

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

**ESTUDOS BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
CASCAS DE *Stryphnodendron polyphyllum* MART. (LEGUMINOSAE)**

GISELY CRISTINY LOPES

**MARINGÁ
2003**



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

Área de Concentração: Produtos Naturais Biologicamente Ativos

**ESTUDOS BOTÂNICO, FÍSICO-QUÍMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
CASCAS DE *Stryphnodendron polyphyllum* MART. (LEGUMINOSAE)**

GISELY CRISTINY LOPES

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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Luzmarina Hernandez**

**MARINGÁ
2003**

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

L864e Lopes, Gisely Cristiny
Estudos botânico, físico-químico, químico e biológico de cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* MART. (Leguminosae) / Gisely Cristiny Lopes. - Maringá, PR : [s.n.], 2003.
225 p. : il.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador Prof^a Dr^a Luzmarina Hernandez.
Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, 2003.

1. Farmacognosia. 2. Fitoquímica. 3. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) - Controle de qualidade. 4. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) - Atividade antimicrobiana. 5. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) - Ação cicatrizante. 6. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) - Atividade antioxidante. 7. Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) - Análise botânica. . Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDD 21.ed. 615.321

ELIANE M. S. JOVANOVIĆ CRB 9/1250

**Aos meus pais, Paulo e Tania,
Aos meus irmãos, Daniely e Paulo Cesar
E a meu avô Jorge Newton
Pelo estímulo e amor.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM, agradeço por sua orientação, seu carinho e amizade e pela confiança depositada em mim.

À professora Dra. Luzmarina Hernandez, do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM, pela colaboração, amizade e apoio na realização deste trabalho.

À professora Dra. Suzana da Costa Santos da Universidade Federal de Goiás, pelo carinho com que nos recebeu em Goiânia, durante excursão botânica.

Ao professor Dr. Celso Vataru Nakamura do Departamento de Análises Clínicas da UEM, pelo suporte na área microbiológica.

À professora Dra. Cássia Mônica Sakuragui, do Departamento de Biologia da UEM, pela contribuição quanto à análise botânica.

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

Ao Dr. Frank Petereit do Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha, pela gentileza do envio da substância galocatequina.

Ao professor Dr. Wagner Villegas da Universidade Estadual Paulista (Unesp): Campus Araraquara, pela atenção prestada em seu laboratório.

Às professoras Dra. Mara Lane Cardoso Carvalho, Dra. Selma Lucy Franco do Departamento de Farmácia e Farmacologia e a MSc. Eneri Vieira de Souza Leite Mello do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM pela amizade, contribuição e exemplo de postura profissional.

Á Dra. Ivânia Terezinha Albrecht Schuquel do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pelos espectros de RMN.

Às minhas queridas amigas de pós-graduação: Tânia Mara Antonelli Ushirobira, Andréia Cristina Conegero Sanches, Maria Inez de Godoy Pelozzo, Fátima Aparecida Machado, Analice, Patrícia Shima Luize, Tatiana Shioji Tiuman, Patrícia Costa Mincoff e Greisiele Lorena Pessini, pela amizade.

Às amigas, Patrícia Érika Rabelo e Silva, Adriana Sanfelice, Elza Yamaguti, Leila Mariko Uemura, Sílvia Raquel Mundo, Denise Pelegrini, Flávia de Oliveira Resende, Letícia Odorizi Tascheto, Lucieni C. M. S. Pereira alunas de iniciação científica, com quem convivi durante a realização deste trabalho, pelo carinho.

Ao MSc. Cleyton Eduardo Mendes de Toledo pelo exemplo.

Aos amigos Cláudio, Sonia, Helena e Leocir do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM, pelo apoio e amizade.

Aos técnicos de laboratório Admir (DFF), Ângela (DB), Marinete (DAC) Maria Eurides e Maria dos Anjos (DCM) muito obrigada pelo carinho e atenção a mim dispensados.

A todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho.

A Capes pelo suporte financeiro.

E, finalmente a Deus por tudo e à minha família, por seu apoio neste e em outros momentos da minha vida.

**“O rio atinge seus objetivos porque
aprendeu a contornar obstáculos”
Lao-Tsé**

1) Publicação do presente trabalho:

✚ Estudos físico-químico, químico e biológico de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). Lopes, G.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Mello, J.C.P. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v.13,supl.2, p.24-27, 2003

✚ Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatography of flavan-3-ols in stem bark from three species of *Stryphnodendron*, G. C. Lopes, A. C. C. Sanches, C. E. M. de Toledo, J. C. P. de Mello, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, submetido, 2003

✚ Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats, G. C. Lopes, A. C. C. Sanches, C. V. Nakamura, L. Hernandez, J. C. P. de Mello, **Journal of Ethnopharmacology**, submetido, 2003

2) Comunicação do presente trabalho em Congresso:

✚ Estudos físico-químico, químico e biológico de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). Lopes, G.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B. P.; Mello, J.C.P. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, IV, 2003, Salvador. **Resumos**....., Salvador, Bahia, Brasil, de 24 a 27 de setembro de 2003.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Sistemática vegetal.....	26
2.1.1 A família Leguminosae.....	26
2.1.2 O gênero <i>Stryphnodendron</i>	27
2.1.3 <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart.....	28
2.1.4 Avaliação do conteúdo químico do gênero <i>Stryphnodendron</i>	32
2.2 Taninos.....	37
2.3 Propriedades biológicas.....	46
2.3.1 Atividade farmacológica.....	46
2.3.1.1 Atividade antimicrobiana.....	49
2.3.1.2 Atividade cicatrizante.....	52
2.3.1.3 Atividade antioxidante.....	58
2.3.2 Toxicologia.....	62
3 OBJETIVOS	67
4 MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1 Matéria-prima vegetal.....	68
4.2 Solventes, reagentes e soluções.....	68
4.3 Equipamentos.....	70
4.3.1 Outros materiais.....	72
4.4 Descrição anatômica.....	72
4.4.1 Corte a mão livre.....	72
4.4.2 Inclusão do material vegetal em parafina.....	72
4.5 Controle de qualidade da matéria-prima vegetal.....	73
4.5.1 Perda por dessecação.....	73
4.5.2 Análise granulométrica por tamisação.....	74
4.5.3 Determinação da umidade em balança com infravermelho.....	74
4.5.4 Determinação da perda por secagem em temperatura ambiente....	74
4.5.5 Teor de extrativos.....	75
4.5.6 Ensaio químico clássico para taninos.....	75
4.5.6.1 Reação com gelatina.....	76

4.5.6.2 Reação com sais de ferro.....	76
4.5.6.3 Reação com acetato de chumbo.....	76
4.5.6.4 Reação com cianeto de potássio.....	76
4.5.6.5 Reação com vanilina clorídrica.....	76
4.5.6.6 Reação de Stiasny.....	76
4.5.7 Determinação do teor de taninos totais.....	77
4.5.8 Determinação do teor de flavonóides totais.....	78
4.6 Preparação de extratos.....	79
4.6.1 Extrato total.....	79
4.6.2 Obtenção da fração acetato de etila.....	80
4.7 Métodos cromatográficos.....	80
4.7.1 Cromatografia em coluna.....	80
4.7.1.1 Cromatografia em coluna da fração acetato de etila.....	80
4.7.1.2 Cromatografia em coluna das subfrações.....	81
4.7.2 Cromatografia em camada delgada.....	82
4.7.3 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	82
4.7.4 Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade.....	82
4.7.5 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
4.7.5.1 Condições cromatográficas.....	83
4.7.5.2 Análise quantitativa.....	84
4.7.5.2.1 Preparação da solução padrão de galocatequina.....	84
4.7.5.1.2 Preparo das amostras.....	84
4.7.5.2.3 Análise de regressão linear.....	84
4.7.5.1.4 Repetibilidade para galocatequina.....	85
4.7.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa.....	85
4.8 Derivatização das substâncias isoladas.....	86
4.9 Análise estrutural das substâncias isoladas.....	86
4.10 Hidrólise de dímeros.....	87
4.10.1 Unidade superior.....	87
4.10.2 Unidade inferior.....	87
4.11 Rotação ótica (polarimetria).....	87
4.12 Ensaio biológicos.....	88
4.12.1 Atividade antimicrobiana	88

4.12.1.1 Padronização da suspensão bacteriana.....	88
4.12.1.2 Padronização da suspensão da levedura.....	88
4.12.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima através do método da diluição em placas.....	88
4.12.2 Atividade cicatrizante.....	90
4.12.2.1 Animais.....	90
4.12.2.2 Procedimento experimental.....	90
4.12.2.3 Análise macroscópica.....	91
4.12.2.4 Análise da proliferação celular epitelial.....	91
4.12.2.5 Análise estatística.....	92
4.12.3 Atividade antioxidante.....	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5.1 Análise botânica.....	93
5.2 Caracterização da matéria-prima e controle de qualidade.....	103
5.3 Análise química.....	116
5.3.1 Monômeros.....	126
5.3.1.1 Galocatequina (Substância I).....	126
5.3.1.2 Epigalocatequina (Substância II).....	131
5.3.2 Dímeros.....	140
5.3.2.1 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina (Substância III).....	140
5.3.2.2 Epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina (Substância IV).....	147
5.3.2.3 Fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina (Substância V).....	154
5.3.2.4 Fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina (Substância VI).....	158
5.3.3 Perfil cromatográfico por CLAE.....	162
5.4 Atividade antibacteriana.....	172
5.5 Ação cicatrizante.....	181
5.6 Atividade antioxidante.....	195
6 CONCLUSÕES.....	199
REFERÊNCIAS.....	202

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart., Abadia de Goiás, Goiás, Brasil, dezembro de 2002.....	29
2	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> , folhas e inflorescências (12/02).....	30
3	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> ,: detalhe das inflorescências	30
4	Estrutura das Sapogeninas 1(R = OH; R' = H), 2 (R =R' = OH), 3 (R = OH; R' = H) e 4 (R =H; R' = OH).....	31
5	Flavan-3-óis isolados das cascas de <i>S. adstringens</i> (Mart.) Coville.....	33
6	Prodelfinidina dimérica isolada de uma fração do extrato do <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	34
7	Novos dímeros isolados de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	35
8	Estrutura de monômeros básicos de taninos condensados..	38
9	Exemplos de procianidinas diméricas.....	39
10	Precipitação do complexo polifenol-proteína – P: Proteína; PF: Polifenol; A: baixa concentração de proteínas; B: alta concentração de proteínas; C: interação proteína-fenol (F).....	41
11	Epigallocatequina-3-O-galato isolada do chá verde.....	43
12	Esquema de corte da pele.....	51
13	Cicatrização cutânea.....	53
14	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O).....	58
15	Cerrado brasileiro.....	92
16	Aspectos macroscópicos das folhas: A) <i>S. adstringens</i> (Mart.) Coville; B) <i>S. polyphyllum</i> Mart.; C) <i>S. obovatum</i> Benth.....	96
17	Visão geral da periderme.....	99
18	Periderme: no detalhe o súber.....	99
19	Caule, parênquima cortical: no detalhe grão de amido	100

20	Caule: parênquima cortical: detalhe células esclerenquimáticas	100
21	Caule: parênquima cortical, no detalhe idioblasto com conteúdo pardo	101
22	Caule: parênquima cortical, no detalhe raio floemático.....	101
23	Caule: parênquima cortical -corte longitudinal da região floemática	101
24	Perda por secagem (PPS) e perda por dessecação (PPD) estabelecida em relação a 100% de droga vegetal.....	105
25	Curva de distribuição granulométrica da droga.....	106
26	Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal.....	107
27	Teor de taninos totais em coletas realizadas no verão para <i>S. polyphyllum</i> , <i>S. obovatum</i> e <i>S. adstringens</i>	112
28	Relação entre teor de extrativos e teor de taninos totais.....	112
29	Cromatografia em camada delgada das 24 subfrações.....	118
30	Proposta de fragmentação das substâncias I e II.....	127
31	Espectro de RMN ¹ H da galocatequina com hidroxilas livres [(CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz)].....	128
32	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da galocatequina com hidroxilas livres [(CD ₃ OD, 300 MHz)].....	129
33	Espectro de RMN ¹ H da epigalocatequina com hidroxilas livres [(CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz).....	132
34	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da epigalocatequina com hidroxilas livres [(CD ₃ OD, 300 MHz)].....	133
35	Espectro de RMN ¹ H da galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para TMS; 300 MHz)].....	136
36	Espectro de RMN ¹ H da epigalocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para TMS; 300 MHz)].....	137
36	Espectro de massas da 4'-O-metil-robinetinidol-(4β→6)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada (ESI positivo).....	
36	Espectro de RMN ¹ H da 4'-O-metil-robinetinidol-(4β→6)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para	

	TMS; 300 MHz)].....	144
37	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ ; 300 MHz)].....	145
	Espectro de massas da epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada (ESI positivo).....	
38	Espectro de RMN ^1H da epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para TMS; 300 MHz)].....	148
39	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ ; 300 MHz)].....	151
	Espectro de massas da fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada (ESI positivo).....	
40	Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para TMS; 300 MHz)].....	156
	Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada [(Acetona, relativo para TMS; 300 MHz)].....	
41	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ ; 300 MHz)].....	157
	Espectro de massas da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada (ESI positivo).....	
42	Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ , relativo para TMS; 300 MHz)].....	160
	Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada [(Acetona; relativo para TMS; 300 MHz)].....	
43	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl ₃ ; 300 MHz)].....	
		161
44	Cromatograma das substâncias referências: a)	

	galocatequina; b) epigalocatequina.....	164
45	Cromatogramas obtido por CLAE, GC – galocatequina; EGC – epigalocatequina, detecção em 210 nm: a) FAE; b) F#4; c) F#5; d) F#9.....	166
46	Curva de calibração do padrão galocatequina, obtido através de CLAE.....	168
47	Espectro de varredura do UV de 200 a 350 nm, referentes aos padrões: a) galocatequina; b) epigalocatequina[c=0,005 mg/ml;metanol].....	169
48	Feridas no dorso de ratos Wistar, após 7 dias de tratamento. Esquerda: ferida tratata com FAE; direita: ferida controle tratada com base de Beeler.....	184
49	Área das feridas (mm ²) tratadas com FAA durante 10 dias	185
50	Área das feridas (mm ²) tratadas com FAE durante 10 dias..	186
51	Corte transversal de ferida cutânea no dorso de rato Wistar, após 7 dias de tratamento: observar células bloqueadas em metáfase na língua de reepitelização.....	188
52	Língua de reepitelização.....	188
53	Efeito do tratamento durante 10 dias com a pomada de extrato bruto (FAA) de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. à 2,5% sobre o número de metáfases/área em feridas cutâneas de ratos. Valores médios (n=5). Teste t, *p<0.05 comparado com o controle.....	190
54	Efeito do tratamento durante 10 dias com a pomada de fração acetato de etila (FAE) de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. à 2,5% sobre o número de metáfases/área em feridas cutâneas de ratos. Valores médios (n=5) Teste t, *p<0.05 comparado com o controle...	190
55	Cromatograma (CCD) representativo da redução do radical DPPH frente a FAA, FAE, FA, galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC), fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina (substância V), F#1, F#2, F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8, F#9 de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart., udando como	

substâncias padrões: quercetina (Q), rutina (R), ácido gálico (Ac.G), astilbina (Al).....

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Gradiente fase móvel para cromatografia em coluna da fração acetato de etila.....	81
2	Gradiente fase móvel para CLAE.....	83
3	Perda por dessecação do pó das cascas de <i>S. polyphyllum</i> Mart. [(n=5)].....	105
4	Análise granulométrica por tamisação das cascas de <i>S. polyphyllum</i> Mart., rasuradas por moinho de martelos.....	108
5	Teor de extrativos obtidos a partir das cascas de <i>S. polyphyllum</i> Mart.	110
6	Reações qualitativas para taninos.....	110
7	Teor de taninos presentes nas cascas de <i>S. polyphyllum</i> Mart.	111
8	Teor de flavonóides presentes nas cascas de <i>S. polyphyllum</i> Mart.	115
9	Vinte e quatro subfrações obtidas por cromatografia em coluna.....	120
10	Deslocamentos da substância I com hidroxilas livres (galocatequina).....	127
11	Deslocamentos da substância II com hidroxilas livres (epigalocatequina).....	132
12	Deslocamentos da substância I peracetilada (galocatequina).....	136
13	Deslocamentos da substância II peracetilada (epigalocatequina).....	136
14	Deslocamentos da substância III peracetilada (4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina).....	143
15	Deslocamentos da substância IV peracetilada (epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina).....	149
16	Deslocamentos da substância V peracetilada (fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina).....	155

17	Dados de deslocamentos da substância VI peracetilada (fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina).....	159
18	Área dos picos da substância referência galocatequina para a curva padrão por CLAE.....	167
19	Valores obtidos para galocatequina e epigalocatequina na FAE, F#4, F#5 e F#9 (n=6).....	170
20	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$).....	173
21	Concentração bactericida mínima ($\mu\text{g/ml}$).....	173
22	Atividade antibacteriana das subfrações de <i>S. polyphyllum</i> Mart. frente a <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>	175
23	Avaliação da proliferação celular epitelial do extrato bruto de <i>S. polyphyllum</i> Mart., média do número de metáfases \pm DP. Teste t, *p<0,05.....	191
24	Avaliação da proliferação celular epitelial da fração acetato de etila de <i>S. polyphyllum</i> Mart., média do número de metáfases \pm DP. Teste t, *p<0,05.....	191

LISTA DE QUADROS

QUADRO		PÁGINA
1	Eventos relacionados a espécies reativas de O ₂	59

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA		PÁGINA
1	Obtenção das frações e subfrações.....	118
2	Fracionamento químico a partir de F#4.....	123
3	Fracionamento químico a partir de F#5.....	146
4	Fracionamento químico a partir de F#9.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	Ágar Mueller-Hinton
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCCAV	Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMH	Caldo Mueller-Hinton
COSY ¹ H/ ¹ H	Espectroscopia de correlação
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EGF	Fator de crescimento epidermal
F#	Subfrações obtidas a partir da fração acetato de etila
FAA	Extrato bruto aceto-aquoso liofilizado
FAE	Fração acetato de etila do extrato bruto liofilizado
FA	Fração aquosa do extrato bruto liofilizado
H&E	Hematoxilina e eosina
HETCOR	Espectroscopia de correlação heteronuclear
<i>m</i>	Multiplete
CD ₃ OD	Metanol deuterado
OMS	Organização mundial da saúde
P.A.	Pró-análise
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
Rf	Relação de frente
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono

s	Singleto
SA	Solução amostra
SC	Solução comparativa
SM	Solução mãe
ST	Solução teste
STP	Solução teste padronizada
t	Tempo (dias, horas ou minutos)
TR	Tempo de retenção
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônia

RESUMO

As cascas do vegetal *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. há muito tempo são usadas pela população para o tratamento de várias enfermidades, principalmente como cicatrizante e anti-séptico. Procurou-se avaliar o extrato bruto (FAA), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FA), obtidos de cascas de *S. polyphyllum* Mart. quanto à composição química, atividade antimicrobiana, cicatrizante e antioxidante, além de estabelecer referências para o controle de qualidade das cascas do vegetal tanto do ponto de vista botânico como físico-químico, acrescidos de dados de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permitiram estabelecer um perfil cromatográfico para a FAE, F#4, F#5 e F#9, estabelecendo dados comparativos com os já existentes para outras espécies do gênero *Stryphnodendron*. Por cromatografia em coluna (CC) em Sephadex® LH-20, vinte e quatro subfrações foram obtidas a partir de FAE, das quais foram isoladas e identificadas 6 substâncias: galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-robinetidinol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina, fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina. O extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa, além das 23 subfrações foram testadas contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli* e contra os fungos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, apresentando moderada atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e ausência de inibição frente a *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli* e frente às cepas de leveduras testadas. O extrato bruto e fração acetato de etila foram avaliados quanto à proliferação celular epitelial em epitélio neoformado em feridas cutâneas de ratos, sendo eficazes na ação cicatrizante. O extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa e as nove primeiras subfrações, além das substâncias isoladas apresentaram atividade antioxidante. Assim, os extratos e frações mostraram-se eficazes nos testes biológicos e com um conteúdo químico rico em taninos condensados.

Palavras-chave: *Stryphnodendron polyphyllum*; Taninos condensados, CLAE, Controle de qualidade, Atividade antimicrobiana, Ação cicatrizante, Atividade antioxidante

ABSTRACT

The stem barks of the *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. is at a long time used by native population for treatment of several diseases, mainly as wound healing and antiseptic. Assessment the crude extract (FAA), ethyl-acetate fraction (FAE) and aqueous fraction (FA) obtained of stem barks of the *S. polyphyllum* Mart. as for chemical composition, antibacterial, wound healing and antioxidant activities, besides establishing references for quality control of the stem barks of the vegetable so much of the point of view botanic as well as physiochemical, to added of data of high-performance liquid chromatography (HPLC) that allowed establishing a profile chromatographic for the FAE, F#4, F#5 and F#9, establishing comparative data with the existent for other species of the gender *Stryphnodendron* By column chromatography (CC) in Sephadex® LH-20, twenty-four subfractions obtained from this ethyl-acetate fraction were isolated and identified 6 compounds: galocatechin, epigallocatechin, 4'-O-methyl-robenitinidin-(4 β →6)-4'-O-methyl-galocatechin, epigallocatechin-(4 β →8)-galocatechin, fisetinidol-(4 β →8)-galocatechin, fisetinidol-(4 α →8)-galocatechin. The crude extract, ethyl-acetate fraction, and aqueous fraction, besides 24 sub fractions were tested against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, showing activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. The crude extract and ethyl-acetate fraction were appraised as for the proliferation cellular in neo-formed epithelium in cutaneous wounds of rats, being effective in the healing action. The crude extract, ethyl acetate fraction, aqueous fraction and the first nine sub fractions, besides the isolated substances presented antioxidant activity. Thus, the extracts and fractions were shown effective in the biological tests and with a rich chemical content in flavan-3-ols and dimers of condensed tannins.

Keywords: *Stryphnodendron polyphyllum*, Condensed tannins, HPLC, Quality control, Antibacterial activity, Wound healing, Antioxidant activity

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o bem estar físico e mental é uma condição que acompanha o homem desde os tempos da caverna até os dias atuais. Assim, ao longo dos tempos, o homem, com a evolução do pensamento, vem buscando maneiras de aliviar a dor e sanar enfermidades.

A história da fitoterapia se confunde com a história da Farmácia. Estudos arqueológicos testemunham o uso das plantas medicinais, nos papiros egípcios, nos escritos chineses e nas táboas de argila do Sumério. São descritos inúmeros relatos de plantas medicinais usadas até hoje como: menta, alecrim, camomila, absinto, babosa, terebentina, entre outras (CALIXTO, 2001).

Na Grécia antiga, Hipócrates (460-377 a.C.), em Roma Dioscórides (100 d.C.) e Galeno (131-201 d.C.) com suas pesquisas trouxeram um avanço significativo no terreno da terapêutica, na classificação de doenças, na posologia e nos métodos de preparo de medicamentos. Com Galeno os estudos da Farmácia avançaram, sobretudo os métodos de extração, com os destilados capazes de extrair o *espírito das plantas*. No século XVI o médico suíço Paracelso (1493-1541) impulsionou o estudo das plantas medicinais, tentou relacionar as virtudes das plantas com suas propriedades morfológicas, forma e cor, seu legado ficou conhecido como *teoria da similitude* (BRAGANÇA, 1996).

Com o fim do século XIX e início do século XX, o cenário mundial é outro, avanços tecnológicos possibilitaram mudanças na vida do homem, os estudos e descobertas das etiologias microbianas das infecções por Louis de Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910) foram responsáveis pelo início da quimioterapia. É neste cenário que se sintetiza pela primeira vez a molécula de ácido acetilsalicílico,

inspirada na substância natural salicilina, extraída de *Salix alba* L. Este foi o ponto de partida para a indústria farmacêutica de medicamentos sintéticos que vem dominando o mercado mundial desde então (YUNES *et al.*, 2001).

Porém, inúmeros produtos vegetais têm sido usados como matérias-primas para o desenvolvimento de substâncias bioativas, como: quinina, das cascas da *Cinchona officinalis* L.; morfina e codeína, do látex do ópio; digoxina, das folhas de *Digitalis purpurea* L.; atropina e hioscina, de espécies de Solanaceae; mais recentemente, o taxol, um diterpenóide, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt., com comprovada eficácia contra câncer de seio e de ovário; etoposídeo, com potencial atividade anticâncer; artemisinina, antimalárico (PHILLIPSON, 2001) e, o safrol, que ocorre no óleo de Sassafrás (*Ocotea* sp), como molécula base para a síntese de novos antiinflamatórios (BARREIRO, 2001).

A terapêutica tradicional vem enfrentando problemas devido ao uso indiscriminado de drogas pela população, como exemplo, observa-se a dessensibilização de receptores orgânicos e a resistências de muitos microorganismos frente a uma gama de antibióticos. Assim, uma alternativa é buscar novas substâncias junto à natureza.

Existem na terra aproximadamente 350.000 espécies de plantas, mas apenas uma pequena porcentagem foi investigada do ponto de vista fitoquímico, e um número ainda menor de frações derivadas dessas plantas foi analisado do ponto de vista farmacológico. Por outro lado, sabendo-se que uma planta pode conter milhares de diferentes metabólitos secundários, os estudos fitoquímicos podem nos dar apenas uma pequena idéia desta complexa mistura. O reino vegetal, representa, desta forma, um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Assim, como a diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, os cientistas voltaram seus estudos aos produtos naturais, considerando que durante milhares de anos de evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória realmente inigualável (YUNES *et al.*, 2001).

No Brasil a respeito da rica flora, que corresponde cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas no mundo, pouco se tem feito para o estudo desta potencial fonte de novas drogas ou como extrato bruto para preparações farmacêuticas (PETROVICK *et al.*, 1999). A exuberância da flora nativa, reserva vasta e cobiçada biodiversidade, guardando certamente, inúmeros padrões moleculares originais ainda desconhecidos. Espécies nativas, com uso popular, consagradas durante anos, estão tendo sua composição química avaliada e ação farmacológica comprovada como por exemplo, o óleo de copaíba. Porém, isso corresponde a aproximadamente 1%, o que é muito pouco. Muitas espécies vegetais foram extintas durante anos de ocupação de terra sem consciência ecológica, uma grande perda para gerações futuras. No entanto a busca para o tratamento de doenças como câncer e AIDS, e o tratamento para os sintomas da menopausa, aproximou os interesses da prática médica atual e a fitoterapia, e vem despertando, ainda que timidamente, a consciência ecológica.

Estima-se que no mundo 2/3 da população faça uso de alguma planta medicinal. No entanto, não se deve esquecer que em drogas vegetais não estão ausentes os efeitos colaterais e tóxicos. O número de atendimentos nas centrais de intoxicação causadas pela ingestão de espécies vegetais é grande. Além disso, é preocupante o uso irracional de coquetéis de drogas vegetais, que na realidade

podem estar mascarando problemas sérios de saúde como a hipertensão arterial e o diabetes.

O mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 30 bilhões em 2000, no Brasil ele é responsável pela cifra de quase US\$ 1 bilhão. Aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente provém de plantas. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem natural e um número bem significativo são de drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Assim, a tendência da indústria farmacêutica mundial com relação a novas drogas, é a de investir efetivamente no potencial terapêutico das plantas medicinais, essas, que ao longo da história vêm demonstrando sua eficiência em relação à tentativa do homem em se manter com saúde. Porém, pesquisas multidisciplinares, envolvendo agrônomos, biólogos, farmacêuticos e médicos, são importantes para a consolidação da fitoterapia como prática segura e eficaz.

Entre os países ocidentais, a Alemanha vêm elaborando monografias (COMISSÃO E) para comprovar o uso popular, garantir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento fitoterápico, além da padronização do extrato vegetal, para a produção de medicamentos éticos.

Dentre as diversas plantas utilizadas como remédios pela população, pode-se citar o gênero *Stryphnodendron* Mart. que apresenta um teor mínimo de 20% em taninos nas cascas de acordo com a FARMACOPÉIA (1959). Entre as quase 40 espécies de *Stryphnodendron*, a mais amplamente estudada em sua composição química e ações farmacológicas foi o *S. adstringens* (Mart.) Coville (MELLO *et al.*, 1996a, 1996b, 1999; TOLEDO, 2002), demonstrando significativa atividade

cicatrizante (PANIZZA *et al.*, 1988), antiinflamatória (LIMA *et al.*, 1998) e antiulcerogênica (AUDI *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2002).

Segundo Mello (1995), *S. adstringens* (Mart.) Coville contém grupos de flavan-3-óis, prodelphinidinas e prorobinetinidinas, substâncias fenólicas que, provavelmente lhe conferem algumas das atividades farmacológicas, e a propriedade de complexar proteínas, promovendo, assim, ação adstringente. Outras espécies de barbatimão [*S. obovatum* Benth e *S. polyphyllum* Mart.] têm sido utilizadas pela população para tratamento de algumas dessas doenças. Assim a composição química das cascas da espécie *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. vem sendo investigada, e suas ações farmacológicas pesquisadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistemática vegetal de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.

2.1.1 A família Leguminosae

O gênero *Stryphnodendron* Mart. pertence a família Leguminosae uma das mais importantes famílias botânicas do ponto de vista econômico, possuindo grande representatividade e notável importância ecológica.

Tradicionalmente a família tem sido dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (HUTCHINSON, 1967; POLHILL *et al.*, 1981; HEYWOOD, 1993). Porém outros autores como CRONQUIST (1988) e DAHLGREN (1983) sugeriram a divisão do grupo em três famílias distintas: Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae.

Apesar de contar com cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies (HUTCHINSON, 1967), a maior parte das espécies da família possuem alguns caracteres comuns: presença de nódulos radiculares que abrigam bactérias nitrificantes, canais secretores, presença de metabólitos secundários freqüentemente taninos, alcalóides e algumas vezes glicosídeos cianogênicos (HEYWOOD, 1993).

Quanto a caracteres morfológicos: folhas usualmente alternas, compostas, pinadas ou bipinadas; flores normalmente bissexuais, radiais para bilateral; apresentando geralmente 5 pétalas dispostas de várias maneiras, estames numerosos, em geral em número de 10 que podem estar fundidos ou não; o ovário é súpero e sempre formado por um único carpelo, com vários óvulos presos à placenta; o fruto mais comum é do tipo legume mas podem ocorrer outros tipos como lomento e sâmara (HEYWOOD, 1993).

A subfamília Mimosoideae a qual o gênero *Stryphnodendron* pertence, é a menor das três subfamílias e possui cerca de 40 gêneros e 2.500 espécies. O grupo pode ser caracterizado morfológicamente por apresentar: árvores para arbustos, ocasionalmente ervas; folhas bipinadas compostas; corola radial, estames em número de 10 (JOLY, 1975).

Os representantes desta subfamília são especialmente abundantes nas regiões tropicais.

2.1.2 O gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* é tipicamente brasileiro, uma vez que aqui ocorrem 94% dos taxa que o compõem. Ele se caracteriza como neotropical, apresentando como limite norte a Costa Rica, na América Central, onde foi registrada a ocorrência de uma única espécie e, como limite sul, o Estado do Paraná, no Brasil, com registro de duas espécies (*S. adstringens* e *S. obovatum*) (OCCHIONI, 1990).

O nome do gênero, segundo Barroso (1978), refere-se a *madeira adstringente*, referindo-se ao *córtex* de várias espécies, ricas em taninos.

Nas considerações taxonômicas feitas para o gênero no Brasil, 8 espécies foram reconhecidas por Bentham (1852) como nativas. Em um estudo posterior realizado por Occhioni Martins e Martins Júnior (1972), 21 espécies foram citadas pelos autores que detalharam apenas as espécies ocorrentes na Amazônia. Segundo, Occhioni (1990), o gênero compreende atualmente 32 taxa, sendo 29 espécies, 1 subespécie e 2 variedades, com distribuição geográfica e hábitos bastante característicos.

Occhioni Martins (1974) estudou as espécies de *Stryphnodendron* ocorrentes nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil e reconheceu 6 espécies das quais 5 com o nome vulgar barbatimão: *S. coriaceum* Benth.; *S. barbadetiman* (Vell.) Mart.; *S. polyphyllum* Mart.; *S. rotundifolium* Mart. e *S. obovatum* Benth.

Occhioni (1990) reportou que 14 taxa ocorrem na floresta Amazônica; 1 táxon arbóreo em floresta semidécida seca (Mato Grosso); 1 táxon arbóreo de mata pluvial (Pernambuco); 4 taxa arbustivos de campos e cerrados (Minas Gerais e São Paulo); 2 taxa arbustivos das caatingas; 2 taxas arbóreos das matas da Serra da Mantiqueira (Rio de Janeiro); 8 taxa subarbustivos “plantas anãs” dos cerrados (Goiás e Minas Gerais).

A separação das espécies é feita principalmente com base em caracteres tais como hábito da planta e morfologia da folha (MARTIUS, 1840; CORRÊA, 1926).

2.1.3 *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.

Caracteriza-se como árvore regular, até 7 metros de altura (fig. 1); ramos crassos, pulverulento-tomentosos; folhas alternas, 15-40 cm de comprimento; raqui quadrangular, estriada, pubescente, glândula alongada na base, pequenas glândulas verruciformes entre as pinas superiores, pinadas, 15-20 jugas, pares opostos ou sub-opostos (fig. 2), 5-11 cm de comprimento; folíolos 10-20 jugos alternos, oblíquos, oblongo-elípticos, ápice emarginado, base arredondada ligeiramente desigual, 0,8-1 cm de comprimento, 3-5 cm de largura, densamente pubescentes em ambas as faces, base da nervura unilateralmente barbada na face inferior; flores purpúreas em espigas delgadas (fig. 3), cilíndricas 2-4 dispostas em fascículos axilares, 5-17 cm de comprimento; cálice campanulado, 1 mm, externamente pubescente; corola 3 mm; estames 10 livres, 3,5-4 mm de

comprimento; antera coroada por glândula alongada caduca; ovário alongado, curto-estipitado, pubescente, 1,5 mm de comprimento; estilete filiforme; fruto legume alongado, 10-12 cm de comprimento, ligeiramente falcado (MARTIUS, 1840).



Foto: G. C. Lopes

Figura 1 - *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Abadia de Goiás, Goiás, Brasil, dezembro de 2002



Foto: J.C.P. Mello

Figura 2 – *Stryphnodendron polyphyllum*, folhas e inflorescências (12/02)

Foto: J.C.P. Mello

Figura 3 - *Stryphnodendron polyphyllum*,: detalhe das inflorescências

2.1.4 Avaliação do conteúdo químico do gênero *Stryphnodendron*

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

Tursch *et al.* (1963) isolaram a partir de um extrato etanólico dos frutos de *S. coriaceum* Benth., duas saponinas triterpênicas conhecidas como sapogeninas **1** e **2** e mais tarde, os mesmos autores isolaram duas outras sapogeninas homólogas (**3** e **4**) (TURSCH *et al.*, 1966) (fig. 4).

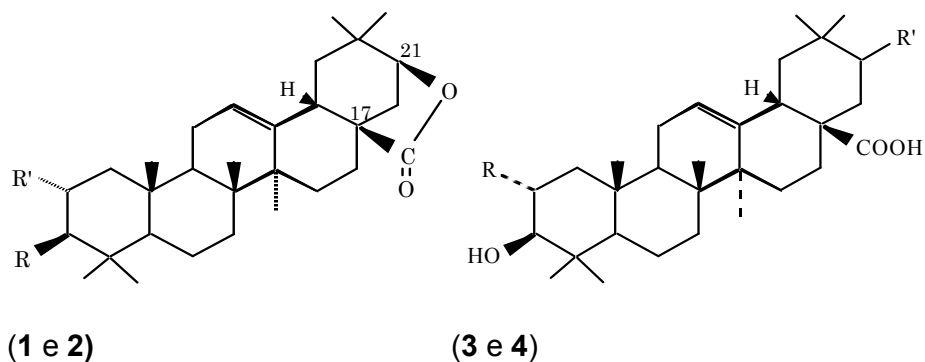


Figura 4 - Estrutura das Sapogeninas 1(R = OH; R' = H), 2 (R =R' = OH), 3 (R = OH; R' = H) e 4 (R =H; R' = OH)

Reicher *et al.* (1992) isolaram a partir dos frutos do *S. barbatiman* Mart. uma galactomanana e sua estrutura foi explicada com ajuda de espectroscopia de ^{13}C .

Mello *et al.* (1996 e 1996a) isolaram a partir das cascas secas do *S. adstringens* (Mart.) Coville, monômeros de flavan-3-óis (fig. 5), prodelfinidinas e algumas prorobinetinidinas, tendo sido suas estruturas elucidadas através de análise espectroscópica em RMN ^1H , RMN ^{13}C e EI- e DCI-MS, além de métodos ópticos. Além dessas, uma nova prodelfinidina denominada 4'-O-metil-galocatequina-

(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (fig. 6) foi identificada da fração acetato de etila do extrato de barbatimão (MELLO *et al.*, 1999).

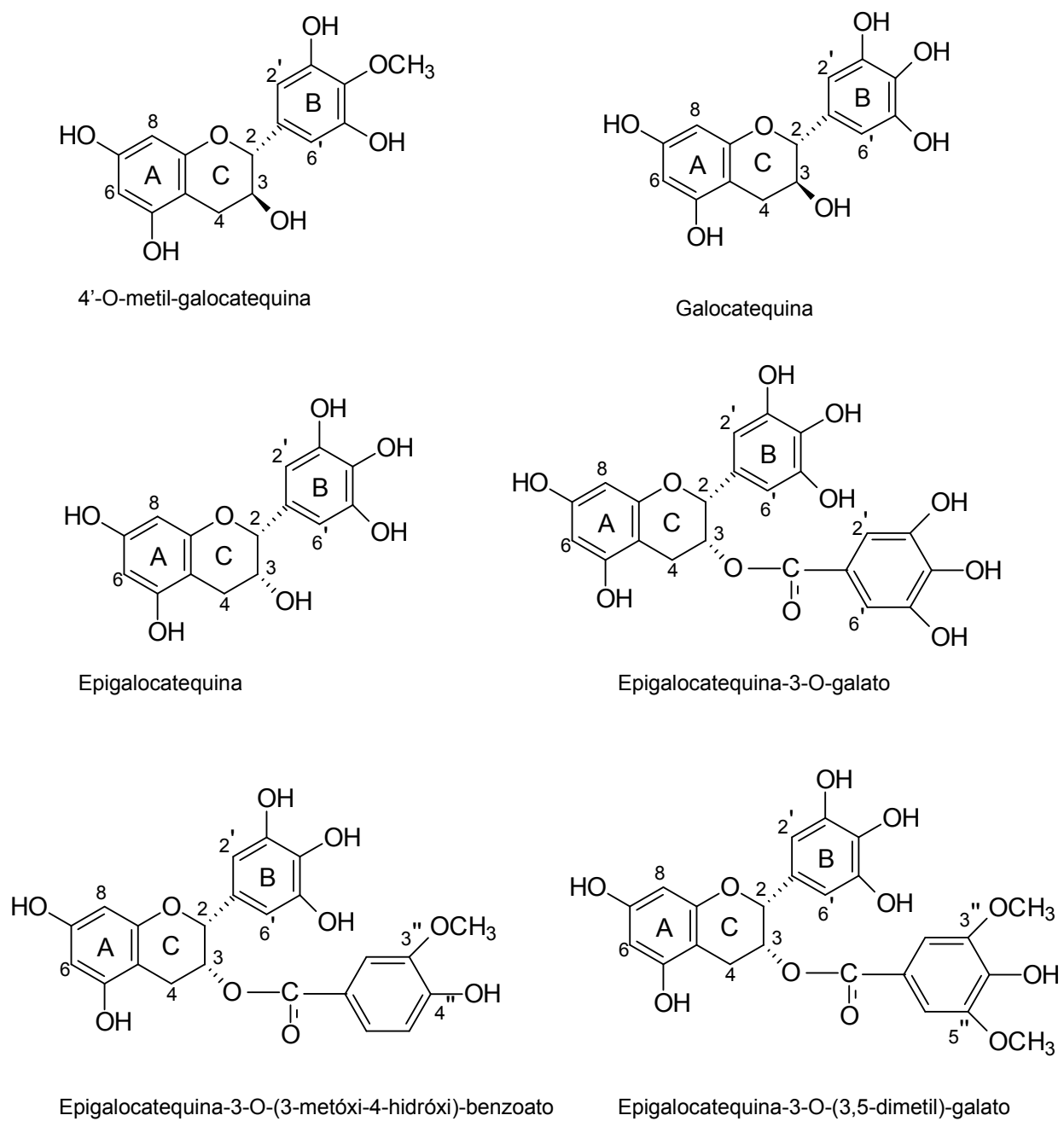
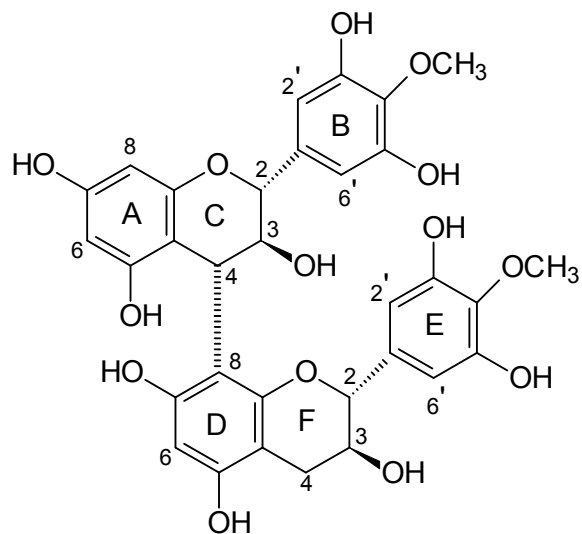


Figura 5 - Flavan-3-óis isolados das cascas do barbatimão (*S. adstringens*)



4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina

Figura 6 - Prodelfinidina dimérica isolada de uma fração do extrato de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Recentemente, Toledo (2002), isolou e identificou duas novas substâncias em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Suas estruturas foram elucidadas através de análise espectroscópica em RMN ^1H , RMN ^{13}C e DCI-MS, além de métodos ópticos, sendo denominadas 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (fig. 7).

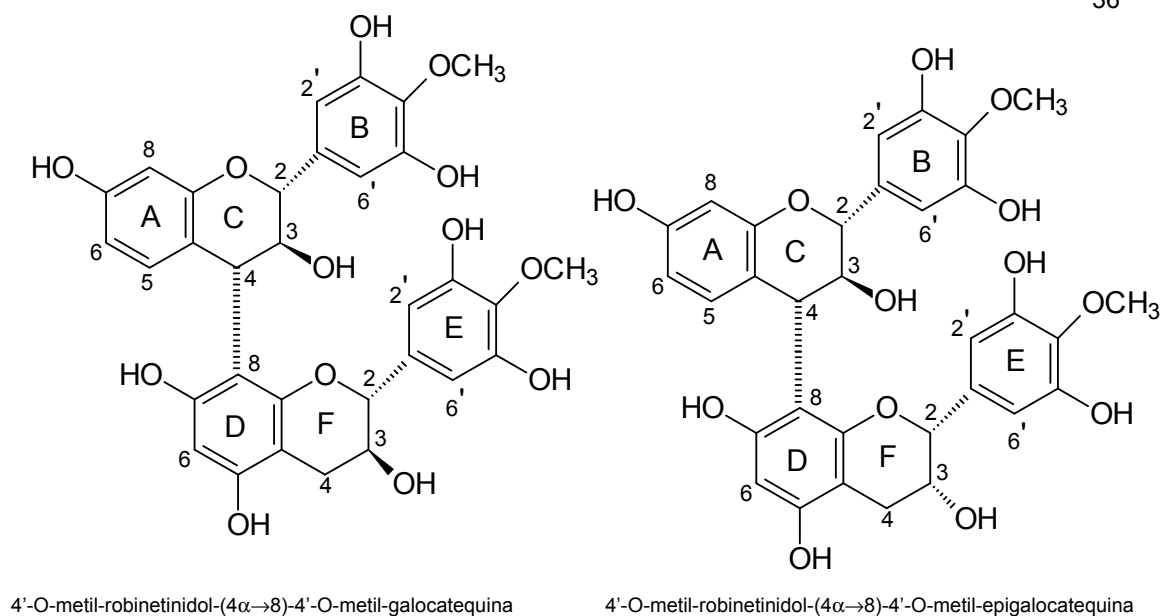


Figura 7 - Novos dímeros isolados de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

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

Sanches *et al.* (2002) em seu trabalho com *Stryphnodendron obovatum* Benth., determinaram a concentração em torno de 15% de taninos totais nas cascas do vegetal, isolando e identificando flavan-3-óis (galocatequina e epigalocatequina) presentes na fração acetato de etila por cromatografia em coluna em Sephadex® LH-20.

2.2 Taninos

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM, 1975).

Historicamente, a importância das drogas que contém taninos está ligada às suas propriedades tanantes, ou seja, sua habilidade de transformar peles frescas em um material imputrescível: o couro.

Bate-Smith e Swain (1962), definiram os taninos como substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com: alcalóides, gelatina e outras proteínas.

A característica fundamental que dá aos taninos suas propriedades biológicas, parece ser a alta concentração de grupos orto-fenol- hidroxil (HASLAM, 1974).

Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em 2 grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MELLO; SANTOS, 2003).

Estruturalmente taninos condensados são mais complexos que taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico (MELLO; SANTOS, 2003). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe também é denominada de proantocianidina ou leucocianidinas (HASLAM, 1975). Esta denominação é devido à característica das proantocianidinas cederem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído à quente (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000)

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos as Choripetalae das dicotiledôneas e não foram encontrados nas Sympetalae (MELLO; SANTOS, 2003). Do ponto de vista biológico, a importância de taninos nas plantas esta relacionada à efetiva propriedade repelente de predadores, quer seja animal ou microbiano. Isso se deve à relevante adstringência que causa a diminuição da palatabilidade, dificuldades na digestão pela complexação dos taninos com enzimas e/ou proteínas, impedindo assim a invasão dos tecidos por parasitas (BATE-SMITH, 1973).

Acredita-se que as propriedades farmacológicas dos taninos são devidas a três características gerais que são comuns em maior ou menor graus aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e, habilidade de se complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

2.1 Taninos condensados

Taninos condensados diferem estruturalmente de acordo com o número de grupos hidroxila presente nos anéis aromático e da estereoquímica do carbono assimétrico do núcleo heterocíclico. Além disso, a presença de O-metilação, O-glicosilação e O-galoilação aumentam a complexidade estrutural (DE BRUYNE *et al.*, 1999).

A variação na hidroxilação classifica as proantocianidinas em vários subgrupos: properlargonidinas (3,4',5,7-OH), procianidinas (3,3',4',5,7-OH),

prodelfinidinas (3,3',4',5,5',7-OH), proguibourtinidinas (3,4',7-OH), profisetinidinas (3,3',4',7-OH), prorobinetinidinas (3,3',4',5',7-OH), proteracacidinas (4',7,8-OH; somente sintética), promelacacidinas (3',4',7,8-OH), proapigeninidinas (4',5,7-OH), e proluteolinidinas (3',4',5,7-OH) (Fig. 8) (FERREIRA; LI, 2000).

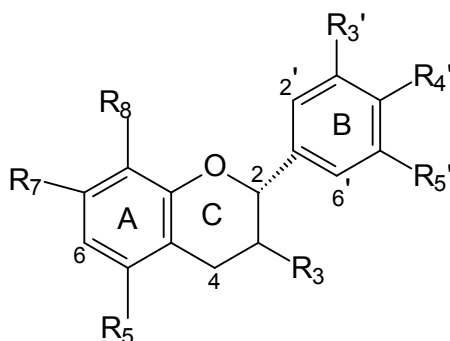


Figura 8 – Estrutura de monômeros básicos de taninos condensados

As proantocianidinas são comumente formadas por monômeros de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8. Além desses, outros monômeros são bastante comuns, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002). Em procianidinas e prodelfinidinas os acoplamentos 4→8 são mais favorecidos estereoquimicamente, mas não são exclusivos. Normalmente, ambos os acoplamentos 4→8 e 4→6 (fig. 9) estão presentes na proporção de 3:1. Em 5-deóxi-proantocianidinas, porém, o acoplamento 4→6 é predominante (DE BRUYNE *et al.*, 1999).

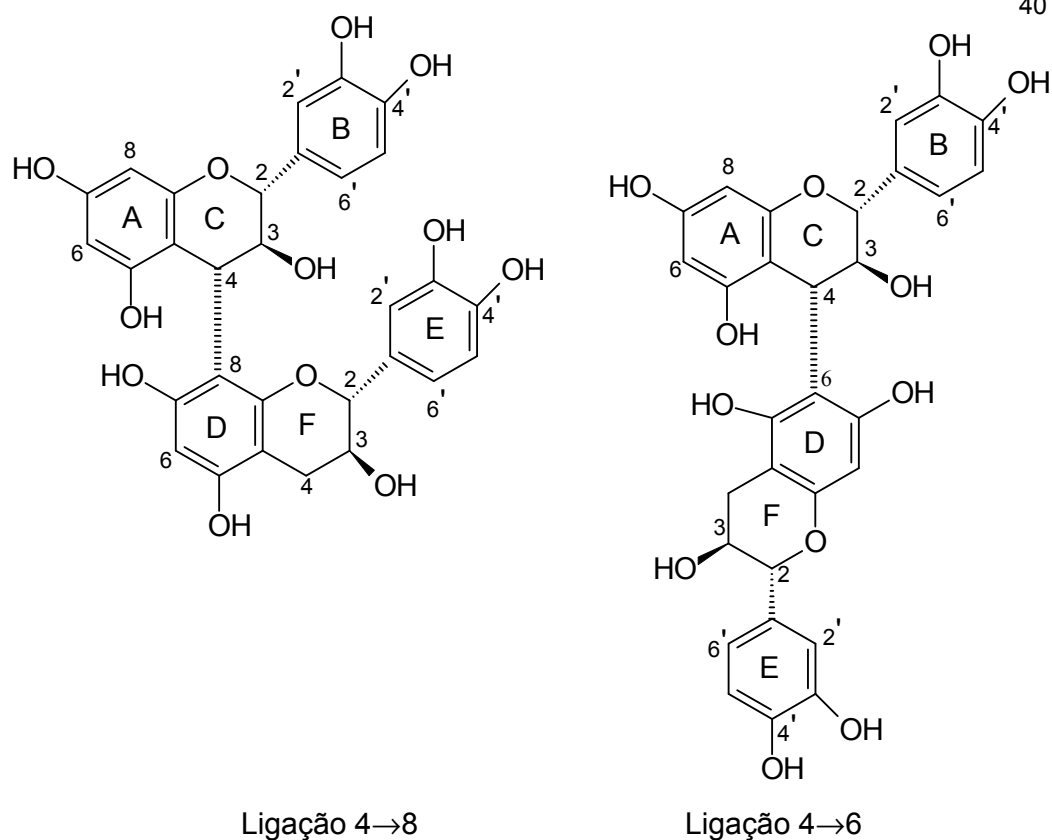


Figura 9 - Exemplos de proantocianidinas diméricas

Muita atenção tem sido dada a análise de taninos e outros compostos fenólicos nas plantas, devido a sua importância farmacológica e ecológica. Estudos sobre as propriedades químicas das leucoantocianidinas e proantocianidinas demonstraram que os principais responsáveis pelas atividades biológicas são respectivamente: flavan-3,4-diol e flavan-3-ol além de seus derivados oligoméricos (WEINGES *et al.*, 1969).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e ulcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Chung *et al.* (1998), em sua revisão abordaram as propriedades biológicas dos taninos, tais como: aspectos antinutricionais e nutricionais, antimutagênica e carcinogênica, antimicrobiana entre outras, relacionados à presença de taninos na alimentação do homem. Outras duas revisões recentes De Bruyne *et al.* (1999) e Santos-Buelga; Scalbert (2000), demonstraram algumas propriedades farmacológicas dos taninos. Dentre essas atividades podem-se citar: antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, inibição enzimática, inibição da agregação plaquetária e efeitos cardíacos, antiúlcera e antidiarréica.

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos taninos foram observadas por Haslam *et al.* (1989), assim como o princípio da adstringência e da cicatrização como base terapêutica nos ferimentos da mucosa, pois os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, assim abaixo dessa camada, ocorre o processo natural de cura (fig. 10).

Os taninos podem formar complexos com proteínas de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações covalentes ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos protéicos (LUCK *et al.*, 1994).

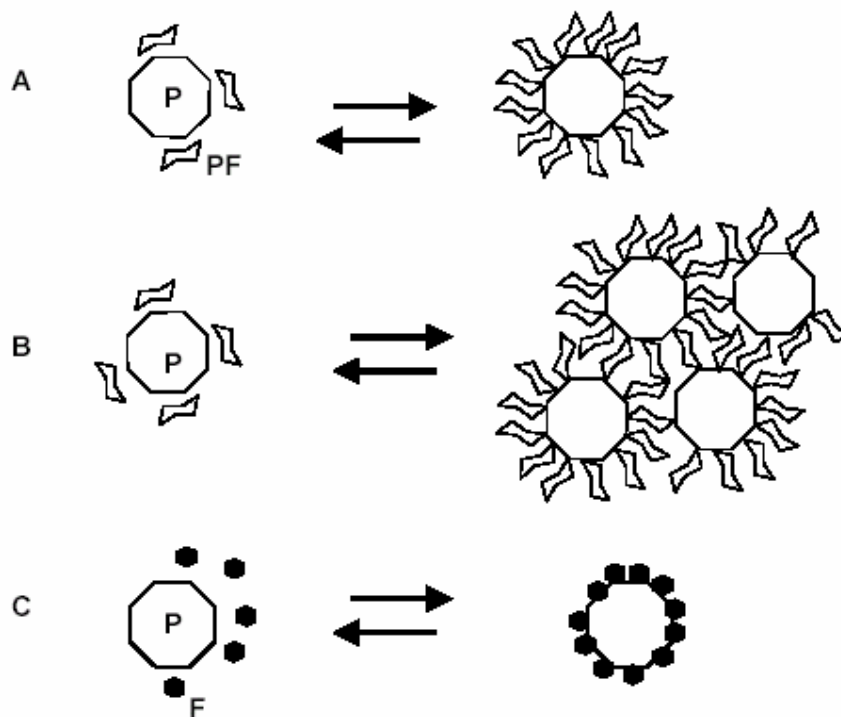


Figura 10 - Precipitação do complexo polifenol-proteína – P: Proteína; PF: Polifenol; A: baixa concentração de proteínas; B: alta concentração de proteínas; C: interação proteína-fenol (F) (HASLAM *et al.*, 1989)

A habilidade de se ligar a proteínas, confere aos taninos a propriedade de inibir enzimas. Testes *in vitro* realizado por Hattori *et al.* (1990) e Ooshima *et al.* (1993), demonstraram que os taninos são capazes de inibir as glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, encontradas na cavidade oral do homem. O efeito da inativação da glucosiltransferase pelos taninos bloqueia a formação da placa dental e de inflamações na região bucal e garganta (SCHOLZ, 1994).

A atividade antimicrobiana dos taninos condensados, vem sendo estudada por diversos grupos na busca de novos agentes terapêuticos. Monômeros galoidados demonstraram atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, agente

etiológico da cárie (OTAKE *et al.*, 1991; NAKAHARA *et al.*, 1993). Apesar da atividade antibacteriana dos taninos ser avaliada tanto contra bactérias Gram negativas como Gram positivas (SCHOLZ, 1994), as proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas isoladas do *Pavetta owariensis* P. Beauv. (Rubiaceae) não demonstraram atividade contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (BALDÉ *et al.*, 1990).

Hatano *et al.* (1989), observaram que os flavan-3-óis, as procianidinas e os taninos hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio, importantes no processo inflamatório, o que leva a acreditar num possível efeito anticarcinogênico e antimutagênico, já que muitos genes mutantes e carcinógenos produzem radicais livres que interagem com macromoléculas celulares. Estas observações foram confirmadas por Kandil *et al.* (1998) e Santos-Buelga e Scalbert (2000), atividade anticâncer; Negro *et al.* (2003) e Desmarchelier *et al.* (1998), atividade antioxidante.

Erdelmeier e colaboradores (1996), demonstraram que os taninos condensados presentes nas cascas e folhas de *Hamamelis virginiana* L., apresentam atividade antiviral e antiflogística, relacionando ainda, que as propriedades antivirais dos taninos, seriam dependentes do número de unidades flavonoídicas. Anteriormente, hamamelitaninos foram apontados por Masaki *et al.* (1994) como potentes agentes anti-radicaais livres.

Meiers *et al.* (2001), em seu estudo sobre agentes anticâncer, reportaram que antocianidinas e delphinidinas são potentes inibidores do fator de crescimento epidermal (EGFR) *in vitro*, sugerindo que taninos são promissores agentes preventivos ao desenvolvimento de câncer.

Takahashi *et al.* (1998), demonstraram que a procianidina B-2 e procianidina B-3, isoladas das sementes de uva, apresentaram uma atividade proliferativa no folículo piloso de ratos tratados com solução a 3% de procianidinas, semelhante ao grupo tratado com minoxidil a 1%, estabelecendo a possibilidade de novas investigações para o tratamento da alopecia.

O chá verde [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze], consumido mundialmente como bebida, tem sido reportado devido às suas benéficas atividades farmacológicas. Ho *et al.* (1992), demonstraram a atividade antioxidante, que foi mais tarde confirmada por Yokozawa *et al.* (1998). Estes autores demonstraram as propriedades de proteção renal do chá verde contra isquemia de reperfusão (YOKOZAWA *et al.*, 1997).

Epigalocatequina-3-O-galato (fig. 11), o maior constituinte químico do chá verde, foi reportado como agente preventivo em câncer de próstata, efeito esse que é mediado pela habilidade dos polifenóis induzirem apoptose em células cancerígenas (ZHAO, *et al.*, 1997, GUPTA, *et al.* 2003).

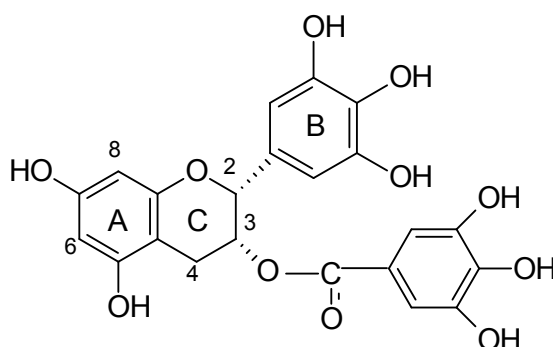


Figura 11 - Epigalocatequina-3-O-galato isolada do chá verde

Aviram *et al.* (2000), avaliaram o suco da romã, rico em taninos (elagitaninos, antocianidinas, catequina, ácido gálico e ácido elágico), e demonstraram atividade antiaterogênica e antioxidante contra oxidação lipoprotéica. Recentemente Aviram *et al.* (2001), reportaram uma atenuação secundária da pressão sangüínea em pacientes com hipertensão arterial. Estes estudos sugerem que o suco da romã pode oferecer proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

2.3 Propriedades biológicas

2.3.1 Atividade Farmacológica

O uso popular do gênero *Stryphnodendron* é bastante difundido entre a população nativa do cerrado brasileiro. Os principais usos preconizados popularmente para as cascas do vegetal são: cicatrizante, tratamento de leucorréia, adstringente, coagulante sangüíneo, antidiarréico e anti-séptico (CORRÊA, 1926; SANTOS *et al.*, 1987).

As propriedades cicatrizantes do barbatimão foram avaliadas em trabalhos realizados por Favoretto *et al.* (1985), Panizza *et al.* (1988), Neves *et al.* (1992a), Eurides *et al.* (1995), Jorge-Neto *et al.* (1996), Vieira *et al.* (1998) e Palermo *et al.* (2002), demonstrando que a ação cicatrizante se deve, principalmente ao fato dos taninos presentes nas cascas do barbatimão, precipitarem proteínas dos tecidos lesados e formarem um revestimento protetor que favorece sua regeneração (PANIZZA *et al.*, 1988).

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

Audi *et al.* (1999), demonstraram a efetiva atividade antiulcerogênica do extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], em diferentes modelos de ulceração gástrica, confirmando assim os trabalhos de Neves *et al.* (1992a e 1992b) e Lima *et al.* (1998).

Recentemente, Martins *et al.* (2002), confirmaram o trabalho de Audi *et al.* (1999), demonstrando a significativa ação antiulcerogênica de *S. adstringens* (Mart.) Coville, avaliando o potencial da atividade de inibição da secreção gástrica ácida durante o experimento de estresse térmico em ratos.

Baurin *et al.* (2002), reportaram a significativa atividade antitirozinase de *S. adstringens* (Mart.) Coville, na ordem de 90%, quando comparado à referência *Morus alba* L. que foi de 97% de inibição.

A atividade antibacteriana do barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], foi demonstrada por Bersani-Amado *et al.* (1996), Alves *et al.* (2000) e Toledo (2002), frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. Sanches *et al.* (2002), avaliaram as propriedades antibacterianas de *S. obovatum* Benth. Estes estudos mostraram uma atividade antibacteriana moderada principalmente contra bactérias Gram positivas.

Jorge *et al.* (1996), demonstraram a ação antileishmanial do extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Recentemente, Toledo (2002), confirmou este trabalho, demonstrando a efetiva ação de frações e subfrações do extrato de *S. adstringens* (Mart.) Coville, contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com resultados superiores a 80% de inibição.

Herzog-Soares *et al.* (2002), avaliaram a atividade tripanocida *in vivo* de *S. adstringens* (Mart.) Coville, demonstrando uma redução significativa do número de parasitos circulantes nos sangue, denotando uma efetiva interferência sobre a curva de parasitemia de *Trypanossoma cruzi*.

Bezerra *et al.* (2002), reportaram a atividade moluscicida de *S. adstringens* (Mart.) Coville e *S. polyphyllum* Mart. contra *Biomphalaria glabrata* (Say), demonstrando que *S. adstringens*, apresenta uma mortalidade de 90% na

concentração de 50 ppm e *S. polyphyllum* impõe uma mortalidade de 40% na população de moluscos na concentração de 20 ppm.

Costa *et al.* (2002), relataram o efeito da infusão de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], nas células sanguíneas e em proteínas plasmáticas tratadas com tecnecium 99m (Tc-99m), demonstrando que houve uma diminuição da marcação dos glóbulos vermelhos, provavelmente devido aos efeitos redutor e quelante do barbatimão.

Souza *et al.* (2002), avaliaram a atividade anticonvulsivante do extrato etanólico (EE) de *S. coriaceum* Benth., no modelo de convulsões induzidas com pentilenotetrazol ou estriçnina. O EE aumentou a latência de convulsão e morte, além da taxa de sobrevivência dos animais, evidenciando atividade anticonvulsiva.

2.4 Propriedades biológicas

2.3.1 Atividade Farmacológica

O uso popular do gênero *Stryphnodendron* é bastante difundido entre a população nativa do cerrado brasileiro. Os principais usos preconizados popularmente para as cascas do vegetal são: cicatrizante, tratamento de leucorréia, adstringente, coagulante sangüíneo, antidiarréico e anti-séptico (CORRÊA, 1926; SANTOS *et al.*, 1987).

As propriedades cicatrizantes do barbatimão foram avaliadas em trabalhos realizados por Favoretto *et al.* (1985), Panizza *et al.* (1988), Neves *et al.* (1992a), Eurides *et al.* (1995), Jorge-Neto *et al.* (1996), Vieira *et al.* (1998) e Palermo *et al.* (2002), demonstrando que a ação cicatrizante se deve, principalmente ao fato dos taninos presentes nas cascas do barbatimão, precipitarem proteínas dos tecidos lesados e formarem um revestimento protetor que favorece sua regeneração (PANIZZA *et al.*, 1988).

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

Audi *et al.* (1999), demonstraram a efetiva atividade antiulcerogênica do extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], em diferentes modelos de ulceração gástrica, confirmando assim os trabalhos de Neves *et al.* (1992a e 1992b) e Lima *et al.* (1998).

Recentemente, Martins *et al.* (2002), confirmaram o trabalho de Audi *et al.* (1999), demonstrando a significativa ação antiulcerogênica de *S. adstringens* (Mart.) Coville, avaliando o potencial da atividade de inibição da secreção gástrica ácida durante o experimento de estresse térmico em ratos.

Baurin *et al.* (2002), reportaram a significativa atividade antitirozinase de *S. adstringens* (Mart.) Coville, na ordem de 90%, quando comparado à referência *Morus alba* L. que foi de 97% de inibição.

A atividade antibacteriana do barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], foi demonstrada por Bersani-Amado *et al.* (1996), Alves *et al.* (2000) e Toledo (2002), frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. Sanches *et al.* (2002), avaliaram as propriedades antibacterianas de *S. obovatum* Benth. Estes estudos mostraram uma atividade antibacteriana moderada principalmente contra bactérias Gram positivas.

Jorge *et al.* (1996), demonstraram a ação antileishmanial do extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Recentemente, Toledo (2002), confirmou este trabalho, demonstrando a efetiva ação de frações e subfrações do extrato de *S. adstringens* (Mart.) Coville, contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com resultados superiores a 80% de inibição.

Herzog-Soares *et al.* (2002), avaliaram a atividade tripanocida *in vivo* de *S. adstringens* (Mart.) Coville, demonstrando uma redução significativa do número de parasitos circulantes nos sangue, denotando uma efetiva interferência sobre a curva de parasitemia de *Trypanossoma cruzi*.

Bezerra *et al.* (2002), reportaram a atividade moluscicida de *S. adstringens* (Mart.) Coville e *S. polyphyllum* Mart. contra *Biomphalaria glabrata* (Say), demonstrando que *S. adstringens*, apresenta uma mortalidade de 90% na

concentração de 50 ppm e *S. polyphyllum* impõe uma mortalidade de 40% na população de moluscos na concentração de 20 ppm.

Costa *et al.* (2002), relataram o efeito da infusão de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], nas células sanguíneas e em proteínas plasmáticas tratadas com tecnecium 99m (Tc-99m), demonstrando que houve uma diminuição da marcação dos glóbulos vermelhos, provavelmente devido aos efeitos redutor e quelante do barbatimão.

Souza *et al.* (2002), avaliaram a atividade anticonvulsivante do extrato etanólico (EE) de *S. coriaceum* Benth., no modelo de convulsões induzidas com pentilenotetrazol ou estriçnina. O EE aumentou a latência de convulsão e morte, além da taxa de sobrevivência dos animais, evidenciando atividade anticonvulsiva.

2.3.1.1 Atividade antimicrobiana

Fungos e bactérias causam doenças importantes no ser humano, principalmente em pacientes imunodeficientes. Apesar da existência de antibióticos e agentes antifúngicos potentes, estão aparecendo cepas resistentes ou multi-resistentes continuamente, impondo a necessidade da procura permanente e o desenvolvimento de novas drogas (SILVER; BOSTION, 1993; ALVES *et al.*, 2000).

Os antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir as seguintes propriedades: atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras (AMATO NETO *et al.*, 1994).

Muitas espécies vegetais são usadas popularmente para o tratamento de diversas doenças infecciosas. Atualmente, ferramentas analíticas modernas facilitam o estudo detalhado da constituição química das plantas, o que possibilita novos parâmetros ao estudo farmacológico e microbiológico, com o possível desenvolvimento de agentes antimicrobianos seguros (CZECH *et al.*, 2001).

Estes fatos e o aparecimento de cepas resistentes de muitos microorganismos infecciosos, deu início à investigação na composição química de extratos vegetais, na busca de novo arsenal para a terapêutica antimicrobiana.

Muitos compostos químicos têm sido isolados de espécies vegetais brasileiras e de outras partes do mundo com potente atividade antimicrobiana de grande interesse para a indústria farmacêutica e para a medicina (LIMA, 2001). Entre os

metabólitos secundários atualmente importantes como agentes antimicrobianos, os taninos têm sido amplamente estudados.

Djipa *et al.* (2000), demonstraram que os extratos aquosos e acêtonicos de *Syzygium jambos* (L.) Alston, ricos em taninos, mostraram atividade antibacteriana, superando plantas clássicas como *Hamamelis virginiana* L., *Krameria triandra* Ruiz & Pav., *Alchimilla vulgaris* L. e *Rubus fruticosus* L.

Burapadaja e Bunchoo (1995), relataram a atividade antibacteriana de *Terminalia citrina* Roxb. contra diferentes microorganismos Gram positivos e Gram negativos. *Rubus ulmifolius* Schott, planta rica em triterpenos, flavonóides e taninos mostrou atividade efetiva contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (PANIZZI *et al.*, 2002).

Esquenazi *et al.* (2002), testaram a atividade antibacteriana dos taninos condensados de *Cocos nucifera* L., contra várias cepas de *Staphylococcus aureus*, demonstrando um alto efeito inibitório desta planta contra esta bactéria. O mesmo foi proposto por Kasai *et al.* (1992) que demonstraram a atividade antibacteriana de *Agrimonia pilosa* Ledeb frente a *S. aureus*.

Bersani-Amado *et al.* (1996), demonstraram que o extrato bruto liofilizado e frações da casca do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Alves *et al.* (2000), em seu estudo sobre plantas do cerrado brasileiro, demonstraram a atividade antibacteriana de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, comprovando a atividade das cascas do vegetal, em extrato clorofórmico e aquoso contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Toledo (2002), demonstrou a atividade antibacteriana das subfrações obtidas por fracionamento em Sephadex® LH-20 do extrato acêtonico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, contra bactérias Gram positivas, relatando ainda que, os monômeros e dímeros isolados neste trabalho, não demonstraram atividade.

Sanches *et al.* (2002), avaliaram a atividade antibacteriana do extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., obtendo resultados satisfatórios frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Sanches *et al.* (2003), demonstraram a atividade antifúngica de *Stryphnodendron obovatum* Benth., avaliando as subfrações obtidas por fracionamento em Sephadex® LH-20 da fração acetato de etila, frente às leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida papapsilosi* e *Candida tropicalis*. Obtendo resultados moderados contra *Candida albicans* e *Candida papapsilosis*.

2.3.1.2 Atividade cicatrizante

A pele recobre a superfície do corpo e corresponde a um dos seus maiores órgãos, atingindo 16% de seu peso. Apresenta-se constituída por duas camadas, uma de origem ectodérmica, a epiderme, epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que repousa sobre a lâmina basal que o separa da derme, uma porção conjuntiva mesodérmica, rica em colágeno, que provê suporte e nutrição ao epitélio (fig. 12).

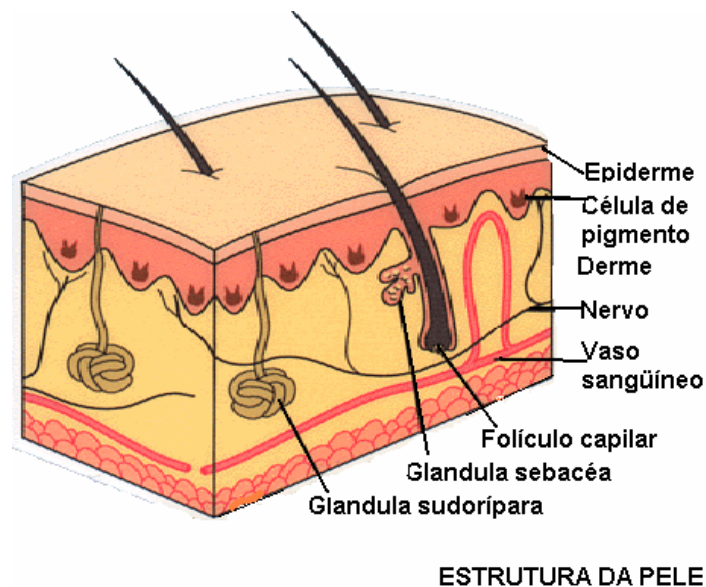


Figura 12 - Esquema de corte da pele

A pele apresenta múltiplas funções, como barreira protetora contra o ambiente externo, protegendo o organismo contra a perda excessiva de água por evaporação e contra o atrito. Assim qualquer rompimento em sua integridade deve ser rapidamente e eficazmente reparado. O processo de reparo requer uma seqüência de eventos coordenados e progressivos: hemostasia, inflamação, síntese

e deposição de colágeno, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelamento da matriz extracelular (STALDELMANN *et al.*, 1998).

Na última década, vários estudos têm demonstrado que diversos fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular são capazes de disparar sinais que iniciam e param cada uma das muitas atividades pelas quais as feridas são cicatrizadas (AGREN, 1999).

Diversos fatores de crescimento liberados por vários tipos celulares como plaquetas, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos iniciam o processo de cicatrização, atraindo células inflamatórias para o local da ferida, uma solução de continuidade, criada pela retirada do fragmento da pele e inicialmente preenchida por sangue coagulado, fibrina e exsudato de inflamação. Este, por sua vez, será o suporte para os fibroblastos e o endotélio vascular neoformado edificarem o tecido de granulação, que em uma cicatrização de segunda intenção, é de suma importância para a contração do tecido conjuntivo (SIMÕES *et al.*, 1986; MARTIN, 1997).

Durante a cicatrização da ferida (fig. 13), a migração celular inicia-se dentro de poucas horas depois do dano e continua até que a superfície epitelial esteja intacta (CLARK, 1996). O trabalho de reepitelização é feito pelo tecido conjuntivo contrátil, através dos fibroblastos que começam a proliferar, providenciando uma nova matriz celular rica em colágeno (MARTIN, 1997). Isto requer uma série de mudanças no comportamento celular, que incluem proliferação celular, diferenciação e migração de queratinócitos da margem da própria ferida, estando envolvidos neste processo mediadores químicos específicos, como por exemplo: fator de crescimento epidermal (EGF). Durante a proliferação a atividade mitótica é alta, permanecendo assim, mesmo depois de fechada a ferida, por mais 2 à 4 dias (GARLICK, 1994).

Assim, para a cura de uma ferida, é necessário um sistema ideal, dinâmico, cíclico, que envolve uma série de mudanças passageiras na matriz extracelular e mudanças correspondentes na interação e adesão celular, que culmine com o remodelamento da área de cicatriz (GRINNELL, 1992).

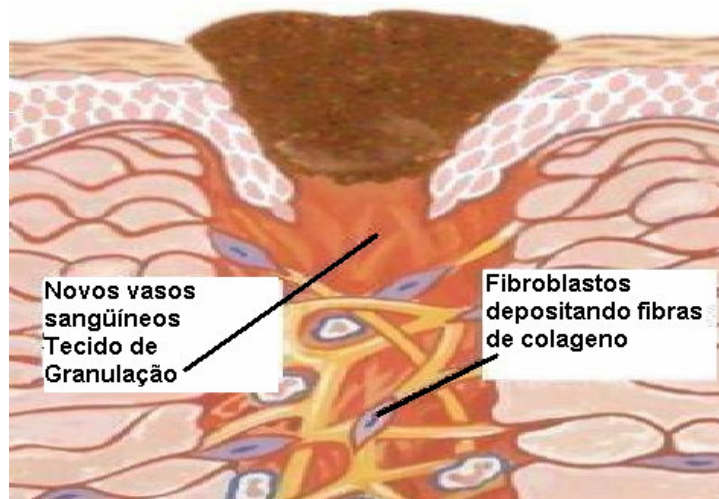


Figura 13 - Cicatrização cutânea

Diversos produtos naturais vêm sendo utilizados ao longo dos anos para tratar de problemas de ordem dermatológica, entre eles pode-se citar: camomila, calêndula, hipérico, óleo de copaíba, óleo de rosa mosqueta, mel, óleo de prímula, erva cidreira, confrei, arnica, entre outros (SCHULZ *et al.*, 2002).

No tratamento de feridas tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar a cicatrização da pele. Entre aproximadamente 300 plantas medicinais e produtos vegetais oficialmente avaliados pela Comissão E*, 47 são indicações

* Comissão E: comissão alemã similar ao FDA de americano

dermatológicas, sendo que 25 dessas plantas tem papel significativo na prática terapêutica (SCHULZ *et al.*, 2002).

Os diferentes compostos químicos (triterpenos, alcalóides, taninos, entre outros) presentes nestes produtos naturais normalmente influenciam em uma ou mais fases da cicatrização.

Nos últimos anos, tem-se dado muita atenção ao papel desempenhado pelas enzimas proteolíticas no processo de reparação dos tecidos danificados e seu efeito na retirada de tecidos necróticos, desvitalizados e infectados da lesão. Neste contexto, a papaína vem sendo estudada com resultados satisfatórios quando a reparação tecidual atua nas fases inicial e de fibroplasia em feridas (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993).

Chithra *et al.* (1998), obtiveram resultados favoráveis na cura de feridas em ratos diabéticos usando como ativo gel de Aloe vera L., sendo que este se mostrou estimulante da proliferação celular, síntese de colágeno e da contração da ferida.

As propriedades cicatrizantes da *Centella asiatica* (L.) Urb. foram estudadas por Shukla *et al.* (1999) concluindo-se que a asiaticosídeo promove angiogênese em ambos os modelos estudados, *in vitro* e *in vivo*, após a análise de parâmetros histológicos.

Espécies de *Echinacea* vêm sendo utilizadas popularmente como cicatrizantes e imunoestimulantes. Recentemente foi estudado a ação do equinacosídeo de *Echinacea pallida* Nutt., que apresenta uma atividade mais potente que as outras espécies, provavelmente, devido à atividade anti-hialuronidase (SPERONI *et al.*, 2002).

Pelas suas propriedades antioxidantes *Terminalia chebula* Retz. pode ser um potente candidato a agente de cicatrização de feridas, devido a influência positiva em várias fases do processo de cicatrização (SUGUNA *et al.*, 2002).

Um grande número de plantas medicinais contendo taninos tem sido usado por suas propriedades cicatrizantes e hemostáticas.

Hamamelis virginiana L. é recomendada pela Comissão E (KOMMISSION, 1990) com as seguintes indicações: “lesões cutâneas leves, processos inflamatórios locais da pele e das membranas mucosas, hemorróidas e problemas associados a veias varicosas”.

Em *Rhizophora mangle* L., planta especialmente rica em ácido clorogênico, o processo de cicatrização foi mais rápido em feridas tratadas com extrato aquoso quando comparado com mercúrio cromo, possivelmente devido ao efeito antioxidante, propriedade de quelar radicais livres, além de outros mecanismos envolvidos no processo curativo normal (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

No processo de reparo de feridas de pele queimadas, o ácido tânico coagula o complexo lipídeo-proteína, e sua ação adstringente acelera a formação de uma casca flexível que cobre a escara da queimadura (HUPKENS *et al.*, 1995).

Há muito, o barbatimão vem sendo empregado pela população nativa para o tratamento de feridas na pele, devido sua casca ser rica em taninos (CORRÊA, 1926).

Favoretto *et al.* (1985), demonstraram a ação cicatrizante do extrato aquoso de cascas de barbatimão [*Stryphnodendron obovatum* Benth.], em úlceras de contenção em ratos, evidenciando a diminuição efetiva das ulcerações no grupo tratado quando comparado ao grupo controle.

Panizza *et al.* (1988), testaram o extrato aquoso de *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Mart., a 1%, sobre feridas de 0,8 mm de diâmetro no dorso dos ratos. Observaram através de análise histológica que o grupo de animais tratados com o extrato apresentaram uma cicatrização mais rápida em relação ao grupo controle.

Neves *et al.* (1992a), comparando extratos aquosos de *Stryphnodendron barbatimao* Mart. e de *Hamamelis virginiana* L., demonstraram que o extrato de barbatimão foi mais eficaz do que o extrato de *H. virginiana*. Os autores observaram, ainda uma nítida ação antiinflamatória dos dois extratos e um aumento da estabilização das paredes das artérias (NEVES *et al.*, 1992b). Em estudo realizado por Eurides *et al.* (1995), com solução aquosa de barbatimão (*S. barbatimao* Mart.), as feridas tratadas dos camundongos, apresentaram tecido de granulação mais desenvolvido no 7º e 21º dias do pós-operatório, em relação ao grupo controle, sem a presença de exsudato purulento e com possível atividade bactericida ou bacteriostática.

Jorge-Neto *et al.* (1996), descreveram a melhor eficácia das associações de tintura de barbatimão e calêndula em relação à calêndula isoladamente, no processo de cicatrização de úlcera varicosa.

Vieira *et al.* (1998), demonstraram, através do modelo de promoção de feridas, com 10 mm de diâmetro no dorso dos ratos, que a pomada de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] a 1%, obtida a partir de um extrato acetona:água, quando comparada à pomada de Nebacetin®, acelerou o processo de cicatrização.

Palermo *et al.* (2002), demonstraram que o tratamento de feridas de 10 mm de diâmetro em ratos com a pomada da fração acêtonica de *Stryphnodendron*

adstringens (Mart.) Coville, a 1%, estimulou a proliferação celular epitelial em feridas de ratos tratadas durante 4 e 7 dias, sugerindo uma boa atividade cicatrizante.

2.3.1.3 Atividade antioxidante

O uso terapêutico de plantas parece ser tão antigo quanto à própria espécie humana. Entretanto, o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente novo, especialmente nas duas últimas décadas, observando-se um enorme crescimento das investigações científicas neste particular, envolvendo desde o efeito de extratos brutos, de frações ou componentes isolados e/ou modificados (WILHELM FILHO *et al.*, 2001), especialmente após a introdução do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* L. na terapêutica como antioxidante (MOREIRA *et al.*, 2002).

Recentemente, tem-se evidenciado o considerável interesse sobre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes na prevenção e melhora de várias doenças degenerativas. O estado celular pró-oxidante ocorre quando se tem um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (fig. 14), sendo que estes estão envolvidos na fisiopatologia de grande número de doenças, inclusive, câncer, inflamação, aterosclerose, esclerose múltipla entre outras (quadro 1). O restabelecimento do balanço oxidativo e a remoção dessas espécies reativas de oxigênio é controlado endogenamente pela enzima peróxido desmutase ou pela administração de antioxidantes (DE BRUYNE *et al.*, 1999).

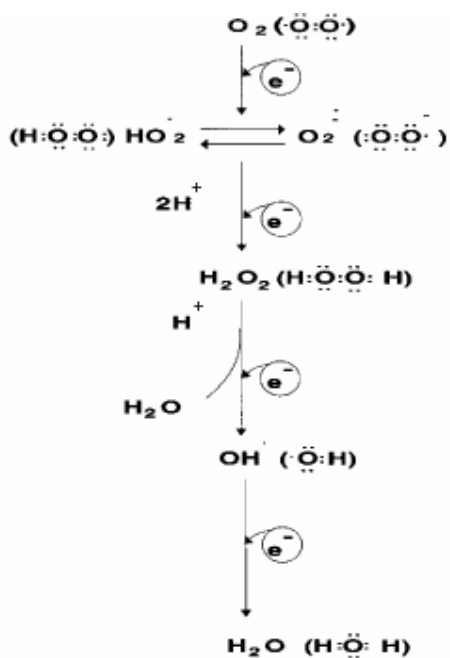


Figura 14 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O)

De acordo com Pietta (2000) e Soares (2002), os mecanismos de ação antioxidantes incluem: supressão de espécies reativas de oxigênio, formando outros substratos pela inibição das enzimas envolvidas ou quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres; inibição da formação de radicais livres que possibilitem a etapa de iniciação; eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia e, aumento das defesas antioxidantes.

Quadro 1 — Eventos relacionados a espécies reativas de O ₂ *
Envelhecimento
Mutações
Câncer
Aterosclerose
Lesão por toxicidade de O ₂ em pulmão e retina
Lesão pós-isquemia e reperfusão de cérebro, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões
Lesão pós-concussão cerebral e pós-hipertensão intracraniana
Síndrome demencial
Disfunção renal pós-transplante
Artrite reumatóide
Hemocromatose transfusional
Doenças auto-imunes
Toxicidade decorrentes da exposição a xenobióticos
*Adaptado de Halliwell B e Gutteridge JMC; Halliwell B; Cohen MV.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas, indubitavelmente, os compostos fenólicos constituem o grupo mais representativo, sendo constituídos por flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas entre outros (WITHELM FILHO *et al.*, 2001), suas propriedades antioxidantes dependem da estrutura e dos substituintes nos anéis heterocíclico e B (PIETTA, 2000).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo eficazes, portanto, para prevenir a oxidação lipídica (SOARES, 2002).

Hussein *et al.* (1987), demonstraram que os flavonóides inibem a lipoperoxidação *in vitro* no estágio de propagação, atuando como bloqueadores das reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxil (.OH). De Bruyne *et al.* (1999) em sua revisão sobre taninos, fazem referência ao trabalho de Uchida *et al.* (1987), que reportaram as propriedades antioxidantes de taninos condensados, frente a DPPH-radical, superóxido anion e o radical hidroxil.

Muitas espécies vegetais e algas marinhas, que apresentam conteúdo químico rico em compostos fenólicos, foram avaliados, frente a diferentes métodos de análise antioxidantes, teste do DPPH, quimiluminescência, entre outros.

O estudo realizado por Desmarchelier *et al.* (1998) com *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., demonstrou efetiva atividade antioxidante e anti-radicaís livres, nos extratos aquoso e metanólico. A microalga *Spirulina maxima*, muito usada na alimentação como suplemento alimentar por ser constituída por proteínas, minerais, vitaminas e compostos fenólicos, apresentou atividade antioxidante, e por ter uma boa disponibilidade farmacocinética, poderia ser usada para prevenir a oxidação celular (MIRANDA *et al.*, 1998).

Moreira *et al.* (2002), demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* das frações isoladas de *Pseudopiptadenia contorta* Rauschert, sendo que as substâncias isoladas, ácido gálico, epicatequina e os galatos de catequina apresentaram resultados bastante significativos. O efeito antioxidante das proantocianidinas presentes no extrato de cacau (*Theobroma cacao* L.), foi avaliado

por Osakabe *et al.* (2000) e Hatano *et al.* (2002), frente a peroxidação lipídica, obtendo-se resultados efetivos. O mesmo foi proposto por Negro *et al.* (2003) em seu trabalho com proantocianidinas isoladas do vinho.

Masaki *et al.* (1994), reportaram a potente atividade de hamamelitaninos, e ácido gálico frente a ensaios químicos e biológicos para determinação da atividade antioxidante. A avaliação de epicatequina, administrada oralmente em ratos, mostrou que a mesma possui capacidade em promover um aumento das defesas antioxidantes no plasma, dos animais tratados, quando comparados ao controle.

2.3.2 Toxicologia

As propriedades tóxicas do barbatimão tem sido relatadas popularmente por criadores de gado de diversas regiões do Brasil. Estes relatam, que durante a seca, época justamente que ocorre a florada do barbatimão, o gado se alimenta das favas da árvore. Relatos folclóricos indicam perda de peso, aborto e debilidade nos animais após a ingestão.

Pereira *et al.* (1989a), demonstraram a toxicidade das favas de *Stryphnodendron barbatimao* Mart. em bovinos, evidenciando sinais clínicos como anorexia progressiva, salivação abundante, desidratação, fezes fétidas, incoordenação, anemia e lesões de fotosensibilização em alguns animais. Posteriormente, Pereira *et al.* (1989b), relataram os aspectos anatomo-histológicos de intoxicação por *S. barbatimao* Mart., reportando alterações macro e microscópicas, desnutrição, desidratação e edema, atribuídos aos taninos presentes na planta. As alterações bioquímicas verificadas na urina foram, mudança de pH, diminuição da densidade, leucopenia, linfopenia e aumento de valores de TGO, bilirrubina, fósforo, uréia e dextrose, com diminuição de cálcio sérico (PEREIRA *et al.*, 1989c).

A toxicidade das favas de *S. coriaceum* Benth., foi demonstrada por Tokarnia *et al.* (1991), relatando intoxicação severa em bovinos, que ocasiona congestão da mucosa oral, sialorréia, regurgitamento do conteúdo ruminal, broncopneumonia por aspiração, andar cambaleante, diarreia, perda de pelos e fotosensibilização. Posteriormente, Tokarnia *et al.* (1998), reportaram a ação abortiva em vacas pela ingestão de favas de *S. obovatum* Benth., confirmando os relatos populares. Os mesmos autores demonstraram ainda que a ingestão de favas de *S. obovatum* Benth.,

é responsável pela irritação no trato digestivo dos bovinos, que leva a debilidade geral (BRITO *et al.*, 2001).

Burger *et al.* (1999), reportaram o efeito abortivo e/ou de infertilidade de vagens e sementes de *S. 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 do 1º ao 7º dia de gestação. No 21º dia da gestação observaram que houve uma redução do peso do útero e o número de fetos vivos das ratas tratadas com extrato das sementes em relação ao grupo controle. A dose letal mediana (DL₅₀) para as sementes foi de 4992,8 mg/kg e para vagens foi de 5000 mg/kg.

O barbatimão tem sido reportado como tóxico para abelhas, Carvalho (1998), demonstrou ser o pólen de *S. polyphyllum* Mart., o agente causador da *cria ensacada* brasileira. O autor verificou que quantidades de pólen, da ordem de 0,04%, podem ocasionar a morte de 50% das larvas das abelhas, enquanto que na concentração de 0,07% é letal para 90%.

Guerra *et al.* (1980a), demonstraram que a administração de sementes de barbatimão (*S. polyphyllum* Mart.), no período compreendido entre o 5º e 8º dias de gestação da rata, ocasionou mortalidade fetal da ordem de 90 a 100%. Estes mesmos autores reportaram que a administração do extrato alcoólico das sementes da planta, produziu efeito zigotóxico nas ratas tratadas no 5º e 6º dia de gestação (GUERRA *et al.*, 1980b).

Guerra *et al.* (1982), administraram em ratas grávidas no 10º e 11º dia de gestação, sementes e vagens de *S. polyphyllum* Mart., e verificaram que a administração de sementes ocasionou 91% de reabsorção, demonstrando, ainda que no rato adulto houve diminuição do peso da hipófise e da vesícula seminal nos animais tratados com as sementes de *S. polyphyllum* Mart.

A excreção renal de água, sódio e potássio foi avaliada em animais submetidos a sobrecarga aquosa de *S. obovatum* Benth., por via gástrica. Em relação ao volume urinário, a casca seca provocou intensa antidiurese enquanto a semente seca provocou diurese. A excreção renal de eletrólitos não foi alterada, enquanto a solução aquosa de caule seco provocou intensa diarreia nos animais (NETO *et al.*, 1988).

Contrera *et al.* (1981), demonstraram que o extrato aquoso de *S. obovatum* Benth., ocasiona hipotrofia generalizada nos músculos da língua, com diminuição do volume nuclear e menor área dos cortes transversais das fibras musculares. Estes mesmos autores demonstraram os efeitos de *S. obovatum* Benth. sobre a glândula submandibular de ratos, tendo sido observadas as seguintes alterações: ácinos de menor tamanho com células mais baixas, citoplasma mais acidófilo, com várias figuras de mitose normais e com núcleos das células acinares e dos ductos estriados mais volumosos e de cromatina mais densa (CONTRERA *et al.*, 1982).

O extrato metanólico das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville foi avaliado sobre o ciclo estral de ratas por Oliveira *et al.* (2002). Os autores observaram um efeito desregulador do ciclo estral das ratas que receberam doses de 200, 400 e 800 mg/kg por via oral.

Rebecca *et al.* (2002), estudaram a toxicidade aguda do extrato bruto de *S. adstringens* (Mart.) Coville, após administração oral, em camundongos. A DL₅₀ encontrada foi de 2699 mg/kg. A administração crônica de extratos 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 do extrato. O efeito tóxico observado pode ser devido a sua ação inibitória no metabolismo energético hepático. Recentemente, Rebecca *et al.* (2003), estudaram os efeitos do extrato bruto de *S. adstringens* (Mart.)

Coville no metabolismo de energia hepático de ratos. Os autores observaram que o extrato 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 e 3) inibição do complexo ATP-sintase.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Objetivou-se com este trabalho fazer uma abordagem etnofarmacológica, de extratos, frações semipurificadas e substâncias puras das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., considerando-se a importância de se traçar um perfil químico e biológico, estabelecendo critérios de identificação para a espécie.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar aspectos anatômicos e morfológicos das cascas;
- Caracterizar a matéria-prima vegetal, estabelecendo parâmetros para o controle de qualidade segundo a farmacopéia a partir das cascas;
- Analisar o conteúdo químico de extratos das cascas da espécie vegetal;
- Estabelecer perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência de extrato semipurificado e subfrações;
- Propor métodos de análise quantitativa dos extratos semipurificados e subfrações;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos, frações e substâncias purificadas;
- Avaliar a ação cicatrizante do extrato bruto (FAA) e fração acetato de etila (FAE);
- Avaliar as propriedades anti-radicalares de extratos, frações e substâncias purificadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima vegetal

As cascas do vegetal *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram coletadas em duas épocas do ano, maio e dezembro de 2002, na cidade de Abadia de Goiás estado de Goiás (16°45'32,4" S; 49°25'06,5" W; 860 m de altitude), Brasil. Após o processo de herborização, preparou-se a exsicata que se encontra depositada como documento taxonômico no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUM 9139. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui. As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e deixadas em estufa de ar circulante a 40 °C por 24 h, após foram deixadas para secagem à temperatura ambiente (24 ± 3 °C) em local arejado e com ausência de luz.

4.2 Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p. a.), e de marca Merck®, Sigma®, Carlo Herba® ou Mallinckrodt®. Foi usado etanol comercial 93,6° GL Cocamar.

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Ácido pícrico
- Ágar Mueller-Hinton
- Álcool etílico

- Anidrido acético
- Caldo Mueller-Hinton
- Caldo Sabouraud
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado Isotec®
- Éter etílico
- Formol
- Hipoclorito de sódio
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec®
- n-propanol
- Penicilina
- Piridina
- Pó de pele cromado
- Reagente Folin-Ciocalteu 2N
- Resina de PERMOUNT®
- Safra-blau (safranina/azul de astra; 1:90; V/V)
- Solução de Bouin
- Solução de carbonato de cálcio R
- Solução de cloreto de alumínio
- Solução de cloreto de trifinil tetrazólio 2%
- Solução de cloreto férrico a 1 % em metanol
- Solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) 0,2 % em metanol
- Solução aquosa de eosina 3,5 %
- Solução de faa – etanol/água destilada/formol/acido acético (45:45:5:5)

- Solução de fast-green – fast green/etanol/xilol (0,1:10:10; V/V)
- Solução aquosa de hematoxilina 0,5 %
- Solução de óleo de cravo – óleo de cravo/etanol/xilol (2:1:1; V/V)
- Solução aquosa de urotropina 0,5 %
- Solução metanólica de ácido acético R
- Soluções tampão pH 6,86 e 4,00 – Digimed
- Soro fisiológico
- Substâncias referências: quercetina, rutina, galocatequina*, ácido gálico

e astilbina

- Tolueno
- Tetraciclina
- Vancomicina
- Vincristina – Oncovin® (Lilly), solução injetável
- Xilol

4.3 Equipamentos

- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear Varian

Gemini 300BB e/ou Mercury Plus 300BB

- Autoclave
- Balança analítica AND HR-200
- Balança Gehaka BG-2000
- Bomba de vácuo FMIQ2
- Câmara de fluxo laminar
- Câmara de UV 254 nm

* Substância cedida pelo Dr. Frank Petereit – Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica – Münster, Alemanha

- Câmera fotográfica digital Sony Mavika modelo FD71
- Coletor de frações ISCO modelo 328
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200
- Cromatógrafo de contra corrente líquido de alta velocidade P.C. Inc., equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm; capacidade de 285 ml – Sample injetor P.C. Inc., com loop de 16 ml
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Gilson mod. 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT; alça de 20 µl; detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156; Degasser 184; Forno 181
- Espectrofotômetro CELM E-215D
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quatro LCZ MICROMASS (Manchester, UK)
- Estufa bacteriológica
- Evaporador rotatório Büchi R - 153 e R – 3000
- Forno de microondas
- Liofilizador Christ Alpha 1-2
- Microscópio óptico Nikkon modelo Alphaphot-2 YS2
- Microscópio óptico Olympus BX40
- Micrótomo Leitz-1512
- Moinho de Facas Tecnal Marconi modelo TE 048
- pH metro Digimed
- Tamisador vibratório -Produtest
- Ultra-turrax UTC 115KT
- Ultra-som Unique-USC 1540, 25 KHz

4.3.1 Outros Materiais

- Coluna: LiChrospher® (250 x 4 mm) - 100 RP-18, 5 µm (Merck)
- Coluna: Lichrocart® (250 x 4 mm), Lichrospher® 100 CN, 5 µm (Merck)

4.4 Descrição anatômica

4.4.1 Corte a mão livre

As cascas foram mantidas em glicerina e solução faa por 24 h. Os cortes anatômicos foram feitos com lâminas de aço inoxidável. Realizaram-se cortes transversais e longitudinais, utilizando-se pedaços de isopor como suporte. Os cortes foram recolhidos em vidro de relógio contendo água e, após seleção dos melhores, colocou-se em solução de hipoclorito de sódio até total clarificação (OLIVEIRA; AKISUE, 1989). Após, foram novamente lavados em água e procedeu-se a reação com safranina e azul de astra (90:1) durante 2 min (GERLACH, 1969). Utilizou-se, também, solução de cloreto férrico a 2% em metanol para detectar a presença de substâncias fenólicas. Os aspectos anatômicos do vegetal foram observados, descritos e ilustrados com auxílio de microscópio óptico.

4.4.2 Inclusão do material vegetal em parafina

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

- | | |
|-----------------|--------|
| - Etanol 50 °GL | 30 min |
| - Etanol 70 °GL | 30 min |
| - Etanol 95 °GL | 30 min |

- Etanol:*t*-butanol (1:1) 15 min
- *t*-butanol 8 h (58 °C)

Em seguida procedeu-se a inclusão do material em parafina por 12 h em estufa a 58 °C, sendo 4 h de imersão em *t*-butanol:parafina (1:1, V/V) e 8 h em parafina. Os blocos foram preparados em pequenas caixas de papel com volume aproximado de 1 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 1, xilol 2 e xilol 3 por 10 min em cada um. A etapa de coloração dos cortes consistiu na seqüência de álcool 50 °GL por 5 min e safranina de 20 a 30 min. O excesso de safranina foi retirado com água destilada, álcool 70 °GL, álcool 90 °GL e álcool absoluto durante 5 min cada. Aplicou-se solução de Fast-green pingando-se uma gota em cada lâmina e deixando aproximadamente 3 min. Lavou-se com uma ou duas gotas de solução de óleo de cravo (óleo de cravo 20 ml; etanol 10 ml; xilol 10 ml) para ativação da coloração.

Continuou-se com a preparação de lâminas permanentes com a seguinte bateria: xilol 1, xilol 2 e xilol 3 por 10 min em cada. Em seguida montou-se a lamínula sobre a lâmina com resina Permunt® (MONTENEGRO, 1985).

4.5 Caracterização da matéria-prima para controle de qualidade da espécie vegetal

4.5.1 Perda por dessecação

Dois gramas de amostra do pó das cascas, exatamente pesados, de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., foram colocadas em pesa-filtros previamente tarados, sendo dessecado em estufa a 105 °C, até peso constante. Os valores representam a média de 3 determinações e são expressos em porcentagem (%; p/p) (Farmacopéia Brasileira, 1988).

4.5.2 Análise granulométrica por tamisação

Cem gramas da droga moída foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises previamente pesados com abertura de malhas correspondentes a 0,840, 0,420, 0,250, 0,177, 0,149 mm, utilizando tamisador vibratório, em vibração 6, durante 20 min. Após, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor, sendo pesadas e calculadas as porcentagens das frações de passagem e de retenção. Os valores representam a média de 3 determinações.

4.5.3 Determinação da umidade em balança com Infravermelho

Foram pesados exatamente cerca de 5 g de cascas rasuradas do *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., e submetidos a aquecimento em balança de infravermelho, até que seu peso não variasse mais que 25%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

4.5.4 Determinação de perda por secagem em temperatura ambiente

Foram pesados 100 g das cascas frescas de barbatimão e expostos à temperatura ambiente, protegido da luz, até peso constante. As amostras foram então pesadas e obtidas por diferença, a perda de água e de substâncias voláteis

durante o processo de secagem. Os valores representam a média de 3 determinações e são expressos em porcentagem (%; p/p).

4.5.5 Teor de extrativos

Aqueceu-se 1,0 grama de amostra, pesada analiticamente, com 100 ml de água, sob refluxo por 10 min. Após o resfriamento, completou-se o volume em balão de 100 ml e filtrou-se. Desprezaram-se os primeiros 20 ml do filtrado. Pesou-se em pesa-filtro previamente tarado exatamente 20 g do extrato, evaporou-se em banho-maria fervente por completo. Colocou-se em estufa a 105 °C por 2 h e deixou em dessecador por 25 min para esfriar e pesou-se. Para cada amostra foram realizadas 3 determinações (Bundesvereinigung, 1979).

O teor de extrativos foi calculado segundo o formula:

$$TE = \frac{g \cdot 500}{p} (\%; \text{ m/m}).$$

Onde:

g = massa do resíduo seco em g;

p = massa da droga em g;

500 = fator de diluição.

4.5.6 Ensaio químico clássico para taninos

Para os ensaios químicos de taninos utilizam-se extrato aquoso, preparado com 5 g do pó das casca do *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. com 100 ml de água destilada, sob refluxo por 15 min. Após filtração para tubos de ensaio, procederam-se os teste abaixo descritos.

4.5.6.1 Reação com gelatina

A 5 ml do extrato acrescentaram-se 2 gotas de ácido clorídrico diluído e algumas gotas de solução de gelatina a 2,5%.

4.5.6.2 Reação com sais de ferro

A 5 ml do extrato acrescentaram-se algumas gotas da solução de cloreto férrico a 1% em metanol.

4.5.6.3 Reação com acetato de chumbo

A 5 ml do extrato acrescentaram-se 5 ml da solução de ácido acético 10% e 5 ml da solução de acetato de chumbo a 10%.

4.5.6.4 Reação com cianeto de potássio

A 2 ml do extrato foi acrescido 1 ml de solução de cianeto de potássio 5%.

4.5.6.5 Reação com vanilina clorídrica

A 2 ml do extrato adicionaram-se 0,5 ml de solução de vanilina 1% e 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado.

4.5.6.6 Reação de Stiasny

Submeteu-se a refluxo por 30 min, 50 ml do extrato e 15 ml do reativo de Stiasny.*

* Reativo de Stiasny: 5 ml de HCl conc. + 10 ml de formol sob refluxo por 20 min.

4.5.7 Determinação do teor de taninos totais

Foram exatamente pesados, 0,750 g da droga vegetal, que foram transferidos para um erlenmeyer com 150 ml de água e deixado durante 30 min em banho-maria a uma temperatura de 80-90°C. Após, resfriou-se o erlenmeyer em água corrente sendo transferido, seu conteúdo, para um balão volumétrico de 250 ml, lavando-se e completando-se o volume com água. Tomaram-se cerca de 80 ml do extrato, que foi filtrado através de papel filtro, desprezando-se os primeiros 50 ml. O filtrado foi 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 desta solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de folin-ciocalteau) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para 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. Cinco mililitros do filtrado foram diluídos com água para 25 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteau) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta (GLASL, 1983).

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

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

$$TT = PT - PNA$$

Onde:

PT	=	Polifenóis totais (%);
PNA	=	Polifenóis não adsorventes (%);
Abs	=	Absorvância medida;
m	=	Massa da droga em g;
TT	=	Teor de taninos totais (%).

4.5.8 Determinação do teor de flavonóides totais

Colocou-se em balão de fundo redondo de 100 ml, 0,400 g de droga moída, exatamente pesados, acrescidos de 1 ml de solução de urotropina a 0,5%, 20 ml de acetona R e 2 ml de ácido clorídrico R, aquecendo sobre manta de aquecimento, mantendo sob refluxo, por 30 min. Filtrou-se através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100 ml. Lavou-se o resíduo da droga e o algodão, em balão de fundo redondo, com duas porções de acetona de 20 ml, sob refluxo, por 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com acetona. Em funil de separação, foram adicionados, 20 ml de solução acetônica, 20 ml de água destilada e extraídos com 15 ml de acetato de etila R, repetindo-se por três vezes, com porções de 10 ml.

As frações acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50 ml de água destilada e colocadas em balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com acetato de etila (solução-mãe- SM).

Adicionou-se 1 ml do reagente cloreto de alumínio* a 10 ml da SM, diluindo-se a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R**, denominada de solução amostra SA. Ao mesmo tempo, 10 ml da SM foram diluídos a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R. Após 30 min mediu-se a absorvância da SA a 425 nm, em cubeta com 1,0 cm de espessura contra solução comparativa (SC) (Deutsches, 1994).

O cálculo do teor baseia-se na absorvância específica da quercetina,

$E_{1cm}^{1\%} = 500$, segundo a formula:

$$Q = \frac{Abs.62500}{500.e.(100 - t)}$$

Onde:

Abs.= Absorvância medida;

e = Massa da droga em g ;

t = Perda por dessecação (%; p/p);

O resultado é fornecido em percentual (m/m) de flavonóides calculados como quercetina (C₁₅H₁₀O₇).

4.6 Preparação de extratos

* Reagente cloreto de alumínio: 1 g de cloreto de alumínio em balão volumétrico de 50 ml completar com solução metanólica de ácido acético a 98% (Böhme; Hartke, 1981).

** Solução metanólica de ácido acético R: em balão volumétrico de 100 ml adicionar 5 ml de ácido acético 98% e completar com metanol (Böhme; Hartke, 1981).

4.6.1 Extrato total

As cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. O material vegetal ficou em maceração por 30 min. Preparou-se o extrato bruto por turbólise em Ultra-turrax®, por 30 min, com intervalos de 10 min, para que a temperatura não excedesse 40 °C. A proporção utilizada foi de 1:10 (m/V), com mistura acetona-água (7:3; V/V) (MELLO *et al.*, 1996a). O extrato foi filtrado em pano filtro de nylon com diâmetro de poros de 10 µm e algodão, com auxílio de bomba de vácuo. Após, foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com temperatura média de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico, congelado e liofilizado, obtendo-se, assim o extrato total FAA.

4.6.2 Obtenção da fração acetato de etila (FAE)

O extrato total FAA (50 g) foi ressuspendido com água destilada (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 10 vezes) (MELLO *et al.*, 1996). As fases aquosa restante (FA) e acetato de etila (FAE) foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

4.7 Métodos cromatográficos

Para a obtenção de frações semipurificas e purificadas, foram empregados diversos métodos cromatográficos, que possibilitaram o isolamento de substâncias químicas presentes na FAE.

4.7.1 Cromatografia em coluna (CC)

4.7.1.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila

A cromatografia em coluna foi usada para fracionar a fração acetato de etila (FAE) (seção 4.6.2), sendo empregada coluna de vidro (h: 750 mm, ϕ 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada com ácido acético 2%, foi estabilizada com etanol 20%. Aplicaram-se 10 g da fração FAE, que foi solubilizada em etanol 20%, no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se o seguinte esquema de eluentes em proporção volumétrica:

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da fração acetato de etila

Fase móvel	Volume (ml)
Etanol 20 %	1605
Etanol 30 %	1650
Etanol 40 %	1640
Etanol 50 %	4950
Etanol 70 %	4000
Etanol 93,6 ° GL	2150
Metanol/água (1:1)	2100
Acetona:água (7:3)	2000

Recolheram-se 10 ml de cada fração em tubo de ensaio com fluxo de 1 ml/min. O monitoramento foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD) (seção 4.7.2). Obtiveram-se 25 subfrações que foram reunidas por

semelhança, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

4.7.1.2 Cromatografia em coluna das subfrações

Algumas das 25 frações obtidas a partir da fração acetato foram submetidas à sucessivas cromatografias em colunas (CC) (h: 320 mm, ϕ 30 mm; h: 400 mm, ϕ 25 mm; h: 600 mm, ϕ 15 mm) contendo Sephadex® LH-20, com fluxo de 1,0 ml/min. Empregou-se a seguinte seqüência de fase móvel: Etanol 10%; Etanol 20%; Etanol 30%, Etanol 40% e Etanol 50%.

O monitoramento dos tubos foi feito através de CCD seção (4.7.2).

4.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD das frações obtidas em cromatografia em coluna (CC) foi realizada utilizando-se como fase estacionária, folhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), a fase móvel foi acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5; V/V). Após o desenvolvimento, as placas foram observadas sob luz UV e depois reveladas com solução de cloreto férrico a 2% em metanol.

4.7.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As substâncias isoladas foram inicialmente derivatizadas (seção 4.8), sendo em seguida aplicadas na forma de barra em gel de sílica PF₂₅₄ com gesso (Merck®) sobre placas de vidro (20 x 20 cm), na espessura de 0,75 mm. A fase móvel empregada foi tolueno/acetona (7:3; V/V).

As bandas correspondentes às substâncias foram demarcadas sob luz UV, calculando-se o valor do R_f para cada substância. Em seguida raspou-se a área e

solubilizou-se em clorofórmio. Deixou-se em agitador magnético cerca de 10 min. Filtrou-se em filtro de vidro sinterizado G4, eliminando-se o clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A amostra foi deixada na capela à temperatura ambiente para completa eliminação do solvente, sendo posteriormente congelada e liofilizada.

4.7.4 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)

Utilizou-se cromatógrafo de contra corrente de alta velocidade (pag. 71), com rotação média de 870 rpm e com fluxo de 1 ml/min. O sistema eluente empregado foi preparado em funil de separação com acetato de etila/*n*-propanol/água (140:8:80; V/V). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Cada fração de 3 ml foi acompanhada por CCD (seção 4.7.2) e os tubos reunidos, por semelhança.

4.7.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.7.5.1 Condições cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT, pré-coluna (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 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 velocidade de fluxo de 0,5 ml/min. Todos os solventes utilizados possuíam grau HPLC.

Tabela 2 - Gradiente da fase móvel utilizado na CLAE

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

4.7.5.2 Análise quantitativa

4.7.5.2.1 Preparação da solução padrão de galocatequina

Para a obtenção da curva padrão foi preparada solução de galocatequina nas concentrações de 1,00; 0,50; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/ml 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.

4.7.5.2.2 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.

4.7.5.2.3 Análise de regressão linear

Empregou-se como padrão externo uma solução metanólica de galocatequina, com concentração de 62,5 µg/ml. As soluções foram filtradas por membrana de politetraflouretileno (Millipore, tipo FHLP01300) de porosidade 0,22 µm e aplicadas ao injetor cromatográfico 20 µl com auxílio de microseringa com capacidade de 25 µl. A área do pico referente ao pico da 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 à média de cinco injeções.

4.7.5.2.4 Repetibilidade para galocatequina

A solução padrão de galocatequina (0,0625 mg/ml), foi injetada 10 vezes isoladamente, obtendo-se o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%).

4.7.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – semi-preparativa

Foi utilizado cromatógrafo líquido Gilson modelo 321, com injetor manual Rheodyne e software UniPoint LCNT. Coluna: LichroCart® (250 x 4mm) preenchidas com LiChrospher® 100 CN com tamanho de partícula de 5 µm e alça de 20 µl. Detector de comprimento de onda variável Gilson UV/VIS 156 e Degasser 184. A temperatura do forno para coluna foi de 22 °C e os cromatogramas foram observados no comprimento de onda de 278 nm.

O sistema eluente utilizado foi isocrático binário, com velocidade de fluxo de 1,0 ml/min, entre acetato de etila e n-hexano (45:55V/V) (PIRETTI *et al.*, 1990).

As amostras foram coletadas manualmente.

4.8 Derivatização das substâncias isoladas

Para quantidades de até 100 mg de substância, adicionaram-se 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml. Deixou-se em repouso por 24 h. Após, colocou-se gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. Filtrou-se sob pressão reduzida através de funil de vidro sinterizado G3 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. Solubilizou-se a substância acetilada em clorofórmio ou

acetona e fez-se retirada do solvente em evaporador rotatório de forma sucessiva até total eliminação da piridina. Transferiu-se para um frasco e colocou-se na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada.

4.9 Análise estrutural das substâncias isoladas

Foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H , ^{13}C), 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HETCOR e HETCOR-LR), empregando-se solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3) e espectrometria de massas (EM). Os espectros das substâncias foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá e foram analisados e comparados com dados da literatura. Os espectros de massas foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha.

4.10 Hidrólise de dímeros

4.10.1 Unidade superior

Colocou-se 1 mg da substância acetilada em 2 ml de solução de HCl 5% em etanol, em balão de fundo afunilado de 25 ml. Deixou em refluxo por 60 min, ou até a solução tornar-se claramente vermelha. Realizou-se CCD em celulose com sistema eluente ácido fórmico/HCl/água (10:1:3; V/V). Foi utilizado cloridrato de pelargonidina como substância referência (MELLO *et al.*, 1996a).

4.10.2 Unidade inferior

Colocou-se 1 mg da substância livre (não acetilada) em 2 ml de solução de

HCl 0,1 N em etanol. Deixou-se em banho-maria a 60 °C por 15 min. Conseguiu-se a identificação através de CCD como descrito na seção 4.7.2 em comparação com substância referência (MELLO *et al.*, 1996a).

4.11 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, empregou-se a equação:

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

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

l = comprimento da cubeta do polarímetro em dm

c = concentração

4.12 Ensaio biológicos

4.12.1 Atividade antimicrobiana

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e os antibacterianos de referência foram penicilina, vancomicina para Gram positivos e tetraciclina para Gram negativos.

As leveduras utilizadas foram *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e o antifúngico de referência foi a nistatina.

4.12.1.1 Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando gotas de uma cultura de 24 h em um tubo contendo solução salina até a obtenção de uma turvação igual à encontrada na escala de Mc Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Posteriormente realizou-se uma diluição 1/10 em tubo eppendorf, obtendo-se uma suspensão de 10^7 UFC/ml.

4.12.1.2 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 encontrada em um tubo contendo suspensão salina até a obtenção 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.

4.12.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método da diluição em placas As frações e substâncias a serem testadas, foram solubilizadas em água (20 mg/ml) e diluídas (1:10) em caldo Mueller-Hinton (CMH), resultando numa solução 2 mg/ml (Solução Teste - ST). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µl de CMH em cada poço. Um volume de 100 µl de ST foi adicionado aos poços da primeira fileira. Fez-se então a diluição seriada homogeneizando e transferindo 100 µl da primeira fileira até a sétima, resultando nas respectivas concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625 µg/ml. A oitava fileira foi utilizada como controle, sem ST. Em seguida, a todos os poços, foram adicionados 5 µl da suspensão de microrganismos previamente padronizada, e a placa foi incubada a 37 °C durante 24 h. A inibição de crescimento foi

evidenciada pela ausência de crescimento microbiano no meio, utilizando solução aquosa de cloreto de trifinil tetrazólio a 2% (TTC) para facilitar a visualização. Determinou-se, então, a CIM, ou seja, a menor concentração da ST capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), as diluições que não resultaram em crescimento na CIM e duas diluições posteriores foram utilizadas semeando-as em ágar Mueller-Hinton (AMH), comprovando-se, assim, a atividade bactericida

O mesmo procedimento foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima das leveduras. Nesse caso, o 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 necessários para o crescimento da levedura. O tempo de incubação para a leitura foi de 48 h (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2000).

4.12.2 Atividade cicatrizante

4.12.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 180 a 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas por 3 dias antes do procedimento experimental, para habituação sob condições de temperatura 20 °C, ciclo de claro/escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. (Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá)

4.12.2.2 Procedimento experimental

Inicialmente os animais foram anestesiados com éter etílico, tendo em seguida, cada um deles seu dorso depilado, procedendo-se então à tricotomia da superfície dorsal. Com o auxílio de um delimitador metálico de 7 mm² de diâmetro, foram realizadas duas demarcações, uma do lado direito da linha mediana e a outra do lado esquerdo. Em seguida a pele (derme e epiderme), das áreas marcadas, foi cortada e removida. As feridas foram então, lavadas com solução salina e medidas com paquímetro. Os animais foram divididos em três grupos de cinco animais cada, sendo mantidos em gaiolas individuais para o tratamento.

Em todos os animais, a ferida do lado direito foi considerada controle e a do lado esquerdo tratada.

A partir de 24 h após a incisão, diariamente, as feridas controle foram tratadas com uma pomada de base inócua (base de Beeler), e as feridas do lado esquerdo foram tratadas com uma pomada contendo extrato de *Stryphnodendron polyphyllum* à 2,5%.

Os sacrifícios foram realizados 4, 7 e 10 dias após o início do tratamento. Duas horas antes do sacrifício dos animais, injetou-se intraperitonealmente 1,0 mg/kg de sulfato de vincristina (Oncovin Lilly®).

Para a coleta do material, os animais foram eutanasiados com éter etílico. As feridas foram medidas novamente, e a superfície dorsal da pele contendo as feridas foi removida e fixada em solução de Bouin por 24 h. Em seguida as feridas foram cortadas ao meio e cada metade foi processada para inclusão em parafina.

Foram feitos cortes semi-seriados de 4 µm a partir da margem cortada. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Uma vez obtidos os cortes histológicos, foi realizada a análise da proliferação celular epitelial.

4.12.2.3 Morfometria das feridas

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.

4.12.2.4 Análise da proliferação celular epitelial

Para análise da proliferação celular da epiderme, foram contadas as células epiteliais bloqueadas em metáfase, nas camadas basal e supra basal. As contagens foram feitas em 40 campos microscópicos, com objetiva de 40x, em microscópio Olympus BX40, utilizando-se uma régua de 250 μm acoplada à ocular de 10X. Os resultados foram expressos pelo número de metáfases/10mm.

Não foram consideradas as metáfases de eventuais folículos pilosos em formação, nas margens das feridas.

4.12.2.5 Análise estatística

Os resultados experimentais foram analisados pelo teste *t*.

4.12.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa, assim como de algumas subfrações F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 e substâncias isoladas galocatequina, epigalocatequina e fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina, foram avaliadas por CCD (seção 4.7.2), tendo como sistema eluente butanol: ácido acético: água (3:1:1; V/V). Nebulizou-se o cromatograma com solução de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) à 0,2% em metanol. Aplicou-se o equivalente a

100 μg dos extratos e subfrações e 10 μg das substâncias isoladas. Os padrões utilizados foram quercetina, ácido gálico, rutina e astilbina a 10 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise botânica

O cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira. Estendia-se originalmente por uma área de 2 milhões de km², abrangendo dez estados do Brasil Central. Hoje, restam apenas 20% desse total, sendo o ecossistema brasileiro que mais alterações sofreu com a ocupação humana (fig. 15).

Típico de regiões tropicais, o cerrado apresenta duas estações bem marcadas: inverno seco e verão chuvoso. Com solo de savana tropical, que abriga pequenas árvores de troncos torcidos e recurvados e de folhas grossas, esparsas em meio a uma vegetação rala e rasteira, misturando-se, às vezes, com campos limpos ou matas de árvores não muito altas que são o cerradão.

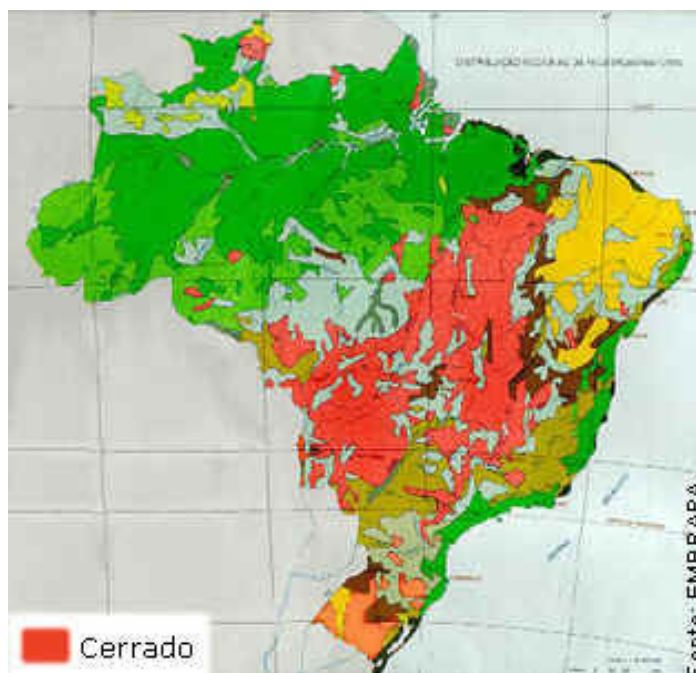


Figura 15 – Cerrado brasileiro

Devida a sua localização, o cerrado, compartilha espécimes com a maioria dos biomas brasileiros (floresta amazônica, caatinga e floresta atlântica), devido a este fato possui uma biodiversidade riquíssima, pode-se estimá-la como sendo constituída por cerca de 3000 espécies, sendo que 1000 delas do estrato arbóreo-arbustivo e 2000 do herbáceo subarbustivo. Contudo devido ao alto grau de endemismo, cerca de 45% de suas espécies são exclusivas. Como umas das famílias de maior concentração destaca-se a Leguminosae, entre as lenhosas, estando o gênero *Stryphnodendron* presente na flora característica do cerrado.

Segundo Occhioni (1990), o gênero *Stryphnodendron* compreende atualmente 32 taxa, sendo 29 espécies, 1 subespécie e 2 variedades, subdivididas em 2 seções, com distribuição geográfica e hábitos bastante característicos. Na divisão realizada por este autor, no taxa arbustivo característico de campos e cerrados do Brasil Central, Minas Gerais e São Paulo, foram descritos as espécies: *S. rotundifolium* Mart., *S. obovatum* Benth., *S. goyazense* Taub., *S. adstringens* (Mart.) Coville. A espécie *S. polyphyllum* Mart. foi descrita com ocorrência típica das matas da Serra da Mantiqueira, Estado do Rio de Janeiro.

Stryphnodendron polyphyllum Mart. é uma espécie vegetal presente no bioma cerrado central do Brasil, com distribuição observada *in loco* de Abadia de Goiás, Goiás a Araguari, Minas Gerais, Brasil.

Esta mudança fitogeográfica em relação à descrita na literatura foi observada em excursão botânica realizada para fins de coleta e produção de exsicatas no início deste trabalho, tendo sido percorrido um trajeto de aproximadamente 1000 km entre Maringá/PR e Abadia de Goiás/GO. Nesta excursão botânica foi possível ainda delimitar uma área geográfica com presença concomitante de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville convivendo na

mesma paisagem geográfica entre Abadia de Goiás (GO) e Araguari (MG). Porém a partir da cidade de Araguari/MG não foi mais verificada a presença de *S. polyphyllum* Mart. e sim da espécie *S. obovatum* Benth. em convivência com *S. adstringens* (Mart.) Coville. Em nenhum momento de nossa excursão foi observado a presença de *S. polyphyllum* Mart. e *S. obovatum* Benth. na mesma área geográfica.

Este tipo de correlação fitogeográfica das espécies, também foi observada por Silva *et al.* (2002) em seu levantamento fitossociológico e florístico de duas áreas de cerrado *sensu stricto* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás; onde foi registrado e avaliado as espécies arbóreas e arbustivas da área de cerrado, tendo sido relatado a presença de *S. polyphyllum* Mart. e *S. adstringens* (Mart.) Coville.

A fitogeografia das espécies de *Stryphnodendron* em áreas de cerrados, não está bem definida, mas em estudo realizado em Altinópolis/SP observou-se a presença de *S. obovatum* Benth. e *S. adstringens* Mart., sem a presença de nenhum exemplar de *S. polyphyllum* Mart., o mesmo verificado em áreas de cerrado no estado do Paraná*.

Talvez esta delimitação geográfica se deva ao tipo de solo da região do cerrado central (Goiás), onde foi presenciada a espécie *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. que compreende solo savânico tropical com alta concentração de ferro e alumínio e baixo índice de nutrientes. Além disso, grande parte das áreas de cerrado já não possui mais a cobertura vegetal original, sendo atualmente ocupada por paisagens antrópicas. Mitermeier *et al.* (1999), estimaram que 67% das áreas de cerrado são consideradas como “altamente modificadas” e apenas 20% encontram-se em seu estado original. Mesmo áreas ainda cobertas de paisagem natural, sofrem conseqüentemente os efeitos da poluição dos recursos hídricos, agrotóxicos,

* Comunicação pessoal Dr. João Carlos Palazzo de Mello

erosão, assoreamento, plantas e animais invasores, extrativismo vegetal e animal predatório, fatores estes decorrentes da industrialização desenfreada e da falta de consciência preservacionista (REATTO *et al.*, 1998).

Existe uma crescente procura no mercado interno e externo por plantas brasileiras, porém, o despreparo dos extrativistas não tem conseguido oferecer plantas com padrão na qualidade e regularidade que o mercado demanda. Os extrativistas conhecem as plantas apenas pelo seu nome popular e, como ele varia de região para região, muitas drogas chamadas pelo mesmo nome são obtidas a partir de espécies distintas de plantas. Assim, para assegurar a qualidade de um produto fitoterápico (erva rasurada, extrato fluido, tintura, entre outros) se faz mister a correta identificação botânica da espécie vegetal empregada como matéria-prima, bem como a distinção entre as espécies por parâmetros anatômicos e morfológicos.

A descrição macroscópica das cascas do gênero *Stryphnodendron*, não permite uma identificação entre as espécies, pois se apresentam recuadas no sentido transversal, com coloração parda esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na superfície interna, porém com a análise das folhas pode-se obter algumas informações para a distinção entre elas. Uma característica macroscópica das folhas de *S. polyphyllum* Mart. é a pubescência (presença de tricomas) permitindo diferenciá-la de *S. adstringens* (Mart.) Coville (folhas glabra em ambas as faces, membranosas e grande) e de *S. obovatum* Benth. (folha com face superior glabra, inferior com nervura central unilateralmente barbada na base e miúda). Quanto à coloração, devido a folhas de *S. polyphyllum* Mart. serem densamente pubescentes, a coloração se torna verde musgo em ambas as faces, diferentemente de *S. adstringens* (Mart.) Coville e *S. obovatum* Benth. que apresentam coloração díspar na face superior e inferior (tonalidade mais clara) (fig. 16).

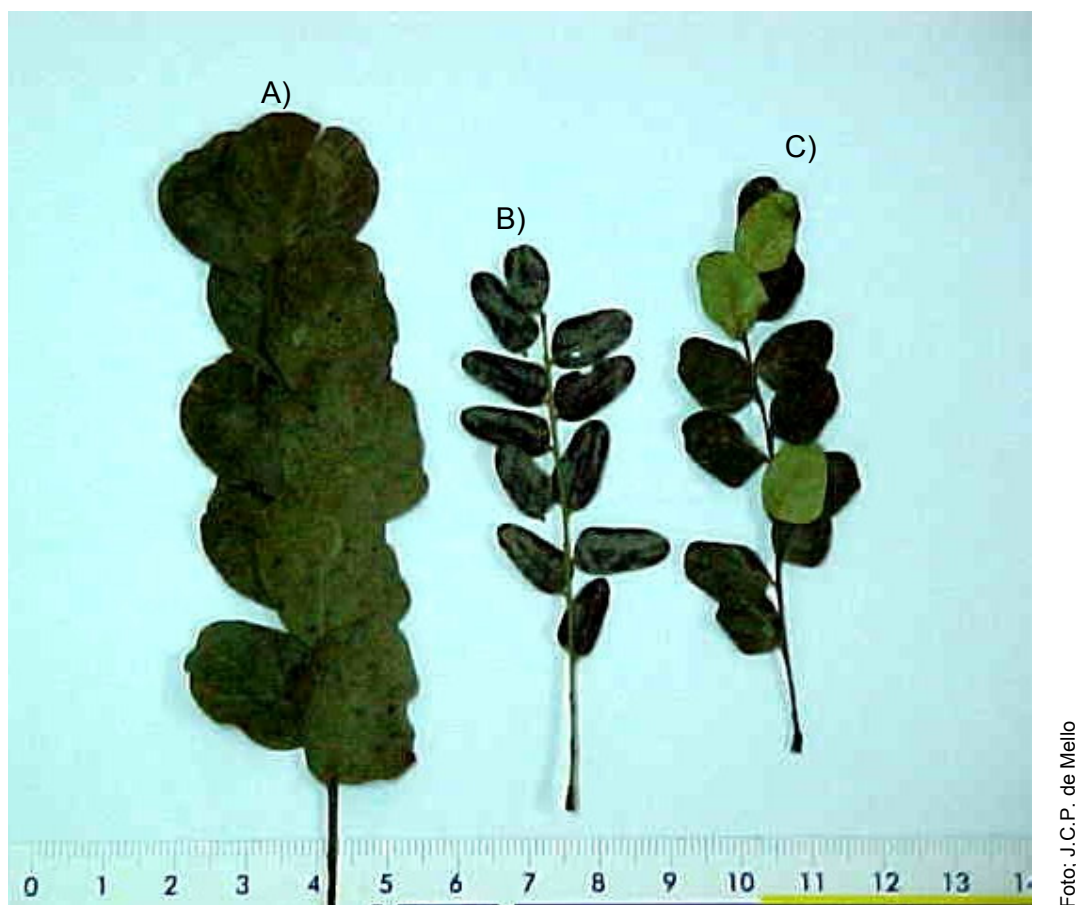


Foto: J.C.P. de Mello

Figura 16 – Aspectos macroscópicos das folhas: A) *S. adstringens* (Mart.) Coville; B) *S. polyphyllum* Mart.; C) *S. obovatum* Bent

A análise anatômica mostrou as principais estruturas das cascas do *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., que foram comparadas com as características de *S. adstringens* (Mart.) Coville, descritas em detalhes morfológicos pela primeira vez por Oliveira e Akisue (1989), sendo abordadas em mais detalhes recentemente por Toledo (2002).

Devido a grande dificuldade de se obter cortes viáveis para a análise, este processo envolveu técnicas de corte diferenciado tanto a mão livre como com auxílio de micrótomo. Dessa forma foi possível avaliar a composição química dos tecidos de acordo com a aplicação do corante com visualização e diferenciação entre lignina,

celulose ou suberina. Pode-se ainda identificar os tecidos vegetais descritos na Farmacopéia (1959), em Oliveira e Akisue (1989) e em Toledo (2002) para *S. adstringens* (Mart.) Coville.

O felogênio e suas derivadas feloderma e súber, que constituem a periderme podem ser observadas na figura 17.

Apesar da difícil separação entre o felogênio e o feloderma, foi possível caracterizar os estratos de células iniciais que constituem o felogênio, com aspecto retangular, radialmente achatadas e enfileiradas, 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 (fig. 18), suas células são grandes, arredondadas e aparentemente sobrepostas. O ritidoma presente evidência que o exemplar de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. apresenta-se em idade adulta cujo crescimento secundário alcançou diversos ciclos, evidenciado pelo desprendimento da casca mais velha.

O parênquima cortical (fig. 19) é constituído por células mais arredondadas, com parede celular menos espessada e celulósica, sendo observados grãos de amido no interior da célula, que caracterizam o parênquima de reserva.

No parênquima cortical, observa-se ainda, um grande número de células esclerenquimáticas (fig. 20), facilmente distinguidas por sua forma, tamanho e bordas espessas. Essas células são dotadas de paredes secundárias espessadas com lignina e são importantes na função de sustentação do vegetal.

Em todo o parênquima cortical é visto, isoladamente ou em grupos, células com conteúdo pardo (fig. 21), que ainda não foram completamente elucidadas em sua composição, sendo possivelmente resinas. Segundo Toledo (2002), as células

de conteúdo pardo, poderiam ser idioblastos taníferos, que guardariam grande quantidade de compostos fenólicos, ajudando a explicar o alto teor de taninos presente nas cascas do gênero *Stryphnodendron*.

No corte transversal da casca na região floemática (fig. 22), observa-se que as fibras do floema estão dispostas em grupos (raio floemático), evidenciados pela safranina. No corte longitudinal (fig. 23), observa-se nas fibras floemáticas a placa crivada, característica do tecido condutor e os raios medulares, corados pelo safrablau. No trabalho realizado por Toledo (2002) com *S. adstringens* (Mart.) Coville, foi descrito ao longo das fibras floemáticas a presença de cristais prismáticos (monocristais), formando uma bainha cristalífera. Estas observações não foram verificadas em *S. polyphyllum* Mart. nos cortes em estudo, sugerindo uma possível distinção anatômica entre as espécies.

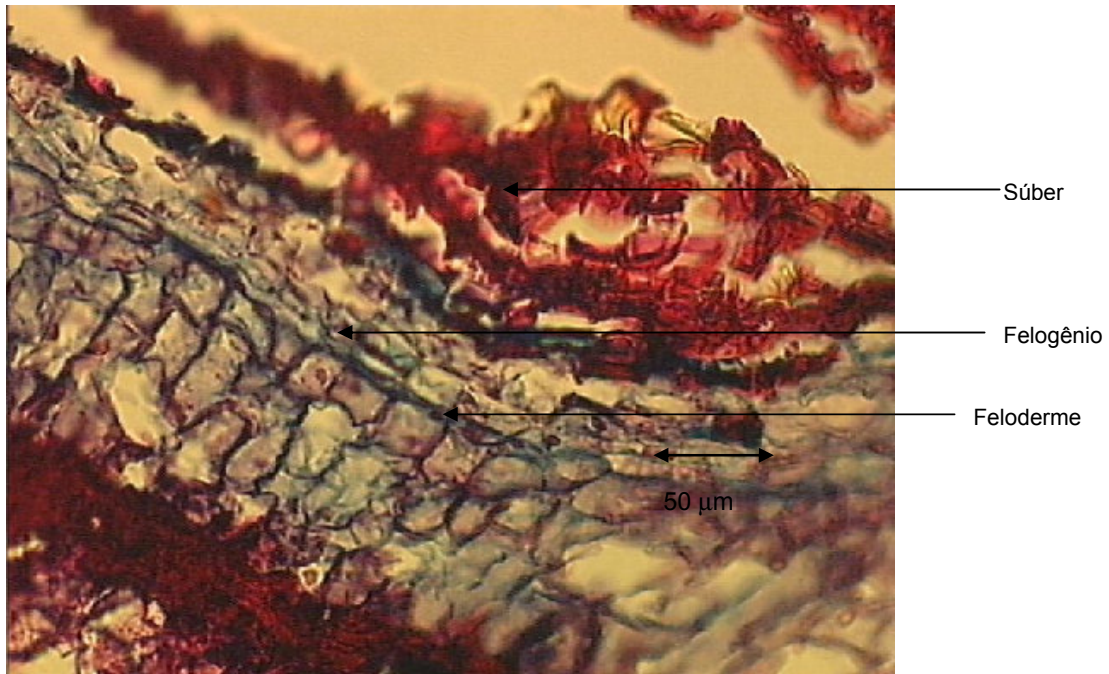


Figura 17 – Visão geral da perideme

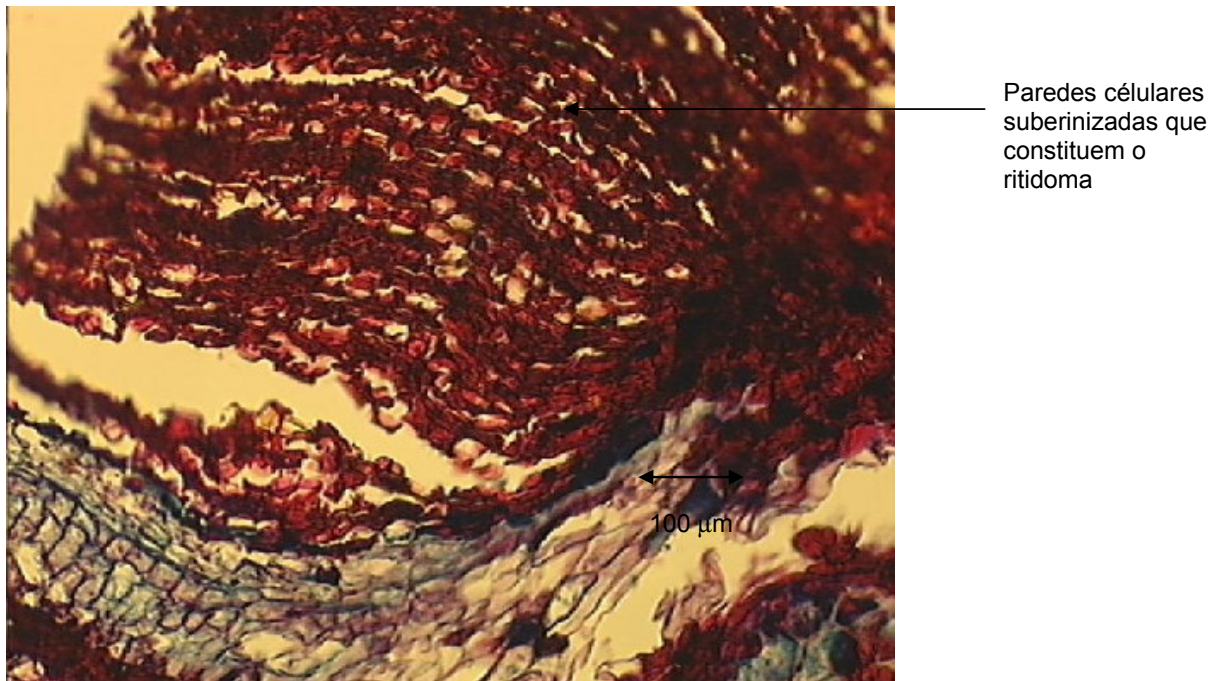


Figura 18 – Periderme: no detalhe súber

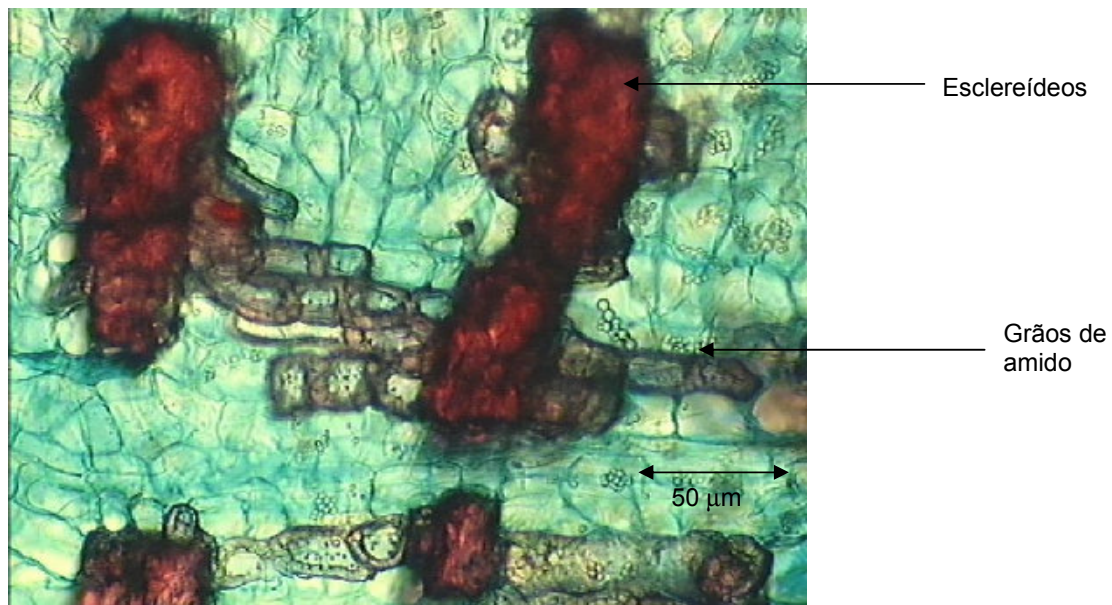


Figura 19- Caule, parênquima cortical: no detalhe grãos de amido

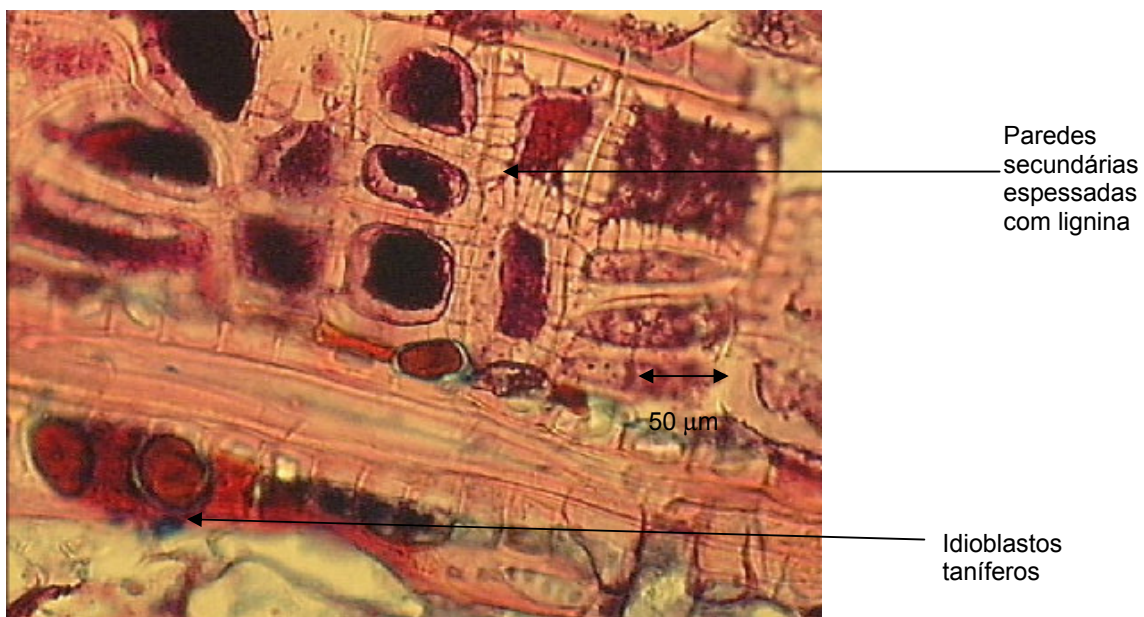


Figura 20 – Caule: parênquima cortical: no detalhe células esclerenquimáticas

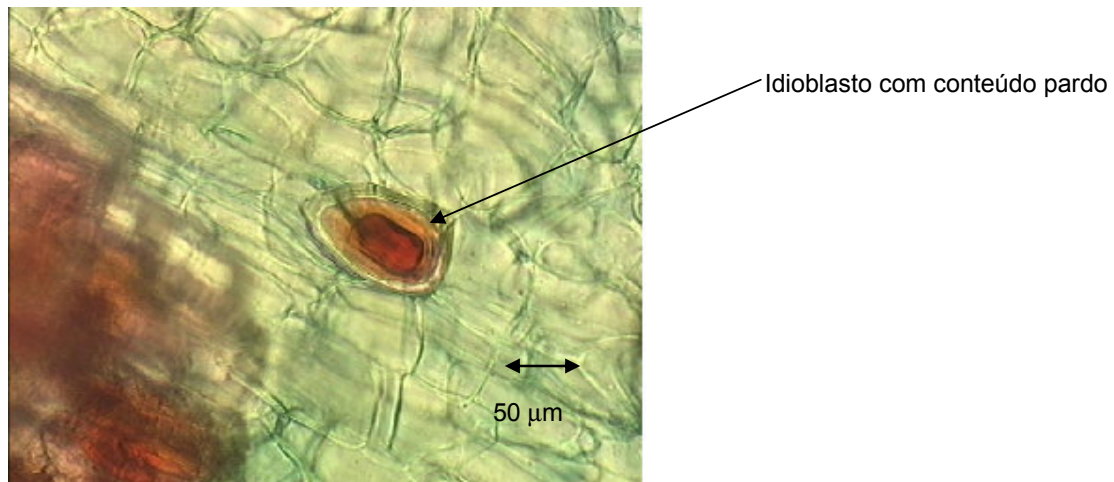


Figura 21 – Caule: parênquima cortical, no detalhe idioblasto com conteúdo pardo

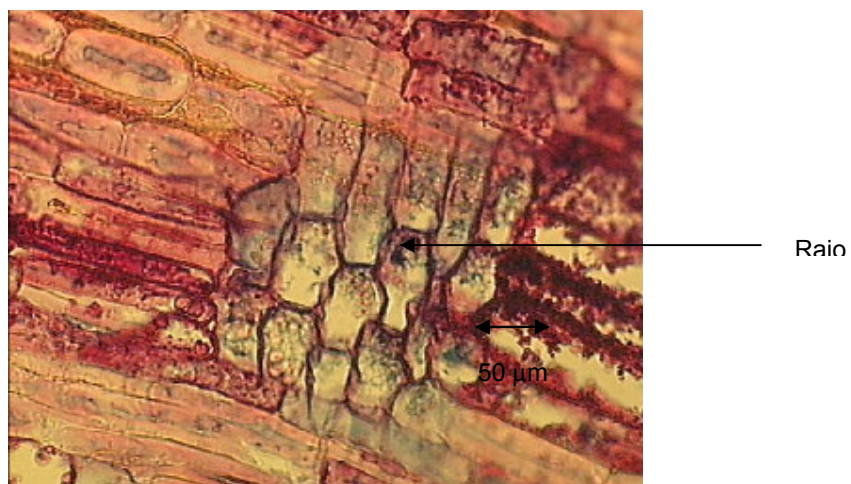


Figura 22 – Caule: parênquima cortical, no detalhe raio floemático

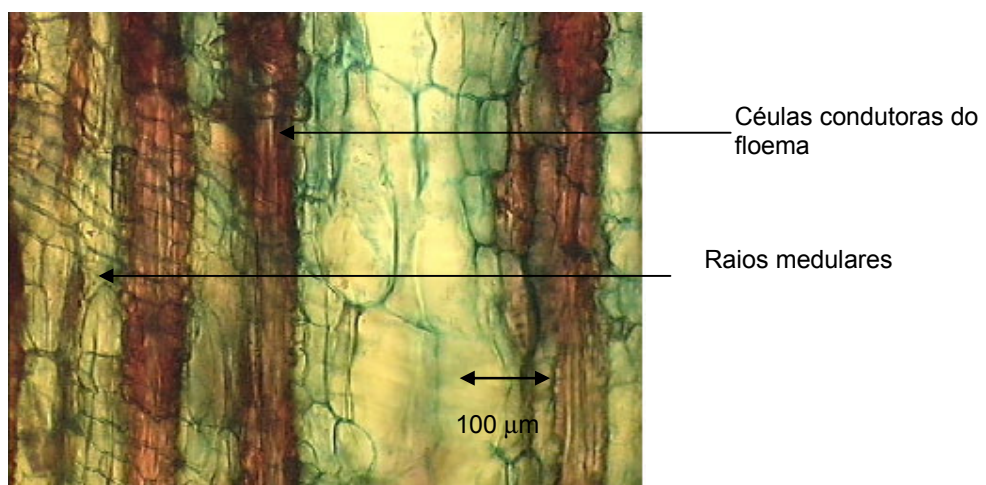


Figura 23 – Caule: parênquiam cortical -corte longitudinal da região floemática

5.2 Caracterização da matéria-prima e controle de qualidade

A avaliação botânica não assegura por si só a constância do efeito terapêutico, a eficácia do vegetal está ligada à sua composição química. As plantas sofrem influências do meio e estas podem traduzir-se em alterações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes químicos, sendo imprescindível considerar fatores de clima, solo, estágio vegetativo, para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal (MELLO, 1989).

Até recentemente, poucos medicamentos naturais haviam sido estudados cientificamente visando o controle de qualidade, a eficácia e a segurança. O crescente interesse das grandes indústrias farmacêuticas pelo mercado de fitoterápicos certamente irá resultar, a curto e médio prazo, em melhoria substancial da qualidade desses produtos, bem como na confirmação da eficácia clínica e segurança dos mesmos.

Como é de se esperar, a qualidade e a disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos, fato que não é observado em relação aos sintéticos. Assim, alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos na pureza e mesmo nas características fenotípicas ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica. Por isso a origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, coleta, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem se conhecidos (BRITISH, 1996).

A caracterização da droga vegetal passa por inúmeras determinações para se estabelecer valores ou faixas que permitam a quantificação da droga antes do

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

Para se obter um perfil de controle de qualidade para *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., foram analisadas amostras coletadas nos períodos de outono e verão de 2002. Estes períodos foram estabelecidos devido à fenologia da espécie vegetal, que floresce em meados do novembro.

A avaliação do teor de umidade presente nas cascas de *S. polyphyllum* Mart. foi determinada através da perda por secagem e da perda por dessecação. A presença de água em excesso, em drogas vegetais, promove o crescimento de bactérias, fungos ou insetos e hidrólise de constituintes. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas na qual a deteriorização é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002).

O processo de secagem transcorreu por um período de 11 dias, sendo realizado à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) com a droga vegetal fresca. O valor médio para as determinações foi de 33,87%. Não foi verificada significância no teor de umidade na droga fresca, entre coletas, demonstrando não haver relação quanto ao índice pluviométrico e as datas das coletas.

A perda por dessecação (tab. 3) foi realizada com a droga seca e moída, determinando-se o teor de umidade residual. Este parâmetro é fundamental para se determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento. A monografia existente na Farmacopéia (1959), preconiza, umidade máxima de 15% para *S.*

adstringens (Mart.) Coville. Audi *et al.* (2003), apontaram como sendo um fator de extrema importância para o controle de qualidade a determinação da umidade, que na avaliação sazonal das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville foi de 15,41, 13,93, 14,83, 14,02%, para outono, inverno, primavera e verão, respectivamente.

Sanches *et al.* (2002), estabeleceram para as cascas de *S. obovatum* Benth. o teor de umidade de (PPD) 12,80% para a droga seca e (PPS) 42,62% para a droga fresca na matéria-prima colhida do verão.

Tabela 3 – Perda por dessecação do pó das cascas de *S. polyphyllum* Mart. (n= 5)

AMOSTRA	UMIDADE (%)	DP	CV%
Outono	13,45	0,39	2,94
Verão	14,70	0,25	1,74

Os resultados da perda por dessecação para *S. polyphyllum* Mart., em ambos períodos de análise, estão dentro dos limites farmacopéicos de água para drogas vegetais, que variam de 8 a 14% para a droga seca, com poucas exceções especificadas nas monografias (FARIAS, 2002). Com relação à massa seca, não houve diferença significativa entre os dados de coletas, isto porém não implica na uniformidade do conteúdo químico das cascas do vegetal (fig. 24).

Durante o processo de secagem, concluiu-se, que as cascas do vegetal, conservam melhores as características organolépticas e químicas, quando estabilizadas à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e conservadas ao abrigo da luz. Quanto à umidade residual da droga cominuída seca, determinou-se, maior segurança frente ao tempo de armazenamento, quando esta é acondicionada em barrilete de papelão, com ausência de luz em ambiente seco.

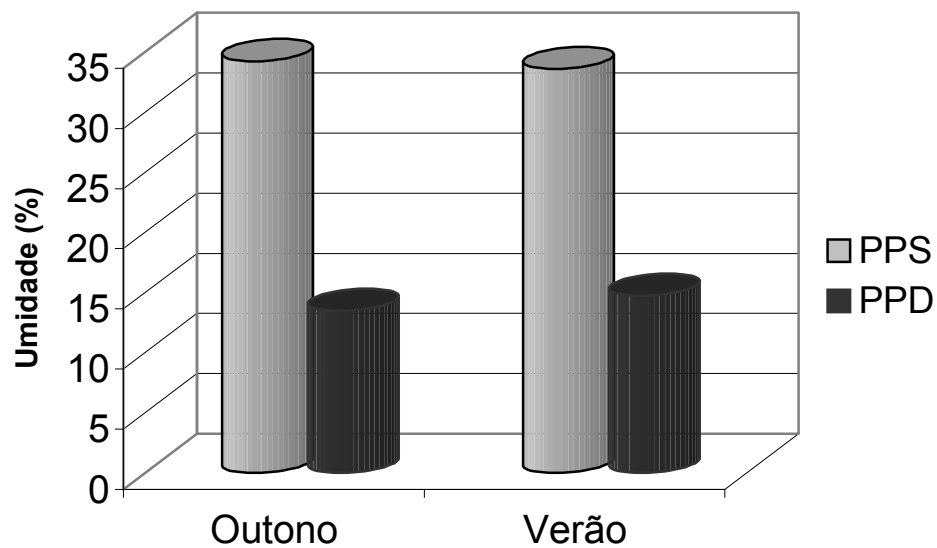


Figura 24 – Perda por secagem (PPS) e perda por dessecação (PPD) estabelecida em relação a 100% de droga vegetal

A distribuição granulométrica é um fator importante na obtenção de um extrato, já que uma maior ou menor extração está intimamente relacionada com a área de superfície e dimensões das partículas em contato com o líquido extrator (CARDOSO, 2002).

A figura 25, que representa a curva de distribuição granulométrica da droga rasurada, mostra que a maior porcentagem de partículas encontra-se numa faixa granulométrica que varia de 0,450 a 0,250 mm.

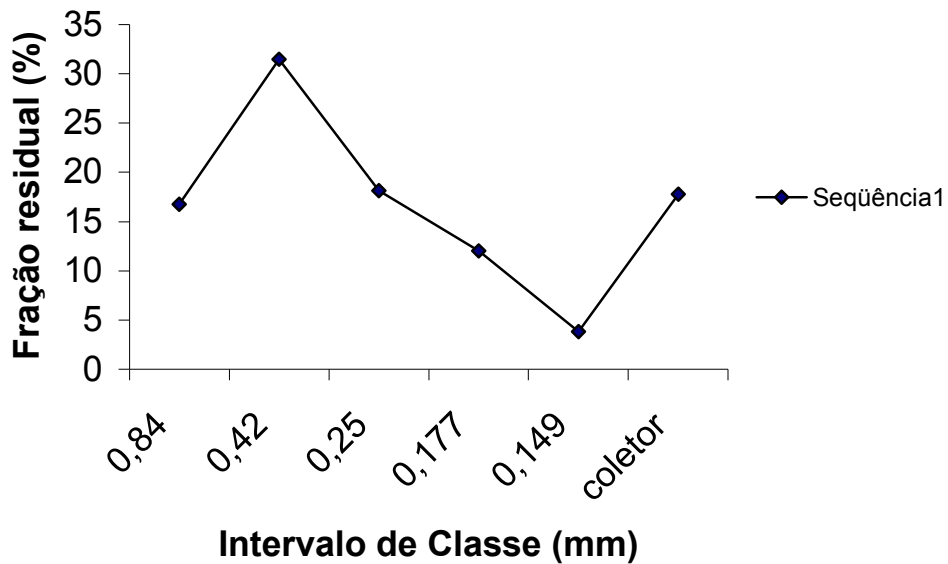


Figura 25 – Curva de distribuição granulométrica da droga

A figura 26, representa as curvas características de retenção e passagem da droga rasurada através da análise granulométrica por tamisação, empregando-se os dados fornecidos pela tabela 4. O diâmetro médio, calculado graficamente a partir do ponto de intersecção das retas foi de 0,46 mm.

Tabela 4 - Análise granulométrica por tamisação das cascas de *S. polyphyllum* Mart., rasuradas por moinho de martelos

Abertura de malha M (mm)	Classe granulométrica m min – m max (mm)	Abertura média M (mm)	Fração Resíduo F (%)	Fração retida acumulada FR (%)	Fração passagem P (%)
0,840	0,84 – 1,00	0,920	16,75	16,75	83,25
0,420	0,42 – 0,84	0,630	31,47	48,22	51,78
0,250	0,25 – 0,42	0,335	18,16	66,38	33,62
0,177	0,177 – 0,25	0,213	12,03	78,41	21,59
0,149	0,149 – 0,177	0,163	3,81	82,22	17,78
Coletor	0,00 – 0,149	0,075	17,78	100	0,00

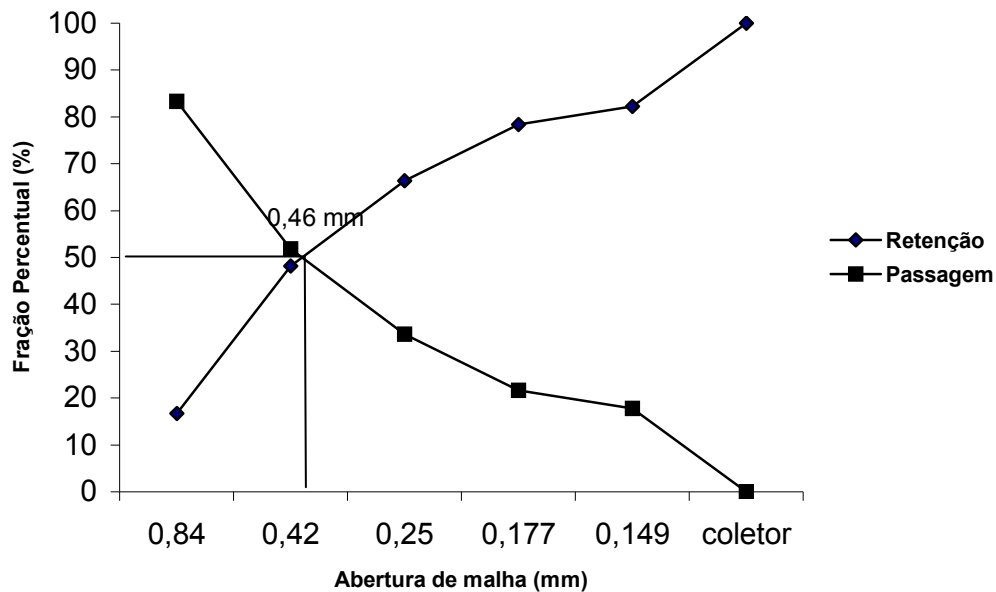


Figura 26 – Curvas acumulativas de retenção e passagem após tamisação da matéria-prima vegetal

A faixa de distribuição granulométrica para as cascas de *S. polyphyllum* Mart. mostra-se homogênea, o que favorece a extração exaustiva do princípio ativo da droga. Em estudo realizado com *S. adstringens* (Mart.) Coville o diâmetro médio das partículas foi de 0,440 mm, sugerindo distribuição de classe homogênea (AUDI *et al.*, 2003).

A determinação do teor de extrativos de uma droga é parâmetro que permite visualizar a capacidade de um determinado líquido extrator retirar substâncias presentes na mesma, sob condições específicas. Pode ser utilizado etanol, água, metanol ou acetona, entre outros; entretanto somente os dois primeiros ou nas misturas, são freqüentemente preconizados em farmacopéias. Na avaliação do teor de extrativos das cascas de *S. polyphyllum* Mart., no entanto, procurou-se estabelecer, como parâmetro de avaliação, o uso de diferentes líquidos extratores com o intuito de determinar o melhor rendimento, objetivando a produção de extrato para análise fitoquímica e para a realização de testes biológicos, entre eles: antimicrobianos e cicatrizantes (tab. 5).

Em relação à coleta de outono, o teor de extrativos foi significativamente menor que o determinado na coleta de verão. Este dado se deve, provavelmente, pelo fato do vegetal se encontrar no verão, em florada, no auge de sua atividade metabólica.

A água como líquido extrator, original da técnica, foi o que apresentou o pior resultado de extração (27,93% no outono e 34,48% no verão), resultado superior ao de Sanches *et al.* (2002) para *S. obovatum* Benth. que foi de 28,63% para as cascas do vegetal colhidas no verão.

Tabela 5 – Teor de extrativos obtidos a partir das cascas de *S. polyphyllum* Mart. [$\bar{x} \pm$ DP (CV%)]

Solvente (V/V)	Outono (%)	Verão (%)
Água	27,93 \pm 0,56 (1,99)	34,48 \pm 0,50 (1,46)
Acetona:água (7:3)	30,92 \pm 1,23 (3,98)	40,79 \pm 2,00 (4,93)
Acetona:água (1:1)	30,24 \pm 0,56 (1,85)	43,50 \pm 0,41 (0,94)
Metanol:água (1:1)	31,47 \pm 0,58 (1,86)	38,50 \pm 1,92 (4,98)
Etanol:água (1:1)	31,60 \pm 0,47 (1,51)	40,79 \pm 1,79 (2,86)

Embora as misturas etanol:água e metanol:água tenham apresentado uma extração qualitativamente equivalentes a extração produzida pela mistura acetona:água, o solvente de escolha foi acetona:água para a preparação dos extratos, pois o uso da acetona promove o bloqueio da associação tanino-proteína, tornando assim a extração quantitativamente maior (MELLO; SANTOS, 2002).

Na análise preliminar das cascas para detecção de taninos, todo o *screening* realizado mostrou-se positivo (tab. 6). A positividade para taninos pode ser uma explicação quanto ao uso popular das cascas do barbatimão, indicando uma explicação para a ação farmacológica do vegetal.

Tabela 6 – Reações qualitativas para taninos

Reação com Gelatina	++
Reação com Sais de Ferro	+++
Reação com Acetato de Chumbo	+
Reação com Cianeto de Potássio	++
Reação com Vanilina Clorídrica	+
<u>Reação de Stiasny</u>	
Taninos condensados	++++
Taninos hidrolisáveis	++

Devido à presença de substâncias polifenólicas, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu para doseamento dos taninos totais. Vários outros métodos, baseados nas propriedades redutoras, têm sido propostos, tais como os métodos baseados na precipitação de taninos com sais metálicos e alcalóides, que são de fácil e rápida execução, porém são inespecíficos, sendo os resultados influenciados por outros constituintes da droga vegetal (ANDRADE, 1996).

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na associação dos taninos às proteínas, o que o torna mais específico, pois, trata-se de um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos. Essa reação, por não ser específica, necessita da adição do pó de pele em etapa posterior. Assim a complexação tanino-proteína torna o método seguro, sendo adotado pela Farmacopéia Européia (1997). Os resultados da determinação dos taninos totais encontram-se na tabela 7.

Tabela 7– Teor de taninos presentes nas cascas de *S. polyphyllum* Mart.

AMOSTRA	TEOR (%)	DP	CV (%)
Outono	10,70	0,42	3,90
Verão	19,51	0,54	2,79

A análise dos resultados do doseamento do teor de taninos totais, demonstra, através da análise de variância, diferença significativa entre as coletas. O teor de taninos encontrado nas cascas da coleta de verão, demonstra maior síntese de substâncias polifenólicas pela planta nesse período, indicando ser, nesse caso, a melhor época para se coletar o *S. polyphyllum* Mart.

De acordo com Toledo *et al.* (1998), as melhores épocas de coleta de *S. adstringens* (Mart.) Coville seriam, respectivamente, o outono e inverno. Nessas

estações, as cascas apresentaram um teor de taninos totais na ordem de 22,59 e 20,51% contra 20,99 e 19,21% na primavera e verão, respectivamente.

Sanches *et al.* (2002), determinaram o teor de taninos totais presentes nas cascas de *S. obovatum* Benth. como sendo de 15,03% no verão.

A figura 27 estabelece uma comparação entre *S. polyphyllum* Mart., *S. obovatum* Benth. e *S. adstringens* (Mart.) Coville, com relação ao teor de taninos das cascas do vegetal colhida na estação de verão. No confronto dos dados de coletas de *S. polyphyllum* Mart. com os descritos na literatura, foi possível estabelecer a presença de maior quantidade de taninos nas cascas de *S. polyphyllum* Mart. no verão, em relação à mesma época de coleta nas cascas de *S. obovatum* Benth. e *S. adstringens* (Mart.) Coville. Porém, um melhor perfil, depende de acompanhamento de coleta sazonal, onde seria possível estabelecer critérios para definir o conteúdo mínimo e máximo de taninos para a espécie, além de outras considerações, tais como: relação do teor de taninos com o teor de extrativos, índice de umidade e perda por dessecação.

A comparação dos resultados obtidos no ensaio de teor de extrativos, permite inferir que o teor de taninos totais está relacionado com este critério de qualidade (fig. 28), visto que o teor de taninos aumentou de maneira proporcional ao aumento de substâncias extraíveis, determinadas pelo teor de extrativos.

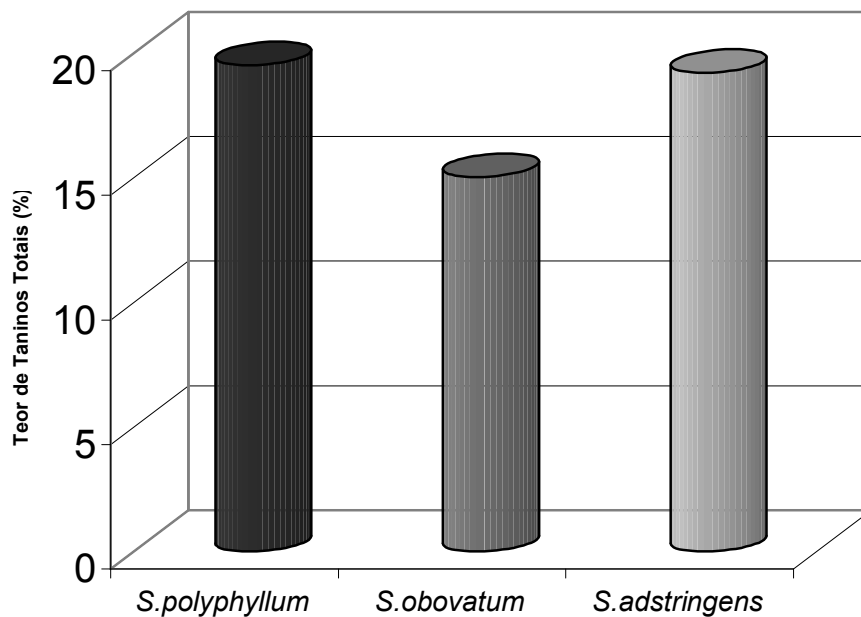


Figura 27 – Teor de taninos totais das cascas em coletas realizadas no verão para *S. polyphyllum* Mart., *S. obovatum* Benth. e *S. adstringens* (Mart.) Coville

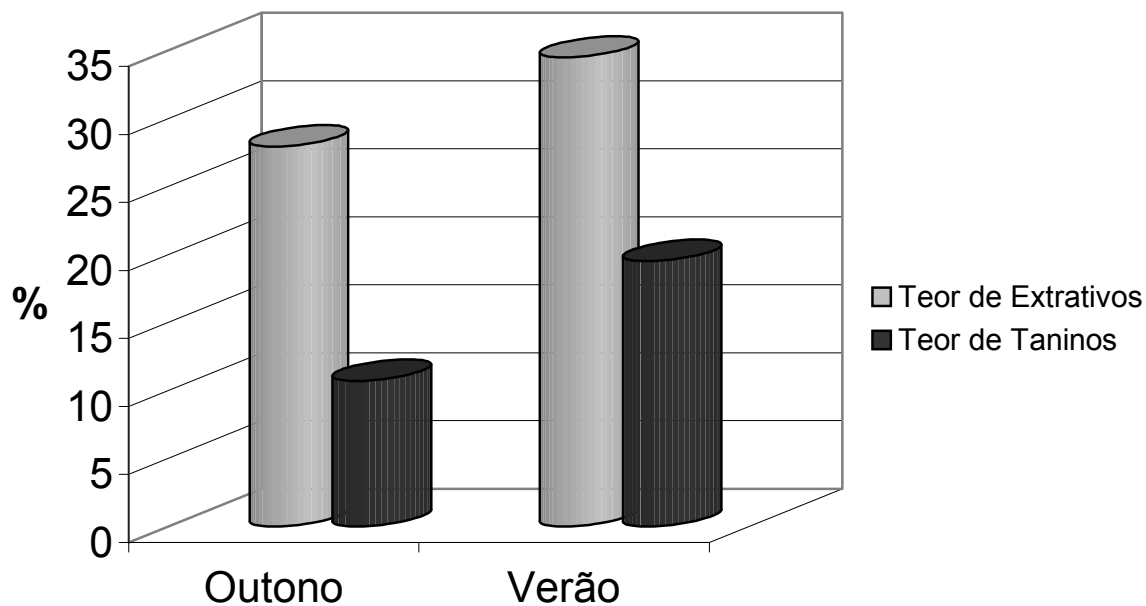


Figura 28 – Relação entre teor de extrativos e teor de taninos totais das cascas de *S. polyphyllum* Mart.

Golçalves *et al.* (2001), determinaram os teores de taninos das cascas de cinco leguminosas arbóreas, *Acacia mangium* Willd., *Albizia guachapele* (Kunth) Dugand, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. e *Samanea saman* (Jacq.) Merr. pelo método de Stiasny. O valor mais expressivo foi para *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. com 16,2%. A Farmacopéia Brasileira (1959) estipula um teor mínimo de 20% de taninos para as cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville. Recentemente, Toledo *et al.* (1998) com as cascas de *S. astringens* (Mart.) Coville e Sanches *et al.* (2002) com *S. obovatum* Benth. obtiveram valores próximos aos descritos no código oficial.

As aplicações industriais para os taninos vegetais, na indústria de curtimento de couro e na fabricação de resinas, e suas propriedades farmacológicas: empregada em casos de inflamações, infecções e, como cicatrizante, justificam o estudo sobre o teor de polifenóis em diferentes espécies vegetais. Além disso, os taninos condensados constituem mais de 90% da produção mundial de taninos comerciais, ultrapassando a faixa de 350.000 t/ano (GUANGCHENG *et al.*, 1991).

A determinação do teor de flavonóides foi outro parâmetro avaliado em *S. polyphyllum* Mart., pois os flavonóides possuem a mesma rota biogenética que os taninos, assim, a sua presença e concentração são importantes, para a análise do comportamento de produção de substâncias polifenólicas e para o controle de qualidade do vegetal.

No doseamento de flavonóides, foi no verão que ocorreu maior síntese desse grupamento químico, como mostra a tabela 8.

Tabela 8 – Teor de flavonóides presentes nas cascas de *S. polyphyllum* Mart.

AMOSTRA	TEOR (%)	DP	CV (%)
Outono	0,573	0,013	2,22
Verão	0,650	0,023	3,60

A presença de flavonóides nas cascas de *S. polyphyllum* Mart. foi superior à encontrada por Toledo *et al.* (1998) nas cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville com valores de 0,12, 0,053, 0,062, 0,00%, respectivamente, para coletas realizadas no outono, inverno, primavera e verão.

Essa determinação não implica que essas substâncias produzam a ação farmacológica estudada, porém servem de parâmetro para as demais análises realizadas (substância marcadora - RDC nº 17/2000 ANVISA) (BRASIL, 2000).

Com os parâmetros avaliados neste estudo foi possível traçar um perfil de qualidade para *S. polyphyllum* Mart. A determinação da melhor época de coleta corresponde neste caso ao verão, onde o material vegetal avaliado apresentou resultados significativamente melhores do ponto de vista tecnológico para a produção de fitoterápico, do que aqueles encontrados no período de outono. No entanto, vale ressaltar, que para a conclusão do perfil de qualidade de *S. polyphyllum* Mart. se faz necessário a análise da matéria-prima vegetal coletada nas estações de primavera e inverno e por um período maior de tempo, como observado para o *Ginkgo biloba* L. (STICHER, 1993). É necessário, ainda, a comparação destes parâmetros com material vegetal proveniente de outras localidades.

5.3 Análise química

A pesquisa química tem por objetivo conhecer as substâncias presentes nas espécies vegetais. A análise química preliminar positivou a presença de compostos fenólicos, coincidindo com dados de literatura. Assim a investigação fitoquímica foi direcionada para o isolamento, purificação e elucidação estrutural de taninos.

As cascas (1519 g) foram coletadas em Abadia de Goiás, estado de Goiás, Brasil, em maio de 2002. O material vegetal seccionado foi submetido à secagem à temperatura ambiente em local seco e arejado. A secagem teve por objetivo a estabilização do material, com a retirada da água, impedindo reações de hidrólise e/ou óxi-redução, além de impedir o crescimento microbiano (CARDOSO, 2002). Determinou-se a perda por secagem (n=3) da casca, e, após 11 dias houve estabilização do farmacógeno, perdendo $33,87\% \pm 1,11$ do peso bruto.

As cascas secas (1109,39 g) foram moídas em moinho de martelos, fornecendo um rendimento de 90,29% (1001,69 g). A moagem teve por finalidade reduzir mecanicamente, o vegetal a pó, de modo a facilitar o processo de extração.

O método de extração escolhido foi o ultra turrax® devido à eficiência da técnica somada à simplicidade, rapidez e versatilidade, permitindo a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala.

Com 900 g de droga moída, preparou-se o extrato bruto a 10% (m/V) com acetona:água (7:3; V/V), apresentado um rendimento de 28,10%, obtendo-se, assim, 252,75 g de extrato liofilizado FAA.

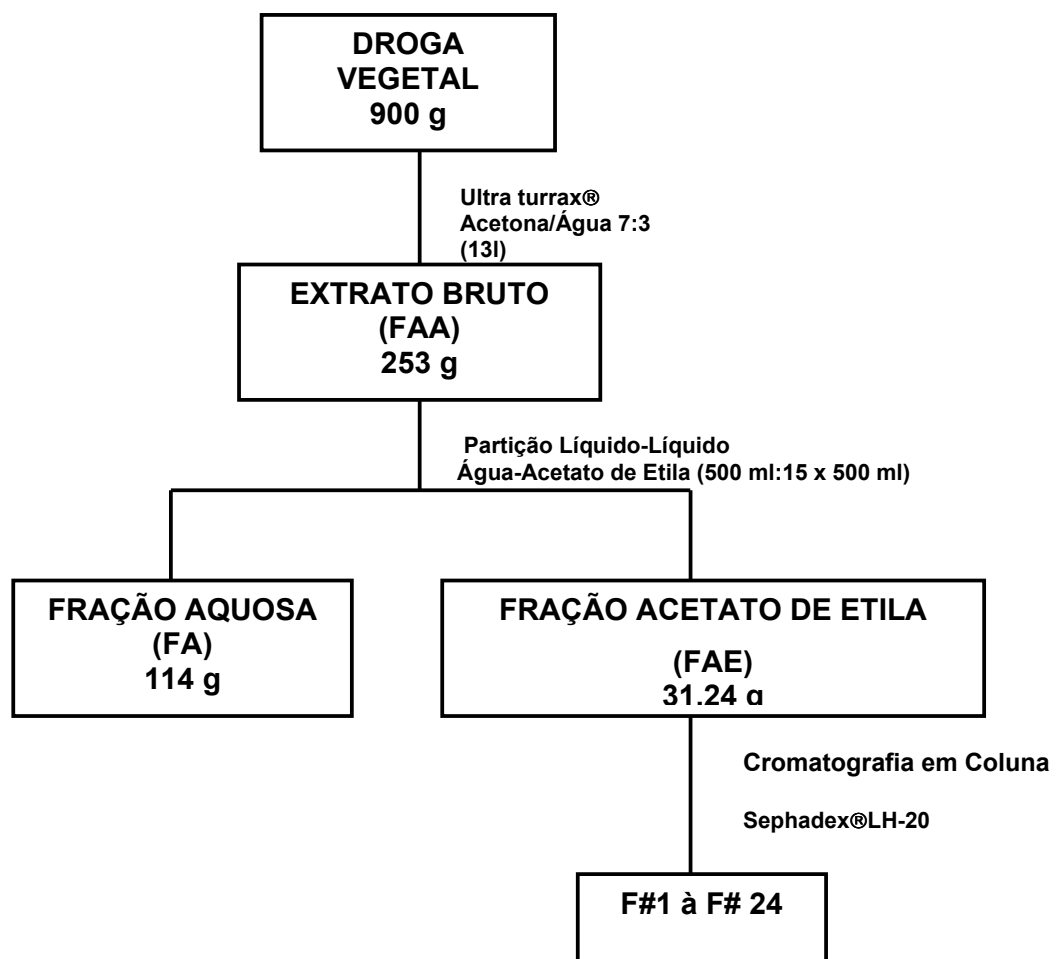
Com o método extrativo por ultra turrax® alcança-se rapidamente o equilíbrio. Trata-se de um método de extração turbulento com rompimento das estruturas celulares em diminutos fragmentos.

Entre os inconvenientes causados pelo ultra turrax® encontram-se a geração de calor durante o processo e a dificuldade de filtração, devido à fragmentação excessiva do material durante o processamento. Para controlar o problema da elevação de temperatura, foi realizado a técnica com duração de 30 min em três etapas de 10 min, com intervalo de 10 min cada etapa para resfriamento do sistema. A filtração foi realizada com sucessivas trocas do material filtrante.

A escolha do líquido extrator baseou-se nas informações obtidas no controle de qualidade realizado (tab. 5) e na literatura consultada.

Com 200 g do extrato bruto liofilizado (FAA) produziu-se por particionamento com acetato de etila, 114 g da fração aquosa (FA) e 31,24 g da fração acetato de etila (FAE). O rendimento de FA foi de 57% e FAE de 15,62%, havendo perdas durante o processo de produção. A obtenção de extratos, frações e subfrações encontram-se no fluxograma 1.

Realizou-se cromatografia em coluna contendo Sephadex® LH-20 com 10 g de FAE. O monitoramento foi executado por CCD, obtendo-se 24 subfrações (tab. 9) que foram reunidas por similaridade de manchas com coloração entre o azul e o marrom, de acordo com a figura 29.



Fluxograma 1 – Obtenção das frações e cromatografia em coluna na obtenção de subfrações

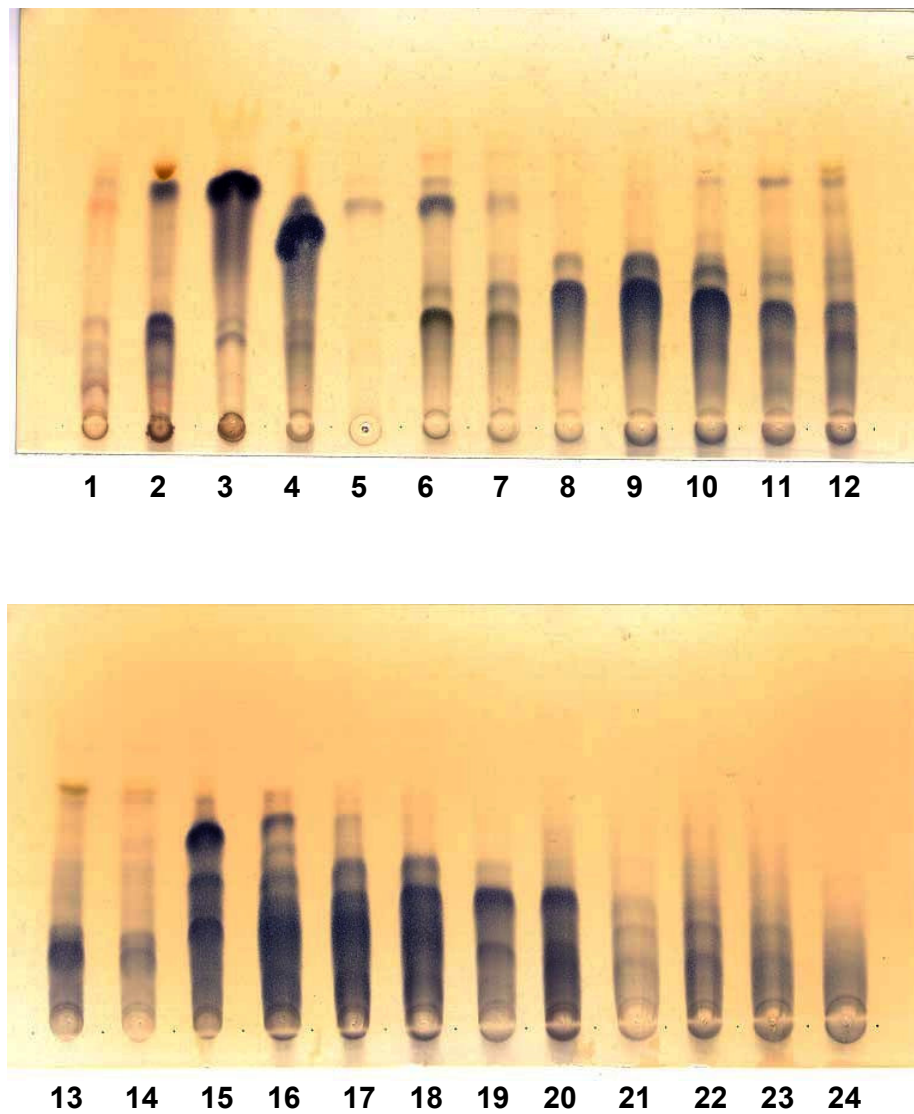


Figura 29 – Cromatografia em camada delgada de 24 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna, sistema cromatográfico: acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; V/V); revelador cloreto férrico a 2% em metanol

FRAÇÃO	Tubo inicial-final	Quantidade (g)	(%)
F#1	001-419	0,2866	2,866
F#2	420-470	0,0663	0,663
F#3	471-510	0,0584	0,584
F#4	511-640	0,6996	6,996
F#5	641-665	0,0614	0,614
F#6	666-685	0,0470	0,470
F#7	686-715	0,0516	0,516
F#8	716-770	0,3509	3,509
F#9	771-950	1,4480	14,48
F#10	951-990	0,2086	2,086
F#11	991-1015	0,0905	0,905
F#12	1016-1040	0,0696	0,696
F#13	1041-1050	0,0450	0,450
F#14	1051-1065	0,1483	1,483
F#15	1066-1215	1,4030	14,03
F#16	1216-1265	0,3880	3,880
F#17	1266-1290	0,1840	1,840
F#18	1291-1320	0,1713	1,713
F#19	1321-1395	0,4374	4,374
F#20	1396-1515	0,1914	1,914
F#21	1516-1540	0,0110	0,110
F#22	1541-1615	0,0484	0,484
F#23	1616-1710	0,0889	0,889
F#24	-	2,0460	20,46
Total		8,6012	86,01

Tabela 9 – Vinte e quatro subfrações obtidas por cromatografia em coluna

No fracionamento realizado em Sephadex® LH-20, espera-se que as substâncias com maiores pesos moleculares apareçam nas frações iniciais. Porém o observado para taninos é a predominância de substâncias de peso molecular menor nas primeiras frações (THOMPSON *et al.*, 1972). Os autores sugerem, ainda, que isso provavelmente se deva a interação entre monômeros de taninos e o sistema eluente, ocorrendo a eluição seqüencial de: monômeros > dímeros > trímeros > tetrâmeros > oligômeros > polímeros. A configuração dos dímeros influenciam o fracionamento, sendo observados que as ligações $4\beta\rightarrow 8$ e $4\beta\rightarrow 6$ interagem antes com o sistema eluente (etanol) que as ligações $4\alpha\rightarrow 8$ ou $4\alpha\rightarrow 6$ (THOMPSON *et al.*, 1972).

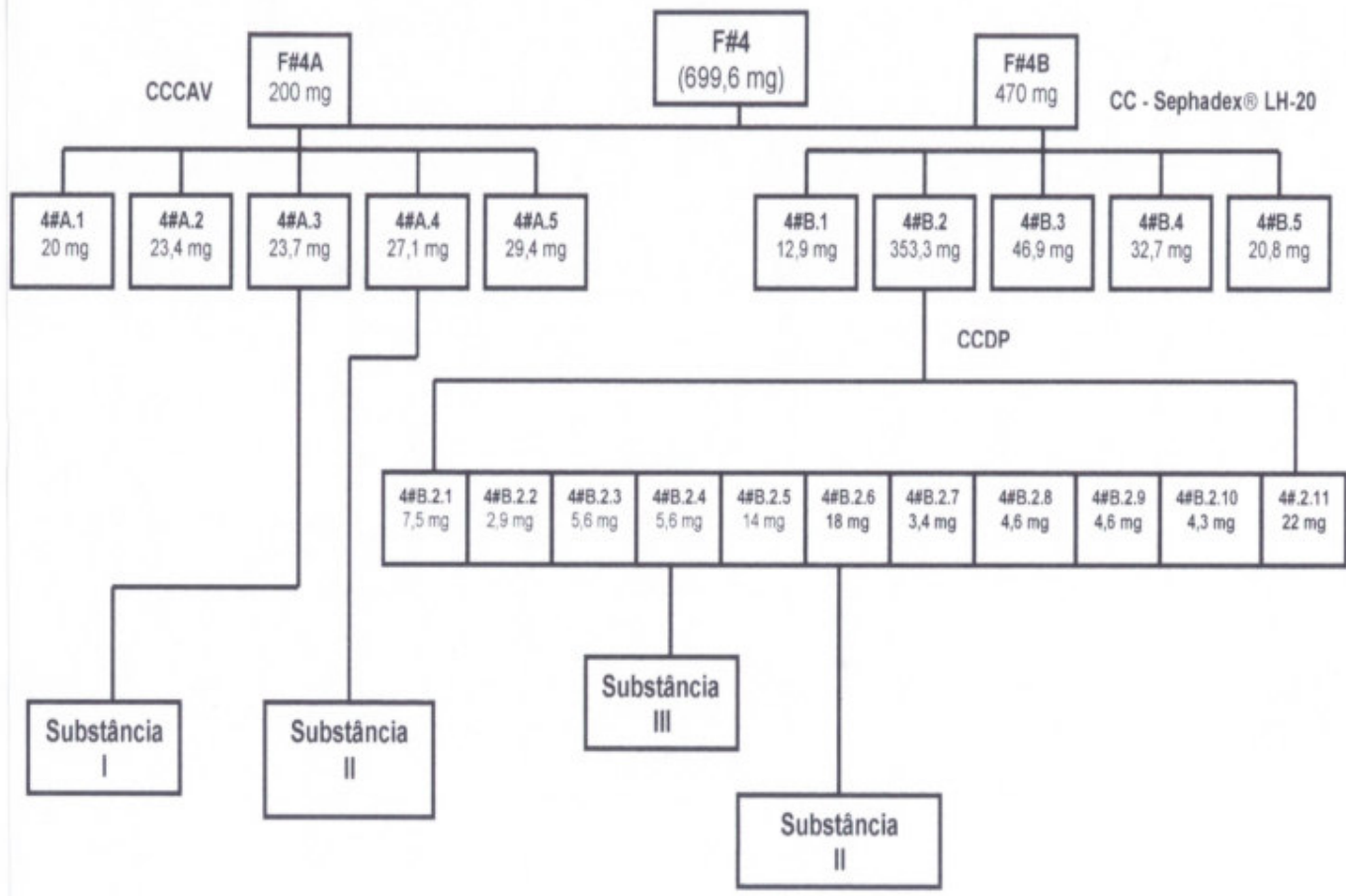
No tentame de conseguir o isolamento e identificação de taninos condensados, iniciou-se o fracionamento com as subfrações F#2, F#3, F#4 e F#5 em cromatografia em coluna (CC) em Sephadex® LH-20. Sendo posteriormente submetidas à cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV) as subfrações F#8, F#9 e novamente a F#4, que em CC não permitiu a separação de isômeros.

O isolamento desses compostos foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Mello *et al.* (1996). O esquema de eluição e o acompanhamento das frações por CCD encontram-se descritos nas páginas 80 e 81 respectivamente.

A CC das frações F#2 e F#3 foi realizada sem êxito, não tendo sido possível a purificação de qualquer substância devido à pequena quantidade de fração.

O fracionamento de F#4 (flux. 2) foi realizado em duas etapas: CC em Sephadex® LH-20 e CCCAV. Inicialmente realizou-se a CC em Sephadex® LH-20, que resultou em cinco novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por

CCD. A subfração F#4B.2 foi submetida a acetilação (seção 4.8) e a CCDP (seção 4.7.3) resultando no isolamento das substâncias II e III.



Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico de F#4

A dificuldade na separação de isômeros de taninos condensados, através de CC em Sephadex® LH-20 ou mesmo em CCDP, levou a submeter a F#4 a novo fracionamento por CCCAV. Essa técnica envolve, basicamente, a partição de um soluto em dois solventes imiscíveis (fase superior e fase inferior), dependendo do coeficiente de partição do soluto para cada solvente (FOUCAULT *et al.*, 1998). A CCCAV consiste de um tubo (\varnothing 1,6 ou 2,6 mm) com capacidade para 350 ml enrolado em uma coluna e colocada sobre um eixo giratório. Essa coluna sofre uma ação centrífuga ocasionada pelos processos de rotação sobre o eixo e de translação do equipamento, a 870 rpm. A coluna é, inicialmente, preenchida com a fase estacionária (fase inferior) através de uma bomba. Após, a fase móvel (fase superior) é bombeada, com fluxo determinado, com o equipamento ligado à 870 rpm, até estabilização do sistema. No entanto, o mecanismo de distribuição dos solventes no tubo ainda não é conhecido (MARSTON e HOSTETTMANN, 1991).

Esse sistema é útil em separação de substâncias polares e com similaridade química, como isômeros, assim obteve-se a **substância I** e novamente a **substância II**, como poderá ser observado na discussão das **substâncias I (galocatequina)** e **II (epigalocatequina)**.

O uso da cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV) foi fundamental na separação das substâncias, principalmente pelo fato de que os flavan-3-óis possuem várias características estruturais semelhantes, o que pode ser comprovado analisando os dados cromatográficos como Rfs e a reatividade frente aos reveladores cromogênicos.

Esse tipo de cromatografia possui algumas vantagens, como: recuperação total da amostra introduzida; não há adsorção irreversível; riscos mínimos de degradação da amostra; baixo consumo de solventes e quantidades mínimas de

uma determinada substância pode ser separada de um extrato bruto. Consequentemente, ela se torna de grande uso no isolamento de substâncias em produtos naturais.

5.3.1 Monômeros

5.3.1.1 Galocatequina – Substância I

Na CCD, a **substância I**, apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 , com $R_f = 0,67$ (seção 4.7.2). Isso forneceu indício característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.2). No espectro de massas foi possível observar o pico do íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ da substância acetilada em m/z 581. O processo de fragmentação da **substância I** pode ser observado na figura 30, estando de acordo com a literatura (MELLO, 1995).

O espectro de ressonância magnética nuclear foi realizado em metanol deuterado, por se tratar de uma substância não acetilada. Na tabela 10 encontram-se os dados (δ em ppm) de RMN ^1H obtidos para a **substância I**. Pode-se notar na figura 31 um espectro característico de monômero de flavan-3-ol. É possível observar os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como duplo dupletos em δ 2,49 e δ 2,80 respectivamente. A constante de acoplamento $J_{\text{H-2},\text{H-3}}$ de 7,2 Hz caracterizou uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* de acordo com WEINGES *et al.* (1969). Pôde-se comprovar a trihidroxilação do anel B em C-3', C-4' e C-5' pela presença de um singleto referente aos deslocamentos de H-2' e H-6' (δ 6,39), pelo fato de serem quimicamente equivalentes. Tornou-se possível, pelo espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (fig. 32), verificar o acoplamento entre H-3 e H-4_{ax} ($J= 7,8$ Hz), H-3 e H-2 ($J= 7,2$ Hz) e H-2 e H-2'/H-6' comprovando a identidade desses hidrogênios.

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação ótica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$ (metanol; $c= 0,1$). Assim identificou-se à substância I como sendo galocatequina, além de estar de acordo com a literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002).

Tabela 10 – Dados de RMN ^1H para a **substância I** com as hidroxilas livres;
 CD_3OD ; 300 MHz

SUBSTÂNCIA I – GALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax	2,49	dd	$^2J_{\text{H-4ax-H-4eq}} = 16,2$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}} = 7,8$
H-4eq	2,80	dd	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 16,2$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 5,4$
H-3	3,96	ddd	$^3J_{\text{H-3-H-2}} = 7,2$ $^3J_{\text{H-3-H-4ax}} = 7,8$ $^3J_{\text{H-3-H-4eq}} = 5,4$
H-2	4,52	d	$^3J_{\text{H-2-H-3}} = 7,2$
H-6	5,85	d	$^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2,4$
H-8	5,91	d	$^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2,4$
H-2'/H-6'	6,39	s	

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

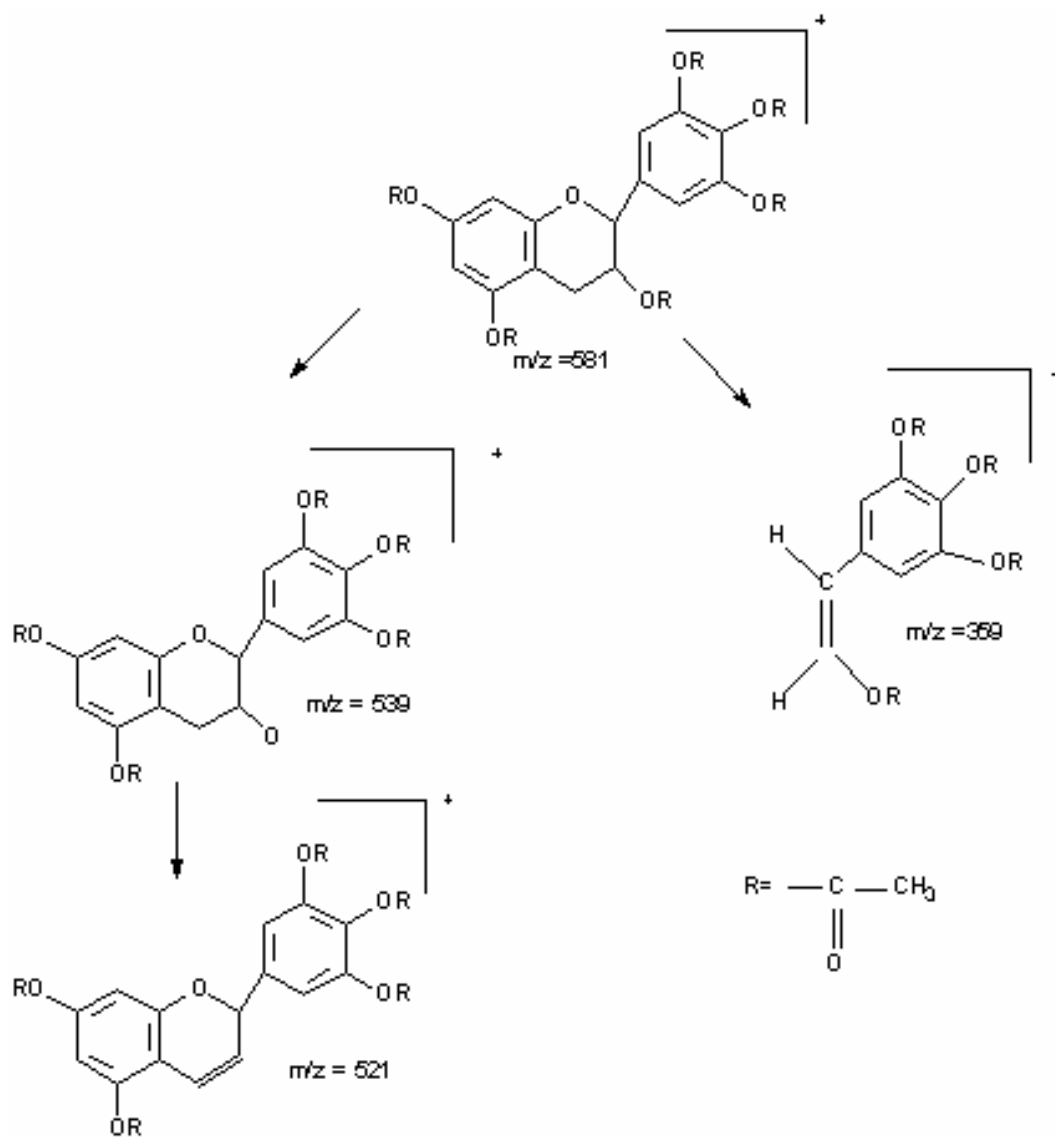


Figura 30 – Esquema de fragmentação das substâncias I e II peracetiladas por ESI positivo

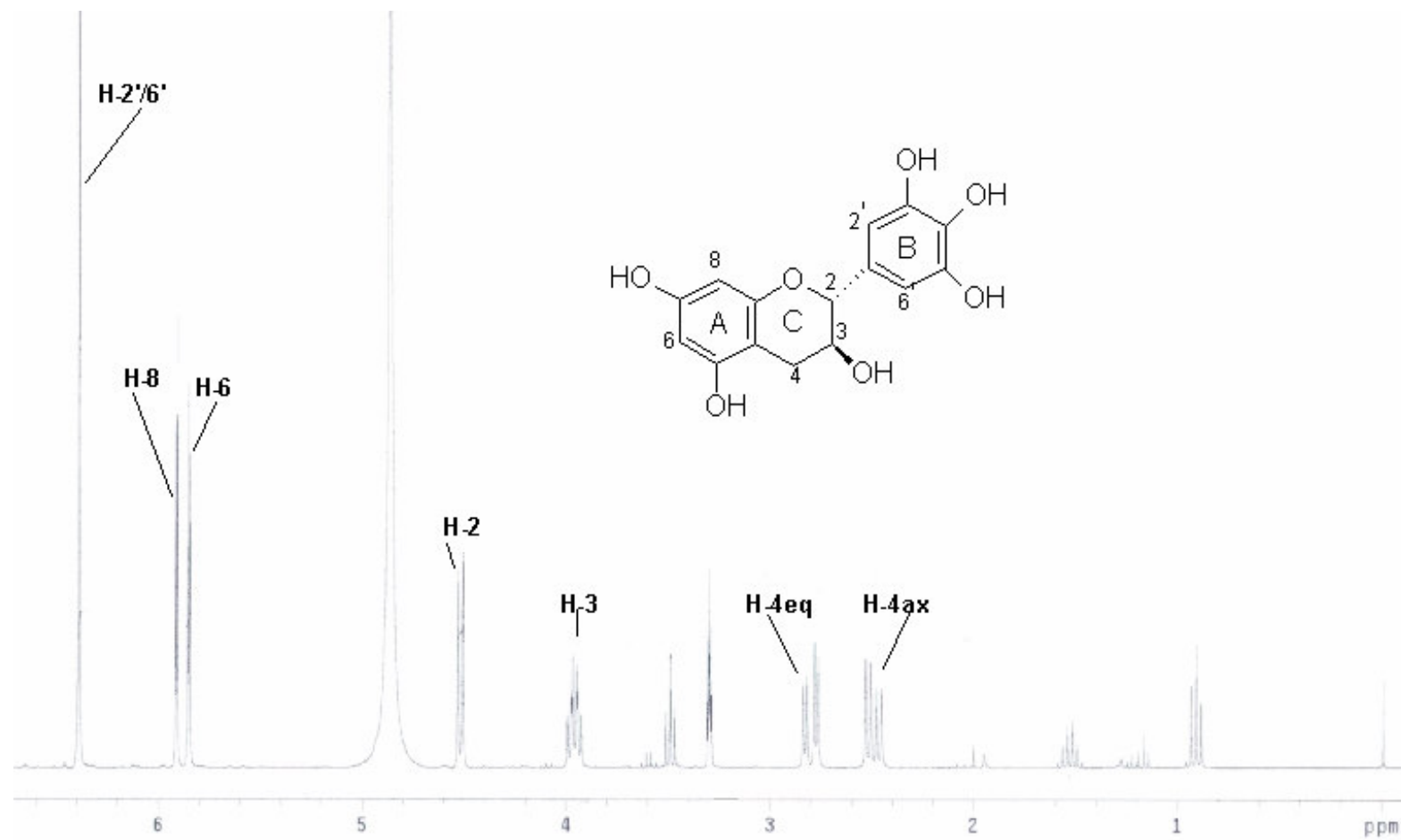


Figura 31 – Espectro de RMN ^1H da galocatequina com hidroxilas livres (CD_3OD relativo para TMS; 300 MHz)

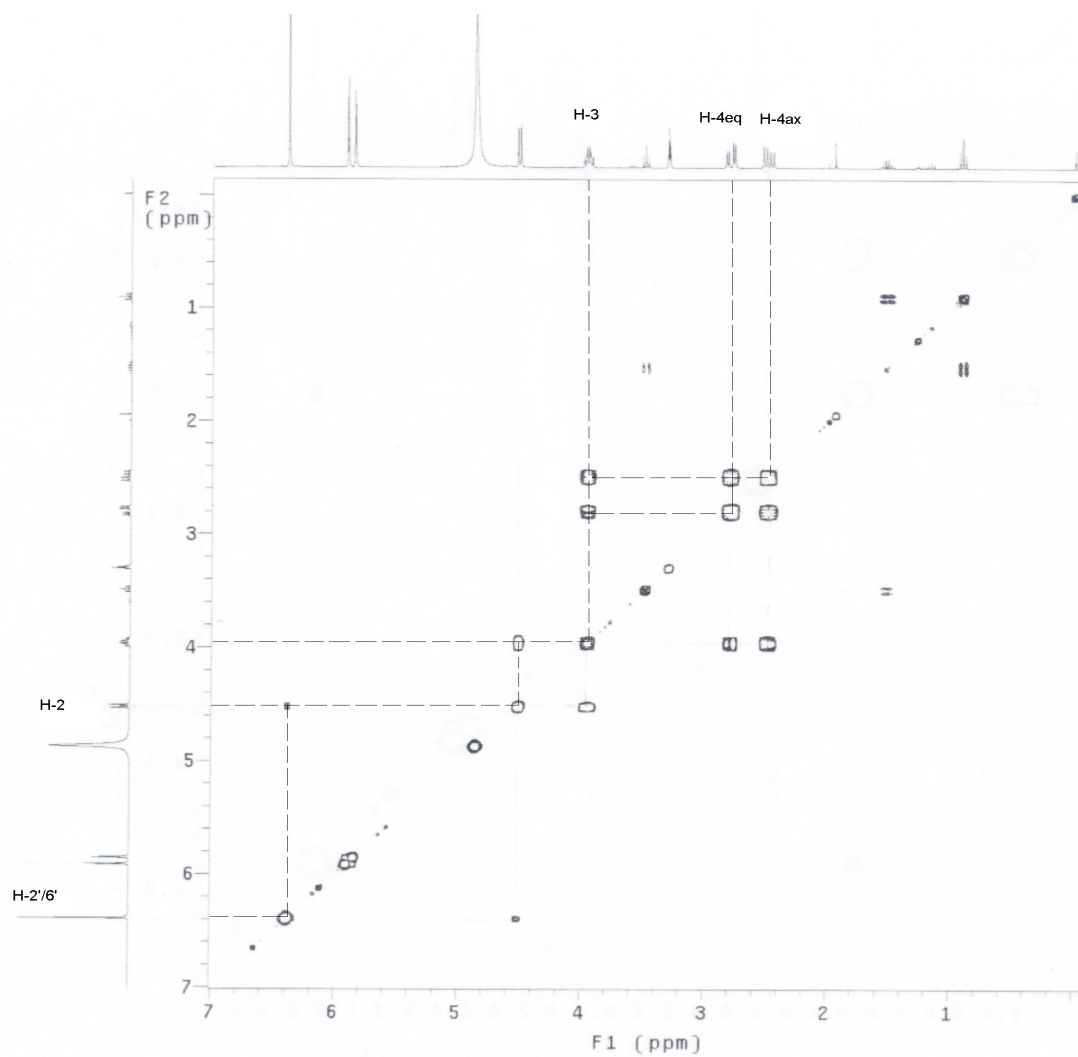


Figura 32 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da galocatequina com hidroxilas livres (CD_3OD , 300MHz)

3.1.2 Epigalocatequina – Substância II

A **substância II** forneceu dados semelhantes aos da **substância I**, com $R_f = 0,66$ e coloração em CCD e para o pico do íon pseudomolecular $[M+Na]^+$ ($m/z = 581$). Assim foi possível confirmar uma substância de estrutura semelhante à galocatequina (**substância I**). O processo de fragmentação mostrou-se idêntico ao da substância I (fig. 30). Entretanto, como percentuais dos fragmentos são diferentes para as duas substâncias, optou-se por não citá-los.

Os dados de deslocamentos referentes à **substância II** encontram-se na tabela 11 (δ em ppm) e o espectro de RMN 1H (fig. 33) foi realizado com metanol deuterado, por se tratar de uma substância não acetilada. Não foi possível a diferenciação entre $H-4_{ax}$ e $H-4_{eq}$, apresentando-se como multipletos entre δ 2,68 – 2,87. A constante de acoplamento H-2 e H-3 foi pequena, não sendo possível calculá-la ($J \leq 1,0$ Hz). O pico referente a H-2 apresenta-se como um pseudo-singlete e H-3 como um multipletos resultante do acoplamento com H-2 e H-4 (equatorial e axial). Segundo, Weinges *et al.* (1969), a pequena constante de acoplamento entre H-2 e H-3, caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. Os demais deslocamentos se assemelham àqueles obtidos para a **substância I**. No COSY $^1H/^1H$ (fig. 34) foi possível verificar o acoplamento entre H-3 e H-4 (equatorial e axial), H-3 e H-2 e H-2 e H-2'/H-6'. A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -10,8^\circ$ (metanol; $c = 0,5$).

De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas e dos dados espectroscópicos (tab. 11 e fig. 33 e 34) e quando comparados os dados com a literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002), confirma-se à **substância II** como sendo **epigalocatequina**.

Tabela 11 – Dados de RMN ¹ H para **substância II** com hidroxilas livres;
CD₃OD; 300 MHz

SUBSTÂNCIA II – EPIGALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J(hz)
H-4 _{eq} /H-4 _{ax}	2,68-2,87	m	
H-3	4,14-4,17	m	
H-2	4,74	ps	
H-6	5,90	d	⁴ J _{H-6,H-8} = 2,4
H-8	5,93	d	⁴ J _{H-8,H-6} = 2,4
H-2'/H-6'	6,51	s	

ps = pseudo-singlete; s = singlete; d = dublete; m = multiplete

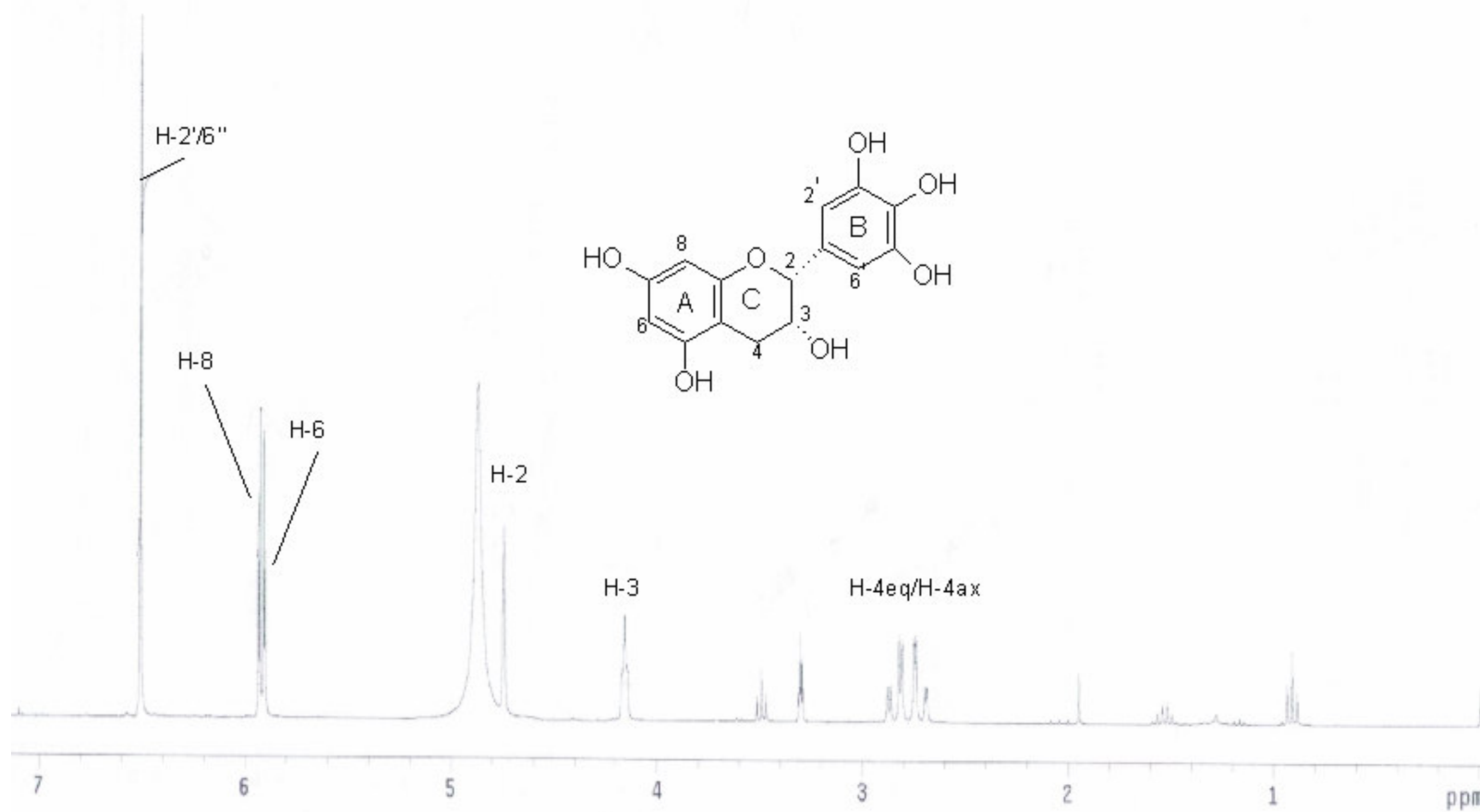


Figura 33 – Espectro de RMN ^1H da epigalocatequina com hidroxilas livres (CD_3OD relativo para TMS; 300 MHz)

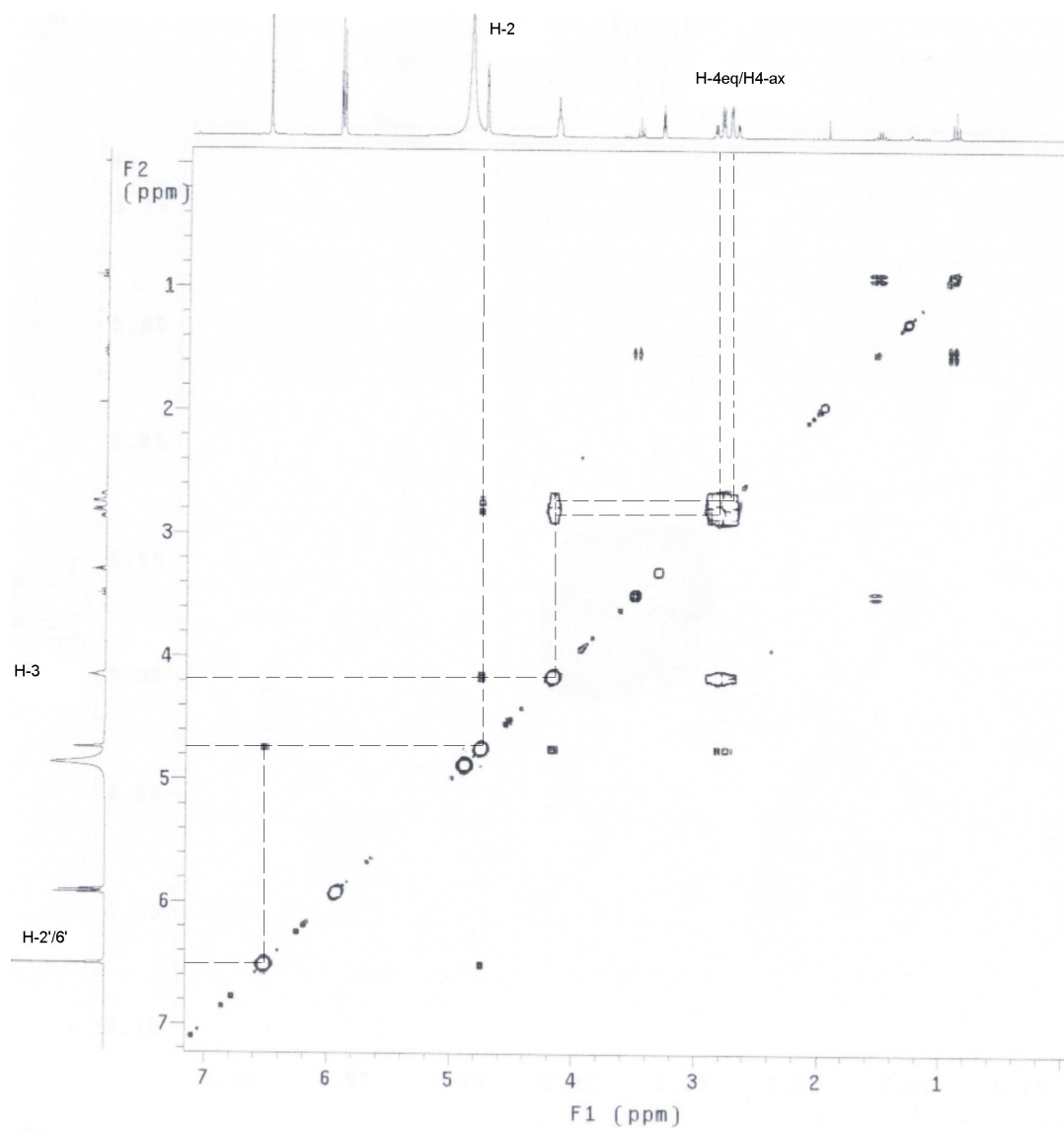


Figura 34 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da epigalocatequina (CD_3OD , 300 MHz)

A acetilação de substâncias com hidroxilas livres realiza-se como forma de facilitar a investigação analítica. Segundo Outtrup e Schaumburg (1981), como substâncias derivatizadas, as mesmas apresentam comportamento químico mais estável e mostram-se nos espectros de RMN com sinais padrão. Assim, os espectros de RMN apresentam características próprias para a identificação dos compostos analisados, tornando a identificação mais segura, quando se compara os dados obtidos com dados de literatura.

O espectro de ^1H RMN das substâncias I e II acetiladas realizado em clorofórmio deuterado (fig. 35 e 36), bem como as tabelas 12 e 13, relacionando os deslocamentos dos hidrogênios, mostram algumas nuances referentes ao processo de derivatização. Os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) se deslocam no espectro para campos mais baixos (desprotegidos). O hidrogênio H-2, desloca-se de δ 4,52 para \square 5,12 (cerca de 0,6 ppm) em galocatequina e de δ 4,74 para 5,08, (cerca de 0,34 ppm) em epigalocatequina. Os hidrogênios do anel A (H-6 e H-8), e do anel B (H-2'/H-6'), conferem com os dados de literatura, estabelecidos por Mello *et al.* (1996).

Tabela 12 – Dados de RMN ¹ H para **substância I** peracetilada; CDCl₃; 300 MHz**SUBSTÂNCIA I – GALOCATEQUINA**

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax	2,66	2,66	dd	² J _{H-4ax,H-4eq} = 16,8 ³ J _{H-4ax,H-3} = 6,6
H-4eq	2,91	2,92	dd	² J _{H-4eq,H-4ax} = 16,8 ³ J _{H-4eq,H-3} = 5,1
H-2	5,12	5,12	d	³ J _{H-2,H-3} = 6,3
H-3	5,20	5,19	ddd	³ J _{H-3,H-2} = 6,3 ³ J _{H-3,H-4ax} = 6,6 ³ J _{H-3,H-4eq} = 5,1
H-6	6,60	6,60	d	⁴ J _{H-6,H-8} = 2,4
H-8	6,66	6,66	d	⁴ J _{H-8,H-6} = 2,4
H-2'/H-6'	7,12	7,12	s	

ps = pseudo-singleteo; s = singleteo; d = dubleteo; m = multipleteo

* Mello *et al.* 1996Tabela 13 – Dados de RMN ¹ H para **substância II** peracetilada; CDCl₃; 300MHz**SUBSTÂNCIA II - EPIGALOCATEQUINA**

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J(Hz)
H-4 _{eq} /H-4 _{ax}	2,85-3,00	2,82-3,04	m	
H-2	5,08	5,08	ps	
H-3	5,37-5,38	5,35-5,42	m	
H-6	6,57	6,57	d	⁴ J _{H-6,H-8} =2,4
H-8	6,67	6,67	d	⁴ J _{H-8,H-6} = 2,4
H-2'/H-6'	7,22	7,22	s	

ps = pseudo-singleteo; s = singleteo; d = dubleteo; m = multipleteo

* Mello *et al.* 1996

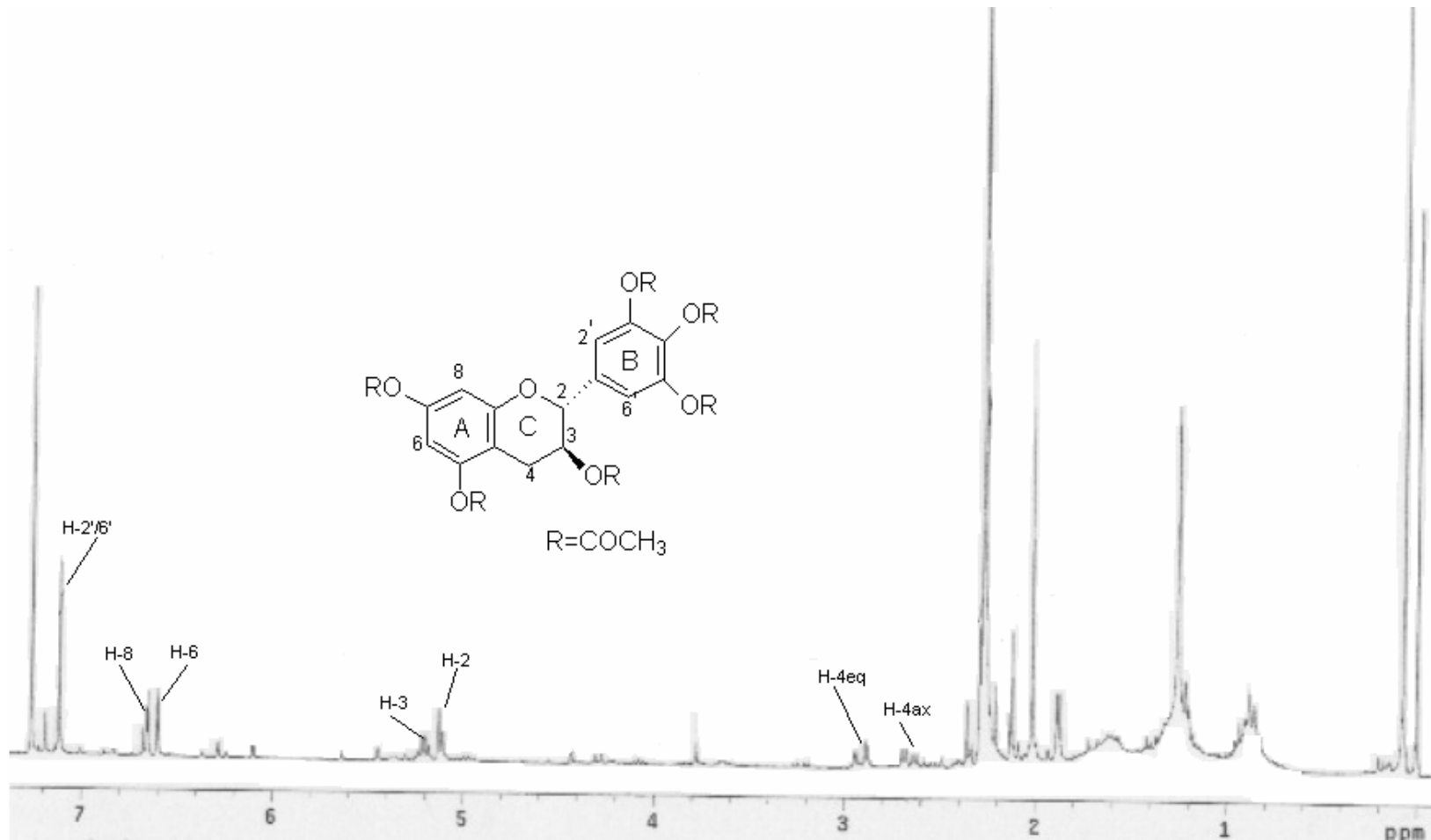


Figura 35 – Espectro de RMN ^1H da galocatequina peracetilada (CDCl_3 relativo para TMS; 300 MHz)

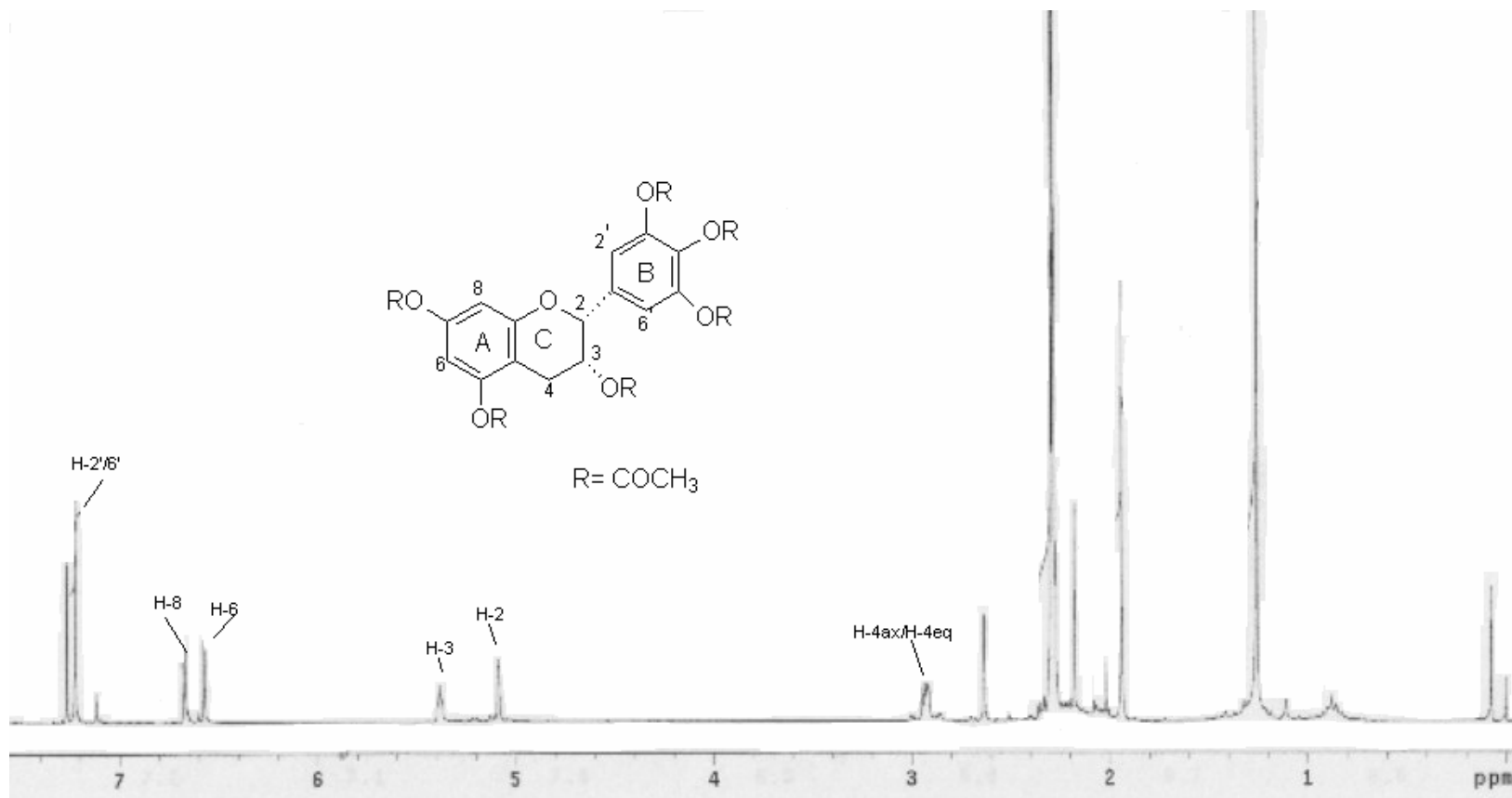


Figura 36 – Espectro de RMN ¹H da epigalocatequina peracetilada (CDCl₃ relativo para TMS; 300 MHz)

O principal aspecto de diferenciação entre galocatequina e epigalocatequina está nos deslocamentos e nas constantes de acoplamento referentes aos hidrogênios H-2 e H-3. Galocatequina apresentou $J_{H-2-H-3} = 7,2$ Hz (δ 4,52 ppm), enquanto que em epigalocatequina, o H-2 mostrou-se como um pseudo-singlete com $J_{H-2-H-3} < 2,0$ Hz (δ 4,74 ppm) (tab.12 e 13).

A confirmação da configuração relativa entre H-2 e H-3 da **substância I (galocatequina)** sendo do tipo *2,3-trans*, é devido a uma constante de acoplamento ($J_{2,3}$) grande em torno de 8-10 Hz (WEINGES *et al.*, 1969; KOLODZIEJ, 1992). Já para a **substância II (epigalocatequina)** a configuração do tipo *2,3-cis* pode ser confirmada pela pequena constante de acoplamento, menor que 2,0 Hz. Assim, após a análise e a comparação com dados de literatura, pôde-se diferenciar as substâncias e identificá-las como **galocatequina (substância I)** e **epigalocatequina (substância II)**.

Essas substâncias já foram isoladas e identificadas em diversas espécies vegetais, no entanto, é a primeira vez que foram isoladas e caracterizadas nesta espécie vegetal.

5.3.2 Dímeros

5.3.2.1 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina – Substância III

A **substância III** isolada por CCDP da F#B4.2 (flux. 2), apresentou-se em CCD com o valor de $R_f = 0,42$ (seção 4.7.2) e com coloração azul escura intensa em $FeCl_3$. O espectro de massas apresentou pico do íon pseudomolecular $[M+Na^+]^+$ em m/z 1023 (fig.37), característico de substâncias diméricas acetiladas.

O espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (fig. 38) da substância acetilada forneceu indícios representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico.

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 utilizaram a relação dos sinais de rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações tipo 4→6 é na proporção de 1:1, enquanto que das substâncias com ligações do tipo 4→8 existe uma conformação de rotâmeros dominante. A duplicidade dos sinais depende da rigurosidade da temperatura de medida e do tipo de solvente empregado (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway *et al.* (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas do sistema de spins AB dos prótons 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 (KOLODZIEJ, 1992). Adicionalmente, o

hidrogênio H-2 de substâncias com ligação 4→8 apresentam-se com deslocamentos entre δ 4,37 e 5,01 ppm, enquanto substâncias ligadas 4→6, entre δ 5,04 e 5,35 ppm.

Uma característica marcante de metóxiacetatos de dímeros de robinetidininas e fisetidininas no espectro de RMN ^1H em CDCl_3 é o sinal do hidrogênio da posição 5 (H-5) do anel A. Esse hidrogênio apresenta-se como um duplete largo com uma constante de acoplamento de $J_{5,6} \geq 8,0$ na região entre δ 6,74-6,82 ppm (BOTHA *et al.*, 1981; NUNES *et al.*, 1989). Bam *et al.* (1990) isolaram pela primeira vez robinetidinol-3-O-galato das cascas de *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) e demonstraram que a região do H-5 (A) encontra-se em campos mais baixos (δ 6,97 ppm). Diagnóstico significativo, no entanto, refere-se ao hidrogênio H-3(C). Com dímeros 5-deóxi-proantocianidinas o hidrogênio H-3(C) aparece em campos mais altos como pseudotripleto com constante de acoplamento de $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} \approx 20,0$ Hz (DREWES *et al.*, 1967; STEYNBERG *et al.*, 1990; MELLO *et al.*, 1996). Botha *et al.* (1981), diferenciaram ligações ($4\alpha \rightarrow 8$) e ($4\beta \rightarrow 8$) em profisetidininas de acordo com as seguintes características: o hidrogênio H-3(C) de dímeros com ligação do tipo ($4\alpha \rightarrow 8$) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*trans*) aparecem como pseudotripletos na região de δ 5,9-6,1 ppm com um somatório na constante de acoplamento de $\Sigma J \approx 20,0$ Hz, enquanto que dímeros com ligação de tipo ($4\beta \rightarrow 8$) (configuração relativa 2,3-*trans*; 3,4-*cis*) aparecem como um quarteto na região de δ 5,3-5,6 ppm e com somatório na constante de acoplamento de $\Sigma J \approx 15,5$ Hz.

O espectro de RMN ^1H da **substância III** apresenta um singlete em δ 3,80 ppm, que pela integração corresponde a 6 hidrogênios indicando dois grupamentos metoxila. Os dados de deslocamento (δ ppm) encontram-se na tabela 14. Através do espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (fig. 39) foi possível atribuir os acoplamentos entre o

hidrogênio alifático H-2 (C) com H-3 (C), e dos hidrogênios H-2 e H-4ax/H-4eq (F) com H-3 (F) e determinar os picos referentes aos hidrogênios H-2'/H-6' dos anéis B (δ 7,12) e E (δ 6,98). A configuração 2,3-*trans* do anel F é comprovada pelo dubleto em δ 5,29 [H-2 (F)] com constante de acoplamento de $J_{H-2(F)-H-3(F)} = 10,8$ Hz. A unidade superior da substância foi caracterizada como 5-deóxi-flavan-3-ol devido a presença do dubleto em δ 7,04 [H-5 (A)] com constante de acoplamento $J_{H-5-H-6} = 8,1$ Hz. Dessa forma confirma-se a unidade superior como sendo robinetinidol. A ligação ($4\beta \rightarrow 6$) foi determinada por comparação com a literatura (MELLO *et al.*, 1996). Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior R_f diferente daquele apresentado para o cloridrato de pelargonidina (0,65 e 0,60, respectivamente). Dessa forma, a **substância III** foi identificada como sendo **4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\beta \rightarrow$ 6)-4'-O-metil-galocatequina**.

Substância semelhante foi isolada de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por Mello (1995), sem a presença do grupamento metóxi na posição 4', significando que, essa substância é inédita, portanto, isolada pela primeira vez de material vegetal.

Tabela 14 – Dados de RMN ^1H da **substância III** peracetilada; CDCl_3 ; 300 MHz

SUBSTÂNCIA III
4'-O-METIL-ROBINETINIDOL-(4 β →6)-4'-O-METIL-GALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (F)	2,66	dd	$^2J_{\text{H-4ax(F),H-4eq(F)}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4ax(F),H-3(F)}} = 6,6$
H-4eq (F)	2,92	dd	$^2J_{\text{H-4eq(F),H-4ax(F)}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4eq(F),H-3(F)}} = 5,7$
H-4 (C)	-	-	-
H-3 (C)	5,08	dd	$^3J_{\text{H-3(C),H-4(C)}} = 12,3$ $^3J_{\text{H-3(C),H-2(C)}} = 6,6$
H-2 (C)	5,12	d	$^3J_{\text{H-2(C),H-3 (C)}} = 6,6$
H-3 (F)	5,20	ddd	$^3J_{\text{H-3(F)-H-4ax(F)}} = 6,6$ $^3J_{\text{H-3(F)-H-4eq(F)}} = 5,7$ $^3J_{\text{H-3(F),H-2(F)}} = 10,8$
H-2 (F)	5,29	d	$^3J_{\text{H-2(F)-H-3(F)}} = 10,8$
H-6 (A)	6,60	dd	$^4J_{\text{H-6(A)-H-5(A)}} = 8,1$ $^3J_{\text{H-6(A)-H-8(A)}} = 2,1$
H-8 (A)	6,66	d	$^4J_{\text{H-8(A)-H-6(A)}} = 2,1$
H-2'/6' (E)	6,98	s	
H-5 (A)	7,04	d	$^3J_{\text{H-5(A)-H-6(A)}} = 8,1$
H-2'/6' (B)	7,12	s	
H-8 (D)	-	-	-

s = singleteo; d = dubleteo; dd = duplo dubleteo; ddd = duplo duplo dubleteo

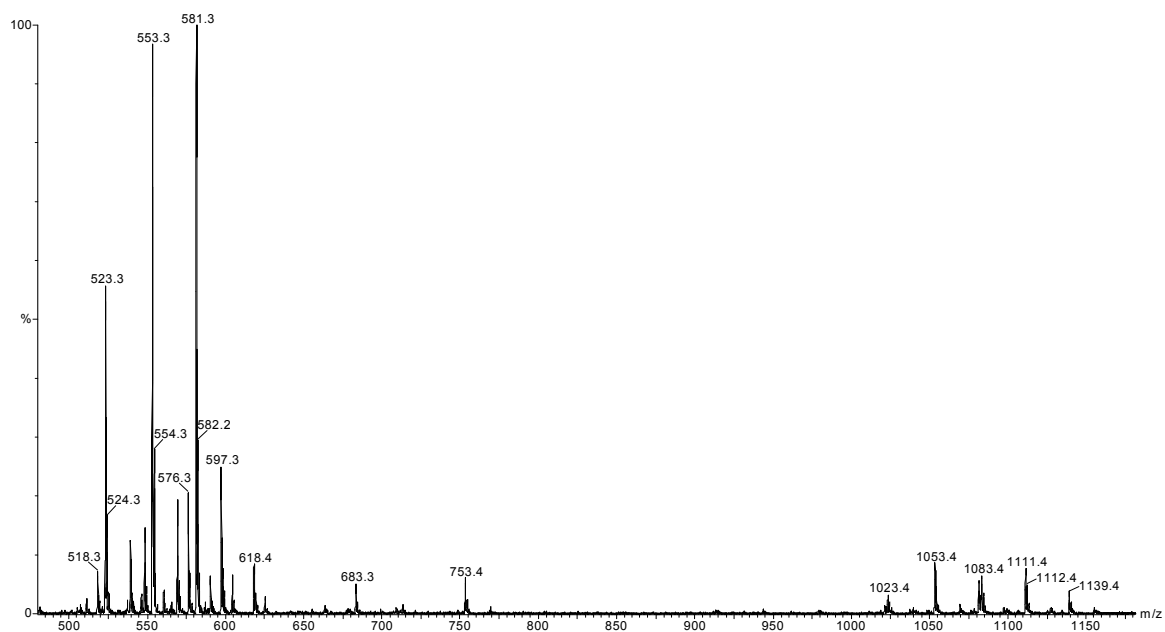


Fig. 37 – Espectro de massas da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina peracetilada por ESI positivo

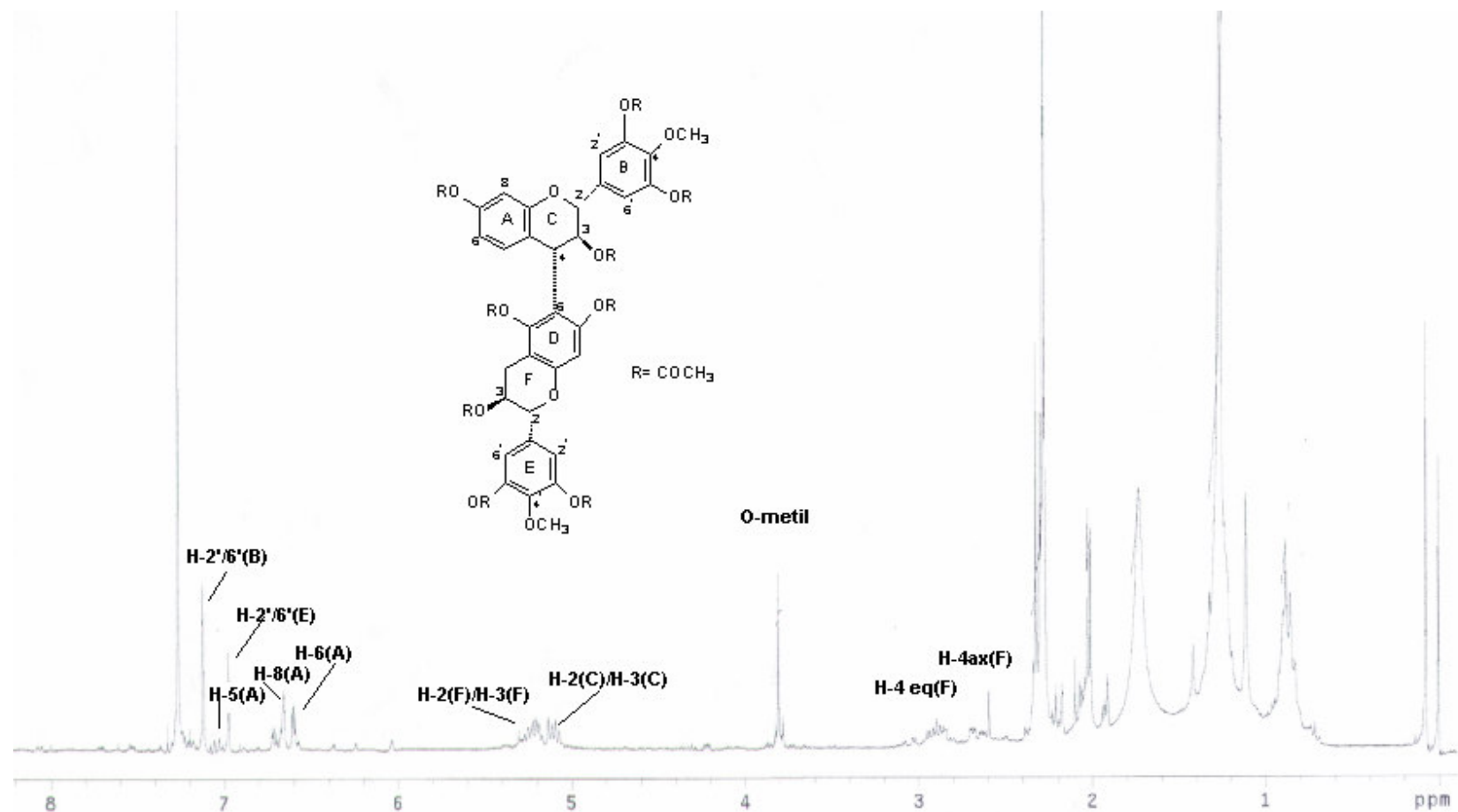


Figura 38 – Espectro de RMN ¹H da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina (CDCl₃ relativo para TMS; 300 MHz)

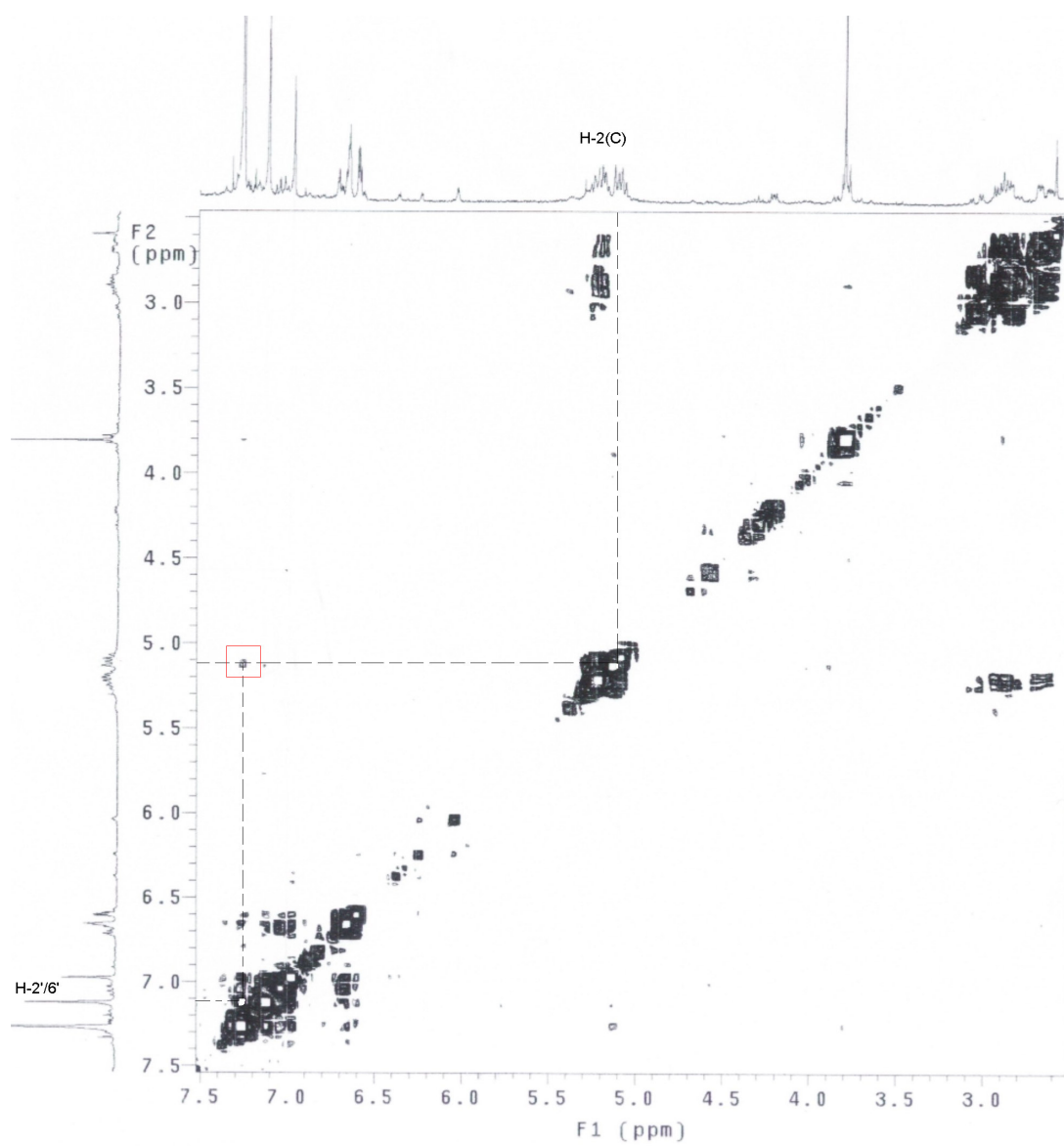
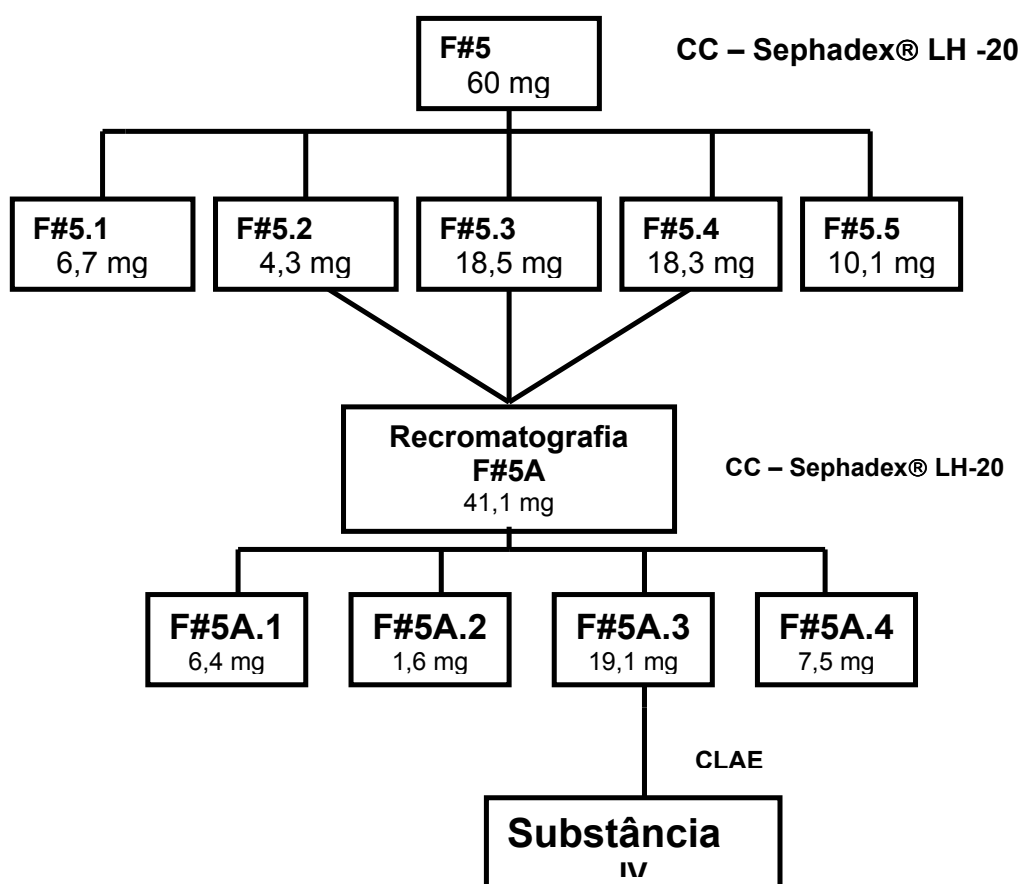


Figura 39 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina (CDCl_3 , 300 MHz)

O fracionamento de F#5 encontra-se disposto no fluxograma 3.

Realizou-se CC em Sephadex® LH-20, que deu origem à novas 5 subfrações que foram analisadas por CCD e reunidas por similaridade. Em análise final da CCD, as subfrações F#5.2, F#5.3 e F#5.4, foram juntadas novamente, e realizada nova cromatografia em coluna contendo Sephadex® LH-20, sendo submetida à seqüência de eluentes descritos na seção 4.7.1.2, dando origem a novas 4 subfrações (F#5A.1, F#5A.2, F#5A.3, F#5A.4).



Fluxograma 3 – Fracionamento cromatográfico da F#5

5.3.2.2 Epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina – Substância IV

A subfração F#5A.3, após CC, mostrou evidências em CCD de se tratar de uma substância dimérica, devido ao valor de $R_f = 0,36$ (seção 4.7.2), além da intensa coloração azul quando revelado com $FeCl_3$, característica de taninos condensados. Após análise do espectro de RMN 1H , a subfração F#5A.3 mostrou uma mistura de substâncias. Assim, optou-se pela derivatização química (acetilação), seguida de CCDP. Mesmo assim, não foi possível a separação da mistura e optou-se por realizar a separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se coluna Lichrospher® 100 CN (250 x 4mm), 5 μm de acordo com a seção 4.7.5.2, resultando no isolamento das **substâncias IV e I**.

O espectro de massas apresentou pico do íon pseudomolecular $[M+Na^+]^+$ em 1133 (fig. 40), característico de substâncias diméricas acetiladas.

O espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (fig. 41) da substância acetilada (F#5A.3.1), forneceu dados representativos que confirmaram tratar-se de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico. Os dados de deslocamentos (δ em ppm) encontram-se na tabela 15. A trihidroxilação dos anéis B e E foi caracterizada pelos singletos em campos mais baixo, δ 6,83 [H-2'/6' (E)] e δ 7,19 [H-2'/H-6' (B)]. É possível observar pelos espectros de RMN 1H e COSY $^1H/^1H$ (fig. 41 e 42) o acoplamento entre os hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A), com constante de $J_{H-6-H-8} = 1,8$ Hz e deslocamentos químicos δ 6,10 e δ 6,29 respectivamente. Essas posições desses hidrogênios demonstram, segundo HEMINGWAY *et al.* (1982), KOLODZIEJ (1986) e DANNE (1994) uma ligação do tipo (4 β →8). Pelo espectro de COSY $^1H/^1H$ (fig. 42) atribuiu-se os acoplamentos entre os hidrogênios H-2(C) e H-4(C) e, H-2(C) e H-3(C), e também entre os hidrogênios H-2(F) e H-3(F) e, H-3(F) e H-4ax/H-4eq(F). As constantes de acoplamento dos hidrogênios H-2(F) e H-3(F) ($J_{2,3} = 9,9$

Hz) indicam a configuração relativa do anel F como sendo do tipo 2,3-*trans*, o anel C apresenta configuração relativa do tipo 2,3-*cis*, devido à presença do pseudo-singlete em δ 4,45, relativo ao acoplamento entre H-2(C) e H-3(C), com constante de acoplamento $J_{2,3} \leq 1,0$ Hz. Confirma-se, ainda, a ligação (4 β →8), segundo KOLODZIEJ (1992), de acordo com a posição do H-2(F) em δ 4,29. Entretanto, a decisão final da configuração absoluta depende da análise do espectro de dicroísmo circular. Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior o mesmo valor de R_f que o cloridrato de pelargonidina (0,60) confirmando ser um flavan-3-ol. Dessa forma, a **substância IV** foi identificada como sendo **epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina**, além de estar de acordo com a literatura (MELLO, 1995).

Essa substância é inédita nesta espécie vegetal, porém já foi isolada anteriormente de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por Mello (1995).

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H para a **substância IV** peracetilada; CDCl_3 ; 300 MHz

SUBSTÂNCIA IV
EPIGALOCATEQUINA-(4 β →8)-GALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (F)	2,54	2,54	dd	$^2J_{\text{H-4ax(F),H-4eq(F)}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4ax(F),H-3(F)}} = 9,3$
H-4eq (F)	3,23	3,23	dd	$^2J_{\text{H-4eq(F),H-4ax(F)}} = 16,5$ $^3J_{\text{H-4eq(F),H-3(F)}} = 6,3$
H-2 (F)	4,29	4,29	d	$^3J_{\text{H-2(F),H-3(F)}} = 9,9$
H-4 (C)	4,43	4,44	d	
H-3 (F)	4,94-4,99	4,97-5,02	m	
H-3 (C)	5,13-5,17	5,12-5,17	m	
H-2 (C)	5,45	5,45	ps	
H-6 (A)	6,10	6,10	d	$^4J_{\text{H-6(A),H-8(A)}} = 2,2$
H-8 (A)	6,29	6,29	d	$^4J_{\text{H-8(A),H-6(A)}} = 2,2$
H-6 (D)	6,68	6,68	s	
H-2'/6' (E)	6,83	6,84	s	
H-2'/6' (B)	7,19	7,19	s	

ps= pseudo singleto; s= singleto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; m= multipleto

* Mello, 1995

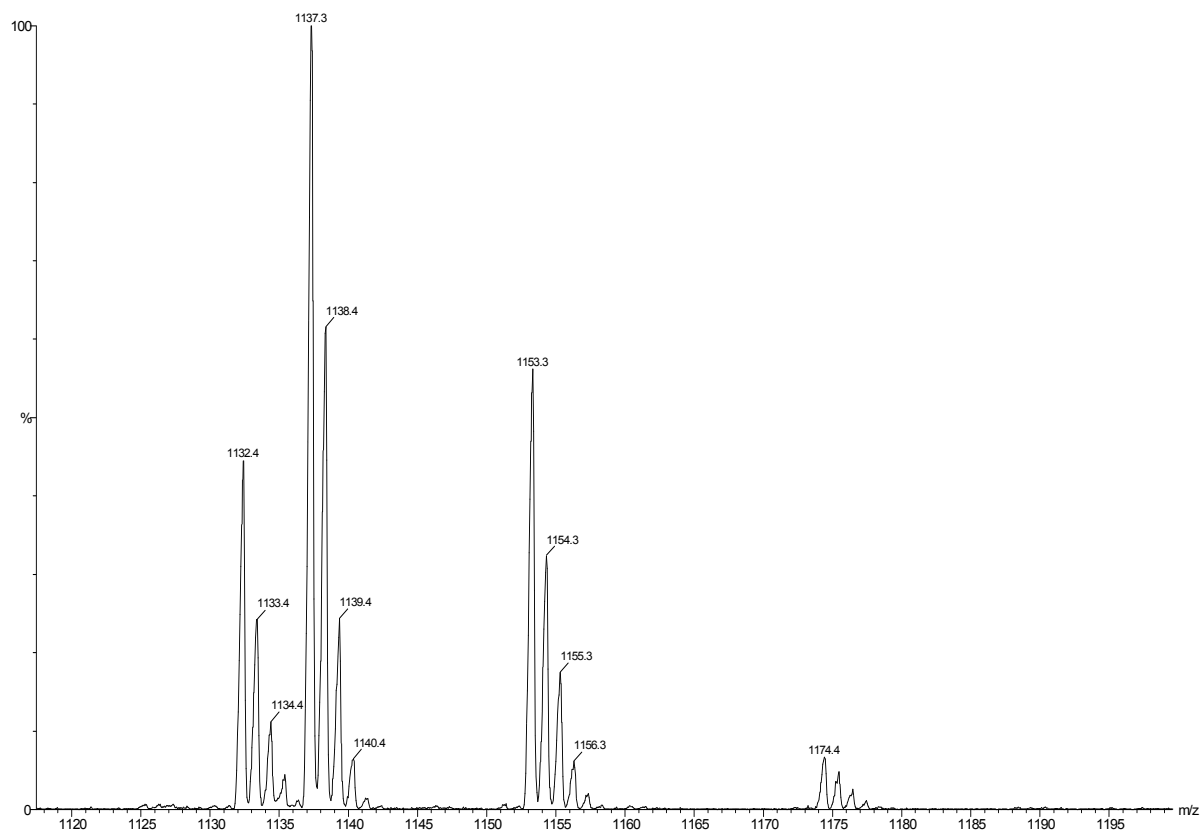


Figura 40 - Espectro de massas da epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina peracetilada por ESI positivo

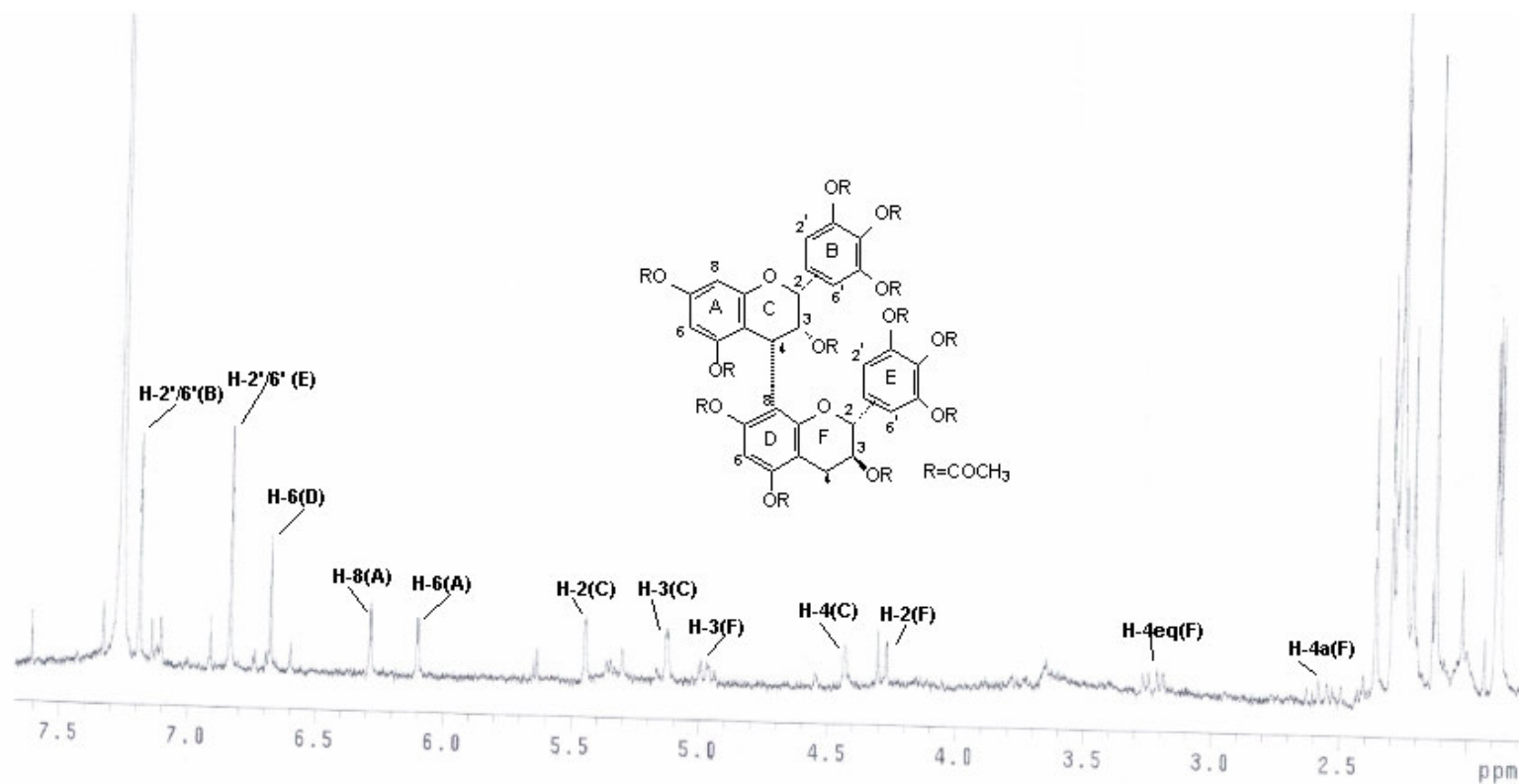


Figura 41 – Espectro de RMN ¹H da epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina (CDCl₃ relativo para TMS; 300 MHz)

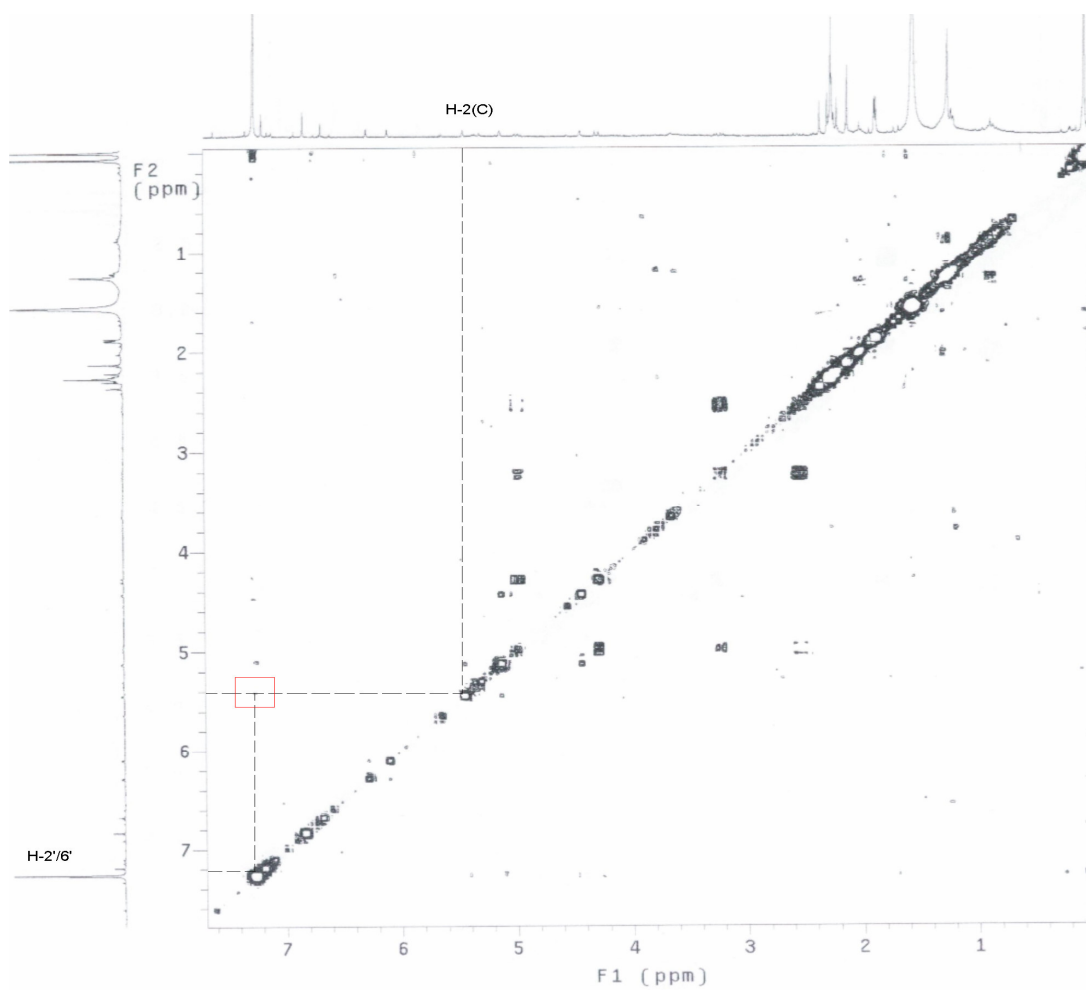
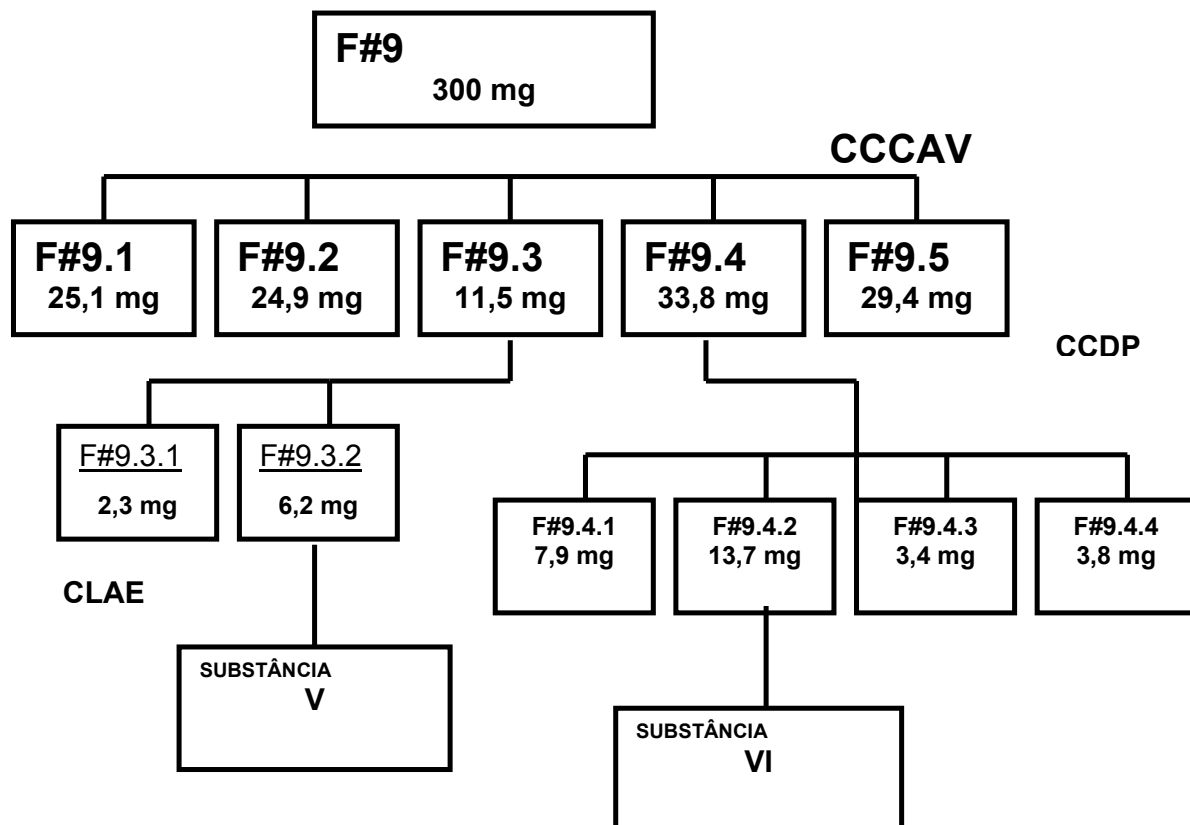


Figura 42 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina (CDCl_3 , 300 MHz)

O fracionamento da F#8 (200 mg) foi realizado em cromatografia em contra corrente (CCCAV), resultando em 6 novas frações semipurificadas, que foram acetiladas e submetidas a CCDP, as selecionadas foram medidas por espectroscopia de RMN ¹H. Todos os espectros mostraram-se inviáveis após análise criteriosa, tanto pela quantidade de amostra, como pelas impurezas ou misturas observadas.

A fração F#9 (300 mg) (flux. 4) foi submetida à cromatografia em contra corrente (CCCAV), produzindo cinco novas frações semipurificadas, que foram analisadas por CCD. Apesar do rendimento em % das cinco subfrações, as que foram viáveis para isolamento de taninos condensados foram as F#9.3 e F#9.4. As mesmas foram enviadas para análise por espectroscopia de RMN, apresentando espectros com impurezas ou misturas. As frações foram então acetilada, e submetida a CCDP, a F#9.3 originou duas novas subfrações. A fração F#9.3.2 foi submetida a CLAE e resultou no isolamento da **substância V**. A fração F#9.4 por CCDP originou quatro novas subfrações. A fração F#9.4.2 resultou no isolamento da **substância VI** por CLAE.



Fluxograma 4 – Fracionamento químico a partir de F#9

5.3.2.3 Fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina – Substância V

A **substância V** isolada por CLAE da F#9.3 (flux. 4), apresentou-se em CCD com o valor de $R_f = 0,62$ (seção 4.7.2) e com coloração azul escura intensa em $FeCl_3$. O espectro de massas apresentou pico do íon pseudomolecular $[M+Na^+]^+$ em m/z 1021 (fig.43), característico de substâncias diméricas acetiladas.

Os deslocamentos referentes à substância V encontram-se na tabela 16 (δ em ppm), os espectros de RMN 1H (fig. 44 e 45) foram realizados em clorofórmio e acetona deuterado por se tratar de uma substância acetilada e apresentam indícios característicos de tratar-se de um dímero de tanino condensado.

O espectro de RMN 1H em acetona da **substância V** (fig. 44) demonstra um singleto em δ 6,89 [H-2'/6' (E)], confirmando a trihidroxilação do anel E. Os hidrogênios da região aromática da unidade superior apresentam-se como um sistema do tipo AMX, sendo possível determinar a presença dos hidrogênios H-5' (B) e H-2' (B) como dubletos em δ 7,14 e 7,26 respectivamente, e H-6' (B) como duplo dubleto em δ 7,38 com constantes de acoplamento de $J_{H-6'-H-5'} = 8,1$ Hz e $J_{H-6'-H-2'} = 2,4$ Hz. A unidade superior da substância foi caracterizada como fisetinidol devido o dubleto em δ 6,78 [H-5(A)] com constante de acoplamento de $J_{H-5,H-6} = 8,4$ A ligação (4 β →8) foi determinada pela somatória das constantes de acoplamento do hidrogênio H-3 (C) que aparece em δ 5,42 e $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} = 15,6$ Hz (DREWES *et al.*, 1967; STEYNBERG *et al.*, 1990; MELLO *et al.*, 1996). Através do espectro de COSY $^1H/^1H$ (fig. 41) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogenios alifáticos H-2 e H-4 (C) com H-3 (C), e entre H-2 e H-4ax/H-4eq (F) com H-3 (F) e determinar o pico referente ao hidrogênio H-2'/H-6' do anél E (δ 7,05) As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ($J_{H-2,H-3} = 7,2$ Hz e $J_{H-3,H-4} = 8,4$ Hz) indicam a configuração relativa do anel como 2,3-*trans*-3,4-*trans*. A configuração relativa 2,3-

trans do anel F é comprovada pelo dubleto em δ 4,27 [H-2 (F)] com constante de acoplamento de $J_{H-2(F)-H-3(F)} = 8,4$ HZ. A análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior um valor de Rf diferente do encontrado para cloridrato de pelargonidina (0,64 e 0,60 respectivamente). Dessa forma, a **substância V** foi identificada como sendo **fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina**, além de estar de acordo com a literatura (MAI-NOPITSCH *et al.* 1990).

Está é a primeira vez que esta substância é isolada e identificada nesta espécie vegetal.

Tabela 16 – Dados de RMN ¹H da **substância V** peracetilada; a=CDCl₃; b= acetona; 300 MHz

SUBSTÂNCIA VI
FISETINIDOL-(4β→8)-GALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (F)	2,60 ^a 2,67 ^b	2,55	dd	² J _{H-4ax-H4eq(F)} = 16,5 ³ J _{H-4ax-H-3(F)} = 8,4
H-4eq (F)	3,13 ^a 3,05 ^b	2,93-3,10	dd	² J _{H-4eq-H-4ax(F)} = 16,5 ³ J _{H-4eq-H-3(F)} = 6,3
H-2 (F)	4,20 ^a 4,27 ^b		d	³ J _{H-2(F)-H-3(F)} = 8,4
H-4 (C)	4,57 ^a 4,62 ^b	4,30	d	³ J _{H-4(C)-H-3(C)} = 6,3
H-3 (F)	5,08 ^a 5,21 ^b	5,17	ddd	³ J _{H-3(F)-H-4ax(F)} = 8,4 ³ J _{H-3(F)-H-4eq(F)} = 6,3 ³ J _{H-3(F)-H-2(F)} = 8,4
H-3 (C)	5,37 ^a 5,42 ^b	5,29-5,39	dd	Σ = 15,5
H-2 (C)	5,56 ^a 5,57 ^b	5,44	d	³ J _{H-2(C)-H-3(C)} = 9,2
H-8 (A)	6,17 ^a 6,16 ^b		d	⁴ J _{H-8(A)-H-6(A)} = 2,4
H-6 (A)	6,47 ^a 6,51 ^b	6,59	dd	³ J _{H-6(A)-H-5(A)} = 8,4 ⁴ J _{H-6(A)-H-8(A)} = 2,4
H-5 (A)	6,81 ^a 6,78 ^b	6,92	d	³ J _{H-5(A)-H-6(A)} = 8,4
H-2'/6'(B)	6,89 ^a 7,05 ^b	7,13	s	
H-5' (B)	7,14 ^b		d	³ J _{H-5'(B)-H-6'(B)} = 8,1
H-2' (B)	7,26 ^b		d	³ J _{H-2'(B)-H-6'(B)} = 2,4
H-6' (B)	7,38 ^b		dd	³ J _{H-6'(B)-H-5'(B)} = 8,1 ⁴ J _{H-6'(B)-H-2'(B)} = 2,4

s = singleto; d = dubleto; dd = duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; pt = pseudotripleto

* Mai-Nopitsch *et al.* 1990

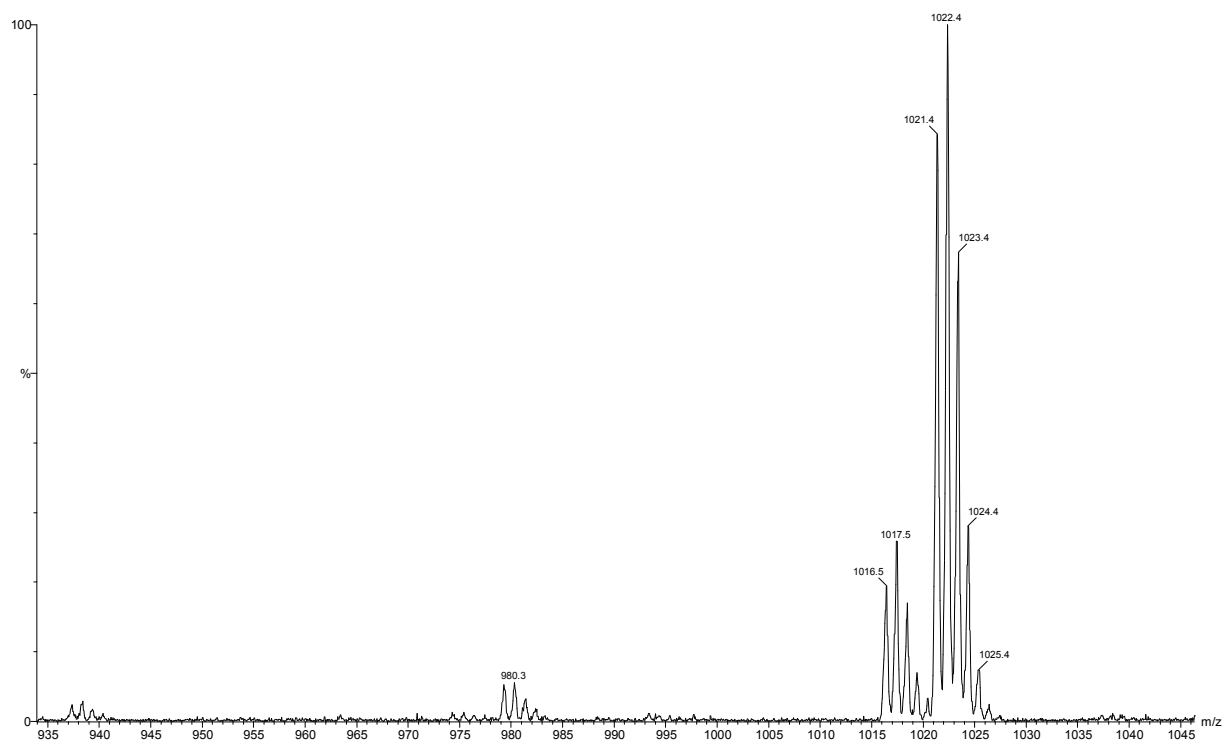


Figura 43 - Espectro de massas de fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada por ESI positivo

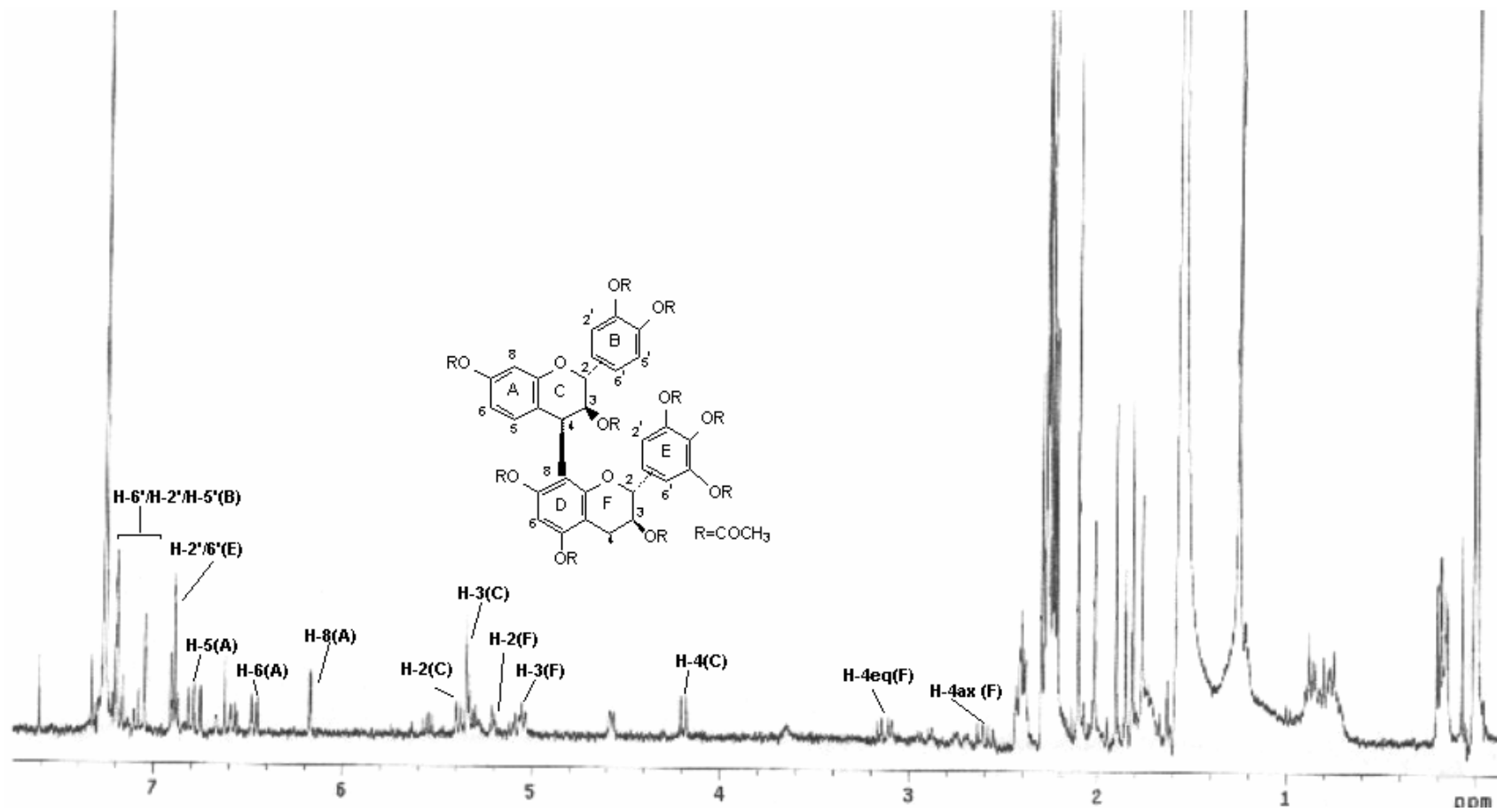


Figura 44 – Espectro de RMN ¹H da fisetinidol-(4β→8)-galocatequina peracetilada (CDCl₃ relativo para TMS; 300 MHz)

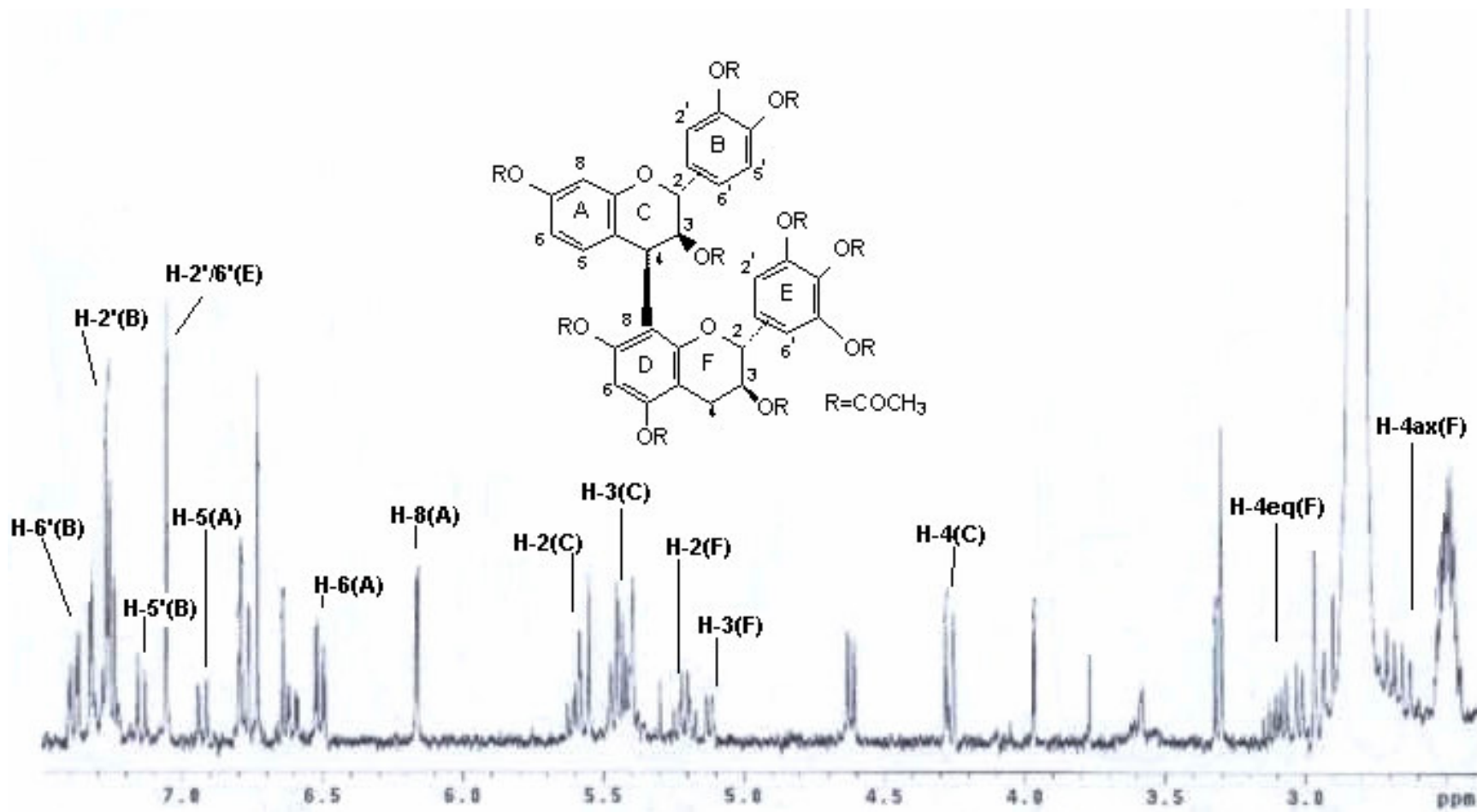


Figura 45 – Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina peracetilada (Acetona; relativo para TMS; 300 MHz)

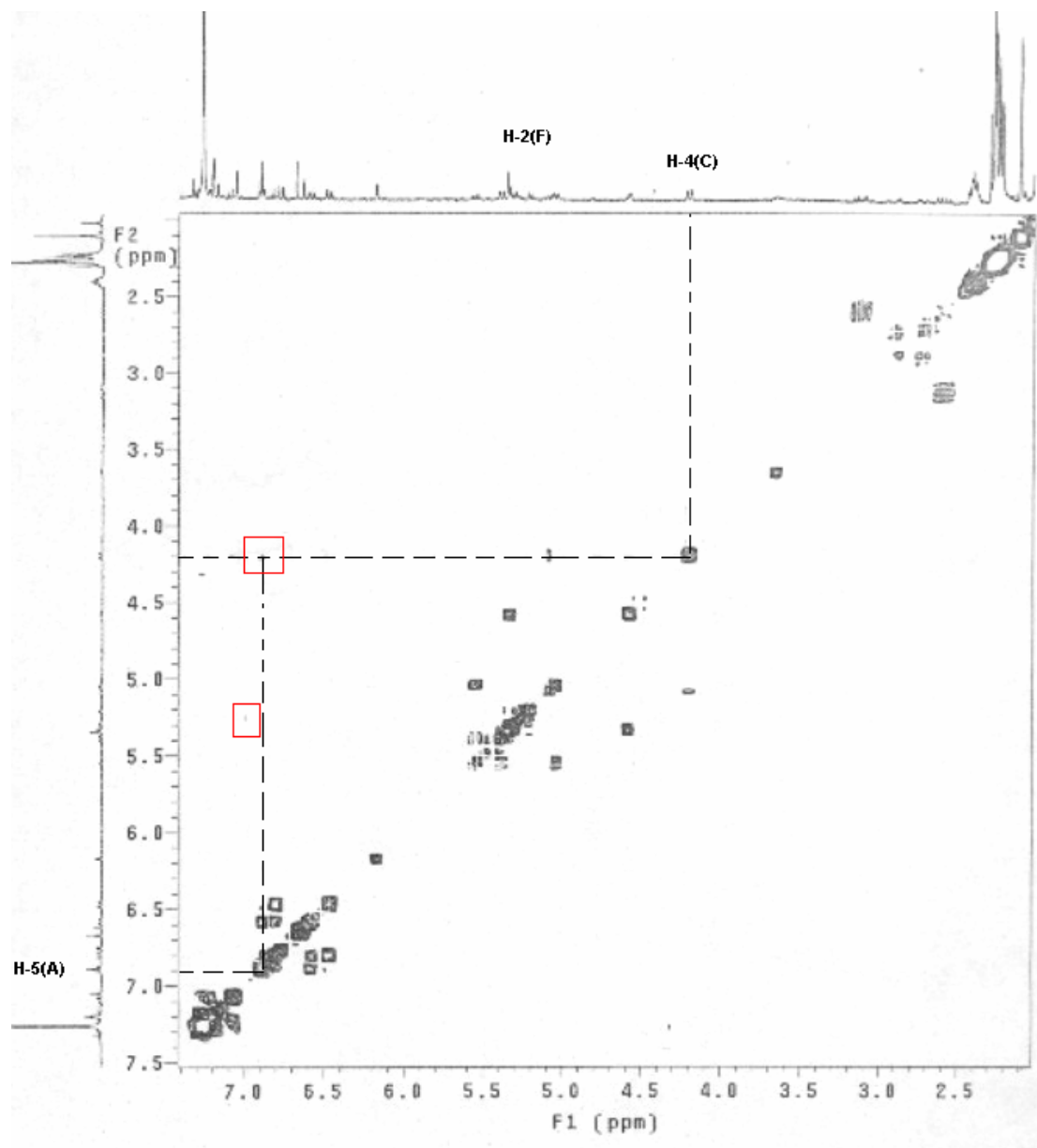


Figura 46 – Espectro de COSY ¹H/¹H da fisetinidol-(4β→8)-galocatequina (CDCl₃, 300 MHz)

5.3.2.4 Fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina – Substância VI

Na CCD, a **substância VI** apresentou-se com uma mancha de coloração azul intensa após revelação com FeCl₃, com R_f = 0,41 (seção 4.7.2), fornecendo indícios característicos de taninos condensados do tipo dimérico. O espectro de massas apresentou pico do íon pseudomolecular [M+Na⁺]⁺ em *m/z* 1021 (fig.47), confirmando tratar-se de substância dimérica acetilada.

Os espectros de RMN ¹H foram realizados em CDCl₃ e acetona deuterada, apresentando características de dímero peracetilado (fig. 48 e 49). Os dados de deslocamento (δ em ppm) encontram-se na tabela 17. O espectro de RMN ¹H da **substância VI** demonstra um singlete δ 6,69 [H-2'/H-6' (E)], determinado à trihidroxilação do anel E. A ligação (4 α →8) foi confirmada pelo deslocamento do hidrogênio H-3 (C) que aparece como um pseudotripleto em δ 5,81, dado discutido anteriormente por Mello *et al.* (1996). Através do espectro de COSY ¹H/¹H (fig. 50) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios alifáticos H-2 e H-4 (C) com H-3 (C), e entre H-2 e H-4_{ax}/H-4_{eq} (F) com H-3 (F) e determinar o pico referente aos hidrogênios H-2'/H-6' do anel E (δ 6,69). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ($J_{H-2,H-3}$ = 9,6 Hz e $J_{H-3,H-4}$ = 9,6 Hz) indicam a configuração relativa do anel como 2,3-*trans*-3,4-*trans*. A configuração 2,3-*trans* do anel F é comprovada pelo dubleto em δ 4,96 [H-2 (F)] com constante de acoplamento $J_{H-2,H-3}$ = 8,4 Hz. A unidade superior da substância foi caracterizada como fisetinidol devido ao hidrogênio H-3 (C), que aparece em δ 5,81 como pseudotripleto com constante de acoplamento de $\Sigma J_{2,3} + J_{3,4} \approx 19,8$ Hz, estando de acordo com a literatura (DREWES *et al.*, 1967; STEYNBERG *et al.*, 1990; MELLO *et al.*, 1996). Além disso, os hidrogênios da região aromática da unidade superior

apresentam-se como um sistema do tipo AMX, sendo possível determinar a presença dos hidrogênios H-2' (B) e H-5' (B) como dubletos em δ 7,09 e 7,15 respectivamente, e H-6' (B) como duplo dubleto em δ 7,02 com constantes de acoplamento de $J_{H-6'-H-5'} = 8,4$ Hz e $J_{H-6'-H-2} = 2,1$ Hz. O dubleto em δ 6,87 [H-5(A)] com constante de acoplamento de $J_{H-5,H-6} = 8,4$ auxiliou na confirmação da unidade superior como sendo uma fisetinidina. Na análise por hidrólise do dímero, verificou-se para a unidade superior um valor de Rf diferente do encontrado para cloridrato de pelargonidina (0,64 e 0,60 respectivamente). Dessa forma, a **substância VI** foi identificada como sendo **fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina**, além de estar de acordo com a literatura (MAI-NOPITSCH *et al.* 1990).

É a primeira vez que esta substância foi isolada e identificada nesta espécie vegetal.

Tabela 17 – Dados de RMN ^1H da **substância VI** peracetilada; a= CDCl_3 ; b= acetona; 300 MHz

SUBSTÂNCIA VI
FISSETINIDOL-(4 α →8)-GALOCATEQUINA

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (F)	2,65 ^a 2,72 ^b	2,66	dd	$^2J_{\text{H-4ax-H4eq(F)}} = 16,8$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3(F)}} = 8,7$
H-4eq (F)	3,05 ^a 3,02 ^b	2,99	dd	$^2J_{\text{H-4eq-H-4ax(F)}} = 16,8$ $^3J_{\text{H-4eq-H-3(F)}} = 6,0$
H-4 (C)	4,49 ^a 4,67 ^b	4,51	d	$^3J_{\text{H-4(C)-H-3(C)}} = 9,9$
H-3 (F)	4,85 ^a 4,86 ^b	4,80-4,87	ddd	$^3J_{\text{H-3(F)-H-4ax(F)}} = 8,7$ $^3J_{\text{H-3(F)-H-4eq(F)}} = 6,0$ $^3J_{\text{H-3(F)-H-2(F)}} = 8,7$
H-2 (F)	4,96 ^a 4,98 ^b	5,04	d	$^3J_{\text{H-2(F)-H-3(F)}} = 8,7$
H-2 (C)	5,01 ^a 5,06 ^b	4,90	d	$^3J_{\text{H-2(C)-H-3(C)}} = 9,6$
H-3 (C)	5,81 ^a 5,83 ^b	5,79	pt	$\Sigma = 19,5$
H-8 (A)	6,65 ^a		d	$^4J_{\text{H-8(A)-H-6(A)}} = 2,4$
H-6 (A)	6,66 ^a 6,69 ^b		dd	$^3J_{\text{H-6(A)-H-5(A)}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6(A)-H-8(A)}} = 2,4$
H-2'/6'(E)	6,69 ^a 6,73 ^b		s	
H-5 (A)	6,87 ^a 6,86 ^b	6,89	d	$^3J_{\text{H-5(A)-H-6(A)}} = 8,4$
H-6' (B)	7,02 ^b		dd	$^3J_{\text{H-6'(B)-H-5'(B)}} = 8,4$ $^4J_{\text{H-6'(B)-H-8'(B)}} = 2,1$
H-2' (B)	7,09 ^b		d	$^4J_{\text{H-2'(B)-H-6'(B)}} = 2,1$
H-5' (B)	7,15 ^b		d	$^4J_{\text{H-5'(B)-H-6'(B)}} = 8,4$

s = singleto; d = dubleto; dd = duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; pt = pseudotripleto

* Mai-Nopitsch *et al.* 1990

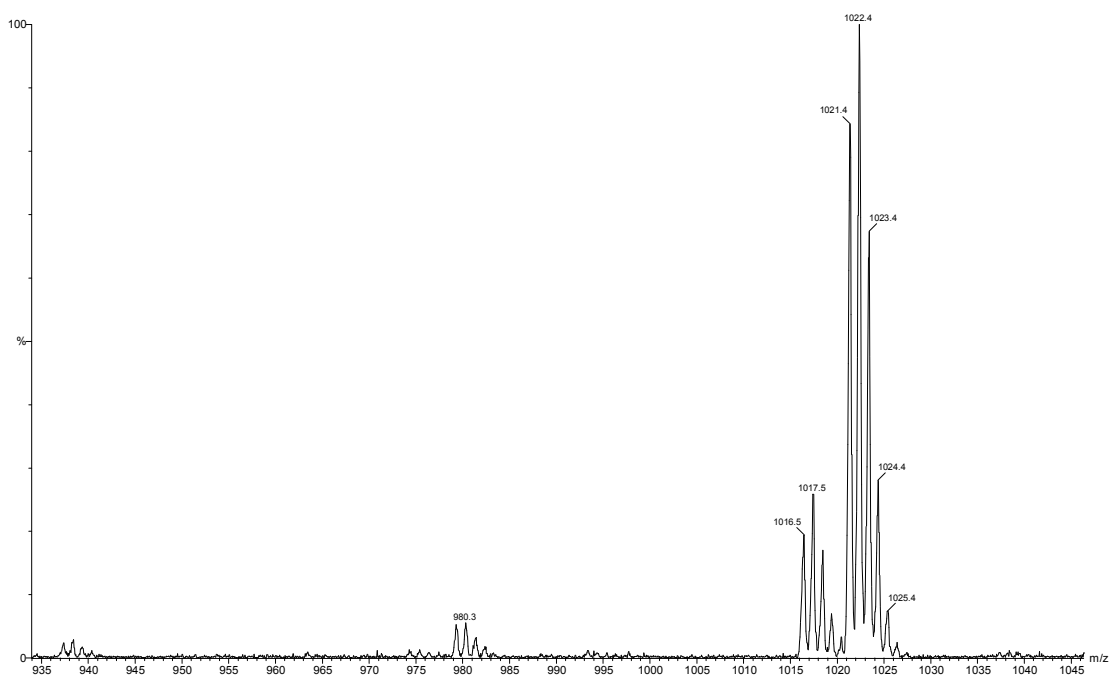


Figura 47 – Espectro de massas da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada por ESI positivo

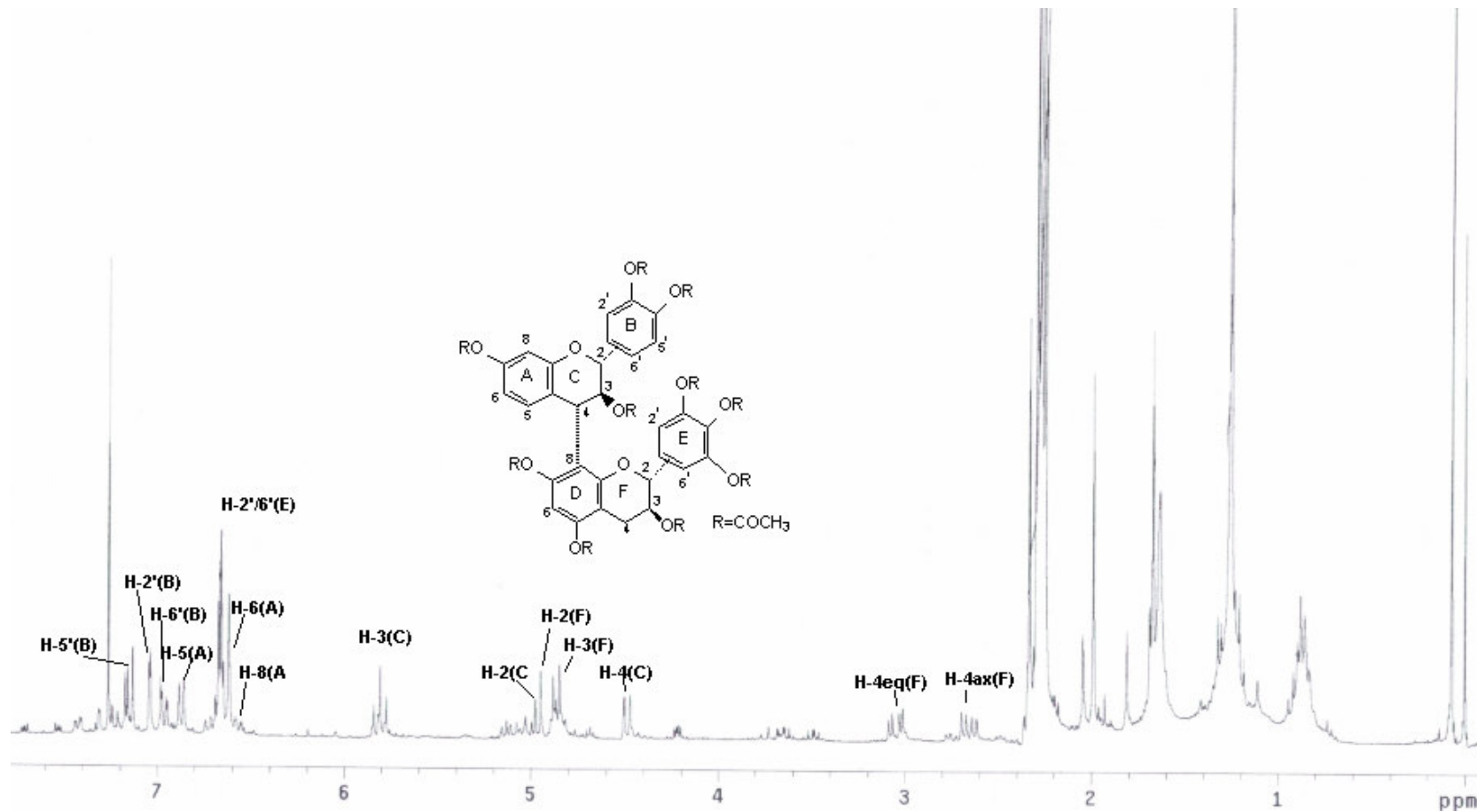


Figura 48 – Espectro de RMN ^1H da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina peracetilada (CDCl_3 relativo para TMS; 300 MHz)

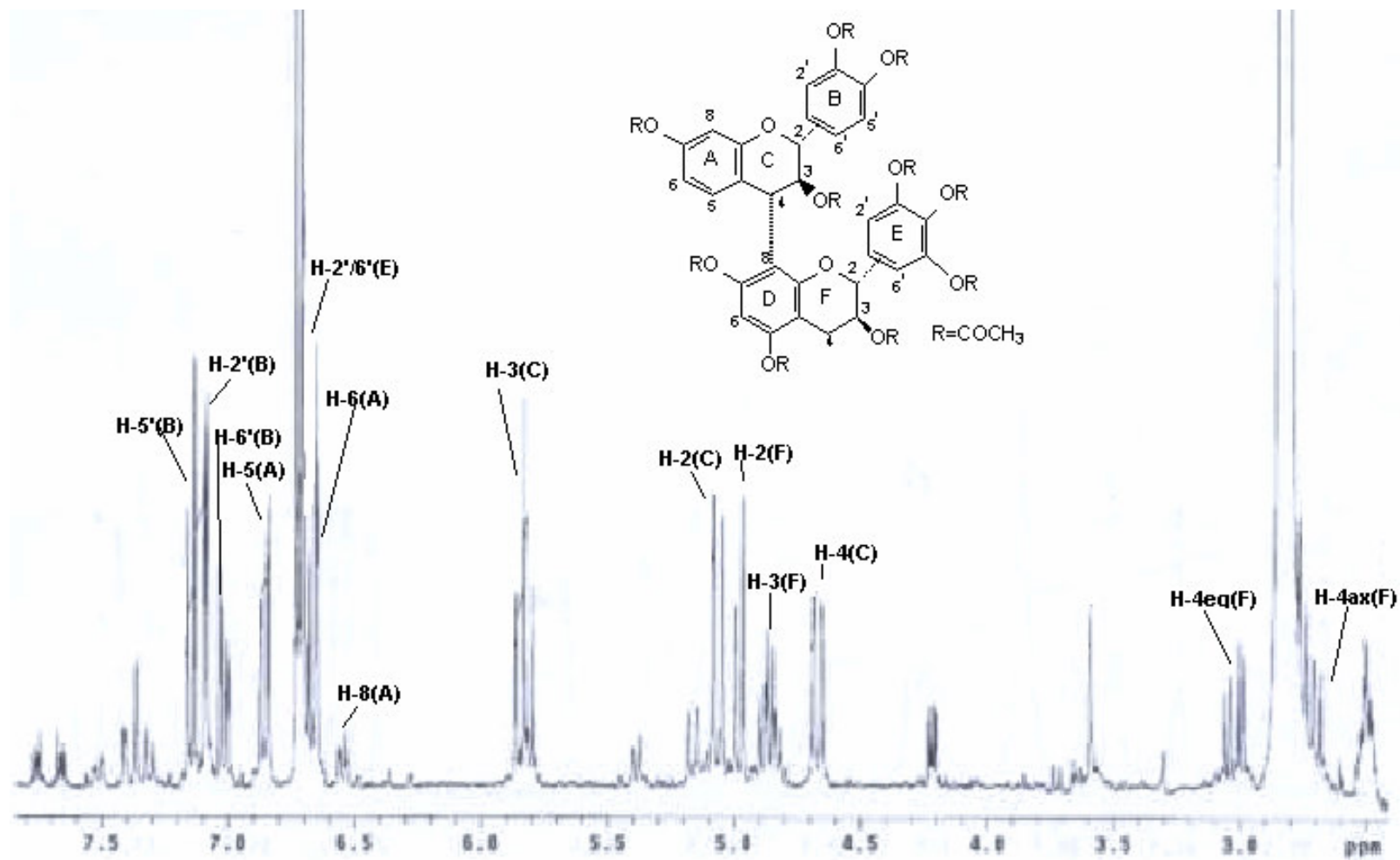


Figura 49 – Espectro de RMN ¹H da fisetinidol-(4α→8)-galocatequina peracetilada (Acetona – d₆ relativo para TMS; 300 MHz)

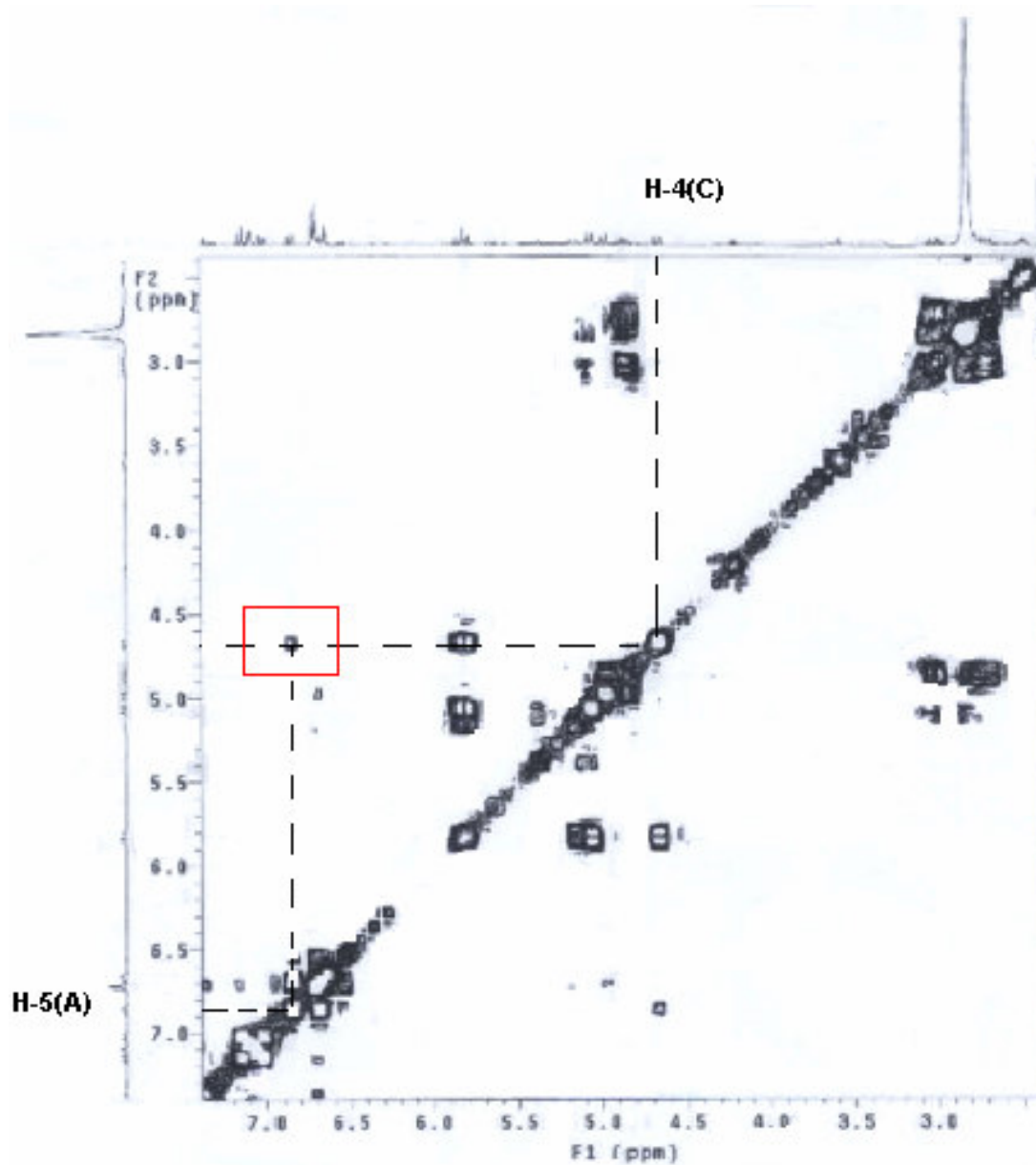


Figura 50 – Espectro de COSY ¹H/¹H da fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina (Acetona d₆, 300 MHz)

5.3.3 Perfil cromatográfico por CLAE

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; WAGNER, 1986, apud FRANCO, 2001).

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 .

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. polyphyllum* Mart., 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 (tab. 2, p. 83) obtendo-se uma boa resolução e separação das substâncias

fenólicas. O uso de ácido (acético, *o*-fosfórico) tem sido reportado por Ueffing (1988), Rohr *et al.* (1999), Wang *et al.* (2000), 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 para determinação de tempo de retenção, estabelecendo-se assim a região onde apareciam os monômeros de taninos condensados no cromatograma (fig. 51). As diminutas diferenças estrutural entre as substâncias, como presença de hidroxila 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).

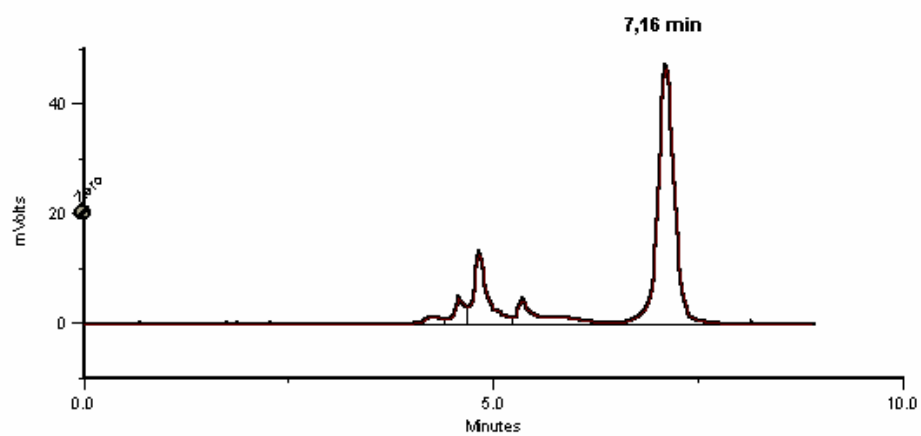
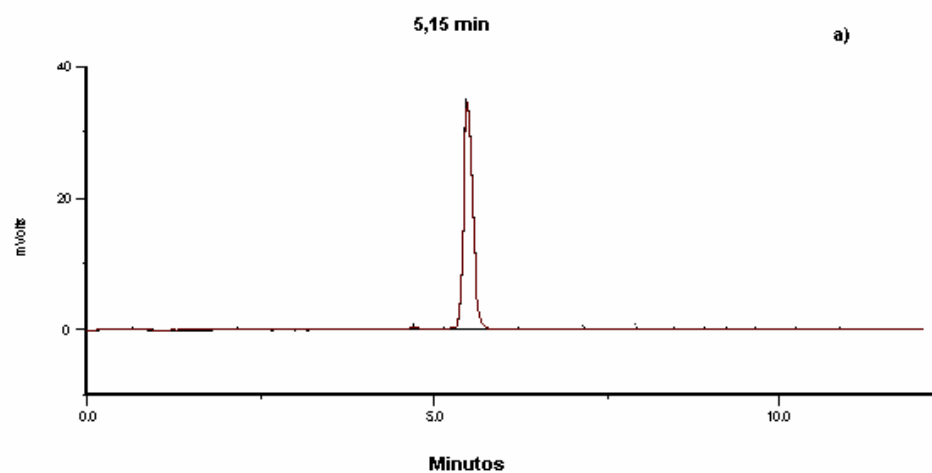


Figura 51 – Cromatograma das substâncias referências: a) galocatequina (5,15 min); b) epigalocatequina (7,16 min)

A prévia purificação de FAA 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 FAE e as subfrações F#4, F#5 e F#9 obtidas a partir das cascas do *S. polyphyllum* Mart. empregando-se a CLAE.

Nos cromatogramas obtidos para FAE, F#4, F#5 e F#9 (fig. 52) foi possível observar a separação dos picos com boa resolução com tempo de retenção na faixa de 3 a 15 min.

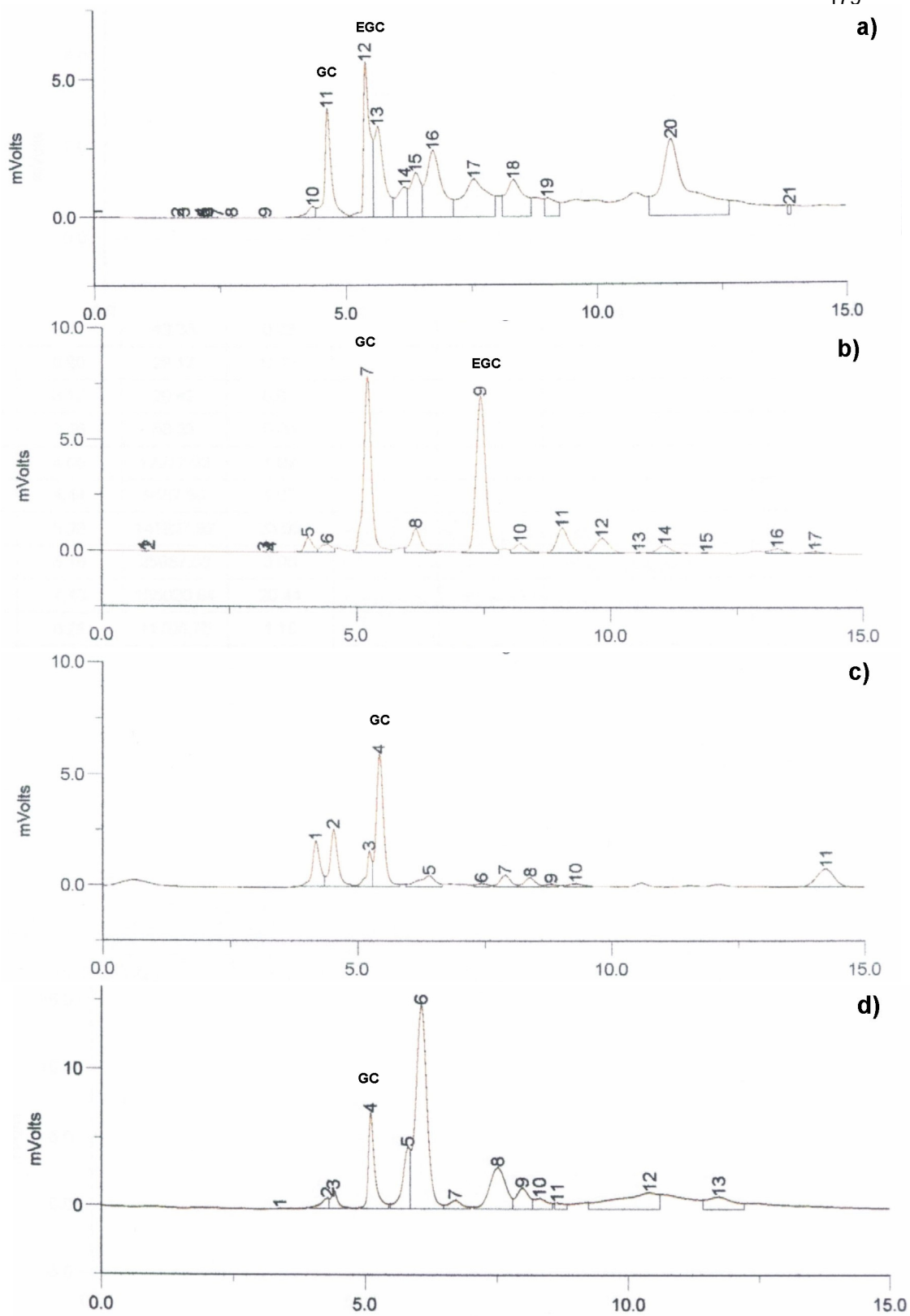


Figura 52 – Cromatogramas obtido por CLAE, GC – galocatequina; EGC – epigalocatequina, detecção em 210: a) FAE; b) F#4; c) F#5 e d) F#9

Com a finalidade de se determinar quais os picos do extrato (FAE) e das subfrações (F#4, F#5, F#9) que correspondem às substâncias galocatequina e epigalocatequina, 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 FAE, F#4, F#5 e F#9 como sendo as mesmas substâncias co-cromatografadas.

Para a avaliação do teor de galocatequina e epigalocatequina em FAE, F#4, F#5 e F#9 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. 18) foi comprovada através da correlação significativa (r^2) 0,99907 para a faixa variando entre 1,0 e 0,0625 mg/ml (fig. 53).

Tabela 18 – Área dos picos da substância referência galocatequina para a curva padrão por CLAE

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

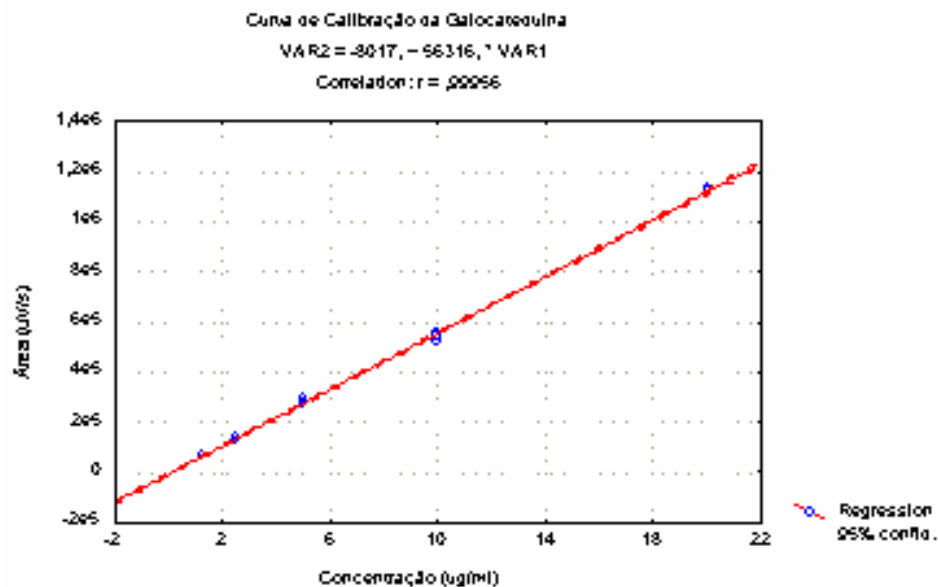


Figura 53 – Curva de calibração do padrão galocatequina, obtido através de CLAE

Para a quantificação de epigalocatequina, a construção da curva de calibração não foi viável, pois o padrão referência apresentou pureza de 60% (fig. 44). 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. 54).

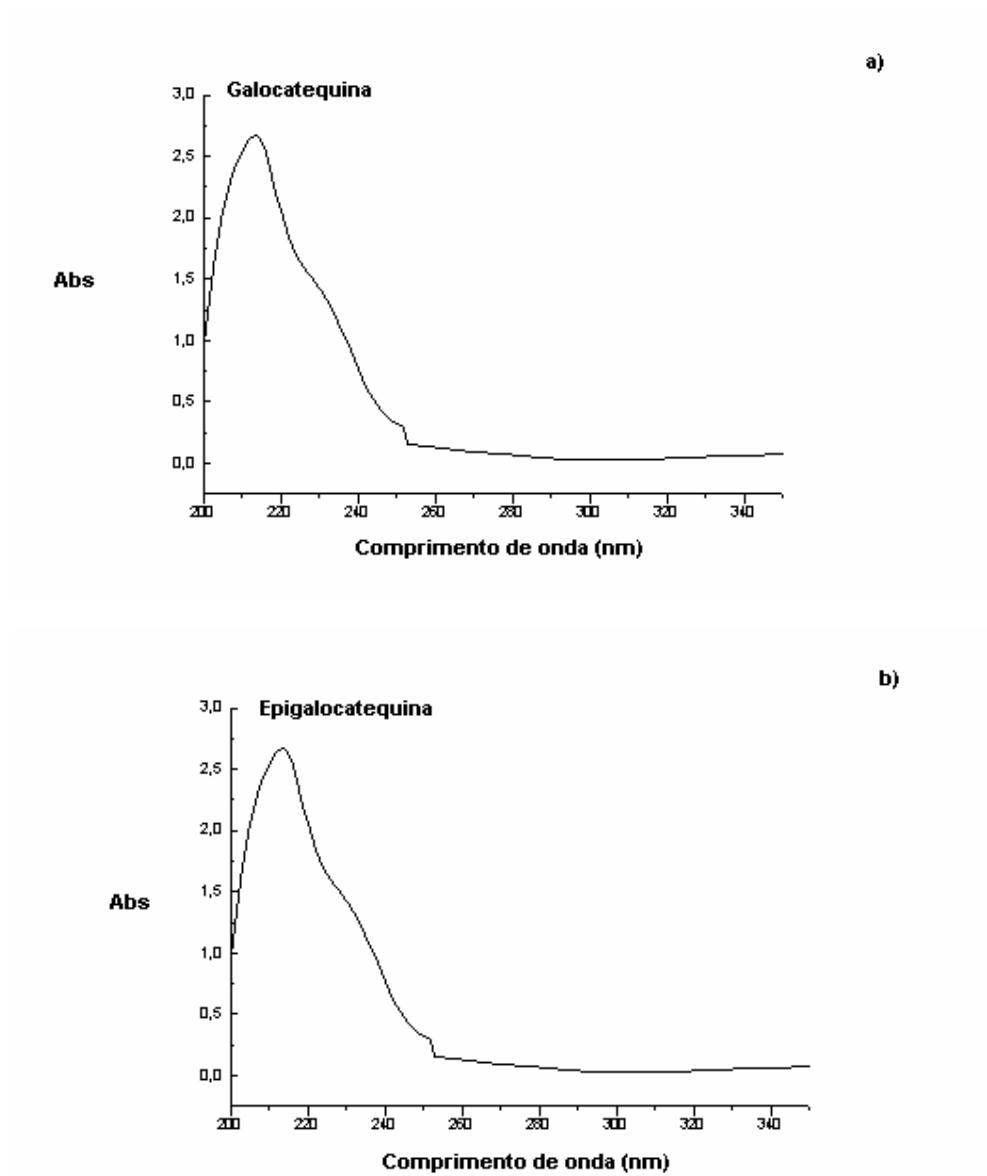


Figura 54 – Espectro de varredura no UV de 200 a 350 nm, referentes aos padrões de galocatequina (a) e epigalocatequina (b) ($c = 0,005$ mg/ml; metanol)

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 FAE, F#4, F#5 e F#9, foram calculadas segundo a equação da reta ($y = ax + b$) e estão expressos na tabela 20. A quantificação dos dímeros isolados de F#4, F#5 e F#9, não foi possível devido ao fato de estarem peracetilados.

Tabela 19 – Valores obtidos para galocatequina e epigalocatequina na FAE, F#4, F#5 e F#9 (n=6)

Frações	Galocatequina			Epigalocatequina		
	TR (min)	Concentração (%)	CV (%)	TR (min)	Concentração (%)	CV (%)
FAE	4,64	12,7	4,06	6,74	18,4	3,04
F#4	5,15	13,5	2,25	7,21	15,0	1,64
F#5	5,35	9,90	3,08	-	-	-
F#9	5,11	9,90	1,55	-	-	-

Através dos resultados obtidos com o desenvolvimento do sistema gradiente para a determinação do teor de galocatequina e epigalocatequina presentes em FAE, F#4, F#5 e F#9, 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.

polyphyllum Mart. esse sistema pode ser utilizado como impressão digital do barbatimão (*fingerprint*) na caracterização de FAE.

5.4 Atividade antimicrobiana

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta das espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460–377 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso (LIMA, 2001).

Atualmente, torna-se preocupante o avanço das doenças infecciosas, e a disseminação de germes resistentes, pois, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se na maioria dos casos os detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e os mecanismos da manifestação de resistência (CUNHA, 1998), portanto é imperiosa a busca de novas drogas.

Lançando-se mão ao arsenal bioquímico e molecular de drogas vegetais, as propriedades bacteriostáticas e bactericidas dos taninos, foram mencionadas recentemente em trabalhos realizados por Scalbert (1991), De Bruyne *et al.* (1999), Toledo (2002), entre outros.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de *S. polyphyllum* Mart., foram empregadas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), por historicamente serem bactérias de interesse médico e estarem envolvidas em grande parte das doenças infecciosas da atualidade, e as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, por estar envolvidas em doenças em pacientes imunodeficientes.

Para a determinação da atividade antibacteriana foram testados inicialmente o extrato bruto (FAA), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FA). Os resultados para CIM e CBM encontram-se representados nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20 – Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$)

Extratos	FAA	FAE	FA
Cepas			
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	125	125
<i>Bacillus subtilis</i>	250	250	250
<i>Pseudonomas aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000
<i>Echerichia coli</i>	>1000	>1000	>1000

Tabela 21 – Concentração bactericida mínima ($\mu\text{g/ml}$)

Extratos	FAA	FAE	FA
Cepas			
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	250	250
<i>Bacillus subtilis</i>	250	250	250

Segundo Holetz *et al.* (2002), pode-se considerar um CIM de até 100 $\mu\text{g/ml}$ como sendo bom resultado antibacteriano, de 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$ moderada atividade, de 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ fraca atividade e acima de 1000 $\mu\text{g/ml}$ ausência de atividade. Portanto os resultados do FAA, FAE e FA obtidos frente às bactérias Gram positivas podem ser considerados moderados, tendo ausência de atividade frente aos microorganismos Gram negativos (>1000 $\mu\text{g/ml}$).

A FAE demonstrou resultados significativos para bactérias Gram positivas, no entanto por se tratar de um extrato semipurificado, possuindo, assim, um conteúdo químico composto por diversas substâncias, tornou-se necessário determinar a atividade antibacteriana das subfrações obtidas por cromatografia em coluna com o

intuito de estabelecer a possível relação estrutura-atividade. Os resultados são representados na tabela 22.

Tabela 22 – Atividade antimicrobiana das subfrações de *S. polyphyllum* Mart. frente a *S. aureus* e *B. subtilis* ($\mu\text{g/ml}$)

<u>Cepas</u>	<i>Staphylococcus aureus</i>		Bacillus subtilis	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<u>F#1</u>	>1000	-	>1000	-
<u>F#2</u>	500	1000	250	250
<u>F#3</u>	1000	1000	250	500
<u>F#4</u>	250	500	500	1000
<u>F#6</u>	250	250	125	250
<u>F#7</u>	250	250	125	250
<u>F#8</u>	250	250	250	250
<u>F#9</u>	125	250	500	500
<u>F#10</u>	250	250	500	>1000
<u>F#11</u>	125	250	500	>1000
<u>F#12</u>	500	1000	500	1000
<u>F#13</u>	250	500	500	1000
<u>F#14</u>	250	500	500	1000
<u>F#15</u>	125	125	500	>1000
<u>F#16</u>	125	250	1000	1000
<u>F#17</u>	125	250	500	1000
<u>F#18</u>	250	500	500	>1000
<u>F#19</u>	125	250	500	1000
<u>F#20</u>	125	250	500	>1000
<u>F#21</u>	250	500	500	>1000
<u>F#22</u>	250	500	500	1000
<u>F#23</u>	500	1000	500	>1000

Ao analisar-se os resultados das subfrações contra *S. aureus*, nota-se que a atividade aumenta progressivamente, alcançando as melhores CIM e CBM na subfração F#15, sendo o resultado menos ativo encontrado na subfração F#3.

Este resultado se deve provavelmente ao comportamento químico de separação dos taninos em Sephadex® LH-20 empregando etanol como eluente, que segundo Thompson *et al.* (1972) eluem primeiramente os monômeros, e posteriormente dímeros à polímeros. Na subfração F#3, foi identificada por cromatografia em camada delgada a presença de galocatequina e epigalocatequina e na subfração F#9 a presença dos dímeros fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina e fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina. Assim, provavelmente, na subfração F#15 ocorra a presença de substâncias com policondensações (oligomêros e polímeros), com peso molecular superior ao encontrado nas subfrações anteriores, que poderiam agir mais especificamente sobre a membrana celular da bactéria *Staphylococcus aureus*, explicando a melhor CIM esta subfração.

Avaliações das substâncias isoladas galocatequina e epigalocatequina foram realizadas frente à bactéria *S. aureus*, e os resultados apresentaram uma CIM >100 μ g/ml. Porém não foi possível determinar a CIM dos dímeros fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina e fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina, por esses se encontrarem derivatizados quimicamente (acetilados).

A determinação da CIM e CBM para *B. subtilis*, apresentou resultados de atividade antimicrobiana moderada em todas as subfrações testadas, obtendo-se os melhores resultados em F#6 e F#7.

Frente ao *B. subtilis*, a subfração F#3 apresentou atividade superior à demonstrada para *S. aureus*, sendo de 250 μ g/ml, porém as substâncias presentes

nessa fração e isoladas de F#4, galocatequina e epigalocatequina foram inativas quando testadas isoladamente. A atividade antimicrobiana de F#3, talvez se deva a possível presença de ácido gálico nessa subfração. Henis *et al.* (1964), demonstraram que o ácido gálico apresenta um CIM 40 vezes mais potente que o ácido tânico frente *B. subtilis*. Em *S. adstringens* (Mart.) Coville foi isolado e caracterizado a presença de ácido gálico, epigalocatequina-3-O-(3,5-dimetil)-galato, epigalocatequina-3-O-(3-metoxi-4hidroxi)-benzoato e epigalocatequina-3-O-galato. (MELLO, *et al.*, 1996a).

Os resultados obtidos para subfração F#15 contra *B. subtilis* foram CIM de 500 µg/ml e CBM de >1000 µg/ml, mostrando que esta fração é mais ativa contra *S. aureus* (125 e 125 µg/ml, respectivamente).

Os testes realizados com bactérias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), constataram a ausência de inibição de todas as subfrações analisadas (>1000 µg/ml).

Foram realizados testes concomitantes aos realizados com os extratos e subfrações de *S. polyphyllum* Mart. com antibióticos clássicos (Vancomicina, Penicilina e Tetraciclina), padronizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, para validação do método.

Os resultados dos testes realizados com os extratos e subfrações de *S. polyphyllum* Mart., no entanto, demonstram a atividade antibacteriana de um “pool” de substâncias, devido à diversidade química dos extratos e subfrações testadas, desta maneira, a molécula ativa, encontra-se diluída. Portanto, a substância ou substâncias verdadeiramente ativas, deverão, necessariamente, serem isoladas em estudos posteriores para comprovação da atividade.

No isolamento e identificação realizado com *S. polyphyllum* Mart., foi necessário a acetilação dos dímeros fisetinidol-(4β→6)-galocatequina, isolado de F#4,

epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, isolado de F#5, fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina e fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina isolado de F#9, para a correta identificação espectroscópica, devido à pequena quantidade de substância isolada. Assim, seria necessário o trabalho com quantidades maiores de extrato bruto na tentativa de se isolar maiores quantidades dessas substâncias para a realização de testes biológicos.

Nos testes realizados com *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* o extrato bruto (FAA), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FA), além das subfrações obtidas por cromatografia em coluna apresentaram resultados superiores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ na CIM. Em estudos realizados com *S. obovatum* Benth, as frações F#13-15 e F#20 apresentaram ação antifúngica moderada, já as frações F#16-19 e F#21-22 apresentaram-se com boa atividade frente às cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (Sanches *et al.*, 2003).

Segundo Scalbert (1991), a atividade antimicrobiana dos taninos se devem a três propriedades: inibição de enzimas das bactérias, complexando-se com substratos dessas enzimas; ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microorganismos, modificando seu metabolismo; complexação com íons metálicos, diminuindo assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microorganismos.

Santos *et al.* (2002), propõem que a presença de grupamentos o-triidroxil no anel B, está envolvido na maior atividade biológica dos taninos, sendo o grau de polimerização um fator de igual importância para a atividade biológica. Anteriormente, De Bruyne *et al.* (1999), sugeriram que as propriedades biológicas dos taninos dependem fortemente da estrutura química e de sua conformação espacial. Scalbert

(1991), em sua revisão, relatou a inibição do crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Clostridium botulinum*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*, em todos os casos mais fortemente inibidas por substâncias triidroxiladas do que por substâncias diidroxiladas no anel B.

Toledo (2002), demonstrou a atividade antimicrobiana das subfrações de *S. adstringens* (Mart.) Coville contra bactérias Gram positivas, obtendo melhores resultados contra *S. aureus*, obtendo uma CIM de 125 µg/ml e CBM de 250 µg/ml.

Sanches *et al.* (2002), demonstraram a atividade antibacteriana de *S. obovatum* Benth., contra *S. aureus* descrevendo que a CIM obtida para extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa foi de 125 µg/ml e a CBM de 500 µg/ml.

A semelhança na composição química entre as espécies [*S. adstringens* (Mart.) Coville, *S. obovatum* Benth. e *S. polyphyllum* Mart.] do gênero *Stryphnodendron*, foi determinada pela comparação bibliográfica, sendo posteriormente analisadas por CLAE. Portanto o efeito antibacteriano das espécies é muito semelhante.

Possivelmente o efeito antibacteriano encontrado nos extratos e subfrações de *S. polyphyllum* Mart. contra bactérias Gram positivas é decorrente do sinergismo entre as substâncias polifenólicas presentes nas cascas do vegetal, sendo necessário mais trabalhos para verificação das substâncias responsáveis pela ação antibacteriana.

5.5 Ação cicatrizante

Há milênios a humanidade cuida de feridas buscando auxiliar o processo natural de cicatrização. Ao longo dos anos, diversos produtos dermatológicos contendo ingredientes ativos de origem vegetal entre eles: β -caroteno, azuleno, taninos entre outros, foram incorporados à terapêutica.

Entre os vegetais que são popularmente empregadas como cicatrizantes encontra-se o gênero *Stryphnodendron* (barbatimão). Diversos grupos de pesquisas vêm buscando a comprovação desta atividade farmacológica, entre eles: Panizza *et al.* (1988); Neves *et al.* (1992); Eurides *et al.* (1996); Jorge Neto *et al.* (1996); Vieira *et al.* (1998); Palermo *et al.* (2002) que realizaram trabalhos com *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e Favaretto *et al.* (1985), que demonstraram a atividade de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

Com o nome de barbatimão, são conhecidas varias espécies taníferas pertencentes à família Leguminosae. Assim tornou-se necessária à caracterização da atividade cicatrizante para *Stryphonodendron polyphyllum* Mart., pois muitas vezes as espécies são confundidas entre si, sendo comercializadas apenas com o nome popular de barbatimão.

S. polyphyllum Mart. apresentou um conteúdo químico rico em taninos, na ordem de 19%. Os taninos têm sido usados na dermatologia devido a sua forte propriedade adstringente, pois quando aplicados topicamente na pele ou em membranas mucosas, provocam precipitação protéica que torna as camadas superficiais impermeáveis a agentes nocivos, encolhendo as estruturas coloidais, e causando vasoconstrição capilar (ação hemostípica) (SCHULZ *et al.*, 2002). Os autores sugerem ainda que a diminuição da permeabilidade vascular é equivalente ao efeito antiinflamatório local. A ação de enrijecimento (adstringência) nos tecidos

priva as bactérias de um meio de crescimento favorável, produzindo um efeito antibacteriano indireto. Além disso, os taninos têm leve ação anestésica tópica que acalma a dor e a irritação.

Avaliou-se a ação da pomada de extratos das cascas de *S. polyphyllum* Mart. a 2,5% em feridas cutâneas de ratos, comparadas com feridas controle tratadas com pomada base (base de Beeler). Foram realizados testes com o extrato bruto (FAA) e a fração acetato de etila (FAE).

Ao exame macroscópico realizado após 4, 7 e 10 dias de tratamento, com FAA e FAE, as feridas controle (base de beeler), apresentavam-se com coloração avermelhada, e crostas úmidas. As feridas tratadas, apresentavam-se com fina crosta de coloração marrom escura, seca, aparentemente sem a presença de infiltração inflamatória (fig. 55).

Ainda no estudo macroscópico verificou-se o aumento da área central e o aspecto irregular das bordas das feridas dos animais dos grupos controle e tratado, provavelmente isto tenha ocorrido devido à presença de crosta leucocitária, coincidindo com as observações feitas por Cotran (1989). Segundo este autor, um tecido ao sofrer agressões é isolado do meio ambiente após ser preenchido por coágulos, fibrina e exsudato, formando uma crosta.

Verificou-se que nas feridas tratadas com pomada dos extratos de *S. polyphyllum* Mart. (barbatimão) à 2,5%, não houve supuração, este dado também foi observado por Eurides *et al.* (1996) após tratamento com solução aquosa de *S. adstringens* (Mart.) Coville. Provavelmente as propriedades adstringentes do barbatimão, permitiram a precipitação protéica dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor (barreira mecânica) contra as bactérias, promovendo uma ação anti-séptica (PANIZZA *et al.*, 1988). Dados que foram corroborados pelos

resultados de CIM e CBM (tab. 20 e 21) de *S. polyphyllum* Mart. contra bactérias Gram positivas, realizados nesse trabalho.

De acordo com Oliveira (1992), a formação de crosta em uma ferida não exsudativa favorece o processo de cicatrização e o exsudato promove a desagregação da crosta e o desenvolvimento de microorganismos. Observou-se, que as feridas tratadas com FAA e FAE não apresentaram exsudação, o que provavelmente, favorece uma cicatrização subcrosta mais eficiente, auxiliando no processo de reparo.

Os extratos das cascas de *S. polyphyllum* Mart. (FAA e FAE) são ricos em compostos fenólicos, principalmente taninos. De acordo com Mota *et al.* (1985), os taninos possuem atividade antiinflamatória e essa ação se deve a um efeito sobre a migração leucocitária e a um antagonismo das ações flogísticas sobre os mediadores da inflamação. Recentemente, Kapu *et al.* (2001), comprovaram o efeito antiinflamatório de extratos de *Crinum giganteum* Andr., ricos em tanino. Assim a ação antiinflamatória dos taninos presentes nas cascas de *S. polyphyllum* Mart., provavelmente pode ter contribuído para um melhor desenvolvimento do quadro de reparo tecidual.



Figura 55 - Feridas no dorso de rato Wistar, após 7 dias de tratamento.
Esquerda: ferida tratada com FAE; direita: ferida controle tratada com base de Beeler

Para verificar se as pomadas contendo barbatimão aceleram o fechamento das feridas, foram mensurados os maiores eixos transversal e longitudinal das feridas no dia em que foram feitas e no dia do sacrifício dos animais. Os resultados apresentam-se nas figuras 56 e 57 .

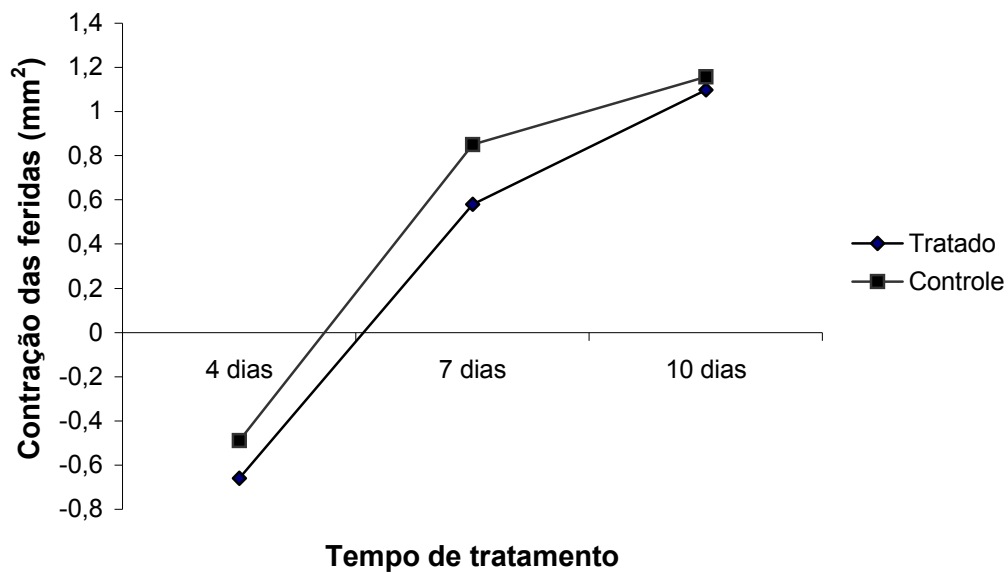


Figura 56 – Área das feridas (mm²) tratadas com FAA durante 10 dias

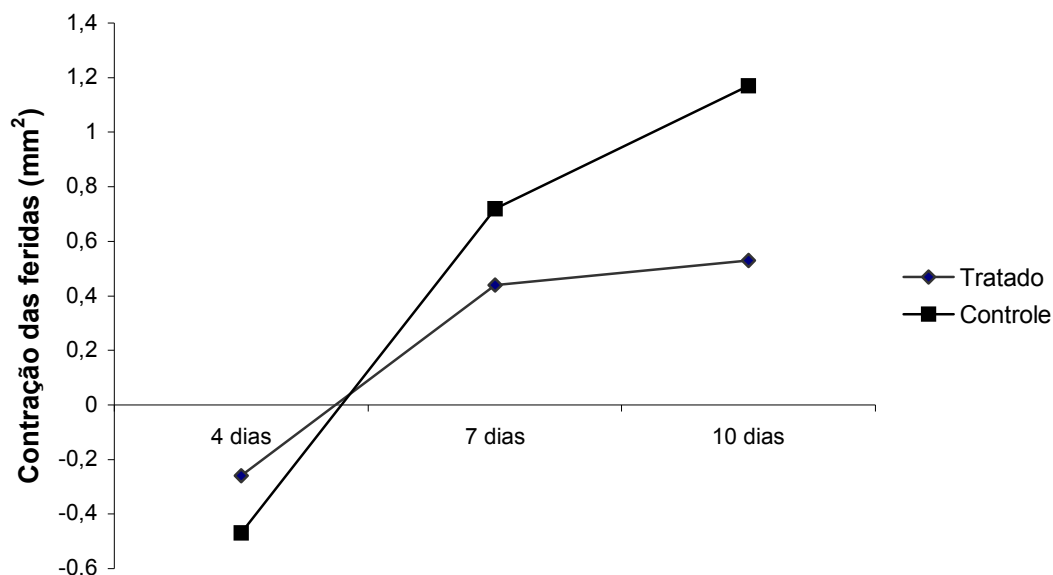


Figura 57 – Área das feridas (mm²) tratadas com FAE durante 10 dias

Na análise das diferenças entre as médias das medidas dos eixos transversal e longitudinal de feridas cutâneas tratadas com extratos das cascas de *S. polyphyllum* Mart., não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos no decorrer dos dias entre feridas tratadas e controle do grupo FAA. No entanto, foi observado que a crosta formada sobre as feridas controle apresentavam-se com área menor que as feridas tratadas com FAE no final dos 10 dias de tratamento. Isto se deve ao fato que taninos precipitam proteínas e formam um revestimento protetor que favorece a cicatrização (HASLAM, 1989), sendo a crosta formada de aspecto duro cobrindo toda a área da lesão externamente. Porém, a porcentagem de ativo usado na preparação da pomada à 2,5% do extrato FAE, sugerem uma dosagem alta, havendo excesso na formação de revestimento externo (casca da ferida). Em estudos anteriores realizados com *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, com pomadas de extrato aceto-aquoso nas

porcentagens de 2,5% e 1%, foram obtidos resultados semelhantes com ambas às dosagens, porém, não havendo formação de cascas com aspecto excessivo no tratamento a 1% de ativo (VIEIRA *et al.*, 1998).

A presença da casca de forma excessiva, também promove a dificuldade de obtenção de cortes viáveis, pois dificulta o processamento do material (devido ao rompimento das cascas durante os cortes no micrótomo).

Outro aspecto foi observado em 4 dias de tratamento tanto com FAA como com FAE, onde a área final, tornou-se maior que a área inicial. Segundo Montandon *et al.* (1977), as forças elásticas da pele vizinha aumentarão consideravelmente o tamanho da ferida, devido à tensão presente nesse local em particular. Além disso, nesse parâmetro foram observadas algumas variações de tamanho da área lesada que podem ser atribuídas a pequenas diferenças no tamanho da ferida no momento de sua confecção.

Outro parâmetro avaliado foi à análise da proliferação celular epitelial, através do método de contagem de metáfases bloqueadas (fig. 58) nas camadas basal e supra basal do epitélio neoformado (fig. 59).

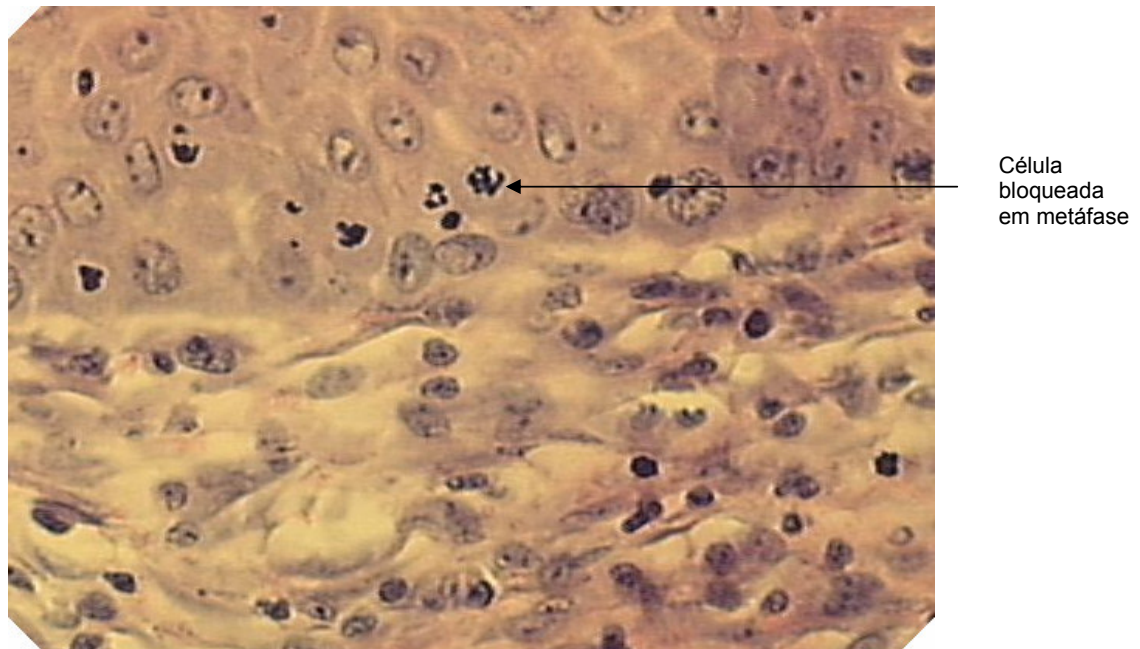


Figura 58 - Corte transversal de ferida cutânea no dorso de rato Wistar, após 7 dias de tratamento: observar células bloqueadas em metáfase na língua de reepitelização

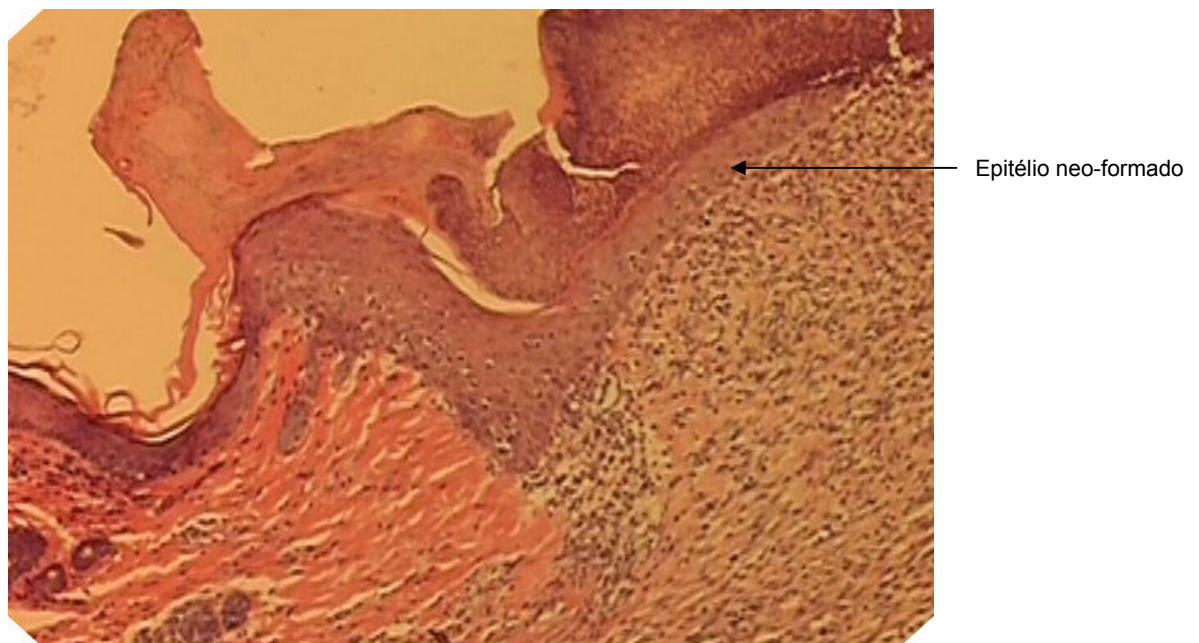


Figura 59 – Língua de reepitelização

Os resultados obtidos estão representados nas figuras 60 e 61, e mostram que houve um aumento da proliferação celular epitelial, evidenciando o maior número de células em divisão obtidas nas feridas tratadas com FAA e FAE quando comparadas frente às feridas controles.

De acordo com Martin (1997), o aumento na atividade proliferativa logo no início da cicatrização, não é um pré-requisito estritamente necessário para o movimento de reepitelização, mas deve estar mais relacionado com um reservatório extra de células, para repor aquelas que foram perdidas na injúria. Assim, a regeneração normal da epiderme requer mitose e migração das células epidermais a partir do epitélio intacto ao redor do sítio da injúria.

Durante os 10 dias de tratamento com FAA e FAE observou-se aumento da proliferação celular nas feridas tratadas. Porém, os resultados só foram estatisticamente satisfatório aos 4 e 7 dias de tratamento em ambos os grupos. O grupo de 10 dias não apresentou resultados estatisticamente significantes (tab. 23 e 24).

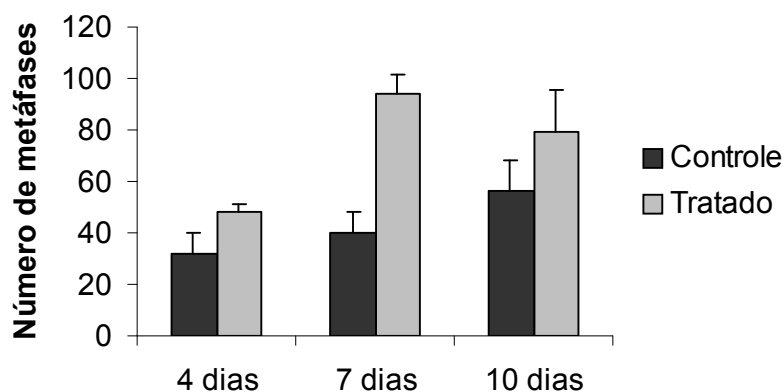


Figura 60 – Efeito do tratamento com a pomada de extrato bruto (FAA) de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. a 2,5% sobre o número de metáfases/10 mm em feridas cutâneas de ratos. Valores médios (n=5). Teste t, *p<0.05 comparados com o controle

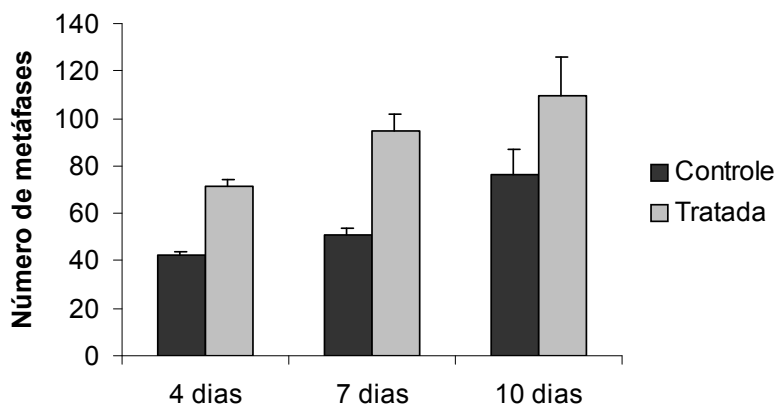


Figura 61 – Efeito do tratamento com a pomada de fração acetato de etila (FAE) de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. a 2,5% sobre o número de metáfases/10 mm em feridas cutâneas de ratos. Valores médios (n=5) Teste t, *p<0.05 comparados com o controle

Tabela 23 – Avaliação da proliferação celular epitelial do extrato bruto de *S. polyphyllum* Mart., média do número de metáfases \pm DP. Teste t, * $p < 0,05$

Tempo	Controle	Tratado	$p < 0,05$
4 dias	31,75 \pm 4,00	48,50 \pm 1,44	0,0077
7 dias	40,00 \pm 8,26	94,00 \pm 7,15	0,0026
10 dias	56,00 \pm 12,19	79,25 \pm 16,13	0,2940

Tabela 24 – Avaliação da proliferação celular epitelial da fração acetato de etila de *S. polyphyllum* Mart., média do número de metáfases \pm DP. Teste t, * $p < 0,05$

Tempo	Controle	Tratado	$p < 0,05$
4 dias	42.75 \pm 0.8539	71.50 \pm 2.598	0.0001
7 dias	50.60 \pm 3.295	94.80 \pm 7.372	0,0006
10 dias	76.50 \pm 10.36	109.5 \pm 16.18	0,1367

Os resultados obtidos com FAA e FAE mostraram atividade estimulante frente ao processo de cicatrização. Nota-se que a FAE apresentou melhor resultado em 4 dias de tratamento quando comparada ao FAA no mesmo período, e que os resultados em 7 dias de tratamento foram semelhantes.

O estímulo de FAE na proliferação celular na fase inicial de cicatrização, provavelmente está relacionada à ação antiinflamatória e adstringente dos taninos, visto que a primeira fase do processo de reparo tecidual envolve a migração de células inflamatórias e a formação de edema, devido ao aumento da permeabilidade vascular e o acúmulo de plasma no local da ferida (MARTIN, 1997). Quando o edema é excessivo, decorrente da presença de fragmentos celulares e de tecidos

necróticos em espaços intercelulares, promove o retardo da cicatrização do tecido (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993). Assim, as propriedades dos taninos de se complexarem com proteínas, provavelmente promovendo uma ação proteolítica que impede a formação de tecidos necróticos, aliada ao efeito antiinflamatório, que causa a redução do edema, foram provavelmente responsáveis pelos melhores resultados da FAE, que apresenta um conteúdo químico mais concentrado em taninos condensados do tipo monômeros a oligômeros passando por dímeros, trímeros e tetrâmeros quando comparados com FAA.

A segunda fase envolvida no processo de cicatrização é a fase proliferativa, onde é decisiva a vascularização da área entre as duas bordas da ferida, que é seguida por fibroplasia e o acúmulo de fibras colágenas produzidas por fibroblastos (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993).

Aos 7 dias de tratamento não houve diferenças entre FAA e FAE, ambas estimularam a proliferação celular epitelial com a mesma intensidade, apesar da diferença de concentração de taninos entre elas, pois em FAA encontra-se menor concentração de taninos à 2,5% de extrato. Provavelmente o efeito de estimulação na cicatrização nesta fase, se deva, talvez, a melhor neovascularização nas feridas tratadas, independente da concentração de monômeros, dímeros, trímeros, oligômeros e polímeros presentes nos extratos. Segundo, Khanna *et al.* (2002), angiogênese é um fator primordial para a cicatrização de feridas. Esses autores demonstraram que taninos condensados, isolados de suco de uva, promoveram um aumento da expressão do fator de crescimento vascular epitelial, que tem a habilidade de promover a angiogênese, determinando um processo de reparo coordenado e progressivo.

De acordo com Kakegawa *et al.* (1985), os taninos são capazes de facilitar a síntese de glicosaminoglicanas, como os primeiros componentes da matriz extracelular. Como consequência, ocorrerá a deposição dessa matriz, com maturação e organização do tecido fibroso, componente substancial no processo de reparação da ferida (OKASALA *et al.*, 1995; CHITHRA *et al.*, 1998;).

Os taninos promovem a cicatrização de feridas por vários mecanismos celulares tais como: quelação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, estimulação da contração da ferida e aumento da formação de vasos capilares e fibroblastos (FERNADEZ *et al.*, 2002). Além desses dados, pode-se citar que taninos (condensados principalmente) atuam na diminuição da dor, baixo risco de infecção, estimulação da regeneração da epiderme, rápida cicatrização e melhor formação de cicatriz, redução de mortalidade e redução da perda de plasma (HUPKENS *et al.*, 1995; KHANNA *et al.*, 1998).

Portanto estes fatores devem estar envolvidos na atividade cicatrizante observada nos extratos das cascas de *S. polyphyllum* Mart., confirmando os trabalhos anteriormente realizados com o gênero *Stryphnodendron* e positivando o uso da espécie *S. polyphyllum* Mart. como cicatrizante. No entanto, estudos posteriores com as substâncias isoladas, deverão ser realizados com o intuito de esclarecer as substâncias verdadeiramente responsáveis pela atividade, ou se esta atividade cicatrizante é devido ao sinergismo das substâncias presentes nos extratos.

Embora os mecanismos fisiológicos exatos da ação dos taninos sobre a cicatrização não estejam totalmente esclarecidos, avaliações morfológicas como as realizadas neste trabalho vêm somar informações àquelas já existentes, e assegurar

maior confiabilidade aos usuários de plantas como medicamentos, quanto à comprovação de sua ação biológica.

5.6 Atividade antioxidante

Devido ao grande interesse voltado ao papel das espécies reativas do oxigênio (EROs) na etiologia de várias doenças tais como: câncer, inflamação, aterosclerose, esclerose múltipla entre outras, intensificou-se a busca por substâncias antioxidantes, ou seja, capazes de interferir tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo (HALLIWELL, 1986).

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; HAMILTON, 1983).

Neste contexto, grande importância tem sido dada aos antioxidantes naturais, principalmente aos compostos fenólicos que, segundo Shahidi *et al.* (1992), funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais. De acordo com Oliveira *et al.* (2002), os compostos fenólicos atuam como inibidores de enzimas relacionadas ao processo de produção das EROs.

As cascas da espécie *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. são constituídas, do ponto de vista químico, majoritariamente por taninos condensados, tendo seu uso popular preconizado com cicatrizante e confirmado neste trabalho. Trabalhos recentes tem relacionado à atividade cicatrizante com as propriedades antioxidantes dos taninos (Fernandez *et al.*, 2002). Portanto, é de especial interesse a averiguação dessa propriedade biológica dos compostos fenólicos e a confirmação desses como substâncias cicatrizantes e capazes de modular o processo oxidativo.

As propriedades anti-radicalares dos extratos, frações e substâncias isoladas das cascas de *S. polyphyllum* Mart., foram avaliadas pelo método da redução do

radical DPPH através da cromatografia em camada delgada (seção 4.7.2). Os resultados estão representados na figura 62.

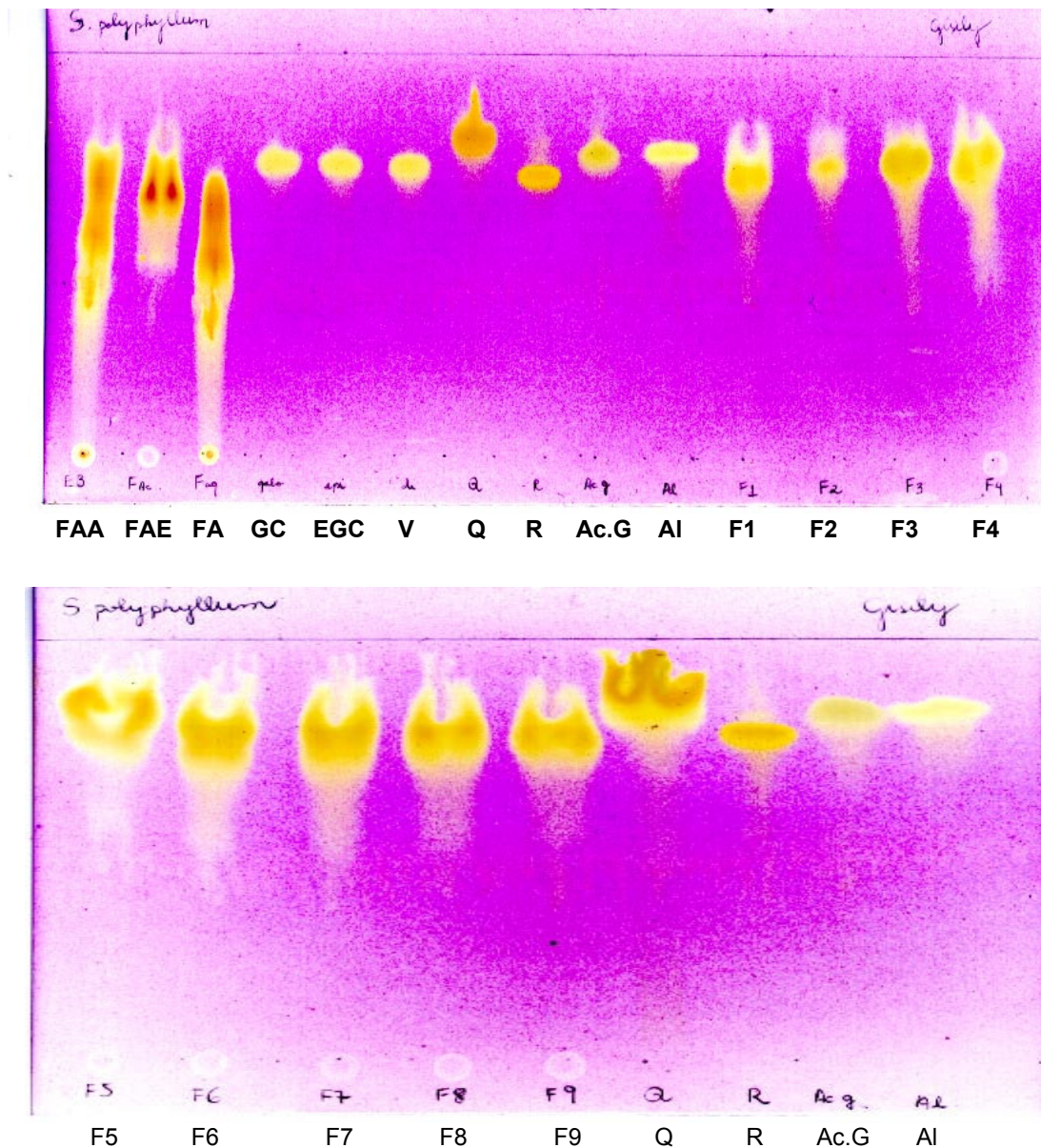


Figura 62 – Cromatograma (CCD) representativo da redução do radical DPPH frente a FAA, FAE, FA, galocatequina (GC), epigalocatequina (EGC), fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina (substância V), F#1, F#2, F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8, F#9 de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., usando como substâncias referência: quercetina (Q), rutina (R), ácido gálico (Ac.G), astilbina (AI), sistema cromatográfico: butanol:ácido acético; água (3:1:1), revelador DPPH 0,2 % em metanol

Os resultados demonstraram que tanto os extratos, subfrações (100 µg/5µl) e substâncias isoladas(10 µg/5µl), apresentaram atividade antioxidante semelhante aos padrões quercetina, rutina, ácido gálico e astilbina, nas concentrações de 10 µg/5 µl.

A atividade antioxidante de taninos tem sido reportada nos trabalhos de Da Silva *et al.* (1998), Soares (2002), Hatano *et al.* (2002), Nakagawa *et al.* (2002), e Negro *et al.* (2003). Segundo, Nakagawa *et al.* (2002), as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão relacionadas com a estrutura do composto, principalmente com o grau de hidroxilação do anel B, sugerindo ainda, que a triidroxilação aumenta a propriedade anti-radicalar dos taninos.

No trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2002), a atividade antioxidante da quercetina, foi como moduladora do processo de produção e liberação de EROs por células fagocitárias em processos de lesão tecidual crônica, coincidindo com as afirmações de Fernadez *et al.* (2002).

Os resultados obtidos avaliaram positivamente o perfil antioxidante dos taninos presentes nos extratos e subfrações das cascas de *S. polyphyllum* Mart., confirmados posteriormente com a permanência da atividade antioxidante nas substâncias isoladas. No entanto, estudos posteriores serão necessários para a avaliação da relação estrutura-atividade das substâncias isoladas na a ação moduladora sobre EROs, e a determinação da concentração capaz de inibir o processo oxidativo *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

- A análise anatômica mostrou que, com a seleção de cortes, pode-se visualizar melhor as estruturas celulares, e de acordo com o corante aplicado, avaliar prováveis composições químicas como: lignina, celulose ou suberina nas cascas do *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.;
- O controle de qualidade físico-químico permitiu estabelecer dados comparativos entre as coletas de verão e outono;
- O teor de umidade encontrado para as diferentes coletas é compatível com o estabelecido na Farmacopéia Brasileira;
- Durante o processo de secagem, concluiu-se, que as cascas do vegetal, conservam melhores as características organolépticas e químicas, quando estabilizadas à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e conservadas ao abrigo da luz;
- O teor de taninos totais e o teor de extrativos determinados para as amostras coletadas em diferentes épocas do ano se mostraram estatisticamente diferentes entre si;
- A determinação do teor de taninos totais é fator decisivo na qualidade da droga e extratos do barbatimão;
- O estudo químico de extratos semipurificados das cascas demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados;
- Foram isolados e identificados: galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina, fisetinidol-(4 β →8)-galocatequina e

- fisetinidol-(4 α →8)-galocatequina. A identificação dessas substâncias, anteriormente já isoladas, corrobora na validação da metodologia empregada;
- Foi isolada e identificada a substância inédita, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 β →6)-4'-O-metil-galocatequina. Esse fato denota o potencial que a droga vegetal possui e pode contribuir para o conhecimento químico e taxonômico do gênero e da família botânica;
 - O sistema desenvolvido para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em gradiente crescente de concentração de metanol a partir de 0,05% (V/V), propicia boa resolução dos picos nos cromatogramas e é reconhecidamente mais econômico;
 - O extrato semipurificado (FAE) e as subfrações, podem ser caracterizados pela CLAE pelos constituintes químicos: galocatequina e epigalocatequina;
 - Por terem apresentado sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade, os métodos de quantificação pela CLAE, demonstraram viabilidade quanto à aplicação;
 - Os resultados obtidos no teste antibacteriano com frações e subfrações mostraram atividade moderada contra as cepas testadas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*;
 - As substâncias galocatequina e epigalocatequina, isoladamente, não mostraram nenhuma atividade antibacteriana, contra as cepas empregadas;
 - Os testes realizados com FAA, FAE, FA e todas as subfrações frente a fungos não apresentaram atividade contra as cepas testadas;
 - A avaliação da ação cicatrizante de FAA e FAE, permite concluir que o extrato (FAA) e a fração semipurificada (FAE) agem favoravelmente no processo de reparo tecidual, pela ação anti-séptica apresentada e pelo aumento da

- proliferação celular epitelial. No entanto a FAE apresenta um resultado melhor devido a sua composição química mas seletiva;
- Os resultados obtidos avaliaram positivamente o perfil antioxidante dos taninos presentes nos extratos e subfrações das cascas de *S. polyphyllum* Mart. Os extratos, subfrações e substâncias isoladas apresentaram atividade antioxidante semelhante aos padrões quercetina, rutina, ácido gálico e astilbina, na concentração de 10 µg/5 µl;

REFERÊNCIAS

AGREN, M.: Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. **Dermatol. Res.**, Minnesota, v.291, p.583-590, 1999.

ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. London: Applied Science, 1983, p.199.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373,2000.

AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. **Antibióticos na prática médica**. 4^a ed. São Paulo: Roca,1994, p.283.

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing os antimicrobials in liquid media. In: LORIAN, V. (ed). **Antibiotics in laboratory medicine**. 4.ed. Pensylvannia: Willians e Wilkins, 1996, p.54-111.

ANDRADE, L. Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná. 1996, 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,1996.

AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P. de; NAKAMURA, C. V.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytother. Res.**, London, v.13, p.264-266, 1999.

AUDI, E.A.; TOLEDO, C. E. M.; SANTOS, F.S.; BELLANDA, P.R.; ALVES-DO-PRADO W.; UEDA-NAKAMURA T.;NAKAMURA, C. V.; SAKUGAGUI, C. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; MELLO, J.C.P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. Submetido, 2003.

AVIRAM, M.; DORENFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; HAYEK, T. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, low density lipoprotein modifications and platelet aggregation: studies in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice and humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, New York, v.71, p.1062-1076, 2000.

AVIRAM, M.; DORNFIELD, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. **Atheroscler.**, Limerick, v.158, p.195-198, 2001.

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 *Pavetta owariensis*. **Phytother. Res.**, London, v.4, p.182-188, 1990.

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

BARREIRO, E. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª ed. Chapeco: Argos, 2001. cap.6, p.237-296.

BARROSO, G.M. **Sistemática da angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: USP, v.2, 1978, p.225.

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

BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T. **Comparative biochemistry**, Vol 3, Mason, H.S. and Florkin, m. Ed. Academie Press, New York, 1962, p.764.

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

BENTHAM, G. **Leguminoase III: Mimosoideae**. In: MARTIUS, C.F.P. Flora Brasiliense. Lehre. J. Cramer, v.15, 1852.

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

BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Milan, v.73, p. 428-430, 2002.

BÖHME, H.; HARTKE, K. Deutsches Aezneibuch-8. Ausgabe, 1978 – Kommentar. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1981.

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

BRAGANÇA, F.C.R. Considerações sobre o histórico dos medicamentos e plantas medicinais. In: BRAGANÇA, L. A. R. (Coor.). **Plantas Medicinais Antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. Niteroi: Ed. Universidade Federal Fluminense, 1996, p. 29-49.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 24.2.2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, 24.2.2000b. Disponível na Internet na página <http://www.in.gov.br>.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. 4. ed. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1996

BRITO, M.E.; 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. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.21, p.9-17, 2001.

BUNDESVEREINIGUNG **Deutscher Apothekerverbände**. Ed. Deutscher Arzneimittel – Codex. 1979. Frankfurt, GOVI – Deutscher Apotheker, 1979.

BURAPADAJA, S.; BUNCHOO, A. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.61, p.365-366, 1995.

BÜRGER, M.E.; AHLERT, N.; BALSISSEOTTO, B.; LANGELOH, A.; SCHIRMER, B.; FOLETTI, R. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**, São Paulo ,v.36, n.6, p.1-8, 1999.

CALIXTO, F.B. Medicamentos fitoterapicos. In:YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (org.). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª ed., Chapéco: Ed. Argos, Ed. Da Unoesc, 2001, cap.7, p.297-316.

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

CARVALHO, A.C.P. Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifica* L. 1998, 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrarias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, 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. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Boca Raton, v.38, n.6, p.421-464, 1998.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. In: **The molecular and cellular biology of wound repair** (Ed.) Clark, R.A.F. New York: Plenum Press Co., 1996, p. 3-50

CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; AZOUBEL, R.; CONTRERA, J.D.; GUSMAN, A.B. Efeitos do extrato de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Fabales-Mimosaceae) na musculatura lingual do embrião de rato. Estudo morfométrico. **Acta Biol. Leopold.**, São Leopoldo, v.3, p187-193, 1981.

CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; PRADO, M.L.M.; BARICHELLO, M.T.; BRASSAROLA, F.R. Efeitos do extrato de sementes de barbatimão [*Stryphnodendron obovatum* Benth (Fabales-Mimosoideae)] na glândula sub-mandibular do rato adulto: estudo morfológico e morfométrico. **Arq. Centro Estud. Curso de Odontol**, Belo Horizonte, v.19, n.1, p.79-91, 1982.

COSTA, T.M.M.; DIAS, A. P.M.; CAPRILES, P.V.S.Z.; 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 labling of blood elements with technetium-99m. **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, v.12, p.7-9, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989, p.1231.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.12, p.564-582, 1999.

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

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs Today**, London, v.34, p.691-698, 1998.

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

CZECH, E.; KNEIFEL, W.; KOPP, B. Microbiological status of commercially available medicinal herbal drugs – a screening study. **Planta Med.**, Stuttgart, v.67, p.263-269, 2001.

DAHLGREN, R.M.T. General aspects of angiosperm and macrosystematics. **Nordic. J. Bot.**, Copenhagen, v.3, p.119-149, 1983.

DANNE, A. Polyphenole aus den traditionellen Arzneipflanzen *Cistis incanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae), Münster, Alemanha, Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, tese doutorado, 1994. 185p.

DA SILVA, E.L.; PISKULA, M.; TERÃO, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Rad. Biol. Med.**, Oxford, v.24, n.7/8, p.1209-1216, 1998.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v.27, p.445-459, 1999.

DEMARCHEZ, M.; SENDEL, P.; PRUNIERAS, M. Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse. **Developm. Biol.**, New York, v.113, p.90-96, 1986.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.31, n.9, p.1163-1170, 1998.

DEUTSCHES ARZEIBUCH. 10. ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994

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

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

ERDELMEIER, C.A.J.; CINATL, J.JR.; RABENAU, H.; DOERR, H.W.; BIBER, A.; KOCH, E. Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. **Planta Med.**, Stuttgart, v.62, n.3, p.241-245, 1996.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M.; TOSTES, J.B.F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA, A. J.R.; ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Res. Microbiol.**, Paris, v.153, p.647-652, 2002.

EURIDES, D.; MAZZANI, A.; BELLEFF, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTE, M.C.S.; TRONCOSO NETO, N.S.; CAMPOS, V.A.; SILVESTRINI JUNIOR, P.L. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart.). **Rev. Fac. Zotec. Vet. Agro. Uruguiana**, Uruguiana, v.2/3, p.37-42, 1995/1996.

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. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4. ed. Porto Alegre/Florianopolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, cap. 10, 2002. p. 165-182.

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

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

FAVORETTO, A.L.; CONTRERA, M.G.D.; PETENUSCI, S.O.; SILVA-NETTO, C.R.; LOPES, R.A. Ação cicatrizante do extrato aquoso de casca de barbatimão *Stryphonodendron obovatum* Benth. em úlceras por contenção em ratos. **Rev. Esc. Farm. Odont. Alfenas**, Alfenas, v.8, p.7-12, 1985.

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

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, D.; LI, X.C. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Nat. Prod. Rep.**, Cambridge, v.17, p.193-210, 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 Trans. I**, Easton, p.1628-1637, 1977.

FOUCAULT, A.P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection, and some recent applications to natural product purification. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.808, p.3-22, 1998.

FRANCO, S.L. Própolis: otimização do processo extrativo, desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida. 2001. 157 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2001.

GARLICK, J.A.; TAICHMAN, L. Fate of Human Keratinocytes during Reepithelialization in an Organotypic Culture Model. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.70, n.6, p.916-924, 1994.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Dtsch. Apoth.r Ztg.**, Berlin, v.123, p.1979-1987, 1983.

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

GONÇALVES, C.A.; LELIS, R.C.C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.8, p.167-173, 2001.

GRINNELL, F. Wound repair, keratinocyte activation and intgrin modulation. **J. Cell Sci.**, Colchester, v.101, p.1-5, 1992.

GUANGCHENG, Z.; YUNLU, L.; YAZAKI, Y. Extractive yields. Stiasny values and polyflavonoid content in barks from six acacia species in Australia. **Australian Forestry**, Queen Victoria, v.54, p.154-156, 1991.

GUERRA, M.O.; ARAÚJO, F.C.; PETERS, V.M. Alterações em fetos e placentas de ratas de 21 dias de gestação, tratadas com sementes de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) durante o período de organogênese e crescimento fetal. **B. Inst. Cien. Biol. Geocie.**, Juiz de Fora, n.33, p.3-11, 1982.

GUERRA, M.O.; ARAÚJO, F.C.; PETERS, V.M.; ANDRADE, A. T. L. Embryo lethality of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. in rats. **Contraception**, Stoneham, v.20, p.353-357, 1979.

GUERRA, M.O.; ARAÚJO, F.C.; PETERS, V.M.; ANDRADE, A. T.L. Aborto em ratas após administração de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.). **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, São Paulo, v.13, n.4-6, p.111-113, 1980a.

GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; CRUZ, E.M.G. Efeito do extrato alcoólico do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) sobre a implantação de ratas. **B. Inst. Cien. Biol. Geocie.**, Juiz de Fora, no 29, p.3-9, 1980b.

GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; VITRAL, G.S.F. Mecanismo da ação embriotóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) em ratas. **Rev. Reprod.**, São Paulo, v.3, p.222-226, 1987.

GUPTA, S.; HUSSAIN, T.; MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.410, p.177-185, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.246, p.501-514, 1986.

HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. **Biochem. J.**, New York, v.139, p.285-288, 1974

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

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

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, Washington, v.59, p.205-215, 1996.

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

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

HATTORI, M.; KUSUMOTO, Y.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl-transferase from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull**, Tokyo, v.38, p.717-720, 1990.

HERZOG-SOARES, J.; ALVES, R.K.; ISAC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.H.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphonodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, v.12, p.1-2, 2002.

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

HEYWOOD, V.H. **Flowering Plants of the World**. Oxford University Press: New York, 1993, p.335.

HO, C.T.; CHEN, Q.; SHI, H.; ZHANG, K.Q.; ROSEN, R.T. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. **Prevent. Med.**, San Diego, v.21, p.520-525, 1992.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; 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, p.1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152p.

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.

HUSSEIN,S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, New York, v.26, p.2489-2491, 1987.

HUTCHINSON, J. **The genera of Flowering Plants (Angiosperms)**. Oxford: Oxford University, 1967.

JOLY, A. B. Botânica, **Introdução à taxonomia vegetal**. 2.ed. São Paulo: Nacional, 1975, p. 398-406.

JORGE NETO, J.; FRACASSO, J.F.; CAMARGO NEVES, M.C.L.; SANTOS, L.E.; BANUTH, V.L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius . **Rev. Ciênc. Farm.**, Araraquara, v.17, p.181-186, 1996.

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

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Pele. In: **Histologia Básica**. 9ª ed., Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, 1999, p.303-314.

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.**, Tokyo, v.33, n.11, p.5079-5082, 1985.

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

KAPU, S.D.; NGWAI, Y.B.; KAYODE, O.; AKAH, P.A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, 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, p.787-789, 1992.

KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C.K. Upregulation of oxidant-induced vegf expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. **Free Rad. Biol. Med.**, Oxford, v.31, n.1, p.38-42, 2001.

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 Rad. Biol. Med.**, Oxford, 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, 1992. v.59, p. 295-320.

KOMMISSION E. Bundesanzeiger n 133 de 19.07.1994. Liste der Monographien. Bundesgesundheitsamt. Institut für Arzneimittel, 1994.

LIMA, G.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas; Uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (org.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1 ed. Chapeco: Argos, 2001. cap.13. p.481-502.

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

LUCK G.; LIAO, H.; MURRAY, N.J.; GRIMMER, H.R.; WARMINSKI, E.E.; WILLIAMSON, M.P.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenols, Adstringency and Proline-rich Proteins. **Phytochemistry**, New York, v.37, n.2, p.357-371, 1994.

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

MARTIN, P. Wound Healing – Aiming for perfect skin regeneration. **Science** Stanford, v.276, p.75-81, 1997.

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

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas Mediciniais**, Imprensa Universitaria, UFV, Viçosa, 1994, p. 220.

MARTIUS, C.F.P. **Flora brasiliensis: Enumeratio Plantarum** V. XV. Parte III, 1840

MASAKI, H., ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hammamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. **Phytochemistry**, New York, v.37, n.2, p.337-343, 1994

MEIERS, S.; KEMÉNY, M.; WEYAND, U.; GASTPAR, R.; ANGERER, E.; MARKO, D. The antocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. **J. Agric. Food. Chem.**, Easton, v.49, p.958-962, 2001.

MELLO, J. C. P. de; SANTOS, S. da C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*.4.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2003. Cap. 24. p. 517-544.

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

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

MELLO, J.C. P de. *Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der Rinde von Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae). Münster, Alemanha, Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, tese doutorado, 1995. 238p.

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

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

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.

MITERMEIER, N.; MYERS, R.A.; MITTERMEIER C.G. Hotspots – Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial ecoregions. CEMEX – **Conservation International**. Mexico City, 1999, p.430.

MONTANDON, D.; D'ANDIRAS, G.; GABBIANI, G. The mechanism of Wound contraction and epithelialization. **Clin. Plast. Sug.**, Charlottesville, v.4, p.325-346, 1977.

MONTENEGRO, G. Manual de técnicas de estudo estrutural y ultraestructural em vegetales. Laboratorio de botánica de la facultad de ciencias biológicas. Pontificia Universidad Católica do Chile. Santiago de Chile. 1985

MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A. S.; SANCHES, E.M.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substancias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseupiptadenia contota* (Leguminosae-Mimosoideae). **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, v.12, p.124-125, 2002.

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

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

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A5, vol. 20, #2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; 5th ed, 2000

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

NEVES, M. do C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D. R.; FRACASSO, J. F.; LEPERA, E. Z. P.; SILVA, R. F. P. Estudo dos efeitos farmacológicos produzidos pelos extratos aquosos de hamamelis e barbatimão. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7, 1992, Caxambu. **Resumos...**, Caxambu, 1992a.

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

NOPITSCH-MAI, C.; KALOGA, M.; LANGHAMMER, L. Pharmakognostisch-phytochemische untersuchung der cortex von *Cassia auriculata* Linné. **Pharm. Ztg. Wiss.**, Berlim, v.4, p.157-159, 1990.

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

OCCHIONI MARTINS, 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 MARTINS, 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.

OCCHIONI, E.M.L. Considerações Taxonômicas no Genêro *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e Distribuição Geográfica das Espécies. **Acta Bot. Bras.**, Porto Alegre, v.4(Suplemento), p.153-158, 1990.

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, C.A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SILVA, S.C.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZEVEDO, A., P.G.B.; GONÇALVES, C.F.F.; COREDIRO, D.S.; LEITÃO, D.P.S.; GASPAR, L.R.; SOUZA, P.L.V.; VALIM, Y.M.L.; MANTOVANI, B. Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclética Química**, São Paulo, v.27, n. especial, 2002

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

OLIVEIRA, H.P. Traumatismo nos amniais domesticos. **Cad. Téc. Esc. Vet.**, Belo Horizonte, v.1, n.7, p.01-57, 1992.

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: XVI **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, FT.392, 2002. Cuiabá. *Resumos*, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF ratas infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.27, p.124-129, 1993.

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

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.438-443, 1991.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBERG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ^1H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Res. Commun.**, Copenhagen, v.46, p.43-52, 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, n.2:jul.-dez., 2002.

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

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.79, p.165-168, 2002.

PEREIRA, C. A.; SANTOS, H.L.; PESSOA, J.M. Intoxicação experimental de bovinos pela fava do barbatimão (*Stryphnodendron barbatimão* Martius). III Dados laboratoriais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.41, n.5, p. 415-432, 1989c.

PEREIRA, C. A.; SANTOS, H.L.; PESSOA, J.M. Intoxicação experimental de bovinos pela fava do barbatimão (*Stryphnodendron barbatimão* Martius). II Aspectos anátomo-histológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.41, n.5, p.405-413, 1989b.

PEREIRA, C. A.; SANTOS, H.L.; PESSOA, J.M. Intoxicação experimental de bovinos pela fava do barbatimão (*Stryphnodendron barbatimão* Martius). I Sinais Clínicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.41, n.5, p.389-403, 1989a.

PEREIRA, M.N.S.; ANDRADE, A.C.U.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville . In: XVI **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 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, propolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e Histológico em ratos. **Rev. Ciên. Bioméd.**, 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. 223 p., 1992.

PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. **Phytochemistry**, New York, v.30, p.81-985, 1991.

PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C.; DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brasil. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.66, p.51-55, 1999.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, New York, v.56, p.237-243, 2001.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Washington, v.63, p.1035-1042, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Oficial, 1926. VI, 747p.

PIRETTI, M.V.; DOCHIERI, P. Separation of peracetylated flavanoid polyphenols by normal-phase high-performance liquid chromatography on a cyano-silica column and their determination. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.14, p.334-342, 1990.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.) **Advances in legume systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. v.1, p.1-26.

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

REATTO, A.; CORREIA, J.R.; SPERA, S.T. Solos do bioma cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado – ambiente e floresta**, p.47-86, 1998.

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

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

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

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V., SCHOEN, F.J., **Patologia estrutural e funcional**. 5ª ed. , ed. Guanabara Koogan, p.45-83, 1996.

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.

SANCHES, A.C.C.; MUNDO, S.R.; SILVA, P.E.R.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. de. Pharmacognostic study and antibacterial activity of the stem bark extract *Stryphnodendron obovatum* Benth, Leguminosae. 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Barcelona-Espanha., v.2, supl.I, p.301, septiembre, 2002.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activity of extracts and flavan-3-ols from *Stryphnodendron obovatum* Benth., Leguminosae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, submetido.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D.C.; SIMÕES, M.J.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirurg. Bras.**, São Paulo, v.8, n.1, p.18-23, 1993.

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

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

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agric.**, London, v.80, p.1094-1117, 2000.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, New York, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Am. Feed Sci. Technol.**, Amsterdam, v.91, p.21-40, 2001.

SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Dtsch. Apoth. Ztg**, Berlim., v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional – Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4^o ed. Manole, 2002

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHUKLA, A.; RASIK, A.M.; JAIN, G.K.; SHANKAR, R.; KULSHRESTHA, D.K. DHAWAN, B.N. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.65, p.1-11, 1999.

SILVA NETO, C.R.; LOPES, R.A.; ROSSI, E.; CONTRERA, M.G.D. Excreção renal de água, sodio e potássio em animais submetidos a sobrecarga aquosa de barbatimão: *Stryphnodendron obovatum*. **Pesq. Homeop.**, Ribeirão Preto, v.5, p.9-20, 1988.

SILVA, L.O.; COSTA, D.A.; SANTO FILHO, K.E.; FERREIRA, H.D.; BRANDÃO, D. Levantamento florístico e fitossociológico em duas área de cerrado *sensu strictu* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. **Acta Bot. Bras.**, Porto Alegre, v.16(1), p.43-53, 2002.

SILVER, L.L.; BOSTION, K.A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.37, p.377-383, 1993.

SIMÕES, M.J.; CABRAL, A.C.V.; BOYACIYAN, K.; KULAY JUNIOR, L.; SASSO, W.S. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v.104, n.3, p.132-134, 1986.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

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

SPERONI, E.; GOVONI, P.; RENZULLI, C.; GUERRA, M.C. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. Root extract. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.79, p.265-272, 2002.

STALDELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds. **The Am. J. of Sug.**, Louisville, v. 176 (Suppl 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.

STICHER, O. Quality of ginkgo preparations. **Planta Med.**, Stuttgart, v.59, p. 2-11, 1993.

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.

SUGUNA, L.; SINGH, S.; SIVAKUMAR, P.; SAMPATH, P.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Terminalia chebula* on dermal wound healing in rats. **Phytother. res.**, London, v.16, p.227-231, 2002.

TAKAHASHI, T.; KAMIYA, T.; YOKOO, Y. Proanthocyanidins from grepe seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells in vitro and convert hair cycle in vivo. **Acta Derm. Venereol.**, Stockh, v.78, p.428-432, 1998.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

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

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; DRIEMEIER, D.; COSTA, J.B.D.; CAMARGO, A.J.R. Aborto em vacas na intoxicação experimental por *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.18, p.35-38, 1998.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; GAVA, A.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.11, p.25-29, 1991.

TOLEDO, C.E.M.; SANTOS, F.S.; MELLO, J.C.P. Controle de qualidade da matéria-prima vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae (Barbatimão). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Departamento de Psicobiologia e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, 1998. p.200.

TOLEDO, C.E.M.de. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae. Araraquara: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, 92p. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), 2002.

TURSCH, B.; TURSCH, E.; HARRISON, I. T.; BRAZÃO da SILVA, G. B. C. T. de C.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; DJERASSI, C. Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformational changes in triterpenes of the β -amyrin class

isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. **J. Org. Chem.**, Washington, v. 28, p. 2390-2394, 1963.

TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E.; CHIURDOGLU, G. Triterpenes II (*). Les sapogénines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. **Bull. Soc. Chim. Belges**, Bruxelles, v.75, p.26-28, 1966.

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

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

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

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

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e akimentos: importancia e perspectivas terapêuticas. In:YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (org.). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª ed., Chapéco: Ed. Argos, Ed. Da Unoesc, 2001, cap.8, p.317-334.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; CHUNG, H.Y.; OURA, H.; NAKAGAWA, H. Inhibitory effect of green tea on injury to a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.61, p.204-206,1997.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; NAKAGAWA,T.; KASHIWAGI, H.; NAKAGAWA, H.; TAKEUCHI, S.; CHUNG, H.Y. In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. **J. Agr. and Food Chem.**, Easton, v.46,p.2143-2150, 1998.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: Necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZHAO,Y.; CAO, J.; MA, H.; LIU, J. Apoptosis induced by tea polyphenols in HL-60 cells. **Cancer Lett.**, Philadelphia, v.121, p.163-167, 1997.