UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

FLÁVIA OLIVEIRA RESENDE

Trichilia catigua: AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA, FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO*

MARINGÁ

2007

FLÁVIA OLIVEIRA RESENDE

Trichilia catigua: AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA, FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO*

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

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2007

Aos meus pais, Vanderlei e Abgail;

Aos meus irmãos, Renata e Rodolfo;

Ao meu noivo Fábio.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e sua infinita bondade.

Aos meus pais Vanderlei e Abgail pelo amor e pelos esforços em prol da minha formação.

Ao meu noivo Fábio pelo seu amor, carinho, incentivo e paciência.

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

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

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, pelo disponibilização do equipamento de CCCAV e auxílio na realização dos fracionamentos.

Ao Ms. Marcelo Aparecido Silva pelo auxílio na realização dos fracionamentos por CCCAV.

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

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho pela realização dos espectros de massas.

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

Aos amigos que me auxiliaram e contribuíram para a realização deste trabalho, em especial, Cláudio, Lia e Ingrid.

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

A Capes pelo suporte financeiro.

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

“Uma caminhada de cem léguas se faz passo a passo” (Autor desconhecido).

RESUMO

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), conhecida como catuaba, é uma planta nativa da América do Sul e Central, sendo mais abundante no sul do Brasil. Suas cascas são empregadas principalmente como estimulantes, possuindo alto teor em taninos. A partir do extrato bruto em acetona:água das cascas da catuaba (EB), obtiveram-se as frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FA). Procurou-se avaliar o EB e suas frações quanto à composição química e atividade antioxidante, além de estabelecer padrões para o controle de qualidade das cascas do vegetal. O controle de qualidade da matéria-prima vegetal foi realizado seguindo parâmetros farmacopéicos, como análise granulométrica, perda por dessecação (PD), teor de extrativos (TE), teor de polifenóis totais (PT) e teor de taninos totais (TT), encontrando-se para a droga vegetal diâmetro médio de partícula=0,56 mm, PD=9,93%±0,14 (CV%=1,46), TE=19,16%±0,78 (CV%=4,10), PT=10,51%±0,17 (CV%=1,62) e TT=6,95%±0,11 (CV%=1,57). Além disso, EB, FAE e FA foram também avaliados quanto aos seus teores de taninos totais, encontrando-se valores de 38,89%±1,14 (CV%=2,93); 69,36%±0,49 (CV%=0,70) e 33,80%±0,30 (CV%=0,89), respectivamente. A FAE foi fracionada através de cromatografia em coluna de SEPHADEX®, obtendo-se 32 subfrações, que foram submetidas a novos fracionamentos. As seguintes substâncias foram isoladas e identificadas: epicatequina, procianidinas B_2 e B_4, cinchonaínas Ia, Ib, IIb e IIc, apocinina E e procianidina C_1. A capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto, fração acetato de etila e substâncias isoladas foi avaliada utilizando-se as técnicas de seqüestro do DPPH• e de redução do ferro. Os valores obtidos para os extratos na técnica do DPPH• foram IC_{50} ($\mu g.ml^{-1}$): EB= 5,44±0,18 (CV%=3,31); FAE=3,85±0,09 (2,35) e FA = 8,76±0,15 (CV%=1,68); e para as substâncias isoladas foram IC_{50} (μ*M*): epicatequina= 10,12 ± 0,24 (CV%=2,43); procianidina B_2=7,95 ± 0,04 (CV%=0,51); cinchonaína Ia=7,87 ± 0,05 (CV%=0,63); cinchonaína Ib=7,67 ± 0,23 (CV%=2,98); cinchonaína IIb=5,05 ± 0,05 (CV%=0,98); cinchonaína IIc=5,15 ± 0,08 (CV%=1,61); procianidina C_1=4,08 ± 0,01 (CV%=0,28). Na técnica da capacidade total de redução de Fe^{3+}-Fe^{+2} os extratos apresentaram poder de redução superior ao Trolox, porém inferior à vitamina C. Todas as substâncias se apresentaram mais ativas que a vitamina C e o Trolox, sendo que as maiores atividades foram observadas na procianidina C_1, cinchonaína IIb e cinchonaína IIc.

Palavras-chave: *Trichilia catigua*, Taninos condensados, Cinchonaínas, Capacidade antioxidante, DPPH, Redução do ferro.

ABSTRACT

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), popularly known as “catuaba”, is a plant native from South and Central America and widely distributed in Brazil. Its barks are mainly used as stimulants, and they have a high concentration of tannins. An ethyl-acetate (FAE) and an aqueous (FA) fraction were obtained from the crude extract (EB) of the “catuaba” bark. The aim of this study was to evaluate the chemical composition and the antioxidant activity of the crude extract and fractions and to establish standards for quality control of the barks. The quality control was carried out based on pharmacopeia tests, granulometric analysis, loss on drying (PD), determination of extractives (TE), total polyphenolics content (PT) and total tannins content (TT). The results found for the drug were mean diameter=0.56 mm, PD=9.93%±0.14 (CV%=1.46), TE=19.16%±0.78 (CV%=4.10), PT=10.51±0.17 (CV%=1.62) and TT=6.95±0.11 (CV%=1.57). Besides, the tannins content was also evaluated in EB, FAE and FA, giving values of 38.89±1.14 (CV%=2.93); 69.36±0.49 (CV%=0.70) and 33.80%±0.30 (CV%=0.89), respectively. FAE was fractionated by column chromatography (SEPHADEX® LH-20) and 32 subfractions were obtained. The following compounds were isolated and identified: epicatechin, procyanidins B_2 and B_4, cinchonains Ia, Ib, IIb and IIc, apocynin E, and procyanidin C_1. The antioxidant capacity *in vitro* of EB, FAE, FA and isolated compounds was evaluated using the DPPH• scavenging method and Fe^{3+}-Fe^{2} reduction capacity. The values obtained by DPPH• method for the extracts were IC_{50} ($\mu g.ml^{-1}$): EB= 5.44±0.18 (CV%=3.31); FAE=3.85±0.09 (2.35) and FA = 8.76±0.15 (CV%=1.68); for the isolated compounds the values were IC_{50} (μ*M*): epicatechin= 10.12 ± 0.24 (CV%=2.43); PB_2=7.95 ± 0.04 (CV%=0.51); cinchonain Ia=7.87 ± 0.05 (CV%=0,63); cinchonain Ib=7.67 ± 0.23 (CV%=2.98); cinchonain IIb=5.05 ± 0.05 (CV%=0.98); cinchonain IIc=5.15 ± 0.08 (CV%=1.61) and PC_1=4.08 ± 0.01 (CV%=0.28). Concerning the reduction capacity, the extracts had higher activity than Trolox, but lower than vitamin C. All the isolated compounds were more effective than vitamin C and Trolox; procyanidin C_1, cinchonain IIb and cinchonain IIc had the highest reduction capacities.

Keywords: *Trichilia catigua*, Condensed Tannins, Cinchonains, Antioxidant Capacity, DPPH, Reduction capacity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 20
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 22
2.1 ASPECTOS GERAIS..... 22
2.1.1 Família Meliaceae..... 22
2.1.2 Gênero *Trichilia*..... 22
2.1.3 *Trichilia catigua* A. Juss..... 28
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS..... 30
2.2.1 Substâncias Fenólicas..... 30
2.2.2 Taninos..... 31
2.2.3 Taninos condensados..... 33
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... 36
2.3.1 Processos oxidativos..... 36
2.3.2 Processo de oxidação lipídica..... 36
2.3.3 Substâncias antioxidantes..... 38
3 OBJETIVOS..... 40
3.1 OBJETIVO GERAL..... 40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 40
3.2.1 Avaliação da qualidade das cascas, extratos e frações semipurificadas de *Trichilia catigua*..... 40
3.2.2 Isolamento de substâncias fenólicas de extrato semipurificado..... 40
3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extrato bruto, semipurificado e substâncias isoladas..... 40
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 41
4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL..... 41
4.2 MATERIAL..... 41
4.2.1 Solventes, reagentes e soluções..... 41
4.3 CONTROLE DE QUALIDADE..... 42
4.3.1 Análises físico-químicas..... 42
4.3.1.1 Determinação da perda por dessecação..... 42
4.3.1.2 Análise granulométrica..... 42
4.3.1.3 Determinação do teor de extrativos..... 43
4.3.2 Análise química quantitativa..... 43
4.3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais..... 43
4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS..... 44
4.4.1 Extrato bruto (EB)..... 44

4.4.2 Fração acetato de etila (FAE)..... 44
4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS..... 45
4.5.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila..... 45
4.5.2 Cromatografia em coluna das subfrações (CC)..... 45
4.5.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)..... 45
4.5.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)..... 46
4.5.5 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)..... 46
4.6 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA..... 46
4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL..... 47
4.8 ROTAÇÃO ÓPTICA (POLARIMETRIA)..... 47
4.9 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR..... 48
4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE..... 48
4.10.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila..... 48
4.10.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+}..... 49
4.10.3 Análise Estatística.....
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO...... 50
5.1 CONTROLE DE QUALIDADE..... 50
5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO..... 53
5.2.1 Substâncias Isoladas..... 60
5.2.1.1 **Substância I – Epicatequina**..... 60
5.2.1.2 **Substância II – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina B_2)**..... 66
5.2.1.3 **Substância III – Catequina-(4α→8)-epicatequina (Procianidina B_4)**..... 72
5.2.1.4 **Substância IV – Cinchonaína Ia**..... 78
5.2.1.5 **Substância V – Cinchonaína IIb**..... 89
5.2.1.6 **Substância VI – Apocinina E.**..... 100
5.2.1.7 **Substância VII –Cinchonaína Ib**..... 113
5.2.1.8 **Substância VIII – Cinchonaína IIc**..... 123
5.2.1.9 **Substância IX – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina C_1)**..... 137
5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE..... 143
5.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)..... 143
5.3.2 Determinação da capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+}..... 150
6 CONCLUSÕES..... 153

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 154

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Aspecto geral da espécie *Trichilia catigua* e detalhe dos frutos e folhas.....	29
2	Medicamento fitoterápico Catuama®, contendo extratos brutos de *Trichilia catigua*, *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*.....	30
3	Estrutura 1: exemplo de tanino hidrolisável [β-1,2,3,4,6-pentagaloil-*D*-glucose]. Estrutura 2: exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4β→8)-catequina].....	32
4	Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas.....	34
5	Estruturas da catequina e epicatequina.....	35
6	Curva de distribuição granulométrica da droga.....	51
7	Curvas cumulativas de resíduo e passagem após a tamisação da matéria-prima vegetal	52
8	Cromatografia em camada delgada, das 32 subfrações obtidas por CC em SEPHADEX® LH-20 da FAE (cromatofolha de alumínio com gel de sílica 60 F_{254} (Merck®), fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5) e sistema revelador solução etanólica de cloreto férrico a 1%).....	55
9	RMN ^{1}H da substância I acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	62
10	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	63
11	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	64
12	Estrutura da **substância I**, epicatequina.....	65
13	Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância II**.....	66
14	RMN ^{1}H da **substância II** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	68
15	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância II** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	69
16	Estrutura da **substância II**, epicatequina-(4β→8)-epicatequina (procianidina B_2).....	71

17	Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância III**.....	72
18	RMN ^{1}H da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	74
19	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).....	75
20	Estrutura da **substância III**, catequina-(4α→8)-epicatequina (Procianidina B_4).....	77
21	Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância IV**.....	78
22	RMN ^{1}H da **substância IV** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	80
23	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância IV** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	81
24	RMN ^{13}C da substância IV acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	82
25	Correlação heteronuclear HMBC da substância IV acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	83
26	Estruturas cinchonaínas Ia (1), substituída em C-8 e cinchonaína Id (2), substituída em C-6.....	86
27	Espectro de dicroísmo circular da **substância IV**.....	87
28	Estrutura da **substância IV**, cinchonaína Ia.....	88
29	Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância V**.....	89
30	RMN ^{1}H da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	92
31	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	93
32	Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	94
33	RMN ^{13}C da **substância V** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	95
34	Correlação heteronuclear HMBC da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).....	96
35	Espectro de dicroísmo circular da **substância V**.....	99
36	Estrutura química da **substância V,** cinchonaína IIb.....	99

37 Espectros de massas de ionização por eletrospray positivo da **substância VI**..... 100

38 RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 102

39 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 103

40 RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 105

41 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 106

42 RMN ^{13}C da **substância VI** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 107

43 Correlação heteronuclear HMQC da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 108

44 Correlação heteronuclear HMBC da substância VI acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 109

45 Espectro de dicroísmo circular da **substância VI**..... 112

46 Estrutura da **substância VI**, apocinina E..... 112

47 Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância VII**..... 113

48 RMN ^{1}H da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 115

49 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 116

50 RMN ^{13}C da **substância VII** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 117

51 Correlação heteronuclear HMQC da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 118

52 Correlação heteronuclear HMBC da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona d_6; relativo para TMS)..... 119

53 Espectro de dicroísmo circular da **substância VII**..... 121

54 Estrutura da **substância VII**, cinchonaína Ib..... 122

55 Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância VIII**..... 123

56 RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 125

57 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 126

58 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 127

59 RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 129

60 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 130

61 RMN ^{13}C da **substância VIII** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 131

62 Correlação heteronuclear HMQC da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 132

63 Correlação heteronuclear HMBC da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS)..... 133

64 Espectro de dicroísmo circular da **substância VIII**..... 135

65 Estrutura química da **substância VIII, cinchonaína IIc**..... 136

66 Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância IX**..... 137

67 RMN ^{1}H da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 139

68 Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS)..... 140

69 Espectro de dicroísmo circular da **substância IX**..... 142

70 Estrutura da **substância IX**, epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina C_1)..... 142

71 Triagem de concentrações de EB para determinar as concentrações das amostras a serem utilizadas no método do DPPH•..... 143

72 Capacidade antioxidante em diferentes concentrações da FAE pelo método do DPPH•..... 144

73 Comparação entre valores de IC_{50} (µg/ml) dos extratos e antioxidantes padrão realizados pelo método do DPPH•..... 145

74 Comparação entre valores de IC_{50} (µ*M*) das substâncias isoladas e antioxidantes padrão realizados pelo método do DPPH•..... 147

75 Correlação entre capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e o número de hidroxilas fenólicas nas substâncias isoladas de *Trichilia catigua*..... 149
76 Capacidade total de redução do EB em diferentes concentrações pelo método de redução do Fe^{+3} para Fe^{+2}..... 150
77 Capacidade total de redução dos extratos em comparação com substâncias antioxidantes padrão..... 151
78 Capacidade total de redução das substâncias isoladas em comparação com substâncias antioxidantes padrão..... 151

LISTA DE QUADROS

QUADRO		PÁGINA
1	Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia*..	24
2	Etapas da reação não enzimática mediada por radicais livres.....	37
3	Mecanismo de ação de antioxidantes primários.....	38

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA		PÁGINA
1	Obtenção do extrato bruto, frações semipurificadas e fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.....	54
2	Substâncias obtidas por diferentes métodos cromatográficos a partir da FAE.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Análise granulométrica por tamisação das cascas de *Trichilia. catigua* A. Juss., rasuradas por moinho de martelo.....	51
2	Teor médio de polifenóis totais e taninos totais presentes nas cascas, extrato bruto e frações semipurificadas de *T. catigua*.....	53
3	Trinta e duas frações obtidas por cromatografia em coluna a partir da FAE.....	56
4	Dados de RMN ^{1}H da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).....	61
5	Dados de RMN ^{1}H da **substância II** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).....	67
6	Dados de RMN ^{1}H da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).....	73
7	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da **substância IV** acetilada**,** incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).....	79
8	Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da **substância IV** livre (300 MHz; CD_3OD, relativo para TMS).....	84
9	Comparação entre deslocamentos de hidrogênios da **substância IV** e da epicatequina no espectro de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$).....	87
10	Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da **substância V** acetilada**,** incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).....	90
11	Comparação entre dados de RMN H^{1} para o hidrogênio H-2(C) da **substância V** e da procianidina B_2 (**substância II**) em $CDCl_3$ e acetona-d_6.....	98
12	Dados de RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).....	101
13	Dados de RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).....	104
14	Comparação entre os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-2 e H-3 nos espectros de RMN ^{1}H (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS) das **substâncias IV, VI e VII**.....	111

15	Comparação entre os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-2 e H-3 nos espectros de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS) das **substâncias IV, VI e VII**.....	111
16	Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da **substância VII** acetilada, incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).....	114
17	Comparação entre deslocamentos de hidrogênios da **substância VII** e da epicatequina no espectro de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$).....	121
18	Dados de RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).....	124
19	Dados de RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).....	128
20	Dados de RMN ^{1}H da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$ relativo para TMS).....	138
21	Capacidade antioxidante de diferentes extratos de *Trichilia catigua* e substâncias referência demonstrada pela redução do DPPH•.....	145
22	Teores de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (%) dos extratos de *Trichilia catigua*.....	146
23	Teores de polifenóis totais (PT) e capacidade antioxidante dos extratos de *Trichilia catigua*.....	146
24	Capacidade antioxidante das substâncias isoladas de *Trichilia catigua* demonstrada pela redução do DPPH•.....	147
25	Comparação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e o número de hidroxilas fenólicas presentes nas substâncias isoladas de *Trichilia catigua*.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δm	Intervalo de abertura de malha
$\varnothing$	Diâmetro
Abs	Absorvância
Acetona d_6	Acetona deuterada
BHT	Butil hidroxi tolueno
CC	Cromatografia em coluna
CCCAV	Cromatografia em contra corrente de alta velocidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CG	Classe granulométrica
COSY $^1H/^1H$	Espectroscopia de correlação hidrogênio-hidrogênio
CV%	Coeficiente de variação
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dl	Dubleto largo
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazila radical
δ	Deslocamento químico
EB	Extrato bruto
F	Fração retida percentual
F#...	Subfrações obtidas a partir da fração FAE
FA	Fração aquosa
FAE	Fração acetato de etila
$FeCl_3$	Cloreto férrico
h	Horas
h:	Altura
HMBC	Coerência de múltiplas ligações
HMQC	Correlação múltiplo quântica
Hz	Hertz
IC_{50}	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração Inicial de DPPH•
J	Constante de acoplamento
$K_3Fe(CN)_6$	Hexacianoferrato de potássio

M	Abertura da malha
m	Multipleto
$\overline{m}$	Dimensão granulométrica média
m*M*	Milimolar
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
mg	Miligramas
ml	Mililitros
µl	Microlitros
P	Fração passagem percentual
PNA	Polifenóis não-adsorventes
ppm	Partes por milhão
PT	Polifenóis totais
R	Fração resíduo percentual
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RSA	Atividade de seqüestro de radicais livres
s	Singleto
sl	Singleto largo
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
TT	Teor de taninos totais
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais remonta praticamente ao princípio da evolução do homem sobre a terra. O homem pré-histórico observava o comportamento dos animais na hora de curar suas feridas ou diminuir sofrimentos. Destas observações deu-se início ao processo instintivo e empírico de caracterização de diversas plantas e seus efeitos, permitindo ao homem discernir quais delas possuíam efeitos medicinais e quais possuíam efeitos tóxicos (ALONSO, 1998).

Até nas culturas mais antigas, procedeu-se à coleta metodológica e científica de informações sobre ervas medicinais para o desenvolvimento de farmacopéias. Grande parte das farmacopéias científicas deriva de tradições de povos nativos. Além disso, as farmacopéias modernas contêm pelo menos 25% de drogas derivadas de plantas e muitas outras que são análogos sintéticos de substâncias isoladas destas (FARNSWORTH *et al.*, 1985; ASTIN, 1998).

A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para satisfazer suas necessidades em saúde, sendo freqüentemente empregadas em serviços primários e atendimento básico. Mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis, o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (WHO, 1998a).

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico, sendo que 25% destas são originadas de plantas superiores (BALANDRIN, 1993). Além disso, as plantas medicinais têm despertado interesse crescente na indústria farmacêutica, pois representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL; WANI, 1996).

De forma similar aos microorganismos, as plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas (SIMÕES *et al.*, 1996), os quais apresentam uma ampla diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996).

A biodiversidade do Brasil possui um grande potencial de moléculas inovadoras, apresentando uma vantagem competitiva de aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas (BARATA; QUEIROZ, 1995; BRASIL, 2006), de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 1996). No entanto, esta megadiversidade brasileira ainda é pouco conhecida, permanecendo como o maior potencial de obtenção de novos produtos farmacêuticos (REIS *et al.*, 1997).

A não regulamentação do setor ou o uso inapropriado das chamadas medicinas e práticas tradicionais, podem ter efeitos negativos e perigosos (BAGOZZI, 2005). A legislação

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

Assim, uma das principais limitações até agora relacionadas com a questão dos produtos naturais como fonte de novos fármacos é a complexidade do processo de avaliação, sendo os extratos considerados misturas biológicas complexas de difícil caracterização (NISBET; MOORE, 1997). Além disso, os constituintes das plantas medicinais podem variar de acordo com fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos (SCHULZ *et al.*, 2002).

Muitas das desvantagens apontadas para a busca de novos fármacos a partir de produtos naturais estão sendo ultrapassadas através de avanços técnicos significativos, principalmente a partir dos anos 80. Os desenvolvimentos alcançados nas técnicas cromatográficas e nas técnicas de elucidação estrutural, particularmente relacionados com a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) também têm sido considerados como capazes de acelerar a obtenção de novos protótipos (SCHENKEL *et al.*, 2004).

Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, a catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss.) é empregada popularmente como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória (PIZZOLATTI *et al*., 2002a).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Meliaceae

Esta família compreende 50 gêneros e cerca de 800 espécies de distribuição predominantemente nos trópicos de todo o mundo. Os maiores gêneros incluem *Cedrela* e *Guarea*, com cerca de 100 espécies cada, e *Trichilia*, com cerca de 200 espécies distribuídas pela América tropical e África (LAWRENCE, 1951).

São plantas arbóreas às vezes de grande porte, com folhas alternas compostas, em geral grandes, de crescimento apical, sem estípulas e às vezes com pulvinos na base. Flores pequenas em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores, hermafroditas, cíclicas, diclamídeas, de simetria radial. Sépalas e pétalas livres. Estames em número duplo ao das pétalas em geral com filetes alargados soldados em um tubo, com as anteras fixas na porção superior interna. Ovário súpero, com 4 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada qual com 1 ou 2 óvulos. Fruto em geral seco, capsular loculicida ou baciforme. Sementes freqüentemente com arilo ou aladas (JOLY, 2002).

Como exemplos brasileiros comuns destacam-se o gênero *Cedrela*, o popular cedro-rosa de excelente madeira avermelhada e os gêneros *Carapa*, *Trichilia* e *Guarea*, que são árvores comuns da mata tropical, em geral, conhecidas indistintamente como canjeranas, de madeira de boa qualidade (JOLY, 2002).

Plantas pertencentes à família Meliaceae têm sido muito utilizadas na medicina popular. Foram reportadas nesta família, atividades antiviral, anti-helmíntica, antiinflamatória e anti-reumática. As propriedades antiinflamatória e anti-reumática de alguns membros desta família, como *Azedirachta indica* A. Juss., *Melia azedarach* L. e *Cedrela tubifibra* Bert. foram explicadas devido à sua ação na resposta imune (BENENCIA *et al.*, 2000)

2.1.2 Gênero *Trichilia*

O gênero *Trichilia*, pertencente à família Meliaceae é um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família e também o que apresenta mais características anatômicas da família Meliaceae, sendo os limonóides os principais metabólitos secundários isolados. Foram isolados também, deste gênero, triterpenos (cicloartanos e damaranso), fitoesteróides, esteróides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ-lactonas, sesquiterpenos, aminoácidos (BELTRAME, 2005) e taninos (BURKILL, 1997).

Várias espécies de *Trichilia* têm sido empregadas na medicina popular no tratamento de várias doenças como desordens hepáticas, e como purgativos, antiepilépticos, antipiréticos, antimaláricos (GERMANÒ *et al.*, 2006), tônicos físico e mental, afrodisíacos e estimulantes sexuais (PIZZOLATTI *et al.*, 2002a).

Eldeen e colaboradores (2005) verificaram que extratos das cascas de *Trichilia dregeana* Sond obtidos com etanol e acetato de etila apresentam atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de exibirem atividade inibitória sobre as enzimas cicloxigenase-1 e acetilcolinesterase.

Ambrozin e colaboradores (2004) verificaram atividade tripanocida em extratos de caule de *Trichilia ramalhoi* Rizzini obtidos com metanol e *n*-hexano.

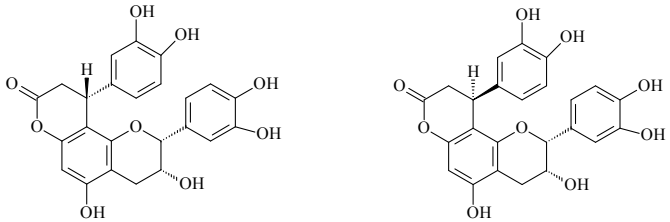
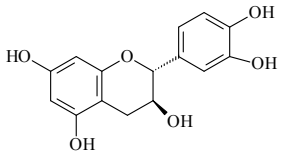
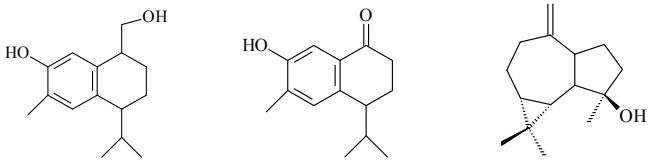
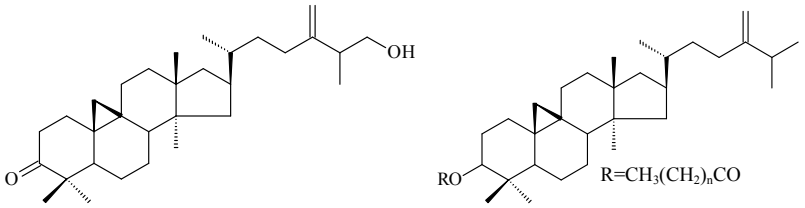
Segundo Germanò e colaboradores (2006), o extrato obtido das raízes de *Trichilia emetica* Vahl, utilizando uma mistura de metanol e ácido acético como líquido extrator, demonstrou atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro*.

Extratos aquosos de *Trichilia emetica* demonstraram atividade letal *in vitro* contra schistosomulas de *Schistosoma haematobium* (SPARG *et al.*, 2000). De acordo com Kamanzi e colaboradores (2004), extratos etanólicos de cascas e raízes de *T. emetica* apresentaram uma forte atividade contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* em concentrações muito baixas.

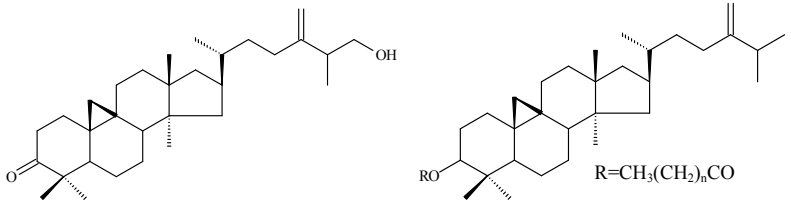
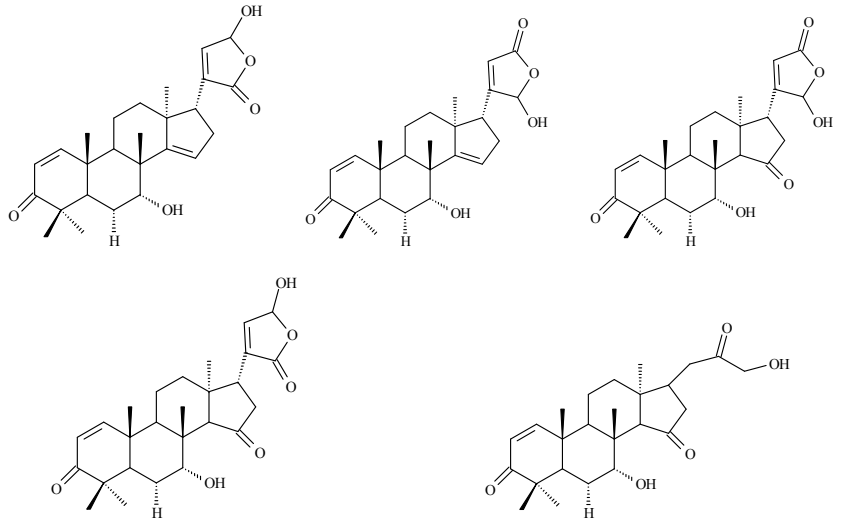
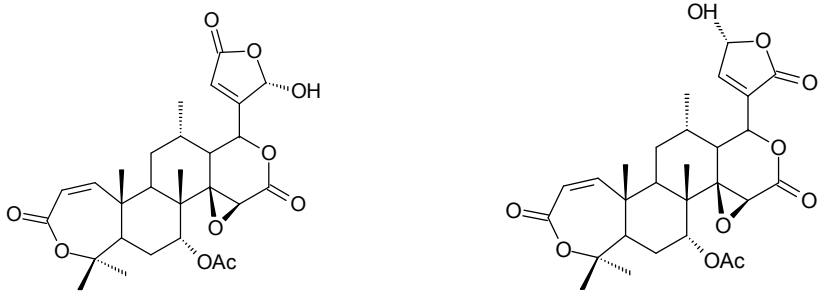
Extratos de *Trichilia glabra* L. interferem com alguns mecanismos relacionados à função imune humana, como: atividade hemolítica do complemento humano, proliferação de linfócitos T, capacidade fagocítica e mecanismo oxidativo de monócitos do sangue periférico e leucócitos polimorfonucleares (BENENCIA *et al.*, 1995; BENENCIA; COULOMBIÉ, 1998). Segundo Benencia e colaboradores (1995), extratos aquosos de folhas de *T. glabra* L. apresentaram ainda atividade inibitória *in vivo* na inflamação imediata induzida por zymosan. Neste caso, a resposta inflamatória é mediada por polimorfonucleares e complemento (SCHALKWIJK *et al.*, 1985).

Nores e colaboradores (1997) verificaram que extratos aquosos de folhas frescas de *Trichilia elegans* exercem efeitos inibitórios em vários componentes do sistema imune de camundongos.

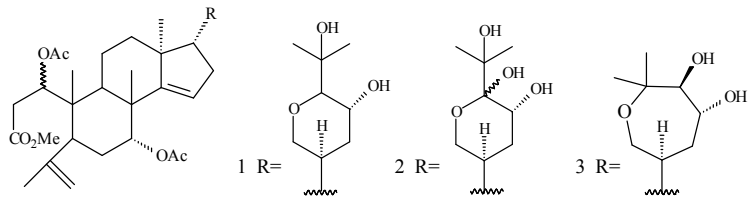
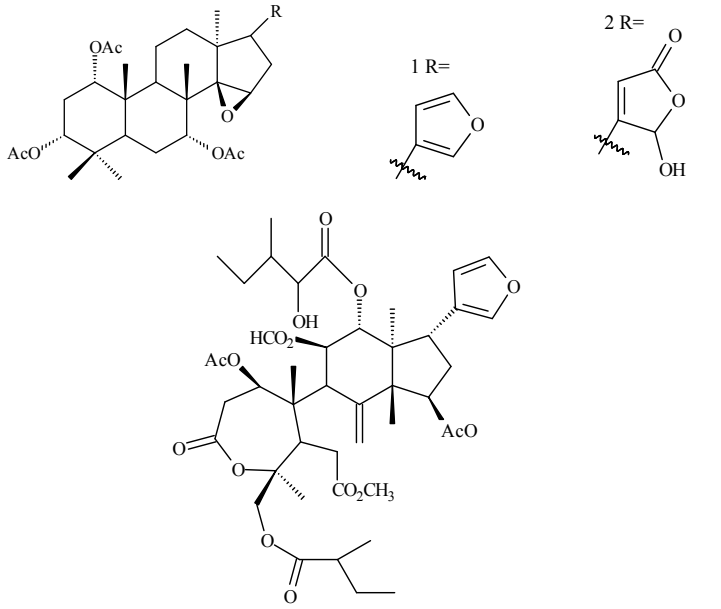
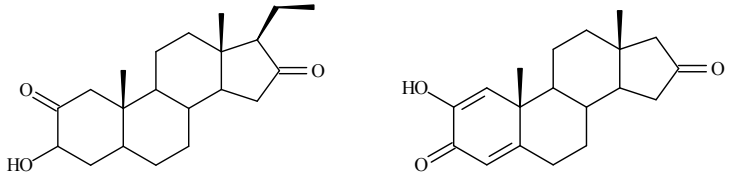
Quadro 1 - Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia.*

ESPÉCIE	CLASSE	ESTRUTURA
Trichilia catigua	Cumarinas (BELTRAME, 2005)	
	Flavolignanas (PIZZOLATTI *et al.*, 2002a)	
	Taninos (BELTRAME,2005)	
	Triterpenos (BELTRAME, 2005)	
Trichilia clausseni	Triterpenos (PUPO *et al.*, 1996)	

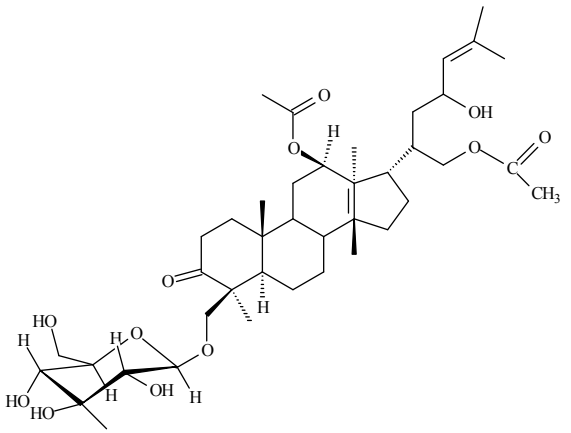
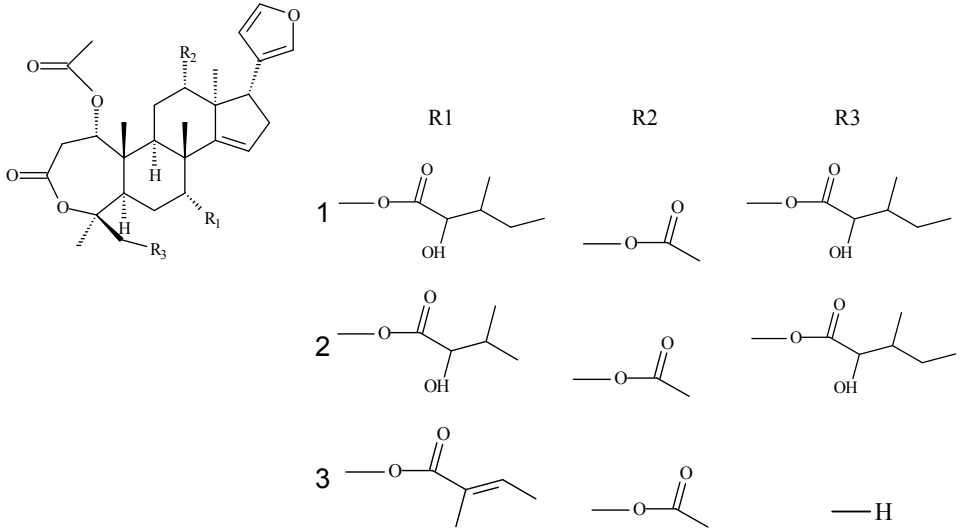
Quadro 1 - Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia* (continuação)

Trichilia clausseni	Triterpenos (PUPO *et al.*, 1996)	
Trichilia estipulata	Limonóides (CORTEZ *et al.*, 1998; CORTEZ et al., 2000)	
Trichilia elegans	Limonóides (GARCEZ *et al.*, 1997)	

Quadro 1 - Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia* (continuação).

Trichilia elegans	Seco-protolimonóides (GARCEZ *et al.*, 1996)	
Trichilia havanensis	Limonóides (HAHN *et al.*, 1996)	
Trichilia hirta	Esteróides (CHAURET *et al.*, 1996)	

Quadro 1 - Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia* (continuação).

Trichilia prieuriana	Protolimonóides (OLUGBADE; ADESANYA, 2000)	
Trichilia rubra	Limonóides (MUZLA *et al*., 1995)	

2.1.3 *Trichilia catigua* A. Juss.

As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como “catuaba” são representadas por mais de 10 espécies diferentes: *Tommadenia violaceae* (Apocynaceae), *Tetragastria catuaba* (Burseraceae), *Secundatia floribunda* (Apocynaceae), *Pouteria* Aubl (Sapotaceae), *Phyllanthus nobilis* (L. f.) Müll. Arg (Euphorbiaceae), *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld & J.F. Souza (Bignoniaceae), *Erythroxylum catuaba* da Silva ex Hamet e *E. vacciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae) e *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) (PEREIRA, 1982). Apesar da problemática apresentada sobre a denominação popular destas espécies, a planta encontrada mais comumente no Brasil como “catuaba” é a espécie vegetal *Trichilia catigua* (MARQUES,1998).

A espécie *Trichilia catigua* A. Juss. (fig. 1), pertencente à família Meliaceae, tem vasta distribuição na América do Sul e Central, sendo mais abundante no sul do Brasil (KLEIN, 1984). Constitui-se numa árvore de 10 m de altura, sendo que os ramos novos pubescentes tornam-se glabros com a idade e de coloração acinzentada. As folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, são curto-pediceladas, oblongo-elípticas, ápice acuminado, irregularmente agudos na base, de até 7 cm de comprimento. As flores podem apresentar coloração branco-amarelada e o fruto é constituído de uma cápsula estreito-oblonga, com pêlos longos rijos e amarelados com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente, aparecendo de dezembro a janeiro. A época de floração é de setembro a outubro, entretanto, a cápsula pode permanecer na árvore por 5 a 6 meses antes de florescer (SOUZA *et al.*, 2001).

A *T. catigua* fornece madeira vermelha, compacta, sólida, flexível, bastante resistente às intempéries, própria para obras externas, marcenaria, carroçaria, torno, carpintaria e excelente lenha; peso específico 0,600 a 0,640. A casca é fina, lisa, amarga e adstringente, servindo para curtume e dando aos couros cor amarela muito apreciada. Também fornece matéria tintorial que vai do amarelo-laranja intenso até o vermelho e o violeta (CORRÊA, 1984).

T. catigua é popularmente conhecida como catuaba ou catiguá e suas cascas são utilizadas na medicina popular como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória (PIZZOLATTI *et al.*, 2002a).



Figura 1 – Aspecto geral da espécie *Trichilia catigua* e detalhe dos frutos e folhas.

Alguns estudos químicos indicaram a presença de omega-fenil alcanos, ácidos omega-fenil alcanóicos, omega-fenil-gama-lactonas, alquil-gama-lactonas, alcenil-gama-lactonas e ácidos graxos, além de β-sitosterol, estigmasterol, campesterol e uma mistura de flavalignanas, em extratos de *T. catigua* (PIZZOLATTI *et al.*, 2002a).

Pizzolatti e colaboradores (2002b) verificaram que extratos hidroalcoólicos de cascas de *T. catigua* apresentam atividade citotóxica contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

O extrato bruto da *T. catigua*, juntamente com extratos de *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*, é comercializado no Brasil, sob a apresentação do Catuama® (fig. 2), que é indicado para fadiga mental e física, astenia neuromuscular e desordens de fraqueza (VAS *et al.* 1997) e também pelo seu efeito analgésico, vasodilatador (CALIXTO; CABRINI, 1997), estimulante e afrodisíaco (ANTUNES *et al.*, 2001). Além disso, este medicamento induziu o relaxamento de corpos cavernosos em coelhos (ANTUNES *et al*., 2001) e apresentou efeito antidepressivo em modelos animais e bioquímicos (CAMPOS *et al*., 2004).



Figura 2 - Medicamento fitoterápico Catuama®, contendo extratos brutos de *Trichilia catigua*, *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*.

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Substâncias Fenólicas

Substâncias fenólicas abrangem uma ampla variedade de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrrem mais frequentemente combinadas com açúcares como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

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

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

O processo clássico para detectar fenóis simples utiliza solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998). Além disso, os fenólicos são todos aromáticos, sendo assim, todos mostram uma intensa absorção na região do UV (CARVALHO *et al.*, 2004; HARBORNE, 1998). Métodos espectrométricos são, dessa forma, especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE,1998).

2.2.2 Taninos

A palavra tanino foi usada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais em couro (COSTA, 2002).

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM *et al.*, 1975), sendo que sua ocorrência nas angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998).

São substâncias fenólicas, solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Daltons, que apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas. Tais substâncias são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2004).

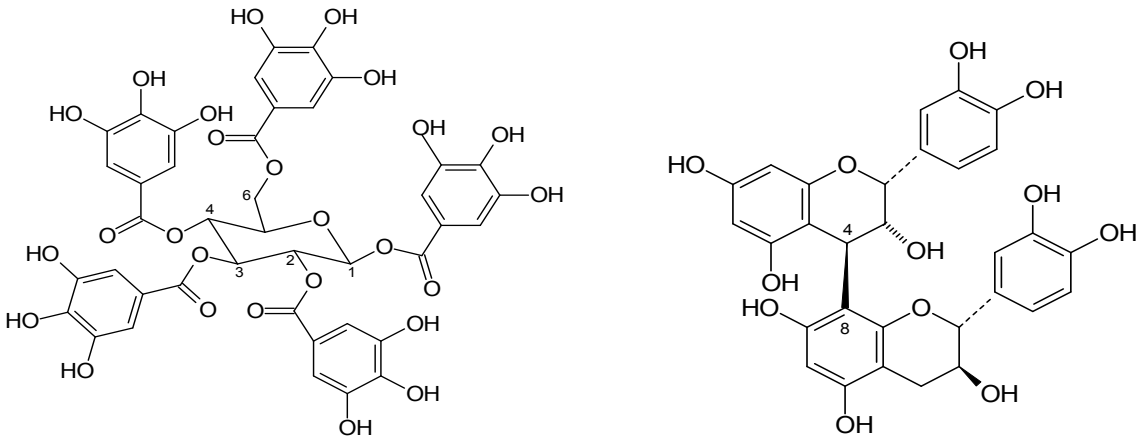
Industrialmente, os taninos são substâncias que, devido à habilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Nas células das plantas, os taninos estão localizados separadamente das proteínas e das enzimas do citoplasma, mas quando o tecido é danificado, quando um animal se alimenta, por exemplo, a reação de tanagem pode ocorrer, fazendo com que as proteínas fiquem menos acessíveis aos sucos gástricos do animal. Os tecidos ricos em taninos são, de fato, amplamente evitados pela maioria dos herbívoros, devido ao sabor adstringente que ele passa. Portanto, uma das maiores funções dos taninos em plantas é a de ser uma barreira para herbívoros e insetos (HARBORNE, 1998).

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

Os taninos são classificados segundo a sua estrutura química em 2 grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β-*D*-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (SANTOS; MELLO, 2004). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros

formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (FREUDENBERG; WEINGES, 1958 e 1960).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetalae das dicotiledôneas (SANTOS; MELLO, 2004).



1 2

Figura 3 – Estrutura 1: exemplo de tanino hidrolisável [β-1,2,3,4,6-pentagaloil-*D*-glicose]. Estrutura 2: exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4β→8)-catequina].

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

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida, fungicida (SCALBERT, 1991; SANCHES *et al.*, 2004), antiviral (OKUDA *et al.*, 1993; FELIPE *et al.*, 2006), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI *et al.*, 1990; OOSHIMA *et al.*, 1993), ação antitumoral (OKUDA *et al.*, 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpessoai* (HOLETZ *et al.*, 2001), atividade cicatrizante (LOPES *et al.*, 2005) e atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA *et al.*, 2006). Os taninos podem atuar também como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2004).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Os taninos podem formar complexos com proteínas de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações covalentes ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos (LUCK *et al.*, 1994). Esta propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (SCHOLZ,1994).

A ação dos taninos na cura de feridas, queimaduras e inflamações ocorre através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. O mesmo mecanismo de ação ocorre no caso das úlceras gástricas (HASLAM, 1998). Lopes *et al.* (2005) observaram que o tratamento de feridas cutâneas com extratos semipurificados de *Stryphnodendron polyphyllum* e *S. obovatum*, que contêm altas concentrações de taninos, promove um aumento significativo na proliferação celular da epiderme.

2.2.3 Taninos condensados

Taninos condensados diferem estruturalmente de acordo com o número de grupos hidroxila presentes nos anéis aromáticos e da estereoquímica do carbono assimétrico do núcleo heterocíclico. Além disso, a presença de *O*-metoxilação, *O*-glicosilação e *O*-galoilação aumentam a complexidade estrutural (DE BRUYNE *et al*., 1999).

Esta classe de taninos também é denominada de proantocianidinas (SANTOS; MELLO, 2004).

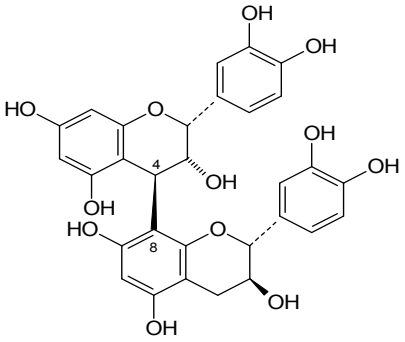
As proantocianidinas são comumente formadas por monômeros de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8. Além desses, outros monômeros são bastante comuns, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002).

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

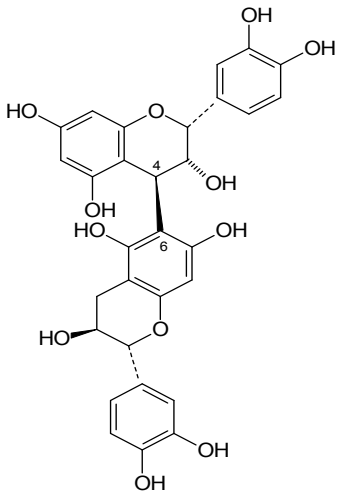
representantes do grupo A possuem complementarmente uma ligação do tipo éter (SANTOS; MELLO, 2004).

Os acoplamentos 4→8 são mais favorecidos estereoquimicamente, mas não são exclusivos. Normalmente ambos os acoplamentos 4→8 e 4→6 estão presentes, mas na proporção de 3:1 (DE BRUYNE *et al.*, 1999).

Proantocianidina tipo-B

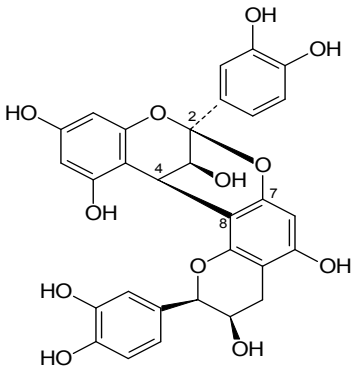


Epicatequina-(4β→8)-catequina



Epicatequina-(4β→6)-catequina

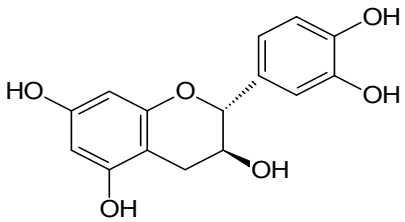
Proantocianidina tipo-A



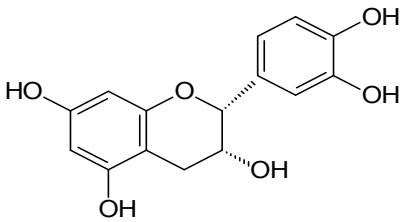
Catequina-(4β→8;2β→*O*→7)-epicatequina

Figura 4 – Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas.

Os flavan-3-óis mais distribuídos são pares diastereoisoméricos de catequina e epicatequina (fig. 5) (HASLAM, 1998), sendo que catequina foi isolada de diversas espécies vegetais, inclusive da *Trichilia catigua* A. Juss. (BELTRAME, 2005).



Catequina



Epicatequina

Figura 5 – Estruturas da catequina e epicatequina.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.3.1 Processos oxidativos

Oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do nosso metabolismo, sendo que o oxigênio é o último receptor no sistema de fluxo de elétron que produz energia na forma de ATP (DAVIES, 1995). Dessa forma, o metabolismo oxidativo é essencial para a sobrevivência das células. Porém essa dependência tem como efeito colateral a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, que levam às modificações oxidativas no organismo (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila ($^{\bullet}OH$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Quando um excesso de radicais livres é formado, ocorre uma sobrecarga nas enzimas protetoras, como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, causando efeitos destrutivos e letais às células. Esse efeito letal ocorre através da oxidação das membranas lipídicas, proteínas celulares, DNA e enzimas, que tem por conseqüência o bloqueio da respiração celular. Além disso, as espécies reativas de oxigênio parecem interferir na transmissão dos sinais celulares (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

As reações oxidativas podem afetar também os alimentos, sendo essas as principais causas das modificações químicas, que resultam nos processos de rancificação e/ou deterioração da qualidade nutricional, cor, sabor, textura e segurança dos alimentos (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

2.3.2 Processo de oxidação lipídica

Um grande número de fenômenos químicos e físicos pode iniciar o processo de oxidação, o qual ocorre continuamente na presença de um substrato adequado, como oxigênio, ácidos graxos poli-insaturados, fosfolipídios, colesterol e DNA. A oxidação lipídica

desempenha um papel importante na deterioração de alimentos e nas modificações oxidativas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (ANTOLOVICH *et al*., 2002).

O processo de oxidação lipídica ocorre por três rotas diferentes: (1) reação não enzimática mediada por radicais livres, (2) foto oxidação não-enzimática e não-radicalar e (3) reação enzimática. Um exemplo da rota (2) é a oxidação do ácido oléico por oxigênio singleto, produzindo dois hidroperóxidos alílicos, através da adição de oxigênio em cada uma das terminações da dupla ligação. A rota (3) envolve a ação de lipoxigenases em vários substratos. A rota (1) é a via clássica de radicais livres, que leva à iniciação e rápida propagação de cadeias de reações destrutivas. Esta última rota conta com as etapas de iniciação, propagação, ramificação e término (ANTOLOVICH *et al*., 2002).

Iniciação

$$LH + R^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + RH$$

Onde LH representa o substrato, por exemplo um lipídio, sendo $R^{\bullet}$ o radical livre iniciador. A oxidação do lipídio gera um radical alil altamente reativo ($L^{\bullet}$), que rapidamente reage com o oxigênio, formando o radical peroxil ($LOO^{\bullet}$).

Propagação

$$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$$

Os radicais peroxil são os carreadores da cadeia de reações, que podem oxidar o lipídio produzindo hidroperóxidos lipídicos (LOOH), os quais podem se transformar em uma série de substâncias como álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e radicais alcoxil ($LO^{\bullet}$).

Ramificação

$$LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + HO^{\bullet}$$
$$2\ LOOH \rightarrow LOO^{\bullet} + LO^{\bullet} + H2O$$

$$LOOH + M^{n+} + H^{+} \rightarrow LO^{\bullet} + M^{(n+1)+} + H_2O$$
$$LOOH + M^{(n+1)+} + OH^{-} \rightarrow LOO^{\bullet} + M^{n+} + H_2O$$

A quebra de hidroperóxidos lipídicos frequentemente envolvem catálises de íons de metais de transição, em reações análogas àquelas com peróxido de hidrogênio, resultando em radicais lipídicos alcoxil e peroxil.

Término

$$LO^{\bullet} + LO^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow \text{Produtos não radicalares}$$
$$LOO^{\bullet} + LO^{\bullet}$$

Combinação de radicais para formar produtos não radicalares.

Quadro 2 - Etapas da reação não enzimática mediada por radicais livres (ANTOLOVICH *et al*., 2002).

2.3.3 Substâncias antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparadas com aquelas do substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação do substrato. Atualmente, antioxidantes foram divididos em duas classes: antioxidantes primários ou interruptores de cadeia e antioxidantes secundários ou preventivos. Antioxidantes secundários são substâncias que retardam a velocidade de oxidação, através da remoção do substrato ou quelação do oxigênio singleto. Já os antioxidantes primários, podem inibir ou retardar a etapa de iniciação da cadeia, reagindo com o radical lipídico, ou ainda inibir a etapa de propagação da cadeia, reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila (ANTOLOVICH *et al*., 2002).

$$L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + AH \rightarrow LOOH + A^{\bullet}$$
$$LO^{\bullet} + AH \rightarrow LOH + A^{\bullet}$$

Onde AH representa o antioxidante e $A^{\bullet}$ representa o radical livre do antioxidante.

O radical livre do antioxidante pode também interferir com a etapa de propagação da cadeia, pela formação de antioxidante peróxido.

$$A^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow LOOA$$
$$A^{\bullet} + LO^{\bullet} \rightarrow LOA$$

Quadro 3 – Mecanismo de ação de antioxidantes primários (ANTOLOVICH *et al*., 2002).

Muitas plantas medicinais contêm grandes quantidades de substâncias fenólicas, as quais podem agir como substâncias antioxidantes, funcionando como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo eficazes, portanto, para prevenir a oxidação lipídica (SOARES, 2002).

Substâncias polifenólicas possuem estrutura química ideal para a atividade de seqüestro de radicais livres, e têm mostrado serem antioxidantes mais eficientes *in vitro* do que a vitamina C e a vitamina E, quando comparados em concentrações molares (RICE-EVANS *et al*., 1987).

Hussein e colaboradores (1987) demonstraram que flavonóides inibem a lipoperoxidação *in vitro* no estágio de propagação, atuando como bloqueadores das reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxila. De Bruyne *et al.* (1999) em sua revisão sobre taninos reportaram as propriedades antioxidantes de taninos condensados, frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), superóxido ânion e o radical hidroxil.

Moreira et al. (2002) demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* das frações isoladas de *Pseudopiptadenia contortal* Rauschert, sendo que as substâncias isoladas,

ácido gálico, epicatequina e os galatos de catequina apresentaram resultados bastante significativos. O efeito antioxidante das proantocianidinas presentes no extrato de cacau (*Teobroma cacao* L.) foi avaliado por Osakabe *et al*. (2000) e Hatano *et al*. (2002), frente à peroxidação lipídica, obtendo-se resultados positivos. O mesmo foi proposto por Negro e colaboradores (2003) em seu trabalho com proantocianidinas isoladas do vinho.

Masaki *et al*. (1994) reportaram uma potente atividade de hamamelitaninos, e ácido gálico frente a ensaios químicos e biológicos para a determinação da atividade antioxidante. A avaliação de epicatequina, administrada oralmente em ratos, mostrou que a mesma possui capacidade em promover um aumento das defesas antioxidantes no plasma dos animais tratados, quando comparados ao controle.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer critérios de caracterização físico-química das cascas da espécie *Trichilia catigua* A. Juss., bem como avaliar o perfil biológico *in vitro* de extratos, frações semipurificadas e substâncias isoladas e identificadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliação da qualidade das cascas, extratos e frações semipurificadas de *Trichilia catigua.*

3.2.2 Isolamento de substâncias fenólicas de extrato semipurificado.

3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extrato bruto, semipurificado e substâncias isoladas através do método com DPPH• e determinação da capacidade total de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As cascas do vegetal *Trichilia catigua* A. Juss. foram coletadas em janeiro de 1997, na cidade de Caitité estado da Bahia, Brasil. A exsicata se encontra depositada no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba sob o número 65901. As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e secas à temperatura ambiente.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Solventes, reagentes e soluções

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

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetona deuterada
- Ácido acético glacial
- Ácido fórmico
- Anidrido acético
- BHT (butil hidroxi tolueno)
- Clorofórmio deuterado Isotec
- DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) Fluka
- Etanol
- Etanol 92,8 °GL Ilha
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec
- *n*-propanol
- Nitrogênio líquido
- Piridina
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteau 2 mol l^{-l} Laborclin®

- SEPHADEX® LH-20 Fluka
- Solução de ácido tricloroacético a 10%
- Solução de carbonato de sódio a 14,06%
- Solução de cloreto ferroso tetrahidratado ($FeCl_2.4H_2O$) 2,0 m*M*
- Solução de hexacianoferrato de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] a 1%
- Solução de hidróxido de sódio a 10%
- Solução etanólica de cloreto férrico a 1%
- Vitamina C – Delaware
- Tolueno
- Tampão fosfato de sódio 0,2 *M* pH 7,4
- Tampão fosfato de sódio 0,2 *M* pH 6,6
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) 97%

4.3 CONTROLE DE QUALIDADE

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

4.3.2 Análises físico-químicas

4.3.1.1 Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 1977b)

Amostras de 2 g da droga vegetal cominuída foram exatamente pesadas em pesa-filtros previamente tarados e colocados em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

4.3.1.2 Análise granulométrica (HELMAN, 1982)

Empregou-se a técnica da granulometria por tamisação. Determinou-se com dois tamises, de 2,000 e 0,149 mm e coletor, escolheu-se mais quatro tamises intermediários,

com abertura de malha de 0,840; 0,420; 0,250 e 0,177, segundo a DIN 4188, tarando-os individualmente.

Pesaram-se 51,39 g do vegetal moído. Tamisou-se o conjunto durante 25 min a 70 vibrações por min, utilizando-se tamisador vibratório RETSCH. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira. O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha (Δm; mm); dimensão granulométrica média ($\overline{m}$; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %).

4.3.2.3 Determinação do teor de extrativos (DEUTSCHES, 1986)

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

4.3.3 Análise química quantitativa

4.3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais (GLASL, 1983)

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

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 ml de

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

Para a determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais de extratos e frações, realizou-se a mesma técnica, porém a etapa de extração não se faz necessária. A quantidade de extrato ou fração utilizada é equivalente a 0,750 g de planta e é calculada com base nos seus respectivos rendimentos.

4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

4.4.1 Extrato bruto (EB)

As cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. A extração foi realizada por Ultra-turrax UTC 115 KT, utilizando acetona/água (7:3; v/v) como líquido extrator, na proporção de 10% (m/v). Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto (EB).

4.4.2 Fração acetato de etila (FAE)

O extrato bruto (50 g) foi ressuspendido em água destilada (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 12 vezes) (MELLO *et al.*, 1996a). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a FAE. A fase aquosa restante foi também concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FA).

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

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

A FAE foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (h: 750 mm ∅ 55 mm) contendo SEPHADEX® LH-20 como fase estacionária. Após limpeza apropriada, a coluna foi estabilizada com etanol 30%. Foram adicionados 13 g da FAE no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se a seguinte seqüência de fase móvel em proporção volumétrica:

1. Etanol/água (3:7)	6,67 l
2. Etanol/água (4:6)	3,20 l
3. Etanol/água (5:5)	4,03 l
4. Etanol/água (7:3)	1,32 l
5. Etanol	1,50 l
6. Metanol/água (5:5)	1,00 l
7. Metanol	1,00 l
8. Acetona/água (7:3)	2,00 l

Recolheram-se 10 ml de cada fração em tubo de ensaio com vazão de 1 ml/min. O monitoramento foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD, seção 4.5.3). Obtiveram-se 32 subfrações (F#1 à F#32), que foram reunidas por semelhança, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

4.5.2 Cromatografia em coluna das subfrações (CC)

Algumas das 32 frações obtidas a partir da fração acetato de etila foram submetidas a sucessivas cromatografias em coluna (h: 320 mm, ∅ 25 mm; h: 300 mm, ∅ 12 mm; h: 400 mm, ∅ 34 mm) contendo Sephadex® LH-20. Empregou-se etanol/água como fase móvel em sistema de gradiente. O monitoramento dos tubos foi feito através de CCD (seção 4.5.3).

4.5.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F_{254} (Merck®) com 0,200 mm de espessura, utilizando-se como

sistema eluente, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram visualizadas sob luz UV a 254 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em etanol.

4.5.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Algumas substâncias isoladas foram derivatizadas (seção 4.6) e em seguida aplicadas em forma de linhas, sobre gel de sílica PF_{254} com gesso (Merck), na espessura de 1,0 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 Rf. Em seguida, as substâncias foram separadas, raspando-se a região correspondente, e solubilizadas em acetona.

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

4.5.5 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) (MELLO, 1995)

Foi utilizado cromatógrafo em contra corrente de alta velocidade P.C. Inc. equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm, capacidade de 285 ml e injetor de amostra P.C. Inc. com alça de 10 ml (CCCAV), com rotação média de 870 rpm e fluxo de 1 ml/min dado por bomba mod Waters 6000A. O sistema eluente empregado foi preparado em funil de separação com acetato de etila:*n*-propanol:água (140:8:80; v/v). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Cada fração de 3 ml foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (seção 4.5.3) e os tubos reunidos por semelhança.

4.6 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA (MELLO *et al.*, 1996b)

Para quantidades de até 100 mg de substância, foram adicionados 1ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml e a mistura foi deixada em repouso por 24 h. Após, foi adicionado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. Filtrou-se sob pressão reduzida através de funil de vidro

sinterizado G3 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi solubilizada em acetona e a retirada do solvente foi realizada através de evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. A substância foi transferida para um frasco e colocada em capela de exaustão à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada.

4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^{1}H e ^{13}C), RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H, HMQC e HMBC), espectrometria de massas (EM), espectroscopia de dicroísmo circular (DC) e polarimetria. Os espectros das substâncias foram analisados e comparados com dados constantes na literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian, Mercury 300BB de 300 MHz para ^{1}H e 75 MHz para ^{13}C, empregando-se solventes deuterados (CD_3OD, acetona-d_6 e $CDCl_3$). Os espectros de massa foram obtidos junto à Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, em aparelho ESI-MS Quattro LC.

4.8 ROTAÇÃO ÓPTICA (POLARIMETRIA)

A determinação óptica ($[\alpha]_D^{20°}$) das substâncias livres e acetiladas foi realizada empregando metanol (grau HPLC) e acetona (grau espectroscópico), respectivamente, a 20 °C em polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 com cubeta de 10 mm. Para a determinação do valor, empregou-se a seguinte equação:

$$[\alpha]_D^{20°} = \frac{100.\alpha}{l.c}$$

onde: α = rotação óptica obtida em graus a 20 ± 0,5 °C

l = comprimento da cubeta do polarímetro em dm

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

4.9 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

As substâncias, acetiladas ou não, foram solubilizadas em metanol ou acetona e medidas em comprimento de onda entre 200-300 nm, utilizando espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco mod J-815. O cálculo da eliptizidade molar ($[\theta_\lambda]$) foi realizado de acordo com a equação:

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

onde:

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

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

C = concentração molar (mol.l^{-1})

l = comprimento da cubeta (cm)

4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.10.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (AMAROWICZ *et al*., 2004)

Extratos, frações, substâncias isoladas e antioxidantes sintéticos utilizados como padrão foram diluídos em 3 ml de metanol, de modo a atingir concentrações de 0,5 a 8,0 μg/ml (extratos e frações) ou 1,0 a 8,0 μ*M* (substâncias isoladas). A estas soluções acrescentaram-se 300 μl de solução de DPPH (1 m*M*). A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas a 517 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650. Foi utilizado como branco uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 ml de metanol) adicionada de 500 μl de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 ml de metanol e 300 μl de solução de DPPH. A atividade de seqüestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoramento do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\%\text{ASR} = \frac{AbsCN - AbsA}{AbsCN}.100$$

Onde:

Abs CN = Absorvância do controle negativo

Abs A = Absorvância da amostra

4.10.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+} (GÜLÇIN, 2006)

Diferentes concentrações dos extratos, frações, substâncias isoladas e antioxidantes sintéticos (10,0 a 90,0 μg/ml para extratos e frações ou 20,0 a 100,0 μ*M* para substâncias isoladas) em 1 ml de água destilada foram misturadas com tampão fosfato (2,5 ml, 0,2 *M*, pH 6,6) e hexacianoferrato de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] (2,5 ml, 1%). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Foi adicionado ácido tricloroacético (2,5 ml, 10%) e após, a mistura foi centrifugada a 1000 x g. O sobrenadante (2,5 ml) foi misturado com água destilada (2,5 ml) e $FeCl_3$ (0,5 ml, 0,1%), e a absorvância foi lida a 700 nm, utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650. Quanto maior for a absorvância, maior é o poder de redução.

4.10.3 Análise Estatística

Todas as análises referentes à capacidade antioxidante e capacidade total de redução foram realizadas em triplicata.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® (Graphpad Software Inc, Microsoft corp.). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão da média e foram analisados utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas através do teste de Tukey e $P<0,05$ foi considerado como critério de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE

A qualidade e a disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos, fato que não é observado em relação aos sintéticos. Assim, alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos na pureza e mesmo nas características fenotípicas, ressaltam a importância da caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica. Por isso, a origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, coleta, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos (BRITISH, 1996).

A avaliação do teor de umidade presente nas cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. foi determinado através da perda por dessecação. A presença de água em excesso, em drogas vegetais, promove o crescimento de fungos, bactérias ou insetos e hidrólise de constituintes. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas nas quais a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002).

A perda por dessecação foi realizada com as cascas secas e moídas, determinando-se o teor de umidade residual (água e/ou substâncias voláteis). Este parâmetro é fundamental para determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento. O valor médio para as determinações foi de 9,93% ± 0,14 (CV%=1,46).

A distribuição granulométrica é um fator importante na obtenção de um extrato, já que um maior ou menor rendimento de extração está intimamente relacionado com a área de superfície e dimensões das partículas em contato com o líquido extrator (CARDOSO, 2002).

A figura 6, que representa a curva de distribuição granulométrica da droga rasurada, mostra que a maior porcentagem de partículas encontra-se numa faixa granulométrica que varia de 0,420 a 0,840 mm, porém este percentual é pouco superior àqueles pertencentes às classes granulométricas 0,250 a 0,420 e 0,840 a 2,000 mm. Portanto, mais de 70% das partículas encontram-se na faixa de 0,250 a 2,000 mm.

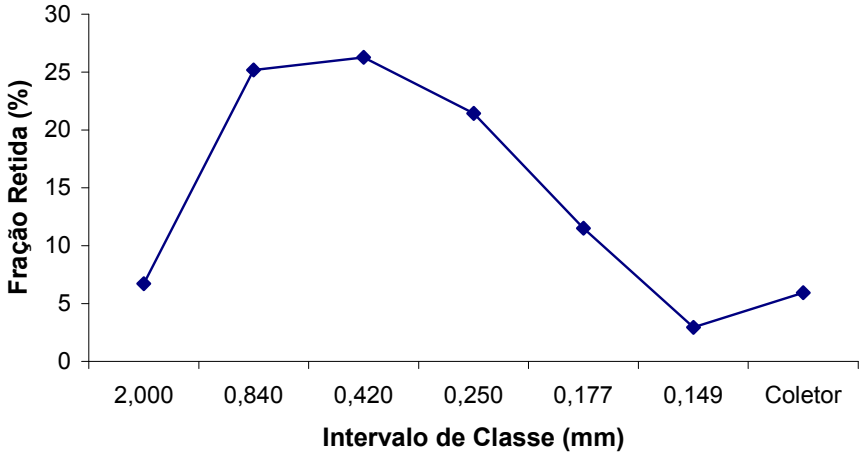


Figura 6 – Curva de distribuição granulométrica da droga.

Tabela 1 – Análise granulométrica por tamisação das cascas de *Trichilia catigua* A. Juss., rasuradas por moinho de martelo.

Abertura de malha M (mm)	Classe granulométrica CG (mm)	Intervalo de abertura de malha Δm (mm)	Dimensão granulométrica média $\overline{m}$ (mm)	Fração retida percentual F (%)	Fração resíduo percentual R (%)	Fração passagem percentual P (%)
2,000	2,000 – 3,000	1,000	2,500	6,71	6,71	93,29
0,840	0,840 – 2,000	1,160	1,420	25,19	31,90	68,10
0,420	0,420 – 0,840	0,420	0,630	26,27	58,17	41,83
0,250	0,250 – 0,420	0,170	0,335	21,43	79,60	20,40
0,177	0,177 – 0,250	0,023	0,213	11,52	91,12	8,88
0,149	0,149 – 0,177	0,028	0,163	2,93	94,05	5,95
Coletor	0,000 – 0,149	0,149	0,074	5,95	100,00	0,00

A figura 7 representa as curvas características de retenção e passagem da droga rasurada através da análise granulométrica por tamisação, empregando-se os dados fornecidos pela tabela 1. O diâmetro médio, calculado graficamente a partir do ponto de intersecção das retas foi de 0,56 mm.

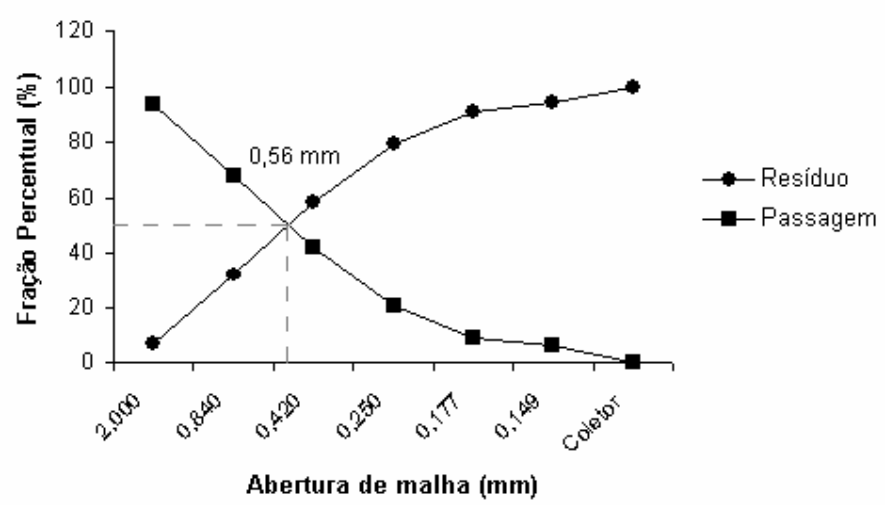


Figura 7 – Curvas cumulativas de resíduo e passagem após a tamisação da matéria-prima vegetal.

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de substâncias extraíveis a partir de uma determinada quantidade de material vegetal (WHO, 1998b), empregando-se água como líquido extrator. Foram realizadas três determinações obtendo-se como resultado o valor médio de 19,16% ± 0,78 (m/v) (CV%=4,10).

A avaliação da qualidade da droga vegetal foi complementada com análises quantitativas do teor de polifenóis totais e taninos totais. O teor médio de polifenóis totais encontrado nas cascas foi de 10,51% ± 0,17 (CV%=1,61) e o teor médio de taninos foi de 6,96% ± 0,11 (CV%=1,57). As análises quantitativas foram realizadas também com o extrato bruto e frações semipurificadas. Os teores de polifenóis totais e taninos totais encontrados estão descritos na tabela 2. Vale ressaltar que a técnica de determinação do teor de polifenóis totais não é uma técnica específica, determinando não somente taninos como também outros polifenóis. Substâncias como derivados do ácido caféico encontrados em Asteraceae e Lamiaceae são denominados de taninos das labiatas e apresentam a capacidade de reagirem com pó-de-pele (proteína), não sendo, no entanto, capazes de serem utilizados no curtimento da pele para a transformação em couro (HEGNAUER, 1986).

Tabela 2 – Teor médio de polifenóis totais e taninos totais presentes nas cascas, extrato bruto e frações semipurificadas de *Trichilia catigua*.

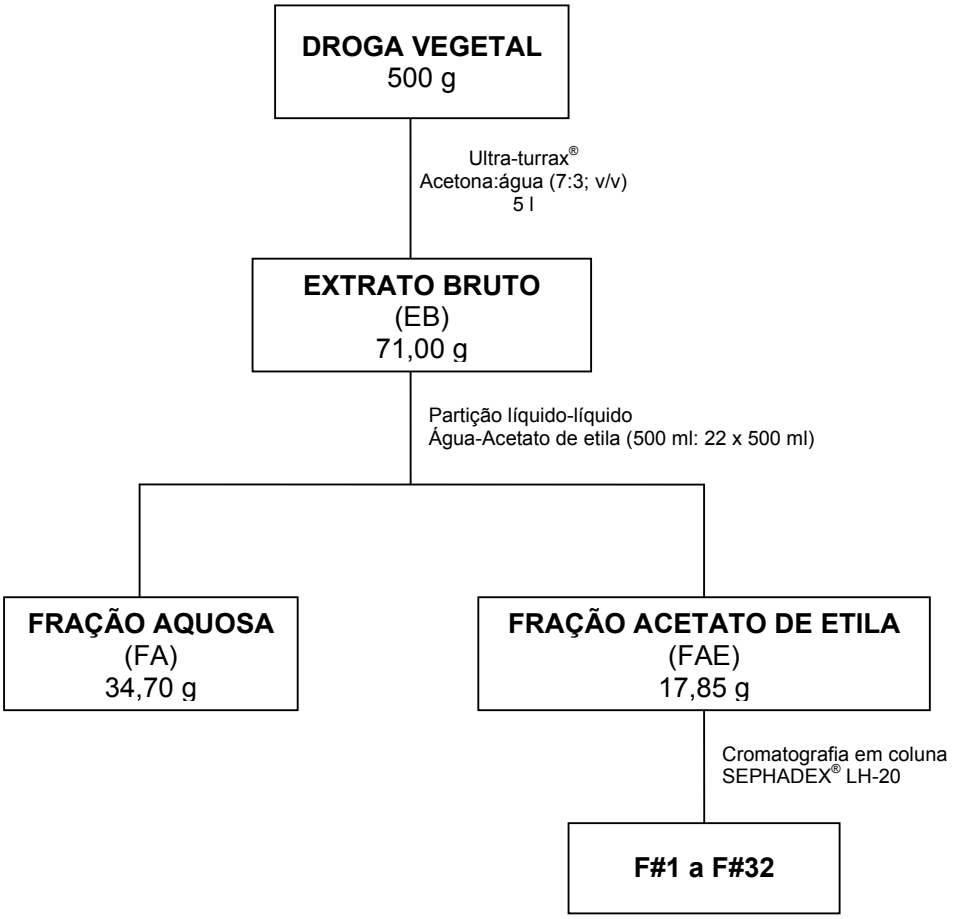
Amostra	Polifenóis totais (%)	Coeficiente de variação (%)	Taninos totais (%)	Coeficiente de variação (%)
Cascas	10,51 ± 0,17	1,61	6,96 ± 0,11	1,57
Extrato bruto (EB)	48,96 ± 1,28	2,63	38,89 ± 1,14	2,93
Fração acetato de etila (FAE)	90,98 ± 0,29	0,32	69,36 ± 0,49	0,70
Fração aquosa (FA)	44,17 ± 0,37	0,84	33,80 ± 0,30	0,89

5.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

Para a extração, optou-se pela turbo-extração, que se baseia na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, devido às forças de cisalhamento. O processo favorece a rápida dissolução das substâncias ativas tornando o método eficiente (VOIGT, 1993), o que soma simplicidade, rapidez e versatilidade, que permitem a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Utilizou-se para isto o Ultra-turrax® UTC 115 KT. Entre os inconvenientes causados pelo Ultra-turrax® encontram-se a geração de calor durante o processo e, posteriormente, a dificuldade de filtração, devido à fragmentação excessiva do material durante o processamento. Para controlar o problema da elevação da temperatura, foi realizada a técnica com duração de 15 min em três etapas de 5 min, com intervalos de 10 min entre cada etapa, para resfriamento do sistema. O solvente de escolha para a extração foi acetona:água (7:3; v/v), pois a acetona promove o bloqueio da associação tanino-proteína, tornando assim a extração quantitativamente maior (MELLO; SANTOS, 2003). Foi realizada filtração sob pressão reduzida em funil de Büchner, através do método de filtração por profundidade com tela de nylon de malha 0,182 μm, seguido por papel de filtro comum (gramatura de 94 g/m^2) e algodão. Após a filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente orgânico e liofilizado, rendendo 14,20% de um extrato marrom escuro, denominado extrato bruto.

Com o extrato bruto liofilizado (EB) produziu-se, por particionamento com acetato de etila, a fração acetato de etila (FAE) e a fração aquosa (FA). O rendimento de FA foi de 6,94% e FAE de 3,57% em relação à droga vegetal e de 25,14% e 48,86%, respectivamente, em relação ao extrato bruto. Houve perdas durante os processos de

extração, filtração, concentração e liofilização. A obtenção de extratos, frações e subfrações encontram-se no fluxograma 1.



Fluxograma 1 – Obtenção do extrato bruto, frações semipurificadas e fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila.

Realizou-se cromatografia em coluna contendo SEPHADEX® LH-20 com 13 g da FAE. O monitoramento foi executado por CCD, obtendo-se 32 subfrações (tabela 3) que foram reunidas por similaridade de manchas com coloração entre o azul e o marrom, de acordo com a figura 8.

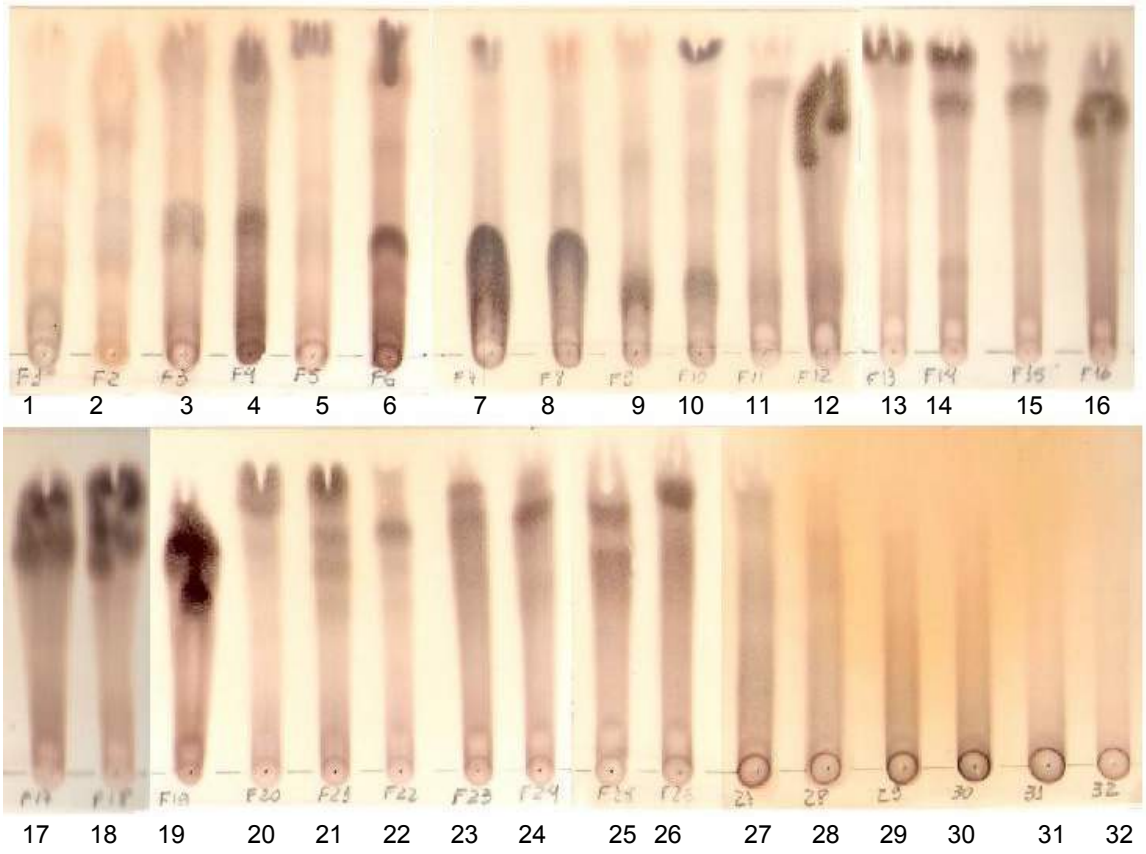


Figura 8 – Cromatografia em camada delgada, das 32 subfrações obtidas por CC em SEPHADEX® LH-20 da FAE (cromatofolha de alumínio com gel de sílica 60 F_{254} (Merck®), fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5) e sistema revelador solução etanólica de cloreto férrico a 1%).

Tabela 3 – Trinta e duas frações obtidas por cromatografia em coluna a partir da FAE.

Fração	Eluente (v/v)	Quantidade (g)	Rendimento em relação à FAE (%)
F#1	Etanol:água (3:7)	0,2488	1,91
F#2	Etanol:água (3:7)	0,2290	1,76
F#3	Etanol:água (3:7)	0,1861	1,43
F#4	Etanol:água (3:7)	0,0715	0,55
F#5	Etanol:água (3:7)	0,0586	0,45
F#6	Etanol:água (3:7)	0,0350	0,27
F#7	Etanol:água (3:7)	0,1213	0,93
F#8	Etanol:água (3:7)	0,1271	0,98
F#9	Etanol:água (3:7)	0,1247	0,96
F#10	Etanol:água (3:7)	0,3005	2,31
F#11	Etanol:água (3:7)	0,0955	0,73
F#12	Etanol:água (3:7)	0,2649	2,03
F#13	Etanol:água (3:7)	0,1099	0,84
F#14	Etanol:água (4:6)	0,2827	2,17
F#15	Etanol:água (4:6)	0,2028	1,56
F#16	Etanol:água (4:6)	0,2323	1,78
F#17	Etanol:água (4:6)	0,7989	6,13
F#18	Etanol:água (4:6)	0,3535	2,71
F#19	Etanol:água (4:6)	1,2754	9,80
F#20	Etanol:água (5:5)	0,4346	3,34
F#21	Etanol:água (5:5)	0,5876	4,51
F#22	Etanol:água (5:5)	0,8489	6,52
F#23	Etanol:água (5:5)	0,2502	1,92
F#24	Etanol:água (5:5)	0,4986	3,83
F#25	Etanol:água (7:3)	0,5241	4,02
F#26	Etanol:água (7:3)	0,7069	5,43
F#27	Etanol	0,0818	0,63
F#28	Metanol:água (5:5)	0,0967	0,74
F#29	Metanol	0,6328	4,78
F#30	Acetona:água (7:3)	0,3917	3,01
F#31	Acetona:água (7:3)	0,1184	0,91
F#32	Acetona:água (7:3)	0,0288	0,22
Total		10,3214	79,16

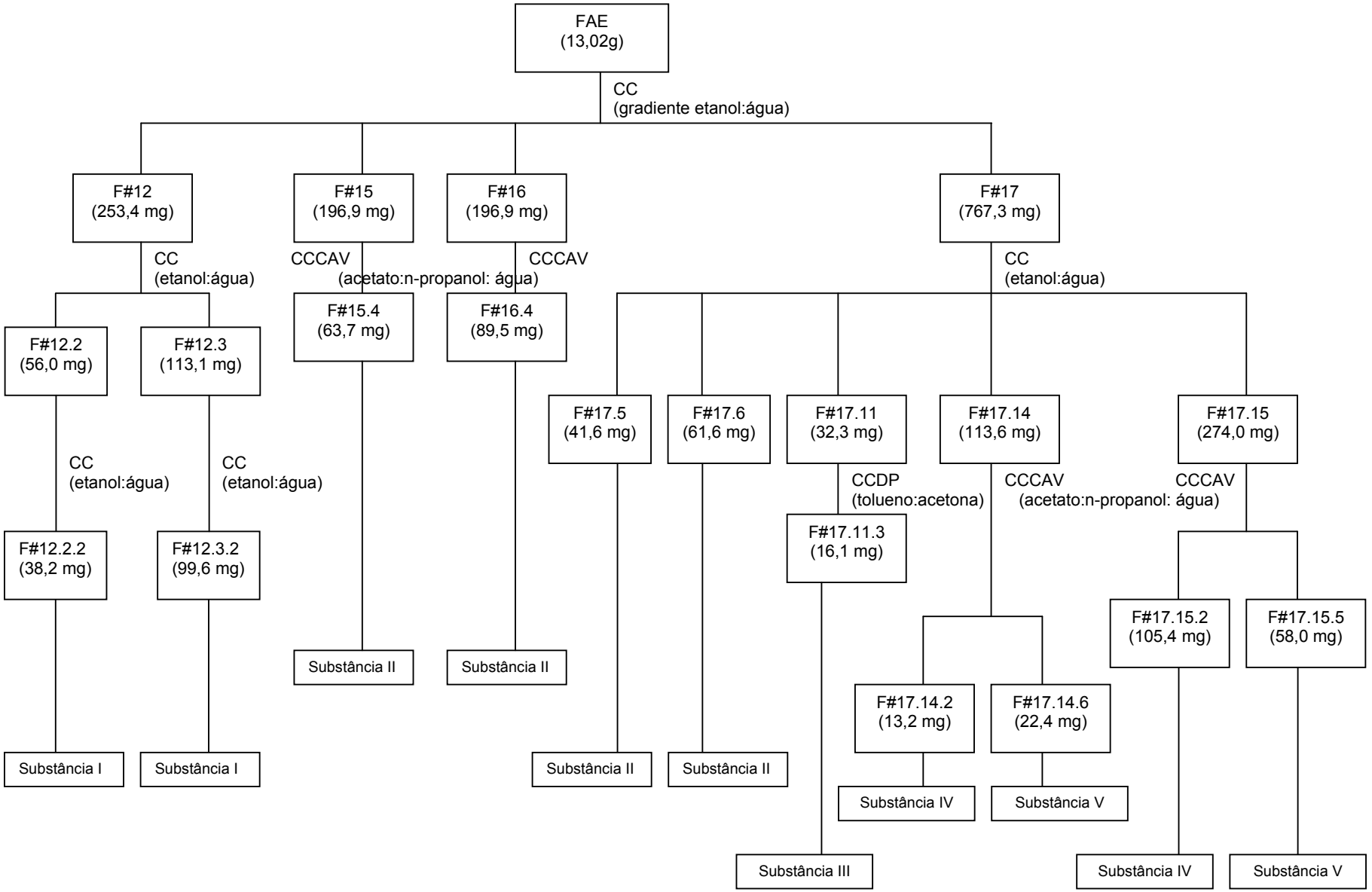
No fracionamento realizado em SEPHADEX® LH-20, espera-se que as substâncias com maiores pesos moleculares apareçam nas frações iniciais. Porém o observado para taninos é a predominância de substâncias de peso molecular menor nas primeiras frações

(THOMPSON *et al.*, 1972). Os autores sugerem ainda que isso provavelmente se deva à interação entre monômeros de taninos e o sistema eluente, ocorrendo a eluição seqüencial de monômeros > dímeros > trímeros > tetrâmeros >oligômeros > polímeros. A configuração dos dímeros influencia o fracionamento, sendo observado que as ligações 4β→8 e 4β→6 interagem antes com o sistema eluente (etanol) que as ligações 4α→8 e 4α→6 (THOMPSON *et al.*, 1972).

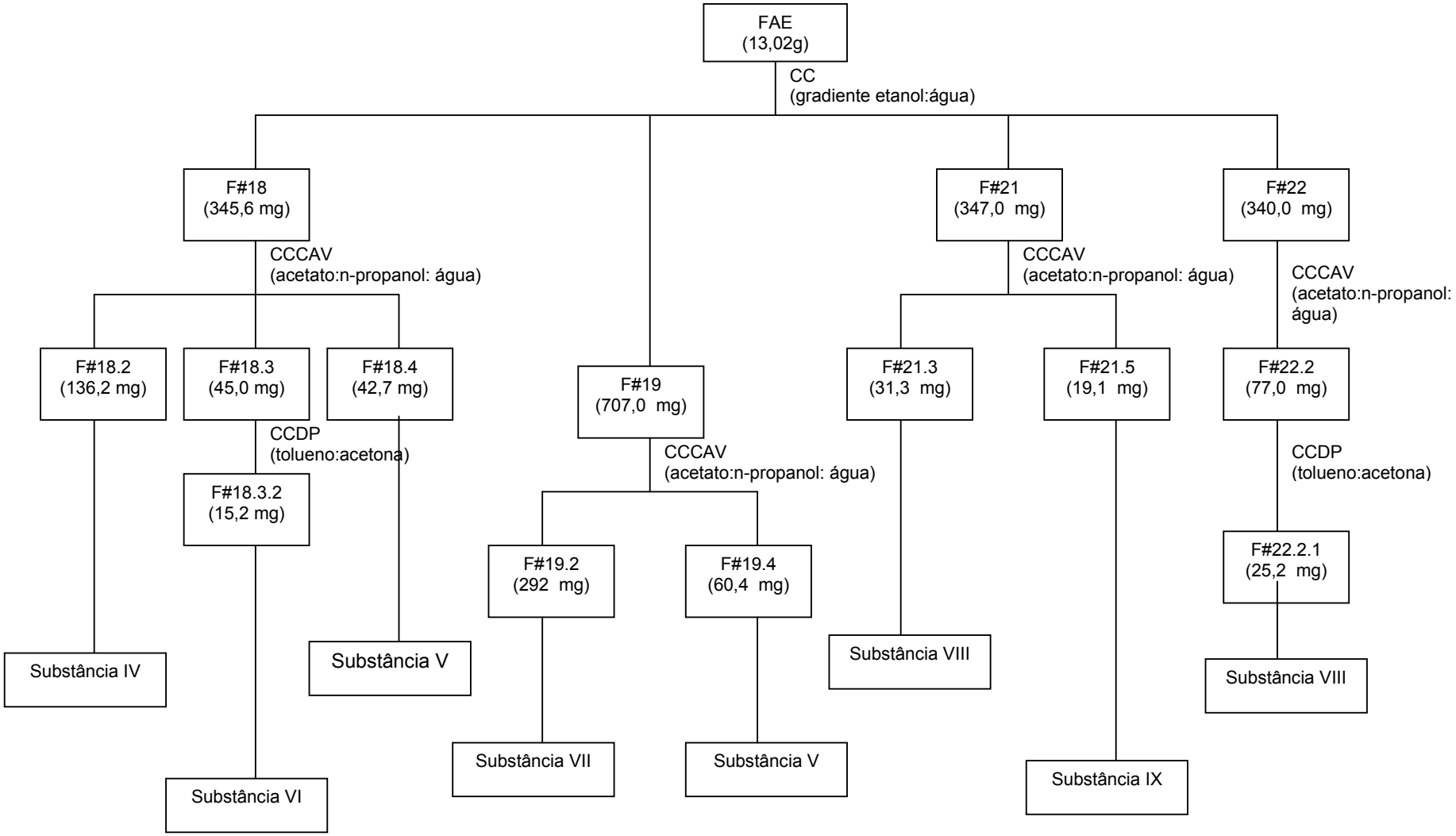
Na tentativa de isolar e identificar taninos condensados, iniciou-se o fracionamento com as subfrações F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8, F#10, F#11, F#12, F#14 e F#17 em cromatografia em coluna (CC) em SEPHADEX® LH-20. As subfrações F#10.2, F#12.2 e F#12.3 obtidas também foram refracionadas por CC. Posteriormente, submeteu-se à cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV) as subfrações F#15, F#16, F#17.14, F#17.15, F#18, F#19, F#21, F#22 e F#26.

As CC das subfrações F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8, F#10, F#10.2 e F#14 foram realizadas sem êxito, devido à pequena quantidade de fração ou, em alguns casos devido à contaminação de substâncias isoladas por solventes impuros, durante a etapa de derivatização química. Dessa maneira, não foi possível a identificação de qualquer substância proveniente destas. Além disso, não foi possível a purificação de substâncias a partir da CCCAV da F#26, devido, provavelmente, ao maior grau de polimerização das substâncias presentes nesta fração, que dificulta o processo de separação.

Os processos de refracionamento das demais subfrações renderam nove sustâncias isoladas e identificadas, conforme demonstrado no fluxograma 2.



Fluxograma 2 – Substâncias obtidas por diferentes métodos cromatográficos a partir da FAE.



Fluxograma 2 – Substâncias obtidas por diferentes métodos cromatográficos a partir da FAE (continuação).

5.2.1 Substâncias Isoladas

5.2.1.1 **Substância I – Epicatequina**

Cerca de 11 mg da subfração F#12.2.2 e 12 mg da F#12.3.2 foram derivatizados (seção 4.6), analisados por RMN e então denominados de **substância I**.

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

O espectro de RMN ^1H (fig. 9), da **substância I** acetilada mostra para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) uma constante de acoplamento $J_{H\text{-}2,H\text{-}3}$ menor que 1 Hz, comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (WEINGES *et al.*, 1969). O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta constante de acoplamento pequena com o hidrogênio H-4_{ax}(C) no valor de 2,1 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento com H-4_{eq}(C) de 4,2 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância I** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges *et al.* (1968b e 1969) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2(C) e H-3(C), com valor entre 8 a 10 Hz demonstra uma configuração relativa *trans*, e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1 Hz a ordem *cis.* Entre δ 7,18 e 7,33 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', comprovando a diidroxilação no anel B, como pode ser observado na tabela 5. Nesse espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 6,55 e δ 6,65 ppm. O espectro de RMN ^1H foi realizado em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), por se tratar de uma substância acetilada. Na tabela 4 encontram-se os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento.

Tabela 4 – Dados de RMN ^{1}H da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	*δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4_{ax}	2,86	2,89	*dd*	$^{2}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}4eq}$ = 18,0 $^{3}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}3}$ = 2,1
H-4_{eq}	2,96	3,00	*dd*	$^{2}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}4eq}$ = 18,0 $^{3}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}3}$ = 4,2
H-2	5,09	5,12	*sl*	
H-3	5,35-5,37	5,41	*m*	
H-6	6,55	6,59	*d*	$^{4}J_{H\text{-}6\text{-}H\text{-}8}$ = 2,4
H-8	6,65	6,69	*d*	$^{4}J_{H\text{-}8\text{-}H\text{-}6}$ = 2,4
H-5’	7,18	7,21-7,31	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4
H-2’	7,33	7,21-7,31	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8
H-6’	7,25	7,21-7,31	*d*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 8,4 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}2'}$ = 1,8

*Ueffing (1988).

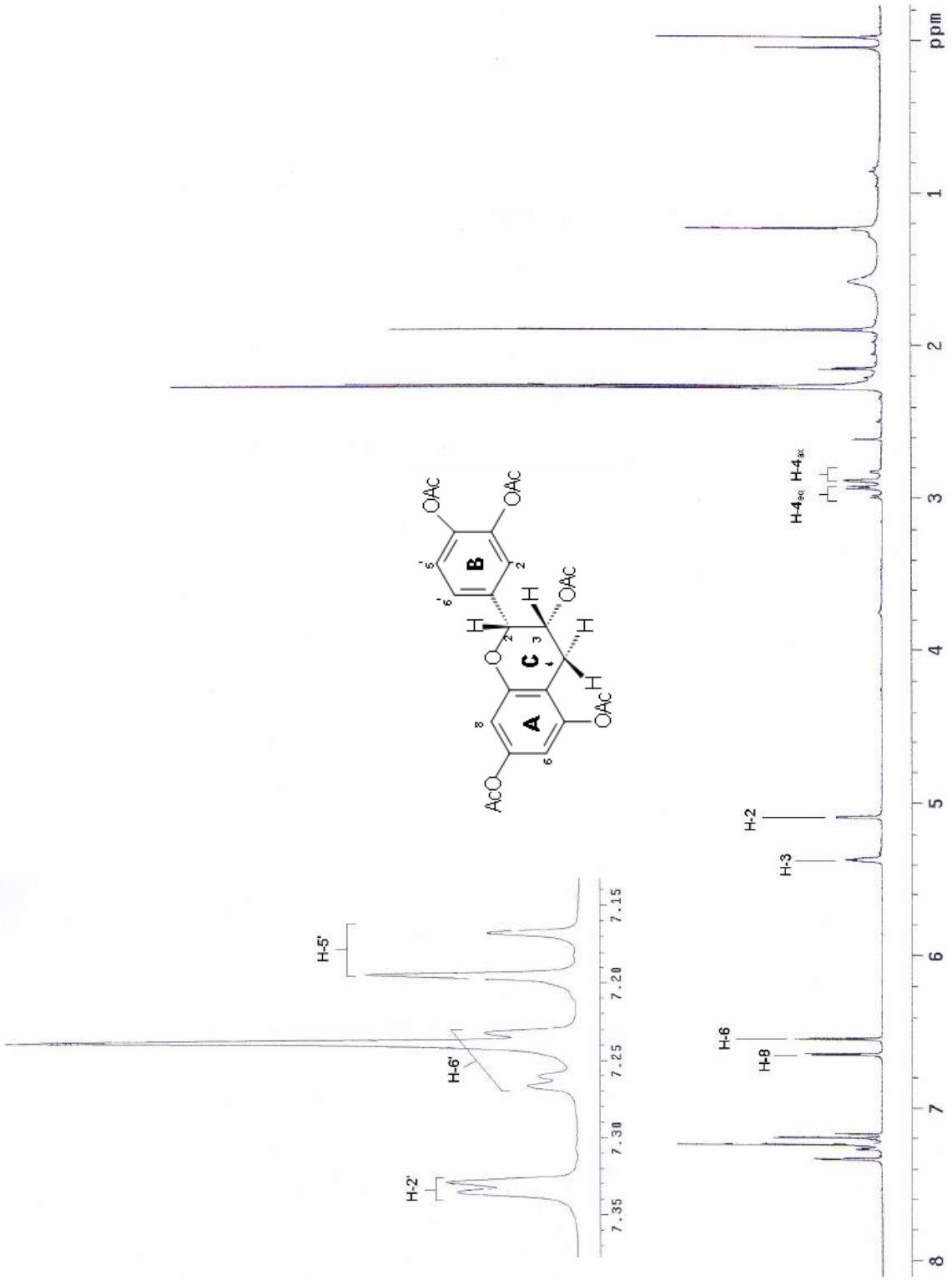


Figura 9 – RMN ^{1}H da substância I acetilada (300 MHz; $CDCl_3$ relativo para TMS).

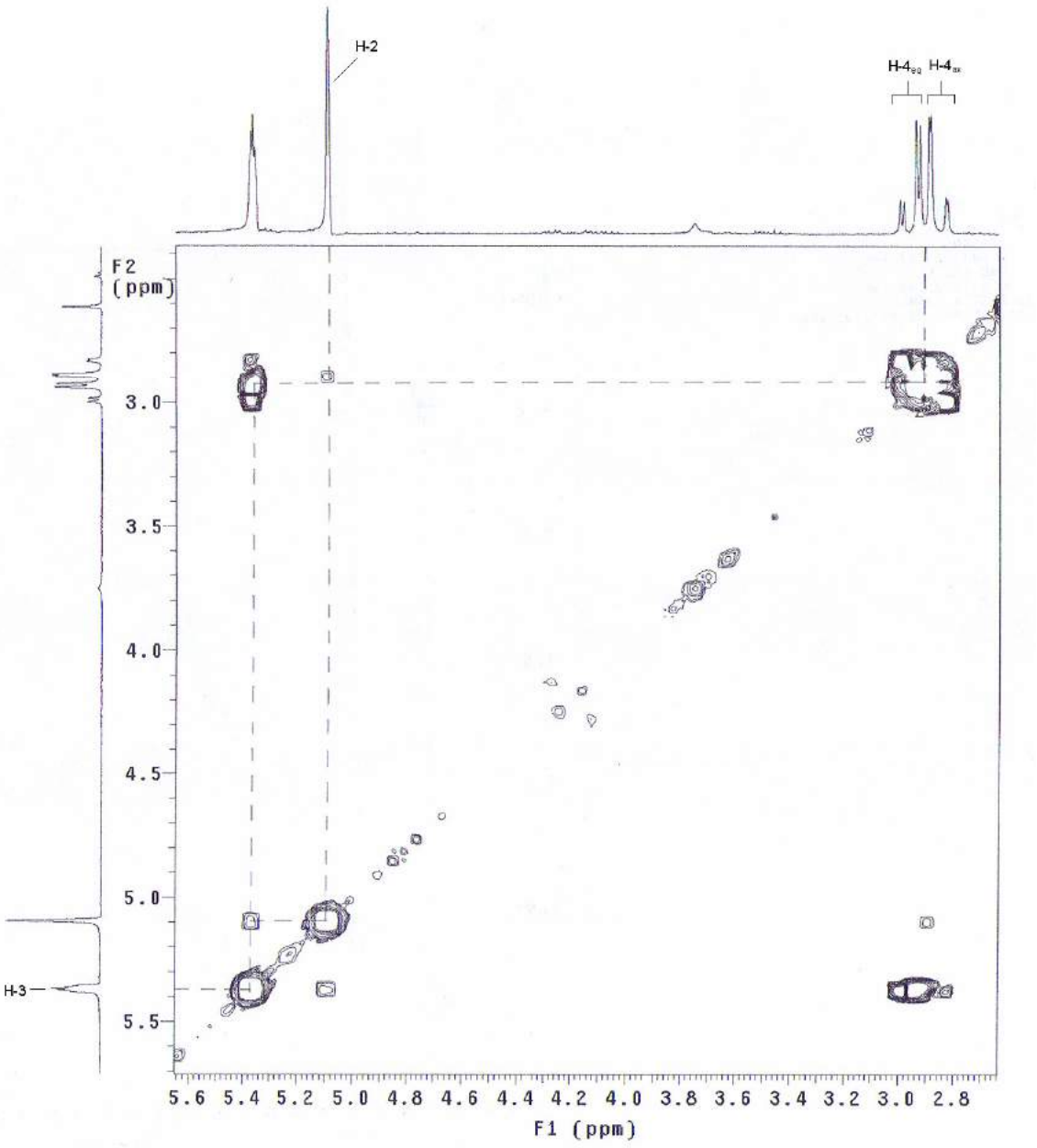


Figura 10 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

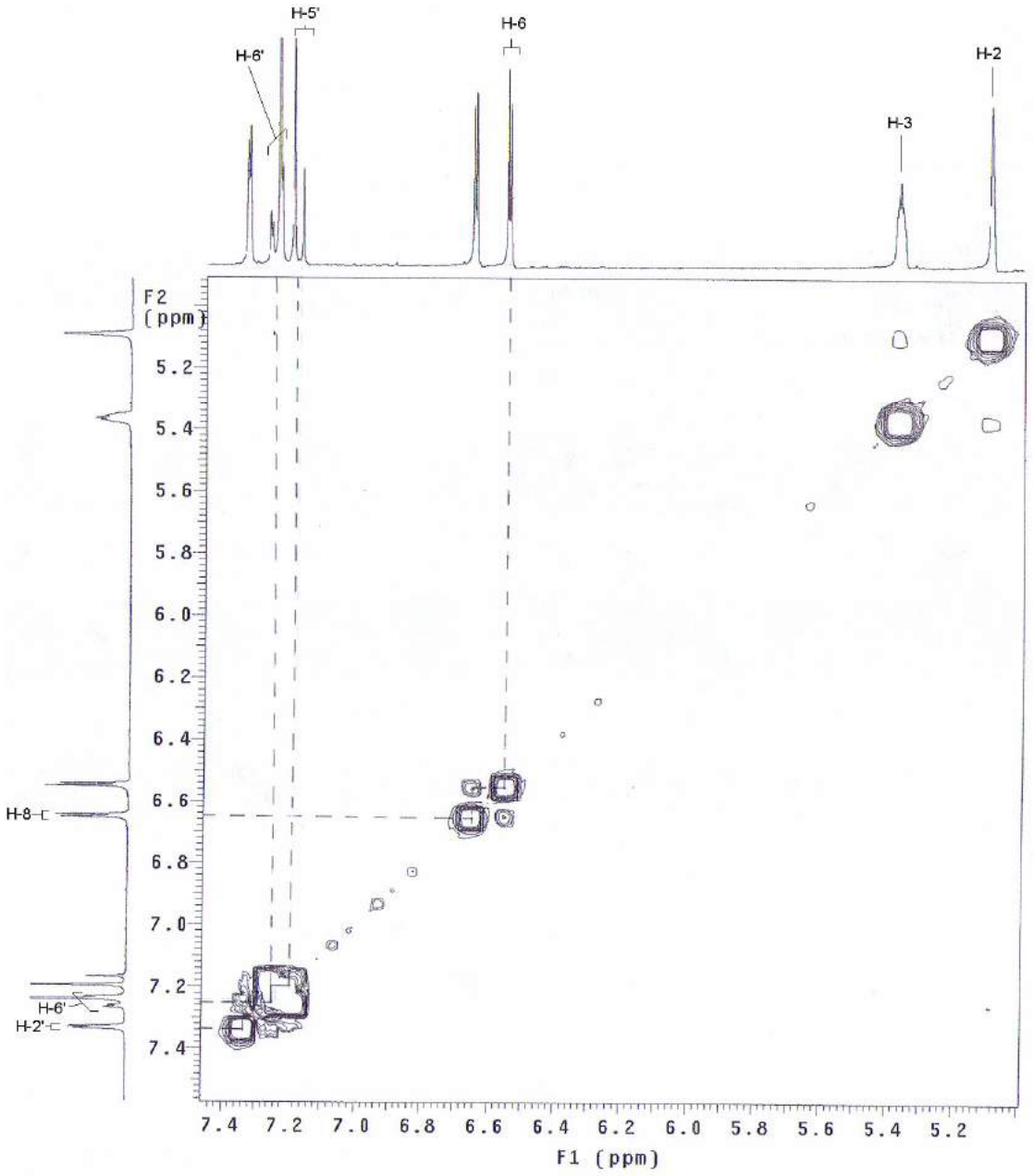


Figura 11 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância I** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

Os espectros de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H) (fig. 10 e 11) mostram as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância I**. A estereoquímica da substância não derivatizada foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°}$ = -8º (metanol; c=0,1). De acordo com Danne (1994b), o valor obtido para a epicatequina foi de $[\alpha]_D^{20°}$ = -20,1º (acetona com a substância acetilada; c=0,04). Pode-se concluir, assim, que a **substância I**, possui a configuração absoluta 2*R*, 3*R*.

De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas e os dados espectroscópicos (tab. 4, fig. 9, 10 e 11) e pela comparação com os dados da literatura, confirma-se a **substância I** como sendo epicatequina (fig. 12). Apesar desta substância ser encontrada em diversas espécies vegetais de diferentes famílias botânicas, esta é a primeira vez que a mesma é descrita na espécie *T. catigua*.

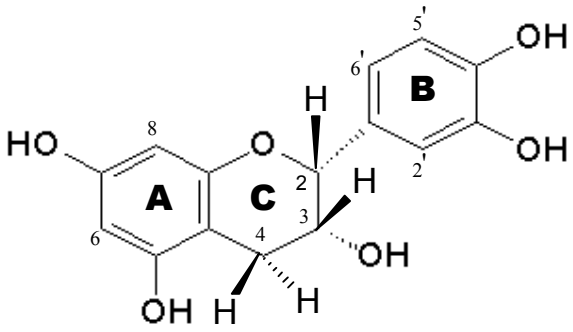


Figura 12 – Estrutura da **substância I**, epicatequina.

5.2.1.2 **Substância II – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina B_2)**

Cerca de 15 mg da subfração F#15.4, 15 mg da F#16.4, 19 mg da F#17.5 e 14 mg da F#17.6 foram derivatizados (seção 4.6), analisados por RMN e então denominados de **substância II**.

A **substância II** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$ = 577,4 e $[M+Na^+]^+$= 601,5 (fig. 13) característico de substâncias diméricas livres de catequina/epicatequina (*m/z*= 578).

O espectro de RMN ^1H em $CDCl_3$ (fig. 13) da **substância II** 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 5.

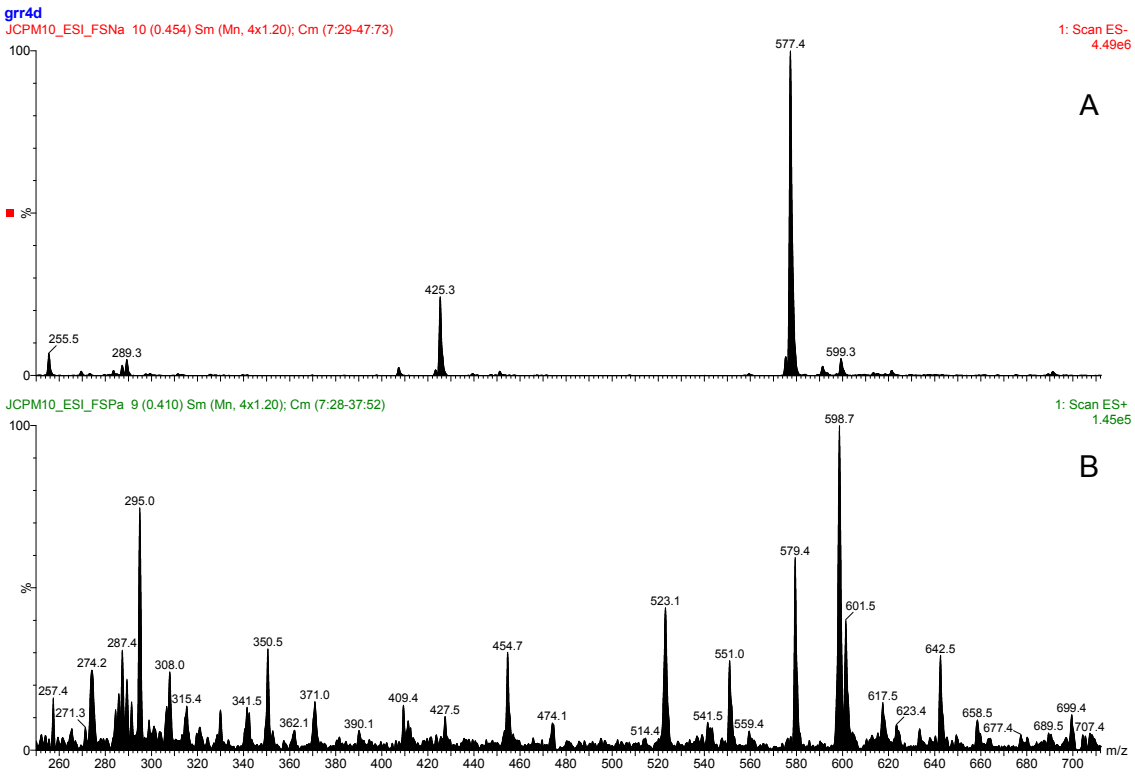


Figura 13 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância II**.

Tabela 5 – Dados de RMN ^{1}H da **substância II** 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 2,88-2,92	*m*	
H-4(C)	4,46	4,46	*d*	$^{3}J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}3}$ = 1,8
H-2(F)	4,54	4,54	*sl*	
H-3(F)	5,10-5,11	5,10	*m*	
H-3(C)	5,15-5,17	5,16	*m*	
H-2(C)	5,58	5,57	*sl*	
H-6(A)	5,99	5,99	*d*	$^{4}J_{H\text{-}6\text{-}H\text{-}8}$ = 2,1
H-8(A)	6,24	6,24	*d*	$^{4}J_{H\text{-}8\text{-}H\text{-}6}$ = 2,1
H-6(D)	6,66	6,66	*s*	
H-6'(E)	6,89	6,89	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 8,4 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H2'}$ = 2,1
H-2'(E)	7,01	7,01	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H6'}$ = 2,1
H-5'(E)	7,04	7,04	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4
H-5'(B)	7,18	7,17	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4
H-6'(B)	7,28	7,29	*dd**	
H-2'(B)	7,36	7,36	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H6'}$ = 1,8

*um dubleto está parcialmente encoberto pelo solvente CDCl3; **Ushirobira, 2003

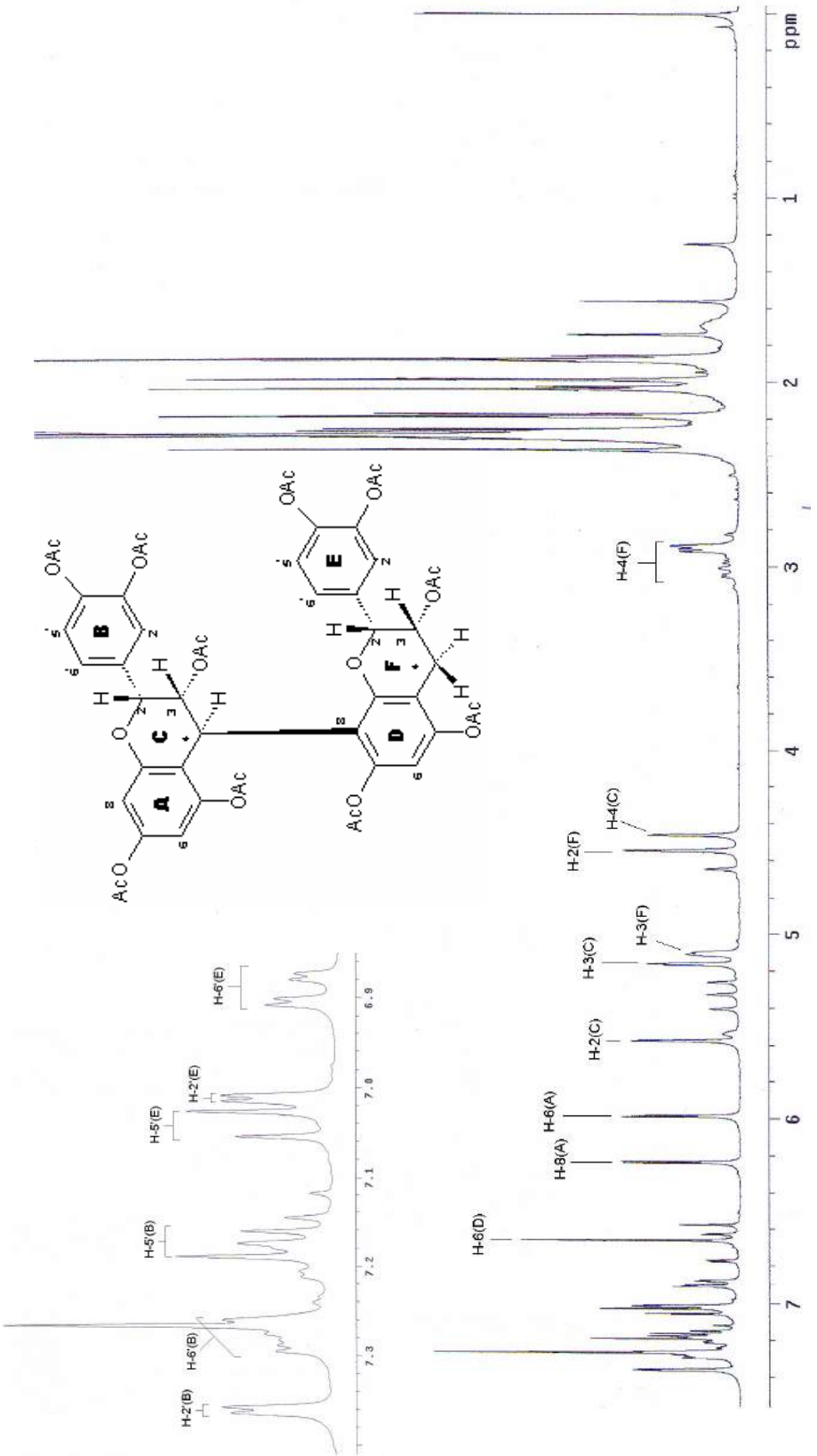


Figura 14 – RMN ^{1}H da **substância II** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$ relativo para TMS).

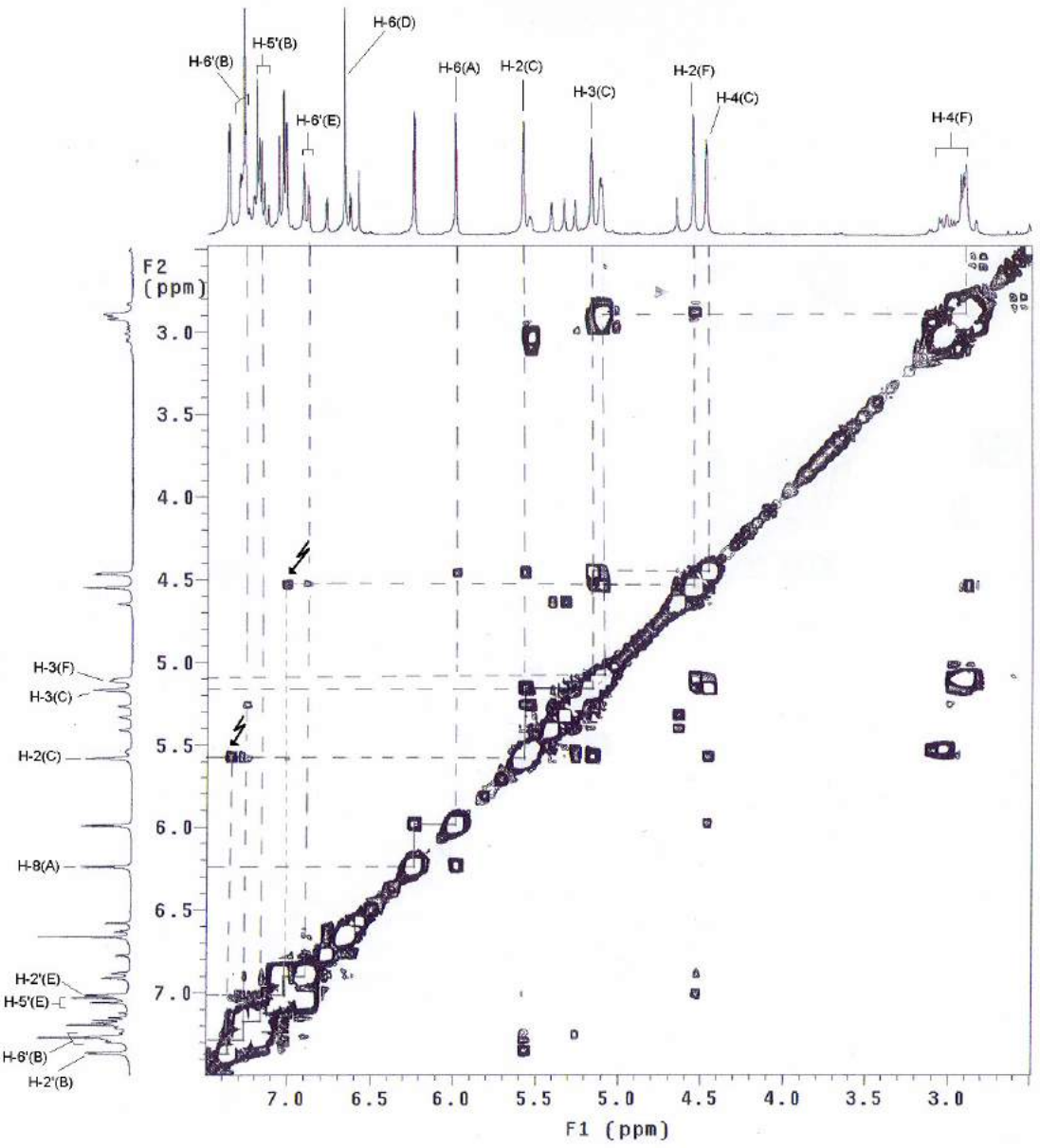


Figura 15 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância II** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

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 $J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}3}$ = 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-*trans*. 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*, também, para a unidade inferior. É perfeitamente visível, no espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H - fig. 15), a correlação de todos estes 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 ^{1}H-^{1}H (fig. 15).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 5,99 e 6,24 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H\text{-}6\text{-}H\text{-}8}$ = 2,1 Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,66 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej e colaboradores (1989), os deslocamentos dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração absoluta do tipo 4*R*.

Além disso, Weinges e colaboradores (1968b) demonstraram que as procianidinas B_1 e B_2 apresentam uma constante de acoplamento pequena entre H-3 e H-4 da unidade superior ($J_{H3\text{-}H\text{-}4}$ ≤ 2,0 Hz), comprovando uma posição 3,4-*trans*. Dessa maneira, a configuração é compatível tanto como 4*S* como 4*R*. Para corroborar com uma possível afirmação do tipo de ligação entre as unidades, superior e inferior, Hör e colaboradores (1995) afirmam que o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre δ 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4→8). O que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de δ 4,54, obedecendo a essa regra. Outro dado significativo citado por Fletcher *et al.* (1977) e Hemingway *et al.* (1982) é a presença significativa de sinais de rotâmeros predominantes para moléculas diméricas com ligações 4β→8, como o que pode ser observado no espectro de RMN ^{1}H (fig. 14). Dessa forma, a **substância II** possui uma configuração do tipo 2*R*, 3*R* e 2*R*', 3*R'*, para as unidades superior e inferior, respectivamente.

De acordo com Thompson *et al*. (1972), o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior de procianidinas diméricas pode ser definida através das bandas de dicroísmo circular em 275 nm. Estes autores demonstraram que procianidinas com configuração absoluta 4*R* apresentam um efeito *Cotton* positivo em 275 nm e procianidinas com configuração 4*S* apresentam bandas opostas, ou seja, efeito negativo em 275 nm. Além disso, Danne *et al.* (1994a) observaram que procianidinas diméricas com ligação do tipo β entre as unidades superior e inferior e, portanto, com configuração absoluta 4*R*, apresentam efeito *Cotton* positivo também entre 220 e 240 nm. Mello *et al.* (1996a) observaram que prodelfinidinas diméricas substituídas em C-3, tanto na unidade inferior, mais comum, como na unidade superior, com ligação do tipo β entre as unidades e, portanto, com configuração absoluta 4*R*, apresentaram um efeito *Cotton* negativo não esperado entre 220 e 240 nm e na região de 275 nm. As substâncias diméricas substituídas em C-3 da unidade inferior, com configuração absoluta 4*S*, ou ligação α entre as unidades, não sofreram alterações no efeito *Cotton* nas regiões citadas anteriormente.

A **substância II** apresentou no espectro de dicroísmo circular efeito *Cotton* positivo nas regiões de 220-240 nm e 275 nm, confirmando uma configuração absoluta 4*R*. A estereoquímica da substância não derivatizada foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°} = +3°$ (metanol; c=0,1). Portanto, pode-se afirmar que a **substância II** trata-se da procianidina B_2 (fig. 16), **epicatequina-(4β→8)-epicatequina**.

Esta é a primeira vez que esta substância é citada para a espécie vegetal *T. catigua*, tendo sido isolada em diversas outras espécies vegetais, como em *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*.

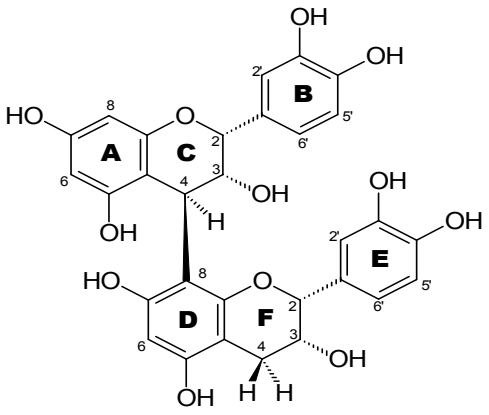


Figura 16 – Estrutura da **substância II**, epicatequina-(4β→8)-epicatequina (procianidina B_2).

5.2.1.3 **Substância III – Catequina-(4α→8)-epicatequina (Procianidina B_4)**

Cerca de 24 mg da subfração F#17.11 foram derivatizados (seção 4.6) e submetidos a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), obtendo-se 3 novas subfrações. A fração F#17.11.3 mostrou evidências em CCD de se tratar de uma substância dimérica, devido ao valor de Rf= 0,33. Após a análise por RMN e espectrometria de massas, esta subfração foi denominada de **substância III**.

A **substância III** apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$ = 997,5 e $[M+Na^+]^+$ = 1021,5 (fig. 17) característico de substâncias diméricas derivatizadas de catequina/epicatequina (*m/z*= 998).

O espectro de RMN ^1H em $CDCl_3$ (fig. 18) da **substância III** forneceu dados representativos de uma substância fenólica do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 6.

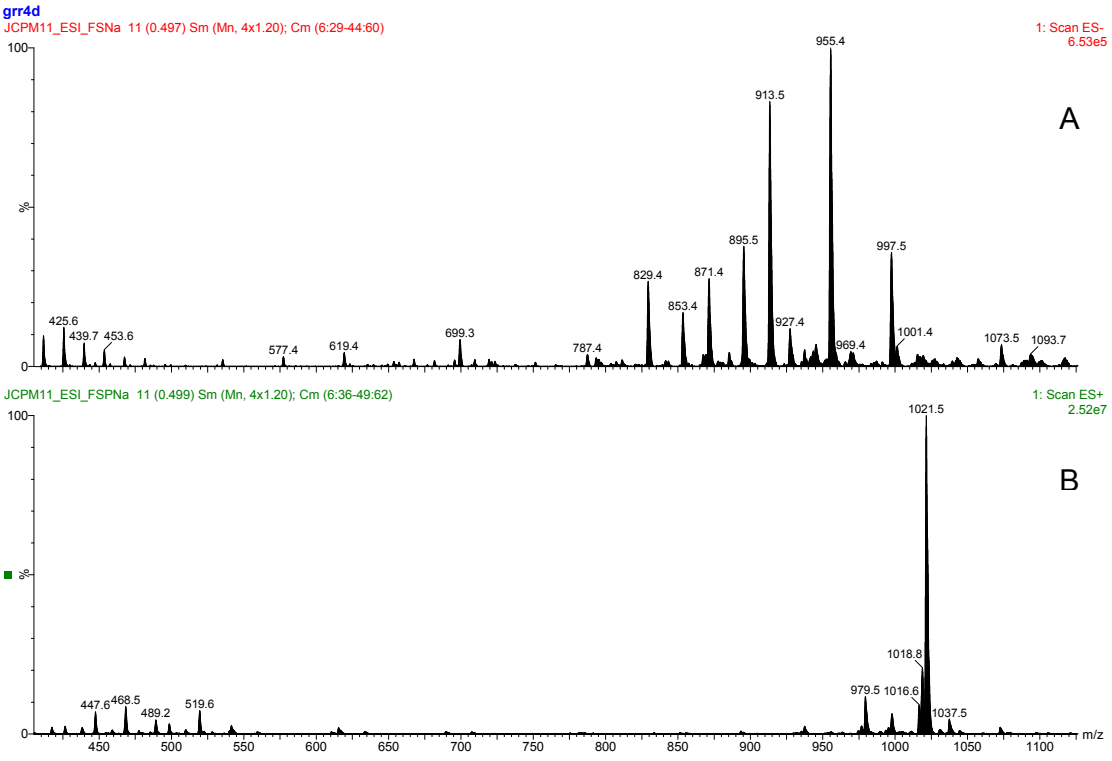


Figura 17 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância III**.

Tabela 6 – Dados de RMN ^{1}H da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	*δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4_{ax} (F)	2,75	2 x 2,91	*dl*	$^{2}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}4eq}$ = 18,0
H-4_{eq} (F)	3,02	2 x 2,91	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}3}$ = 4,8 $^{2}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}4ax}$ = 18,0
H-4 (C)	4,52	4,52	*d*	$^{3}J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}3}$ = 9,6
H-2 (C)	4,82	4,85	*d*	$^{3}J_{H\text{-}2\text{-}H\text{-}3}$ = 9,9
H-2 (F)	5,01	5,01	*sl*	
H-3 (F)	5,18-5,23	5,18	*m*	
H-3 (C)	5,72	5,67	*t***	Σ*J* = 19,5
H-6 (A)	6,53	6,52	*d*	$^{4}J_{H\text{-}6\text{-}H\text{-}8}$ = 2,4
H-8 (A)	6,58	6,55	*d*	$^{4}J_{H\text{-}8\text{-}H\text{-}6}$ = 2,4
H-6 (D)	6,63	6,60	*s*	
H-2’ (E)	6,85	6,85-7,30	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 2,1
H-6’ (B e E)	6,89-6,92	6,85-7,30	*m*	
H-2’ (B)	6,97	6,85-7,30	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 2,1
H-5’ (E)	7,10	6,85-7,30	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4
H-5’ (B)	7,15	6,85-7,30	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4

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

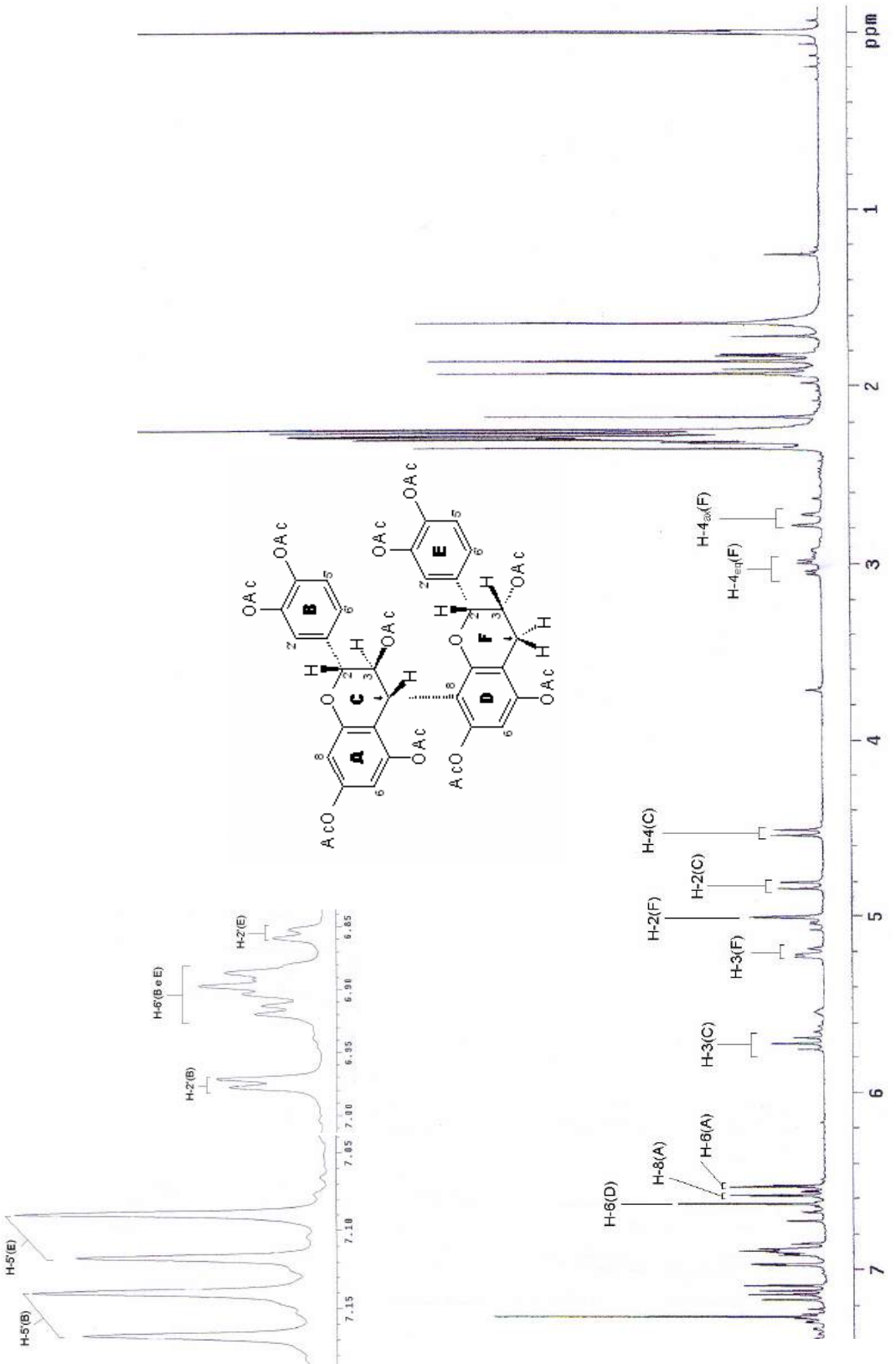


Figura 18 – RMN ^{1}H da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$ relativo para TMS).

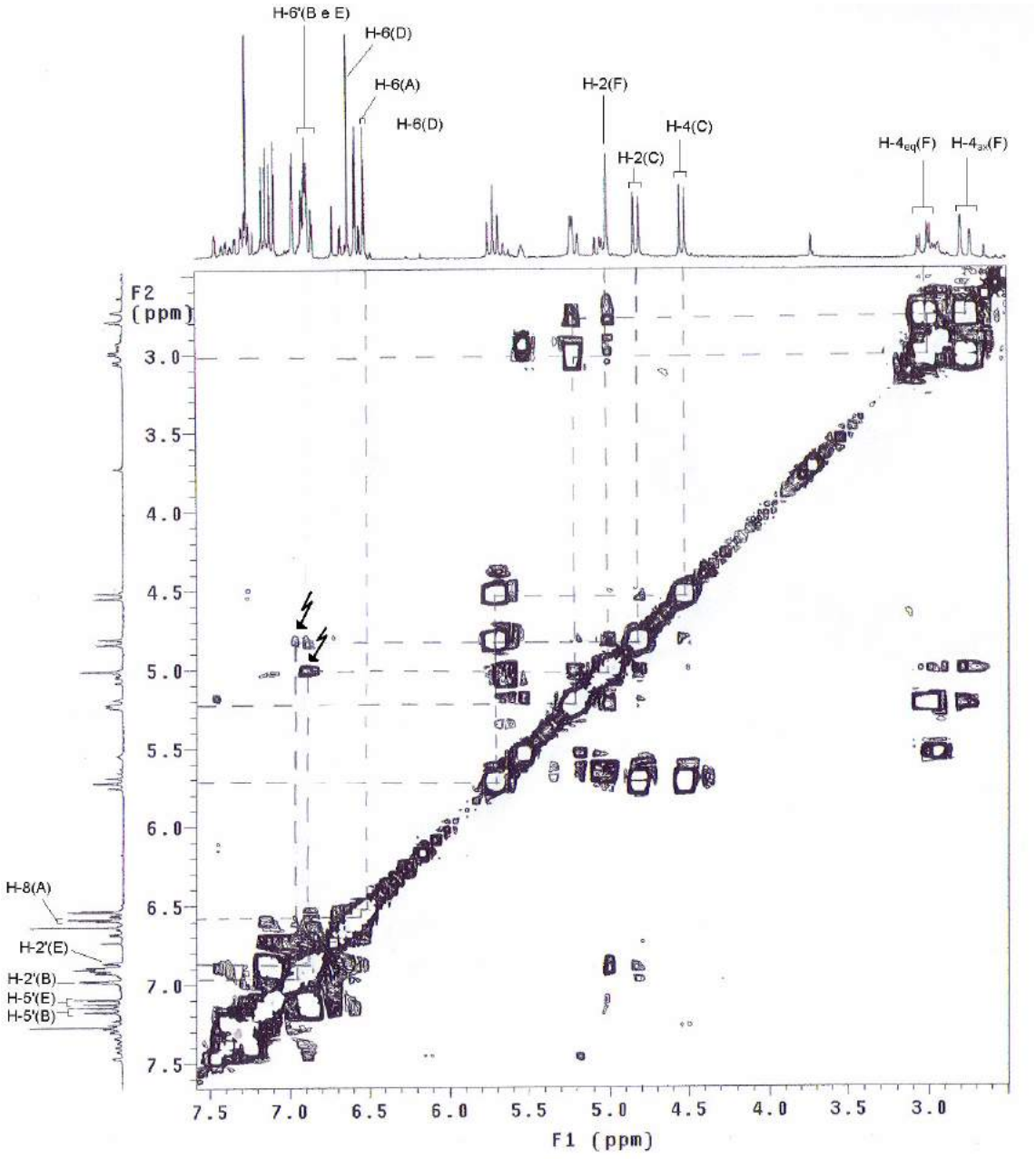


Figura 19 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância III** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4_{ax}(F) e H-4_{eq}(F), sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 2,75 e 3,02 ppm, respectivamente. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,52 ppm. Sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é grande de $J_{H-3-H-4}$ = 9,6 Hz. Enquanto que o acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante de 9,9 Hz. Esses dados referentes aos hidrogênios alifáticos da unidade superior estabelecem uma configuração do tipo 2,3-*trans*, 3,4-*trans*.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,21 e 5,01 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis*, para a unidade inferior. No espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H) (fig. 19), pode-se observar a correlação entre todos os 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 (anel E) e H-6' da unidade superior (anel B), através do espectro de COSY ^{1}H-^{1}H. Assim, foi possível estabelecer a correlação entre o H-2(C) com H-2'(B) e H-2(F) com H-2'(E), através do espectro de COSY ^{1}H-^{1}H (fig. 19).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 6,53 e 6,58 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{H-6-H-8}$ = 2,4 Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,63 ppm, apresenta-se como um singleto. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej e colaboradores (1989), o deslocamento dos hidrogênios do anel A estão de acordo com uma configuração do tipo 4*S*. Portanto, pode-se afirmar que a ligação entre as unidades superior e inferior seja do tipo 4α.

Como observado na **substância III**, o posicionamento do hidrogênio H-2(F) entre 4,37 e 5,04 ppm indica uma ligação do tipo (4→8) (HÖR *et al.*, 1995), o que pode ser observado para essa substância é exatamente um valor de 5,01. Outro dado característico refere-se à posição de H-3(C) em δ 5,72 ppm. O deslocamento do hidrogênio alifático H-3 e a proporção rotamérica de 1:1, é característico de ligações do tipo α entre as unidades superior e inferior. Dessa forma, a **substância III** possui uma configuração do tipo 2*R*,3*S* e 2*R*',3*R*', para as unidades superior e inferior, respectivamente. A estereoquímica da substância derivatizada foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°}$ = -14,6° (acetona; c=0,13). A configuração absoluta só poderá ser totalmente confirmada através da determinação de dicroísmo circular. Entretanto, Ueffing (1988) isolou e identificou essa mesma substância, a partir de *Tilia* sp., com dados de

dicroísmo circular. Por comparação entre os dados obtidos neste trabalho e o da **substância III**, pode-se afirmar que a mesma trata-se da procianidina B_4 (fig. 20), **catequina-(4α→8)-epicatequina**. Esta substância não foi, até o presente momento, isolada da espécie *Trichilia catigua* ou mesmo no gênero *Trichilia*, tendo sido obtida de outras espécies vegetais como *Paullinia cupana* var. *sorbilis*.

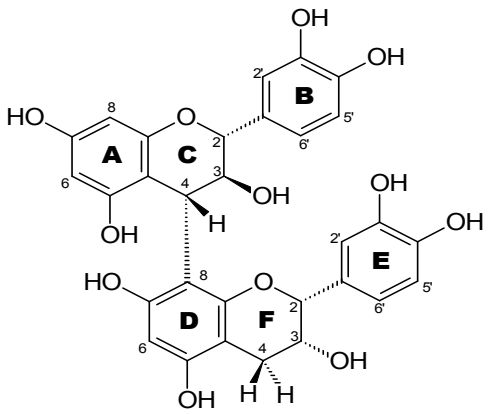


Figura 20 – Estrutura da **substância III**, catequina-(4α→8)-epicatequina (Procianidina B_4).

5.2.1.4 **Substância IV – Cinchonaína Ia**

Cerca de 10 mg da F#17.14.2, 16 mg da subfração F#17.15.2 e 16 mg da F#18.2 foram derivatizados (seção 4.6), analisados por RMN, espectrometria de massas, dicroísmo circular e então denominados de **substância IV**.

A **substância IV** livre apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$= 451,4 e $[M+Na^+]^+$= 475,3 (fig. 21), característico de substâncias do tipo catequina/epicatequina (*m/z*= 290) acrescidas de uma unidade fenilpropanóide.

A análise dos espectros de RMN ^1H (fig. 22), RMN ^{13}C (fig. 24), RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 23) e das correlações heteronucleares 2D HMQC e HMBC (fig. 25) da **substância IV** derivatizada em acetona-d_6 forneceu dados representativos de uma substância fenilpropanóide derivada da epicatequina (*m/z*= 452). Além disso, a **substância IV** livre foi também submetida à análise por RMN em CD_3OD para comparação dos dados com a literatura. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento e as correlações heteronucleares HMQC e HMBC da **substância IV** acetilada podem ser observados na tabela 7 e os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento da **substância IV** livre encontram-se na tabela 8.

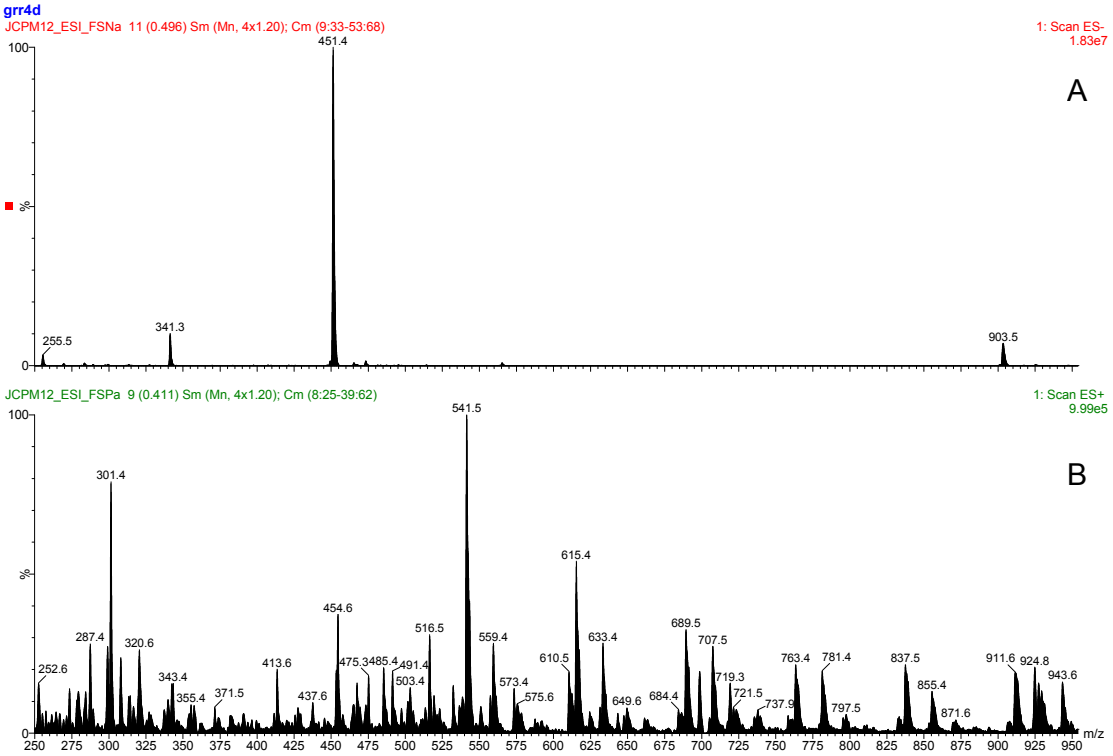


Figura 21 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância IV**.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da **substância IV** acetilada**,** incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).

H/ C	δ (ppm) ^{1}H	Multiplicidade	*J* (Hz)	δ (ppm) ^{13}C	^{1}H- ^{13}C HMBC- $_{n}J_{CH}$	
					$_{2}J_{CH}$	$_{3}J_{CH}$
2	5,20	*sl*		77,6	C-3, C-1’	
3	5,42-5,45	*m*		67,1	C-10	
4	2,72 (ax)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}3}$ = 1,5 $^{2}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}4eq}$ = 16,2	26,6	C-3, C-10	C-2, C-5, C-9
	2,99 (eq)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}3}$ = 4,5 $^{2}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}4ax}$ = 16,2		C-10	C-5, C-9
5				150,7		
6	6,50	*s*		104,8	C-5, C-7	C-8, C-10
7				151,7		
8				111,5		
9				152,6		
10				109,9		
1’				137,1		
2’	7,33	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8	122,8	C-3’	C-2, C-6’
3’				143,3		
4’				143,1		
5’	7,11	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4	124,2	C-4’	C-1’
6’	7,25	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 8,4 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}2'}$ = 1,8	125,4		C-2, C-2’, C-4’
1’’				141,3		
2’’	6,93	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 2,4	125,3		C-4’’, C-7’’
3’’				143,5		
4’’				142,5		
5’’	6,90	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 8,1	123,1		C-3’’
6’’	6,98	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 8,1 $^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 2,4	124,9		C-4’’
7’’	4,75	*dl*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 6,0	35,1	C-1’’, C-8’’, C-8	C-2’’, C-9’’, C-7
8’’	3,24 (ax)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8'ax'\text{-}H\text{-}7''}$ = 7,5 $^{3}J_{H\text{-}8''ax\text{-}H\text{-}8''eq}$ = 16,2	36,7	C-7’’, C-9’’	C-1’’
	2,90 (eq)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''eq\text{-}H\text{-}7''}$ = 1,8 $^{3}J_{H\text{-}8''eq\text{-}H\text{-}8''ax}$ = 16,2		C-7’’, C-9’’	C-1’’, C-8
9’’				167,3		

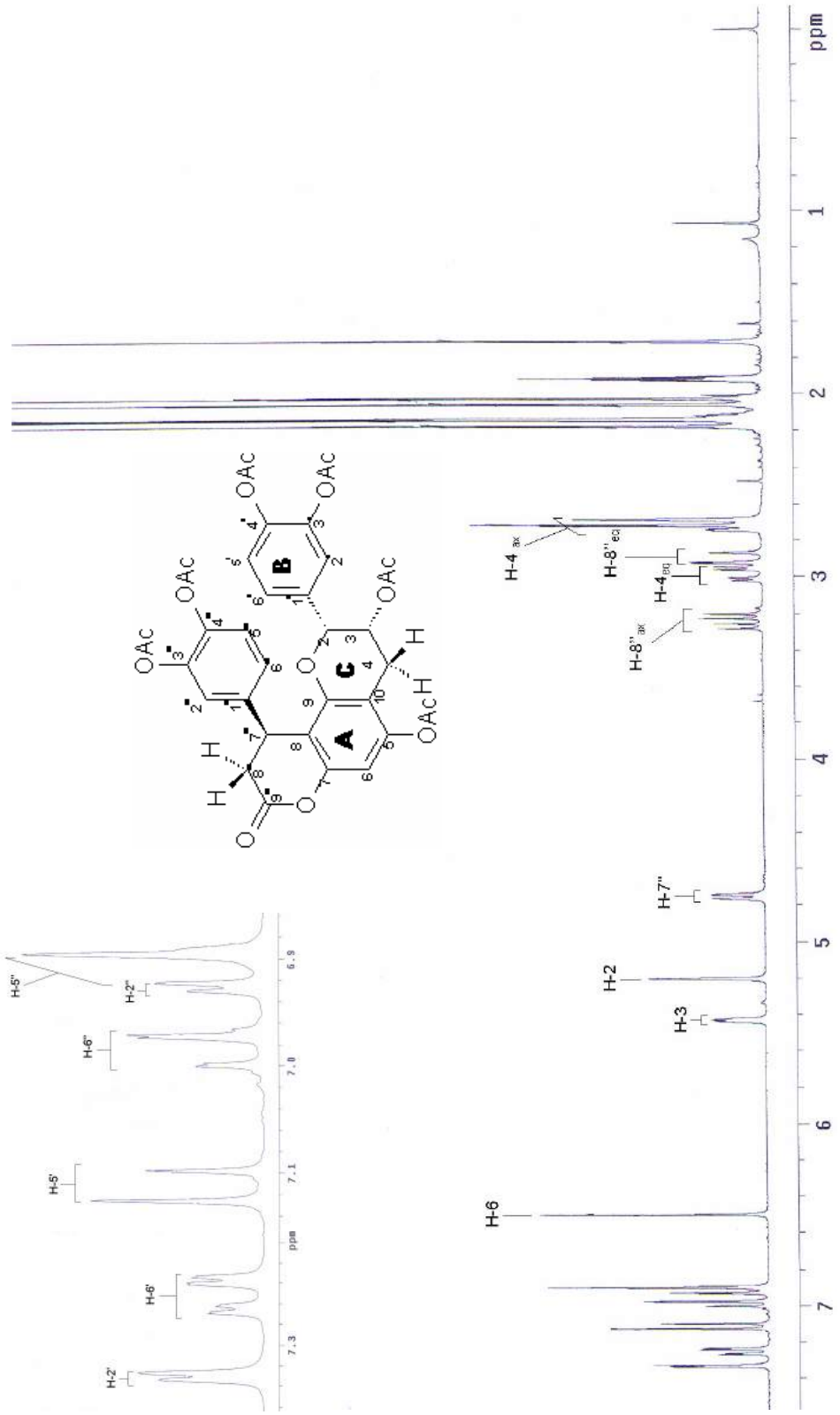


Figura 22 – RMN H^1 da **substância IV** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

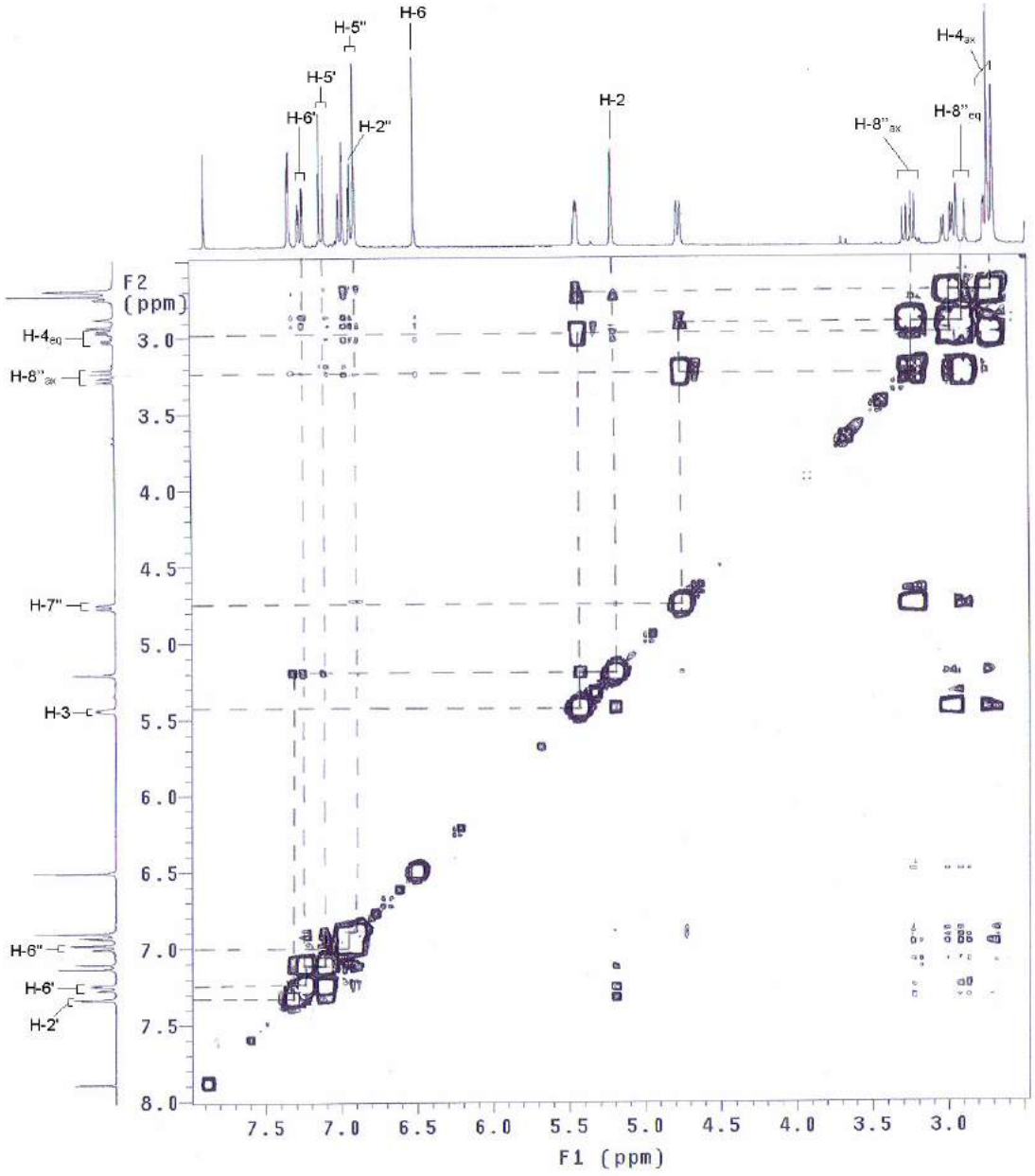


Figura 23 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância IV** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

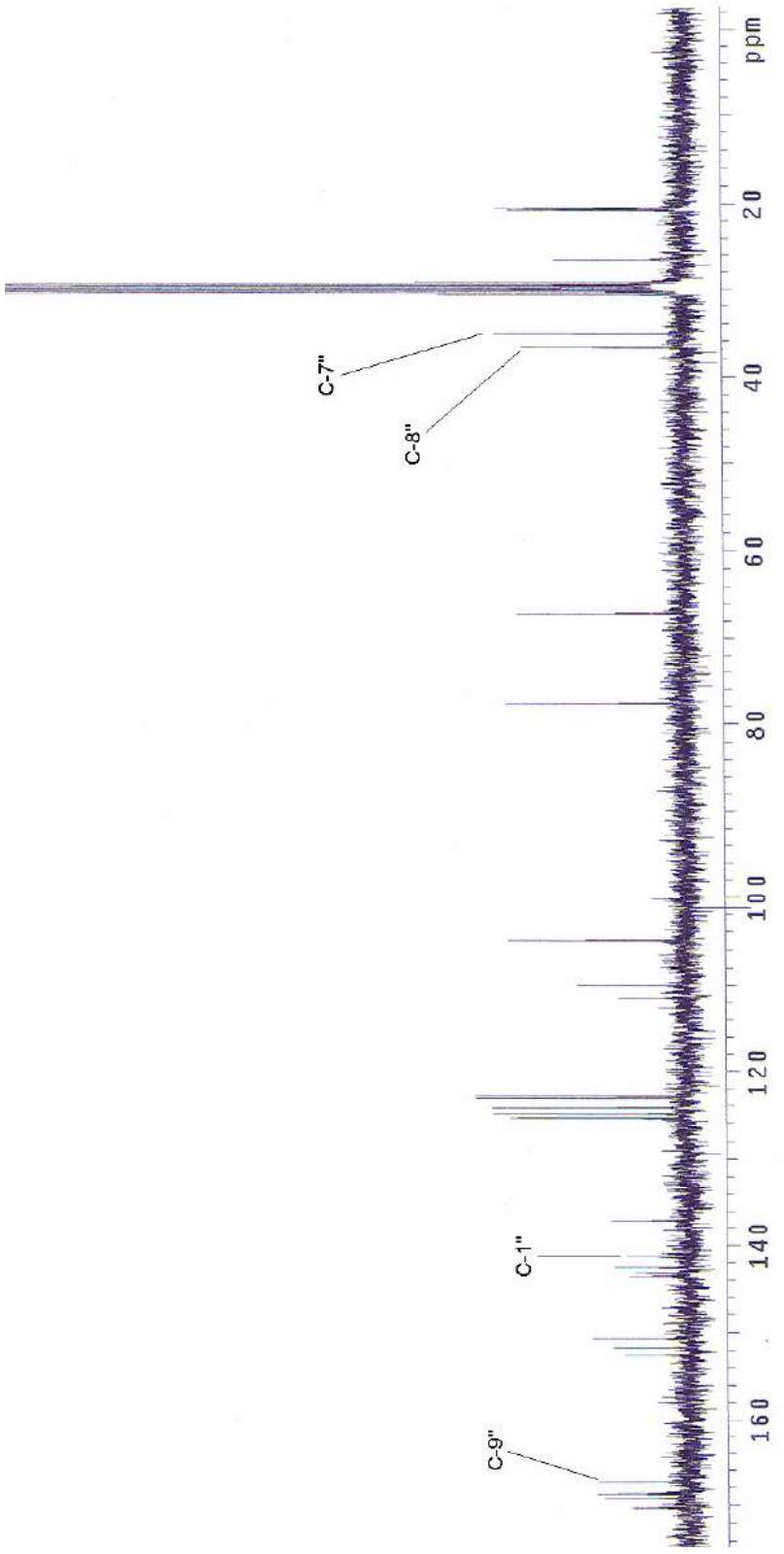


Figura 24 –RMN ^{13}C da **substância IV** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

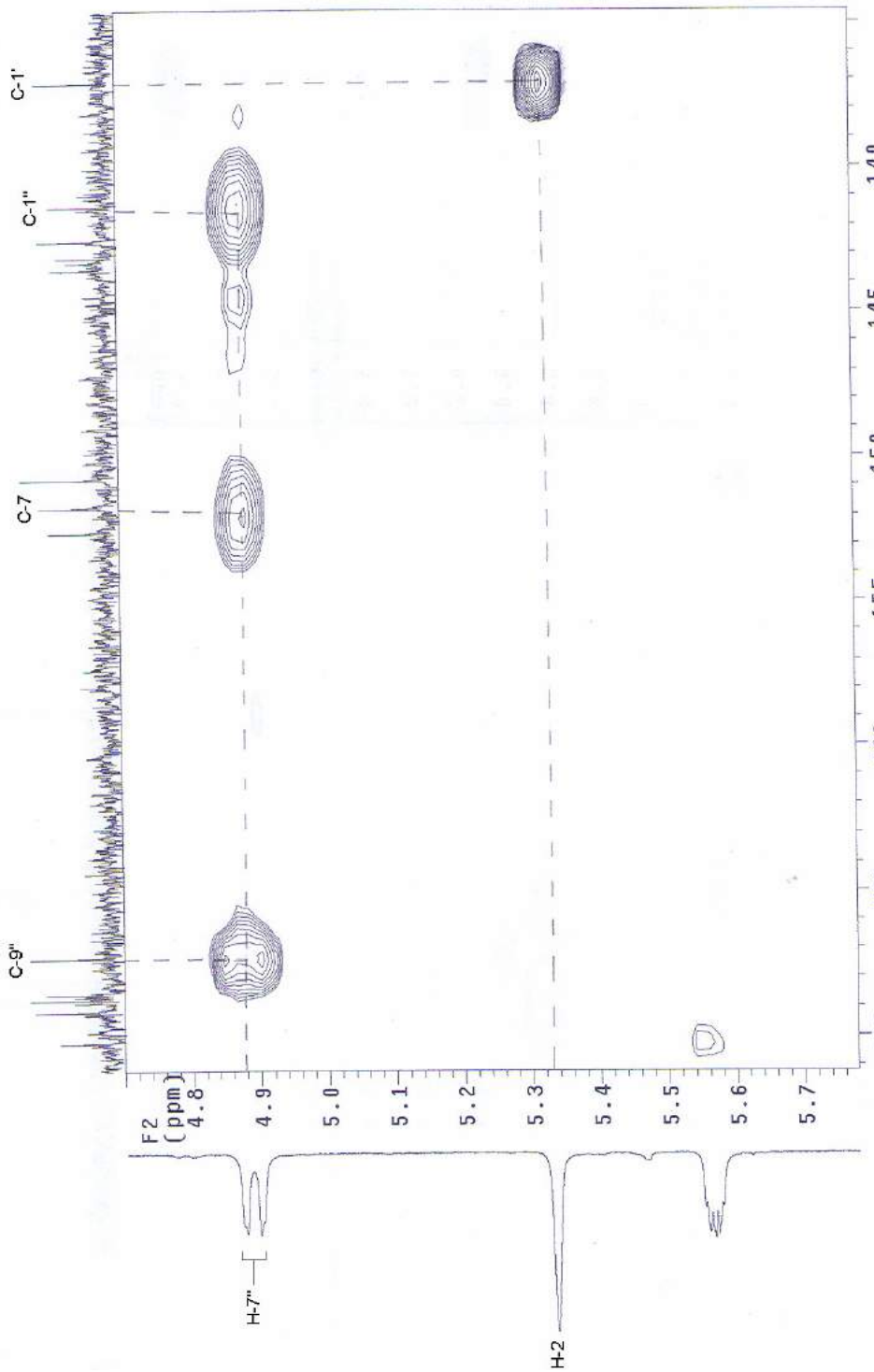


Figura 25 – Correlação heteronuclear HMBC da **substância IV** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da **substância IV** livre (300 MHz; CD_3OD, relativo para TMS).

H/ C	δ (ppm) ^{1}H	*δ Literatura (ppm) ^{1}H	Multiplicidade	*J* (Hz)	δ (ppm) ^{13}C	*δ Literatura (ppm) ^{13}C
2	4,84	4,85	*sl*		79,7	80,08
3	4,23-4,25		*m*		66,5	66,91
4	2,87-2,94	2,88	*m*		29,4	28,27
5					157,3	157,18
6	6,20	6,23	*s*		96,2	96,44
7					152,0	151,95
8					106,0	106,13
9					153,4	153,40
10					105,2	105,21
1'					131,9	129,98
2'	6,97	6,83	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8	115,0	114,99
3'					145,1	146,27
4'					145,7	147,60
5'	6,75	6,69	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,1	115,9	115,94
6'	6,78	6,61	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 8,1 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}2'}$ = 1,8	119,1	119,20
1''					135,4	133,78
2''	6,52	6,63	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 2,1	114,9	115,32
3''					146,3	148,78
4''					145,9	148,49
5''	6,60	6,63	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 8,1	116,5	116,56
6''	6,44	6,54	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 8,1 $^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 2,1	119,2	119,32
7''	4,54	4,43	*dl*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 5,4	35,3	34,18
8''	3,05 (ax)	2,98	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8'ax'\text{-}H\text{-}7''}$ = 6,9 $^{3}J_{H\text{-}8''ax\text{-}H\text{-}8''eq}$ = 7,2	38,6	37,30
	2,82-2,87 (eq)		*m*			
9''					170,8	167,71

*Pizzolatti *et al.*, 2002a

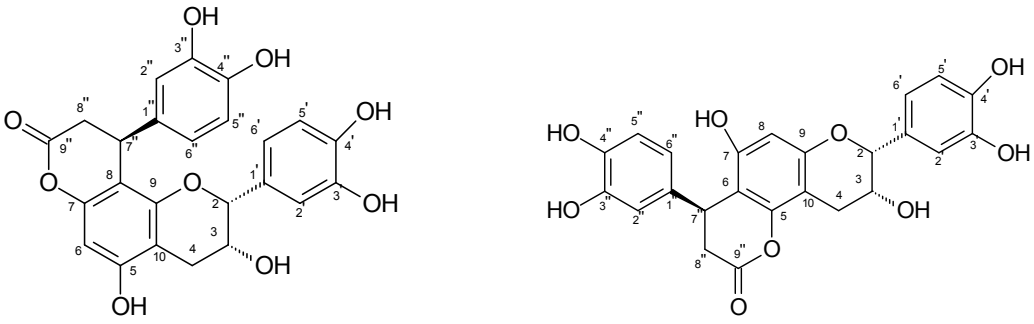
A existência de um substituinte fenilpropanóide ligado no anel A da unidade flavan-3-ol pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (fig. 24), onde aparecem sinais atribuídos a uma carbonila (C-9'') em δ 167,3 ppm, um grupo metileno α em relação à carbonila (C-8'') em δ 36,7 ppm, um carbono metínico β em relação à carbonila (C-7'') em 35,1 ppm e um anel aromático dihidroxilado.

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da porção epicatequina H-4_{ax} e H-4_{eq}, bem como os hidrogênios alifáticos da porção fenilpropanóide, H-8''$_{eq}$ e H-8''$_{ax}$. Os hidrogênios H-4_{ax} e H-4_{eq} se apresentam com deslocamentos em δ 2,72 e 2,99 ppm, respectivamente; enquanto que os hidrogênios H-8''$_{eq}$ e H-8''$_{ax}$ se apresentam com deslocamentos em δ 2,90 e 3,24 ppm, respectivamente, no espectro da substância acetilada em acetona-d_6 (fig. 22).

Os hidrogênios alifáticos da porção epicatequina, H-3(C) e H-2(C), apresentam deslocamentos em δ 5,43 e 5,20 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis*, para esta parte da molécula. Já o hidrogênio alifático H-7'' apresenta deslocamento em δ 4,75 ppm, aparecendo como um dubleto largo, teoricamente representando um duplo-dubleto, com constantes de acoplamento de 6 Hz entre H-7'' e H-8''$_{ax}$ e inferior a 1 Hz entre H-7'' e H-8''$_{eq}$ (fig. 22). No espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H - fig. 23), pode-se observar a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nas unidades monoméricas do tipo catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. Assim foi possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios aromáticos através do espectro de COSY ^{1}H-^{1}H, bem como a correlação entre o H-2(C) e H-2'(B) da parte epicatequina.

Segundo Nonaka e Nishioka (1982), a localização da unidade fenilpropanóide ligada ao anel A da unidade epicatequina pode ser determinada através do espectro de RMN ^{13}C. Quando a unidade fenilpropanóide se encontra ligada no carbono 8 do anel A da unidade flavan-3-ol (fig. 26, estrutura 1), este carbono se desloca para campos mais baixos em relação ao carbono 6. Já quando a ligação do fenilpropanóide ocorre em C-6 (fig. 26, estrutura 2), este carbono se desloca para campos mais baixos, enquanto C-8 se desloca para campos mais altos.

No espectro de RMN ^{13}C da **substância IV** acetilada, o carbono C-8 aparece com deslocamento δ em 111,6 (campo mais baixo) e C-6 aparece em δ 104,8 (campo mais alto). O mesmo ocorre no espectro da substância livre, em que C-8 aparece em δ 106,0 e C-6 em δ 96,2. Portanto, a **substância IV** trata-se de um flavan-3-ol substituído por um fenilpropanóide em C-8.



1 2

Figura 26 – Estruturas cinchonaínas Ia (1), substituída em C-8 e cinchonaína Id (2), substituída em C-6.

A posição do anel aromático da porção fenilpropanóide, pode ser definida através dos deslocamentos do hidrogênio H-2 e dos hidrogênios do anel aromático da porção flavan-3-ol. Na cinchonaína Ia, em que este anel se encontra em posição β (fig. 26), os sinais de H-2 e dos hidrogênios do anel B, coincidem com os sinais encontrados para os mesmos hidrogênios da epicatequina, ou seja, o anel fenilpropanóide em posição β não provoca efeitos de blindagem ou desblindagem sobre os hidrogênios da porção flavan-3-ol. Já na cinchonaína Ib (anel em posição α), estes hidrogênios sofrem efeitos anisotrópicos, provocando o deslocamento de H-2 para campos mais baixos e dos hidrogênios do anel B para campos mais altos (NONAKA; NISHIOKA, 1982; revisado por CHEN *et al.*, 1993). Para se fazer tal comparação, é necessário comparar espectros de RMN ^{1}H feitos com os mesmos solventes. Tal comparação é apresentada na tabela 9, onde se pode observar que os sinais de H-2 e H-2'(B) apresentam os mesmos valores de deslocamento químico tanto na **substância IV**, quanto na epicatequina.

Os efeitos anisotrópicos descritos anteriormente, podem ser observados através da análise do modelo de Dreiding.

Nonaka e Nishioka (1982) acreditaram inicialmente que esta estrutura se tratava da cinchonaína Ib. Entretanto, após novos estudos, Chen *et al.* (1993) chegaram à conclusão que a mesma tratava-se da cinchonaína Ia.

Tabela 9 – Comparação entre deslocamentos de hidrogênios da **substância IV** e da epicatequina no espectro de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$).

H	Sustância IV δ (ppm)	Epicatequina δ (ppm)
H-2	5,09	5,09
H-2'(B)	7,33	7,33
H-5'(B)	7,06	7,18
H-6'(B)	7,01	7,25

A estereoquímica da substância livre foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20^\circ}$ = -35 ° (metanol; c=0,1). Além disso, realizou-se espectroscopia de dicroísmo circular para confirmação da estereoquímica da **substância IV** (fig. 24). Segundo Chen *et al*. (1993), a observação dos espectros de dicroísmo circular nos comprimentos de onda de 234, 255 e 280 nm permite estabelecer a configuração do carbono β-metínico (C-7''). Quando o hidrogênio β-metínico (H-7'') se encontra em posição α, observa-se um efeito *Cotton* negativo em 234 e 280 nm e um efeito positivo em 255 nm. Já quando H-7'' se encontra em posição β, são observadas bandas de sinais opostos, indicando que estas se devem principalmente ao carbono β-metínico, sendo muito pouco afetadas pelos carbonos assimétricos da unidade flavan-3-ol (C-2 e C-3) (CHEN *et al*., 1993). O que se observa para a **substância IV** é exatamente um forte efeito *Cotton* negativo em 234 e 280 nm e um efeito positivo em 255 nm (fig. 27), confirmando uma configuração α para H-7'' e β para o anel aromático fenilpropanóide.

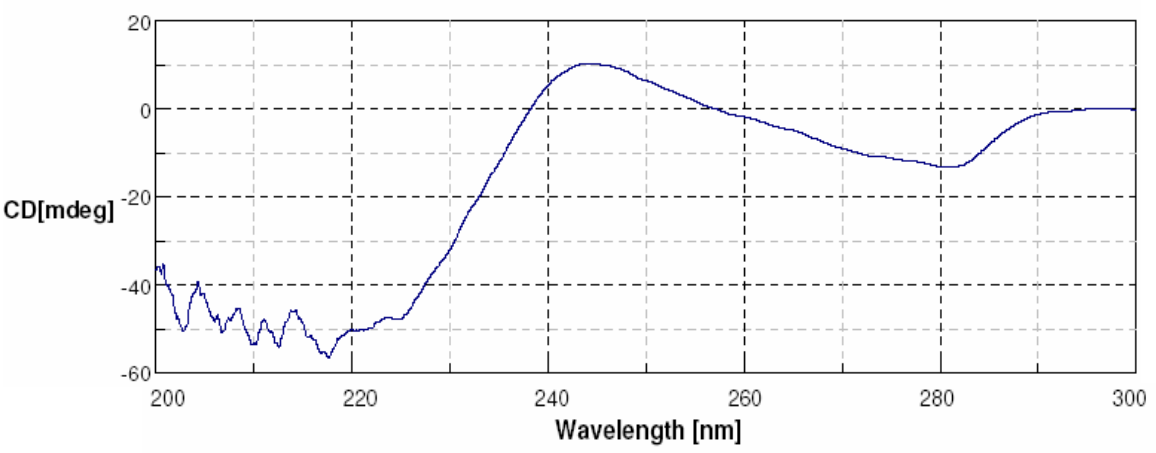


Figura 27 – Espectro de dicroísmo circular da **substância IV**.

Portanto, conclui-se que a **substância IV** trata-se da cinchonaína Ia (fig. 28).

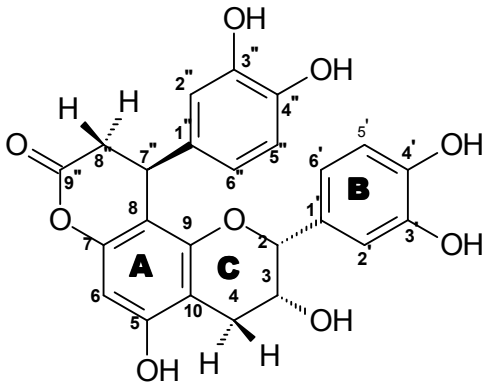


Figura 28 – Estrutura da **substância IV**, cinchonaína Ia.

5.2.1.5 **Substância V – Cinchonaína IIb**

Cerca de 11 mg da subfração F#17.14.6, 11 mg da F#17.15.5, 14 mg da F#18.4 e 17 mg da F#19.4 foram derivatizados (seção 4.6), analisadas por RMN, espectrometria de massas e dicroísmo circular e então denominadas de **substância V**.

A **substância V** livre apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$ = 739,4 e $[M+Na^+]^+$ = 763,4 (fig. 29) característico de uma substância dimérica contendo duas unidades de catequina/epicatequina e adicionalmente uma unidade fenilpropanóide, de modo semelhante à **substância IV** (*m/z*=740).

A análise dos espectros de RMN ^1H (fig.30), RMN ^{13}C (fig. 33), RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 31 e 32) e das correlações heteronucleares 2D HMQC e HMBC (fig. 34) da **substância V** derivatizada por acetilação, em acetona-d_6, forneceu dados representativos de uma substância dimérica composta por um monômero fenilpropanóide derivado da epicatequina e de outro monômero epicatequina. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento e as correlações heteronucleares HMQC e HMBC da **substância V** acetilada podem ser observados na tabela 10.

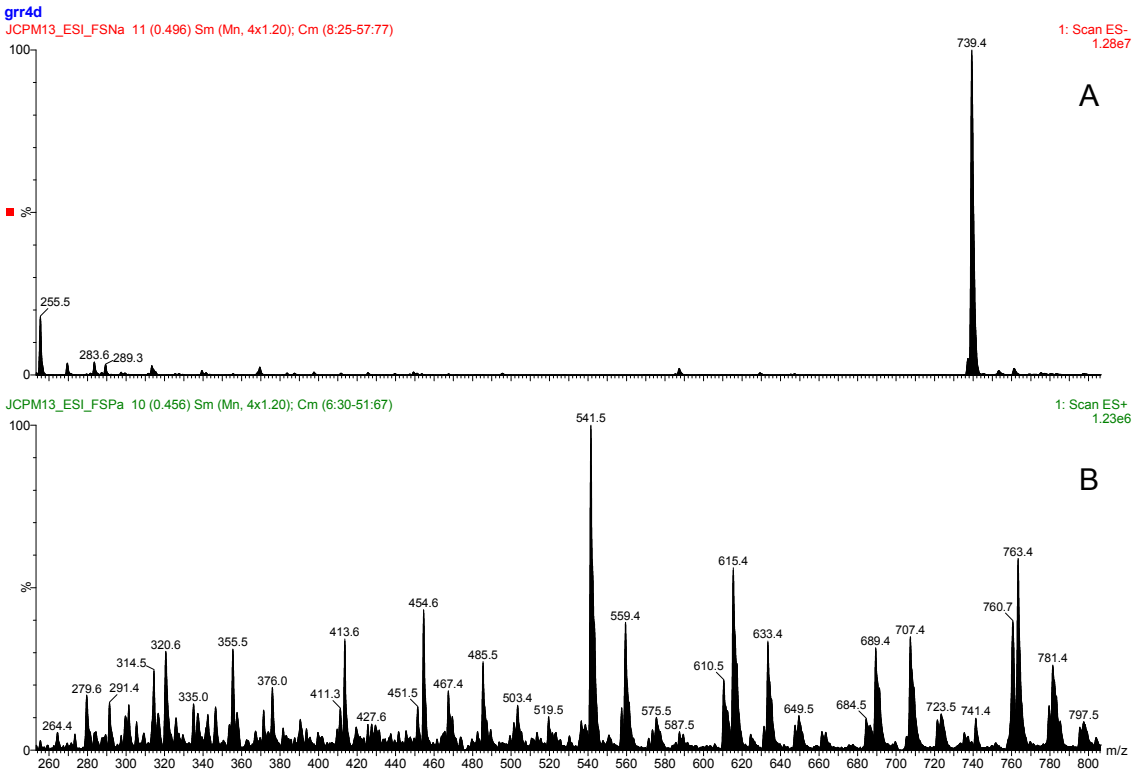


Figura 29 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância V**.

Tabela 10 - Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da **substância V** acetilada**,** incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).

H/ C	δ (ppm) ^{1}H	Multiplicidade	*J* (Hz)	δ (ppm) ^{13}C	^{1}H- ^{13}C HMBC- $_{n}J_{CH}$	
					$_{2}J_{CH}$	$_{3}J_{CH}$
2(F)	4,89	*sl*		77,9	C-3(F), C-1'(E)	C-5'(E)
3(F)	5,23-5,25	*m*		67,3		
4(F)	2,85 (ax)	*m*		26,9		
	2,98 (eq)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}3}$ = 4,5 $^{2}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}4ax}$ = 17,7			
5(D)				149,2[a]		
6(D)	6,76	*s*		111,5	C-5(D), C-7(D)	C-8(D), C-10(D)
7(D)				150,4[a]		
8(D)				117,2		
9(D)				154,7		
10(D)				112,5		
1'(E)				136,9		
2'(E)	7,23	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8	124,6		C-2(F), C-4' (E), C-6'(E)
3'(E)				143,2[b]		
4'(E)				142,4 [b]		
5'(E)	7,22	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4	123,2	C-4'(E), C-6'(E)	
6'(E)	7,28	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 6,3 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}2'}$ = 2,7	125,3	C-1'(E)	
2(C)	5,86	*sl*		75,8	C-3(C), C-1'(B)	C-2'(B)
3(C)	5,16-5,18	*m*		71,3		C-10(A)
4(C)	4,54	*d*	$^{3}J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}3}$ = 1,8	35,0	C-3(C), C-8(D), C-10(A)	C-2(C)
5(A)				149,6[c]		
6(A)	6,40	*s*		104,8	C-7(A)	C-8(A), C-10(A)
7(A)				150,4		
8(A)				110,2		
9(A)				152,8[c]		
10(A)				111,7		
1'(B)				136,8		
2'(B)	6,96	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 2,1	123,2	C-3'(B)	C-2(C), C-6'(B)
3'(B)				143,3[d]		
4'(B)				143,4[d]		
5'(B)	7,17	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 8,4	124,4	C-4'(B)	C-1'(B)
6'(B)	7,05	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}5'}$ = 8,4 $^{4}J_{H\text{-}6'\text{-}H\text{-}2'}$ = 2,1	125,6		C-2(C), C-2'(B), C-4'(B)
1''				141,6		
2''	6,88	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 2,4	122,6	C-1'', C3''	C-6'', C-7''
3''				143,6[e]		
4''				142,9[e]		
5''	7,28	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 8,7	124,2	C-4''	
6''	7,10	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 8,7 $^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 2,4	126,1		C-2'', C-7''
7''	4,16	*dl*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 6,6	34,6	C-1'', C-8'', C-8	C-2'', C-6'', C-9'', C-7

8''	2,78 (eq)	*dd*	$^{3}J_{\text{H-8''eq-H-7''}}$ = 1,5 $^{3}J_{\text{H-8''eq-H-8''ax}}$ = 16,5	36,9	C-9''	C-8
	2,28 (ax)	*dd*	$^{3}J_{\text{H-8''ax-H-7''}}$ = 0,9 $^{3}J_{\text{H-8''ax-H-8''eq}}$ = 16,5		C-7'', C-9''	C-1''
9''				167,1		

^{a}, ^{b}, ^{c}, ^{d}, ^{e} carbonos intercambiáveis.

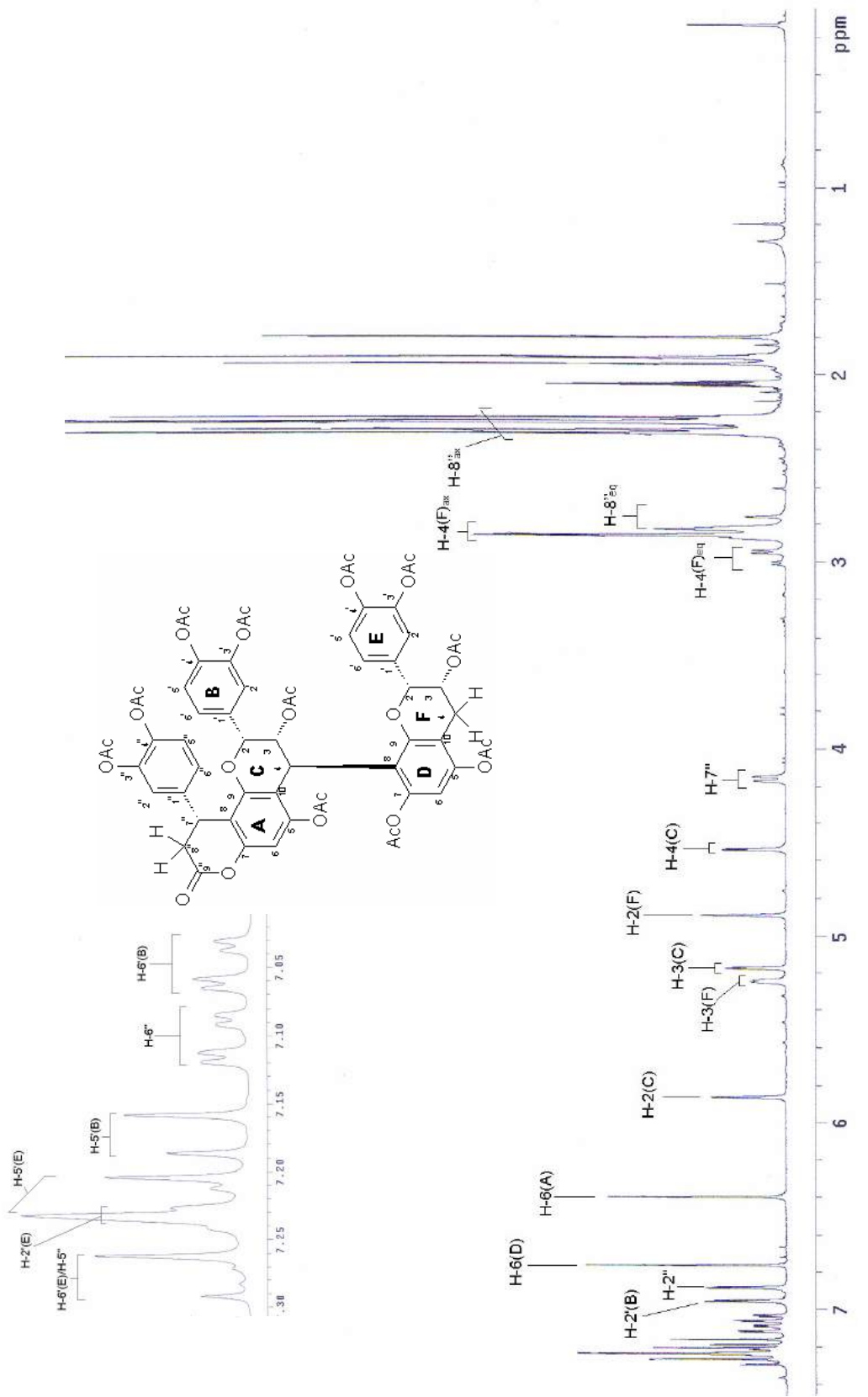


Figura 30 – RMN H^1 da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

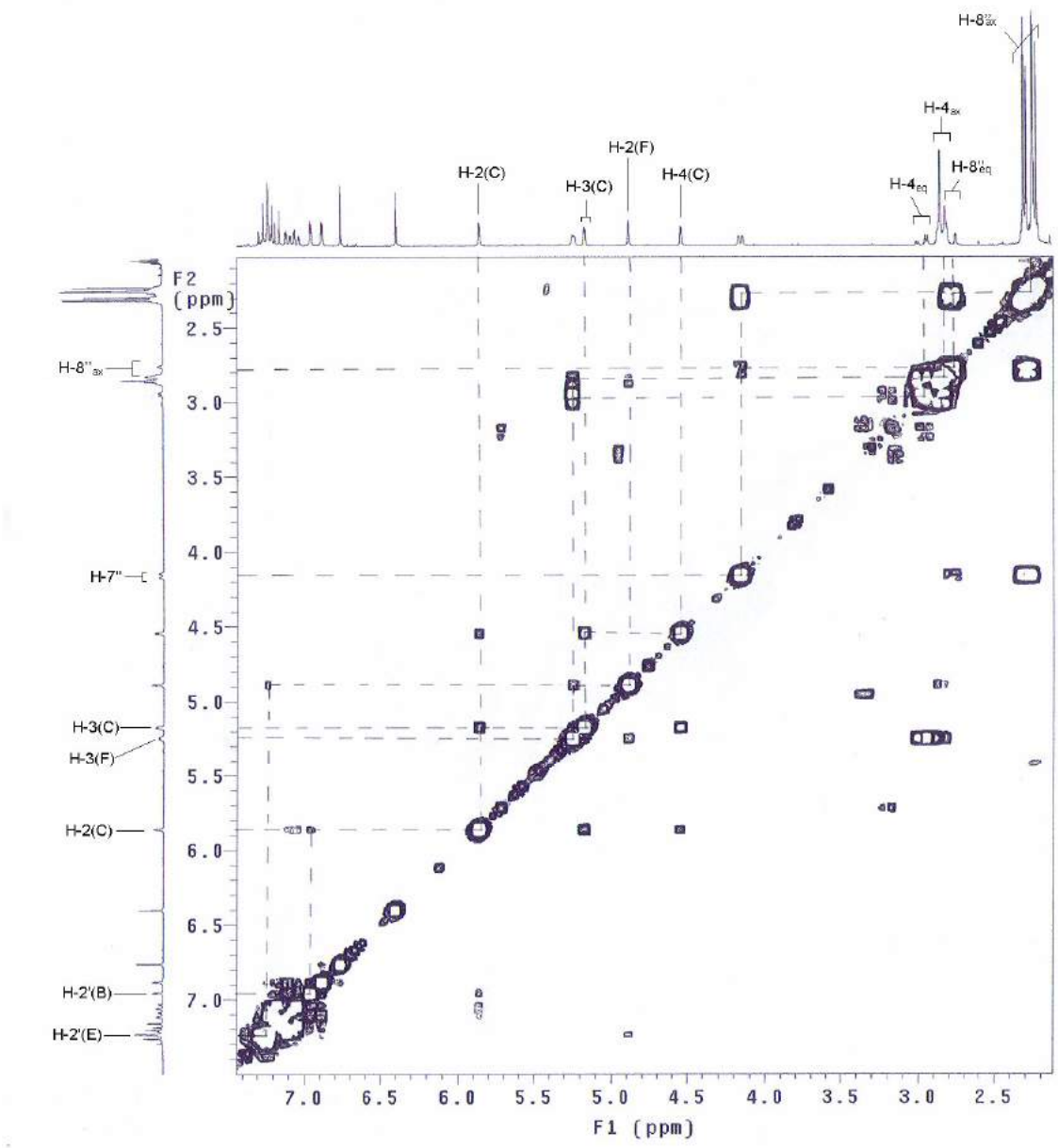


Figura 31 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

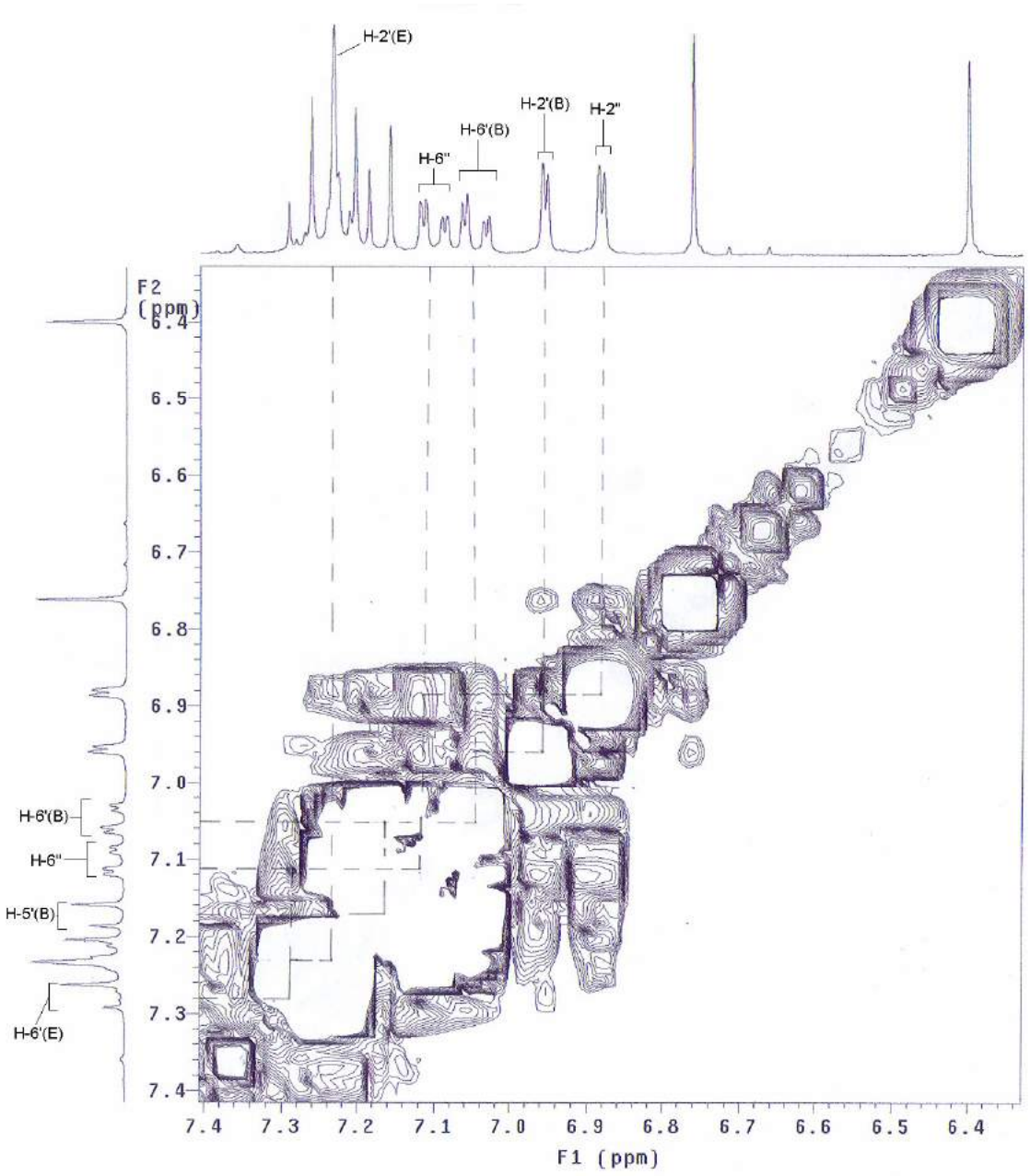


Figura 32 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

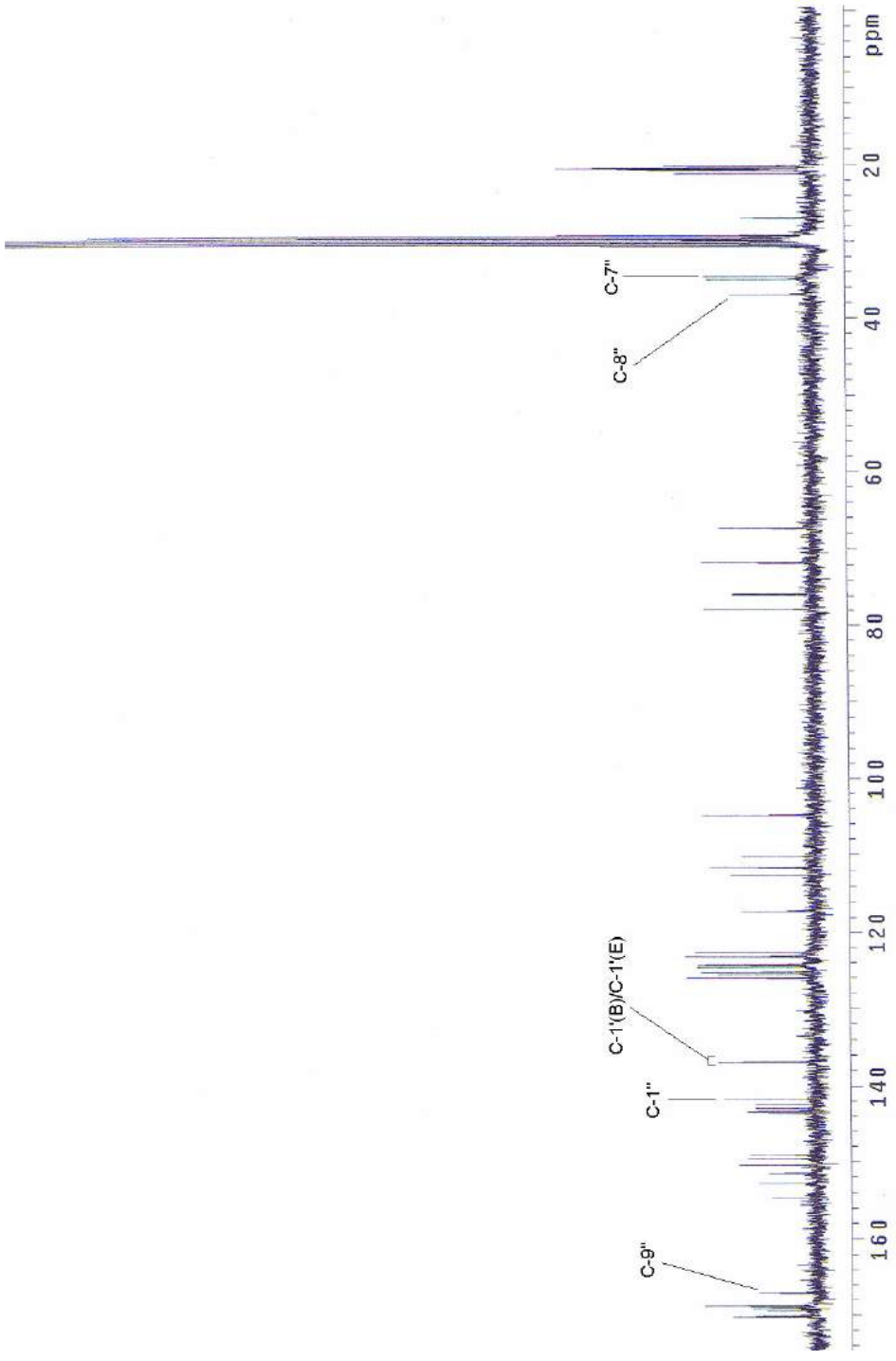


Figura 33 –RMN ^{13}C da **substância V** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

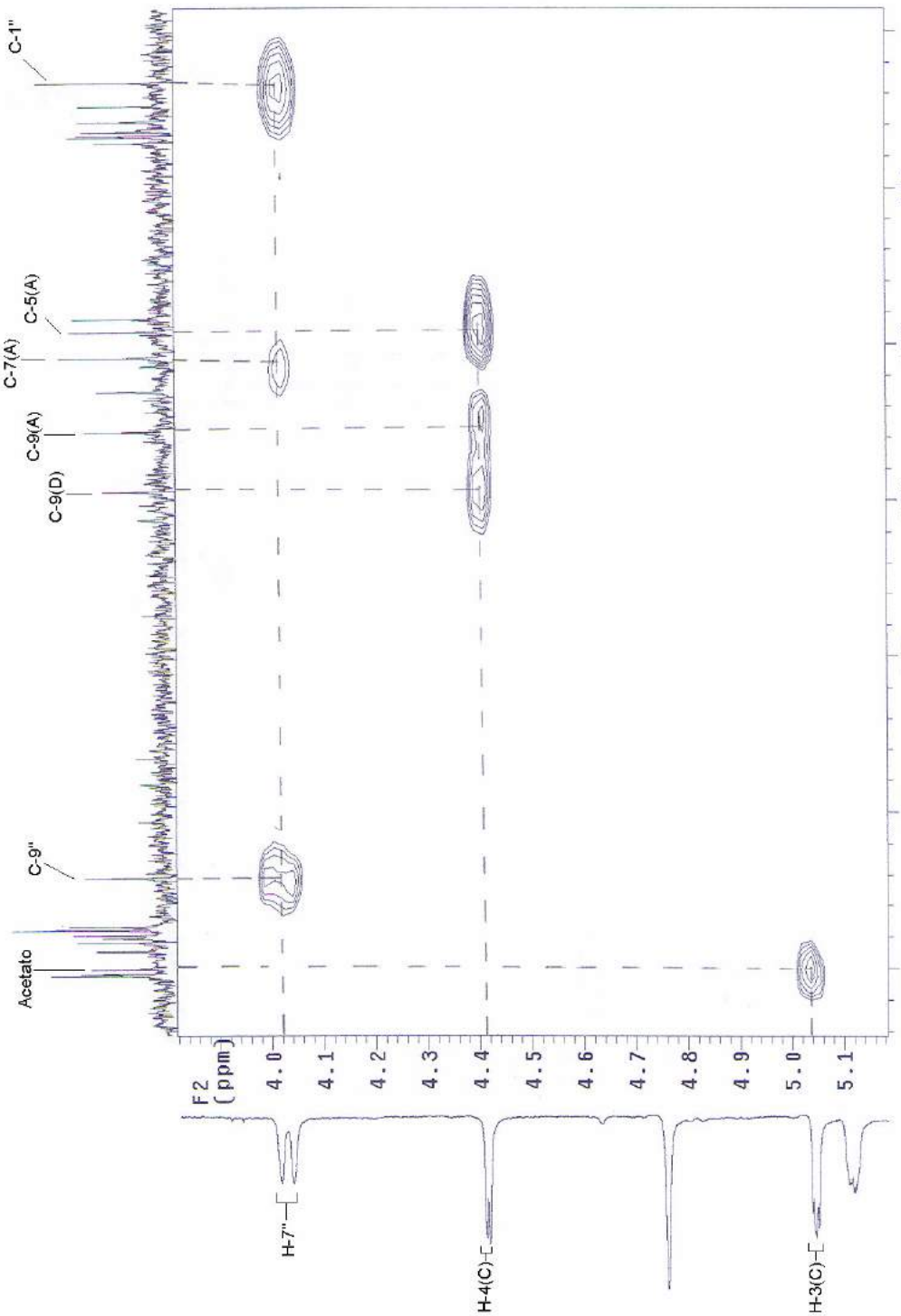


Figura 34 – Correlação heteronuclear HMBC da **substância V** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

Na **substância V**, a existência de um substituinte fenilpropanóide ligado no anel A da unidade flavan-3-ol superior pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (fig. 33), onde aparecem sinais atribuídos a uma carbonila (C-9'') em δ 167,1 ppm, um grupo metileno α em relação à carbonila (C-8'') em δ 36,9 ppm, um carbono metínico β em relação à carbonila (C-7'') em 34,6 ppm e um anel aromático com um sistema AMX.

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da porção fenilpropanóide da unidade superior, H-8''$_{ax}$ e H-8''$_{eq}$, sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 2,28 e 2,78 ppm, respectivamente no espectro da substância acetilada em acetona-d_6.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4(F)$_{ax}$ e H-4(F)$_{eq}$ também se encontram bem protegidos, apresentando deslocamentos em δ 2,85 e 2,98 ppm, respectivamente. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,54 ppm e sua constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) é de $J_{H3\text{-}H4}$ = 1,8 Hz, sugerindo uma configuração 3,4-*trans*. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante inferior a 1 Hz, estabelecendo uma configuração do tipo 2,3-*cis*, 3,4-*trans*, para a unidade superior. Esta unidade apresenta ainda o hidrogênio alifático H-7'', com deslocamento em δ 4,16 Hz, apresentando-se como um dubleto largo, teoricamente representando um duplo dubleto, com constantes de acoplamento de 6,6 Hz entre H-7'' e H-8''$_{eq}$ e inferior a 1 Hz entre H-7'' e H-8''$_{ax}$.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,34 e 4,89 ppm, respectivamente. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* para a unidade inferior.

A correlação heteronuclear entre H-4(C) e C-8(D) no espectro de HMBC comprova a ligação entre as unidades superior e inferior como sendo do tipo (4→8).

O tipo de ligação (α ou β) entre o carbono 4 da unidade superior com o carbono 8 da unidade superior pode ser definido através da comparação do espectro de RMN H^1 da **substância V** com o espectro da procianidina B_2. Os dados de deslocamento químico são semelhantes para estas duas substâncias, sugerindo-se que a ligação entre a unidade superior e a unidade inferior da **substância V** seja do tipo 4β→8.

No espectro de RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 31 e 32), pode-se observar a correlação de todos os hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos do tipo catequina/epicatequina, com três sistemas do tipo AMX, sendo dois pertencentes às porções epicatequina e um pertencente à porção fenilpropanóide da unidade superior. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios, através do espectro de COSY ^1H-^1H

(fig. 31 e 32). Assim, é possível também observar a correlação entre o H-2(C) com H-2'(B) e H-2(F) com H-2'(E), através destes espectros.

O hidrogênio do anel A, H-6(A) aparece em δ 6,40, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,76 ppm; ambos apresentam-se como singletos.

A configuração do hidrogênio 7'' e do anel aromático da porção fenilpropanóide pode ser definida com base nos efeitos anisotrópicos exercidos por este anel sobre o hidrogênio H-2(C), que podem ser observados através da análise do modelo de Dreiding.

Como descrito anteriormente para a **substância IV**, quando o anel aromático fenilpropanóide se encontra em posição β, este não exerce efeitos anisotrópicos sobre H-2(C) e quando este anel se encontra em posição α, as nuvens eletrônicas dos dois anéis aromáticos do monômero cinchonaína interagem entre si, provocando um efeito de desblindagem sobre o hidrogênio H-2(C), deslocando-o para campos mais baixos. Tal fato pode ser observado nos espectros de RMN H^1 da **substância V**, quando comparados aos espectros da procianidina B_2 (**substância II**), conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 – Comparação entre dados de RMN H^1 para o hidrogênio H-2(C) da **substância V** e da procianidina B_2 (**substância II**) em $CDCl_3$ e acetona-d_6.

Hidrogênio	**Substância V** δ **(ppm)**	**Substância II (PB_2)** δ **(ppm)**
H-2(C) ($CDCl_3$)	5,70	5,58
H-2(C) (acetona-d_6)	5,86	5,72

A estereoquímica da substância livre foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20^\circ} = +22^\circ$ (metanol; c=0,1). Além disso, realizou-se espectroscopia de dicroísmo circular para confirmação da configuração absoluta em C-4(C) (fig. 35).

No espectro de dicroísmo circular da **substância V** (fig. 35), pode-se observar um efeito *Cotton* positivo em toda extensão do espectro analisado (200-300 nm). Portanto a estrutura da **substância V** está de acordo com uma estrutura dimérica com ligação do tipo β entre as unidades superior e inferior e, portanto, com uma configuração absoluta 4*R*. Além disso, pode-se observar que o efeito *Cotton* positivo dado pela ligação β se sobrepõe aos efeitos dados pelo carbono β-metínico da porção fenilpropanóide da molécula, conforme observado para os monômeros do tipo cinchonaína.

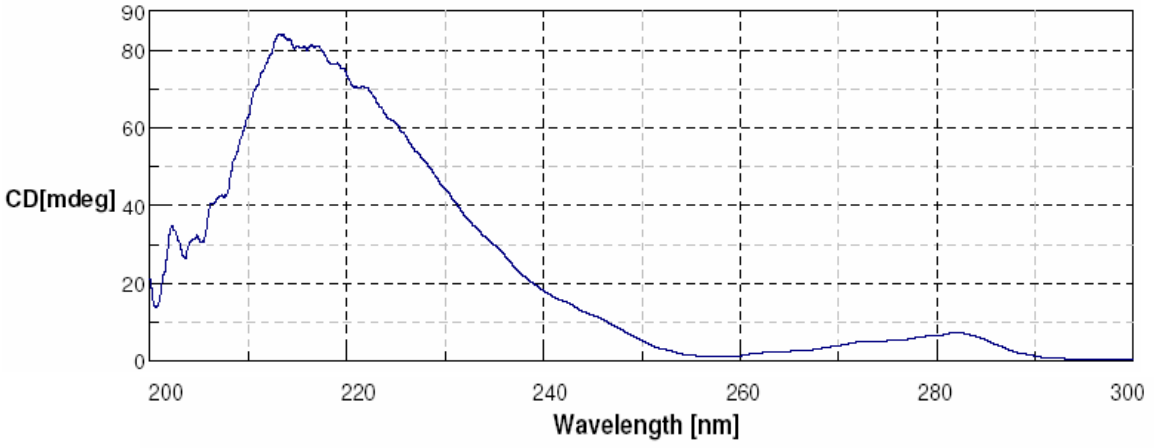


Figura 35 - Espectro de dicroísmo circular da **substância V**.

Dessa maneira, concluiu-se que a **substância V** trata-se da cinchonaína IIb (fig. 36), com o anel aromático fenilpropanóide em posição α e ligação 4$\beta\rightarrow$8 entre as unidades superior e inferior. Esta é a primeira vez que esta substância é isolada no gênero *Trichilia*, tendo sido isolada anteriormente da espécie *Cinchona succirubra*.

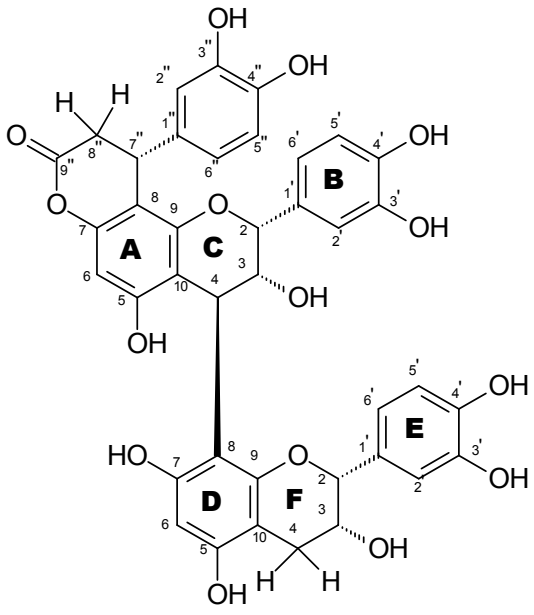


Figura 36 – Estrutura química da **substância V**, cinchonaína IIb.

5.2.1.6 **Substância VI – Apocinina E**

Cerca de 25 mg da subfração F#18.3 foram derivatizados (seção 4.6) e purificados por CCDP (seção 4.5.4), obtendo-se uma banda com Rf 0,31 (F#18.3.2), que foi submetida à análise por RMN, espectrometria de massas e dicroísmo circular e então denominada de **substância VI**.

Na análise do espectro de massas, o pico do íon pseudo-molecular $[M+Na^+]^+$= 785,4 (fig. 37) está de acordo com uma substância do tipo epigalocatequina acrescida de uma unidade fenilpropanóide derivatizada por acetilação (*m/z*= 762).

A análise dos espectros de RMN ^1H (fig. 38 e 40), RMN ^{13}C (fig. 42), RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 39 e 41) e das correlações heteronucleares 2D HMQC (fig. 43) e HMBC (fig. 44) da **substância VI** derivatizada em $CDCl_3$ e acetona-d_6 forneceu dados representativos de uma substância fenilpropanóide derivada da epigalocatequina. O espectro de RMN ^{13}C se assemelha ao espectro da **substância VII**, porém com diferença de deslocamento nos carbonos do anel B da porção flavan-3-ol. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento da **substância VI** acetilada em $CDCl_3$ podem ser observados na tabela 12 e os dados em acetona-d_6 são encontrados na tabela 13.

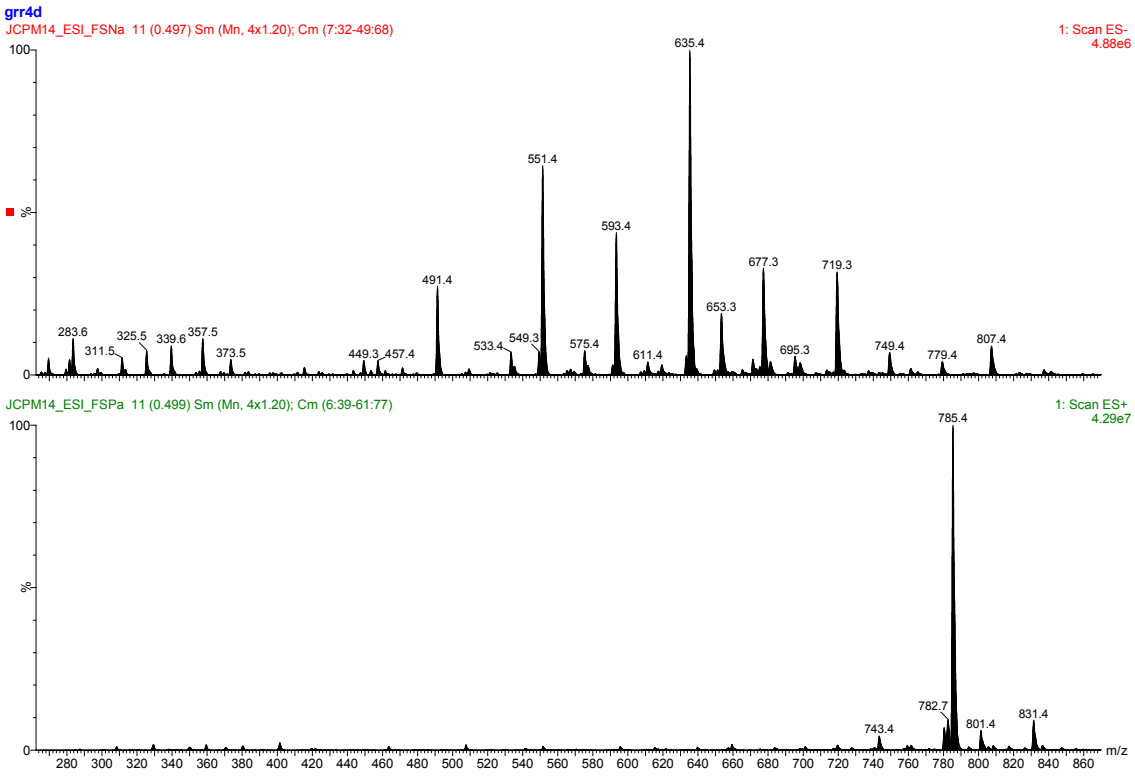


Figura 37 – Espectros de massas de ionização por eletrospray positivo da **substância VI**.

Tabela 12 – Dados de RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4	2,88 - 2,96	*m*	
H-8'' $_{eq}$	3,03	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}7''}$ = 6,9 $^{2}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}8''}$ = 16,5
H-8'' $_{ax}$	3,12	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}7''}$ = 2,1 $^{2}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}8''}$ = 16,5
H-7''	4,64	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 6,9 $^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 2,1
H-2	5,11	*sl*	
H-3	5,30 - 5,34	*m*	
H-6	6,61	*s*	
H-2'	6,94	*s*	
H-6'	6,94	*s*	
H-6''	6,97	*dd*	$^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 1,8 $^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 6,0
H-2''	7,13	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 1,8
H-5''	7,17	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 7,5

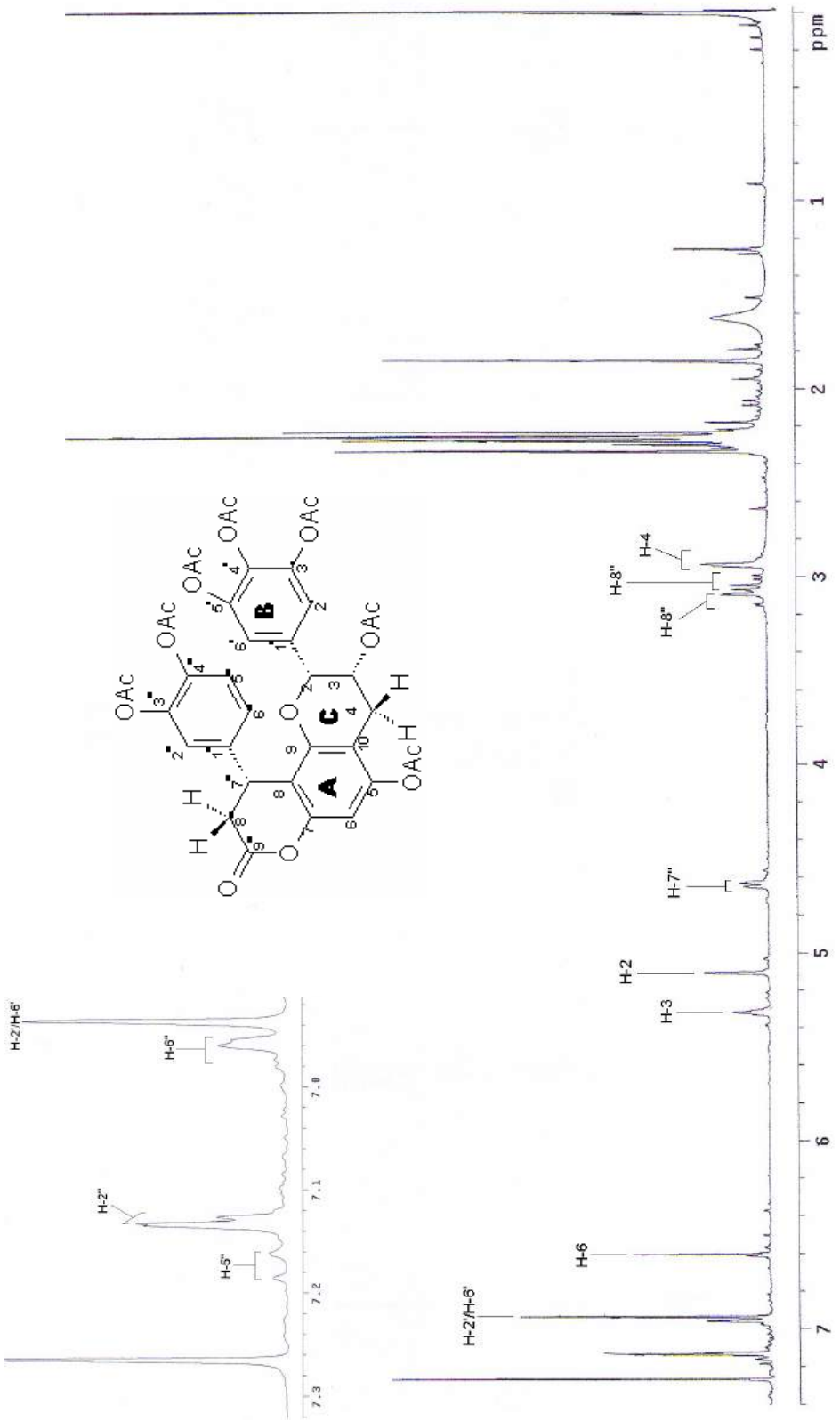


Figura 38 – RMN H^1 da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

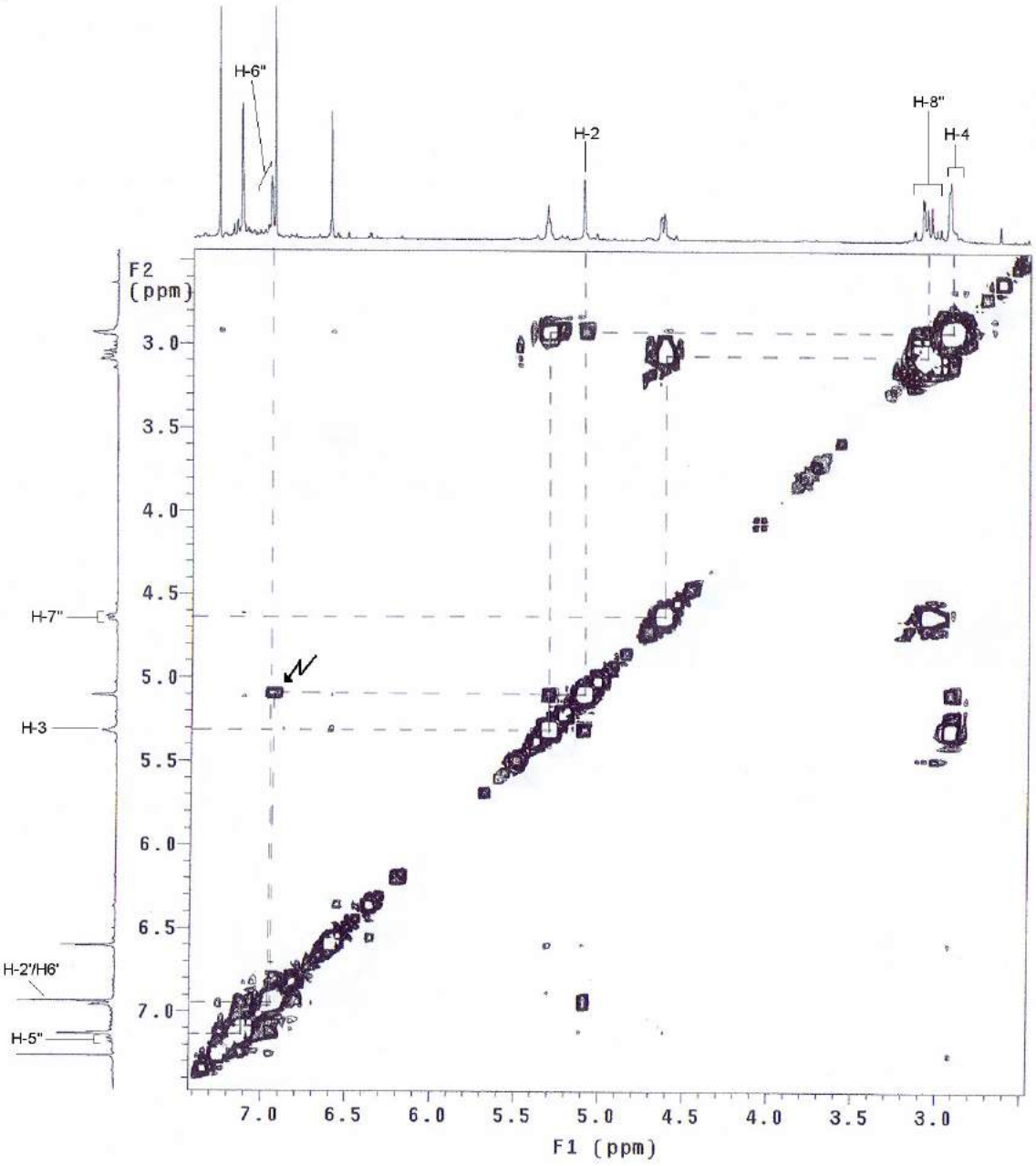


Figura 39 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

Tabela 13 – Dados de RMN ^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4	2,92 – 3,10	*m*	
H-8''$_{eq}$	3,13	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}7''}$ = 1,8 $^{2}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}8''}$ = 16,2
H-8''$_{ax}$	3,34	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}7''}$ = 7,5 $^{2}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}8''}$ = 16,2
H-7''	4,80	*dl*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 4,8
H-2	5,48	*sl*	
H-3	5,44 - 5,46	*m*	
H-6	6,63	*s*	
H-2'	7,01	*s*	
H-6'	7,01	*s*	
H-6''	7,18	*dd*	$^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 2,1 $^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 8,4
H-5''	7,25	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 8,4
H-5''	7,35	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 3,9

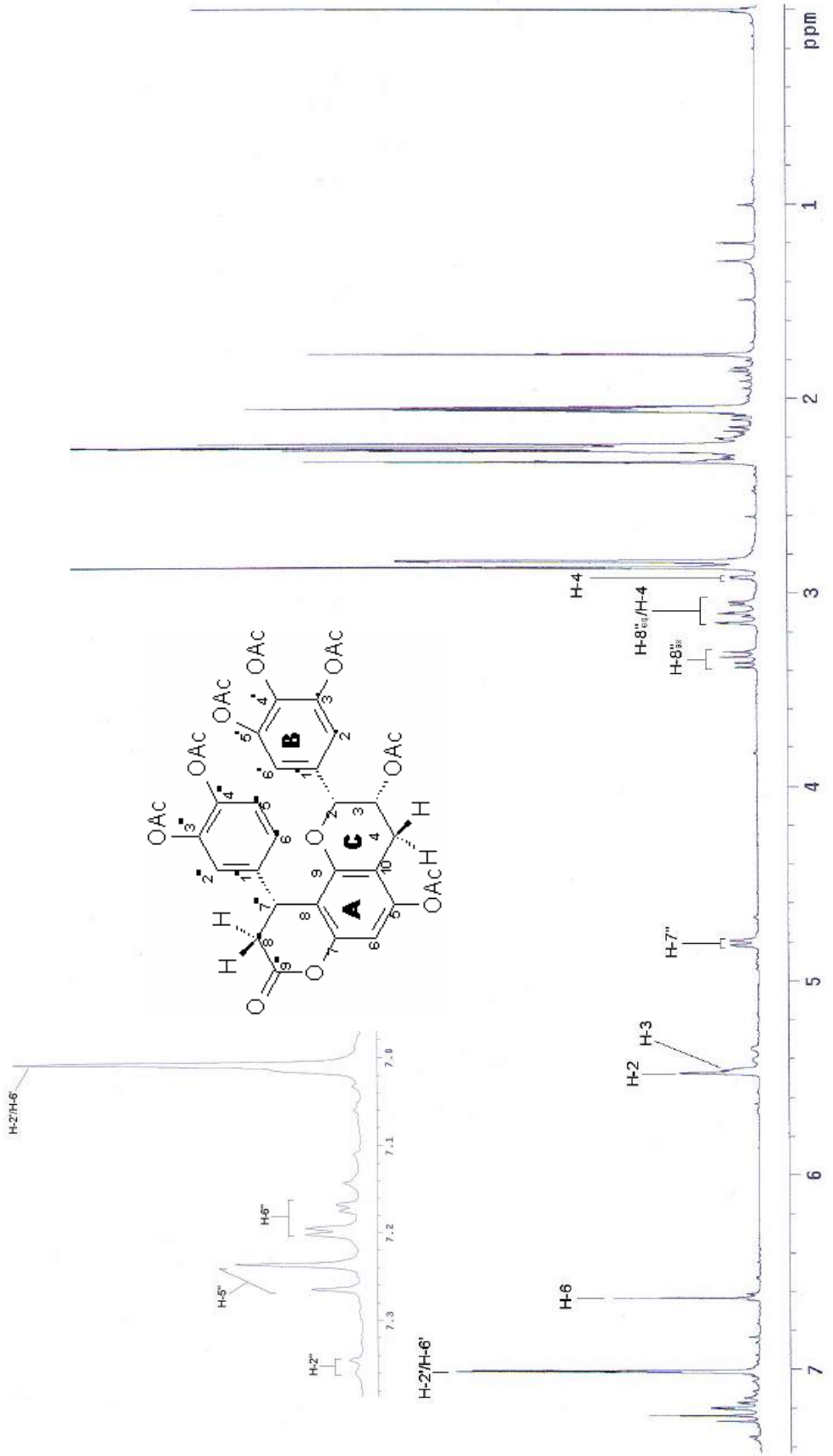


Figura 40 – RMN H^1 da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

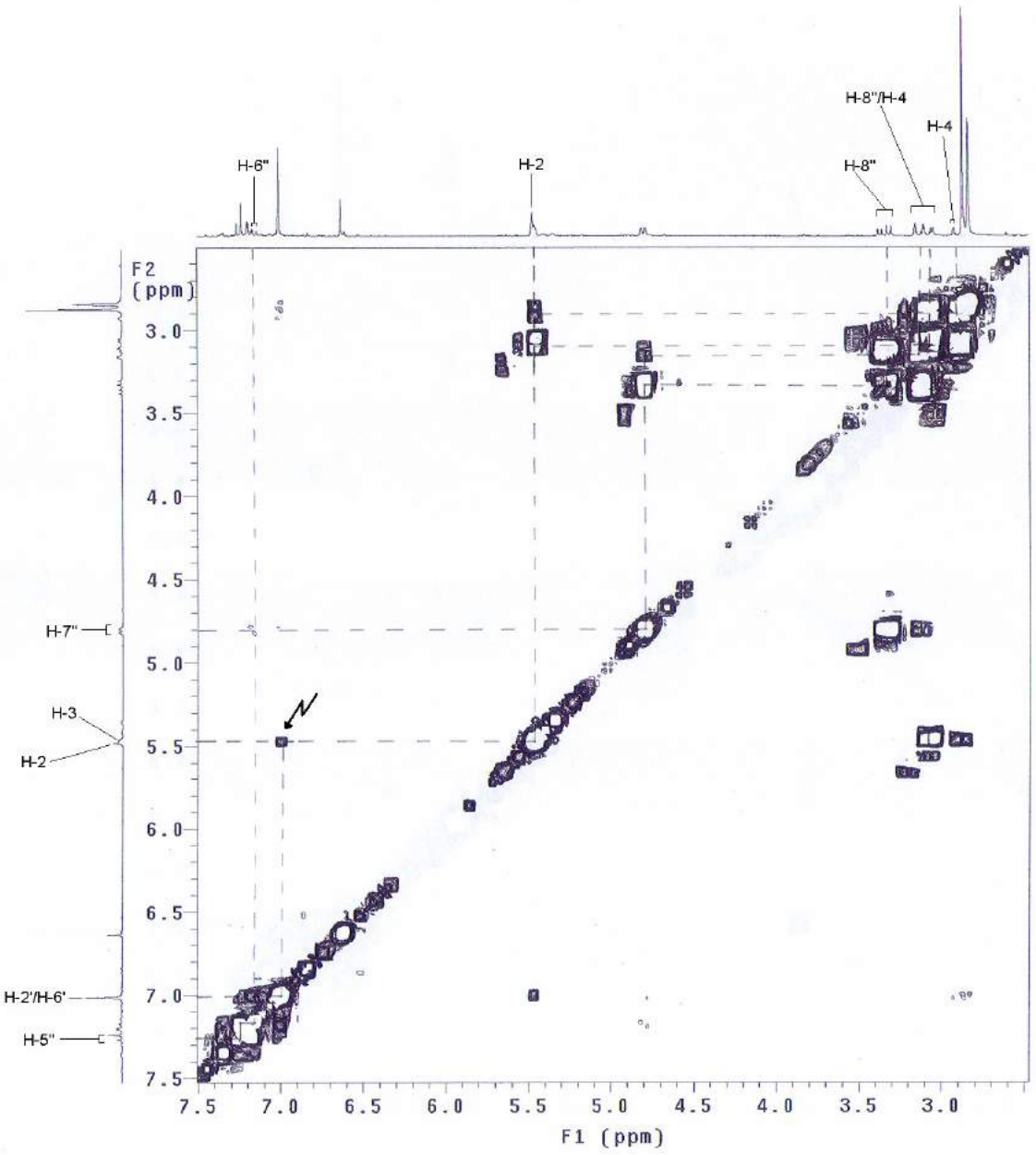


Figura 41 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

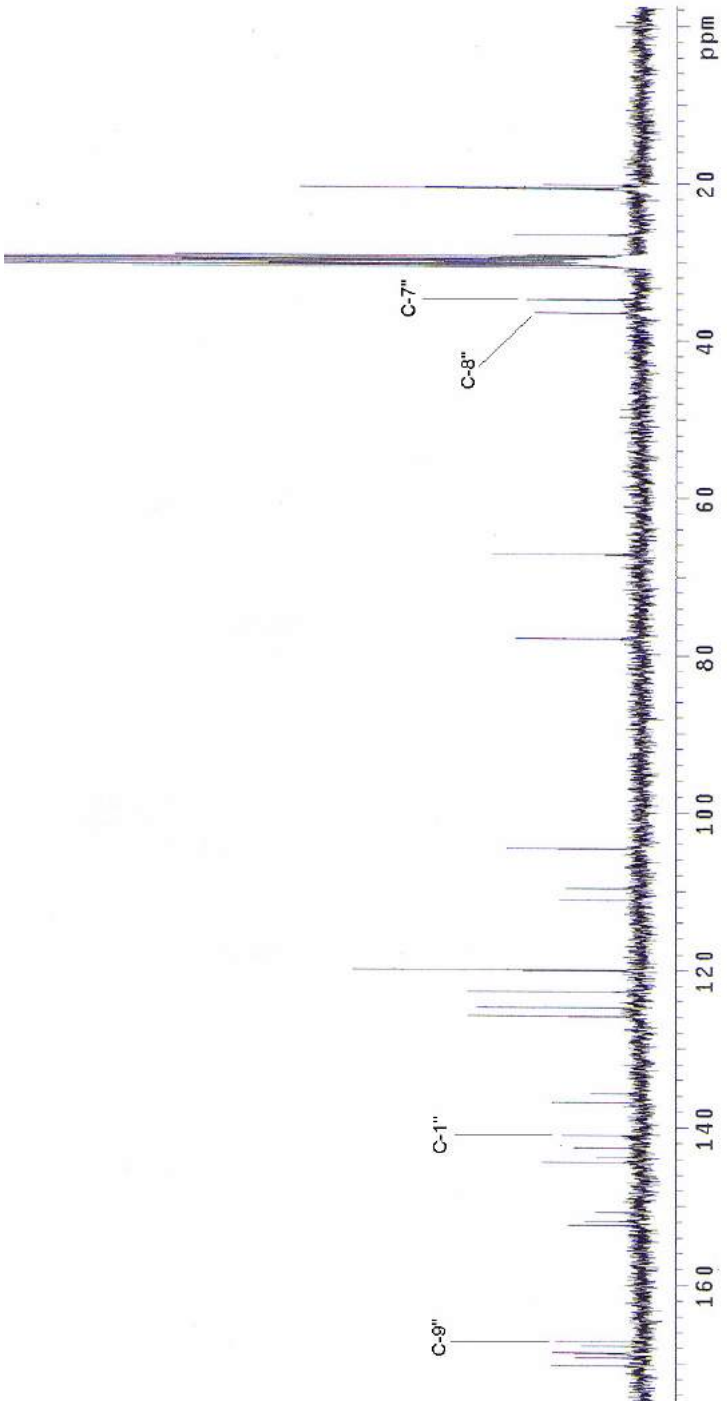


Figura 42 –RMN ^{13}C da **substância VI** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

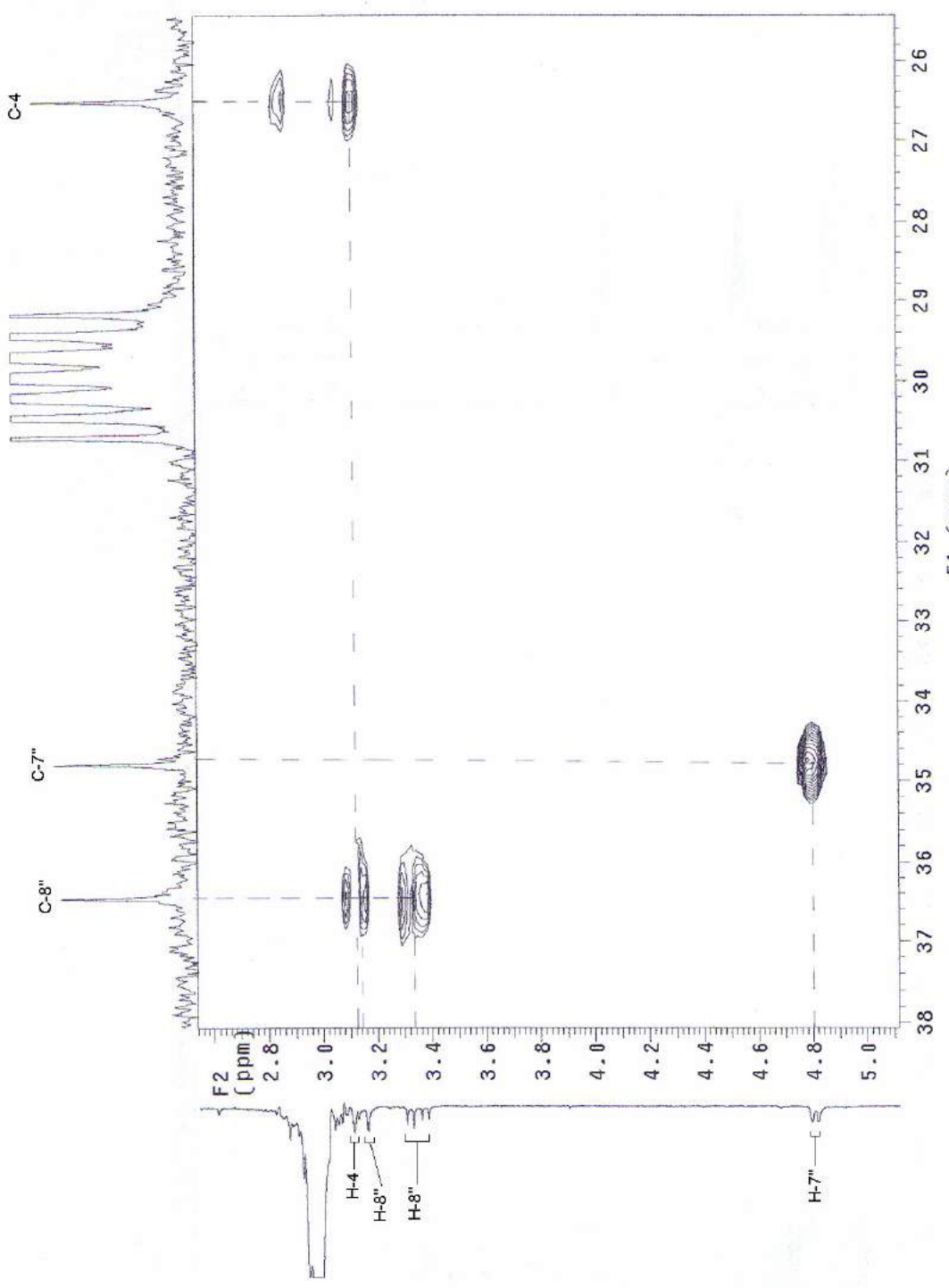


Figura 43 – Correlação heteronuclear HMQC da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

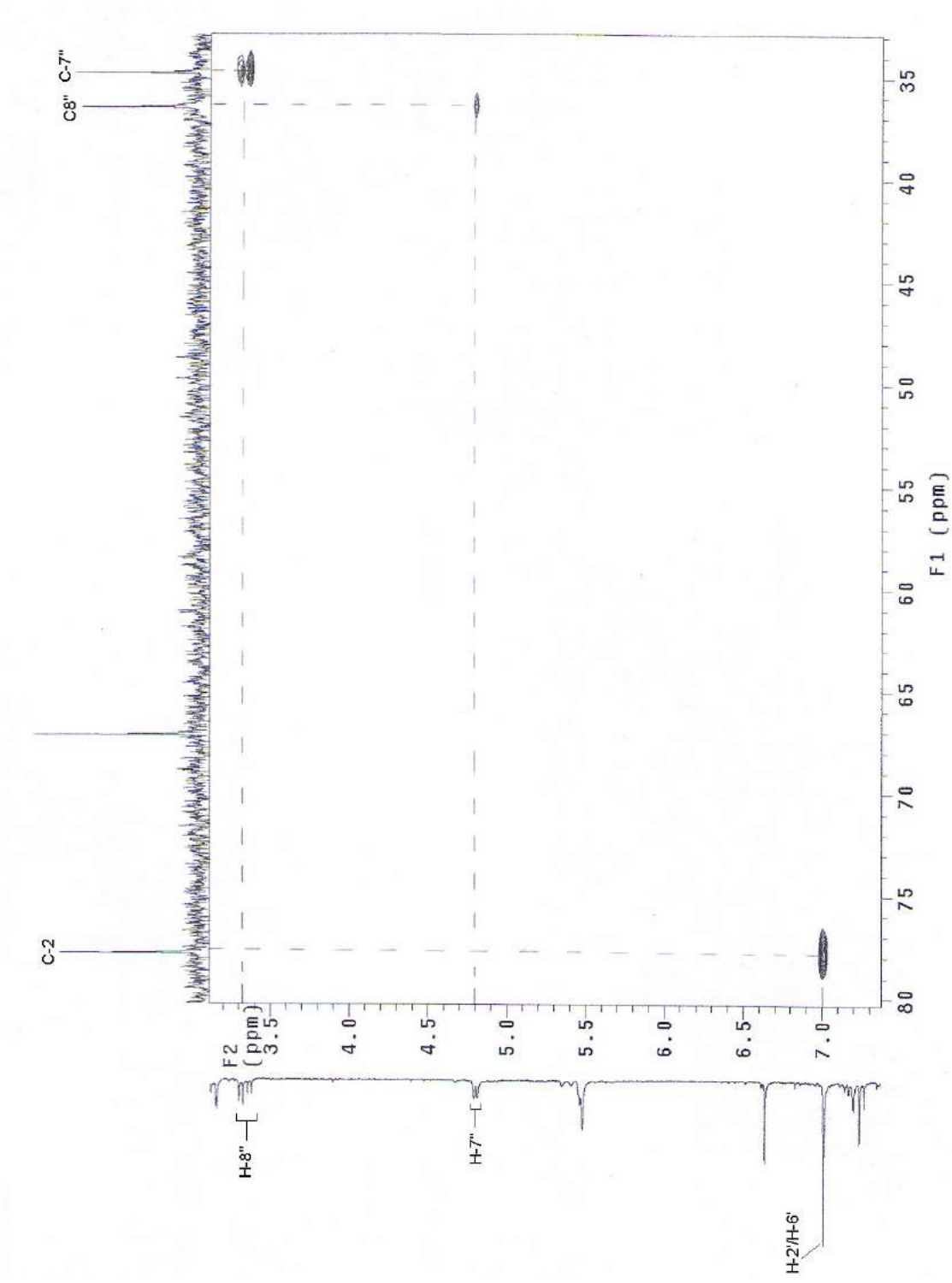


Figura 44 – Correlação heteronuclear HMBC da **substância VI** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

Na **substância VI**, assim como nas **substâncias IV** e **V**, a existência de um substituinte fenilpropanóide ligado no anel A da unidade flavan-3-ol pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (fig. 42), onde aparecem sinais atribuídos a uma carbonila (C-9'') em δ 167,1 ppm, um grupo metileno α em relação à carbonila (C-8'') em δ 36,5 ppm, um carbono metínico β em relação à carbonila (C-7'') em 34,8 ppm e um anel aromático com um sistema AMX.

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da porção flavan-3-ol H-4_{ax} e H-4_{eq}, bem como os hidrogênios alifáticos da porção fenilpropanóide, H-8''$_{ax}$ e H-8''$_{eq}$. Os hidrogênios H-4_{ax} e H-4_{eq} se apresentam com deslocamentos entre 2,92 e 3,10 ppm; enquanto que os hidrogênios H-8''$_{eq}$ e H-8''$_{ax}$ se apresentam com deslocamentos em δ 3,13 e 3,34 ppm, respectivamente, no espectro da substância acetilada em acetona-d_6 (fig. 40).

O hidrogênio alifático da porção epigalocatequina H-2(C) apresenta deslocamento químico em δ 5,48 e o H-3(C) apresenta deslocamento entre δ 5,44 e 5,46 ppm. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração relativa 2,3-*cis*, para esta parte da molécula. Já o hidrogênio alifático H-7'' apresenta deslocamento em δ 4,80 ppm, aparecendo como um dubleto largo, teoricamente representando um duplo-dubleto, com constante de acoplamento de 4,8 Hz entre H-7'' e H-8''$_{eq}$ e inferior a 1 Hz entre H-7'' e H-8''$_{ax}$. No espectro de RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 41), pode-se observar a correlação entre todos os hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios aromáticos da porção fenilpropanóide apresentam-se como nas unidades monoméricas do tipo catequina/epicatequina, como um sistema do tipo AMX. Já os hidrogênios aromáticos da porção epigalocatequina se apresentam como um único singleto, com deslocamento δ em 7,01, pois se tratam de hidrogênios quimicamente equivalentes, conferindo uma triidroxilação do anel B. Foi possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios aromáticos através do espectro de COSY ^1H-^1H (fig. 41). Além disso, a triidroxilação na parte inferior da molécula (porção epigalocatequina) foi confirmada pela correlação entre o sinal do H-2(C) e o sinal do H-2'(B)e H-6'(B) no espectro de COSY ^1H-^1H.

O hidrogênio H-6 aparece como um singleto em δ 6,63 ppm. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), a configuração relativa da porção epigalocatequina é do tipo 2,3-*cis* e a configuração absoluta 2*R*, 3*R*.

Segundo Nonaka e Nishioka (1982), a **substância VI** se trata de uma unidade epigalocatequina substituída de uma unidade fenilpropanóide em C-8, pois no espectro de RMN ^{13}C (fig. 42) da **substância VI** acetilada, o carbono C-8 aparece com deslocamento δ

em 111,1 (campo mais baixo) e C-6 aparece em δ 104,6 (campo mais alto). Além deste dado, Czochanska *et al.* (1979) e Cai *et al.* (1991) demonstraram que uma unidade do tipo 2,3-*cis* com anel B triidroxilado apresenta o C-2 em campos mais altos (δ~78 ppm) que o respectivo epímero, galocatequina, com o C-2 em campos mais baixos (δ~82 ppm).

A posição do anel aromático da porção fenilpropanóide, pode ser definida através da comparação dos dados de deslocamento químico dos hidrogênios H-2 e H-3 nos espectros de RMN ^{1}H em acetona-d_6 (tab. 14) e $CDCl_3$ (tab. 15). Dessa maneira, concluiu-se que a **substância VI** apresenta o anel aromático da porção fenilpropanóide em posição α, assim como a **substância VII**.

Tabela 14 – Comparação entre os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-2 e H-3 nos espectros de RMN ^{1}H (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS) das **substâncias IV, VI e VII**.

Hidrogênio	**Substância IV** δ (ppm)	**Substância VI** δ (ppm)	**Substância VII** δ (ppm)
H-2 (C)	5,20	5,48	5,46
H-3 (C)	5,42-5,45	5,44 - 5,46	5,45-5,47

Tabela 15 – Comparação entre os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-2 e H-3 nos espectros de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS) das **substâncias IV, VI e VII**.

Hidrogênio	**Substância IV** δ (ppm)	**Substância VI** δ (ppm)	**Substância VII** δ (ppm)
H-2 (C)	5,01	5,11	5,13
H-3 (C)	5,41	5,32	5,32

A estereoquímica da substância derivatizada foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°} =$ +6,2° (acetona; c=0,08). Além disso, realizou-se espectroscopia de dicroísmo circular para confirmação da configuração absoluta em C-7'' (fig. 45).

Segundo Chen *et al*. (1993), quando o hidrogênio β-metínico (H-7'') se encontra em posição α, observa-se um efeito *Cotton* negativo em 234 e 280 nm e um efeito positivo em 255 nm. Já quando H-7'' se encontra em posição β são observadas bandas de sinais opostos, indicando que estas bandas se devem principalmente ao carbono β-metínico, sendo muito pouco afetadas pelos carbonos assimétricos da unidade flavan-3-ol (C-2 e C-3). No espectro de dicroísmo da **substância VI** (fig. 45) observa-se um efeito *Cotton* positivo

em 234 e 280 nm e um efeito negativo em 255 nm, confirmando uma configuração β para H-7'' e α para o anel aromático fenilpropanóide (fig. 46).

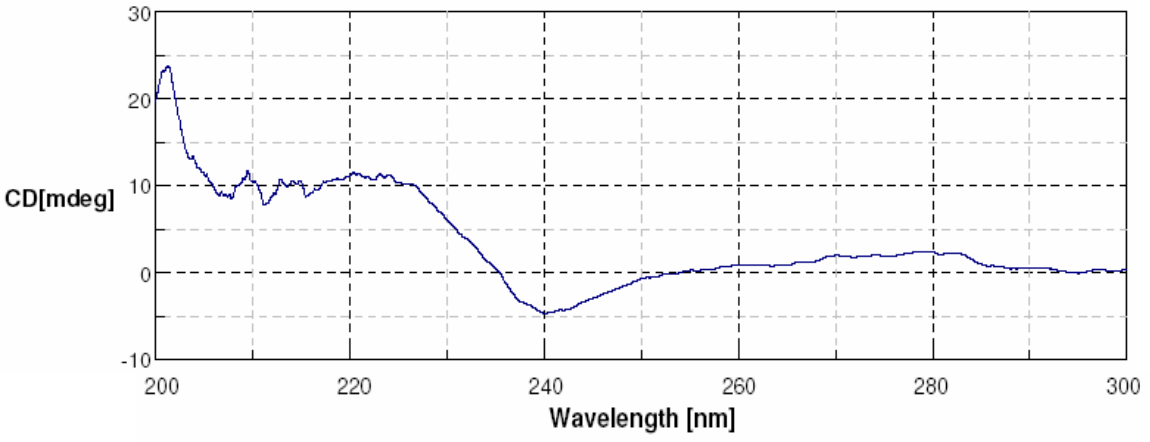


Figura 45 – Espectro de dicroísmo circular da **substância VI**.

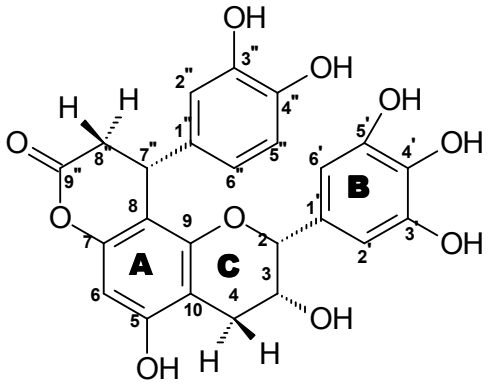


Figura 46 – Estrutura da **substância VI**, apocinina E.

A **substância VI** nunca havia sido isolada de fontes naturais, sendo a primeira vez que a mesma ocorre.

5.2.1.7 **Substância VII – Cinchonaína Ib**

Cerca de 30 mg da subfração F#19.2 foram derivatizados (seção 4.6), analisados por RMN, espectrometria de massas e dicroísmo circular e então denominados de **substância VII**.

A **substância VII** livre apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$= 451,4 e $[M+Na^+]^+$= 475,4 (fig. 47) característico de substâncias monoméricas tipo catequina/epicatequina adicionada de uma unidade fenilpropanóide (*m/z*= 452).

A análise dos espectros de RMN ^1H (fig. 48), RMN ^{13}C (fig. 50), RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 49) e das correlações heteronucleares 2D HMQC (fig. 51) e HMBC (fig. 52) da **substância VII** derivatizada em acetona-d_6 e $CDCl_3$ forneceu dados representativos de uma substância fenilpropanóide derivada da epicatequina. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento e as correlações heteronucleares HMQC e HMBC da **substância VII** acetilada podem ser observados na tabela 16.

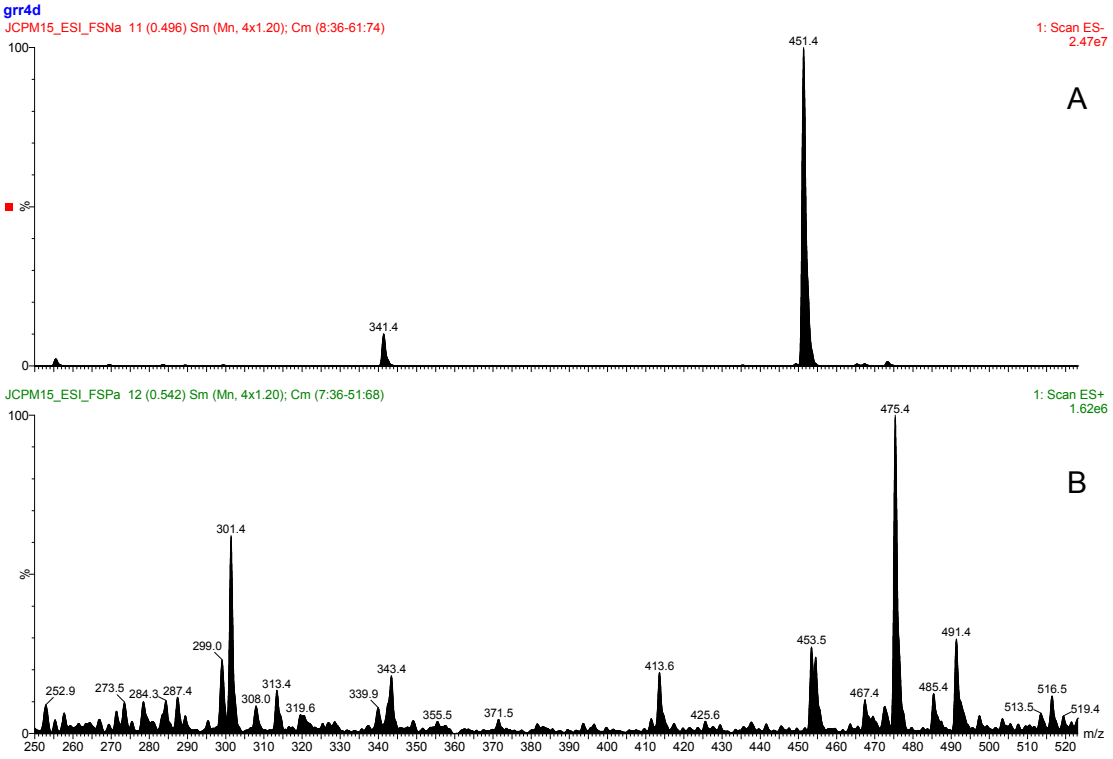


Figura 47 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância VII**.

Tabela 16 – Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C da **substância VII** acetilada, incluindo correlações heteronucleares HMQC e HMBC (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).

H/C	δ (ppm) ^{1}H	Multiplicidade	*J* (Hz)	δ (ppm) ^{13}C	^{1}H- ^{13}C HMBC- $_{n}J_{CH}$	
					$_{2}J_{CH}$	$_{3}J_{CH}$
2	5,46	*sl*		78,1	C-3, C-1'	C-2'
3	5,45-5,47	*m*		67,3		C-1'
4	2,88 (ax)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}3}$ = 1,8 $^{2}J_{H\text{-}4ax\text{-}H\text{-}4eq}$ = 16,8	26,5	C-3, C-10	C-2, C-5, C-9
	3,08 (eq)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}3}$ = 4,5 $^{2}J_{H\text{-}4eq\text{-}H\text{-}4ax}$ = 17,7		C-10	
5				150,8		
6	6,63	*s*		104,5	C-5	C-8, C-10
7				152,0		
8				111,1		
9				152,6		
10				109,7		
1'				137,2		
2'	7,03	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8	122,9	C-3'	C-2, C-4'
3'				143,2		
4'				143,2		
5'	7,14	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 5,4	124,2	C-4'	C-3'
6'	7,18-7,19	*m*		125,8	C-1'	
1''				141,2		
2''	7,14	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 1,8	125,4		
3''				143,7		
4''				142,6		
5''	7,04	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 7,5	123,2		
6''	7,25	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 8,4 $^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 1,8	124,8	C-1''	
7''	4,78	*dl*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 6,0	34,9	C-1'', C-8'', C-8	C-9'', C-7
8''	3,11 (ax)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''eq\text{-}H\text{-}7''}$ = 1,8 $^{3}J_{H\text{-}8''eq\text{-}H\text{-}8''ax}$ = 16,2	36,5	C-7'', C-9''	C-1''
	3,34 (eq)	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8'ax'\text{-}H\text{-}7''}$ = 7,5 $^{3}J_{H\text{-}8''ax\text{-}H\text{-}8''eq}$ = 16,2		C-7'', C-9''	C-1'', C-8
9''				167,1		

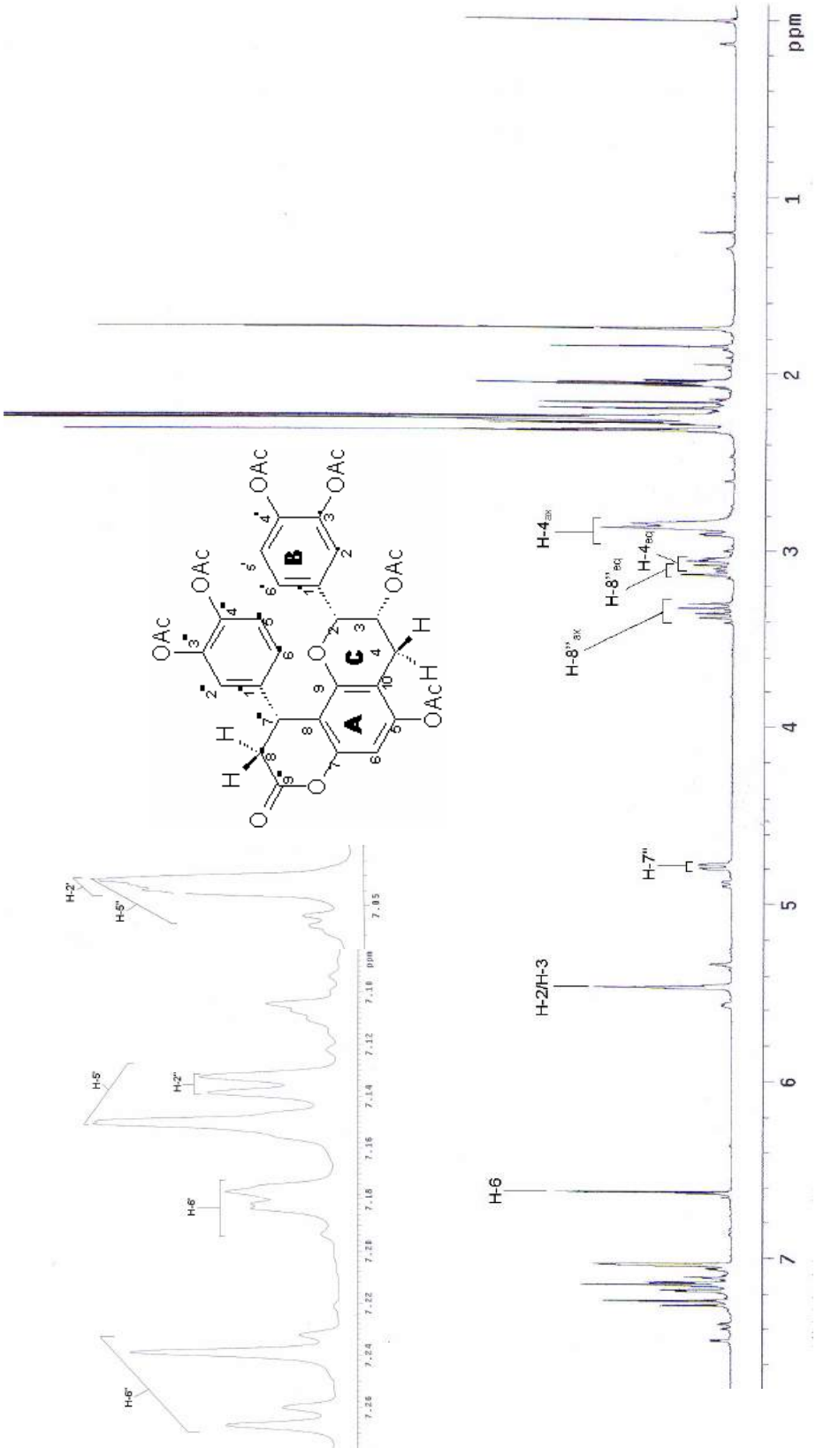


Figura 48 – RMN H^1 da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

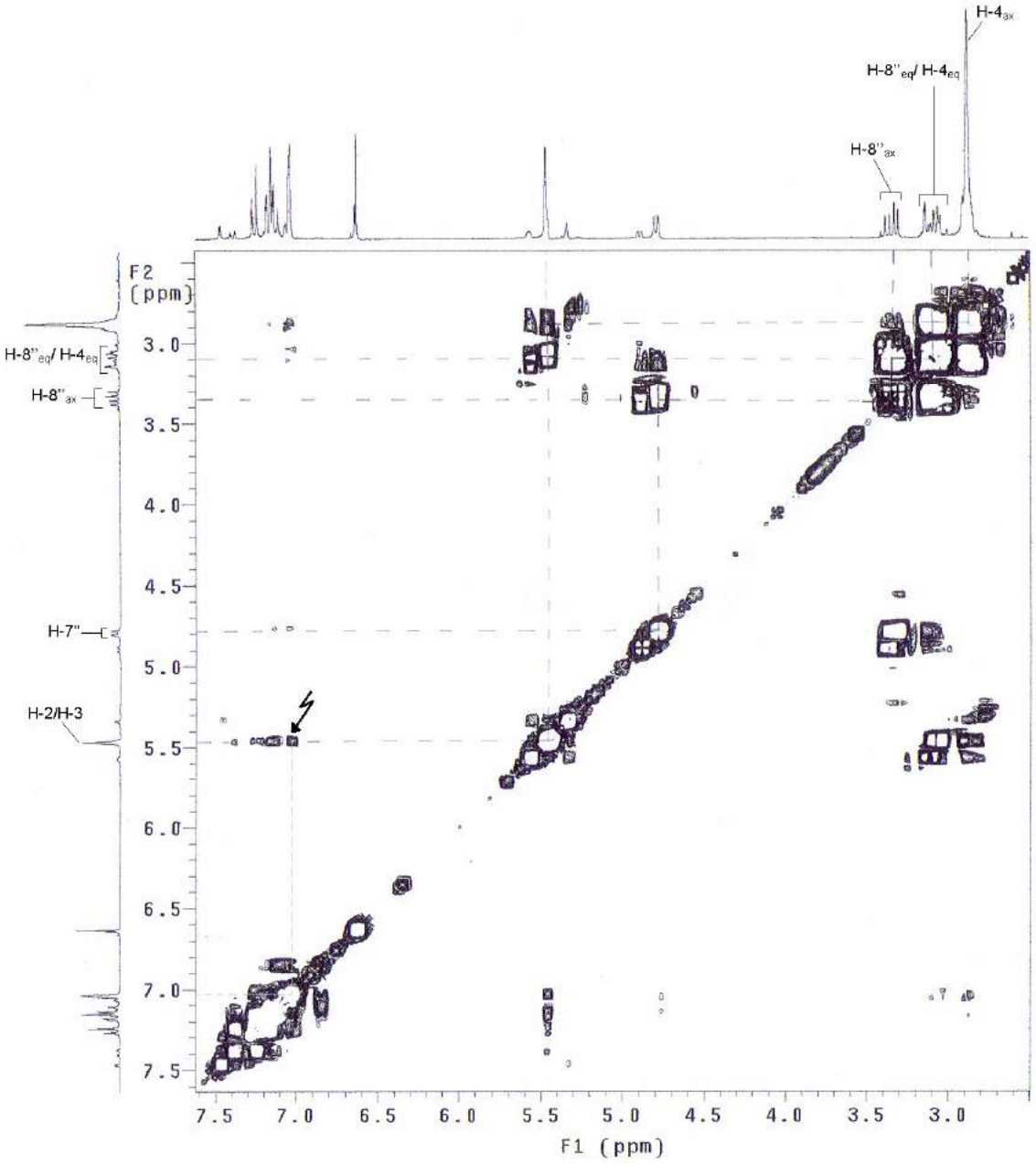


Figura 49 – Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

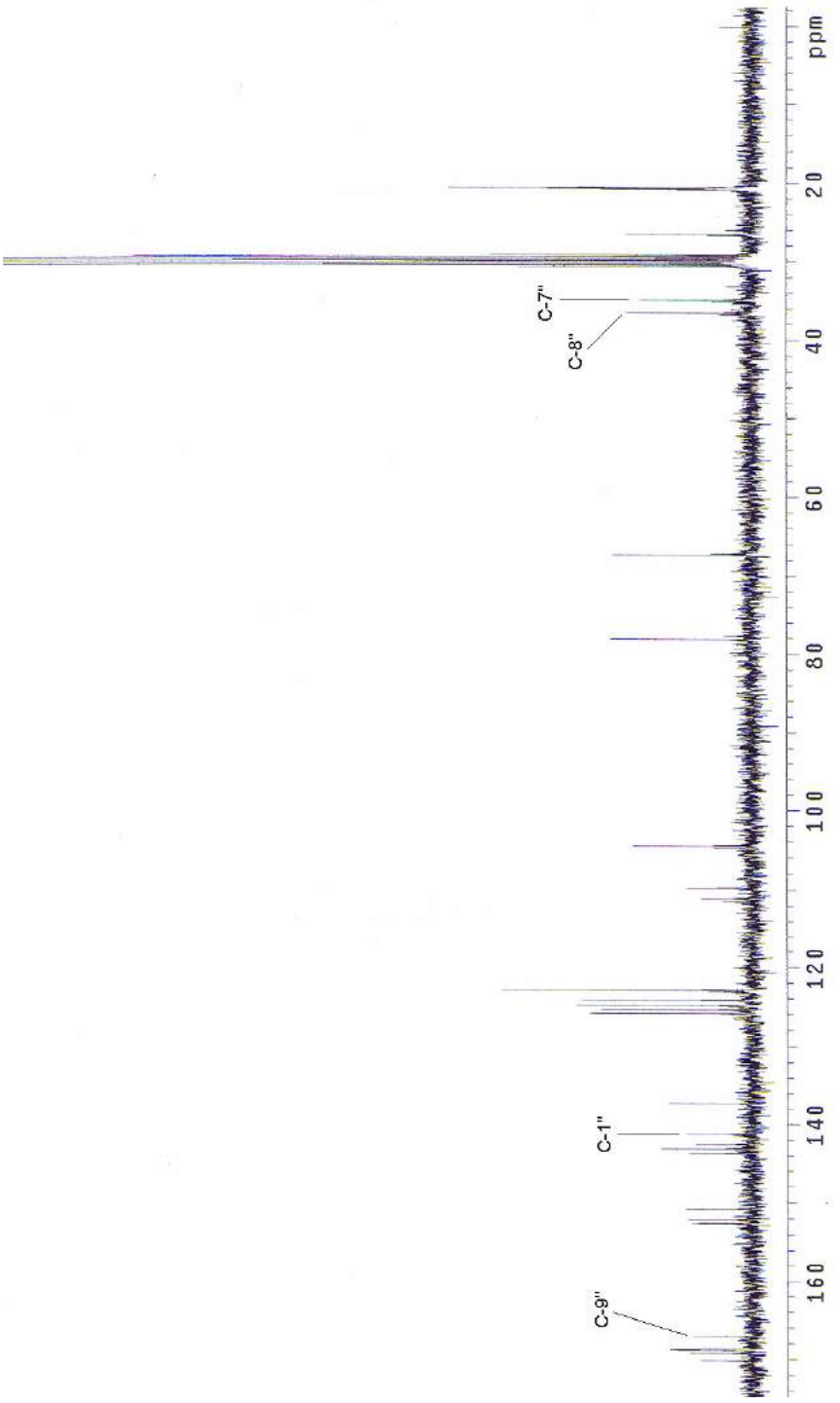


Figura 50 – RMN ^{13}C da **substância VII** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

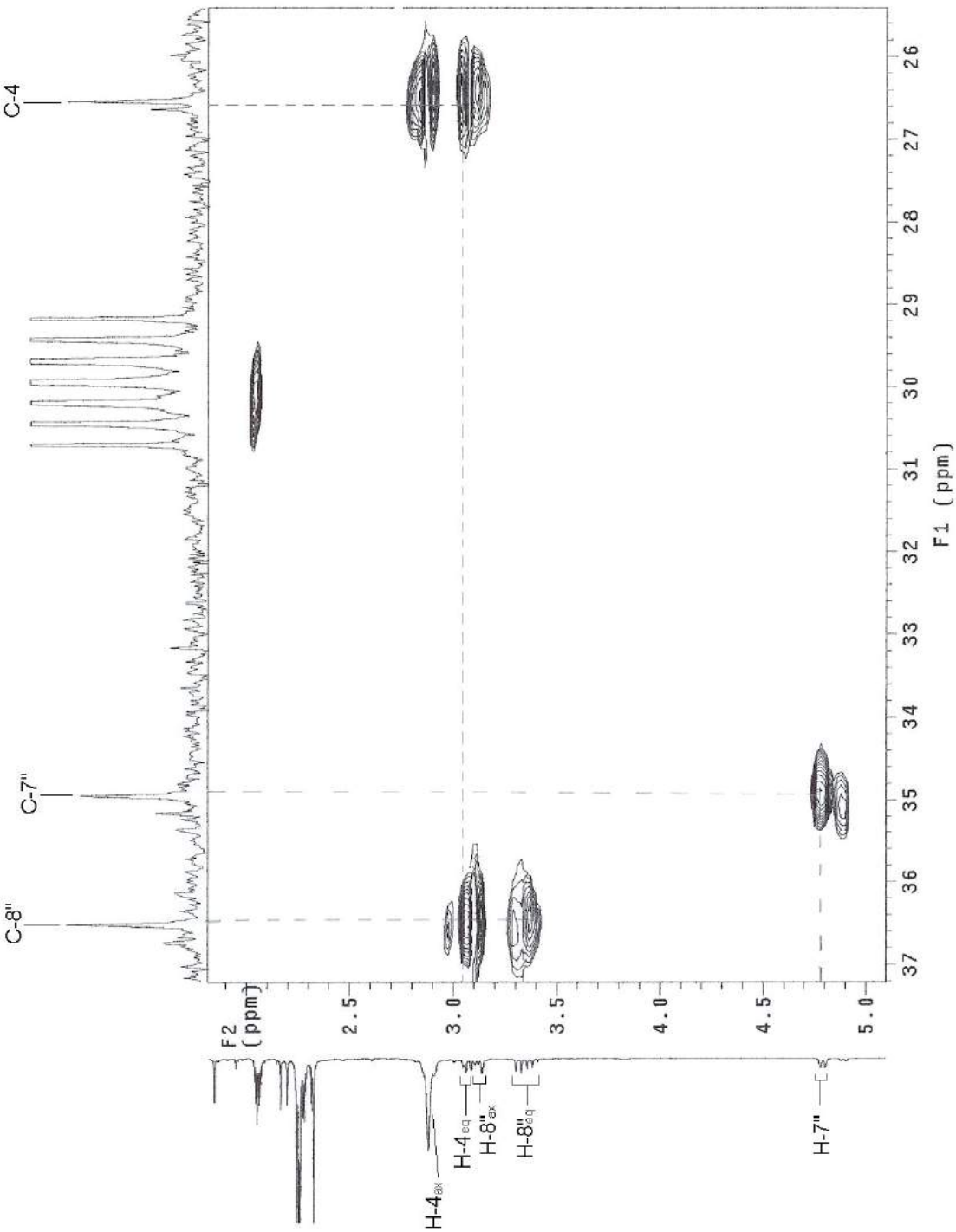


Figura 51 – Correlação heteronuclear HMQC da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

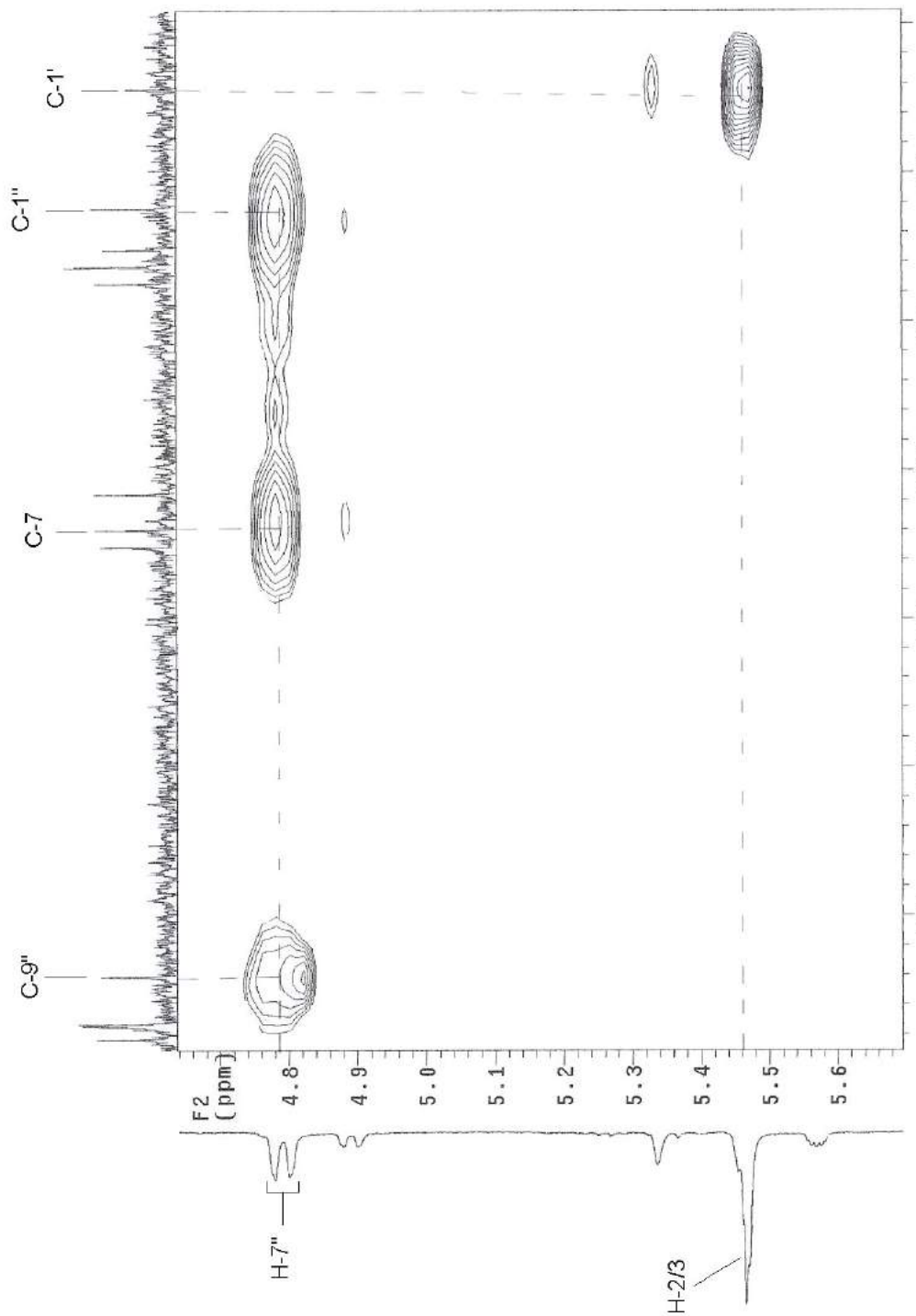


Figura 52 – Correlação heteronuclear HMBC da **substância VII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

A análise do espectro de RMN ^{1}H desta substância (fig. 48) se assemelha ao da **substância IV** (fig. 22), ou seja, ao da cinchonaína Ia, apresentando diferenças nos deslocamentos dos hidrogênios alifáticos (anel C) e da unidade fenilpropanóide.

Na **substância VII**, assim como na **substância IV**, a existência de um substituinte fenilpropanóide ligado no anel A da unidade flavan-3-ol pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (fig. 50), onde aparecem sinais atribuídos a uma carbonila (C-9'') em δ 167,1 ppm, um grupo metileno α em relação à carbonila (C-8'') em δ 36,5 ppm, um carbono metínico β em relação à carbonila (C-7'') em 34,9 ppm e um anel aromático diidroxilado.

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da porção epicatequina H-4_{ax} e H-4_{eq}, bem como os hidrogênios alifáticos da porção fenilpropanóide, H-8''$_{ax}$ e H-8''$_{eq}$. Os hidrogênios H-4_{ax} e H-4_{eq} se apresentam com deslocamentos em δ 2,88 e 3,08 ppm, respectivamente; enquanto que os hidrogênios H-8''$_{ax}$ e H-8''$_{eq}$ se apresentam com deslocamentos em δ 3,11 e 3,08 ppm, respectivamente, no espectro da substância acetilada em acetona-d_6.

Os hidrogênios alifáticos da porção epicatequina, H-2(C) e H-3(C), apresentam-se sobrepostos em δ 5,45-5,47 ppm. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração relativa 2,3-*cis*, para esta parte da molécula. Já o hidrogênio alifático H-7'' apresenta deslocamento em δ 4,79 ppm, aparecendo como um dubleto largo, teoricamente representando um duplo dubleto, com constantes de acoplamento de 6 Hz entre H-7'' e H-8''$_{eq}$ e inferior a 1 Hz entre H-7'' e H-8''$_{ax}$. No espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H - fig. 49), pode-se observar a correlação entre todos esses hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nas unidades monoméricas do tipo catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX. Além disso, foi possível estabelecer a correlação entre o H-2(C) e H-2'(B) da porção flavan-3-ol, através do espectro de COSY ^{1}H-^{1}H (fig. 49).

O hidrogênio H-6(A) aparece como um singleto em δ 6,63 ppm. De acordo com Fletcher e colaboradores (1977), Hemingway e colaboradores (1982) e Kolodziej (1989), a configuração relativa da porção epicatequina é do tipo 2,3-*cis* e a configuração absoluta 2*R*, 3*R*.

Segundo Nonaka e Nishioka (1982), a **substância VII** trata-se de uma unidade flavan-3-ol substituída de uma unidade fenilpropanóide em C-8, pois no espectro de ^{13}C RMN da **substância VII** acetilada, o carbono C-8 aparece com deslocamento δ em 111,1 (campo mais baixo) e C-6 aparece em δ 104,5 (campo mais alto).

A posição do anel aromático da porção fenilpropanóide, pode ser definida através dos deslocamentos do hidrogênio H-2 e dos hidrogênios do anel aromático da porção flavan-3-ol, como descrito para cinchonaína Ia. Na cinchonaína Ib, em que este anel se

encontra em posição α (fig. 54), o sinal de H-2(C) encontra-se em campos mais baixos e os hidrogênios do anel B se encontram em campos mais altos quando comparados com os sinais da epicatequina (tab. 17). Estes deslocamentos demonstram que estes hidrogênios sofrem efeitos anisotrópicos provocados pela posição α do anel aromático fenilpropanóide (NONAKA; NISHIOKA, 1982; revisado por CHEN *et al.*, 1993). Ou seja, o anel aromático da parte flavan-3-ol sofre uma blindagem quando o anel aromático fenilpropanóide se encontra em posição α e conseqüentemente o hidrogênio alifático H-2(C) sofre uma desblindagem. Portanto, sugere-se que a **substância VII** trata-se da cinchonaína Ib (fig. 54). Estes efeitos anisotrópicos podem ser observados através da análise do modelo de Dreiding.

Tabela 17 – Comparação entre deslocamentos de hidrogênios da **substância VII** e da epicatequina no espectro de RMN ^{1}H (300 MHz; $CDCl_3$).

H	**Sustância VII** δ **(ppm)**	**Epicatequina** δ **(ppm)**
H-2	5,13	5,09
H-2'(B)	7,01	7,33
H-5'(B)	7,14	7,18
H-6'(B)	7,11	7,25

A estereoquímica da substância livre foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°}$ = -3 ° (metanol; c=0,1). Acredita-se que este valor se deva à pequena quantidade de cinchonaína Ia presente, em mistura, juntamente com a **substância VII**. Pois se espera que este valor seja fracamente positivo assim como na **substância VI**. Para a confirmação da configuração absoluta desta substância, foi realizada análise por dicroísmo circular.

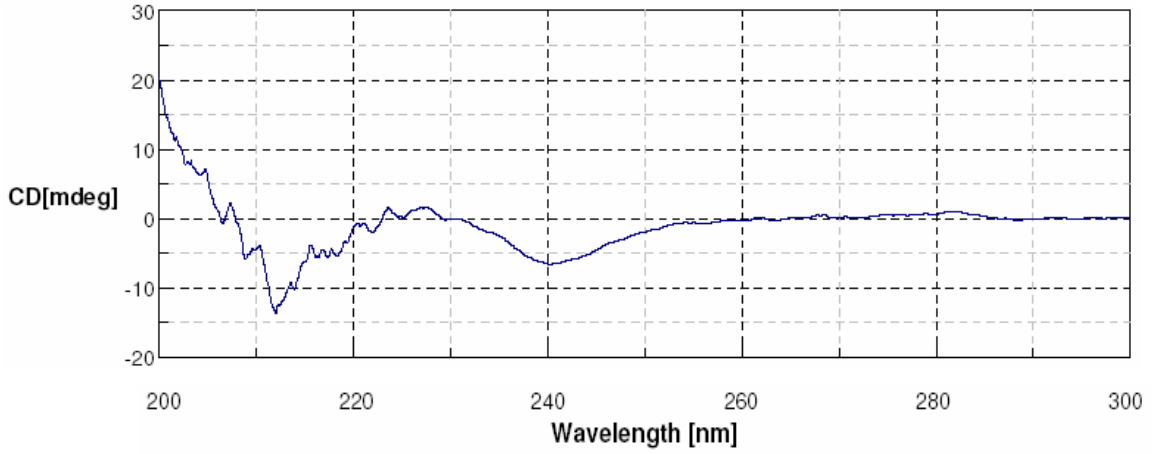


Figura 53 – Espectro de dicroísmo circular da **substância VII**.

No espectro de dicroísmo circular da **substância VII** (fig. 53), pode-se observar um efeito *Cotton* positivo em 234 e 280 nm e um efeito negativo em 255 nm, confirmando a posição β para o hidrogênio metínico (H-7'') e a posição α para o anel aromático fenilpropanóide (CHEN *et al*., 1993).

Dessa maneira, concluiu-se que a **substância VII** se trata da cinchonaína Ib (fig. 54).

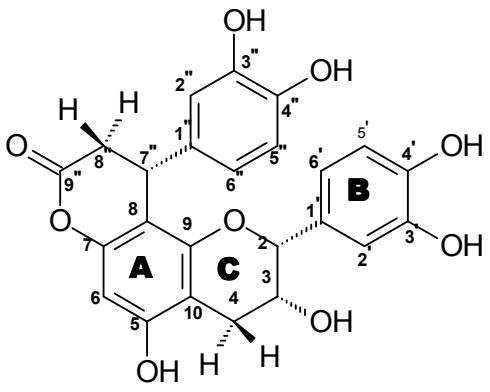


Figura 54 – Estrutura da **substância VII**, cinchonaína Ib.

As **substâncias IV** (cinchonaína Ia) e **VII** (cinchonaína Ib) foram isoladas anteriormente da espécie *Trichilia catigua* (PIZZOLATTI, 2002a; BELTRAME, 2006), porém há uma confusão na estereoquímica dos epímeros, que pode ser esclarecida através da análise do modelo de Dreiding, pela determinação e análise do dicroísmo circular e ainda por análises de difração de raio X.

5.2.1.8 **Substância VIII – Cinchonaína IIc**

Cerca de 15 mg da subfração F#21.3 foram derivatizados (seção 4.6), analisadas por RMN, espectrometria de massas e dicroísmo circular e então denominados de **substância VIII**. Além desta, a subfração F#22.2 (cerca de 26 mg), também foi derivatizada e purificada por CCDP (seção 4.5.4), obtendo-se a F#22.2.1, que foi então analisada por RMN, concluindo-se tratar da mesma substância.

A **substância VIII** livre apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M- H^+]^-$= 739,4 e $[M+Na^+]^+$= 763,4 (fig. 55) característico de uma substância dimérica livre, contendo uma unidade do tipo catequina/epicatequina adicionada de outra unidade catequina/epicatequina substituída de um fenilpropanóide (*m/z*=740).

A análise dos espectros de RMN ^{1}H (fig. 56 e 59), RMN ^{13}C (fig. 61), RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H) (fig. 57, 58 e 60) e das correlações heteronucleares 2D HMQC (fig. 62) e HMBC (fig. 63) da **substância VIII** derivatizada em $CDCl_3$ e acetona-d_6 forneceu dados representativos de uma substância dimérica apresentando um monômero fenilpropanóide derivado da epicatequina e outro monômero epicatequina. O espectro de RMN ^{13}C (fig. 61) se assemelha ao espectro da **substância V (**fig. 33), porém com pequenas diferenças de deslocamento nos carbonos da porção fenilpropanóide da unidade superior. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento da **substância VIII** acetilada em $CDCl_3$ podem ser observados na tabela 18 e os dados em acetona-d_6 são encontrados na tabela 19.

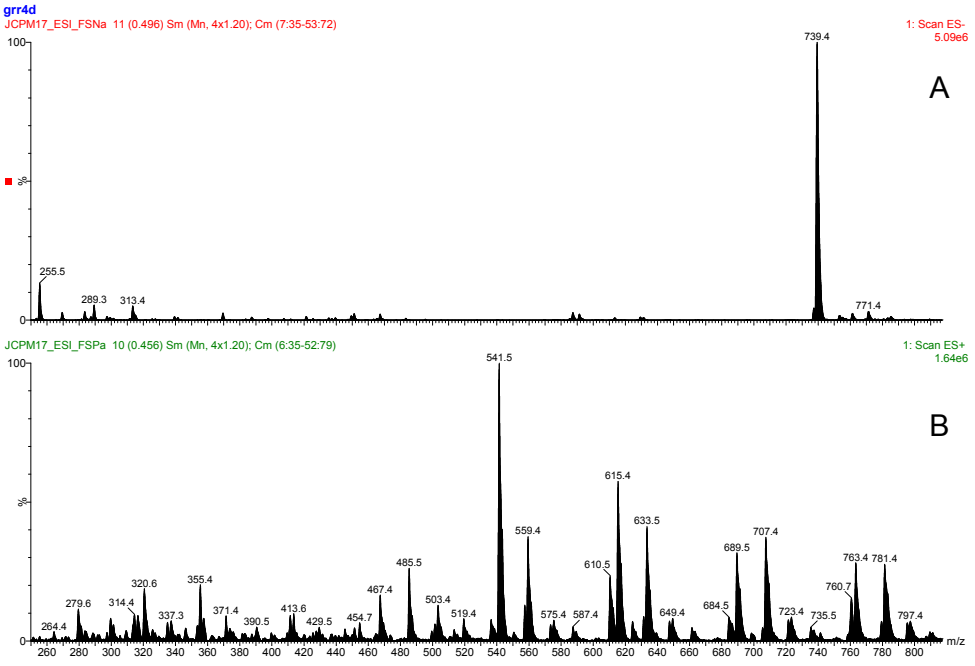


Figura 55 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância VIII**.

Tabela 18 – Dados de RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4(F)	2,91 - 3,09	*m*	
H-8''	3,10 - 3,25	*m*	
H-4(C)	4,56	*sl*	
H-7''	4,72	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 6,6 $^{3}J_{H\text{-}7''\text{-}H\text{-}8''}$ = 1,8
H-2(F)	5,20	*sl*	
H-3(C)	5,29 - 5,30	*m*	
H-2(C)	5,38	*sl*	
H-3(F)	5,48 - 5,50	*m*	
H-6(A)	6,49	*s*	
H-6(D)	6,60	*s*	
H-6''	7,00	*dd*	$^{4}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}2''}$ = 1,8 $^{3}J_{H\text{-}6''\text{-}H\text{-}5''}$ = 7,2
H-2''	7,10	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2''\text{-}H\text{-}6''}$ = 2,1
H-2'(E)	7,23	*sl*	
H-5''	7,14	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5''\text{-}H\text{-}6''}$ = 7,8
H-5'(B)	7,16	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 7,5
H-5'(E)	7,16	*d*	$^{3}J_{H\text{-}5'\text{-}H\text{-}6'}$ = 7,5
H-6'(E)	7,22 - 7,25	*m*	
H-6'(B)	7,22 - 7,25	*m*	
H-2'(B)	7,35	*d*	$^{4}J_{H\text{-}2'\text{-}H\text{-}6'}$ = 1,8

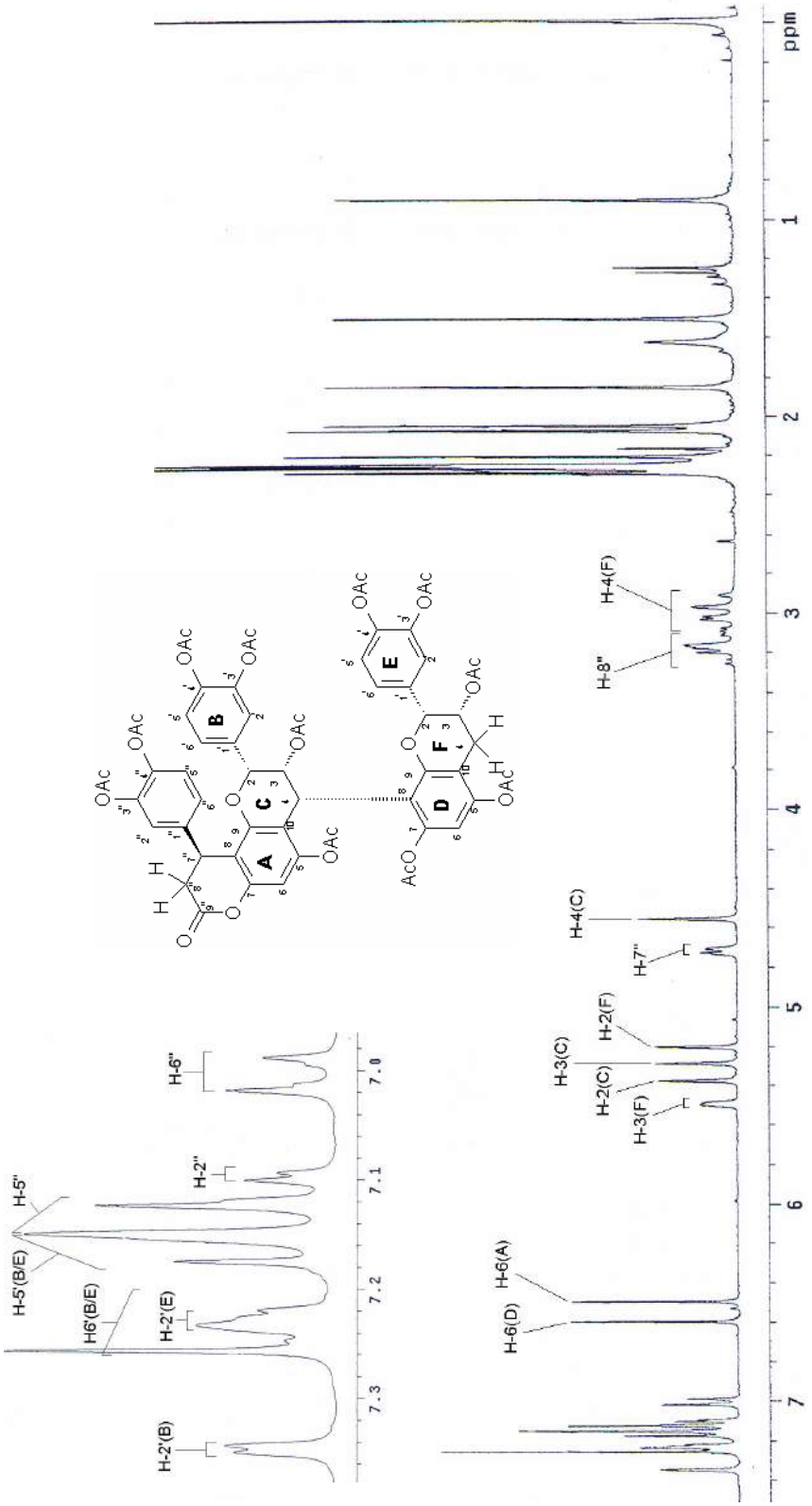


Figura 56 – RMN H^1 da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

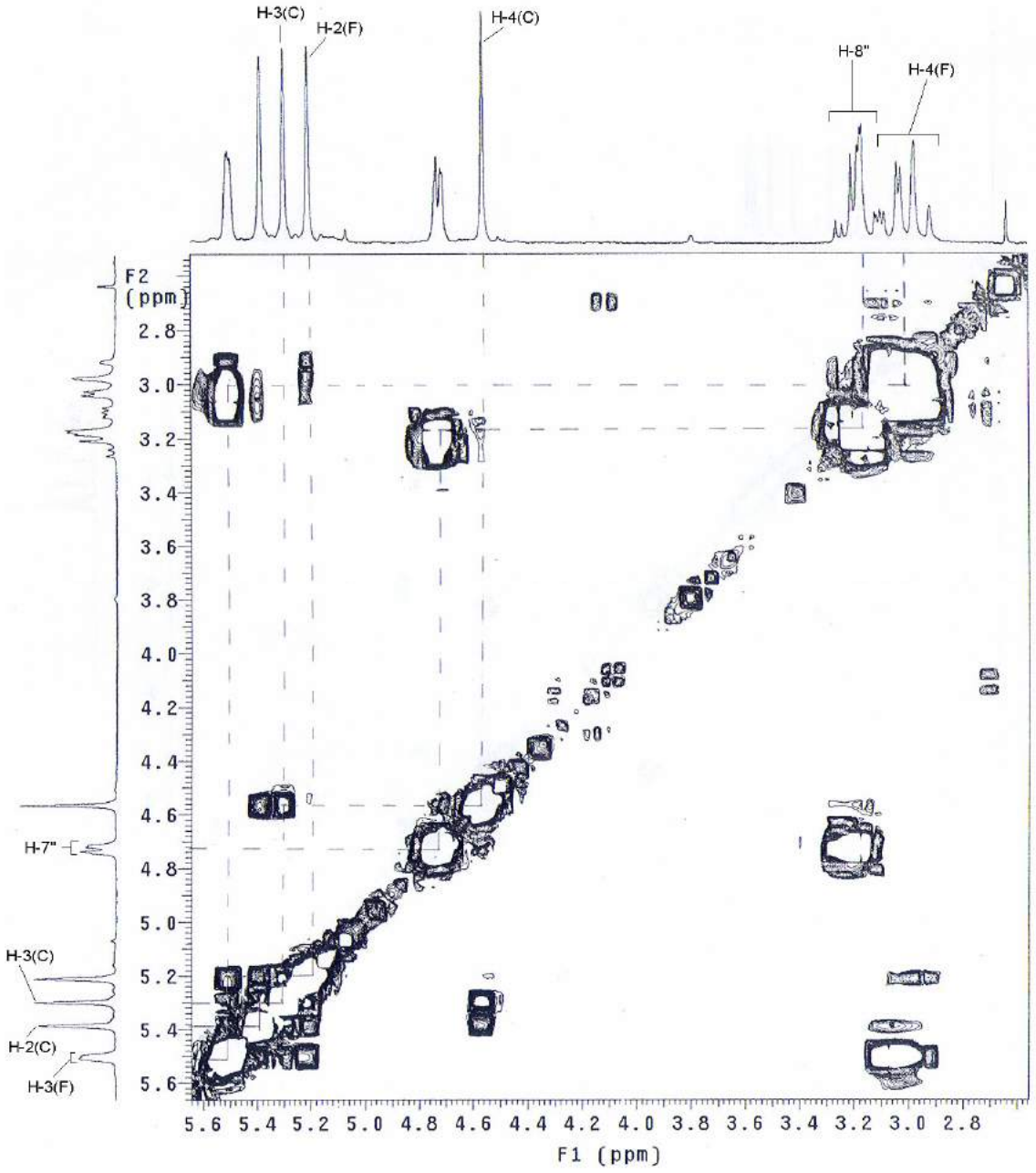


Figura 57 – Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

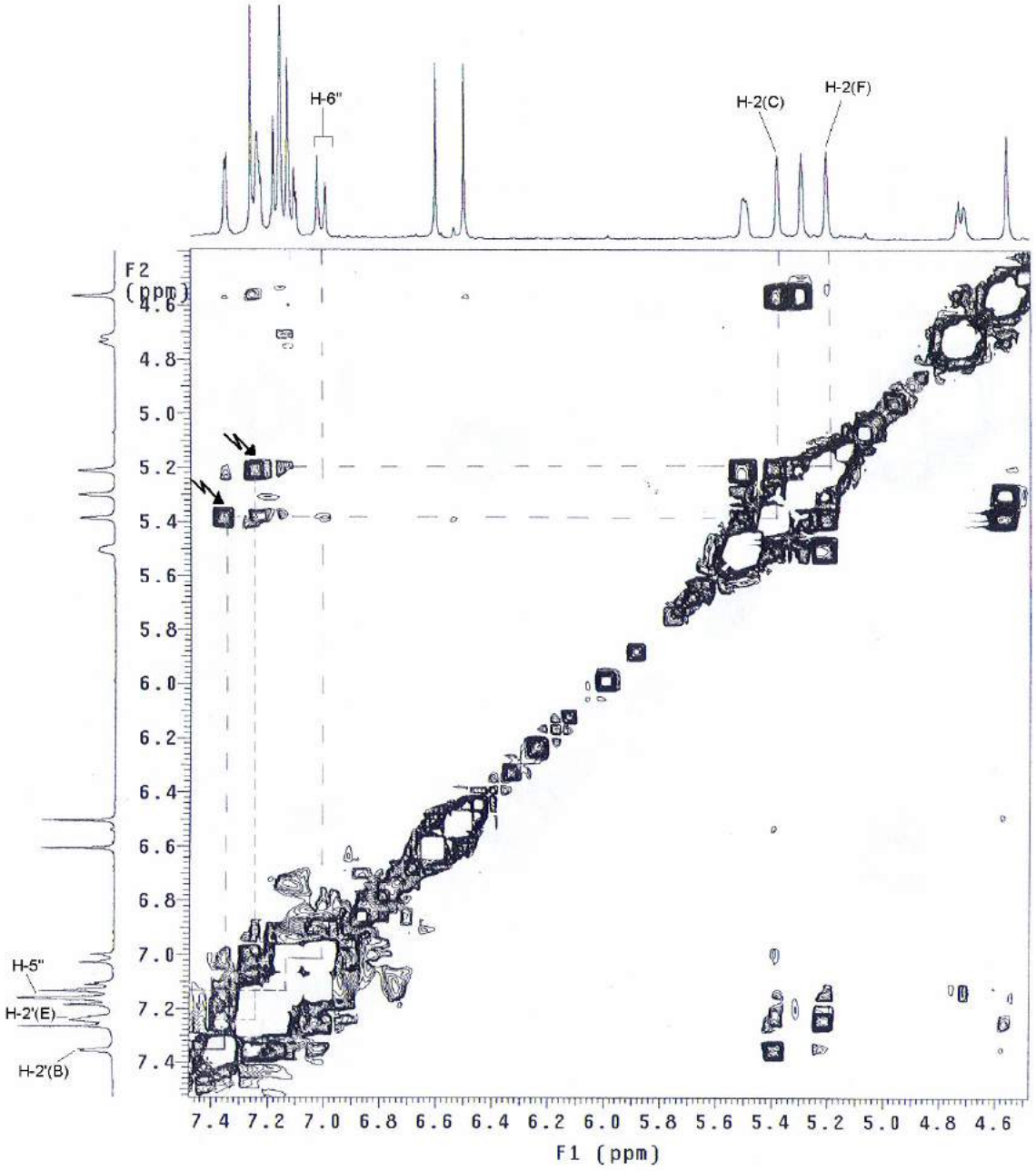


Figura 58 – Espectro COSY $^{1}H/^{1}H$ da **substância VIII** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

Tabela 19 – Dados de RMN ^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6, relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4_{ax}(F)	2,82 - 2,95	*m*	
H-8''$_{eq}$	2,95 – 3,07	*m*	
H-4_{eq}(F)	3,20	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}3}$ = 4,5 $^{2}J_{H\text{-}4\text{-}H\text{-}4}$ = 1,8
H-8''$_{ax}$	3,52	*dd*	$^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}7''}$ = 7,8 $^{3}J_{H\text{-}8''\text{-}H\text{-}8''}$ = 16,5
H-4(C)	4,67	*sl*	
H-7''	4,92	*dl*	ΣJ = 7,2
H-3(C)	5,34 - 5,35	*m*	
H-2(F)	5,40	*sl*	
H-2(C)	5,41	*sl*	
H-3(F)	5,66 -5,68	*m*	
H-6(A)	6,61	*s*	
H-6(D)	6,64	*s*	
H (B, E, fenilpropanóide)	7,11 – 7,45		

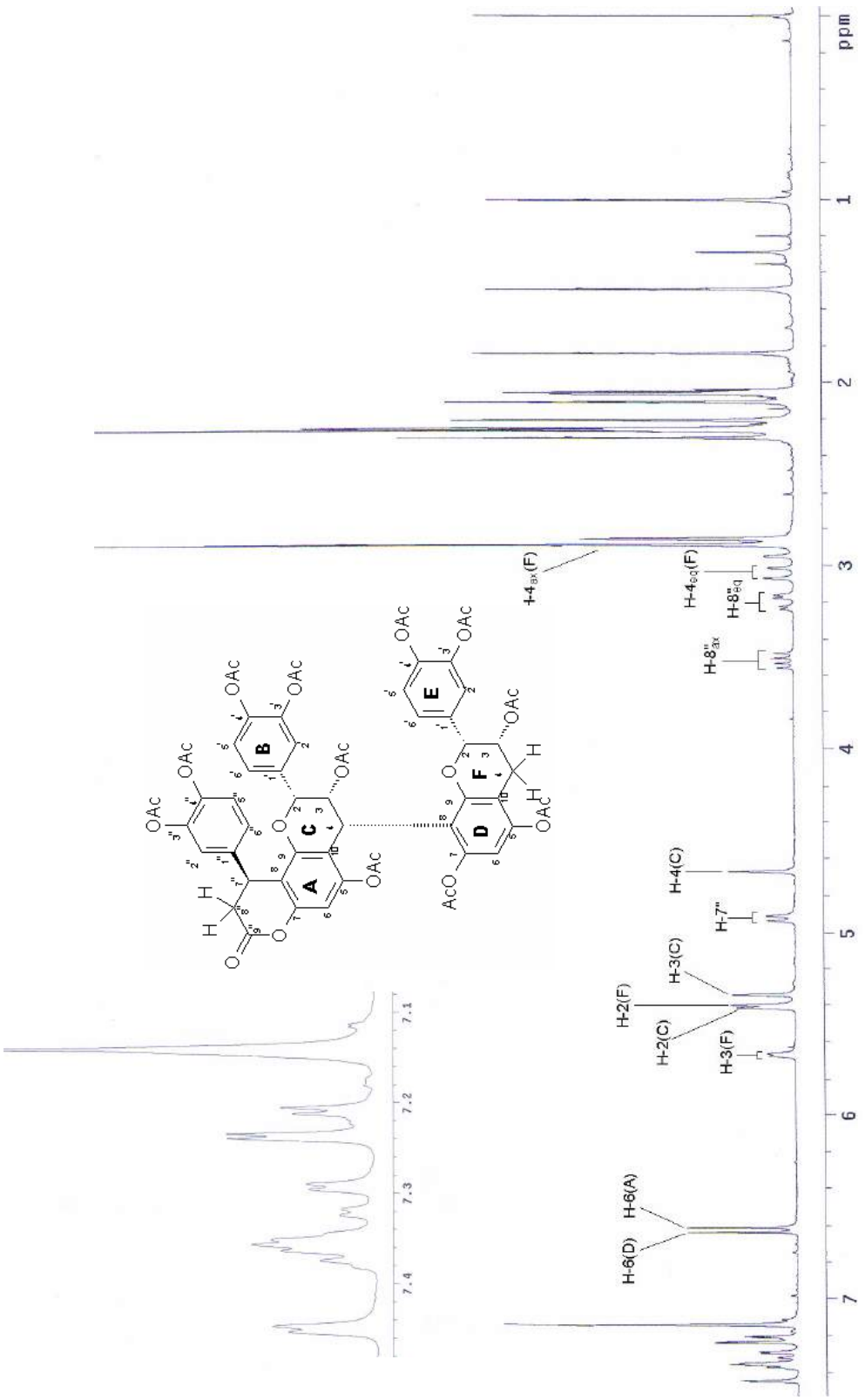


Figura 59 – RMN H^1 da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

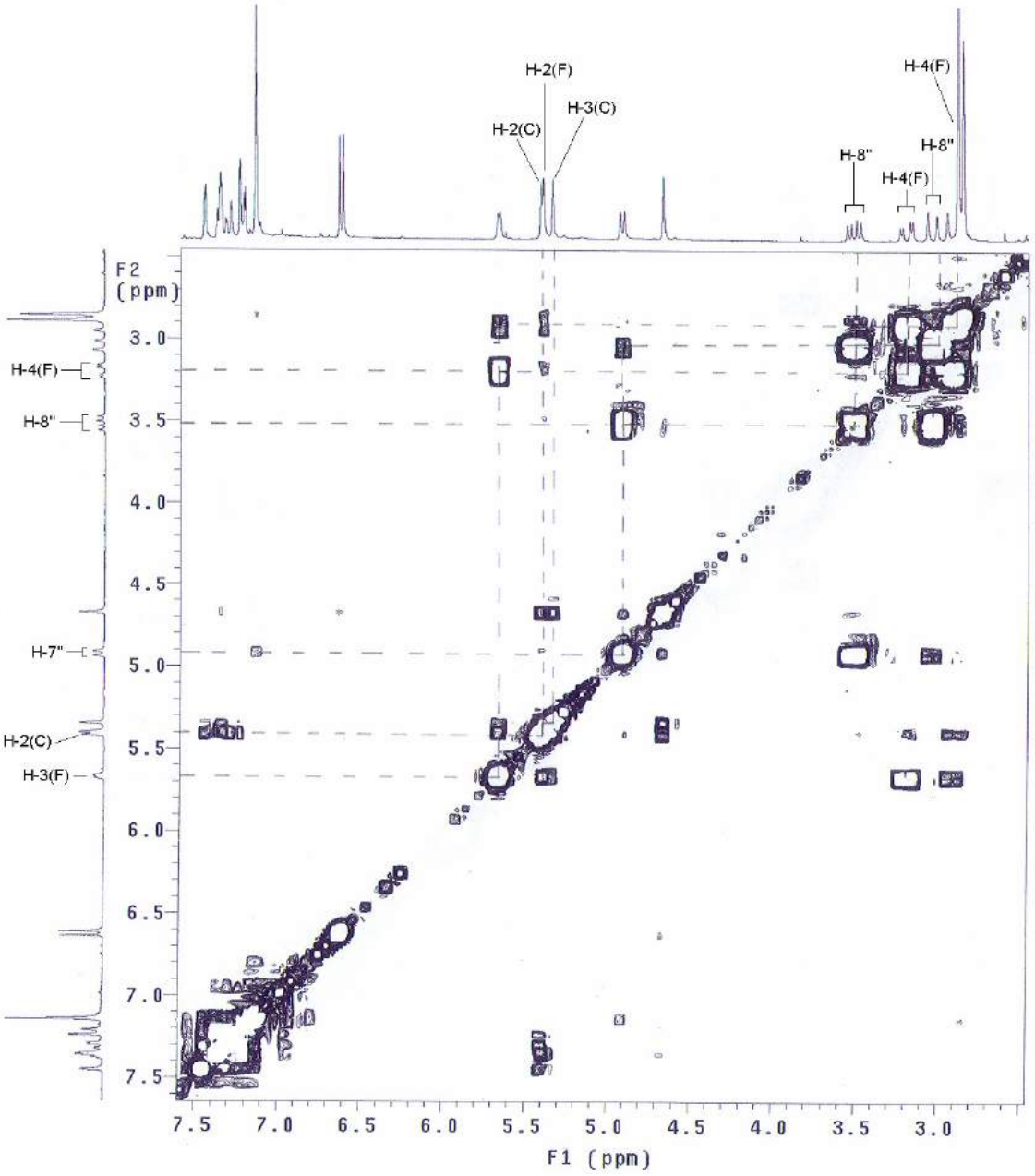


Figura 60 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

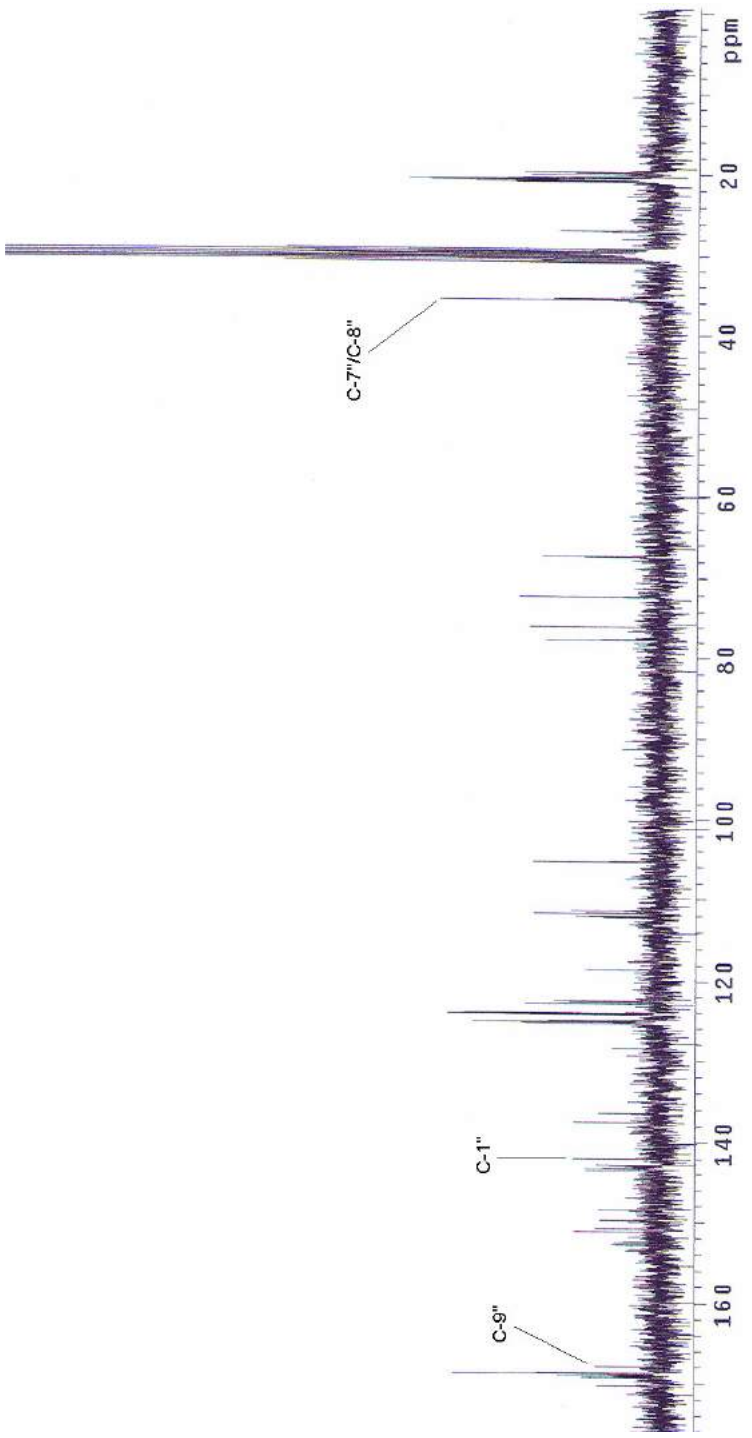


Figura 61 – RMN ^{13}C da **substância VIII** acetilada (75 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

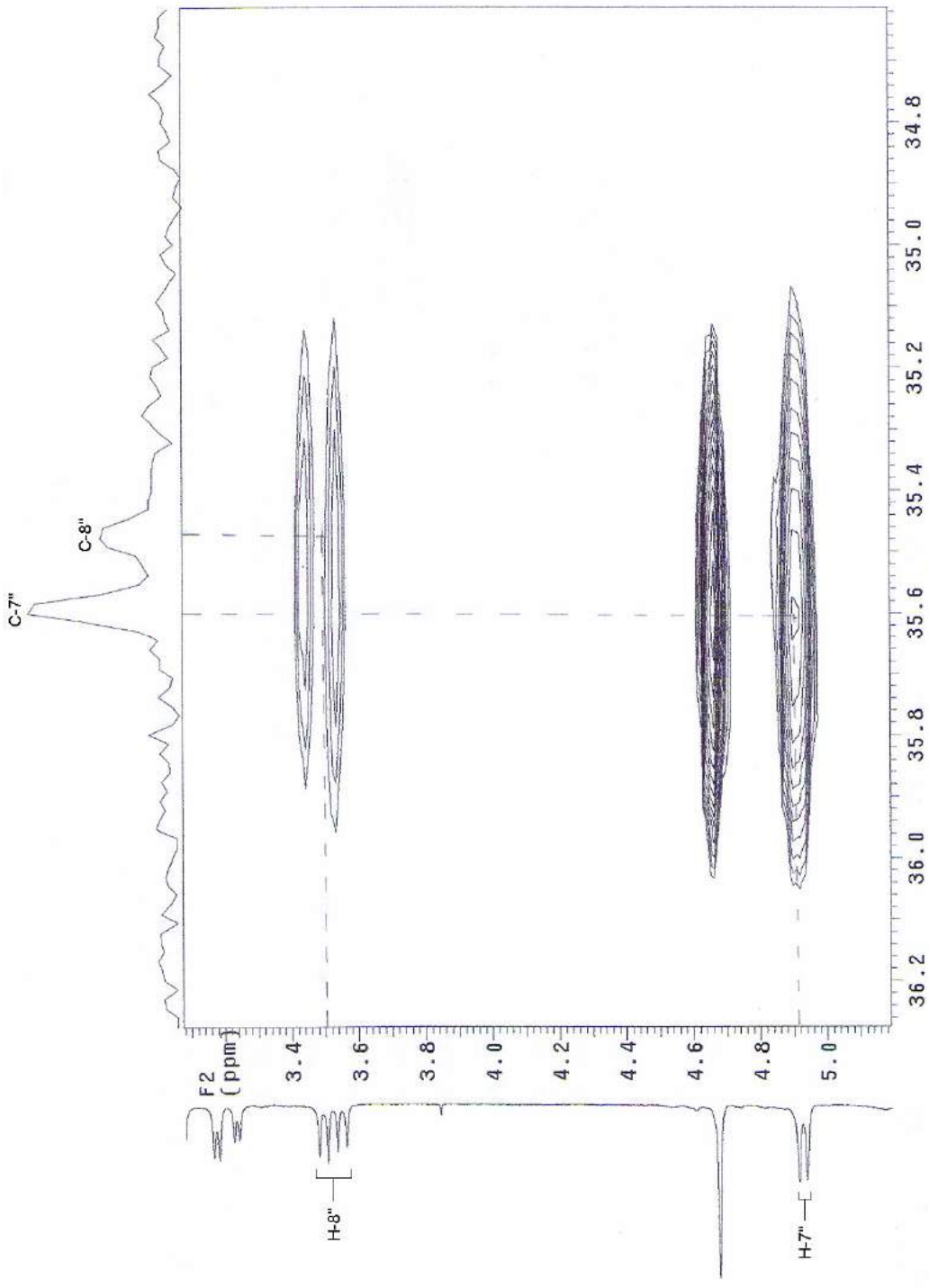


Figura 62 – Correlação heteronuclear HMQC da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

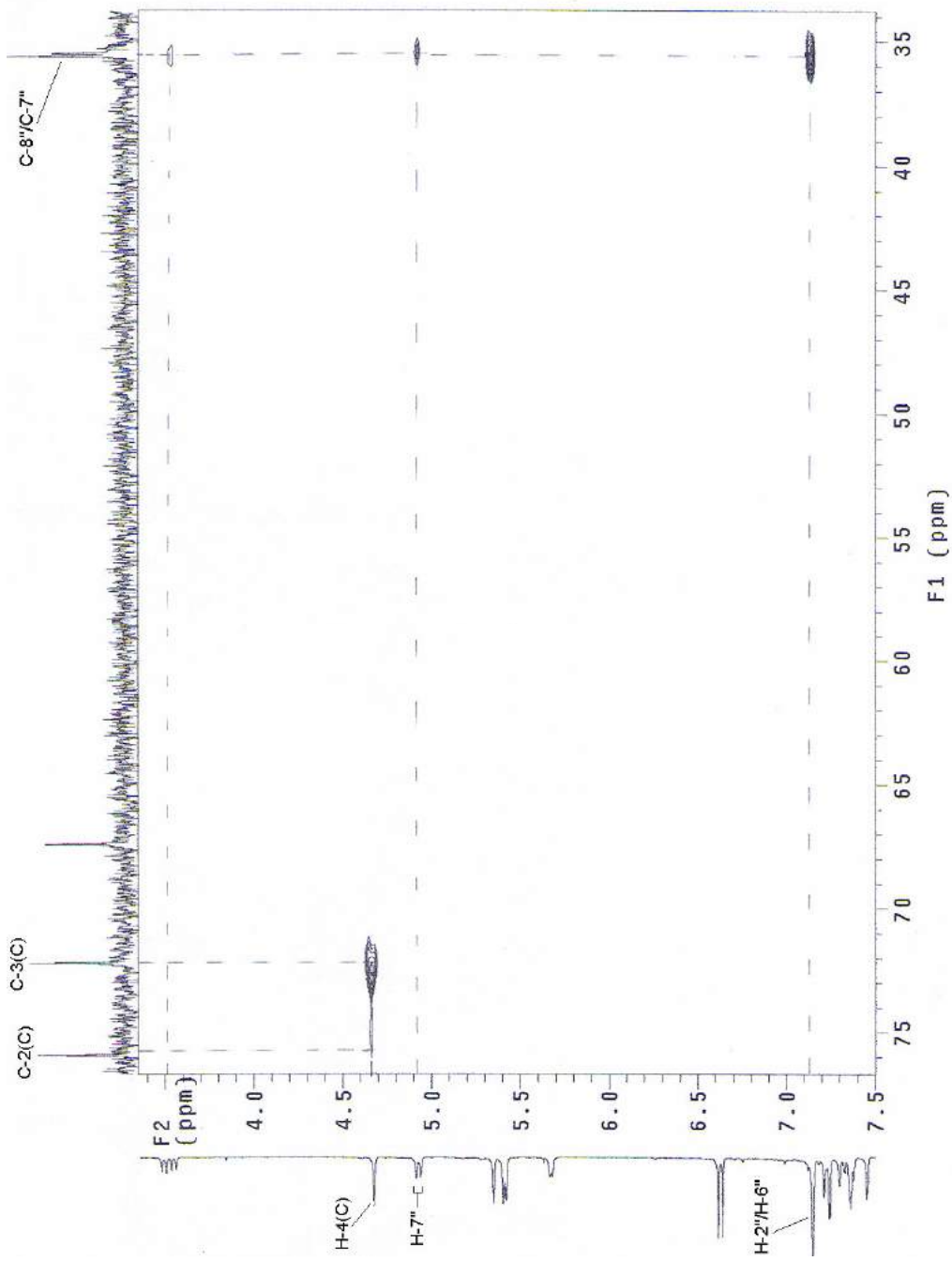


Figura 63 – Correlação heteronuclear HMBC da **substância VIII** acetilada (300 MHz; acetona-d_6; relativo para TMS).

Na **substância VIII**, a existência de um substituinte fenilpropanóide ligado no anel A da unidade flavan-3-ol superior pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C (fig. 61), onde aparecem sinais atribuídos a uma carbonila (C-9'') em δ 167,9 ppm, um grupo metileno α em relação à carbonila (C-8'') em δ 35,6 ppm, um carbono metínico β em relação à carbonila (C-7'') em 35,5 ppm e um anel aromático com um sistema AMX.

Observa-se pelos sinais entre δ 2,80 e 5,68 ppm a presença de uma substância do tipo proantocianidina dimérica. Isto pode ser confirmado pelas correlações existentes no espectro de COSY ^{1}H-^{1}H (fig. 58 e 60).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da porção fenilpropanóide da unidade superior, H-8''$_{eq}$ e H-8''$_{ax}$, sendo que se apresentam com deslocamentos em δ 3,01 e 3,52 ppm, respectivamente no espectro da substância acetilada em acetona-d_6.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior H-4(F)$_{ax}$ e H-4(F)$_{eq}$ também se encontram bem protegidos, apresentando deslocamentos em δ 2,92 e 3,20 ppm, respectivamente. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,67 ppm como um singleto largo com constante de acoplamento com o hidrogênio H-3(C) inferior a 1 Hz, sugerindo uma configuração 3,4-*cis*. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui também uma constante inferior a 1 Hz, estabelecendo uma configuração do tipo 2,3-*cis*, 3,4-*cis*, para a unidade superior (WEINGES *et al.*, 1968).

Esta unidade apresenta ainda o hidrogênio alifático H-7'', com deslocamento em δ 4,92 Hz, apresentando-se como um dubleto largo, teoricamente representando um duplo dubleto, com constantes de acoplamento de 7,2 Hz entre H-7'' e H-8''$_{ax}$ e inferior a 1 Hz entre H-7'' e H-8''$_{eq}$.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,67 e 5,40 ppm, respectivamente, no espectro de RMN H^1 em acetona-d_6. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* para a unidade inferior.

A correlação heteronuclear entre H-4(C) e C-8(A) observada no espectro de HMBC, comprova a ligação entre as unidades superior e inferior como sendo do tipo (4→8).

No espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H) (fig. 56) pode-se observar correlações entre todos os hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da região aromática apresentam-se como nos derivados monoméricos do tipo catequina/epicatequina, com três sistemas do tipo AMX, sendo dois pertencentes às porções epicatequina e um pertencente à porção fenilpropanóide da unidade superior. É possível determinar os deslocamentos e as constantes de acoplamento de quase todos os hidrogênios, através do espectro de COSY

^{1}H-^{1}H (fig. 58 e 60). Assim, é possível também observar a correlação entre o H-2(C) com H-2'(B) e H-2(F) com H-2'(E) (fig. 58).

Apesar da semelhança da estrutura com substâncias diméricas do tipo epicatequina-(4α→8)-epicatequina, a presença de uma unidade fenilpropanóide na parte superior da molécula pode alterar de forma significativa os deslocamentos dos hidrogênios alifáticos, tanto do anel C como do anel F. Isto pode ser comprovado comparando-se os espectros de RMN entre esta **substância VIII** e a **substância V**.

A estereoquímica da substância livre foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20°} = -5°$ (acetona; c=0,1). Além disso a configuração absoluta de C-4(C) foi confirmada através da análise do espectro de dicroísmo circular.

Segundo Thompson *et al.* (1972) procianidinas diméricas com configuração 4*S*, ou seja, com ligação do tipo α entre as unidades superior e inferior, apresentam efeito *Cotton* negativo em 275 nm. Além disso, Mello (1995) demonstrou que estruturas diméricas de taninos condensados com configuração 4*S* apresentam efeito *Cotton* negativo também entre 220 e 240 nm.

No espectro de dicroísmo circular da **substância VIII** (fig. 64) pode-se observar um efeito *Cotton* negativo entre 220 e 240 nm e em 275 nm, estando de acordo com uma configuração do tipo 4*S*, ou seja, a ligação entre as unidades superior e inferior foi confirmada como sendo do tipo α. Através deste espectro, pode-se observar que o efeito negativo dado pela ligação α não se sobrepõe ao efeito provocado pelo carbono β-metínico da porção fenilpropanóide. Pois o efeito *Cotton* positivo em 255 nm dado pela posição β do anel aromático fenilpropanóide, como observado para o monômero cinchonaína Ia, se mantém na substância dimérica **VIII**, diferentemente do que ocorre na **substância V**.

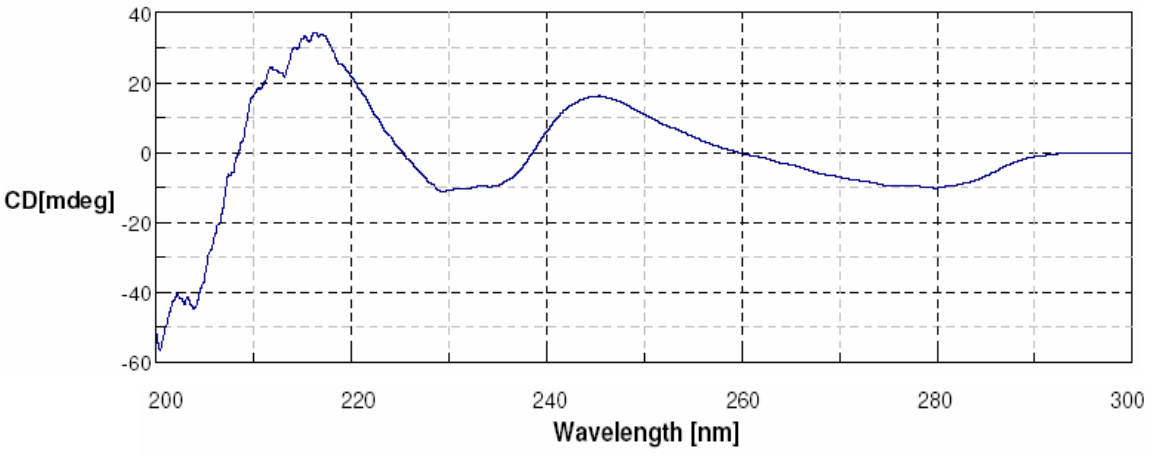


Figura 64 – Espectro de dicroísmo circular da **substância VIII**.

Dessa maneira, concluiu-se que a **substância VIII** trata-se da cinchonaína IIc (fig 65).

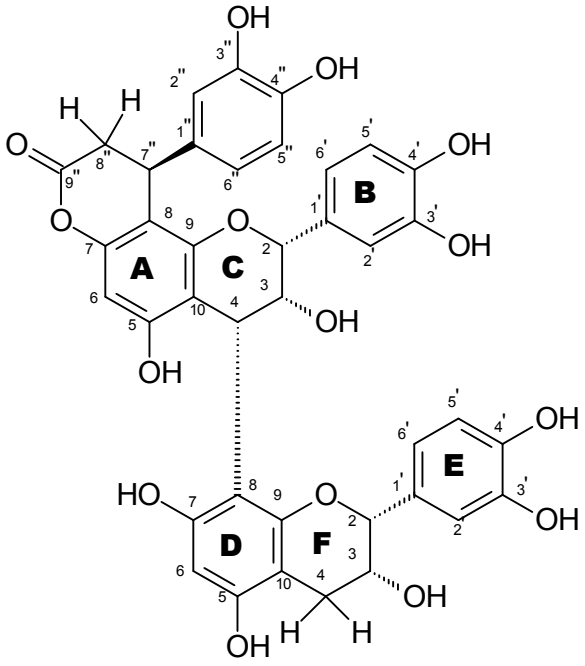


Figura 65 – Estrutura química da **substância VIII,** cinchonaína IIc.

A **substância VIII** nunca foi isolada de fontes naturais ou mesmo obtida por síntese, sendo a primeira vez que a mesma ocorre.

5.2.1.9 **Substância IX – Epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina C_1)**

Cerca de 13 mg da subfração F#21.5 foram derivatizados (seção 4.6), analisados por RMN, espectrometria de massas e dicroísmo circular e então denominadas de **substância IX**.

A **substância IX** livre apresentou no espectro de massas pico do íon pseudo-molecular $[M\text{-}H^+]^-$= 865,5 e $[M+Na^+]^+$= 889,4 (fig. 66) característico de substâncias triméricas livres do tipo catequina/epicatequina (*m/z*= 866).

A análise dos espectros de RMN ^1H (fig. 67) e RMN 2D (COSY ^1H-^1H) (fig. 68) da **substância IX** derivatizada em $CDCl_3$ forneceu dados representativos de uma substância trimérica apresentando três unidades epicatequina unidas através de ligações 4β→8. O espectro de RMN ^1H em $CDCl_3$ (fig. 67) correlaciona-se com o espectro obtido por Ueffing (1988). Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 20.

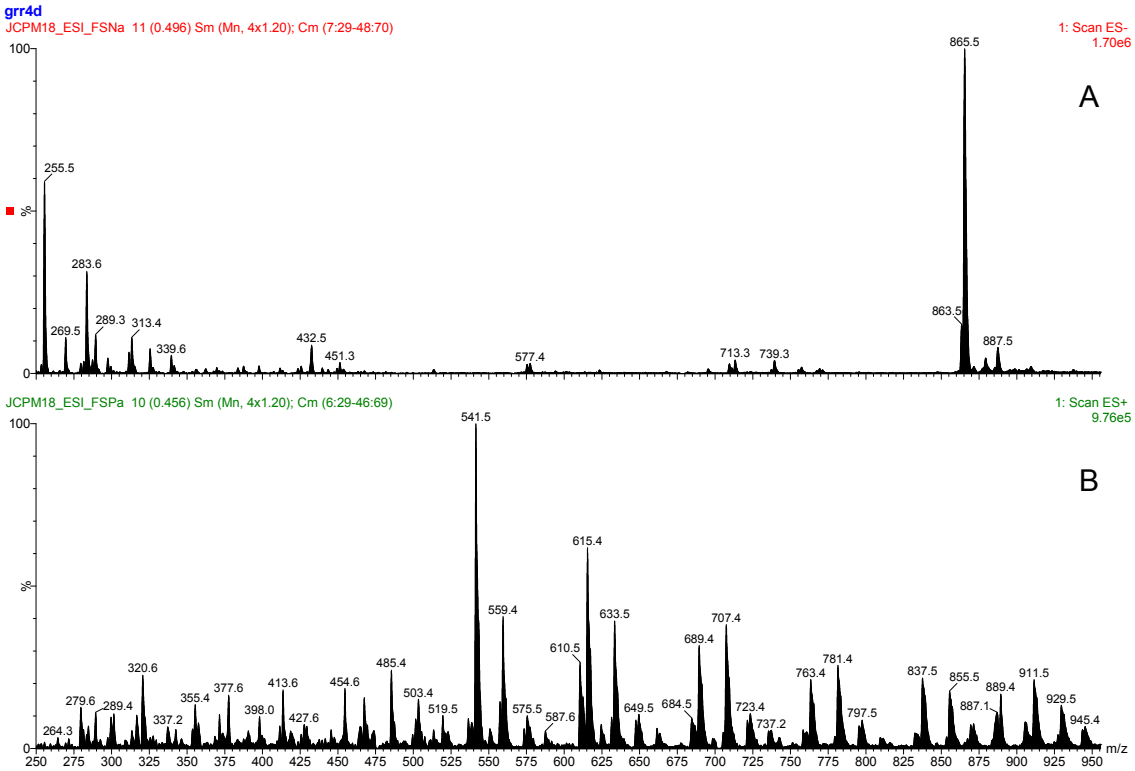


Figura 66 – Espectros de massas de ionização por eletrospray negativo (A) e ionização por eletrospray positivo (B) da **substância IX**.

Tabela 20 – Dados de RMN ^{1}H da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$ relativo para TMS).

Hidrogênio	δ (ppm)	*δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)
H-4 (I)	2 x 2,93-3,13	2 x 2,88–3,11	*m*	
H-4 (C)	4,66	4,65	*s*	
H-4 (F)	4,70	4,71	*s*	
H-2 (F)	4,78	4,82	*s*	
H-3 (C)	5,12	5,09	*m*	
H-2 (I)	5,21	5,16	*s*	
H-2 (C)	5,37	5,40	*s*	
H-3 (F)	5,41	5,44	*m*	
H-3 (I)	5,48	5,48	*m*	
H-6 (A)	5,94	5,95	*d*	$^{4}J_{H\text{-}6\text{-}H\text{-}8}$ = 2,4
H-8 (A)	6,25	6,21	*d*	$^{4}J_{H\text{-}8\text{-}H\text{-}6}$ = 2,4
H-6 (D)	6,65	6,62	*s*	
H-6 (G)	6,71	6,72	*s*	
H-(B, E e H)	6,76 - 7,37	7,11-7,40	*m*	

*Ueffing (1988).

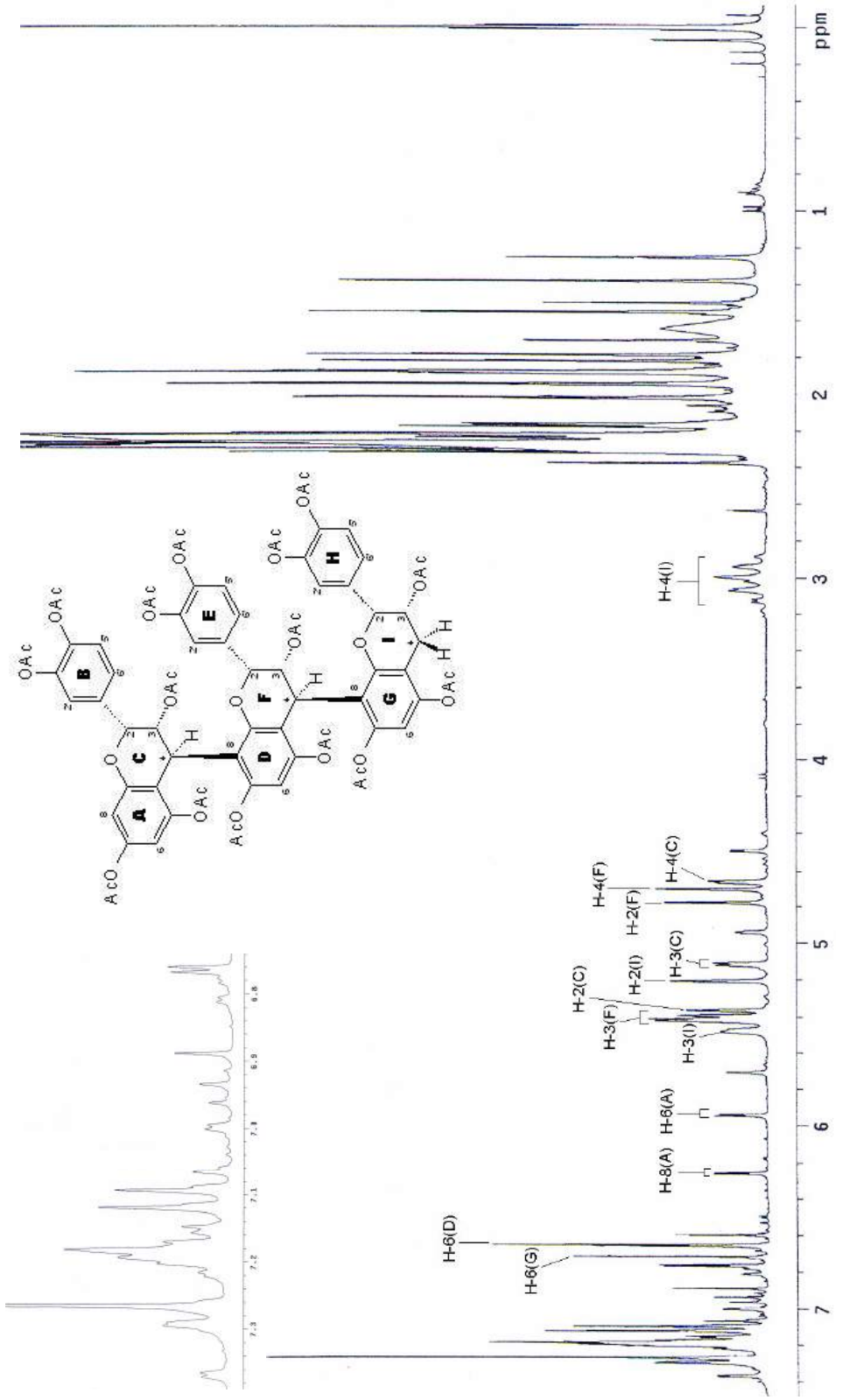


Figura 67 – RMN H^1 da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

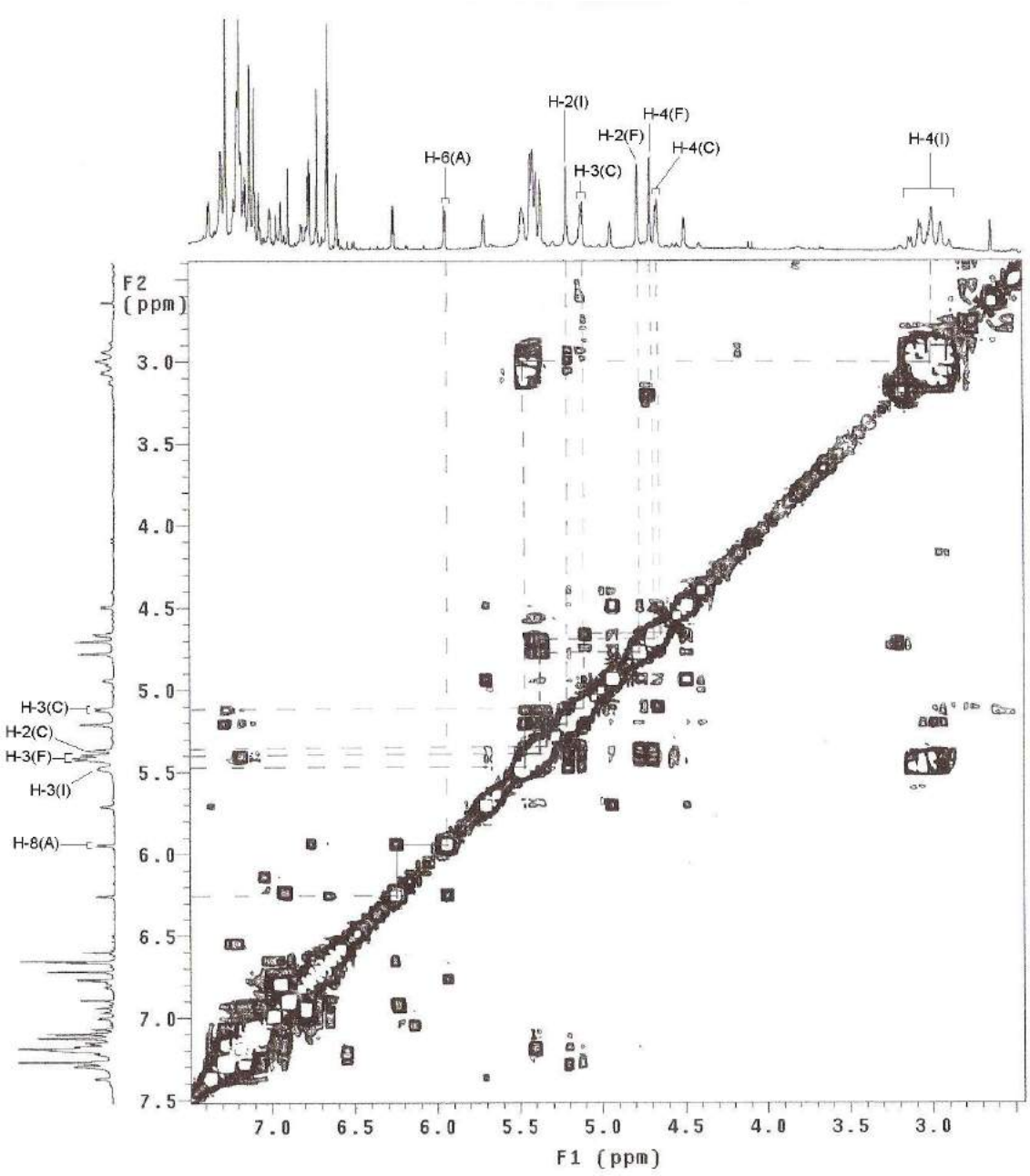


Figura 68 – Espectro COSY ^{1}H-^{1}H da **substância IX** acetilada (300 MHz; $CDCl_3$; relativo para TMS).

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(I)], sendo que se apresentam como multipleto, entre δ 2,93-3,13 ppm. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, δ 4,66 ppm. O hidrogênio H-4(F) apresenta-se em δ 4,70 ppm como um singleto. Os hidrogênios H-2(F), H-2(I) e H-2(C) apresentam-se como singletos em δ 4,78, 5,21 e 5,37, respectivamente.

Os hidrogênios H-3(C), H-3(F) e H-3(I) apresentam-se como multipletos com deslocamentos em δ 5,12; 5,41 e 5,48 ppm, respectivamente.

No espectro de RMN 2D (COSY ^{1}H-^{1}H) (fig. 68), foi possível fazer a correlação de todos os hidrogênios alifáticos. A constante de acoplamento de todos os hidrogênios alifáticos foi inferior a 2 Hz, estabelecendo-se uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* nos anéis C, F e I, encontrando-se em acordo com Weinges e colaboradores (1968). Porém, com relação aos hidrogênios da região aromática, não foi possível fazer uma correlação satisfatória entre os três sistemas do tipo AMX (fig. 68).

Os hidrogênios do anel A, H-6(A) e H-8(A), aparecem em δ 5,94 e 6,25 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a J_{H6-H8}=2,4 Hz, enquanto que os hidrogênios H-6(D) e H-6(G), em δ 6,65 e 6,71 ppm, respectivamente, apresentam-se como singletos.

Esta substância apresenta sinais aproximadamente em δ 4,70, 4,95 e 5,70 ppm (fig. 67) que mostram a presença de rotâmeros que poderiam representar sinais claros de hidrogênios. No entanto, Outtrup e Schaumburg (1981) discutiram o efeito de determinados solventes e temperatura na sinalização de rotâmeros, e demonstraram que espectros de RMN em $CDCl_3$ de substâncias diméricas e superiores, à temperatura ambiente, ligadas 4β→8, apresentam sinais rotaméricos fortes e predominantes, e principalmente quando comparados com ligações 4α→8.

Ueffing (1988) isolou e identificou a substância epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina peracetato de *Tilia* sp. (Tiliaceae), e os dados de RMN ^{1}H são totalmente coincidentes.

A estereoquímica da substância derivatizada foi determinada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20^\circ} = +7{,}0^\circ$ (metanol; c=0,1). Além disso, foi realizada espectroscopia de dicroísmo circular para confirmar a estereoquímica das ligações entre os monômeros.

De acordo com Danne *et al*. (1994a) e Thompson *et al*. (1972), ligações do tipo β entre monômeros de uma procianidina provocam um efeito *Cotton* positivo em 220-240 nm e 275 nm. Já ligações do tipo α promovem um efeito *Cotton* negativo, nos mesmos comprimentos de onda.

No espectro de dicroísmo circular da **substância IX** (fig. 69), observa-se um efeito *Cotton* positivo em toda a extensão do espectro analisado (200-300 nm), comprovando que as ligações entre os monômeros de epicatequina são todas do tipo β. Portanto, pode-se afirmar que a **substância IX** trata-se da procianidina C_1 (fig. 70), **epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina**.

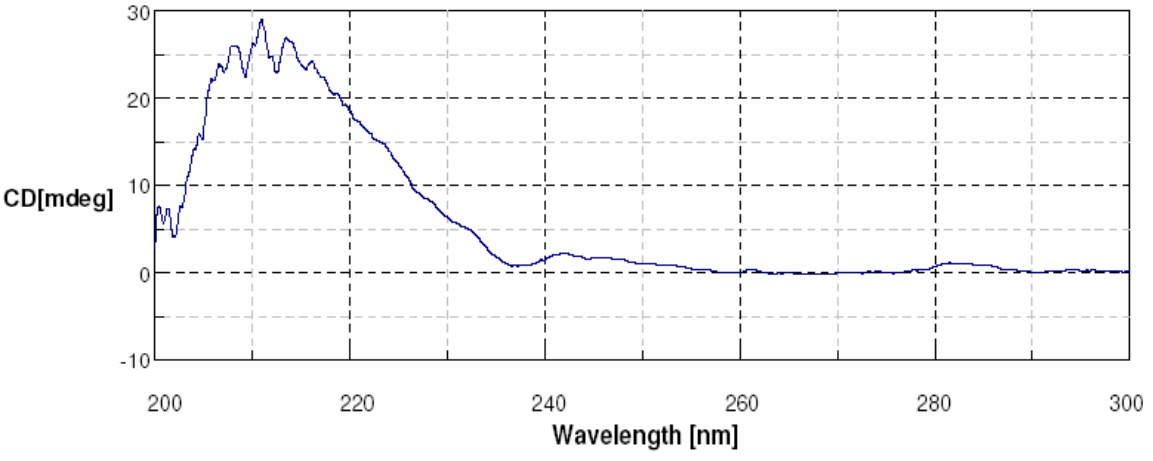


Figura 69 – Espectro de dicroísmo circular da **substância IX**.

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

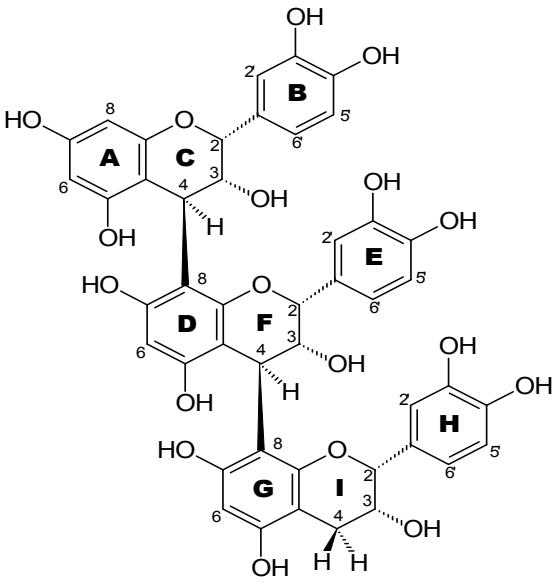


Figura 70 – Estrutura da **substância IX**, epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina (Procianidina C_1).

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

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

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

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

Com o objetivo de se determinar quais concentrações das amostras seriam utilizadas na realização deste método, primeiramente realizou-se uma triagem com concentrações distintas de extrato bruto, variando entre 250 e 0,5 µg/ml (fig. 71). Então, optou-se por utilizar as concentrações de 8,0; 6,5; 5,0; 3,5; 2,0 e 0,5 µg/ml para a determinação da capacidade antioxidante dos extratos.

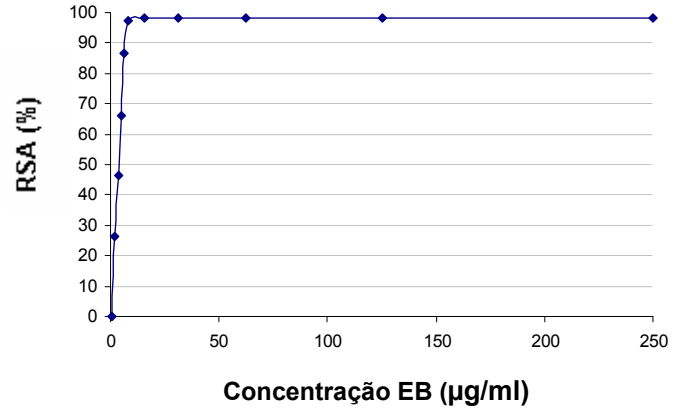


Figura 71 – Triagem de concentrações de EB para determinar as concentrações das amostras a serem utilizadas no método do DPPH•

A capacidade antioxidante do extrato bruto, das frações aquosa e acetato de etila, da vitamina C e do Trolox foram avaliadas nas concentrações de 0,5 a 8,0 µg/ml. Enquanto que para as substâncias I, II, IV, V, VII, VIII e IX foram utilizadas concentrações molares de 1,0 a

10,0 μ*M*. As substâncias III e VI não foram avaliadas quanto às suas capacidades antioxidantes, devido às pequenas quantidades das substâncias isoladas.

A mudança de coloração de violeta para amarela (descoramento da solução) foi inversamente proporcional à concentração, como demonstrado na figura 72.



Figura 72 - Capacidade antioxidante em diferentes concentrações da FAE pelo método do DPPH•.

Tabela 21 - Capacidade antioxidante de diferentes extratos de *Trichilia catigua* e substâncias referência demonstrada pela redução do DPPH•.

Amostra	IC_{50} Média (µg/ml)	CV%
EB	5,49 ± 0,18	3,31
FAE	3,85 ± 0,09	2,35
FA	8,76 ± 0,15	1,68
Vitamina C	5,26 ± 0,22	4,18
Trolox	7,52 ± 0,12	1,62

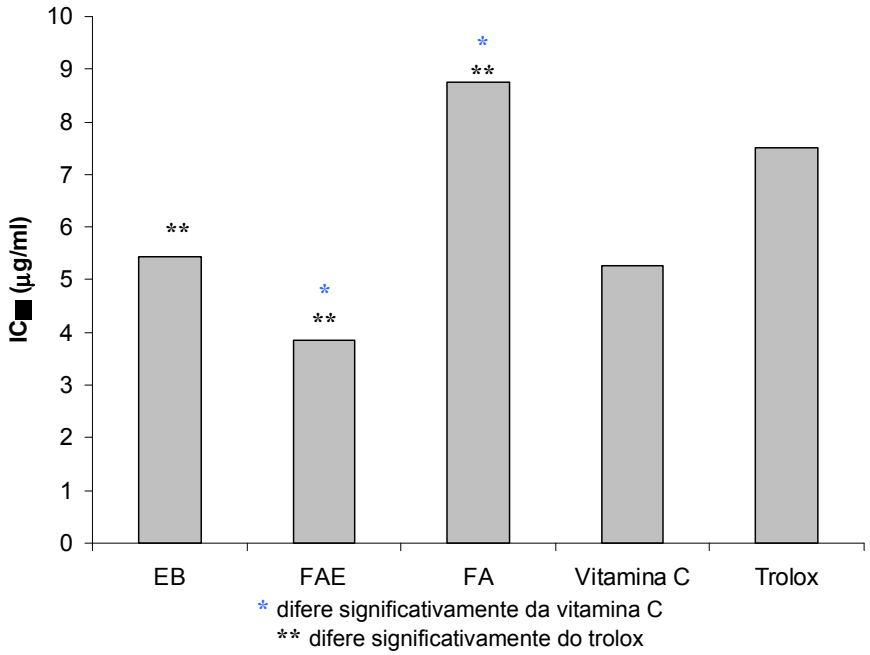


Figura 73 – Comparação entre valores de IC_{50} (µg/ml) dos extratos e antioxidantes padrão realizados pelo método do DPPH•.

Todos os extratos apresentaram uma alta capacidade antioxidante, sendo que a FAE apresentou capacidade superior à vitamina C e ao Trolox (substâncias de reconhecida ação antioxidante). A capacidade antioxidante do extrato bruto não difere significativamente da capacidade antioxidante da vitamina C em 95% de significância, porém é superior à capacidade antioxidante do trolox (fig. 73).

Paralelamente à realização da capacidade antioxidante, fez-se o teor de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (tab. 22), com o objetivo de verificar se existe uma relação direta entre ambos.

Tabela 22 – Teores de polifenóis totais (PT) e de taninos totais (TT) (%) dos extratos de *Trichilia catigua*.

Amostra	PT - g(%) ± *dp* (CV%)	TT - g(%) ± *dp* (CV%)
EB	48,76 ± 1,28 (2,63)	38,89 ± 1,14 (2,93)
FAE	90,98 ± 0,29 (0,32)	69,36 ± 0,48 (0,70)
FA	44,17 ± 0,37 (0,84)	33,80 ± 0,30 (0,89)

A FAE apresentou o maior teor de polifenóis e taninos totais refletindo na avaliação antioxidante com um baixo valor de IC_{50}. Por sua vez, a FA, que apresentou os menores teores de polifenóis totais e taninos totais, refletiu em um alto valor de IC_{50} em relação aos demais extratos. E os teores intermediários para EB foram coerentes com a avaliação antioxidante obtida.

Tabela 23 – Teores de polifenóis totais (PT) e capacidade antioxidante dos extratos de *Trichilia catigua*.

Amostra	PT (%)	IC_{50} (µg/ml)
EB	48,76	5,44
FAE	90,98	3,85
FA	44,17	8,76

Quanto maiores os teores de polifenóis totais e taninos totais presentes no extrato, maior é a sua capacidade antioxidante. Portanto, estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante em extratos vegetais e a atividade antioxidante de substâncias isoladas de drogas vegetais contendo taninos em sua composição é viável e comprova a eficiência destas substâncias na captura de radicais livres.

Tabela 24 – Capacidade antioxidante das substâncias isoladas de *Trichilia catigua* demonstrada pela redução do DPPH•.

Amostra	IC_{50} Média (µ*M*)	CV%
Epicatequina	10,12 ± 0,24	2,43
Procianidina B_2	7,95 ± 0,04	0,51
Cinchonaína Ia	7,87 ± 0,05	0,63
Cinchonaína Ib	7,67 ± 0,23	2,98
Cinchonaína IIb	5,05 ± 0,05	0,98
Cinchonaína IIc	5,15 ± 0,08	1,61
Procianidina C_1	4,08 ± 0,01	0,28
Vitamina C	30,11 ± 1,31	4,36
Trolox	30,10 ± 0,48	1,59

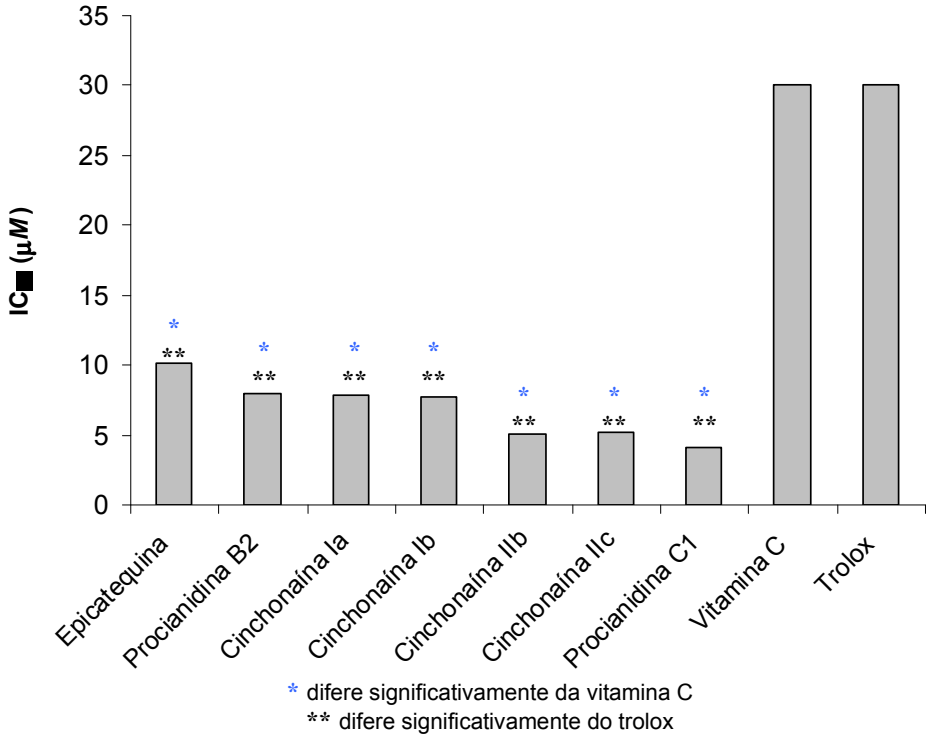


Figura 74 – Comparação entre valores de IC_{50} (µ*M*) das substâncias isoladas e antioxidantes padrão realizados pelo método do DPPH•.

Todas as substâncias isoladas da *Trichilia catigua* apresentaram capacidade antioxidante superior à vitamina C e ao Trolox (substâncias de reconhecida ação antioxidante) (fig. 74).

Não existe diferença significativa em 95% de sgnificância entre os monômeros cinchonaína Ia e cinchonaína Ib e nem entre os dímeros cinchonaína IIb e cinchonaína IIc, indicando que a estereoquímica da molécula não exerce influência sobre a atividade de seqüestro de radicais livres.

De acordo com dados da literatura, a atividade de seqüestro de radicais livres de compostos fenólicos é amplamente influenciada pelo número de hidroxilas presentes nos anéis aromáticos (PELLATI *et al*., 2004). Assim, quanto maior o número de grupos hidroxila, maior é a atividade de seqüestro de radicais. Os resultados deste estudo estão de acordo com os dados da literatura, especialmente no que diz respeito às substâncias que apresentam apenas unidades flavan-3-ol em sua estrutura (fig. 75). Entretanto, no caso das cinchonaínas parece haver um segundo mecanismo envolvido juntamente com o número de grupos hidroxila, pois não existe diferença significativa entre as atividades antioxidante dos monômeros de cinchonaína e a procianidina B2 e nem entre os dímeros de cinhonaína e a procianidina C1, apesar do número inferior de hidroxilas fenólicas presentes nas cinchonaínas em relação às procianidinas (tab. 25).

Tabela 25 – Comparação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e o número de hidroxilas fenólicas presentes nas substâncias isoladas de *Trichilia catigua.*

Substância	IC_{50} Média (μ*M*)	Número de hidroxilas fenólicas
Epicatequina	10,12 ± 0,24	4
Cinchonaína Ia	7,87 ± 0,05	5
Cinchonaína Ib	7,67 ± 0,23	5
Procianidina B_2	7,95 ± 0,04	8
Cinchonaína IIb	5,05 ± 0,05	9
Cinchonaína IIc	5,15 ± 0,08	9
Procianidina C_1	4,08 ± 0,01	12

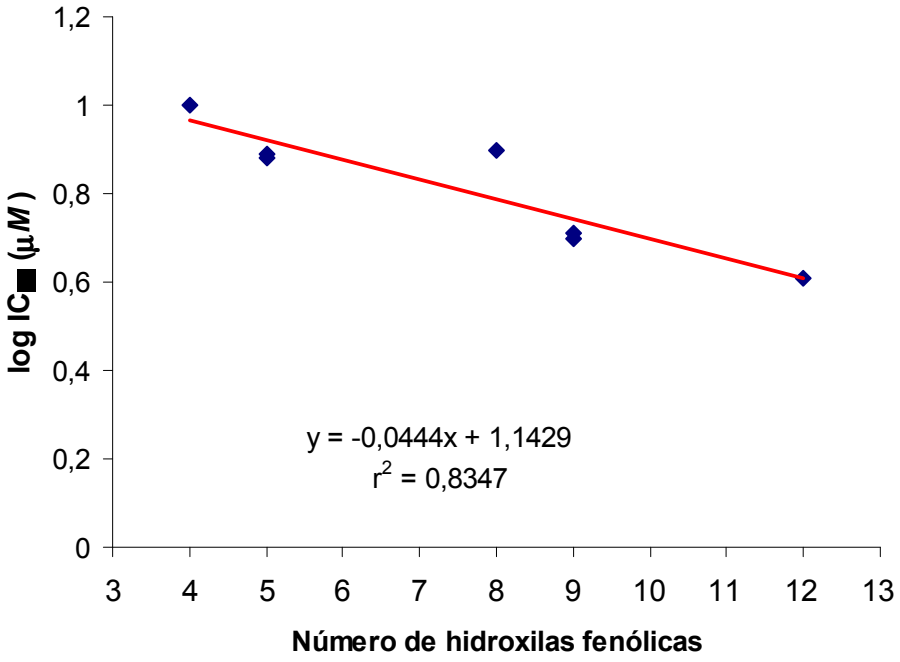


Figura 75 - Correlação entre capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e o número de hidroxilas fenólicas nas substâncias isoladas de *Trichilia catigua*.

5.3.2 Determinação da capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+}

A capacidade total de redução de uma substância é um forte indicador do seu potencial antioxidante. A presença de agentes redutores, como substâncias antioxidantes, em uma amostra promove a redução do Fe^{3+} [$K_3Fe(CN)_6$] para Fe^{2+} [$K_4Fe(CN)_6$]. O composto formado com ferro reduzido reage com a solução de cloreto férrico formando um complexo fortemente colorido e insolúvel em água, denominado azul de Perls da Prússia, que pode ser monitorado espectrofotometricamente (ELLIS, 2007). Neste método, a coloração amarela da solução teste muda para diferentes tonalidades de verde, dependendo do poder de redução das amostras (CHUNG *et al.*, 2002) e quanto maior a absorvância da amostra, maior é a capacidade de redução desta (fig. 76 e 77).

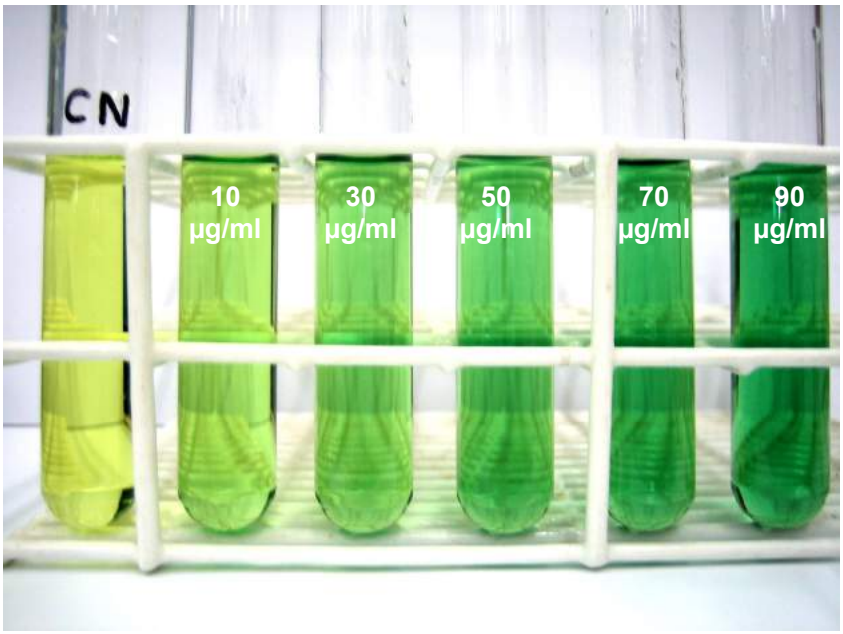


Figura 76 – Capacidade total de redução do EB em diferentes concentrações pelo método de redução do Fe^{+3} para Fe^{+2}.

Para a determinação da capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+}, utilizaram-se concentrações de 10, 30, 50, 70 e 90 µg/ml para os extratos e 20, 40, 60, 80 e 100 µ*M* para as substâncias isoladas. Todas as amostras foram comparadas com a vitamina C e o Trolox (substâncias de reconhecida ação antioxidante).

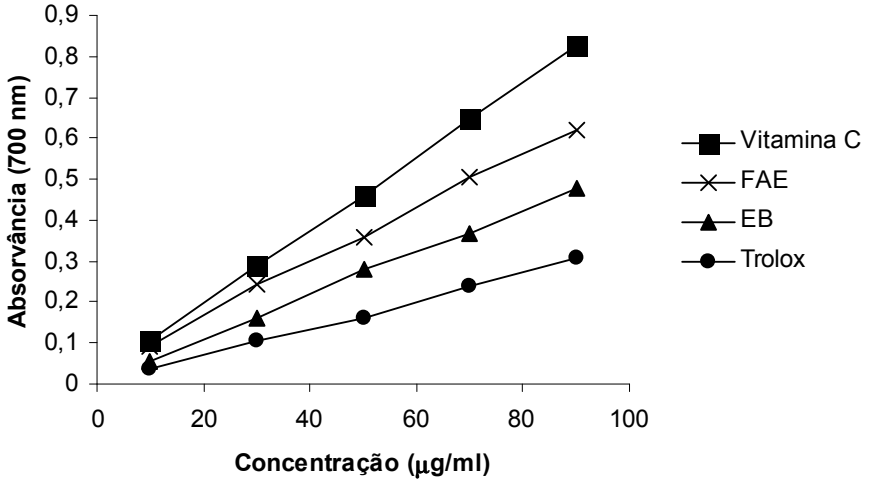


Figura 77 – Capacidade total de redução dos extratos em comparação com substâncias antioxidantes padrão.

O EB e FAE apresentaram capacidade de redução significativamente superior ao antioxidante padrão Trolox, porém inferior à vitamina C.

Os dados obtidos para a capacidade total de redução do ferro, novamente apontam para o fato de que extratos com maiores teores em polifenóis totais e taninos tendem a apresentar maior poder antioxidante (fig. 77).

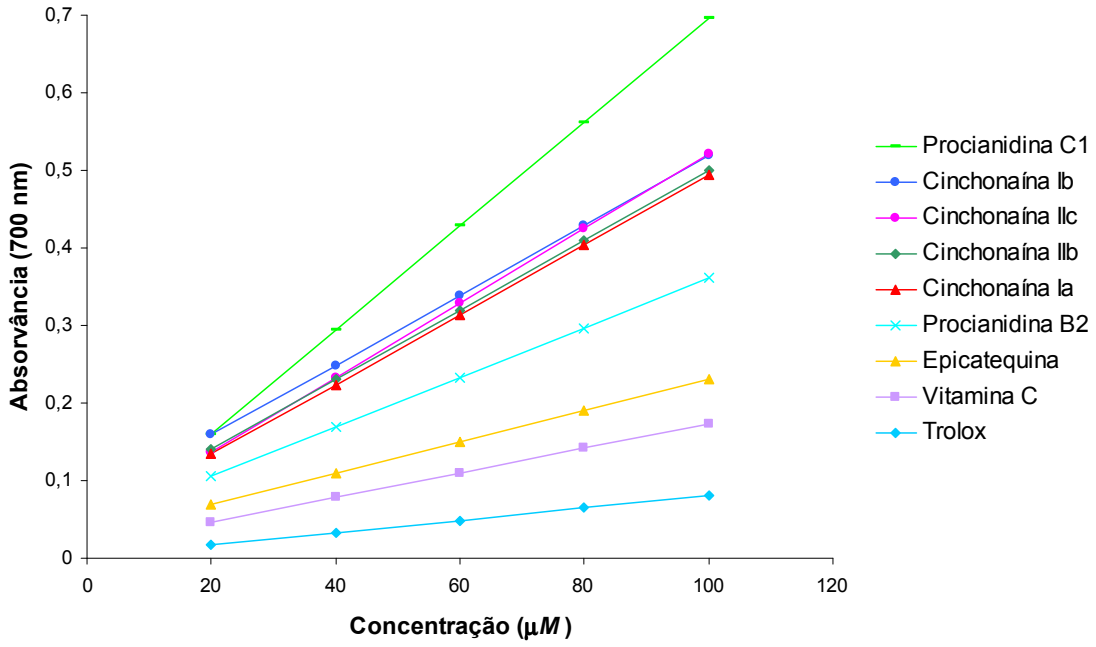


Figura 78 - Capacidade total de redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} das substâncias isoladas em comparação com substâncias antioxidantes padrão.

Todas as substâncias testadas apresentaram capacidade de redução significativamente superior aos antioxidantes padrão (vitamina C e Trolox) (fig. 78). As atividades de redução do ferro obtidas para epicatequina, procianidina B_2 e procianidina C_1 comprovam também a correlação entre o número de hidroxilas fenólicas e o poder de redução para substâncias contendo apenas unidades flavan-3-ol em sua estrutura.

As capacidades de redução dos monômeros de cinchonaínas não diferem significativamente das capacidades redutoras dos dímeros em nível de significância de 95%. Estes dados indicam que, para estas substâncias, a capacidade total de redução do ferro não está relacionada com o número de hidroxilas fenólicas e sim com a presença da unidade fenilpropanóide. Entretanto, existe diferença significativa entre as atividades das cinchonaínas Ia e Ib, sugerindo que a estereoquímica da molécula também exerça influência sobre o seu poder de redução.

6 CONCLUSÕES

Através das análises físico-químicas qualitativas e quantitativas, foram determinadas as condições mínimas da droga vegetal.

As substâncias epicatequina, procianidinas B_2, B_4 e C_1, cinchonaínas IIb e IIc e apocinina E foram isoladas pela primeira vez no gênero *Trichilia*.

As substâncias apocinina E e cinchonaína IIc, até o presente, não foram isoladas de fontes naturais ou mesmo obtidas por via sintética, sendo a primeira vez que as mesmas ocorrem.

A avaliação da capacidade antioxidante do EB, FA e FAE revelou que extratos com maiores teores de polifenóis totais apresentam um maior poder redutor e seqüestrador de radicais livres.

A determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• das substâncias isoladas comprovou que quanto maior o número de hidroxilas fenólicas, maior é a capacidade de seqüestro de radicais livres da substância. Porém nas cinchonaínas parece haver um segundo mecanismo envolvido nesta atividade, relacionado à substituição de uma unidade fenilpropanóide.

A capacidade total de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} das procianidinas isoladas também demostrou uma correlação entre o número de hidroxilas fenólicas e o poder de redução. Entretanto, no caso das cinchonaínas a capacidade de redução parece estar relacionada com a presença da unidade fenilpropanóide e sua estereoquímica, sofrendo pouca ou nenhuma influência do número de hidroxilas fenólicas.

Devido à alta atividade de redução e seqüestro de radicais livres apresentada pelas substâncias isoladas da espécie vegetal *Trichilia catigua*, pode-se considerar estas substâncias como opções em potencial para a pesquisa de novos medicamentos para doenças degenerativas desencadeadas por radicais livres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, J.R. *Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Indusgraf S.A., 1998. p.17.

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

AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal Activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.2, p.227-231, 2004.

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

ANTUNES,E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotheraphy Research*, v.15, p.416-421, 2001.

ASTIN, J.A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. *Journal of the American Medical Association*, v.279, p.1548–1553, 1998.

BAGOZZI, D. Traditional medicine. World Health Organization Fact sheet n.134. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em 14 mar. 2005.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R., 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: Human Medicinal Agents from Plants, ACS Symposium Series 534, 1993, Washington, USA, American Chemical Society ISBN 0-8412-2705-5, p.2-12.

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

BELTRAME, F.L. *Caracterização de duas espécies vegetais (Trichilia catigua e Anemopaegma arvense) usadas como "Catuaba" por métodos cromatográficos hifenados a*

métodos espectroscópicos e análise multivariada. 2005. 153f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

BELTRAME, F.L.; FILHO, E.R.; BARROS F.A.P.; CORTEZ, D.A.G.; CASS, Q.B. A validated high-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography*, v.1119, p.257-263, 2006.

BENENCIA, F.; COURREÈGES, M.C.; NORES, M.M.; COULOMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.49, p.133–139, 1995.

BENENCIA, F.; COULOMBIE´, F.C. Immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* leaf aqueous extracts. *Phytotherapy Research,* v.12, n.3, p.167–171, 1998.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M.C.; COULOMBIÉ, F.C. Anti-inflammatory Activities of *Trichilia glabra* Aqueous Leaf Extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.293-300, 2000.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 48 de 16.3.2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 18.3.2004.

BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA. 4. ed. Bounemouth: British Herbal Medicine Association, 1996.

BURKILL, H.M. *The useful Plants of West Tropical Africa*, v. 4. 2. ed. Royal Botanic Gardens Kew, 1997. p.88-134.

CAI, Y.; EVANS, F.J.; Roberts, M.F.; PHILLIPSON, J.D; ZENK, M.; GLEBA, Y.Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, v.30, p.2033-2044, 1991.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytotherapy Research*, v.11, p.32-38, 1997.

CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L.S.B; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* , v.78, p.757–764, 2004.

CARDOSO, M.L.C. *Desenvolvimento de Metodologias Analíticas e Tecnológicas na Obtenção de Extratos secos Nebulizados de Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. 2002, 114f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.

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

CHAURET, D.C., DURST, T., ARNASON, J.T. Novel Steroids from *Trichilia Hirta* as Identified by nanoprobe inadequate 2D-NMR Spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, v.37, n.44, p.7875-7878, 1996.

CHEN, H.F.; TANAKA, T.; NONAKA, G.I.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K. Phenylpropanoid-substituted catechins from *Castanopsis Hystrix* and structural revision of cinchonains. *Phytochemistry*, v.33, n.1, p.183-187, 1993.

CHUNG, Y.C.; CHANG, C.T.; CHAO, W.W.; LIN, C.F.; CHOU, S.T. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NKI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.2454- 2458, 2002.

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

CORTEZ, D.A.G., FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C., DA SILVA, M.F.G.F., FERREIRA, A.G. A limonoid from *Trichilia estipulata*. *Phytochemistry* , v.55, p.711-713, 2000.

CORTEZ, D.A.G., FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C., DA SILVA, M.F.G.F., FERREIRA, A.G., CASS, Q.B., PIRANI, J.R. Meliacin Butenolides from *Trichilia estipulata*. *Phytochemistry*, v.49, n.8, p.2493-2496, 1998.

COSTA, A.F. *Farmacognosia*. Lisboa: Editora Calouste Gilbenkian, 2002.

CZOCHANSKA, Z; FOO, L.Y.; NEWMAN, R.H.; PORTER, L.J.; THOMAS, W.A.; JONES, W.T. Direct proof of a homogeneus polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, p.375-377, 1979.

DANNE, A.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ol prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry*, v.37, n.2, p.533-538, 1994a.

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

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

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.27, p.445-459, 1999.

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

ELDEEN, I.M.S.; ELGORASHI, E.E.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v.102, p.457-464, 2005.

ELLIS, R. Perls Prussian Blue Staining Protocol. Disponível em <http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/perls_prussian-blue_ellis.htm>. Acesso em: 05 mar. 2007.

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

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

FARNSWORTH, N.R., AKERELE, O., BINGEL, A.S., SOEJARTA, D.D., ENO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of World Health Organization*, v.63, p.226–230, 1985.

FELIPE, A.M.M.; RINCÃO, V.P.; BENATI, F.J.; LINHARES, R.E.C.; GALINA, K.J.; TOLEDO, C.E.M.; LOPES, G.C.; MELLO; J.C.P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.6, p.1092-1095, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLETCHER, A.C.; PORTER, L.J.; HASLAM, E.; GUPTA, R.K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, p.1628-1637, 1977.

FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Catequine, andere Hydroxy-flavane und Hydroxy-flavene. *Fortschritte der Chemie organischen Naturstoffe*, v.16, p.1-25, 1958.

FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Systematik und Nomenklatur der Flavonoide. *Tetrahedron*, v.8, p.336-349, 1960.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; RODRIGUES, E.D.; POTT, V.J.; ROQUE, N.F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. E*legans. Phytochemistry,* v.42, n. 5, p.1399-1403, 1996.

GARCEZ, F.R., GARCEZ, W.S., TSUTSUMI, M.T., ROQUE, N.F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. e*legans*. *Phytochemistry*, v.45, n.1, p.141-148, 1997.

GERMANÒ, M.P.; D'ANGELO,V.; BIASINI, T.; SANOGO, R.; DE PASQUALE, R.; CATANIA, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105, p.368-373, 2006.

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

GÜLÇIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, v.78, p.803-811, 2006.

HAHN, L.R.; CÁRDENAS, T.J.; ARENAS, C. Trichavensin, a prieurianin derivative from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry,* v.43, n.2, p.457-459, 1996.

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

HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal*, v.139, p.285-288, 1974.

HASLAM, E.; HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall,1975, v.9, p.505-560.

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

HASLAM, E. *Practical Polyphenolics:* from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1.ed., 1998, p.10-83.

HATANO, T.; MIYTAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, v.59, p.749-758, 2002.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosil transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.38, p.717-720, 1990.

HEGNAUER, R. Myriophyllinm Inklusen und Gerbstoffe. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1986. p.298, v.7.

HELMAN, J. *Farmacotecnia teorica y practica*. 3. ed. Mexico: Continental, 1982, v.4, p.1147-1187.

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

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

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.

HUSSEIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v.26, p.2489-2491, 1987.

ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.942-949, 2006.

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

KAMANZI ATINDEHOU, K.; SCHMID, C.; BRUN, R.; KONÉ, M.W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.221-227, 2004.

KLEIN, R.M. *Flora Ilustrada Catarinense* – Meliáceas, Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí, 1984. p.55-60.

KOLODZIEJ, H. Tannins of medicinal plants: application of ^{1}H RMN parameters to the analysis of procyanidins. *Farmaceutisch Tijdschrift voor Belgie*, v.66e, p.44, 1989.

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

LAWRENCE, G.H.M. *Taxonomy of vascular plants.* New York: The Macmillan Company, 1951. p.560-561.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and

Stryphnodendron obovatum Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.265-272, 2005.

LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N.J.; GRIMMER, H.R.; WARMINSKI, E.E.; WILLIAMSON, M.P.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenols, Adstringency and Proline-rich Proteins. *Phytochemistry*, v.37, n.2, p.357-371, 1994.

MARQUES, L.C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. *Revista Racine*, v.3(43), p.8-11, 1998.

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

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hammamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochemistry*, v.37, n.2, p.337-342, 1994.

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

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

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

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. (org.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4. ed., Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. Da UFSC, 2003. Cap.24. p.517-544.

MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A.S.; SANCHES, E.M.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseupiptadenia contota* (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.124-125, 2002.

MUSZA, L.L.; KILLAR, L.M.; SPEIGHT, P.; BARROW, C.J.; GILLUM, A.M.; COOPER, R. Minor limonoids from *Trichilia rubra. Phytochemistry,* v.39, n.3, p.621-624, 1995.

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

NISBET, L.J.; MOORE, M. *Will natural products remain na important source of drug research for the future? Current Opinion in Biotechnology*, n.8, p.708-712, 1997.

NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds: phenylpropanoid-substituted epicatechins, cinchonais from *Cinchona succirubra. Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.30, n.12, p.4268-4276, 1982.

NORES,M.M.; COURRAGES, M.C.; BENENCIA, F.; COULOMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, p.99-106, 1997.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO,T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v.52, p.1-31, 1989.

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

OLUGBADE, T.A.; ADESANYA, S.A. Prieurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia prieuriana*. *Phytochemistry* v.54, p.867-870, 2000.

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

OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TAKIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hipercholesterolemic rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Trombosis*, v.7, p.164-168, 2000.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ^{1}H 270 MHz NMR spectroscopy. *Carlsberg Research Communication*, v.46, p.43-52, 1981.

PELLATI, F.; STEFANIA, B.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinaceae* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.35, n.2, p.289-301 , 2004.

PEREIRA, N.A. *Contribuição de Manuel Freire Alemão de Cisneiros para o Conhecimento de nossos Fitoterápicos*. Rio de Janeiro: Brasileira de Artes Gráficas, 1982.

PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E.F.A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeitschrift der Naturforschung*, v.57(c), p.483-488, 2002a.

PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, v.9, p.422-426, 2002b.

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

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

PUPO, M.T., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B., DA SILVA, M.F.G.F. A cicloartane triterpenoid and ω-phenyl alkanoic and alkenoic acids from *Trichilia calusseni*. *Phytochemistry*, v.42, n.3, p.795-798, 1996.

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

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v.2, n.4, p.152-159, 1997.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungical activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.1-7, 2005.

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

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

SCHALKWIJK, J.; VAN DEN BERG, W.B.; VAN DE PUTTE, L.B.A.; JOOSTEN, L.A.B.; VAN DER SLUIS, M. Effects of experimental joint inflammation on bone marrow and periarticular bone. A study of two types of arthritis, using a variable degrees of inflammation. *British Journal of Experimental Pathology*, v.66, p.435–443, 1985.

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

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

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

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1996.

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

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Brazilian Archieves of Biology and Technology*, v.44, n.4, p.383-394, 2001.

SPARG, S.G.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A.K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.209-214, 2000.

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

TOLEDO, C.E.M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de Stryphnodendron adstringens (Martius) Covile, Leguminosae. Araraquara: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2002.

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

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

VAS, Z.R.; MATA, L.V.; CALIXTO, J.B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytotherapy Research*, v.11, p.101-106, 1997.

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

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

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

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

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

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