

## Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência

Gisely Cristiny Lopes<sup>1</sup>, Andréia Cristina Conegero Sanches<sup>2</sup>, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo<sup>1</sup>, Ana Cristina Isler<sup>1</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, <sup>2</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Um método de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa foi desenvolvido usando água (0,05% de TFA):acetonitrila (0,05% de TFA) como fase móvel, em sistema gradiente para a análise dos flavan-3-óis presentes em extrato semipurificado das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron obovatum*. A CLAE foi realizada com a fração acetato de etila (FAE) sendo submetida à extração em fase sólida (cartucho C18-E) com metanol:água (2:8), filtrada por membrana de porosidade 0,5 µm; a pré-coluna e coluna empregadas foram Phenomenex® Gemini C-18 (5 µm), com esta última mantida a 30 °C, com vazão de 0,8 mL/min e detecção a 210 nm. Utilizaram-se soluções dos padrões de ácido gálico e galocatequina para a obtenção da curva analítica. O método proposto foi validado de acordo com a resolução RE n° 899/2003 da ANVISA. A análise quantitativa da FAE das três espécies mostrou que existe similaridade no teor de galocatequina. *S. adstringens* possui ácido gálico em uma proporção superior a 60% em relação às outras duas espécies. A metodologia desenvolvida mostrou-se viável à aplicação em plantas ricas em taninos, como nos casos de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*.

**Unitermos:** *Stryphnodendron adstringens*. *Stryphnodendron polyphyllum*. *Stryphnodendron obovatum*. Cromatografia líquida de alta eficiência. Taninos/determinação quantitativa. Análise quantitativa.

A method of separation and quantification by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed, using water (0.05% TFA):acetonitrile (0.05% TFA) as the mobile phase in a gradient system. Flavan-3-ols present in a semipurified extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum* and *Stryphnodendron obovatum* were analyzed. The HPLC was performed with the ethyl-acetate fraction (EAF) using a solid-phase extraction on cartridges C18-E with methanol:water (2:8), filtered through a membrane of 0.5 µm pore size; the column was Phenomenex® Gemini C-18 (5 µm) at 30 °C, with a flow rate of 0.8 mL/min. The analysis was done at 210 nm. Gallic acid and galocatechin solutions were used as calibration standards. The proposed method was validated by resolution RE No. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency. Quantitative analysis of the EAF showed high contents of flavan-3-ols in the stem bark of all three species. This study demonstrated that it is possible to determine the concentration of individual substances in tannin-rich plants. The system developed can be used as a chromatographic profile for the semipurified fraction of *S. adstringens*, *S. polyphyllum*, and *S. obovatum*.

**Uniterms:** *Stryphnodendron adstringens*. *Stryphnodendron polyphyllum*. *Stryphnodendron obovatum*. High-performance liquid chromatography. Tannins/quantitative determination. Quantitative analysis.

### INTRODUÇÃO

*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville,

\*Correspondência: J. C. P. Mello. Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 - 87020-900 - Maringá - PR, Brasil. E-mail: mello@uem.br

*Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. são plantas medicinais que crescem abundantemente nas regiões de cerrado do Brasil, e pertencem à família Leguminosae (Occhioni, 1990). Popularmente são conhecidas como “barbatimão”, sendo extensamente empregadas pela população nativa no trata-

mento de diarreia, leucorréia, como coagulante sanguíneo e cicatrizante (Corrêa, 1926).

A composição química das espécies de *Stryphnodendron* avaliadas até o presente em cascas, folhas e sementes sugere um conteúdo químico constituído por: sapogeninas (Tursch *et al.*, 1963; 1966), galactomananas (Reicher *et al.*, 1992), flavonóides (Pereira, Andrade, Piló-Veloso, 2002) e principalmente taninos (Mello, Petereit, Nahrstedt, 1996a; 1996b; 1999; Lopes *et al.*, 2003; Sanches *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2008). As cascas da espécie *S. adstringens*, constante da Farmacopéia Brasileira, apresentam um conteúdo mínimo de 8% taninos (Farmacopéia Brasileira, 2002).

Estudos com as cascas das espécies do gênero *Stryphnodendron* tem demonstrado: atividade antimicrobiana (Bersani-Amado *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2003; Sanches *et al.*, 2005), antiviral (Felipe *et al.*, 2006), cicatrizante (Jorge-Neto *et al.*, 1996, Palermo *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005), antiúlcera (Audi *et al.*, 1999), antioxidante (Lopes *et al.*, 2005), antiinflamatória (Lima, Martins, De Souza, 1998), antileishmania (Jorge *et al.*, 1996), atividade tripanocida *in vivo* (Herzog-Soares *et al.*, 2002), moluscicida (Bezerra *et al.*, 2002), atividade frente ao tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai* (Holetz *et al.*, 2005) e frente a *Candida albicans* (Ishida *et al.*, 2006).

Portanto, diante do potencial farmacológico das espécies de *Stryphnodendron*, e visando um possível desenvolvimento tecnológico de seus extratos, esse trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de métodos de separação e determinação de taninos presentes em extratos semipurificados das cascas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram coletadas em novembro de 1999 em São Jerônimo da Serra, PR (23°43'7,8" S; 50°45'23,5" W; 926 m altitude), as de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. em dezembro de 2002 em Abadia de Goiás, GO (16°45'32,4" S; 49°25'06,5" W; 860 m de altitude) e as de *Stryphnodendron obovatum* Benth. em fevereiro de 2001, em Assis, SP, (22°35'20,8" S; 50°24'18,7" W; 546 m altitude; autorização do Instituto Florestal de São Paulo, nº. 42.697/2002). A identificação das espécies foi realizada pela Prof. Dra. Cássia Mônica Sakuragui e os documentos taxonômicos encontram-se depositados no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, sob os números HUEM 3800, 9139 e 8583, respectivamente.

### Preparação dos Extratos

Os extratos foram obtidos por turbo extração (Ultraturax® UTC115KT; 20 min;  $t \leq 40$  °C) a 10% (m/v) da droga vegetal, usando como líquido extrator uma mistura acetona:água (7:3). Após, os extratos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida e liofilizados (EB). Os EBs foram dissolvidos em água e particionados com acetato de etila, dando origem a duas novas frações semipurificadas: fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) (Mello, Petereit, Nahrstedt, 1999).

### Solventes e outros materiais

Acetonitrila (grau HPLC, Mallinckrodt), ácido trifluoroacético (TFA) (Merck) e água ultrapurificada (Milli-Q, Millipore) com condutividade de 18 mΩ foram usados para o preparo da fase móvel usada no desenvolvimento dos cromatogramas. Ácido gálico e galocatequina (Sigma) foram usados como padrão externo.

Cartuchos Strata C18-E (55 μm, 70A), com capacidade de extração de 200 mg/3 mL, foram usados para a extração em fase sólida.

A fase móvel foi filtrada com membrana 0,45 μm (FHUP04700, Millipore). Para filtração das amostras, utilizou-se membrana FHLP01300 de porosidade 0,5 μm (Millipore).

### Equipamento e condições cromatográficas

Foi empregado cromatógrafo a líquido Gilson modelo 321, injetor manual Rheodine e alça de injeção de 20 μL, detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156, sistema de degaseificação de solvente Gilson Degasser 864 e forno Gilson 831. A temperatura do forno para coluna foi mantida em 30 °C e os cromatogramas foram observados a 210 nm, com detectibilidade de 0,5 AUFS. O sistema de controle foi realizado pelo software UniPoint LCNT®. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, foram usados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex®, modelo Gemini, porosidade 5 μm. A separação cromatográfica foi realizada utilizando água: 0,05 % de TFA (v/v) (fase A) e acetonitrila: 0,05% de TFA (v/v) (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 0,8 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 10 min: 19,35% fase B; 13,5 min: 25% fase B; 23 min: 38% fase B; 25 min: 75% fase B; 28 min: 5% fase B; 32 min: 5% fase B; o volume injetado foi de 100 μL. Os picos dos cromatogramas foram identificados e comparados com o tempo de retenção dos padrões ácido gálico e galocatequina. Para análise da especificidade foi

empregado cromatógrafo a líquido Varian ProStar 240 com detector de arranjo de fotodiodos Varian 330. O sistema de controle foi realizado pelo software System Control Varian Star. Para o desenvolvimento dos cromatogramas as condições seguem como acima.

### Preparo das amostras para análise por CLAE

O extrato purificado (FAE; 5 mg) foi retomado com 1 mL de metanol:água (2:8, v/v) e extraído em cartucho C18-E, previamente acondicionado. Foram eluídos 9 mL de metanol:água (2:8), sendo o eluato recolhido em balão volumétrico de 10 mL com aferição de volume. As soluções foram filtradas através de membrana FHLP01300 e aplicadas no injetor cromatográfico com auxílio de microseringa com capacidade para 200 µL.

### Curva analítica da galocatequina e ácido gálico

Aproximadamente 3,8 mg, exatamente pesados, de galocatequina padrão foram dissolvidos em metanol:água (50:50, v:v) em balão volumétrico de 25 mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 1,14; 2,28; 4,56; 9,12 e 18,24 µg/mL. De forma semelhante, realizou-se com o ácido gálico padrão. Aproximadamente 10 mg, exatamente pesados, foram dissolvidos em metanol:água (50:50, v/v) em balão volumétrico de 100 mL. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 2,0; 4,0; 8,0; 14,0 e 16,0 µg/mL. As soluções foram filtradas através de membrana (FHLP01300) de porosidade 0,5 µm e aplicadas no injetor cromatográfico com auxílio de microseringa com capacidade de 200 µL. As áreas dos picos referentes ao ácido gálico e galocatequina (padrão e amostras) foram determinadas por integração e as concentrações nas amostras foram calculadas através da curva de regressão linear definida pela equação:  $y = ax + b$ .

### Parâmetros de validação

#### Especificidade

A especificidade do método proposto foi demonstrada através da injeção em quintuplicata das soluções de amostras e dos padrões ácido gálico e galocatequina, previamente filtrados, em cromatógrafo Varian ProStar 240 com detector de arranjo de fotodiodos Varian 330.

#### Linearidade

A linearidade foi determinada pela curva analítica desenvolvida por CLAE, para os padrões ácido gálico e galocatequina. A faixa de concentração apropriada foi

determinada. O coeficiente de correlação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular e demais parâmetros foram obtidos através da análise de variância realizada pelo programa STATISTICA®.

#### Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através da relação entre o desvio-padrão da curva analítica e o coeficiente angular, usando-se o fator multiplicador apropriado, conforme sugerido na RE nº 899/03 (Brasil, 2003).

#### Precisão

##### • Precisão intra-corrída (repetibilidade)

O teste de repetibilidade foi realizado através de três repetições, utilizando-se seis determinações para a solução de extratos semipurificados, realizadas pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, verificando-se se os resultados encontravam-se dentro da diferença máxima aceitável. As áreas dos picos correspondentes ao ácido gálico e galocatequina foram determinadas a 210 nm. Os valores de área dos picos obtidos foram registrados e comparados, avaliando-se a precisão do método através do desvio-padrão e do coeficiente de variação.

##### • Precisão intermediária (precisão intercorridas)

A precisão intermediária foi expressa através de variações do mesmo laboratório, em dias diferentes, por analistas diferentes e determinadas em três replicatas.

##### • Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância ANOVA, onde os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ( $p < 0,05$ ) pelo teste *t* de Student, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ . A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Software Prisma®, STATISTICA® e Excel®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para remover os interferentes da matriz, e viabilizar uma eficiente purificação do extrato, optou-se pela extração em fase sólida. A extração de substâncias fenólicas de alta massa molar do extrato vegetal é de grande importância, pela interação que essas substâncias apresentam com a fase estacionária; o que pode causar grandes danos à coluna analítica, levando a interferência no processo cromatográfico (Głowniak, Zgórk, Kozyra, 1996). O uso de cartuchos C18 na purificação de proantocianidinas foi reportado anteriormente por Suarez, Picinelli, Mangas

(1996), Papegiannopoulos *et al.* (2002) e Garcia, Cancho Grande, Gándara (2004), sendo considerado um excelente método de purificação prévia.

Na extração em fase sólida (cartucho C18-E), a eluição com 9 mL de metanol:água (2:8) resultou na completa extração das substâncias de menor massa molar (monômeros, dímeros e trímeros), possibilitando a caracterização por CLAE desses extratos. Esses resultados foram obtidos, após a otimização e avaliação de diferentes polaridades entre metanol:água como sistema eluente.

Os extratos de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* apresentam teor em taninos totais da ordem de: 19, 12 e 19%, respectivamente (Audi *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2005); apresentando em sua constituição química substâncias com diferentes graus de polimerização e classes de taninos condensados (profisetinidinas, prorobinetinidinas e prodelfinidinas).

A separação das proantocianidinas presentes nos extratos é dificultada, principalmente, pela similaridade de estruturas. Para diminuir a interação entre os grupos hidroxilas livres e a fase estacionária, a fase móvel foi acidulada (TFA). Isto se fez necessário devido ao fato de os flavan-3-óis serem mais estáveis em meio ácido, como reportado por Zhu *et al.* (1997). Além disso o uso de TFA diminui a ionização dos grupos fenólicos entre as separações. Portanto, a presença de ácido na fase móvel é essencial para a completa separação dos flavan-3-óis presentes na mistura, especialmente para a eliminação de cauda nos picos do cromatograma (Dalluge *et al.*, 1998).

As diminutas diferenças estruturais entre as substâncias, como a presença ou mesmo ausência de hidroxilas ou metoxila, é suficiente para a obtenção de boa separação entre as mesmas, porque estas se distribuem na coluna, de acordo com sua polaridade e força eluotrópica do sistema eluente (Szepesi, 1990). Porém, no caso de proantocianidinas a ordem de eluição na coluna depende do grau de polimerização da molécula, havendo significativa correlação entre o tempo de retenção e a massa molar da substância (Yanagida, Shoji, Kanda, 2002). Isto pode ser observado na Figura 1, tendo em vista que as substâncias de baixa massa molar possuem um tempo de retenção pequeno, enquanto que as substâncias de alta massa molar permanecem retidas por mais tempo na coluna.

A condição cromatográfica descrita na metodologia foi encontrada, depois da avaliação com diferentes fases móveis e diferentes misturas de seus constituintes, entre metanol, água e acetonitrila.

Em estudo preliminar usando metanol:água:ácido acético em coluna LiChrospher® 100 RP-18, as condições de otimização para a separação das substâncias não foram mantidas, principalmente em relação ao tempo de

retenção. Isso se deve principalmente ao ajuste da força eluotrópica inadequada e a faixa de pH.

O sistema gradiente desenvolvido resultou na completa separação dos picos de interesse em 32 minutos, incluindo o tempo de equilíbrio da coluna entre as injeções. Foram determinados os tempos de retenção do ácido gálico e galocatequina na FAE das três espécies vegetais analisadas. Com a finalidade de se determinar quais picos na FAE correspondem às substâncias ácido gálico e galocatequina, foi realizada uma co-cromatografia. A adição das mesmas não levou ao surgimento de novos picos, nem a alteração da aparência dos já existentes, aumentando especificamente a intensidade daqueles com tempo de retenção ( $t_R$ ) semelhante aos das substâncias de referência ácido gálico e galocatequina. Através desta análise, foi possível certificar a identidade dos picos da FAE, como sendo aqueles das mesmas substâncias co-cromatografadas.

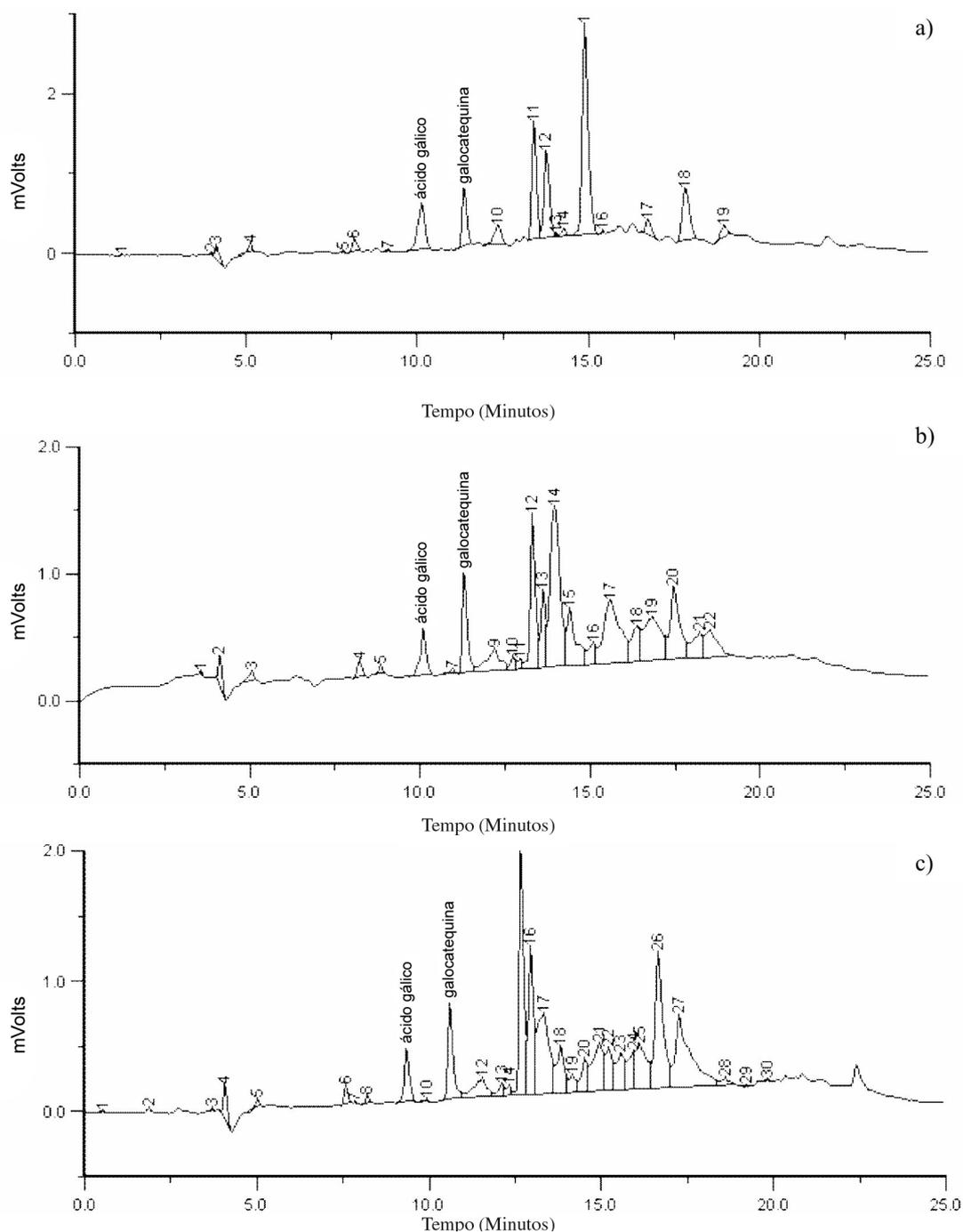
A validação deste método de desenvolvimento analítico foi realizada de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 899 (Brasil, 2003).

A seletividade do método foi avaliada pela análise dos cromatogramas das soluções de FAE que apresentaram boa resolução dos picos de ácido gálico e galocatequina, indicando que o método pode ser aplicado para a determinação seletiva destes polifenóis em extrato semipurificado das espécies *Stryphnodendron* (Figura 1).

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico a 210 nm dos extratos semipurificado (FAE) de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, respectivamente, mostrando a boa separação entre ácido gálico e galocatequina, com os respectivos tempos de retenção: 10,0 e 11,3 min para *S. adstringens*, 10,1 e 11,3 min para *S. polyphyllum*, e 9,4 e 10,6 min para *S. obovatum*. Os picos cromatográficos obtidos apresentam-se simétricos e com boa resolução da linha de base.

A especificidade do método está relacionada ao evento da detecção e representa a capacidade de identificar e quantificar uma substância na presença de interferentes numa referida amostra, que constitua uma mistura complexa. A resolução entre os picos (ácido gálico e galocatequina) na amostra, após análise dos cromatogramas empregando cromatógrafo com detector de arranjo de fotodiodos, caracterizou a especificidade do método (dados não mostrados). Os espectros no UV das substâncias (ácido gálico e galocatequina) comprovaram a ausência de impurezas, pois estes não variaram do início ao fim da eluição dos picos.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear "R<sup>2</sup>" entre as áreas do analito nos padrões e as concentrações correspondentes destas substâncias na curva resposta. A comprovação do teste foi realizada a partir

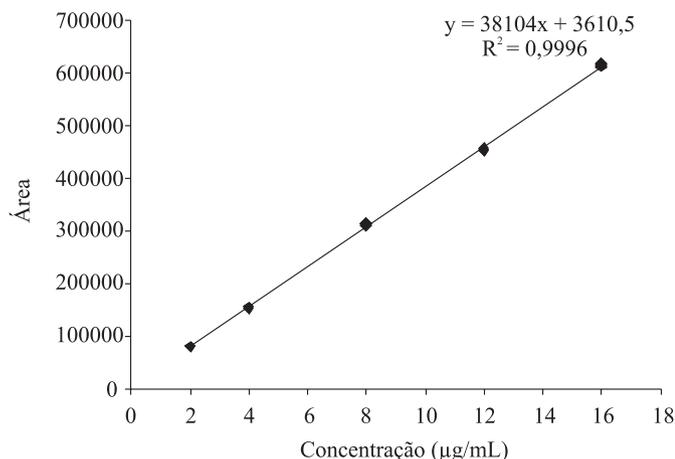


**FIGURA 1** - Perfil cromatográfico a 210 nm do extrato semipurificado: a) *S. adstringens*, b) *S. polyphyllum*, c) *S. obovatum*. Picos correspondentes ao ácido gálico e galocatequina. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5  $\mu$ m), C-18, coluna (250 x 4.6 mm d.i.; 5  $\mu$ m), Phenomenex® Gemini C-18; fase móvel: água: 0,05 % de TFA (v/v) (fase A) e acetonitrila: 0,05% de TFA (v/v) (fase B); 0 min: 5% fase B; 10 min: 19,35% fase B; 13,5 min: 25% fase B; 23 min: 38% fase B; 25 min: 75% fase B; 28 min: 5% fase B; 32 min: 5% fase B; vazão: 0,8 mL/min; detecção: 210 nm.

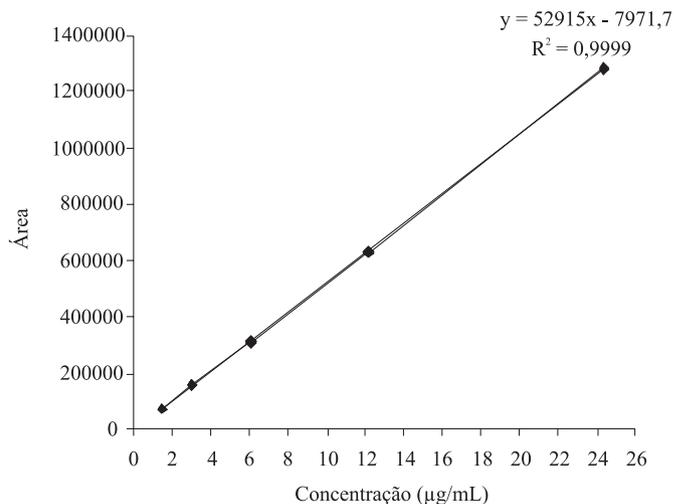
da análise de variância (ANOVA) e análise de resíduos.

As curvas analíticas para os padrões ácido gálico e galocatequina estão representadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. O método mostrou-se linear entre as concentrações analisadas.

Através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área, foi calculado o limite de detecção e quantificação, obtendo-se os valores de 0,16 e 0,54  $\mu$ g/mL para o ácido gálico, e 0,11 e 0,38  $\mu$ g/mL para a galocatequina, respectivamente.



**FIGURA 2** - Curva analítica do ácido gálico. Valor mínimo do coeficiente de correlação (“R<sup>2</sup>”) estipulado pela RE n° 899: 0,9900.



**FIGURA 3** - Curva analítica da galocatequina. Valor mínimo do coeficiente de correlação (“R<sup>2</sup>”) estipulado pela RE n° 899: 0,9900.

Os resultados de repetibilidade de cada extrato encontram-se na Tabela I e mostram um coeficiente de variação inferior ao especificado pela RE n° 899, que especifica o limite do coeficiente de variação em 5,0%.

Os resultados de precisão intermediária de cada extrato demonstrado na Tabela II, avaliados através da ANOVA, demonstram não haver diferença significativa em nível de 95% de confiança entre os valores.

A partir dos dados apresentados na Tabela I, é possível observar na comparação entre as espécies, a ocorrência de maior teor de ácido gálico em *S. adstringens*, superior a 60%, quando comparado com as outras duas espécies, sendo que a concentração de galocatequina, no entanto, é similar entre as três espécies. Este resultado referenda a peculiar proximidade taxonômica entre as espécies.

**TABELA I** – Avaliação da repetibilidade dos extratos de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*.

Amostra	Concentração (µg/mL), [ $\bar{x} \pm dp$ (CV%)]	
	Ácido gálico	Galocatequina
<i>S. adstringens</i>	0,279 ± 0,009 (3,32%)*	0,399 ± 0,003 (0,75%)
<i>S. polyphyllum</i>	0,106 ± 0,001 (1,69%)*	0,378 ± 0,004 (1,11%)*
<i>S. obovatum</i>	0,092 ± 0,004 (4,84%)*	0,380 ± 0,01 (3,01%)

\* Pico com tempo de retenção observado com área menor do que LQ e/ou LD

**TABELA II** – Avaliação da precisão intermediária dos extratos de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* [ $\bar{x} \pm dp$  (CV%)].

Analista	Dia	<i>S. adstringens</i>		<i>S. polyphyllum</i>		<i>S. obovatum</i>	
		Ácido Gálico	Galocatequina	Ácido Gálico	Galocatequina	Ácido Gálico	Galocatequina
A-1	Dia 1	0,2855±0,008 (3,07%)*	0,3911±0,007 (2,02%)	0,1042±0,002 (2,50%)*	0,3757±0,004 (1,12%)*	0,0933±0,003 (4,06%)*	0,3835±0,004 (1,25%)
	Dia 2	0,2858±0,011 (4,01%)*	0,3947±0,005 (1,46%)	0,1055±0,002 (2,63%)*	0,3829±0,009 (2,49%)	0,0896±0,004 (4,64%)*	0,3828±0,012 (3,21%)
A-2	Dia 3	0,2813±0,002 (0,94%)*	0,3910±0,009 (2,42%)	0,1059±0,001 (0,88%)*	0,3799±0,007 (1,95%)*	0,0926±0,004 (4,36%)*	0,3815±0,009 (2,44%)
	Dia 4	0,2834±0,010 (3,57%)*	0,3944±0,008 (2,23%)	0,1068±0,002 (2,34%)*	0,3829±0,008 (2,27%)	0,0910±0,004 (4,40%)*	0,3848±0,009 (2,47%)

\* Pico com tempo de retenção observado com área menor do que LQ e/ou LD

## CONCLUSÕES

O método de separação otimizado neste trabalho permitiu a determinação do ácido gálico e da galocatequina presentes na fração acetato de etila das espécies em estudo.

O uso de cartuchos C18-E como suporte para a extração em fase sólida, permitiu melhor resolução e repetibilidade na separação cromatográfica; e a fase móvel acidulada, em sistema gradiente, resultou na diminuição no tempo de análise.

Em vista dos resultados obtidos, a metodologia aqui aplicada demonstrou potencial para sua aplicação em outros extratos vegetais ricos em taninos, como nos casos de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro da CAPES, CNPq e da Fundação Araucária. Ao Instituto Florestal de São Paulo pela permissão da coleta de *Stryphnodendron obovatum*. Agradecemos também a Admir Arantes pela assistência técnica e Cláudio Roberto Novello pela assistência técnica e auxílio nas discussões do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.95, p.367-373, 2000.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother. Res.*, Reading, v.13, p.264-266, 1999.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, C. E. M.; SANTOS, F. S.; BELLANDA, P. R.; ALVES-DO-PRADO, W.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; SAKURAGUI, C. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; MELLO, J. C. P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. *Acta Farm. Bonaerense*, Buenos Aires, v.23, p.328-333, 2004.
- BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J. C. P. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, F006, 1996, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, Milan, v.73, p. 428-430, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica (RE) nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Diário Oficial da União*, 2.6.2003. Disponível em <e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>. Acesso em: 26 out. 2005.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Oficial, 1926. v.6, p.747.
- DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C.; THOMAS, J. B.; SANDER, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.793, p.265-274, 1998.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 4.ed. (Fasc.4, monografia 176). São Paulo: Atheneu, 2002.
- FELIPE, A. M. M.; RINCÃO, V. P.; BENATI, F. J.; LINHARES, R. E.; GALINA, K. J.; TOLEDO, C. E. M.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol. Pharm. Bull.*, Japão, v.29, p.1092-1095, 2006.
- GARCÍA, A. A.; CANCHO GRANDE, B.; GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.1054, p.175-180, 2004.
- GLOWNIAK, K.; ZGÓRKA, G.; KOZYRA, M. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.730, p.25-29, 1996.

- HERZOG-SOARES, J.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Rev. Bras. Farmacogn.*, São Paulo, v.12, p.1-2, 2002.
- HOLETZ, F. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.100, p.397-401, 2005.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, Oxford, v.58, p. 942-949, 2006.
- JORGE NETO, J.; FRACASSO, J. F.; CAMARGO NEVES, M. C. L.; SANTOS, L. E.; BANUTH, V. L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius. *Rev. Cienc. Farm.*, Araraquara, v.17, p.181-186, 1996.
- JORGE, A. S.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; MELLO, J. C. P.; BERTOLINI, D.A. Anti-leishmanial "barbatimão" (*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae) extract against promastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.91, supl., novembro, p.1976, 1996.
- LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA JR., P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.*, Reading, v.12, p.218-220, 1998.
- LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Estudos físico-químico, químico e biológico de cascas e extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, Maringá, v.13, p.24-27, 2003.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J. Ethnopharmacol.*, Leiden, v.99, p.265-272, 2005.
- LOPES, G. C.; MACHADO, F. A. V.; TOLEDO, C. E. M.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, London, v.36, n.12, p.925-931, 2008.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, New York, v.41, p.807-813, 1996a.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, New York, v.42, p.857-862, 1996b.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, New York, v.51, p.1105-1107, 1999.
- OCCHIONI, E. M. L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Bot. Bras.*, Porto Alegre, v.4, p.153-158, 1990.
- PALERMO, D.; PEREIRA, L. C. M. S.; MELLO, J. C. P.; HERNANDES, L. Atividade cicatrizante do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville] em feridas cutâneas. *Arq. Apadec.*, Maringá, v.6, p.2, 2002.
- PAPAGIANNPOULOS, M.; ZIMMERMANN, B.; MELLENTHIN, A.; KRAPPE, M.; MAIO, G.; GALENSA, R. Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.958, p.9-16, 2002.
- PEREIRA, M. N. S.; ANDRADE, A. C. U.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. Cuiabá. *Resumos*. Cuiabá: UFMT, 2002. QI.017.
- REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v.34/35, p.349, 1992.
- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.41, p.101-107, 2005.

- SUÁREZ, B.; PICINELLI, A.; MANGAS, J. J. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.727, p.203-209, 1996.
- SZEPESI, G. *HPLC in pharmaceutical analysis*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1990. v.1, p.6-9.
- TURSCH, B.; TURSCH, E.; HARRISON, I. T.; BRAZÃO da SILVA, G. B. C. T. de C.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; DJERASSI, C. Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformational changes in triterpenes of the  $\beta$ -amyrin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. *J. Org. Chem.*, Washington, v. 28, p. 2390-2394, 1963.
- TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E.; CHIURDOGLU, G. Triterpenes II (\*). Les sapogénines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. *Bull. Soc. Chim. Belges*, Bruxelles, v.75, p.26-28, 1966.
- YANAGIDA, A.; SHOJI, T.; KANDA, T. Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Japão, v.66, p.1972-1975, 2002.
- ZHU, Q. Y.; ZHANG, A.; TSANG, D.; HUANG, Y.; CHEN, Y. Z. Stability of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, Davis, v.45, p.4624-4628, 1997.

Recebido para publicação em 08 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 24 de junho de 2008.