



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**ESTUDOS DE CONTROLE DE QUALIDADE E
FITOQUÍMICA DE EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS DE
SEMENTES DE *Paullinia cupana* KUNTH E SUA ATIVIDADE
SOBRE *Helicobacter pylori***

BRUNA APARECIDA ALVES AGUIAR

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maringá, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**ESTUDOS DE CONTROLE DE QUALIDADE E
FITOQUÍMICA DE EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS DE
SEMENTES DE *Paullinia cupana* KUNTH E SUA ATIVIDADE
SOBRE *Helicobacter pylori***

BRUNA APARECIDA ALVES AGUIAR

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maringá, 2015

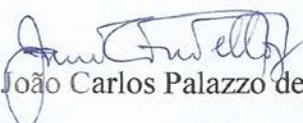
BRUNA APARECIDA ALVES AGUIAR

**ESTUDOS DE CONTROLE DE QUALIDADE E FITOQUÍMICA DE
EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDAS DE SEMENTES DE *PAULLINIA
CUPANA* KUNTH E SUA ATIVIDADE SOBRE
*HELICOBACTER PYLORI***

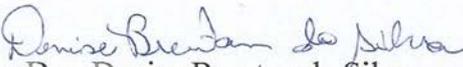
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24 de abril de 2015

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello


Dr. Cleyton Eduardo Mendes de Toledo


Dra. Denise Brentan da Silva

Aos meus pais, Paulo e Maria Aparecida

À minha irmã, Maria Fernanda

Ao meu namorado, Rodrigo

Agradecimentos

A Deus, por tudo. A Nossa Senhora, pela sua intercessão em todos os momentos.

Aos meus pais Paulo e Maria Aparecida, pelo amor, incentivo, confiança e apoio.

A minha irmã Maria Fernanda, pelo companheirismo, parceria, amizade, incentivo e apoio.

Ao meu namorado Rodrigo, pela força, apoio na fase final do trabalho e todo amor e carinho.

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

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

A todos os servidores da Universidade, em especial Admir, Helena, Rose, Marli, Carlos e todos os professores, técnicos, auxiliares, secretários que me ajudaram de alguma forma para a execução do presente trabalho.

Aos colegas de laboratórios parceiros, Angelo, Gean, Ivania e Denise, que ajudaram na execução de alguns experimentos.

A todos os meus colegas de trabalho do laboratório Palafito, Letícia, André, Leila, Tânia, Fernanda, Mariane, Marcelo, Ana Luiza, Andressa, Renata, Gisely, Maísa, Lorena, pelo apoio, ajudas, dicas, compartilhamento de conhecimentos e experiências.

Aos estagiários do laboratório Palafito, Felipe, Raquel, Naiara, Tiago que direta ou indiretamente tanto contribuíram para a execução do presente trabalho.

A todos os meus colegas da pós-graduação e graduação, Sabrina, Priscila, Edilainy, Cristina, Carolina, Lizziane, Jaqueline, pelo auxílio, dicas, conhecimentos, apoio, incentivo e amizade.

A todas as pessoas envolvidas no presente trabalho direta e indiretamente, pela contribuição de cada um.

A Capes e ao CNPq pelo suporte financeiro.

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

A Nossa Senhora

Cubra-me com seu manto de amor
Guarda-me na paz desse olhar
Cura-me as feridas e a dor me faz suportar

Que as pedras do meu caminho
Meus pés suportem pisar
Mesmo ferido de espinhos me ajude a passar

Se ficaram mágoas em mim
Mãe tira do meu coração
E aqueles que eu fiz sofrer, peço perdão

Se eu curvar meu corpo na dor
Me alivia o peso da cruz
Interceda por mim minha Mãe, junto a Jesus...

Sempre que o meu pranto rolar
Ponha sobre mim suas mãos
Aumenta minha fé e acalma o meu coração

Grande é a procissão a pedir
A misericórdia, o perdão
A cura do corpo e pra alma, a salvação

Pobres pecadores, oh Mãe
Tão necessitados de Vós
Santa Mãe de Deus, tem piedade de nós

De joelhos aos Vossos pés
Estendei a nós Vossas mãos
Rogai por todos, nós Vossos filhos, meus irmãos

Nossa Senhora, me dê a mão
Cuida do meu coração
Da minha vida, do meu destino
Do meu caminho
Cuida de mim

Roberto Carlos / Erasmo Carlos

Este trabalho foi realizado no laboratório Palafito – Laboratório de Biologia Farmacêutica, bloco K80, salas 13 e 14; no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, bloco I90, sala 123, bloco B08; Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) na Central de Produtos Naturais (CPN).

Partes deste trabalho foram apresentados nos congressos:

5º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul e 5º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul - Aguiar B.A.A., Panizzon G.P., Bueno, F.G., Krzyzaniak, L.M., Klein, T., Longhini R., Mello J.C.P., 2013. Análises químicas preliminares de fração semipurificada aquosa de extrato de guaraná. 5º COSIMP Congresso. Cascavel, Brasil.

14th International Congress of Ethnopharmacology ISE 2014 Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica SLF - Aguiar B.A.A., Fernandes F.R., Panizzon G.P., Marques L.L.M., Longhini R., Mello J.C.P., 2014. Quality Control of Seeds of guaraná by pharmacopoeia methods and chemical profile analysis by HPLC-DAD. 14th ISE International Congress. Puerto Varas, Chile.

BIOGRAFIA



Bruna Aparecida Alves Aguiar nasceu em Loanda, no dia 26 de agosto de 1989, residindo em Santa Cruz de Monte Castelo desde o nascimento até o ingresso na faculdade. Em 2006, finalizou o ensino médio no Colégio Loanda e em 2007 iniciou o curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá. Neste período participou do Grupo PET-Farmácia, participou de projeto de ensino na Secretaria Municipal de Saúde de Maringá e concluiu a graduação em 2011. Em 2013, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

AGUIAR, B.A.A., 2015, Estudos de controle de qualidade e fitoquímica de extrato e frações obtidas de sementes de *Paullinia cupana* Kunth e sua atividade sobre *Helicobacter pylori*, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 66p.

Paullinia cupana Kunth, conhecida por guaraná, é uma planta brasileira nativa da Amazônia, sendo suas sementes de ampla utilização no mercado alimentício e farmacêutico. Diversas atividades biológicas têm sido descritas na literatura pelo uso de extratos brutos e suas frações semipurificadas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade de dois diferentes lotes da planta, caracterizar quimicamente a fração semipurificada aquosa (FAQ) e avaliar a atividade do extrato bruto e frações semipurificadas sobre a bactéria *Helicobacter pylori*. A partir do extrato bruto de *P. cupana* (EBPC) prepararam-se as frações semipurificadas por partição com acetato de etila (EPA) e água (FAQ). Para o controle de qualidade, dos dois lotes de sementes, foram realizadas análises físico-químicas farmacopeicas da droga vegetal e análise do perfil químico via CLAE-DAD na fração EPA. Para análise do perfil químico da FAQ, foram realizados RMN ¹³C de sólidos e EM via infusão direta. Os resultados das análises físico-químicas para os lotes 1 e 2 foram, respectivamente: 32,75% e 29,71% em teor de extrativos; 1,87% e 1,42% de cinzas totais; 8,84% e 9,94% na perda por dessecação; 6,37% e 5,13% no doseamento de metilxantinas, e 9,62% e 9,25% no teor em polifenóis totais e a análise por CLAE-DAD mostrou semelhança no perfil químico dos lotes. O espectro de RMN ¹³C, no estado sólido, apresentou características de flavan-3-ol com sinais correspondentes às duas regiões fenólicas (anéis A e B); à ligação interflavonoides, características estas que sugerem a presença de taninos condensados (proantocianidinas). O espectro de massas demonstrou a presença de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros de procianidinas, além da presença de ácido cafeico e derivados. A avaliação biológica demonstrou que o extrato e frações não possuem forte atividade sobre *Helicobacter pylori*, mas uma atividade bacteriostática. Os resultados demonstram a qualidade e características do material vegetal utilizado no estudo e a presença de taninos condensados e ácido cafeico na FAQ do extrato de guaraná.

Palavras-chaves: *Paullinia cupana*, ensaios farmacopeicos, proantocianidinas, ácido cafeico, *Helicobacter pylori*.

AGUIAR, B.A.A., 2015, Quality control and phytochemical evaluation of extract and fractions obtained from *Paullinia cupana* Kunth seeds and its activity against *Helicobacter pylori*, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 66p.

Paullinia cupana Kunth, known as guarana, is a native Brazilian plant from the Amazon, and its seeds have wide use in the food and pharmaceutical market. Several biological activities have been described in the literature by using crude extracts and their semi-purified fractions. The objective of this study was to evaluate the quality of two different lots of the plant, chemically characterize the aqueous semipurified fraction (FAQ), and assess the activity of the crude extract and semipurified fractions against *Helicobacter pylori*. From the crude extract of *P. cupana* (EBPC) yielded the semipurified fractions in ethyl acetate (EPA) and water (FAQ). For quality control, of the two lots, pharmacopoeic analyses were made in plant drugs and analysis of chemical profile via HPLC-DAD was made in the EPA fraction. The chemical profile of the FAQ were performed by using ^{13}C NMR and MS by direct infusion. The results of physico-chemical analyses for lots 1 and 2 were, respectively, 32.75% and 29.71% in extractives content; 1.87% and 1.42% of total ash; 8.84% and 9.94% loss on drying; 6.37% and 5.13% in the determination of methylxanthines, and 9.62% to 9.25% in total polyphenol content, and by HPLC-DAD showed similarity in the chemical profile of two lots. The solid ^{13}C NMR spectrum showed characteristics of flavan-3-ol as signals corresponding to the two phenolic regions (rings A and B); bond of interflavonoids, these characteristics suggest the presence of condensed tannins (proanthocyanidins). The mass spectrum showed the presence of monomers, dimers, trimers and tetramers of procyanidins, and the presence of caffeic acid and derivatives. The biological evaluation showed that the extract and fractions do not have strong activity against *Helicobacter pylori*, but a bacteriostatic activity. The results demonstrate the quality and characteristics of the plant material used in the study and the presence of condensed tannins and caffeic acid in the FAQ guarana.

Keywords: *Paullinia cupana*, pharmacopoeial assays, proanthocyanidins, caffeic acid, *Helicobacter pylori*.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Frutos e Sementes de Guaraná <i>in natura</i> e secas em tacho de ferro	24
Figura 2 -	Pastas de guaraná moldadas em diferentes formas e em formato cilíndrico e osso de pirarucu. Fonte: Yamaguti-Sasaki (2006)	25
Figura 3 -	Monômeros de flavan-3-óis catequina e epicatequina	26
Figura 4 -	Procianidinas isoladas de <i>P. cupana</i>	27
Figura 5 -	I – Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II – Teofilina (1,3-dimetilxantina); III – Teobromina (3,7-dimetilxantina)	31
Figura 6 -	Estrutura básica dos flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis	31
Figura 7 -	Curva de calibração da catequina	48
Figura 8 -	Curva de calibração da epicatequina	48
Figura 9 -	Curva de calibração da cafeína	49
Figura 10 -	Cromatogramas das soluções extrativas dos Lote 1 e Lote 2. Catequina (1), Epicatequina (2), Cafeína (3)	50
Figura 11 -	Escolha da faixa de trabalho	51
Figura 12 -	IC ₅₀ para capacidade antioxidante frente ao DPPH	52
Figura 13 -	Estrutura básica do flavan-3-ol	53
Figura 14 -	RMN ¹³ C de sólidos da fração semipurificada aquosa de guaraná.	54
Figura 15 -	Espectro de massas de varredura no modo negativo da fração semipurificada aquosa	55
Figura 16 -	Espectro de fragmentação do pico <i>m/z</i> 179.....	56
Figura 17 -	Estrutura molecular do ácido cafeico	56
Figura 18 -	Estrutura molecular do ácido cafeico ligado à uma hexose	56
Figura 19 -	Espectro de fragmentação do pico <i>m/z</i> 341	57

Figura 20 -	Espectro de fragmentação do pico m/z 289	58
Figura 21 -	Espectro de fragmentação do pico m/z 577	58
Figura 22 -	Espectro de fragmentação do pico m/z 865	59
Figura 23 -	Espectro de fragmentação do pico m/z 1154	59
Figura 24 -	Curva de crescimento de <i>H. pylori</i> incubado em diferentes concentrações de EB, FAE e FAQ de Guaraná	61

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1 -	Controle de Qualidade por métodos farmacopeicos	47
Tabela 2 -	Dados da regressão para o cálculo dos teores de catequina, epicatequina, e cafeína	49
Tabela 3 -	Quantificação de catequina, epicatequina e cafeína	50
Tabela 4 -	Capacidade antioxidante frente ao DPPH	52
Tabela 5 -	Concentração inibitória mínima de frações de guaraná frente <i>H. pylori</i>	60

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC	Cinzas Totais
BHI	Caldo Infuso de Cérebro e Coração
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2 – difenil–1–picril–hidrazila
EB	Extrato Bruto
EC	Teor de Extrativos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESI-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
ETM	Teste do Labirinto do T Elevado
FAE	Fração Acetato de Etila
FAQ	Fração Aquosa
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% de uma dada atividade
LD	Perda por Dessecação
MX	Metilxantinas
mM	Milimolar
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso/volume

RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
SD	Desvio Padrão
TP	Polifenóis Totais
TT	Taninos Totais
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	22
2.1.1 Família Sapindaceae.....	22
2.1.2 Gênero <i>Paullinia</i>	23
2.1.3 <i>Paullinia cupana</i> Kunth.....	23
2.2.1 Metilxantinas.....	30
2.2.2 Taninos Condensados.....	31
2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	33
2.3.1 <i>Helicobacter pylori</i>	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 MATERIAIS.....	35
4.1.1 Solventes e Reagentes.....	35
4.1.2 Equipamentos.....	36
4.1.3 Matéria-prima Vegetal.....	36
4.2 MÉTODOS.....	37
4.2.1 Controle de Qualidade.....	37
4.2.1.1 Perda por Dessecação.....	37
4.2.1.2 Teor de Extrativos.....	37
4.2.1.3 Teor de Cinzas Totais.....	37
4.2.1.4 Teor de Polifenóis Totais.....	38
4.2.1.5 Teor de Metilxantinas.....	38
4.2.1.6 Avaliação do Perfil Químico do Lote via CLAE.....	39
4.2.1.6.1 Revalidação da metodologia de doseamento via CLAE.....	39
4.2.1.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	40
4.2.1.8 Análise Granulométrica.....	41
4.2.2 Preparo da Fração.....	41
4.2.3 Avaliação química.....	42

4.2.3.1 Análise por RMN ¹³ C no estado sólido da fração semipurificada aquosa de <i>P. cupana</i>	42
4.2.3.2 Espectrometria de massas por infusão direta (ESI-MS)	42
4.2.4 Avaliação frente à bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	43
4.2.4.1 Susceptibilidade quantitativa por microdiluição.....	43
4.2.4.2 Avaliação do crescimento microbiano por turbidimetria	44
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	45
5.1 Controle de Qualidade	45
5.1.1 Perda por Dessecação	45
5.1.2 Teor de Extrativos	45
5.1.3 Teor de Cinzas Totais.....	46
5.1.4 Teor de Polifenóis Totais.....	46
5.1.5 Teor de Metilxantinas.....	46
5.1.6 Avaliação do Perfil Químico do Lote via HPLC	47
5.1.6.1 Revalidação da metodologia de doseamento via HPLC.....	47
5.1.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	51
5.1.8 Análise Granulométrica	52
5.2 Preparo da Fração.....	52
5.3 Avaliação química.....	53
5.3.1 Análise por RMN ¹³ C no estado sólido da fração semipurificada aquosa de <i>P. cupana</i>	53
5.3.2 Espectrometria de massas por infusão direta (MS)	54
5.4 Avaliação biológica - <i>Helicobacter pylori</i>	60
5.4.1 Susceptibilidade quantitativa por microdiluição	60
5.4.2 Avaliação do crescimento microbiano por turbidimetria.....	61
6 CONCLUSÃO	62

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas pelo homem como fonte de alimentos, vestimentas, habitação, utilidades domésticas, manifestação artística e cultural, entre outras, desde o início da sociedade. A busca por tratamento de enfermidades com o uso de plantas, inicialmente, se deu de forma empírica, onde as espécies eram escolhidas pela semelhança do formato de suas folhas ou frutos com as partes do corpo doentes. Os conhecimentos adquiridos foram repassados de geração em geração, sendo registrados por inúmeras civilizações antigas, como o famoso Papiro de Ebers, considerado o mais extenso e famoso documento sobre práticas medicinais ancestrais (aproximadamente 1.500 a.C.), o qual possui relatos do uso de plantas para o tratamento de enfermidades. O primeiro compêndio europeu de plantas medicinais data do século I d.C. e foi escrito pelo médico grego Dioscórides. As monografias desses compêndios eram baseadas nas ilustrações das plantas em questão, suas nomenclaturas e indicações (Bryan, 1930, Schulz et al., 2002, Cunha et al., 2003, Simões et al., 2004).

Até o século XIX a medicina tradicional pautada no uso de plantas era predominante. Com o início do isolamento de substâncias e da síntese química houve uma drástica diminuição do uso de plantas e seus extratos, sendo então, seu uso considerado como uma modalidade alternativa. O uso de medicamentos sintéticos ou substâncias isoladas passaram a ser os principais arsenais terapêuticos, visto a revolução científica e tecnológica ocorrida no período (Shulz et al., 2002, Cunha et al., 2003, Simões et al., 2004).

Com o desenvolvimento da ciência a partir do século XIX, as plantas têm sido objeto de estudo para a elucidação de novas moléculas bioativas, para que possam se tornar novos medicamentos, mais eficazes e potentes que os atualmente disponíveis. Uma numerosa parcela dos medicamentos utilizados pela medicina é derivada de plantas (Shulz et al., 2002).

O estudo de plantas com a finalidade de isolamento de substâncias, elucidação estrutural e modificação e/ou síntese dessas moléculas, mantêm-se de grande interesse pela comunidade científica, pois continua sendo uma tarefa desafiadora. Além do fato da riqueza de moléculas, a diversidade química encontrada em produtos naturais é muito maior que a biblioteca de substâncias sintéticas atualmente disponível (Bucar et al., 2013).

O Brasil é o país com a mais abundante maior biodiversidade do planeta, onde estão presentes espécies nativas de plantas medicinais, as quais são matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos, além de serem objeto de estudo para a descoberta de novos fármacos em potencial.

A riqueza biológica brasileira associada à sua sócio diversidade social, à qual que envolve vários povos e comunidades, com visões, saberes e práticas culturais próprias, torna-se ainda mais importante. Pois, com seu vasto patrimônio genético e sua diversidade cultural, o Brasil, tem a oportunidade de estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e autônomo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, que prime pelo uso sustentável da biodiversidade e respeite princípios éticos (Brasil, 2009). Considerando a relação da riqueza biológica e do conhecimento popular tem-se no Brasil um grande potencial do surgimento de novos medicamentos. Hoje, existem estudos comparativos demonstrando que pesquisas pautadas em espécies usadas com base no conhecimento popular, indicativas de espécies que contém substâncias bioativas, são mais bem sucedidas do que as pautadas em espécies escolhidas ao acaso (Simões et al., 2004).

Assim o estudo de espécies da biodiversidade brasileira torna-se importante para o estabelecimento de projetos cooperativos entre os diversos setores envolvidos na cadeia de produção do setor de plantas medicinais, medicamentos fitoterápicos e indústria farmacêutica no geral, indústria alimentícia e cosmética, pois favorece o desenvolvimento de tecnologias apropriadas que incentivem pequenos empreendimentos, como a agricultura familiar e o uso sustentável da biodiversidade nacional. Na questão do uso terapêutico das plantas, esses saberes e práticas estão intrinsecamente relacionados aos territórios e seus recursos naturais, como parte integrante da reprodução sociocultural e econômica desses povos e comunidades. A expectativa é de que esta ação intensifique o investimento em pesquisa de espécies nativas da flora brasileira e desenvolvimento por parte do setor privado, viabilizando alavancar esta cadeia produtiva (Brasil, 2009).

Considerando o guaraná, uma espécie tipicamente brasileira, e os inúmeros relatos de seu uso pelas populações nativas, as pesquisas científicas que explorem seu potencial farmacológico são promissoras.

A partir de todo este contexto, o presente trabalho visou o estudo químico da fração aquosa de extrato de guaraná obtido pelo processo de extração descrito na Patente PI0006638-9 . A necessidade de estudos químicos da fração aquosa do extrato do guaraná é crescente pelos trabalhos realizados envolvendo atividades biológicas do mesmo, com isso a investigação de uma provável ação frente à bactéria *Helicobacter pylori* também foi realizada devido a potencialidade da natureza das substâncias a serem pesquisadas neste tipo de extrato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Sapindaceae

A família Sapindaceae está distribuída em quatro subfamílias, Dodonaeoideae, Hippocastanoideae, Sapindoideae e Xanthoceroideae (Buerki et al., 2010). Compreende cerca de 141 gêneros e 1900 espécies, sendo a maioria encontradas em zonas tropicais ou subtropicais e alguns gêneros em zonas sub-temperadas (Acevedo-Rodríguez et al., 2011). No Brasil essa família é representada por 27 gêneros e 419 espécies (Somner et al., 2013). Dentro da subfamília Sapindoideae a tribo Paullinieae, composta pelos gêneros *Cardiospermum*, *Houssayanthus*, *Lophostigma*, *Paullinia*, *Serjania*, *Urvillea* e *Thinouia*, responde por cerca de 60% das espécies Sapindaceae na região neotropical (Acevedo-Rodríguez et al., 2011).

A grande maioria das espécies dessa família é nativa da Ásia, mas também estão presentes na América do Sul, África e Austrália. Muitas destas espécies são economicamente importantes, como pode-se citar o guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), longan (*Dimocarpus longan* Lour.), pitomba (*Talisia esculenta* Radlk.) e rambutan (*Nephelium lappaceum* Poir.) (Menzel, 2003, Herculando e Matos, 2008, Buerki et al., 2009).

A maioria dos gêneros de Sapindaceae são predominantemente árvores emergentes de tamanho médio a grande ou arbustos eretos. Arvoretas, cipós, e subarbustos são restritas aos trópicos. Há cerca de 500 espécies de lianas, as quais são exclusivas à região neotropical (Acevedo-Rodríguez et al., 2011). Nesta família a maioria das trepadeiras possuem gavinhas, com caule de crescimento em espessura anômalo, os arbustos e mesmo árvores possuem folhas alternas, compostas, sem estípulas, ou às vezes inteiras (Schulz, 1968). As flores são pequenas, em geral branco-esverdeadas, não vistosas, reunidas em inflorescências paniculadas axilares ou terminais. São hermafroditas ou de sexo separado, às vezes com os 3 tipos de flores na mesma inflorescência (poligamia), cíclicas, em geral de simetria zigomorfa, diclamídeas. Suas sépalas e pétalas são pentâmeras ou em número menor. Androceu formado em geral por oito estames. Ovário superior, tricarpelar e trilocular, cada lóculo com um só óvulo. Fruto seco indeiscente, de pericarpo de consistência cartilaginosa ou esquizocarpo, com frutículos samaróides, sempre com sementes no ápice e suas sementes às vezes apresentam arilo (Joly, 2002).

2.1.2 Gênero *Paullinia*

O gênero *Paullinia* L. pertence à família Sapindaceae, subfamília Sapindoideae, tribo Paullinieae Kunth ex DC. (1824) é constituído por aproximadamente 190 espécies nativas da região neotropical e caracterizam-se por serem trepadeiras lenhosas (Acevedo-Rodríguez et al., 2011).

Certas espécies de *Paullinia* são venenosas, podendo inclusive envenenar o mel produzido por abelhas, ou serem utilizadas no envenenamento de flechas pelos índios, como também na pescaria mergulhando-se as plantas com raízes na água (timbó) (Joly, 2002). Numerosas espécies de *Paullinia* têm sido relatadas como sendo úteis na preparação de medicamentos e bebidas ricas em cafeína (Acevedo-Rodríguez et al., 2011).

Segundo levantamento bibliográfico realizado por Antonelli-Ushirobira (2003) muitas espécies são citadas por terem propriedades medicinais, como, *P. barbadensis* Jacq., *P. costaricensis* Radlk., *P. cupana* Kunth, *P. emetica* R.E. Schult., *P. fuscescens* Kunth, *P. imberbis* Radlk., *P. meliifolia* Juss., *P. pinnata* L., *P. pterophylla* Triana & Planch., *P. tomentosa* Jacq., *P. trigonia* Vell. e *P. yoco* R.E. Schult. & Killip. Ainda segundo o levantamento, a utilização dessas espécies pelo uso popular se dá no tratamento de nevralgias, dores de cabeça, doenças mentais, diarreia, tensão pré-menstrual, dores pós-parto, arteriosclerose, reumatismo e também há relatos como contraceptivos. Já as espécies *P. cupana*, *P. yoco* e *P. pterophylla* são utilizadas na preparação de bebidas estimulantes e para *P. cupana* e *P. pinnata* são atribuídas propriedades especiais de magia e encantamento.

2.1.3 *Paullinia cupana* Kunth

Paullinia cupana Kunth é uma planta brasileira originária da região central da Amazônia. Conhecida popularmente como guaraná e pelos índios como “uaraná” é a espécie de maior importância econômica do gênero *Paullinia*, com utilização ampla e difusa, destacando-se como uma das plantas medicinais mais usadas na Amazônia brasileira, com seus efeitos estimulantes já conhecidos na Europa desde os tempos da colônia. A primeira descrição datada do guaraná se deu em 1669, pela observação do jesuíta João Felipe Betendorf, que os índios, na Amazônia, consumiam uma bebida feita de guaraná com propriedades diuréticas, ação contra dores de cabeça, febres e câimbras. Na metade do século 18, a atividade antidiarreica passou a ser explorada. A partir daí, muitas características desta planta passaram a ser exploradas e pesquisas em torno da constituição química ganharam espaço (Henman, 1982, Polo, 2006).

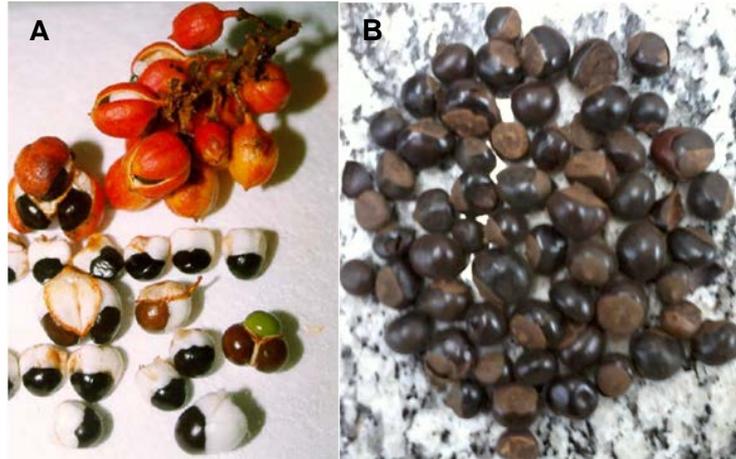


Figura 1 – Frutos (A) e Sementes (B) de Guaraná *in natura* e secas em tacho de ferro.

O arbusto de *Paullinia cupana* é de pequeno porte, com casca escura. Possui ramos tirsoides pilosos na extremidade e glabros na base de 4 a 8 mm de diâmetro. As folhas são compostas penadas em disposição dística com 5 folíolos, pecíolo comum, e medem de 7 a 15 cm de comprimento, nu e glabro, estípulas de 2 a 3 mm de comprimento. Quanto às flores estas são grandes, polígamas, zigomorfas, com simetria oblíqua, aromáticas e dispostas em cachos, possuem sépalas submembranosas de cerca de 3 mm e pétalas oblongas de 3 a 5 mm. Seus frutos (Figura 1) são globosos e brilhantes em forma de cápsulas elipsoides ou esféricas, apiculadas, com coloração vermelha na parte superior e amarela na inferior de 2 a 3 cm. Possuem uma ou duas sementes ovoides, com aproximadamente 12 mm de comprimento, possui arilo abundante antes da maturação, testa amarelo-claro ou preta, o embrião não possui albúmen, é curvo e contém cotilédones carnosos, firmes, plano-convexos (Menezes Júnior, 1942, Corrêa et al., 1984, Polo, 2006).

Os índios Maués costumam preparar uma pasta com as sementes de guaraná, com intuito de conservação do produto, para poder utilizá-lo a qualquer época. A pasta é preparada a partir da privação dos frutos maduros de suas partes moles (exocarpo, mesocarpo e arilo), dispostos em pequenas camadas e em local limpo, para secagem rápida e livre de fermentação. Em forno apropriado, as sementes são torradas em calor regular, sendo frequentemente remexidas, para que o aquecimento ocorra uniformemente. Depois de torradas, as sementes são transferidas para um saco e são vigorosamente batidas, para a separação do tegumento. Depois da limpeza das mesmas, são transferidas para um pilão de madeira, previamente aquecido, e trituradas a pó fino. Adiciona-se água para a formação da pasta, a qual é moldada em cilindros, pães ou formas variadas (Figura 2). Com o tempo essa pasta torna-se rígida, e para utilizá-la é necessária a raspagem com o auxílio do osso hioide do pirarucu, um peixe amazônico (Figura 2). Essa pasta pode ser encontrada no

comércio, adicionada de cacau, farinha de mandioca ou cascas de quina, com o objetivo de aumentar a consistência da massa ou o amargor peculiar (Corrêa et al., 1984).

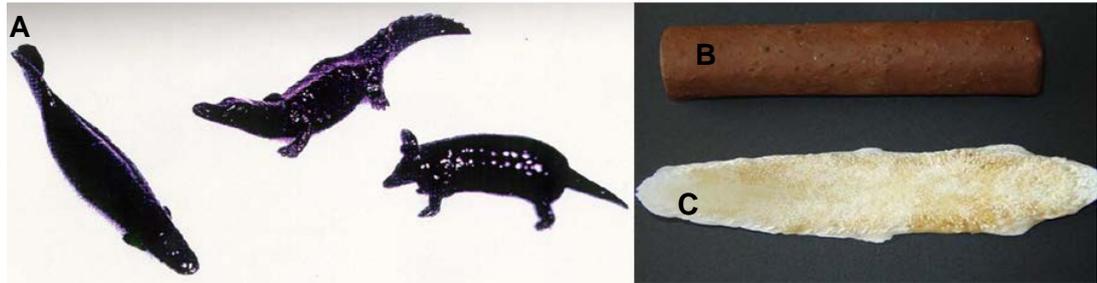


Figura 2 – Pastas de guaraná moldadas em diferentes formas,(A) e em formato cilíndrico (B) e osso de pirarucu (C).

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

Devido o grande interesse pelo guaraná tanto pelas indústrias alimentícia e cosmética, quanto pela farmacêutica, inúmeros estudos fitoquímicos e farmacológicos tem sido realizados com guaraná. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis, especialmente taninos (Yamaguti-Sasaki et al., 2007). Os principais constituintes químicos das sementes de guaraná, elegidos como os principais responsáveis pelas atividades biológicas e suas diversas formas de uso, são os taninos e as metilxantinas. Sementes de guaraná de diferentes lugares foram analisadas quanto ao teor de taninos totais (TT) e metilxantinas (MX). As sementes foram provenientes do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta (AMO1), e do Amazonas, de Maués (AMO2). O teor de taninos totais encontrado para AMO1 foi de $5,92 \pm 0,24\%$ e para AMO2 foi de $4,14 \pm 0,25\%$. No doseamento de metilxantinas obteve-se para AMO1 valor de $6,07 \pm 0,07\%$, enquanto que AMO2 apresentou um valor superior de $7,78 \pm 0,11\%$ (Antonelli-Ushirobira et al., 2004).

Amostras de sementes de guaraná provenientes da região amazônica e secas por diferentes métodos foram avaliadas. Através do doseamento por métodos espectrofotométricos, o maior teor de MX foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 h com adição de água, enquanto que o maior teor de TT foi obtido com a amostra torrada em tacho metálico por 4 h sem água (Antonelli-Ushirobira et al., 2004).

Posteriormente, estudos fitoquímicos da fração semipurificada acetato de etila de guaraná mostraram a presença de monômeros de flavan-3 óis (Figura 3), como a

epicatequina, catequina, *ent*-epicatequina (Figura 3), cafeína e procianidinas B1, B2, B3, B4, A2 e C1 (Figura 4) (Antonelli-Ushirobira et al., 2007, Yamaguti-Sasaki et al., 2007, Ito, 2011, Klein et al., 2012).

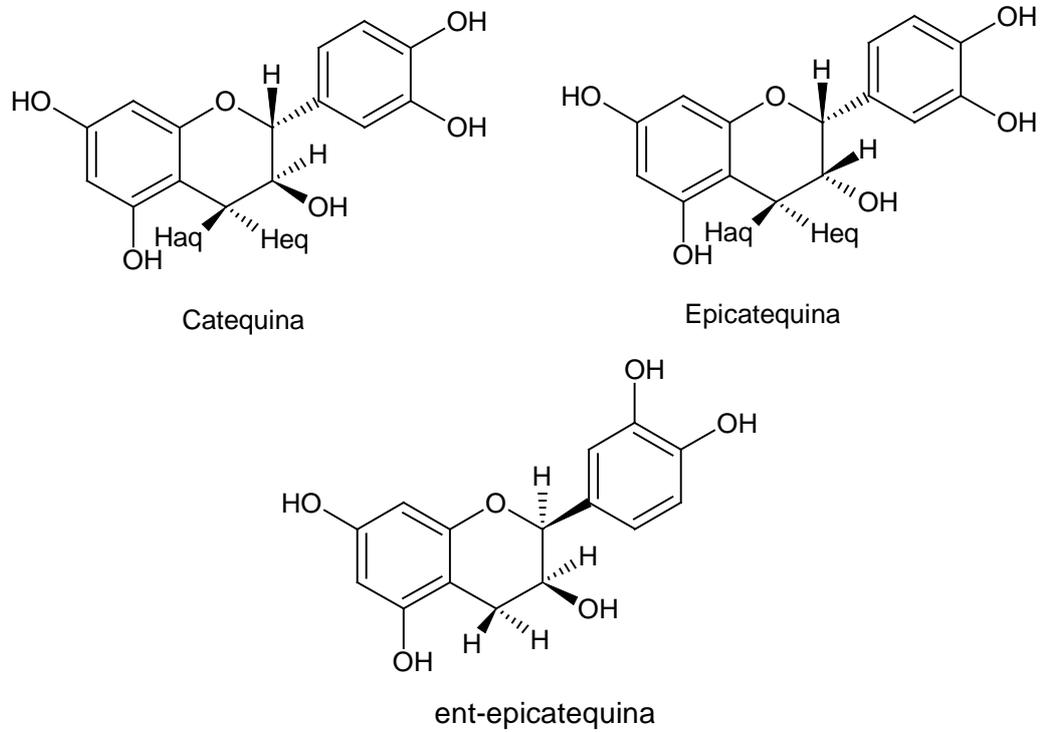


Figura 3 – Monômeros de flavan-3-óis catequina e epicatequina.

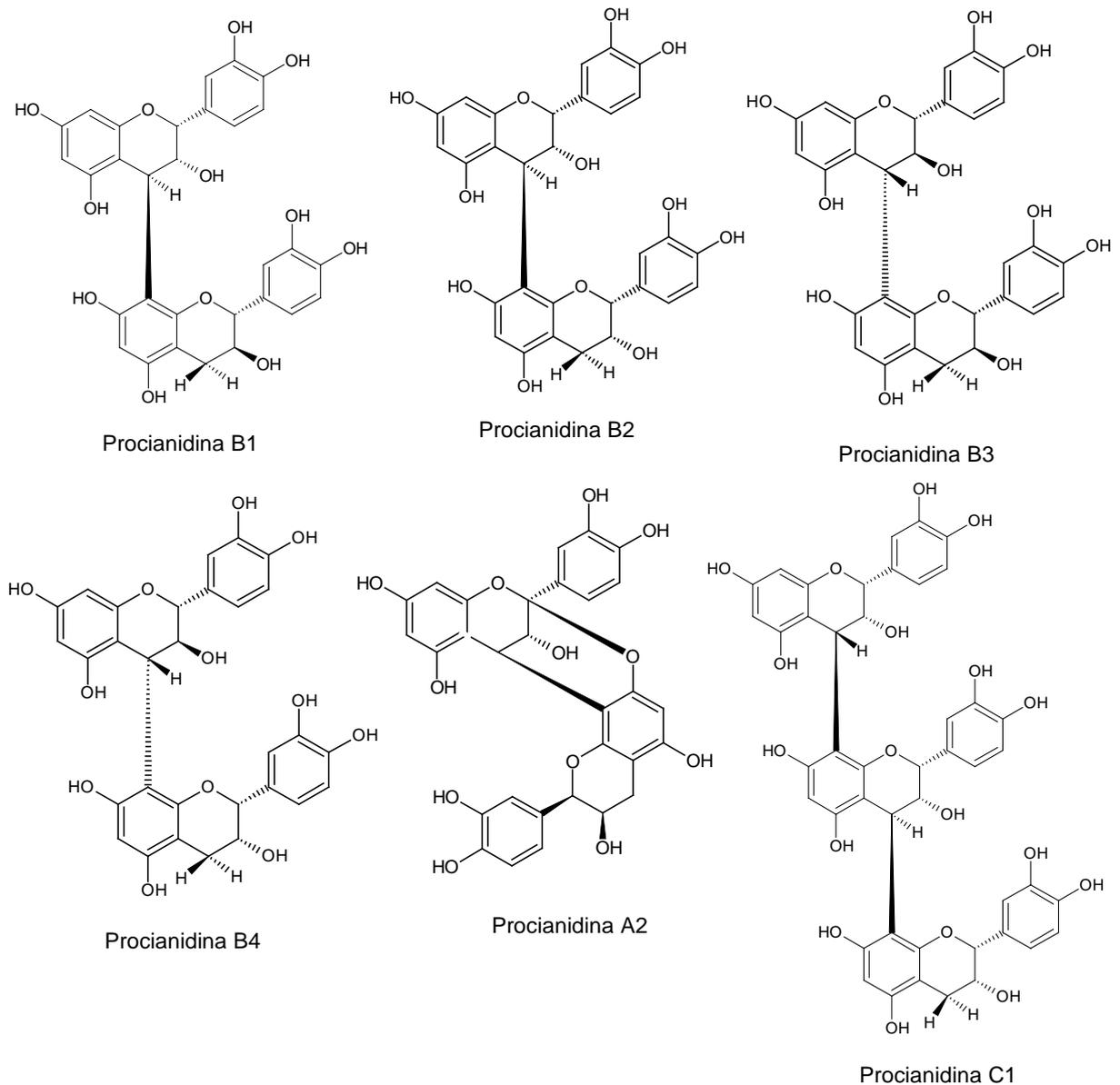


Figura 4 – Procianidinas isoladas de *P. cupana*.

Como os extratos vegetais nem sempre apresentam as mesmas concentrações de ativos, devido às diferenças entre as características edafo-climáticas apresentadas entre lotes de uma mesma planta, é necessário que se conheça os marcadores químicos presentes no extrato. Estes marcadores podem ou não ser componentes ativos, que serão avaliados e quantificados sempre que um novo lote de extrato for produzido. Assim consegue-se padronizar o extrato em função dos marcadores químicos e tem-se sempre um mesmo teor de substâncias ativas na forma farmacêutica final (Simões et al., 2001). Klein e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica de quantificação de marcadores químicos por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de fração semipurificada de guaraná, onde pode-se quantificar cafeína, catequina e

epicatequina. Assim, pode-se confirmar a qualidade e semelhança em teores químicos entre as diferentes matérias-primas vegetais.

Vários trabalhos já foram e estão sendo realizados com o objetivo de confirmar e averiguar alguns dos efeitos atribuídos ao guaraná. Experimentos *in vivo* relataram baixa toxicidade desta droga, exibindo efeitos antioxidantes, antiamnésia, efeito protetor contra danos no DNA induzidos por DEN (Nitrosodietilamina) em fígado de rato e potencial ação como quimiopreventivo na carcinogênese. Diversas substâncias com propriedades quimiopreventivas e antineoplásicas, como as metilxantinas e polifenóis apresenta a ação como quimiopreventivo na carcinogênese. Este fato acontece pela redução da expansão celular de células pré-neoplásicas, diminuindo a proliferação e aumentando a apoptose das células tumorais, e conseqüentemente, reduzindo a área do tumor. O guaraná já demonstrou possuir ação antiproliferativa *in vitro* em células de câncer de mama da linhagem MCF-7, em concentrações de 5 e 10 µg/mL e um efeito significativo de interação com medicamentos quimioterápicos, melhorando o efeito antiproliferativo destes agentes quimioterapêuticos (Espinola et al., 1997, Mattei et al., 1998, Otobone et al., 2005, Fukumasu et al., 2006a,b, Fukumasu et al., 2008, Hertz et al., 2015).

Alguns trabalhos relacionados à ação do guaraná sobre o sistema nervoso central relatam um efeito benéfico sobre a cognição, não alterando a atividade locomotora e uma relevante atividade antidepressiva após tratamento crônico. A fração acetato de etila é ativa por via oral e produz efeitos panicolíticos em ratos submetidos ao teste labirinto em T elevado (ETM). Os sistemas neurotransmissores serotoninérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos neste efeito. Assim, essa fração pode ser útil no tratamento de transtornos de humor tais como transtorno do pânico. O efeito ansiolítico e panicolítico da fração semipurificada aquosa do extrato do guaraná também foi avaliada e os resultados obtidos comprovaram a existência destas atividades (Otobone et al., 2005, Otobone et al., 2007, Roncon et al., 2011, Rangel et al., 2013) .

Uma potencial atividade bacteriostática contra *Streptococcus mutans* foi descrita em experimentos *in vitro*, a qual pode ser utilizada na prevenção da placa dental bacteriana. Os resultados da atividade antioxidante e antibacteriana contra *S. mutans* demonstraram que as atividades são diretamente proporcionais à quantidade de polifenóis presentes no extrato (Yamaguti-Sasaki et al., 2007). Os extratos e substâncias isoladas do guaraná foram avaliados *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e mesmo em concentrações de até 1000 µg/mL, não houve atividade contra esses microrganismos (Antonelli-Ushirobira et al, 2007). Porém, Barbosa e Mello (2004) avaliaram, através de estudo clínico, a atividade do extrato aquoso produzido

com sementes de guaraná (5 e 7,5%) sobre a formação de placa bacteriana dentária, comparando-o com o gluconato de clorexidina (0,12%) no uso como bochecho. Os resultados de atividade antiplaca comprovaram estatisticamente a eficiência dos extrativos de guaraná em relação ao controle positivo . Matsuura e colaboradores (2014) avaliaram o efeito do extrato aquoso de guaraná na concentração de 10 mg/mL sobre candidíase oral, e os resultados mostraram que não houve inibição no crescimento de *Candida albicans*, porém reduziu a adesão da *Candida sp.* em células epiteliais bucais e em superfícies de poliestireno o que demonstra o potencial uso do guaraná na prevenção de doenças bucais . Ainda relacionado ao sistema digestório, o extrato de guaraná apresenta também propriedade gastroprotetora e oferece benefícios terapêuticos nos distúrbios gastrointestinais, como redução de lesões gástricas agudas induzidas por indometacina e etanol (Campos et al., 2003).

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Metilxantinas

Metilxantinas são substâncias derivadas das xantinas, sendo seus precursores bases púricas livres, como hipoxantina, adenina, guanina e nucleosídeos. Este grupo de substâncias está distribuído principalmente em espécies vegetais de regiões tropicais e subtropicais, podendo ocorrer em zonas temperadas também, porém com menor frequência. No vegetal este grupo químico está envolvido com o metabolismo do nitrogênio e do carbono, envolvido com reações de transmetilação e desmetilação. Espécies dos gêneros *Coffea*, *Cola*, *Theobroma*, *Ilex*, *Camellia* e em especial *Paullinia* contém quantidades consideráveis de metilxantinas (Simões et al., 2004).

Quimicamente as metilxantinas são solúveis em água e soluções aquosas ácidas a quente e etanol a quente, solventes orgânicos clorados e soluções alcalinas de hidróxido de amônio. Caracterizam-se por apresentarem-se como bases fracas que se dissociam facilmente em água, são extraídas por solventes clorados em meio amoniacal ou por suas soluções ácidas. A “reação de murexida” permite a caracterização destes compostos, pautada na cisão oxidativa em aloxano e ácido dialúrico resultando na formação de um complexo amoniacal, chamado purpurato de amônio de coloração violácea. A caracterização pode ser realizada também por CCD, usando como sistema eluente clorofórmio e etanol ou um sistema ácido com, por exemplo, ácido acético, metanol e acetato de etila, com revelador a base de iodo ou o princípio da reação de murexida ou luz ultravioleta (Simões et al., 2004).

As metilxantinas mais conhecidas são cafeína, teofilina e teobromina (Figura 5). Essas substâncias agem em receptores do sistema nervoso central, melhorando o humor, excitação e os níveis de concentração. A ação das metilxantinas no sistema nervoso central parece estar relacionada com a interação antagonista de receptores de adenosina, outros mecanismos podem estar relacionados, porém os outros mecanismos ocorrem com altas doses de metilxantinas. A ação antagonista dos receptores de adenosina está relacionada com a redução da incidência de doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson e de Alzheimer, pois o bloqueio desses receptores leva a um aumento da atividade neuronal do cérebro, fazendo com que estas células tenham um tempo de vida mais longo. O aumento dessa atividade neuronal pode ser devido a uma regulação da perfusão cerebral, por um aumento no consumo de oxigênio cerebral, ou aumento da produção de fluido cerebroespinal (Franco et al., 2013).

localização de úlcera péptica, formando uma película protetora, que promove o reparo do tecido. Possuem também potencial ação nos processos anti-inflamatórios, atividade antioxidante e ainda atividade anti-*Helicobacter pylori* (Jesus et al., 2012).

Pastene et al. (2009a, 2009b, 2010) demonstraram que extratos de casca de maçã, ricos em taninos condensados apresentam atividade inibitória da urease de *Helicobacter pylori*, enzima importante para colonização da bactéria no trato gastrointestinal, e atividade inibitória da toxina VacA, principal fator de virulência da bactéria e atividade antiadesão de *H. pylori*. Teymournejad et al. (2010) desenvolveram um enxaguante bucal contendo extrato de *Salvadora persica* L. para remover o *H. pylori* da placa dental, concluindo que este extrato, que é rico em taninos, foi um forte inibidor do crescimento de *H. pylori* na boca.

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS

2.3.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram negativa, microaerófila e espiralada (Levinson e Jawetz, 1994), considerada como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de gastrite, úlceras duodenais e gástricas (Fox e Wang, 2001), câncer gástrico (Herrera e Parsonnet, 2009) e linfomas gástricos associados à mucosa (Parsonnet et al., 1994) e às células β (Wotherspoon et al., 1991). Em 1994, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer declarou o *H. pylori* como carcinogênico classe I (IARC, 1994). A erradicação do *H. pylori* é reconhecidamente um tratamento importante e fortemente recomendado contra as doenças do aparelho gástrico (Chenoll et al., 2011, Jesus et al., 2012). Uma das fontes de infecção do *H. pylori* é a boca e a placa dentária. Estudos demonstram que a erradicação desta bactéria destes locais pode inibir a reinfecção do estômago, visto que, devido à presença desta bactéria na placa dental e a fraca penetração de antibióticos sobre a placa dentária, a bactéria volta a colonizar o estômago e reaparece novamente após o tratamento com antibiótico e remoção da infecção do estômago (Teymournejad et al., 2010). Assim, a remoção da placa dentária contribui para a eliminação das fontes de bactérias que possam estar envolvidas na recolonização estomacal. Segundo Parente e Parente (2010), a infecção pelo *H. pylori* é uma das mais prevalentes entre os seres humanos, estimando-se que afete aproximadamente metade da população mundial em todos os continentes, havendo correlação inversa entre taxas de prevalência e situação sócio-econômica da população.

Como referencial teórico, sabe-se que extratos vegetais têm sido frequentemente utilizados na medicina tradicional para tratamento de várias doenças, e que os polifenóis encontrados em diversas espécies vegetais têm apresentado significativa atividade antimicrobiana frente a *H. pylori*. Burger et al. (2000) utilizando suco de cranberry, demonstrou que polifenóis de alto peso molecular (procianidinas) inibem a adesão da *H. pylori* na mucosa gástrica, sugerindo um importante papel na prevenção de úlceras pépticas. Os autores sugerem que os polifenóis inibem a ligação da adesina desta bactéria com o ácido siálico. Estudos comprovaram o efeito inibidor de extratos vegetais ricos em substâncias fenólicas sobre o crescimento da *H. pylori* e seus principais mecanismos de instalação na mucosa gástrica (Burger et al., 2000, Pastene et al., 2009a,b, Pastene et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo realizar o controle de qualidade do material vegetal e a avaliar quimicamente a fração semipurificada aquosa de extrato de guaraná e realizar a avaliação biológica frente à bactéria *Helicobacter pylori*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o controle de qualidade das sementes de guaraná utilizadas durante o desenvolvimento do presente projeto;

Avaliar o perfil químico da fração semipurificada acetato de etila de *P. cupana* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;

Obter e caracterizar a fração semipurificada aquosa de *P. cupana* por RMN ^{13}C de sólidos e espectrometria de massas;

Avaliar a atividade biológica do extrato e frações semipurificadas de *P. cupana* contra à bactéria *Helicobacter pylori*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes e Reagentes

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

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetonitrila grau HPLC
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Ácido trifluoroacético
- Ágar triptona de soja
- Albumina sérica bovina
- Álcool de cereais – Cereálcool
- Anidrido acético
- Caldo infuso de cérebro e coração (BHI)
- Carbonato de sódio
- Cloreto de sódio
- Cloreto férrico
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)
- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico
- Hidróxido de sódio
- Hipoclorito de sódio
- Metanol deuterado Isotec®
- Metanol grau HLPC
- *n*-propanol
- Nitrogênio líquido – Departamento de Física da UEM
- Reagente de Folin-Ciocalteu

- Reagente corante de ensaio de proteína BioRad
- Sangue de carneiro – Biotério da UEM
- Sephadex G-25
- Sephadex LH-20
- Soro fetal bovino
- Vitamina C

4.1.2 Equipamentos

- Aparelho de ressonância magnética nuclear, Varian Gemini 300BB
- Balança analítica, Marte®, modelo AY220
- Bomba a vácuo, Pfeiffer Vacuum modelo DV05
- Câmera de lâmpada UV 254 nm
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Waters Alliance 2695 (Milford, MA, EUA), com compartimento de controle de temperatura da coluna, desgaseificador em linha, bomba quaternária, amostrador automático e um detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters 2998). Software Empower 3 (Milford, MA, EUA).
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo, Micromass Quattro API micro™ equipado com uma fonte de ionização electrospray Z-pulverizador (ESI) (Waters, Milford, MA, EUA). Software MassLynx™ (versão 4.0, Waters, Milford, MA, EUA).
- Espectrofotômetro, OceanOptics USB 2000+
- Estufa de CO₂, Sanyo MCO-17AC
- Estufa de secagem e esterilização, Fanem 315 SE
- Evaporadores rotatórios, Buchi® R-200 e Buchi® R- 114
- Leitor de microplacas, BIO-TEK Power Wave XS
- Liofilizadores, Christh Alpha 1-2 e Alpha 1-4 LD
- Medidor de pH microprocessado de bancada, Gehaka mod PG1800
- Micropipetadores, Eppendorf® (20 a 5000 µL)
- Mini agitador, LabDancer, IKA®
- Moinho de martelos, Tigre ASN-5
- Ultra-som, Elma®, T-460 35 Hz

4.1.3 Matéria-prima Vegetal

As sementes de *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), secas em tacho de ferro, foram adquiridas do produtor rural Sr. José Augusto de Souza, do Estado de Mato Grosso,

município de Alta Floresta, Rodovia MT 325, Estrada Central, km 8, LT 376 A. As sementes referentes ao lote 1 foram adquiridas em 2003 e armazenadas em barril de papelão no laboratório PALAFITO, as referentes ao lote 2 foram recebidas em agosto de 2013.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Controle de Qualidade

As análises de controle de qualidade foram realizadas para os dois lotes de droga vegetal, moídas em moinho de martelos.

4.2.1.1 Perda por Dessecação

O teor de umidade foi determinado empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Cerca de 0,5 g da droga vegetal moída foi pesada em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas por 30 min à temperatura de 105 °C. O resultado foi calculado em relação a 100 g da droga, pela média de três determinações (Brasil, 2010).

4.2.1.2 Teor de Extrativos

Para a determinação do teor de extrativos, foram pesados cerca de 1,0 g de droga vegetal, o peso exato anotado para fins de cálculo. A droga pesada foi submetida à decocção com 100,0 mL de água durante 10 min. Após o resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume completado a 100,0 mL. Após filtração em papel filtro, os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Uma alíquota equivalente a 20,0 g foi pesada em pesa-filtro previamente tarado e levada à evaporação até secura em banho-maria, sob agitação. O pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa à temperatura de 105 °C até peso constante, resfriado em dessecador e pesado. Foram realizadas três determinações, e o resultado foi expresso pela média (Deutches, 1986).

4.2.1.3 Teor de Cinzas Totais

O doseamento de cinzas totais da droga vegetal foi realizado de acordo com metodologia estabelecida para ensaios de pureza da monografia do guaraná pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010). Cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada, foram pesados e transferidos para cadinhos previamente tarados. A amostra, distribuída uniformemente no cadinho, foi incinerada até que todo o carvão fosse eliminado. A amostra foi incinerada em mufla por 4 h a 400 °C. Após resfriamento em dessecador as cinzas foram pesadas. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca ao ar até peso constante, sendo o experimento realizado em triplicata e o resultado expresso pela média.

4.2.1.4 Teor de Polifenóis Totais

Para o doseamento de polifenóis totais, foi seguida metodologia descrita por Glasl (1983) com modificações. Foram pesados 0,750 g da droga pulverizada e transferido para um erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada. Foram adicionados 150 mL de água destilada e aquecida em banho-maria durante 30 min, à temperatura de 60 °C. Logo após foi resfriado em água corrente e transferido para um balão volumétrico de 250 mL. O volume foi completado com água destilada. Após decantar e filtrar o líquido sobrenadante em papel de filtro os primeiros 50 mL do filtrado foram desprezados e o restante denominado como Solução Mãe (SM).

Para a preparação da Solução Amostra (SA), 5 mL da Solução Mãe foram diluídos em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Foram transferidos volumetricamente 2 mL desta solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 14,06% (p/v). A absorvância foi determinada em 691 nm após 30 min, utilizando água destilada para ajuste do zero (Glasl, 1983).

O teor de polifenóis totais (droga seca) foi calculado, expressos em porcentagem, segundo a expressão:

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

Onde:

Abs = absorvância da solução amostra para polifenóis totais;

m = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água.

4.2.1.5 Teor de Metilxantinas

O doseamento de metilxantinas da droga vegetal foi realizado de acordo com metodologia estabelecida na monografia do guaraná pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010). Para o preparo da Solução Amostra, foi pesado, cerca de 0,25 g da droga pulverizada e realizado uma extração com 20 mL de ácido sulfúrico 2,5% (v/v), com agitação mecânica, durante 15 min, por quatro vezes. As porções foram filtradas para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com o mesmo solvente. Uma alíquota de 10 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com ácido sulfúrico 2,5% (v/v). As soluções para curva analítica foram preparadas

dissolvendo, cerca de 50 mg de cafeína SQR em 100 mL de ácido sulfúrico 2,5% (v/v), obtendo solução estoque a 0,05% (p/v). As soluções de referência foram preparadas transferindo alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL da solução estoque, separadamente, para balões volumétricos de 100 mL. Completado o volume com ácido sulfúrico 2,5% (v/v), de forma a obter soluções a 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, respectivamente. A absorbância da solução amostra e das soluções para curva analítica foram medidas em 271 nm, utilizando solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v) para ajuste do zero. O teor de cafeína (metilxantinas) na amostra foi calculado a partir da equação da reta obtida com as soluções para curva analítica da cafeína.

4.2.1.6 Avaliação do Perfil Químico do Lote via CLAE

A avaliação do perfil químico da droga vegetal foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência por metodologia desenvolvida e validada com objetivo de controle de qualidade do lote a ser usado (Klein et al., 2012). A análise foi realizada em um cromatógrafo Waters Alliance 2695 (Milford, MA, EUA). Sistema equipado com um compartimento de controle de temperatura da coluna, um desgaseificador em linha, uma bomba quaternária, um amostrador automático e um detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters 2998). A aquisição de dados, análise e relatórios foram realizadas utilizando software Empower 3 (Milford, MA, EUA).

Uma porção de 2,00 mg de FAE diluído em 1 mL de metanol a 20% foi extraída em um cartucho de extração em fase sólida C18 e diluída em 25 mL de metanol 20%. Alíquotas de 10 µL foram analisadas por CLAE. O sistema eluente de fase móvel A (água com 0,05% de ácido trifluoroacético) e fase móvel B (metanol:acetonitrila, 25:75 com 0,05% de ácido trifluoroacético), o gradiente utilizado foi: 0 min, 80:20 (A:B); 20 min, 74:26 (A:B); 21 min, 80:20 (A:B); 24 min, 80:20 (A:B). O cromatograma foi obtido a 280 nm com fluxo de 0,5 mL/min.

4.2.1.6.1 Revalidação da metodologia de doseamento via CLAE

Para a realização do doseamento dos marcadores químicos da fração semipurificada acetato de etila de guaraná, a revalidação do método de quantificação descrito por Klein e colaboradores (2012) se fez necessária.

A revalidação do referido método foi realizada segundo recomendações da RE nº 899 de 2003 e do ICH-Q2-R1 (2005) Os parâmetro avaliados foram: exatidão, linearidade e precisão intra-ensaio.

Os padrões utilizados para as análises foram: cafeína, catequina e epicatequina. Todos os padrões foram diluídos em metanol 20% e filtrados através de filtro de membrana FHLP01300 20 μ m (Millipore)

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando quantidades de catequina (100, 50, e 25 μ g/mL) e epicatequina (100, 50, e 25 μ g/mL) a solução de amostras. Os ensaios de recuperação foram realizadas em triplicata. Os dados de recuperação foram determinados dividindo o valor obtido para a amostra preparada com a adição padrão, pela quantidade adicionada, e depois multiplicando por 100%

A avaliação da linearidade foi determinada pela realização de 5 repetições de curvas compostas por 5 pontos, obtidas segundo método descrito por Klein e colaboradores (2012). Para as soluções padrão de catequina e epicatequina as concentrações avaliadas na curva foram 18,75, 37,50, 75,00 e 150,00 μ g/mL, para a cafeína as concentrações utilizadas foram 100,00, 50,00, 25,00, 12,50, 6,25, 3,125 μ g/mL. As curvas foram calculadas por regressão linear e análise de variância (ANOVA).

A precisão intra-ensaio ou repetibilidade foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão e coeficiente de variação do resultado de 3 análises de quantificação.

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

A capacidade antioxidante das frações frente o DPPH foram realizadas segundo Amarowicz *et al.* (2004) com modificações. Primeiramente foi determinada a faixa de trabalho do extrato, ou seja, em quais concentrações o extrato apresenta atividade sobre o radical DPPH. Foram pesados 0,0050 g de extrato e solubilizados em metanol grau HPLC em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a concentração de 500 μ g/mL (SOLUÇÃO 1). Através de pipeta volumétrica 1 mL da Solução 1 foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completado volume com metanol grau HPLC, obtendo-se a concentração de 50 μ g/mL (SOLUÇÃO 2). Foram pesados 5,9 mg de DPPH e dissolvidos em 15 mL de metanol. Diluições de 500 a 0,25 μ g/mL de cada fração foram preparadas e 375 μ L de solução de DPPH foi adicionado em cada diluição. As concentrações que apresentaram coloração de champanhe a roxo claro foram escolhidas para a análise. Além das concentrações de coloração amarelo claro a roxo claro, mais seis concentrações intermediárias forma preparadas para a análise.

Uma solução metanólica de BHT (butil-hidroxi-tolueno), foi preparada como branco, pesando-se 2,0 mg em 4 mL de metanol. Foram adicionados 500 µL da solução de DPPH ao branco. Às soluções de análise 375 µL da solução de DPPH foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. Como controle negativo foi utilizado uma solução contendo 3 mL de metanol adicionada de 375 µL de solução de DPPH. As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas a 517 nm, em espectrofotômetro. A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem do descolorimento do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\%ASR = 100 \cdot \left(\frac{1 - Abs A}{Abs CN} \right)$$

Onde:

Abs CN= absorvância do controle negativo

Abs A= absorvância da amostra

Os valores de %ASR foram calculados para cada concentração do extrato, e utilizados para construção de curva de calibração. O valor de IC₅₀ do extrato, ou seja, no qual é estimada a concentração (µg/mL) de antioxidante necessária para inibir 50% do radical DPPH foi calculado a partir da curva de calibração.

4.2.1.8 Análise Granulométrica

A análise granulométrica foi realizada pela técnica de tamisação com os dois lotes em triplicata segundo Ansel (2005) com modificações. Foram utilizados tamises com malha de abertura: 1,41; 1,18; 0,84; 0,42; 0,25 mm e o coletor. Onde 100,00 g de droga vegetal moída foram colocados no conjunto de tamises. O conjunto foi tamisado durante 30 min a 70 vibrações por minuto. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira e calculado o diâmetro médio calculado pela equação:

$$dm = \frac{\sum (\%retida) \times (abertura \text{ média})}{100}$$

4.2.2 Preparo da Fração

As sementes moídas de guaraná foram utilizadas para preparar a solução extrativa usando como solvente extrativo acetona: água (7:3; v/v) (EB), por turbo-extração (Ultra-Turrax UTC115KT, IKA Works, Wilmington, NC, USA). Após, o solvente orgânico foi

removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida e o restante do material sólido foi liofilizado (EBPC-patente solicitada PI0006638-9). O EBPC (extrato bruto) foi particionado com acetato de etila, resultando nas frações acetato de etila (EPA) e fração aquosa (FAQ), a qual é objeto de estudo do presente projeto (Antonelli-Ushirobira et al., 2010, Audi e Mello, 2000).

4.2.3 Avaliação química

As análises químicas foram realizadas com a fração semipurificada aquosa do extrato de guaraná (FAQ).

4.2.3.1 Análise por RMN ^{13}C no estado sólido da fração semipurificada aquosa de *P. cupana*

O espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido foi obtido em um espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus 300BB (Varian, EUA) com sonda CPMAS 7 mm, uma frequência de 75,45 MHz para ^{13}C (Bueno et al., 2014). O espectro foi analisado e comparado com os dados da literatura.

4.2.3.2 Espectrometria de massas por infusão direta (ESI-MS)

Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Micromass Quattro API micro™ equipado com uma fonte de ionização electrospray Z-pulverizador (ESI) (Waters, Milford, MA, EUA). Para aquisição dos dados foi utilizado o software MassLynx™ (versão 4.0, Waters, Milford, MA, EUA).

Cerca de 500 ng/mL de cada amostra foram diluídas em metanol:água 1/1 (v/v). Em seguida foi realizada infusão direta das amostras no espectrômetro de massas, operando no modo positivo e negativo de ionização. Os espectros foram adquiridos na faixa de 90 a 700 Da. No modo negativo, a voltagem do capilar foi de 3,0 kV, do cone 35 V e do cone de extração de 2 V. A temperatura da fonte foi de 110 °C, temperatura de dessolvatação de 250 °C, fluxo de gás do cone de 50 L/h, e fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h. No modo positivo: a voltagem do capilar foi de 4,0 kV, do cone 35 V e do cone de extração de 2 V. A temperatura da fonte foi de 110 °C, temperatura de dessolvatação de 250 °C, fluxo de gás do cone de 50 L/h, e fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h. O scan time foi de 0,3 s com interscan time de 0,02 s (Bueno et al., 2014).

4.2.4 Avaliação frente à bactéria *Helicobacter pylori*

4.2.4.1 Susceptibilidade quantitativa por microdiluição

O teste de susceptibilidade quantitativa foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo (Megraud e Lehours, 2007). O microrganismo utilizado no teste foi uma cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 doada pela FIOCRUZ. O preparo do inóculo foi iniciado dois dias antes do experimento, com a ativação da bactéria, com cultivo em placa, contendo meio TSA suplementado com 5,0% de sangue de carneiro, e incubação em ambiente microaeróbico (10% CO₂) à 37 °C. Após os dois dias de crescimento, duas placas onde foram cultivados os microrganismos foram raspadas e a massa celular foi suspensa em salina, o inóculo foi padronizado pela escala de McFarland 0,5 (1,5x10⁸ UFC). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100,00 µL de meio BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino nos poços da microplaca de acordo com o número de diluições a serem realizadas. Os extratos a serem testados foram adicionados nos primeiros poços de cada fileira da placa na concentração de 1.000,00 µg/mL, a diluição seriada 1:2 foi realizada a partir deste primeiro poço, até que se alcançasse a concentração de 3,9 µg/mL (no nono poço). Os extratos e o antimicrobiano utilizado para o controle positivo do teste foram diluídos com o meio BHI contendo 10,0% de DMSO (dimetilsulfóxido). A substância utilizada como controle positivo foi a claritromicina, nas concentrações que variaram de 4,0 µg/mL a 0,0156 µg/mL, também aplicada em diluição seriada 1:2. Após a realização da diluição seriada, o inóculo padronizado foi diluído 1:10 e adicionado aos poços correspondentes. Poços com controle do extrato, controle da bactéria, controle do meio, e controle do diluente foram preenchidos. Em cada poço, foram adicionados 5,0 µL de suspensão bacteriana padronizada pela escala de McFarland 0,5, exceto nos poços controle da droga e controle do meio. A microplaca foi incubada por 4 dias em ambiente microaeróbico (10% CO₂) à 37 °C. A partir da observação visual do crescimento microbiano, a maior diluição onde houve inibição do crescimento bacteriano, foi definida como a concentração mínima inibitória (MIC), conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (2007).

4.2.4.2 Avaliação do crescimento microbiano por turbidimetria

O teste de avaliação do crescimento microbiano por turbidimetria foi realizado por microplacas e a leitura realizada em leitor de ELISA marca/modelo BIO-TEK Power Wave XS. O microrganismo utilizado no teste foi uma cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 doada pela FIOCRUZ. O preparo do inóculo, extratos e suas concentrações testadas, foram realizados como descrito no item 4.2.5.1. Após a incubação, foi realizada leitura da placa a 600 nm. Os dados obtidos pelos ensaios de turbidimetria foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, utilizando o programa estatístico GraphPad InStat versão 3.05. Foi considerado estatisticamente diferentes valores cujo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Controle de Qualidade

A realização de análises de controle de qualidade para drogas e/ou extratos vegetais é de extrema importância, para se conhecer as características químicas dos mesmos, pelo fato de que, devido às diferenças apresentadas entre lotes de uma mesma droga, que têm diferenças em função das características edafo-climáticas ao qual a espécie vegetal foi exposta, eles podem nem sempre apresentar as mesmas concentrações dos ativos. Conhecendo-se suas características e diferenças químicas, consegue-se padronizar o extrato em função dos marcadores químicos e mantendo-se semelhante o teor de substâncias ativas na forma farmacêutica final com o ajuste das concentrações dos compostos (SIMÕES ET AL., 2004). O controle de qualidade da matéria-prima vegetal de fitoterápicos é de tal importância, que é item requerido pela RDC 26/2014 para o registro de medicamentos fitoterápicos junto à ANVISA para comercialização. Análises necessárias ao controle de qualidade são descritas em compêndios oficiais, como as farmacopeias. As análises de controle de qualidade foram realizadas para duas amostras de sementes de guaraná. Sendo elas, Lote 1 que corresponde a um lote antigo (2010) e Lote 2, correspondente ao lote adquirido em 2013, ou seja, um lote novo (Tabela 1).

5.1.1 Perda por Dessecação

A perda por dessecação consiste em um fator importante no controle de qualidade de fitoterápicos, pois, refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na droga vegetal. A determinação de umidade na planta seca torna-se importante quando se considera o uso de matéria-prima vegetal na produção industrial de fitoterápicos (ANTONELLI-USHIROBIRA ET AL., 2004). As amostras do presente trabalho apresentaram os valores de $8,84 \pm 0,37\%$ para o Lote 1, e $9,94 \pm 0,20\%$ para o Lote 2. Ambas as amostras apresentaram teores abaixo de 10,00%, o que demonstra que estão em boas condições de armazenamento e por apresentarem um teor de umidade baixo, a proliferação microbiana no material vegetal é dificultada.

5.1.2 Teor de Extrativos

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de constituintes extraíveis a partir de uma determinada quantidade de material vegetal utilizando-se a água como líquido extrator, além de que pode ser considerado como uma característica própria e auxiliar na avaliação da qualidade dessa droga vegetal (YAMAGUTI-

SASAKI, 2006). Foram realizadas três determinações obtendo-se como resultado o valor médio de $32,75 \pm 0,30\%$ para o Lote 1 e $29,71 \pm 0,89\%$ para o Lote 2.

5.1.3 Teor de Cinzas Totais

As drogas vegetais apresentam componentes de natureza inorgânica, sendo estes próprios da constituição da droga é denominado de intrínseco e difere dos componentes inorgânicos de origem externa, por exemplo, areia, pedra, gesso e terra. Estes últimos são originários de más preparações ou falsificações. Levando-se em consideração o componente inorgânico intrínseco de cada droga, fixou-se o limite máximo que, excedido, determina a reprovação do produto, fixado para o guaraná pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição o valor de 3,0%. A quantificação do conteúdo inorgânico faz-se por meio da determinação de cinzas totais, a qual mostra, principalmente, o cuidado que foi dedicado na preparação de determinada droga vegetal. Os lotes avaliados apresentaram valores de $1,87 \pm 0,03\%$ para o Lote 1 e $1,42 \pm 0,05\%$ para o Lote 2.

5.1.4 Teor de Polifenóis Totais

O teor de polifenóis totais é uma avaliação química quantitativa da qualidade da droga vegetal, por dosear um grupo importante de substâncias ativas da droga estudada em questão. Os lotes estudados apresentaram $9,62 \pm 0,10\%$ e $9,25 \pm 0,15\%$ para Lote 1 e Lote 2, respectivamente. Em relação aos polifenóis, quantitativamente os dois lotes apresentam teores muito parecidos, não diferindo em termos quantitativos para este grupo de substâncias.

5.1.5 Teor de Metilxantinas

As metilxantinas, assim como os polifenóis, são um grupo de substâncias presentes em quantidades relevantes na espécie estudada esua quantificação encontra-se descrita na monografia da droga vegetal na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). O lote 1 apresentou $6,37 \pm 0,17\%$ de metilxantinas e o Lote 2 $5,13 \pm 0,27\%$. Os dois lotes avaliados apresentaram-se dentro das condições exigidas pela Farmacopeia Brasileira por ambos apresentarem teor de metilxantinas acima de 5,00%. Pode-se observar que o Lote 1 apresenta maior quantidade deste grupo de substâncias, demonstrando a importância de se realizar o controle de qualidade do material, para se conhecer as diferenças entre um lote e outro a qual está trabalhando, para que na padronização do extrato, estas diferenças quantitativas das substâncias ativas e de interesse sejam corrigidas.

Tabela 1 - Controle de Qualidade por métodos farmacopeicos.

	Lote 1 (% ± DP, CV%)	Lote 2 (% ± DP, CV%)
LD	8,84 ± 0,37, 4,18	9,94 ± 0,20, 2,01
EC	32,75 ± 0,30, 0,92	29,71 ± 0,89, 3,01
AC	1,87 ± 0,03, 1,60	1,42 ± 0,05, 3,33
TP	9,62 ± 0,10, 1,05	9,25 ± 0,15, 1,63
MX	6,37 ± 0,17, 2,67	5,13 ± 0,27, 5,57

DP: Desvio Padrão, CV: Coeficiente de Variação, LD: Perda por Dessecação, EC: Teor de Extrativos, AC: Cinzas Totais, TP: Polifenóis Totais, MX: Metilxantinas. N=3.

5.1.6 Avaliação do Perfil Químico do Lote via HPLC

5.1.6.1 Revalidação da metodologia de doseamento via HPLC

Para a realização do doseamento dos marcadores químicos de fração semipurificada de guaraná, a revalidação do método validado por Klein *et al.* (2012) se fez necessária pelo fato do método ter sido executado em equipamento diferente do utilizado para validação, e foi realizada segundo recomendações da RE 899 de 2003 e do ICH-Q2-R1.

Foi realizada a exatidão do método por análise de recuperação, onde três concentrações de padrão foram adicionadas na amostra e os valores obtidos foram divididos pela concentração adicionada e multiplicado por 100. Os valores de recuperação obtidos foram de: 92,9 ± 4,13% para epicatequina e 94,03 ± 3,99% para catequina.

Seguindo a recomendação das normas citadas foi também realizada precisão intra-ensaio ou repetibilidade, os valores obtidos para a catequina foi de 2,23% de coeficiente de variação e de 4,44% para a epicatequina.

A linearidade foi realizada para os padrões de catequina, epicatequina e cafeína, em 5 concentrações diferentes e 5 repetições para cada concentração (Figuras 7, 8 e 9). Os parâmetros de linearidade mostrados na Tabela 2.

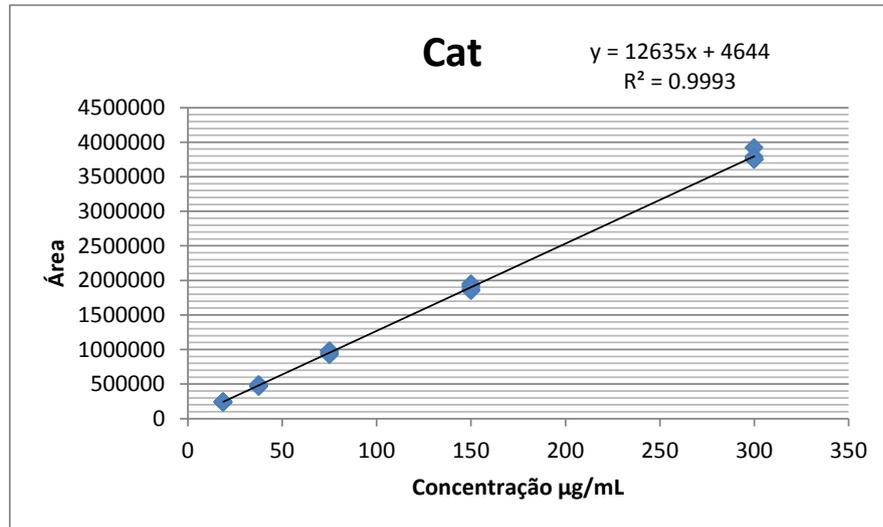


Figura 7 – Curva de calibração da catequina.

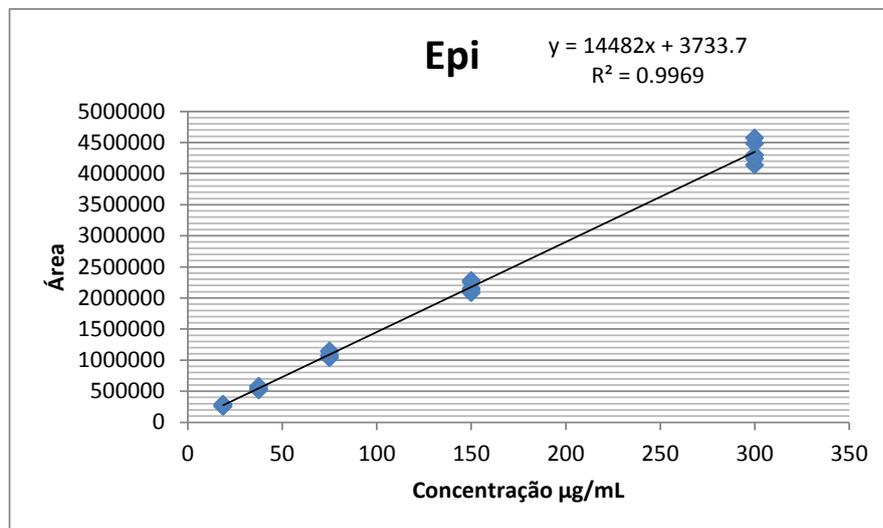


Figura 8 – Curva de calibração da epicatequina.

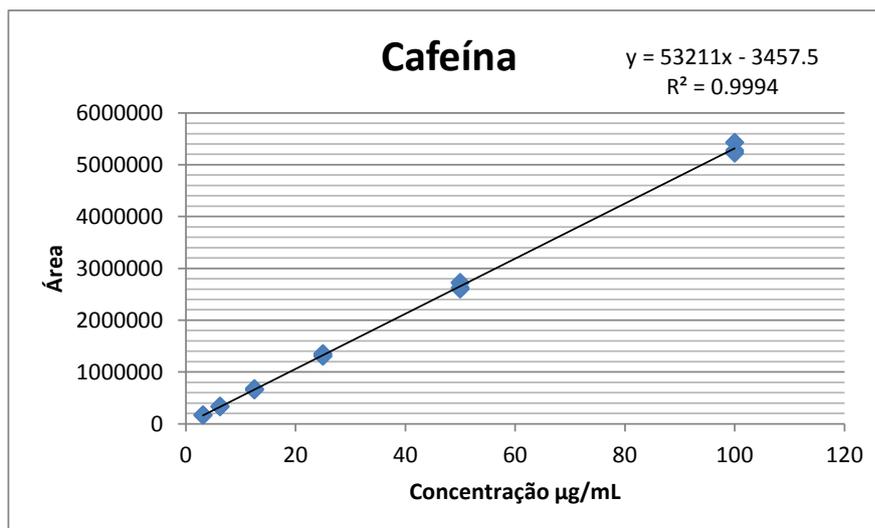


Figura 9 – Curva de calibração da cafeína.

Tabela 2 - Dados da regressão para o cálculo dos teores de catequina, epicatequina, e cafeína.

	Catequina	Epicatequina	Cafeína
N	5	5	5
Faixa de linearidade (µg/mL)	300-18,75	300-18,75	100-3,125
Inclinação (a)	12635	14482	53211
Intercepto (b)	4644	3733,7	-3457,5
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9993	0,9969	0,9994

Visto que os parâmetros analisados para a revalidação apresentaram-se dentro dos limites especificados pela legislação, o método apresentou-se válido para ser executado e os extratos quantificados a partir do mesmo.

A partir das curvas de calibração obtidas foram calculados os teores dos marcadores químicos da fração semipurificada acetato de etila, dos extratos de guaraná dos dois diferentes lotes, visando o conhecimento quantitativo dos seus principais constituintes químicos conhecidos, valores que podem ser observados pela Tabela 3 e perfil químico pelos cromatogramas observados na Figura 10.

Na Tabela 3, podemos notar as diferenças nas quantidades dos principais polifenóis encontrados no extrato, visto que no Lote 1 a catequina está em maior concentração que a epicatequina e no Lote 2 o inverso é observado, apresentando quantidades maiores de epicatequina, essa observação é importante para a padronização do extrato e o

conhecimento de suas características químicas, visto que em produtos naturais, estas diferenças são comumente encontradas pelas diferenças de épocas de plantio e colheita, resultantes das condições edafo-climáticas variantes as quais são submetidas cada droga em diferentes lotes.

Tabela 3 - Quantificação de catequina, epicatequina e cafeína.

	Catequina ($\mu\text{g/mL}$; $\mu\text{g/mg}$ FAE)	Epicatequina ($\mu\text{g/mL}$; $\mu\text{g/mg}$ FAE)	Cafeína ($\mu\text{g/mL}$; $\mu\text{g/mg}$ FAE)
Lote 1	13,19; 164,88	16,03; 200,34	20,84; 260,52
Lote 2	17,59; 219,93	13,03; 162,87	19,25; 240,63

Observando os cromatogramas da Figura 10, podemos notar que os tempos de retenção coincidem para os 3 picos correspondentes aos marcadores químicos quantificados nos dois lotes, 12,07 min para catequina, 14,51 min para epicatequina e 17,50 min para cafeína. Não havendo diferenças nos tempos de retenção e no espectro ultravioleta, podemos afirmar que cada pico em cada tempo de retenção se trata da mesma substância.

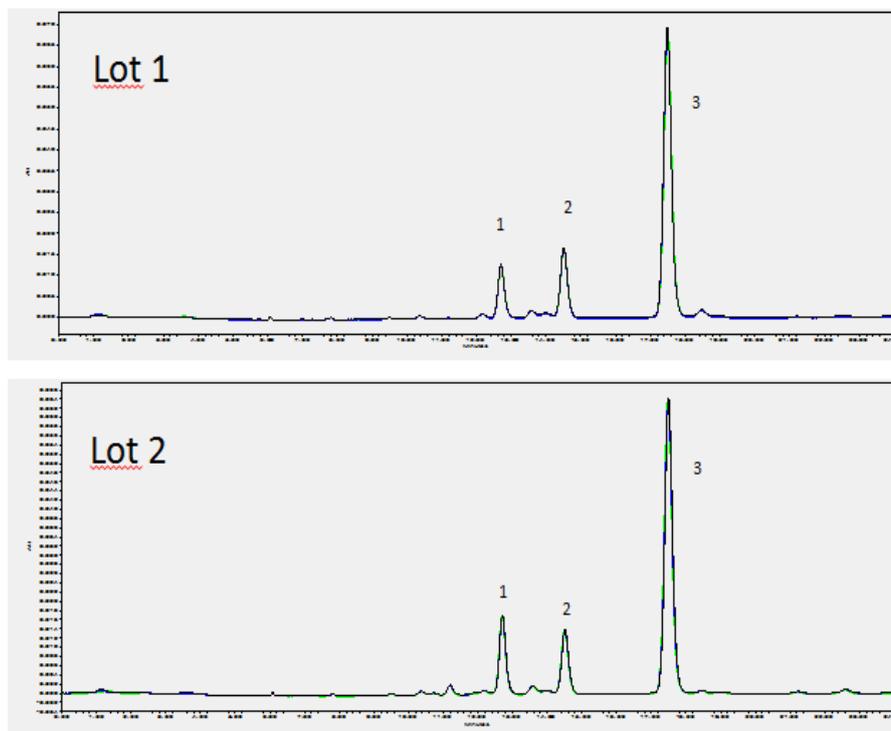


Figura 10 – Cromatogramas das soluções extrativas dos Lotes 1 e 2. Catequina (1), Epicatequina (2), Cafeína (3).

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

O método do DPPH é um importante indicativo do potencial antioxidante dos extratos vegetais os quais são testados. Baseia-se na redução de soluções alcoólicas de DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. Soluções de DPPH mostram forte absorvância em 517 nm, com coloração violeta (roxa). Com a atividade sequestrante do radical exercida pelo antioxidante testado, a absorvância diminui pela descoloração resultante em relação ao grau de redução. Os resultados foram expressos como valores de IC_{50} , e que representam a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH.

Foram avaliados frente ao radical DPPH extrato bruto (EB), fração aquosa (FAQ) e fração acetato (FAE), obtidos a partir dos dois lotes de droga vegetal, lote 1 e lote 2. Na Figura 11 pode-se observar a coloração apresentada na etapa da escolha da faixa de trabalho, para a realização da diluição para as leituras em espectrofotômetro. Esta etapa foi realizada para todos os extratos dos dois lotes.



Figura 11 – Escolha da faixa de trabalho para o teste do DPPH.

Todos os extratos do lote 1 apresentaram valores de IC_{50} menor que os seus correspondentes ao lote 2 (Figura 12). O EB do lote 1 apresentou o melhor resultado como antioxidante, com valor de IC_{50} de 3,75 $\mu\text{g/mL}$, chegando ser menor que o da Vitamina C (4,29 $\mu\text{g/mL}$), caracterizada como substância de alto poder antioxidante bem estudada. Para o lote 2, o EB apresentou valor de IC_{50} de 13,93 $\mu\text{g/mL}$, a fração FAE foi o extrato do lote 2 que apresentou o melhor valor de IC_{50} (5,90 $\mu\text{g/mL}$) comparado com os valores dos outros extratos testados do mesmo lote. A FAE do lote 1 apresentou IC_{50} de 5,83 $\mu\text{g/mL}$ e a FAQ 12,34 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a FAQ do lote 2 apresentou valor de 21,95 $\mu\text{g/mL}$.

Os três extratos obtidos pelo lote 1 apresentaram valores mais baixos de IC₅₀ quando comparados aos extratos obtidos a partir do lote 2 (Tabela 4). Caracterizando, assim, o lote 1 como um lote com maior potencial para atividades antioxidantes do que o lote 2. Diferenças estas comuns de serem encontradas em se tratando de produtos naturais.

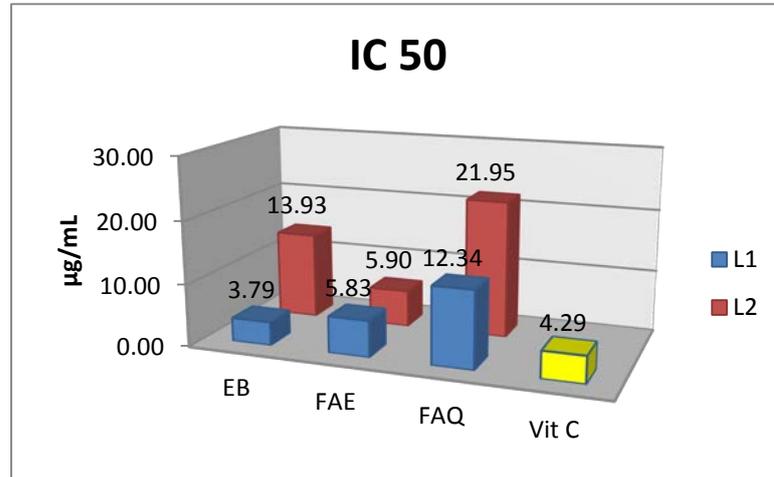


Figura 12 – IC₅₀ frente ao DPPH de EB, FAE e FAQ dos Lotes 1 e 2 e Vitamina C.

Tabela 4 - Capacidade antioxidante frente ao DPPH.

	Lote 1 (µg/mL; ± SD; CV%)	Lote 2 (µg/mL; ± SD; CV%)
EB	3,79; ± 0,06; 1,59	13,93; ± 0,18; 1,27
FAE	5,83; ± 0,13; 2,15	5,90; ± 0,11; 1,94
FAQ	12,34; ± 0,29; 2,36	21,95; ± 0,01; 0,06
Vit C	4,29; ± 0,07; 1,52	4,29; ± 0,07; 1,52

5.1.8 Análise Granulométrica

A análise granulométrica foi realizada para os dois lotes de droga vegetal, e o resultado do cálculo do diâmetro médio das partículas foi de 0,468 mm para o lote 1 e 0,472 mm para o lote 2.

5.2 Preparo da Fração

Extrações foram realizadas com os dois lotes disponíveis no laboratório de acordo com a metodologia da patente PI0006638-9. Obteve-se como rendimentos dos extratos brutos, 20,96% para o lote 1 e 17,19% para o lote 2. Quanto às partições, a fração acetato de etila apresentou como rendimento frente à droga vegetal 9,87% para o lote 1 e 8,57%

para o lote 2. A fração aquosa apresentou rendimento de 7,75% para o lote 1 e 4,82% para o lote 2.

5.3 Avaliação química

5.3.1 Análise por RMN ^{13}C no estado sólido da fração semipurificada aquosa de *P. cupana*

O espectro de RMN ^{13}C , no estado sólido (Figura 14), foi obtido em um espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus 300BB (Varian, EUA) com sonda CPMAS 7 mm, uma frequência de 75,45 MHz para ^{13}C . Baseando-se na literatura já existente, o espectro apresenta sinais com várias características de substâncias derivadas do flavan-3-ol (Figura 13).

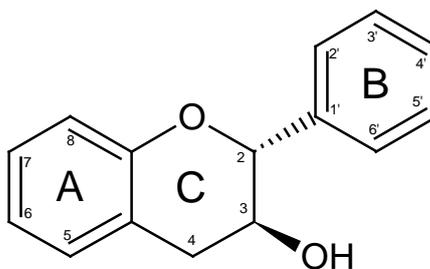


Figura 13 – Estrutura básica do flavan-3-ol.

Sinal em 144 ppm, indica a presença de C3',4'-OH do anel B de unidades de procianidinas e também corresponde à presença das duas regiões fenólicas (A e B), sugerindo a presença de taninos condensados (Lorenz e Preston, 2002). Sinal em 156 ppm indica o ataque de grupos -OH nos carbonos C5 e C7 (=C-OH) do anel A. Sinais nas regiões de 105 e 95 ppm, indicam a presença de ligações interflavonoides entre C4-C8 e/ou C4-C6, respectivamente, o que reforça a indicação da presença de taninos condensados. Porém, a ausência de sinal a 95 ppm combinada com a presença de um sinal a 105 ppm indicam a predominância de ligações do tipo C4-C8, a classificação padrão de procianidinas (Silva et al., 2014). O carbono C3 é demonstrado pela presença de sinal em 73 ppm (Es-Safi et al., 2006), e em 64 ppm caracteriza C3 de unidade terminal de procianidinas poliméricas (Zhang et al., 2010). Sinal em 116 ppm é atribuído ao C2' e C5' e em 144 ppm corresponde ao C3', 4'-OH de unidades de procianidinas. Uma banda de fraca intensidade encontrada em 99 ppm mostra a presença de C6, C8 e C10 de procianidinas e também uma ligação entre unidades de flavonoides, podendo ser uma ligação C4-C8 ou C4-C6. Sinal entre 160-180 ppm indica a presença de um grupo C = O na posição C-4 de flavonóis (Silva et al., 2014). A presença de C9 é demonstrada pelo sinal entre 190-200 ppm (Navarrete et al., 2011). A

ligação interflavonoides é confirmada pela presença do sinal em 30 ppm, característico no caso de taninos poliméricos (Wawer et al., 2006), pois sinais nas regiões de 30 a 37 ppm, estão relacionados com a presença de C4 envolvido em ligações interflavonoídicas e em especial o sinal na região de 37 ppm mostra um alto teor em taninos condensados (Oo et al., 2009).

O espectro de de RMN ^{13}C também apresenta sinais com características indicativas da presença de ácido cafeíco e seus derivados. A região de 70 ppm relaciona-se com os açúcares que possam estar ligados à molécula do ácido, os sinais em 120 e 150 ppm relacionam-se aos carbonos 7' e 8' e sinais em 170 ppm são indicativos da carbonila do ácido ligada ao açúcar (Yoshida, 2008; Cheminat, 1988).

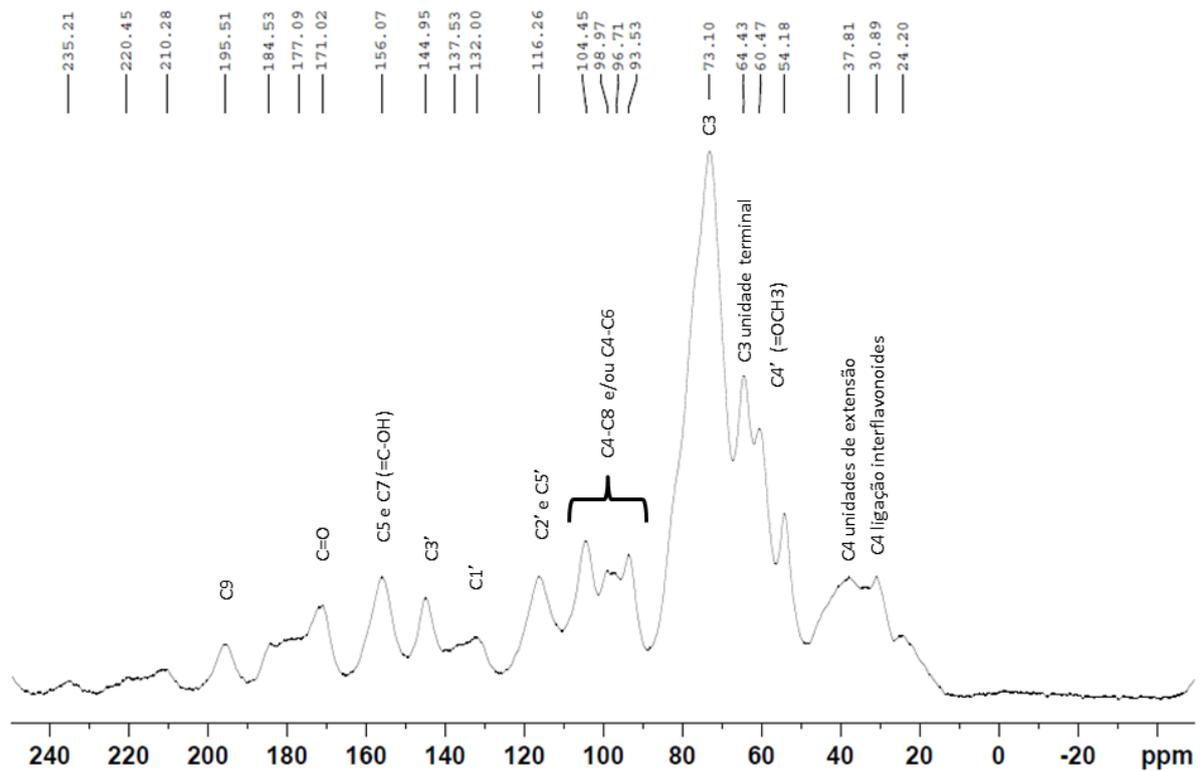


Figura 14 – RMN ^{13}C de sólidos da fração semipurificada aquosa de guaraná.

5.3.2 Espectrometria de massas por infusão direta (MS)

A análise química via espectrometria de massas foi realizada por injeção direta da fração aquosa do extrato de guaraná, e realizada posteriormente a fragmentação (MS-MS) dos principais íons presentes no espectro de massas (Figura 15). O espectro obtido em

modo de ionização negativo mostrou maior número de íons que no modo positivo, podendo assim, retirar mais informações do espectro no modo negativo, o qual foi o escolhido para análise. Observou-se no espectro massas de interesse as quais foram submetidas à fragmentação MS-MS, sendo elas (m/z) 179 (Figura 16), 289 (Figura 17), 341 (Figura 18), 577 (Figura 19), 865 (Figura 20) e 1154 (Figura 21).

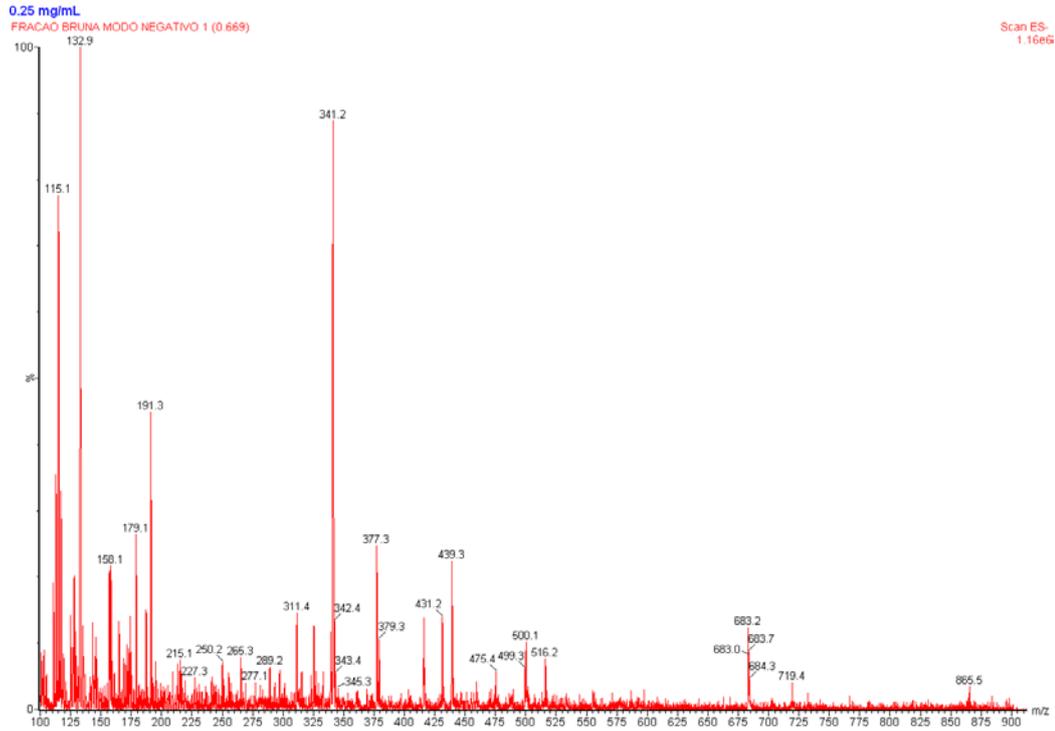


Figura 15 – Espectro de massas no modo negativo da fração semipurificada aquosa

O pico correspondente à massa m/z 179 foi escolhido para a realização da fragmentação (Figura 16), por este aparecer no espectro de massas e na fragmentação do pico m/z 341 (Figura 19), o qual aparece com uma intensidade no scan e tornou-se uma substância de interesse em ser investigada e identificada. Avaliando a literatura existente (Cheminat et al., 1988, Chen et al., 2012, Chen et al., 2013) e o espectro de fragmentação, com a presença do fragmento m/z 135, podemos sugerir que o pico m/z 179 está relacionado à molécula de ácido cafeico (Figura 17). O pico correspondente à relação m/z 341 está provavelmente relacionado com a molécula de ácido cafeico ligado à uma hexose (Figura 18), este quando fragmentado dá origem ao íon m/z 179 (ácido cafeico) e este ao íon m/z 135 (Chen et al., 2012).

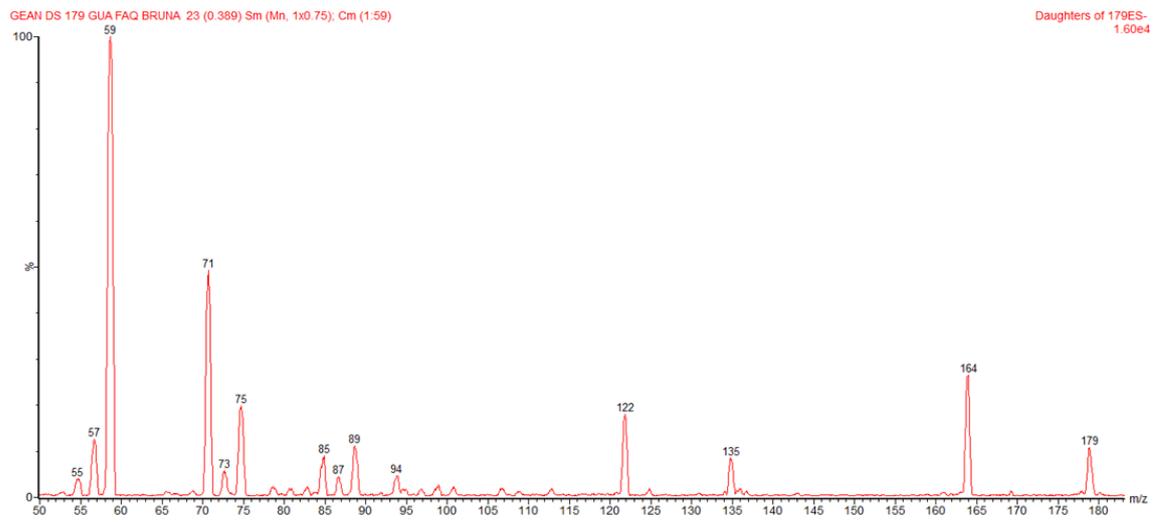


Figura 16 – Espectro de fragmentação do pico m/z 179.

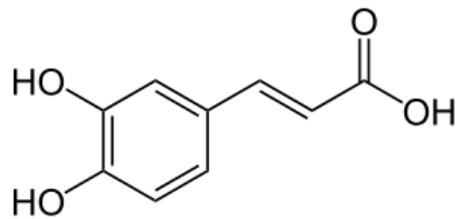


Figura 17 – Estrutura do ácido cafeico.

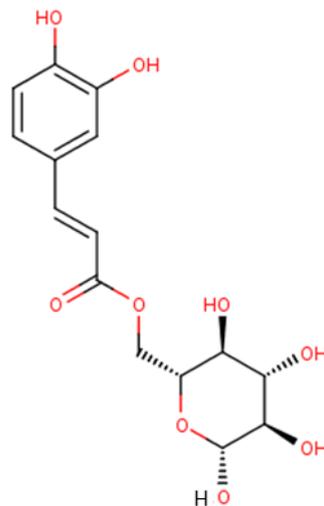


Figura 18 – Estrutura do ácido cafeico ligado à uma hexose.

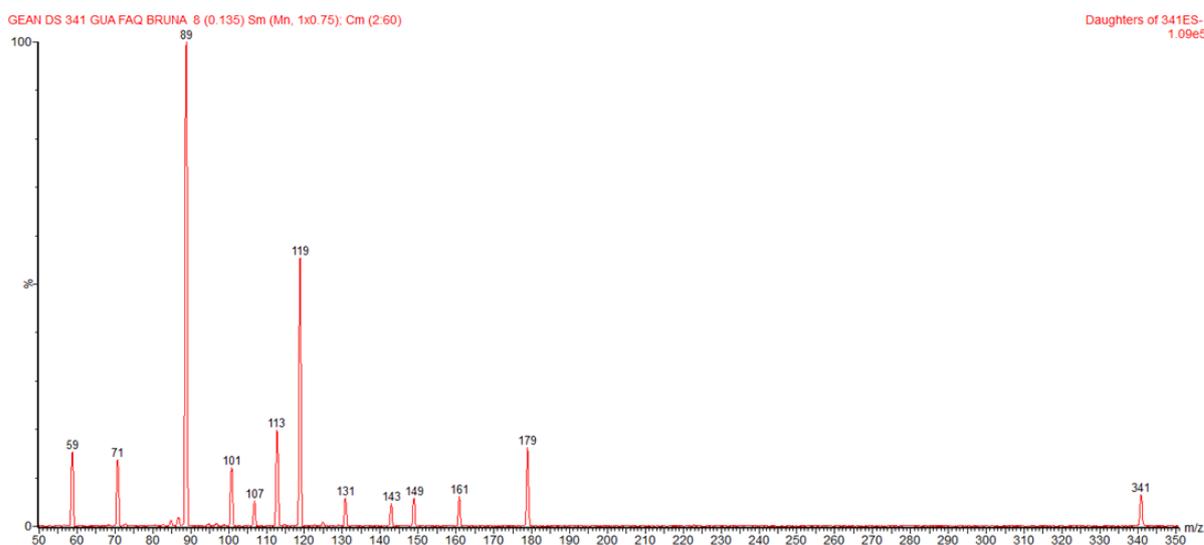
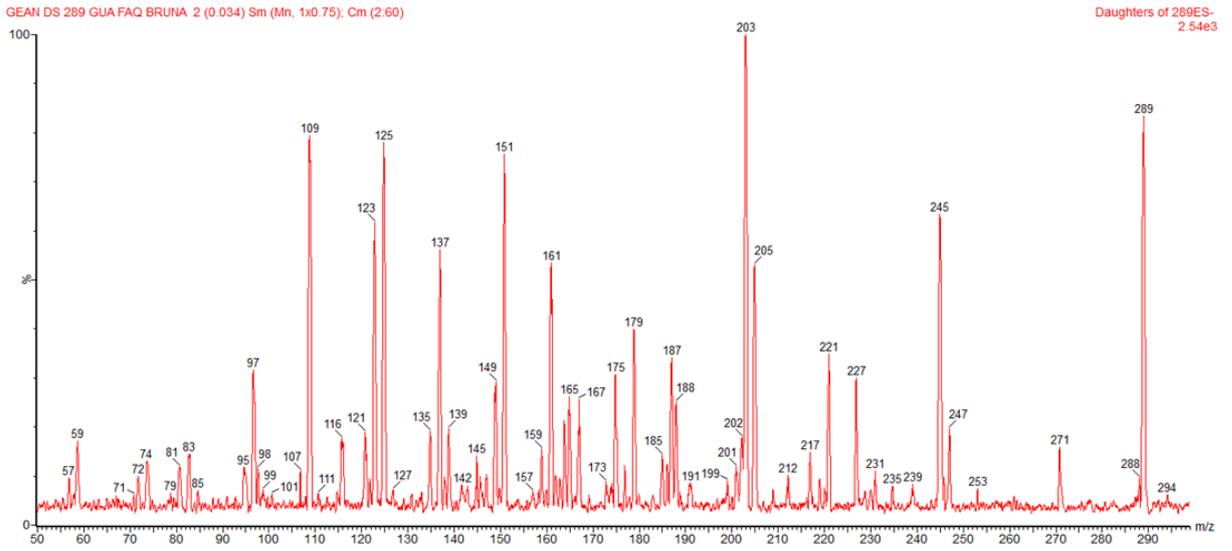
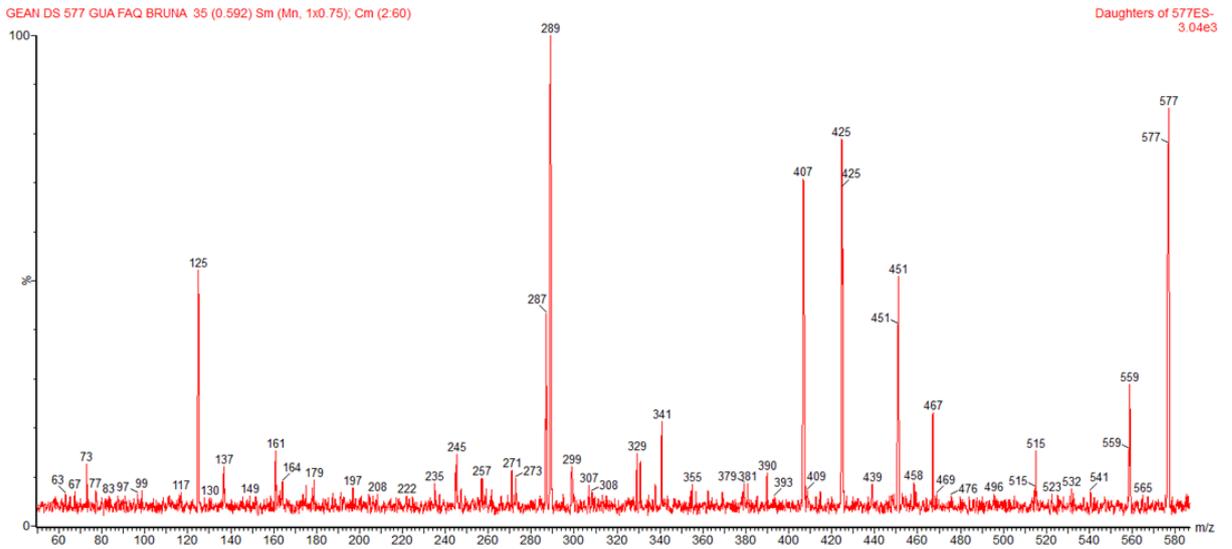


Figura 19 – Espectro de fragmentação do pico m/z 341.

O espectro de massas de varredura também demonstrou a presença de procianidinas e seus oligômeros, sendo possível a observação de monômeros (m/z 289), dímeros (m/z 577), trímeros (m/z 865) e tetrâmeros (m/z 1154), este último em menor intensidade, segundo a presença de massas já descritas na literatura (Souza, et al., 2008, Kajdzanoska et al., 2010).

Analisando as fragmentações das procianidinas oligoméricas, podemos inferir que entre os dímeros presentes, há a presença de procianidina B2, pois segundo a literatura os fragmentos m/z 425 e m/z 451 (Figura 21) são específicos da fragmentação deste tanino condensado (Poupard et al., 2011). Trímeros de procianidinas (Figura 22) também estão presentes pela observação dos fragmentos m/z 577 e m/z 289 no espectro MS-MS de m/z 865. No espectro de fragmentação m/z 1154 (Figura 23) observa-se o fragmento m/z 577, característico em fragmentação de tetrâmeros (Kajdzanoska et al., 2010).

Figura 20 – Espectro de fragmentação do pico m/z 289.Figura 21 – Espectro de fragmentação do pico m/z 577.

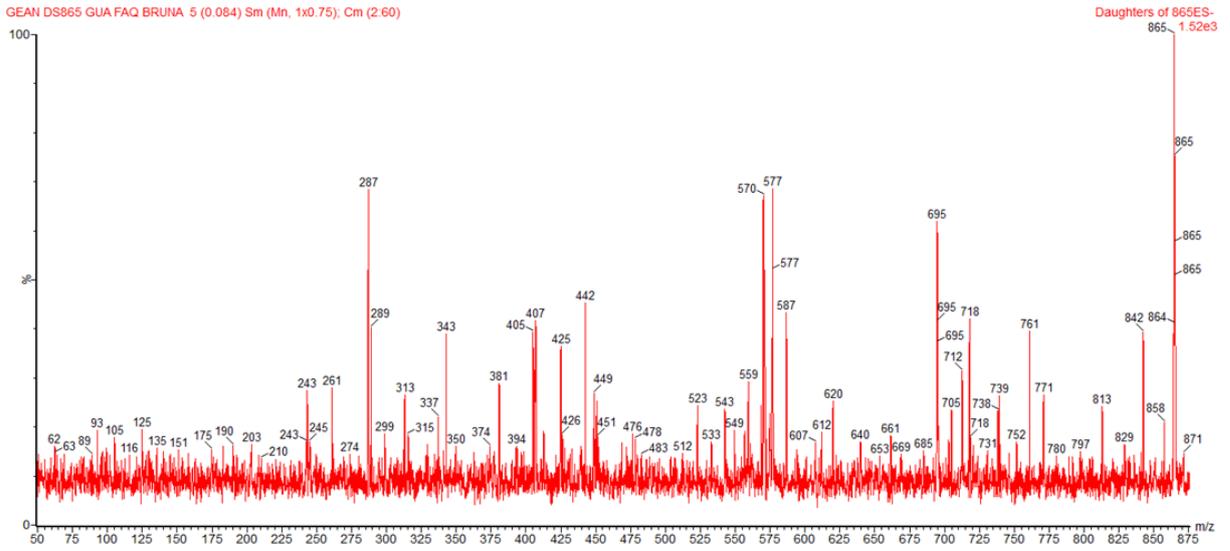


Figura 22 – Espectro de fragmentação do pico m/z 865.

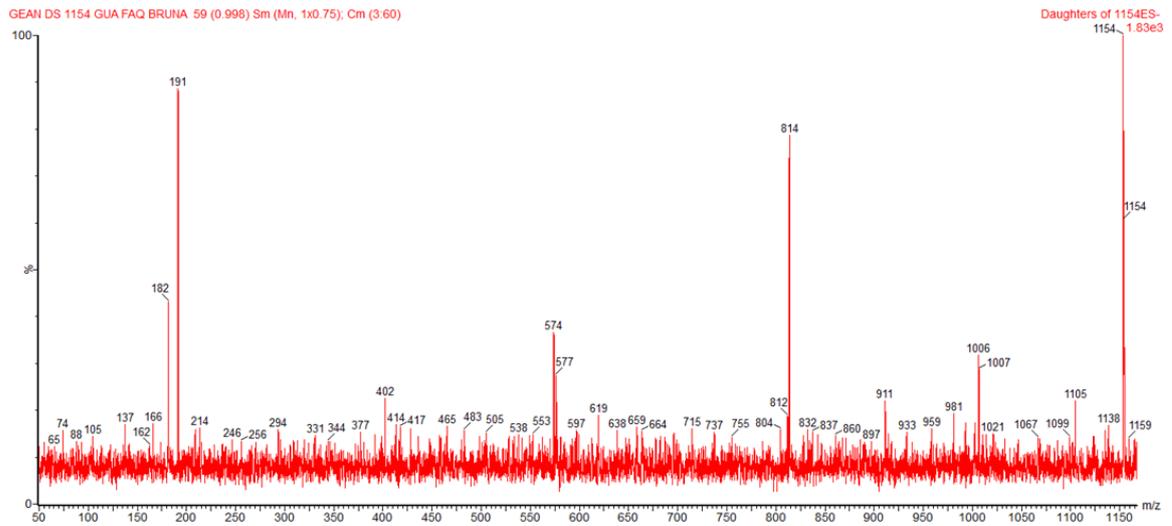


Figura 23 – Espectro de fragmentação do pico m/z 1154.

5.4 Avaliação biológica - *Helicobacter pylori*

5.4.1 Susceptibilidade quantitativa por microdiluição

A avaliação da susceptibilidade quantitativa por microdiluição demonstrou que as frações de guaraná testadas e suas diluições sobre o *Helicobacter pylori* apresentaram variados valores de MIC (Tabela 5). O valor de MIC para a FAE foi de 500,00 µg/mL, apresentando atividade moderada frente ao microrganismo, para EB o MIC apresentou-se na concentração de 1000,00 µg/mL, caracterizando baixa atividade e para a FAQ o valor de MIC foi >1000,00 µg/mL, mostrando-se aparentemente inativa frente à bactéria (Holetz et al., 2002). Portanto, não é adequado continuar os testes microbiológicos para estabelecer a concentração bactericida mínima (MBC). Em estudos anteriores, extratos de guaraná foram testados frente *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e os mesmos também não apresentaram valores de MIC (Antonelli-Ushirobira et al., 2007) Porém, quando testado frente a mecanismos de virulência, como Yamaguti-Sasaki et al. (2007) que testaram extratos de guaraná frente à adesão de *S. mutans* em uma superfície de vidro liso, todos os extratos inibiram essa adesão e também reduziram a produção de ácidos, em comparação com uma solução de gluconato de clorexidina (Yamaguti-Sasaki et al., 2007). Pastene et al. (2009) avaliaram extratos de maçã, ricos em procianidinas e o mesmo também não apresentou atividade satisfatória para o MIC frente a *H. pylori*. Porém sobre a inibição da urease isolada, os polifenóis de alto peso molecular, procianidinas, apresentaram um efeito interessante, principalmente no que diz respeito à capacidade de colonização do *H. pylori* pela atividade da urease.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima de frações de guaraná frente *H. pylori*.

	MIC (µg/mL)
EB	1000,00
FAE	500,00
FAQ	>1000,00
Clarithromicina	0,25

EB: Extrato Bruto, FAE: Fração Acetato de Etila, FAQ: Fração Aquosa, MIC: Concentração Inibitória Mínima

5.4.2 Avaliação do crescimento microbiano por turbidimetria

Os valores de absorvância obtidos pelo ensaio de turbidimetria foram convertidos em percentagem de viabilidade celular ($\% = \text{Abs teste} / \text{Abs controle} \times 100$) e estão apresentados na Figura 24. Estas análises mostram que houve diferença estatística ($P < 0,05$) no crescimento microbiano em quase todas as concentrações dos extratos testados frente ao controle. Para o EB e a FAQ apenas a concentração de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença significativa de crescimento comparado ao controle, para a FAE todas as concentrações apresentaram diferença frente ao controle.

Analisando os gráficos de crescimento microbiano, também pode-se notar que há uma diminuição gradual na viabilidade celular de acordo com o aumento da concentração de FAE e EB, indicando uma ação dose-dependente. Na FAE há uma queda característica até a concentração de 15,6 $\mu\text{g/mL}$, havendo pequenas diminuições a partir desta concentração, sendo que nas concentrações de 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ já pode-se observar uma estabilização deste efeito, uma vez que a viabilidade celular destas concentrações mantém-se similares. O mesmo acontece para a FAQ, cuja estabilização da viabilidade celular ocorre a partir de 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Estes dados indicam um possível efeito bacteriostático dos extratos de guaraná, pela redução do crescimento microbiano e estabilização do mesmo.

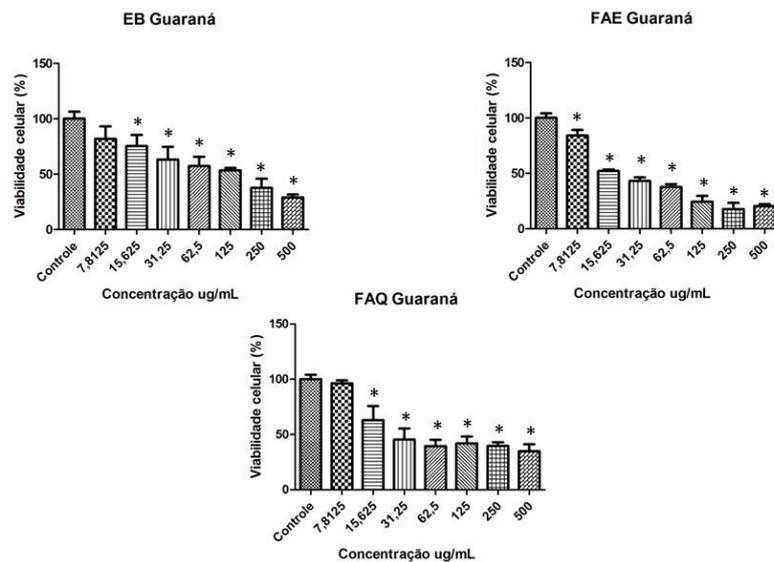


Figura 24 – Curva de crescimento de *H. pylori* incubado em diferentes concentrações de EB, FAE e FAQ de Guaraná.

6 CONCLUSÃO

Os resultados das análises físico-químicas para os lotes 1 e 2 demonstraram suas características, dos dois lotes de droga vegetal, para fins de controle de qualidade, elucidando suas diferenças químicas, demonstrando a importância da realização destas análises para a garantia da manutenção da dose das substâncias de interesse em medicamentos de origem natural, pela realização de ajustes nas dosagens de extratos, pelo conhecimento das quantidades das substâncias e/ou grupos de substâncias em cada lote.

A análise por CLAE-DAD mostrou semelhança no perfil químico dos diferentes lotes e suas diferenças quantitativas.

O espectro de RMN ^{13}C , no estado sólido, apresentou características de flavan-3-ol com: sinais correspondentes às duas regiões fenólicas (A e B); à ligação interflavonoides, e características que sugerem a presença de taninos condensados (proantocianidinas).

O espectro de massas obtido por ESI-MS/MS demonstrou a presença de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros de procianidinas, além da presença também de ácido cafeico e derivados.

A avaliação biológica frente *Helicobacter pylori* demonstrou que o extrato e frações não possuem atividade bactericida sobre *Helicobacter pylori*, mas uma atividade bacteriostática e a necessidade que os estudos continuem sob os mecanismos de virulência do microrganismo.

Os resultados demonstram a qualidade e características do material vegetal utilizado no estudo, a presença de taninos condensados e ácido cafeico na FAQ do extrato de guaraná e sobre *Helicobacter pylori* uma atividade bacteriostática.

REFERÊNCIAS

- Acevedo-Rodríguez, P., van Welzen, P.C., Adema, F., van der Ham, R.W.J.M., 2011. Sapindaceae, in: Kubitzki, K. (Ed.), The families and genera of vascular plants 10—Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer, Berlin, p. 446.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84, 551-562.
- Ansel, H. C., Popovich, N. G., Allen JR., L. V., 2000. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6.ed. Premier, São Paulo.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., 2003. Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 195.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., Kaneshima, E.N., Gabriel, M., Audi, E.A., Marques, L.C., Mello, J.C., 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guarana (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food Chem Toxicol* 48, 1817-1820.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., Yamaguti, E., Uemura, L.M., Mello, J.C.P., 2004. Controle de Qualidade de Amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farmacêutica Bonaerense* 23, 383-386.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., Yamaguti, E., Uemura, L.M., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Mello, J.C.P., 2007. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Lat Am J Pharm* 1, 5-9.
- Audi, E.A., Mello, J.C.P., 2000. Efeito Antidepressivo do Extrato da Droga Vegetal Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke in: UEM, U.E.M.-. (Ed.), NITPAR, Brasil.
- BARBOSA, G.D.A., MELLO, J.C.P., 2004. Clinical evaluation of the guarana extract on the dental plaque control. *Revista Paulista de Odontologia* 26, 28-30.
- Brasil, 2003. RE 899 de 29 de Maio de 2003-ANVISA, in: Sanitária, A.N.d.V. (Ed.).
- Brasil, 2010. *Farmacopeia Brasileira*, 5 ed. Anvisa, Brasília.

Brasil, 2009. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, 1 ed. Ministério da Saúde, Brasília, p. 136.

Bryan, C.P., 1930. The Papyrus Ebers: translated from the German version. The Garden City Press LTD., Letchworth.

Bucar, F., Wube, A., Schmid, M., 2013. Natural product isolation--how to get from biological material to pure compounds. *Nat Prod Rep* 30, 525-545.

Bueno, F.G., Panizzon, G.P., Mello, E.V.S.L., Lechtenberg, M., Petereit, F., Mello, J.C.P., Hensel, A., 2014. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia* 99, 252-260.

Buerki, S., Forest, F., Acevedo-Rodriguez, P., Callmander, M.W., Nylander, J.A., Harrington, M., Sanmartin, I., Kupfer, P., Alvarez, N., 2009. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). *Mol Phylogenet Evol* 51, 238-258.

Buerki, S., Lowry II, P.P., Alvarez, N., Razafimandimbison, S.G., Küpfer, P., Callmander, M.W., 2010. Phylogeny and circumscription of Sapindaceae revisited: molecular sequence data, morphology and biogeography support recognition of a new family, Xanthoceraceae, *Plant Ecology and Evolution*, 148-161

Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E.I., Sharon, N., Neeman, I., 2000. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 295-301.

Campos, A.R., Barros, A.I., Santos, F.A., Rao, V.S., 2003. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. *Phytother Res* 17, 1199-1202.

Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H., Brouillard, R., 1988. Caffeoyl Conjugates from Echinacea Species: Structures and Biological Activity. *Phytochemistry* 27, 2787-2794.

Chen, H.J., Inbaraj, B.S., Chen, B.H., 2012. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int J Mol Sci* 13, 260-285.

Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarria, J., Iglesias, J.R., Balbarie, P., Ramon, D., Genoves, S., 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 77, 1335-1343.

CLSI, C.a.L.S.I., 2007. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, Tentative Standard M26-T, Wayne.

Corrêa, M.P., de Azeredo Penna, L., Florestal, I.B.D., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.

Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.R., 2003. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

de Jesus, N.Z., de Souza Falcao, H., Gomes, I.F., de Almeida Leite, T.J., de Moraes Lima, G.R., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., da Silva, M.S., de Athayde-Filho, P.F., Batista, L.M., 2012. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int J Mol Sci* 13, 3203-3228.

de Souza, L.M., Cipriani, T.R., Iacomini, M., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., 2008. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J Pharm Biomed Anal* 47, 59-67.

Deutches, 1986. *Arzneibuch*. , 9 ed. Wissenschaftliche, Stuttgart.

Duke, J.A., 1987. *Handbook of medicinal herbs*. CRC Press, Florida.

Es-Safi, N.E., Guyot, S., Ducrot, P.H., 2006. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *J Agric Food Chem* 54, 6969-6977.

Espinola, E.B., Dias, R.F., Mattei, R., Carlini, E.A., 1997. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 55, 223-229.

Fox, J.G., Wang, T.C., 2001. *Helicobacter pylori*--not a good bug after all! *N Engl J Med* 345, 829-832.

Franco, R., Onatibia-Astibia, A., Martinez-Pinilla, E., 2013. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients* 5, 4159-4173.

Fukumasu, H., Avanzo, J.L., Heidor, R., Silva, T.C., Atroch, A., Moreno, F.S., Dagli, M.L., 2006a. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food Chem Toxicol* 44, 862-867.

Fukumasu, H., Avanzo, J.L., Nagamine, M.K., Barbuto, J.A., Rao, K.V., Dagli, M.L., 2008. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guarana, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Braz J Med Biol Res* 41, 305-310.

Fukumasu, H., da Silva, T.C., Avanzo, J.L., de Lima, C.E., Mackowiak, II, Atroch, A., de Souza Spinosa, H., Moreno, F.S., Dagli, M.L., 2006b. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 233, 158-164.

Glasl, H., 1983. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 123, 1979-1987.

Harmonisation., I.C.o., 2005. ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, International Conference on Harmonisation.

Henman, A.R., 1982. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. *J Ethnopharmacol* 6, 311-338.

Herculano, A.C.M., Matos, W.L., 2008. Levantamento das espécies de Sapindáceas arbóreas no estado do Rio de Janeiro. *Saúde & Ambiente em Revista* 3, 76-85.

Herrera, V., Parsonnet, J. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* 15, 971-976.

Hertz, E., Cadona, F.C., Machado, A.K., Azzolin, V., Holmrich, S., Assmann, C., Ledur, P., Ribeiro, E.E., OC, D.E.S.F., Manica-Cattani, M.F., IB, D.A.C., 2015. Effect of on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. *Mol Clin Oncol* 3, 37-43.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., Filho, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 1027-1031.

Iarc, W.G., 1994. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals., Lyon.

Ito, L.A., 2011. Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para separação e identificação de cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullinia cupana* var.

sorbilis (Mart.) Ducke - Sapindaceae, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Joly, A.B., 2002. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal, 13 ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.

Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., 2010. HPLC-DAD-ESI-MS Identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. Macedonian J Chem Chem Eng 29, 181-194.

Klein, T., Longhini, R., de Mello, J.C., 2012. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guarana). Talanta 88, 502-506.

Levinson, W.E., Jawetz, E., 1994. Medical microbiology and immunology., 3 ed. Appleton & Lange, East Norwalk.

Lorenz, K., Preston, C.M., 2002. Characterization of high-tannin fractions from humus by carbon-13 cross-polarization and magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. J Environ Qual 31, 431-436.

Matsuura, E., Godoy, J.S.R., Bonfim-Mendonça, P.S., Mello, J.C.P., Svidzinski, T.I.E., Gasparetto, A., Maciel, S.M., 2014. In vitro effect of *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of *Candida albicans*' to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. Archives of Oral Biology 2014.

Mattei, R., Dias, R.F., Espinola, E.B., Carlini, E.A., Barros, S.B., 1998. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. J Ethnopharmacol 60, 111-116.

Megraud, F., Lehours, P., 2007. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 20, 280-322.

Menezes Júnior, J.B.F., 1942. Do exame microscópico do guaraná em bromatologia. Rev Inst Adolfo Lutz 2, 45-68.

Menzel, C.M., 2003. Fruits of tropical climates fruits of the sapindaceae, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, pp. 2786-2790.

Navarrete, P., Pizzi, A., Bertaud, F., Rigolet, S., 2011. Condensed tannin reactivity inhibition by internal rearrangements: detection by CP-MAS 13C NMR. Maderas. Cienc Tecnol 13, 59-68.

- Oo, C.W., Kassima, M.J., Pizzi, A., 2009. Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II). *Industrial Crops Prod* 30, 152-161.
- Otobone, F.J., Sanches, A.C., Nagae, R., Martins, J.V., Sela, V.R., de Mello, J.C., Audi, E.A., 2007. Effect of lyophilized extracts from guarana seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 21, 531-535.
- Otobone, F.J., Sanches, A.C., Nagae, R.L., Martins, J.V.C., Obici, S., Mello, J.C.P., Audi, E.A., 2005. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive performance in morris water maze in rats. *Braz Arch Biol Techn* 48, 723-728.
- Parente, J.M.L., Parente, M.P.P.D., 2010. Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori*. *GED: gastroenterologia endoscopia digestiva* 29.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H., Friedman, G.D., 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330, 1267-1271.
- Pastene, E., Speisky, H., Garcia, A., Moreno, J., Troncoso, M., Figueroa, G., 2010. In vitro and in vivo effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem* 58, 7172-7179.
- Pastene, E., Speisky, H., Troncoso, M., Alarcon, J., Figueroa, G., 2009a. In vitro inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils. *J Agric Food Chem* 57, 7743-7749.
- Pastene, E., Troncoso, M., Figueroa, G., Alarcon, J., Speisky, H., 2009b. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *J Agric Food Chem* 57, 416-424.
- Polo, S.H.O., 2006. Estrutura e desenvolvimento de sementes de *Paullinia* L. (Sapindaceae), Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas,, Campinas, p. 107.
- Poupard, P., Sanoner, P., Baron, A., Renard, C.M., Guyot, S., 2011. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 46, 1186-1197.

- Rangel, M.P., de Mello, J.C.P., Audi, E.A., 2013. Evaluation of neurotransmitters involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia cupana* (guarana) in elevated T maze. *Rev Bras Farmacogn* 23, 358-365.
- Roncon, C.M., Biesdorf de Almeida, C., Klein, T., de Mello, J.C., Audi, E.A., 2011. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guarana seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Med* 77, 236-241.
- Schultz, A.R., 1968. Introdução ao estudo da Botânica Sistemática, 3 ed. Globo, Porto Alegre.
- Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V.E., 2002. Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde, 1 ed. Editora Manole Ltda., Barueri.
- Silva, S.M., Abe, S.Y., Bueno, F.G., Lopes, N.P., de Mello, J.C., Nakashima, T., 2014. Direct proof by ¹³C-nuclear magnetic resonance of semi-purified extract and isolation of ent-Catechin from leaves of *Eucalyptus cinerea*. *Pharmacogn Mag* 10, 191-194.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5 ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre.
- Somner, G.V., Ferrucci, M.S., Acevedo-Rodríguez, P., Coelho, R.L.G., Perdiz, R., 2013. Sapindaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Teymournejad, O., Sattari, M., Mobarez, A.M., Esmaeili, D., 2010. Antibacterial Effects of persica mouth wash on *Helicobacter pylori* Growth. *J Glob Infect Dis* 2, 197-198.
- Wawer, I., Wolniak, M., Paradowska, K., 2006. Solid state NMR study of dietary fiber powders from aronia, bilberry, black currant and apple. *Sol Stat Nucl Magn Reson* 30, 106-113.
- Wotherspoon, A.C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R., Isaacson, P.G., 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338, 1175-1176.
- Yamaguti-Sasaki, E., 2006. Extratos de semente de *Paullinia cupana*: avaliação fitoquímica, capacidade antioxidante e estudo preliminar microbiológico na prevenção da formação da placa dental, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 139.
- Yamaguti-Sasaki, E., Ito, L.A., Canteli, V.C., Ushirobira, T.M., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., de Mello, J.C., 2007. Antioxidant capacity and in vitro

prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 12, 1950-1963.

Yoshida, K., Hishida, A., Iida, O., Hosokawa, K., Kawabata, J., 2008. Flavonol Caffeoylglycosides as α -Glucosidase Inhibitors from *Spiraea cantoniensis* Flower. *J Agric Food Chem* 56, 4367-4371.

Zhang, L.L., Lin, Y.M., Zhou, H.C., Wei, S.D., Chen, J.H., 2010. Condensed tannins from mangrove species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and their antioxidant activity. *Molecules* 15, 420-431.

Zhao, Y., Li, X., Zeng, X., Huang, S., Hou, S., Laia, X., 2013. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*, *Analytical Methods*. The Royal Society of Chemistry.