

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E TANINOS CONDENSADOS DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia* MART. ex REISS.

Mônica Bordin Pessuto, Isis Casemiro da Costa, Angelita Boldieri de Souza, Fernanda Michely Nicoli e João Carlos Palazzo de Mello\*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

Frank Petereit

Westfälische Wilhelms-Universität, Institute for Pharmaceutical Biology and Phytochemistry, Hittorfstrasse 56, D-48149 Münster, Alemanha

Heinrich Luftmann

Westfälische Wilhelms-Universität, Institute for Organic Chemistry, Corrensstrasse 40, D-48149 Münster, Alemanha

Recebido em 8/7/08; aceito em 29/9/08; publicado na web em 26/1/09

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS AND CONDENSED TANNINS FROM LEAVES OF *Maytenus ilicifolia* MART. ex REISS. *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) is a native plant of South America and popularly known as “espinheira-santa”. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from this plant. The antioxidant activity of the crude and semipurified extracts and isolated compounds was evaluated through DPPH-radical and phosphomolybdenum-complex assays. By both methods, the ethyl-acetate fraction demonstrated better antioxidant capacity compared with vitamin C and trolox. In the compounds, the higher the number of hydroxyls, the greater the antioxidant activity. In addition, stereochemistry influenced antioxidant activity, i.e., compounds with 2*R*,3*R* showed greater activity than those with 2*R*,3*S*.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*; condensed tannins; antioxidant activity.

## INTRODUÇÃO

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae) é uma planta nativa do sul do Brasil, Uruguai, Paraguai, norte da Argentina,<sup>1</sup> Chile e Bolívia.<sup>2</sup> Popularmente é conhecida como “espinheira-santa” e utilizada no tratamento de lesões gástricas (antiulcerogênica), antiinflamatória, analgésica, cicatrizante em feridas, antiasmática, como remédio antitumoral indígena e como agente regulador da fertilidade, hábito comum de algumas tribos indígenas e populações rurais do Paraguai e Bolívia.<sup>2,3</sup>

Diversas atividades, como antiulcerogênica,<sup>3,4</sup> antiinflamatória,<sup>3,4</sup> antiedematogênica,<sup>4</sup> antinociceptiva,<sup>3,5</sup> antiproliferativa,<sup>6</sup> de diferentes extratos, de frações ricas em flavonóides e de substâncias isoladas de *M. ilicifolia*, *M. rigida*, *M. robusta* e *M. truncata* foram avaliadas e comprovadas. Além dessas atividades, o extrato de *M. ilicifolia* foi avaliado para proteção da cóclea em animal de laboratório, devido à cisplatina, demonstrando que o mesmo não possui qualquer efeito protetivo.<sup>7</sup>

Os constituintes químicos presentes nas diferentes espécies avaliadas estão relacionados aos grupos de taninos condensados (4'-metil-epigallocatequina),<sup>5</sup> flavonóides<sup>8</sup> e triterpenos (pristimerina).<sup>3,6</sup> Em outras espécies, *M. acanthophylla* e *M. aquifolium*, foram isolados constituintes químicos semelhantes aos já encontrados em *M. ilicifolia*.<sup>9</sup>

Taninos condensados são apontados como constituintes químicos majoritários em extratos aquosos de *M. ilicifolia*, sendo utilizados como marcadores no controle de qualidade de extratos e medicamentos fitoterápicos através de diferentes técnicas de avaliação e desenvolvimento tecnológico.<sup>10</sup>

Testes de toxicidade aguda e crônica realizados com o infuso

das folhas de *M. ilicifolia* não provocaram efeitos tóxicos (estudo pré-clínico),<sup>11</sup> mutagênicos<sup>12</sup> e teratogênicos<sup>13</sup> em animais ou em células vegetais. Alguns autores<sup>14</sup> realizaram ensaio clínico fase I com abafado (infuso) das folhas de espinheira-santa e demonstraram que o abafado não é tóxico ao ser humano.

Substâncias fenólicas são reconhecidamente detentoras de pronunciada atividade antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais livres e como quelantes de metais, despertando, assim, interesse face à possibilidade de serem utilizadas em várias doenças degenerativas, como envelhecimento prematuro, processos inflamatórios, cicatrização, câncer, entre outras.<sup>15</sup>

Assim, este trabalho avaliou o potencial antioxidante de extratos e de taninos condensados isolados das folhas de *M. ilicifolia*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury Plus a 300 MHz (<sup>1</sup>H) e 75 MHz (<sup>13</sup>C), otimizado para técnicas uni e bidimensionais, registrados em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e TMS como padrão de referência interno. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros de massas quadrupolo *electrospray* Quattro LCZ (Waters-Micromass, Manchester, UK) com injetor *nanospray* (EM-ESI), e massas de alta resolução foram obtidas em MicroTof (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) com *electrospray* de tempo de fuga com alça de injeção, com precisão de massas esperada melhor que ±5 mDa (HR-ESI-TOF). Os espectros de massas foram realizados no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha. Os espectros de difração circular foram realizados em espectropolarímetro Jasco J-815, em metanol, na região entre 200 e 300 nm, no Instituto de

\*e-mail: mello@uem.br

Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha.

### Material vegetal

As folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. foram coletadas em Marialva, PR, (S23°28'46,7"; W051°77'41,5"; 621 m de altitude) em novembro de 2004, secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas Tecnal TE-048. Exsicata do vegetal (folhas com sementes) encontra-se depositada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Biologia da UEM sob número HUEM 10623. A identificação foi realizada pela Profa. Dra. E. Jacomassi (UNIPAR, Umuarama, PR).

### Métodos de extração e isolamento

As folhas de *M. ilicifolia* (500 g) foram extraídas com acetona: água (7:3; v/v) a 10% (p/v) em Ultra-Turrax® (UTC 115 KT) durante 20 min, filtradas, seguida de concentração à pressão reduzida em evaporador rotatório (Büchi R-114) e liofilizadas, rendendo 127 g de extrato bruto (EB). O EB (125 g) foi previamente solubilizado em água e particionado com acetato de etila (12,5 L) rendendo, após liofilização, duas frações semipurificadas: fração aquosa (FAQ) (95,2 g) e fração acetato de etila (FAE) (25,3 g), ambas com características de pó amorfo e com coloração marrom.

A FAE (15 g) foi submetida em coluna (700x55 mm) contendo Sephadex® LH-20, utilizando-se o sistema eluente EtOH:H<sub>2</sub>O (1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 1:1; 1,2 L cada),<sup>16</sup> sendo obtidas 26 frações (F#1–26). As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico obtido em cromatografia em camada delgada analítica (cromatofolhas de gel de sílica F<sub>254</sub>, 0,200 mm espessura, Merck; sistema eluente: AcOEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O, 90:5:5; luz UV 254 nm; revelador: cloreto férrico a 1% em etanol).

As frações 10 (98,4 mg), 11 (477,3 mg), 13 (471 mg) e 16 (679,6 mg) foram refractionadas em coluna contendo Sephadex® LH-20, utilizando-se o sistema eluente EtOH:H<sub>2</sub>O (1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 1:1; v/v; 100 mL cada) fornecendo diversas subfrações. As subfrações 10-4, 11-10, 13-4, 16-6 e 16-8 forneceram as substâncias **1** (6 mg), **2** (26 mg), **3** (6 mg), **4** (15 mg) e **5** (45 mg), respectivamente. Após, todas as substâncias foram derivatizadas por acetilação (anidrido acético:piridina; 1,2:1; temperatura ambiente/24 h) e purificadas em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP; sílica gel com gesso PF<sub>254</sub>, Merck; sistema eluente: tolueno:acetona, 7:3; v/v).<sup>16</sup>

#### *Epicatequina* (**1**)

C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>, EM/ESI [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 523; [M-H]<sup>+</sup> *m/z* 499. RMN de <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), multiplicidade e *J* (Hz)]: δ 2,87 [dd, H-4ax (C), *J*=17,7 e 2,1 Hz], 2,98 [dd, H-4eq (C), *J*=17,7 e 4,5 Hz], 5,10 [s, H-2 (C)], 5,38 [m, H-3 (C)], 6,56 [d, H-6 (A), *J*=2,1 Hz], 6,67 [d, H-8 (A), *J*=2,1 Hz], 7,20 [d, H-5' (B), *J*=8,4 Hz], 7,26 [dd, H-6' (B), *J*=8,4 e 1,8 Hz], 7,35 [d, H-2' (B), *J*=1,8 Hz]. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>= -1,0° (c 0,001; acetona).

#### *Epigallocatequina* (**2**)

C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>, EM/ESI [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 581; [M-H]<sup>+</sup> *m/z* 557. RMN de <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), multiplicidade e *J* (Hz)]: δ 2,82-3,04 [m, H-4ax/H-4eq], 5,08 [brs, H-2 (C)], 5,38 [m, H-3 (C)], 6,57 [d, H-6 (A), *J*=2,1 Hz], 6,67 [d, H-8 (A), *J*=2,1 Hz], 7,22 [s, H-2'/H-6' (B)]. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>= -1,0° (c 0,001; acetona).

#### *Catequina* (**3**)

C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>, EM/ESI [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 523; [M-H]<sup>+</sup> *m/z* 499. RMN de

<sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), multiplicidade e *J* (Hz)]: δ 2,66 [dd, H-4ax (C), *J*=16,5 e 6,3 Hz], 2,86 [dd, H-4eq (C), *J*=16,5 e 5,1 Hz], 5,14 [d, H-2 (C), *J*=6,6 Hz], 5,25 [ddd, H-3 (C), *J*=6,6, 5,1 e 6,3 Hz], 6,59 [d, H-6 (A), *J*=2,4 Hz], 6,65 [d, H-8 (A), *J*=2,4 Hz], 7,26 [dd, H-6' (B), *J*=8,4 e 1,8 Hz], 7,19 [d, H-5' (B), *J*=8,4 Hz], 7,17 [d, H-2' (B), *J*=1,8 Hz]. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>= +3,0° (c 0,001; acetona).

#### *Epicatequina-(4β→8)-catequina* (*procianidina* B<sub>1</sub>) (**4**)

C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>22</sub>, HR-ESI-TOF [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 1021,2373 e o calculado 1021,2378. RMN de <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), multiplicidade e *J* (Hz)]: δ 2,56 [dd, H-4ax (F), *J*=16,5 e 9,3 Hz], 3,20 [dd, H-4eq (F), *J*=16,5 e 6,6 Hz], 4,34 [d, H-2 (F), *J*=9,6 Hz], 4,41 [d, H-4 (C), *J*=1,8 Hz], 5,04 [ddd, H-3 (F), *J*=9,6 e 9,3 e 6,6 Hz], 5,16 [m, H-3 (C)], 5,46 [s, H-2 (C)], 5,99 [d, H-8 (A), *J*=2,1 Hz], 6,29 [d, H-6 (A), *J*=2,1 Hz], 6,67 [s, H-6 (D)], 6,85-7,43 [m, H-2'/H-5'/H-6' (B)'], 6,85-7,43 [m, H-2'/H-5'/H-6' (E)]. RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 73,74 (2-C), 71,10 (3-C), 34,21 (4-C), 148,14 (5-A), 108,81 (6-A), 149,96 (7-A), 107,43 (8-A), 155,69 (9-A), 111,65 (10-A), 136,57 (1'-B), 122,33 (2'-B), 142,13 (3'-B), 142,60 (4'-B), 123,29 (5'-B), 124,74 (6'-B), 78,49 (2-F), 68,60 (3-F), 27,37 (4-F), 148,89 (5-D), 110,94 (6-D), 149,49 (7-D), 117,26 (8-D), 154,20 (9-D), 113,86 (10-D), 134,82 (1'-E), 122,51 (2'-E), 141,95 (3'-E), 142,54 (4'-E), 123,37 (5'-E), 125,59 (6'-E). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>= +8,0° (c 0,001; acetona). CD (c 0,1; metanol): [θ]<sub>240</sub> 9000.

#### *Epicatequina-(4β→8)-epicatequina* (*procianidina* B<sub>2</sub>) (**5**)

C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>22</sub>, HR-ESI-TOF [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 1021,2373 e o calculado 1021,2378. RMN de <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm), multiplicidade e *J* (Hz)]: δ 2 x 2,90-2,94 [m, H-4 (F)], 4,46 [d, H-4 (C), *J*=1,8 Hz], 4,54 [s, H-2 (F)], 5,10 [m, H-3 (F)], 5,16 [m, H-3 (C)], 5,57 [s, H-2 (C)], 5,98 [d, H-8 (A), *J*=2,4 Hz], 6,23 [d, H-6 (A), *J*=2,4 Hz], 6,65 [s, H-6 (D)], 6,89 [dd, H-6' (E), *J*=8,4 e 1,8 Hz], 7,01 [d, H-2' (E), *J*=1,8 Hz], 7,04 [d, H-5' (E), *J*=8,4 Hz], 7,17 [d, H-5' (B), *J*=8,4 Hz], 7,28 [dd, H-6' (B), *J*=8,4 e 1,8 Hz], 7,36 [d, H-2' (B), *J*=1,8 Hz]. RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 73,85 (2-C), 71,30 (3-C), 34,23 (4-C), 148,05 (5-A), 108,88 (6-A), 149,32 (7-A), 107,48 (8-A), 155,61 (9-A), 111,81 (10-A), 136,81 (1'-B), 122,47 (2'-B), 141,98 (3'-B), 142,23 (4'-B), 123,37 (5'-B), 124,69 (6'-B), 77,45 (2-F), 67,06 (3-F), 26,90 (4-F), 148,15 (5-D), 110,59 (6-D), 149,38 (7-D), 116,99 (8-D), 154,47 (9-D), 111,95 (10-D), 134,71 (1'-E), 122,71 (2'-E), 141,88 (3'-E), 142,23 (4'-E), 123,05 (5'-E), 125,34 (6'-E). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>= +3,0° (c 0,001; acetona). CD (c 0,1; metanol): [θ]<sub>240</sub> 6500.

### Polifenóis totais em extratos EB, FAQ e FAE

O teor de polifenóis totais (PT) nos extratos EB, FAQ e FAE foi estimado por ensaio colorimétrico baseado nos procedimentos descritos por Glasl<sup>17</sup> com algumas modificações.<sup>18</sup> Cerca de 0,1895 g de EB, 0,1349 g de FAQ e 0,034 g de FAE foram dissolvidos em água (250 mL; SM), respectivamente. Uma alíquota de 5 mL foi diluída em água para 25 mL. Uma alíquota de 2 mL foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL com 1 mL de reagente fenol de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água, e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min foi medida a absorbância a 691 nm (PT). A água foi utilizada como branco. A porcentagem de polifenóis totais foi determinada, em triplicata, como segue:

$$PT(\%) = \frac{15625 \cdot Abs}{1000 \cdot m}$$

onde: PT= polifenóis totais (%); Abs = absorbância; m= massa (g) de EB, FAQ ou FAE.

### Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos bruto (EB) e semipurificados, frações aquosa (FAQ) e acetato de etila (FAE) foi avaliada pelos métodos do radical DPPH<sup>18,19</sup> e pela formação do complexo fosfomolibdênio.<sup>18,20</sup> As substâncias isoladas foram avaliadas apenas pelo método do radical DPPH.

Na atividade antioxidante por DPPH com os extratos EB, FAQ e FAE utilizaram-se 5 mg de amostra dissolvidas em MeOH diluindo-a até se obter as concentrações de 0,1; 0,02; 0,01; 0,005 e 0,0025 mg/mL. Com as substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, de acordo com a massa molecular, foram obtidas as concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625  $\mu\text{M}$  sendo acrescidos 0,125  $\mu\text{L}$ , para cada 1 mL da amostra a ser testada, da solução de DPPH (1 mmol L<sup>-1</sup>). Após 30 min, a absorbância da solução resultante foi lida em espectrofotômetro em 517 nm. Foram utilizados como padrão a vitamina C e como branco o BHT (2 mg de BHT em 4 mL de MeOH com 0,5 mL de solução de DPPH), sendo os resultados expressos em termos de IC<sub>50</sub>.

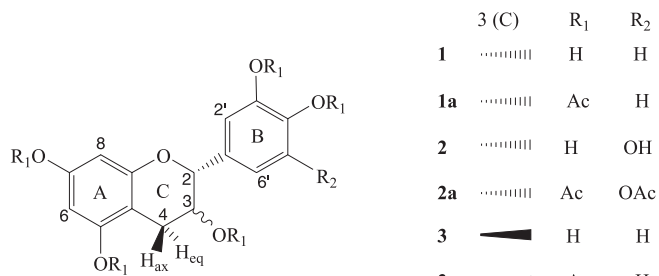
No método do fosfomolibdênio as amostras (0,3 mL com concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ ) foram testadas com a solução reagente (3 mL da solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 mol L<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 28 mmol L<sup>-1</sup>, molibdato de amônio 4 mmol L<sup>-1</sup> em água destilada), incubadas em banho-maria a 95 °C/90 min e, após resfriamento, lidas em espectrofotômetro a 695 nm. Como branco utilizaram-se 0,3 mL de metanol com 3 mL de reagente. A atividade antioxidante foi calculada com base na taxa de formação do complexo fosfomolibdênio (Capacidade Antioxidante Relativa - CAR) em relação ao padrão vitamina C, com valor de referência 1,0.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As múltiplas cromatografias em Sephadex® LH-20, seguidas de derivatização e CCDP, resultaram no isolamento e identificação das substâncias **1-5**. Estas foram identificadas como epicatequina (**1**), epigalocatequina (**2**), catequina (**3**), epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (**4**) e epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (**5**), através da análise dos espectros de massas, RMN (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC e HSQC), di-croísmo circular (somente para as substâncias **4** e **5**) e polarimetria, além de comparação com dados de literatura.<sup>18,21</sup>

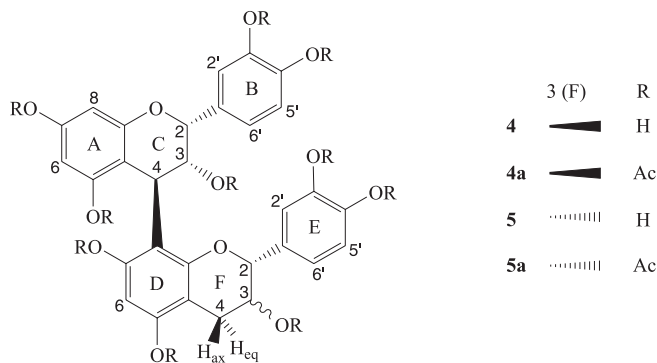
A identificação dos monômeros de taninos condensados foi realizada a partir dos espectros de massas, de RMN <sup>1</sup>H, COSY e polarimetria para comprovação da configuração absoluta. As substâncias **1**, **2** e **3** correspondem aos monômeros epicatequina (**1**), epigalocatequina (**2**) e catequina (**3**) e suas diferenciações foram realizadas com base nos dados espectroscópicos dos hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C),<sup>18,21,22</sup> bem como na região aromática correspondente aos hidrogênios do anel A. As três substâncias tiveram a configuração absoluta confirmada pelos dados de polarimetria (Figura 1).

As procianidinas **4** e **5** foram identificadas como epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B<sub>1</sub>) e epicatequina-(4 $\beta$ →8)-



**Figura 1.** Substâncias monoméricas isoladas das folhas de *M. ilicifolia*: **1**, epicatequina, **2**, epigalocatequina, **3**, catequina. Ac = acetato

epicatequina (procianidina B<sub>1</sub>) por comparação dos dados físicos (RMN <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC e HMBC, espectrometria de massas e di-croísmo circular) de seus derivados acetilados **4a** e **5a**, e com dados de literatura.<sup>18,21</sup>



**Figura 2.** Substâncias diméricas isoladas das folhas de *M. ilicifolia*: **4**, epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina, **5**, epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina. Ac = acetato

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância **4a** mostra os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-4(C) com  $J_{3,4}$  de 1,8 Hz. Os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) da unidade “superior” apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz e, H-2(F) e H-3(F) da unidade “inferior” uma  $J_{2,3}$  de 9,6 Hz. Estes dados estabelecem uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*-3,4-*cis* para a unidade “superior” e 2,3-*trans* para a unidade “inferior”. A ligação (4→8), de proantocianidinas diméricas peracetiladas, pode ser confirmada pela proporção de rotâmeros e pela posição, tanto do hidrogênio H-2(F), em  $\delta$  4,34 ppm, como pelos sinais dos hidrogênios H-6(A), H-8(A) e H-6(D) em 6,29, 5,99 e 6,67 ppm, respectivamente, que se encontram em campos mais altos que os equivalentes (4→6).<sup>23</sup> A análise das correlações heteronucleares (HMQC e HMBC) confirmou a ligação (4→8) através da correlação (<sup>2</sup>J) entre o hidrogênio 4 do anel C ( $\delta$  4,41 ppm) e o carbono 8 do anel D ( $\delta$  117,26 ppm). Ainda no espectro HMBC observa-se a posição dos hidrogênios H-6(A) e H-8(A) a  $\delta$  6,29 e 5,99 ppm, respectivamente. A posição destes hidrogênios vem sendo sempre determinada para H-6(A) em campos mais altos que H-8(A). No entanto, o espectro HMBC demonstrou que a posição de ambos os hidrogênios ocorre de forma inversa ao descrito na literatura.<sup>23</sup> Esta informação, no entanto, refere-se às substâncias derivatizadas, permanecendo em aberto a determinação para substância não derivatizada. Assim, os hidrogênios 6 e 8 correlacionam-se com os seus respectivos carbonos a  $\delta$  108,81 e 107,43 ppm, e com os carbonos a  $\delta$  111,65 [H-10(A)] e 155,69 [H-9(A)], respectivamente. O espectro de di-croísmo circular mostrou na região de 200 a 300 nm efeito Cotton positivo, confirmando uma ligação beta entre as unidades “superior” e “inferior”. Adicionalmente, o valor obtido de  $[\alpha]_D^{20}$  de +8,0° confirma a configuração absoluta da substância **4a**. O espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-TOF) mostra um íon pseudomolecular [M+Na]<sup>+</sup> com  $m/z$  1021,2373, calculado 1021,2378, o qual está de acordo com a fórmula molecular C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>22</sub> e confirma a substância dimérica natural **4a**. A comparação dos dados espectrais com os da literatura<sup>18,21</sup> confirma a identificação da substância **4** como sendo epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B<sub>1</sub>).

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância **5a** mostrou que todos os hidrogênios alifáticos dos anéis C e F possuem uma constante de acoplamento inferior a 2,0 Hz. Esses dados estabelecem uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*-3,4-*trans* para a unidade “superior” e do tipo 2,3-*cis* para a unidade “inferior”. A ligação (4→8) de proantocianidinas diméricas peracetiladas pode ser observada pela proporção de rotâmeros e pela posição, tanto dos hidrogênios H-2(C)

como pelos deslocamentos dos hidrogênios H-6(A), H-8(A) e H-6(D), que se encontram em campos mais altos que o equivalente (4→6).<sup>23</sup> Além disso, a análise das correlações heteronucleares (HMQC e HMBC) mostrou uma correlação a <sup>2</sup>J entre o hidrogênio 4 do anel C (δ 4,46 ppm) e o carbono 8 do anel D (δ 116,99 ppm). Desta maneira, confirma-se a ligação do tipo (4→8) entre as unidades “superior” e “inferior” da substância **5a**. A posição dos hidrogênios H-6(A) e H-8(A) a δ 6,23 e 5,98 ppm, respectivamente, foi determinada através do espectro HMBC. As posições destes hidrogênios foram determinadas (<sup>2</sup>J) em δ 108,88 e 107,48 ppm, e com os carbonos em (<sup>3</sup>J) a δ 111,81 [H-10(A)] e 155,61 [H-9(A)], respectivamente, contrariando trabalhos publicados anteriormente,<sup>23</sup> e de forma semelhante à substância **4**, a determinação destes hidrogênios com a substância não derivatizada permanece em aberto. O espectro de dicroísmo circular mostrou na região de 220 a 240 nm efeito Cotton positivo, confirmando a ligação “beta” entre as unidades “superior” e “inferior”. O valor obtido de [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> de +3,0° confirma a configuração absoluta da substância **5a**. A substância **5a** apresentou a fórmula molecular C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>22</sub> a partir do HR-ESI-TOF ([M+Na]<sup>+</sup>, m/z encontrado 1021,2373, calculado 1021,2378). A comparação desses dados espectrais com os da literatura,<sup>18,21</sup> aliada aos dados de espectrometria de massas, confirmou a identificação da substância **5** como sendo epicatequina-(4β→8)-epicatequina (prociandina B<sub>2</sub>).

As substâncias **4** e **5**, apesar de já terem sido isoladas de diversas fontes naturais, não foram, até o presente momento, identificadas nas folhas de *M. ilicifolia*. Desta forma, esta informação promoverá avanços nos procedimentos de validação de extratos<sup>10</sup> com possível aplicação na produção de medicamentos fitoterápicos.

Os resultados mostraram que a capacidade antioxidante pelos métodos do radical DPPH e do complexo fosfomolibdênio foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais (Tabela 1). A FAE apresentou alto teor em polifenóis totais e uma correlação direta com a capacidade antioxidante em termos de IC<sub>50</sub> e CAR, quando comparada à vitamina C e ao trolox. Ao contrário desta observação é a correlação com a fase aquosa, que demonstrou uma baixa capacidade antioxidante (IC<sub>50</sub> e CAR) com um baixo teor em polifenóis totais. As substâncias referência (vitamina C e trolox) não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Os métodos utilizados para avaliação do potencial antioxidante do extrato de folhas de *M. ilicifolia* demonstraram resultados concordantes entre si, sendo possível afirmar que a FAE apresenta capacidade antioxidante, significativa para P<0,0001, em com-

**Tabela 1.** Atividade antioxidante de extratos e padrões pela redução do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) e pela formação do complexo fosfomolibdênio (CAR) e o teor de polifenóis totais (PT)

| Amostra    | IC <sub>50</sub> (µg/mL)<br>x̄ ± dp (CV%) | PT<br>x̄ ± dp (CV%)  | CAR<br>x̄ ± dp (CV%)  |
|------------|---|----------------------|-----------------------|
| EB         | 35,34±0,35<br>(0,98)*                     | 26,24±0,48<br>(1,83) | 0,30±0,09<br>(2,93)   |
| FAQ        | 47,31±0,19<br>(0,40)*                     | 12,85±0,65<br>(5,06) | 0,15±0,01<br>(4,95)   |
| FAE        | 25,39±1,04<br>(4,07)*                     | 78,12±1,84<br>(2,36) | 0,70±0,03**<br>(4,40) |
| Vitamina C | 7,18±0,26 (3,56)                          |                      | 1,00**                |
| Trolox     | 7,52±0,12 (1,62)                          |                      |                       |

\*ANOVA, estatisticamente significativa P<0,0001; \*\*ANOVA, estatisticamente significativa P<0,01; PT= polifenóis totais; CAR=capacidade antioxidante relativa; EB=extrato bruto; FAQ=fração aquosa; FAE=fração acetato de etila

paração aos EB e FAQ, devido, possivelmente, ao conteúdo em substâncias polifenólicas. A capacidade antioxidante relativa ou total da FAE foi estatisticamente comparável à vitamina C, o que denota o potencial desta fração, provavelmente pela presença dos taninos condensados.

As substâncias isoladas da FAE das folhas de *M. ilicifolia* foram avaliadas frente ao método do radical DPPH. Os valores obtidos pelo método em IC<sub>50</sub> (µM) para as substâncias isoladas catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina-(4β→8)-catequina (PB<sub>1</sub>) e epicatequina-(4β→8)-epicatequina (PB<sub>2</sub>) foram [x̄ ± dp (CV%)], respectivamente: 9,95 ± 0,87 (8,74), 9,12 ± 0,24 (2,63), 8,91 ± 0,73 (8,19), 3,30 ± 0,32 (9,70) e 3,56 ± 0,12 (3,37). Estes dados demonstram que quanto maior o número de hidroxilas fenólicas presentes na substância, maior é a capacidade de seqüestro de radicais livres, como observado, principalmente, com as substâncias diméricas. Adicionalmente, a estereoquímica das substâncias catequina (2R,3S) em relação à epicatequina e epigalocatequina (2R,3R) reflete uma diferença na capacidade de seqüestro de radicais livres. Os dados confirmam, ainda, que as substâncias com grupos do tipo pirogalol (triidroxilado, anel B) possuem maior atividade que as substâncias com grupos do tipo catecol (diidroxilado), confirmando dados anteriormente publicados.<sup>24</sup>

Assim, é possível estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante de extratos vegetais e a atividade de seqüestro de radicais livres de substâncias isoladas de espécies vegetais contendo taninos, demonstrando a eficiência destas substâncias na captura destes radicais.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa de Iniciação Científica. Ao técnico A. Arantes pela assistência técnica e a C. R. Novello pelo apoio nas técnicas de atividade antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- Nascimento, V. T.; Lacerda, E. U.; Melo, J. G.; Lima, C. S. A.; Amorim, E. L. C.; Albuquerque, U. P.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2005**, *7*, 56.
- Cordeiro, P. J. M.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 523; Zhu, N.; Sharapin, N.; Zhang, J.; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 265.
- Leite, J. P. V.; Jorge, R. M.; Oliveira, A. B.; Tagliati, C. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 93.
- Souza-Formigoni, M. L. O.; Oliveira, M. G. M.; Monteiro, M. G.; Silveira-Filho, N. G.; Braz, S.; Carlini, E. A.; *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *34*, 21; Fonseca, A. P. N. D.; Silva, G. D. F.; Carvalho, J. J.; Del Carmen, G.; Salazar, M.; Duarte, L. P.; Silva, R. P.; Jorge, R. M.; Tagliati, C. A.; Zani, C. L.; Alves, T. M. A.; Peres, V.; Vieira Filho, S. A.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 842; Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Otofujii, G. M.; Cipriani, T. R.; Souza, L. M.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Marques, M. C. A.; Mesia-Vela, S.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 433; Andrade, S. F.; Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Cechinel Filho, V.; Niero, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 252.
- Dias, K. S.; Marques, M. S.; Menezes, I. A. C.; Santos, T. C.; Silva, A. B. L.; Estevam, C. S.; Sant'Ana, A. E. G.; Pizza, C.; Antonioli, A. R.; Marçal, R. M.; *Fitoterapia* **2007**, *78*, 460.
- Costa, P. M.; Ferreira, P. M. P.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Santos, V. A. F. F. M.; Corsino, J.; Moraes, M. O.; Costa-Lotuf, L. V.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C.; *Toxicol. in Vitro* **2008**, *22*, 854.
- Kasse, C. A.; Cruz, O. L. M.; Iha, L. C. N.; Antunes, M. L.; *Resumos do Annual Meeting of American Academy of Otolaryngology Head Neck Surgery*, Toronto, Canadá, 2006.

8. Cipriani, T. R.; Mellinger, C. G.; Souza, L. M.; Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; Marques, M. C. A.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1018.
9. Oliveira, D. M.; Silva, G. D. F.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 661; Tiberti L. A.; Yariwake, J. H.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *846*, 378.
10. Soares, L. A. L.; Oliveira, A. L.; Ortega, G. G.; Petrovick, P. R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 787; Cordeiro, D. S., Oliveira, W. P.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *299*, 115; Cordeiro, D. S.; Raghavan, G. S. V.; Oliveira, W. P.; *Biosyst. Eng.* **2006**, *94*, 221.
11. Carlini, E. A.; Braz, S. Em *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: Maytenus ilicifolia, "espinheira-santa" e outras*; Carlini, E. L. A., ed.; CEME/AFIP: Brasília, 1988.
12. Camparoto, M. L.; Teixeira, R. O.; Mantovani, M. S.; Vicentini, V. E. P.; *Genet. Mol. Biol.* **2002**, *25*, 85.
13. Oliveira, M. G. M.; Monteiro, M. G.; Macaúbas, C.; Barbosa, V. P.; Carlini, E. A.; *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *34*, 29.
14. Carlini, E. A.; Frochten-Garten, M. L. Em *Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (Maytenus ilicifolia)*; Carlini, E. L. A., ed.; CEME/AFIP: Brasília, 1988.
15. Haslam, E.; *Practical Polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action*, Cambridge University Press: Cambridge, 1998; Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Cross, C. E.; *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598.
16. Mello, J. C. P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A.; *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1105.
17. Glasl, H.; *Deutsch. Apoth. Ztg.* **1983**, *123*, 1979.
18. Yamaguti-Sasaki, E.; Ito, L. A.; Canteli, V. C. D.; Ushirobira, T. M. A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Mello, J. C. P.; *Molecules* **2007**, *12*, 1950.
19. Amarowicz, R.; Pegg, R. B.; Rahimi-Morghaddam, P.; Barl, B.; Weil, J. A.; *Food Chem.* **2004**, *84*, 551; Hatano, T.; Edamatsu, R.; Hiramatsu, M.; Mori, A.; Fujita, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, T.; Okuda, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2016.
20. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M.; *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 337; Hirata, L. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2004.
21. Ushirobira, T. M. A.; Yamaguti, E.; Uemura, L. M.; Nakamura, C. V.; Dias Filho, B. P.; Mello, J. C. P.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, *26*, 5.
22. Weinges, K.; Bähr, W.; Ebert, W.; Göritz, K.; Marx, H. D.; *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1969**, *27*, 157.
23. Petereit, F.; Kolodziej, H.; Nahrstedt, A.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 981; Hemingway, R. W.; Foo, L. Y.; Porter, L. J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 1209; Kolodziej, H.; *Farmaceut. Tijdschr. Belg.* **1989**, *66e*, 44; Mello, J. P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 807; Kolodziej, H. Em *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*; Hemingway, R. W.; Laks, P. E., eds.; Plenum Press: New York, 1992; Hör, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M.; *Planta Med.* **1995**, *61*, 208.
24. Van Acker, S. A. B. E.; Van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A.; *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 331.