



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANALICE MARTINS DALEFFI ZOCOLER

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FITOQUÍMICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum*
BENTH. (LEGUMINOSAE)

MARINGÁ
2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Área de concentração: Produtos Naturais Biologicamente Ativos

ANALICE MARTINS DALEFFI ZOCOLER

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FITOQUÍMICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum*
BENTH. (LEGUMINOSAE)

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ
2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANALICE MARTINS DALEFFI ZOCOLER

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FITOQUÍMICA E DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum*
BENTH. (LEGUMINOSAE)

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira
UNESP – Araraquara - SP

Prof. Dr. Gentil José Vidotti
Universidade Estadual de Maringá

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Z84a Zocoler, Analice Martins Daleffi
Avaliação da qualidade, fitoquímica e da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (leguminosae) / Analice Martins Daleffi Zocoler. - Maringá, Pr : [s.n.], 2005.
132 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

1. Barbatimão - *Stryphnodendron obovatum*. 2. Taninos condensados - Substâncias químicas - Fitoquímica. 3. Radical DPPH - Capacidade antioxidante. 4. Complexo fosfomolibdênio - Capacidade antioxidante. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDD 21.ed. 615.321




Fundação Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas

ATA DO EXAME DE DISSERTAÇÃO DA PÓS-GRADUANDA ANALICE MARTINS DALEFFI ZOCOLER, REALIZADA NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, NO DIA VINTE E NOVE DO MÊS DE AGOSTO DO ANO DE DOIS MIL E CINCO.

Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e cinco, às nove horas, no Bloco K-80, Sala 12, realizou-se o exame de dissertação "Avaliação da qualidade, fitoquímica e da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae)", da pós-graduanda Analice Martins Daleffi Zocoler, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéutica, área de concentração Produtos Naturais Biologicamente Ativos. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello (presidente/orientador), Dra. Raquel Regina Duarte Moreira (membro convidado) e Dr. Gentil José Vidotti (membro convidado). Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a pós-graduanda foi aprovada, obtendo o título de mestre. E para constar, foi lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
(Presidente da Banca – orientador)


Dra. Raquel Regina Duarte Moreira
(Membro convidado)


Dr. Gentil José Vidotti
(Membro convidado)

*O Senhor é o meu pastor, nada me faltará;
Ele me faz repousar em pastos verdejantes.
Leva-me para junto das águas de descanso;
refrigera-me a alma.
Guia-me pelas veredas da justiça
por amor do seu nome.
Ainda que eu ande pelo vale da
sombra da morte,
não temerei mal nenhum,
porque tu estás comigo.
a tua vara e o teu cajado
me consolam.
Preparas-me uma mesa
na presença dos meus adversários,
unges-me a cabeça com óleo;
o meu cálice transborda.
Bondade e misericórdia certamente
me seguirão
todos os dias de minha vida;
e habitarei na casa do Senhor
para todo o sempre.*

Salmo 23

Agradeço a ti, meu Senhor e meu Deus!

*Ao meu marido Marcos,
minhas filhas Isadora e Raquel
e a minha mãe Augustinha
por todo o apoio, carinho,
compreensão e estímulo
no decorrer desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello agradeço por sua orientação, sua compreensão, sua dedicação e amizade e por todos os ensinamentos prestados ao longo do mestrado.

A professora Dra. Cássia Mônica Sakuragui, pela identificação da planta.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM.

As professoras Dra. Mara Lane Cardoso Carvalho e Izabel Cristina Piloto Ferreira pela contribuição e exemplo profissional.

Ao professor Dr. Wagner Vilegas da UNESP de Araraquara pela disponibilidade em me receber em seu laboratório.

Ao Dr. Heinrich Luftmann do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pela realização dos espectros de massas.

À Dra. Ivânia Terezinha Albrecht Schuquel do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela realização dos espectros de ressonância.

À Gisely Cristiny Lopes e Andréia Cristina Conegero Sanches por todo apoio e dedicação ao longo do mestrado.

Às minhas queridas amigas da pós graduação Lúcia, Mônica, Zilda Cristiani, Letícia, Ione, Maria Inês, Elza, Juliana, e a todos aqueles com quem convivi durante a realização deste trabalho, pela amizade e alegria do convívio.

As minhas queridas amigas Fátima Machado, Jeanina Cotello e Sandra Andréa Pierini por todo carinho e amizade.

Ao Marcelo, Roberta e Miriam do laboratório de Química da UNESP de Araraquara, por toda atenção com que me receberam.

A Helena e Sônia por toda atenção e dedicação prestadas.

Aos técnicos de laboratório Admir e Leocir, por todo o auxílio.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, pela oportunidade de concretizar este trabalho.

A CAPES – PROAP pelo auxílio financeiro na execução deste trabalho.

A todos de minha família, por seu apoio neste e em outros momentos de minha vida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

EPÍGRAFE

“... Pensamentos tornam-se ações, ações tornam-se hábitos, hábitos tornam-se caráter, e nosso caráter torna-se nosso destino ...”

James C. Hunter

RESUMO

Stryphnodendron obovatum Benth. (Leguminosae), espécie nativa do cerrado brasileiro, conhecido popularmente por “barbatimão”, tem sido usado há muito tempo no tratamento de várias enfermidades, principalmente como cicatrizante e anti-séptico. Suas cascas são ricas em taninos. Esse trabalho objetivou realizar estudos de controle de qualidade, isolamento de substâncias polifenólicas a partir do extrato bruto e a avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *S. obovatum* Benth. O controle de qualidade da matéria-prima vegetal foi realizado seguindo parâmetros farmacopéicos tendo sido possível traçar um perfil da droga vegetal, visando manter um padrão de reprodutibilidade, compatível com a literatura. A partir da fração acetato de etila, submetida a cromatografia em coluna Sephadex[®] LH-20, foram isoladas e identificadas 7 substâncias: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, ácido *p*-hidróxibenzóico, 4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina, robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina, identificadas através de espectrometria de massas, RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY ¹H/¹H, HMBC e HMQC. O estudo da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH• evidenciou para o extrato bruto um valor de IC₅₀ de 4,52 μ g/ml e para a fração acetato de etila um valor de IC₅₀ de 4,04 μ g/ml, demonstrando possuírem capacidade antioxidante quando comparados com a vitamina C (IC₅₀= 4,93 μ g/ml). A capacidade antioxidante *in vitro* avaliada pelo método do complexo fosfomolibdênio evidenciou que tanto a fração acetato de etila (CAR= 0,95) quanto a fração aquosa (CAR= 0,93) possuem capacidade de formação do complexo fosfomolibdênio quando comparados com a vitamina C (CAR= 1,0). Desta maneira, os extratos de *S. obovatum* Benth. mostraram ter capacidade antioxidante, provavelmente devido à presença de taninos condensados, evidenciado na análise fitoquímica.

Palavras-chave: *Stryphnodendron obovatum*. Taninos condensados. Capacidade antioxidante. Radical DPPH. Complexo Fosfomolibdênio.

ABSTRACT

Stryphnodendron obovatum Benth. (Leguminosae), popularly known as “barbatimão”, a species native to the Brazilian cerrado (savannah), has been used for a long time for the treatment of various illnesses, mainly as a cicatrizant and antiseptic. Its bark is rich in tannins. The objective of this work was to evaluate the quality control, isolate polyphenolic substances from the raw extract, and evaluate the antioxidant capacity of extracts of the bark of *S. obovatum* Benth. The quality control of the raw plant material was carried out following pharmacopeic parameters. It was possible to trace a profile of the chemical constituents of the plant drug, in order to establish a standard of reproducibility compatible with the literature. From the ethyl-acetate fraction, 24 subfractions were obtained by chromatography on a Sephadex[®] LH-20 column. Seven substances were isolated and identified: gallic acid, gallocatechin, epigallocatechin, *p*-hydroxybenzoic acid, 4'-*O*-methyl-galocatechin, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin, and robinetinidol-(4 α →8)-gallocatechin, by mass spectrometry, RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY ¹H/¹H, HMBC and HMQC. The study of the antioxidant capacity for the method of DPPH• it evidenced that the gross extract and the fraction acetate of etila of *S. obovatum* possesses high antioxidant capacity when compared with the vitamin C. The antioxidant capacity evaluated by the method of the complex phosphomolibdenum evidenced that so much the fraction ethyl-acetate as the aqueous fraction possesses capacity of formation of the complex phosphomolibdenum when compared with the vitamin C. In this way, *S. obovatum* Benth. was showed to probably have an antioxidant, due high capacity to the presence of tannins, mainly of the condensed type, as demonstrated in the phytochemical analysis.

Key words: *Stryphnodendron obovatum*. Condensed tannins. Antioxidant capacity.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribuição do <i>Stryphnodendron obovatum</i> no Brasil	23
2	<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth., Assis, SP, com detalhe das folhas e inflorescência	25
3	Estrutura das sapogeninas 1 [(R ₁ =OH; R ₂ =H), 2 (R ₁ =R ₂ =OH), 3 (R ₁ =OH; R ₂ =H) e 4 (R ₁ =H; R ₂ =OH)]	26
4	Estrutura química de prodelfinidinas 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina isolada das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	28
5	Epigalocatequina (I) e galocatequina (II) isoladas das cascas de <i>S. obovatum</i> Benth.	29
6	Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis: 1. ácido gálico; 2. ácido elágico	31
7	Exemplos de prontocianidinas diméricas do tipo B	32
8	Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com a tabela 1	33
9	Associação polifenol-proteína	35
10	Precipitação do complexo polifenol-proteína – P- proteína; PF- polifenol; A- baixa concentração de proteínas; B- alta concentração de proteínas; C- interação proteína-polifenol	36
11	Exemplos de antioxidantes sintéticos e naturais	47
12	Estrutura do DPPH•: radical livre (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e reduzido (difenil picrilhidrazina)	50
13	Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas (a= dimerização e b= estabilização de um radical DPPH)	51
14	Cromatografia em camada delgada de 24 subfrações obtidas da fração acetato de etila por CC (Sephadex [®] LH-20) (Cromatofolhas de gel de sílica F ₂₅₄ ; acetato de etila:ácido fólico:água; 90:5:5; revelação com FeCl ₃ a 1% em metanol)	72
15	Espectro de RMN ¹ H da substância I (ácido gálico) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	80

16	Espectro de massas (ES-MS) da substância I (ácido gálico) em modo negativo	81
17	Espectro de RMN ¹ H da substância II (galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	84
18	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância II (galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	85
19	Espectro de RMN ¹ H da substância III (epigalocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	88
20	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância III (epigalocatequina) (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	89
21	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H ampliado da substância III (epigalocatequina) (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	90
22	Espectro de RMN ¹³ C da epigalocatequina (a) e galocatequina (b) (CD ₃ OD; 75 MHz; ppm)	91
23	Espectro de RMN ¹ H da substância IV (ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico) (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	93
24	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância IV (ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico) (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	94
25	Espectro de RMN ¹ H da substância V (4'- <i>O</i> -metil-galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	97
26	Espectro COSY ¹ H/ ¹ H da substância V (4'- <i>O</i> -metil-galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	98
27	Espectro de HMQC da substância V (4'- <i>O</i> -metil-galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	99
28	Espectro de HMBC da substância V (4'- <i>O</i> -metil-galocatequina) (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	100
29	Espectro de RMN ¹ H da substância VI [epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina peracetilada] (CDCl ₃ ; TMS; 300 MHz; ppm)	105
30	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância VI [epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina peracetilada] (CDCl ₃ ; TMS; 300 MHz; ppm)	106
31	Espectro de RMN ¹ H da substância VII [robinetinidol-(4α→8)-galocatequina peracetilada] (CDCl ₃ ; TMS; 300 MHz; ppm)	109

32	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VII [robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada] (CDCl_3 ; TMS; 300 MHz; ppm)	110
33	Espectro de massas (ES-MS) da substância VII [robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada] com adição de Na^+	111
34	Capacidade antioxidante da fração acetato de etila das cascas de <i>S. obovatum</i> pelo método de seqüestro do radical DPPH, evidenciando a mudança de coloração de violeta para amarela, da maior para a menor concentração	112
35	Comparação entre valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) realizados pelo método do DPPH•. Valores de IC_{50} realizados pelo método do DPPH• apresentados pela vitamina C (4,93 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,05$; CV% = 1,07), EB (4,52 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,16$; CV% = 3,54), FAE (4,04 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,13$; CV% = 3,22) e FAQ (5,58 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,22$; CV% = 3,94). *diferença significativa entre os experimentos ($P < 0,005$)	113
36	Ensaio da capacidade antioxidante após redução do complexo fosfomolibdênio. 1. branco; 2. extrato bruto; 3. fração acetato de etila; 4. fração aquosa; 5. vitamina C	116
37	Comparação da capacidade antioxidante do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) (200 $\mu\text{g}/\text{mg}$), após redução do complexo fosfomolibdênio. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão da capacidade antioxidante em relação a atividade desempenhada pela vitamina C (CAR) usada como padrão (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	117

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos	33
2	Determinação do teor de taninos totais em relação ao líquido extrator e a droga vegetal	66
3	Determinação do teor de extrativos das cascas de <i>S. obovatum</i> Benth.	68
4	Abordagem fitoquímica preliminar	69
5	Vinte e quatro subfrações obtidas por cromatografia em coluna da fração acetato de etila	73

6	Dados da substância II - galocatequina (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	83
7	Dados da substância III – epigalocatequina (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	87
8	Dados da substância IV - ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	92
9	Dados da substância V - 4'-O-metil-galocatequina (CD ₃ OD; 300 MHz; TMS; ppm)	96
10	Dados da substância VI - epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina peracetilada (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	104
11	Dados da substância VII - robinetinidol-(4α→8)-galocatequina peracetilada (CD ₃ OD; TMS; 300 MHz; ppm)	108

LISTA DE FLUXOGRAMA

	Página
1 Preparação de extrato e separação cromatográfica de <i>S. obovatum</i> Benth.	71
2 Fracionamento cromatográfico da fração F3#6 por CCCAV e CC de <i>S. obovatum</i>	74
3 Fracionamento cromatográfico da fração F3#7 por CCCAV e CC de <i>S. obovatum</i>	75
4 Fracionamento cromatográfico da fração F3#8 por CCCAV e CC de <i>S. obovatum</i>	76
5 Fracionamento cromatográfico da fração F3#10 por CCDP de <i>S. obovatum</i>	77
6 Fracionamento cromatográfico da fração F3#12 por CC e CCDP de <i>S. obovatum</i>	78

ESQUEMAS

	Página
1 Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton	43
2 Formação das espécies reativas de oxigênio (ERO)	43
3 Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CAR	Capacidade antioxidante relativa
CCCAV	Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
COSY ¹H/¹H	Espectroscopia de correlação hidrogênio/hidrogênio
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DPPH	2,2 – difenil-1-picrilhidrazila
EB	Extrato bruto
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
F#	Subfrações obtidas a partir da fração acetato de etila
F1	Fração extrato bruto
F2	Fração aquosa
F3	Fração acetato de etila
m	Multiplete
PNA	Polifenóis não adsorventes
pt	Pseudo triplete
PT	Polifenóis totais
R_f	Relação de frente
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SM	Solução mãe

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.	23
3.2	Descrição macroscópica	24
3.3	Conteúdo químico do gênero <i>Stryphnodendron</i>	26
3.4	Taninos	29
3.5	Propriedades biológicas dos taninos	37
3.5.1	Atividades farmacológicas e toxicológicas	37
3.6	Atividade antioxidante	41
3.6.1	Antioxidantes naturais	46
3.6.2	Substâncias fenólicas e atividade antioxidante	48
3.6.3	Métodos para avaliação da atividade antioxidante	50
4	METODOLOGIA	53
4.1	Droga vegetal	53
4.2	Solventes, soluções e reagentes	53
4.3	Equipamentos	54
4.4	Análise quantitativa	55
4.4.1	Determinação do teor de taninos totais	55
4.5	Análises físico-químicas	56
4.5.1	Determinação da perda por secagem	56
4.5.2	Determinação da perda por dessecação	57
4.5.3	Determinação do teor de extrativos	57
4.6	Análise fitoquímica preliminar	58

4.6.1	Teste de espuma (saponinas)	58
4.6.2	Cumarinas	58
4.6.3	Fenólicos simples	58
4.6.4	Compostos antracênicos livres	59
4.6.5	Flavonóides	59
4.7	Preparação dos extratos	59
4.7.1	Extrato total (F1)	59
4.7.2	Obtenção da fração acetato de etila (F3)	60
4.8	Métodos cromatográficos	60
4.8.1	Cromatografia em coluna da fração acetato etila	60
4.8.2	Cromatografia em coluna das subfrações	61
4.8.3	Cromatografia em camada delgada	61
4.8.4	Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)	61
4.8.5	Derivatização química das substâncias isoladas	62
4.8.6	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	62
4.9	Análise estrutural das substâncias isoladas	63
4.10	Atividade antioxidante	63
4.10.1	Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres pelo método do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	63
4.10.2	Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio	64
4.11	Análise estatística	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Caracterização da matéria-prima e controle de qualidade	65
5.1.1	Teor de taninos totais	65

5.1.2	Perda por secagem e perda por dessecação	66
5.1.3	Teor de extrativos	68
5.1.4.	Abordagem fitoquímica preliminar	69
5.2	Estudo químico	70
5.3	Análise espectroscópica e caracterização dos compostos isolados	79
5.3.1	Monômeros	79
5.3.1.1	Substância I – ácido gálico	79
5.3.1.2	Substância II – galocatequina	82
5.3.1.3	Substância III – epigalocatequina	86
5.3.1.4	Substância IV – ácido <i>p</i> -hidróxibenzóico	92
5.3.1.5	Substância V – 4'-O-metil-galocatequina (peracetilada)	95
5.3.2	Proantocianidinas diméricas	101
5.3.2.1	Substância VI – epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina	103
5.3.1.7	Substância VII – robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina	107
6	Capacidade antioxidante	112
6.1	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos das cascas de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth. pelo método DPPH•	112
6.2	Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos das cascas de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth. pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio	115
7	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas pela população é tão antigo quanto a história da própria humanidade. Durante milênios, o homem aprendeu a conhecer as plantas e valer-se de suas propriedades sobre o organismo.

O emprego dos vegetais perde-se no tempo, na história do ser humano. Na busca de alívio para suas dores e enfermidades, o homem foi impelido, através dos séculos, a analisar os fenômenos da natureza e a buscar soluções que o ajudassem a minorar seus sofrimentos. O consumo de plantas medicinais teria sido a primeira forma de uso de medicamento de que se tem notícia. Os documentos arqueológicos, hoje à disposição, só registram fatos a partir de 3.000 anos antes de Cristo, e possibilitam afirmar que muitos povos, há milênios, tinham conhecimento do poder de grande quantidade de plantas, seja pelas suas qualidades curativas, seja por permitirem sensações anormais (BRAGANÇA, 1996).

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico ou para o desenvolvimento de novos medicamentos, a partir das substâncias delas isoladas, ou via plantas transgênicas, tem-se mostrado uma forma não convencional de produção de matérias primas vegetais, que começa a ser melhor explorada (NODARI; GUERRA, 2003).

Por conseqüência, são necessários estudos cada vez mais detalhados com cada espécie vegetal para garantir três aspectos básicos: eficácia, segurança e qualidade (DELAPORTE et al., 2001).

A Resolução - RDC nº 48, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e define como fitoterápico “todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais” (BRASIL, 2004).

Para o desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico são necessários estudos prévios em diversas áreas do conhecimento como: botânica,

agronomia, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica, desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação do teor da substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse presentes na matéria-prima, produtos intermediários e produtos finais, bem como avaliação das características físicas e físico-químicas dos produtos transformados (SONAGLIO et al., 2003).

No Brasil praticamente não existe cultivo de plantas medicinais. Muitas espécies vegetais de interesse são coletadas por pessoas que, na maioria das vezes, não sabem identificar corretamente uma espécie vegetal e suas variedades. Essas amostras são muitas vezes vendidas a distribuidoras, que as repassam a firmas que produzem extratos vegetais ou às farmácias. A grande maioria destas firmas não realiza controle de qualidade dos produtos adquiridos (DI STASI, 1996).

Um controle de qualidade efetivo não pode ocorrer apenas na análise final do produto fitoterápico, mas deve incluir também a obtenção da espécie vegetal correta, seu cultivo, colheita, secagem, pois esse é um início de um processo que irá determinar toda a qualidade futura do produto em termos de confiabilidade, estabilidade, inocuidade e efetividade. A planta medicinal não poderá apresentar insetos, bolores e altos níveis de microorganismos. Por isso, métodos de desinfecção são aplicados, tais como o calor, radiação e outros. A recomendação para o armazenamento é que seja guardada a parte da planta inteira e bem estabilizada, facilitando a identificação e o controle de qualidade, e preservando melhor as substâncias ativas do vegetal, suas características. A espécie vegetal de interesse também requer uma extração padronizada, estabilização e acondicionamento higiênico, acompanhando-se cada estágio desse processo, lote por lote, por análises químicas e por um controle microbiológico, até a obtenção do produto final (CARDOSO, 2000).

A monitoração do cultivo e da produção de plantas medicinais deve empregar o uso de marcadores, que indicam a presença do princípio ativo de interesse e com teor especificado. Segundo a RDC 48/2004 da ANVISA (BRASIL, 2004), marcador é o componente ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SANTOS; MELLO, 2003).

Os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. Um processo similar ocorre provavelmente em caso de úlcera gástrica, em que uma camada de tanino-proteína complexados protege a mucosa do estômago (SANTOS; MELLO, 2003).

Taninos têm sido utilizados no curtimento do couro desde a antigüidade, sendo que sua obtenção permanece como uma das mais importantes aplicações comerciais de todo extrativo de madeiras. Também contribuem significativamente no sabor adstringente de vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas (SANTOS; MELLO, 2003).

Acredita-se que a produção de taninos pelo vegetal como metabólito secundário seja para a própria defesa da planta.

Dentre as espécies em estudo, encontra-se o *Stryphnodendron obovatum* Benth., popularmente conhecido como barbatimão. Espécie arbórea da flora brasileira, encontrada tipicamente nas áreas de Cerrado do Brasil central. Suas cascas são espessas e apresentam efeito adstringente, devido à alta concentração de taninos.

2 OBJETIVOS

- Realizar estudos de controle de qualidade das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.
- Isolar e identificar taninos condensados de extrato semipurificado de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

- Avaliar a capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Stryphnodendron obovatum* Benth.

Stryphnodendron obovatum Benth. é conhecido como barbatimão e barbatimão-de-folha-miúda, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

O gênero *Stryphnodendron* é nativo do cerrado (Fig. 1) e possui cerca de 48 espécies, entre elas *S. obovatum* Benth., pertencente a família Leguminosae, subfamília Mimosaceae, ordem Fabales (CRONQUIST, 1988).



Figura 1 - Distribuição do *Stryphnodendron obovatum* no Brasil.
Fonte: Brito et al., 2001.

Por outro lado, Hegnauer e Hegnauer (1994) sugerem três subfamílias: Mimosaceae, Papilionaceae e Cesalpiniaceae, 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 seu emprego.

Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Sub-classe:	Rosidae
Ordem:	Fabales
Família:	Leguminosae
Gênero:	<i>Stryphnodendron</i>
Espécie:	<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.

3.2 Descrição macroscópica

Stryphnodendron obovatum Benth. é um arbusto perene, floresce entre outubro e fevereiro. Possui cerca de 3-4 metros de altura (Fig. 2), folhas alternas de 15-20 cm de comprimento, folíolos (4-9 pares) alternos, obovados, com 5-10 mm de comprimento, 3-6 mm de largura, ápice emarginado, base atenuada, ligeiramente desigual, face superior glabra, inferior com nervura central. As inflorescências são do tipo espiga delgadas e cilíndricas com 12-16 cm de comprimento (Fig. 2), isoladas e germinadas, cálice curto-lacinado glabro (1 mm), corola (3-4 mm) glabra, estames livres (4-5 mm), ovário alongado (1 mm de comprimento). Fruto é do tipo legume alongado (10-12 mm de comprimento e 10-15 mm de largura), achatado. As sementes são obovadas, oblíquas (9 mm de comprimento) (MARTINS, 1974).



Figura 2 - *Stryphnodendron obovatum* Benth. Assis, SP, com detalhe das folhas e inflorescência.

Foto: Andréia Cristina Conegero Sanches (2005).

3.3 Conteúdo químico do gênero *Stryphnodendron*

Tradicionalmente, o estudo de produtos naturais de origem vegetal é feito utilizando-se técnicas de isolamento e purificação de substâncias orgânicas, em conjunto com métodos espectrométricos (RMN, EM, IV entre outros). Ao conjunto destes procedimentos pode ser denominado de “Fitoquímica Clássica” (TREASE; EVANS, 1989).

A Farmacopéia Brasileira (1959) preconiza um teor mínimo de taninos em torno de 20% nas cascas da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e 8% no mínimo de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2002). Toledo (2002), Lopes (2003) e Sanches (2004) estabeleceram teores de taninos de 19,51%, 15,03% e 19,21% para *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, respectivamente. A partir do extrato etanólico dos frutos de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. foram isoladas as sapogeninas 1 e 2 (TURSCH et al., 1963) e mais tarde duas homólogas 3 e 4 (TURSCH et al., 1966).

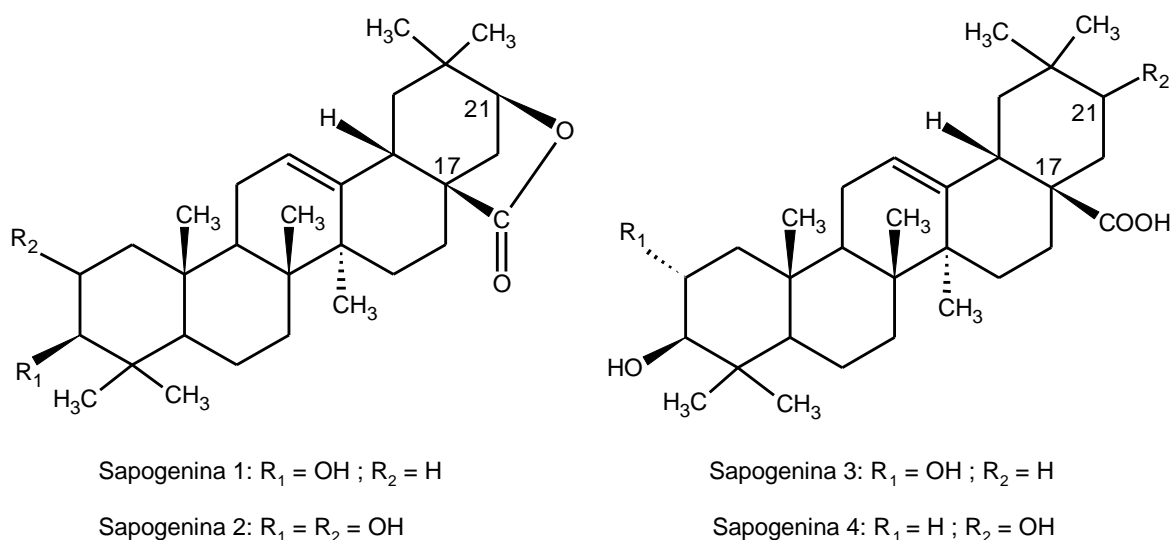


Figura 3 – Estrutura das sapogeninas 1 [($R_1=OH$; $R_2=H$), 2 ($R_1=R_2=OH$), 3 ($R_1=OH$; $R_2=H$) e 4 ($R_1=H$; $R_2=OH$)]

Reicher et al. (1992) conseguiram isolar a partir de frutos de *S. barbatiman* Mart., uma galactomanana, cuja estrutura foi elucidada com o auxílio de espectros de ^{13}C .

A partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville, Mello et al. (1996a) isolaram os seguintes flavan-3-óis:

- 4'-O-metil-galocatequina
- galocatequina
- epigalocatequina
- epigalocatequina-3-O-galato e
- outras duas novas substâncias: epigalocatequina-3-O-(3,5-dimetil)-galato e epigalocatequina-3-O-(3-metóxi-4-hidróxi)-benzoato.

Também foram isoladas e elucidadas as seguintes prodelphinidinas:

- epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina
- epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina
- epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato
- epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato
- galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-galato
- galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato
- epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato
- epigalocatequina-(4 β →6)-epigalocatequina

Foram isoladas também as seguintes prorobinetidinas:

- robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina
- robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina
- robinetinidol-(4 β →8)-galocatequina
- robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato
- robinetinidol-(4 α →6)-galocatequina
- robinetinidol-(4 α →6)-epigalocatequina
- robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-galato
- robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina

Os mesmos autores, em 1999, isolaram uma nova prodelfinidina: 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina (Fig. 4).

Essas substâncias foram identificadas através de métodos espectroscópicos de (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HETCOR, NOE, COLOC), espectrometria de massas, além de métodos ópticos (polarimetria e dicroísmo circular).

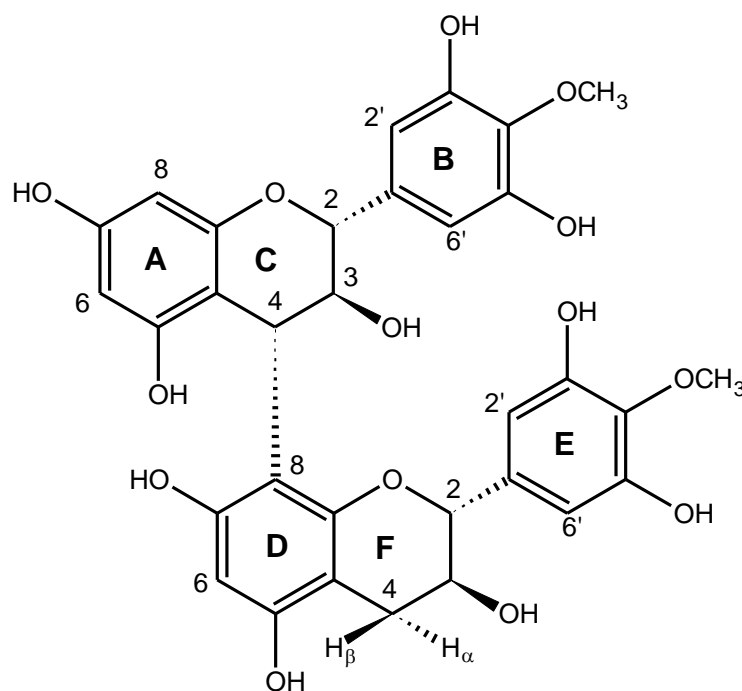


Figura 4 - Estrutura química de prodelfinidina 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina isolada das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

Toledo (2002) isolou e identificou duas novas substâncias a partir de extratos da casca de *Stryphnodendron adstringens*, sendo denominadas 4'-O-metil-robinetidinol-(4 α →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetidinol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina.

Sanches (2004) isolou de um extrato semipurificado da fração acetato de etila das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., epigalocatequina e galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina e epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina (Fig. 5).

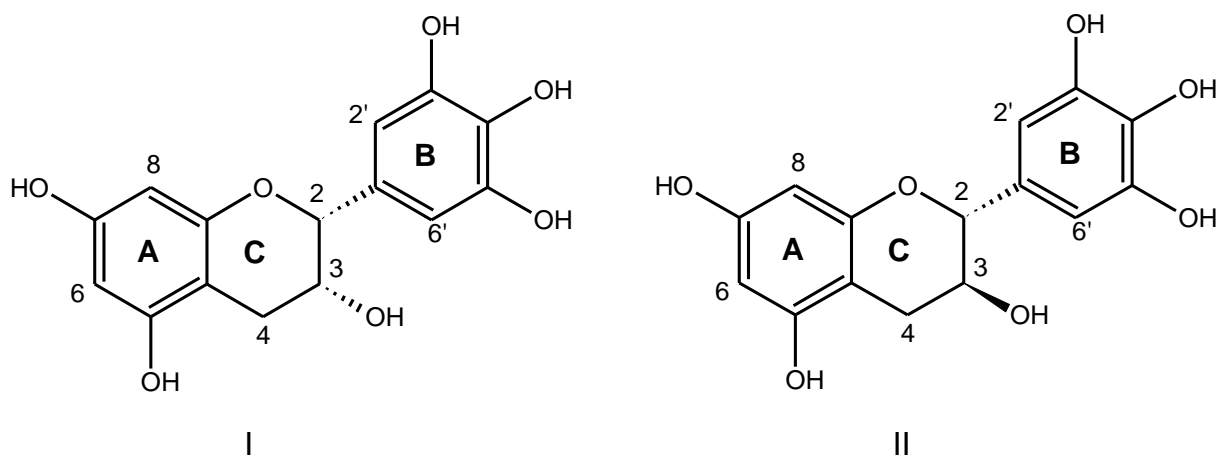


Figura 5 - Epigallocatequina (I) e galocatequina (II) isoladas das cascas de *S. obovatum* Benth.

Lopes (2003) isolou, além de galocatequina e epigallocatequina, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina, epigallocatequina-(4 β →8)-galocatequina, fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina e uma substância inédita: fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina de um extrato semipurificado das cascas de *S. polyphyllum* Mart.

Pereira et al. (2002) isolaram e identificaram ácido oleoanólico, β -sitosterol, β -amirina, triterpenos pentacíclico (3-oxo-taraxerina) e quercetina do extrato das folhas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.

Machado (2005) isolou recentemente das cascas de *S. polyphyllum* Mart. as seguintes substâncias: ácido gálico, galocatequina, epigallocatequina, 4'-O-metil-galocatequina e fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina.

3.4 Taninos

A palavra tanino foi usada, pela primeira vez, em 1796, por Seguin, para definir o princípio adstringente da casca do carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais tornando-a imputrescível e resistente à água fervente evitando a sua gelatinização. Desde então, empregou-se diversamente: num sentido restrito e sem propriedade, como sinônimo de ácido tânico e, num sentido amplo, para designar um grupo de constituintes vegetais caracterizados por certas propriedades comuns: a capacidade de curtir couro (BRUNETON, 1991).

Taninos são metabólitos secundários de plantas superiores, conhecidos pela capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas. Por este 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 e 3000 Daltons (SANTOS; MELLO, 2003). Os complexos com os alcalóides, como no caso da cafeína, ocorrem através de pontes de hidrogênio entre as metilas ligadas ao nitrogênio da cafeína e as hidroxilas aromáticas dos taninos. Essas associações ocorrem, preferencialmente, quando existe a presença de grupos galóilas, como no caso dos taninos hidrolisáveis ou nos condensados galóilados (HASLAM, 1998).

A importância dos taninos nas plantas encontra-se relacionada à defesa da mesma contra predadores animal ou microbiano. Os taninos causam diminuição da palatabilidade, dificuldades na digestão pela complexação com enzimas e/ou proteínas, impedindo assim a invasão dos vegetais por parasitas (BATE-SMITH, 1973).

Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Estruturalmente taninos condensados são mais complexos que taninos hidrolisáveis. (SANTOS; MELLO, 2003).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto os taninos condensados ocorrem amplamente em Gimnospermas e Angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos as Choripetalae das dicotiledôneas e não foram encontrados nas Sympetalae (SANTOS; MELLO, 2003).

Tanto taninos condensados, quanto hidrolisáveis, possuem características comuns em maior ou menor grau: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante, sequestradores de radicais livres e capacidade de se complexar com macromoléculas, incluindo proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Taninos condensados são oligo ou poliésteres de um açúcar (ou de um poliol relacionado), sendo que o açúcar geralmente é a glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico e denominados galotaninos. Os elagitatinos são formados pela hidrólise ácida de ligações éster de galotaninos que possuem acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico. São característicos das angiospermas dicotiledôneas, principalmente das subclasses Rosidae,

Dileniidae, Hamamelidae, com exceção da família Asteridae, onde não são normalmente encontrados (SANTOS; MELLO, 2003) (Fig. 6).

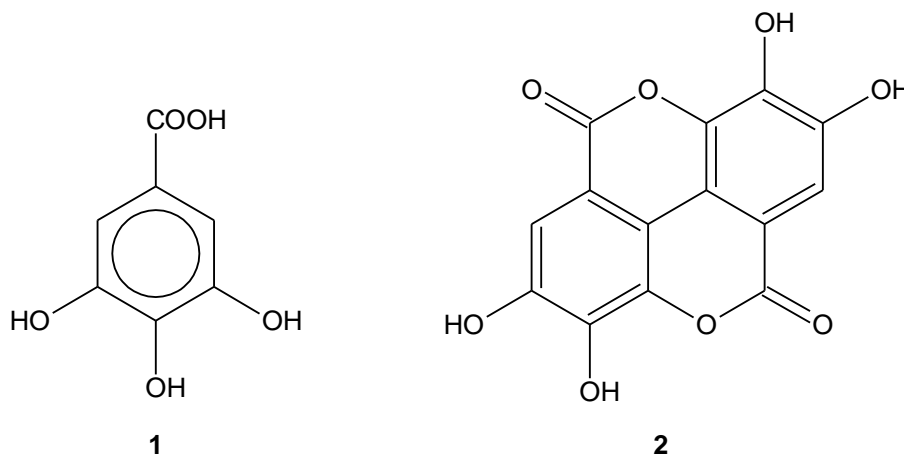


Figura 6 - Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis: 1. ácido gálico; 2. ácido elágico.

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. São também denominados 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 bastantes comuns, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002). Produzem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido mineral diluído à quente (SANTOS; MELLO, 2003).

Muitos trabalhos desde então avaliaram as propriedades químicas das leucoantocianidinas e proantocianidinas. Nesses, foram demonstrados que os principais responsáveis pelas atividades biológicas são, respectivamente, flavan-3,4-diol e flavan-3-ol, além de seus derivados oligoméricos (WEINGES et al., 1969).

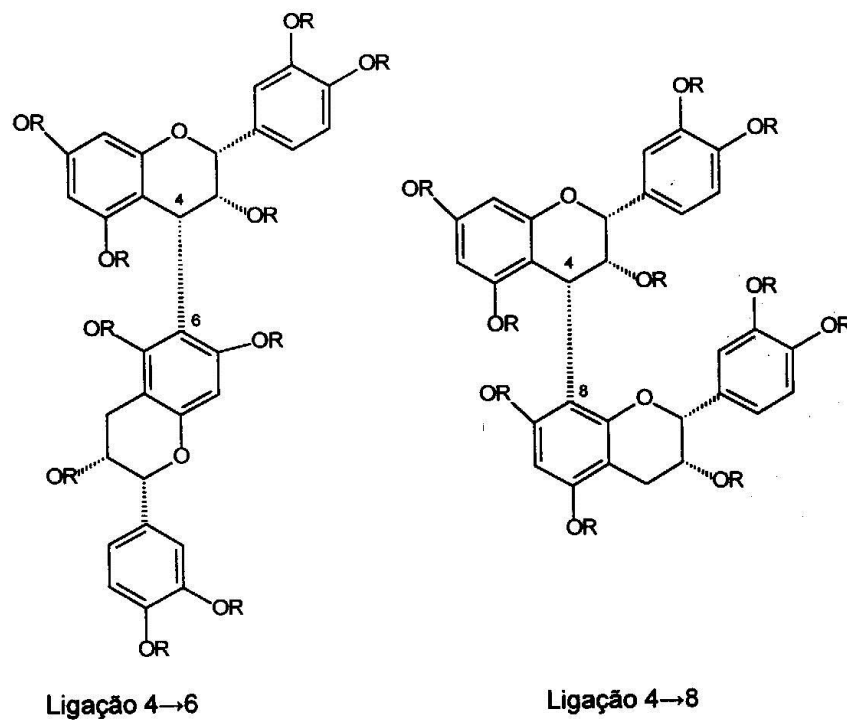


Figura 7 - Exemplos de proantocianidinas diméricas do tipo B.

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.

Diversos frutos possuem taninos em sua constituição: *Vitis* spp L. (uva), *Malus pumila* Mill. (maça), *Rubus manogyna* L. (framboesa), *Vaccinium oxycoccus* L. ("cranberries"). Entre bebidas, as comumente utilizadas são: *Coffea* spp L. (café), *Camellia sinensis* L. Kuntze (chá verde); entre os cereais: *Hordeum* spp L. (cevada), *Vicia* spp L., *Pisum* spp L. (ervilha), *Brassica napus* L. (mostarda) (PRICE; BUTLER, 1980).

Os taninos condensados podem ser divididos em tipo 1 e tipo 2, de acordo com a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A (Fig. 8; Tab. 1).

Podem também ser classificados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos, conforme Santos e Mello (2003).

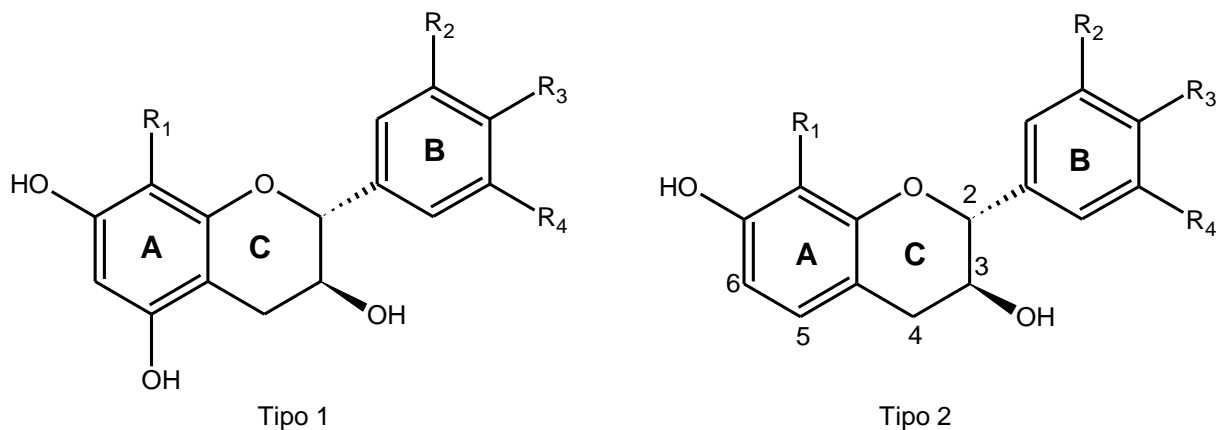


Figura 8 – Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com a tabela 1.

Tabela 1- Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos.

Tipo	Proantocianidina	Monômero Nome trivial	Substituinte			
			R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargonidina	Afzelequina	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	Ortina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

Fonte: Santos; Mello, 2003.

Os diferentes grupos possuem diferentes reatividades. As procianidinas são diferentes das prodelfinidinas porque as últimas possuem um grupamento OH a mais no anel B, a qual aumenta a habilidade dos taninos em se complexar com proteínas (AERTS et al., 1999).

Acoplamentos oxidativos entre monômeros de flavonóis (formando dois dímeros) são comuns entre as posições 4 e 8, embora possa, também, ocorrer nas posições 4 e 6, entre as unidades superior e inferior, respectivamente, formando o tipo B das proantocianidinas. Entretanto, no tipo A das proantocianidinas a forma de acoplamento é diferenciada, possuindo uma ligação do tipo éster (SCHOFIELD et al., 2001).

A nomenclatura trivial de taninos condensados tem origem em Weinges et al. (1968a e 1968b) e em Thompson et al. (1972).

A nomenclatura trivial ou mesmo a IUPAC, não se mostra prática para estruturas complexas como os taninos condensados, desta maneira, utiliza-se a nomenclatura proposta por Hemingway et al. (1982) na qual os nomes são formados a partir da estrutura básica dos flavan-3-óis. A estereoquímica usual dos flavan-3-óis no carbono 2 é R; enquanto que, nas estruturas com configuração 2S aplica-se ao nome trivial o prefixo *enantio*, que se abrevia por *ent*. Desta maneira, (+)-catequina é chamada de catequina e (-)-catequina, é denominada *ent*-catequina. Nos dímeros, trímeros e oligômeros superiores, é utilizada nomenclatura semelhante ao dos açúcares, em que a posição da ligação e a disposição espacial da ligação são descritas entre parênteses. As ligações entre os monômeros no C-4 é indicada pela nomenclatura α ou β (SANTOS; MELLO, 2003).

Segundo Hagerman (1992), a presença de ésteres de galato, pode mudar consideravelmente as propriedades biológicas dos taninos.

Hatano et al. (2002) isolaram e identificaram proantocianidinas glicosiladas a partir de sementes de cacau (*Teobroma cacao* L., Sterculiaceae). Bennie et al (2002) isolaram um dímero raro do tipo C4(C) \rightarrow C5(D) [(oritina-(4 α \rightarrow 5)-epioritina-4 β -ol], da *Acacia galpinii* Burt Davy e de *Acacia caffra* (Thunb) Willd.

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos taninos foram observadas por Haslam et al. (1989), assim como o princípio da adstringência e da cicatrização

Os taninos podem formar complexos com proteínas (Fig. 9 e 10) de forma reversível (pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) 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 (SANTOS; MELLO, 2003). Esse mesmo tipo de ligação promove a produção de couro em curtumes.

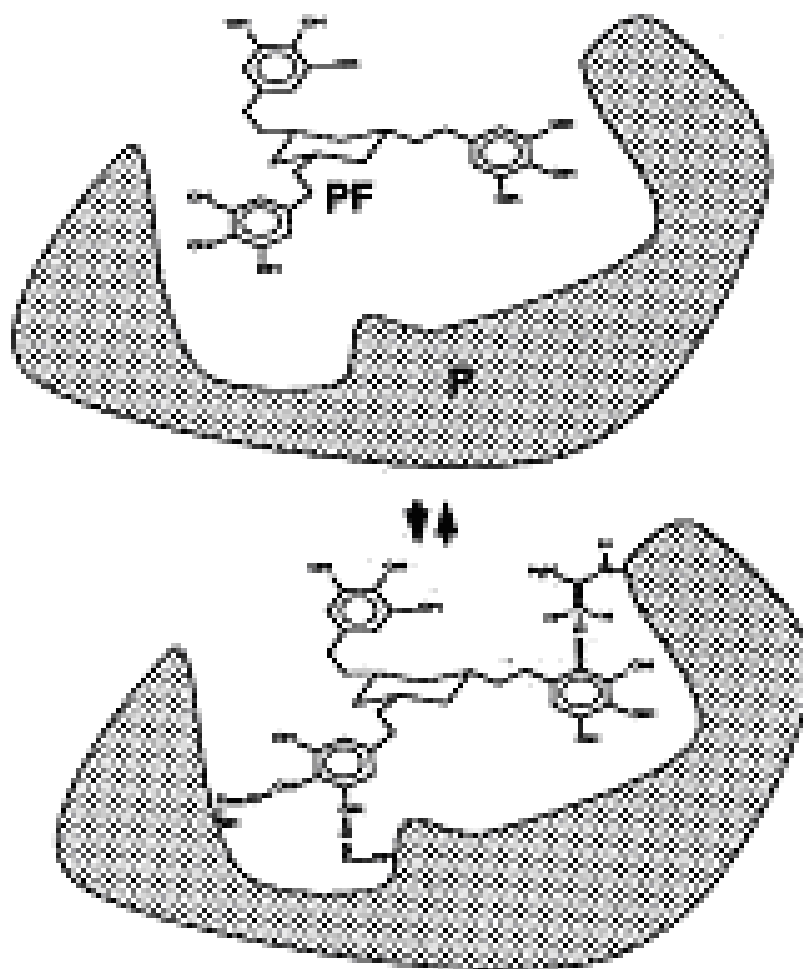


Figura 9- Associação polifenol-proteína (HASLAM et al., 1989).

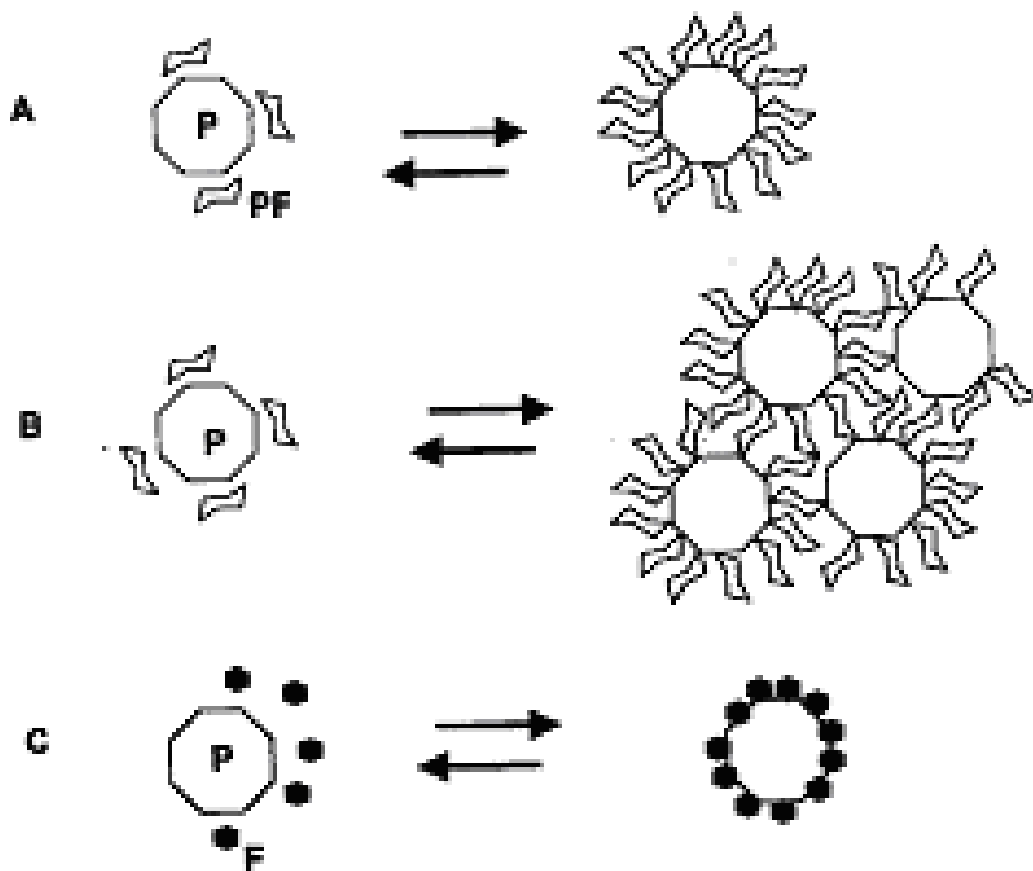


Figura 10 - Precipitação do complexo polifenol-proteína – P- proteína; PF- polifenol; A- baixa concentração de proteínas; B- alta concentração de proteínas; C- interação proteína-polifenol (HASLAM et al., 1989).

3.5 Propriedades biológicas dos taninos

3.5.1 Atividades farmacológicas e toxicológicas

Há muito o barbatimão vem sendo empregado pela população nativa para diversas finalidades (TOLEDO, 2002).

O extrato chamado *córtex adstringens brasiliensis*, composto pelos vegetais: *Stryphnodendron barbatimao* Mart., *Piptadenia colubrina* (Vell.) Benth., *Pithecellobium avaremotemo* Mart. e *Mimosa verrucosa* Benth. vem sendo 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) demonstraram ação cicatrizante da infusão das cascas de *S. barbadetiman* (Velloso) Martius, utilizando camundongos depilados no dorso, em áreas delimitadas, onde se praticaram incisões. Esta atividade foi confirmada por Neves et al (1992), no extrato aquoso das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.

Sanches (2004) e Lopes (2003) evidenciaram ação cicatrizante, através do aumento significativo da proliferação celular epitelial nas feridas de ratos tratados com pomadas contendo extrato bruto ou acetato de etila a 2,5%, obtido das cascas de *S. obovatum* e *S. polyphyllum*, respectivamente, em relação à fração aquosa.

A capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* a partir de extratos brutos das cascas de *S. adstringens* foi demonstrada por Bersani-Amado et al. (1996).

Sanches et al. (2004) avaliaram atividade antimicrobiana de extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., tendo sido demonstrado resultado positivo frente a bactéria *Staphylococcus aureus* com uma CIM de 62,5 µg/ml.

Toledo (2002) também evidenciou atividade antimicrobiana frente a bactérias gram negativas e gram positivas, de subfrações do extrato acetato de etila de *S. adstringens* (Mart.) Coville, constatando que os monômeros e dímeros isolados neste trabalho, não demonstraram mesma atividade.

Tokarnia et al. (1998) avaliaram o aborto em vacas provocado pela intoxicação induzida através da ingestão de favas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. Foram observados os seguintes sintomas: diminuição de apetite, diminuição da atividade ruminal, sialorréia, dificuldade em se levantar, andar desequilibrado, tremores musculares, emagrecimento e três das sete vacas avaliadas tiveram aborto, após 20-30 dias.

Audi et al. (1999) avaliaram o potencial antiulcerogênico de extrato bruto e frações semipurificadas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville em ratos obtendo resultados positivos significativos, confirmando estudos anteriores de Neves et al. (1992a e 1992b) e Lima et al. (1998).

Martins et al. (2002) demonstraram significativa ação antiulcerogênica do extrato bruto e frações semipurificadas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville avaliando o potencial da atividade de inibição da secreção gástrica ácida durante o experimento de estresse térmico em ratos.

O extrato metanólico das cascas de *S. adstringens* sobre o ciclo estral de ratas foi avaliado, onde observaram um efeito desregulador em ratas que receberam doses de 200, 400, 800 mg/kg por via oral. A uréia também foi avaliada havendo uma redução em seus níveis, sugerindo um efeito do extrato em nível renal (OLIVEIRA et al., 2002).

Herzog et al. (2002) avaliaram a atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e constataram uma redução significativa no número de parasitas de *Tripanossoma cruzi* no sangue.

Costa et al. (2002) estudaram o efeito da infusão de barbatimão nas células vermelhas sanguíneas e em proteínas plasmáticas com tecnecium 99 m (Tc-99m). Estas células foram tratadas e avaliou-se a porcentagem de radioatividade nas amostras. A infusão de barbatimão diminuiu a labelidade de células vermelhas sanguíneas devido ao potencial redutor e também por formar quelatos com íons estanho.

Baurin et al. (2002) avaliaram a atividade antitirosinase de *S. barbatimao* Mart., demonstrando uma redução de 90% na inibição da tirosinase *in vitro*. O resultado foi semelhante àquele obtido com a referência, utilizando o cogumelo *Morus alba*, que inibiu a atividade da tirosinase em 97%. Este resultado foi muito interessante, já que o gênero não revelou a presença de compostos naturais

descritos como inibidores da atividade da tirosinase. Outras pesquisas em melanócitos humanos são necessárias para confirmar estas atividades.

Atividade anticonvulsivante foi demonstrada nos estudos de Souza et al. (2002), em experimento com convulsões induzidas por pentilenotetrazol utilizando extrato etanólico de *S. coriaceum* Benth.

Atividade antiinflamatória foi observada na fração acetona obtida a partir do extrato bruto em metanol das cascas do caule de *S. adstringens*, através de edema induzido nas patas traseiras de ratos (LIMA et al., 1998).

Atividade antileishmanial do extrato de barbatimão (*S. adstringens*) contra formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* foi demonstrada através de estudos de Jorge et al. (1996), confirmada por Toledo (2002), através de ensaios com frações e subfrações de extrato da mesma espécie, com resultados superiores a 80% de inibição. A intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. e estudos anátomo-histológicos em bovinos foram estudados por Brito et al. (2001). Dos 17 bovinos que receberam as favas, cinco morreram. Dos animais que receberam dose única, apenas o bovino que recebeu 60 g/kg morreu. As demais mortes ocorreram nos bovinos que receberam doses repetidas (10 g/kg por 8 dias; 20 g/kg por 3 dias; 30 g/kg por 2 dias e 40 g/kg por 2 dias).

Contrera et al. (1982) estudaram as malformações induzidas pelo extrato de sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth. no embrião de ratas. Os autores concluíram que o peso fetal era reduzido quando comparado ao grupo controle, além de crescimento retardado e disfunção nos sistemas nervoso e ósseo.

Rebecca et al. (2002) estudaram a toxicidade aguda do extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, após administração oral, em camundongos. A DL₅₀ encontrada foi de 2699 mg/kg. A administração crônica de extrato nas concentrações de 800 a 1600 mg/kg, por 30 dias, provocou diminuição no peso corpóreo, involução do timo, aumento na glicose plasmática e aspartato aminotransferase, demonstrando um efeito tóxico com a administração crônica de extratos de barbatimão. Esse efeito observado pode ser devido a ação inibitória no metabolismo energético hepático.

Rebecca et al. (2003) realizaram estudos dos efeitos do extrato aquoso total de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no metabolismo de energia hepático de ratos. Os autores observaram que o extrato em estudo prejudica a fosforilação oxidativa (processo que promove liberação de energia livre na forma de ATP), por no

mínimo 3 mecanismos: 1) desacoplamento da fosforilação oxidativa; 2) inibição do fluxo de elétrons pelo canal respiratório; 3) inibição do complexo ATP-sintase.

A excreção renal de água, sódio e potássio foi avaliada em animais submetidos a sobrecarga de solução aquosa de diversas partes de *S. obovatum* (caule, cascas secas e semente em pó). A casca seca provocou intensa antidiurese, enquanto a semente seca provocou diurese com menor intensidade. A excreção renal de eletrólitos não foi alterada, enquanto a solução aquosa de caule seco provocou intensa diarreia nos animais (NETO et al., 1988).

Sanches (2004) e Lopes (2003) evidenciaram atividade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e subfrações de *S. obovatum* e *S. polyphyllum*, respectivamente. Esta atividade foi avaliada pelo método de redução do radical DPPH através da cromatografia em camada delgada.

Segundo Santos et al. (2002), a atividade biológica dos taninos condensados está relacionada com o grau de polimerização. A afinidade por complexação com proteínas ricas em prolina, atividade anti-radical livre e a atividade antiviral são aumentadas pela polimerização. Seu estudo também evidenciou o aumento de algumas atividades biológicas do *S. polyphyllum*, com relação ao *S. adstringens*, pelo primeiro possuir uma quantidade maior de esterificação com ácido gálico em sua estrutura, o que faz aumentar as hidroxilas fenólicas na molécula, modificando o arranjo espacial dos polímeros. Esta modificação no arranjo espacial pode, também, aumentar a seletividade das mesmas por receptores específicos.

3.6 Atividade antioxidante

A etiologia de doenças degenerativas, os radicais livres, e o interesse em substâncias com atividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos devido a descoberta do envolvimento dos radicais livres na fisiopatologia das doenças crônicas (SANTOS; MELLO, 2003).

A autoxidação, reação complexa catalisada por fatores extrínsecos que se inicia com a formação de radicais livres, além de afetar profundamente as características sensoriais de alimentos e medicamentos pelo desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis tornando-os inaceitáveis pelos consumidores, também reduzem o tempo de vida útil dos mesmos. Os produtos da oxidação lipídica podem, ainda, desencadear a peroxidação *in vivo*, resultando em vários problemas de saúde (HALLIWELL, 1996; HASLAM, 1996).

Desde o início da vida no planeta, a toxicidade do oxigênio atmosférico tem sido o principal desafio à sobrevivência dos organismos vivos. O O₂ participa de reações de óxi-redução e é aceptor final de H⁺ no metabolismo normal de mamíferos. As oxidações biológicas geram espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres que podem provocar lesões celulares, muitas vezes irreparáveis (CARVALHO, 2004).

A atividade metabólica normal do organismo humano produz constantemente radicais livres. Estes são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres, ou não pareados, em sua órbita externa. Os elétrons livres destas moléculas fazem com que as mesmas se tornem altamente reativas (CHEESEMAN; STALER, 1996), atacando componentes celulares como DNA e RNA, membrana celular e outras substâncias oxidáveis, acelerando o envelhecimento e, podendo assim, contribuir para a instalação de doenças degenerativas (KLEIN, 2002).

Alguns fatores aumentam o risco de estresse oxidativo na célula, como: fumo, consumo de bebidas alcoólicas, de alimentos salgados, condimentados e contendo toxinas de fungos, radiação ionizante, reações metabólicas envolvendo metais de transição e compostos xenobióticos que entram em contato com o organismo. Os metabólitos vegetais produzidos pelo estresse, também chamados fitoalexinas, que contém grupos hidroxilas e quinonas, são as principais fontes dietária de agentes oxidantes para os animais (CARVALHO, 2004).

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. O radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, ou seja, os elétrons da última camada encontram-se desemparelhados. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (RUSSEL, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

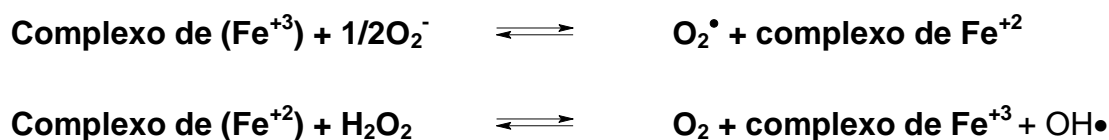
A formação de um radical livre, o superóxido ($O_2\bullet$), é derivado do oxigênio molecular (O_2). O O_2 é composto por dois átomos de oxigênio (O), cujo número atômico é 8, tendo a seguinte distribuição de elétrons: $1s^2, 2s^2, 2p^4$, faltando portanto dois elétrons em sua última camada para adquirir maior estabilidade. Para formar o oxigênio molecular (O_2), os dois elétrons solitários do subnível p, de um átomo de oxigênio, compartilham elétrons com os dois elétrons de outro átomo de oxigênio, formando uma molécula estável com 8 elétrons na última camada (L). Reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular (O_2), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ($O_2\bullet$), considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada L. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxi-redução, portanto, os radicais livres provocam ou resultam desse tipo de reação na última camada (RUSSEL, 1994).

Na formação de radicais livres, a molécula de oxigênio é a grande vilã, por ser relativamente lábil e reagir mais facilmente para formar radicais livres. Não está devidamente esclarecido, mas acredita-se que o oxigênio, na presença de catalisadores como luz visível, radiação ionizante, radiação ultravioleta, temperatura e metais pesados, sejam os iniciadores desta etapa (MELO; GUERRA, 2002).

Radicais livres têm como um dos principais alvos o DNA, sendo que o seu alcance está associado à doenças como o câncer e doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Hodgkin. Em último caso, sob condições fisiológicas, ERO (espécies reativas de oxigênio) podem atacar o DNA na porção açúcar (deoxirribose) ou na sua base (CARVALHO, 2004).

A maioria das reações dos radicais livres envolve a redução do oxigênio molecular levando à formação de ERO como o ânion superóxido ($O_2\bullet$) e radical hidroxila ($OH\bullet$). Em geral, as espécies ativas de oxigênio são essenciais para muitas funções celulares, contribuindo para o envelhecimento e doenças degenerativas.

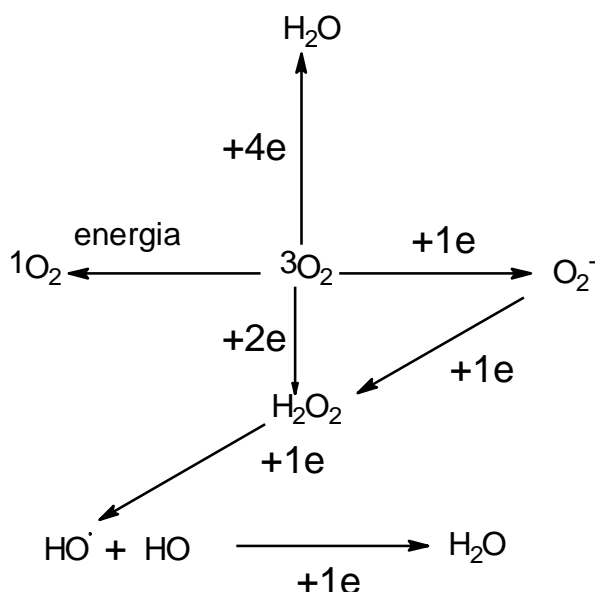
Assim, a proteção dos componentes celulares contra as modificações oxidativas pode ser estabelecida com o uso de antioxidantes (CARDOSO, 2004). A união O-O do peróxido de hidrogênio é relativamente lábil e pode ocorrer sua decomposição, formando o radical (OH•), sendo altamente reativo. Essa reação é conhecida como reação de Haber Weiss. Sua velocidade é grandemente favorecida, pela presença de íons ferro (Fe⁺³) e cobre (Cu⁺²). Por outro lado, o íon férrico pode ser reduzido a íon ferroso pelo radical superóxido e pela “via de Fenton”. Em presença de H₂O₂ é oxidado novamente a íon férrico, com a formação de um radical hidroxila (OH•) (GUERRA; FANAN, 1994) (Esquema 1).



Esquema 1 - Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton.

Fonte: Guerra e Fanan, (1994).

A molécula de oxigênio pode também, absorver energia, passando para um estado excitado de maior energia, formando o oxigênio singlete, tendo um poder oxidante maior que o oxigênio triplete (LLESUY, 2002).



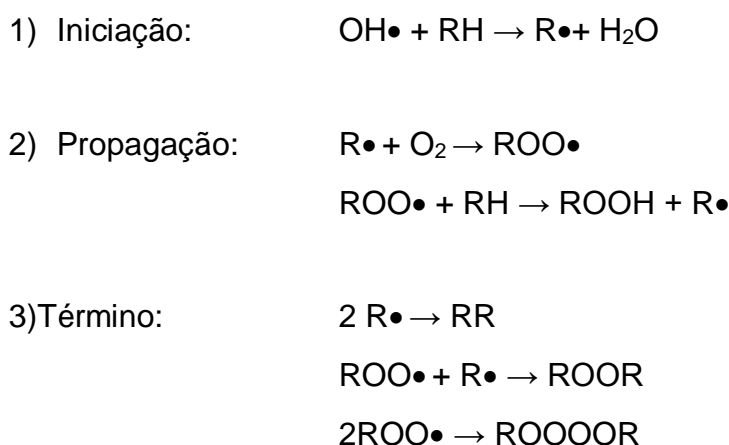
Esquema 2 - Formação das espécies reativas de oxigênio (ERO).

Fonte: Llesuy (2002).

A formação da ERO ocorre pela mitocôndria, tratando-se de um processo fisiológico contínuo que ocorre em condições anaeróbicas e por enzimas envolvidas em reações de óxido-redução em outros compartimentos celulares. Tem sido estabelecido que cerca de 1-2% do oxigênio consumido pela mitocôndria sofre redução univalente, produzindo o ânion superóxido ($O_2\bullet$) em nível da coenzima Q e do complexo NADH-CoQ redutase (CARDOSO, 2004).

Além das espécies reativas de oxigênio, outros radicais livres estão envolvidos nos processos biológicos, tais como: complexo de metais pesados de transição (Fe^{+3}/Fe^{+2}) e (Cu^{+2}/Cu^{+}), radicais de carbono (triclorometil), radicais de enxofre (tiol), radicais de nitrogênio (fenildiazina e óxido nítrico) (SOARES, 2002).

Muitas são as alterações causadas por estes radicais, a peroxidação lipídica, por exemplo, é uma reação de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, afetando sua integridade estrutural e funcional, alterando sua fluidez e permeabilidade. Abrange três etapas: a iniciação, propagação e terminação. Na etapa da iniciação, o radical hidroxila ($OH\bullet$) é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno. A formação deste radical dá início à etapa de propagação, por combinar-se com o O_2 , formando radicais peróxido. Este, por sua vez, é capaz de retirar um hidrogênio de outra molécula de lipídio, dando continuidade da reação em cadeia. O término da reação pode ocorrer por diferentes caminhos (MELO; GUERRA, 2002), conforme pode ser observado no esquema 3



Esquema 3 - Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados.
Fonte: Melo e Guerra (2002).

Os radicais livres podem, também, provocar modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, cross linking, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas. A reação de radicais livres com ácidos nucleicos também foi observada, gerando mudanças em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações cromossômicas (SOARES, 2002). Pode-se citar também, a ação tóxica resultante de altas concentrações de íon superóxido e peróxido de hidrogênio (HALLIWELL et al., 1996).

O organismo humano dispõe de um mecanismo de defesa formado por diferentes antioxidantes (superóxido dismutase, “glutation”, catalase) e outros como vitamina E, ácido ascórbico, betacaroteno, que provêm da dieta alimentar (HASLAM, 1996).

Algumas vezes, estas substâncias não conseguem deter de maneira eficaz os radicais livres, dizendo-se portanto que o organismo encontra-se em estado de estresse oxidativo, o qual representa um aumento na concentração de radicais livres, por diminuição das defesas orgânicas, por elevação da produção de radicais livres ou a combinação das duas condições (LLESUY, 2002).

Todos estes problemas relacionados com os radicais livres têm levado a inúmeras pesquisas, na tentativa de se encontrar substâncias comprovadamente antioxidantes, que poderiam minimizar os efeitos relatados.

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação. Podem ser sintéticos ou naturais, de acordo com a origem. Agem em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo significativamente, a oxidação do mesmo (HALLIWELL et al., 1996).

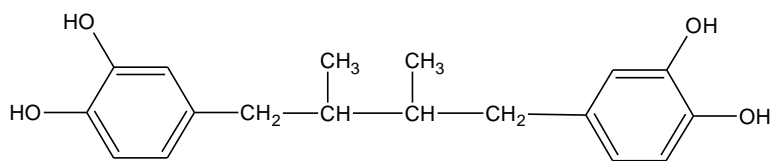
Os antioxidantes verdadeiros (primários) agem interrompendo a cadeia da reação através de doação do elétron ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em compostos estáveis. Vários antioxidantes agem desta maneira como: butilhidróxianisol, butilhidróxitolueno, ésteres do ácido gálico, *t*-butilhidroquinona, tocoferol e flavonóides. Os antioxidantes secundários agem retardando a etapa da auto-oxidação por diferentes mecanismos que incluem: complexação com metais, seqüestro de oxigênio e decomposição de hidroperóxidos (GORDON, 1990).

3.6.1 Antioxidantes naturais

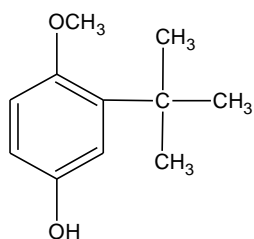
O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais têm aumentado, principalmente, para prevenir a deterioração de alimentos e para minimizar o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos têm diminuído devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos. O papel de antioxidantes dietários e seus benefícios para a saúde tem atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente, os extraídos de plantas (CARVALHO, 2004).

Na década de 80 teve início o interesse pelos antioxidantes naturais, mais precisamente os de origem vegetal, devido aos estudos que comprovaram os efeitos tóxicos de doses elevadas de antioxidantes sintéticos (butilhidróxitolueno, butilhidróxianisol e *t*-butilhidroquinona). Efeitos sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático foram observados (DURAN, 1993).

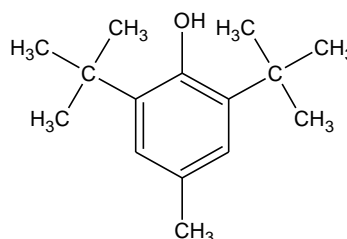
A maioria das substâncias naturais, com exceção do tocoferol, deve sua ação antioxidante à presença de hidroxilas fenólicas. A maioria dessas substâncias, possui grupos funcionais ativos na posição *orto*, enquanto nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, mas, não possuindo por este motivo, mudança na ação dos mesmos (Fig. 11).



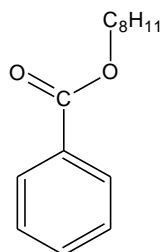
ÁCIDO NORDIHIIDROGUAIIARÉTICO (NDGA)



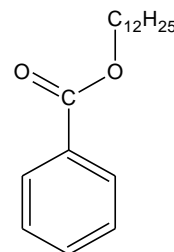
BUTILHIIDRÓXIANISOL (BHA)



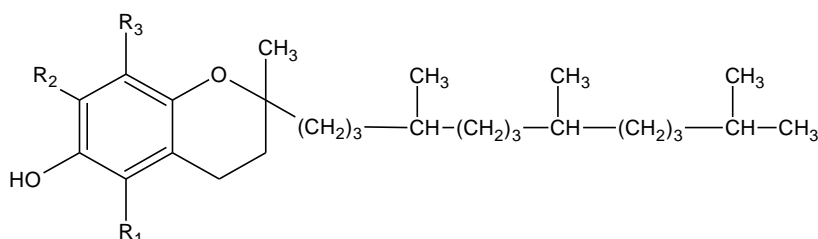
BUTILHIIDRÓXITOLUENO



GALATO DE OCTILA



GALATO DE DODECILA



FÓRMULAS GERAIS DOS TOCOFERÓIS (VITAMINA E)

Figura 11 – Exemplos de antioxidantes sintéticos e naturais.

Estudos recentes mostram que vários extratos de plantas exercem ação antioxidantes. A partir da perspectiva do valor potencial dos antioxidantes, os pesquisadores buscam substâncias naturais com potente atividade antioxidante e baixa toxicidade (CARVALHO, 2004).

Várias substâncias de origem vegetal têm sido apontadas como antioxidantes. Recentemente, o interesse por elas aumentou muito. Assim, o uso terapêutico de antioxidantes requer que sejam determinados seus efeitos sobre diferentes

moléculas biológicas, por isso, muito embora extratos de plantas tenham sido consagrados pelo uso, é necessário que trabalhos científicos analisem tais propriedades (CARVALHO, 2004).

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes contra os danos moleculares causados por ERO. As substâncias fenólicas compreendem o principal grupo de antioxidantes de origem vegetal (CARVALHO, 2004).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SANTOS; MELLO, 2003), e a ação engloba tanto a etapa da iniciação quanto a de propagação (SOARES, 2002).

3.6.2 Substâncias fenólicas e atividade antioxidante

Todos os taninos apresentam atividade antioxidante, principalmente a de inibição da oxidação de ácido ascórbico catalizada por cobre II. Já o ácido elágico, derivado obtido da condensação de duas unidades de ácido gálico, demonstra apresentar inibição da peroxidação lipídica nos microssomas de fígado de ratos numa concentração de 5×10^{-4} mol l⁻¹ além de apresentar atividades antimutagênica e anticarcinogênica (CARVALHO, 2004).

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis. Por exemplo, nas seguintes situações: o bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas; o bloqueio da lipoxigenase em leucócitos; o bloqueio da xantinoxidase e a repressão da formação de radicais de ânion superóxido assim como dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Dessa forma os taninos teriam uma possível importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos (SHOLZ, 1994).

A epicatequina, via oral, demonstrou promover aumento da atividade das defesas antioxidantes no plasma de ratos, comparados com o controle. Esse estudo faz parte da pesquisa sobre a atividade antioxidante de taninos de *Hamamelis virginiana* L. para determinação da atividade antioxidante realizada por Masaki et al. (1994).

O estudo realizado por Desmarchelier et al. (1998) com *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., demonstrou efetiva atividade antioxidante e anti-radica

livres, tanto no extrato aquoso como no metanólico. A microalga *Spirulina maxima*, muito usada na alimentação como suplemento alimentar por ser constituída por proteínas, minerais, vitaminas e compostos fenólicos apresentou atividade antioxidante, segundo Miranda et al. (1998).

Moreira et al. (2002), observaram atividade antioxidante *in vitro* de frações isoladas de *Pseudopiptadenia contorta* Rauschert, contendo ácido gálico, epicatequina e galatos de catequina.

Osakabe et al. (2000) e Hatano et al. (2002) estudaram o extrato de sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.), apresentando efeito antioxidante devido as proantocianidinas presentes no extrato. Negro et al. (2003), obtiveram o mesmo resultado com as proantocianidinas isoladas do vinho.

No trabalho realizado por Oliveira et al. (2002), a atividade antioxidante da quercetina foi relatada como moduladora das espécies reativas de oxigênio (EROs), por células fagocitárias em lesões crônicas, coincidindo com as afirmações de Fernandez et al. (2002).

Fenglin et al. (2004) em seu trabalho com extrato metanólico das folhas frescas de 300 plantas medicinais chinesas, encontraram 56 espécies, ricas em taninos e flavonóides, com grande capacidade de seqüestro de radicais livres.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros.

Pietta (2000) em sua revisão sobre flavonóides como antioxidantes, faz referência ao trabalho de Bors et al. (1990) os quais afirmam que as propriedades antioxidantes destes compostos dependem da estrutura e dos substituintes nos anéis heterocíclico e B.

Antolovich et al. (2002), em uma revisão sobre os métodos para testar atividade antioxidante, afirmam que os diferentes ensaios podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*, sendo necessário para o desenvolvimento dos mesmos estabelecer modelos de indução de oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo antioxidante ou sua extensão.

Observam ainda que a maioria dos ensaios utiliza o envolvimento da oxidação acelerada, os quais envolvem a adição de um agente iniciador (temperatura, agitação, pressão parcial de O₂, metais de transição, exposição à luz) e uma fonte

de radicais livres específica. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação ou sua extensão é medido.

Cada método possui uma forma de expressar o resultado de forma direta ou indireta, através da medida da razão ou extensão de: a) decréscimo do substrato ou pesquisa do consumo de oxigênio; b) formação de produtos de oxidação ou c) formação ou decréscimo de pesquisas de radicais livres.

3.6.3 Métodos para avaliação de atividade antioxidante

Existem diversas metodologias disponíveis para detectar a capacidade antioxidante.

O método de seqüestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) tem sido extremamente utilizado para avaliar a atividade de seqüestro de radicais livres de antioxidantes naturais. Vários componentes fitoquímicos (flavonóides, fenilpropanóides, ácidos fenólicos) são conhecidos pela sua capacidade antioxidante em frutas e vegetais. O seqüestro de radicais livres é geralmente tido como o responsável por inibir a peroxidação lipídica (PELATTI et al., 2003).

Este ensaio é baseado na redução de uma solução alcoólica de DPPH, na presença de um doador de hidrogênio (antioxidante), devido a formação de uma forma não radical livre (DPPH-H) (Fig. 12)

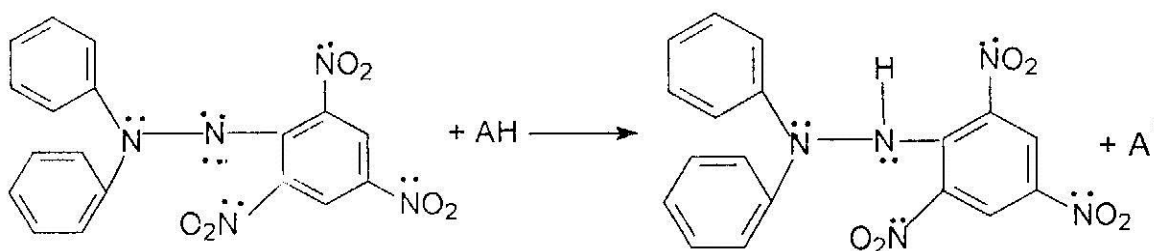


Figura 12 – Estrutura do DPPH•: radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e reduzido (difenil picrilhidrazina).

Fonte: Brand-Willians et al. (1995).

O DPPH• remanescente é medido a 517 nm após 30 min. O decréscimo da absorvância corresponde inversamente à atividade de seqüestro do radical livre da amostra, acompanhada simultaneamente de mudança de coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto oxidado (PELLATI et al., 2003).

O método é simples, rápido e sensível, utiliza reagentes de custo relativamente baixo e não faz uso de instrumentos sofisticados.

Os mecanismos de reação entre os compostos fenólicos e o DPPH foram descritos por Brand-Willians et al. (1995) e parece envolver, de forma isolada ou combinada, a dimerização por acoplamento oxidativo de dois radicais formados, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH e, por último um radical de DPPH pode se estabilizar com um radical aril (Fig. 13).

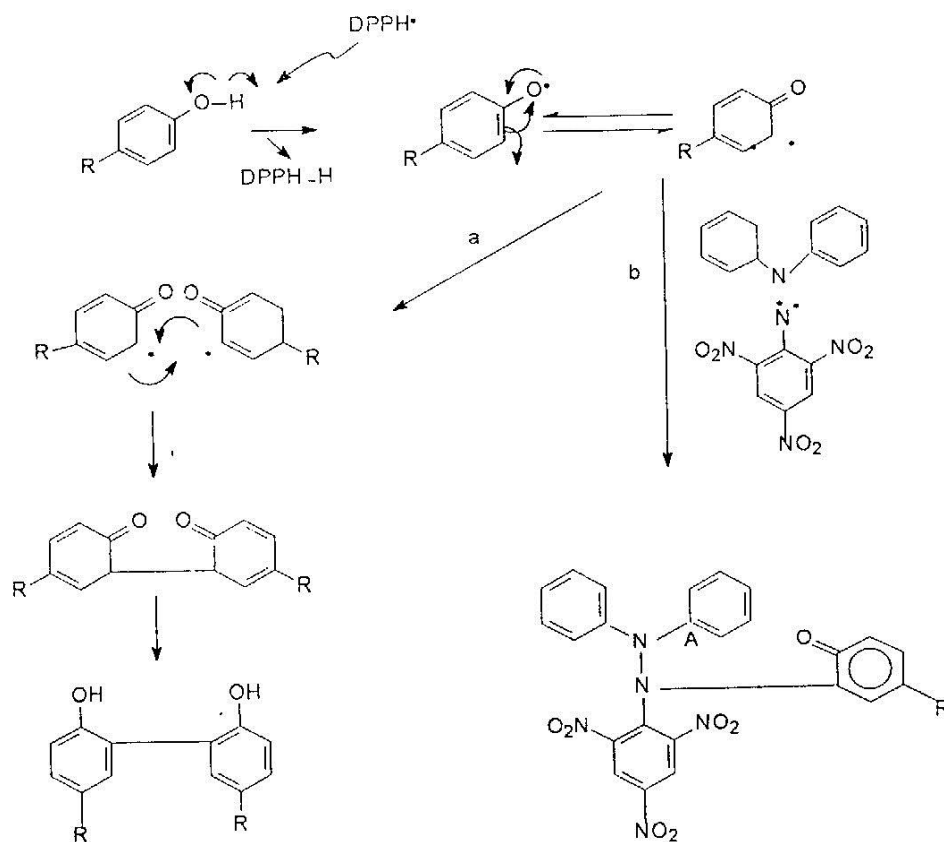


Figura 13 – Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas (a= dimerização e b= estabilização de um radical DPPH).

Fonte: Brand-Willians et al. (1995).

A forma de expressar os resultados como a capacidade de sequestrar/reduzir o radical DPPH, pode ser apresentada de formas variadas, dificultando as comparações. Pode-se expressar os resultados em forma de porcentagem (HOLLEY; CHEESEMAN, 1993; LU; FOO, 2001; CHOI et al., 2002), pelo valor de IC₅₀, a qual mede a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, e também, pelo poder antioxidante ou anti-radicalar, o qual expressa a relação inversa da IC₅₀ (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

Outro método freqüentemente usado para avaliar a capacidade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio, o qual baseia-se na redução do Mo⁺⁶ para Mo⁺⁵ com subsequente formação de um complexo fosfato-Mo⁺⁵. Em contraste com o método do DPPH• acima descrito, esta reação se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado (PRIETTO et al., 1999).

4 METODOLOGIA

4.1 Droga vegetal

As cascas do vegetal *Stryphnodendron obovatum* Benth. foram coletadas no dia 08 de fevereiro de 2003, no Instituto Florestal, na cidade de Assis, estado de São Paulo (S: 22°34'37,3" ;W: 50°24'33,3" ; h:545 m).

Após o processo de herborização, preparou-se uma exsicata que se encontra depositada como documento taxonômico no Herbário, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, sob o número HUM 9972. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, por comparação com o tipo nomenclatural.

As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 35 °C durante 24 h. Posteriormente foram deixadas para secagem à sombra, em temperatura ambiente (24 ± 3 °C) em local arejado. Após a secagem, o material foi moído em moinho de martelos (Tigre ASN5).

4.2 Solventes, soluções e reagentes

Para a realização dos experimentos foram empregados reagentes com grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas Mallinckrodt® , Merck® ou Sigma®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetona deuterada Isotec®
- Ácido acético glacial
- Ácido clorídrico concentrado
- Ácido clorídrico 2 mol l⁻¹
- Ácido clorídrico 6 mol l⁻¹
- Ácido fórmico
- Álcool n-propílico
- Amônia
- Anidrido acético
- BHT (butil-hidróxi-tolueno)
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado Isotec®
- Etanol
- Éter etílico
- Gel de sílica com gesso preparativa F₂₅₄
- Hidróxido de potássio
- Magnésio em pó
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec®
- Nitrato de prata amoniacal
- Placas cromatográficas de gel de sílica F₂₅₄ , 0,200 μm espessura - Merck®
- Piridina
- Pó-de-pele R, Freiberg, Alemanha
- Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteau 2 mol l⁻¹ , Laborclin
- Solução de carbonato de cálcio
- Solução de DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazila) 1 mmol l⁻¹ em metanol
- Solução metanólica de cloreto férrico 1%

- Tolueno

4.3 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento – Fisatom 752A
- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear – Varian Mercury Plus 300BB
- Aparelho de ultrassom – Unique USC cleaner 1540, 25 kHz
- Balança analítica AND HR-200
- Balança semi-analítica Marte AI-500
- Balança analítica Ohaus MB-200 com sistema de secagem por infravermelho.
- Banho-maria – Marte MB
- Bomba de vácuo – Ibav BRD4
- Câmara de ultravioleta 365 nm – Germetec
- Coletor de frações – ISCO Modelo 328
- Coletor de frações – Pharmacia Biotech FRAC-200
- Cromatógrafo de contra-corrente de alta velocidade P. C. Inc., equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm; capacidade de 285 ml – sample injetor P. C. Inc., com loop de 10 ml
- Espectrofotômetro Varian UV/VIS Cary 1 e
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quatro LCZ MICROMASS (Manchester, UK)
- Estufa de secagem e esterilização – Fanem 315 SE
- Evaporador rotatório Büchi R-114, R-153
- Liofilizador Christh Alpha 1-2
- Moinho de martelos Tigre mod. ASN-5
- Ultra-turrax UTC115KT

4.4 Análise quantitativa

4.4.1 Determinação do teor de taninos totais

Cerca de 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesada, foram transferidos para um erlenmeyer com 150 ml de água e deixada durante 30 min em banho-maria a uma temperatura de 80-90 °C. Após o resfriamento do erlenmeyer em água corrente, seu conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, lavando-se e completando-se o volume com água. Tomou-se cerca de 80 ml do extrato e filtrou-se através de papel filtro, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido é denominado Solução-Mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Foram transferidos 2 ml dessa solução com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm empregando-se a água como branco.

Para a determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para um béquer e agitados durante 60 minutos. Após, a solução foi filtrada e 5 ml do filtrado foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Foram transferidos 2 ml dessa solução com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extrações e diluições) foram realizados sob proteção da ação da luz direta (GLASL, 1983).

A porcentagem de taninos totais foram calculados segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625 \times Abs.}{1000 \times m}$$

$$PNA = \frac{15625 \times Abs.}{1000 \times m}$$

$$TT = PT - PNA, \text{ onde:}$$

PT= Polifenóis totais (%)

PNA= Polifenóis não adsorventes

Abs= Absorvância medida

m= Massa da droga (g)

TT= Teor de taninos totais

4.5 Análises físico-químicas

4.5.1 Determinação da perda por secagem

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal fresca foram colocados para secar à temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante.

Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentualmente, através da média de três determinações (FARMACOPÉIA, 2000).

4.5.2 Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica da marca Ohaus MB-200 com sistema de secagem por infravermelho.

Cerca de 5 g da droga vegetal moída foram exatamente pesadas, em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas por 30 min à temperatura de 110 °C, com intervalo de 15 min entre cada determinação, tempo necessário para o resfriamento da balança. O resultado foi calculado em relação a 100 g de droga, pela média de cinco determinações (CARDOSO, 2002).

4.5.3 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da droga vegetal seca e moída, exatamente pesada, foi submetida a decocção com 100,0 g de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado a 100,0 g. A solução foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20 ml desprezados. Deste filtrado foram pesados uma alíquota equivalente a 20,0 g em pesa-filtro previamente tarado e evaporado até a secura em banho de

água, sob agitação constante. O resíduo foi levado à balança de infravermelho à temperatura de 110 °C durante 10 min e pesado (FARMACOPÉIA, 2000).

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m} \quad \text{onde,}$$

TE = teor de extrativos (% m/m)

g = massa resíduo seco (g)

m = massa da amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

4.6 Análise fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica foi realizada em triplicata conforme Harborne (1998).

4.6.1 Teste de espuma (saponinas)

Foram transferidos 0,5 g da droga pulverizada em um tubo de ensaio e tratados com 10,0 ml de água destilada quente. Após o resfriamento, foi agitado vigorosamente por 10 s. Na presença de saponinas forma-se um anel de espuma, persistente por um mínimo de 15 min e que não desaparece com a adição de algumas gotas de ácido clorídrico 2 mol l⁻¹.

4.6.2 Cumarinas

Aqueceu-se a 100 °C, durante 10 min, o pó do vegetal estabilizado numa câmara de microsublimação (os sublimados devem aparecer sob a forma de gotas incolores na câmara de microsublimação, ou cristais acidulares). Caso ocorra a presença de sublimados, esses devem ser dissolvidos com 0,5 ml de metanol,

lançando-se numa folha de papel de filtro e quando seco, deve ser colocado em cima uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio, cobrindo-se a metade da mancha com papel preto e expondo-o às radiações ultravioletas.

A metade exposta adquire, pouco a pouco, fluorescência verde, em caso de reação positiva, que aparece ao final do primeiro minuto. Repetiu-se o procedimento com a outra parte descoberta para confirmação do resultado.

4.6.3 Fenólicos simples

Pulverizou-se a droga vegetal numa argola de vidro com HCl 6 mol l⁻¹ cobrindo-se com lâmina. A lâmina inferior foi colocada sobre a chapa quente até a formação de sublimado. Esperou-se a formação de condensado na lâmina superior e tratou-se com algumas gotas de AgNO₃ amoniacal. Reação positiva forma precipitado negro.

4.6.4 Compostos antracênicos livres

Agitou-se cerca de 0,2 g de pó com 5,0 ml de éter. Deixou-se em repouso para decantar. Transferiu-se para um tubo de ensaio a camada etérea, adicionou-se cerca de 1,0 ml de amônia diluída e agitou-se. A camada aquosa corada de róseo é indicativo da presença de compostos antracênicos livres.

4.6.5 Flavonóides

Evaporou-se 5,0 ml de um extrato etanólico a 20% em cápsula de porcelana em banho-maria até a secura. Dissolveu-se em álcool (etanol absoluto) e colocou-se em tubo de ensaio. Adicionou-se 200 mg de magnésio em pó e 1 ml de HCl concentrado, lentamente, e deixou-se reagir durante 15 min. O desenvolvimento de coloração rósea ou vermelha indica a presença de substâncias flavonoídicas.

4.7 Preparação de extratos

A preparação de extratos seguiu a metodologia de Mello et al. (1996a) e Toledo (2002).

4.7.1 Extrato total (F1)

As cascas, após secagem e moagem, foram utilizadas sem separação granulométrica. O extrato bruto foi preparado em Ultra-turrax por 20 min, tomando-se o cuidado para que a temperatura não excedesse 40 °C. A proporção utilizada foi de 1:10 (m/v), com solução de acetona-água (7:3; v/v) (CORK; KROCKENBERGER, 1991). A seguir, foi realizada filtração à vácuo e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, com temperatura média de 40 °C, até completa eliminação do solvente orgânico, congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto (F1).

4.7.2 Obtenção da fração acetato de etila (F3)

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

4.8 Métodos cromatográficos

No desenvolvimento desse trabalho foram empregados vários métodos cromatográficos para obtenção de frações semipurificadas e de substâncias químicas com relativo grau de pureza.

4.8.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila (F3)

A fração F3 foi fracionada empregando-se coluna de vidro (h: 750 mm; Ø: 55mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 20%. Vinte gramas da fração acetato de etila (F3), após ser dissolvida em uma pequena quantidade do primeiro eluente, foram adicionados no topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Foi empregada a seguinte seqüência de fase móvel:

- | | | |
|----|-------------------------------------|------------|
| 1. | EtOH 20% | 1,3 litros |
| 2. | EtOH 30% | 2,6 litros |
| 3. | EtOH 40% | 3,1 litros |
| 4. | EtOH 50% | 6,7 litros |
| 5. | EtOH 96% | 3,0 litros |
| 6. | Acetona/H ₂ O (7:3; v/v) | 3,0 litros |

As frações foram recolhidas em tubo de ensaio (10 ml cada) com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento foi realizado através de CCD (seção 4.8.3). As frações obtidas foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até total eliminação do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas (MELLO et al., 1996a).

A coluna, após o processo de separação finalizado, foi limpa com acetona:H₂O (7:3; v/v) e mantida em ácido acético 2%.

4.8.2 Cromatografia em coluna das subfrações

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

1. EtOH 5%
2. EtOH 10%
3. EtOH 15%
4. EtOH 20%
5. EtOH 25%
6. EtOH 30%
7. EtOH 35%
8. EtOH 40%
9. EtOH 45%
10. EtOH 50%

O monitoramento dos tubos foi realizado através de CCD (seção 4.8.3).

4.8.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD das frações obtidas em coluna foi realizada em cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5; v/v/v). Após o desenvolvimento, as placas foram observadas sob luz UV (254 nm) e depois reveladas com solução etanólica de cloreto férrico a 1% (MELLO et al., 1996a).

4.8.4 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 para as frações advindas da CC (seção 4.8.1). O sistema eluente foi preparado em funil de separação com acetato de etila/n-propanol/água (140:8:80; v/v/v). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. As frações foram recolhidas em tubos de ensaio com volume de 3 ml cada e foram monitorados por CCD (MELLO et al., 1996a).

4.8.5 Derivatização química das substâncias isoladas

Para quantidades de até 100 mg de substância isolada foram adicionados 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml, deixando-se em repouso por 24 h. Após este período, foi colocado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. A filtração foi feita sob pressão reduzida em filtro com placa porosa G3 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi dissolvida e filtrada em clorofórmio. A retirada do solvente foi feita em evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. Após a eliminação de toda piridina, transferiu-se a substância para um frasco e colocou-se na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente, para posteriormente ser congelada e liofilizada.

4.8.6 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

A amostra, após ter sido derivatizada quimicamente (acetilada), foi separada por cromatografia em camada delgada preparativa.

As placas de gel de sílica foram preparadas da seguinte maneira: em placas de vidro (20x20 cm) foram espalhadas em suspensão de gel de sílica PF₂₅₄ contendo gesso (Merck®) e etanol:água (3:7; v/v), em uma espessura de 0,75 mm. Como meio eluente foi utilizado tolueno:acetona (7:3; v/v). Após a corrida, as manchas foram visualizadas em UV, separadas, calculado o valor do *R_f*, raspadas e solubilizadas em acetona. Após, as substâncias foram filtradas em filtro G3, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e levadas para análise (RMN).

4.9 Análise estrutural das substâncias isoladas

Foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (¹H, ¹³C), 2D (¹H/¹H, COSY, HMBC, HMQC), e espectrometria de massas (EM). Os espectros das substâncias foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os espectros de massas foram

obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha. Os espectros foram analisados e comparados com dados da literatura.

4.10 Atividade antioxidante

4.10.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa foi efetuada através do método de seqüestro do radical DPPH (AMAROWICZ et al., 2004).

Foi realizada uma triagem nas seguintes concentrações: 0,000256; 0,00128; 0,0064; 0,032; 0,160; 0,800; 4,0; 20,0; 100,0; e 500 µg/ml em 4 ml de metanol.

Foram realizadas baterias com 5 tubos de ensaio nas seguintes concentrações: extrato bruto: 4, 3, 2, 1 e 0,5 µg/ml; fração aquosa e fração acetato de etila: 20, 15, 10, 4 e 1 µg/ml e vitamina C: 8, 6, 4 e 2 µg/ml em metanol. Após, foi acrescentado em todos os tubos 0,5 ml de uma solução de DPPH 1 mmol l⁻¹. A mistura foi agitada por 15 s em vortex e mantida em temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida, procedeu-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro à 517 nm.

O branco foi preparado com 4 ml de metanol, adicionado de 0,5 ml de DPPH 1 mmol l⁻¹, a qual foi reduzida com 2 mg de butilhidroxitolueno (BHT). Foi efetuada também a leitura do controle negativo com 0,5 ml da solução de DPPH 1 mmol l⁻¹ em 4 ml de metanol (AMAROWICZ et al., 2004).

A atividade anti-radicalar (RSA – radical scavenging activity)) foi calculada como uma porcentagem de descoloração do radical DPPH, usando-se a seguinte equação:

$$\text{RSA} = 100 \times (1 - \text{AE}/\text{AD}), \text{ onde:}$$

AE = absorvância da solução quando um extrato foi adicionado em determinada concentração

AD = absorvância da solução de DPPH

Os resultados foram expressos em IC_{50} , que representa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH•. Esses cálculos foram realizados através da regressão linear (HARRIS, 2005; MILONI, 2004) e representam a média de três determinações em cada bateria. Um exemplo do cálculo da IC_{50} pode ser visto no Anexo A.

4.10.2. Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico

Uma alíquota (0,3 ml) da solução de extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa (200 $\mu\text{g/ml}$) foi misturado separadamente em um tubo de ensaio com a solução reagente (3 ml) {ácido sulfúrico (0,6 mol l^{-1}), fosfato de sódio (28 mmol l^{-1}) e molibdato de amônio (4 mmol l^{-1}) em água destilada}. Os tubos foram incubados em banho-maria 95 °C, durante 90 min. Após o resfriamento, a absorvância foi lida a 695 nm contra o branco (3 ml de solução reagente e 0,3 ml do mesmo solvente da amostra). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em relação ao ácido ascórbico (0,3 ml de solução 2 mmol l^{-1}), usado como padrão, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1 (100%) (PRIETTO et al., 1999).

4.11 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o método de Tukey, mais especificamente ANOVA de uma via não paramétrico, por meio do programa GraphPad Prism 3.00®. Diferenças significativas implicaram em $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima e controle de qualidade

A caracterização da droga vegetal passa por inúmeras determinações para se estabelecer valores ou faixas que permitam a sua qualificação e também a sua

quantificação antes do preparo do medicamento. Diversos métodos químicos, físicos e físico-químicos como cromatografia em camada delgada, determinação da perda por dessecação, determinação do teor de extrativos e a quantificação de substâncias ativas ou mesmo de substâncias marcadoras, também são utilizadas a fim de caracterizar e padronizar o material vegetal ou mesmo seus extrativos (LOPES, 2003).

Um controle de qualidade efetivo deve ocorrer em todas as etapas do processo, desde a correta identificação do vegetal, bem como o método de secagem apropriado, porque a partir destas etapas é que dependerá a qualidade do produto final, em termos de confiabilidade e reprodutibilidade.

O marcador, definido na RDC 48 de 2004 (BRASIL, 2004) como sendo componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Na espécie *S. obovatum* Benth., o marcador são os taninos, classe de metabólitos secundários presente em grande proporção neste vegetal.

5.1.1 Teor de taninos totais

Dentro da análise quantitativa, foi realizada a determinação do teor de taninos totais em relação a vários líquidos extratores, como água, acetona-água (1:1; v/v), acetona-água (7:3; v/v) e também em relação à droga vegetal (droga fresca, seca e liofilizada).

Na determinação de taninos totais foi empregado o método de Folin-Ciocalteu, que baseia-se na associação dos taninos às proteínas, tornando-o mais específico, pois, trata-se de um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos. Essa reação, no entanto, por não ser específica, necessita da adição do pó de pele em etapa posterior. Assim, a complexação tanino-proteína torna o método seguro. Os resultados da determinação dos taninos totais encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação do teor de taninos totais em relação ao líquido extrator e

a droga vegetal.

DROGA VEGETAL	LÍQUIDO EXTRATOR	TEOR DE TANINOS (%)
Fresca	Água	10,15
Seca	Água	17,84
Seca	Acetona:água (1:1;v/v)	32,60
Seca	Acetona:água (7:3; v/v)	40,00

A análise dos resultados do doseamento do teor de taninos totais demonstra como melhor líquido extrator a acetona:água (7:3; v/v). Hagerman (1988) confirmou o aumento superior significativo na extração de taninos, tanto condensados, como hidrolisáveis com acetona:água. A vantagem do uso de acetona em comparação com outros solventes reside na propriedade de bloquear a capacidade do tanino de se complexar com proteínas, o que não acontece quando se utilizam misturas com metanol (SANTOS; MELLO, 2003).

O teor de taninos totais em água apresentou um resultado de 17,84% para coleta realizada no mês de fevereiro, assemelhando-se aos valores obtidos por Sanches (2003), com a mesma espécie (*S. obovatum* Benth.), de 15,03% para o mês de fevereiro e de 18,75% para o mês de setembro.

5.1.2 Perda por secagem e perda por dessecação

A avaliação do teor de umidade presente nas cascas de *S. obovatum* Benth. foi determinada através da perda por secagem e da perda por dessecação. A presença de água em excesso, em drogas vegetais, promove o crescimento de bactérias, fungos ou insetos e hidrólise ou outras reações enzimáticas alterando os constituintes naturais, formando, assim, artefatos. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas no qual a deteriorização é promovida pela água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002).

As soluções extrativas são obtidas, principalmente, a partir de drogas vegetais secas ou contendo reduzida quantidade de suco celular, com o propósito de extrair delas os constituintes com atividade farmacológica. Durante a extração de sólidos, as células do material a extrair encontram-se mais ou menos retraídas e os diversos

componentes do suco celular estão precipitados sob a forma de sólidos amorfos ou cristalinos (PRISTA et al., 1981).

A perda por secagem transcorreu por um período de 8 dias, sendo realizado à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) com a droga vegetal fresca até a sua estabilização. O valor médio para as determinações foi de 38,70% de perda de seu peso bruto. Um valor aproximado foi obtido por Sanches (2003) com a mesma espécie em estudo, coletada também em Assis, SP, na mesma época do ano (fevereiro), apresentando resultado de 42,62%.

A perda por dessecação mostra o comportamento da planta quanto a sua quantidade de água e/ou substâncias voláteis nas diferentes estações do ano. É importante também avaliar o período de armazenamento, pois é possível observar se a droga vegetal está perdendo água e/ou substâncias voláteis ou se está absorvendo água do ambiente (MELLO, 1989).

A perda por dessecação foi realizada com a droga seca e moída, determinando-se o teor de umidade residual. Este parâmetro é fundamental para se determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento. O resultado obtido mostra que a perda por dessecação para *S. obovatum* Benth. foi de 7,5%. Esse teor encontra-se dentro de parâmetros normais de material seco para cascas, que varia em torno de 8 a 14%, de acordo com Di Stasi (1996). A monografia existente na Farmacopéia Brasileira (1959), preconiza umidade máxima de 15% para *S. adstringens* (Mart.) Coville. Valores acima desse percentual poderiam representar perda de atividade ou mesmo facilitar o crescimento microbiano, prejudicando assim o material vegetal.

Durante o processo de secagem, conclui-se, que as cascas do vegetal, conservam melhor as características organolépticas e químicas, quando estabilizadas à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e conservadas ao abrigo da luz (LOPES, 2003).

5.1.3 Teor de extrativos

O principal objetivo que se pretende atingir ao preparar uma solução extrativa é separar os princípios ativos de uma droga dos que são inativos, e isso depende, fundamentalmente, da seletividade do solvente utilizado. A seletividade é uma das características exigidas de qualquer processo de extração, pois é devido a ela que, tanto quanto possível, se dissolverão apenas os princípios ativos e se deixarão, no resíduo, os compostos fisiologicamente inativos e que constituem, aliás, a quase totalidade da droga (PRISTA et al., 1981).

A determinação do teor de extrativos de uma droga é parâmetro que permite visualizar a capacidade de um determinado líquido extrator retirar substâncias presentes na mesma, sob condições específicas. Podem ser utilizados água, etanol, metanol ou acetona, entre outros. Essa técnica é de fácil realização e constitui

importante dado para contribuir ao controle de qualidade da espécie em estudo. Com o intuito de posteriormente se extrair taninos, foi avaliado o teor de extrativos das cascas de *S. obovatum* Benth., procurando-se estabelecer como parâmetro de avaliação, o uso de diferentes líquidos extratores e também em relação à droga vegetal, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 – Determinação do teor de extrativos das cascas de *S. obovatum* Benth.

DROGA VEGETAL	LÍQUIDO EXTRATOR	TEOR DE EXTRATIVOS (%)
Fresca	Acetona:água (1:1; v/v)	27,71
Fresca	Acetona:água (7:3; v/v)	24,90
Seca	Acetona:água (1:1; v/v)	42,27
Seca	Acetona:água (7:3; v/v)	40,75
Seca	Água	36,83

A técnica utilizando a planta fresca não apresentou resultados satisfatórios, comparados com a planta seca. Pode-se observar que com a planta seca o pior resultado obtido foi com a água, confirmando o resultado de Lopes (2003) para *S. polyphyllum* Mart. O melhor resultado obtido para teor de extrativos foi com acetona:água (1:1; v/v), vindo à seguir a composição acetona:água (7:3; v/v) resultado confirmado por Lopes (2003) que obteve para *S. polyphyllum* Mart., respectivamente 43,50 e 40,79%.

Convém ressaltar que mesmo o teor de extrativos ter apresentado um resultado superior com acetona:água (1:1; v/v), foi escolhido como solvente a acetona:água (7:3; v/v), por esta ter apresentado um resultado superior no doseamento de taninos totais (40%), além de fornecer a estabilidade dos taninos.

5.1.4 Abordagem fitoquímica preliminar

Na abordagem fitoquímica preliminar obteve-se resultado positivo para fenólicos simples e resultado fracamente positivo para flavonóides. Quanto aos testes de cumarina, saponinas e compostos antracênicos livres, o resultado obtido foi negativo, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 - Abordagem fitoquímica preliminar.

TESTE	RESULTADO
Saponinas	Negativo
Cumarina	Negativo
Compostos antracênicos livres	Negativo
Flavonóides	Fracamente positivo
Fenólicos simples	Positivo

Os dados obtidos mostram grupos de substâncias que podem ser empregados na caracterização da matéria-prima, como fenólicos simples e flavonóides. De outra forma, os dados negativos servem igualmente de parâmetros comparativos que não caracterizam a espécie. Esses dados juntamente com os demais obtidos são de relevante importância para a caracterização da matéria-prima vegetal e o controle de qualidade da referida espécie, objeto de estudo deste trabalho.

5.2 ESTUDO QUÍMICO

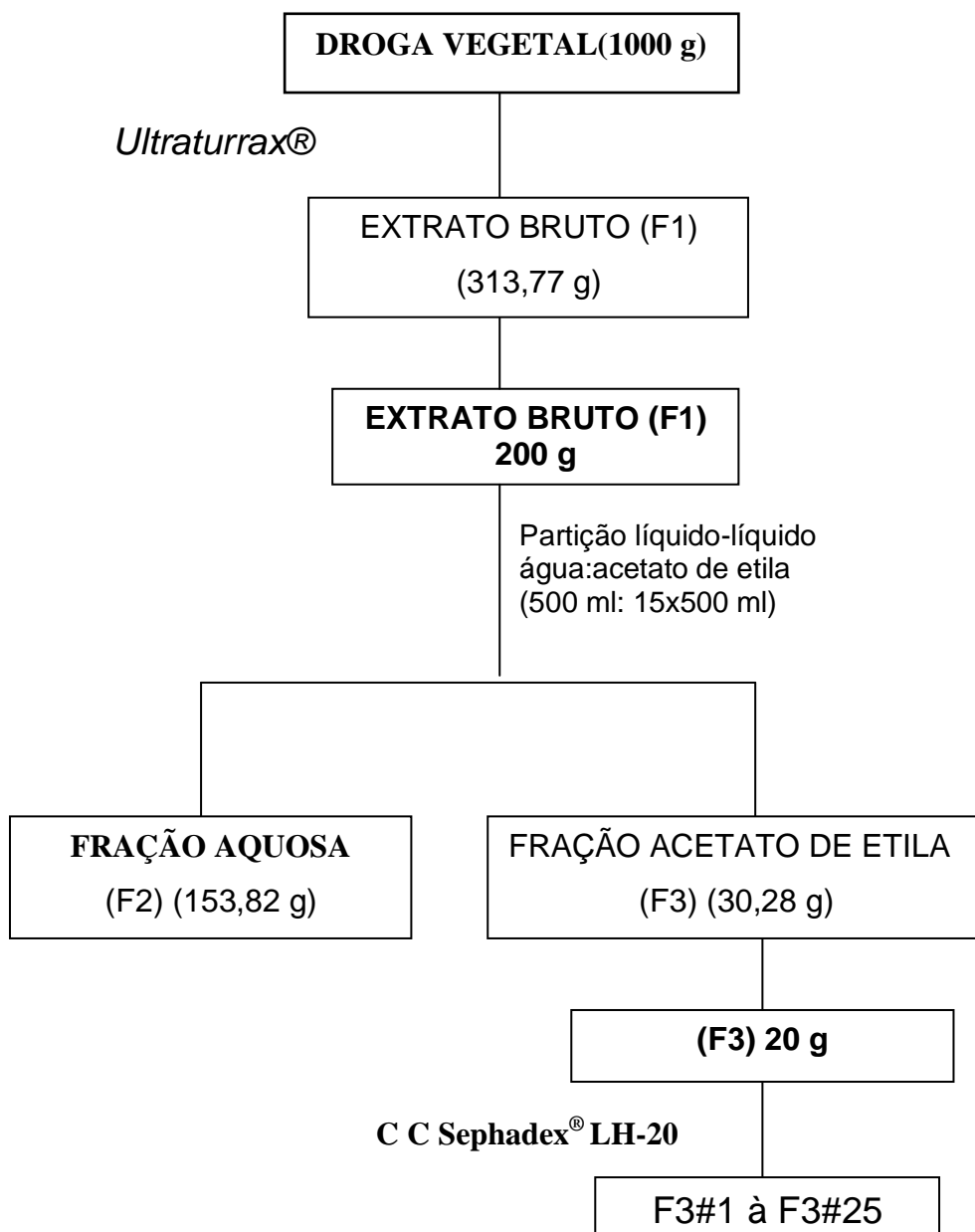
A pesquisa química tem por objetivo conhecer os constituintes químicos, também chamados metabólitos secundários, presentes nas espécies vegetais. Essa investigação foi direcionada ao isolamento, purificação e elucidação estrutural de taninos.

As cascas após o processo de secagem (1438 g) foram moídas em moinho de martelos fornecendo 1271 g, com rendimento de 94,85%. A moagem teve por finalidade reduzir mecanicamente o vegetal a pó, de modo a facilitar o processo de extração.

O método de extração escolhido foi o Ultra-turrax® devido à eficiência, simplicidade e rapidez da técnica. Com 1000 g da droga moída, preparou-se o extrato bruto a 10% (m/v) com acetona:água (7:3; v/v) que posteriormente foi filtrado à vácuo e o solvente eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, apresentando um rendimento de 31,38%, obtendo-se assim, 313,77 g de extrato liofilizado (F1).

A escolha do líquido extrator baseou-se nas informações obtidas no controle de qualidade (Tab. 2) e na literatura consultada (SANTOS; MELLO, 2003).

Com 200 g do extrato bruto liofilizado (F1) obteve-se por particionamento com acetato de etila, 153,82 g da fração aquosa (F2) e 30,28 g da fração acetato de etila (F3). O rendimento de F2 foi de 76,91% e F3 de 15,14%. A obtenção das frações e subfrações a partir da fração F1, encontra-se no fluxograma 1.



Fluxograma 1 – Preparação de extrato e separação cromatográfica de *S. obovatum* Benth.

Com o intuito de fracionamento da fração F3 (acetato de etila), realizou-se cromatografia em coluna contendo Sephadex[®] LH-20 com 20 g da mesma. Através do monitoramento por CCD, pôde-se reunir 24 subfrações (F3#2 – F3#25). A F3#1 foi perdida por motivos técnicos. Todas as subfrações foram avaliadas em CCD e reunidas por similaridade, de acordo com a figura 14.

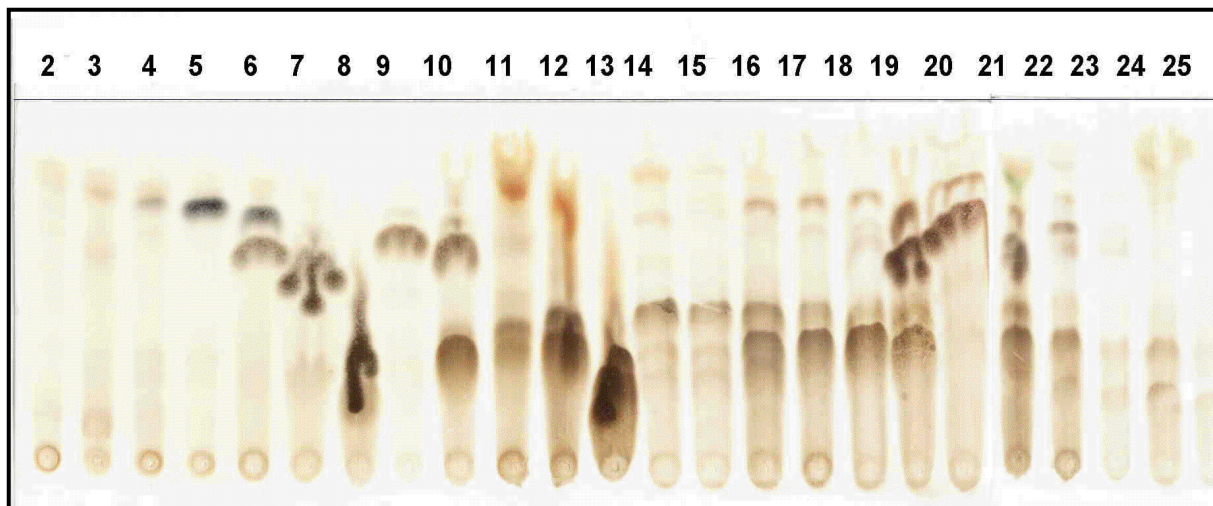


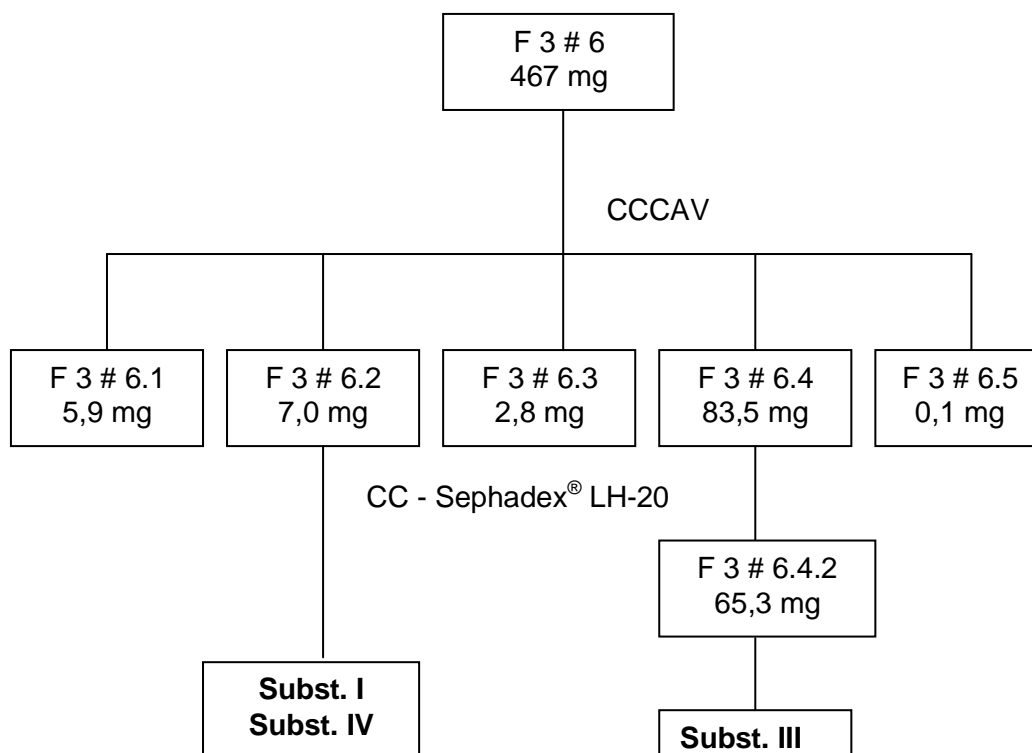
Figura 14 – Cromatografia em camada delgada de 24 subfrações obtidas da fração acetato de etila por CC (Sephadex[®] LH-20) (Cromatofolhas de gel de sílica F₂₅₄; acetato de etila:ácido fólico:água; 90:5:5; revelação com FeCl₃ a 1% em metanol).

Tabela 5 – Vinte e quatro subfrações obtidas por cromatografia em coluna da fração acetato de etila.

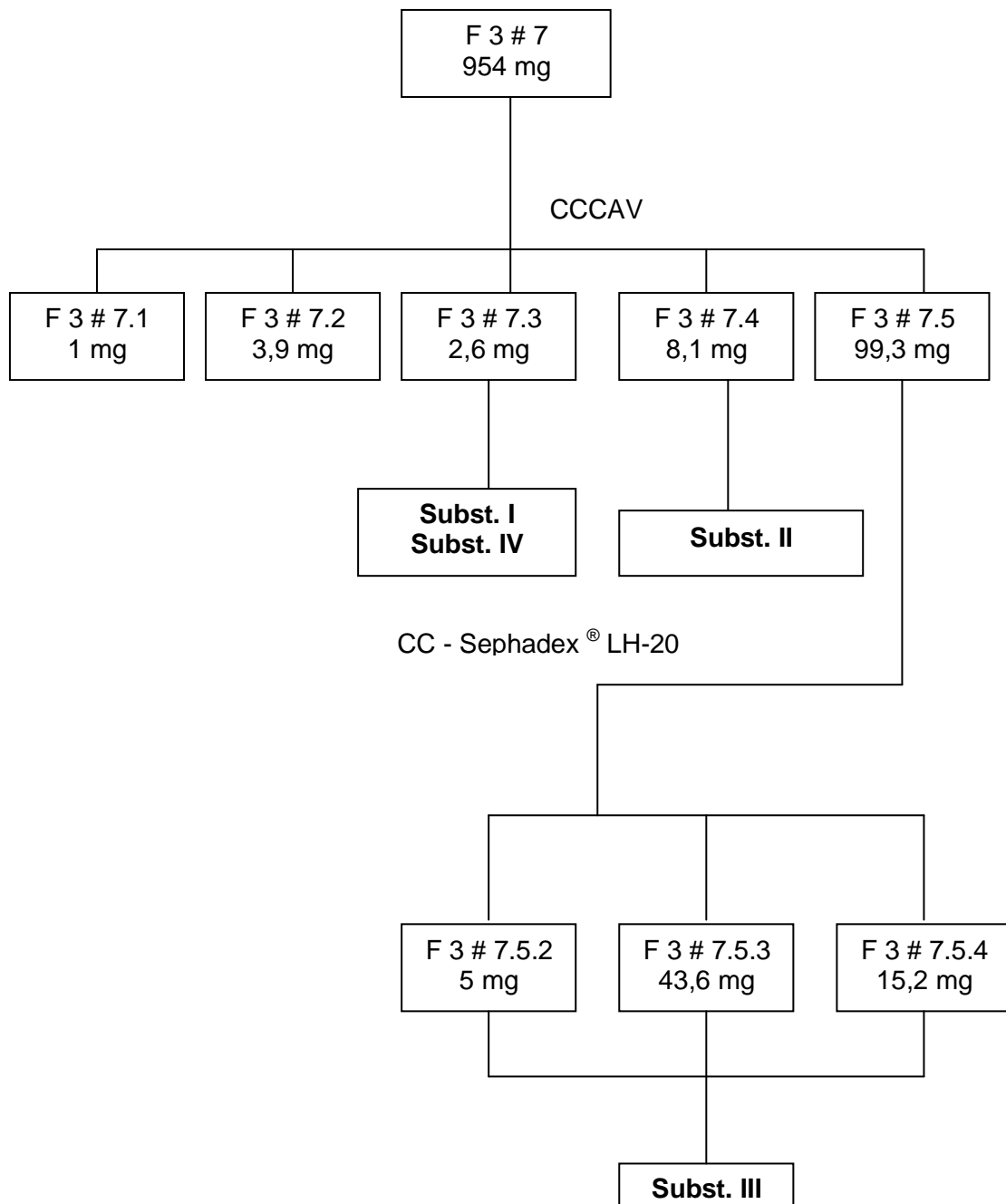
Fração	Eluente (v/v)	Volume aproximado (l)	Quantidade (g)	(%)
F 3#2	Etanol/Água (2:8)	0,40	0,0957	0,48
F 3#3	Etanol/Água (2:8)	0,50	0,1055	0,53
F 3#4	Etanol/Água (3:7)	1,20	0,0583	0,29
F 3#5	Etanol/Água (3:7)	1,35	0,1291	0,65
F 3#6	Etanol/Água (4:6)	0,60	0,4666	2,33
F 3#7	Etanol/Água (4:6)	0,65	0,9536	4,77
F 3#8	Etanol/Água (4:6)	0,55	0,4779	2,39
F 3#9	Etanol/Água (4:6)	0,70	0,3077	1,54
F 3#10	Etanol/Água (4:6)	0,60	0,6317	3,16
F 3#11	Etanol/Água (1:1)	0,60	0,2538	1,27
F 3#12	Etanol/Água (1:1)	0,55	0,9953	4,98
F 3#13	Etanol/Água (1:1)	0,50	0,4179	2,09
F 3#14	Etanol/Água (1:1)	0,65	0,2857	1,43
F 3#15	Etanol/Água (1:1)	0,55	0,1345	0,67
F 3#16	Etanol/Água (1:1)	0,50	0,1839	0,92
F 3#17	Etanol/Água (1:1)	0,55	0,472	2,36
F 3#18	Etanol/Água (1:1)	0,50	0,3309	1,65
F 3#19	Etanol/Água (1:1)	0,45	1,2461	6,23
F 3#20	Etanol/Água (1:1)	0,50	1,4067	7,03
F 3#21	Etanol/Água (1:1)	0,45	0,3346	1,67
F 3#22	Etanol/Água (1:1)	0,50	0,3438	1,72
F 3#23	Etanol/Água (1:1)	0,45	0,2182	1,09
F 3#24	Etanol	3,0	0,1876	0,94
F 3#25	Acetona:Água (:3)	3,0	0,1395	0,68
Total			10,1766	50,88

O fracionamento empregando-se cromatografia em coluna contendo Sephadex[®] LH-20, é de se esperar que as substâncias com maiores pesos moleculares aparecessem nas frações iniciais. Porém, houve uma predominância de substâncias de pesos moleculares menores. Este fato está relacionado com a interação das hidroxilas fenólicas das substâncias fenólicas e o gel (Sephadex[®] LH-20). Assim, os monômeros de taninos (flavan-3-óis) eluem seqüencialmente da seguinte maneira: monômeros > dímeros > trímeros > tetrâmeros > oligômeros > polímeros, conforme proposto por Thompson et al. (1972).

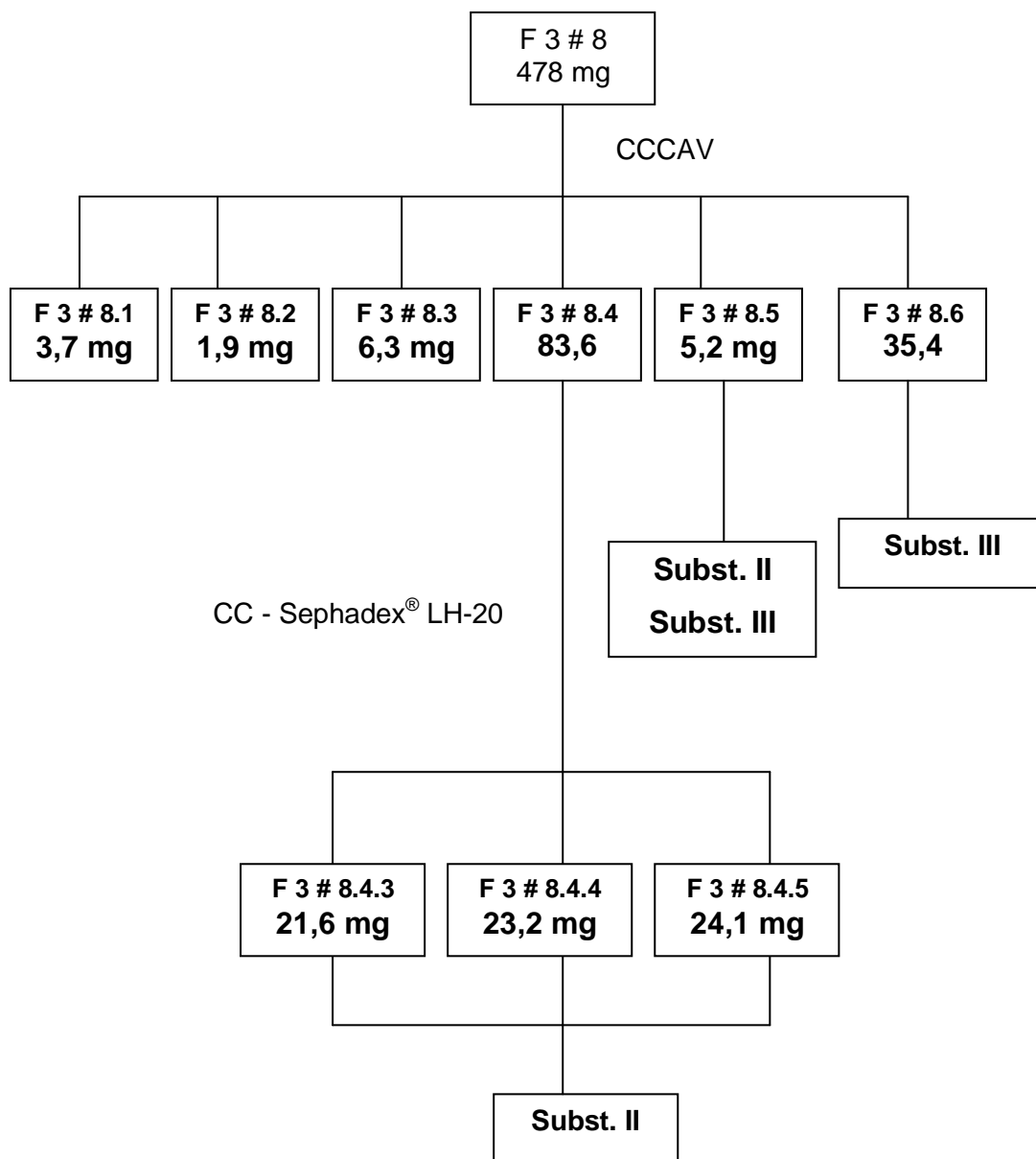
Na tentativa de se conseguir isolar substâncias fenólicas, iniciou-se o fracionamento com as frações F3#6, F3#7, F3#8 e F3#9 utilizando-se cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) e cromatografia em coluna (CC), como pode ser observado nos fluxogramas 2, 3 e 4



Fluxograma 2–Fracionamento cromatográfico da fração F3#6 por CCCAV e CC de *S. obovatum*.



Fluxograma 3—Fracionamento cromatográfico da fração F3#7 por CCCAV e CC de *S. obovatum*.

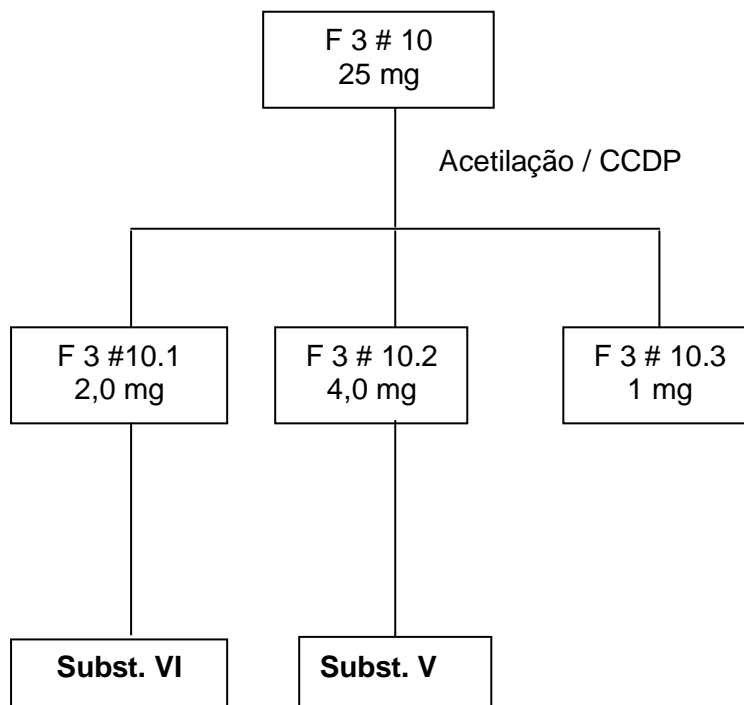


Fluxograma 4–Fracionamento cromatográfico da fração F3#8 por CCCAV e CC de *S. obovatum*.

A F3#9 foi submetida à CCCAV obtendo-se as frações F3#9.1 à F3#9.4. Da F3#9.3 foi isolado a substância II. A F3#9.4 foi submetida à CC obtendo-se cinco sub-frações, onde da F3#9.4.2. foram isoladas as substância II (5 mg) e III (5 mg) e da F3#9.4.3. foi isolado novamente a substância II (21,2 mg).

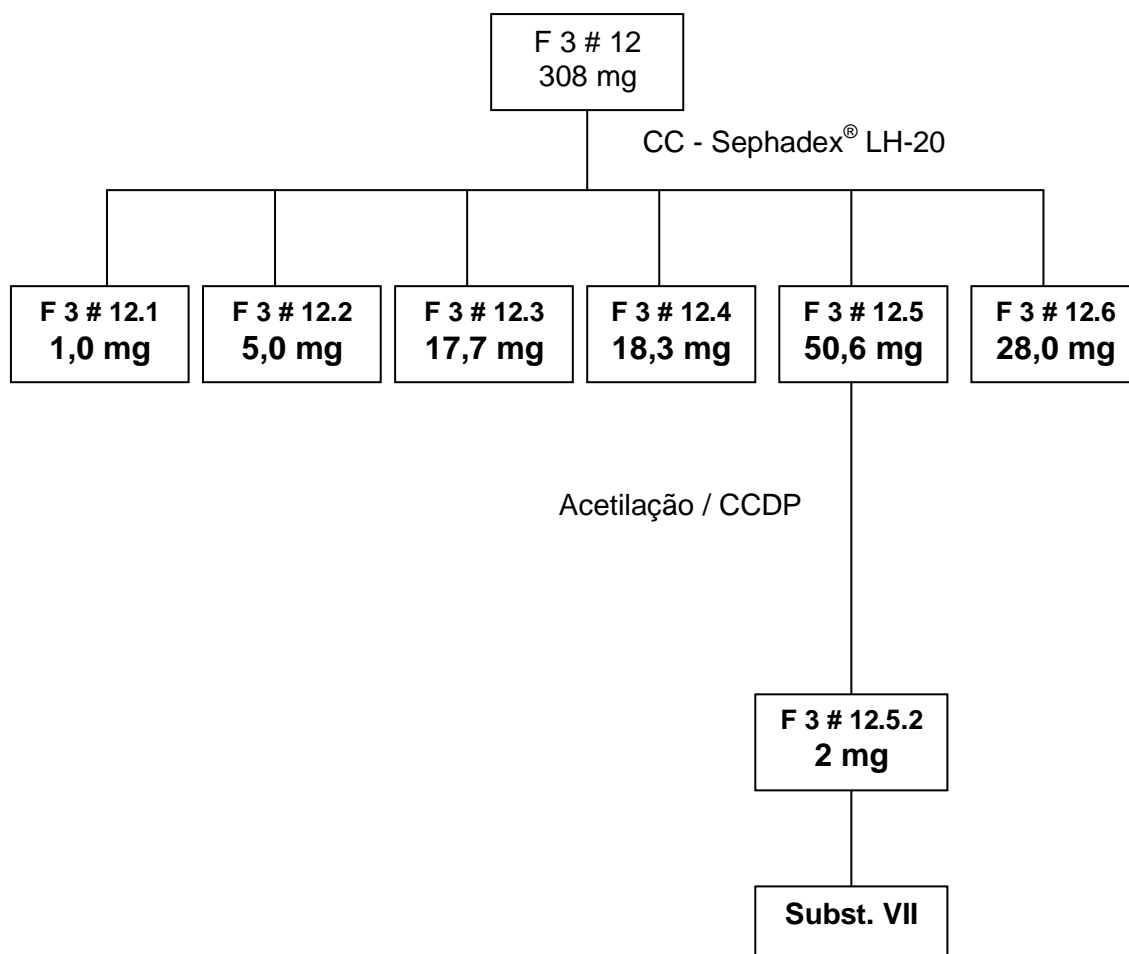
A fração F3#10 foi submetida a uma acetilação e posteriormente à cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) e suas subfrações levadas a análise de RMN ^1H (Fluxograma 5).

A fração F3#11 passou pelo mesmo procedimento, porém não foi possível obter nenhuma substância devido ao baixo rendimento.



Fluxograma 5—Fracionamento cromatográfico da fração F3#10 por CCDP de *S. obovatum*.

A fração F3#12 foi submetida à cromatografia em coluna (CC) em Sephadex® LH-20 fornecendo 6 subfrações, sendo que posteriormente foi realizada uma derivatização por acetilação da F3#12.5 seguido de limpeza por cromatografia em camada delgada preparativa, conforme pode ser observado no fluxograma 6



Fluxograma 6–Fracionamento cromatográfico da fração F3#12 por CC e CCDP de *S. obovatum*.

5.3 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.3.1 Monômeros

5.3.1.1 Substância I – ácido gálico

A **substância I** (8,6 mg; 0,0027% em relação ao EB) apresentou-se na CCD como uma mancha de coloração azul intensa após revelação com FeCl_3 , com valor de R_f de 0,75 (4.8.3). Esse dado forneceu indício característico de substâncias fenólicas.

No espectro de RMN ^1H (Fig. 15) foi observado um singlete na região de δ 7,04 ppm, atribuído a dois hidrogênios aromáticos quimicamente equivalentes na posição 2 e 6 característicos de compostos com núcleo aromático tetrasubstituído (um grupo carboxílico na posição 1 e três grupos hidroxilas nas posições 3, 4 e 5). Os assinalamentos podem ser resolvidos aplicando-se o princípio da aditividade do substituinte (SILVERSTEIN et al., 1991). O espectro de massas (ES-MS) (Fig. 16) apresentou pico do íon molecular em m/z 170,2, pico do íon pseudomolecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 169,2, pico em m/z 125,2 formado pela perda do grupo carboxila (M-45) e o pico base em m/z 89,2 correspondendo à estrutura com $\text{C}_6\text{O}_1\text{H}_1$ (assinalada na figura 15).

De acordo com os dados observados e analisados e quando comparados com a literatura (LU; FOO, 2001), confirma-se a substância I como sendo ácido gálico.

5.3.1.2 Substância II – galocatequina

A **substância II** (105,8 mg; 0,034% em relação ao EB) apresentou-se na CCD como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 , com valor de R_f de 0,75 (4.8.3), fornecendo indícios característicos de substâncias fenólicas.

O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) foi realizado em metanol deuterado, por se tratar de uma substância não derivatizada. Pode-se notar na figura 17 um espectro característico de monômero de flavan-3-ol. Os dados encontram-se dispostos na tabela 6.

Assim, é possível observar na figura 16, os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como duplo dubletos em δ 2,50 e δ 2,80 ppm, respectivamente. O

sistema ABMX entre δ 2,50 e 3,96 ppm mostra todos os hidrogênios do anel heterocíclico. Além desses, observa-se um dubleto em δ 4,52 ppm e um duplo duplo dubleto em δ 3,96 ppm, ambos com uma constante de acoplamento $J_{H-2-H-3}$ de 7,2 Hz, caracterizando uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* de acordo com Weinges et al (1969). A triidroxilação do anel B em C-3', C-4'e C-5' pode-se comprovar pela presença de um singlete referente aos deslocamentos de H-2' e H-6' (δ 6,39 ppm), pelo fato de serem quimicamente equivalentes. O espectro de COSY $^1H/^1H$ (Fig. 18) mostra os acoplamentos entre H-3 e H-4_{ax} e H-3 e H-4_{eq} e também entre H-3 e H-2 ($J=7,2Hz$), comprovando a identidade destes hidrogênios.

Os hidrogênios correspondentes a H-6 (A) e H-8 (A) foram determinados em δ 5,85 e δ 5,91 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento $J_{H-6-H-8} = 2,1$ Hz.

Assim, a **substância II** foi identificada como **galocatequina**, tendo sido isolada e identificada dentre outras espécies em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO et al., 1996a; TOLEDO, 2002); *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (LOPES, 2003) e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (SANCHES, 2003).

Tabela 6 - Dados da substância II - galocatequina (CD₃OD; 300 MHz; TMS;ppm).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 ax (C)	2,50	dd	² J _{H-4ax-H-4eq} =16,2 ³ J _{H-4ax-H-3} =7,8
H-4 eq (C)	2,80	dd	² J _{H-4eq-H-4ax} =16,2 ³ J _{H-4eq-H-3} =5,4
H-3 (C)	3,96	ddd	³ J _{H-3-H-2} =7,2 ³ J _{H-3-H-4ax} =7,8 ³ J _{H-3-H-4eq} =5,4
H-2 (C)	4,52	d	³ J _{H-2-H-3} =7,2
H-6* (A)	5,85	d	⁴ J _{H-6-H-8} =2,4
H-8* (A)	5,91	d	⁴ J _{H-8-H-6} =2,4
H-2'/H-6'	6,40	s	

s= singlete; d= dublete; dd= dublo dublete;ddd= duplo duplo dublete. *Kombal (1995) intercambiáveis.

5.3.1.3 Substância III – epigalocatequina

A **substância III** (172,1 mg; 0,055% em relação ao EB) apresentou valor de R_f = 0,75 (4.8.3) e coloração azul intensa após revelação com FeCl₃, na CCD, característico de substâncias fenólicas.

A análise do espectro de RMN ¹H (Fig. 19) da **substância III** foi realizada em metanol deuterado e forneceu dados semelhantes aos da **substância II** (galocatequina) mostrando picos de flavan-3-óis ou taninos condensados. Os dados referentes à **substância III** encontram-se na tabela 7 e figura 19. O espectro de RMN ¹H mostrou em δ 2,72 e δ 2,84 ppm dois sinais do tipo duplo dublete, representando respectivamente H-4 axial e H-4 equatorial sendo possível ser visualizado através da correlação com H-3 assinalada no espectro de 2D (COSY ¹H/¹H; Fig. 20). A constante de acoplamento entre ³J_{H-2-H-3} foi menor que 2,0 Hz,

caracterizando uma configuração do tipo 2,3-*cis* (WEINGES et al., 1969), os demais deslocamentos se assemelham àqueles obtidos para a **substância II**.

A presença de um singleto correspondendo a dois hidrogênios em δ 6,51 ppm comprova a triidroxilação no anel B dos hidrogênios H-2' e H-6', devido os mesmos serem quimicamente equivalentes. Os hidrogênios correspondentes a H-6 (A) e H-8 (A) foram determinados em δ 5,90 e δ 5,93 ppm, respectivamente, como dubletos com uma pequena constante de acoplamento $J_{H-6-H-8} = 2,4$ Hz característico de ligações *meta* em anéis aromáticos.

O espectro COSY $^1H/^1H$ (Fig. 20) permite ainda, observar todos os acoplamentos dos hidrogênios presentes no anel heterocíclico. No espectro COSY $^1H/^1H$ ampliado na região entre δ 4,0 à δ 6,6 ppm (Fig. 21) observa-se a correlação entre os hidrogênios H-2'/H-6' do anel B com o hidrogênio H-2 do anel C. Esta correlação, não foi possível ser visualizada na **substância II** (galocatequina). Na figura 22 observam-se os espectros de RMN ^{13}C das **substâncias II** e **III**. Pode ser observado que a diferença entre ambas relaciona-se ao sinal em δ 82,8 ppm para galocatequina e δ 79,9 ppm para epigalocatequina, correspondendo ao carbono 2. De acordo com Czochanska et al. (1979) e Cai et al. (1991), os epímeros galocatequina e epigalocatequina podem ser seguramente diferenciados por esta análise. Este dado foi também observado por Sanches (2004) para estas substâncias isoladas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. De acordo com as análises realizadas em CCD e dos dados espectroscópicos quando comparados com a literatura (MELLO et al., 1996a; TOLEDO, 2002; LOPES, 2003; SANCHES, 2004), confirma-se a **substância III** como sendo **epigalocatequina**.

Tabela 7 - Dados da substância III - epigalocatequina (CD₃OD; 300 MHz; TMS; ppm).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 ax	2,72	dd	$J_{H-4ax-H-4eq}=16,8$ $J_{H-4ax-H-3}=3,0$
H-4 eq (C)	2,84	dd	$J_{H-4eq-H-4ax}=16,8$ $J_{H-4eq-H-3}=4,5$
H-2 (C)	4,75	s	

H-3 (C)	4,16	sl	
H-6* (A)	5,90	d	2,4
H-8* (A)	5,93	d	2,4
H-2'/H-6'	6,51	s	

s= singlete; sl= singlete largo; d= dublete; dd= dublo dublete. *Kombal (1995) intercambiáveis.

5.3.1.4 Substância IV – ácido *p*-hidróxibenzóico

Na CCD, a **substância IV** (1 mg; 0,0003% em relação ao EB) apresentou valor de $R_f = 0,77$ (4.8.3) e como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 . Isso forneceu indício característico de compostos fenólicos, de acordo com o sistema eluente empregado.

No espectro de RMN ^1H (Fig. 23) foi observado um dublete na região de δ 7,20 ppm, atribuído a dois hidrogênios aromáticos equivalentes na posição 2 e 6 e um dublete na região de δ 7,75 ppm, atribuído a dois hidrogênios aromáticos também com deslocamentos químicos equivalentes às posições 3 e 5 (SILVERSTEIN et al., 1991).

No ácido *p*-hidróxibenzóico os hidrogênios em posição *orto* ao grupo carboxílico (Ha/ Ha') tem deslocamento químico (δ) equivalente, da mesma forma que os hidrogênios *orto* ao grupo hidróxi (Hb/Hb'). Em anéis benzênicos *para*-dissubstituídos, J_{ab} e $J_{a'b'}$ são iguais, de valor entre 7-10 Hz, aproximadamente. Igualmente, $J_{a'b}$ e $J_{ab'}$ são iguais, porém com valor muito menor, de 0-1 Hz. Como Ha e Ha' se acoplam de maneira diferente com um outro hidrogênio específico, eles não são magneticamente equivalentes. Conforme os substituintes *para* tornam-se mais parecidos um com outro (nas suas propriedades de blindagem) o sistema tende ao padrão dublete AA' BB' (SILVERSTEIN et al., 1991). No espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (Fig. 24) observa-se as correlações entre Ha e Hb.

De acordo com as análises realizadas em CCD e dos dados espectroscópicos e quando comparados com a literatura (MELLO et al., 1996a), confirma-se a substância IV como ácido *p*-hidroxibenzóico.

Tabela 8 - Dados da substância IV - ácido p-hidroxibenzóico (CD₃OD; 300 MHz; TMS; ppm).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
Ha/Ha'	7,20	d	8,4
Hb/Hb'	7,75	d	8,4

5.3.1.5 Substância V – 4'-O-metil-galocatequina peracetilada

A **substância V** (4 mg; 0,0013% em relação ao EB) apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl₃, fornecendo R_f=0,53 (4.8.3) e também mostrando características de polifenóis.

Os dados referentes à **substância V** encontram-se na tabela 9 e na figura 25. O espectro de RMN ¹H (Fig. 25) apresentou similaridades com a galocatequina (**substância II**), exceto para um singlete correspondendo a 3 hidrogênios em δ 3,72 ppm indicando um grupamento metoxila. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos hidrogênios heterocíclicos exibiram um sistema ABMX característico para o spin padrão de 2,3-*trans* flavan-3-ol (MELLO et al., 1996a). Pelo espectro COSY ¹H/¹H (Fig. 26) pode-se verificar os acoplamentos entre todos os hidrogênios do anel heterocíclico. Observa-se a correlação entre H-2 e H-2'/H-6' marcada no espectro

Nas figuras 27 (HMQC) e 28 (HMBC) observam-se as correlações no estabelecimento da posição da metoxila em C4' do anel B.

Assim, a **substância V** foi identificada como sendo **4'-O-metil-galocatequina**, a qual foi isolada de *Panda oelosa* Pierre (Pandaceae) (GARCIA et al., 1993), de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO et al., 1996a; TOLEDO, 2002) e de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (MACHADO, 2005).

Tabela 9 - Dados da substância V - 4'-O-metil-galocatequina peracetilada (CD₃OD; 300 MHz; TMS; ppm).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 ax (C)	2,66	dd	$^2J_{H-4ax-H-4eq}=16,2$ $^2J_{H-4ax-H-3}=7,8$
H-4 eq (C)	2,91	dd	$^2J_{H-4ax-H-4eq}=16,2$ $^3J_{H4ax-H4eq}=5,4$
O-CH ₃	3,72	s	
H-2 (C)	5,11	d	$^3J_{H-2-H-3}=7,2$
H-3 (C)	5,21	ddd	$^3J_{H-3-H-2}=7,2$ $^3J_{H-3-H-4ax}=7,8$ $^3J_{H-3-H-4eq}=5,4$
H-6 (A)	6,59	d	$^4J_{H-6-H-8}=2,4$
H-8 (A)	6,66	d	$^4J_{H-8-H-6}=2,4$
H-2'/H-6'	7,12	s	

s= singletto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; ddd= duplo duplo dubleto

5.3.2 Proantocianidinas diméricas

Fletcher et al. (1977) mostraram através de estudos de RMN com 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 utilizaram a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações do 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; 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 hidrogênios do anel A das substâncias com ligação 4→6 como estando em campos mais baixos ou desprotegidos (δ 6,7 ppm), enquanto os sinais da ligação 4→8 em campos mais altos (δ 6,1 ppm). 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 δ 4,37 e 5,01, enquanto substâncias com ligação 4→6, entre δ 5,04 e 5,35 ppm.

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de RMN ¹H, 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 dicroísmo 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 et al., 1996a e 1996b).

5.3.2.1 Substância VI – epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina

A análise em CCD da fração referente a **substância VI** (2 mg; 0,00064% em relação ao EB) demonstrou uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl₃, com R_f igual a 0,43 (4.8.3).

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Fig. 29) da **substância VI** acetilada, forneceu dados que se encontram na tabela 10.

A figura 29 da **substância VI** acetilada demonstra na região aromática dois singletos característicos referentes a dois hidrogênios cada, dos anéis (B/E) triidroxilados em δ 6,89 ppm [H-2' e H-6' (E)] e δ 7,22 ppm [H-2' e H-6' (B)]. Os hidrogênios dos anéis A e D como nos derivados monoméricos galocatequina ou epigalocatequina com H-6 (A) e H-8 (A) em δ 6,06 ppm e δ 6,25 ppm, H-6 (D) em δ 6,65 ppm respectivamente. Todos os hidrogênios heterocíclicos dos anéis C e F apresentaram uma pequena constante de acoplamento ($J \leq 2,0$ Hz). Este dado corresponde a uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* tanto para a unidade “superior” quanto para a unidade “inferior” de acordo com o proposto por Weinges et al. (1969). O espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (Fig. 30) mostra as correlações entre H-2'/H-6' (B) com H-2 (C) e H-2'/H-6' (E) com H-2 (F). O hidrogênio H-2 (F) apresenta um singlete em δ 4,50 ppm demonstrando assim, uma possível ligação 4 β →8 (HEMINGWAY et al., 1982; KOLODZIEJ, 1992; DANNE, 1994; MELLO et al., 1996). Após a análise explicitada e em comparação com a literatura, a **substância VI** trata-se de **epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina**. Essa substância já foi isolada e minuciosamente caracterizada de *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae) (DANNE, 1994), de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO et al., 1996a) e de *Stryphnodendron obovatum* (SANCHES, 2003). São conhecidos análogos monogaloilado na posição 3 da unidade “superior” e digaloilados nas unidades “superior” e “inferior”, que foram isolados de *Rheum sp* (Polygonaceae), *Myrica rubra* (Lour.) Siebold & Zucc. (Myricaceae), *Thea sp* (Theaceae) (NONAKA et al., 1981; HASHIMOTO et al., 1989) e de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO et al., 1996a).

Tabela 10 - Dados da substância VI - epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina peracetilada (CD₃OD; 300 MHz).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura δ (ppm)
H-4ax /H-4eq(F)	2,89–2,94	m		2,87-2,94
H-4 (C)	4,48	d	$3J_{H-4(C) - H3(C)} = 2,1$	4,48
H-2 (F)	4,50	s		4,50
H-3 (C)/H-3 (F)	5,09-5,13	m		5,08-5,15
H-2 (C)	5,54	s		5,54
H-6 (A)	6,06	d	$4 J_{H-6(A) - H 8(A)} = 2,1$	6,06
H-8 (A)	6,25	d	$4 J_{H-6(A) - H 8(A)} = 2,1$	6,25
H-6 (D)	6,65	s		6,65
H-2'/H-6' (E)	6,89	s		6,89
H-2'/H-6'(B)	7,21	s		7,22

s= singleto; dd= duplo dubleto; ddd= duplo duplo dubleto; m=multipleto; Mello (1995).

5.3.1.7 Substância VII – robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina

Na CCD, a **substância VII** (2 mg; 0,00064% em relação ao EB) apresentou-se como uma mancha de coloração azul intensa após revelação com FeCl₃, com R_f = 0,41 (4.8.3), fornecendo indícios característicos de taninos condensados do tipo dimérico.

O espectro de RMN ¹H foi realizado em CDCl₃ e apresentou características de dímero peracetilado (Fig. 31). Os dados de deslocamento encontram-se na tabela 11. O espectro de RMN ¹H da **substância VII** demonstra um singleto em δ 6,68 ppm [H-2'/H-6' (E)]. A ligação (4 α →8) foi confirmada pelo deslocamento do hidrogênio H-3(C) que aparece como um pseudo tripleto em δ 5,78 ppm, dado discutido anteriormente por Mello et al. (1996b). Através do espectro de COSY ¹H/¹H (Fig. 32) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios H-2'/H-6' (B) com H-2 (C).

As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ($J_{H-2, H-3} = 9,6$ Hz e $J_{H-3, H-4} = 9,8$ Hz) indicam a configuração relativa do anel como *2,3-trans-3,4-trans*. A configuração *2,3-trans* do anel F é comprovada pelo dubleto em δ 5,03 ppm [H-2 (F)] com constante de acoplamento $J_{H-2, H-3} = 8,6$ Hz. Desta forma a unidade inferior foi caracterizada como sendo galocatequina. A unidade superior da substância foi caracterizada como robinetinidol devido ao pseudo tripleto H-3 (C), que aparece em δ 5,78 ppm com constante de acoplamento $\Sigma J = 19,5$ Hz, estando de acordo com a literatura (DREWES et al., 1967; STEYNBERG et al., 1990; MELLO et al., 1996b). O dubleto em δ 6,88 ppm [H-5(A)] com constante de acoplamento $J = 8,4$ Hz (acoplamento do tipo W) característico de 5-deóxi-proantocianidina, auxiliou na confirmação da unidade superior como sendo robinetinidol. O espectro de massas (EM/ES) em modo positivo (Fig. 33) com adição de Na^+ , apresentou o pico molecular em m/z 1079,5. Este dado auxilia na identificação da **substância VII**, confirmando tratar-se de uma substância dimérica (acetilada) com ausência de hidroxila na posição 5 do anel A, conforme descrito anteriormente. Desta forma, a **substância VII** foi identificada como sendo **robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina**, tendo sido isolada de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO et al., 1996b) e de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (LOPES, 2003).

Tabela 11 - Dados da substância VII - robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada (CD₃OD; 300 MHz).

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura δ (ppm)
H-4 ax (F)	2,66	m		2,66
H-4 eq (F)	2,98	dd	$^2J_{H-4eq(F)-H4ax(F)}=16,7$ $^3J_{Heq(F)-H-3 (F)}=-5,9$	2,99
H-4 (C)	4,51	d	$^3J_{H4 (C)-H-3 (C)}= 9,8$	4,51
H-2 (C)	4,89	d	$^3J_{H-2(C)-H-3 (C)}= 9,6$	4,90
H-3 (F)	4,84-4,87	m		4,80-4,87
H-2 (F)	5,03	d	$^3J_{H-2(F)-H-3(F)}=8,6$	5,04
H-3 (C)	5,78	pt	$\Sigma=19,5$ Hz	5,79
H-2'/H-6' (E)				
H-6/H-8 (A)	6,65	m		6,65
H-6 (D)				
H-5 (A)	6,88	d	$^3J_{H-5(A)-H-6(A)}=8,4$	6,89
H-2'/H-6' (B)	6,95	s		

s= singlete; pt= pseudo tripleto; d= dublete; dd= duplo dublete; ddd= duplo duplo dublete; m=multiplete; Mello et al. (1996b).

6 Capacidade antioxidante

6.1 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. pelo método DPPH•

Dentre os métodos químicos usados para a determinação da atividade antioxidante, destaca-se o método que utiliza o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), o qual é um radical livre estável, que na presença de um antioxidante

doador de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina (KOLEVA et al., 2002). Esta redução pode ser acompanhada espectrofotometricamente a 517 nm, pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança da coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto reduzido, descorando a medida que a reação se processa (Fig. 34). Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH• residual, mensurado após um período de tempo, corresponde inversamente à atividade antioxidante da substância analisada. A intensidade dessa mudança de coloração é proporcional à concentração da(s) substância(s) com potencial antioxidante presente(s), em conformidade com as leis de Lambert e Beer. Essa descoloração gradativa deve-se ao pareamento, também gradativo, dos elétrons de DPPH• disponíveis (BLOIS, 1958).



Figura 34 – Capacidade antioxidante da fração acetato de etila das cascas de *S. obovatum* pelo método de seqüestro do radical DPPH, evidenciando a mudança de coloração de violeta para amarela, da maior para a menor concentração.

A avaliação da capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa foram realizadas pelo método do seqüestro do radical DPPH, empregando-se o BHT como branco. A vitamina C foi usada como controle positivo. Foi efetuado também a leitura do controle negativo preparado com 0,5 ml da solução de DPPH 1 mmol l^{-1} em 4 ml de metanol.

Os resultados foram expressos pelo valor de IC_{50} , ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH• (ANTOLOVICH et al., 2002). A figura 35 mostra os valores encontrados de IC_{50} do extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa e vitamina C.

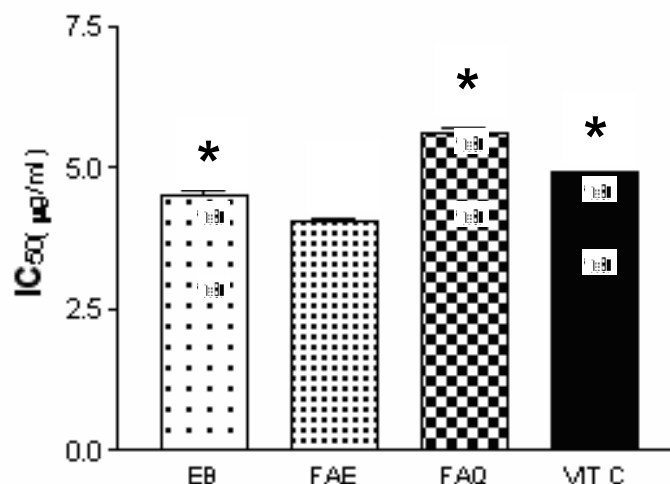


Figura 35 – Comparação entre valores de IC₅₀ (µg/ml) realizados pelo método do DPPH•. Valores de IC₅₀ realizados pelo método do DPPH• apresentados pela vitamina C (4,93 µg/ml ± 0,05; cv% = 1,07), EB (4,52 µg/ml ± 0,16; cv% = 3,54), FAE (4,04 µg/ml ± 0,13; cv% = 3,22) e FAQ (5,58 µg/ml ± 0,22; cv% = 3,94). *diferença significativa entre os experimentos ($P < 0,005$).

Pode-se avaliar que os extratos de *S. obovatum*, de uma forma geral, possuem capacidade antioxidante quando comparados com a vitamina C (substância de reconhecida ação antioxidante). Os dados obtidos, quando comparados com outras espécies, como no caso de *Bauhinia microstachya* (escada de macaco) (IC₅₀ de 8,64 µg/ml) (HIRATA, 2004), de *Rauvolfia sellowii* (pau-para-tudo) (IC₅₀ de 30,27 µg/ml); *Jacaranda micrantha* (caroba) (IC₅₀ de 46,29 µg/ml), *Anchietea pyrifolia* (cipó-suma) (IC₅₀ de 91,81 µg/ml) (MENEZES et al., 2004), dentre outras, mostraram melhor capacidade antioxidante.

Nota-se que dentre os extratos avaliados, a fração acetato de etila é a que possui maior capacidade antioxidante (IC₅₀ de 4,04 µg/ml), vindo a seguir o extrato bruto (IC₅₀ de 4,52 µg/ml). A fração aquosa apresentou uma IC₅₀ de 5,58 µg/ml. Na análise estatística, empregando-se Anova de uma via não paramétrico e o método de Tukey, observou-se o que segue: a fração acetato de etila apresentou a melhor atividade, seguida do extrato bruto, ambas para $P < 0,001$. Esta avaliação e comparação é realizada frente ao controle positivo, vitamina C. A fração aquosa, apesar de apresentar um valor estatisticamente significativo ($P < 0,01$) frente a vitamina

C, não reflete uma capacidade antioxidante, mas sim o contrário, haja visto que o valor obtido é superior ao da vitamina C. Como dito anteriormente, o valor residual deve ser inversamente proporcional ao valor residual de DPPH•.

Estudos evidenciam que o efeito benéfico atribuído aos polifenóis para determinadas atividades farmacológicas esteja envolvido com sua habilidade de seqüestro de espécies reativas de oxigênio (CARVALHO, 2004).

A presença de um éster gálico ou galato, preferencialmente na posição 3', aumenta a habilidade em seqüestrar radicais $O_2\bullet$ e $OH\bullet$. O seqüestro de radicais livres foi mais intenso para acoplamentos de dímeros (4→8) que para os acoplamentos (4→6) das proantocianidinas (DE BRUYNE et al., 1999), diferença não observada na atividade de seqüestro de radicais OH.

Hatano et al. (1990) observaram em seus estudos, a forte ação de seqüestro de radicais $O_2\bullet$ para o ácido gálico. O efeito foi justificado pela estrutura orto-triidroxilada desta substância.

Nakagawa et al. (2002) também relacionaram as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos com o grau de hidroxilação do anel B, sugerindo ainda, que a triidroxilação aumenta a atividade anti-radicalar dos taninos.

Entretanto, Haslam (1996) alerta que, assim como o ascorbato em algumas circunstâncias mostra atividade pró-oxidante, os compostos fenólicos também poderiam reagir com o íon ferro na presença de peróxido de hidrogênio para produzir espécies reativas de oxigênio, as quais poderiam subsequente danificar outras moléculas biológicas.

Até o momento, nenhum estudo foi realizado para comparar taninos condensados que possuem OH na posição 5 do anel com aqueles que não a possuem, como as prorobinetinidinas isoladas neste trabalho e profisetinidinas isoladas de *S. polyphyllum* Mart. (MACHADO, 2005).

6.2 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio

Outro método freqüentemente usado para avaliar a capacidade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio, o qual se baseia na redução do MO^{+6} para Mo^{+5} , com

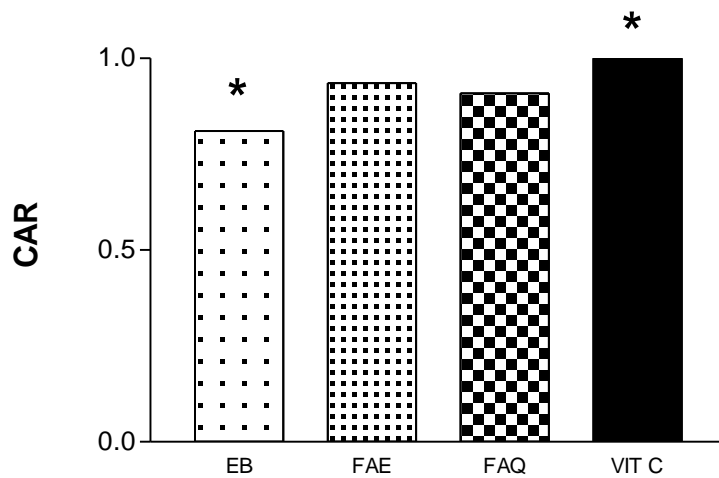
subseqüente formação de um complexo fosfato-Mo⁺⁵. Em contraste com o método do DPPH• acima descrito, esta reação se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado (PRIETTO et al., 1999).

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio é um método considerado simples, de baixo custo e usado quando se deseja avaliar e comparar a capacidade antioxidante de uma variedade de extratos (HIRATA, 2004). Desta maneira, o extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa (200 µg/ml) foram submetidos à reação de óxido-redução. A solução teste inicial possui coloração amarela tornando-se verde à medida que a solução de fosfato molibdênio se reduz, sendo lida em 695 nm (Fig. 36) (PRIETTO et al., 1999).



Figura36 - Ensaio da capacidade antioxidante após redução do complexo fosfomolibdênio. 1. branco; 2. extrato bruto; 3. fração acetato de etila; 4. fração aquosa; 5. vitamina C.

A figura 37 mostra os valores encontrados para a capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa em relação à vitamina C (200 µg/ml). Esta substância é reconhecida pelo seu poder antioxidante que assume o valor da unidade (MAY, 1999) e freqüentemente utilizada como referência neste tipo de ensaio experimental (PRIETTO et al., 1999). Dessa forma, pode-se observar que a Capacidade Antioxidante Relativa (CAR) de todas as frações e do extrato bruto foi menor que a referência.



*diferença com relação a vitamina C ($P \leq 0,005$).

Figura 37 – Comparação da capacidade antioxidante do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) (200 $\mu\text{g/ml}$), após redução do complexo fosfomolibdênio. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão da capacidade antioxidante em relação a atividade da vitamina C (CAR) usada como padrão (200 $\mu\text{g/ml}$).

Dentre as frações estudadas, a fração acetato de etila apresentou o maior potencial para reduzir o complexo fosfomolibdênio, cuja capacidade antioxidante relativa (CAR) foi de $0,9537 \pm 0,067$; $\text{cv} = 7,02\%$, seguida da fração aquosa (CAR = $0,9275 \pm 0,0498$; $\text{cv} = 5,37\%$) e do extrato bruto (CAR = $0,8242 \pm 0,0445$; $\text{cv} = 5,39\%$). Pela análise estatística nota-se diferença significativa entre a CAR da vitamina C (CAR = 1,0) quando comparado ao valor de CAR do extrato bruto ($P \leq 0,005$). A CAR da fração acetato de etila e da fração aquosa quando comparadas à vitamina C, não apresentaram diferença significativa.

7 CONCLUSÕES

- O controle de qualidade permitiu traçar um perfil da droga vegetal, visando manter um padrão de reprodutibilidade, compatíveis com a literatura.
- O estudo fitoquímico de extratos semipurificados das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae) demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.
- Foram isoladas e identificadas 7 substâncias, contribuindo ao estudo fitoquímico da espécie:
 - ácido gálico,
 - galocatequina,
 - epigalocatequina,
 - ácido *p*-hidróxibenzóico,
 - 4'-*O*-metil-galocatequina,
 - epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina,
 - robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina.
- O estudo da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH evidenciou que o extrato bruto e a fração acetato de etila de *S. obovatum* possuem potencial antioxidante quando comparados com a vitamina C.
- O estudo da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método do complexo fosfomolibdênio evidenciou que tanto a fração acetato de etila como a fração aquosa de *S. obovatum* possuem capacidade de formação do complexo fosfomolibdênio comparando-as com a vitamina C.

REFERÊNCIAS

AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agric. Ecosyst. Environmental**, v. 75, p.1-12, 1999.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM; BARL, B., WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst.**, v. 127, p.183-198, 2002.

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. **Phytotherapy Research (London)** v. 13, p. 264-266, 1999.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative adstringency. **Phytochemistry (New York)**, v. 12, p. 907-912, 1973.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 82, no. 2-3, p.155-158, 2002.

BENNIE, L.; COETZEE, J.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and stereochemistry of dimeric proanthocyanidins possessing the rare C4(C) C5 (D) interflavanyl linkage. **Phytochemistry**, v. 59, p.673-678, 2002.

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.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. **Methods Enzymology**, v.186, p.343-355, 1990.

BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. Short communication. **Toxicology Letters** **00**, p. 1-9, 2003

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar** (Coord.). Niterói: EDUFF, 1996.

BRAND WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft un – Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 48 de 16.03.2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18.03.2004.

BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg.Mimosoideae) em bovinos e achados anátomo-histopatológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 61-71, abr./jun., 2001.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica e de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2033-2040, 1991.

CARDOSO, C. A. L. **Análise Cromatográfica de Plantas e Produtos Fitoterápicos**, 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Araraquara, 2000.

CARDOSO, M. L. C. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas e Tecnológicas na Obtenção de Extratos Secos Nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O Mach.** 2002. 114 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências

Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Uma introdução à química de radicais livres. In: CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. (Ed.). **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: interativos, p.1-13, 1996.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p.1161-1168, 2002.

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

CONTRERA, M. G. D.; LOPES, R. A.; AZOUBEL, R.; COLUSSO, A. J.; CONTRERA, J. D.; GUSMAN, A. B. Efeitos do extrato de sementes de barbatimão *Stryphnodendron obovatum* Benth (Fabales, Mimosaceae) no desenvolvimento fetal do rato. **Biológica** – Ribeirão Preto, v. 7, p. 37-44, 1981/1982.

CORK, S. J.; KROCKENBERGER, A. K. Methods and pitfalls of extraction condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. **Journal Chemical Ecology**, v. 17, p. 123-134, 1991.

COSTA, T. E. M. M.; DIAS, A. P.M. D.; CAPRILES, P. V. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; AMORIN, E. L. C. de; LIMA, C. S. A. de; BERNARDO-FILHO, M. Effect of barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville] infusion on the labeling of blood elements with technetium-99m. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12; p.7-9, 2002, supplement.

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

CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; PORTER, L. J.; THOMAS, W. A.; JONES, W. T. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, p. 375-377, 1979.

DANNE, A. **Polyphenole aus den traditionellen Arzneipflanzen *Cistus incanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae).** 260 f. Tese (Doutorado) - Münster, Alemanha, 1994.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical and Systematic Ecology**, Oxford, v. 27, p. 445-459, 1999.

DELAPORTE, R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. de. Control de Callidad Y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze Y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 20, no. 1, p. 39-46, 2001.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência.** São Paulo: UNESP, p. 12, 1996. p. 187-196.

DREWES, S. E.; ROUX, D. G.; SAAYMAN, H. M.; EGGERS, S. H.; FEENEY, J. Some stereochemically identical biflanols from the bark tannins of *Acacia meransii*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, Easton., p.1302-1308, 1967.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasasy Aceites**, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. São Paulo: Ed. São Paulo, 1959.

FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v.74, p.14-23, 2004.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J.Z.; DALLA, G. MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the open surgical wounds. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, p. 564-568, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira (São Paulo)**, v. 43, n. 1, 1997.

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

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

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

Guia Fitoterápico. Maringá, Prefeitura Municipal, 2000.

GUERRA, S. S. F.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries**, v. 6, p. 51-54, 1994.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: HUDSON, B. J. F. (Ed). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, p.1-18, 1990.

HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **J. Chemical Ecology**, v. 14, p. 453-461, 1988.

HAGERMAN, A. E. Tannin-protein interaction. In: HO, C. T.; LEE, C. Y.; HUANG, M. T. (Eds), **Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health**. 1. Analysis, occurrence and Chemistry. Washington, DC: American Chemical Society, 2002. cap.19, p.236-247.

HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HARBORNE, J. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1998.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2005.

HASHIMOTO, F.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds XC. 8-C-Ascorbyl (-)-epigallocatechin 3-O-gallate and novel dimeric flavan-3-ols, oolonghomobisflavans A and B, from Oolong tea. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 3255-3263, 1989.

HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. v.9, p.505-560.

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

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Washington, D. C., v. 59, p. 215, 1996.

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

HATANO, T.; YASHUARA, T.; YOSHIHARA, R. AGATA, I.; NORO, T.; OKUDA, T. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, no. 5, p. 1224-1229, 1990.

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**, v. 59, p.749-758, 2002.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M. Leguminosae. In: HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M. (Ed.). Chemotaxonomie der pflanzen. Basel: **Birkhäuser Verlag**. v. 11a. p. 1, 1994.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Linkageisomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-prcyanidins, **Journal Chemical Society, Perkin Transactions I**,

Easton, p. 1209-1216, 1982.

HERZOG-SOARES, J. D. A.; ALVES, R.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p.1-2, 2002, suplement.

HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado) – 2004.

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

HOLLEY, A. E.; CHEESEMAN, K. . Measuring free radical reations in vivo. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 494-505, 1993.

ISELY, D. Vascular flora of the southeastem 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-leismanial “barbatimão” [(*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae)] extract against promastigotes formas os *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p.1976, 1996, suplement.

KLEIN, A. B. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: **MARRONI, N. P. (Org.)**. Estresse oxidativo e antioxidantes. Canoas: Ulbra, 2002.

KOLEVA, II. , VAN BEEK T. A.; LISSEN, J. P.; de GROOT A.; EVSTATIEVA L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

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

KOMBAL, R. **Untersuchung der flavan-3-ole und flavonoide in *Potentilla anserine* L.**, Tese (Doutorado) - Universidade de Münster, Alemanha, p. 180, 1995.

LIMA, S. C.; MARTINS, D. T. O.; de SOUZA Jr, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, London, vol. 12, p. 218-220, 1998.

LLESUY, S. F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: MARRONI, N. P. (Org.). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ulbra, p. 22-31, 2002.

LOPES, G. C. **Estudos botânico, físico-químico, químico e biológico de cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae)**. 2003, 225 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*) **Food Chemistry**, v. 5, p. 197-202, 2001.

MACHADO, F. A. V. **Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae), barbatimão** curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005. Dissertação (Mestrado) - 2005.

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hammamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. **Phytochemistry (New York)**, v. 37, no. 2, p. 337-343, 1994.

MARTINS, E. M. O. ***Stryphnodendron* Mart. Leg. Mim. As espécies do nordeste, sudeste e sul do Brasil II**. Leandra, n. 4-5, p. 53-67, dz., 1974.

MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; RAO, V. S. N. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, p. 427-431, 2002.

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane. **Faseb Journal**, v. 13, p. 995-1006, 1999.

MELLO J. C. P. de; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) D. C. (Asteraceae) hidroalcoholic extracts. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MELLO, J. C. P. de. **Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less) D. C. compostas (carqueja)**, 1989. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

MELLO, J. C. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry (New York)**, v. 41, no. 3, p. 807-813, 1996a.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRDSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, no 3, p. 857-862, 1996b,

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

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidantes de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas, SP, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan.-jun., 2002.

MILONE, G. **Estatística: geral e aplicada**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima* Braz. **Journal of Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 31, no. 8, p. 1075-1079, 1998.

MOREIRA, D. L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseupiptadenia contola* (Leguminosae-Mimosidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p. 124-125, 2002.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chemical Toxicology**, London, v. 40, p. 1745-1750, 2002.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresour. Technology**, Essex, v. 87, p. 41-44, 2003.

NEVES, M. C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D. R.; FRACASSO, J. F.; LEPERA, E. Z.; 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. C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D. R.; FRACASSO, J. F.; LEPERA, E. P.; SILVA, R. F. 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.

NETO, C. R. S.; LOPES, R. A.; CONTRERA, M. G. D. Excreção renal de água, sódio e potássio em animais submetidos à sobrecarga aquosa de barbatimão *Stryphnodendron obovatum*. **Pesquisa Homeopática**, n. 5., p. 9-20, 1988.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, cap. 2, 2003, p. 25.

NONAKA, G. I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. **Journal Chemical Society, Perkin Transactions I**, Easton, p. 2139-2145, 1981.

OLIVEIRA, E. de. Cascas adstringentes brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 15-17, 1947.

OLIVEIRA, S. S.; MOTA, V. C.; BARROS, W. M.; BARROS, M. M. Efeitos do extrato metanólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) sobre o ciclo estral de ratas e parâmetros bioquímicos. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002. Cuiabá. **Resumos...** UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TARIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. **J. Atheroscler. Tromb.**, Limerick, v. 7, p. 164-168, 2000.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ^1H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 46, p. 3-52, 1981.

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

PELATTI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2003.

PEREIRA, M. N. S.; ANDRADE, A. C. U.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, CUIABÁ. **Resumos...**, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

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

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products (Columbus)** Washington, D.C. v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PORTER, L. J. Condensed tannins. In: ROWE, J. W. (Ed.) **Natural Products of Woody Plants I**. Berlin: Springer, 1989, p. 651.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Tannins and nutrition. **Purdue Univ. Exp. Sta. Bulletin**. 272 W Lafayette IN, 36 f., 1980.

PRISTA, L. N.; CORREIA ALVES, A.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, v. 1 e 3, 3 ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1981

PRIETTO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitations of antioxidant capacity through the formations of a phosphomolybdenum complex:

specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; MELLO, J. C. P. de; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology** 83, p. 101-104, 2002

REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; KELMER-BRACHT, A. M.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; MELLO, J. C. P. de; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. Short communication. **Toxicology Letters** 00, p. 1-9, 2003.

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 Biotechnology (Clifton)**, v. 34/45, p. 349, 1992

RUSSEL, J. B. Os elétrons. In: **Química geral**, 2 ed. Makro Books, São Paulo, v. 1, p.242-294, 1994.

SANCHES, A. C. C.; **Estudos anatômico, físico-químico, químico, da atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante do extrato das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae)**. Araraquara: curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004. Dissertação (Mestrado) – 2004.

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

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, p. 292-299, 2002.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. de. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS; Editora da UFSC, 2003, cap. 24, p. 528 – 532.

SCHOFIELD, P; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysys of condensed tannins: a

review. In: **Animal Feed Science Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SCHOLZ, E., Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Deutsch. Apotheker. Zeitung**, v. 134, n. 34, p. 3167-3179, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRILL, C. T. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, v. 15, n. 1, p.71-81, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS; Editora da UFSC, cap. 13, p. 221 – 258, 2003.

SOUZA, S. M. C.; ROCHA, I. L. F.; NOBRE, M. E. P.; COSTA, J. G. M.; VALE, T. G.; VIANA, G. S. Atividade anticonvulsiva do extrato etanólico (ea) de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002. Cuiabá. **Resumos...**, Cuiabá: UFMT, 2002.

STEYNBERG, J. P.; BURGUER, J. F. W.; MALAN, J. C. S.; CRONJÉ, A.; YOUNG, D. A.; FERREIRA, D. Natural (-)-fisetinol-(4,8)-(-)-epicatechin profisetinidins. **Phytochemistry**, New York, v. 29, p. 257-277, 1990.
THOMPSON, C. E. M. de; SANTOS, D.; HASLAM, E.; TANNER, R. J. N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. **Journal Chemical Society, Perkin Transactions I**, Easton, p. 1387-1399, 1972.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; DRIMEIER, D.; COSTA, J. B. D.; CAMARGO, A. J. R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (leg. Mimosidaceae). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 1, 1998.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae**. 92 f. Araraquara: curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade

Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002. Dissertação (Mestrado) – 2002.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. London: Baillière-Tindall, 1989, p. 45-73.

TURSCH, B.; TURSCH, E.; HARRISON, I. T.; BRAZÃO da SILVA, G. B. C. T. C.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; DJERASSI, C. Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformational changes in triterpenes of the β -amyrin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. **Journal Organic Chemistry**, Washington D. C., v. 28, p. 2390, 1963.

TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E.; CHIURDOGLU, G. Triterpenes II(*). Les sapogénines J e L de *Stryphnodendron coriaceum*. **Bulletin Society Chemistry**, Belges, v. 75, p. 26, 1966.

WEINGES, K.; BAHR, W.; EBERT, W.; GORITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschritte der Chemical Organischer Naturstoffe**, v. 27, p. 158-260, 1969.

YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; TOLEDO, C. E. M.; MELLO, J. C. P. de. Controle de qualidade e análise fitoquímica de cascas e extratos de Barbatimão. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002. Cuiabá. **Resumos...**, Cuiabá: UFMT, 2002.