



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



ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE POLIFENÓIS EM *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO)

MAÍSA ALMEIDA LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ, 2014

Maísa
Almeida
Leite

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE POLIFENÓIS EM
Stryphnodendron adstringens (BARBATIMÃO)

Mestrado
PCF-UEM
2014

MAÍSA ALMEIDA LEITE

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE POLIFENÓIS
EM *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ, 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Catlogação na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L533i Leite, Maísa Almeida.

Isolamento e identificação estrutural de polifenóis em *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) / Maísa Almeida Leite. – Maringá, 2014.
88 f. : il.

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Barbatimão – Teses. 2. Taninos – Teses. 3. Fitoquímica – Teses. 4. Análise cromatográfica – Teses. 5. Plantas medicinais – Teses. I. Mello, João Carlos Palazzo de. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDU 633.88

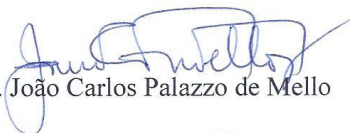
MAÍSA ALMEIDA LEITE

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE POLIFENÓIS EM
*STRYPHNO DENDRON ADSTRINGENS (BARBATIMÃO)***

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

Aprovada em 17 de dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello


Dr. Cleyton Eduardo Mendes de Toledo


Dra. Graciete Matioli

Este trabalho foi realizado no Laboratório PALAFITO, bloco K80, salas 13 e 14, da Universidade Estadual de Maringá.

Parte deste trabalho foi apresentado:

- IV Workshop sobre Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos

LEITE, M.A.; LOPES, M.L.M.; MELLO, J.C.P. Isolamento e identificação de polifenóis do extrato de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). In: IV Workshop sobre Desenvolvimento Tecnológico de Medicamentos Fitoterápicos, 2012, Manaus.

- IX Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

LEITE, M.A.; LOPES, M.L.M.; MELLO, J.C.P. Isolamento e identificação de taninos de uma fração semipurificada do extrato de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). In: IX Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2013, Goiânia.

- 4th Brazilian Conference on Natural Products

LEITE, M.A.; LOPES, M.L.M.; MELLO, J.C.P. Flavan-3-ols, prodelphinidins and prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal.

Dedico esta dissertação a Deus, aos meus pais, irmão e avós, pelo incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cuidar de cada detalhe, proporcionando Suas graças sempre nos momentos certos.

À Mãe, Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de Schoenstatt, a quem este trabalho foi consagrado, pela presença e proteção em minha vida.

Aos meus pais, Edson e Fátima, por lutarem junto comigo para a realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão, Maurício, pelo exemplo e por saber que nunca estarei sozinha.

Aos meus avós Arceste e Izabel, Leonor e Antônio (*in memoriam*), por me fazerem sentir tão amada.

Aos meus tios e primos, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao professor João Carlos Palazzo de Mello pela oportunidade, orientação, confiança, generosidade, amizade e pelos conhecimentos transmitidos. Tudo isso foi fundamental para a realização deste trabalho e, sobretudo, para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao pessoal do laboratório PALAFITO: Vanessa Munhoz, Lorena Pessini, Renata Longhini, Tânia Antonelli, Gisely Lopes, Fernanda Bueno, Maria Cristina DiCiaula, Letícia Krzyzaniak, Bruna Aguiar, André Oliveira, Ana Luiza Sereia, Leila Marques, Andressa Blainski, por todo conhecimento compartilhado, ajuda e convivência.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Milena Jayme, Talita Naomi e Alexandre Reinas, pelas conversas e risadas.

À Maria Luiza Miguel Lopes pela ajuda neste trabalho.

Ao Admir Arantes e Cláudio Roberto Novello pelo auxílio técnico no laboratório e amizade.

À professora Mirela Rabito, pelo exemplo e incentivo.

À Helena pelo apoio, ajuda e seu bom humor.

Aos queridos amigos: Ailin Albertoni, Camila Dias, Cristiane Bezerra, Diego Petenucci, José Henrique de Oliveira, Guilherme Zanin, Karine Nunes, Livia Médici, Miriane Tsuda, Natália Gonzaga, Sergio Tanaka, pelos momentos divertidíssimos que sempre passamos juntos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Então ouvi a voz do Senhor, conclamando:

“Quem enviarei? Quem irá por nós?”

E eu respondi: Eis-me aqui. Envia-me!

(Isaías 6:8)



Máisa Almeida Leite nasceu em Londrina, PR, no dia 14/08/1989. Cresceu na cidade de Ubitatã, PR, e aos 14 anos voltou para Londrina para cursar o ensino médio no colégio Maxi. Em 2007 ingressou no curso de Farmácia da Universidade Estadual de Londrina, onde participou de projetos relacionados à aflatoxina em alimentos, sob a orientação da professora Dra. Elisa Hirooka, e ao controle de qualidade de medicamentos, sob a orientação das professoras Dra. Marlene Nery e Ms. Mirela Rabito. Em 2012 iniciou mestrado acadêmico no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Maringá, realizando suas atividades no laboratório de Biologia Farmacêutica PALAFITO, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

RESUMO

LEITE, MA 2013. Isolamento e identificação estrutural de polifenóis em *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 88p.

Stryphnodendron adstringens, conhecido como “barbatimão”, é utilizado como planta medicinal pela população e é encontrado no cerrado brasileiro. Os extratos das cascas desta planta possuem alto teor em taninos, sendo que destes já foram isoladas e identificadas diversas substâncias, entre elas, flavan-3-óis, prodelfinidinas e prorobinetinidinas. Estudos realizados com a espécie comprovaram atividades antimicrobiana, antiviral, cicatrizante, antiúlcera, antioxidante, anti-inflamatória, e antileishmania. Este trabalho teve por objetivo o isolamento e a identificação estrutural de polifenóis de uma fração semipurificada acetato de etila obtida a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* utilizando diferentes métodos cromatográficos, como a cromatografia em coluna (CC), a cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV), a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), a cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A identificação destas substâncias foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC). Foram identificadas as substâncias 4'-O-metil-galocatequina, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato, 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidróxi)-benzoato. Além disso, neste trabalho foram isoladas 4'-O-metil-epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-galocatequina, galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina e epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina, substâncias inéditas na espécie. Dessa forma, o conhecimento dos constituintes químicos de *S. adstringens* pode promover informações relativas à caracterização da espécie e explicar, ao menos em partes, as atividades farmacológicas do vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: *Stryphnodendron adstringens*, taninos condensados, métodos cromatográficos.

ABSTRACT

LEITE, MA 2013. Isolamento e identificação estrutural de polifenóis em *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Master degree, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 88p.

Stryphnodendron adstringens, known as "barbatimão", is used as a medicinal plant by the population and it is found in the Brazilian savannah (cerrado). The extracts from the bark of this plant have high tannin content. Several compounds were isolated and identified, like flavan-3-ols, prodelphinidins and prorobinetinidins. Studies with the species proved the following activities: antimicrobial, antiviral, wound healing, antiulcer, antioxidant, anti-inflammatory, and antileishmanial. This work aimed the isolation and structural identification of polyphenols of ethyl acetate semipurified fraction obtained from the stem barks of *Stryphnodendron adstringens* using different chromatographic methods, such as column chromatography (CC), high-speed counter-current chromatography (HSCCC), preparative thin layer chromatography (Prep-TLC), medium-pressure liquid chromatography (MPLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The identification was performed by spectroscopic methods of nuclear magnetic resonance (NMR) 1D (^1H and ^{13}C), 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC). Compounds were identified as 4'-O-methylgallocatechin, gallocatechin, epigallocatechin, epigallocatechin-3-O-galate, 4'-O-methylgallocatechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallocatechin, 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgallocatechin, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-galate, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hidroxi)-benzoate. In addition, it was isolated by the first time 4'-O-methylepigallocatechin, epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β →8)-gallocatechin, gallocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin and epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin in this species. Thus, knowledge of the chemical constituents of *S. adstringens* can promote information concerning the characterization of the species and explain, at least in part, the pharmacological activities of the plant.

KEYWORDS: *Stryphnodendron adstringens*, condensed tannins, chromatographic methods.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - (A) <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville; (B) Folíolos; (C) cascas picadas.	10
Figura 2 - Estruturas dos flavan-3-óis isolados da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	12
Figura 3 - Prodelfinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	13
Figura 4 - Prodelfinidina dimérica isolada da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	14
Figura 5 – Prorobinetidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	15
Figura 6 - Dímeros isolados das cascas de <i>S. adstringens</i>	16
Figura 7 - Monômeros básicos de taninos condensados.	24
Figura 8 - Estruturas básicas de proantocianidinas.	25

CAPÍTULO 2

Figure 1 – Chemical structures of isolated compounds 1, 7, 9 and 10.	32
Figure 2 – Chemical structures of isolated compounds 2-6, 8, 11, 123.	33
Figure S1 - ¹ H NMR spectrum (300 MHz, CD ₃ OD) of 4'-O-methylepigallocatechin (1).	39
Figure S2 - ¹ H/ ¹ H COSY spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (1).	39
Figure S3 – ¹³ C NMR spectrum (75 MHz, CD ₃ OD) of 4'-O-methylepigallocatechin (1).	40
Figure S4 – HSQC spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (1).	40
Figure S5 - HMBC spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (1).	41
Figure S6 - ¹ H NMR spectrum (300 MHz, CDCl ₃) of 4'-O-methylgalocatechin (2).	43
Figure S7 - ¹ H/ ¹ H COSY spectrum of 4'-O-methylgalocatechin (2).	43
Figure S8 - ¹ H NMR spectrum (300 MHz, CDCl ₃) of 4'-O-methylgalocatechin-(4α→8)-4'-O-methylgalocatechin (3).	45
Figure S9 - ¹ H/ ¹ H COSY spectrum of 4'-O-methylgalocatechin-(4α→8)-4'-O-methylgalocatechin (3).	45
Figure S10 - HSQC spectrum of 4'-O-methylgalocatechin-(4α→8)-4'-O-methylgalocatechin (3).	46
Figure S11 - HMBC spectrum of 4'-O-methylgalocatechin-(4α→8)-4'-O-methylgalocatechin (3).	46
Figure S9 - ¹ H NMR spectrum (300 MHz, CDCl ₃) of epigallocatechin (4).	48

Figure S10 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin (4).	48
Figure S11 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of galocatechin (5).....	50
Figure S12 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of galocatechin (5).	50
Figure S13 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgalocatechin.	52
Figure S14 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgalocatechin (6).	52
Figure S15 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-galocatechin (7).	54
Figure S16 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-galocatechin (7).	54
Figure S17 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (8).	56
Figure S18 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (8).	56
Figure S19 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (9).	58
Figure S20 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (9).....	58
Figure S21 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (10).....	60
Figure S22 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (10).	60
Figure S23 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-galate (10).	62
Figure S24 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-galate (10).	62
Figure S25 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-3-O-galate (12).	64
Figure S26 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-3-O-galate (12).....	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Flavan-3-óis isolados da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	12
Tabela 2 - Prodelphinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	14
Tabela 3 - Prorobinetidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	16
Tabela 4 - Grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensados.	25

CAPÍTULO 2

Table S1 - ¹ H NMR data of 4'-O-methylepigallocatechin (1) (300 MHz, in CD ₃ OD).....	41
Table S2 - ¹³ C NMR data of 4'-O-methylepigallocatechin (1) (75 MHz, in CDCl ₃).....	42
Table S3 - ¹ H NMR data of 4'-O-methylgalocatechin (2) (300 MHz, in CDCl ₃).....	44
Table S4 - ¹ H NMR data of 4'-O-methylgalocatechin-(4α→8)-4'-O-methylgalocatechin (3) (300 MHz, in CDCl ₃).	47
Table S5 - ¹ H NMR data of epigallocatechin (4) (300 MHz, in CDCl ₃).....	49
Table S6 - ¹ H NMR data of galocatechin (5) (300 MHz, in CDCl ₃).....	51
Table S7 - ¹ H NMR data of 4'-O-methylrobinetinidol-(4α→8)- 4'-O-methylgalocatechin (6) (300 MHz, in CDCl ₃).	53
Table S8 - ¹ H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate-(4β→8)-galocatechin (7) (300 MHz, in CDCl ₃).....	55
Table S 9 - ¹ H NMR data of epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (8) (300 MHz, in CDCl ₃).	57
Table S10 - ¹ H NMR data of galocatechin-(4α→8)-epigallocatechin (9) (300 MHz, in CDCl ₃).	59
Table S11 - ¹ H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate-(4β→8)-epigallocatechin (10) (300 MHz, in CDCl ₃).	61
Table S12 - ¹ H NMR data of epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-galate (10) (300 MHz, in CDCl ₃).	63
Table S13 - ¹ H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate (12) (300 MHz, in CDCl ₃).	65

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Obtenção do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>S. adstringens</i>	79
Fluxograma 2 - Fracionamento da fração Acetato de Etila (FAE) obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i>	80
Fluxograma 3 - Fracionamento da fração III obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> ...	81
Fluxograma 4 - Fracionamento da fração IV obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> .	82
Fluxograma 5 - Fracionamento da fração V obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> ..	83
Fluxograma 6 - Fracionamento da fração VI obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> .	84
Fluxograma 7 - Fracionamento da fração VII obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> ..	85
Fluxograma 8 - Fracionamento da fração VIII obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> .	86
Fluxograma 9 - Fracionamento da fração IX obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> .	87
Fluxograma 10 - Fracionamento da fração X obtida a partir das cascas de <i>S. adstringens</i> ..	88

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

br s: broad singlet

CC: cromatografia em coluna

CCCAV: cromatografia em contracorrente de alta velocidade

CCD: cromatografia em camada delgada

CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl_3 : deuterated chloroform

CD_3OD : deuterated methanol

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLMP: cromatografia líquida de media pressão

COSY ^1H - ^1H : correlation spectroscopy

d: doublet

dd: doublet of doublet

ddd: doublet of doublet of doublet

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EB: extrato bruto

EtOAc: acetate of ethyl

EtOH: ethanol

FAE: fração acetato de etila

HMBC: heteronuclear multiple bond correlation

HPLC: high-performance liquid chromatography

HSCCC: high-speed counter current chromatography

HSQC: heteronuclear multiple quantum correlation

Hz: hertz

J: coupling constant

m: multiplete

MHz: megahertz

MeOH: methanol

Me₂CO: acetone

MPLC: medium pressure liquid chromatography

NMR: nuclear magnetic resonance

n-PrOH: propan-1-ol

ppm: parts per million

Prep-TLC: preparative thin layer chromatography

RMN: ressonância magnética nuclear

s: singlet

SUS: sistema único de saúde

TLC: thin layer chromatography

TMS: tetramethylsilane

UV: ultraviolet

v/v: volume/volume

δ: chemical shift

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	6
1.1.1 Família Fabaceae	6
1.1.2 Gênero <i>Stryphnodendron</i>	7
1.1.3 <i>Stryphnodendron adstringens</i>	9
1.2 ASPECTOS QUÍMICOS	23
1.2.1 Substâncias fenólicas	23
1.2.2 Taninos.....	23
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	28
Abstract	29
1 Introduction.....	29
2 Results and Discussion.....	30
3 Experimental.....	34
3.1 General.....	34
3.2 Plant Material.....	35
3.3 Extraction and Isolation.....	35
4 Conclusion.....	36
5 References	37
6 Supplementary Material	38
CAPÍTULO 3 - DISCUSSÃO GERAL.....	66
3 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos as plantas são utilizadas pelo homem na alimentação e no tratamento de várias enfermidades (Bendazzoli, 2000). O registro da cura por meio do uso de plantas ditas medicinais por civilizações como egípcios, chineses e hindus data de muitos anos antes de Cristo. No Brasil, têm-se os primeiros registros do uso de plantas em rituais religiosos e de cura realizados por índios e escravos (Marques, 1999; Cunha 2007).

Já no início do século XX houve uma preferência mundial pelos medicamentos sintéticos, motivada pela consolidação do processo industrial e o aumento na produção de substâncias terapêuticas mais puras e com menos efeitos colaterais (Rates, 2001; Toledo, 2002).

Atualmente, observa-se um retorno na procura por plantas medicinais, devido, principalmente, ao grande interesse da população em terapias alternativas ou mesmo complementares. Este fato está relacionado, sobretudo, à crença de que tratamentos ditos “naturais” sejam menos agressivos ao organismo humano (Ribeiro et al., 2005).

Assim, esta crescente procura pelas plantas com poder de cura e seus produtos derivados vem chamando atenção das agências internacionais e governamentais, que buscam garantir que tais tratamentos sejam seguros e eficazes (Perfeito, 2012).

No Brasil, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006 (Brasil, 2006a, 2006b), procurando incentivar a prática racional no uso de plantas. Esta portaria objetivou aumentar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, garantindo acesso com segurança, eficácia e qualidade às plantas medicinais, aos fitoterápicos e aos serviços relacionados à fitoterapia (Rodrigues et al., 2006).

Além disso, no Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 foi aprovado a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Esta política busca “*garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional*” (Brasil, 2006c). Deste modo, o uso de fitoterápicos pelo SUS foi ampliado e em fevereiro de 2009 o MS divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus) (Brasil, 2009), onde estão descritas diversas plantas utilizadas na medicina popular. Esta lista é composta por 71 espécies vegetais, para as quais deverão ser priorizadas pesquisas e investimentos com a finalidade de que sejam empregadas com segurança e eficácia nas suas diferentes formas de apresentação: material vegetal *in natura*, material vegetal seco, medicamentos manipulados e industrializados. Dentre as espécies listadas encontra-se *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, planta popularmente conhecida como barbatimão e tradicionalmente utilizada como agente cicatrizante e no tratamento da leucorreia.

Com a revalorização da fitoterapia, ressurgiu o interesse dos laboratórios farmacêuticos na pesquisa de substâncias isoladas a partir de fontes naturais, que podem servir como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (Turolla; Nascimento, 2006). Ao retomar os estudos em produtos naturais, os pesquisadores consideram que durante milhares de anos de evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável (Yunes et al., 2001).

Com o avanço das técnicas espectroscópicas, os pesquisadores têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas que até pouco tempo eram difíceis de serem identificadas (Pinto, et al., 2002). Muitas desvantagens apontadas para a busca de novos fármacos a partir de produtos naturais estão sendo superadas por meio do desenvolvimento das técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) (Schenkel et al., 2004).

Mesmo assim, apenas uma pequena parcela da rica flora brasileira já foi pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial na produção de fármacos, extratos vegetais, inseticidas, corantes naturais e derivados (Takaki et al., 2007). Um indicativo da necessidade de se investir em pesquisas de espécies medicinais brasileiras e no desenvolvimento de fitoterápicos é o fato de que de todas as espécies vegetais com registro no Brasil menos de 30% são nativas da América do Sul (Carvalho et al., 2008). Observando-se a velocidade que o fenômeno de extinção está ocorrendo entre as espécies vegetais, várias plantas com propriedades medicinais podem desaparecer antes mesmo de seu valor ser reconhecido, o que torna ainda mais urgente aumentar os investimentos nesta área.

A produção de fitoterápicos a partir de plantas nativas é fundamental e constitui a principal estratégia para proteção e valorização da flora brasileira (Brandão et al., 2006a). Desse modo, as pesquisas por novos produtos oriundos da vegetação do Brasil é uma oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio, minimizando a dependência nacional no setor farmacêutico.

Em meio as plantas brasileiras utilizadas na medicina popular está *Stryphnodendron adstringens*, espécie característica do bioma cerrado. O barbatimão está presente desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira e vem sendo estudada ao longo dos anos por apresentar potencial farmacológico bem diversificado, tais como efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes, antimicrobianos, entre outros.

O objetivo do trabalho foi dar continuidade ao estudo fitoquímico da espécie *S. adstringens* por meio de diferentes técnicas cromatográficas. Os estudos químicos desta espécie são de extrema importância, pois podem promover maiores conhecimentos relativos à caracterização da espécie bem como possibilitar a ampliação da utilização da mesma.

Este trabalho está dividido da seguinte forma:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Capítulo 2 – Artigo intitulado: New Flavan-3-ol and prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*

Capítulo 3 – Discussão geral

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo o isolamento e a identificação estrutural de polifenóis da fração solúvel em acetato de etila, obtida a partir do extrato das cascas secas de *Stryphnodendron adstringens*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar substâncias da fração semipurificada acetato de etila por diferentes métodos cromatográficos, tais como cromatografia em coluna (CC), cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Identificar estruturalmente as substâncias isoladas por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo consiste em uma revisão bibliográfica de *Stryphnodendron adstringens*, a qual abordará aspectos relacionados ao gênero e a espécie, bem como seus aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ASPECTOS GERAIS

1.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas, depois de Orchidaceae e Poaceae, compreendendo 727 gêneros e aproximadamente 19.327 espécies (Lewis et al., 2005). Segundo Agares et al. (1994), nessa família encontram-se vegetais de interesse em quase todos os campos de aplicação. De acordo com Judd et al. (2002) é a segunda família em importância econômica e agrícola, sendo precedida apenas pelas Poaceae. No Brasil, são encontrados cerca de 212 gêneros e 2.729 espécies, dentre estas 1.462 endêmicas que crescem em regiões do cerrado e campos abertos (Vaz et al., 2013).

No sistema de classificação APG II (2003) a família é tratada como Fabaceae, no entanto, o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (2006) aceita o nome Leguminosae.

A família apresenta uma ampla distribuição ao redor do mundo, estando presente tanto em florestas tropicais quanto em desertos, planícies e regiões alpinas (Doyle & Luckow 2003). Esta variação de hábitos faz com que possamos encontrar desde ervas efêmeras, passando por plantas aquáticas até árvores de grande porte (Lewis et al. 2005).

Além do grande número e disseminação de suas espécies, a riqueza desta família inclui seu potencial alimentício, medicinal, madeireiro, ornamental, produtor de fibras, óleo e combustível, na agricultura e na indústria química (Wojciechowski et al. 2004).

Parte das espécies pertencentes a esta família possui uma característica em comum, que é a presença de nódulos nas raízes contendo bactérias do gênero *Rhizobium*. Estas bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o em outros compostos nitrogenados (Wink et al. 2003).

Uma grande variedade de metabólitos secundários foi estudada em plantas da família Fabaceae, tais como alcaloides, aminoácidos não proteicos, aminas, fenilpropanoides, flavonoides, iso-flavonoides, cumarinas, antraquinonas, di-, sesqui- e triterpenos (Wink et al. 2003).

Alguns autores dividem esta família em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Hutchinson, 1967; Polhill et al., 1981; Heywood, 1993). No entanto, outros autores dividem o grupo em três famílias distintas: Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae (Cronquist, 1988; Dahlgren, 1983).

Plantas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Esta subfamília compreende cerca de 80 gêneros e 3.270 espécies de árvores e arbustos (Khelladi et al., 2010). No Brasil, destacam-se as espécies dos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron*, sendo muitas delas de importante valor medicinal (Barroso, 1984).

1.1.2 Gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* pertence a família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, ordem Fabales. Possui cerca de 30 espécies distribuídas na América do Sul e uma na América Central, sendo o Brasil o país que abriga o maior número de espécies (Luckow, 2005). No Brasil, este gênero distribui-se em diversos tipos de vegetação, principalmente no Cerrado e na Amazônia. São encontradas desde espécies anãs prostradas com cerca de 50 cm de altura a grandes árvores com 35 a 40 m (Occhioni, 1990).

De acordo com Corrêa (1978), as atividades farmacológicas do gênero *Stryphnodendron* são diretamente relacionadas com os teores de taninos presentes nas casca do vegetal, que podem variar entre 20% a 50% dos compostos presentes na planta. A capacidade de precipitar proteínas, especialmente aquelas encontradas na cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente dos taninos, possibilitando seu fácil reconhecimento (Costa, 2009).

Tursch et al. (1963) isolaram do extrato etanólico dos frutos de *S. coriaceum* Benth. duas sapogeninas, denominadas 1 e 2. Sapogeninas homólogas (3 e 4) foram isoladas posteriormente da mesma espécie (Tursch et al. 1966).

Uma galactomanana foi isolada dos frutos de *S. barbatimam* Mart. (Reicher et al. 1992) e das cascas de *S. obovatum* Benth. foram isolados flavan-3-óis, prodelfinidinas e prorobinetidinas (Sanches et al. 2005; Zocoler et al., 2005). Em 2009, Lopes et al. isolaram profisinetidinas e prorobinetidina na espécie *S. polyphyllum* Mart.

A partir das casca de *S. adstringens* (Mart.) Coville prodelfinidinas e prorobinetidinas foram isolados (Mello et al., 1996a; 1996b; 1999). Das folhas desta mesma espécie, Pereira et al. (2002) isolaram e identificaram ácido oleanóico, quercetina, β -sitosterol, β -amirina e triterpenos pentacíclicos.

Santos et al. (2002) compararam três diferentes espécies (*S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *Dimorphandra mollis* Benth.) conhecidas como barbatimão quanto sua composição de taninos por métodos cromatográficos e colorimétricos. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os gêneros *Stryphnodendron* e *Dimorphandra*, bem como entre as espécies do gênero *Stryphnodendron*. No estudo, verificou-se que os taninos condensados do gênero *Stryphnodendron* são formados por unidade de prodelfinidinas (galocatequina e epigalocatequina) e que a espécie *S. polyphyllum* possui maior quantidade de ácido gálico esterificado em sua estrutura se comparado a *S. adstringens*.

Seis novos triterpenos glicosilados com esqueleto oleano foram isolados do pericarpo de *S. fissuratum* Mart. (Yokosuka et al., 2008). Em um trabalho posterior, este grupo isolou da mesma espécie sete novos triterpenos glicosilados com esqueleto tipo lupano (Yosuka et al., 2011).

Em um estudo anatômico comparativo das cascas e folhas de *S. adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, Sanches et al. (2007) demonstraram haver diferenças significativas nas características macroscópicas dos folíolos entre as três espécies de barbatimão. *S. polyphyllum* apresentou grande quantidade de tricomas em ambas as faces dos folíolos, enquanto *S. adstringens* demonstrou folíolo maior se comparado às outras duas espécies. Em relação a anatomia das cascas, as três espécies estudadas apresentaram-se semelhantes e portanto não permitiram a diferenciação das mesmas por este tipo de análise.

Várias são as atividades farmacológicas do gênero *Stryphnodendron* utilizadas na medicina tradicional. Extratos da casca de *S. polyphyllum* e *S. obovatum* são utilizados pela população como agentes antissépticos, anti-inflamatórios e cicatrizantes (Lopes et al., 2005).

Estudos mostraram a eficácia do extrato da casca de *S. polyphyllum* contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Bezerra et al., 2002).

Lopes et al. (2005) demonstraram as atividades cicatrizantes, antioxidante e antibacteriana da espécie *S. obovatum*. Feridas cutâneas em ratos Wistar foram tratadas com pomadas contendo 2,5% do extrato bruto (EB) de *S. obovatum* ou 2,5% da fração acetato de etila (FAE) obtida do EB. Foi observado crescimento das células da epiderme em ambos tratamentos. Além disso, a concentração inibitória mínima (CIM) frente a *S. aureus* foi de 250 µg/mL e no ensaio antioxidante com DPPH em placa de cromatografia em camada delgada, tanto o EB quanto a FAE protegeram a descoloração do radical DPPH já em 0,032 µg/mL.

Neste mesmo estudo a espécie *S. polyphyllum* também demonstrou atividade cicatrizante no tratamento com os dois tipos de pomada. Além disso, foi confirmada capacidade antioxidante e antimicrobiana sobre *S. aureus* com uma CIM de 125 µg/mL (Lopes et al., 2005).

Zocoler et al., (2009) verificaram a capacidade antioxidante do extrato bruto (EB), da fração acetato de etila (FAE) e de substâncias isoladas das cascas de *S. obovatum* pelos métodos do radical livre DPPH e de formação do complexo fosfomolibdênio. Tanto o EB, quanto a FAE e as substâncias isoladas demonstraram maior atividade que os controles utilizados no estudo (Trolox e vitamina C).

A atividade antitirozinase do extrato das cascas de *Stryphnodendron barbatimao* foi avaliada *in vitro*. No estudo, os autores demonstraram uma redução de 90% na atividade da enzima (Baurin et al., 2002).

A ingestão das favas de *S. obovatum* provocou abortos em vacas, além de outros efeitos observados em decorrência da intoxicação (Tokarnia et al., 1998). A fim de se caracterizar o quadro clínico causado, Brito et al. (2001), demonstraram em um estudo que a administração das favas em dose única não causou manifestações sintomatológicas, mas em

doses repetidas causaram adoecimento e até morte dos animais. Intoxicação em animais após a ingestão de favas de *S. fissuratum* também foi relatada por Ferreira et al. (2009).

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

Extratos hidroalcoólicos e aquosos das cascas e das folhas de *S. rotundifolium* Mart. foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidante. Os resultados obtidos foram satisfatórios e os autores sugeriram que a espécie poderia ser efetiva na prevenção de doenças causadas por *stress* oxidativo (Costa et al., 2012).

1.1.3 *Stryphnodendron adstringens*

Stryphnodendron adstringens é popularmente conhecido como barbatimão, podendo também ser chamado pelos nomes populares de barba-de-timão, ibatimó, uabatimão, árvore que aperta, choranzinho-roxo, casca da virgindade ou da mocidade. A palavra *Stryphnodendron* é originada do grego e significa Stryphnós (duro), déndron (árvore), deste modo passando-se a ideia de lenho duro (Panizza et al., 1988).

A espécie apresenta como sinônimos: *Acacia adstringens* Mart., *Mimosa barbadetiman* Vell., *Mimosa virginalis* Koster, *Stryphnodendron barbadetiman* Mart. e *Stryphnodendron barbatimao* Mart. (Occhioni Martins, 1990).

O *S. adstringens* é uma planta arbórea, de porte pequeno, tortuosa, inerte, de casca rugosa com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na superfície interna, com pouca folhagem e de crescimento muito lento. As folhas são alternas, duplicado-pinadas, grandes, com aproximadamente 30 cm de comprimento. Os folíolos são alternos, glabros, subcoriáceos, orbiculares, com ápice retuso e base assimétrica. As flores são numerosas, pequenas, esbranquiçadas, dispostas em espigas densas, axilares e medem aproximadamente 10 cm de comprimento. Os frutos são do tipo legumes sésseis, possuindo sementes ligeiramente achatadas e de coloração castanho-claro. As folhas são caducas, permanecendo a árvore despida nos meses de junho e julho, voltando a brotar no mês de agosto. A floração inicia-se em setembro e a frutificação em novembro (Ferri, 1969; Corrêa, 1978) (Figura 1).

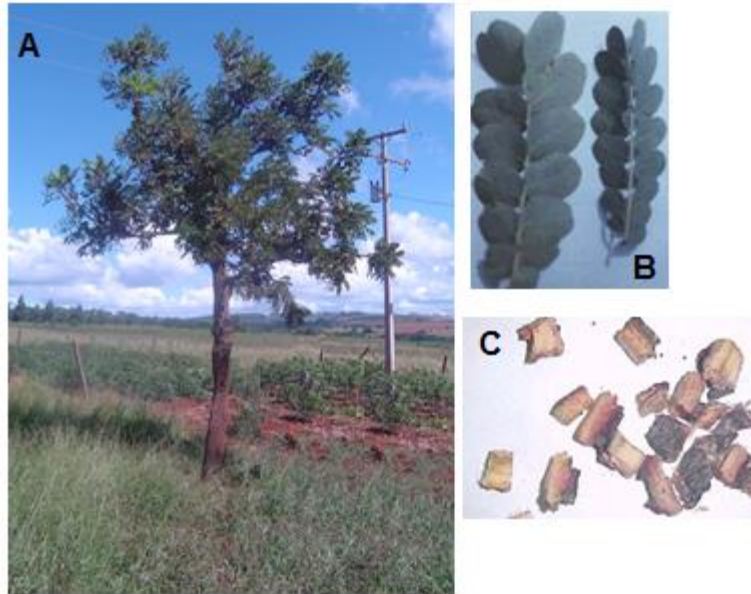


Figura 1 - (A) *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville; (B) Folíolos; (C) cascas picadas.
FOTOS: MARCO ANTONIO COSTA, 2007.

No Brasil, o histórico do uso desta planta na medicina tradicional é bastante amplo. *S. adstringens* foi descrito no século XIX por naturalistas europeus que percorreram diversas regiões do país, sendo a segunda espécie mais mencionada por eles. De acordo com seis naturalistas, o barbatimão era comumente usado como adstringente, antidiarreico, no tratamento de úlceras e leucorreia (Brandão et al., 2006; Brandão et al., 2008). Muitas das atividades sugeridas têm sido confirmadas por pesquisas científicas.

Assim, *S. adstringens* foi descrito já na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, que data de 1929, permanecendo até a última edição, publicada em 2010 (Farmacopeia Brasileira 5 edição). De acordo com a monografia desta espécie, a droga vegetal é constituída pelas cascas secas da árvore, contendo no mínimo 8% de taninos totais, expressos em pirogalol.

Vários fatores edáficos podem alterar a produção de taninos no barbatimão. Santos et al. (2006) coletaram mensalmente durante um ano cascas de *S. adstringens* e correlacionaram o teor de taninos com as condições climáticas do período da coleta (precipitação, umidade e temperatura média). Assim, verificou-se que o teor deste metabólito secundário é maior nas estações quentes e chuvosas, sendo a máxima produção encontrada no período de florescência (mês de outubro). Os autores justificaram o resultado alegando que com o clima quente e úmido há um aumento na proliferação de insetos e micro-organismos patogênicos e isso faz com que a planta aumente sua defesa por meio da produção de taninos. Em um outro estudo, Jacobson et al. (2005) também verificaram que a época mais propícia para coleta, ou seja, para obtenção de uma melhor matéria-prima quanto aos teores de taninos nas cascas de *S. adstringens* ocorria em épocas chuvosas.

O uso disseminado desta espécie pela população pode ser evidenciado por estudos como o levantamento etnobotânico realizado nas comunidades do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e na cidade de Alto Paraíso (GO). *S. adstringens* estava entre as 10 plantas medicinais mais utilizadas pela população, sendo indicada por todos entrevistados (Souza; Felfili, 2006). Um outro estudo realizado com as comunidades tradicionais do estado do Mato Grosso demonstrou o uso difundido das cascas do barbatimão pela população em tratamento de doenças de pele (Macedo; Ferreira, 2004).

No mercado brasileiro existe uma especialidade farmacêutica registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) produzida com o barbatimão. Trata-se da pomada FITOSCAR®, produzida pela empresa Apsen Farmacêutica, indicada como agente cicatrizante em vários tipos de lesão (<http://www.apsen.com.br>).

Além disso, a espécie *S. adstringens* está inscrita na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus), o que demonstra o interesse do Ministério da Saúde pela planta, devido o seu potencial terapêutico e a necessidade de se orientar pesquisas com a espécie, a fim de se avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS.

Um estudo foi realizado por Corrêa em 2012 para analisar a variação geográfica de *S. adstringens* coletado em diferentes regiões dos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo. O diâmetro médio do tronco das árvores foi de 17,2 cm, sendo que as cascas correspondiam a 12% desse valor. O tamanho dos frutos variou de 9 a 14 cm. Foram observados ataque de insetos nas semente, o que comprometeu, em muitos casos, sua qualidade das sementes. O trabalho ainda constatou que 46% das árvores estudadas já haviam sido submetidas à extração das cascas, o que ocasionou sérias injúrias aos troncos das plantas. Este fato afetou a força e a resistência das árvores, indicando que a proteção da espécie se faz necessária (Corrêa et al., 2012).

Mello et al. (1993; 1996a; 1996b) isolaram e identificaram, por meio de métodos cromatográficos e espectroscópicos, de uma fração acetato de etila do extrato acetona:água (7:3; v/v) das cascas secas do barbatimão, monômeros básicos de taninos condensados (denominados flavan-3-óis), prodelfinidinas e prorobinetinidinas.

A separação de flavan-3-óis (Figura 2, Tabela 1) foi realizada por meio da utilização de cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20, cromatografia em contra-corrente multicamada (CCMC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa em fase reversa C18 e cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (Mello et al., 1993, 1996a, 1996b, 1997).

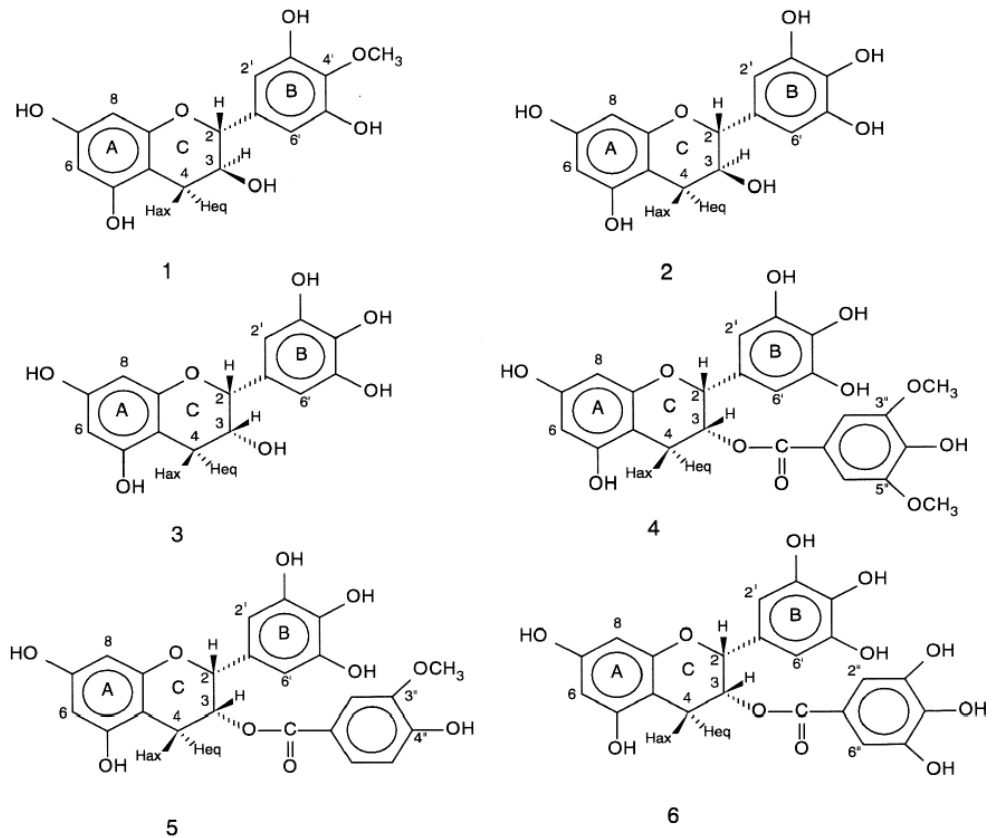


Figura 2 - Estruturas dos flavan-3-óis isolados da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Tabela 1 - Flavan-3-óis isolados da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Substância	Estrutura
4'-O-Metil-galocatequina	1
Galocatequina	2
Epigalocatequina	3
Epigalocatequina-3-O-(3,5-dimetil)-galato	4
Epigalocatequina-3-O-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato	5
Epigalocatequina-3-O-galato	6

As prodelfinidinas (Figura 3, Tabela 2) são classificadas como proantocianidinas do tipo 1, devido a presença de hidroxila na posição C-5 do anel A, e foram isoladas por meio de CC em Sephadex LH-20 e CCMC, CLAE em fase reversa C18 e CCD preparativa (Mello et al., 1996a e 1997).

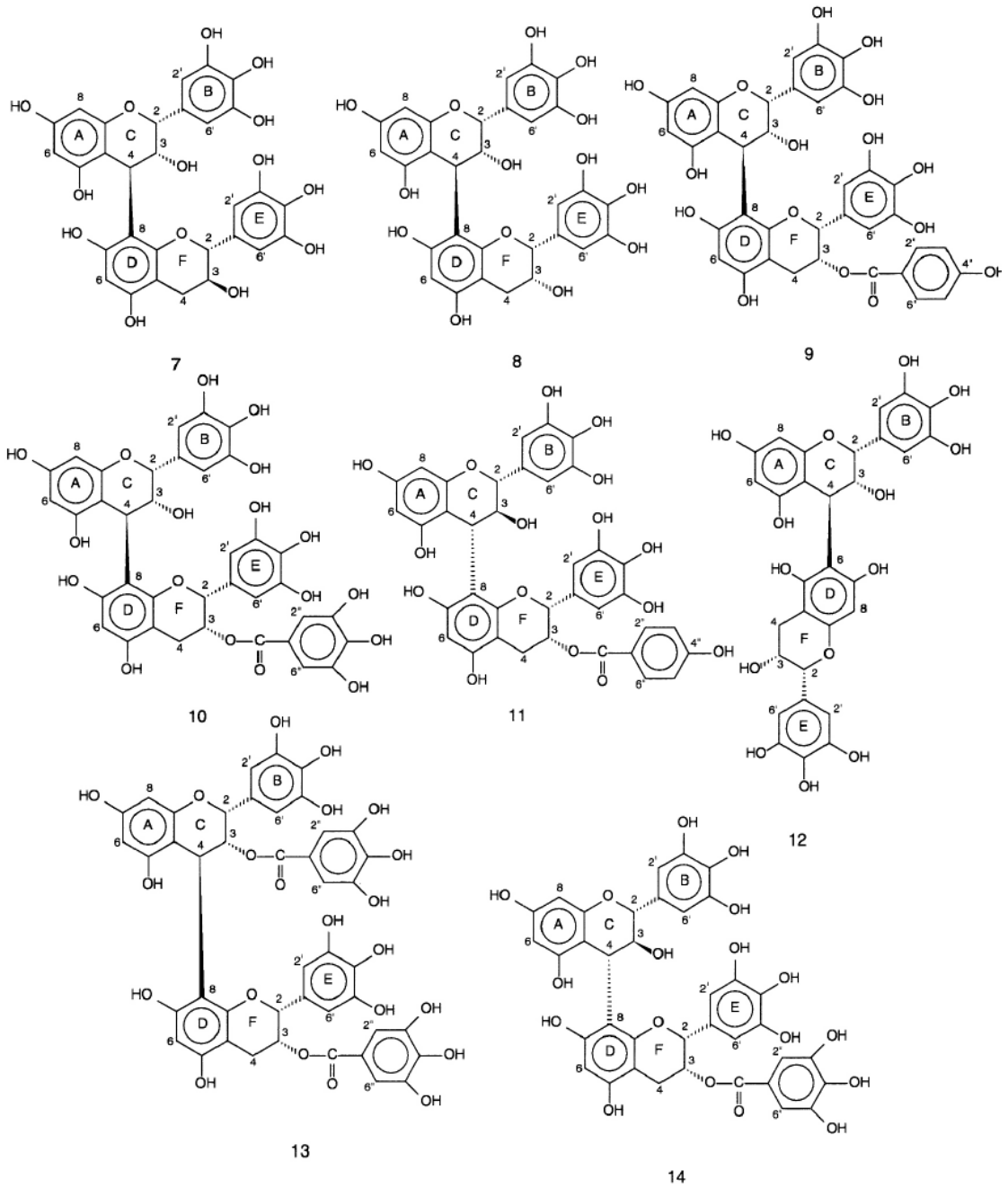


Figura 3 - Prodelfinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Tabela 2 - Prodelfinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Substância	Estrutura
Epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina	7
Epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina	8
Epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidroxi)-benzoato	9
Epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato	10
Galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidroxi)-benzoato	11
Epigalocatequina-(4 β →6)-epigalocatequina	12
Epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato	13
Galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-galato	14

Uma proantocianidina, 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (Figura 4), um raro derivado 4'-metóxi de prodelfinidina, foi isolada a partir das cascas de *S. adstringens*. A fração solúvel em acetato de etila do extrato acetona:água (7:3; v/v) das cascas secas da planta foi cromatografada em CC em Sephadex LH-20, seguida de CCMC (Mello et al., 1999).

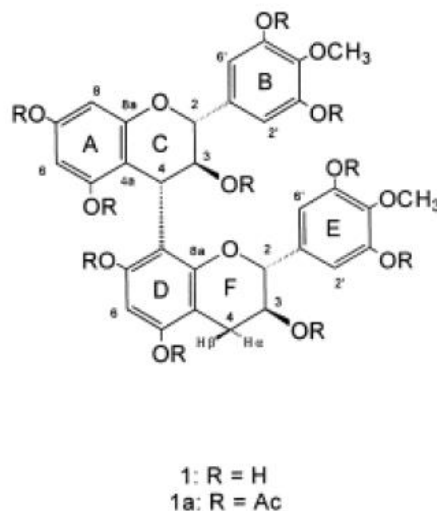


Figura 4 - Prodelfinidina dimérica isolada da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Já na separação de prorobinetidinas (Figura 5, Tabela 3), foi utilizada cromatografia em Sephadex LH-20, cromatografia em contra-corrente multi-camada (CCMC) e CLAE em fase reversa C18 (Mello et al., 1996b e 1997). As prorobinetinidinas formam um grupo raro de taninos condensados e são classificadas como proantocianidinas do tipo 2, devido a ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A.

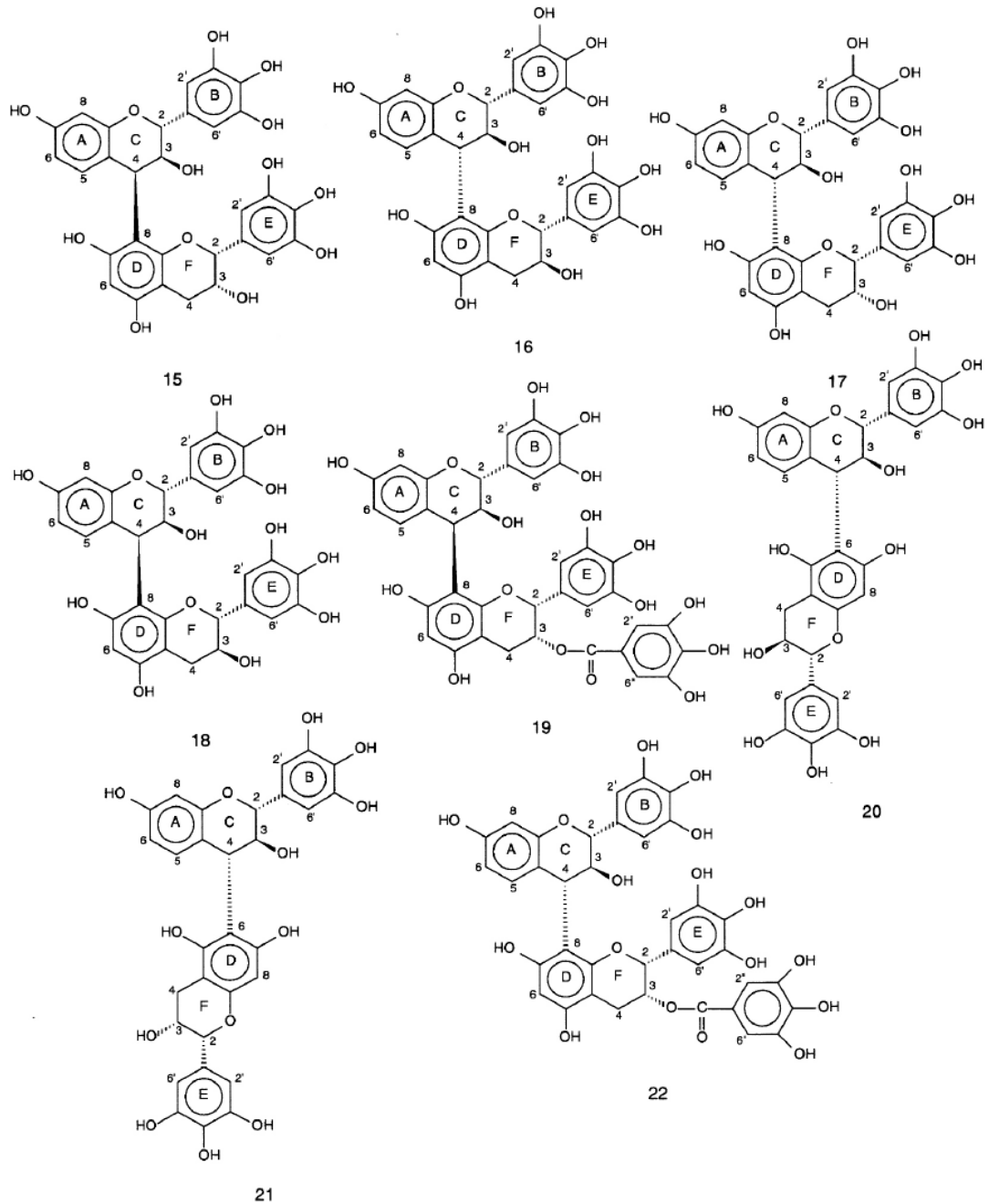


Figura 5 – Prorobinetidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Tabela 3 - Prorobinetidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de *S. adstringens*.

Substância	Estrutura
Robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina	15
Robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina	16
Robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina	17
Robinetinidol-(4 β →8)-galocatequina	18
Robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato	19
Robinetinidol-(4 α →6)-galocatequina	20
Robinetinidol-(4 α →6)-epigalocatequina	21
Robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina-3-O-galato	22

Lopes et al. (2009) isolaram e identificaram duas substâncias inéditas em *S. adstringens*, sendo denominadas 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina (Figura 6).

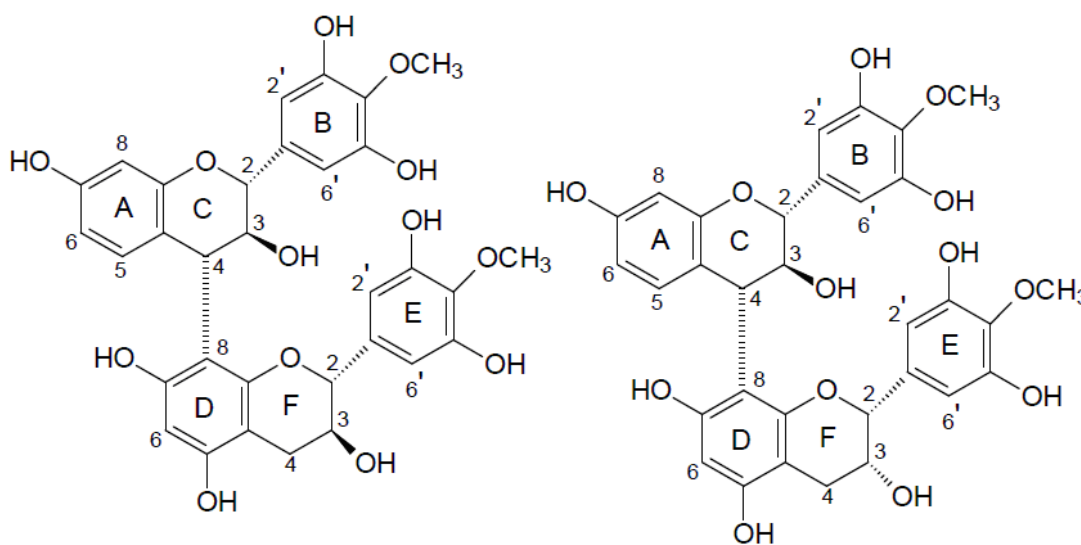


Figura 6 - Dímeros isolados das cascas de *S. adstringens*.

Inúmeros trabalhos já foram realizados a fim de se verificar as propriedades medicinais de *S. adstringens* e identificar as substâncias responsáveis por tais efeitos. Os taninos têm sido apontados como possíveis responsáveis pelas propriedades apresentadas pela planta, pois exercem diversas atividades biológicas como antisséptica, antimicrobiana anti-hemorrágica, antidiarreica, cicatrizante e anti-inflamatória (Santos et al., 2002; Rebecca et al., 2003; Ishida et al., 2006).

As cascas de *S. adstringens* apresentam atividade cicatrizante (Vieira et al., 1998), anti-inflamatória (Lima et al., 1998), antiulcerogênica (Audi et al., 1999), antiprotozoária e anti-

helmíntica (Herzog-Soares et al., 2002; Bezerra et al., 2002; Holetz et al., 2005), antimicrobiana (Toledo, 2002; Audi et al., 2004), além de antiviral e antifúngica (Felipe et al., 2006; Ishida et al., 2006; Ishida et al., 2009).

Cicatrizante

A ação cicatrizante de *S. adstringens* foi confirmada em um estudo realizado com medicamento, na forma de pomada, contendo 1% da fração acetato de etila obtida da casca da planta. Foi avaliada a atividade cicatrizante em feridas excisionais na pele de ratos após 4, 7 e 10 dias de tratamento tópico. As feridas tratadas com barbatimão apresentaram um maior número de mitoses se comparadas a aquelas tratadas com a pomada base, ou seja, sem a fração. Além disso, houve estímulo da proliferação epitelial. Os autores sugeriram que as proantocianidinas presentes na fração são as responsáveis pelos efeitos observados na epiderme (Hernandes et al., 2010).

Coelho et al. (2010) avaliaram a atividade cicatrizante de uma pomada contendo 10% do extrato aquoso das cascas do barbatimão. Após 14 dias de tratamento, as feridas já estavam completamente cicatrizadas, sendo que não foram observadas presença de secreção purulenta. A análise histológica mostrou epitelização completa após o período e o grupo tratado com a pomada apresentou quantidades acentuadas de fibroblastos e colágeno se comparado ao grupo controle (grupo tratado com salina).

Um outro estudo foi conduzido para avaliar a cicatrização de úlceras de decúbito por meio de tratamento durante 6 meses com pomada contendo 3% do fitocomplexo fenólico do barbatimão. Durante o estudo, 100% das lesões tratadas com o medicamento cicatrizaram completamente (Minatel, et al., 2010). Em um trabalho realizado anteriormente, Vieira et al. (1998) já haviam demonstrado que a pomada contendo 1% do extrato bruto do barbatimão acelerou o processo de cicatrização de feridas no dorso dos ratos, quanto comparada a pomada Nebacetin.

Anti-inflamatória

Lima e colaboradores (1998) testaram a atividade anti-inflamatória da fração acetônica do extrato bruto do barbatimão, utilizando ratos em modelos de inflamação aguda e crônica. O extrato mostrou-se eficaz em diminuir o edema de pata induzido pela carragenina e dextrana e teve efeito significativo na redução do exsudato e na migração dos leucócitos em análise pleural de ratos. A ação antiedema foi comparável a produzida pelas drogas de referência empregadas nos experimentos.

Antiulcerativo

Trabalho realizado por Audi et al., (1999) estudou a ação antiulcerativa de *S. adstringens* em três modelos experimentais em ratos, empregando diferentes mecanismos de ulcerogênese. Os resultados mostraram que o extrato bruto, bem como suas frações, tiveram efeito antiulcerogênico na lesão gástrica induzida pelo estresse agudo e etanol-acidificado, quando comparados a droga de referência (cimetidina). A efetividade do barbatimão no tratamento de úlceras foi confirmada em estudo realizado por Martins et. al (2002).

Antiprotozoário

A atividade antiprotozoária do extrato das cascas do barbatimão em *Trypanossoma cruzi* foi avaliada por Herzog-Soares et al. (2002) e confirmada por Luize et al. (2005). Holetz et al. (2005) utilizaram o protozoário não-patogênico *Herpetomonas samuelpessoai*, pertencente a família Trypanosomatidae, a mesma família do protozoário *T. cruzi*, como modelo para testar a ação do extrato bruto do barbatimão contra protozoários patogênicos. Os resultados demonstraram um efeito inibitório no crescimento do *H. samuelpessoai*, com decréscimo da atividade enzimática relacionada ao seu metabolismo.

Além disso, outro protozoário, *Leishmania (L.) amazonensis*, causador da leishmaniose, foi testado com o extrato da planta. Toledo (2002) demonstrou atividade de *S. adstringens* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com inibição total do crescimento das mesmas.

Antimicrobiano

Audi et al. (2004) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos acetônicos e semipurificados das cascas de *S. adstringens*. Houve inibição do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e resistência para a *Echerichia coli*. Santos et al. (2009) constataram a suscetibilidade dos micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* frente ao extrato aquoso do barbatimão. Em um estudo de bioprospecção, extratos das cascas desta espécie demonstraram atividade frente a *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Souza et al. 2007b).

A ação antibacteriana do extrato seco e a atividade antisséptica do sabonete líquido contendo o extrato seco foram avaliadas frente as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, pelo método de difusão em ágar. A concentração bactericida mínima encontrada para o extrato foi de 50 mg/mL contra *S. aureus* e 75 mg/mL frente *S. epidermidis* e *E. coli*. O sabonete mostrou maior eficiência antisséptica contra as bactérias na concentração de 100 mg de extrato/mL de sabonete (Souza et al., 2007a).

Toledo (2002) demonstrou alta atividade antimicrobiana do extrato acetona:água (7:3; v/v) da casca desta planta, bem como das diferentes subfrações do extrato. Houve inibição do crescimento das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, sendo que a concentração inibitória mínima encontrada foi abaixo de 1000 µg/mL. Neste mesmo trabalho, testaram-se taninos condensados derivados de galocatequina e epigalocatequina, porém estes não apresentaram atividade antimicrobiana quanto testados isoladamente.

Testes *in vitro* de *S. adstringens* contra micro-organismos patogênicos da cavidade oral foram realizados com extratos das cascas do barbatimão frente a *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pelos testes de difusão em ágar e de microdiluição. Todos os micro-organismos foram susceptíveis aos extratos e, segundo os autores, esses extratos podem ser uma terapia alternativa frente a doenças da cavidade oral, como cáries e periodontites (Gomes, et al., 2009; Pereira et al., 2011). Em um outro estudo, Soares et al. (2008) avaliaram a atividade antibacteriana do barbatimão sobre micro-organismos da cárie dental. O extrato hidroalcoólico da planta foi ativo frente à *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei* no método de diluição em caldo, podendo assim ser considerado um adjuvante em tratamentos odontológicos.

A ação do extrato metanólico de *S. adstringens* foi verificada sobre o crescimento dos fungos patogênicos *Fusarium oxysporum* e *Cladosporium sphaerospermum*. O extrato foi incorporado ao meio de cultura e a inibição do crescimento dos fungos foi observada, sendo a maior sensibilidade ao extrato encontrada em *Fusarium oxysporum* (Silva et al., 2010). Além disso, Oliveira et al. (2007) demonstraram a ação do extrato hidroalcoólico das cascas do barbatimão frente a bactéria causadora da tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*.

Ishida et al. (2006) testaram uma subfração (F2.4) do extrato bruto das cascas do barbatimão contra cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Candida* sp. presentes no fluido vaginal de mulheres sem histórico de imunodeficiência e contra duas cepas padronizadas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os resultados mostraram-se melhores nas concentrações acima de 7,8 mg/L, resultado comparável ao da droga de referência (nistatina). A ação antifúngica foi atribuída aos taninos condensados que, de acordo com os autores, afetaram a integridade das células das leveduras. Os autores também demonstraram ações nos fatores de virulência do fungo, como inibição da aderência a células Vero e superfície inerte (vidro), bem como o aumento da fagocitose. Esta mesma fração foi testada frente ao *Cryptococcus neoformans*, uma levedura que causa enfermidade em pacientes imunocomprometidos, em um outro estudo realizado por Ishida et al. (2009). Os resultados mostraram que, assim como para os fungos do gênero *Candida*, o barbatimão foi efetivo contra *C. neoformans*, interferindo na homeostase celular e no crescimento das leveduras, além de interferir na formação da cápsula de polissacarídeo.

Em 2009, Silva et al. avaliaram o potencial antifúngico de plantas do cerrado brasileiro contra espécies *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. Comparado a outros estudos, como os de Ishida (2006), foi verificada baixa atividade do extrato de barbatimão frente a *C. albicans*. Este resultado foi atribuído às diferenças de concentração da droga vegetal, ao solvente e as partes da planta utilizadas, bem como a idade do vegetal e a época da coleta das espécies.

Antiviral

As atividades antivirais contra o polivírus 1 (P-1) e contra o herpes bovino (BHV-1) foram estudados por Felipe et al. (2006) utilizando o extrato bruto das cascas da espécie, bem como suas frações aquosa e alcoólica. A fração aquosa foi a mais efetiva, inibindo 97% das amostras de BHV-1 e 93% das amostras de P-1. Assim, os autores concluíram que as substâncias testadas foram eficazes contra os vírus, mas ainda há dúvidas quanto aos componentes antivirais.

Outras atividades avaliadas

O extrato etanólico das cascas do barbatimão apresentou 95% de taxa de inibição da tirosinase, enzima chave na produção da melanina. Assim, esta planta pode ser estudada visando-se o tratamento de desordens dermatológicas (Souza et al., 2012a).

Melo et al. (2007) demonstraram o efeito antinociceptivo evidente do extrato bruto e das frações semipurificadas do barbatimão nos modelos experimentais de contorção induzida por ácido acético e dor induzida pela formalina.

Em um estudo realizado por Vicente et al. (2009), um creme contendo 6% do extrato bruto das cascas de *S. adstringens* foi eficaz no tratamento tópico para inibir o crescimento de pelos.

Souza et al. (2012b) estudaram a atividade inibitória do extrato das cascas do barbatimão frente às enzimas α -amilase e β -glucosidase, responsáveis pela hidrólise de carboidratos. A inibição dessas enzimas é importante no tratamento do diabetes mellitus por possibilitar a redução dos níveis de glicemia pós-prandial do indivíduo. O extrato etanólico da planta apresentou resultados significativos se comparados aos das substâncias de referência, com um IC₅₀ de 1,86 μ g/mL para α -amilase e 0,61 μ g/mL para β -glucosidase.

O extrato das cascas de *S. adstringens* foi testado no combate a cercária, forma infectante do *Schistosoma mansoni* em mamíferos, causador da esquistossomose. Após uma hora de exposição à concentração de 100 e 200 ppm do extrato, as cercárias apresentaram taxa de mortalidade de 100%. Na concentração de 50 ppm essa taxa foi de 75% e para 20 ppm a taxa de mortalidade foi 50% (Vinald et al., 2005).

Extratos das cascas e das folhas do barbatimão foram testados contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. O extrato demonstrou alta toxicidade ao matar 100% dos moluscos na concentração de 100 ppm e 60% em 50 ppm (Bezerra et al., 2002).

Paula et al. (2010) avaliaram a ação de extratos vegetais sobre a inibição das atividades biológicas do veneno de *Lachesis muta*, conhecida popularmente como surucucu. O extrato de *Stryphnodendron adstringens* foi o único que neutralizou todos os efeitos causados pelo veneno (hemolítico, coagulante, proteolítico e hemorrágico). Em 2009, Lucena et al. desenvolveram e verificaram a capacidade de uma formulação contendo extratos das cascas do barbatimão em neutralizar os efeitos locais induzidos pela peçonha de *Brothrops pauloensis*. Os resultados demonstraram que a formulação se apresentou estável e foi capaz de inibir os efeitos hemorrágicos e a mitotoxicidade induzida pela substância tóxica do animal.

Foi estudado o efeito do extrato bruto do barbatimão no metabolismo de energia hepático de ratos. Rebecca et al. (2003) observaram que o extrato prejudicou a fosforilação oxidativa, processo que promove liberação de energia na forma de ATP, por no mínimo três mecanismos.

Um estudo avaliou as propriedades antígeno-tóxicas e antioxidantes de extratos obtidos a partir das folhas do barbatimão. Os resultados demonstraram que os extratos inibiram a lesão do DNA, causada pela ciclofosfamida, diminuindo a formação de micronúcleos. Além disso, a atividade antioxidante foi confirmada pelo ensaio do DPPH. Assim, os autores ressaltaram os efeitos benéficos do barbatimão como agente anticarcinogênico (Filho et al., 2011).

O efeito do extrato metanólico da espécie foi avaliado no ciclo estral de ratas. No estudo, verificou-se que 100% das ratas tratadas ciclaram normalmente, demonstrando que o extrato não alterou o ciclo estral das ratas em nenhuma dose testada (Oliveira; Vanzeler, 2011).

O fator de proteção solar (FPS) em fotoprotetor acrescido com extrato de *S. adstringens* foi avaliado por Munhoz et al. (2012). Neste estudo os autores demonstraram que, de acordo com a metodologia empregada, o extrato não pode ser considerado ativo fotoprotetor, haja vista que a amostra contendo o extrato do barbatimão não aumentou significativamente o FPS se comparado ao controle.

Toxicidade

Rebecca et al. (2002) estudaram a toxicidade aguda do extrato bruto de *S. adstringens* administrado por via oral em camundongos. A DL_{50} encontrada foi de 2.699 mg/kg. A administração crônica, por 30 dias, do extrato bruto nas concentrações de 800 e 1.600 mg/kg

demonstrou efeito tóxico, com diminuição no peso corpóreo, involução do timo, aumento da concentração de glicose plasmática e aspartato aminotransferase.

Costa et al. (2010) analisaram a toxicidade da fração aquosa (F2 - rica em polímeros de proantocianidinas) do extrato bruto de *S. adstringens*. A DL_{50} estimada no tratamento de 14 dias em ratos foi de 3.015 mg/kg. Já em relação à avaliação da mutagenicidade deste extrato, os autores demonstraram que nenhuma dose utilizada no teste de micronúcleo foi genotóxica. Além disso, este mesmo estudo demonstrou o efeito protetor desta fração aquosa frente à ação citotóxica do agente quimioterápico ciclofosfamida. Em um trabalho posterior, Costa et al. (2013) avaliaram a toxicidade crônica dessa mesma fração aquosa. Durante 90 dias ratos Wistar foram tratados com diferentes doses de F2 e, em seguida, foram avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Apesar de alguns valores obtidos terem variado entre o sexo dos animais e a dose de droga administrada, não houve um perfil linear nessas alterações, sendo que todas as variações estavam dentro dos limites considerados normais para a espécie do animal. Assim, conclui-se que nas doses administradas *S. adstringens* não se mostrou tóxico aos roedores. Neste mesmo estudo também foi verificado que a administração da fração aquosa em roedores não acarretou mudança nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, sugerindo que a fração não exerceu alteração neurocomportamental nos animais.

Almeida et al. (2010) estudaram a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico das folhas do barbatimão, administrado por via intraperitoneal em camundongos, e encontraram uma DL_{50} de 0,25 mg/mL. Já Cecílio et al. (2012) avaliaram a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *S. adstringens* em células MA-104. A maior concentração testada que não provocou alterações morfológicas nas células, ou seja, a máxima concentração não-tóxica, foi de 50 µg/mL.

Audi et al. (1999) verificaram que a administração oral do extrato de *S. adstringens* em ratos em concentrações acima de 2.000 mg/kg provocou sinais de toxicidade.

S. adstringens demonstrou efeito abortivo em ratas tratadas com vagens e sementes da espécie (Burger et al., 1999). No entanto, não apresentou genotoxicidade em *Drosophila melanogaster* (Sousa et al., 2003).

Uso industrial

Devido aos altos teores de taninos, *S. adstringens* também é empregado na indústria do couro e na fabricação de tinta de escrever. Assim, o barbatimão possui importância não só para a fitoterapia, mas ainda como fonte de taninos para o abastecimento de curtumes e matéria corante para indústria de tintas (Rizzini; Mors, 1976; Corrêa, 1984).

1.2 ASPECTOS QUÍMICOS

1.2.1 Substâncias fenólicas

Compostos fenólicos compreendem uma ampla variedade de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem frequentemente combinadas com açúcares. Dentre as substâncias fenólicas pertencentes ao metabolismo secundário vegetal, são encontradas diversas estruturas, tais como ácidos fenólicos, ligninas, taninos, derivados da cumarina, entre outros (Harborne, 1998; Carvalho et al., 2004).

Os fenóis têm a capacidade de se complexarem a proteínas por meio de ligações de hidrogênio. Quando as membranas das células vegetais são destruídas e os constituintes celulares se reúnem, como no caso da produção de extratos brutos, ocorre a inibição da atividade enzimática da planta. No entanto, os compostos fenólicos são muito suscetíveis à oxidação enzimática, pois sofrem ação das fenolases, que são enzimas intracelulares (Harborne, 1998).

As substâncias fenólicas colaboram para o sabor, odor e coloração de vários vegetais. Essas características são importantes para sua utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Além disso, a atividade antioxidante desses compostos sugere que doenças causadas por oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de substâncias fenólicas (Carvalho et al., 2004).

Os métodos espectroscópicos são utilizados nas análises de identificação e quantificação de fenóis, já que, sendo aromáticos, apresentam uma intensa absorção na região do UV. O processo clássico para detectar fenóis simples utiliza solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (Harborne, 1998).

1.2.2 Taninos

Taninos são substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas e estão presentes em várias partes dos vegetais, como raízes, cascas, folhas e frutos. São classificados como compostos polifenólicos, apresentando pesos moleculares que variam geralmente entre 500 e 3000 u (Vital et al., 2004). Muitas plantas ricas em taninos são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças como diarreia, hipertensão, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, processos inflamatórios, entre outros. Inicialmente estes compostos foram identificados por sua capacidade de precipitar proteínas e hoje são empregados pelo homem na forma de ervas medicinais, fabricação de bebidas e na indústria de curtume, de tintas e petrolífera (Santos; Mello, 2004).

Os taninos são classificados de acordo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Santos; Mello, 2004).

Os taninos hidrolisáveis são poliésteres de glicose, geralmente β -D-glucose, e são classificados em taninos gálicos e taninos elágicos, dependendo do ácido formado após sua hidrólise (ácido gálico e ácido elágico, respectivamente) (Santos; Mello, 2004).

Os taninos condensados são oligômeros ou polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe também é denominada proantocianidinas ou leucocianidinas devido à sua características de, mediante aquecimento ácido, produzirem pigmentos avermelhados das classes das antocianidinas (Santos; Mello, 2004; Paes et al., 2006). Os taninos condensados são classificados de acordo com o número de hidroxilas presentes nos anéis aromáticos em: procianidinas, prodelfinidinas, properlargonidinas, profisetinidinas, probinetinidinas, proguibourinidinas, proteracacianidinas, promelacacianidina e prodistenidina (Figura 7; Tabela 4) (Ferreira; LI, 2000; Lopes et al., 2009; Cala et al., 2010). Estas diferenças entre os grupos substituintes podem ter um efeito sobre a reatividade dos taninos. Além disso, a hidroxila do carbono 3 (anel C) pode estar esterificada com o ácido gálico e a presença deste éster pode modificar significativamente as propriedades biológicas dos taninos (Schofield, 2001).

As proantocianidinas são geralmente formadas por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4 \rightarrow 6 ou 4 \rightarrow 8 (Figura 8). Em procianidinas e prodelfinidinas os acoplamentos 4 \rightarrow 8 são os mais favorecidos estereoquimicamente. Além daqueles monômeros, outras unidades também podem ser facilmente encontradas nas moléculas de taninos condensados, tais como galocatequina, epigalocatequina, robinetidinol e fisetidinol (Bruyne et al., 1999).

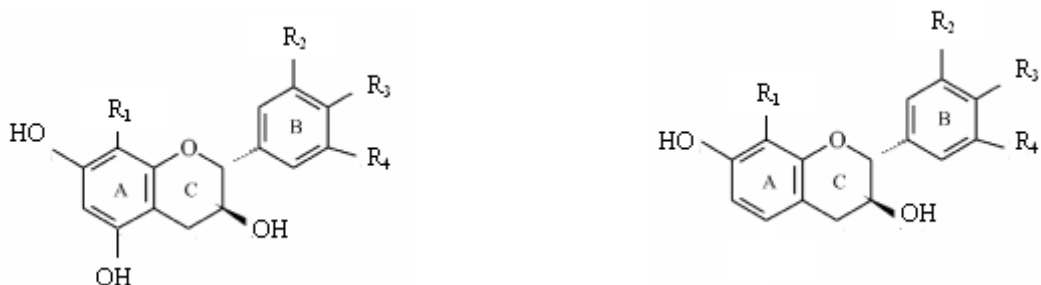


Figura 7 - Monômeros básicos de taninos condensados.

Tabela 4 - Grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensados.

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

Fonte: Mello & Santos, 2004.

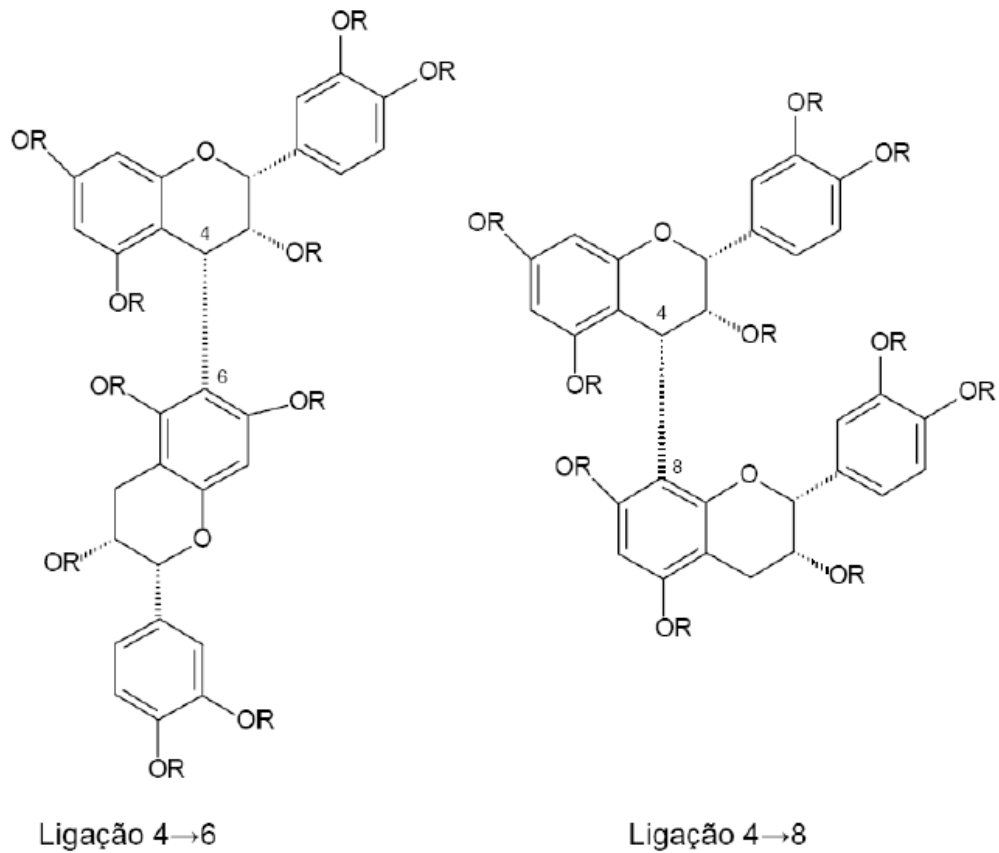


Figura 8 - Estruturas básicas de proantocianidinas.

Taninos condensados e hidrolisáveis distribuem-se no reino vegetal seguindo padrões diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem em Gimnospermas e Angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão praticamente restritos às Choripetalae das Dicotiledôneas (Santos; Mello, 2004).

Acredita-se que as propriedades farmacológicas dos taninos são devidas a pelo menos três características gerais que são comuns, em maior ou menor grau, aos dois grupos, condensados e hidrolisáveis (Haslam, 1996):

1. Complexação com íons metálicos (ferro, alumínio, cálcio, manganês, entre outros);
2. Atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres;
3. Complexação com macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos.

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

As ligações de hidrogênio são responsáveis também pela capacidade que os taninos têm de se complexar com alcaloides. Nesse caso, as ligações de hidrogênio ocorrem entre as metoxilas ligadas ao nitrogênio do alcaloide e os hidrogênios aromáticos dos taninos (Haslam, 1996).

Algumas atividades dos taninos hidrolisáveis e condensados já foram demonstradas, tais como ação bactericida, fungicida (Scalbert, 1991; Sanches et al., 2005), antiviral (Okuda et al., 1993; Felipe et al., 2006), moluscicida (Marston; Hostettmann, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (Hattori et al., 1990; Ooshima et al., 1993), ação antitumoral (Okuda et al., 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (Holetz et al., 2005), atividade cicatrizante (Lopes et al., 2005; Hernandez et al., 2010), atividade de inibição de *Candida albicans* (Ishida et al., 2006) e antinociceptivo (Melo et al., 2007), gastroprotetivo e antitopoisomerase (Sánchez-Burgos et al., 2013). Os taninos também podem formar radicais estáveis ao atuar como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo (Santos; Mello, 2004).

Foi confirmado que os taninos são tóxicos para fungos e bactérias, devido a algumas de suas propriedades, como inibição de enzimas extracelulares e da fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem deprivação de substrato e de ferro. No entanto, alguns microorganismos resistem à ação dos taninos por meio de seus mecanismos de defesa (Scalbert, 1991).

No processo de cura de feridas, inflamações e queimaduras, os taninos formam uma camada protetora sobre o tecido lesado ao se complexar com as proteínas e/ou polissacarídeos. Esse processo ocorre provavelmente de maneira similar na mucosa gástrica (Santos; Mello, 2004).

Os taninos apresentam diferentes solubilidades e sua extração pode ser realizada com diferentes solventes. Geralmente prefere-se usar a mistura água-acetona por ser menos suscetível a reagir com os taninos hidrolisáveis (Schofield et al., 2001).

Diversas técnicas são empregadas para a análise de taninos. Dentre as mais modernas destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizada para a separação desses compostos, sendo possível o uso de colunas de fases normais ou reversas. Com relação à elucidação estrutural dos taninos, tem-se a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas (Schofield et al., 2001), bem como métodos ópticos para determinação da estrutura relativa e absoluta.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

Neste artigo é abordado o isolamento e a identificação de taninos obtidos a partir das cascas de *S. adstringens*. O modelo adotado neste manuscrito foi da revista *Molecules*.

New Flavan-3-ol and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*

Maísa Almeida Leite¹, João Carlos Palazzo de Mello^{1*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mello@uem.br;
Tel.: +55-44-3011-4816; Fax: +55-44-3011-5050.

Abstract

A new methylated flavan-3-ol 4'-O-methylepigallocatechin (**1**) together with prodelphinidins epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-gallocatechin (**7**), gallocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (**9**) and epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (**10**) in *Stryphnodendron adstringens* along with 8 known proanthocyanidins (**2-6, 8, 11, 12**) were isolated from the extract of the stem bark of this plant. Their structures were elucidated by spectroscopic analyses and compared with data found in the literature. Hence, the chemical study of *S. adstringens* is very important to complement the data of morphological studies and provide more information about the species taxonomy.

Keywords: tannins, flavan-3-ol, prodelphinidins, *Stryphnodendron*.

1 Introduction

The genus *Stryphnodendron* Mart. belongs to the family Fabaceae, subfamily Mimosoideae, order Fabales. It has about 30 species distributed in South America and one in Central America. Brazil is the country that has the highest number of species [1]. It can be found since prostrate dwarf species with about 50 cm tall until large trees with 35-40 m, in vegetations like Savannah and Amazon forest [2].

According to Corrêa (1978), the pharmacological activities of the genus *Stryphnodendron* are directly related to their tannin content which ranges from 20% to 50% of the compounds presents in the plant. The barks of this genus are used by people for treatment of various diseases, especially by its antiulcerogenic, antimicrobial potential and as wound healing.

Stryphnodendron was first described by Martius (1837) from three species collected in Brazil, and after more detailed and in two species added by Bentham in 1842. With new collects

of samples in Latin America countries new taxa belonging to this genus were described [4]. It is important to highlight the works of Occhioni-Martins [2, 5, 6, 7, 8, 9, 10], which included synonyms, taxonomic considerations and data about the distributions of species.

The taxonomic relationships in *Stryphnodendron* has been studied in order to find information for better delimitation of its species. Rizzini & Heringer [11] divided the genus into two sections according to the habit of the species: *Stryphnodendron* section *Stryphnodendron*, consisting of the arboreal species, and *Stryphnodendron* section *Eleaneeae*, formed by subshrubs species. Guinet & Caccavari [12] studying the pollen morphology of 27 species of *Stryphnodendron* do not confirmed the hypothesis of Rizzini & Heringer. Scalon [4], in a revision of the genus, recognized nine new species and suggested the union of the species into three groups, morphologically distinct from each other. According to the author, it was observed that *Stryphnodendron* taxa are morphologically different, although sometimes the segregation of species is given by a unique combination of variable characters.

Thus, the study of chemical constituents of the plant is very important to complement the data of morphological studies and then provide more accurate information about plant taxonomy.

Among the species used in Brazilian folk medicine is *S. adstringens* (Mart.) Coville, commonly known as barbatimão. This species is described since the first edition of the Brazilian Pharmacopoeia and has been studied over the years by presenting a pharmacological potential very diversified, such as anti-inflammatory, wound healing, antimicrobial [13, 14, 15, 16, 17], and others.

Considering the economic importance and the pharmacological effects of the species *S. adstringens*, this work aimed to continue the chemical studies about the extract of the bark of this plant. In this paper is reported the isolation and structure elucidation of a new flavan-3-ol (**1**) and prodelphinidins (**7**, **9**, **10**) along with 8 known proanthocyanidins (**2-6**, **8**, **11**, **12**).

2 Results and Discussion

The structure elucidation of proanthocyanidins by nuclear magnetic resonance (NMR) is difficult due the presence of rotameric signals in the spectra. To overcome this problem, the derivatization (acetylation) of the substances is carried out. Thus, these compounds exhibit stable chemical behavior and are shown in NMR with standard signals [18]. Thereby, the comparison with the data obtained in the literature allow elucidate the structures safely.

The NMR spectral profile of compound **1** suggested flavan-3-ol characteristics. The ^1H NMR spectral (CD_3OD) data showed one three-proton singlet at δ 3.80, which indicate a methoxyl group. The position of this group was confirmed at C-4' from a HMBC spectrum. It is possible to observe H-4 (axial and equatorial) as multiplets in δ 2.73 and δ 2.87,

respectively. H-2 showed as pseudo-singlet at δ 4.78 and H-3 as a multiplet at δ 4.19. Because of the small coupling constants of the H-2 and H-3, this indicated a 2,3-*cis* relative configuration [19]. All heterocyclic protons coupling constants could be assigned from the ^1H - ^1H -COSY spectrum. The hydroxylation at B-ring (C-3', C-4', and C-5') is proved by a singlet relative of the chemical shift of H-2' and H-6', due they are chemically equivalent. Besides, the protons H-6 and H-8 showed duplets at δ 5.95 and δ 5.93, respectively. From these results, the compound **1** was determined as 4'-O-methyl-epigallocatechin (Fig. 1). This compound was first isolated by Delle Monache et al. (1967) [20] in the roots of *Ouratea* sp., and it is the first time reported in *Stryphnodendron adstringens*.

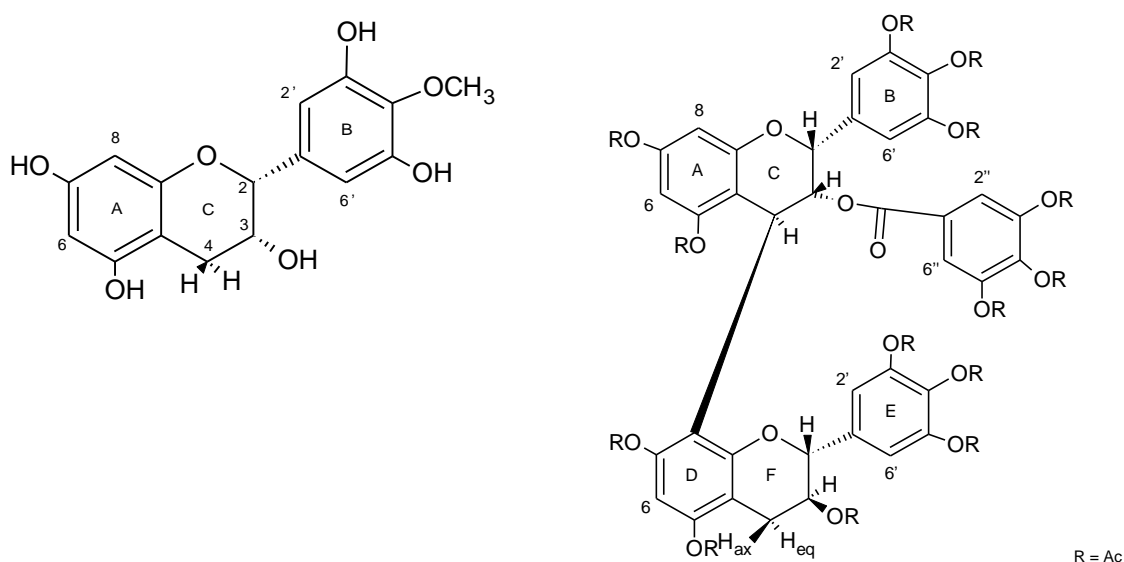
Identification of compound **7** was described by the physical data for the corresponding peracetate (**7a**). All heterocyclic protons could readily be assigned from the ^1H - ^1H COSY spectrum. The coupling constants of the C- ring constituent units ($J_{2-3} < 2$ Hz) established the 2,3-*cis* configuration, while the 2,3-*trans* configuration of the F-ring was confirmed due the large coupling constants of H-2 and H-3 ($J_{2-3} = 9,9$ Hz) [19]. The chemical shift of the B-ring two proton singlet at δ 7.20 support the 2,3-*cis* configuration in the upper unit and indicate 4 β -linked dimer [21]. The 4 \rightarrow 8 linkage was evident by the dominance of one rotamer in the spectra [22]. The long-range couplings between H-2 (C) and H-2 (F) and the respective pyrogallol type B- and E-ring proton resonance allowed distinguishing the singlets of B- and E-ring. The two proton singlet at 7.54 was equivalent of a galloyl group. Since the H-3 (C) showed a significant down-field shift (δ 5.40) as compared with the H-3(C) of epigallocatechin-(4 β \rightarrow 8)-gallocatechin (5.13) [23], the galloyl group was considered to be located at the C-3 (C). Hence, compound **7a** was identified as epigallocatechin-3-O-galate-(4 β \rightarrow 8)-gallocatechin (fig. 2). This compound was first described by Danne et al. (1993) [23] from the air-dried aerial parts of *Cistus incanus*, and it is reported in *S. adstringens* in the first time in this work.

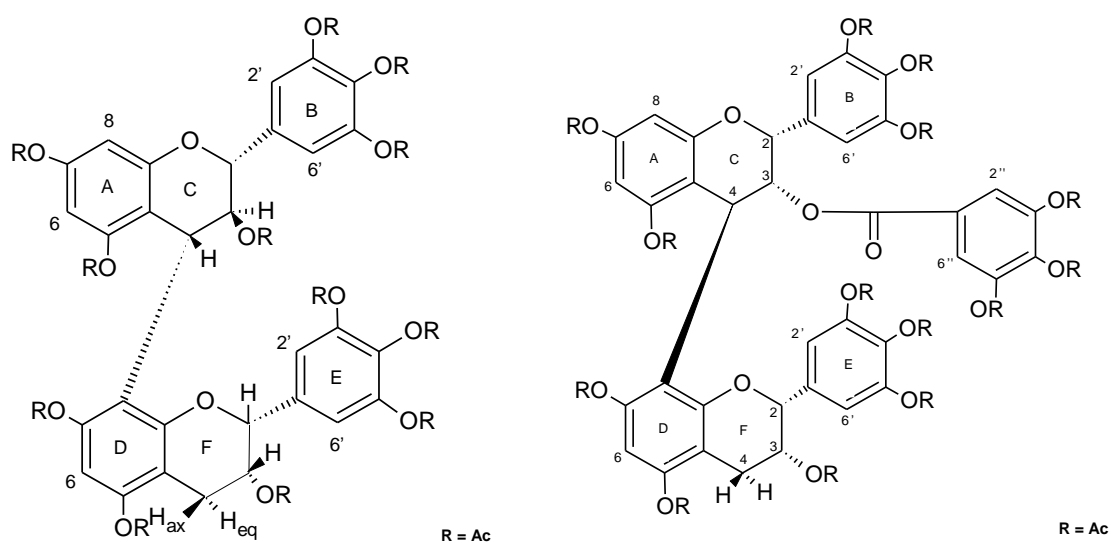
Compound **9** was readily identified as gallocatechin-(4 α \rightarrow 8)-epigallocatechin (prodelphinidin B4) (fig. 3) by comparison of the spectroscopic data of its peracetate (**9a**). All heterocyclic protons were assigned from the ^1H - ^1H COSY spectrum. The large coupling constants of the C-ring ($J_{2-3} = 9.9$ Hz) and the small coupling constants of the F-ring ($J_{2-3} < 2$ Hz) indicate a 2,3-*trans* and 2,3-*cis* relative configuration in the upper and the lower unit, respectively [19]. The chemical shift of the B-ring two proton singlet at δ 6.96 support the 2,3-*trans* configuration in the upper unit [21]. The dominance of one rotamer characterize 4 \rightarrow 8 linkage [22]. The pyrogallol type B- and E-ring proton resonance were distinguished by their long-range couplings with the H-2 (C) and H-2 (F) proton resonance, respectively. Therefore, this compound was isolated by the first time in *S. adstringens* and was identified as

gallo catechin-(4 α →8)-epigallocatechin, which was previously isolated from the leaves of *Ribes sanguineum* by Foo and Porter (1978) [24].

Structural assessment of compound **10** was effected by comparison of the physical data of its peracetate (**10a**). The ^1H NMR spectrum (CDCl_3) of **10a** showed close structural resemblance to the dimer **11a** [25], concerning proton chemical shifts and an additional two proton aromatic singlet due to a galloyl group. All heterocyclic protons could be assigned from the ^1H - ^1H COSY spectrum. The small coupling constants of the C- and F- ring ($J_{2,3\text{C}} = 2,1\text{ Hz}$; $J_{2,3\text{F}} < 2\text{ Hz}$) indicate a 2,3-*cis* relative configuration in the upper and the lower unit [19]. The chemical shift of the B-ring two proton singlet at δ 7.23 support the 2,3-*cis* configuration in the upper unit and indicate 4 β -linked dimer [21]. The dominance of one rotamer characterize 4→8 linkage [22]. The pyrogallol type B- and E-ring proton resonance were distinguished by the long-range couplings between the H-2 (C) and H-2 (F) proton resonance and the respective H-2'/6' resonance. The downfield shift of H-3 (C) (δ 5.39) in the ^1H NMR spectrum of **10a** compared with the equivalent proton in the compound without the galloyl group (δ 5.08-5.15) [25] suggested that the galloyl moiety is at C-3 (C) [21]. Thus, compound **10a** was identified as epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (fig. 4). This compound was first identified by Danne et al. (1994) [21] from the air-dried herb of *Cistus salvifolius* and it is a new compound in *S. adstringens*.

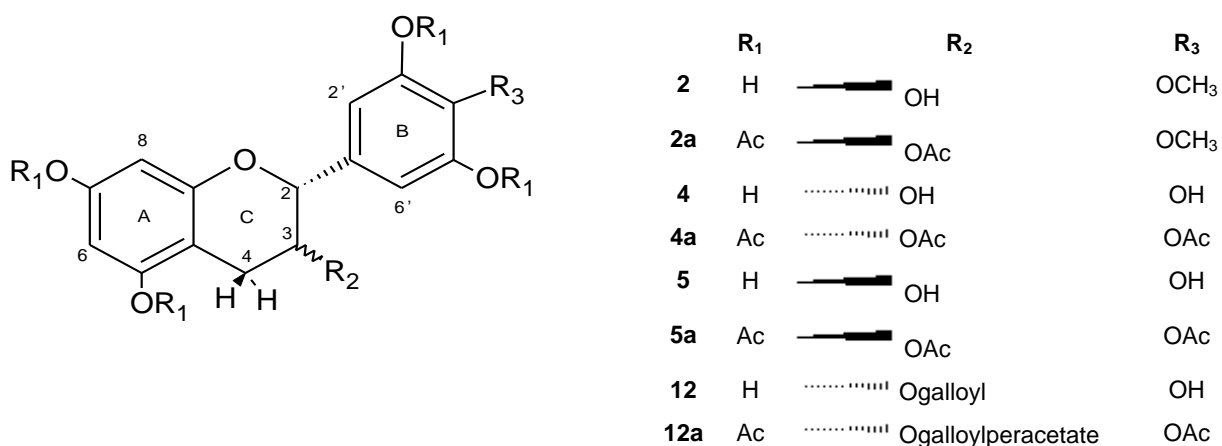
Figure 1 – Chemical structures of isolated compounds **1**, **7**, **9** and **10**.

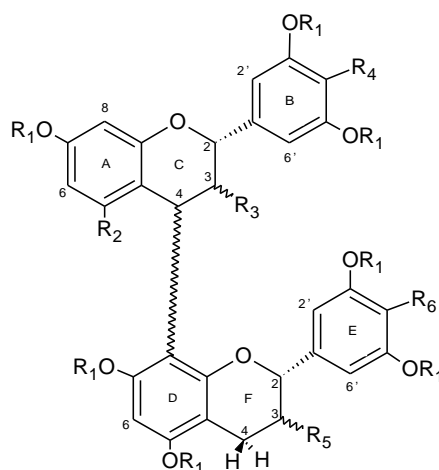




Compounds presented in figure 2 were isolated and identified as: 4'-O-methylgallocatechin (**2a**) [25], 4'-O-methylgallocatechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallocatechin (**3a**) [26], epigallocatechin (**4a**) [25], gallocatechin (**5a**) [25], 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgallocatechin (**6a**) [27], epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (**8a**) [25], epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-gallate (**11a**) [25], and epigallocatechin-3-O-gallate (**12a**) [25]. Their structures were determined by comparison with the data reported in the literature of their peracetate derivatives, and all compounds were identified in *S. adstringens* before.

Figure 2 – Chemical structures of isolated compounds **2-6, 8, 11, 12**.





	R1	R2	R3	R4	R5	R6	4 ~~~~~ 8
3	H	OH	— OH	OCH ₃	— OH	OCH ₃
3a	Ac	OAc	— Oac	OCH ₃	— OAc	OCH ₃
6	H	H	— OH	OCH ₃	— OH	OCH ₃
6a	Ac	H	— Oac	OCH ₃	— OAc	OCH ₃
8	H	OH OH	OH O(4-OHbenzoyl)	OH	—
8a	Ac	OAc Oac	OAc O(4-Acbenzoyl)	OAc	—
11	H	OH OH	OH Ogalloyl	OH	—
11a	Ac	OAc Oac	OAc Ogalloylperacetate	OAc	—

3 Experimental

3.1 General

NRM spectra were carried out on Varian (Mercury 300BB, 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C) instrument, using TMS as an internal standard. The extract of the stem bark was made in Ultra-turrax[®] UTC115KT. Column chromatography (CC; 710 x 50 mm) was performed on Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemical Co., Ltd.). The High-speed counter-current chromatography apparatus (HSCCC) was constructed in State University of Maringá, and is equipped with polytetrafluoroethylene coils (2.5 internal diameter, total volume capacity of 200 mL), 20 mL of sample loop and pump with flow capacity of 10 mL (Waters mod. 510). The rotational speed was 780 rpm, the solvent system used was EtOAc-*n*-PrOH-H₂O (35:2:20; v v⁻¹), being the upper layer as mobile phase and the flow rate 0,8 mL min⁻¹. The medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was performed on reverse phase silica (Septra C18-E, 100 Å, PREPLC; 365 x 20 mm), with a gradient of MeOH (5% until 100%) as mobile phase at 2 mL min⁻¹. The acetylation was performed in pyridine-Ac₂O (1:1.2) at ambient temperature for 24 h. The derivatized compounds were purified on preparative thin layer chromatography (Prep-TLC), and on high-performance liquid chromatography (HPLC). In the preparative thin layer chromatography (Prep-TLC) was used

Silica gel PF60 (Merck) as stationary phase and toluene:Me₂CO (60:40 v.v⁻¹) as mobile phase. The HPLC (Gilson model 321, equipped with manual sampler Rheodyne, software UniPoint LCNT and detector with variable wavelength) was performed on normal-phase 100-CN (250 x 4 mm, Lichrospher, Merck) with the solvent systems hexane/EtOAc (60:40 v.v⁻¹) at 1 mL min⁻¹. The fractions obtained from CC, HSCCC and MPLC were monitored by silica gel TLC plates (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.2 mm, Merck) using EtOAc:HCOOH:H₂O (90:5:5 v.v⁻¹). The spots were visualized by UV 256 nm, and after with FeCl₃ solution at 1% in ethanol.

3.2 Plant Material

The stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville were collected in March 2008, in the city of São Jerônimo da Serra, State of Paraná, Brazil. Voucher specimen was deposited in the herbarium of the State University of Maringá under number HUM 14321. The species was identified by Prof. Dr. Cássia Mônica Sakuragui.

3.3 Extraction and Isolation

Air-dried and powdered stem barks of *S. adstringens* (2 kg) was exhaustively extracted with Me₂CO-H₂O (7:3 v.v⁻¹) by turbo-extraction (20 min; t ≤ 40 °C), filtered and evaporated under reduced pressure. The lyophilized extract (600 g) was redissolved in water (500 mL) and extracted with EtOAc (500 mL, 10 times). After evaporation of solvents and lyophilization, EtOAc fraction and water fraction gave 210 g and 390 g, respectively. A portion of EtOAc fraction (20 g) was subjected to CC on Sephadex LH-20, with the eluents 50% EtOH, 100% EtOH, 70% Me₂CO, yielding 17 fractions (I–XXVII). Fraction III (1.56 g) was subjected to HSCCC and gave six subfractions. Subfraction III-3 (544.1 mg) was chromatographed on MPLC to afford compounds **1** (87.2 mg) and **2** (231 mg). A portion of subfraction III-4 (65.3 mg) was acetylated and purified on prep-TLC, giving compound **3** (9.6 mg). Fraction IV (1.72 g) was subjected to HSCCC, affording three subfractions. Subfraction IV-3 (129.7 mg) was submitted on MPLC, yielding compound **4** (13.6 mg). Fraction V (1.07 g) was separated on HSCCC to give seven subfractions, which subfraction V-4 (197.7 mg) was subjected to MPLC to afford compound **5** (12.8 mg). After being separated on HSCCC, fraction VI yielded five subfraction, and VI-2 was acetylated and purified on prep-TLC and HPLC to give compound **6** (5 mg). Fraction VII (1.75 g) was fractionated on HSCCC, giving seven subfractions. Subfraction VII-3 was acetylated and purified on prep-TLC and HPLC to afford compound **7** (6 mg). Fraction VIII (1.28 g) was subjected to HSCCC and gave seven subfractions. Subfractions VIII-2 (86.4 mg) and VIII-6 (18.6) were acetylated and purified on prep-TLC and HPLC. VIII-2 afforded compounds **8** (5.3 mg) and **9** (6.1 mg), and VIII-6

yielded compound **10** (5.7 mg). Fraction IX (1.21 g) was fractionated on HSCCC, affording eight subfractions. Subfraction IX-8 was acetylated and purified on prep-TLC to give compound **11** (5,4 mg). After the separation of fraction X on HSCCC was obtained six subfractions, which subfraction X-2 was identified as compound **12** (129 mg).

4'-O-methylepigallocatechin (**1**). $^1\text{H-NRM}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ 2.72 (H-4_{ax}(C), *dd*, $J = 16.95$ and 3 Hz), 2.85 (H-4_{eq}(C), *dd*, $J = 16.65$ and 4.5 Hz), 3.78 (O-methyl, *s*, 3H), 4.18 (H-3(C), *m*), 4.77 (H-2(C), *br s*), 5.91 (H-6(A), *d*, $J = 2.1$ Hz), 5.93 (H-8(A), *d*, $J = 2.4$ Hz), 6.52 (H-2'/6'(B), *s*, 2H).

Epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β →8)-galocatechin (**7**). $^1\text{H-NRM}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ 2.55 (H-4_{ax}(F), *dd*, $J = 16.8$ and 9 Hz), 3.20 (H-4_{eq}(F), *dd*, $J = 16.5$ and 6.6 Hz), 4.28 (H-2(F), *d*, $J = 9.9$ Hz), 4.54 (H-4(C), *d*, $J = 1.8$ Hz), 4.95 - 5.04 (H-3(F), *m*), 5.40 (H-3(C), *m*), 5.56 (H-2(C), *br d*), 6.23 (H-6(A), *d*, $J = 2.4$ Hz), 6.36 (H-8(A), *d*, $J = 2.4$ Hz), 6.68 (H-6(D), *s*), 6.85 (H-2'/6'(E), *s*, 2H), 7.20 (H-2'/6'(B), *s*, 2H), 7.54 (H-2 and H-6 (galloyl at the 3-O position), *s*, 2H).

Galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (**9**). $^1\text{H-NRM}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ 2.76 (H-4_{ax}(F), *br d*, $J = 18.3$ Hz), 2.99 (H-4_{eq}(F), *dd*, $J = 18.15$ and 4.8 Hz), 4.59 (H-4(C), *d*, $J = 9.6$ Hz), 4.88 (H-2(C), *d*, $J = 9.9$), 5.05 (H-2(F), *br d*), 5.28 (H-3(F), *m*), 5.72 (H-3(C), *m*), 6.53 (H-6(A), *d*, $J = 2.4$ Hz), 6.58 (H-8(A), *d*, $J = 2.1$ Hz), 6.64 (H-6(D), *s*), 6.82 (H-2'/6'(E), *s*, 2H), 6.96 (H-2'/6'(B), *s*, 2H).

Epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β →8)-epigallocatechin (**10**). $^1\text{H-NRM}$ (CD_3OD , 300 MHz): δ 2.91 (H-4_{ax} and H-4_{eq}(F), *m*, 2H), 4.53 (H-2(F), *br s*), 4.57 (H-4(C), *d*, $J = 2.1$ Hz), 5.11 (H-3(F), *m*), 5.39 (H-3(C), *m*), 5.66 (H-2(C), *br d*), 6.13 (H-6(A), *d*, $J = 2.4$ Hz), 6.29 (H-8(A), *d*, $J = 1.8$ Hz), 6.68 (H-6(D), *s*), 6.91 (H-2'/6'(E), *s*, 2H), 7.23 (H-2'/6'(B), *s*, 2H), 7.57 (H-2 and H-6 (galloyl at the 3-O position), *s*, 2H).

4 Conclusion

Tannins from *Stryphnodendron adstringens* have been widely studied due to their medicinal importance [25, 26, 27]. In our studies, the methylated flavan-3-ol 4'-O-methylepigallocatechin and the prodelphinidins epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β →8)-galocatechin, galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin, epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β →8)-epigallocatechin were identified at first time in *S adstringens*. It shows that new compounds still can be found in this species. Further studies are important to verify medicinal properties of the compounds identified.

5 References

1. Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. In *Legumes of the world*, Royal Botanic Gardens Kew: London, UK, **2005**; pp.163-183.
2. Occhioni, E.M.L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart.(Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Bot. Bras.* **1990**, 4, 153-158.
3. Corrêa, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas e cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **1978**; 590p.
4. Scalon, V.R. Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae), **2007**. Unpublished Thesis. Universidade de São Paulo, USP, Brazil.
5. Occhioni-Martins, E.M. Nova espécie de *Stryphnodendron* para flora Amazônica. *Leandra*, **1972**, 2, 121-123.
6. Occhioni-Martins, E.M. Nova espécie de *Stryphnodendron* para flora do Cerrado. *Leandra*, **1977**, 7, 19-21.
7. Occhioni-Martins, E.M. Sobre a sinonímia científica de espécies de *Stryphnodendron* Mart. (Leg. Mim.). *Leandra*, **1979**, 8-9, 85-89.
8. Occhioni-Martins, E.M. A *Stryphnodendron* new to the Amazon flora. *Contr. Univ Mich. Herb.* **1980a**, 14, 83-84.
9. Occhioni-Martins, E.M. Distribuição geográfica do gênero *Stryphnodendron* com descrição de nova espécie (Leg. Mim.). *Revista Brasil. Biol.* **1980b**, 40, 729-732.
10. Occhioni-Martins, E.M. *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) com especial referência aos taxa amazônicos. *Leandra*, **1981**, 10-11, 3-100.
11. Rizzini, C.T. & Heringer, E.P. As espécies anãs de *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasil. Biol.* **1987**, 47, 447-454.
12. Guinet P.H. & Caccavari, M.A. Pollen morphology of the genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Mimosoideae) in relation to its taxonomy. *Grana*, **1992**, 31, 101-112.
13. Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O.; de Souza, P.T.J.R. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.* **1998**, 12, 218-220.
14. Ishida, K.; Rozental, S.; Mello, J.C.P.; Nakamura, C.V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2009**, 8, 29-33.
15. Felipe, A.M.M.; Rincão, V.P.; Benati, F.J.; Linhares, R.E.C.; Galina, K.J.; Toledo, C.E.M.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P.; Nozawa, C. Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29, 1092-1095.
16. Holetz, F.B.; Nakamura, T.U.; Dias Filho, B.P.; Mello, J.C.P.; Morgado-Díaz, J.A.; Toledo, C.E.M.; Nakamura, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2005**, 100, 397-401.
17. Hernandez, L.; Pereira, L.M.S.; Palazzo, F.; Mello, J.C.P. Wound-healing valuation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, 46, 431-436.
18. Outtrup, H.; Schaumburg, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. *Carlsberg Res. Comm.* **1981** 46: 43-52.
19. Weinges, K.; Bähr, W.; Ebert, W.; Göritz, K.; Marx, H.D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1969**, 27, 158-260.
20. Delle Monache, F.; d'Albuquerque I.L.; Ferrari, F., Marini-Bettolo, G.B. A new catechin and a dimeric proanthocyanidin from *Ouratea* sp. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 43, 4211-4214.
21. Danne, A.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* **1994**, 33, 533-538.

22. Fletcher, A.C.; Porter, L.J.; Haslam, E.; Gupta, R.K. Plant proanthocyanidins. Part3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1977**, 1628-1637.
23. Danne, A.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* **1993**, 34, 1129-1133.
24. Foo, L. Y. and Porter, L. J. Prodelphinidin Polymers : Definition of Structural Units. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1978**, 1186-1190.
25. Mello, J.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 1996a, 41, 807-813.
26. Mello, J.C.P.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **1999**, 51, 1105-1107.
27. Lopes, G.C.; Machado, F.A.V.; Toledo, C.E.M.; Sakuragui, C.M.; Mello, J.C.P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, 36, 925-931.

6 Supplementary Material

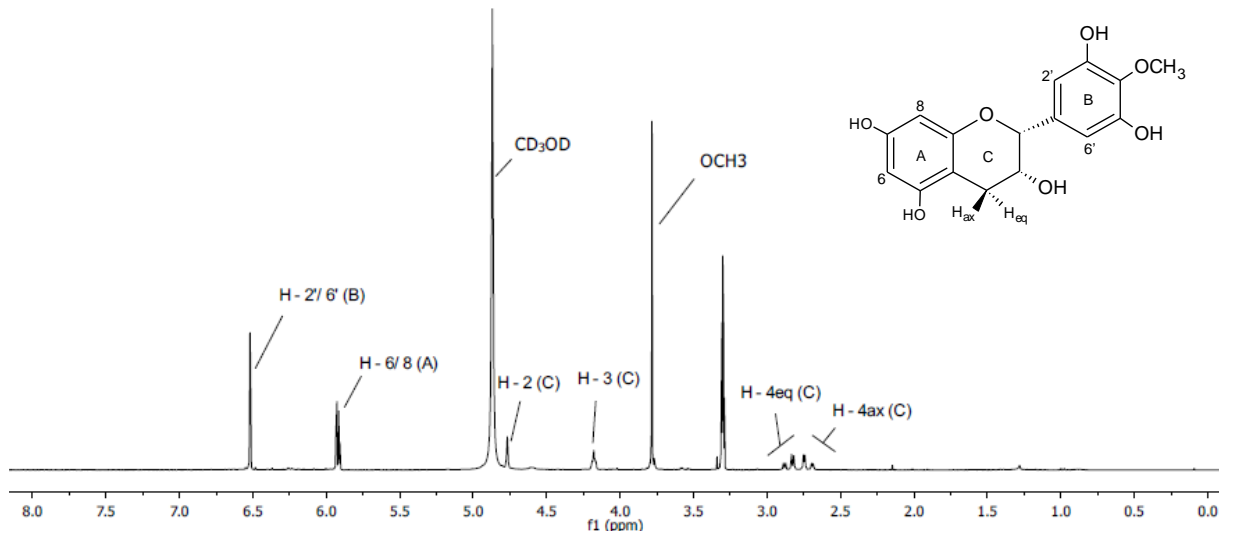
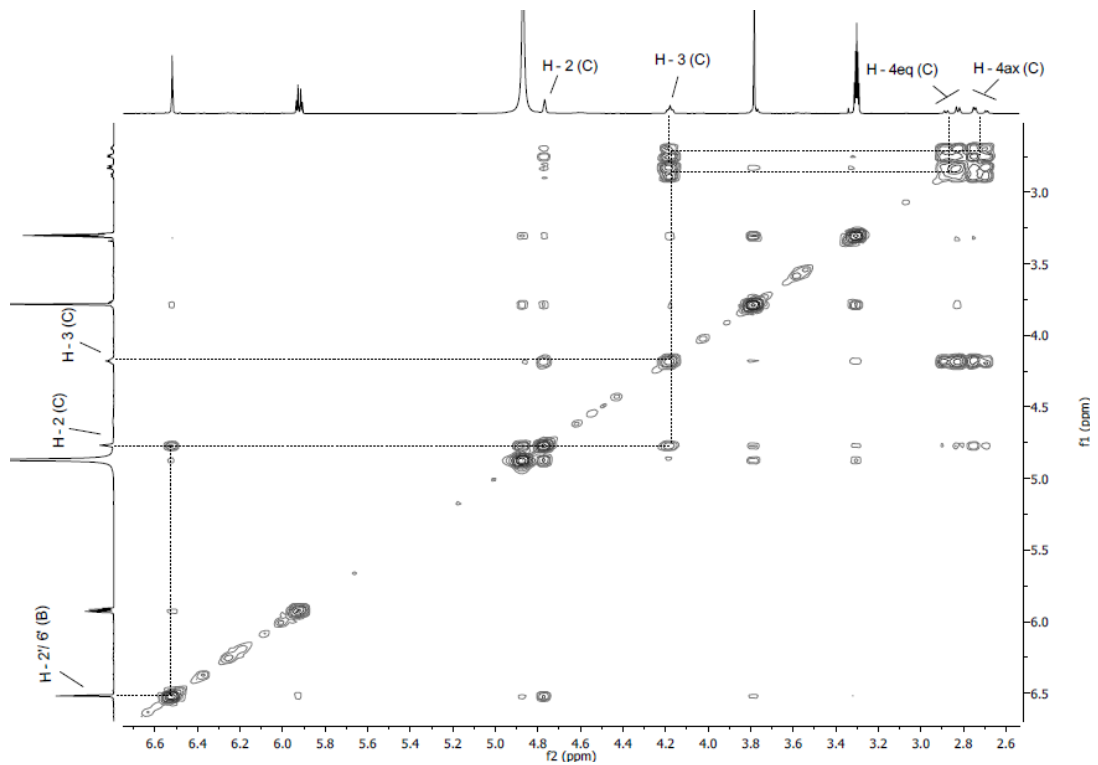
Figure S1 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CD_3OD) of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**).Figure S2 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**).

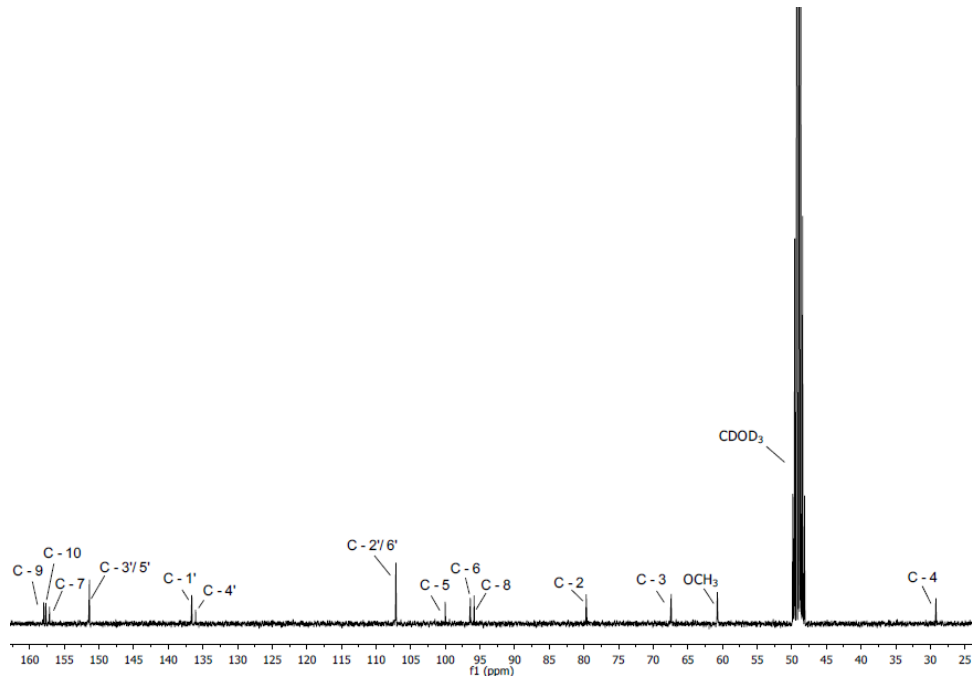
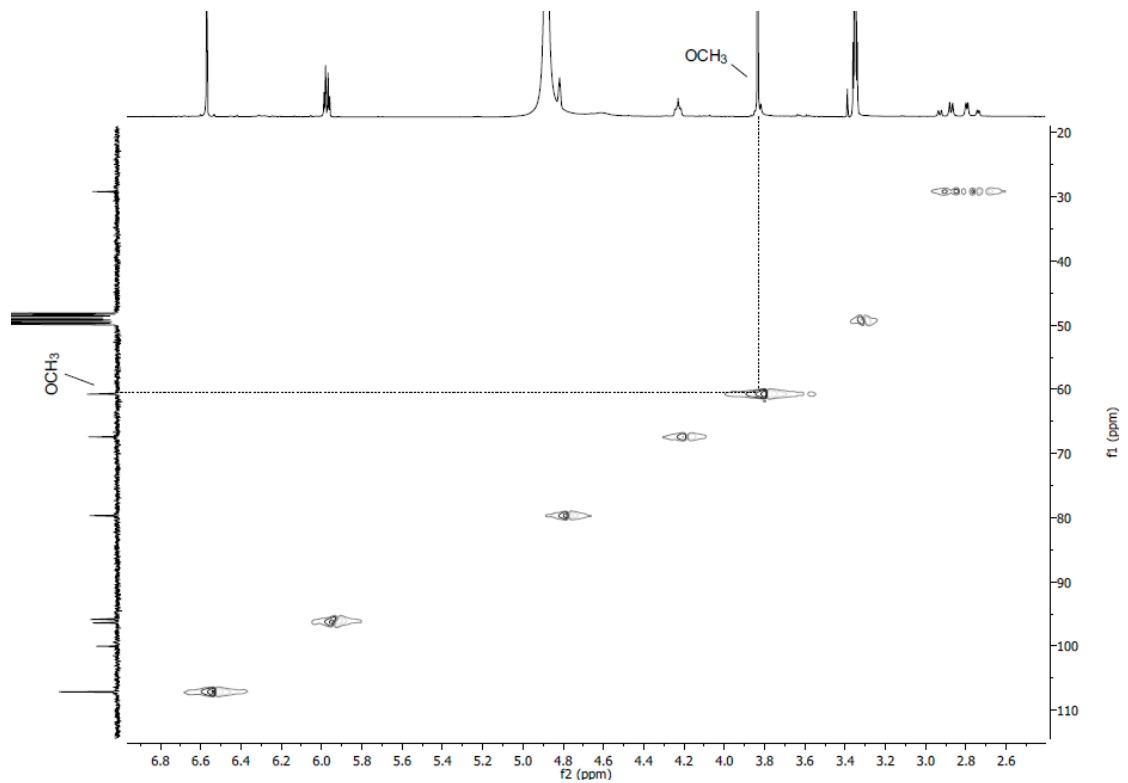
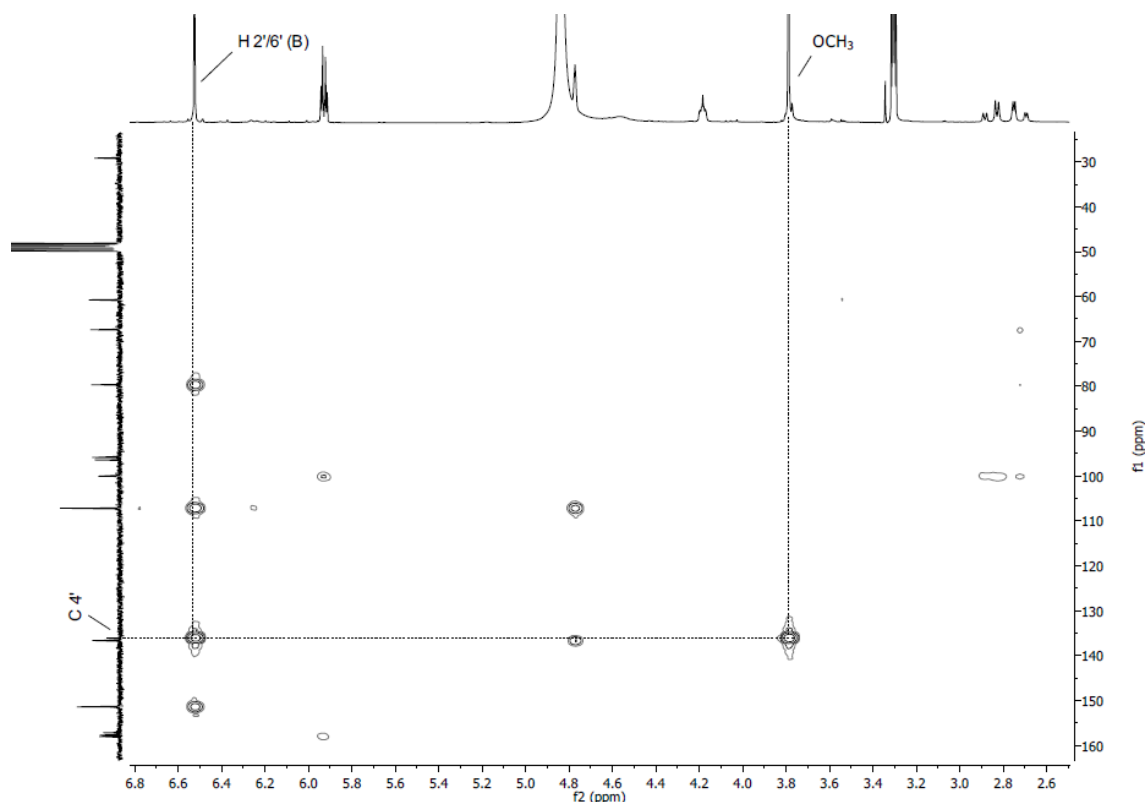
Figure S3 – ^{13}C NMR spectrum (75 MHz, CD_3OD) of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**).Figure S4 – HSQC spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**).

Figure S5 - HMBC spectrum of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**).Table S1 - ^1H NMR data of 4'-O-methylepigallocatechin (**1**) (300 MHz, in CD_3OD).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax	2.72 (dd)	2.73	16.95; 3
4eq	2.85 (dd)	2.85	16.65; 4.5
-OCH ₃	3.78 (s)	3.79	
3	4.18 (m)	4.19	
2	4.77 (br s)	4.78	
6	5.91 (d)	5.93	2.1
8	5.93 (d)	5.95	2.4
2'/6'	6.52 (s)	6.53	

* Magalhães (2012).

Table S2 – ¹³C NMR data of 4'-O-methylepigallocatechin (1) (75 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*
2	79.7	79.8
3	67.4	67.5
4	29.2	29.3
5	100.1	100.2
6	96.5	96.6
7	157.2	157.3
8	95.9	96.0
9	158.0	158.1
10	157.8	157.8
1'	136.6	136.7
2'	107.2	107.3
3'	151.4	151.5
4'	136.1	136.3
5'	151.4	151.5
6'	107.2	107.3
OCH ₃	60.8	60.9

* Magalhães (2012).

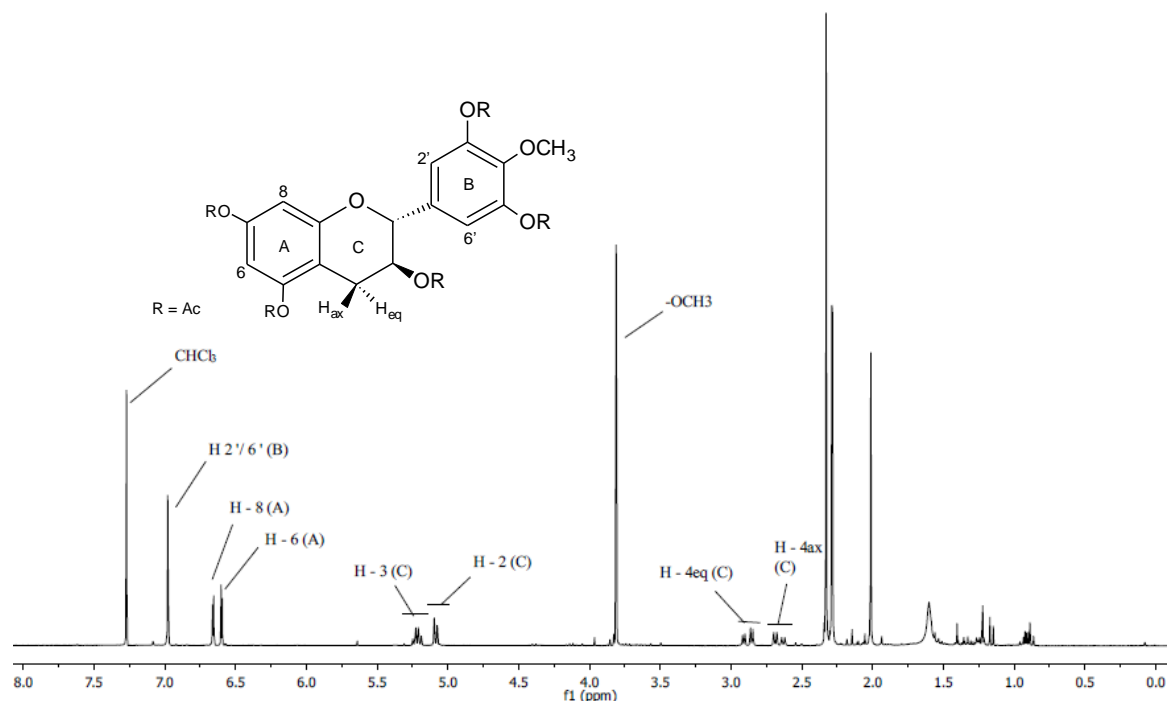
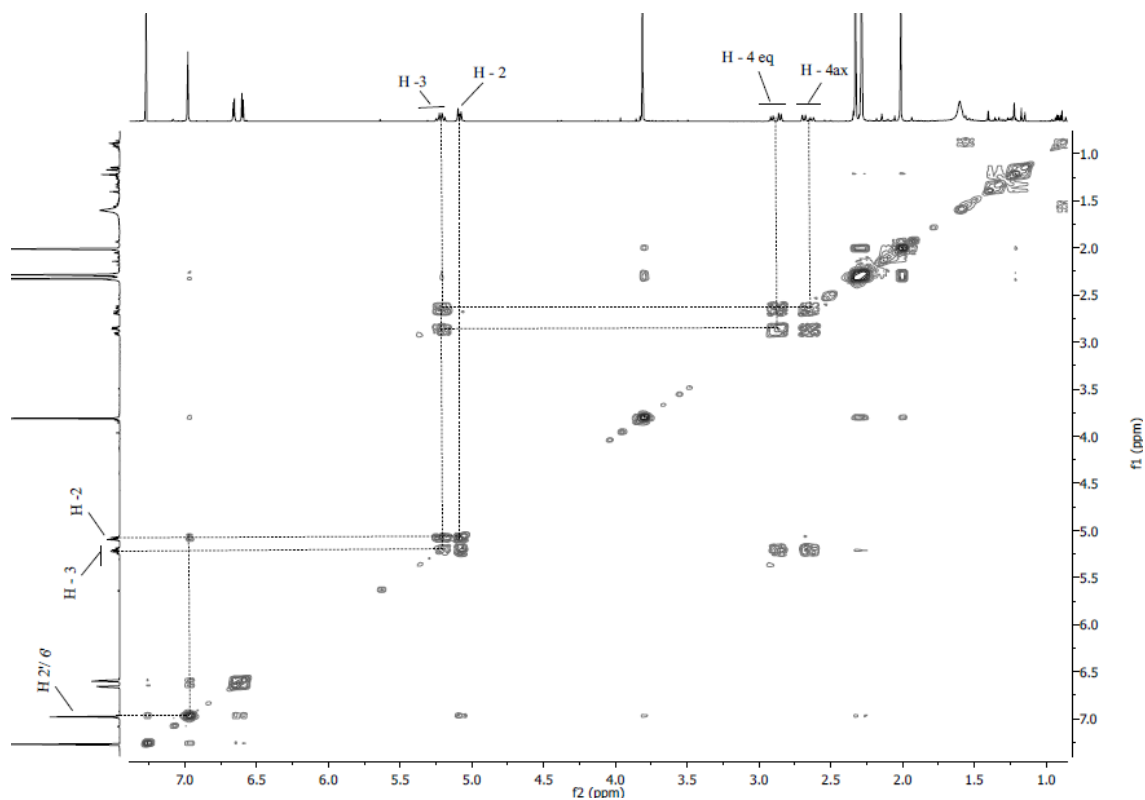
Figure S6 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of 4'-O-methylgallocatechin (**2**).Figure S7 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of 4'-O-methylgallocatechin (**2**).

Table S3 - ¹H NMR data of 4'-O-methylgalocatechin (**2**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax	2.65 (dd)	2.65	16.8; 6.6
4eq	2.87 (dd)	2.88	16.65; 5.1
-OCH ₃	3.80 (s)	3.80	
2	5.08 (d)	5.08	6.3
3	5.21 (ddd)	5.20	6.45; 6.45; 5.1
6	6.59 (d)	6.59	2.4
8	6.65 (d)	6.66	2.1
2'/6'	6.97 (s)	6.97	

* Mello et al. (1996a)

Figure S8 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of 4'-O-methylgallo catechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallo catechin (**3**).

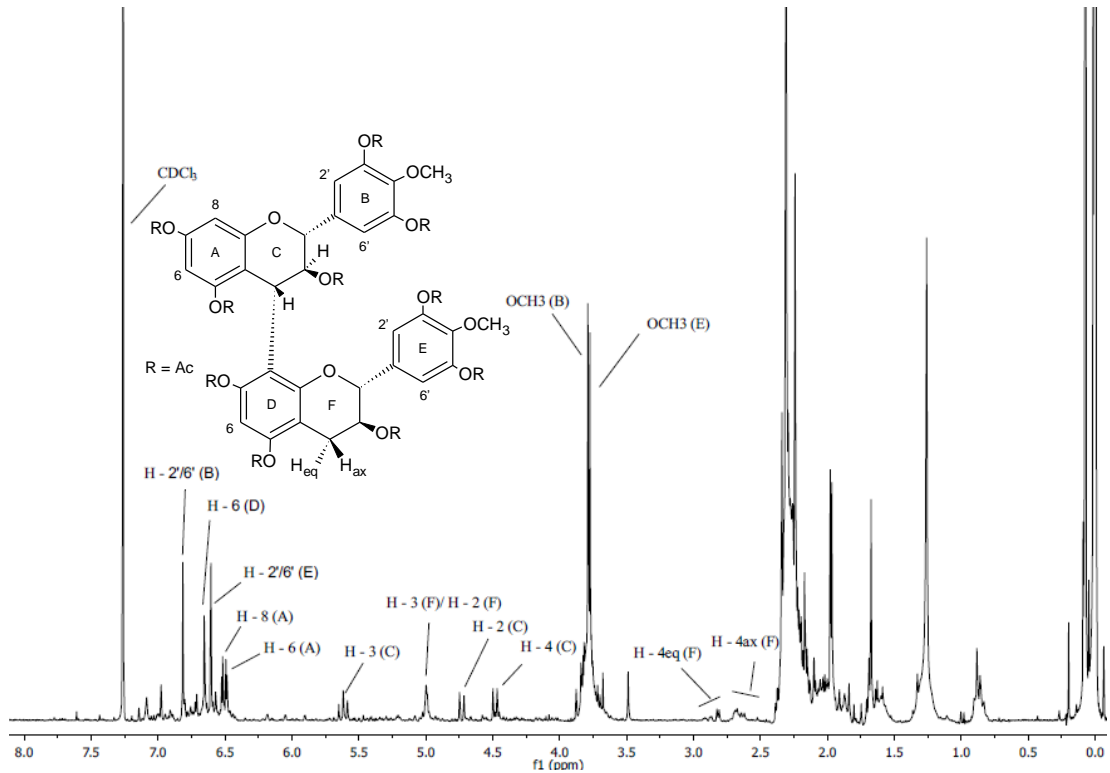


Figure S9 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of 4'-O-methylgallo catechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallo catechin (**3**).

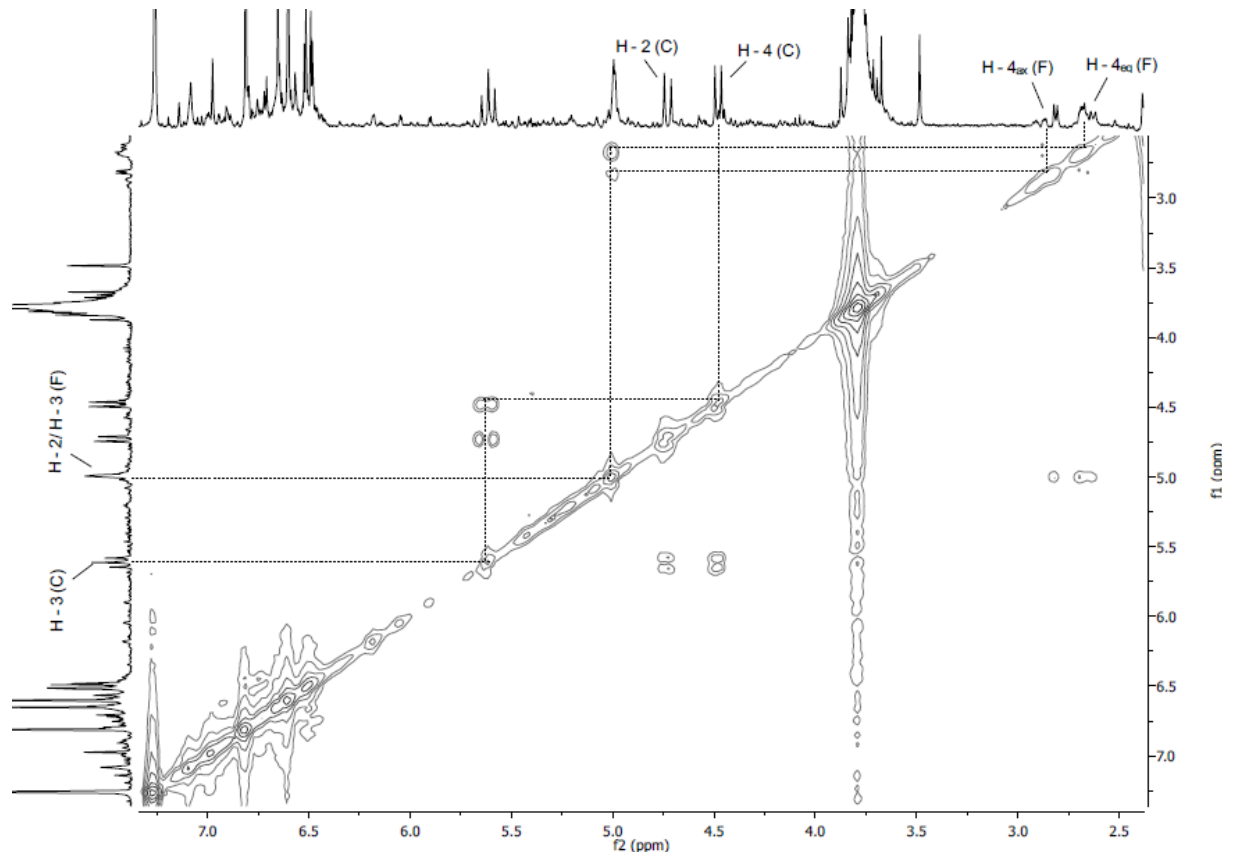


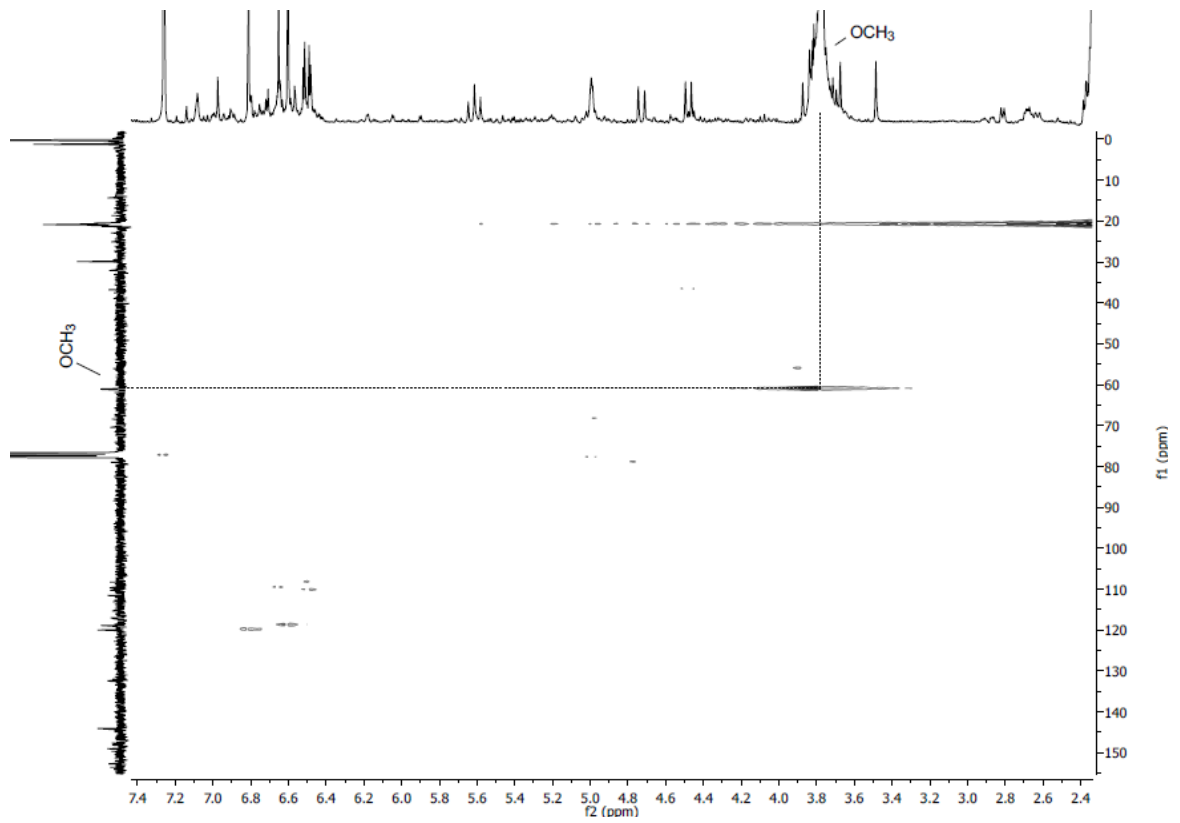
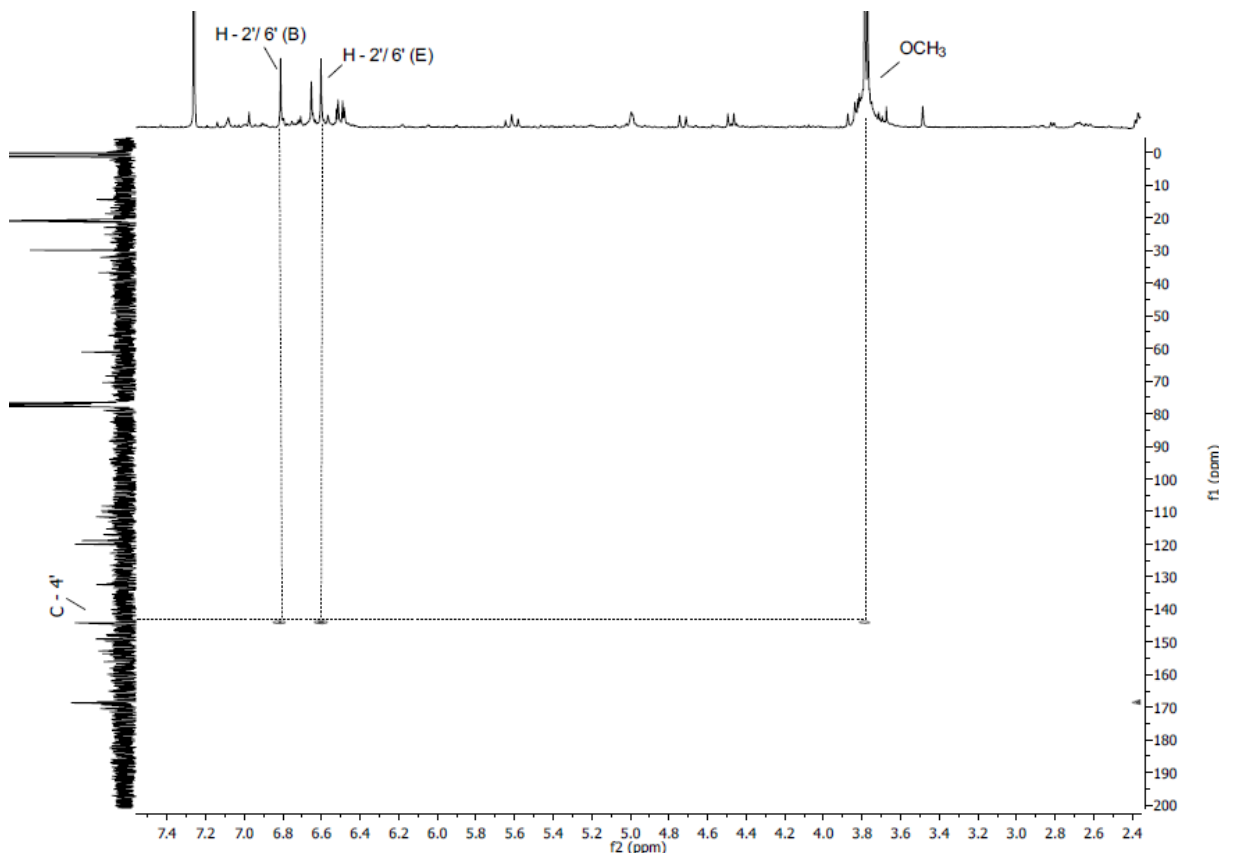
Figure S10 - HSQC spectrum of 4'-O-methylgallo catechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallo catechin (**3**).Figure S11 - HMBC spectrum of 4'-O-methylgallo catechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallo catechin (**3**).

Table S4 - ¹H NMR data of 4'-O-methylgallo catechin-(4 α →8)-4'-O-methylgallo catechin (**3**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)	2.62 – 2.70 (m)	2.65	
4eq (F)	2.81 – 2.87 (m)	2.83	
-OCH ₃ (B)	3.77 (s)	3.77	
-OCH ₃ (E)	3.79 (s)	3.79	
4 (C)	4.48 (d)	4.48	9.3
2 (C)	4.73 (d)	4.73	9.9
3 (F)/ 2 (F)	5.01 (m)	5.02	
3 (C)	5.62 (br t)	5.61	9.9; 9.6
6 (A)	6.49 (d)	6.49	2.1
8 (A)	6.52 (d)	6.52	2.4
2'/6' (E)	6.60 (s)	6.60	
6 (D)	6.65 (s)	6.65	
2'/6' (B)	6.81 (s)	6.81	

* Mello et al. (1999)

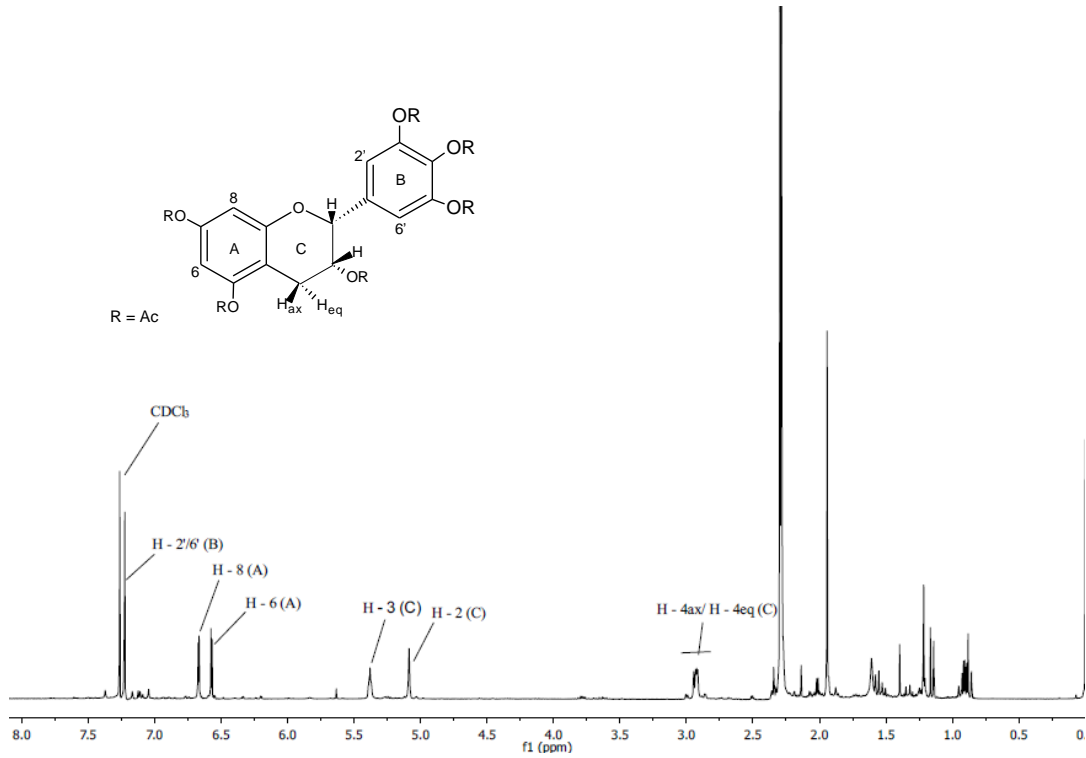
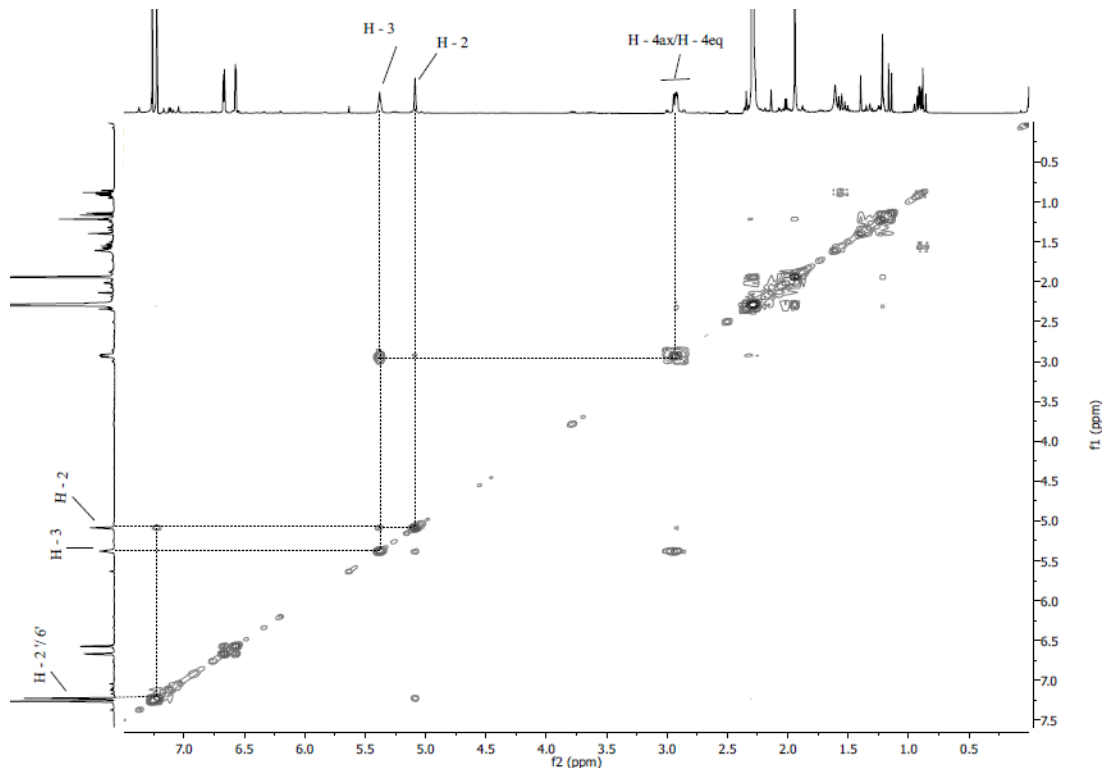
Figure S12 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin (4).Figure S13 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin (4).

Table S5 - ¹H NMR data of epigallocatechin (**4**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax/4eq	2.85 – 3.01 (m)	2.82 – 3.04	
2	5.09 (s)	5.08	
3	5.38 (m)	5.35 – 5.42	
6	6.57 (d)	6.57	2.4
8	6.67 (d)	6.67	2.1
2'/6'	7.22 (s)	7.22	

* Mello et al. (1996a)

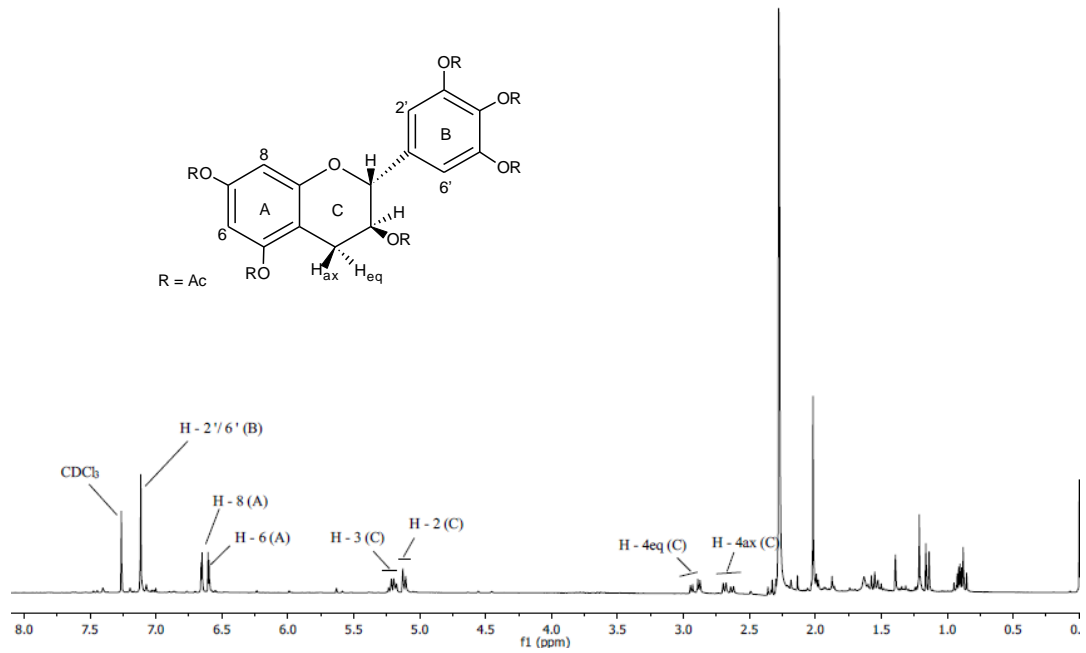
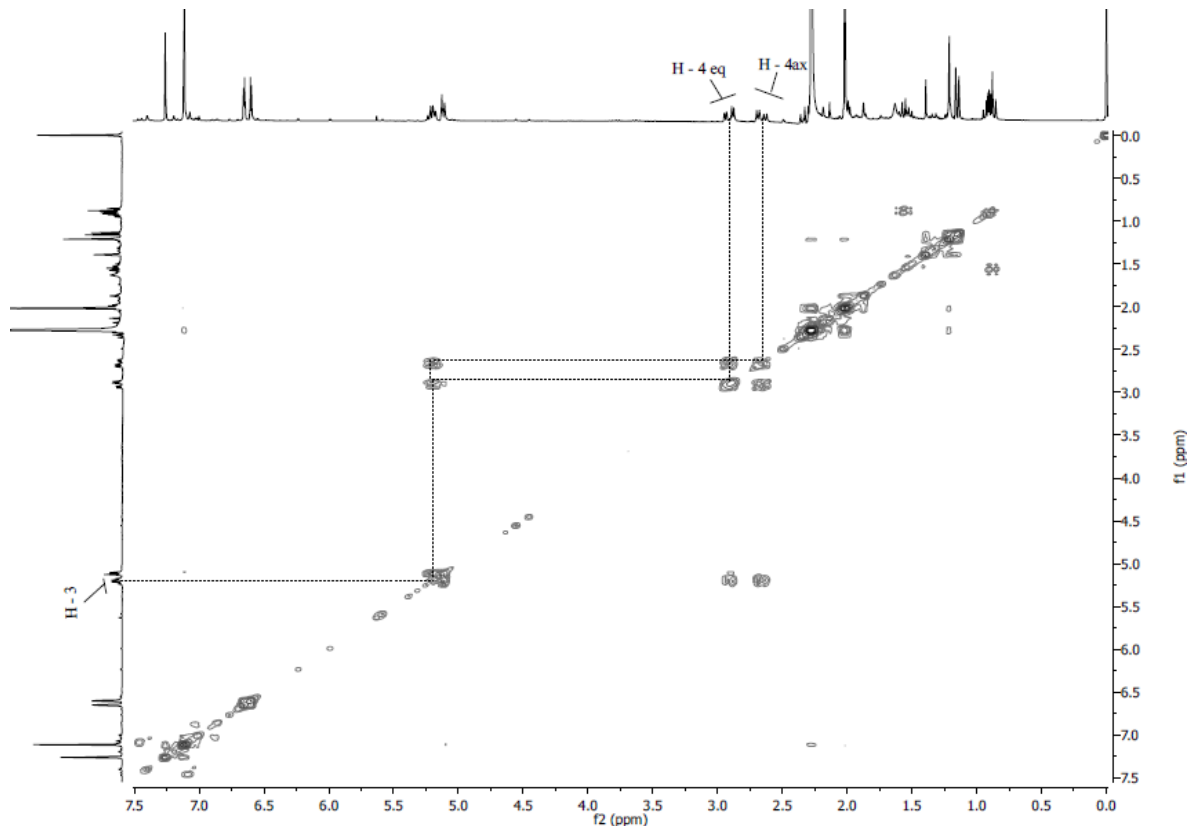
Figure S14 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of gallocatechin (**5**).Figure S15 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of gallocatechin (**5**).

Table S6 - ¹H NMR data of gallo catechin (**5**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax	2.66 (dd)	2.66	16.8; 6.6
4eq	2.91 (dd)	2.92	16.8; 5.1
2	5.12 (d)	5.12	6.3
3	5.21 (ddd)	5.19	6.21; 6.6; 5.1
6	6.60 (d)	6.60	2.1
8	6.65 (d)	6.66	2.1
2'/6'	7.12 (s)	7.12	

* Mello et al. (1996a)

Figure S16 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgalocatechin.

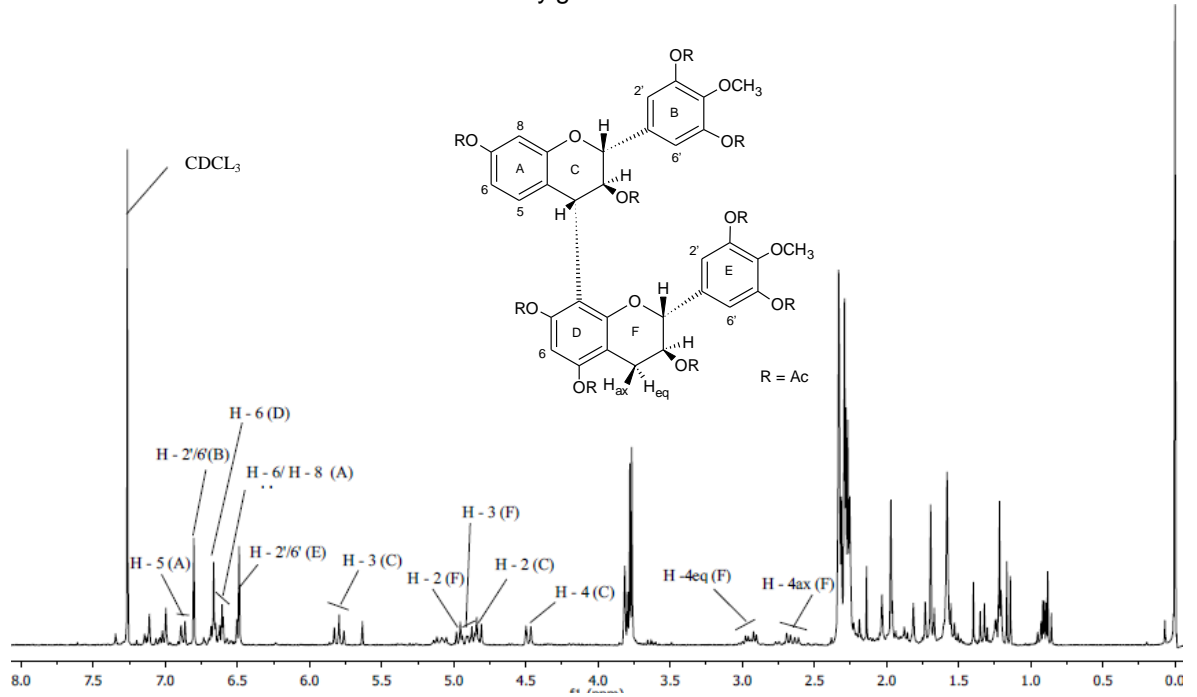


Figure S17 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)-4'-O-methylgalocatechin (6).

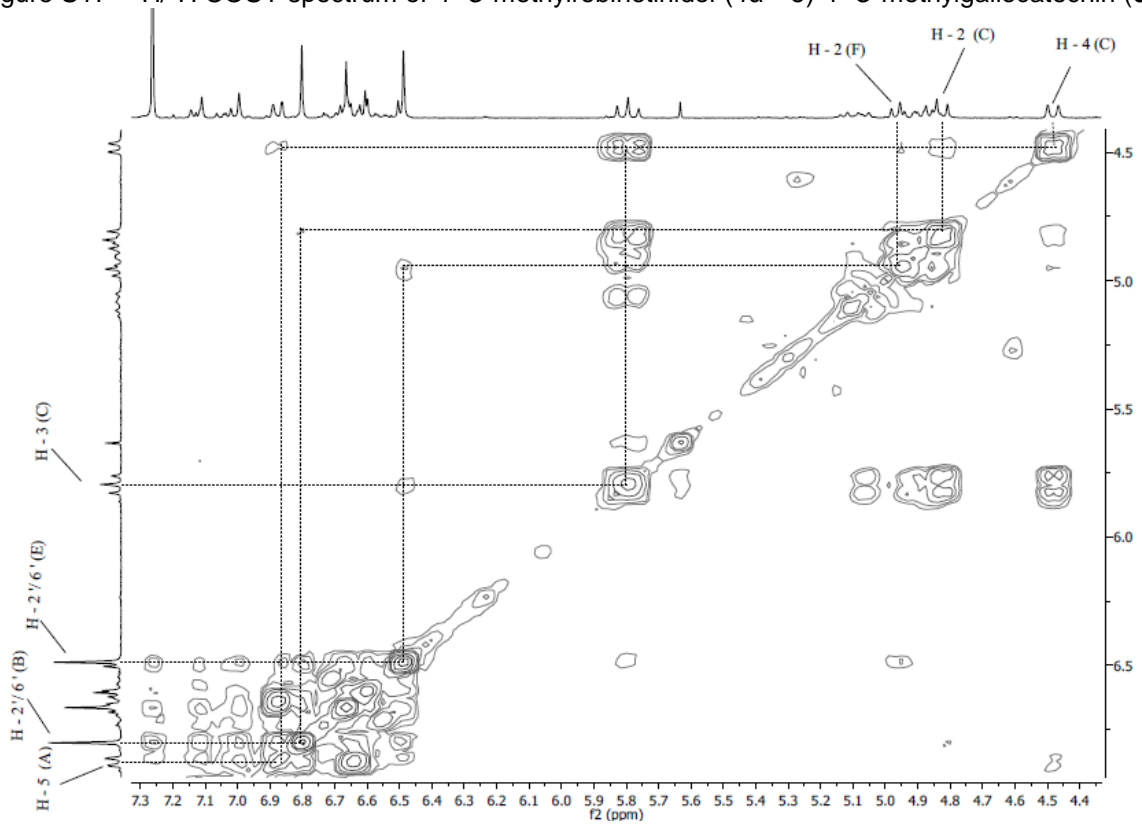


Table S7 - ¹H NMR data of 4'-O-methylrobinetinidol-(4 α →8)- 4'-O-methylgallocatechin (**6**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)	2.65 (dd)	2.65	16.65; 8.1
4eq (F)	2.94 (dd)	2.94	16.65; 6
-OCH ₃	3.79	3.82	
4 (C)	4.48 (d)	4.48	9.9
2 (C)	4.82 (d)	4.83	9.9
3 (F)	4.86 - 4.91 (ddd)	4.88 - 4.91	
2 (F)	4.97 (d)	4.97	7.8
3 (C)	5.80 (br t)	5.80	9.9; 9.9
6 (A)	6.60 (d)	6.60	2.1
8 (A)	6.63 (d)	6.63	2.4
2'/6' (E)	6.49	6.49	
6 (D)	6.66 (s)	6.66	
2'/6' (B)	6.80 (s)	6.80	
5 (A)	6.88	6.88	7.5

* Lopes et al. (2009)

Table S8 - ^1H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-gallocatechin (**7**) (300 MHz, in CDCl_3).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)	2.55 (dd)	2.52	16.8; 9
4eq (F)	3.20 (dd)	3.26	16.5; 6.6
2 (F)	4.28 (d)	4.33	9.9
4 (C)	4.54 (d)	4.54	1.8
3 (F)	4.95 – 5.04 (m)	5.07	
3 (C)	5.40 (m)	5.40	
2 (C)	5.56 (br d)	5.57	
6 (A)	6.23 (d)	6.16	2.4
8 (A)	6.36 (d)	6.32	2.4
6 (D)	6.70 (s)	6.71	
2'/6' (E)	6.85 (s)	6.86	
2'/6' (B)	7.20 (s)	7.22	
2''/6''	7.54	7.55	

* Danne et al. (1993)

Figure S20 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (**8**).

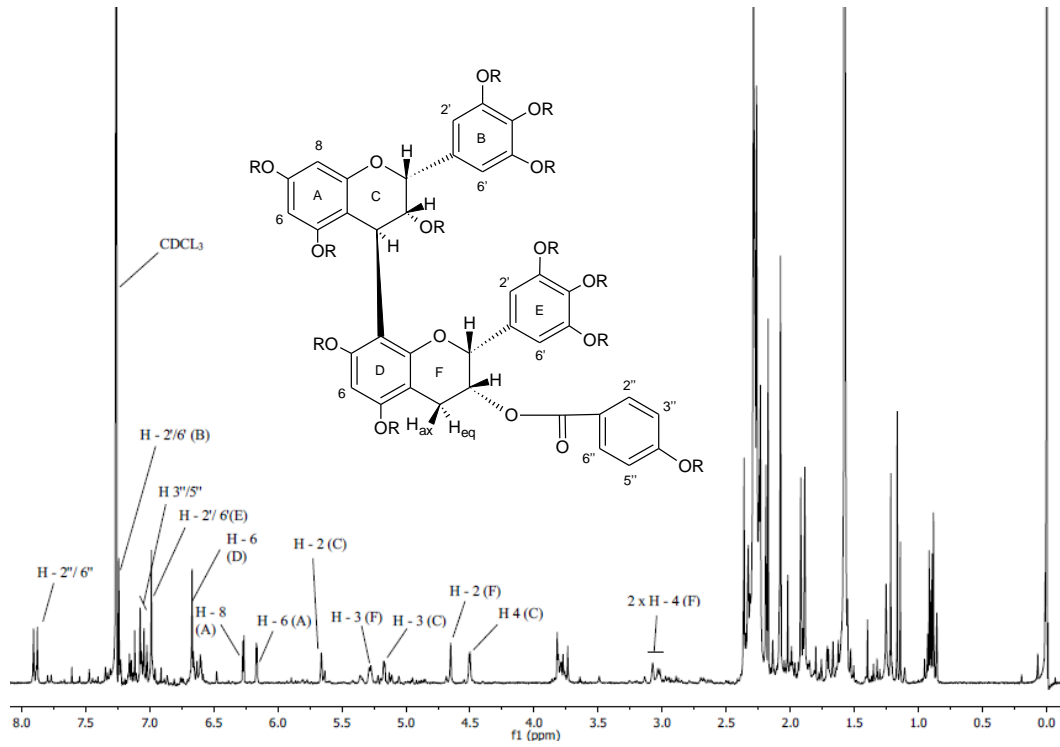


Figure S21 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (**8**).

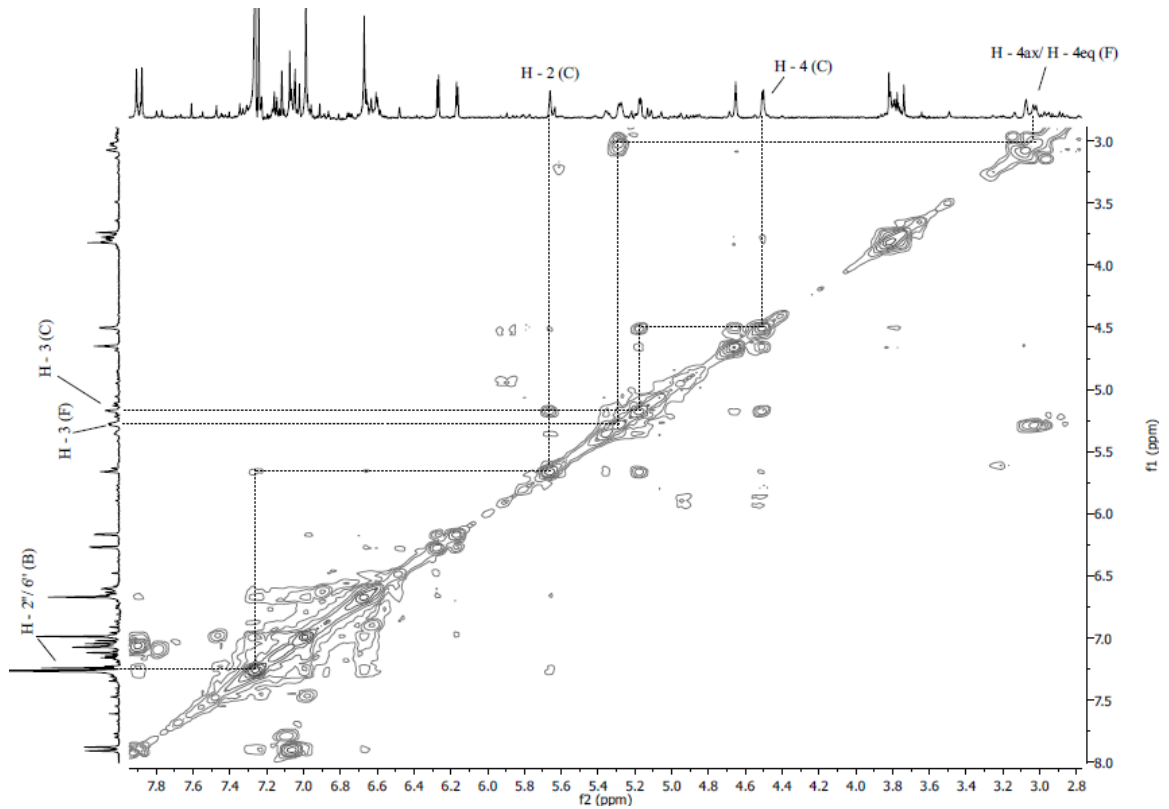


Table S 9 - ¹H NMR data of epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-(4-hydroxy)benzoate (**8**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)/ 4eq (F)	3.09 – 3.00 (m)	2.94 – 3.18	
4 (C)	4.50 (d)	4.51	2.1
2 (F)	4.65 (br d)	4.66	
3 (C)	5.16 – 5.20 (m)	5.16 – 5.19	
3 (F)	5.25 – 5.30 (m)	5.25 – 5.31	
2 (C)	5.66 (br d)	5.67	
6 (A)	6.16 (d)	6.17	2.1
8 (A)	6.27 (d)	6.27	2.1
6 (D)	6.67 (s)	6.67	
2'/6' (E)	6.99 (s)	6.99	
2'/6' (B)	7.24 (s)	7.25	
3''/5''	7.06	7.06	
2''/6''	7.89	7.90	

* Mello et al. (1996b)

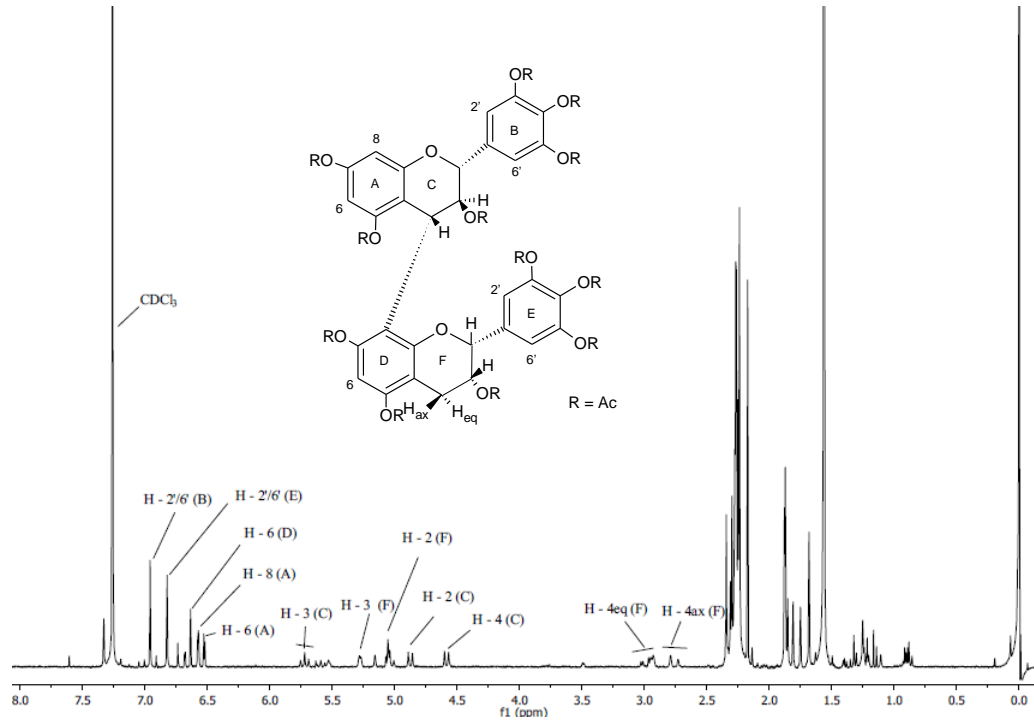
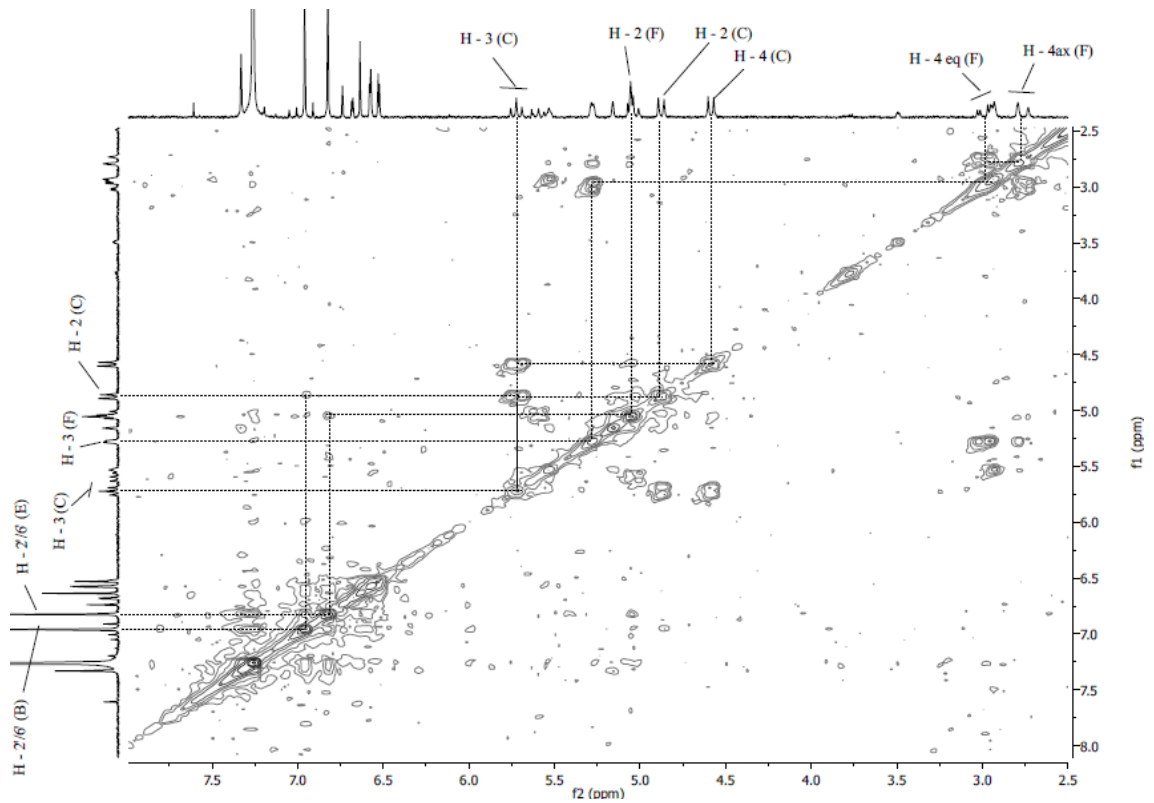
Figure S22 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (**9**).Figure S23 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of galocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (**9**).

Table S10 - ¹H NMR data of gallocatechin-(4 α →8)-epigallocatechin (9) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)	2.76 (dd)	2.87	18.3
4eq (F)	2.99 (dd)	2.87	18.15; 4.8
4 (C)	4.59 (d)	4.56	9.6
2 (C)	4.88 (d)	4.94	9.9
2 (F)	5.05 (br d)	5.05	
3 (C)	5.72 (m)	5.78	
3 (F)	5.28 (m)	5.28	
6 (A)	6.53 (d)	6.53	2.4
8 (A)	6.58 (d)	6.57	2.1
6 (D)	6.64 (s)	6.74	
2'/6' (E)	6.82 (s)	6.82	
2'/6' (B)	6.96 (s)	6.96	

* Helsper et al. (1993)

Figure S24 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (**10**).

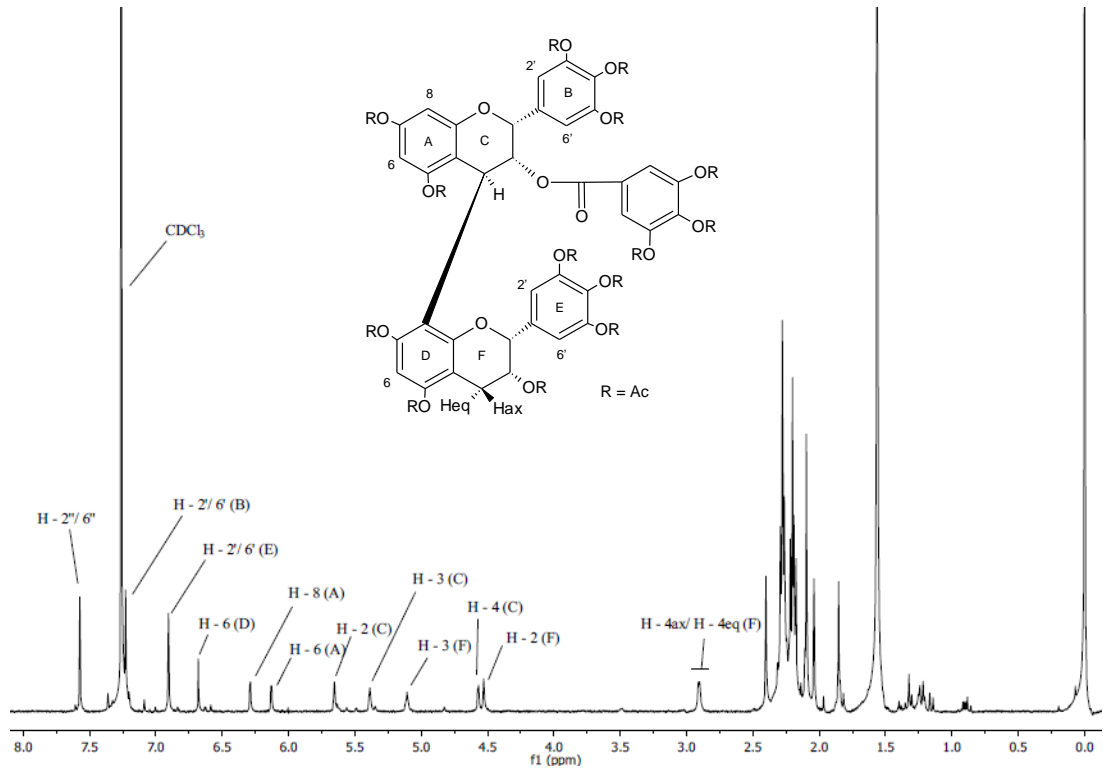


Figure S25 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-3-O-galate-(4 β →8)-epigallocatechin (**10**).

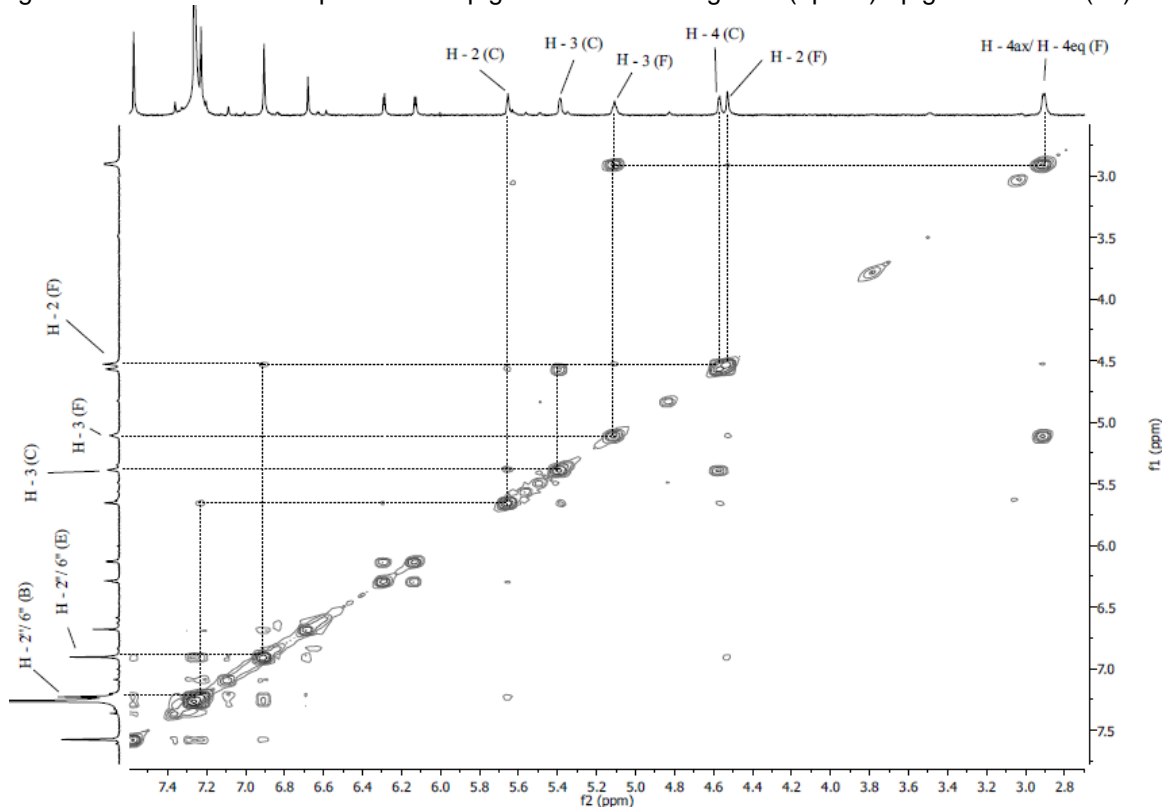


Table S11 - ¹H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate-(4β→8)-epigallocatechin (**10**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)/ 4eq (F)	2.91 (m)	2.91	
2 (F)	4.53 (br d)	4.54	
4 (C)	4.57 (d)	4.57	2.1
3 (F)	5.11 (m)	5.12	
3 (C)	5.39 (m)	5.39	
2 (C)	5.66 (br d)	5.66	
6 (A)	6.13 (d)	6.13	2.4
8 (A)	6.29 (d)	6.29	1.8
6 (D)	6.68 (s)	6.68	
2'/6' (E)	6.91 (s)	6.91	
2'/6' (B)	7.23 (s)	7.24	
2''/6''	7.57 (s)	7.58	

* Danne et al. (1994)

Figure S26 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-galate (**10**).

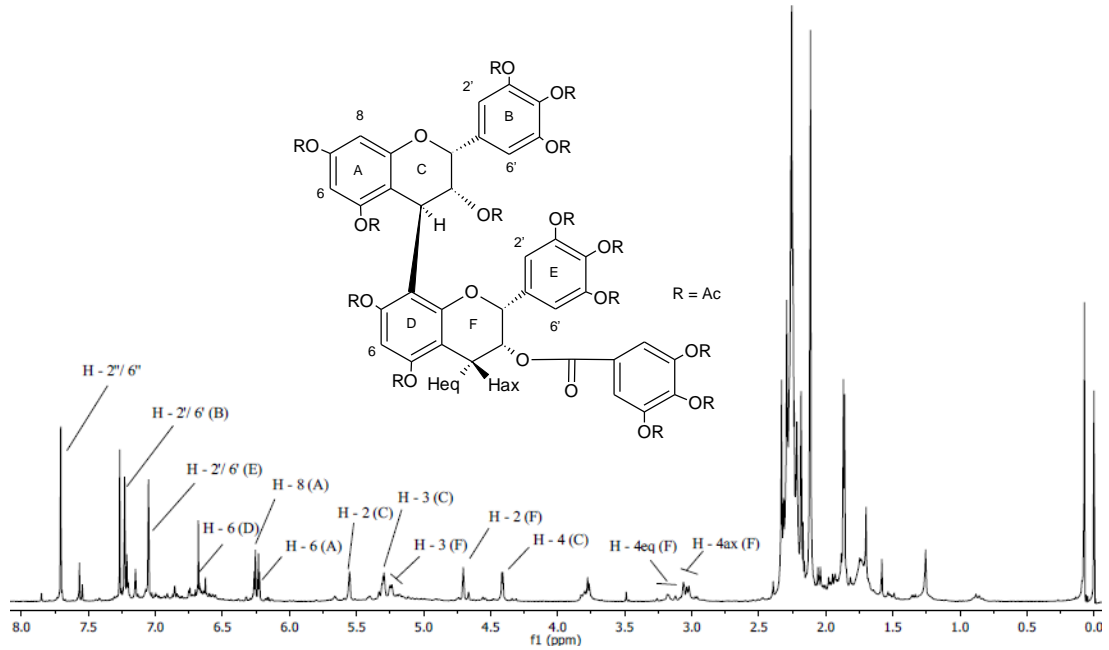


Figure S27 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-galate (**10**).

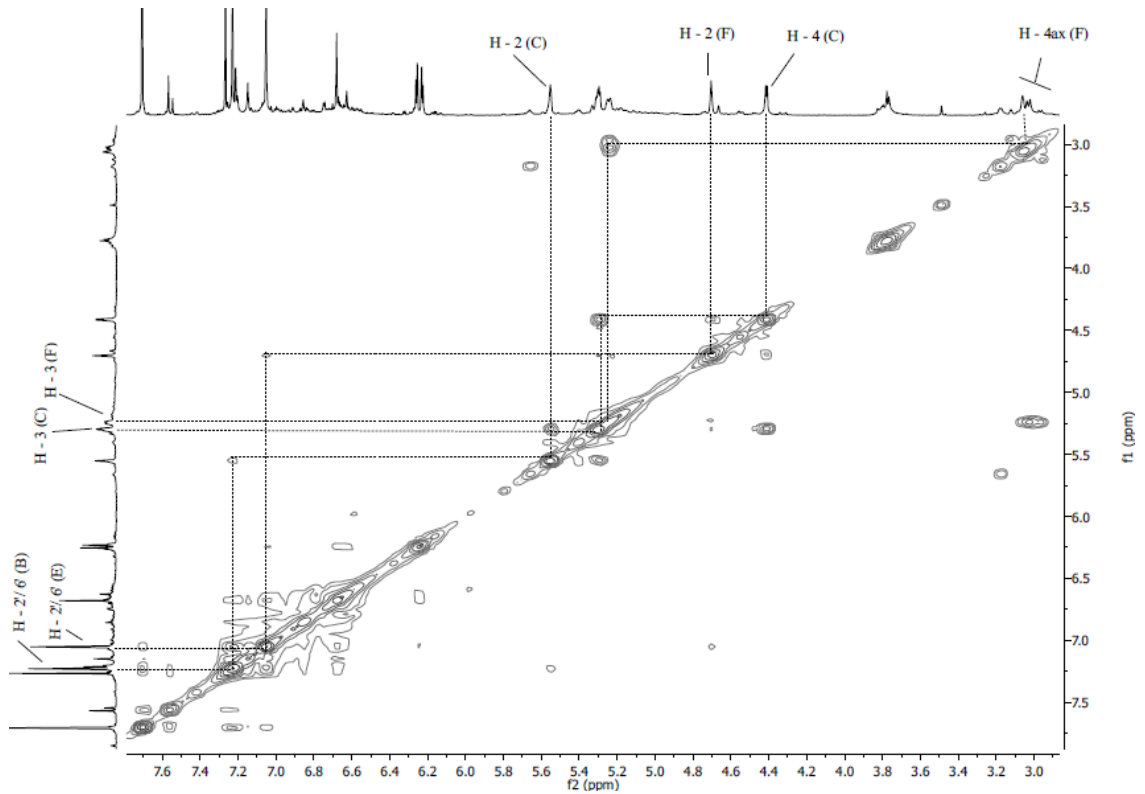


Table S12 - ¹H NMR data of epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-galate (**10**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax (F)/ 4eq (F)	3.02 - 3.18	3.01-3.19	
4 (C)	4.41	4.41	2,1
2 (F)	4.70	4.70	
3 (F)	5.24	5.21 – 5.27	
3 (C)	5.29 – 5.33	5.28 – 5.34	
2 (C)	5.55	5.55	
6 (A)	6.23	6.23	2.1
8 (A)	6.26	6.26	2.4
6 (D)	6.68	6.68	
2'/6' (E)	7.05	7.05	
2'/6' (B)	7.23	7.23	
2''/6''	7.71	7.71	

* Mello et al. (1996a)

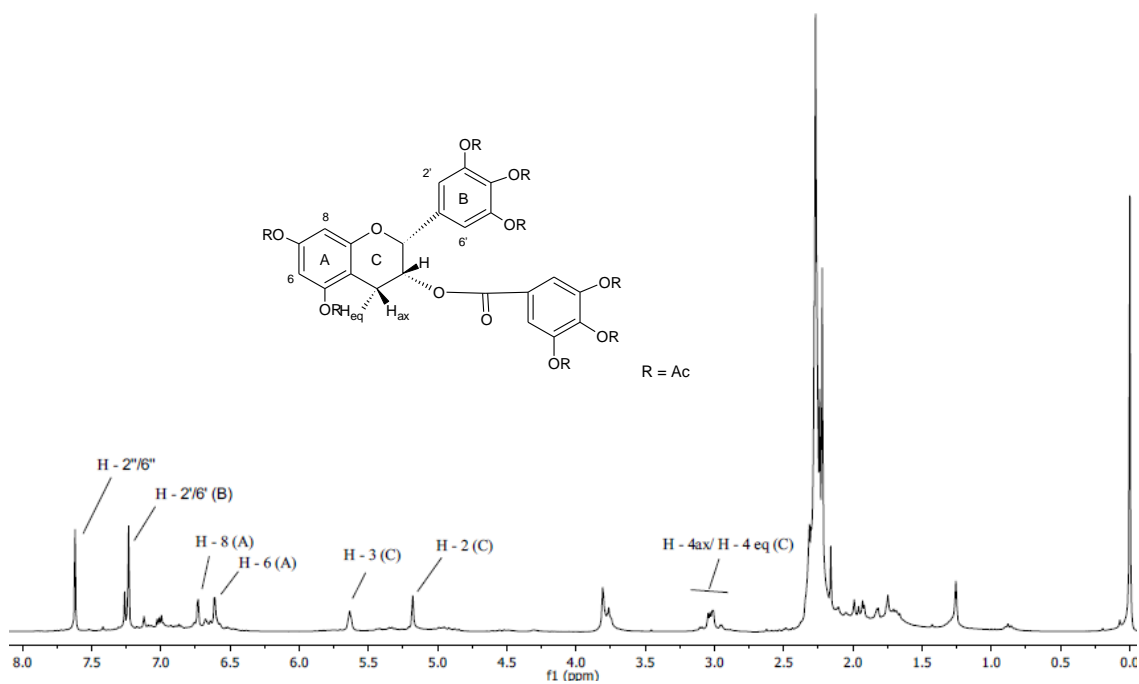
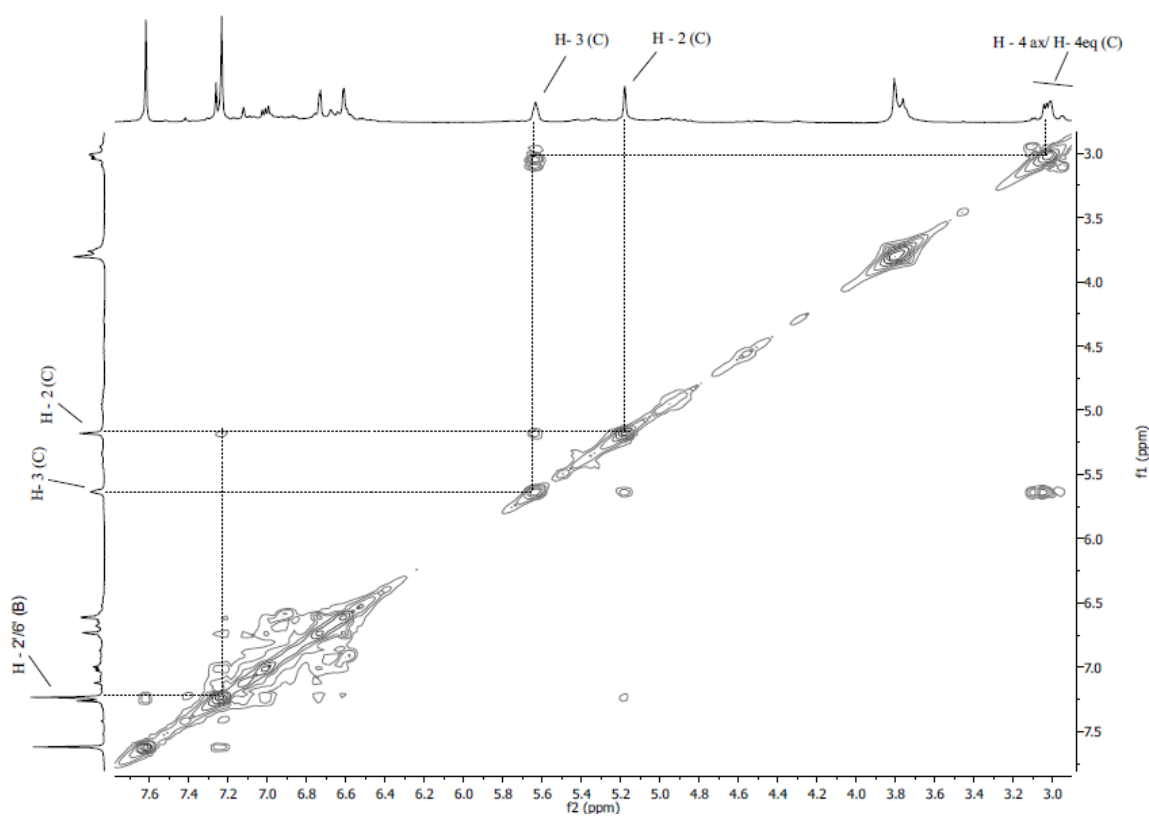
Figure S28 - ^1H NMR spectrum (300 MHz, CDCl_3) of epigallocatechin-3-O-galate (**12**).Figure S29 - $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY spectrum of epigallocatechin-3-O-galate (**12**).

Table S13 - ¹H NMR data of epigallocatechin-3-O-galate (**12**) (300 MHz, in CDCl₃).

Position	δ (ppm)	δ literature (ppm)*	J (Hz)
4ax/4eq	2.95 – 3.11 (m)	2.91-3.14	
2	5.18 (s)	5.17	
3	5.64 (m)	5.60 – 5.66	
6	6.61 (d)	6.61	1.8
8	6.73 (d)	6.74	1.8
2'/6'	7.23 (s)	7.24	
2''/6''	7.62 (s)	7.62	

* Mello et al. (1996a)

CAPÍTULO 3 - DISCUSSÃO GERAL

Este capítulo compreende uma breve discussão sobre o trabalho.

As plantas produzem diferentes substâncias químicas, sendo que o tipo e as diferentes proporções desses compostos dependem do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, ou seja, dos fatores edafoclimáticos. Algumas substâncias, no entanto, são típicas de determinadas espécies e assim podem servir de parâmetro para caracterização e identificação do vegetal.

Um exemplo dessas substâncias são as prorobinetinidinas encontradas na espécie *Stryphnodendron adstringens*. Muitas das estruturas isoladas e identificadas até o momento não foram encontradas na natureza, ou mesmo sintetizadas (Mello et al., 1996b, Lopes et al., 2009).

S. adstringens tem sido explorado tradicionalmente por suas propriedades medicinais. É utilizado pela população por sua atividade cicatrizante e no tratamento da leucorreia. Os taninos são apontados como os possíveis responsáveis pelos efeitos terapêuticos da planta (Rebecca et al., 2002; Ishida et al., 2009; Hernandez et al. 2010).

Desse modo, o conhecimento dos constituintes químicos de *S. adstringens* podem promover conhecimentos relativos à caracterização da espécie e explicar, ao menos em partes, as atividades farmacológicas do vegetal.

A mistura acetona:água foi o solvente de escolha para a preparação do extrato (Mello, 1995). Apesar do metanol ter uma extração qualitativamente melhor, a acetona bloqueia a associação tanino-proteína, promovendo uma extração quantitativamente maior. Além disso, foi constatado que a água misturada com solventes orgânicos aumenta o rendimento da extração de compostos fenólicos (Santos; Mello, 2004).

Na separação realizada em Sephadex® LH-20 espera-se que as substâncias com pesos moleculares maiores apareçam nas frações iniciais. No entanto, para taninos, observa-se a predominância de moléculas com peso molecular menor nas primeiras frações. Este fato está relacionado, provavelmente, com a interação entre os monômeros de taninos com o sistema eluente, ocorrendo assim a eluição sequencial: monômeros > dímeros > trímeros > tetrâmeros > oligômeros > polímeros. (Thompson et al., 1972). O presente trabalho corrobora a afirmação de Thompson, já que foi observado que a maior parte dos monômeros foi isolada nas frações iniciais (III, IV e V), enquanto grande parte dos dímeros foi encontrada nas frações VII e VIII.

A purificação final dos compostos presentes nas frações obtidas na cromatografia em coluna (CC) contendo Sephadex LH-20 foi feita por meio da cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV), cromatografia líquida de média pressão (CLMP), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A cromatografia em contracorrente de alta velocidade é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária é retida no aparelho, sem a utilização de um suporte sólido, e a fase móvel passa através desta. Dentre suas vantagens podem ser citadas: recuperação total da amostra, uso em escala preparativa, rapidez e economia (Ito, 2005). Devido à diversidade de sistemas solventes que podem ser utilizados, a CCCAV pode separar tanto compostos polares como apolares. A escolha de um sistema adequado é o ponto-chave para o sucesso da técnica. Para separação de taninos neste trabalho, utilizou-se como sistema solvente acetato de etila:*n*-propanol:água, conforme trabalhos realizados por Mello (1996a; 1996b). Nesse sistema, o *n*-propanol funciona como uma interface entre o solvente aquoso e o orgânico, possibilitando assim a separação de substâncias com características estruturais semelhantes.

Os monômeros, dímeros e trímeros de taninos condensados podem ser isolados por CLAE utilizando-se diferentes proporções de MeOH:água (Mello et al., 1996a). Um sistema de solvente escolhido para CLAE analítica pode ser transposto à CLMP de forma simples e direta (Schaufelberger; Hostettmann, 1985). Esta observação pode ser confirmada neste trabalho, já que os monômeros foram isolados por CLMP, empregando-se como fase estacionária sílica e como fase móvel um gradiente de MeOH:água.

A elucidação estrutural de flavan-3-ol com hidroxilas livres é relativamente simples com o auxílio da ressonância magnética nuclear (RMN). Entretanto, para proantocianidinas, sua interpretação é dificultada devido aos sinais rotaméricos presentes nos espectros. Para superar esse problema, realiza-se a derivatização (acetilação) das substâncias com piridina e anidrido acético. Desta forma, as mesmas apresentam comportamento químico estável e mostram-se nos espectros de RMN com sinais padrão (Outtrup; Schaumburg, 1981). Desse modo, os compostos analisados neste trabalho apresentam características próprias para sua identificação e, portanto, os dados obtidos e a comparação com os dados encontrados na literatura permitem elucidar estruturalmente as substâncias de forma segura.

Os taninos condensados acetilados podem ser separados por CCDP ou CLAE (Piretti; Doghieri 1990, Mello et al., 1996a). Neste caso, as hidroxilas da substância reagem com o anidrido acético, o que torna a substância menos polar. Assim, a separação ocorre utilizando-se uma fase estacionária em fase normal. Os dímeros encontrados neste trabalho foram isolados empregando-se CCDP, com fase estacionária de gel de sílica F₂₅₄ e com fase móvel misturas de tolueno:acetona, ou CLAE, com fase estacionária uma coluna se ciano-sílica e com fase móvel mistura de hexano:acetato de etila.

Nota-se então, que o padrão de isolamento sequencial com diferentes formas de separação adotado neste trabalho foi eficaz ao isolamento de taninos condensados da fração semipurificada de *S. adstringens*. Por meio desse modelo conseguiu-se isolar quatro

novas substâncias na espécie, a 4'-O-metil-epigalocatequina, a epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-galocatequina, a galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina e a epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina.

3 CONCLUSÃO

As formas de extração e fracionamento utilizadas no estudo químico de extratos semipurificados de *Stryphnodendron adstringens* foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.

Foram isolados e identificados: 4'-O-metil-galocatequina, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato, 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato, epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-(4-hidroxi)-benzoato.

Além disso, foram isoladas quatro substâncias inéditas na espécie, a 4'-O-metil-epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-galocatequina, galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina e a epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina.

Assim, os estudos fitoquímicos de *S. adstringens* são de fundamental importância para contribuir na caracterização da espécie, que tem potencial farmacológico diversificado e reconhecido.

REFERÊNCIAS

- Agares FV, Pereira C, Rizzini CM 1994. *Botânica: angiospermae, taxonomia, morfologia, reprodução, chave para determinação de família*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 243p.
- Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, Amorim ELC 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 110: 76-91.
- Almeida AC, Sobrinho EM, Pinho L, Souza NS, Martins ER, Duarte ER, Santos HO, Brandi IV, Cangussu AS, Costa JPR 2010. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodunurundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. *Cienc. Rural* 40 (1): 200-203.
- Angiosperm Phylogeny Group 2003. *An update of the angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants*. APG II. Botanical journal of the Linnean Society, p. 399-436.
- Ardisson L, Godoy JS, Ferreira LAM, Sthemann JR, Brandão MGL 2002. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Rev. Bras. Farmacogn.* 12 (1): 27-34.
- Audi EA, Toledo DP, Peres PG, Kimura E, Pereira WKV, Mello JCP, Nakamura CV, Alves W, Cuman RKN, Bersani-Amado CA 1999. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 3: 264-266.
- Audi EA, Toledo CEM, Santos FS, Bellanda PR, Alves-do-Prado W, Nakamura TU, Nakamura CV, Sakuragui CM, Bersani-Amado CA, Mello JCP 2004. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. *Acta farm. Bonaer.* 23: 328-333.
- Barroso GM 1984. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, p. 326.
- Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 82: 155-158.
- Bendazzoli WS 2000. Fitomedicamentos: Perspectiva de resgate de uma terapia histórica. *Mundo saúde* 24 (2): 123-126.
- Bersani-Amado CA, Nakamura CV, Nakamura TU, Martinez M, Mello JCP 1996. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Resumo. p.14.
- Bezerra JCB, Silva IA, Ferreira HD, Ferri PH, Santos SC 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian cerrado medicinal plants. *Fitoterapia* 73: 428-430.
- Bittencourt SC, Caponi S, Falkenberg MB 2002. O uso das plantas medicinais sob prescrição médica: pontos de diálogo e controvérsia com o uso popular. *Rev. Bras. Farmacogn.* 12: 89-91.
- Brandão MGL, Gomes CG, Nascimento AM 2006a. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. *Revista Fitos* 2 (3): 24-29.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mór RLM 2006b. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. bras. farmacogn* 16 (3): 408-420.
- Brandão MGL, Zanetti NNS, Oliveira P, Graef CFF, Santos ACP, Monte-Mór RLM 2008. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol.* 120:141-148.
- Brasil 2006a. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos. *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*. Brasília: (DF).
- Brasil 2006b. Ministério da Saúde. SUS amplia uso de plantas medicinais - Disponível Em: [Http://200.214.130.38/Portal/Aplicacoes/Noticias/Noticias_Detalhe.Cfm?Co_Seq_Noticia=26462](http://200.214.130.38/Portal/Aplicacoes/Noticias/Noticias_Detalhe.Cfm?Co_Seq_Noticia=26462).

- Brasil 2006c. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicináveis e Fitoterápicos. Brasília: (DF).
- Brasil 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: (DF). Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.
- Brasil 2011, Ministério do Meio Ambiente. Quarto Relatório Nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica. Brasília: (DF).
- Braz Filho R 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente 2010. *Quim. Nova* 33 (1): 229-239.
- Brito MF, Tokarnia CH, Peixoto PV 2001. Intoxicação Experimental Pelas Favas de *Stryphnodendron Obovatum* (Leg. Mimosoideae) em Bovinos. Caracterização do quadro clínico. *Pesq. Vet. Bras.* 21 (2): 9-17.
- Bruyne TD, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 445-459.
- Bürger ME, Ahlert N, Baldisserotto B, Langeloh A, Schirmer B, Foletto R 1999. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 36: 296-299.
- Burkill HM 1997. *The useful plants of west tropical Africa*. Royal Botanic Gardens Kew, p. 88-134.
- Cala O, Pinaud NI, Simon C, Fouquet E, Laguerre M, Dufourc EJ, Pianet I 2010. NMR and molecular modeling of wine tannins binding to salivary proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *FASEB J* 24 (11): 4281- 4290.
- Calixto JB 2000. Biopirataria: a diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. *Ciência Hoje* 28 (2): 37-43.
- Calixto JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 179-189.
- Calixto JB 2003. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciênc. Cult.* 55 (3): 37-39.
- Carvalho JCT, Gosmann G, Schenkel EP 2004. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.20, p.433-449.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Brás. Farmacogn.* 18 (2): 314-319.
- Cecílio AB, Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, Oliveira DA, Sobral MEG, Duarte MGR, Moreira CPS, Silva CG, Almeida VL 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J. Ethnopharmacol.* 141: 975-981.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y 1998. Tannins and human health: A review. *Critical Reviews In Food Nutrition, Amherst* 38 (6): 421-464.
- Coelho JM, Antonioli AB, Silva DN, Carvalho TMMB, Pontes ERJC, Odashiro NA 2010. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 37 (1): 45-51.
- Corrêa MP 1978. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas e cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 590.
- Corrêa VS, Cerdeira AL, Fachin AL, Bertoni BW, Pereira OS, França SC, Momm HG, Moraes RM, Pereira MAS 2012. Geographical variation and quality assessment of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville within Brazil. *Genet. Resour. Crop Ev* 59: 1349-1356.
- Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk EDA, Mello JCP, Nakamura TU, Filho BPD, Nakamura CV 2010. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 58: 330-335.

- Costa MA 2011. Investigação da atividade toxicológica e farmacológica da fração rica em polímeros de proantocianidina, obtida das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). 153f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Brasil.
- Costa JGM, Leite GO, Dubois AF, Seeger RL, Boligon AA, Athayde ML, Campos AR, Rocha JBT 2012. Antioxidant Effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius Extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): Potential Involvement in Its Therapeutic Use. *Molecules* 17: 934-950.
- Costa MA, Mello JCP, Kaneshima EM, Nakamura TU, Filho BPD, Audi EA, Nakamura CV 2013. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 1-9.
- Cronquist A 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden.
- Cunha, A.P. Aspectos Históricos Sobre Plantas Medicinais, Seus Constituintes Activos E Fitoterapia. Disponível Em [Http://www.Esalq.Usp.Br/Siesalq/Pm/Aspectos_Historicos.Pdf](http://www.Esalq.Usp.Br/Siesalq/Pm/Aspectos_Historicos.Pdf), Acessado Em 13/10/2012.
- Danne A, Petereit F, Nahrstedt A 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* 33 (2): 533-538.
- Dahlgren RMT 1983. General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics. *Nordic. J. Bot.* 3: 119-149.
- Doyle JJ, Luckow MA 2003. The rest of the iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Farmacopeia Brasileira 2010. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v 1,2.
- Ferreira D, Li XC 2000. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat. Prod. Rep.* 13: 193-212.
- Ferreira EV, Boabaid F M, Arruda LP, Lemos RAA, Souza MA, Nakazato L, Colodel EM 2009. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) em bovinos. *Pesqui. Vet. Bras.* 29 (11): 951-957.
- Ferri MG 1969. *Plantas do Brasil: espécies do cerrado*. São Paulo: Edgard Blucher, p.192.
- Filho PRS, Ferreira LA Gouvêa CMCP 2011. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21(6): 1000-1005.
- Gomes RT, Santos VR, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MGL 2009. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). *Int. J. Dent.* 8 (1): 1-5.
- Guerra MP, Nodari RO 2004. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais E Éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. 6ª. Ed., Porto Alegre-Florianópolis: Ed. da Universidade-Editora da Ufsc, p.13-40.
- Harborne JB 1998. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall.
- Haslam E 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
- Hernandes L, Pereira LMS, Palazzo F, Mello JCP 2010. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46: 431-436.
- Herzog-Soares JD, Alves RK, Isac E, Bezerra JCB, Gomes MH, Santos SC, Ferri PH 2002. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Rev. Bras. Farmacogn.* 12: 1-2.
- Heywood VH 1993. *Flowering Plants of the World*. New York: Oxford University Press, p. 335.
- Hutchinson J 1967. *The genera of flowering plants (Angiosperms)*. Oxford: Oxford University, 1967.

- Holetz FB, Nakamura TU, Filho BPD, Mello JCP, Morgado-Díaz JÁ, Toledo CEM, Nakamura CV 2005. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (4): 397-401.
- Hostettmann K, Queiros FE, Vieira CP 2003. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos: Ed. UFSCar.
- Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Filho BPD, Nakamura TU, Nakamura CV 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 942-949.
- Ishida K, Rozemal S, Mello JCP, Nakamura CV 2009. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5 (29): 29-33.
- Ito Y 2005. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1065: 145-168.
- Jacobson TKB, Garcia J, Santos SC, Duarte JB, Farias JG, Kliemann HJ 2007. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesqui. Agropec. Trop.* 35 (3): 163-169.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA 2002. *Plant systematic: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Khelladi YB, Maurin O, Hurter J, Bank MVD 2010. The evolutionary history and biogeography of Mimosoideae (Leguminosae): an emphasis on African acacias. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57: 495-508.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M 2005. *Legumes of the World*. London: Royal Botanic Gardens Kew, p. 434.
- Lima JCS, Martins DTO, Souza PTJR 1998. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.* 12: 218-220.
- Lopes GC, Sanches ACC, Nakamura CV, Filho BPD, Hernandez L, Mello JCP 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J. Ethnopharmacol.* 99: 265-272.
- Lopes GC, Machado FAV, Toledo CEM, Sakuragui CM, Mello JCP 2009. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 925-931.
- Lucena MN, Mendes MM, Brandeburgo MIH 2009. Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e sua eficácia na neutralização dos efeitos induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. *Horizonte Cient.* 3 (1).
- Luck G, Liao H, Murray NJ, Grimmer HR, Warminski EE, Williamson MP, Lilley TH, Haslam, E 1994. Polyphenols, adstringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* 37 (2): 357-371.
- Luckow M 2005. Tribo Mimosaeae. In: Lewis G, Schrire BD, Mackinder BA, Lock JM (Eds) *Legumes of the world*. Kew: Royal Botanic Gardens, p.163-183.
- Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, NAKAMURA TU, Filho BPD, Cortez DAG, Mello JCP, Nakamura CV 2005. Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41: 1-10.
- Macedo M, Ferreira AR 2004. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev. Bras. Farmacogn.* 14 (1): 40-44.
- Magalhães CG 2012. Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* reissek (celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol. 186f Tese (Doutorado), Curso de Pós-graduação em Ciências da UFMG, Belo Horizonte.
- Marques VRB 1999. *Natureza em Boiões: Medicinas e Boticários no Brasil Setecentista*. Ed. Unicamp.

- Martins DTO, Lima JCS, Rao VSN 2002. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. *Phytother. Res.* 16: 427-431.
- McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth D, Marhold K, Nicolson DH, Prado J, Silva PC, Skog JE, Wiersema JEH, Turland NJ 2006. Tradução Carlos Bicudo e Jefferson Prado. *Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Viena)*, São Carlos: Rima.
- Mello JCP 1995. Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae). 263f. Tese (Doutorado), Universidade de Münster, Alemanha.
- Mello JCP, Peterleit F, Nahrstedt A 1999a. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 41 (3): 807-813.
- Mello JCP, Peterleit F, Nahrstedt A 1999b. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 42 (3): 857-862.
- Mello JCP 1997. Taninos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville – Mimosaceae – barbatimão. *Caderno de Farmácia* 13 (2): 105-109.
- Mello JCP, Peterleit F, Nahrstedt A 1999. A dimeric prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* 51: 1105-1107.
- Minatel DG, Pereira MAS, Chiaratti TM, Pasqualin L, Oliveira JCN, Couto LB, Lia RCC, Cintra JM, Bezzon MFA, Franca SC 2010. Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. *Rev. Bras. Med.* 67 (7): 250-256.
- Munhoz VM, Lonni AASG, Mello JCP, Lopes GC 2012. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apli.* 33 (2): 225-232.
- Nodari RO, Guerra MP 2004. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.1, p. 13-26.
- Occhini EML 1990. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart.(Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Bot. Bras.* 4 (2): 153-158.
- Oliveira DG, Prince KA, Higuchi CT, Santos ACB, Lopes LMX, Simões MJS, Leite CQF 2007. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drink. *Rev. ciênc. farm. básica. apli.* 28 (2): 165-169.
- Oliveira SS, Vanzeler, MLA 2011. Avaliação dos efeitos do extrato metabólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville por gavagem no ciclo estral de ratas. *Revista Eletrônica de Farmácia* 8 (1): 22-28.
- Outtrup H, Schaumburg K 1981. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. *Carlsberg Res. Comm.* 46: 43.
- Paes JB, Marinho IV, Limas RA, Limas CR, Azevedo TKB 2006. Technical viability of tannins of four Forest species of Brazilian semi-arid region to skidder skins. *Ci. Fl.* 16 (4): 453-462.
- Panizza S, Rocha AB, Gecchi R, Silva RS, Peneado R 1988. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farm.* 10: 101-106.
- Paula RC, Sanchez EF, Costa TR, Martins CHG, Pereira PS, Lourenço MV, Soares AM, Fuly AL 2010. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 16 (2): 311-323.
- Pereira MNS, Andrade ACU, Piló-Veloso, D 2002. Isolamento e identificação de metabólitos secundários das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. In: *Simpósio De Plantas Medicinais Do Brasil*, 17. Cuiabá. Resumos. Cuiabá: UFMT. QI.017
- Pereira ZV, Mussury RM, Almeida AB, Sangalli A 2009. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. *Acta Sci. Biol. Sci.* 31: 293-299.

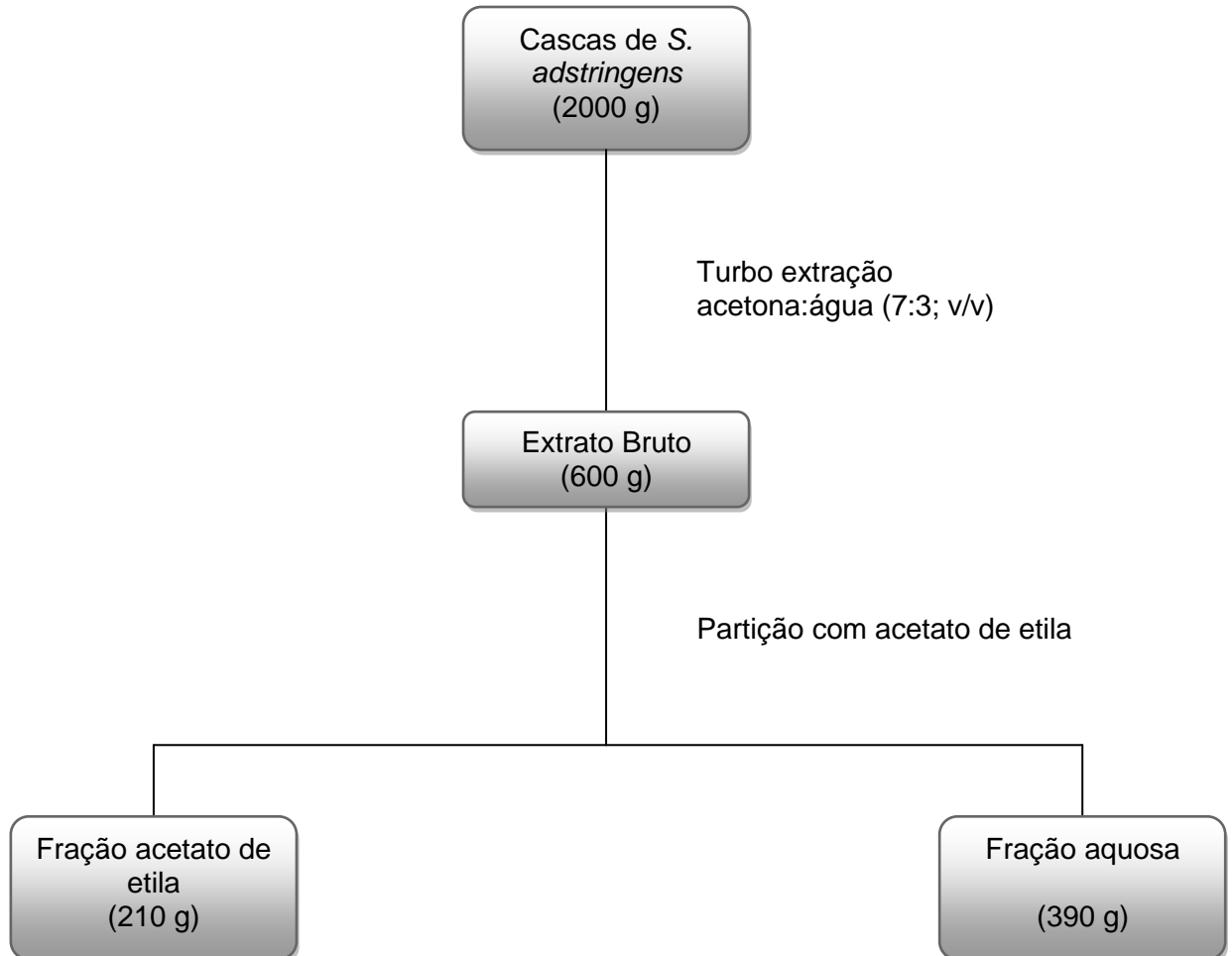
- Pereira EMR, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MGL, Santos VR 2011. In Vitro Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. *Planta Med* 77: 401-404.
- Perfeito JPS 2012. O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento. 161f. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília.
- Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* 25: 45-61.
- Piretti MV, Doghieri P 1990. Separation of peracetylated flavanoid and flavonoid polyphenols by normal-phase high-performance liquid chromatography on a cyano-silica column and their determinations. *J. Chromatogr.* 514: 334-342.
- Polhill RM, Raven PH, Stirton CH 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: *Advances in legume systematics*. London: Royal Botanic Gardens, Kew 1: 1-26.
- Rates SMK 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rebecca MA, Ishii-Iwamoto EL, Grespan R, Cuman RKN, Caparroz-Assef SM, Mello JCP, Bersani-Amado CA 2002. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 83: 101-104.
- Rebecca MA, Ishii-Iwamoto EL, Kelmer-Bracht AN, Caparroz-Assef SM, Cuman RKN, Pagadigorria CLS, Mello JCP, Bracht A, Bersani-Amado CA 2003. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol Lett.* 143: 55-63.
- Reicher F, Leitner SCS, Sierakowski MR, Fontana JD, Correa JBC 1992. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35 349-357.
- Ribeiro AQ, Leite JPV, Dantas-Barros AM 2005. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (1): 65-70.
- Rizzini CT, Mors WB 1976. *Botânica econômica brasileira*. São Paulo: Edusp.
- Rizzini CT 1997. *Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos*. São Paulo: Âmbito Cultural.
- Rodrigues AG, Santos MG, Amaral ACF 2006. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In: Brasil, 2006. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília: (DF).
- Sanches ACC, Lopes GC, Nakamura CV, Filho BPD, Mello JCP 2005. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 41 (1): 1-7.
- Sanches ACC, Lopes GC, Toledo CEM, Sacramento LVS, Sacuragui CM, Mello JCP 2007. Estudo Morfológico Comparativo das cascas e Folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* – Leguminosae. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (3): 362-368.
- Santos CS, Costa WF, Ribeiro JP, Guimarães DO, Ferri PH, Ferreira HD, Seraphin JC 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia* 73: 292-299.
- Santos SC, Mello JCP 2004. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.24, p. 527-554.
- Santos SC, Costa WF, Batista F, Santos LR, Ferri PH, Ferreira HD, Seraphin JS 2006. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (4): 552-556.
- Scalbert A 1991. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Schaufelberger D, Hostettmann K 1985. Analytical and preparative reversed-phase liquid-chromatography of secoiridoid glycosides. *J Chromatogr. A* 346: 396-400.
- Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR 2004. Produtos de Origem Vegetal e o desenvolvimento de Medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello

- JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.15, p.371-400.
- Schoefield P, Mbugua DM, Pell AN 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.
- Silva FM, Paula JE, Espindola LS 2009. Evaluation of the antifungal potential of brazilian cerrado medicinal plants. *Mycoses* 52: 511-517.
- Silva AB, Dias LP, Silva HK, Silva I, Nascimento VLV 2010. Bioatividade do extrato metanólico do barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (MART.) Coville sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos. Resumo em: Anais do Sistema de Gerenciamento de Conferências (OCS), V CONNEPI.
- Soares SP, Vinholis AHC, Casemiro LA, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG 2008. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. *Rev. Odonto Ciênc.* 23 (2): 141-144.
- Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 41: 293-299.
- Souza SMC, Silva LACT, Nobre MEP, Costa JG, Vale TG, Viana GSB 2002. Atividade anticonvulsivante do extrato etanólico (EE) de *Stryphnodendron coriaceum* Benth; Anais. Anais da SBPM-2002.
- Souza CD, Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot. Brás.* 20 (1): 135-142.
- Souza TM, Moreira RRD, Pietro RCLR, Isaac VLB 2007a. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. *Braz. J. Pharmacogn.* 17(1): 71-75.
- Souza TM, Severi JA, Silva VYA, Santos E, Pietro RCLR 2007b. Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities in the bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *J. Bas. Appl. Pharm. Sci.* 28 (2): 221-226.
- Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, Fonseca YM, Silva EC, Silveira D, Magalhães P 2012a. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLoS ONE* 7(11): 1-7.
- Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhães PO 2012b. Inhibitory activity of α -amilase and β -glucosidase by plants extracts from the Brazilian Cerrado. *Planta Med.* 78: 393-399.
- Takaki EY, Modesto MSJ, Figueiredo LHM 2007. Proteção intelectual e análise de mercado da biodiversidade brasileira. *Rev. Ciênc. Agrár.* 48: 143-159.
- Tokarnia CH, Brito MF, Driemeier D, Costa JBD, Camargo AJR 1998. Aborto Em vacas na intoxicação experimental por *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). *Pesqui. Vet. Bras.* 18 (1): 35-38.
- Toledo CEM 2002. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.. 92f Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.
- Turolla MSR, Nascimento ES 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev. Bras. Ciênc.Farm.* 42 (2): 291-306.
- Tursch B, Tursch E, Harrison IT, Brazão da Silva GBCT de C, Monteiro HJ, Gilbert B, Mors WB, Djerassi C 1963. Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformational changes in triterpenes of the β -amyirin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. *J. Org. Chem.* 28: 2390-2394.
- Tursch B, Dalozze D, Tursch E, Chiurdoglu G 1966. Triterpenes II (*). Les sapogénines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. *Bull. Soc. Chim. Belges* 75: 26-28.
- Vasconcelos MCA, Rodovalho NCM, Pott VJ, Ferreira AMT, Arruda ALA, Marques MCS, Castilho RO, Bueno NR 2004. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 14 (1): 121-127.

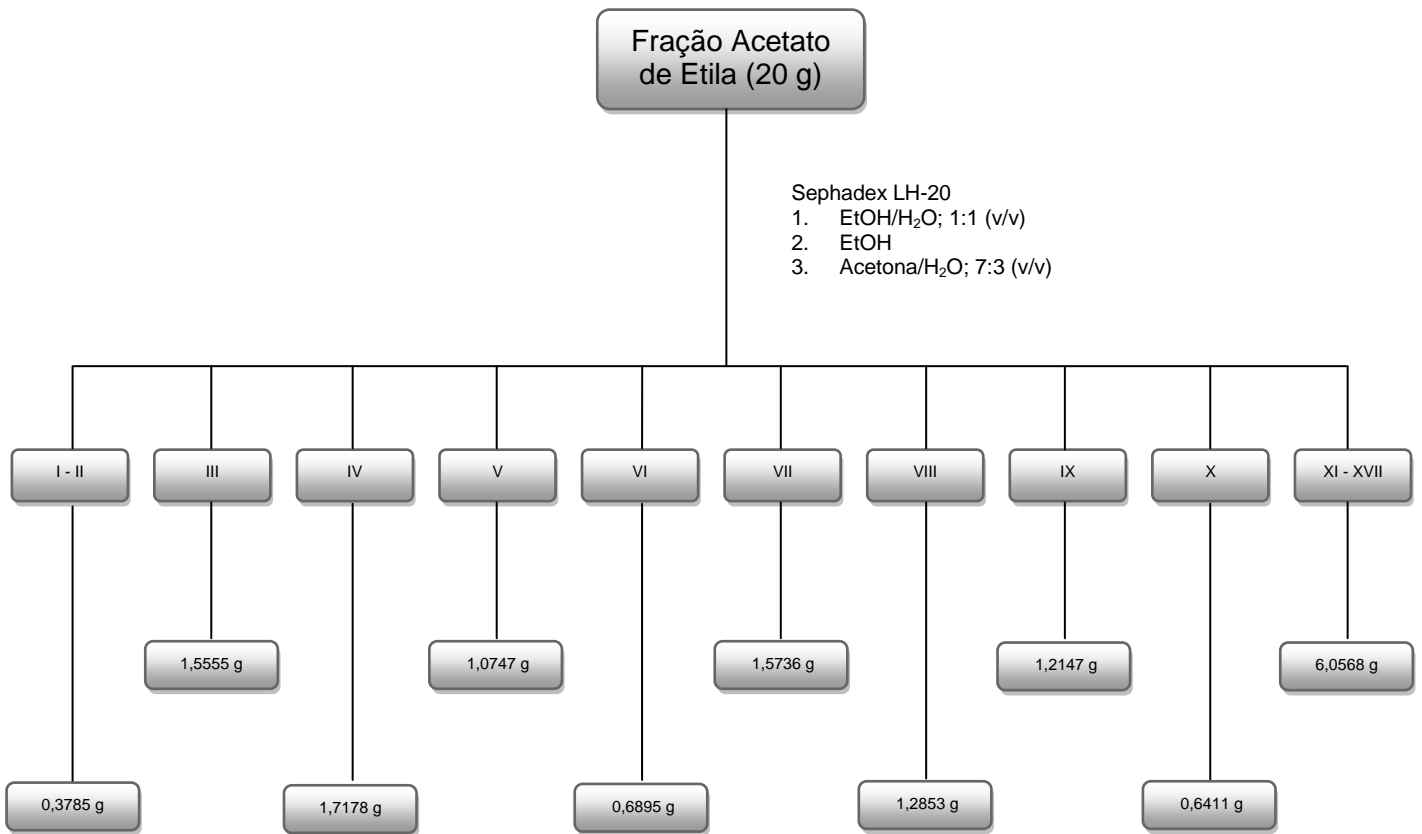
- Vaz AMSF. et al. Fabacea. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>. Acesso em: 26 de Maio de 2013.
- Veiga-Junior FV, Pinto AC 2005. Plantas medicinais: Cura segura? *Quim. Nova* 28 (3): 519-528.
- Vieira FC, Mello EVSL, Mello JCP 1998. Cicatrização cutânea em feridas de ratos após aplicação tópica de pomadas de barbatimão e nebacetin. In: *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Águas de Lindóia-SP, Resumos, p.15.
- Vicente RA, Leite E, Silva VR, Baby AR, Velasco MVR, Bedin V 2009. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of a cream containing the *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville bark extract for suppressing terminal hair growth. *JEAD* 23: 410-414.
- Vinald MC, Santos SC, Ferri PH, Junior RSL, Bezerra JCB 2005. Avaliação da atividade de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* ssp. sobre miracídios e cercarias de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Patol. Trop.* 34 (2): 137-143.
- Vital BR, Carneiro ACO, Pimenta AS, Lucia RML 2004. Adesivos a base de taninos das cascas de duas espécies de eucaliptos para produção de chapas de flocos. *Rev. Árvore* 28 (4): 571-582.
- Yokosuka A, Kawakami S, Haraguchi M, Mimaki Y 2008. Stryphnosides A-F, six new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. *Tetrahedron* 64: 1474-1481.
- Yokosuka A, Kawakami S, Haraguchi M, Mimaki Y 2011. Seven new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. *Phytochem. Lett.* 4: 259-266.
- Wink M, Mohamed GI 2003. A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogenesis inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 897-917.
- Wojciechowski MF, Lavin M, Sanderson MJ 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91 (11): 1846-1862.
- World Health Organization (WHO) 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. Geneva: WHO.
- Zocoler AMD, Sanches ACC, Albrecht I, Mello JCP 2009. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Braz. J. Pharm. Sci.* 45 (3): 443-452.

ANEXOS

Fluxogramas dos fracionamentos das frações obtidas a partir das cascas de *S. adstringens*.



Fluxograma 1 – Obtenção do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *S. adstringens*.



Fluxograma 2 - Fracionamento da fração Acetato de Etila (FAE) obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.

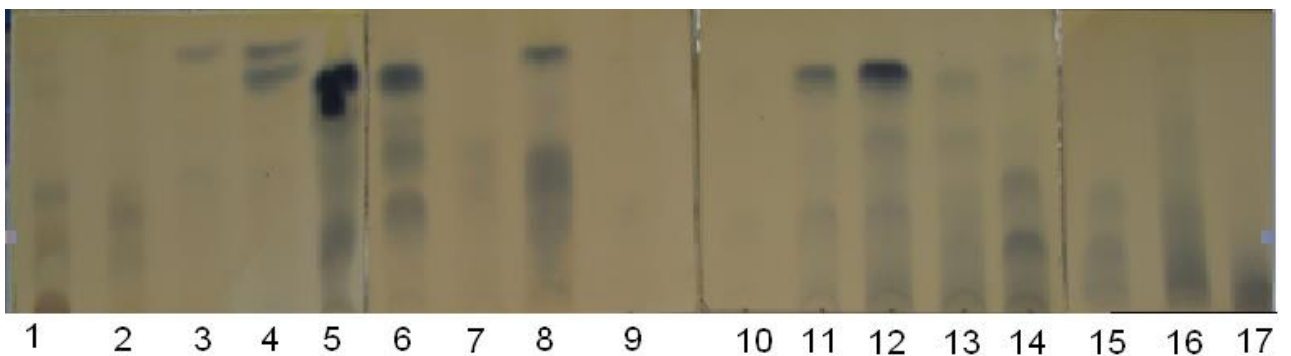
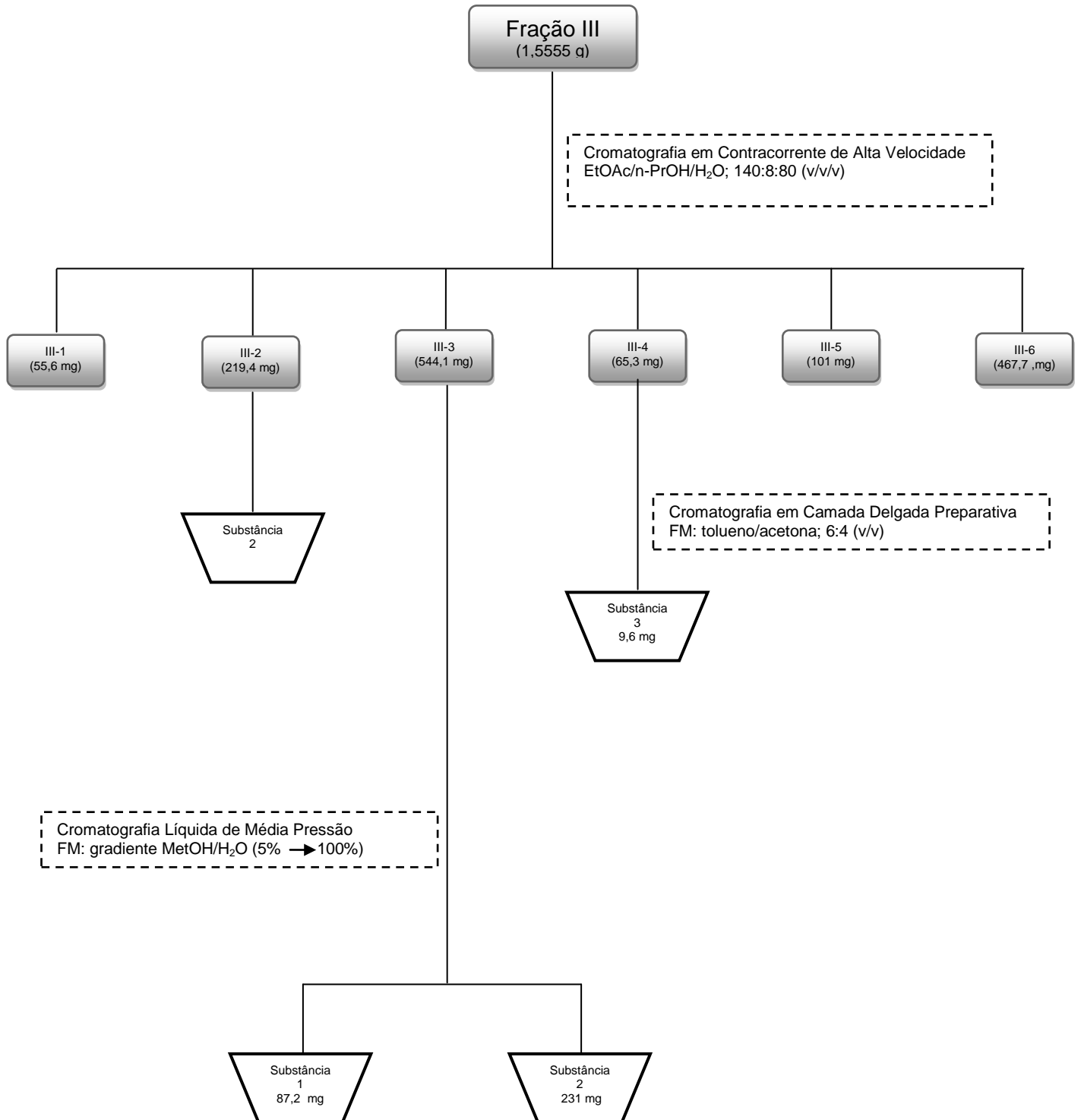
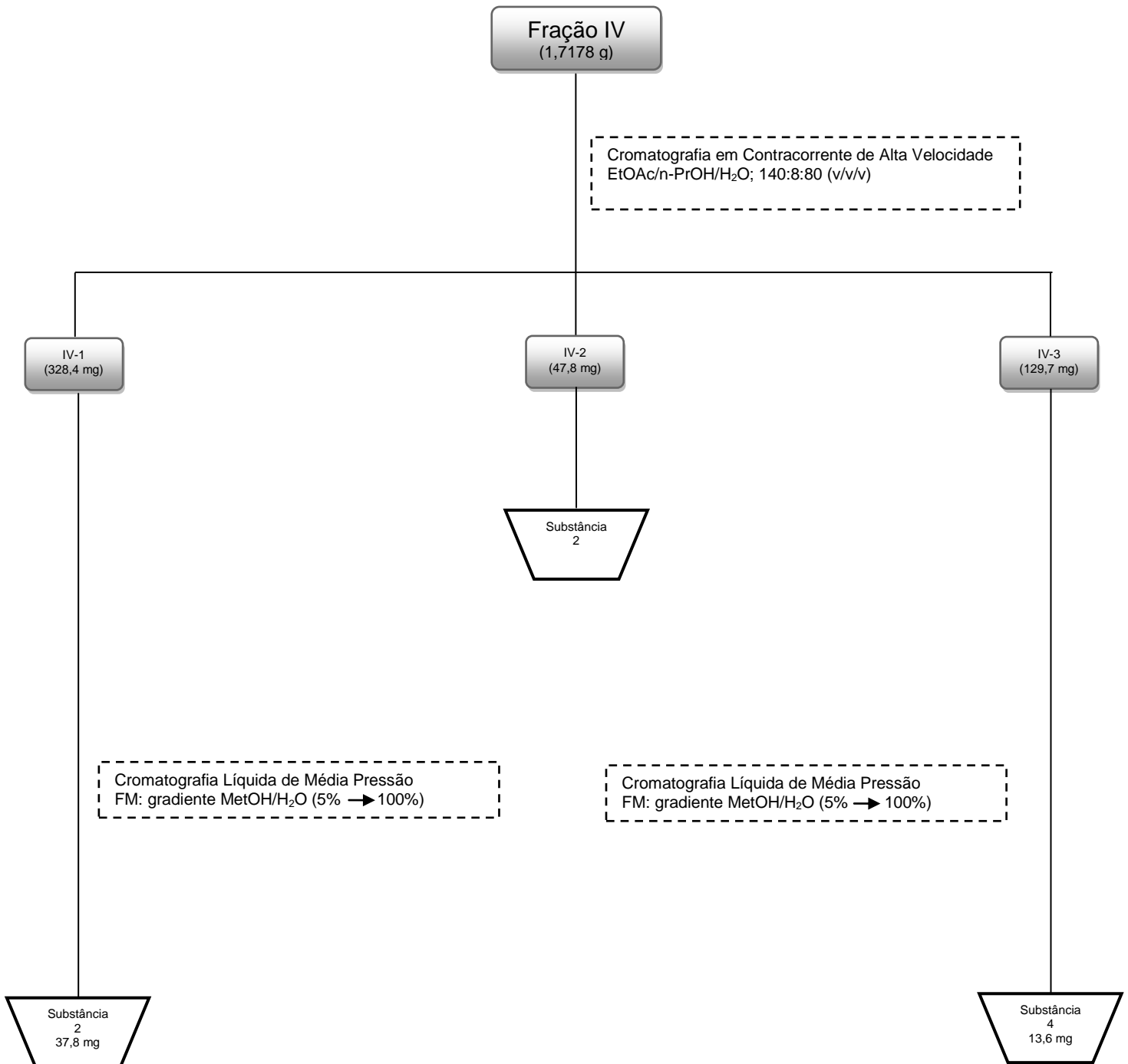


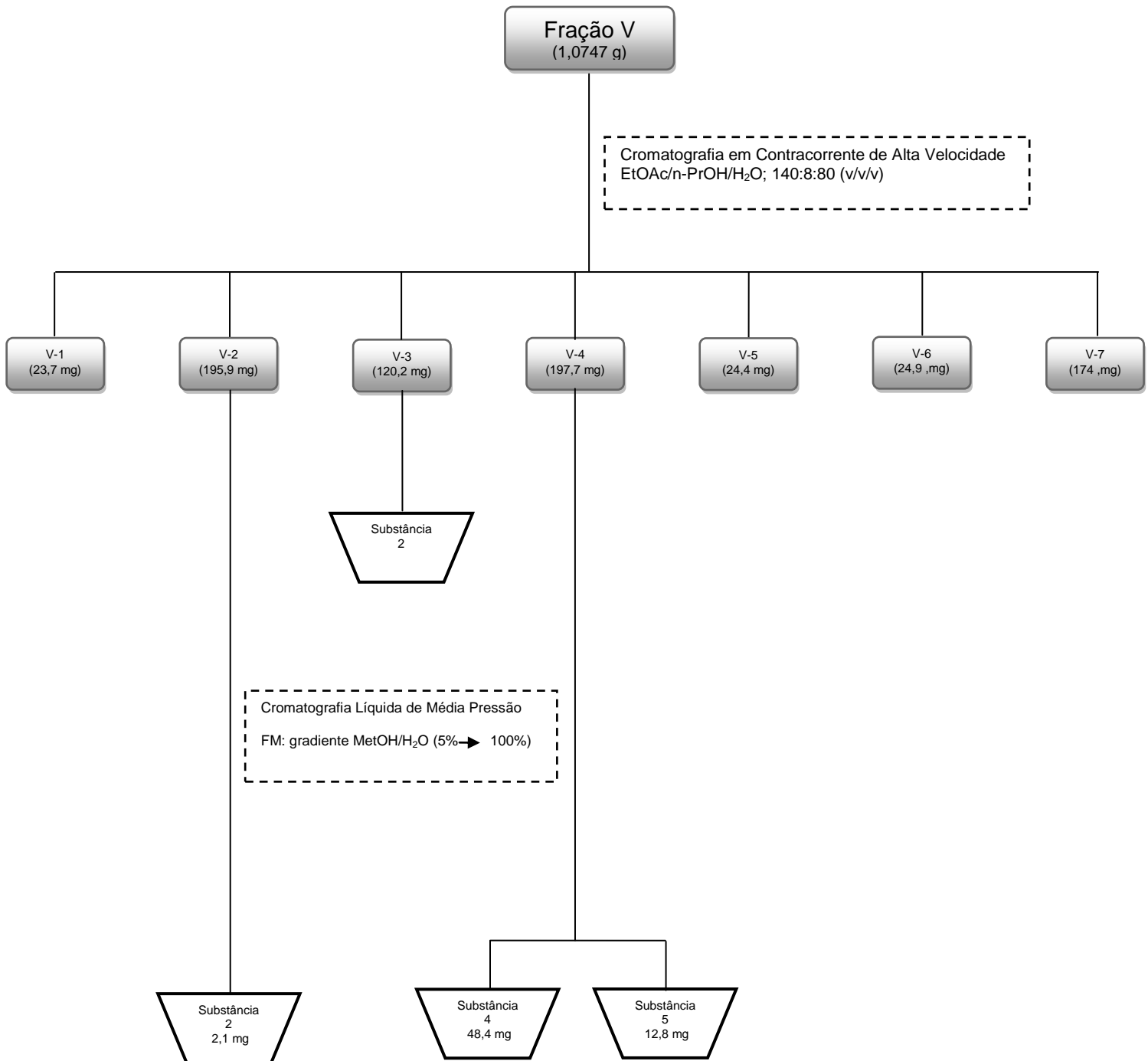
Figura 9 - Cromatografia em camada delgada das 21 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna.



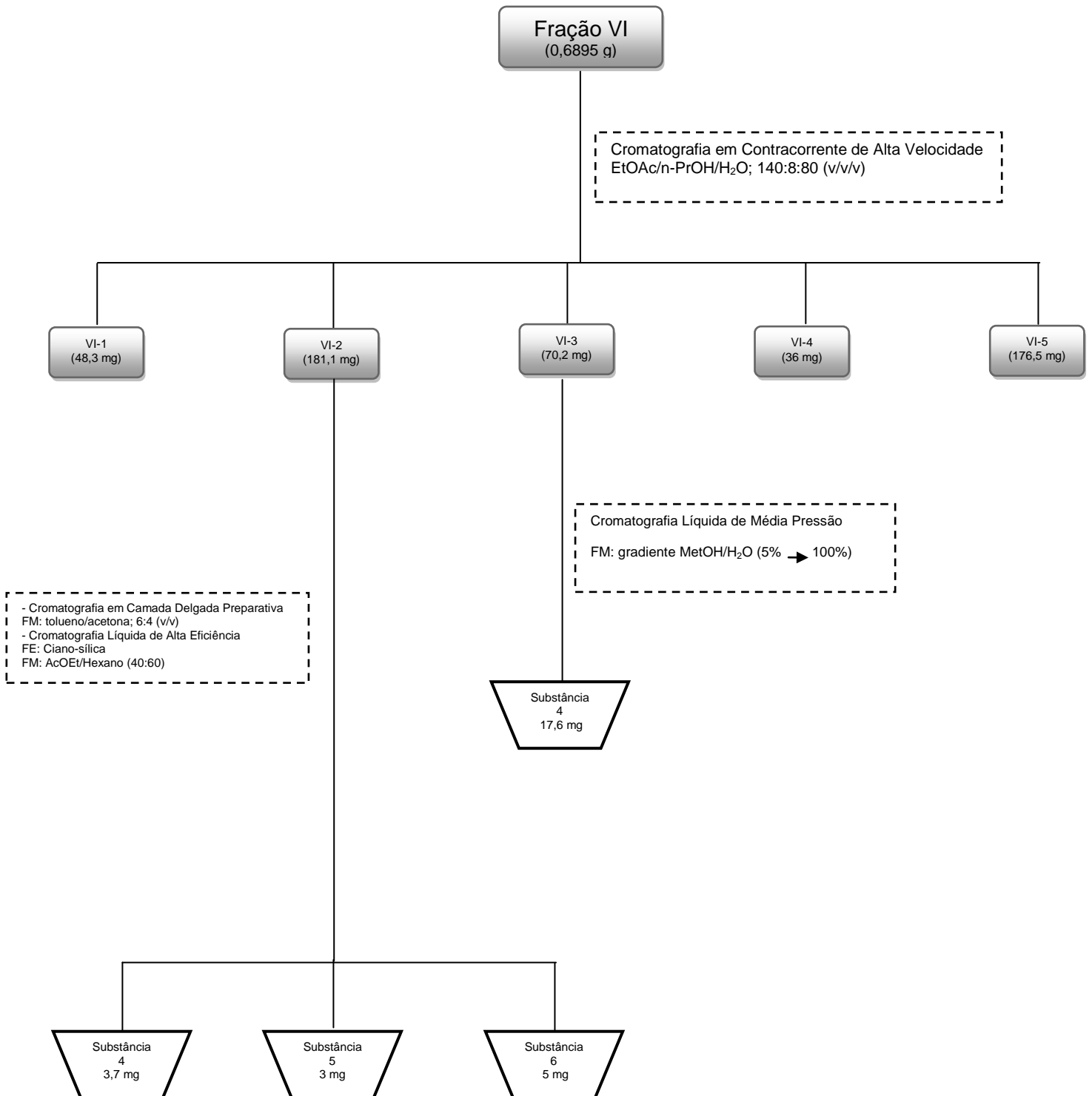
Fluxograma 3 - Fracionamento da fração III obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



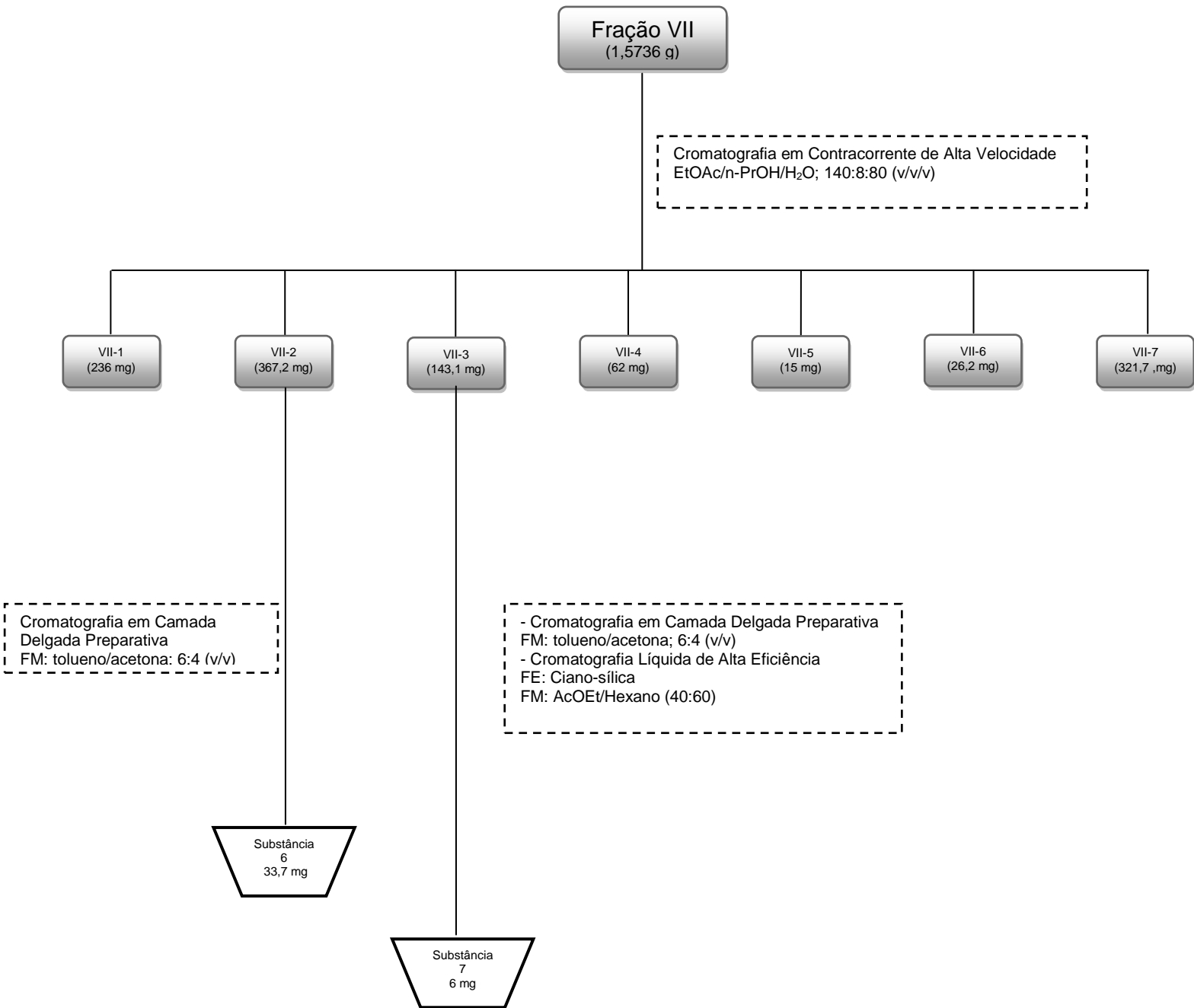
Fluxograma 4 - Fracionamento da fração IV obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



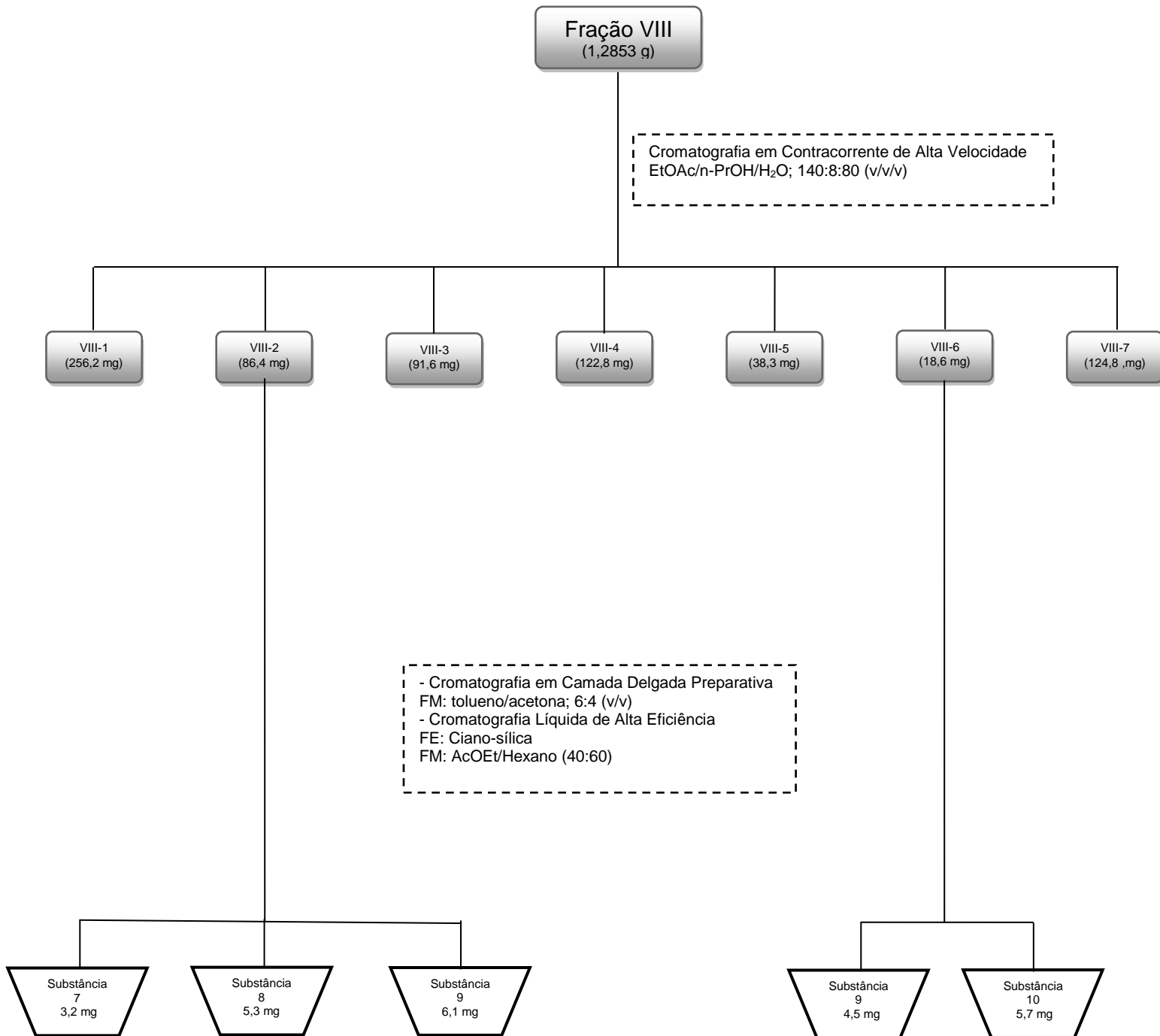
Fluxograma 5 - Fracionamento da fração V obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



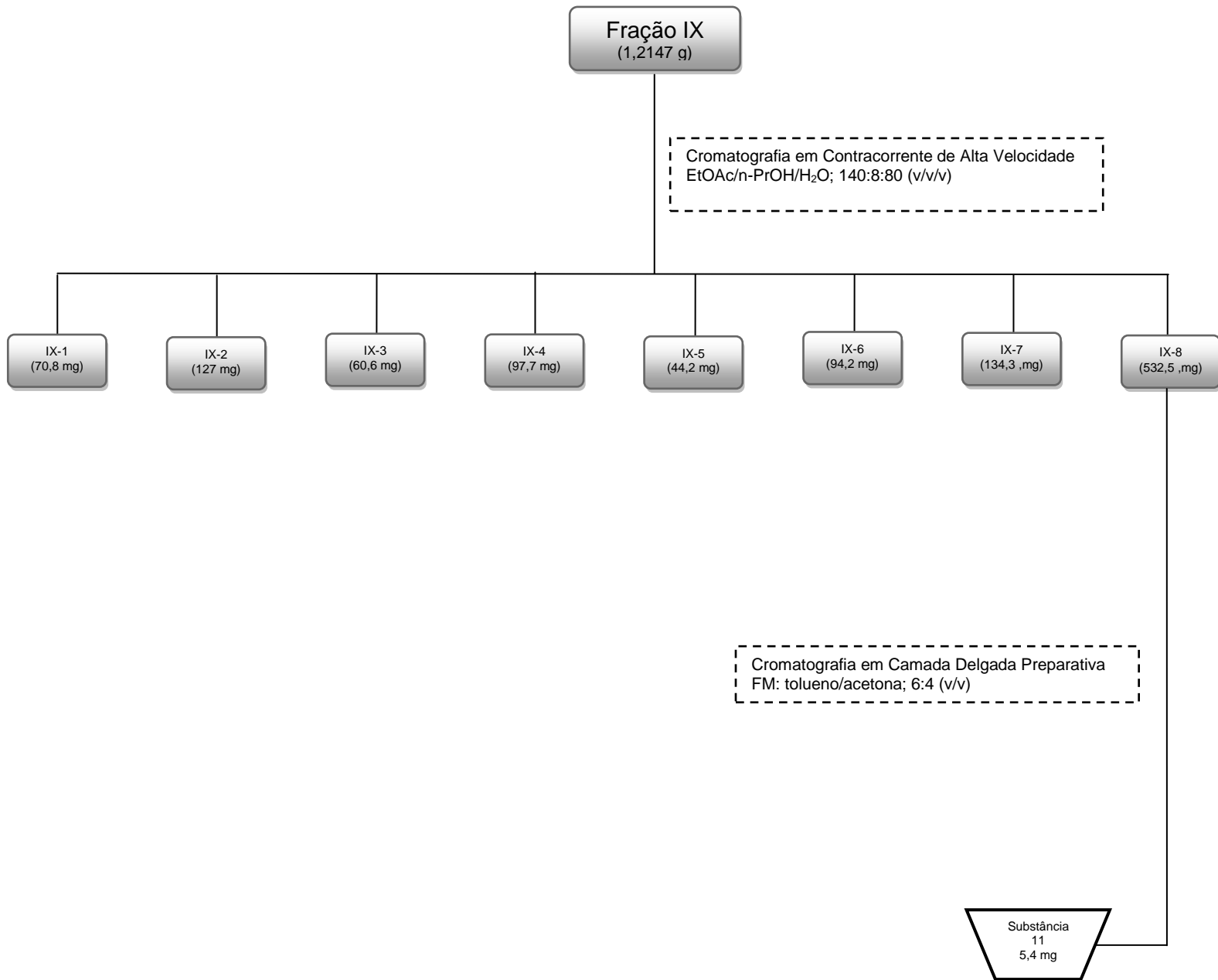
Fluxograma 6 - Fracionamento da fração VI obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



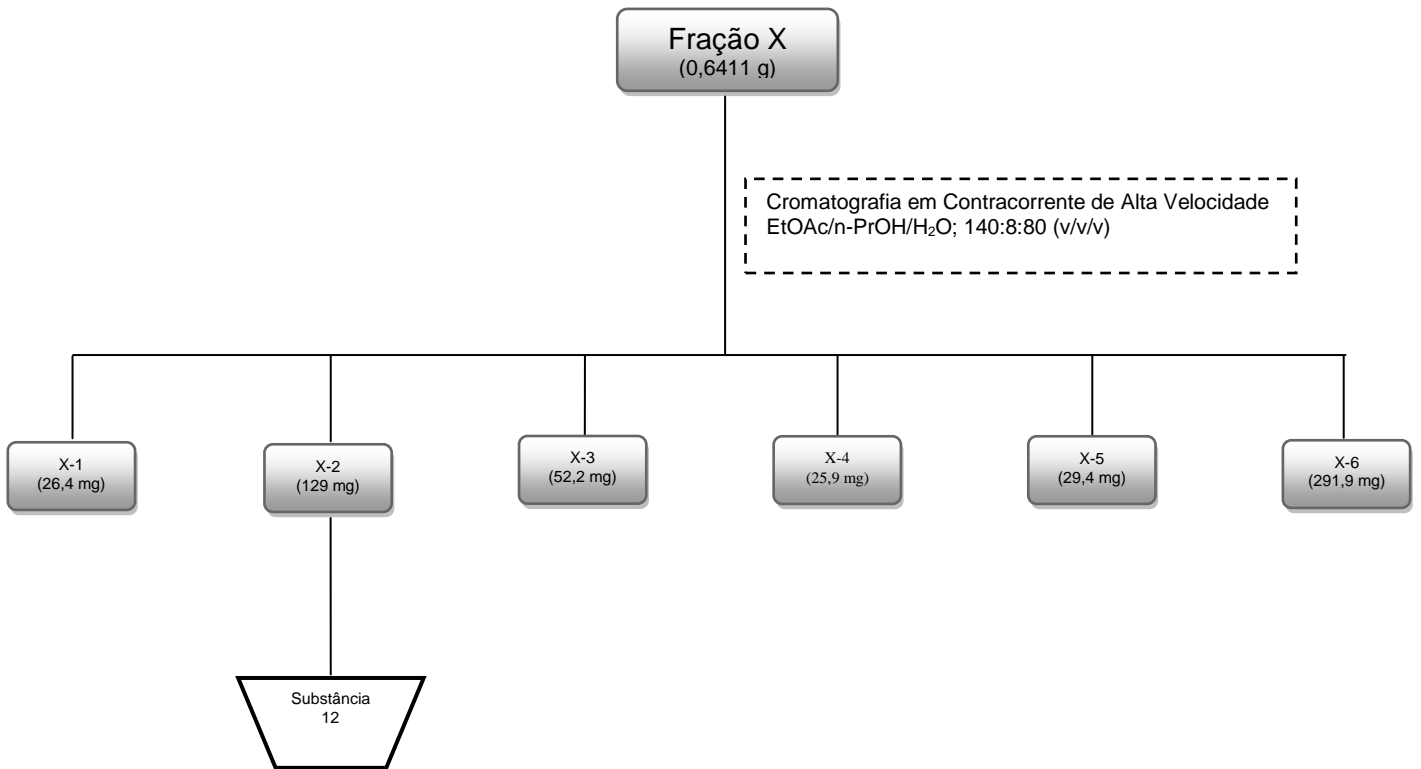
Fluxograma 7 - Fracionamento da fração VII obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



Fluxograma 8 - Fracionamento da fração VIII obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



Fluxograma 9 - Fracionamento da fração IX obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.



Fluxograma 10 - Fracionamento da fração X obtida a partir das cascas de *S. adstringens*.