

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE**  
**EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron polyphyllum* MART.,**  
**LEGUMINOSAE, BARBATIMÃO**

FATIMA APARECIDA VIEIRA MACHADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

ARARAQUARA  
2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE**  
**EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron polyphyllum* MART.,**  
**LEGUMINOSAE, BARBATIMÃO**

FATIMA APARECIDA VIEIRA MACHADO

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

ARARAQUARA  
2005

#### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M149e Machado, Fatima Aparecida Vieira  
Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, barbatimão / Fatima Aparecida Vieira Machado. - Araraquara, SP : [s.n.], 2005.  
101 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

1. *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) - Plantas medicinais. 2. *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) - Fitoquímica. 3. *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) - Capacidade oxidante - Avaliação. 4. *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) - Taninos condensados. 5. *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) - Extrato bruto e frações. I. Universidade Estadual Paulista. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDD 21.ed.615.321

Zenaide Soares da Silva CRB 9/1307

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

FATIMA APARECIDA VIEIRA MACHADO

### **ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS CASCAS DE *Stryphnodendron polyphyllum* MART., LEGUMINOSAE, BARBATIMÃO**

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

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

Profa. Dra. Izabel Cristina Piloto Ferreira  
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado  
UNESP – Araraquara - SP

Araraquara, 25 de fevereiro de 2005

***Aos meus pais Lourdes e Ermelino e  
à minha irmã Fábria***

## AGRADECIMENTOS

Ao **professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello**, pela sua orientação, exemplo profissional, compreensão e amizade.

Ao **professor Dr. Wagner Vilegas**, pela atenção e disponibilidade.

Ao **Dr. Heinrich Luftmann** do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha pela realização dos espectros de massas e auxílio em suas interpretações.

Aos **professores de Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNESP**, Câmpus Araraquara pelos conhecimentos compartilhados.

Ao meu **pai, Ermelino Vieira Machado**, e minha **mãe Lourdes Sperandio Machado**, pelo incentivo e apoio nas horas difíceis.

À minha prima, **Alba Maria Perfeito**, pelo incentivo, amizade e carinho.

A todos os **colegas da Pós-Graduação**, pelo aprendizado e a alegria do convívio.

Aos queridos amigos da pós-graduação da UEM e UNESP: **Maria Inez, Gisely, Andréia, Analice, Juliana, Elza, Lúcia, Rubiana, Fernando, Luigina, Kélia, Ketylin, Marcelo e Marcio**, pela amizade e apoio.

Às colegas do Programa de Iniciação Científica (UEM), **Adriana e Flávia**, pela cooperação e amizade.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação da UNESP e UEM: **Laura, Claudia, Sônia Ornella, Helena e Sônia**, pela atenção e carinho.

Aos técnicos de laboratório da UEM: **Admir, Leocir e Cláudio**.

Às minhas amigas, **Selma, Soraia, Terezinha, Edna, Sueko, Kátia e Kaity** pelo incentivo, carinho e colaboração.

A todos que, diretamente e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNESP**, pela oportunidade de aprendizado.

À **Deus** por me permitir realizar mais uma etapa em minha vida.

Se fordes bicho-da-seda, deveis produzir fios de seda, incessantemente. Se vos tornardes fios de seda, deveis vos transformar em tecido de seda. Se nascerdes pepita ou minério de ouro, ao ser peneirado, escolhido, aquecido e derretido, não deveis reclamar do calor nem da sujeira. Mesmo que sejais apartados da areia ou da rocha, deveis saltitar, abandonando o apego. Não choreis mesmo que sejais apartados da rocha. Se vos lamentardes, não vos transformareis em um cintilante lingote de ouro.

Revista Sukyo Mahikari - nº 86-abril 2004

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	Introdução ao gênero <i>Stryphnodendron</i> .....	20
2.2	Distribuição geográfica do gênero <i>Stryphnodendron</i> .....	21
2.3	Descrição macroscópica de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart .....	22
2.4	Constituintes químicos do gênero <i>Stryphnodendron</i> .....	23
2.4.1	Estudo do principal componente do gênero <i>Stryphnodendron</i> .....	28
2.5	Propriedades biológicas.....	32
2.5.1	Atividades farmacológicas e toxicológicas.....	32
2.5.1.1	Radicais livres e antioxidantes.....	35
2.5.1.3	Métodos para avaliação da atividade antioxidante.....	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
3.1	Objetivo geral.....	45
3.2	Objetivos específicos.....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
4.1	Droga vegetal.....	46
4.2	Solventes, reagentes e soluções.....	46
4.3	Equipamentos.....	47
4.4	Obtenção e moagem da planta.....	48
4.5	Análise físico-química e quantitativa.....	48
4.5.1	Determinação da perda por dessecação.....	48
4.5.2	Teor de extrativos.....	48
4.5.3	Determinação do teor de taninos totais.....	49
4.6	Obtenção do extrato bruto.....	50
4.6.1	Obtenção da fração acetato de etila (FAE).....	50
4.7	Métodos cromatográficos.....	50
4.7.1	Cromatografia em coluna da fração acetato etila.....	51
4.7.2	Cromatografia em coluna das frações F4, F6, F8 e F10 e das subfrações F3#1, F3#2, F4#6, F6#2, F6#3 e F6#4.....	52
4.7.3	Cromatografia em camada delgada.....	52
4.7.4	Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade para as frações F3, F4, F5, F7 e 9.....	52
4.7.5	Cromatografia em camada preparativa (CCDP).....	53
4.8	Derivatização das substâncias isoladas.....	53
4.9	Análise estrutural das substâncias isoladas.....	54
4.10	Capacidade antioxidante.....	54
4.10.1	Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres pelo método de DPPH• (2,2-defenil-1-picrilhidrazila).....	54
4.11	Análise Estatística.....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
5.1	Caracterização físico-química e quantitativa.....	56
5.1.1	Perda por dessecação.....	56
5.1.2	Teor de extrativos.....	56
5.1.3	Determinação do teor de taninos totais.....	56



5.2	Fitoquímica.....	57
5.2.1	Substância I - ácido gálico .....	61
5.2.2	Flavan-3-ol.....	65
5.2.2.1	Substância II - galocatequina.....	65
5.2.2.2	Substância III – Epigalocatequina.....	69
5.2.2.3	Substância IV - 4'-O-metil-galocatequina.....	74
5.2.3	Dímero de flavan-3-ol.....	79
5.2.3.1	Substância V - fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina .....	79
5.3	Capacidade antioxidante .....	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura química do taxol, artemisina e safrol, isolado de <i>Taxus brevifolia</i> Nutt., <i>Artemisia annua</i> L. e <i>Ocotea</i> sp respectivamente.....	17
2	<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. A= ramo florido, B= folíolo, C= flor completa, D= flor séc longitudinal, E= gineceu, F=estame .....	23
3	Estrutura das sapogeninas 1 [(R=OH; R'=H), 2 (R=R'=OH), 3 (R=OH; R'=H) e 4 (R=H; R'=OH)].....	24
4	Estruturas das substâncias flavan-3-ol, isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de <i>S. adstringens</i> (Mart.) Coville: 1= epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato, 2= epigalocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigalocatequina.....	26
5	Estrutura de prodelfinidinas isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de <i>S. adstringens</i> (Mart) Coville: 1= epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato, 2= epigalocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigalocatequina.....	27
6	Estrutura de prorobinetinidinas, isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de <i>S. adstringens</i> (Mart) Covill: 1= robinetinidol-(4 $\alpha$ →6)-epigalocatequina e 2= robinetinidol-(4 $\beta$ →8)-galocatequina.....	28
7	Estrutura química básica de taninos hidrolisáveis: 1= ácido gálico e 2= ácido elágico.....	29
8	Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com o quadro 1.....	30
9	Diferença no tipo de acoplamento nos taninos condensados do tipo A: 1= robinetinidol-(2 $\beta$ →7;4 $\beta$ →8)-epicatequina e do tipo B: 2= epicatequina-(4 $\beta$ →6)-catequina e 3= epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina.....	32
10	Exemplos de antioxidantes naturais esintéticos: 1= butil-hidróxi-tolueno, 2= galato de epigalocatequina e 3= vitamina E.....	40
11	Estrutura do DPPH radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e reduzido (difenil picrilhidrazina).....	43
12	Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas a= dimerização e b= estabilização de um radical DPPH .....	44

13	Cromatografia em camada delgada das 20 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna. Sistema cromatográfico: gel de sílica F <sub>254</sub> ; sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v) e revelação com cloreto férrico 1% em etanol .....	60
14	Espectro de massas do ácido gálico por ESI no modo negativo.. .....	62
15	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância I - ácido gálico [(CD <sub>3</sub> OD, TMS, 300 MHz, ppm)].....	63
16	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância I - ácido gálico (CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz, ppm).....	64
17	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância II - galocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, TMS, 300 MHz, ppm)].....	66
18	Espectro de COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância II - galocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, TMS, ppm)].....	68
19	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância III - epigalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD), 300 MHz, TMS, ppm)].....	71
20	Espectro de COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância III - epigalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, TMS, ppm)].....	72
21	Espectro de RMN <sup>13</sup> C das substâncias II e III - galocatequina e epigalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 75 MHz, ppm)].....	73
22	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância IV - 4'-O-metilgalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, TMS, 300 MHz, ppm)].....	76
23	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância IV - 4'-O-metilgalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, ppm)].....	77
24	Espectro de massas da substância IV- 4'-O-metilgalocatequina por ESI negativo .....	78
25	Espectro de NOE da substância IV - 4'-O-metilgalocatequina .....	78
26	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância V [fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina] peracetilada (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , TMS, 300 MHz, ppm) .....	82
27	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância V [fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina] peracetilada (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , TMS, 300 MHz, ppm) .....	83
28	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância V [(fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina peracetilada [(acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , TMS, 300 MHz, ppm)].....	83
29	Espectro COSY <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H da substância V [(fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina peracetilada [(CDCl <sub>3</sub> , TMS, 300 MHz, ppm)] .....	85
30	Valores de IC <sub>50</sub> para FEB, FAE, FAQ e vitamina C, pelo método do seqüestro do DPPH' .....	86
31	Mudança de coloração de violeta para amarela nas diferentes concentrações da amostra FEB ( $\mu$ g/ml) avaliada pelo método de seqüestro do radical DPPH.....	87

32	Comparação da capacidade antioxidante de FEB, FAE e FAQ, pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.....	88
33	Coloração verde observada pela formação do complexo fosfomolibdênio na amostra EB (n=3), comparadas com o branco (à esquerda).....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Gradiente da fase móvel utilizada para CC da fração acetato de etila .....	51
2	Subfrações obtidas por CC da fração acetato de etila .....	59
3	Deslocamentos químicos de RMD $^{13}\text{C}$ da substância I - ácido gálico [(CD <sub>3</sub> OD; 75MHz, TMS, ppm)] .....	62
4	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ da substância II - galocatequina em [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, TMS, ppm)].....	67
5	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ da substância III - epigalocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, TMS, ppm)] .....	70
6	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ da substância IV - 4'-O-metil-galocatequina [(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz, TMS, ppm)] .....	75
7	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ da substância V - fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina [(a=acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> e b=CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz, TMS, ppm)] .....	84

## LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma		Página
1	Extração a partir das cascas de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. e fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna.....	8
2	Fracionamento cromatográfico da F3.....	61
3	Fracionamento cromatográfico da F4.....	65
4	Fracionamento cromatográfico da F4.....	70
5	Fracionamento cromatográfico da F7.....	75
6	Fracionamento cromatográfico da F9.....	80

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton .....	37
2	Formação das espécies reativas de oxigênio.....	37
3	Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados.....	38

## LISTA DE QUADRO

Quadro		Página
1	Classificação de taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CAR</b>	Capacidade antioxidante relativa
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H</b>	Espectroscopia de correlação hidrogênio/hidrogênio
<b>D</b>	Dubleto
<b>Dd</b>	Duplo dubleto
<b>Ddd</b>	Duplo duplo dubleto
<b>DCI-MS</b>	Espectroscopia de massas por decomposição química
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>EI-MS</b>	Espectroscopia de massas por impacto de elétrons
<b>F#</b>	Subfrações obtidas a partir da fração acetato de etila
<b>FEB</b>	Fração extrato bruto
<b>FAE</b>	Fração acetato de etila
<b>FAQ</b>	Fração aquosa
<b>IC<sub>50</sub></b>	Quantidade da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH
<b>M</b>	Multiplete
<b>NOE</b>	Efeito overhauser nuclear
<b>PNA</b>	Polifenóis não adsorventes
<b>PT</b>	Polifenóis totais
<b>Rf</b>	Relação de frente
<b>RSA</b>	Radical scavenging activity
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>SM</b>	Solução mãe

## RESUMO

O gênero *Stryphnodendron*, Leguminosae, cresce abundantemente no cerrado brasileiro, e é conhecido popularmente como barbatimão. As cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* são extensivamente utilizadas popularmente no tratamento de diarreia e leucorréia, como coagulante sangüíneo, como antiinflamatório e, também, como estimulante no processo de cicatrização. Os componentes químicos isolados até o momento são saponinas, flavonóides e, principalmente taninos. O objetivo deste trabalho foi o isolamento de substâncias polifenólicas, e avaliação da capacidade antioxidante do extrato bruto e frações semipurificadas das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. A fração acetato de etila (FAE) foi submetida à cromatografia em coluna, contendo Sephadex® LH-20, obtendo-se 20 subfrações, das quais foram isoladas e identificadas cinco substâncias: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina e fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina, através de espectroscopia de massas, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H e NOE. A avaliação da capacidade antioxidante, foi realizada *in vitro*, através de dois métodos espectrofotométricos. O primeiro ensaio foi realizado empregando-se o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila. O segundo teste baseou-se na redução do molibênio (VI) para molibdênio (V) com formação de complexo de coloração verde fosfato/Mo(V) em pH ácido. O resultado obtido mostrou que a FAE possui maior capacidade antioxidante com valor de IC<sub>50</sub> de 7,602 ± 0,21 (CV%=2,75) para o radical DPPH e valor de capacidade antioxidante relativa à vitamina C de 0,8178 ± 0,07 (CV%=4,16) para a redução do complexo fosfomolibdênio entre as a mostras analisadas.

**Palavras-chave:** *Stryphnodendron polyphyllum*; Leguminosae; taninos condensados; capacidade antioxidante; radical DPPH; complexo fosfomolibdênio.



## ABSTRACT

The genus *Stryphnodendron*, Leguminosae, grows abundantly in the “cerrado” (central savannahs) of Brazil, where it is popularly known as “barbatimão”. The stem barks of *Stryphnodendron polyphyllum* are extensively used by the local population of treatment of diarrhoea and leukorrhoea, as a blood coagulant, as antiinflammatory and to stimulate wound healing. The isolated chemical groups at the moment are saponins, flavonoids and mainly, tannins. This work aimed at the isolation of polyphenolic compound and the evaluation of the antioxidant capacity from crude extracts and semipurified fractions of the stem bark of *S. polyphyllum*. The ethyl-acetate fraction was submitted to column chromatography, containing Sephadex® LH-20 and was obtained 20 subfractions. From these fractions were isolated and identified five compounds: gallic acid, gallocatechin, epigallocatechin, 4'-O-methylgallocatechin, and fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-gallocatechin, through mass spectrometry, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR; COSY <sup>1</sup>H/H and NOE. The antioxidant capacity was evaluated *in vitro*, through two spectrophotometric methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, and the second based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) with formation of a green phosphate/Mo(V) complex at acidic pH. The result showed for the sample FAE a value of IC<sub>50</sub> of 7.602 ± 0.21 (RSD%=2.75) for DPPH radical and the value for relative antioxidant capacity expressed as equivalent of ascorbic acid standard was 0.8178 ± 0.07 (RSD%=4.16) for reduction of phosphomolybdenum complex, among the sample tested.

**Key words:** *Stryphnodendron polyphyllum*; Leguminosae, condensed tannins; antioxidant capacity; DPPH radical; complex phosphomolybdenum

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o alívio de diversas doenças, remonta aos primórdios da história da Humanidade. Manuscritos contendo informações sobre o uso de diversas plantas foram legados por grandes civilizações da Antigüidade (PHILLIPSON, 2001).

Na Idade Média os mosteiros tornaram-se verdadeiros centros de estudos, produção e utilização de plantas medicinais, fazendo com que muitas informações não fossem perdidas durante a censura imposta à época da inquisição (PHILLIPSON, 2001).

No Renascimento, com a liberdade de pensamento, a curiosidade e novos horizontes que se descortinavam, várias ciências tiveram seu desenvolvimento como a matemática, a química e a botânica, entre outras (BRAGANÇA, 1996).

Mas, foi somente no século XIX que se iniciou o isolamento de princípios ativos de plantas medicinais, sendo a descoberta da substância quinina e, da quinidina, da *Cinchona* spp., por cientistas franceses, um marco para novas pesquisas. A partir daí, expedições às florestas eram comuns, com o intuito de coletar cascas de árvores, folhas, para que fossem levadas até os laboratórios, onde um trabalho árduo se iniciava, buscando o isolamento de substâncias químicas.

Algumas substâncias químicas, isoladas de plantas superiores, antes da Segunda Guerra Mundial, são utilizadas até os dias de hoje: a morfina e a codeína, do látex da *Papaver somniferum* L.; a digoxina das folhas de *Digitalis* sp.; a atropina e a hioscina de *Atropa belladonna* L. Estas substâncias entre outras possuem importância histórica como protótipo no desenvolvimento de fármacos, respectivamente hipno-analgésico, cardiotônico e anticolinérgico (SCHENKEL et al., 2003).

A era do antibiótico surgiu durante e após a Segunda Guerra Mundial devido a uma série de compostos isolados de determinados fungos: *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*.

A descoberta da reserpina, da *Rauvolfia* spp., utilizada como anti-

hipertensiva e das vincristina e vimblastina, obtidas de *Cantharanthus roseus* (L.) G. Don, quimioterápicos bastante eficientes, são exemplos de fármacos desenvolvidos após a Segunda Guerra Mundial, com grande importância para a terapêutica (SCHENKEL et al., 2003).

Apesar do impacto destas descobertas, a farmacoterapia começa a tomar novos rumos com a síntese do ácido acetilsalicílico, em 1897, inspirado na substância natural salicilina, extraída de *Salix alba* L., sendo a deflagração para o desenvolvimento da indústria de síntese orgânica (YUNES et al., 2001).

Nos últimos anos a indústria farmacêutica começa a se voltar mais uma vez para a pesquisa das plantas medicinais, devido ao grande interesse da população pelas terapias alternativas e por aquelas, as quais utilizam produtos naturais, principalmente as derivadas de plantas. Outras razões podem estar envolvidas nesse contexto, as quais incluem: ineficiência dos fármacos sintéticos, abuso ou uso incorreto, resultando em efeitos colaterais e outros problemas, além da dificuldade de acesso a alguns tipos de tratamentos (RATES, 2001).

As pesquisas na busca de novos fármacos a partir de vegetais estão cada vez mais avançadas devido ao desenvolvimento tecnológico. Recentemente, pesquisas levaram à descoberta do taxol, um diterpenóide, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt., possuidor de comprovada eficácia contra o câncer de mama e de ovário, da artemisina, um potente antimalárico, obtido da *Artemisia annua* L. (PHILLIPSON, 2001) e o safrol que ocorre no óleo de sassafrás (*Ocotea* sp.), como molécula base para a síntese de novos antiinflamatórios (BARREIRO, 2001) (Fig.1).

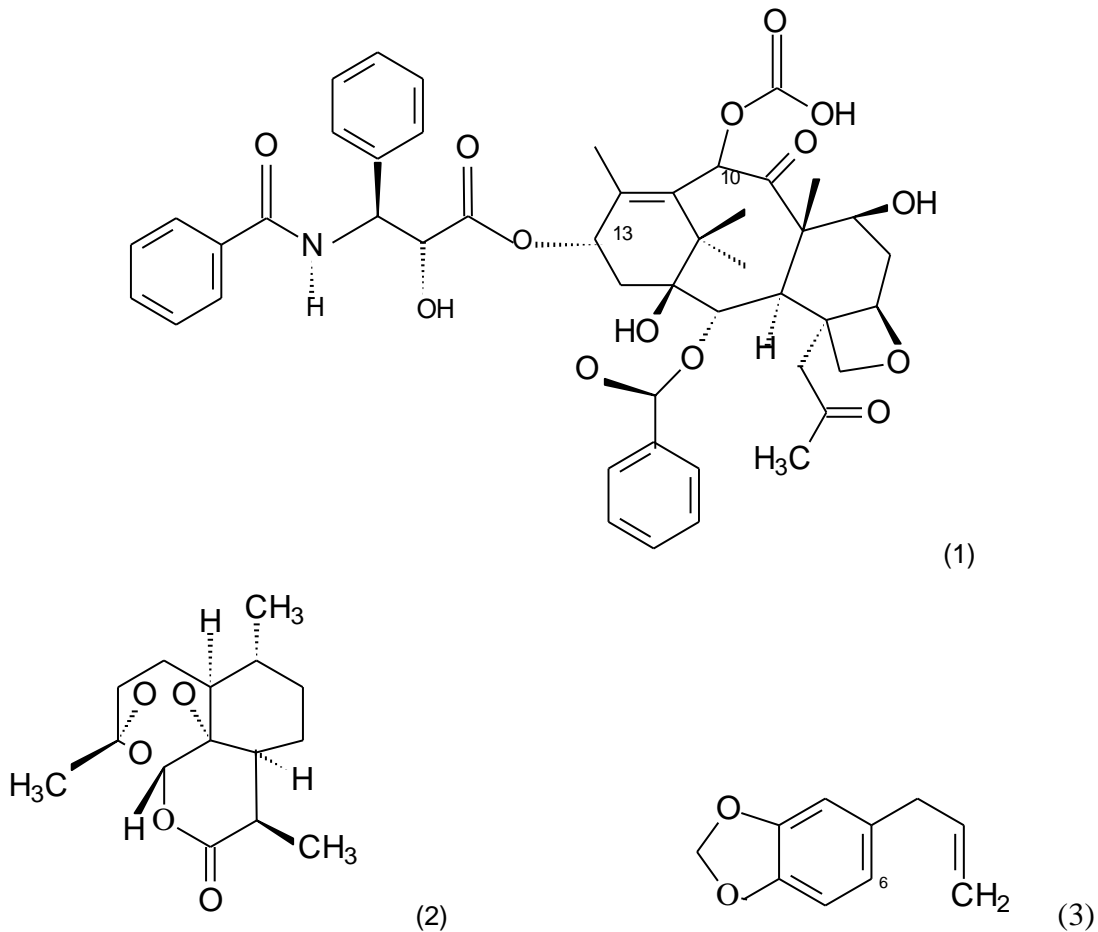


Figura 1 - Estrutura química do taxol (1), artemisina (2) e safrol (3), isolado de *Taxus brevifolia* Nutt., *Artemisia annua* L. e *Ocotea* sp. respectivamente.

Dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originários de plantas e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais (RATES, 2001).

Deve-se levar em consideração, também, que é necessário um programa de cada país com relação à exploração de plantas medicinais, de forma racional, respeitando a biodiversidade, em particular na América do Sul e Ásia, os quais possuem uma rica flora. O objetivo seria estudá-las, com o intuito de evitar a extinção de várias espécies (RATES, 2001).

Rates (2001), em seu trabalho de revisão, afirma ainda que, vários autores consideram que os resultados com as pesquisas, nesta área, produzem efeitos através da interdisciplinaridade entre as ciências (a química, a farmacologia, a botânica, a toxicologia, a antropologia, a agronomia, a biotecnologia e a tecnologia farmacêutica). Desse modo, a fitoquímica é uma área de conhecimento científico

que se concretiza aliada às ciências citadas.

Com relação ao Brasil, apesar da rica flora que corresponde a quase 20% das espécies de plantas conhecidas no mundo, as pesquisas ainda são poucas se comparadas à sua exuberante flora nativa, reserva vasta e cobiçada biodiversidade (PETROVICK et al., 1999).

O gênero *Stryphnodendron*, família Leguminosae, é tipicamente brasileiro, possuindo como metabólito secundário principal taninos. A importância dos taninos, originariamente descrita, está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro. Além disso, a planta possui diferentes usos na medicina popular, incluindo ação cicatrizante; tratamento da leucorréia; adstringência; antidiarréica e anti-séptica (PIO CORRÊA, 1946; SANTOS et al., 1987).

Estudos têm mostrado que as principais atividades biológicas e farmacológicas dos taninos incluem propriedades bactericidas, fungicidas, antivirais, moluscicidas, de inibição enzimática, de inibição da peroxidação de lipídios e, sequestrador de radicais livres e ação antitumoral (SANTOS; MELLO, 2003).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Introdução ao gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron*, conhecido popularmente por barbatimão, é uma planta medicinal que se distribui no Brasil a partir da região Amazônica (OCCHIONI MARTINS, 1980) e cresce abundantemente na região de savanas do centro do Brasil, atingindo o Estado do Paraná, com o registro de duas espécies: *S. adstringens* e *S. obovatum*. Mas, a planta, também cresce em outros países da América do Sul e Central, chegando até a Costa Rica, onde foi encontrada uma única espécie (OCCHIONI, 1990).

O nome *Stryphnodendron*, origina da palavra grega *stryphnós*, que significa duro e *déndron*, árvore. Os termos referem-se à idéia de lenho duro, típico da planta (PENNA, 1946). Já, a palavra barbatimão tem origem indígena, ybatimó ou uabatimó, que significa árvore que aperta (BRAGA, 1953), termo que remete para a palavra adstringente em português. A adstringência é devida à riqueza em compostos fenólicos do tipo taninos. Além de barbatimão, a planta recebe outros nomes populares como: barba-de-timão, ibatimó, uabatimó, chorãozinho-roxo, casca da virgindade ou da mocidade (PIO CORREA, 1946; COIMBRA, 1942; PENNA, 1946).

Este gênero pertence à família Leguminosae, sub-família Mimosoidae e está incluído na Farmacopéia Brasileira de 1929, como *Stryphnodendron barbadetiman* Martius, nomenclatura que, mais tarde, foi modificada por Coville, para *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. Occhioni Martins e Martins Junior (1972), fazendo nova revisão nomenclatural dessa espécie, estabeleceram o binômio *Stryphnodendron barbadetiman* (Velloso) Martius e passaram os demais para a sinonímia. Entretanto, Forero (1972), restabelece o termo *S. adstringens* (Mart.) Coville.

Segundo Occhioni (1990), 32 taxas são conhecidas, sendo 29 espécies, 1 subespécie e 2 variedades, com distribuição geográfica e hábitos bastante característicos. As espécies *S. coriaceum* Benth., *S. barbadetiman* (Vell.) Mart., *S. polyphyllum* Mart., *S. rotudifolium* Mart. e, *S. obovatum* Benth., foram estudadas por

Occhioni Martins (1974) nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil.

O critério para a identificação das espécies é baseado principalmente na morfologia da folha e nos hábitos da planta (MARTIUS, 1840; PIO CORRÊA, 1946).

## **2.2 Distribuição geográfica do gênero *Stryphnodendron***

A área de maior dispersão deste gênero encontra-se na América do Sul, sendo que a maior concentração das espécies encontra-se na Amazônia. O gênero compreende distribuição geográfica e hábitos bastante característicos, o que permite separá-los em grupos (Grupo I: 14 taxa que ocorrem na Floresta Amazônica, todas, árvores de grande porte, atingindo em média 35 m de altura. Grupo II: 1 taxon arbóreo, cerca de 20 m de altura, em floresta semidecídua seca, região de transição para o cerrado, Mato Grosso. Grupo III: 1 taxon arbóreo, cerca de 10 m de altura, de ocorrência característica em mata pluvial, Pernambuco. Grupo IV: 4 taxa arbustivos, com altura entre 4-7 m, dos campos e cerrados do Brasil central, Minas Gerais e São Paulo. Grupo V: 2 taxa arbustivos, de ocorrência típica nas caatingas do nordeste brasileiro. Grupo VI: 2 taxas arbóreas de ocorrência típica nas matas da Serra da Mantiqueira, Estado do Rio de Janeiro e Grupo VII: 8 taxa subarbustivos, denominados “plantas anãs”, com, no máximo, 0,50 m de altura, característicos dos cerrados de Goiás e Minas Gerais (OCCHIONI, 1990).

Dos 32 taxa do gênero, 30 ocorrem em território brasileiro. Na Venezuela ocorrem apenas 6; nas Guianas, 5; na Bolívia, 4; no Peru, 3; na Colômbia, 2 e apenas 1 no Paraguai, Costa Rica, Suriname e Equador (RIZZINI, 1980).

Embora, a distribuição deste gênero no Brasil seja grande, estudos indicam que a casca de barbatimão está em fase de declínio, seja por esgotamento do recurso ou pela substituição da atividade extrativista por outras, como agricultura e a pecuária (BORGES FILHO; FELFILI, 2003). A coleta da casca é feita de forma desordenada, o que coloca a espécie sob risco de extinção. Ainda, segundo os autores, dados disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000) apontam que a produção de casca de barbatimão decresceu de 1500 para apenas 12 toneladas/ano no período de 1988 a 2000. Desta maneira recomendam-se técnicas de manejo sustentável, protocolos de extração e proteção de áreas contra o fogo.

### **2.3 Descrição macroscópica de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.**

Arbusto ou árvore copada, 4-10 m de altura; ramos espessos, profundamente estriados; folhas alternas, 15 cm de comprimento; ráqui quadrangular, estriada, pubescente, com glândula alongada na base, pequenas glândulas verruciformes entre as pinas superiores; pinas 11-20 pares opostos ou sub-opostos, 5-11 cm de comprimento; folíolos 10-21 pares alternos ou sub-opostos, oblongos, ápice emarginado, base arredondada ligeiramente desigual, 0,8-1 cm de comprimento, 3-5 mm de largura, densamente pubescente em ambas as faces, base da nervura unilateralmente com tricomas na face interior; espigas delgadas, cilíndricas 2-4 dispostas em fascículos axilares, 5-17 cm de comprimento; cálice campanulado, 1 mm, externamente pubescente; corola 3 mm, puberula externamente; 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; legume alongado, 8-12 cm de comprimento, ligeiramente falçado, conforme figura 2 (OCHIONI MARTINS, 1974).



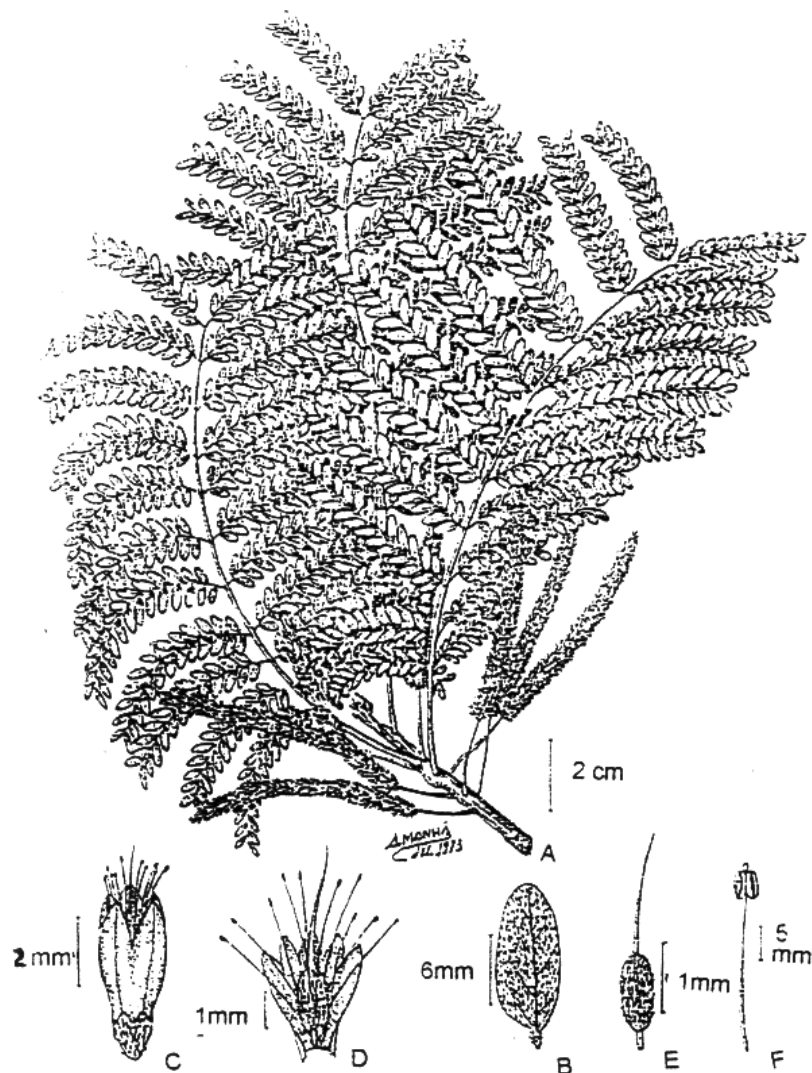


Figura 2 - *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.

A= ramo florido, B= folíolo, C= flor completa, D= flor séc longitudinal, E= gineceu, F= estame.

Fonte: Leandra, v. 3/4, n. 4/5, 1974.

#### 2.4 Constituintes químicos do gênero *Stryphnodendron*

A Farmacopéia Brasileira (1959) descreve que o teor mínimo de taninos encontrado nas cascas da espécie de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, é de 20%, no mínimo, e 8%, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2002). Toledo (2002), Lopes (2003) e Sanches (2004), estabeleceram teores de taninos de 19,51%, 15,03%% e 19,21% para *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, respectivamente.

A partir do extrato etanólico dos frutos de *Stryphnodendron coriaceum* Benth., foram isoladas quatro sapogeninas (TURSCH et al., 1963 e 1966), conforme

figura 3.

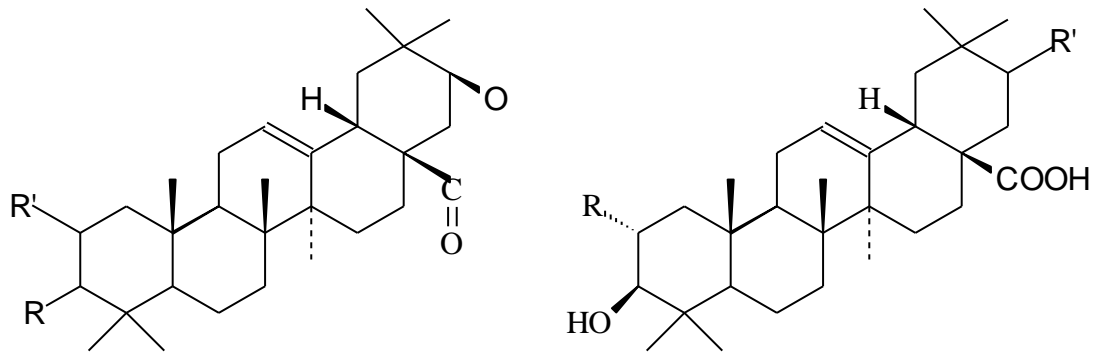


Figura 3 - Estrutura das sapogeninas 1 (R=OH; R'=H), 2 (R=R'=OH), 3 (R=OH; R'=H) e 4 (R=H; R'=OH)

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

A partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de *S. adstringens* (Mart.) Coville, Mello et al. (1996a e b), isolaram:

Flavan-3-ol:

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

Também foram isoladas e elucidadas oito prodelfinidinas, das quais, quatro são inéditas (em **negrito**):

- epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-galocatequina,
- epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina,
- epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-galato,
- epigalocatequina-3-O-galato-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-galato,

- galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina-3-O-galato,
- galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato,
- epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato,
- epigalocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigalocatequina.

Foi possível, também o isolamento de oito prorobinetidinas, das quais, cinco são inéditas (em negrito):

- **robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina,**
- **robinetidinol-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina,**
- robinetidinol-(4 $\beta$ →8)-galocatequina,
- **robinetidinol-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina-3-O-galato,**
- robinetidinol-(4 $\alpha$ →6)-galocatequina,
- **robinetidinol-(4 $\alpha$ →6)-epigalocatequina,**
- **robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina-3-O-galato,**
- robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina.

Os mesmos autores, em 1999, isolaram uma nova prodelfinidina: 4'-O-metil-galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (Fig. 4, 5 e 6).

As estruturas foram identificadas através da análise de espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$ , NOE, de massas por EI e DCI-MS e dicroísmo circular.

Toledo (2002) isolou e identificou duas novas substâncias a partir de extratos das cascas de *Stryphnodendron adstringens*, sendo denominadas 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina.

Sanches (2003) isolou de um extrato semipurificado das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (epigalocatequina e galocatequina, epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-galocatequina e epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina).

Lopes (2003) isolou, além de galocatequina, epigalocatequina, robinetidinol-

(4 $\beta$ →6)-4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-galocatequina, fisetinidol-(4 $\beta$ →8)-galocatequina e uma substância inédita: fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina de um extrato semipurificado das cascas de *S. polyphyllum* Mart.

Pereira et al. (2002) isolaram e identificaram ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina, triterpenos pentacíclico (3-oxo-taraxerona) e quercetina do extrato das folhas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.

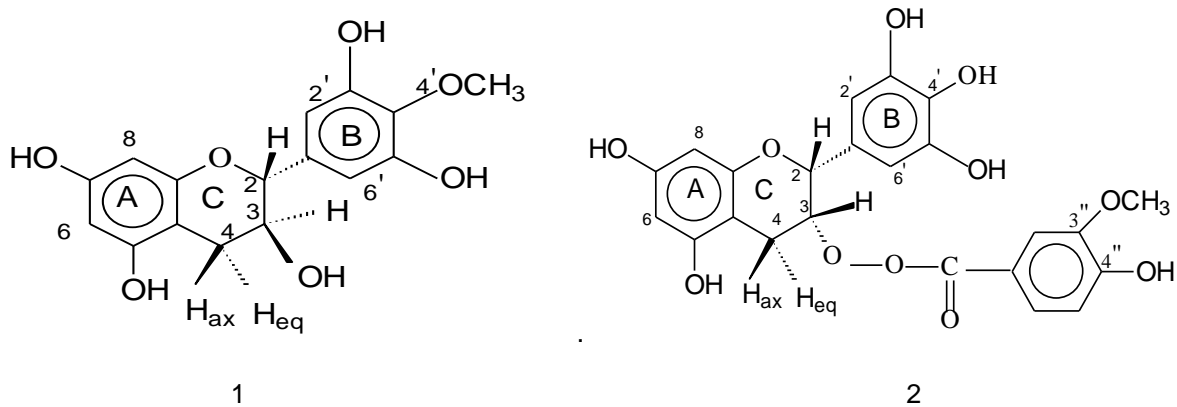


Figura 4 – Estrutura de substâncias flavan-3-ol, isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de *S. adstringens* (Mart.) Coville [Mello et al. (1996a)]: 1= 4'-O-metil-galocatequina; 2= epigalocatequina-3-O-(3"-metóxi-4"-hidróxi)-benzoato

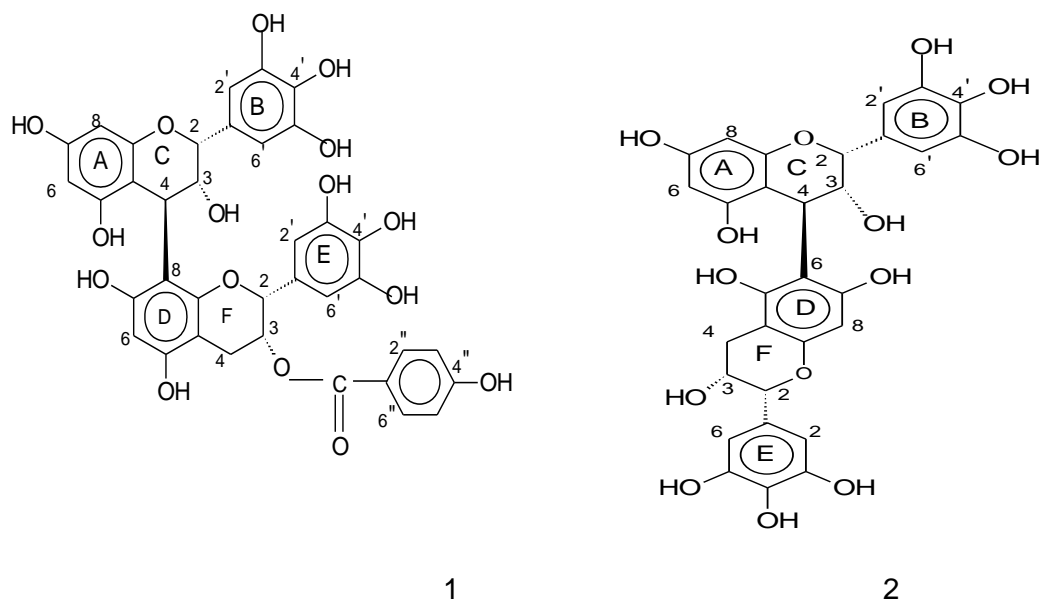


Figura 5 - Estrutura de prodelfinidinas isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de *S. adstringens* (Mart.) Coville [Mello et al. (1996a)]: 1= epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato, 2= epigallocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigallocatequina

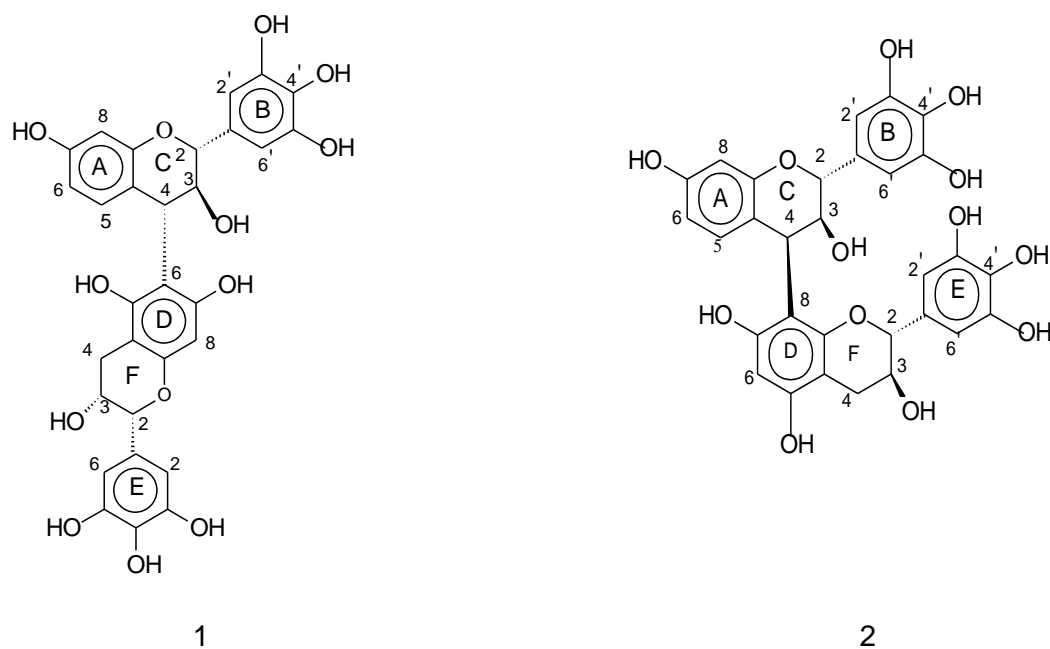


Figura 6 – Estrutura de prorobinetidinas isoladas a partir de extratos liofilizados, obtidos de cascas secas de *S. adstringens* (Mart.) Coville [Mello et al. (1996b)]. 1= robinetinidol-(4 $\alpha$ →6)-epigallocatequina e 2= robinetinidol-(4 $\beta$ →8)-galocatequina

#### 2.4.1 Estudo do principal componente do gênero *Stryphnodendron*: taninos

Os taninos podem ser definidos como substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962). Segundo Buelga e Scalbert (2000) os taninos encontram-se difundidos em plantas e alimentos de origem vegetal: frutas, legumes, sementes, grãos cereais, bebidas (vinho, chá, cidra, cacau).

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

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

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

Taninos hidrolisáveis são oligo ou poliésteres de um açúcar (ou de um poliol relacionado), sendo que o açúcar geralmente é a glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico e, denominados galotaninos. Os elagitaninos são formados pela hidrólise ácida de ligações éster de galotaninos que possuem acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico (Fig. 7). São característicos das angiospermas dicotiledôneas, principalmente das subclasses Rosidae, Dileniidae, Hamamelidae, com exceção da família Asteridae, onde não são normalmente encontrados (SANTOS; MELLO, 2003).

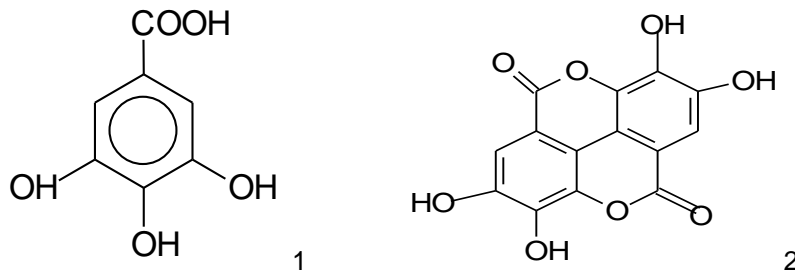


Figura 7 – Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis: 1= ácido gálico e 2= ácido elágico

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3-4-diol. São, também, denominados proantocianidinas ou leucocianidinas (HASLAM et al., 1975). Esta denominação é devida às características das proantocianidinas de formarem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído a quente. Encontram-se distribuídos amplamente nas gimnospermas e angiospermas (BUELGA; SCALBERT, 2000; SANTOS; MELLO, 2003). Os taninos condensados podem ser divididos em tipo 1 e tipo 2, de acordo com a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A. Podem também, ser classificados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos, conforme Santos e Mello (2003) (Fig. 8, Quadro 1).

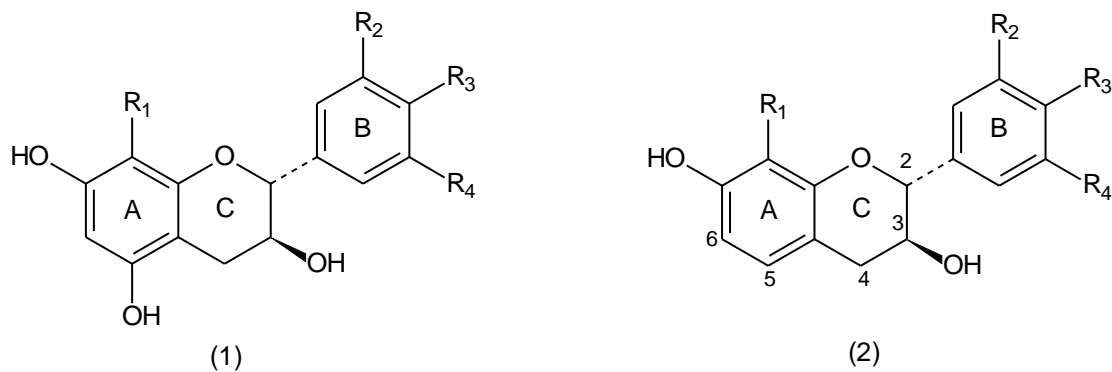


Figura 8 - Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com o quadro 1

Fonte: Santos; Mello, 2003

Quadro 1 - Classificação de taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos

Tipo	Proantocianidina	Monômero Nome trivial	Substituinte			
			R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargonidina	Afzelequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelfinidina	Galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacinidina	Oritina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

Fonte : Santos; Mello, 2003

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

Acoplamentos oxidativos entre monômeros de flavonóis (formando os dímeros) são comuns entre as posições 4 e 8, embora possa, também, ocorrer nas posições 4 e 6, entre as unidades, superior e inferior, respectivamente, formando o tipo B das proantocianidinas. Entretanto, no tipo A das proantocianidinas a forma de acoplamento é diferenciada, possuindo uma ligação do tipo éter, como pode ser observado na figura 9 (SCHOFIELD et al., 2001).

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

A nomenclatura trivial ou mesmo a IUPAC não se mostram práticas para estruturas complexas como os taninos condensados, desta maneira, utiliza-se a nomenclatura proposta por Hemingway et al. (1982), na qual os nomes são formados a partir da estrutura básica dos flavan-3-óis. A estereoquímica usual dos flavan-3-óis no carbono 2 é *R*; enquanto que, nas estruturas com configuração 2*S*



aplica-se ao nome trivial o prefixo *enantio*, que se abrevia por *ent*. Desta maneira, (+)-catequina é chamada de catequina e (-)-catequina, é denominada *ent*-catequina. Nos dímeros, trímeros e oligômeros superiores é utilizada nomenclatura semelhante à dos açúcares, em que a posição da ligação e a disposição espacial da ligação são escritas entre parênteses. As ligações entre os monômeros no C4 são indicadas, pela nomenclatura  $\alpha$  ou  $\beta$  (SANTOS; MELLO, 2003). Exemplos dessa nomenclatura podem ser observados nas figuras 4, 5 e 6.

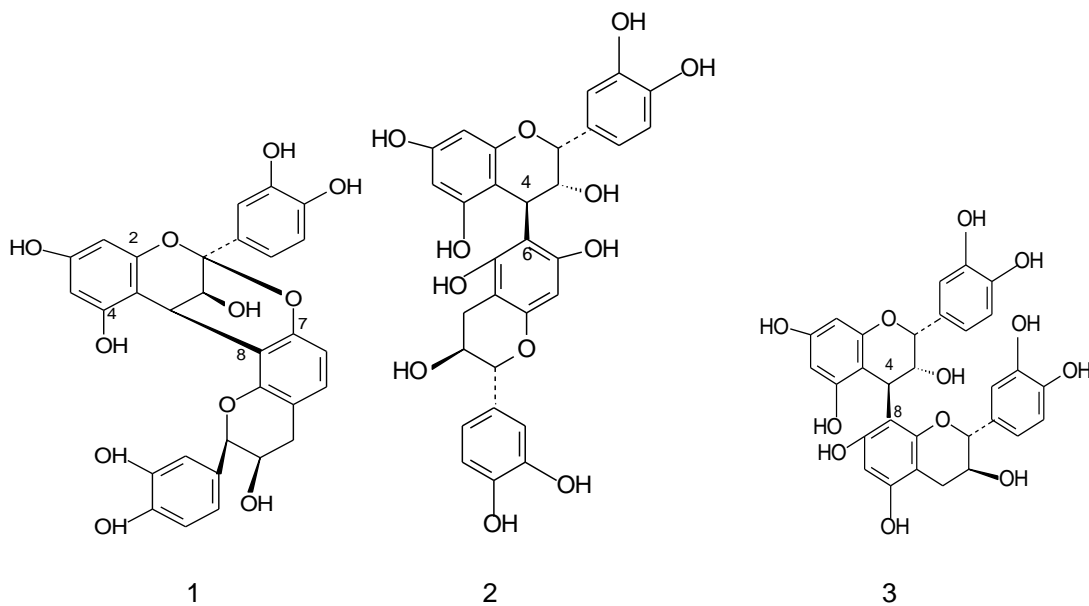


Figura 9 – Diferença no tipo de acoplamento nos taninos condensados do tipo A: 1= robinetinidol-(2 $\beta$ →7;4 $\beta$ →8)-epicatequina e do tipo B: 2= epicatequina-(4 $\beta$ →6)-catequina e 3= epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina

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

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

## 2.5 Propriedades biológicas dos taninos

### 2.5.1 Atividades farmacológicas e toxicológicas

Panizza et al. (1988) demonstraram ação cicatrizante da infusão das cascas de *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Mart., utilizando camundongos depilados no dorso, em áreas delimitadas, onde se praticaram incisões. Esta atividade foi confirmada por Neves et al. (1992a), no extrato aquoso das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.

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

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

Sanches et al. (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato bruto, fração aquosa e fração acetato das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., tendo sido demonstrado resultado positivo frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, apresentando uma CIM de 62,5 µg/mL.

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

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

A atividade antiulcerogênica de extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.)

Coville] foi avaliada por Audi et al. (1999), em diferentes modelos de ulceração gástrica, com resultados positivos, confirmando estudos anteriores de Neves et al. (1992a e 1992b) e Lima et al. (1998).

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

Oliveira et al. (2002) evidenciaram efeito desregulador do ciclo estral de ratas, utilizando extrato metanólico das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

Herzog-Soares et al. (2002) avaliaram a atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Constataram uma redução significativa no número de parasitas de *Trypanosoma cruzi*, evidenciado por uma efetiva interferência sobre a curva de parasitemia no sangue de camundongos infectados com formas promastigotas do parasito, os quais, após 24 h, foram tratados por via intra-gástrica com 0,1ml de extrato das cascas da planta, na concentração de 400 ppm, por dez dias.

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

Baurin et al. (2002) avaliaram a atividade antitirosinase de *S. barbatimao* Mart., demonstrando uma redução de 90% na inibição da tirosinase *in vitro*. O resultado foi semelhante àquele obtido com a referência, utilizando o cogumelo *Morus alba*, que inibiu a atividade da tirosinase em 97%. Este resultado é interessante, já que o gênero não revelou a presença de compostos naturais descritos como inibidores da atividade da tirosinase. Outras pesquisas em melanócitos humanos são necessárias para confirmar estas atividades.

Atividade anticonvulsivante foi demonstrada nos estudos de Souza et al. (2002b) em experimento com convulsões induzidas por pentilenotetrazol utilizando

extrato etanólico de *S. coriaceum* Benth.

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

Atividade antileishmanial do extrato de barbatimão [*S. adstringens* (Mart.) Coville], contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi demonstrada através de estudos de Jorge et al. (1996) confirmado por Toledo (2002), através de ensaios com frações e subfrações de extrato de *S. adstringens* (Mart.) Coville, com resultados superiores a 80% de inibição.

Rebecca et al. (2002) estudaram a toxicidade aguda do extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville após administração oral em camundongos. A DL<sub>50</sub> encontrada foi de 2699 mg/kg. A administração crônica de extratos nas concentrações de 800 a 1600 mg/kg, por 30 dias, provocou a diminuição no peso corporal, involução do timo, aumento da glicose plasmática e aspartato aminotransferase, demonstrando um efeito tóxico com a administração crônica de barbatimão.

Rebecca et al. (2002) avaliaram, ainda, os efeitos do extrato bruto total de *S. adstringens* (Mart.) Coville no metabolismo energético de fígado de ratos, tratados por um período de trinta dias e com dose diária de 1600 mg/kg. O estudo demonstrou que o extrato prejudica a fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas de ratos Wistar e inibe a neoglicogênese. Se estes efeitos forem manifestados *in vivo*, outros danos em processos biossintéticos podem ocorrer, tais como na síntese de macromoléculas, as quais podem contribuir em pequena escala, no decréscimo de ganho peso de peso corporal.

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

Segundo Santos et al. (2002) a atividade biológica dos taninos condensados está relacionada com o grau de polimerização. A afinidade por complexação com proteínas ricas em prolina, atividade anti-radical livre e a atividade antiviral são aumentadas pela polimerização. Seu estudo também evidenciou o aumento de

algumas atividades biológicas do *S. polyphyllum*, com relação ao *S. adstringens*, pelo primeiro possuir uma quantidade maior de substâncias contendo esterificação com o ácido gálico em sua estrutura, o que faz aumentar as hidroxilas fenólicas na molécula, modificando, o arranjo espacial dos polímeros. Esta modificação no arranjo espacial pode, também, aumentar a seletividade das mesmas por receptores específicos.

### 2.5.1.2 Formação de radicais livres e antioxidantes

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

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

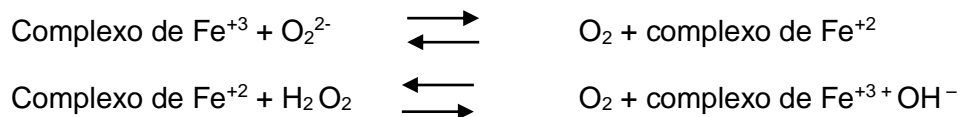
Os radicais livres centrados em  $O_2$  são formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos. Pode-se citar a fosforilação oxidativa, reação responsável pela geração de energia ao organismo através do ATP, realizado na mitocôndria, como um bom exemplo de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres. A fagocitose excessiva e a ativação do metabolismo do ácido araquidônico, nos processos de inflamação, também, são fontes endógenas de formação de radicais livres. Ao mesmo tempo, fatores exógenos (radiação UVA, pesticidas, poluição, cigarro, medicamentos antitumorais,

estilo de vida não saudável) também contribuem para a formação de radicais livres (HIRATA, 2004).

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

O oxigênio pode ser considerado como um birradical, pois possui dois elétrons desemparelhados. Esta estrutura corresponde ao  $O_2$  em estado fundamental, também chamado de oxigênio tripleto ( $^3O_2$ ). O oxigênio é um agente oxidante, ao oxidar-se um composto se reduzirá por ganho de elétrons, caso o  $O_2$  aceite quatro elétrons, se formará uma molécula de água. Caso ganhe um elétron, o produto obtido é o superóxido ( $O_2^-$ ). A adição de outro elétron formará o ânion peróxido ( $O_2^{2-}$ ), que não possui elétrons desemparelhados, não sendo considerado, portanto, um radical livre. Normalmente, nos sistemas biológicos, a redução parcial do oxigênio por ganho de dois elétrons produz o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

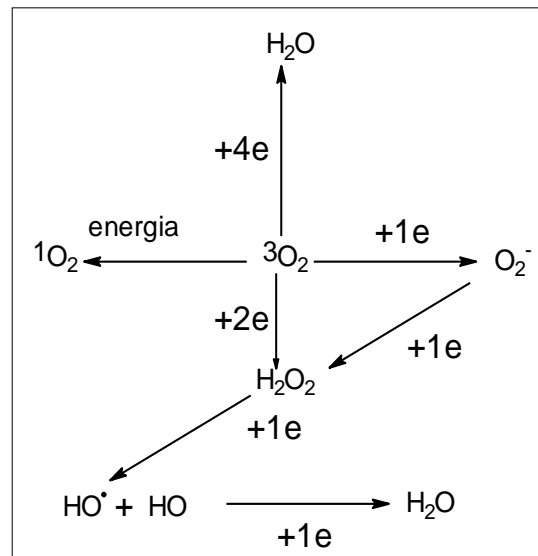
A união O-O do peróxido de hidrogênio é relativamente lábil e pode ocorrer sua decomposição, formando o radical ( $OH^\cdot$ ), altamente reativo. Esta reação é conhecida como reação de Haber-Weiss. Sua velocidade é grandemente favorecida, pela presença de íons ferro ( $Fe^{+3}$ ) e cobre ( $Cu^{+2}$ ). Por outro lado, o íon férrico pode ser reduzido a íon ferroso pelo radical superóxido e pela “via de Fenton”. Em presença de  $H_2O_2$  é oxidado novamente a íon férrico, com a formação de um radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (GUERRA; FANAN, 1994) (Esquema 1).



Esquema 1 - Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton  
 Fonte: Guerra; Fanan, 1994

A molécula de oxigênio pode, também, absorver energia, passando para um estado excitado de maior energia, formando o oxigênio singleto, tendo um poder oxidante maior que o oxigênio tripleto. O ânion  $O_2^-$ , o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) são chamados de espécies

reativas de oxigênio (ERO) (LLESUY, 2002) (Esquema 2).



Esquema 2 - Formação das espécies reativas de oxigênio (ERO).  
Fonte: Llesuy, 2002

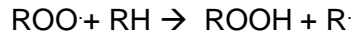
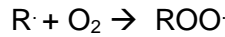
Além das espécies reativas de oxigênio, outros radicais livres estão envolvidos nos processos biológicos, tais como: complexos de metais de transição ( $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}/Cu^+$ ), radicais de carbono (triclorometil), radicais de enxofre (Tiol), radicais de nitrogênio (fenildiazina e óxido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

Muitas são as alterações causadas por estes radicais, a peroxidação lipídica, por exemplo, é uma reação de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, afetando sua integridade estrutural e funcional, alterando sua fluidez e permeabilidade. Abrange três etapas: a iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno. A formação deste radical dá início à etapa de propagação, por combinar-se com o  $O_2$ , formando radicais peróxido. Este, por sua vez, é capaz de retirar um hidrogênio de outra molécula de lipídio, dando continuidade da reação em cadeia. O término da reação pode ocorrer por diferentes caminhos (MELO; GUERRA, 1994), conforme pode ser observado no esquema 3.

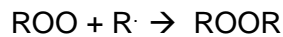
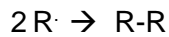
## 1) Iniciação



## 2) Propagação



## 3) Término



Esquema 3 - Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados

Os radicais livres podem, também, provocar modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, “cross linking”, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas. A reação de radicais livres com ácidos nucleicos também foi observada, gerando mudanças em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações cromossômicas (SOARES, 2002). Pode-se citar, também, a ação tóxica resultante de altas concentrações de íon superóxido e peróxido de hidrogênio (HALLIWELL et al., 1995).

O organismo humano dispõe de um mecanismo de defesa formado por diferentes antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione, catalase) e outros, por exemplo, a vitamina E, o ácido ascórbico, o  $\beta$ -caroteno que provêm da dieta alimentar (HASLAM, 1996).

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

Todos estes problemas relacionados com os radicais livres têm levado a



inúmeras pesquisas, na tentativa de se encontrar substâncias comprovadamente antioxidantes, que poderiam minimizar os efeitos relatados.

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação e, em sintéticos ou naturais, de acordo com a origem. A atividade antioxidante é evidenciada em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo, significativamente, a oxidação do mesmo (HALLIWELL et al., 1995).

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

Na década de 80 teve início o interesse pelos antioxidantes naturais, mais precisamente os de origem vegetal com Chipault et al. (1982), devido aos estudos que comprovaram os efeitos tóxicos de doses elevadas de antioxidantes sintéticos (butil-hidróxi-tolueno, butil-hidróxi-anisol e *t*-butil-hidroquinona). Foram observados efeitos sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático (DURAN; PADILLA, 1993).

A maioria das substâncias naturais, com exceção do tocoferol, deve sua ação antioxidante à presença de hidroxilas fenólicas. A maioria dessas substâncias possui grupos funcionais ativos na posição *orto*, enquanto nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, os grupos funcionais encontram-se na posição *para*, mas, não possuindo por este motivo, mudança na ação (Fig.10).

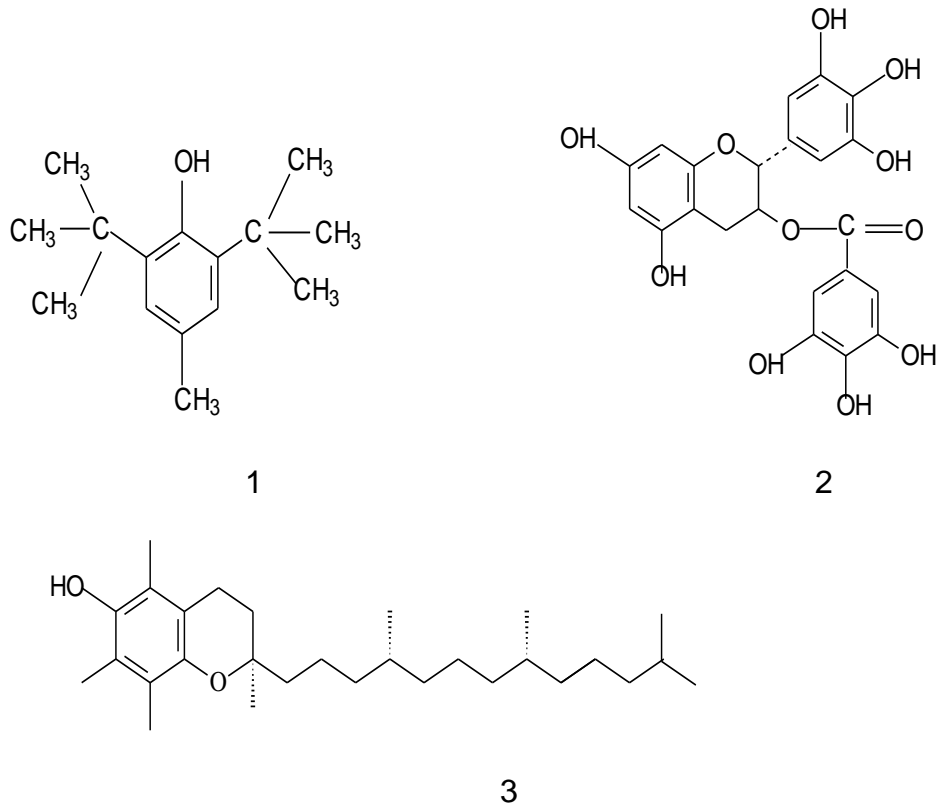


Figura 10 - Exemplo de antioxidantes sintéticos e naturais: 1= butil-hidróxi-tolueno, 2= galato de epigallocatequina e 3= vitamina E

As substâncias fenólicas agem seqüestrando radicais livres e algumas vezes quelando os metais, portanto, a ação engloba tanto a etapa de iniciação quanto a de propagação (SOARES, 2002).

Vários estudos comprovam a atividade antioxidante dos flavonóides, entre eles cita-se o trabalho de Hussein et al. (1987), pela demonstração da inibição da lipoperoxidação *in vitro* no estágio de propagação, agindo como bloqueadores das reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxila (OH). Referência ao trabalho de Uchida et al. (1987) é feita por De Bruyne et al. (1999), relatando as propriedades antioxidantes dos taninos condensados, em relação ao radical DPPH, ânions superóxido e o radical hidroxil.

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

Várias espécies de algas marinhas foram estudadas em relação a diferentes

ensaios de atividade antioxidante. Miranda et al. (1998) estudaram a microalga *Spirulina maxima*, constituída por proteínas, minerais, vitaminas e compostos fenólicos, a qual apresentou atividade antioxidante.

Desmarchelier et al. (1998) demonstraram ação antioxidante nos extratos aquoso e metanólico de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., a qual é rica em compostos fenólicos.

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

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

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

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

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

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

Antolovich et al. (2002) em uma revisão sobre os métodos para testar atividade antioxidante, afirmam que os diferentes ensaios podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*, sendo necessário para o desenvolvimento dos mesmos estabelecer

modelos de indução de oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo antioxidante ou sua extensão.

Observaram ainda, que, a maioria dos ensaios utiliza o envolvimento da oxidação acelerada, os quais envolvem a adição de um agente iniciador (temperatura, agitação, pressão parcial de O<sub>2</sub>, metais de transição, exposição à luz) e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e é medido o grau de oxidação, ou sua extensão.

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

### **2.5.1.3 Métodos para avaliação de atividade antioxidante**

Existem diversas metodologias disponíveis para detectar a capacidade antioxidante.

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

Este ensaio é baseado na redução de uma solução alcoólica de DPPH, na presença de um doador de hidrogênio (antioxidante), devido a formação de uma forma não radical livre (DPPH-H) (Fig. 11).

O DPPH• remanescente é medido a 517 nm após 30 min. O decréscimo da absorvância corresponde inversamente à atividade de seqüestro de radical livre da amostra, acompanhada simultaneamente de mudança de coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto oxidado (PELLATI et al., 2003). O método é simples, rápido e sensível, utiliza reagentes de custo relativamente baixo e não faz uso de instrumentos sofisticados.

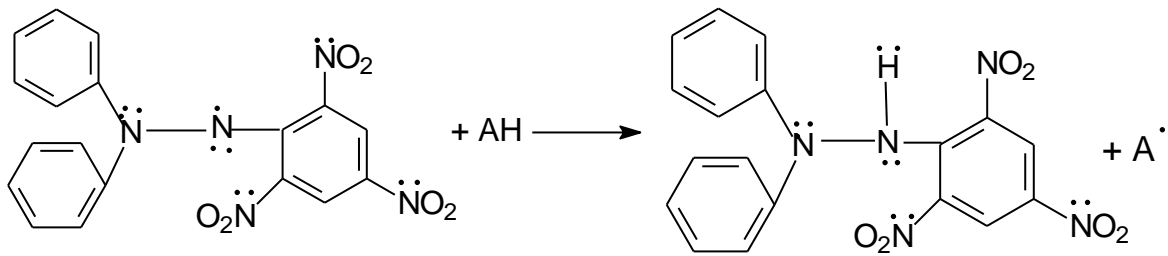


Figura 11 - Estrutura do DPPH radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e reduzido (difenilpicrilhidrazina).

Fonte: Brand-Willians et al., 1995.

Os mecanismos de reação entre as substâncias fenólicas e o DPPH<sup>•</sup> foram descritos por Brand-Willians et al. (1995) e parecem envolver, de forma isolada ou combinada, a dimerização por acoplamento oxidativo de dois radicais formados, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH<sup>•</sup> e, por último um radical de DPPH<sup>•</sup> pode se estabilizar com um radical aril (Fig. 12)

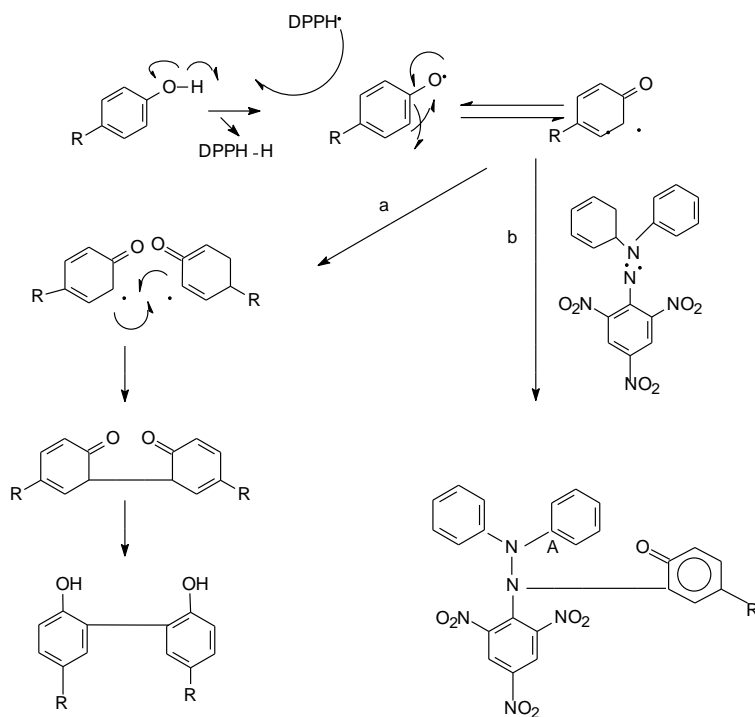


Figura 12 - Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas.

a= dimerização e b= estabilização de um radical DPPH

Fonte: Brand-Willians et al., 1995.

A forma de expressar os resultados como a capacidade de seqüestrar/reduzir o radical DPPH, pode ser apresentada de formas variadas, dificultando as comparações. Podem-se expressar os resultados em forma de porcentagem (HOLLEY; CHEESEMAN, 1993; LU; FOOD, 2001; CHOI et al., 2002), pelo valor de IC<sub>50</sub> (BRAND-WILLIAMS, 1995; FENGLIN, 2003; PELLATI et al 2003) o qual mede a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH•, e, também, pelo poder antioxidante ou poder anti-radical, o qual expressa a relação inversa da IC<sub>50</sub> (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O método da determinação da capacidade antioxidante através da redução do complexo fosfomolibdênio, baseia-se na redução do Mo<sup>+6</sup> para Mo<sup>+5</sup> pela solução amostra (em água, metanol, etanol, dimetil sulfóxido ou hexano), com subsequente formação de um complexo fosfato-Mo<sup>+5</sup> de coloração verde, em pH ácido, que é medido a 695 nm (PRIETO et al, 1999; FOOD, 2001). Este método também é considerado simples e de baixo custo como o do seqüestro do DPPH•, mas, utiliza altas temperaturas por tempo prolongado, ao contrário do método do seqüestro de DPPH•. O resultado é expresso através do número de equivalentes de ácido ascórbico (vitamina C) considerado como padrão, cuja atividade antioxidante é considerada 1 (100%) (MAY, 1999; VANDUJIN et al., 2002) e também da vitamina E e ácido gálico (PRIETO et al., 1999; DASGUPTA; DE, 2004)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil fitoquímico de uma fração semipurificada obtida das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a matéria-prima vegetal
- Analisar o conteúdo químico da fração acetato de etila das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e das frações aquosa e acetato de etila.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Droga vegetal

As cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram coletadas em 12 de dezembro de 2002, em Abadia de Goiás, no estado de Goiás, Estância Martair, BR 060 (S 16°45' 33,9"; W 049°25'08,2"; 864 m de altitude). Uma exsicata do material vegetal foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o nº HUM 9139 e sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, do Departamento de Biologia da UEM.

### 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 Erba®, Mallinckrodt® ou Synth. Foi usado etanol comercial 93,6 °GL da Cocamar.

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetona deuterada Isotec®
- Ácido fórmico
- Anidrido acético
- Água destilada
- Butil-hidróxi-tolueno (BHT)
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado Isotec®
- Gel de sílica com gesso preparativa PF<sub>254</sub>
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec®
- Placas cromatográficas de gel de sílica F<sub>254</sub>, 0,200 mm espessura, fabricado pela Merck®
- N-propanol



- Piridina
- Tolueno
- Solução de cloreto férrico 1% em etanol
- Solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) 1 mmol l<sup>-1</sup> em metanol
- Reagente de Folin-Ciocalteau 2 N, Laborclin
- Solução de carbonato de cálcio R
- Pó de pele R levemente cromado para determinação de taninos, Freiberg, Alemanha
- Solução de ácido sulfúrico 0,6 mmol l<sup>-1</sup>
- Solução de fosfato de sódio 28 mmol l<sup>-1</sup>
- Solução de molibdato de amônio 4 mmol l<sup>-1</sup>

### 4.3 Equipamentos

- Aparelho de espectroscopia de ressonância nuclear magnética Varian, Mercury Plus 300BB
- Balança analítica AND HR-200
- Balança Gehaka BG-2000
- Bomba de vácuo FMIQ2
- Câmara de UV 254 nm
- Coletor de frações ISCO modelo 328
- Cromatógrafo de contra-corrente de alta velocidade P.C. Inc., equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm; capacidade de 285 ml – injetor de amostra P.C. Inc, com loop de 10 ml
- Espectrofotômetro Varian UV/VIS Cary 1E VARIAN
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quatro LCZ MICROMASS (Manchester, UK)
- Estufa de secagem e esterilização – Fanem 315 SE
- Evaporador rotatório Büchi R-153 e R- 3000 V
- Liofilizador Christ Alpha 1-2
- Ultra-turrax UTC115KT
- Ultra-som Unique - USC 1540, 25KHz

- Moinho de martelos - TIGRE ASN-5
- Vortex Phoenix - AP56

#### 4.4 Obtenção e moagem da planta

A planta coletada foi submetida à secagem à temperatura ambiente ( $25 \pm 4$  °C). As cascas secas foram moídas em moinho de martelos.

#### 4.5 Análise físico-química e quantitativa

##### 4.5.1 Determinação da perda por dessecação

Dois gramas de amostra do pó das cascas, exatamente pesados, de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. foram colocados em pesa-filtros previamente tarados, sendo dessecado em estufa a 105 °C, até peso constante. Os valores representam a média de três determinações e são expressos em percentagem (%; p/p) (FARMACOPÉIA, 2000).

##### 4.5.2 Teor de extrativos

Aqueceu-se 1,0 grama da amostra, pesado 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 restante do filtrado, evaporou-se em banho-maria fervente por completo. Colocou-se em estufa a 105 °C por 2 h, retirado e colocado em dessecador por 25 min para esfriar e em seguida procedeu-se à pesagem. Para cada amostra foram realizadas três determinações (FARMACOPÉIA, 2000).

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, segundo a equação:

$$TE = g.FD.100/m$$

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

g= massa do resíduo seco (g);

m= massa da amostra (g)

FD= fator de diluição (5).

#### 4.5.3 Determinação do teor de taninos totais

Foram pesados exatamente 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 de 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-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para 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 dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foi realizado sob proteção da luz direta (GLASL, 1983).

A percentagem de taninos totais foi calculada segundo as equações:

$$PT = 15625 \cdot \text{Abs} / 1000 \cdot m \quad PNA = 15625 \cdot \text{Abs} / 1000 \cdot m \quad TT = PT - PNA$$

onde: PT polifenóis totais (%);

PNA= polifenóis não adsorventes (%);

Abs= absorvância medida;

m= massa da droga em g;

TT= teor de taninos totais (%).

#### **4.6 Obtenção do extrato bruto**

Pesou-se 1,8 kg da droga moída que foi colocada em maceração com 18 l do solvente: acetona: água (7:3; v/v) por 30 min. Após este tempo foi empregada a turbólise (Ultra-turrax)<sup>®</sup>, por 30 min, em intervalos de 10 min (TOLEDO, 2002), para o resfriamento do sistema. Em seguida ao processo de extração, a filtração foi realizada com sucessivas trocas do material filtrante, sob pressão reduzida e, concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico. Em seguida, foi efetuado o congelamento em nitrogênio líquido, liofilizado, pesado e armazenado em freezer.

##### **4.6.1 Obtenção da fração acetato de etila (FAE)**

Foram pesados 50 g do extrato bruto liofilizado, solubilizando-os em 500 ml de água destilada. Em seguida procedeu-se à partição líquido/líquido com 500 ml de acetato de etila, por 12 vezes. Repetiu-se o procedimento por cinco vezes com 50 g de extrato bruto liofilizado, cada vez, totalizando 250 g de extrato bruto. Empregou-se na partição, 30 l de acetato de etila e 2,5 l de água destilada.

As fases, aquosa e acetato de etila foram separadas, concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até completa eliminação do solvente orgânico. Em seguida foram congeladas; liofilizadas, pesadas e armazenadas em freezer.

## 4.7 Métodos cromatográficos

Para o isolamento de substâncias químicas a partir da FAE, foram empregados diversos métodos cromatográficos.

### 4.7.1 Cromatografia em coluna da FAE

O fracionamento da FAE foi realizada em coluna de vidro (h: 750 mm; Ø: 55 mm) contendo Sephadex<sup>®</sup> LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada, foi estabilizada com etanol 40%. Adicionaram-se 20 g da FAE, dissolvidos em quantidade suficiente do eluente (etanol 40%). Após solubilização, o extrato foi adicionado ao topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Deixou-se passar o eluente de forma contínua por 24 h. A seqüência de fase móvel empregada, em proporção volumétrica, foi a seguinte: etanol/água 40, 50, 70, etanol 93,6 °GL, acetona/água (7:3), conforme a tabela 1.

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

Fase móvel (v/v)	Volume (ml)
Etanol 40	1200
Etanol 50	6260
Etanol 70	1170
Etanol 93,6 °GL	3850
Acetona:água (7:3)	2000

Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 10,0 ml com fluxo de 1,0 ml/min. com o auxílio de coletor de frações. Para obtenção das diferentes frações foi realizado acompanhamento cromatográfico em camada delgada (gel de sílica F<sub>254</sub>; fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:água; 90:5:5; revelador: solução etanólica de FeCl<sub>3</sub> a 1%). Desta maneira, obtiveram-se 20 frações (F1 a F20) reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em camada delgada. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congelada, liofilizada, pesada e armazenada em freezer.

#### **4.7.2 Cromatografia em coluna das frações F4, F6, F8 e F10 e das subfrações F3#1, F3#2, F4#6, F6#2, F6#3 e F6#4**

As frações (F4, F6, F8 e F10) e as subfrações (F3#1, F3#2 e F4#6; F6#2; F6#3 e F6#4), estas, obtidas através da cromatografia de contra-corrente de alta velocidade, foram recromatografadas, uma a uma em coluna (h: 320mm; Ø: 30 mm; h: 400 mm, Ø 25 mm; h: 600, Ø 15 mm), empregando-se Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A seqüência de eluentes foi: etanol 4%, 8% e 12%. Cada amostra foi dissolvida em pequena quantidade do primeiro eluente e em seguida procedeu-se à aplicação da mesma, na coluna, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 5 ml com fluxo de 1,0 ml/min para obtenção das diferentes subfrações. O monitoramento foi efetuado através de CCD (item 4.7.3). Cada fração, reunida por semelhança cromatográfica, foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congelada, liofilizada, pesada e armazenada em freezer.

#### **4.7.3 Cromatografia em camada delgada**

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de alumínio contendo gel de sílica F<sub>254</sub> (Merck®), utilizando-se como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5; v/v), visualizado em lâmpada de ultravioleta a 254 nm e, em seguida, utilizou-se como revelador a solução etanólica de cloreto férrico a 1%.

#### **4.7.4 Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade para as frações F3, F4, F5, F7 e F9**

O sub-fracionamento das frações foi realizado em cromatógrafo de contra-corrente de alta velocidade (CCCAV). As fases estacionária e móvel foram obtidas através da mistura de acetato de etila:*n*-propanol:água (140:8:80; v/v) o qual foi agitado em funil de separação. A fase inferior (aquosa) foi denominada fase estacionária e a fase superior (orgânica), de fase móvel. As frações foram solubilizadas na proporção de 1:1 das fases superior e inferior, em um volume de 10 ml, e, em seguida, injetadas. As amostras foram coletadas em tubo de ensaio com um fluxo de 1 ml/min e cada tubo monitorado por CCD (item 4.7.3). As subfrações

obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, liofilizadas, congeladas e armazenadas em freezer.

#### **4.7.5 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)**

Algumas substâncias isoladas, que não se conseguiu um alto grau de pureza, foram derivatizadas quimicamente por acetilação e em seguida foram solubilizadas e aplicadas em forma de linha sobre placas de vidro (20x20 cm) contendo gel de sílica PF<sub>254</sub> com gesso (Merck®), com 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 254 nm, calculando-se o valor do R<sub>f</sub> para cada substância. Em seguida raspou-se a área e solubilizou-se em clorofórmio. Filtrou-se em funil de filtro 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, liofilizada e armazenada em freezer.

#### **4.8 Derivatização das substâncias isoladas**

Às amostras de até 100 mg foram adicionados 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 para completa reação, protegidas da luminosidade. Após, foi colocado gelo picado interna e externamente ao balão, ficando em repouso por 2 h. Em seguida, procedeu-se à filtração sob pressão reduzida através de funil de vidro sinterizado G4 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi, então, solubilizada em clorofórmio e retirou-se o solvente em evaporador rotatório de forma sucessiva até eliminação total da piridina, transferindo-se então, para um frasco e colocado na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada e armazenada em freezer.

#### **4.9 Análise estrutural das substâncias isoladas**

A análise estrutural das substâncias isoladas foram realizadas através de

métodos espectrofotométricos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) e 2D ( $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY, NOE e HMQC). Os espectros foram analisados, interpretados e comparados com dados de literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian Mercury Plus, de 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75,45 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os espectros das substâncias foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os espectros de massas foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, na Alemanha, empregando-se o espectômetro de massas Quatro LCZ Micromass.

#### **4.10 Capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e a fração aquosa foram realizadas através do método do seqüestro do radical DPPH (HATANO et al., 1988; AMAROWICZ et al., 2004) e pelo Método da redução do complexo fofomolibdênico (PRIETTO et al., 1999). Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

##### **4.10.1 Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres pelo método do DPPH $^\bullet$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)**

Foram realizadas baterias com 5 tubos para o extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa e vitamina C, nas concentrações de 1,5; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{g/ml}$  em 4 ml de metanol. Após, foi acrescentado, em todos os tubos, 0,5 ml de uma solução de DPPH a 1  $\text{mmol l}^{-1}$ . A mistura de cada tubo foi agitada em vortex por 15 s, mantida em temperatura ambiente por 30 min protegidas da luz, e em seguida, procedeu-se à leitura da absorvância em espectrofotômetro a 517 nm.

O branco foi preparado com 4 ml de metanol, adicionado de 0,5 ml de solução de DPPH a 1  $\text{mmol l}^{-1}$ , a qual foi reduzida com 2 mg de butil-hidróxi-tolueno (BHT). Foi efetuada, também, a leitura do controle negativo preparado com 500  $\mu\text{l}$  da solução de DPPH 1  $\text{mmol l}^{-1}$ , em 4 ml de metanol.



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

$\% \text{ RSA} = 100 \times (1 - \text{AE} - \text{AD})$ , onde: AE é a absorvância da solução quando um extrato foi adicionado em determinada concentração, e AD é a absorvância da solução do radical DPPH (HATANO et al., 1988; AMAROWICZ et al., 2004).

Neste trabalho os resultados foram expressos na forma de IC<sub>50</sub>, quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH\* e, quanto menor o seu valor, maior a capacidade antioxidante da amostra.

Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados através de equações de regressão linear das concentrações dos extratos e da porcentagem de inibição do radical livre (ANEXO 1).

#### **4.10.2 Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio**

Uma alíquota de 0,3 ml da amostra e da vitamina C a 200 µg/ml em metanol, foi adicionado de 3 ml de uma solução reagente (ácido sulfúrico 6 mmol l<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 28 mmol l<sup>-1</sup> e molibdato de amônio 4 mmol l<sup>-1</sup>, completado com água destilada) em tubo de ensaio. Em seguida os tubos foram cobertos individualmente e incubados à 95 °C por 90 min, em banho-maria. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi efetuada a leitura da absorvância a 695 nm contra um branco (3 ml da solução reagente com 0,3 ml de metanol). Quanto maior a absorvância, maior a capacidade antioxidante da amostra. A capacidade antioxidante foi expressa em comparação como o número de equivalente de ácido ascórbico considerada 1 (um), 100%, através da capacidade antioxidante relativa (CAR) à vitamina C.

#### **4.11 Análise Estatística**

Os resultados estão apresentados como média ± o desvio padrão (DP) para um número de amostra (n) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância de uma via (Anova) quando comparados três ou mais amostras, por meio do programa GraphPad Prism 3.03®, através do teste de comparação múltipla de Tukey, com intervalos de confiança, quando indicado, e, foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Caracterização físico-química e quantitativa**

#### **5.1.1 Perda por dessecação**

A perda por dessecação das cascas apresentou o seguinte resultado:  $15,30\% \pm 0,35$  (CV%= 2,29), enquanto Lopes (2003) obteve  $14,70 \pm 0,25$  (CV 1,74), para a mesma planta colhida no verão, os quais se apresentam dentro de valores determinados pela Farmacopéia (1959) que preconiza a umidade máxima de 15% para *S. adstringens* (Mart.) Coville. Valores muito acima deste percentual poderiam representar perda de atividade biológica ou mesmo facilitar o crescimento microbiano, prejudicando, desta maneira, o material vegetal (CARDOSO, 2002).

#### **5.1.2 Teor de extrativos**

O teor de extrativos de uma droga é importante para se determinar a capacidade de um líquido extrator em retirar substâncias presentes na mesma. Podem ser utilizados água, etanol, metanol ou acetona, entre outros. Entretanto, somente os solventes água e etanol são preconizados em farmacopéias.

Neste trabalho, o teor de extrativos das cascas foi efetuado em água, obtendo-se um rendimento de  $33,42\% \pm 0,68$  (CV%= 2,02). Lopes (2003) obteve com a mesma droga vegetal coletada no verão teor de  $34,48\% \pm 0,50$  (CV%= 1,46). Para a droga coletada no outono Lopes (2003) conseguiu valor de  $27,93\% \pm 0,56$  (CV%=1,99). Este fato pode ser devido ao vegetal encontrar-se em florada no verão, no ápice de sua atividade metabólica.

#### **5.1.3 Deteminação do teor de taninos totais**

O método utilizado para a realização do doseamento de taninos totais foi o de Folin-Ciocalteau com a adição de pó-de-pele para a pesquisa de substâncias fenólicas capazes de se complexarem com proteínas. Este método baseia-se na capacidade de associação dos taninos às proteínas e na redução do ácido

fosfotúngstico com compostos fenólicos, resultando em cor azul profundo, que é medido espectrofotometricamente. Esta reação por não ser específica, necessita de pó-de-pele em etapa posterior, para que a complexação tanino-proteína torne o método seguro, sendo utilizado pela Farmacopéia Européia (1997).

O resultado do doseamento do teor de taninos totais das cascas foi de 20,58%  $\pm$  0,81 (CV%= 3,66). Este teor está de acordo com o obtido por Lopes (2003), que encontrou 19,51% $\pm$  0,54 (CV= 2,79), para a droga vegetal coletada no verão. Na coleta de outono Lopes (2003) conseguiu um teor de 10,70%  $\pm$  0,54 (CV=2,79). Portanto, devido a planta coletada no verão ser mais rica em conteúdo fenólico, esta estação foi escolhida para a realização dos ensaios fitoquímicos e de capacidade antioxidante.

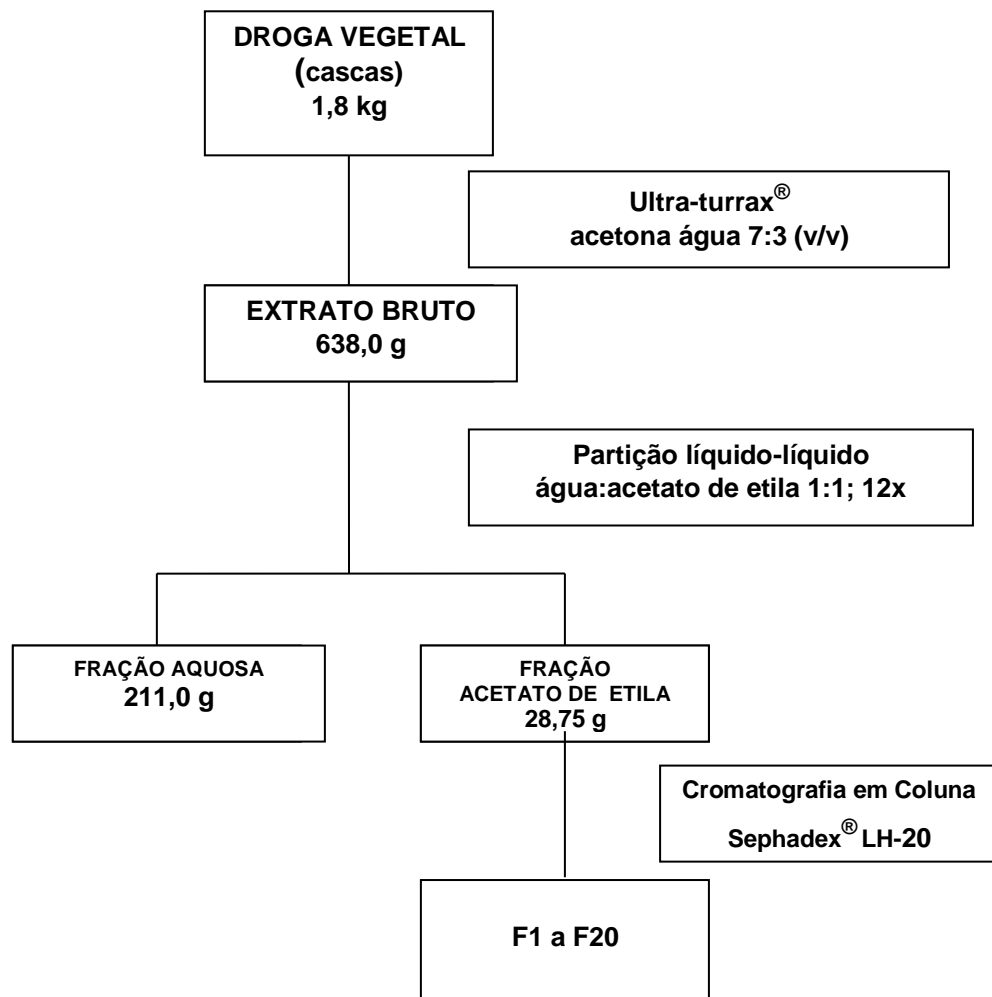
## 5.2 Fitoquímica

Para a obtenção do extrato bruto foi utilizado o solvente acetona:água (7:3; v/v) pelo motivo do mesmo promover o bloqueio da associação tanino-proteína, proporcionando uma extração quantitativamente maior (SANTOS; MELLO, 2003).

A obtenção do extrato bruto (FEB) foi realizada com 1,8 kg de cascas secas e moída, por turbo-extração, que resultou em 638 g de material liofilizado, com rendimento de 35,44%.

Com 250 g do FEB procedeu-se à partição líquido/líquido com acetato de etila e água, obtendo-se 211,0 g de fração aquosa (FA) e 28,75 g de fração acetato de etila (FAE). O método utilizado, turbólise ou o Ultra-Turrax<sup>®</sup>, é prático e efetivo, o inconveniente é que o mesmo gera calor e dificulta a filtração por fragmentar em excesso o material durante o processamento. Para controlar estes problemas, a técnica teve uma duração de 60 min com três etapas de extração de 10 min cada, com intervalos de 10 min entre uma etapa e outra.

O fracionamento com 20 g da fração acetato de etila, através da cromatografia em coluna (Sephadex<sup>®</sup> LH-20) rendeu 20 subfrações, de acordo com fluxograma 1, tabela 2 e figura 13.



Fluxograma 1 - Extração a partir das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna

Tabela 2 - Subfrações obtidas por CC da fração acetato de etila

<b>Fração</b>	<b>Tubos</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>(%)</b>
F1	001-145	0,0500	0,25
F2	146-225	0,7600	3,80
F3	226-295	0,3353	1,70
F4	295-325	0,7994	4,00
F5	326-360	1,0388	5,20
F6	361-374	0,3256	1,60
F7	375-420	0,6259	3,10
F8	421-450	0,3197	1,60
F9	451-550	1,3881	6,90
F10	551-574	0,3072	1,50
F11	575-629	0,7629	3,80
F12	630-675	0,4775	2,40
F13	676-725	0,6515	3,30
F14	726-750	0,2619	1,30
F15	751-879	1,5092	7,50
F16	880-980	0,8175	4,10
F16	981-1080	1,1534	5,80
F18	1081-1135	0,4368	2,20
F19	1136-1210	0,2410	1,20
F20	1211-1405	0,3348	1,70
F21	1406-1600	5,1835	25,90
<b>TOTAL</b>		<b>17,78</b>	<b>88,85%</b>

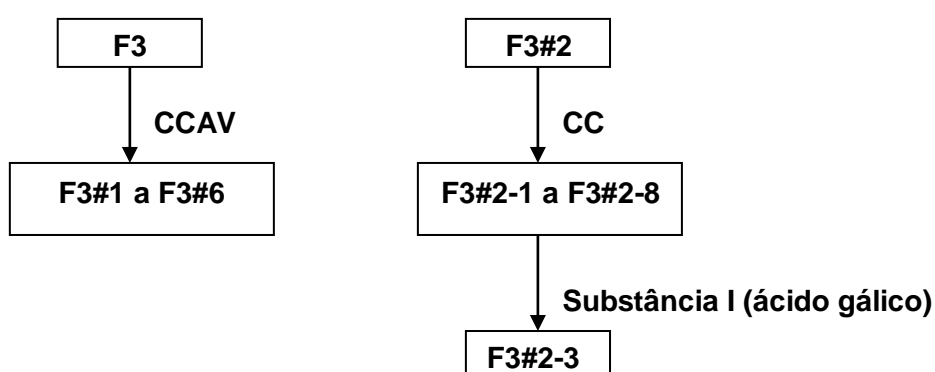
1 2. 3 4 5 6 7 8 9 10

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Figura 13 - Cromatografia em camada delgada das 20 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna. Sistema cromatográfico: gel de sílica F<sub>254</sub>; sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v) e revelação com cloreto férrico 1% em etanol

Com o intuito de se obter o isolamento de substâncias, procedeu-se o subfracionamento das frações F-3 a F10. Com as frações F3, F4, F5, F7 e F9 foi utilizado cromatógrafo de contra-corrente de alta velocidade (CCCAV), no Laboratório de Química da UNESP, Campus de Araraquara e, para as frações F4, F6, F8 e F10 foi utilizado cromatografia em coluna, no Laboratório de Farmacognosia da UEM. Quando necessário foi efetuado nova cromatografia em coluna de algumas subfrações para se conseguir o isolamento de substâncias.

### 5.2.1 Substância I - ácido gálico



Fluxograma 2 - Fracionamento cromatográfico da F3

A fração (**F3**) (3353 mg) resultou, após uso da CCCAV, em 6 subfrações. Devido a pequena quantidade obtida, não se obteve o isolamento de nenhuma substância pura. Assim, a subfração F3-2 (33,2 mg) foi novamente fracionada em cromatografia em coluna (Sephadex<sup>®</sup> LH-20), resultando 8 subfrações conforme fluxograma 2.

A subfração F3-2#3 (2,8 mg) apresentou uma única mancha na cromatografia em camada delgada (CCD; seção 4.7.3;  $R_f = 0,72$ ). Após revelação com solução de cloreto férrico a 1% em etanol, apresentou-se com coloração azul escuro intenso. O espectro de massas (ES-MS) no modo negativo apresentou pico do íon pseudomolecular  $[M-H]^-$  em  $m/z$  169 (Fig. 14). O espectro de RMN  $^1H$ , apresentou um singlete em  $\delta = 7,04$  ppm correspondendo as hidrogênios H-2 e H- (Fig. 15). A figura 16 corresponde ao espectro de RMN  $^{13}C$  e na tabela 3 encontram-se os seus dados. Comparando-se os dados obtidos de RMN, tanto de  $^1H$  como de  $^{13}C$ , com os da literatura (LU; FOO, 1999), a **substância I** foi identificada como

sendo **ácido gálico**.

Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância I - ácido gálico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75 MHz, TMS, ppm)

<b>Carbono</b>	<b>(ppm)</b>	<b>Literatura (<math>\text{D}_2\text{O}</math>)*</b>
C-2/6	109,12	110,52
C-1	121,18	121,38
C-4	138,27	135,93
C-3/5	145,17	144,94
C-7 (COOH)	169,99	170,76

\* Lu; Food, 1999.

Figura 14 – Espectro de massas da substância I (ácido gálico) por ESI no modo negativo

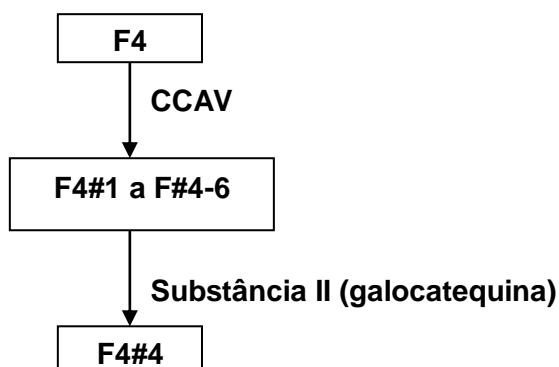


Figura 15 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância I - ácido gálico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS, 300 MHz, ppm)

Figura 16 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância I - ácido gálico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz, ppm)

## 5.2.2 Flavan-3-ol

### 5.2.2.1 Substância II – galocatequina



Fluxograma 3 - Fracionamento cromatográfico da F4

A fração 4 (**F4**) (7994 mg) resultou em 6 subfrações após uso da CCAV. A análise por CCD da subfração F4#4 (26,6 mg), conforme fluxograma 3, mostrou mancha com  $R_f = 0,69$  e coloração azul intenso após revelação com  $\text{FeCl}_3$ . A subfração F4#4 foi submetida diretamente à espectroscopia por RMN  $^1\text{H}$ . O espectro de massas apresentou o pico do íon pseudomolecular  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  da **substância II** em  $m/z=329$ , estando em concordância com o obtido por Mello et al. (1996a).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em metanol deuterado, mostrou sinais de flavan-3-óis ou taninos condensados (Fig. 17, Tab. 4). Os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) absorvem como duplo dubletos em  $\delta \approx 2,49$  e  $\delta 2,80$  ppm, 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 o proposto por Weinges et al. (1969). A trihidroxilação do anel B em C-3', C-4' e C-5' foi comprovada pelo singlete em  $\delta \approx 6,39$  ppm, correspondendo aos hidrogênios H-2' e H-6'. O espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 18) mostra os acoplamentos entre: H-3 e H-4<sub>ax</sub>, H-3 e H-4<sub>eq</sub> e H-3 e H-2 provando a identidade destes hidrogênios. Na região aromática foi possível observar os hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A) em  $\delta \approx 5,85$  e  $\delta \approx 5,93$  ppm, respectivamente, com o mesmo valor de acoplamento (2,4 Hz), podendo ser visualizado na figura 17.

Assim, a **substância II** foi identificada como **galocatequina**, tendo sido isolada e identificada anteriormente de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Mello et al., 1996a; Toledo, 2002; Sanches, 2004).

As subfrações F5#5 (19,5 mg) e F7#6 (29,9 mg) também resultaram no isolamento e identificação de galocatequina.

Figura 17 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância II - (galocatequina) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS, 300 MHz, ppm)

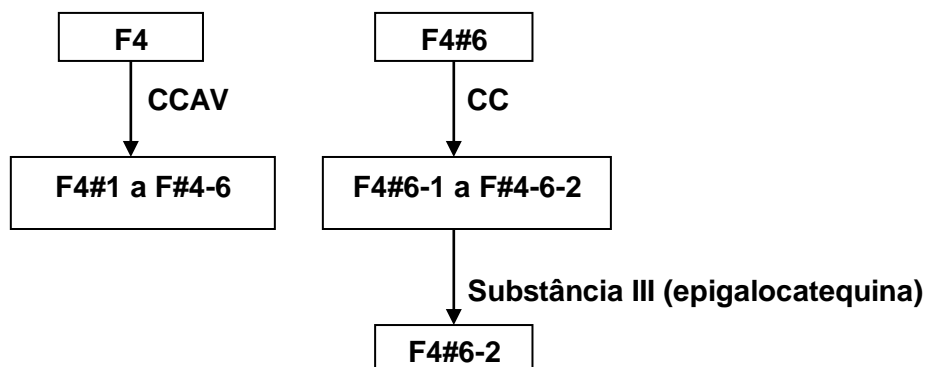
Tabela 4 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  da substância II -galocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300MHz, TMS, ppm)

Hidrogênio	(ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax	2,49	dd	$^2J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,2$ $^2J_{\text{H4ax-H3}} = 7,8$
H-4eq	2,80	dd	$^2J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,2$ $^3J_{\text{H4ax-H4eq}} = 5,4$
H-2 (C)	4,52	d	$^3J_{\text{H2-H3}} = 7,2$
H-3 (C)	3,96	ddd	$^3J_{\text{H3-H2}} = 7,2$ $^3J_{\text{H3-H4a}} = 7,8$ $^3J_{\text{H3-H4eq}} = 5,4$
H-6 (A)	5,85	d	$^4J_{\text{H6-H8}} = 2,4$
H-8 (A)	5,93	d	$^4J_{\text{H8-H6}} = 2,4$
H-2'/H-6 (B)	6,39	s	

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

Figura 18 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da substância II - galocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz, TMS, ppm)

### 5.2.2.2 Substância III – Epigallocatequina



Fluxograma 4 - Fracionamento cromatográfico da F4

A fração 4 (**F4**) (7994 mg) resultou em 6 subfrações após uso da CCCAV. A subfração F4#6 (40,4 mg) foi purificada por cromatografia em coluna (CC), resultando em 4 subfrações., conforme fluxograma 4. Análise por CCD da subfração F4#6-2 (22,5mg), mostrou uma mancha com  $R_f = 0,65$ , de coloração azul intensa, após revelação com  $FeCl_3$ . O espectro de massas apresentou o pico do íon pseudomolecular  $[M+Na]^+$  da **substância III** em  $m/z=329$ , estando em concordância com o obtido por Mello et al. (1996a).

Análise do espectro de RMN  $^1H$ , em metanol deuterado (Fig. 19), mostrou picos de flavan-3-óis ou taninos condensados, semelhantes àqueles encontrados para a **substância II** (Tab. 5).

O multiplete entre  $\delta$  2,74 e 2,85 correspondente aos hidrogênios  $H-4_{ax}$  e  $H-4_{eq}$  é possível de ser visualizado através da correlação com  $H-3$  assinalada no espectro 2D (COSY  $^1H/^1H$ ; Fig. 20). A constante de acoplamento entre  $H-2$  e  $H-3$  foi pequena, não tendo sido possível calculá-la ( $J \leq 1,0$  Hz) evidenciando a configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (Fig. 19 e Tab. 4) (Weinges et al., 1969). A triidroxilação no anel B é comprovada através de um singleto característico correspondente aos dois hidrogênios  $H-2'$  e  $H-6'$  em  $\delta$  6,51. Na região aromática é possível observar, ainda, os hidrogênios  $H-6(A)$  e  $H-8(A)$  em  $\delta$  5,90 e  $\delta$  5,93 como dubletos com pequena constante de acoplamento (2,4 Hz), característico de ligações *meta* em anéis aromáticos.

O espectro COSY  $^1H/^1H$  permite, ainda, observar todos os acoplamentos



dos hidrogênios presentes no anel heterocíclico, bem como a correlação entre os hidrogênios H-2'/6' do anel B com o hidrogênio H-2 do anel C (observar a indicação). Esta correlação, apesar de existir, não foi possível ser visualizada na **substância II** (galocatequina).

Na figura 21 observa-se os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias II e III. Pode ser observado que a diferença entre ambas relaciona-se ao sinal em  $\delta$  82,86 ppm para a galocatequina e  $\delta$  79,88 ppm para a epigalocatequina, correspondendo ao carbono 2. De acordo com Czochanska et al. (1979) e Cai et al. (1991), os epímeros, galocatequina e epigalocatequina, podem ser diferenciados por esta análise. Este dado foi também observado por Sanches (2004) para estas substâncias isoladas de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

Desta maneira a subfração F4#6-2, denominada **substância III**, foi identificada como **epigalocatequina**, estando de acordo com a literatura (MELLO et al., 1996a; TOLEDO, 2002; LOPES, 2003; SANCHES, 2004). A fração F7#7 (8,1 mg) também resultou na substância epigalocatequina.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  da substância III (epigalocatequina) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300 MHz, TMS, ppm)

Hidrogênio	(ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4eq/H-4ax	2,74-2,80	m	
H-2 (C)	4,74	s	
H-3 (C)	4,15	ps	
H-6 (A)	5,90	d	$^4J_{\text{H6-H8}} = 2,4$
H-8 (A)	5,93	d	$^4J_{\text{H8-H6}} = 2,4$
H-2'/H-6 (B)	6,51	s	

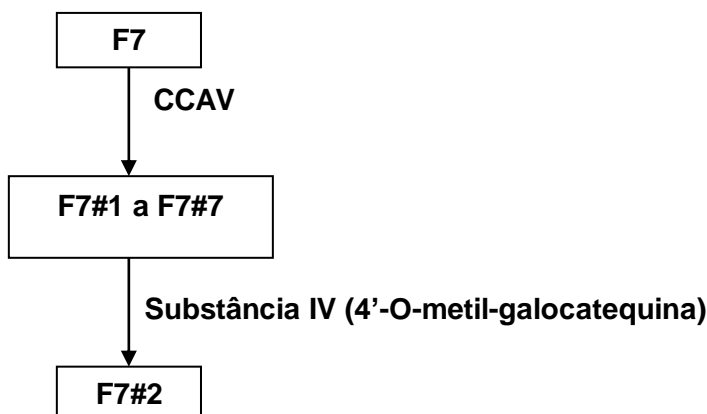
s= singleto; d= dubleto, m= multipleteo; ps= pseudoduploduplodubleteo

Figura 19 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância III - epigallocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS, 300MHz, ppm)

Figura 20 - Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da substância III - epigallocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz, TMS, ppm)

Figura 21 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das substâncias II e III -galocatequina e epigalocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz, ppm)

### 5.2.2.3 Substância IV - 4'-O-metil-galocatequina



Fluxograma 5 - Fracionamento cromatográfico da F7

A fração 7 (F7) (6259 mg) resultou em 7 subfrações por CCAV, conforme fluxograma 5A análise de CCD da subfração F7#2 (30,6 mg) mostrou mancha com  $R_f = 0,65$ , de coloração azul intenso após revelação com  $FeCl_3$ . O espectro de RMN  $^1H$ , (Tab. 6 e Fig. 22) mostrou semelhança com a galocatequina, acrescida de um singlete em  $\delta 3,78$ .

O singlete em  $\delta 3,78$  corresponde a 3 hidrogênios através da análise da integral, indicando um grupamento metoxila. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos hidrogênios heterocíclicos exibiram um sistema ABMX característico de um flavan-3-ol do tipo 2,3-*trans* (MELLO et al., 1996a). O espectro COSY  $^1H/^1H$  (Fig. 23), permite verificar os acoplamentos entre todos os hidrogênios do anel heterocíclico.

O espectro de massas ESI modo negativo mostra pico em 319 e com o cloro como auxiliar de ionização, pico em 355 (Fig. 24).

O experimento NOE (Fig. 25) com irradiação no sinal  $\delta 3,78$  não alterou nenhum sinal, demonstrando, claramente, que a metoxila encontra-se na posição C-4' do anel B. Assim, a **substância IV** foi identificada como sendo **4'-O-metil-galocatequina**, a qual foi isolada de *Panda oleosa* Pierre (Pandaceae) (GARCIA et al., 1993) e posteriormente de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae) (MELLO et al., 1996a, TOLEDO, 2002).

As subfrações F5#2 (6 mg) e F6#3-2 (7,3 mg) foram identificadas, também,

como 4'-O-metil-galocatequina.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV -4'-O-metil-galocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS, 300 MHz, ppm)

Hidrogênio	(ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax	2,49	dd	$^2J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,2$ $^2J_{\text{H4ax-H3}} = 7,8$
H-4eq	2,80	dd	$^2J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,2$ $^3J_{\text{H4ax-H4eq}} = 5,4$
H-2 (C)	4,52	d	$^3J_{\text{H2-H3}} = 7,2$
H-3 (C)	3,96	ddd	$^3J_{\text{H3-H2}} = 7,2$ $^3J_{\text{H3-H-4ax}} = 7,8$ $^3J_{\text{H3-H-4eq}} = 5,4$
H-6 (A)	5,85	d	$^4J_{\text{H6-H8}} = 2,4$
H-8 (A)	5,93	d	$^4J_{\text{H8-H6}} = 2,4$
H-2'/H-6 (B)	6,39	s	
O-CH <sub>3</sub>	3,78	s	

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

Figura 22 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV - 4'-O-metil-galocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS, 300 MHz, ppm)

Figura 23 – Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da substância IV - 4'-O-metil-galocatequina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz, TMS, ppm)

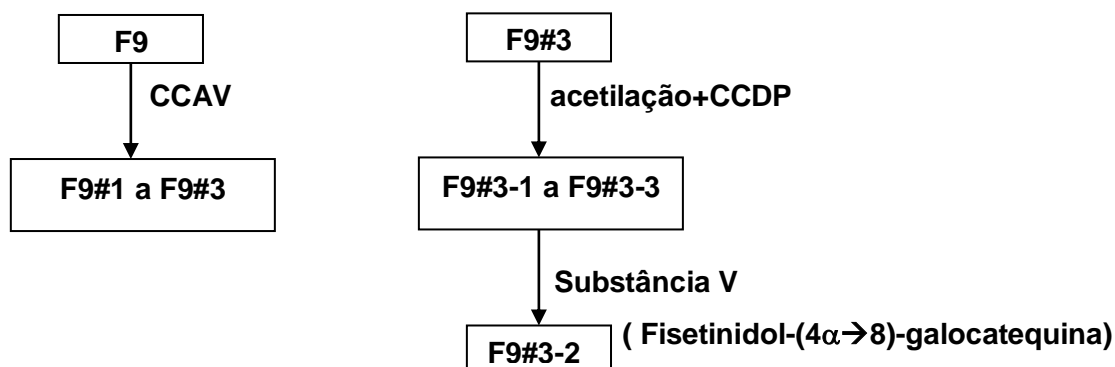


Figura 24 – Espectro de massas da substância IV - 4'-O-metil-galocatequina por ESI modo negativo

Figura 25 - Espectro NOE da substância IV - 4'-O-metil-galocatequina

### 5.2.3 Dímero de flavan-3-ol

#### 5.2.3.1 Substância V - fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina



Fluxograma 6 - Fracionamnto cromatográfico da F9

A fração 9 (F9) (14,7mg) resultou em 3 subfrações por CCCAV. Na CCD, a subfração F9#3 (14,3mg) apresentou-se com uma única mancha de coloração azul intensa após revelação com  $\text{FeCl}_3$ , com  $R_f = 0,41$ , fornecendo indícios característicos de taninos condensados. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  apresentou-se de forma complexa não sendo possível a sua interpretação. Assim, a subfração F9#3 foi derivatizada por acetilação fornecendo, após purificação por CCDP, conforme fluxograma 6 a fração F9#3-2 com 1,4 mg e foram realizados espectros de RMN  $^1\text{H}$  em acetona- $d_6$  e  $\text{CDCl}_3$  apresentando características de um tanino condensado do tipo dimérico peracetilado (Fig. 26 e 29). Os dados de deslocamentos encontram-se na tabela 7.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da **substância V** (acetona- $d_6$ ) mostra um singlete em  $\delta$  6,73 [H-2'/H-6' (E)], determinando a triidroxilação do anel E. Esse dado pode ser confirmado pela observação do espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 27). Através do espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 28) foi possível visualizar, ainda, os acoplamentos entre os hidrogênios alifáticos H-2(C) e H-4(C) com H-3(C) e, entre H-2(F) e H-4ax/H-4eq(F) com H-3(F). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C ( $J_{\text{H-2,H-3}} = 9,6$  Hz e  $J_{\text{H-3,H-4}} = 9,9$  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  $\delta$  4,98 [H-2(F)] com constante de acoplamento 8,7 Hz e pelo H-3(F) ( $\delta$  4,86) com  $J_{\text{H-2,H-3}} = 8,7$

Hz. A unidade superior da substância foi caracterizada como fisetinidol devido ao hidrogênio H-3(C), que aparece em  $\delta$  5,83 como pseudotripleto com uma somatória das constante de acoplamento de  $J_{2,3} + J_{3,4} \sim 19,5$  Hz, estando de acordo com a literatura (DREWES et al., 1967; STEYNBERG et al., 1990; NOPITSCH-MAI et al., 1990; MELLO et al., 1996b). Além disso, os hidrogênios da região aromática do anel B 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  $\delta$  7,09 e 7,15 ppm, respectivamente. O hidrogênio 5 do anel A encontra-se em  $\delta$  6,87 ppm com  $J_{H-6'-H-5'} = 8,4$  Hz e  $J_{H-6'-H-2'} = 2,1$  Hz. Este dubleto em  $\delta$  6,87 ppm ( $J_{H-6'-H-2'} = 8,4$  Hz) auxiliou na confirmação da unidade superior como sendo uma profisetidina. A ligação (4 $\alpha$ →8) foi confirmada pelo deslocamento do hidrogênio H-3(C) que aparece como um pseudotripleto em  $\delta$   $\square$ 5,81 ppm. Dessa forma, a **substância V** foi identificada como sendo **fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina**, de acordo com Nopitsch-Mai et al. (1990). Esta substância foi isolada anteriormente por Lopes (2003) de um extrato semipurificado das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.

Figura 26 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância V [fisetidinol-(4 $\alpha$ - $\rightarrow$ 8)-galocatequina] peracetilada (acetona-d<sub>6</sub>, TMS, 300 MHz, ppm)

Figura 27 - Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da substância V [fisetidinol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina] peracetilada (acetona- $d_6$ , TMS, 300 MHz, ppm)

Figura 28 - Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  da substância V [fisetidinol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina] peracetilada (acetona- $d_6$ , TMS, 300 MHz, ppm)

Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H para a substância V -[fisetinidol-(4α→8)-galocatequina] (a=CDCl<sub>3</sub> e b=acetona-d<sub>6</sub>, TMS, 300 MHz, ppm)

Hidrogênio	δ (ppm)	*Literatura δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax(F)	2,65 <sup>a</sup> 2,72 <sup>b</sup>	2,65	dd	<sup>2</sup> J <sub>H4ax-H4eq(F)</sub> = 16,8 <sup>3</sup> J <sub>H4ax-H3(F)</sub> = 8,7
H-4eq (F)	3,05 <sup>a</sup> 3,02 <sup>b</sup>	3,05	dd	<sup>2</sup> J <sub>H4eq-H-4ax(F)</sub> = 16,8 <sup>3</sup> J <sub>H4eq-H3(F)</sub> = 6,0
H-4 (C)	4,49 <sup>a</sup> 4,67 <sup>b</sup>	4,53	d	<sup>3</sup> J <sub>H4(C)-H3(C)</sub> = 9,9 <sup>a</sup> <sup>3</sup> J <sub>H4(C)-H3(C)</sub> = 9,3 <sup>b</sup>
H-3 (F)	4,86 <sup>a</sup> 4,86 <sup>b</sup>	4,97	ddd	<sup>3</sup> J <sub>H3(F)-H4ax(F)</sub> = 8,7 <sup>3</sup> J <sub>H3(F)-H4eq(F)</sub> = 6,0 <sup>3</sup> J <sub>H3(F)-H2(F)</sub> = 8,7
H-2 (F)	4,96 <sup>a</sup> 4,98 <sup>b</sup>	4,96	d	<sup>3</sup> J <sub>H2(F)-H3(F)</sub> = 8,7
H-2 (C)	4,96 <sup>a</sup> 5,06 <sup>b</sup>	4,87	d	<sup>3</sup> J <sub>H2(C)-H3(C)</sub> = 8,7 <sup>a</sup> <sup>3</sup> J <sub>H2(C)-H3(C)</sub> = 9,6 <sup>b</sup>
H-3 (C)	5,81 <sup>a</sup> 5,83 <sup>b</sup>	5,81	pt	Σ = 19,5 <sup>a</sup> Σ = 19,8 <sup>b</sup>
H-8 (A)	6,66 <sup>a</sup> 6,65 <sup>b</sup>	6,69-6,61	d	<sup>4</sup> J <sub>H8(A)-H6(A)</sub> = 2,4
H-6 (A)	6,64 <sup>a</sup> 6,69 <sup>b</sup>	6,69-6,61	dd	<sup>3</sup> J <sub>H6(A)-H5(A)</sub> = 8,4 <sup>4</sup> J <sub>H6(A)-H8(A)</sub> = 2,4
H-6 (D)	6,66 <sup>a</sup> 6,71 <sup>b</sup>		s	
H-2'/6' (E)	6,67 <sup>a</sup> 6,73 <sup>b</sup>	6,69-6,61	s	
H-5 (A)	6,87 <sup>a</sup> 6,86 <sup>b</sup>	6,87	d	<sup>3</sup> J <sub>H-5(A)-H-6(A)</sub> = 8,4
H-6' (B)	6,89 <sup>a</sup> 7,02 <sup>b</sup>	6,68	dd	<sup>3</sup> J <sub>H6'(B)-H5'(B)</sub> = 8,4 <sup>a</sup> <sup>3</sup> J <sub>H6'(B)-H5'(B)</sub> = 8,1 <sup>b</sup> <sup>4</sup> J <sub>H6'(B)-H2'(B)</sub> = 2,1 <sup>a</sup> <sup>4</sup> J <sub>H6'(B)-H2'(B)</sub> = 1,8 <sup>b</sup>
H-2' (B)	7,04 <sup>a</sup> 7,09 <sup>b</sup>	6,69-6,61	d	<sup>4</sup> J <sub>H2'(B)-H6'(B)</sub> = 2,1 <sup>a</sup> <sup>4</sup> J <sub>H2'(B)-H6'(B)</sub> = 1,8 <sup>b</sup>
H-5' (B)	7,15 <sup>a</sup> 7,15 <sup>b</sup>	6,69-6,61	d	<sup>4</sup> J <sub>H5'(B)-H6'(B)</sub> = 8,4 <sup>a</sup> <sup>4</sup> J <sub>H5'(B)-H6'(B)</sub> = 8,1 <sup>b</sup>

s = singleteo; d= dubleteo,dd=duplo dubleteo; ddd=duplo duplo dubleteo; pt = pseudotripeto

\* Nopitsch-Mai et al. (1990) em CDCl<sub>3</sub>

Figura 29 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância V - [fisetidinol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina] peracetilada (CDCl<sub>3</sub>, TMS, 300 MHz, ppm)



### 5.3 Capacidade antioxidante

Na avaliação da capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato e fração aquosa realizadas pelo método do seqüestro do radical DPPH, os resultados foram expressos na forma de IC<sub>50</sub>.

Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados para o extrato bruto (FEB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) de *Stryphnodendron polyphyllum* foram  $7,9245 \pm 0,18$  (CV= 2,23%);  $7,6020 \pm 0,21$  (CV= 2,75%) e  $7,9523 \pm 0,21$  (CV= 2,67%) respectivamente. Para a vitamina C o valor de IC<sub>50</sub> foi de  $7,18 \pm 0,26\%$  (CV=3,56%) (Fig. 30 ). Os valores de IC<sub>50</sub> tanto de FEB como de FAQ foram estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o padrão de vitamina C. Já, para a FAE observa-se uma capacidade antioxidante semelhante ao do padrão de Vitamina C.

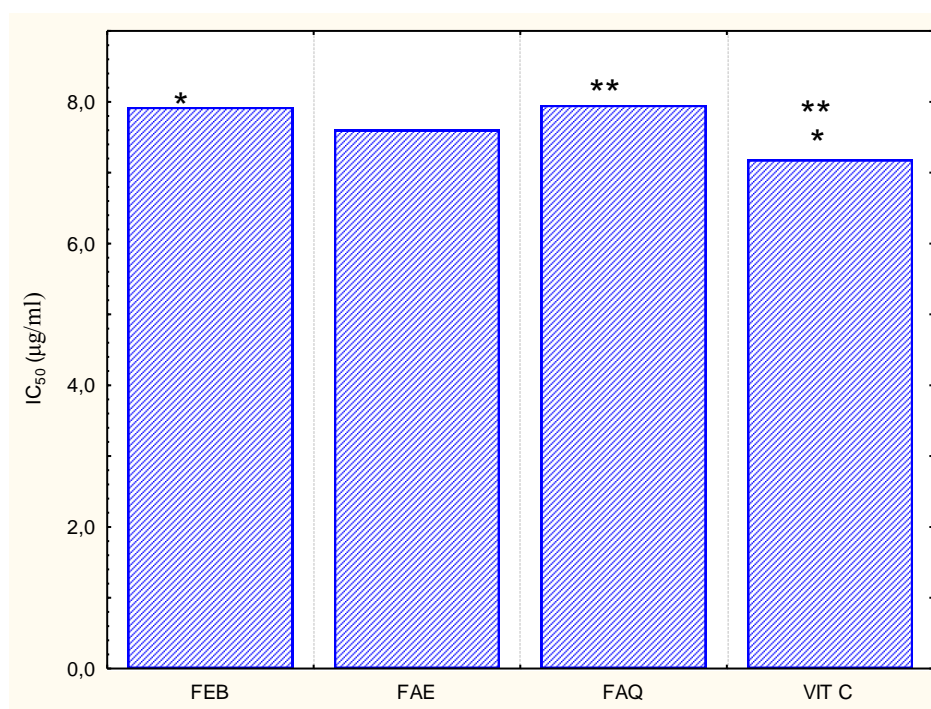


Figura 30 - Valores de IC<sub>50</sub> para FEB, FAE, FAQ e vitamina C, pelo método do seqüestro do DPPH\* diferença significativa entre a vitamina C e o extrato bruto, \*\* diferença significativa entre a vitamina C e a fração aquosa

Na figura 31 pode-se observar a mudança na coloração observada quando da redução do radical DPPH pela amostra nas diferentes concentrações.

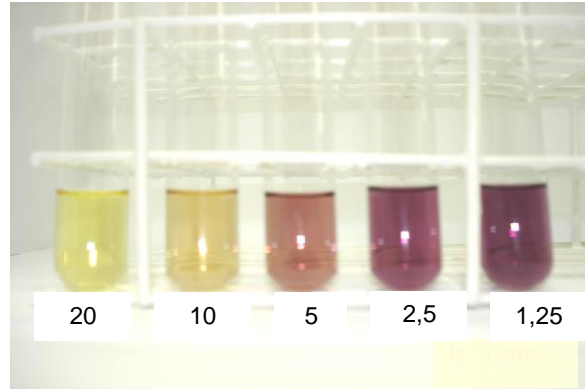


Figura 31 - Mudança de coloração de violeta para amarela nas diferentes concentrações da amostra FEB ( $\mu\text{g/ml}$ ) avaliada pelo método de seqüestro do radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio também utilizou a vitamina C como substância referência, com valor igual a 1. A capacidade antioxidante relativa à vitamina C (CAR) do extrato bruto (FEB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) foi de  $0,7947 \pm 0,05$  (CV= 7,07%),  $0,8178 \pm 0,07$  (CV= 4,16%) e  $0,7629 \pm 0,03$  (CV= 10,29%), respectivamente (Fig. 32). Todos os valores obtidos foram menores que a substância referência, vitamina C. Estatisticamente houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras e a vitamina C, mas não houve diferença significativa entre as amostras.

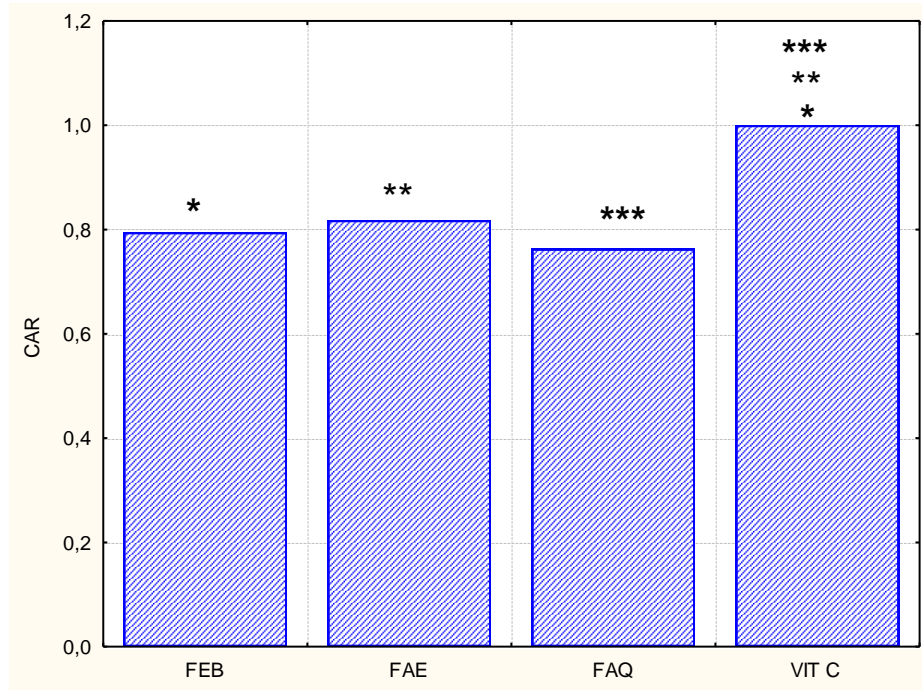


Figura 32 - Comparação da capacidade antioxidante de FEB, FAE e FAQ, pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio

Na figura 32 pode-se observar a formação de coloração verde quando da redução do fosfomolibdênio pela amostra.

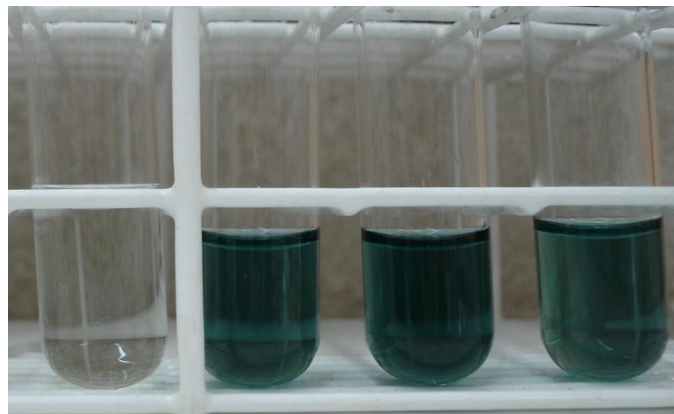


Figura 33 - Coloração verde observada na formação do complexo fosfomolibdênio na amostra EB (n=3), comparadas com o branco (à esquerda)

A capacidade antioxidante das amostras é considerada alta, e os dois métodos utilizados neste trabalho permitem concluir que as amostras testadas possuem capacidade antioxidante, considerando que são uma mistura, em comparação com a vitamina C que é uma substância pura. Nos dois métodos a FAE apresentou resultados melhores em relação à FEB e FAQ, evidenciando que o

processo utilizado na extração de substâncias com atividade antioxidantes na FAE foi efetivo.

A capacidade antioxidante observada nos dois métodos empregados neste trabalho era esperada, porque os polifenóis possuem habilidade de varredura de radicais tais como a hidroxila, o superóxido e o peróxido, conforme pode ser observado nos trabalhos seguintes.

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

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

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

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

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

As pesquisas devem continuar com o intuito de se conseguir detalhar as atividades farmacológicas dos taninos, para que se consiga, desta maneira, chegar com segurança a formas farmacêuticas que possam ser úteis no combate a diferentes doenças que afetam o ser humano.

## 6 CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química da planta (perda por secagem, teor de extrativos e teor de taninos totais) mostrou resultados compatíveis com a literatura.
- O estudo fitoquímico de extratos semipurificados das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae) demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.
- Foram isoladas e identificadas cinco substâncias: ácido gálico; galocatequina; epigalocatequina; 4'-O-metil-galocatequina; fisetinidol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina, desta maneira, colaborando na caracterização fitoquímica da espécie.
- A capacidade antioxidante através do teste de redução do radical DPPH<sup>•</sup> e da redução do complexo fosfomolibdênio mostraram ser positivos para o extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food. Chem.**, v.84, p.551-62, 2004.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MAC DONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-98, 2002.

AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.V.; MELLO, J.C.P. de; NAKAMURA, C.V.; ALVES do PRADO; W.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytother. Res.**, v.3, p.264-6, 1999.

BARREIRO, E. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In: YUNES, R. A. CALIXTO, J.B. (Org). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. cap.6, p.237-96.

BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T. **Comparative biochemistry**. New York: Academic Press, 1962, v.3, p.764.

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

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.82, n.2-3, p.155-8, 2002.

BENNIE, L.; COETZEE, J.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and stereochemistry of dimeric proteracacinidins possessing the rare C-4(C)→C5(D) interflavanyl linkage. **Phytochemistry**, v.59, p.673-8, 2002.

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

BORGES FILHO, H.C.; FELFILI J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.). Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Árvore**, v.27, n.5, p.735-45, 2003.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839-51, 2001.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1953.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Tech.**, v.28, p.25-30, 1995.

BUELGA, C.S.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agr.**, v.80, p.28-32, 2000.

CAI, Y., EVANS, F. J., ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry** v.30, 2033-2044, 1991.

CARDOSO, M.L.C. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnologias na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.** 2002, 114 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.

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

CHERNOVIZ, P.L.N. **Formulário e guia médico**. 18. ed Paris: Roger e Chernoviz, 1908.

CHIPAULT, J.R.; MIZUN, G.K.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v.17, p.46-55, 1952.

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

CHUNG, K. T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Tannins and human health: a review. **Food Sci. Nutr.**, v.38, n.6, p.421-464, 1998.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: laboratório Clínico Silva Araújo, 1942.

COSTA, T.E.M.M.; DIAS, A.P.M.D.; CAPRILES, P.V.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; AMORIN, E.L.C. de; LIMA, C.S.A. de; BERNARDO-FILHO, M. Effect of barbatimão

[*Stryphnodendron adstringens* (Mart.), Coville] infusion on the labeling of blood elements with technetium-99m. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.12; supl.; p.7-9, 2002.

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

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. **Food Chem.**, v.1-6, 2004.

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.445-59, 1999.

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.**, v.31, n.9, p.1163-70, 1998.

DREWES, S.E.; ROUX, D.G.; SAAYMAN, H. M.; EGGERS, S.H.; FEENEY, J. Some stereochemically identical biflavonols from the bark tannins of *Acacia meransii*. **J. Chem. Soc. Comm.**, p.1302-13088, 1967.

DURAN, R. M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-6,1993.

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

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed.São Paulo: Atheneu, 2002. part.2, fasc.IV, monog. 176.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J.Z; DALLA, G. MELCHIOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the open surgical wounds. **Fitoterapia**, Milano, v.73, p.564-8, 2002.

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

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

GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T.N.; NYASSÉ, B. 4'-O-methylgallo catechin from *Panda oleosa*. **Phytochemistry**, v.32, p.1626-8, 1993.

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



GUERRA, S.S.F.; FANAN S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics & Toiletries**, v.6, p.51-4, 1994.

HAGERMAN, A.E. Tannin-protein interaction. In: HO, C.T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.T. (Eds), **Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health**. 1. Analysis, occurrence and Chemistry. Washington: DC: American Chemical Society, 1992. cap.19, p.236-47.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGEER, J. AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, n.7, p.601-17, 1995.

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

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

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

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**, v.59, p.749-58, 2002.

HATANO, T.; YASHUARA, T.; YOSHIHARA, R. AGATA, I.; NORO, T.; OKUDA, T. **Chem. Pharm. Bull.**, v.38, n.5, p.1224-9, 1990.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L.Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins. **J.Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p.1209-16, 1982.

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

HIRATA, L.L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* Macbride, CESALPINACEAE, em serum**. 2004. 84p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

HOLLEY, A.E.; CHEESEMAN, K.H. Measuring free radical reactions *in vivo*. **Brit. Medical Bull.**, v.49, p. 494-505, 1993.

HUSSEIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, p.2489-91, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Economia. Agropecuária. Produção da extração vegetal e da silvicultura- PEVS**. Disponível em < [www.ibge.net/home/estatística/economia;pevs/tabela\\_1\\_apevs.shtm](http://www.ibge.net/home/estatística/economia;pevs/tabela_1_apevs.shtm) > acesso em 15/07/2003.

JACOB, R.A.; BURRI, B. Oxidative damage and defense. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, (s), p.985(s)-990(s), 1996.

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. Cienc. Farm.**, Araraquara, v.17, p.181-186, 1996.

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

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

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

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

LON, S.; SZCZEPANSKA -SADOWSKA E. PACZWA, P.; GANTE D. Enhanced blood pressure role of the brain nitreergic system in renin transgenic rats. **Rain Research.**, v.842, p.384-391, 1999.

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

LU, Y.; FOOD, L.Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chem.**, v.65, p.1-8, 1999.

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

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.**, v.16, p.427-431, 2002.

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

MARTIUS, C.F.P. **Flora brasiliensis: Enumeratio Plantarum** V. XV. Parte III, 1840. MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hamamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. **Phytochemistry**, v.37, n.2, p.337-43, 1994.

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

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

MELLO, J.C.P. de; PETEREIT, F.; NAHRDSTEDT, A. A flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.41, p.807-13, 1996a.

MELLO, J.C.P. de; PETEREIT, F.; NAHRDSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.42, n.3, p.857-62, 1996b.

MELLO, J.C.P. de; PETEREIT, F.; NAHRDSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.51, p.1105-7, 1999.

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

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, n.8, p.1075-9, 1998.

MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A.S.; SANCHES, E.M.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseupiptadenia contola* (Legumminosae-Mimosidae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.12, p.124-125, 2002.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, p.1745-50, 2002.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresour. Technol.**, v.87, p.41-4, 2003.

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

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

NOPITSCH-MAI, C.; KALOGA, M.; LANGHAMMER, L. Pharmakognostisch-phytochemische Untersuchung der cortex von *Cassia auriculata* Linné. **Pharm. Ztg. Wiss.**, v.4, p.157-9, 1990.

OCCHIONI MARTINS, E. M.; MARTINS JUNIOR, A. G. *Stryphnodendron* Mart. (Leg.Mim.): As espécies da Amazônia brasileira, **Leandra**, 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**, n.4-5, p.53-67, 1974.
- OCCHIONI MARTINS, E.M. Distribuição geográfica do gênero *Stryphnodendron adstringens* com descrição de nova espécie (Leg., Mim.). **Rev. Bras. Biol.**, v.40, p.729, 1980.
- OCCHIONI, E M.L. Considerações taxonômicas no Gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoidae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Bot. Bras.**, v.4 (Suplemento), p.153-8, 1990.
- OLIVEIRA, S.S.; MOTA, V.C.; BARROS, W.M.; BARROS, M.M. Efeitos do extrato metanólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) sobre o ciclo estral de ratas e parâmetros bioquímicos. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, FT. 392, 2002. Cuiabá. **Resumos**, UFMT. Cuiabá-MT, 2002.
- OLIVEIRA, C.A; AZZOLINI, A.C.S.; SILVA; SILVAS. C.; CORDEIRO, 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 Quím.**, v.27, n. especial, 2002.
- OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TARIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. **J. Atheroscler. Tromb.**, v.7, p.164-8, 2000.
- PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; SILVA, R.A.P.S. *Stryphnodendron barbadetiman* (Velloso) Martius: Teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Rev. Cienc Farm.**, v.10, p.101-6, 1988.
- PELATTI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **J.Pharmaceut. Biomed. Anal.**, v.35, n. 2, p.289-301, 2004.
- PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946.
- 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.
- PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C.; DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brasil. **J. Ethopharmacol.**, v.66, p.51-55, 1999.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237-43, 2001.
- PIETTA, P.G. Flavonóids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.1035-42, 2000.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas medicinais do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946.

PRIETO, P.; PINEDA, M; AGUIAR, M. spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal. Bioch.** v.269,p. 337-341,1999.

PRIEUR, C., RIGAUD, J.,CHEYNIER,V., MOUTOUNET, M., Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, v.36, 781-4, 1994.

RATES, S.M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-13, 2001.

REBECCA, M.A.; ISHI-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN R.; CUMAN, R.K.N.; ASSEF, S.M.C.; MELLO, J.C.P. de; AMADO, C.A.B. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v.83, p.101-4, 2002.

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

RIZZINI, C.T. Novas espécies de *Stryphnodendron* Mart (Leg-Mim.). Anais da Academia brasileira de ciências, v.51, n.4, p. 912-913, 1980.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; DEANS, S.G.; DORMAN, H.J.D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta medica**, v.66, p.687-93, 2000.

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. 50<sup>th</sup> ANNUAL CONGRESS OF THE SOCIETY FROM MEDICINAL PLANT RESEARCH, Barcelona-Espanha, v.2, supl.I, p.301, septiembre, 2002.

SANCHES, A.C.C. **Estudo anatômico, físico-químico, químico, da atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante do extrato das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae)**. 2004. 223p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.

SANTOS, C.A. de M.; TORRES, K.R. E LEONARTT, R. **Plantas Mediciniais (herbarium, flora et scientia)**. Curitiba: Scientia et a labor, 1987. p.39.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. de. 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**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2003. cap.24, p.615-56.

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**, Milano, v.73, p.292-9, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-83, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos 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**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2003. cap.15. p. 371-400.

SCHOFIELD, P; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysys of condensed tannins: a reiew. In: **Animal Feed Sci. Technol.**, v.91, p.21-40, 2001.

SILVA da, R.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITJAVILA, S.J. **Agr. Food Chem.**, v.39, p.1549-52, 1991.

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

SOUZA, S.M.C.; ROCHA, I.L.F.; NOBRE, M.E.P.; COSTA, J.G.M.; VALE, T.G.; VIANA, G.S. Atividade anticonvulsiva do extrato etanólico (ea) de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, F.T.297, 2002. Cuiabá. **Resumos**, UFMT. Cuiabá-MT, 2002b.

STEYNBERG, J.P.; BURGUER, J.F.W.; MALAN, J.C.S.; CRONJÉ, A.; YOUNG, D. A.; FERREIRA, D. Natural (-)-fisetinol-(4,8)-(-)-epicatechin profisetinidins. **Phytochemistry.**, v.29, p.275-7, 1990

THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distributition in nature of plant procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, p.1387-99, 1972.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; DRIMEIER, D.; COSTA, J.B.D.; CAMARGO, A.J.R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (leg. Mimosidaceae). **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, n.1, p. 35-38, 1998.

TOLEDO, C.E.M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, leguminosae**, 2002 92p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara.

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 conformation changes in triterpenes of the  $\beta$ -amirin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. **J. Org.Chem.**, v.28, p.2390-94, 1963.

TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E. CHIURDOGLU, G. Triterpens II (\*). Les sapogénines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. **Bul. Soc. Chim. Belges**, Bruxelles, v.75, p.26-28, 1966.

TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E.; CHIURDOGLU, G. Triterpenes II. Les sapogénines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. **Bull. Soc. Chim. Belges**, v.75, p.26-28, 1966.

VANDUJIN, M.M.; ZEE, J.V.D.; BROEK, P.J.V.D. Analysis of transmembrane redox reactions: interaction of infra-and extracellular ascorbate species. **Methods of Enzymol.**, v.352, p. 268-279.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. Rio de Janeiro: Campos, 1981.

WEINGES, K.; HELLIWILL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid um green tea using HPLC. **Food Chem.**, v.68, p.115-121, 2000.

WEINGES, K.; KALTEENHAUSER, W.; MARX, H. D.; NADER, E.; NADER, F.; PERNER, J.; SEILER D. Procyanidine aus Fruchten. **Leibigs Annalen der Chemie**, v.711, p.184-204, 1968a.

WEINGES, K.; GORITZ, K.; NADER, F. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XI Konfigurationsbestimmung von C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub> –Procyanidinen und Strukturaufklärung eines neuen procyanidins. **Liebigs Annalen der Chemie**, v.715, p.164-71, 1968b.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e Fitoterápicos: Necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

### Exemplo de Cálculo para obtenção da IC<sub>50</sub>:

Realização do experimento baseado em 3 determinações ( n=3).

A atividade radicalar foi calculada como: % RSA= 100 x (1 - AE - AD), onde: AE é a absorvância da solução quando um extrato foi adicionado em determinada concentração, e AD é a absorvância da solução do radical DPPH (HATANO et al., 1988; AMAROWICZ et al., 2004). (ver quadro abaixo).

Tubos	Concentração	Absorvância	% RSA
1	1,25		
2	2,5		
3	5		
4	10		
5	20		

- Para cada determinação (n=1, n=2 e n=3), faz-se o cálculo para se obter a equação da reta, conforme quadro a seguir

Tubos	X *	Y **	Y <sup>2</sup>	XY
1				
2				
3				
4				
5				
	$\sum x$	$\sum y$	$\sum Y^2$	$\sum xy$

\* Concentração de cada tubo em µg/ml; \*\* absorvância para cada concentração

Aplica-se os resultados nas seguintes fórmulas:

$$a = \frac{(\sum xy) - (\sum x \cdot \sum y)}{(n \sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{(\sum y) \cdot (a \sum x)}{n}$$

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Onde:

$a$ = coeficiente angular da reta.

$b$ = coeficiente linear da reta (intercepto no eixo  $y$ ).

$n$  = nº de concentrações (ou tubos) que foram escolhidos como pontos para a confecção da reta. Neste exemplo sendo igual a 5 (cinco).

$r$ = coeficiente de correlação (pode variar de -1 a +1), quanto mais próximo de 1 (um) melhor, porque quando  $r= 1$  diz-se que há correlação perfeita positiva entre as duas variáveis (VIEIRA, 1981; MILONE, 2004).

A equação da reta é dada por  $y= ax + b$ , onde  $y=$  % RSA,  $x=$  concentração e  $ab=$  foram calculados.

Desse modo tem-se: %RSA =  $a \cdot$  concentração+  $b$ .

Para saber em qual concentração se obterá 50% de inibição ( $IC_{50}$ ), faz-se:

$$50 = a \cdot \text{concentração} + b, \text{ ou seja: } IC_{50} = 50 - \frac{b}{a}$$

obs: o termo concentração equivale a concentração para cada tubo em  $\mu\text{g/ml}$ .

## ANEXO 2

### COMUNICAÇÃO DO PRESENTE TRABALHO EM CONGRESSO

- Machado, F.A.V.; Mello, J. C. P Estudo fitoquímico de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum*- Mart. – Barbatimão. In. I CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE CASCAVEL-PR, 2004. Cascavel. **Resumos**, Unioeste. Cascavel-PR, 2004.

## Fatima Aparecida Vieira Machado

Data de nascimento: 12 de outubro de 1960

Naturalidade: Londrina - PR                      Nacionalidade: Brasileira

Filiação: Ermelino Vieira Machado e Lourdes Sperandio Machado

Endereço:        Rua: Sumaré, nº 95 – Jardim Santos Dumont

Paranavaí - Pr.

Fone: 44-3423-8291

E-mail: [fatimam@vsp.com.br](mailto:fatimam@vsp.com.br)

---

### Formação profissional

- 1983: Farmacêutica-Bioquímica pela UEM - Universidade Estadual de Maringá.
  - 2000: Título de Especialista em Manipulação Magistral Alopata pela ANFARMAG - Associação Nacional dos Farmacêuticos magistrais.
  - 2002: Especialista em Ciências Fisiológicas pela UEL - Universidade Estadual de Londrina.
  - Desde 2002: Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências farmacêuticas, UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *Campus Araraquara* - SP.
- 

### Atividade Profissional

- 1989 a 2001: Sócia - proprietária da Calêndula - Farmácia de Manipulação Ltda, Londrina – PR.
- 1998-2004: Ministrante de Cursos de Atualização em Manipulação Farmacêutica e Cosmecêutica pela Oficinal - Grupo de Estudos Farmacêuticos de Londrina - Pr e SENAC - Curitiba- PR.
- Desde 2001: Docente da Unipar - Universidade Paranaense, *Campus Paranavaí* – PR.
- Desde 2004: Coordenadora do Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmetologia da Unipar - Universidade Paranaense, *Campus Parana* – PR.