



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



ANDRÉ OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO
SEMIPURIFICADA DE CASCAS DE CATUABA (*Trichilia catigua*)**

MARINGÁ

2017

ANDRÉ OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO
SEMIPURIFICADA DE CASCAS DE CATUABA (*Trichilia catigua*)**

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 para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2017

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

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

Silva, André Oliveira Fernandes da

S586i Isolamento e identificação de polifenóis de fração
semipurificada de casca de catuaba (*Trichilia*
catiguá) / . -- Maringá, 2017.
78 f. il. , figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de
Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Fitoquímica. 2. *Trichilia catiguá*. 3.
Polifenóis. 4. Métodos cromatográficos. 5. RMN. 7.
Ácido neoclorogênico. 8. Cinchoninas Ia, Ib, IIb.
I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22. ED.615.321

JLM-001942

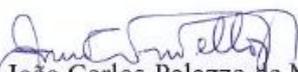
ANDRÉ OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS DE FRAÇÃO
SEMIPURIFICADA DE CASCAS DE CATUABA (*Trichilia catigua*)**

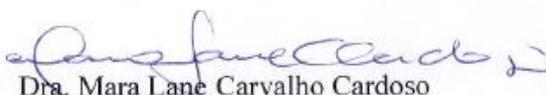
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dr. Cláudio Roberto Novello
Universidade Tecnológica Federal do Paraná


Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

Aos meus pais Washington e Rosana,
Aos meus irmãos Alexandre e Matheus,
pelo apoio, incentivo e carinho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Washington e Rosana pela dedicação, paciência e esforços para a minha formação.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por toda a dedicação, paciência, incentivo e amizade.

À Profa. Dra Renata Longhini pela produção dos extratos e frações, com os quais o trabalho foi realizado.

Ao Admir Arantes por todo o suporte técnico para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Claudio Roberto Novello pela ajuda na realização dos experimentos de cromatografia em contracorrente.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, em especial as técnicas Ana e Carol e ao Prof. Dr. Ernani Abicht Basso pela realização dos espectros de RMN.

Ao Gean Panizzon, pela realização dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, pela realização dos espectros de massas de alta Resolução

A todos os colegas do Laboratório Palafito, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento transmitido.

À Helena pela paciência, apoio e amizade.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Maringá.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, Bloco K80, salas 13 e 14 de responsabilidade do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, no Laboratório de Química (Ernani Abicht Basso) e no Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP).

"Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou como um resultado que aponta uma nova direção"

Steve Jobs

BIOGRAFIA



André Oliveira Fernandes da Silva nasceu em Araçatuba, SP, no dia 23 de abril de 1983. Concluiu o ensino médio no colégio Salesiano, em Araçatuba, no ano 2000. Em 2007 iniciou o curso de Farmácia pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP. Durante o curso realizou estágio na Farmácia Ensino em dispensação de medicamentos e na UBS Simione com ênfase na dispensação de medicamentos controlados, formando-se em 2010. No ano de 2012 realizou estágio não remunerado no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, na Universidade Estadual de Maringá, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Em 2014, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, tendo como foco de pesquisa o isolamento e identificação de substâncias fenólicas em drogas vegetais, desenvolvendo a parte experimental no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito.

RESUMO

SILVA, A. O. F. 2017. Isolamento e identificação de polifenóis em extrato de Catuaba (*Trichilia catigua*). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 76p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), conhecida como catuaba e catiguá, é uma planta amplamente encontrada da América do Sul à América Central. As cascas são utilizadas principalmente como estimulantes; apresentam ação antioxidante, analgésica, vasodilatadora, anti-inflamatória e antidepressiva, sendo também utilizadas na medicina popular como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficit de memória. Quimicamente, a espécie destaca-se por possuir um alto teor de substâncias fenólicas, incluindo flavonoides e taninos. Considerando o interesse científico e econômico que essa espécie desperta, é fundamental que se realize estudos que visam o isolamento e a identificação estrutural de substâncias presentes no extrato. Neste estudo, fração acetato de etila obtida por partição a partir do extrato bruto acetona:água das cascas de *T. catigua* foi submetida a diferentes métodos cromatográficos, tais como, cromatografia em coluna, cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV) e cromatografia em camada delgada, com o objetivo de isolar as substâncias fenólicas. A identificação foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H) e por espectrometria de massas. Como resultado do processo de isolamento e, após a caracterização pelos métodos espectroscópicos e em comparação com a literatura, foram identificadas as seguintes substâncias: ácido neoclorogênico, epicatequina, cinchonaínas Ia, Ib e IIb.

Palavras-chaves: *Trichilia catigua*, polifenóis, métodos cromatográficos, RMN, ácido neoclorogênico, cinchonaínas Ia, Ib e IIb.

ABSTRACT

SILVA, A. O. F. 2017. Isolation and identification of polyphenols in extract of Catuaba (*Trichilia catigua*). Master's Dissertation, Post graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 76p.

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae), known as catuaba and catiguá, is a plant widely found in South America to Central America. The barks are mainly used as stimulants; and have antioxidant, analgesic, vasodilator, anti-inflammatory and anti-depressant action, and is also used in folk medicine as a tonic for the treatment of fatigue, stress, impotence and memory deficits. At the chemical point, the species stands out for having a high content of phenolic compounds, including flavonoids and tannins. Considering the scientific and economic interest that this kind awakens, it is essential to conduct studies aimed at the isolation and structural identification of substances present in the extract. In this study, semipurified fraction obtained from the crude extract acetone:water from *T. catigua* barks was subjected to various chromatographic methods, such as column chromatography, high speed countercurrent (MLCCC), and thin-layer chromatography with the aim of isolate phenolic substances. Identification was performed by spectroscopic methods of nuclear magnetic resonance (NMR) 1D (^1H and ^{13}C), 2D NMR (^1H - ^1H -COSY), and mass spectrometry. According the isolation, it was identified the following compounds: neoclorogenic acid, epicatechin, and cinchonains Ia, Ib and IIb.

Keywords: *Trichilia catigua*, polyphenols, chromatographic methods, neoclorogenic acid, cinchonains Ia, Ib and IIb.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Árvore e Frutos da <i>Trichilia catigua</i> (catuaba).....	23
2	Extratos brutos de <i>Trichilia catigua</i> , <i>Paulinia cupana</i> , <i>Ptychopetalum olacoides</i> e <i>Zingiber officinale</i> , comercializado como Catuama.....	27
3	Exemplos de taninos: (1) tanino hidrolisável- [β -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose]; (2) tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina].....	29
4	Exemplos de taninos do tipo B e A e dos tipos básicos de monômeros possíveis.....	32
5	Algumas substâncias químicas da espécie <i>T. catigua</i> que foram isoladas elucidadas.....	38
6	Cromatógrafo de contracorrente em gotas.....	40
7	Cromatógrafo locular rotacional.....	40
8	Equipamento CCCAV.....	41
9	Cascas da catuaba íntegras e moídas.....	44
10	Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz, Bruker, modelo AVANCE III HD.....	46
11	Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 500 MHz, Bruker, modelo AVANCE III HD.....	47
12	Espectro de massas no modo negativo da substância I.....	51
13	Espectro de RMN de hidrogênios da substância I (300 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄).....	52
14	Espectro bidimensional de RMN (¹ H- ¹ H-COSY) da substância I.....	53
15	Espectro de massas do modo negativo da substância II.....	54
16	Espectro de RMN ¹ H da substância II (300 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄).....	55
17	Espectro de massas no modo negativo da substância III.....	56
18	Espectro de RMN de ¹³ C da substância III (75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆).....	57
19	Espectro de ¹ H RMN da substância III derivatizada por acetilação (300 MHz, acetona- <i>d</i> ₆).....	58
20	Espectro de massas no modo positivo da substância IV.....	60
21	Espectro de massas no modo negativo da substância IV.....	61
22	Apresentação da unidade flavan-3-ol.....	62
23	Espectro de hidrogênios da substância IV (500 MHz; acetona- <i>d</i> ₆).....	63
24	Estrutura química da cinchonaina Ib.....	63

25	Espectro de RMN ^{13}C da substância IV (125 MHz, acetona- d_6).....	64
26	Espectro bidimensional de RMN (^1H - ^1H COSY) da substância IV (500 MHz; acetona- d_6).....	64
27	Espectro de massas no modo negativo da substância V.....	66
28	Espectro de hidrogênios da substância V (500 MHz; acetona- d_6).....	68
29	Espectro de ^{13}C da substância V (125 MHz; acetona- d_6).....	68
30	Espectro bidimensional de RMN (^1H - ^1H COSY) da substância V.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Dados de deslocamento da substância I (300 MHz; MeOD- d_4).....	53
2	Dados de deslocamento da substância II em ^1H -RMN (300 MHz; MeOD- d_4).....	55
3	Dados de RMN ^1H da substância III acetilada (300 MHz; acetona- d_6).....	59
4	Dados de deslocamento da substância IV (500MHz; Acetona - d_6).....	65
5	Comparação entre os deslocamentos de hidrogênio da substância IV e da epicatequina no espectro de RMN ^1H (500 MHz; acetona- d_6).....	65
6	Dados de deslocamento da substância V (500 MHz; acetona- d_6).....	70
7	Comparação entre os deslocamentos de hidrogênio da substância V e da epicatequina no espectro de RMN ^1H (500 MHz; acetona d_6).....	71

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA		PÁGINA
1	Produção de extrato bruto, fração aquosa, fração acetato de etila e métodos cromatográficos utilizados no isolamento de substâncias segundo Longhini.....	48
2	Subfrações obtidas por meio da CCCAV.....	49
3	Isolamento de substâncias a partir de algumas subfrações por meio de CCCAV.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCCAV	Cromatógrafo em Contra Corrente de Alta Velocidade
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EB	Extrato Bruto
FA	Fração Aquosa
FAE	Fração Acetato de Etila
TFA	Ácido Trifluoroacético
UV	Ultra-Violeta
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
EM	Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 ASPECTOS GERAIS	21
2.1.1 Família Meliaceae.....	21
2.1.2 O gênero <i>Trichilia</i> P. Browne	21
2.1.3 <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	22
2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	24
2.2.1 Antimicrobiana	24
2.2.2 Antioxidante	24
2.2.3 Anticelulite	25
2.2.4 Fotoprotetor	25
2.2.5 Afrodisíaco.....	25
2.2.6 Antiarrítmico	25
2.2.7 Antidepressivo	26
2.2.8 Anti-inflamatório	26
2.2.9 Outras Atividades.....	26
2.3 ASPECTOS QUÍMICOS.....	27
2.3.1 Substâncias fenólicas	27
2.4 CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE.....	33
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 MATERIAL	43
4.1.1 Solventes reagentes e soluções	43
4.2 EQUIPAMENTOS	43
4.3 MATÉRIA PRIMA VEGETAL.....	44
4.4 EXTRATO BRUTO (EB).....	44
4.5 FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE).....	44
4.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	44
4.6.1 Cromatografia em Coluna (CC).....	45
4.6.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	45
4.6.3 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (CCCAV).....	45

4.7 Análise estrutural.....	46
4.7.1 Derivatização química (MELLO et al.,1996).....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.2 Isolamento e identificação estrutural de substâncias	50
5.2.1 Substância I - Ácido neoclorogênico (3-O-[E]-cafeoil-D-(-)-ácido quínico).....	51
5.2.2 Substância II - epicatequina	54
5.2.3 Substância III – Cinchonáína IIb	55
5.2.4 Substância IV- Cichonaina IA.....	60
5.2.5 Substância V- Cinchonaina IB.....	66
6 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A utilização de medicamentos tradicionais, bem como, medicamentos de origem vegetal, se reflete mundialmente. Em média, 70-95% dessa população, utiliza esses medicamentos tradicionais, afim de algum tipo de tratamento (ROBINSON; ZHANG, 2011). Fato esse, que explica a importância de se desenvolver métodos adequados para o controle de qualidade das plantas e seus produtos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), práticas de saúde não convencionais, como, fitoterapia, técnicas manuais e acupuntura estão em desenvolvimento, apresentando um significativo êxito, de modo a complementar às terapias alopáticas (OMS, 2008).

O uso de plantas medicinais é visto como uma prática complementar às terapias com a utilização de medicamentos sintéticos, já que estes apresentam um maior custo no mercado e são agressivos ao organismo. O uso de plantas medicinais, assim como a automedicação, propagou-se, principalmente pelo baixo custo e fácil acesso por parte da grande parcela da população (OMS, 2008).

A partir da Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006, o Ministério da Saúde oferece fórmulas terapêuticas e preventivas à população, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), dentre as quais se destaca o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos além de relatar, por meio de levantamento realizado em 2004, o qual divulga que 116 municípios de 22 estados brasileiros utilizam a fitoterapia como forma de tratamento (BRASIL, 2006a).

A fitoterapia se apresenta como uma medicina alternativa, a qual vem crescendo com o passar dos anos. A produção de fitofármacos lucra em torno de 15 bilhões de dólares, no mercado mundial de medicamentos. O fator responsável por tal crescimento é a evolução dos estudos científicos, com merecido destaque, a descoberta da eficácia de plantas medicinais, principalmente aquelas que são utilizadas pela população com fins terapêuticos, provenientes de estudos químicos e farmacológicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Assim como os micro-organismos, as plantas produzem uma ampla variedade de compostos químicos (SANTOS; MELLO, 2007) com grande diversidade estrutural, sendo responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (BARATA; QUEIROZ, 2005).

Estima-se que a biodiversidade do planeta se apresenta em cerca de 11 milhões de espécies, sendo destes, cerca de 1,5 milhões se encontram catalogadas. Esses dados representam, apenas 13% do total de espécies encontradas no planeta (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

Já o Brasil, com sua megabiodiversidade, apresenta uma biota estimada em 170 a 210 mil espécies, referente a 13% da riqueza do planeta (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

O investimento e utilização de fitoterápicos apresentam, entre outras vantagens, o efeito sinérgico, a associação de mecanismos de substâncias agindo em diferentes alvos moleculares. Por muitas vezes, o fato de desenvolverem substâncias protótipo, a produção de fármacos com significativa eficiência é ampliada para determinados alvos moleculares (YUNES et al., 2001).

Trichilia catigua A. Juss. (Meliaceae) é uma árvore de médio porte, e encontra-se amplamente distribuída pela América do Sul. É conhecida no Brasil, “catuaba”, “catigua” e “catuama”. Várias espécies diferentes de *Erythroxylum* ou *Anemopaegma* são regionalmente conhecidas como “catuaba”, e são vendidas comercialmente, fato esse, que torna a identidade da fonte da planta, muitas vezes incerta. Segundo Marques (1998) no Brasil, a *T. catigua*, é a principal espécie vendida como “catuaba”. Na medicina popular, a espécie é utilizada como tônico para o tratamento da fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória (PIZZOLATTI et al., 2002).

Alguns estudos experimentais comprovaram que a *T. catigua* apresenta as atividades tais como: antinociceptivos (VIANA et al., 2011), anti-inflamatório (QUINTÃO et al., 2008), antidepressivo (CAMPOS et al., 2005; BONASSOLI et al., 2012), antioxidantes (CHASSOT et al., 2011; TANG et al., 2007), e para déficits de atenção (CHASSOT et al., 2011).

O controle de qualidade da matéria-prima vegetal, para fármacos derivados de plantas, como a casca de catuaba é de expressiva importância, visto que sua composição química pode alterar naturalmente de acordo com o clima, entre outros fatores (GOBBONETO; LOPES, 2007). Existem estudos que avaliaram o efeito sobre gravidez e lactação, absorção intestinal, contra *Trypanosoma cruzi*, Herpes Vírus, estresse oxidativo, entre outros. Esta qualidade garante a presença e a proporção dos constituintes químicos.

Taninos, ou flavan-3-ol, alcaloides e lignanas são os principais metabólitos secundários encontrados na *T. catigua* (PIZZOLATTI et al., 2002). Segundo Schenkel et al. (2004) o desenvolvimento atingido com as técnicas cromatográficas e com as técnicas de elucidação estrutural, principalmente relacionados com Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM), também têm sido mencionados como capazes de avançar na obtenção de novos protótipos.

Este trabalho teve por objetivo o isolamento por meio de diferentes métodos cromatográficos, identificação e caracterização de substâncias por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (H e ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HBMC) bem como por espectroscopia de massas (EM).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Meliaceae

É a principal família do grupo das angiospermas e compreende 52 gêneros e 3.198 espécies, destas 669 são espécies aceitas (THE PLANT LIST, 2017).

São plantas arbóreas, muitas vezes de grande porte, com folhas alternas compostas, geralmente grandes, de crescimento apical, sem estípulas e às vezes com pulvinos na base. Apresenta folhas pequenas, em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores; hermafroditas, cíclicas, diclamídeas, de simetria radial. Sépalas e pétalas livres. Estames em número duplo ao das pétalas e, em geral com filetes alargados soldados em um tubo, com as anteras fixas na porção superior interna. O ovário é súpero, com 4 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada qual com um ou dois óvulos. Os frutos em geral, são secos, capsular loculicida ou baciforme. As sementes frequentemente possuem arilo ou são aladas (JOLY, 2002).

No Brasil destacam-se os gêneros *T. catigua* var. *affinis* (A.Juss.) C. DC., *T. catigua* var. *glabior* C. DC., *T. catigua* var. *longifoliola* C. DC., *T. catigua* var. *pallens* C. DC., *T. catigua* var. *parviflora* C. DC. e *T. catigua* var. *pilosior* C. DC. (THE PLANT LIST, 2017).

No Paraná ocorrem nove espécies: *T. casaretti* C. DC., *T. clausenii* C. DC., *T. elegans* A. Juss. subsp. *elegans*, *T. lepidota* subsp. *schumanniana* (Harms) T. D. Penn., *T. pallens* C. DC., *T. pallida* Sw., *T. catigua* A. Juss., *T. pseudostipularis* (A. Juss.) C. DC. e *T. silvatica* C. DC (PATRICIO; CERVI, 2005).

As plantas pertencentes à família Meliaceae têm sido muito utilizadas na medicina popular. Foram reportadas nesta família, atividades antiviral, anti-helmíntica, anti-inflamatória e antirreumática. Assim como propriedades anti-inflamatórias e antirreumáticas de alguns membros desta família, como *Azedirachta indica* A. Juss., *Melia azedarach* L. e *Cedrela tubifibra* Bert. foram relacionadas à sua ação na resposta imune (BENENCIA et al., 2000).

2.1.2 O gênero *Trichilia*

O gênero *Trichilia*, pertencente à família Meliaceae, é um dos gêneros que possui o maior número de espécies e mais características anatômicas da família Meliaceae, sendo os limonoides o principal metabólito secundário isolado. Foram isolados também, deste gênero, triterpenos (cicloartanos e camaranos), fitoesteroides, esteroides pregnanos, cumarinas, lignanas, lactonas, sesquiterpenos, aminoácidos (BELTRAME, 2005) e taninos (BURKILL, 1997). Segundo o indicado em *The Plant List*, 2017 para a espécie *T. catigua* (nome aceito) existem seis sinônimos. No entanto o gênero apresenta, neste mesmo banco de dados, 106

espécies aceitas, 286 sinônimas e 92 espécies ainda não resolvidas (THE PLANT LIST, 2017).

No Brasil o gênero é endêmico e encontrado de Norte a Sul, porém, como domínios fitogeográficos, destacando-se a região Amazônica, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. São encontrados em vegetações do tipo Floresta Ciliares ou Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Estacional, Semidecidual e Restinga (FLORA DO BRASIL, 2017).

Muitas espécies de *Trichilia* têm sido empregadas na medicina popular no tratamento de algumas doenças, como desordens hepáticas, e como purgativos, antiepilépticos, antipiréticos, antimaláricos (GERMANÓ et al., 2006), também usados como tônicos físico e mental, afrodisíacos e estimulantes sexuais (PIZZOLATTI et al., 2002).

Eldeen et al. (2005) verificaram que extratos das cascas da *T. dregeana* Sond., obtidos com etanol e acetato de etila apresentam atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de exibirem atividade inibitória sobre as enzimas ciclooxigenase-1 e acetilcolinesterase.

Ambrozin et al. (2004) verificaram atividade tripanocida em extratos de caule de *T. ramalhoi* Rizzini obtidos com metanol e *n*-hexano.

Germanó et al. (2006) observaram atividade antioxidante por inibição de peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro* em extrato obtido das raízes de *T. emetica* Vahl, utilizando uma mistura de metanol e ácido acético como líquido extrator.

2.1.3 *Trichilia catigua* A. Juss.

As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como “catuaba” são representadas por mais de 10 espécies diferentes: *Temnadenia violacea* (Vell.) Miers (Apocynaceae), *Tetragastris catuaba* Soares da Cunha (Burseraceae), *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae), *Pouteria* Aubl (Sapotaceae), *Phyllanthus nobilis* (L.f.) Müll. Arg (Euphorbiaceae), *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld & J.F. Souza (Bignoniaceae), *Erythroxylum catuaba* da Silva ex Hamet, *E. vacciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae) e *T. catigua* A. Juss. (Meliaceae) (PEREIRA, 1982). Apesar da problemática apresentada sobre a denominação popular destas espécies, a planta encontrada mais comumente no Brasil como “catuaba” é a espécie vegetal *T. catigua* (Figura 1) (MARQUES, 1998).



Figura 1 - Folhas, flores e frutos da *Trichilia catigua* (Catuaba). Fonte: Claudio R. Novello e Ismar S. Moscheta.

Esta espécie tem vasta distribuição na América do Sul e Central, sendo mais abundante no sul do Brasil (KLEIN, 1984). Constitui-se numa árvore de 10 m de altura, sendo que os ramos novos pubescentes tornam-se glabros com a idade e de coloração acinzentada. As folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, são curto-pediceladas, oblongo-elípticas, ápice acuminado, irregularmente agudos na base, de até 7 cm de comprimento. As flores podem apresentar coloração branco-amarelada e o fruto é constituído de uma cápsula estreito-oblonga, com pêlos longos rijos e amarelados com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente, aparecendo de dezembro a janeiro. A época de floração é de setembro a outubro, entretanto, a cápsula pode permanecer na árvore por 5 a 6 meses antes de florescer (SOUZA; SALES, 2001).

Após alguns testes, Lagos (2006) traçou um perfil fitoquímico das cascas e folhas de *T. catigua*. Tal perfil revelou que o extrato aquoso das folhas expressou a presença de antocianinas e taninos condensados e hidrolisáveis. Já o perfil das cascas, revelaram a presença de saponinas. O perfil traçado com o extrato alcoólico demonstrou a presença de flavonoides e esteroides. Tal fato comprova a semelhança na composição de ambas as partes da planta.

Oliveira et al. (2012) realizaram estudos preliminares com as cascas de *T. catigua*, através dos quais, foi possível, perceber a presença de antocianinas e antracênicos, porém não foi possível observar a presença de alcaloides, mucilagens, óleos essenciais e cumarinas.

A partir da espécie *T. catigua*, foi possível elucidar e isolar algumas substâncias químicas, dentre as quais, pode-se destacar epicatequina procianidinas B2 [epicatequina-

(4 β →8)-epicatequina], B4 [catequina-(4 α →8)-epicatequina] e C1 [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina] além de cinchonaínas IIA e IIB (LAGOS, 2006; RESENDE, 2007; RESENDE et al., 2011), cinchonaínas IA, IB, IC e ID (PIZZOLATTI et al., 2002b; BELTRAME, 2005; RESENDE, 2007; TANG et al., 2007; MARTINELLI, 2010; RESENDE et al., 2011), catiguanina A e B (TANG et al., 2007), cumarinas e triterpenos (BELTRAME, 2005), ácido clorogênico, catequina, esteroides-sitosterol e estigmasterol (LAGOS, 2006) e, apocinina E (RESENDE et al., 2011).

Fitoquimicamente, a espécie (*Trichilia catigua*) se diferencia devido a presença de flavalignanas (apocinina E e cinchonaínas IA, IB, IC, ID, IIA e IIB) (BELTRAME, 2005; TANG et al., 2007, RESENDE et al., 2011; VIANA et al., 2011), flavonoides (catequina, epicatequina, catiguaninas A e B) (TANG et al., 2007) e taninos (procianidinas B2, B4 e C1) (TANG et al., 2007; RESENDE et al., 2011), alguns dos quais são pares diastereoméricos.

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.2.1 Antiviral

Bernardi e et al. (2010) partindo das cascas de *T. catigua*, avaliaram os efeitos do extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila, contra a replicação de herpesvírus bovinos. As doses utilizadas variam de 12,5 a 100 g/mL, as quais foram administradas 1-2 h antes, durante (tempo zero) e 1-2 h após a infecção pelo vírus. A citotoxicidade foi comprovada e doses acima de 400 mg/mL para as células hep-2, para todas as alíquotas. A inibição foi de 100%, no tempo zero período virucida do extrato bruto, em todas as dosagens utilizadas. Já no teste com as frações aquosa e acetato de etila, nas concentrações entre 50 e 100 mg, também no tempo zero, foi possível observar inibição total do vírus. Contudo, tal estudo comprova que o extrato bruto e as frações, agem no período inicial de replicação viral e também, diretamente nas partículas virais do agente.

2.2.2 Antioxidante

Resende (2007) avaliou a capacidade antioxidante do extrato bruto (acetona-água: 7:3, v/v), fração aquosa e fração acetato de etila, das cascas de *T. catigua*. Todos os extratos apresentaram significativa capacidade antioxidante. A fração acetato de etila revelou uma atividade antioxidante maior que a vitamina C e o Trolox (Substâncias antioxidantes já conhecidas, frente ao radical livre DPPH e a redução da capacidade de Fe³⁺ para Fe²⁺. O estudo revela que quanto maior a quantidade de polifenóis totais e de taninos presentes no extrato, maior é a capacidade antioxidante do mesmo. A fração acetato de etila, é considerada rica em compostos fenólicos, por tanto, apresenta uma significativa atividade antioxidante.

2.2.3 Anticelulite

Segundo Baby et al. (2006, 2007) uma formulação obtida através da associação do extrato bruto de *T. catigua*, *Ptychopetalum olacoides* e *Pfaffia sp*, comercializada como Slimbuster H® e, no Brasil como Chemyunion tem sido utilizada para o tratamento contra lipodistrofia ginoide (celulite). Tal formulação é preparada com extrato padronizado com uma concentração de 1,025mg de rutina. A concentração utilizada em doses semissólidas é de 5%, e o efeito lipolítico é proveniente da padronização de flavonoides totais e saponinas presentes no extrato.

2.2.4 Fotoprotetor

As substâncias fenólicas têm apresentado significativa importância em se tratando de efeitos sinérgicos com protetores solares, físicos e químicos, com o objetivo de aumentar o fator de proteção solar (FPS). Diante desse fato, (MUNHOZ et al., 2012), trabalharam com o extrato bruto de *T. catigua*, com o objetivo de testar o seu aumento no FPS, e sua possível participação no teor total de polifenóis e sua capacidade antioxidante. Os resultados do presente estudo, revelaram que tais formulações se apresentavam estáveis após a adição dos extratos, revelaram também, que as características físico-químicas, foram preservadas, ao se comparar com o controle. Foi possível, comprovar também que a capacidade antioxidante foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis. Contudo, em teste *in vitro*, o FPS apresentou uma queda fato esse que se fez necessário aumentar as formulações de extratos de *T. catigua*.

2.2.5 Afrodisíaco

No Brasil, *T. catigua* é uma planta popularmente utilizada como afrodisíaco, muito usada para tratar déficits de impotência sexual, estresse, fadiga e memória (PIZZOLATTI et al., 2003).

Antunes et al. (2001) e Gomes (2007) realizaram um estudo com o intuito de analisar o efeito da Catuama (Formulação antiga), no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos, assim como testar o efeito do extrato hidroalcoólico de *T. catigua* para o mesmo fim. Foi possível observar que as substâncias isoladas da formulação (Catuama), bem como formulação apresentaram um relaxamento dose-dependente do corpo cavernoso de curta duração. Já o extrato das cascas de *T. catigua*, revelou um relaxamento duradouro e sustentável.

2.2.6 Antiarrítmico

Em alguns estudos com Catuama foi possível observar que o fármaco atua

revertendo a fibrilação ventricular, com isso, evita a reindução e a condução intraventricular prolongada em coelhos cardíacos, apresentando um efeito antiarrítmico. Este mesmo efeito foi revelado em extratos de *T. catigua*. Com o estudo foi possível comprovar que o extrato de *T. catigua* foi o responsável pela ação atribuída ao produto (PONTIERI et al., 2007).

2.2.7 Antidepressivo

Chassot et al. (2011), em estudos com camundongos, tinham por objetivo avaliar um possível efeito antidepressivo, assim como, ansiolítico, motores e cognitivos, do extrato bruto e fração acetato de etila (FAE), das cascas da *T. catigua*. Para realização do trabalho, utilizaram doses entre 200-400 mg/kg e 100-400 mg/kg, respectivamente. Os resultados comprovaram que uma única administração não modificou o comportamento dos animais, os quais foram submetidos ao teste de labirinto elevado, bem como, a sua atividade motora, no teste de campo aberto. Foi possível comprovar um efeito depressivo da FAE, ao se utilizar uma dose acima de 400 mg/kg. Assim comprovou-se que tanto o extrato como a FAE, agiram melhorando a memória dos camundongos.

2.2.8 Antinociceptiva

Vianna et al. (2011) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico das cascas de *T. catigua*, sobre o comportamento de analgesia em ratos machos Swiss, como também avaliaram os possíveis mecanismos envolvidos nessa ação. Os animais foram submetidos ao teste de placa quente, a contração abdominal e também ao teste de Von Frey, após o tratamento de 200 mg/kg de extrato via oral. Embora, para o teste de placa quente o extrato tenha apresentado um efeito antinociceptivo, apenas 3 h após a sua administração, o mesmo apresentou essa atividade nos três modelos utilizados. Com isso, conclui-se que a ação do extrato, possivelmente se relaciona com o sistema dopaminérgico, que por sua vez, tem uma ligação com o aumento da hipotermia induzido pelo uso da apomorfina e com o controle da catalepsia induzida pelo aloperidol.

2.2.9 Outras Atividades

Catuama foi capaz de comprovar significativamente os sintomas causados pela síndrome da boca ardente (SPANEMBERG et al., 2012).

A isquemia cerebral causou um processo neurodegenerativo em camundongos, os quais foram controlados com a utilização da fração acetato de etila (FAE), obtida através do extrato bruto proveniente das cascas da *T. catigua*. A FAE atuou na recuperação funcional e diminuição da perda de células do hipocampo, proporcionando uma neuroproteção (TRUITI

et al., 2015)

Oliveira et al. (2005) realizaram um estudo toxicológico com preparação comercial de *T. catigua* (Catuama). A administração de 25 mL era feita 2 vezes ao dia ao longo de 28 dias, afim de se comprovar qualquer possível efeito tóxico em voluntários humanos de ambos os sexos, com comprovação de alterações hematológicas e bioquímicas.

Já Chassot et al. (2011) trabalharam com o intuito de comprovar o efeito toxicológico em ratos. Os animais foram tratados com extrato bruto e fração acetato de etila obtidos a partir das cascas de *T. catigua*. Não se registrou efeitos tóxicos em doses 5000 mg/kg de extrato bruto e 3000 mg/kg de fração acetato de etila. Nenhuma morte foi detectada e não foi possível se estabelecer uma DL₅₀.

Partindo-se de estudos realizados com a *T. catigua*, tendo em vista que apresenta uma maior comercialização (Figura 2), em relação a outras espécies, também conhecida como catuaba, e levando-se em conta, sua importância nas áreas farmacêuticas e de cosméticos, fato esse, que gera um maior interesse em estudos relacionados a atividades farmacológicas, farmacocinéticas, o controle de qualidade, assim como os ensaios pré-clínicos e clínicos estimularão a utilização de extratos e substâncias em áreas terapêuticas e cosmetológicas, proporcionando uma melhor qualidade de vida dos usuários, uma vez que a espécie *T. catigua*, apresenta resultados promissores (LONGHINI et al., 2016).



Figura 2 - Extratos brutos de *Trichilia catigua*, *Paulinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*, comercializado como Catuama.

2.3 ASPECTOS QUÍMICOS

2.3.1 Substâncias fenólicas

Os polifenóis abrangem um grupo de substâncias classificadas como metabólitos secundários. Podem ser encontrados em diversas partes da planta, tais como: folhas, flores, hastes, frutos, sementes e outros (AGUILERA-CARBÓ et al., 2008). Os polifenóis são divididos basicamente em 3 grupos; taninos complexos, taninos condensados e taninos hidrolisáveis (KHANBABAEE, 2001).

Substâncias fenólicas representam uma vasta gama de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias

fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais frequentemente combinadas com açúcares, tais como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

As substâncias fenólicas são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de muitos vegetais, sendo muitas delas importantes cientificamente por potencialmente poderem ser utilizadas na prevenção de doenças provindas das oxidações reativas em sistemas biológicos (CARVALHO et al., 2007).

Pulido et al. (2000) demonstraram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação podem ser os critérios que determinam o poder de redução dos polifenóis na dieta.

No processo clássico para identificar fenóis simples é utilizada solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, com isso têm-se colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998). Contudo, todos os fenólicos aromáticos exprimem uma significativa absorção na região do UV (HARBORNE, 1998; CARVALHO et al., 2007). Por isso, métodos espectrométricos são importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

2.3.1.1 Taninos

Tanino é uma palavra que foi utilizada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais em couro (COSTA, 2002).

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM et al., 1975), sendo que sua ocorrência nas Angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998).

São substâncias fenólicas, solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Daltons, e apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides e proteínas. Essas substâncias são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2007).

Industrialmente, os taninos são substâncias que, devido a possibilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Nas células vegetais os taninos se encontram separados das proteínas e das enzimas do citoplasma, mas quando o tecido é danificado, quando um animal se alimenta, por exemplo, ocorre a reação de tanagem, fazendo com que as proteínas fiquem menos acessíveis aos sucos gástricos do animal. Os tecidos ricos em taninos são amplamente evitados pela maioria dos herbívoros, devido ao sabor adstringente que ele apresenta. Portanto, uma das maiores funções dos taninos em plantas é a de ser uma barreira para herbívoros e insetos (HARBORNE, 1998).

Os taninos são classificados de acordo com a sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis caracterizam-se por um poliol central (β -D-glicose), cujas funções hidroxilas, são esterificadas com ácido gálico (SANTOS; MELLO, 2007). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (FREUDENBERG; WEINGES, 1958; FREUDENBERG; WEINGES, 1960).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em Gimnospermas e Angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos as Choripetalae das dicotiledôneas (Figura 3) (SANTOS; MELLO, 2007).

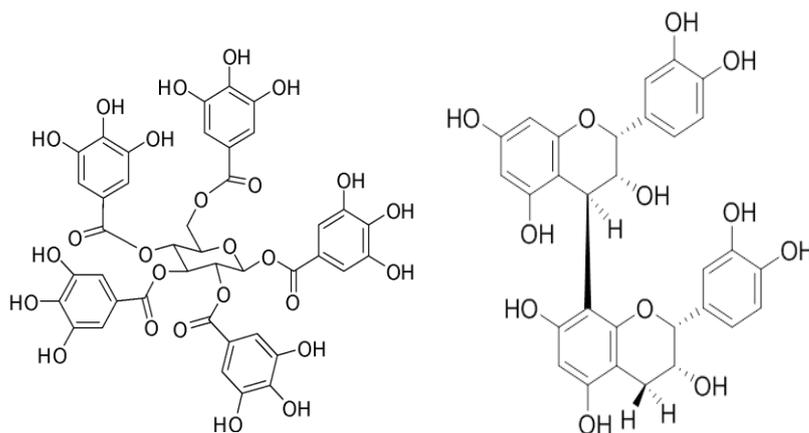


Figura 3- Exemplos de taninos: (1) tanino hidrolisável- β -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose (2) tanino condensado - epicatequina-(4 β →8)-catequina.

Plantas ricas em taninos são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias, dentre as quais podem-se citar: ação bactericida, fungicida (SCALBERT, 1991; SANCHES, 2004), antiviral (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 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; YOSHIDA; HATANO, 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), atividade cicatrizante (LOPES et al., 2005) e atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006). Os taninos agem também como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2007).

Bueno et al. (2011) constataram a partir do extrato bruto produzido através das

cascas do caule de *Poincianella pluviosa*, o poder cicatrizante dos taninos, substâncias majoritárias na espécie. Queratinócitos e fibroblastos foram utilizados *in vitro*. Em seguida foram realizadas análises que comprovaram a presença de polifenóis e taninos hidrolisáveis, confirmando o poder cicatrizante da espécie.

O Extrato Bruto (EB) e a fração acetato de etila da espécie *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Barbatimão), mostraram-se eficientes no processo de cicatrização, apresentando um aumento da proliferação celular (SANCHES, 2004).

Lopes et al. (2005) observaram que o tratamento de feridas cutâneas com extratos semipurificados de *S. polyphyllum* Mart. e *S. obovatum*, que contêm altas concentrações de taninos, promove um aumento significativo na proliferação celular da epiderme.

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos provêm, pelo menos em parte, de três características gerais, sendo essas comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos (condensados e hidrolisáveis). Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e capacidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Os taninos podem se complexar com proteínas de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As ligações de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações covalentes ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos proteicos (LUCK et al., 1994). Esta propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (SCHOLZ, 1994).

A atividade dos taninos na cura de feridas, queimaduras e inflamações ocorre devido à formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína ou polissacarídeo) sobre pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura, pode, então, ocorrer. O mesmo mecanismo de ação ocorre no caso das úlceras gástricas (HASLAM, 1998).

2.3.1.2 Taninos condensados

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros que se formam através de várias condensações de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Denomina-se proantocianidinas esta classe de taninos (FREUDENBERG; WEINGES, 1958; FREUDENBERG; WEINGES, 1960). Tal denominação é devido à capacidade dos taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados os quais são da classe das antocianidinas, que tem como exemplos a cianidina e delfinidina.

Estruturalmente os taninos condensados diferem-se com relação ao número de hidroxilas presentes no anel aromático e à estereoquímica do carbono assimétrico do núcleo

heterocíclico. A presença de O-metilação, O-glicosilação e O-galoilação aumentam a complexidade estrutural (DE BRUYNE et al., 1999).

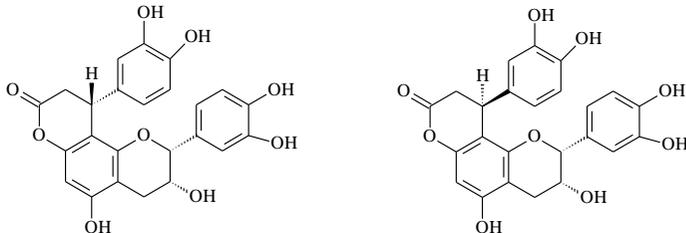
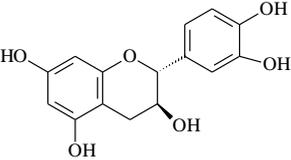
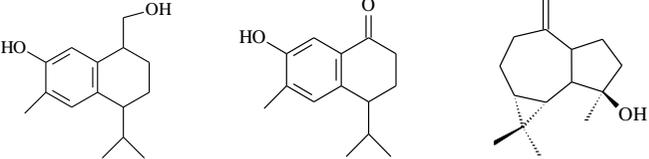
Esta classe de taninos é denominada de proantocianidinas (SANTOS; MELLO, 2007). As proantocianidinas são, geralmente, formadas por monômeros de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8. Outros monômeros são, também, muito comuns, tais como, galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol (TOLEDO, 2002).

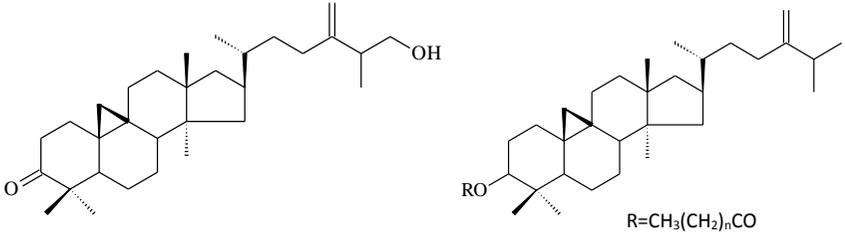
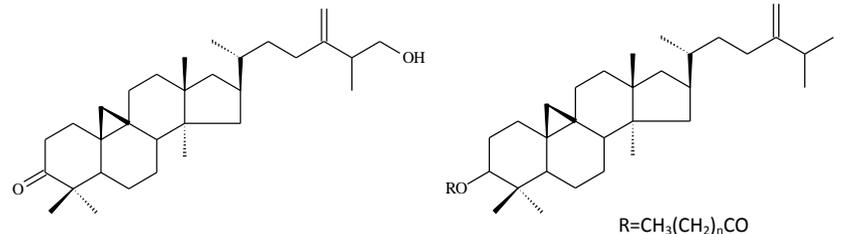
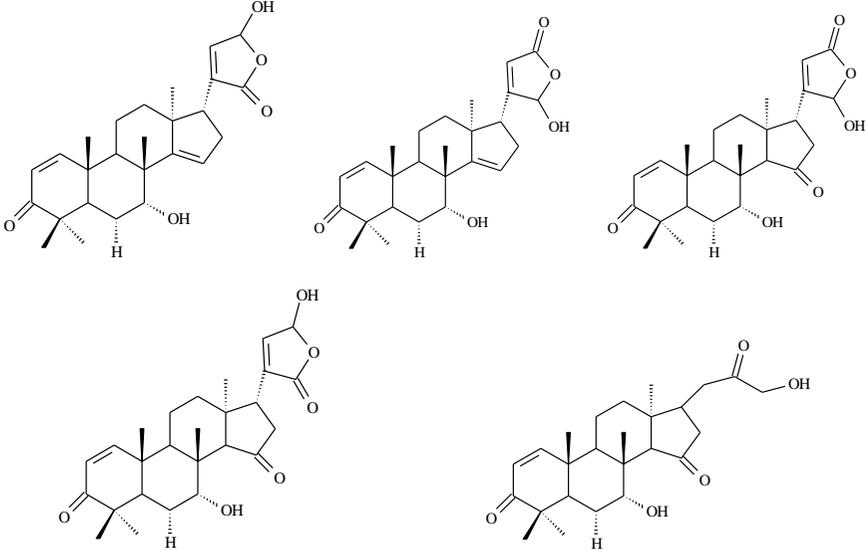
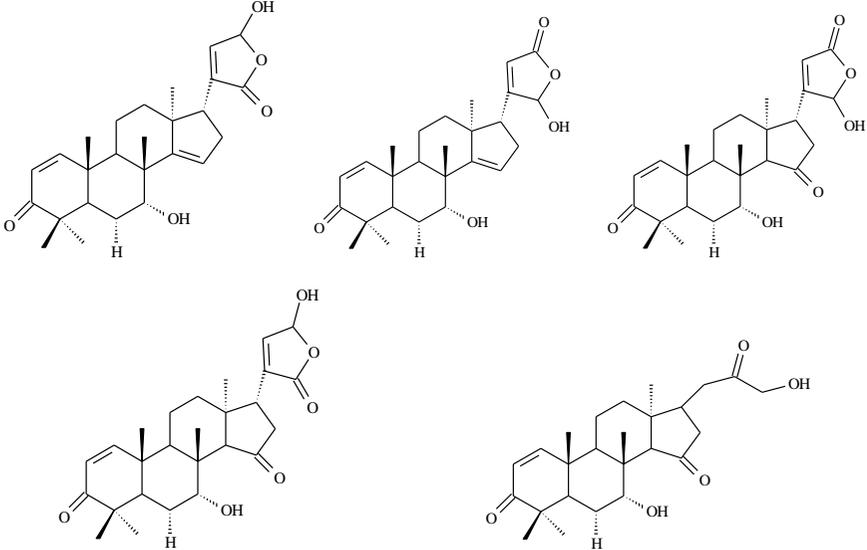
Os dímeros de procianidinas são divididos em dois grupos denominados A e B. As procianidinas do grupo B apresentam uma ligação carbono-carbono entre C-4 da porção superior e o C-8 ou C-6 da porção inferior (PORTER, 1992), e os pertencentes ao grupo A possuem adicionalmente ligação do tipo éter (Figura 4) (SANTOS; MELLO, 2007).

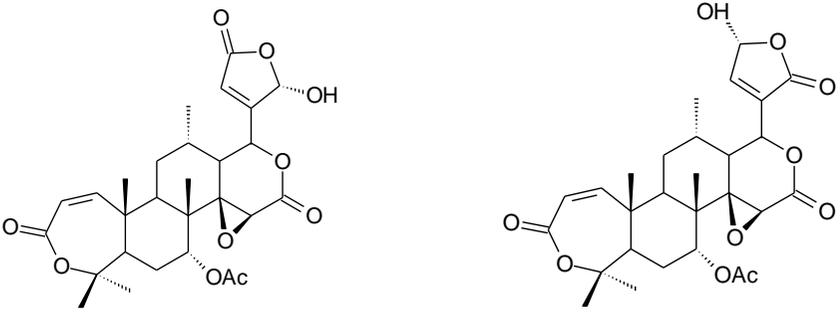
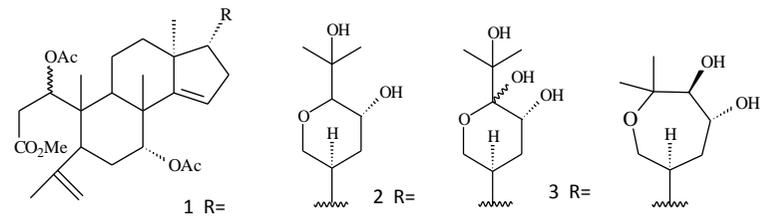
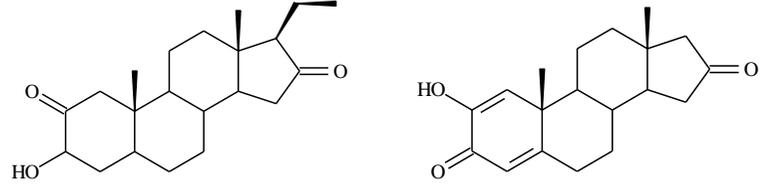
Os acoplamentos 4→8 são, estereoquimicamente, mais favorecidos, porém, não são exclusivos. Geralmente os acoplamentos 4→8 e 4→6 estão presentes, porém, na proporção 3:1 (DE BRUYNE et al., 1999).

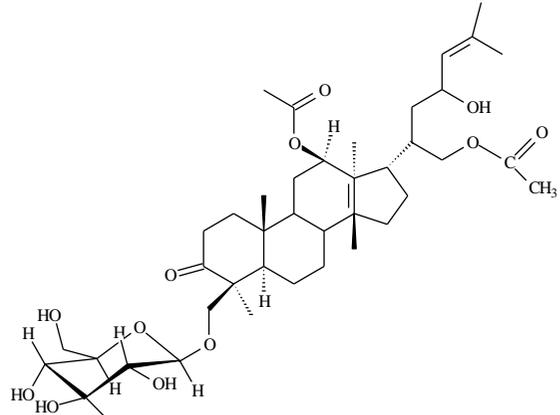
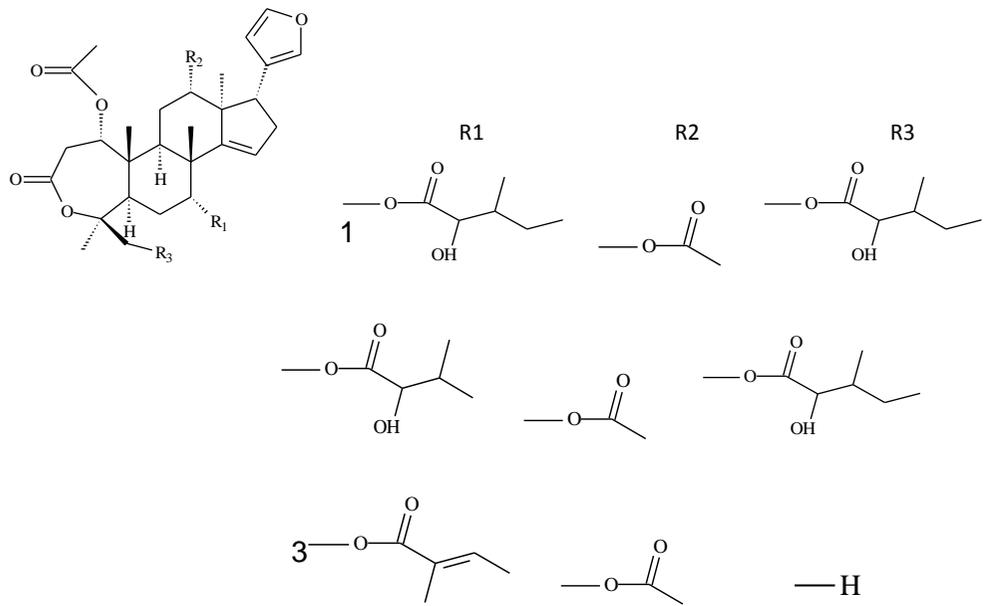
Os taninos condensados se dividem, geralmente, em dois tipos, dependendo, da presença ou ausência da hidroxila na posição C-5 do anel A (Figura 4) (PORTER, 1992; HEMINGWAY; FOO; PORTER, 1982).

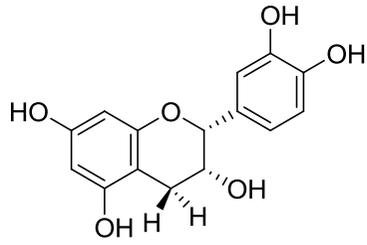
Quadro 1 - Substâncias químicas isoladas de espécies do gênero *Trichilia*.

ESPÉCIE	CLASSE	ESTRUTURA
<i>Trichilia catigua</i>	Cumarinas (BELTRAME, 2005)	
	Flavolignanas (PIZZOLATTI <i>et al.</i> , 2002a)	
	Taninos (BELTRAME, 2005)	
	Triterpenos (BELTRAME, 2005)	

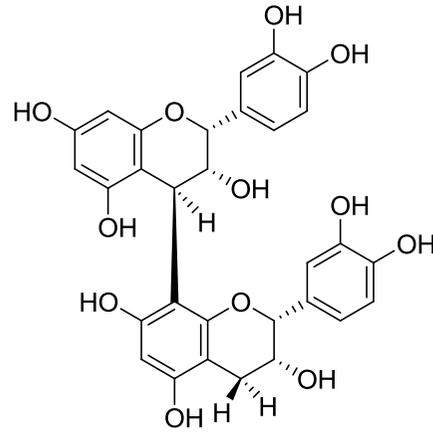
<p><i>Trichilia claussenii</i></p>	<p>Triterpenos (PUPO <i>et al.</i>, 1996)</p>	 <p>R=CH₃(CH₂)_nCO</p>
<p><i>Trichilia claussenii</i></p>	<p>Triterpenos (PUPO <i>et al.</i>, 1996)</p>	 <p>R=CH₃(CH₂)_nCO</p>
<p><i>Trichilia estipulata</i></p>	<p>Limonóides (CORTEZ <i>et al.</i>, 1998; CORTEZ <i>et al.</i>, 2000)</p>	
<p><i>Trichilia estipulata</i></p>	<p>Limonóides (CORTEZ <i>et al.</i>, 1998; CORTEZ <i>et al.</i>, 2000)</p>	

<p><i>Trichilia elegans</i></p>	<p>Limonóides (GARCEZ <i>et al.</i>, 1997)</p>	
<p><i>Trichilia elegans</i></p>	<p>Seco-protolimonóides (GARCEZ <i>et al.</i>, 1996)</p>	
<p><i>Trichilia hirta</i></p>	<p>Esteróides (CHAURET <i>et al.</i>, 1996)</p>	

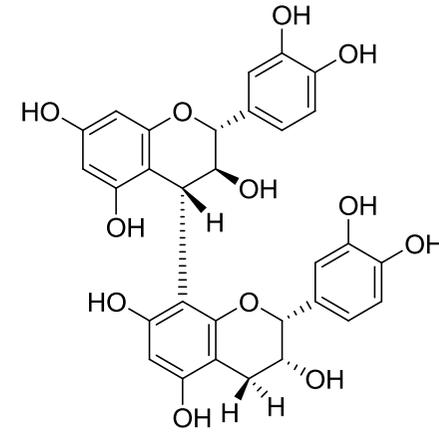
<p><i>Trichilia prieuriana</i></p>	<p>Protolimonóides (OLUGBADE; ADESANYA, 2000)</p>	
<p><i>Trichilia rubra</i></p>	<p>Limonóides (MUZLA <i>et al.</i>, 1995)</p>	



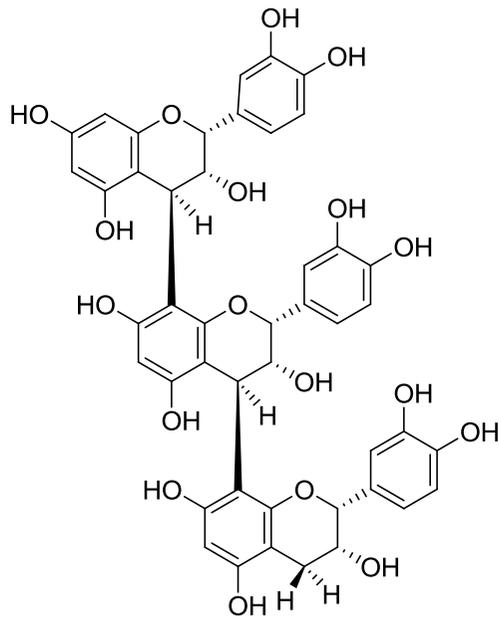
1



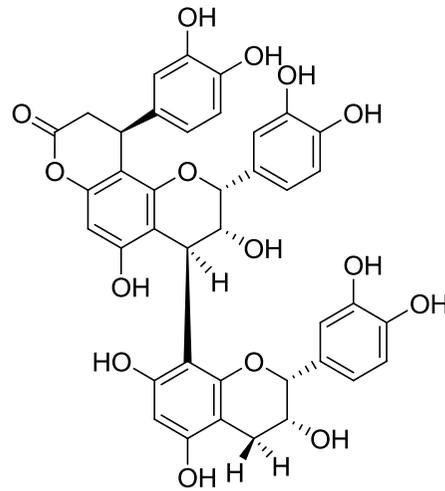
2



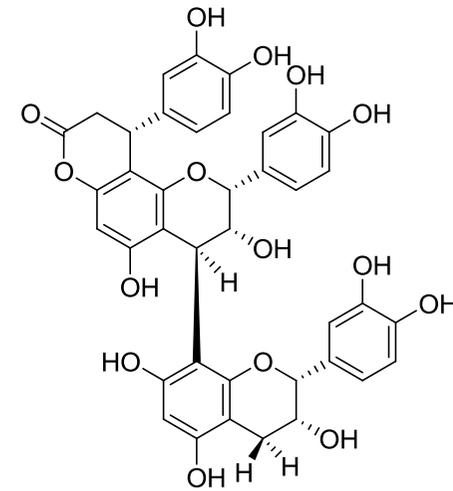
3



4



5



6

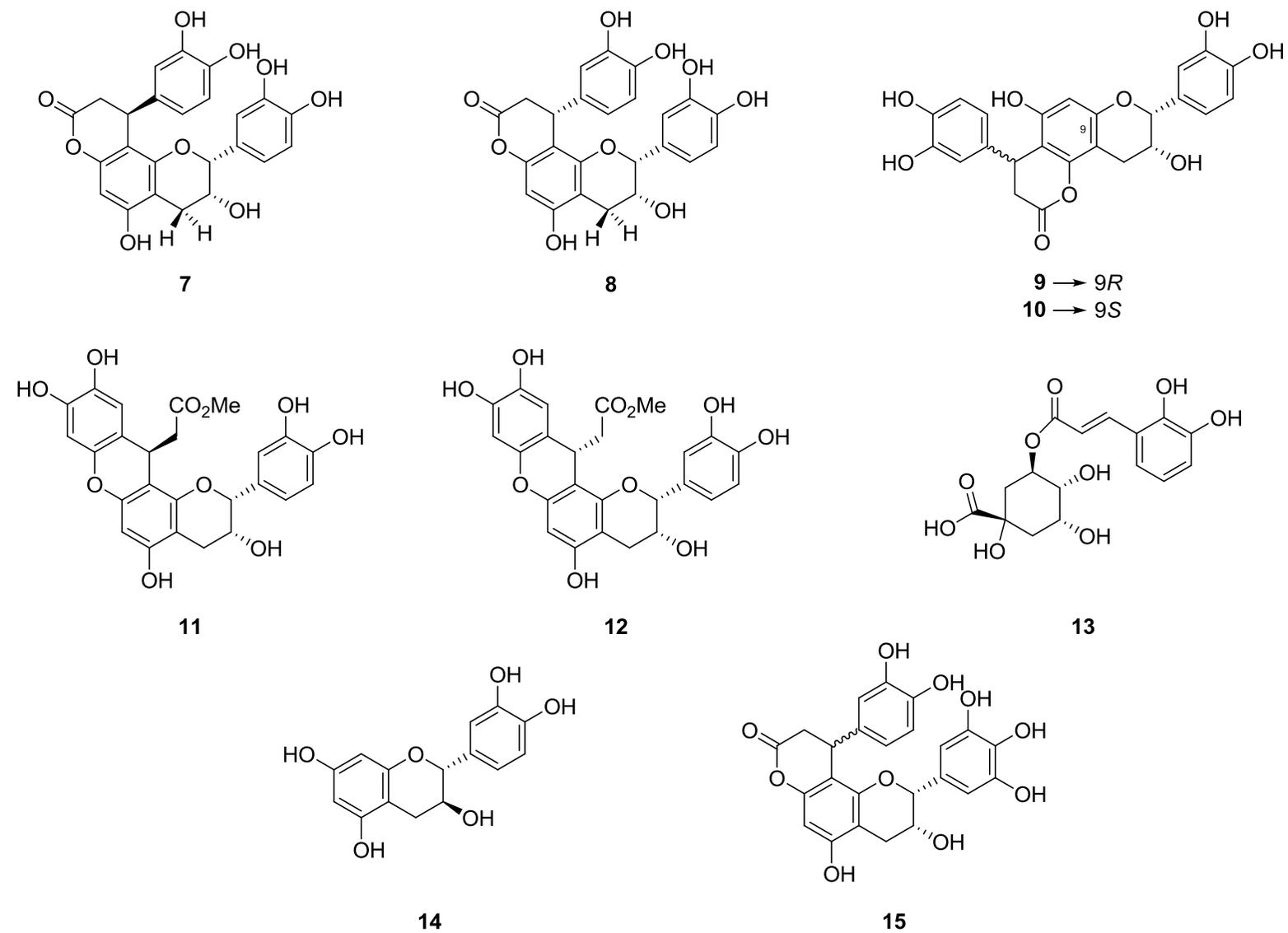


Figura 5 – Algumas substâncias químicas da espécie *T. catigua* que já foram isoladas e elucidadas.

Diferentes espécies de *Trichilia* foram avaliadas do ponto de vista químico e estas substâncias podem ser observadas no Quadro 1. Além disso, diferentes substâncias do tipo taninos condensados foram isoladas de *T. catigua*, como (Figura 5): epicatequina (1), procianidina B₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina] (2), B₄ [catequina-(4α→8)-epicatequina] (3) e C₁ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-epicatequina] (4), cinchonainas IIa (5) e IIb (6), (Lagos, 2006; Resende, 2007; Resende et al., 2011), cinchonaina Ia (7), Ib (8), Ic (9) e Id (10) (Pizzolatti et al., 2002b; Beltrame, 2005; Resende, 2007; Tang et al., 2007; Martinelli, 2010; Resende et al., 2011), catiguanina A (11) e B (12) (Tang et al., 2007), cumarinas e triterpenos (Beltrame, 2005), ácido clorogênico (13), caquina (14), os esteroides β-sitosterol e stigmasterol (Lagos, 2006), e apocinina E (15) (Resende et al., 2011).

2.4 CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE

No método em contracorrente a separação ocorre por um processo conhecido como partição líquido/líquido, isto é, ambas as fases, móvel e estacionária, são líquidas, não sendo, portanto, necessário o uso de um suporte sólido como fase estacionária, comum nos demais métodos cromatográficos (BERTHOD, 1991). A ausência de suportes sólidos pode evitar uma possível adsorção irreversível da amostra e a degradação de substâncias ativas, presentes na mesma (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994), como também a administração de uma quantidade significativa de amostras, não sendo necessário anteriormente, sua pré-purificação. Possibilita também a perda de pequena quantidade de amostra administrada, assim como um consumo mínimo de solventes (MANDAVA; ITO, 1998). A eficiência dessa técnica está relacionada com a definição ideal do sistema eluente a ser utilizado (CONWAY, 1989).

Existem, basicamente, três tipos de cromatógrafo em contracorrente:

Contracorrente em gotas ("DCCC: droplet counter-current chromatography"): gotas da fase móvel passam pela fase estacionária, assim, o soluto é particionado entre as duas fases imiscíveis. Colunas de vidro (200-600) dispostas verticalmente e em série, são acopladas uma a outra por tubos de teflon. A fase móvel é administrada de forma ascendente ou descendente, dependendo de sua densidade se comparando com a fase estacionária (Figura 6). Nesta técnica utiliza-se sistema eluente ternário ou quaternário. O uso de sistema binário quase não ocorre, pois o uso de um sistema eluente com três ou mais solventes diferentes, ajuda a diminuir a diferença de polaridade entre as duas fases, como também, possibilita uma maior seletividade do sistema (MARSTON; HOSTETTMANN,

1994).



Figura 6- Cromatógrafo de contracorrente em gotas. Fonte: Istituto di Chimica Biomoleculare. Consiglio Nazionale delle Ricerche. (BÜCHI MOD. 670), 1987.

Contracorrente Locular Rotacional ("RLCC: rotation locular counter-current chromatography"): o equipamento é composto por 16 colunas, em geral de vidro, cada uma possui 16 compartimentos e ficam posicionadas ao redor de um eixo rotacional, no qual seu ângulo de inclinação e sua velocidade rotacional podem variar (SNYDER et al., 1984). As análises podem ocorrer de forma ascendente ou descendente (Figura 7). Em relação à técnica acima descrita, a RLCC, possui baixa resolução, porém, existem estudos que descrevem o seu uso em separações de substâncias naturais (DOMON et al., 1982; KUBO, 1991).



Figura 7- Cromatógrafo locular rotacional. Fonte: Escola de Pós-Graduação em Agricultura/ Faculdade de Agricultura- Universidade de Kyoto, Kyoto, Japão 2016.

Contracorrente de Alta Velocidade (CCCAV) ("HSCCC: high-speed counter-current

chromatography"): é o método em contracorrente mais usado para a separação de produtos naturais. Possui uma bobina de tubo de teflon enrolada, em formato espiral, em multicamadas. Ao redor de um eixo central apresenta uma coluna, na qual induz-se um movimento de natureza rotacional e translacional ou planetária, em alta velocidade ou cerca de 800 rpm (Figura 8). Neste método a fase estacionária fica retida dentro do equipamento por uma força centrífuga, enquanto que, a fase móvel percorre todo o conjunto a uma vazão de cerca de 1,0 mL/min dependendo do sistema, garantido assim, um menor tempo de trabalho, em relação às outras técnicas de contracorrente. A CCCAV possui algumas vantagens se comparado aos outros métodos de contracorrente, tais como, menor tempo na realização da análise e menor consumo de solventes (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

O método de CCCAV foi desenvolvido na década de 1970 e é bastante utilizada para a separação de produtos naturais (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994), dentre os quais, podem-se destacar os taninos.

O equipamento de CCCAV é composto por uma coluna em formato espiral e um contrapeso, que sob ação de uma força centrífuga, promove um movimento em sentido planetário da coluna e faz com que o contrapeso gire em torno de seu próprio eixo. Esse movimento planetário exerce duas importantes funções para que ocorra uma separação eficiente: um mecanismo de rotação do sistema eluente livre de interferentes, de modo que a fase móvel flui continuamente através da coluna de separação e a segunda que realiza um movimento hidrodinâmico do sistema eluente no interior da coluna, quando as duas fases (móvel e estacionária), dois líquidos imiscíveis, são injetadas em uma das extremidades da coluna, a rotação separa por completo as duas fases ao longo da coluna, a medida que a fase mais leve ocupa a região chamada cabeça e a fase mais pesada ocupa a região chamada calda (ITO, 2005). Comumente encontram-se sistemas eluentes compostos por três (ternário) ou quatro (quaternário) solventes diferentes, isso para proporcionar uma separação mais eficiente (SANTOS; MELLO, 2007).

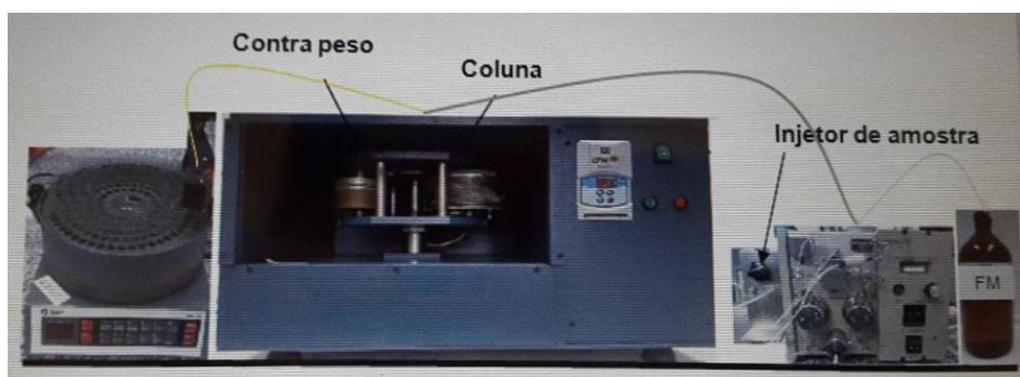


Figura 8- Equipamento CCCAV. A. Coletor com tubos; B. Sistema CCCAV (Contrapeso e coluna); C. Bomba purificadora de amostras. Fonte: Letícia Maria Krzyzaniak, 2015.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar estruturalmente taninos da fração semipurificada acetato de etila, obtida a partir do extrato bruto das cascas secas de *Trichilia catigua*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar substâncias da fração semipurificada acetato de etila por meio de diferentes métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna (CC), cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV).
- Identificar estruturalmente as substâncias isoladas, por métodos espectrométrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes que foram empregados possuem grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vertec® ou Synth®, exceto quando especificado:

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Anidrido acético
- Metanol deuterado Isotec®
- Metanol grau HLPC
- *n*-propanol
- Solução de cloreto férrico a 1% em etanol

4.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Marte®, modelo AY220
- Bomba a vácuo Pfeiffer Vacuum modelo DV05
- Bomba Waters 510
- Câmera com lâmpada UV 254 nm
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200
- Colunas cromatográficas para cromatografia líquida de média pressão
- Cromatógrafo de contra corrente líquido de alta velocidade com coluna de teflon de 130 m, volume da coluna 325 mL, manufaturado na Universidade Estadual de Maringá
- Evaporadores rotatórios Buchi® R-200 e Buchi® R-114
- Liofilizador Christ® Alpha 1-4.

4.3 MATÉRIA PRIMA VEGETAL

As cascas de *T. catigua* foram adquiridas em Caetité, Bahia, Brasil, em agosto de 2008 e identificado por Dr. Gerdt Hatschbach. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário de Curitiba Town Hall (no. 306253), Curitiba, Paraná, Brasil (Figura 9).



Figura 9- Cascas da catuaba íntegras e moídas. Fonte: Ana Luiza Sereia, 2011.

4.4 EXTRATO BRUTO (EB)

As cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem a necessidade de separação granulométrica. Realizou-se a extração por meio do Ultra-turrax (Ika, UTC115 KT), utilizando acetona/água (7:3; v/v) como líquido extrator, na proporção de 10% (m/v). Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o EB. Esse procedimento foi realizado por LONGHINI (2013).

4.5 FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE)

Cerca de 50 g do EB foram ressuspensos em água destilada (500 mL) e particionado com acetato de etila (500 mL; 12 vezes) em funil de separação (MELLO et al., 1996a). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a FAE. A fase aquosa restante foi também concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FA). Esta etapa de preparação da FAE foi realizada por Longhini (2013).

4.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para obtenção de subfrações e/ou mesmo substâncias isoladas e purificadas foram empregados diferentes métodos cromatográficos.

4.6.1 Cromatografia em Coluna (CC)

A fração acetato de etila de catuaba (FAE) foi fracionada, utilizando-se uma coluna de vidro (h: 750 mm Ø 55 mm) contendo Sephadex[®] LH-20 (300 g) como fase estacionária. Após limpeza adequada com ácido acético glacial 2%, a coluna foi estabilizada com etanol 50% e foram adicionados cerca de 20 g de FAE no topo da coluna com auxílio de uma pipeta. Como fase móvel foi empregada a seguinte sequência de solventes em proporção volumétrica:

1. Etanol/água (1:1)
2. Etanol 100%
3. Acetona/água (7:3)

Recolheram-se 10 mL de cada fração em tubo de ensaio com vazão de 1 mL/min, sendo que o monitoramento dessas frações foi realizado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) (seção 4.6.2). As subfrações foram reunidas por semelhança cromatográfica, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas. A obtenção das frações por CC a partir da FAE foi realizada por Longhini et al. (2013).

4.6.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck[®]) de 0,200 mm de espessura. O sistema eluente foi composto de acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v) e as substâncias foram visualizadas sob luz UV, a 254 nm. Utilizou-se uma solução de cloreto férrico a 1% em etanol para revelação química das placas cromatográficas.

4.6.3 Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (CCCAV)

O cromatógrafo em contracorrente de alta velocidade (CCCAV) utilizado foi manufaturado nas dependências da Universidade Estadual de Maringá e é equipado com coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 2,5 mm de diâmetro interno, possuindo capacidade total de 325 mL, injetor com capacidade de 10 mL de amostra e bomba de solvente de duplo pistão, com capacidade de fluxo máximo de 10 mL (Waters 510) (Figura 7). O sistema eluente foi preparado em funil de separação com acetato de etila-*n*-propanol-água (140:8:80; v/v), sendo que a fase aquosa foi utilizada como fase inferior (estacionária) e a fase orgânica como fase superior (móvel). As subfrações obtidas na separação por cromatografia em coluna (seção 4.6.1) foram injetadas em CCCAV e as subtrações resultantes foram coletadas em tubos de ensaios sempre com volume definido em cada

subfração (Fluxograma-3) e reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (seção 4.6.2). A vazão da fase móvel foi determinada para cada subfração individualmente, variado entre (0,7 a 1,0 mL) (RESENDE, 2007).

4.7 Análise estrutural

As substâncias visualizadas em CCD e que demonstraram estar isoladas foram analisadas utilizando-se métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (^1H - ^1H -COSY), no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, com auxílio do aparelho de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz (Figura 10) e 500 MHz (Figura 11), Bruker, modelo AVANCE III HD para ^1H e, 75 e 125 MHz para ^{13}C , respectivamente, com uso de solventes deuterados. Os espectros das substâncias foram analisados e comparados com os dados da literatura.



Figura 10- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz, Bruker, modelo AVANCE III HD. Fonte: Laboratório de RMN, Bloco 31, salas 11 e 12, UEM.



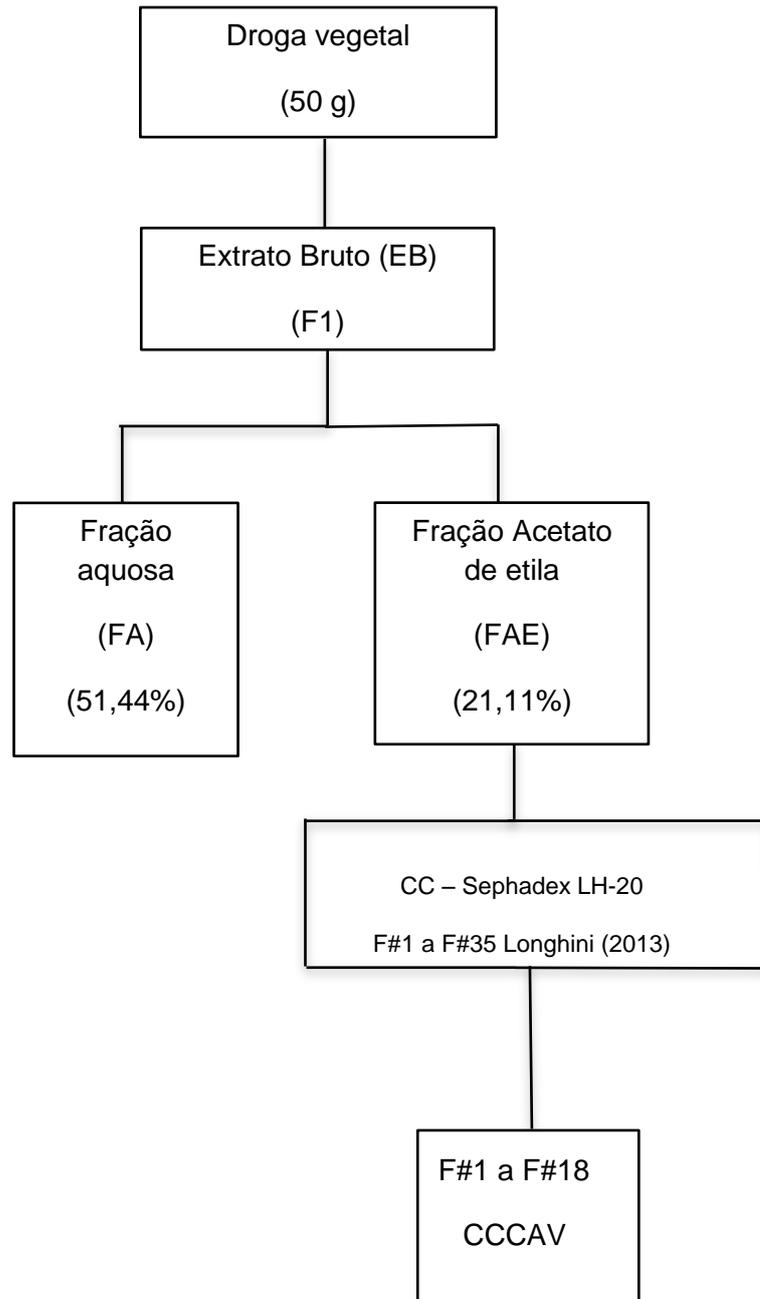
Figura 11 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 500 MHz, Bruker, modelo AVANCE III HD. Fonte: Laboratório de RMN, Bloco 31, salas 11 e 12, UEM.

4.7.1 Derivatização química

Para quantidades de até 100 mg de substância, foram adicionados 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 mL e a mistura foi deixada em repouso por 24 h. Após, foi adicionado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. A solução foi filtrada sob pressão reduzida por meio de funil de vidro sinterizado G3 ou G4 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi solubilizada em acetona e a retirada do solvente foi realizada por meio de evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. A substância foi transferida para um frasco e colocada em capela de exaustão à temperatura ambiente para total eliminação do solvente, sendo acondicionada em estufa sob pressão reduzida. (MELLO, *et al.*, 1996)

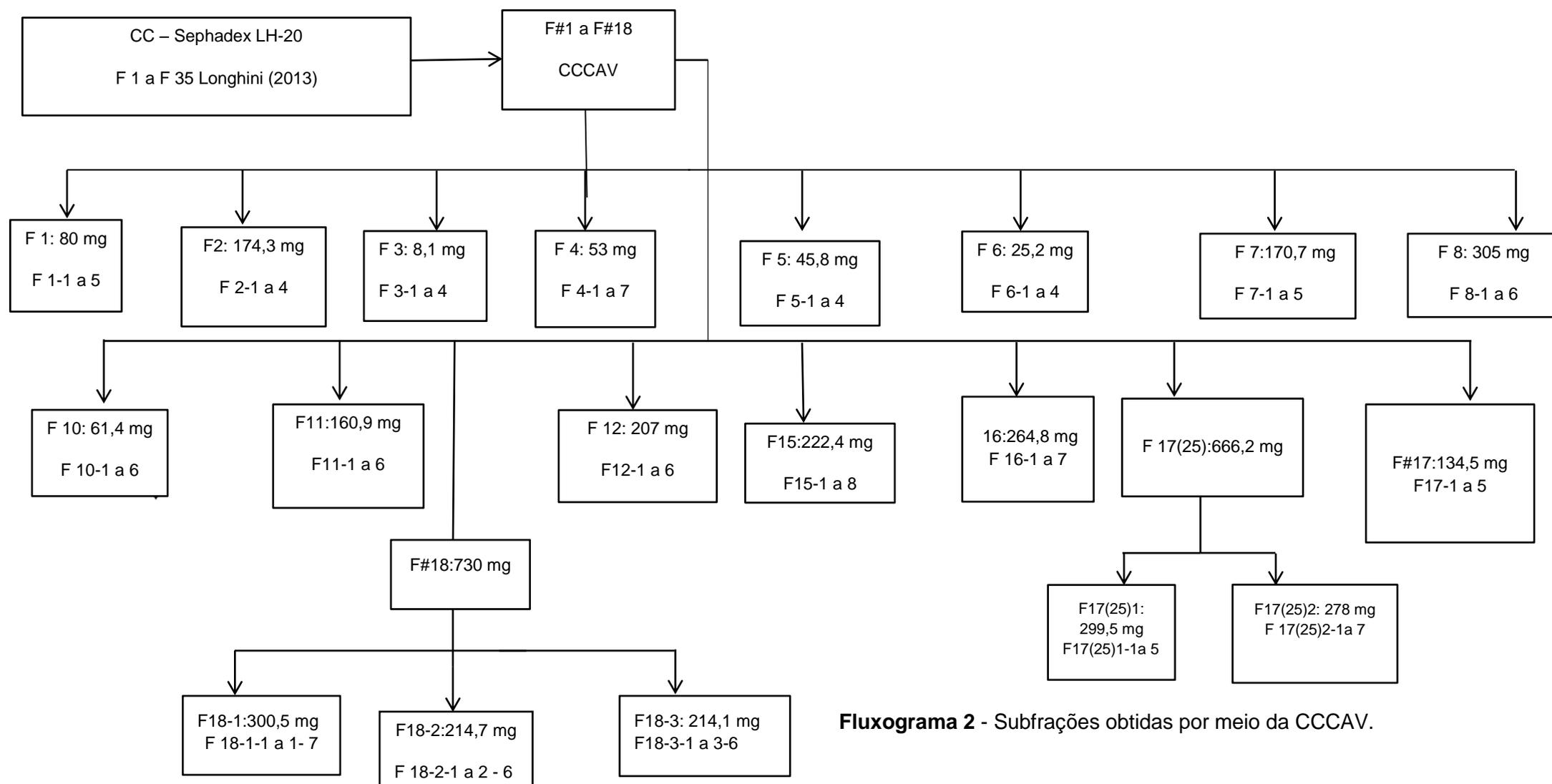
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Fluxograma 1 demonstra a produção de extrato bruto (EB), fração aquosa (FA) e fração acetato de etila, como também, métodos cromatográficos utilizados na obtenção de subfrações utilizadas no isolamento de substâncias, a partir das cascas da *Trichilia catigua*, segundo Longhini et al. (2013).



Fluxograma 1 - Produção de extrato bruto, fração aquosa, fração acetato de etila e métodos cromatográficos utilizados no isolamento de substâncias segundo Longhini.

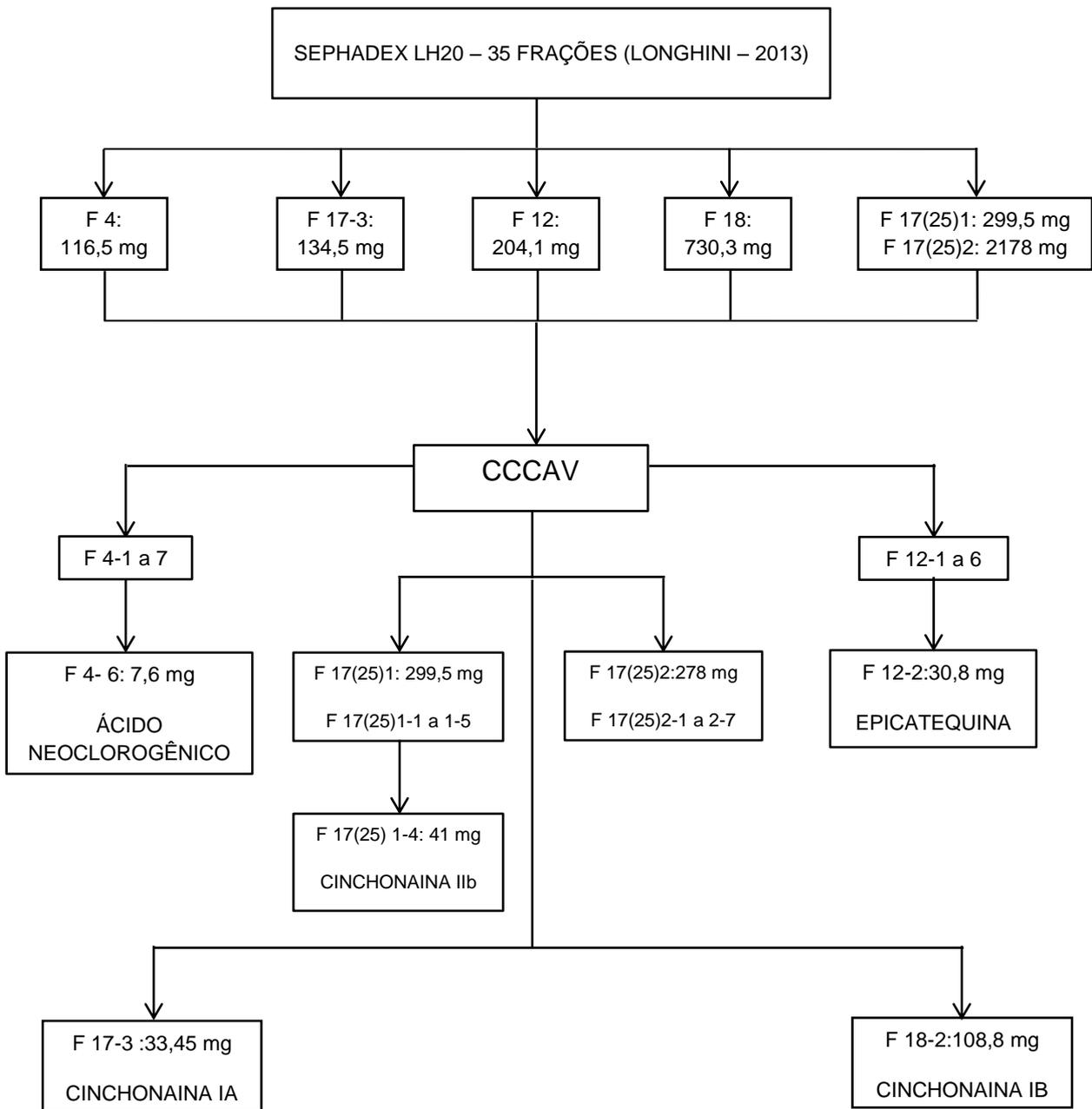
O Fluxograma 2 expressa as subfrações obtidas por Longhini et al. (2013), empregando cromatografia em coluna, Sephadex LH-20, como também, as substancias isoladas nesse trabalho, com a utilização do CCCAV.



Fluxograma 2 - Subfrações obtidas por meio da CCCAV.

5.2 Isolamento e identificação estrutural de substâncias

Das 35 frações obtidas por Longhini et al (2013) por cromatografia em coluna (Sephadex LH-20) algumas destas foram selecionadas para serem utilizadas na separação cromatográfica por CCCAV (Fluxograma 3)



Fluxograma 3 - Isolamento de substâncias a partir de algumas subfrações por meio de CCCAV.

5.2.1 Substância I - Ácido neoclorogênico (3-O-[*E*]-cafeoil-D-(-)-ácido quínico)

A partir da subfração 4 proveniente da CC em Sephadex LH-20 (116,5 mg) com utilização do CCCAV empregando vazão de 1,0 mL/min foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (item 4.6.2) e obtidas as subfrações F#4-1 a F#4-7, com o sistema eluente constante em 4.6.3. Com a F#4-6 (7,6 mg), após visualização em CCD, foi realizada análise por RMN de ^1H .

A substância I apresentou no espectro de massas pico íon pseudo-molecular [M-H] m/z 353,3 encontrando-se em concordância com substância do tipo ácido clorogênico. Análise com adutos de sódio e potássio confirmaram o íon molecular (Figura 12).

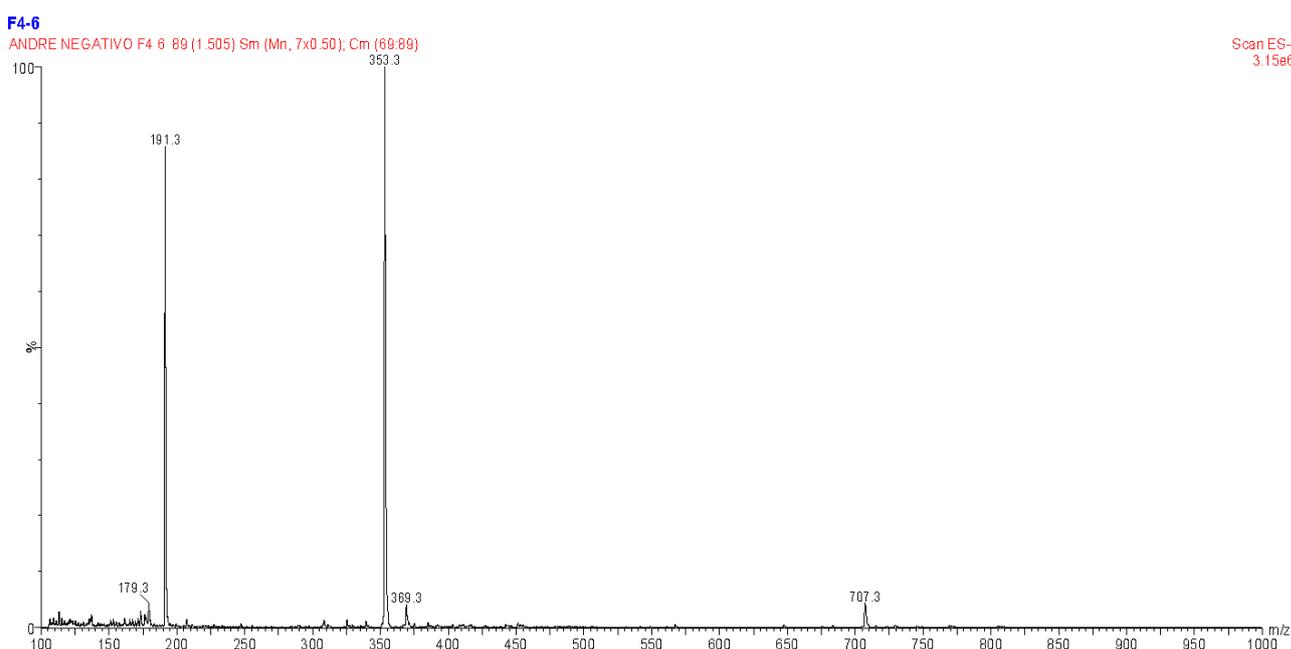


Figura 12- Espectro de massas no modo negativo da substância I.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 13) da substância I em metanol deuterado apresentou dados referentes aos hidrogênios correspondentes ao ácido neoclorogênico (Tabela 1).

O ácido clorogênico ou derivados do ácido quínico distinguem-se por apresentarem sete hidrogênios alifáticos no espectro de RMN de hidrogênios (Figura 13). Os hidrogênios H-2_{ax}, H-2_{eq}, H-6_{ax} e H-2_{eq} formam um multiplete e possuem uma constante de acoplamento de cerca de J 2 ppm. Segundo Jürgenliemk (2001) a atribuição dos deslocamentos químicos e acoplamentos foram possíveis apenas por simulação. Em adição aos acoplamentos vicinais e geminais ocorre um acoplamento 4J (acoplamento do tipo W) entre H-2_{eq} e H-6_{eq} de cerca de 2 Hz (PAULI et al., 1998). O hidrogênio 4 aparece como um duplo duplete, uma vez que possui um pequeno acoplamento axial estável e com uma grande constante de

acoplamento com H-5 (${}^3J_{H-4_{ax}/H-5_{ax}}$ ca. 9 Hz) e uma pequena com o H-3_{eq} (${}^3J_{H-4_{ax}/H-3_{eq}}$ ca. 3 Hz), enquanto H-3 e H-5 apresentam-se como *ddd*, uma vez que são os hidrogênios adjacentes geminais do grupo metileno. Por sua vez H-3 possui uma posição equatorial, que sofre somente acoplamentos equatorial/equatorial (${}^3J_{H-3/H-2_{eq}}$) ou equatorial/axial (${}^3J_{H-3_{eq}/H-2_{ax}}$, ${}^3J_{H-3_{eq}/H-4_{ax}}$) e pode, portanto, resultar em pequenos valores (3-4 Hz), e aparecem como pseudo-*dt*. Como o H-5 encontra-se em posição axial, possui duas grandes constantes de acoplamento diaxial (${}^3J_{H-5_{ax}/H-4_{ax}}$, ${}^3J_{H-5_{ax}/H-6_{ax}}$) e uma pequena axial/equatorial (${}^3J_{H-5_{ax}/H-6_{eq}}$) (POETSCH, 1997). A região aromática do derivado *p*-cumárico pode ser reconhecida pelo sistema spin AA'XX'. De um lado tem um acoplamento *orto* (3J -8 Hz), e ocorre um acoplamento meta fraco (4J -2 Hz). Para os derivados do ácido cafeico contudo observa-se um típico spin sistema AMX. Os hidrogênios acoplados H-7'e H-8' são da cadeia lateral. Uma constante de acoplamento de cerca de ${}^3J_{H-7'/H-8'}$ = 16 Hz confere para a forma [*E*], enquanto o acoplamento da forma [*Z*] é cerca de 13 Hz, e ambos os hidrogênios se encontram deslocados em campos mais altos (IBRAHIM; BARRON, 1989), fato que pode ser observado para a substância I com ${}^3J_{H-7'/H-8'}$ = 18 Hz, confirmando a configuração [*E*]. As possíveis correlações bidimensionais dos hidrogênios da substância I podem ser observadas na Figura 14, no espectro de 1H - 1H -COSY.

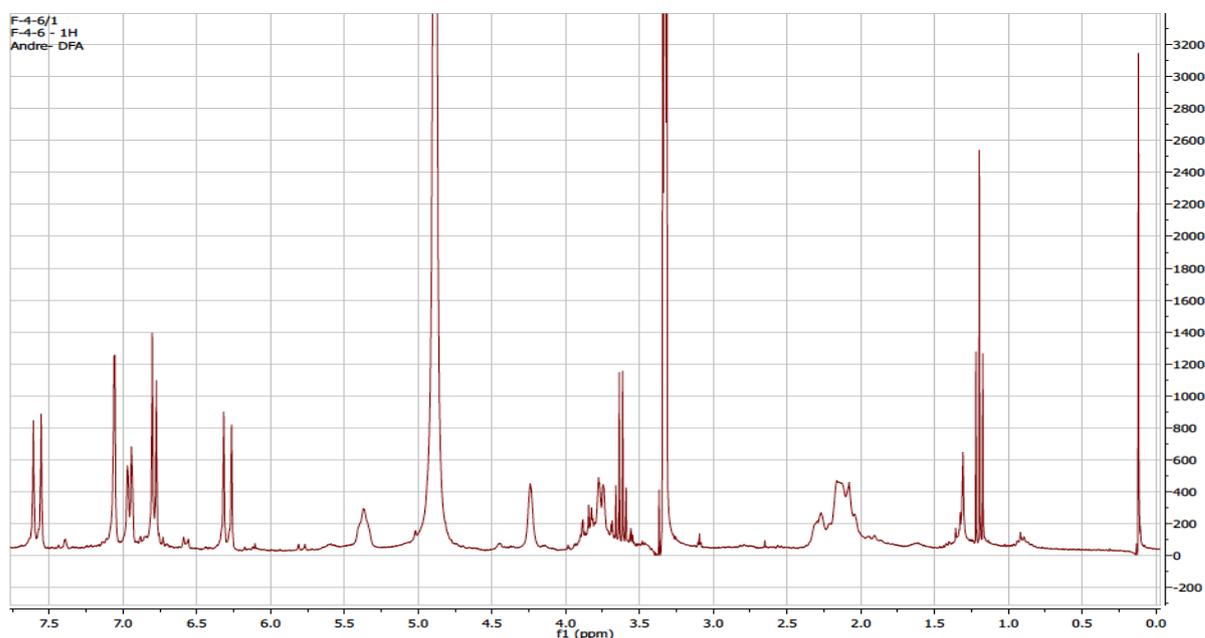


Figura 13- Espectro de RMN 1H da substância I (300 MHz, MeOD-*d*₄).

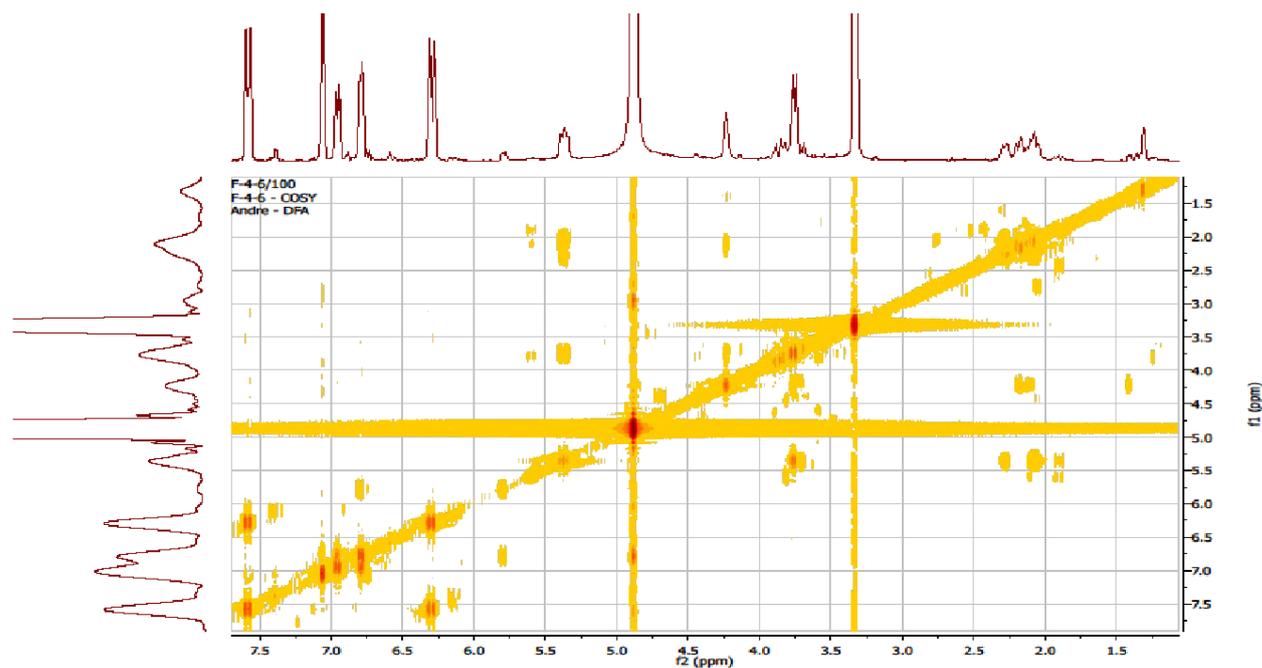


Figura 14 - Espectro bidimensional de RMN (^1H - ^1H -COSY) da substância I.

Tabela 1 - Dados de deslocamento da substância I (300 MHz; MeOD- d_4)

Hidrogênio	δ (ppm)	δ Literatura* (ppm)	Multiplicidade	J(Hz)
H-2 _{ax/eq}	2,05-2,32	2,19	m	
H-3	5,37	5,34	m	
H-4	3,66-3,59	3,63	dd	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 6$ $^3J_{\text{H-4-H-5}} = 15$
H-5	4,24	4,15	m	
H-6 _{ax/eq}	2,05-2,32	2,19	m	
H-2'	7,06	7,04	d	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 3$
H-5'	6,79	6,76	d	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 9$
H-6'	6,91	6,94	pd	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 9$
H-7'	7,58	7,58	d	$^3J_{\text{H-7'-H-8'}} = 18$
H-8'	6,29	6,30	d	$^3J_{\text{H-8'-H-7}} = 18$

*Jürgenliemk (2001).

5.2.2 Substância II - epicatequina

A partir da subfração 12 proveniente da CC em Sephadex LH-20 (204,1 mg) com utilização do CCCAV empregando vazão de 1,0 mL/min foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (item 4.6.2) e obtidas as subfrações F#12-1 a F#12-6, com o sistema eluente constante em 4.6.3. Com a F#12-2 (30,8 mg), após visualização em CCD, foi realizada análise por RMN de ^1H .

A **substância II** apresentou no espectro de massas pico íon pseudo-molecular de (m/z 290), característico de flavan-3-ol (Figura 15)

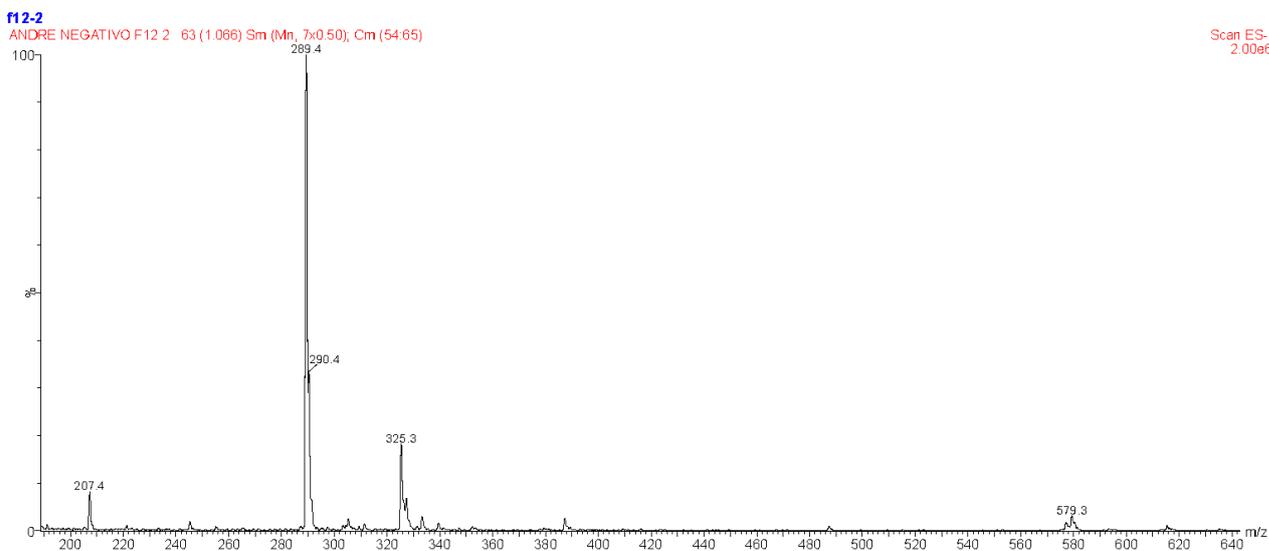


Figura 15- Espectro de massas do modo negativo da substância II.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 16) da substância II em metanol deuterado, mostra para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) com constante de acoplamento $J_{\text{H-2,H-3}}$ menor que 1 Hz, comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (WEINGES et.al.,1969). O hidrôgenio alifático H-3(C) apresenta constante de acoplamento pequena com H-4_{ax}(C) no valor de 3 Hz, e com H-4_{eq}(C) de 6 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância II** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges et. al. (1968 e 1969) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2(C) e H-3(C), com valor entre 8 e 10 Hz demonstra uma configuração relativa a *trans*, e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1 Hz refere-se a configuração relativa do tipo *cis*. Entre δ 7,00 e 6,76 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' comprovando a diidroxilação no anel B, como pode ser observado na tabela 2. Nesse espectro observa-se, ainda os hidrogênios referentes ao anel A, H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 5,96 e δ 5,93 ppm. Na Tabela 2 encontram-se dados de deslocamento, multiplicidade e constante de acoplamento.

Tabela 2 - Dados de deslocamento da substância II em ^1H -RMN (300 MHz; MeOD- d_4).

Hidrogênio	δ (ppm)	δ (ppm)* Literatura	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 _{ax}	2,72-2,78	2,72	dd	$^2J_{\text{H-4ax-Heq}}=18$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}}=3$
H-4 _{eq}	2,85-2,92	2,86	dd	$^2J_{\text{H-4ax-Heq}}=18$ $^3J_{\text{H-4ax-H-3}}=6$
H-2	4,84	4,80	s	
H-3	4,20	4,16	m	
H-6	5,94	5,90	d	$^4J_{\text{H-6-H-8}}=3$
H-8	5,96	5,93	d	$^4J_{\text{H-8-H-6}}=3$
H-5	6,75	6,75	d	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}}=9$
H-2'	6,99	6,97	m	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}}<3$
H-6'	6,80	6,79	m	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}}=9$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}}<3$

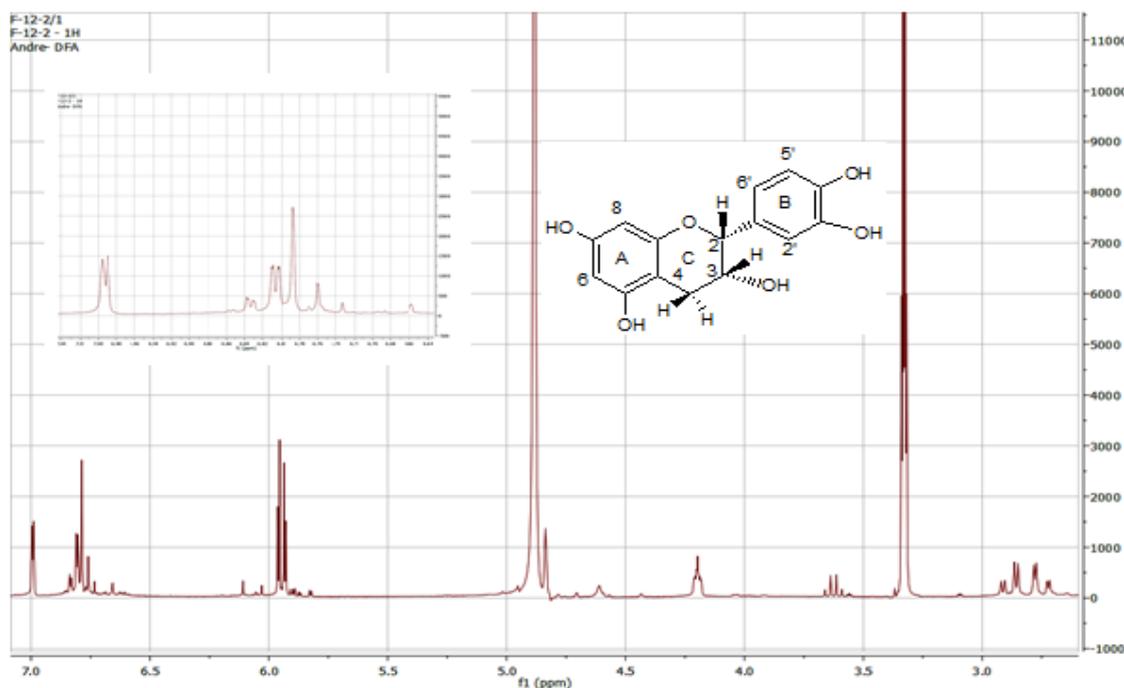


Figura 16 - Espectro de RMN ^1H da substância II (300 MHz, MeOD- d_4).

5.2.3 Substância III – Cinchonaína IIb

A partir da subfração F#17(25) proveniente da CC em Sephadex LH-20 (666,2 mg) foi realizada CCCAV com vazão de 1,0 mL/min, as frações foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (item 4.6.2) e obtidas as subfrações F#17(25)1 (299,5 mg) e F#17(25)2 (278,0 mg), com o sistema eluente constante em 4.6.3. Com a F#17(25)1-4 (41 mg), após visualização em CCD, foi realizada análise por RMN de hidrogênio.

A análise do espectro de massas da substância acetilada apresentou pico do íon

pseudo-molecular $[M-H]^+$ m/z 738,9 e com fragmento correspondente a uma (epi)catequina com $[M-H]^+$ m/z 289,0 (Figura 17).

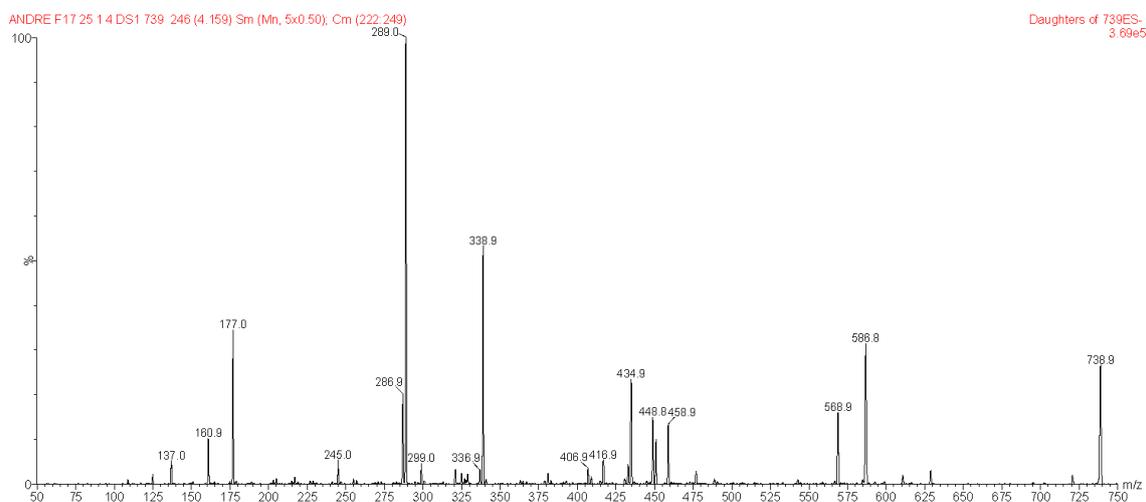


Figura 17- Espectro de massas no modo negativo da substância III.

A presença de um grupamento fenilpropanoide na porção superior da unidade flavan-3-ol pode ser confirmada por RMN ^{13}C (Resende, 2007). Assim, os sinais em δ 167,1 (carbonila), 35,8 (grupo metileno α em relação à carbonila - C-8"), e 34,2 ppm carbono metínicos em relação à carbonila (C-7") e um anel aromático com sistema AMX são semelhantes aos indicados por Resende (2007) (Figura 18).

A análise do espectro de RMN 1H (Figura 19) da substância III derivatizada por acetilação, em acetona- d_6 , apresentou dados representativos de uma substância dimérica, com grupamento fenilpropanoide derivado da epicatequina. Os resultados do deslocamento (δ em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento da substância III acetilada, estão expressos na Tabela 3.

Os hidrogênios mais protegidos da substância são os alifáticos do fenilpropanoide, ou seja, H-8"ax e H-8"eq, com deslocamentos em δ 2,27 e 2,79 ppm.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [H-4(F) axial e equatorial] encontram-se protegidos, com deslocamentos em δ 2,87 e 2,99 ppm, respectivamente. O H-4(C) apresenta-se em campo menos protegido, comparativamente, e sua constante de acoplamento com H-3(C) é cerca de 2 Hz, configurando-se como 3,4-*trans*. A constante de acoplamento entre H3(C) e H-2(C) deve ser inferior a 1 Hz, sugerindo uma configuração do tipo 2,3-*cis*, 3,3-*trans*, para a unidade superior. O H-7" com deslocamento em δ 4,18 ppm, apresenta-se como dubleto largo, com constante de acoplamento de $^3J_{H-7''-H-8''_{eq}}$ de 6 Hz e inferior a 1 Hz entre $^3J_{H-7''-H-8''_{ax}}$.

Os hidrogênios da unidade inferior [H-3(F) e H-2(F)] apresentam um constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando assim, a configuração 2,3-*cis*.

A ligação entre as unidades, superior e inferior, de acordo com os dados apresentados por Resende (2007), a substância possui uma ligação do tipo 4 β 8.

Os sinais apresentados na região aromática do anel A e D, bem como dos anéis B e E, estão todos de acordo com os dados da literatura (Resende, 2007).

Assim, caracteriza-se esta substância como sendo cinchonáina IIB, previamente isolada e identificada por Resende (2007).

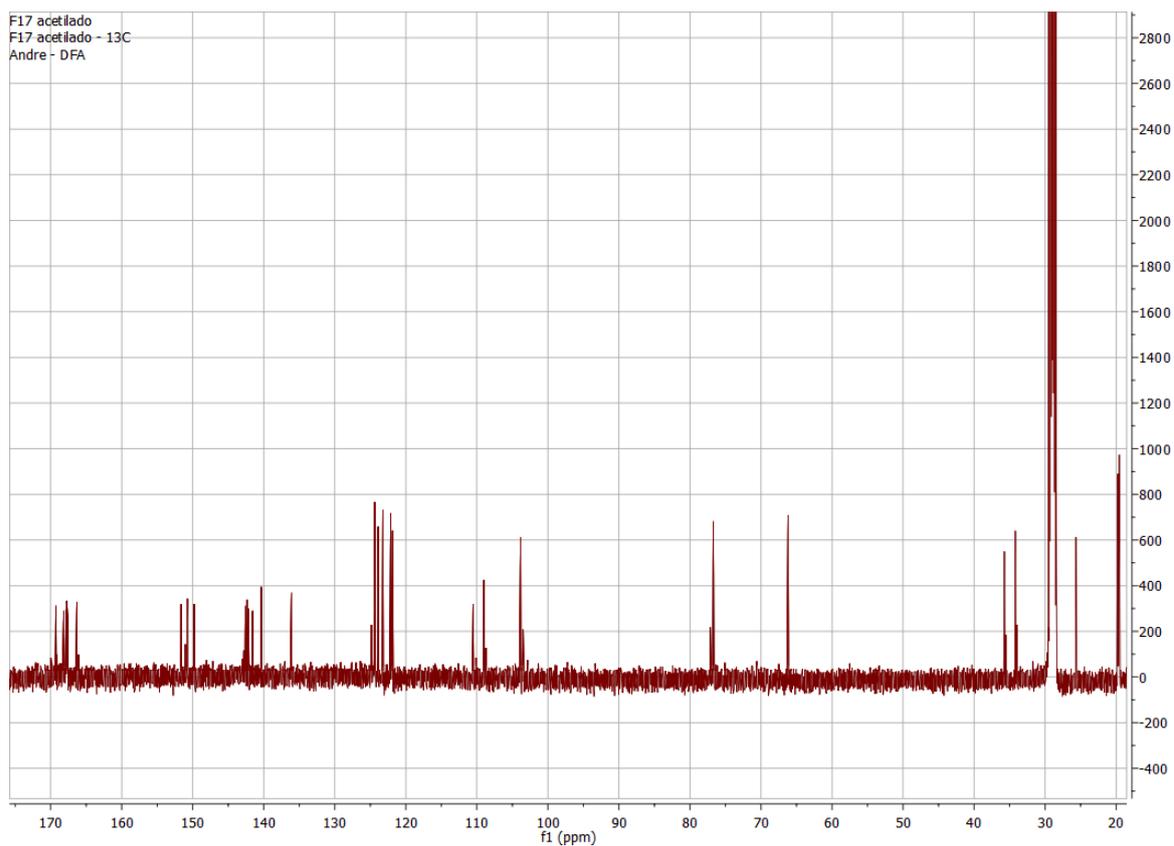


Figura 18- Espectro de RMN de ^{13}C da substância III (75 MHz, acetona- d_6).

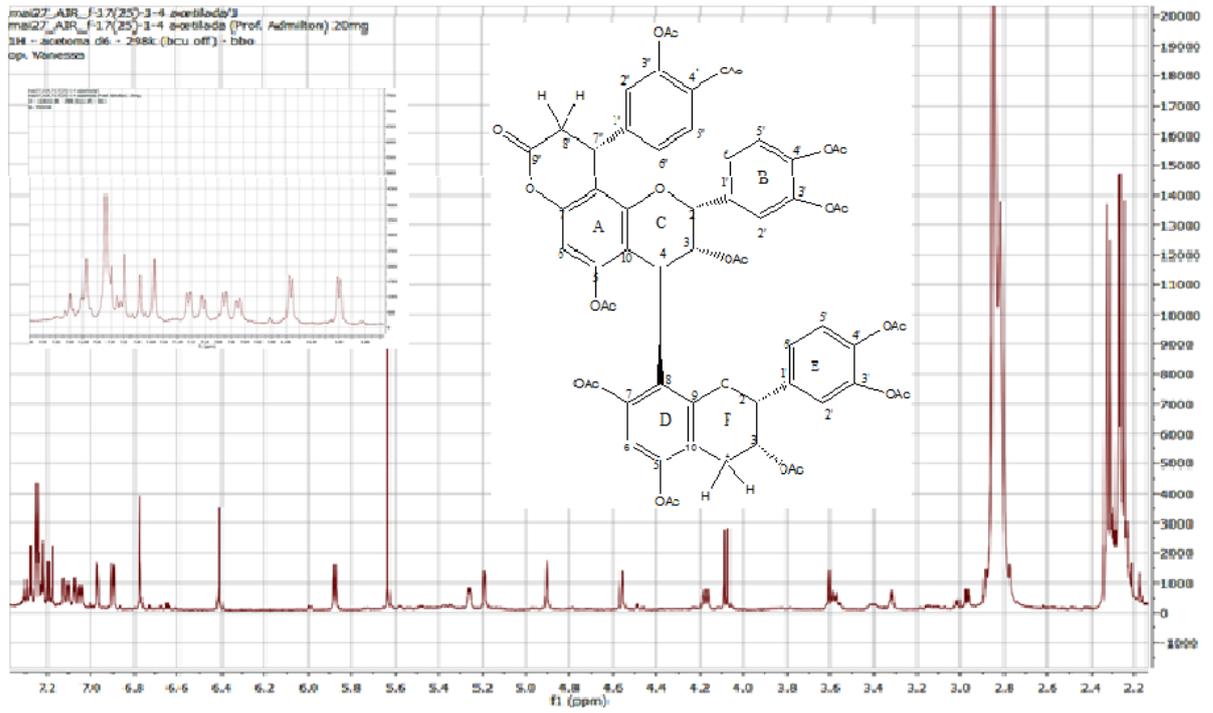


Figura 19- Espectro de ^1H RMN da substância III derivatizada por acetilação (300 MHz, acetona- d_6).

Tabela 3 - Dados de RMN ^1H da substância III acetilada (300 MHz; acetona- d_6).

H/ C	δ (ppm) ^1H	Multiplicidade	J (Hz)	Literatura* δ (ppm) ^1H
	2,99(eq)	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-4eq-H-3}} = 4,84$ $^2J_{\text{H-4eq-H-4ax}} = 17,3$	
5(D)				
6(D)	6,79	<i>s</i>		6,76
2'(E)	7,20	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 1,5$	7,23
5'(E)	7,22	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,8$	7,22
6'(E)	7,26	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 6,7$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 3,0$	7,28
2(C)	5,85	<i>sl</i>		5,86
3(C)	5-12-5,14	<i>m</i>		5,16-5,18
4(C)	4,50	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4-H-3}} = 1,6$	4,54
6(A)	6,42	<i>s</i>		6,40
2'(B)	6,92	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2'-H-6'}} = 2,51$	6,96
3'(B)				
4'(B)				
5'(B)	7,10	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5'-H-6'}} = 8,0$	7,17
6'(B)	7,08	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6'-H-5'}} = 8,65$ $^4J_{\text{H-6'-H-2'}} = 2,3$	7,05
1''				
2''	6,91	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-2''-H-6''}} = 2,6$	6,88
3''				
4''				
5''	7,22	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-5''-H-6''}} = 8,31$	7,28
6''	7,15	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-6''-H-5''}} = 8,30$ $^4J_{\text{H-6''-H-2''}} = 2,3$	7,10
7''	4,12	<i>dl</i>	$^3J_{\text{H-7''-H-8''}} = 6,20$	4,16
8''	2,72 (eq)	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-8''eq-H-7''}} = 1,20$ $^3J_{\text{H-8''eq-H-8''ax}} = 16,20$	2,78 (eq)
	2,31 (ax)	<i>dd</i>	$^3J_{\text{H-8''ax-H-7''}} = 0,82$ $^3J_{\text{H-8''ax-H-8''eq}} = 16,0$	2,28 (ax)
9''				

*Antonelli-Ushirobira (2003).

5.2.4 Substância IV- Cichonaina IA

A partir da subfração 17 proveniente da CC em Sephadex LH-20 (549,9 mg) com utilização do CCCAV, empregando uma vazão de 1,0 mL/min foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (item 4.6.2) e obtidas as subfrações F#17-1 a F#17-5, com sistema eluente constante em 4.6.3. Com F#17-3 (33,45 mg), após a visualização em CCD, foi realizada a análise por RMN ^1H , ^{13}C , 2D COSY (^1H - ^1H), e por espectrometria de massas.

A análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN 2D (COSY ^1H - ^1H) da substância IV acetilada em acetona- d_6 apresentou dados representativos de uma substância fenilpropanoide derivada da epicatequina (m/z 452; Figuras 20 e 21).

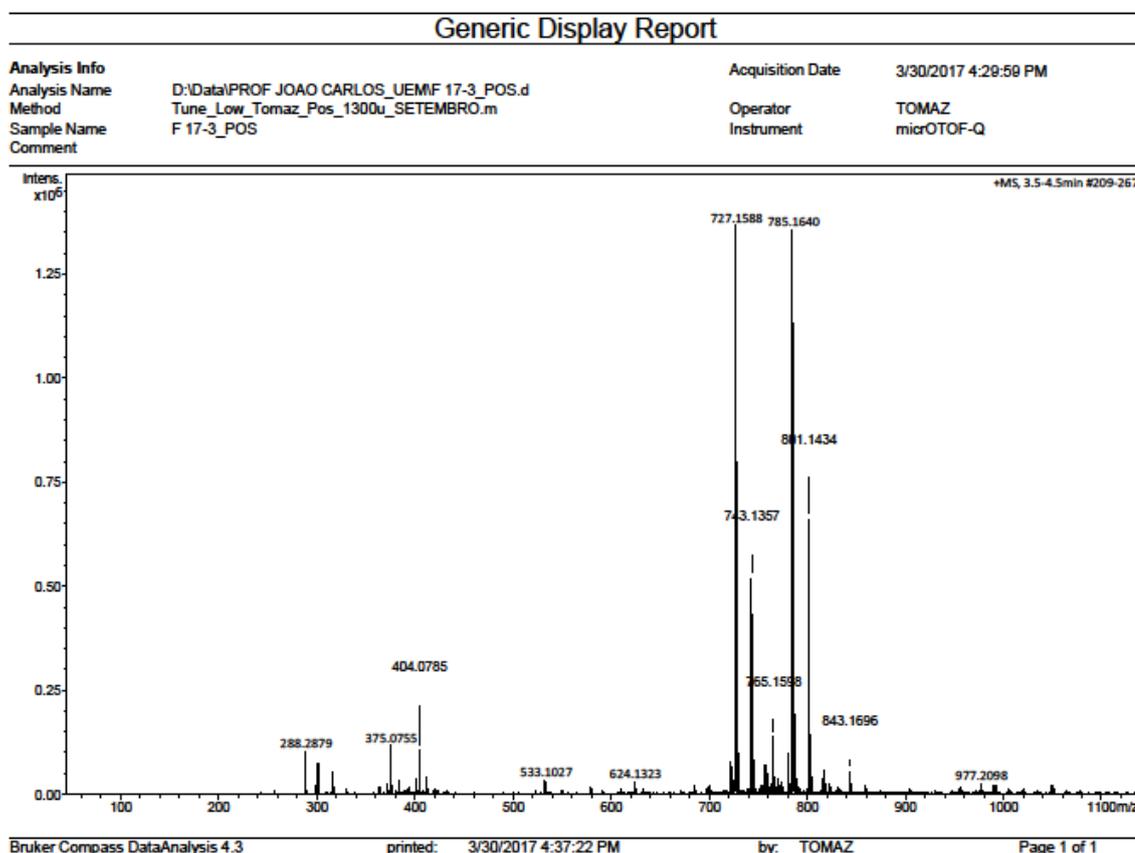


Figura 20- Espectro de massas no modo positivo da substância IV.

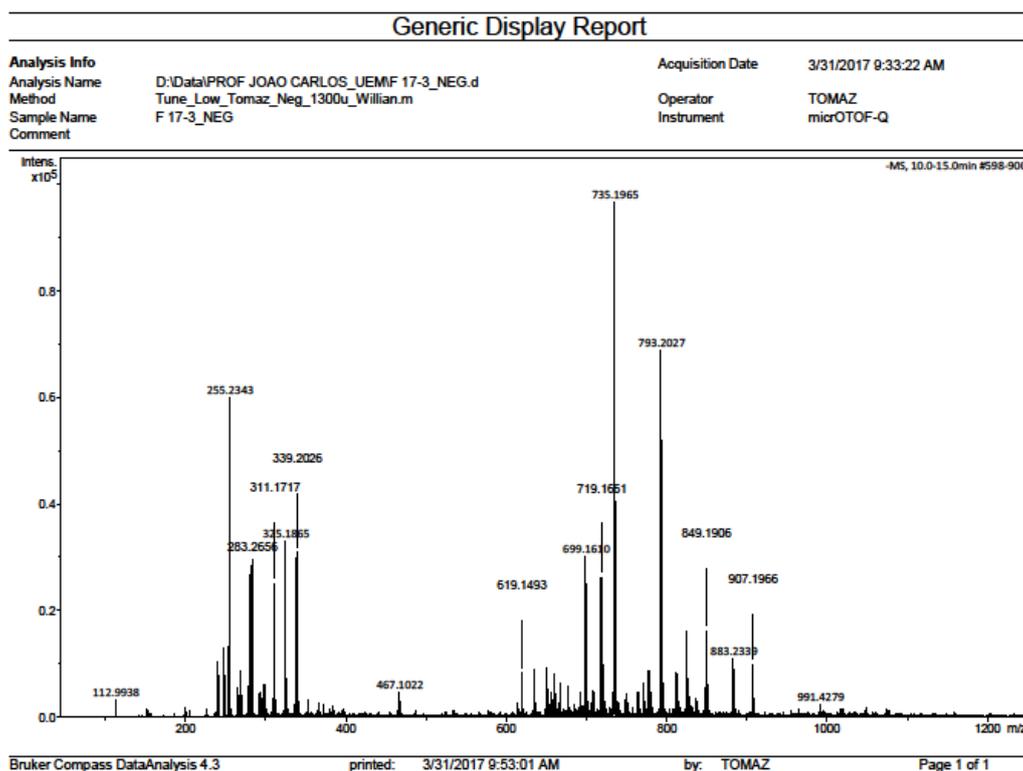


Figura 21- Espectro de massas no modo negativo da substância IV.

A presença de um substituinte fenilpropanoide ligado ao anel A da unidade flavan-3-ol (Figura 22) pode ser comprovada pelo espectro de RMN ^{13}C (Figura 25), no qual demonstram sinais referentes a uma carbonila (C-9 $''$) em δ 167,3 ppm, um grupo metileno α em relação a carbonila (C-8 $''$) em δ 36,7 ppm, e um carbono metílico β em relação à carbonila (C-7 $''$) em 35,1 ppm e um anel aromático dihidroxilado.

Os hidrogênios mais protegidos na molécula são os alifáticos da porção epicatequina H-4 $_{ax}$ e H-4 $_{eq}$, assim como, os hidrogênios da porção fenilpropanoide, H-8 $''_{eq}$ e H-8 $''_{ax}$. Os hidrogênios H-4 $_{ax}$ e H-4 $_{eq}$ possuem um deslocamento em δ 2,72 e 2,99 ppm, respectivamente; ao passo que os hidrogênios H-8 $''_{eq}$ e H-8 $''_{ax}$, possuem um deslocamento em δ 2,90 e 3,24 ppm, respectivamente (Figura 23, Tabela 4).

Os hidrogênios alifáticos da porção epicatequina H-3(C) e H-2(C), possuem deslocamentos em δ 5,43 e 5,20 ppm, respectivamente. Estes apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, fato esse, que confirma a configuração 2,3-*cis*. Enquanto que o hidrogênio alifático H-7 $''$ possui um deslocamento em δ 4,75 ppm, se apresentando como um dubleto largo, podendo ser um duplo-dubleto, com constantes de acoplamento em 6 Hz entre H-7 $''$ e H-8 $''_{ax}$ e inferior a 1 Hz entre H-7 $''$ e H-8 $''_{eq}$ (Figura 23). No espectro de RMN 2D (COSY ^1H - ^1H) (Figura 26) é possível observar a correlação de todos esses

hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios que se encontram na região aromática se apresentam tais como unidades monoméricas do tipo catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX.

Dessa forma foi possível comprovar o deslocamento, assim como, as constantes de acoplamento de todos os hidrogênios aromáticos, por meio do espectro de COSY ^1H - ^1H , como também, a determinar a correlação entre o H-2(C) e H-2'(B) da porção epicatequina.

O hidrogênio H-6(A) apresentou-se como um singlete em δ 6,50 ppm. Segundo Fletcher et al. (1977), Hemingway et al. (1982) e Kolodziej (1989) a representação relativa à parte epicatequina é do tipo 2,3-*cis*.

Nonaka e Nishioka (1982) comprovam que a localização da unidade fenilpropanoide que se encontra ligada ao anel A da porção epicatequina pode ser comprovada por meio do espectro de RMN ^{13}C .

Pelo fato da unidade fenilpropanoide estar ligada aos carbonos 8 do anel A da unidade flavan-3-ol (Figura 22), este carbono se desloca para campos mais baixos em comparação com o carbono 6. Porém, quando a ligação do grupo fenilpropanoide ocorre em C-6, este carbono se desloca para campos mais altos.

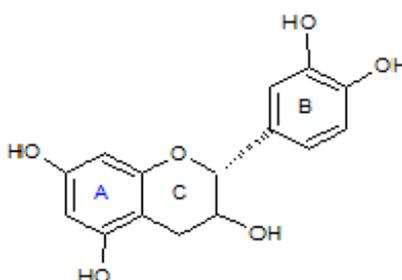


Figura 22 - Apresentação da unidade flavan-3-ol.

A posição do anel aromático da porção fenilpropanoide, pode ser comprovada a partir dos deslocamentos do H-2 e dos hidrogênios do anel aromático da porção flavan-3-ol. Na cinchonáina IA, na qual, esse anel se encontra em β , os sinais de H-2 e os hidrogênios do anel B, são semelhantes aos sinais observados nos mesmos hidrogênios da epicatequina, ou seja, o anel fenilpropanoide na posição β não é capaz de causar efeitos de blindagem ou desblindagem sobre os hidrogênios da porção flavan-3-ol.

Na cinchonáina IB, a qual o anel se encontra em posição α , os mesmos hidrogênios sofrem efeitos anisotrópicos, causando o deslocamento de H-2 para campos mais baixos e dos hidrogênios do anel B para campos mais altos (NONAKA; NISHIOKA, 1982; CHEN et al., 1993). Para se comprovar é fundamental comparar os espectros de RMN ^1H realizados

com os mesmos solventes. Essa comparação pode ser observada na Tabela 5, a qual revela que os sinais de H-2 H-2'(B) possuem os mesmos valores de deslocamento químico, tanto na substância IV, como na epicatequina.

Nonaka e Nishioka (1982) a princípio concluíram que esta estrutura se referia à cinchonina IB (Figura 24). Porém, Chen et al. (1993) comprovaram que a mesma se referia a cinchonina IA.

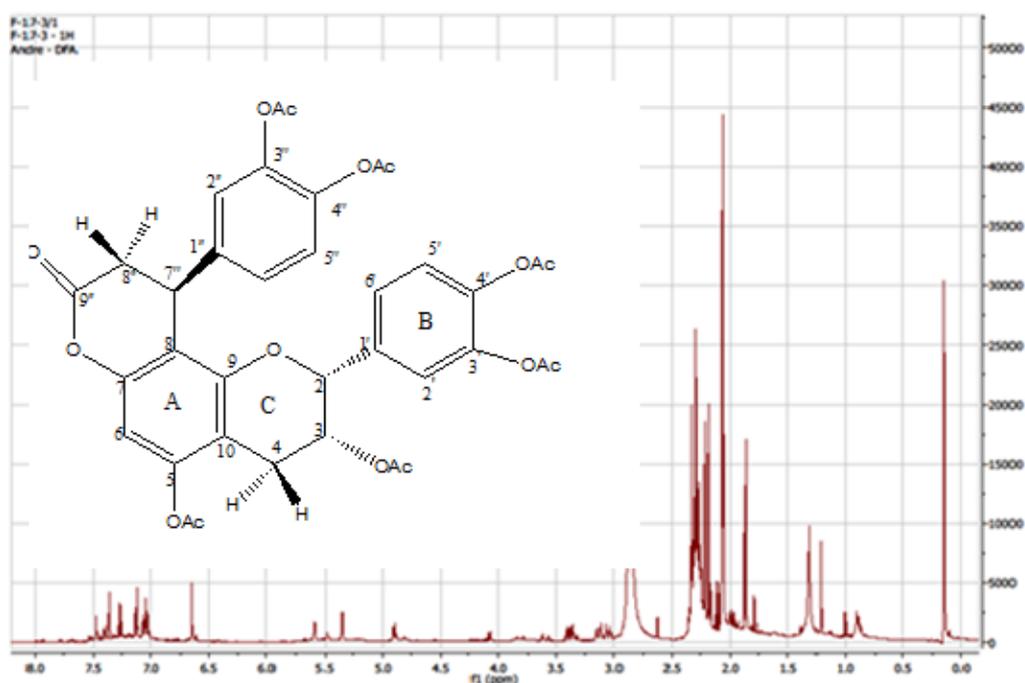


Figura 23 -Espectro RMN ^1H da substância IV (500 MHz; acetona- d_6).

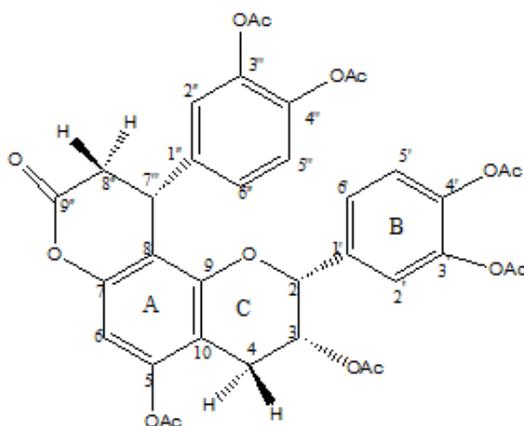


Figura 24- Estrutura química da cinchonina IB.

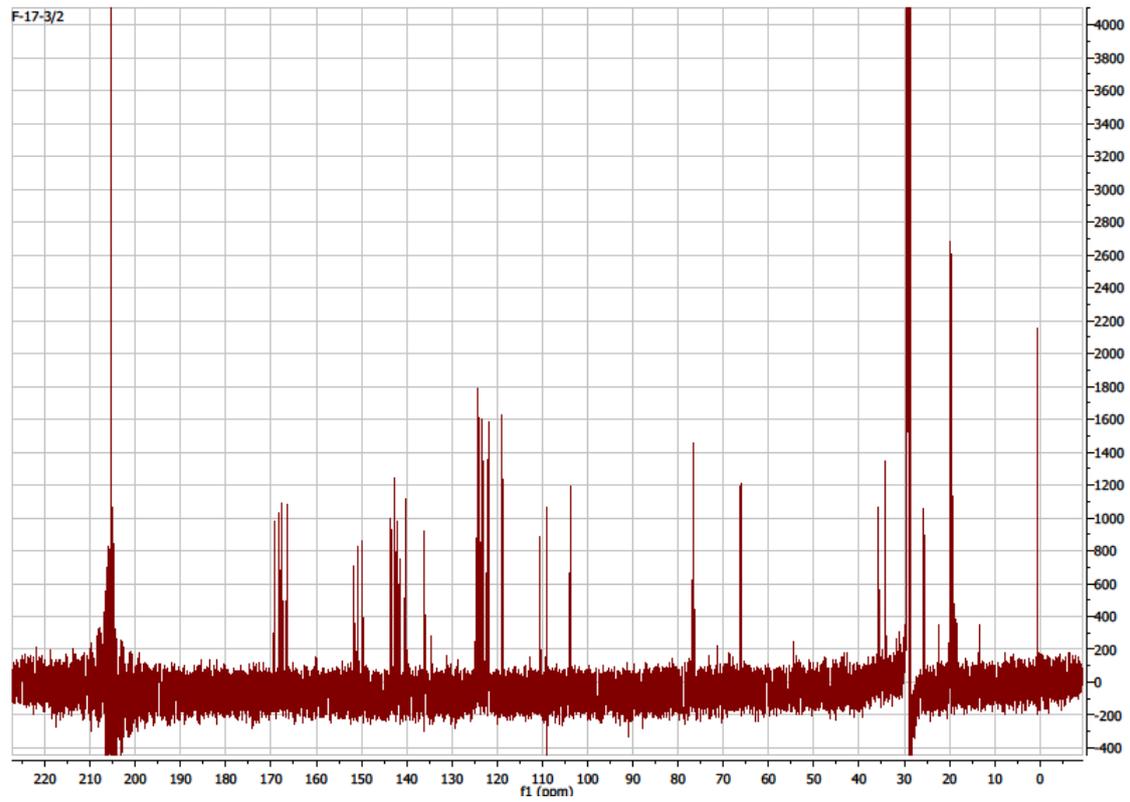


Figura 25- Espectro de RMN ^{13}C da substância IV (125 MHz, acetona- d_6).

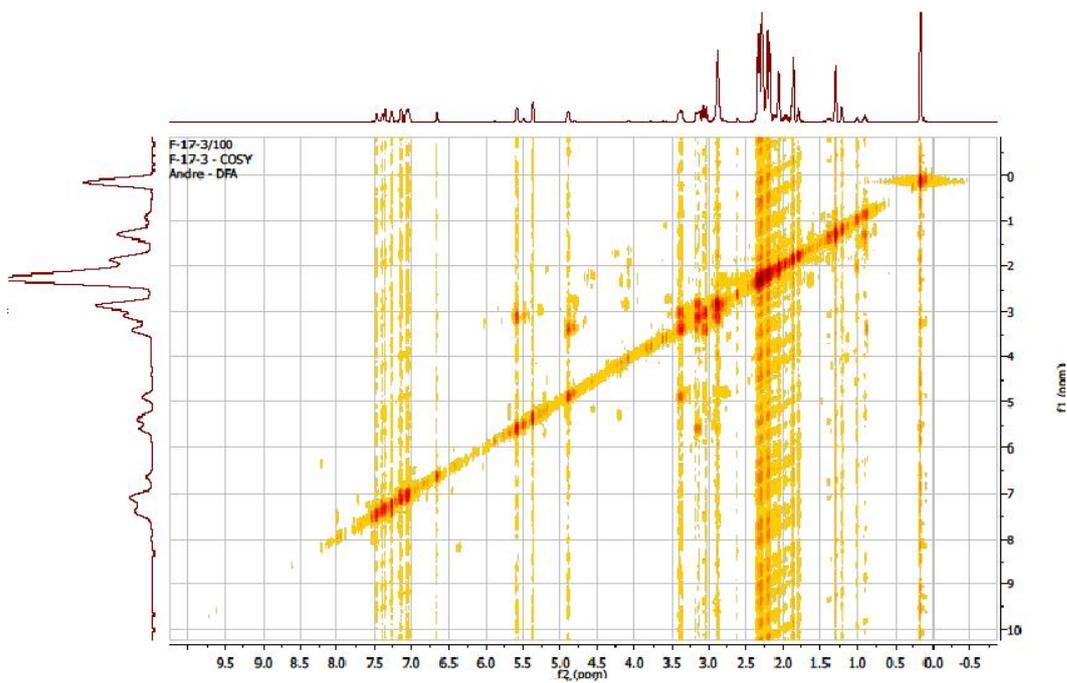


Figura 26-Espectro bidimensional de RMN (^1H - ^1H COSY) da substância IV (500 MHz; acetona- d_6).

Tabela 4 - Dados de deslocamento da substância IV (500 MHz; acetona- d_6).

Hidrogênio	δ (ppm)	δ Literatura*	Multiplicidade	J (Hz)
2	4,9	4,84	sl	$^3J_{H-2-H-3}=1$
3	4,26-4,28	4,23-4,85	m	
//4	2,9-3,01	2,87-2,94	m	
5				
6	6,23	6,20	s	
7				
8				
9				
10				
1'				
2'	6,94	6,97	d	$^4J_{H-2'-H-6'}=1,67$
3'				
4'				
5'	6,73	6,75	d	$^3J_{H-5'-H-6'}=7,8$
6'	6,77	6,78	dd	$^3J_{H-6'-H-5'}=7,8$ $^4J_{H-6'-H-2'}=1,3$
1''				
2''	6,49	6,52	d	$^4J_{H-2''-H-6''}=1,75$
3''				
4''				
5''	6,65	6,60	d	$^3J_{H-5''-H-6''}=7,8$
6''	6,50	6,44	dd	$^3J_{H-6''-H-5''}=7,8$ $^4J_{H-6''-H-2''}=1,75$
7''	4,60	4,43	dd	$^3J_{H-7''-H-8''}=5,9$ $^3J_{H-7''-H-8''}=1$
8''	3,09(ax) 2,87-2,90	3,00	m	$^3J_{H-8''AX'-H-7''}=7,2$ $3J_{H-8''ax-H-8''eq}=7,5$

*Resende, 2007

Tabela 5. Comparação entre os deslocamentos de hidrogênio da substância IV e da epicatequina no espectro de RMN 1H (500 MHz; acetona- d_6).

H	Substância IV δ (ppm)	Epicatequina δ (ppm)
H-2	5,08	5,09
H-2'(B)	7,30	7,33
H-5'(B)	7,08	7,18
H-6'(B)	7,09	7,25

5.2.5 Substância V- Cinchonaína IB

A partir da subfração 18 proveniente da CC em Sephadex LH-20 (730,3 mg), foi realizada a CCCAV com vazão de 1,0 mL/min, as frações foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (item 4.6.2) as subfrações F#18-1 (300,5 mg), F#18-2 (214,7 mg) e F#18-3 (214,1 mg), com o sistema eluente constante em (4.6.3). Com a F#18-1-2 (115,4 mg), após a visualização em CCD, foi realizada análise de RMN e espectrometria de massas (Figura 27).

A análise dos espectros RMN ^1H (Figura 28), RMN ^{13}C (Figura 29), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H) (Figura 30) da substância V derivatizada em acetona- d_6 , forneceu dados representativos de uma substância fenilpropanoide proveniente da epicatequina. Os dados de deslocamento (δ em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento da substância V estão descritos na Tabela 6.

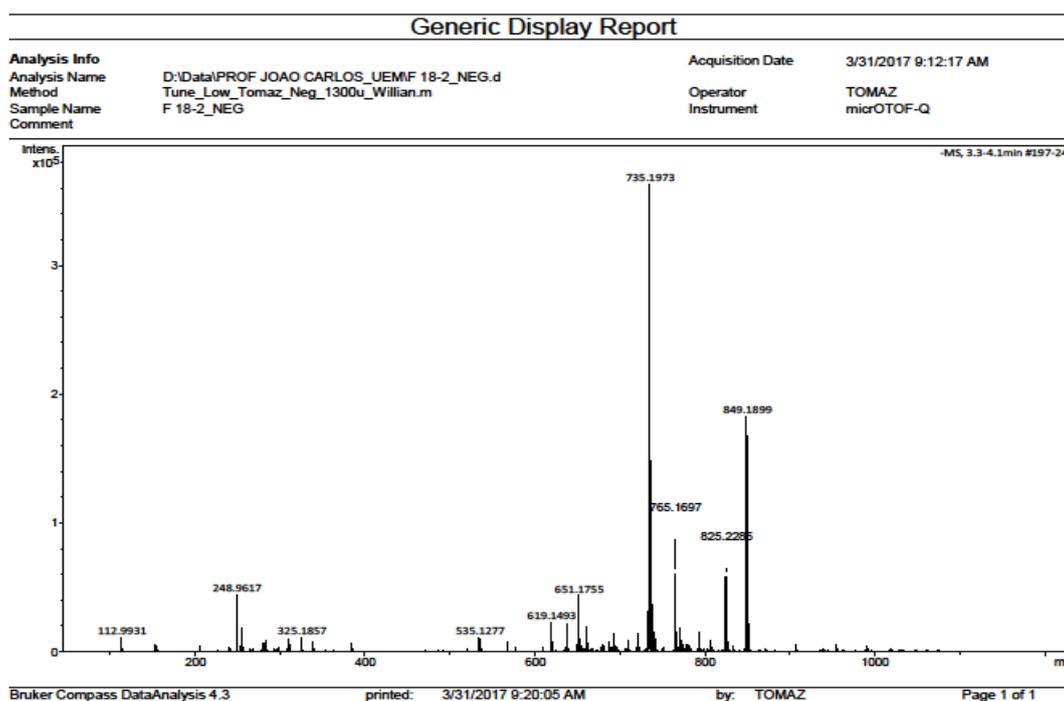


Figura 27 - Espectro de massas no modo negativo da substância V.

A análise do espectro de RMN ^1H dessa substância (Figura 28, Tabela 6) apresenta uma certa semelhança com espectro da substância IV (Figura 23), isto é, da cinchonaína Ia, denotando algumas diferenças nos deslocamentos dos hidrogênios alifáticos (anel C) e da unidade fenilpropanoide.

Os hidrogênios mais protegidos da molécula são os hidrogênios alifáticos da unidade epicatequina H-4_{ax} e H-4_{eq}, assim como, os hidrogênios alifáticos do grupo fenilpropanoide,

H-8^{ax} e H-8^{eq}. Os Hidrogênios H-4^{ax} e H-4^{eq} se revelam com deslocamentos em δ 2,84 e 3,03 ppm, respectivamente, já os H-8^{ax} e H-8^{eq} denotam um descolamento em δ 3,03 e 3,06 ppm, respectivamente.

Os hidrogênios alifáticos da região epicatequina, H-2(C) e H-3(C) revelam-se sobrepostos em δ 5,44 e 5,47 ppm. Estes possuem uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração relativa 2,3-*cis* para essa região da molécula. O hidrogênio alifático H-7^{ax} possui um deslocamento em δ 4,71 ppm, apresentando-se como um dubleto largo, relativo a um duplo dubleto, com constante de acoplamento de 6 Hz entre H-7^{ax} e H-8^{eq} e inferior a 1 Hz entre H-7^{ax} e H-8^{ax}. No espectro de RMN 2D (COSY ¹H-¹H; Figura 30) é possível perceber a correlação entre todos esses hidrogênios alifáticos. Os hidrogênios da porção aromática revelam-se nas unidades monoméricas do tipo catequina/epicatequina, com dois sistemas do tipo AMX.

Foi possível, também, estabelecer a correlação entre o H-2(C) e H-2'(B) da região flavan-3-ol (Figura 22), a partir do espectro de COSY ¹H-¹H (Figura 30).

O hidrogênio H-6(A) aparece como um singleto em δ 6,58 ppm. (FLETCHER et al., 1977; HEMINGWAY et al., 1982; KOLODZIEJ 1989), a configuração referente à epicatequina é do tipo 2,3-*cis* e a configuração absoluta 2*R*,3*R*.

A posição do anel aromático da unidade fenilpropanoide pode ser confirmada devido aos deslocamentos do H-2 e dos hidrogênios do anel aromático da porção flavan-3-ol, assim como foi descrito para a cinchonaína Ia. A cinchonina Ib, que possui um anel na posição α , possui um sinal de H-2(C), que se encontra em campos mais baixos e os hidrogênios do anel B, encontram-se em campos mais altos, ao se comparar com os sinais da epicatequina (Tabela 7). Tais deslocamentos confirmam que estes hidrogênios, sofrem efeitos anisotrópicos, referentes a posição α do anel aromático fenilpropanoide (NONAKA; NISHIOKA, 1982); comprovado por (CHEN et al., 1993). Assim, o anel aromático da porção flavan-3-ol (Figura 22), sofre uma blindagem assim que o anel aromático se encontra em posição α , e o hidrogênio alifático H-2(C) passa por uma desblindagem.

Com isso, pode-se concluir que a **substância V** trata-se da substância cinchonaína Ib (Figura 28).

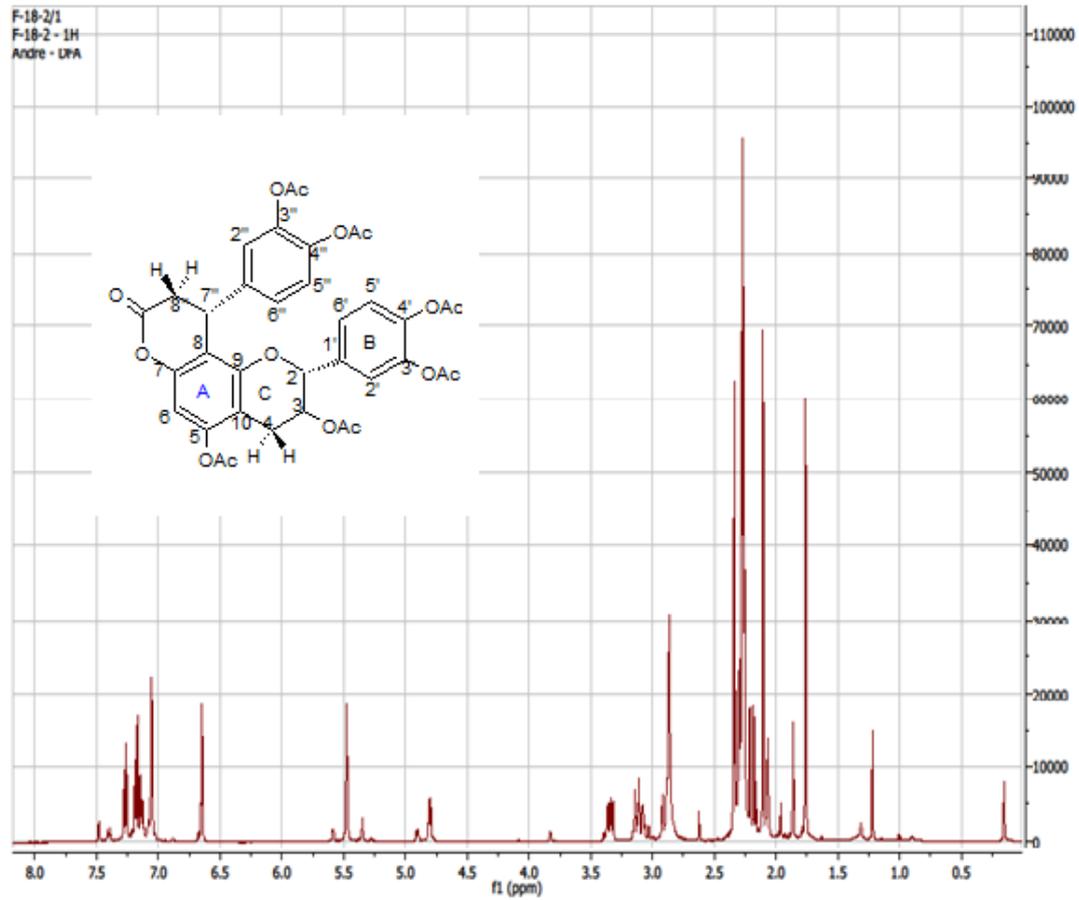


Figura 28 - Espectro de hidrogênios da substância V (500 MHz; acetona- d_6).

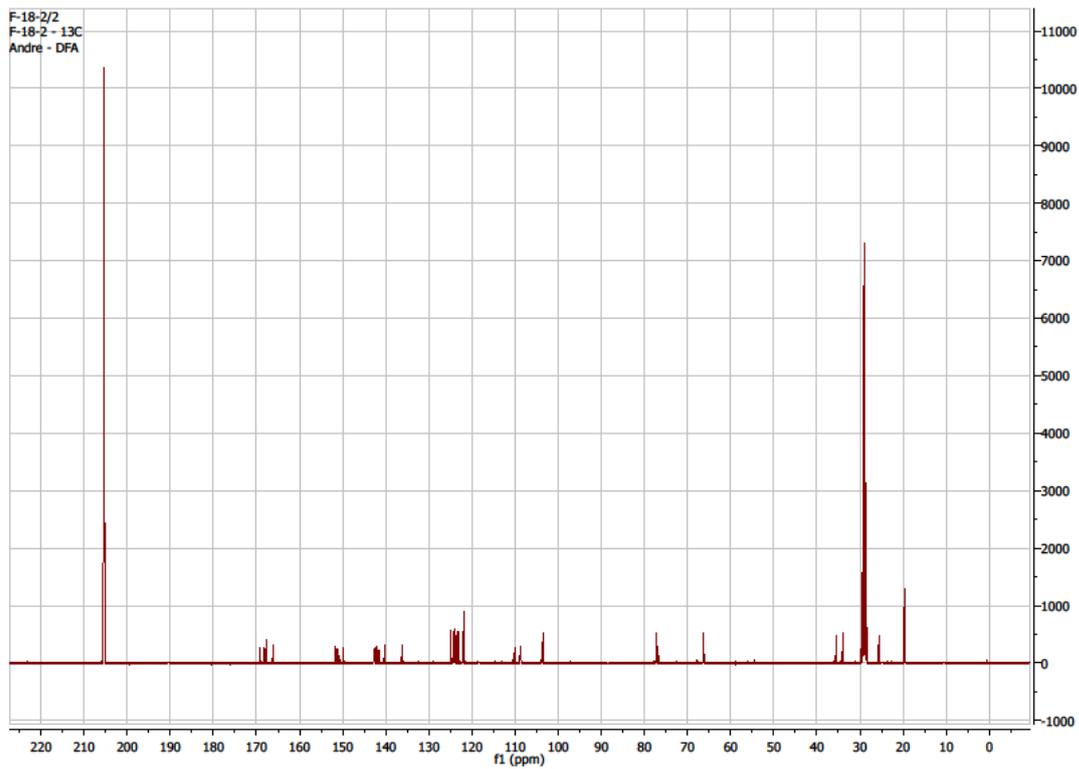


Figura 29- Espectro de ^{13}C da substância V (125 MHz; acetona- d_6).

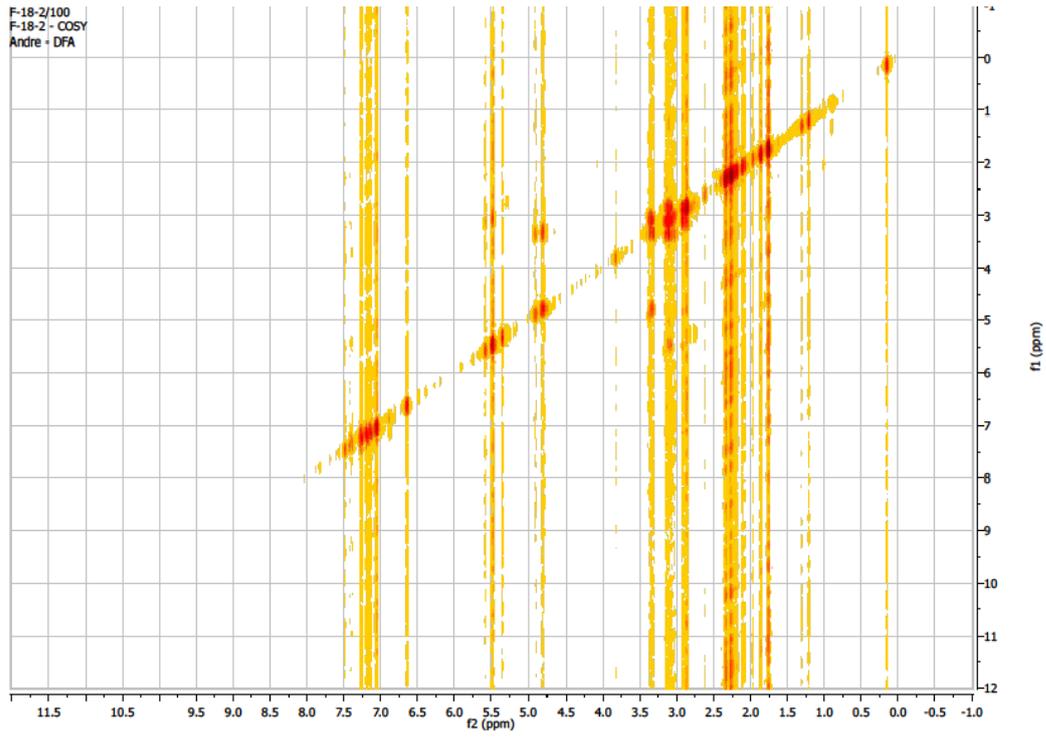


Figura 30- Espectro bidimensional de RMN (^1H - ^1H COSY) da substância V.

Tabela 6 - Dados de deslocamento da substância V (500 MHz; acetona- d_6).

Hidrogênio	δ (ppm)	δ Literatura	Multiplicidade	J(Hz)
2	5,42	5,46	sl	$^3J_{H-2-H-3}=1$
3	5,44-5,47	5,45-5,47	m	
4	2,84(ax)	2,88(ax)	dd	$^3J_{H-4ax-H-4eq}=1,5$ $^2J_{H-4ax-H-4eq}=16,2$
	3,03(eq)	3,08 (eq)	dd	$^3J_{H-4eq-H-3}=4,2$ $^2J_{H-4eq-H-4ax}=17,1$
5				
6	6,58	6,63	s	
7				
8				
9				
10				
1'				
2'	6,97	7,03	d	$^4J_{H-2'-H-6'}=1,25$
3'				
4'				
5'	7,10	7,14	d	$^3J_{H-5'-H-6'}=4,9$
6'	7,14-7,16	7,18-71,19	m	
1''				
2''	7,10	7,14	d	$^4J_{H-2''-H-6''}=1,25$
3''				
4''				
5''	7,02	7,04	d	$^3J_{H-5''-H-6''}=7,2$
6''	7,20	7,25	dd	$^3J_{H-6''-H-5''}=7,9$ $^4J_{H-6''-H-2''}=1,3$
7''	4,71	4,78	dl	$^3J_{H-7''-H-8''eq}=5,5$ $^3J_{H-7''-H-8''ax}=1$
8''	3,06 (ax)	3,11 (ax).	dd	$^3J_{H-8''eq-H-7''}=1,3$ $^3J_{H-8''eq-H-8''ax}=15,7$
	3,30 (eq)	3,34(eq)	dd	$^3J_{H-8''ax-H-7''}=7,1$ $^3J_{H-8''-ax-H-8''eq}=15,8$

Resende, 2007

Tabela 7 - Comparação entre os deslocamentos de hidrogênio da substância V e da epicatequina no espectro de RMN ^1H (500 MHz; acetona- d_6).

H	Substancia V δ (ppm)	Epicatequina δ (ppm)
H-2	5,09	5,09
H-2'(B)	6,95	7,33
H-5'(B)	7,11	7,18
H-6'(B)	7,07	7,25

6 CONCLUSÕES

Os sistemas cromatográficos utilizados neste trabalho demonstraram ser viáveis no isolamento de substâncias polifenólicas.

Das cinco substâncias isoladas uma é rara, cinchonaína IIb e outra, ácido neoclorogênico, pelo nosso melhor conhecimento e até o momento, não foi isolado no gênero *Trichilia*.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-CARBO, A. F.; ARGURO, C.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; AGUILAR, C. N.; FAVELA-TORRES, E. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. **Chemical Papers**, v. 62, p. 440-444, 2008.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 227-231, 2004.
- ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 416-421, 2001.
- BABY, A. R.; MACIEL, C. P.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss and *Ptychopetalum olacoides* Benth standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. **Journal of AOAC International**, v. 89, p. 1532-1537, 2006.
- BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, v. 43, p. 405-412, 2007.
- BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição efetiva ou potencial do PADCT para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade. Campinas: [s.n.], 1995.
- BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição efetiva do PADCT para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade. Campinas: MC BELTRAME, F. L. Caracterização de duas espécies vegetais (*Trichilia catigua* e *Anemopaegma arvense*) usadas como "Catuaba" por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal de São Carlos, 153 f., 2005.
- BELTRAME, F. L. Caracterização de duas espécies vegetais (*Trichilia catigua* e *Anemopaegma arvense*) usadas como "Catuaba" por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal de São Carlos, 153 f., 2005.
- BELTRAME, F. L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 119, p. 257-263, 2006.
- BENENCIA, F.; COURRÉGES, M. C.; COULOMBIÉ, F. C. Anti-inflammatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 293-300, 2000.
- BERNARDI, A. L. S.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; RINCÃO, V. P.; NOZAWA, C. M.; MELLO, J. P.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Effects of the *Trichilia catigua* (catuaba/catigua) inhibit Bovine herpesvirus-1 replication in cell culture. **Virus Reviews & Research**, v. 15, p. 112-113, 2010.
- BERTHOD, A. Practical approach to high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 550, p. 677-693, 1991.
- BONASSOLI, V. T.; CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 179-184, 2012.
- BRASIL. **Ministério da saúde**. Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Brasília, 2006a.
- BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; LEITE-MELLO, ENER V. S.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P.; HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252-260, 2011.
- BURKILL, H. M. The useful plants of West Tropical Africa. 2. ed. Families M-R. **Royal**

- Botanic Gardens Kew**, v. 4, p. 89-93, 1997.
- CAMPOS, M. M.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 45-53, 2005.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 519-536, 2007.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- CHASSOT, J. M.; LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1143-1148, 2011.
- CHEN, H. F.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K. Phenylpropanoid-substituted catechins from *Castanopsis Hystrix* and structural revision of cinchonins. **Phytochemistry**, v. 33, n. 1, p.183-187, 1993.
- CONWAY, W. D. Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Application. **VCH: Weinheim**, 1989.
- CORSE, J.; LUNDIN, R. E.; SONDEHEIMER, E.; WAISS, A. C. Conformation Analysis of D(-)-Quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance. **Phytochemistry**, v.5, p. 1651-1656, 1999.
- COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Editora Calouste Gilbenkian, 2002.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DOMON, B.; HOSTETTMANN, K.; KOVACEVIC, K.; PRELOG, V. Separation of the enantiomers of (\pm)-norephedrine by rotation locular counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 250, p. 149-151, 1982.
- ELDEEN, I. M. S.; ELGORASHI, E. E.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 457-464, 2005.
- 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. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.
- FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurations studies of natural procyanidins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 1628-1637, 1997.
- FLORA DO BRASIL. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 9 mai.2017.
- FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Catequine, andere hydroxy-flavane und hydroxyflavene. **Fortschritte der Chemie Organischen Naturstoffe**, v. 16, p. 1-25, 1958.
- FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Systematik und nomenklatur der flavonoide. **Tetrahedron**, v. 8, p. 336-349, 1960.
- GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; BIASINI, T.; SANOGO, R.; DE PASQUALE, R.; CATANIA, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 368-373, 2006.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-382, 2007.
- GOMES, M. L. M. Morfometria testicular de ratos wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae), **Biologia Celular Estrutural**.

- Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3.ed. Springer Netherlands, 1998.
- HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. The flavonoids. Springer US, p. 505-560, 1975.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HASLAM, E. Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1.ed., p.10-83, 1998.
- HATTORI, M.; KUSUMOTO, I.; NMABA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y., Effect of tea polyphenols of glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 717-720, 1990.
- HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions I, p. 1209-1216, 1982.
- HOLETZS, F. B.; NAKAMURA, T. U.; DIAS F. 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*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 397-401, 2005.
- IBRAHIM, R.; BARRON, D. Phenylpropanoids in *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 1: Plant Phenolics. DEY, P. M.; HARBONE J. B., Hrsg. Vol.1, **Academic Press London**, 1989.
- ISTITUTO DI CHIMICA BIOMOLECULARE. CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE. (BÜCHI MOD. 670), 1987.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006.
- ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 145-168, 2005.
- JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13ª ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 2002.
- JÜRGENLIEMK, G., Phenolische Inhaltsstoffe aus dem Kraut von *Hypericum perforatum* L.-analytische, biopharmazeutische und pharmakologische Aspekte. Tese de doutorado em Química e Farmácia. Faculdade de Matemática e Ciências Naturais. Universidade de Münster, Alemanha, 177p., 2001.
- KHANBABAEE, K.; REE, T. V. Tannis: Classification and definition, **Natural Product Reports**, v. 18, p. 621-649, 2001.
- KLEIN, R. M. Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandenses. In: Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre, p. 367-375, 1984.
- KOLODZIEJ, H. Tannins of the medicinal plants: application of 1H RMN parameters to the analysis of procyanidins. **Farmaceutisch Tijdschrift voor Belgie**, v. 66e, p. 44, 1989.
- KUBO, I. Recent applications of counter-current chromatography to the isolation of bioactive natural products. **Journal of Chromatography A**, v. 538, p. 187-191, 1991.
- LAGOS, J. B. Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; SILVA, J. R. W.V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 7, p. 1247-1254, 2013.
- LONGHINI, R.; LONNI, A. A. S. G.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, 2016.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES,

- L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.
- LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIAMSON, M. P.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenols, adstringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, v. 37, n. 2, p. 357-371, 1994.
- MANDAVA, N. B.; ITO, Y. Countercurrent Chromatography - Theory and practice, Marcel Dekker: New York, 1998.
- MARQUES, L. C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal. **Revista Racine**, v. 8, n. 43, p. 8-11, 1998.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides review. **Phytochemistry**, v. 24, p. 639-652, 1985.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 654, p. 315-341, 1994.
- MARTINELLI, F. R. Cinchonáinas – método cromatográfico e produção de padrões para controle de qualidade de extratos polares de catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss.). Dissertação de mestrado em Química. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2010.
- MUNHOZ, V. M.; LONNI, A. A. S. G.; MELLO, J. C. P.; LOPES, G. C. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 225-232, 2012.
- NONAKA, G. I.; NISHIOCA, I. Tannis and related compounds: Phenylpropanoid-substituted epicatechins, cinchonais from *Chinchona succirubra*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 4268-4276, 1982.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analysing tannins. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1-31, 1989.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p. 507-521, 1993.
- OLIVEIRA, C. H.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of na herbal medicinal extract of Paullinia cupana, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama®). **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 54-57, 2005.
- OLIVEIRA, K. A. M.; OLIVEIRA, G. V.; BATALINI, C.; ROSALEM, A.; RIBEIRO, L. S. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211, 2012.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 27, p. 124-129, 1993.
- PATRICIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, v.34, p. 27-71, 2005.
- PAULI, G. F.; POESTCH, F., NAHRSTEDT, A. struture assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 177-185, 1998.
- PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão taxionômica e morfo-biológica. Rio de Janeiro. **Químio**, p. 105, 1982.
- PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA, A. J.; SMÂNIA, E. F. A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift der Naturforschung**, v. 57, p. 483-488, 2002.
- PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 422-426, 2003.
- POETSCH, F. Hydroxyzimtsäurekonjugate in drei Solidag-Arten sowie Untersuchungen zur

- diuretischen Akitivität ausgewählter Extrakte und Fraktionen. Dissertation, Münster, 1997.
- PONTIERI, V.; SCALABRINI-NETO, A.; CAMARGO, A. F. F.; KOIKE, M. K.; VELASCO, I. T. Theherbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. **Journal of Electrocardiology**, v, 40, p. 534.e531-534.e538, 2007.
- PORTER, L. J. Structure and chemical properties of the condensed tannis. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS., P. E. Plants Polyphenols: synthesis, properties, significance. New York: Plenum Press. 1. ed. p. 245-258, 1992.
- PULIDO, R.; HERNANDEZ-GARCIA, M. & SAURA-CALIXTO, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1275-1282, 2000.
- QUINTÃO, N. L. M.; FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. **Phytomedicine**, v.15, p. 245-252, 2008.
- RESENDE, F. O. *Trichilia catigua*: avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica in vitro, Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *in vitro* antioxidative activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.
- ROBINSON, M. M.; ZHANG, X.-R. A situação mundial dos medicamentos. Medicamentos tradicionais: situação global, problemas e desafios. Organização Mundial de Saúde (OMS), Genebra, Suíça 2011.
- SAKURAGUI, C. M.; STEFANO, M. V.; CALAZANS, L. S. B. Meliaceae. Lista de espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000162>>. Acesso: 09 mai.2017.
- SANCHES, A. C. C. Estudo Farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth, atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, p.194, 2004.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFSC e Editora da UFRGS, 2007.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.
- SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxicologie. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 134, n. 34, p. 3167-3179, 1994.
- SNYDER, J. K.; NAKANISHI, K.; HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN M. Applications of rotation locular counter-current chromatography in natural products isolation. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 7, p. 243, 1984.
- SOUZA, E. B.; SALES, M. F. *Mitracarpus longicalyx* (Rubiaceae, Spermaceae), a new species from northeastern Brazil. **Brittonia**, v. 53, n. 4, p. 482-486, 2001.
- STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., Farmacognosia. Do Produto natural ao medicamento. Capítulo 01, p. 01-03, 2017.
- SCHENKEL, E. P.; PETROVICK, P. R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed rev. ampl., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC. Capítulo 15, p. 371-400, 2004.
- SPANEMBERG, J. C.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; GOMES, A. P. N.; CAMPOS, M. M.; SALUM, F. G. Effect of an herbal compound for treatment of burning mouth syndrome: randomized, controlled, double-blind clinical trial. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 113, p. 373-377, 2012.
- TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant

- phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2010-2013, 2007.
- THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/browse/A/Meliaceae/>>. Acesso: 11 mai. 2017.
- TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Covile, Leguminosae. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, p. 92, 2002.
- TRUITI, M. T.; SOARES, L. M.; LONGHINI, R.; MILANI, H.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction protects against cognitive impairments and hippocampal cell death induced by bilateral common carotid occlusion in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 232-237, 2015.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; BROWN, D. M.; FULLAS, F.; OWALD, J. B.; JOSEPHSON, F. F.; THORNTON, N. M.; PEZZUTO, J. M.; BEECHER, C. W. W.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; KINGHORN, A. D. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. **Phytomedicine**, v. 3, n. 3, p. 281-285, 1996.
- WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, v. 27, p. 158-260, 1969.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Traditional medicine**: definitions. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acessado em: 10 de set. 2008.
- VIANA, A. F.; MACIEL, I. S.; MOTTA, E. M.; LEAL, P. C.; PIANOWSKI, L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, p. 1-8, 2011.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, F. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitoterápicos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.