

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Instituto de Química - Campus Araraquara**

**Leonardo Perez de Souza**

**Padronização de extratos vegetais: *Astronium*  
*urundeuva* (*Anacardiaceae*)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Araraquara**  
**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

S731p Souza, Leonardo Perez de  
Padronização de extratos vegetais : *Astronium urundeuva*  
(Anacardiaceae) / Leonardo Perez de Souza. - Araraquara :  
[s.n], 2012  
94 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Wagner Vilegas

1. Plantas medicinais. 2. Padronização. 3. Estabilidade.  
4. Galotaninos. I. Título.

LEONARDO PEREZ DE SOUZA

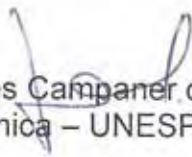
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 14 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Carmen Lúcia Cardoso  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

## SÚMULA CURRICULAR

### *Dados Pessoais*

Nome: Leonardo Perez de Souza  
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
- UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica,  
Laboratório de Fitoquímica  
Rua Prof. Francisco Degni, 55. Jd. Quitandinha, CEP: 14800-900.  
Telefone: 16 3301-9792  
E-mail: leonardo.prz@gmail.com

### Formação Acadêmica:

#### ***Graduação***

##### Bacharelado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,  
Instituto de Química, Campus Araraquara  
Local: Araraquara - SP  
Curso: Química com Atribuições Tecnológicas  
Período: 2006-2009  
Trabalho Orientado em Química – Departamento de Química Orgânica:  
Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-  
farmacológica em plantas superiores: *Byrsonima fagifolia* (Malpighiaceae).–  
Bolsista FAPESP  
Orientador: Dr. Clenilson Martins Rodrigues e Wagner Vilegas

#### ***Pós Graduação***

##### Mestrado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,  
Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara  
Local: Araraquara - SP  
Período: 2010-2012  
Bolsista: FAPESP  
Título da Dissertação: Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva*  
(Anacardiaceae).  
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

## Trabalhos apresentados em congressos:

1. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W. LC-ESI-IT-MS identification of polyphenolic compounds from *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: IV Congresso da BrMASS. 2011. Campinas.
2. Brahim, G. T.; da Silva, V. C.; **Souza, L. P.**; Vilegas, W. Chemical profile of *Astronium urundeuva* by ESI-IT-MS<sup>n</sup>. In: IV Congresso da BrMASS. 2011. Campinas.
3. **Souza, L. P.**; Borges, M. S.; da Silva, V. C.; Vilegas, W. Validation of HPLC-PAD method for the determination of phenolic compounds in *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: 3<sup>rd</sup> Brazilian Conference on Natural Products. 2011. Ouro Preto.
4. Borges, M. S.; **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W. Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo. 2011. Ciudad del Este.
5. Borges, M. S.; **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W. Desenvolvimento e aplicação de metodologias cromatográficas para análise e comparação de extratos padronizados de *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2011. Araraquara.
6. Brahim, G. T.; da Silva, V. C.; **Souza, L. P.**; Vilegas, W. Compostos polares isolados dos caules de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2011. Araraquara.
7. Rodrigues, C. M.; Elletto, D.; da Silva, V. C.; **Souza, L. P.**; Carbone, V.; Vilegas, W. Método de pré-concentração empregado na determinação do grau de polimerização de proantocianidinas presentes em folhas de espécies de *Byrsonima* por MALDI-TOF-MS. In: 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011. Florianópolis.
8. Borges, M. S.; Brahim, G. T.; **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W. Isolamento e identificação de substâncias polares das folhas de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). In: 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011. Florianópolis.
9. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W. Caracterização de constituintes químicos de *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae) por HPLC-PDA. In: 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011. Florianópolis.
10. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W.; Rodrigues, C. M. Predição estrutural de derivados do ácido galoilquinico baseada em dados de RMN-H<sup>1</sup>. In: 17<sup>o</sup> Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti. 2009. Araraquara.
11. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; Vilegas, W.; Rodrigues, C. M. Isolamento de derivados do ácido galoilquinico a partir do infuso de folhas de *Byrsonima fagifolia* com emprego do conceito de transposição analítico/semipreparativo em HPLC. In: 17<sup>o</sup> Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti. 2009. Araraquara.
12. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; dos Santos, L. C.; Vilegas, W.; Rodrigues, C. M. Emprego da técnica de RN-H<sup>1</sup> na identificação e diferenciação de derivados do ácido galoilquinico de *Byrsonima fagifolia*. 2009. Fortaleza.
13. **Souza, L. P.**; da Silva, V. C.; dos Santos, L. C.; Vilegas, W.; Rodrigues, C. M. Aplicação do conceito de scale-up no isolamento de derivados do ácido

galoilquinico de *Byrsonima fagifolia* por HPLC. In: 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009. Fortaleza.

14. **Souza, L. P.**; de Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; da Silva, V. C.; Vilegas, W.; Rodrigues, C. M. Uso da técnica ESI-IT-MS<sup>n</sup> na rápida obtenção e caracterização do perfil dos constituintes químicos presentes no infuso das folhas de *Byrsonima fagifolia* Niedenzu (Malpighiaceae). In: XXXVIII Semana da Química. 2008. Araraquara.

15. **Souza, L. P.**; de Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; da Silva, V. C.; Rodrigues, C. M.; Vilegas, W. Rápida identificação dos constituintes químicos do infuso de *Byrsonima fagifolia* Niedenzu (Malpighiaceae) usando ESI-IT-MS<sup>n</sup>. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasile X International Congress of Ethnopharmacology. 2008. São Paulo.

16. **Souza, L. P.**; Rodrigues, C. M.; dos Santos, L. C.; Vilegas, W. Avaliação da composição química presente no infuso das folhas de *Byrsonima fagifolia* Niedenzu (Malpighiaceae) por HPLC-PAD. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp. Araraquara. 2008.

17. **Souza, L. P.**; Rodrigues, C. M.; dos Santos, L. C.; Vilegas, W. Avaliação da composição química presente no infuso das folhas de *Byrsonima fagifolia* Niedenzu (Malpighiaceae) por HPLC-PAD. In: 16<sup>o</sup> Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Franca. 2007.

#### **Formação complementar:**

1. **CE and CE/MS in the OMICS era.** Ministrado pelos Prof. Philip Britz-McKibbin, Prof<sup>a</sup> Marina Tavares e Prof. Emanuel Carrilho. In: 4<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas. 2011. Carga horária: 8 horas.

2. **Estratégias para descoberta e desenvolvimento de novas drogas à partir de produtos naturais.** Ministrado pelo Prof. Mario Sérgio Palma. In: VII Simpósio/VII Reunião de Avaliação do Biota e IV Reunião de Avaliação do BIOprospecTA. 2011.

3. **Química Farmacêutica: pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos orgânicos e inorgânicos.** In: XXXIX Semana da Química (Araraquara). 2009. Carga horária: 20 horas.

4. **Técnicas de separação cromatográficas.** Ministrado pelo Prof. Alberto José Cavalheiro. In: XXVIII Semana da Química (Araraquara). 2008. Carga horária: 32 horas.

5. **Aplicação de técnicas hífenadas na análise de produtos naturais de plantas medicinais.** Ministrado pelo Prof. Norberto P. Lopes. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasile X International Congress of Ethnopharmacology. 2008. Carga horária: 3 horas.

6. **Recentes avanços no isolamento e detecção de produtos naturais.** Ministrado pelos Prof. Wagner Vilegas e Prof. Ian Castro-Gamboa. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp. 2008. Carga horária: 8 horas.

7. **Química dos materiais.** Ministrado pelo Prof. Elson Longo. In: XXXVII Semana da Química (Araraquara). 2007. Carga horária: 16 horas.

8. **Química Forense.** Ministrado pelo Prof. Valter Stefani. In: XXVI Semana da Química (Araraquara). 2006. Carga horária: 12 horas.

9. **Nanotecnologia.** Ministrado pelo Prof. Marco Cremona. In: XXVI Semana da Química (Araraquara). 2006. Carga horária: 12 horas.

*“Dedico este trabalho a toda  
minha família e amigos que  
sempre estiveram ao meu lado.”*

## Agradecimentos

Gostaria primeiramente de agradecer ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, por ter me aberto as portas de seu laboratório desde o início de minha iniciação científica. Pelos valiosos conselhos e ensinamentos que me passou durante todo esse período, pela liberdade que sempre me deu para fazer minhas escolhas e por ser sempre uma pessoa muito aberta e amiga.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Campaner dos Santos, por estar sempre disponível para ajudar com qualquer coisa dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Clenilson Martins Rodrigues pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante a minha iniciação científica os quais foram tão importantes durante o meu mestrado. E por ainda hoje, mesmo distante, continuar sempre disponível para ajudar como for possível.

A Dr<sup>a</sup>. Viviane Cândida da Silva por todas as inestimáveis contribuições que fez para esse trabalho. Por todo o auxílio que sempre deu a todos no laboratório, e por ainda hoje estar sempre se prontificando a fazer tudo o que puder para nos ajudar.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, por tudo que me ensinou durante o meu estágio de docência.

A todos os professores do Departamento de Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas.

Aos Professores Dr. Alberto José Cavalheiro e Dr<sup>a</sup> Isabele Rodrigues Nascimento pela avaliação do meu trabalho durante o exame geral de qualificação e pelos conselhos que me deram.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Guilherme e Maiara, por toda a contribuição que deram no desenvolvimento desse projeto.

Ao Dr. Alberto Camilo Alecio pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas e ao Dr. Nivaldo Boralle por toda a ajuda com os experimentos de NMR.

A FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todas as funcionárias da seção de pós-graduação, em especial minha querida prima Patrícia pela excepcional pessoa que sempre foi para com todos, e que deixa muita saudade nos nossos corações.

A todos os colegas de laboratório e departamento pelas incontáveis horas de trabalho e diversão.

A todos os meus amigos pelas inúmeras situações que compartilhamos juntos que ficarão para sempre na memória, e por todo apoio durante os momentos mais difíceis.

E em especial a toda a minha família. Aos meus pais Antônio Carlos e Aparecida, ao meu irmão Luiz Gustavo, aos meus avós e a todos os meus tios e primos, cuja influência me fizeram a pessoa que eu sou e o carinho e dedicação me ajudaram a conquistar todos os meus objetivos.

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.”*

*Albert Einstein*

## Resumo

O uso de fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança garantidas tem mostrado resultados surpreendentes em diversos países. Contudo, o Brasil ainda possui deficiências na correta caracterização dos produtos brutos e falta de um controle de qualidade mais rigoroso para esses materiais. As etapas necessárias para utilização de uma planta como fitoterápico são, primeiramente, a comprovação da sua eficácia e segurança através de ensaios farmacológicos seguidas da correta caracterização química do extrato e quantificação de alguns marcadores escolhidos para representarem a sua identidade. *Astronium urundeuva* é uma planta brasileira utilizada na medicina popular, para a qual são reportadas atividades antiulcerogênica e antiinflamatória, assim como efeito no trânsito gastrointestinal e em colites, sendo um alvo interessante para utilização como fitoterápico. Extratos foram preparados por percolação como descrito pela farmacopéia brasileira e avaliados por ESI-IT-MS e LC-MS apresentando em sua composição majoritária galotaninos e derivados. A caracterização química foi obtida através de duas diferentes abordagens, para os compostos majoritários análise por FIA-ESI-IT-MS forneceram indício sobre quais as substâncias presentes no extrato e HPLC-PDA com adição de padrão confirmou as identidades dessas substâncias, enquanto que os compostos minoritários tiveram que passar por uma etapa adicional de pré-concentração utilizando GPC em Sephadex LH20, depois da qual as substâncias foram identificadas ou pelo mesmo procedimento que os compostos majoritários ou por isolamento e caracterização utilizando HPLC em escala semipreparativa e espectroscopia de NMR. Dessa forma foi possível a identificação de 10 compostos fenólicos, assim como 8 galotaninos os quais foi possível somente atribuição do DP (grau de polimerização), pois são substâncias dificilmente isoladas e que não possuem padrões disponíveis. Por fim uma metodologia de HPLC-PDA foi proposta e validada como uma forma de garantir a qualidade dos extratos através da quantificação de três marcadores: ácido gálico, galato de metila e 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG).

## Abstract

The use of standardized phytotherapies with attested efficacy and safety has shown surprisingly good results in many countries. Nevertheless, Brazil still has deficiencies at the correct chemical characterization of raw products, and lack of a more rigorous quality control of those materials. The necessary steps for the use of a plant as a phytotherapeutic are, at first, proof of the efficacy and safety through pharmacological essays followed by the correct chemical characterization of the extract and quantification of some markers chosen to represent its identity. *Astronium urundeuva* is a Brazilian traditional herb used in folk medicine, it is reported that it shows antiulcerogenic and anti-inflammatory activity, as effect at the gastric transit and colitis, being an interesting target to be used as a phytotherapeutic. Extracts were prepared by percolation as described by Brazilian Farmacopeia and screened by FIA-ESI-IT-MS and LC-MS showing a major composition of gallotannins and derivatives. The chemical characterization was achieved with two different approaches, for the major compounds FIA-ESI-IT-MS analysis provided a clue about which substances were present at the extract and HPLC-PDA with standard addition confirm the identities of these substances, while the minor compounds had to go through an additional step of pre-concentration achieved by gel permeation chromatography using Sephadex LH20, after that the substances were identified either by the same procedure as for the major compounds or by isolation and characterization using HPLC in semi preparative scale and NMR spectroscopy. This way it was possible to identify 10 phenolic compounds, also 8 gallotannins which it was possible only to attribute the degree of polymerization since they are hardly isolated and there are no standards available. An HPLC-PDA methodology was proposed and validated as a way to ensure the quality of the extracts through the quantification of three markers: gallic acid, methyl gallate e 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (PGG).

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AcOEt	Acetato de Etila
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfoxo hexadeuterado
i.d.	<i>Internal diameter</i> (Diâmetro Interno)
FE	Fase estacionária
FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry (Análise por injeção em fluxo - Ionização por Electrospray - <i>Ion Trap</i> - Espectrometria de Massas)
FM	Fase móvel
GPC	Gel Permeation Chromatography (Cromatografia de Permeação em Gel)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
<i>m</i>	Múltiplo
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
PDA	Photo-Diode Array (Arranjo de Fotodiodos)
PGG	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galoil- $\beta$ -D-glicose
PTFE	Politetrafluoretileno ( <i>Teflon</i> <sup>®</sup> )
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
RP18	Reversed-Phase (Fase reversa C-18)
<i>s</i>	Singleto
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Delgada)
<i>t<sub>r</sub></i>	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
$\delta$	Deslocamento químico

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Distribuição mundial de espécies de Anacardiaceae.	24
<b>Figura 2.</b>	Distribuição das espécies de <i>Astronium</i> coletadas pelo programa Biota no estado de São Paulo. Em azul as coletas de <i>Astronium urundeuva</i> .	27
<b>Figura 3.</b>	Árvore, folhas e frutos de <i>Astronium urundeuva</i> .	27
<b>Figura 4.</b>	Análise por TLC das frações obtidas por LLE do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	36
<b>Figura 5.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	36
<b>Figura 6.</b>	Espectro na região do UV de padrão de ácido gálico.	37
<b>Figura 7.</b>	Análise por TLC das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% por GPC em Sephadex LH20 <sup>®</sup> .	39
<b>Figura 8.</b>	Espectro na região do UV característico de flavonóides.	40
<b>Figura 9.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	41
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	42
<b>Figura 11.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	43
<b>Figura 12.</b>	Identificação de substâncias presentes na fração 5 por co-injeção com padrões de: 1) ácido gálico; 2) Galato de metila; 3) Galato de etila; 4) Ácido protocatecuico; 5) Ácido clorogênico.	44
<b>Figura 13.</b>	Identificação de substância presente na fração 9 por co-injeção com padrões de ácido elágico.	45
<b>Figura 14.</b>	Galotanino contendo ligação depsídica.	46
<b>Figura 15.</b>	Espectro UV de derivados do ácido gálico com e sem a ligação depsídica. Espectro UV encontrado na fração 8.	46
<b>Figura 16.</b>	Espectro de massas: <b>A)</b> <i>full-scan</i> da substância <b>Au7</b> , em modo negativo, <b>B)</b> MS <sup>2</sup> do íon <i>m/z</i> 939 <b>C)</b> MS <sup>3</sup> do íon <i>m/z</i> 939 – 769.	48
<b>Figura 17.</b>	Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG).	49
<b>Figura 18.</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR da substância <b>7</b>	50
<b>Figura 19.</b>	<b>A)</b> Espectro de massas em <i>full-scan</i> da substância <b>8</b> ; <b>B)</b> Fragmento obtido para o íon <i>m/z</i> 447 da substância <b>8</b> – FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> , modo negativo	51
<b>Figura 20.</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR da substância <b>8</b>	52
<b>Figura 21.</b>	de separação por HPLC-PDA mostrando experimento de co-injeção da substância <b>8</b>	53

	com padrão isolado de Quercetina-3-O-Rhamnopiranosídeo ( <b>tr = 10,93 min</b> ).	
<b>Figura 22.</b>	Metanólise do ácido tanico sob condições ligeiramente ácidas para obtenção de PGG	54
<b>Figura 23.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA <b>A)</b> obtido a partir do extrato Et OH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> ; <b>B)</b> obtido a partir da infusão aquosa das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	55
<b>Figura 24.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA mostrando a metanolise dos galotaninos em pH 5. <b>A)</b> amostra armazenada em meio neutro; <b>B)</b> amostra armazenada em pH 5.	56
<b>Figura 25.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras no dia de preparo. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. <b>A)</b> amostra armazenada a -20 °C; <b>B)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; <b>C)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.	57
<b>Figura 26.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após uma semana. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. <b>A)</b> amostra armazenada a -20 °C; <b>B)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; <b>C)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.	57
<b>Figura 27.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após duas semanas. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. <b>A)</b> amostra armazenada a -20 °C; <b>B)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; <b>C)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.	58
<b>Figura 28.</b>	Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após três semanas. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. <b>A)</b> amostra armazenada a -20 °C; <b>B)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; <b>C)</b> amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.	58
<b>Figura 29.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA do extrato feito através de percolação e liofilizado.	59
<b>Figura 30.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas subfrações obtidas após separação em Sephadex LH 20 <sup>®</sup> do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	60
<b>Figura 31.</b>	Espectro de massas em <i>full-scan</i> da substância <b>9</b> , em modo negativo.	61
<b>Figura 32.</b>	Estrutura de <b>Au9</b> , mostrando o equilíbrio entre as formas <i>meta</i> e <i>para</i> -depsídicas.	62
<b>Figura 33.</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-NMR da substância <b>9</b> .	63
<b>Figura 34.</b>	Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> .	64
<b>Figura 35.</b>	Espectro de massas em <i>full-scan</i> do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> , em modo negativo, destacando os íons referentes aos galotaninos mono e bicarregados.	65
<b>Figura 36.</b>	Análise do extrato de <i>A. urundeuva</i> por HPLC-ESI-IT-MS e cromatogramas extraídos dos íons de <i>m/z</i> 787; 939; 1091; 1243; 1395; 1547; 1699.	66
<b>Figura 37.</b>	Análise do extrato de <i>A. urundeuva</i> por HPLC-ESI-IT-MS e cromatogramas extraídos dos íons de <i>m/z</i> 545; 621; 697; 773; 849; 925; 1001; 1077.	67

- Figura 38.** Análise das amostras FIA-ESI-IT-MS: **A)** amostra recém preparada de extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* **B)** amostra de extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* após procedimento de hidrólise em tampão acetato pH 5. 68
- Figura 39.** Análise de amostra de extrato de *A. urundeuva* por FIA-ESI-IT-MS após armazenamento do material liofilizado durante 10 meses a 40 °C. 69
- Figura 40.** Cromatograma representativo da separação por HPLC-PDA para quantificação de ácido gálico, galato de metila e PGG em extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. 71
- Figura 41.** Curvas de calibração obtidas por calibração externa para quantificação de ácido gálico, galato de metila e PGG. 72
- Figura 42.** Espectros de massas obtidos a partir de análise por FIA-ESI-IT-MS dos picos referentes as substâncias no cromatograma da figura 39. **A)** Ácido gálico 1; **B)** Galato de metila 2; **C)** PGG 7. 75
- Figura 43.** Equações para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação. 79

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição das massas das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% das folhas de <i>A. urundeuva</i> por GPC.	39
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição das massas das sub-frações obtidas após separação por SPE em C18.	47
<b>Tabela 3.</b>	Valores de <sup>1</sup> H-NMR da substância <b>7</b> .	49
<b>Tabela 4.</b>	Preparo e condições de armazenagem das amostras utilizadas no teste da estabilidade do extrato em solução.	56
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição das massas das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% por GPC em Sephadex LH 20 <sup>®</sup> .	59
<b>Tabela 6.</b>	Dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração.	72
<b>Tabela 7.</b>	Massas das amostras de extrato utilizadas na quantificação.	73
<b>Tabela 8.</b>	Concentrações das substâncias analisadas e teor no extrato EtOH 70%.	73
<b>Tabela 9.</b>	Determinação da exatidão do método para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.	76
<b>Tabela 10.</b>	Resultados do teste de repetitividade para cada uma das substâncias quantificadas.	77
<b>Tabela 11.</b>	Determinação da precisão intermediária do método para cada uma das substâncias quantificadas.	78

## Sumário

Introdução	18
Plantas medicinais	18
Cuidados	18
Controle de qualidade	20
Saúde	21
Economia	21
Medicina tradicional	23
A família <i>Anacardiaceae</i> e o gênero <i>Astronium</i>	23
Objetivos	29
Geral	29
Específicos	29
Parte experimental	30
Instrumentos	30
Materiais, Reagentes e Soluções	31
Material Vegetal	32
Extrações	32
Preparo das amostras para análise por HPLC-PDA	33
Procedimento de separação por GPC em Sephadex LH 20 <sup>®</sup>	34
Resultados e Discussões	35
Estudo preliminar	35
Investigação química de <i>Astronium urundeuva</i>	35
Separação dos constituintes químicos do extrato por GPC	37
Identificação dos constituintes químicos por HPLC-PDA	44
Purificação das substâncias presentes nas frações	45
Fração 8	45
Fração 11	47
Identificação dos constituintes químicos através de técnicas espectroscópicas	48
Identificação da substância 7	48
Identificação da substância 8	51
Estabilidade do extrato	53
Estabilidade do extrato por HPLC-PDA	54
Isolamento de substâncias com ligação depsídica	58
Isolamento da substância 9	61
Identificação da substância 9	61
Identificação das substâncias no perfil cromatográfico	63
Análise do extrato por ESI-IT-MS	64
Análise da estabilidade do extrato por FIA-ESI-IT-MS	67

Avaliação quantitativa dos marcadores	69
Construção das curvas de calibração	71
Aplicação do método analítico	72
Validação	74
Especificidade	74
Exatidão	75
Precisão	76
Linearidade	78
Limite de detecção e limite de quantificação	79
Considerações finais	80
Referências	85

## **INTRODUÇÃO**

### **Plantas medicinais**

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática comum desde os primórdios da humanidade. Estudos arqueológicos feitos no Iraque registraram oito espécies de plantas em sepulturas de homens de Neanderthal (60.000 a.C.), das quais sete ainda são utilizadas como plantas medicinais nos dias de hoje (NAGY, 2012). Algumas das culturas mais desenvolvidas da antiguidade, como a chinesa e a egípcia, são famosas pela utilização de misturas de ervas para o tratamento de doenças, sendo que o papiro de Ebers (1.550 a.C.) é um dos registros mais antigos e representativos desse conhecimento, contendo 800 prescrições, e mais de 700 drogas de origem natural (NAGY, 2012).

Atualmente mais de 1,5 bilhões de pessoas no mundo todo fazem uso de plantas medicinais. Isso ocorre principalmente devido à crença de que tudo que é natural não possui efeitos colaterais, além de terem baixo custo. Contudo, com o crescimento da parcela da população que utiliza essas preparações, tem havido também um incremento nos relatos de reações adversas (LI; ZHAO & YANG, 2011).

### **Cuidados**

Plantas medicinais são comercializadas livremente em mercados e feiras livres, sendo consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e até mesmo de sua identidade.

A aplicação aos fitofármacos das mesmas normas científicas aplicadas às drogas sintéticas tem comprovado a eficácia de várias espécies no tratamento de diversas doenças. Só no período de 2005 a 2007, treze fármacos à base de produtos naturais ou semi-sintéticos foram aprovadas para comercialização mundial (BUTLER, 2008).

Contudo, diversas plantas apresentam forte toxicidade, como é o caso da *Digitalis purpurea* L (Scrophulariaceae), cujas folhas possuem glicosídeos cardiotônicos (KUATE et al., 2008). Mesmo plantas com comprovada atividade farmacológica, podem apresentar alguns efeitos colaterais devido ao uso indiscriminado. É o caso do chá verde (*Camellia sinensis*, Theaceae) que em excesso pode causar danos ao fígado e arritmia, além de interagir com outros medicamentos (SCHÖNTHAL, 2011).

A questão da dosagem representa um grande entrave para se garantir a segurança e eficácia das ervas medicinais, mesmo em se tratando de plantas com atividades biológicas confirmadas. Os fabricantes não precisam apresentar quanto do princípio ativo está presente em cada preparação, sendo que uma dose muito pequena pode não surtir efeito algum, enquanto que uma dose maior pode induzir interações perigosas com o organismo (FISCHMAN, 2000; LI; ZHAO & YANG, 2011).

Além disso, numerosos fatores como clima, condições de cultivo, tempo da colheita, secagem, armazenamento, procedimento de extração e adulterações tanto acidentais quanto deliberadas podem causar uma ampla variabilidade nos constituintes ativos e colocar a saúde e segurança do paciente em risco (TISTAERT; DEJAEGER & HEYDEN, 2011). Um tipo de adulteração bastante comum e extremamente perigosa é a adição de fármacos sintéticos a fim de se aumentar o suposto efeito terapêutico. Estudos forenses realizados com fitoterápicos para o tratamento de obesidade registraram frequentes adulterações com fármacos sintéticos. Por exemplo, substâncias do grupo das anfetaminas, que aumentam significativamente o efeito emagrecedor, mas podem causar uma série de efeitos adversos (CARVALHO et al., 2010).

## **Controle de qualidade**

Tendo em vista o grande aumento no uso, muitas vezes indiscriminado, das plantas medicinais, tem-se observado maior interesse por parte de cientistas e empresas farmacêuticas, no sentido de entender melhor a composição química dessas plantas, e assegurar não só a eficácia, mas também a segurança do seu uso. Dois marcos importantes relacionados à recente popularização das ervas medicinais, ambos encabeçados pela *Organização Mundial de Saúde (WHO)*, incluem o *Manual on quality control methods for medicinal plant materials* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998), que descreve uma série de testes utilizados para se obter parâmetros de qualidade do material vegetal, e o *General guidelines for methodologies on research and evaluation of Traditional Medicine* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000), que tem por principal objetivo o desenvolvimento de metodologias tanto de avaliação quanto de regulação e registro de plantas medicinais (AMEH et al., 2010).

Fica evidente que o controle de qualidade é uma etapa essencial para que uma planta possa ser utilizada como fitoterápico. Contudo, as ervas medicinais são comumente comercializadas sem discriminação das diferentes partes da planta, ou como uma mistura de diferentes ervas. Em alguns casos apresentam centenas ou até alguns milhares de componentes. Muitas vezes os compostos responsáveis pela atividade são desconhecidos, o que dificulta significativamente um controle de qualidade eficaz (LI; ZHAO & YANG, 2011).

Devido à grande complexidade das ervas medicinais, pequenas diferenças em substâncias fortemente relacionadas à atividade podem não ser facilmente visualizadas, mesmo assim, afetam significativamente o resultado obtido para o paciente após sua utilização. Esse obstáculo em particular vem sendo superado através do desenvolvimento de técnicas analíticas e ferramentas estatísticas para tratamento de dados. Estes

possibilitam identificar uma enorme quantidade de substâncias em misturas complexas e detectar variáveis que influenciam significativamente as atividades farmacológicas (YULIANA et al., 2011).

### **Saúde**

É evidente que no contexto mundial muito tem sido feito para se assegurar a qualidade e garantir a segurança dos usuários de fitoterápicos. Contudo, vale ainda ressaltar a importância deste tipo de terapia alternativa para países em desenvolvimento, como o Brasil, que muitas vezes têm defasagens nos seus sistemas de saúde. Os fitoterápicos são uma opção mais barata que fármacos sintéticos (ZUANAZZI & MAYORGA, 2010), especialmente interessantes em casos crônicos, cujo tratamento necessita de uma continuidade, gerando assim grandes gastos com medicamentos.

Seguindo esta tendência, o Ministério da Saúde brasileiro divulgou lista contendo 71 plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamento pelo Sistema Único de Saúde (RELAÇÃO, 2012). Foram selecionadas plantas com potencial para serem usadas contra diabetes, úlceras, inflamações e outras doenças crônicas. Essa é uma lista que serve para orientar estudos e pesquisas, a fim de gerar produtos que possam ser agregados no âmbito do sistema de saúde. Alguns programas municipais ou estaduais já distribuem plantas, mas em um número ainda incipiente e sem obedecer a padrões científicos de qualidade.

### **Economia**

A flora brasileira é conhecida pela sua enorme biodiversidade, sendo considerada uma das maiores fontes de materiais com atividade farmacológica do mundo. Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população brasileira, sendo um reflexo dessa

enorme biodiversidade somado à riqueza das diferentes culturas que se misturaram no país (indígena, europeia e africana) (BRANDÃO et al, 2008).

Apesar desse rico conhecimento popular e da biodiversidade disponíveis no Brasil, muito pouco é aproveitado comercialmente. A maioria das patentes envolvendo as plantas brasileiras pertence aos países estrangeiros, sendo que o Brasil possui apenas um único medicamento baseado na sua flora que foi inteiramente desenvolvido no país, o Acheflan<sup>®</sup> (*Cordia verbenacea*) (UNICAMP, 2005).

Estima-se que o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de USD 22 bilhões por ano, sendo que o mercado brasileiro é responsável por aproximadamente USD 1 bilhão (FREITAS, 2007). Isso representa uma parcela de aproximadamente 4,5% do total mundial. Considerando que o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, esses números indicam clara falta de investimentos no desenvolvimento de ciência e tecnologia voltada para esse setor.

A lacuna econômica que a falta de investimento na tecnologia de plantas medicinais representa para o Brasil pode ser verificada quando consideramos a atual condição do mercado de exportação do país que é liderada por produtos com baixo valor agregado, como a soja, cujo preço é de USD 0,23/Kg, enquanto que o valor médio agregado pela cadeia produtiva de plantas medicinais é de USD 41,10/Kg (ZUANAZZI & MAYORGA, 2010).

Fica evidente que no futuro os fitoterápicos podem vir a representar papel socioeconômico muito importante no país. Mas isso ainda exige investimento grande de esforços conjuntos no sentido de se caracterizar quimicamente e farmacologicamente a flora brasileira, e estabelecer diretrizes e parâmetros de qualidade para a produção e utilização desses produtos com segurança e eficácia.

### **Medicina Tradicional**

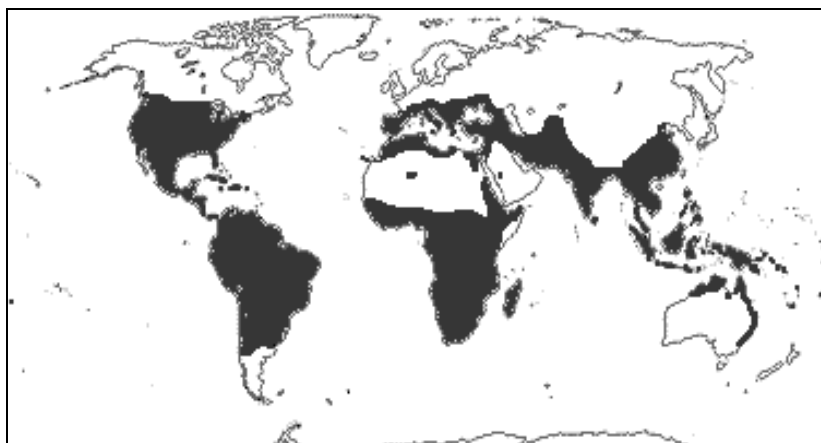
A base da medicina tradicional na maioria dos países está relacionada ao conhecimento popular de plantas medicinais. A pesquisa com fitoterápicos é frequentemente guiada pelos conhecimentos populares e pela etnobotânica (OLIVEIRA, et al., 2009).

Muitas plantas medicinais são utilizadas por diferentes comunidades para o tratamento de diversas doenças, sendo esse o ponto de partida para muitos estudos. Plantas amplamente difundidas pela população devido aos seus usos medicinais são promissoras para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

Alguns exemplos de plantas muito utilizadas ao redor do mundo são *Lannea barteri* (KONÉ et al., 2011), *Sclerocarya birrea* (NDIFOSSAP et al., 2010), *Semecarpus anacardium* (ADHAMI et al., 2012), *Mangifera indica* (GEBARA et al., 2011) e *Astronium urundeuva* (CARTAXO; SOUZA & ALBUQUERQUE, 2010), todas essas espécies fazem parte da família *Anacardiaceae* e são utilizadas no tratamento de doenças crônicas como reumatismo, diabetes, dores e gastrites.

### **A família *Anacardiaceae* e o gênero *Astronium***

A família *Anacardiaceae*, pertencente à ordem Sapindales. Compreende cerca de 70 gêneros e 700 espécies. No Brasil, ocorrem 15 gêneros e cerca de 70 espécies. Tem distribuição predominantemente tropical e subtropical (Figura 1), sendo encontrada em todo o território brasileiro e em grande parte do mundo (STEVENS, 2008). É constituída de espécies arbóreas, arbustos e algumas lianas (WATSON & DALLWITZ, 2008; CARVALHO & GAIAD, 2011). Os gêneros desta família são subdivididos em cinco tribos, que levam em conta os caracteres florais: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae.



**Figura 1.** Distribuição mundial de espécies de *Anacardiaceae* (STEVENS, 2008).

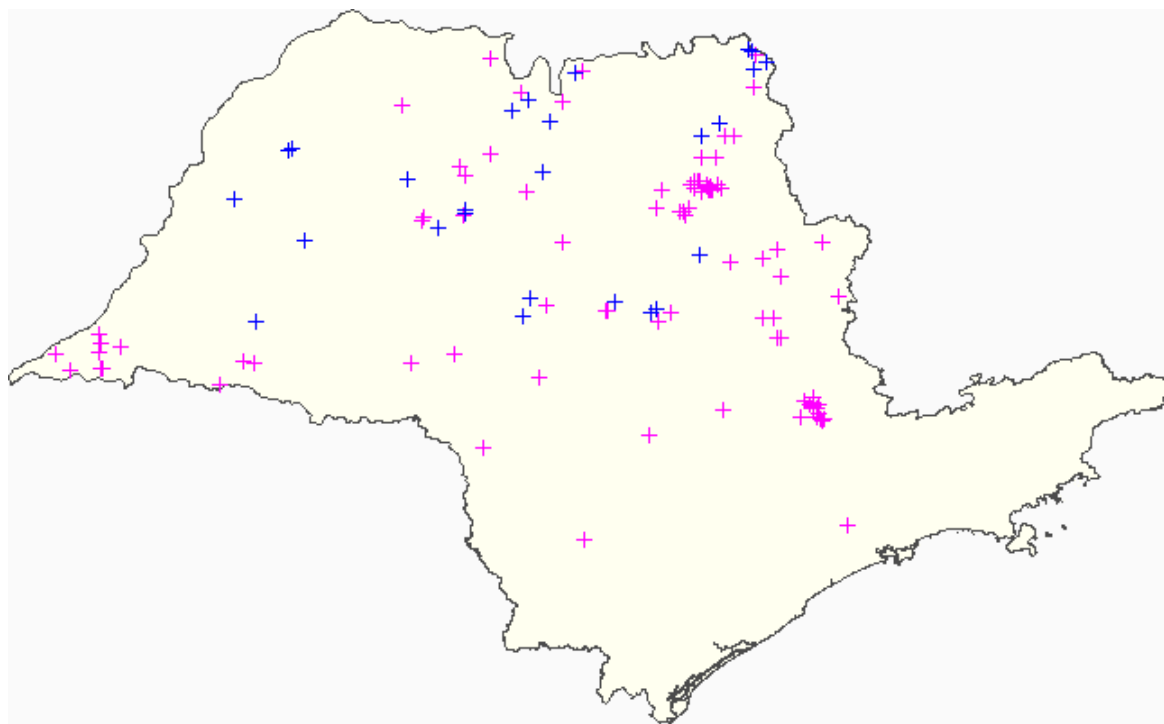
A família se destaca por apresentar espécies de considerável expressão econômica. Na alimentação, frutos e sementes comestíveis como o caju (*Anacardium occidentale* L.), manga (*Mangifera indica* L.), pistache (*Pistacia vera* L.) e pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolia* L) e também, espécies de interesse farmacológico, que são usadas pela população para o tratamento de diabetes (NDIFOSSAP et al., 2010) e epilepsia (MARCHETTI et al., 2011), na prevenção de Ausaimer (ADHAMI et al., 2012), na cura de fraturas, resfriados, febre tifóide, disenterias, diarréias (HARTLEY, 2009; SIBANDZE; ZYL & VUUREN, 2010) e úlceras (CARLINI et al., 2010). Destacam-se também espécies empregadas na ornamentação e paisagismo, como dos gêneros *Cotinus*, *Rhus*, *Schinus*, *Searsia*, *Pistacia*, *Harpephyllum*, *Lanea*, *Rhodosphaera*, *Smodingium*, *Toxicodendron*, que apresentam belas inflorescências, infrutescências e folhagens verdes. Outros gêneros se destacam pela madeira de alta qualidade, resistência química e mecânica, como *Tapirira*, *Schinopsis*, *Astronium*, *Myracrodrunon*, *Ozoroa* e *Protorhus*, e ainda plantas produtoras de vernizes (*Schinopsis*, *Astronium*, *Anacardium*, *Myracrodrunon*, *Ozoroa*) (PELL, 2004).

Cerca de 25% dos gêneros de Anacardiaceae são conhecidos pela sua toxicidade e por causarem dermatite de contato, como por exemplo, *Anacardium*, *Astronium*, *Blepharocarya*, *Cotinus*, *Lithrea*, *Mangifera*, *Mauria*, *Myracrodruon*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Semecarpus*, *Spondias*, *Swintonia* e *Toxicodendron*. A dermatite provocada por estas plantas é atribuída principalmente aos lipídios fenólicos (PELL, 2004).

Estudos sobre a constituição química de Anacardiaceae relatam a ocorrência de flavonoides, incluindo biflavonoides, terpenos, xantonas, chalconas, e principalmente, lipídios fenólicos e seus derivados (CORREIA et al., 2006; GEBARA et al., 2011; NAWWAR et al., 2011). Do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, somente cerca de 7% das espécies foram investigadas e os gêneros mais estudados são *Mangifera*, *Rhus*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lansea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Dentre estes se destacam: *Schinus terebinthifolius*, apresentando atividade antifúngica (JOHANN et al., 2010) e grande quantidade de  $\alpha$ -pineno que apresenta atividade antimetástase em melanomas (MATSUO et al., 2011), *Schinus molle*, apresentando óleos essenciais com atividades inseticida e repelente (ABDEL-SATTAR et al., 2009) *Mangifera indica*, avaliada quanto à atividade antiinflamatória (KNÖDLER et al., 2008) *Anacardium occidentale*, investigada quanto atividade antiulcerogênica (KONAN & BACCHI, 2007) e antibacteriana (GREEN et al., 2008), *Lansea barteri*, apresentando atividades antioxidante, antimicrobiana e inibitória da acetilcolinesterase (KONÉ et al., 2011) e espécies de *Rhus*, apresentando atividades antimalárica, antimutagênica, antioxidante, hipoglicêmica, dentre outras (RAYNE & MAZZA, 2007; MAHJOUB et al., 2010).

Desse modo, o estudo de espécies de Anacardiaceae se justifica pela diversidade de metabólitos e atividades biológicas relatadas.

O gênero *Astronium* é composto por cerca de 35 espécies, sendo típico das regiões norte e nordeste do Brasil, porém muito encontrado também na região sudeste (Figura 2). De acordo com a literatura, a espécie *Astronium urundeuva* (Figura 3) foi a mais estudada, sendo detectadas atividades antiulcerogênica (CARLINI et al., 2010; SOUZA et al., 2007; RAO et al., 1987), antiinflamatória (SOUZA et al., 2007; VIANA et al., 1997) antibacteriana, antifúngica (SÁ et al., 2009a), neuroprotetora (NOBRE JUNIOR et al., 2007) e efeitos no trânsito gastrintestinal (MENEZES et al., 1988) e em colites (RAO et al., 1986). Lectina isolada da madeira apresentou atividade inseticida (SÁ et al., 2008; NAPOLEÃO et al., 2011) e larvicida em *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009b). Extrato aquoso de *A. urundeuva* apresentou citotoxicidade em células cancerígenas (MAHMOUD et al., 2011) e inibiu o crescimento de cáries em ratos (MENEZES et al. 2010). Gel contendo fração do extrato de *A. urundeuva* rica em chalconas apresentou efeito no tratamento de periodontite em ratos (BOTELHO et al., 2008). A casca e entrecasca de *A. urundeuva* são indicadas na medicina popular contra diarreias. A casca também é usada no tratamento de hemorróidas. O chá das raízes é empregado contra reumatismo, o chá das folhas no tratamento de úlceras da pele e o chá dos frutos contra dor de dente (ALMEIDA et al., 1998; DESMARCHELIER et al., 1999; MENEZES et al., 2010). Sob o ponto de vista químico, foram detectados e isolados polifenóis (proantocianidinas), chalconas e ligninas da madeira (NAPOLEÃO et al., 2011; MORAIS et al., 1999) e as chalconas urundeuvinas I, II e III, responsáveis pelas atividades analgésica e antiinflamatória (BOTELHO et al., 2008; VIANA et al., 2003). De *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* foram avaliados somente os óleos essenciais (MAIA et al., 2002; RODRIGUES-BURBANO, 2010), sendo que um dos composto voláteis de *A. graveolens* apresentou atividade repelente a insetos (CHEN; WIEMER & HOWARD, 1984).



**Figura 2.** Distribuição de espécies de *Astronium* coletadas no estado de São Paulo. Em azul as coletas de *Astronium urundeuva* (BIOTA-FAPESP, 2012).



**Figura 3.** Árvore, folhas e frutos de *Astronium urundeuva* (LORENZI, 2008).

A ampla utilização de espécies do gênero *Astronium* na medicina popular, a sua distribuição por todo o país e incipiência de dados químicos aprofundados justificam os estudos fitoquímicos deste importante gênero botânico.

## **OBJETIVOS**

### **a) Geral**

- 1) Investigar plantas nativas da flora brasileira a fim de obter extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas.

### **b) Específicos**

- 1) Dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico de plantas medicinais de espécies ocorrentes no Cerrado, sobretudo aquelas do Estado de São Paulo;
- 2) Preparar extratos padronizados a partir de *Astronium urundeuva*;
- 3) Realizar a otimização de métodos e modelos de preparação de extratos;
- 4) Avaliar as diferenças quali- e quantitativas entre a composição química dos tipos de preparação estudados (infuso e extratos polares).
- 5) Desenvolver metodologia analítica para avaliar a composição química de extratos EtOH 70%.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentos

As separações cromatográficas analíticas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco<sup>®</sup>), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco<sup>®</sup>) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco<sup>®</sup>), e em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (gradiente binário) modelo LC-20AT (Shimadzu<sup>®</sup>), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos modelo SPD-M20A (Shimadzu<sup>®</sup>) e a um injetor automático SIL-20A (Shimadzu<sup>®</sup>). Separações em modo semipreparativo foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo P1000 (Spectra Physics<sup>®</sup>) com bomba de fluxo máximo 10 mL/min acoplada a detector por Índice de Refração modelo Waters R401 (Millipore<sup>®</sup>) e registrador modelo L250E (Knauer<sup>®</sup>).

Os experimentos de massas foram realizados em espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo scientific<sup>®</sup>), com analisador de massa Ion Trap 3D e ionização por *electrospray*. Para os experimentos de LC-MS o equipamento foi acoplado a um sistema de HPLC e UHPLC Accela High Speed LC (Thermo scientific<sup>®</sup>),.

Em modo analítico foi usada 1) coluna de fase reversa RP18, modelo Synergi Hydro (Phenomenex<sup>®</sup>) de 250 x 4,6 mm, com partículas de tamanho médio de 4 µm, pré-coluna (Phenomenex<sup>®</sup>) de 4 x 3 mm e 2) coluna de fase reversa RP18, modelo Synergi Hydro (Phenomenex<sup>®</sup>) de 150 x 4,6 mm, com partículas de tamanho médio de 4 µm, pré-coluna (Phenomenex<sup>®</sup>) de 4 x 3 mm. Em modo semipreparativo foi usada coluna de fase reversa RP18, modelo Synergi Hydro (Phenomenex<sup>®</sup>) de 250 x 4,6 mm, com partículas de tamanho médio de 4 µm. Amostras e padrões foram injetados através de um injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne<sup>®</sup>) com um *loop* variável com capacidade máxima de 100 µl (modo analítico) e 500 µl (modo semipreparativo).

Amostras aquosas foram secas em liofilizador da marca Savant Instruments INC., modelo Micro Modulyo e extratos orgânicos reduzidos em rotaevaporador modelo Laborota 4001 - efficient, marca Heidolph<sup>®</sup>, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph<sup>®</sup>.

A pesagem de material vegetal, extratos e dos padrões comerciais ou purificados utilizados na preparação das soluções estoque foi feita em balança analítica TE214S, de capacidade para 200 g e precisão de 0,001 g (Sartorius<sup>®</sup>) foi usada.

Os experimentos <sup>1</sup>H- e <sup>13</sup>C-NMR 1D e 2D: COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, *g*-HMQC, *g*-HMBC e TOCSY 1D foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 500 MHz (11,7 T) (Varian<sup>®</sup> Inova).

Nos fracionamentos dos extratos por Cromatografia de Permeação em Gel foi usada bomba peristáltica *Pharmacia*, modelo P1 18-1110-91, conectada a coluna de vidro (180 x 3 cm) preenchida com Sephadex LH-20<sup>®</sup> e a um coletor de frações *Pharmacia*, modelo RediFrac, com capacidade para 95 frações.

### **Materiais, reagentes e soluções**

Balões volumétricos usados no preparo dos padrões foram imersos por 24 h em solução de Extran (Merck<sup>®</sup>) 3% (v/v), para remoção de contaminantes. O material foi enxaguado em água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>) e seco a temperatura ambiente.

Galato de metila, galato de etila e ácido gálico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foram usados como padrão. Demais metabólitos não disponíveis comercialmente foram isolados e caracterizados por <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR. Todos os padrões e amostras foram armazenadas em vials de 2 ml e mantidos em freezer a -20°C.

Na preparação das amostras, padrões e de FM em HPLC foram usados Acetonitrila e metanol grau HPLC (Baker Inc). Os demais solventes são todos de grau PA.

Nos experimentos de NMR foram usados Acetona Hexadeuterada e Dimetil Sulfóxido Hexadeuterado (Acros<sup>®</sup>, Aldrich<sup>®</sup>, Sigma<sup>®</sup>)

Nas triagens das frações foram usadas placas de camada delgada de silicagel em suporte de alumínio (Merck<sup>®</sup>, Aldrich<sup>®</sup>), e como reveladores exposição à luz ultravioleta (254 e 366 nm) (Chromatovue<sup>®</sup>) e spray de solução anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguido de aquecimento em estufa a 120 °C.

### **Material vegetal**

Folhas e caules de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (números de registro 1444 e 1446) foram coletados nos municípios paulistas de Bálamo e Votuporanga, respectivamente. Os exemplares foram coletados em novembro/2007 e identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro (IB – UNICAMP). Exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). O nome da espécie *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. é sinonímia de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

Depois de separadas as partes, folhas e caules foram secos em estufa a 40°C, moídos em moinhos de facas, sendo posteriormente pesados, embalados, etiquetados e armazenados em local seco.

### **Extrações**

O material vegetal (folhas e cascas) foi submetido aos seguintes processos extrativos:

- 1) Maceração com EtOH 70%: 500 mg de cada material foi extraído com 5 mL de Etanol 70% por 30 dias, 1 vez ao dia;
- 2) Infusão das folhas: 500 mg do material moído foram extraídos com 5 mL de água a 80°C durante 5 minutos.

3) Percolação com EtOH 70% (PRISTA, 1995): O material moído (884 g) foi previamente intumescido com 2 L de etanol 70% (v/v) durante 2 horas em béquer de 2 litros. Após esse período, percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou entre 1,0 e 2,0 mL/min/Kg de droga vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

Todos os extratos e o infuso foram rota-evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40°C, liofilizados para completa remoção da água e armazenados em frascos tarados.

### **Preparo das amostras para análise por HPLC-PDA**

Todos os extratos passaram por um processo de *clean-up* utilizando cartucho de SPE RP18 (50 mg). O cartucho foi previamente ambientado com 5,0 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O, na proporção mais adequada. Em seguida, a amostra foi filtrada através do cartucho, o qual foi em sequência eluído com 3,0 mL da mesma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O. A solução obtida foi seca em temperatura ambiente e o sólido resultante redissolvido em MeOH/H<sub>2</sub>O, filtrado em filtro de PTFE (0,45 µm), armazenado em vial de vidro e analisados por HPLC-PDA.

O infuso foi solubilizado diretamente em H<sub>2</sub>O Milli-Q e filtrado em membrana PTFE 0,45 µm (simplepure<sup>®</sup>), sem passar pelo processo de *clean-up*.

**Procedimento de separação por GPC em Sephadex LH 20<sup>®</sup>**

3,5 g do extrato foram misturados e homogeneizados com 10 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2, v/v). A solução obtida foi centrifugada e o sobrenadante aplicado no topo de uma coluna (57 cm x 3 cm) preenchida com Sephadex LH 20<sup>®</sup>, previamente ambientada com a respectiva FM usada na solubilização da amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Estudo preliminar

Espécies de *Astronium* vêm sendo investigadas no âmbito químico e farmacológico pelos grupos de Pesquisas em Produtos Naturais participantes do projeto BIOTA – Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas.

SILVA (2011) realizou análises preliminares do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* por espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>) e concluiu que a espécie apresenta derivados de ácido gálico e galotaninos.

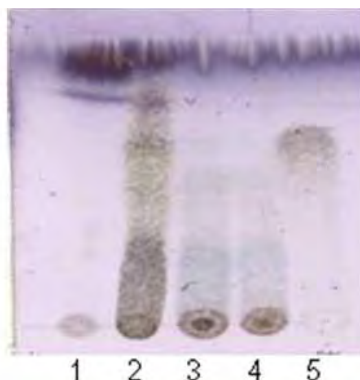
Galotaninos representam uma classe de metabólitos secundários muito interessantes do ponto de vista farmacológico, pois possuem ampla variedade de atividades biológicas e estão presentes em grande número de espécies vegetais (ENGELS; GÄNZLE & SCHIEBER, 2012).

### Investigação química de *Astronium urundeuva*

Com base nessas informações, o estudo fitoquímico foi iniciado a partir do extrato EtOH 70% das folhas, que é o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (PRISTA, 1995). A fim de facilitar a visualização dos componentes do extrato, 100 mg do mesmo foram dissolvidos em 5 mL de mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2, v/v) e extraídos três vezes com cada um dos solventes: hexano, AcOEt e *n*-BuOH.

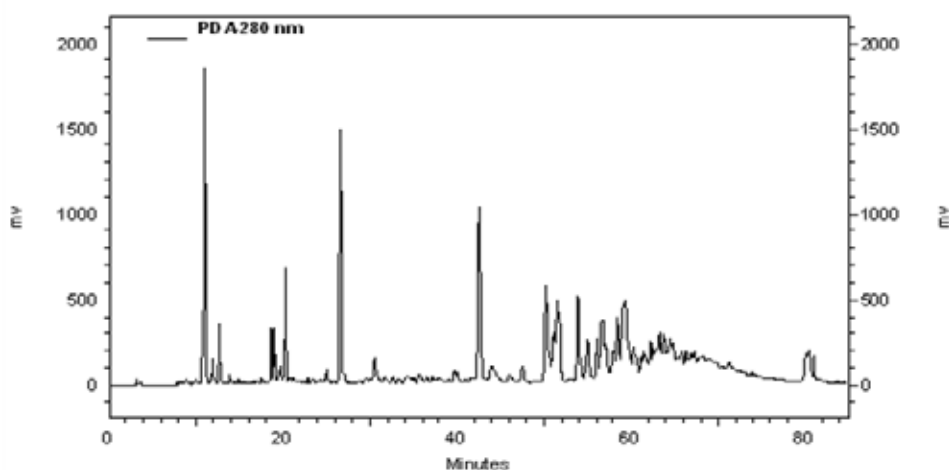
Análise por TLC (Figura 4) evidenciou que na fração hexânica ficaram concentradas apenas substâncias extremamente apolares. A Fr. AcOEt apresentou substâncias ao longo de toda a placa cromatográfica, enquanto que as frações *n*-BuOH e aquosa retiveram substâncias de maior polaridade, semelhantes entre si. Revelação com

anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostrou manchas de coloração cinza, sugerindo a presença de derivados de ácidos fenólicos (WAGNER, BLADT & ZGAINSKI, 2003).



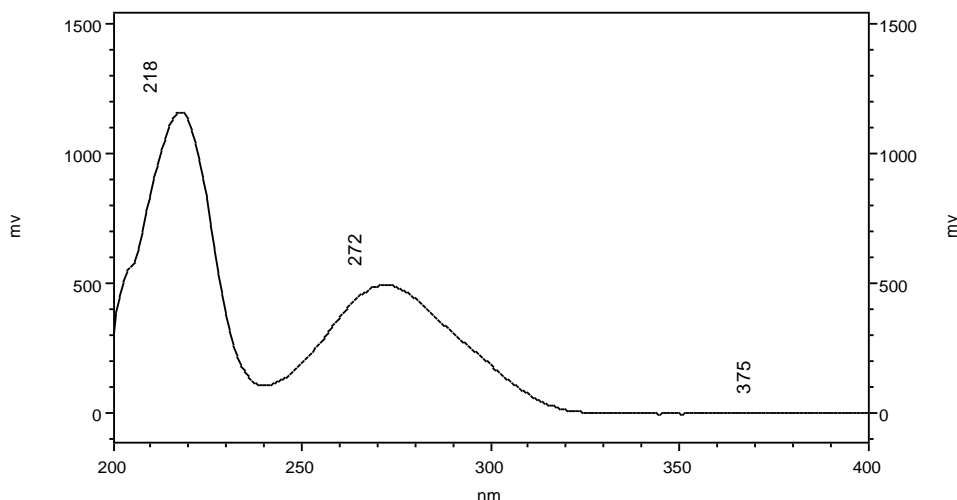
**Figura 4.** Análise por TLC das frações obtidas por LLE do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. (silicagel, clorofórmio:metanol:ácido acético [70:30:0,5 v:v:v], anisalaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). 1 – fração hexânica; 2 – fração AcOEt; 3 – fração nBuOH; 4 – fração H<sub>2</sub>O; 5 – padrão de ácido gálico.

Alíquota (10 mg) do extrato EtOH 70% obtido por percolação foi avaliada por HPLC-PDA. Foram observados, no cromatograma, dois comportamentos distintos. Uma primeira parte com picos bem resolvidos ( $t_r$  entre 0 e 45 min), seguida de uma região com picos bastante alargados ( $t_r$  entre 45 e 85 min), quase que totalmente sobrepostos (Figura 5).



**Figura 5.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min) perfazendo uma análise com tempo total de 85 min.

A evidência da presença majoritária de derivados do ácido gálico foi comprovada pelas bandas de absorção do sistema benzílico, com máximos na região do UV em 210-220 nm e entre 260-280 nm, Figura 6 (STICHER, 2008).



**Figura 6.** Espectro na região do UV de padrão de ácido gálico.

A má resolução dos picos cromatográficos somada as bandas de absorção no UV sugerem que as substâncias eluindo entre 45 e 85 min (Figura 5) correspondem aos galotaninos.

### **Separação dos constituintes químicos por GPC**

A etapa posterior consistiu em realizar a separação dos constituintes químicos presentes no extrato das folhas por GPC.

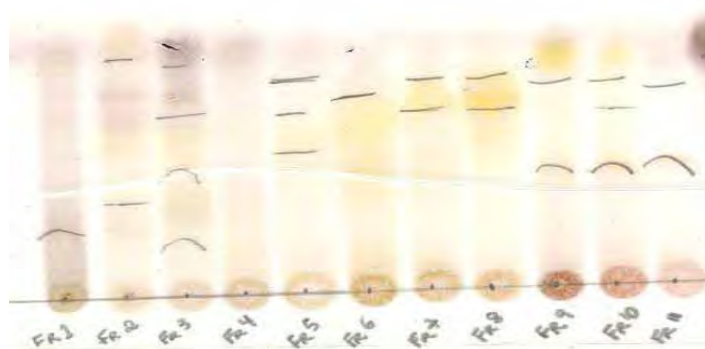
Separações baseadas no suporte Sephadex LH 20<sup>®</sup> são amplamente utilizadas na investigação e isolamento de produtos naturais e os melhores resultados ocorrem quando se utiliza solventes orgânicos, principalmente metanol, como FM (LINSKENS & JACKSON, 1992). No entanto, devido à baixa solubilidade do extrato em metanol e a ausência de outro suporte com maior compatibilidade com sistema aquoso, houve a

necessidade de realizar as separações cromatográficas empregando como FM um sistema binário constituído de MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2, v/v).

Tendo em vista a grande quantidade de taninos no extrato, utilizou-se também a eluição com um segundo sistema binário composto de Acetona:H<sub>2</sub>O (7:3, v/v), sistema muito utilizado na separação de taninos em suporte de Sephadex LH 20<sup>®</sup> (ENGELS et al., 2009). A necessidade desse sistema se dá devido ao fato de que taninos não são separados pelo mecanismo típico de permeação em gel verificado quando se utiliza Sephadex LH 20<sup>®</sup>, no qual deveriam ser eluídos rapidamente por se tratarem de moléculas grandes. Mas, pelo contrário, ficam retidos, devido ao grande número de interações entre as suas hidroxilas e as da própria FE, cuja estrutura corresponde a um gel de dextranas hidroxipropiladas. Desta forma, o primeiro sistema, composto de MeOH:H<sub>2</sub>O, elui substâncias fenólicas menores, como os ácidos fenólicos e flavonóides, e o segundo sistema, composto de Acetona:H<sub>2</sub>O, proporciona a eluição dos taninos.

Durante o processo de separação cromatográfica foram coletadas 120 frações e a triagem destas foi feita por TLC. Na avaliação das frações, inúmeros sistemas de eluição foram testados e um foi selecionado para realizar o monitoramento das frações: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Ác. acético (70:30:0,05; v/v/v) (WAGNER, BLADT & ZGAINSKI, 2003).

Os procedimentos cromatográficos foram repetidos três vezes a fim de se obter quantidade significativa de massa das frações semi-purificadas, sendo que em cada uma das vezes foi aplicada uma massa de 3,5 g do extrato à coluna. Ao final foram feitas triagens por TLC e as frações das três colunas foram todas reagrupadas, por similaridade, em um total de 11 frações (Figura 7).



**Figura 7.** Análise por TLC das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% por GPC em Sephadex LH20<sup>®</sup>. (Silicagel, clorofórmio:metanol:ácido acético [70:30:0,05 v:v:v], anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Depois de reagrupadas, as frações foram secas e suas massas determinadas. A Tabela 1 ilustra a distribuição das massas das frações obtidas após o procedimento de separação cromatográfica do extrato por GPC em Sephadex LH 20<sup>®</sup>. A massa total das frações significativamente menor que a massa inicial pode ser atribuída ao precipitado que foi separado da amostra antes que essa fosse aplicada à coluna.

**Tabela 1.** Distribuição das massas das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* por GPC.

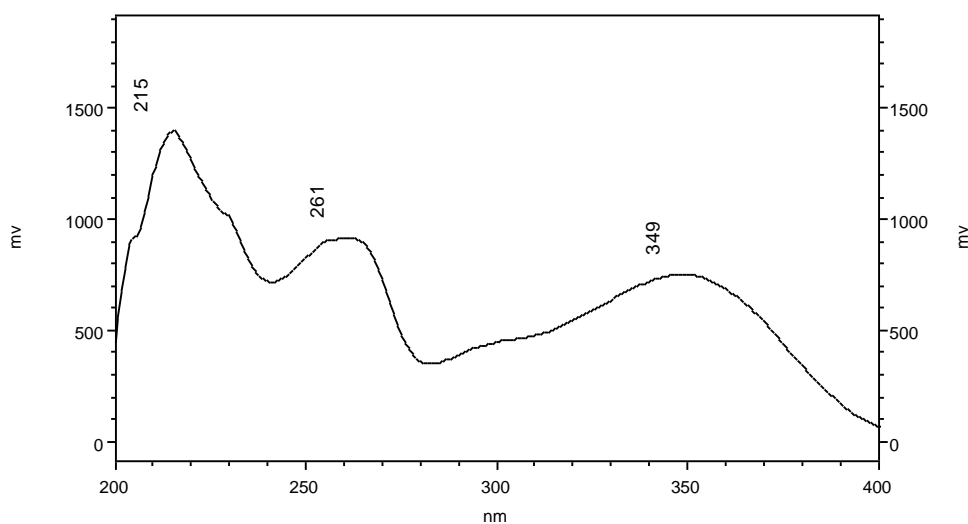
Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
Fr1	197,3	Fr7	320,7
Fr2	1689,9	Fr8	719,0
Fr3	842,9	Fr9	192,7
Fr4	408,2	Fr10	1844,0
Fr5	99,8	Fr11	903,6
Fr6	522,9	<b>Massa total</b>	<b>7,741 g</b>

Para avaliar a viabilidade de isolamento e purificação, as frações listadas na Tabela 1 foram analisadas por HPLC-PDA. O procedimento nesta etapa consistiu em preparar amostras das frações na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Desta forma, 2 mg de cada fração foram solubilizados em aproximadamente 0,5 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). A solução foi

filtrada em membrana de *PTFE* de 0,45  $\mu\text{m}$ . O volume final da solução foi ajustado para 2 mL. A solução foi armazenada em *vial* e posteriormente analisada por HPLC-PDA.

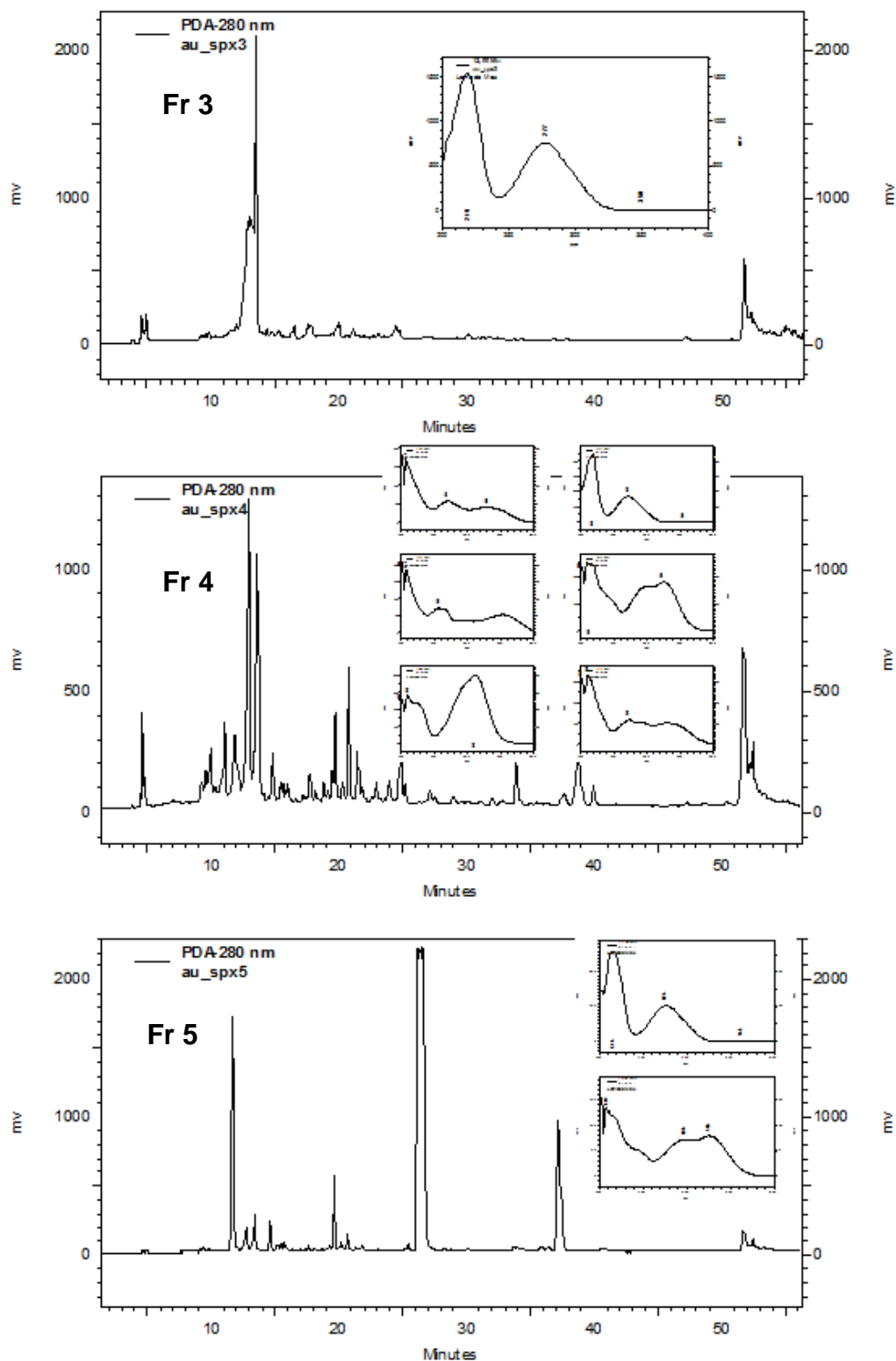
A partir dos cromatogramas mostrados nas figuras 9 a 11 é possível verificar que a separação preliminar por GPC apresentou baixa seletividade para alguns dos compostos majoritários. Quatro picos cromatográficos com UV característicos de derivados do ácido gálico (bandas em 220 e 270 nm), em aproximadamente 12 min, 20 min, 26 min e 37 min aparecem repetidamente e em alta intensidade na maioria das frações.

As frações 1 e 2 apresentaram quantidade considerável de material, porém nenhuma substância com absorção significativa na região do UV. Nas frações 6, 7 e 8 foram concentradas as substâncias com UV característicos de derivados de flavonóides, que mostram bandas de absorção em 240-290 nm (Banda II, anel A) e em 300-390 nm (Banda I, anel B) (Figura 8) (MERKEN & BEECHER, 2000).

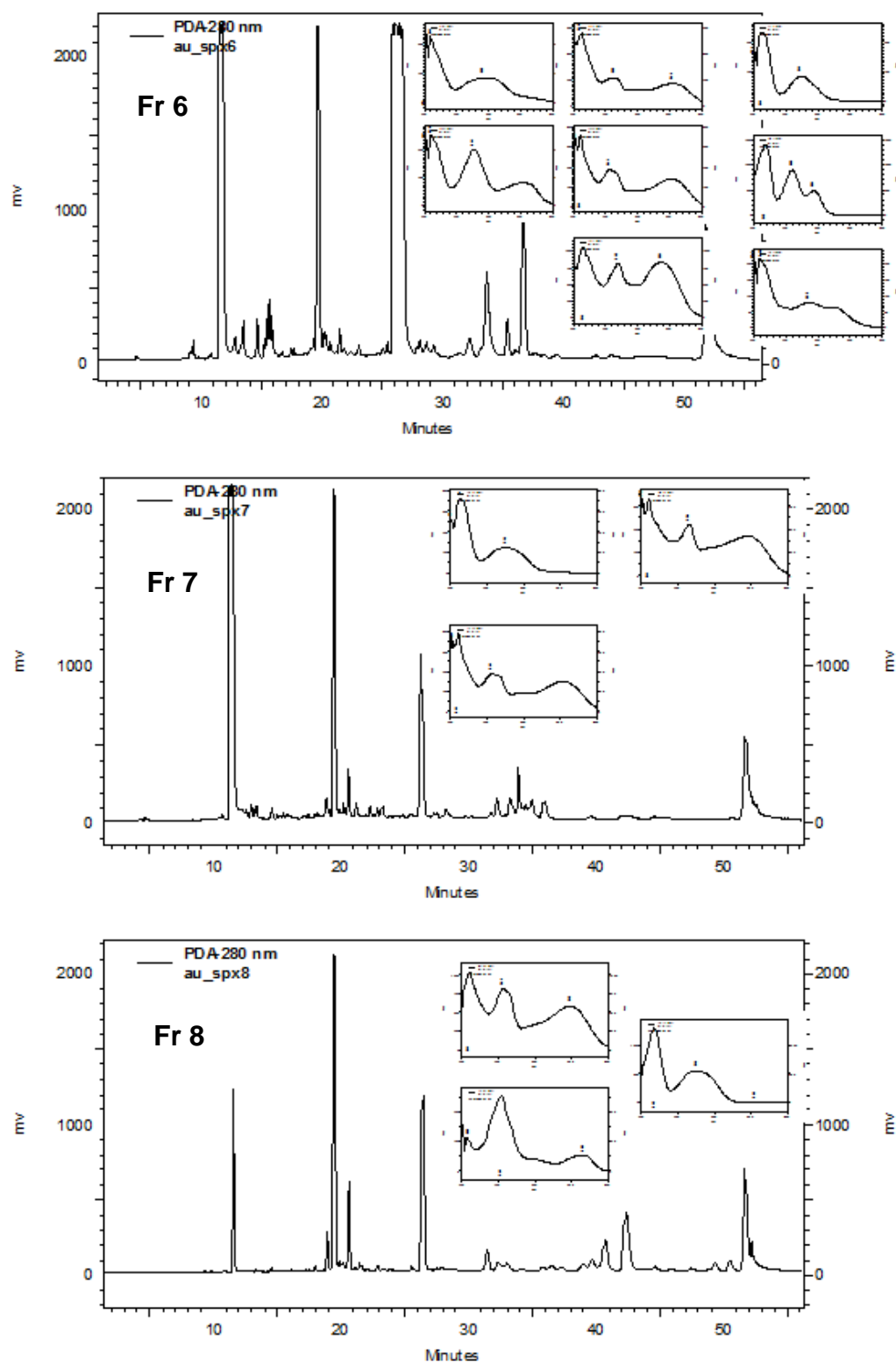


**Figura 8:** Espectro na região do UV característico de flavonóides.

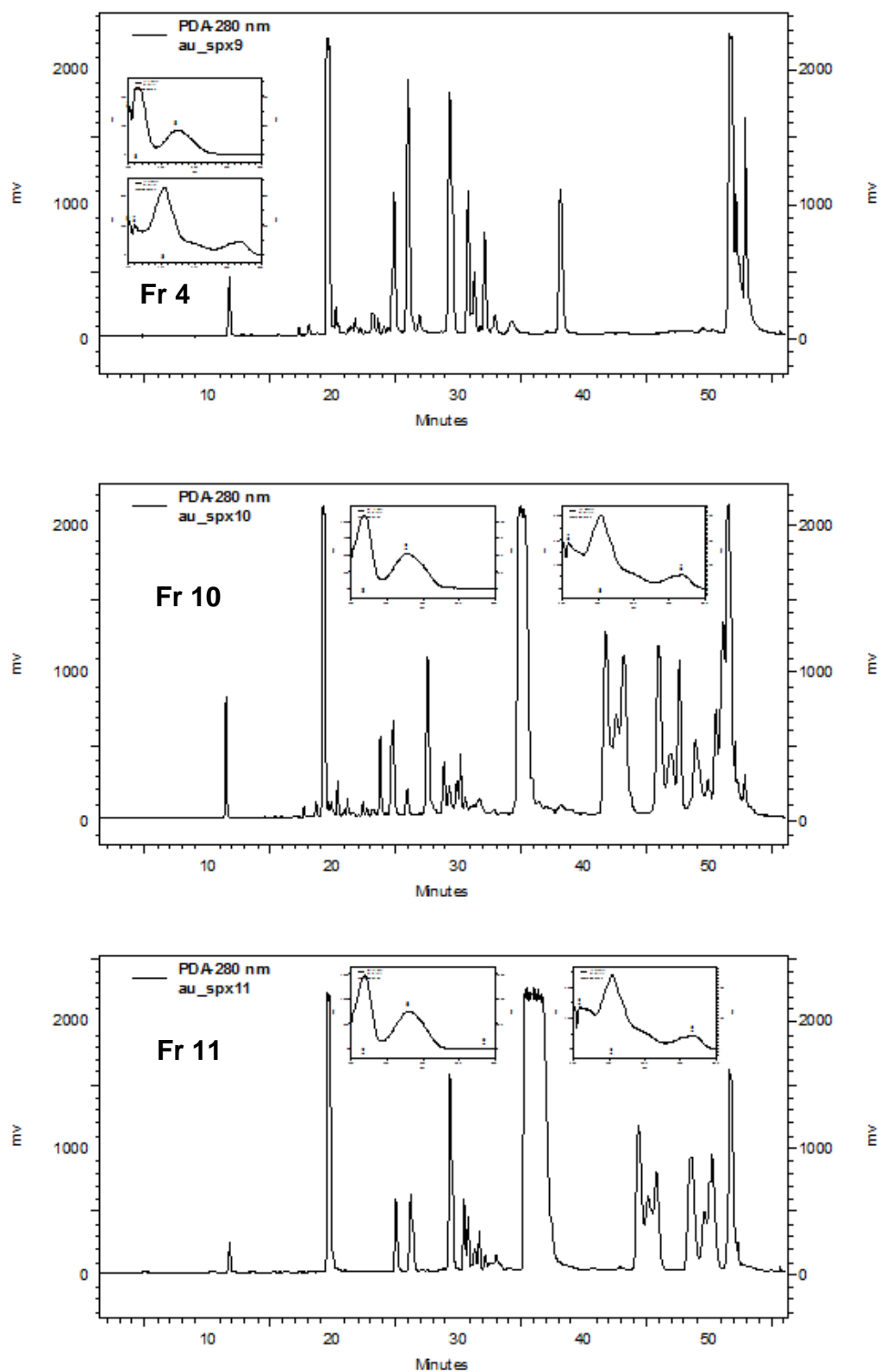
Desta maneira, a etapa subsequente consistiu em realizar o isolamento, purificação e identificação das substâncias presentes nas frações mencionadas na Tabela 1.



**Figura 9.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-100% B (5 min), 100% B (isocrático; 5 min), perfazendo uma análise com tempo total de 55 min.



**Figura 10.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9.

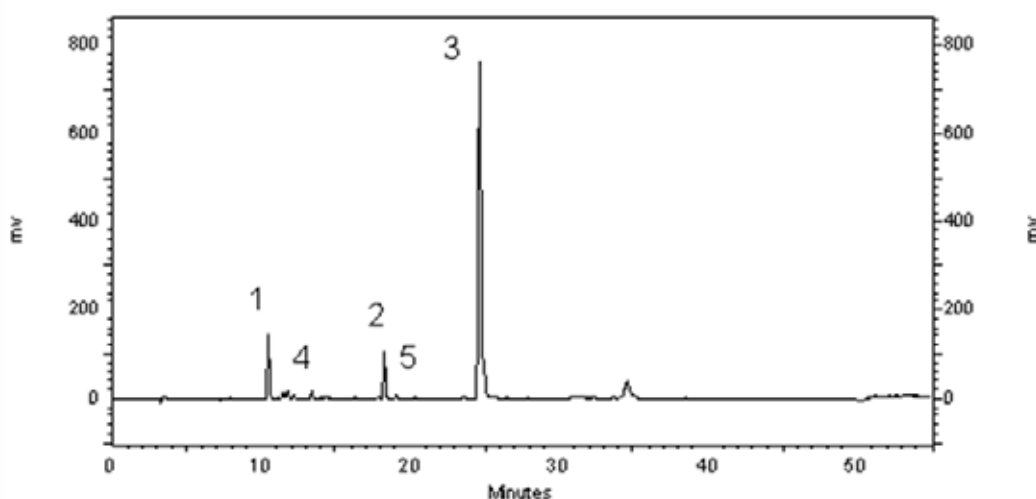


**Figura 11.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas frações obtidas após separação por GPC do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9.

### Identificação dos constituintes químicos por HPLC-PDA

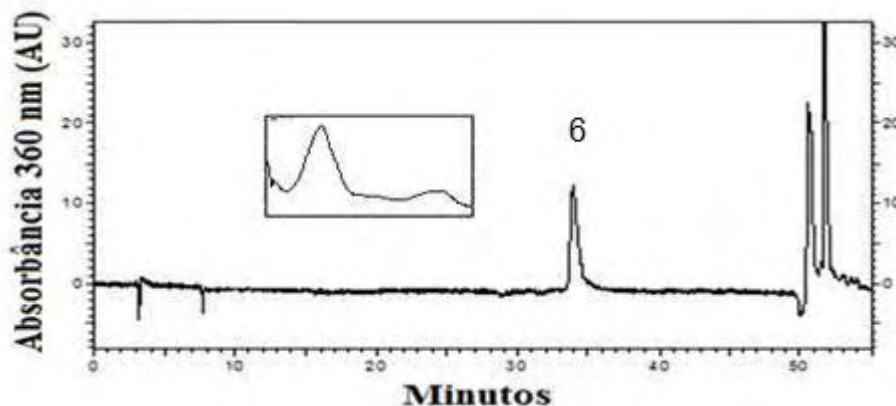
Substâncias comuns, puderam ser facilmente identificadas sem necessariamente serem isoladas, através de experimentos de co-injeção da amostra com padrão da substância.

A fração 5 foi analisada por co-injeção com substâncias padrão disponíveis no laboratório. Os padrões comparados foram ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido clorogênico e ácido protocatecuico. Todas essas substâncias foram detectadas no extrato, sendo que as três primeiras parecem estar em maiores quantidades enquanto que as últimas parecem substâncias minoritárias (Figura 12).



**Figura 12.** Identificação de substâncias presentes na fração 5 por co-injeção com padrões de: 1) ácido gálico; 2) Galato de metila; 3) Galato de etila; 4) Ácido protocatecuico; 5) Ácido clorogênico. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9.

Procedimento semelhante foi utilizado para identificar o ácido elágico na fração 9 (Figura 13).



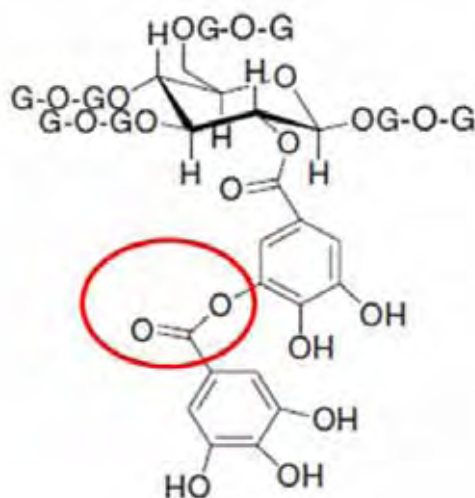
**Figura 13.** Identificação de substância presente na fração 9 por co-injeção com padrões de ácido elágico. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9.

Desta forma, por experimento de co-injeção, foram identificados, do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*, as substâncias ácido gálico 1, galato de metila 2, galato de etila 3, ácido protocatecuico 4, ácido clorogênico 5 e ácido elágico 6.

### **Purificação das substâncias presentes nas frações**

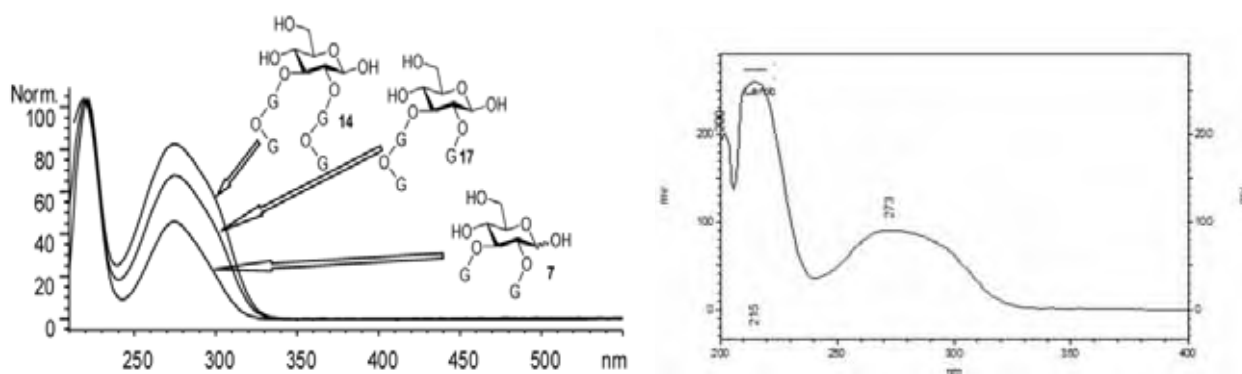
#### **Fração 8**

No perfil cromatográfico da fração 8 (Figura 10, p.42), pôde-se observar o ácido gálico 1 (11,2 min) e seus derivados, galato de metila 2 (19,2 min) e galato de etila 3 (25,5 min) seguidos de uma faixa (de 30 min até 45 min) constituída basicamente de flavonóides (bandas no UV em 260 nm e 350 nm). O espectro do pico com  $t_r = 21$  min (figura 10, p. 42) é semelhante ao espectro típico dos derivados de ácido gálico, mas com pequena distorção na banda de absorção, o que é frequentemente atribuído à presença de uma ligação depsídica entre duas unidades de ácido gálico (Figura 15).



**Figura 14.** Galotanino contendo ligação depsídica.

A presença desse tipo de ligação causa um efeito auxocrômico devido à conjugação dos grupos cromóforos das duas unidades de ácido gálico (ARAPITSAS, et al., 2007). Essa conjugação que não ocorre, por exemplo, na formação da ligação entre uma unidade de ácido gálico e glicose. Essa distorção se torna ainda mais óbvia conforme aumenta o número de ligações depsídicas (figura 15).



**Figura 15.** Espectro UV de derivados do ácido gálico com e sem a ligação depsídica (ARAPITSAS, et al., 2007). Espectro UV encontrado na fração 8.

Primeiramente 719,0 mg da fração 8 foram submetidos a fracionamento em cartucho de C18 (10g) eluído com 1) 300 ml de metanol 20%, 2) 300 ml de metanol 100 %.

As duas frações foram analisadas por HPLC-PDA. Na fração 20% (332 mg) permaneceram os derivados de ácido gálico **1**, **2** e **3**, e na fração 100% (305 mg) ficaram concentrados os flavonóides. Purificação dos flavonóides por HPLC-RI utilizando MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) como fase móvel levou ao isolamento da substância **8** (8 mg).

### **Fração 11**

Observou-se um pico cromatográfico de alta intensidade tanto no extrato bruto quanto nas frações 10 e 11, e que não pôde ser identificado por co-injeção.

A fração 11 mostrou-se complexa. 550,0 mg da fração 11 foram então submetidos a fracionamento em cartucho de C18 (10g) eluído com 1) 300 ml de metanol 20%, 2) 300 mL de metanol 40% e 3) 300 ml de metanol 100 % (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição das massas das sub-frações obtidas após separação por SPE em C18.

<b>Sub-fração</b>	<b>Massa (mg)</b>
11_20%	104,8
11_40%	398,4
11_100%	9,6
<b>Total</b>	<b>512,8</b>

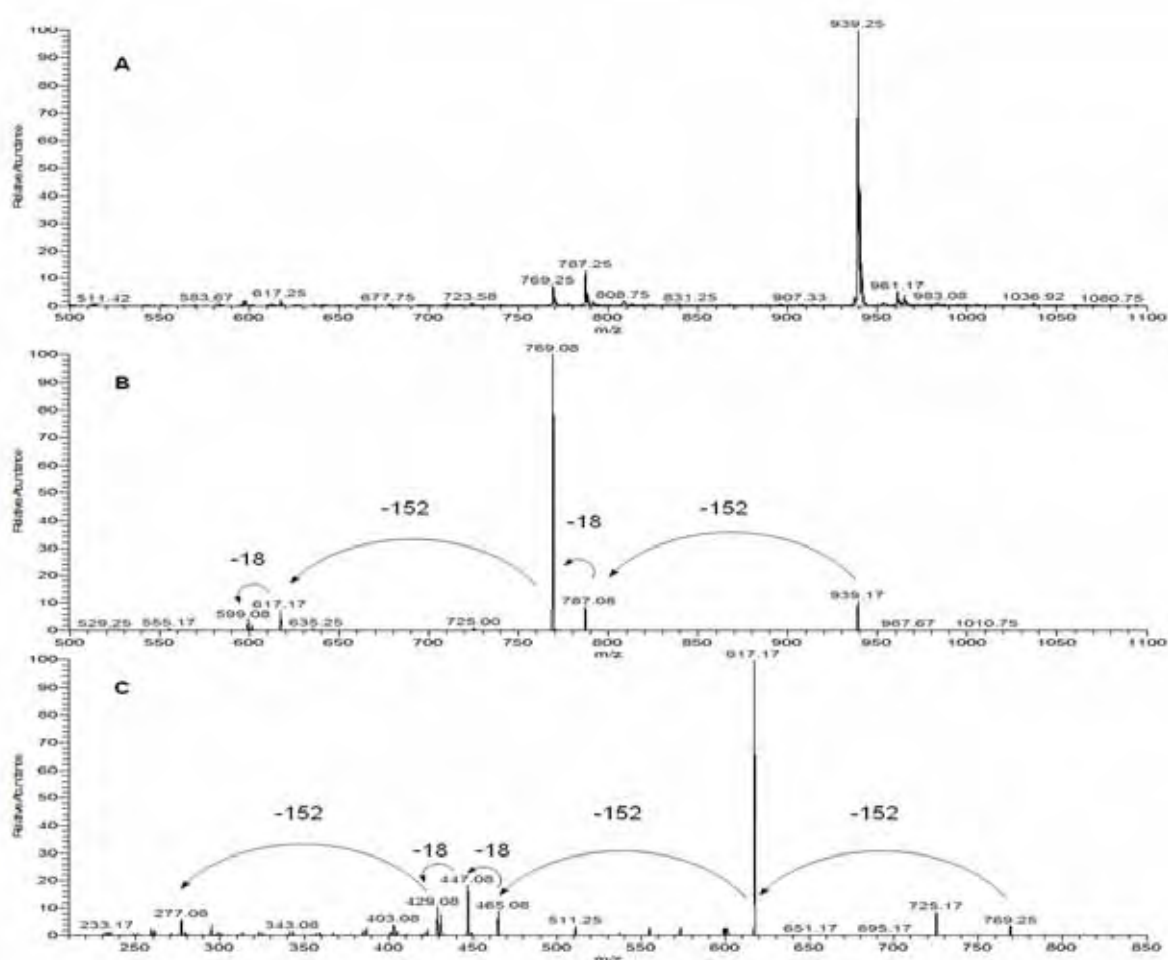
Análise das frações 40% por HPLC-PDA mostrou que a substância **7** foi obtida com grau de pureza suficiente para a sua identificação. Procederam-se então análises por <sup>1</sup>H-NMR e espectrometria de massas, para a identificação estrutural do composto.

Análise da fração 20% mostrou a presença majoritária de galato de metila **2** e galato de etila **3**.

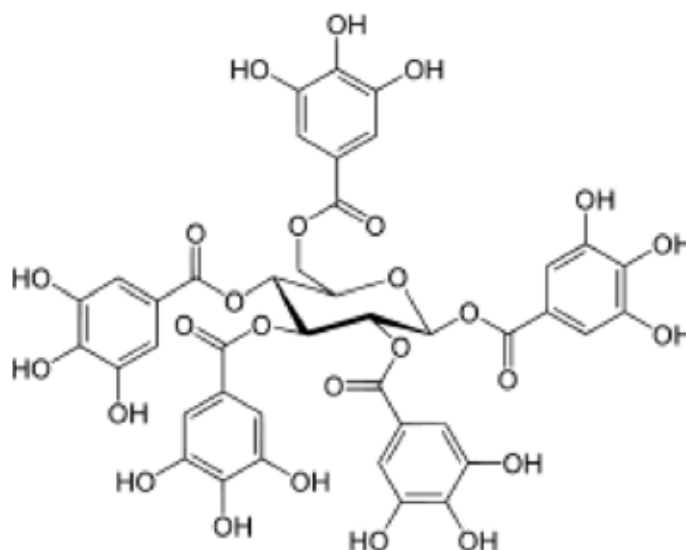
## Identificação dos constituintes químicos através de técnicas espectroscópicas

### Identificação da substância 7

O espectro de massas obtido em modo negativo apresentou pico intenso referente ao íon de  $m/z$  939  $[M-H]^-$  (Figura 16A). Experimentos de  $MS^2$  e  $MS^3$  mostraram perdas consecutivas de unidades de  $m/z$  152 Da, característico de grupos galoiil (Figura 16B e 16C). Perda de uma unidade adicional de  $m/z$  152 a partir do fragmento de  $m/z$  295 (não observada no espectro) resulta no íon produto de  $m/z$  179  $[M - 5 \times 152 - H]^-$ , que pode ser atribuído a uma hexose desprotonada  $[M-H]^-$ . Esse conjunto de dados é compatível com a estrutura da 1,2,3,4,6-pental-O-galoiil- $\beta$ -D-glicose (PGG) (Figura 17), substância natural presente em diversas plantas medicinais (ZHANG et al., 2009).



**Figura 16.** Espectro de massas: **A)** full-scan da substância **Au7**, em modo negativo, **B)**  $MS^2$  do íon  $m/z$  939 **C)**  $MS^3$  do íon  $m/z$  939 – 769.



**Figura 17.** Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG).

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (Figura 18) evidenciou um conjunto de sinais característicos de uma unidade de açúcar (1H cada, entre  $\delta$  4,39 e 6,34) e outro conjunto formado por cinco singletos na região de hidrogênios aromáticos (2H cada, sinais entre  $\delta$  6,94 e 7,10), referentes às unidades de ácido gálico. As multiplicidades observadas para os hidrogênios alifáticos são condizentes com a  $\beta$ -glicose, porém os deslocamentos químicos destes encontram-se em região de desblindagem, devido à esterificação pelas unidades galoilas (KHAMBABAE & LÖTZERICH, 1997).

**Tabela 3.** Valores de  $^1\text{H-NMR}$  da substância **7** (Acetona- $d_6$ ) (KHAMBABAE & LÖTZERICH, 1997).

Hidrogênio	PGG ( $\delta$ )	Substância 7 ( $\delta$ )
1	6,24	6,34 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
2	5,61	5,63 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $8,5$ Hz, 1H)
3	5,98	6,02 ( <i>dd</i> $J = 10,0$ Hz, 1H)
4	5,65	5,67 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ Hz, 1H)
5	4,56-4,74	4,57 ( <i>m</i> , 1H)
6	4,56-4,74	4,39 ( <i>dd</i> , $J = 5,0$ e $13,0$ Hz, 1H) 4,57 ( <i>m</i> , 1H)
Gall	6,94; 6,97; 7,01, 7,04 e 7,10	7,19; 7,13; 7,08; 7,03; 6,99 ( <i>s</i> , 2H cada)

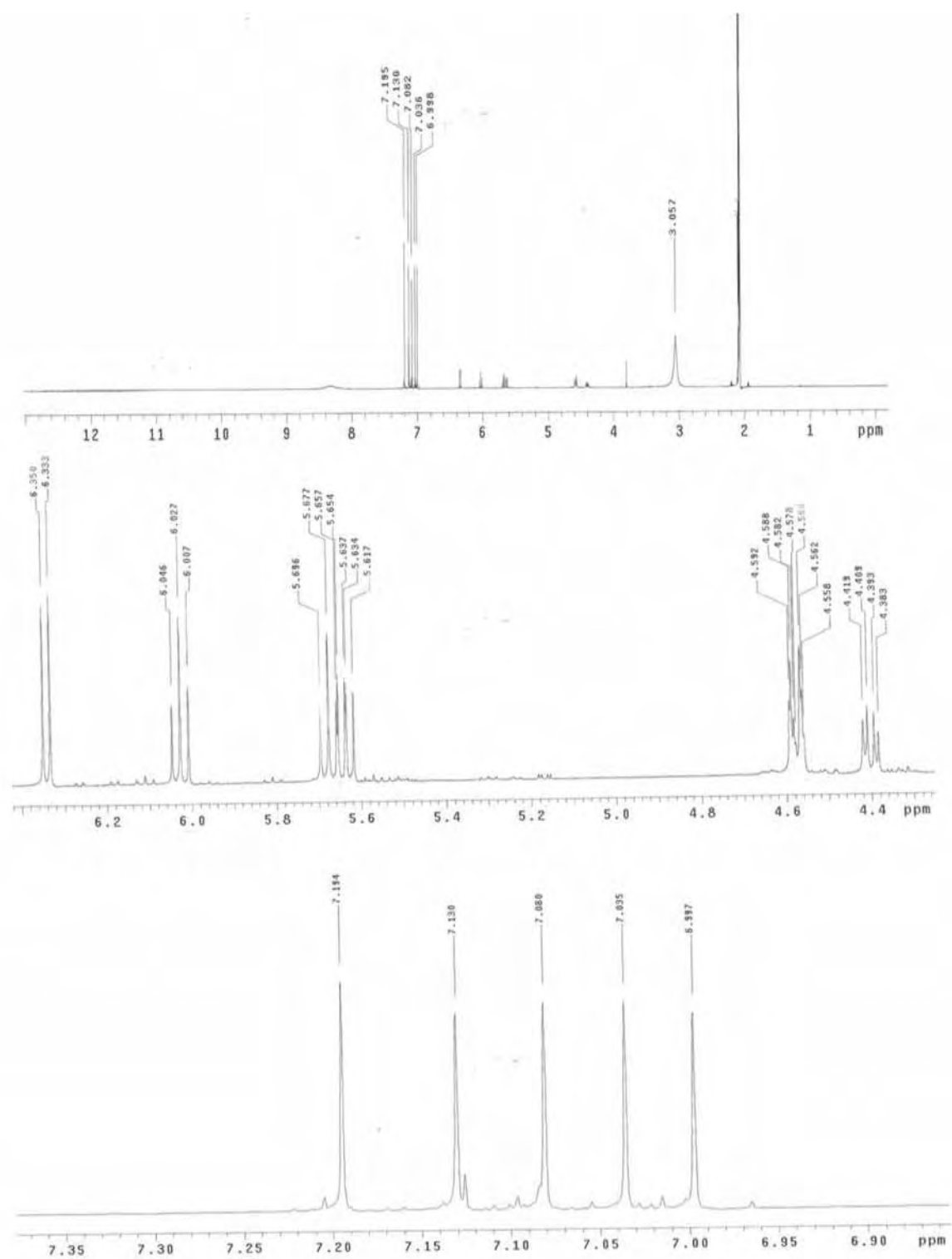
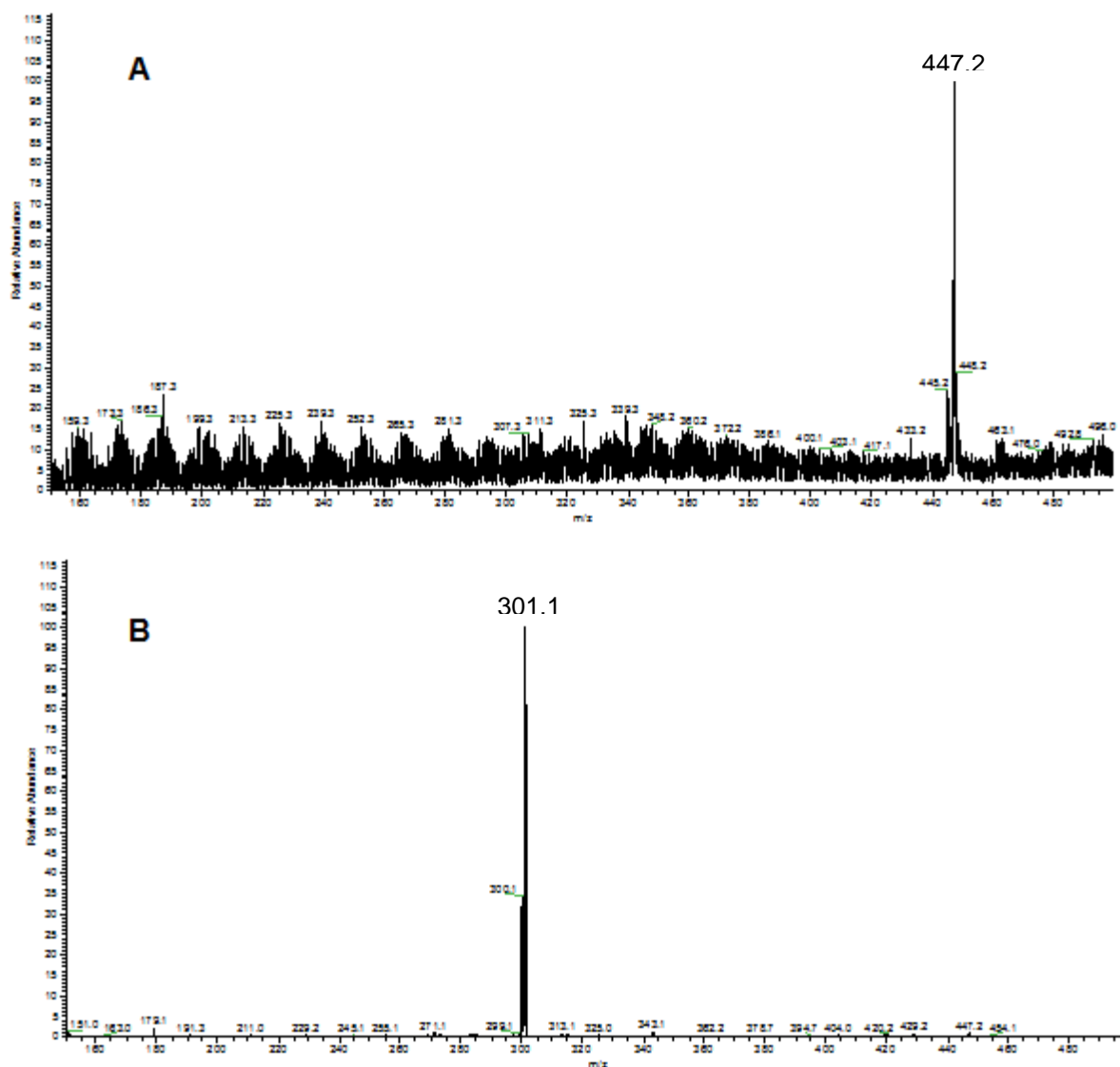


Figura 18. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  da substância **7** (11,7 T, Acetona- $d_6$ ).

### Identificação da substância **8**

O espectro de massa da substância **8** apresentou íon intenso em  $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup> (Figura 19A), cujo MS<sup>2</sup> apresentou também um único íon fragmento de  $m/z$  301 (Figura 19B), consistente com a aglicona quercetina. A perda de uma unidade de  $m/z$  146 Da indica a presença de uma desoxihexose O-substituída na aglicona do flavonóide.



**Figura 19. A)** Espectro de massas em *full-scan* da substância **8**; **B)** Fragmento obtido para o íon  $m/z$  447 da substância **8** – FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, modo negativo.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **8** (Figura 20) exibiu um dubleto em  $\delta$  7,29 ( $J = 2,0$  Hz), um duplo dubleto em  $\delta$  7,24 ( $J = 2,5$  e  $8,0$  Hz) e um dubleto em  $\delta$  6,86 ( $J = 8,0$  Hz). O anel A foi caracterizado pelos dubletos em  $\delta$  6,38 e 6,19, de  $J = 2,0$  Hz, típico de hidrogênios em posição *meta*. Foi observado sinal em  $\delta$  5,24 ( $J = 1,5$  Hz), característico de hidrogênio anomérico de açúcar em posição equatorial. A determinação da identidade do açúcar foi obtida pela presença de um dubleto em  $\delta$  0,81 ( $J = 6$  Hz) referente aos hidrogênios metílicos de rhamnose.

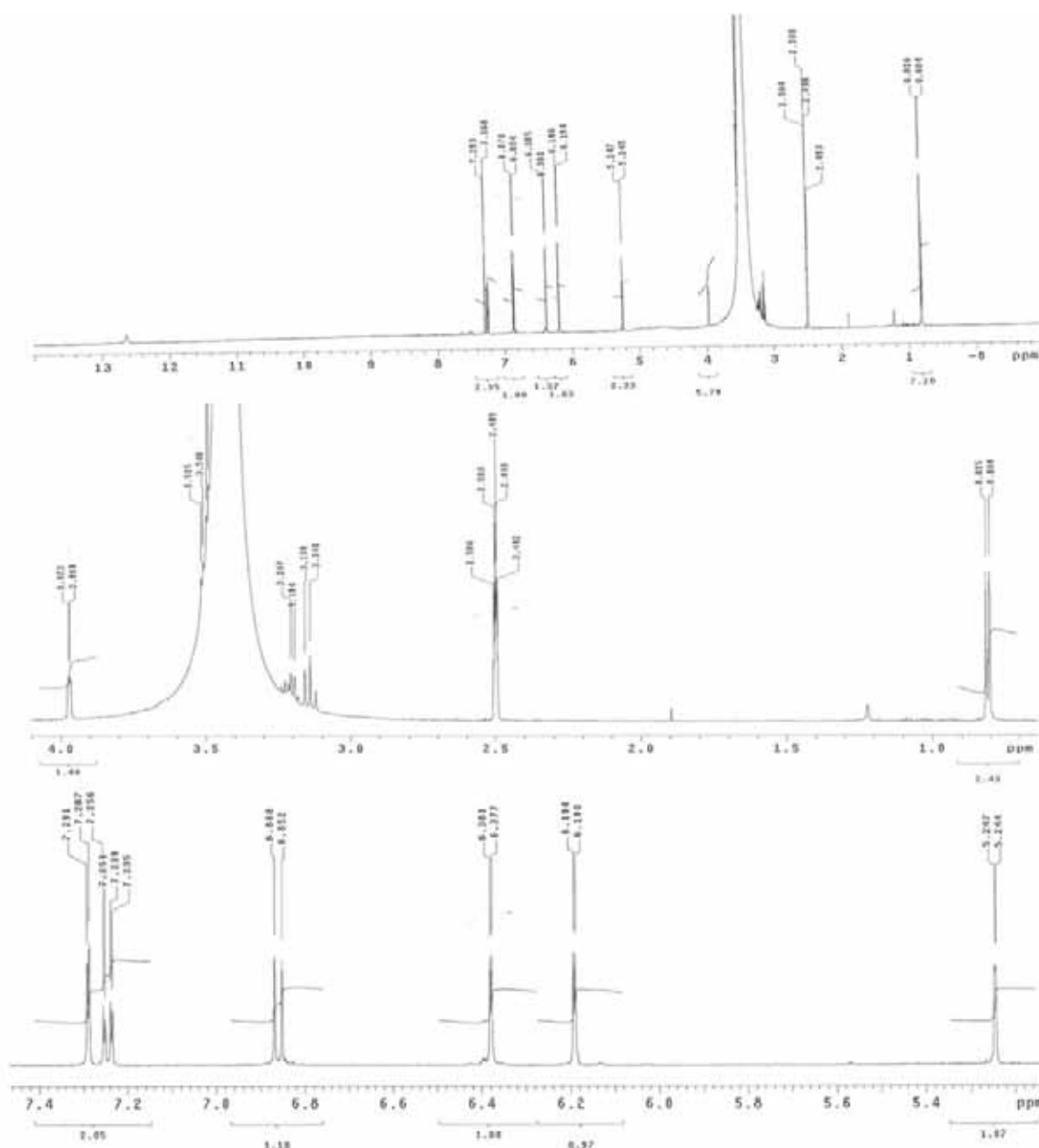
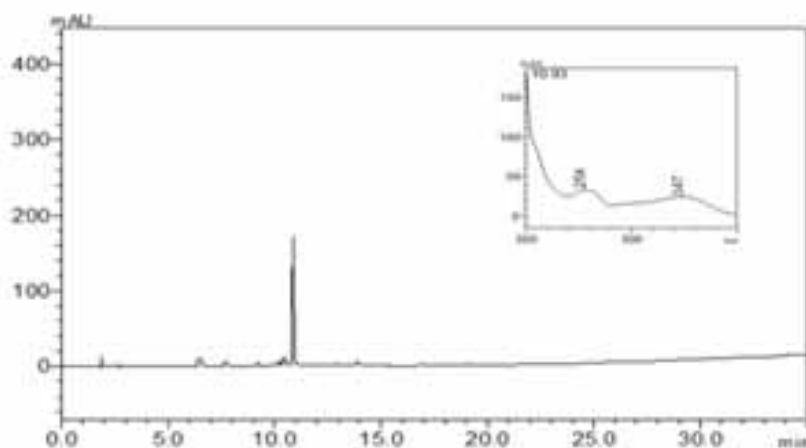


Figura 20. Espectro de  $^1\text{H}$ -NMR da substância **8** (11,7 T, DMSO- $d_6$ ).

Os espectros de  $^1\text{H-NMR}$  forneceram fortes indícios de que a substância corresponde à quercetina-3-O-Rhamnopiranosídeo (quercitrina). Posterior experimento de co-injeção com padrão da substância em HPLC-PDA comprovou a sua identidade (Figura 21).



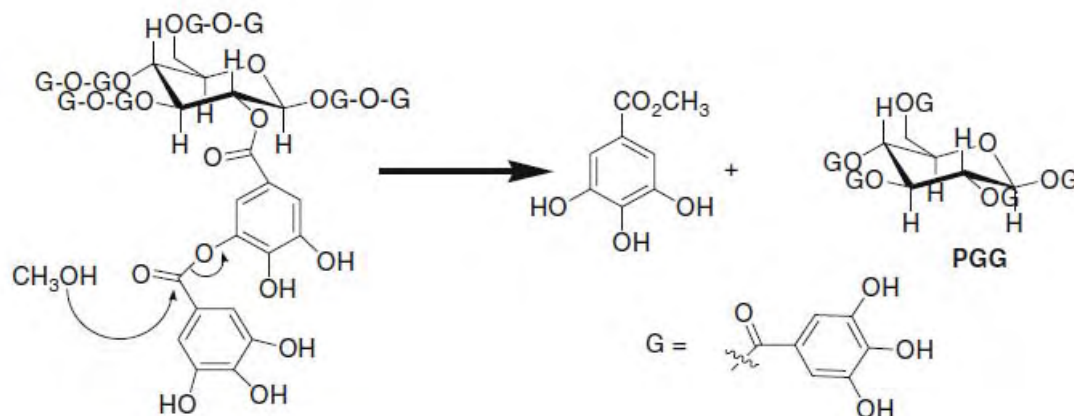
**Figura 21.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA mostrando experimento de co-injeção da substância **8** com padrão isolado de Quercetina-3-O-Rhamnopiranosídeo ( $\text{tr} = 10,93 \text{ min}$ ). FM: ACN + TFA 0,1% (**B**) e  $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA}$  0,1% (**A**). Coluna Phenomenex<sup>®</sup> Synergi Hydro RP18 (150 x 4.6 mm i.d.; 4  $\mu\text{m}$ ), HPLC (Shimadzu<sup>®</sup>), fluxo 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Sistema de eluição gradiente: 0-100% B (30 min).

### Estabilidade do Extrato

A fração 8 apresentou pico cromatográfico relativamente intenso com UV característico de ligação depsídica entre unidades de ácido gálico, contudo após procedimentos de purificação nenhuma substância com tais características foi encontrada nas frações, levando à suspeita de que algumas substâncias poderiam estar sofrendo degradação.

Uma característica comum dos galotaninos, responsável pela sua classificação como taninos hidrolisáveis, é que as ligações depsídicas são facilmente rompidas por solvólise. Relatos da literatura mostram que essas ligações sofrem metanólise em condições ligeiramente ácidas ( $\text{pH}=5$ ), sendo esse um procedimento utilizado para obtenção de 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG) a partir do ácido tânico, que é uma mistura disponível comercialmente de galotaninos com diferentes graus de polimerização. Dessa

reação resultam o PGG e o galato de metila (figura 22) (ZHANG et al., 2009; CHEN & HAGERMAN, 2004).



**Figura 22.** Metanólise do ácido tanico sob condições ligeiramente ácidas para obtenção de PGG (ZHANG et al., 2009).

A presença de substâncias lábeis precisa ser cuidadosamente avaliada, pois pode levar a conclusões precipitadas acerca da composição química e sua influência sobre as atividades biológicas observadas para um extrato. Além disso, pode comprometer todo o procedimento de isolamento das substâncias, uma vez que as condições para que ocorra a quebra da ligação estão presentes durante a maioria das etapas de purificação e análise.

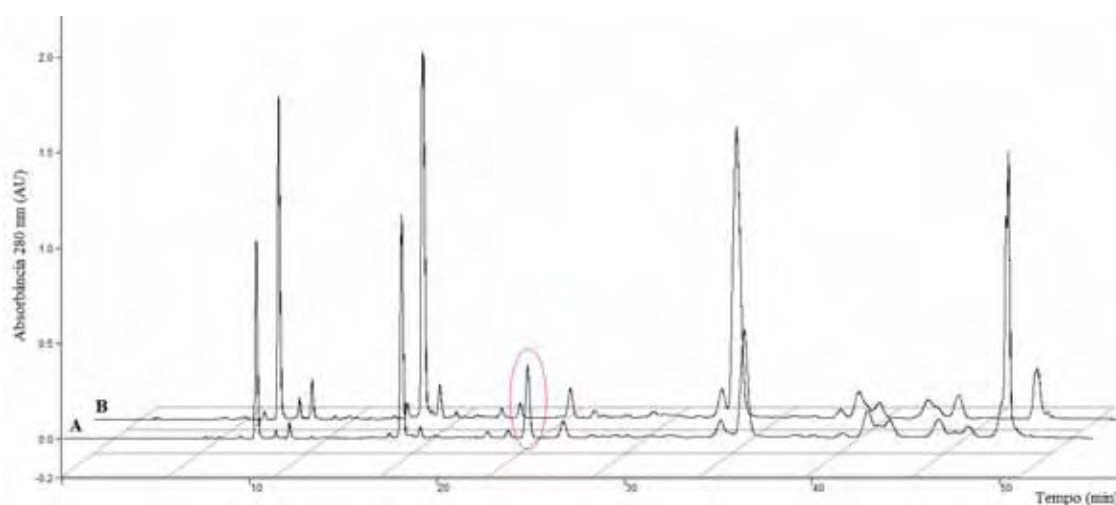
Em virtude disso, iniciou-se um estudo da estabilidade dessas substâncias a fim de se verificar se elas estariam se decompondo durante as etapas de extração, armazenamento e purificação, além de quais os possíveis artefatos que estariam sendo gerados a partir dessa decomposição.

### **Estabilidade do extrato por HPLC-PDA**

A literatura descreve detalhadamente a metanólise dos galotaninos (ZHANG et al., 2009). Logo, suspeitou-se que o mesmo poderia estar ocorrendo na presença de etanol,

que foi utilizado como solvente extrator, justificando a presença de altas concentrações de galato de etila, sendo esse atribuído à reação de alcoólise e não ao metabolismo secundário da planta.

Comparação dos cromatogramas obtidos a partir do extrato EtOH 70% e da infusão aquosa (Figura 23) permitiu visualizar a presença do galato de etila **2** unicamente no extrato EtOH 70% (mas não na infusão, Figura 23B), sugerindo que o mesmo seja um artefato.

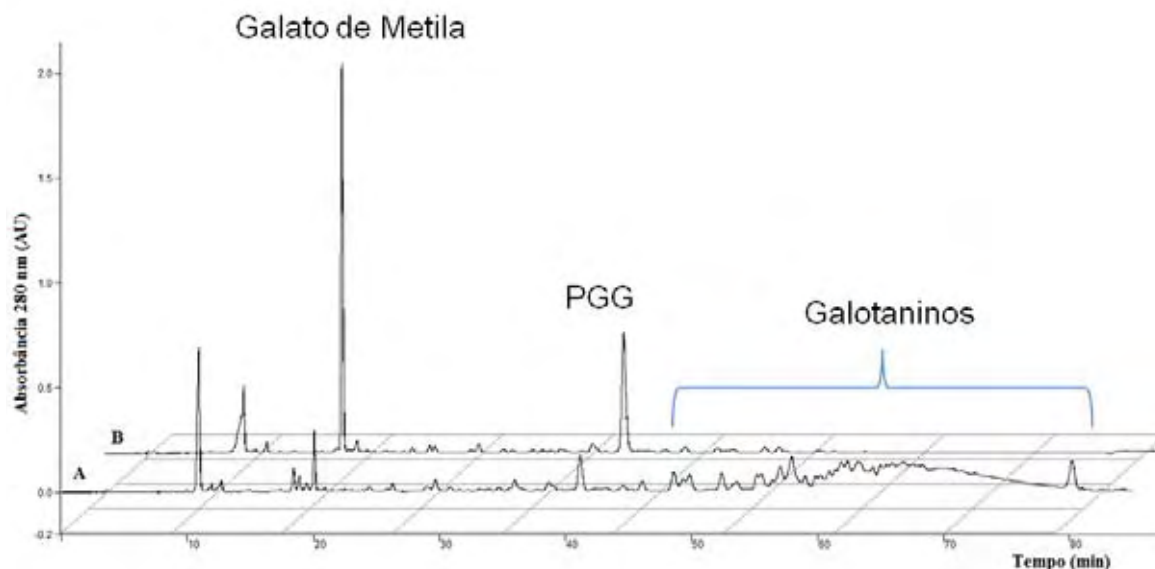


**Figura 23.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA **A)** obtido a partir do extrato Et OH 70% das folhas de *A. urundeuva*; **B)** obtido a partir da infusão aquosa das folhas de *A. urundeuva*. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9. O pico destacado corresponde ao galato de etila (confirmado por co-injeção com padrão,  $t_r = 24,90$  min).

Tendo em vista que a estabilidade também pode sofrer influência do pH, mesma amostra do extrato EtOH 70% foi dividida em duas porções de 10 mg, sendo a primeira colocada em um balão contendo 200 mL de uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), e a segunda em um balão contendo 100 mL de MeOH e 100 mL de um tampão acetato (mistura com pH 5).

As amostras foram deixadas em repouso nessas condições durante 24 horas, e então analisadas por HPLC-PDA. Os cromatogramas (Figura 24) mostraram uma diferença significativa na região atribuída aos galotaninos com maior grau de polimerização (região

entre 55 e 80 min), além de um aumento significativo nas quantidades de galato de metila ( $tr \approx 19$  min) e PGG ( $tr \approx 43$  min).



**Figura 24.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA mostrando a metanolise dos galotaninos em pH 5. **A)** amostra armazenada em meio neutro; **B)** amostra armazenada em pH 5. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5.

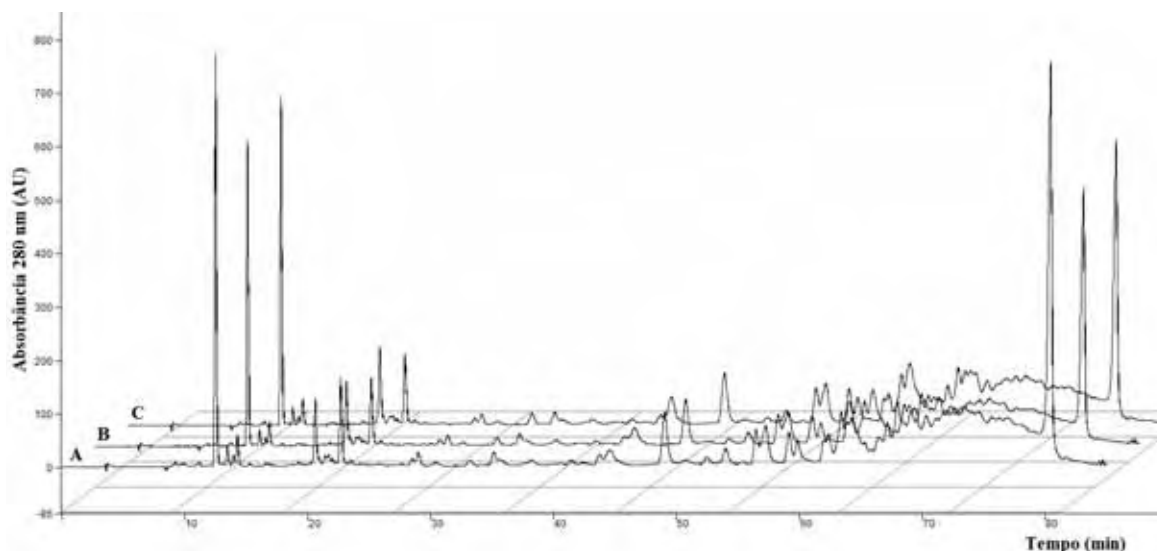
A estabilidade do extrato EtOH 70% (em pH 7) em diferentes condições de armazenamento também foi avaliada. Três *vials* de 2 mL foram preparados e armazenados nas condições descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Preparo e condições de armazenagem das amostras utilizadas no teste da estabilidade do extrato em solução.

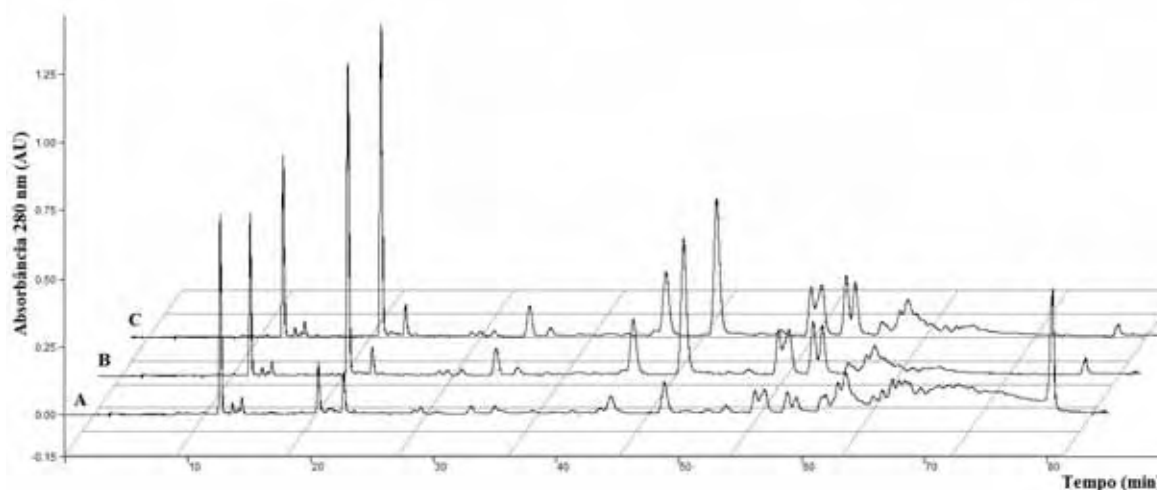
<b>Vial</b>	<b>Concentração (mg.1,5mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Condição/Temperatura</b>
1 (A)	4,8	freezer (-20,0 °C)
2 (B)	4,7	Ambiente (25°C, presença de luz)
3 (C)	4,7	Ambiente (25°C, ausência de luz)

As três amostras foram analisadas por HPLC-PDA semanalmente (Figuras 25 a 28). A amostra armazenada em *freezer* apresentou estabilidade significativamente maior que as outras, mostrando que em temperaturas baixas é possível controlar a decomposição

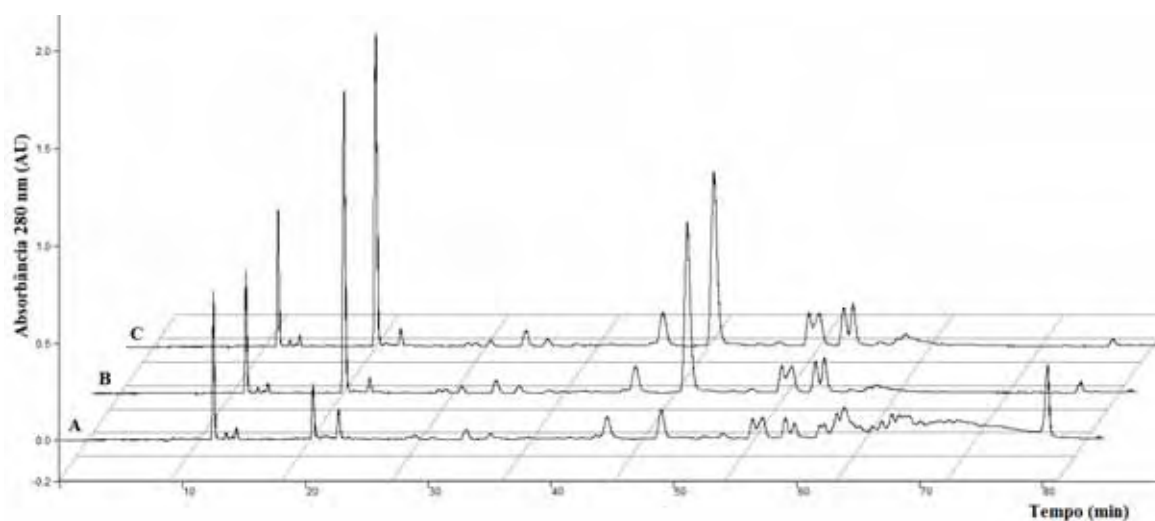
dessas substâncias. Ambas as amostras que ficaram a temperatura ambiente sofreram a decomposição, independente da presença ou ausência de luz.



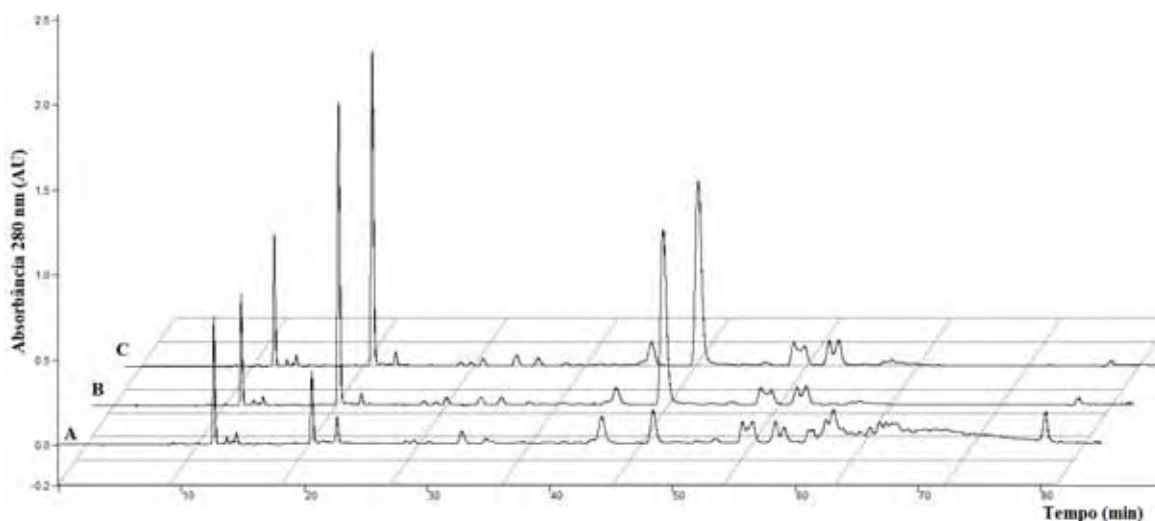
**Figura 25.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras no dia de preparo. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. **A)** amostra armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; **B)** amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; **C)** amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.



**Figura 26.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após uma semana. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. **A)** amostra armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; **B)** amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; **C)** amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.



**Figura 27.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após duas semanas. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. **A)** amostra armazenada a -20 °C; **B)** amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; **C)** amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.



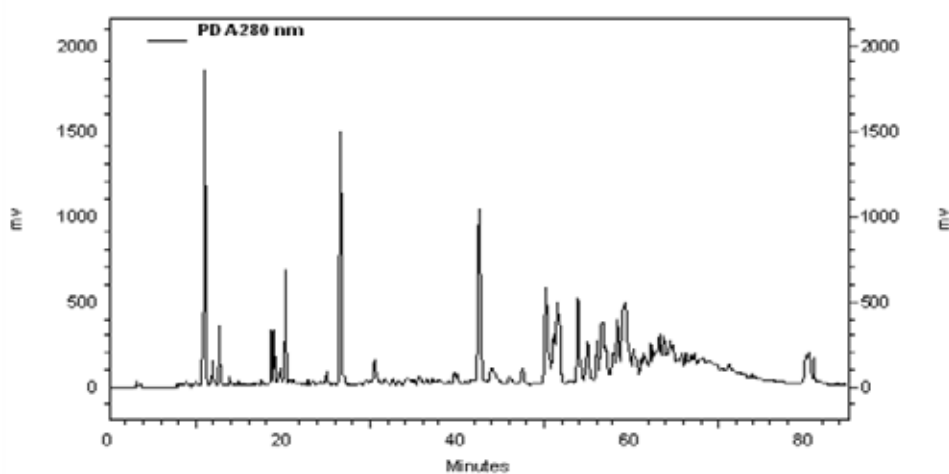
**Figura 28.** Cromatogramas de separação por HPLC-PDA das amostras após três semanas. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5. **A)** amostra armazenada a -20 °C; **B)** amostra armazenada em temperatura ambiente e exposta à luz; **C)** amostra armazenada em temperatura ambiente na ausência de luz.

### Isolamento de substâncias com a ligação depsídica.

Os resultados da estabilidade do extrato mostraram que o fracionamento anterior do extrato EtOH 70% por GPC poderia estar comprometido, tendo em vista que muitas das substâncias contendo ligações depsídicas foram expostas por tempo prolongado às

condições nas quais ocorre a solvólise. Por isso, realizou-se um novo fracionamento do extrato EtOH 70% por GPC em Sephadex LH20<sup>®</sup>.

Primeiramente verificou-se a integridade do extrato obtido por percolação, que foi liofilizado e armazenado. Pelo cromatograma da figura 29 pôde-se verificar que a composição deste permanece inalterada, pois o cromatograma mostra todos os picos característicos dos taninos de maior grau de polimerização (picos entre 55 e 80 min).



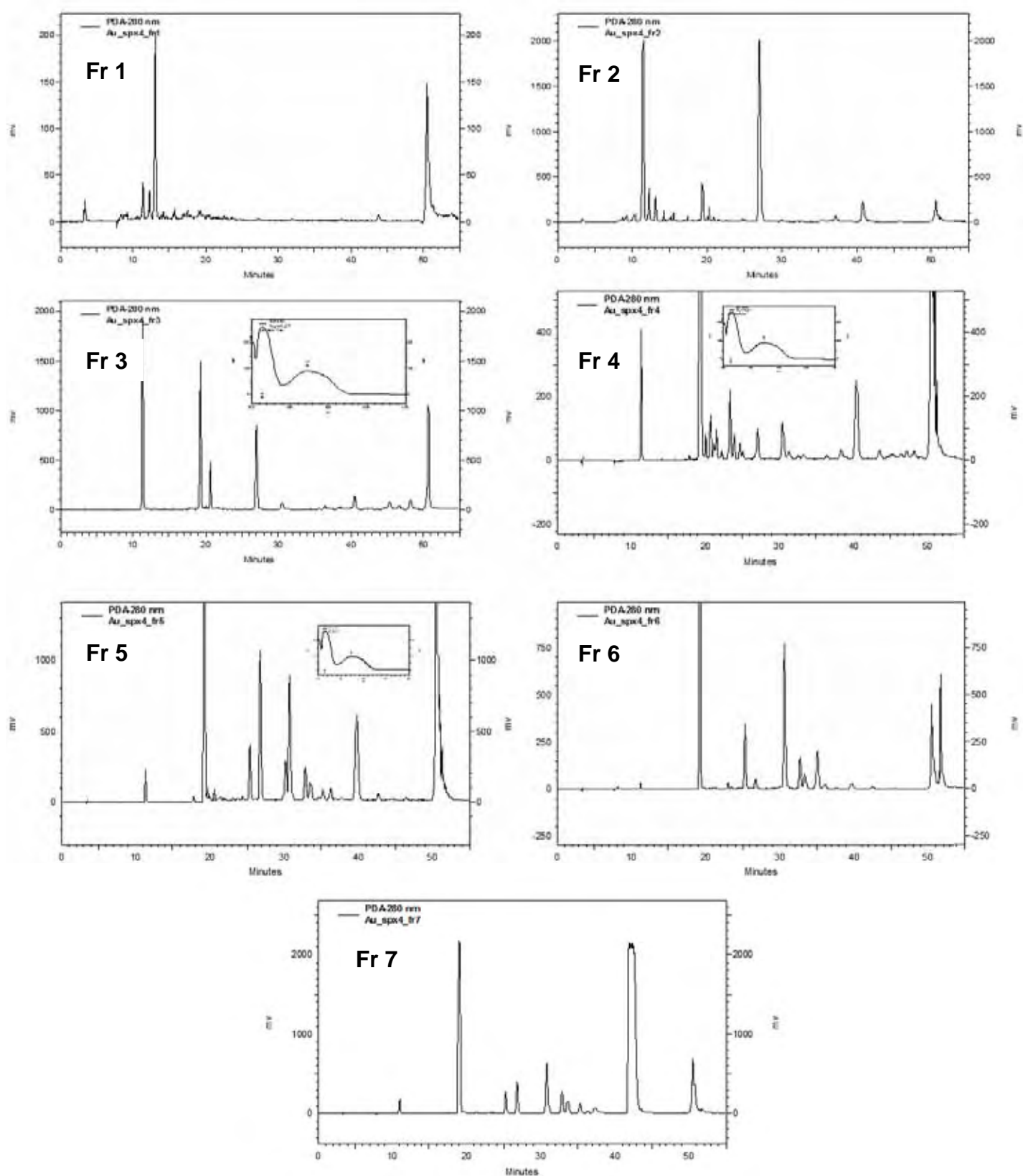
**Figura 29.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA do extrato feito através de percolação e liofilizado. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 5.

O fracionamento por GPC foi então repetido, tomando-se o cuidado de secar todas as frações imediatamente após qualquer procedimento cromatográfico, evitando as condições favoráveis à solvólise. Foram obtidas 7 frações (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição das massas das frações obtidas após separação do extrato EtOH 70% por GPC em Sephadex LH 20<sup>®</sup>.

Subfração	Massa (mg)	Subfração	Massa (mg)
Fr1	2543	Fr5	237,2
Fr2	787,8	Fr6	97,6
Fr3	1200	Fr7	2106
Fr4	159,9	<b>Massa total</b>	<b>7,703 g</b>

Todas as frações foram então analisadas por HPLC-PDA (Figura 30).



**Figura 30.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes nas subfrações obtidas após separação em Sephadex LH 20<sup>®</sup> do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 9.

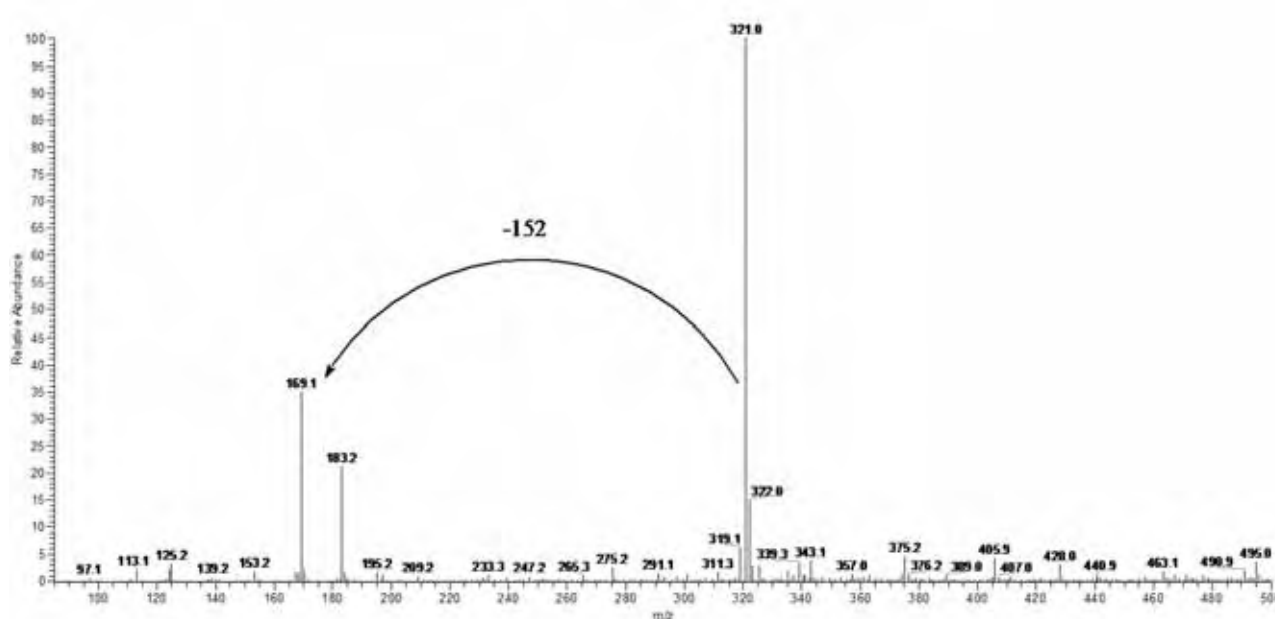
As substâncias de maior interesse, com o espectro UV atribuído às ligações depsídicas, foram encontradas nas frações 3 (1200 mg) , 4(159,9 mg) e 5 (237,2 mg). Contudo, nas frações 4 e 5, essa substância corresponde a um pico minoritário, e as frações apresentaram menor massa. Por isso, optou-se por iniciar o isolamento da substância encontrada na fração 3.

### ***Isolamento da substância 9***

A fração 3 foi submetida a um fracionamento em cartucho de C18, eluída com MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9, v:v), e posteriormente purificada por HPLC-RI utilizando a mesma FM. Dessa forma foram obtidos 3 mg da substância.

### ***Identificação da substância 9***

O espectro de massas da substância **9** apresentou um íon intenso de  $m/z$  321 [M-H]<sup>-</sup>. Fragmentação desse íon precursor levou aos íons produtos de  $m/z$  183 [M – 138 – H]<sup>-</sup> e 169 [M – 152 – H]<sup>-</sup> (Figura 31), este último relacionado à perda de um grupo galoila.

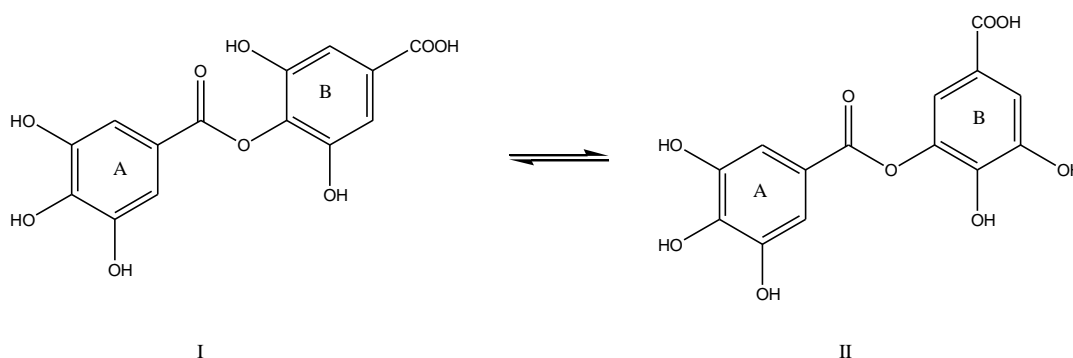


**Figura 31.** Espectro de massas em *full-scan* da substância **9**, em modo negativo.

Esses dados sugerem a presença de uma molécula de ácido gálico esterificada por outra unidade de ácido gálico, sendo que o íon de  $m/z$  321 corresponde exatamente a um grupo galoila ligado a uma molécula de ácido gálico. O íon de  $m/z$  183 possui massa correspondente ao galato de metila, que pode ter sido formado a partir da metanólise da substância **9**.

A análise do espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (Figura 33) da substância **9** confirma a presença de duas unidades de ácido gálico unidas entre si por ligação depsídica. Ainda, é possível verificar a existência de uma mistura em equilíbrio de isômeros *meta* e *para*. As formas *meta* e *para*-depsídios são encontradas em solução como uma mistura em equilíbrio para grupos galoilas ligado entre si por este tipo de união (AN; OH & KIN, 2005).

Os singletos em  $\delta$  7,08 (2H) e 7,09 (2H) são referentes à estrutura *para*-depsídica, em que os hidrogênios aromáticos, em cada unidade, são quimicamente e estericamente equivalentes. Para a estrutura *meta*-depsídica, são observados dois dubletos em  $\delta$  7,12 (2 Hz, 1H) e 7,32 (2 Hz, 1H) referentes aos hidrogênios estericamente diferentes da unidade II-B. O singlete em  $\delta$  7,02 é referente aos dois hidrogênios da unidade II-A.



**Figura 32.** Estruturas das substâncias **9I** e **9II**, mostrando o equilíbrio entre as formas *meta* e *para*-depsídicas (AN, OH & KIN, 2005).

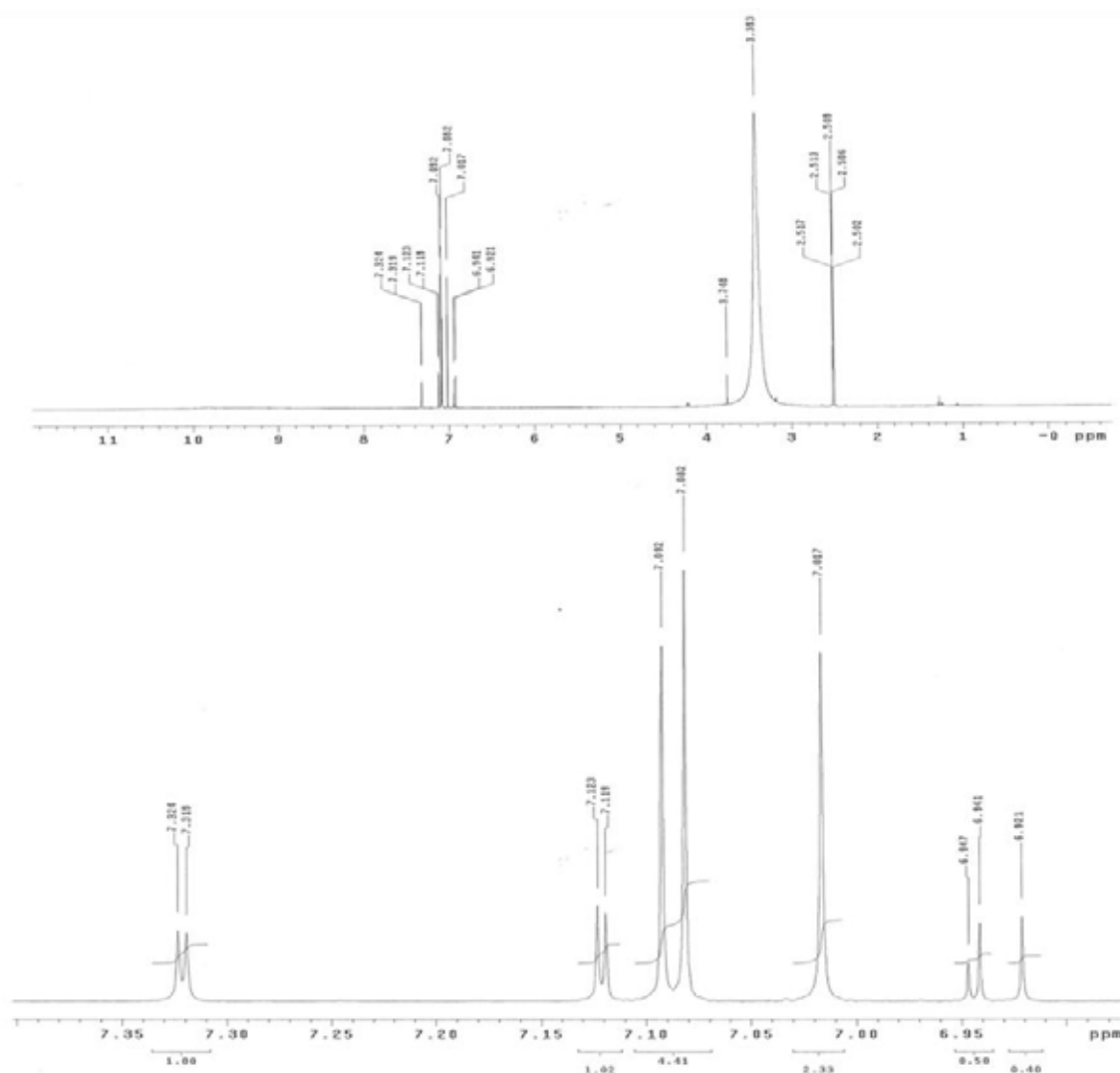


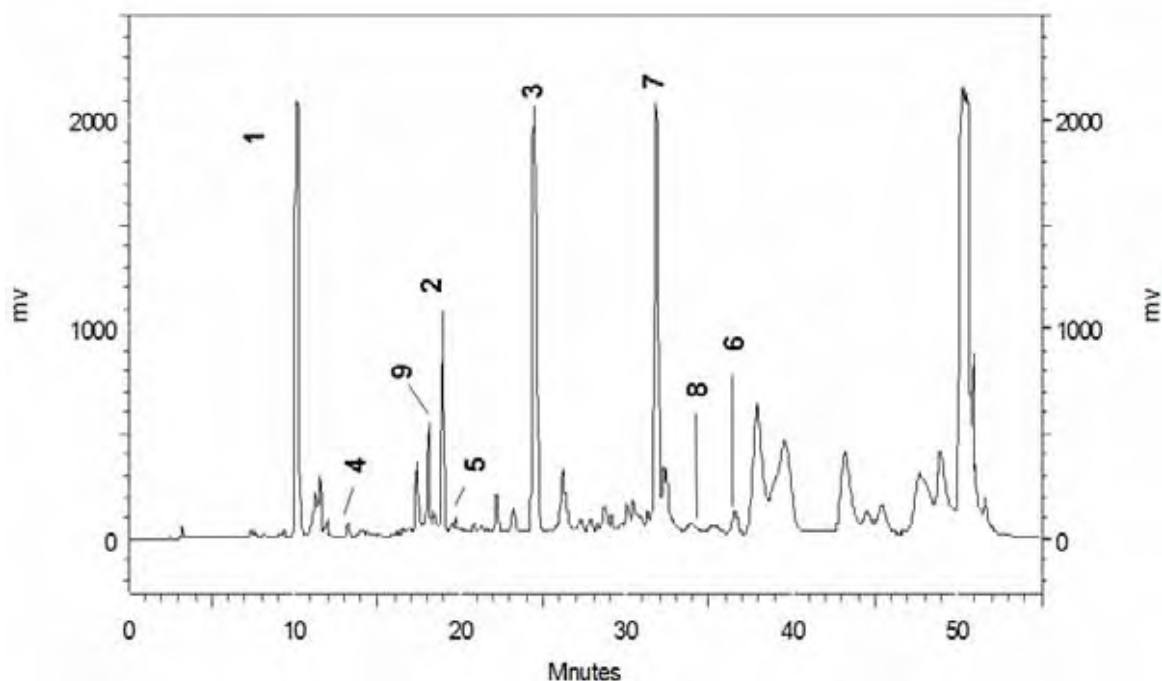
Figura 33. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  da substância **9** (11,7 T, DMSO-d<sub>6</sub>).

A substância **9** foi então identificada como sendo uma mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico **9** (Figura 32).

### Identificação das substâncias no perfil cromatográfico

Cada uma das substâncias foi identificadas no perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* (Figura 34) através de co-injeção com a substância isolada ou com padrão: ácido gálico **1**, galato de metila **2**, galato de etila **3**, ácido

protocatecuico **4**, ácido clorogênico **5**, ácido elágico **6**, PGG **7**, Quercetina-3-O-Rhamnopiranosídeo **8** e a mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico **9**.



**Figura 34.** Cromatograma de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. Condições cromatográficas equivalentes as da figura 9.

### Análise do extrato por ESI-IT-MS

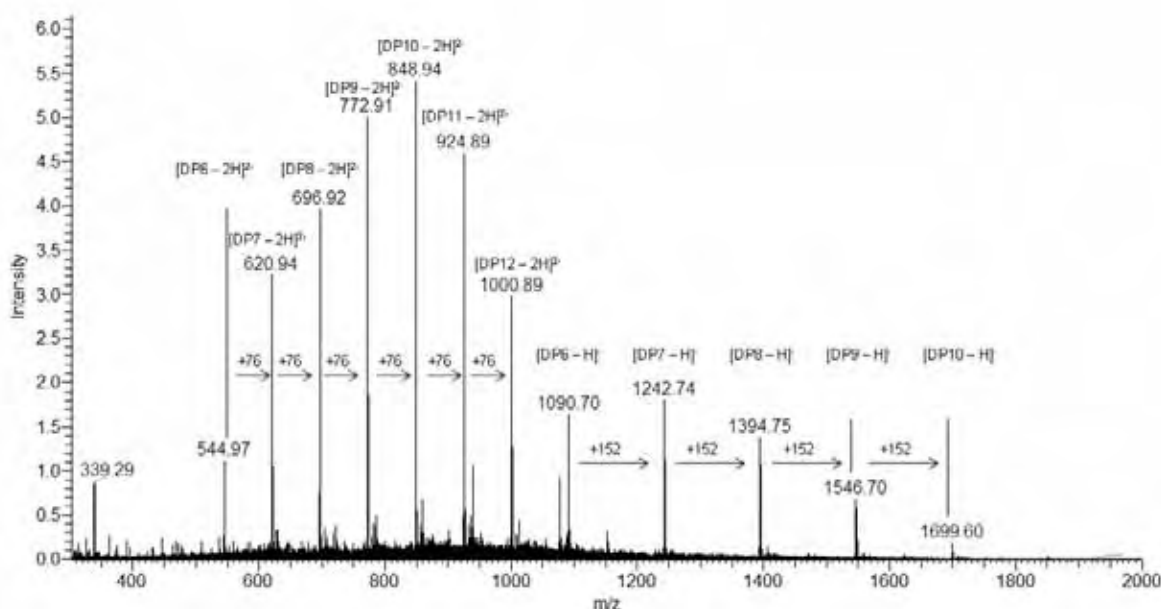
Análises anteriores mostraram que *A. urundeuva* apresenta majoritariamente galotaninos, substâncias que dificilmente podem ser isoladas através de procedimentos cromatográficos convencionais como GPC ou HPLC, devido ao grande número de isômeros que são formados à medida que se aumenta o grau de polimerização do tanino (ROMANI, CAMPO & PINELLI, 2012). Por isso, optou-se por avaliar o perfil desse extrato por espectrometria de massas.

Para uma avaliação inicial, analisou-se o extrato EtOH 70% por meio de ESI-IT-MS no modo de inserção direta da amostra e análise por *full scan*. Extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* passou por *clean-up* em cartucho de C18 (FM = MeOH:H<sub>2</sub>O, 9:1, v/v), foi

diluído para uma concentração de 10 ppm, filtrado através de membrana de PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , e introduzido diretamente na fonte de ESI através de uma seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em fluxo de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . A figura 35 mostra o espectro de massas em *full-scan*.

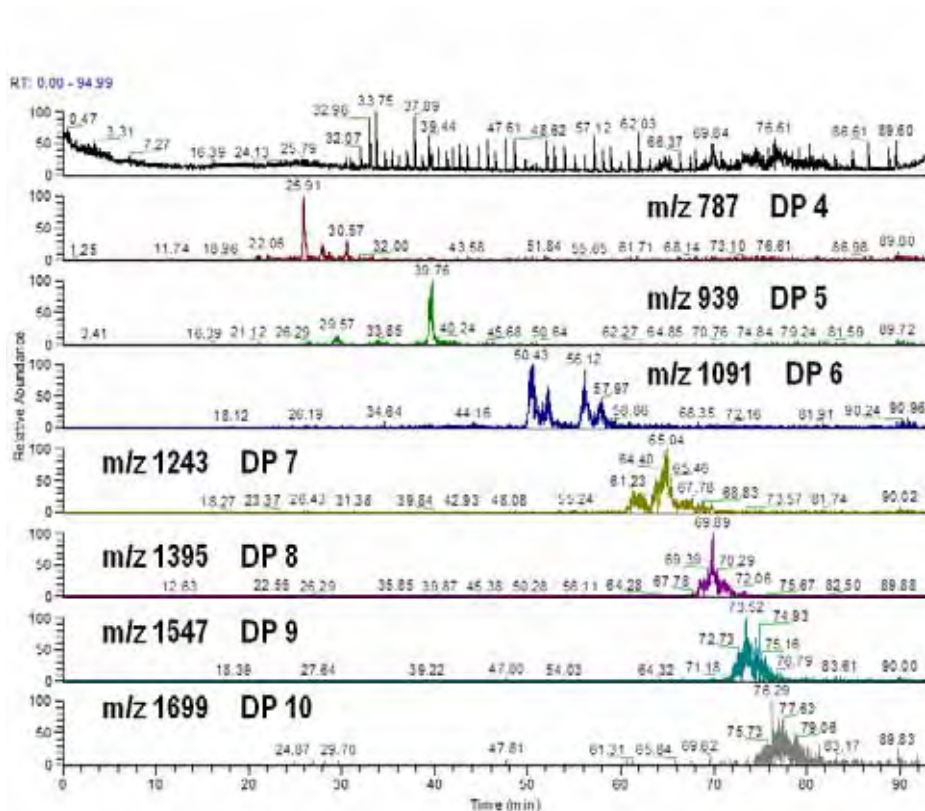
A figura 35 mostra a existência de uma série de picos referentes a diversas substâncias com pesos moleculares separados por 152 Da. Tomando-se como núcleo da molécula uma unidade de glicose (180 Da), os picos observados correspondem a uma série contendo uma molécula de glicose esterificada por de 4 a 12 unidades de ácido gálico (SILVA et al., 2011).

Observaram-se também sinais referentes aos íons  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ , cuja diferença de massa entre dois íons adjacentes é igual a 76 Da (Figura 35). Esses picos são ainda mais intensos, e auxiliam na identificação de galotaninos com altos graus de polimerização.



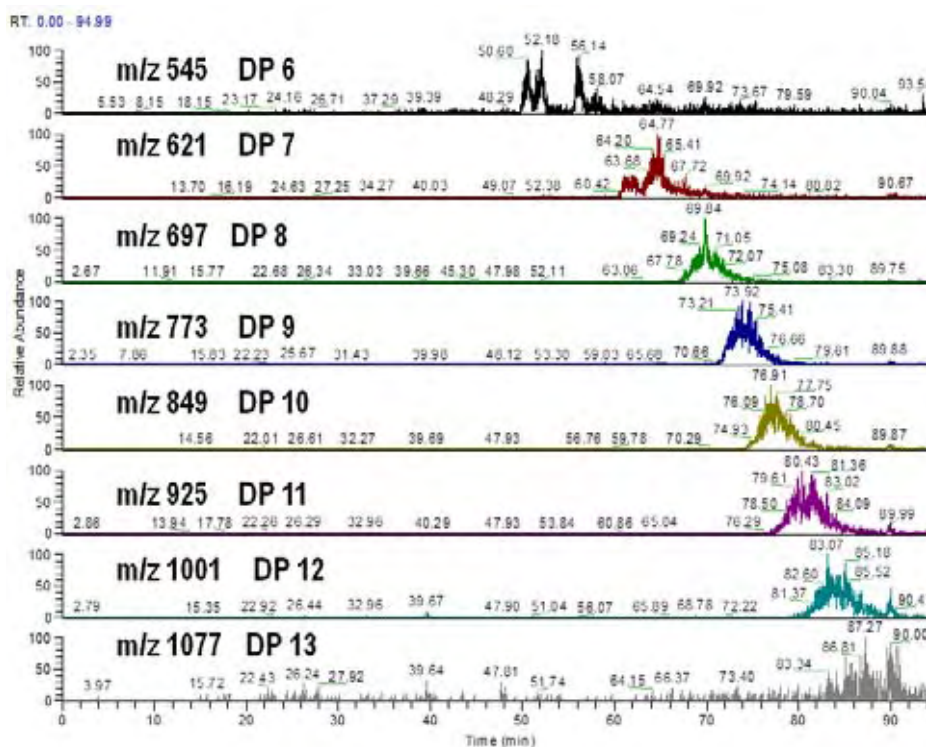
**Figura 35.** Espectro de massas em *full-scan* do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*, em modo negativo, destacando os íons referentes aos galotaninos mono e bicarregados.

A figura 36 mostra a análise por HPLC-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70% e os cromatogramas extraídos dos íons detectados.



**Figura 36.** Análise do extrato de *A. urundeuva* por HPLC-ESI-IT-MS e cromatogramas extraídos dos íons de  $m/z$  787; 939; 1091; 1243; 1395; 1547; 1699. Condições cromatográficas: FM: ACN + ácido acético 0,1% (B) e H<sub>2</sub>O + ácido acético 0,1% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4,6 mm i.d.; 4 µm), HPLC Accela High Speed LC (Thermo scientific®), fluxo 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min) perfazendo uma análise com tempo total de 85 min.

A partir do cromatograma obtido foi possível observar a mesma série de galotaninos com até 10 unidades de ácido gálico esterificando uma molécula de glicose. Observa-se que o aumento no grau de polimerização das substâncias provoca também aumento na interação com a fase estacionária da coluna de fase reversa (C18) (Figura 36). Ainda, à medida que a massa molecular do galotanino aumenta, o mesmo ocorre com o número de picos sobrepostos na respectiva região do cromatograma. Isso provavelmente é observado devido à possibilidade de ocorrência de maior número de isômeros (ROMANI, CAMPO & PINELLI, 2012).

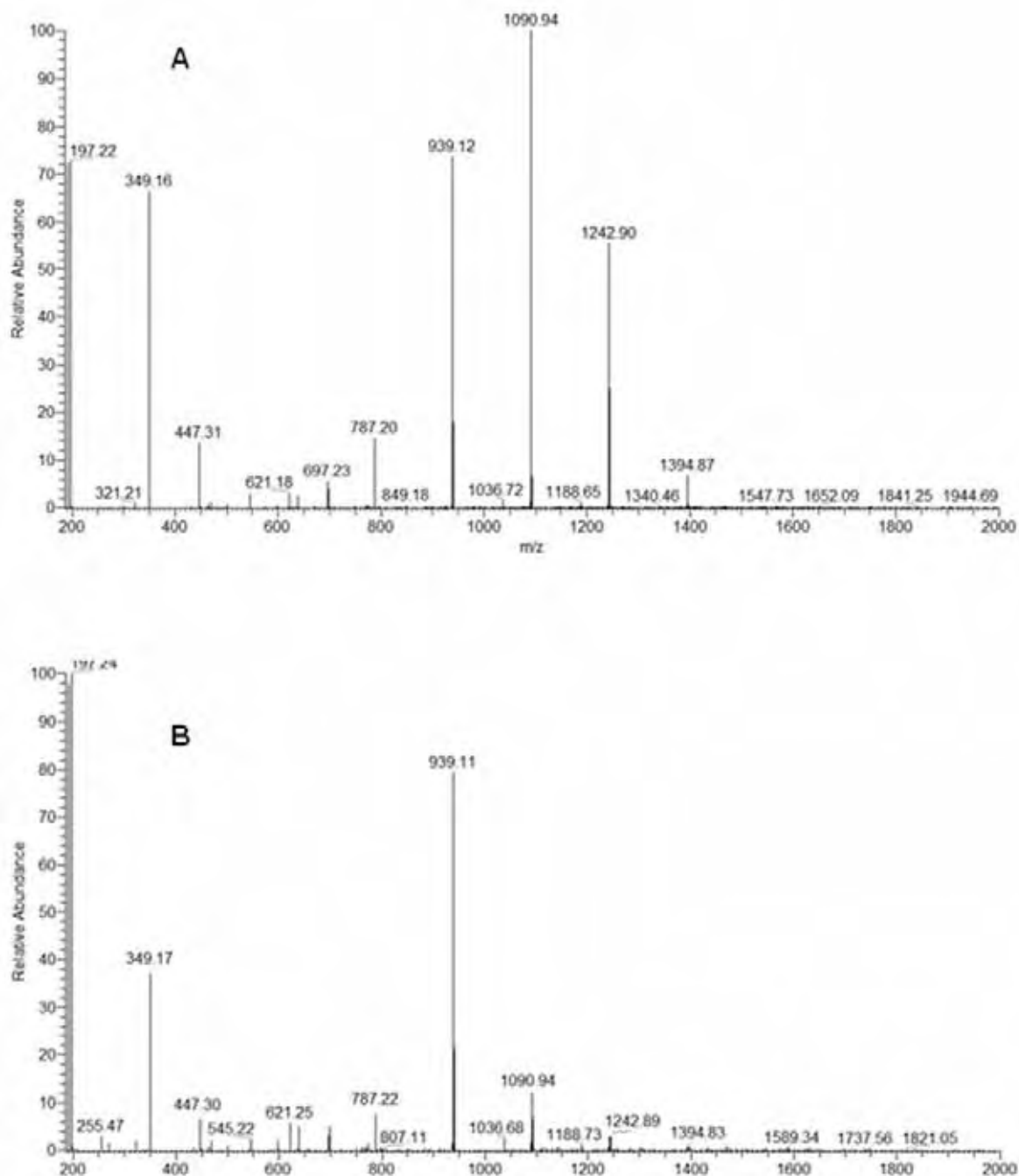


**Figura 37.** Análise do extrato de *A. urundeuva* por HPLC-ESI-IT-MS e cromatogramas extraídos dos íons de  $m/z$  545; 621; 697; 773; 849; 925; 1001; 1077. Condições cromatográficas equivalentes a da figura 36.

### Análise da estabilidade do extrato por FIA-ESI-IT-MS

A obtenção do perfil do extrato por FIA-ESI-IT-MS é uma forma bastante eficiente de se verificar a identidade do extrato. Além disso, trata-se de uma técnica interessante do ponto de vista do monitoramento da integridade desses extratos, uma vez que leva a um menor consumo de tempo e solvente que análises por HPLC.

Uma amostra de extrato recém preparada e outra que passou pelo procedimento de hidrólise descrito na seção **Estabilidade do extrato** (p. 53) foram analisadas por FIA-ESI-IT-MS. Os resultados estão apresentados na figura 38. Pode-se observar a decomposição dos taninos com maiores DP e o aumento da quantidade de PGG na amostra que sofreu hidrólise em meio ácido.

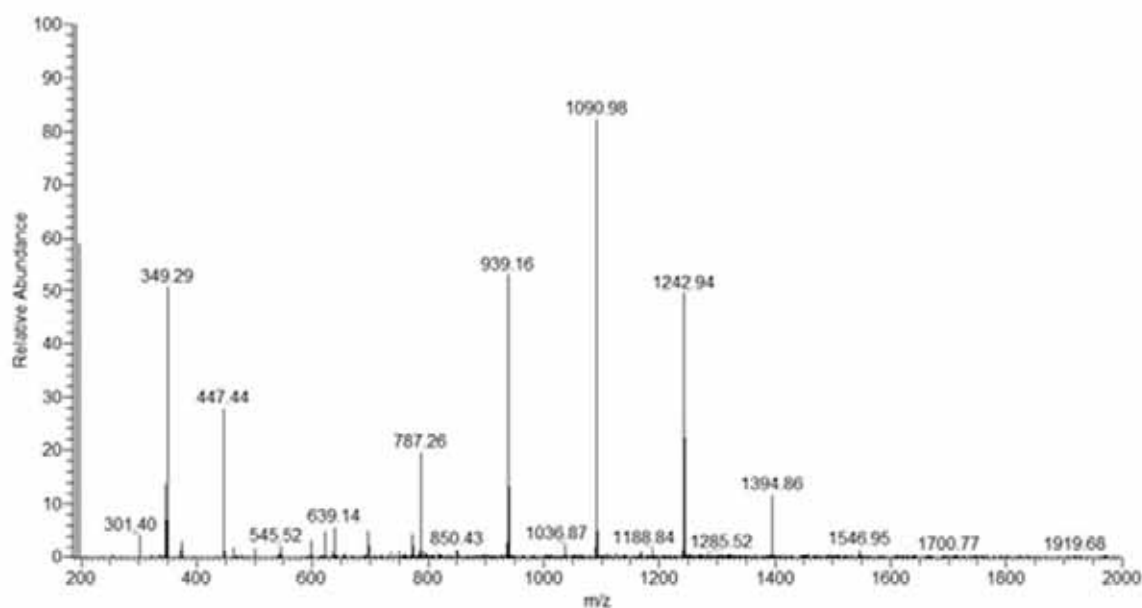


**Figura 38.** Análise das amostras FIA-ESI-IT-MS: **A)** amostra recém preparada de extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* **B)** amostra de extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* após procedimento de hidrólise em tampão acetato pH 5.

Testes de decomposição do extrato em relação ao tempo de armazenamento podem ser realizados de forma acelerada utilizando uma temperatura elevada (40 °C) por um período mínimo de seis meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Uma amostra

do extrato EtOH 70% liofilizado foi mantida durante dez meses sob condições controladas de temperatura (40 °C) a fim de se verificar a estabilidade do extrato liofilizado em relação ao tempo de armazenamento. A amostra foi analisada através de FIA-ESI-IT-MS para verificar a sua possível decomposição.

O resultado apresentado na figura 39 mostra que não existem diferenças significativas em relação ao extrato recém preparado (Figura 38A), indicando que o armazenamento do extrato liofilizado durante longos períodos não compromete a integridade química desse extrato.



**Figura 39.** Análise de amostra de extrato de *A. urundeuva* por FIA-ESI-IT-MS após armazenamento do material liofilizado durante 10 meses a 40 °C.

### **Avaliação quantitativa dos marcadores**

A quantificação de taninos em extratos vegetais é uma tarefa muito complicada devido à complexidade estrutural dessa classe de substâncias. A impossibilidade de obter cromatogramas bem resolvidos somada à indisponibilidade de padrões comerciais ou

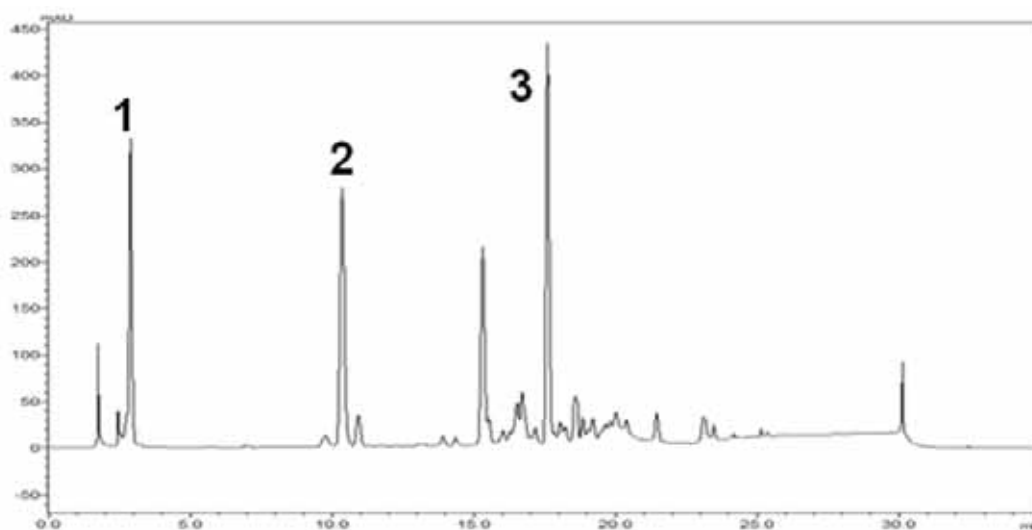
isolados da maioria dessas substâncias faz com que a abordagem geral seja a quantificação apenas do teor total de taninos através de ensaios não específicos, como o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu proposto pela Farmacopéia Européia (MØLLER, HANSEN & CORNETT, 2009).

Buscando uma abordagem diferenciada e que proporcione maiores informações sobre as características dos taninos presentes, optou-se pela sua quantificação através de HPLC-PDA. A quantificação direta dos taninos através dessa técnica é ainda impossível devido à carência de metodologias capazes de resolver todos os picos referentes a essas substâncias. A forma encontrada para se contornar esse problema foi a realização de uma etapa adicional no preparo da amostra que consiste na hidrólise dos taninos utilizando tampão acetato em pH 5, seguida da quantificação do ácido gálico, do galato de metila e do PGG.

Os métodos cromatográficos utilizados anteriormente para análise dos taninos proporcionaram boa resolução para todos os picos de interesse. Contudo, apresentaram também um tempo de análise muito longo.

Visando diminuir o tempo de análise, uma coluna de mesma FE, mas comprimento menor (150 x 4,6 mm) foi utilizada e o método otimizado para se obter uma boa resolução para os três picos quantificados no menor tempo possível. O resultado final está representado no cromatograma da figura 40. O tempo de corrida pôde ser reduzido de 55 para 27 minutos sem perda de resolução para os picos analisados.

Considerando que esta pode vir a ser uma metodologia analítica utilizada no controle de qualidade de um fitoterápico, procedeu-se também com a validação desse método.

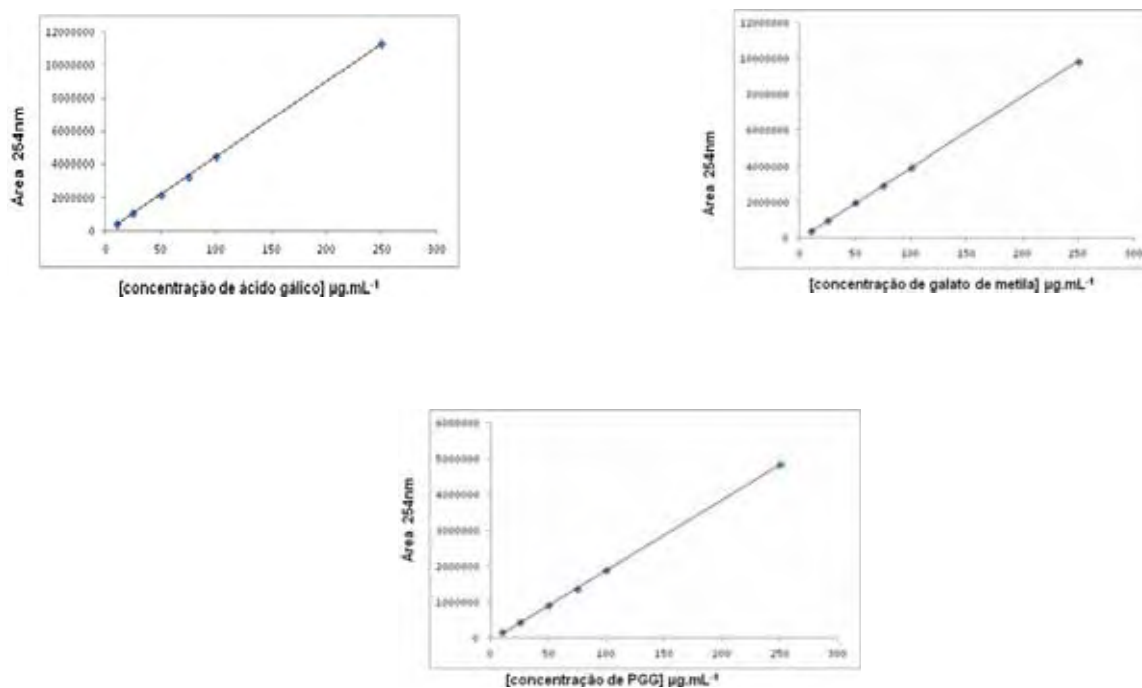


**Figura 40.** Cromatograma representativo da separação por HPLC-PDA para quantificação de ácido gálico, galato de metila e PGG em extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva*. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (A). Coluna Phenomenex<sup>®</sup> Synergi Hydro RP18 (150 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Shimadzu<sup>®</sup>), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 5-30% B (20 min), 30-100% B (2 min), 100% B (isocrático; 5 min), perfazendo uma análise com tempo total de 27 min.

### Construção das curvas analíticas e quantificação

A quantificação dos analitos foi realizada utilizando calibração com padrão externo. As curvas analíticas foram construídas utilizando padrões comerciais de ácido gálico e galato de metila e padrão isolado de PGG.

Primeiramente uma solução estoque na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup> de cada um dos padrões foi preparada solubilizando os padrões em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) tamponado com acetato para pH 5. A partir de diluições sucessivas da solução estoque foram obtidos 6 níveis de concentração (10, 25, 50, 75, 100 e 250 µg.mL<sup>-1</sup>), cada um deles foi analisado em triplicata, as médias das áreas dos picos cromatograficos obtidas foram interpoladas em função da concentração e através de regressão linear foram obtidas as curvas analíticas (Figura 41).



**Figura 41.** Curvas analíticas obtidas por calibração externa para quantificação de ácido gálico, galato de metila e PGG.

A partir das curvas analíticas foram obtidos os coeficientes linear (a) e angular (b), o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), todos apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Dados obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas.

<b>Substância</b>	<b>Coeficiente linear (a)</b>	<b>Coeficiente angular (b)</b>	<b>Coeficiente de correlação</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Ácido gálico	-70634	45314	0,9999	2,58	7,82
Galato de metila	-22782	39490	0,9999	0,67	2,03
PGG	-57844	19575	0,9998	5,12	15,53

### Aplicação do método analítico

Duas amostras de extrato EtOH 70% bruto de *A. urundeuva* (Tabela 7) foram solubilizadas em 0,5 mL de solução MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) tamponado com tampão de acetato/ácido acético para pH 5, e deixados nessa solução durante 48 horas para

completa hidrólise dos taninos. Após esse período as amostras foram eluídas através de um cartucho de SPE utilizando 3 mL da mesma solução como FM, os volumes foram então completados para 5 mL em balão volumétrico e por fim foram filtradas em membrana de PTFE 0,45 µm para um vial e analisadas em triplicata por HPLC-PDA.

**Tabela 7.** Massas das amostras de extrato utilizadas na quantificação.

<b>Amostra</b>	<b>massa (mg)</b>
1	34,2
2	32,9

Os picos cromatográficos referentes aos três analitos de interesse (ácido gálico, galato de metila e PGG) foram integrados para obtenção da área. Através desses valores, foram obtidas as concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a partir das curvas analíticas (Figura 41, tabela 6). Esses resultados foram então convertidos para uma relação de  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  a fim de se obter o teor de cada substância no extrato EtOH 70% de folhas de *A. urundeuva* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Concentrações das substâncias analisadas e teor no extrato EtOH 70%.

<b>Substância</b>	<b>Concentração <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g.mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Teor (%)</b>
Ácido gálico	49,23 $\pm$ 2,75	38,33 $\pm$ 0,79	3,83
Galato de metila	77,88 $\pm$ 1,37	60,68 $\pm$ 1,07	6,07
PGG	192,54 $\pm$ 4,32	143,48 $\pm$ 0,71	14,35

Os resultados obtidos mostram quantidade significativa das três substâncias. É importante salientar que os subprodutos da decomposição dos galotaninos, galato de metila e PGG, são responsáveis por aproximadamente 20% da massa total do extrato. Essa é uma quantidade significativa se tratando de metabólitos secundários, comprovando o alto teor de taninos da planta. Estudos realizados com *Terminalia chebula*

(*Combretaceae*), outra planta muito utilizada na medicina popular devido ao alto teor de galotaninos, apresentaram valores semelhantes para o teor de taninos, variando entre 20 e 30% (THOMAS et al., 2012).

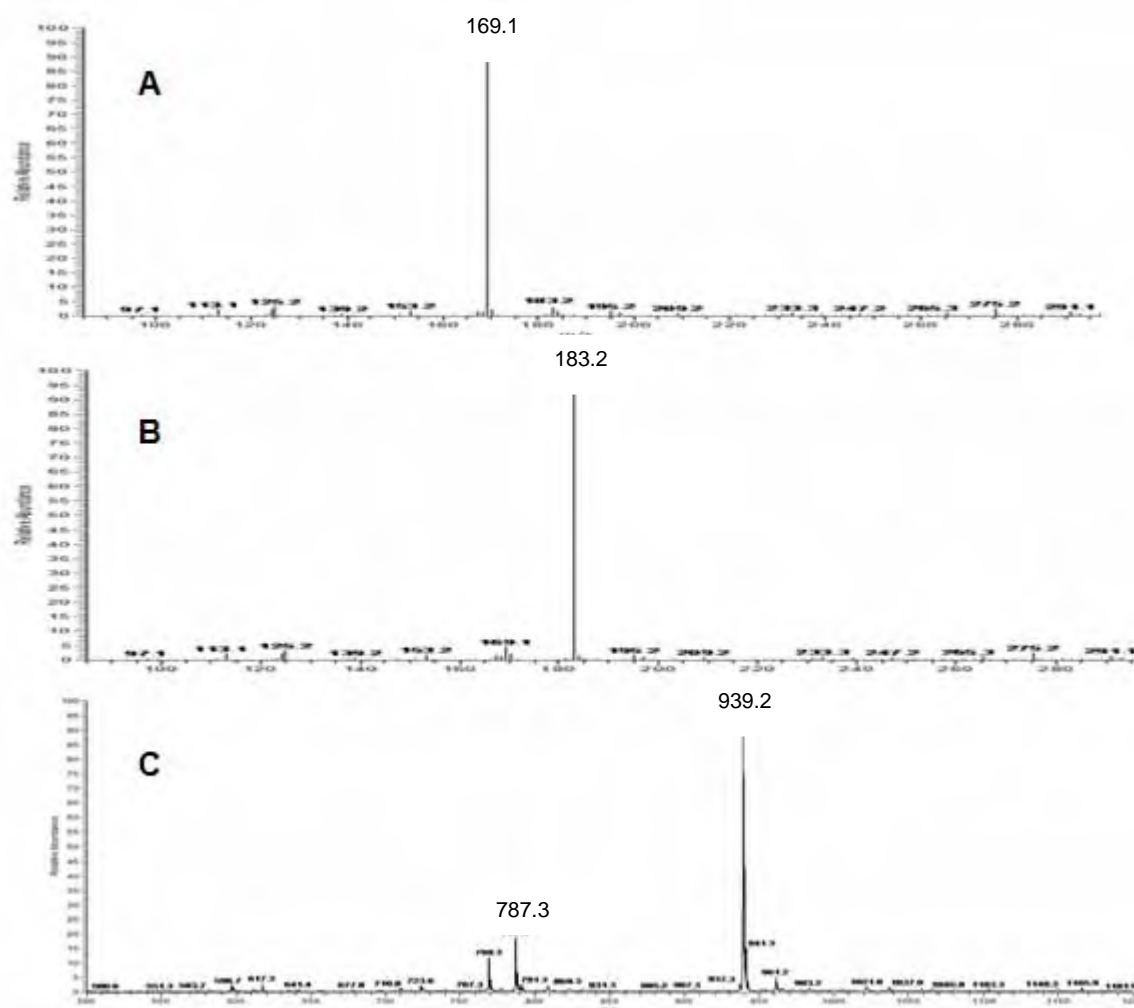
### **Validação**

Uma etapa importante no desenvolvimento de qualquer produto que atenda normas técnicas para a sua comercialização é a validação de uma metodologia analítica.

Para validação da metodologia utilizada foram avaliados: especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e linearidade, seguindo as recomendações do ICH para validação de procedimentos analíticos (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

### **Especificidade**

A especificidade foi avaliada coletando-se individualmente cada um dos picos obtidos no cromatograma por HPLC-PDA e analisando-os através de FIA-ESI-IT-MS. Os espectros de massas obtidos dessa forma apresentaram os sinais esperados referentes às substâncias quantificadas, sem quantidades significativas de outras substâncias (Figura 42) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).



**Figura 42.** Espectros de massas obtidos a partir de análise por FIA-ESI-IT-MS dos picos referentes as substâncias no cromatograma da figura 40. **A)** Ácido gálico **1**; **B)** Galato de metila **2**; **C)** PGG **7**.

### Exatidão

Para avaliar a exatidão, três soluções em concentrações conhecidas dos padrões (20, 75 e 200 ppm) foram submetidas aos mesmos procedimentos de preparo que as amostras de extrato e em seguida foram analisadas em triplicata. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das porcentagens recuperadas (Tabela 9) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

**Tabela 9.** Determinação da exatidão do método para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.

	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>		
		<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>	<b>Repetição 3</b>
Ácido gálico	20	98,81	98,10	98,44
	75	98,12	98,05	97,90
	200	98,57	98,69	98,68
	Média	98,37		
	RSD	0,33		
Galato de metila	20	98,52	98,53	98,27
	75	99,81	98,73	98,58
	200	97,67	98,02	98,45
	Média	98,51		
	RSD	0,59		
PGG	20	98,56	97,26	97,30
	75	27,28	98,34	97,17
	200	97,61	97,25	97,23
	Média	97,56		
	RSD	0,52		

Os resultados obtidos mostraram que a exatidão do método é muito boa para todas as substâncias analisadas (RSD menor que 2%). Os desvios padrão relativos mostram ainda que o processo de preparo das amostras é reprodutível (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

### **Precisão**

A repetitividade foi determinada através de seis análises de uma mesma amostra com concentração dentro da faixa encontrada no extrato. O resultado está apresentado na forma de desvio padrão relativo em relação à média (Tabela 10). O método apresentou

excelente repetitividade, com todos os RSDs menores que 1% (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

**Tabela 10.** Resultados do teste de repetitividade para cada uma das substâncias quantificadas.

<b>Substância</b>	<b>Média (Área)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
Ácido gálico	3259570	27961	0,86
Galato de metila	2935996	16454	0,56
PGG	1369283	12972	0,95

O preparo das amostras é uma das etapas críticas de toda a análise, pois envolve uma série de procedimentos sujeitos a erros (pesagem, hidrólise dos taninos, *clean-up* em cartucho de SPE e diluição seguida finalmente pela análise por HPLC-PDA).

Por isso, a precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de duas amostras do extrato, preparadas por diferentes analistas em dias diferentes. Foram calculados os RSDs para cada uma das duas amostras e a diferença entre os valores médios em porcentagem para os dois analistas. (Tabela 11) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

**Tabela 11.** Determinação da precisão intermediária do método para cada uma das substâncias quantificadas.

		<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
Ácido gálico	[Média] ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	38,89	37,77
	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	0,19	0,36
	%SDR	0,51	0,96
	%Diferença (médias)	2,96	
Galato de metila	[Média] ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	59,92	61,43
	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	0,42	0,33
	%SDR	0,70	0,53
	%Diferença (médias)	2,46	
PGG	[Média] ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	142,98	143,99
	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	4,25	7,86
	%SDR	2,97	5,46
	%Diferença (médias)	0,70	

Todos os analitos apresentaram uma diferença entre as duas médias menor que 3%, reforçando a boa reprodutibilidade tanto do método cromatográfico quanto do preparo das amostras

### **Linearidade**

A linearidade foi obtida a partir do coeficiente de correlação da regressão linear dentro da faixa de concentrações estudada. Todos os analitos apresentaram excelente linearidade dentro da faixa analisada ( $10 - 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), o que pôde ser verificado pelos valores do coeficiente de correlação das curvas analíticas apresentados na tabela 6 (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

**Limite de detecção e limite de quantificação**

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados a partir das curvas analíticas pelas equações apresentadas na figura 43.

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S} \qquad LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

**Figura 43.** Equações para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação.

O parâmetro  $\sigma$  corresponde ao desvio padrão da curva de calibração e S à inclinação da curva. Os resultados foram apresentados como concentração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010).

Todos os analitos apresentaram limites de quantificação muito inferiores às concentrações analisadas (Tabela 6).

Tendo-se em vista todos os dados apresentados é possível afirmar que a metodologia proposta é capaz de inferir com confiabilidade e de forma reprodutível as quantidades de ácido gálico, galato de metila e PGG presentes em extratos de *A. urundeuva* (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005). Através dessas concentrações é possível determinar o teor de taninos do extrato, que é consideravelmente alto.

O alto teor de taninos presentes no extrato é interessante do ponto de vista farmacológico, uma vez que existem relatos de uma série de atividades biológicas relacionadas a taninos de diferentes estruturas e massas moleculares (OKUDA & ITO, 2011). Vale destacar a importância dos galotaninos que vêm sendo estudados por apresentarem desde atividade anti-inflamatória e anti-oxidante (FELDMAN et al., 2001), até potencial no tratamento de doenças como câncer e diabetes (ZHANG et al., 2009).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *A. urundeuva* é extensivamente explorada em termos farmacológicos, devido ao seu amplo uso popular. Foram detectadas atividades antiulcerogênica (CARLINI et al., 2010; SOUZA et al., 2007; RAO et al., 1987), antiinflamatória (SOUZA et al., 2007; VIANA et al., 1997) antibacteriana, antifúngica (SÁ et al., 2009a), neuroprotetora (NOBRE JUNIOR et al., 2007), inseticida (SÁ et al., 2008; NAPOLEÃO et al., 2011), larvicida (SÁ et al., 2009) e efeitos no trânsito gastrintestinal (MENEZES et al., 1988) e em colites (RAO et al., 1986). Destaca-se a importância das atividades antiulcerogênica e antiinflamatória dentro do contexto do tratamento de doenças crônicas.

Estudos fitoquímicos relatam o isolamento, a partir de extratos das cascas, de polifenóis (proantocianidinas), ligninas (NAPOLEÃO et al., 2011; MORAIS et al., 1999), as chalconas urundeuvinas I, II e III, responsáveis pelas atividades analgésica e antiinflamatória (BOTELHO et al., 2008; VIANA et al., 2003) e a lectina que apresentou atividade inseticida (SÁ et al., 2008; NAPOLEÃO et al., 2011) e larvicida em *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009b). Extratos das folhas apresentaram majoritariamente galotaninos (SILVA et al., 2011)

O estudo do extrato EtOH 70% das folhas de *A. urundeuva* indica que derivados de ácidos fenólicos são os metabólitos secundários de maior ocorrência na espécie, em especial galotaninos, que são polímeros de ácido gálico com um núcleo sacarídico.

Essas substâncias são conhecidas pela sua instabilidade frente à solvólise, o que justifica um estudo criterioso não somente da composição química, mas também da estabilidade do extrato, que pode vir a sofrer transformações significativas durante as etapas de extração, armazenamento e análise, que podem influenciar sobremaneira na produção de um fitoterápico.

Os estudos da estabilidade do extrato deixaram evidente que as condições utilizadas nas etapas de fracionamento e purificação devem ser cuidadosamente avaliadas. Práticas comuns como uso de ácido nas fases móveis e longa exposição aos solventes precisam ser evitadas para garantir a integridade das substâncias a serem isoladas e identificadas.

Considerando a utilização do extrato como fitoterápico, a estabilidade não representa um obstáculo, uma vez que a decomposição das substâncias acontece somente em solução e mesmo nesse meio pode ser facilmente controlada, tomados os devidos cuidados principalmente com relação à temperatura e ao pH. Estudos realizados com o extrato liofilizado mostraram que este é estável até mesmo em condições de temperatura alta (40 °C).

O experimento de co-injeção permitiu identificar as substâncias ácido gálico **1**, galato de metila **2**, galato de etila **3**, ácido protocatecuico **4**, ácido clorogênico **5** e ácido elágico **6**. Do fracionamento fitoquímico foram isolados dois galotaninos, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicose **7**, e uma mistura de ácido 3-galoilgálico e 4-galoilgálico **9**, e quercetina-3-O-rhamnopiranosídeo **8**, um flavonoide comumente encontrado em folhas de espécies vegetais. O isolamento do flavonoide **8** está de acordo com análise preliminar realizada por espectrometria de massas, a qual revelou a presença do íon de  $m/z$  447, cuja fragmentação é consistente com a substância.

Os resultados obtidos usando espectrometria de massas, por sua vez, apesar de não garantirem a estrutura espacial da hexose a qual estão ligados os grupos galoil, permitem verificar o grau de polimerização dos taninos. Através dos espectros foi possível visualizar compostos com até 12 unidades de ácido gálico ligadas a um núcleo sacarídico.

As análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, ao detectar vários picos cromatográficos para uma mesma  $m/z$ , revelaram a grande diversidade de estruturas possíveis, de isômeros de posição e esteroisômeros, que

podem contribuir de maneira significativa para a Química de Produtos Naturais e para a busca de novos princípios ativos e espécies vegetais promissoras para o tratamento de várias doenças.

Análise por FIA-ESI-IT-MS é uma ferramenta muito eficiente para obtenção do perfil metabólico do extrato, sendo capaz de diferenciar rapidamente amostras íntegras e decompostas.

A presença majoritária de galotaninos no extrato é uma informação importante do ponto de vista biológico, sendo relatadas diversas atividades farmacológicas interessantes associadas à presença dessa classe de substâncias, sobretudo do PGG.

Diversos ensaios *in vitro* e alguns *in vivo* têm mostrado que PGG apresenta uma série de atividades biológicas interessantes, apontando para um grande potencial terapêutico no tratamento de algumas doenças incluindo câncer e diabetes (ZHANG et al., 2009). Testes *in vivo* mostraram efeito contra câncer de próstata (HU et al., 2008), câncer de pulmão (HUH et al., 2005), sarcoma (MIYAMOTO et al., 1987) e câncer de mama (ZHANG et al., 2009). Foi relatado também efeito inibitório *in vitro* no crescimento e/ou formação de câncer de mama, leucemia, melanoma e câncer de fígado (ZHANG et al., 2009).

Estudos *in vivo* mostraram que PGG reduz o nível de glicose no sangue e aumenta a tolerância à glicose em ratos diabéticos e obesos. Esses resultados sugerem que o PGG pode servir como composto para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de diabetes e síndrome metabólica (ZHANG et al., 2009).

O poder anti-oxidante do PGG foi avaliado em diversos modelos, sendo que mostrou  $EC_{50}$  de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na captura de radicais livres DPPH, ou seja, mais potente que a vitamina E (ABDELWAHED; BOUHLEL & SKANDRANI., 2007). Uma observação bastante interessante é que concentrações de  $106 \mu\text{M}$  foram mais efetivas que

concentrações maiores de 212 e 424  $\mu\text{M}$  (ZHANG et al., 2009). Esse resultado é importante do ponto de vista do uso de *A. urundeuva* como fitoterápico e mostra a importância da padronização dos extratos a fim de se administrar uma concentração conhecida e para a qual se tenha uma resposta biológica ótima.

Em testes de antimutagenicidade PGG mostrou atividade considerável na inibição da mutagenicidade de 3-hidroxiamino-1-metil-5-H-pirido[4,3-b]indol em *Salmonella typhimurium* na ausência de S9. Comparando massas idênticas, PGG foi mais potente que ácido gálico, ácido elágico, epicatequina galato e epigallocatequina galato (OKUDA; MORI & HAYATSU, 1984).

Uma série de testes utilizando diferentes modelos apontam atividade anti-inflamatória do PGG, mostrando sobretudo um grande potencial na supressão do processo de inflamação vascular, sendo um agente interessante para o tratamento de arteriosclerose (ZHANG et al., 2009).

PGG mostrou também um efeito inibitório da enzima esqualeno-sintase com  $\text{IC}_{50}$  por volta de 1  $\mu\text{M}$  em ratos. A esqualeno-sintase é uma enzima chave na síntese de colesterol (PARK et al., 2002).

PGG purificado de *Paeoniae radix*, erva utilizada no tratamento de úlceras e gastrites na medicina tradicional chinesa, mostrou forte efeito inibitório em  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase com  $\text{IC}_{50}$  0,166  $\mu\text{M}$  (ONO et al., 2000). Esse resultado sugere que o PGG é a substância responsável pela inibição da secreção ácida.

Outros estudos apontaram também atividade anti-alérgica (CAVALHER-MACHADO; ROSAS & BRITO, 2008), anti-convulsiva (SUGAYA et al., 1991), anti-viral incluindo inibição do vírus HIV (LEE et al., 2006), vasodilatadora (GOTO et al., 1996) e anti-hipertensiva (LIU; HSU & TSAI, 2003). A atividade anti-hipertensiva é também frequentemente atribuída aos taninos, muito estudada, principalmente em vinhos.

Esses resultados podem ser utilizados como complemento para as informações etnofarmacológicas, considerando que o extrato de *A. urundeuva* possui altas concentrações dessa substância, e grande parte das atividades atribuídas ao PGG são condizentes com usos populares da planta. A maior parte dessas atividades biológicas é relevante no âmbito do tratamento de doenças crônicas, justificando estudos farmacológicos a fim de se comprovar essas atividades para o extrato de *A. urundeuva*.

Presença de grande quantidade de galotaninos é uma característica muito interessante do ponto de vista farmacológico, mas um desafio do ponto de vista analítico. Abordagens gerais para a quantificação dessa classe de substâncias, como o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu proposto pela Farmacopéia Européia (MØLLER, HANSEN & CORNETT, 2009), fornecem apenas o teor total de taninos através de ensaios não específicos.

Quantificação direta de taninos através de técnicas como HPLC-PDA é inviável devido à complexidade estrutural dessas substâncias. A quantificação dos produtos de metanólise dos galotaninos é uma forma de tornar viável a determinação do teor de galotaninos através de HPLC, e assim obter-se muito mais informações sobre a amostra do que através de técnicas menos específicas como ensaios colorimétricos.

A metodologia desenvolvida apresentou excelentes parâmetros de validação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010), mostrando que os resultados obtidos são consistentes, e podem ser utilizados na garantia da quantidade e natureza dos taninos presentes nos extratos. As concentrações obtidas para o extrato foram condizentes com outras plantas contendo altos teores de taninos (THOMAS et al., 2012), mostrando que *Astronium urundeuva* é uma planta promissora para o futuro desenvolvimento de um fitoterápico.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATTAR, E.; ZAITOUN, A. A.; FARAG, M. A.; GAYED, S. H. E.; HARRAZ, F. M. H. Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. **Natural Products Research**, v. 24, n. 3, p. 226-235, 2010.
- ABDELWAHED, A.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, n. 1, p. 1-13, 2007.
- ADHAMI, H. R.; LINDER, T.; KAEHLIG, H.; SCHUSTER, D.; ZEHL, M.; KRENN, L. Catechol alkenyls from *Semecarpus anacardium*: acetylcholinesterase inhibition and binding mode predictions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 142-148, 2012.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Brasília, DF: EMBRAPA, 1998.
- AMEH, S. J.; OBODOZIE, O. O.; INYANG, U. S.; ABUBAKAR, M. S.; GARBA, M. Current phytotherapy – a perspective on the science and regulation of herbal medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 72-81, 2010.
- AN, R-B.; OH, H.; KIN, Y-C. Phenolic constituents of Galla Rhois with hepatoprotective effects on tacrine- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in hep G2 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2155-2157, 2005.
- ARAPITSAS, P.; MENICHETTI, S.; VINCIERI, F. F.; ROMANI, A. Hydrolyzable tannins with hexahydroxydiphenoyl unit and the m-depsidic link: HPLC-DAD-MS identification and model synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 48-55, 2007.
- BIOTA-FAPESP. **Atlas**. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/index>>. Acesso em: 19 mar. 2012.
- BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; MONTENEGRO, D.; BANDEIRA, M. A.; FONSECA, S. G. C.; NOGUEIRA, N. A. P.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 442-449, 2008.
- BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century european naturalists and in the official pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141-148, 2008.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, L. M.; MARTINI, M.; MOREIRA, A. P. L.; LIMA, A. P. S.; CORREIA, D.; FALCÃO, T.; GARCIA, S. C.; BAIRROS, A. V.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D. Presence of sythetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, p. 6-12, 2010.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. **Anacardiaceae**. EMPRESA BRAILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: EMBRAPA. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CON T000fu1aqjv402wyiv807nyi6sjly92tp.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CON T000fu1aqjv402wyiv807nyi6sjly92tp.html)>. Acesso em: 5 jun. 2011.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A. The antiallergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1552-1560, 2008.

CHEN, T. K.; WIEMER, D. F.; HOWARD, J. J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Naturwissenschaften**, v. 71, n. 2, p. 97-98, 1984.

CHEN, Y.; HAGERMAN, A. E. Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and beta-1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4008-4011, 2004.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de *Anacardiaceae*. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C.; THOMAS, J. B.; SANDER, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 265-274, 1998.

DESMACHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "Caatinga" region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacolgy**, v. 67, p. 69-77, 1999.

ENGELS, C.; GÄNZLE, A. G.; SCHIEBER, A. Fast LC-MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. **Food Research International**, v. 45, p. 422-426, 2012.

ENGELS, C.; KNÖLDER, M.; ZHAO, Y. Y.; CARLE, R.; GÄNZLE, M. G.; SCHIBER, A. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica indica* L.) Kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7712-7718, 2009.

FELDMAN, S. K.; SAHASRABUDHE, K.; LAWLOR, M. D.; WILSON, S. L.; LANG, C. H.; SCHEUCHENZUBER, W. J. *In vitro* and *in vivo* inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion by the gallotannin  $\beta$ -D-pentagalloylglucose. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 1813-1815, 2001.

FISCHMAN, J. Herbs and prescription can make a risk mixture. **US News World Report**, v. 128, p. 64-65, 2000.

FREITAS, A. de. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo\\_fitoterapicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf)> Acesso em: 19 mar. 2012.

GE, F.; KE, C.; TANG, W.; YANG, X.; TANG, C.; QIN, G.; XU, R.; LI, T.; CHEN, X.; ZUO, J.; YE, Y. Isolation of chlorogenic acids and their derivatives from *Stemona japonica* by preparative HPLC and evaluation of their anti-AIV (H5N1) activity *in vitro*. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 213-218, 2007.

GEBARA, S. S.; FERREIRA, W. O.; RÉ-POPPI, N.; SIMIONATTO, E. Volatile compounds of leaves and fruits of *Mangifera indica* var. *coquinho* (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Food Chemistry**, v. 127, p. 689-693, 2011.

GOTO, H.; SHIMADA, Y.; AKECHE, Y.; KOHTA, K.; HATTORI, M.; TERASAWA, K. Endothelium dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 436-439, 1996.

GREEN, I. R.; TOCOLI, F. E.; LEE, S. H.; NIHEI, K.; KUBO, I. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1315-1320, 2008.

HARTLEY, L. **Secondary compounds within the Anacardiaceae**. Disponível em: <[http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_1998/hartley.htm](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/hartley.htm)>. Acesso em: 25 ago. 2009.

HU, H.; LEE, H. J.; JIANG, C. Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells *in vitro* and suppresses prostate xenograft tumor growth *in vivo*. **Molecular Cancer Therapy**, v. 7, n. 9, p. 2681-2691, 2008.

HUH, J. E.; LEE, E. O.; KIM, M. S. Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen activated protein kinase pathways. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 8, p. 1436-1445, 2005.

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH Harmonized tripartite guideline. **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2 (R1). [S.l, s.n], 2005.
- IDA, Y.; SATOH, Y.; OHTSUKA, M.; NAGASAO, M.; SHOJI, J. Phenolic constituents of *Phellodendron amurense* bark. **Phytochemistry**, v. 35, p. 209-215, 1994.
- JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; WATANABE, G. A.; COTA, B. B.; SIQUEIRA, E. P.; PIZZOLATTI, M. G.; ZANI, C. L.; RESENDE, A. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 388-396, 2010.
- KHANBABAEE, K.; LÖTZERICH, K. Efficient total synthesis of the natural products 2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose and the unnatural 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\alpha$ -D-glucopyranose. **Tetrahedron**, v. 53, p. 10725-10732, 1997.
- KNÖDLER, M.; CONRAD, J.; WENZIG, E. M.; BAUER, R.; LACORN, M.; BEIFUSS, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Antiinflammatory 5-(11 $\text{`Z}$ -heptadecenyl)- and 5-(8 $\text{`Z}$ ,11 $\text{`Z}$ -heptadecadienyl)-resorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels. **Phytochemistry**, v. 69, p. 988-993, 2008.
- KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 237-242, 2007.
- KONÉ, W. M.; SORO, D.; DRO, B.; YAO, K.; KAMANZI, K. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory properties of *Lannea barteri* (*Anacardiaceae*). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1516-1523, 2011.
- KUATE, S. P.; PÁDUA, R. M.; EISENBEISS, W. F.; KREIS, W. Purification and characterization of malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane 21-*O*-malonyltransferase (Dp21MaT) from leaves of *Digitalis purpurea* L. **Phytochemistry**, v. 69, p. 619-626, 2008.
- LEE, S. J.; LEE, H. K.; JUNG, M. K.; MAR, W. *In vitro* antiviral activity of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-beta-D-glucose against hepatitis B virus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 10, p. 2131-2134, 2006.
- LI, H. Y.; MIYAHARA, T.; TEZUKA, Y.; NAMBA, T.; NEMOTO, N.; TONAMI, S.; SETO, H.; TADA, T.; KADOTA, S. The effect of kampo formulae on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. I. Active constituents of Tsu-kangan. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 1322-1326, 1998.
- LI, S. P.; ZHAO, J.; YANG, B. Strategies for quality control of Chinese medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 802-809, 2011.
- LINSKENS, H. F.; JACKSON, J. F. **Modern methods of plant analysis**: plant toxin analysis. Berlin: Springer, 1992. p. 4-9.

LIU, J. C.; HSU, F. L.; TSAI, J. C. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Life Sciences**, v. 73, n. 12, p. 1543-1555, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAHJOUB, M. A.; AMMAR, S.; EDZIRI, H.; MIGHRI, N.; BOURAOUI, A.; MIGHRI, Z. Anti inflammatory and antioxidant activities of some extracts and pure natural products isolated from *Rhus tripartita* (Ucra). **Medicinal Chemistry Research**, v. 19, p. 271-282, 2010.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. Ó.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; CARREIRA, L. M. M. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 17, p. 72-74, 2002.

MARCHETTI, C.; GAVAZZO, P.; STAFFORD, G. I.; STANDEN, J. V. South African plants used in traditional medicine to treat epilepsy have an antagonistic effect on NMDA receptor currents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 383-388, 2011.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, V. F.; SCUTTI, J. A. B.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G.  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 449-454, 2011.

MENEZES, A. M.; RAO, V. S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p. 531-533, 1988.

MENEZES, T. E. C.; DELBEM, A. C. B.; BRIGHENTI, F. L.; OKAMOTO, A. C.; JARDIM JUNIOR, E. G. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 3, p. 300-305, 2010.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.

MIYAMOTO, K.; KISHI, N.; KOSHIURA, R.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; OKUDA, T.; Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 814-822, 1987.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A.; PILO-VELOSO, D. ; DRUMOND, M. G. Studies on polyphenols and lignin os *Astronium urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.

MØLLER, C.; HANSEN, S. H.; CORNETT, C. Characterization of tannin-containing herbal drugs by HPLC. **Phytochemistry Analysis**, v. 20, p. 231-239, 2009.

NAGY, M. (Comp.) **History of phytotherapy and pharmacognosy**. Disponível em: <[http://www.chem.uwec.edu/chem491\\_w01/%20Pharmacognosy%20491/%20%20%20%20%20Med%20Chem%20Lectures/Lecture%20%206/HistoryofPharmacognosy.pdf](http://www.chem.uwec.edu/chem491_w01/%20Pharmacognosy%20491/%20%20%20%20%20Med%20Chem%20Lectures/Lecture%20%206/HistoryofPharmacognosy.pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2012.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NAWWAR, M.; HUSSEIN, S.; AYOUB, N.; HASHIM, A.; EL-SHARAWY, R.; LINDEQUIST, U.; HARMS, M.; WENDE, K. Constitutive phenolics of *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) and their biological effects on human keratinocytes. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1265-1271, 2011.

NDIFOSSAP, I. G. M.; FRIGERIO, F.; CASIMIR, M.; TSOFAK, F. N.; DONGO, E.; KAMTCHOING, P.; DIMO, T.; MAEHLER, P. *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem-bark extract corrects glycaemia in diabetic rats and acts on  $\beta$ -cells by enhancing glucose-stimulated insulin secretion. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p. 79-86, 2010.

NOBRE JUNIOR, H. V.; MAMIA, F. D.; OLIVEIRA, R. A.; BANDEIRA, M. A. M.; PESSOA, C. Ó.; MORAES, M. O.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective actions of tannins from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced neuronal cell death. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 13, n. 2, p. 41-57, 2007.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure im medicinal and food plants – hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, v.16, p. 2191-2217, 2011.

OKUDA, T.; MORI, K.; HAYATSU, H. Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 3755-3758, 1984.

OLIVEIRA, F. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; FONSECA-KRUEL, V. S. HANAZAKI, N. Avanço nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 590-605, 2009.

ONO, K.; SAWADA, T.; MURATA, Y. Pentagalloylglucose, an antisecretory component of *Paeoniae radix*, inhibits gastric H<sup>+</sup>, K(+) -ATPase. **Clinica Chimica Acta**, v. 290, n. 2, p. 159-167, 2000.

PARK, J. K.; CHO, H. J.; LIM, Y.; CHO, Y. H.; LEE, C. H. Hypocholestrolemic effect of CJ90002 in hamsters: a potent inhibitor for squalene synthase from *Paeonia moutan*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 222-227, 2002.

PELL, S. K. **Molecular systematic of the cashew family (Anacardiaceae)**. 2004. 207 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Department of Biological Science, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2004.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmaceutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 3.

RAO, V. S.; VIANA, G. S.; MENEZES, A. M. S.; GADELHA, M. G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. aqueous extract. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 20, n. 6, p. 803-805, 1987.

RAO, V. S.; MENEZES, A. M. S.; VASCONCELOS, F. A.; ALMEIDA, F. R. C.; FONTELES, M. C. Effect of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colites. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 19, p. 568-568, 1986.

RAYNE, S.; MAZZA, G. Biological activities of extracts from Sumac (*Rhus* spp.): a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 165-175, 2007.

RELAÇÃO nacional de plantas medicinais de interesse do SUS: espécies vegetais. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2012.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES-BURBANO, D.; QUIJANO-CELIS, C. E.; PINO, J. A. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 488-489, 2010.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PENELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, v. 130, p. 214-221, 2012.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. D. L.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, 460-464, 2008.

SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. D. L.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009a.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S. CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009b.

SALMINEN, J. P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 283-291, 1999.

SCHÖNTHAL, A. H. Adverse effects of concentrated green tea extracts. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 874-885, 2011.

SIBANDZE, G. F.; ZYL, R. L.; VUUREN, S. F. The anti-diarrhoeal properties of *Breonadia salicina*, *Syzygium cordatum* and *Ozoroa sphaerocarpa* when used in combination in Swazi traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 506-511, 2010.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v.17, n. 4, p. 365-375, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 443-449, 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; MILACH, A. C. Jr.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (*Anacardiaceae*) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 220-225, 2007.

STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>>. Acesso em: 25 ago. 2009.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 517-554, 2008.

SUGAYA, A.; SUZUKI, T.; SUGAYA, E.; YUYAMA, N.; YASUDA, K.; TSUDA, T. Inhibitory effect of peony root extract on pentylentetrazolinduced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1-2, p. 159-167, 1991.

THOMAS, R.; TRIPATHI, R.; KAMAT, S. D.; KAMAT, D. V. Comparative study of phenols and antioxidant activity of phytochemicals of *T. chebula* extracted using microwave and ultrasonication. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 1, p. 194-197, 2012.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, p. 148-161, 2011.

UNICAMP cria antiinflamatório com base em planta brasileira. **Agência Folha**, 2005. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u13239.shtml>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189-195, 2003.

VILLAS-BOAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 385-386, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 2003. 384 p.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Versão 25 de novembro de 2008. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 25 ago. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plants material**. Geneva, 1998. 122 p. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. Geneva, 2000, 80 p. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2000.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf)>. Acesso em: 09 jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations**. Geneva, 2009. 178 p. Disponível em: <[http://www.aaps.org/inside/Focus\\_Groups/Stability/imagespdfs/WHO%20Stability%20Guideline%202009.pdf](http://www.aaps.org/inside/Focus_Groups/Stability/imagespdfs/WHO%20Stability%20Guideline%202009.pdf)>. Acesso em: 09 jul. 2011.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 157-169, 2011.

ZHANG, J.; LI, L.; KIM, S.; HAGERMAN, A. E.; LÜ, J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2066-2080, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoproduto e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.