

# Análise qualitativa e quantitativa dos taninos presentes em *Gomidesia palustris*

Chemical assays and chromatographic analysis from tannins contents in *Gomidesia palustris* (DC.) Kausel (Myrtaceae)

Marlise A.S. Prates de Lima\*, George G. Ortega & Eloir P. Schenkel

**RESUMO** – *Gomidesia palustris* (DC.) Kausel é uma planta pertencente à família Myrtaceae, de ampla ocorrência na região sul do Brasil, conhecida popularmente como “pitangueira-do-mato” ou “guamirim”. Não tendo sido encontradas referências a estudos anteriores, as folhas e os frutos foram analisados quanto à composição química. Os testes preliminares indicaram teor elevado de taninos. Os ensaios químicos e a análise cromatográfica indicaram a presença de taninos hidrolisáveis, com a predominância de taninos elágicos. Para a quantificação desse tipo de composto foi utilizado, com algumas adaptações, o método de hemoanálise com doseamento espectrofotométrico da hemoglobina residual, após precipitação dos taninos, sendo encontrado um valor médio de 12,71% de compostos tanantes nas folhas. Através de processos cromatográficos, foram isolados o ácido elágico e o ácido gálico.

**SUMMARY** – *Gomidesia palustris* (DC.) Kausel (Myrtaceae) is an evergreen tree widely spread in southern Brazil and surrounding regions, commonly known as “pitangueira-do-mato” or “guamirim”. There is no former reference to the chemical studies of this species.

Preliminary tests and further chemical assays and chromatographic analysis detected high tannins contents in the leaves, chiefly hydrolysable tannins with predominance of ellagitanins. Ellagic acid and gallic acid were isolated by chromatographic methods.

The content of the tannins was determined by spectrophotometric haemoanalysis after a partial precipitation with tannins (modified Bate-Smith's method). A mean content of 12,71% was found in the leaves.

## INTRODUÇÃO

*Gomidesia palustris* (DC.) Kausel é uma espécie da família Myrtaceae, conhecida popularmente no Rio Grande do Sul como “pitangueira-do-mato” ou “guamirim”. Sua distribuição, no Brasil, é restrita ao Sul de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, ocorrendo também em países vizinhos, como nordeste da Argentina, Paraguai e norte do Uruguai (Legrand, 1967; Mattos, 1983).

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e mais de 3.000 espécies localizadas em regiões tropicais e subtropicais (Cronquist, 1981). O gênero *Gomidesia*, por sua vez, possui cerca de 40 espécies (Legrand, 1958). Esta amplitude se reflete na quantidade de estudos químicos realizados, sendo destaque na família a ampla ocorrência de polifenóis, taninos e óleos voláteis (Hegnauer, 1964; Cronquist, 1981).

Na família é freqüente a ocorrência de taninos gálicos e elágicos (Bhatia e Bajaj, 1975; Painuly e Tandon, 1983; Mair *et alli*, 1987). A presença de ácido gálico e ácido elágico livres é freqüen-

temente relatada (Egawa *et alli*, 1977; Yazaki, 1977).

Sobre *Gomidesia palustris* não foram encontradas referências químicas. Considerando o alto teor de componentes fenólicos característicos da família, o presente trabalho relata a caracterização e quantificação dos compostos tanantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram realizadas duas coletas de material vegetal. A primeira, foi realizada no município de Guaíba, RS, em novembro de 1990. A segunda, no município de Arroio dos Ratos, RS, em fevereiro de 1992, quando foram coletados frutos e folhas.

### Preparação dos extratos

As folhas e os frutos foram separados do resto da planta enquanto o material vegetal ainda estava fresco. As folhas da primeira coleta foram maceradas em etanol. As folhas e os frutos da segunda coleta foram separados em três partes. Uma parte

foi macerada com acetato de etila, outra com n-butanol e uma terceira com acetona-água na promoção de 1:1. A seguir, os extratos acetona-água foram concentrados até total evaporação da acetona e submetidos a extração com éter etílico, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.

### Análise qualitativa de taninos

Para a análise qualitativa de taninos foram realizados os ensaios químicos clássicos, conforme metodologia descrita por Schmidt (1955). Os materiais utilizados nestes ensaios foram o extrato etanólico das folhas, os extratos acetato de etila das folhas e dos frutos e as frações acetato de etila, n-butanólica e aquosa das folhas e dos frutos. Para a análise cromatográfica em camada delgada foi utilizado n-butanol-ácido acético-água (4:1:5 - fase superior) como eluente, como suporte, celulose e, como agentes de detecção: luz ultravioleta 360 nm e cloreto férrico. As amostras autênticas utilizadas foram: ácido gálico, de procedência Merck; ácido elágico, (+) catequina, (-) epicatequina de

Recebido em 10/04/95

\*Parte de sua dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia-UFRGS  
Av. Ipiranga, 2752-90610-000 Porto Alegre-RS. Apoio financeiro CNPq

procedência Roth e ácido tânico de procedência Baker Chemical.

### Hidrólise de taninos

Para a hidrólise dos taninos foi utilizada a técnica segundo Seikel e Hillis, 1970.

### Análise quantitativa de taninos

A quantificação dos taninos foi realizada conforme o método de hemoanálise (adstringência relativa), proposto por Bate-Smith (1973), também chamado de método do eritrócito, com algumas modificações. Como substância de referência foi utilizado o ácido tânico.

### Preparação do extrato

Cerca de 1,0 g das folhas secas, reduzidas a pó, foram exatamente pesadas e extraídas, três vezes, sob refluxo moderado, com 100 mL de solução de metanol a 50%, durante 10 minutos cada. Os extratos foram decantados e filtrados a frio usando algodão. Os filtrados foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório a vácuo a uma temperatura de 30 a 40°C até um volume aproximado de 40 mL. O concentrado foi a seguir levado a um volume de 100,0 mL com água destilada.

### Preparação da amostra de sangue

Cerca de 10 mL de sangue venoso humano foram coletados com seringa. A amostra foi fracionada em duas partes, uma para análise laboratorial, visando a caracterização do sangue e outra para análise quantitativa de taninos.

Características do sangue: proteínas totais: 7,8 g/dL; número de eritrócitos: 4,1 milhões/mm<sup>3</sup>; hemoglobina: 11,4 g%; hematócrito: 37%.

Para a análise quantitativa de taninos foi acrescentado ao sangue uma solução aquosa de ácido etilenodiaminotetracético a 10% (EDTA) como anticoagulante, na proporção de 0,1 mL de solução de EDTA para cada 5 mL de sangue. Após, 2,00 mL de sangue tratado desta maneira foram diluídos a 100,0 mL com água destilada, promovendo a hemólise e a conseqüente liberação de hemoglobina.

### Preparação da solução de ácido tânico

Cerca de 100,0 mg de ácido tânico foram exatamente pesados e dissolvidos com água destilada. O volume final da

solução foi ajustado a 100,0 mL (igual a solução de 1 mg/mL). As soluções assim preparadas foram imediatamente utilizadas.

### Preparação da curva padrão

Para a elaboração da curva padrão foram acrescentados em cada tubo de centrífuga contendo 2,00 mL da solução de sangue hemolisado: 0,0; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL da solução de ácido tânico, completando o volume final de 4 mL com água destilada. Após a adição das respectivas quantidades de solução de ácido tânico, a cada tubo de centrífuga, os mesmos foram agitados por 15 segundos. O mesmo procedimento foi repetido após adição da quantidade necessária de água destilada. Foram realizadas três determinações para cada diluição.

### Preparação da amostra

Para a preparação da amostra foram acrescentados a cada tubo de centrífuga, contendo 2,00 mL da solução de sangue hemolisado: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,3 mL do extrato, completando o volume final de 4 mL com água destilada. O processo de agitação foi o mesmo utilizado para as diluições da curva padrão. Foram realizadas quatro determinações para cada diluição. Para verificar a interferência da coloração do extrato, foram utilizadas as mesmas diluições empregadas para a amostra, ou seja, 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,3 mL de extrato, completando o volume final de 4 mL com água destilada.

Ao término das preparações acima mencionadas (curva padrão e amostra), as mesmas foram centrifugadas a 5500 rpm durante 10 minutos e os respectivos sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio. A leitura da absorvância foi feita a 578 nm, utilizando água destilada como solução de compensação ("branco").

### Isolamento do ácido elágico

Cerca de 5 g do extrato etanólico das folhas da primeira coleta foram aplicados em uma coluna cromatográfica preparada com 400 g de gel de sílica 60, utilizando acetato de etila: ácido acético: água (90:5:5) como eluente inicial. Prosseguiu-se a eluição, acrescentando a esta mistura quantidades crescentes de etanol e finalmente só etanol. O processo de eluição foi monitorado utilizando

lâmpada ultravioleta universal. As frações 2 a 13 foram reunidas e após concentração apresentaram um precipitado, o qual foi separado por centrifugação. O resíduo obtido foi redisperso em acetato de etila e centrifugado.

A secagem do resíduo rendeu 16 mg da substância a qual foi caracterizada como ácido elágico através de espectroscopia no infravermelho (principais picos: 3100, 1690, 1615, 1330 nm) e co-cromatografia bidimensional, comparando com amostra autêntica.

### Isolamento do ácido gálico

Uma amostra de 324,6 mg da fração éter etílico dos frutos foi fracionada em coluna de Sephadex<sup>R</sup> LH 20, utilizando metanol como eluente. A fração 2, após a evaporação do solvente, mostrou presença de cristais de coloração bege. Após recristalização foram obtidos 7,9 mg da substância caracterizada como ácido gálico, através de co-cromatografia bidimensional, utilizando amostra autêntica e os sistemas: n-butanol-ácido acético água (4:1:5 - fase superior) e ácido acético-ácido clorídrico conc.-água (30:3:10) utilizando celulose como suporte.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos resultados das reações químicas clássicas para taninos (Tabela I), sugere a presença de taninos hidrolisáveis principalmente no extrato etanólico, nas frações n-butanólicas das folhas e dos frutos e nas frações aquosas das folhas e dos frutos. A indicação da presença de taninos condensados foi obtida para as frações n-butanólica e aquosa dos frutos. Porém, o resultado obtido na reação com água de bromo a 2% foi negativo para todas as amostras, o que sugere a ausência de taninos condensados.

Para confirmar os resultados relativos a presença ou não de taninos condensados foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada. Todas as amostras que na avaliação qualitativa para taninos apresentaram algum resultado positivo para taninos condensados foram cromatografadas, tomando como referência amostras autênticas de (+) catequina e de (-) epicatequina. Após revelação com vanilina clorídrica, a presença de taninos condensados não foi constatada em amostra alguma.

A análise qualitativa cromatográfica das amostras nos sistemas n-butanol:

**TABELA I**  
**Resultados das reações químicas qualitativas para taninos realizadas**  
**com diferentes extratos e frações de *Gomidesia palustris***

	KCN	PbAc CH <sub>3</sub> COOH	NaNO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N	NaNO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> COOH	Vanilina 1% HCL 37%	Cloreto férico	Água de Bromo 2%	HCL 1N
EtOH 1ª coleta	++	++	+++	+++	-	verde ++	-	+
AcOEt frutos	+	-	+	+	-	marrom ++	-	++*
AcOEt folhas	-	-	+	+	-	marrom ++	-	-
Fração AcOEt folhas	+++	-	+++	++	-	verde ++	-	-
Fração AcOEt frutos	++	+	++	++	-	azul ++	-	-
Fração n-BuOH folhas	+	++	++	++	-	verde ++	-	-
Fração n-BuOH frutos	++	++	+++	+++	+++	verde ++	-	+
Fração H <sub>2</sub> O folhas	++	++	+++	+++	+	azul +++	-	+
Fração H <sub>2</sub> O frutos	+++	++	+++	+++	+++	azul +++	-	+

+ Coloração fraca

++ Coloração média

+++ Coloração intensa

\* Desaparece

ácido acético 27% (1:1) e BAW (4:1:5 - fase superior) indicou a presença de ácido gálico e de ácido elágico livres em todos os extratos e frações, com exceção do extrato acetato de etila das folhas.

Os resultados dos ensaios químicos e da análise cromatográfica indicam a predominância de taninos hidrolisáveis em folhas e frutos de *Gomidesia palustris*.

A análise cromatográfica das frações acetato de etila, n-butanólica e aquosa de folhas, utilizando o sistema BAW (4:1:5 - fase superior) e como substâncias de referência o ácido tânico, o ácido gálico e o ácido elágico, demonstrou que os taninos hidrolisáveis presentes em *Gomidesia palustris* são extremamente polares, pois todos eles apresentaram um valor de R<sub>f</sub> inferiores ao do ácido elágico (R<sub>f</sub> = 0,36).

Após a realização da hidrólise ácida da fração aquosa das folhas, o principal

produto de hidrólise obtido foi o ácido elágico. Isto indica que os taninos hidrolisáveis presentes em *Gomidesia palustris* são predominantemente taninos elágicos.

O ácido elágico foi isolado através do fracionamento em coluna de gel de sílica do extrato etanólico e identificado através de espectroscopia no infravermelho e co-cromatografia bidimensional com amostra autêntica.

O ácido gálico foi isolado através de cromatografia em coluna de permeação molecular da fração éter etílico dos frutos e identificado através do comportamento cromatográfico e co-cromatografia bidimensional com amostra autêntica.

Para a quantificação dos taninos foi utilizado o método de hemoanálise de Bate-Smith com algumas adaptações, com o intuito de suprimir algumas fontes de erro embutidas no método origi-

nal. Esse método baseia-se na formação de um complexo tanino - hemoglobina, ocasionado pelo envolvimento principalmente de pontes de hidrogênio as hidroxilas fenólicas dos taninos formam fortes pontes de hidrogênio com a carbonila de amida peptídica (Loomis e Battaille, 1966). A quantidade de hemoglobina complexada é calculada a partir da diferença das absorvâncias obtidas por leitura espectrofotométrica a 578 nm da solução não tratada e da solução tratada com ácido tânico (hemoglobina residual). Os resultados do ensaio são expressos em miligramas de ácido tânico por mililitro de extrato.

As medidas de absorvância obtidas para as diferentes concentrações da solução de ácido tânico na elaboração da curva padrão estão representadas na Tabela II. Durante este procedimento foi necessário adicionar quanti-

**TABELA II**

Absorvâncias determinadas para a elaboração da curva padrão obtida através do método de hemoanálise, com doseamento espectrofotométrico

Solução de Ácido Tânico (mg/ml)	Absorvância (y)	Absorvância média ± Desvio Padrão	Absorvância Estimada (y)
0,0	1,098 1,098	1,098 ± 0,0	1,078
0,6	0,697 0,691 0,691	0,693 ± 3,5 x 10 <sup>-3</sup>	0,677
0,8	0,497 0,509 0,517	0,507 ± 1,0 x 10 <sup>-2</sup>	0,543
1,0	0,372 0,370 0,368	0,370 ± 2,0 x 10 <sup>-3</sup>	0,410
1,2	0,260 0,259 0,264	0,261 ± 2,7 x 10 <sup>-3</sup>	0,276
1,4	0,206 0,200 0,190	0,198 ± 8,1 x 10 <sup>-3</sup>	0,143

**TABELA III**

Análise de variância (Anova) da regressão linear para a curva padrão de ácido tânico

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F	Probabilidade
Entre repetições	1	0,550566	0,550566	320,412*	0,0001
Entre diluições	4	0,006873	0,001718		
Total	4	0,557439	-		

\*Significativo para p = 0,05

Dados Estatísticos Complementares  
Análise de resíduos (Durbin-Watson):  
1,3969

Limite de confiança inferior = 0,77177\*\*

Limite de confiança superior =  
0,56450\*\*

Reprodutibilidade (n = 4) = 2,29%

\*\* Valores relativos à inclinação da reta.

dades de sangue maior do que as indicadas no método original de Bate-

\* Pela análise através do método do pó de pele agradecemos ao Prof. Marco A. Dexheimer, Indústrias Seta S.A. - Extrativa Taninos de Acácia, Estância Velha RS.

Smith. Outrossim, a necessidade de empregar um agente anticoagulante levou a testar duas das substâncias, heparina e EDTA. Este último foi escolhido uma vez que, na presença deste, foi observada a formação de complexo tanino-hemoglobina, com um padrão de sedimentação caracterizado pela rápida formação de um sedimento e concomitantemente formação de uma fase sobrenadante límpida e transparente. A adição de heparina, ao contrário, levou a uma separação difícil do sedimento.

A fonte de erro sistemático provocado pela não correção da absorção interferente do extrato livre de taninos

também não é contemplada no método original de Bate-Smith. Foi verificado que soluções extrativas aquosas diluídas das folhas de *Gomidesia palustris* absorviam de fato no comprimento de onda de 578 nm, o que leva a um teor de taninos calculado inferior ao valor real. Face a esta observação, foi introduzido neste trabalho o emprego de soluções de extrato não tratadas, correspondendo ao fator de diluição correspondente, como solução de compensação ("branco").

A equação da reta foi obtida pela análise da regressão linear usando o método dos mínimos quadrados. Os dados relativos à análise de variância (Anova) da regressão linear estão indicados na Tabela III. A análise de variância (Anova) confirma, para o coeficiente de regressão calculado ( $r^2=0,98767$ ), a linearidade no âmbito das concentrações de trabalho ( $F=320,4$ ;  $P=0,0001$ ). A análise de resíduos segundo Durbin-Watson (Drapper e Smith, 1981) não revelou qualquer tendência na distribuição dos resíduos.

A Tabela IV apresenta os resultados da determinação do teor de taninos no extrato. O teor foi calculado por inserção da absorção lida na equação da reta obtida através da análise da regressão linear da curva padrão do ácido tânico.

O teor de taninos foi de 12,71%, expresso em equivalente de ácido tânico. Dessa maneira, as folhas de *Gomidesia palustris* representam uma fonte potencial de taninos. As modificações introduzidas no método permitem contornar o erro sistemático através da introdução de soluções de compensação, tornando o mesmo mais específico e preciso. É importante ressaltar que a linearidade observada para o método corresponde a uma concentração de taninos até 1,4 mg/mL em equivalente de ácido tânico, observando-se acima desta concentração perda crescente de linearidade, explicada pelo esgotamento expressivo da hemoglobina disponível. Para a mesma amostra, a determinação dos taninos pelo método do pó de pele havia indicado para as folhas um valor de 12,52%\*. Esse método é utilizado preferentemente pela indústria de tanagem, mas apresenta algumas desvantagens, como o preço oneroso do pó de pele, a variação inerente do teor de proteínas e o tempo requerido para a análise. O valor observado através do método de hemoaglutinação foi muito próximo

TABELA IV

Teores de taninos calculados para o extrato aquoso das folhas de *Gomidesia palustris*, utilizando a equação da reta estimada para a curva padrão de ácido tânico

y = 0,66814.x + 1,07795					
Extrato (mL)	n	Absorvância Média ± Desvio Padrão	x (mg/mL)	Taninos %	C.V. %
0,5	4	0,684 ± 9,9 x 10 <sup>-3</sup>	0,5896	11,79	1,45
0,6	4	0,545 ± 1,3 x 10 <sup>-2</sup>	0,7976	13,30	2,29
0,7	4	0,458 ± 3,5 x 10 <sup>-3</sup>	0,9279	13,26	0,77
0,8	4	0,353 ± 1,7 x 10 <sup>-2</sup>	1,0850	13,56	4,73
1,0	4	0,195 ± 3,3 x 10 <sup>-3</sup>	1,3215	13,22	1,69
1,2	4	0,102 ± 4,8 x 10 <sup>-3</sup>	1,4607	12,17	4,71
1,3	4	0,066 ± 4,1 x 10 <sup>-3</sup>	1,5146	11,65	6,21

Porcentagem média de taninos = 12,71 ± 0,8057

ao valor encontrado na análise com o pó de pele, sugerindo a equivalência analítica de ambos os métodos, e a possibilidade da sua utilização rotineira para a quantificação de taninos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Bate-Smith, E. C. Ellagitannin content of leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry*, v. 11, pp. 1755-1757, 1972.

2 - Bate-Smith, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative adstringency. *Phytochemistry*, v. 12, pp. 907-912, 1973.

3 - Bhatia, I. S.; Bajaj, K. L. Chemical constituents of the seeds and bark of *Syzygium cumini*. *Planta Médica*, v. 28, pp. 346-352, 1975.

4 - Cronquist, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University, pp. 639-643 1981.

5 - Drapper, N.R.; Smith, H. *Applied regression analysis*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.

6 - Egawa, H. Antifungal substances found in leaves of *Eucalyptus* species. *Experientia*, v.33, 889, 1977.

7 - Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Basel: Birkäuser, v.5, pp. 163 - 195 1964.

8 - Legrand, C. D. Las especies tropicales del genero *Gomidesia*. *Comunicaciones Botánicas del Museo de História Natural de Montevideo*, v.37, pp.1-30, 1958.

9 - Legrand, C. D.; Klein, R. M. Mirtáceas. In: Reitz, P. R. (ed.). *Flora ilustrada catarinense*. I Parte. Fasc. Mirt. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues/CNPq, 1967.

10 - Loomis, W.D.; Battaile, J. Plant of phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, v.5, pp. 423-438, 1966.

11 - Mair, A.G.R.; Pandiyan, M.; Venkatasubramanian, H. Polyphenolic compounds from flowers of *Psidium guajava*. *Fitoterapia*, v.58, pp. 204-205, 1987.

12 - Mattos, J.R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. *Roessléria*, v.5, pp. 169-364, 1983.

13 - Painuly, P.; Tandon, J.S. Two 3 c-methylflavone glycosides from *Eugenia Kurzii*. *Phytochemistry*, v.22, pp. 243, 1983.

14 - Schmidt, O.T. Naturliche Gerbstoffe. In: Paech, K.; Tracey, M. V. (eds.). *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Berlin: Springer, 1955. v.3, pp. 524-526.

15 - Seikel, M. K.; Hills, W.E. Hydrolysable tannins of *Eucalyptus delegatensis* wood. *Phytochemistry*, v.9, pp. 1115-1128, 1970.

16 - Yazaki, Y. Polyphenols and triterpenoids of *Eugenia gustavioides* wood. *Phytochemistry*, v.16, pp. 138-139, 1977.

## Plantas no tratamento da demência senil no Noroeste Amazônico

R.E. Schult - *J. Ethnopharmacology* 38: 129-135, 1993

Os ameríndios do Noroeste Amazônico respeitam os idosos e tentam tratar daqueles que sofrem de demência senil. Pelo menos 25 espécies de plantas são empregadas no tratamento da Doença de Alzheimer ou problemas semelhantes. As plantas são administradas sob a forma de chá das folhas ou raízes por um período de vários dias a numerosas semanas. As plantas são de 15 famílias fanerogâmicas, mas pouco conhecimento se tem da química da maioria das espécies. Em vista do corrente interesse na Doença de Alzheimer e problemas relacionados, essas espécies estão sendo melhor estudadas.

A planta que vem auxiliando os estudos sobre a Doença de Alzheimer é a leguminosa africana, *Physostigma venenosum*, que é de onde é obtida a fisostigmina (Ezerina), um antiacetilcolinesterásico, empregado para estabelecer a natureza do receptor nicotínico relacionado com o tipo da demência.

Na relação apresentada por Schult, algumas espécies apresentam atividade antiacetilcolinesterásica.