

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

**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)**

TÂNIA MARA ANTONELLI USHIROBIRA

MARINGÁ

2003

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

**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)**

TÂNIA MARA ANTONELLI USHIROBIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Carlos Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

MARINGÁ

2003

Dedico este trabalho ao meu esposo Massao,
por seu apoio e amor incondicional, e à minha
querida filha Raisia, a quem minhas ausências
foram, com certeza, mais sentidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela força nas dificuldades.

Aos meus pais Antonio e Isidia pelo amor, confiança e incentivo nos estudos.

Aos meus irmãos Umberto (*in memoriam*) e Gilberto pelo carinho, apoio e oportunidade de desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela confiança, incentivo e amizade durante sua orientação.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Marques pela ajuda e experiência repassada nesses anos de trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Heinrich Luftmann do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pelos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, do Departamento de Análises Clínicas – UEM, pelo acompanhamento nos ensaios microbiológicos.

Ao Prof. Msc. Edílson Nobuyoshi Kaneshima, do Laboratório de Patologia – UEM, pela ajuda na realização da análise histopatológica.

À farmacêutica bioquímica Luciene Setsuko Akimoto, proprietária do Laboratório Cedlab, pela realização dos exames laboratoriais.

À Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, pela colaboração durante o estágio em docência.

Aos técnicos Leocir e Admir (Farmacognosia), Cláudio (Farmacotécnica), Marinete (Microbiologia), Maristela (Patologia) e Dra. Ivânia (Química) que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos colegas de turma pela amizade recebida.

Aos amigos Andréia Cristina Conegero Sanches, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo, Gisely Cristiny Lopes, Greisiele Lorena Pessini, Karen Janaína Galina e Valter Roman Junior, pelo companheirismo e auxílio no trabalho experimental.

À todos os colegas estagiários que de alguma forma me auxiliaram, principalmente à Leila Mariko Uemura e Elza Yamaguti pela dedicação dispensada.

Às secretárias Sônia e Helena do Departamento de Farmácia e Farmacologia.

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

“A falsa ciência gera ateus;
a verdadeira ciência leva os homens
a se curvar diante da divindade”.

Voltaire (1694 – 1778)

RESUMO

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, conhecida como guaraná, é uma planta nativa brasileira, cultivada principalmente na região amazônica, e suas sementes possuem altos teores de metilxantinas e taninos. É empregada popularmente como estimulante das funções cerebrais. A partir do extrato bruto (EBPC) das sementes de guaraná, obteve-se duas frações semi-purificadas: FAQ e EPA, (patente requerida sob sigilo pela UEM). A EPA foi fracionada através de cromatografia em coluna de Sephadex® (CC), obtendo-se 24 subfrações, das quais foram isoladas e identificadas as substâncias: cafeína, catequina, epicatequina e procianidinas B₂, B₃ e B₄. A atividade antibacteriana dos extratos e substâncias isoladas foi avaliada *in vitro* frente à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentando atividade frente aos microorganismos até a concentração de 1000 µg/ml. Foi realizado com a fração EPA estudo toxicológico pré-clínico agudo e subcrônico. O teste agudo, em camundongos machos Swiss, produziu mortalidade, com DL₅₀ de 1,769 ± 0,242 g/kg (v.o.) e 0,593 ± 0,097 g/kg (i.p.). O teste subcrônico, em ratos machos e fêmeas Wistar, produziu diminuição no ganho de peso corporal nos ratos machos. Os exames bioquímicos, estatisticamente significativos, não foram equivalentes entre os sexos (machos: fosfatase alcalina, glicemia e TGP; fêmeas: amilase, fosfatase alcalina, glicemia, triglicérides e uréia) e não houve observação de uma relação dose-dependente. Esses resultados sugerem para a fração EPA uma possível hepatotoxicidade.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*. Metilxantinas. Flavan-3-óis. Taninos condensados. Atividade antibacteriana. Estudo toxicológico agudo e subcrônico

ABSTRACT

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, popularly known as “guaraná”, is a Brazilian plant, growing in the Amazonian area, and their seeds has a high concentration of tannins and methylxanthines. This plant is popularly used as a stimulant of the cerebral functions. From the crude extract (EBPC) of the seeds of “guaraná” was obtained a semi-purified extract (EPA) and aqueous fraction (FAQ) (requeried patent). The EPA was chromatographed by CC (Sephadex–LH20) and 24 subfractions were obtained, which were isolated and identified the following compounds: caffeine, catechin, epicatechin, procyanidins B₂, B₃ and B₄. The antibacterial activity of the extracts and isolated compounds was carried out against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and presented a negative effect at the concentration lower than 1000 µg/ml. The acute and subchronic toxicology evaluation was carried out with EPA fraction. In the acute toxicology test, with Swiss male mice, were observed LD₅₀ 1,769 ± 0,242 g/kg (p.o.) e 0,593 ± 0,097 g/kg (i.p.). The subchronic test, with male and female Wistar rats, led to decrease of the body weight gains in the male rats. In spite of the data no-simultaneous between males and females animals, about the biochemical analyses with statistically significant results (males: alkaline phosphatase, glucose and alanine aminotransferase; females: amylase, alkaline phosphatase, glucose, triglycerides and urea) and no observation dose-response relationship, these results suggest that the EPA fraction showed some possible toxicity at the liver.

Keywords: *Paullinia cupana*. Methylxanthines. Flavan-3-óis. Condensed tannins. Antibacterial activity. Acute and subchronic toxicological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	35
2	Figuras moldadas a partir da pasta do guaraná.....	37
3	I - Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II - Teofilina (1,3-dimetilxantina); III - Teobromina (3,7-dimetilxantina).....	39
4a	Taninos condensados diméricos – Série B de procianidinas.....	43
4b	Monômeros básicos de taninos condensados.....	44
5	Cromatograma das 24 subfrações da EPA.....	74
6	Espectro de massas da substância I	79
7	Espectro de ¹ H RMN da substância I	80
8	Espectro de HETCOR da substância I	81
9	Espectro de HMBC da substância I	82
10	Estrutura da substância I , cafeína.....	83
11	Espectro de massas da substância II	87
12	Proposta de fragmentação da substância II	88
13	Espectro de ¹ H RMN da substância II	89
14	Espectro de ¹ H/ ¹ H COSY da substância II	90
15	Estrutura da substância II , epicatequina.....	91
16	Espectro de dicroísmo circular da epicatequina.....	92
17	Espectro de massas da substância III	95
18	Espectro de ¹ H RMN da substância III	96
19	Espectro de ¹ H/ ¹ H COSY da substância III	97

20	Estrutura da substância III , catequina.....	98
21	Espectro de dicroísmo circular da catequina.....	99
22	Espectro de massas da substância IV acetilada.....	104
23	Espectro de ¹ H RMN da substância IV acetilada.....	106
24	Espectro ¹ H/ ¹ H COSY de da substância IV acetilada.....	109
25	Estrutura da substância IV , procianidina B ₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina].....	110
26	Espectro de massas da substância V acetilada.....	111
27	Espectro de ¹ H RMN da substância V acetilada.....	113
28	Espectro de ¹ H/ ¹ H COSY da substância V acetilada.....	116
29	Estrutura da substância V , procianidina B ₃ [catequina-(4α→8)-catequina].....	117
30	Espectro de massas da substância VI acetilada.....	118
31	Espectro de ¹ H RMN da substância VI acetilada.....	119
32	Espectro de ¹ H/ ¹ H COSY da substância VI acetilada.....	123
33	Estrutura da substância VI , procianidina B ₄ [catequina-(4α→8)-epicatequina].....	124
34	Cromatograma da fração EPA contendo catequina (1), epicatequina (2) e cafeína (3).....	125
35	Curva padrão de epicatequina.....	126
36	Curva padrão de catequina.....	127
37	Cromatograma da subfração 5: catequina (1), epicatequina (2)	128
38	Cromatograma da subfração 8: catequina (1), epicatequina (2)	129
39	Cromatograma com padrão interno de catequina.....	129
40	Cromatograma com padrão interno de epicatequina.....	129

41	Cromatograma da subfração 9 contendo procianidinas B ₃ (1), B ₄ (2) e B ₂ (3).....	130
42	Preparo da placa de 96 poços.....	140
43	Gaiolas metabólicas.....	146
44	Cromatograma da atividade antioxidante do guaraná.....	152
45	Evolução ponderal de ratos machos tratados com fração EPA	162
46	Evolução ponderal das fêmeas tratadas com fração EPA.....	162
47	Peso dos rins dos ratos machos tratados subcronicamente com a fração EPA (v. o.).....	164
48	Peso dos pulmões dos ratos machos tratados subcronicamente com a fração EPA (v. o.).....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos.....	44
2	Gradiente da fase móvel utilizada para CLAE.....	60
3	Análise química preliminar das sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	67
4	Determinação do resíduo seco das sementes de <i>P. cupana</i>	69
5	Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA.....	75
6	Deslocamentos da substância I	78
7	Deslocamentos da substância II	86
8	Deslocamentos da substância III	94
9	Dados de ¹ H RMN da substância IV acetilada.....	105
10	Dados de ¹ H RMN da substância V acetilada.....	112
11	Dados de ¹ H RMN da substância VI acetilada.....	120
12	Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos, frações e substâncias isoladas das sementes de <i>P. cupana</i> em µg/ml.....	154
13	Concentração inibitória mínima controle com antibacterianos.....	156
14	Efeito toxicológico da fração EPA administrada por v.o. e i.p. em camundongos.....	158
15	Evolução ponderal de camundongos machos tratados agudamente com fração EPA.....	160
16	Peso dos órgãos no teste agudo em camundongos tratados	

	com fração EPA.....	160
17	Peso dos órgãos dos ratos machos submetidos a tratamento subcrônico com fração EPA.....	163
18	Peso dos órgãos das fêmeas submetidas a tratamento subcrônico com fração EPA.....	163
19	Resultados do teste do campo aberto (mov/5min) dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA.....	166
20	Parâmetros hematológicos dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA.....	169
21	Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA.....	170
22	Resultados histopatológicos (frequência) de ratos machos submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA.....	172
23	Resultados histopatológicos (frequência) das fêmeas submetidas ao tratamento subcrônico com fração EPA.....	173

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma		Página
1	Preparação de extratos e fracionamento cromatográfico da fração semipurificada EPA.....	73
2	Fracionamento cromatográfico da F#5.....	84
3	Fracionamento cromatográfico da F#9.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AMREF	Amostra referencial
AMT	Amostra teste
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMH	Caldo Mueller-Hinton
COSY ¹H/¹H	Espectroscopia de correlação hidrogênio – hidrogênio
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espectro de massas
F#...	Subfrações obtidas a partir da fração EPA
FeCl₃	Cloreto férrico
HETCOR	Espectroscopia de correlação carbono - hidrogênio

i.p.	Via intraperitoneal
m	Multipleteo
PNA	Polifenóis não adsorventes
PPS	Perda por secagem
PPD	Perda por dessecação
PT	Polifenóis totais
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SM	Solução mãe
SNC	Sistema nervoso central
ST	Solução teste
SVS	Secretaria de vigilância sanitária
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade formadora de colônia
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS GERAIS	29
CAPÍTULO 1 CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO QUÍMICO	30
1. REVISÃO DE LITERATURA	31
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	31
1.1.1 Família Sapindaceae.....	31
1.1.2 Gênero <i>Paullinia</i>	32
1.1.3 <i>Paullinia cupana</i> H.B.K. var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke.....	33
1.2 ASPECTOS QUÍMICOS.....	38
1.2.1 Metilxantinas.....	38
1.2.1.1 Cafeína.....	40
1.2.2 Taninos.....	41
1.2.3 Outras substâncias químicas.....	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	48
3.2 MATERIAL.....	48
3.2.1 Solventes, reagentes e soluções.....	48
3.2.2 Materiais e equipamentos.....	50
3.3 CONTROLE DE QUALIDADE.....	52
3.3.1 Análise química preliminar.....	52
3.3.2 Análises físico-químicas.....	52

3.3.2.1	Determinação da perda por secagem.....	52
3.3.2.2	Determinação da perda por dessecação.....	53
3.3.2.3	Determinação do teor de extrativos.....	53
3.3.2.4	Determinação do teor de resíduo seco.....	54
3.3.3	Análise química quantitativa.....	54
3.3.3.1	Determinação do teor de taninos totais.....	54
3.3.3.2	Determinação do teor de metilxantinas.....	55
3.3.3.3	Determinação do teor de cinzas totais.....	56
3.3.3.4	Determinação de óleos fixos.....	56
3.4	PREPARAÇÃO DE EXTRATOS.....	57
3.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	57
3.5.1	Cromatografia em coluna (CC) da fração EPA.....	57
3.5.2	Cromatografia em camada delgada.....	58
3.5.3	Cromatografia em coluna das subfrações F#5 à F#9.....	58
3.5.4	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	59
3.5.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	60
3.5.5.1	Condições cromatográficas.....	60
3.5.5.2	Curva de calibração dos padrões.....	61
3.5.5.3	Preparo das amostras.....	61
3.5.5.4	Análise quantitativa.....	61
3.6	DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA.....	62
3.7	ANÁLISE ESTRUTURAL.....	63
3.8	HIDRÓLISE DE DÍMEROS.....	63
3.8.1	Unidade superior.....	63
3.8.2	Unidade inferior.....	64

3.9	ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA).....	64
3.10	DICROISMO CIRCULAR.....	65
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE.....	66
4.2	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO.....	71
4.2.1	Substância I – Cafeína	76
4.2.2	Taninos condensados.....	83
4.2.2.1	Substância II - Epicatequina.....	85
4.2.2.2	Substância III – Catequina.....	93
4.2.2.3	Substâncias IV - Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B ₂).....	103
4.2.2.4	Substância V – Catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B ₃).....	110
4.2.2.5	Substância VI – Catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B ₄)	117
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	125
	CAPÍTULO 2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, MICROBIOLÓGICA E TOXICOLÓGICAS (AGUDA E SUBCRÔNICA)	131
1.	REVISÃO DE LITERATURA.....	132
1.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	132
1.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	134
1.2.1	Atividade antibacteriana.....	134
1.2.2	Atividade farmacológica e toxicológica.....	135
2.	OBJETIVOS.....	137
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	138
3.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	138

3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	138
3.2.1 Avaliação microbiológica.....	138
3.2.1.1 Padronização da suspensão bacteriana.....	139
3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método da diluição em placas.....	139
3.2.2 Avaliação toxicológica pré-clínica.....	141
3.2.2.1 Aspectos éticos.....	142
3.2.2.2 Teste agudo.....	142
3.2.2.3 Teste subcrônico.....	143
3.2.2.4 Teste do campo aberto (<i>open-field</i>).....	144
3.2.2.5 Coleta de material para análise laboratorial.....	144
3.2.2.5.1 Coleta de urina.....	144
3.2.2.5.2 Coleta de sangue.....	145
3.2.2.6 Análise laboratorial.....	147
3.2.2.6.1 Análise da urina.....	147
3.2.2.6.2 Análise do sangue.....	147
3.2.2.7 Análise histopatológica.....	148
3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	149
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	151
4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	151
4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	153
4.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA.....	157
4.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA SUBCRÔNICA.....	161
4.4.1 Evolução ponderal e comportamental.....	161
4.4.2 Exames laboratoriais.....	168

4.4.3 Análise histopatológica.....	171
CONCLUSÕES.....	177
REFERÊNCIAS.....	179
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização que o homem utiliza os vegetais como fonte de alimentos, vestuários, habitação, utilidades domésticas e como meio restaurador da saúde. As plantas medicinais e seus extratos constituíam a maioria dos medicamentos.

A importância de seu uso como medicamento no decorrer do desenvolvimento da sociedade foi bastante variável, tendo, algumas plantas, caído em progressivo desuso devido ao desenvolvimento industrial que substituiu as plantas medicinais pelos princípios ativos extraídos e isolados e posteriormente pelas substâncias sintéticas (SCHENKEL *et al.*, 2002).

Este quadro começou a mudar nas últimas décadas, quando observou-se um aumento significativo no uso de produtos naturais em todo o mundo, onde as plantas medicinais surgem como alternativa de tratamento nas doenças onde os medicamentos convencionais não tem obtido grande êxito. Outro fator seria a falsa suposição de que medicamentos fitoterápicos não apresentariam efeitos colaterais, porém há estudos que relatam que muitas plantas podem ser carcinogênicas e/ou mutagênicas (FONSECA *et al.*, 1994; BRITO *et al.*, 1990).

Atualmente, diversos centros de pesquisa nacionais e estrangeiros se dedicam ao estudo das substâncias presentes nas plantas medicinais. No Brasil, vários fatores atuam para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos pelas indústrias farmacêuticas, como a riqueza da biodiversidade brasileira, os custos de pesquisa e desenvolvimento, que são menores em relação a um medicamento sintético, a tradição no uso de plantas medicinais pela população, além da tendência

de crescimento do mercado mundial de medicamentos fitoterápicos (PEREIRA *et al.*, 2002).

O Brasil abriga 55 a 60 mil espécies de plantas do grupo das angiospermas, que é o principal e economicamente mais importante grupo de plantas terrestres. Isto equivale a aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas no mundo, e destas, 10 mil podem ser medicinais, aromáticas e úteis. Dentre os 17 países mais ricos em biodiversidade do mundo, o Brasil está em primeiro lugar, detendo de 22 a 24% do total de espécies desse grupo. Regiões como a Mata Atlântica, bacia Amazônica, a caatinga na região semi-árida do Nordeste e o Cerrado contêm grande número de espécies não encontradas em qualquer outro lugar (BRASIL, 1998).

Considerando que apenas 5% da flora mundial foi estudada até hoje e só 1% é utilizada como matéria-prima, esses dados comprovam o enorme interesse no potencial da flora brasileira, uma vez que o mercado mundial de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos soma aproximadamente U\$ 400 bilhões ao ano. Só no Brasil, no setor de medicamentos fitoterápicos, o volume de vendas já atingiu a cifra de US\$ 500 milhões. Cifra considerada pequena, se comparada aos valores publicados para a Europa e EUA, no ano de 2000: US\$ 8,5 e 6,3 bilhões respectivamente (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

O mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil começou a crescer significativamente nos últimos cinco anos, e estima-se que possa crescer pelo menos 10% ao ano nos próximos anos. Isso se deve a vários motivos entre eles o fato de serem medicamentos que atende um público de menor renda, pois não são em geral de custo elevado, (CALIXTO, 2000).

O interesse pelas plantas, surge também, no que se refere à atividade antimicrobiana que alguns vegetais possam apresentar. Atualmente, observa-se o aumento das infecções bacterianas nas populações, problema esse, que está sendo considerado um caso de saúde pública por estar relacionado com a resistência que os microorganismos têm adquirido aos antibióticos utilizados. Como exemplo pode-se citar as altas taxas de resistência notadas em patógenos hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI), onde infecções causadas por bactérias Gram-positivas têm aumentado (BAX *et al.*, 2000).

Apesar de vários estudos científicos comprovarem que a fitoterapia pode oferecer soluções eficazes e mais baratas para diversas doenças, existem poucas informações disponíveis a respeito da segurança desses medicamentos para a saúde humana. Uma das razões do pouco conhecimento sobre os medicamentos fitoterápicos está no difícil controle de qualidade (químico, físico-químico, farmacológico ou toxicológico) dos extratos vegetais utilizados. Outro problema que se pode apontar é a falta de recursos para financiar pesquisas nessa área, a ausência de política de produção de medicamentos fitoterápicos e dificuldade de interação e cooperação entre os diferentes grupos multidisciplinares que trabalham nessa área (LAPA *et al.*, 2001; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A planta medicinal, utilizada na preparação de medicamentos, é um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Portanto como todo corpo estranho os produtos de sua biotransformação pode levar à reações por parte do organismo humano. Um exemplo sobre o efeito tóxico de plantas medicinais: o confrei (*Symphytum officinale* L.) foi amplamente divulgado por apresentar propriedades terapêuticas fantásticas, no entanto, estudos toxicológicos mostraram que o confrei possui uma substância extremamente tóxica para o fígado

(HIRONO *et al.*, 1978; ABBOTT, 1988; YEONG *et al.*, 1991; 1993). Outro exemplo: as plantas do gênero *Aristolochia* são usadas como antiinflamatória, e são proibidas em diversos países por apresentarem como constituinte químico o ácido aristolóquico, que demonstrou ser nefrotóxico, carcinogênico e mutagênico (EMEA, 2002).

Dessa forma o uso popular, e mesmo tradicional, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. A avaliação dessa segurança deve ser feita com estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (LAPA *et al.*, 2001).

No Brasil, o desenvolvimento industrial de qualquer medicamento é regido pela Lei Federal nº 6360 de 1976. As exigências contidas nessa norma legal envolvem o desenvolvimento de todas as informações necessárias ao conhecimento do produto, desde os aspectos de controle de qualidade da matéria-prima e produto acabado, passando obrigatoriamente por estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos, bem como por estudos clínico-terapêuticos (BRASIL, 1976).

Em termos de medicamentos fitoterápicos, a legislação brasileira estabeleceu normas complementares à lei citada, estando essas normas constituídas pela Resolução RDC nº 17 de 24.02.00 (BRASIL, 2000), e em síntese detalha a esses medicamentos, basicamente, os mesmos requisitos éticos pertinentes a qualquer medicamento, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária (MARQUES; PETROVICK, 2001).

Os estudos toxicológicos pré-clínicos são realizados seguindo-se protocolos aceitos internacionalmente, ainda que, as exigências legais variem de país a país. No Brasil, esses estudos seguem roteiro da Organização Mundial da Saúde (1993), e são realizados segundo o protocolo da Portaria SVS nº 116 (BRASIL, 1996). Essa

Portaria apresenta roteiro de elaboração de estudos toxicológicos pré-clínicos, complementada por preceitos gerais para estudos de eficácia terapêutica (MARQUES; PETROVICK, 2001).

Portanto, diante do exposto anteriormente, para a utilização de uma planta medicinal como medicamento, ela deve ser previamente validada, ou seja, ter sua ação comprovada e sua toxicidade avaliada cientificamente como qualquer outro medicamento (LAPA *et al.*, 2001).

Considerando todos esses fatores, e o aumento do uso de plantas na medicina popular brasileira, escolheu-se como objeto de estudo nesse trabalho uma planta amplamente utilizada pela população: o guaraná. Sua importância como produto farmacêutico é demonstrada pela presença em três edições da Farmacopéia Brasileira e sua produção e comercialização são regulamentadas pelo Ministério da Agricultura - Portaria 70/82 (BRASIL, 1982).

Segundo Catálogo Brasileiro de Medicamentos, estão listadas 121 especialidades farmacêuticas contendo o produto. Isto indica que a indústria farmacêutica utiliza as sementes do guaraná na produção de medicamentos, e a indústria alimentícia utiliza-as, principalmente, na produção de bebidas refrigerantes e como complemento alimentar (ORTEGA *et al.*, 1989).

Quanto à classificação botânica, Corrêa (1984) descreve o guaraná como sendo da família Sapindaceae, com duas subespécies: *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, considerado guaraná verdadeiro do Brasil, crescendo no baixo Amazonas, e *Paullinia cupana* H.B.K. var. *typica*, do alto Orenoco, também chamado popularmente de cupana e yoco na Colômbia e Venezuela. As duas subespécies foram assim descritas pelo botânico Adolfo Ducke:

1. *Paullinia cupana* H.B.K. var. *typica* – apresenta plantas novas com folíolos fortemente lobados e recortados. Não apresenta gavinhas e suas flores e frutos são maiores que na outra variedade, chegando os frutos ao dobro ou triplo dos daquela. Esses frutos são acentuadamente obovado-piriformes e de coloração vermelho bastante escuro, com pouco brilho.

2. *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – as plantas novas apresentam folíolos fracamente lobados e as plantas adultas são abundantemente providas de gavinhas, freqüentemente junto às inflorescências ou nas mesmas. Os frutos dessa subespécie são menores, aproximadamente esféricos, de coloração vermelho vivo e brilhante.

Ao que parece a maior dificuldade para o cultivo dessa planta em outras regiões, além da região de origem no Amazonas, não está no clima e sim na qualidade do solo. Porém, aos poucos, está se conseguindo um aumento na área de cultivo do guaraná, hoje se estendendo também na região sul da Bahia (LAUTENBACHER, 1994).

As sementes são empregadas na medicina popular principalmente como estimulante das funções cerebrais, porém vários outros usos já foram relatados como: afrodisíaco, ação tônica generalizada na evolução senil, estimulante cardiovascular e do trato gastrintestinal, diurético, febrífugo, sedativo, supressor do apetite, leucorréias (corrimento vaginal), diarréias crônicas, flatulência, em casos de dispepsias atônicas e na debilidade geral, tratamento da enxaqueca e nevralgias (CORRÊA, 1984).

Quimicamente as sementes de guaraná se caracterizam pelo alto teor de metilxantinas [principalmente cafeína e em menor quantidade teofilina e teobromina (MARX *et al.*, 1985)] e provavelmente, se deve a esse fato, seu uso como

estimulante do SNC, uma vez que as metilxantinas atuam no organismo produzindo excitação e euforia, sensação diminuída de fadiga e aumento na atividade motora (RANG *et al.*, 1997).

Porém é conhecido que estas substâncias não possuem ações farmacológicas que justifiquem todos os efeitos terapêuticos alegados popularmente a essa planta. Por outro lado, é descrito a presença de altas concentrações de taninos, o que possivelmente possa explicar alguns desses efeitos terapêuticos, tendo como base recentes trabalhos de diversas áreas em relação a esse grupo de substâncias (CARLINI, 1995).

OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista a importância do guaraná no contexto atual da fitoterapia, esse trabalho objetivou o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, estudo químico e avaliações biológicas com extrato semipurificado das sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke.

CAPÍTULO 1

CONTROLE DE QUALIDADE E *ESTUDO QUÍMICO*

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS GERAIS

1.1.1 Família Sapindaceae

Essa família compreende 140 gêneros distribuídos nos trópicos e subtropicais de todo o mundo, sendo conhecida cerca de 1100 espécies. Há muito poucas espécies extratropicais. As espécies brasileiras são quase todas cipós de mata virgem (SCHULTZ, 1968).

A maioria das plantas aqui incluídas é constituída por trepadeiras com gavinhas, com caule de crescimento anômalo, ou também arbustos e mesmo árvores com folhas alternas, compostas, sem estípulas, ou às vezes inteiras.

As flores são pequenas, em geral branco-esverdeadas, 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. Sépalas e pétalas pentâmeras ou em número menor. Androceu formado em geral por 8 estames. Ovário súpero, tricarpelar e trilobular, cada lóculo com um só óvulo. Fruto seco indeiscente, de pericarpo de consistência cartilaginosa ou esquizocarpo, com frutículos samaróides, sempre com sementes no ápice. Semente às vezes com arilo (JOLY, 1998).

1.1.2 Gênero *Paullinia*

O gênero *Paullinia* L. é um grupo de plantas neotropical com aproximadamente 180 espécies. Dessas, trinta e nove são consideradas de importância econômica.

Certas espécies de *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, 1998).

Muitas são reportadas como tendo propriedades medicinais: *P. barbadensis*, *P. costaricensis*, *P. cupana*, *P. emetica*, *P. fuscescens*, *P. imbertis*, *P. jamaicensis*, *P. meliaefolia*, *P. pinnata*, *P. pterophylla*, *P. tomentosa*, *P. trigonia* e *P. yoco*. Essas espécies são utilizadas, geralmente, no tratamento de nevralgias, dores de cabeça, doenças mentais, diarréia, 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).

Este mesmo trabalho ainda relata informação sobre usos, distribuição geográfica e composição química de quarenta e uma espécies de *Paullinia*, baseadas em pesquisas de literatura botânica, médica e etnobotânica.

1.1.3 *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke

Paullinia cupana, pertencente à família Sapindaceae, é um arbusto de pequeno porte. 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, com 4 a 8 mm de diâmetro e sua casca é parda. O corpo lenhoso é simples. As folhas são isoladas, em disposição dística, compostas penadas a cinco folíolos e têm 40 cm de comprimento e de largura. As flores são polígamas, zigomorfas, com plano de simetria oblíqua, dispostas em cachos. Os frutos são cápsulas elipsóides ou esféricas, apiculadas, de cor vermelha quando maduros, que medem de 2 a 3 cm. Possuem uma ou duas sementes ovóides, com tamanho aproximado de 12 mm de comprimento, munidas de um arilo bastante abundante antes da maturação (fig. 1). É desigualmente convexa dos dois lados, às vezes encimada por um curto apículo, glabra, luzidia, de cor pardo-purpurina, ou pardo-negra e apresenta um largo hilo, que é guarnecido pelo arilo, carnosos, membranosos e esbranquiçados. O embrião, desprovido de albúmen, possui um curto eixo radículo-caulinar inferior e espessos cotilédones, desiguais, carnosos, firmes, plano-convexos (MENEZES JR., 1942; CORRÊA, 1984).

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, é feita a colheita (MENEZES JR., 1942).

O guaraná também é conhecido pelos índios pelo nome de “uaraná”, sendo originário da Amazônia, onde existe 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), no Estado do Pará, na região cacaeira da Bahia entre Salvador e Ilhéus e no Vale do Ribeira em São Paulo (CORRÊA, 1984; DUKE, 1987; HENMAN, 1982; LAUTENBACHER, 1994).

Segundo Henman (1982), uma preocupação no cultivo do guaraná refere-se aos ataques de fungos e insetos à planta. Um fungo em particular, *Colleotrichum guaranicola* Albuquerque, conhecido localmente como “a queima” e que provoca o surgimento de mancha negra no fruto do guaraná, tem enfraquecido muitas áreas de plantio ao redor de Maués, sendo essas áreas normalmente abandonadas. Porém, a poda da planta doente tem sido útil na luta contra o fungo, cuja incidência tem diminuído consideravelmente removendo-se as partes afetadas e queimando-as.

A primeira descrição escrita do guaraná data de 1669, quando o missionário jesuíta João Felipe Betendorf ao penetrar na Amazônia notou que os índios consumiam uma bebida feita de guaraná, o qual 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 servia para atenuar os riscos do calor (HENMAN, 1982).



Figura 1 – Sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

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 pequenas camadas, em local limpo, para que sequem rapidamente e sem fermentação. Depois, em forno próprio as sementes são torradas em calor regular e freqüentemente remexidas, para que fiquem uniformemente aquecidas. Depois de torradas, as sementes são transferidas para um saco onde recebem vigorosas batidas, para separação do tegumento. As sementes limpas são, em seguida, 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. 2). A pasta adquire com o passar do tempo rigidez e para ser utilizada como alimento ou na indústria farmacêutica, torna-se necessário raspar com o auxílio do osso hióide do pirarucu – peixe amazônico (CORRÊA, 1984).

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 para aumentar a consistência da massa ou o seu amargor peculiar (CORRÊA, 1984).

Há séculos atrás, os índios utilizavam as sementes de guaraná, principalmente, como estimulante tanto em festas, como em combates. Porém, outras indicações já foram relatadas como disenteria, 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).



Figura 2 – Figuras moldadas a partir da pasta do guaraná

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).

De acordo com a Portaria MAPA nº 544 de 16 de novembro de 1998, o teor mínimo de cafeína permitido em refrigerante de guaraná é de 0,6 mg/100 ml, enquanto o teor mínimo de semente de guaraná ou de seu equivalente em extrato é de 20 mg/100 ml. Ao refrigerante que for adicionado cafeína natural ou sintética, não deverá ter o limite de cafeína superior a 20 mg/100 ml do produto a ser consumido, enquanto que o refrigerante que contiver semente de guaraná ou seu equivalente em extrato não poderá ser adicionado de cafeína sintética ou obtida de outro vegetal (BRASIL, 1998).

1.2 ASPECTOS QUÍMICOS

1.2.1 Metilxantinas

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

Nos vegetais, as metilxantinas estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono. Podem ter significado ecológico para as plantas que as produzem,

influenciando a relação entre organismos e favorecendo a adaptação do vegetal a ambientes desfavoráveis (RATES, 2001).

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).

A principal reação de caracterização das metilxantinas é denominada “reação de murexida”. Pode também ser realizada em CCD utilizando-se preferencialmente gel de sílica GF₂₅₄ impregnada com vapores de amônia e sistema eluente composto de clorofórmio e etanol. A revelação é feita com iodo em meio ácido ou sob luz UV (RATES, 2001).

Para o doseamento empregam-se os métodos de gravimetria, espectrofotometria no UV e métodos cromatográficos como a CLAE e cromatografia em fase gasosa (CG) (BELLIARDO *et al.*, 1985; CARLSON; THOMPSON, 1998; ANDRADE *et al.*, 1999; FARMACOPÉIA, 2000; PAGLIARUSSI *et al.*, 2002).

Existem três metilxantinas de ocorrência natural farmacologicamente ativas: cafeína (I), teofilina (II) e teobromina (III) (fig.3) (RANG *et al.*, 1997).

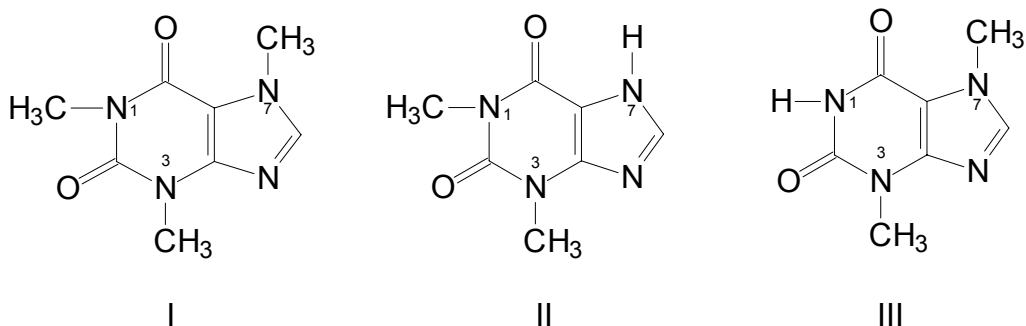


Figura 3 – I - Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II - Teofilina (1,3-dimetilxantina); III - Teobromina (3,7- dimetilxantina)

1.2.1.1 Cafeína

Entre as metilxantinas farmacologicamente ativas, a cafeína, sem dúvida, é a que mais desperta o interesse em estudos científicos. Provavelmente, pelo fato de ser o alcalóide presente em várias espécies vegetais consumidas popularmente, como por exemplo o café (*Coffea arabica* L.), erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) e guaraná [*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke].

Nas sementes de guaraná, a cafeína ocorre associada a outras substâncias do grupo das metilxantinas, principalmente teobromina e teofilina. A cafeína foi detectada também nas flores, caule e raízes de *Paullinia cupana*. Teobromina foi encontrada somente nas flores, folhas e caule, não sendo detectada a presença de teofilina (CORRÊA, 1984).

A primeira análise química descrita sobre o guaraná data de 1826 e foi feita por Theodor von Martius, que isolou das sementes uma substância branca, amarga, cristalizada em forma de agulhas e que possuía notável ação fisiológica, denominando guaranina e que representa aproximadamente 4% do peso seco das sementes (CAGNO, 1942; HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984). Posteriormente, em 1840, Berthemot e Deschastelus após análises mais detalhadas concluíram que a guaranina nada mais era que a cafeína.

A cafeína é um estimulante suave e um psicoativo amplamente utilizado no mundo. Aumenta a secreção de norepinefrina e aumenta a atividade neural em numerosas áreas cerebrais. É absorvida no trato gastrointestinal e é rapidamente distribuída por todos os tecidos, podendo atravessar com facilidade a barreira placentária. Muitos dos efeitos da cafeína parecem ocorrer por antagonismo competitivo dos receptores de adenosina, que é um neuromodulador que influencia

várias funções no sistema nervoso central. A ingestão de cafeína, ou bebidas que a contenham, produz nas pessoas menos sonolência, menos fadiga e um fluxo de pensamento mais claro e rápido. Entretanto, tarefas que exijam coordenação muscular delicada (movimentos finos) ou habilidade aritmética podem ser adversamente afetados. O aumento da dose produz sinais de progressiva estimulação do sistema nervoso central (SNC), incluindo nervosismo ou ansiedade, inquietação, insônia, tremores e hiperestesia. A doses ainda maiores, convulsões generalizadas e em foco são produzidas (BLOOM, 1996; O'BRIEN, 1996).

Quantidades excessivas de cafeína podem causar uma síndrome chamada “cafeinismo”, cujos sintomas incluem ruídos no ouvido, mudanças de temperamento, diarreia, delírios, aceleração da respiração, tensão muscular e tremores. A dose letal da cafeína em adultos é de cerca de 5 a 10 g (O'BRIEN, 1996; SERAFIN, 1996).

Estudos têm sido desenvolvidos para auxiliar na quantificação da cafeína presente nas sementes de guaraná, como por exemplo os trabalhos desenvolvidos por Andrade *et al.* (1999) e Pagliarussi *et al.* (2002).

1.2.2 Taninos

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, que apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente possibilitando seu reconhecimento em frutos verdes. Essa propriedade também é essencial para explicar a função na planta de proteção contra ataques de alguns patógenos e herbívoros.

Essas substâncias encontram-se difundidas em plantas e alimentos de origem vegetal, como por exemplo: frutas, legumes, sementes, grãos, cereais, bebidas (vinho, chá, cidra, cacau) (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

São considerados metabólitos secundários e são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MELLO; SANTOS, 2001).

Taninos hidrolisáveis são metabólitos caracterizados por uma ou mais unidades de ácido gálico esterificadas com um poliol (PORTER, 1989). Ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos que indicam estarem restritas às Choripetalae, não sendo encontradas em Sympetalae (MELLO; SANTOS, 2001).

Taninos condensados, também chamados de proantocianidinas ou leucocianidinas (HASLAM, 1975), são formados por cadeias de unidades de flavan-3-ol (monômeros) (PORTER, 1989). Ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, sendo distribuídos em plantas lenhosas.

No grupo das proantocianidinas, a cadeia mais comum é constituída por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8 (fig. 4a). Outros monômeros são também encontrados, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (PORTER, 1989), (fig.4b, tab.1).

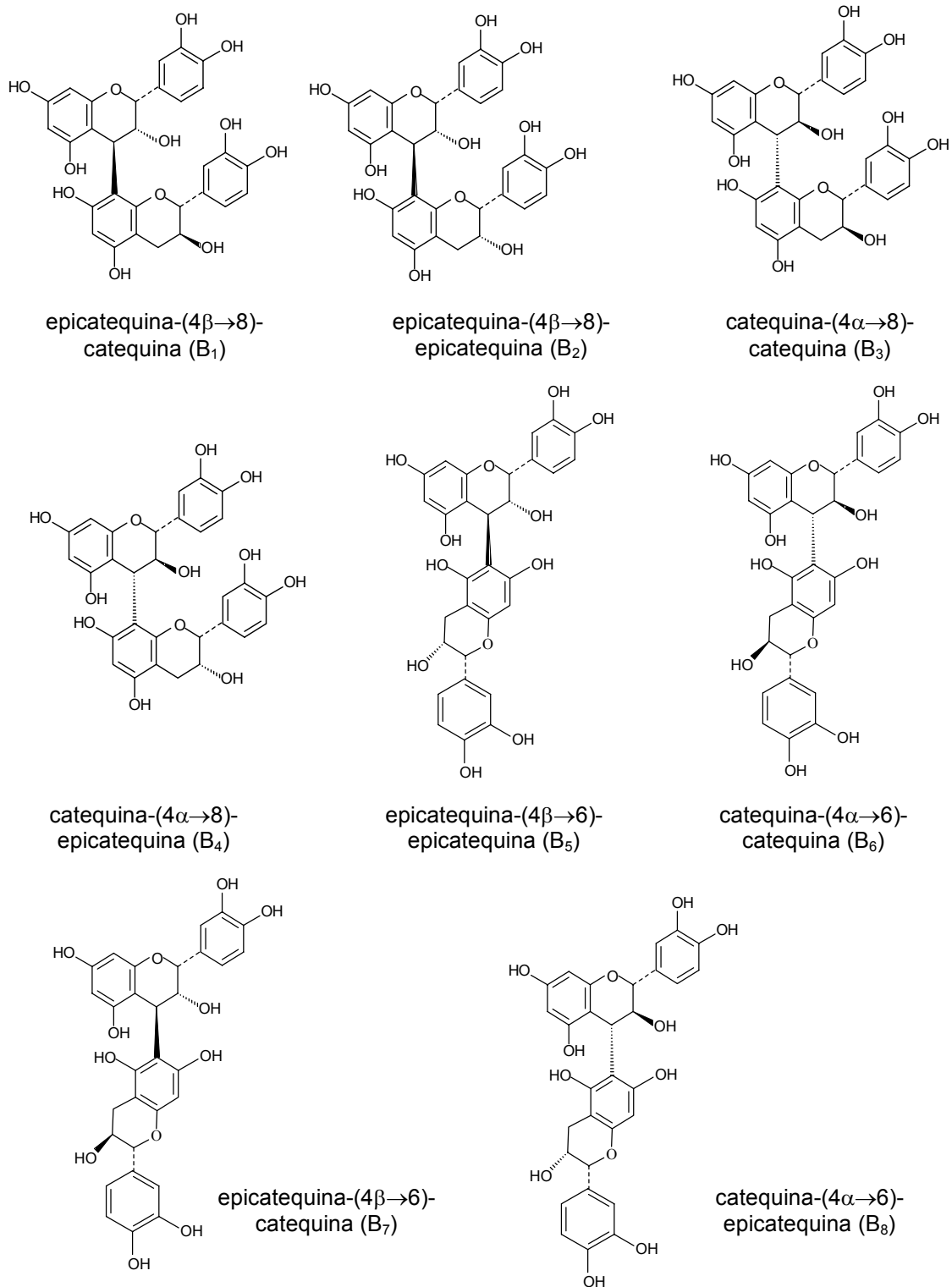


Figura 4a – Taninos condensados diméricos – Série B de procianidinas

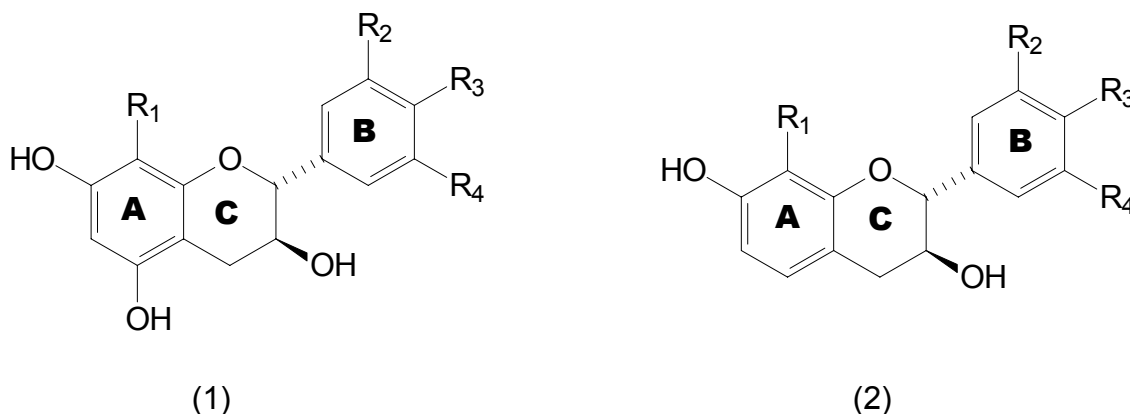


Figura 4b – Monômeros básicos de taninos condensados

Tabela 1 – Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos

Tipo	Monômero (nome trivial)	Substituinte			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	Distenina	H	H	H	H
	Afzelequina	H	H	OH	H
	Catequina	H	OH	OH	H
	Galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Oritina	OH	H	OH	H
	Mesquitol	OH	OH	OH	H

Fonte – MELLO; SANTOS, 2001.

A nomenclatura comum dos flavan-3-óis e proantocianidinas derivam originalmente de Weinges *et al.* (1968a e 1968b) e de Thompson *et al.* (1972).

Os dímeros de procianidinas foram caracterizados através do nome usual e divididos em dois grupos, designados por A (C₃₀H₂₄O₁₂) e B (C₃₀H₂₆O₁₂) (MELLO;

SANTOS, 2001). O grupo do tipo B é o mais comumente encontrado na natureza, tendo sido isolado de diversas espécies vegetais (THOMPSON *et al.*, 1972).

A natureza polimérica das proantocianidinas dificulta as análises desses compostos devido à sua complexidade estrutural, assim, pouco se conhece sobre seu consumo em termos quantitativos, apesar de ser clara a amplitude de seu consumo diário. Dessa forma muitos métodos analíticos têm sido utilizados como forma de quantificá-los nas plantas e nos alimentos (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

Muitos dos efeitos biológicos de interesse dos taninos condensados, derivam de suas propriedades físico-químicas que são: formar complexos estáveis com íons metais e com proteínas e, como outros polifenóis são bons agentes redutores. Como agentes redutores, eles podem participar na prevenção de câncer de diferentes órgãos internos. Outros efeitos benéficos em humanos também descritos foram inibição da oxidação "*in vitro*" da LDL, proteção contra doenças cardiovasculares como as proantocianidinas do vinho e do chá, quando consumidos moderadamente (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000; SCHOFIELD *et al.*, 2001).

Atualmente, na medicina popular, plantas ricas em taninos têm sido bastante empregadas para diversos fins, tais como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios (HASLAM, 1996). Assim, vários trabalhos têm sido realizados, nas últimas décadas, por pesquisadores interessados em investigar as atividades farmacológicas e biológicas dos taninos, obtendo resultados satisfatórios (WEINGES *et al.*, 1971; HATANO *et al.*, 1989; DONGMO *et al.*, 2000).

Os taninos, juntamente com a cafeína, apresentam-se como os compostos mais abundantes e importantes presentes nas sementes de guaraná, sendo objeto

de estudo há várias décadas nessa espécie vegetal (NIERENSTEIN, 1922; MARX, 1990; CARLSON; THOMPSON, 1998).

1.2.3 Outras substâncias químicas

Cagno (1942) verificou a presença de um corante vermelho nas sementes de cacau, cola e guaraná, que se apresentava na forma de uma substância amorfa, de sabor adstringente. Em outro estudo, Simão *et al.* (1986) determinaram a fórmula mínima desse pigmento vermelho como sendo $(\text{CH}_2\text{O})_n$, e sugeriram tratar-se de um polímero. Esse pigmento vermelho natural é que dá a coloração ao extrato de guaraná, matéria-prima usada na fabricação do refrigerante.

Segundo Henman (1982), traços de uma saponina conhecida como timbonina, semelhante a compostos descritos em vários timbós (planta da família Leguminosae, gêneros *Derris* e *Lenchocarpus*) empregados pelos índios da Amazônia como veneno para capturar peixes, foi descrita pelo químico alemão Peckholt, no século passado.

Outros estudos com guaraná foram realizados, podendo-se citar os trabalhos de Benoni *et al.* (1996) que analisaram a composição do óleo essencial do guaraná, e Avato *et al.* (2002) que avaliaram a composição química do óleo extraído das sementes de guaraná.

Outras espécies de *Paullinia* (Sapindaceae) também desperta o interesse dos pesquisadores, como pode-se observar pelos trabalhos de Spitzer (1995 e 1996) que pesquisou a presença de cianolipídeos em *Paullinia elegans* e *Paullinia meliaefolia*, e Thomsen e Brimer (1997) que realizaram estudos para a verificação da presença de constituintes cianogênicos em *Paullinia capreolata*.

2. OBJETIVOS

Esse capítulo do trabalho teve como objetivos:

1. Controle de qualidade da matéria-prima vegetal, para comparação com amostras pré-analisadas.
2. Obtenção de fração semipurificada EPA a partir do extrato bruto das sementes de guaraná.
3. Análise química da fração EPA, com isolamento e identificação dos compostos fenólicos e metilxantinas.
4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência da fração EPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As sementes do vegetal *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke foram adquiridas do produtor Sr. José Augusto de Souza, do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta, Sítio Nossa Senhora Aparecida, Rodovia MT 325, km 8. Foram coletadas de setembro a novembro de 2000 e enviadas à Maringá após serem torradas e secas em tacho de ferro. No laboratório de Farmacognosia foram moídas em moinho de martelos. Uma exsicata encontra-se depositada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob número HUM 9.065. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes utilizados, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), e das marcas Carlo Erba®, Merck® ou Sigma®. Foi utilizado etanol comercial 93,6° (COCAMAR).

- Acetato de etila
- Acetona

- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ágar Mueller-Hinton medium desidratado Difco
- Álcool n-butílico
- Álcool etílico
- Álcool metílico
- Anidrido acético
- Bálsamo do Canadá Synth
- Caldo Mueller-Hinton Difco
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado Isotec
- Corante Eosina
- Corante Hematoxilina
- Corante Leishman (eosina azul de metileno) a 0,2% em metanol
- 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) a 0,2% em metanol - Fluka
- Hexano
- *Kits* para dosagens bioquímicas Labtest e Biodiagnóstica
- Metanol deuterado Isotec
- Parafina Synth
- Penicilina
- Piridina
- Pó-de-pele R levemente cromado para determinação de taninos, Freiberg, Alemanha.
- Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu – 2 N – Laborclin
- Sephadex® LH-20 Fluka

- Solução aquosa de TTC a 2% (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio) Inlab
- Solução de ác. sulfúrico 2,5% (V/V)
- Solução de carbonato de sódio 14,06%
- Solução etanólica de cloreto férrico 1%
- Solução de formol 10% tamponado
- Tetraciclina
- Tiras reativas Multistix-Bayer Diagnósticos
- Vancomicina Libra
- Xilol

3.2.2 Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos utilizados na realização do trabalho, nos diferentes laboratórios, estão especificados a seguir:

- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear Varian Gemini 300BB e Mercury 300BB
- Aparelho de ultrassom Unique USC Cleaner 1450, 25 KHz
- Aparelho extrator de Soxhlet
- Agitador magnético com aquecimento
- Autoclave vertical Fabbe–Primar modelo 103
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Ohaus MB-200 com secagem por infravermelho
- Balança semi-analítica Marte AL-500
- Banho maria Marte MB
- Bomba de vácuo Ibav BRD4

- Câmara de UV 254 nm Germetec
- Capela de fluxo laminar
- Coletor de frações ISCO modelo 328
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200
- Contador automatizado Cell Dyn-Abbott-Laboratories
- Cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck
- Cromatógrafo Líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT; pré-coluna (c: 4mm; Ø 3mm) e coluna (c: 250 mm; Ø 4mm) preenchidas com LiChrospher® 100 RP-18 com tamanho de partícula de 5 µm; alça de 20 µl; detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156; Degasser 184
- Espectrofotômetro UV/VIS Cary 1E Varian
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ Micromass, Manchester, UK
- Estufa de secagem e esterilização Fanem 315 SE
- Estufa de incubação bacteriológica
- Evaporador rotatório Büchi R-114 e R-153
- Gaiolas metabólicas
- Liofilizador Christ Alpha 1-2
- Micrótopo rotativo Leitz modelo 1512
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- Mufla Fornitec
- Polarímetro Perkin-Elmer modelo 241
- Turbolizador Skymesen LSV-5

3.3 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.

3.3.1 Análise química preliminar

Entre os diferentes ensaios, realizaram-se os seguintes (HARBORNE, 1984):

- 1) taninos
- 2) compostos antracênicos
- 3) glicosídeos flavônicos
- 4) saponinas
- 5) Metilxantinas
- 6) Aromáticos simples

3.3.2 Análises físico-químicas

3.3.2.1 Determinação da perda por secagem (sementes e pó)

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal foram colocados a secar à temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de

substâncias voláteis e/ou água percentual, através da média de cinco determinações (MELLO e PETROVICK, 2000).

3.3.2.2 Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho (CARDOSO, 2002).

Cerca de 5 g da droga vegetal moída foram exatamente pesadas em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas por 30 min à temperatura de 110 °C, com intervalo de 15 min entre cada determinação, tempo necessário para o resfriamento da balança. O resultado é calculado em relação a 100 g da droga, pela média de três determinações.

3.3.2.3 Determinação do teor de extrativos

Pesou-se exatamente cerca de 1,0 g de guaraná cominuído, e submeteu-se à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 min. Após o resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume completado a 100,0 ml. Após filtração em papel filtro, os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Pesou-se uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e levou-se 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 (DEUTSCHES, 1986). Foram realizadas três determinações.

3.3.2.4 Determinação do teor de resíduo seco

Realizou-se o mesmo procedimento de preparação da amostra, conforme o item 3.3.2.3, utilizando-se os seguintes solventes, em proporções volumétricas:

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

Para cada solvente, foram realizadas três determinações e o resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato (MELLO e PETROVICK, 2000).

3.3.3 Análise química quantitativa

3.3.3.1 Determinação do teor de taninos totais

Pesou-se exatamente cerca de 0,750 g de droga pulverizada, e transferiu-se 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, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Tomou-se cerca de 80 ml do extrato, filtrou-se, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido é 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 à 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para 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 a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco (GLASL, 1983). Foram realizadas três determinações.

3.3.3.2 Determinação do teor de metilxantinas

Preparo da substância de referência: pesaram-se exatamente 50 mg de cafeína dissolvendo-se em 100 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V). Empregaram-se 3,0 ml dessa solução, equivalentes a 1500 µg de cafeína, completando-se o volume em balão volumétrico de 100 ml com solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V), obtendo-se a concentração de 15 µg/ml de cafeína.

Preparo das amostras de guaraná: pesaram-se exatamente cerca de 250 mg da amostra de guaraná pulverizada e extraiu-se com 20 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V) com agitação mecânica durante 15 min, por quatro vezes. Filtraram-se as porções para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com solução de ácido sulfúrico 2,5% (V/V). Transferiram-se 10 ml desta solução

para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com a solução de ácido sulfúrico, obtendo-se uma concentração teórica em torno de 15,0 µg/ml.

As leituras no espectrofotômetro foram realizadas à 271 nm, utilizando-se solução de ácido sulfúrico a 2,5% (V/V), como solução de compensação (ANDRADE, 1996). Foram realizadas três determinações.

3.3.3.3 Determinação do teor de cinzas totais

O teor de cinzas totais foi determinado em forno de mufla (FARMACOPÉIA, 2000). As amostras de pó de guaraná, colocadas em cadinhos de porcelana previamente tarados, foram incineradas em forno de mufla a 450 °C até que todo o carvão tivesse sido eliminado. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas. Foram realizadas três determinações.

3.3.3.4 Determinação de óleos fixos

Cerca de 10 g da droga seca, exatamente pesados, foram transferidos para cartucho de celulose e colocado em aparelho extrator de Soxhlet. Em um balão limpo, seco e previamente pesado foi colocado fragmentos de porcelana e o líquido extrator n-hexano em quantidade suficiente para realizar três sifonagens. A extração foi realizada sob aquecimento suficiente para manter o solvente em ebulição moderada durante 4 h. Concluída a extração, aguardou-se o esfriamento, e transferiu-se o conteúdo do cartucho para grau de porcelana. A droga, então, foi pulverizada e transferida novamente ao interior do cartucho e para o extrator. Reiniciou-se a extração nas condições acima, por período adicional de 2 h. O

solvente foi, então, evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório e o balão transferido para estufa a 105 °C, resfriado e pesado. A operação foi repetida até peso constante e a porcentagem de óleos fixos calculada com base na diferença entre massa da tomada de ensaio e a do resíduo (FARMACOPÉIA, 2000).

3.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

Extrato bruto das sementes de guaraná (EBPC) foram preparados, obtendo-se posteriormente duas frações semipurificadas: FAQ e EPA (Patente Requerida, sob sigilo pela Universidade Estadual de Maringá - INPI – Protocolo nº 000802 de 28 de novembro de 2000).

3.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

No desenvolvimento desse trabalho empregaram-se várias técnicas cromatográficas para a obtenção de frações semipurificadas, auxiliando no isolamento de substâncias químicas.

3.5.1 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%. Adicionaram-se 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 3.5.2). 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.

3.5.2 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.

3.5.3 Cromatografia em coluna das subfrações F#5 à F#9

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/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 3.5.2).

3.5.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Algumas substâncias isoladas foram derivatizadas (seção 3.6) 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 clorofórmio.

Deixou-se em ultra-som (25 kHz) por aproximadamente 15 min. Filtrou-se em filtro sinterizado G4, eliminando-se o clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A substância foi recolhida em frasco previamente tarado e deixada em capela até total eliminação do solvente. Posteriormente foi congelada e liofilizada.

3.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.5.5.1 Condições cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT. Foi empregado como suporte pré-coluna (4mm x 3mm) e coluna (250 mm x 4mm) preenchidas com LiChrospher® 100 RP-18 com tamanho de partícula de 5 µm e alça de 20 µl. Detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156 e Degasser 184. A temperatura do forno para coluna foi de 27 °C e os cromatogramas foram observados nos comprimentos de onda de 272 e 280 nm com sensibilidade de 0,05 AUFS.

O sistema eluente utilizado foi gradiente binário, com velocidade de fluxo de 0,9 ml/min, entre ácido acético 5% em água e metanol de acordo com a tabela 2 (MARX, 1990). Todos os solventes utilizados possuíam grau HPLC.

Tabela 2 – Gradiente da fase móvel utilizada para CLAE

Tempo (min)	Metanol (%)	Ác. acético 5% (%)
0	10	90
15	50	50
20	100	0
25	100	0
35	10	90

3.5.5.2 Curva de calibração dos padrões

Para a obtenção da curva padrão foram preparadas soluções, separadamente, contendo catequina e epicatequina nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/ml em mistura metanol:água (50:50). As soluções foram filtradas por membrana de politetraflouretileno (Millipore[®], FHLP01300) de porosidade de 0,5 μm e 20 μl foram injetados no cromatógrafo com auxílio de microseringa com capacidade de 100 μl .

As áreas dos picos correspondentes às duas substâncias foram relacionadas com suas respectivas concentrações, calculando-se as equações das retas através de regressão linear. Os resultados foram expressos pela média de cinco procedimentos.

3.5.5.3 Preparo das amostras

As amostras a serem analisadas, EPA e subfrações 5, 8 e 9, foram solubilizadas em metanol:água (50:50), na concentração de 1 mg/ml. Em seguida filtrou-se em filtro Millipore[®].

3.5.5.4 Análise quantitativa

Empregou-se como padrão externo uma solução metanólica de catequina e epicatequina, com concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$. As soluções foram filtradas por membrana de politetraflouretileno (Millipore[®]) de porosidade 0,5 μm e homogeneizadas nas soluções metanólicas obtidas de acordo com a seção 3.5.5.3,

sendo submetidas à análise cromatográfica com auxílio de microseringa com capacidade de 100 µl. As áreas dos picos referentes a catequina e epicatequina foram determinadas por integração, e as concentrações de catequina e epicatequina nas amostras foram calculadas através da curva de regressão linear definida pela equação 1:

$$y = ax + b \quad (1)$$

x = concentração da substância, catequina ou epicatequina na amostra (mg/ml)

a = interseção com eixo x da equação da reta

b = coeficiente angular da reta

y = área do pico da amostra (mV/s)

3.6 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA

Para quantidades de até 100 mg de substância, adicionaram-se 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml. Deixou-se em repouso por 24 h. Após, colocou-se gelo picado interna e externamente ao balão, deixando-se em repouso por 2 h. Filtrou-se em filtro sinterizado G4 e a substância acetilada foi lavada com água até total eliminação da piridina. Solubilizou-se a substância acetilada em clorofórmio e retirou-se o solvente 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. Após, a substância foi congelada e liofilizada (MELLO *et al.*, 1996).

3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) e Espectroscopia de Massas (EM). Os espectros das substâncias foram analisados e também, comparando-se com dados constantes em literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian Gemini 2000 e Mercury Plus de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , empregando-se solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3). Os espectros de massas 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.

3.8 HIDRÓLISE DE DÍMEROS

3.8.1 Unidade superior

Colocou-se 1 mg da substância acetilada em 2 ml de solução de HCl 5% em etanol, em balão de fundo afunilado de 25 ml. Deixou-se em refluxo por 60 min, ou até a solução tornar-se claramente vermelha. Realizou-se CCD em celulose com

sistema eluente ácido fórmico:HCl:água (10:1:3; V/V) (MELLO *et al.*, 1996). Foram utilizados cloridrato de pelargonidina e epicatequina como substâncias referência.

3.8.2 Unidade inferior

Colocou-se 1 mg da substância livre (não derivatizada) em 2 ml de solução de HCl 0,1 N em etanol. Deixou-se em banho-maria a 60 °C por 15 min. Conseguiu-se a identificação através de CCD, como descrito na seção 3.5.2, em comparação com as substâncias referência catequina e epicatequina (MELLO *et al.*, 1996).

3.9 ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA)

A determinação da rotação ótica ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) da substância acetilada sucedeu-se empregando acetona (grau espectroscópico) a 20 °C. Para a determinação do valor, empregou-se a equação 2.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = \frac{100.\alpha}{l.c} \quad (2)$$

α = rotação ótica obtida em graus a $20 \pm 0,5$ °C

l = comprimento da cubeta do polarímetro em dm

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

3.10 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 elipticidade molar $([\theta_\lambda])$ foi realizado de acordo com a equação 3.

$$[\theta_\lambda] = \frac{\theta_\lambda}{C \cdot l} \cdot 100 \quad (3)$$

$([\theta_\lambda])$ = elipticidade molar (deg.cm².decimol⁻¹)

θ_λ = elipticidade (deg)

C = concentração molar (mol. l⁻¹)

l = comprimento da cubeta (cm)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE

Um dos problemas atribuídos aos fitoterápicos está relacionado ao controle de qualidade da matéria-prima. Fraudes e adulterações são comuns quando se trata de plantas medicinais, e isto ocorre por vários fatores, tais como: falta de conhecimento dos produtores e distribuidores; fiscalização deficiente e, falta de profissionais qualificados para a identificação e controle de drogas vegetais (ZAUPA *et al.*, 2000b; BRANDÃO *et al.*, 2001).

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 das matérias-primas vegetais pode variar dependendo da procedência do material (VON POSER; MENTZ, 2001)

Algumas análises químicas preliminares foram realizadas para avaliar a presença dos constituintes químicos nas sementes de guaraná (tab.3).

Essas análises foram realizadas com o intuito de comparar as amostras de sementes desse trabalho (amostra teste – AMT), com outra amostra já trabalhada anteriormente, proveniente da Embrapa Ocidental de Manaus, que foi tomada como amostra referencial (AMREF) (YAMAGUTI *et al.*, 2001).

Tabela 3 – Análise química preliminar comparativa de sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

Princípio ativo	AMT	AMREF*
Taninos	+	+
Compostos antracênicos	+	+
Aromáticos simples	+	+
Metilxantinas	+	+
Flavonóides	-	+
Saponinas	-	-

+ = presença do grupo químico; - = ausência do grupo químico; *Yamaguti *et al.*, 2001

Essa análise química e todos os testes de controle de qualidade seguintes realizados com a AMT, serviram de base para a segurança do trabalho, no que se refere às possíveis mudanças dos constituintes químicos que uma droga vegetal possa apresentar, quando coletada em lugares diferentes, de acordo com o citado por Von Poser e Mentz (2001).

Outro fator importante no controle de qualidade de fitoterápicos refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na droga vegetal. Essa avaliação torna-se necessária uma vez que o excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar degradação de constituintes químicos, além de facilitar a proliferação de fungos e bactérias (FARIAS, 2001).

Realizou-se a perda por secagem (PPS) do guaraná 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 1,33% para as sementes e de 0,71% para o pó.

Na perda por dessecação (PPD), realizada pelo método gravimétrico, em balança analítica, a planta foi dessecada com sistema de secagem por infravermelho e obteve-se o seguinte resultado: $8,98\% \pm 0,27$. A PPD foi realizada somente com a droga vegetal em pó.

A determinação de umidade (PPD) na planta seca torna-se importante quando se considera o uso de matéria-prima vegetal na produção industrial de fitoterápicos. É necessário a verificação do correto armazenamento dessa droga, ou seja, se a mesma está mantendo sua qualidade, uma vez que a absorção de água pode acarretar em perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos. O teor de umidade obtido de 8,98% encontra-se entre os valores estabelecido nas diferentes farmacopéias, que varia entre 8 e 14%, com poucas exceções (BACCHI, 1995; FARIAS, 2001).

A determinação do teor de extrativos é um método utilizado para quantificar constituintes extraídos da droga vegetal por um determinado solvente, que pode ser etanol ou água, preferencialmente (ANDRADE, 1996; FARMACOPÉIA, 2000).

Para a determinação do teor de extrativos, empregou-se a água como líquido extrator, por ser, sem dúvida, um dos líquidos extratores mais importantes. Realizaram-se três determinações obtendo-se como resultado o valor médio de $22,98\% \pm 1,16$ (m/V). Esse valor, no entanto, não representa, obrigatoriamente, uma menor atividade biológica, que deve ser avaliada através de metodologia específica.

A determinação do resíduo seco, foi realizada a partir de uma solução extrativa obtida através de diferentes solventes. O melhor rendimento foi obtido quando se utilizou acetona:água (7:3; V/V) como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 – Determinação do resíduo seco das sementes de *Paullinia cupana*

Solvente (V/V)	Rendimento (%)			
	AMT	CV(%)	AMREF*	CV(%)
Acetona:água (7:3)	21,20 ± 1,17	5,52	29,33 ± 0,28	0,95
Acetona:água (7:1)	20,48 ± 2,73	13,33	24,50 ± 0,37	1,53
Etanol:água (1:1)	17,49 ± 0,00	0,00	28,08 ± 0,42	1,48
Metanol:água (1:1)	14,98 ± 2,50	16,68	23,41 ± 0,41	1,74

*Yamaguti *et al.*, 2001

A obtenção de uma maior quantidade de extrativos com o líquido extrator acetona:água, serve de parâmetro na qualidade da droga vegetal. A AMREF também apresentou melhor rendimento nesse líquido extrator (29,33% ± 0,28).

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. A qualidade da solução extrativa é definida pelo solvente empregado na extração (SONAGLIO *et al.*, 2001).

A avaliação da qualidade pode ser complementada por análises quantitativas de seus constituintes originais. Nessa determinação, são incluídas técnicas de doseamento de substâncias ativas ou outros componentes característicos (MATOS, 1994).

A AMT apresentou um valor de 5,92% ± 0,24 de taninos totais, enquanto que a AMREF apresentou quantidade inferior (4,14%). Esse fato pode estar relacionado com o local de coleta das sementes, e não com o período, já que esse ocorre sempre entre setembro e novembro.

Esses valores, entretanto, encontram-se dentro dos valores encontrados em literatura para a droga vegetal guaraná. Segundo Henman (1982), essa taxa estaria entre 4 a 6% e de acordo com Duke (1987), o guaraná deve apresentar entre 5 a 25% de taninos. Valores acima de 7% podem ocorrer, porém Duke (1987) não discute o método empregado para se obter 25% em taninos. Outro estudo realizado com *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis*, determinou uma quantidade de taninos totais de 12,1% pelo método de Folin e Denis (MARX, 1990).

O doseamento de metilxantinas foi realizado por espectrofotometria na região do UV a 271 nm. Segundo Andrade (1996 e 1999), essa técnica apresentou melhores resultados quando comparada ao método proposto pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1977).

Obteve-se com a AMT valor de 6,07% de metilxantinas, enquanto que a AMREF apresentou valor superior (7,78%). Comparando-se esses valores com os encontrados por Andrade (1996 e 1999) para amostras comerciais de guaraná (acima de 5%) esses valores encontram-se dentro do esperado para essa droga vegetal.

Após essas análises realizadas com a AMT provenientes da região de Alta Floresta, confirmou-se a qualidade e semelhança em teores de substâncias químicas características (metilxantinas e taninos) quando comparada com a AMREF.

A determinação do teor de cinzas é um método para medir a quantidade de substância residual não volatilizada, quando a droga é incinerada. As cinzas incluem cinzas fisiológicas e de materiais estranhos e cinzas não fisiológicas.

Para a AMT o teor de cinzas totais foi de 1,23%, encontrando-se dentro do limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira, menor que 2% (FARMACOPÉIA, 1959). Outros valores foram descritos, para sementes de guaraná, mas sempre

inferiores a 2%. Segundo Lautenbacher (1994), o guaraná apresenta teor de cinzas totais entre 1,0 e 2,0%. Angelucci *et al.* (1978) encontraram valores entre 1,44 e 1,85% e Cagno (1942) determinou o teor em 1,80%,

Outra técnica que pode ser utilizada no controle de qualidade da droga vegetal guaraná é a determinação de óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes. A determinação de óleos fixos das sementes de guaraná seguiu a técnica descrita na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1986), encontrando-se um valor de 3,1%.

Segundo Corrêa (1984), em 1861 Fournier encontrou nas sementes de guaraná um óleo verde fixo. Ainda de acordo com esse autor, Peckolt, em 1866, encontrou em 100 g de sementes de guaraná a quantidade de 2,95% de óleo fixo de coloração amarela. Cagno (1942) observou a presença de um depósito gorduroso, amarelo-esverdeado, emulsionável pela água quente. Essas substâncias graxas foram dosadas e corresponderam a 2,75% do peso da amostra.

Para a AMT o valor encontrado encontra-se próximo dos valores descritos na literatura para a droga vegetal guaraná.

4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

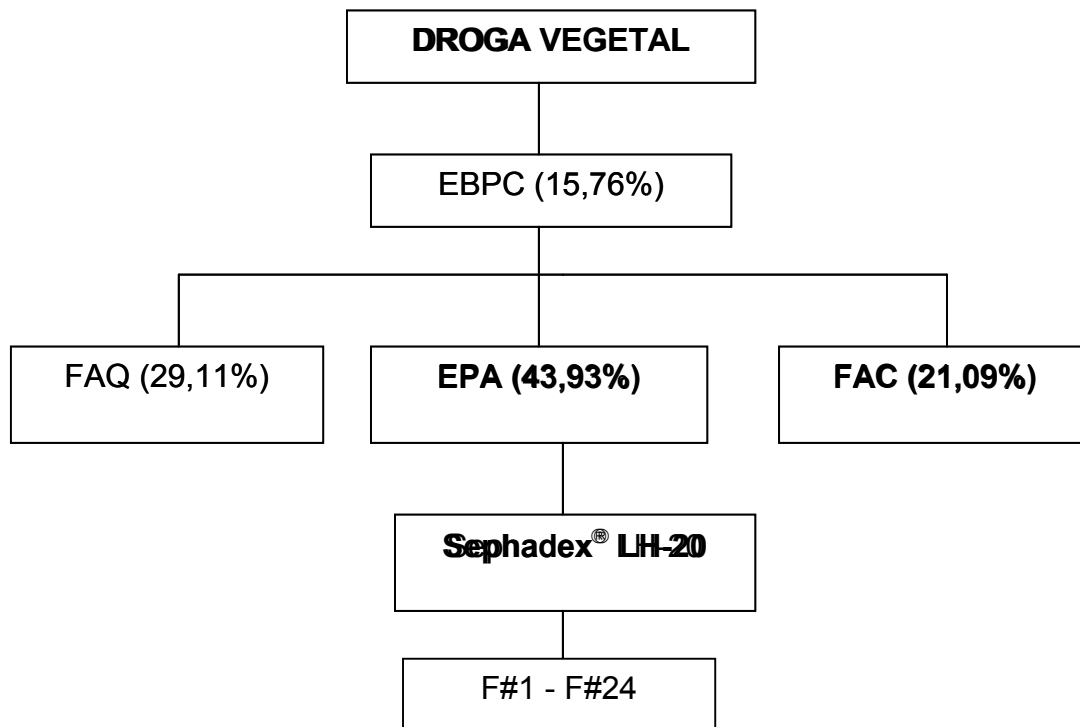
A pesquisa química tem por objetivo conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais. De acordo com os resultados apresentados na tabela 3 (p.67) e com os objetivos propostos, o presente trabalho pesquisou compostos fenólicos no extrato EPA do guaraná, direcionando-o para o isolamento e a elucidação estrutural de taninos.

A droga vegetal utilizada na preparação dos extratos foi adquirida do Mato Grosso, região de Alta Floresta. O processo de torrefação e secagem ocorreu no lugar de origem, sendo realizado em tachos de ferro por período de 1 h. Optou-se por adquirir as sementes já secas e torradas, para se preservar as características do processo de preparo das sementes de acordo com o uso popular local.

Após a moagem das sementes e dentre os vários métodos de extração existentes, optou-se pela turbólise ou turbo-extração, que baseia-se 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, 1983), à qual soma-se simplicidade, rapidez e versatilidade, que permitem a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Para processamento em grande escala emprega-se o Ultra-turrax[®] (IKA[®] WORKS, Inc.).

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, sob sigilo), e um resíduo insolúvel (FAC). O rendimento obtido, a partir de 100 g de EBPC, foi de 43,93 g de EPA (43,93%), 29,11 g de FAQ (29,11%), 21,09 g de FAC (21,09%) (flux.1).

A quantidade restante (5,87%) trata-se das perdas ocorridas durante o processo de produção, que é relativamente alta, podendo ser reduzida, se o sistema de produção de extratos for do tipo “in-line” seguido de filtração acoplada.



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

A partir da 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 Sephadex[®] LH-20, utilizando-se o sistema eluente descrito na seção 3.5.1 (p.57) (THOMPSON *et al.*, 1972; NONAKA *et al.*, 1983; MELLO *et al.*, 1996a; TOLEDO, 2002).

Através do monitoramento da coluna por CCD (seção 3.5.2 – p.58), reuniu-se 24 subfrações (F#1 – F#24) que foram agrupadas por semelhança visualizada 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.5). Os rendimentos de cada subfração (F#1 – F#24) foram calculados e encontram-se na tabela 5.

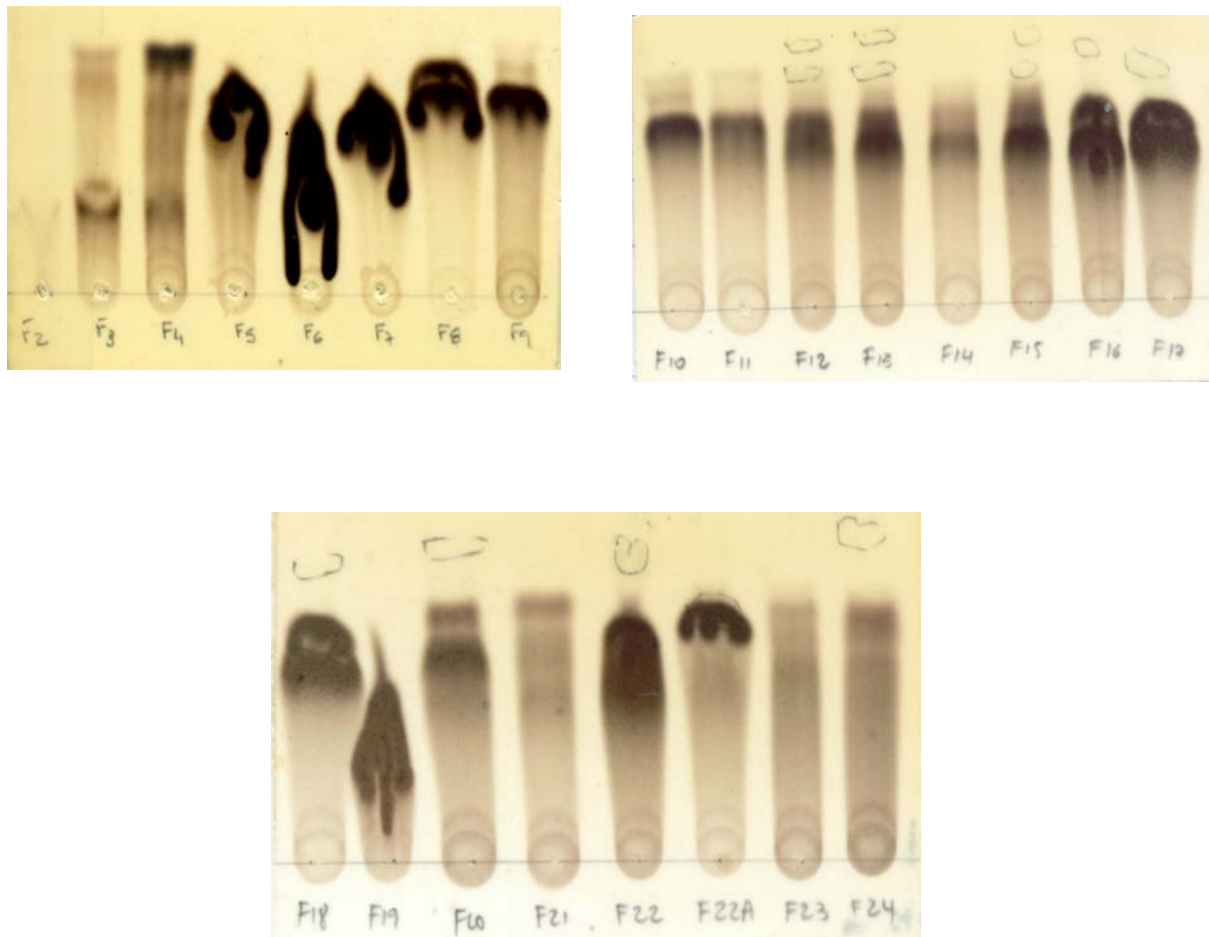


Figura 5 – Cromatograma das 24 subfrações da EPA
(gel de sílica F₂₅₄; AcOEt:ácido fórmico:H₂O; 90:5:5; FeCl₃ à 1%)

Tabela 5 – Rendimento das subfrações da fração semipurificada EPA

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

A subfração F#1 após concentração e liofilização forneceu quantidade de amostra que se tornou instável, prejudicando sua análise. A subfração F#3 não apresentou mancha no cromatograma característica para compostos fenólicos, além de pequena quantidade, não se trabalhando com essas subfrações. Essas duas subfrações não apresentaram reação positiva para metilxantinas (reação de murexida).

A subfração F#4, forneceu pouca quantidade de amostra, dessa forma optou-se por uma derivatização química por acetilação, sendo, posteriormente, enviadas para análise de RMN. Os espectros, porém, não apresentaram boa resolução e devido à pouca quantidade não foi possível continuar as análises e elucidar qualquer estrutura molecular.

4.2.1 Substância I – Cafeína

Durante o processo de concentração da F#2, sob pressão reduzida, ocorreu a formação de cristais. A amostra com os cristais foi colocada em um balão acrescentando-se 50 ml de álcool 50%, concentrada sob pressão reduzida e deixada descansar à temperatura de 4 °C para que ocorresse o máximo de formação dos cristais. Após, foi filtrada em filtro de placa sinterizada (G4), sendo o filtrado denominado de F#2 e os cristais isolados denominados F#2c. As duas subfrações foram, concentradas sob pressão reduzida, liofilizadas, obtendo-se um rendimento de: F#2= 0,7105 g e F#2c= 2,4697 g.

A subfração F#2 foi submetida ao fracionamento por CC em Sephadex® (seção 3.5.3; p.58), porém nenhuma substância foi obtida dessa amostra.

De acordo com a literatura, foi isolada das sementes de guaraná uma substância branca, amarga, cristalizada em forma de agulhas, o qual concluiu-se, após análises mais detalhadas, tratar-se da cafeína (CAGNO, 1942; HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984).

A F#2c, denominada **substância I**, indicava ser um composto puro por apresentar-se na forma de cristais, com formato de agulhas, estando em acordo com as descrições na literatura para a cafeína. Assim, realizou-se teste de caracterização de metilxantinas - reação de murexida, apresentando resultado positivo.

A **substância I** foi, então, analisada por RMN ^1H , ^{13}C , HETCOR, HMBC e por espectrometria de massas.

A análise do espectro de massas (fig.6), demonstrou o íon molecular $[\text{M}^+]=194,9$, estando esse valor em concordância com a literatura para substância cafeína (THE MERCK INDEX, 1996).

Os dados espectrais de ^1H RMN e ^{13}C RMN da **substância I** encontram-se demonstrados na tabela 6. O espectro de ^1H RMN (fig.7), da **substância I** apresenta um sinal único e como singleto, correspondendo ao hidrogênio H-8, que apresenta-se em δ 7,52 ppm. O restante dos sinais no espectro de ^1H RMN refere-se aos três grupamentos metilas. Um dos sinais apresenta-se como dubleto em δ 4,0 ppm, com constante de acoplamento pequena, $J_{\text{H7-H8}} < 1,0$ Hz. Esse sinal corresponde claramente ao grupamento metila da posição 7. Os outros dois sinais aparecem como singletos em δ 3,41 ppm e δ 3,59 ppm, correspondendo aos hidrogênios das posições 1 e 3 respectivamente. Através do espectro de HETCOR (fig.8) e baseado nas observações de Sitkowski *et al.*, (1995), pôde-se estabelecer com segurança que os sinais a δ 27,89 ppm, δ 29,71 ppm e δ 33,55 ppm relacionam aos carbonos N1-CH₃, N3-CH₃ e N7-CH₃. De forma semelhante, observou-se o carbono

correspondente ao hidrogênio em H-8, estabelecendo-se o C-8 em δ 141,35 ppm, e de forma direta.

Tentando-se estabelecer a correlação a longa distância (3J) entre os carbonos tetrasubstituídos e os hidrogênios das metilas, realizou-se o espectro HMBC (fig.9). Observou-se que o sinal em δ 141,35 ppm correspondendo ao C-8, de acordo com o observado na figura 8 (HETCOR), apresenta correlação com os hidrogênios de N7-CH₃, sendo que esses hidrogênios encontram-se, ainda, correlacionados com C-5, estabelecendo-se, assim, sinal em δ 107,57 ppm. O acoplamento dos hidrogênios de N1-CH₃ e N3-CH₃ é comum com o carbono em C-2. Isso pode ser verificado na figura 9, onde o C-2 apresenta-se em δ 151,70 ppm. De forma análoga, porém separadamente, é possível estabelecer a posição dos carbonos C-4 e C-6 em δ 148,68 ppm e δ 155,41 ppm, respectivamente.

Tabela 6 – Deslocamentos da **substância I** (^1H RMN=300 MHz; ^{13}C RMN= 75,45 MHz; CDCl₃; relativo para TMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	** δ Literatura (ppm)	Carbono	δ (ppm)	** δ Literatura (ppm)
3 x H-1	3,41	3,37	C-1	27,89	27,5
			C-2	151,70	151,3
3 x H-3	3,59	3,55	C-3	29,71	29,3
			C-4	148,68	148,3
			C-5	107,57	107,1
3 x H-7	4,00	4,01	C-6	155,41	154,9
			C-7	33,55	33,2
H-8	7,52	7,58	C-8	141,35	141,2

**Sitkowski *et al.*, 1995.

Figura 6 – Espectro de massas da substância I

Figura 7 – Espectro de RMN ^1H da **substância I** (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)

Figura 8 – Espectro HETCOR da **substância I** (75,5 MHz; CDCl₃)

Figura 9 – Espectro HMBC da **substância I** (300 MHz; CDCl_3)

Todos os dados de deslocamentos, tanto para hidrogênios como para carbonos encontram-se em conformidade com os dados da literatura para cafeína (SITKOWSKI *et al.*, 1995). De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas, e os dados espectroscópicos (tab.6, fig.6, 7, 8 e 9) e, quando comparados com os dados de literatura, confirma-se a **substância I** como sendo **cafeína** (fig.10).

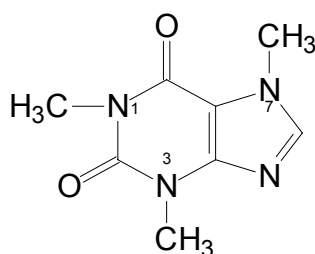


Figura 10 – Estrutura da **substância I**, cafeína

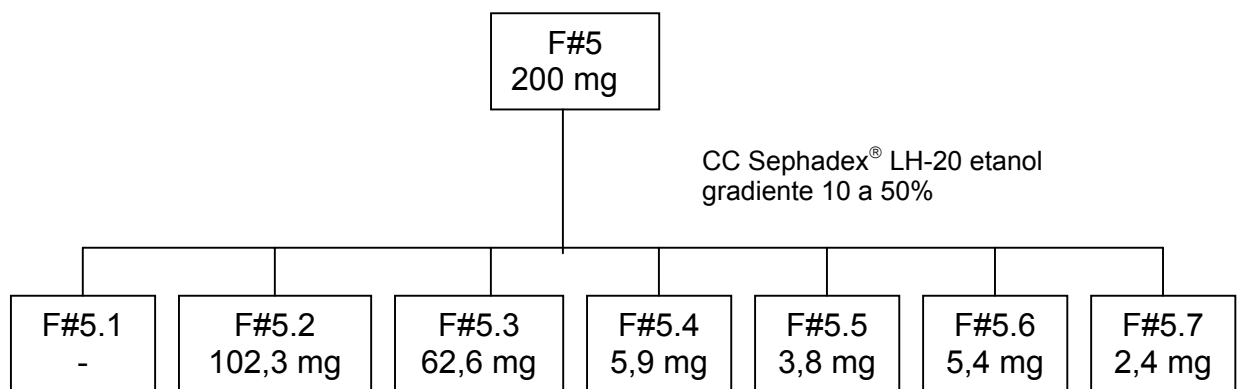
4.2.2 Taninos condensados

Uma das características do guaraná, é a presença marcante de substâncias fenólicas, principalmente as derivadas de catequina ou flavan-3-óis, ou seja, taninos condensados, tais como citado por Nierenstein (1922) ou mais recentemente por Marx (1990). Entretanto não se encontra em literatura estudo químico clássico com isolamento e identificação de compostos polifenólicos.

Assim, com o objetivo de isolar e identificar compostos polifenólicos, e, na expectativa de se obter substâncias puras, foram realizados novos fracionamentos por CC (seção 3.5.3 – p.58), com as subfrações F#5, F#6, F#7, F#8 e F#9, pelo fato

dessas apresentarem um perfil cromatográfico em CCD, após revelação com cloreto férrico, característico de substâncias fenólicas.

Cerca de 200 mg da F#5 foram recromatografadas através de CC (seção 3.5.3 – p.58) resultando em 7 subfrações, como pode ser observado no fluxograma 2.



Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico da F#5

As subfrações F#5.2 e F#5.3, denominadas de **substâncias II** e **III**, respectivamente, apresentaram uma única mancha no cromatograma, após revelação com FeCl_3 , indicando, possivelmente, substâncias puras e do tipo catequina/epicatequina (MELLO, 1995). Ambas foram analisadas através da espectroscopia de RMN 1D (^1H) e 2D (COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$) e espectrometria de massas. As demais subfrações não foram viáveis para possíveis análises estruturais, devido às quantidades obtidas.

4.2.2.1 Substância II – Epicatequina

O espectro de massas da **substância II**, forneceu o íon pseudo-molecular $[M+Na^+]= 313$ encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z= 290$) não derivatizada (fig.11).

O processo de fragmentação proposto da substância pode ser observado na figura 12, estando de acordo com a literatura (PALLENBACH, 1992; MELLO, 1995).

O espectro de 1H RMN (fig.13), da **substância II** com as hidroxilas livres, mostra para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) uma constante de acoplamento $J_{H-2,H-3}$ menor que 1 Hz comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (WEINGES *et al.*, 1969). O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta uma constante de acoplamento pequena com o hidrogênio H-4_{ax}(C) no valor de 2,7 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento com H-4_{eq}(C) de 4,5 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância II** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges *et al.* (1968 e 1969) a constante de acoplamento dos prótons H-2(C) e H-3(C), com aproximadamente 6 Hz demonstra uma configuração relativa *trans*, e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1 Hz a ordem *cis*. Entre δ 6,75 e 6,97 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos prótons H-2', H-5' e H-6', comprovando a di-hidroxilação no anel B, como pode ser observado na tabela 7. Nesse espectro observa-se, ainda, os prótons H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 5,90 e δ 5,93 ppm. Esses prótons, em solução, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro, desde que a substância encontre-se com as hidroxilas livres (PETEREIT, 1992). Os dados de deslocamento estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 – Deslocamentos da **substância II** (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS)

Próton	δ (ppm)	** δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (C)	2,72	2,7 – 2,86	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,8$ $J_{H-4ax-H-3} = 2,7$
H-4eq (C)	2,86		<i>dd</i>	$J_{H-4eq-H-4ax} = 16,8$ $J_{H-4eq-H-3} = 4,5$
H2 (C)	4,80	4,85	<i>s</i>	$J_{H-2,H-3} < 1$
H3 (C)	4,16	4,21	<i>m</i>	$J_{H-2,H-3} < 1$ $J_{H-3-H-4eq} = 4,5$ $J_{H-3-H-4ax} = 2,7$
H6 (A)*	5,90	5,94	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,4$
H8 (A)*	5,93	6,02	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,1$
H-5' (B)	6,75	6,81 – 7,04	<i>d</i>	$J_{H-5'-H-6'} = 8,1$
H-6' (B)	6,79	6,81 – 7,04	<i>dd</i>	$J_{H-6'-H-5'} = 8,4$ $J_{H-6'-H-2'} = 1,8$
H-2' (B)	6,97	6,81 – 7,04	<i>d</i>	$J_{H-2'-H-6'} = 1,8$

* intercambiáveis (Kombal, 1993); **Foo *et al.*, 2000

Figura 11 – Espectro de massas da **substância II**

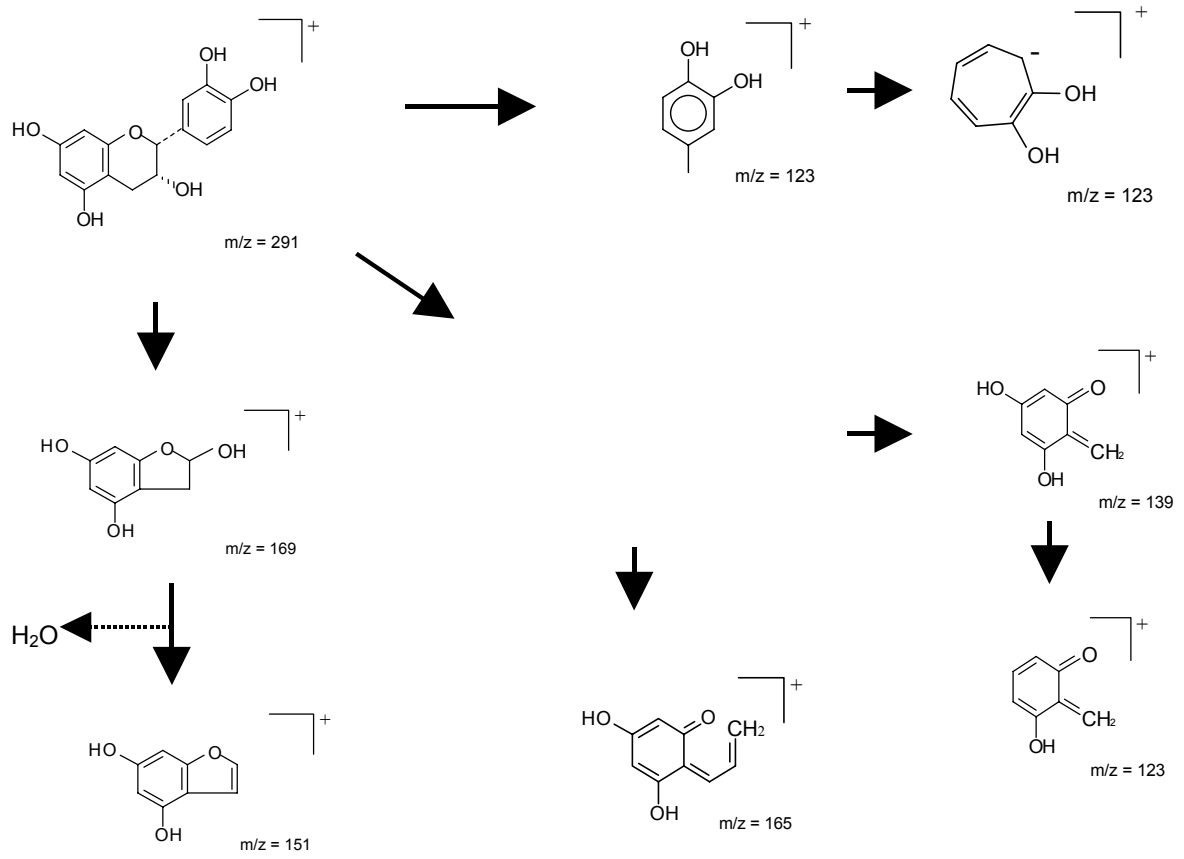


Figura 12 – Proposta de fragmentação da **substância II**

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H da **substância II** (300 MHz; CD_3OD ; relativo para TMS)

Figura 14 – Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da **substância II** (300 MHz; CD_3OD ; relativo para TMS)

O espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) (fig.14) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância II**. Ainda é possível ordenar o hidrogênio H-2' e H-6', bem como o H-8(A), pelo acoplamento à distância entre si, como pode ser observado na figura 14.

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ (metanol; $c = 0,001$). De acordo com Danne (1994), o valor obtido para a epicatequina foi de $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$ (acetona com a substância acetilada; $c = 0,04$). Pode-se concluir, assim, que a **substância II**, possui a configuração absoluta $2R, 3R$, que pode ser confirmada pelo espectro de dicroísmo circular (fig.16), onde se obteve um evidente efeito *Cotton* positivo na região de 230-240 nm, com valor de 1800 e um leve efeito *Cotton* negativo na região de 270-280 nm, com valor de -1500.

De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (tab.7, fig.11, 13 e 14) e, quando comparados com os dados de literatura, confirma-se a **substância II** como sendo **epicatequina** (fig.15).

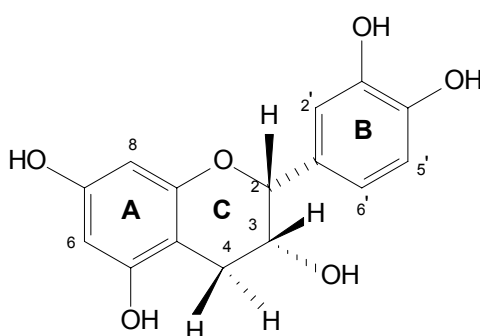


Figura 15 – Estrutura da **substância II**, epicatequina

Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular da epicatequina

4.2.2.2 Substância III – Catequina

A análise do espectro de massas da subfração F#5.3, denominada **substância III**, forneceu o íon pseudo-molecular $[M+Na^+] = 313$ encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z = 290$) não derivatizada (fig.17).

A **substância III** apresenta o espectro de 1H RMN (fig.18), com as hidroxilas livres, mostrando para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) uma constante de acoplamento $J_{H-2,H-3}$ de 7,5 Hz, que se comparada com a **substância II** (epicatequina), a mesma é grande comprovando uma configuração relativa 2,3-*trans* (WEINGES *et al.*, 1969). O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta uma constante de acoplamento com o hidrogênio H-4_{ax}(C) no valor de 8,1 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento H-4_{eq}(C) de 5,1 Hz. Portanto, pode-se afirmar que existe uma configuração relativa para a **substância III** do tipo 2,3-*trans*, 3,4_{ax}-*trans* e 3,4_{eq}-*cis*. Entre δ 6,71 e 6,84 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios do anel B (H-2', H-5' e H-6'), comprovando, assim, a di-hidroxilação no anel. Nesse espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 5,85 e δ 5,92 ppm. Os dados de deslocamento podem ser visualizados na tabela 8.

O espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY) (fig.19) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância III**.

Tabela 8 – Deslocamento da **substância III** (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS)

Próton	δ (ppm)	** δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (C)	2,49	2,54	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,2$ $J_{H-4ax-H-3} = 8,1$
H-4eq (C)	2,83	2,92	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,2$ $J_{H-4eq-H-3} = 5,1$
H-2 (C)	4,55	4,57	<i>s</i>	$J_{H-2-H-3} = 7,5$
H-3 (C)	3,96	3,99 – 4,06	<i>ddd</i>	$J_{H-3-H-2} = 7,5$ $J_{H-3-H-4eq} = 5,1$ $J_{H-3-H-4ax} = 8,1$
H-6 (A)*	5,85	5,88	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,1$
H-8 (A)*	5,92	6,03	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,1$
H-6' (B)	6,71	6,77 - 6,91	<i>dd</i>	$J_{H-6'-H-5'} = 8,4$ $J_{H-6'-H-2'} = 1,8$
H-5' (B)	6,76		<i>d</i>	$J_{H-5'-H-6'} = 8,4$
H-2' (B)	6,84		<i>d</i>	$J_{H-2'-H-6'} = 1,8$

* intercambiáveis (Kombal, 1993); **Kombal, 1993

Figura 17 – Espectro de massas da substância III

Figura 18 – Espectro de RMN ^1H da **substância III** (300 MHz; CD_3OD ; relativo para TMS)

Figura 19 – Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da **substância III** (300 MHz; CD_3OD ; relativo para TMS)

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação ótica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +1,0^\circ$ (acetona; c= 0,001). De acordo com Danne (1994), o valor obtido para a catequina foi de $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$ (acetona com a substância acetilada; c= 0,04). Pode-se concluir, assim, que a **substância III**, possui a configuração absoluta *2R, 3S*, que pode ser confirmada pelo espectro de dicroísmo circular (fig.21), onde se obteve um leve efeito *Cotton* positivo na região de 230-240 nm, com valor de 850 e um evidente efeito *Cotton* negativo na região de 270-280 nm, com valor de -1650.

De acordo com as análises realizadas de CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (tab.8, fig.17, 18 e 19) e, quando comparados com os dados de literatura, pode-se afirmar que a **substância III** trata-se de **catequina** (fig.20).

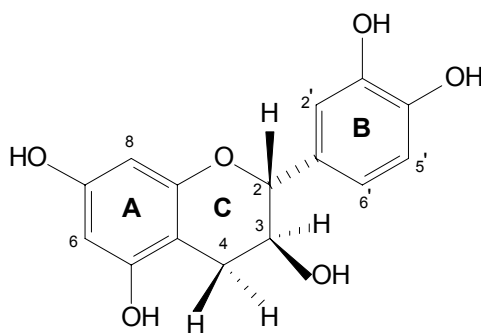


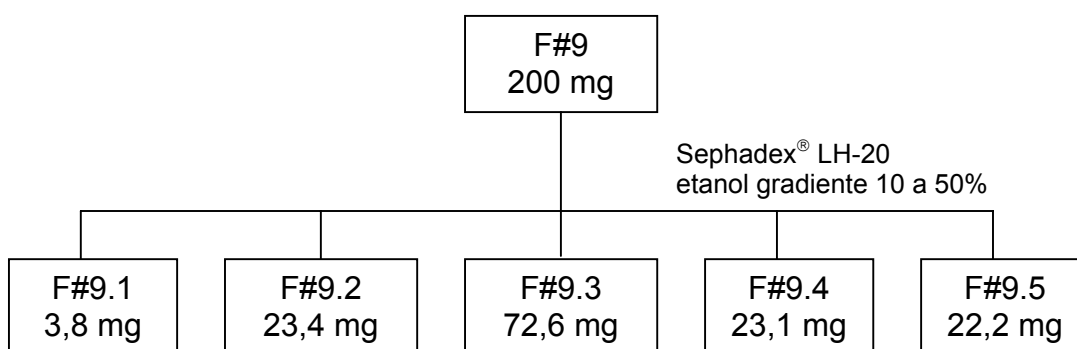
Figura 20 – Estrutura da **substância III**, catequina

Figura 21 – Espectro de dicroísmo circular da catequina

Marx (1990) identificou catequina e epicatequina através de extrato de sementes do guaraná. Entretanto o autor utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (EI) para a confirmação dessas substâncias. Por esse método, afirma o autor, que as duas substâncias representam cerca de 80% do conteúdo total de taninos nas sementes. Dessa forma, esse trabalho, confirma o resultado obtido por Marx (1990) com a identificação dessas duas substâncias.

Na tentativa de isolamento de novos compostos, as subfrações F#6, F#7 e F#8 também foram recromatografadas por CC (seção 3.5.3 – p.58), sendo as manchas apresentadas na CCD (seção 3.5.2 – p.58) características para compostos fenólicos. Entretanto, com essas subfrações, obteve-se novamente as substâncias já isoladas e identificadas anteriormente: **catequina** e **epicatequina**.

A última subfração recromatografada em CC foi a F#9 (200 mg), a qual forneceu cinco subfrações, como pode ser observado no fluxograma 3.



Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico da F#9

Das cinco subfrações obtidas, somente a F#9.2, F#9.3 e F#9.4 tiveram continuidade nas análises. A análise do espectro de RMN dessas subfrações indicou, provavelmente, tratarem ser proantocianidinas diméricas.

Marx (1990) interpretou um cromatograma, obtido por CLAE, a partir de extrato de sementes de guaraná, e apontou indícios da presença de proantocianidinas diméricas. Como os picos foram muito pequenos em relação aos de catequina e epicatequina, não foi possível identificá-los. Essa afirmação, no entanto, relaciona-se com os resultados obtidos por Lea (1980), estudando o comportamento de um soluto em uma mistura eluente com extratos de sidra (vinho branco).

A interpretação dos espectros de RMN 1D (^1H) e 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) forneceu subsídios iniciais suficientes para a elucidação estrutural das proantocianidinas diméricas, entretanto, a análise completa desses compostos relaciona-se também com a análise do espectro de massas e dicroísmo circular.

Fletcher *et al.*, (1977) mostraram através de estudos de RMN de procianidinas paracetiladas 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 do tipo (4→6) é na proporção de 1:1, enquanto que das substâncias com ligações do tipo (4→8) existe uma conformação de rotâmeros dominante. A duplicidade dos sinais depende da rigorosidade da temperatura de medida e do tipo de solvente empregado (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway *et al.* (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas (B_1/B_7 e B_2/B_5) do sistema de spins AB dos hidrogênios

do anel A das substâncias com ligações (4→6) como estando em campos mais baixos (desprotegido) (δ 6,7 ppm), enquanto os sinais da ligação análoga (4→8) em campos mais altos (δ 6,1 ppm). Entretanto esse critério de diferenciação, entre (4→6) e (4→8), somente é válido para substâncias com uma configuração 4*R* (KOLODZIEJ, 1989). Adicionalmente, o hidrogênio H-2 de substâncias ligadas (4→8) apresentam-se com deslocamento entre δ 4,37 e δ 5,01 ppm, enquanto as substâncias ligadas (4→6) entre δ 5,04 e δ 5,35 ppm (HÖR *et al.*, 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 a essa substância ter uma constante de acoplamento grande, pois essa 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).

Um método apropriado, portanto, para determinar a configuração absoluta de C-4 é através do dicroísmo circular (CD).

Thompson *et al.*(1972) indicaram a medida em CD de procianidinas diméricas como significativo pelo “efeito Cotton” em 275 nm. Procianidinas diméricas com configuração 4*S*, como a B₂, mostram-se através de um efeito Cotton negativo, enquanto que as substâncias 4*R*, uma curva espelhada (efeito Cotton positivo). É possível, ainda, utilizar outro comprimento de onda para fazer a diferenciação, como na região entre 220-240 nm (MELLO, 1995).

4.2.2.3 Substância IV – Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B₂)

Cerca de 10 mg das subfrações F#9.2, F#9.3 e F#9.4 foram derivatizadas (seção 3.6, p.62) e purificadas em CCDP (seção 3.5.4, p.59), sendo então denominadas de **substâncias IV, V e VI**, respectivamente.

A **substância IV** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na^+]^+ = 1021,3$ (fig.22) característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

O espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (fig.23) da **substância IV** forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 9. Esse espectro assemelha-se ao espectro de epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina peracetilada, com exceção dos hidrogênios da região aromática (MELLO, 1995).

Figura 22 – Espectro de massas da **substância IV** acetilada

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 (F)	2 x 2,88-2,92	2 x 2,90 – 2,95	<i>m</i>	
H-4 (C)	4,46	4,47	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 1,8$
H-2 (F)	4,54	4,54	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-3 (F)	5,10	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)	5,57	5,56	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} < 1$
H-6 (A)	5,99	5,99	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-8 (A)	6,24	6,19	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-6 (D)	6,66	6,63	<i>s</i>	
H-6' (E)	6,89	6,90 – 7,41	<i>dd</i>	$^4J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,1$ $^3J_{\text{H-6'-H-2'}} = 1,8$
H-2' (E)	7,01	6,90 – 7,41	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2'-H-6}} = 1,8$
H-5' (E)	7,04	6,90 – 7,41	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-5'-H-6''}} = 8,1$
H-5' (B)	7,17	6,90 – 7,41	<i>d</i>	$J_{\text{H-2'-H-6'}} = 8,1$
H-6' (B)	7,29	6,90 – 7,41	<i>dd*</i>	
H-2' (B)	7,36	6,90 – 7,41	<i>d</i>	$J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$

* um dubleto está parcialmente encoberto pelo solvente CDCl_3 ; **Ueffing, 1988

Figura 23 – Espectro de RMN ^1H da **substância IV** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(F)] apresentam-se idênticos, entre δ 2,88-2,92 ppm, sendo os hidrogênios mais protegidos da molécula. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,46 ppm. A constante de acoplamento do hidrogênio H-3(C) com o hidrogênio H-4(C) é pequena de $J_{H3-H4} = 1,8$ 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*. 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 relativa 2,3-*cis* e 3,4-*cis*, também, para a unidade inferior. É perfeitamente visível, no espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY – fig.24), 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, através do espectro de COSY ($^1H/^1H$) (fig.24). Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 5,99 e 6,23 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H6-H8} = 2,4$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,65 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher *et al.* (1977), Hemingway *et al.*, (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 *et al.* (1968c) 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 4S como 4R. Para corroborar com uma possível afirmação do tipo de ligação entre as unidades, superior e inferior, Hör *et al.*, (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 4,54, 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 IV** possui uma configuração do tipo 2R,3R e 2R',3R', 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 de *Tilia* sp. com dados de dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos nesse trabalho e o da **substância IV**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₂ (fig.25), **epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-epicatequina**.

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

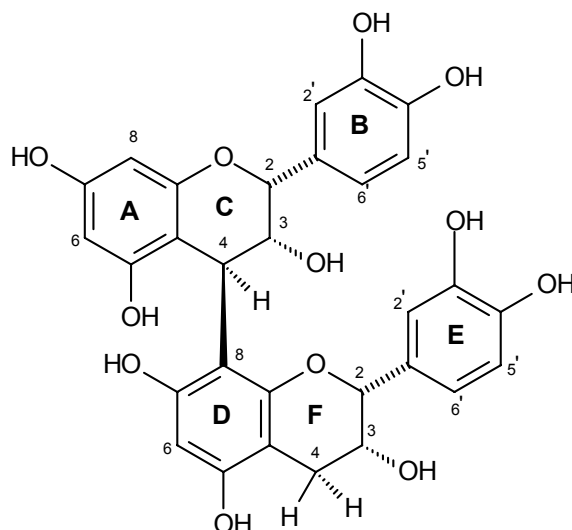


Figura 25 – Estrutura da **substância IV**, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina
(procianidina B₂)

4.2.2.4 Substância V – Catequina-(4 α →8)-catequina (Procianidina B₃)

A **substância V** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na^+]^+ = 1021,3$ (fig.26) característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

Para a **substância V**, o espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (fig.27) também 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 ($-OCH_3$) (MELLO *et al.*, 1999; TOLEDO, 2002). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 10.

Figura 26 – Espectro de massas da **substância V** acetilada

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} (F)	2,66	2,66	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 7,5$
H-4 _{eq} (F)	2,93	2,93	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 5,4$
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)	4,96	4,95	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 7,8$
H-3 (F)	5,02	5,03	<i>ddd</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} = 7,8$ $^3J_{\text{H-3-H-4ax}} = 7,5$ $^3J_{\text{H-3-H-4eq}} = 5,4$
H-3 (C)	5,62	5,63	<i>t</i> *	$\Sigma J = 19,2$
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)	6,64	6,64	<i>s</i>	
H-6' (E)	6,73	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>	$^4J_{\text{H-2'-H-6}} = 1,8$
H-6' (B)	6,99	6,71 – 7,15	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 1,8$
H-2' (B)	7,02	6,71 – 7,15	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,8$
H-5' (E)	7,14	6,71 – 7,15	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$
H-5' (B)	7,14	6,71 – 7,15	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,4$

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

Figura 27 – Espectro de RMN ^1H da **substância V** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F) apresentam-se com deslocamentos em δ 2,66 e 2,93 ppm, respectivamente, sendo os hidrogênios mais protegidos da molécula. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,48 ppm. A constante de acoplamento do hidrogênio H-3(C) com o hidrogênio H-4(C) é grande de $J_{H3-H4} = 9,3$ Hz, e 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 relativa 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 5,02 e 4,96 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento grande, confirmando a configuração relativa 2,3-*trans* e 3,4-*trans*, também, para a unidade inferior. É perfeitamente visível, no espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY – fig.28), 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-5' da unidade inferior e H-5' da unidade superior, através do espectro de COSY ($^1H/^1H$) (fig.28). 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 $J_{H6-H8} = 2,4$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,64 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher *et al.* (1977), Hemingway *et al.* (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, não existe a dificuldade em afirmar a configuração absoluta da

substância na posição 4, e portanto, determinar se essa ligação será do tipo 4β ou 4α . Para facilitar a interpretação do tipo de ligação entre as unidades, superior e inferior, Hör *et al.* (1995) afirmam que o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4→8), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 4,96, obedecendo essa regra. Soma-se a essa regra o dado da proporção dos rotâmeros, com uma conformação dominante, característica de ligação do tipo (4→8). Dessa forma, a **substância V** possui uma configuração do tipo $2R,3S$ e $2R',3S'$, para as unidades superior e inferior, respectivamente. A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada com a determinação através de dicroísmo circular. Entretanto, Petereit (1992) isolou e identificou essa substância com dados de dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos nesse trabalho e o da **substância V**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B_3 (fig.29), **catequina-(4α →8)-catequina**.

Figura 28 – Espectro COSY de $^1\text{H}/^1\text{H}$ da **substância V** acetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS)

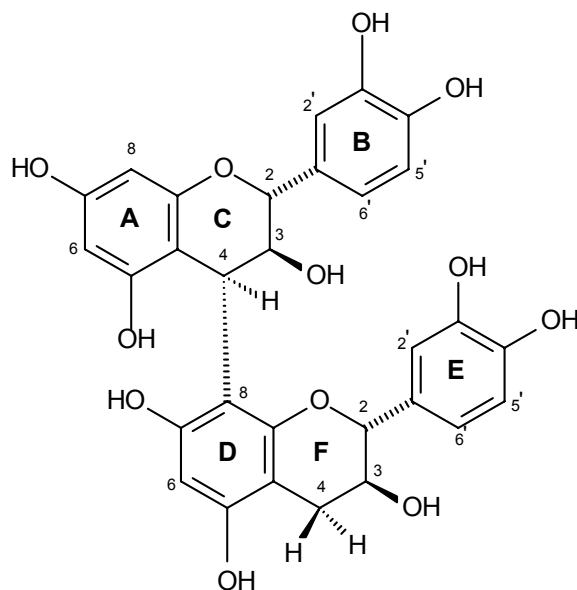


Figura 29 – Estrutura da **substância V**, catequina (4 α →8)-catequina
(procianidina B₃)

4.2.2.5 Substância VI – Catequina-(4 α →8)-epicatequina (Procianidina B₄)

A **substância VI** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M+Na^+]^+ = 1021,3$ (fig.30) característico de substâncias diméricas acetiladas de catequina/epicatequina.

Para a **substância VI**, o espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (fig.31) novamente apresentou dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 11.

Figura 30 – Espectro de massas da substância VI acetilada

Figura 31 – Espectro de RMN ¹H da **substância VI** acetilada (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} (F)	2,72 – 2,78	2 x 2,91		
H-4 _{eq} (F)	3,02	2 x 2,91	<i>dd</i>	$^3J_{\text{Heq-H-3}} = 17,1$ $^2J_{\text{Heq-Hax}} = 5,4$
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)	5,21	5,18	<i>m</i>	$^3J_{\text{H-3-H-2}} < 1$
H-3 (C)	5,71	5,67	<i>t</i> *	$\Sigma J = 19,5$
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-(B e E)	6,85 – 7,30***	6,85 – 7,30		

* pseudo-triplete (teoricamente *dd*); **Ueffing, 1988; *** parcialmente encoberto pelo CDCl_3

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F) apresentam-se com deslocamentos em δ 2,76 e 3,02 ppm, respectivamente, sendo os hidrogênios mais protegidos da molécula. O hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,53 ppm. A constante de acoplamento do hidrogênio H-3(C) com o hidrogênio H-4(C) é grande e de $J_{H3-H4} = 9,6$ 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 relativa 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 5,21 e 5,01 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração relativa *2,3-cis* e *3,4-cis*, para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY – fig.32), 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. Porém, não foi possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios, pertencentes ao sistema AMX dessa substância. Assim, apesar das dificuldades encontradas, foi possível, através do espectro de $^1H/^1H$ COSY (fig.32), estabelecer a correlação entre o H-2(C) com H-2'(B), bem como estabelecer o valor de 8,4 Hz para a constante de acoplamento dos hidrogênios H-5' dos anéis B e E, sem ter sido possível, no entanto, 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 $J_{H6-H8} = 2,4$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,63 ppm, apresenta-se como um singlete.

De acordo com Fletcher *et al.* (1977), Hemingway *et al.* (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, não 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 V**, 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 VI** 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 circular. Essa substância já foi isolada e identificada por Ueffing (1988) a partir de *Tilia* sp. apresentando os dados de dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância VI**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B₄ (fig.33), **catequina-(4 α \rightarrow 8)-epicatequina**.

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

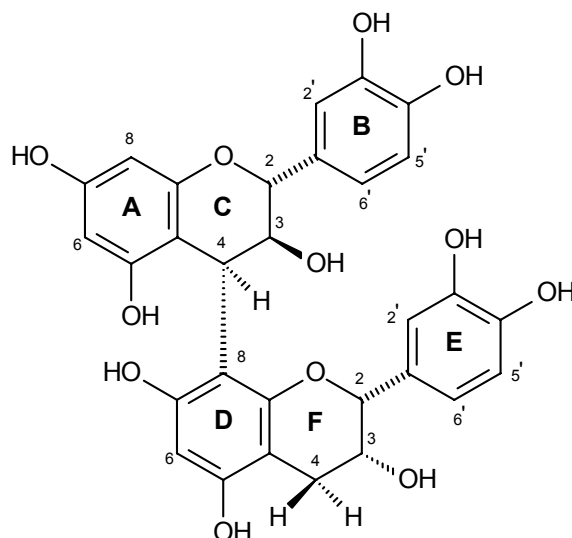


Figura 33 – Estrutura da **substância VI**, catequina-(4 α →8)-epicatequina
(procianidina B₄)

Os dados constantes em literatura, até o momento, apresentaram sempre e de forma indireta, a presença de catequina e epicatequina como substâncias fenólicas majoritárias, sem no entanto terem sido isoladas e identificadas como foram nesse trabalho, sendo assim a primeira vez que as mesmas foram confirmadas com dados espectroscópicos. Dímeros de taninos condensados como as procianidinas B₂, B₃ e B₄, apesar de já terem sido isoladas e identificadas de diferentes fontes naturais como por exemplo em: *Cistus incanus* L.; *Tilia* sp; *Guazuma ulmifolia* Lam. (UEFFING, 1988; PETEREIT, 1992; GALINA, 2003), não haviam sido isoladas e identificadas em *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke.

Marx (1990) infere a presença de prováveis dímeros de taninos condensados através da interpretação de um cromatograma obtido por CLAE. Assim, estabeleceu-se como sendo a primeira vez que essas substâncias são descritas a partir dessa fonte vegetal.

4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os métodos empregados no doseamento de extratos e o estabelecimento de um *fingerprint* por CLAE são fundamentais na padronização de extratos vegetais (STICHER *et al.*, 1998). Os métodos farmacopéicos e o doseamento de grupos de substâncias para drogas vegetais, no entanto, são comuns de serem encontrados em farmacopéias (STICHER *et al.*, 2000).

Assim, procurou-se traçar um perfil cromatográfico para caracterização e quantificação das substâncias padrões (catequina e epicatequina) presentes na fração semipurificada EPA.

Após algumas tentativas no desenvolvimento com diferentes sistemas eluentes, selecionou-se um gradiente entre metanol e ácido acético 5 % (tab.2, p.60). De acordo com as condições cromatográficas descritas na seção 3.5.5.1 (p.60), obteve-se o cromatograma (fig.34) como resultado da análise da fração EPA.

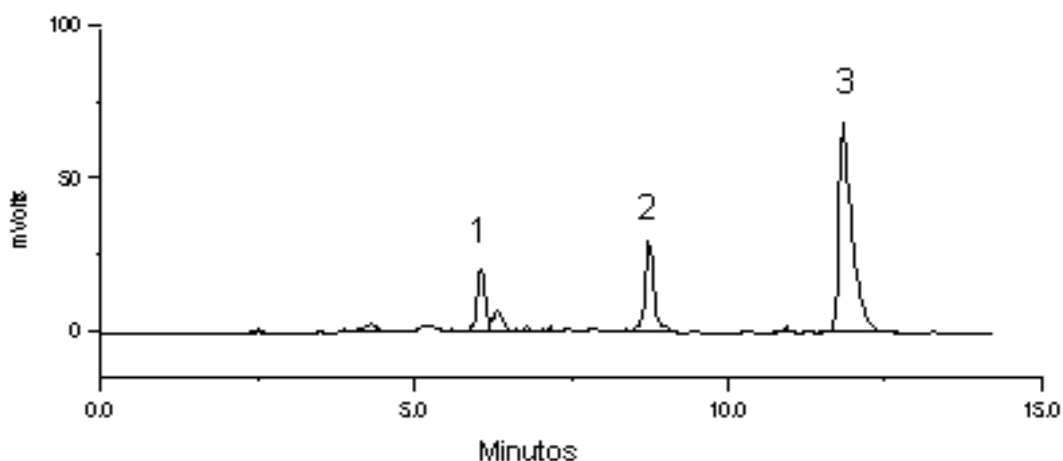


Figura 34 – Cromatograma da fração EPA contendo catequina (1), epicatequina (2) e cafeína (3)

Observando o cromatograma da fração EPA, pode-se considerar que ocorreu uma boa separação das substâncias com um tempo total de 15 min por injeção. As substâncias catequina e epicatequina apresentaram tempo de retenção de 6,17 e 8,85 min, respectivamente. Comparando esses dados com o cromatograma da solução contendo padrão externo de catequina e epicatequina, observa-se uma coincidência nos tempos de retenção de ambos os padrões. Dessa forma torna-se possível avaliar o teor dessas substâncias na fração EPA.

A curva de calibração foi obtida relacionando-se as áreas dos picos das substâncias padrões com suas respectivas concentrações, utilizando-se o método descrito na seção 3.5.5.2 (p.61). As figuras 35 e 36 mostram os picos das substâncias padrões, catequina e epicatequina, com os respectivos intervalos de confiança.

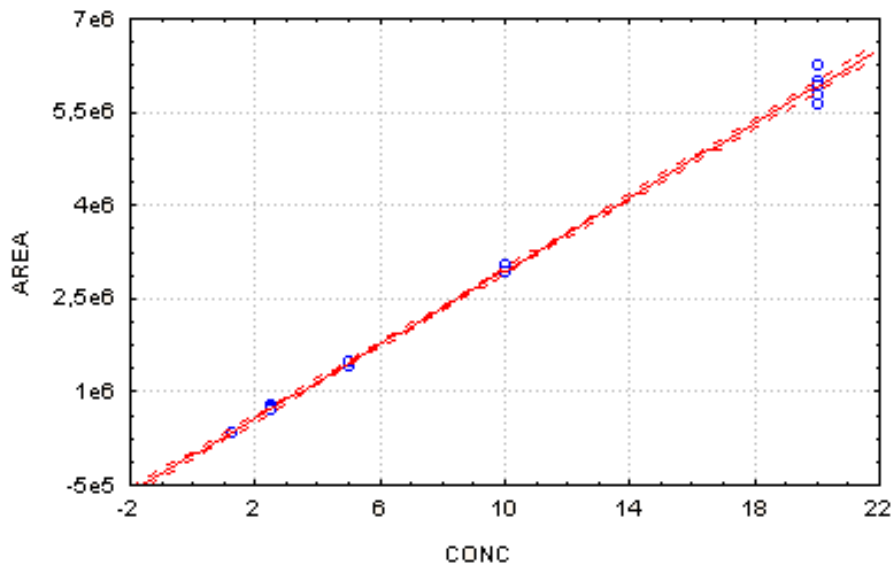


Figura 35 – Curva padrão de epicatequina

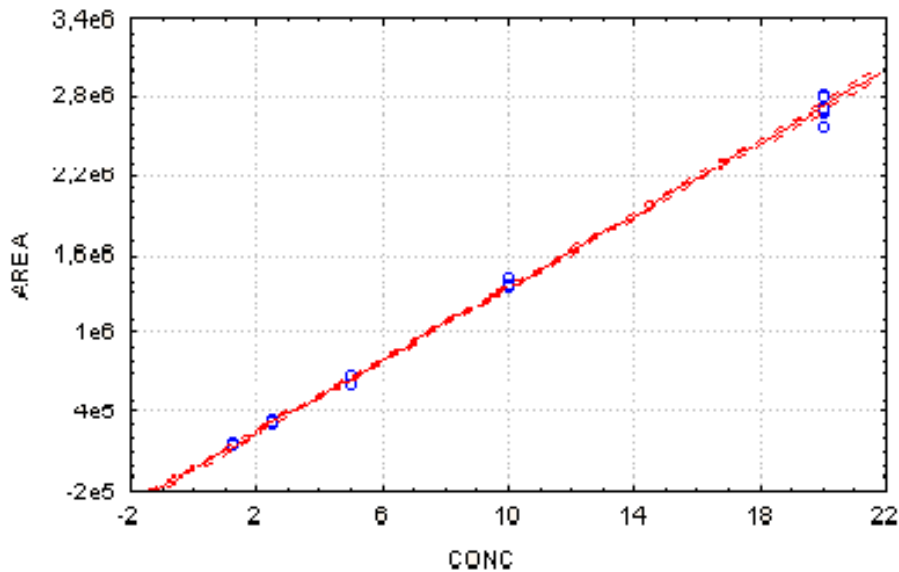


Figura 36 – Curva padrão de catequina

O coeficiente de correlação encontrado para a substância catequina foi de $R^2 = 0,9977$, com a equação da reta ($y = ax + b$) sendo $y = 138036,6 \cdot x - 26432,5$. Para a epicatequina os valores encontrados foram: $R^2 = 0,9975$ sendo a equação da reta $y = 296653,3 \cdot x - 12455,2$.

Assim, com base nos resultados obtidos com a análise da fração EPA e aplicando-se a equação da reta para as respectivas substâncias, pôde-se calcular a quantidade de catequina e epicatequina presente na referida fração, e na droga vegetal. Para cada 100 g de fração EPA, aplicando-se as equações da reta para catequina e epicatequina, respectivamente, obtêm-se 12,6 g de catequina e 8,55 g de epicatequina. Relacionando-se para 100 g de droga vegetal, nessa é possível estimar cerca de 869,4 mg de catequina e 589,0 mg de epicatequina.

Através do cromatograma da fração EPA (fig.34) tornou-se possível a caracterização da substância cafeína. Com a utilização de padrão externo, confirmou-se ser o pico de nº 3 o correspondente à cafeína, apresentando tempo de retenção de 11,92 min.

As subfrações F#5 e F#8, de onde isolaram-se e identificaram-se as substâncias catequina e epicatequina, também foram analisadas por CLAE. A subfração F#5, foi analisada por comparação entre os tempos de retenção das substâncias padrões e os tempos de retenção dos picos das substâncias no cromatograma (fig.37). Para essa análise não houve adição de padrão externo, e os tempos de retenção observados foram de 6,09 e 9,01 para catequina e epicatequina, respectivamente.

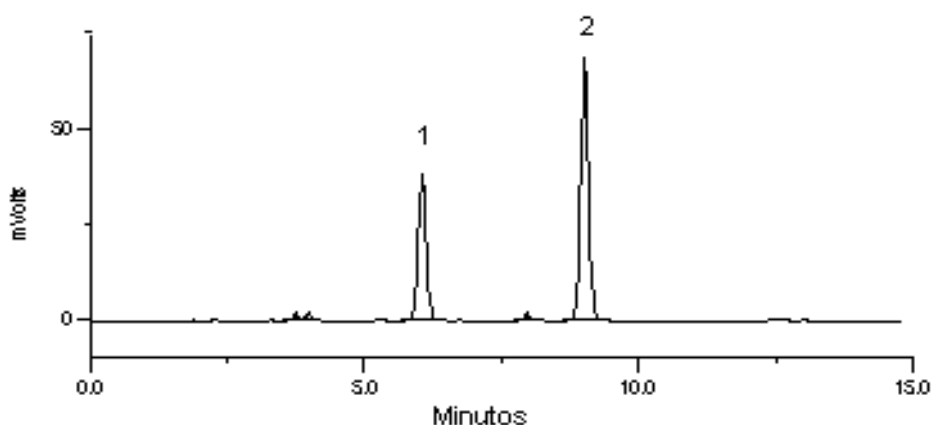


Figura 37 – Cromatograma da subfração F#5: (1) catequina; (2) epicatequina

Assim como na fração EPA, a subfração 8 foi analisada comparando-se os dados obtidos no cromatograma (fig.38), com o cromatograma da solução contendo padrão interno de catequina e epicatequina (fig.39 e 40).

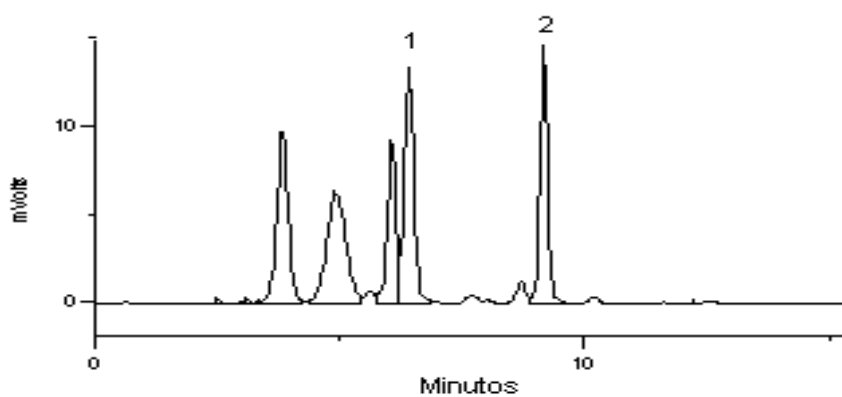


Figura 38 – Cromatograma da subfração F#8 (1) catequina e (2) epicatequina

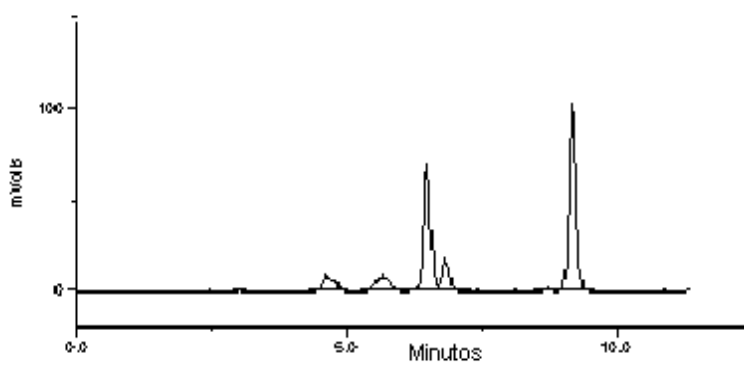


Figura 39 – Cromatograma com padrão interno de catequina

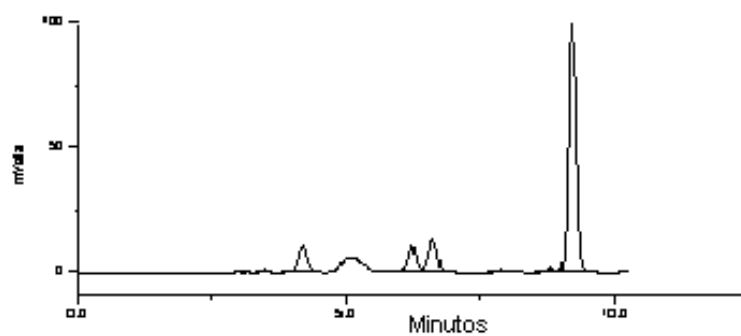


Figura 40 – Cromatograma com padrão interno de epicatequina

Finalmente, analisou-se a subfração F#9 da qual foram isolados e identificados três dímeros de taninos condensados. Observaram-se os tempos de retenção de 4,56, 5,54 e 6,78 min para as procianidinas B₃, B₄ e B₂, respectivamente (fig.41). Esses resultados, podem confirmar o proposto por Lea (1980) e Marx (1990), que considera os menores picos, com tempos de retenção entre 0 e 10 no cromatograma por CLAE, para o guaraná, como sendo de procianidinas diméricas.

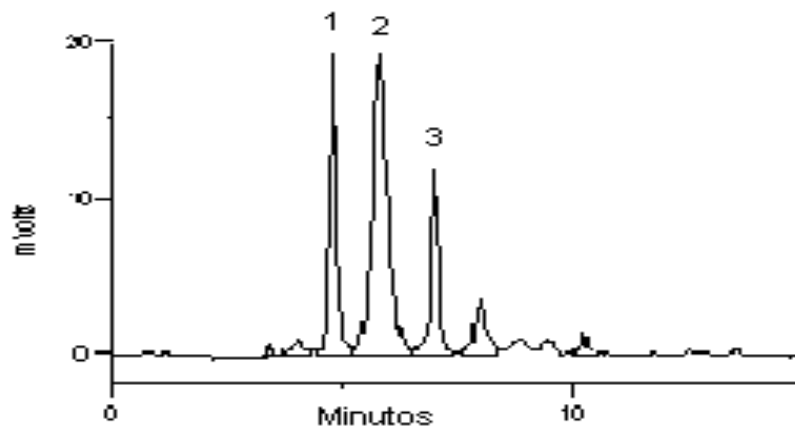


Figura 41 – Cromatograma da subfração F#9 contendo procianidinas B₃ (1), B₄ (2) e B₂ (3)

A concentração dessas substâncias na subfração F#9 foi realizada baseado na concentração de catequina e epicatequina relacionado com a equação $y = ax + b$. A concentração obtida foi de 0,169, 0,29 e 0,043 mg/ml para as substâncias B₃, B₄ e B₂, respectivamente.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, MICROBIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA (AGUDA E SUBCRÔNICA)

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo Machlin e Bendich (1987), os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem causar lesões teciduais ao reagirem com os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, os nucleotídeos do DNA e as pontes sulfidrilas de proteínas. Esses radicais, no entanto, são originários de reações metabólicas normais do organismo. Existem evidências de que contribuem para a etiologia de muitas moléstias crônicas como enfisema, processos inflamatórios, artrites, problemas cardiovasculares, catarata e câncer.

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres no processo normal do envelhecimento, tendo em vista o interesse da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética em novas substâncias antioxidantes (CUENDT *et al.*, 1997, FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MITTLER, 2002; HOSTETTMAN *et al.*, 2003; NEGRO *et al.*, 2003).

Na verdade, 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 metabolismo do oxigênio" (ERMO). As ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. 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 ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila (OH^{\cdot}), e o

peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Normalmente, a redução completa do O₂ ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERMO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (FERREIRA, 1997). Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN; HAMILTON, 1983).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992; MELLO; SANTOS, 2001), agindo 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 apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). As substâncias fenólicas e alguns derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucas são as permitidas para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Devido a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ser um iniciador importante da aterogênese (STEINBERG *et al.*, 1989; STEINBRECHER *et al.*, 1990), 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 as vitaminas E, C e β-caroteno (SOARES, 2002).

1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS

1.2.1 Atividade antibacteriana

Entre as várias atividades biológicas referentes às substâncias fenólicas, a atividade antibacteriana é uma das que desperta maior interesse entre os pesquisadores devido ao aumento das infecções bacterianas nas populações, com aumento da resistência frente aos antibióticos atuais.

Taninos e compostos fenólicos vêm sendo amplamente reconhecidos por possuir alto potencial antibiótico, afirmação esta que confirma o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis como drogas com efeito anti-séptico (KOLODZIEJ *et al.*, 1999).

A toxicidade dos taninos para com os microorganismos tem sido bem documentada com estudos envolvendo vários campos de pesquisas, 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, visando a descoberta de novos fármacos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas, como por exemplo os trabalhos realizados por Simeray *et al.* (1982), Baldé *et al.* (1990), Kasai *et al.* (1992), Scholz (1994), Navarro *et al.* (1996), Foo *et al.* (2000), Akiyama *et al.* (2001), Ho *et al.* (2001), Toledo (2002), Galina (2003), entre outros.

1.2.2 Atividade farmacológica e toxicológica

Os efeitos biológicos dos compostos fenólicos dependem de três propriedades essenciais: formação de complexos com proteínas, formação de quelatos com íons metais e capacidade redutora (SANTOS-BUELGA, 2000).

Vários trabalhos farmacológicos foram desenvolvidos com o guaraná, tendo em vista o interesse em se confirmar alguns dos vários efeitos atribuídos a essa planta.

Sanches *et al.* (1999) e Otobone *et al.* (2001) testaram o extrato bruto (EB) e semipurificado (EPA) das sementes de guaraná quanto à possível atividade antidepressiva em ratos tratados cronicamente e expostos ao modelo experimental do nado forçado.

Galduróz e Carlini (1994) verificaram os efeitos agudos do pó de guaraná sobre a cognição, ansiedade e sono em voluntários normais com idade entre 20 e 35 anos utilizando estudos duplo cego.

Mattei *et al.* (1998) realizaram testes comportamentais em ratos e camundongos, não sendo observado nenhum efeito sobre a atividade motora e sobre o efeito hipnótico do pentobarbital.

Bydlowski *et al.* (1988 e 1991) testaram *in vivo* e *in vitro* o extrato aquoso de *Paullinia cupana* em termos de efeitos sobre a agregação plaquetária.

Entre os vários usos populares, o guaraná é usado como tônico e estimulante das funções cerebrais, e estas propriedades foram parcialmente confirmadas com o estudo realizado por Espínola *et al.* (1997).

Miura *et al.* (1998) também investigou a ação tônica do extrato aquoso de guaraná em camundongos normais, exercitados e glicogenolíticos induzidos por epinefrina.

Estudos toxicológicos com plantas também tem merecido interesse por parte dos pesquisadores, entre os quais podem-se citar os trabalhos desenvolvidos por Fonseca *et al.* (1994), Santa Maria *et al.* (1998), Rebecca *et al.* (2002 e 2003).

2. OBJETIVOS

Esse capítulo do trabalho teve por objetivos:

5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos, subfrações e substâncias isoladas de *Paullinia cupana*.
6. Avaliação microbiológica do extrato bruto (EBPC), das frações semi-purificadas: fração EPA e fração aquosa (FAQ) e substâncias puras.
7. Avaliação toxicológica aguda e subcrônica da fração EPA em roedores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos EBPC, FAQ, EPA e FAC, assim como de algumas subfrações e substâncias isoladas (F#2c, F#5.2 e F#5.3), foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD), (cap.1, seção 3.5.2, p.58), tendo como sistema eluente butanol:ácido acético:água (3:1:1) (CUENDET *et al.*, 1997). Nebulizou-se o cromatograma com solução de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) a 0,2% em metanol. Aplicaram-se 100 µg dos extratos e subfrações e 10 µg das substâncias isoladas e padrões. Os padrões utilizados foram quercetina, ácido gálico, rutina e astilbina.

3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.2.1 Avaliação microbiológica

A atividade antibacteriana dos extratos EBPC, FAQ, EPA e substâncias puras (F#2c, F#5.2 e F#5.3) de *Paullinia cupana*, foi observada *in vitro*, pelo Método de Diluição (WOODS; WASHINGTON, 1995), contra cepas do American Type and Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (25923), *Bacillus subtilis* (6623), *Escherichia coli* (25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (15442).

3.2.1.1 Padronização da suspensão bacteriana

A partir de uma cultura bacteriana de 24 h em caldo Mueller-Hinton (CMH), 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 $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Realizou-se, após, uma diluição 1/10 em tubo eppendorf, para obter-se uma suspensão de 10^7 UFC/ml, cujo inóculo foi empregado no ensaio microbiológico.

3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método da diluição em placas

As amostras a serem testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) preparando-se uma solução estoque de 20 mg/ml. Em seguida foram diluídas (1:10) em caldo Mueller-Hinton, obtendo-se uma solução 2 mg/ml (Solução Teste – ST).

Em uma placa de 96 poços pipetou-se um volume de 100 μ l de caldo Mueller-Hinton em cada poço, sendo em seguida adicionado um volume de 100 μ l de ST aos poços da primeira fileira, obtendo-se uma concentração inicial de 1000 μ g/ml.

Realizou-se, em seguida, diluições seriadas, homogeneizando e transferindo 100 μ l da primeira fileira até a sétima fileira, resultando nas respectivas concentrações de: 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625 μ g/ml. A oitava fileira de poços foi utilizada como controle da bactéria, contendo somente caldo Mueller-Hinton e suspensão bacteriana.

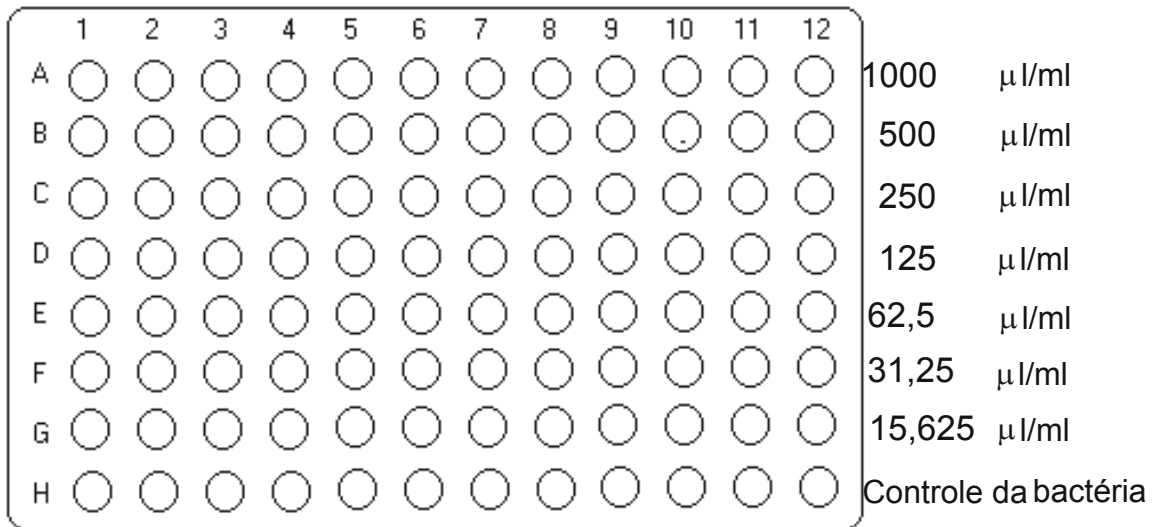


Figura 42 – Preparo da placa de 96 poços

A todos os poços foram adicionados 5 μl da suspensão de microorganismos padronizada, e em seguida a placa foi incubada a 37 °C durante 24 h.

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 antibacterianos clássicos. Utilizou-se os seguintes antibióticos de referência: **I** - Penicilina para *Staphylococcus aureus*; **II** - Vancomicina para *Bacillus subtilis* e **III** - Tetraciclina para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Com a penicilina preparou-se uma solução de 5 mg/ml (solução A), em seguida essa solução foi diluída 1/100 (solução B). A solução B foi novamente diluída 1/10 em CMH. Ao primeiro poço da microplaca contendo 100 μl de CMH foi

adicionada 100 µl dessa última solução, obtendo-se então uma concentração de 2,5 µg/ml.

A vancomicina e a tetraciclina foram preparadas diluindo-se 5 mg das respectivas drogas em 100 µl de água destilada (solução A), essa foi diluída 1/100 e novamente diluída 1/10 em CMH. Ao primeiro poço da microplaca contendo 100 µl de CMH foi adicionada 100 µl dessa última solução, obtendo-se então uma concentração de 25 µg/ml.

3.2.2 Avaliação toxicológica pré-clínica

Os testes toxicológicos pré-clínicos agudo e subcrônico da fração EPA de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, foram realizados com animais adquiridos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

O Biotério Central mantém cadastro no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e é certificado junto ao Conselho Regional de Medicina Veterinária.

Para o teste agudo foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com 45 dias e peso individual médio aproximado de 35 g. Para o teste subcrônico foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*), também com 45 dias e peso individual médio aproximado de 220 g.

Os testes toxicológicos seguiram os procedimentos descritos por Brito (1994), Brasil (1996) e Zaupa *et al.* (2000).

3.2.2.1 Aspectos éticos

Para a realização da avaliação toxicológica, padronizou-se os procedimentos segundo os aspectos pertinentes à ética na experimentação animal, de acordo com a Legislação e Ética do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA – 1991).

Foi apresentado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) dessa Instituição, projeto de pesquisa para avaliação e aprovação dos trabalhos realizados com animais.

O parecer do CEEA favorável ao trabalho apresenta-se sob nº 039/03 (ANEXOS).

3.2.2.2 Teste agudo

Camundongos machos Swiss, previamente pesados, foram separados em grupos de maneira a não apresentarem diferenças estatísticas no peso no início do teste. Os grupos constituíram-se em controle e teste com 10 animais cada, mantidos em caixas de polipropileno (5 animais/caixa), devidamente identificadas.

Os grupos teste receberam administração aguda da solução teste EPA, por via oral e intraperitoneal, nas doses de 5,0, 2,5 e 1,0 g/kg e 2,5, 1,5, 1,0, 0,5 e 0,1 g/kg, respectivamente, e os grupos controle receberam água. Para a administração oral (gavage) utilizou-se uma agulha recurvada com ponta arredondada e para a administração intraperitoneal foi utilizado agulha de insulina. Os camundongos foram observados logo após a administração e diariamente durante 14 dias, avaliando-se a

evolução ponderal no 1º, 7º e 14º dia. Os animais foram, ao final do experimento, sacrificados com éter. Os órgãos: rins, coração, fígado e pulmões foram retirados, pesados e avaliados quanto a possíveis anormalidades macroscópicas.

3.2.2.3 Teste subcrônico

Ratos machos e fêmeas Wistar foram pesados e divididos em grupos, por sexo, e de forma a não apresentarem diferenças estatísticas com relação ao peso entre eles. Separou-se em um grupo controle e três grupos teste, de 15 animais cada, sendo mantidos em grupos de 5 em caixas de polipropileno identificadas.

Cada animal recebeu, diariamente, por um período de 90 dias, administração de água ou da solução teste nas doses de 30, 150 e 300 mg/kg por via oral (gavage). Os animais foram observados diariamente com relação ao comportamento e pesados semanalmente. Todos os animais receberam ração e água à vontade durante o período de tratamento.

No último mês de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (*open-field*) (seção 3.2.2.4) e realizou-se a coleta de urina (seção 3.2.2.5.1) para exames físico, químico e de sedimentoscopia (seção 3.2.2.6.1).

Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação, recolhendo-se o sangue (seção 3.2.2.5.2) para análise hematológica e bioquímica (seção 3.2.2.6.2). Coração, rins, fígado e pulmões foram removidos imediatamente após o sacrifício, pesados e encaminhados para análise histopatológica (seção 3.2.2.7).

3.2.2.4 Teste do campo aberto (*open-field*)

O teste do campo aberto (*open-field*) seguiu o método descrito por Carlini (1986), constituindo-se de uma caixa circular de madeira de 76 cm de raio com paredes de 49 cm de altura. O piso da caixa é quadriculado, dividindo o campo em 4 partes centrais e 8 partes periféricas. A iluminação é feita por uma lâmpada quente (100 W) colocada acima do centro da caixa.

Cada animal, individualmente, foi colocado no centro da caixa, em um quadrado previamente determinado, e seu comportamento foi observado durante 5 min. Toda vez que o animal entrou em um novo quadrado, registrou-se o evento. Além da atividade locomotora (ambulação), foram avaliados o número de vezes que o animal se apóia nas patas traseiras assumindo posição vertical (*levantamento*), número de vezes que o animal realiza auto-limpeza e índices de emocionalidade como micção e defecação.

3.2.2.5 Coleta de material para análise laboratorial

3.2.2.5.1 Coleta de urina

Após 60 dias de tratamento com a solução teste EPA, procedeu-se o início da coleta de urina dos animais. Utilizaram-se gaiolas metabólicas cilíndricas de aço inox, contendo uma parte superior onde colocou-se o animal e uma parte inferior em formato de funil, por onde foi recolhido o material em frasco de vidro colocado na ponta do funil (fig.43)

Os animais foram, individualmente, colocados nas gaiolas metabólicas, e deixados por 24 h, com ração e água à vontade. O material recolhido foi enviado ao laboratório para as análises.

3.2.2.5.2 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada em dois tubos de ensaio: um contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante (tubo A) e outro tubo seco para separação do soro (tubo B).

O sangue coletado em tubo com EDTA (tubo A) foi, novamente, subdividido em dois, um para o hemograma (A1) e o outro para a dosagem de glicose (A2).

Os tubos A2 e B foram centrifugados para a realização das dosagens bioquímicas.



Figura 43 – Gaiola metabólica

3.2.2.6 Análise laboratorial

Os exames laboratoriais foram realizados pelo Laboratório Cedlab, Maringá, Pr, e apresenta certificação do Programa Nacional de Controle de Qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (ANEXOS).

3.2.2.6.1 Análise da urina

O exame parcial de urina foi realizado através da utilização de tiras reativas e a bacterioscopia foi através da coloração de Gram do sedimento obtido após centrifugação. As reações positivas nas tiras foram confirmadas com reações bioquímicas qualitativas.

Foram realizados exames físico (volume, cor, aspecto, depósito, pH e densidade), químico (proteína, cetonas, urobilinogênio, glicose, hemoglobina e nitrito), de sedimentoscopia (células epiteliais, leucócitos, hemácias, cristais, cilindros e filamentos de muco) e bacterioscopia.

3.2.2.6.2 Análise do sangue

O hemograma foi feito em contador automatizado e a contagem diferencial foi realizada após coloração do esfregaço com corante Leishman. Foi verificado eritrograma, leucograma e plaquetas.

As dosagens bioquímicas foram realizadas com *kits* comerciais através de reações enzimáticas-colorimétricas (glicose, colesterol total, triglicérides, uréia e ácido úrico), colorimétricas [creatinina, transaminase glutâmico pirúvica (TGP), bilirrubinas direta, indireta e total e albumina] ou cinéticas (amilase e fosfatase alcalina).

3.2.2.7 Análise histopatológica

Essa análise foi realizada no Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas, da Universidade Estadual de Maringá.

Os procedimentos histopatológicos foram realizados conforme as técnicas de rotina descritas por Montenegro e Franco (1992) e Mikel (1994). Após a visualização do conjunto, os órgãos-alvo foram removidos, dissecados, pesados e analisados quanto ao aspecto macroscópico.

Em seguida, os órgãos-alvo foram seccionados e submetidos à etapa de fixação por um período de 12 a 16 h, com utilização de solução de formol a 10% tamponado. Após a fixação, os órgãos foram desidratados progressivamente em 5 banhos de álcool etílico (70 °GL, 80 °GL, 96 °GL, etanol absoluto¹, etanol absoluto²), permanecendo por 1 h em cada banho. Imediatamente após a desidratação, foi iniciada a etapa da diafanização, onde os órgãos foram submetidos a dois banhos de xilol (no primeiro banho é necessário deixar o órgão mergulhado por 2:30 h; no segundo banho deixa-se o órgão mergulhado até a diafanização).

Uma vez diafanizado, esses órgãos foram submetidos a dois banhos de parafina no interior da estufa, a uma temperatura de 65 °C. A passagem dos órgãos

em cada banho ocorreu em intervalos de 2 h. Após a impregnação pela parafina, foram emblocados e deixados à temperatura ambiente durante 72 h para que ocorresse sua solidificação, formando assim um bloco contendo um órgão-alvo.

Após o emblocamento, foi realizada a etapa de microtomia, com auxílio de um micrótomo rotativo. Cada órgão emblocado foi submetido a cortes histológicos de 5 μm de espessura. Esses cortes foram distendidos em banho histológico (40 °C) e colhidos na superfície de uma lâmina mergulhada diagonalmente dentro do banho. As lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas à uma bateria de coloração de rotina, hematoxilina e eosina (H.E.). Essa bateria consiste de remoção da parafina pelo xilol, hidratação e desidratação progressiva em banhos de álcool, corados em banhos contendo solução de H.E., diafanizados em banhos de xilol e finalmente montadas as lâminas permanentes, sob lamínula com Bálsamo do Canadá.

As lâminas permanentes, foram analisadas através de microscopia óptica (aumento 4 a 40x).

3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para o cálculo da DL_{50} utilizou-se o método proposto por Miller e Tainter, realizando-se cálculos matemáticos, determinando-se também o desvio padrão (ZANINI; OGA, 1994). Os cálculos matemáticos foram realizados relacionando-se Log da dose e probito, aplicando-se as equações (4) e (5) que relacionam b e a da reta de regressão.

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (4)$$

$$a = y - bx \quad (5)$$

Onde: x = Log dose

y = probito

n = nº de grupos de animais

Empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via para os testes toxicológicos (agudo e subcrônico), seguida do teste de Duncan. As freqüências das ocorrências histopatológicas foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$ para todos os experimentos.

Essas análises foram realizadas através do programa estatístico STATISTICA[®], versão 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas.

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, portanto, seriam substâncias que apresentariam o poder de proteger o organismo contra os efeitos degenerativos desses metabólitos tóxicos (CARLINI, 1995; MELLO; SANTOS, 2001).

Utilizando-se o método descrito na seção 3.1 (p.138), foi realizado com o guaraná, teste para a verificação de uma possível atividade antioxidante.

Os resultados, como demonstrado na figura 44, apresentaram-se positivo para os extratos (1- EBPC; 2- FAQ; 3- FAC; 4- EPA), as subfrações (5- F#5; 6- F#6; 7- F#7; 8-F#8; 9-F#9) e as substâncias isoladas e identificadas como substâncias fenólicas (11- epicatequina; 12- catequina), na concentração de 100 µg/ml para os extratos e subfrações e 10 µg/ml para as substâncias isoladas, apresentando visualmente uma maior intensidade de atividade quando comparada com os padrões (13- quercetina; 14- rutina; 15- ácido gálico; 16- astilbina).

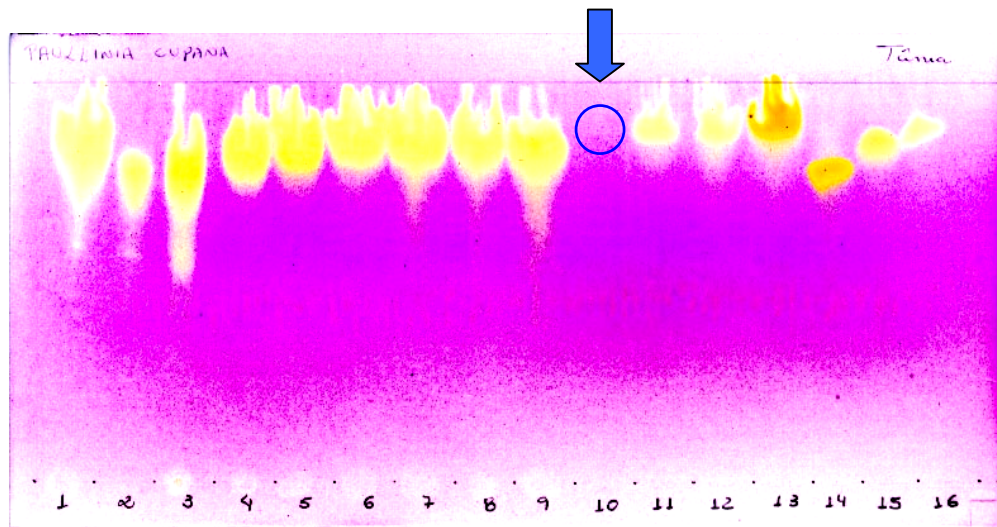


Figura 44 – Cromatograma da atividade antioxidante do guaraná (gel de sílica F₂₅₄; Butanol:ácido acético:água; 3:1:1; DPPH à 0,2%)

Comparando-se o resultado obtido nesse teste de atividade antioxidante realizado com o guaraná, com trabalhos utilizando-se plantas que apresentam substâncias fenólicas, pode-se dizer que o mesmo apresenta-se com resultados dentro do esperado para plantas com esse tipo de metabólito secundário. Segundo Hostettmann (2003) as substâncias fenólicas são, na maioria dos casos, responsáveis pelo resultado obtido, podendo ser, futuramente, alternativa na busca de medicamentos para as doenças degenerativas.

Yoshizawa *et al.* (1987) e Figueira *et al.* (2002) realizaram estudos com extratos de chá verde, que apresenta a (-)-epigallocatequina galato como o principal constituinte polifenol, e demonstraram a atividade antioxidante desse extrato. De acordo com o radical substituinte da molécula da substância fenólica, esta apresenta um mecanismo diferente de ação antioxidante (GRASSMANN *et al.*, 2002).

Ainda de acordo com o cromatograma acima, observa-se que o resultado apresentou-se negativo para a substância identificada como cafeína (nº 10 no cromatograma).

Alguns trabalhos relatam a atividade antioxidante dessa substância (SHI *et al.*, 1991; DEVASAGAYAN *et al.*, 1996), entretanto, o trabalho realizado por Lee (2000) apresenta resultados que se contrapõe aos trabalhos anteriores. Segundo o autor, a atividade antioxidante relatada anteriormente, sugere a cafeína como composto antioxidante na concentração de milimolar, havendo poucas informações disponíveis acerca da atividade antioxidante da cafeína e seus metabólitos em concentrações fisiológicas, que seria de micromolar. De acordo com dados apresentados por Lee, o nível sérico da cafeína em adultos não ultrapassaria 50 $\mu\text{mol/l}$. Ainda, o autor aponta como tendo atividade antioxidante os metabólitos da cafeína (1-metilxantina e ácido 1-metilúrico).

No trabalho realizado com o guaraná, foi utilizada a cafeína na concentração de 10 μg , equivalente a 0,051 μmol , estando esse valor abaixo do considerado relevante, sendo, portanto, um dos fatores responsáveis pelo resultado negativo obtido nesse teste.

4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os testes antimicrobianos foram motivados pelo fato de que plantas ricas em taninos possuem ação bactericida, como pode ser observado na revisão de Scalbert (1991).

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), no presente trabalho, utilizou-se uma técnica simples e de baixo custo que têm apresentado alto potencial de utilização universal (TELLES; MOSCA, 2000).

Os resultados obtidos para a avaliação da CIM em testes microbiológicos com as amostras teste de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, frente às bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), estão demonstrados na tabela 12.

Tabela 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos, frações e substâncias isoladas das sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, em $\mu\text{g/ml}$

Extratos e substâncias puras	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	Atividade antibacteriana			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EBPC	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
FAQ	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
EPA	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
F#2c	> 100	> 100	> 100	> 100
F#5.2	> 100	> 100	> 100	> 100
F#5.3	> 100	> 100	> 100	> 100

Tanto nesse trabalho, como no realizado por Holetz *et al.* (2002), considerou-se que o extrato bruto (EBPC) e as frações semipurificadas (FAQ, EPA), com CIM menor de 100 $\mu\text{g/ml}$, apresenta boa atividade antimicrobiana, de 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$ a atividade antimicrobiana é moderada, até 1000 $\mu\text{g/ml}$ foi considerada fraca atividade e, acima de 1000 $\mu\text{g/ml}$, o extrato é dito inativo. Para as substâncias isoladas, a CIM acima de 100 $\mu\text{g/ml}$ é considerada inativa.

Verifica-se na tabela 12 que os extratos, frações e substâncias isoladas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, testados *in vitro*, não apresentaram atividade antimicrobiana, nesse modelo experimental, frente a microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, considerando como parâmetros os valores citados por Holetz *et al.* (2002).

A pesquisa sobre a atividade antimicrobiana encontra, muitas vezes, alguns problemas devido à diversidade de técnicas e critérios empregados (RIOS *et al.*, 1988).

Utilizando-se da mesma metodologia e critérios de avaliação dos resultados obtidos, Galina (2003) demonstrou que o extrato bruto das cascas de mutamba (com teor de cerca de 5% em taninos) apresentou boa ação bacteriostática frente à *S. aureus*, atividade moderada para *B. subtilis* e, fraca atividade frente às bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*), o que torna a metodologia válida para esse tipo de avaliação, descartando, dessa forma, falha no modelo experimental adotado para as análises antimicrobianas com o guaraná.

Silva e Cechinel Filho (2002), mostraram que o extrato acetato de etila da espécie *Bauhinia splendens* Kunth, apresentou CIM 400 µg/ml contra *S. aureus*. Kolodziej *et al.* (1999) demonstraram que proantocianidinas extraídas da espécie *Hamamelis virginiana* L. apresentaram CIM de 1000-2000 µg/ml, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A procianidina B₂, isoladamente, mostrou atividade antibacteriana com uma CIM de 1000 µg/ml para *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, e 2000 µg/ml para *E. coli*.

Verifica-se nos trabalhos citados anteriormente, que as CIM apresentadas estão elevadas quando comparadas aos valores determinados aos antimicrobianos clássicos e de acordo com o proposto por Holetz *et al.* (2002). Para o guaraná não

foi determinado valores exatos, mas sim obtidos valores acima do considerado ativo de acordo com Holetz *et al.* (2002), o que o torna inadequado quanto ao uso como possível fármaco antimicrobiano.

Tendo em vista esses resultados, não houve continuidade nos testes microbiológicos para a verificação da concentração bactericida mínima (CBM).

Em paralelo realizou-se um ensaio com antibacterianos clássicos, como descrito na seção 3.2.1.2 (p.139), tendo por finalidade o controle do processo, de modo a se confirmar que as cepas utilizadas não eram resistentes. Os valores obtidos estão demonstrados na tabela 13 e foram comparados com dados da literatura para a CIM dos antibióticos de referência (WOODS; WASHINGTON, 1995). A literatura apresenta os seguintes resultados para os antibióticos: **I** – Penicilina: $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$, **II** – Tetraciclina: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ e **III** – Vancomicina: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$.

Tabela 13 - Concentração inibitória mínima controle com antibacterianos

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	Atividade antibacteriana			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Penicilina	0,00975	--	--	--
Tetraciclina	--	--	0,78	3,125
Vancomicina	--	0,09	--	--

Com esses resultados pode-se confirmar que as cepas utilizadas não foram resistentes, pois os valores encontraram-se dentro dos limites da literatura. Dessa forma, foi validada a metodologia empregada para a avaliação da CIM.

4.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA

Estudos toxicológicos pré-clínicos de extratos de plantas medicinais, torna-se cada vez mais rotineiro entre as indústrias de medicamentos fitoterápicos, em atendimento às normas legais, que exigem estudos de eficácia e segurança (BRASIL, 2000).

O teste toxicológico agudo (DL_{50}) é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, administrada em dose única ou em várias doses em um período de 24 h (BRITO, 1994).

A DL_{50} da fração semipurificada EPA foi calculada com base no método proposto por Miller e Tainter (ZANINI; OGA, 1994). Os valores empregados para os cálculos encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 - Efeito toxicológico agudo da fração EPA de *P. cupana* administrada por v.o. e i.p. em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Total mortos	Efeito (%)	Valor corrigido (a)	Probita	Log da dose
1	5000 (v.o.)	10	100	97,5	6,96	3,69
2	2500 (v.o.)	8	80	80	5,84	3,39
3	1000 (v.o.)	1	10	10	3,72	3
4	2500 (i.p.)	10	100	97,5	6,96	3,39
5	1500 (i.p.)	10	100	97,5	6,96	3,17
6	1000 (i.p.)	7	70	70	5,52	3
7	500 (i.p.)	1	10	10	3,72	2,69
8	100 (i.p.)	0	0	2,5	3,04	2

Os testes agudos realizados com o guaraná produziram mortalidade em mais de 50% da população nas doses de 5,0 e 2,5 g/kg (v.o.) e 2,5, 1,5 e 1,0 g/kg (i.p.). No entanto, nenhuma alteração comportamental aparente, nos animais sobreviventes, foi encontrada durante os 14 dias de observação. A DL_{50} calculada foi de $1,769 \pm 0,242$ g/kg v.o. e de $0,593 \pm 0,097$ g/kg i.p.

Quanto ao peso corporal, os animais não apresentaram diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados (tab.15). O aumento ou diminuição do peso corporal dos animais pode representar alterações fisiológicas importantes, tais como: hepáticas, hormonais ou mesmo não absorção de componentes como proteínas, aminoácidos, entre outros.

Após o período de 14 dias os animais foram sacrificados para a pesagem (tab.16), e posterior análise macroscópica dos órgãos, sem, no entanto, terem

apresentado qualquer tipo de alteração. Nos órgãos avaliados encontrou-se diminuição significativa no peso dos pulmões dos camundongos tratados com a dose de 0,1 g/kg, embora essa alteração não tenha ocorrido em outras doses.

Esse fato, porém, não chegou a comprometer o desenvolvimento dos animais, demonstrando dessa forma, tratar-se, provavelmente, de uma variabilidade biológica ocorrida nesse grupo de animais, uma vez que esse fato não ocorreu em doses maiores.

Tabela 15 - Evolução ponderal de camundongos machos tratados agudamente com fração EPA

Via	N _{in}	Dose	Peso inicial	N _f	Peso 7 dias	Peso 14 dias
v.o.	10	5,0 g/kg	34,1 ± 3,4	0	morte	morte
	10	2,5 g/kg	34,8 ± 2,8	2	34,9 ± 0,1	37,6 ± 1,4
	10	1 g/kg	35,6 ± 2,8	9	38,3 ± 4,2	41,1 ± 4,7
	10	controle	35,6 ± 4,2	10	39,3 ± 4,4	42,5 ± 4,3
i.p.	10	2,5 g/kg	37,2±2,9	0	morte	morte
	10	1,5 g/kg	36,1±4,8	0	morte	morte
	10	1,0 g/kg	37,6±4,7	3	41,3±6,1	43,6±6,1
	10	0,5 g/kg	36,8±5,3	9	39,0±4,5	40,9±6,1
	10	0,1 g/kg	34,0±5,6	10	38,6±5,8	41,8±5,9
	10	Controle	34,6±3,3	10	38,3±3,9	39,9±4,2

ANOVA não significativa; N_{in}=número de animais por grupo no início do experimento; N_f=número de animais sobreviventes

Tabela 16 - Peso dos órgãos no teste agudo em camundongos machos tratados com fração EPA

Via	N	Dose (g/kg)	Coração	Rins	Fígado	Pulmões	Baço
	0	5,0	morte	morte	morte	morte	morte
v.o.	2	2,5	0,23 ± 0,09	0,67 ± 0,04	2,66 ± 0,11	0,33 ± 0,02	0,22 ± 0,01
	9	1,0	0,23 ± 0,07	0,73 ± 0,09	2,81 ± 0,43	0,37 ± 0,08	0,22 ± 0,09
	10	Controle	0,22 ± 0,08	0,65 ± 0,15	3,15 ± 0,49	0,33 ± 0,05	0,18 ± 0,06
i.p.	0	2,5	morte	morte	morte	morte	morte
	0	1,5	morte	morte	morte	morte	morte
	3	1,0	0,21 ± 0,04	0,71 ± 0,10	2,54 ± 0,44	0,32 ± 0,05	0,22 ± 0,10
	9	0,5	0,26 ± 0,05	0,63 ± 0,08	3,0 ± 0,66	0,38 ± 0,06	0,27 ± 0,06
	10	0,1	0,23 ± 0,08	0,67 ± 0,11	3,32 ± 0,6	0,30 ± 0,07*	0,22 ± 0,06
	10	Controle	0,26 ± 0,06	0,61 ± 0,13	2,93 ± 0,55	0,40 ± 0,07	0,20 ± 0,05

* estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Duncan - p≤0,05);

N=número de animais por grupo

4.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA SUBCRÔNICA

4.4.1 Evolução ponderal e comportamental

Os estudos de toxicidade subcrônica fornece informações dos riscos para a saúde, quando da utilização de uma dada substância, principalmente por via oral, por tempo prolongado e limitado (30 ou 90 dias) (BRITO, 1994). Esse teste fornece informações adicionais sobre órgãos-alvo e efeitos cumulativos da substância teste.

Considerando que a população utiliza o guaraná (pó) diariamente, na dose de 1g/dia^{*}, realizou-se estudo de toxicidade de doses repetidas, denominado toxicidade subcrônica, com a fração EPA do guaraná.

Durante o período de 90 dias de tratamento não houve mortalidade dos animais. Observou-se, no entanto, diminuição no peso corporal dos machos tratados com 150 e 300 mg/kg de EPA a partir do 21º dia até o 90º dia (fig.45), quando comparado ao grupo controle. Nas fêmeas não foram observadas alterações estatisticamente significantes na evolução ponderal (fig.46).

Observou-se, também nas doses de 150 e 300 mg/kg, que os machos apresentaram diminuição significativa no peso dos rins. Os animais tratados com a dose de 150 mg/kg também apresentaram diminuição no peso dos pulmões (tab.17, fig.47 e 48). As fêmeas, entretanto, não apresentaram variações significativas em nenhum dos órgãos avaliados (tab.18).

* comunicação pessoal – farmacêutica Nádia Regina Alvim da Fonseca – Ervanário, Maringá.

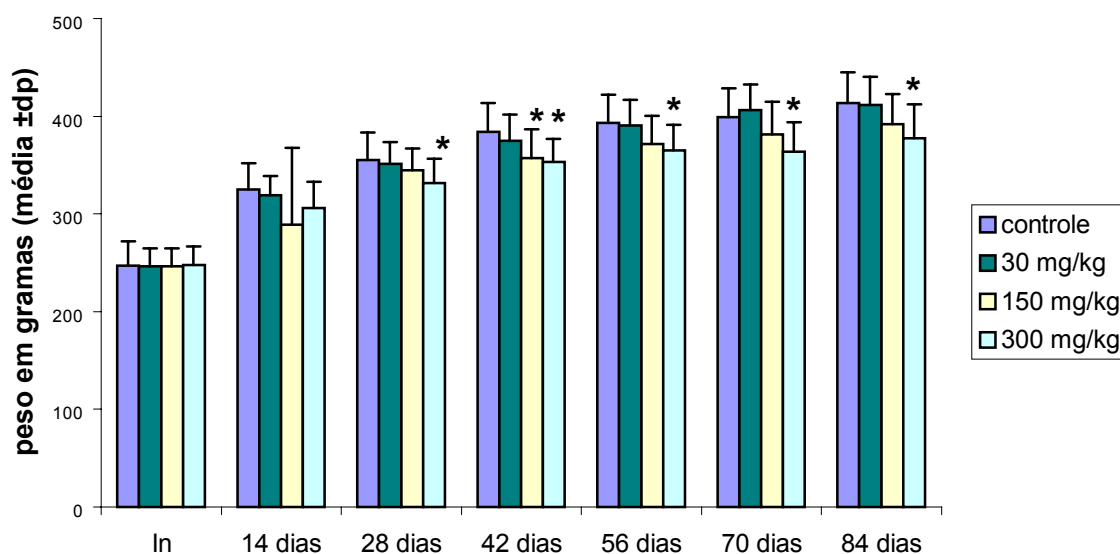


Figura 45 - Evolução ponderal de ratos machos tratados com fração EPA. Os valores estão expressos em média \pm dp. * Estatisticamente diferentes do grupo controle – ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,05$

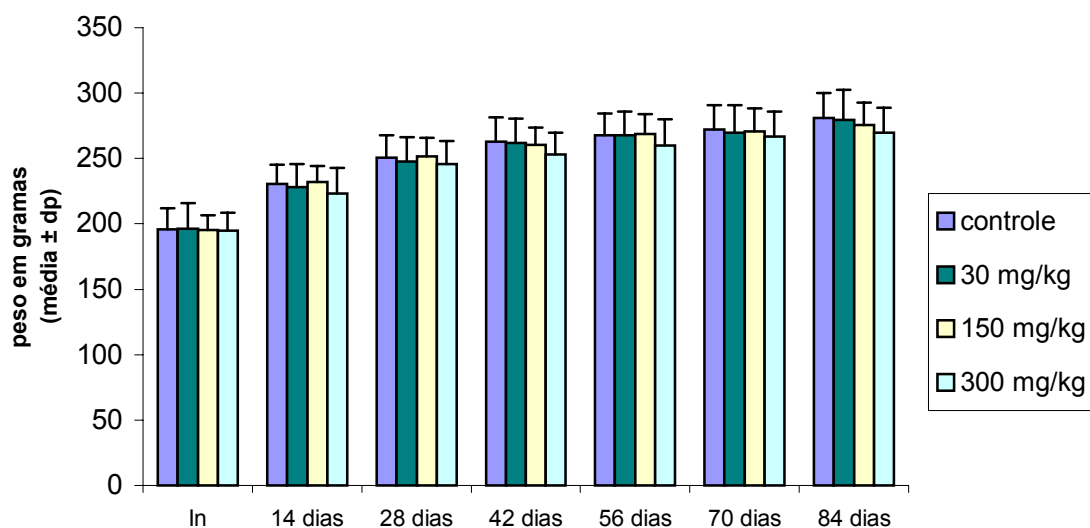


Figura 46 - Evolução ponderal das fêmeas tratadas com fração EPA. Os valores estão expressos em média \pm dp.

Tabela 17- Peso dos órgãos dos ratos machos submetidos a tratamento subcrônico com fração EPA

Dose (mg/kg)	N	Coração (g)	Fígado (g)	Rim D (g)	Rim E (g)	Pulmões (g)
Controle	15	1,25 ± 0,10	11,18 ± 1,05	1,26 ± 0,09	1,30 ± 0,10	2,13 ± 0,24
30	15	1,25 ± 0,09	11,57 ± 0,97	1,25 ± 0,07	1,23 ± 0,09	2,08 ± 0,23
150	15	1,18 ± 0,14	10,88 ± 1,10	1,18 ± 0,10*	1,19 ± 0,09*	1,91 ± 0,32*
300	15	1,18 ± 0,12	10,38 ± 1,14	1,18 ± 0,08*	1,20 ± 0,08*	2,10 ± 0,19

*estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida do teste de Duncan $p \leq 0,05$);

N=número de animais por grupo

Tabela 18 – Peso dos órgãos das fêmeas submetidas a tratamento subcrônico com fração EPA

Dose (mg/kg)	N	Coração (g)	Fígado (g)	Rim D (g)	Rim E (g)	Pulmões (g)
Controle	15	1,03 ± 0,08	10,60 ± 0,93	0,88 ± 0,09	0,88 ± 0,12	1,73 ± 0,22
30	15	0,96 ± 0,09	10,60 ± 1,29	0,88 ± 0,11	0,84 ± 0,10	1,57 ± 0,13
150	15	0,97 ± 0,05	10,99 ± 1,41	0,87 ± 0,07	0,83 ± 0,07	1,58 ± 0,22
300	15	0,94 ± 0,06	10,49 ± 0,82	0,87 ± 0,07	0,84 ± 0,95	1,63 ± 0,25

ANOVA não significativa; N=número de animais por grupo

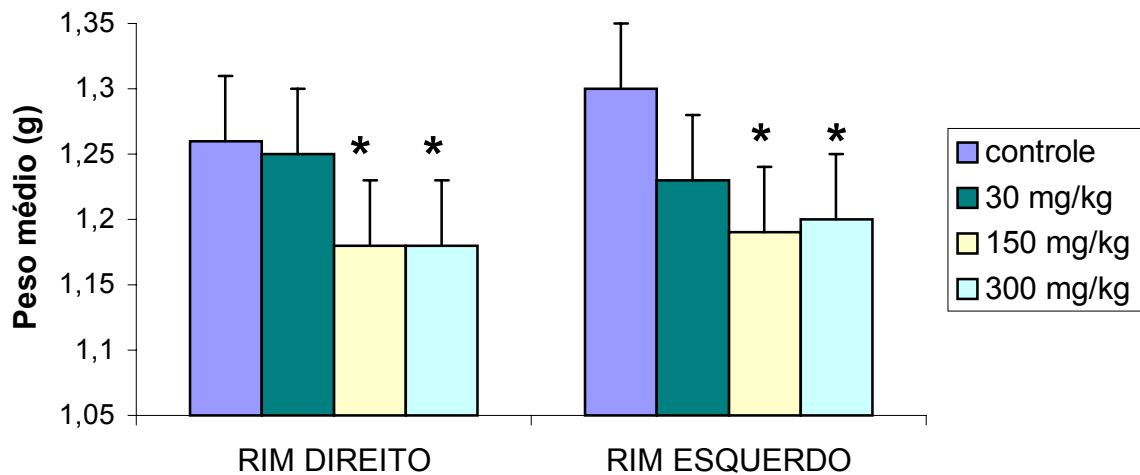


Figura 47 - Peso dos rins dos ratos machos tratados subcronicamente com a fração EPA (v.o.). Os valores estão expressos em média \pm dp. (*Estatisticamente diferentes dos respectivos controles – ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,05$)

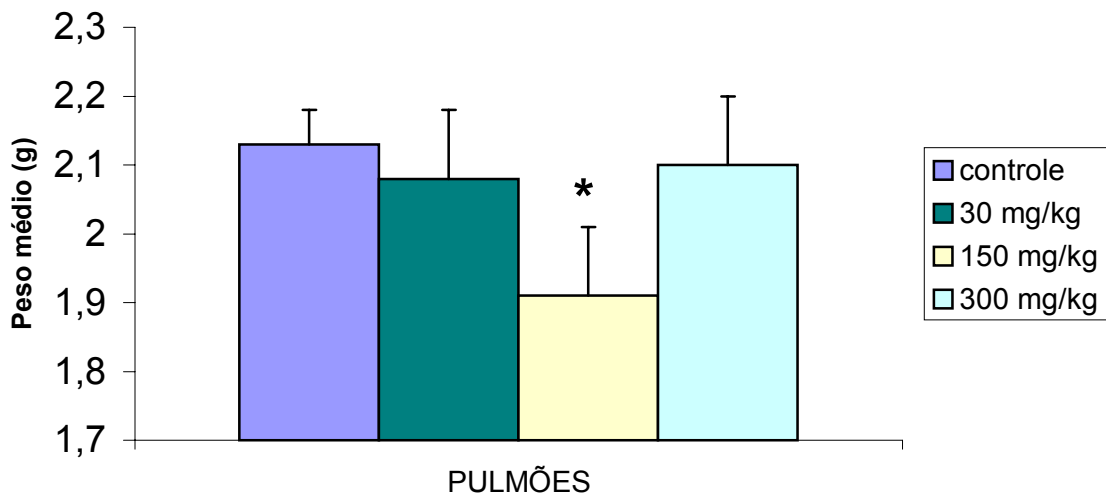


Figura 48 - Peso dos pulmões dos ratos machos tratados subcronicamente com a fração EPA (v.o.). Os valores estão expressos em média \pm dp. (*Estatisticamente diferentes dos respectivos controles – ANOVA seguida pelo teste de Duncan - $p \leq 0,05$)

Analisando-se as figuras referentes à evolução ponderal (fig.45 e 46), verifica-se que as fêmeas tratadas com a maior dose também apresentaram pequena diminuição no ganho de peso corporal, em relação ao grupo controle, embora esse fato não tenha sido estatisticamente significativo, nem tenha interferido na evolução dos órgãos (tab.18). Os machos tiveram diminuição no peso dos rins e pulmões (tab.17 e fig.47 e 48) além de diminuição no ganho de peso corporal, indicando uma possível toxicidade do produto. Porém, a forma como isso ocorre, ou seja, o mecanismo dessa ação não foi estudado no presente trabalho. Essas manifestações, uma vez que não foram equivalentes em ambos os sexos, podem também, indicar uma maior susceptibilidade específica dos ratos machos.

No teste do campo aberto (*open-field*), verifica-se a atividade locomotora do animal, podendo-se detectar a atividade estimulante ou sedativa de um composto. Os resultados encontrados nesse trabalho apontam um aumento significativo na ambulação e no levantamento dos machos tratados com as doses de 150 e 300 mg/kg. Todos os grupos de fêmeas tratadas com a fração EPA também apresentaram aumento significativo na ambulação, porém, somente na dose de 150 mg/kg ocorreu aumento significativo no *rearing* ($p \leq 0,05$) (tab.19).

Tabela 19 – Resultados do teste do campo aberto (mov/5 min) dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA

	N	Dose (mg/kg)	Ambulação	Levantamento	Auto-limpeza	Micção	Defecação
MACHOS	15	Controle	23,93 ± 21,60	17,07 ± 12,89	7,06 ± 6,04	0,13 ± 0,35	3,20 ± 3,23
	15	30	26,73 ± 27,78	15,40 ± 13,15	5,26 ± 6,57	0,33 ± 0,61	4,06 ± 2,73
	15	150	76,20 ± 22,56*	43,33 ± 13,52*	7,20 ± 4,17	0,33 ± 0,48	4,93 ± 3,01
	15	300	85,80 ± 34,48*	42,60 ± 13,04*	6,73 ± 4,36	0,60 ± 1,05	3,06 ± 3,88
FÊMEAS	15	Controle	48,60 ± 23,87	24,80 ± 12,33	8,53 ± 4,73	0,80 ± 1,08	2,00 ± 2,59
	15	30	73,46 ± 25,77*	28,20 ± 10,71	8,00 ± 4,70	0,46 ± 1,24	3,06 ± 3,57
	15	150	107,0 ± 32,17*	37,00 ± 14,80*	7,86 ± 4,56	0,53 ± 0,83	2,60 ± 3,39
	15	300	109,6 ± 37,07*	34,07 ± 16,35	9,60 ± 4,74	0,46 ± 0,74	1,66 ± 2,38

*estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida do teste de Duncan $p \leq 0,05$);
N=número de animais por grupo

Esses aumentos na ambulação e no levantamento, podem indicar que os animais apresentavam-se estimulados, o que poderia estar relacionado, de certa maneira, com a presença da cafeína na fração EPA, uma vez que às metilxantinas são atribuídas atividades de estimulação do sistema nervoso central (RANG *et al.*, 1997).

Um aspecto interessante é o fato da dose menor, 30 mg/kg, não promover estimulação nos machos, pois o teste do campo aberto ocorreu em iguais condições ambientais para ambos os sexos. Logo, o fato de todas as fêmeas tratadas, incluindo-se a de menor dose, apresentarem alterações significativas com relação à ambulação, pode estar relacionado a uma maior propensão das fêmeas à estimulação do SNC.

Mendes e Carlini (2002) realizaram estudos toxicológicos pré-clínicos em ratos, onde os grupos receberam extratos de café nas concentrações de 100, 200 e

400 mg/kg e cafeína na dose de 20 mg/kg, durante 180 dias. Nos resultados apresentados, não houve aumento na ambulação dos animais tratados com cafeína no teste do campo aberto. Segundo os autores, esse resultado pode ser indicativo de que outros compostos, e não somente a cafeína presente no café, podem exercer alguma atividade estimulante sobre o sistema nervoso central.

De maneira semelhante, o teste realizado com o guaraná pode ser interpretado como um indicativo da presença de outras substâncias nessa planta que apresentem alguma atividade sobre o SNC. Otobone *et al.* (2001) demonstraram que o extrato bruto EBPC e a fração semipurificada (EPA) do guaraná apresentaram redução no tempo de imobilidade no teste do nado forçado indicativo de atividade antidepressiva.

A presença de compostos fenólicos, principalmente taninos, isolados e identificados anteriormente, podem estar relacionados com essa atividade, uma vez que esses compostos apresentam-se em quantidade majoritária na fração EPA, e, também, pelo fato de que somente a presença da cafeína não seria suficiente para explicar todas as indicações de usos dessa planta popularmente.

4.4.2 Exames laboratoriais

Exames laboratoriais, urina e sangue, são essenciais e auxiliam no entendimento de qualquer alteração do metabolismo animal. Entre os exames sugeridos pela Portaria 116/96 (SNVS/MS), foram realizados os seguintes: exame parcial de urina, hemograma, glicose, colesterol total, triglicérides, uréia, ácido úrico, creatinina, transaminase glutâmico pirúvica (TGP), bilirrubinas direta, indireta e total, albumina, amilase e fosfatase alcalina.

Dentre os exames laboratoriais realizados, nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados e controle foi observado para os parâmetros urinários examinados.

Os exames de sangue mostraram alguns resultados significativos tanto em machos como em fêmeas, entretanto não houve ocorrência concomitante em ambos os grupos de animais. Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos realizados nos animais encontram-se demonstrados nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Parâmetros hematológicos dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA

Parâmetros	Grupos (N=15)			
	Controle	30 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg
Machos				
Hemácias (milh/mm ³)	7,2 ± 0,4	7,3 ± 0,4	7,2 ± 0,3	7,1 ± 0,4
Hb (g/dL)	16,7 ± 0,3	16,9 ± 0,3	16,9 ± 0,4	16,9 ± 0,6
Ht (%)	52,1 ± 1,1	52,7 ± 0,8	52,6 ± 1,3	53,0 ± 0,8
VGM (u ³)	72,2 ± 4,2	72,3 ± 4,0	73,4 ± 3,8	74,6 ± 3,9
HGM (uuG)	23,0 ± 1,1	23,3 ± 1,4	23,6 ± 1,3	23,8 ± 0,9
CHGM (%)	31,9 ± 0,6	32,2 ± 0,3	32,1 ± 0,4	31,9 ± 0,9
Leucócitos (mil/mm ³)	7,6 ± 1,3	6,9 ± 1,1	5,8 ± 1,3*	6,1 ± 0,6*
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,8	2,0 ± 0,7	1,9 ± 1,1	2,1 ± 1,4
Linfócitos (%)	60,0 ± 8,6	66,2 ± 7,4	62,0 ± 6,9	61,4 ± 5,0
Monócitos (%)	2,1 ± 0,6	3,0 ± 1,3	1,4 ± 0,7	1,5 ± 0,5
Segmentados (%)	36,2 ± 8,6	28,5 ± 7,7	34,4 ± 7,0	34,7 ± 5,8
Neutrófilos (%)	36,2 ± 8,6	28,6 ± 7,8	34,6 ± 7,0	34,8 ± 5,6
Fêmeas				
Hemácias (milh/mm ³)	6,6 ± 0,4	6,4 ± 0,3	6,7 ± 0,6	6,7 ± 0,5
Hb (g/dL)	15,1 ± 0,4	15,0 ± 0,6	15,2 ± 0,5	15,0 ± 0,3
Ht (%)	46,6 ± 1,1	45,8 ± 2,1	46,6 ± 1,4	46,6 ± 1,0
VGM (u ³)	68,3 ± 8,2	71,8 ± 4,8	68,9 ± 5,2	69,8 ± 4,9
HGM (uuG)	22,7 ± 1,3	23,5 ± 1,6	22,6 ± 2,1	22,5 ± 1,6
CHGM (%)	32,3 ± 0,5	32,8 ± 0,9	32,7 ± 0,9	32,2 ± 0,2
Leucócitos (mil/mm ³)	6,3 ± 1,0	5,7 ± 0,9	5,2 ± 0,7*	5,8 ± 1,3
Eosinófilos (%)	1,8 ± 0,8	2,4 ± 1,6	1,6 ± 1,0	1,2 ± 0,7
Linfócitos (%)	66,9 ± 4,0	62,4 ± 6,6	67,0 ± 6,6	63,0 ± 9,3
Monócitos (%)	1,9 ± 0,9	1,5 ± 0,7	1,6 ± 1,0	1,9 ± 1,4
Segmentados (%)	29,2 ± 4,0	33,4 ± 6,2	29,5 ± 6,6	33,7 ± 9,0
Neutrófilos (%)	29,2 ± 4,0	33,6 ± 6,2	29,6 ± 6,7	33,7 ± 9,0

* estatisticamente diferente do grupo controle ($p \leq 0,05$); N=número de animais por grupo

Tabela 21 - Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA

Parâmetros	Grupos (N=15)			
	Controle	30 mg/kg	150 mg/kg	300 mg/kg
Machos				
Ácido úrico (mg/dl)	4,5 ± 1,2	5,1 ± 1,1	4,8 ± 0,6	4,9 ± 0,9
Albumina (g/dl)	3,6 ± 0,3	4,0 ± 0,6	3,9 ± 0,5	3,6 ± 0,2
Amilase (U/dl)	129,5 ± 13,5	145,0 ± 29,9	128,8 ± 11,8	120,7 ± 8,2
Bilirrubina direta (mg/dl)	0,48 ± 0,04	0,30 ± 0,18	0,42 ± 0,05	0,46 ± 0,04
Bilirrubina indireta (mg/dl)	0,52 ± 0,07	0,71 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,52 ± 0,06
Bilirrubina total (mg/dl)	1,0 ± 0,06	0,9 ± 0,02	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,04
Colesterol total (mg/dl)	121,0 ± 10,8	126,9 ± 10,4	113,4 ± 11,2	117,8 ± 16,0
Creatinina (mg/dl)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Fosfatase alcalina (U/L)	108,7 ± 24,3	143,8 ± 32,9*	163,1 ± 54,5*	173,9 ± 30,4*
Glicemia (mg/dl)	51,8 ± 10,1	34,6 ± 7,9*	39,2 ± 5,4*	46,4 ± 9,5
TGP (U/I)	40,9 ± 7,7	50,6 ± 3,7*	52,8 ± 10,6*	49,5 ± 8,8*
Triglicérides (mg/dl)	115,9 ± 19,3	146,9 ± 20,3	129,0 ± 35,5	106,3 ± 17,4
Uréia (mg/dl)	60,7 ± 5,0	53,7 ± 4,1	62,8 ± 6,6	60,9 ± 7,6
Fêmeas				
Ácido úrico (mg/dl)	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,4
Albumina (g/dl)	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,1
Amilase (U/dl)	124,3 ± 11,6	122,9 ± 10,4	134,5 ± 10,2*	138,4 ± 12,7*
Bilirrubina direta (mg/dl)	0,49 ± 0,13	0,49 ± 0,04	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,03
Bilirrubina indireta (mg/dl)	0,51 ± 0,13	0,51 ± 0,06	0,53 ± 0,04	0,53 ± 0,03
Bilirrubina total (mg/dl)	1,0 ± 0,06	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,01
Colesterol total (mg/dl)	98,0 ± 7,1	97,4 ± 10,3	92,7 ± 8,4	92,0 ± 12,8
Creatinina (mg/dl)	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Fosfatase alcalina (U/L)	199,9 ± 16,0	187,2 ± 34,7	238,9 ± 58,8*	221,9 ± 41,6
Glicemia (mg/dl)	48,9 ± 14,2	59,7 ± 6,9*	65,3 ± 15,2*	68,2 ± 12,8*
TGP (U/I)	76,9 ± 18,4	64,7 ± 13,7	77,4 ± 18,2	71,0 ± 9,2
Triglicérides (mg/dl)	170,6 ± 28,4	139,9 ± 26,8*	113,3 ± 21,6*	105,6 ± 24,2*
Uréia (mg/dl)	52,6 ± 7,0	62,7 ± 9,1*	61,8 ± 2,7*	63,3 ± 7,2*

* estatisticamente diferente do grupo controle ($p \leq 0,05$); N=número de animais por grupo

4.4.3 Análise histopatológica

Realizou-se avaliação histopatológica dos rins, fígado e coração dos ratos machos e fêmeas controle e tratados, de acordo com a metodologia proposta (seção 3.2.2.7, p.148). A análise histopatológica visa auxiliar a interpretação dos resultados bioquímicos, verificando-se possíveis anormalidades teciduais nos órgãos que possam explicar determinadas alterações ocorridas com os animais. O protocolo para os estudos toxicológicos pré-clínicos, utilizado como referência nesse trabalho, indica como necessário a análise histopatológica dos órgãos coração, rins e fígado (PORTARIA 116/96 SVS – BRASIL, 1996). A análise macroscópica dos pulmões não evidenciou nenhuma anormalidade que justificasse a sua avaliação microscópica. Os resultados histopatológicos estão demonstrados nas tabelas 22 e 23.

Tabela 22 – Resultados histopatológicos (frequência) de ratos machos submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA

Órgão	Grupos	N	Normal	Foco inflamatório	Congestão
Rins	Controle	10	8	0	2
	30 mg/kg	10	8	0	2
	150 mg/kg	10	8	0	2
	300 mg/kg	10	10	0	0
Fígado	Controle	10	9	0	1
	30 mg/kg	10	9	0	1
	150 mg/kg	10	10	0	0
	300 mg/kg	10	9	1	0
Coração	Controle	10	2	1	8
	30 mg/kg	10	7	0	3
	150 mg/kg	10	0	0	10
	300 mg/kg	10	3	1	6

Teste de Fisher-não significante; N= número de animais por grupo

Tabela 23 – Resultados histopatológicos (frequência) de ratos fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com fração EPA

Órgão	Grupos	N	Normal	Foco inflamatório	Congestão
Rins	Controle	10	10	0	0
	30 mg/kg	10	10	0	0
	150 mg/kg	10	10	0	0
	300 mg/kg	10	8	0	2
Fígado	Controle	10	8	1	1
	30 mg/kg	10	10	0	0
	150 mg/kg	10	8	0	2
	300 mg/kg	10	10	0	0
Coração	Controle	10	4	0	6
	30 mg/kg	10	2	0	8
	150 mg/kg	10	4	0	6
	300 mg/kg	10	6	0	4

Teste de Fisher-não significante; N= número de animais por grupo

Nos exames hematológicos, verificou-se diminuição no número de leucócitos nos machos tratados nas doses de 150 e 300 mg/kg, enquanto que nas fêmeas somente a dose de 150 mg/kg apresentou diminuição. Entretanto, para as fêmeas, o número de leucócitos encontrado, apesar de ter sido estatisticamente significativo, ainda apresentou-se próximo do valor mínimo de variação biológica normal [valor referência= $8,6 \pm 2,7$ mil/mm³ -(WOLFORD *et al.*, 1986)], enquanto que para os machos os valores encontraram-se abaixo do valor mínimo considerado normal [valor referência= $10,6 \pm 2,9$ mil/mm³ -(WOLFORD *et al.*, 1986)]. Esses dados, no entanto, podem indicar uma tendência à leucopenia, que pode, mais uma vez, ser indicativo de toxicidade, e/ou maior susceptibilidade dos animais machos.

Dentre os exames bioquímicos, os machos apresentaram valores alterados para fosfatase alcalina [valor referência= 174 ± 82 IU/l -(WOLFORD *et al.*, 1986)] e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) [valor referência= 38 ± 14 IU/l -(WOLFORD *et al.*, 1986)]. Ambos encontraram-se aumentados em todos os grupos tratados. As fêmeas apresentaram alterações nos valores de fosfatase alcalina somente nos animais tratados com a dose de 150 mg/kg [valor referência= 140 ± 80 IU/l - (WOLFORD *et al.*, 1986)].

A fosfatase alcalina é produzida por muitos tecidos, principalmente por ossos, fígado, intestino e placenta, e é excretada pela bile. Níveis elevados de fosfatase alcalina ocorrem em distúrbios ósseos, como por exemplo raquitismo e em doenças hepáticas, como por exemplo cirrose e hepatite aguda viral. A TGP também apresenta-se com os níveis elevados nas hepatopatias (LIMA *et al.*, 2001)

Essas alterações bioquímicas ocorridas nos machos, apresentaram-se com valores no limite máximo da faixa de normalidade, podendo-se sugerir a presença de alterações hepáticas nesses animais. Entretanto, as análises histopatológicas do órgão não demonstraram qualquer alteração na estrutura histológica do mesmo.

Em todas as fêmeas tratadas ocorreram alterações nos valores bioquímicos dos exames de uréia, glicemia e triglicérides, e, nas tratadas com as doses de 150 e 300 mg/kg houve também alterações nos valores de amilase. Esses valores apresentaram-se elevados em relação ao grupo controle, exceto para triglicérides que teve os valores diminuídos.

A amilase é uma enzima digestiva pancreática que hidrolisa os amidos, o glicogênio e a maioria dos outros carboidratos (à exceção da celulose) para formar disacarídeos e alguns trisacarídeos (GUYTON, 1997). A amilase se acha elevada, principalmente na pancreatite aguda.

Os valores elevados para amilase, quando comparados ao grupo controle, novamente pode ser indicativo de alterações a nível digestivo dos animais.

As alterações apresentadas para os valores de glicemia [valor referência= 119 ± 53 mg/dl -(WOLFORD *et al.*, 1986)] e triglicérides [valor referência= 125 ± 70 mg/dl -(WOLFORD *et al.*, 1986)] nas fêmeas, apesar de serem significativas em termos estatísticos, não apresentaram relevância biológica. O mesmo ocorre com os machos que apresentaram valores de glicemia diminuídos nas doses de 30 e 150 mg/kg, mais uma vez demonstrando haver, provavelmente, uma maior susceptibilidade biológica desses animais.

Fisiologicamente a uréia se eleva no sangue devido a: diminuição da função renal, diminuição da função hepática, ou por uma dieta hiperproteica (GUYTON, 1997; LABTEST®).

Observando os valores de uréia para os machos [valor referência= $20 \pm 3,2$ mg/dl -(WOLFORD *et al.*, 1986)] verifica-se que os mesmos encontraram-se elevados, embora não apresentem alterações entre os grupos que demonstra diferença estatística. Até mesmo o grupo controle de ambos os sexos mostraram-se com os valores aumentados quando comparados com os dados da literatura.

A disfunção renal pode ser melhor avaliada através das dosagens concomitantes de uréia e creatinina. Tanto para machos [valor referência= $0,6 \pm 0,12$ mg/dl -(WOLFORD *et al.*, 1986)] como para fêmeas [valor referência= $0,7 \pm 0,13$ mg/dl -(WOLFORD *et al.*, 1986)] pode-se observar que os valores de creatinina mantiveram-se normais, diminuindo a possibilidade de problemas renais. Reforçando esses dados, a análise histopatológica dos rins também não demonstrou nenhuma anormalidade no órgão (tab.23).

Dessa forma, a hipótese mais provável para o aumento nos valores de uréia, seria uma diminuição da função hepática. Verifica-se que as provas bioquímicas de função hepática apresentaram alterações consideráveis nos dois grupos de animais, embora tenham sido mais expressivos em machos do que em fêmeas.

Na análise histopatológica verifica-se também que houve uma maior incidência de congestão no coração de ambos os animais, sem distinção entre o grupo controle e tratado. A congestão consiste no aumento da quantidade de sangue no interior dos vasos de um órgão ou território orgânico (METZE, 2000). Provavelmente, essa congestão tenha ocorrido devido ao tipo de sacrifício (decapitação), pois no momento da passagem da guilhotina pelo pescoço do animal cria-se uma força contrária ao fluxo sangüíneo, causando uma congestão passiva pela demora ou ausência no esvaziamento sangüíneo do órgão, conforme descrito por Cotran (1996).

Assim, pode-se considerar que a avaliação histopatológica não foi capaz de evidenciar alterações dose-resposta relacionadas ao tratamento dos animais com a fração EPA.

Por outro lado, verificou-se que as alterações bioquímicas relatadas evidenciaram uma possível hepatotoxicidade da fração EPA do guaraná, nas doses testadas, principalmente nos animais machos, que pode ser indicativo de uma maior susceptibilidade biológica desses animais.

CONCLUSÕES

As análises físico-químicas farmacopéicas e não farmacopéicas determinaram as condições mínimas da droga vegetal, e atestaram a qualidade e equivalência em teores de substâncias químicas características (metilxantinas e taninos) quando comparadas as sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* provenientes de lugares diferentes.

Foram isoladas e identificadas da fração EPA as seguintes substâncias: cafeína, catequina, epicatequina, procianidina B₂ [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina], procianidina B₃ [catequina-(4 α →8)-catequina] e procianidina B₄ [catequina-(4 α →8)-epicatequina]. Os dímeros de taninos condensados foram, pela primeira vez, isolados e identificados nessa espécie vegetal bem como os monômeros de flavan-3-óis.

As análises por CLAE demonstraram ser possível a caracterização e identificação das substâncias presentes na fração semipurificada EPA assim como nas subfrações, comprovando a possibilidade de utilização do sistema no controle de qualidade de extratos das sementes de guaraná.

O teste de atividade antioxidante confirmou os resultados obtidos por outros trabalhos com plantas que apresentam compostos fenólicos em sua composição. Pode-se considerar o guaraná como uma futura opção na pesquisa de novos medicamentos para as doenças degenerativas.

As análises microbiológicas não demonstraram ser o guaraná efetivo no combate a microorganismos, Gram + e Gram -, apesar dos compostos fenólicos serem majoritários na composição química da planta.

O teste toxicológico agudo realizado em camundongos com a fração EPA, demonstrou ser a mesma tóxica em altas doses (acima de 1000 mg/kg). No teste toxicológico subcrônico evidenciou-se uma possível hepatotoxicidade, principalmente nos machos, nas doses testadas.

Conclui-se que, a espécie vegetal *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, com amplo uso medicinal pela população, apresenta-se promissora para a medicina, principalmente no que se refere à atividade antioxidante. Contudo, é necessário que novos estudos toxicológicos, em uma segunda espécie animal, e posteriormente em humanos seja realizado objetivando a segurança no uso dessa planta, conforme preconiza a Portaria 116/96 da SNVS.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, P. J. Comfrey: assessing the low-cost health risk. **Med. J. Aust.**, v. 149, p. 678-682, 1988.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 48, v. 4, p.487-491, 2001
- ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. Rancidity in foods. Applied Science. 199 p, 1983.
- ANDRADE, L. **Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. 106 p Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- 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, n.1/2, p.7-9, 1999.
- ANGELUCCI, E.; TOCCHINI, R. P.; LAZARINE, V. B.; FONTES PRADO, M. A. Caracterização química da semente de guaraná. **Boletim do Instituto Tecnológico de Alimentos**, v. 56, n. 5, p. 183-192, 1978.
- AVATO, P.; PESANTE, M. A.; FANIZZI, F. P.; SANTOS, C. A. M. Cyanolipids from *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. In: Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 50, 2002, Barcelona, **Resumos...**Barcelona, UB, 2002.
- BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo. UNESP, cap.12, p.169-186, 1995.
- BALDÉ, A. M.; van HOOFF, 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*. **Phytoterapy Research**, v. 4, p.182, 1990.
- BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs – the need for and development of new antibacterials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 51-59, 2000.

BECK, H. T. A survey of the useful species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). **Advance in Economic Botany**, v. 8, p. 41-56, 1990.

BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M. G. HPLC Determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola spp.* samples. **Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung**, n.180, p. 398-401, 1985.

BENONI, H.; DALLAKIAN, P.; TARAZ, K. Studies on the essential oil from guarana. **Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung**, v.203, p.95-98, 1996.

BLOOM, F. E. Neurotransmission and the central nervous system. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ed). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9^{ed}. New York, McGraw Hill. cap. 12, p.286, 1996.

BRANDÃO, M. G. L.; OLIVEIRA, P.; MOREIRA, R. A.; ALVES, R. M. S.; VIEIRA, M. T.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Qualidade de amostras comerciais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos: drogas inscritas na Farmacopéia Brasileira. **Infarma**, Brasília, v.13, n. 11/12, 2001.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23.9.1976. Dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos medicamentos, drogas, insumos, correlatos, cosméticos, saneantes e outros. **Diário Oficial da União**, 24.9.1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 70 de 16.03.82. Publica norma de identidade, qualidade, embalagem, armazenamento e transporte do guaraná em grão, bastão e pó. **Diário Oficial da União**, 19.03.82.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116 de 8.8.1996. Publica proposta de norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 12.8.1996b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica: Brasil**. Brasília, 1998, p.34 e 35.

BRASIL. Ministério da Agricultura. MAPA nº 544 de 16 de Novembro de 1998. Regulamento Técnico para Fixação dos padrões de identidade e qualidade para refrigerante. **Diário Oficial da União**, 17.11.1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24.2.2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 24.4.2000b.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, Unicamp, 1994.

BRITO, M. T.; MARTINEZ, A.; CADAVID, N. F. G. Mutagenic activity in regional foods and beverages from the Venezuelan Andean region, **Mut. Res.**, v.243, p.115-120, 1990.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A novel property of an 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.

BYDLOWSKI, S. P.; DAMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. F. An aqueous extract of guarana (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.24, p.421-424, 1991.

CAGNO, N. Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n.1, p. 69-99, 1942.

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, p. 179-189, 2000.

CARDOSO, M. L. C. **Desenvolvimento de técnica analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach – Malpighiaceae – (nó-de-cachorro)**. Araraquara: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2002, 128p Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

CARLINI, E. A. *et. al.*, Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CARLINI, E. A. **Medicamentos, drogas e saúde**, São Paulo: Hucitec, p.64 e 65, 1995

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **J. AOAC Int**; v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo, 1991.

CORK, S. J.; KROCKENBERGER, A. K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. **J. Chem. Ecol.**, v. 17, p. 123, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.3, p.545-555.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins**: patologia estrutural e funcional, 5 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

CUENDT, M., HOSTETTMAN, K., POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, **Helvetica Chimica Acta**, v.80, p.1144-52, 1997.

DANNE, A. **Polyphenole aus den traditionellen arzneipflanzen *Cistus encanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae)**. 1994. 260 p. Tese (Doutorado) – Universidade de Münster, Alemanha, 1994.

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

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 1282, p. 63-70, 1996.

DONGMO, A. B.; KAMANYI, M. S.; ANCHANG, B.; NKEH, B. C. A.; NJAMEN, D.; NGUELEFACK, T. B.; NOLE, T.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extracts of *Erythrophleum suaveolens* (Caesalpinaceae), Guillemin & Perrottet. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 77, p. 137-141, 2001

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press. Florida. 1987, p.349

EMEA. Position Paper on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochia* species. London, **EMEA/HMPWP/23/00**, 10p, 2002.

ESPÍNOLA, E. B., DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A., Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 55 (3) 223-229, 1997.

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**. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, cap.12, p.199-222, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. São Paulo, Siqueira, 1959.

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo, Atheneu, 1986.

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

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, 1997.

FIGUEIRA, M. E.; MOTA-FILIPPE, H.; SEPODES, B.; PINTO, R.; BARROSO, M. I. e GIÃO-T-RICO, J. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of epigallocatechin gallate, a major catechin from green tea. In: Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 50, 2002, Barcelona, **Resumos...**Barcelona, UB, 2002.

FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant proantocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. **Journal of Chemical Society**, Perkin Trans. I, p. 1628, 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.

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

GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. A. Acute effects of the *Paullinia cupana*, “Guaraná” on the cognition of normal volunteers. **Revista Paulista de Medicina**, v. 112, n.3, p.607-611, 1994.

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

GRASSMANN, J., HIPPELI, S., ELSTNER, E. F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant physiology and biochemistry**, v.40, n.6-8, p.471-478, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997, cap. 69, p. 791-797.

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

HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. Chapman and Hall, London, p. 505-560, 1975.

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

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; HIRAMATSU, M.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 37, p.2016, 1989.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins, **Journal of Chemical Society**, Perkin Trans., p.1209, 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**, n.6, p.311-338, 1982.

HIRONO, I.; MORI, H.; HAGA, M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 61, p. 865-869, 1978.

HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, J. S.; CHEN, C. P. e 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.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97(7): 1027-1031, 2002.

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.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**, São Carlos, EdUFSCar, p. 54, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed. Companhia Editora Nacional. São Paulo. 1998, p. 428-430.

KASAI, S.; WATANABE, S.; KAWABATA, J.; TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*. **Phytochemistry**, v.31, n. 3, p. 787-789, 1992

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

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 anserina* L.** 1993, 180p Tese (Doutorado), Westfälischen Wilhelms – Universität zu Münster.

KOMMISSION E. Bundesanzeiger n° 133 de 19.07.1994. **Liste der Monographien.** Bundesgesundheitsamt: Institut für Arzneimittel, 1994.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. 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.** Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap.11, p.183-198.

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

LEA, A. G. H. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography of procyanidins and their oxidation products in ciders and wines, optimised by Snyder's procedures. **Journal of Chromatography**, n. 194, p. 62-68, 1980.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**. n. 295, p. 141-154, 2000.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica.** Técnica e Interpretação. 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**. v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987

MARQUES, L. C.; PETROVICK, P. R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. 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.** Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap.14, p.261-299.

MARX, F.; PFEILSTICKER, K.; MAIA, J. G. S. Zur analytk von guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, n. 12, p. 390-392, 1985.

MARX, F. Analysis of guaraná 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.

MATOS, F. J. A. Proposta de validação farmacognóstica de drogas vegetais, plantas medicinais e fitoterápicos. **Infarma**, v.3, n.1/6, p. 9-14, 1994.

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**, n. 60, p. 111-116, 1998

MELLO, J. P. de **Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae)**. 1995. 236 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

MELLO, J. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, p.807, 1996.

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

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (*Asteraceae*) Hydroalcoholic Extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.19, nº 3, p.211-215, 2000.

MELLO, J. C. P. ; SANTOS, S. C. 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**. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, cap.24, p.527-554, 2001

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Toxicologia pré-clínica do extrato de café BST 0101: estudos iniciais em roedores. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 17., 2002, Cuiabá. **Resumos**...Cuiabá, 2002.

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

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bagliolo: Patologia**, 6. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, cap. 6, p. 81-111.

MIKEL, U. V. **Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology**. Ed. Armed Forces. Institute of Pathology American Registre of Pathology. Washington DC. 253 p., 1994.

MITTLER, R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant Science**, v. 7, n. 9, p.405-410, 2002.

MIURA, T.; TATARA, M.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, I. Effect of guaraná on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 6, p. 646-648, 1998.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 3^a ed. São Paulo, Atheneu, 1992.

NAVARRO, V.; VILARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican tradicional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p.143-147, 1996.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 139-244, 1985

NEGRO, C., TOMASSI, L., MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extract. **Bioresource technology**, v.87, p.41-44, 2003.

NIERENSTEIN, M. Catechutannins: *Paullinia cupana*. **Journal of Chemistry Society**, v. 121, p.23-28, 1922.

NONAKA, G. I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p. 2139-2145, 1983.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and drug abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ed). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9ªed. New York, McGraw Hill. cap. 24, p.417, 1996.

OGA, S.; SAITO, T. Ensaios pré-clínicos e controle biológico. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5ª ed, Atheneu, São Paulo, 1994, cap.81, p. 653-669.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Regional Office for the Western Pacific Research Guidelines for Evaluation the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila, 1993.

ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P.; ATHAYDE, M. L.; MENTZ, L. A. Brasilianische Phytotherapeutika. Ihre rolle im Arzneimittelmarkt. **Deutsche Apotheken Zeitung**, v. 129, p. 1847-1848, 1989.

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.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Research Communications**, v. 46, p.43, 1981.

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

PALLENBACH, E. **Proanthocyanidine aus *Quercus petraea* (Mattuschka)** Lieblein, Dissertation, Freiburg i. B., 1992.

PEREIRA, M. A. C.; MAYORGA BORGES, P. E.; PETROVICK, P.R. **Perfil da indústria farmacêutica do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 2002, p. 32.

PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae)**, 1992. Tese (Doutorado), Universidade de Münster, Alemanha, 1992.

PORTER, L. J. Tannins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.) **Method in plants biochemistry**. London: Academic press, v.1, p. 390, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central e Drogas Psicotomiméticas. In: _____. **Farmacologia** 3 ed, Guanabara Koogan, cap. 32, p. 510-511, 1997.

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**. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap. 33, p.733-749.

REBECCA, M. A. *et al.*, Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.101-104, 2002.

REBECCA, M. A. *et al.*, Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology letters**, p.1-9, 2003.

RIMPLER, H. **Pharmazeutische Biologie II: Biogene Arzneistoffe**, Georg Thieme, Stuttgart, 228, 1990.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Sreening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, n.2-3, p.127-149, 1988.

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

SANCHES, A. C. C.; NAGAI, 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.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 80, p.1094-1117, 2000.

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. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap.15, p.301-330.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M. e PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Food Science and Technology**, n.91, p.21-40, 2001.

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

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

SERAFIN, W. E. Fármacos usados no tratamento da asma. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ed). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 9ªed. New York, McGraw Hill. cap. 28, p.491-495, 1996.

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

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology.* v.29, n.1, p.1-6, 1991.

SILVA, K. L.; CECHINEL F^o, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p.449-454, 2002.

SIMÃO, A. M.; MURADIAN, J.; CARVALHO, J. P. P. Isolamento do pigmento vermelho natural do pó de guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. **Síntese**, n. 10, p. 9-15, 1986.

SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; BEVALOT, F.; VAQUETTE, J. Les propriétés antifongiques des cistacées et plus particulièrement de *Cistus laurifolius* L.: rôle des tanins non hydrolysables. **Fitoterapia**, n.53, p. 45-48, 1982.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SITKOWSKI, J.; STEFANIAK, L.; NICOL, L.; MARTIN, M. L.; MARTIN, G. J. e WEBB, G. A. Complete assignments of the ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR spectra of caffeine. **Spectrochimica Acta**, v. 51A, n .5, p. 839-841, 1995.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v.15, n.1, 2002.

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. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap.13, p.223-260.

SPITZER, V. GLC-MS Analysis of the fatty acids of the seed oil, triglycerides, and cyanolipid of *Paullinia elegans* (Sapindaceae) – a rich source of cis-13-eicosenoic acid (Paullinic acid). **J. High Resolut. Chromatogr.**, v. 18, p. 413-416, 1995.

SPITZER, V. Fatty acid composition of some seed oils of the Sapindaceae. **Phytochemistry**, v. 42, n.5, p. 1357-1360, 1996.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**. v. 320, n. 14, p. 915-924, 1989.

STEINBRECHER, U. P.; ZHANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 9, n. 2, p. 155-168, 1990.

STICHER, O.; MEIER, B. Hawthorn (*Crataegus*) Biological Activity and New Strategies for Quality Control. In: **Phytochemicals of Europe Chemistry and Biological Activity**. ACS Symposium, Series 691, American Chemical Society, cap. 17, p. 241-62, 1998.

STICHER, O.; MEIER, B.; HASLER, A. The analysis of Ginkgo flavonoids. In: _____. **Ginkgo biloba**. The Netherlands: Harwood academic, 2000. cap.10, p.179-202.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n.1-2, p.15-19, 2000.

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

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

THOMSEN, K.; BRIMER, L. Cyanogenic constituents in wood plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n.124, p.273-294, 1997.

TOLEDO, C.E.M. de **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae].** 2002. 116 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

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

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie.** 7. Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

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.** Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, 2001, cap.4, p.61-74.

WEINGES, K.; KALTENHÄUSEN, W.; MARX, H.D.; NADER, E.; NADER, F.; PERNER, J.; SEILER, D. Procyanidine aus Früchten. **Liebigs Annalen der Chemie**, v.711, p.184-204, 1968a.

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

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

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, v.27, p.158-260, 1969.

WEINGES, K.; KLOSS, P.; TRUNZLER, G.; SCHULLER, E. Über kreislaufwirksame dimere und oligomere Dehydro-catechine. **Planta Medica**, n. Suppl., p.61, 1971.

WOLFORD, S.T. *et al.*, References range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, n.18, p.161-168, 1996.

WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed., American Society for Microbiology:Washington, cap.113, p.1327-1341, 1995.

YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; USHIROBIRA, T. M. A.; de MELLO, J. C. P. Caracterização físico-química de amostras de guaraná. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 3, 2001, Curitiba. **Resumos...** Curitiba, UFPR, 2001.

YEONG, M. L.; CLARK, S. P.; WARING, J. M.; WILSON, R. D.; WAKEFIELD, S. J. The effects of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. **Pathology**, v. 23, p. 35-38, 1991.

YEONG, M. L.; WAKEFIELD, S. J.; FORD, H. C. Hepatocyte membrane injury and bleb formation following low dose comfrey toxicity in rats. **Ind. J. Exp. Pathol.**, v. 74, p. 211-217, 1993.

YOSHIZAWA, S.; HORIUCHI, T.; FUJIKI, H.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.; SUGIMURA, T. Antitumor promoting activity of (-) epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea. **Phytotherapy Research**, v.1, n.1, p.44-47, 1987.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; BORGES, J. O.; DUTRA, A. L.; USHIROBIRA, T. M. A.; MARQUES, L. C. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 16., 2000, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; SILVA, E. A.; CHANKE, A. L. S.; USHIROBIRA, T. M. A.; MARQUES, L. C. Controle de qualidade farmacobotânico e legal de fitoterápicos comercializados nas farmácias de Maringá (Pr). **Revista Racine**, São Paulo, n.58, p.32-36, 2000.