

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDOS ANATÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
CASCAS E EXTRATOS OBTIDOS DE BARBATIMÃO  
[*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]**

**CLEYTON EDUARDO MENDES DE TOLEDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

Outubro – 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDOS ANATÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
CASCAS E EXTRATOS OBTIDOS DE BARBATIMÃO  
[*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]**

**CLEYTON EDUARDO MENDES DE TOLEDO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

Outubro – 2002

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

CLEYTON EDUARDO MENDES DE TOLEDO

### **ESTUDOS ANATÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE CASCAS E EXTRATOS OBTIDOS DE BARBATIMÃO [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
UEM – Maringá – PR

Prof. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira  
UNESP – Araraquara – SP

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick  
UFRGS – Porto Alegre – RS

Araraquara, 11 de outubro de 2002

***Dedico este trabalho à  
meu Pai Heitor,  
minha Mãe Alvina e  
minha Esposa Gislaine.  
Os nossos dias serão para sempre...***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador Dr. João Carlos Palazzo de Mello pelo acompanhamento, revisão dos estudos e amizade ao longo destes sete anos. Meu especial agradecimento:

Aos meus irmãos Cleber e Cláudio, minhas cunhadas Sandra e Elisângela e meus sobrinhos Victor, Jorge e Thiago pelo carinho e força em toda minha vida.

Ao professor Dr. Wagner Villegas pela confiança e atenção prestada em minhas análises junto ao seu laboratório.

Aos professores Diógenes, Luís Carlos, Mara e Selma pelo apoio, incentivo, amizade e ensino.

Aos professores Luís Vitor, Cássia, Celso Nakamura e Valdrinez pela orientação e amizade durante a pesquisa.

Ao professor Dr. Heinrich Luftmann do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pelos espectros de massas e ajuda na interpretação.

Aos amigos Rodrigo, Henrique, Alison, Uirá, João e Rita pela enorme contribuição e pelos grandes momentos que passamos juntos.

Aos amigos, Karen, Walter, Elza, Leila, Tânia, Márcia, Admir, Andréia, Cláudio, Lucílio, Claudenice e Wadilson pelo trabalho em equipe e amizade que conquistamos.

Aos amigos Fábio e Roberta (Unesp), Helena e Sônia (UEM), Paulo (imuno clínica), Marinete (micro básica), Angélica (lab. de botânica – Unesp), Cláudia, Laura e Sônia (Unesp) e D. Nair pela amizade, paciência e orientações durante meus estudos.

Aos amigos Carlinhos, Mano (e família), China, Luciano, Luka verna, Stone, Paulinho Schoffen, Robson, Fábio, Gelda, Paulinho, Débora, Zé Carlos e Beta pela amizade e incentivo à cultura musical.

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica – UNESP - Araraquara

À Capes pela liberação de recursos financeiros para que fosse possível a realização deste trabalho.

Apresentações de partes do presente trabalho em Congressos:

- Chemical and Antibacterial evaluation of the stem bark from *Stryphnodendron adstringens* (Martius), Coville, Leguminosae. Toledo, C. E. M.; Uemura, L. M.; Yamaguti, E.; Mitsui, M. L.; Nakamura, C. V.; Mello, J. C. P. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 13, suppl. 1, p. s112, 2001. In: Congress of Pharmaceutical Sciences, 3, 2001, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, de 8 a 11 de abril de 2001.
- Isolamento químico e avaliação microbiológica das cascas do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae. Toledo, C. E. M.; Uemura, L. M.; Yamaguti, E.; Mitsui, M. L.; Nakamura, C. V.; Mello, J. C. P. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 3, 2001, Curitiba. **Resumos...**, Curitiba, Paraná, Brasil, de 26 a 28 de setembro de 2001.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FLUXOGRAMAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
2.1. <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	6
2.2. Taninos condensados.....	12
2.3. Atividade antibacteriana.....	19
2.4. Leishmaniose.....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. Matéria-prima vegetal.....	25
3.2. Solventes e reagentes.....	25
3.3. Equipamentos.....	26
3.4. Descrição anatômica.....	27
3.4.1. Corte a mão livre.....	27
3.4.2. Inclusão do material vegetal em parafina (Montenegro, 1985) .....	28
3.5. Métodos cromatográficos.....	29
3.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	29
3.5.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	29
3.5.3. Cromatografia de contra corrente de alta velocidade (CCCAV).....	30
3.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	30
3.6. Preparação de extratos.....	30
3.6.1. Extrato total (F1) .....	30
3.6.2. Obtenção da fração acetato de etila (F3).....	31
3.6.3. Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila (F3) .....	31

3.6.4. Cromatografia em coluna das subfrações.....	32
3.7. Derivatização química das substâncias isoladas.....	32
3.8. Análise estrutural das substâncias isoladas.....	32
3.9. Hidrólise de dímeros (Mello et al., 1996a).....	33
3.9.1. Unidade superior.....	33
3.9.2. Unidade inferior.....	33
3.10. Ensaio biológicos.....	33
3.10.1. Atividade antibacteriana.....	33
3.10.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	34
3.10.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método da diluição em placas (Amsterdam, 1996).....	34
3.10.1.3. Tempo de morte bacteriana.....	35
3.10.2. Atividade leishmanicida.....	36
3.10.2.1. Meio 199 completo.....	36
3.10.2.2. Repique de cultura.....	36
3.10.2.3. Padronização da cultura de formas promastigotas.....	36
3.10.2.4. Padronização da solução teste (ST).....	36
3.10.2.5. Avaliação da atividade leishmanicida.....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cerrado brasileiro.....	4
2	<i>S. adstringens</i> (Mart.) Coville, Leguminosae – A – Coleta em São Jerônimo da Serra; B – Folíolos; C – Casca picada.....	7
3	Estrutura das sapogeninas 1 e 2.....	8
4	Estrutura das sapogeninas 3 e 4.....	8
5	Flavan-3-óis isolados das cascas do barbatimão [(R=H)].....	9
6	Prodelfinidina dimérica das cascas do barbatimão [(4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina)].....	10
7	Exemplos de proantocianidinas diméricas.....	13
8	Estruturas dos principais monômeros de taninos condensados [(tab. 1)].....	13
9	Estrutura química da cianidina e delfinidina.....	14
10	Exemplo de procianidinas triméricas isoladas da cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> L.); A- catequina-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina; B- galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina.....	15
11	Associação polifenol-proteína [(P- proteína; PF- polifenol) (Haslam et al., 1989)].....	17
12	Precipitação do complexo polifenol-proteína – P- proteína; PF- polifenol; A- baixa concentração de proteínas; B- alta concentração de proteínas; C- interação proteína-fenol (F) (Haslam et al., 1989).....	17
13	Placa de 96 poços com TTC, evidenciando os poços com crescimento bacteriano (poços vermelhos).....	35
14	Corte longitudinal da casca de barbatimão.....	40
15	Células pétreas [(CP)] em corte transversal sem corante.....	40
16	Fibras do floema em corte transversal.....	41
17	Corte longitudinal (safrablau) mostrando fibras do floema [(FF)], raios medulares [(RM)], cristais prismáticos [(CR)] e células	

	parenquimática grandes [(CG)].....	41
18	Corte longitudinal (safrablau) mostrando as fibras do floema [(FF)] e a bainha de cristais prismáticos [(CR)].....	42
19	Corte transversal da casca mostrando as fibras floemáticas, raios medulares, células gigantes e cristais prismáticos.....	42
20	Células com conteúdo pardo [(CD)].....	43
21	CCD das 12 subfrações – [(R <sub>f</sub> a=0,60; R <sub>f</sub> b=0,48; R <sub>f</sub> c=0,36; R <sub>f</sub> d=0,60; R <sub>f</sub> e=0,40; R <sub>f</sub> f=0,30)].....	45
22	Proposta de fragmentação das substâncias I e II [(R= acetato)]...	49
23	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , relativo a TMS, 300 MHz).....	51
24	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	52
25	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância epigalocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , , relativo a TMS, 300 MHz).....	54
26	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância epigalocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	55
27	Espectro de massas da substância III peracetilada.....	57
28	Proposta de fragmentação da substância III [(R= acetato)].....	58
29	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , relativo para TMS, 300 MHz).....	60
30	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	61
31	Espectro HETCOR da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	62
32	Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	62
33	Espectro de massas da substância IV peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	65
34	Proposta de fragmentação da substância IV [(R= acetato)].....	66
35	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl <sub>3</sub> , relativo a TMS, 300 MHz).....	69

36	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	70
37	Espectro HETCOR da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	71
38	Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	71
39	Espectro de massa da substância V peracetilada.....	74
40	Proposta de fragmentação das substâncias V e VI [(R= acetato)].....	75
41	Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina ( $\text{CDCl}_3$ , relativo a TMS, 300 MHz).....	77
42	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina ( $\text{CDCl}_3$ , relativo a TMS, 300 MHz).....	78
43	Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	79
44	Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina ( $\text{CDCl}_3$ , relativo a TMS, 300 MHz).....	82
45	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	83
46	Cromatograma do extrato bruto liofilizado F1 [(A – ác.acético 5%; M – metanol)].....	85
47	Cromatograma da fração acetato de etila F3 [(A- ác.acético 5%; M – metanol)] com a possível localização dos picos das substâncias isoladas [(G – galocatequina; E – epigalocatequina; M – 4'-O-metil-galocatequina; D1 - 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina)].....	85
48	Cromatograma das substâncias isoladas [(A – galocatequina; B – 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina; C – epigalocatequina; D - 4'-O-metil-galocatequina; E – 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina)].....	86
49	Cromatograma das substâncias isolada a partir de F3#2 [(A – subfração F3#2; B - 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina; C - 4'-O-metil-galocatequina; D – 4'-O-metil-	

	robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigallocatequina)].....	87
50	Cromatograma das substâncias isoladas a partir de F3#3 [(A – subfração F3#3; B – galocatequina; C – epigallocatequina)].....	87
51	Curva do tempo de morte bacteriana da subfração F3#12 sobre <i>S. aureus</i> [(X= 125 $\mu$ g/ml)].....	95
52	Inibição do crescimento dos protozoários das subfrações em 24 horas.....	97
53	Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#3.....	98
54	Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#5.....	99
55	Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#7.....	100
56	Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#9.....	101
57	Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#12.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Monômeros de taninos condensados de acordo com a figura 8.....	13
2	Gradiente da fase móvel utilizada para CLAE.....	30
3	Preparação dos tubos estéreis e respectivas concentrações.....	37
4	Doze subfrações obtidas por CC.....	45
5	Deslocamentos da substância I peracetilada.....	50
6	Deslocamentos da substância II peracetilada.....	53
7	Deslocamentos da substância III peracetilada.....	59
8	Deslocamentos da substância IV peracetilada.....	68
9	Deslocamentos da substância V peracetilada.....	76
10	Deslocamentos da substância VI peracetilada.....	81
11	Tempo de retenção das diferentes substâncias isoladas.....	86
12	Concentração inibitória mínima contra <i>P. aeruginosa</i> .....	90
13	Concentração inibitória mínima contra <i>S. aureus</i> .....	90
14	Concentração inibitória mínima contra <i>B. subtilis</i> .....	90
15	Concentração bactericida mínima contra <i>P. aeruginosa</i> .....	90
16	Concentração bactericida mínima contra <i>S. aureus</i> .....	91
17	Concentração bactericida mínima contra <i>B. subtilis</i> .....	91
18	Concentração inibitória mínima com antibacterianos.....	92
19	Concentração inibitória mínima dos antibacterianos.....	93
20	Concentração inibitória mínima das substâncias isoladas.....	93
21	Tempo de morte sobre <i>S. aureus</i> com a subfração F3#12.....	94
22	F3#3 - Média do número de promastigotas [ $\times 10^4$ ].....	98
23	F3#5 - Média do número de promastigotas [ $\times 10^4$ ].....	99
24	F3#7 - Média do número de promastigotas [ $\times 10^4$ ].....	100
25	F3#9 - Média do número de promastigotas [ $\times 10^4$ ].....	101
26	F3#12 - Média do número de promastigotas [ $\times 10^4$ ].....	102

**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

Fluxograma		Página
1	Obtenção das frações e subfrações.....	44
2	Fracionamento cromatográfico a partir de F3#2.....	46
3	Fracionamento cromatográfico a partir de F3#3.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCCAV	Cromatografia de contra-corrente de alta velocidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMH	Caldo Mueller-Hinton
COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H	Espectroscopia de correlação
<i>d</i>	Dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo duplete
F1	Extrato bruto aceto-aquoso liofilizado
F2	Fração aquosa do extrato bruto liofilizado
F3	Fração acetato de etila do extrato bruto liofilizado
F3#...	Subfrações obtidas a partir da fração acetato de etila
FAA	Etanol/água destilada/formol/ác. acético (10:7:2:1)
HETCOR	Espectroscopia de correlação heteronuclear
<i>m</i>	Multiplete
MEOD	Metanol deuterado
NOE	Nuclear overhauser experiment
OMS	Organização mundial da saúde
P.A.	Pró-análise
R <sub>f</sub>	Relação de frente
RMN- <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
ST	Solução teste
STP	Solução teste padronizada
T	Tempo (dias, horas ou minutos)

T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônia

## RESUMO

As cascas do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville há muito tempo são utilizadas pela população para tratamento de várias enfermidades, principalmente como cicatrizante e anti-séptico. Esse trabalho objetivou analisar quimicamente, através de monitoramento biológico, as frações e substâncias obtidas a partir do extrato bruto de suas cascas, além de testá-las nas atividades antibacteriana e leishmanicida. Realizou-se, também, análise anatômica visando conhecer as estruturas das cascas do vegetal. Esses cortes anatômicos viabilizaram parâmetros para o controle de qualidade do vegetal. Foram obtidas 12 subfrações a partir da fração acetato de etila, das quais foram isoladas e identificadas 6 substâncias: galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-robenitinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robenitinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina. As 12 subfrações foram testadas sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as subfrações apresentaram atividade contra as duas primeiras bactérias, enquanto que a F3#12 mostrou ação contra *P. aeruginosa*. As subfrações F3#3, F3#5, F3#7, F3#9 e F3#12 foram testadas contra as formas promastigostas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sendo as duas últimas as mais eficazes em concentrações menores. Assim, os extratos e frações mostraram-se eficazes nos testes biológicos e com um conteúdo químico rico em monômeros e dímeros de taninos condensados.

Palavras-chave: *Stryphnodendron adstringens*; Taninos condensados; Leguminosae; Atividade antibacteriana; Atividade leishmanicida

## ABSTRACT

The stem barks of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville is at a long time used by the native population for treatment of several illnesses, mainly as healing and antiseptic. This work analysed chemically, through biological screening, obtaining fractions and substances starting from the crude extract of its stem bark, besides testing them for the antibacterial and leishmanicidal activities. Carry also an analysis anatomic to aim to know the structures of the barks. Of the 12 subfractions obtained starting from the ethylacetate fraction were isolated and identified 6 substances: gallocatechin, epigallocatechin, 4'-O-methylgallocatechin, 4'-O-methylgallocatechin-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-methylgallocatechin, 4'-O-methyl-robenitinidin-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-methyl-epigallocatechin and 4'-O-methyl-robenitinidin-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-methyl-gallocatechin. The 12 subfractions were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. All fractions presented activity against the first two bacterias, while only F3#12 it showed action against *P. aeruginosa*. The subfractions F3#3, F3#5, F3#7, F3#9 and F3#12 were tested against *Leishmania (L.) amazonensis*. All fractions presented activity, being the two last the most effective in smaller concentrations. Thus, it is ended that the anatomical curt made possible parameters for the quality control of the vegetable, and their extracts and fractions were shown effective in the biological tests and with a rich chemical content in flavan-3-ols and dimers of condensed tannins.

Keywords: *Stryphnodendron adstringens*; Condensed tannins; Leguminosae; Antibacterian activity; Leishmanicidal activity.

## 1. INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies vegetais são utilizadas pela população desde os tempos mais remotos, que as aproveitam de diversas formas, como, fonte de alimento e de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, armas para lutas ou caças, na produção de meios de transporte, nas manifestações artísticas, culturais e religiosas e na tentativa de curar ou amenizar diversos sintomas oriundos de diferentes patologias.

No século XX, com a revolução industrial e o grande desenvolvimento da química orgânica, houve uma preferência mundial por produtos farmacologicamente ativos sintéticos. Isso ocorreu por diversas razões, entre outras pelo fato de que esses compostos foram obtidos na forma pura e também podiam sofrer modificações estruturais produzindo compostos mais ativos e com menos efeitos colaterais. Outra razão era o difícil controle de qualidade (químico, físico-químico, farmacológico ou toxicológico) dos extratos vegetais utilizados. Além disso, a cultura das várias etnias mostrava diferentes pontos de vista com relação à idéia sobre saúde e doença, e as plantas medicinais eram utilizadas em rituais magias e crenças religiosas. Assim a fitoterapia ficou como uma opção para populações pobres ou como superstições religiosas sem valor farmacológico.

De cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo, os princípios ativos provêm de plantas. De 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número relativamente grande de substâncias sintéticas é obtido a partir de precursores extraídos de drogas vegetais (Rates, 2001). Deve-se lembrar que várias substâncias ativas não são produzidas sinteticamente, por ser economicamente inviável, e são, ainda, obtidas a partir de plantas nativas ou cultivadas (ex. digoxina, emetina, escopolamina, entre outras).

Atualmente houve um aumento no interesse por terapias alternativas e, dentre elas, o uso das plantas medicinais encontra-se em destaque, se é que se

pode chamar a mais antiga das formas de tratamentos de sintomas e doenças de terapia alternativa. Por outro lado, os medicamentos sintéticos vêm se tornando, em algumas situações, ineficientes ou inseguros. O excesso de efeitos colaterais, o uso abusivo, a prescrição indiscriminada e o uso incorreto, resultam em uma razão não ideal de risco/benefício. Isso promove graves riscos ao paciente e muitas vezes acarreta dependências, piorando o quadro clínico. Outro motivo que levou ao aumento do uso das plantas medicinais é que, parte da população mundial não tem acesso à medicina convencional, devido à situação econômica, ao descaso do sistema político/econômico mundial e das grandes indústrias farmacêuticas.

A afirmação de que os medicamentos fitoterápicos são isentos de efeitos colaterais, divulgados tanto pela sociedade quanto pelo setor comercial (farmácias e indústrias), é um erro e deve ser corrigido. Fatos como esse levam a automedicação, de forma “milagrosa”, seja com as plantas medicinais ou com os fitomedicamentos. Pessoas substituem um tratamento pré-elaborado por drogas ou compostos vegetais como ato de má fé devido à sua exploração comercial. Por outro lado, as camadas populares de baixa renda estão expostas a essa situação devido ao excesso de propaganda enganosa e pela atuação incipiente dos organismos estatais responsáveis pela vigilância sanitária.

O uso popular e tradicional não é suficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Várias drogas são utilizadas tradicionalmente há séculos como *Panax ginseng* C. A. Mey (ginseng) e *Ginkgo biloba* L. (ginco). No entanto, diversos estudos foram realizados nas últimas décadas objetivando atender os preceitos da eficácia e segurança. Nesse sentido, os fitomedicamentos não se diferenciam dos medicamentos sintéticos e sua autorização para comercialização deve estar de acordo com as evidências experimentais, sejam farmacológicas, toxicológicas e clínicas. Somente após a aprovação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, estando de acordo com a Resolução 17 de fevereiro de 2000, esse terá autorização de comercialização.

Os investimentos na área de síntese de novos fármacos têm diminuído em função do alto custo para se conseguir produtos com atividade terapêutica. Assim, a busca de novos produtos oriundos de drogas vegetais vem crescendo nos últimos anos, sejam eles como fitofármacos ou como medicamentos fitoterápicos.

A riqueza da flora brasileira tem sido pouco explorada até o momento, de forma que somente uma pequena parte das espécies vegetais foi investigada quimicamente e uma parte ainda menor, tiveram suas propriedades farmacológicas avaliadas (Payne et al., 1991). Um estudo completo, “da planta ao medicamento”, somente é possível através de um trabalho multidisciplinar com envolvimento das áreas de botânica (sistemática, anatomia e morfologia), química, farmacognosia, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica e clínica (Verpoorte, 1989; Elisabetsky, 2001).

O Brasil conta com aproximadamente 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, sendo, assim, o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo (Dias, 1996). Entretanto, constata-se que apenas 15 a 17% das plantas catalogadas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996). Dessas, apenas 8% foram avaliadas em suas propriedades medicinais e, somente 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização

Grande parte das espécies vegetais brasileiras encontra-se no cerrado. Rezende (1998) relata como o segundo maior bioma em extensão territorial, perdendo apenas para Amazônia. Ele possui aproximadamente 2 milhões de quilômetros quadrados, cobrindo um quarto do território brasileiro e abrangendo a quase totalidade da região centro-oeste, partes da região norte, nordeste e sudeste (fig. 1).

O cerrado caracteriza-se, grosseiramente, por uma vegetação rasteira, com raros arbustos, ou árvores de pouca altura, troncos tortuosos, galhos baixos e retorcidos (Caruso, 1997). Por possuir solos de baixa fertilidade, exige uma adubação fosfatada e prévia correção de acidez para o desenvolvimento de

agricultura. Todavia, responde por mais de um terço da produção de grãos do país, e é considerado como uma das mais importantes fonte de suprimento para o século XXI (Caruso, 1997).

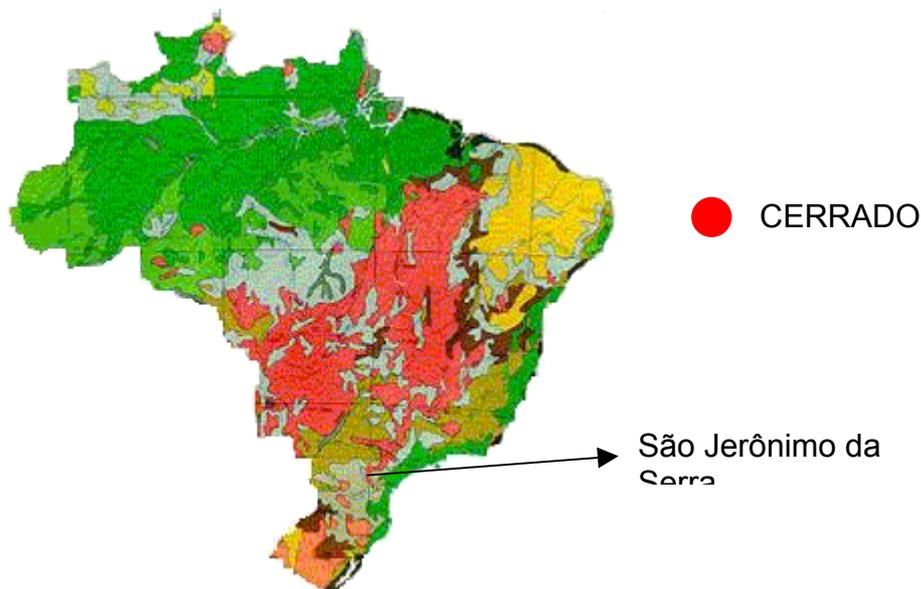


Figura 1 – Cerrado brasileiro

Dentre as espécies vegetais do cerrado, o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) é freqüentemente utilizado na medicina popular. Esse vegetal foi selecionado através da etnofarmacologia, que pode ser definida como: ramo da etnobiologia que trata de práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina ou de outra forma mais aceita como a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (Elisabestky, 2001).

Alguns estudos químicos e farmacológicos foram realizados com extratos obtidos da casca do vegetal em questão, objetivando confirmar os dados obtidos na etnofarmacologia, tais como: ação cicatrizante, antiinflamatória, hipotensora e antibacteriana. Além desses estudos foram realizados trabalhos de controle de qualidade da droga vegetal por um período de dois anos (Toledo et al., 1998; Uemura et al., 2000).

Esse trabalho objetivou estudar as cascas do vegetal *Stryphnodendron*

---

*adstringens* (Mart.) Coville sob os aspectos anatômico e morfológico das cascas, análise por cromatografia líquida de alta eficiência de extratos bruto e semipurificados, testar esses extratos em bactérias (Gram positivas e Gram negativas) e no parasita *Leishmania (L.) amazonensis* e, isolar e reconhecer compostos fenólicos, taninos condensados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Como sinonímia de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville são encontrados *Mimosa barba de timan* Vellozo, *Acacia adstringens* Mart., *Stryphnodendron barbatimao* Mart., *Stryphnodendron barbatiman* Mart. e *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Mart. em Index Kewensis (1885). Optou-se por empregar o termo *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville segundo Forero (1972). Como nome vulgar nas diversas regiões do país, têm-se: barbatimão (São Paulo, Minas Gerais), barbatimão verdadeiro (Minas Gerais), chorãozinho verde (Minas Gerais), fava de veado (Maranhão), barbatimão de folha grande (Minas Gerais).

O gênero *Stryphnodendron* Mart. pertence à família Leguminosae (ordem Fabales), a qual perfaz, para Cronquist (1988), cerca de 3000 espécies. Hegnauer e Hegnauer (1994) as ordenam em 3 sub-famílias, Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae dentro da família Leguminosae, ordem Rosales. Entre os dois sistemas naturais de classificação adotados atualmente, não está totalmente esclarecido, qual deles deve ser empregado. Com finalidade didática, adota-se a sistemática de Cronquist (1988) como a mais atual, já que Hegnauer e Hegnauer (1994) utilizam a proposta de Isely (1990) e não justifica o seu emprego.

O vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae (fig. 2), caracteriza-se como um arbusto ou árvore, com ramos curtos e grossos possuindo cascas recuadas no sentido transversal, com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na superfície interna; as folhas são alternas, grandes, duplicado-pinadas de cerca de 30 cm de comprimento; pinas com 9-12 cm aproximadamente e 5-8 jugos; folíolos quase todos alternos, com 6-8 jugos, de base oblíqua, arredondada e parte apical obtusa, glabros em ambas as faces e membranosos (Ferri, 1969). Possui flores pequenas, numerosas e em espigas densas, com cerca de 7 cm; os frutos são do tipo legume (vagem) com

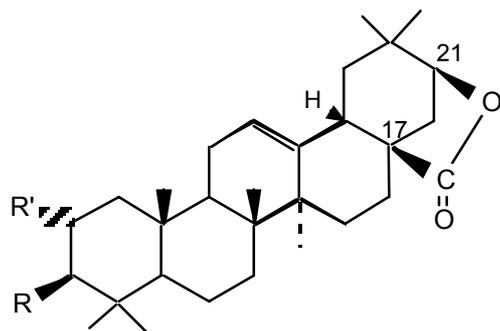
aproximadamente 10 cm; as sementes possuem forma oblonga (mais longa que larga), e são levemente achatadas (Oliveira e Akisue, 1989).



Figura 2 – *S. adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae – A – Coleta em São Jerônimo da Serra; B – Folíolos; C – Casca picada

Algumas indicações do conteúdo químico do vegetal encontram-se na Farmacopéia Brasileira (1959), a qual indica o teor mínimo de 20% em taninos nas cascas.

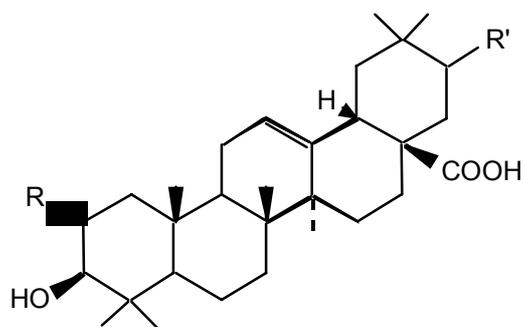
Tursch et al. (1963) isolaram a partir de um extrato etanólico dos frutos de *S. coriaceum* Benth., duas saponinas triterpênicas conhecidas como sapogeninas 1 e 2 (fig. 3). Sapogeninas homólogas às 1 e 2 (fig. 4) foram isoladas mais tarde do extrato etanólico dos frutos da mesma espécie vegetal (Tursch et al., 1966).



Sapogenina 1 - R = OH; R' = H

Sapogenina 2 - R = R' = OH

Figura 3 - Estrutura das sapogeninas 1 e 2



Sapogenina 3 - R = OH; R' = H

Sapogenina 4 - R = H; R' = OH

Figura 4 - Estrutura das sapogeninas 3 e 4

Reicher et al. (1992) isolaram a partir dos frutos do *S. barbatiman* Mart. uma galactomanana e sua estrutura foi explicada com ajuda de espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Mello et al. (1996a e 1996b) isolaram, a partir de liofilizados das cascas secas do *S. adstringens* (Mart.) Coville, flavan-3-óis (fig. 5), prodelfinidinas e prorobinetinidinas, tendo sido suas estruturas elucidadas através de análise espectroscópica em 1D ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN), 2D (COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$ , HETCOR e NOE), EI- e DCI-MS, além de métodos ópticos (polarimetria e dicroísmo circular). Mais recentemente foi isolada e identificada uma nova prodelfinidina, 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (fig. 6) (Mello et al., 1999).

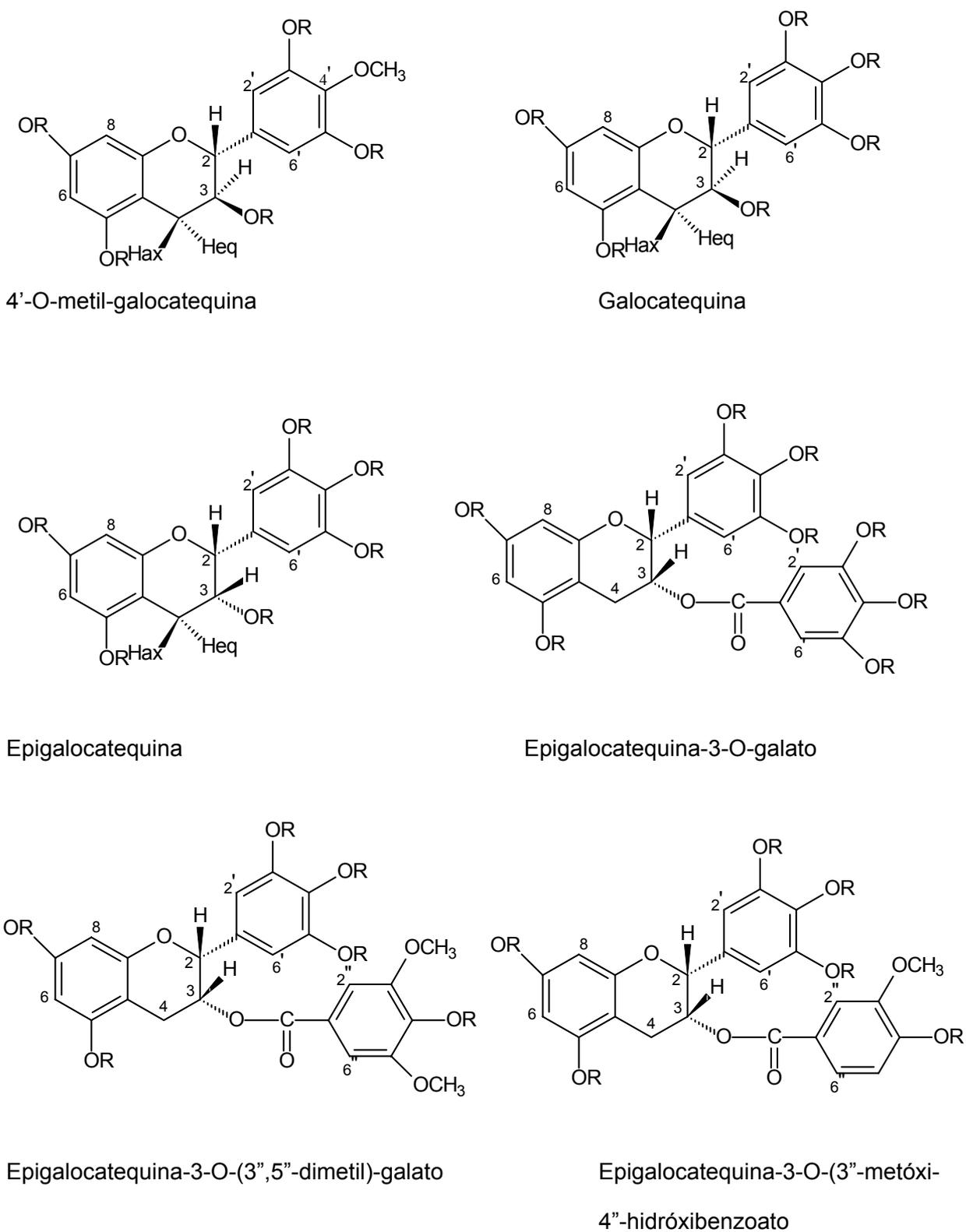


Figura 5 - Flavan-3-óis isolados das cascas do barbatimão (R= H)

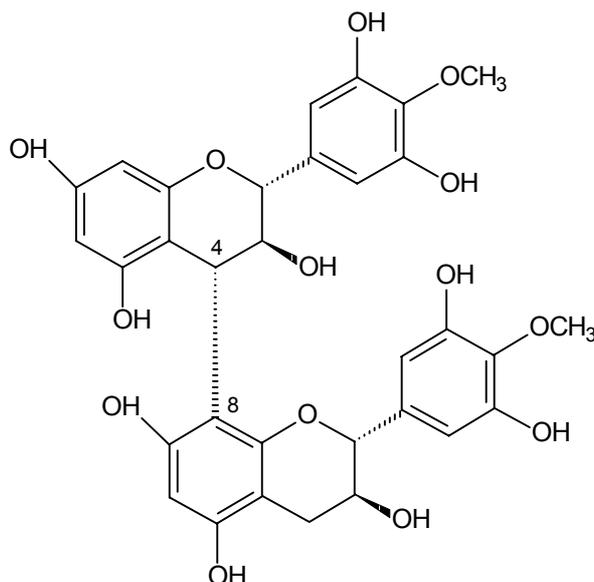


Figura 6 - Prodelfinidina dimérica das cascas do barbatimão [4'-O-metilgalocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metilgalocatequina]

Há muito o barbatimão vem sendo empregado pela população nativa para diversas finalidades. Entretanto, poucos são os trabalhos científicos realizados que confirmam esses usos.

O composto chamado *cortex adstringens brasiliensis*, produzido através dos vegetais: *Stryphnodendron barbatimao* Mart. , *Piptadenia colubrina* (Vell.) Benth., *Pithecellobium avaremotemo* Mart. e *Mimosa verrucosa* Benth. é empregado contra leucorréia, diarreia, hemorragia e como agregante plaquetário (Oliveira, 1947; Siqueira, 1982).

O extrato aquoso das cascas de *S. barbatimao* Mart. foi descrito por Coimbra (1942) e Hoehne (1978) na lavagem das genitálias femininas, bem como uma solução contra pruridos para uso externo. Santos et al. (1987) indicam o uso do mesmo extrato como adstringente, anti-séptico e antiinflamatório.

Panizza et al. (1988) testaram em ratos o extrato aquoso a 1% sobre uma ferida de 0,8 cm de diâmetro. Observaram através de análise histológica que o grupo de animais tratados com o extrato apresenta uma cicatrização mais rápida em relação ao grupo controle.

Outro teste de cicatrização realizado por Neves et al. (1992a), comparando extratos aquosos de *S. barbatimao* Mart. e de *Hamamelis virginiana* L., demonstrou que o extrato de barbatimão foi mais eficaz do que o extrato de *H. virginiana* L. Os autores observaram, ainda, uma nítida ação antiinflamatória dos dois extratos e um aumento da estabilização das paredes das artérias (Neves et al., 1992b).

Vieira et al. (1998) demonstraram, através do modelo da promoção de feridas, com 10 mm de diâmetro no dorso de ratos, que a pomada de barbatimão a 1%, obtida a partir de um extrato acetona-água, quando comparada à pomada de Nebacetin®, acelerou o processo de cicatrização.

Lima et al. (1998) demonstraram que a fração acetônica do extrato bruto da casca do *S. adstringens* (Mart.) Coville foi avaliada em modelos de inflamação aguda e crônica apresentando uma diminuição significativa no edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana, confirmando a diminuição da permeabilidade vascular proposta por Neves et al. (1992b).

Mais recentemente foi possível, além de confirmar os trabalhos de Neves et al. (1992a e 1992b) e de Lima et al. (1998), apresentar novas perspectivas de ampliação dos estudos através da avaliação das atividades antiúlcera e hipotensora, com resultados significativamente positivos para essas atividades com extrato bruto liofilizado e suas frações, obtidas através de partição líquido-líquido (Audi et al., 1999).

Bersani-Amado et al. (1996) demonstraram que extrato bruto liofilizado e frações da casca do barbatimão, foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Alves et al. (2000) também comprovaram atividade antibacterina das cascas do vegetal, demonstrando que os extratos clorofórmico e aquoso possuem efeito contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*.

## 2.2. Taninos condensados

Taninos são metabólitos secundários de plantas superiores, conhecidos pela capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas. Por esse motivo, foi o primeiro produto natural vegetal a ser utilizado industrialmente no processo de transformação de pele em couro (Porter, 1989). Os taninos também formam complexos com alcalóides e metais pesados e possuem massa molecular entre 500 a 3000 Daltons (Mello e Santos, 2001). Os complexos com os alcalóides, como no caso com a cafeína, ocorrem através de pontes de hidrogênio entre as metoxilas ligadas ao nitrogênio da cafeína e os hidrogênios aromáticos dos taninos. Essas associações ocorrem, preferencialmente, quando existe a presença de grupos galoilas, como no caso dos taninos hidrolisáveis ou nos condensados galoilados (Haslam, 1998).

Os taninos condensados são também denominados de proantocianidinas ou leucoantocianidinas (Haslam, 1975). As proantocianidinas são formadas comumente por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8 (fig. 7). Além desses, outros monômeros são bastante comuns, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (tab. 1; fig. 8). Bate-Smith e Lerner (1954) estudaram a distribuição sistemática das leucoantocianidinas nas plantas e mostraram que com tratamento ácido, a maioria formava cianidina, e uma pequena porção delphinidinas (fig. 8). Bate-Smith (1953) sugeriu que leucoantocianidinas eram provavelmente as substâncias responsáveis por reações características de tecidos vegetais ora atribuídas aos taninos.

Muitos trabalhos desde então avaliaram as propriedades químicas das leucoantocianidinas e proantocianidinas. Nesses, foram demonstrados que as estruturas responsáveis por diversas propriedades são, respectivamente, flavan-3,4-diol e flavan-3-ol, além de seus derivados oligoméricos (Weinges et al., 1969).

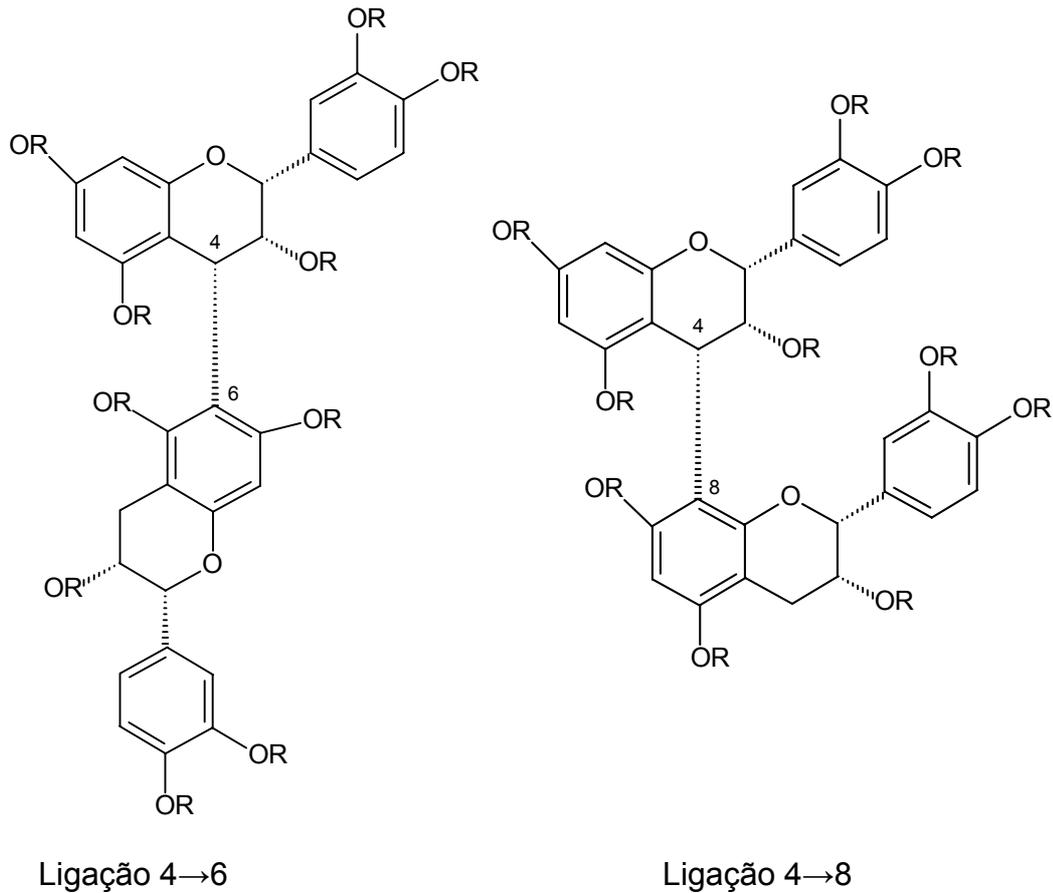


Figura 7 - Exemplos de proantocianidinas diméricas

Tabela 1- Monômeros de taninos condensados de acordo com a figura 8

Tipo	Proantocianidinas	Monômero nome trivial	Substituinte			
			R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargonidina	Afzlequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelfinidina	galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacinidina	Oritina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

Fonte: Mello e Santos, 2000.

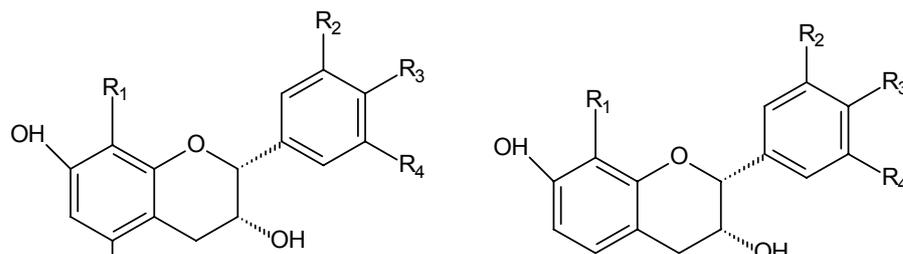
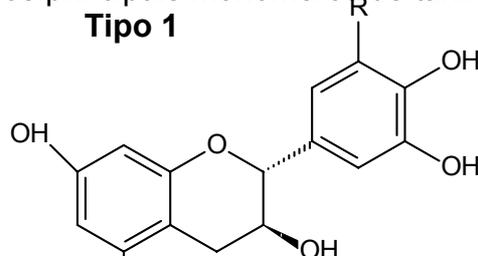


Figura 8 – Estruturas dos principais monômeros de taninos condensados (tab. 1)



R = H - Cianidina

R = OH - Delfinidina

Figura 9 – Estrutura química da cianidina e delfinidina

Várias proantocianidinas triméricas foram isoladas das cascas de *Kandelia candel* (L.) Druce e auxiliaram no entendimento da biossíntese desses compostos (Hsu et al., 1985). Catequina-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina e galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina (fig. 10) foram isoladas da cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Outtrup e Schaumburg, 1981).

As proantocianidinas são excelentes marcadores taxonômicos devido a sua fácil detecção (Bate-Smith, 1966). Distribuem-se em todo reino vegetal, mas principalmente em Gimnospermas e Angiospermas. Bate-Smith (1966) foi o primeiro a observar a correlação entre madeira (lenho, cascas) e proantocianidinas. De uma amostra de 800 espécies, 61% das famílias ditas lenhosas continham proantocianidinas, e apenas 15% das famílias herbáceas apresentaram estes constituintes.

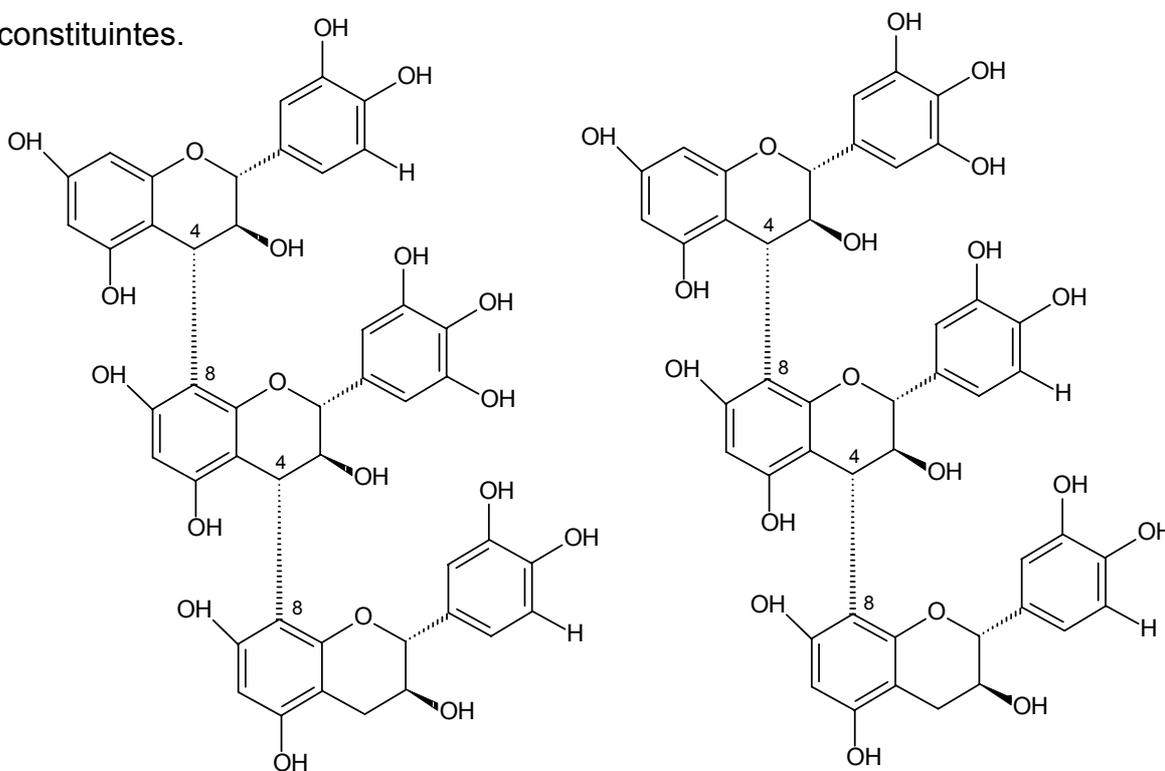


Figura 10 - Exemplo de procianidinas triméricas isoladas da cevada (*Hordeum vulgare* L.); A- catequina-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina; B- galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina;

Duas revisões recentes de Ferreira e Bekker (1996) e Ferreira e Li (2000) demonstram vários tipos novos de taninos condensados isolados e identificados de fontes naturais. Juntos, os artigos abrangem um levantamento de proantociandinas isoladas de janeiro de 1992 a dezembro de 1998.

Mole (1993) fez uma revisão da distribuição sistemática de taninos em Angiospermas.

Bate-Smith e Swain (1953) avaliaram as proantociandinas como fator nutricional, enquanto Price e Butler (1980) fizeram uma revisão envolvendo taninos condensados e nutrição, elaborando uma lista de frutos, cereais, bebidas e outros gêneros alimentícios contendo taninos. Os frutos incluem, por exemplo, *Malus pumila* Mill. (maçã), *Rubus fruticosus* L. (framboesa), *Vaccinium oxycoccus* L. ("cranberries"); cereais: *Hordeum spp.* (cevada), *Vicia spp.*, *Pisum spp.* (ervilha), *Brassica napus* L. (canola), entre outros. Entre as bebidas incluíram-se *Coffea spp.* (café), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) e *Vitis spp.* (uva). Reddy et al. (1985) publicaram uma lista de 20 espécies de legumes, e demonstraram que algumas variedades de feijões são de baixo valor nutricional diminuindo a digestibilidade das proteínas, causando baixa eficiência alimentar e aumentando a depressão em animais de laboratório, provavelmente devido aos taninos presentes.

Taninos condensados vêm sendo pesquisados por suas diversas propriedades farmacológicas e fisiológicas. Devido à propriedade de se combinarem com as proteínas das plantas, protegem-nas contra o ataque de herbívoros, além de apresentarem inibição enzimática em humanos (Galloway, 1989).

Scholz (1994) apresenta uma revisão sobre as atividades farmacológicas e toxicológicas tanto de taninos condensados como de hidrolisáveis. Revisão realizada por Chung et al. (1998) relata algumas características de taninos confirmando dados de outros autores como: ação antibacteriana; atividade hipotensora; auxílio na

coagulação sangüínea; diminuição do nível de lipídios no soro devido à baixa absorção intestinal e, modulação da resposta imunológica.

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos taninos foram observadas por Haslam et al. (1989), assim como o princípio da adstringência e a cicatrização como base terapêutica nos ferimentos de mucosa. Os taninos podem formar complexos com proteínas (fig. 11 e 12) de forma reversível (pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbica) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações hidrofóbicas ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos. Quando tecidos do vegetal são lesados, há formação de complexos irreversíveis entre taninos e proteínas (reação catalisada por enzimas) numa tentativa de correção ou cicatrização da lesão (Mello e Santos, 2001). Esse mesmo tipo de ligação promove a produção de couro em curtumes.

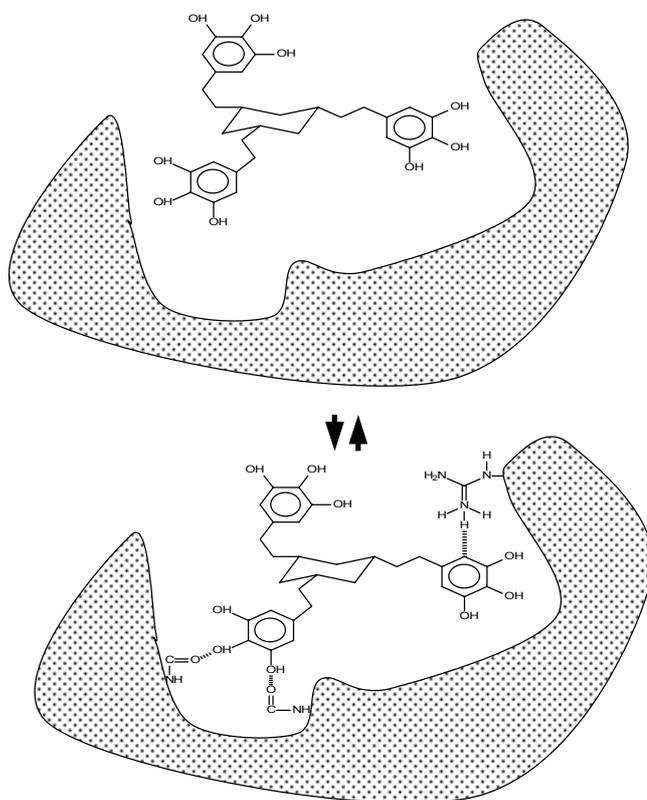


Figura 11– Associação polifenol-proteína (P– proteína; PF– polifenol) (Haslam et al., 1989)

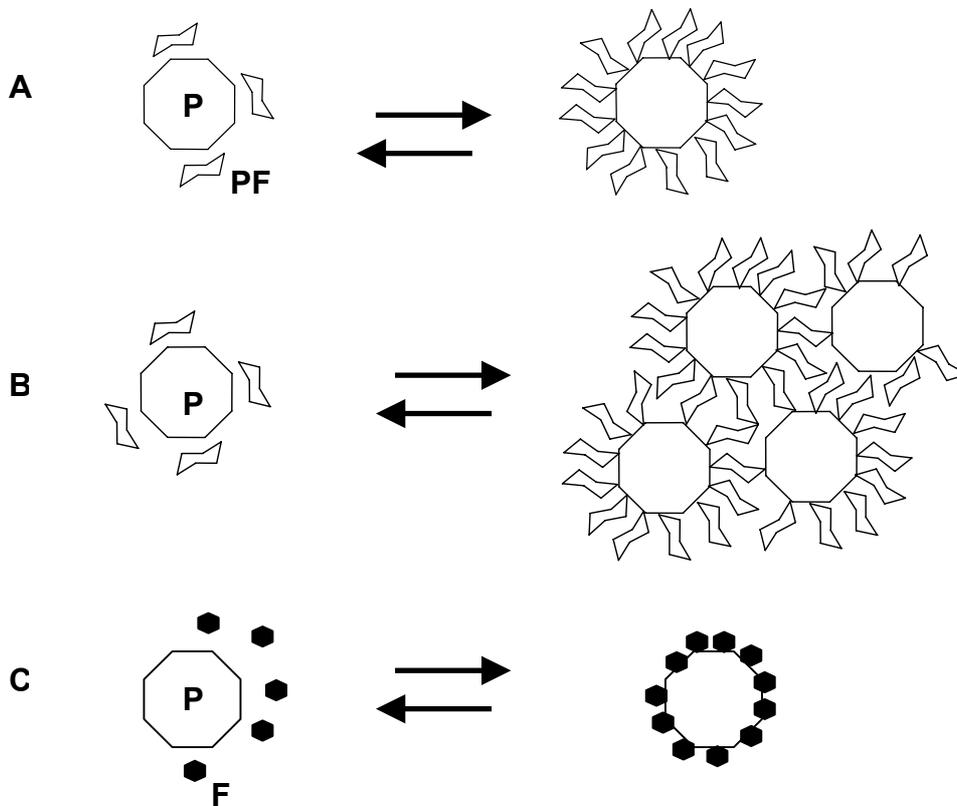


Figura 12 – Precipitação do complexo polifenol-proteína – P- proteína; PF– polifenol; A– baixa concentração de proteínas; B– alta concentração de proteínas; C– interação proteína-fenol (F) (Haslam et al., 1989)

Uma forte atividade antiulcerogênica pode ser observada a partir de uma procianidina trimérica isolada da *Lindera umbellata* Blume (Lauraceae), contra nenhuma atividade dos monômeros e dímeros, ou mesmo uma fraca atividade de tetrâmeros, como o cinamotanino B-1 e D-1 (Ezaki et al., 1985).

Proantocianidinas oligoméricas possuem atividade sobre o sistema circulatório, que se baseia na dilatação das paredes coronarianas e um efeito inotrópico positivo (Weinges et al., 1971). Estas propriedades foram demonstradas pelos flavonóides e procianidinas de *Crataegus monogyna* Jacq. e *C. oxyacantha* L., Rosaceae (Ammon e Kaul, 1994a, 1994b e 1994c).

Plantas que agem contra diarreia, atuam geralmente como adstringente e possuem gosto amargo (Heinrich et al., 1992). Galvez et al. (1991 e 1993) testaram um extrato aquoso das cascas de *Sclerocarya birrea* A. Rich. Hochst.

(Anacardiaceae) como antidiarréico e atribuíram este efeito a uma inibição da contração da musculatura lisa do cólon. O mesmo foi observado com o extrato metanólico das raízes de *Psidium guajava* L., Myrtaceae (Obasi et al., 1993).

Morton (1986) demonstrou que alguns chás contendo taninos apresentaram efeitos positivos contra câncer esofágico. Hatano et al. (1989) observaram que os flavan-3-óis, as proantocianidinas e os taninos hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio, importantes no processo inflamatório, levando a acreditar num possível efeito anticarcinogênico e antimutagênico, já que muitos genes mutantes e carcinógenos produzem radicais livres que interagem com macromoléculas celulares (Chung et al., 1998). Seus estudos mostram que essa ação é dependente do grau de hidroxilação do anel B, do grau de polimerização e do grau de galoilação das substâncias. Os autores observaram, ainda, uma diminuição do efeito tóxico dos radicais ânion-superóxidos e atribuíram essa atividade à estabilidade dos radicais fenóxi. Prodelfinidina B-2 e diversos elagitaninos agem como antiinflamatórios por bloquear a hialuronidase ativa ou a degranulação dos mastócitos (Kakegawa et al., 1985). Kandil e Nassar (1998) demonstraram uma atividade positiva de um elagitanino, obtido de *Terminalia arjuna* Wight & Arn., contra câncer de mama.

Gazave et al. (1975) estudaram a epigalocatequina como co-fator para vitamina C enquanto Matthe et al. (1999) relataram os taninos como inibidores da HIV transcriptase reversa.

### 2.3. Atividade antibacteriana

Ao longo dos últimos anos, grande número de fármacos foi testado, na expectativa de descoberta de novos agentes antibacterianos. Esses fármacos provêm de diversas fontes, podendo ser resumidos em sintéticos (produzidos em laboratórios), naturais (vegetal, animal, mineral e microbiológico) e semi-sintéticos (naturais modificados). Muitos desses tornaram-se medicamentos de escolha contra

algumas patologias causadas por bactérias, mas, com o passar do tempo, pode-se observar uma diminuição de atividade efetiva destes agentes. O motivo principal é a resistência bacteriana, que em sua reprodução, acabam gerando indivíduos resistentes aos antibacterianos. Um dos fatores que contribuem para o aumento desse fato é o uso indiscriminado dos antibacterianos pela população, muitas vezes, aconselhada por algum profissional de saúde.

Atualmente há uma carência de anti-infecciosos com ação específica, eficaz e de baixo efeito colateral. Isso levou a uma corrida em busca de novos agentes antibacterianos, principalmente através de fontes naturais. Muitos extratos vegetais e substâncias isoladas estão sendo testados contra os mais diferentes tipos de bactérias patogênicas ao homem. Os vegetais ricos em polifenóis estão entre os pesquisados para essa atividade. Chah et al. (2000) comprovaram o relato etnofarmacológico de atividade antibacteriana dos frutos do vegetal *Solanum torvum* Sw. (alcalóides, flavonóides e taninos) contra bactérias de isolados clínicos de humanos e animais. O extrato bruto das folhas de *Trichilia heudelotti* Planch ex Oliver, diterpenos e alguns ácidos fenólicos isolados mostraram atividade antibacteriana e antifúngica moderada (Aladesanmi e Ododiran, 2000). Rauha et al. (2000) demonstraram a atividade de quatro plantas ricas em flavonóides e outros compostos fenólicos contra nove bactérias diferentes, entre elas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

Os taninos são polifenóis que demonstram atividades farmacológicas, principalmente no tocante à infecção por bactérias. Propõem-se três mecanismos de ação para essa atividade: inibição de enzimas das bactérias, complexando-se com os substratos dessas enzimas; ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microorganismos, modificando o seu metabolismo; complexação com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microorganismos (Mello e Santos, 2001).

Vários vegetais com taninos estão sendo testados para atividade antibacteriana. Os extratos aquoso e acetônico de *Syzygium jambos* (L.) Alston,

ricos em taninos, mostraram atividade antibacteriana, superando plantas clássicas como *Hamamelis virginiana* L., *Krameria triandra* Ruiz & Pav., *Alchemilla vulgaris* L. e *Rubus fruticosus* L. (Djipa et al., 2000). Esses autores mostraram, ainda, que com a eliminação dos taninos, os extratos perdem a atividade. Ahmad e Beg (2001) demonstraram atividade antibacteriana de várias espécies vegetais indianas ricas em taninos e flavonóides contra bactérias droga-resistentes. Chattopadhyay et al. (2001) determinaram a presença de taninos e flavonóides em *Alstonia macrophylla* Wall. Ex G. Don e a atividade antibacteriana dos extratos brutos metanólico e metanólico-aquoso. Ebi et al. (1999) mostraram que algumas subfrações do extrato bruto de casca de *Uvaria chamae* P. Beauv. possuem atividade maior que a penicilina G e cloranfenicol, sendo que a subfração mais ativa é a que contém taninos entre seus compostos.

Alguns extratos de diferentes espécies vegetais foram avaliados contra *Helicobacter pylori* e aqueles que continham taninos se mostraram mais ativos (Annuk et al., 1999), demonstrando um importante auxílio no tratamento de úlceras estomacais.

Monômeros galoilados demonstraram atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie (Otake et al., 1991; Nakahara et al., 1993). Apesar da atividade antibacteriana dos taninos ser avaliada tanto contra bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (Scholz, 1994), as proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas isoladas de *Pavetta owariensis* P. Beauv. (Rubiaceae) não demonstraram atividade contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Baldé et al., 1990).

#### 2.4. Leishmaniose

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença de evolução crônica que acomete pele e mucosas. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos hematófagos conhecidos genericamente por flebótomos.

---

As leishmanioses são protozooses com ampla distribuição mundial e aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair uma das diversas formas da doença. Estima-se em 12 milhões o número de casos existentes, com um acréscimo anual de 1,5 milhões de novos casos (Modabber, 1993).

As primeiras suspeitas sobre a ocorrência da doença nas Américas foram levantadas em 1885, época em que já se registravam, em pacientes do Brasil, úlceras de pele que lembravam a leishmaniose tegumentar do velho mundo, conhecida como botão do oriente (Pessoa e Martins, 1982).

Apesar de ser considerada uma zoonose, a leishmaniose tegumentar americana acomete a cada ano milhares de indivíduos, deixando como saldo um vasto espectro de formas clínicas, que vai desde úlceras cutâneas benignas até formas mucosas graves e mutilantes.

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com Laison e Shaw (1987), esse é dividido em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, conforme o local de desenvolvimento no trato intestinal dos vetores.

Os mosquitos, genericamente denominados flebotomíneos, são os hospedeiros invertebrados de *Leishmania*, nos quais os parasitas vivem na forma flagelada, denominada promastigota. O homem e outros vertebrados são infectados ao serem picados por aqueles flebotomíneos (Grimaldi et al., 1987 e 1989; Marzochi, 1992).

No hospedeiro vertebrado os protozoários são parasitas intracelulares obrigatórios de fagócitos mononucleares. Nessas células os parasitas são encontrados nos fagolisossomas como formas não flageladas, denominadas amastigotas. Esse fato constitui um dos mistérios da biologia do parasita, que consegue sobreviver e replicar-se no interior de macrófagos, subvertendo uma das funções primárias dessas células que é destruir microorganismos (Berman, 1997).

Quando as formas promastigotas são inoculadas pelo vetor, ocorre rápida internalização por células locais e a transformação para amastigotas. Vários

mecanismos garantem esse processo e, para o parasita sobreviver, é importante que a fagocitose ocorra por macrófagos, uma vez que várias células podem fagocitar *Leishmania*, mas sua sobrevivência ocorre somente nessas células.

A adaptação de flebotomíneos nos ambientes antrópicos é evidente e tem propiciado a formação do ciclo de transmissão nos ambientes domiciliar e peridomiciliar em zonas rurais e urbanas, facilitando a infecção do homem e dos animais domésticos, sobretudo cães e eqüídeos (Aguilar et al., 1986 e 1989; Yoshida, 1990).

A doença humana tradicionalmente é dividida em síndromes clínicas: visceral, cutânea e cutâneo-mucosa. Cada espécie de *Leishmania* pode produzir mais de uma síndrome clínica e cada síndrome pode ser causada por múltiplas espécies (Pearson e Queiroz-Souza, 1996).

As leishmanioses cutânea e cutâneo-mucosa resultam da multiplicação do protozoário em fagócitos da pele. Nas leishmanioses cutâneas do velho mundo estão envolvidas principalmente as espécies *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (Laison e Shaw, 1987).

Nas Américas a doença é causada primariamente por espécies como *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) venezuelensis*, *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*. Os reservatórios podem ser os cães e principalmente os roedores silvestres. O homem geralmente se infecta por viver ou trabalhar em regiões florestais.

As manifestações clínicas são pequenas úlceras, únicas ou múltiplas, que se desenvolvem no local da picada do vetor, em regiões expostas como orelhas, face, membros superiores ou outras. Em raras ocasiões podem ocorrer casos de leishmaniose cutânea difusa, em que a *L. (L.) amazonensis* geralmente está envolvida. A infecção causada por *L. (V.) brasiliensis* pode resultar na doença mucosa, que afeta o nariz, boca, garganta e faringe, com destruição dos tecidos cartilagosos e desfigurações na face. Essas manifestações mucosas podem ocorrer meses ou mesmo anos após a cura das lesões cutâneas (Pearson e

Queiroz-Souza, 1996; Berman, 1997).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar tem vasta distribuição, abrangendo quase todos os estados, onde acomete pessoas de todas as faixas etárias e de ambos os sexos. No estado do Paraná, a leishmaniose tegumentar incide em diversos municípios (Roberto et al., 1997; Teodoro et al., 1991). Em inquérito realizado entre 1992 e 1993 por Silveira e colaboradores (1996) mostraram que 19,9% dos indivíduos investigados entre 30 e 39 anos de seis propriedades agrícolas nos municípios de Jussara e Terra Boa (noroeste do estado do Paraná) tiveram ou estavam com a doença.

Muitos compostos são conhecidos por apresentar ação leishmanicida, mas o tratamento da doença é baseado principalmente no uso de antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®). No Brasil, o Ministério da Saúde normatizou a conduta para o tratamento, que é feito com o Glucantime®, em esquemas de injeções intramusculares diárias, em ciclos que se repetem até a cicatrização da lesão. Muitos pacientes chegam a tomar mais de 100 doses injetáveis. Os efeitos colaterais desse fármaco são significativos: dores de cabeça, mal estar geral, dores musculares e existe o risco de reação de hipersensibilidade. O Estado garante a distribuição gratuita através do Sistema Único de Saúde, sendo, no entanto, freqüente o racionamento na distribuição desse medicamento.

Há um crescente interesse em se buscar novas formas de tratamento, com fármacos de fácil obtenção, melhor eficácia e custo. Assim, as drogas vegetais aparecem como uma das alternativas.

Vários estudos têm sido realizados nesse sentido e diferentes espécies vegetais têm apresentado componentes ativos contra espécies de *Leishmania*, por exemplo: *Nyctanthes arbortristis* L. (Tandon et al., 1991), *Anacardium occidentale* L. (França et al., 1993), *Peschiera vanheurckii* (Müll. Arg.) L. Allorge (Moretti et al., 1994) e *Plumbago scandens* L. (Santos et al., 1997).

O extrato de "barbatimão", *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville,

apresentou atividade sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Jorge et al., 1996). Experimentos em andamento mostram que esse efeito também é observado sobre as formas intracelulares de leishmania, as amastigotas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As cascas do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram coletadas em 20 de novembro de 1999 às 9:00 h no município de São Jerônimo da Serra (23°43'7,8"S; 50°45'23,5"E; 926 m altitude), Estado do Paraná. Após o processo de herborização, preparou-se exsicata, com as folhas, flores e cascas, que encontra-se depositada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob número HUM 3800. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui. Algumas amostras de cascas e folíolos foram colocadas em solução de FAA e glicerina para posterior estudo anatômico. As cascas foram fragmentadas e deixadas para secagem à temperatura ambiente (24 °C) em local arejado e com ausência da luz solar.

#### 3.2. SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), e de marca Mallincrodt®, Merck® ou Sigma®.

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ágar Mueller-Hinton meio desidratado Difco
- Anidrido acético
- Azul de astra
- Caldo Mueller-Hinton Difco
- Clorofórmio

- Clorofórmio deuterado Isotec
- Etanol
- FAA – etanol/água destilada/formol/ácido acético (10:7:2:1; V/V)
- Formalina a 2% em solução salina
- Glicerina
- Hipoclorito de sódio
- Meio 199
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec
- *n*-propanol
- Penicilina
- Piridina
- Resina Permout ®
- Safrablau (safranina/azul de astra; 1/90; V/V)
- Safranina
- Solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 2%
- Solução de cloreto férrico a 2% em metanol
- Solução de Fast-green - fast-green/etanol/xilol (0,1:10:10; V/V)
- Solução de L-glutamina
- Solução de óleo de cravo - óleo de cravo/etanol/xilol (2:1:1; V/V)
- Soro bovino fetal Difco
- Tolueno
- Xilol

### ~~3.3.~~3.3. EQUIPAMENTOS

- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear Varian Gemini 300BB
- Câmera fotográfica Digital Sony Mavika modelo FD71

- Câmera fotográfica Pentax K1000
- Coletor ISCO modelo 328
- Cromatógrafo Líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne (alça de 20 µl) e software UniPoint LCNT; colunas (c: 4 mm; Ø 3 mm) e coluna (c: 250 mm; Ø 4 mm) preenchidas com LiChrospher® 100 RP-18 com tamanho de partícula de 5 µm; detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156; Degasser 184.
- Cromatógrafo de contra corrente de alta velocidade PC INC, Minarik® equipado com coluna “triple coil” de 320 ml e módulo de injeção.
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ MICROMASS.
- Evaporador rotatório Büchi R-114
- Liofilizador Christ Alpha I-2
- Câmara de UV Germetec GM-24 (254 e 365 nm)
- Microscópio óptico Nikon modelo Alphaphot-2 YS2
- Moinho de martelos Tecnal Marconi modelo TE 048
- Turbo extrator Skymesen modelo LSV 04
- Ultrassom Unique-USC 1540, 25 kHz

### 3.4. DESCRIÇÃO ANATÔMICA

#### 3.4.1. Corte a mão livre

As cascas foram mantidas em glicerina e FAA por 24 h. Os cortes anatômicos foram feitos com lâminas de aço inoxidável. Realizaram-se cortes transversais e longitudinais, utilizando-se pedaços de isopor como suporte. Os cortes foram recolhidos em vidro de relógio contendo água e, após seleção dos melhores, colocou-se em solução de hipoclorito de sódio até total clarificação (Oliveira e Akisue, 1989). Após, foram novamente lavados em água e procedeu-se a reação com safranina e azul de astra durante 2 minutos (Gerlach, 1969). Utilizou-se,

também, solução de cloreto férrico a 2% em metanol para detectar a presença de substâncias fenólicas. Os aspectos anatômicos do vegetal foram observados, descritos e ilustrados com auxílio de microscópio óptico. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio e em microscópio óptico com câmera fotográfica digital.

### 3.4.2. Inclusão do material vegetal em parafina (Montenegro, 1985)

As cascas mantidas em glicerina e FAA foram seccionadas em fragmentos com aproximadamente 0,5 cm de largura e 1 cm de altura, os quais foram submetidos à desidratação conforme a seqüência:

- Etanol 50 GL	30 min
- Etanol 70 GL	30 min
- Etanol 95 GL	30 min
- Etanol / <i>t</i> -butanol (1:1)	15 min
- <i>t</i> -butanol	8 h (58 °C)

Em seguida procedeu-se a inclusão do material em parafina por 12 h em estufa a 58 °C, sendo 4 h de imersão em *t*-butanol/parafina (1:1, V/V) e 8 h em parafina. Os blocos foram preparados em pequenas caixas de papel com volume aproximado de 1 cm<sup>3</sup> e deixados em temperatura ambiente por 10 min e, após, os blocos foram colocados em refrigerador a 4 °C por 1 h.

Os cortes anatômicos foram obtidos em micrótomo na espessura de 12 µm e transferidos para lâminas de vidro, sendo distendidos em chapa aquecida a ± 50 °C. Após, procedeu-se a desparafinização dos cortes utilizando a seqüência: xilol 1, xilol 2 e xilol 3 por 10 min em cada um. A etapa de coloração dos cortes consistiu na seqüência de álcool 50 °GL por 5 min e safranina de 20 a 30 min. O excesso de safranina foi retirado com água destilada, álcool 70 °GL, álcool 90 °GL e álcool absoluto durante 5 min em cada um deles. Aplicou-se solução de Fast-green pingando-se uma gota em cada lâmina e deixando aproximadamente 3 min. Lavou-se com uma ou duas gotas de solução de óleo de cravo (óleo de cravo 20 ml; etanol 10 ml; xilol 10 ml) para ativação da coloração.

Continuou-se com a preparação das lâminas permanentes com a seguinte bateria: xilo 1, xilol 2 e xilol 3 por 10 min em cada um. Em seguida montou-se a lamínula sobre a lâmina com resina Permout®.

### 3.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

No desenvolvimento desse trabalho foram empregados vários métodos cromatográficos na obtenção de frações semipurificadas, auxiliando no isolamento de substâncias químicas e nos estudos biológicos.

#### 3.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD das frações obtidas em cromatografia em coluna (CC) foi realizada em folhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®), utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5; V/V). Após o desenvolvimento, as placas foram observadas sob luz UV (254 nm) e depois reveladas com solução de cloreto férrico a 2% em metanol (Mello et al., 1996a).

#### 3.5.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As substâncias isoladas foram inicialmente derivatizadas (seção 3.7) e em seguida aplicadas na forma de barra em gel de sílica PF<sub>254</sub> com gesso (Merck®) sobre placas de vidro (20 x 20 cm), na espessura de 0,75 ou 1 mm. O sistema eluente empregado foi tolueno/acetona (7:3; V/V). As faixas de substâncias foram demarcadas sob luz UV (254 nm), calculando-se o valor de R<sub>f</sub> para a substância. Em seguida raspou-se a zona e adicionaram-se 3 ml de clorofórmio. Deixou-se em ultrassom por aproximadamente 15 min. Filtrou-se em filtro G3, eliminando o clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A amostra foi deixada na capela à temperatura ambiente para completa eliminação do solvente, sendo posteriormente congelada e liofilizada (Mello et al., 1996a).

### 3.5.3. Cromatografia de contra corrente de alta velocidade (CCCAV)

Utilizou-se cromatógrafo de contra corrente de alta velocidade, com rotação média de 870 rpm e com fluxo de 1 ml/min. O sistema eluente empregado foi preparado em funil de separação com acetato de etila/*n*-propanol/água (140:8:80; V/V). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Os tubos coletores, com volume de 3 ml, foram monitorados por CCD (seção 3.5.1) (Mello et al., 1996a).

### 3.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras analisadas foram solubilizadas em metanol nas concentrações de 1 mg/ml (substâncias isoladas), 30 mg/ml (subfrações F3#11 e F3#12) e 50 mg/ml (extrato bruto, fração acetato de etila e demais subfrações). Em seguida filtrou-se em filtro Millipore® (FHLPO1300). A temperatura do forno para coluna foi de 30 °C e os cromatogramas foram observados nos comprimentos de onda de 278 e 300 nm.

O sistema eluente utilizado foi gradiente binário, com velocidade de fluxo de 1 ml/min, entre ácido acético 5% em água e metanol de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Gradiente da fase móvel utilizada para CLAE

Tempo (min)	Metanol (%)	Ác. acético 5% (%)
0	10	90
25	50	50
30	100	0
35	100	0
40	10	90

## 3.6. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

### 3.6.1. Extrato total (F1)

As cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-

se o material sem separação granulométrica. Preparou-se o extrato bruto em turbo-extrator, por 15 min, tomando-se o cuidado para que a temperatura não excedesse 40 °C. A proporção utilizada foi de 1:10 (m/V), com a mistura de acetona-água (7:3; V/V) (Cork e Krockenberger, 1991). Após a filtração por algodão, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório na temperatura média de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico, congelado e liofilizado, obtendo-se o extrato F1.

### 3.6.2. Obtenção da fração acetato de etila (F3)

O extrato F1 (50 g) foi ressuspenso em água (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 10 vezes) (Porter, 1989). As fases aquosa restante (F2) e acetato de etila (F3) foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

### 3.6.3. Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila (F3)

A fração F3 foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (h: 750 mm; Ø 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 50 °GL. Vinte gramas da fração F3 foram adicionadas no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se a seguinte seqüência de fase móvel em proporção volumétrica:

- |                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| 1. EtOH/água destilada (1:1),    | 8 l   |
| 2. EtOH,                         | 6 l   |
| 3. Acetona/água destilada (7:3), | 2,5 l |

Recolheu-se em tubo de ensaio (10 ml cada) com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento foi realizado através de CCD (seção 3.5.1). Obtiveram-se 12 subfrações, que foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório, até total eliminação do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas (Mello et al., 1996a).

#### 3.6.4. Cromatografia em coluna das subfrações

Algumas das 12 subfrações obtidas a partir da fração F3 foram submetidas a sucessivas CC (h: 320 mm Ø 30 mm; h: 400 mm Ø 25 mm; h: 600 mm Ø 15 mm) contendo Sephadex® LH-20 e com fluxo de 1,0 ml/min. O sistema eluente foi empregado na seguinte seqüência:

1. EtOH 10 °GL
2. EtOH 20 °GL
3. EtOH 30 °GL
4. EtOH 40 °GL
5. EtOH 50 °GL
6. EtOH 60 °GL
7. EtOH 70 °GL

O monitoramento dos tubos foi realizado através de CCD (seção 3.5.1).

#### 3.7. DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Para quantidades de até 100 mg de substância, adicionaram-se 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml. Deixou-se em repouso por 24 h. Após, colocou-se gelo picado interna e externamente ao balão, deixando por 2 h. Filtrou-se a vácuo em filtro G3 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. Dissolveu-se a substância acetilada em clorofórmio ou acetona e fez-se retirada do solvente em evaporador rotatório de forma sucessiva até total eliminação da piridina. Transferiu-se para um frasco e colocou-se na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada.

#### 3.8. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância

magnética nuclear (RMN) 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), 2D ( $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY, HETCOR e HETCOR-LR), empregando-se solventes deuterados (MeOD e  $\text{CDCl}_3$ ) e espectrometria de massas (EM). Os espectros das substâncias foram obtidos no Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de Maringá e foram analisados e comparados com dados da literatura. Os espectros de massas foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha.

### 3.9. HIDRÓLISE DE DÍMEROS (MELLO ET AL., 1996A)

#### 3.9.1 Unidade superior

Colocou-se 1 mg da substância acetilada em 2 ml de solução de HCl 5% em etanol, em balão de fundo afunilado de 25 ml. Deixou-se em refluxo por 60 min, ou até a solução tornar-se claramente vermelha. Realizou-se CCD em celulose com sistema eluente ác. fórmico/HCl/água (10:1:3; V/V). Foi utilizado cloridrato de pelargonidina como substância referência.

#### 3.9.2. Unidade inferior

Colocou-se 1 mg da substância livre (não acetilada) em 2 ml de solução de HCl 0,1 N em etanol. Deixou-se em banho-maria a 60 °C por 15 min. Conseguiu-se a identificação através de CCD como descrito na seção 3.5.1 em comparação com substância referência.

### 3.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 3.10.1. Atividade antibacteriana

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),

*Bacillus subtilis* (ATCC 6623) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e os antibacterianos de referência foram penicilina, vancomicina e cloranfenicol, respectivamente.

#### 3.10.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando gotas de uma cultura de 24 h em um tubo contendo solução salina até a obtenção de uma turvação igual à encontrada na escala de Mc Farland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).

#### 3.10.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método da diluição em placas (Amsterdam, 1996)

As frações e substâncias a serem testadas, foram solubilizadas em água (20 mg/ml) e diluídas (1:10) em caldo Mueller-Hinton (CMH), resultando numa solução 2 mg/ml (Solução Teste - ST). Em uma placa de 96 poços (fig. 13) foram adicionados 100 µl de CMH em cada poço. Um volume de 100 µl de ST foi adicionado aos poços da primeira fileira. Fez-se então a diluição seriada homogeneizando e transferindo 100 µl da primeira fileira até a sétima, resultando nas respectivas concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625 µg/ml. A oitava fileira foi utilizada como controle, sem ST. Em seguida, a todos os poços, foram adicionados 5 µl da suspensão de microrganismos previamente padronizada, e a placa foi incubada a 37 °C durante 24-48 h. A inibição de crescimento foi evidenciada pela ausência de crescimento microbiano no meio, utilizou-se solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio a 2% (TTC) para facilitar a visualização, determinando então a CIM, ou seja, a menor concentração da ST capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), as diluições que não resultaram em crescimento na CIM e duas diluições anteriores foram utilizadas semeando-as em ágar Mueller-Hinton (AMH), comprovando-se, assim, a atividade bactericida.

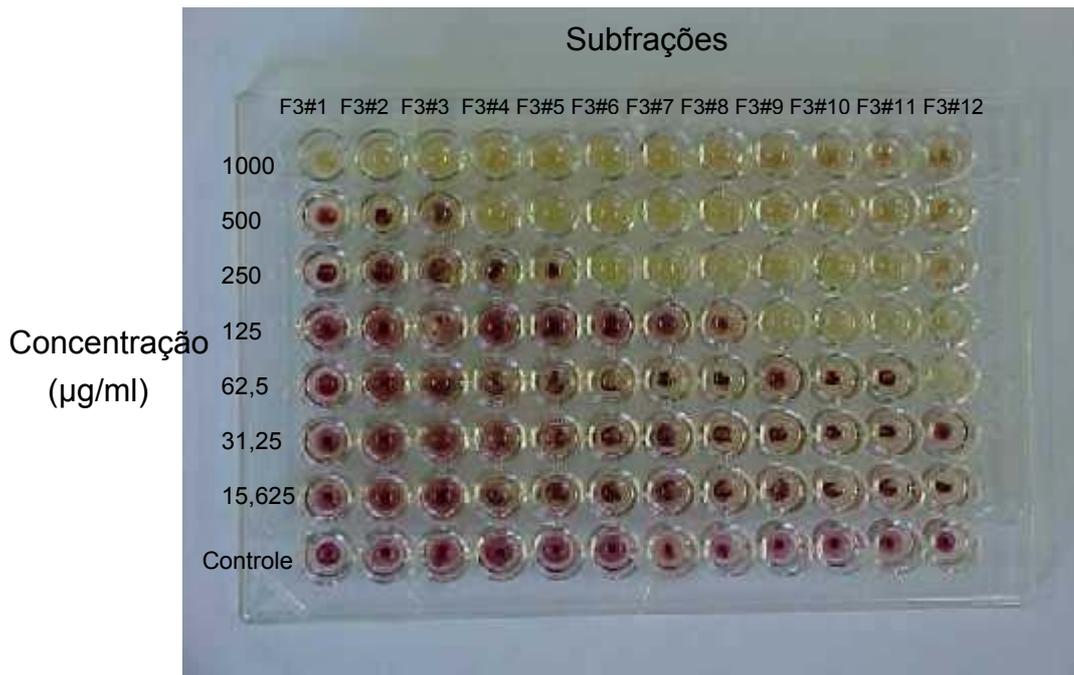


Figura 13 – Placa de 96 poços com TTC, evidenciando os poços com crescimento bacteriano (poços vermelhos)

### 3.10.1.3. Tempo de morte bacteriana

Obtido o resultado da CIM (x), em µl/ml, colocou-se 100 µl de CMH nos sete primeiros poços da primeira coluna de uma placa de 96 poços. Adicionou-se ao primeiro poço superior da linha 100 µl da solução contendo a fração a ser testada diluída em CMH. Fez-se uma diluição seriada, homogeneizando e transferindo, sucessivamente, 100 µl do primeiro ao sexto poço da primeira coluna, objetivando as concentrações finais, respectivamente, 0,5x, 1x, 2x, 4x, 8x e 16x (em µl/ml), ficando a sétima fileira como controle. Colocaram-se 10 µl de suspensão bacteriana em CMH, contendo aproximadamente  $5 \times 10^4$  UFC/ml, nos sete poços utilizados da primeira coluna. Preparou-se uma placa para cada tempo de leitura ( $t = 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24$  h).

Em cada tempo de leitura, adicionaram-se 90 µl de CMH no restante dos poços da placa. Para facilitar as contagens das colônias, fez-se uma diluição seriada homogeneizando e transferindo 10 µl do primeiro poço da fileira até o último, repetindo-se para todas as fileiras. Realizou-se a semeadura dos poços em placa de

Petri com AMH para realizar a contagem das colônias (Klepser et al., 1996).

### 3.10.2. Atividade leishmanicida

#### 3.10.2.1. Meio 199 completo

Foi utilizado o meio 199 contendo 1 ml de solução de L-glutamina, penicilina 6,3 mg/ml, estreptomicina 10 mg/ml e soro bovino fetal 10%. O meio foi esterilizado através de membrana Millipore® (HA em éster de celulose, 0,45 µm de poro, 25 mm de diâmetro).

#### 3.10.2.2. Repique de cultura

Utilizou-se a cepa MHOM/BR/73/M2269 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mantida em camundongos por repiques a cada 50-60 dias. As formas promastigotas foram obtidas após isolamento dos parasitas dos camundongos, inoculação em meio de cultura 199 completo e crescimento por 5-7 dias a 26 °C.

Em frascos de cultura de 25 ml estéreis, adicionaram 4 ml de meio 199 completo e 1 ml da cultura de leishmania ( $1 \times 10^5$  promastigotas/ml). Deixou-se em estufa incubadora de 5 a 7 dias, a 26 °C. Após, as culturas foram homogeneizadas através de seringa e agulha (25 x 7 mm) e observadas ao microscópio óptico (400x) para confirmação de crescimento homogêneo e sem contaminação.

#### 3.10.2.3. Padronização da cultura de formas promastigotas

Adicionaram-se 50 µl da cultura em 950 µl de formalina 2% em solução salina, realizando-se a contagem em câmara de Neubauer. Foram preparados 16 ml de cultura contendo  $2 \times 10^5$  promastigotas/ml.

#### 3.10.2.4. Padronização da solução teste (ST)

Pesaram-se 20 mg da ST e diluiu-se em 10 ml de meio 199 completo (2 mg/ml). Essa solução foi filtrada em membrana Millipore® (HA em éster de celulose, 0,45 µm de poro, 25 mm de diâmetro) no momento de uso.

### 3.10.2.5. Avaliação da atividade leishmanicida

As diferentes concentrações foram preparadas de forma estéril (tab. 3).

Tabela 3 - Preparação dos tubos estéreis e respectivas concentrações

Tubos (STP)*	Quantidade (ml)			Concentração final da ST (µg/ml)
	Solução teste (ST)	Meio 199 completo	Cultura de Leishmania	
1	4,00	-	4,00	1000
2	0,40	3,60	4,00	100
3	0,04	3,96	4,00	10
Controle	-	4,00	4,00	-

\* STP – Solução Teste Padronizada

Alíquotas de 500 µl de cada concentração e do controle foram distribuídas em tubos de 1 ml estéreis e com tampa. Foram preparados 12 tubos para cada concentração (STP) e 12 tubos para o controle, totalizando-se 48 tubos. Os tubos foram mantidos em estufa a 26 °C. A primeira contagem das culturas de leishmania - foi realizada após 24 h, sendo avaliados 3 tubos de cada concentração e 3 tubos do controle (n=3). A contagem foi repetida após 48, 72 e 96 h.

Para a contagem, as culturas foram homogeneizadas com agulha e seringa. Após, preparou-se uma diluição adequada da cultura em formalina a 2% e realizou-se a contagem em câmara de Neubauer.

A concentração de formas promastigotas de leishmania nos tubos contendo a droga foi comparada com a encontrada em seus respectivos controles. O resultado final da atividade leishmanicida foi calculado para os quatro dias de leituras em porcentagem de inibição do crescimento nos tubos contendo as diferentes concentrações da ST em relação ao crescimento nos tubos controle (Callahan et al., 1997).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos vegetais são utilizados pela população na tentativa de controlar diversas doenças ou sintomas, e muitas vezes são utilizados indevidamente. Assim, essas “plantas milagrosas” vêm ao longo dos anos trazendo transtornos para seus usuários, seja simplesmente pela ausência da atividade farmacológica, ou mesmo pela ocorrência de intoxicações. Esse fato está relacionado, normalmente, com o uso errôneo das partes vegetais (má caracterização e/ou preparação e administração errada). Esses erros levam, além de prejuízos ao paciente, a um intenso extrativismo, colocando em risco várias espécies vegetais nativas, sem que sejam estudadas (França, 2001).

Em qualquer estudo envolvendo matéria-prima vegetal, é fundamental a identificação correta da droga, que consiste na comparação com uma espécie já existente em uma coleção e/ou com descrições e ilustrações encontradas na literatura. O erro de identificação pode ocorrer em pesquisas acadêmicas e na produção de medicamentos envolvendo drogas vegetais, levando, algumas vezes, a falsos resultados e produtos, com conseqüente desperdício de investimento e problemas aos consumidores. Nas pesquisas, a matéria-prima pode ser perfeitamente identificada, já que normalmente, o próprio pesquisador faz a coleta de várias partes vegetais, preparando a exsicata e facilitando o processo de identificação. Já na produção medicamentosa, esse processo tende a ser mais problemático. Normalmente apenas o farmacógeno é comprado, e na maioria das vezes na forma moída. Nesse caso faz-se uso de algumas análises químicas como complemento, (reações químicas de caracterização, CLAE, CCD entre outras) obtidas em monografias específicas para cada droga.

A análise anatômica mostrou as principais estruturas das cascas do *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Esse trabalho envolveu técnicas de corte diferenciado, tanto à mão livre como com o auxílio de micrótomo, isso se deve a grande dificuldade de se obter cortes viáveis de serem analisados. Selecionaram-

se os melhores entre aqueles obtidos pelos dois processos, resultando em cortes preparados em lâminas com glicerina e cortes que foram incluídos na parafina. Com essa seleção de cortes, pode-se visualizar as estruturas celulares, e de acordo com a cor resultante da aplicação do corante, observou-se suas possíveis composições químicas como: lignina, celulose ou suberina.

As características anatômicas das cascas do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram publicadas pela primeira vez na Farmacopéia (1926). Sua monografia é composta de informações sobre seus caracteres microscópicos, sem ilustrações. Oliveira e Akisue (1989) descreveram as mesmas características acrescentando desenhos. Suas ilustrações foram úteis para o desenvolvimento do presente trabalho, auxiliando, entre outros fatores, na identificação do vegetal. Possíveis equívocos entre espécies do gênero podem ser evitados, desde que outras espécies sejam estudadas da mesma maneira e de forma comparativa. As apresentações por desenhos e fotos fornecem subsídios a respeito das principais características anatômicas das cascas do barbatimão, facilitando o controle de qualidade do farmacógeno.

Observando-se os cortes obtidos, tanto a mão livre, quanto aqueles emblocados em parafinas, foi possível reconhecer os tecidos apresentados na Farmacopéia (1959) e por Akisue e Oliveira (1989).

Apesar da difícil separação entre o felogênio e a feloderme (parênquima cortical secundário), foi possível a perfeita observação da periderme (fig. 14) que, além dos tecidos citados, o súber também participa de sua formação. O súber, que é originário do felogênio, tornou-se evidenciado pelo espessamento de sua parede por suberina, substância que confere impermeabilidade à água e ao ar. Suas células são grandes, arredondadas e aparentemente sobrepostas. Foi possível notar a presença de lignina nas células suberosas, evidenciada pela safranina. Já o felogênio e o feloderme são formados por células retangulares, alongadas no sentido tangencial, enfileiradas e justapostas.

As células do parênquima cortical, propriamente dito, apresentaram-se

mais arredondadas e com parede celular menos espessada e celulósica (fig. 14).

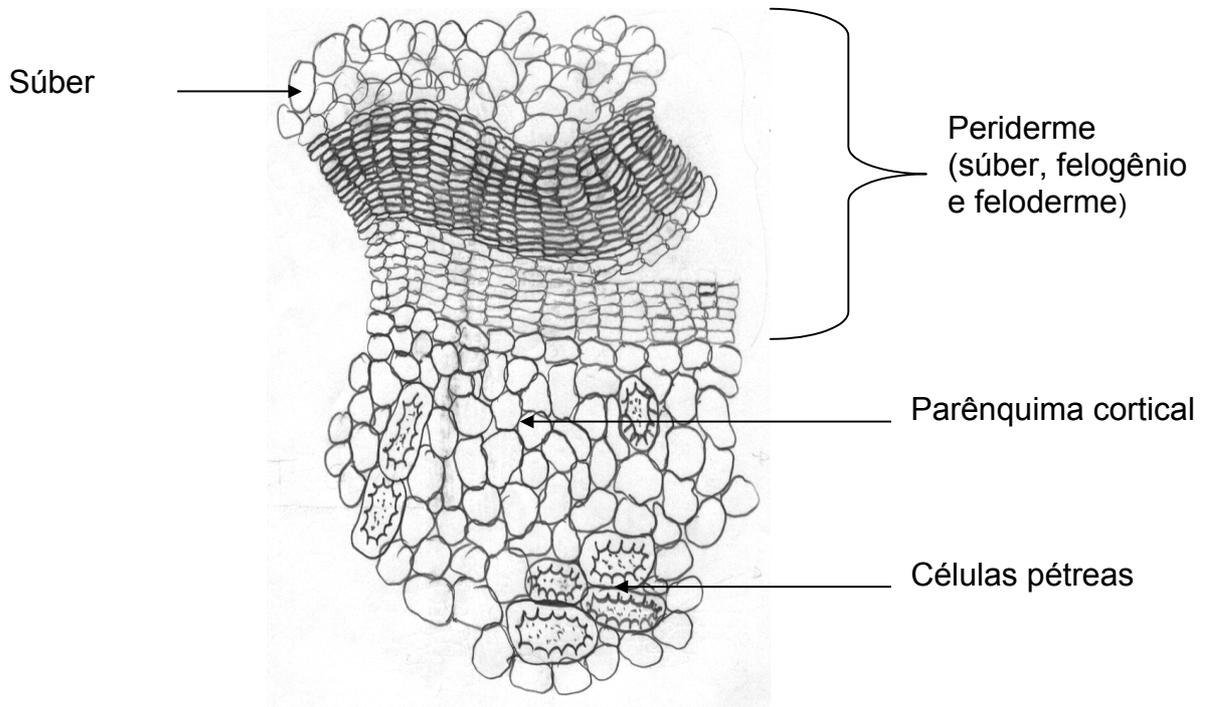


Figura 14 – Corte longitudinal da casca de barbatimão

O parênquima cortical apresenta um grande número de células esclerenquimáticas, facilmente distinguida por sua forma, tamanho e bordas espessas, nomeadas como células pétreas (fig. 14 e 15) (Esau, 1974). Essas células são dotadas de paredes secundárias espessadas com lignina, mostrando-se avermelhadas em Safrablau, e são importantes na função de sustentação do vegetal

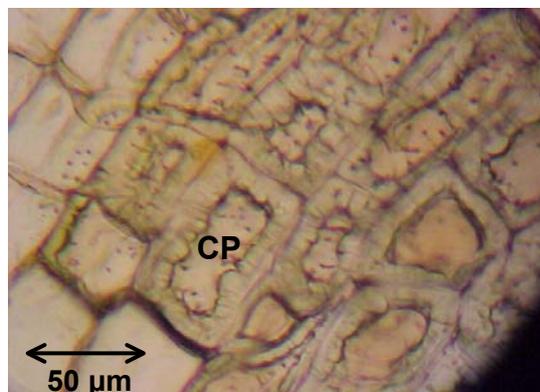


Figura 15 – Células pétreas (CP) em corte transversal sem corante

No corte transversal da casca na região floemática, observa-se que as fibras do floema estão dispostas em grupos (fig. 16), evidenciadas também pela safranina.

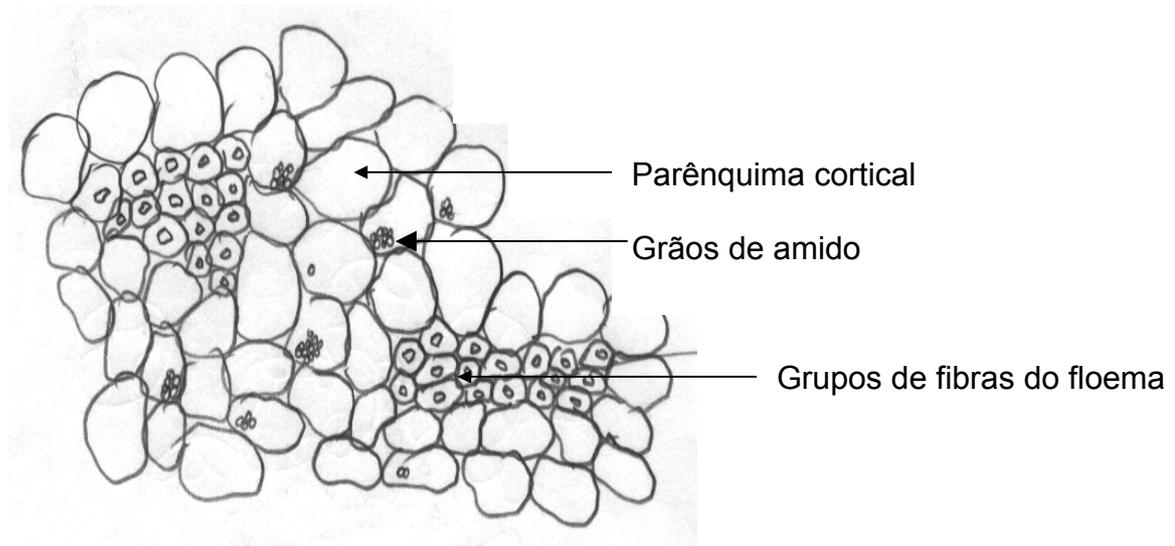


Figura 16 – Fibras do floema em corte transversal

Em corte longitudinal, observa-se que ao longo das fibras floemáticas, aparecem células contendo cristais prismáticos (monocristais), formando uma bainha cristalífera (fig. 17 e 18), caracterizando fortemente a anatomia vegetal.

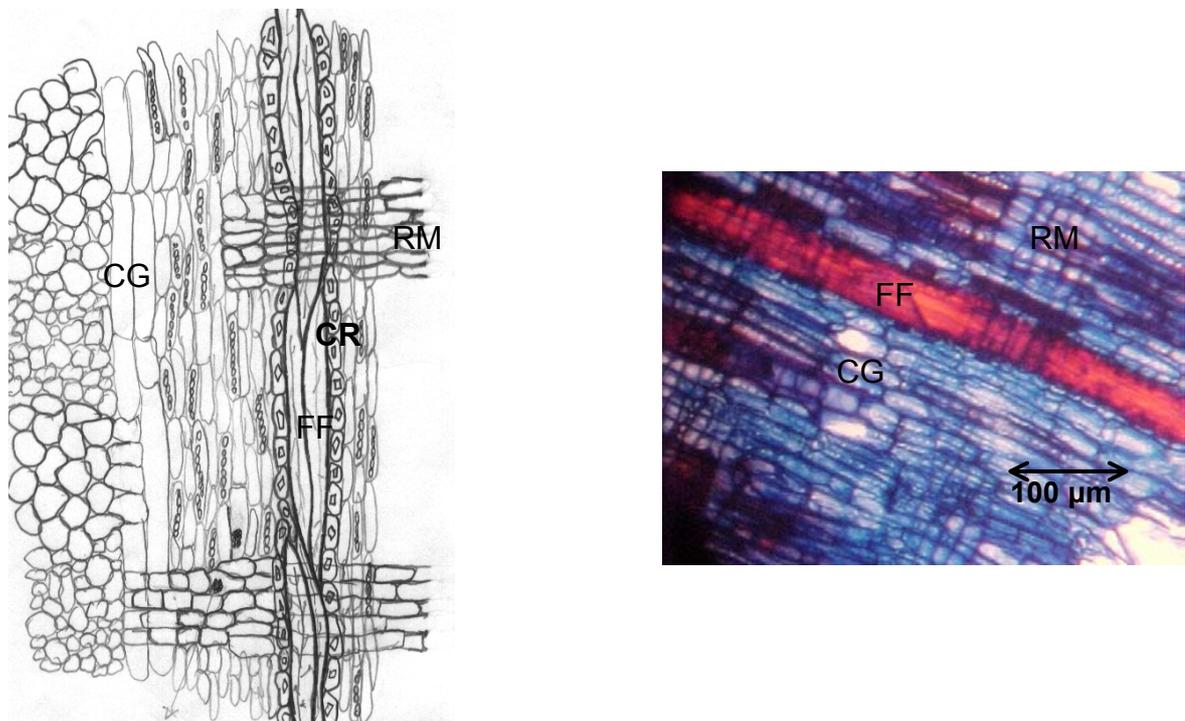


Figura 17 – Corte longitudinal (safranblau) mostrando fibras do floema (FF), raios medulares (RM), cristais prismáticos (CR) e células parenquimática grandes (CG).

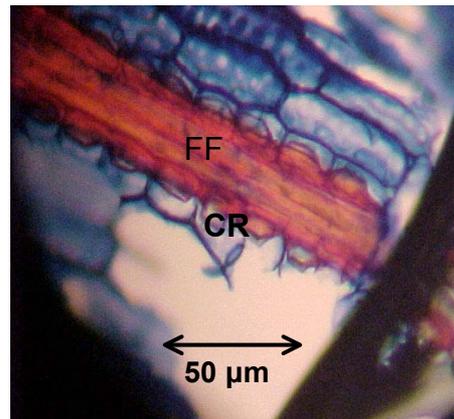


Figura 18 – Corte longitudinal (safrablau) mostrando as fibras do floema (FF) e a bainha de cristais prismáticos (CR)

As fibras floemáticas, os raios medulares, as células gigantes e os cristais podem ser observados na figuras 17, 18 e 19. Na figura 20 é possível identificar numerosos grupos de 5 a 7 células parenquimáticas que se destacam pelo seu tamanho. Nas demais células, nota-se grande número de grãos de amido.

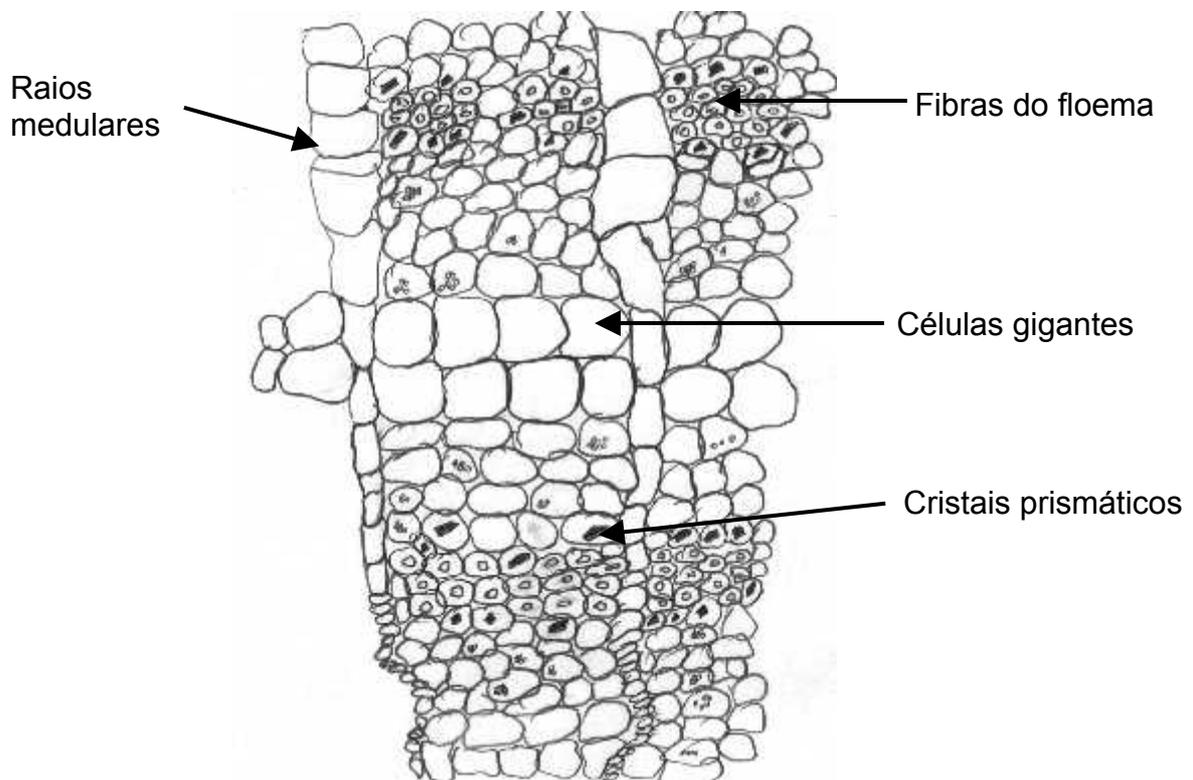


Figura 19 – Corte transversal da casca mostrando as fibras floemáticas, raios medulares, células gigantes e cristais prismáticos

Em todo parênquima cortical é visto, isoladamente ou em grupos, células com conteúdo pardo, ainda não caracterizadas, mas, possivelmente resinosas (fig. 20).

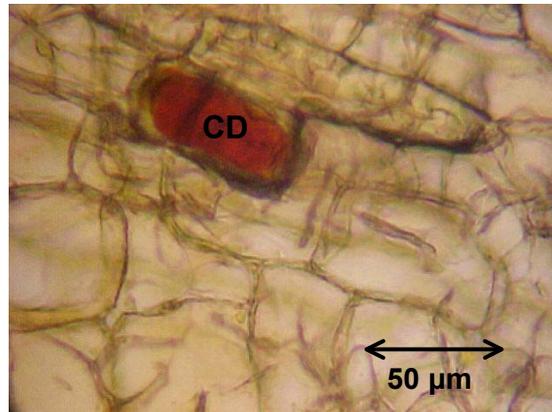


Figura 20 – Células com conteúdo pardo (CD)

Houve suspeita de que as células com conteúdo pardo (ainda não elucidadas) fossem idioblastos taníferos, isto é, células com o meio intracelular com grande quantidade de taninos. Isso ajudaria na explicação do armazenamento de substâncias fenólicas e adstringentes ou mesmo tanantes nas cascas do *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, que apresentam um teor de cerca de 20 % em taninos (Farmacopéia, 1959).

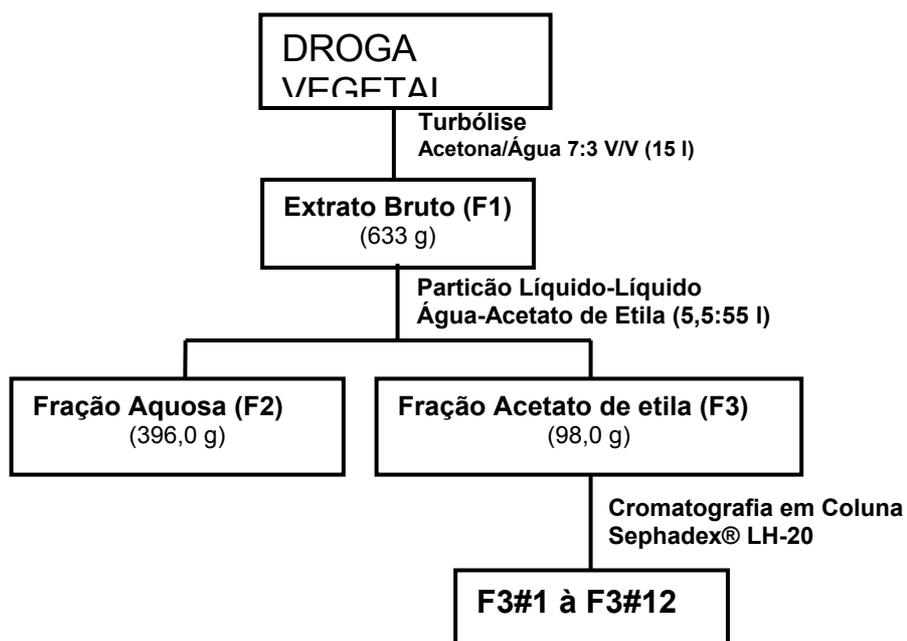
Essa idéia, da possível presença de substâncias fenólicas em idioblastos e, o isolamento e identificação de 23 compostos das cascas da espécie vegetal, dos quais 10 foram totalmente inéditos obtidos de fonte natural (Mello et al., 1996a, 1996b e 1999), resultaram no propósito de isolamento e identificação de possíveis novos taninos condensados. Assim, esse trabalho empregou a mesma metodologia proposta por esses autores.

As cascas (3,960 kg) foram coletadas em São Jerônimo da Serra, estado do Paraná, Brasil. O material foi submetido à secagem a sombra e em local arejado. Realizou-se paralelamente a perda por secagem ( $n= 5$ ) da casca, e, após nove dias houve estabilização no processo de secagem, perdendo  $52,81\% \pm 1,86$  do peso bruto. As cascas secas (1,864 kg) foram moídas, fornecendo um rendimento de

87,39% (1,629 kg em pó).

Com 1,5 kg da droga cominuída preparou-se extrato bruto por turbo-extração com um rendimento de 42,13%, obtendo-se 633 g de material liofilizado (F1).

Com 550 g da fração F1 produziu-se por partição líquido-líquido, 396,0 g da fração aquosa (fração F2) e 98,0 g da fração acetato de etila (F3). Empregou-se na partição 55 l de acetato de etila e 5,5 l de água destilada. A obtenção das frações e subfrações a partir da fração F1, encontra-se no fluxograma 1. As quantidades utilizadas de droga vegetal no trabalho se devem a amplitude do projeto elaborado, com envolvimento de várias áreas de pesquisa, como microbiologia, parasitologia, farmacognosia, botânica, histologia e farmacologia, e que resultarão em mais alguns anos de estudo.



Fluxograma 1 - Obtenção das frações e subfrações

Com o intuito de fracionamento da fração F3 (acetato de etila), realizou-se cromatografia em coluna em Sephadex® LH-20 com 20 g da mesma. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes com porções de 20 g. Através do monitoramento por CCD, pôde-se reunir 12 subfrações (F3#1 – F3#12) de acordo com a tabela 4. Todas as subfrações foram avaliadas em CCD (fig. 21).

Tabela 4- Doze subfrações obtidas por CC

Fração	Eluente	Volume aproximado (l)	Quantidade (g)	(%)
F3#1	Etanol/Água (1:1; V/V)	4,8	2,0612	3,44
F3#2	Etanol/Água (1:1; V/V)	1,35	7,4268	12,38
F3#3	Etanol/Água (1:1; V/V)	1,8	8,4632	14,11
F3#4	Etanol/Água (1:1; V/V)	1,65	2,2966	3,83
F3#5	Etanol/Água (1:1; V/V)	2,97	4,9626	8,27
F3#6	Etanol/Água (1:1; V/V)	2,28	4,1726	6,95
F3#7	Etanol/Água (1:1; V/V)	2,85	3,1477	5,25
F3#8	Etanol/Água (1:1; V/V)	3,75	3,7152	6,19
F3#9	Etanol/Água (1:1; V/V)	4,95	1,2507	2,08
F3#10	Etanol/Água (1:1; V/V)	7,20	2,8090	4,68
F3#11	Etanol	12,30	2,6231	4,37
F3#12	Acetona/Água (7:3; V/V)	7,50	6,4586	10,76

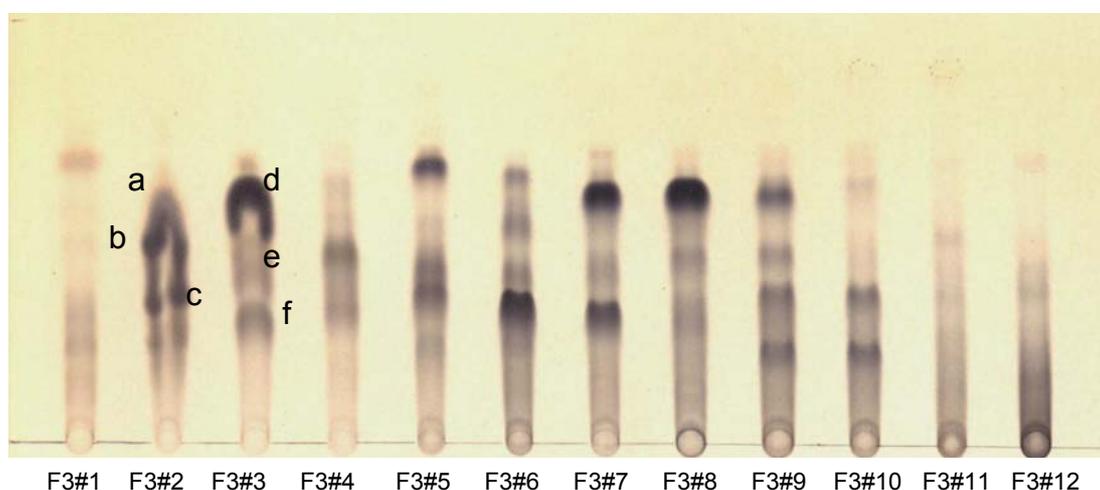


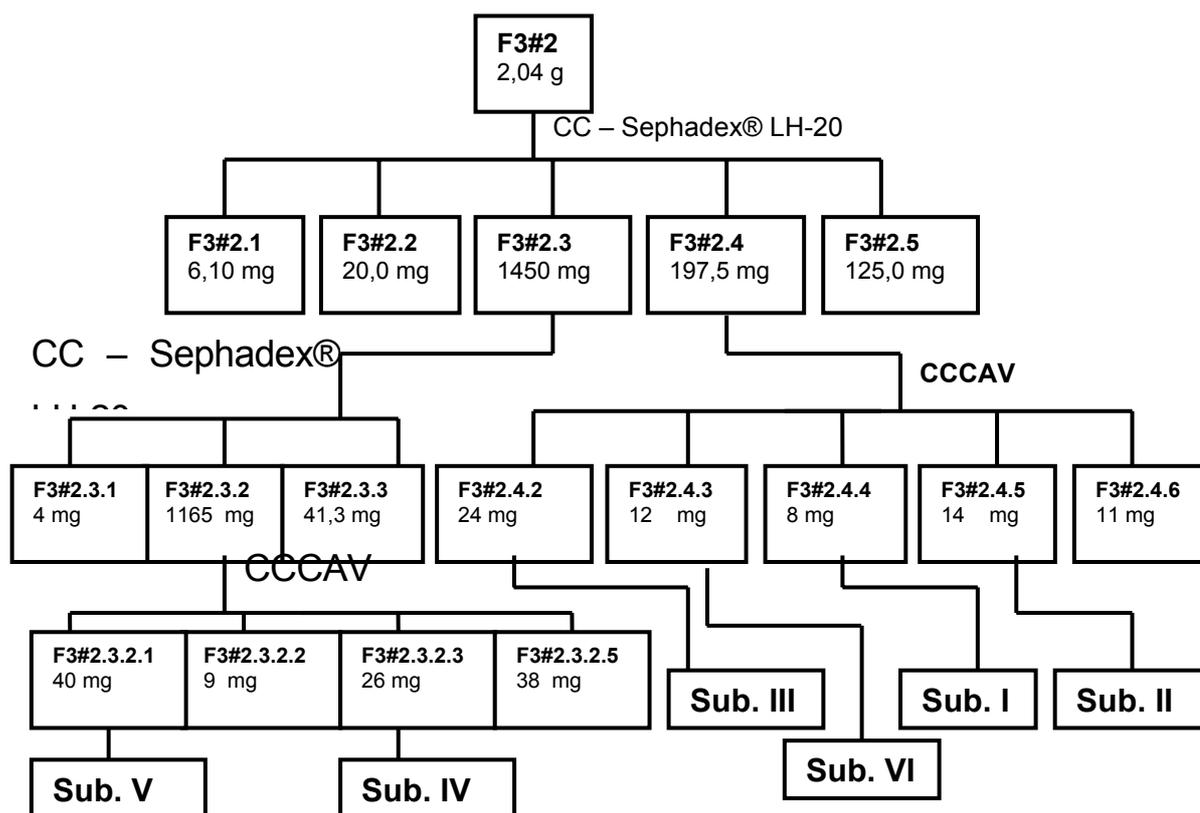
Figura 21 – CCD das 12 subfrações ( $R_{fa}=0,60$ ;  $R_{fb}=0,48$ ;  $R_{fc}=0,36$ ;  $R_{fd}=0,60$ ;  $R_{fe}=0,40$ ;  $R_{ff}=0,30$ )

Pelo fracionamento ter sido realizado por Sephadex® LH-20, é de se esperar que as substâncias com maiores massas moleculares aparecessem nas frações iniciais. Porém, houve uma predominância de substâncias de massas moleculares menores. Propõe-se que o fato esteja relacionado com a interação entre os monômeros de taninos e sistema eluente, ocorrendo a eluição seqüencial de monômeros>dímeros>trímeros>tetrâmeros>oligômeros>polímeros (Thompson et al., 1972).

De acordo com o cromatograma (fig. 21) e, na tentativa de se conseguir isolar monômeros de taninos condensados (flavan-3-óis), iniciou-se o fracionamento com as frações F3#2 e F3#3. Isto está baseado na presença de manchas com

coloração entre o azul e o marrom (fig. 21 -  $R_f$ s:  $a=0,60$ ;  $b=0,48$ ;  $c=0,36$ ;  $d=0,60$ ;  $e=0,40$ ;  $f=0,30$ ). O isolamento desses compostos foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Mello et al. (1996a), como pode ser observado nos fluxogramas 1, 2 e 3. O esquema de eluição e acompanhamento das frações por CCD encontra-se descrito nas seções 3.5.1 e 3.6.4.

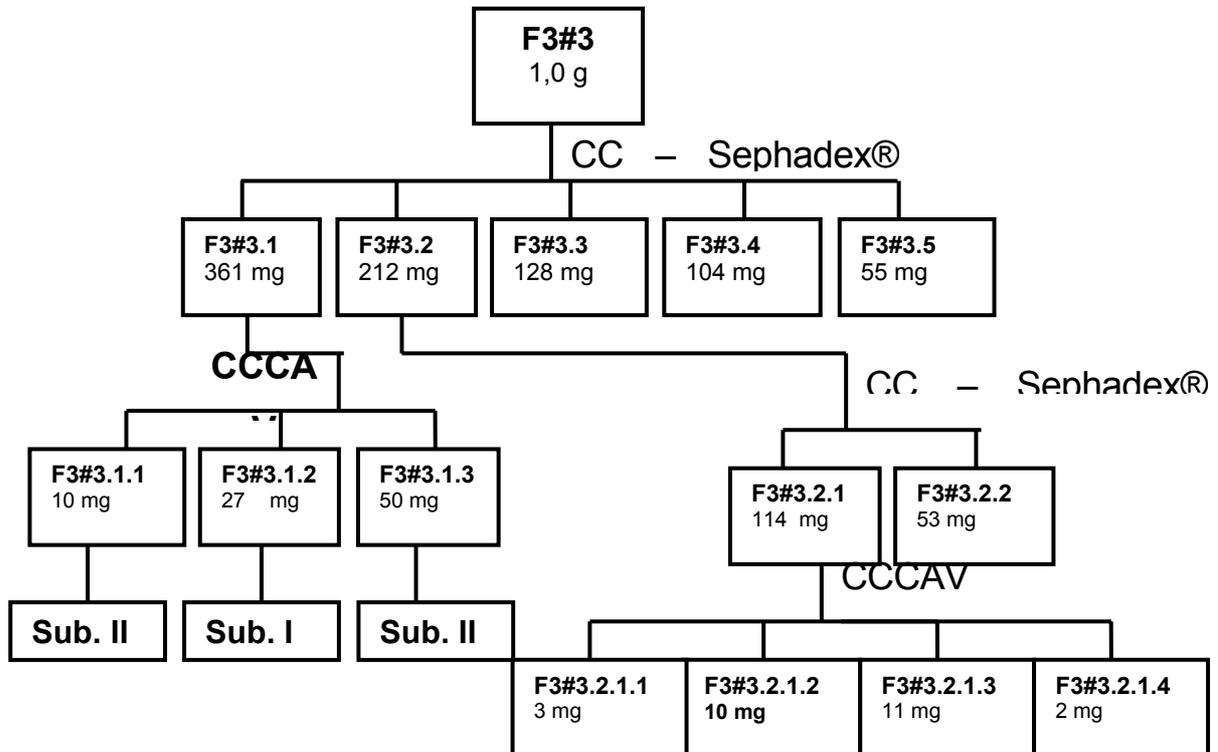
A CC em Sephadex® LH-20 (seção 3.6.4) com a subfração F3#2 (2,04 g - fluxograma 2) produziu cinco novas frações semipurificadas, que foram submetidas à análise por CCD. Selecionaram-se as subfrações F3#2.3 e F3#2.4. A subfração F3#2.4 (197,5 mg) foi submetida diretamente à cromatografia de contra-corrente (CCAV), resultando no isolamento das substâncias I, II e III, F3#2.4.4 – 8 mg; F3#2.4.5 – 14 mg e F3#2.4.2 – 24 mg, respectivamente.



Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico a partir de F3#2

A partir da subfração F3#3, obteve-se cinco novas frações por CC em Sephadex® LH-20, selecionando-se a subfração F3#3.1 (361 mg) para ser

cromatografada em CCCAV. Isolaram-se, novamente, as substâncias I, II e III, F3#3.1.2 – 27 mg; F3#3.1.3 – 50 mg e F3#3.1.1 – 10 mg, respectivamente.



Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico a partir de F3#3

O uso da cromatografia de contra-corrente (CCCAV) foi fundamental na separação das substâncias. Esse tipo de cromatografia possui algumas vantagens, como: recuperação total da amostra introduzida; não há adsorção irreversível; riscos mínimos de degradação da amostra; baixo consumo de solventes e quantidades mínimas de uma determinada substância pode ser separada de um extrato bruto. Conseqüentemente, ela se torna de grande uso no isolamento de substâncias em produtos naturais. Sua técnica envolve, basicamente, a partição de um soluto em dois solventes imiscíveis, dependendo do coeficiente de partição do soluto para cada solvente. A CCCAV consiste de um tubo ( $\varnothing$  1,6 ou 2,6 mm) com capacidade para 350 ml enrolado em uma coluna e colocada sobre um eixo giratório. Essa coluna sofre uma ação centrífuga ocasionada pelos processos de rotação sobre o eixo e de translação do equipamento, há 700 rpm. A coluna é ligada a uma bomba

que promove uma entrada de líquido, controlando, assim, o fluxo. O mecanismo de distribuição dos solventes no tubo ainda não é conhecido (Marston e Hostettmann, 1991). Esse sistema é útil em separação de substâncias polares e com similaridade química. Assim, a CCCAV foi fundamental para o isolamento das substâncias, principalmente pelo fato de que os flavan-3-óis possuem várias características estruturais semelhantes, o que pode ser comprovado analisando os dados cromatográficos como  $R_f$ s e a reatividade frente aos reveladores cromogênicos.

Após a separação cromatográfica e análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD) de todas as substâncias, observou-se que todos apresentavam picos característicos de flavan-3-óis. Com o intuito de obter espectros de ressonância que apresentasse facilidade na interpretação, além de torná-las mais estáveis do ponto de vista químico, as substâncias foram acetiladas (seção 3.7) e, novamente, sujeitas à espectroscopia em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Na CCD, a substância I apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com  $\text{FeCl}_3$ , com  $R_f = 0,67$ . Isso forneceu indícios característicos de taninos condensados. No espectro de massas foi possível observar o pico do íon molecular  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  em  $m/z$  581, sendo que a substância possui, na forma acetilada, massa molecular igual a 558. O processo de fragmentação da substância I pode ser observado na figura 22.

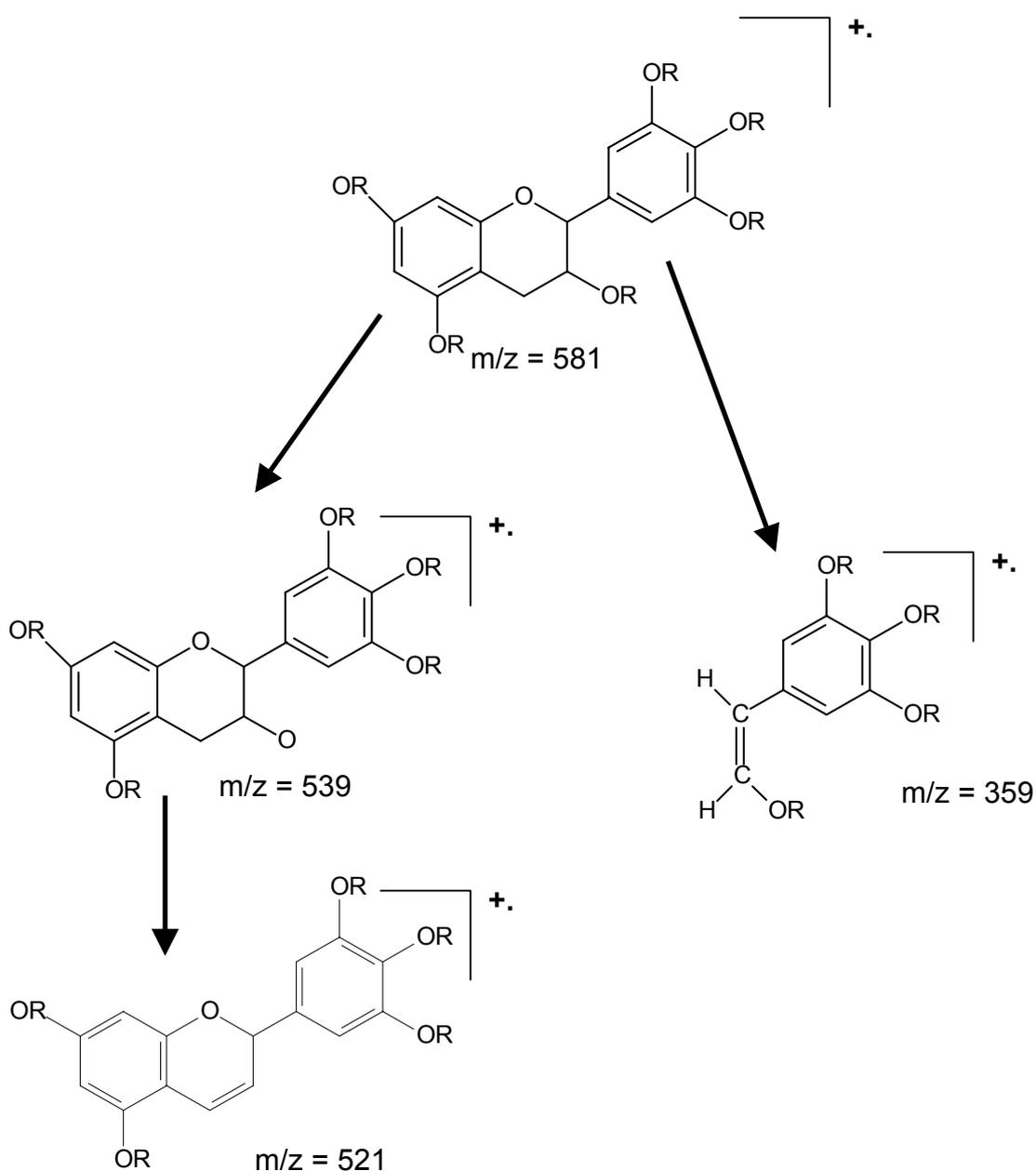


Figura 22 – Proposta de fragmentação das substâncias I e II (R= acetato)

Na tabela 5 encontram-se os deslocamentos ( $\delta$  em ppm) de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para a substância I acetilada comparados com aqueles encontrados na literatura (Mello et al., 1996a). Pode-se notar na figura 23 um característico espectro de monômero de flavan-3-ol peracetilado. É possível observar os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como multipletos em  $\delta$  2,66 e  $\delta$  2,92

respectivamente. A constante de acoplamento  $J_{H-2, H-3}$  (6,3 Hz) caracterizou o monômero como tendo uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* (Weinges et al., 1969). Pode-se comprovar a tri-hidroilação do anel B em C-3', C-4' e C-5' pela presença de um singlete referente aos deslocamentos de H-2' e H-6', pelo fato de serem quimicamente equivalentes. Tornou-se possível, pelo espectro COSY  $^1H/^1H$  (fig. 24), verificar o acoplamento entre H-3 e H-4<sub>ax</sub> ( $J = 6,6$  Hz), comprovando a identidade desses hidrogênios. Assim identificou-se a substância I como sendo galocatequina, de acordo com essa interpretação e os dados da literatura.

Tabela 5 - Deslocamentos da substância I peracetilada

$\delta$ (ppm)	$\delta$ - Literatura (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,94	2,92	H-4eq	<i>m</i>	$^2J_{H_{eq-4} - H_{ax-4}} = 16,8$ $^3J_{H_{eq-4} - H-3} = 5,1$
2,60 – 2,70	2,66	H-4ax	<i>m</i>	
5,12	5,12	H-2	<i>d</i>	$^3J_{H-2 - H-3} = 6,3$
5,21	5,19	H-3	<i>ddd</i>	$^3J_{H-3 - H-2} = 6,3$ $^3J_{H-3 - H_{ax-4}} = 6,6$ $^3J_{H-3 - H_{eq-4}} = 5,1$
6,60	6,60	H-6	<i>d</i>	$^4J_{H-6 - H-8} = 2,1$
6,66	6,66	H-8	<i>d</i>	$^4J_{H-8 - H-6} = 2,1$
7,12	7,12	H-2'/H-6'	<i>s</i>	

s= singlete; d= dubleto; m= multipleteo; ddd=duplo duplo dubleto

Figura 23 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 24 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

A substância II forneceu dados semelhantes aos da substância I, para  $R_f$  (0,66) e coloração em CCD e para o pico do íon molecular  $[M+Na]^+$  ( $m/z= 581$ ). Assim foi possível confirmar uma substância de estrutura semelhante à galocatequina (substância I). O processo de fragmentação mostrou-se idêntico ao da substância I (fig. 22). Entretanto, como os percentuais dos fragmentos são diferentes para as duas substâncias, optou-se por não citá-los.

Os deslocamentos referentes à substância II encontram-se na tabela 6 e, na figura 25, o espectro de RMN  $^1H$ . Não foi possível a diferenciação entre H-4<sub>ax</sub> e H-4<sub>eq</sub>, apresentando-se com um multipletto entre  $\delta$  2,82 e 3,04. A constante de acoplamento H-2 e H-3 foi muito pequena, não sendo possível calculá-la. O pico referente a H-2 apresenta-se como um pseudo singleto e H-3 como um multipletto resultante do acoplamento com H-4 (equatorial e axial). Segundo Weinges et al. (1969), a pequena constante de acoplamento entre H-2 e H-3, caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. Os demais deslocamentos se assemelham àqueles obtidos para substância I. No espectro COSY  $^1H/^1H$  (fig. 26) foi possível verificar o acoplamento entre H-3 e H-4 (equatorial e axial) que, após comparação com dados da literatura (Mello et al., 1996a), confirma a substância II como sendo epigalocatequina.

Tabela 6 - Deslocamentos da substância II peracetilada

$\delta$ (ppm)	$\delta$ - Literatura (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,86 – 3,01	2,82 – 3,04	H-4eq/H-4ax	<i>m</i>	
5,09	5,08	H-2	<i>ps</i>	
5,38	5,35 – 5,42	H-3	<i>m</i>	
6,57	6,57	H-6	<i>d</i>	$^4J_{H-6-H-8} = 2,4$
6,67	6,67	H-8	<i>d</i>	$^4J_{H-8-H-6} = 2,4$
7,23	7,22	H-2'/H-6'	<i>s</i>	

*ps*= pseudo singleto; *s*= singleto; *d*= dubleto; *m*= multipletto;

Figura 25 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da epigalocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 26 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da epigalocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

O principal aspecto de diferenciação entre a galocatequina e a epigalocatequina está nos deslocamentos referentes aos hidrogênios H-2 e H-3. A substância I apresentou  $J_{H-2 - H-3}=6,3$  Hz, enquanto que na substância II, o H-2 mostrou-se como um pseudosinglete em  $\delta$  5,09 (tab. 5 e 6). Outras diferenças podem ser notadas nos espectros RMN  $^1H$ . Na substância I, o hidrogênio H-2 aparece como um duplete em  $\delta$  5,12 e H-3 um duplo duplo duplete em  $\delta$  5,19. O H-3 da substância II aparece como um multiplete entre  $\delta$  5,35 – 5,42. Conclui-se que a configuração entre H-2 e H-3 da substância I é do tipo *trans*, já que possui uma constante de acoplamento ( $J_{2,3}$ ) grande em torno de 8-10 Hz (Weinges et al., 1969; Kolodziej, 1992). As conformações *trans* e *cis* foram confirmadas pela correlação H-3 com H-4<sub>eq</sub> e H-4<sub>ax</sub> da substância II, enquanto na primeira substância, houve apenas correlação entre H-3 e H-4<sub>ax</sub>. Após a análise e a comparação com dados de literatura, pode-se diferenciar as substâncias e identificá-las como galocatequina (substância I) e epigalocatequina (substância II).

A substância III apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl<sub>3</sub>, fornecendo  $R_f= 0,75$  e também mostrando características de polifenóis. No espectro de massas (fig. 27) pode verificar o íon do pico molecular  $[M+Na^+]^+$  para a substância peracetilada em  $m/z$  553, caracterizando um monômero de taninos condensados e resultando na massa da substância na forma acetilada ( $m/z$  530). O processo de fragmentação da substância III encontra-se na figura 28.

Figura 27 – Espectro de massas da substância III peracetilada

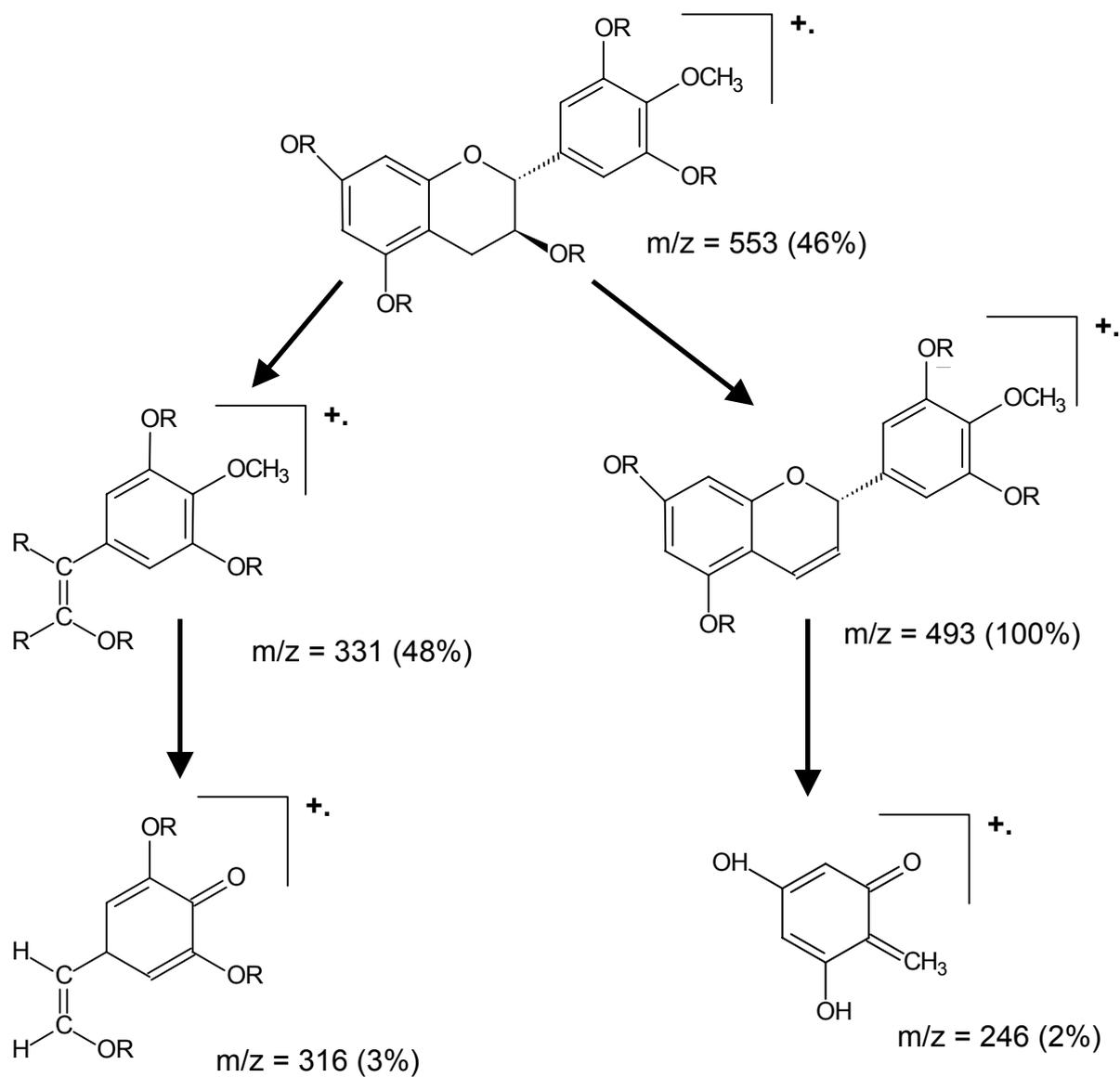


Figura 28 – Proposta de fragmentação da substância III (R= acetato)

Os dados referentes aos deslocamentos de RMN  $^1\text{H}$  da substância III encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 – Deslocamentos da substância III peracetilada

$\delta$ (ppm)	$\delta$ - Literatura (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,65	2,65	H-4 <sub>ax</sub>	<i>dd</i>	$^2J_{\text{Hax-4} - \text{Heq-4}} = 16,8$ $^3J_{\text{Hax-4} - \text{H-3}} = 6,9$
2,88	2,88	H-4 <sub>eq</sub>	<i>dd</i>	$^2J_{\text{Heq-4} - \text{Hax-4}} = 16,8$ $^3J_{\text{Heq-4} - \text{H-3}} = 4,8$
3,81	3,80	O-Metil	<i>s</i>	
5,08	5,08	H-2	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2} - \text{H-3}} = 6,3$ $^3J_{\text{H-3} - \text{H-2}} = 6,3$
5,21	5,20	H-3	<i>ddd</i>	$^3J_{\text{H-3} - \text{Hax-4}} = 6,6$ $^3J_{\text{H-3} - \text{Heq-4}} = 5,4$
6,59	6,59	H-6	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6} - \text{H-8}} = 2,1$
6,65	6,66	H-8	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8} - \text{H-6}} = 2,1$
6,97	6,97	H-2'/H-6'	<i>s</i>	

*s*= singlete; *d*= dublete; *m*= multiplete; *ddd*=duplo duplo dublete

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 29) apresentou similaridades com a galocatequina (substância I), exceto para um siglete com 3 hidrogênios a  $\delta$  3,80 indicando um grupamento metoxila. Os hidrogênios heterocíclicos exibiram um sistema ABMX característico para o *spin* padrão de 2,3-*trans* flavan-3-ol ( $J_{2,3} = 6,3$  Hz) (Mello et al., 1996a). Pelo espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (fig. 30) pode-se verificar o acoplamento entre H-3 e H-4<sub>ax</sub> e H-4<sub>eq</sub>. A posição do grupamento metoxila no C-4' foi determinada com base nos resultados de experimentos HETCOR e HETCOR-LR (fig. 31 e 32), os quais mostraram correlações entre o C-4' e os hidrogênios H-2'/6' e os hidrogênios da metoxila ( $\delta$  3,80). Assim, essa substância foi identificada como sendo 4'-O-metil-galocatequina, a qual foi isolada de *Panda oleosa* Pierre (Pandaceae) (Garcia et al., 1993) e posteriormente de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae) (Mello et al., 1996a).

Figura 29 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 30 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Figura 31 – Espectro HETCOR da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Figura 32 – Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Fletcher et al. (1977) mostraram através de estudos de RMN de procianidinas peracetiladas que as ligações 4→6 e 4→8 encontram-se em duas conformações energéticas protegidas. Como critério de diferenciação para o tipo de ligação, os autores utilizam a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações tipo 4→6 é na proporção de 1:1, enquanto que das substâncias com ligações do tipo 4→8 existe uma conformação de rotâmeros dominante. A duplicidade dos sinais depende da rigorosidade da temperatura de medida e do tipo de solvente empregado (Outtrup e Schaumburg, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway et al. (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas do sistema de spins AB dos prótons do anel A das substâncias com ligação 4→6 como estando em campos mais baixos (desprotegidos) ( $\delta$  6,7), enquanto os sinais da ligação 4→8 em campos mais altos ( $\delta$  6,1). Entretanto esse critério de diferenciação, somente é válido para substâncias com uma configuração 4*R* (Kolodziej, 1992). Adicionalmente, o hidrogênio H-2 de substâncias com ligação 4→8 apresentam-se com deslocamentos entre  $\delta$  4,37 e 5,01, enquanto substâncias ligadas 4→6, entre  $\delta$  5,04 e 5,35.

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , até a configuração absoluta deixa-se “transparecer” através do C-4 (C) da ligação entre as unidades de interflavanóis, quando a unidade superior for do tipo catequina (2*R*, 2*S*). isso é devido a essa substância ter uma constante de acoplamento grande, pois fornece uma ordem pseudoequatorial. No entanto, quando a unidade superior for epicatequina, o C-4 (C) apresentará sempre uma constante de acoplamento pequena e não poderá, nesse caso, se afirmar a configuração absoluta, pois esse composto possibilita tanto uma configuração 4*R* (posição diequatorial do hidrogênio) como 4*S* (acoplamento axial-equatorial) (Petereit, 1992). O método apropriado para determinar a configuração absoluta de C-4 é através do dicróismo circular (CD). Thompson et al. (1972) indicaram a medida em CD de

procianidinas diméricas significativamente pelo efeito “cotton” em 275 nm. Procianidinas diméricas com configuração 4*S*, mostram-se através de um efeito negativo, enquanto que substâncias 4*R*, uma curva espelhada (efeito positivo). É possível, ainda, utilizar outro comprimento de onda para fazer a diferenciação, como na região entre 220-240 nm (Mello, 1996a e 1996b).

Com a subfração F3#2.3 (1450 mg) empregou-se novamente a CC em Sephadex® LH-20, e das três frações resultantes optou-se por fracionar a subfração F3#2.3.2 (1165 mg) (fluxograma 2), empregando-se a cromatografia de contracorrente (CCCAV) obtendo-se a substância IV (F3#2.3.2.3 – 26 mg) visivelmente pura em CCD (seção 3.5.1, p. 29) com valor de  $R_f = 0,58$  e com coloração azul escura intensa com  $\text{FeCl}_3$ .

Cerca de 10 mg da substância IV foi acetilada e purificada por CCDP (seção 3.5.2). O espectro de massas apresentou pico do íon molecular  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  em  $m/z$  1081 (fig. 33), característico de substâncias diméricas acetiladas. A proposta de fragmentação da substância IV pode ser observado na figura 35.

Figura 33 – espectro de massas da substância IV peracetilada

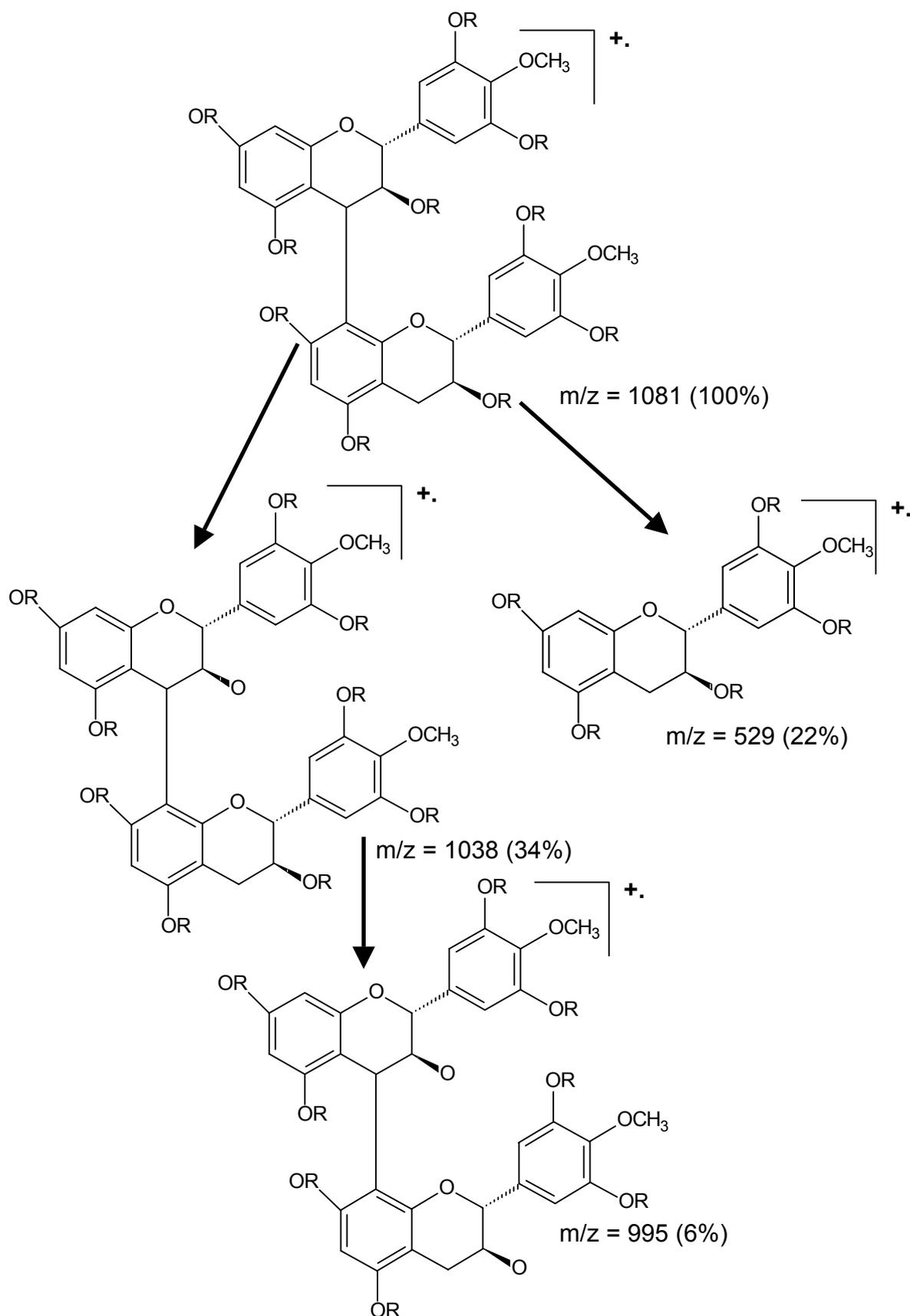


Figura 34 – Proposta de fragmentação da substância IV (R= acetato)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  (fig. 35) da substância acetilada forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento ( $\delta$  em ppm) encontram-se na tabela 8. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto IV apresenta dois singletos correspondendo a 3 hidrogênios cada em  $\delta$  3,79 e 3,77 indicando dois grupamentos metoxilas. Através do espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (fig. 36) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios H-2/H-4 (C) e H-3 (C), e também entre H-2/H-3 (F) e H-4 $\alpha$ /H-4 $\beta$  (F). Os acoplamentos de longo alcance entre os sinais de hidrogênios H-2(C) e H-2(F) e os respectivos sinais de H-2'/6' permitem distinguir os sinais dos hidrogênios do tipo pirogalol dos anéis B ( $\delta$  6,81) e E ( $\delta$  6,60). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ( $J_{2,3}= 9,9$  Hz e  $J_{3,4}= 9,6$  Hz) indicam a configuração relativa do anel C como sendo do tipo 2,3-*trans*-3,4-*trans*. O pico largo sobreposto dos hidrogênios H-2(F) e H-3(F) em  $\delta$  5,02 não permite distinguir com certeza a estereoquímica relativa das posições 2,3. Essa observação já foi relatada para galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina (Helsper et al., 1993) e pode ser explicada pelas trocas conformacionais do anel F (Balas e Vercauteren, 1995). A configuração relativa 2,3-*trans*-3,4-*trans* do anel C da proantocianidina foi também confirmada pela posição ( $\delta$  ca. 4-5) da ressonância do C-2 devido ao substituinte em C-4 em comparação com a análoga configuração 2,3-*cis* (Fletcher et al., 1977). O dímero não poderia ter a ligação 4→6, pois assim, segundo Petereit et al. (1991) após análise de vários espectros de dímeros de proantocianidinas, os picos de H-2' e H-6', apareceriam em  $\delta > 7$ . Pelo espectro HETCOR e HETCOR-LR (fig. 37 e 38) foi possível caracterizar o carbono da metoxila e os carbonos C-2'/6' dos anéis B e E. Os grupamentos metoxílicos foram estabelecidos na posição C-4' por comparação com a literatura (Mello et al., 1999) e com a substância I isolada e identificada nesse trabalho. Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior o mesmo valor de  $R_f$  que o cloridrato de pelargonidina (0,69) confirmando ser um flavan-3-ol. A unidade inferior mostrou-se semelhante em CCD (seção 3.5.1) com a 4'-O-metil-galocatequina ( $R_f=0,87$ ). Dessa forma, a substância IV foi identificada como sendo 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-

4'-O-metil-galocatequina, tendo sido isolado e identificado anteriormente por Mello et al. (1999) em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

Tabela 8 - Deslocamentos da substância IV peracetilada

$\delta$ (ppm)	$\delta$ - Literatura* (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,66	2,65	H-4 $\beta$ (F)	<i>dd</i>	<sup>2</sup> J <sub>H-4<math>\beta</math>(F) - H-4<math>\alpha</math>(F)</sub> = 16,7 <sup>3</sup> J <sub>H-4<math>\beta</math>(F) - H-3(F)</sub> = 7,8
2,84	2,83	H-4 $\alpha$ (F)	<i>dd</i>	<sup>2</sup> J <sub>H-4<math>\alpha</math>(F) - H-4<math>\beta</math>(F)</sub> = 16,7 <sup>3</sup> J <sub>H-4<math>\alpha</math>(F) - H-3(F)</sub> = 5,4
3,77	3,77	O-metil (B)	<i>s</i>	
3,79	3,79	O-metil (E)	<i>s</i>	
4,48	4,48	H-4 (C)	<i>d</i>	<sup>3</sup> J <sub>H-4(C) - H-3(C)</sub> = 9,9
4,73	4,73	H-2 (C)	<i>d</i>	<sup>3</sup> J <sub>H-2(C) - H-3(C)</sub> = 9,9
5,02	5,02	H-3 (F)/H-2 (F)	<i>m</i>	
5,62	5,61	H-3 (C)	<i>pseudo t</i>	<sup>3</sup> J <sub>H-3(C) - H-2(C)</sub> = 9,9 <sup>3</sup> J <sub>H-3(C) - H-4(C)</sub> = 9,9
6,49	6,49	H-6 (A)	<i>d</i>	<sup>4</sup> J <sub>H-6(A) - H-8(A)</sub> = 2,4
6,52	6,52	H-8 (A)	<i>d</i>	<sup>4</sup> J <sub>H-8(A) - H-6(A)</sub> = 2,4
6,60	6,60	H-2'/6' (E)	<i>s</i>	
6,65	6,65	H-6 (D)	<i>s</i>	
6,81	6,81	H-2'/6' (B)	<i>s</i>	

*s*= singleto; *d*= dupletto; *m*= multipletto; *dd*=duplo dupletto; *t*= triplete

\* Mello et al., 1999

Figura 35 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 36 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Figura 37 – Espectro HETCOR da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Figura 38 – Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Uma característica marcante de metóxi-acetatos de dímeros de robinetidininas e fisetidininas no espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  é o sinal do hidrogênio da posição 5 (H-5) do anel A. Esse hidrogênio apresenta-se como um duplete largo com uma constante de acoplamento de  $J_{5,6} \geq 8,0$  na região entre  $\delta$  6,74-6,82 ppm (Botha et al., 1981; Nunes et al., 1989). Bam et al. (1990) isolaram pela primeira vez robinetidinol-3-O-galato de cascas de *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) e demonstraram que a região do H-5 (A) encontrava-se em campos mais altos ( $\delta$  6.97). Diagnóstico significativo, no entanto, refere-se ao hidrogênio H-3 (C). Com dímeros 5-deóxi-proantocianidinas, o hidrogênio H-3 (C) aparece em campos mais altos como pseudo-triplete com constante de acoplamento de  $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} \approx 20,0$  Hz (Drewes et al., 1967; Steynberg et al., 1990; Mello et al., 1996b). Botha et al. (1981) diferenciam ligações ( $4\alpha \rightarrow 8$ ) e ( $4\beta \rightarrow 8$ ) em profisetidininas de acordo com as seguintes características: o hidrogênio H-3 (C) de dímeros com ligação do tipo ( $4\alpha \rightarrow 8$ ) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*trans*) aparecem como pseudo-triplete na região de  $\delta$  5,9-6,1 ppm com um somatório na constante de acoplamento de  $\Sigma J \approx 20,0$  Hz, enquanto que dímeros com ligação do tipo ( $4\beta \rightarrow 8$ ) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*cis*) aparecem como um quarteto na região de  $\delta$  5,3-5,6 ppm e com um somatório na constante de acoplamento de  $\Sigma J \approx 15,5$  Hz.

Da mesma maneira que no caso das prodelfinidinas (p. 63), a configuração absoluta em C-4 é obtida através da utilização do dicroísmo circular.

A fixação da ligação ( $4 \rightarrow 6$ ) ou ( $4 \rightarrow 8$ ) faz-se analogamente como no caso de proantocianidinas diméricas, observando-se a proporcionalidade dos sinais rotaméricos (Fletcher et al., 1977).

Realizou-se com a subfração F3#2.3 (1450 mg) CC em Sephadex® LH-20. Entre as frações resultantes optou-se por fracionar a subfração F3#2.3.2 (1165 mg) (fluxograma 2, p. 46), empregando-se a cromatografia de contra-corrente (CCCAV, seção 3.5.3, p. 30). Obteve-se a substância V (F3#2.3.2.1 – 40 mg) visivelmente pura em CCD (seção 3.5.1, p. 29) com  $R_f = 0,59$  e com coloração azul escura

intensa com  $\text{FeCl}_3$ .

Cerca de 10 mg da substância V foi acetilada e purificada por CCDP (seção 3.5.2, p. 29). O espectro de massas apresentou pico do íon molecular  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  em  $m/z$  1023 (fig. 39), característico de substâncias diméricas acetiladas. O processo de fragmentação da substância V pode ser observado na figura 40.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  (fig. 41) da substância acetilada forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento ( $\delta$  em ppm) encontram-se na tabela 9. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto V apresenta dois singletos em  $\delta$  3,79 e 3,77 que, pela integração corresponde a 6 hidrogênios indicando dois grupamentos metoxilas. Através do espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (fig. 42) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios alifáticos H-2 e H-4 (C) com H-3 (C), e entre H-2 e H-4 $\alpha$ /H-4 $\beta$  (F) com H-3 (F) e determinar os picos referente aos hidrogênios H-2'/H-6' dos anéis B (7,08 ppm) e E (6,80 ppm). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ( $J_{2,3} = 9,6$  Hz e  $J_{3,4} = 10,2$  Hz) indicam a configuração relativa do anel como *2,3-trans-3,4-trans*. A configuração *2,3-cis* do anel F é comprovada pelo pseudo-singlete em  $\delta$  5,05, o que indica um acoplamento mínimo entre os hidrogênios H-2 (F) e H-3 (F). A unidade superior da substância foi caracterizada com robinetinidol devido ao hidrogênio H-3 (C), que aparece em  $\delta$  5,80 como pseudo-triplete com constante de acoplamento de  $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} \approx 19,8$  Hz, estando de acordo com a literatura (Drewes et al., 1967; Steynberg et al., 1990; Mello et al., 1996b). O dublete em  $\delta$  6,99 [H-5 (A)] com constante de acoplamento  $J_{5,6} = 7,0$  Hz auxiliou na confirmação da unidade superior como sendo uma robinetinidina. Pelo espectro HETCOR-LR (fig. 43) foi possível caracterizar o carbono da metoxila e os hidrogênios H-2'/6' dos anéis B e E. A ligação (4 $\alpha$ →8) foi determinada pelo deslocamento do hidrogênio H-3 (C) que apareceu como pseudo-triplete em  $\delta$  5,80, dado esse anteriormente discutido por Mello e colaboradores (1996b).

Figura 39 – Espectro de massas da substância V peracetilada

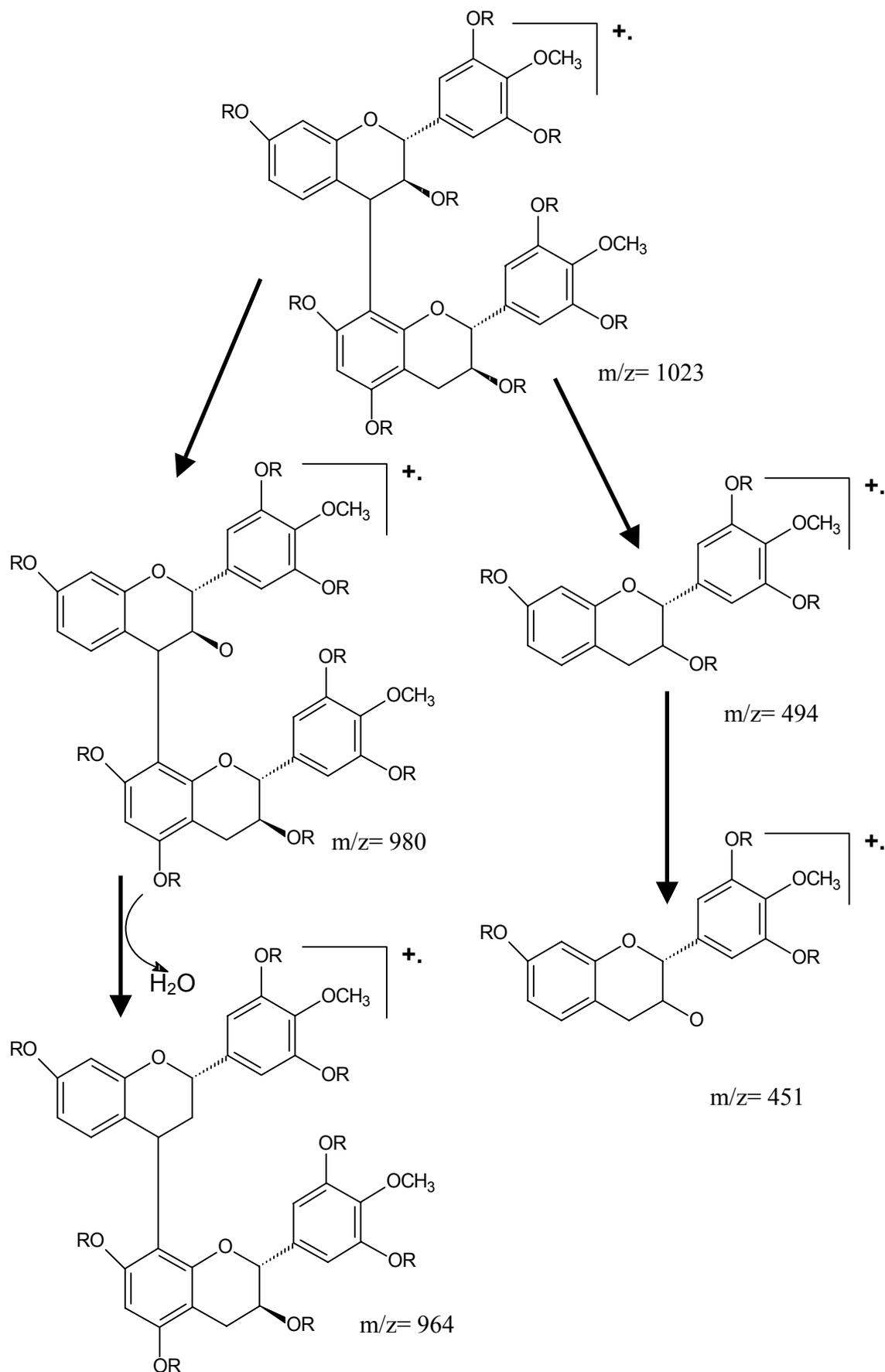


Figura 40 – Proposta de fragmentação das substâncias V e VI (R= acetato)

Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior um valor de  $R_f$  diferente do encontrado para cloridrato de pelargonidina (0,84 e 0,70, respectivamente). A unidade inferior mostrou-se semelhante em CCD (seção 3.5.1) com a 4'-O-metilgalocatequina ( $R_f=0,87$ ), confirmando ser uma unidade de flavan-3-ol metoxilada. Dessa forma, a substância V foi identificada como sendo 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina. Essa substância é inédita no reino vegetal e não foi, ainda, isolada ou mesmo sintetizada.

Tabela 9 - Deslocamentos da substância V peracetilada

$\delta$ (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,84 – 3,00	H-4 $\alpha$ (F)/ H-4 $\beta$ (F)	<i>m</i>	
3,82	O-metil (B/E)	<i>s</i>	
4,48	H-4 (C)	<i>d</i>	$^3J_{H-4(C)-H-3(C)} = 10,2$
4,83	H-2 (C)	<i>d</i>	$^3J_{H-2(C)-H-3(C)} = 9,6$
5,37	H-3 (F)	<i>pseudo t</i>	
5,05	H-2(F)	<i>d</i>	$^3J_{H-2(F)-H-3(F)} = 8,1$
5,80	H-3 (C)	<i>pseudo t</i>	$^3J_{H-3(C)-H-2(C)} = 9,6$
			$J_{H-3(C)-H-2(C)} = 10,2$
6,57	H-8 (A)	<i>d</i>	$J_{H-8(A)-H-6(A)} = 2,4$
6,59	H-6 (A)	<i>dd</i>	$J_{H-6(A)-H-8(A)} = 2,4$
			$J_{H-6(A)-H-5(A)} = 7,8$
6,80	H-2'/6' (E)	<i>s</i>	
6,49	H-6 (D)	<i>s</i>	
7,08	H-2'/6' (B)	<i>s</i>	
6,99	H-5 (A)	<i>d</i>	$^3J_{H-5(A)-H-4(C)} = 6,9$

*s*= singlete; *d*= dublete; *m*= multiplete; *dd*=duplo dublete; *t*= triplete

Figura 41 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 42 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Figura 43 – Espectro HETCOR-LR da 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

Submeteu-se a subfração F3#2.4 (197,5 mg) à cromatografia de contracorrente (CCCAV, seção 3.5.3, p. 30), obtendo-se a substância VI [F3#2.4.3 (6 mg)] visivelmente pura em CCD (seção 3.5.1, p. 29) com  $R_f = 0,58$  e com coloração azul escura intensa com  $\text{FeCl}_3$ .

A substância VI foi acetilada (6 mg) e purificada por CCDP (seção 3.5.2, p. 29). O espectro de massas apresentou pico do íon molecular  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  em  $m/z$  1023 característico de taninos condensados diméricos e acetilados. A proposta do processo de fragmentação da substância VI é semelhante ao da substância V (fig. 40). Entretanto, como os percentuais dos fragmentos são diferentes das substâncias V e VI, optou-se por não citá-los.

A substância acetilada apresentou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (fig. 44) com características de compostos fenólicos do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamento ( $\delta$  em ppm) encontram-se na tabela 10. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto VI demonstra um singlete em  $\delta$  3,82 que, pela integração corresponde a 6 hidrogênios indicando dois grupamentos metoxilas coincidentes, ligadas aos anéis B e E. Através do espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (fig. 45) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios H-2 e H-4 (C) com H-3 (C), e também entre H-2 e H-4 $\alpha$ /H-4 $\beta$  (F) com H-3 (F). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ( $J_{2,3} = 9,9$  Hz e  $J_{3,4} = 9,9$  Hz) indicam a configuração relativa do tipo *2,3-trans-3,4-trans*. A configuração *2,3-trans* do anel F é comprovada pelo dubleto em  $\delta$  4,97 [H-2 (F)] com constante de acoplamento  $J = 8,1$  Hz. Essa forma de interpretação está diretamente relacionada com as estruturas monoméricas, discutidas nesse trabalho. A unidade superior da substância foi caracterizada como 5-deóxy-flavan-3-ol devido ao hidrogênio H-3 (C), que aparece em  $\delta$  5,80 como pseudo-triplete com constante de acoplamento de  $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} \approx 19,8$  Hz, característico para profisetinidinas e prorobinetinidinas (Drewes et al., 1967; Steynberg et al., 1990; Mello et al., 1996b). O dubleto em  $\delta$  6,88 [H-5 (A)] com constante de acoplamento  $J_{5,6} = 8,1$  auxiliou na confirmação da unidade superior como um 5-deóxi-flavan-3-ol (Botha et al., 1981; Nunes et al., 1989). A possibilidade

de confirmação de que a unidade superior venha a ser fisetinidol ou robinetinidol, relaciona-se com o grau de hidroxilação no anel B. Na região aromática no espectro de RMN  $^1\text{H}$  observou-se um singlete correspondendo a 2 hidrogênios quimicamente equivalentes referente ao anel B (6,80 ppm) e outro singlete, também correspondendo a 2 hidrogênios quimicamente equivalentes referente ao anel E (6,49 ppm). Dessa forma confirma-se a unidade superior como sendo robinetinidol. A ligação ( $4\alpha \rightarrow 8$ ) foi determinada pelo deslocamento do próton H-3 (C) que apareceu como pseudo-triplete em  $\delta$  5,80 (Mello et al., 1996b). Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior  $R_f$  diferente daquele apresentado para o cloridrato de pelargonidina (0,85 e 0,70, respectivamente). Dessa forma, a substância VI foi identificada como sendo 4'-O-metil-robinetinidol-( $4\alpha \rightarrow 8$ )-4'-O-metil-galocatequina. Essa substância foi isolada pela primeira vez de material vegetal e, não foi sintetizada até o momento.

Tabela 10 - Deslocamentos da substância VI peracetilada

$\delta$ (ppm)	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,65	H-4 $\alpha$ (F)	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4}\alpha\text{(F)}-\text{H-4}\beta\text{(F)}} = 16,95$
2,94	H-4 $\beta$ (F)	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-4}\alpha\text{(F)}-\text{H-3}\text{(F)}} = 8,1$ $^2J_{\text{H-4}\beta\text{(F)}-\text{H-4}\alpha\text{(F)}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4}\beta\text{(F)}-\text{H-3}\text{(F)}} = 6$
3,82	O-metil (B/E)	<i>s</i>	
4,48	H-4 (C)	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4}\text{(C)}-\text{H-3}\text{(C)}} = 9,9$
4,83	H-2 (C)	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2}\text{(C)}-\text{H-3}\text{(C)}} = 9,9$
4,88 – 4,91	H-3 (F)	<i>m</i>	
4,97	H-2(F)	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-2}\text{(F)}-\text{H-3}\text{(F)}} = 8,1$
5,80	H-3 (C)	<i>pseudo t</i>	$^3J_{\text{H-3}\text{(C)}-\text{H-2}\text{(C)}} = 9,9$ $^3J_{\text{H-3}\text{(C)}-\text{H-4}\text{(C)}} = 9,9$
6,60	H-6/H-8 (A)	<i>dd</i>	
6,49	H-2'/6' (E)	<i>s</i>	
6,66	H-6 (D)	<i>s</i>	
6,80	H-2'/6' (B)	<i>s</i>	
6,88	H-5 (A)	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5}\text{(A)}-\text{H-4}\text{(C)}} = 9,98,1$

*s*= singlete; *d*= dublete; *m*= multiplete; *dd*=duplo dublete; *t*= triplete

Figura 44 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$  relativo para TMS; 300 MHz)

Figura 45 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

A cromatografia constitui um processo físico-químico de separação dos constituintes de uma mistura, muito útil na análise de produtos vegetais. Dentre os diferentes métodos, um dos que mais se destacam é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). É uma técnica apurada e relativamente dispendiosa, principalmente pela necessidade de uma alta pressão e fluxo livre de pulsação, que faz com que a fase móvel flua a uma velocidade constante e controlada através da coluna (Falkenberg et al., 2001).

A obtenção de um perfil cromatográfico é uma possibilidade de identificação utilizada, principalmente, para preparados fitoterápicos intermediários como extratos, tinturas, entre outros. Dependendo da técnica utilizada, fatores como tipo de coluna ou suporte, sistema solvente, fluxo, tempo de desenvolvimento são fatores que influenciam positivamente o seu estabelecimento. Assim, além de viabilizar uma possível caracterização, pode-se determinar a presença de interferentes na droga. Nesse tipo de análise é necessário o uso de padrões comparativos que podem ser substâncias marcadoras ou de referência ou então literaturas específicas como no caso de monografias em farmacopéias ou publicações científicas (Sticher et al., 2000).

Nesse sentido, optou-se por caracterizar os extratos e frações obtidas a partir das cascas do barbatimão empregando-se a CLAE, em face de sua sensibilidade e reprodutibilidade.

Devido à grande quantidade de substâncias no extrato e nas frações, obtidas a partir das cascas do barbatimão, houve dificuldades em encontrar um sistema eluente adequado. Após diversas tentativas no desenvolvimento com diferentes sistemas eluentes, selecionou-se um gradiente entre metanol e ácido acético 5% (tab. 2, p. 30). Entretanto, não foi possível obter picos isolados, o que demonstra o grande número de substâncias extraíveis pelo método utilizado. Isso dificultou uma análise mais profunda, que poderia resultar no doseamento das substâncias isoladas e outras de referência nas frações, no extrato bruto e, com controle rigoroso do método extrativo, na droga vegetal.

Nos cromatogramas obtidos do extrato bruto F1 (fig. 46) e da fração acetato de etila F3 (fig. 47), foi possível verificar a quantidade de substâncias ali presentes referentes à casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, caracterizando a riqueza química da droga vegetal. Empregaram-se vários sistemas eluentes, variando os solventes, a forma de gradiente e o fluxo.

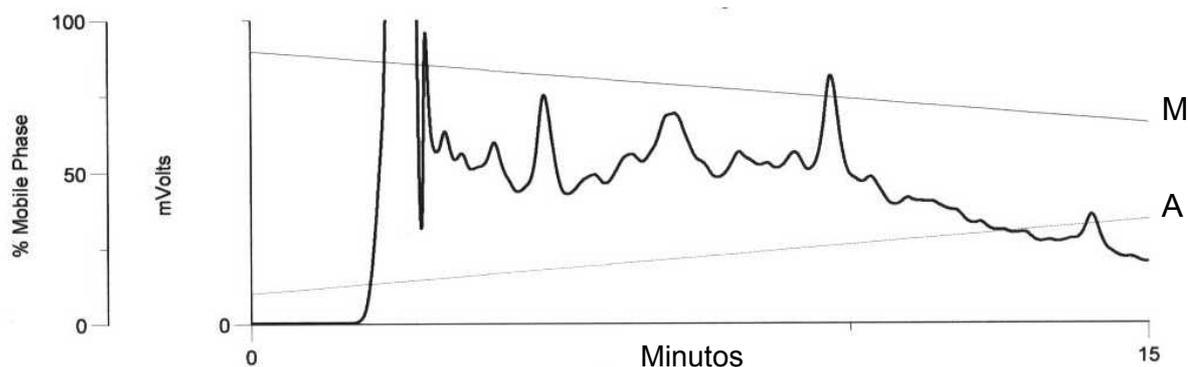


Figura 46 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado F1 (A– ác. acético 5%; M– metanol)

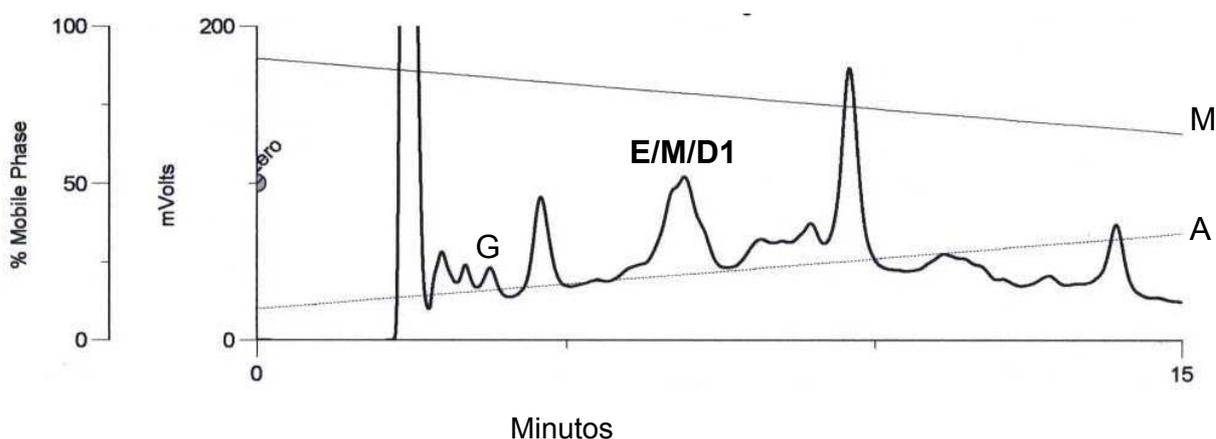


Figura 47 – Cromatograma da fração acetato de etila F3 (A– ác. acético 5%; M– metanol) com a possível localização dos picos das substâncias isoladas (G– galocatequina; E– epigalocatequina; M– 4'-O-metil-galocatequina; D1– 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina)

Muitos dos picos presentes nos cromatogramas das subfrações obtidas a partir da fração F3 e também presentes no cromatograma da fração F3 possibilitam

comprovar que, as diferentes substâncias se mantiveram íntegras durante o processo de fracionamento através de cromatografia em coluna. Isso pode ser comprovado pela semelhança entre os cromatogramas em diferentes tempos de retenção. Na figura 48 e na tabela 11 podem ser observados todos os picos das substâncias isoladas e seus respectivos tempos de retenção.

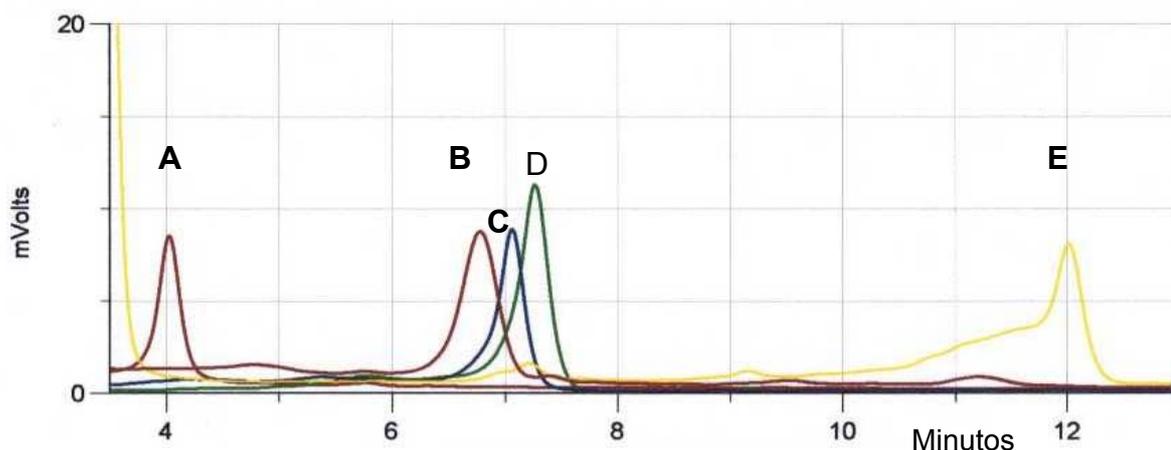


Figura 48 – Cromatograma das substâncias isoladas [A– galocatequina; B– 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina; C– epigalocatequina; D- 4'-O-metil-galocatequina; E– 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina]

Tabela 11 – Tempo de retenção das diferentes substâncias isoladas.

Substâncias isoladas	T <sub>R</sub> (min.)
Galocatequina (A)	3,95
Epigalocatequina (C)	7,06
4'-O-metil-galocatequina (D)	7,27
4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (B)	6,78
4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina (E)	12,01

O pico referente à epigalocatequina (F3#3.1.3 e F3#2.4.5) apresentou um T<sub>R</sub> de 7,06 min. A sua localização no extrato bruto (F1) e nas frações tornou-se difícil devido à sobreposição com o pico da 4'-O-metil-galocatequina (T<sub>R</sub> = 7,27 min) e da 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (T<sub>R</sub> = 6,78). Os picos se sobressaem nos cromatogramas do extrato bruto, da fração F3 e da subfração F3#3.

O pico referente a galocatequina (A - F3#3.1.2 e F3#2.4.4) teve um tempo de retenção de 3,95 min, facilitando sua caracterização nos extratos bruto, acetato de etila e nas subfrações.

As substâncias isoladas também foram caracterizadas em suas subfrações originais. A figura 49 mostra os picos das substâncias 4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina e a 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina com a subfração F3#2. Foi possível, no entanto, relacionar os picos dessa subfração com as substâncias. Com a substância 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina não foi possível a caracterização em CLAE devido à quantidade de substância isolada ser insuficiente.

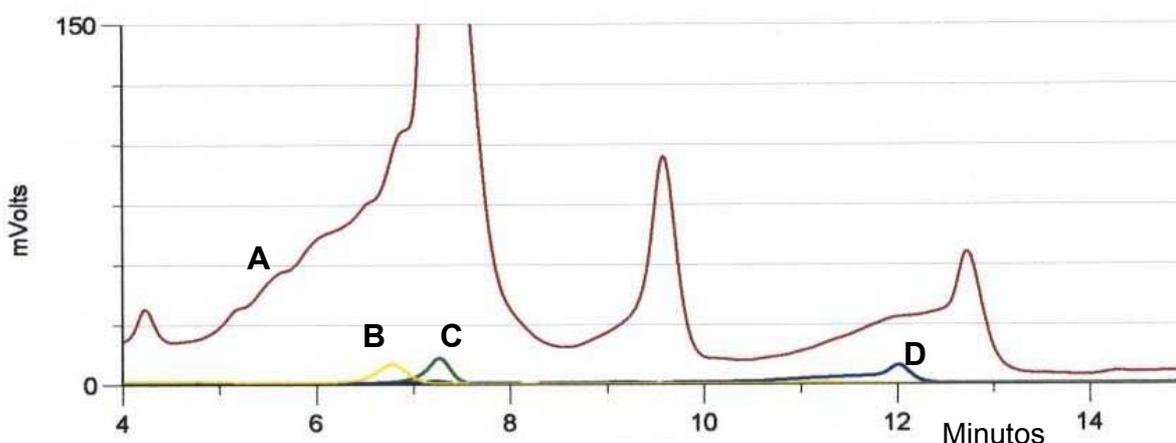


Figura 49 – Cromatograma das substâncias isolada a partir de F3#2 [A –subfração F3#2; B- 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina; C- 4'-O-metil-galocatequina; D- 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina]

Já na figura 50 pode ser observada a mesma relação anterior, agora entre a subfração F3#3 e as substâncias galocatequina e epigalocatequina.

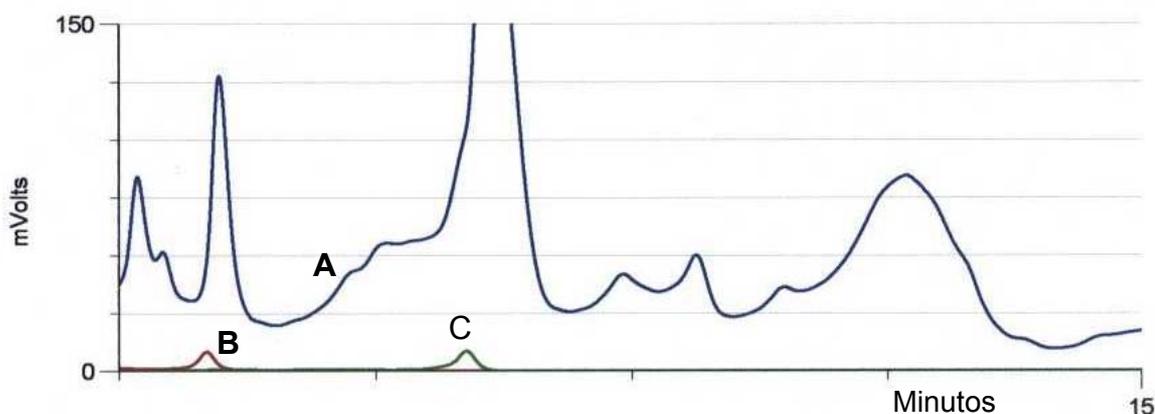


Figura 50 – Cromatograma das substâncias isoladas a partir de F3#3 (A– subfração F3#3; B– galocatequina; C– epigalocatequina)

Dessa maneira pode-se vislumbrar a possibilidade de identificar esses compostos isoladamente ou mesmo nos extratos parcialmente purificados do barbatimão, já que no extrato bruto as dificuldades são maiores. Assim, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência pode auxiliar no controle de qualidade tanto da droga vegetal como de seus extrativos.

As substâncias galocatequina e epigalocatequina são substâncias comumente encontradas em várias espécies vegetais não servindo como possíveis substâncias marcadoras taxonômicas. Entretanto as substâncias 4'-O-metil-galocatequina e o dímero 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina serviriam adequadamente a essa finalidade face à impossibilidade de falsificações e/ou adulterações tanto da droga vegetal como de seus extratos. Mole (1993) fez uma revisão da distribuição sistemática de taninos em angiospermas. Haslam e Cai (1994) e Okuda *et al.* (1993) utilizaram os elagitaninos como marcadores taxonômicos na caracterização das espécies das famílias Hamamelidae, Dileniidae e Rosidae. Da mesma maneira que esses autores, os taninos condensados poderiam servir de marcadores tanto do ponto de vista do controle de qualidade como taxonômico, haja vista sua especificidade química e pelo fato de serem estruturas totalmente inéditas encontradas na natureza.

Os usos populares das cascas do barbatimão estão relacionados com processos de cicatrização, tanto em humanos como em animais. Sabe-se que nesses processos, a possibilidade de infecção por bactérias da microbiota normal pode ocorrer e transformar o processo de cicatrização normal em um processo inflamatório de difícil cura. Assim, optou-se por comprovar o uso popular, além de confirmar o relatado por Bersani-Amado *et al.* (1996).

As bactérias empregadas na avaliação da atividade antibacteriana *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* foram selecionadas por representarem espécies Gram-positivas e Gram-negativas e estarem presentes em infecções humanas, de pele ou mucosas. A infecção por *S. aureus* (Gram-positiva), de acordo com a localização e outras características, recebe

diferentes designações, como foliculite (infecção de um folículo piloso), furunculose (infecção dos folículos pilosos ou glândulas sebáceas obstruídas, com envolvimento do tecido celular subcutâneo) e o hordéolo ou terçol (infecção de uma glândula sebácea marginal das pálpebras). Indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão podem adquirir infecções mais graves, destacando-se a osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia e, ocasionalmente, a meningite e artrite bacteriana (Trabulsi et al, 1999). O *S. aureus* pode, também, causar graves intoxicações (Trabulsi et al, 1999). Entre essas, uma mais freqüentes em recém-nascidos, é a chamada de síndrome da pele escaldada ou doença de Ritter (deslocamento de extensas áreas da epiderme). O *B. subtilis*, também Gram-positiva, está normalmente associado a bacteremias e septicemias, normalmente em pacientes imuno-comprometidos. Além disso, por ser capaz de sobreviver em condições adversas de dessecação, temperatura e pH, é utilizado no controle de qualidade em testes de esterilização pelo óxido de etileno e a vapor (Trabulsi et al, 1999). A *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa e está relacionada com infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podendo resultar em bacteremias severas. Estão associadas também a infecções urinárias, devido ao uso de catéteres (Trabulsi et al, 1999).

Entre os métodos de atividade antibacteriana, propôs-se avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), de acordo com a metodologia descrita em 3.10.1 (p. 34).

Os resultados obtidos para a CIM e para a CBM das subfrações estão representados nas tabelas 12 a 18.

Tabela 12 - Concentração inibitória mínima contra *P. aeruginosa*

Concentração da ST (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,625	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 13 - Concentração inibitória mínima contra *S. aureus*

Concentração da ST (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,625	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 14 - Concentração inibitória mínima contra *B. subtilis*

Concentração da ST (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,625	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 15 - Concentração bactericida mínima contra *P. aeruginosa*

Concentração da ST (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 16 - Concentração bactericida mínima contra *S. aureus*

Concentração da ST (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 17 - Concentração bactericida mínima contra *B. subtilis*

Concentração da droga (µg/ml)	Subfrações											
	F3#1	F3#2	F3#3	F3#4	F3#5	F3#6	F3#7	F3#8	F3#9	F3#10	F3#11	F3#12
1000	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Analisando-se a tabela 12 referente a CIM das 12 subfrações, obtidas da fração acetato de etila (F3), contra *P. aeruginosa*, observa-se que apenas a subfração F3#12 mostrou atividade bacteriostática na concentração de 1000 µg/ml. Nessa concentração, a F3#12 também demonstrou atividade bactericida, como pode ser observado na tabela 16.

Observando os resultados com as demais bactérias testadas, nota-se um aumento de atividade, de acordo com o crescimento nas subfrações avaliadas. Constata-se que todas as subfrações possuem maior atividade contra *S. aureus* em relação às demais bactérias analisadas.

A subfração F3#1 mostrou atividade inibitória contra *S. aureus* e *B. subtilis* nas concentrações de 1000 µg/ml e 500 µg/ml, respectivamente. Entretanto, a CBM manteve-se em 1000 µg/ml. A subfração F3#2 não demonstrou nenhuma atividade contra os microorganismos testados. A subfração F3#3 mostrou-se ativa apenas contra *S. aureus* (tab. 13 e 17). As subfrações F3#4 a F3#12 mostraram atividades semelhantes, prevalecendo ação contra *S. aureus* (tab. 13 a 18).

As CIM das subfrações sobre *S. aureus* variaram entre 125 µg/ml (F3#10 e F3#12) e 500 µg/ml (F3#4), enquanto que as CBM resultaram em 500 µg/ml (F3#4,

5, 6, 7, 8 e 9) e 250 µg/ml (F3#10, 11 e 12). Tal semelhança de atividade das diferentes subfrações também foi observada contra *B. subtilis*.

As subfrações F3#4, 5, 7, 10 e 11 resultaram numa concentração inibitória de 500 µg/ml e, as subfrações F3#6, 8 e 9 tiveram menor atividade contra *B. subtilis*, com a CIM de 1000 µg/ml. A subfração F3#12, contra essa bactéria, foi a que mostrou maior atividade, resultando em uma CIM de 250 µg/ml. Já as concentrações bactericidas se mantiveram em 1000 µg/ml para as subfrações F3#4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12, enquanto que as subfrações F3#9 e 11 não produziram atividade bactericida, apenas inibitória (tab. 12 a 18).

Realizou-se paralelamente aos testes de atividade antibacteriana das subfrações, um controle com antibacterianos clássicos (tab. 18).

Tabela 18 - Concentração inibitória mínima com antibacterianos

Vancomicina ( <i>B.subtilis</i> )		Penicilina ( <i>S. aureus</i> )		Cloranfenicol ( <i>P. aeruginosa</i> )	
Crescimento Bacteriano	Concentração (µg/ml)	Crescimento Bacteriano	Concentração (µg/ml)	Crescimento Bacteriano	Concentração (µg/ml)
-	50	-	5	-	1000
-	25	-	2,5	-	500
-	12,5	-	1,25	-	250
-	6,25	-	0,625	-	125
-	3,125	-	0,3125	+	62,5
-	1,5625	-	0,15625	+	31,25
+	0,78125	-	0,078125	+	15,625
+	--	+	--	+	--

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Assim, pode-se comparar as concentrações que mostraram atividade, confirmar o crescimento bacteriano e a sua interrupção, validando, assim, a metodologia. A concentração inibitória mínima (CIM) dos antibacterianos encontra-se na tabela 19.

Tabela 19 – Concentração inibitória mínima dos antibacterianos

Antibacterianos	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Vancomicina	1,56	-	-
Penicilina	-	< 0,078	-
Cloranfenicol	-	-	125

Analisando os resultados obtidos com os antibacterianos clássicos, pode-se observar que as subfrações não possuíam atividade comparável. Mas, a isso se deve vários fatores. O principal deles é que cada subfração trata-se de um extrato semipurificado, possuindo, assim, várias substâncias químicas. Isso faz com que o princípio ativo ou o conjunto de substâncias responsáveis pelo efeito antibacteriano, no caso, fique diluído. Necessita-se para comparação, da avaliação da atividade antibacteriana de outras subfrações, a serem obtidas por fracionamentos continuados, ou ainda, avaliar as substâncias isoladas.

Assim, as substâncias isoladas, galocatequina (GAL), epigalocatequina (EPI), 4'-O-metil-galocatequina (4MG), 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (4MGMG), 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (4MRMG) e 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina (4MRME) foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana, utilizando além das bactérias anteriores, a *Escherichia coli* (ATCC 25922). As concentrações empregadas foram de: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625  $\mu\text{l/ml}$  (tab. 20). Entretanto, nenhuma das substâncias avaliadas demonstraram atividade antibacteriana nas concentrações analisadas.

Tabela 20 - Concentração inibitória mínima das substâncias isoladas

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Substâncias					
	GAL	EPI	4MG	4MGMG	4MRMG	4MRME
100	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
12,5	+	+	+	+	+	+
6,25	+	+	+	+	+	+
3,125	+	+	+	+	+	+
1,5625	+	+	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+	+	+

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano.

Tendo em vista os resultados obtidos, selecionou-se a subfração F3#12, por ter demonstrado maior atividade em todas as situações de avaliação, para análise da curva do tempo de morte bacteriana. Essa metodologia tem a finalidade de verificar qual o tempo em que uma substância ou uma subfração inicia e mantém sua atividade antibacteriana, em diferentes concentrações, sempre, comparado a um controle de crescimento bacteriano.

Com a subfração F3#12 (tab. 21; fig. 51), foi possível observar, na Concentração Inibitória Mínima determinada ( $X=125 \mu\text{g/ml}$ ), que houve um efeito até 18 h após entrar em contato com a bactéria. A partir deste tempo sua atividade foi diminuída e as colônias voltaram a crescer. Uma atividade menor, mas semelhante, foi observada para  $X=0,5$  ( $62,5 \mu\text{g/ml}$ ). Para as demais concentrações ( $2X=250 \mu\text{g/ml}$ ,  $4X=500 \mu\text{g/ml}$ ,  $8X=1000 \mu\text{g/ml}$  e  $16X=2000 \mu\text{g/ml}$ ) foi observada uma quase total inibição do crescimento, que se iniciou a partir de 6 h e manteve-se até mesmo após 24 horas.

Tabela 21 - Tempo de morte sobre *S. aureus* com a subfração F3#12

Número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml)							
Tempo (h)	Controle	0,5X	1X	2X	4X	8X	16X
0	6300	6300	6300	6300	6300	6300	6300
3	2260000	220000	16000	6000	7300	3470	2050
6	18700000	18700000	174000	910	1490	48	53
9	1,70E+13	820000000	131000	400	1100	5,00E+01	5,00E+01
12	1,68E+14	1,27E+10	277000	11400	800	50	50
18	7,90E+13	990000000	290000	1700	50	50	50
24	2,92E+21	9900000000	1,03E+10	50	50	50	50

Log do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml)							
Tempo (h)	Controle	0,50 X	1,0 X	2,0 X	4,0 X	8,0 X	16,0 X
0	3,799341	3,79934055	3,799341	3,799341	3,799341	3,799341	3,799341
3	6,354108	5,34242268	4,20412	3,778151	3,863323	3,540329	3,311754
6	7,271842	7,27184161	5,240549	2,959041	3,173186	1,681241	1,724276
9	13,23045	8,91381385	5,117271	2,60206	3,041393	1,69897	1,69897
12	14,22531	10,1038037	5,44248	4,056905	2,90309	1,69897	1,69897
18	13,89763	8,99563519	5,462398	3,230449	1,69897	1,69897	1,69897
24	21,46538	9,99563519	10,01284	1,69897	1,69897	1,69897	1,69897

X= 125  $\mu\text{g/ml}$

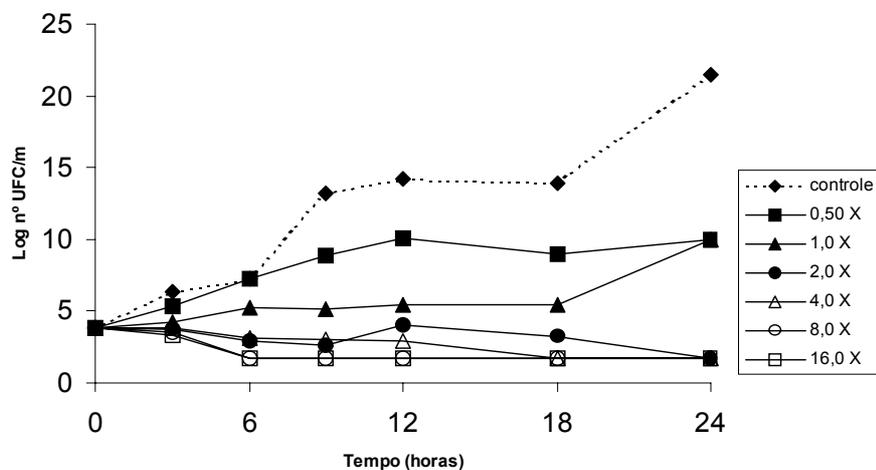


Figura 51 – Curva do tempo de morte bacteriana da subfração F3#12 sobre *S. aureus* ( $X=125 \mu\text{g/ml}$ )

Existem informações populares do emprego de chás das cascas do barbatimão em casos de leishmaniose<sup>1</sup>, no norte do Brasil. A busca de resposta para essa atividade é, não somente interessante, mas de fato importante para o país que possui casos de endemias e, em alguns locais, epidemias. Como se trata de um assunto relacionado ao sistema público de saúde, é fundamental que se comprove tal atividade com extratos vegetais ou mesmo com substâncias sintéticas, na tentativa de minimizar o efeito danoso que essa doença causa no ser humano.

A forma promastigota (flagelada) é encontrada no vetor (mosquito do gênero *Phlebotomus*) que infectam o homem através de sua picada. Nas células humanas, no entanto, ocorre a transformação para forma amastigota, aflagelada.

O tratamento de escolha atualmente é feito com o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), que é ativo contra todas as formas da leishmaniose. É um composto antimônio pentavalente que *in vivo* é reduzido à forma ativa trivalente. Essa última, reage com os grupos tiólicos presentes em sistemas enzimáticos essenciais do parasito, formando ligação covalente. É administrado via intramuscular

<sup>1</sup> Comunicação pessoal, Profa. Dra. Isabel Cristina Piloto Ferreira – Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá

profunda na dose de 60 a 100 mg/kg de peso. O tratamento é feito por duas séries de 10 a 20 injeções, uma por dia, com intervalo de 15 dias entre uma série e outra (Korolkovas, 1997). Os efeitos colaterais do Glucantime® são preocupantes, já que a droga pode causar cólicas gastrintestinais, dor muscular retardada, rigidez das articulações, além de já terem sido observadas elevações da transaminases hepáticas, que são reversíveis após a interrupção da terapia, mas que podem causar choque e morte súbita (Tracy e Webster, 1996). Além da toxicidade causada pelos antimoniais, há outras desvantagens, como: injeção intramuscular extremamente dolorida, períodos longos de terapia exigido e, um custo relativamente alto (Tracy e Webster, 1996).

Estudos anteriores revelaram atividade promissora para o extrato bruto (F1) e a fração acetato de etila (F3) contra a forma promastigota (Jorge et al., 1996). Procurou-se, então, com as subfrações obtidas a partir da F3 (F3#3, F3#5, F3#7, F3#9 e F3#12), dar continuidade ao trabalho e avaliar suas atividades contra essa forma. A escolha das subfrações F3#3, F3#5, F3#7, F3#9 e F3#12 deveu-se pela quantidade suficiente dessas para esse e outros métodos de atividade biológica a serem analisados. Avaliações de atividade sobre a forma amastigota, encontra-se em andamento.

As porcentagens de inibição do crescimento do protozoário pelas subfrações analisadas se encontram na figura 52. Todas as frações testadas demonstraram atividade na concentração de 1000 µg/ml, inibindo 100% do crescimento do protozoário. Entretanto, nenhuma das frações mostrou atividade na concentração 10 µg/ml.

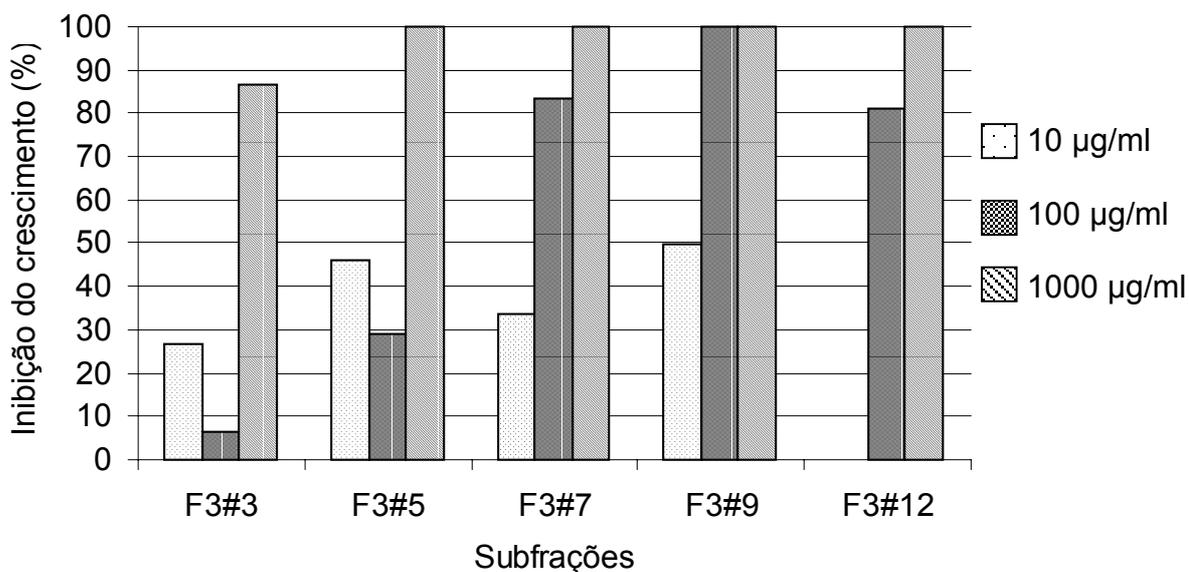


Figura 52 – Inibição do crescimento dos protozoários das subfrações em 24 horas.

Nas figuras 53 a 57 pode-se observar a curva das diferentes concentrações das subfrações em função do logaritmo do número de promastigotas contados nos tempos previstos. Com uso da curva logarítmica, pode-se ter uma visão geral das concentrações empregadas, pois, em números reais de unidades do protozoário, haveria grande diferença numérica, tornando inviável a apresentação em uma mesma planilha.

As avaliações feitas para as subfrações F3#7, F3#9 e F3#12 mostraram atividade leishmanicida, inibindo em mais de 90% o crescimento do protozoário na mesma concentração (fig. 53 a 57; tab. 22 a 26). As subfrações F3#3 e F3#5 não demonstraram atividade na concentração 100 µg/ml.

Esses resultados demonstram que as subfrações possuem atividade crescente no sentido da subfração F3#1 para a subfração F3#12. Isso foi observado também para os testes antibacterianos. Vale ressaltar que pelo modo de obtenção dessas subfrações, há uma maior concentração de monômeros nas subfrações iniciais e uma maior concentração de taninos de alta massa molecular nas subfrações finais, conforme ficou demonstrado anteriormente nesse trabalho.

Tabela 22 - F3#3 - média do número de promastigotas ( $\times 10^4$ )

Tempo (h)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	10	100	1000	Controle
24	$3,67 \pm 2,05$	$4,67 \pm 0,94$	$0,67 \pm 0,47$	$5,0 \pm 0,82$
48	$25,0 \pm 10,42$	$20,33 \pm 3,09$	$0,33 \pm 0,47$	$13,33 \pm 0,94$
72	$163,33 \pm 54,43$	$42,33 \pm 5,79$	$0,33 \pm 0,47$	$51,67 \pm 11,26$
96	$350 \pm 85,77$	$200,0 \pm 40,82$	$0,33 \pm 0,47$	$282,67 \pm 73,78$

0	Log da concentração de promastigotas			
	5	5	5	5
24	4,69897	4,564666	4,669317	3,826075
48	5,12483	5,39794	5,308137	3,518514
72	5,713238	6,213066	5,626648	3,518514
96	6,45128	6,544068	6,30103	3,518514

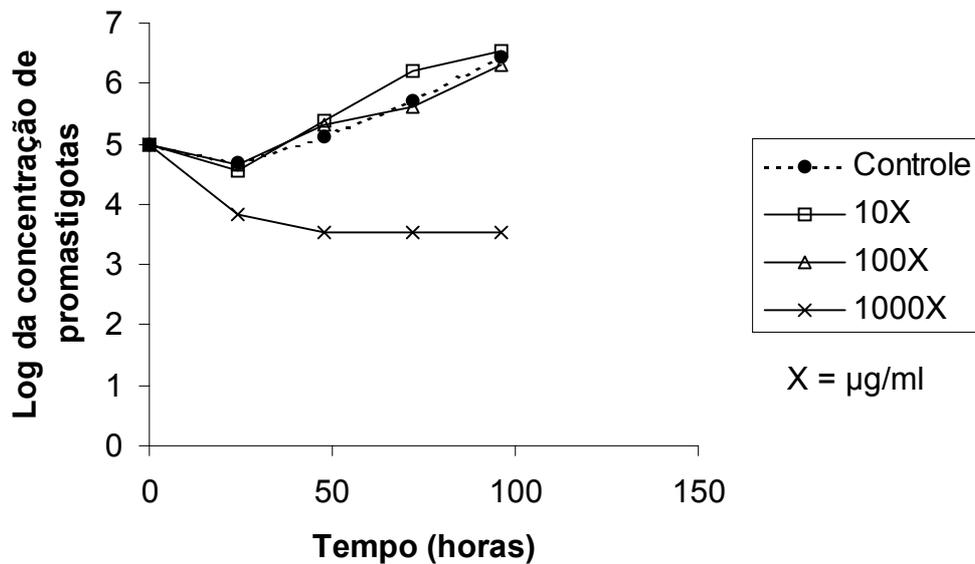


Figura 53 – Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#3

Tabela 23 - F3#5 - média do número de promastigotas ( $\times 10^4$ )

Tempo (h)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	10	100	1000	Controle
24	$4,33 \pm 1,25$	$5,67 \pm 3,09$	0,0	$8,0 \pm 0,82$
48	$16,0 \pm 4,08$	$30,33 \pm 3,77$	0,0	$15,33 \pm 2,36$
72	$89,67 \pm 6,34$	$54,0 \pm 13,74$	0,0	$81,33 \pm 13,89$
96	$446,67 \pm 99,78$	$106,67 \pm 9,43$	0,0	$366,67 \pm 174,61$

Tempo (h)	Log da concentração de promastigotas			
	5	5	5	5
0	5	5	5	5
24	4,90309	4,636488	4,753583	0
48	5,185542	5,20412	5,481872	0
72	5,910251	5,952647	5,732394	0
96	6,564275	6,649987	6,028042	0

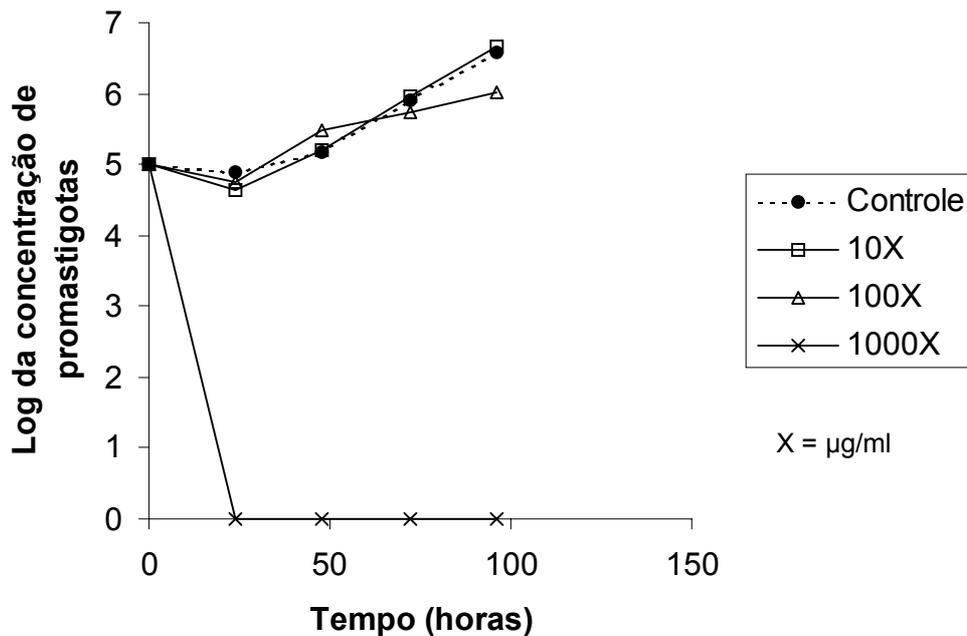


Figura 54 – Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#5

Tabela 24 - F3#7 - média do número de promastigotas ( $\times 10^4$ )

Tempo (h)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	10	100	1000	Controle
24	$1,33 \pm 0,94$	$0,33 \pm 0,47$	0,0	$2,0 \pm 1,63$
48	$16,67 \pm 0,47$	$4,67 \pm 1,70$	0,0	$16,33 \pm 2,49$
72	$72,0 \pm 14,7$	$9,30 \pm 0,94$	0,0	$70,0 \pm 29,53$
96	$310,67 \pm 51,86$	$12,33 \pm 1,25$	0,0	$303,0 \pm 69,46$

Tempo (h)	Log da concentração de promastigotas			
	5	5	5	5
0	5	5	5	5
24	4,30103	4,123852	3,518514	0
48	5,212986	5,221936	4,669317	0
72	5,845098	5,857332	4,968483	0
96	6,481443	6,492299	5,090963	0

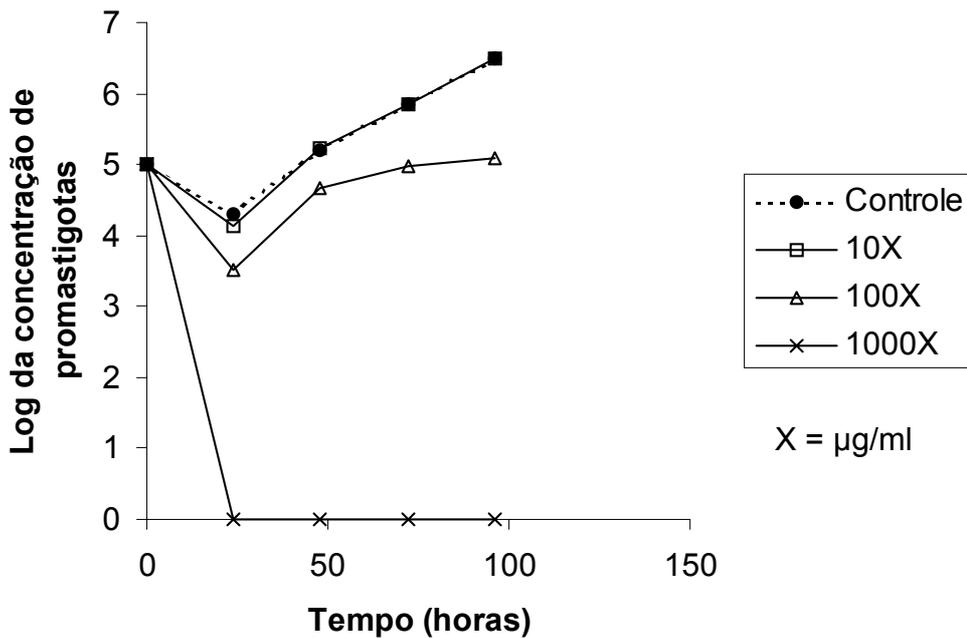


Figura 55 – Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#7

Tabela 25 - F3#9 - média do número de promastigotas ( $\times 10^4$ )

Tempo (h)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	10	100	1000	Controle
24	$3,67 \pm 1,70$	0,0	0,0	$7,33 \pm 1,70$
48	$25,33 \pm 2,05$	$5,0 \pm 1,41$	0,0	$31,67 \pm 1,25$
72	$53,33 \pm 24,94$	$8,0 \pm 0,82$	0,0	$73,3 \pm 9,43$
96	$266,67 \pm 67,99$	$8,0 \pm 0,82$	0,0	$406,67 \pm 67,99$

Tempo (h)	Log da concentração de promastigotas			
	5	5	5	5
0	5	5	5	5
24	4,865104	4,564666	4	0
48	5,500648	5,403635	4,69897	0
72	5,865104	5,726972	4,90309	0
96	6,609242	6,425974	4,90309	0

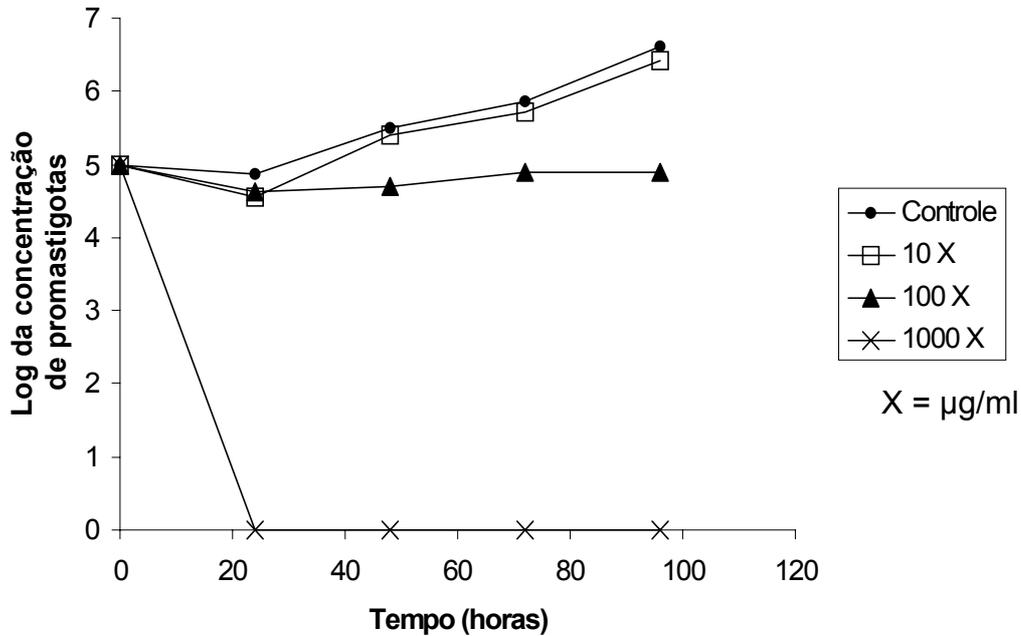


Figura 56 – Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#9

Tabela 26 - F3#12 - média do número de promastigotas ( $\times 10^4$ )

Tempo (h)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	10	100	1000	Controle
24	$6,33 \pm 2,36$	$1,0 \pm 0,82$	0,0	$5,33 \pm 0,94$
48	$17,0 \pm 3,74$	$5,67 \pm 1,25$	0,0	$15,0 \pm 2,16$
72	$47,33 \pm 15,15$	$7,0 \pm 2,94$	0,0	$50,67 \pm 9,39$
96	$308,67 \pm 68,90$	$13,0 \pm 2,16$	0,0	$288,33 \pm 76,43$

0	Log da concentração de promastigotas			
	5	5	5	5
24	4,726727	4,801404	4	0
48	5,176091	5,230449	4,753583	0
72	5,704751	5,675137	4,845098	0
96	6,45989	6,489494	5,113943	0

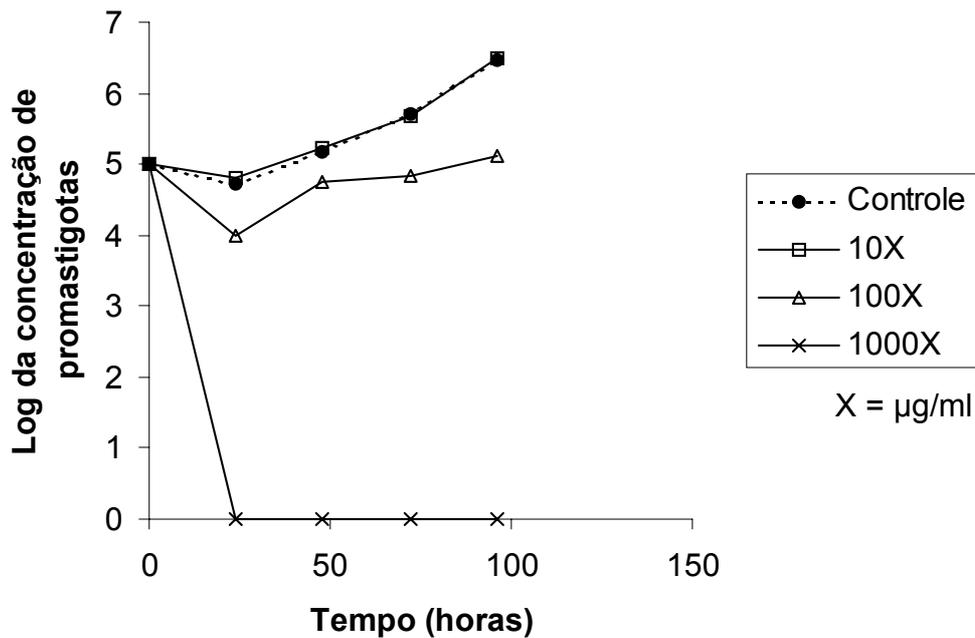


Figura 57 – Curva de inibição do crescimento do protozoário em diferentes concentrações de F3#12

A possibilidade de transformação de uma droga vegetal em um medicamento passa, necessariamente, por um longo processo de estudos e conhecimentos, tanto da droga vegetal como de seus extrativos, intermediários e final, além das etapas químicas, biológicas, tecnológicas, pré-clínicas, toxicológicas e clínicas.

Esse trabalho procurou, dentro de suas limitações, apresentar algumas das características da droga vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, barbatimão, dando ênfase a alguns aspectos tais como: morfo-anatomia das cascas, químicos de extratos semipurificados, de controle de qualidade desses extratos e biológicos, tanto de extratos como de substâncias isoladas e purificadas.

Espera-se que esse possa ser continuado na expectativa de vê-lo transformado em medicamento com o alvo voltado à população de uma maneira em geral.

## 5. CONCLUSÕES

A análise anatômica mostrou que, com a seleção de cortes, pode-se visualizar melhor as estruturas celulares, e de acordo com o corante aplicado, avaliar prováveis composições químicas como: lignina, celulose ou suberina nas cascas, auxiliando, ainda, na identificação do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

O estudo químico de extratos semipurificados das cascas demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.

Foram isolados e identificados: galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina e 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina. A identificação dessas substâncias, anteriormente já isoladas, corrobora na validação da metodologia empregada.

Foram isoladas e identificadas duas substâncias inéditas, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina. Esse fato denota o potencial que a droga vegetal possui e pode contribuir para o conhecimento químico e taxonômico do gênero e da família botânica.

Os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, demonstram, mesmo com dificuldade na separação das substâncias na fração acetato de etila (F3), a possibilidade de utilização do sistema no controle de qualidade qualitativo de extratos de casca de barbatimão.

Os resultados obtidos no teste antibacteriano com as subfrações mostraram atividade contra as cepas testadas. A subfração F3#12 mostrou a melhor atividade, com ação contra *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria resistente a vários antibacterianos. Para as demais bactérias, as concentrações que mostraram atividade foram muito semelhantes, com um aumento crescente de atividade de F3#1 para F3#12.

As substâncias, galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina, isoladamente, não mostraram nenhuma atividade antibacteriana, contra as cepas empregadas.

A avaliação das subfrações contra as formas promastigostas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi promissora. A atividade foi crescente com as subfrações analisadas, e mostraram que as subfrações F3#9 e F3#12 foram as mais ativas, havendo inibição de crescimento superior a 80% das formas promastigostas na concentração de 100  $\mu$ g/ml.

Conclui-se que, a espécie vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, com amplo uso medicinal pela população nativa, apresenta-se promissora na elaboração de um medicamento fitoterápico. É necessária a continuação dos estudos, para a obtenção de novos compostos e em quantidade para a realização de outros testes biológicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; DEANE, L. M. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 471-472, 1986.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; FERNANDES, E.; MONEN, H.; GRIMALDI, JR. G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 19-28, 1989.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 113-123, 2001.
- ALADESANMI, A. J.; ODEDIRAN, S. A. Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p. 179-182, 2000.
- 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**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMMON, H. P. T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavanoiden und Procyanidinen. Teil 1: Historisches und Wirkstoffe. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 132, p. 2433, 1994a.
- AMMON, H. P. T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavanoiden und Procyanidinen. Teil 2: Wirkungen auf das Herz. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 134, p. 2521, 1994b.
- AMMON, H. P. T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen. Teil 3: Wirkungen auf den Kreislauf. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 134, p. 2631, 1994c.
- AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: LORIAN, V. (ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 4.ed. Pennsylvania: Williams and Wilkins, p. 54-111, 1996.
- ANNUK, H.; HIRMO, S.; TÜRI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTRÖM, T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 172, p. 41-45, 1999.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P. de; 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.**, v. 13, p. 264-266, 1999.
- BALAS, L.; VERCAUTEREN, J. Extensive high-resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers. **Magn. Resn. Chem.**, v. 32, p. 386-393, 1994.
- BALDÉ, A. M.; van HOOF, L.; PIETERS, L. A.; van den BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Plant antiviral agents. VII. Antiviral and antibacterial proanthocyanidins from the bark of *Pavetta owariensis*. **Phytother. Res.**, v. 4, p. 182-188, 1990.

BAM, M.; MALAN, J. C. S.; YOUNG, D. A.; BRANDT, E. V.; FERREIRA, D. Profisetinidin-type 4-aryflavan-3-ols and related  $\delta$ -lactones. **Phytochemistry**, v. 4, p. 283-287, 1990.

BATE-SMITH, E. C. Colour reactions of flowers attributed to (a) flavonoids and (b) caroteno oxides. **J. Exp. Bot.**, v. 4, p. 1, 1953.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. Identification of leucanthocyanins as "tannins" ins food. **Chem. Ind.**, p. 377-378, 1953.

BATE-SMITH, E. C.; LERNER, N. H. Leuco-anthocyanins. 2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves. **Biochem. J.**, v. 58, p. 126, 1954.

BATE-SMITH, E. C. J. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance in dicotyledons. **J. Linn. Soc. (Bot.)**, v. 58, p. 95-173, 1966.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J. C. P. de. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Resumos...**, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.

BOTHA, J. J.; FERREIRA, D.; ROUX, D. G. Syntesis of condensed tannins. Part 4. A direct biomimetic approach to (4,6)- and (4,8)-biflavonoids. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p. 1213-1219, 1981.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CARUSO, R. **Cerrado brasileiro: desenvolvimento, preservação e sustentabilidade**. Campinas: Cargill, 1997.

CHAH, K. F.; MUKO, K. N.; OBOEGBULEM, S. I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. **Fitoterapia**, v. 71, p. 187-189, 2000.

CHATTOPADHYAY, D.; MAITI, K.; KUNDU, A. P.; CHAKRABORTY, M. S.; BHADRA, R.; MANDAL, S. C.; MANDAL, A. B. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of Bay Islands. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 49-55, 2001.

CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C. Y.; HUANG, Y. Y.; LIN, Y. Y. Tannins and human healt: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia: catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia**. 1.ed., Rio de Janeiro: Lab. Clín. Silva Araújo, 1942. p. 42.

CORK, S. J.; KROCKENBERGER, A. K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. **J. Chem. Ecol.**, v. 17, p. 123, 1991.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed., New York: The New York Botanical Garden, 1988. p. 261.

DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 1996. p. 10.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 307-313, 2000.

DREWES, S. E.; ROUX, D. G.; SAAYMAN, H. M.; EGGERS, S. H.; FEENEY, J. Some stereochemically identical biflavanols from the bark tannins of *Acacia meransii*. **J. Chem. Soc. Comm.**, p. 1302-1308, 1967.

EBI, G. C.; IFEANACHO, C. J.; KAMALU, T. N. Antimicrobial properties of *Uvaria chamae* stem bark. **Fitoterapia**, v. 70, p. 621-624, 1999.

ELISABESTKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. Cap. 6. p. 87-100.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. 15.reimpr., São Paulo: Edgard Blücher, 2000. p. 174.

EZAKI, N.; KATO, M.; TAKIZAWA, N.; MORIMOTO, S.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus. IV. Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. **Planta Med.**, v. 34, p. 34-38, 1985.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. Cap. 10. p. 163-180.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 1.ed., São Paulo, 1926. p. 116-117.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed., São Paulo: Siqueira, 1959. p. 126.

FERREIRA, D.; BEKKER, R. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Nat. Prod. Rep.**, v. 13, p. 411-433, 1996.

FERREIRA, D.; LI, X.-C. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 193-212, 2000.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil: espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. p.192.

FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p. 1628-1637, 1977.

FORERO, E. Studies in *Stryphnodendron* (Leguminosae: Mimosoideae) including two new taxa. **Brittonia**, v. 24, p.143-147, 1972.

FRANÇA, F.; CUBA, A. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; VIRGENS, M. L.; MARSDEN, P. D. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale* L.) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 26, n. 3, p. 151-155, 1993.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. Cap. 7. p. 101-122.

GALLOWAY, D. F. The biological significance of tannins: an overview. In: HEMINGWAY, R. W.; KARCHESY, J. J. (ed.). **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum, 1989. p. 447.

GALVEZ, J.; ZARZUELO, A.; CRESPO, M. E.; UTRILLA, M. P.; JIMÉNEZ, J. Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rats. **Phytother. Res.**, v. 5, p. 276-278, 1991.

GALVEZ, J.; CRESPO, M. E.; ZARZUELO, A.; de WITTE, P.; SPIESSENS, C. Pharmacological activity of a procyanidin isolated from *Sclerocarya birrea* bark: antidiarrhoeal activity and effects on isolated guinea-pig ileum. **Phytother. Res.**, v. 7, p. 25-28, 1993.

GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T. N.; NYASSÉ, B. 4'-O-methylgallo catechin from *Panda oleosa*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1626-1628, 1993.

GAZAVE, J. M.; PARROT, J. L.; ROGER, C.; ACHARD, M. Investigations on vitamin C2 (sparing factor of ascorbic acid). A study of its metabolism. In: FARKAS, L.; GABOR, M., KALLAY, F. (ed.). **Topics in flavonoid chemistry and biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1975. p. 197-200.

GERLACH, G. **Botanische Microtechnik, eine Einführung**. Stuttgart: George Thieme, 1969.

GRIMALDI JR, G; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of new world *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, p. 270-287, 1987.

GRIMALDI JR, G; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, p. 687-725, 1989.

HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. p. 505-560.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; YA, C.; GAFFNEY, S. H.; SPENCER, C. M.; MARTIN, R.; MAGNOLATO, D. Some observations on the role of plant polyphenols in traditional herbal medicines. **Farmaceutisch tijdschrift voor België**, v. 66, p. 21, 1989.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. **Nat. Prod. Rep.**, p. 41-46, 1994.

HASLAM, E. **Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge: Cambridge University, 1998. p. 155-163.

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; HIRAMATSU, M.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 2016-2021, 1989.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M. Leguminosae. In: HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M. (ed.). **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel: Birkhäuser, 1994. v. 11, p. 1.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; ANTONIO BARRERA, N. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 36, p. 63-80, 1992.

HELSPER, J. P. F. G.; KOLODZIEJ, H.; HOOGENDIJK, J. M.; VAN NOREL, A. Characterization and trypsin inhibitor activity of proanthocyanidins from *Vicia faba*. **Phytochemistry**, v. 34, n.5, p. 1255-1260, 1993.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkins Trans. I**, p. 1209-1216, 1982.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Novos Horizontes, 1978. p. 147.

HSU, F.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XXXI. Isolation and characterization of proanthocyanidins in *Kandelia candel* (L.) Druce. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 33, p. 3142-3152, 1985.

INDEX KEWENSIS *Stryphnodendron adstringens*. In: **Index Kewensis**, Oxford: Clarendon, 1885. v. 2, p. 1010.

ISELY, D. Vascular flora of the southeastern United States. In: ISELY, D. (ed.). **Leguminosae (Fabaceae)**. London: Chapman Hill, 1990. parte 2.

JORGE, A. S.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; MELLO, J. C. P. de; BERTOLINI, D. A. Anti-leishmanial "barbatimão" (*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae) extract against promastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, Suppl., p. 1976, 1996.

KAKEGAWA, H.; MATSUMOTO, H.; ENDO, K.; SATOH, T.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 33, p. 5079-5081, 1985.

KANDIL, F. E.; NASSAR, M. I. A Tannin anti-cancer promotor from *Terminalia arjuna*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1567-1568, 1998.

KLEPSEK, M. E.; BANEVICIUS, M. A.; QUINTILIANI, R.; NIGHTINGALE, C. H. Characterization of bactericidal activity of clindamycin against *Bacteroides fragilis* via kill curve methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 8, p. 1941-1944, 1996.

KOLODZIEJ, H. <sup>1</sup>H NMR spectral studies of procyanidin derivatives: derivation of diagnostic <sup>1</sup>H NMR parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (ed.). **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum, 1992. v. 59, p. 295-320.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 187.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic, 1987. v. 1, p. 1-120.

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. **Phyther. Res.**, v. 12, p. 218-220, 1998.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Modern separation methods. **Nat. Prod. Rep.**, p. 391-413, 1991.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **J. Bras. Med.**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MATTHE, G.; WRIGHT, A. D.; KOENIG, G. M. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. **Planta Med.**, v. 65, n. 6, p. 493-506, 1999.

MELLO, J. C. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996a.

MELLO, J. C. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857-862, 1996b.

MELLO, J. C. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.

MELLO, J. C. P. de; SANTOS, S. da C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. Cap. 24. p. 517-544.

MODABBER, F. Leishmaniasis. In: **Tropical disease research: progress 1991-92: eleventh programme report of the UNDP/WHO special programme for research and training in tropical disease (TDR)**, WHO: Geneva, 1993. p. 77-91.

MOLE, S. The systematic distribution of tannins in the leaves of Angiosperms: a tool for ecological studies. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 21, p. 833-846, 1993.

MONTENEGRO, G. **Manual de técnicas de estudio estructural y ultraestructural em vegetales. Laboratorio de botánica de la facultad de ciencias biológicas**. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, 1985.

MORETTI, V. M. C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PORZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARDT, B.; MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-Indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (Syn, *Tabernaemontana van heurkii*). **Planta Med.**, v. 60, p. 455-459, 1994.

MORTON, J. F. The potential carcinogenicity of herbal tea. **Environ. Carcino. Revs.** v. 4, p. 203-223, 1986.

NAKAHARA, K.; KAWABATA, S.; ONO, H.; OGURA, K.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 968-973, 1993.

NEVES, M. do C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D. R.; FRACASSO, J. F.; LEPERA, E. Z. P.; SILVA, R. F. P. Estudo dos efeitos farmacológicos produzidos pelos extratos aquosos de hamamelis e barbatimão. In: REUNIÃO ANUAL DA

FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7, 1992, Caxambu. **Resumos...**, Caxambu, 1992a.

NEVES, M. do C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D.R.; FRACASSO, J.F.; SILVA, R.F.P.; LEPERA, E.Z.P. Estudo dos efeitos farmacológicos de hamamelis e barbatimão. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. **Resumos...**, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992b.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. I In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2001. Cap. 1. p. 11-24.

NONAKA, G. I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p. 2139-2145, 1983.

NUNES, D. S.; HAAG, A.; BESTMANN, H. J. Two proanthocyanidins from the bark of *Dalbergia monetaria*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2183-2186, 1989.

OBASI, B. N. B.; IGBOECHI, C. A.; ANUFORO, D. C.; AIMUFUA, K. N. Effects of extracts of *Newbouldia laevis*, *Psidium guajava* and *Phyllanthus amarus* on gastrointestinal tract. **Fitoterapia**, v. 64, p. 235-238, 1993.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 507-521, 1993.

OLIVEIRA, E. de Cascas adstringentes brasileiras. **Rev. Bras. Farm.**, v. 29, p. 15-17, 1947.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 263-267.

OTAKE, S.; MAKIMURA, M.; KUROKI, T.; NISHIHARA, Y.; HIRASAWA, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Res.**, v. 25, p. 438-443, 1991.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by <sup>1</sup>H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Res. Commun.**, v. 46, p. 43-52, 1981.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SILVA, R. A. P. de S. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 10, p. 101-106, 1988.

PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULLER, M. **The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture, plant cell and tissue culture in liquid systems**. Oxford: Oxford University, 1991.

PEARSON, R. D.; QUEIROZ-SOUZA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infec. Dis.**, v. 22, p. 1-13, 1996.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872 p.

PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 981-985, 1991.

PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur Entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae)**, Münster, 1992. Tese de Doutorado. 223 p.

PIO CORREIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Oficial, 1926. p. 1.

PORTER, L. J. Tannins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic, 1989. v. 1, p. 389-419.

PORTER, L. J.; HEMINGWAY, R. W. Significance of the condensed tannins. In: ROWE, J. W. (ed.). **Natural products of woody plants**. Berlin: Springer, 1989. v. 2, p. 988-1027.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Tannins and nutrition. **Purdue univ. exp. sta. bull.** 272 W. Lafayette IN, 1980. 36 p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAUHA, J.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 3-12, 2000.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Dry bean tannin: a review of nutritional implications. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 62, p. 541-549, 1985.

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). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 349, 1992.

REZENDE, A. V. Importância das matas de galeria: manutenção e recuperação. In: RIBEIRO, J. F. (ed.). **Cerrado: matas de galeria**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 164 p.

ROBERTO, A. C. B. S.; LIMA, A. P.; PEIXOTO, P. R.; MISUTA, N. M.; FUKUSHIGE, Y.; FERREIRA, M. E. M. C.; NERILO SOBRINHO, A.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Avaliação da terapia com antimoniato de N-metil glucamina e de notificação de leishmaniose tegumentar. **An. Bras. Dermatol.**, v. 72, p. 129-136, 1997.

SANTOS, C. A. de M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas medicinais (Herbarium, flora et scientia)**. Curitiba: Scientia et Labor, 1987. p. 39.

SANTOS, E. C. T.; PAIVA, S. R.; KAPLAN, M. A. C.; BERGMAN, B. R. Atividade anti-leishmania de *Plumbago sacadens* (Plumbaginaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v. 78, n. 1, p. 13-15, 1997.

SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 134, p. 3167-3179, 1994.

SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; GUILHERME, A. L. F.; TOLEDO, M. J. O.; RAMOS, M.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; SPINOZA, R. P.; BARBOSA, O. C. Aspectos epidemiológicos de leishmaniose

tegumentar em áreas endêmicas do estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 141-147, 1996.

SIQUEIRA, J. C. de Plantas do cerrado na medicina popular. **Spectrum J. Bras. Ci.**, v. 2, n. 8, p. 41-44, 1982.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospectin and??? benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

STEYNBERG, J. P.; BURGER, J. F. W.; MALAN, J. C. S.; CRONJÉ, A.; YOUNG, D. A.; FERREIRA, D. Natural (-)-fisetinidol-(4,8)-(-)-epicatechin profisetinidins. **Phytochemistry**, v. 29, p. 275-277, 1990.

STICHER, O.; MEIER, B.; HASLER, A. The analysis of ginkgo flavonoids. In: van BEEK, T.A. (ed.). **Ginkgo biloba**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 179-202.

TANDON, J. S.; SRIVASTAVA, V.; GURU, P. Y. Iridoid: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 4, p. 1102-1104, 1991.

TEODORO, U.; LA SALVIA F. V.; LIMA, E. M.; MISUTA, N. M.; VERZIGNASSI, T. G.; FERREIRA, M. E. M. C. Leishmaniose tegumentar na região: flebotomíneos de área de transmissão norte do Paraná - Brasil. **Rev. Saude Publica**, v. 25, p. 129-133, 1991.

THOMPSON, R. S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R. J. N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin I**, p. 1387-1399, 1972.

TOLEDO, C. E. M. de; SANTOS, F. S. dos; MELLO, J. C. P. de. Controle de qualidade da matéria-prima vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae (barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Departamento de Psicobiologia e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, 1998.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed., São Paulo: Atheneu, 1999. p. 149-282.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados no tratamento das protozoonoses: tripanosomíase, leishmaniose, amebíase, giardíase, tricomoníase e outras protozoonoses. In: GILMAN, A. G. (ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p. 725-740.

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.**, 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.**, v. 75, p. 26-28, 1966.

UEMURA, L. M.; YAMAGUTI, E.; MELLO, J. C. P. de. Análise da droga vegetal barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Recife. **Resumos...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2000. p.182.

VERPOORTE, R. Some phytochemical aspects of medicinal plant research. **J. Ethnopharmacol.**, v. 25, p. 43-59, 1989.

VIEIRA, F. C.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. de. Cicatrização cutânea em feridas de ratos após aplicação tópica de pomadas de barbatimão e nebacetin. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Departamento de Psicobiologia e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, 1998. p.188.

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschr. Chem. org. Naturst.**, v. 27, p. 158-260, 1969.

WEINGES, K.; KLOSS, P.; TRUNZLER, G.; SCHULER, E. Über Kreislaufwirksame dimere und oligomere Dehydro-Catechine. **Planta Med.**, Suppl., p. 61, 1971.

YOSHIDA, E. L. A. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo state, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 133-134, 1990.

---

Cleyton Eduardo Mendes de Toledo

---

Data de nascimento – 22/04/1975

Naturalidade – Pereira Barreto, SP      Nacionalidade – Brasileira

Filiação – Heitor Alves Toledo

Alvina Mendes de Toledo

Estado Civil – Casado

Cônjuge – Gislaïne Guilherme Toledo

1982-1989 – Primeiro grau - Escola Estadual de 1° e 2° Grau “José Amador”, Teodoro Sampaio, São Paulo.

1990 – Primeiro ano do segundo grau – Escola Estadual de 1° e 2° grau Salvador Moreno Munhoz, Teodoro Sampaio, São Paulo.

1991-1992 – Conclusão do segundo grau – Colégio Estadual Dr. Gastão Vidigal, Maringá, Paraná.

1995–1998 - Graduação em Farmácia - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.

1996-1998 - Bolsista CNPq com o projeto “Padronização e controle farmacognóstico das cascas e folhas da matéria-prima vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosacea (Barbatimão)”.

**3/1998-3/1999 - Bolsista da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira.**

3/1999-8/1999 – Farmacêutico responsável pela Farmácia Mandacaru Ltda., Maringá, Paraná.

8/1999-2/2000 - Farmacêutico responsável pela Farmácia Kay Ltda., Maringá, Paraná.

Desde de 2/2000 – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Câmpus de Araraquara, São Paulo.

3/2000-3/2002 – Bolsista CAPES em nível de mestrado.