



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

ELZA YAMAGUTI SASAKI

EXTRATOS DE SEMENTE DE *Paullinia cupana*: AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA,
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO PRELIMINAR MICROBIOLÓGICO NA
PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DA PLACA DENTAL

MARINGÁ

2006

ELZA YAMAGUTI SASAKI

EXTRATOS DE SEMENTE DE *Paullinia cupana*: AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA,
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO PRELIMINAR MICROBIOLÓGICO NA
PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DA PLACA DENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador:
Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

MARINGÁ

2006

Aos meus pais, Masayoshi e Rosa;

Aos meus irmãos, Marcos e Fabio;

Ao meu esposo Edson.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, fé e sua infinita bondade.

Aos meus pais Masayoshi e Rosa pelo amor, carinho, confiança, incentivo e pelos esforços e dedicação para que eu me tornasse quem sou hoje.

Aos meus irmãos Marcos e Fabio pelo apoio e carinho.

Ao meu esposo Edson pelo seu amor, carinho, incentivo e paciência.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela orientação, dedicação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela co-orientação, conhecimentos compartilhados e pela parceria no trabalho realizado.

À Dra. Ivânia T. Shunquel pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Dr. Frank Petereit do Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha, pelo auxílio na interpretação de alguns dos espectros de RMN.

Ao Dr. Roberto K. Sasaki pela ajuda na aquisição de material de literatura da área odontológica.

A M.Sc. Tânia Mara Antonelli Ushirobira pela sua ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos técnicos Admir e Clemensau (Farmacognosia), Cláudio (Farmacotécnica) e Marinete (Microbiologia) que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos.

A querida amiga Leila Mariko Uemura pelo companheirismo, incentivo e imensa amizade.

A todos os colegas do mestrado, em especial Mônica, Patrícia, Flávia, Gisely, Juliana, Karina, Kelly, Andrea, Ivens e Daniel, pelo companheirismo e apoio.

Aos amigos que me auxiliaram e contribuíram para a realização deste trabalho Lia, Vanessa A., Vanessa C., Vanessa I., Fernanda, Ísis, Ana Cristina e Glalber.

A Helena e Sônia pela amizade, paciência, carinho e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

O êxito em qualquer campo
é dos que põem o melhor de si
no que fazem (Alvin Tofler).

RESUMO

Paullinia cupana H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, conhecida como guaraná, é uma planta nativa brasileira. Suas sementes são empregadas principalmente como estimulantes, possuindo alto teor de metilxantinas e taninos. A partir do extrato bruto (EBPC) das sementes do guaraná, obtiveram-se duas frações semipurificadas: FAQ e EPA (Patente requerida PI#0.006.638-9). A EPA foi fracionada através de cromatografia em coluna de Sephadex®, obtendo-se 24 subfrações e cromatografia em contra corrente de alta velocidade, obtendo-se 7 subfrações. As seguintes substâncias foram isoladas e identificadas: catequina, epicatequina, *ent*-epicatequina, procianidinas B₁, B₂, B₃, e B₄, procianidina A₂ e procianidina C₁. A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso, bruto e semipurificados foi avaliada utilizando-se as técnicas do fosfomolibdênio e do DPPH•. Todos os extratos diferiram significativamente do padrão (vitamina C) na avaliação do complexo fosfomolibdênio e no ensaio do DPPH•. Os valores obtidos no DPPH• foram IC₅₀ (µg.ml⁻¹): EBPC = 6,67, EPA = 5,23, FAQ = 14,97 e EA = 9,59. Foi realizado um estudo preliminar microbiológico na prevenção da formação da placa dental pelo teste de aderência em superfície de vidro frente à *Streptococcus mutans* e pelo ensaio de redução da produção de ácidos. Observou-se que EBPC e FAQ foram os que apresentaram melhores resultados, demonstrando que os extratos de *Paullinia cupana* podem ser empregados na prevenção da formação de placa bacteriana dentária.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, metilxantinas, taninos condensados, flavan-3-óis, capacidade antioxidante, prevenção da formação da placa dental, aderência.

ABSTRACT

Paullinia cupana H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, popularly known as “guaraná”, it is a Brazilian native plant. Its seeds are mainly used as stimulant, and they have a high concentration of methylxanthines and tannins. From the crude extract (EBPC) of the “guaraná” seeds were obtained two semipurified extracts FAQ and EPA (Required Patent PI#0.006.638-9). EPA was chromatographed by column chromatography (Sephadex® LH-20) and 24 subfractions were obtained. EPA also was chromatographed by multilayer countercurrent chromatography and 7 subfractions were obtained. The following compounds were isolated and identified: catechin, epicatechin, *ent*-epicatechin, procyanidins B₁, B₂, B₃ and B₄, procyanidin A₂ and procyanidin C₁. The antioxidant capacity *in vitro* of the aqueous, crude and semipurified extracts were evaluated being used the techniques of the phosphomolybdenum and DPPH•. All of the extracts differed significantly of the standard (vitamin C) in the evaluation of the phosphomolybdenum compound and DPPH• assay. The values obtained in DPPH• were IC₅₀ (µg.ml⁻¹): EBPC = 6,67, EPA = 5,23, FAQ = 14,97 and EA = 9,59. It was accomplished a microbiologic preliminary study in the prevention of the dental plaque formation by the test of the adherence to a glass surface face to *Streptococcus mutans* and for the assay of reduction of acids production. It was observed that EBPC and FAQ were the ones that presented better results, demonstrating that the extracts of *Paullinia cupana* can be used in the prevention of the dental bacterial plaque formation.

Keywords: *Paullinia cupana*, methylxanthines, condensed tannins, flavan-3-ols, antioxidant capacity, prevention of the formation of dental plaque, adherence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Folhas, flores, frutos e sementes	22
Figura 2 – Flores do guaraná	23
Figura 3 – Frutos do guaraná	23
Figura 4 – Sementes do guaraná: com arilo, em pó, secas	24
Figura 5 – Figuras moldadas a partir da pasta de guaraná	25
Figura 6 – Bastão de guaraná e língua do pirarucu	25
Figura 7 – I – Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II – Teofilina (1,3-dimetilxantina); III – Teobromina (3,7-dimetilxantina)	28
Figura 8 – Exemplo de tanino hidrolisável (β -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glucose)	31
Figura 9 – Exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina]	32
Figura 10 – Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas	34
Figura 11 – Estruturas da catequina e epicatequina	35
Fluxograma 1 – Preparação de extratos e fracionamento cromatográfico da fração semipurificada EPA.	66
Figura 12 – Cromatograma das 24 subfrações de EPA por CC	66
Figura 13 – Cromatograma das 7 subfrações de EPA por CCCAV	68
Figura 14 – Espectro de RMN ¹ H da substância I (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS).72	72
Figura 15 – Espectro COSY (¹ H/ ¹ H) da substância I acetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	74
Figura 16 – Estrutura da substância I , catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B ₃)	75
Figura 17 – Espectro de RMN ¹ H da substância II (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	77
Figura 18 – Espectro COSY (¹ H/ ¹ H) da substância II acetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	79
Figura 19 – Estrutura da substância II , catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B ₄)	80
Figura 20 – Espectro de RMN ¹ H da substância III (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	82
Figura 21 – Espectro COSY (¹ H/ ¹ H) da substância III acetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	84
Figura 22 – Estrutura da substância III , epicatequina-(4 β →8)-epicatequina- (4 β →8)-epicatequina (Procianidina C ₁)	85
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H das substâncias IV e V (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo	

para TMS).....	86
Figura 24 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância IV acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	88
Figura 25 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância V acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	91
Figura 26 – Estrutura da substância IV , catequina	92
Figura 27 – Estrutura da substância V , epicatequina	92
Figura 28 – Espectro de RMN ^1H da substância VI (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	93
Figura 29 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância VI acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	95
Figura 30 – Estrutura da substância VI , <i>ent</i> -epicatequina	96
Figura 31 – Espectro de RMN ^1H da substância VII (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	98
Figura 32 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância VII acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	100
Figura 33 – Estrutura da substância VII , epicatequina-($4\beta\rightarrow 8;2\beta\rightarrow\text{O}\rightarrow 7$)-epicatequina	101
Figura 34 –Espectro de RMN ^1H da substância VIII (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	103
Figura 35 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância VIII acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	105
Figura 36 – Estrutura da substância VIII , epicatequina-($4\beta\rightarrow 8$)-epicatequina (Procianidina B_2).....	106
Figura 37– Espectro de RMN ^1H da substância IX (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	108
Figura 38 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da substância IX acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)	110
Figura 39 – Estrutura da substância IX , epicatequina-($4\beta\rightarrow 8$)-catequina (Procianidina B_1).....	111
Figura 40 – Capacidade antioxidante realizada pelo método de fosfomolibdênio. Da esquerda para direita: branco, EBPC, EPA, FAQ, EA e vitamina C.....	112
Figura 41 – Comparação entre valores de CAR realizados pelo método do fosfomolibdênio.....	113
Figura 42 – Capacidade antioxidante de EBPC pelo método do DPPH•	114
Figura 43 – Capacidade antioxidante de EPA pelo método do DPPH•	114
Figura 44 – Capacidade antioxidante de FAQ pelo método do DPPH•	114

Figura 45 – Capacidade antioxidante de EA pelo método do DPPH•	115
Figura 46 – Capacidade antioxidante da vitamina C pelo método do DPPH•	115
Figura 47 – Comparação entre valores de IC ₅₀ (µg/ml) realizados pelo método do DPPH•	116
Figura 48 – Percentagem de inibição da aderência de <i>Streptococcus mutans</i> em lamínula após tratamento com extratos contendo 0,75 mg/ml em taninos. *ANOVA, P < 0,05	119
Figura 49 – Efeito dos extratos na redução da produção de ácidos pelo <i>Streptococcus mutans</i>	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise química preliminar comparativa de sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	62
Tabela 2 – Taninos totais de sementes armazenadas de forma íntegra e moídas no dia anterior ao doseamento	64
Tabela 3 – Taninos totais de sementes armazenadas moídas em junho de 2005	65
Tabela 4 – Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA por CC	67
Tabela 5 – Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA por CCCAV	68
Tabela 6 – Dados de ¹ H RMN da substância I acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	71
Tabela 7 – Dados de ¹ H RMN da substância II acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	76
Tabela 8 – Dados de ¹ H RMN da substância III acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS).	81
Tabela 9 – Dados de ¹ H RMN da substância IV acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	87
Tabela 10 – Dados de ¹ H RMN da substância V acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	90
Tabela 11 – Dados de ¹ H RMN da substância VI acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS).	94
Tabela 12 – Dados de ¹ H RMN da substância VII acetilada (300 MHz; CDCl ₃ e acetona relativos para TMS).....	97
Tabela 13 – Dados de ¹ H RMN da substância VIII acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	102
Tabela 14 – Dados de ¹ H RMN da substância IX acetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	107
Tabela 15 - Capacidade antioxidante demonstrada pela redução do DPPH•.....	115
Tabela 16 – Teores de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (%)	116
Tabela 17 – Teores de polifenóis totais (PT) e capacidade antioxidante	117
Tabela 18 – Teores de taninos totais (%) e concentração de amostra avaliada	119
Tabela 19 – Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>Paullinia cupana</i> em <i>Streptococcus mutans</i>	120
Tabela 20 – Teores de taninos totais (%) e quantidade de amostra avaliada.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
BHI	Caldo infuso de cérebro e coração
CAR	Capacidade antioxidante relativa
CC	Cromatografia em coluna
CCCAV	Cromatografia em contra corrente de alta velocidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia de alta eficiência
COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$	Espectroscopia de correlação hidrogênio-hidrogênio
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
\emptyset	Diâmetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EA	Extrato aquoso a 5%
EBPC	Extrato bruto de <i>Paullinia cupana</i>
EM	Espectro de massas
EPA#...	Subfrações obtidas a partir da fração EPA por CCCAV
F#...	Subfrações obtidas a partir da fração EPA por CC
FeCl_3	Cloreto férrico
HETCOR	Espectroscopia de correlação carbono-hidrogênio
IC_{50}	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH•
<i>m</i>	Multiplete
m/v	Massa/volume
mg	miligramas
ml	mililitros
PA	Pró ou para análise
PNA	Polifenóis não-adsorventes

PPS	Perda por secagem
PPD	Perda por dessecação
PT	Polifenóis totais
s	Singleto
SM	Solução mãe
SNC	Sistema nervoso central
ST	Solução teste
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade formadora de colônia
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA SAPINDACEAE	20
2.2 GÊNERO <i>Paullinia</i>	21
2.3 <i>Paullinia cupana</i> H.B.K. VAR. <i>sorbilis</i> (MART.) DUCKE	22
2.4 PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS	27
2.4.1 Metilxantinas	27
2.4.2 Compostos fenólicos	29
2.4.3 Taninos	30
2.4.4 Taninos condensados	33
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	36
2.5.1 Atividade antioxidante	38
2.5.2 Atividade antibacteriana	43
2.5.2.1 A placa dental e a atividade anti-cárie.....	44
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL.....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	49
4.2 MATERIAL.....	49
4.2.1 Solventes, reagentes e soluções	49
4.2.2 Materiais e equipamentos	50
4.3 CONTROLE DE QUALIDADE	52
4.3.1 Análise química preliminar	52
4.3.2 Análises físico-químicas	52
4.3.2.1 Determinação da perda por secagem	52
4.3.2.2 Determinação da perda por dessecação.....	52
4.3.2.3 Determinação do teor de extrativos.....	52
4.3.2.4 Determinação do teor de resíduo seco.....	53
4.3.3 Análise química quantitativa	53
4.3.3.1 Determinação do teor de taninos totais	53
4.3.3.2 Determinação do teor de metilxantinas	53
4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	55
4.4.1 Extrato utilizado no isolamento químico	55

4.4.2 Extratos utilizados nos ensaios biológicos	55
4.4.2.1 Extrato Aquoso	55
4.4.2.2 Extrato Bruto, EPA e FAQ	55
4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	55
4.5.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração EPA	55
4.5.2 Cromatografia em camada delgada	56
4.5.3 Cromatografia em coluna das subfrações F#10 a F#14	56
4.5.4 Cromatografia em contra corrente da fração EPA	56
4.5.5 Cromatografia em coluna das subfrações EPA#4 e EPA#6	56
4.5.6 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	57
4.6 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA	57
4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL	57
4.8 ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA)	58
4.9 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR	58
4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	59
4.10.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio	59
4.10.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	59
4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> IN VITRO	60
4.11.1 Amostra bacteriana	60
4.11.2 Teste de aderência em lamínula	60
4.11.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em placas	60
4.11.4 Efeito do extrato na produção de ácidos	61
5 RESULTADOS	62
5.1 CONTROLE DE QUALIDADE	62
5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO	65
5.2.1 Cromatografia em coluna de EPA	66
5.2.2 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade de EPA	68
5.2.3 Substâncias isoladas	69
5.2.3.1 Proantocianidinas diméricas	69
5.2.3.2 Substância I – Catequina-(4α→8)-catequina (Procianidina B₃)	70
5.2.3.3 Substância II - Catequina-(4α→8)-epicatequina (Procianidina B₄)	75
5.2.3.4 Substância III – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina C₁)	80

5.2.3.5 Substância IV e V – Catequina e epicatequina	85
5.2.3.5.1 <i>Substância IV – Catequina</i>	87
5.2.3.5.2 <i>Substância V – Epicatequina</i>	89
5.2.3.6 Substância VI – ent-Epicatequina	92
5.2.3.7 Substância VII – Epicatequina-(4β→8;2β→O→7)-epicatequina (Procianidina A₂)	96
5.2.3.8 Substância VIII – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina B₂)	101
5.2.3.9 Substância IX – Epicatequina-(4β→8)-catequina (Procianidina B₁)	106
5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	112
5.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico	112
5.3.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	113
5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> IN VITRO	118
5.4.1 Teste de aderência em lamínula	118
5.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em placas	120
5.4.3 Efeito do extrato na produção de ácidos	121
6 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	140

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S252e Sasaki, Elza Yamaguti
Extratos de sementes de *Paullinia cupana*:
avaliação fitoquímica, capacidade antioxidante e
estudo preliminar microbiológico na prevenção da
formação da placa dental / Elza Yamaguti Sasaki. --
Maringá : [s.n.], 2006.
139 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de
Mello.
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2006.

1. *Paullinia cupana* - Estudo fitoquímico. 2.
Paullinia cupana - Capacidade antioxidante. 3.
Paullinia cupana - Prevenção da formação da placa
dental *in vitro*. I. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

CDD 21.ed. 615.32378

1 INTRODUÇÃO

As plantas representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos. Um grande número de fármacos utiliza estas substâncias como modelos para sua síntese. Os pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados com a ampla diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas destes produtos (WALL; WANI, 1996).

No mundo, o número de espécies de plantas superiores é de aproximadamente 250.000. Estima-se que entre 35 e 70 mil espécies são ou foram usadas em algumas culturas com propósitos medicinais (WHO, 1998a).

A biodiversidade do Brasil possui um grande potencial de moléculas inovadoras, apresentando uma vantagem competitiva de aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas (BARATA; QUEIROZ, 1995; BRASIL, 2006) que, se mostrarem com valor medicinal, poderão ser utilizadas pela indústria farmacêutica como matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou como fonte de modelo para fitofármacos.

No entanto, esta megadiversidade brasileira ainda é pouco conhecida, permanecendo como o maior potencial de obtenção de novos produtos farmacêuticos. Contudo, aliado ao desconhecimento do potencial dessa diversidade, encontra-se a ausência de características de cultivo e manutenção das espécies. Assim, os processos de extrativismo predatório ainda perduram e somente o acesso às informações que viabilizem a implantação de tecnologias pertinentes aos ambientes e diversidade existentes pode mudar este quadro (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

Além disso, o Brasil é constituído por vários biomas, com uma diversidade de solos e climas que favorece a riqueza e a variedade de tipos de vegetação e espécies da flora distribuídas pelos diversos ecossistemas brasileiros. Deve-se ressaltar também que além da biodiversidade, o conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico vindo da miscigenação da população brasileira também é uma vantagem importante no processo de desenvolvimento de pesquisas com drogas vegetais para o fortalecimento do país na área e o aproveitamento deste recurso de forma sustentável (SILVA et al., 2001).

As drogas vegetais são usadas há milhares de anos. Seu uso continua até hoje devido aos benefícios biomédicos e a crença cultural em muitas partes do mundo. A atenção sobre o uso de plantas medicinais, pelas autoridades sanitárias, tem aumentado consideravelmente, pois é o único remédio disponível em áreas menos desenvolvidas. Além disso, vem se tornando uma alternativa popular na maioria destas áreas (WHO, 1993).

Nos últimos anos, as drogas vegetais e seus derivados manipulados ou industrializados vêm sendo preferidos pela sociedade aos medicamentos de origem sintética, devido parcialmente à percepção emocional de que os produtos naturais são mais

brandos e menos perigosos do que produtos químicos (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002; RASKIN et al., 2002).

Outros fatores também têm contribuído para o crescimento de fitoterápicos no mercado mundial: o grande interesse em medicamentos alternativos; a preferência da população pela medicina preventiva; a crença nos benefícios efetivos das plantas medicinais no tratamento de certas doenças em que as terapias e os medicamentos convencionais têm sido inadequados; tendência a automedicação; melhoria na qualidade, eficácia e segurança aprovada das plantas medicinais; alto custo dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000).

No entanto, isto tem gerado uma série de problemas quanto a utilização de fitoterápicos e a implementação da fitoterapia no Brasil: a publicidade de que “o que é natural não faz mal”, que exclui a possibilidade de reações adversas ou efeitos tóxicos; a proliferação da utilização e comercialização de produtos inertes ou tóxicos, independentes da comprovação da eficácia; prescrição e dispensação não regulamentadas, pois a maioria dos fitoterápicos são produtos de venda livre; baixa qualidade dos produtos e o desenvolvimento incipiente das formulações; prevalência da utilização de literatura promocional como fonte de informação; dentre outros (RATES, 2001). Contudo, algumas medidas como a determinação da venda sob prescrição médica de alguns fitoterápicos como kava kava, hipérico, valeriana, ginkgo entre outros, vêm sendo executadas (BRASIL, 2004).

A natureza não fornece seus produtos com uma composição definida e padronizada. Os constituintes das plantas medicinais podem variar de acordo com fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002).

Fatores como o método de extração e contaminação por microrganismos, metais pesados, pesticidas entre outros, podem também interferir na qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Por estas razões, indústrias farmacêuticas preferem usar plantas cultivadas ao invés do extrativismo devido a menor variação em seus constituintes (CALIXTO, 2000; SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002). Porém, o conhecimento sobre cultivo ou manejo de populações naturais de plantas medicinais da flora nativa é relativamente pequeno (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

A pesquisa com plantas medicinais é considerada uma fonte rica para a procura de novas moléculas, sendo que a maior parte da flora é quimicamente desconhecida. O conhecimento sobre o uso medicinal associado às plantas é muito empregado nos países de Terceiro Mundo, principalmente nos que ainda possuem extensas florestas tropicais, como o Brasil (ELISABETSKY, 1991).

Além disso, muitas das dificuldades apontadas para a busca de novos fármacos a partir de produtos naturais estão sendo ultrapassadas através de avanços técnicos significativos, principalmente a partir dos anos 80. Os desenvolvimentos alcançados nas

técnicas cromatográficas e nas técnicas de elucidação estrutural, particularmente relacionados com a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) também têm sido considerados como capazes de acelerar a obtenção de novos protótipos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004).

Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, o guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é empregado popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo, sedativo, assim como no tratamento da enxaqueca, blenorragia, epilepsia, flatulência, entre outros (CORRÊA, 1984).

O guaraná é originário da Amazônia brasileira e venezuelana e das Guianas. Há duas subespécies, *Paullinia cupana* Kunth. var. *typica* (cupana-yocco) e *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná-de-maués). A espécie *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* é cultivada na região de Maués, na Amazônia brasileira. As sementes são torradas e privadas do tegumento e, com adição de água, são transformadas em pasta. Eventualmente, com farinha de mandioca, moldam-se “pães de guaraná”, que são defumadas durante dias até o completo endurecimento. Estes pães são utilizados como estimulante e revigorante pelos indígenas e na medicina popular ocidental (RATES, 2004).

O Brasil é, praticamente, o único produtor de guaraná no mundo. Sua produção tem se expandido da Amazônia brasileira para os estados do Pará, Acre, Rondônia e, nos últimos anos, para o Mato Grosso e Bahia (SUFRAMA, 2003). Segundo dados do IBGE, em 2004, as plantações de guaraná no país ocupavam aproximadamente 14.108 ha, dos quais 6.858 ha encontravam-se no Estado do Amazonas, 6.013 ha na Bahia e 769 ha no Mato Grosso (IBGE, 2006).

Face ao crescente uso e comercialização do guaraná, aos seus usos como alimento e também como medicamento, este trabalho procurou obter e fornecer subsídios adicionais aos existentes na expectativa de ampliar resultados para o estabelecimento de condições favoráveis ao uso deste produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae é representada por cerca de 140 gêneros e 1600 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. Não há muitas espécies extratropicais. No Brasil ocorrem 24 gêneros e cerca de 400 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Pertence a Divisão Angiospermae e Ordem Sapindales (JOLY, 2002).

Esta família constitui-se na maioria por trepadeiras com gavinhas, com caule de crescimento em espessura anômalo, ou também arbustos e mesmo árvores com folhas alternas, compostas, sem estípulas, ou às vezes inteiras (SCHULTZ, 1968).

As flores são pequenas, em geral branco-esverdeadas, não vistosas, reunidas em inflorescências paniculadas axilares ou terminais. São hermafroditas ou de sexo separado, às vezes com os 3 tipos de flores na mesma inflorescência (poligamia), cíclicas, em geral de simetria zigomorfa, diclamídeas. Suas sépalas e pétalas são pentâmeras ou em número menor. Androceu formado em geral por oito estames. Ovário superior, tricarpelar e trilocular, cada lóculo com um só óvulo. Fruto seco indeiscente, de pericarpo de consistência cartilaginosa ou esquizocarpo, com frutículos samaroídeos, sempre com sementes no ápice. Semente às vezes com arilo (JOLY, 2002).

Devem ser destacados na flora brasileira as espécies dos gêneros *Serjania*, *Paullinia*, *Urvillea* e *Cardiospermum*, muito freqüentes nas bordas de florestas. A principal espécie de interesse econômico da família é o guaraná (*Paullinia cupana*). Algumas outras espécies produzem frutos comestíveis como a lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) e a pitomba [*Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk.] (SOUZA; LORENZI, 2005).

2.2 GÊNERO *Paullinia*

Paullinia L. é um grupo de plantas neotropical com aproximadamente 180 espécies. Dessas, 39 são consideradas de importância econômica.

Certas espécies de *Serjania* e *Paullinia* são plantas venenosas, podendo inclusive envenenar o mel produzido por abelhas, outras são utilizadas no envenenamento de flechas pelos índios, como também na pescaria mergulhando-se as plantas com raízes na água (timbó) (JOLY, 2002).

Muitas são reportadas como tendo propriedades medicinais: *P. barbadensis* Jacq., *P. costaricensis* Radlk., *P. cupana* Kunth, *P. emetica* R.E. Schult., *P. fuscescens* Kunth, *P. imberbis* Radlk., *P. meliifolia* Juss., *P. pinnata* L., *P. pterophylla* Triana & Planch., *P. tomentosa* Jacq., *P. trigonia* Vell. e *P. yoco* R.E. Schult. & Killip. Essas espécies são utilizadas geralmente no tratamento de nevralgias, dores de cabeça, doenças mentais, diarreia, tensão pré-menstrual, dores pós-parto, arteriosclerose, reumatismo e também há relatos como contraceptivos. Algumas espécies como *P. cupana*, *P. yoco* e *P. pterophylla* são utilizadas na preparação de bebidas estimulantes. Ainda atribui-se a duas espécies propriedades especiais de magia e encantamento: *P. cupana* e *P. pinnata* (BECK, 1990 apud ANDRADE, 1996). Este mesmo trabalho ainda relata informação sobre usos, distribuição geográfica e composição química de 41 espécies de *Paullinia*, baseadas em pesquisas de literatura botânica, médica e etnobotânica.

Weckerle, Stutz e Baumann (2003) pesquisaram a presença de alcalóides purínicos em três espécies *P. cupana*, *P. pachycarpa* Benth. e *P. yoco*. Na *P. cupana*, a teobromina foi encontrada em todas as partes da planta, a teofilina apenas no pericarpo e nas sementes, e a cafeína em quase todas as partes com uma concentração de 4,28% (peso seco) nas sementes. Na *P. pachycarpa* apenas a teobromina foi detectada, em todas as partes da planta, exceto pericarpo e semente. Na *P. yoco* a teobromina e a cafeína foram detectadas em todas as partes exceto pericarpo e semente que não foram analisadas.

2.3 *Paullinia cupana* H.B.K. VAR. *sorbilis* (MART.) DUCKE

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, pertencente a família Sapindaceae, é um arbusto de pequeno porte, de casca muito escura e ramos tirsóides de 4 a 8 mm de diâmetro. O caule principal e os diferentes ramos apresentam sulcos profundos em número de 4 ou 5. Os ramos são pilosos na extremidade e glabros na base. As folhas (Fig. 1) são compostas penadas com 5 folíolos, pecíolo comum de 7 a 15 cm de comprimento, nu e glabro, estípulas de 2 a 3 mm de comprimento, folíolos curto ou longo-peciolados. As flores são grandes e aromáticas, dispostas em cachos (Fig. 2), com sépalas submembranosas de 3 mm, pétalas oblongas de 3 a 5 mm. Os frutos (Fig. 3) são cápsulas longo-estipitadas, piriformes, elipsóides ou esféricas, apiculadas, de cor vermelha na parte superior e amarela na inferior, medindo de 2 a 3 cm. Possuem uma ou duas sementes ovóides, com tamanho aproximado de 12 mm de comprimento, testa amarelo-claro ou preta e arilo curto e cupuliforme, embrião curvo e cotilédones carnosos (MENEZES JR., 1942; CORRÊA, 1984).



Fonte: Plantas Medicinais de Köhler, 1883

Figura 1 – Folhas, flores, frutos e sementes.



Fonte: Missouri Botanical Garden, 2005

Figura 2 – Flores do guaraná.



Fonte: Almeida, 2005

Fonte: Mello, 1999

Figura 3 – Frutos do guaraná.

A primeira descrição do guaraná data de 1669, quando o missionário jesuíta João Felipe Betendorf, ao desbravar pela Amazônia, notou que os índios consumiam diariamente uma bebida feita de guaraná, os quais descreviam propriedades diuréticas, sendo também eficaz contra dores de cabeça, febres e câimbras. Em meados do século XVIII, algumas autoridades, como o Bispo Queiroz, tornaram-se adeptas ao uso do guaraná, afirmando que aliviava diarreias e o calor opressor do clima (HENMAN, 1982).

O guaraná é originário da Amazônia. Era encontrado inicialmente na parte sudeste do Estado do Amazonas, em Maués e Parintins (MACHADO, 1946; CORRÊA, 1984) existindo em abundância na região de Maués, a 250 km de Manaus. Pode ser encontrado também em pequenas áreas da Amazônia Venezuelana. Nas últimas décadas, seu cultivo tem sido incentivado em outras áreas, sobretudo nos vales dos rios Purus, Tapajós e Parintins (Amazonas), nos Estados do Pará, Acre e Rondônia, na região cacaueteira da Bahia entre Salvador e Ilhéus, no Vale do Ribeira em São Paulo e na região de Alta Floresta em

Mato Grosso (CORRÊA, 1984; DUKE, 1987; HENMAN, 1982; SUFRAMA, 2003; IBGE, 2006).

O guaraná também é conhecido pelos índios pelo nome de “uaraná”. Era consumido como alimento sob a forma de bebida, preparado com rasuras da pasta em água e açúcar. Os médicos prescreviam o guaraná diretamente em pó (Fig. 4) ou sob a forma de extrato fluido, indicado como antitérmico, antidiarréico, estimulante, analgésico e antigripal. Os nativos da Amazônia também atribuíam propriedades afrodisíacas a ele (MACHADO, 1946). Há séculos atrás, os índios utilizavam as sementes de guaraná, principalmente como estimulante tanto em festas, como em combates. Porém, outras indicações também já foram relatadas como arteriosclerose, nevralgia, leucorréia, enxaqueca, epilepsia, flatulência, entre outras (HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984; DUKE, 1987). O uso freqüente de guaraná pode acarretar alguns efeitos indesejáveis, entre os quais disúria (DUKE, 1987).



Fonte: Embrapa

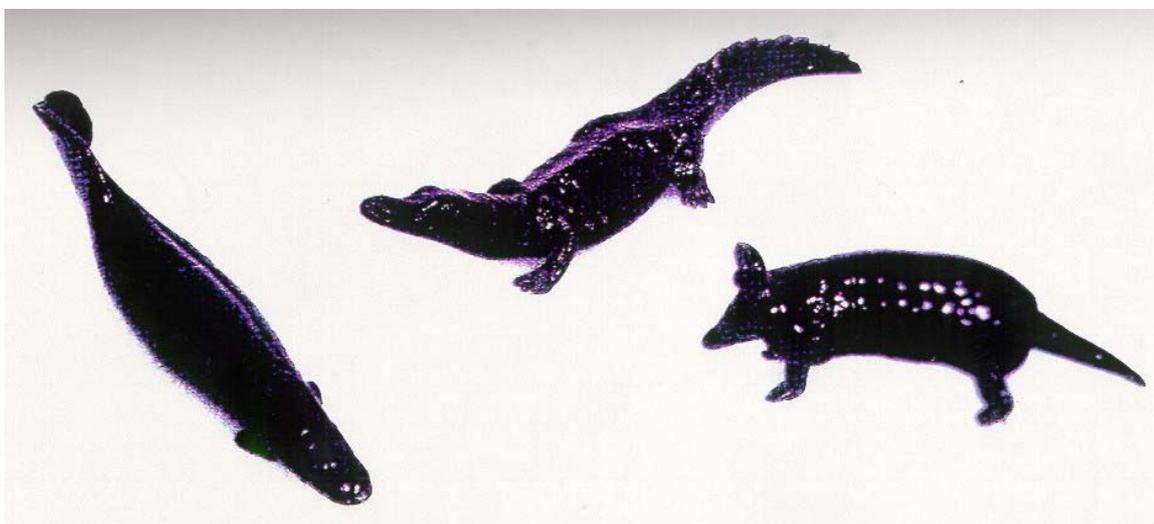
Figura 4 – Sementes do guaraná: com arilo, em pó, secas.

Os efeitos medicinais são atribuídos ao alto conteúdo de cafeína e alcalóides associados, como também a quantias consideráveis de taninos. Por muitos anos, o principal uso do guaraná foi na forma de xaropes, extratos e destilados empregados principalmente como agentes flavorizantes e como uma fonte de cafeína pela indústria de refrigerantes (HENMAN, 1982).

O guaranazeiro necessita de terreno fértil, humoso, permeável e que contenha arenito para um bom desenvolvimento. Além de condições climáticas, como chuvas abundantes e altas temperaturas (MACHADO, 1946). A floração é anual e ocorre em julho, com a frutificação começando em setembro e outubro, terminando a maturação somente em novembro e dezembro, quando então se faz a colheita (MENEZES JR., 1942).

Com as sementes de guaraná, os índios Maués preparam uma pasta, como forma de conservação do produto, para dispor dele em toda e qualquer época. A pasta é

preparada do seguinte modo: os frutos maduros são privados das partes moles (exocarpo, mesocarpo e arilo) e dispostos em finas camadas, em local limpo, para uma secagem rápida e sem fermentação. Depois, as sementes são torradas em forno próprio, em calor regular e remexidas freqüentemente, para que aqueçam uniformemente. Depois de torradas, as sementes são transferidas para um saco onde recebem vigorosas batidas, para que sejam separadas do tegumento. Em seguida, as sementes limpas são transferidas para pilão de madeira, previamente aquecido, e reduzidas a pó fino. Ao pó adiciona-se água para formar a pasta, onde é feita a moldagem em cilindros, pães ou figuras de aspecto variado (Fig. 5). A pasta adquire rigidez com o passar do tempo e para ser utilizada, torna-se necessário raspar com o auxílio do osso hióide ou da língua (Fig. 6) do pirarucu – peixe amazônico (MACHADO, 1946; CORRÊA, 1984).



Fonte: Lautenbacher, 1994

Figura 5 – Figuras moldadas a partir da pasta de guaraná.



Fonte: Sasaki e Mello, 2006

Figura 6 – Bastão de guaraná e língua do pirarucu.

A pasta comumente encontrada no comércio acha-se adicionada de cacau, farinha de mandioca ou cascas de quina (para conferir propriedades antimaláricas). Essas substâncias são adicionadas sob o pretexto de aumentar a consistência da massa ou o seu amargor peculiar (CORRÊA, 1984).

O xarope de guaraná, em particular, é bastante utilizado pela indústria alimentícia na América Latina como flavorizante em refrigerantes e licores. O guaraná tem sido utilizado também no preparo de bebidas carbonatadas, comercializadas como altamente energéticas (DUKE, 1987).

Sementes de guaraná [*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke], obtidas de lugares diferentes, foram analisadas quanto ao teor de taninos totais e metilxantinas. As sementes foram provenientes do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta (**AMO1**), e do Amazonas, de Maués (**AMO2**). O teor de taninos totais encontrado para **AMO1** foi de $5,92 \pm 0,24\%$ e para **AMO2** foi de $4,14 \pm 0,25\%$. No doseamento de metilxantinas obteve-se para **AMO1** valor de $6,07 \pm 0,07\%$, enquanto que **AMO2** apresentou um valor superior de $7,78 \pm 0,11\%$ (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004).

A análise cromatográfica por CCD mostrou um valor de $R_f = 0,43$ para cafeína e $0,72$ e $0,71$ para catequina e epicatequina, respectivamente. A análise por CLAE apresentou, para uma fração semipurificada, tempos de retenção de catequina, epicatequina e cafeína de $6,17$, $8,85$ e $11,91$ min, respectivamente. Assim, pode-se confirmar a qualidade e semelhança em teores químicos entre as diferentes matérias-primas vegetais (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004).

Amostras de sementes de guaraná provenientes da região amazônica e secas por diferentes métodos, foram analisadas por técnicas farmacopéicas e outras. Realizou-se o doseamento de metilxantinas (MX) e dos taninos totais (TT), através de métodos espectrofotométricos, para a comparação das amostras. O maior teor de MX foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 h com adição de água, enquanto que o maior teor de TT foi obtido com a amostra torrada em tacho metálico por 4 h sem água (USHIROBIRA et al., 2004).

2.4 PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS

2.4.1 Metilxantinas

As metilxantinas estão presentes em várias bebidas alimentícias ou estimulantes não alcoólicas como café, guaraná e cola. As mais abundantes são a cafeína, a teofilina e a teobromina. Geralmente são consideradas pseudoalcalóides, pois possuem caráter anfótero, podendo se comportar como ácidos ou bases, e seus precursores biogénéticos são as bases púricas. No entanto, devido a sua atividade biológica marcante, distribuição restrita e presença de nitrogênio heterocíclico, são classificadas por muitos autores como alcalóides purínicos. Estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono nos vegetais. Seus teores podem ser influenciados por fatores ambientais e estágio de desenvolvimento (RATES, 2004).

As metilxantinas não ocorrem em famílias filogeneticamente relacionadas, e sim com distribuição restrita a regiões tropicais e subtropicais. Aproximadamente 60 espécies vegetais, distribuídas nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Sterculiaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae = Ternstroemiaceae) contêm metilxantinas (RATES, 2004).

São solúveis em água e soluções aquosas ácidas e etanol à quente, solventes orgânicos clorados e soluções alcalinas. Podem ser diferenciadas em função de sua solubilidade, temperatura de sublimação e faixa de fusão dos respectivos sublimados (THE MERCK INDEX, 1996).

Sua caracterização pode ser realizada pela “reação de murexida” ou por cromatografia em camada delgada utilizando-se preferencialmente gel de sílica GF₂₅₄ impregnada com vapores de amônia e sistema eluente composto de clorofórmio (ou diclorometano) e etanol (ou metanol) (RATES, 2004).

O doseamento é obtido através de métodos de gravimetria, espectrofotometria no ultravioleta e métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia em fase gasosa e a eletroforese capilar (AURICCHIO; BATISTIC; HOPPEN, 1987; MARX; MAIA, 1990; CARLSON; THOMPSON, 1998; ANDRADE; SCHENKEL; BERGOLD, 1999; FARMACOPÉIA, 2000; 2003; PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002; USHIROBIRA, 2003; SOMBRA et al., 2004).

São conhecidas três metilxantinas de ocorrência natural farmacologicamente ativas: cafeína, teofilina e teobromina (Fig. 7). Exercem efeito estimulante sobre o SNC, produzindo um estado de maior alerta; diurese; estimulação do músculo cardíaco; relaxamento do músculo liso, particularmente o músculo brônquico (RANG; DALE; RITTER, 2001).

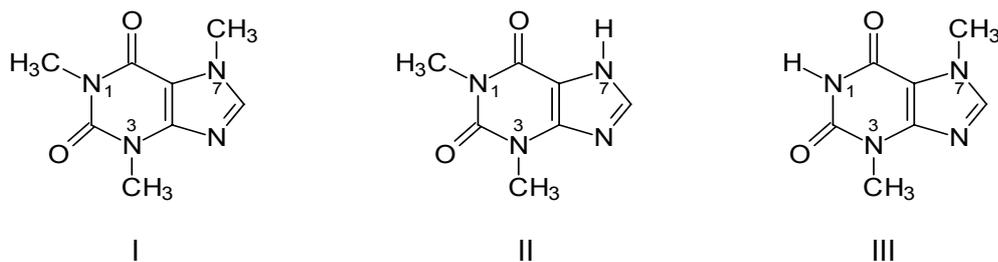


Figura 7 - I – Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II – Teofilina (1,3-dimetilxantina); III – Teobromina (3,7-dimetilxantina).

A primeira análise química do guaraná, que se tem conhecimento, foi publicada em 1826 pelo farmacêutico Theodor von Martius. Ele encontrou uma substância constituída por um óleo graxo verde, uma resina, goma, amido, celulose e uma matéria cristalina, branca e amarga, idêntica à cafeína, a qual ele denominou guaranina e que representava 4,24% do peso seco das sementes. Em 1840, Berthelot e Dechastelus identificaram a guaranina como sendo a cafeína (MACHADO, 1946; HENMAN, 1982; CÔRREA, 1984).

Anos mais tarde, o cientista Paulo de Berredo Carneiro fez um estudo químico mais aprofundado encontrando cafeína em todos os órgãos adultos da *Paullinia cupana* e teobromina nas flores, folhas e casca do caule (CÔRREA, 1984).

Baumann, Schulthess e Hänni (1995) encontraram nas sementes (cotilédone) 4,28% de cafeína, 0,015% de teobromina e 0,007% de teofilina. A cafeína contida no guaraná é significativamente maior (cerca de 4x) que de *Coffea* sp., 30 vezes maior que do cacau e 10 vezes maior que de chá *Yerba*, outras bebidas estimulantes populares (EDWARDS et al., 2005).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2003), o guaraná deve conter no mínimo 5% de metilxantinas. Bebidas contendo cafeína ou preparados a base de guaraná são amplamente utilizados na medicina popular como estimulantes, tônicos e revigorantes (RATES, 2004).

A cafeína ocorre como um pó branco ou como formações aciculares brilhantes, reunidas em massas felpudas. Tem sabor amargo. Pode ser sublimada sem decomposição, quando aquecida (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). É solúvel em lipídios, sendo absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002). A cafeína passa facilmente através de todas as membranas e barreiras fisiológicas, presumivelmente devido a sua característica hidrofílica e lipofílica, o que também explica o rápido efeito estimulante do SNC após o consumo de bebidas contendo cafeína (BAUMANN; SEITZ, 1992 apud WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003). A literatura descreve que a cafeína e as plantas medicinais que contêm cafeína são úteis para o alívio a curto prazo de sintomas devidos à fadiga física ou mental. Seus possíveis efeitos colaterais incluem desarranjo estomacal, nervosismo e insônia (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002).

A cafeína se difunde passivamente na planta levando a uma disposição fitoquímica de alcalóides purínicos dentro do córtex e possivelmente dentro do caule, característica do gênero *Paullinia*. Esta disposição tem uma explicação fisiológica, em plantas com alcalóides purínicos, uma grande parte da cafeína normalmente se complexa com fenóis (no vacúolo) (WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003). Nas sementes de *P. cupana*, as catequinas agem como agentes de complexação (MARX, 1990), e supõe-se que elas exerçam este papel em outras partes da planta, assim como em outras espécies deste gênero. Sendo assim, espera-se uma distribuição similar ao dos complexados. No caso da *Paullinia* tem-se que postular altas concentrações de polifenóis no córtex do caule velho levando a um considerável acúmulo de cafeína possivelmente excedendo sua solubilidade (WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003).

Em nível molecular, o princípio ativo do guaraná, foi identificado como cafeína anidra em complexação molecular provavelmente com material celular como taninos. A coordenação envolvida na complexação é sugerida por ocorrer através do átomo de nitrogênio não metilado no anel imidazólico, pela ponte de hidrogênio com um grupo hidroxila dos taninos (EDWARDS et al., 2005).

2.4.2 Compostos Fenólicos

O termo compostos fenólicos abrange uma ampla variedade de substâncias de plantas, as quais possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais freqüentemente combinadas com açúcares como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

Os fenóis possuem a habilidade de se complexarem com proteínas por ligações de hidrogênio. Quando os constituintes celulares das plantas se reúnem e as membranas são destruídas durante os processos de isolamento, os fenóis rapidamente complexam com proteínas e como resultado, geralmente ocorre a inibição da atividade enzimática em extratos brutos de plantas. Por outro lado, os fenóis são por si só muito susceptíveis à oxidação enzimática e o material fenólico pode ser perdido durante os processos de isolamento, devida a ação de enzimas “fenolases” específicas presentes em todas as plantas. A extração dos fenóis de plantas com álcool em ebulição normalmente previne a oxidação enzimática (HARBORNE, 1998).

Os compostos fenólicos são todos aromáticos, sendo assim, todos mostram uma intensa absorção na região de UV do espectro (HARBORNE, 1998; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Métodos espectrométricos são, dessa forma, especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

Eles contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses importantes economicamente pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Têm-se relatado atividade antioxidante, sugerindo que doenças causadas pelas oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de compostos fenólicos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Pulido et al. (2000) afirmaram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação parecem ser os critérios que regem o poder redutor dos polifenóis da dieta.

O processo clássico para detectar fenóis simples é através de solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1 %, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998).

2.4.3 Taninos

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton. São responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2004).

Os taninos ocorrem amplamente em plantas vasculares, sua ocorrência nas angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998). Compreendem um grande grupo de substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal; em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Quando ocorrem em grande quantidade, geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Por definição, eles tem a habilidade de reagir com proteínas, formando co-polímeros insolúveis em água estáveis. Industrialmente, os taninos são substâncias de origem de plantas que, devido a sua habilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Na célula das plantas, os taninos estão localizados separadamente das proteínas e das enzimas do citoplasma, mas quando o tecido é danificado, quando um animal se alimenta, por exemplo, a reação de tanagem pode ocorrer, fazendo com que as proteínas fiquem menos acessíveis aos sucos gástricos do animal. Os tecidos ricos em taninos são, de fato, amplamente evitados pela maioria dos herbívoros, devido ao gosto adstringente que ele passa. Uma das maiores funções dos taninos em plantas é a de ser uma barreira para herbívoros (HARBORNE, 1998).

A adstringência é geralmente reconhecida como uma sensação de extrema “amarração” e secura. Isto acontece pois a saliva contém entre 1,0 e 3,5 mg de proteína por ml de saliva, contendo de 16 a 33% de prolina. O fenômeno da adstringência deve, provavelmente, estar associada especificamente com a interação de polifenóis com as proteínas ricas em prolina (HASLAM, 1998).

Os taninos são compostos não cristalizáveis que, com água, formam soluções coloidais que apresentam reação ácida. Provocam a precipitação de soluções de gelatina e de alcalóides; com sais de ferro, formam compostos solúveis de coloração azul-escura ou preto-esverdeada; são precipitados por sais de cobre, chumbo e estanho, bem como por solução forte de dicromato de potássio aquoso. Em soluções alcalinas, muitos desses derivados logo absorvem oxigênio (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Quimicamente, há dois tipos principais de taninos, com base na identidade dos núcleos fenólicos existentes e na maneira como se unem (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997), que são distribuídos de forma irregular. Os taninos condensados ocorrem quase universalmente em samambaias e gimnospermas e são muito comuns entre as angiospermas, especialmente em espécies lenhosas. Por outro lado, os taninos hidrolisáveis são limitados às dicotiledôneas sendo encontrados relativamente em poucas famílias. Os dois tipos de taninos, porém, podem ocorrer juntos na mesma planta, como em casca e folha de carvalho (HARBORNE, 1998).

As substâncias dos taninos hidrolisáveis são o ácido gálico e o ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose (Fig. 8). Estes ésteres são facilmente hidrolisados, produzindo os ácidos fenólicos e o açúcar (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

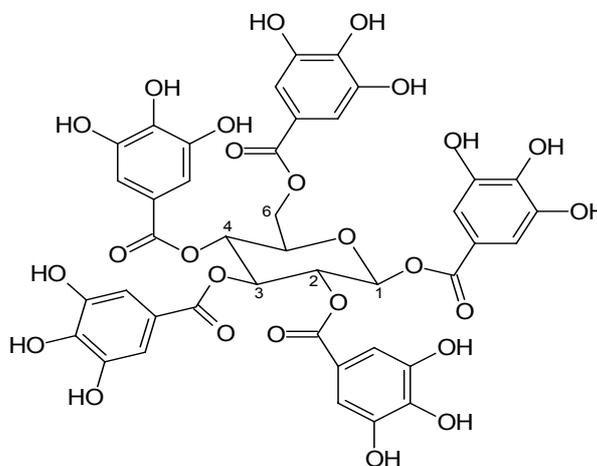


Figura 8 – Exemplo de tanino hidrolisável (β -1,2,3,4,6-pentagaloil-*D*-glucose).

Taninos condensados ou flavanóis podem ser estimados como sendo formados biossinteticamente pela condensação de monômeros de catequinas (ou galocatequinas) para formar dímeros (Fig. 9) e então oligômeros maiores (HARBORNE, 1998).

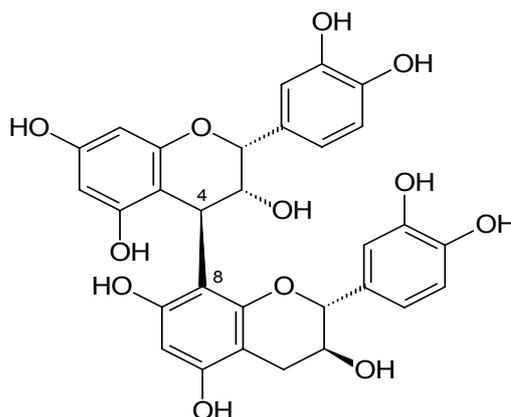


Figura 9 – Exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina].

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, distúrbios estomacais, distúrbios renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). Sendo assim, vários pesquisadores têm investigado as atividades farmacológicas e biológicas dos taninos, obtendo resultados satisfatórios. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991), antiviral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993) e ação antitumoral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três características: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de complexar com outras moléculas (HASLAM, 1998).

As plantas que contêm taninos como a hamamélis e a noz-de-galha, bem como os taninos parcialmente purificados (ácido tânico) e seus derivados (ácido acetiltânico), são usadas como adstringentes do tubo digestivo e em escoriações cutâneas. No tratamento de queimaduras, as proteínas dos tecidos expostos são precipitadas e formam um revestimento protetor ligeiramente anti-séptico, sob o qual pode ocorrer a regeneração dos tecidos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Enzimas como a glucosiltransferase, produzidas por *S. mutans* e *S. sobrinus*, encontradas na cavidade bucal do homem, são inibidas *in vitro* pelos taninos, levando ao bloqueio da formação da placa dental e de inflamações na região bucal e garganta (SCHOLZ, 1994). Isto se deve à propriedade dos taninos de se ligarem às proteínas.

Os taninos podem atuar como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2004).

Os taninos, juntamente com a cafeína, apresentam-se como os compostos mais abundantes e importantes presentes nas sementes do guaraná, sendo objeto de estudo há várias décadas (NIERENSTEIN, 1922; MARX, 1990; CARLSON; THOMPSON, 1998; USHIROBIRA, 2003).

2.4.4 Taninos Condensados

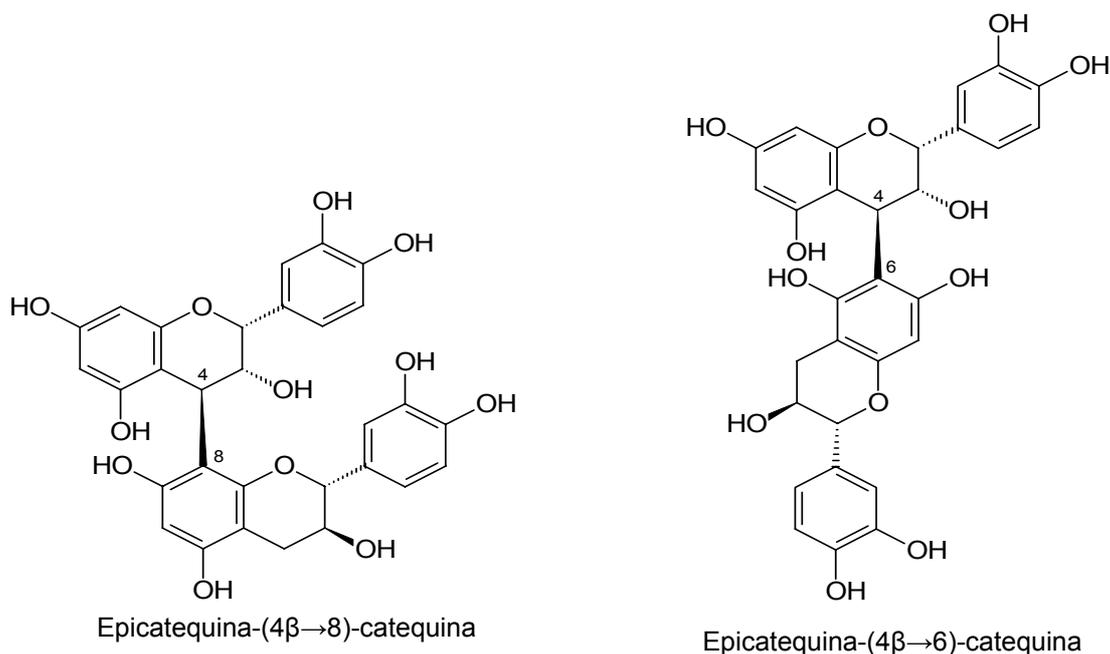
Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe de taninos também é denominada como proantocianidina (SANTOS; MELLO, 2004).

São os compostos mais úteis para a defesa química das plantas. Não são apenas potentes agentes antifúngico, antibacteriano e antiviral, mas em plantas com capacidade de sintetizá-los, concede uma poderosa alimentação dissuasiva a todos os herbívoros (SWAIN, 1978 apud HASLAM, 1998).

Estes compostos são antioxidantes muito eficazes que funcionam como captadores de radicais livres. Compostos extraídos de sementes de uvas (*Vitis vinifera* L.) são comercializados como suplementos dietéticos, pois acredita-se que sejam eficazes para melhorar a circulação arteriovenosa periférica, quadros de fragilidade capilar, retinopatias, doenças inflamatórias do colágeno e outras doenças relacionadas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os dímeros de procianidinas são divididos em dois grupos designados por A e B (Fig. 10). Procianidinas do grupo B possuem uma ligação carbono-carbono entre C-4 da unidade “superior” e o C-8 ou C-6 da unidade “inferior” (PORTER, 1992), enquanto que os representantes do grupo A possuem complementarmente uma ligação do tipo éter (SANTOS; MELLO, 2004).

Proantocianidina tipo-B



Proantocianidina tipo-A

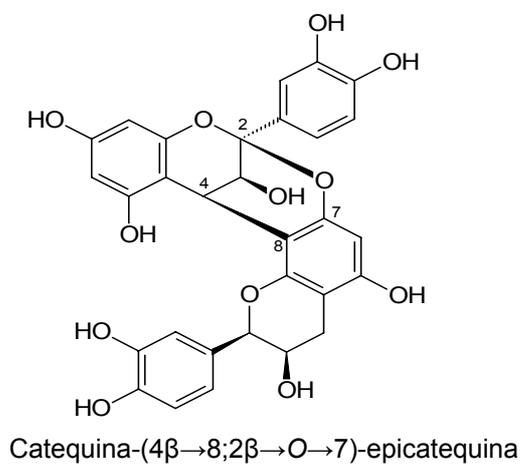


Figura 10 – Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas.

As proantocianidinas são amplamente distribuídas, principalmente em plantas lenhosas (HARBORNE, 1998; SANTOS; MELLO, 2004). Os flavan-3-óis mais distribuídos são os pares diastereoisoméricos catequina e epicatequina (Fig. 11) (HASLAM, 1998) e estão presentes nas sementes do guaraná (MARX, 1990).

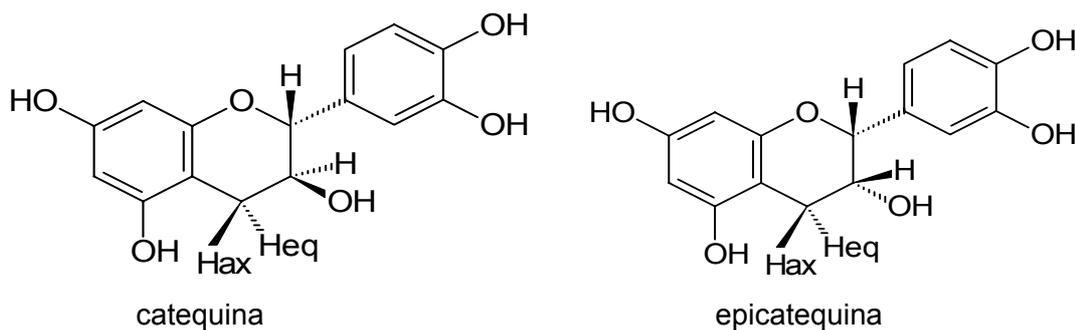


Figura 11 – Estruturas da catequina e epicatequina.

Marx (1990) constatou que as sementes de guaraná são ricas em catequina (6%) e epicatequina (3,8%) representando aproximadamente 80% do total de taninos.

Flavan-3-óis com configuração 2S, como *ent*-catequina e *ent*-epicatequina, ocorrem raramente (HASLAM, 1998). No entanto, Kofink e Galensa (2005) analisaram amostras de guaraná, cacao, café e chá, por eletroforese capilar e demonstraram, com o uso de um seletor quiral natural (ciclodextrina), que extrato da sementes de guaraná possui as substâncias 2R catequina, epicatequina e suas formas quirais 2S (*ent*-catequina e *ent*-epicatequina).

Um número significativo de proantocianidinas vêm sendo reconhecidas como tendo duas ligações (uma C-C e uma C-O) entre duas unidades de flavan-3-óis. Típicas destes compostos são as proantocianidinas A-1 e A-2, que foram os primeiros membros desta classe a serem isolados. Estruturas com pontes duplas como estas têm conformações muito mais rígidas do que as procianidinas do tipo B (HASLAM, 1998).

A partir do extrato bruto das sementes de guaraná, Antonelli Ushirobira e colaboradores (2007) obtiveram a fração semipurificada EPA, a qual foi fracionada através de cromatografia em coluna de Sephadex® (CC). Foram isoladas e identificadas: cafeína, epicatequina, catequina, procianidina B₂, procianidina B₃ e procianidina B₄.

2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O guaraná é usado na medicina popular devido aos possíveis efeitos na estimulação mental e muscular, e também por sugerir efeitos afrodisíacos e rejuvenecedores (MACHADO, 1946; HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984).

Vários estudos biológicos com o guaraná foram realizados com o interesse em confirmar os efeitos atribuídos a esta planta.

Bydlowski, Yunker e Subbiah (1988) demonstraram que o guaraná tem ação anti-agregante e desagregante em plaquetas, podendo ser útil na prevenção ou tratamento de trombose e outros problemas vasculares.

Numa avaliação dos efeitos da administração crônica de guaraná sobre a cognição de voluntários jovens normais, não se obteve nenhuma mudança significativa (GALDURÓZ; CARLINI, 1994). Em voluntários idosos normais também não foi detectada nenhuma manifestação clínica (GALDURÓZ; CARLINI, 1996). No entanto, os resultados de Kennedy e colaboradores (2004) forneceram a primeira demonstração em humanos dos efeitos psicoativos do guaraná, com o desempenho cognitivo melhorado.

Espínola e colaboradores (1997) demonstraram que a administração crônica (9 meses) em baixas doses de guaraná melhorou a capacidade física de camundongos, quando submetidos a uma situação de estresse do nado forçado e um efeito positivo em ratos e camundongos na aquisição de memória, ao reverter parcialmente o efeito de amnésia da escopolamina. Os ratos tratados com cafeína em doses similares ao encontrado no extrato não demonstraram nenhuma melhora nos desempenhos físico e mental. Isto sugere que estes efeitos possam ser atribuídos a outras substâncias além da cafeína. Os taninos presentes em alta quantidade (16,0%) no pó utilizado do guaraná pode ser o responsável pelas atividades. Os animais tiveram a mesma média de vida útil, indicando uma baixa toxicidade do guaraná, mesmo após 23 meses de tratamento. Campos e colaboradores (2005) também obtiveram melhora no nado forçado com camundongos.

Sanches, Nagai e Audi (1999) e Otobone, Martins e Audi (2001) testaram o extrato bruto (EBPC) e semipurificado (EPA) das sementes de guaraná quanto à possível atividade antidepressiva em ratos tratados cronicamente e expostos ao modelo experimental do nado forçado e obtiveram uma resposta positiva.

Otobone e colaboradores (2005) estudaram o efeito do extrato bruto (EBPC) do guaraná, e seus constituintes semipurificados (EPA e EPB), sobre o comportamento cognitivo em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. EBPC e EPA mostraram menor latência para encontrar a plataforma submersa quando comparados ao grupo controle, o que sugere efeito benéfico sobre a cognição. Além disso, aumentou o número de cruzamentos no teste do campo aberto, mostrando efeito estimulante.

O guaraná demonstrou possuir efeito antioxidante inibindo o processo de peroxidação lipídica, um fato que poderia ser relacionado às altas concentrações de taninos presentes no guaraná (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005).

Basile e colaboradores (2005) obtiveram um efeito antibacteriano significativo, expresso como concentração mínima inibitória (CIM) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em particular, *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 16 µg/ml), *Proteus mirabilis* (CIM = 32 µg/ml), *Proteus vulgaris* (CIM = 32 µg/ml) e *Escherichia coli* (CIM = 32 µg/ml) foram as mais inibidas.

Os extratos aquosos produzidos com sementes de guaraná a 5 e 7,5% foram avaliados sobre a placa dental bacteriana e comparados ao gluconato de clorexidina a 0,12%, empregando-se o bochecho como forma de aplicação. Os resultados analisados comprovaram estatisticamente a eficiência destes extrativos de guaraná em relação ao controle positivo (BARBOSA; MELLO, 2004).

Campos e colaboradores (2003) demonstraram a atividade protetora do guaraná contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em ratos. Fukumasu e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades antigenotóxicas/citotóxicas do guaraná em hepatócitos de camundongos injetados com *N*-nitrosodietilamina (DEN) e demonstraram seu efeito protetor contra os danos de DNA induzidos por DEN no fígado de camundongo.

Em ensaios de indução lisogênica em *Escherichia coli* e de mutação genética bacteriana em *Salmonella typhimurium* avaliaram-se as propriedades genotóxicas e mutagênicas do guaraná, que foram positivas. O complexo formado pela cafeína e um flavonóide, provavelmente catequina ou epicatequina na presença de potássio, é o provável responsável pela atividade genotóxica (FONSECA et al, 1994). Santa Maria e colaboradores (1998) também obtiveram resultados citotóxicos *in vitro* em células bacterianas de *Photobacterium phosphoreum* e células do ovário de hamster. No entanto, deve-se notar que ambos os estudos utilizaram uma grande quantidade de guaraná se comparado a outros estudos (FUKUMASU et al., 2006).

Segundo Mattei e colaboradores (1998) o guaraná não demonstrou efeitos tóxicos em doses altas de 1000-2000 mg/kg (i.p. e p.o.) e não induziu alterações significantes em parâmetros para triagem toxicológica. No entanto, Ushirobira (2003) demonstrou que a fração semipurificada EPA foi tóxica em altas doses (acima de 1000 mg/kg) pelo teste toxicológico agudo em camundongos.

2.5.1 Atividade antioxidante

Oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial do nosso metabolismo, sendo que o oxigênio é o último receptor de elétron no sistema de fluxo de elétron que produz energia na forma de ATP (DAVIES, 1995). Sendo assim, o metabolismo oxidativo é essencial para a sobrevivência das células. Porém, um efeito não desejado desta necessidade é a produção de radicais livres e de outras espécies de oxigênio reativo que causam mudanças oxidativas (WINROW et al., 1993). Quando se forma um excesso de radicais livres, eles podem saturar enzimas protetoras como as superóxido dismutase, catalase e peroxidase destruindo e causando efeitos letais a célula pela oxidação de lipídeos de membrana, proteínas celulares, DNA e enzimas, desta forma bloqueando a respiração celular (BAUER et al., 1999; BAE et al., 1999).

Radical livre é qualquer átomo ou molécula, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, um número ímpar de elétrons, em sua última camada eletrônica. A presença de elétrons desemparelhados confere uma alta reatividade que o leva a completar o orbital à custa de elétron “retirado” de outras moléculas (PRYOR, 1976 apud LLESUY, 2002). Os radicais livres estão relacionados a várias doenças degenerativas, incluindo envelhecimento prematuro, processos inflamatórios e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

No entanto, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois, como são em sua maioria derivados do metabolismo do O_2 , pode-se utilizar a seguinte designação aos radicais livres: “espécies reativas do oxigênio” (ERO). As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Possuem utilidade fisiológica: envolvimento na produção de energia, fagocitoses, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular, e síntese de compostos biologicamente importantes (HALLIWELL, 1997). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($\bullet O_2^-$), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila ($\bullet OH$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo em humanos inicia-se de um desequilíbrio nos níveis de antioxidantes (espécies oxigênio reativas x defesa e mecanismo de reparo) (ANTOLOVICH et al., 2002), através da geração excessiva de radicais livres ou do detrimento da velocidade de remoção destas espécies (LLESUY, 2002). Isto leva a oxidação de lipídios em membranas celulares, proteínas em tecidos ou enzimas, carboidrato, e DNA, causando dano de membrana, modificação de proteína (inclusive enzimas), e dano de DNA. Este dano oxidativo é considerado como a causa do envelhecimento e de várias doenças

degenerativas associadas, como doenças do coração, catarata, disfunção cognitiva, e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998 apud PIETTA, 2000).

Dentre as defesas endógenas estão as enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), além da vitamina E, ácido úrico e albuminas séricas. Além destas defesas, o consumo de antioxidantes na dieta também é importante (ANTOLOVICH et al., 2002).

Antioxidantes são compostos que inibem ou retardam a oxidação de outras moléculas inibindo a iniciação ou propagação das reações de oxidação em cadeia. Há duas categorias básicas de antioxidantes, os sintéticos e os naturais. Os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos de nitrogênio (alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas), ou carotenóides, como também o ácido ascórbico (LARSON, 1988 apud VELIOGLU et al., 1998).

Os principais antioxidantes sintéticos usados em alimentos são: BHT (butil- hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol), TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e PG (propil galato) (KULISIC et al., 2004; RAMALHO; JORGE, 2006). No entanto, os compostos sintéticos vêm sendo questionados quanto a sua inocuidade (IMAIDA et al, 1983 apud YEN; DUH, 1994; SOARES, 2002), e isto tem motivado a busca por antioxidantes naturais.

Nos últimos anos o interesse na aplicação de antioxidantes no tratamento médico tem aumentado consideravelmente. Alimentos naturais geralmente contêm antioxidantes naturais que podem seqüestrar radicais livres. Pequenas moléculas antioxidantes alimentares, como vitamina C, vitamina E e carotenóides têm gerado um interesse particular como defesa contra doenças degenerativas (KOHLMEIER; HASTINGS, 1995; STAMPFER; RIMM, 1995).

Os antioxidantes naturais, em especial os flavonóides, exibem uma gama de efeitos biológicos, incluindo atividades antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, antitrombótica e vasodilatadora. A atividade antioxidante é uma propriedade fundamental e importante para a vida. Muitas das funções biológicas, como antimutagenicidade, anticarcinogenicidade, e antienvhecimento, entre outros, originam desta propriedade (COOK; SAMMAN, 1996 apud VELIOGLU et al., 1998).

Há uma rica e heterogênea classe de substâncias, os antioxidantes (poli)fenólicos, caracterizados pela presença de um ou múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura molecular. Este anel fenólico pode estar presente tanto na forma oxidada (quinona) quanto na forma reduzida (fenol). Os antioxidantes pertencem a classes distintas como, por exemplo, ácidos fenólicos simples (ácido caféico), fitoalexinas (resveratrol) ou flavonóides (catequina, quercetina) (AHERNE; O'BRIEN, 2002; HOLLMAN; KATAN, 1999; RICE-EVANS et al.,1996). Podem ainda se polimerizar e formar substâncias com alto peso molecular como os taninos (KAMPA et al., 2004).

Normalmente, os grandes consumidores de frutas e vegetais têm um estilo de vida saudável que pode ser um fator importante para a sua resistência contra doenças crônicas. Ao todo, frutas e vegetais fazem um papel preventivo que se deve a uma variedade de componentes inclusive vitaminas, minerais, fibras, e numerosos fitoquímicos, inclusive flavonóides. Assim, é possível que flavonóides também contribuam com o efeito protetor de frutas e vegetais (PIETTA, 2000). Alguns exemplos de vegetais e produtos com ação antioxidante: ervas e especiarias como sálvia (LU; FOO, 2001), orégano (KULISIC et al., 2004), funcho (RUBERTO et al., 2000); frutas como uva e maçã (FRANKE et al., 1994 apud PIETTA, 2000); vinho (SALVADOR; PICADA, 2002); chá verde (YEN; CHEN, 1995) e mel (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; SANTOS; MELLO, 2004), podendo agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentado por estas substâncias (NAWAR, 1985 apud SOARES, 2002). As substâncias fenólicas e alguns derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; no entanto, poucas são as permitidas para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Os compostos polifenólicos também podem inibir enzimas oxidativas (fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipoxigenase), atuando como protetores e regeneradores dos antioxidantes primários do organismo como o ácido ascórbico, os tocoferóis e o β -caroteno (KINSELLA et al., 1993 apud SALVADOR; PICADA, 2002)

Alguns estudos têm sugerido que substâncias fenólicas como flavonóides e ácidos fenólicos, são consideravelmente antioxidantes mais potentes que a vitamina C e a vitamina E (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; VINSON et al., 1995); outros estudos têm demonstrado uma alta correlação entre a atividade antioxidante total de algumas frutas e seus teores fenólicos totais (GUO et al., 1997; VELIOGLU et al., 1998). Czinner et al. (2000) avaliaram as propriedades *in vitro* de *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, utilizada como hepatoprotetor, colerético e desintoxicante e conseguiram relacionar seu conteúdo em polifenóis e flavonóides com sua atividade antioxidante. Aljadi e Kamaruddin (2004) comprovaram a atividade antioxidante em méis de flores da Malásia e correlacionaram com seus teores fenólicos totais.

Miliauskas, Venskutonis e Van Beek (2004) também observaram uma correlação entre a capacidade de seqüestro de radicais de extratos com o teor de compostos fenólicos totais. Extratos de *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin, *Geranium macrorrhizum* e *Potentilla fruticosa* demonstraram uma alta atividade de seqüestro de radicais (RSA) e altos

teores de compostos fenólicos. Os autores observaram que os compostos fenólicos são provavelmente os responsáveis pela atividade de seqüestro de radicais destes extratos.

As atividades antioxidantes dos polifenóis de sálvia, que consistem em glicosídeos de flavona e uma gama de derivados de ácido rosmarínico, foram avaliados quanto a sua capacidade para seqüestrar DPPH e radicais do ânion superóxido e também sua capacidade de reduzir Mo(VI) para Mo(V). Todos os derivados do ácido rosmarínico mostraram atividade antioxidante potente nos três sistemas de teste. A atividade antioxidante dos flavonóides foi variável e aqueles com um catecol no anel B (glicosídeos de luteolina) foram mais ativos que aqueles sem (glicosídeos de apigenina) (LU; FOO, 2001).

Yen e Chen (1995) estudaram a atividade antioxidante de vários extratos de chá verde, chá “pouchong”, chá “oolong” e chá preto. Todos eles exibiram acentuada atividade antioxidante e poder redutor, especialmente o chá “oolong”. Os polifenóis correspondem ao grupo mais abundante de compostos nas folhas, e as catequinas constituem o componente principal que parece ser o responsável pela atividade antioxidante. Lunder (1992 apud YEN; CHEN, 1995) informou que havia uma correlação entre a atividade antioxidante e epigallocatequina-galato (EGCg). Em geral, o conteúdo de catequinas em chá é relacionado ao grau de fermentação durante o processo de produção; então, o conteúdo de catequinas em vários chás está na ordem chá verde > chá “pouchong” > chá “oolong” > chá preto. Neste estudo, extratos de chá “oolong” mostraram atividade antioxidante mais forte que os outros extratos de chá. Assim, a variável em atividade antioxidante destes quatro extratos de chá poderia não ser completamente atribuída ao conteúdo de catequinas.

Amarowicz et al. (2004) prepararam e avaliaram extratos etanólicos das raízes de *Glycyrrhiza lepidota* Nutt. ex Pursh, *Echinacea angustifolia* DC., *Polygala senega* L., folhas de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. e partes aéreas de duas variedades de *Equisetum* L. spp. quanto a sua capacidade de seqüestrar radicais livres, por vários ensaios químicos. O extrato de folhas de *Arctostaphylos uva-ursi* exibiu a atividade antioxidante mais alta, podendo ser comparado ao do extrato do chá verde, e pareceu ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Neste estudo, os componentes polifenólicos também pareceram ser responsáveis, pelo menos em parte, pela capacidade do extrato de seqüestrar radicais.

Devido a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ser um iniciador importante da aterogênese (STEINBERG et al., 1989; STEINBRECHER et al., 1990 apud SOARES, 2002), vários autores utilizaram o modelo de oxidação de LDL *in vitro* para verificar o potencial antioxidante de ácidos fenólicos. Alguns deles, como o caféico e o clorogênico, apresentaram um elevado poder antioxidante neste sistema, sendo comparado ao poder encontrado para a vitamina E, C e β -caroteno (SOARES, 2002).

Mattei et al (1998) avaliaram o pó das sementes de *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* e comprovaram um efeito antioxidante em baixas concentrações (1,2 μ g/ml), por

inibir o processo de peroxidação lipídica. Isto poderia ser relacionado às altas concentrações de taninos presentes no guaraná, haja vista que já foi demonstrado que a cafeína não possui capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• (USHIROBIRA, 2003).

Ushirobira (2003) também obteve um resultado positivo quanto ao efeito antioxidante para os extratos, as subfrações e as substâncias isoladas e identificadas como substâncias fenólicas da *Paullinia cupana*.

Recentemente, a capacidade antioxidante do extrato etanólico de sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart. (Sapindaceae) foi determinada pelo teste de malonildialdeído (MDA). A redução da peroxidação lipídica foi de 62,5% usando um extrato de guaraná a 2 µg/ml, sendo que o efeito demonstrou ser dose-dependente. Este extrato foi analisado através de espectrofotometria para determinar a concentração de substâncias com catecol. O conteúdo de fenólicos totais também foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu e calculado como equivalentes de ácido gálico (EAG). A concentração de equivalente de catecol foi de 6,06 ± 0,13 mg/g, enquanto o conteúdo de fenólicos totais foi de 8,43 ± 0,21 mg/g (BASILE et al., 2005).

Pulido et al. (2000) afirmaram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação parecem ser os critérios que regem o poder redutor dos polifenóis da dieta. Dos resultados obtidos por eles e dos resultados informados por outros autores (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; RICE-EVANS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998), foi aparente que polifenóis têm maior capacidade antioxidante *in vitro* do que ácido ascórbico e DL- α -tocoferol. Considerando que estes compostos estão presentes em quantias significantes na maioria das frutas e vegetais, enfatizam-se a significância dos polifenóis como antioxidantes naturais provenientes da dieta e a importância de aprofundar a compreensão de sua biodisponibilidade e efeitos *in vivo*.

Vários métodos vêm sendo utilizados para expressar a capacidade antioxidante de extratos obtidos a partir de plantas, sendo que o efeito sob diferentes concentrações é comparado ao efeito exercido por uma substância de atividade reconhecida, como as vitaminas C ou E, ou com um composto puro, como a quercetina ou rutina. No entanto, a distinção entre atividade antioxidante e capacidade antioxidante deve estar na interpretação dos resultados, pois esta se refere à somatória de todas as atividades antioxidantes exercidas individualmente por cada componente presente em uma mistura, como é o caso de extratos (ANTOLOVICH et al., 2002).

2.5.2 Atividade antibacteriana

Dentre as várias atividades biológicas atribuídas às substâncias fenólicas, a atividade antibacteriana é uma das que despertam maior interesse entre os pesquisadores. Isto se deve ao aumento das infecções bacterianas nas populações e ao aumento da resistência frente aos antibióticos atuais. Taninos e compostos fenólicos são amplamente reconhecidos por possuir alto potencial antibiótico, o que vem a confirmar o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis como drogas com efeito anti-séptico (KOLODZIEJ et al., 1999).

Para os taninos propõem-se três mecanismos de ação para essa atividade: inibição de enzimas das bactérias, complexando-se com os substratos dessas enzimas; ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo; complexação com íons metálicos, diminuindo assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SANTOS e MELLO, 2004). A toxicidade dos taninos para com os microrganismos tem sido bem documentada com estudos envolvendo vários campos de pesquisa, entre eles: alimentos, plantas, solos, patologia de plantas, farmacologia e nutrição humana e animal (SCALBERT, 1991).

Diversos estudos têm sido realizados com plantas que possuem substâncias fenólicas, com o objetivo de descobrir novos fármacos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas, como por exemplo os trabalhos realizados por Baldé et al. (1990), Scholz (1994), Mello et al. (1998, 2000), Akiyama et al. (2001), Ho et al. (2001), Toledo (2002), Galina (2003), Ushirobira (2003), Lopes et al. (2005), Holetz et al. (2005), Sanches et al. (2005), Luize et al. (2005) entre outros.

Apesar da atividade antibacteriana dos taninos ser avaliada tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (SCHOLZ, 1994), as proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas isoladas de *Pavetta owariensis* P. Beauv. (Rubiaceae) não demonstraram atividade contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (BALDÉ et al., 1990). O extrato etanólico de sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart., com concentrações entre 16 e 128 µg/ml, demonstrou um efeito antibacteriano significativo, expresso como concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em particular, *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 16 µg/ml), *Proteus mirabilis* (CIM = 32 µg/ml), *Proteus vulgaris* (CIM = 32 µg/ml) e *Escherichia coli* (CIM = 32 µg/ml) foram as mais inibidas. Estes resultados estão relacionados às substâncias fenólicas presentes (BASILE et al., 2005). Monômeros galoilados demonstraram atividade antibacteriana em *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie (OTAKE et al., 1991; NAKAHARA et al., 1993).

2.5.2.1 A placa dental e a atividade anti-cárie

Em países em desenvolvimento e com alto consumo de carboidratos, a formação de cárie dentária, além de ser comum, passa a ser um problema de saúde, podendo ser contornado através de métodos preventivos. Entre estes, cita-se a fluoretação da água, recomendado não somente pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1984), como pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). A placa dental constitui-se de um agregado estruturado e não calcificado de microrganismos sobre os dentes ou outras estruturas bucais sólidas. O primeiro estágio da sua formação caracteriza-se pela deposição de uma película adquirida de origem salivar, que inicialmente ocorre por adsorção seletiva e eletrostática de glicoproteínas bacterianas à superfície dentária (MACEDO et al., 1977a; 1977b). Este processo leva a formação da cárie dentária, iniciada pela desmineralização do esmalte dentário, devido aos ácidos produzidos a partir da fermentação de carboidratos pelas bactérias, com conseqüente queda do pH do meio bucal (MACEDO et al., 1978a).

O uso de extratos vegetais ou mesmo parte de drogas vegetais no controle da placa bacteriana dentária e, portanto, da cárie, tem sido empregado por diversas etnias, de forma cultural e indireta. Stralfors (1967) estudou em Hamster extratos de quebracho [*Schinopsis lorentzii* (Griseb.) Engl.] e mimosa (*Acacia mollissima* Willd.) mostrando que seus extratos promovem a diminuição de cáries. Nakahara e colaboradores (1993) provaram que o chá verde das folhas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze de uso tradicional no Japão, possui uma atividade anticariogênica, dado pela presença de taninos condensados galoilados, tais como epicatequina galato e epigallocatequina galato. Noelli (1998) demonstrou o uso de espécies vegetais por índios Guarani no campo odontológico. Espécies como a *Inga* sp. comprovaram mais uma vez que os taninos são os responsáveis pela inibição da formação de cárie naquela tribo indígena.

A atividade do extrato aquoso produzido com sementes de guaraná a 5 e 7,5% foram avaliados sobre a placa dental bacteriana e comparados com o gluconato de clorexidina a 0,12%, empregando-se o bochecho como forma de aplicação. Os resultados analisados comprovaram estatisticamente a eficiência destes extrativos de guaraná em relação ao controle positivo (BARBOSA; MELLO, 2004).

O principal microrganismo cariogênico é o *Streptococcus mutans* devido às suas propriedades acidogênica (capacidade de produzir ácidos) e acidúrica (capacidade de tolerar e de se desenvolver em biofilme dental ácido), além de sua capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares (PEC) e polissacarídeos intracelulares (PIC). Embora a maioria dos estudos clínicos sobre microrganismos cariogênicos relate o termo "*S. mutans*" genericamente, esses estreptococos cariogênicos são denominados "estreptococos do grupo *mutans*", que compreende diversas espécies no homem. A espécie *S. mutans* é

encontrada em mais de 80% dos indivíduos na maioria das populações e é considerado o principal microrganismo cariogênico para o homem (GIBBONS, 1984; LOESCHE, 1986).

A cariogenicidade está fortemente associada à habilidade destes microrganismos em sintetizar glucanos extracelulares insolúveis em água pelo uso de glucosiltransferases (GTases). Os glucanos são sintetizados a partir da sacarose pelas ações auxiliares de GTases e são altamente aderentes a várias superfícies sólidas, incluindo a superfície do dente. Este processo bioquímico resulta em aderência firme e irreversível de estreptococos do grupo *mutans* à superfície do dente, o que eventualmente leva a formação da placa dental e ao desenvolvimento da cárie dental (KOGA et al., 1986 apud NAKAHARA et al., 1993).

Como os microrganismos presentes na placa metabolizam certos carboidratos, os ácidos resultantes como os ácidos láctico, fórmico, acético, succínico e outros orgânicos, tornam-se concentrados no local, levando a desmineralização da superfície externa do dente, e a cárie se inicia (MACEDO et al., 1978a; TAKAHASHI, 2005). Em condições fisiológicas as superfícies bacterianas e dentárias têm predomínio de cargas negativas, e a saliva encontra-se saturada de íons cálcio e fosfato, o que favorece o estado cristalino da hidroxiapatita do esmalte dentário. Os ácidos decorrentes do metabolismo bacteriano atuam reduzindo o pH da placa bacteriana, e ligam-se às hidroxilas da hidroxiapatita, favorecendo a formação de fosfato de cálcio, e a subsequente dissolução do esmalte dentário (BALZAR et al., 2001; TENUTA et al., 2003 apud STAMFORD et al., 2005).

Um fator importante na prevenção de cárie dental e doença periodontal seria a remoção mecânica da placa. No entanto, existem dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente (ADDY et al., 1987). Em reconhecimento às limitações dos métodos mecânicos de higiene, foram realizadas pesquisas com agentes químicos visando o controle da placa. Essas substâncias podem agir de diferentes formas: interferindo na adesão bacteriana à superfície dental através de agentes antiadesivos, prevenindo a proliferação bacteriana na superfície dentária com agentes antimicrobianos e removendo a placa pré-existente (ADDY; SLAYNE; WADE, 1992). Uma outra possibilidade seria o uso de substâncias que interferissem na síntese de PEC (mecanismo particularmente importante na aderência intermicrobiana de *S. mutans*) (IKENO; IKENO; MIYAZAWA, 1991). Dentre as substâncias químicas disponíveis no mercado, a única que se mostra efetiva na prevenção da cárie é a clorexidina, mas a sua utilização permanece restrita devido aos efeitos colaterais locais decorrentes do seu uso prolongado, principalmente diminuição e distúrbio do paladar e amarelamento dos dentes e da língua (ADDY; SLAYNE; WADE, 1992). Outros agentes vêm sendo investigados na busca de uma substância que controle a cárie e que não produza efeitos colaterais, podendo ser usada em larga escala (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996).

Uma variedade de compostos capazes de controlar a cárie dental tem sido extensivamente avaliada sobre os seguintes critérios: atividade antimicrobiana (ONISHI et al., 1981; HADA et al., 1989), inibição da GTase por neutralização imunológica (HAMADA et al., 1991), inibidores de enzima (KAKIUCHI et al., 1986), e troca de sacarose por outros adoçantes (OOSHIMA et al., 1983, 1988, 1992). No entanto, apenas um número limitado de compostos a partir de produtos naturais são disponíveis devido a efetividade, estabilidade, odor, paladar e possibilidade econômica.

Kubo, Muroi e Himejima (1992) relataram que o extrato de chá verde contém algumas substâncias cariostáticas. Tem-se constatado que vários compostos fenólicos poderiam suprimir o desenvolvimento de estreptococos do grupo *mutans* e inibir a síntese de glucanos a partir da sacarose através de GTases. Ésteres galoilados de epicatequina, epigallocatequina e *ent*-galocatequina aumentaram esta atividade (HATTORI et al., 1990; SAKANAKA et al., 1990). Ooshima e colaboradores (1993) constataram que os componentes ativos do extrato de chá “oolong”, supostamente identificados como polifenóis poliméricos específicos de suas folhas, resultaram em reduções significantes no desenvolvimento de cáries e acúmulo de placa em ratos infectados com estreptococos do grupo *mutans*. Este extrato também demonstrou seu efeito inibitório na deposição de placa em voluntários humanos (OOSHIMA et al., 1994). Um dos fatores para este efeito seria a redução da taxa da produção de ácido (MATSUMOTO et al., 1999), pois a acidificação contribui com a desmineralização da superfície do dente (TAKAHASHI, 2005). Vários componentes nos chás verde e preto, como catequinas, tem propriedades *in vitro* que sugerem uma atividade anticariogênica. Estudos em modelos animais demonstraram que estes efeitos podem traduzir em prevenção de cáries. Um número limitado de triagem clínica em humanos sugere que o uso regular do chá poderia reduzir a incidência e severidade das cáries (HAMILTON-MILLER, 2001).

O extrato da casca do grão de cacau reduziu a taxa de crescimento de estreptococos do grupo *mutans in vitro*, os quais resultaram na redução de produção de ácido. Além disso, a síntese de glucanos insolúveis por glucosiltransferases de *S. mutans* MT8148R e *S. sobrinus* 6715 foi significativamente inibido, diminuindo a aderência de células dependentes de sacarose. A administração do extrato em água potável resultou em significantes reduções de desenvolvimento de cáries e acúmulo de placa dental em ratos Sprague-Dawley infectados com as bactérias testes (OOSHIMA et al., 2000).

Ikeno, Ikeno e Miyazawa (1991) observaram a ação antimicrobiana do extrato de própolis sobre cepas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. cricetus*. Eles detectaram a inibição da formação de glucanos insolúveis a partir da sacarose por esse extrato, através da inibição da aderência ao vidro, e inibição da atividade de glucosiltransferase (GTase).

Tinturas de malva, salva, camomila, tomilho, cacau e própolis foram analisadas contra *S. mutans* e *S. sobrinus* por Gebara, Zardetto e Mayer (1996). Tomilho, cacau e própolis apresentaram atividade antimicrobiana e foram capazes de inibir a adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus* à superfície de vidro. Estes resultados sugeriram a possibilidade do uso dessas substâncias no controle de *S. mutans* e *S. sobrinus* na placa dental.

Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees, *Cassia alata* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Psidium guajava* L. e *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. demonstraram efeito inibitório significativo na aderência bacteriana em superfícies de vidro. *A. paniculata*, *C. alata*, *C. sinensis* e *H. perforata* inibiram a aderência de *S. mutans* ATCC 25175, sendo a *C. sinensis* o inibidor mais forte (LIMSONG et al., 2004).

Nostro e colaboradores (2004) comprovaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don f. contra estreptococos orais. Eles observaram uma significativa redução da hidrofobicidade e da aderência à superfície de vidro do *S. mutans*, que poderia estar relacionada aos compostos flavônicos como apigenina, luteolina, dentre outros.

Os polifenóis presentes na maçã inibiram a atividade de GTases de estreptococos do grupo *mutans* e a aderência dependente de sacarose de células bacterianas *in vitro*. Os mais fortes inibidores de GTases foram os taninos condensados da maçã, uma mistura de procianidinas. Sua eficácia dependeu amplamente do grau de polimerização (YANAGIDA et al, 2000).

Enfim, a presença de polifenóis no controle da placa e da cárie dental parece ser um fator de grande importância para a Saúde Pública, demonstrando a potencialidade dos taninos como complementação na higiene bucal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta dissertação tem por finalidade realizar o estudo químico e biológico dos extratos das sementes do guaraná, devido ao seu amplo emprego em produtos alimentícios, cosméticos, nutracêuticos e farmacêuticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a qualidade das sementes, confirmando suas características através da comparação com a literatura e amostras analisadas anteriormente.
- Isolar e identificar substâncias polifenólicas a partir da fração semipurificada EPA.
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos e frações semipurificadas.
- Analisar de forma preliminar o potencial antibacteriano frente a *Streptococcus mutans in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As sementes da planta *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke foram adquiridas do Sr. José Augusto de Souza, do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta, Sítio Nossa Senhora Aparecida, Rodovia MT 325, km 8. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob número HUEM 9.065. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma® ou Carlo Herba®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético glacial
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico
- Ácido nítrico
- Ágar Bacto
- Anidrido acético
- Caldo infuso de cérebro e coração (BHI) Synth
- Cloreto de sódio Reagen
- Clorexidina 2% FGM Produtos Odontológicos
- Clorofórmio deuterado Isotec
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) Fluka
- Extrato de carne Becton Dickinson
- Etanol
- Etanol 92,8° GL Ilha
- Fosfato de potássio dibásico ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)

- Fosfato de potássio diidrogenado (KH_2PO_4)
- Glicose
- Hipoclorito de sódio
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec
- Nitrogênio Líquido
- Peptona de carne Quimilabor
- Piridina
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteu 2 mol l^{-1} Laborclin®
- Sacarose Nuclear
- Sephadex® LH-20 Fluka
- Solução aquosa de TTC a 2% (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio) Inlab
- Solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v)
- Solução de ácido sulfúrico a 0,6 M
- Solução de carbonato de sódio a 14,06%
- Solução etanólica de cloreto férrico a 1%
- Solução de fosfato de sódio a 28 mM
- Solução de molibdato de amônio 4 mM
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) CAAL
- Uréia
- Vermelho de fenol
- Vitamina C - Delaware

4.2.2 Materiais e equipamentos

- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear Varian Gemini 300BB e Mercury Plus 300BB
- Aparelho de ultra-som Unique USC Cleaner 1450, 25 KHz
- Agitador magnético com aquecimento
- Autoclave vertical Fabbe-Primar modelo 103
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Balança analítica Ohaus MB-200 com secagem por infravermelho
- 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 fluxo laminar
- Câmara de UV 254 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
- Cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck
- Espectrofotômetro UV/VIS Cary 1E Varian
- Estufa de secagem e esterilização Fanem 315 SE
- 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
- Micropipetadores Eppendorf (10 a 1000 µl)
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- pHmetro Digimed
- Polarímetro Perkin-Elmer modelo 241
- Turbolizador Skymesen LSV-5
- Ultra-turrax UTC 115 KT
- Vortex mod. AP-56

4.3 CONTROLE DE QUALIDADE

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.

4.3.1 Análise química preliminar

Entre os diferentes ensaios com a droga, foram realizados os seguintes (HARBORNE, 1984):

- 1) taninos
- 2) compostos antracênicos
- 3) aromáticos simples
- 4) metilxantinas
- 5) saponinas

4.3.2 Análises físico-químicas

4.3.2.1 Determinação da perda por secagem (sementes e pó) (MELLO; PETROVICK, 2000)

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal foram colocados para secar a 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.

4.3.2.2 Determinação da perda por dessecação (CARDOSO, 2002)

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho.

Cerca de 5 g da droga vegetal moída foram exatamente pesados em bandejas de alumínio taradas, e desseçadas por 15 min à temperatura de 110 °C, com intervalo de 15 min entre cada determinação, tempo necessário para o resfriamento da balança. O resultado foi calculado em relação a 100 g da droga, pela média de três determinações.

4.3.2.3 Determinação do teor de extrativos (DEUTSCHES, 1986)

Foram pesados exatamente cerca de 1,0 g de guaraná cominuído, que foi submetida à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 minutos. 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 até peso constante, resfriado em dessecador e pesado. Foram realizadas três determinações.

4.3.2.4 Determinação do teor de resíduo seco (MELLO; PETROVICK, 2000)

Foi realizado o mesmo procedimento de preparação da amostra, conforme o item 4.3.2.3, utilizando-se os seguintes solventes, em proporções volumétricas:

- a) acetona:água (7:3)
- b) etanol:água (1:1)

O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato.

4.3.3 Análise química quantitativa

4.3.3.1 Determinação do teor de taninos totais (GLASL, 1983)

Foi pesado exatamente cerca de 0,750 g de droga pulverizada, transferida para um erlenmeyer com 150 ml de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 85 °C. Após resfriamento em água corrente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foram filtrados, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 N) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinações de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para um béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada e 5 ml do filtrado foi diluído com água para 25 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 N) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Foram realizadas três determinações.

4.3.3.2 Determinação do teor de metilxantinas (ANDRADE, 1996)

Preparo da substância de referência: foram pesados exatamente 50,0 mg de cafeína, que foram dissolvidos em 100 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v). Uma alíquota de 3,0 ml desta solução, equivalentes a 1500 µg de cafeína, foi colocada em balão de 100 ml

completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v), obtendo-se a concentração de 15,0 $\mu\text{g/ml}$ de cafeína.

Preparo das amostras de guaraná: foram exatamente pesados cerca de 250 mg da amostra de guaraná pulverizada e extraídas com 20 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v) com agitação mecânica durante 15 minutos, por quatro vezes. As porções foram filtradas para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v). 10 ml desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v), obtendo-se a concentração teórica em torno de 15,0 $\mu\text{g/ml}$.

As leituras no espectrofotômetro foram realizadas a 271 nm, utilizando-se solução de ácido sulfúrico a 2,5% (v/v), como solução de compensação. Foram realizadas três determinações.

4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As sementes foram torradas e secas em tacho de ferro no local de coleta. No laboratório de Farmacognosia foram moídas em moinho de martelos.

4.4.1 Extrato utilizado no isolamento químico

Com o pó vegetal obtido foi realizada extração de acordo com o pedido de privilégio de invenção a Patente PI 0.006.638-9 (UEM).

4.4.2 Extratos utilizados nos ensaios biológicos

4.4.2.1 Extrato Aquoso

O extrato aquoso foi preparado por turbólise, durante 15 min. A proporção de droga utilizada foi de 5% (m/V) com água destilada. Em seguida foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com temperatura abaixo de 40 °C, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado.

4.4.2.2 Extrato Bruto, EPA e FAQ

Com o pó vegetal obtido foi realizada extração de acordo com o pedido de privilégio de invenção junto ao INPI sob o nº PI 0.006.638-9.

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.5.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração EPA

A fração EPA foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (h: 750 mm Ø 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 50%. Foram adicionados 15 g da fração EPA no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se a seguinte seqüência de fase móvel em proporção volumétrica:

1. EtOH/água (1:1)	7,4 l
2. EtOH	1,25 l
3. MetOH	1,45 l
4. Acetona/água destilada (7:3)	7 l

Recolheram-se 8 ml de cada fração em tubo de ensaio com fluxo de 1 ml/min. O monitoramento foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD, seção 4.5.2). Obtiveram-se 24 subfrações (F#1 à F#24), que foram reunidas por semelhança, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) com 0,200 mm de espessura, utilizando-se como sistema eluente, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram visualizadas sob luz UV a 254 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em etanol.

4.5.3 Cromatografia em coluna das subfrações F#10 a F#14

Algumas subfrações obtidas a partir da fração EPA foram recromatografadas por CC (h: 600 mm Ø 31 mm; h: 740 mm Ø 16 mm; h: 760 mm Ø 11 mm) contendo Sephadex® LH-20 e com fluxo de 1 ml/min (4 ml por tubo de ensaio). O sistema eluente foi empregado na seguinte seqüência, em proporção volumétrica:

1. EtOH 10%
2. EtOH 20%
3. EtOH 30%
4. EtOH 40%
5. EtOH 50%

O monitoramento das frações foi realizado através de CCD (seção 4.5.2).

4.5.4 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade da fração EPA (MELLO, 1995)

Foi utilizado cromatógrafo em contra corrente de alta velocidade (CCCAV), com rotação média de 870 rpm, com fluxo de 1 ml/min. O sistema eluente empregado foi preparado em funil de separação com acetato de etila/ *n*-propanol/ água (140:8:80; v/v). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Cada fração de 3 ml foi acompanhada por cromatografia (seção 4.5.2) em camada delgada e os tubos reunidos por semelhança.

4.5.5 Cromatografia em coluna das subfrações EPA#4 e EPA#6

Algumas subfrações obtidas a partir da fração EPA foram recromatografadas por CC (bureta de 50 ml; h: 740 mm Ø 16 mm) contendo Sephadex® LH-20 e com fluxo de 1 ml/min (4 ml por tubo de ensaio). O sistema eluente foi empregado na seguinte seqüência, em proporção volumétrica:

1. EtOH 10%

2. EtOH 20%
3. EtOH 30%
4. EtOH 40%
5. EtOH 50%

O monitoramento das frações foi realizado através de CCD (seção 4.5.2).

4.5.6 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Algumas substâncias isoladas foram derivatizadas (seção 4.6) e em seguida aplicadas em forma de linhas, em gel de sílica PF₂₅₄ com gesso (Merck), na espessura de 0,750 mm, sobre placa de vidro (20 x 20 cm). O sistema eluente utilizado foi tolueno:acetona (7:3; v/v).

Após o desenvolvimento, as faixas de substâncias foram demarcadas sob luz UV, calculando-se o valor de R_f. Em seguida, as substâncias foram separadas raspando-se a região correspondente e solubilizadas em acetona.

Filtrou-se em filtro sinterizado G4, eliminando-se a acetona em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A substância foi recolhida em frasco previamente tarado e deixada em capela até total eliminação do solvente.

4.6 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA (MELLO et al., 1996)

Para quantidades de até 100 mg de substância, foram adicionados 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml. Ficou em repouso por 24 h. Em seguida, foi colocado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando-se em repouso por 2 h. Foi filtrado em filtro sinterizado G4 e a substância acetilada foi lavada com água até total eliminação da piridina. A substância acetilada foi solubilizada em clorofórmio e o solvente foi retirado em evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. Transferiu-se para um frasco previamente tarado e colocou-se na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Em seguida, a substância foi congelada e liofilizada.

4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (¹H e ¹³C), RMN 2D (¹H/¹H COSY) e Espectroscopia de Massa (EM). Os espectros das substâncias foram analisados e

comparados com dados constantes na literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian Gemini 300BB e Mercury 300BB de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , empregando-se solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3). Os espectros de massa foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, em aparelho ESI-MS Quattro LCZ (Micromass Manchester, UK) com alça nanospray.

4.8 ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA)

A determinação ótica ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) da substância acetilada sucedeu-se empregando metanol (grau HPLC) a 20°C . Para a determinação do valor, empregou-se a seguinte equação:

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

onde: 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)

4.9 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

As substâncias, acetilada ou não, foram solubilizadas em metanol ou acetona e medidas em comprimento de onda entre 200-300 nm. O cálculo da eliptizidade molar ($[\theta_\lambda]$) foi realizado de acordo com a equação:

$$[\theta_\lambda] = \frac{\theta_\lambda}{C \cdot l} \cdot 100$$

onde: $[\theta_\lambda]$ = eliptizidade molar ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$)

$[\theta_\lambda]$ = eliptizidade (deg)

C = concentração molar ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

l = comprimento da cubeta (cm)

4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.10.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico (PRIETO et al., 1999)

Uma alíquota (0,3 ml) da solução amostra (200 µg/ml) foi misturada em um tubo de ensaio com a solução reagente (3 ml) {ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM) em água destilada}. Os tubos foram incubados em banho-maria 95 °C, por 90 min. Após resfriamento, a absorvância foi lida a 695 nm contra o branco (3 ml de solução reagente e 0,3 ml do mesmo solvente utilizado na amostra). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em relação ao ácido ascórbico (0,3 ml de solução 2 mM), usado como padrão, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1 (100%).

4.10.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (AMAROWICZ et al., 2004)

Extratos foram preparados nas concentrações 0,16-20,0 µg/ml em metanol. Solução metanólica de DPPH• (1mM, 0,5 ml) foi adicionada a amostra (4 ml) nas diferentes concentrações, e a reação ocorreu em temperatura ambiente por 30 min. Solução de 0,5 ml de DPPH• em 4 ml de metanol foi usada como controle e outra solução de 2 mg de BHA em 4 ml de metanol com 0,5 ml de solução de DPPH• foi utilizada como branco. Os valores da absorvância foram medidos a 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH• consumido (AA%), utilizando-se para isso a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

Onde: Abs= absorvância

4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A *Streptococcus mutans* IN VITRO.

4.11.1 Amostra bacteriana

As amostras utilizadas foram padrões da American Type Culture Collection: *S. mutans* – ATCC 25175 cedidas gentilmente pela Fundação Osvaldo Cruz.

4.11.2 Teste de aderência em lamínula

Culturas de *Streptococcus mutans* de 24 h em BHI a 37 °C em microaerofilia (obtido em jarra com o método da vela – 10% CO₂) foram centrifugadas por 20 min e ressuspensas com tampão (3,0 ml) ajustando a escala McFarland (1,5 x 10⁸ células/ml). Desta suspensão bacteriana, 1,5 ml foram adicionados a 1,5 ml de tampão (controle) e outros 1,5 ml foram adicionados a 1,5 ml de extrato. Foram incubados a 37 °C em microaerofilia por 4 h, centrifugados e ressuspensos com BHI sacarose (3,0 ml). Foi feita diluição seriada em meio BHI: 10⁻¹, 10⁻². Em uma placa de 24 poços foi colocado 500 µl da diluição 10⁻² onde havia uma lamínula. A placa foi incubada por 2 h. Em seguida, a suspensão foi retirada de cada poço e foi substituída por tampão. A lamínula foi removida, lavada em tampão e colocada em outra placa de 24 poços. Foram adicionados 500 µl de sangue de carneiro (10%) em BHI ágar (1%) sobre a lamínula e a placa foi incubada. A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi feita após 24 h de incubação (descrito por HAMADA et al., 1981 com algumas modificações) em triplicata. Foi realizada também a contagem de viáveis em placas com sangue de carneiro (10%) em BHI ágar (1%).

4.11.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em placas.

A partir de uma cultura bacteriana de *S. mutans* de 24 h em caldo BHI e em microaerofilia, padronizou-se a suspensão bacteriana adicionando gotas desta cultura em um tubo contendo solução salina estéril, até a obtenção de uma turvação igual à encontrada na escala de McFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/ml). Em seguida, realizou-se uma diluição 1/10 em tubo eppendorf, para obter-se uma suspensão de 10⁷ UFC/ml, cujo inóculo foi empregado no ensaio microbiológico.

As amostras testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e submetidas ao ultra-som, preparando-se uma solução teste (ST) de 20 mg/ml. Em uma placa de 96 poços pipetou-se um volume de 100 µl de caldo BHI em cada poço, sendo em seguida adicionado um volume de 100 µl de ST aos poços da primeira fileira, obtendo-se uma concentração inicial de 10.000 µg/ml. Em seguida, realizou-se diluições seriadas, homogeneizando e transferindo 100 µl da primeira fileira até a sétima fileira, resultando nas

respectivas concentrações de: 5.000; 2.500; 1.250; 625; 312,5; 156,25 µg/ml. A oitava fileira de poços foi utilizada como controle da bactéria, contendo somente caldo BHI e suspensão bacteriana. A todos os poços foram adicionados 5 µl da suspensão de microrganismos padronizada, e em seguida a placa foi incubada a 37 °C durante 24 h e em microaerofilia. A concentração inibitória mínima foi determinada como sendo a menor concentração da fração capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Essa inibição foi confirmada pela adição de 20 µl de TTC (solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólico a 2%), facilitando a visualização por colorir de vermelho a suspensão nos poços com crescimento bacteriano. Em paralelo, realizou-se controle com clorexidina 2% (descrito em NCCLS, 2000 com algumas modificações).

4.11.4 Efeito do extrato na produção de ácidos

Semeou-se o microorganismo *Streptococcus mutans* (1 ml em 100 ml de Caldo Vermelho de Fenol contendo glucose 1% e o extrato). Foi incubado a 37 °C em microaerofilia e, em intervalos regulares de tempo, retirou-se 4 ml da cultura e mediu-se o pH em pHmetro (descrito por OOSHIMA et al., 2000 com algumas modificações).

5 RESULTADOS

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE

As plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas denominadas metabólitos secundários, sendo que alguns são produzidos em maior quantidade do que outros. A quantidade dessas substâncias pode variar de acordo com as condições climáticas e edáficas. Dessa forma, a qualidade da matéria-prima vegetal pode variar dependendo da sua procedência e período de coleta (VON POSER; MENTZ, 2004).

Sementes de guaraná, obtidas de lugares diferentes, foram analisadas quanto aos aspectos físico-químicos (perda por dessecação, teor de extrativos, teor de resíduo seco) e quanto ao teor de taninos totais e metilxantinas. Foram observadas variações tanto nos aspectos físico-químicos quanto nos teores de taninos e metilxantinas, demonstrando haver a necessidade de se realizar controle de qualidade (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004). Além disso, Ushirobira e colaboradores (2004) avaliaram o teor de taninos e metilxantinas em sementes cultivadas numa mesma região submetidas a diferentes métodos de secagem e demonstraram que estas sofreram severas variações.

As Farmacopéias e as monografias elaboradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizam os ensaios de qualidade de matérias-primas vegetais. Através delas verifica-se a identidade botânica do material juntamente com a pureza e caracterização dos constituintes químicos da espécie (FARIAS, 2004).

Algumas análises químicas preliminares foram realizadas para avaliar a presença dos constituintes químicos nas sementes de guaraná (Tab. 1). Essas análises foram realizadas com o intuito de comparar as sementes adquiridas para os testes biológicos deste trabalho (G2) com as sementes utilizadas por Ushirobira (2003) (G1), sendo que também foram adquiridas do mesmo local e do mesmo produtor.

Tabela 1 – Análise química preliminar comparativa de sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*.

Grupo químico	G1	G2
Taninos	+	+
Compostos antracênicos	+	+
Aromáticos simples	+	+
Metilxantinas	+	+
Saponinas	-	-

+ = presença do grupo químico; - = ausência do grupo químico.

Essa análise química e todos os testes de controle de qualidade seguintes realizados serviram de base para certificação deste trabalho, além de garantir que o estudo fosse com sementes equivalentes às utilizadas por Ushirobira (2003).

Com relação a perda por secagem (PPS), as sementes foram secas à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) com as sementes íntegras e secas e em pó. A estabilização no processo de secagem ocorreu após um mês, devido a alguns dias de chuva durante o período da análise. O valor médio da PPS foi de 1,38% para as sementes e de 0,75% para o pó. Este dado é importante no controle de fitoterápicos, pois se refere ao teor de umidade presente na droga vegetal. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar na degradação de constituintes químicos, além de facilitar a proliferação de fungos e bactérias (WHO, 1998b; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004; FARIAS, 2004).

Realizou-se também a perda por dessecação (PPD) do pó, pelo método gravimétrico em balança analítica. A planta foi dessecada com sistema de secagem por infravermelho obtendo-se o seguinte resultado: $9,57\% \pm 0,12$. Esta técnica consiste na determinação do percentual de material volatilizado (água e/ou substâncias voláteis) após a dessecação. O teor de umidade obtido encontra-se entre os valores estabelecidos nas diferentes farmacopéias, que varia entre 8 e 14%, com poucas exceções (CARDOSO, 2002; FARIAS, 2004).

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de substâncias extraíveis a partir de uma determinada quantidade de material vegetal (WHO, 1998b), empregando-se água como líquido extrator. Foram realizadas três determinações obtendo-se como resultado o valor médio de $26,30\% \pm 1,16$ (m/V).

A determinação do resíduo seco foi realizada a partir de uma solução extrativa obtida através de diferentes solventes. A acetona:água (7:3; v/v) foi a que apresentou o melhor rendimento 25,35%, enquanto que com etanol:água (1:1; v/v) obteve-se 24,69%.

A qualidade da solução extrativa é definida pelo solvente empregado na extração. Quando se utiliza a droga vegetal para fins de produção industrial, deve-se considerar quais as melhores condições para se obter uma extração produtiva dos constituintes químicos (SONAGLIO et al., 2004).

A avaliação da qualidade do guaraná foi complementada com análises quantitativas de alguns constituintes detectados na análise fitoquímica. Realizaram-se as determinações do teor de taninos e do teor de metilxantinas.

Para a determinação do teor de taninos obteve-se $5,47\% \pm 0,19$ de taninos totais. Ushirobira (2003) obteve $5,92\% \pm 0,24$. Esses valores encontram-se de acordo com os encontrados na literatura. De acordo com Henman (1982), as sementes devem conter de 4 a 6%.

O teor de metilxantinas obtido foi de $6,19\% \pm 0,08$, enquanto que Ushirobira (2003) obteve 6,07%. Estes valores encontram-se dentro do esperado quando comparados aos valores encontrados por Andrade (1996 e 1999) para amostras comerciais de guaraná (acima de 5%). Este doseamento foi realizado por espectrofotometria na região do UV a 271 nm. Segundo Andrade (1996 e 1999), esta técnica apresentou melhores resultados ao ser comparada ao método proposto pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1977).

Com a realização destas análises, confirmaram-se a qualidade e semelhança em teores de substâncias químicas características.

Utilizando os teores de taninos totais como referência, avaliou-se mensalmente o teor de taninos totais em sementes do guaraná armazenadas íntegras com moagem imediatamente antes da análise e moídas no tempo zero. As sementes foram armazenadas em barriletes de papelão. Para análise do teor de taninos (Tab. 2) as sementes íntegras foram moídas no momento do doseamento, em moinho de martelos. Para efeitos de comparação, as sementes do mesmo lote, foram moídas no início do experimento e armazenadas em barriletes de papelão (Tab. 3), considerando-se este como o tempo zero do experimento. O doseamento de taninos totais foi realizado utilizando o pó-de-pele como fonte de proteína e a leitura à 691 nm realizada através de espectrofotômetro UV/VIS Varian Cary 1, de acordo com Glasl (1983).

Tabela 2 – Taninos totais de sementes armazenadas de forma íntegra e moídas no dia anterior ao doseamento.

Mês	média \pm dp	CV%
Junho/2005	5,19 \pm 0,08	1,51
Julho	4,93 \pm 0,08	1,59
Agosto	4,92 \pm 0,08	1,53
Setembro	4,35 \pm 0,06	1,37
Outubro	4,98 \pm 0,12	2,45
Novembro	5,48 \pm 0,02	0,42
Dezembro	4,70 \pm 0,06	1,20
Janeiro/2006	5,54 \pm 0,05	0,82
Fevereiro	4,92 \pm 0,10	2,01
Março	4,70 \pm 0,04	0,85
Abril	5,60 \pm 0,06	0,98
Maiο	5,48 \pm 0,16	2,96
Junho	5,09 \pm 0,08	1,54

Tabela 3 – Taninos totais de sementes armazenadas moídas em junho de 2005.

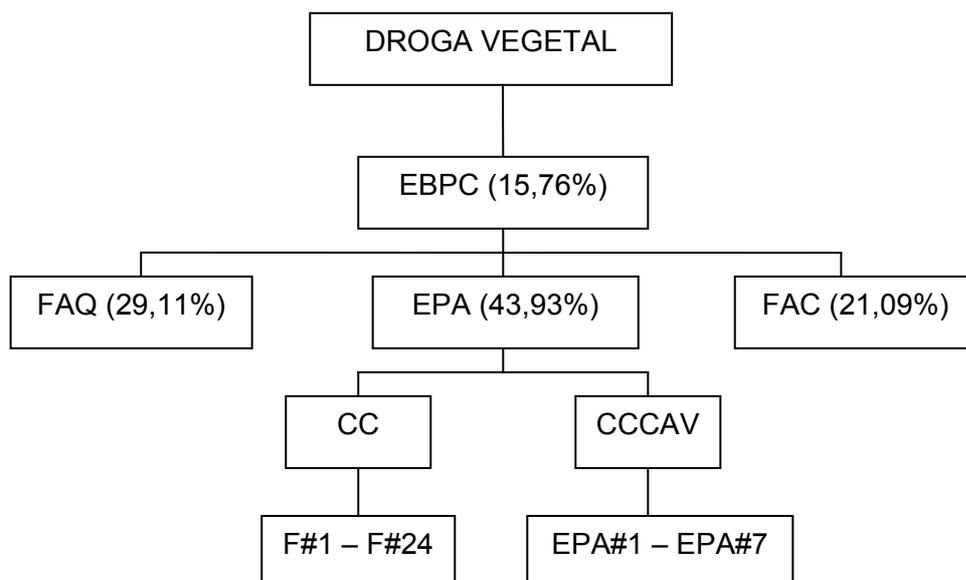
Mês	média ± dp	CV%
Junho/2005	5,19 ± 0,08	1,51
Julho	4,71 ± 0,07	1,47
Agosto	4,99 ± 0,05	1,08
Setembro	4,61 ± 0,05	1,17
Outubro	5,05 ± 0,14	2,83
Novembro	4,87 ± 0,01	0,24
Dezembro	4,35 ± 0,08	1,89
Janeiro/2006	5,27 ± 0,02	0,35
Fevereiro	5,33 ± 0,13	2,34
Março	4,86 ± 0,01	0,17
Abril	4,83 ± 0,12	2,49
Maiο	5,00 ± 0,12	2,32
Junho	5,33 ± 0,12	2,26

Estes resultados foram submetidos a uma análise estatística de variância (programa SAS), em nível de 5% de significância. Obteve-se p-valor = 0,3872, já que p-valor > 0,05 (0,3872 > 0,05), pode-se afirmar com 95% de confiança que não há diferença no modo de armazenamento das sementes de guaraná. Sendo assim, os doseamentos realizados demonstraram que a forma de armazenamento pareceu não influir no teor total de taninos ao longo de certo tempo (12 meses).

5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

Para a extração, optou-se pela turbo-extração, que se baseia na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, devido às forças de cisalhamento. O processo favorece a rápida dissolução das substâncias ativas tornando o método eficiente (VOIGT, 1993), à qual se soma simplicidade, rapidez e versatilidade, que permitem a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Utilizou-se para isto o Ultraturax® UTC115KT.

Após o preparo do EBPC, o mesmo foi filtrado, concentrado e liofilizado, apresentando um rendimento médio de 15,76%. Obtiveram-se posteriormente duas frações semipurificadas: FAQ e EPA (Patente requerida pela UEM; INPI#PI0006638-9), e um resíduo insolúvel (FAC). O rendimento obtido, a partir de 100 g de EBPC, foi de 43,93 g de EPA, 29,11 g de FAQ e 21,09 g de FAC (Flux. 1) (USHIROBIRA, 2003).



Fluxograma 1 – Preparação de extratos e fracionamento cromatográfico da fração semipurificada EPA.

5.2.1 Cromatografia em coluna de EPA

A partir de EPA realizou-se o processo de isolamento e identificação de compostos fenólicos presentes nas sementes de guaraná – *Paullinia cupana* var *sorbilis*. Empregaram-se 15 g de EPA em cromatografia em coluna de Sephadex® LH-20, utilizando-se o sistema eluente descrito na seção 4.5.1 (p. 53) (THOMPSON et al., 1972; NONAKA; MORIMOTO; NISHIOKA, 1983; MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996; TOLEDO, 2002; USHIROBIRA, 2003).

Através do monitoramento da coluna por CCD (seção 4.5.2, p. 54), obtiveram-se 24 subfrações (F#1 à F#24), que foram reunidas por semelhança sob luz UV a 254 nm. Após a eliminação do solvente orgânico sob pressão reduzida, foram liofilizadas e procedeu-se novamente à CCD das subfrações, para a visualização do comportamento das mesmas (Fig. 12). Os rendimentos de cada subfração (F#1 à F#24) foram calculados e encontram-se na tabela 4 (USHIROBIRA, 2003).

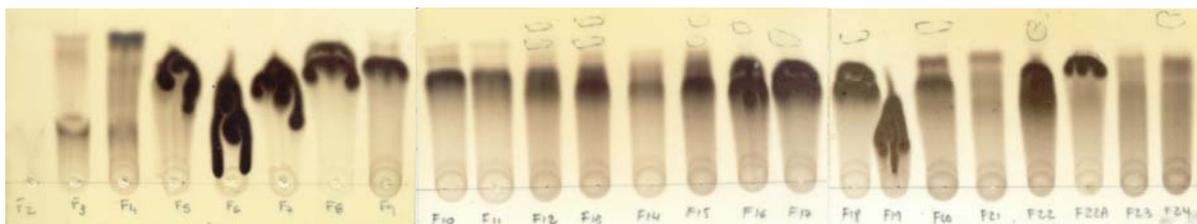


Figura 12 – Cromatograma das 24 subfrações de EPA por CC.

Tabela 4 – Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA por CC.

Fração	Eluente (v/v)	Quantidade (g)	Rendimento (%)
F#1	Etanol:água (1:1)	0,2724	1,82
F#2	Etanol:água (1:1)	3,4668	23,11
F#3	Etanol:água (1:1)	0,0768	0,50
F#4	Etanol:água (1:1)	0,0217	0,15
F#5	Etanol:água (1:1)	0,5027	3,35
F#6	Etanol:água (1:1)	4,4436	29,62
F#7	Etanol:água (1:1)	1,1023	7,35
F#8	Etanol:água (1:1)	0,3682	2,45
F#9	Etanol:água (1:1)	0,3249	2,17
F#10	Etanol:água (1:1)	0,0925	0,60
F#11	Etanol:água (1:1)	0,0597	0,40
F#12	Etanol:água (1:1)	0,0428	0,30
F#13	Etanol:água (1:1)	0,0725	0,50
F#14	Etanol:água (1:1)	0,0339	0,20
F#15	Etanol:água (1:1)	0,0634	0,40
F#16	Etanol:água (1:1)	0,2835	1,89
F#17	Etanol:água (1:1)	0,3129	2,09
F#18	Etanol:água (1:1)	0,4652	3,10
F#19	Etanol:água (1:1)	0,5583	3,70
F#20	Etanol:água (1:1)	0,0994	0,60
F#21	Etanol:água (1:1)	0,1058	0,70
F#22	Etanol	0,1445	0,90
F#22-A	Etanol	0,1348	0,89
F#23	Metanol	0,2172	1,45
F#24	Acetona	0,0751	0,50
Total		13,3409	88,74

Ushirobira (2003) refracionou as subfrações F#1 a F#9, das quais foram isoladas as seguintes substâncias: cafeína (substância I), epicatequina (substância II), catequina (substância III), epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B₂ - substância IV), catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B₃ - substância V) e catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B₄ - substância VI).

Neste trabalho, foram refracionadas as subfrações de F#10 a F#14. As subfrações F#10.5 e F#13.10 obtidas também foram refracionadas.

As subfrações F#10.5.4, F#11.5, F#11.9, F#11.10, F#12.4, F#12.9, F#13.10.4 e F#14.6 foram derivatizadas quimicamente e submetidas a análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY).

5.2.2 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade de EPA

A fração EPA foi submetida diretamente a cromatografia de contra corrente de alta velocidade (CCCAV; seção 4.5.4, p. 54).

Através do monitoramento da coluna por CCD (seção 4.5.2, p. 54), obtiveram-se 7 subfrações (EPA#1 à EPA#7), que foram reunidas por semelhança sob luz UV a 254 nm. Após a eliminação do solvente orgânico sob pressão reduzida, foram liofilizadas e procedeu-se novamente à CCD das subfrações, para a visualização do comportamento das mesmas (Fig. 13). Os rendimentos de cada subfração (EPA#1 à EPA#7) foram calculados e encontram-se na tabela 5.

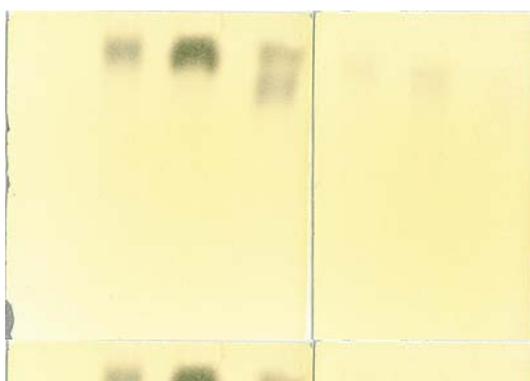


Figura 13 – Cromatograma das 7 subfrações de EPA por CCCAV.

Tabela 5 – Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA por CCCAV.

Fração	Quantidade (mg)	Rendimento (%)
EPA#1	-	
EPA#2	58,8	5,88
EPA#3	361,8	36,18
EPA#4	71,0	7,10
EPA#5	80,1	8,01
EPA#6	190,4	19,04
EPA#7	71,5	7,15
Total	833,6	83,36

As subfrações EPA#2, EPA#3 e EPA#5 foram derivatizadas quimicamente. As subfrações EPA#4 e EPA#6 foram refracionadas. As subfrações EPA#4.4, EPA#4.7,

EPA#4.12, EPA#4.13, EPA#4.14, EPA#6.4 e EPA#6.7 obtidas foram derivatizadas quimicamente e submetidas a análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY).

5.2.3 Substâncias Isoladas

5.2.3.1 Proantocianidinas diméricas

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 utilizam a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações tipo 4→6 é na proporção 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; SCHAUMBURG, 1981).

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

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de ^1H RMN, até a configuração absoluta deixa-se “transparecer” através do C-4(C) da ligação entre as unidades interflavan, quando a unidade superior for do tipo catequina (2*R*, 3*S*). Isso é devido ao fato dessa 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).

O método apropriado para determinar a configuração absoluta de C-4 é através do dicroísmo circular (CD). Thompson e colaboradores (1972) indicaram a medida em CD de procianidinas diméricas significativamente pelo efeito “cotton” em 275 nm. Procianidinas diméricas com configuração 4*S* mostram-se através de um efeito negativo, enquanto que substâncias 4*R*, uma curva espelhada (efeito positivo). É possível, ainda, utilizar outro

comprimento de onda para fazer a diferenciação, como na região entre 220-240 nm (MELLO, 1995).

5.2.3.2 **Substância I – Catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B₃)**

Cerca de 6 mg de um total de 10 mg da subfração F#10.5.4 foram derivatizadas (seção 4.6, p. 55), analisadas por RMN e então denominada de **substância I**.

A **substância I** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ = 1021,3 característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

Para a **substância I**, o espectro de ¹H RMN em CDCl₃ (Fig. 14) forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Esse espectro assemelha-se ao espectro de 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada, com exceção aos hidrogênios da região aromática e aqueles correspondentes à metoxila (-OCH₃) (MELLO et al., 1999; TOLEDO, 2002). Esta substância já foi isolada por Ushirobira (2003) e seu espectro correlaciona-se com este. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 – Dados de ^1H RMN da **substância I** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (F)	2,66	2,66	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 7,8$
H-4 _{eq} (F)	2,93	2,93	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,8$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 5,7$
H-4 (C)	4,48	4,48	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 9,3$
H-2 (C)	4,76	4,76	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 9,9$
H-2 (F)	4,95	4,95	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 8,1$
H-3 (F)	5,05	5,03	<i>m</i>	
H-3 (C)	5,63	5,63	<i>t**</i>	$\Sigma J = 19,5$
H-6 (A)	6,48	6,48	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-8 (A)	6,51	6,51	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-6 (D)	6,65	6,64	<i>s</i>	
H-6' (E)	6,72	6,71-7,15	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$
H-2' (E)	6,93	6,71-7,15	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-6' (B)	6,99	6,71-7,15	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$
H-2' (B)	7,02	6,71-7,15	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-5' (E)	7,13	6,71-7,15	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,1$
H-5' (B)	7,14	6,71-7,15	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$

*Petereit (1992); **pseudo-triplete (teoricamente *dd*).

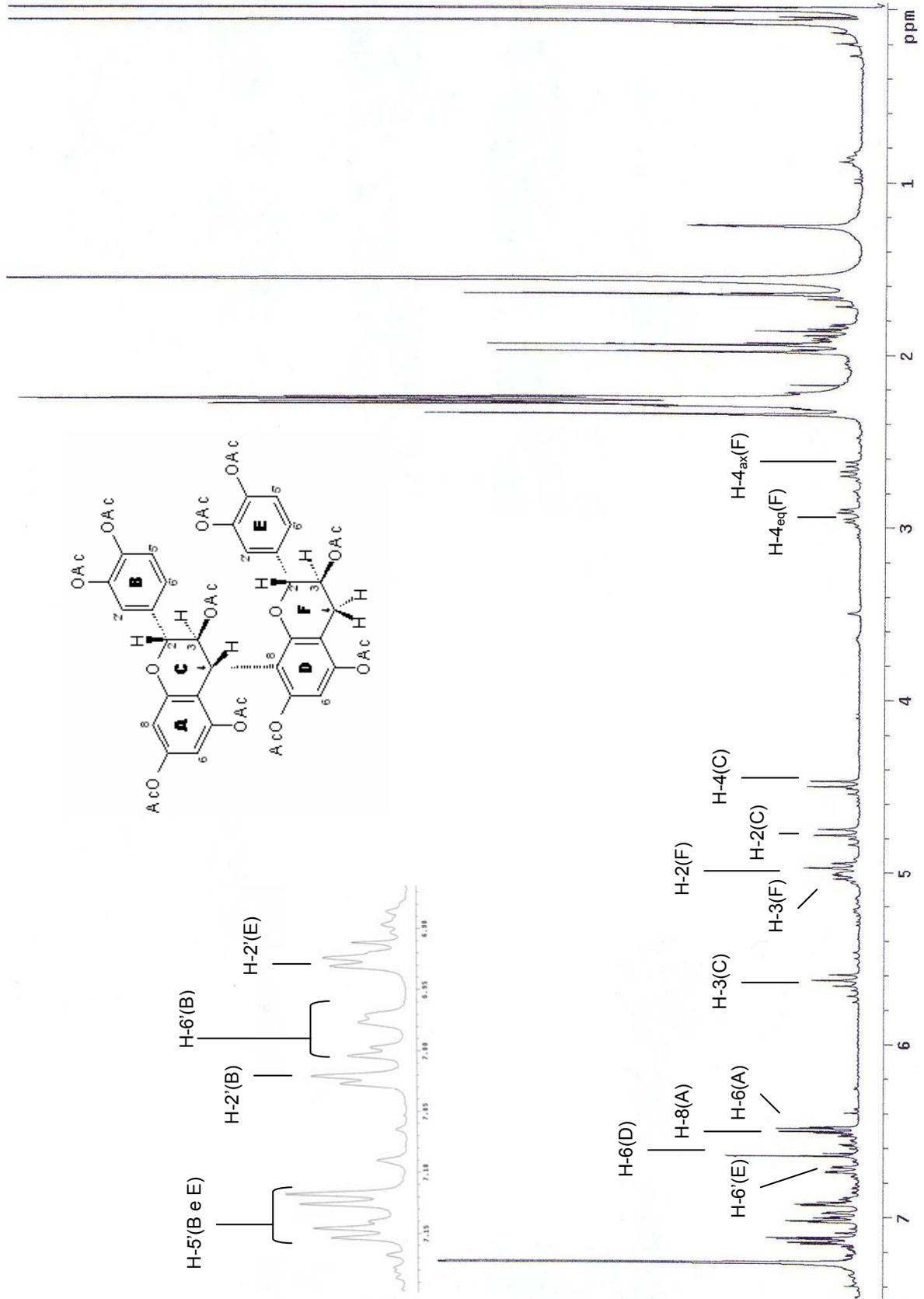


Figura 14 – Espectro de RMN ¹H da substância I (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F), sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 2,66 e 2,93 ppm, respectivamente. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,48 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é grande de $J_{H_3-H_4} = 9,3$ Hz. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante de 9,9 Hz. Esses dados referentes aos hidrogênios alifáticos da unidade superior estabelecem uma configuração do tipo 2,3-*trans*, 3,4-*trans*.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,05 e 4,95 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento grande, confirmando a configuração 2,3- *trans* e 3,4- *trans*, também para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY – Fig. 15), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos são visíveis. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos, catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios através do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) (Fig. 15).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 6,48 e 6,51 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H_6-H_8} = 2,4$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,65 ppm, apresenta-se como um singlete. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), os deslocamentos dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4S. No entanto, pelo fato da configuração relativa da unidade superior ser do tipo 3,4-*trans* e uma configuração absoluta 2*R*,3*S*, existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4 β ou 4 α .

Para facilitar a interpretação do tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, Hör e colaboradores (1995) afirmam que o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4 \rightarrow 8), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 4,95, obedecendo essa regra. Soma-se a isso o dado da proporção dos rotâmeros, com uma conformação dominante, característica de ligação do tipo (4 \rightarrow 8). Dessa forma, a **substância I** possui uma configuração do tipo 2*R*,3*S* e 2*R'*,3*S'*, para as unidades superior e inferior, respectivamente. A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada com a determinação através de dicroísmo celular. Entretanto, Petereit (1992) isolou e identificou essa mesma substância com dados de dicroísmo celular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância I**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₃ (Fig. 16), **catequina-(4 α \rightarrow 8)-catequina**.

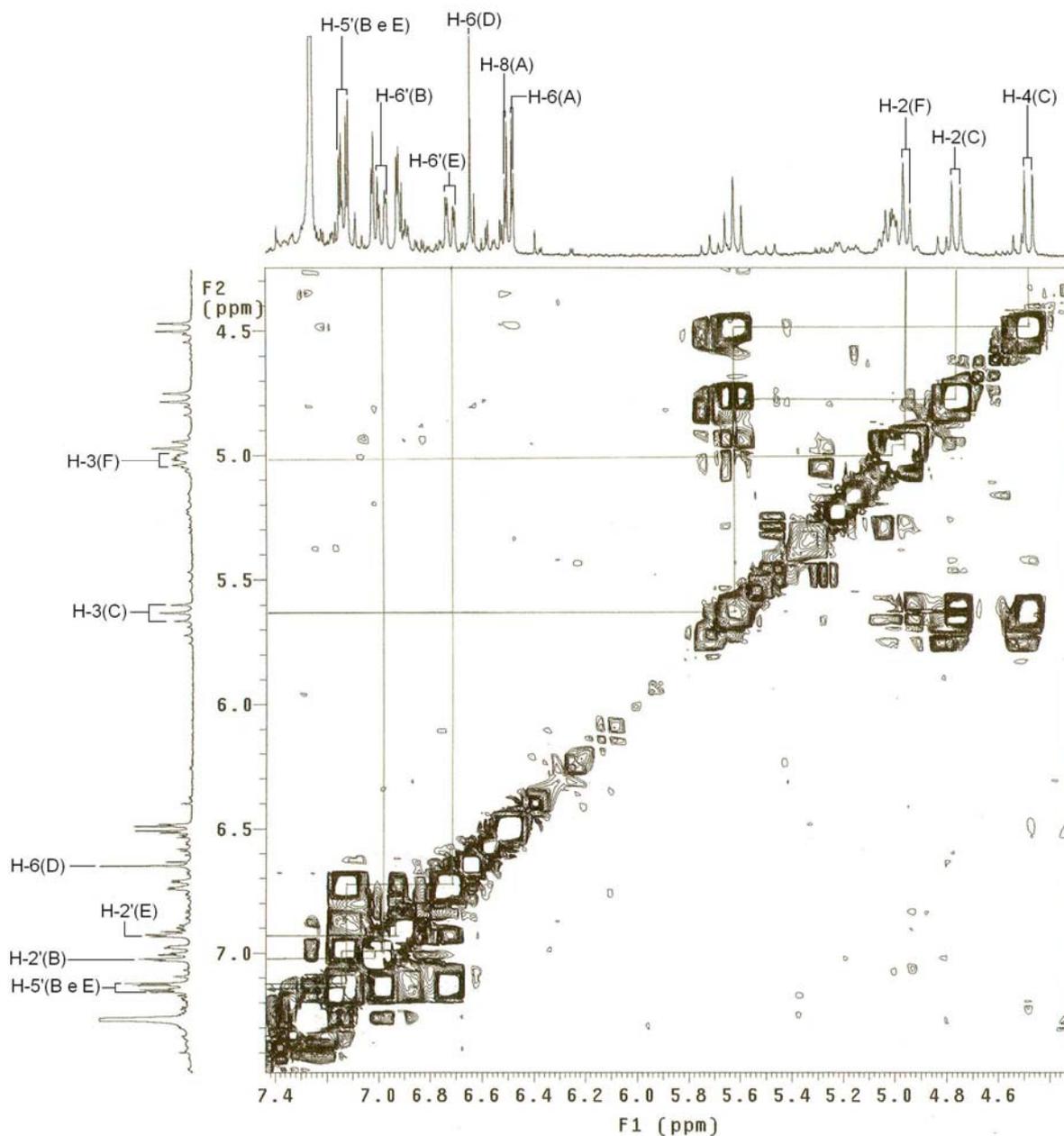


Figura 15 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância I** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -31,5^\circ$ (metanol; $c = 1,43$).

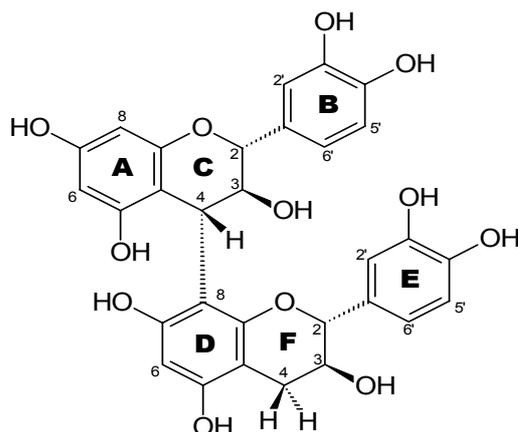


Figura 16 – Estrutura da **substância I**, catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B₃).

5.2.3.3 **Substância II - Catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B₄)**

Cerca de 15 mg de um total de 36,5 mg das subfrações F#10.5.3, F#11.5, F#12.4 e 4,0 mg de 4,5 mg de EPA#4.7 foram derivatizadas (seção 4.6, p. 55), analisadas por RMN e então denominada de **substância II**.

A **substância II** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ = 1021,3 característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

Para a **substância II**, o espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (Fig. 17) forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Esta substância já foi isolada por Ushirobira (2003) e seu espectro correlaciona-se com este. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7 – Dados de ^1H RMN da **substância II** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (F)	2,76	2 x 2,91	<i>m</i>	
H-4 _{eq} (F)	3,02	2 x 2,91	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 18,0$ $^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 4,8$
H-4 (C)	4,53	4,52	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 9,6$
H-2 (C)	4,82	4,85	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 9,9$
H-2 (F)	5,01	5,01	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (F)	5,22	5,18	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-3 (C)	5,72	5,67	<i>t**</i>	$\Sigma J = 19,8$
H-6 (A)	6,53	6,52	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-8 (A)	6,58	6,55	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-6 (D)	6,63	6,60	<i>s</i>	
H-2' (E)	6,85	6,85-7,30	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$
H-6' (B e E)	6,88-6,93	6,85-7,30	<i>m</i>	
H-2' (B)	6,97	6,85-7,30	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-5' (E)	7,10	6,85-7,30	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$
H-5' (B)	7,15	6,85-7,30	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$

*Ueffing (1988); **pseudo-triplete (teoricamente *dd*).

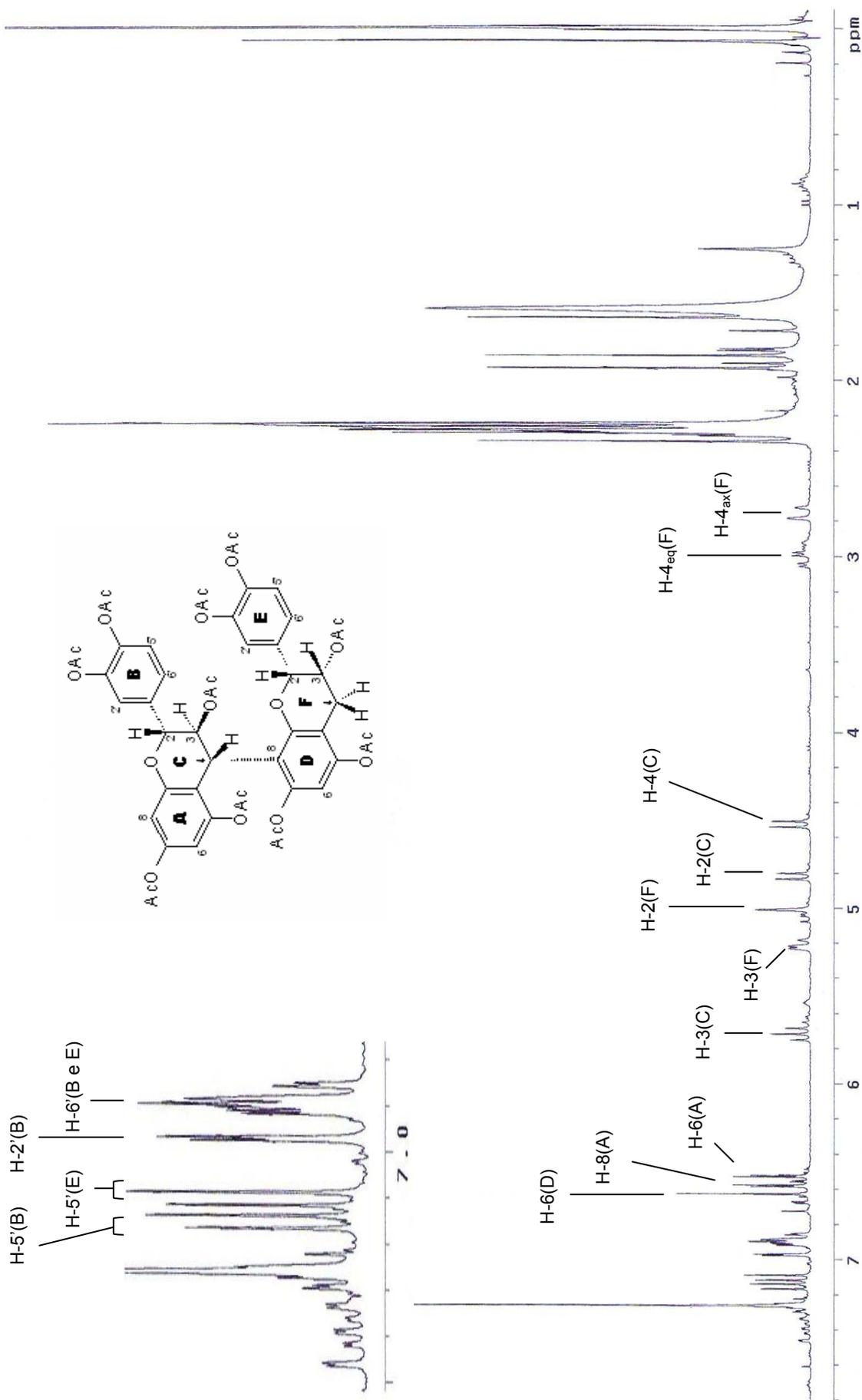


Figura 17 – Espectro de RMN ¹H da substância II (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F), sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 2,76 e 3,02 ppm, respectivamente. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,53 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é grande de $J_{H_3-H_4} = 9,6$ Hz. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante de 9,9 Hz. Esses dados referentes aos hidrogênios alifáticos da unidade superior estabelecem uma configuração do tipo 2,3-*trans*, 3,4-*trans*.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,22 e 5,01 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* e 3,4-*cis*, para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY – Fig. 18), pode-se observar a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos, catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de quase todos os hidrogênios, com exceção do H-6' da unidade inferior e H-6' da unidade superior, através do espectro de COSY ($^1H/^1H$) (Fig. 18). Assim, apesar das dificuldades encontradas, foi possível estabelecer a correlação entre o H-2(C) com H-2'(B), através do espectro de COSY ($^1H/^1H$) (Fig. 18), bem como estabelecer o valor de 8,4 Hz para a constante de acoplamento dos hidrogênios H-6' com H-5' (*meta*-acoplamento) dos anéis B e E, sem ter sido possível estabelecer a ordem.

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 6,53 e 6,58 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H_6-H_8} = 2,4$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,63 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), o deslocamento dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4S. No entanto, pelo fato da configuração relativa da unidade superior ser do tipo 3,4-*trans* e uma configuração absoluta 2R,3S, existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4 β ou 4 α .

Como observado na **substância II**, o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4 \rightarrow 8) (HÖR et al., 1995), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 5,01. Dessa forma, a **substância II** possui uma configuração do tipo 2R,3S e 2R',3R', para as unidades superior e inferior, respectivamente. A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada com a determinação através de dicroísmo celular. Entretanto, Ueffing (1988) já isolou e identificou essa mesma substância, a partir de *Tilia* sp., com dados de dicroísmo celular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância II**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₄ (Fig. 19), **catequina-(4 α \rightarrow 8)-epicatequina**.

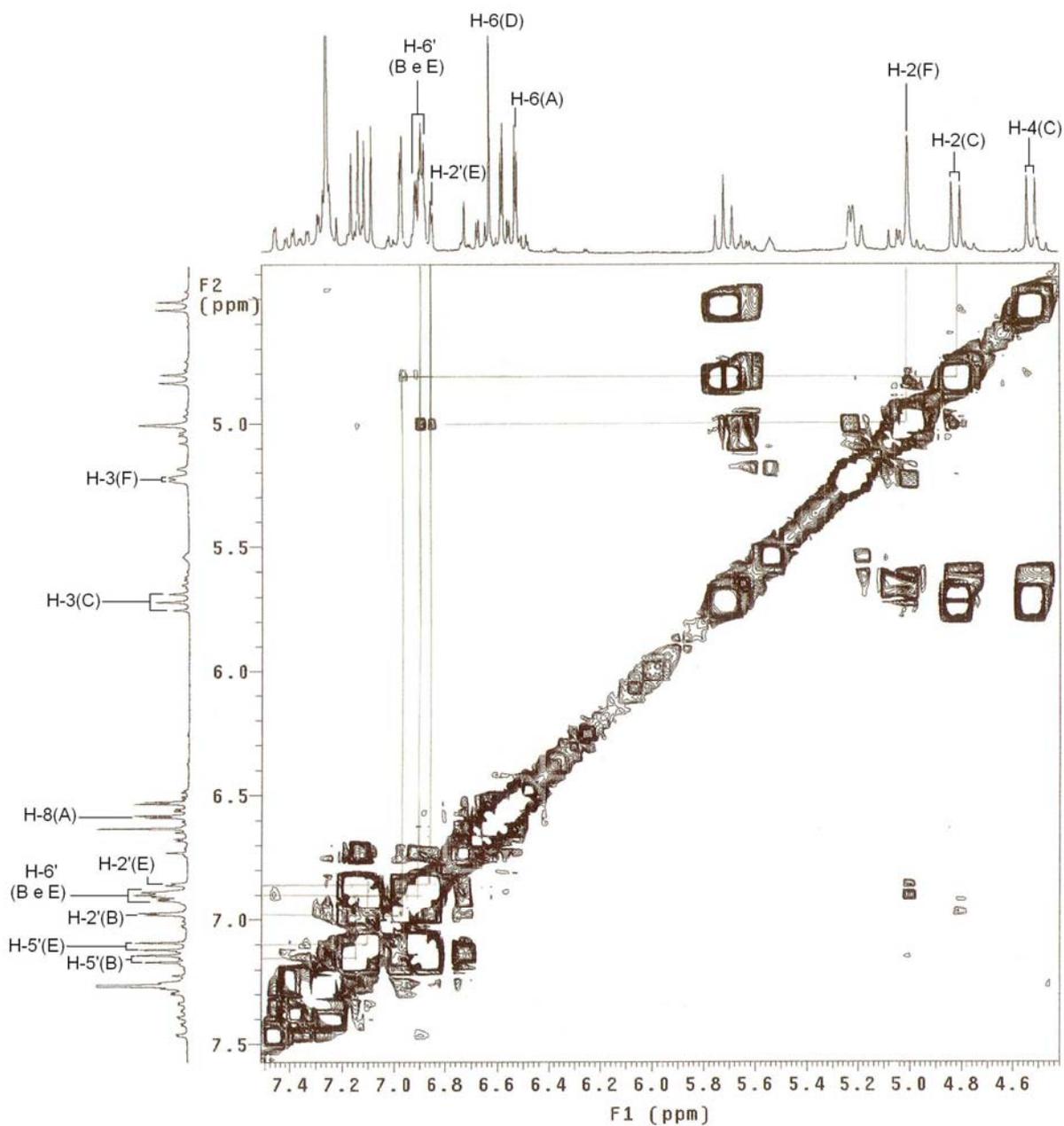


Figura 18 – Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância II** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -16,8^\circ$ (metanol; $c = 1,43$).

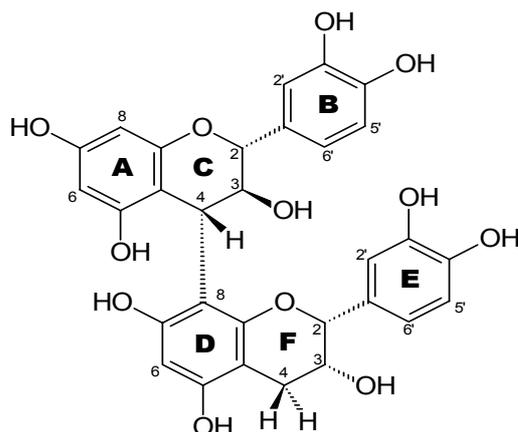


Figura 19 – Estrutura da **substância II**, catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B₄).

5.2.3.4 **Substância III** – Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina C₁)

Cerca de 14 mg de um total de 27,7 mg das subfrações F#11.9, F#11.10, F#12.9 foram derivatizadas (seção 4.6, p. 55) e analisadas por RMN. Após análise dos espectros de RMN ¹H, as subfrações foram reunidas e submetidas a CCDP (seção 4.5.6, p. 55), obtendo-se a subfração F#11.9.2. Esta subfração, bem como as subfrações F#14.6 (7 mg acetilados de 8,2 mg) e EPA#6.7 (4,9 mg acetilados de 5,9 mg) foram analisadas por RMN e então denominadas de **substância III**.

O espectro de ¹H RMN em CDCl₃ (Fig. 20) correlaciona-se com o espectro obtido por Ueffing (1988). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 – Dados de ^1H RMN da **substância III** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (I)	2,93-3,11	2 x 2,88–3,11	<i>m</i>	
H-4 (C)	4,65	4,65	<i>s</i>	
H-4 (F)	4,70	4,71	<i>s</i>	
H-2 (F)	4,78	4,82	<i>s</i>	
H-3 (C)	5,12	5,09	<i>m</i>	
H-2 (I)	5,21	5,16	<i>s</i>	
H-2 (C)	5,36	5,40	<i>s</i>	
H-3 (F)	5,40	5,44	<i>m</i>	
H-3 (I)	5,48	5,48	<i>m</i>	
H-6 (A)	5,94	5,95	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-8 (A)	6,26	6,21	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-6 (D)	6,65	6,62	<i>s</i>	
H-6 (G)	6,71	6,72	<i>s</i>	
H-(B, E e H)	6,65-7,30	7,11-7,40	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 10,5$

*Ueffing (1988); **parcialmente encoberto pelo CDCl_3 .

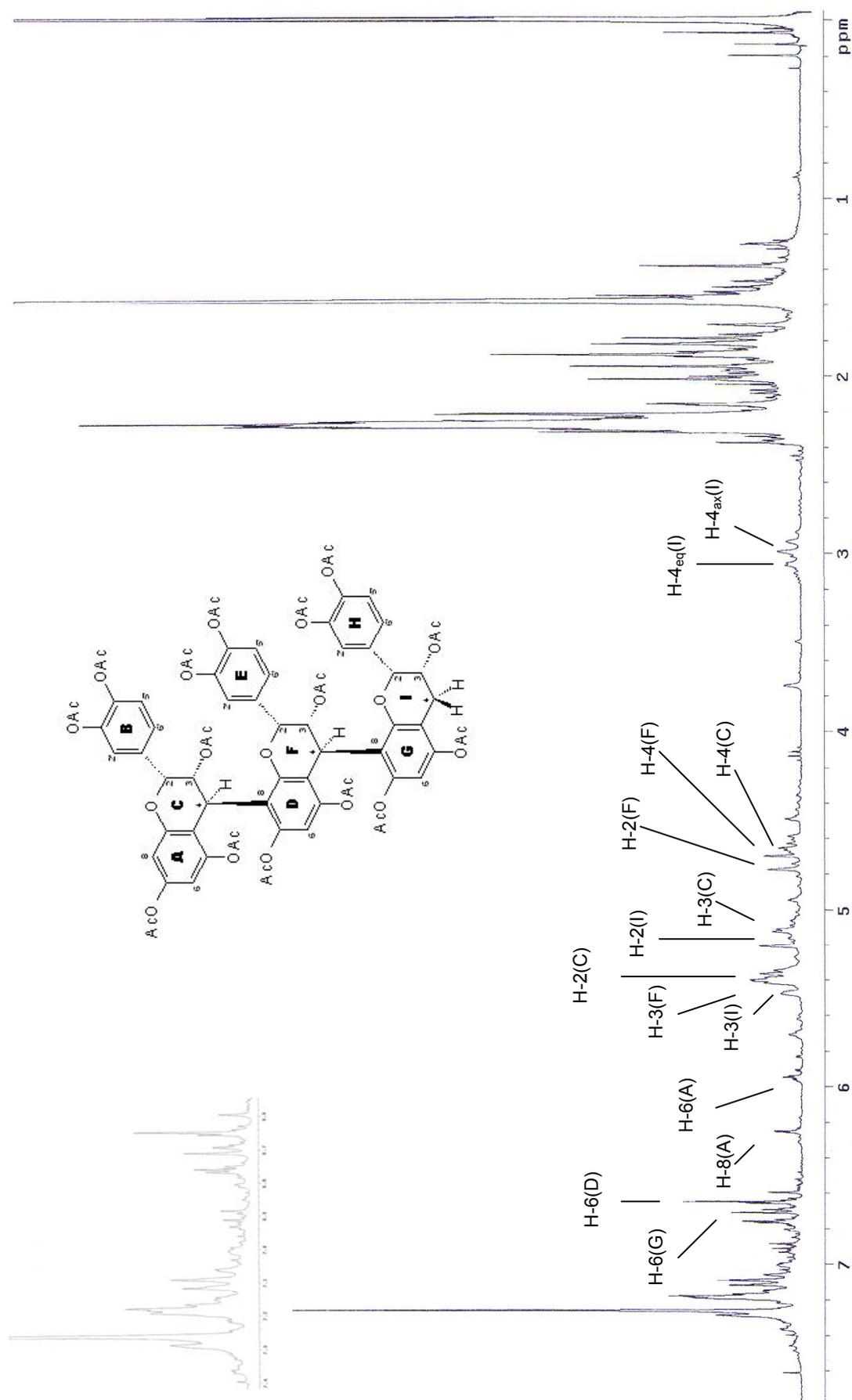


Figura 20 – Espectro de RMN ¹H da substância III (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(I)], sendo que se apresentam como multipletos, entre δ 2,93-3,11 ppm. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,65 ppm. O hidrogênio H-4(F) apresenta-se em δ 4,70 ppm como um singletos. Os hidrogênios H-2(F), H-2(I) e H-2(C) apresentam-se como singletos em δ 4,78, 5,21 e 5,36, respectivamente.

Os hidrogênios H-3(C), H-3(F) e H-3(I) apresentam-se como multipletos com deslocamentos em δ 5,12, 5,40 e 5,48 ppm, respectivamente.

No espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY – Fig. 21), foi possível fazer a correlação de todos os hidrogênios alifáticos citados anteriormente. A constante de acoplamento de todos os hidrogênios alifáticos foi inferior a 2 Hz, estabelecendo-se uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* nos anéis C, F e I de acordo com Weinges e colaboradores (1968). Porém, com relação aos hidrogênios da região aromática, não foi possível fazer uma correlação satisfatória entre os três sistemas do tipo AMX. (Fig. 21).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 5,94 e 6,26 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{\text{H6-H8}}=2,4$ Hz, enquanto que os hidrogênios H-6(D) e H-6(G), em δ 6,65 e 6,71 ppm, respectivamente, apresentam-se como singletos.

Ueffing (1988) isolou e identificou a substância epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina peracetato de *Tilia* sp. (Tiliaceae), e os dados de RMN ^1H são totalmente coincidentes. Além disso, Ueffing (1988) demonstrou através de dados de dicroísmo circular que as ligações entre as unidades eram todas do tipo β . Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância III**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina C₁ (Fig. 22), **epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina**.

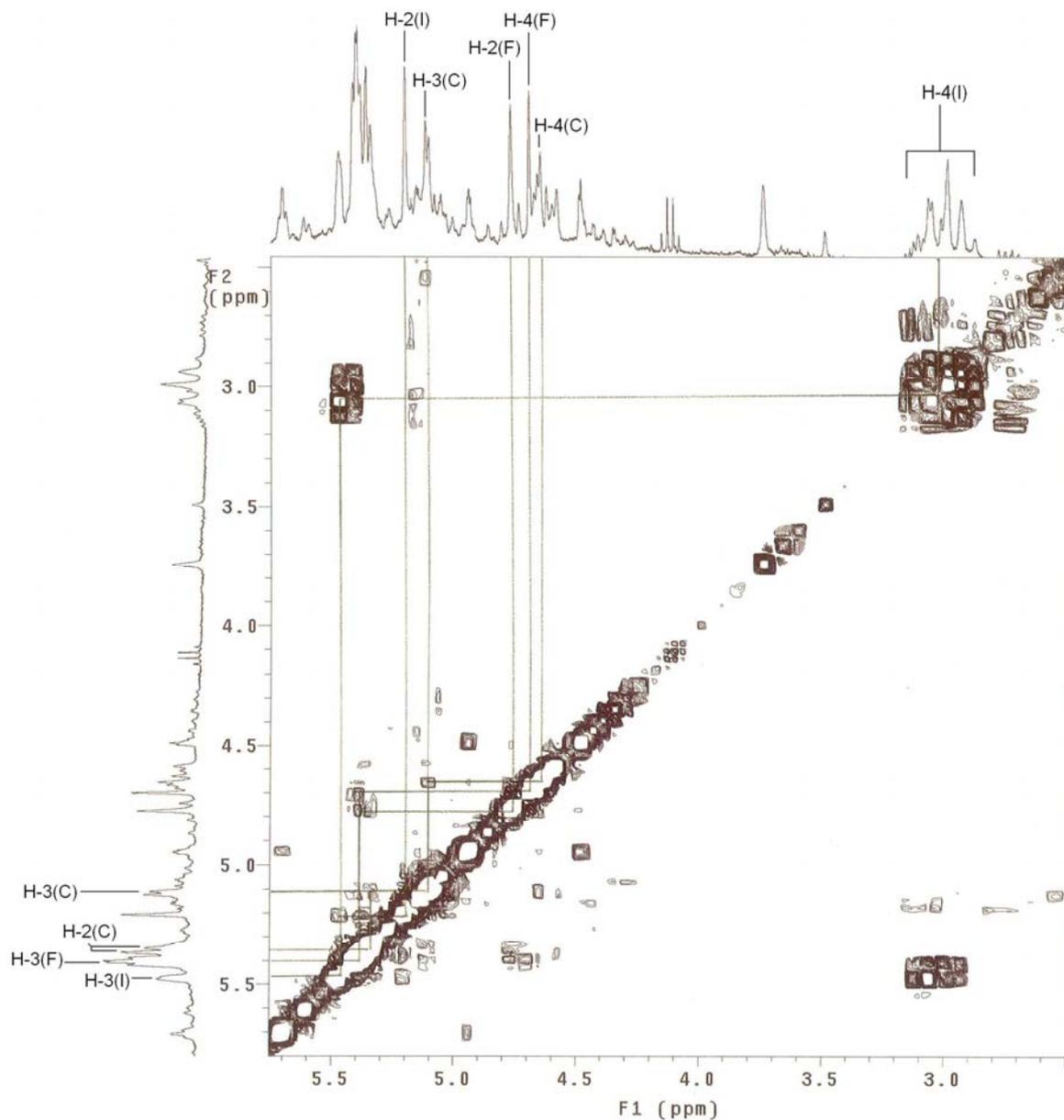


Figura 21 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância III** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

A estereoquímica absoluta da substância derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +5,81^\circ$ (metanol; $c = 3,1$).

Contudo, para uma identificação precisa, serão realizados espectrometria de massas e dicroísmo circular desta substância. Dessa maneira, poder-se-á estabelecer a configuração absoluta da substância, como tendo configuração do tipo $2R,3R$ ou $2R,3S$.

Esta substância já foi isolada de diversas fontes naturais, entretanto esta é a primeira vez que é descrita para o gênero *Paullinia*.

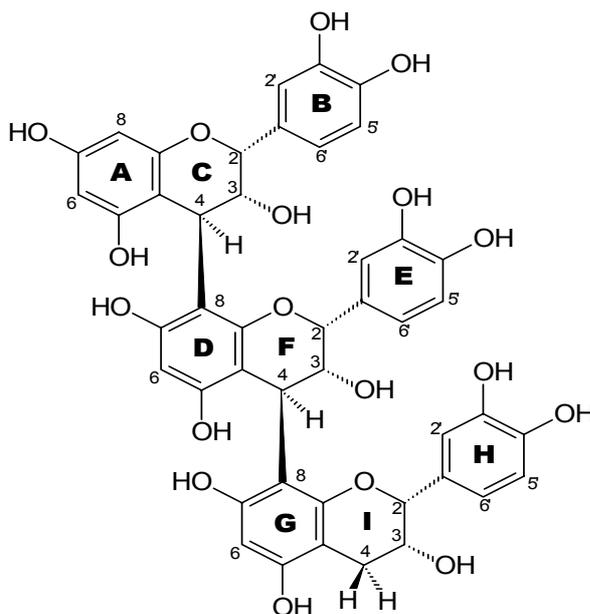


Figura 22 – Estrutura da **substância III**, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina C₁).

5.2.3.5 Substância IV e V – Catequina e epicatequina

Cerca de 30 mg de um total de 361,8 mg da subfração EPA#3 foram derivatizados (seção 4.6, p. 55) e denominados como uma mistura das **substâncias IV** e **V**. Estas substâncias também já foram isoladas por Ushirobira (2003).

O espectro de ¹H RMN em CDCl₃ obtido (Fig. 23) corresponde aos sinais das duas substâncias obtidas por Ushirobira (2003) e Rocha (2005).

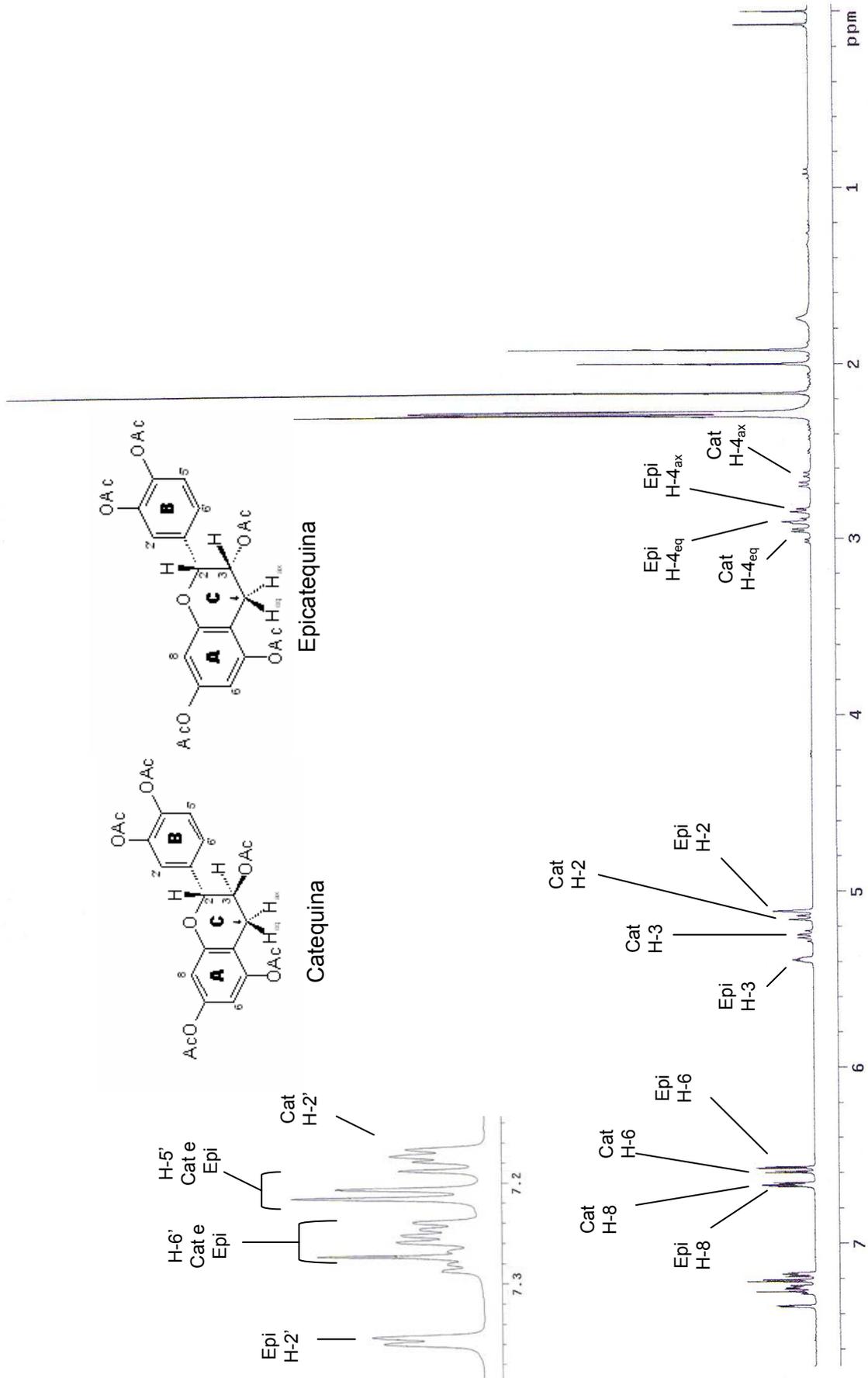


Figura 23 – Espectro de RMN ¹H das substâncias IV e V (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

5.2.3.5.1 Substância IV - Catequina

O espectro de ^1H RMN mostra, para a **substância IV**, para os hidrogênios alifáticos H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) deslocamentos de δ 2,66 e 2,98 ppm, respectivamente e uma constante de acoplamento de 16,8 Hz. O hidrogênio alifático H-3(C) se correlaciona com os hidrogênios H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) apresentando constantes de acoplamento com valor de 6,3 e de 4,2 Hz, respectivamente, indicando uma configuração relativa 3,4_{ax}-*trans* e 3,4_{eq}-*cis*. Para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) o espectro mostra deslocamentos de δ 5,25 e 5,15 ppm, respectivamente e uma constante de acoplamento $J_{\text{H-2-H-3}}$ de 6,3 Hz comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* (WEINGES et al., 1969). Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância IV** do tipo 2,3-*trans*, 3,4_{ax}-*trans* e 3,4_{eq}-*cis*.

Entre δ 7,16 e 7,29 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-5' e H-6', enquanto que em δ 7,17 ppm encontra-se o H-2' da **substância IV**, comprovando a di-hidroilação no anel B. Nesse espectro observam-se também, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) em δ 6,59 e 6,66 ppm. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observadas na tabela 9. O espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) (Fig. 24) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância IV**. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e aos da literatura, pode-se afirmar que a **substância IV** trata-se da **catequina**.

Tabela 9 – Dados de ^1H RMN da **substância IV** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (C)	2,66	2,66	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,8$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 6,3$
H-4 _{eq} (C)	2,98	2,87	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 17,7$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 4,2$
H-2 (C)	5,15	5,15	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 6,3$
H-3 (C)	5,25	5,25	<i>m</i>	
H-6 (A)	6,59	6,59	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,66	6,66	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-2' (B)	7,17	7,28	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-5' e 6' (B)	7,17-7,29	7,28	<i>m</i>	

*Rocha (2005)

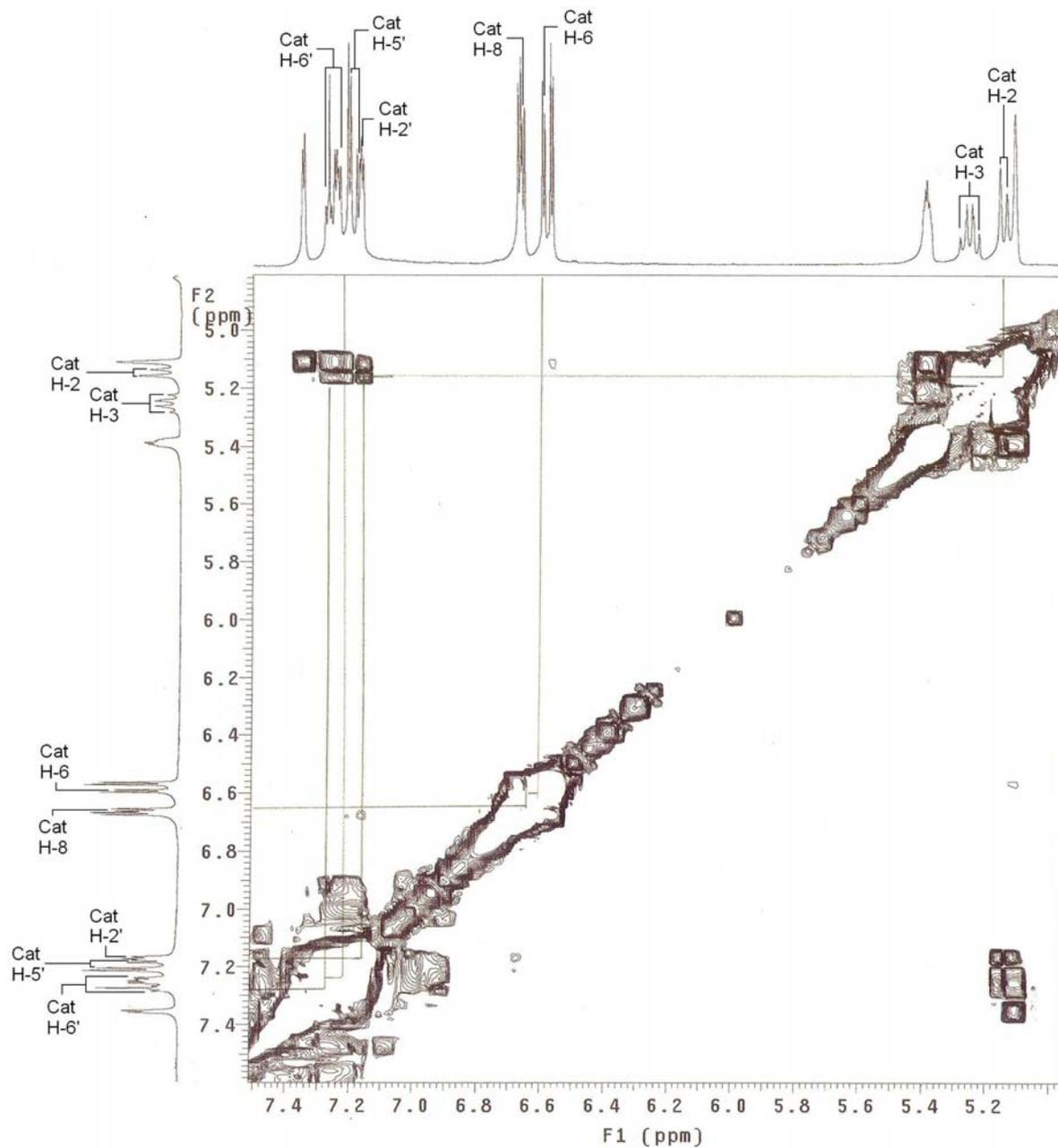


Figura 24 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância IV** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

5.2.3.5.2 Substância V - Epicatequina

O espectro de ^1H RMN mostra, para a **substância V**, para os hidrogênios alifáticos H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) deslocamentos de δ 2,84 e 2,90 ppm, respectivamente. O hidrogênio alifático H-3(C) se correlaciona com os hidrogênios H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) apresentando constantes de acoplamento com valor de 2,1 e 5,1 Hz, respectivamente, indicando uma configuração relativa 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) o espectro mostra deslocamentos de δ 5,38 e 5,11 ppm, respectivamente e 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). Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância V** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges e colaboradores (1968 e 1969) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2(C) e H-3(C), com aproximadamente 6 a 8 Hz demonstram uma configuração relativa *trans* e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 2 Hz a ordem *cis* para os hidrogênios H-2(C) e H-3(C).

Entre δ 7,19 e 7,36 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', comprovando a di-hidroxilação no anel B, sendo que em δ 7,36 ppm encontra-se o H-2'. Nesse espectro observam-se também, os prótons H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 6,57 e 6,67 ppm. Esses hidrogênios, quando em solução, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro, desde que a substância se encontre com as hidroxilas livres, não sendo o caso da **substância V** que se encontra derivatizada por acetilação (PETEREIT, 1992). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observadas na tabela 10.

O espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) (Fig. 25) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância V**. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e aos da literatura, pode-se afirmar que a **substância V** trata-se da **epicatequina**.

Tabela 10 – Dados de ^1H RMN da **substância V** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (C)	2,84	2,89	<i>m</i>	
H-4 _{eq} (C)	2,90	3,00	<i>m</i>	
H-2 (C)	5,11	5,12	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (C)	5,38	5,41	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-6 (A)	6,57	6,59	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,67	6,69	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,1$
H-5' (B)	7,21	7,21-7,31	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 2,7$
H-6' (B)	7,26-7,29	7,21-7,31	<i>m</i>	
H-2' (B)	7,36	7,21-7,31	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$

*Ueffing (1988).

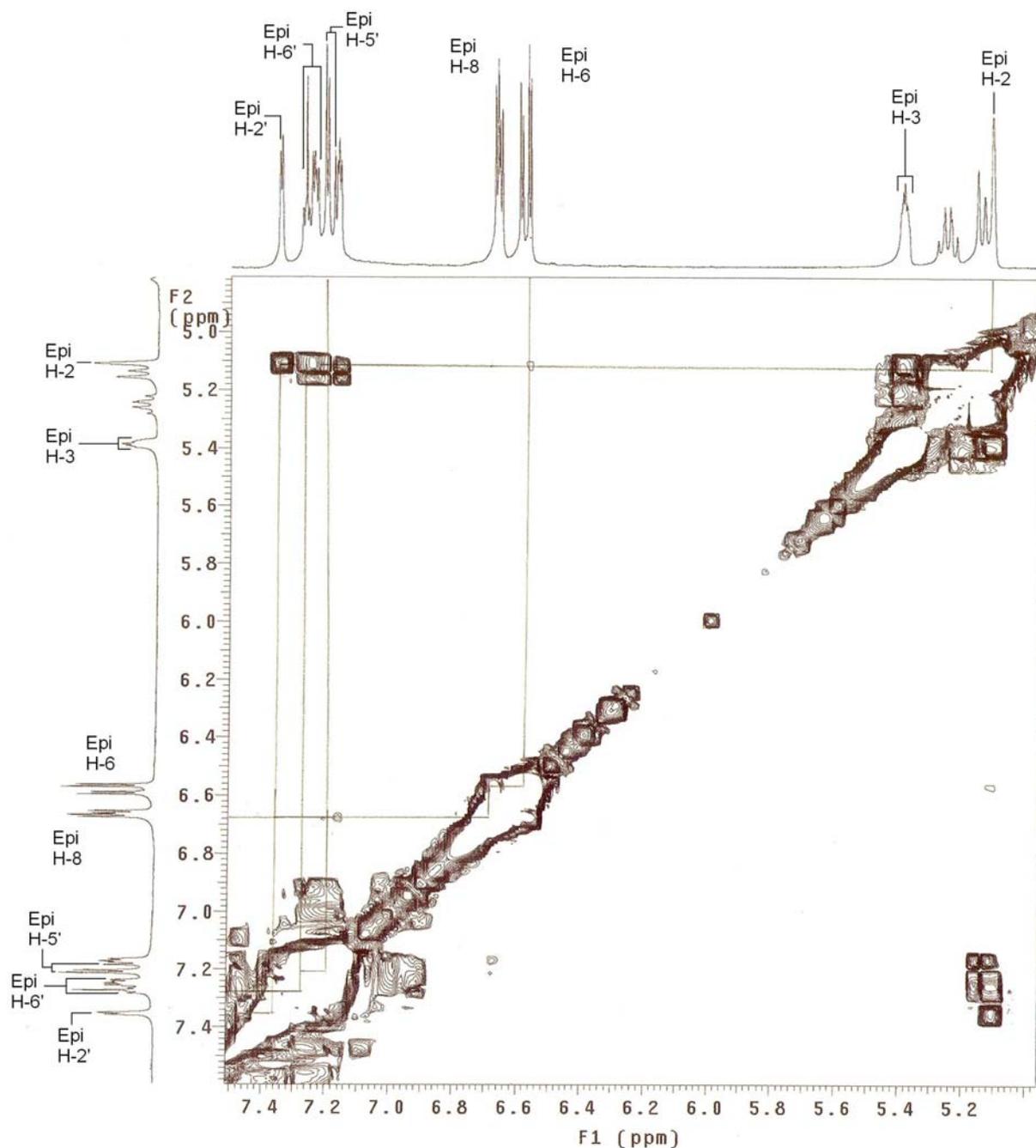


Figura 25 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância V** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

A estereoquímica relativa da subfração EPA#3 não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -2,0^\circ$ (metanol; $c = 2$). No entanto, Ushirobira (2003) obteve para epicatequina $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ (metanol; $c = 0,001$) e para catequina $[\alpha]_D^{20} = +1,0^\circ$ (acetona; $c = 0,001$). Danne (1994) obteve $[\alpha]_D^{20} = +18,9^\circ$ (acetona com a substância acetilada; $c = 0,09$).

Assim, de acordo com as interpretações realizadas e de acordo com as literaturas analisadas (USHIROBIRA, 2003; ROCHA, 2005), esta subfração corresponde a uma mistura das **substâncias IV e V**, seguramente, de **catequina** e **epicatequina** (Figs. 26 e 27, respectivamente).

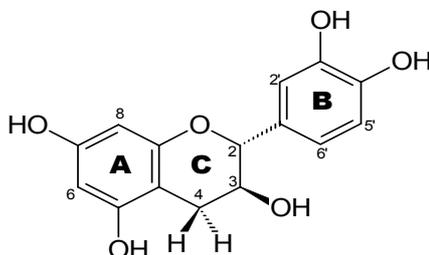


Figura 26 – Estrutura da **substância IV**, catequina.

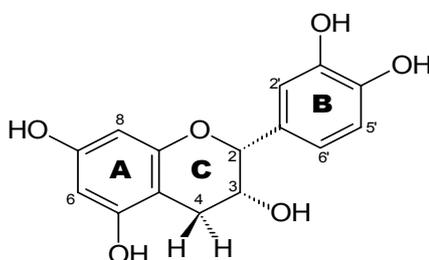


Figura 27 – Estrutura da **substância V**, epicatequina.

5.2.3.6 **Substância VI** – *ent*-Epicatequina

Cerca de 3 mg do total de 4 mg da subfração EPA#4.14 foram derivatizados (seção 4.6, p. 55) e denominados de **substância VI**.

A **substância VI** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na^+]^+ = 313$ encontrando-se em concordância com substância do tipo catequina/epicatequina ($m/z = 290$) não derivatizada.

O espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ obtido (Fig. 28) corresponde ao espectro obtido por Ushirobira (2003). Esta substância também foi isolada por Rocha (2005) a partir das cascas de *Guazuma ulmifolia* e seu espectro correlaciona-se com este.

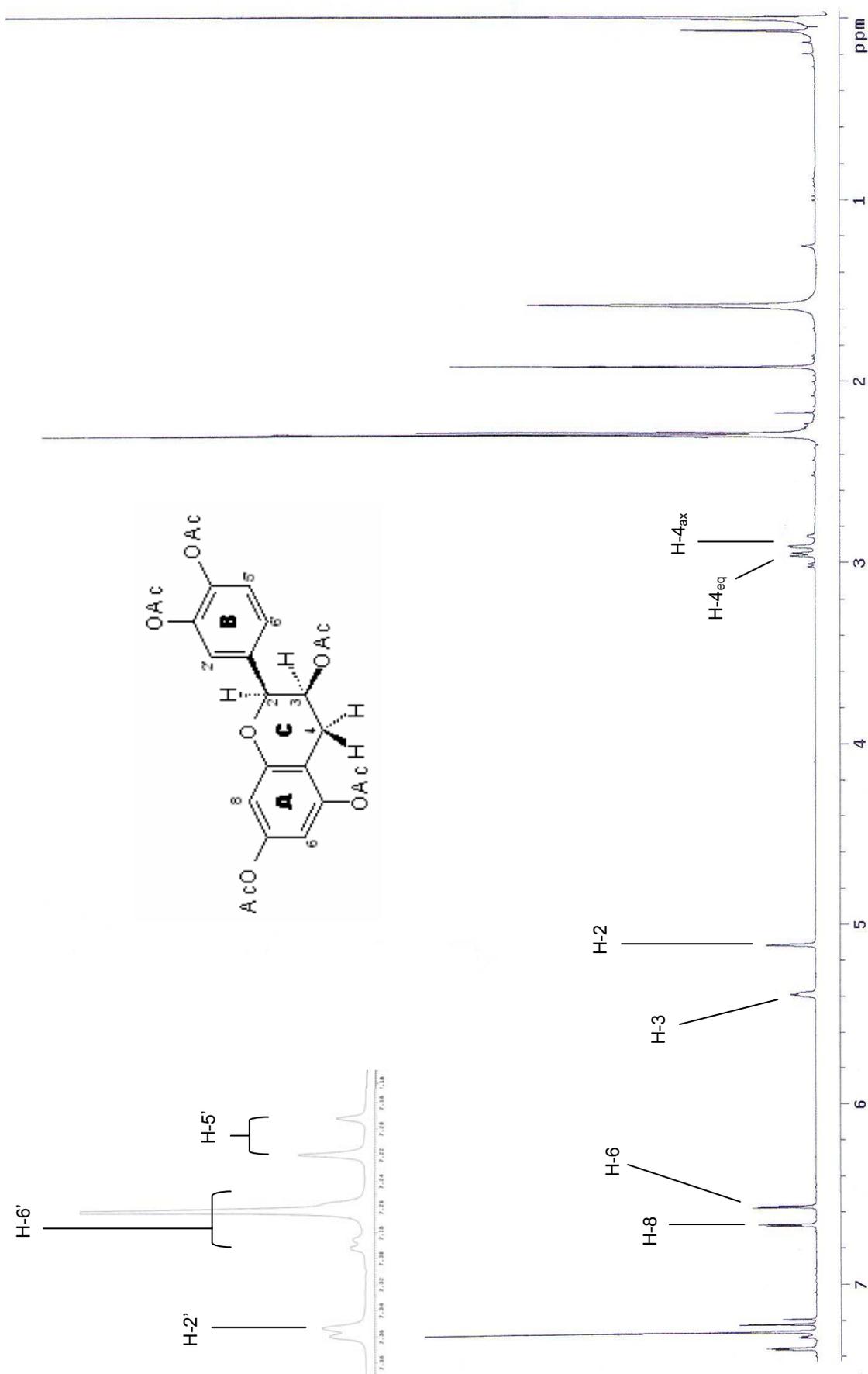


Figura 28 – Espectro de RMN ¹H da substância VI (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Tabela 11 – Dados de ^1H RMN da **substância VI** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (C)	2,88	2,89	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 18$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 2,1$
H-4 _{eq} (C)	2,98	3,00	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 17,7$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 4,5$
H-2 (C)	5,12	5,12	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (C)	5,39	5,41	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-6 (A)	6,57	6,59	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,67	6,69	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-5' (B)	7,20	7,21-7,31	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$
H-6' (B)	7,27	7,21-7,31	<i>dd</i> **	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 1,8$
H-2' (B)	7,36	7,21-7,31	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$

*Ueffing (1988); **parcialmente encoberto pelo CDCl_3 .

O espectro de ^1H RMN mostra para os hidrogênios alifáticos H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) deslocamentos de δ 2,88 e 2,98 ppm, respectivamente e uma constante de acoplamento de 18 Hz. O hidrogênio alifático H-3(C) se correlaciona com os hidrogênios H-4_{ax}(C) e H-4_{eq}(C) apresentando constantes de acoplamento com valor de 2,1 e 4,5 Hz, respectivamente, indicando uma configuração relativa 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) o espectro mostra deslocamentos de δ 5,39 e 5,12 ppm, respectivamente e 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). Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância VI** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges e colaboradores (1968 e 1969) a constante de acoplamento dos prótons H-2(C) e H-3(C), com aproximadamente 6 a 8 Hz demonstram uma configuração relativa *trans* e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1 Hz a ordem *cis* para os prótons H-2(C) e H-3(C). Entre δ 7,19 e 7,36 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', comprovando a di-hidroilação no anel B. Nesse espectro observam-se também, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 6,57 e 6,67 ppm. Esses hidrogênios, quando em solução, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro, desde que a substância se encontre com as hidroxilas livres, não sendo o caso da **substância VI** que se encontra derivatizada por

acetilação (PETEREIT, 1992). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 11.

O espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) (Fig. 29) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância VI**.

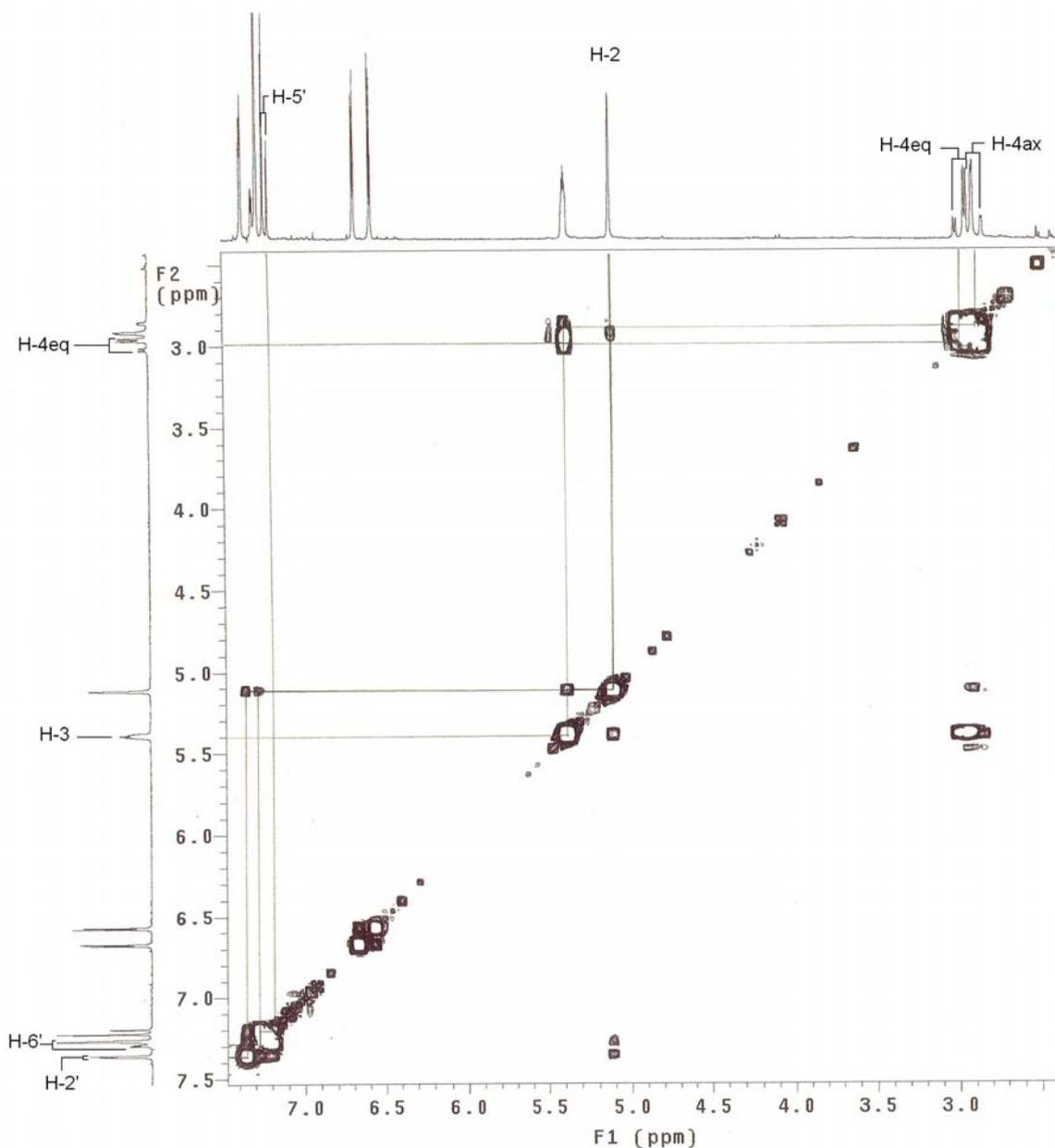


Figura 29 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância VI** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$ (metanol; c= 0,5). No entanto, Ushirobira (2003) obteve para epicatequina $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ (metanol; c= 0,001) e Danne (1994) obteve $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$ (acetona com a substância acetilada; c= 0,04). Sendo assim, a **substância VI** trata-se de **ent-epicatequina** (Fig. 30). Kofink e Galensa (2005) analisaram amostras de guaraná e demonstraram, com o uso de um seletor quiral natural (ciclodextrina) por meio de eletroforese capilar, que extrato da sementes de guaraná possui as substâncias 2*R* catequina, epicatequina e suas formas quirais 2*S* (*ent*-catequina e *ent*-epicatequina). Esta é a primeira vez que isola-se esta substância no gênero *Paullinia*.

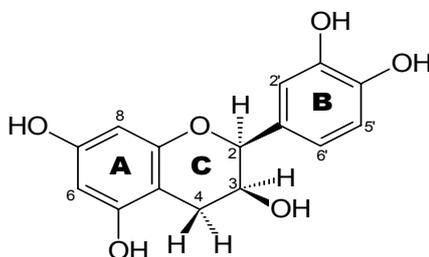


Figura 30 – Estrutura da **substância VI**, *ent*-epicatequina.

5.2.3.7 Substância VII – Epicatequina-(4 β →8;2 β →O→7)-epicatequina (Procianidina A₂)

Cerca de 3 mg do total de 4,3 mg da subfração EPA#4.12 foram derivatizados (seção 4.6, p. 55) e denominados de **substância VII**.

O espectro de ¹H RMN em CDCl₃ (Fig. 31) forneceu os seguintes dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (Tab. 12).

Tabela 12 – Dados de ^1H RMN da **substância VII** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativos para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (F)	2,88-2,90	2,80	<i>m</i>	
H-4 (C)	4,60	4,57	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 4,2$
H-2 (F)	4,85	5,22	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (C)	5,05	5,25	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} = 4,2$
H-3 (F)	5,35	5,30	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-8 (A)	6,38	6,45	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,1$
H-6 (D)	6,58	6,48	<i>s</i>	
H-6 (A)	6,69	6,77	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-5' (B e E)	7,21-7,24	7,20-7,70	<i>m</i>	
H-6' (E)	7,38	7,20-7,70	<i>m</i>	
H-2' (B e E)	7,41	7,20-7,70	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-6' (B)	7,51	7,20-7,70	<i>dd</i>	$^4J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,7$ $^3J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$

*Karchesy e Hemingway, 1986.

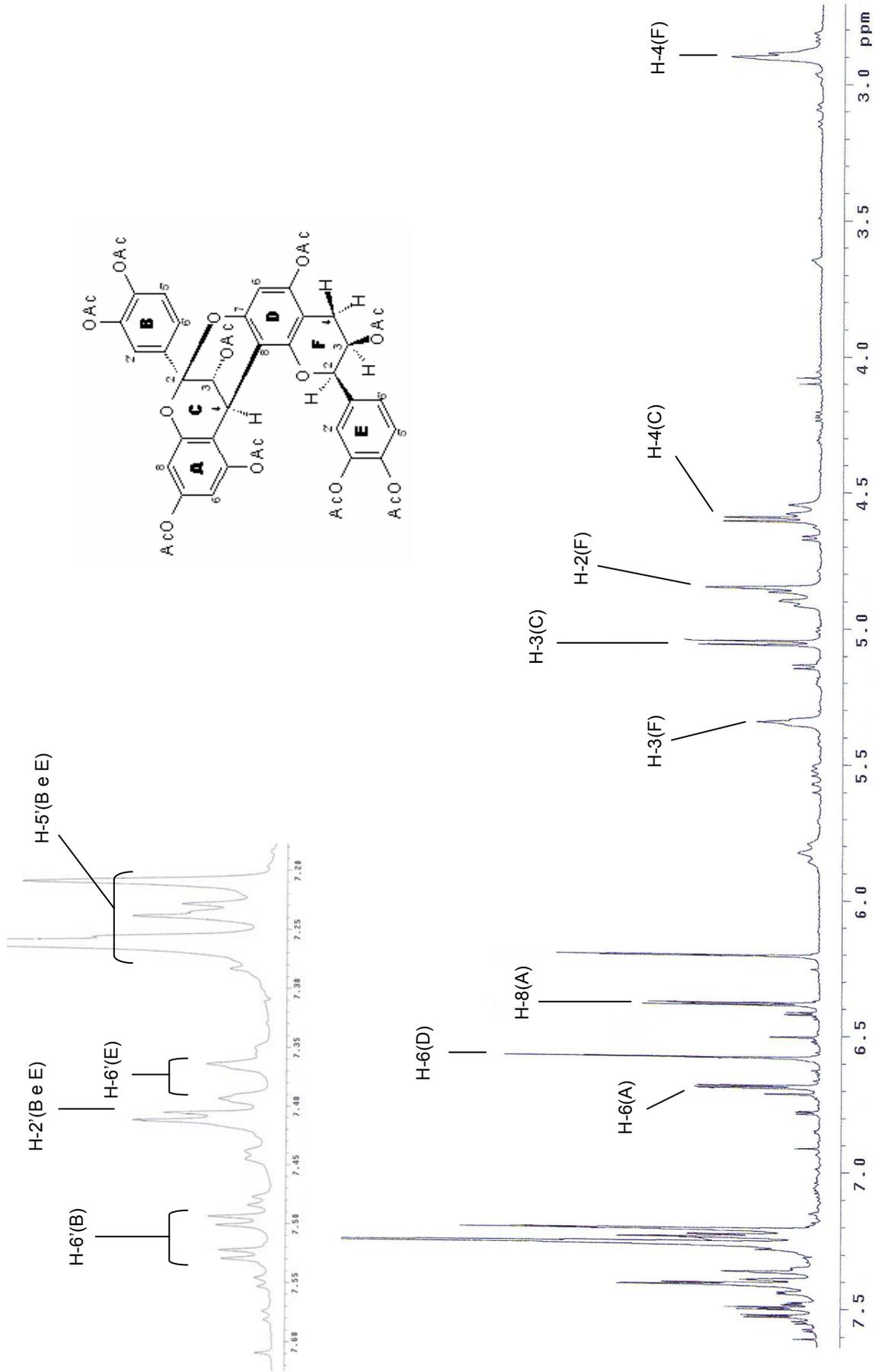


Figura 31 – Espectro de RMN ¹H da substância VII (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(F)], sendo que se apresentam idênticos, entre δ 2,88-2,90 ppm. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,60 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é de $J_{H3-H4} = 4,2$ Hz, característico para compostos do tipo procianidina A (JACQUES et al., 1974).

A integração de prótons no espectro de RMN ^1H apresenta um total de 15 prótons, todos não equivalentes magneticamente (excluindo prótons dos grupos hidroxilas). Isto sugere que uma ligação éter entre os anéis C e D esteja presente (VIVAS et al., 1996).

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,35 e 4,85 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* e 3,4-*cis*, para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY – Fig. 32), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos é visível. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos, catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de quase todos os hidrogênios através do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) (Fig. 32).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 6,69 e 6,38 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H6-H8} = 2,1$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,58 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), o deslocamento dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4*R*. No entanto, pelo fato da configuração relativa da unidade superior ser do tipo 3,4-*cis* e uma configuração absoluta 2*R*,3*R*, existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4 β ou 4 α .

Além disso, Hör e colaboradores (1995) afirmam que o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4 \rightarrow 8), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 4,85, obedecendo essa regra.

Por comparação entre os dados da **substância VII** e os dados da literatura consultada (KARCHESY; HEMINGWAY, 1986), pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina A₂ (Fig. 33), **epicatequina-(4 β \rightarrow 8;2 β \rightarrow O \rightarrow 7)-epicatequina**.

A estereoquímica absoluta da substância derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +5,3^\circ$ (metanol; $c = 1,5$).

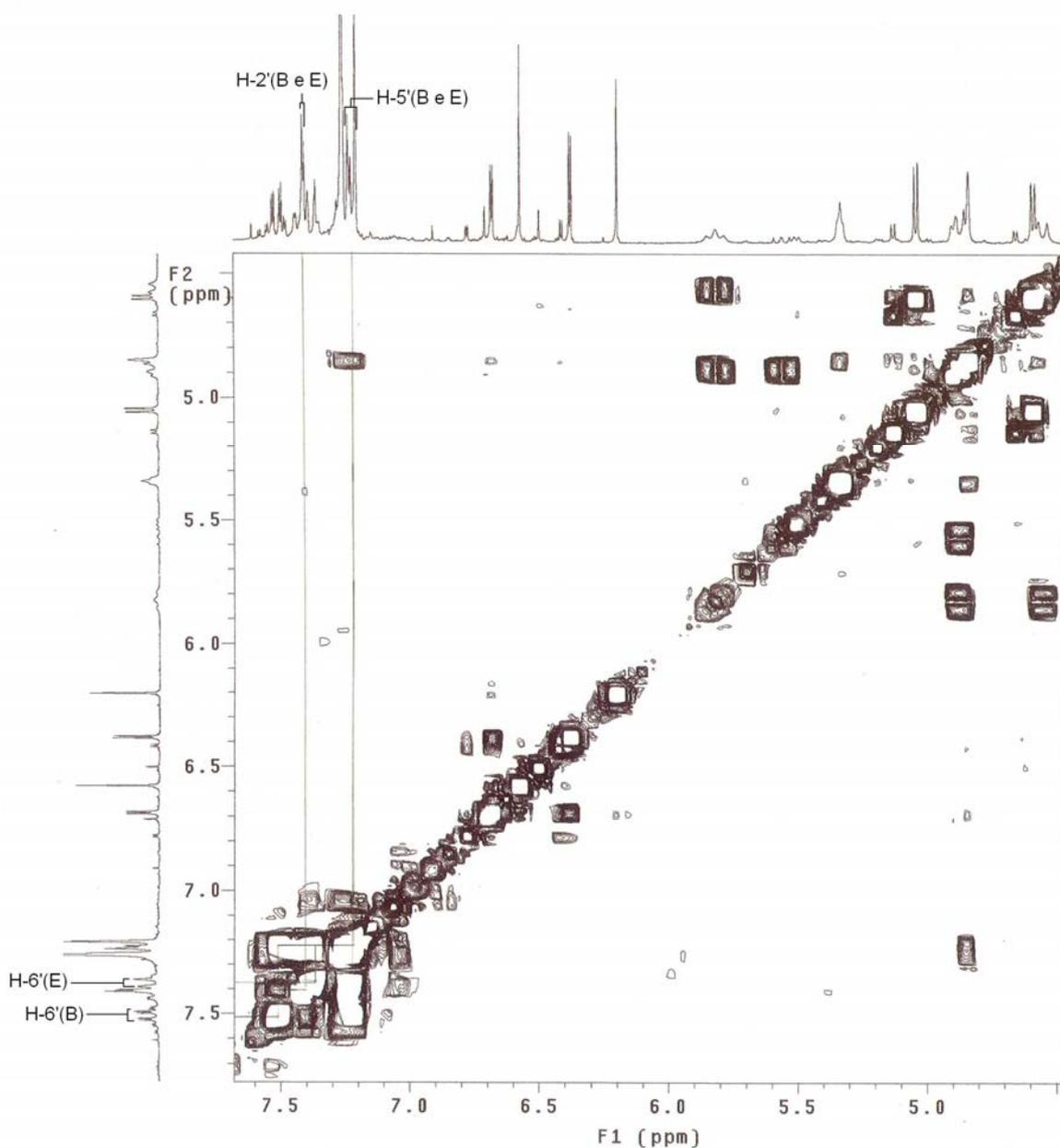


Figura 32 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância VII** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

Contudo, para uma identificação precisa, serão realizados espectrometria de massas e dicroísmo circular desta substância. Dessa maneira, poder-se-á estabelecer a configuração absoluta da substância, estabelecendo-se a configuração *2R,3R* ou *2R,3S*.

Esta substância já foi isolada de diversas fontes naturais, entretanto esta é a primeira vez que é descrita para o gênero *Paullinia*.

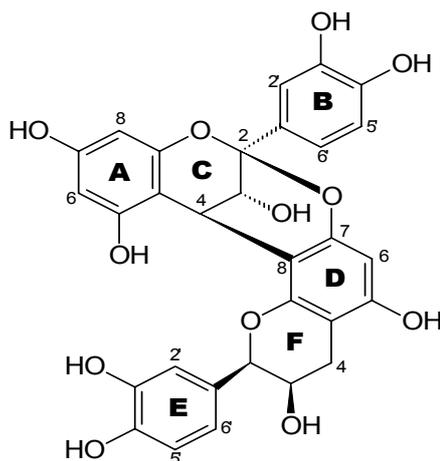


Figura 33 – Estrutura da **substância VII**, epicatequina-(4 β →8;2 β →O→7)-epicatequina.

5.2.3.8 **Substância VIII – Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B₂)**

Cerca de 22 mg do total de 80 mg da subfração EPA#5 foram derivatizados (seção 4.6, p. 55) e denominados de **substância VIII**. Esta substância já foi isolada por Ushirobira (2003).

A **substância VIII** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ = 1021,3 característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

O espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (Fig. 34) forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Esse espectro correlaciona-se com o de Ushirobira (2003). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13 – Dados de ^1H RMN da **substância VIII** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (F)	2,88-2,92	2 x 2,90–2,95	<i>m</i>	
H-4 (C)	4,46	4,47	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 2,4$
H-2 (F)	4,54	4,54	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (F)	5,11	5,09	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-3 (C)	5,16	5,15	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-2 (C)	5,58	5,56	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-6 (A)	5,99	5,99	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,24	6,19	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,1$
H-6 (D)	6,66	6,63	<i>s</i>	
H-6' (E)	6,90	6,90-7,41	<i>dd</i>	$^4J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,4$ $^3J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$
H-2' (E)	7,01	6,90-7,41	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,1$
H-5' (E)	7,13	6,90-7,41	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,7$
H-5' (B)	7,18	6,90-7,41	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$
H-6' (B)	7,28	6,90-7,41	<i>dd**</i>	$^4J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,7$ $^3J_{\text{H-6'-H-2'}} = 1,8$
H-2' (B)	7,36	6,90-7,41	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$

*Ueffing (1988); **um dubleto está parcialmente encoberto pelo solvente CDCl_3 .

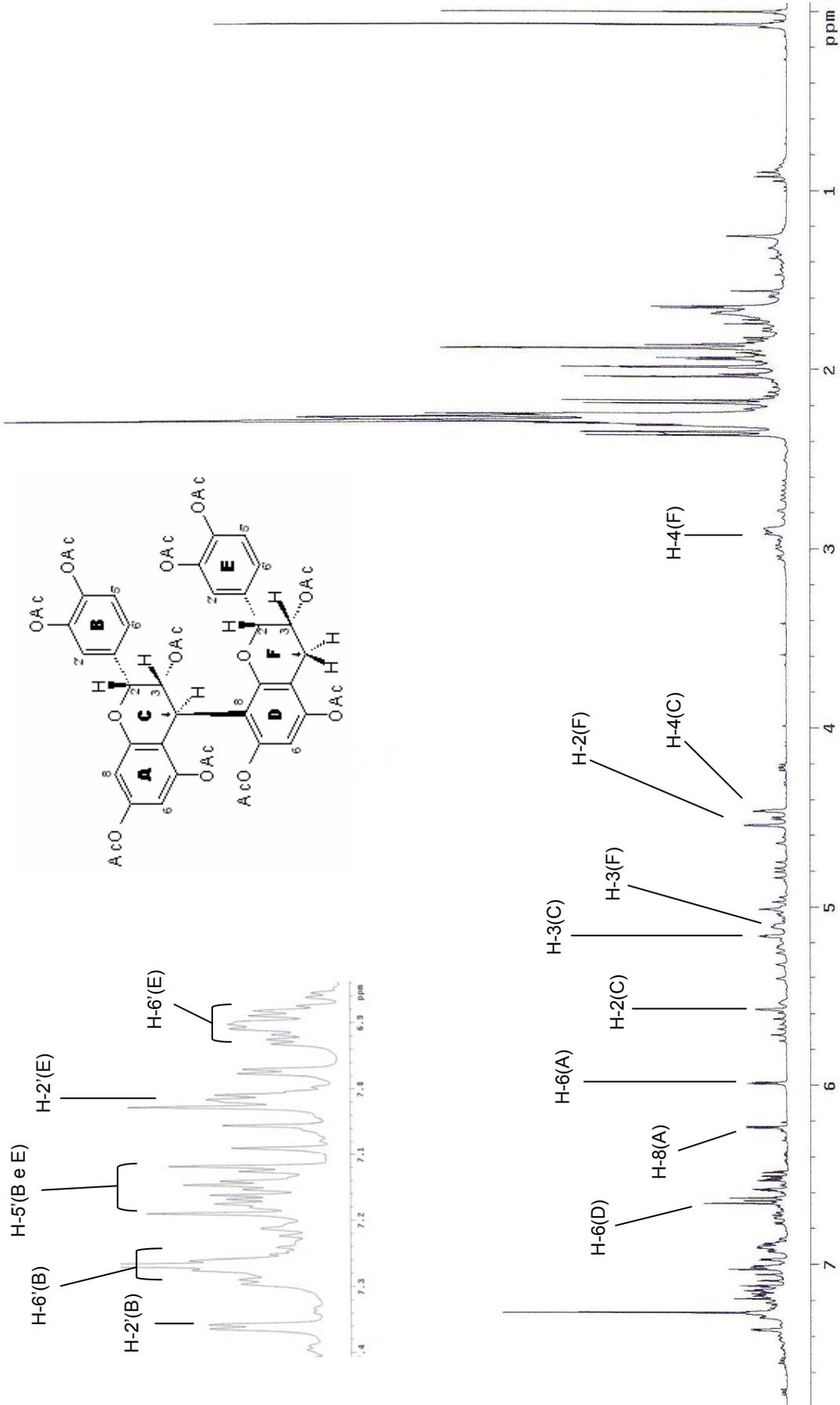


Figura 34 – Espectro de RMN ¹H da substância VIII (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(F)], sendo que se apresentam idênticos, entre δ 2,88-2,92 ppm. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,46 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é pequena de $J_{H_3-H_4} = 2,4$ Hz. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante inferior a 1 Hz. Esses dados referentes aos hidrogênios alifáticos da unidade superior estabelecem uma configuração do tipo 2,3-*cis*, 3,4-*cis* (WEINGES et al., 1968).

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,10 e 4,54 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* e 3,4-*cis*, também para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY – Fig. 35), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos são visíveis. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos, catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de quase todos os hidrogênios através do espectro de COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) (Fig. 35).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 5,99 e 6,24 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H_6-H_8} = 2,1$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,66 ppm, apresenta-se como um singlete. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), o deslocamento dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4*R*. No entanto, pelo fato da configuração relativa da unidade superior ser do tipo 3,4-*cis* e uma configuração absoluta 2*R*,3*R*, existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4 β ou 4 α .

Além disso, Weinges e colaboradores (1968) demonstraram que as procianidinas B₁ e B₂ apresentam uma constante de acoplamento pequena ($J_{3,4} \leq 2,0$ Hz), comprovando uma posição 3,4-*cis*. Dessa maneira, a configuração é compatível tanto como 4*S* como 4*R*. Para corroborar com uma possível afirmação do tipo de ligação entre as unidades, superior e inferior, Hör e colaboradores (1995) afirmam que o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre δ 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4 \rightarrow 8), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 4,54, obedecendo essa regra. Recentemente, Galina (2003) isolou e identificou a substância epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-epicatequina peracetato das cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam (Sterculiaceae), e os dados são totalmente coincidentes. Dessa forma, a **substância VIII** possui uma configuração do tipo 2*R*,3*R* e 2*R'*,3*R'*, para as unidades superior e inferior, respectivamente. A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada com a determinação através de dicroísmo celular. Entretanto, Ueffing (1988) isolou e identificou essa mesma substância com dados de dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da

substância VIII, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₂ (Fig. 36), epicatequina-(4 β →8)-epicatequina.

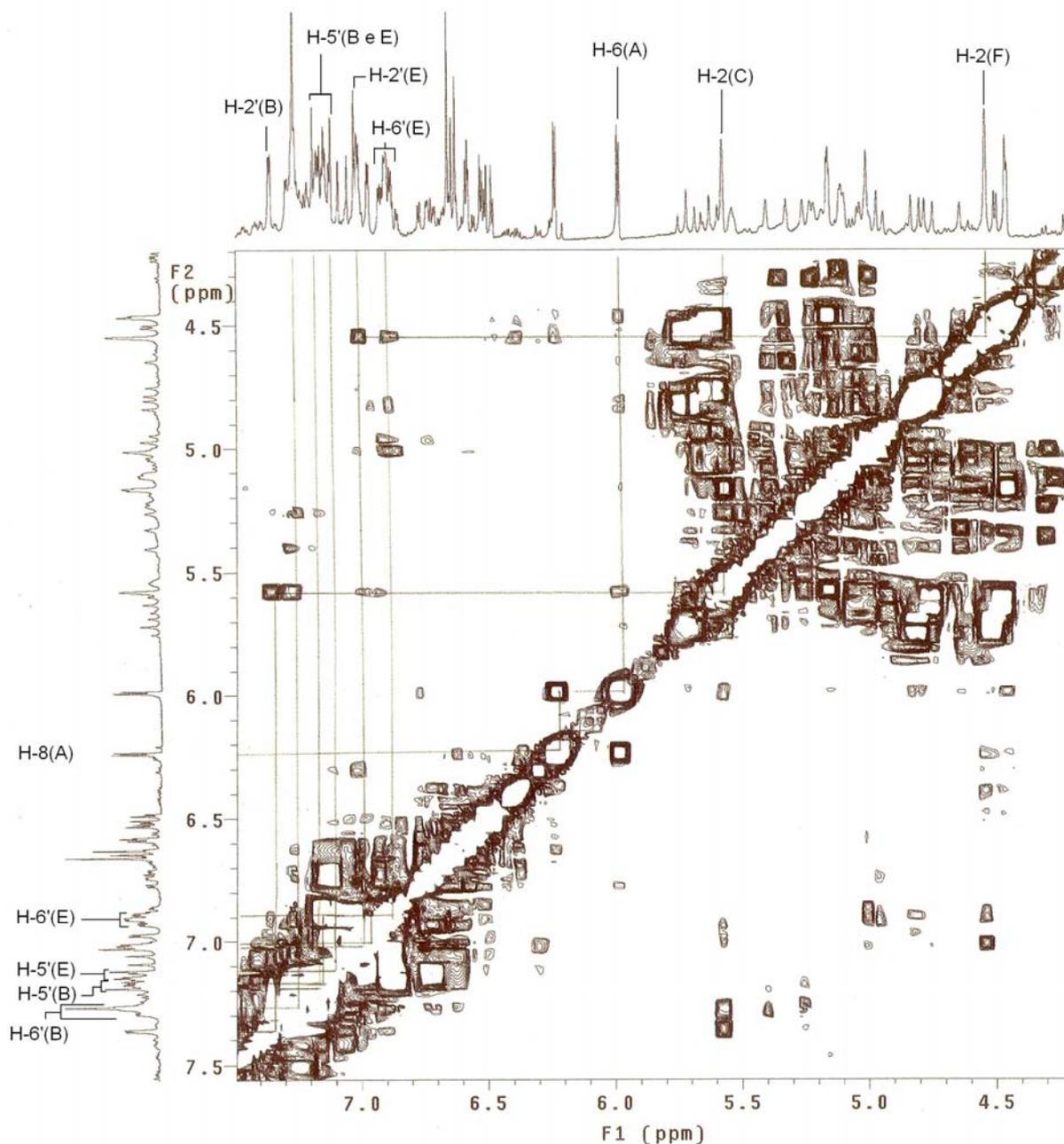


Figura 35 - Espectro COSY (¹H/¹H) da **substância VIII** acetilada (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -4,5^\circ$ (metanol; c= 2,0).

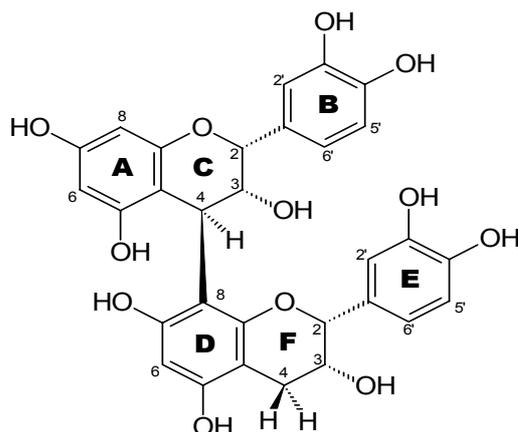


Figura 36 – Estrutura da **substância VIII**, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B₂).

5.2.3.9 **Substância IX** – Epicatequina-(4 β →8)-catequina (Procianidina B₁)

Cerca de 7 mg do total de 10 mg da subfração EPA#6.4 foram derivatizados (seção 4.6, p. 55) e denominados de **substância IX**.

A **substância IX** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ = 1021,3 característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

O espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (Fig. 37) forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Esse espectro correlaciona-se com o de Rocha (2005). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14 – Dados de ^1H RMN da **substância IX** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax} (F)	2,56	2,55	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 9,0$
H-4 _{eq} (F)	3,21	3,17	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 6,6$
H-2 (F)	4,33	4,33	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 9,6$
H-4 (C)	4,42	4,43	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 2,1$
H-3 (F)	5,05	5,04	<i>ddd</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} = 9,6$ $^3J_{\text{H-3-H-4ax}} = 9,3$ $^3J_{\text{H-3-H-4eq}} = 6,6$
H-3 (C)	5,15	5,12	<i>t**</i>	$^3J_{\text{H-3-H-4}} = 1,8$
H-2 (C)	5,47	5,46	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-6 (A)	5,99	5,99	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,29	6,27	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,1$
H-6 (D)	6,68	6,68	<i>s</i>	
H-2' (E)	6,88	6,80 - 7,30	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$
H-6' (E)	6,94	6,80 - 7,30	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$
H-5' (E)	7,09	6,80 - 7,30	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,1$
H-5' (B)	7,16	6,80 - 7,30	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,7$
H-6' (B)	7,24	6,80 - 7,30	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,7$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,1$
H-2' (B)	7,29	6,80 - 7,30	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$

*Ueffing (1988); **pseudo-triplete (teoricamente *dd*).

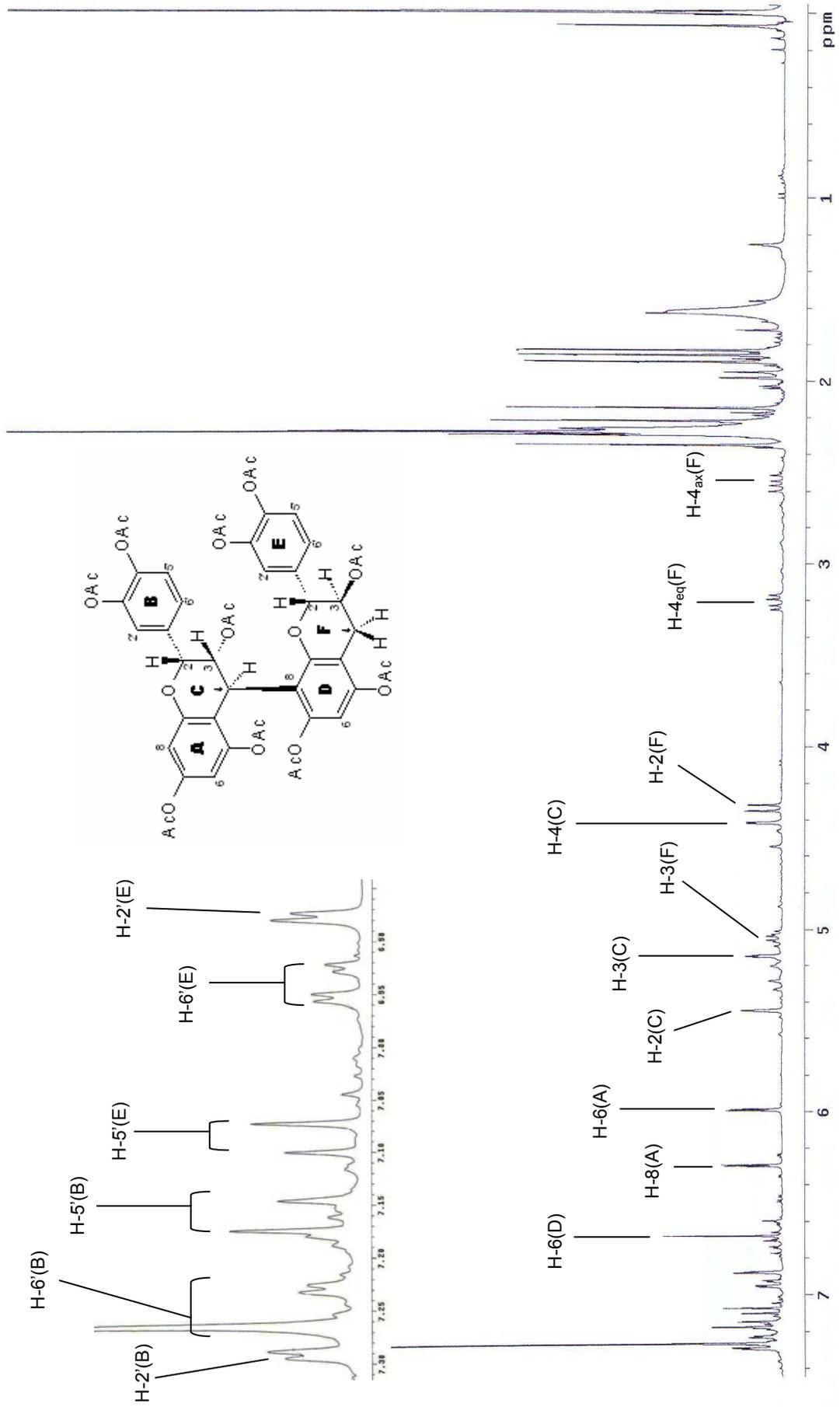


Figura 37 – Espectro de RMN ^1H da substância IX (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F), sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 2,56 e 3,21 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento de 16,5 Hz. Assim pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*trans* para a unidade inferior. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,42 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é de $J_{H_3-H_4} = 2,1$ Hz. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante inferior a 1 Hz. Esses dados referentes aos hidrogênios alifáticos da unidade superior estabelecem uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*, 3,4-*cis* (WEINGES et al., 1968).

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,05 e 4,33 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento de 9,6 Hz, confirmando a configuração 2,3-*trans* e 3,4-*trans*, para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY – Fig. 38), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos são visíveis. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos, catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX, mostrando sinais entre δ 6,87 e 7,30 ppm com diferentes constantes de acoplamento e os sinais referem-se aos hidrogênios dos anéis B e E. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios através do espectro de COSY ($^1H/^1H$) (Fig. 38) e tabela 14.

O espectro de 1H RMN mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6(A), H-8(A) e H-6(D) em δ 5,99, 6,29 e 6,68 ppm, respectivamente, indicando provavelmente uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway e colaboradores (1982), Kolodziej (1989), Danne (1994) e Mello (1995). De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), o deslocamento dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4*R*. No entanto, pelo fato da configuração relativa da unidade superior ser do tipo 3,4-*cis* e uma configuração absoluta 2*R*,3*R*, existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4 β ou 4 α . Além disso, Weinges e colaboradores (1968) demonstraram que as procianidinas B₁ e B₂ apresentam uma constante de acoplamento pequena ($J_{3,4} \leq 2,0$ Hz), comprovando uma posição 3,4-*cis*. Dessa maneira, a configuração é compatível tanto como 4*S* como 4*R*.

Ao mesmo tempo, a posição de ressonância do hidrogênio H-2(F) em δ 4,33 ppm sugere uma ligação (4 β →8) (KOLODZIEJ, 1992). Além destes dados, em todo o espectro de 1H RMN observa-se uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,20 e 5,33 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo (4→8) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981).

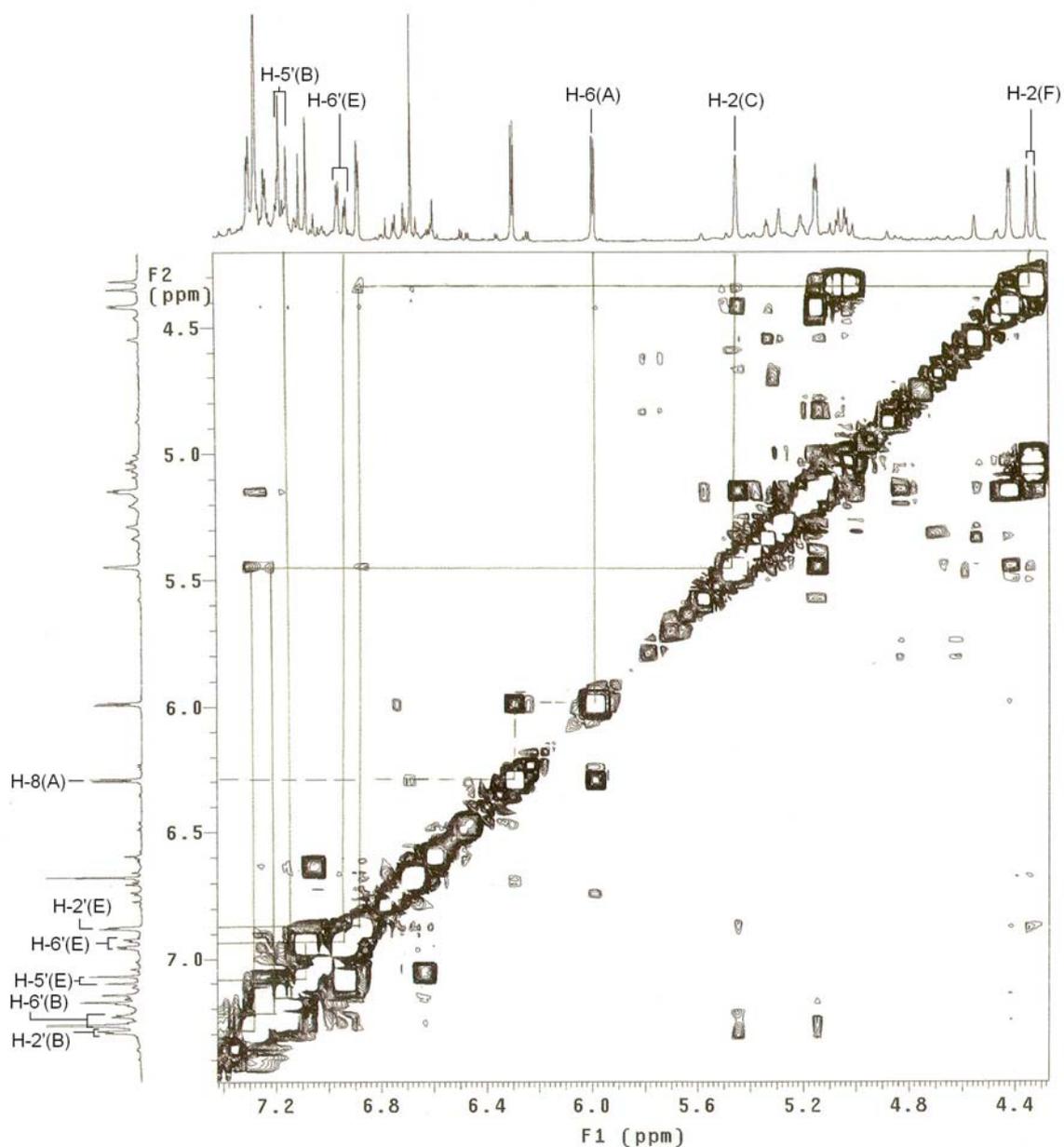


Figura 38 - Espectro COSY ($^1\text{H}/^1\text{H}$) da **substância IX** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

Recentemente, Rocha (2005) isolou e identificou a substância epicatequina-(4 β →8)-catequina das cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae), e os dados são totalmente coincidentes. Dessa forma, a **substância IX** possui uma configuração do tipo 2*R*,3*R* e 2'*R*',3'*S*', para as unidades superior e inferior, respectivamente. A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada com a determinação através de dicroísmo circular. Entretanto, Ueffing (1988) isolou e identificou essa mesma substância com dados de dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância IX**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₁ (Fig. 39),

epicatequina-(4 β →8)-catequina. Esta substância já foi isolada de diversas fontes naturais, entretanto esta é a primeira vez que é descrita para o gênero *Paullinia*.

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ (metanol; c= 1,0).

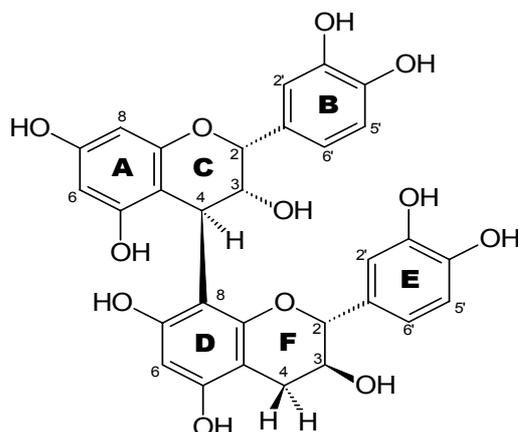


Figura 39 – Estrutura da **substância IX**, epicatequina-(4 β →8)-catequina (Procianidina B₁).

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico

Este método é baseado na redução do Mo(IV) ao Mo(V) pelo agente antioxidante pesquisado e a subsequente formação de um complexo verde fosfato/Mo(V) em pH ácido. Quanto mais redutor for o agente antioxidante testado, maior a absorvância da amostra e mais evidente é a coloração do complexo que é lido no espectrofotômetro em λ específico (PRIETO et al., 1999).

Este método é considerado simples, de baixo custo e pode ser utilizado para comparar a capacidade antioxidante de uma série de extratos (HIRATA, 2004).

Foram avaliados os extratos bruto (EBPC) e aquoso (EA) e as frações semipurificadas EPA e FAQ (Fig. 40), na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ em metanol, sempre em triplicata.



Figura 40 – Capacidade antioxidante realizada pelo método de fosfomolibdênio. Da esquerda para direita: branco, EBPC, EPA, FAQ, EA e vitamina C.

A capacidade antioxidante relativa (CAR) foi calculada frente a vitamina C (200 $\mu\text{g/ml}$) por ser uma substância de poder antioxidante reconhecido e que assume o valor da unidade (100% de atividade) nesse tipo de ensaio (HIRATA, 2004). Os valores de CAR obtidos pelo método do fosfomolibdênio foram: $0,69 \pm 0,03$ (CV%= 4,15) para EBPC, $0,75 \pm 0,01$ (CV%= 1,75) para EPA, $0,36 \pm 0,02$ (CV%= 5,20) para FAQ e $0,46 \pm 0,01$ (CV%= 0,96) para EA (Fig. 41).

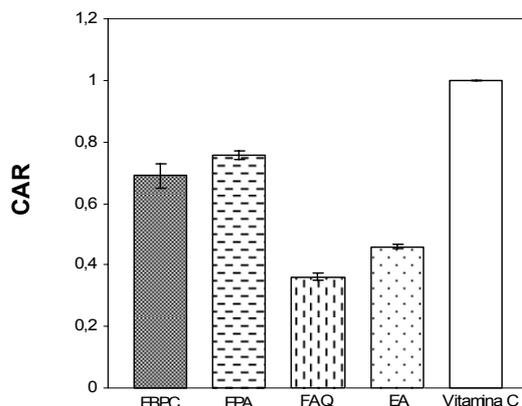


Figura 41 – Comparação entre valores de CAR realizados pelo método do fosfomolibdênio.

As amostras avaliadas foram todas significativamente diferentes ($P < 0,001$) em relação a vitamina C, sendo que EPA e EBPC apresentaram uma diferença significativa $P < 0,01$ entre si. Os valores obtidos foram expressivos apesar de serem menores que a da vitamina C (Fig. 41). Porém, esses valores foram maiores que os encontrados por Hirata (2004) para a rutina ($CAR \approx 0,3$), flavonóide abundante em frutas e vegetais. Dentre as amostras avaliadas, a EPA foi a que apresentou maior potencial para reduzir o complexo fosfomolibdênico com CAR 0,75, seguida por EBPC (0,69), EA (0,46) e FAQ (0,36).

5.3.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Este método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH• na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. Soluções de DPPH• mostram forte absorvância em 517 nm, com coloração violeta (roxa). A absorvância desaparece e a descoloração resultante é estequiométrica (proporcional) em relação ao grau de redução. O restante do DPPH• (que não foi reduzido; e que foi medido após determinado tempo) corresponde inversamente a atividade seqüestrante do radical exercida pelo antioxidante testado (KULISIC et al., 2004).

É um método realizado à temperatura ambiente, sendo assim, elimina-se o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997). Os resultados foram expressos como valores de IC_{50} , e que representam a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH• (ANTOLOVICH et al., 2002).

Para este método realizou-se uma pré-análise com concentrações distintas entre si ($\mu\text{g/ml}$): 100; 20; 4; 0,8 e 0,16, com o objetivo de encontrar o intervalo mais próximo aos valores de IC_{50} . A capacidade antioxidante de EBPC, EPA, FAQ, EA e da vitamina C (Figs. 42, 43, 44, 45 e 46, respectivamente) foi avaliada, nas respectivas concentrações, tratadas com solução de DPPH• por 30 min à temperatura ambiente, sendo que a mudança de coloração de violeta para amarela foi proporcional às concentrações (Tab. 15).

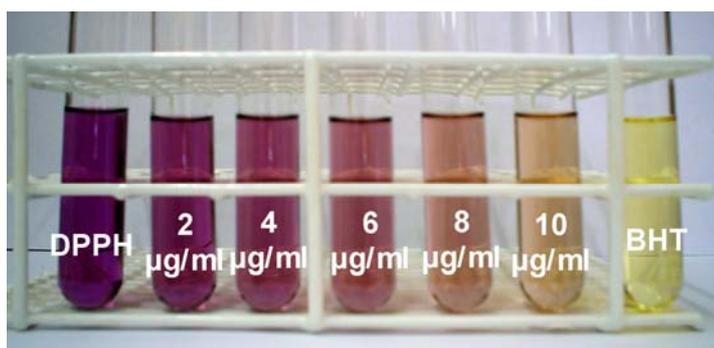


Figura 42 – Capacidade antioxidante de EBPC pelo método do DPPH•.

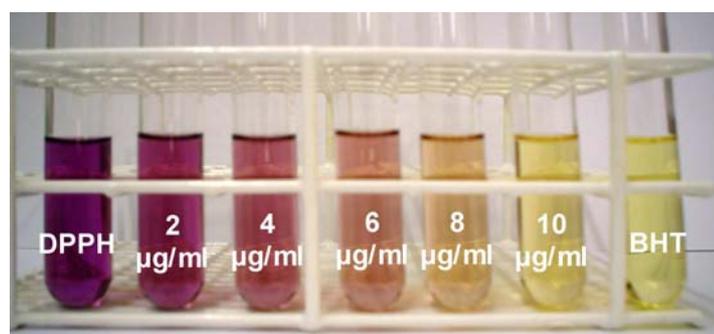


Figura 43 – Capacidade antioxidante de EPA pelo método do DPPH•.



Figura 44 – Capacidade antioxidante de FAQ pelo método do DPPH•.



Figura 45 – Capacidade antioxidante de EA pelo método do DPPH•.



Figura 46 – Capacidade antioxidante da vitamina C pelo método do DPPH•.

Tabela 15 - Capacidade antioxidante demonstrada pela redução do DPPH•.

Amostra	IC ₅₀ Média (µg/ml)	CV%
EBPC	*6,67 ± 0,05	0,82
EPA	**5,23 ± 0,08	1,49
FAQ	*14,97 ± 0,15	1,01
EA	*9,59 ± 0,04	0,41
Vitamina C	4,93 ± 0,05	1,07

*ANOVA, *estatisticamente significante P < 0,001; ** P < 0,05 em relação a vitamina C

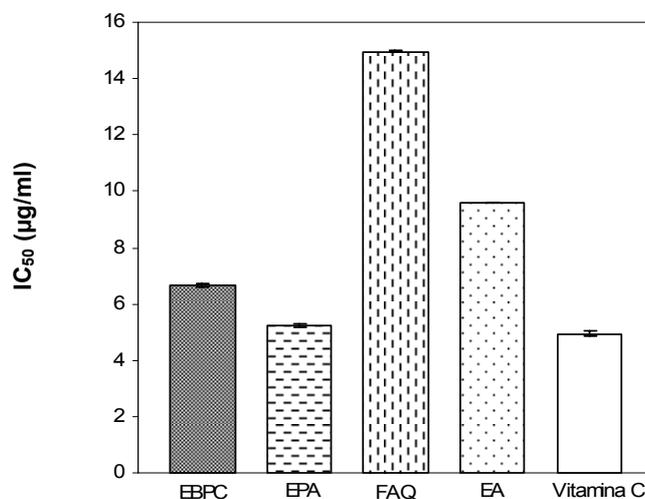


Figura 47 – Comparação entre valores de IC₅₀ (µg/ml) realizados pelo método do DPPH•.

Todos os extratos tiveram uma alta capacidade antioxidante, mesmo quando comparados à substância de reconhecida ação antioxidante como a vitamina C (Fig. 47).

Paralelamente à realização da capacidade antioxidante, fez-se o teor de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (Tab. 16), com o objetivo de verificar se existe uma relação direta entre ambos.

Tabela 16 – Teores de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (%).

Amostra	PT - g(%)± dp (CV%)	TT - g(%)± dp (CV%)
EBPC	55,95 ± 1,12 (2,01)	31,15 ± 1,46 (4,68)
EPA	65,80 ± 0,62 (0,93)	30,05 ± 0,54 (1,80)
FAQ	22,71 ± 0,37 (1,64)	17,09 ± 0,52 (3,03)
EA	36,47 ± 0,18 (0,51)	16,16 ± 0,44 (2,75)

O EPA apresentou o maior teor de polifenóis totais refletindo na avaliação antioxidante com um baixo valor de IC₅₀ e um CAR mais alto em relação aos demais extratos (Tab. 17). Por sua vez, o FAQ que apresentou o menor teor de polifenóis totais refletiu em um alto valor de IC₅₀ e no CAR mais baixo em relação aos demais extratos. Os teores intermediários para EBPC e EA foram coerentes às suas respectivas avaliações antioxidantes obtidas.

Tabela 17 – Teores de polifenóis totais (PT) e capacidade antioxidante.

Amostra	PT (%)	CAR	IC ₅₀ (µg/ml)
EBPC	55,95	0,69	6,67
EPA	65,80	0,75	5,23
FAQ	22,71	0,36	14,97
EA	36,47	0,46	9,59

De modo geral, com relação aos dois métodos utilizados, todos os resultados obtidos para *Paullinia cupana* apresentaram alta capacidade antioxidante quando comparados com valores obtidos de outras espécies. O extrato hidroetanólico de *Bauhinia microstachya* (escada de macaco) apresentou CAR = 0,34 e IC₅₀ = 5,50 µg/ml (HIRATA, 2004); o extrato aquoso a 5% de *Jacarandá micrantha* (caroba) apresentou CAR = 0,38 e IC₅₀ = 46,29 µg/ml (MENEZES; SCHWARZ; SANTOS, 2004); o extrato bruto de *Guazuma ulmifolia* (mutamba) apresentou CAR = 0,49 e IC₅₀ = 8,04 µg/ml (ROCHA, 2005).

No entanto, não é possível relacionar de forma direta os teores de taninos totais das amostras com suas respectivas capacidades antioxidantes. Porém, Hatano e colaboradores (2002) mediram a atividade antioxidante de polifenóis isolados do extrato de cacao e, pelo método do DPPH•, obtiveram os seguintes resultados (em IC₅₀): 2,1 µg/ml para epicatequina, 1,4 µg/ml para procianidina B₂ e 6,2 µg/ml para procianidina C₁. Estas substâncias foram isoladas do extrato semipurificado EPA de *Paullinia cupana*, corroborando com os resultados da capacidade antioxidante obtidos. Bem como os resultados não mostrados do método do DPPH (IC₅₀) com as substâncias epicatequina-(4β→8)-catequina (PB₁), epigallocatequina, catequina e galocatequina isoladas de outra espécie vegetal em nosso grupo de pesquisa, que mostraram valores de 1,90 µg/ml, 2,62 µg/ml, 2,88 µg/ml e 4,67 µg/ml, respectivamente. Assim, estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante em extratos vegetais e a atividade antioxidante de substâncias isoladas de drogas vegetais contendo taninos em sua composição é viável e comprova a eficiência destas substâncias na captura de radicais livres.

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A *Streptococcus mutans* IN VITRO

5.4.1 Teste de aderência em lamínula

A prevenção de cáries depende do controle da placa bacteriana. Para que uma substância venha a ser utilizada no controle da cárie, a pesquisa se inicia com os estudos *in vitro*, como o teste de aderência em superfície lisa de vidro. Essa substância deve ter ação direta sobre os microrganismos cariogênicos ou sobre os fatores envolvidos na formação da placa bacteriana.

Taninos e compostos fenólicos são amplamente reconhecidos por possuir alto potencial antibiótico (KOŁODZIEJ et al., 1999). Catequinas, por exemplo, têm propriedades *in vitro* que sugerem uma atividade anticariogênica, como a prevenção da aderência bacteriana nos dentes (HAMILTON-MILLER, 2001). Os polifenóis presentes na maçã inibiram a aderência dependente de sacarose de células bacterianas *in vitro* (YANAGIDA et al, 2000).

As sementes do guaraná possuem um alto teor em taninos. São ricas em catequina (6%) e epicatequina (3,8%) (MARX, 1990), além dos dímeros procianidinas B₁, B₂, B₃ e B₄, presentes (ANTONELLI USHIROBIRA et al., 2007). Barbosa e Mello (2004) demonstraram a eficiência do extrato aquoso produzido com sementes de guaraná a 5 e 7,5% no controle *in vivo* da placa bacteriana dentária, comparado ao gluconato de clorexidina a 0,12%, empregando-se o bochecho como forma de aplicação.

Diante destes dados realizou-se o teste de aderência de *Streptococcus mutans* em lamínula para os extratos bruto (EBPC) e aquoso a 5% (EA) e os extratos semipurificados EPA e FAQ de *Paullinia cupana*, utilizando solução de gluconato de clorexidina diluída a 0,00012% como substância de referência. A partir do teor de extrativos do extrato aquoso e dos teores de taninos totais dos extratos, calculou-se a quantidade de amostra a ser avaliada (Tab. 18). Os extratos foram testados nas concentrações de 1,5 e 0,75 mg/ml.

Tabela 18 – Teores de taninos totais (%) e concentração de amostra avaliada.

Amostra	g(%) \pm dp (CV%)	Concentração de amostra (mg/ml)
EA	16,16 \pm 0,44 (2,75)	9,28
EBPC	31,15 \pm 1,46 (4,68)	4,81
EPA	30,05 \pm 0,54 (1,80)	4,99
FAQ	17,09 \pm 0,52 (3,03)	8,78

Os resultados obtidos na inibição de aderência de *S. mutans* em superfície lisa de vidro (lamínula), utilizando taninos na concentração de 0,75 mg/ml, comparados à aderência observada no controle, foram: 62,18% \pm 2,09 para EA, 79,69% \pm 5,23 para EBPC, 52,69% \pm 17,95 para EPA, 69,95% \pm 2,90 para FAQ e 82,88% \pm 4,28 para clorexidina a 0,00012%, conforme demonstrado na figura 48.

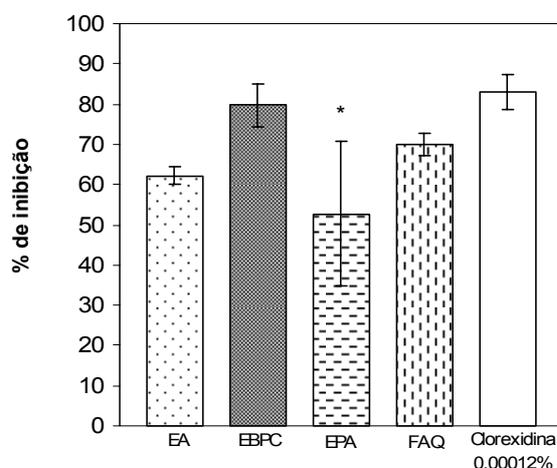


Figura 48 – Percentagem de inibição da aderência de *Streptococcus mutans* em lamínula após tratamento com extratos contendo 0,75 mg/ml em taninos. *ANOVA, $P < 0,05$ em relação a clorexidina.

Observou-se a inibição da aderência em todos os extratos, o que vem a confirmar a eficiência do extrato aquoso no controle da formação de placa dentária demonstrada por Barbosa e Mello (2004). EBPC e FAQ foram os que apresentaram melhores resultados. Pela análise estatística, apenas EPA foi significativamente diferente em relação à clorexidina ($P < 0,05$).

Na concentração de 0,75 mg/ml em taninos, os extratos estavam nas seguintes concentrações: 4,64 mg/ml para EA, 2,405 mg/ml para EBPC, 2,495 mg/ml para EPA e 4,39 mg/ml para FAQ. Sendo assim, o EBPC obteve o melhor resultado, uma vez que mesmo em menor concentração, foi o que demonstrou maior inibição da aderência de *S. mutans* em lamínulas.

Contudo, para a concentração de 1,5 mg/ml em taninos observou-se um aumento na inibição da aderência para FAQ obtendo-se 88,08% de inibição (dados não mostrados), superando, inclusive o efeito da clorexidina a 1,2 µg/ml.

No entanto, na avaliação do crescimento através da contagem de viáveis, EPA apresentou um efeito inibitório o que deve estar interferindo no efeito de aderência. Os demais extratos não sofreram esta interferência. Para confirmar esta suposição, realizou-se o teste de concentração inibitória mínima.

5.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi realizada para certificar se os extratos realmente inibiram a aderência e não o crescimento bacteriano de *S. mutans*.

Primeiramente utilizaram-se extratos com concentração de 1.000 µg/ml, mas obteve-se crescimento em todas as diluições das amostras testadas. Realizou-se, então, a partir da concentração de 10.000 µg/ml. Os resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *Paullinia cupana* em *Streptococcus mutans*.

Extratos	CIM (µg/ml)
Aquoso	>10.000
Bruto	>10.000
EPA	5.000
FAQ	10.000
Clorexidina 2%	5

Na avaliação do crescimento através da contagem de viáveis, observou-se um efeito inibitório de EPA, que se confirmou com a realização deste ensaio. A CIM de EPA foi de 5 mg/ml, a concentração avaliada no teste de inibição da aderência foi de 2,5 mg/ml (0,75 mg/ml em taninos). Esta concentração inibiu o crescimento bacteriano, mas não completamente.

FAQ apresentou uma CIM de 10 mg/ml. Considerando a concentração de 1,5 mg/ml em taninos, que correspondeu a uma concentração de 8,78 mg/ml deste extrato, esta

concentração não inibiu o crescimento através da contagem de viáveis realizadas no teste de aderência, confirmando sua eficiência diretamente sobre a inibição da aderência em superfície lisa.

Ushirobira (2003) avaliou a atividade antibacteriana do extrato bruto e dos extratos semipurificados de *Paullinia cupana* frente às bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) através da determinação da CIM. Todos os extratos do “guaraná” não foram efetivos nas amostras bacterianas utilizadas, apesar dos compostos fenólicos serem majoritários na composição química da planta.

5.4.3 Efeito do extrato na produção de ácidos

Um dos fatores para o efeito inibitório na deposição de placa seria a redução da taxa da produção de ácido, pois a acidificação contribui com a desmineralização da superfície do dente (TAKAHASHI, 2005).

Os extratos também foram submetidos a este ensaio, utilizando solução de gluconato de clorexidina a 2% como substância de referência. A quantidade avaliada também foi padronizada de acordo com o ensaio realizado por Ushirobira (dados não publicados) a partir de 500 mg de EBPC e com os teores de taninos totais (Tab. 20).

Tabela 20 – Teores de taninos totais (%) e quantidade de amostra avaliada

Amostra	g(%)± dp (CV%)	Amostra (mg)
EA	16,16 ± 0,44 (2,75)	963,8
EBPC	31,15 ± 1,46 (4,68)	500
EPA	30,05 ± 0,54 (1,80)	518,3
FAQ	17,09 ± 0,52 (3,03)	911,4

A produção de ácidos foi monitorada pela medida do pH em função do tempo. Todos os extratos diminuíram a redução do pH do meio, podendo estar inibindo a produção de ácidos a partir da glicose.

Os extratos apresentaram as seguintes diminuições de pH em 12 h: EA = 0,84, EBPC = 0,41, EPA = 0,56 e FAQ = 0,44, enquanto que o controle teve uma queda de 2,08 e a clorexidina de 0,29 (Fig. 49).

Os ensaios realizados demonstraram bons resultados para todos os extratos. EBPC e FAQ apresentaram os melhores efeitos também neste ensaio. Com a diminuição da

produção de ácidos, diminuiria a desmineralização da superfície externa do dente inibindo a formação da cárie.

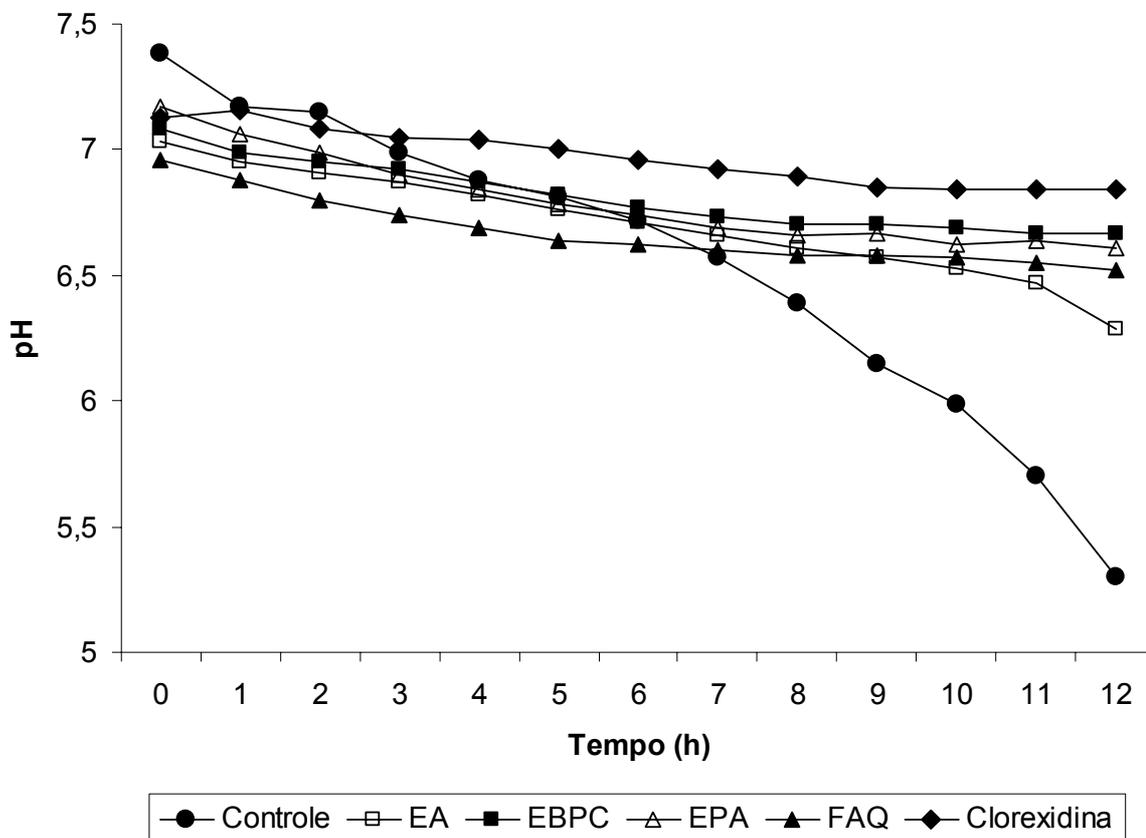


Figura 49 – Efeito dos extratos na redução da produção de ácidos pelo *Streptococcus mutans*.

Polifenóis de plantas demonstram vários tipos de atividades fisiológicas. Nos últimos anos, muitos estudos demonstraram a anticariogenicidade de polifenóis do chá. No entanto, não há muitas pesquisas com polifenóis encontrados em outras plantas (YANAGIDA et al., 2000).

Os polifenóis dos chás de *Camellia sinensis* são efetivos na redução de cáries tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A prevenção da aderência bacteriana é muito bem documentada (OOSHIMA et al., 1994; MATSUMOTO et al., 1999; HAMILTON-MILLER, 2001), bem como a redução da produção de ácidos (MATSUMOTO et al., 1999). Ésteres galoilados de epicatequina, epigalocatequina e (-)-galocatequina aumentaram esta atividade (HATTORI et al., 1990; SAKANAKA et al., 1990; NAKAHARA et al., 1993).

Ooshima e colaboradores (2000) demonstraram que o extrato da casca do grão de cacau reduziu a produção de ácido por *S. mutans*. Além disso, diminuiu a aderência de células dependentes de sacarose pela inibição das GTases. Yanagida e colaboradores

(2000) demonstraram que os polifenóis presentes na maçã inibiram a aderência dependente de sacarose de células bacterianas *in vitro*. Este fato poderia ser analisado em relação ao guaraná, já que a composição química de extratos de maçã assemelham-se à do guaraná.

Apesar de inúmeros estudos relacionarem a inibição da formação de placa bacteriana dentária com compostos polifenólicos, não se observou uma relação direta desta atividade com taninos neste estudo, uma vez que os extratos avaliados possuíam aproximadamente o mesmo teor em taninos entre si. No entanto, esta avaliação preliminar demonstrou que os extratos de *Paullinia cupana* podem vir a ser empregados na prevenção da formação de placa bacteriana dentária e conseqüentemente, da formação da cárie dental, uma vez que seus extratos demonstraram, *in vitro*, a inibição da aderência bacteriana em superfície lisa, fator predisponente para o desenvolvimento da cárie e doenças periodontais.

Contudo, um estudo mais aprofundado é necessário, incluindo ensaios para a avaliação da inibição da GTase, e a utilização de superfícies mais parecidas com a superfície dos dentes como a hidroxiapatita, utilizada em vários estudos.

6 CONCLUSÕES

As análises físico-químicas farmacopéicas e não farmacopéicas determinaram as condições mínimas da droga vegetal, atestando a qualidade e equivalência em teores de substâncias químicas características (metilxantinas e taninos) quando comparadas as sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* estudadas por Ushirobira (2003) provenientes da mesma região, Alta Floresta, MS.

Foram isoladas e identificadas da fração EPA as seguintes substâncias: catequina, epicatequina, *ent*-epicatequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina (PB₁), epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (PB₂), catequina-(4 α →8)-catequina (PB₃), catequina-(4 α →8)-epicatequina (PB₄), epicatequina-(4 β →8;2 β →O→7)-epicatequina (PA₂) e epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (PC₁).

A avaliação da capacidade antioxidante confirmou os resultados obtidos por outros trabalhos com plantas que apresentam compostos fenólicos em sua composição. O estudo de EBPC, EA, EPA e FAQ revelou o poder redutor de *Paullinia cupana*, especialmente EPA, de acordo com os métodos utilizados. Pode-se considerar o guaraná como uma opção na pesquisa de novos medicamentos para doenças degenerativas desencadeadas por radicais livres.

Os resultados obtidos no estudo preliminar do potencial antibacteriano frente a *Streptococcus mutans in vitro*, sugeriram que os extratos de *Paullinia cupana* poderiam ser empregados na prevenção da formação de placa bacteriana dentária. Conseqüentemente na formação da cárie dental, uma vez que seus extratos demonstraram a inibição da aderência bacteriana em superfície lisa, fator predisponente para o desenvolvimento da cárie e doenças periodontais, além de reduzir a produção de ácidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, M.; GRIFFITHS, G.; DUMMER, P.; KINGDOM, A.; SHAW, W.C. The distribution of plaque and gingivitis and influence of tooth brushing in a group of South Wales 11-12 years old children. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 14, p. 564-572, 1987.

ADDY, M.; SLAYNE, M.A.; WADE, W.G. The formation and control of dental plaque – an overview. **Journal Applied Bacteriology**, v. 73, p. 269-278, 1992.

AHERNE, S.; O'BRIEN, N. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487-491, 2001.

ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 513-518, 2004.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.

ANDRADE, L. **Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná**. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado)–Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.

ANDRADE, L.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M. Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 7-9, 1999.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

ANTONELLI USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; PALAZZO DE MELLO, J.C. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 26, n. 1, p. 5-9, 2007.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L.M.; MELLO, J.C.P. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 383-386, 2004.

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A.; HOPPEN, V.R. Introdução da técnica espectrofotométrica na detecção da cafeína em guaraná. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, p. 39-44, 1987.

BAE, G.U.; SEO, D.W.; KWON, H.K.; LEE, H.Y.; HONG, S.; LEE, Z.W.; HA, K.S.; LEE, H.W.; HAN, J.W. Hydrogen Peroxide Activates p70^{S6k} Signaling Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32596-32602, 1999.

BALDÉ, A.M.; van HOOF, L.; PIETERS, L.A.; van der BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Plant antiviral agents. VII Antiviral and antibacterial proanthocyanidins from the bark of *Pavetta oeariensis*. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 182, 1990.

BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. **Contribuição Efetiva do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade**. Campinas: MCT/PADCT/PGCT, 1995.

BARBOSA, G.D.A.F.; MELLO, J.C.P. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. **Revista Paulista de Odontologia**, n. 4, p. 28-30, 2004.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32–36, 2005.

BAUER, V.; SOTNIKOVA, R.; MACHOVA, J.; MATYAS, S.; PUCOVSKY, V.; STEFEK, M. Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine, vessels and airways and the effect of antioxidants. **Life Sciences**, v. 65, n. 18/19, p. 1909-1917, 1999.

BAUMANN, T.W.; SCHULTHESS, B.H.; HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**, 18.03.2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Riqueza de espécies**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/capa/index.html>>. Acesso em: 06 jul. 2006.

BYDLOWSKI, S.P.; YUNKER, R.L.; SUBBIAH, M.T.R. A novel property of na aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 535-538, 1988.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; ALBUQUERQUE, F.A.A.; LEAL, L.K.A.; RAO, V.S.N. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760. 1997.

CARDOSO, M.L.C. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach – Malpighiaceae – (nó-de-cachorro)**. 2002. 128 f. Tese (Doutorado)–Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

CARLSON, M.; THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guarana. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 20, p. 433-449.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.3, p. 545-555.

CZINNER, E.; HAGYMÁSI, K.; BLÁZOVICS, A.; KÉRY, Á.; SZÖKE, É.; LEMBERKOVICS, É. *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 437–443, 2000.

DANNE, A. **Polyphenole aus den traditionellen Arzneipflazen *Cistus incanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae)**. 1994. 262 f. Tese (Doutorado)–Pharmazeutisch Biologie und Phytochemie, Münster, Alemanha, 1994.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society symposium**, v. 61, p. 1-31, 1995.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 9. ed. Ausgabe, Stuttgart, Wissenschaftliche, 1986.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC Press, 1987, p. 349.

EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; OLIVEIRA, L.F.C.; ALIA, J.M.; LE HYARIC, M.; AMEIDA, M.V. FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, p. 177-186, 2005.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, 32,p.235-239, 1991.

ESPÍNOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 223-229, 1997.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 10, p. 229-245.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 12, p. 263-288.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 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. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 1628-1637, 1977.

FONSECA, C.A.S.; LEAL, J.; COSTA, S.S.; LEITÃO, A.C. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, p. 165-173, 1994.

FOO, L.Y.; LU, Y.; HOWELL, A.B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriate *Escherichia coli* *in vitro*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 173-181, 2000.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.D.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Protective effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862-867, 2006.

GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.A. Acute effects of the Guaraná – *Paullinia cupana* on the cognition of normal volunteers. **São Paulo Medical Journal/RPM**, v. 112, n. 3, p. 607-611, 1994.

GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.A. The effects of long-term administration of guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Medical Journal/RPM**, v. 114, n. 1, p. 1073-1078, 1996.

GALINA, K.J. ***Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: estudo botânico, químico e microbiológico**. 2003. 105 f. Tese (Mestrado)–Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2003.

GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 251-256, 1996.

GIBBONS, R.J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **Journal of Dental Research**, v. 63, n. 3, p. 378-385, 1984.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1983, 1983.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 1, p. 13-28.

GUO, C.; CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables.

Relationships to oxygen radical absorbance capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1787–1796, 1997.

HADA, S.; KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Identification of antibacterial principles against *Streptococcus mutans* and inhibitory principles against glucosyltransferase from the seed of *Areca catechu* L. **Phytotherapy Research**, v. 3, p. 140-144, 1989.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 1 part 2, p. S44-S52, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HAMADA, S.; TORII, M.; KOTANI, S.; TSUCHITANI, Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. **Infection and Immunity**, v. 32, n. 1, p. 364-372, 1981.

HAMADA, S.; HORIKOSHI, T.; MINAMI, T.; KAWABATA, S.; HIRAOKA, J.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 4161-4167, 1991.

HAMILTON-MILLER, J. M. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 299-302, 2001.

HARBORNE, J. **Phytochemical Methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall. 3. ed. 1998.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p 205-215, 1996.

HASLAM, E. **Practical Polyphenolics**: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1. ed. 1998. p. 10-83 (24-31), 178-225 (180, 193-194)

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**, v. 59, p. 749-758, 2002.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, I.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols of glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 38, n. 3, p. 717-720, 1990.

HEMINGWAY, R.W.; FOO, L.Y.; PORTER, L.J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I (Easton)**, p. 1209-1216, 1982.

HENMAN, A.R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.

HIRATA, L.L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. 2004. 95 f. Tese (Mestrado)– Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, C.C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 187-191, 2001.

HOLETZ, F.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.; MORGADO-DIAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 397-401, 2005.

HOLLMAN, P.; KATAN, M. Dietary flavonóides: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.

HÖR, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 208-212, 1995.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp>>. Acesso em: 11 jul. 2006.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

JACQUES, D.; HASLAM, E.; BEDFORD, G.R.; GREATBANKS, D. Plant proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 2663-2671, 1974.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, p. 428-430.

KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T.; OKUDA, T.; NAMBA, T. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 34, p. 720-725, 1986.

KAMPA, M.; ALEXAKI, V.I.; NOTAS, G.; NIFLI, A.P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. R63-R74, 2004.

KARCHESY, J.J.; HEMINGWAY, R.W. Condensed tannins: (4 β →8;2 β →O→7)-linked procyanidins in *Arachis hypogaea* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 966-970, 1986.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401-411, 2004.

KOFINK, M.; GALENSA, R. Enantiomerentrennung von Catechinen mittels Kapillarelektrophorese. **Lebensmittelchemie**, v. 59, p. 111-112, 2005.

KOHLMEIER, L.; HASTINGS, S. B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, suppl. 6, 1370S–1376S, 1995.

KOŁODZIEJ, H. Synthesis and characterization of procyanidin dimmers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1209-1215, 1986.

KOŁODZIEJ, H. Tannins of medicinal plants: application of ¹H RMN parameters to the analysis of procyanidins. **Farmaceutisch tijdschrift voor België**, v. 66e, p. 44, 1989.

KOŁODZIEJ, H. ¹H NMR spectral studies of procyanidin derivatives: derivation of diagnostic ¹H NMR parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. In: HEMINGWAY, R.W.; LAKS, P.E. **Plant Polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum Press. 1. ed. 1992. p. 295-320.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Medica**, n. 65, p. 444-446, 1999.

KOMBAL, R. **Untersuchung der Flavan-3-ole und Flavonoide in *Potentilla anserine* L.** 1993. Tese (Doutorado em Ciências Naturais)-Universidade de Münster, Münster, Alemanha.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 245-248, 1992.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004.

LAUTENBACHER, L. Guarana. Wunderdrogue oder genußmittel? **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 134, n. 31, 1994.

LIMSONG, J.; BENJAVONGKULCHAI, E.; KUVATANASUCHATI, J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 281-289, 2004.

LLESUY, S.F. Introdução y especies activas de oxígeno. In: MARRONI, N.P. (Organizadora). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 1. ed., Canoas: Editora da ULBRA, p. 21-32, 2002.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265-272, 2005.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, p. 197–202, 2001.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MACEDO, N.L.; LACAZ NETTO, R.; SOUZA, W.L.A.; LIMA, F.R. Placa bacteriana dentária I – Película adquirida. **Revista Ars Cvrandi em Odontologia**, v. 4, n. 5, p. 4-9, 1977a.

MACEDO, N.L.; LACAZ NETTO, R.; SOUZA, W.L.A.; LIMA, F.R. Placa bacteriana dentária II – Formação. **Revista Ars Cvrandi em Odontologia**, v. 4, n. 7, p. 16-26, 1977b.

MACEDO, N.L.; LACAZ NETTO, R.; SOUZA, W.L.A.; LIMA, F.R. Placa bacteriana dentária III – Aspectos estruturais e microbiológicos. **Revista Ars Cvrandi em Odontologia**, v. 5, p. 4-16, 1978a.

MACEDO, N.L.; LACAZ NETTO, R.; SOUZA, W.L.A.; LIMA, F.R. Placa bacteriana dentária IV – Matriz intermicrobiana, composição química, metabolismo. **Revista Ars Cvrandi em Odontologia**, v. 5, p. 3-11, 1978b.

MACHADO, O. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do Brasil – o guaraná. **Rodriguésia**, v. 9, n. 20, p. 89-110, 1946.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. Review. **Phytochemistry**, v. 24, p. 639-652, 1985.

MARX, F. Analysis of guarana seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 190, p. 429-431, 1990.

MARX, F.; MAIA, J.G. Analysis of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). III. Identification and determination of guarana beverages by HPLC analysis of caffeine and theophylline. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 285-286, 1990.

MATSUMOTO, M.; MINAMI, T.; SASAKI, H.; SOBUE, S.; HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. **Caries Research**, v. 33, n. 6, p. 441-445, 1999.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MELLO, J.C.P. **Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae)**. 1995. 263 f. Tese (Doutorado)–Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelfinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-812, 1996a.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857-862, 1996b.

MELLO, J. C. P.; REBECCA, M. A.; PERES, P. G. P.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; AMADO, C. A. B.; AUDI, E. A. Controle de qualidade e atividade biológica da droga vegetal *Leonurus sibiricus* L. (Labiatae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 20-22, 1998.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric prodelfinidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.

MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. A.; AREU, B. A.; ENDO, E. H. Effect of crude extract of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) on growth and cell differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*. In: Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, XXVII, 2000, Caxambu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. II, p. 133-133, 2000.

MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.19, n.3, p. 211-215, 2000.

MENEZES, J.R. J.B.F. do exame microscópico do guaraná em bromatologia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 1, p. 45-68, 1942.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231–237, 2004.

NAKAHARA, K.; KAWABATA, S.; ONO, H.; OGURA, K.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 968-973, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5, vol. 20, #2. National committee for clinical laboratory standards, Wayne, PA; 5 ed.

NIERENSTEIN, M. Catechutannins: *Paullinia cupana*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 23-28, 1922.

NOELLI, F.S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **Revista Diálogos**, v. 2, p. 177-199, 1998.

NONAKA, G.I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 2139-2145, 1983.

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M.A.; CRISAFI, G.; MUSOLINO, A.D.; PROCOPIO, F.; ALONZO, V. Modifications of hydrophobicity, *in vitro* adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 423-427, 2004.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**, v. 55, p. 117-122, 1989.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 507-521, 1993.

ONISHI, M.; OZAKI, F.; YOSHINO, F.; MURAKAMI, Y. An experimental evidence of caries preventive activity of non-fluoride component in tea. **Journal of Dental Health (Tokyo)**, v. 31, p. 158-161, 1981.

OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T.; TAKEI, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; HAMADA, S. The caries inhibitory effects of GOS-sugar *in vitro* and in rat experiments. **Microbiology and Immunology**, v. 32, n. 11, p. 1093-1105, 1988.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.; YOSHIDA, T.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Noncariogenicity of maltitol in specific pathogen-free rats infected with mutans streptococci. **Caries Research**, v. 26, p. 33-37, 1992.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N.; HAMADA, S. Noncariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 43-49, 1983.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Research**, v. 27, n. 2, p. 124-129, 1993.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; TAMURA, Y.; HAMADA, S. Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. **Caries Research**, v. 28, n. 3, p. 146-149, 1994.

OOSHIMA, T.; OSAKA, Y.; SASAKI, H.; OSAWA, K.; YASUDA, H.; MATSUMURA, M.; SOBUE, S.; MATSUMOTO, M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p. 639-645, 2000.

OTAKE, S.; MAKIMURA, M.; KUROKI, T.; NISHIHARA, Y.; HIRASAWA, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Research**, v. 25, p. 438-443, 1991.

OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C.; AUDI, E.A. Avaliação do extrato bruto e semipurificado do guaraná em testes comportamentais. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2001, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, 2001. p. 68.

OTOBONE, F.J.; SANCHES, A.C.; NAGAE, R.L.; MARTINS, J.V.C.; OBICI, S.; MELLO, J.C.P.; AUDI, E.A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on cognitive performance in Morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 723-728, 2005.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Research Communications (Copenhagen)**, v. 46, p. 3-52, 1981.

PAGLIARUSSI, R.S.; FREITAS, L.A.P.; BASTOS, J.K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 10-16, 2002.

PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NARHSTEDT, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 981-985, 1991.

PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur Entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae)**, Münster, 1992. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais)-Universidade de Münster, Münster, Alemanha.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PLANTAS MEDICINAIS DE KÖHLER. In: WOLTERS, B. **Drogen Pfeilgift und Indianermedizin**: Arzneipflanzen aus Südamerika. Greifenberg: Urs Freund Verlag. 1. ed. 1994. p. 153.

PORTER, L.J. Structure and chemical properties of the condensed tannins. In: HEMINGWAY, R.W.; LAKS, P.E. **Plant Polyphenols**: synthesis, properties, significance. New York: Plenum Press. 1. ed. 1992. p. 245-258.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Estimulantes do sistema nervoso central e drogas psicotomiméticas. In: **Farmacologia** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 511.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; NEBOJSA, I.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and Human Health in the Twenty-first Century. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.522-531, 2002.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

RATES, S.M.K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 34, p. 885-901.

REIS, M.S. dos; MARIOT, A; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 3, p. 45-74.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier. 1. ed. 1997. p.149-162, 207.

ROCHA, J.C.B. **Avaliação da qualidade, estudo químico, histológico e de permeação cutânea de extratos das cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*,**

Sterculiaceae. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado)-UEM. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maringá.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; DEANS, S.G.; DORMAN, H.J.D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* e *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v. 66, p. 687-693, 2000.

SAKANAKA, S.; SATO, T.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic streptococci. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 2925-2929, 1990.

SALVADOR, M.; PICADA, J.N. Os vinhos como antioxidantes. In: MARRONI, N.P. (Organizadora). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**, 1. ed., Canoas: Editora da ULBRA, p. 21-32, 2002.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 101-107, 2005

SANCHES, A.C.C.; NAGAE, R.L.; AUDI, E.A. Avaliação da atividade antidepressiva do extrato de sementes do guaraná (*Paullinia cupana*) em ratos. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA E ANÁLISES CLÍNICAS DE MARINGÁ, 3., 1999, Maringá. **Resumos...** Maringá: UEM, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.M.; MUÑOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J.M. Evaluation of the toxicity of guarana with *in vitro* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, p. 164-167, 1998.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 24, p. 517-544.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed rev. ampl., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 15, p. 371-400.

SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 134, n. 34, p. 3167-3179, 1994.

SCHULTZ, A.R. **Introdução ao estudo da Botânica Sistemática**. 3. ed. Porto Alegre: Globo, 1968, v. 2, p. 179.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 1. ed., Barueri: Ed. Manole Ltda., 2002, cap. 1, 3, p. 1-40, 125-126.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SILVA, S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L.H.; MARTINS M.V.M. **Plantas Medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Pesquisa financiada pelo Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha e pelo Ibama, 2001.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOMBRA, L.L.; GÓMEZ, M.R.; OLSINA, R.; MARTÍNEZ, L.D.; SILVA, M.F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2004.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed rev. ampl., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 13, p. 289-326.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2005, p. 437-441.

STAMFORD, T.C.M.; PEREIRA, D.M.S.; ALCÂNTARA, L.C.; COUTO, G.B.L. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes sadios. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, n. 1, p. 71-76, 2005.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, suppl. 6, p. 1365S-1369S, 1995.

STRALFORS, A. Effect of hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials (caries in relation to food consumption and animal growth). **Archives of Oral Biology**, v. 12, n. 3, p. 321-332, 1967.

SUFRAMA. **Potencialidades regionais**: estudo de viabilidade econômica – Guaraná. Manaus, 2003.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **International Congress Series**, v. 1284, p. 103-112, 2005.

The MERCK Index, New Jersey: Merck, 22. ed., 1996.

THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E. TANNER, R.J.N. Plant pranthocyanidins. Part 1. Introduction, the isolation, structure and distribution in nature of plants procyanidins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 1387-1399, 1972.

TOLEDO, C.E.M. de. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos de barbatimão [Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville, Leguminosae]**. 2002. 116 f. Tese (Mestrado)–Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

UEFFING, I. **Untersuchung von Procyanidinen in *Tilia spec.*-ein Beitrag zur qualitativen und quantitativen HPLC-Analytik von Flavanolen.** 1988. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais)-Universidade de Münster, Münster, Alemanha.

USHIROBIRA, T.M.A. **Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná).** 2003. 198 f. Dissertação (Mestrado)-Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2003.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; AUDI, E.A.; MELLO, J.C.P. de. Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2004.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2800-2802. (1995).

VIVAS, N.; GLORIES, Y.; PIANET, I.; BARBE, B.; LAGUERRE, M. Acomplete structural and conformational investigation of procyanidin A2 dimer. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 12, p. 2015-2018, 1996.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie.** 7. ed. Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, 1993, p. 65-69.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed rev. ampl., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 4, p. 75-89.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WECKERLE, C.S.; STUTZ, M.A.; BAUMANN, T.W. Purine alkaloids in *Paullinia*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 735-742, 2003.

WEINGES, K.; GÖRITZ, K.; NADER, F.; PERNER, J. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XI Konfigurationbestimmung von $C_{30}H_{26}O_{12}$ - Procyanidine und Strukturaufklärung eines neuen Procyanidins. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 715, p. 164-171, 1968b.

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H.D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschritte der Chemical Organischer Naturstoffe**, v. 27, p. 158-260, 1969.

WINROW, V.R.; WINYARD, P.G.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. **British Medical Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 506-522, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevention methods and programmes for oral diseases.** Geneva: WHO Technical Report Series, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines.** Manila, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the appropriate use of herbal medicines.** Manila, 1998a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials.** Genebra, 1998b.

YANAGIDA, A.; KANDA, T.; TANABE, M.; MATSUDAIRA, F.; CORDEIRO, J. G. O. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factor of mutans streptococci. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5666-5671, 2000.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 27-32, 1995.

YEN, G.C.; DUH, P.D. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 629-632, 1994.