

- Alternanthera repens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.61, n.1, p.41-47, 1998.
- ⁷Zhou, B.N.; Blasko, G.; Cordell, G.A. Alternanthin, a C-glycosylated flavonoid from *Alternanthera philoxeroides*. *Phytochemistry*, v.27, n.11, p.3633-3636, 1988.
- ⁸Meyer, A.V. Avaliação da atividade anti-neoplásica dos extratos vegetais de *Peschiera fuchsiaeifolia*, *Gomphrena globosa* e *Alternanthera brasiliana* sobre linhagens tumorais humanas. *Monografia*. FCFRP, Ribeirão Preto, SP, p.27.
- ⁹Ito, E; Crozier, A; Ashihara, H. Theophylline metabolism in higher plants. *Biochim Biophys Acta*, v.1336, n.2, p.323-330, 1997.
- ¹⁰Yabuki N, Ashihara H. Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured plant cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1073, n.3, p.474-480, 1991.
- ¹¹Stebbins, N.E., Polacco, J.C. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.*, v.109, n.1, p.169-175, 1995.
- ¹²Yamamoto, H., Ieda, K., Tsuchiya, S., Yan, K., Tanaka, T., Inuma, M., Mizuno, M. Flavonol glycoside production in callus cultures of *Epimedium diphyllum*. *Phytochemistry*, v.31, n.3, p.837-840, 1992.
- ¹³Liu, J.J., Guo, Y., Zheng, S.P., Zhang, M.H. Research on the selecting suspension cell line of higher productivity of flavonol glycoside by hypoxia stress as well as the stability in subcultures. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, v.17, n.1, p.94-97, 2001.
- ¹⁴Berhow, M.A., Bennett, R.D., Poling, S.M., Vannier, S., Hidaka, T., Omura, M. Acylated flavonoids in callus cultures of *Citrus aurantifolia*. *Phytochemistry*, v.36, n.5, p.1225-1227, 1994.
- ¹⁵Murashige, T.; Skoog, F.A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

***Autora para correspondência:**

Profª. Dra. Suzelei C. França
 Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
 Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnológicas,
 Unidade de Biotecnologia
 Av. Costábile Romano, 2201 - Ribeirânia
 14096-380 - Ribeirão Preto - São Paulo
 Telefone: 16 6036706
 E-mail: sfranca@unaerp.br

Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae)

Lopes, G.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Mello, J.C.P.*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
 Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Abstract

Two flavan-3-ols and one proanthocyanidins have been isolated from the stem bark of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., which is traditionally used in Brazil against various diseases. The structure was determined on the basis of spectroscopic data including 1-D (¹H, ¹³C) and 2-D NMR (¹H/¹H COSY) and MS. The antibacterial activities of an acetone:water and semipurified extracts from the stem bark of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. were evaluated. Both the crude and semipurified extracts showed activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Quality control was determined using several pharmacopoeial assay.

Muitos dos trabalhos com plantas medicinais são desenvolvidos em função de informações terapêuticas obtidas à partir da medicina popular, porém estudos multidisciplinares, envolvendo o conhecimento químico, atividade biológica e o controle tecnológico de qualidade da droga vegetal e de seus extratos são importantes para a consolidação da fitoterapia como prática segura e eficaz. Com o nome de barbatimão, são conhecidas várias espécies taníferas, pertencentes à família Leguminosae, destacando-se, entre elas, a espécie *Stryphnodendron*

polyphyllum Mart., empregada em casos de inflamações, infecções e, como cicatrizante entre a população nativa do cerrado¹. Até o presente momento, a espécie mais amplamente estudada em sua composição química² e ações farmacológicas^{3,4,5} foi o *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Assim, procurou-se avaliar o extrato bruto (FAA) e os extratos liofilizados: fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FR) obtidos das cascas de *S. polyphyllum* quanto à composição química, atividade antimicrobiana, além de estabelecer padrões para controle de qualidade das cascas do vegetal.

Parte da Dissertação de Mestrado de G.C. Lopes

Através dos métodos cromatográficos (CCD, CC, CCCAV, CLAE e CCDP) e espectroscópicos RMN 1D (¹H, ¹³C) e 2D (¹H/ ¹H COSY) e de massas, foram isolados e identificados galocatequina (I), epigalocatequina (II) e epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina (III) (Fig. 1). Os espectros de RMN ¹H das substâncias foram obtidos após derivatização química (acetilação). Através do espectro de COSY ¹H/¹H, foi possível verificar os acoplamentos entre os hidrogênios e comprovar a identidade das substâncias, tornando a identificação segura quando comparados os dados obtidos com os da literatura^{2,6}.

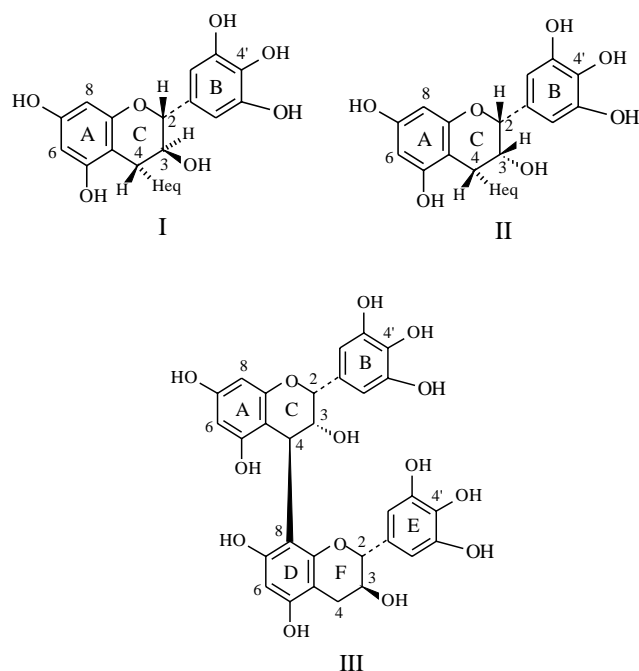


Figura 1. Substâncias isoladas e identificadas de *Stryphnodendron polyphyllum*. galocatequina (I), epigalocatequina (II) e epigalocatequina-(4β→8)-galocatequina (III)

Muitas espécies vegetais são usadas popularmente para o tratamento de diversas doenças infecciosas, inclusive, esquistossomose, leishmaniose, malária, fungos e bactérias. Atualmente, ferramentas analíticas modernas facilitam o estudo detalhado da constituição química das plantas, o que possibilita novos parâmetros ao estudo farmacológico e microbiológico, com o possível desenvolvimento de agentes antimicrobianos seguros⁷. No presente trabalho o teste da atividade antimicrobiana de extratos de *S. polyphyllum* foi realizado através do método de diluição em placas (CIM e CBM) e os resultados encontram-se na tabela 1.

A avaliação da atividade antimicrobiana (CIM e CBM) foi realizada de acordo com o seguinte critério: até 100 µg/ml como sendo boa atividade antimicrobiana, de 100 a 500 µg/ml moderada atividade, de 500 a 1000 mg/ml fraca atividade e acima de 1000 mg/ml ausência de atividade⁸. Portanto, os resultados do FAA, FAE e FR obtidos (Tab. 1) frente às bactérias Gram-positivas podem ser considerados moderados, tendo ausência de atividade frente aos microorganismos Gram-negativos (>1000 µg/ml).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos liofilizados (FAA, FAE, FR) de *Stryphnodendron polyphyllum* frente às bactérias testes

Extratos	CIM (µg/ml)			CBM (µg/ml)		
	FAA	FAE	FR	FAA	FAE	FR
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	125	125	250	250	250
<i>Bacillus subtilis</i>	250	250	250	250	250	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000	-	-	-

Os resultados dos testes realizados com os extratos de *S. polyphyllum* demonstraram atividade antimicrobiana através de uma mistura complexa de substâncias, dessa maneira, provavelmente, a molécula ativa, encontra-se diluída. Portanto, a substância ou substâncias verdadeiramente ativas deverão, necessariamente, serem isoladas em estudos posteriores para comprovação da atividade e mesmo determinar o mecanismo de ação.

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

da eficácia clínica e segurança dos mesmos.

Como é de se esperar, a qualidade e a disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos, fato que não é observado em relação aos sintéticos. Assim, alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos na pureza e mesmo nas características fenotípicas ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica.

Para se obter um perfil de controle de qualidade para as cascas de *S. polyphyllum*, foram analisadas amostras coletadas nos períodos de outono e verão de 2002.

A determinação de umidade através da perda por secagem provê uma indicação do conteúdo de água. Não foi verificada significância no teor de umidade na droga fresca, entre as coletas, demonstrando não haver relação quanto ao índice pluviométrico e as datas das coletas.

A perda por dessecação foi realizada com a droga seca e moída, determinando-se o valor médio de umidade residual, que foi de $13,45 \pm 0,40$ % (CV=2,94%) para o outono e de $14,70 \pm 0,25$ % (CV=1,74%) para o verão. Os resultados da perda por dessecação, em ambos períodos de análise, estão dentro dos limites farmacopéicos para drogas vegetais, que variam de 8 a 14% de umidade para a droga seca, com poucas exceções especificadas nas monografias⁹. Esse parâmetro é fundamental para se determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento.

A determinação do teor de extrativos nas cascas de *S. polyphyllum* para os dois períodos de coleta (outono e verão de 2002) pode ser considerada como característica de compostos polares. Os teores obtidos foram de $27,93 \pm 0,56$ % (CV=1,99%) no outono e de $34,48 \pm 0,50$ % (CV=1,46%) no verão. A correlação entre o teor de extrativos e o conteúdo de taninos totais nas cascas, permite inferir que esse teor está relacionado ao primeiro critério (Fig. 2), visto que o teor de taninos aumentou de maneira proporcional ao aumento das substâncias extraíveis [outono: $10,70 \pm 0,42$ % (CV=3,90%) e verão: $19,51 \pm 0,54$ % (CV=2,79%)]. As aplicações industriais para os taninos vegetais, na indústria de curtimento de couro e na fabricação de resinas, e suas propriedades farmacológicas: em casos de inflamações, infecções e, como cicatrizante, justificam o estudo sobre o teor de polifenóis nas diferentes espécies vegetais. Além disso, os taninos condensados constituem

mais de 90% da produção mundial de taninos comerciais, ultrapassando a faixa de 350.000 t/ano¹⁰.

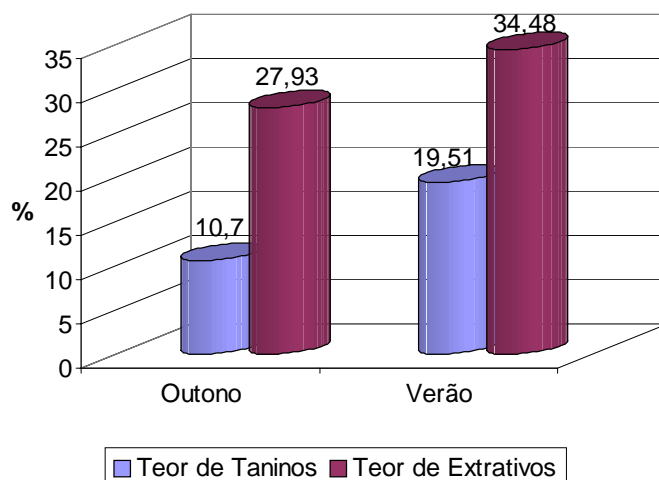


Figura 2. Relação entre teor de extrativos e teor de taninos totais

Material e Métodos

A droga vegetal foi coletada em Abadia de Goiás, GO (S16°45'33,9"; W049°25'08,2"; 864 m de altitude), em maio e dezembro de 2002, e o material foi identificado pela Profa. Dra. Cassia Mônica Sakuragui (DBI-UEM). Material testemunho encontra-se depositado como documento taxonômico no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUM 9139.

Preparou-se extrato acetona:água (7:3; FAA), o qual foi particionado com acetato de etila (FAE), restando a fração aquosa (FR). A FAE foi fracionada em cromatografia em coluna (CC) (Sephadex® LH-20) e acompanhada por CCD. As subfrações F4 e F5 foram recromatografadas em cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV). As substâncias isoladas foram acetiladas e submetidas a análise por RMN ¹H, ¹³C, COSY e MS.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de diluição em microplacas determinando a concentração mínima inibitória (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Foram realizados os seguintes ensaios farmacopéicos: perda por dessecação; perda por secagem; teor de extrativos e teor de taninos totais.

Referências Bibliográficas

- ¹Pio Correia, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Oficial, 1926. p.1.
- ²Mello, J.C.P. de; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. Phytochemistry (New York), v.41, n.3, p.807-813, 1996a.
- ³Panizza, S.; Rocha, A.B.; Gecchi, R.; Silva, R.A.P. de S. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. Rev. Ciênc. Farm. (Araraquara), v.10, p.101-106, 1988.
- ⁴Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O.; de Souza Jr, P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. Phytother. Res. (London), v.12, p.218-220, 1998.
- ⁵Audi, E.A.; Toledo, D.P.; Peres, P.G.; Kimura, E.; Pereira, W.K.V.; Mello, J.C.P.de; Nakamura, C.V.; Alves-do-Prado, W.; Cuman, R.K.N.; Bersani-Amado, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. Phytother. Res. (London), v.13, p.264-266, 1999.
- ⁶Mello, J.C.P.de; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. Phytochemistry (New York), v.42, n.3, p.857-862, 1996b.
- ⁷Czech, E.; Kneifel, W.; Kopp, B. Microbiological status of commercially available medicinal herbal drugs - a screening study. Planta Med. (Stuttgart), v.67, p.263-269, 2001.
- ⁸Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.
- ⁹Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.de; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, cap.10, 2002. p.165-182.
- ¹⁰Guangcheng, Z.; Yunlu, L.; Yazaki, Y. Extractive yields.

Stiasny values and polyflavonoid content in barks from six acacia species in Australia. Aust. Forestry (Queen Victoria), v.54, p.154-156, 1991.

*** Autor para correspondência:**

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Universidade Estadual de Maringá
Av. Colombo, 5790
87020-900 - Maringá - PR
E-mail: mello@uem.br