

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum* Benth., ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E DA AÇÃO CICATRIZANTE DOS SEUS EXTRATOS

ANDRÉIA CRISTINA CONEGERO SANCHES

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP

2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum* Benth., ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E DA AÇÃO CICATRIZANTE DOS SEUS EXTRATOS

ANDRÉIA CRISTINA CONEGERO SANCHES

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP

2004

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

S311e Sanches, Andréia Cristina Conegero
Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.
atividade antioxidante, antimicromiana e da ação cicatrizante dos seus
extratos. / Andréia Cristina Conegero Sanches . – Araraquara, 2004.
214 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista. “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade
de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello

1. Stryphnodendron. 2. Taninos condensados. 3. Isolamento químico.
4. Atividade biológica. 5. Planta medicinal. I. Mello, João Carlos Palazzo.
orient. II. Título.

CDD: 615.321

*A meus pais Antonio e Shirley
Meu irmão André e minha cunhada
Daiane, meu tio Fernando
Meus avós: Francisco, Ângelo (in
memorian), Tereza e Malvina*

“Existem pessoas que nos fazem viver...”

AGRADECIMENTOS

“Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos obrigue a realizar aquilo de que somos capazes. É este o papel da amizade.”

Emerson

A Deus pela oportunidade desta existência, e por nos conceder na Natureza recursos para combatermos nossas enfermidades ao mesmo tempo dando-nos inspiração para realizar um trabalho como esse, que resgata o valor de nossas plantas.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por sua orientação, sua compreensão e amizade ao longo dessa etapa e pelos conhecimentos compartilhados desde o período da graduação, na Universidade Estadual de Maringá.

Aos professores Cássia Mônica Sakuragui, Eneri V. S. Leite Mello, Luzmarina Hernandes, Celso Nakamura, Luis Vitor S. Sacramento, Raquel Regina Duarte Moreira pelo apoio e amizade durante a pesquisa.

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

Às minhas primas Leila, Elenita, Shirley, Inês, Franciele e Géssica pela amizade e confiança.

Às minhas amigas: Luciany, Lika, Marina, Eliane, Patrícia, Elyandra, Mariza, Érica, Karen, Rita, Priscila, Aline, Tânia, Lorena, Cristiane, Marly, Gisely, Fátima, Inês, Josimara, Francielli e Maria do Carmo pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos: Marcos Luciano e família, Alberto e família, Elias e família, Ângelo, Antônio, José e Alex pela amizade e companheirismo cultivados nessa etapa.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia e Departamento de Farmácia e Farmacologia: Sílvia R. Mundo, Patrícia Érica R. e Silva, Leila Uemura, Elza Yamaguti, Cleyton E. M. Toledo, Karen J. Galina, Valter Roman, Leocir, Analice, Admir, D.Nair, Solidalva, Nina, Cláudio, Carlos E. , Lucílio, Helena, Sônia, Marcos Trombeli pelo trabalho em equipe.

Aos professores do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM Selma, Mara, Diógenes e Luiz Carlos pela valiosa colaboração em vários momentos desse trabalho.

As amigas Eurides e Maria dos Anjos (Histologia-UEM), Angélica (laboratório de botânica, FCF-Unesp), Cláudia, Laura e Sônia (Seretaria de Pós-Graduação da FCF-Unesp), Marinete (Microbiologia Básica- UEM), Elisete (Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas–UEM), Angela e Emy (Herbário-UEM) pelo auxílio na execução desse trabalho .

Aos professores do mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus Araraquara pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM, por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos da UNIOESTE pelo incentivo e confianças depositados em meu trabalho em especial: Daniela Ferreira Miyata, Verediana Lenartovicks, Fabíola Giordani.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNESP, pela oportunidade de concretizar esse trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, imprescindível para que fosse possível a realização desse trabalho.

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

TERMO DE APROVAÇÃO

ANDRÉIA CRISTINA CONEGERO SANCHES

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS CASCAS DE *Stryphnodendron obovatum* BENTH., ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E AÇÃO CICATRIZANTE DE SEUS EXTRATOS

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

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

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento
UNESP – Araraquara –SP

Araraquara, 23 de janeiro de 2004

LISTA DE FIGURAS

1	Ação exploratória do homem e seu resultado perante a natureza	32
2	<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.	36
3	Estrutura das sapogeninas 1, 2, 3 e 4 isoladas dos frutos de <i>Stryphnodendron coriaceum</i> Benth.	38
4	Estrutura química de prodelfinidina [(4'-O-(metilgalocatequina- (4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina)] isolada das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	39
5	Estrutura química da quercetina	40
6	Epigalocatequina e galocatequina isoladas de <i>S. obovatum</i>	41
7	Associação polifenol-proteína	49
8	Precipitação do complexo polifenol-proteína	49
9	Estrutura básica de proantocianidina	51
10	Esquema de corte da pele	64
11	Placa de 96 poços utilizada para desenvolvimento da técnica de microdiluição em caldo	95
12	Corte transversal de casca de <i>S. obovatum</i> Benth. coradas em safrablau	103
13	Ritidoma nas cascas de barbatimão corados em safrablau	104
14	Células esclerenquimáticas em corte transversal de casca de barbatimão coradas em safrablau	105
15	a) Corte longitudinal corado em safrablau mostrando as fibras do floema, cristais prismáticos e b) células gigantes presentes e células de conteúdo pardo	106
16	Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas através de cromatografia em coluna Sephadex® LH-20	121
17	Espectro de RMN ¹ H de epigalocatequina, (CD ₃ OD, ν = 300 MHz)	126
18	Espectro de RMN ¹ H de epigalocatequina peracetilada, (CDCl ₃ , ν = 300 MHz)	127
19	Espectro COSY ¹ H/ ¹ H de epigalocatequina (CDCl ₃ , ν = 300 MHz)	128

20	Espectro de massas de epigalocatequina peracetilada	129
21	Espectro de RMN ^1H de galocatequina (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	132
22	Espectro de RMN C^{13} da galocatequina (CD_3OD relativo para TMS, $\nu = 75$ MHz)	133
23	Espectro massas de galocatequina peracetilada	134
24	Espectro de RMN ^1H de epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)-galocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	140
25	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)-galocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	141
26	Espectro de massas de epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)-galocatequina	142
27	Espectro de RMN ^1H da epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)- epigalocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	146
28	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)- epigalocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	147
29	Espectro de massas de epigalocatequina-(4 \rightarrow 8)-epigalocatequina peracetilada	148
30	Espectro de RMN ^1H de robinetinidol-(4 \rightarrow 8)-epigalocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	153
31	Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de robinetinidol-(4 \rightarrow 8)-epigalocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)	154
32	Espectro de massas de robinetinidol-(4 \rightarrow 8)-epigalocatequina peracetilada	155
33	Cromatograma das substâncias referências	158
34	Cromatogramas obtido por CLAE de a) FAcOEt; b) F#48; c) F#10 e d) F#11	159
35	Curva de calibração do padrão galocatequina, obtido através de CLAE	161

36	Espectro de varredura no UV de 200 a 350 nm, referentes aos padrões de galocatequina (a) e epigalocatequina (b)	162
37	Atividade antioxidante	165
38	Língua de reepitelização (aumento 10X)	179
39	Células em metáfase (aumento 40X)	183
40	Efeito do tratamento durante 4 dias com pomada de extrato bruto (PB) de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth. sobre o índice de metáfases/área	182
41	Efeito do tratamento durante 10 dias com pomada contendo extrato bruto (PEB) (a), (PAcOEt) (b), (PAq) (c) de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth. 2,5% sobre a migração celular em feridas cutâneas de ratos Wistar. Valores médios \pm DP.	185
42	Efeito do tratamento com pomada de extrato bruto (PEB) (a), (PAcOEt) (b), (PAq) (c) de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth. 2,5% sobre o número de metáfases/área em feridas cutâneas. Valores médios (n=5).	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMH	Ágar Mueller Hinton
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATTC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
∅	Diâmetro
d	Dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EB	Extrato bruto
EE	Extrato etanólico
EM	Espectrometria de massas
ERMO	Espécie reativa do metabolismo de oxigênio
F#1	Subfrações obtidas através de CC da fração acetato de etila

<u>EAcOEt</u>	Fração acetato de <u>etila</u>
h	Altura
HETCOR	Espectroscopia de correlação <u>heteronuclear</u>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
<u>m</u>	<u>Multiplete</u>
<u>mg</u>	Miligramas
<u>ml</u>	Militros
<u>mm</u>	Milímetros
<u>p.a</u>	Pró-análise
<u>PAcOEt</u>	Pomada da fração acetato de <u>etila</u>
<u>PAq</u>	Pomada da fração aquosa
PBS	Salina tampão fosfato
PEB	Pomada de extrato bruto
RMN	Ressonância magnética nuclear
<u>s</u>	Singleto
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil <u>tetrazólio</u>
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Luz ultravioleta
<u>m/V</u>	<u>massa</u> /Volume
V/V	Volume/volume

LISTA DE FLUXOGRAMAS E QUADROS

1	Preparação de extratos e fracionamento a partir das cascas de <i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.	117
2	Fracionamento fitoquímico a partir de F#8	122
3	Fracionamento cromatográfico a partir de F#10	143
4	Fracionamento cromatográfico a partir de F#10	137
n.	Quadro	Pg
1	Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos	52

LISTA DE TABELAS

n.	Tabela	Pg
1	Gradiente da fase móvel utilizada na CLAE	88
2	Análise fitoquímica preliminar das casca coletadas em Assis e lepê	109
3	Perda por secagem e perda por dessecação das cascas de barbatimão coletadas em Assis e lepê	110
4	Teor extrativo (%) e teor de taninos das cascas do barbatimão em diferentes métodos de extração e líquidos extratores coletadas em Assis e lepê	112
5	Determinação de teor extrativo (%) em diferentes métodos de extração e líquidos extratores das cascas de barbatimão coletadas em Assis utilizadas para o isolamento químico	113
6	Rendimentos de extração nas diferentes fases de semipurificação da matéria-prima vegetal	116
7	Frações obtidas através de cromatografia em coluna Sephadex [®] LH-20 da fração AcOEt	119
8	Dados da substância I epigacotequina; CD ₃ OD; (ν = 300 MHz)	123
9	Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹ H para a substância I epigacotequina peracetilada em (CDCl ₃ ; ν = 300 MHz)	125
10	Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹ H para a substância II galocatequina peracetilada CDCl ₃ , (ν = 300 MHz)	131
11	Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹ H para a substância III [epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada] (CDCl ₃ ν = 300 MHz)	132

12	Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹ H para a substância IV [epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina peracetilada] (CDCl ₃ , ν = 300 MHz)	145
13	Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹ H para a substância V [robinetinidol-(4β→8)-epigalocatequina peracetilada] (CDCl ₃ , ν = 300 MHz)	152
14	Área dos picos da substância referência galocatequina para a curva padrão por CLAE	160
15	Valores obtidos para galocatequina e epigalocatequina na FAE, F#8, F#10 e F#11 (n=6)	163
16	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos das cascas de <i>S. obovatum</i> Benth.	169
17	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CBM) dos extratos das cascas de <i>S. obovatum</i> Benth.	173
18	Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de extrato bruto aceto-aquoso liofilizado (PEB) 2,5% (n=5)	177
19	Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de fração acetato liofilizada (PAcOEt) 2,5% (n=5)	177
20	Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de fração aquosa liofilizada (PAq) 2,5% (n=5)	178

RESUMO

O “barbatimão de folha miúda” *Stryphnodendron obovatum* Benth. é usado popularmente como: cicatrizante, antimicrobiano, em leucorréia, blenorragia, diarréia, hemorragia e no tratamento de úlcera. Esse trabalho teve como objetivo realizar estudo farmacognóstico e comprovar atividades antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante do extrato bruto, frações e subfrações. Traçou-se o perfil das estruturas anatômicas, constituintes químicos da droga vegetal, observando que a melhor época de coleta para se obter os taninos, dentre as estações do ano avaliadas foi a primavera. A partir de cromatografia em coluna Sephadex® LH-20 obteve-se 22 subfrações a partir da fração acetato de etila, e foram isoladas e identificadas 5 substâncias: epigalocatequina, galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina e robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina. Através de cromatografia líquida de alta eficiência foi possível propor método simples e eficiente de separação para taninos. O estudo da atividade antioxidante mostrou que as subfrações de 6 a 12 demonstraram excelente atividade quando comparada aos controles quercetina, rutina, ácido gálico e astilbina. Todas as frações, subfrações e extratos foram testadas frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*. As subfrações F#13 a F#22 foram ativas frente as bactérias (Gram-positivas) e as leveduras (*C. albicans* e *C. parapsilosis*). O extrato bruto e a fração acetato de etila aumentaram o número de metáfase/área indicando melhora na proliferação celular epitelial nas feridas tratadas com pomadas contendo 2,5% dessas frações.

Palavras chave: *Stryphnodendron obovatum*, Leguminosae, controle de qualidade, taninos, CLAE, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, ação cicatrizante.

ABSTRACT

“Barbatimão de folha miúda” *Stryphnodendron obovatum* Benth. was used popularly as: antimicrobial, in wound healing, leukorrhea, blenorhoea, diarrhoea, and anti-inflammatory. The present work was to accomplish study pharmacognostic and to check some activities of EB, fractions and subfractions: antioxidant, antimicrobial and wound healing properties. It was possible to trace a profile of the representatives chemists of the vegetable drug, and also to observe that the best time for obtaining tannins was the Spring. From CC Sephadex® LH-20 it 22 subfractions were obtained using FAcOEt, and 5 compounds were isolated and identified: epigallocatechin, galocatechin, epigallocatechin-(4 β →8)-galocatechin, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin and robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatechin. The study of the antioxidant activity showed that the subfractions 6 to 12 demonstrated antioxidant activity as compared to the controls quercetin, rutin, galic acid, and astilbin. All the fractions, subfractions and extracts were tested against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*. The subfractions F#13 to F#22 were active against Gram-positive microorganisms, *C. albicans* and *C. parapsilosis*. FEB and FAcOEt increased the metafase number/area indicating improvement in the proliferation cellular in the wounds using pomade at 2.5%.

KEYS WORDS: *Stryphnodendron obovatum*, Leguminosae, quality control, tannin, antioxidant activity, antimicrobial activity, wound healing properties.

SUMÁRIO

	SUMÁRIO.....	4
1	INTRODUÇÃO.....	24
2	OBJETIVOS.....	33
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	34
3.1	<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.....	34
3.2	Descrição macroscópica.....	35
3.3	Conteúdo químico do gênero <i>Stryphnodendron</i>.....	37
3.4	Atividades farmacológicas de extratos de algumas espécies do gênero <i>Stryphnodendron</i>	41
3.4.1	<i>Estudos científicos de algumas atividades farmacológicas</i>	42
3.4.1.1	<i>Antimicrobiana</i>.....	43
3.4.1.2	<i>Atividade cicatrizante</i>.....	43
3.4.1.3	Toxicologia.....	43
3.4.1.4	<i>Outras atividades</i>.....	46
3.5	Taninos.....	48
3.6	Taninos condensados.....	51
3.7	Atividade antioxidante.....	57
3.8	Antimicrobianos.....	61
3.9	Cicatrização.....	64
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
4.1	Droga Vegetal.....	75
4.2	Solventes, soluções e reagentes.....	75
4.3	Equipamentos.....	77
4.4	Identificação e caracterização da espécie em estudo.....	79

4.4.1	Estudo taxonômico.....	79
4.4.1.2	Descrição Botânica.....	79
4.4.1.2.1	<i>Inclusão do material vegetal em parafina.....</i>	79
4.4.2	Análises físico-químicas.....	80
4.4.2.1	<i>Perda por dessecação.....</i>	80
4.4.2.2	<i>Determinação do teor de extrativos.....</i>	81
4.4.2.3	<i>Perda por secagem.....</i>	82
4.4.3	Análise fitoquímica preliminar.....	82
4.4.3.1	<i>Identificação do núcleo esteroidal.....</i>	82
4.4.3.2	<i>Teste de espuma (saponinas).....</i>	83
4.4.3.3	<i>Polifenóis.....</i>	83
4.4.3.4	<i>Taninos condensados e hidrolisáveis.....</i>	83
4.5	Análise Quantitativa.....	84
4.5.1	<i>Determinação do teor de taninos totais.....</i>	84
4.6	Isolamento de compostos fenólicos.....	86
4.6.1	<i>Obtenção da fração acetato de etila.....</i>	86
4.6.2	<i>Isolamento dos compostos presentes na fração acetato de etila</i>	86
4.6.3	<i>Cromatografia em coluna das frações F1 à F12.....</i>	88
4.6.4	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD).....</i>	89
4.6.5	<i>Derivatização química.....</i>	89
4.6.6	<i>Cromatografia em camada delgada preparativa.....</i>	90
4.6.7	<i>Análise estrutural das substâncias isoladas.....</i>	90
4.6.8	<i>Rotação ótica (Polarimetria).....</i>	91
4.6.9	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	91
4.6.9.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência – quantitativa.....</i>	91
4.6.9.1.1	<i>Condições cromatográficas.....</i>	91

4.6.9.2	<i>Curva de calibração.....</i>	92
4.6.9.2.1	Preparação das soluções padrão de catequina, epicatequina.. e galocatequina	92
4.6.9.2.2	Preparo das amostras.....	93
4.6.9.2.3	Análise quantitativa.....	93
4.6.9.2.4	Repetibilidade para Galocatequina.....	94
4.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	95
4.7.1	Estudo da atividade antioxidante.....	95
4.7.2	Estudo da atividade microbiológica.....	96
4.7.2.1	<i>Padronização da suspensão bacteriana.....</i>	96
4.7.2.2	Padronização da suspensão da levedura.....	96
4.7.2.3	Preparo das drogas.....	97
4.7.2.4	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para.... bactérias através do método de diluição em placas</i>	98
4.7.3	Estudo da ação cicatrizante.....	100
4.7.3.1	<i>Animais.....</i>	100
4.7.3.2	<i>Comitê de ética em experimentação animal.....</i>	100
4.7.3.3	<i>Preparo das feridas.....</i>	100
4.7.3.4	<i>Preparo da pomada controle (base de Beeler).....</i>	101
4.7.3.5	<i>Preparo da pomada teste.....</i>	101
4.7.3.6	<i>Aplicação da pomada teste e pomada controle.....</i>	102
4.7.3.7	<i>Análise macroscópica.....</i>	102
4.7.3.8	<i>Coleta e processamento do material para análise histológica...</i>	102
4.7.3.9	<i>Análise Microscópica da proliferação celular epitelial.....</i>	105
4.7.3.10	<i>Análise da migração celular epitelial.....</i>	105
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	102
5.1	Estudo morfo anatômico das cascas.....	102

5.2	Controle de qualidade.....	107
5.3	Isolamento químico.....	115
5.3.1	Substância I: Epigalocatequina.....	122
5.3.2	Substância II: Galocatequina.....	130
5.3.3	Proantocianidinas diméricas.....	135
5.3.3.1	Substância III: epigalocatequina-(4\rightarrow8)-galocatequina.....	143
5.3.3.2	Substância IV: epigalocatequina-(4\rightarrow8)-epigalocatequina.....	147
5.3.4	5-deóxi-proantocianidinas.....	149
5.3.4.1	Substância V: robinetinidol-(4\rightarrow8)-epigalocatequina.....	150
5.3.5	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	156
5.4	Atividade Antioxidante.....	164
5.5	Atividade antimicrobiana.....	167
5.6	Atividade cicatrizante.....	176
6	CONCLUSÕES.....	188
	Referências Bibliográficas.....	190
	Anexos.....	211

1. INTRODUÇÃO

Popularmente a arte da cura através das plantas existe há tempos imemoriais. O papiro de Ebers, com data de 1500 a.C., encontrado no Egito, mencionava 150 plantas curativas, além de citar referências ainda mais antigas. Na Índia, observa-se o Susruta-samhita, que continha 700 plantas de uso medicinal, escrito em 600 a.C. Já a China teve sua primeira farmacopéia oficial promulgada em 659 d.C., enquanto o Império dos Astecas cultivava jardins de plantas medicinais, na era pré-colombiana (MARQUES, 1999).

Samuel Hahnemann (1755-1843), pioneiro da homeopatia, retirava das plantas e da natureza o máximo valor terapêutico. A história das plantas medicinais se confunde com a história da botânica e da medicina. Até o século XVI, os tratados de botânica, “herbários”, consideravam, além das plantas, as suas atividades farmacológicas. Hipócrates (em torno de 460 a.C.) e Galeno sobressaíam-se na idade antiga na arte erudita de curar através das plantas, sendo seus estudos reconhecidos e seguidos durante séculos a fio (BRAGANÇA, 1996).

A difusão da fitoterapia deve-se às publicações dos herbários e pela criação da primeira cátedra de botânica na Escola de Medicina de Pádua, em 1533. Em período anterior a este, as plantas eram tidas apenas como ingredientes utilizados na fabricação dos *simplices*, que eram utilizados na produção dos *compostos*. Em 1542, na Alemanha elaborou-se a primeira farmacopéia com 300 espécies vegetais de todo mundo. No final do século XVI, já haviam jardins botânicos organizados em várias universidades.

O sueco Karl von Linnè (1707-1778) através de seus estudos, deu início a Botânica Moderna (BRAGANÇA, 1996).

No Brasil, as plantas eram usadas pelos povos indígenas em rituais de cura, o mesmo ocorria com povos africanos que faziam associações com rituais religiosos. Os europeus também prestaram seu papel na disseminação da fitoterapia durante o período de colonização, bem como os chineses e japoneses, no início do século XX, quando chegaram ao Brasil (MARQUES, 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, por motivos de pobreza e precariedade do sistema de saúde, cerca de 65-80% da população mundial procura cuidados primários através das plantas medicinais (CALIXTO, 2000).

Os fitoterápicos têm sido, no caso do Brasil e de muitos outros países, o suporte da indústria farmacêutica nacional de pequeno e médio porte. No Brasil, devido à sua ampla biodiversidade, o uso de plantas medicinais é muito difundido entre a população. No entanto, a biodiversidade brasileira não é totalmente esclarecida, existem estimativas de milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos a serem investigadas (GUERRA e NODARI, 2001).

O mercado mundial de drogas de origem vegetal ainda fornece informações pouco precisas. Entretanto as informações que são fornecidas a sociedade são as seguintes: Estima-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal movimente US\$ 12,4 bilhões, sendo que 50% desse valor é referente ao mercado europeu. Outras informações sobre as prescrições são as seguintes: 25% do receituário médico de países desenvolvidos são de produtos naturais e preparações, e cerca de 80% em países em desenvolvimento (GUERRA e NODARI, 2001). Estimativas revelam que o mercado mundial de

produtos farmacêuticos movimentam US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (GUERRA e NODARI, 2001). Os mesmos autores afirmam que: no Brasil estima-se 25% dos US\$ 8 bilhões, faturamento de 1996, da indústria farmacêutica nacional, sejam originados de medicamentos derivados de plantas. No entanto, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais.

Apesar dos poucos estudos científicos comprovando a atividade das plantas medicinais, é amplo seu uso popular. As principais condições onde há procura de plantas são: febre comum (66%), desordens digestivas e/ou intestinais (25%), cefaléia (25%), insônia (25%), úlcera (34%), nervosismo (21%), desordens circulatórias (15%), bronquites (15%), doenças de pele (15%), fadiga e exaustão (12%). Vários fatores contribuem com o mercado mundial de fitoterápicos como: elevado custo de medicamentos sintéticos, preferência dos consumidores por terapias naturais, crença equivocada da ausência de efeitos indesejáveis dos medicamentos fitoterápicos e prática de automedicação (CALIXTO, 2000).

Por outro lado, poucas são as espécies vegetais que possuem estudos científicos de segurança, eficácia e controle de qualidade (CALIXTO, 2000).

A pesquisa destas “drogas vegetais” é dificultada por alguns fatores como: deficiência de padronização e controle de qualidade; uso de diferentes dosagens das plantas medicinais; estudos randomizados inadequados e pacientes não propriamente selecionados; grandes variações na duração do tratamento;

dificuldades para estabelecer placebos apropriados devido, principalmente, às características organolépticas (CALIXTO, 2000).

Além das atividades farmacológicas benéficas comprovadas cientificamente, sabe-se, também, da existência de efeitos tóxicos e interações de plantas medicinais com outros medicamentos. Um caso conhecido são as interações do *Hypericum perforatum* L. com contraceptivos orais, levando a estagnação do sangramento e com teofilina e ciclosporina, diminuindo suas concentrações (BERMAN, 2000).

Güzelcan *et al.* (2001) relataram caso de uma jovem de 23 anos que desenvolveu mania aguda e psicose quando fazia uso de uma combinação de extratos de valeriana (*Valeriana faurei* L.) e erva de São João (*Hypericum perforatum* L.) em doses elevadas.

Ioannides (2002), avaliou a interação entre ciclosporina em pacientes transplantados que faziam uso (automedicação) de erva de São João (*Hypericum perforatum* L.), observando rejeição do tecido transplantado.

O sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas (SINITOX) relata que aproximadamente 60% dos casos de intoxicação por plantas tóxicas no Brasil ocorrem com crianças com idade inferior aos 9 anos e 80% destes casos são acidentais (PLANTAS, 2002).

Estes relatos comprovam a preocupação dos pesquisadores da área na conscientização da população sobre o equívoco da crença popular sobre as plantas medicinais serem “naturais e não causarem mal”.

Tendo em vista a utilização das plantas medicinais, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária e atualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentaram os procedimentos de registro de medicamentos

fitoterápicos no mercado brasileiro através da legislação própria e com fiscalização (MARQUES e PETROVICK, 2001).

Este processo, no entanto, tem início na colonização brasileira quando a família real portuguesa chega ao Brasil em 1808, e estabeleceu padrões de produção, e regularizou a situação do boticário (MARQUES e PETROVICK, 2001).

Rodolfo Albino Dias da Silva (1889-1931), em 1929, publica a primeira edição da Farmacopéia Brasileira, contendo cerca de 280 espécies vegetais da Flora Brasileira e exótica. O governo brasileiro oficializou a utilização de plantas medicinais como matéria-prima farmacêutica através do Decreto nº 19606 de 1931, junto com a regulamentação da profissão farmacêutica. No entanto, o parâmetro de qualidade existente à época era a Farmacopéia, porém as monografias da primeira edição não aludiam nenhuma referência à toxicidade, ação terapêutica, nem condições que pudessem garantir a qualidade de medicamentos fitoterápicos (MARQUES e PETROVICK, 2001).

As regulamentações referentes à venda ou a introdução de um medicamento fitoterápico no mercado brasileiro têm evoluído no sentido de garantir ao consumidor medicamentos com padrões de segurança, eficácia e qualidade.

A portaria 06/95 discute a situação dos medicamentos fitoterápicos registrados até 31/01/1995, ficando estabelecido o prazo até 31/01/2001, para que se realizassem testes de toxicidade de forma a avaliar se os medicamentos fitoterápicos atendiam os critérios de segurança. Nesse período de avaliação, os medicamentos deveriam conter em sua bula e embalagem os dizeres

“Medicamento em Estudo para Avaliação Científica da Toxicidade e das Indicações Terapêuticas” (BRASIL, 1995).

Em agosto de 1996, a Vigilância Sanitária editou a portaria SVS nº 116 estabelecendo normas para estudo de toxicidade e eficácia de fitoterápicos. Determinou-se que se deve usar animais jovens, saudáveis e com mesmo peso, além de ser necessário o estudo da toxicidade em duas espécies animais, entre elas, uma deve ser não roedora. As condições dos experimentos devem ser estáveis, a via de administração deve ser a via utilizada para uso clínico, sempre com a utilização de um grupo controle. Os animais devem ser divididos em grupos tratados e controles, e serem avaliados machos e fêmeas das duas espécies. Para toxicidade aguda, além das especificações já discutidas é necessário que se estude uma outra via de administração além da prevista, e a observação se faz por pelo menos 7-15 dias. Deve-se, ainda, observar sinais de locomoção, comportamento, respiração, mortes, exames bioquímicos e histopatológicos (BRASIL, 1996).

A toxicidade em doses repetidas deve ser estudada em condições semelhantes à anterior e o período de administração varia de acordo com o uso pretendido em humanos: alguns dias (em animais-quatro semanas), um mês ou mais por ano (em animais-treze semanas). Estudos complementares sobre efeitos de fertilidade e performance reprodutiva, gestação, carcinogênese, mutagênese também devem ser realizados (BRASIL, 1996).

A toxicologia clínica deve ser estudada em voluntários sadios sendo administrados (droga e placebo), com administração aguda 7 dias e crônica 8-12 semanas. Estudos clínicos complementares e laboratoriais devem ser realizados após 3, 6 semanas e 24 horas após a última dose. Deve-se observar

que todos estes estudos devem passar pela avaliação de um comitê de ética (BRASIL, 1996).

Em 7 de agosto de 2002, a Diretoria Colegiada da ANVISA propõe algumas mudanças no regulamento técnico para medicamentos fitoterápicos, a RDC 17/00. Ficou estabelecido que, para o registro de um medicamento fitoterápico, deve existir um estudo prévio de estabilidade acelerada em três lotes ou estudo de estabilidade de longa duração. Não deve existir nos nomes dos medicamentos nenhuma das designações: “Plus, Max, Forte, Hiper”, que façam alusão à ação terapêutica diferenciada, o controle de qualidade deve ser descrito detalhadamente e acompanhado de referência bibliográfica e devem estar de acordo com as metodologias do Guia para Validação de Métodos Analíticos, além de serem realizados testes de estabilidade que devem seguir o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade de Medicamentos. Os medicamentos importados devem apresentar comprovante de pedido de inspeção sanitária e os testes de estabilidade devem seguir o Guia para Realização de Estudo de Estabilidade de Medicamentos (BRASIL, 2002; SANCHES, 2002a).

Em 28 de fevereiro de 2002 a ANVISA publica a resolução ANVS-RE nº 356 e 357, determinando a apreensão de todos produtos farmacêuticos contendo *Hypericum perforatum* L. e *Piper methysticum* G. Forst, que não contenham em suas embalagens tarja vermelha e a frase “venda sobre prescrição médica”, além daqueles que não estivessem devidamente registrados na ANVISA, considerando-se importantes interações medicamentosa, observadas pelo uso desses medicamentos fitoterápicos com outros medicamentos (BRASIL, 2002a).

A procura por fitoterápicos é imensa no cenário mundial, devido a isso, existem, leis que procuram legalizar seu uso, sua exploração, como por exemplo o artigo 14 do cap. VI da constituição de 1988 que regulamenta uma autorização prévia de autoridade competente para utilização para se ter acesso a recursos genéticos (GUERRA e NODARI, 2001).

A exploração dos recursos naturais é alarmante e, com objetivo de controlar essa atividade foi publicada a medida provisória 2052-1, de 28 de julho de 2000. Essa, regulamenta a exploração do patrimônio genético existente no País e, somente pode-se realizar mediante autorização ou permissão da União e o seu uso, comercialização ou aproveitamento para quaisquer fins, submetidos à fiscalização. É de propriedade da União o patrimônio genético existente em seus bens, bem como nos recursos naturais encontrados na plataforma continental e na zona econômica exclusiva. Vedou-se o acesso ao patrimônio genético para práticas nocivas ao meio ambiente e à saúde humana e para o desenvolvimento de armas biológicas e químicas. O poder público pode a qualquer momento que evidenciar alguma prática irreversível ao patrimônio genético do país impedir a atividade.

A legislação prevê que o Poder Executivo criará um Conselho Interministerial, vinculado à Casa Civil da Presidência da República, e essa pode conceder à instituição pública ou privada nacional, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, e a universidade nacional, pública ou privada, autorização especial de acesso, com prazo de duração de até dois anos, renovável por igual período (BRASIL, 2000).

No entanto no Brasil ainda existe exploração indiscriminada destas plantas, inclusive dentro das próprias reservas (Fig. 1), como por exemplo o que

acontece com o barbatimão, uma espécie com propriedades medicinais amplamente conhecidas pela população. É possível encontrar, mesmo em locais protegidos inúmeras espécies em extinção, devido a ação do homem que tem como responsabilidade legal cuidar das espécies presentes na reserva. Até que ponto nossa legislação está sendo cumprida?

Essa pergunta, sem resposta, nos deixa preocupados com a situação da flora Brasileira, que lamentavelmente está sendo extinta.



Figura 1- Ação exploratória do homem e seu resultado perante a natureza.

Foto: Sanches, (2002)

2. OBJETIVOS

Devido à imensa procura popular por plantas medicinais, entre elas espécies do cerrado como o *Stryphnodendron obovatum* Benth. Leguminosae, e aos poucos trabalhos encontrados, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Realizar estudos de controle de qualidade da droga vegetal *Stryphnodendron obovatum* Benth., e de seus extratos das cascas
- 2) Isolar polifenóis (taninos condensados) dos extratos das cascas *Stryphnodendron obovatum* Benth.
- 3) Estudar a atividade antioxidante
- 4) Estudar a atividade antimicrobiana
- 5) Avaliar ação cicatrizante dos extratos

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Stryphnodendron obovatum* Benth.

O gênero *Stryphnodendron* pertencente a família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, ordem Fabales (CRONQUIST, 1988), é nativo do cerrado e possui cerca de 48 espécies entre elas a *S. obovatum* Benth. Por outro lado Hegnauer e Hegnauer (1994) segerem três subfamílias, Mimosoideae, Papilionoidae e Caesalpinoideae dentro da família Leguminosae, ordem Rosales. Apesar dos dois sistemas de classificação, ainda não se tem esclarecido qual deles se utilizar. Entretanto, por motivos didáticos se utiliza a sistemática de Cronquist, (1988) como mais atual, já que Hegnauer e Hegnauer (1994) utilizam a proposta de Isely (1990) e não justificam seu emprego.

A subfamília Mimosoidae está presente em regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Austrália, contendo aproximadamente de 50 a 60 gêneros distribuídos nestas áreas.

Stryphnodendron é um curioso gênero de Leguminosae, subfamília Mimosoideae, tipicamente de clima tropical e subtropical sul americano. Do ponto de vista fitogeográfico e ecológico, em relação às espécies indígenas, deve-se ressaltar a constância da ocorrência das espécies em *habitats* bem definidos, podendo-se classificar as espécies em tipicamente florestal e as de ocorrência nos campos cerrados (OCHIONI, 1972).

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

3.2 Descrição macroscópica

Stryphnodendron obovatum Benth. é um arbusto perene, floresce entre outubro e fevereiro. Produz vagens, as quais são consumidas pelo gado o que favorece sua dispersão (BARBATIMÃO..., 2003). Possui cerca de 3-4 metros de altura; folhas alternas de 15-20 cm de comprimento, folíolos (4-9 pares) alternos, obovados (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, isoladas e germinadas, cálice curto-lacinado, glabro (1 mm), corola (3-4 mm), glabra, estames livres (4-5 mm) de comprimento, 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) (OCHIONI, 1974).



A



B

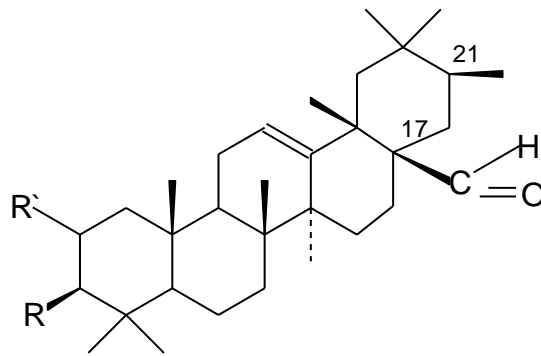


Figura 2- *Stryphnodendron obovatum* Benth.: A. Inflorescências, B. inflorescência com origem no caule, C. arbusto.

3.3 Conteúdo químico do gênero *Stryphnodendron*

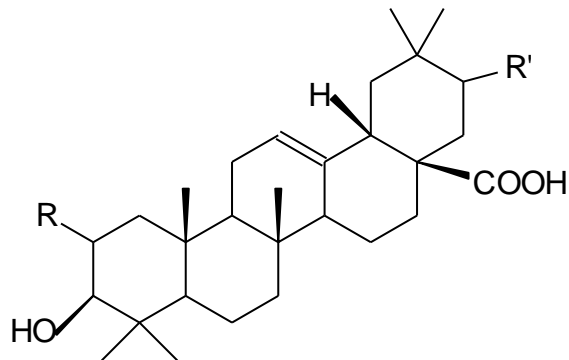
A Farmacopéia Brasileira (1959) indica um teor mínimo de taninos em cerca de 20% nas cascas da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, e o mesmo foi confirmado por Mello *et al.* (1996a) e Yamaguti *et al.* (2002).

A partir do extrato etanólico dos frutos de *S. coriaceum* Benth. foram isoladas duas sapogeninas 1 e 2 (TURSCH *et al.*, 1963). Sapogeninas homólogas (3 e 4) foram, posteriormente, isoladas pelos mesmos pesquisadores dos frutos da mesma espécie vegetal (Fig. 3) (TURSCH *et al.*, 1966).



Sapogenina 1- R=OH; R'=H

Sapogenina 2- R=R'=OH



Sapogenina 3- R=OH; R'=H

Sapogenina 4- R=H; R'=OH

Figura 3- Estrutura das sapogeninas 1, 2, 3 e 4 isoladas dos frutos de *Stryphnodendron coriaceum* Benth.

A partir dos frutos de *S. barbatimam*, Reicher *et al.* (1992) *apud* Toledo (2002), isolaram uma galactomanana e sua estrutura foi esclarecida com auxílio de espectro de RMN ^1H e ^{13}C .

A partir de extratos liofilizados de cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Mello *et al.* (1996a e 1996b), isolaram prodelfinidinas e prorobinetinidinas. Essas substâncias foram identificadas através de métodos espectroscópicos de (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HETCOR), espectrometria de massas, além de métodos ópticos (polarimetria e dicroísmo circular). Os mesmos autores isolaram e identificaram epigalocatequina, galocatequina além de uma nova prodelfinidina, 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina (Fig. 4 e 6) (MELLO *et al.*, 1999).

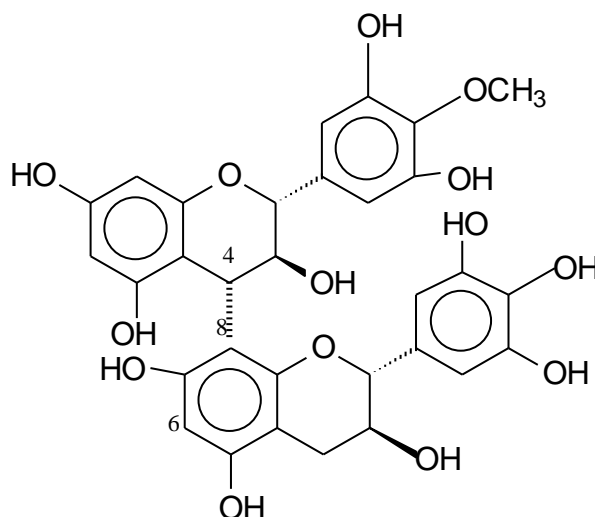


Figura 4- Estrutura química de prodelfinidina [4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina] isolada das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Pereira *et al.* (2002), isolaram e identificaram ácido oleanólico, β -sitosterol e β -amirina da fração CH_2Cl_2 : AcOEt (4:1, V/V) do extrato das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, além de triterpenos pentacíclico (3-oxo-taraxerona). Realizaram também partições e cromatografias em coluna do sólido remanescente do extrato etanólico de onde isolaram quercetina (Fig. 5).

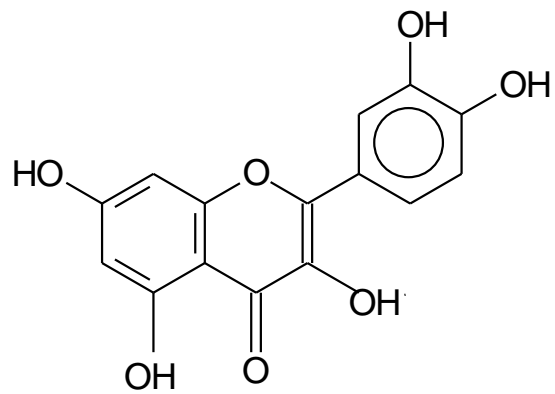


Figura 5- Estrutura química da quercetina

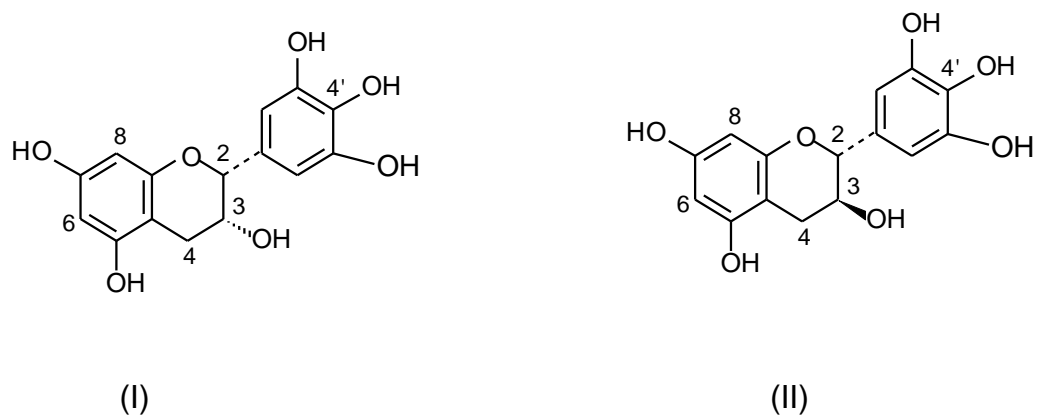


Figura 6- Epigallocatequina (I) e galocatequina (II) isoladas das cascas de *S. obovatum* Benth.

3.4 Atividades farmacológicas de extratos de algumas espécies do gênero *Stryphnodendron*

Popularmente, ao gênero *Stryphnodendron* são atribuídas diversas atividades farmacológicas, como: cicatrizante, antimicrobiana, no tratamento de leucorréia, blenorragia, diarréia, disenteria, hemorragia e no tratamento de úlcera. Entretanto, poucos estudos científicos existem buscando comprovar essas atividades que o uso popular lhe atribui.

3.4.1 Estudos científicos de algumas atividades farmacológicas

3.4.1.1 Antimicrobiana

O extrato aquoso das cascas de *S. barbatimam* na lavagem de genitálias femininas e para prurido externo foi descrito por Coimbra ainda na primeira metade do século XX (COIMBRA, 1942). Já o uso do extrato aquoso das cascas de *S. barbatimao* como antisséptico, adstringente e antiinflamatório foi citado por Santos *et al.* (1987).

Bersani-Amado *et al.* (1996), demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* dos extratos brutos e das frações obtidas através de partição líquido-líquido com polaridade crescente, obtidas com as cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

3.4.1.2 Atividade cicatrizante

Panizza *et al.* (1988), observaram que feridas de ratos tratados com decocto a 1% das cascas de *Stryphnodendron barbatiman* Mart. acelerou o processo de cicatrização e reduziu os fenômenos inflamatórios.

Em estudos mais recentes Vieira *et al.* (1998), demonstraram que a atividade da pomada de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville] em ratos, quanto a reepitelização, neocapilarização e formação de tecido de granulação é semelhante a Nebacetin®.

3.4.1.3 Toxicologia

Brito *et al.* (1996) *apud* Tokarnia *et al.* (1998), relataram que em Rondonópolis, Mato Grosso, algumas vacas se viciam em ingerir as favas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., não saindo debaixo deste arbusto e conseqüentemente emagrecendo e abortando. No entanto elas não morrem apesar de ficarem com seu estado geral muito debilitado.

O aborto em vacas provocado pela intoxicação induzida através da ingestão de favas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. foi avaliado por Tokarnia *et al.* (1998). Os autores observaram a diminuição do apetite, da atividade ruminal, sialorréia, dificuldade de se levantar, andar desequilibrado, tremores musculares e emagrecimento, e 3 das 7 vacas avaliadas após 20-30 dias tiveram aborto. Esse experimento vem confirmar a etnofarmacologia da região das fazendas do cerrado dos estados de São Paulo e Mato Grosso, sobre a ocorrência de aborto em vacas que ingeriam favas dessa espécie vegetal.

Bürger *et al.* (1999), estudaram o efeito abortivo e/ou infertilizante de vagens e sementes de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville em ratos.

Foram administrados 0,5 ml/100 g de peso de extrato das vagens ou sementes e água como controle por gavagem (via oral) do 1° ao 7° dia de gestação. No 21° dia de gestação observaram que houve uma redução do peso do útero e no número de fetos vivos das ratas tratadas com extratos da semente em relação ao grupo controle. A dose letal média DL₅₀ para sementes foi de 4.992,8 mg/kg e para as vagens foi de 5.000 mg/kg.

A intoxicação experimental e o estudo do seu caso clínico em bovinos foram estudados por Brito *et al.* (2001), os quais administraram favas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. por via oral, dose única ou dose repetida. Nas doses únicas de 10-20 g/kg não houve manifestação de sintomatologia. Entretanto, nas demais doses repetidas de 2,5 g/kg por 30 dias adoeceram levemente, já os que receberam 5 g/kg por dois dias morreram.

Nas regiões do cerrado na época do florescimento das espécies de barbatimão tem sido observado uma grande mortalidade de abelhas em apiários, sugerindo efeito tóxico de seu pólen, sendo este fenômeno conhecido como “cria ensacada”. Recentemente um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa descobriu que essa toxicidade está relacionada aos pólenes de barbatimão (POLEN..., 2002).

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 2.699 mg/kg. A administração crônica de extrato nas concentrações de 800 e 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), estudaram os 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.

Muitos estudos ainda são necessários no intuito de elucidar as atividades farmacológica e tóxica de extratos de cascas de espécies de *Stryphnodendron* e suas substâncias isoladamente.

3.4.1.4 Outras atividades

A excreção renal de água, sódio e potássio foi avaliada em animais submetidos a sobrecarga de solução aquosa de diversas partes de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (caule, cascas secas e semente em pó). A casca seca provocou intensa redução na diurese, 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).

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.

Oliveira *et al.* (2002) testaram o extrato metanólico das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre o ciclo estral de ratas, onde observaram um efeito desregulador nos animais 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.

Herzog-Soares *et al.* (2002) avaliaram a atividade tripanomicida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Foram infectados camundongos com formas tripomastigotas do parasito e após 24 h administrou-se por via intragástrica 0,1 ml de extrato na concentração de 400 ppm, durante dez dias. Observaram com este tratamento uma redução significativa na curva de parasitemia de *Trypanossoma cruzi*.

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

Baurin *et al.* (2002), estudaram a atividade antitirosinase de algumas plantas tropicais entre elas *Stryphnodendron barbatimao* Mart. que apresentou uma redução de 90% na inibição da tirosinase *in vitro* do cogumelo, semelhante ao controle positivo: *Morus alba* L. (amora).

A atividade contra *Biomphalaria glabrata* dos extratos alcoólicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram altamente tóxicas ao molusco nas concentrações de 100 e 50 ppm.

No entanto na concentração de 20 ppm os extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram letais em 40% (BEZERRA *et al.*, 2002).

Souza *et al.* (2002) avaliaram a atividade anticonvulsivante do extrato etanólico (EE) de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. no modelo de convulsões induzidas com pentilenotetrazol ou estriçnina. Foram utilizados camundongos fêmeas, tratados com EE nas doses de 50 a 400 mg/kg, i.p., 30 min antes da administração do pentilenotetrazol (100 mg/kg, i.p. ou estriçnina 2 mg/kg, s.c.). O EE de *S. coriaceum* Benth. aumentou a latência de convulsão e morte, além da taxa de sobrevivência dos animais, no modelo de convulsões induzidas com o pentilenotetrazol, evidenciando atividade anticonvulsiva.

3.5 Taninos

Tanino é um termo utilizado para designar substâncias de origem vegetal capazes de transformar “pele fresca em couro”. Essas substâncias encontram-se difundidas em plantas e alimentos de origem vegetal, como por exemplo: frutas, legumes, sementes, grãos cereais, bebidas (vinho, chá, cidra, cacau) (BUELGA e SCALBERT, 2000).

Taninos são metabólitos secundários de plantas superiores. Possuem peso molecular entre 500 a 3000 Daltons, formam complexos com alcalóides e metais que são utilizados em plantações de cítricos com deficiência em ferro, ou na complexação com chumbo no controle da poluição em rodovias (MELLO e SANTOS, 2001).

São solúveis em água, possuem propriedades especiais como a de precipitar proteínas (Fig. 7 e 8), alcalóides. A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral caracteriza o sabor adstringente dos

taninos, possibilitando seu reconhecimento em frutos verdes. Essa mesma propriedade tem como função na planta de proteção contra ataque de alguns patógenos e herbívoros (BUELGA e SCALBERT, 2000).

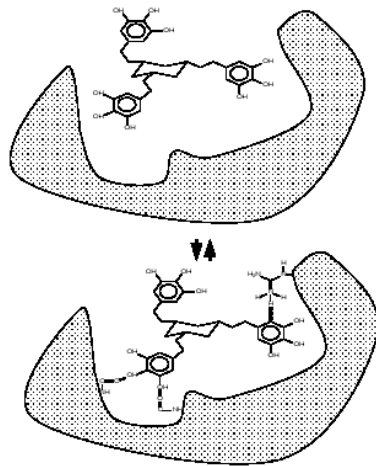


Figura 7 - Associação polifenol-proteína (HASLAM *et al.*, 1989)

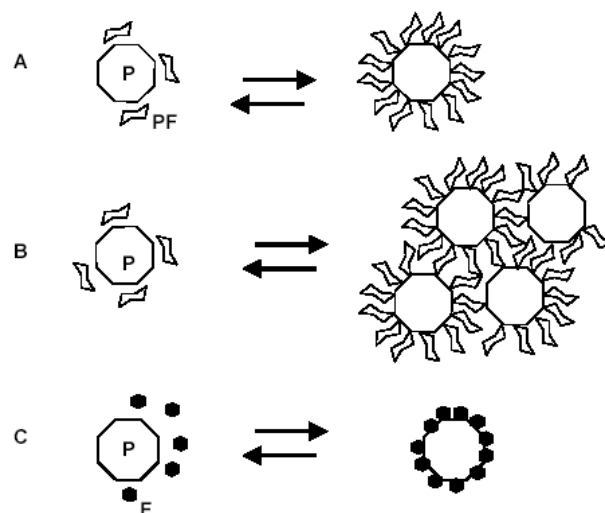


Figura 8 - Precipitação do complexo polifenol-proteína – P- proteína; PF- polifenol; A- baixa concentração de proteínas; B- alta concentração de proteínas; C- interação proteína-fenol (F) (HASLAM *et al.*, 1989)

Estruturalmente taninos possuem 12-16 grupos fenólicos e 5-7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas de massa molecular. Essas características juntamente com o elevado peso molecular claramente fazem com que taninos e polímeros fenólicos fundam-se no processo de produção de vinho tinto ou chá preto.

Os taninos são divididos segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (MELLO e SANTOS, 2001).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas unidades ou mais de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe também é denominada de proantocianidina ou leucocianidinas (MELLO e SANTOS, 2001). Essa denominação é devido à característica das proantocianidinas cederem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído à quente (BUELGA e SCALBERT, 2000; MELLO e SANTOS, 2001).

Os complexos com os alcalóides, como por exemplo com a cafeína, ocorrem através de ligações dos hidrogênios das metoxilas ligadas ao nitrogênio da cafeína e os hidrogênios aromáticos dos taninos. Essas associações ocorrem, preferencialmente, quando existe a presença de grupos galoilas, como no caso dos taninos hidrolisáveis ou nos condensados galoilados (HASLAM, 1998).

3.6 Taninos condensados

Os taninos condensados são formados por unidades elementares de flavan-3-ol com ligações C-C e ocasionalmente ligações C-O-C. Os flavan-3-óis possuem um esqueleto típico flavonoídico com ligações C₆-C₃-C₆ (BUELGA e SCALBERT, 2000).

As proantocianidinas são formadas comumente por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8, entre as unidades superior e inferior, respectivamente, como pode ser visto na figura 4. Além dos monômeros catequina e epicatequina, outros são bastante comuns, como, galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002).

São classificados de acordo com a hidroxilação das cadeias em procianidinas, prodelfinidinas, properlargonidinas, profisetinidinas, probinetinidinas, proguibourtinidinas, proteracacianidinas (Fig. 9, Quadro 1) (FERREIRA e LI, 2000).

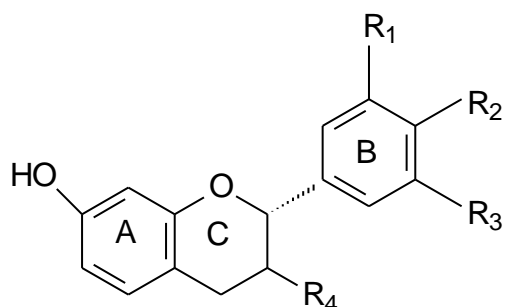
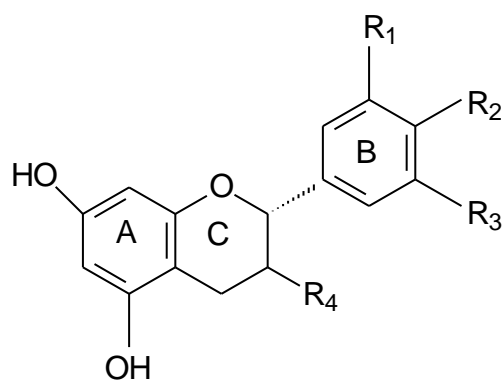


Figura 9- Estrutura básica de proantocianidina

Quadro 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	O	H
	Procianidina	Catequina	H	O	H	H
	Prodelfinidina	Galocatequina	H	H	O	O
				O	H	H
				H	O	
					H	
					H	
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	O	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	O	H	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	H	O	O
	Proteracacinidina	Ortina	O	O	H	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	H	H	O	H
			O	H	H	H
			H	O	O	
				H	H	
					O	
					H	

As proantocianidinas são de natureza polimérica e devido a essa característica pouco se conhece sobre seu consumo em termos quantitativos, apesar de ser claro a amplitude de seu consumo diário (BUELGA e SCALBERT, 2000).

A fácil detecção das proantocianidinas é um fator importante para seu estudo (BATE-SMITH, 1966). Estas se distribuem em todo reino vegetal, mas principalmente em gimnospermas e angiospermas. Ao se observar a correlação entre madeira (lenho, cascas) e proantocianidinas, o autor, concluiu que em 800 espécies, correspondendo a 61% das famílias ditas lenhosas continham proantocianidinas, e apenas 15% das herbáceas possuíam esse componente.

Uma lista de 20 espécies de legumes contendo taninos foi publicada por Reddy *et al.* (1985), onde demonstraram que algumas variedades de feijão são de baixo valor nutricional diminuindo a digestibilidade das proteínas. Em alguns vegetais (sorgo, soja, canola, girassol) utilizados em rações comerciais para nutrição animal, onde estão presentes taninos condensados (proantocianidinas), que são deletérios ao desempenho produtivo dos animais. Isso se deve pela formação de complexos com carboidratos e outras macromoléculas alimentares, pela inibição da atividade de várias enzimas digestivas, através da diminuição da absorção de outros nutrientes pela parede celular, devido a formação de complexos com íons bivalentes de metais e pela erosão de células epiteliais do intestino (WARREHAM *et al.*, 1994).

Em peixes, que possuem estômago e, que receberam alimentação ácida, com ingredientes contendo taninos, demonstraram menor digestibilidade dos nutrientes e piores taxas de conversão alimentar, queda no desempenho

produtivo e baixa no depósito lipídico nas carcaças e vísceras (QUINTERO *et al.*, 2000).

Por outro lado, nos peixes sem estômago e de digestão alcalina, taninos condensados não provocaram efeitos deletérios, porém os hidrolisáveis causaram intoxicação acumulada (BECKER e MAKKAR, 1999).

A diversidade de efeitos dos taninos se deve às diferenças na capacidade fisiológica dos animais e às diferentes reações químicas apresentadas pelos diversos grupos de taninos, fato que demonstra a correlação entre o nicho alimentar e a espécie animal (HAGERMAN *et al.*, 1992).

Assim pode-se listar diversos frutos com a presença de taninos entre eles: *Vitis spp* L.(uva), *Malus pumila* Mill. (maçã), *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 e BUTLER, 1980).

Os efeitos dos taninos em algumas espécies de animais não são muito favoráveis. Entretanto, muitos efeitos benéficos em humanos já foram descritos como por exemplo: inibição da oxidação *in vitro* da LDL (lipoproteínas de baixa densidade), proteção contra doenças cardiovasculares, devido às proantocianidinas presentes no vinho e no chá, em casos de consumo moderado (BUELGA e SCALBERT, 2000).

Chung *et al.* (1998), em uma revisão confirmam dados sobre algumas atividades dos taninos condensados e hidrolisáveis como: ação antibacteriana,

atividade hipotensora, auxílio na coagulação sanguínea, diminuição no nível de lipídios e modulação na atividade imunológica.

Proantocianidinas oligoméricas possuem atividade sobre o sistema circulatório, que se baseia na dilatação coronariana e efeito inotrópico positivo (WEINGS *et al.*, 1971).

Hatano *et al.* (1989), observaram que, flavan-3-óis, proantocianidinas e taninos hidrolisáveis possuem capacidade de capturar radicais livres do oxigênio, importantes no processo inflamatório, levando a acreditar num possível efeito anticarcinogênico e antimutagênico, já que a produção de radicais livres interage com macromoléculas celulares através de genes mutantes e carcinogênicos. Essa ação é dependente do grau de hidroxilação do anel B, do grau de polimerização e, do grau de galoilação das substâncias (CHUNG *et al.*, 1998).

Gazave *et al.* (1975), observaram que epigallocatequina atua como cofator para vitamina C, enquanto Matthe *et al.* (1999), estudaram os taninos como inibidores da transcriptase reversa do vírus HIV.

Prodelfinidina B-2 e diversos taninos elágicos agem como antiinflamatórios por bloquear a hialuronidase ativa ou degranulação dos mastócitos (KAKEGAWA *et al.*, 1985).

Buelga e Scalbert (2000), relataram que polímeros fenólicos dos chás e vinho apresentam efeito sobre o câncer, e Morton (1986), demonstrou que alguns chás contendo taninos apresentaram efeito sobre o câncer esofágico. Kandil e Nassar (1998), demonstraram a atividade de um elagitanino (taninos hidrolisáveis) obtido através de *Terminalia arjuna* Wight & Arn. em câncer de mama.

Atividade antibacteriana dos monômeros galoilados contra *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie foi observada por Otake *et al.* (1991) e Nakahara *et al.* (1993). Os taninos possuem atividade antibacteriana contra Gram-negativas e Gram-positivas como foi demonstrado na revisão de Scholz (1994), entretanto as proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas isoladas do *Pavetta owariensis* P. Beauv. (Rubiaceae) não demonstraram atividade contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (BALDÉ *et al.*, 1990). Recentemente, Toledo (2002) observou a ausência de atividade antibacteriana contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, para as substâncias galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metilgalocatequina e 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina.

O mesmo autor estudou a atividade de subfrações do extrato de cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, planta com elevados teores de taninos em suas cascas, demonstrando possuir atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, com inibição total do crescimento das mesmas na concentração de 100 μ g/ml nas primeiras 20 h.

3.7. Atividade antioxidante

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, entre outros (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MITTLER, 2002).

Existem estudos sobre a etiologia de doenças degenerativas e 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 (MELLO e SANTOS, 2001).

Em primeiro lugar é necessário ter uma noção do que é um radical livre. 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 e MATSUBARA, 1997)

A formação de um radical livre, o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), 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 12 elétrons na última camada (L).

Deve-se recordar que 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 ($O_2^{\cdot-}$), considerado instável por possuir número ímpar (13) de elétrons na última camada L. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, portanto, os radicais livres provocam ou resultam esse tipo de reação na última camada (RUSSEL, 1994).

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O₂, pode-se utilizar a seguinte designação aos radicais livres: "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" (ERMO). As ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN e HAMILTON, 1983 apud SOARES, 2002).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992 apud SOARES, 2002; MELLO e SANTOS, 2001), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. De acordo com o radical substituinte da molécula do composto fenólico este apresenta um mecanismo diferente de ação antioxidante (GRASSMANN *et al.*, 2002).

Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985 apud SOARES, 2002) o que pode acontecer por exemplo com os taninos. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI *et al.*, 1992 apud SOARES, 2002).

Alguns estudos estão sendo realizados com objetivo de encontrar plantas com atividade antioxidante tendo em vista o interesse da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética em novas substâncias com essa propriedade (CUENDT *et al.*, 1997, HOSTETTMAN *et al.*, 2003; NEGRO *et al.*, 2003).

Tendo em vista que a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é um iniciador importante da aterogênese (STEINBERG *et al.*, 1990; STEINBRECHER *et al.*, 1990 apud SOARES, 2002), vários autores utilizaram o modelo de oxidação de LDL *in vitro* para verificar o potencial antioxidante de ácidos fenólicos. Alguns deles, como o caféico e o clorogênico, apresentaram um elevado poder antioxidante neste sistema, sendo comparado ao poder encontrado para a vitamina E, C e β -caroteno (SOARES, 2002).

A atividade antioxidante dos componentes voláteis de *Artemisia judaica* L. foi estudada por El-Massry *et al.* (2002), observando a presença de inúmeros componentes que podem ser usados como antioxidante e flavorizante na indústria alimentícia.

Negro *et al.* (2003), estudaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos isolados do extrato de uva vermelha através do teste de descoloração do β -caroteno, e observaram que as substâncias polifenólicas obtidas dessa espécie vegetal possuem efeito antioxidante quando comparadas com os antioxidantes sintéticos hidroxitolueno butilado.

Velásquez *et al.* (2003), avaliaram a atividade antioxidante de seis plantas da medicina tradicional paraguaia. Os extratos metanólicos de *Aristolochia giberti* Hook, *Cecropia pachystachya* Trec., *Eugenia uniflora* L., *Piper fulvescens* DC., *Schinus weinmannifolia* Engler e *Schinus terebinthifolia* Engler, foram avaliados, observando-se a proteção contra a ação enzimática e não enzimática

da peroxidação lipídica nas membranas microsossomais de ratos. Todas as plantas avaliadas apresentaram atividade inibitória na peroxidação lipídica. *Aristolochia giberti* Hook., *Schinus weinmannifolia* Engler, *Piper fulvescens* DC. em baixas concentrações inibiram a peroxidação lipídica microsossomal.

3.8 Antimicrobianos

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas uma vez que Hipócrates (460-337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2500 a 3000 anos atrás, mostram que alguns povos como chineses e indianos, ainda primitivos, utilizavam mofo, papa de soja e outros produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (LIMA, 2001).

As substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam um imenso avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais. Os antimicrobianos atuam sobre microorganismos patogênicos e oportunistas que podem levar a uma incapacitação prolongada ou mesmo levar ao óbito (ROBERTS, 1997 apud LIMA, 2001).

A toxicidade dos taninos para com os microorganismos tem sido bem documentada. Estudos envolvem vários campos de pesquisas, entre eles: alimentos, plantas, solos, patologia de plantas, farmacologia e nutrição humana e animal (SCALBERT, 1991).

Taninos e compostos fenólicos vêm sendo amplamente reconhecidos por possuir alto potencial antibiótico, afirmação esta que confirma o uso de plantas

medicinais ricas em polifenóis como drogas com efeito anti-séptico (KOLODZIEJ *et al.*, 1999).

Scalbert (1991), propôs diferentes mecanismos para explicar esta atividade antimicrobiana: inibição de enzimas extracelulares, deprivação de substrato, inibição da fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem deprivação de ferro.

Em um estudo realizado com *Agrimonia pilosa* Ledeb, planta amplamente distribuída na Ásia, foram isolados três derivados de catequina a partir de um extrato acetônico das raízes, os quais demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (KASAI *et al.*, 1992).

Uma fração de proantocianidinas, isolada da espécie *Vaccinium macrocarpon* Ait., foi testada frente à *Escherichia coli*, apresentando potente atividade biológica por inibir a aderência da bactéria nas células uroepiteliais (FOO *et al.*, 2000).

Simeray *et al.* (1982), demonstraram que extratos de algumas plantas da família Cistaceae são eficientes *in vitro* contra diversos fungos, propriedade essa atribuída aos taninos condensados.

Um estudo da atividade antibacteriana de diversos taninos frente à *Staphylococcus aureus* demonstrou que o ácido tânico é um ótimo adjuvante no tratamento de infecções da pele (AKIYAMA *et al.*, 2001).

Navarro *et al.* (1996), realizaram uma triagem com doze espécies botânicas usadas na medicina tradicional do México, para detectar a possível atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Dentre as plantas estudadas encontra-se a mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) que apresentou resultados de

inibição do crescimento microbiano (CIM) frente aos microrganismos acima citados da ordem de 10, 20 e 40 µg/ml, respectivamente.

Taninos isolados da espécie *Vaccinium vitis-idaea* L. testados contra patógenos periodontais apresentaram potente atividade antimicrobiana, podendo assim, ser essa planta útil no tratamento de doenças periodontais (HO *et al.*, 2001).

Holetz *et al.* (2002), realizaram um estudo de algumas plantas usadas na medicina popular brasileira no tratamento de doenças infecciosas. Os autores observaram que 10 das 13 plantas estudadas apresentaram potencial antimicrobiano e 9 plantas apresentaram potencial anticandida, comprovando a eficiência da etnobotânica no estudo de espécies para o tratamento de várias doenças infecciosas.

Galina (2003), realizou testes de atividade antimicrobiana para *Guazuma ulmifolia* Lam. frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). A análise foi realizada com o extrato bruto das cascas de mutamba e frações semipurificadas, confirmando a atividade bacteriostática frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e bactericida frente às bactérias Gram-positivas.

Estudos realizados com *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por Toledo (2002), planta do mesmo gênero da espécie em estudo nesse trabalho, demonstrou que subfrações isoladas das cascas dessa espécie mostraram atividade antibacteriana contra cepas bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), sendo que uma subfração em especial (F3#12)

mostrou a melhor atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria resistente a vários agentes antibacterianos.

3.9 Cicatrização

A pele adulta normal consiste de duas camadas: (1) um epitélio superficial, estratificado queratinizado, que repousa sobre uma lâmina basal, que o separa da derme, e (2) a derme, que é uma camada de tecido conjuntivo, rica em colágeno, e provê suporte e nutrição ao epitélio (Fig. 10). Apêndices da pele, tais como pêlos e glândulas, também são observados. Eles derivam do epitélio e se ligam a ele, mas se projetam profundamente na derme.

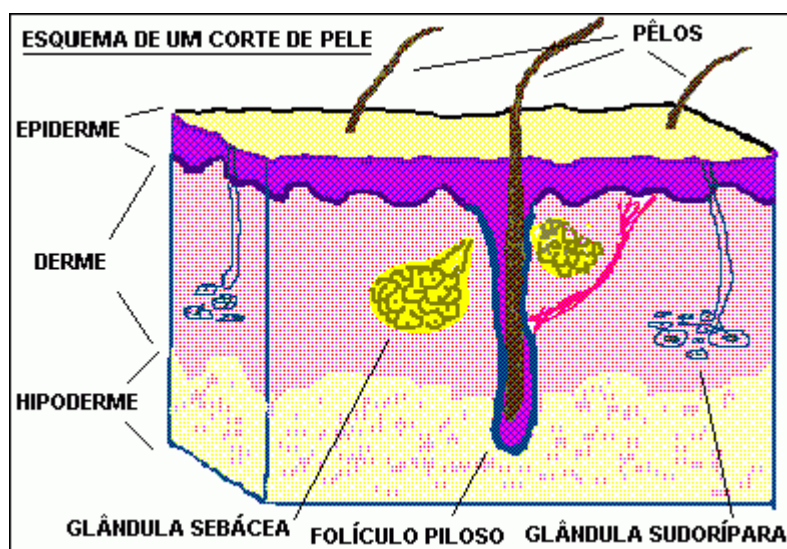


Figura 10- Esquema de corte da pele

Fonte: A pele..., 2003

Pelo fato de a pele agir como uma barreira protetora contra o ambiente externo, qualquer ruptura em sua integridade necessita ser rapidamente e eficientemente reparada. Tal reparo envolve uma seqüência de eventos

coordenados, altamente complexos, que podem ser divididos em três fases que se sobrepõem – inflamação, contração da ferida e reconstituição e remodelação da matriz extracelular (CHITHRA *et al.*, 1998; WEARING e SHERRATT, 2000).

Se a injúria é restrita à epiderme, seu reparo começa quase imediatamente e pode selar a ferida dentro de 24 h. Contudo, quando a derme também é danificada, um reparo temporário é obtido na forma de um coágulo e nos dias subseqüentes seguem-se as etapas para regenerar as partes perdidas. Estas etapas incluem a migração de células inflamatórias e fibroblastos, e o crescimento de capilares para o interior do coágulo. Estas células e capilares compõem um tecido de granulação contrátil, que puxa as margens da ferida. Paralelamente, a partir das margens da epiderme seccionada, os queratinócitos, das camadas basal e supra basal (AGREN, 1999), migram no sentido da ferida para cobrir a superfície desnuda (MARTIN, 1997).

Após a separação dos queratinócitos da membrana basal, estes encontram o leito de matriz provisória da ferida, muito diferente daquele da membrana basal, sendo composto de fibrina, fibronectina, vitronectina, tenascina e colágenos (AGREN, 1999).

Algumas horas após o início da migração, os queratinócitos da margem da ferida sofrem um aumento em sua atividade proliferativa, a qual, embora não estritamente necessária para o movimento da reepitelização, provê um pool extra de células para renovar aquelas perdidas durante a injúria (MARTIN, 1997).

Durante o reparo cutâneo, a matriz extracelular ferida é um regulador chave dos processos de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. A quantidade e a organização de matriz extracelular na ferida são determinados por um equilíbrio dinâmico entre a síntese, deposição e a degradação da matriz

(SOO *et al.*, 2000). As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas que têm a habilidade coletiva de degradar todos os componentes da matriz extracelular. As MMPs são categorizadas em collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs de membrana.

Todas as atividades que levam ao processo de cicatrização de feridas, são controladas por diversos fatores de crescimento e por componentes da matriz extracelular responsáveis por disparar sinais que iniciam e param cada uma dessas atividades (AGREN, 1999). Tais fatores de crescimento são liberados por vários tipos celulares, como plaquetas, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos; eles iniciam o processo de cicatrização, atraindo células inflamatórias para o local da ferida, estimulando a contração do tecido conjuntivo, a resposta angiogênica (MARTIN, 1997; AGREN, 1999), a produção de colágeno pelos fibroblastos e a expressão de proteases pelos queratinócitos, responsáveis pela remodelação da matriz extracelular (SOO *et al.*, 2000). Estes processos ocorrem de uma forma espaço-temporal altamente organizada (AGREN, 1999).

Com o objetivo de restaurar a pele lesada, os curativos, que são realizados desde o início da civilização, utilizam os mais variados produtos com a intenção de abreviar o tempo da cicatrização e diminuir o sofrimento dos pacientes (CICATRIZAÇÃO..., 2003).

As feridas crônicas e seu tratamento são responsáveis pelos elevados custos no sistema de saúde. Mais de 2 milhões de pessoas sofrem com este tipo de ferida, sendo que em 25% dos casos, elas ocorrem nas pernas e nos pés (STADELMAN, 1998). Além disso, promove danos à sociedade, como menor qualidade de vida e produtividade. Em função disso, o processo de cicatrização e seu tratamento vem sendo intensamente estudado.

Observa-se, quando da execução dos curativos, a dificuldade na escolha de produtos mais adequados, de acordo com cada momento de evolução do processo cicatricial e paralelamente a esta questão, os profissionais da saúde, bem como pacientes e familiares, deparam-se com o alto custo dos produtos comercializados, que apresentam comprovadamente bons resultados.

Esta situação se agrava nos casos de feridas crônicas, cujo tratamento é prolongado, e muitas vezes agravado pela pré-existência de patologias como o diabetes ou insuficiência vascular, que dificultam a cicatrização.

Muitos são os produtos e técnicas utilizadas para o tratamento de feridas (MEDEIROS *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001). Contudo, nem sempre estes tratamentos são disponíveis no mercado, nem tão pouco acessíveis do ponto de vista econômico, para as populações de baixa renda.

Apesar de toda tecnologia buscando a melhora da cicatrização, os elevados custos são um fator limitante no uso de todo esse arsenal terapêutico. A população com menor poder aquisitivo, cerca de 65-80% da população mundial, buscam, nas plantas, a cura de seus males. O Brasil é um país rico em plantas, utilizados de forma terapêutica pela população, para o tratamento de lesões cutâneas agudas ou crônicas. Contudo, grande parte desses produtos naturais ainda não têm sua eficácia e nem mesmo seus efeitos adversos cientificamente demonstrados (CALIXTO, 2000).

Carvalho *et al.* (1991), estudaram a atividade cicatrizante de creme de calêndula (*Calendula officinalis* L.) e associação de confrei (*Symphytum officinale* L.), própolis e mel em feridas infectadas em ratos. Os autores observaram a aceleração da cicatrização nos grupos tratados e também a

atividade superior do creme de calêndula (*Calendula officinalis* L.) quando comparado com o creme de confrei (*Symphytum officinale* L.), própolis e mel.

Brito *et al.* (1998), estudaram os efeitos do óleo de copaíba [*Copaifera officinalis* (Jacq.) L.] na cicatrização de feridas abertas em ratos, tratados com óleo de copaíba ou salina. Os pesquisadores observaram um aumento no tamanho da crosta das lesões e também a presença de escaras e perda de pêlos.

Posteriormente os mesmos autores (1999), realizaram um estudo microscópico (morfométrico e morfológico), e observaram que o processo inflamatório foi encontrado em ambos grupos, entretanto este foi maior no grupo tratado com óleo de copaíba [*Copaifera officinalis* (Jacq.) L.] em todos os períodos de tratamento. O valor da contagem de vasos sanguíneos foi maior no grupo tratado com óleo de copaíba [*Copaifera officinalis* (Jacq.) L.] e a contagem das fibras colágenas obteve maior aumento no grupo controle.

Speroni *et al.* (2002), estudaram a ação cicatrizante de *Echinacea pallida* em excisões na pele de ratos e observaram que o equinacósido foi o responsável pela atividade cicatrizante. A *Echinacea purpurea* especialmente possui atividade cicatrizante provavelmente por uma ação antihialuronidase.

O gênero *Stryphnodendron* descrito na Farmacopéia Brasileira (1929) como tendo ação cicatrizante, embora não existam muitos estudos demonstrando de que maneira, ou em quais etapas da reparação tecidual esta planta é efetiva.

O extrato aquoso de *Stryphnodendron obovatum* Benth. acelerou a cicatrização de úlceras de contenção em ratos tratados durante um período de 1 a 6 dias (FAVARETTO *et al.*, 1985).

Panizza *et al.* (1988) observaram que feridas de ratos tratados com decocto a 1% das cascas de *Stryphnodendron barbatiman* Mart. acelerou o processo de cicatrização e reduziu os fenômenos inflamatórios.

Em estudos mais recentes Vieira *et al.* (1998), compararam a atividade da pomada de barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, à 1% com Nebacetin® em ratos. Observaram que os dois tratamentos apresentaram resultados semelhantes quanto a reepitelização, neocapilarização e formação de tecido de granulação.

Recentemente Palermo *et al.* (2002), estudaram a atividade de pomadas contendo 1% de uma fração F#3 de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, na proliferação celular observando uma estimulação desta atividade em ratos tratados diariamente durante 4 e 7 dias, sugerindo um efeito cicatrizante.

4. METODOLOGIA

4.1 Droga Vegetal

As cascas e folhas utilizadas no controle de qualidade foram coletadas na região de Assis, no Instituto Florestal (22°35'20,8"S; 50°24'18,7"W; 546 m altitude) e Iepê (Km 30, rodovia 457), no Estado de São Paulo (Anexo 1), região de cerrado brasileiro, nos períodos de outubro de 2000, fevereiro de 2001 e setembro de 2001.

As cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. utilizadas no isolamento químico (1 kg aproximadamente) foram coletadas em 19 de

fevereiro de 2001 na região de Assis, no estado de São Paulo (22°35'20,8''S; 50°24'18,7''W; 546 m altitude) (Anexo 1).

Foram produzidas exsiccatas das diferentes coletas que encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob os números HUM 8137, 8139, 8180, 8182, 8583.

4.2 Solventes, soluções e reagentes

Todo trabalho realizado em laboratório foi efetuado empregando-se reagentes com grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas Mallinckrodt®, Merck® ou Sigma®, exceto quando especificado.

Acetato de etila

Acetato neutro de chumbo

Acetona

Acetona/água (7:3; V/V)

Ácido acético glacial

Ácido fórmico

Ágar Mueller-Hinton medium desidratado Difco

Anidrido acético

Azul de astra

Caldo Mueller-Hinton Difco

Cloreto férrico 2%

Clorofórmio

Clorofórmio deuterado Isotec®

Dimetilsulfóxido

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Eosina

Etanol

Éter etílico

FAA [Etanol/água destilada/formol/ácido acético (10:7:2:1; V/V]

Ferrocianeto de potássio $[K(FeCN)_6]$ a 1%

Formaldeído

Hematoxilina

Hidróxido de potássio

Magnésio em pó

Metanol

Metanol deuterado Isotec[®]

Nistatina

Nitrato de prata

Parafina

Penicilina

Permunt[®]

Piridina

Pomada controle (base de Beeler)

Pomada tratamento (contendo extrato bruto, fração acetato de etila ou fração aquosa a 2,5%)

Salina 0,9%

Solução aquosa saturada de ácido pícrico

Solução de sulfato de bário (escala de MacFarland)

Solução metanólica de cloreto férrico 1%

Tetraciclina

TTC (Inlab[®]) cloreto de trifeniltetrazólio

Vancomicina (LIBRA[®])

Vincristina (Oncovim[®]- Lilly)

Xilol

4.3 Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento – Fisatom 752A

Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear – Varian Gemini 300BB

Aparelho de ultrassom – Unique USC cleaner 1450, 25 kHz

Autoclave vertical – Fabbe – Primer modelo 103

Balança analítica AND HR-200

Balança semi-analítica Marte AL-500

Banho maria – Marte MB

Bomba de vácuo – Ibav BRD4

Câmara de ultravioleta 365 nm – Germetec

Câmara de fluxo laminar

Coletor de frações – ISCO Modelo 328

Coletor de frações – Pharmacia Biotech FRAC-200

Coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 (c: 4mm; Ø 3mm) e coluna (c: 250 mm; Ø 4mm) com tamanho de partícula de 5 µm e alça de 20 µl

Cromatógrafo líquido Gilson modelo 321 injetor manual Rheodyne e software

UniPoint LCNT

Espectrofômetro UV/VIS Cary 1E Varian

Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ micromass, Manchester – UK
(elétron spray positivo)

Estufa bacteriológica

Estufa de secagem e esterilização – Fanem 315SE

Evaporador rotatório Büchi R-114, R-153

Injetor manual Rheodyne

Liofilizador Christh Alpha 1-2

Membrana de politetraflouretileno (Millipore® - FHLP01300)

Microscópio Olympus CBB

Micrótomo rotativo Leitz 1512

4.4 Identificação e caracterização da espécie em estudo

4.4.1 Estudo Botânico

4.4.1.1 Estudo taxonômico

A identificação da espécie foi realizado no Laboratório de Sistemática Vegetal da UEM pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, por comparação com o tipo nomenclatural.

4.4.1.2 Descrição Botânica

4.4.1.2.1 Inclusão do material vegetal em parafina (MONTENEGRO, 1985)

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

Em seguida procedeu-se a inclusão do material em parafina por 12 h em estufa a 58 °C, sendo 4 h de imersão em *t*-butanol/parafina (1:1, V/V) e 8 h em parafina. Os blocos foram preparados em pequenas caixas de papel com volume aproximado de 1 cm³ e deixados em temperatura ambiente por 10 min e, após, os blocos foram colocados em refrigerador a 4 °C por 1 h.

Os cortes anatômicos foram obtidos em micrótomo na espessura de 12 µm e transferidos para lâminas de vidro, sendo distendidos em chapa aquecida a ± 50 °C. Após, procedeu-se a desparafinização dos cortes utilizando a seqüência: xilol desparafinizador, xilol:álcool 3:1, xilol:álcool 1:1, xilol:álcool 1:3 por 1 min em cada um. A etapa de coloração dos cortes consistiu na seqüência de álcool 100, 70, 50 °GL, água destilada por 1 min e safrablau 60 min, seguido de lavagens na seqüência inversa de álcool, e xilol diafanizador (15 min), em seguida as lâminas foram montadas com Permount®.

4.4.2 Análises físico-químicas

4.4.2.1 Perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 2000)

Amostras pesando exatamente cerca de 2,0 g da droga vegetal foram colocadas, em pesa-filtros previamente tarados e em seguida colocados em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados estão expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

4.4.2.2 Determinação do teor de extrativos (FARMACOPÉIA, 2000)

Cerca de 1,0 g da droga vegetal seca e moída, exatamente pesada, foi submetido a decocção com 100,0 g de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado a 100,0 ml. A solução foi filtrada em papel filtro e os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Do restante do filtrado foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até *secura* em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

onde:

TE = teor de extrativos (%;m/m)

g = massa de resíduo seco (g)

m = massa de amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

4.4.2.3 Perda por secagem (FARMACOPÉIA, 2000)

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal fresca foram colocados a secar a temperatura ambiente. Foram pesados diariamente até peso constante. A perda por secagem foi calculada pela média das determinações das amostras avaliadas.

4.4.3 Análise fitoquímica preliminar (HARBORNE, 1984)

4.4.3.1 Identificação do núcleo esteroidal

Reação de Liebermann-Burchard: foram evaporados, em cápsula de porcelana, cerca de 2,0 ml do extrato clorofórmico e retomado o resíduo com cerca de 1,0 ml de anidrido acético. Transferiu-se para um tubo de ensaio e adicionou-se cuidadosamente 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. Observação de um anel colorido entre as fases, sendo positivo para heterosídeos cardíacos.

4.4.3.2 Teste de espuma (saponinas)

Foram transferidos 0,5 g de 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. Observou-se a formação de espuma com no mínimo 1 cm de altura e persistente por no mínimo 15 min.

4.4.3.3 Polifenóis

A 20,0 ml de um extrato aquoso a 10% foram adicionadas 5 gotas da seguinte mistura: 1,0 ml de solução de cloreto férrico a 1% (p/V) + 1,0 ml de solução de ferrocianeto de potássio a 1% (p/V). Observou-se a formação de coloração vermelha na camada aquosa.

4.4.3.4 Taninos condensados e hidrolisáveis – Reação de Stiasny

Submeteu-se a refluxo por 30 min, 50 ml de um decocto a 5% adicionado de 15 ml do reativo de Stiasny (5 ml de HCl concentrado + 10 ml de formol sob refluxo durante 20 min). Os taninos condensados originam um precipitado

vermelho (flobafenos). Os taninos hidrolisáveis, se presentes, permanecem em solução, podendo ser detectados da seguinte maneira: 10 ml do filtrado + 5 g de acetato de sódio + 4 gotas de FeCl_3 a 1% em solução metanólica. Presença de coloração azulada indica positividade de reação.

4.5 Análise Quantitativa

4.5.1 Determinação do teor de taninos totais (GLASL, 1983)

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 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. Tomaram-se cerca de 80 ml do extrato e filtrou-se através de papel de 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. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão 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 min. Após, a solução foi filtrada

e, 5 ml do filtrado foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão 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. A porcentagem de polifenóis e taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625.ABs}{1000.m}$$

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

$$TT = PT - PNA$$

onde:

PT=	Polifenóis totais (%)
PNA=	Polifenóis não adsorventes (%)
Abs=	Absorbância medida
M =	Massa da droga em gramas
TT=	Teor de taninos totais
Abs=	Absorbância da droga

4.6 Isolamento de compostos fenólicos (MELLO, 1995, TOLEDO, 2002)

Após secagem, as cascas foram moídas em moinho de martelos. Preparou-se o extrato bruto em turbo-extrator, partindo-se de 500 g de cascas moídas, por 15 min, tomando-se o cuidado para que a temperatura não excedesse a 40 °C, na proporção de 1:10 (m/V), com a mistura de acetona-água (7:3; V/V). Após a filtração por algodão, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura média de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico. O extrato foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto (EB) (Fluxograma 1).

4.6.1 Obtenção da fração acetato de etila

O extrato bruto liofilizado (50 g) foi ressuspenso em água (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 12 vezes). As fases aquosa (FA) e acetato de etila (FACOEt) foram separadas, concentradas em evaporador rotatório, congeladas e liofilizadas.

4.6.2 Isolamento dos compostos presentes na fração acetato de etila

Para o fracionamento da fração FACOEt, empregou-se uma coluna de vidro (h: 750 mm; Ø: 55 mm) contendo Sephadex[®] LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 50%. Dez gramas da fração FACOEt, após ser dissolvida em uma pequena quantidade do primeiro sistema eluente, foram adicionados no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur, empregando-se a seguinte seqüência de fase móvel, em proporção volumétrica:

1. EtOH/H₂O (1:1)

2. EtOH (70)
3. EtOH (100)
4. MeOH/H₂O (1:1),
5. Acetona/H₂O (7:3)

Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 10 ml com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento foi realizado através de cromatografia em camada delgada a cada 5 tubos. Obtiveram-se 22 frações (F1 até F22), que foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas (Fluxograma1).

4.6.3 Cromatografia em coluna das frações F1 à F12

O fracionamento das frações F1 à F12 foi realizado por cromatografia em coluna (h: 400 mm; Ø 20 mm) empregando-se Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 10%. Adicionou-se a fração a ser cromatografada, dissolvida em uma pequena quantidade do primeiro sistema eluente, e aplicada no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se a seguinte seqüência de fase móvel:

1. EtOH 10%
2. EtOH 20%
3. EtOH 30%
4. EtOH 40%
5. EtOH 50%

Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 5,0 ml com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento foi realizado através de CCD. Obteve-se subfrações, que

foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas e liofilizadas.

A coluna, após o processo de separação finalizado, passou por um processo de limpeza com acetona:água (7:3; V/V) e ácido acético 2%.

4.6.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5; V/V). Observou-se em lâmpada ultravioleta (UV) 254 nm, em seguida, utilizou-se como revelador cromogênico a solução metanólica de cloreto férrico a 1%.

4.6.5 Derivatização química

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 10 mg da fração desejada juntamente com 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético seguindo esta ordem de adição. Agitou-se levemente, tampou-se e cobriu-se com papel alumínio, deixando em repouso por 24 h. Após este período adicionou-se gelo picado dentro do balão deixando-se este imerso em gelo durante 2 h, filtrou-se em filtro G4, lavando-se com água resfriada. O precipitado obtido no filtro G4 foi solubilizado em clorofórmio, concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizado.

4.6.6 Cromatografia em camada delgada preparativa

A amostra, após ter sido derivatizada quimicamente (acetilação), foi separada por cromatografia em camada delgada preparativa. As placas de gel de sílica foram preparadas como segue: em placas de vidro (20 x 20 cm) foram espalhadas uma 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 de R_f, raspadas e solubilizadas em clorofórmio. Após, as substâncias foram filtradas em filtro G3, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, recolhidas em frasco previamente tarado, liofilizadas e acondicionadas em freezer (-20 °C).

4.6.7 Análise estrutural das substâncias isoladas

Foi realizada através de métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (¹H,¹³C), e RMN 2D (¹H/¹H COSY) e espectrometria de massas (EM). Os espectros foram analisados e comparados com dados da literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Gemini 300 BB de 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C, junto ao departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, empregando-se solventes deuterados (CD₃OD, CDCl₃). Os espectros de massas foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha utilizando-se aparelho ESI-MS Quattro LCZ micromass, Manchester – UK (elétron spray positivo).

4.6.8 Rotação ótica (Polarimetria)

A determinação da rotação ótica ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) da substância acetilada sucedeu-se empregando acetona (grau espectroscópico) a 20 °C. Para a determinação do valor, empregando-se a seguinte equação.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = 100 \cdot \frac{\alpha}{lc}$$

α =rotação ótica obtida em graus a $20 \pm 0,5$ °C

l =comprimento da cubeta do polarímetro em dm

c = concentração da substância em porcentagem (m/V)

4.6.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.6.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência – quantitativa

Foi utilizado cromatógrafo líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT. Pré-colunas (c: 4mm; Ø 3mm) e coluna (c: 250 mm; Ø 4mm) preenchidas com LiChrospher® 100 RP-18 com tamanho de partícula de 5 µm e alça de 20 µl. Detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156 e Degaisser 184. A temperatura do forno para coluna foi de 27 °C e os cromatogramas foram observados nos comprimentos de onda de 210 e 280 nm com sensibilidade de 0,05 AUFS

O sistema eluente utilizado foi metanol:ácido acético pH= 2,2 conforme gradiente descrito na tabela 2, com vazão de 0,5 ml/min. Todos os solventes utilizados possuíam grau HPLC (CLAE).

Tabela 1- Gradiente da fase móvel utilizada na CLAE, descrito abaixo:

Tempo (min)	Metanol (%)	Ác. Acético pH=2,2 (%)
0	0,05	99,95
20	1	99
27	6	94
35	15	85
40	80	20
45	80	20
50	0,05	99,95

4.6.9.2 Curva de calibração

4.6.9.2.1 Preparação das soluções padrão de catequina, epicatequina e galocatequina

Para a obtenção da curva padrão foram preparadas soluções contendo catequina, epicatequina e galocatequina nas concentrações de 1,00; 0,50; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/ml de cada substância referência em mistura metanol:água (50:50). As soluções foram filtradas por membrana de politetraflouretileno (Millipore® - FHLP01300) de porosidade 0,22 μm e, foram aplicados 20 μl no injetor com auxílio de microsseringa com capacidade de 25 μl .

As áreas dos picos correspondentes às substâncias foram relacionados com as respectivas concentrações, calculando-se as equações das retas através da equação de regressão linear. Os resultados foram expressos pela média de cinco procedimentos.

4.6.9.2.2 Preparo das amostras

As amostras analisadas foram solubilizadas em metanol:água (50:50) nas concentrações de 1 mg/ml (subfrações) e 0,5 mg/ml (fração acetato de etila), sendo em seguida filtradas com filtro Millipore® (FHLP01300) e reservadas para posterior análise.

4.6.9.2.3 Análise quantitativa

Empregou-se como padrão externo uma solução metanólica de galocatequina, com concentração de 62,5 µg/ml. A solução foi filtrada por membrana de politetraflouretileno (Millipore®, tipo FHLP01300) de porosidade 0,22 µm e aplicadas ao injetor com auxílio de microseringa com capacidade de 25 µl. As área do pico referente a galocatequina foi determinada por integração e as concentrações de galocatequina e epigalocatequina nas amostras foram calculadas através da curva de regressão linear definida pela equação:

$$Y = ax + b$$

onde:

x = concentração da substância, galocatequina e epigalocatequina na amostra (mg/ml);

a = interseção com o eixo x da equação da reta;

b = coeficiente angular da reta

Y = área do pico da amostra (mV/s)

Os resultados correspondem a média de cinco injeções.

4.6.9.2.4 Repetibilidade para galocatequina

A solução padrão de galocatequina (62,5 µg/ml), foi injetada 10 vezes isoladamente sempre ao durante o mesmo dia, obtendo-se o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%).

4.7 Ensaio biológicos

4.7.1 Estudo da atividade antioxidante (CUENDT *et al.*, 1997, HOSTETTMAN *et al.*, 2003)

As amostras (EB, EtOAc, subfrações e substâncias referência) foram preparadas e aplicadas em placas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ na concentração de 100 µg dos extratos e frações não purificadas e 10 µg dos substâncias referência (quercetina, ácido gálico, rutina, astilbina) e substâncias purificadas. As amostras foram pesadas e solubilizadas em metanol nas concentrações de 5 mg/ 250 µl das amostras não purificadas e 1 mg/ 500 µl das substâncias puras e substâncias referência.

Em seguida para garantir a concentração já especificada anteriormente de cada amostra, aplicou-se 5 µl das amostras e substâncias referência na placa de CCD. A fase móvel utilizada foi n-butanol:ácido acético:água (3:1:1; V/V) e revelou-se com solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) a 0,2% em metanol. As substâncias com atividades anti-radicalares aparecem na forma de manchas amareladas sobre um fundo violeta.

4.7.2 Estudo da atividade microbiológica: método de microdiluição em caldo (NCCLS, 2000)

Diluição em microplaca (determinação da concentração inibitória mínima-MIC e da concentração bactericida mínima-MBC)

4.7.2.1 Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se gotas de uma cultura de 24 h, num tubo contendo salina estéril até atingir uma turvação igual à suspensão padrão de sulfato de bário correspondente ao tubo 0,5 escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Posteriormente realizou-se uma diluição 1/10 em tubo eppendorf, obtendo-se uma suspensão de 10^7 UFC/ml.

4.7.2.2 Padronização da suspensão da levedura

A suspensão de levedura foi padronizada adicionando-se gotas de uma cultura de 24 h, num tubo contendo salina estéril até atingir uma turvação igual a suspensão padrão de sulfato de bário correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/ml). Posteriormente realizou-se uma diluição 1/100 em tubo eppendorf, obtendo-se uma suspensão de 10^4 UFC/ml.

4.7.2.3 Preparo das drogas

A penicilina foi utilizada como controle para *Staphylococcus aureus*. Preparou-se uma solução A de 5 mg/ml (1 mg em 200 µl de água destilada),

em seguida esta solução foi diluída 1/100 em água destilada (solução B: 0,05 mg/ml), por fim a solução B foi diluída 1/10 em caldo Mueller-Hinton (CMH), obtendo-se uma concentração final de 5 µg/ml.

A vancomicina utilizada como controle para *Bacillus subtilis* e a tetraciclina para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram preparadas através da diluição de 5 mg das respectivas drogas em 100 µl de água destilada (solução A). Esta por sua vez, foi diluída 1/100 em água destilada (solução B) e a solução B foi diluída em 1/10 em CMH.

A nistatina utilizada como controle para as leveduras (*Cândida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), foi preparada a partir de uma solução estoque de 1,024 mg/ 200 µl de DMSO. Em seguida foi realizada uma diluição 1/10 em DMSO (solução A), retirou-se 100 µl da solução A, que foi adicionado em 300 µl de caldo Sabouraud (solução B) estando o controle em condições de desenvolver a técnica.

4.7.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias através do método de diluição em placas

Preparou-se uma solução estoque de 20 mg/ml (20.000 µg/ml) da amostra da droga e realizou-se uma diluição 1/10 em CMH, em tubo eppendorf, obtendo-se uma solução de 2.000 µg/ml (solução teste). Pipetaram-se 100 µl de CMH nos 96 poços da microplaca (Fig.11), sendo um poço para controle da droga (última coluna) e outro para controle da bactéria (última linha). A partir da solução de 2.000 µg/ml, pipetaram-se 100 µl para o primeiro poço, obtendo-se uma concentração de 1.000 µg/ml. Realizaram-se

diluições seriadas 1/2 em tubos eppendorf, transferindo-se 100 µl do primeiro poço para os poços subseqüentes, obtendo-se concentrações de 500; 250; 125; 62,500; 31,250; 15,625 µg/ml. Pipetaram-se 5 µl da suspensão bacteriana 10⁷ UFC/ml em cada poço, adicionando-se portanto 50.000 UFC/poço, exceto no poço controle da droga. Incubou-se a microplaca em estufa a 37 °C/24 h.

A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio. Utilizou-se uma solução aquosa de cloreto de trifênil tetrazólio a 2% (TTC) para facilitar a visualização, determinada como CIM, a menor concentração da fração capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*.

Realizou-se a subcultura de todos os poços onde ocorreu inibição, do primeiro poço onde houve crescimento e do poço controle da bactéria em placa com ágar Mueller Hinton (AMH) com alça calibrada de 10 µl. Incubou-se as placas em estufa a 37 °C/24 h. Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), as diluições que não resultaram em crescimento na CIM e duas diluições anteriores foram utilizadas semeando-as em AMH, comprovando a atividade bactericida.

O mesmo procedimento foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima das leveduras. Nesse caso caldo e o meio de cultura adequados para realização da subcultura onde determinou-se a concentração fungicida mínima, foi o Sabouraud, pois esse contém os nutrientes e o pH necessários para o crescimento da levedura. O tempo de incubação para a leitura foi de 48 h, numa temperatura de 37 °C.

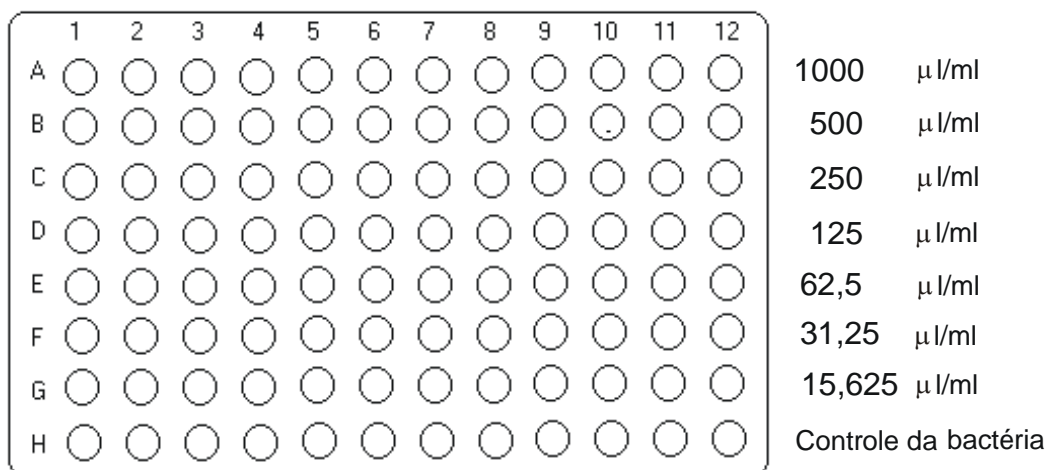


Figura 11- Placa de 96 poços utilizada para desenvolvimento da técnica de microdiluição em caldo

4.7.3 Estudo da ação cicatrizante

4.7.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 150-180 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas por três dias antes do procedimento experimental, para habituação sob condições de temperatura de 20 °C, com ciclos de claro/escuro de 12 h, e livre acesso à água e alimento.

4.7.3.2 Comitê de Ética em Experimentação Animal

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá, através de formulários próprios (Anexo 2).

4.7.3.3 Preparo das feridas

Os animais foram anestesiados com éter etílico e submetidos à tricotomia da região dorsal, próximo à cabeça onde foram realizadas as feridas. Após a anti-sepsia da região com álcool 70%, demarcou-se a distância entre as duas feridas (tratada e controle) com um delimitador metálico medindo aproximadamente 7 mm². A seguir as medidas transversal e longitudinal foram tomadas com um paquímetro, sendo a profundidade previamente definida através da padronização dos tecidos retirados na confecção da ferida.

4.7.3.4 Preparo da pomada controle (base de Beeler)

Controle: Base de Beeler (Prista e da Fonseca, 1993)

Álcool cetílico	75,0 g
Propilenoglicol	50,0 g
Lauril sulfato de sódio (Surfax 100)	10,0 g
Cera de abelha branco	5,0 g
Água destilada	360,0 g

Técnica de Preparo:

Fundiu-se a fase oleosa em um béquer e a fase aquosa em outro, depois verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa e simultaneamente foi agitado. Acondicionou-se em frasco opaco e bem vedado, mantendo-se longe de luz, calor e umidade.

4.7.3.5 Preparo da pomada teste

Empregou-se a base da pomada controle, incorporando-se o extrato bruto ou fração (acetato, aquosa) na concentração de 2,5%.

4.7.3.6 Aplicação da pomada teste e pomada controle

As aplicações das pomadas foram realizadas diariamente a partir do dia que as feridas foram confeccionadas. A aplicação foi realizada com auxílio de espátula sobre toda a ferida, uma vez ao dia sempre no mesmo horário e pelo mesmo analista. Observou-se, após a aplicação das pomadas, o comportamento dos animais por um período de 10 min.

4.7.3.7 Análise macroscópica

As medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal das feridas foram obtidas no dia em que as feridas foram confeccionadas, e no dia do sacrifício. As medidas foram tomadas com paquímetro, sempre pelo mesmo analista.

4.7.3.8 Coleta e processamento do material para análise histológica

Os animais foram sacrificados com éter etílico após 4, 7 e 10 dias de tratamento. Duas horas antes do sacrifício os animais receberam, intraperitonealmente, 0,5 mg/kg de sulfato de vincristina (Oncovin, Lilly®). As injeções foram realizadas sempre no mesmo período para eliminar variações circadianas. Após o período de tratamento, foram realizadas as

medidas das feridas e em seguida os animais foram sacrificados através do aproveitamento da anestesia com éter etílico. Após a remoção da pele, esta foi aderida em papel cartão, com a região da ferida em cicatrização voltada para cima. Procedeu-se à fixação em Bouim [solução saturada de ácido pícrico, formaldeído, ácido acético glacial (75:25:5; V/V)], por um período entre 16-24 h.

As amostras sofreram processo de desidratação e foram tratadas com uma série de álcool em grau alcoólico crescente como descrito abaixo.

1- Álcool 80% → 1 h

2- Álcool 90% → 1 h

3- Álcool 100%→ 1:30 h

4- Álcool 100%→ 2 h

5-Xilol→ 1 h (foi observado a coloração material, caso não estivesse transparente, foi deixado por mais tempo no xilol)

6-Parafina banho I→ 1 h

7-Parafina banho II→ 1:30 h

Após o procedimento de desidratação, as amostras foram emblocadas em caixinhas de papel de tamanho variável, de acordo com o tamanho do material a ser emblocado. As caixinhas foram preenchidas com parafina em estado líquido. O material foi colocado com a superfície a ser cortada voltada para baixo. Identificou-se a lateral da caixinha com o número e o tratamento do rato. O material foi solidificado em geladeira e cortado no mesmo dia, caso contrário solidificou-se à temperatura ambiente. Foram realizados cortes em

micrótomo na espessura de 5 μm , realizou-se a montagem das lâminas e, posteriormente foi realizada coloração de hematoxilina-eosina.

A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada da seguinte maneira:

Primeiramente o material foi hidratado na seqüência:

- 1- colocou-se o material em xilol para desparafinizar → 30 min
- 2- álcool 100 % → 5 min
- 3- álcool 90% → 3 min
- 4- álcool 80% → 5-10 min ou até desaparecer aspecto amarelado, após, secar por 30 segundos.
- 5- álcool 70% → 3 min
- 6- água destilada → 3 min
- 7- hematoxilina → 20-40 s
- 8- lavou-se em água corrente duas vezes e deixou-se em água por 10 min, para limpar eventuais resíduos na lâmina, colocou-se em eosina por 15 s Após o processo de hidratação, realizou-se o procedimento de desidratação como segue:

- 1- passou-se uma vez na água da torneira
- 2- colocou-se no álcool 90%, rapidamente
- 3- álcool 100% (5 min)
- 4- álcool 100% (5 min)
- 5- xilol (5 min- diafanização)
- 6- xilol II (5 min)
- 7- montou-se a lâmina com lamínula em Permout®
- 8- Deixou-se secar por três dias e posteriormente realizou-se leitura em microscópio (Olympus CBB) – 100 vezes

4.7.3.9 Análise microscópica da proliferação celular epitelial

A análise da proliferação celular da epiderme foi realizada pela contagem das células epiteliais bloqueadas em metáfase, após a injeção de sulfato de vincristina (0,5 mg/kg de peso do animal), nas camadas basal e supra basal. As contagens foram feitas em 50 campos microscópicos, com objetiva de 100 vezes, em microscópio, utilizando-se régua de 105 μm acoplada à ocular de 10 vezes. Não foram consideradas metáfases de eventuais folículos pilosos em formação nas margens das feridas.

4.7.3.10 Análise da migração celular epitelial (medida da língua de reepitelização)

A análise da migração celular epitelial foi realizada com o auxílio de uma régua de 105 μm acoplada ao microscópio, com ocular de 5 vezes, traçando-se uma reta paralela à língua de reepitelização. Foram analisadas 14 superfícies reepitelizadas de cada ferida. Quando a ferida estava aberta, os dois lados foram medidos e a soma das línguas foram consideradas uma única medida, e nos casos de ferida fechada considerou-se toda superfície reepitelizada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudo morfo-anatômico das cascas

Sempre que existir estudos utilizando-se matéria prima vegetal faz-se necessário a identificação e descrição botânica correta para garantir a identidade da espécie em questão.

Qualquer possível erro pode causar sérios danos na produção de um fitoterápico, na pesquisa e principalmente no indivíduo que utiliza-se desse medicamento.

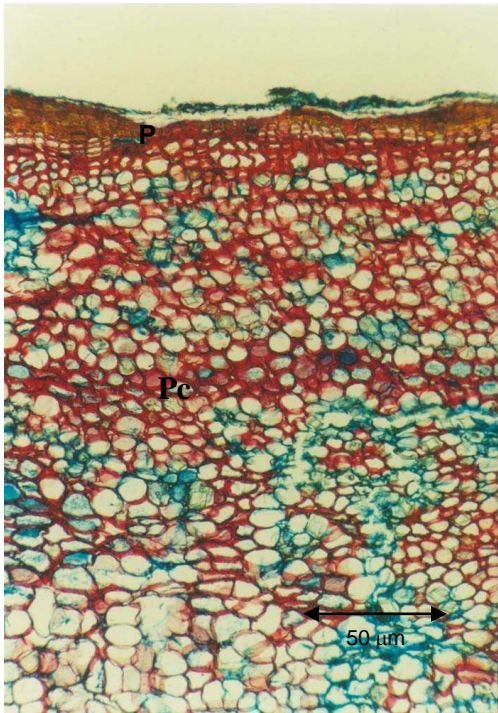
Na maioria das vezes o consumidor compra a planta moída, por isso, para sua identificação torna-se necessário método de identificação por microscopia do pó ou mesmo reações químicas.

As características anatômicas de *Stryphnodendrom adstringens* (Mart.) Coville foram descritas pela primeira vez na Farmacopéia Brasileira (1929), porém não apresentava ilustrações. Em 1989, Oliveira e Akisue descreveram novamente essas características, porém, dessa vez, ilustradas. Toledo (2002), através de cortes à mão livre e com auxílio de um micrótomo descreveu detalhadamente essas estruturas viabilizando parâmetros para controle de qualidade dessa espécie vegetal.

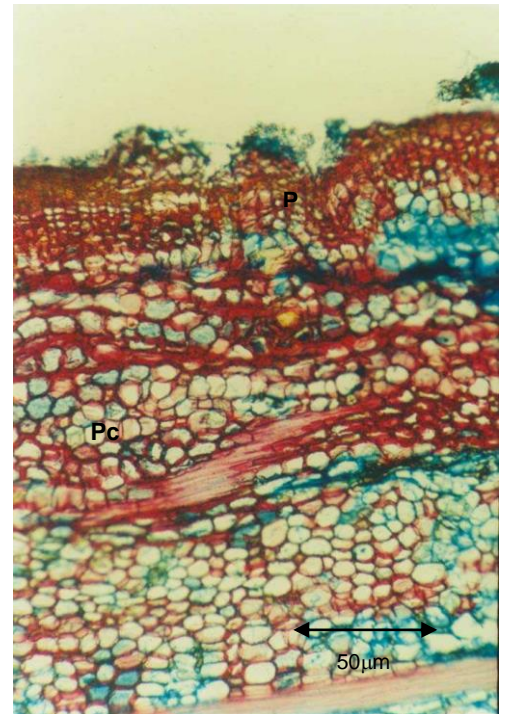
Nesse estudo foram realizados cortes com auxílio de um micrótomo, os cortes a mão livre foram inviáveis, devido as características do próprio tecido vegetal.

As análises botânicas das cascas mostram as principais estruturas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

A



D



B

Figura 12- Corte transversal de casca de *S. obovatum* Benth. coradas em safrablau. Onde P: periderme, Pc: parênquima cortical

A figura 12 a e b, mostra a periderme constituída pelo felogênio, feloderme e súber. A diferenciação entre os tecidos é difícil, entretanto observa-se que o felogênio possui células com aspecto retangular, radialmente achatada e enfileirada, com paredes delgadas e lume claro. A feloderme é caracterizada por células alongadas com paredes finas não lignificadas. O súber, externamente ao felogênio, tem a parede interna recoberta por lamelas de suberina, substância que confere impermeabilidade à água e ao ar, suas células são grandes, arredondadas e aparentemente sobrepostas.

A figura 13 mostra o ritidoma sugerindo que o arbusto em questão apresenta-se em idade adulta, sendo que seu crescimento secundário alcançou diversos ciclos, evidenciado pelo desprendimento da casca mais velha.

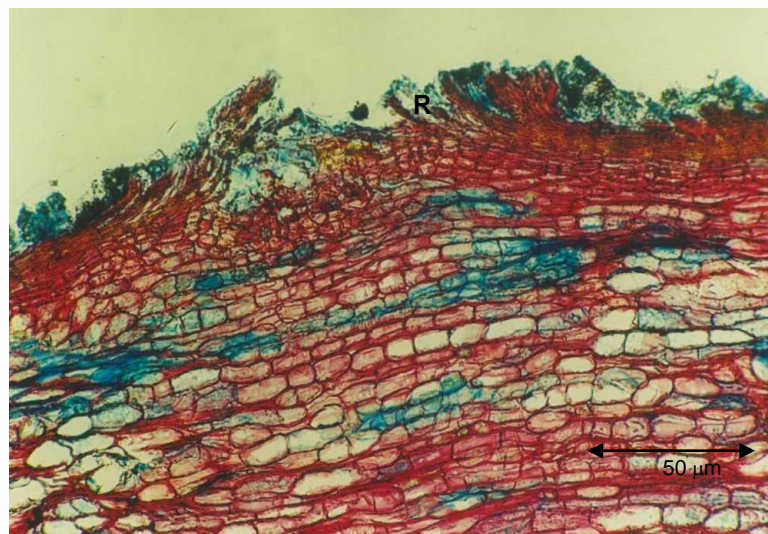


Figura 13- Ritidoma nas cascas de barbatimão corados em safrablau.

Onde R: ritidoma

O parênquima cortical apresenta um grande número de células esclerenquimáticas, facilmente distinguida por sua forma, tamanho e bordas espessas, nomeadas como células pétreas (Fig.14) (Esau, 2000). Essas células são dotadas de paredes secundárias espessadas com lignina, mostrando-se avermelhadas em Safrablau, e são importantes na função de sustentação do vegetal. Os grãos de amido presentes no interior das células do parênquima são constituintes de reserva do vegetal. Essas observações não permitem uma diferenciação anatômica entre as cascas de *S. obovatum* Benth. e *S. adstringens* (Mart.) Coville.

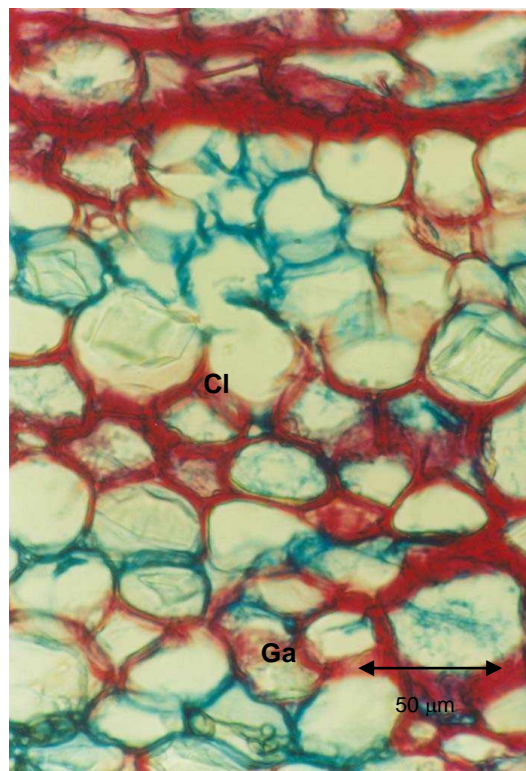


Figura 14-. Células esclerenquimáticas em corte transversal de casca de barbatimão coradas em safrablau. (Cl): células lignificadas, (Ga): grãos de amido

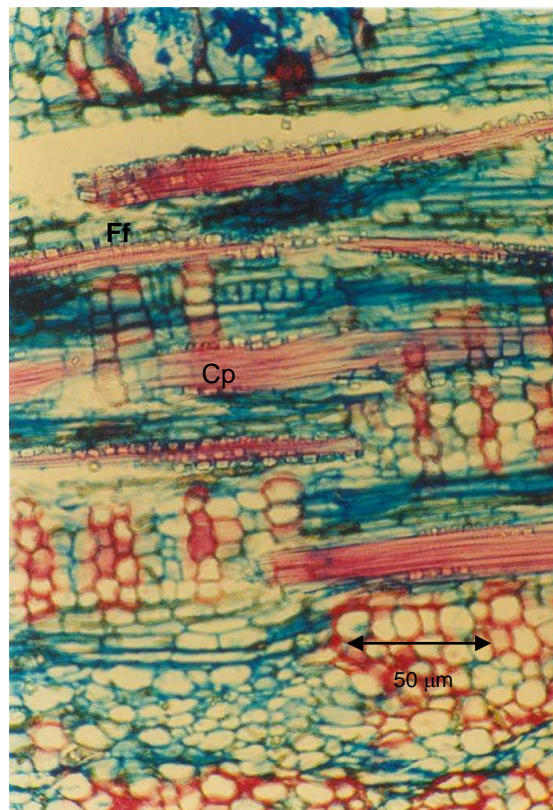
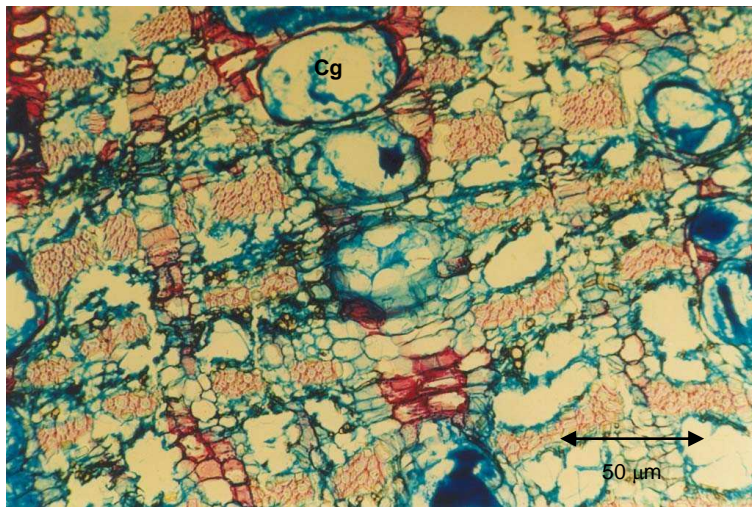


Figura 15- Corte longitudinal corado em safrablau. A) (Cp): cristais prismáticos, (Ff): fibras do floema; B) (Cg): células gigantes, (CCP): células de conteúdo pardo

A figura 15b da região floemática mostra as fibras do floema em grupos e a presença de bainha de cristais prismáticos presentes em toda extensão das fibras podem ser vistas na figura 15a. Toledo (2002), observou essas fibras com bainha de cristal em *S. adstringens* (Mart.) Coville. Pode-se observar também a presença de células gigantes já encontradas pelo mesmo autor nas cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.. A presença de células com conteúdo pardo são descritas por Toledo (2002) que sugere serem idioblastos taníferos, que podem ser responsáveis pelo armazenamento de taninos, um dos mais abundantes metabólitos secundários presentes nas cascas dessa espécie vegetal.

5.2 Controle de qualidade

O estudo de extratos vegetais em busca de novas opções terapêuticas é uma área em expansão tanto no setor acadêmico como no industrial, devido ao imenso uso popular e sua eficácia terapêutica cientificamente comprovada em inúmeras espécies vegetais. Por isso, são necessários cada vez mais estudos detalhados para garantir os três aspectos básicos e fundamentais para um medicamento: eficácia, segurança e qualidade, garantindo a credibilidade necessária ao seu uso (DELAPORTE *et al.*, 2001).

De acordo com Farias (2001), a qualidade da matéria-prima vegetal é um fator determinante inicial da qualidade do fitoterápico. Os parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos são, em princípio, estabelecidos por códigos oficiais e farmacopéias, como por exemplo, a Farmacopéia Brasileira ou de outros países e também por monografias elaboradas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998; FARMACOPÉIA, 2000).

Alguns ensaios de controle de qualidade foram realizados com objetivo de caracterizar a espécie em estudo e estabelecer valores para as cascas e folhas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

As amostras coletadas em Assis e Iepê, SP, em outubro de 2000, fevereiro de 2001 e setembro de 2001 respectivamente, foram secas ao ar livre e protegidas da luz com objetivo de garantir a qualidade da droga vegetal.

A Resolução RDC nº17 de 24 de fevereiro de 2000 - ANVISA prevê que a partir da droga vegetal até a obtenção de um medicamento fitoterápico, são necessários a aquisição de dados ou informações que possam ser empregados no controle de todas as suas fases de produção.

Tendo em vista as exigências da resolução RDC nº17, e a ausência de estudos de controle de qualidade, objetivou-se traçar um perfil da droga vegetal *Stryphnodendron obovatum* Benth., colaborando com a garantia de qualidade desta espécie visando um fitoterápico que venha atender as exigências da legislação. Para tanto, são necessários testes químicos e físico-químicos preliminares bem como análise cromatográfica, de acordo com os constantes nos parágrafos 2.1.1.5, 2.1.1.7, 2.1.2 da citada Resolução.

Foram realizadas diversas análises com a droga vegetal, entre elas: perda por dessecação, perda por secagem, teor de extrativos e determinação do teor de taninos, triagem fitoquímica preliminar com objetivo de caracterizar a espécie de acordo com estes parâmetros.

A triagem fitoquímica preliminar permite traçar um perfil dos constituintes ou grupos químicos presentes no farmacógeno, facilitando um direcionamento para estudos posteriores.

As cascas e as folhas apresentaram compostos fenólicos como grupo comum, como pode ser observado na tabela 1. O gênero *Stryphnodendron*, por sua vez, possui a adstringência como característica peculiar (MELLO *et al.*, 1999; TOLEDO, 2002). Essa característica é própria de taninos, sejam hidrolisáveis ou condensados (MELLO e SANTOS, 2001), e como previsto, os mesmos foram detectados pelas reações específicas (Tabela 2).

Tabela 2- Análise fitoquímica preliminar das casca coletadas em Assis e Iepê

	Cascas			Folhas		
	Out/00	Fev/01	Set/01	Out/00	Fev/01	Set/01
Identificação do núcleo esteroidal	-	-	-	+	-	-
Teste de espuma	-	+	+	-	+	+
Polifenóis	+	+	+	+	+	+
Taninos Condensados	+	+	+	+	+	+
Taninos Hidrolisáveis	+	+	+	+	+	+

+ presença; - ausência

Outras técnicas de controle de qualidade farmacopéicos foram realizados com o objetivo de estabelecer critérios específicos para a droga vegetal em estudo, como pode ser observado na tabela 3.

A confirmação da presença de substâncias fenólicas na triagem fitoquímica preliminar vem justificar o seu uso popular para curtir couro, como cicatrizante devido as propriedades desses compostos em se complexar com

proteínas. A presença desses constituintes também justifica os estudos das atividades antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes presentes nesse trabalho.

Tabela 3- Perda por secagem e perda por dessecação das cascas de barbatimão coletadas em Assis e Iepê (outubro de 2000, fevereiro de 2001 e setembro de 2001)

Técnicas	Assis		Iepê
	Período	Média	Média
Perda por secagem	Out/2000	55,74	54,36
	Fev/2001	42,62	28,88
	Set/2001	26,84	25,21
Perda por dessecação	Out/2000	12,30	13,20
	Fev/2001	12,80	13,90
	Set/2001	12,15	13,40

A perda por secagem apresentou valores muito próximos entre as duas localidades. Após um período de 7 dias, as cascas estabilizaram-se e não perderam mais peso, avaliando-se sempre os pesos entre os dias anterior e subsequente.

A coleta referente aos períodos de out/2000 e set/2001, apesar de serem diferentes entre si, não o são em relação às duas localidades. Essas diferenças na perda por secagem, entre os períodos de coleta, podem estar relacionados com as chuvas em out/2000, e pelo fato da não ocorrência dessas em set/2001, haja vista que os meses são próximos, porém em anos diferentes (Tab. 3).

De forma semelhante, porém com outras espécies vegetais Delaporte *et al.* (2001), observaram que a perda por secagem não apresentou valores tão discrepantes para a perda por secagem. Esse fato pode, ainda, estar relacionados com o bioma Cerrado. Essa região, normalmente, apresenta duas épocas bem características, sendo uma de seca (março-outubro) e outra de chuva (novembro-fevereiro) (CERRADO, 2003).

Já a perda por dessecação (Tab. 3) apresenta valores pouco variáveis, além de demonstrar que estão dentro dos valores previamente determinados em literatura para as cascas, em torno de 8-14% (BACCHI, 1996). Valores acima desse percentual poderiam representar perda de atividade ou mesmo facilitar o crescimento microbiano, prejudicando, assim, o material vegetal.

A perda por secagem foi maior que a perda por dessecação constatando-se que a secagem à temperatura ambiente foi eficiente. Pode-se observar também uma maior quantidade de água e substâncias voláteis nas amostras coletadas em outubro de 2000, isso pode ser causado por um maior índice pluviométrico nas regiões de Assis e Iepê neste período, quando comparado às outras duas amostras dessas localidades.

Comparando-se os valores obtidos para o teor de extrativos, para as amostras coletadas em Assis e em Iepê, a época de fevereiro foi que apresentou melhores resultados (Tab. 4).

Tabela 4- Teor de extrativos e teor de taninos das cascas de barbatimão coletadas em Assis e Iepê (outubro de 2000, fevereiro de 2001 e setembro de 2001)

Técnicas		Assis	Iepê
	Período	Média	Média
Teor de extrativos	Out/2000	28,63	25,05
	Fev/2001	29,56	30,73
	Set/2001	28,42	23,45
Teor de taninos	Out/2000	19,02	15,19
	Fev/2001	15,03	13,50
	Set/2001	18,75	12,72

O teor de extrativos avalia a quantidade de substâncias extraíveis aplicando-se o método e o líquido extrator preconizado, ou seja, decocção e a água, respectivamente de acordo com a organização mundial da saúde (WHO, 1998). Pode-se observar, na tabela 4, uma variação no teor de extrativos das amostras coletadas nas diferentes épocas. Esse fato demonstra que o farmacógeno possui diferentes quantidades de substâncias, pois a metodologia foi a mesma e realizada pelo mesmo analista. Isso, no entanto, não pode ser relacionado com possíveis alterações nas propriedades biológicas e/ou farmacológicas, pois não é esse método apropriado a essa finalidade.

O melhor resultado para o teor de taninos está relacionado para a época de outubro em ambas as localidades (Tab. 4).

Através do teor de taninos pode-se avaliar a concentração constante do princípio ativo da planta em qualquer época do ano. Assim, é possível realizar a

devida correção da quantidade de planta ou extrato, utilizada para produzir o fitomedicamento garantindo sempre a mesma concentração do princípio ativo no produto final.

Nesse sentido, pode-se observar diferentes medicamentos fitoterápicos que apresentem essa proporção tais como: Tanakan (*Ginkgo biloba* L., 24% de heterosídeo, 6% de gincolídeos-bilobalídeos, IPSEN PHARMA).

Na época de fevereiro/2001, coleta de lepê, que apresentou perda por secagem de 27,88%, foi a amostra de melhor quantidade de substâncias extraíveis (Tabela 5).

Tabela 5- Determinação de teor extrativo (%) em diferentes métodos de extração e líquidos extratores das cascas e folhas do barbatimão coletadas em Assis utilizadas para o isolamento químico

Parte da Planta	Decocção-água	Refluxo- água	Refluxo-acetona:água (7:3;V/V)
Cascas	28,63	28,42	37,41
Folhas	25,82	26,89	46,68

Com o intuito de avaliar outros métodos de extração e líquidos extratores, realizou-se a determinação de resíduo seco conforme o constante na tabela 5. Os resultados demonstram que a melhor extração ocorre com refluxo empregando-se a mistura acetona:água (7:3 V/V), fato esse comprovado também no trabalho de Hargerman (1988). 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 (MELLO e SANTOS, 2001).

De acordo com os resultados obtidos através do controle de qualidade (Tab. 3, 4, 5) pode-se afirmar que a melhor época de coleta é a primavera e que as amostras da região de Assis em todos os períodos avaliados apresentaram teor de taninos de 3-4% maior que as amostras da região de Iepê.

Apesar do teor de taninos ser superior, o mesmo não ocorre com o teor de extrativos, não havendo, assim, uma correlação direta entre esses dois métodos, já que a época de outubro/2000 apresentou maior teor de taninos em ambas localidades.

O melhor método de extração dentre os avaliados foi o refluxo utilizando acetona:água (7:3; V/V), que rendeu valor de resíduo seco em torno de 20% maior para as folhas e 10% maior para as cascas.

5.3 Isolamento químico

Para os estudos químicos, a matéria-prima vegetal coletada em Assis (fev./2001) foi submetida a secagem em local arejado e seco e apresentou um rendimento de 72,80% (770 g) em relação ao total de cascas frescas coletadas (1058 g). No processo de moagem, em moinho de martelos, sem um sistema adequado de coleta de pós, houve uma perda de 14,16% (661 g). Esse fato demonstra que se pode melhorar o sistema de coleta de pós e diminuir a perda de material vegetal moído, empregando-se por isso um sistema fechado (HERNANDEZ, 1982).

Mello *et al.* (1996a, 1996b e 1999), encontraram um teor de taninos cerca de 20%, além de terem isolado e identificado 23 substâncias das cascas de

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville, sendo 10 inéditas. Recentemente, Toledo (2002), isolou e identificou dois novos dímeros de taninos condensados, inéditos, derivados do tipo 5-deóxi-flavan-3-ol, da mesma espécie vegetal, demonstrando que o gênero *Stryphnodendron* serve como fonte de estudos para esse grupo de substâncias.

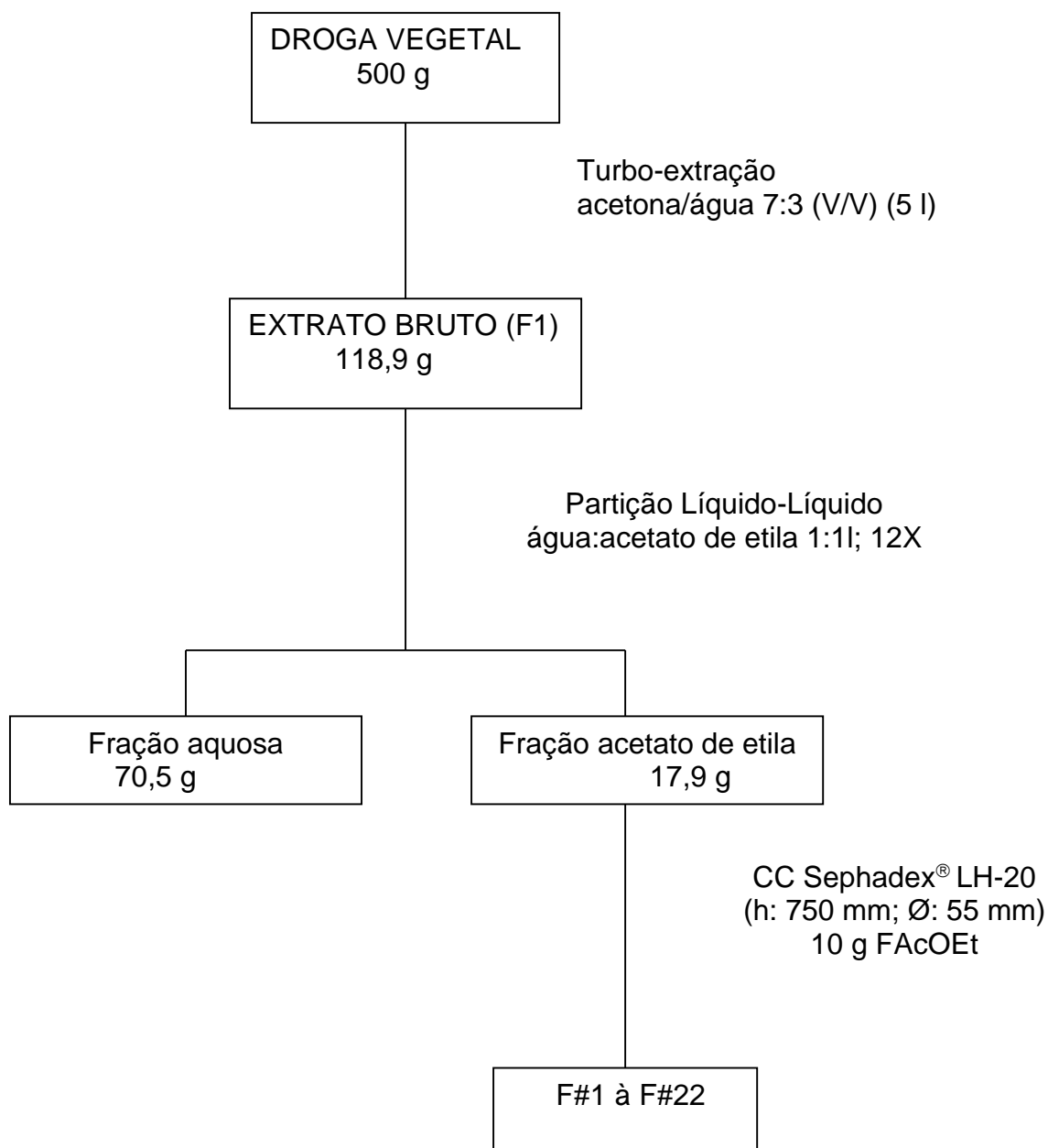
Baseados nestes trabalhos objetivou-se isolar e identificar taninos condensados a partir de extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., empregando-se as metodologias propostas por esses autores. Com essa finalidade, utilizou-se da coleta realizada na Estação Ecológica de Assis, SP, em fevereiro de 2001, conforme autorização do Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (autos nº: 42697/2002, anexo I).

Com 500 g de cascas trituradas preparou-se extrato bruto por turbo-extração obtendo-se um rendimento de 118,88 g de liofilizado (23,28%). Solubilizaram-se 100 g de extrato bruto em 1000 ml de água e realizou-se partição líquido-líquido com acetato de etila (1000 ml; 12 vezes) obtendo-se os rendimentos constantes da tabela 6.

Tabela 6- Rendimentos de extração nas diferentes fases de semipurificação da matéria-prima vegetal

	Quantidade (g)	Porcentagem em relação à casca	Porcentagem em relação ao extrato bruto
Fração AcOEt	17,89	3,58	17,89
Fração Aquosa	70,50	14,10	70,50

A porcentagem de perda (11,61%) em relação ao extrato bruto (100%) ocorrido na fração aquosa foi devido à dificuldade de se concentrar os extratos aquosos em evaporador rotatório sob pressão reduzida, pois se formava uma espuma persistente e o mesmo refluxava com perda de material. Provavelmente a espuma que não desmanchava, seja devido as saponinas presentes no extrato, haja vista que foi detectada a sua presença através da triagem fitoquímica preliminar, que pode ser observado na tabela 2.



Fluxograma 1- Preparação de extratos a partir das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. e fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna

Através do uso da cromatografia em coluna (CC) em Sephadex® LH-20 fracionou-se a fração acetato de etila (FAcOEt) (Flux. 1). Esse fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada, e as frações foram reunidas por semelhança, fornecendo 22 subfrações com seus respectivos rendimentos, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7- Frações obtidas através de cromatografia em coluna Sephadex® LH-20 da fração AcOEt

Frações	Eluente	Volume aproximado (ml)	Quantidade (g)	(%)
F#1	Etanol/água (1:1; V/V)	400	-	
F#2	Etanol/água (1:1; V/V)	220	0,1275	1,275
F#3	Etanol/água (1:1; V/V)	430	0,1893	1,893
F#4	Etanol/água (1:1; V/V)	200	0,0300	0,3
F#5	Etanol/água (7:3; V/V)	230	0,0445	0,445
F#6	Etanol/água (7:3; V/V)	250	0,0153	0,153
F#7	Etanol/água (7:3; V/V)	300	0,0365	0,365
F#8	Etanol/água (7:3; V/V)	290	0,3046	3,046
F#9	Etanol/água (7:3; V/V)	400	0,4162	4,162
F#10	Etanol/água (7:3; V/V)	300	0,1352	1,352
F#11	Etanol/água (7:3/V)	600	0,3978	3,978
F#12	Etanol/água (7:3/V)	400	0,4880	4,880
F#13	Etanol 100%	400	0,1643	1,643
F#14	Etanol 100%	250	0,3116	3,116
F#15	Etanol 100%	250	0,0496	0,496
F#16	Etanol 100%	230	0,3118	3,118
F#17	Etanol 100%	600	0,7688	7,688
F#18	Etanol 100%	150	1,3331	13,331
F#19	Etanol 100%	200	0,1700	1,7
F#20	Etanol 100%	500	0,3645	3,645

F#21	Acetona:água (7:3)	1000	0,400	4,0
F#22	Metanol 100%	2000	0,450	4,5
TOTAL		10000	5,8471	58,471

As subfrações F#21 e F#22 foram obtidas no processo de limpeza da coluna. Também foi usado ácido acético 2% para a limpeza da coluna e as subfrações obtidas a partir da limpeza com essa solução não foram consideradas.

A subfração F#1 não foi trabalhada por falta de material disponível (Tab. 7) e por não apresentar nenhuma mancha característica na CCD (Fig.16). As subfrações F#2 e F#3 apresentaram, de forma semelhante à F#1, nenhuma zona característica na CCD (Fig. 16), não se realizando, portanto, nenhum estudo químico com essas subfrações.

A subfração F#4 foi, inicialmente, derivatizada quimicamente, pela quantidade disponível (30 mg) (Tab. 7), e as análises espectroscópicas de RMN de hidrogênio resultaram em espectro inadequado à interpretação.

Após análise da CCD (Fig. 16) e pelas quantidades obtidas, as subfrações F#5, F#6 e F#7 foram reunidas. Realizou-se a derivatização química, acetilação, seguida de limpeza em CCDP. A zona principal foi submetida à análise de RMN de hidrogênio, resultando em um grande grau de impurezas, não sendo possível realizar nenhuma identificação.

Já as frações F#8, F#9, F#10, F#11 e F#12 foram recromatografadas em coluna contendo Sephadex® LH-20 (h: 23 cm; Ø: 4 cm).

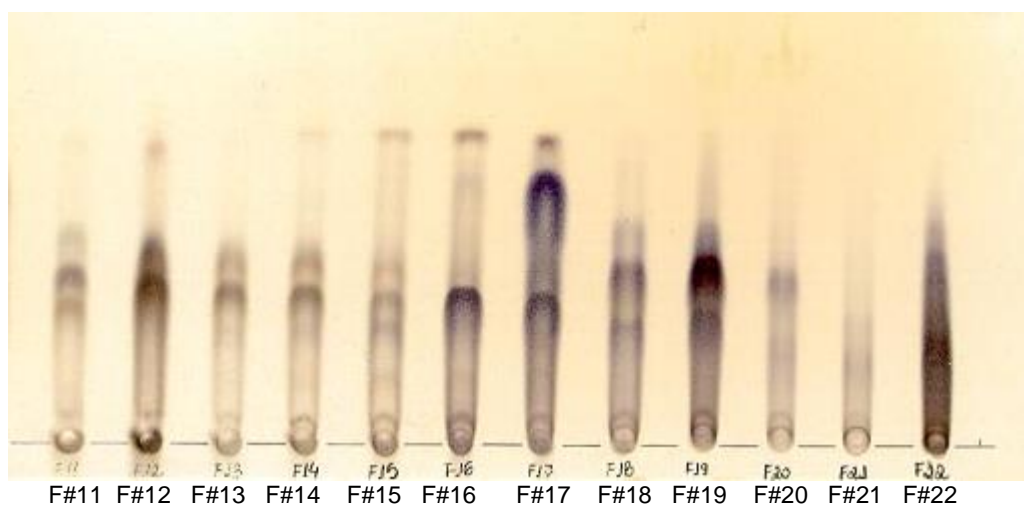
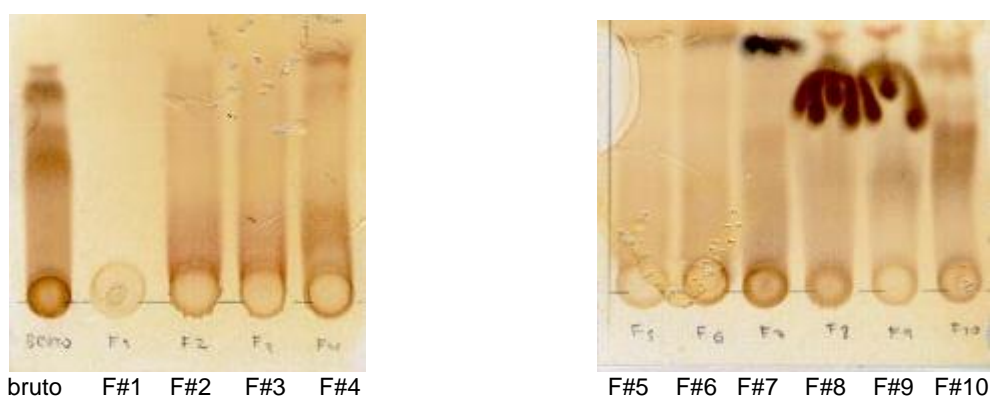
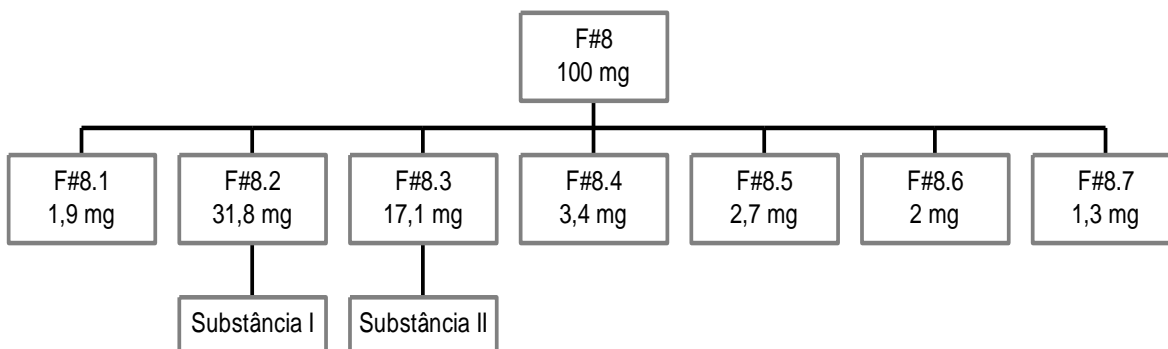


Figura 16- Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas através de cromatografia em coluna Sephadex® LH-20

A subfração F#8 (100 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (Sephadex® LH-20) rendendo sete novas frações semipurificadas, que foram submetidas à análise por CCD. As subfrações F#8.2 (31,8 mg) e F#8.3 (17,1 mg) apresentaram quantidade suficiente para análises espectroscópicas, resultando no isolamento das **substâncias I e II** (Flux. 2).



Fluxograma 2- Fracionamento fitoquímico a partir de F#8

5.3.1 Substância I: Epigallocatequina

A análise em CCD (Fig. 16) da subfração F8#2 (**substância I**) demonstrou uma mancha com Rf igual a 0,88 de coloração azul intenso após revelação com FeCl₃. No espectro de RMN de hidrogênio (CD₃OD) da **substância I** (Fig. 17) foram observados picos característicos de flavan-3-óis ou taninos condensados.

O espectro de RMN ¹H em CD₃OD da **substância I** (Fig. 17) mostrou dois duplo dubletos em δ 2,72 e 2,84 ppm, correspondendo ao hidrogênio H-4ax(C) e H-4eq(C), respectivamente. Os dados espectrais da **substância I** encontram-se na tabela 8. A constante de acoplamento entre os hidrogênios heterocíclicos H-2(C) e H-3(C) ($J_{2,3} < 1,0$ Hz) confirma a configuração relativa 2,3-*cis*. A trihidroxilação no anel B é comprovada através de um singleto característico correspondente aos dois hidrogênios, H-2' e H-6' em δ 6,51 ppm. No espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 5,90 e δ 5,93 ppm. Esses hidrogênios em solução, no entanto, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro, desde que a substância encontre-se com as hidroxilas livres (PETEREIT, 1992).

Tabela 8- Dados da **substância I** :epigallocatequina (CD₃OD; ν = 300 MHz)

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (C)	2,72	dd	$J_{H-4ax-H-4eq}$ = 16,8 $J_{H-4ax-H-3}$ = 3,0
H-4eq (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	$^4J_{H-6-H-8}$ = 2,1
H-8* (A)	5,93	d	$^4J_{H-8-H-6}$ = 2,3
H-2'/H-6'	6,51	s	

s= singleto; sl= singleto largo; d= dubleto; dd= dublo dubleto; * intercambiáveis (Kombal, 1993)

Com o objetivo de obter espectros de ressonância que pudesse facilitar a interpretação, além de tornar a substância mais estável quimicamente, à **substância I** foi acetilada e, novamente, sujeita à espectroscopia de RMN em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

O espectro de RMN em CDCl₃ da **substância I** (Fig. 18) é característico de monômero de flavan-3-ol peracetilado. Os dados espectrais encontram-se listados na tabela 9. Observam-se os sinais referentes aos hidrogênios alifáticos H-4, tanto axial como equatorial, como multipletos entre δ 2,85-3,01 ppm. O sinal referente ao hidrogênio H-2(C) apresenta-se como pseudo-singleto e H-3(C) como um multipletos resultante do acoplamento com H-4 (equatorial e axial). A constante de acoplamento $J_{2,3}$ foi inferior a 2 Hz. Weinges *et al.* (1969) demonstraram que a constante de acoplamento entre H-2(C) e H-3(C) sendo pequena, caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. Esse dado confirma aquele obtido com a **substância I** antes da derivatização. Interessante é o que ocorre entre os sinais de H-2 e H-3, com inversão de

posição após a acetilação e ao mesmo tempo com deslocamentos para campos mais altos de Δ 1,22 ppm para H-3(C) e de Δ 0,34 ppm para H-2(C). A presença de um singlete correspondendo a dois hidrogênios em δ 7,23 ppm comprova a trihidroxilação no anel B dos hidrogênios H-2' e H-6', devido os mesmos serem magneticamente equivalentes. Os hidrogênios correspondentes a H-6(A) e H-8(A), após a acetilação, permanecem fixos e foram determinados em δ 6,57 e 6,67 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento $J_{H-6-H-8} = 2,1$ Hz, estando de acordo com o proposto por Mello (1995). O espectro de RMN, sozinho, não permite declarar a configuração absoluta dos hidrogênios do anel heterocíclico. Assim, a comprovação da configuração absoluta (2*R*,3*R* ou 2*R*,3*S*) é possível de se determinar através de dicroísmo circular. Korver e Wilkins (1971) estabeleceram, através de um estudo com substâncias puras, que flavan-3-óis com uma configuração 2*R* apresentam um efeito Cotton negativo na região de aproximadamente 280 nm e um efeito Cotton positivo na região de aproximadamente 235 nm. A configuração 2*S*, como, por exemplo, (-)-catequina ou (+)-epicatequina, apresenta os efeitos de forma contrária. O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 305,1 (100%) e em $[M+H]^+$ o íon molecular em m/z 289,1 (62%) (Fig. 20). A determinação da rotação específica $[\alpha]_D^{20} = -0,048^\circ$ (metanol, $c = 1$ mg/ml) confirma, adicionalmente, a configuração 2*R*. De acordo com as informações anteriores e, em comparação com os dados de literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002), a figura 19 mostra o espectro de COSY que confirma a correlação dos hidrogênios alifáticos conclui-se a **substância I** como sendo **epigalocatequina**.

Tabela 9- Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹H para a **substância I** peracetilada em CDCl₃; ν = 300 MHz.

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura δ (ppm)*
H-4eq/H-4ax (C)	2,86-3,01	m		2,82-3,04
H-2 (C)	5,09	s		5,08
H-3 (C)	5,37-5,40	m	< 1,0	5,35-5,42
H-6 (A)	6,57	d	2,1	6,57
H-8 (A)	6,67	d	2,1	6,67
H-2'/H-6' (B)	7,23	s		7,22

m=múltiplo, s=singlo, d= dublo; * (Mello, 1995)

Figura 17- Espectro de RMN ^1H da epigallocatequina peracetilada (CD_3OD relativo para TMS, $\nu= 300 \text{ MHz}$)

Figura 18- Espectro de RMN ^1H da epigallocatequina peracetilada (CDCl_3 relativo para TMS, $\nu= 300 \text{ MHz}$)

Figura 19- Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da epigalocatequina (CDCl_3 , $\nu=300\text{ MHz}$)

Figura 20- Espectro de massas da epigallocatequina peracetilada

5.3.2 Substância II: Galocatequina

A análise em CCD da **substância II** demonstrou uma mancha com Rf igual a 0,88 com coloração azul intenso após revelação com FeCl₃, semelhante à observada para a **substância I**.

Os dados espectrais presentes na tabela 10 referem-se à **substância II** peracetilada (CDCl₃). É possível observar os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como multipletos em δ 2,63 e δ 2,91 ppm, respectivamente. A constante de acoplamento entre $^3J_{H-2-H-3} = 6,6$ confirmou a configuração relativa como sendo do tipo 2,3-*trans* (WEINGES *et al.*, 1969). A presença de um singlete correspondendo a dois hidrogênios em δ 7,23 ppm referente aos hidrogênios H-2' e H-6', comprova a tri-hidroilação no anel B, devido os mesmos serem magneticamente equivalentes. Os hidrogênios correspondentes a H-6(A) e H-8(A), após a acetilação, permanecem fixos e foram determinados em δ 6,57 e 6,67 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento de 2,1 Hz, estando de acordo com o proposto por Mello (1995). Através do espectro de RMN ¹³C, em acetona deuterada, os epímeros galocatequina e epigalocatequina podem ser seguramente diferenciados (Fig.22) (CZOCHANSKA *et al.*, 1979; CAI *et al.*, 1991). No espectro de C¹³ (CD₃OD), (Fig. 22) o C-2, em δ 82,9 ppm, da galocatequina com as hidroxilas livres, encontra-se em campos mais baixos perante o C-2 da epigalocatequina, esse em cerca de δ 79,9 ppm. O resultado obtido é o mesmo, que aquele observado por Czochanska *et al.*(1979) e Cai *et al.*, (1991), porém em solventes diferentes. O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular [M+Na⁺]⁺ em *m/z* 329 (100%) e em [M+H⁺] o íon molecular em *m/z* 307,1 (51%) (Fig. 23). Através desses dados e em comparação com a

literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002), pode-se concluir que a **substância II** trata-se de **galocatequina**.

Tabela 10- Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ^1H para a **substância II** (galocatequina peracetilada) CDCl_3 , $\nu = 300 \text{ MHz}$

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura δ (ppm)*
H-4ax (C)	2,91	m		2,92
H-4eq (C)	2,63	m		2,66
H-2 (C)	5,11	d	$^3J_{\text{H-2-H-3}}=6,6$	5,12
H-3 (C)	5,2	ddd	$^3J_{\text{H-3-H-2}}=7,2$ $^3J_{\text{H-3-H4ax}}=7,5$ $^3J_{\text{H-3-H4eq}}=5,4$	5,19
H-6 (A)	6,57	d	$^4J_{\text{H-6-H-8}}= 2,1$	6,6
H-8 (A)	6,64	d	$^4J_{\text{H-8-H-6}}= 2,1$	6,66
H-2'/H-6' (B)	7,12	s		7,12

s=singleteo, d= dubleteo, m=multipleteo, ddd=duplo duplo dubleteo; * Mello, (1995)

Figura 21- Espectro de RMN ^1H de galocatequina peracetilada (CDCl_3 relativo para TMS, $\nu=300$ MHz)

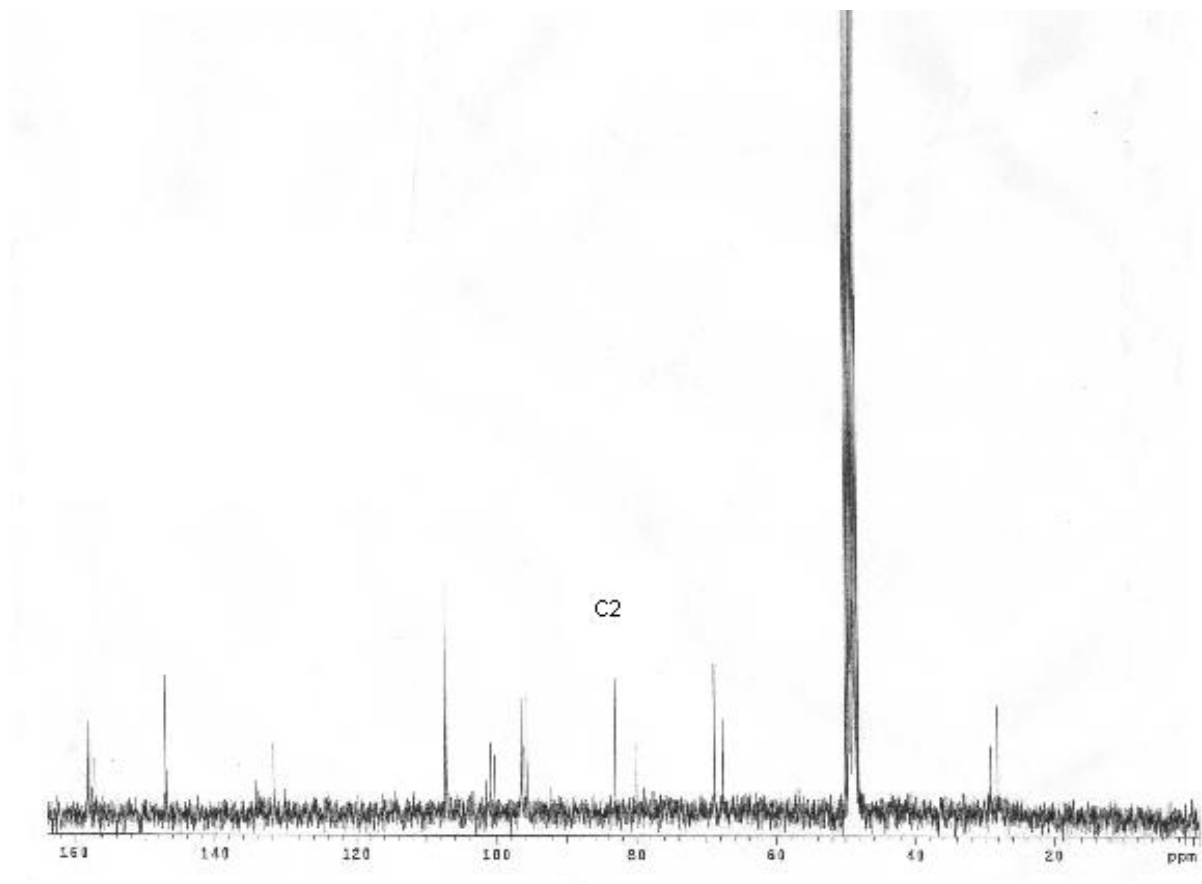


Figura 22- Espectro de RMN C^{13} de galocatequina (CD_3OD relativo para TMS, $\nu=$ 300 MHz)

Figura 23- Espectro massas de galocatequina peracetilada

5.3.3 Proantocianidinas diméricas

Das subfrações obtidas, somente as F#10.4, F#11.3 e F#10.6, denominadas de **substâncias III, IV e V**, respectivamente, tiveram continuidade nas análises. A análise do espectro de RMN ^1H dessas subfrações indicou, provavelmente, tratarem ser proantocianidinas diméricas.

A interpretação dos espectros de RMN 1D (^1H) e 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) forneceu subsídios iniciais suficientes para a elucidação estrutural das proantocianidinas diméricas, entretanto, a análise completa desses compostos relaciona-se também com a análise do espectro de massas e dicroísmo circular.

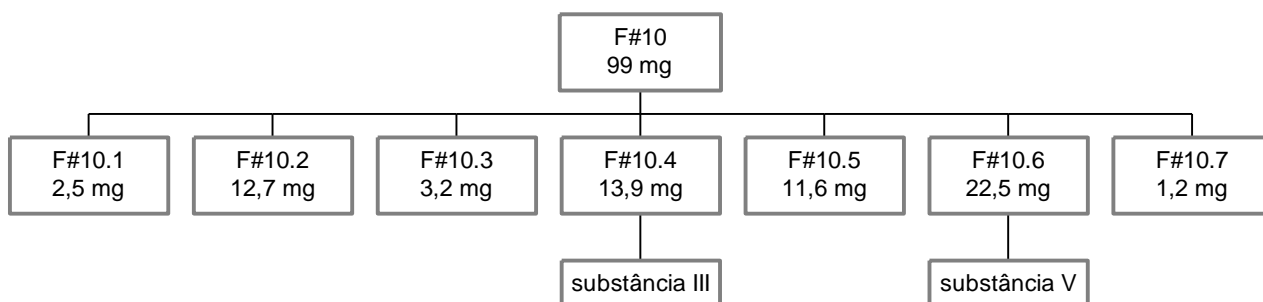
Fletcher *et al.* (1977) mostraram através de estudos de RMN de procianidinas peracetiladas que as ligações (4→6) e (4→8) encontram-se em duas conformações energéticas protegidas. Como critério de diferenciação para o tipo de ligação, os autores utilizam a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de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

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway *et al.* (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas (B_1/B_7 e B_2/B_5) do sistema de spins AB dos hidrogênios do anel A das substâncias com ligação 4→6 como estando em campos mais baixos (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 4R

(KOŁODZIEJ, 1992). Adicionalmente, o hidrogênio H-2 de substâncias com ligação 4→8 apresenta-se com deslocamentos entre δ 4,37 e 5,01 ppm, enquanto substâncias 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 (3*R*,3*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 com efeito “cotton” em 275 nm para procianidinas diméricas com configuração 4*S*, mostrando-se 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 como proposto por Mello *et al.* (1996a e 1996b).

5.3.3.1 **Substância III**: epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina



Fluxograma 3- Fracionamento cromatográfico da F#10

A análise em CCD da fração F#10.4 referente à **substância III** (Flux. 3), demonstrou uma mancha com Rf igual a 0,82 com coloração azul intenso após revelação com FeCl₃.

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Fig. 24) da **substância III** acetilada, após purificação em CCDP, forneceu os dados que se encontram na tabela 11.

O espectro de RMN ¹H mostra na região aromática dois singletos característicos referentes a dois hidrogênios correspondendo aos anéis B e E com triidroxilação, em δ 6,84 ppm [H-2' e H-6' (E)] e δ 7,19 ppm [H-2' e H-6' (B)]. Esses hidrogênios apresentam-se, como nos derivados monoméricos galocatequina ou epigalocatequina, como um singlete contendo dois hidrogênios. A posição dos hidrogênios H-6(A) e H-8(A) em δ 6,10 ppm e δ 6,28 ppm, respectivamente, indica uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway *et al.* (1982), Kolodziej (1986), Danne (1994) e Mello (1995). Do mesmo modo, a posição de ressonância do hidrogênio H-2(F) em δ 4,29 ppm

sugere uma ligação (4 β →8) (Kolodziej, 1992). Enquanto a constante de acoplamento entre os hidrogênios H-2(F) e H-3(F) é elevada ($J_{2,3} = 9,9$ Hz) e confirma uma configuração relativa 2,3-*trans* para a unidade “inferior”, a pequena constante de acoplamento ($J_{2,3} \leq 1,0$ Hz) referente aos hidrogênios H-2(C) e H-3(C) comprova uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* para a unidade “superior”. É perfeitamente visível no espectro de RMN 2D (1H/1H COSY – Fig. 25), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos. O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em m/z 611,2 (19%) e em $[M+H]^+$ o íon molecular em m/z 305,0 (100%) (Fig. 26). Em comparação com a literatura (PETEREIT, 1992; MELLO, 1995), confirma-se a **substância III** como sendo **epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina**. Essa substância já foi encontrada em *Pithecellobium lobatum* Benth. (Mimosaceae) (Lee *et al.*, 1992), *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) (TANAKA *et al.*, 1992), *Cistus incanus* L. (Cistaceae) (PETEREIT *et al.*, 1992) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO *et al.*, 1996a).

Tabela 11- Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ¹H para a **substância III** (epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina peracetilada) CDCl₃ ν = 300 MHz

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura* δ (ppm)
H-4ax (F)	2,54	dd	² J _{H 4-ax-H4-eq} = 16,7 ³ J _{Hax4F-H3F} =9,5	2,54
H-4eq (F)	3,23	dd	² J _{Hax4-eq4} =16,7 ³ J _{Heq4F-H-3F} =6,8	3,23
H-2 (F)	4,29	d	³ J _{H2F7-H3F} =9,9	4,29
H-4 (C)	4,44	d	³ J _{H4C-H3C} =2,1	4,44
H-3 (F)	4,94-5,03	m		4,97-5,02
H-3 (C)	5,12-5,17	m		5,12-5,17
H-2 (C)	5,45	sl		5,45
H-6 (A)	6,10	d	⁴ J _{H6- H8} =2,1	6,10
H-8 (A)	6,29	d	⁴ J _{H8- H6} =2,1	6,29
H-6 (D)	6,68	s		6,68
H-2'/H-6' (E)	6,84	s		6,84
H-2'/H-6' (B)	7,19	s		7,19

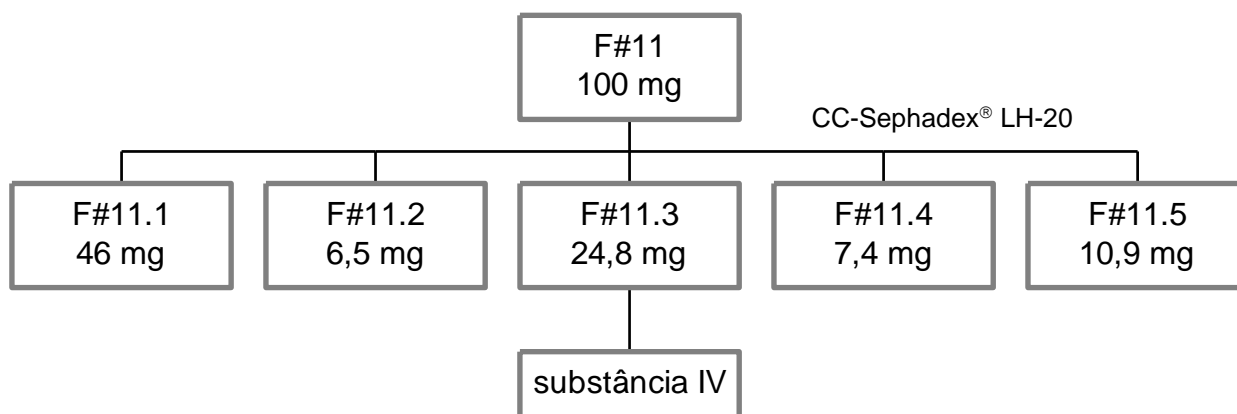
s= singleto, sl= singleto largo, d= dubleto, dd= duplo dubleto, m= multipletto; * Mello 1995

Figura 24- Espectro de RMN ^1H de epigallocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada CDCl_3 , $\nu = 300 \text{ MHz}$, relativo para TMS

Figura 25- Espectro de COSY¹H/¹H de epigallocatequina-(4β→8)-gallocatequina peracetilada CDCl₃, ν = 75 MHz,

Figura 26- Espectro de massas de epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina

5.3.3.2 **Substância IV:** epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina



Fluxograma 4- Fracionamento cromatográfico da F#11

A análise em CCD da fração referente a **substância IV** (F#11.3; Flux. 4) demonstrou uma mancha com Rf igual a 0,82 com coloração azul intenso após revelação com FeCl₃.

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Fig. 27) da **substância IV** acetilada, forneceu dados que se encontram na tabela 12.

O espectro de RMN ¹H de epicatequina-(4 β →8)-epicatequina peracetilada (LANGHAMMER et al., 1981; KOLODZIEJ, 1986) mostra com exceção da região aromática, uma semelhança com o espectro de RMN ¹H da **substância IV** peracetilada. Esse espectro acusa na região aromática dois singletos característicos referentes a dois hidrogênios, referente a dois anéis (B/E) trihidroxilados em δ 6,89 ppm [H-2' e H-6' (E)] e δ 7,22 ppm [H-2' e H-6' (B)], em oposição para dois sistemas de spin do tipo AMX da procianidina. Esses hidrogênios apresentam-se, como nos derivados monoméricos galocatequina ou epigalocatequina, com um singleto contendo dois hidrogênios. Com a posição

de ressonância dos hidrogênios H-6(A) e H-8(A) em δ 6,10 ppm e δ 6,28 ppm, respectivamente, assim como a posição do hidrogênio H-2(F) em δ 4,29 ppm demonstra-se uma ligação (4 β →8) (HEMINGWAY *et al.*, 1982; KOLODZIEJ, 1992; DANNE, 1994; MELLO, 1995). Todos os hidrogênios heterocíclicos dos anéis C e F apresentam uma pequena constante de acoplamento ($J \leq 2,0$ Hz). Isto corresponde uma configuração relativa 2,3-*cis* tanto para a unidade “superior” quanto para a unidade “inferior” de acordo com o proposto por Weinges *et al.*, 1969. É possível, no espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY – Fig. 28), a correlação de todos esses hidrogênios alifáticos. . O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ em m/z 633,1 (26%) e em $[\text{M}^+\text{H}^+]$ o íon molecular em m/z 413,2 (100%) (Fig. 29). Após a análise explicitada e, em comparação com a literatura, a **substância IV** trata-se de **epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina** tendo sido isolada e minuciosamente caracterizada em *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae) (DANNE, 1994) e de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MELLO *et al.*, 1996a). 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) e *Thea* sp (Theaceae) (NONAKA *et al.*, 1981; NONAKA *et al.*, 1983a; HASHIMOTO *et al.*, 1989).

Tabela 12- Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ^1H para a **substância IV** [epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina peracetilada] (CDCl_3 , $\nu = 300 \text{ MHz}$)

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura* δ (ppm)
H-4ax/H-4eq (F)	2,89-3,02	m		2,87-2,94
H-4 (C)	4,46	d	$^3\text{J}_{\text{H}_{4(\text{C})}-\text{H}_{3(\text{C})}}=2,1$	4,48
H-2(F)	4,49	s		4,50
H-3 (C)/H-3 (F)	5,09-5,11	m		5,08-5,15
H-2 (C)	5,54	sl		5,54
H-6 (A)	6,06	d	$^4\text{J}_{\text{H}_{6(\text{A})}-\text{H}_{8(\text{A})}}=2,1$	6,06
H-8 (A)	6,25	d	$^4\text{J}_{\text{H}_{6(\text{A})}-\text{H}_{8(\text{A})}}=2,1$	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)	7,22	s		7,22

s= singleto, sl= singleto largo, d= dubleto, m= multipletto; * Mello (1995)

Figura 27- Espectro de RMN ^1H de epigallocatequina-(4 β →8)- epigallocatequina peracetilada (CDCl_3 relativo para TMS, $\nu = 300$ MHz)

Figura 28- Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de epigalocatequina-(4 β →8)- epigalocatequina peracetilada
CDCl₃, ν = 300 MHz

Figura 29- Espectro de massas de epigallocatequina-(4 β →8)-epigallocatequina

5.3.4 5-deóxi-proantocianidinas

Uma característica marcante em espectro de RMN ^1H (CDCl_3) de metóxiacetato de dímeros de fisetinidol e robinetinidol é o sinal do hidrogênio da posição 5 do anel A, o qual aparece como um dubleto largo com uma constante de acoplamento de $J_{5,6} \geq 8,0$ Hz na região entre δ 6,47-6,82 ppm (BOTHA *et al.*, 1981b; NUNES *et al.*, 1989). Bam *et al.* (1990) isolaram pela primeira vez robinetinidol-3-O-galato das cascas de *Peltophorum africanum* Sond. (Caesalpiniaceae) e demonstraram que o posicionamento de H-5(A) de metóxiacetato ficava em campos mais baixos em δ 6,97 ppm. Um diagnóstico importante relaciona-se com o H-3(C). Em dímeros de 5-deóxi-proantocianidina o hidrogênio H-3(C) aparece em campo mais baixo como um pseudo-triplete com uma constante de acoplamento de $\sum J_{2,3} + J_{3,4} \approx 20,0$ Hz (DREWES *et al.*, 1967; du PREEZ *et al.*, 1971; STEYNBERG *et al.*, 1990). A diferenciação entre as ligações ($4\alpha \rightarrow 8$) e ($4\beta \rightarrow 8$) de profisetinidinas foi realizada por Botha *et al.* (1981b) através das seguintes observações: o hidrogênio H-3(C) de dímeros com ligação ($4\alpha \rightarrow 8$) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*trans*) aparece como pseudo-triplete na região entre δ 5,9-6,1 ppm com uma $\sum J$ de aproximadamente 20 Hz, enquanto que para dímeros com ligação do tipo ($4\beta \rightarrow 8$) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*cis*) aparece um quarteto na região entre δ 5,3-5,6 ppm com uma $\sum J$ de aproximadamente 15 Hz. A determinação da configuração absoluta em C-4 deve ser fixada com a medida através de dicroísmo circular. A diferenciação entre ligações ($4 \rightarrow 8$) e ($4 \rightarrow 6$) consegue-se através da analogia com proantocianidinas peracetiladas observando-se a proporção dos sinais rotaméricos (FLETCHER *et al.*, 1977).

5.3.4.1 **Substância V**: robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatequina

A análise em CCD da fração referente a **substância V** (F#10.6; Flux. 3) demonstrou uma mancha com R_f igual a 0,63 com coloração azul intenso após revelação com FeCl₃.

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ da **substância V** acetilada, após purificação em CCDP, forneceu dados que se encontram na tabela 13.

A figura 32 representa os dados do espectro de massas com um íon pseudo-molecular [M+Na]⁺ em *m/z* 633,1 (24%) e em [M+H]⁺ o íon molecular em *m/z* 413,2 (100%). Essa massa molecular corresponde provavelmente a uma proantocianidina dimérica.

O espectro de RMN ¹H da **substância V** peracetilada (Fig. 30) apresenta na região aromática um modelo de substituição do tipo AMX entre δ 6,26-6,86 ppm, correspondendo a uma 1,3,4-tri-substituição aromática. Complementarmente, o espectro de RMN ¹H mostra dois singletos contendo dois hidrogênios cada em δ 6,78 ppm e δ 7,12 ppm, os quais são coordenados, através de um acoplamento a longa distância pelo espectro 2D (COSY ¹H/¹H) (Fig. 31), hidrogênios H-2(C) e H-2(F), com os hidrogênios equivalentes H-2'/H-6' dos anéis B e E, respectivamente. No espectro de COSY ¹H/¹H, a **substância V** apresenta um acoplamento do tipo "W" entre o H-4(C) e o H-5 do anel A. O sistema spin do tipo AMX deriva, portanto, do anel A da unidade "superior" de flavan-3-ol participando da formação da proantocianidina. O singleto em δ 6,64 ppm corresponde ao hidrogênio H-6(D) ou H-8(D). As posições dos hidrogênios

H-5(A), H-6(A) e H-8(A) em δ 6,86 ppm, δ 6,44 ppm e δ 6,26 ppm, respectivamente, a do hidrogênio H-2(F) em δ 4,42 ppm, bem como a dominância de uma forma rotamérica (FLETCHER *et al.*, 1977) comprova a ligação interflavanoil (4 \rightarrow 8). Por conseguinte o sinal em δ 6,64 ppm corresponde ao hidrogênio H-6(D) (HEMINGWAY *et al.*, 1982; KOLODZIEJ, 1989). O dubleto em 6,86 ppm sinalizou o hidrogênio H-5(A) (DREWES *et al.*, 1966a; BAM *et al.*, 1990). A constante de acoplamento pequena ($J_{2,3} \leq 2,0$ Hz) dos hidrogênios do anel heterocíclico (F) confirma uma configuração relativa 2,3-*cis*. A configuração relativa 2,3-*trans* é comprovada através da grande constante de acoplamento dos hidrogênios heterocíclicos da unidade “superior”. A posição de H-3(C) em δ 5,27-5,42 ppm relaciona-se com uma ligação do tipo (4 β \rightarrow 8) (BOTHA *et al.*, 1981b). Através desses dados pode-se afirmar que a **substância V** trata-se do dímero **robinetinidol-(4 β \rightarrow 8)-epigalocatequina**. Essa substância foi isolada anteriormente por Mello (1995) das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, sendo essa, a primeira vez que a substância é isolada de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

Tabela 13- Valores de deslocamentos obtidos através de RMN ^1H para a **substância V** [(robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatequina peracetilada)] (CDCl_3 , $\nu = 300$ MHz)

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura* δ (ppm)
H-4ax/H-4eq (F)	2,84-2,91	m		2,89-2,98
H-2 (F)	4,42	s		4,45
H-4 (C)	4,47	d	$^3J_{\text{H3(C)-H4(C)}}=5,4$	4,49
H-3 (F)/ H-3 (C)	5,27-5,42	m		5,28-5,39
H-2 (C)	5,48	d	$^3J_{\text{H2(C)-H3(C)}}=7,8$	5,50
H-8 (A)	6,26	d	$^4J_{\text{H8(A) - H6(A)}}=2,4$	6,29
H-6 (A)	6,44	dd	$^4J_{\text{H6(A)- H8(A)}}=2,3$ $^3J_{\text{H4(C)-H3(C)}}=8,6$	6,47
H-6 (D)	6,64	s		6,66
H-2'/H-6' (E)	6,78	s		6,78
H-5 (A)	6,86	d	$^3J_{\text{H5(A)-H6 (A)}}=6,6$	6,86
H-2'/H-6' (B)	7,12	s		7,15

s=singleteo, d= dubleteo, dd=duplo dubleteo, m=multiploteo; * Mello (1995)

Figura 30- Espectro de RMN ^1H de robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatequina peracetilada, relativo para TMS, CDCl_3 , $\nu = 300 \text{ MHz}$.

Figura 31- Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatequina peracetilada (CDCl_3 , $\nu = 300 \text{ MHz}$)

Figura 32- Espectro de massas de robinetinidol-(4 β →8)-epigallocatequina

5.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizada para documentação do extrato, pois com seu auxílio torna-se possível adquirir informações dos picos individuais, de espectrometria de massas e/ou espectro no ultravioleta de acordo com o método de detecção utilizado (HE, 2000), permitindo assim traçar um perfil próprio de cada extrato vegetal.

A detecção e a separação cromatográfica de compostos oriundos das plantas são incomparavelmente mais difíceis do que a separação das substâncias sintéticas. Isto por que, os extratos de plantas contêm misturas complexas de substâncias, as quais apresentam variadas concentrações (TITTEL e WAGNER, 1986).

Para a avaliação quantitativa de misturas complexas tem-se como alternativa mais viável aqueles métodos que permitam concomitantemente a separação e o doseamento dos diversos componentes do extrato. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além de cumprir este requisito alia exatidão e elevada reprodutibilidade (MELLO, 1989).

A resolução (R_s) de um cromatograma está diretamente relacionada à conexão entre seletividade (N), fator de capacidade (k') e eficiência da coluna. Portanto, para se obter boa resolução é necessário considerar que: o soluto pode interagir com a fase estacionária ($k > 0$), as forças de interação dos diferentes solutos devem ser diferentes ($\alpha > 1$) e a coluna deve ter um certo número de pratos teóricos (SZEPESI, 1990). O autor aconselha ainda, procurar utilizar colunas com material de enchimento com diâmetro de partículas pequenas, para minorar estes problemas e obter melhor resolução.

No desenvolvimento das condições de separação para CLAE do extrato semipurificado e de subfrações de *S. obovatum* Benth., duas fases móveis foram testadas, uma contendo acetonitrila e água e outra com metanol e água acidulada (ácido fosfórico ou ácido acético). Optou-se por utilizar o sistema eluente metanol: ácido acético (pH= 2,2) (V/V), com velocidade de fluxo de 0,5 ml/min, em sistema gradiente obtendo-se uma boa resolução e separação das substâncias fenólicas. O uso de ácido (acético ou *o*-fosfórico) tem sido reportado por Ueffing (1988), Rohr *et al.* (1999), Wang *et al.* (2000) e Svedström *et al.* (2002) em trabalhos realizados com taninos como sendo essencial para a completa separação das substâncias fenólicas e para a análise quantitativa.

Durante a fase de desenvolvimento do perfil cromatográfico, foram utilizados padrões (Fig. 33) para determinação de tempo de retenção, estabelecendo-se assim a região onde apareciam os monômeros de taninos condensados no cromatograma. As diminutas diferenças estrutural entre as substâncias, como presença de hidroxilas ou metoxila, é suficiente para a obtenção de boa separação entre substâncias, já que essas, se distribuem no cromatograma de acordo com sua polaridade e força eluotrópica do sistema eluente (SZEPESI, 1990).

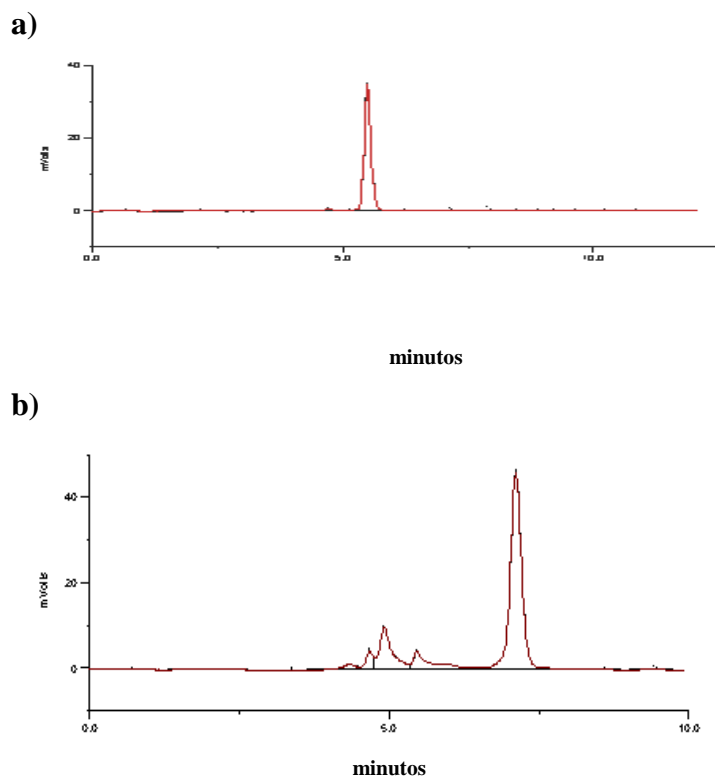


Figura 33– Cromatograma das substâncias referências: a) galocatequina; b) epigalocatequina. Lincrospher RP-18 (250x4mm), detecção a 280 nm, 27 °C, sensibilidade de 0,05 AUFS, metanol:água pH 2,2

A prévia purificação de EB para o uso na CLAE foi necessária para assegurar uma eficiente separação das substâncias e evitar por conseguinte que a coluna sofresse saturação e pudesse vir a prejudicar a eficiência e a resolução dos cromatogramas. Assim, optou-se por caracterizar a FAcOEt e as subfrações F#8, F#10 e F#11 obtidas a partir das cascas do *S. obovatum* Benth. empregando-se a CLAE.

Nos cromatogramas obtidos para FAcOEt, F#8, F#10 e F#11 (fig. 34) foi possível observar a separação dos picos com boa resolução em tempo de retenção na faixa de 3 a 15 min.

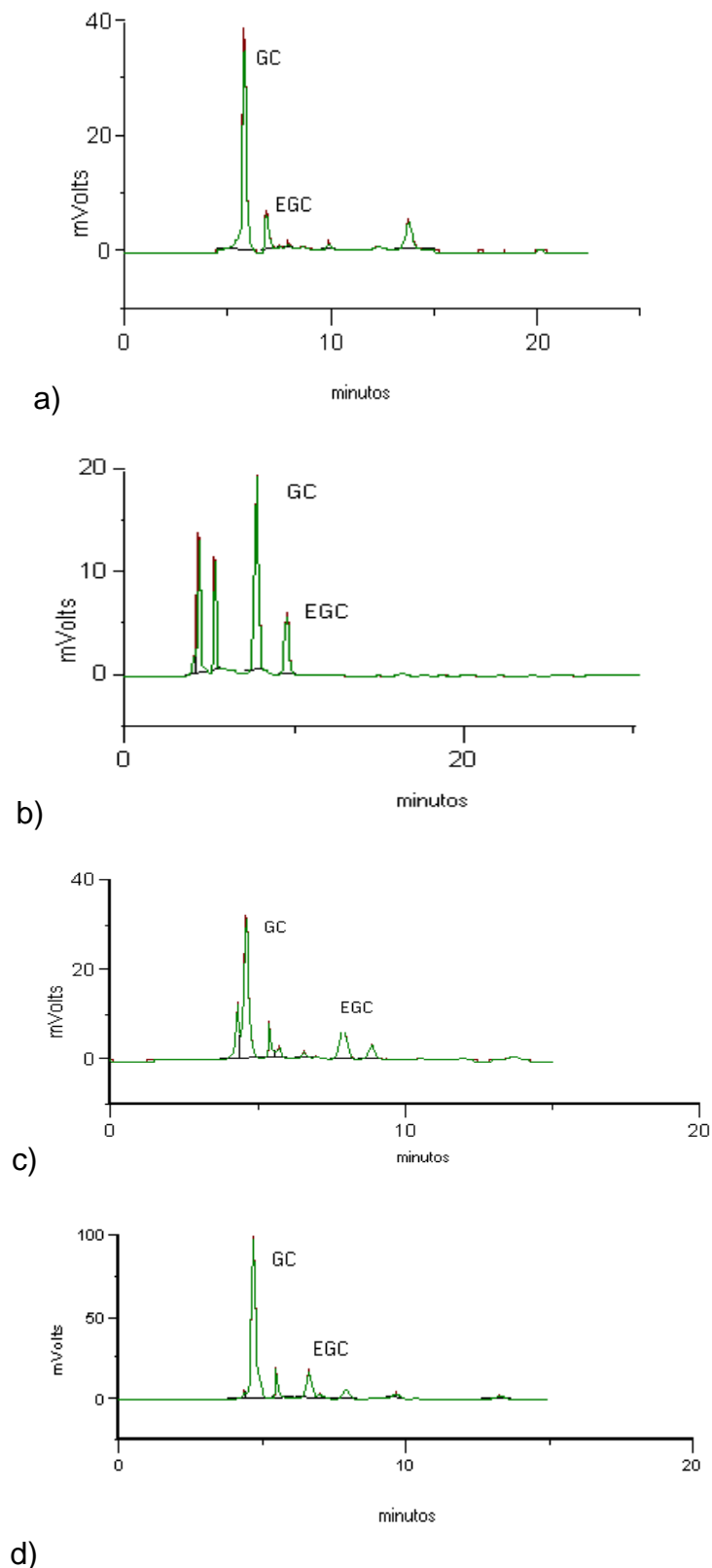


Figura 34 – Cromatogramas obtido por CLAE, GC – galocatequina; EGC – epigalocatequina, detecção em 210 e 280 nm: a) FAcOEt; b) F#8; c) F#10 e d) F#11, Lincrospher RP-18 (250x4mm), detecção a 280 nm, 27 °C, sensibilidade de 0,05 AUFS, metanol:água pH 2,2

Com a finalidade de se determinar quais os picos do extrato (FACOEt) e das subfrações (F#8, F#10, F#11) que correspondem a galocatequina e epigalocatequina referência, foi realizado CLAE do extrato e subfrações adicionando essas substâncias referências. A adição das mesmas não levou ao surgimento de novos picos, nem a alteração da aparência dos já existentes, aumentando especificamente a intensidade daqueles com tempo de retenção (TR) semelhantes aos da substância referência correspondente. Através desta análise co-cromatográfica pode-se certificar a identidade dos picos de FACOEt, F#8, F#10 e F#11 como sendo as mesmas substâncias co-cromatografadas.

Para a avaliação do teor de galocatequina e epigalocatequina em FACOEt, F#8, F#10 e F#11 foi necessária a obtenção da curva de calibração, que estabelece a linearidade entre as várias diluições empregadas.

A linearidade da curva padrão de galocatequina entre as suas concentrações e a área dos picos (Tab. 14) foi comprovada através da correlação significativa (r^2) 0,99907 para a faixa variando entre 1,0 e 0,0625 mg/ml (Fig. 35).

Tabela 14 – Área dos picos da substância referência galocatequina para a curva padrão por CLAE

Concentração de galocatequina (mg/ml)	n	Área $\bar{x} \pm DP$ (CV%)
1,0	5	1124997 \pm 12201,96 (1,08)
0,5	5	539659,57 \pm 13099,70 (2,42)
0,25	5	276100,08 \pm 8346,87 (3,02)
0,125	5	133110,33 \pm 4174,82 (3,14)
0,0625	5	68126,98 \pm 1131,04 (1,66)

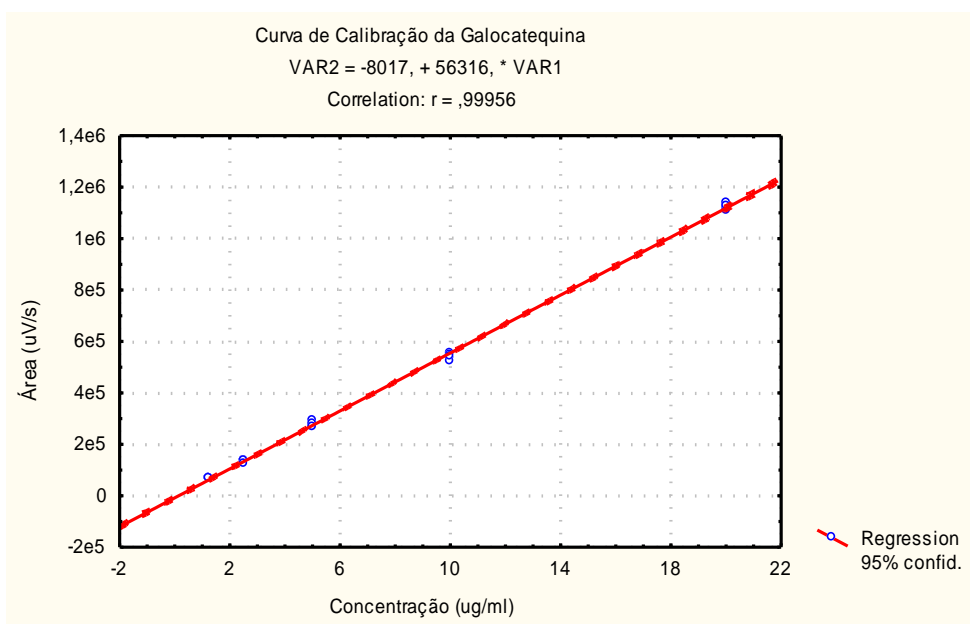
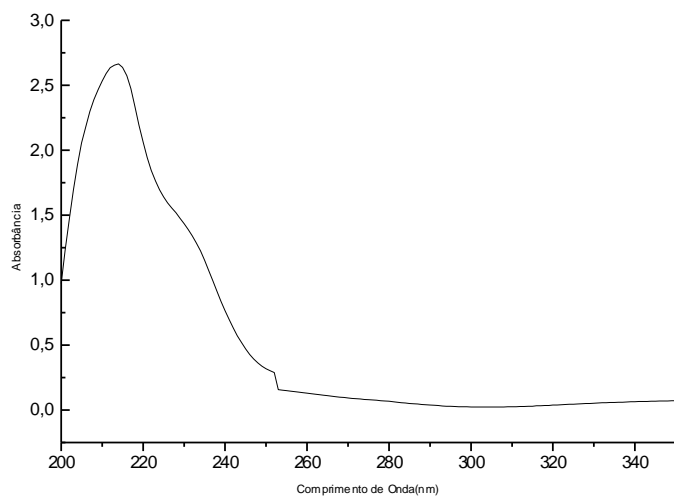
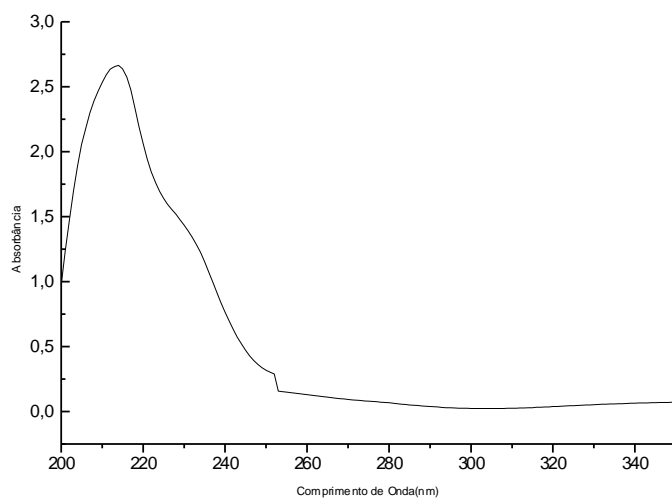


Figura 35– Curva de calibração do padrão galocatequina, obtido através de CLAE

Para a quantificação de epigalocatequina, a construção da curva de calibração não foi viável, pois a substância referência apresentou pureza de 60%. Assim optou-se por quantificar epigalocatequina através da curva de calibração de galocatequina, visto que ambas as substâncias apresentam a mesma absorvidade relativa, além de terem o mesmo peso molecular (Fig. 36).



a)



b)

Figura 36– Espectro de varredura no UV de 200 a 350 nm, referentes aos padrões de galocatequina (a) e epigalocatequina (b) em MeOH.

Para a validação do perfil cromatográfico proposto através da CLAE, foram obtidos os coeficientes de variação da repetibilidade para galocatequina que foi da ordem de 0,0624 mg/ml \pm 0,000103584 (0,166%). Esse dado permite a avaliação da repetibilidade e ainda reprodutibilidade do método de quantificação proposto.

As concentrações de galocatequina e epigalocatequina em FAcOEt, F#8, F#10 e F#11, foram calculadas segundo a equação da reta ($y = ax + b$) e estão expressos na Tabela 15. A quantificação dos dímeros isolados de F#8, F#10 e F#11, não foi possível devido ao fato dos mesmos estarem peracetilados.

Tabela 15 – Valores obtidos para galocatequina e epigalocatequina na FAE, F#8, F#10 e F#11 (n=6).

	Galocatequina			Epigalocatequina		
	TR (min)	Concentração (%)	DP (%)	TR (min)	Concentração (%)	DP (%)
FAcOEt	5,61	34,60	3,03	6,67	16,50	1,28
F#8	5,40	16,92	2,03	7,79	29,91	1,64
F#10	4,52	25,05	3,15	6,82	10,13	1,18
F#11	4,74	33,10	0,38	6,71	11,46	1,35

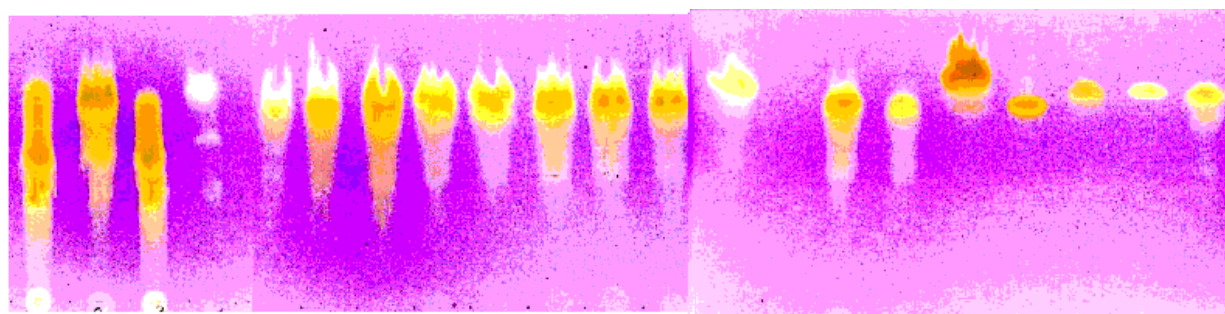
Através dos resultados obtidos com o desenvolvimento do sistema gradiente para a determinação do teor de galocatequina e epigalocatequina presentes em FAcOEt, F#8, F#10 e F#11, comprovou-se a simplicidade, rapidez e precisão do método, além da economia de fase móvel frente ao sistema de separação, que possibilita a identificação e a quantificação das substâncias presentes no extrato e subfrações. Este estudo demonstrou que é possível determinar a concentração de substâncias individuais em plantas ricas em taninos, e que apesar da complexidade da composição química de *S. obovatum*

Benth. esse sistema pode ser utilizado como impressão digital do barbatimão “*fingerprint*” na caracterização de FAcOEt.

5.4 Atividade Antioxidante

Devido ao elevado teor de taninos presentes nas cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. realizou-se teste de atividade antioxidante do extrato bruto, frações e algumas subfrações nebulizando-se o cromatograma com solução de DPPH. O resultado obtido podem ser visualizados na Figura 37.

O DPPH, um radical livre estável, quem atua como agente oxidante, liga-se às hidroxilas (HUNSAKER e SCHENK, 1983), nesse caso presentes nos polifenóis proporcionando coloração púrpura.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Figura 37- Atividade antioxidante: 1. extrato bruto, 2. fração acetato, 3. fração aquosa, 4. F#2, 5. F#3, 6. F#5-7, 7. F#8, 8.F#9, 9. F#10, 10. F#10, 11.F#12, 12. substância I, 13. substância II, 14 . sem amostra, 15. substância IV, 16. F#11.3, 17. quercetina, 18. rutina, 19. ácido gálico, 20. astilbina, 21. substância III

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que todas as frações possuem atividade antioxidante, destacando-se as amostras de 6 à 12, que demonstraram excelentes atividades quando comparada aos controles quercetina, rutina, ácido gálico e astilbina. Esses dados vêm corroborar as informações obtidas em literatura, pois as substâncias 6-11 apresentaram atividade antioxidante nas concentrações de 100 µg/ml, a substância 12 apresentou mancha semelhante às substâncias 6-11, sendo sua concentração de 10 µg/ml, por se tratar de uma substância pura.

Estudos sobre a etiologia de doenças degenerativas e os radicais livres existem desde 1930. Entretanto, 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 (HASLAM, 1998).

As espécies reativas do oxigênio são reconhecidas como responsáveis por um grande número de doenças, assim como pelo processo de envelhecimento. Os radicais livres constituem um alvo interessante para o desenvolvimento de novas drogas (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Alguma espécie de oxigênio reativa está envolvida em doenças como: esclerose

múltipla, câncer, envelhecimento, Parkinsonismo, doenças autoimunes, inflamações, artrites e arterosclerose (HASLAM, 1998).

Polifenóis funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (MELLO e SANTOS, 2001; SHAHIDI *et al.*, 1992 apud SOARES, 2002), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.

Okamura *et al.*, (1993) estudaram a atividade antioxidante de taninos e flavonóides presentes no *Eucalipto rostrata*, e observaram que a atividade desses metabólitos isolados foram maior que o controle (antioxidante sintético: 3-t-butil-4-hidroxianisol).

Através de espectro de ressonância paramagnética Bors *et al.*, (2000) estudaram o potencial antioxidante de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis do vinho tinto e chá verde. Os resultados obtidos mostram que as proantocianidinas possuem um potencial antioxidante maior que flavonóides.

A espécie vegetal *Rumex patientia* L., foi estudada por Demirezer *et al.*, (2001), que isolaram e identificaram alguns constituintes (antraquinonas e taninos), além de avaliar atividade antioxidante. As substâncias isoladas que obtiveram melhores resultados para atividade antioxidante foram: catequina e 6-clorocatequina.

5.5 Atividade antimicrobiana

É grande a procura de alternativas vegetais para o arsenal terapêutico no tratamento de infecções microbianas, tendo em vista o uso indiscriminado de antibióticos, muitos dos quais apresentam-se, atualmente, ineficazes como

resultado dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias (BAX *et al.*, 2000).

Taninos são tóxicos para fungos e bactérias, e estas atividades são devidas a algumas de suas propriedades como: inibição de enzimas extracelulares, deprivação de substrato, inibição da fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem deprivação de ferro. Entretanto muitos microrganismos resistem a ação dos taninos através de mecanismos de defesa como: síntese de polímeros, complexos de tanino-proteína, oxidação, biodegradação e síntese de sideróforos (SCALBERT, 1991).

O barbatimão vem sendo utilizado popularmente devido às suas possíveis atividades: cicatrizante, antimicrobianas, no tratamento de leucorréia, blenorragia, diarréias, hemorragias e tratamento de úlceras. No entanto, poucos estudos científicos existem buscando comprovar essas atividades que o uso popular lhe atribuem. Tendo em vista o uso como antimicrobiano, objetivou-se comprovar a etnofarmacologia da espécie *Stryphnodendron obovatum* Benth., já que Bersani-Amado *et al.* (1996), demonstraram que extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Entre os métodos existentes para a pesquisa de atividade antibacteriana, empregaram-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Os resultados obtidos tanto para a CIM como para a CBM são apresentados nas Tabelas (16 e 17).

Tabela 16- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

Frações	µg/ml							
	<i>S. aureus</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EB	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
FAq	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
FAcOEt	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#3	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#5-7	500	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#8	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#9	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#10	250	250	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#11	250	250	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#12	250	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#13	125	250	125	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#14	125	250	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#15	125	125	62,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#16	62,5	125	62,5	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#17	62,5	125	31,5	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#18	62,5	125	31,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#19	62,5	>1000	62,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#20	125	500	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#21	62,5	125	62,5	125	>1000	>1000	>1000	>1000
F#22	62,5	125	62,5	125	>1000	>1000	>1000	>1000
Substância I	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância II	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância III	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância IV	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância V	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Vancomicina	-	-	0,18	-	-	-	-	-
Penicilina	0,0098	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	3,13	-	0,78	-

Nr= não realizado

A tabela 16 apresenta os resultados da CIM e CBM frente as bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). A interpretação dos resultados baseou-se no trabalho de Holetz e colaboradores (2002) que classificam como ausência de atividade antimicrobiana uma CIM >1000 µg/ml para frações não purificadas e >100 µg/ml para substâncias puras.

Pode-se observar que para *Staphylococcus aureus*, as subfrações F#16-19 e F#21-22 apresentaram uma CIM de 62,5 µg/ml podendo ser consideradas, assim, com boa atividade antimicrobiana. Entretanto, essas mesmas frações apresentaram CBM de 125-500 µg/ml com exceção de F#19 que possui CBM maior que 1000 µg/ml. As frações EB, FAq, FAcOEt, F#5-7 a F#15 e F#20 são frações com atividade antimicrobiana moderada com CIM menores que 500 µg/ml e maiores que 100 µg/ml.

Com base na classificação de Holetz *et al.* (2002), pode-se afirmar que as frações F#2-4 e epigalocatequina, galocatequina, epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina, epigalocatequina-(4β→8)-epigalocatequina, robenetidnidol-(4β→8)-epigalocatequina não possuem atividade antimicrobiana contra a bactéria *S.aureus*.

Os resultados da CIM e CBM frente à bactéria *B. subtilis* mostraram que as frações F#17 e F#18 foram capazes de inibir o crescimento bacteriano na concentração de 31,5 µg/ml. A F#19 apresentou uma CIM de 62,5 µg/ml. De forma semelhante as subfrações F#15-16 e F#21-22, possuem uma CIM de 62,5 µg/ml. As subfrações F#17-19 não possuem ação bactericida, entretanto F#21-22 demonstraram CBM (125 µg/ml) e F#15 (500 µg/ml). Nenhuma das

substâncias puras foi capaz de matar a bactéria, e sequer de inibir o crescimento de *B. subtilis*.

Todas as frações testadas foram inativas frente às bactérias Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os resultados apresentados no trabalho com extrato de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, contendo altos teores em taninos (TOLEDO, 2002), foram parcialmente diferentes daqueles obtidos nesse trabalho. A diferença principal relaciona-se com atividade desse extrato frente às bactérias Gram negativas onde, a última subfração obtida da fração acetato de etila de *S. adstringens*, apresentou CIM e CBM somente na concentração de 1000 µg/ml, enquanto que a subfração correspondente em *S. obovatum* (F#22; Tab.16) não foi encontrada ausência de crescimento bacteriano, sequer nessa mesma concentração. Para substâncias isoladas, esperava-se resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho, já que Toledo (2002), avaliou 6 substâncias puras (taninos condensados) obtidas de *S. adstringens* e nenhuma delas apresentou resultado inferior a 100 µg/ml. Da mesma maneira, Galina (2003), testou extratos e substâncias puras (taninos condensados) e obteve resultados sempre superiores a 1000 µg/ml e 100 µg/ml, respectivamente, indicando, de acordo com a convenção adotada por Holetz e colaboradores (2002), não possuírem atividade antibacteriana. Para Kolodziej *et al.* (1999), no entanto, valores para substâncias puras entre 1000 e 2000 µg/ml são considerados com atividade entre fraca a moderada.

Resultados obtidos no presente trabalho não é possível relacionar o valor final de CIM ou mesmo de CBM. Esses valores poderiam auxiliar no correlacionamento, de acordo com Scalbert (1991), entre o grau de hidroxilação

do anel B de taninos condensados e o nível de crescimento de determinadas bactérias. A ausência de uma efetiva atividade sobre o crescimento de bactérias pode ser explicada, provavelmente, pela heterogeneidade química dos polifenóis produzidos e pela grande concentração, contrabalançada com sua baixa toxicidade para os microrganismos (KOLODZIEJ *et al.*, 1999).

Tabela 17- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., frente às leveduras

Frações	µg/ml							
	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
EB	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Eaq	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EtOAc	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#5-7	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#9	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#10	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#11	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#12	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#13	125	250	125	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#14	125	250	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#15	125	125	62,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#16	62,5	125	62,5	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#17	62,5	125	31,5	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
F#18	62,5	125	31,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#19	62,5	>1000	62,5	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#20	125	500	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000
F#21	62,5	125	62,5	125	>1000	>1000	>1000	>1000
F#22	62,5	125	62,5	125	>1000	>1000	>1000	>1000

Substância I	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância II	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância III	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância IV	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Substância V	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr	>100	Nr
Nistatina	1	-	8	-	4	-	8	-

Nr= não realizado

Como pode ser observado na tabela 17, as subfrações F#13-15 e F#20 apresentaram ação antifúngica moderada com CIM de 125 µg/ml). Todas essas frações foram capazes de matar *Candida albicans* em concentrações que variaram de 250 a 500 µg/ml. Os mesmos resultados de concentração fungicida mínima foram obtidos para *Candida parapsilosis*, com exceção de F#13 que não apresentou esse potencial. No entanto foram testados EB, FAq, FAcOEt, F#2-12, epigallocatequina, galocatequina, epigallocatequina-(4β→8)-galocatequina, epigallocatequina-(4β→8)-epigallocatequina, robenetidinol-(4β→8)-epigallocatequina e nenhum dos extratos ou mesmo as substâncias puras foram ativas frente à levedura *C. albicans*.

As frações F#16-19 e F#21-22 apresentaram-se com boa atividade antifúngica, com CIM de 62,5 µg/ml, e mataram as leveduras *Candida albicans* nas concentrações de 125-250 µg/ml com exceção da fração F#19 que apresentou somente atividade inibitória.

Os resultados obtidos para *C. parapsilosis* foram ainda melhores que para *C. albicans*, pois frente a essa levedura as frações F#17 e 18 apresentaram uma CIM de 31,5 µg/ml mas, no entanto, apenas a F#18 apresentou potencial fungicida na concentração de 500 µg/ml, enquanto F#17 somente inibiu seu crescimento. Os extratos EB, FAq, FAcOEt e as subfrações F#2-12, F#8.2-8.3,

F#10.4, F#10.6 e F#11.3 não foram ativas nas concentrações testadas. As frações F#13-14 possuem atividade moderada com uma CIM (125 µg/ml), entretanto F#13 não apresenta atividade antifúngica, pois sua CFM foi maior que 1000 µg/ml, enquanto a F#14 resultou em 500 µg/ml. As frações F#15-16, F#19, F#21-22 apresentaram CIM de 62,5 µg/ml e CFM entre 500 -1000 µg/ml.

As mesmas frações foram testadas frente à levedura *C. krusei* e *C. tropicalis*, porém todas foram inativas.

Para se tornar um antimicrobiano se faz necessário outros estudos em busca de melhores valores de CIM e CBM.

Entretanto pode-se considerar que os resultados obtidos foram promissores, pois valores mais elevados de CIM e CBM podem ser explicados por alguns fatores, como a mistura de componentes mesmo em frações mais purificadas, o que resultaria numa diluição das substâncias responsáveis pelos efeitos encontrados nos testes realizados. Assim, faz-se necessário uma maior purificação desses componentes para se tornar possível uma comparação dos resultados obtidos com os padrões empregados.

Pode-se concluir que dentre todos os extratos, subfrações e substâncias puras avaliadas, seja frente às bactérias Gram positivas (*S.aureus* e *B. subtilis*) ou ainda frente às leveduras (*C. albicans* e *C. parapsilosis*), as que apresentaram melhores resultados foram F#13-F#22.

5.6 Atividade cicatrizante

Nos últimos anos tem se intensificado o interesse pela fitoterapia com aplicação em dermatologia e cosmética, tendo em vista os bons resultados encontrados através de pesquisas científicas e uso popular (PAREJA, 1996).

Os taninos auxiliam na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações devido à sua capacidade de complexação com proteínas através da formação de uma película protetora sobre a região danificada (HASLAM, 1989).

Esse grupo de substâncias possui ação antiinflamatória comprovadamente, como pode ser visto nos trabalhos de Mota *et al.* (1985) e Kapu *et al.* (2001), além do trabalho de revisão de Scholz (1994).

Tendo em vista a riqueza de taninos nas cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., a ausência de estudos sobre sua possível atividade cicatrizante, seu intenso uso na medicina popular, principalmente na região do cerrado brasileiro, seu habitat natural, objetivou-se avaliar a ação da pomada de extratos a 2,5% em feridas cutâneas de ratos.

Foi possível, por meio de observação clínica, verificar que a cicatrização das feridas do dorso dos animais procedeu-se normalmente, sem que fossem observados processos infecciosos ou de qualquer outra natureza. Essas observações foram comprovadas através de uma posterior análise microscópica da ferida.

Os resultados das medidas das feridas, realizadas com paquímetro, são apresentados nas tabelas 18 e 20.

Tabela 18- Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de extrato bruto aceto-aquoso (PEB) a 2,5% (n=5).

Tempo (dias)	Eixo transversal		Eixo longitudinal	
	Controle (cm) (X ±EPM)	PEB 2,5% (cm) (X ±EPM)	Controle (cm) (X ±EPM)	PEB 2,5% (cm) (X ±EPM)
4	1,33 ± 0,025	1,23 ± 0,02	0,83 ± 0,02	0,80 ± 0,07
7	0,66 ± 0,025	0,64 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,02
10	0,36 ± 0,060	0,44 ± 0,05	0,22 ± 0,07	0,32 ± 0,08

* X: média, EPM: erro padrão da média

Tabela 19- Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de fração acetato (PAcOEt) a 2,5% (n=5)

Tempo (dias)	Eixo transversal		Eixo longitudinal	
	Controle (cm) (X ±EPM)	PAcOEt 2,5% (cm) (X ±EPM)	Controle (cm) (X ±EPM)	PAcOEt 2,5% (cm) (X ±EPM)
4	1,26 ± 0,05	1,22 ± 0,06	0,98 ± 0,07	1,06 ± 0,02
7	0,66 ± 0,09	0,72 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,96 ± 0,10
10	0,34 ± 0,04	0,50 ± 0,09	0,32 ± 0,05	0,22 ± 0,05

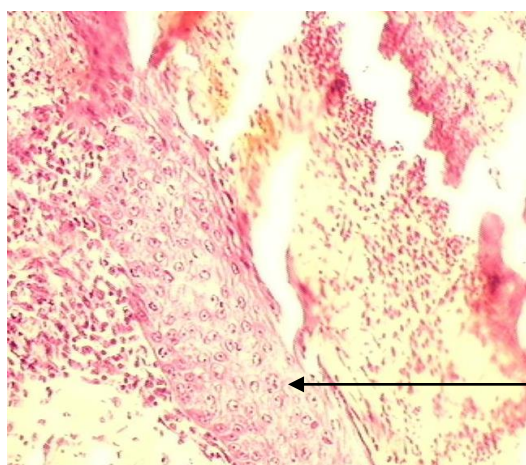
* X: média, EPM: erro padrão da média

Tabela 20- Diferenças entre as médias inicial e final das medidas dos maiores eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com base de Beeler (controle) e com pomada de fração aquosa (PAq) a 2,5% (n=5)

Tempo (dias)	Eixo transversal		Eixo longitudinal	
	Controle (cm) (X ±EPM)	PAq 2,5% (cm) (X ±EPM)	Controle (cm) (X ±EPM)	PAq 2,5% (cm) (X ±EPM)
4	1,35 ± 0,09	1,38 ± 0,04	1,2 ± 0,04	1,15 ± 0,11
7	0,60 ± 0,05	0,76 ± 0,11	0,90 ± 0,05	0,92 ± 0,05
10	0,74 ± 0,10	0,60 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,46 ± 0,04

* X: média, EPM: erro padrão da média

As feridas observadas com 4 dias, apresentaram uma “língua epitelial” (Fig. 38) com formato alongado. No entanto nesse período, não foi encontrada nenhuma ferida que tenha sido completamente reepitelizada. Já nas feridas com 10 dias de tratamento, pôde-se observar que apenas algumas apresentavam reepitelização completa, devendo-se, provavelmente, à resposta individualizada dos animais, o que prejudica a análise global em alguns casos.



Língua de reepitelização. Região onde se determina índice de metáfase/área

Figura 38- Corte transversal de ferida cutânea de rato Wistar, corada em H&E.
Língua de reepitelização (aumento 10X)

As células em metáfase foram observadas em todas as áreas do epitélio recém formado, contudo foi evidente a maior concentração de metáfases nas margens da ferida (Fig. 39).

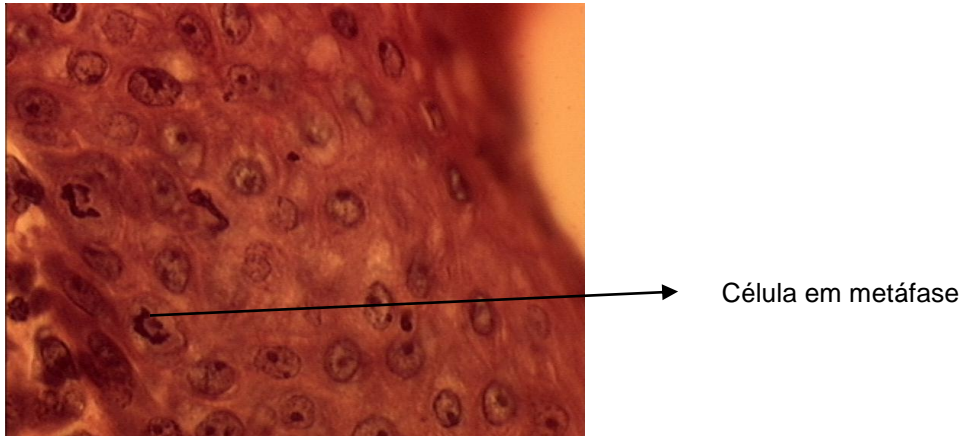
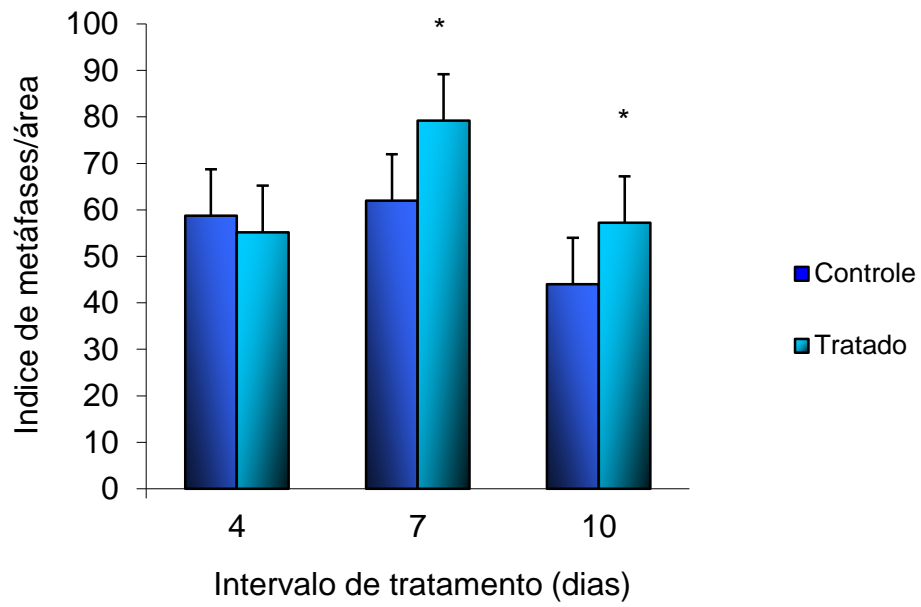
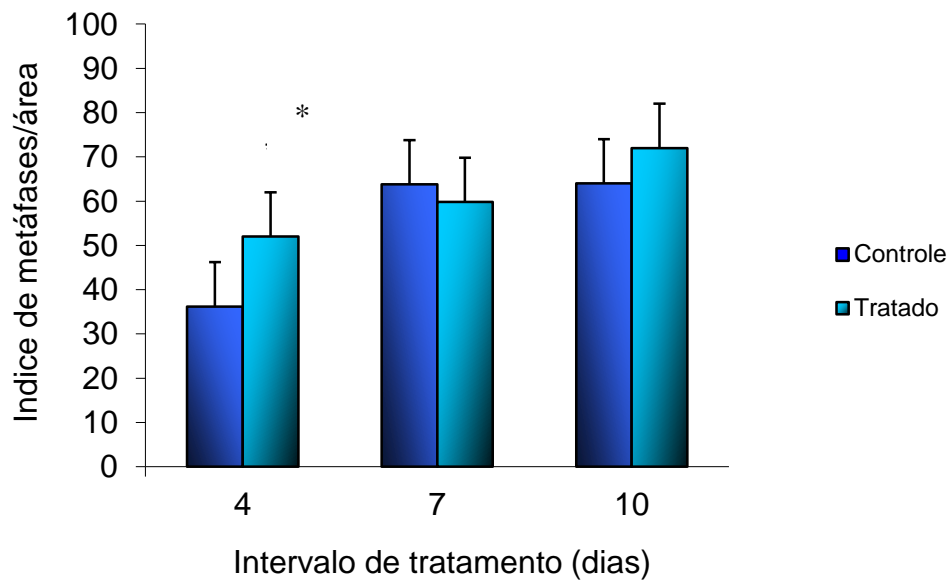


Figura 39- Corte transversal de ferida cutânea de rato Wistar, corada em H&E. Células em metáfase (aumento 40X)

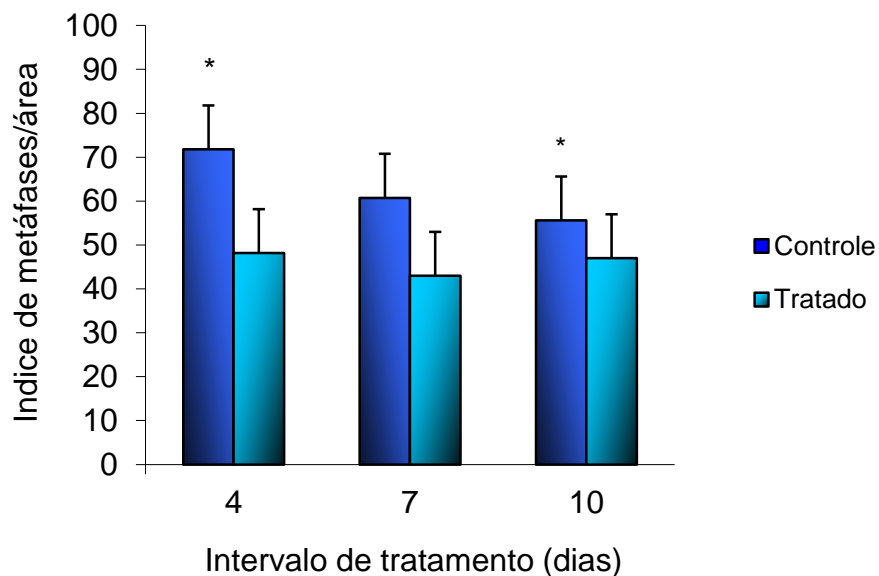
O tratamento com pomada de extrato bruto durante 7 e 10 dias mostrou uma melhora estatisticamente significativa quando comparada com o controle (base de Beeler). Entretanto, as feridas tratadas durante 4 dias não foram observadas melhora na cicatrização (Fig.40)



a)



b)



c)

Figura 40- Efeito do tratamento com pomada de extrato bruto (PEB) (a), (PAcOEt) (b), (PAq) (c) de *Stryphnodendron obovatum* Benth. 2,5% sobre o número de metáfases/área em feridas cutâneas. Valores médios (n=5).

Observou-se um aumento estatisticamente significativo $p < 0,05$, no índice de metáfases/área nas feridas tratadas com pomada PEB, quando comparada ao controle, o que indica uma maior proliferação celular estimulada pelo extrato de *Stryphnodendron obovatum* Benth. a 2,5% após 7 e 10 dias (Fig.40a).

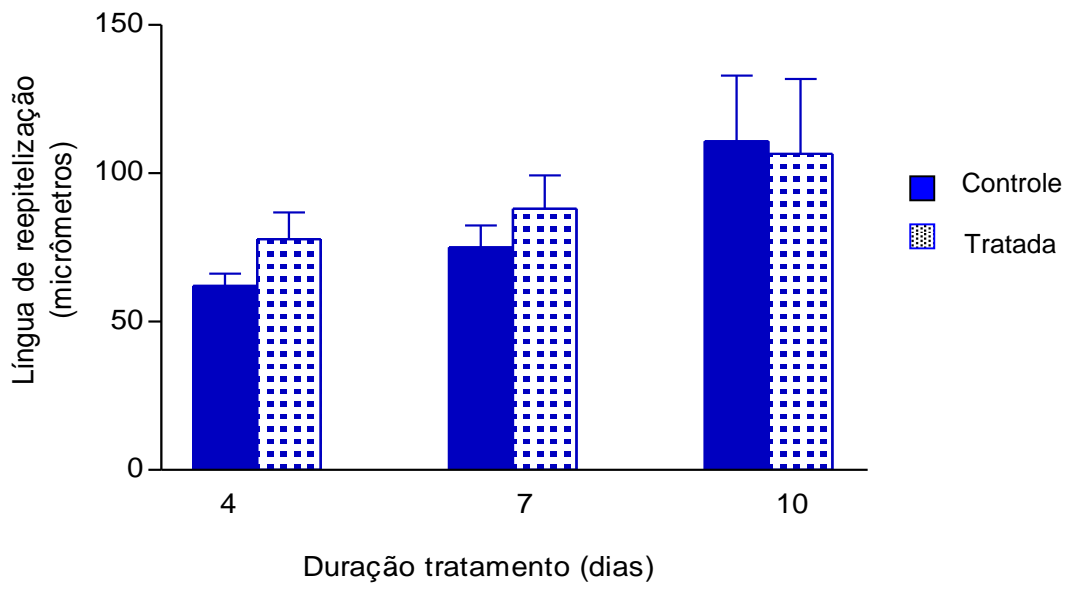
Foi possível observar um aumento estatisticamente significativo $p < 0,005$, no índice de metáfases/área na ferida tratada com pomada PAcOEt, quando comparada ao controle, o que indica uma maior proliferação celular estimulada pelo extrato de *Stryphnodendron obovatum* Benth. a 2,5% nos primeiros 4 dias (Fig. 40b).

Os resultados obtidos com o extrato bruto e fração acetato mostram atividade estimulante de seus componentes, no processo de cicatrização. A ação das substâncias mais polares presente na fração acetato de etila pode ser responsável por sua ação nos processos iniciais (4 dias) da cicatrização o que difere do extrato bruto que possui atividade no final do experimento (7 e 10 dias). A fração aquosa interferiu negativamente nos processos de cicatrização (7 e 10 dias) (Fig.40c).

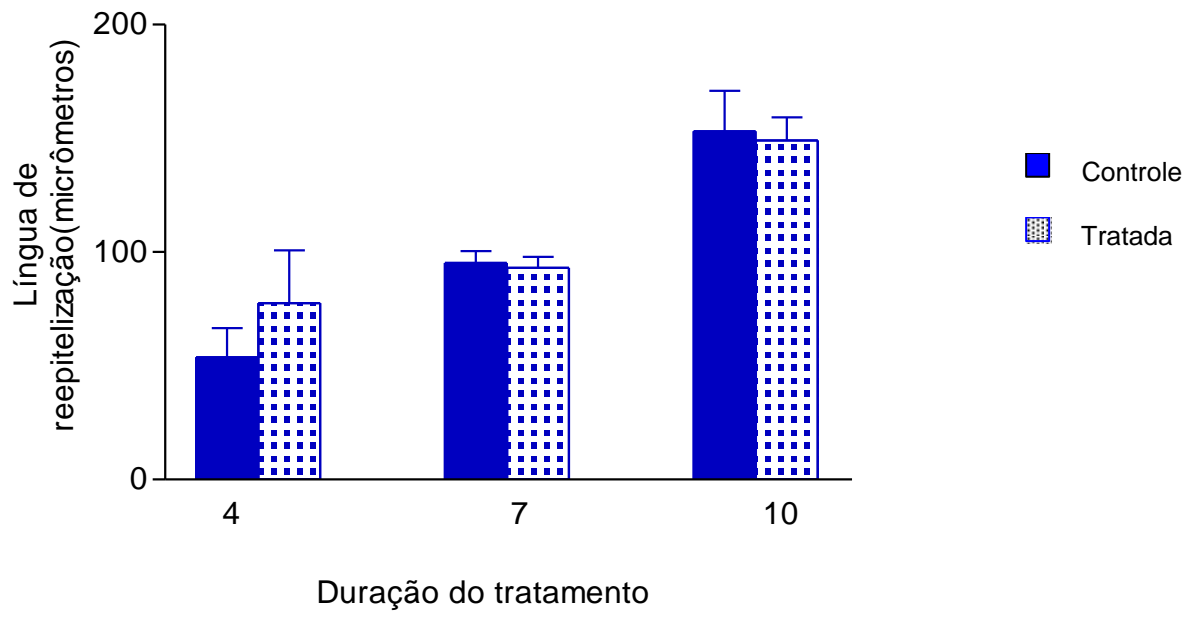
Através de ensaios específicos para determinação de saponinas no extrato bruto e frações determinou-se a presença desta classe de substâncias na composição química do extrato bruto e fração aquosa de *Stryphnodendron obovatum* Benth. Essas substâncias polares (solúveis em água), devido seu caráter anfifílico, formam complexos com fosfolipídeos das membranas celulares alterando sua permeabilidade e causando sua destruição (SCHENKEL *et al.*, 2001). Essa característica das saponinas, que provavelmente estão presentes na fração aquosa, pode ser responsável pela ação nas feridas tratadas com pomada contendo essa fração.

A avaliação do tamanho da língua de reepitelização também foi realizada e os resultados são demonstrados nas figuras 41.

a)



b)



c)

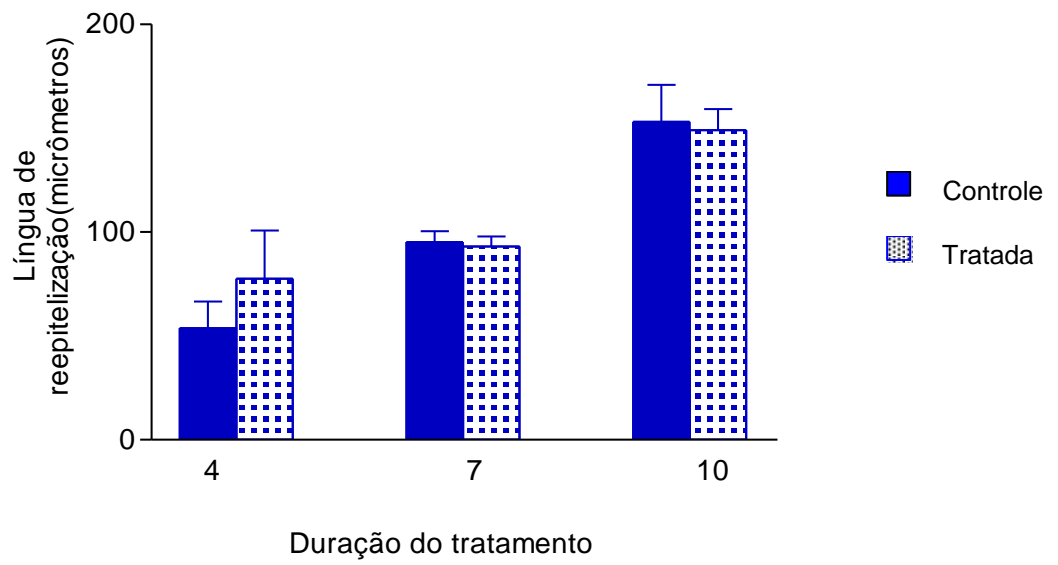


Figura 41- Efeito do tratamento durante 10 dias com pomada contendo extrato bruto (PEB) (a), (PACOEt) (b), (PAq) (c) de *Stryphnodendron obovatum* Benth. 2,5% sobre a migração celular em feridas cutâneas de ratos Wistar. Valores médios \pm DP, Teste t.

Os resultados obtidos através da análise de migração celular epitelial, observado pela medida da língua de reepitelização (Fig. 41), das feridas tratadas com o extrato bruto e frações, não foram significativas quando comparadas ao controle (base de Beeler).

Os resultados anteriormente analisados mostram uma melhora na proliferação celular das feridas tratadas com extrato bruto e fração acetato de etila. Entretanto, a migração celular epitelial não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Esse efeito pode ser justificado pela ação dos taninos na complexação com proteínas, que podem ter prejudicado a migração celular, assim apesar de um maior índice de metáfases/área nas feridas tratadas com extrato bruto (10 dias) e fração acetato de etila (4 dias) a migração não foi aumentada.

No processo de cicatrização ocorrem vários fatores concomitantemente, entre eles (ANDRADE, 1995):

1. Limpeza: logo após o ferimento, os tecidos liberam mediadores da inflamação tais como: enzimas cicloxigenases e lipoxigenases
2. Retração pela ação de miofibroblastos
3. Tecido de granulação: crescimento de novos tecidos para preencher o local lesado
4. Reepitelização: crescimento do epitélio abaixo da crosta da ferida

Davidson e Breyer (2003), observaram que baixos níveis de ciclooxigenase-1 reduzem a reepitelização e o tecido de granulação, aumentando níveis de TNF- α e citocinas que atuam negativamente no processo de reparo. Nesse processo, a presença de outras células como plaquetas e leucócitos são fundamentais pois, além da formação de massa celular, atraem substâncias químicas endógenas (fatores quimiotáticos) responsáveis pelo início da formação de novos tecidos e vasos sanguíneos. Essas células estimulam as fases subsequentes do processo cicatricial.

Por outro lado, a possibilidade de uma ação antiinflamatória ocorre devido a ação dos taninos por serem capazes de facilitar a síntese de glicosaminoglicanas, as quais são os primeiros componentes da matriz extracelular, com maturação e organização do tecido fibroso, componente substancial no processo de reparação da ferida (OKASALA *et al.*, 1995; CHITHRA *et al.*, 1998). Além dessas configurações já ficou demonstrado que taninos, principalmente condensados, atuam na redução da dor, diminuindo risco de infecção, estimulação da regeneração da epiderme, rápida cicatrização e melhor formação da cicatriz, redução de mortalidade e redução da perda de plasma (HUPKENS *et al.*, 1995; KHANNA *et al.*, 2002).

Durante os últimos 15 anos foi possível encontrar estudos sobre a atividade cicatrizante de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (PANIZZA *et al.*, 1988; VIEIRA *et al.*, 1998; PALERMO *et al.*, 2002). Em todos os trabalhos, os autores observaram ação de pomadas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville na cicatrização e proliferação celular.

Portanto os resultados obtidos através do estudo com a pomada de extratos de *Stryphnodendron obovatum* Benth. estão de acordo com os

resultados obtidos com *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville nos estudos avaliados e confirmando a etnofarmacologia dessa espécie amplamente utilizada.

6. CONCLUSÕES

O estudo morfo-anatômico mostrou estruturas características do gênero *Stryphnodendron*.

O controle de qualidade permitiu traçar um perfil dos constituintes químicos da droga vegetal, além de observar a melhor época de coleta (primavera), dentre as estações do ano avaliadas, e propor o melhor método de extração (turbólise com acetona:água 7:3 V/V).

A fração acetato de etila forneceu 22 subfrações a partir das quais foram isoladas e identificadas 5 substâncias: epigalocatequina, galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina e robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina. De acordo com as substâncias conclui-se que a droga vegetal tem potencial para contribuir com o conhecimento químico e taxonômico do gênero e da família botânica.

A metodologia realizada através de CLAE comprovou a eficiência e simplicidade do método proposto para separação de taninos presente no extrato em estudo.

As subfrações foram testadas para a atividade antioxidante, e de acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que todas as frações possuem essa atividade, destacando-se as amostras das subfrações 6 à 12, que demonstraram

excelentes atividades quando comparada aos controles quercetina, rutina, ácido gálico e astilbina.

Pode-se avaliar que as subfrações F#13 a F#22 apresentaram atividade frente as bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) ou ainda frente a leveduras (*Candida albicans* e *C. parapsilosis*), as que apresentaram melhores resultados foram.

O estudo da atividade cicatrizante da espécie mostrou um aumento significativo da proliferação celular epitelial para as feridas tratadas com pomadas contendo o extrato bruto ou acetato de etila a 2,5%, enquanto o grupo tratado com PAq mostrou um prejuízo na cicatrização.

Conclui-se que, a espécie vegetal *Stryphnodendron obovatum* Benth., amplamente utilizada pela população, apresenta atividades promissoras para elaboração de um medicamento fitoterápico, entretanto se faz necessário a continuação desses estudos para obtenção de novos compostos químicos e a realização de novos ensaios biológicos e toxicológicos.

REFERÊNCIAS

A PELE. Disponível em: <<http://www.dermatologia.net/>>. Acesso em 08 jan.2003

AGREN, M. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. **Dermatological Research**, v.29, p.583-590, 1999.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMAZAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrobial Chemoter.**, (UK), v.48, n. 4, p. 487-491, 2001.

ANDRADE, Z. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.123-135, 1995.

AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P., PERES, P.G.; KIMURA, E., PEREIRA, W.K.V., MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; ALVES PRADO, W.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytoterapy Research**. (London), v.3, p.264-266, 1999.

BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: Di Stasi, L.C., **Plantas Medicinais: arte e ciência-um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, UNESP, p. 169-186, 1996.

BALDÉ, A.M., van HOOFF, L., PIETERS, L.A., van den BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. Plant antiviral agents. VII. Antiviral and antibacterial proanthocyanidins from the bark of *Povetta owariensis*. **Phytother. Res.** (London), v.4, p.182, 1990.

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

BARBATIMÃO: Plantas tóxicas do pantanal. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/livros/plantastoxicadas/12barbatimao.html>>. Acessado em 05 nov. 2002.

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

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q. T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J. Ethnopharmacol.** (Lousane), v.82, n.2-3, p.155-158, 2002.

BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs- the need for and development of new antibacterials. In. **J. Antimicrobial Agents**, (Amsterdan), v.16, p.51-59, 2000.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture** (Oxford), v.175, p.327-335, 1999.

BERMAN, A. F. Herb-drug interactions. **The Lancet**, (UK), v. 355, p. 134-138, jan.2000.

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

BEZERRA, J. C. B; SILVA, I. A; H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Fitoterapia** (Milan), v.73, n.5, p.428-430, 2002.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMALER, K. Eletron paramagnetic ressonande studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. **Arch. Biochem. Biophys.**, (New York), v.374, n.2, p.347-355, 2000.

BOTHA, J. J.; FERREIRA, D.; ROUX, D. G. Synthesis of condensed tannins. Part.4 A direct biomimetic approach to [4,6]- and [4-8]- biflavonoids, **J. Chem. Soc., Perkin Transaction I** (London), p.1235-1245, 1981.

BRAGANÇA, F.C.R. Considerações sobre o histórico dos medicamentos e plantas medicinais. In: BRAGANÇA, L.A.R. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Niterói-RJ, Editora da Universidade Federal Fluminense, 1996, p.29-49.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução ANVS-RE nº356 e 357 de 28.2.2002. Determina apreensão, em todo território Nacional, de qualquer produto farmacêutico contendo Erva de São João (*Hypericum perforatum* L) que não possuam tarja vermelha contendo os dizeres "Venda sob prescrição médica" e que não possua registro nessa Agência, **Diário Oficial da União** 28.8.2002a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução Colegiada (RDC) nº17 de 24.4.2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 24.4.2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 61 de 12.8.200.2 Aprova regulamento técnico, visando atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 12.8.2002b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS nº6 de 31.1.1995. Institui e normatiza o registro de fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**,06.02.1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância Sanitária. Portaria nº116 de 8.8.1996. Publica: norma para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**,12.8.1996.

BRASIL,Presidência da Republica, subchefia de Assuntos Juridicos, Medida provisória nº 2052-1 de 28.07.2000. Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e a transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 30.07.2000.

BRITO, I. S. Comunicação pessoal (Médico veterinário, Rondonópolis-MT, 1996). In: TOKARNIA, C.H., BRITO, M.F., DRIEMEIER, D., COSTA, J.B.D., CAMARGO, A.J.R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesq. Veterinária Brás.**, v.18, n.1, 1998.

BRITO, M. F.; TOKARNIA; C. H.; PEIXOTO, P. V.; SILVA, H. K.; NOGUEIRA, M. Intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. 1. Caracterização do quadro clínico. **Pés. Veterinária Brás.** (Rio de Janeiro), v. 21, n.1, p. 1-12, 2001.

BRITO, N. M. B., SIMÕES, M. J. G., GOMES, P. de O., PESSOA, A. F., MELO, M. F. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Rev. Paulista Méd.**, v. 13, n.1, p.12-17, 1999.

BRITO, N.M.B., SIMÕES, M. de J.G., GOMES, PESSOA, A. de F., MELO, M.F. de. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Rev. Paulista Méd.**, v. 12, n.1, p.28-32, 1998.

BUELGA, C.S., SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agr.** (London), v.80, p.1094-1117, 2000.

BÜRGER, M. E.; AHLERT, N.; BALDISSEROTTO, B.; LANGELOH, A.; SCHIRMER, B.; FOLETTO, R. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Bras. J. Vet. Res. Animal Sci.** (Rio de Janeiro), v.36, n.6, 1999.

CAI, Y., EVANS, F. J., ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry** (New York), v.30, p.2033-40, 1991.

CALIXTO, J.B., Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytoterapeutic agents). **Bras. J.f Med. and Biol. Res.** (Ribeirão Preto), v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo Editora SENAC-SP, 2001.

CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas-Estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Cienc. Biomed.** (Marília), v.12, p.39-50, 1991.

CERRADO: Clima e Relevo. Disponível em: <www.portalbrasil.eti.br/cerrado_climarelevo.htm>, acesso em: 23 maio/2003.

CHITHRA, P.; SAJITHALAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **J. Ethnopharmacol.** (Lousane), v.59, p.179-186, 1998.

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

CICATRIZAÇÃO. Disponível em: <http://www.curativoage.com.br/proc_cicatricial.htm>, acesso em 08 jan.2003.

COIMBRA, R. Notas de fitoterapia: catálogo dos dados principais sobre as plantas utilizadas em medicina e farmácia. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo; 1942; p.42.

COSTA, T. E. M. M.; DIAS, A. P. M. D.; CAPRILES, P. V. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A; BERNARDO-FILHO, M.; Effect of barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville] infusion on the labeling of blood elements with technetium-99m. **Rev. Bras. Farmacogn.** (São Paulo); v.12; supl.; p.7-9, 2002.

COULADIS M.; BAZIOU P.; VERYKOKIDOU E.; LOUKIS A. Antioxidant Activity of Polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Phytoter. Res.**, n.16, p. 769-770, 2002.

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

CUENDT, M.; HOSTETTMAN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helv. Chim. Acta**, (Basel), v.80, p.1144-1152, 1997.

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. **J. Chem. Soc., Chemical Communications**, (Cambridge), p.375-377, 1979.

DANNE, A. Polyphenole aus den traditionellen *Arzneipflanzen Cistus incanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae), Dissertação, Münster, Alemanha, 1994, 260p.

DAVIDSON J.M.; BREYER M.D. Inflammatory modulation and wound repair. **J. Invest. Dermatol.**, p.xi-xii, 2003.

DELAPORTE, R.H., SÁNCHEZ M.G., CUÉLLAR, A.C., MELLO, J.C.P. Control de calidad y actividad antiinflamatoria de las drogas vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. **Acta Farm. Banaerense**, (La Plata), v.20, n.1, p.39-46, 2001.

DEMIREZER, Ö. L; UZ-KURUÜZÜM, A.; BERGERE, E.; ZEECK, A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. **Phytochemistry** (New York), v.58, p.1213-1217, 2001.

DREWES, S. E.; ROUX, D.G.; FEENEY, J.; EGGERS, S. H. Stereochemistry of natural 4,6 linked (+)- bileucofisetinidin, **J. Chem. Soc., Chemical Communications**, (Cambridge), p.368-69, 1966.

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

DU PREEZ, I. C.; ROWAN, A. C.; ROUX, D.G. Hindered rotation about the *sp*²-*sp*³ hybridized C-C bond between flavonoid units in condensed tannins. **J. Chem. Soc., Chemical Communications**, (Cambridge), p.315-16, 1971.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.E.; FAROUK, A. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. **Food Chem.** (Oxford), v.79, p. 331-336, 2002.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**, São Paulo: Edgard Blücher, 2000. p. 109.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. de, MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre-Florianópolis: Editora da Universidade-Editora da UFSC, 2001, p 199-222.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. São Paulo: Ed. Industria Gráfica Siqueira, 1959.

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

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. Ed. Nacional, 1929, p.116-117.

FAVARETTO, A.L.V., CONTRERA, M.G.D.; PETENUSCI, S.O.; SILVA-NETO, C.R.; LOPES, R.A.; SATAKE, T. Ação cicatrizante do extrato aquoso de casca de barbatimão *Stryphnodendron obovatum* Benth. em úlceras de contenção em ratos. **Revista da Escola de Odontologia de Alfenas (Alfenas)** v.8, p.7-11, 1985.

FERREIRA, A. L. A, MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Brás.** (São Paulo), v.43, n.1, 1997.

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

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

FOO, L. Y.; LU, Y.; HOWELL, A. B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins adherence of urophatogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. **Phytochemistry (New York)**, v.54, p. 173-181, 2000.

GALINA, K. J. ***Guazuma ulmifolia* Lam. Sterculiaceae: Estudo botânico, químico e microbiológico.** 105f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2003.

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

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deut. Apotheker Zeit.** (Oberusel), v.123, p.1979-1987, 1983.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiol. Biochem.** (Paris), v.40, n.6-8, p.471-478, 2002.

GUERRA, M. P.; NODARI R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3.ed., Porto Alegre-Florianópolis: Ed. da Universidade-Editora da UFSC, 2001. p 13-40.

GÜZELCAN, Y.; SCHOLTE, W. F.; ASSIES, J.; BECKER, H. E. Mania during the use of a combination preparation with St. John's wort (*Hypericum perforatum* L). **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde** (Amsterdam), v.145, n.40, p.1943-1945, 2001.

HAGERMAN, A. E., Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **J. Chem. Ecol.** (New York), v.14, p.453-461, 1988.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.** 2.nd. London:Chapman and Hall, 1984, 288p.

HARGERMAN, A. E; ROBBINS, C. T.; WEERASURITA, Y.; WILSON, T. C.; MCARTHUR, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **J. Range Manag.** (Denver), v.45, n.1, p.57-62, 1992.

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. **Chem. and Pharmac. Bull.** (Tokio), v.37, p.3255-3263, 1989.

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

HASLAM, E., HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. The flavonoids, **Chapman and Hall**, London, v.9, 1975, 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** (Brussels), v.66, p.21, 1989.

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

HE, X. G. On line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **J. Chromatogr. A** (Amsterdam), n.880, p. 203-232, 2000.

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. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I** (London), p. 1209-1216, 1982.

HERNANDEZ, R. A. Molienda y Tamizado. In: HELMAN, J. **Farmacotecnica: teorica y practica.** México, Ed. Cia Editorial Continental, cap. 31, p. 1147-1187, 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). **Rev. Bras. Farmacogn.** (Maringá); v.12; supl.; p.1-2, 2002.

HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, J. S.; CHEN, C. P.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **J. Pharmacy Pharmacol.** (London), n.53, n.2, p. 187-191, 2001.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** (Rio de Janeiro), v.97, n. 7, 1027-1031, 2002.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**, (São Carlos), ed. EdUFSCar, 2003, p. 54.

HUPKENS, P.; BOXNA, H.; DOKTER, J. Tannic acid as a topical agent in burns: historical considerations and implications for new developments. **Burns** (Oxford), v.21, n.1, p.57-61, 1995.

HUNSAKER JR., D. B.; SCHENK, G. H. The determination of thiols with diphenylpicrylhydrazyl as a spectrophotometric reagent. **Talanta**, Great Britain, v.30, n.7, p. 475-480, 1983.

IOANNIDES, C. Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. **Xenobiotica** (London): the fate of foreign compounds in biological systems, v.33, n.6, p 451-478, 2002.

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

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

KANDIL, F.E.; NASSAR, M.I., A tannin anti-cancer promotor from *Terminalia arjuna*. **Phytochemistry** (New York), v.48, n.8, p.1567-1568, 1998.

KAPU, S.D.; NGWAI, Y.B.; KAYODE, O.; ARAK, P.A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **J. Ethnopharmacol.** (Lousane), v.78, p.7-13, 2001.

KASAI, S.; WATANABE, S.; KAWABATA, J.; TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*. **Phytochemistry** (New York), v.31, n.3, p. 787-789, 1992.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biol. Med.** (New York), v.33, n.8, p.1089-1096, 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. W.; LAKS, P. E. (ed.). **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance.** New York: Plenum, v. 59, p. 295-320, 1992.

KOŁODZIEJ, H. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. **Phytochemistry** (New York), v.25, p.1209-1215, 1986.

KOŁODZIEJ, H. Tannins of medicinal plants: application of ¹H NMR parameters to the analysis of procyanidins. **Farmaceutisch Tijdschrift voor België**, (Brussels) v.66e, p. 44-50, 1989.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTE, K. P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Medica** (Stuttgart), n.65, p.444-446, 1999.

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

KORVER, O., WILKINS, C. K., Circular dichroism spectra of flavonols. **Tetrahedron** (Elmsford), v.27, pg. 5459-5465, 1971.

LANGHAMMER, L.; RAUWALD, H. W.; SCHULZE, G. Neu-untersuchung von Tiliae flos DAB 8. **Archiv Pharmaz.** (Weinheim), v.314, p.424-432, 1981.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. (orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**, Chapecó: Editora universitária ARGOS, p.483-501, 2001.

LIMA, E. O., Guerra, M. F. L., Silva, M. G., Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Rev. Bras. de Farm.** (Rio de Janeiro), v. 81, n. 3/4, p.95-97, 2000.

MAIA, V. **Técnica Histológica**, São Paulo, Atheneu: 1979, p. 14-17.

MARQUES, L. C., PETROVICK P. R.. Normatização da Produção e Comercialização de Fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed., Porto Alegre-Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. p 261-299.

MARQUES, V.R.B., **Natureza em boiões: medicinas e boticários no Brasil setencista**,(Campinas), ed. Unicamp, 1999, 350p.

MARTIN, P. Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science** (Washington), v. 276, p. 75-81, 1997.

MATTHE, G., SCHULER, A.D, KOENIG, G.M., HIV transcriptase inhibitors of natural origin. **Planta Medica** (Stutgard), v.65, n.6, p.493-506, 1999.

MEDEIROS, A.C., RAMOS, A.M.O.de, FILHO, A.M.D., AZEVEDO, R.C.F.de, ARAJO, F.L.F.B. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialuronico. **Acta Cirúrgica Brasileira** (São Paulo), v.14, n.4, 1999.

MELLO, J.C. P.; PETEREIT, F., NAHRDSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry** (New York), v.51, p.1105-07, 1999.

MELLO, J.C. P.; PETEREIT, F., NAHRDSTEDT, A. A flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry** (New York), v.41, p.807-813, 1996a.

MELLO, J. C. P ; PETEREIT, F., NAHRDSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry** (New York), v.42, p.857-862, 1996b.

MELLO, J. C. P. **Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae)**. Münster, 1995, 236p.Tese (Doutorado), Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

MELLO, J. C. P ; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed., Porto Alegre - Florianópolis: Editora da Universidade-Editora da UFSC, 2001, p.527-554.

MELLO, J.C.P. **Desenvolvimento galênico de macerados de Baccharis trimera (Less.) DC. – Compositae – (Carqueja)**. 1989. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1989.

MITTLER, R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** (Oxford), v.7, n.9, p.405-410, 2002.

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

MORTON, J. F. The potencial carcinogenicity of herbal tea. **Environ. Carc. Res.**, v.4, p.203-223, 1986.

MOTA, M. L. R.; THAMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **J. Ethnopharmacol.** (Lousane), v.13, p.289-300, 1985.

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

NAVARRO, V.; VILARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J. Ethnopharmacol.** (Lousane), v.53, p. 143-147, 1996.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 2000.

NEGRO, C.; TOMASSI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extract. **Biores. Technol.** (Essex-Inglaterra), v.87, p.41-44, 2003.

NETO, C. R. S.; LOPES, R. A.; ROSSI, E.; CONTRERA, M. G. D. Excreção renal de água, sódio e potássio em animais submetidos à sobrecarga aquosa

de barbatimão *Stryphnodendron obovatum*. **Pés. Homeopática** (Ribeirão Preto), n.5, p.9-20, 1988.

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

NONAKA, G. I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. . **J. Chem. Soc., Perkin Trans I** (London), p. 2139-2145, 1981.

NUNES, D. S.; HAAG, A.; BETMANN, H. J. Pharmakognostisch-phytochemische Untersuchung der cortex von *Cassia auriculata* Linnè. **Pharmazeutische Zeitung Wiss.** (Frankfurt), v.135, p. 2183-2186, 1989.

OCCHIONI, E. M., MARTINS JUNIOR, A .G. *Stryphnodendron* Mart. (Leg. Mim.): As espécies da Amazônia brasileira, **Leandra** (Rio de Janeiro), v.2, n.2, p.11-40, 1972.

OCCHIONI, E. M. *Stryphnodendron* Mart. Leg. Mim. As espécies do nordeste, sudeste e sul do Brasil II. **Leandra** (Rio de Janeiro), n.4-5, p. 53-67, 1974.

OKAMURA, H.; MIMURA, A; YAKOU, Y; NIWANO, M.; YOKAHARA, Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalypto rostrata*. **Phytochemistry** (New York), v.33, n.3, p.557-561, 1993.

OKASALA, O.; SALO, T.; TAMMI, R.; HAKKINEN, L.; JALKANEN, M.; INKI, P.; LARJAVA, H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. **J. Histochem. Cytochem.** (Baltimore), v.43, n.2, p.125-135, 1995.

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

OLIVEIRA, S. S.; MOTA, V. C.; BARROS, W. M de; BARROS, M. M. Efeitos do extrato metanólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville (barbatimão) sobre o ciclo estral de ratas e parâmetros bioquímicos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, FT.392, 2002. Cuiabá. *Resumos*, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

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

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

PALERMO, D.; PEREIRA, L. C. M. S.; MELLO, J. C. P.; HERNANDES, L. Atividade cicatrizante do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville] em feridas cutâneas. **Arq. Apadec**, (Maringá), V.6, (suppl.), p. 69, 2002.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA e SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbatiman* (VELLOZO) MARTIUS: Teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Rev. Cienc Farm.** (Araraquara), v.10, p.101-106, 1988.

PAREJA, B. P. Plantas medicinales con aplicaciones en Dermatología y Cosmética. **Folia Dermatol. Peruana**, v. 7, n.3-4, p.48-52, 1996.

PEREIRA, M. N. S.; ANDRADE, A. C. U.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville . In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, QI.017, Cuiabá. *Resumos*, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

PERRI DE CARVALHO, P. S.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas-Estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Cienc. Biom.** (São Paulo), v.12, p.39-50, 1991.

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

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

PLANTAS tóxicas no Brasil. Disponível em:
<<http://www.fiocruz.br/cict/sinitox/prognacional.htm>>, acesso em 06
nov.2002.

PÓLEN de Barbatimão [*Stryphnodendron sp.*] também Afeta Meliponídeos.
Disponível em:< http://www.agrov.com/vegetais/pla_tox/barbatimao.htm>
Acesso em 05 nov.2002.

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

PRISTA, L. N.; DA FONSECA, A. Produtos medicamentosos e suas características. **Manual de Terapia Dermatológica e Cosmetologia**, São Paulo, 1ª edição, Livraria Roca Ltda, 1993, pg. 226-229, 379.

QUINTERO PINTO, L. G., PEZZATO, L. E., MIRANDA, E. C. Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Sci.** v.22, n.3, p.677-681, 2000.

REBECCA, M. A; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CRESPIAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAM, R. K. N.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.** (Lausanne), p. 101-104, 2002.

REBECCA, M. A; ISHII-IWAMOTO, E. L.; KELMER-BRACHT, A. M., CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAM, R. K. N.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; MELLO, J. C. P.; BACHT, A.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicol. Lett.** (Amsterdam), p. 1-9, 2003.

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

REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Appl. Biochem. Biotechnol.** (Clifton), v. 34/35, p. 349, 1992.

ROHR, G.E.; MEIER, B.; STICHER, O. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. **J. Chromatogr. A** (Amsterdam), v.835, p.59-65, 1999.

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

SANCHES, A. C. C. **Análise da legislação para comercialização de fitoterápicos no mercado brasileiro com ênfase em plantas com atividade psicotrópica**, 2002, 35f., Trabalho de Conclusão de curso (Especialização em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM. Maringá, 2002.

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

SCALBERT, A., Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** (New York), v.30, n.12, 3875-83, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. de, MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre-Florianópolis: Editora da Universidade-Editora da UFSC, p 199-222, 2001.

SCHOLZ, E. Planziliche Gerbstoffe: Pharmakologie und toxikologie. **Deut. Apotheker Zeitung**,(Oberusel) v.134, p. 3167, 1994.

SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P.; BEVALOT, F.; VAQUETTE, J. Les propriétés antifongiques des cistacées et plus particulièrement de *Cistus laurifolius* L.: rôle des tanins non hydrolysables. **Fitoterapia** (Milan), n.53, p. 45-48, 1982.

SOARES S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** (Campinas), v.15, n.1, 2002.

SOO, C.; SHAW, M.D.; ZHANG, X.; LONGAKER, M.T.; HOWARD, E.W.; TING, D.M.D Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. **Plastic Reconstr. Surg.** (Baltimore), v.105, n.2, p.638-47, 2000.

SOUZA, S.M.C.; ROCHA, I. L. F.; NOBRE, M. E. P.; COSTA, J. G. M.; VALE, T. G.; VIANA, G. S. B. Atividade anticonvulsiva do extrato etanólico (ea) de *Stryphnodendron coriaceum* BENTH. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, FT.154, 2002. Cuiabá. *Resumos*, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

SPERONI, E.; GOVONI, P.; GUIZZARDI, S.; RENZULLI, C.; GUERRA, M. C. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. Root extract. **J. Ethnopharmacol.** (Lausanne), v.79, p. 265-72, 2002.

STADELMANN, W. K., DIGENIS, A. G. TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Amer. J. Surg.** (Princeton), v.176, supl.2A, p. 26S-38S, 1998.

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

SVEDSTRÖM, U.; VUORELA, H.; KOSTIAINEM, R.; HUOVINEM, K.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidins from dimers up to the hexamer in hawthorn. **J. Chromatogr. A** (Amsterdam), v.968, p.53-60, 2002.

SZEPESI, G. **HPLC in pharmaceutical analysis**. 1st ed. Boca Raton: CRC, v.1, 1990. p. 6-9.

TANAKA, T.; ISHIDA, N.; ISHIMATSU, M.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. CXVI. Six new complex tannins, guajavins, psidins and psiguavin from the bark of *Psidium guajava* L. **Chem. Pharmac. Bull. (Tóquio)**, v. 40, p.2092, 1992.

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

TITTEL, G.; WAGNER, H. Constituents of plants drugs. In: ENGELHARDT, H. (Ed.) **Practice of high performance liquid chromatography**. Berlim: Verlag, 1986. p. 368.

TOKARNIA, C. H., BRITO, M. F., DRIEMEIER, D., COSTA, J. B. D., CAMARGO, A. J. R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pés. Vet. Bras.** (Rio de Janeiro), v.18, n.1, 1998.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.** 2002, 92f, Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2002.

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

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*. **J. Organic Chem.** (Washington), v.28, p. 2390, 1963.

UEFFING, I. **Untersuchung von Procyanidinen in Tilia spec.- ein Beitrag zur qualitativen und quantitativen HPLC-analytik von Flavonolen.** Münster, 1988, 164f., (tese doutorado), Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, 1988.

VELÀZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M. ; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts, **Fitoterapia** (Milan), v.74, p.91-97, 2003.

VIEIRA, F. C.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Cicatrização cutânea em feridas de ratos após a aplicação tópica de pomadas de Barbatimão e Nebacetin®. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 16, p.188, Águas de Lindóia, 1998.

WANG, H.; HELLIWLL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid un green tea using HPLC. **Food Chem.**, Kidlington Oxord, v.68, p.115-121, 2000.

WARREHAM, C. N., WISEMAN, J., COLE, D. J. A. Processing and antinutritive factors in feedstuffs. In COLE, D. J. A., VARLEY, M. A. (Eds.). **Principles of Pig Sciences Nottingham**, 427p., 1994.

WEARING H.J. & SHERRAT, J.A.: Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model for dermal epidermal interaction in epidermal wound healing, **Math. Biosci.** (New York), v.165, p. 41-62, 2000.

WEINGES, K., KLOSS, P., TRUNZLER, G., SCHULER, E. Über kreislaufwirksame dimere und oligomere Dehydro-catechine. **Planta Medica** (Stuttgart), suppl., p.61, 1971.

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschritte Chem. Organischer Naturstoffe**,(Vienna-austria) v. 27, p. 158-260, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regional Office for the Western Pacific Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines.** Manila, 1998.

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: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, CQ.014, 2002. Cuiabá. *Resumos*, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.