



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



**TAÍSA DALLA VALLE RÖRIG RIBEIRO**

**FRAÇÃO AQUOSA DE BARBATIMÃO: AVALIAÇÃO DE SUA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO  
SH-SY5Y**

**Maringá**

**2018**

**TAÍSA DALLA VALLE RÖRIG RIBEIRO**

**Fração aquosa de barbatimão: avaliação da composição química e atividade biológica em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

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 parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

**Maringá**

**2018**

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

R484f Ribeiro, Taísa Dalla Valle Rorig  
Fração aquosa de barbatimão: avaliação de sua  
composição química e atividade biológica em células  
de neuroblastoma humano SH-SY5Y. / Taísa Dalla Valle  
Rorig Ribeiro. -- Maringá, 2018.  
87 f.: il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. João Carlos Palazzo de  
Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento  
de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos  
Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, 2018.

1. Barbatimão. 2. *Stryphnodendron adstringens*. 3.  
Taninos condensados. 4. Doença de Alzheimer. I.  
Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de  
Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos  
Biologicamente Ativos. III. Título.

CDD 21.ed. 615.321  
AHS-CRB-9/1065

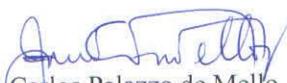
**TAÍSA DALLA VALLE RÖRIG RIBEIRO**

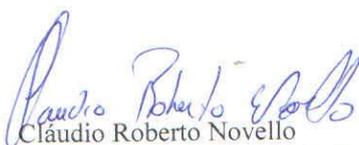
**FRAÇÃO AQUOSA DE BARBATIMÃO: AVALIAÇÃO DE SUA  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA EM CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

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 agosto de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

  
João Carlos Palazzo de Mello  
*Universidade Estadual de Maringá*

  
Cláudio Roberto Novello  
*Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

  
Lucy Megumi Yamauchi Lioni  
*Universidade Estadual de Londrina*

## **Agradecimentos**

A meus pais, Eloi Antonio Rörig e Ana Maria Dalla Valle, por seus ensinamentos de vida e incentivos na educação dos filhos, mesmo diante de todas as adversidades.

A meu esposo, André Luis Ribeiro, companheiro fiel, que não me deixou desistir diante as dificuldades.

A meu filho, Miguel, motivo de orgulho, entusiasmo e paixão pela vida.

A todos integrantes do laboratório Palafito, pela constante ajuda e incentivo diante dos mais variados percalços inerentes à pesquisa.

Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela oportunidade concedida.

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”**

**Isaac Newton**

## Biografia



Taísa Dalla Valle Rörig Ribeiro nasceu em Amambai, MS, no dia 03 de abril de 1987. Em 2005 concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Felipe de Brum, Amambai, MS. Em 2007 iniciou o curso de Farmácia generalista na Universidade Paranaense – UNIPAR. No período de 2007 a 2008 trabalhou no setor de controle de processos da indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi. Em 2009 participou de projeto de extensão desenvolvido pela ITAIPU sobre implantação de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde. No período de 2010 a 2011 participou de projetos de iniciação científica no laboratório de fitoquímica, sob a orientação Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Junior. Iniciou em 2016 o Mestrado em Ciências Farmacêuticas - área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito.

## RESUMO

RIBEIRO, T. D. V. R. Fração aquosa de barbatimão: Avaliação de sua composição química e atividade biológica em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 87p.

*Stryphnodendron adstringens*, popularmente conhecida como barbatimão é uma planta típica do cerrado brasileiro que apresenta em suas cascas altos índices de polifenóis, representado principalmente por taninos condensados, do tipo prodelfinidinas e prorobinetinidinas que foram identificados a partir da fração acetato de etila originada de um extrato acetona:água, no entanto 78% do extrato bruto (EB) é representado pela fração aquosa (F2) que não possui estudos que a tenham caracterizado química ou biologicamente. Diversos estudos demonstram que o consumo de plantas ricas em polifenóis diminuem a incidência de doenças neurodegenerativas na população, dentre elas a doença de Alzheimer (DA), que é a principal causa de demência no mundo, representando cerca de 60 a 80% dos casos. Os tratamentos disponíveis atualmente tratam somente a sintomatologia da doença, portanto a descoberta de novos medicamentos que tratam ou que previnam a DA faz-se necessária. O objetivo desse trabalho é caracterizar quimicamente a fração aquosa e avaliar *in vitro* sua atividade protetora frente ao peptídeo  $\beta A_{25-35}$  em linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Para identificar os compostos presentes na fração aquosa foi realizado as análises por LC-DAD-MS e Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN de  $^{13}C$ ). Por meio das análises de viabilidade celular pela técnica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e vermelho neutro foi avaliada a citotoxicidade, e a proteção da fração aquosa em linhagem de neuroblastoma humano, frente à droga indutora de dano  $\beta A_{25-35}$ . A análise de massas demonstrou que as subfrações da F2 apresentam em sua composição substâncias fenólicas, como taninos e cromonas. Na avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT a fração aquosa demonstrou diminuir a viabilidade da linhagem celular de neuroblastoma em concentrações acima de 0,48 e 31,25  $\mu g/mL$  no período de 24 e 48 h, respectivamente. Na técnica de vermelho neutro as concentrações que diminuiram a viabilidade das células foram 0,97  $\mu g/mL$  em 24 h e 3,90  $\mu g/mL$  no período de 48 h, e não protegeu as células contra os danos causados pela droga  $\beta A_{25-35}$ . Até o momento pode se concluir que a fração aquosa é uma matriz muito complexa e dificulta o isolamento e identificação de suas substâncias. Nas avaliações *in vitro* a fração demonstrou citotoxicidade em baixas concentrações e não desempenhou atividade protetora contra os danos causados pela  $\beta A$  em linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y.

Palavras Chave: Barbatimão; *Stryphnodendron adstringens*; taninos condensados, Doença de Alzheimer

## ABSTRACT

RIBEIRO, T.D.V.R. 2018. Barbatimão aqueous fraction: Evaluation of its chemical composition and biological activity in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. Master Dissertation, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 87p.

*Stryphnodendron adstringens*, popularly known as *barbatimão* is a typical plant of Brazilian cerrado that presents in its barks high levels of polyphenols, represented mainly by condensed tannins of the type prodelphinidins and prorobinetinidins that were identified from the ethyl acetate fraction originated from an acetone: water extract, however 78% of the crude extract is represented by aqueous fraction (F2) which does not have chemical characterization studies. Several studies show that the consumption of plants rich in polyphenols decrease neurodegenerative disease in the population, among them the Alzheimer disease (AD), which is the leading cause of dementia in the world, accounting for about 60 to 80% of cases, and so far, remains unhealed, so the discovery of new drugs that treat or prevent AD is necessary. The aim of this work is the chemical characterization of the aqueous fraction and the *in vitro* evaluation of its protective activity against the  $\beta A_{25-35}$  peptide in human neuroblastoma line (SH-SY5Y). The chemical analyses of F2 were performed by LC-DAD-MS and Nuclear Magnetic Resonance Carbon ( $^{13}C$  NMR). The cytotoxicity and the protection of the F2 in neuroblastoma lineage were evaluated through the cellular viability analyzes by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) and Neutral Red human, against the drug inducing  $\beta A_{25-35}$  damage. Mass analysis showed that F2 may have phenolic compounds, such as tannins and chromones. In the evaluation of cytotoxicity by the MTT assay the F2 was shown to decrease the viability of the neuroblastoma cell line at concentrations above 0.48 and 31.25  $\mu g/mL$  in the 24 and 48 h, respectively. In the neutral red technique the concentrations that decreased the viability of the cells were 0.97  $\mu g/mL$  in 24 h and 3.90  $\mu g/mL$  in the 48 h, and did not protect the cells against damage caused by the  $\beta A_{25-35}$  drug. To date it may be concluded that the F2 is a very complex matrix which makes it difficult to isolate and identify its compounds. In *in vitro* evaluations the fraction demonstrated cytotoxicity at low concentrations and did not perform protective activity against the damage caused by  $\beta A$  in SH-SY5Y neuroblastoma line.

Keywords: Barbatimão; *Stryphnodendron adstringens*; condensed tannins; Alzheimer's disease.

## Lista de Figuras

Figura	Título	Página
1	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville, Leguminosae. A: coleta em São Jerônimo da Serra; B: folíolos; C: casca picada	20
2	Estrutura sapogeninas 1; 2; 3; 4	21
3	Flavan 3-óis isolados da fração acetato de etila das cascas de <i>S.adstringens</i>	23
4	Prodelfinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S. adstringens</i>	24
5	Prorobinetinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas secas de <i>S.adstringens</i>	25
6	Dímeros isolados da fração acetato de etila das cascas de <i>S.adstringens</i>	25
7	Quatro novos dímeros de taninos condensados isolados das fração acetato de etila de Barbatimão	26
8	Hexâmero de 2114 <i>u</i> presente na fração aquosa de barbatimão, sugerido por análise de Massas e Ressonância magnética Nuclear	27
9	Exemplo de tanino hidrolisável	28
10	Estruturas dos principais monômeros de taninos condensados. Tipo 1: presença de hidroxila no Carbono 5; Tipo 2: com a ausência de hidroxila no carbono	28
11	Exemplos de proantocianidinas diméricas do tipo B	29
12	Exemplo de proantocianidina dimérica do tipo A	29
13	Processamento proteolítico APP. <b>A:</b> Via não amiloidogênica, pela ação de $\alpha$ secretases. <b>B:</b> Via amiloidogênica pela ação de $\beta$ secretase	38
14	Ilustração de uma placa 96 poços com descrição de método da avaliação da citotoxicidade da F2 em linhagem celular SH-SY5Y	55
15	Ilustração de uma placa 96 poços com descrição método da avaliação da proteção da F2 contra o dano induzido pela proteína $\beta$ A em linhagem celular SH- SY5Y	56
16	Rendimento do extrato bruto e frações F2 e F3	57
17	Curva de padrão analítico de ácido gálico e galocatequina	58
18	Perfil cromatográfico da fração aquosa em sistema de eluição em gradiente de 150 min	61

19	Perfis cromatográficos da subfração 5 da F2 em dois gradientes; <b>A:</b> gradiente de 73 minutos; <b>B:</b> gradiente de 150 minutos	61
20	Perfil cromatográfico das 12 subfrações originadas por cromatografia em coluna da F2	65
21	Cromatogramas das subfrações 1, 3, 4, 5, 11 e 12 obtidos por análise LC-DAD-MS.	66
22	Exemplo de uma cromona: C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxycromone: (5,7 dihydroxycromona-7-O-rutinosídeo) substância utilizada como referência para comparar os dados de RMN de C disponíveis na literatura com os dados obtidos da subfração 3	68
23	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (500 MHz, Metanol deuterado) da subfração 3	69
24	Avaliação da citotoxicidade de concentrações de 0,24 a 125µg/mL de F2 pela técnica de MTT em dois períodos de tempo, 24 h e 48 h.	70
25	Avaliação da citotoxicidade de concentrações de 0,24 a 125µg/mL de F2 pela técnica de Vermelho neutro em dois períodos de tempo, 24 h e 48 h.	71
26	Avaliação da proteção da F2 contra os danos induzidos pelo peptídeo βA	73

## Lista de Tabelas

Tabela	Título	Página
1	Grau de hidroxilação dos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensados	28
2	Polifenóis com atividade em DA	48
3	Gradiente utilizado na cromatografia em coluna de Sephadex LH20	52
4	Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 73 min para monitoramento das subfrações originadas por CC	53
5	Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 155 min	60
6	Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 73 min	60
7	Compostos identificados nas subfrações 1,3,4,5,11 e 12, sugeridos através da análise de Massas.	66
8	Dados de RMN de <sup>13</sup> C da subfração 3 (500 MHz, Metanol deuterado) para confirmação da presença de C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxymone	68

## Lista de Abreviações

PPA	Proteína Precursora do Amilóide
APOE	Alipoproteína E
BHV-1	Herpes Bovino
BACE 1	Enzima $\beta$ secretase
CC	Cromatografia em coluna
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCMC	Cromatografia em contra corrente multi camada
CPT	Teor de polifenóis totais
DA	Doença de Alzheimer
EB	Extrato bruto
EGCG	Epigallocatequina 3 galato
EGC	Epigallocatequina
ECG	Epicatequina 3 galato
EC	Epicatequina
F1	Fração acetato de Etila
F2	Fração aquosa
$\beta$ A	Beta Amilóide
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
MTT	3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NMDA	N- Metil- D- Aspartato
TEP	Tomografia de emissão de prótons
PSE1	Presinilina 1
PSE2	Presinilina 2
PS	Placas senis
RMN	Ressonância magnética nuclear

## SUMÁRIO

1	Introdução	16
2	Revisão de Literatura	19
2.1	Aspectos gerais	19
2.1.1	Família Leguminosae	19
2.1.2	Gênero <i>Stryphnodendron</i>	19
2.1.3	A espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	20
2.2	Aspectos Químicos	21
2.2.1	Composição química do gênero	21
2.2.2	Taninos	27
2.3	Propriedades biológicas da espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i>	29
2.3.1	Atividades farmacológicas	29
2.3.2	Atividade cicatrizante	30
2.3.3	Atividade anti-inflamatória	31
2.3.4	Atividade antiulcerogênica	31
2.3.5	Atividade antibacteriana	31
2.3.6	Atividade antifúngica	32
2.3.7	Atividade antiparasitária	33
2.3.8	Atividade antiviral	33
2.3.9	Outras atividades	34
2.3.10	Toxicidade	35
2.4	Doença de Alzheimer (DA)	36
2.4.1	DA e mutações genéticas	37
2.4.2	Fatores de risco não modificáveis para DA	39
2.4.3	Fatores de risco modificáveis	39
2.5	Tratamentos na Doença de Alzheimer	40
2.5.1	Anticolinesterásicos	40
2.5.2	Inibidores dos receptores NMDA	41
2.5.3	Pesquisas de novos medicamentos	41
2.5.4	Inibidores da proteína $\beta$ A.	41
2.5.5	Inibidores de cobre e zinco	42
2.5.6	Inibidores das enzimas de clivagem do APP	42
2.5.7	Drogas que interferem com a deposição de Tau	43
2.5.8	Moléculas que previnem o dano oxidativo	43
2.6	Compostos fenólicos no tratamento de DA	44
2.6.1	Chá Verde.	45

2.6.2 Blueberries	45
2.6.3 Resveratrol	46
2.6.4 Curcumina	47
3 Objetivos	49
3.1 Objetivo Geral.	49
3.2 Objetivos específicos	49
4.0 Material e Métodos	50
4.1 Matéria prima vegetal	50
4.2 Processo Extrativo	50
4.2.1 Extrato bruto (EB)	50
4.2.2 Obtenção da fração aquosa (F2)	50
4.3 Caracterização química do extrato bruto e F2	50
4.3.1 Determinação do teor de polifenóis totais (CPT) dos extratos	50
4.3.2 Determinação de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE	51
4.4 Cromatografia em coluna (CC) da fração aquosa (F2)	52
4.5 Desenvolvimento de método analítico em CLAE para monitoramento das subfrações da F2	52
4.6 Análise dos constituintes de extrato e frações por LC-DAD-MS	53
4.7 Ressonância Magnética Nuclear	53
4.8 Avaliação da atividade protetora da fração aquosa (F2) de barbatimão em modelo doença de Alzheimer <i>in vitro</i>	54
4.8.1 Linhagem celular e condições de cultura	54
4.8.2 Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho neutro	54
4.8.3 Teste de MTT: citotoxicidade e proteção da fração aquosa	55
4.8.4 Análises estatísticas	56
5. Resultados e Discussão	57
5.1 Rendimento do extrato bruto das cascas de barbatimão e de suas subfrações, F1 e F2	57
5.2 Polifenóis totais	57
5.3 Determinação de ácido gálico e galocatequina por CLAE	58
5.4 Cromatografia em coluna clássica	58
5.5 Desenvolvimento de método analítico por CLAE.	59
5.6 Identificação dos constituintes presentes na fração aquosa por LC-DAD-MS	66
5.7 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono	67
5.8 Citotoxicidade da F2 em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y	70

5.9 Proteção da fração F2 contra danos induzidos pela proteína $\beta A_{25-35}$ em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y	72
--	----

## 1 Introdução

Vivemos em um mundo em rápida mudanças, com novas conquistas econômicas e novas estratégias para a produção de alimentos e para a promoção da saúde. Nos últimos 60 anos, foram desenvolvidos vários novos medicamentos para tratar várias doenças, embora apenas alguns, principalmente os antibióticos, curando pacientes (VERPOORTE, 2015).

Atualmente, para as doenças mais importantes, tem-se medicamentos disponíveis. Mas, para desenvolver medicamentos para doenças menores ou doenças que afeta populações pobres, o custo parece ser alto demais para trazer um novo medicamento ao mercado para esses pacientes em questão. Estima-se que cerca de 1 bilhão são gastos para um único medicamento novo, além disso, o desenvolvimento de fármacos consome tempo, de 8 a 12 anos a partir da descoberta de um resultado até a sua aplicação clínica. A indústria farmacêutica não tem incentivos econômicos e o lançamento de novos fármacos a partir de moléculas sintéticas está estagnando. Ao mesmo tempo, globalmente, até 80% das pessoas estão utilizando medicamentos tradicionais, principalmente à base de plantas. Cerca de 40.000 a 70.000 espécies de plantas têm uma ou mais aplicações médicas em vários sistemas de medicina tradicional e em geral eles são baratos e amplamente disponíveis. (VERPOORTE, 2015).

Em alguns países industrializados, o uso de produtos da medicina tradicional é significativo, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população têm usado esses recursos da medicina tradicional sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional. De forma semelhante no Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde (BRASIL, 2012).

Portanto, é inegável que a flora constitui um arsenal terapêutico de enorme importância, pois há vários séculos vem sendo considerada fonte medicamentosa, empregada tanto em preparações tradicionais quanto, mais recentemente, na forma de princípios ativos puros (SCHULZ et al., 2002).

Dos medicamentos atualmente produzidos pelas indústrias e comercializados nas farmácias e drogarias, estima-se que pelo menos 25% são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (NEWMAN; CRAGG, 2016). No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, de todas os medicamentos disponíveis no mercado até o final de 2014, 49% são produtos naturais ou diretamente derivados deles (NEWMAN; CRAGG, 2016).

No entanto na década de 1990 com a introdução das grandes bibliotecas de compostos sintéticos e o rápido desenvolvimento da biotecnologia e da biologia molecular

parecia tornar obsoleto o método tradicional de pesquisa de novos medicamentos através do processo de triagem dos extratos de plantas (SCANNELL et al., 2012). Porém, em vez de introduzir mais drogas no mercado, as taxas de aprovação de novos medicamentos diminuíram. Enquanto 45 medicamentos novos foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) em 1990, apenas 21 foram aprovados em 2010 (DAVID et al., 2015; KINGSTON, 2011). Embora os motivos dessa tendência decrescente sejam complexos (KOLA; LANDIS, 2004), um aspecto importante é que as bibliotecas de compostos sintéticos geralmente cobrem apenas uma pequena variedade de diversidade química. Devido aos altos números de amostra em tais bibliotecas, os compostos a serem investigados ainda são frequentemente selecionados rapidamente, principalmente com base em valores de potência (SCANNELL et al., 2012).

Com o avanço das técnicas espectroscópicas, os pesquisadores têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas que até pouco tempo eram difíceis de serem identificadas (SCHENKEL et al., 2007). No entanto, as grandes empresas estão objetivadas a procurarem na natureza modelos (templates) que lhes permitam utilizar como ponto de partida para o desenho de substâncias ativas, hemi ou semissíntese ou as próprias plantas desempenhando o papel de matéria prima para a extração de ativos puros (VEERESHAM, 2012).

O Brasil conta com aproximadamente 32.109 espécies vegetais nativas catalogadas, de um total estimado de 390.000, mundialmente, considerado portanto, o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo (KEW, 2016; ZAPPI et al., 2015). Entretanto, constata-se que apenas 5.000 espécies foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (RATES, 2001), e apenas 0,4% foram investigadas fitoquimicamente (GURIB-FAKIM, 2006).

O cerrado brasileiro com 12.356 espécies de plantas nativas (MENDONÇA et al., 2008), caracteriza-se por apresentar uma ampla diversidade taxonômica, principalmente nos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), assinalando um maior distanciamento filogenético das espécies, o que gera uma maior diferença e diversidade química entre elas (GOTTLIEB; BORIN, 1994). No entanto, Machado et al. (2004) estimam que 55% deste bioma já tenham sido desmatado ou já sofreram a ação do homem, e que apenas 2,2% de sua extensão estão protegidos por lei, sendo considerada a vegetação de maior risco no país (KLINK; MACHADO, 2005).

Mendelsohn e Balick (1995) estimaram o valor de fármacos ainda não descobertos nestas florestas tropicais e chegaram em 375 o número potencial de drogas existentes. Desse total, 47 já teriam sido descobertas, como a vincristina, vinblastina, curare, quinino, codeína e pilocarpina.

Dentre as espécies vegetais do cerrado, o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) é frequentemente utilizado na medicina popular e integra a lista de plantas

regulamentadas pela ANVISA para comercialização com a finalidade de planta medicinal (BRASIL, 2010).

Estudos químicos desenvolvidos com a espécie levaram a elucidação de diversos compostos fenólicos da classe de taninos condensados (MELLO, 1996a,1996b;1997). Além disso várias investigações farmacológicas foram realizados com extratos obtidos da casca do vegetal em questão, e de outras duas espécies do gênero, *S. obovatum* e *polyphillum*, objetivando confirmar os dados etnofarmacológicos tais como: ação cicatrizante, anti-inflamatória, antiulcerogênica, hipotensora, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiofídica, antinociceptiva, e antioxidante (PANIZZA et al., 1998; AUDI et al., 1999; LIMA et al., 1998; SANCHES et al., 2005; LUIZE et al., 2005; ISHIDA et al., 2006; MELO et al., 2007; PEREIRA et al., 2011).

Como resultado de tais pesquisas tem-se hoje disponível no mercado o primeiro medicamento proveniente de uma planta típica do cerrado brasileiro, a pomada Fitoscar, com registro concedido pela Anvisa, é composta por extrato seco das cascas de *S. adstringens*, tendo como indicação de uso o auxílio no processo de cicatrização e antissepsia de lesões de pele e mucosas (ANVISA, 2018).

Além disso, plantas ricas em polifenóis, ou compostos fenólicos isolados a partir de plantas, como Blueberries, green tea, resveratrol, curcumina, tem sido relatadas como promissoras ao tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas, dentre elas a doença de Alzheimer, que é a principal causa de demência do mundo e de internamento hospitalar entre as pessoas da terceira idade (RAMASSAMY, 2006; KATZMAN, 1976; ASSOCIATION'S ALZHEIMER, 2016).

Dentro desse contexto, hoje sabe-se que a fração acetato de etila do barbatimão, rica em taninos, apresenta atividade protetora em modelo de doença de Alzheimer *in vitro* (dados ainda não publicados). A continuidade dos estudos químicos e biológicos com a fração aquosa do barbatimão são de grande relevância, pois podem promover maiores conhecimentos relativos à caracterização química da espécie bem como possibilitar a ampliação da utilização farmacológica da mesma. Portanto o objetivo desse trabalho foi estudar fitoquimicamente a fração aquosa obtida do extrato bruto aceto aquoso das cascas da espécie *S. adstringens* e avaliar sua atividade sobre células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Aspectos Gerais

#### 2.1.1 Família Leguminosae

A família Leguminosae (Fabaceae) representa a terceira maior família de angiospermas, abrangendo 917 gêneros com aproximadamente 23.535 espécies (THE PLANT LIST, 2018).

Bentham (1842, 1875) baseando-se em características morfológicas das flores e frutos da família Leguminosae dividiu-a em três subfamílias, Mimosaceae (=Mimosoidae), Caesalpiniaee(=Caesalpinioideae) e Papilionaceae (=Papilionadeae). Em estudos posteriores, baseando-se em características morfológicas, essas subfamílias permaneceram sendo adotadas e referidas como, Cesalpinioideae, Papilionoideae (ou Faboideae) e Mimosoideae (HEYWOOD, 1978; POLHILL; RAVEN, 1981; LEWIS, 1987). No entanto Cronquist, (1981) elevou as subfamílias à categoria de famílias Fabaceae, Caesalpiniaceae e Mimosaceae.

A Leguminosae pode apresentar-se sob a forma de ervas, arbustos até árvores de grande porte (FROHNE; JENSEN,1998) amplamente distribuída pelo mundo, tendo a subfamília Papilionoideae dispersão cosmopolita e as subfamílias Cesalpinioideae e Mimosoideae têm por habitat as regiões tropicais e subtropicais do planeta.

Alguns caracteres são comuns a todas as espécies: geralmente apresentam nódulos em suas raízes onde abrigam bactérias simbióticas principalmente do gênero *Rhizobium*, que por quimiossíntese, fixam nitrogênio atmosférico. Frequentemente produzem metabólitos secundários da classe dos taninos, terpenoides, alcaloides, aminoácidos não proteicos e isoflavonoides (FROHNE; JENSEN, 1998).

#### 2.1.2 O Gênero *Stryphnodendron*

*Stryphnodendron* nome dado por sua característica (*stryphnon*= adstringente, *dendron* = madeira), está inserido na subfamília Mimosoideae, a menor dentre as subfamílias da Leguminosae, possuindo 76 gêneros e cerca de 3000 espécies (LEWIS et al., 2005). Martius (1837) descreveu pela primeira vez o gênero *Stryphnodendron* no Brasil, através da coleta na época de três espécies.

Pela análise de novos espécimes e novas expedições de coleta realizadas em países da América Latina, foram descritos novas espécies pertencentes a este gênero (OCHIONI, 1959; RIZZINI; HERINGER, 1987; FORERO, 1972; OCHIONI-MARTINS, 1972, 1974,1977, 1980). O gênero agora compreende 53 espécies, sendo que dessas 30 são nomes de espécies aceitas, 15 consideradas sinonímias e 8 espécies não resolvido. Apresentando uma

dispersão restrita ao continente sulamericano, tendo como limite norte a Nicarágua e como limite sul o norte do estado do Paraná, observando-se uma predominância de 94% das espécies em território nacional, sendo que 18 espécies são de ocorrência somente em solo Brasileiro e 2 espécies não integram a diversificada flora brasileira (OCHIONI,1990; THE PLANT LIST, 2018).

Rizzinni e Heringer (1987) dividiram o gênero conforme seu hábito de vida em duas seções distintas: *Stryphnodendron*, incluindo as espécies arbustivas e arbóreas dotadas de tronco simples e a seção *Elenaeae* Rizz.& Her., com as espécies subarbustivas de caule bastante ramificado típicas de regiões com queimadas.

### 2.1.3 A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

*Stryphnodendron adstringens* é uma planta típica do cerrado e caatinga brasileira, e tem como sinonímia *Acacia adstringens* Mart., *Mimosa barbadetiman* Vellozo, *Stryphnodendron barbatimão* Mart., *Stryphnodendron barbatiman* Mart. e *Mimosa virginalis* Koster (OCHIOLI 1990; FORERO 1972), e popularmente é conhecida como: Barbatimão, Barba de timão e Chorãozinho roxo (Figura 1).



Figura 1. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, leguminosae. A: coleta em São Jerônimo da Serra; B: folíolos; C: casca picada. foto: João Carlos P. Mello (2002).

Segundo Ochioni (1990) a espécie apresenta hábito arbustivo ou arbóreo de pequeno a médio porte alcançando entre 4 e 7 metros de altura na fase adulta. O tronco é revestido

por casca de característica recurvada no sentido transversal com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada internamente que se destaca facilmente; ramos curtos, grossos, rugosos, estípulas pequenas, grossas, caducas; folhas alternas, grandes, duplicado-pinadas de cerca de 30 cm de comprimento; pinas com 9-12 cm aproximadamente e 5-8 jugos; folíolos quase todos alternos, com 6-8 jugos, de base oblíqua, arredondada e parte apical obtusa e até retusa, glabros em ambas as faces, membranosos; flores muito pequenas, numerosas, em espigas densas de cerca de 10 cm de comprimento; frutos são legumes de uns 10 cm, grossos, quase cilíndricos; sementes oblongas levemente achatadas (FERRI, 1969).

## 2.2 Aspectos Químicos

### 2.2.1 Composição química do gênero

Pesquisas fitoquímicas realizadas com o gênero levaram ao isolamento de substâncias da classe das saponinas, triterpenos, galactomananas e taninos (TURSCH et al., 1963; YOKOSUKA et al., 2008; REICHER et al., 1992; MELLO et al., 1996a, 1996b).

Tursch et al. (1963) isolaram a partir de extrato etanólico dos frutos de *S. coriaceum* Benth., duas saponinas triterpênicas conhecidas como sapogeninas 1 e 2. Pesquisas posteriores com a mesma espécie resultaram no isolamento de outras duas sapogeninas homólogas, 3 e 4 (Figura 2) (TURSCH et al., 1966).

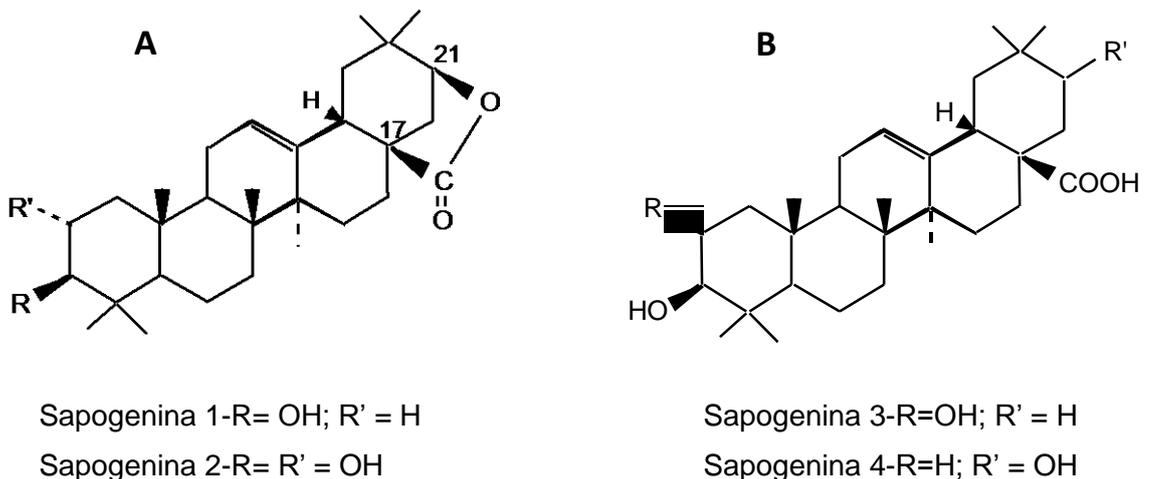


Figura 2. Estrutura **A**: sapogeninas 1 e 2; Estrutura **B**: sapogeninas 3 e 4 isoladas de extrato alcóolico dos frutos de *S. coriaceum* (TURSCH et al., 1963; 1966).

Yokosuka et al. (2008) isolaram do pericarpo de *S. fissuratum* Mart. seis novos triterpenos glicosilados com esqueleto oleano. O mesmo grupo em trabalhos posteriores com a espécie, conseguiram isolar sete novos triterpenos, possuindo esqueleto do tipo lupano e mais recentemente isolaram dez novas substâncias da mesma classe química (YOKOSUKA

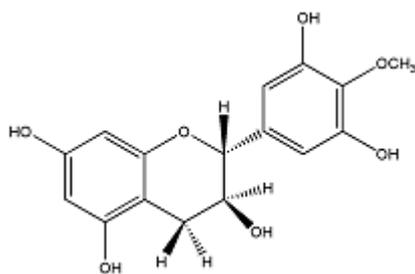
et al., 2011, 2016).

Lopes et al. (2008) estudando a composição química das cascas de *S. polyphyllum* encontraram um teor de aproximadamente 19% de taninos, do qual conseguiu-se isolar dímeros de taninos condensados (4'-O-metil-robinetinidol-(4 $\beta$ →6)-4'-O-metil-galocatequina e epigalocatequina-(4 $\beta$ →8)-galocatequina) e duas profisetidinas. Outras pesquisas com o mesmo tipo de material vegetal, porém de espécie distinta, *S. obovatum* Benth., resultou no isolamento de flavan-3-óis, prodelfinidinas e profisetidinas (SANCHES et al., 2005; ZOCOLER et al., 2009).

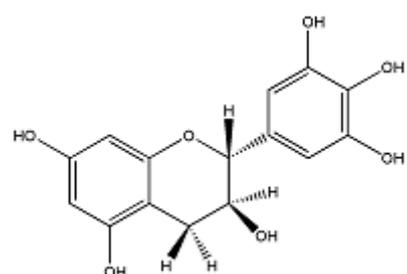
Já referente à espécie em estudo, *S. adstringens*, algumas indicações de sua composição química está descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), a qual determina uma quantidade mínima de 8% de taninos totais em suas cascas. Ardisson (2002) obteve 30,8% de polifenóis totais, desses, 29,9% correspondentes a taninos. Já Toledo et al. (2002) obteve uma concentração de taninos de 22,59% na droga vegetal.

Mello et al. (1996a e 1996b) isolaram, a partir da fração acetato de etila de extrato aceto aquoso das cascas de *S. adstringens*, monômeros básicos de taninos condensados (flavan-3-óis), prodelfinidinas e prorobinetinidinas.

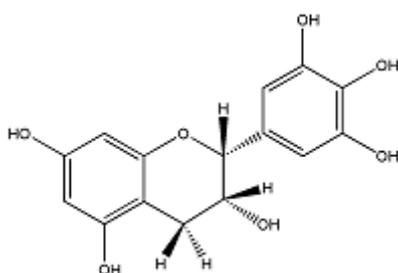
A separação de flavan-3-óis (Figura 3) foi realizada por meio da utilização de cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20, cromatografia em contracorrente multicamada (CCMC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa em fase reversa C18 e cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa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



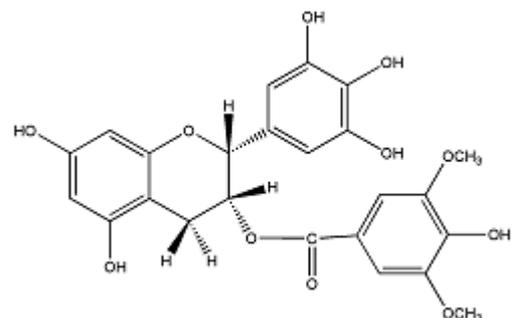
4'-O-metil-galocatequina



Galocatequina



Epigalocatequina



Epigalocatequina-3-O-(3'',5''-dimetil)-galato

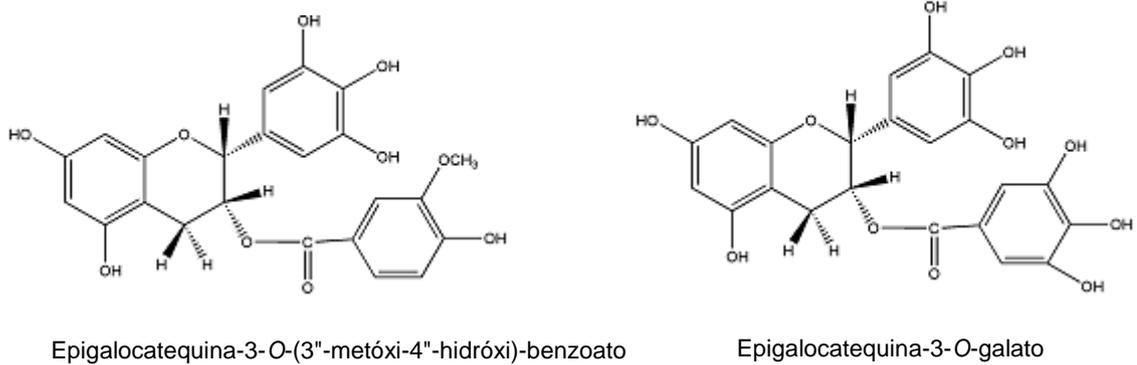
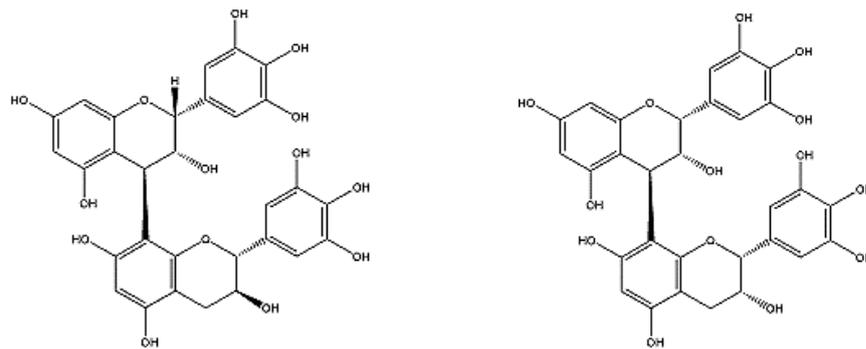


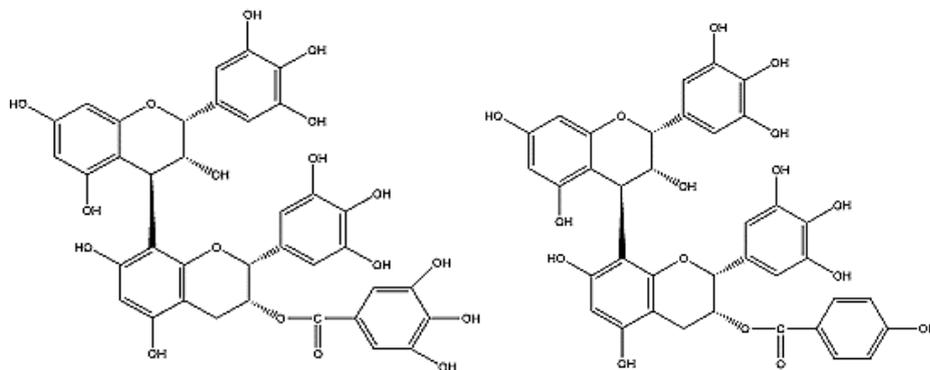
Figura 3. Flavan 3-óis isolados a partir da fração acetato de etila das cascas do barbatimão (MELLO, et al., 1996a; 1996b).

As prodelfinidinas (Figura 4) são classificadas como proantocianidinas do tipo 1, devido a presença de hidroxila na posição C-5 do anel A, e foram isoladas por meio de CC em Sephadex LH-20, cromatografia em contra-corrente multi-camada (CCMC), CLAE em fase reversa C18 e CCD preparativa (MELLO et al., 1996a e 1997).



Epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-galocatequina

Epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina



Epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina-3-O-galato

Epigallocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina-3-O-(4-hidroxi)-benzoato

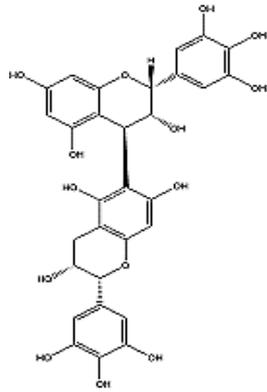
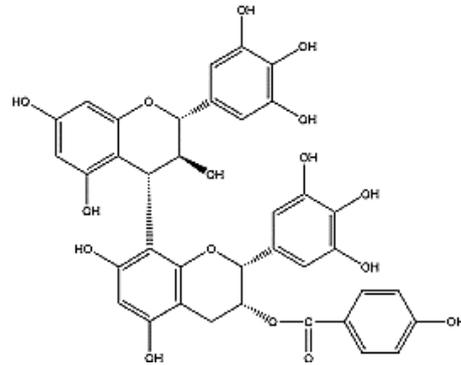
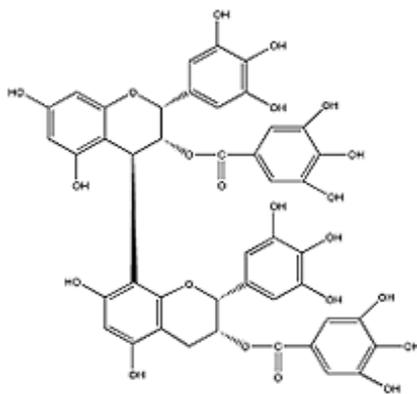
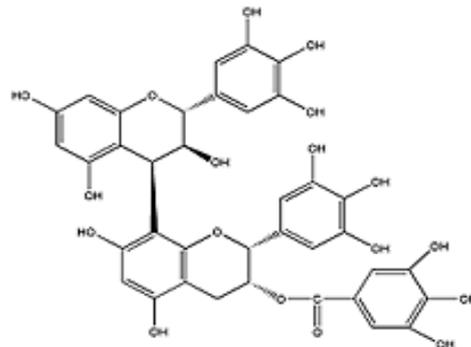
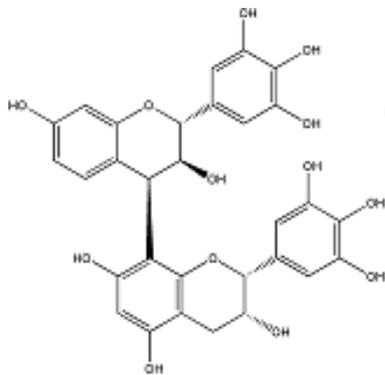
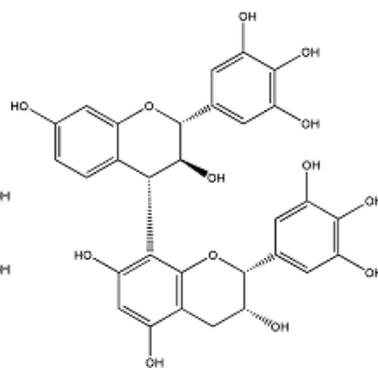
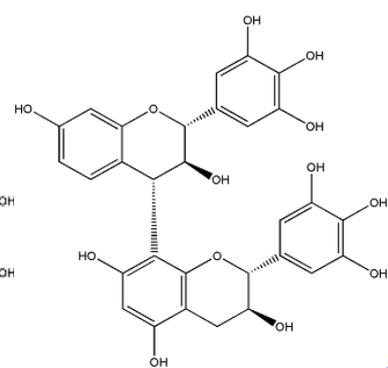
Epigallocatequina-(4 $\beta$ →6)-epigallocatequinaGalocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigallocatequina-3-O-(4-hidroxi)-benzoatoEpigallocatequina-3-O-galato-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequina-3-O-galatoGalocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigallocatequina-3-O-galato

Figura 4. Prodelfinidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas de *Stryphnodenron adstringens*. (MELLO et al., 1996a e 1997).

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

Robinetidinol-(4 $\beta$ →8)-epigallocatequinaRobinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-epigallocatequinaRobinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-galocatequina

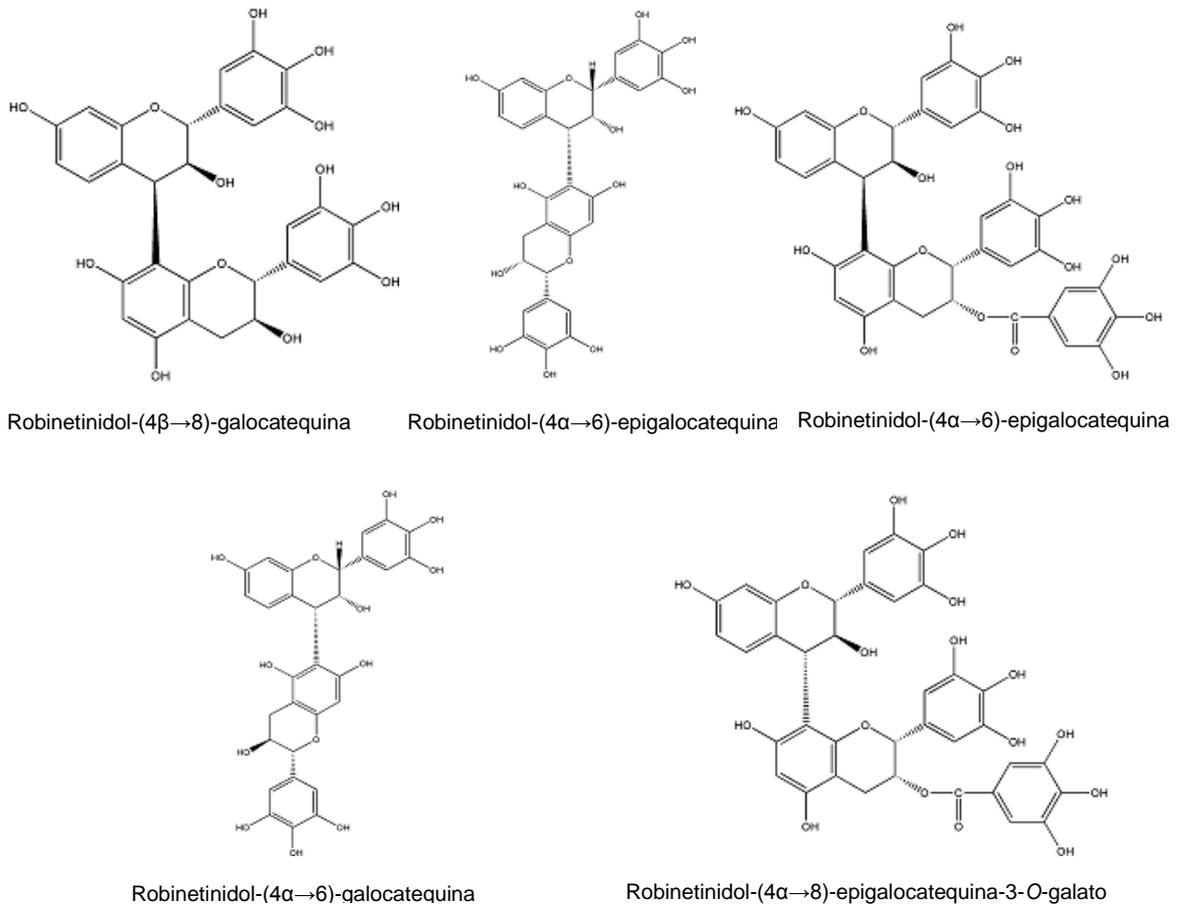


Figura 5. Prorobinetidinas diméricas isoladas da fração acetato de etila das cascas de *S.adstringens* (MELLO et al., 1996a e 1997).

Toledo et al. (2002) isolaram e identificaram duas substâncias inéditas em *S. adstringens*, sendo denominadas 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robinetidinol-(4 $\alpha$ →8)-4'-O-metil-galocatequina (Figura 6).

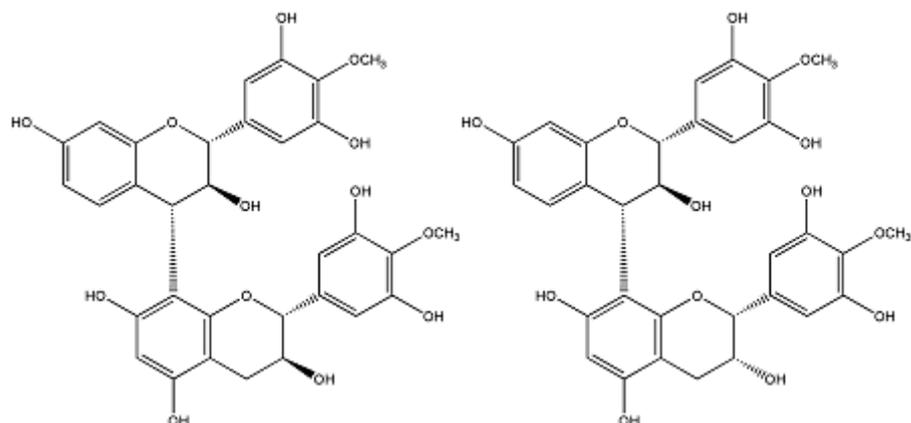


Figura 6. Dímeros isolados da fração acetato de etila das cascas de *S.adstringens* (TOLEDO et al., 2002).

Mais recentemente Leite et al., (2014) isolaram 4'-O-metil-epigalocatequina; epigalocatequina-3-O-galato-(4 $\beta$ →8)-galocatequina; galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina

e epigalocatequina-3-O-galato-(4 $\beta$ →8)–epigalocatequina (Fig. 7).

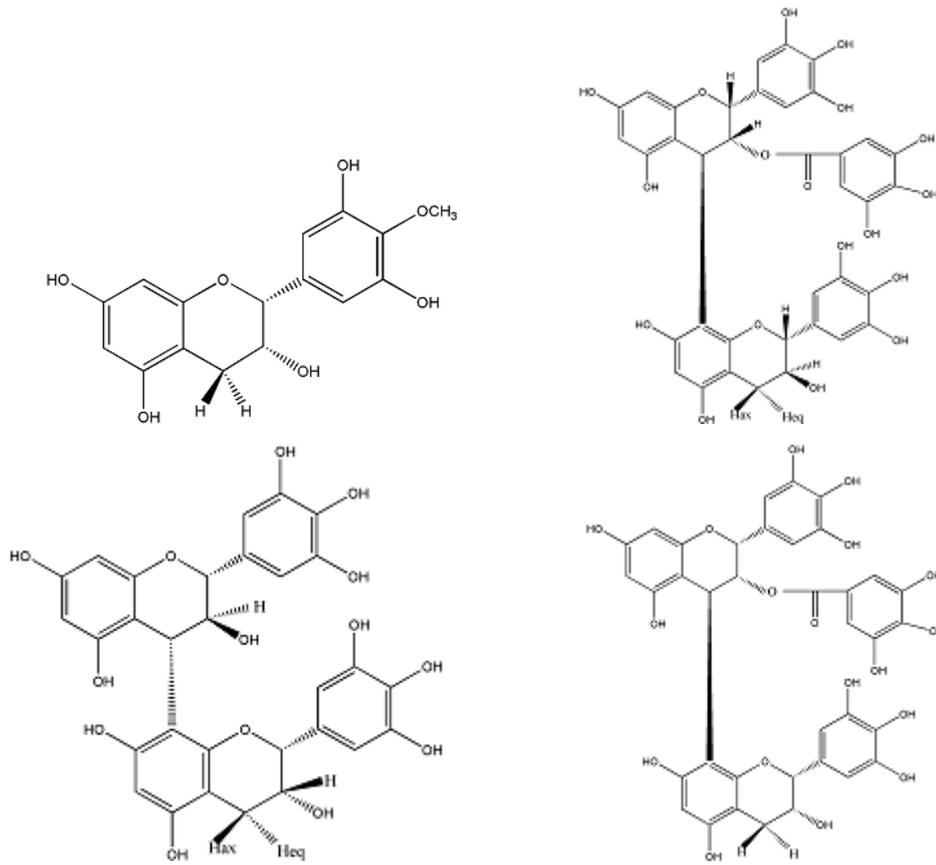


Figura 7. Quatro novos dímeros de taninos condensados isolados das fração acetato de etila de *S. adstringens* (LEITE et al., 2014).

Diferentemente da fração acetato de etila, com caracterização química bem definida, tem-se a fração aquosa que até o presente trabalho, uma única substância de peso molecular de 2114 *u* (Figura 8) teve a identidade sugerida por análises de espectrometria de massas e de Ressonância magnética nuclear (RMN) (ISHIDA et al., 2006).

Além das substâncias isoladas da classe dos taninos Reicher et al. (1992) isolaram de *S. barbatimam*, espécie sinônima de *S. adstringens*, uma galactomanana que teve sua estrutura elucidada com auxílio de espectrometria de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

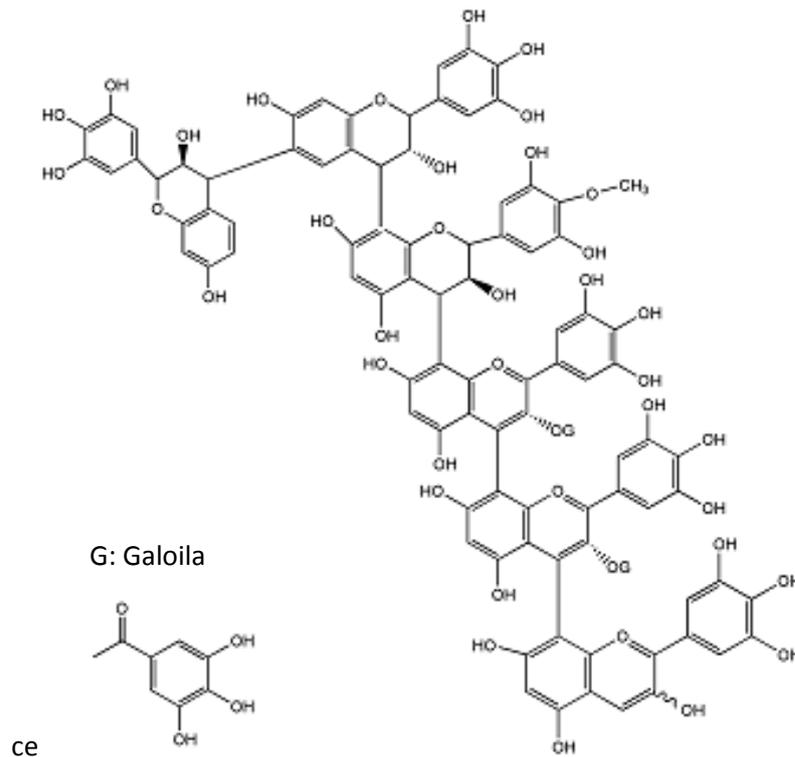


Figura 8. Hexâmero de 2114 u presente na fração aquosa de barbatimão, sugerido por análise de Massas e Ressonância magnética Nuclear (ISHIDA et al., 2006)

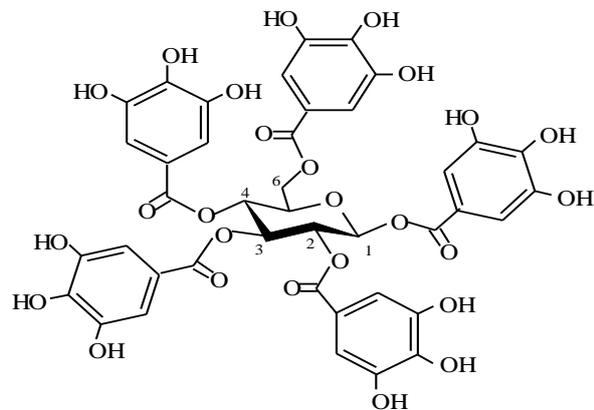
### 2.2.2 Taninos

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água de alto peso molecular produzidas pelo vegetal através do metabolismo secundário, cujo papel biológico acredita-se estar diretamente relacionado com a defesa química da planta, contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra micro-organismos patogênicos (SANTOS; MELLO, 2007; BERNAYS et al., 1989).

Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: Taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas. Taninos hidrolisáveis (Figura 9) são caracterizados por apresentar um poliálcool central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas funções hidroxilas, em quantidades variáveis, apresentam-se esterificadas com unidades de ácido gálico (SANTOS; MELLO, 2007).

Já os taninos condensados, também denominados proantocianidinas, pelo fato de liberarem antocianidinas (cianidina e delphinidina) quando submetidos à hidrólise ácida mineral são estruturalmente mais complexos, apresentam-se sob a forma de oligômeros ou polímeros formados pela policondensação de unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (HASLAM, 1975; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000), e conforme o grau de hidroxilação presente em seus anéis aromáticos e a estereoquímica do carbono assimétrico no núcleo heterocíclico, tem-se vários outros monômeros básicos pelos quais os taninos condensados podem ser constituídos

(Tabela 1; Figura 10) (SANTOS; MELLO, 2007).



$\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glucose

Figura 9. Exemplo de tanino hidrolisável (SANTOS; MELLO, 2007).

Tabela 1- Grau de hidroxilação dos anéis A e B dos monômeros básicos de taninos condensado

Tipo	Proantocianidinas	Monômero Nome trivial	Substituinte			
			R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargodina	Afzlequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelfinidina	Galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacínidina	Oritina	OH	H	OH	H
	Promelacacínidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

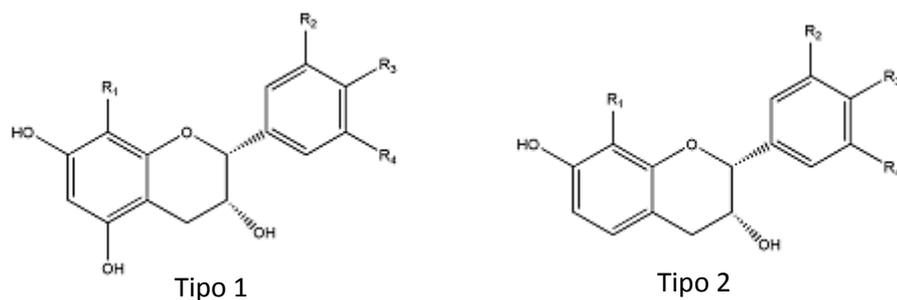


Figura 10. Estruturas dos principais monômeros de taninos condensados. Tipo 1: presença de hidroxila no Carbono 5; Tipo 2: com a ausência de hidroxila no carbono 5 (SANTOS; MELLO, 2007).

As proantocianidinas apresentam-se divididos em 2 grupos, A e B, conforme o tipo de ligação química que une seus monômeros. Os que se encontram interligados via interações de carbono nas posições Carbono-4 da unidade superior com o Carbono-6 ou Carbono-8 da unidade inferior são classificados como grupo B (Figura 11), e os que possuem complementarmente uma ligação do tipo éter correspondem ao grupo A (Figura 12)

(SANTOS; MELLO, 2007).

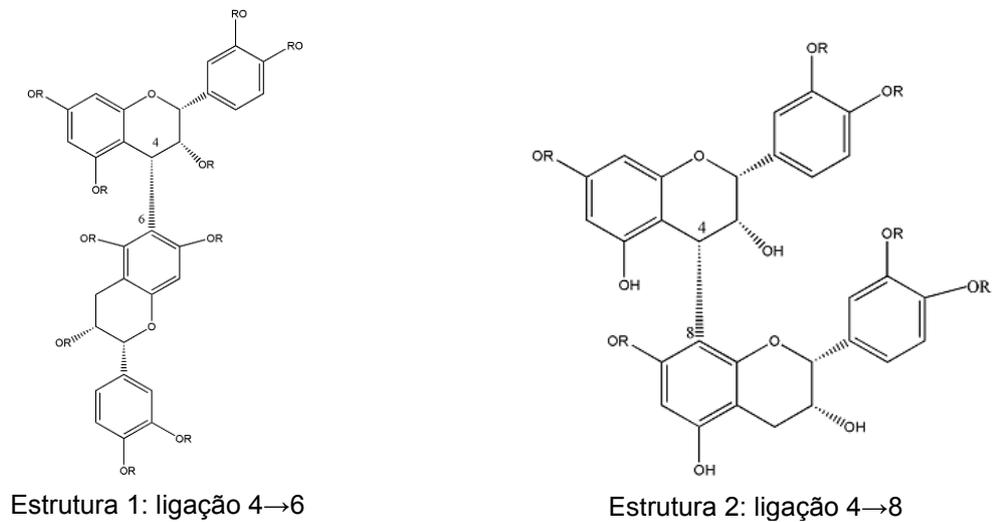


Figura 11. Exemplos de proantocianidinas diméricas do tipo B. **Estrutura 1:** ligação Carbono 4 da unidade superior com carbono 6 da unidade inferior; **Estrutura 2:** ligação carbono 4 da unidade superior com carbono 8 da unidade inferior. (SANTOS; MELLO, 2007).

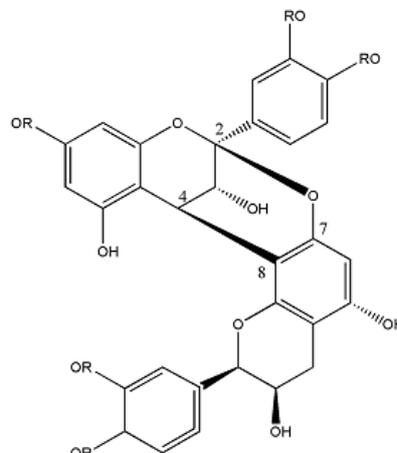


Figura 12. Exemplo de proantocianidina dimérica do tipo A. Ligação do carbono 4 da unidade superior com carbono 8 da unidade inferior além de uma ligação éter do carbono 2 da unidade superior com o oxigênio que se encontra ligado ao carbono 7 da unidade inferior (SANTOS; MELLO, 2007)

## 2.3 Propriedades biológicas da espécie *Stryphnodendron adstringens*

### 2.3.1 Atividades farmacológicas

Na medicina popular, o decocto das cascas de *S. adstringens* é amplamente empregado no tratamento de leucorreias, hemorragias, diarreias, hemorróidas, limpeza de ferimentos e na forma de gotas contra conjuntivite. O chá da casca é indicado no tratamento de hemorragias uterinas, feridas ulcerosas e para pele excessivamente oleosa (SILVA et al., 2010a).

Trabalhos científicos realizados com as cascas de barbatimão comprovaram sua atividade cicatrizante (VIEIRA et al.,1998), anti-inflamatória (LIMA et al.,1998), antiulcerogênica (AUDI et al.,1999), anti-helmíntica (HERZOG-SOARES et al., 2002; BEZERRA et al., 2002; HOLETZ et al., 2002), antiofídica (de LUCENA; MENDES; BRANDEBURGO, 2009), antinociceptiva (MELO et al., 2007) e, antimicrobiana frente à protozoários, fungos, vírus e bactérias (TOLEDO, 2002; AUDI et al., 2004; FELIPE et al., 2006; ISHIDA et al., 2006; ISHIDA et al., 2009).

### **2.3.2 Atividade cicatrizante**

As propriedades cicatrizantes do barbatimão foram estudadas por Panizza et al. (1998), em feridas de ratos tratados com o decocto das cascas a 1% o qual resultou em um processo de cicatrização mais rápido, com processos inflamatórios mais discretos. Em um trabalho realizado anteriormente, Vieira et al. (1998) já haviam demonstrado que a pomada contendo 1% do extrato bruto do barbatimão acelerou o processo de cicatrização de feridas no dorso dos ratos, quando comparada a pomada Nebacetin.

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

A ação cicatrizante da fração acetato de etila do barbatimão incorporado a uma pomada em concentração de 1% foi avaliada em feridas excisionais na pele de ratos após 4, 7 e 10 dias de tratamento tópico. As feridas tratadas com a fração apresentaram um maior número de mitoses se comparadas a aquelas tratadas com o controle, a pomada base. Além disso, houve estímulo da proliferação epitelial. Os autores sugeriram que as proantocianidinas presentes na fração são as responsáveis pelos efeitos observados na epiderme (HERNANDES et al., 2010).

Mais recentemente Pinto et al. (2015) trataram feridas de ratos diabéticos por um período de 14 dias com gel contendo 1% de extrato bruto de barbatimão, e observaram nos primeiros dias de tratamento que o extrato estimulou a migração de células e a proliferação de queratinócitos e após o décimo dia estimulou a substituição das fibras de colágeno do tipo III (cicatricial) por fibras do tipo I (remodelação).

Um estudo clínico desenvolvido com 27 pacientes com úlceras de decúbito demonstrou que o tratamento com uma pomada contendo 3% de barbatimão foi capaz de cicatrizar 100% das feridas, sendo que as lesões do tipo I e II levaram em média de 3 a 6

semanas e a de grau III de 10 a 18 semanas de tratamento (MINATEL et al., 2010).

### 2.3.3 Atividade anti-inflamatória

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

### 2.3.4 Atividade antiulcerogênica

Trabalhos realizados por Audi et al. (1999) demonstraram a eficácia das frações acetato de etila do extrato de barbatimão como antiulcerogênica em 2 dos 3 modelos de ulceração induzida em ratos. Posteriormente Martins et al. (2002) confirmaram a significativa ação antiulcerogênica de *S. adstringens*, através da avaliação da atividade inibitória da secreção gástrica ácida durante o estudo de estresse térmico em ratos.

### 2.3.5 Atividade antibacteriana

Extratos de diferentes polaridades das cascas de barbatimão foram avaliados *in vitro* frente à bactérias e fungos comumente relacionados com doenças da cavidade oral como cáries e periodontíase. Todos os microorganismos, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram expressivamente susceptíveis aos extratos estudados (GOMES et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Anteriormente Soares et al. (2008) já haviam relatado a mesma atividade do extrato hidroalcoólico em outras duas bactérias presentes na cavidade oral *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*.

Toledo et al. (2002) demonstraram a atividade antimicrobiana das subfrações obtidas por cromatografia em Sephadex LH-20 contra o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, os resultados não se repetiram quando testaram-se as substâncias presentes no extrato que foram isoladas, derivados de galocatequina e epigalocatequina. Audi et al. (2004) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de barbatimão e suas frações, e obtiveram como resultados a inibição do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que *Echerichia coli* demonstrou ser resistente a ação do extrato.

A ação antibacteriana do extrato seco e a atividade antisséptica do sabonete líquido contendo o extrato seco foram avaliadas frente as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, pelo método de difusão em ágar. A concentração bactericida mínima encontrada para o

extrato foi de 50 mg/mL contra *S. aureus* e 75 mg/mL frente *S. epidermidis* e *E. coli*. O sabonete mostrou maior eficiência antisséptica contra as bactérias na concentração de 100 mg de extrato/mL de sabonete (SOUZA et al., 2007a).

### 2.3.6 Atividade antifúngica

Ishida et al. (2006) testaram uma subfração polimérica de proantocianidinas obtida por cromatografia em Sephadex LH-20 da fração aquosa de barbatimão contra cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Candida* sp. isoladas a partir de fluido vaginal de mulheres. Os melhores resultados na inibição fúngica foram observadas em concentrações acima de 7,8 µg/mL, comparável aos valores obtidos pela nistatina, medicamento utilizado como droga de referência. Adicionalmente foi relatado uma inibição dos fatores de virulência dos fungos, como a diminuição da aderência à células Vero e superfície inerte (vidro), bem como o aumento da fagocitose.

Luiz et al. (2015) relataram que essa mesma fração polimérica apresenta atividade contra os biofilmes de *C. albicans* diminuindo a atividade metabólica e sua biomassa nos estágios iniciais de sua formação, como também diminuiu a atividade metabólica em biofilmes já formados, resultados esses comparáveis aos antifúngicos utilizados como padrão, anfotericina e fluconazol.

A fração aquosa também exibe efeito fungistático em *C. tropicalis* com a concentração inibitória mínima variando de 0,5 a 8,0 µg/mL. Observou-se uma redução significativa da massa de biofilme com o pré-tratamento e até mesmo com incubação durante a formação de biofilmes. A exposição prévia das células planctônicas a esta concentração de F2 também diminuiu significativamente a aderência da levedura em células HEP-2, hidrofobicidade da superfície celular e níveis de mRNA dos genes ALST1-3. Na avaliação *in vivo* foram utilizadas larvas de *Tenebrio molitor*, que são susceptíveis à infecção por *C. tropicalis*. O tratamento com 128 e 256 µg/mL da fração aumentou significativamente a sobrevivência de larvas infectadas (MOREY et al., 2016).

Ishida et al. (2009) avaliaram a subfração frente a fatores de virulência de cepas de *Cryptococcus neoformans*. Os resultados demonstraram que os taninos presentes na subfração interferiram no crescimento e homeostase celular além de diminuir significativamente a formação e o tamanho da cápsula de polissacarídeo, além da pigmentação.

Melo-Silva et al. (2009) pesquisaram o potencial antifúngico de plantas do cerrado brasileiro contra *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. Dentre as espécies, *S. adstringens* apresentou uma concentração mínima inibitória de 78 µg/mL frente a *T. rubrum* e demonstrou ser ineficaz na inibição do crescimento de *C. albicans*. Resultado diferente dos encontrados

nos trabalhos citados anteriormente, o que pode ser justificado pelo fato de terem sido utilizados solventes extratores diferentes, como também a utilização de indivíduos e coleta de seu material vegetal proveniente de regiões e épocas distintas, acabam interferindo na quantificação dos taninos presentes nos extratos em estudo (TOLEDO et al., 2002).

De Freitas et al. (2018) demonstraram que a fração aquosa semipurificada de barbatimão e uma de suas subfrações contendo proantocianidina polimérica, inibiu *in vitro* o crescimento de isolados de *Candida* spp., incluindo cepas com resistência antifúngica a fluconazol e / ou anfotericina B, além de inibir as células de dispersão de biofilme de *Candida*. Além disso, um gel acrescido de fração aquosa controlou a infecção vaginal por *C. albicans* e *C. glabrata* em camundongos, sem toxicidade perceptível ao tecido vaginal.

### 2.3.7 Atividade antiparasitária

Herzog-Soares et al. (2002) avaliaram a ação tripanocida do extrato bruto das cascas de barbatimão em camundongos. Os resultados demonstraram que durante as quantificações, o extrato de *S. adstringens* apresentou uma significativa interferência sobre a curva de parasitemia do *T. cruzi*, reduzindo o número de parasitos circulantes no sangue. Posteriormente Luize (2005) demonstrou uma inibição do crescimento *in vitro* de aproximadamente 51,9% das formas epimastigotas de *T. cruzi* e de 36,5% contra as formas promastigotas de *Leishmania* em concentração de tratamento de 100mg/mL.

Toledo et al. (2002) demonstraram a inibição total das formas promastigotas de *L. amazonensis*, quando tratadas com barbatimão.

Bezerra et al. (2002) relataram a atividade moluscicida da planta contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, levando a mortalidade de 90% dos parasitas quando tratados com extrato à uma concentração de 50 ppm. Já Vinald et al. (2005) pesquisaram a ação do extrato no combate a cercária, forma infectante do *S. mansoni* em mamíferos. O tratamento levou a mortalidade de 100% das cercárias quando utilizaram concentrações de 100 e 200 µg/mL do extrato, e em concentrações de 50 e 20µg/mL as taxas de mortalidade foram 75% e 50%, respectivamente.

### 2.3.8 Atividade antiviral

As atividades antivirais contra o polivírus 1 (P-1) e contra o herpes bovino (BHV-1) foram estudados por Felipe et al. (2006) utilizando o extrato bruto das cascas da espécie, bem como suas frações aquosa e alcoólica. A fração aquosa foi a mais efetiva, inibindo 97% das amostras de BHV-1 e 93% das amostras de Polivírus 1.

### 2.3.9 Outras atividades

Pesquisas desenvolvidas com extrato aquoso de barbatimão realizadas por De Lucena, Mendes e Brandeburgo (2009), demonstraram que o extrato desempenhou atividade antiofídica para o veneno de espécies de cobras conhecidas popularmente como jararaca, *Bothrops moojeni* e *Bothrops pauloensis*, inibindo suas atividades hemolíticas, hemorrágicas, coagulativas e proteolíticas em camundongos. Na avaliação da inibição da letalidade, o tratamento realizado a uma concentração de 99 mg/kg do peso do animal de extrato inibiu em 100% a mortalidade induzida por *Bothrops pauloensis* e 80% da mortalidade induzida por *Bothrops moojeni*. Paula (2009), pesquisando plantas brasileiras com atividade antiofídica confirmou esses resultados para o barbatimão.

Melo et al. (2007) demonstraram um efeito antinociceptivo do barbatimão nos modelos experimentais de contorção induzida por ácido acético e dor induzida pela formalina. Por outro lado, o barbatimão não modificou significativamente o tempo de latência dos animais no teste da placa quente, sendo assim, os autores sugeriram que o extrato de barbatimão apresenta efeito antinociceptivo por mecanismos periféricos.

Em um estudo realizado por Vicente et al. (2009), um creme contendo 6% do extrato bruto das cascas de barbatimão foi eficaz no tratamento tópico para inibir o crescimento de pelos em casos de hirsutismo sem apresentar efeitos colaterais, e sua ação provavelmente se deu pela inibição da enzima  $5\alpha$  redutase.

Souza et al. (2012b) estudaram a atividade inibitória do extrato das cascas do barbatimão frente às enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -glucosidase, responsáveis pela hidrólise de carboidratos. A inibição dessas enzimas é importante no tratamento do diabetes mellitus por possibilitar a redução dos níveis de glicemia pós-prandial do indivíduo. O extrato etanólico da planta apresentou resultados significativos se comparados aos das substâncias de referência, com um  $IC_{50}$  de 1,86  $\mu$ g/mL para  $\alpha$ -amilase e 0,61  $\mu$ g/mL para  $\beta$ -glucosidase

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

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

Sabino et al. (2017) demonstrou que a fração aquosa de um extrato acetona água das folhas de barbatimão foi citotóxica contra duas linhagens celulares de câncer de mama

humano, MCF-7 e o triplo negativo, MDA-MB-435. A fração diminuiu significativamente a viabilidade das células cancerosas e aumentou a expressão dos genes Bax, caspase-9, caspase-3 ativa, caspase-8, LC-3 e beclin-1 e diminuiu a expressão de Bcl-2, caspase-3 e pró-caspase-8. Em relação a alterações morfológicas foram observados o arredondamento de células, o encolhimento e a redução da condensação nuclear além do diâmetro e comprimento da célula.

### 2.3.10 Toxicidade

Foi realizado por Alves et al. (1996) um estudo do efeito do extrato aquoso das flores de barbatimão na longevidade de abelhas operárias *Apis mellifera* africanizadas. Os resultados demonstraram que em relação ao grupo controle as abelhas tratadas tiveram seu tempo de vida reduzido à metade. Posteriormente Alves et al. (1999) trataram abelhas operárias utilizando extrato aquoso, obtido a partir dos nectários de barbatimão, os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas na média de tempo de vida entre abelhas tratadas e abelhas controle, considerado como indicativo da atoxicidade do extrato testado.

Rebeca et al. (2002) avaliaram *in vivo* a toxicidade aguda de extrato bruto de barbatimão administrada por via oral. Durante os 30 dias de tratamento utilizando concentrações de extrato bruto de 800 e 1600 mg/kg observaram que os ratos tratados em relação aos animais controle apresentaram um ganho de peso menor, elevação nos níveis de glicose plasmática, involução do timo e DL50 estimada em 2.699 mg/kg.

Em estudos de toxicidade utilizando fração aquosa de barbatimão Costa et al. (2010) relataram que doses inferiores a 2000 mg/kg não ocasionou a morte de animais e a DL50 encontrada foi de 3015 mg/kg. A fração não demonstrou atividade genotóxica aos animais e houve indicativos de que protegeu os animais em estudo contra os danos causados pela droga utilizada como controle positivo, a ciclofosfamida.

Em um trabalho posterior, Costa et al. (2013) avaliaram a toxicidade crônica dessa mesma fração aquosa. Durante 90 dias ratos Wistar foram tratados com diferentes doses da fração aquosa, em seguida foram avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Apesar de alguns valores obtidos terem variado entre o sexo dos animais e a dose de droga administrada, não houve um perfil linear nessas alterações, sendo que todas as variações estavam dentro dos limites considerados normais para a espécie do animal. Assim, conclui-se que nas doses administradas de barbatimão não se mostrou tóxico aos roedores. Neste mesmo estudo também foi verificado que a administração da fração aquosa em roedores não acarretou mudança nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, sugerindo que a fração não exerceu alteração neurocomportamental nos animais.

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

Audi et al. (1999) verificaram que a administração oral do extrato de barbatimão em ratos em concentrações acima de 2.000 mg/kg provocou sinais de toxicidade. Em outro estudo demonstrou efeito abortivo em ratas tratadas com vagens e sementes da espécie (BÜRGER et al., 1999). No entanto, não apresentou genotoxicidade em *Drosophila melanogaster* (SOUSA et al., 2003).

## 2.4 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é reconhecida como a causa mais comum de demência, compreendendo cerca de 60 a 80% dos casos, bem como a principal causa de morte entre as pessoas da terceira idade (KATZMAN, 1976; ALZHEIMER, ASSOCIATION'S 2016). Acometendo cerca de 35 milhões de pessoas no mundo, e com uma estimativa que a prevalência da doença crescerá cerca de 225% até 2050, afetando mais de 115 milhões de pessoas mundialmente (WIMO; PRINCE, 2010). Sendo que atualmente mais mulheres do que homens são acometidas pela DA e outras demências, representando dois terços dos casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

A DA é clinicamente caracterizada em seu estágio inicial pela perda de memória, e posteriormente prejuízo na função cognitiva, linguagem, habilidades visuoespaciais e função executiva, juntamente com mudanças comportamentais (CUMMINGS; COLE, 2002). Terminalmente, os pacientes podem ficar acamados, incontinentes e incapazes de comunicar-se (LOPEZ, 2011).

Patologicamente a DA é caracterizada por uma perda de conexões sinápticas dentro do córtex entorrinal progredindo para o hipocampo e córtex cerebral, em paralelo a esses achados tem-se à presença de placas senis (PS) extracelulares, a qual consiste de peptídeos beta amiloide ( $\beta$ A), e intracelularmente por depósitos de emaranhados neurofibrilares, composto por agregados de proteína Tau hiperfosforilada (KATZMAN, 1991).

Atualmente, os médicos têm acesso a ferramentas projetadas para ajudar com o diagnóstico, como o Mini Mental State Evaluation (MMSE), que é usado para avaliar a capacidade cognitiva do paciente (uma escala de 30 pontos é usada, com >25 sendo normal e <25 como provável DA) (FOLSTEI; MCHUGH, 1975). Como também alternativas de imagem tais como RMN e tomografia de emissão de próton (PET), que visualizam tanto a extensão da

degeneração do hipocampo, sulco e giro como a diminuição da utilização da glicose pelos neurônios (JACK, 1999).

A progressão da DA pode ser estratificada em quatro estágios principais: DA pré clínico, comprometimento cognitivo leve, DA inicial e DA tardio estágio. A DA pré clínico é definido como potencial estágio para DA no qual o paciente apresenta-se completamente funcional nos exames cognitivos como o MMSE, mas o crescimento da patologia dentro do cérebro está presente, porém no instante desconhecida, (SMALL; FRATIGLIONI; BACKMAN, 2001; VLASSENKO; BENZINGER; MORRIS, 2012). As alterações cerebrais associadas com a DA podem começar 20 anos ou mais antes dos sintomas aparecerem. Quando as mudanças iniciais ocorrem, o cérebro compensa por elas, permitindo que os indivíduos continuem sem alterações em suas funcionalidades (VILLEMAGNE et al., 2013; BATEMAN, 2012).

No estágio de comprometimento cognitivo leve tem sido descrito como sendo o estágio de transição entre um estado de cognição normal e DA inicial, e subdivide-se em estágio amnésico e não amnésico, sendo que o estágio amnésico costuma apresentar uma taxa de conversão de aproximadamente 32% à DA em um período de cinco anos (WARD et al., 2013).

Conforme ocorre a progressão clínica da DA o cérebro demonstra graus variados de degeneração, com comprometimento cognitivo leve apresentando degeneração relativamente pequena afetando o hipocampo, sulco e giro, enquanto um maior grau de degeneração afeta as mesmas regiões cerebrais em DA tardio além de atrofia adicional do lóbulo frontal e alargamento ventricular em DA inicial e DA tardia (DRAYER et al., 1985; FARROW et al., 2007; JACK et al., 1999).

Com exceção dos casos de Alzheimer causados por mutações genéticas, os especialistas acreditam que a DA, como outras doenças crônicas comuns, se desenvolve como resultado de múltiplos fatores e não de uma única causa (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

#### **2.4.1 DA e mutações genéticas**

Uma pequena porcentagem dos casos de DA (aproximadamente 1% ou menos) (BEKRIS et al., 2010) se desenvolve como resultado de mutações em qualquer um de três genes específicos. Essas mutações envolvem o gene da proteína precursora amiloide (APP) e os genes das proteínas presenilina 1 (PSE1) e presenilina 2 (PSE2). Aqueles que herdaram uma mutação nos genes APP ou PSE1 consequentemente desenvolverão DA familiar. Enquanto que mutações no gene PSE2 apresentam 95% de chance de desenvolver a doença (GOLDMAN; HAHN; BIRD, 2011).

A importância da APP na patogênese de DA se deu pelas evidências de mutações genéticas de pacientes com DA familiar (DAF). Hoje em dia, sabe-se de pelo menos 32

mutações da APP que causam DA familiar. Todas as mutações da APP são conhecidas por alterar o processamento proteolítico da APP, resultando em aumento da produção de  $\beta$ A total ou em um aumento seletivo na forma de  $\beta$ A (1-42) (GOATE; HARD, 2012; SELKOE, 2001). Além das mutações da APP, mutações na PSE1 (392 famílias) e em PSE2 (23 famílias) foram identificadas na DA familiar (SCHEUNER et al., 1996).

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, a APP uma proteína transmembrana, é clivada por secretases e, normalmente sob ação de alfa secretases, via fisiológica, forma uma proteína não amiloidogênica que tem funções de proteção neuronal. Já na clivagem pelas secretases gama e beta, via patológica, forma-se um composto amiloidogênico (Figura 13) (ZHENG, KOO, 2006; VASSAR et al., 1999). No processamento fisiológico da APP, por meio da clivagem sucessivas pelas enzimas  $\alpha$  e  $\gamma$ -secretases, forma um fragmento solúvel (sAPP $\alpha$ ) e outro fragmento com 83 aminoácidos (C83) que é degradado posteriormente pelas  $\gamma$ -secretases, originando um fragmento de 3 aminoácidos e outro fragmento intracelular denominado domínio intracelular amiloide, que são rapidamente degradados (ZHANG et al., 2012).

No processamento patológico do APP pela ação da  $\beta$  secretases (BACE1), ocorre clivagem da proteína na região transmembrana, liberando um fragmento solúvel e outro de 99 aminoácidos (C99). O C99 é posteriormente processado por  $\gamma$  secretases, compostos por 4 domínios: duas isoformas de presenilinas (PSE1 e PSE2), APH1 e Nicastrin (VASSAR et al., 1999; VETRIVEL et al., 2006), que podem degradar esse fragmento em diferentes pontos da sua região transmembrana, formando espécies de  $\beta$ A com 38 a 43 aminoácidos, sendo que as formas  $\beta$ A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> são encontradas nas placas amiloides, sendo a  $\beta$ A<sub>1-42</sub> a mais abundante em DA (JARRET et al., 1993).

Esta torna-se neurotóxica mediante a uma reorganização estrutural, que constitui formas derivadas da proteína  $\beta$ A, oligômeros de dimensões diversas, como monômeros, dímeros e trímeros, que se agregam, formando as PS (HARDY, 2009).

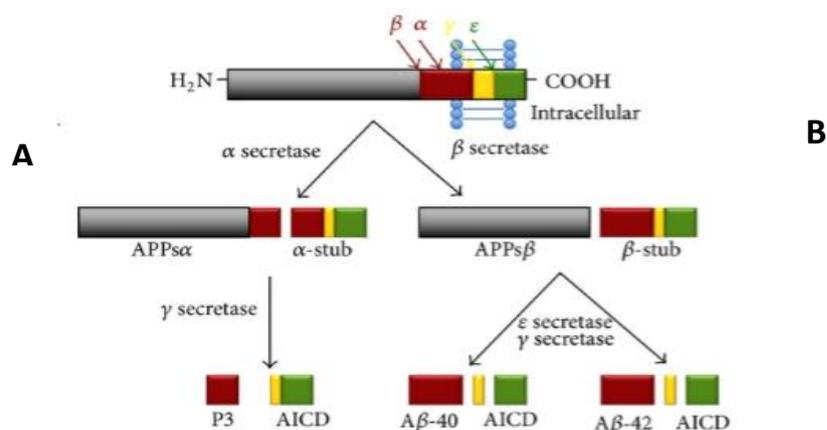


Figura 13. Processamento proteolítico APP. **A:** Via não amiloidogênica, pela ação de  $\alpha$  secretases. **B:** Via amiloidogênica pela ação de  $\beta$  secretases

A  $\beta$ A 42 tem dois aminoácidos hidrofóbicos adicionais em comparação com  $\beta$ A40, que favorece a uma maior formação fibrilar em  $\beta$ A42, esse aumento da hidrofobicidade possivelmente também permite que este peptídeo se integre dentro da bicamada lipídica iniciando processos de dano celular (BUTTERFIELD et al., 2013).

#### **2.4.2 Fatores de risco não modificáveis para DA**

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de DA, destaca-se a idade (HEBERT et al., 2010), histórico familiar (GREEN et al., 2002; LAUTENSCHLAGER et al., 1996) e a presença do gene da apolipoproteína E (APOE) herdada dos pais  $\epsilon$ 4 (SAUNDERS et al., 1993; FARRER et al., 1997).

A idade é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de DA. A maioria das pessoas com DA tem 65 anos ou mais; 15% das pessoas com doença de Alzheimer tem 65-74 anos, enquanto que 44% tem idade entre 75-84 anos (HEBERT et al., 2010).

Uma história familiar de Alzheimer por si só não é o suficiente para que um indivíduo desenvolva a doença. No entanto, os indivíduos que têm um pai, irmão ou irmã com DA são mais propensos a desenvolver a doença. Quando as doenças ocorrem em famílias, a hereditariedade (genética), fatores compartilhados ambientais e de estilo de vida, ou ambos, podem desempenhar um papel (LOY et al., 2014). O risco aumentado, devido a ter uma história familiar de Alzheimer não é inteiramente explicado se o indivíduo herdou o gene de risco APOE  $\epsilon$ 4.

O gene APOE codifica para uma proteína que transporta o colesterol na corrente sanguínea, todos herdam uma das três isoformas do gene APOE  $\epsilon$ 4 -  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ou  $\epsilon$ 4 - de cada pai. A forma  $\epsilon$ 3 é a mais comum, e a isoforma  $\epsilon$ 2 a menos comum. Aqueles que herdam uma cópia do formulário  $\epsilon$ 4 têm um risco três vezes maior de desenvolver DA do que aqueles sem a forma  $\epsilon$ 4, enquanto que aqueles que herdam duas cópias da forma  $\epsilon$ 4 apresentam um risco 8 a 12 vezes maior (LOY et al., 2014; HOLTZMAN; HERZ; BU, 2012). Além disso, os que possuem a forma  $\epsilon$ 4 são mais propensos a desenvolver DA em uma idade mais jovem do que aqueles com isoformas  $\epsilon$ 2 ou  $\epsilon$ 3 do gene APOE (SPINNEY, 2014). Estima-se que 40% a 65% das pessoas diagnosticadas com DA possuam uma ou duas cópias do gene APOE  $\epsilon$ 4 (FARRER et al., 1997).

#### **2.4.3 Fatores de Risco Modificáveis para DA**

Em um estudo recente Baumgart et al. (2015) avaliando o estado da evidência sobre os efeitos de fatores de risco modificáveis sobre o declínio cognitivo e a demência concluíram que existem evidências suficientemente fortes, de uma perspectiva baseada na população,

que a atividade física regular e o gerenciamento de fatores de risco cardiovascular (especialmente diabetes, obesidade, tabagismo e hipertensão) reduzem o risco de declínio cognitivo e podem reduzir o risco de demência.

Além disso resultado de estudos evidenciam que o consumo de uma dieta que beneficie o coração, como as de menor ingestão de gorduras saturadas, pode estar associado à redução do risco de Alzheimer e demência, sendo assim, o contrário também se aplica a uma má alimentação (GU et al., 2010).

Ter um menor grau de escolaridade é classificado como fator de risco para DA e pesquisadores vem descrevendo quais são os fatores de risco gerados pela baixa escolaridade na saúde das pessoas. Dentre eles enquadra-se uma maior probabilidade dessas pessoas ter ocupações que são menos estimulantes mentais (MCDOWELL et al., 2007). Além disso, um menor nível de escolaridade pode refletir em status socioeconômico mais baixo, o que pode aumentar a probabilidade de uma má nutrição e diminuir a capacidade de pagar cuidados de saúde ou obter tratamentos, como por exemplo, para fatores de risco cardiovasculares (MCDOWELL et al., 2007).

## **2.5 Tratamentos na doença de Alzheimer**

### **2.5.1 Anticolinesterásicos**

Há no mercado uma série de farmacoterapias aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de DA. Estes medicamentos melhoram os sintomas ou retardam o declínio; porém nenhum impacta diretamente no processo neurodegenerativo subjacente (SADOWSKY; GALVIN, 2012).

A estratégia do uso de anticolinesterásicos é melhorar a transmissão colinérgica, retardando a degradação da acetilcolina presente na fenda sináptica para compensar sua baixa disponibilidade, juntamente à perda dos receptores nicotínicos causado pela patologia (FARLOW et al., 2002).

Atualmente há três anticolinesterásicos indicados para o tratamento de DA, donepezila, galantamina e rivastigmina, todos demonstram benefícios clínicos na função cognitiva e no estado clínico geral (CUMMINGS et al., 2012; RAINA et al., 2008), e de desempenho na DA tardia (CUMMINGS et al., 2012; BIRKS, 2006). Não existem diferenças significativas, clinicamente comprovada entre os medicamentos em termos de eficácia, no entanto a eficácia e a tolerabilidade associada aos medicamentos é dependente da dose, por isso, embora altas doses possam ser eficazes, seus efeitos colaterais podem ser limitantes de dose (BIRKS, 2006; ANAND; MESSINA; HARTMAN, 2000).

### 2.5.2 Inibidores dos receptores NMDA

Memantina é um antagonista não competitivo dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), indicado para DA moderada a severa, que acredita-se proteger os neurônios da excitotoxicidade. Em estudos clínicos demonstraram melhorar a cognição e função global, em pessoas com DA moderado a grave após 6 meses de uso (MCSHANE; AREOSA; MINAKARAN, 2006).

Estudos do uso combinado de memantina e donepezila em pacientes com DA moderada a severa, demonstraram um benefício significativo na função cognitiva, linguagem, comportamental e estado geral, em relação ao grupo placebo (FELDMAN et al., 2010; HOWARD et al., 2012). No entanto, esses benefícios não foram observados em pacientes com DA leve a moderada (FARLOW et al., 2010).

### 2.5.3 Pesquisas de novos medicamentos

O desenvolvimento de medicamentos que modificam a progressão da DA é reconhecido como uma necessidade mundial. Estes devem presumivelmente ser substâncias que irão modificar, quer estabilizando ou diminuindo, os mecanismos patológicos em nível molecular que conduzem à neurodegeneração e, finalmente, a demência (GALIMBERTI; SCARPINI, 2011; KURZ, PERNECZKY, 2011).

Assim, tanto a proteína  $\beta$ A como a Tau são alvos principais para terapias modificadoras de DA. Deste ponto de vista, a DA poderia ser prevenida ou efetivamente tratado, diminuindo a produção de  $\beta$ A e a hiperfosforilação da proteína Tau; evitando assim a agregação destas proteínas, ou então neutralizando e removendo as formas agregadas tóxicas ou mal encadernadas destas proteínas, ou uma combinação destas modalidades (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013).

Foram descritos vários mecanismos patogênicos adicionais, possivelmente sobrepostos com placas de  $\beta$ A e formação de emaranhados neurofibrilares, incluindo inflamação (GRIFFIN, 2006), dano oxidativo (REDDY et al., 2009) e desregulação de ferro (ADLARD; BUSH, 2006).

### 2.5.4 Inibidores da proteína $\beta$ A

Como os oligômeros de  $\beta$ A são tóxicos, substâncias que inibam tal agregação podem ser importantes no tratamento de DA. Uma dessas substâncias é a colostrina, um complexo polipeptídico rico em prolina derivado do colostro de ovelha. A colostrina inibe a agregação  $\beta$ A e sua neurotoxicidade em ensaios celulares, e melhora o desempenho cognitivo em

modelos animais. Embora um ensaio tenha demonstrado melhoras modestas nos escores de Mini Avaliação do Estado Mental para pacientes com DA leve, outro tratamento de 15 meses, demonstrou que os efeitos benéficos não se sustentaram durante todo o período de tratamento (BILIKIEWICZ; GAUS, 2004).

Outro composto chamado scyllo-inositol é capaz de estabilizar agregados oligoméricos de  $\beta$ A e inibir sua toxicidade no hipocampo de ratos. Um estudo de 18 meses com pacientes com DA leve a moderada, avaliando sua eficácia e segurança forneceu provas insuficientes para apoiar ou refutar seu benefício (SALLOWAY et al., 2011).

O único inibidor de agregação de A $\beta$  atingindo a fase clínica III é o ácido glicosaminoglicano 3-amino-1-propanossulfônico sintético (3APS, Tramiprosato) (GAUTHIER et al., 2009). Esse composto foi projetado para interferir com a ligação de glicosaminoglicanos e  $\beta$ A. Os resultados decepcionantes da América do Norte levaram à interrupção dos testes na Europa.

Outros estudos sugerem que o tramiprosato promove um efeito anormal na agregação da proteína Tau em células neuronais (SANTA-MARIA et al., 2007). Estes resultados enfatizam a importância de testar os potenciais medicamentos para a DA em ambos os marcadores da patologia ( $\beta$ A e Tau).

### **2.5.5 Inibidores de Cobre e Zinco**

Vários quelantes de zinco e cobre inibem a agregação de  $\beta$ A em estudos *in vitro*, e *in vivo* com animais. Estudo de fase clínica avaliando as respostas ao tratamento com PBT2 (Hydroxyquinoline) após 12 semanas de uso, comparando os resultados com o grupo do tratamento placebo, observaram que o grupo que recebeu PBT2 na dosagem de 250 mg apresentava uma percentagem de pacientes com melhoras significativamente maiores do que as dos grupo placebo (FAUX et al., 2010).

### **2.5.6 Inibidores das enzimas de clivagem do APP**

A Inibição da enzima de clivagem de APP do sítio  $\beta$ , a enzima  $\beta$ -secretase (BACE1), é um alvo terapêutico promissor, embora o desenvolvimento de uma terapia com inibidor de BACE1 seja problemático por duas razões: 1) BACE1 desempenha importantes papéis fisiológicos. Portanto, a inibição da enzima pode ter consequências tóxicas; 2) o local ativo de BACE1 é relativamente grande, e é improvável que muitos dos compostos volumosos que possam inibir sua atividade atravessem a barreira hematoencefálica. Muitos compostos capazes de inibir o BACE1 ainda estão na fase pré-clínica (SILVESTRI, 2009).

A inibição de alfa secretase, produzidas principalmente pelas presenilinas PSE1 e PSE2, apresentam vários outros substratos transmembranares além do APP, ocasionando efeitos adversos gastrointestinais e hematopoéticos severos, o que dificulta o avanço no desenvolvimento de inibidores de alfa secretases clinicamente úteis (WONG et al., 2004). É o caso do Semagacestat que em dois estudos clínicos de fase III precisaram ser interrompidos devido a detecção de efeitos danosos na cognição e funcionalidade em relação aos que receberam placebo (IMBIMBO; GIARDINA, 2007). Já o Tarenflubil, que desempenha papel modulador de alfa secretase também demonstrou ser completamente ineficaz para o tratamento de DA (IMBIMBO; GIARDINA, 2011).

### **2.5.7 Compostos que interferem com a deposição de Tau.**

As quinases são conhecidas por induzirem a hiperfosforilação da proteína Tau (YIANNPOULOU; KARYDAKIS; SAKKA, 2009). Apesar do grande número de sítios de fosforilação de Tau e da capacidade de múltiplas quinases para a fosforilação de locais individuais, a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 $\beta$ ) emergiu como um potencial alvo terapêutico. O composto mais estudado capaz de inibir a GSK3 é o lítio, mas vários outros compostos estão em desenvolvimento, incluindo pirazolopirazinas, pirazolopiridinas, aminotiazole e o valproato de sódio (MARTINEZ; PEREZ, 2008). Em estudos recentes o benefício do tratamento com lítio a curto prazo nos resultados cognitivos e biológicos em pessoas com MCI amnésico foi confirmado, e apoia a noção de que o lítio tem elementos que modificam a doença podendo então atuar na prevenção de DA (FORLENZA et al., 2011).

Outro composto, uma fenotiazina, o azul de metileno, demonstrou resultados promissores em teste clínico como terapia para DA, com melhorias na função cognitiva dos pacientes após 6 meses de administração, porém tendo o efeito indesejado de a urina ficar com a coloração azul (GURA, 2008).

### **2.5.8 Moléculas que previnem o dano oxidativo**

A maioria dos estudos sobre os efeitos da administração de vitaminas que possuem atividade antioxidante forneceu informações inconclusivas, demonstrando que diminuem produtos de peroxidação, mas não apresentaram efeitos positivos sobre os aspectos cognitivos ou funcionais. Nesse contexto tem-se estudos realizados com pacientes de DA, que tomaram inibidores da colinesterase e suplementos de vitamina C ou vitamina E por 1 ano, resultando em uma diminuição dos produtos de oxidação presentes no líquido céfalo raquidiano, mas não havendo diferença na cognição dos pacientes (ARLT et al., 2012).

Do mesmo modo, um tratamento de 16 semanas com uma combinação de vitamina E, vitamina C e ácido  $\alpha$ -lipoico diminuiu os níveis de estresse oxidativo no cérebro, mas surpreendentemente, esta terapia acelerou o declínio cognitivo de acordo com as pontuações do MMSE (GALASKO et al., 2012).

Por outro lado, os resultados recentes de um grande ensaio clínico demonstraram que altas doses de vitamina E (2,000 IU/dia) maiores das que foram utilizadas nos estudos citados anteriormente resultou em índices menores de declínio funcional em pacientes com DA quando comparado com o grupo placebo (DYSKEN et al., 2014).

## 2.6 Compostos fenólicos no tratamento de DA

Polifenóis constitui um dos principais compostos ativos de plantas medicinais e preparações medicinais à base de planta (HASLAM, 1998). Está claro que as ações fisiológicas e farmacológicas dos taninos muito provavelmente derivam, em partes, a características químicas que os polifenóis possuem em comum: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e habilidade de se complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Os resultados de pesquisas publicadas ilustram o papel emergente e promissor dos compostos polifenólicos como ferramentas terapêuticas em doenças neurodegenerativas, como na DA. Muitos estudos evidenciam que os polifenóis poderiam proteger os neurônios contra vários compostos tóxicos (RAMASSAMY, 2006).

A visão emergente é que os compostos polifenólicos podem exercer efeitos benéficos nas células não só através do seu potencial antioxidante, mas também através da modulação de diferentes caminhos, tais como cascatas de sinalização, processos anti-apoptóticos ou a síntese / degradação do peptídeo  $\beta$ A (LEE et al., 2005; JANG; SURH, 2003; ONO et al., 2003). Os estudos demonstram que as concentrações de polifenóis da dieta podem ser suficientemente altas *in vivo* para exibir a atividade farmacológica no cérebro (LIM et al., 2001; JOSEPH et al., 1999).

Há um grande número de caminhos e de proteínas quinases que foram relatados como alvos para compostos fenólicos demonstrando um amplo espectro de alvos e fortalecendo sua utilidade em doenças multifatoriais (CHEN et al., 2000; LEVITES et al., 2003; KOH et al., 2003). Outro ponto crucial diz respeito às consequências das interações ou ao efeito sinérgico entre diferentes compostos polifenólicos, atuando através de vários alvos intracelulares. Esses achados sugerem que diferentes caminhos podem ser o alvo de diferentes polifenóis presentes em um mesmo extrato (Tabela 2).

Estudos epidemiológicos indicam que hábitos alimentares e antioxidantes da dieta podem influenciar a incidência de DA (DESCHAMPS et al., 2001; ENGELHART et al., 2002;

LEMESHOW et al., 1998; MORRIS et al., 2002). Em um estudo acompanhado por 5 anos, entre 1991 e 1996, Commenges et al. (2000) encontraram uma associação inversa significativa entre a ingestão de flavonoides e o risco de demência. A ingestão diária média de flavonoides foi de 14,4 mg, provenientes de frutas (35,2%), vegetais (19,1%), vinho (16,9%) e chá (16,0%).

### 2.6.1 Chá Verde

O chá verde contém uma série de produtos químicos bioativos e é particularmente rico em flavonoides (GRAHAM, 1992), incluindo catequinas e seus derivados. Análises química da planta mostrou que (-)-epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) é o principal constituinte polifenólico (mais de 60% das catequinas totais), representando mais de 10% do peso seco do extrato, seguido de (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC) e (-)-epicatequina-3-O-galato (ECG) (MOYERS; KUMAR, 2004).

Estudos com extrato de chá verde demonstraram sua capacidade de inibir *in vitro* a expressão do gene pró-apoptótico Bax e a atividade de NF $\kappa$ B, que na presença de  $\beta$ A encontram-se naturalmente elevados (LEE et al., 2005). A confirmação dessa propriedade do chá verde também foi observada em camundongos onde EGCG reprimiu completamente a imunoreatividade para o gene pré apoptótico Bax (MANDEL et al., 2004).

A EGCG também é capaz de regular o processamento proteolítico do APP tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A EGCG em cultura de células pode promover a via não amiloidogênica pela regulação da alfa secretase (LEVITES et al., 2003). Em outro estudo com cultura de células primárias de ratos transgênicos para APP, o composto reduziu a formação do peptídeo  $\beta$ A (1-40 e 1-42) (REZAI-ZADEH et al., 2005). Enquanto que a EC reduziu a formação de placas  $\beta$ A (ONO et al., 2003).

Jeon et al. (2003) trataram ratos transgênicos com EGCG intraperitonealmente, e puderam concluir que sua atividade na modulação da via não amiloidogênica (alfa secretase) no cérebro foi diretamente pela ação da substância e não por um de seus metabólitos conjugados.

### 2.6.2 Blueberries

As catequinas são os principais polifenóis presente em blueberries com 378 mg/100 g de planta *in natura*, sendo que desse total a epicatequina representa de 34 a 129 mg/100 g (SELLAPPAN et al., 2002).

Pesquisas avaliando os efeitos da suplementação alimentar de ratos com extrato de blueberries demonstraram que os animais ficaram protegidos contra a perda neuronal e o declínio da função cognitiva através de diferentes vias, tais como, antioxidante, anti-apoptótico e pela regulação da sinalização celular (JOSEPH et al., 1999; GOYARZU et al., 2004; JOSEPH et al., 2003).

A suplementação dietética por 8 semanas com 2% de extrato de blueberries reverteu o déficit cognitivo no teste de performance no labirinto de água de ratos considerados velhos, com 19 meses de idade (JOSEPH et al., 1999). Esses ratos apresentaram níveis mais baixos de NFkB do que os que receberam a dieta controle, demonstrando que a atividade positiva na função cognitiva envolve mais do que suas ações antioxidantes mas provavelmente pela modulação de genes imunológicos e pró-inflamatórios (GOYARZU et al., 2004).

Joseph et al. (2003), observaram que ratos transgênicos para DA (APP/PSEN1) que receberam 2% do total da sua dieta referente a extrato de blueberries, a partir do quarto mês de vida até completar um ano de idade, apresentaram uma performance similar aos ratos não transgênicos.

### 2.6.3 Resveratrol

O principal constituinte de uvas e de vinho tinto é o resveratrol (tras-3,4,5-trihydroxystilbene) um polifenol não flavonoico, que possui estudos epidemiológicos indicando que o consumo moderado de vinho está associado com uma menor incidência de DA (TRUELSEN; THUDIUM; GROMBACK, 2002).

O resveratrol protege *in vitro* contra a toxicidade induzida pela  $\beta$ A através de sua atividade antioxidante, atenuando o acúmulo de espécies reativas do oxigênio, e impedindo a morte celular via rotas de apoptose induzida por espécies reativas de oxigênio (JANG; SURH, 2003). Além disso conseguiu reverter a toxicidade induzida pela  $\beta$ A em cultura de células primárias do hipocampo, mesmo quando o tratamento com o resveratrol só foi iniciado após duas horas de indução ao dano pelo peptídeo  $\beta$ A (HANG, 2003).

Resultados mais promissores vieram de um estudo onde conclui-se que o consumo semanal de vinho tinto estava associado a um menor risco de demência (TRUELSEN; THUDIUM; GROMBACK, 2002).

Mais recentemente Turner et al. (2015) desenvolveram um estudo clínico para avaliar o impacto do tratamento com resveratrol nos biomarcadores em pacientes com DA leve a moderada. Ao final das 52 semanas de tratamento, embora alguns biomarcadores apresentaram alterações, observou-se que o tratamento com resveratrol não alterou os níveis da  $\beta$ A42 no plasma. Já no líquido cerebrospinal, não houve alteração de  $\beta$ A42, Tau e phospho-

Tau 181. Também foram observadas inalterações no volume do hipocampo, espessura do córtex entorrinal, MMSE, CDR (avaliação da demência clínica), ADAS-cog (avaliação da escala cognitiva na DA), NPI (inventário neuropsiquiatria) ou metabolismo de glicose ou insulina. Tais achados sugerem ação a nível de sistema nervoso central, mas eles não indicam benefício aos portadores de DA.

#### 2.6.4 Curcumina

A curcumina é um composto polifenólico que apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante, e epidemiologicamente observa-se que a população asiática indiana tem uma prevalência muito menor de DA se comparada com a população americana. E que a partir de então levantou-se a possibilidade que o consumo de tal substância pudesse estar influenciando tais resultados (GANGULI et al., 2000).

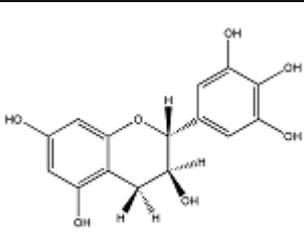
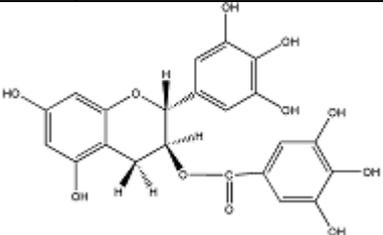
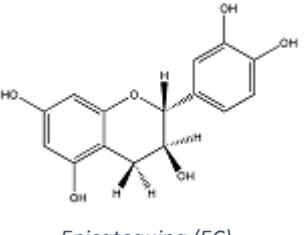
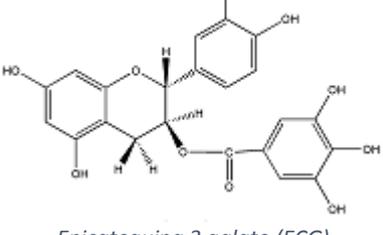
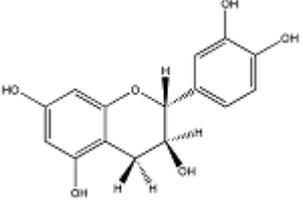
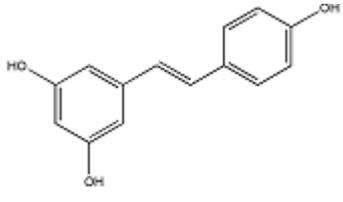
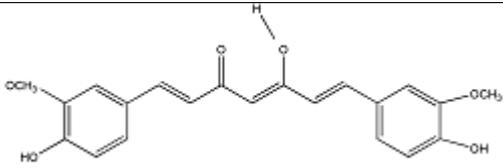
De forma a corroborar com tal achado epidemiológico Lim et al. (2001) suplementaram a dieta de ratos transgênicos APP, com baixas doses de curcumina por 6 meses, e relataram índices de inflamação e danos oxidativos menores, e esta atividade foi correlacionada a uma redução de 43 a 50% da agregação do peptídeo  $\beta$ A insolúvel. Já tratamentos com altas concentrações de curcumina preveniu o déficit de memória causado pela injeção intracerebroventricular de  $\beta$ A.

Infelizmente em pacientes com DA, a curcumina não diminuiu os índices de produtos do estresse oxidativo no CSF ou plasma, ou o nível  $\beta$ A1-40 no plasma, e não foi capaz de melhorar os resultados de teste neuropsicológico dos pacientes (RINGMAN, et al., 2012; BAUM et al., 2008).

Como sugerido por Ringman et al. (2012) a baixa biodisponibilidade do fármaco e os baixos níveis plasmáticos devido à fraca absorção do trato gastrointestinal podem ser os motivos da falta de eficácia nos estudos. Há alguma esperança de que a eficácia de curcumina possa ser melhorada através do uso de suas formas lipídicas, que se prevê que tenham uma melhor absorção em comparação com a forma não lipídica (DISILVESTRO et al. 2012). Em um estudo em voluntários saudáveis e de meia-idade, a forma lipídica de curcumina (80 mg/dia) diminuiu os níveis de  $A\beta$ 1-40 no plasma, sugerindo que outros ensaios com curcumina lipídica devem ser considerados em pacientes com DA (DISILVESTRO et al., 2012).

Outro ponto crucial em relação à atividade de plantas ricas em polifenóis, diz respeito às consequências das interações ou ao efeito sinérgico entre diferentes compostos polifenólicos, atuando através de vários alvos intracelulares. Esses achados sugerem que diferentes caminhos podem ser o alvo de diferentes polifenóis presentes em um mesmo extrato (Tabela 2) (RAMASSAMY, 2006).

Tabela 2 – Polifenóis com atividade em DA.

Polifenóis no Tratamento da Doença de Alzheimer		
Origem	Composto químico	
Chá verde	 <p><i>Epigallocatequina (EGC)</i></p>	(MOYERS; KUMAR, 2004).
	 <p><i>Epigallocatequina 3 galato (EGCG)</i></p>	
	 <p><i>Epicatequina (EC)</i></p>	
	 <p><i>Epicatequina 3 galato (ECG)</i></p>	
Blueberries	 <p><i>Epicatequina (EC)</i></p>	(SELLAPPAN et al., 2002).
Uvas Vinho tinto	 <p><i>Trans-resveratrol</i></p>	(JANG et al., 1997).
Açafrão da Terra	 <p><i>Curcumina</i></p>	(GANGULI et al., 2000).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo a identificação dos polifenóis presentes na fração aquosa de barbatimão, e avaliar a atividade desta fração em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Realizar o fracionamento da fração aquosa semipurificada utilizando método cromatográfico em coluna Sephadex LH-20.

3.2.2 Realizar análise por espectrometria de massas e de RMN das subfrações para identificar sua composição química.

3.2.3 Avaliar a citotoxicidade da fração aquosa em linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y pela técnica de MTT e Vermelho neutro

3.2.4 Avaliar a proteção da fração aquosa contra os danos induzidos pelo peptídeo  $\beta A_{25-35}$  em linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y pela técnica de MTT.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Matéria prima vegetal**

As cascas do vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram coletadas em março de 2010 no município de São Jerônimo da Serra (23°43'7,8"S; 50°45'23,5"E; 926 m altitude), estado do Paraná. Após o processo de herborização, preparou-se exsicata, com as folhas, flores e cascas, que se encontra depositada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob número (HUEM 14321). As cascas da planta foram cortadas em pedaços menores e secas à temperatura ambiente. Posteriormente ao processo de secagem, as cascas foram moídas em moinho de martelos (Tigre ASN5) originando a droga pulverizada que então foi submetida ao processo extrativo.

### **4.2 Processo extrativo**

#### **4.2.1 Extrato bruto (EB)**

O extrato bruto das cascas do barbatimão foi preparado por turboextração (Ultra-turrax UTC115KT) em concentração 1:10 (m/v) da droga pulverizada em relação ao líquido extrator acetona-água (7:3; v/v) por 20 min dividido em quatro etapas de 5 min com pausas do mesmo tempo entre cada etapa, para que a temperatura não excedesse 40 °C. Após, o extrato seguiu para o processo de filtração, e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida à 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico, seguido de congelamento e liofilização, obtendo-se o extrato bruto (EB) (MELLO, 1996a).

#### **4.2.2 Obtenção da fração aquosa (F2)**

O extrato EB (50 g) foi ressuspenso em água (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 mL/12 vezes) (MELLO, 1996a). As frações resultantes, acetato de etila (F1) e aquosa (F2) foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

### **4.3 Caracterização química do EB e F2**

#### **4.3.1. Determinação do teor de polifenóis totais (CPT)**

O CPT dos extratos foi realizado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com procedimentos de Blainski; Lopes; Mello, (2013), e todas as extrações e procedimentos

foram feitos sob o abrigo da luz.

Exatamente cerca de 25,0 mg do EB de barbatimão e da fração F2, foram dissolvidos em água em balão volumétrico de 25 mL (solução estoque). Após, 5 mL da solução estoque foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e completou o volume com água. Uma nova mistura composta por 2 mL desta solução, 1 mL do reagente 2 N Folin-Ciocalteu e 10 mL de água foram diluídos em um balão volumétrico de 25 mL com carbonato de sódio anidro a 10,15% (m/v). Após 30 min, a absorvância foi medida em 760 nm em espectrofotômetro UV- Vis, utilizando a água como branco.

Para a curva em triplicata do padrão pirogalol foram pesados 50,0 mg do composto e dissolvidos em 25 mL de água; tomaram-se alíquotas de 1,0, 1,75, 2,5, 3,25 ou 4,0 mL e foram completados para 25 mL com água. Destas soluções, alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para balão volumétrico juntamente a 1 mL do reagente 2 N Folin-Ciocalteu e 10 mL de água e diluídos para 25 mL com carbonato de sódio anidro a 10,15% (m/v) originando concentrações de 1,28, 2,24, 3,20, 4,16 ou 5,12 µg/mL of pirogalol que foram lidas em espectrofotômetro como citado para o EB e F2.

A absorção específica foi determinada a partir da equação linear. O PT expresso como pirogalol do EB e F2 foi calculado pela Equação (1):

$$PT = 1562.5 A/A^{1\%} m$$

Onde A = Absorvância da amostra para PT;  $A^{1\%}$  = Absorvância específica de pirogalol; m = massa da amostra analisada em gramas; 1562.5 = fator de diluição da amostra.

#### **4.3.2 Determinação de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE**

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Thermo® HPLC com detector de arranjo de diodos (PDA). Foi realizado um gradiente de eluição em uma coluna Phenomenex® Gemini C-18 (250 mm x 4,6 mm) com partículas de 5 µm, com pré-coluna empacotada. A fase móvel consistiu de água acidificada com ácido trifluoroacético (pH 2,5) como solvente A, e acetonitrila acidificada com ácido trifluoroacético (pH 2,5) como solvente B. Ambos os solventes passaram pelo processo de degaseificação. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/min utilizando o seguinte gradiente: 0 min 5% B; 10 min 19,3% B; 13,5 min 25% B; 23 min 38% B; 25 min 75% B; 28 min 5% B; 32 min 5%B. A leitura foi realizada por detector UV/Vis no comprimento de onda de 210 nm.

Solução amostra: foi pesado 1,0 g do extrato bruto produzido previamente, e ressuspenso em 10 mL de água ultrapura (Milli-Q-Millipore). A solução obtida foi extraída com 10 mL de acetato de etila em funil de separação de 125 mL (7 vezes). Para que houvesse a separação completa das fases, o extrato foi deixado em repouso a -18 °C durante 5 min. As

fases orgânicas foram combinadas e filtradas sob pressão reduzida, através de papel filtro com 5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se um resíduo. O resíduo foi ressuspenso em 5 mL de metanol e água (2:8; v/v) e extraído em cartucho SPE C8 (55 mm, 70 Å) em seguida eluiu-se mais 10 mL de metanol:água (2:8; v/v), o filtrado resultante foi completado com metanol:água (2:8; v/v) em balão volumétrico de 100 mL., obtendo a solução S1. Uma alíquota de 5 mL de S1 foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, e o volume completado com metanol:água (1:1; v/v) (S2). A solução S2 foi filtrada em filtro de poro de 0,45 µm, antes da injeção (seringa de 20 µL) (LOPES et al., 2009).

#### 4.4 Cromatografia em coluna (CC) da fração aquosa (F2)

A fração F2 (5,0 g) foi fracionada em CC de vidro de 51 cm de altura por 9,2 cm de diâmetro utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e como fase móvel gradiente de dioxano: água (Tabela 3).

Tabela 3- Gradiente utilizado na cromatografia em coluna de Sephadex LH20.

Volume (mL)	Fase Móvel	
	Dioxano (%)	H <sub>2</sub> O (%)
1200	3	7
1100	3,3%	6,7
1400	4	6
1500	5	5

As subfrações foram recolhidas em tubo de ensaio (10 mL cada) e o monitoramento foi realizado por CLAE de 5 em 5 tubos até o tubo de número 140 e, de 10 em 10 tubos do tubo 140 até o de número 440.

#### 4.5 Desenvolvimento de método analítico em CLAE para monitoramento das subfrações da F2

O desenvolvimento de método analítico por CLAE foi realiza em cromatógrafo Thermo® Finnigan Surveyor com detector UV 280 nm, amostrador automático Surveyor Autosampler Plus e software ChromQuest® 4.2; coluna Phenomenex® – RP 18 (250 X 4,6 mm, 4 µm) e pré-coluna Phenomenex® (Analytical Guard Cartridge System KJO-4282). Como fase móvel em proporção volumétrica, água: ácido fórmico (100:1,0), metanol: ácido fórmico (100:1,0) e isopropanol: ácido fórmico (100:1,0) com vazão de 1 mL/min, em gradiente segundo (Tabela 4).

Tabela 4 - Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 73 min. para monitoramento das subfrações originadas por CC

Tempo (min)	Fase móvel		
	Água + 1% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Metanol + 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Isopropanol+ 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	75	25	0
30	41	59	0
35	30	50	20
45	14	0	86
55	0	10	90
58	0	10	90
59	75	25	0
73	75	25	0

#### 4.6 Análises dos constituintes de extratos e frações por LC-DAD-MS

Um cromatógrafo líquido Ultra Rápido (UFLC) Shimadzu acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) e um espectrômetro de massa (MicroTOF-Q III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com ionização por eletropulverização foi usado para analisar as amostras. A coluna cromatográfica foi uma Kinetex C18 (2,6, 150, 2,1 mm, Phenomenex). A taxa de fluxo e a temperatura do forno foram de 0,3 mL/min e 50 °C, respectivamente. A fase móvel foi composta por acetonitrila (solvente B) e água ultrapura (Milli-Q; solvente A) acrescida de ácido fórmico (0,1% de ácido fórmico, v/v) e o gradiente de eluição foi o seguinte: -2 min: 3% B, 2-25 min: 3-25% B, 25-40 min: 25-80% B e 40-43 min a 80% B. As amostras foram preparadas a 1 mg/mL e 2 µL foram injetados no sistema cromatográfico. As análises de espectrometria de massa foram realizadas em modo negativo e positivo.

#### 4.7 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram realizados no equipamento Avance III HD, 500 MHz Bruker; magneto supercondutor 11.74 T, modelo 500'54 Ascend ULH; sonda multinuclear de 5mm PABBO BB/19F-1H. As amostras foram preparadas em metanol deuterado à temperatura ambiente.

#### 4.8 Avaliação da atividade protetora da fração aquosa (F2) de barbatimão em modelo de doença de Alzheimer *in vitro*.

##### 4.8.1 Linhagem celular e condições de cultura

A linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi cultivada em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, em 5 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose*) (Gibco – Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal

(Gibco – Life Technologies), 1% de solução antibiótico-antimicótico (Gibco – Life Technologies) e 3,27 g/L de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$  – Synth), sob condições de incubação de 37,0 °C em atmosfera de 5,0% de  $\text{CO}_2$ .

#### **4.8.2 Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho neutro**

A avaliação da citotoxicidade utilizando Vermelho neutro foi realizada como descrito por Borenfreund; Puerner (1985), com modificações. Na avaliação da citotoxicidade foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células por poço em placas de cultura de 96 poços, com 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. Decorrido o tempo de estabilização de 24 h à 37,0 °C em 5,0% de  $\text{CO}_2$ , o meio de cultura foi substituído pelo tratamento com a F2 (Figura 14). As placas foram incubadas por 24 e 48 h a 37,0 °C em 5,0% de  $\text{CO}_2$ . O ensaio foi realizado com sete réplicas de cada condição.

Decorrido os tempos de tratamento, o sobrenadante foi retirado e 200  $\mu\text{L}$  de solução de Vermelho neutro (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram adicionados e a placa incubada novamente em estufa umidificada com 5,0% de  $\text{CO}_2$  a 37,0 °C, por 3 h. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em  $\text{CaCl}_2$  (1%). Após cinco minutos retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de álcool ácido. A absorvância foi lida a 540 nm no leitor de microplacas (BioTek). O percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a fórmula (%) =  $(A_{\text{tratamento}}/A_{\text{CN}}) \times 100$ . Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular para normalização dos dados obtidos.

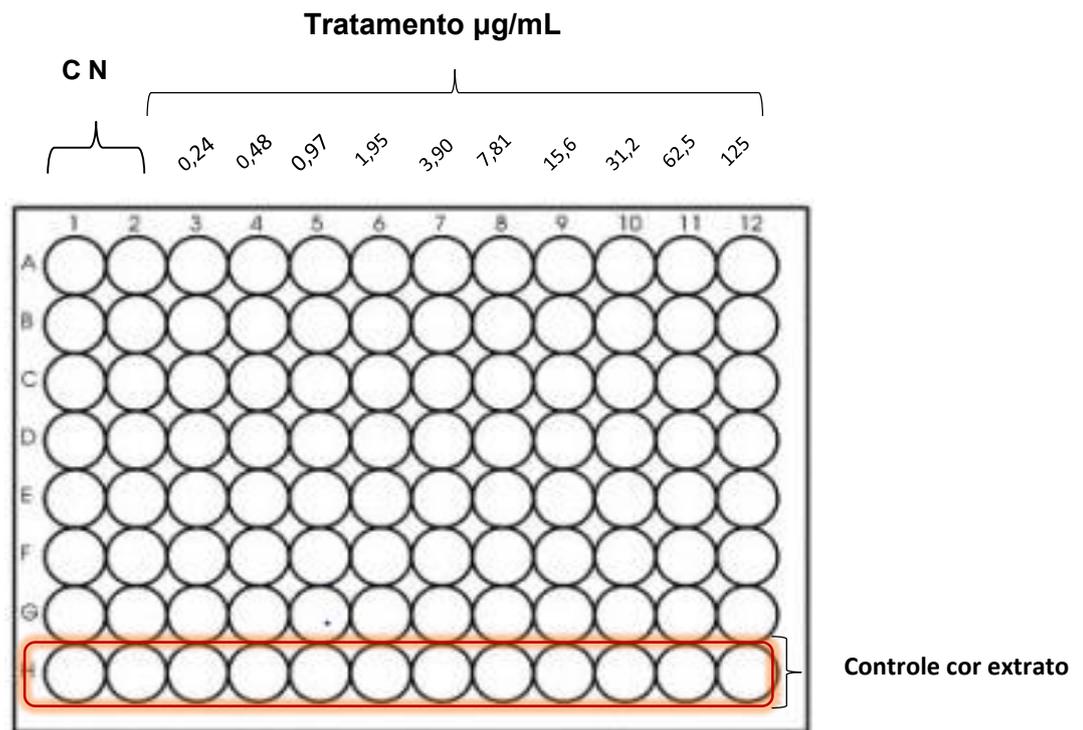


Figura 14. Avaliação da citotoxicidade da fração F2- **CN**: células e meio (DMEM); **Tratamento**: células + DMEM +  $\neq$  concentrações da fração aquosa; **Controle cor extrato**: DMEM +  $\neq$  concentrações da fração aquosa.

#### 4.8.3 Teste de MTT: citotoxicidade e proteção da F2 frente ao dano induzido pelo peptídeo $\beta A_{25-35}$ .

A avaliação da citotoxicidade e proteção celular pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi realizada como descrito por Mosmann (1983), com modificações. Na avaliação da citotoxicidade foram semeadas  $10^5$  células por poço em placas de cultura de 96 poços, com 200  $\mu$ L de meio de cultura. Decorrido o tempo de estabilização de 24 h à 37,0 °C em 5,0% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi substituído pelo mesmo esquema de tratamento realizado na técnica de avaliação de citotoxicidade por Vermelho neutro (Figura 14). As placas foram incubadas por 24 e 48 h a 37,0 °C em 5,0% de CO<sub>2</sub>. O ensaio foi realizado com sete réplicas de cada condição.

Para a avaliação da proteção da F2 do barbatimão em células de neuroblastoma humano foi utilizada as mesmas condições de cultivo, concentração e estabilização celular conforme descrito acima, e os tratamentos ocorreram conforme (Figura 15). Após 24 h de incubação das células com a fração aquosa, adicionou-se a droga indutora de danos, o fragmento  $A\beta_{25-35}$  em concentração de 10  $\mu$ M e incubou-se novamente por períodos de 24 e 48 h, em temperatura de 37,0 °C e em 5,0% de CO<sub>2</sub>.

Decorrido os períodos de 24 e 48 h, as células de ambos os tratamentos, citotoxicidade e proteção, foram incubadas por 4 h após adição de 100  $\mu$ L da solução de MTT a 0,5 mg/mL (Amresco). Para solubilização dos cristais de formazam foram utilizados 100  $\mu$ L de DMSO. A mensuração da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (BioTek) a 570 nm. O percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a fórmula (%) =  $(A_{\text{tratamento}}/A_{\text{CN}}) \times 100$ . Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular para normalização dos dados obtidos.

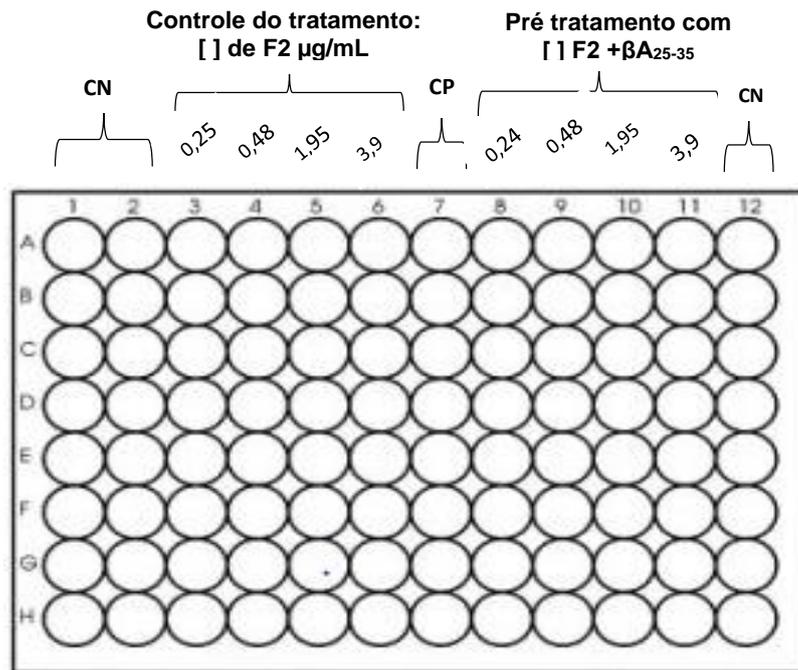


Figura 15. Proteção fração aquosa frente ao dano da proteína  $\beta$ A; **CN- Controle Negativo:** Células e meio (DEMEM); **Controle do tratamento:** células +  $\neq$  concentrações de F2 + DEMEM.; **CP- Controle Positivo:** Células +  $\beta$ A + DEMEM; **Pré tratamento com F2:** Células (previamente tratadas por 24 h com  $\neq$  concentrações de F2) +  $\beta$ A + DEMEM.

#### 4.8.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos ensaios de MTT e Vermelho neutro, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey em nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas por meio do programa estatístico *GraphPad InStat* versão 3.05.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Rendimento do EB das cascas de barbatimão e de suas frações, F1 e F2.

A partir de 700 g de droga pulverizada das cascas de barbatimão, obtiveram-se 238 g de EB. Dessa quantidade, 150 g foram utilizados na partição líquido-líquido com acetato de etila originando a F2 (118 g) com um rendimento de 78% e a F1 com (32 g) com um rendimento de 21,7% (Figura 16).

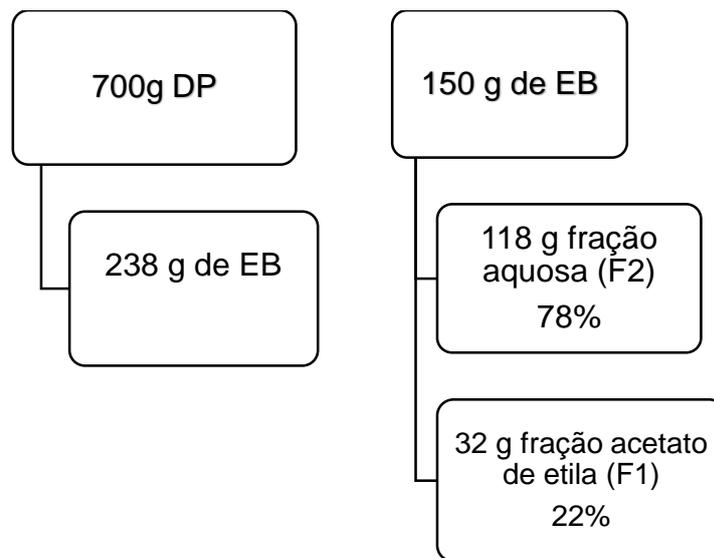


Figura 16. Rendimento extrato bruto de barbatimão e frações F1 e F2.

### 5.2 Polifenóis totais

Através do doseamento de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, obteve-se uma concentração de 33% de polifenóis totais para a F2 e de 34,8% para EB de barbatimão. Valor semelhante foi encontrado por Nascimento (2008) em extrato etanólico das cascas de barbatimão com concentração de PT de 32,6%. Já Santos Filho (2008) avaliando o teor de polifenóis em diferentes extratos de folhas de barbatimão obteve 23,93% de PT para extrato bruto etanólico e para sua fração aquosa 34,94%, e o valor obtido de PT para o extrato bruto aquoso foi de 32%.

Os polifenóis compreendem uma grande classe de compostos químicos amplamente distribuídos em plantas, e seu teor vem sendo correlacionado com a atividade antioxidante desempenhada por essas plantas. Os benefícios desses compostos estão sendo comprovados cientificamente na prevenção de diversas doenças, entre elas patologias de grande relevância como câncer e doenças neurodegenerativas (RAJBHAR, et al., 2015; Navarro et al., 2017).

### 5.3 Determinação de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A concentração de ácido gálico encontrada para o EB foi de  $30,231 \pm 2,040 \mu\text{g/g}$  e a concentração de galocatequina foi de  $89,753 \pm 6,36 \mu\text{g/g}$  de EB. De forma semelhante um extrato distinto porém produzido com droga vegetal provenientes da mesma coleta gerou um teor de ácido gálico de  $34,389 \pm 5,018 \mu\text{g/g}$  EB e de galocatequina de  $72,451 \pm 7,185 \mu\text{g/g}$  EB (dados ainda não publicados).

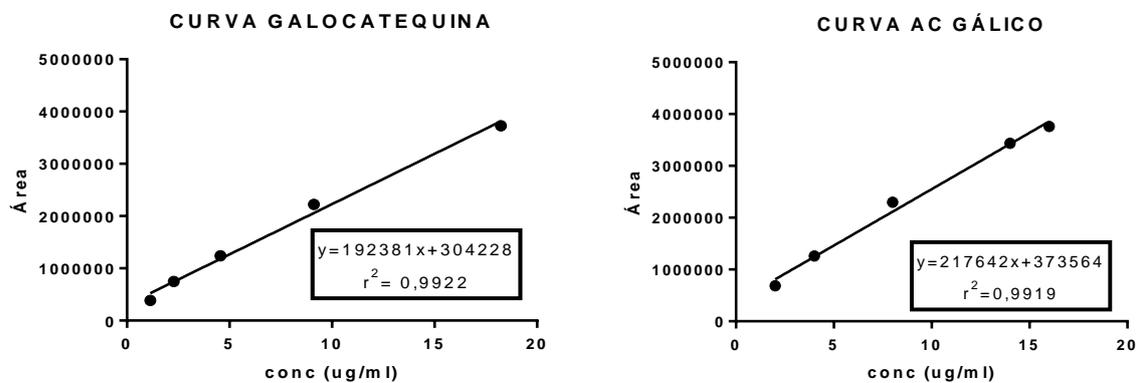


Figura 17. Curva analítica de ácido gálico e galocatequina

### 5.4 Cromatografia em coluna clássica

Para fins de isolamento da F2 do barbatimão, utilizou-se como sistema eluente um gradiente de dioxano: água partindo de uma concentração inicial (3:7; v/v) até concentração (5:5; v/v). De 5 g de F2 de barbatimão submetidas à técnica de CC em Sephadex LH-20 originaram 440 tubos contendo 10 mL de fase móvel, e o monitoramento se deu por análise em CLAE de 5 em 5 tubos até o tubo 140, e de 10 em 10 tubos, do tubo 150 até 440.

Quando analisa-se o gradiente utilizado para o fracionamento da F2 do barbatimão (3:3 até 5:5, v/v dioxano:água) percebe-se que não há a possibilidade de se trabalhar com amplitude entre as proporções de dioxano; água, possivelmente devido a uma homogeneidade nos tamanhos das substâncias presentes na fração. Diferentemente dessa característica, são os gradientes utilizados por outros autores para o isolamento de substâncias presentes em outras espécies de plantas, onde há uma amplitude entre as proporções dos solventes utilizados nos gradientes, o que provavelmente influencia na eficácia de separação das substâncias, utilizando Sephadex LH20 como fase estacionária (Hsu et al. 1985; Morimoto et al. 1986; Singhi et al. 2009). A técnica de permeação em gel foi

utilizada pela primeira vez em 1975 para o isolamento de taninos (STRUMEYER; MALIN, 1975). Com o passar do tempo diversos extratos de plantas contendo taninos foram purificados por meio dessa técnica principalmente os monômeros e dímeros de taninos condensados.

Hsu et al. (1985) isolaram da espécie *Dioscorea cirrhosa* monômeros até tetrâmeros de taninos condensados, através de sucessivos processos cromatográficos em MCI gel e Sephadex LH-20 e o monitoramento de suas subfrações foram realizadas por meio de CCD.

Morimoto et al. (1986) isolaram das cascas de *Cinnamomum cassia*, flavan-3-ol glicosilados, tetrâmero, pentâmero e hexâmero de taninos condensados, pela combinação de técnicas de permeação em gel utilizando MCI gel e Sephadex LH-20, além da técnica de adsorção em Bondapak C<sub>18</sub>, sendo que o monitoramento foi realizado por CCD e a identificação pelas análises em espectrometria de Massas e por RMN.

Recentemente Hellenbrand et al. (2015), determinaram o grau de polimerização das proantocianidinas presente nas folhas de *Hypericum perforatum* através dos métodos de permeação em gel Sephadex LH-20 com etapas posteriores de isolamento em CLAE preparativo com coluna Diol. Os autores conseguiram identificar a presença de proantocianidinas compostas por até 10 unidades monoméricas. Na etapa de isolamento por Sephadex utilizaram como fase móvel dioxano:água (7:3; v/v) e o monitoramento se deu pela técnica de CCD.

Tentou-se reproduzir a metodologia acima citada desenvolvida por Hellenbrand et al. (2015) com a fração aquosa do barbatimão, porém quando utilizaram os solventes na proporção (7:3; v/v) na CC, todas as substâncias presentes no extrato saíram com menos de 1 volume da coluna cromatográfica, talvez pelo fato de as substâncias provavelmente terem ficado fora dos poros do gel.

## 5.5 Desenvolvimento de método analítico por CLAE

Primeiramente para o desenvolvimento foi avaliado uma mistura ternária composta pela fase A: água e ácido fórmico (99:1; v/v) e B: metanol e ácido fórmico (99:1; v/v) em gradiente linear de eluição no tempo 0 composto de 95% de fase A e 5% de fase B, até 30 min com 5% de fase A e 95% de fase B e como fase estacionária coluna C18. Porém, quando esse gradiente foi testado em uma sequência de corridas com a finalidade de monitoramento das subfrações originadas por CC, a coluna analítica atingiu a pressão máxima de trabalho com o passar das horas trabalhadas.

Como a pressão de trabalho da coluna analítica aumentou de forma lenta e gradativa ao longo das horas de trabalho possivelmente pela retenção de compostos na fase

estacionária, testou-se novamente um gradiente, agora quartenário, com a adição do solvente isopropanol que apresenta maior poder de eluição, para o tipo de fase estacionária selecionada.

Sendo assim, o desenvolvimento analítico mais apropriado para fins de monitoramento das subfrações originadas por CC em Sephadex LH-20 da F2 deu-se pelo uso de metanol, água e isopropanol acidificados como fase móvel, e coluna C18 como fase estacionária. Dois gradientes com tempos de análises diferentes foram desenvolvidos, um com um poder de resolução maior porém impraticável por apresentar um tempo de análise de 155 min (Tabela 5), e um segundo gradiente de 73 min (Tabela 6) com um poder de eluição maior, devido a uma concentração maior de isopropanol na fase móvel.

Tabela 5 - Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 155 min.

Tempo (min)	Fase móvel		
	Água + 1% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Metanol + 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Isopropanol+ 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	75	25	0
30	40	60	0
35	57	43	0
90	41	59	0
95	35	45	20
115	30	20	50
145	20	15	65
146	75	25	0
155	75	25	0

Tabela 6- Gradiente de desenvolvimento por CLAE com tempo de 73 min.

Tempo (min)	Fase móvel		
	Água + 1% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Metanol + 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Isopropanol+ 1%CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	75	25	0
30	41	59	0
35	30	50	20
45	14	0	86
55	0	10	90
58	0	10	90
59	75	25	0
73	75	25	0

No entanto, na avaliação do perfil cromatográfico da F2, mesmo utilizando o gradiente com tempo de análise de 155 min não foi possível obter resolução analítica, como também foi observado um alargamento da base do pico, indicativo da complexidade da matriz vegetal (Figura 19). Provavelmente esse perfil se dá pela elevada quantidade de substâncias presentes na amostra como também pela presença de polímeros de taninos condensados, conforme já demonstrado em outros trabalhos da literatura (RODRIGUES et al., 2007; RIGAUDI et al., 1993; HELLENBRAND et al., 2015).

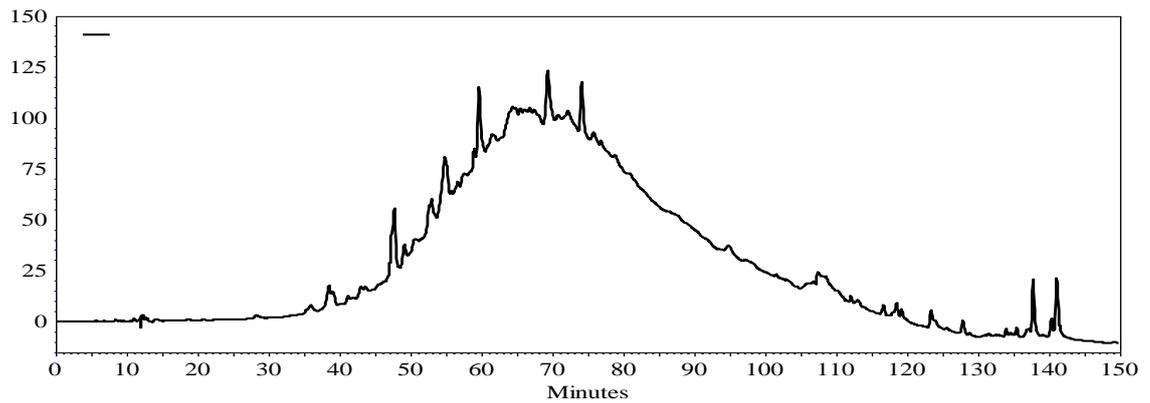


Figura 18. Perfil cromatográfico F2 demonstrando ausência de resolução em gradiente de 155 min.

Para reduzir o tempo de análise de 155 para 73 min aumentou-se a concentração de isopropanol de tal forma que o tornou predominante na fase móvel, e resultou em uma perda na qualidade de resolução, contudo gerou uma economia de solvente e de tempo, de 77 min por análise (Figura 19).

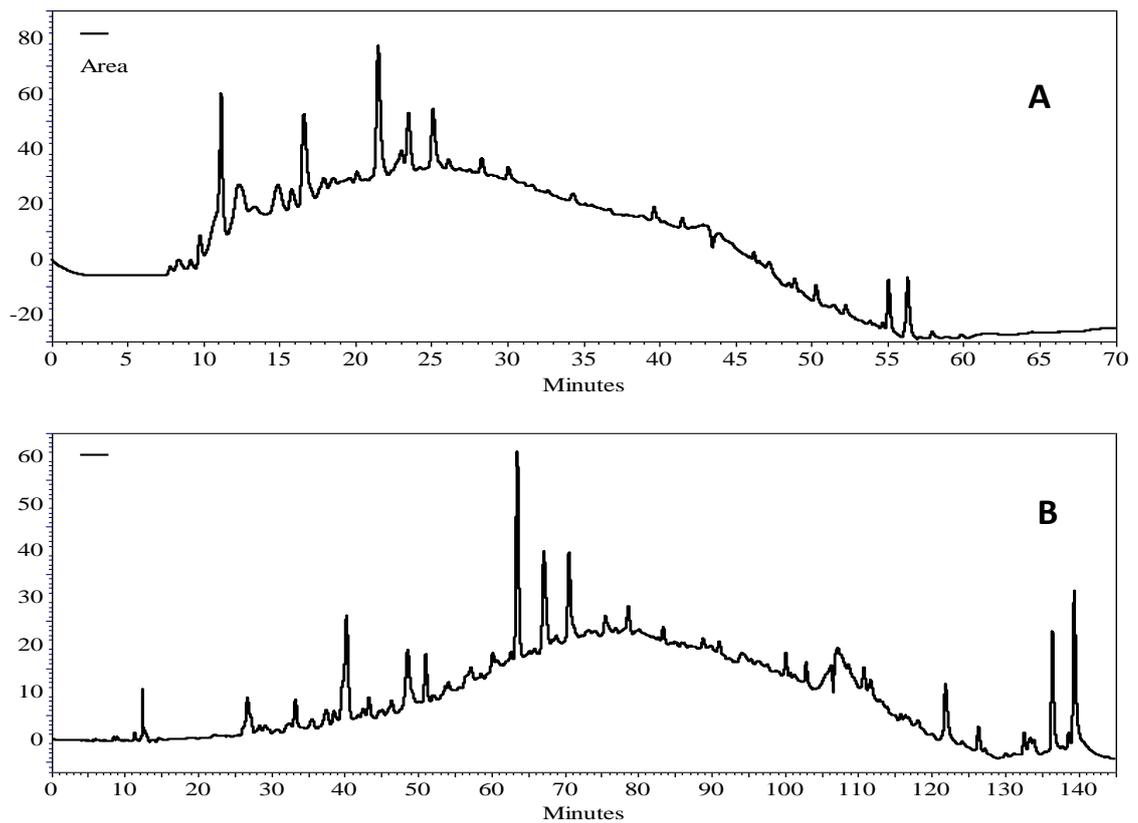


Figura 19. Perfis cromatográficos da subfração 5 da F2 em dois gradientes; **A**: gradiente de 73 min; **B**: gradiente de 155 min.

Tal proporção de isopropanol na fase móvel talvez não precisasse ser tão predominante se houvesse a possibilidade de controle de temperatura da coluna analítica, assim como outros autores o fizeram, utilizando temperatura de trabalho de 40 °C (RIGAUD

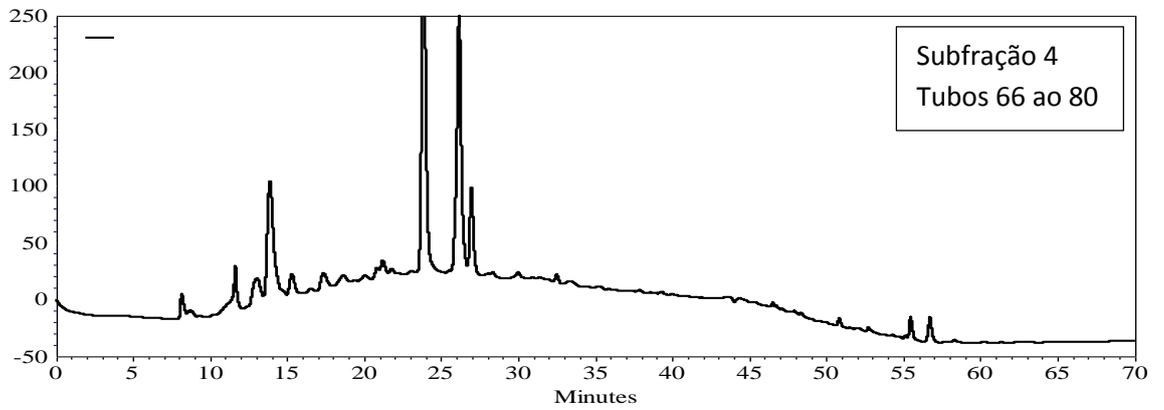
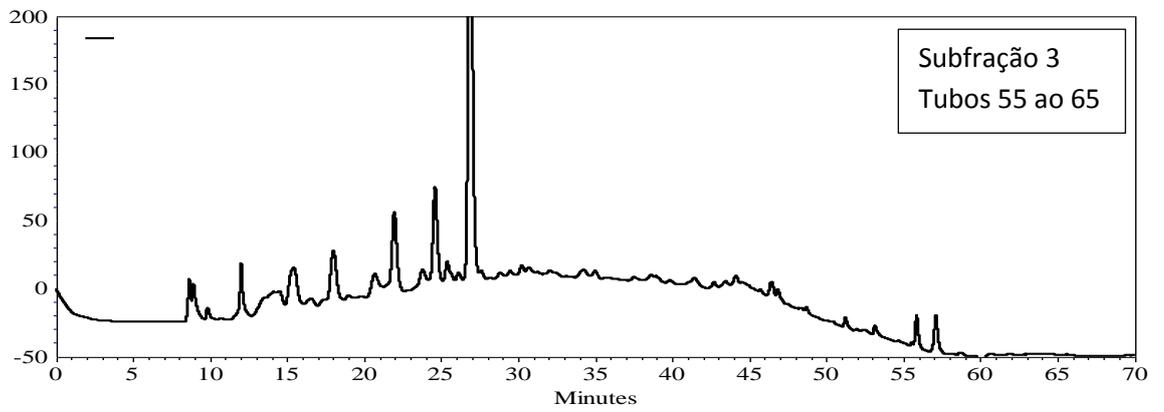
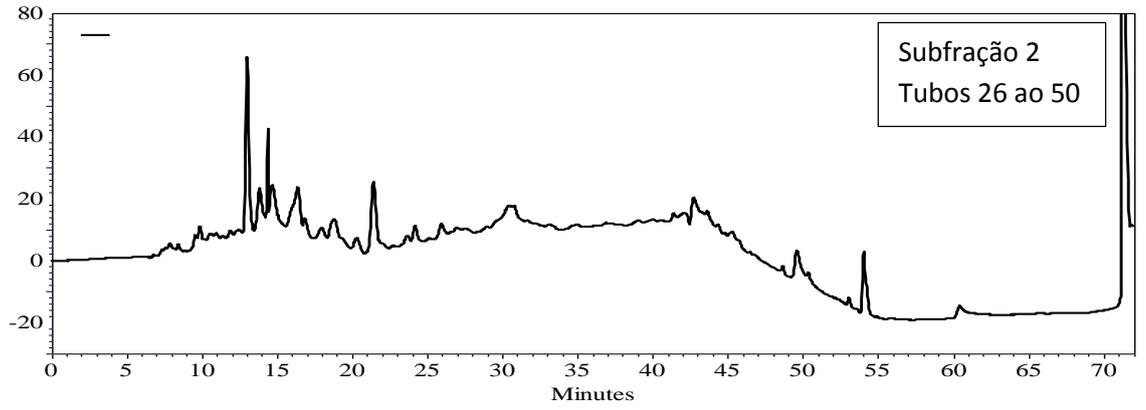
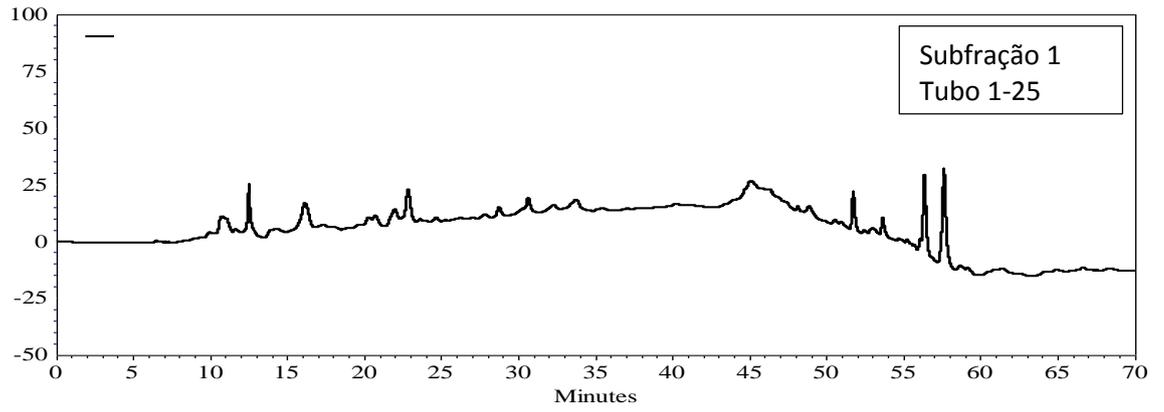
et al., 1993; HELLENBRAND et al., 2015). O controle de temperatura de coluna em CLAE em determinadas situações é fundamental, principalmente em sistemas de fase reversa onde influencia fortemente parâmetros como solubilidade, difusividade, polaridade e viscosidade da fase móvel. Em temperaturas mais elevadas, a viscosidade é reduzida e a velocidade de difusão torna-se mais elevada, fazendo com que a velocidade de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel seja aumentada e com ela o poder de eficiência, tornando possível diminuir substancialmente o tempo de análise (TEUTENBERG, 2009; LANÇAS, 2012). Outro fator interessante é que a redução da pressão pelo incremento de temperatura permite o uso de solventes de viscosidades maiores (LANÇAS, 2012).

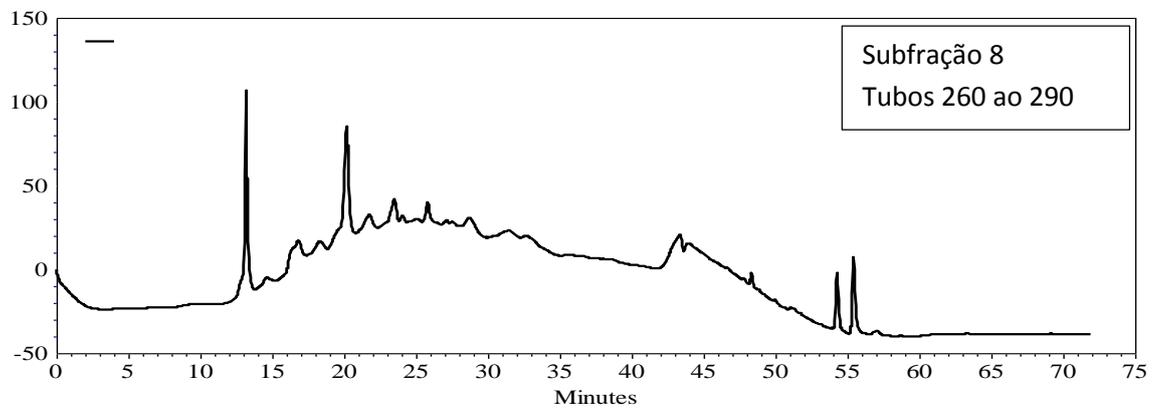
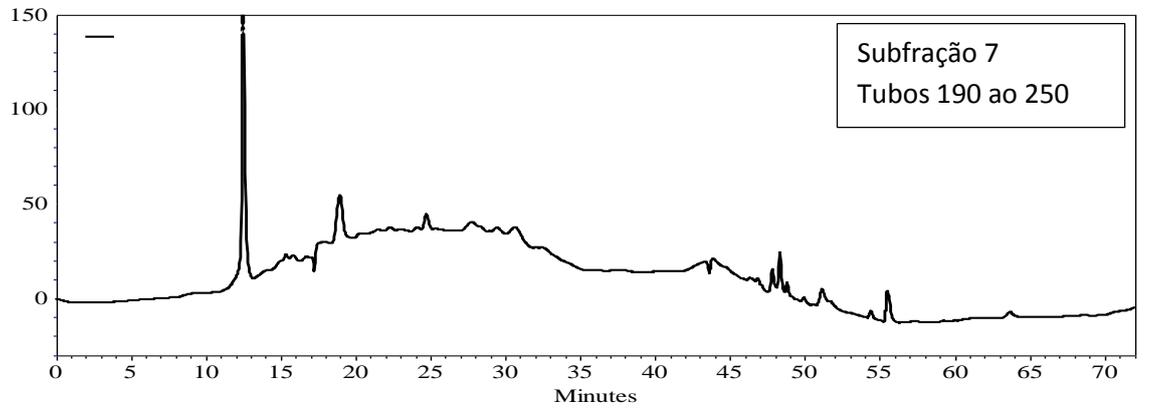
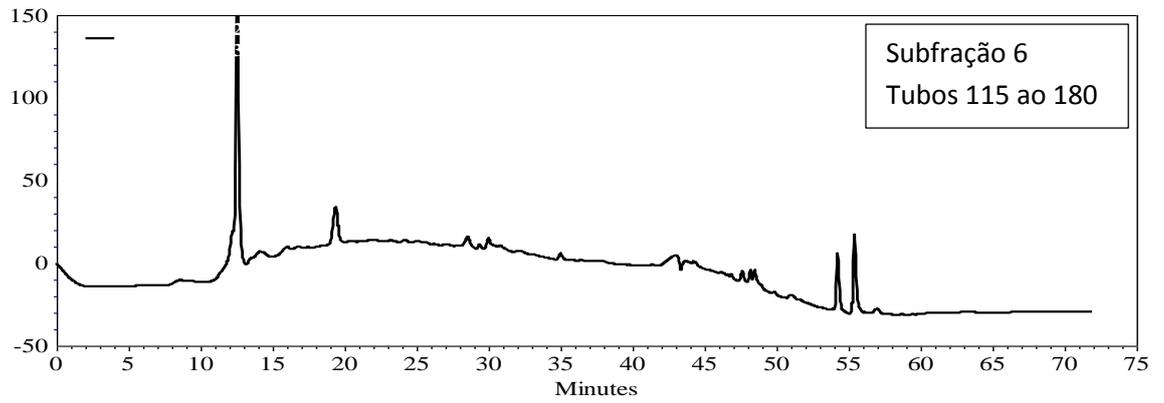
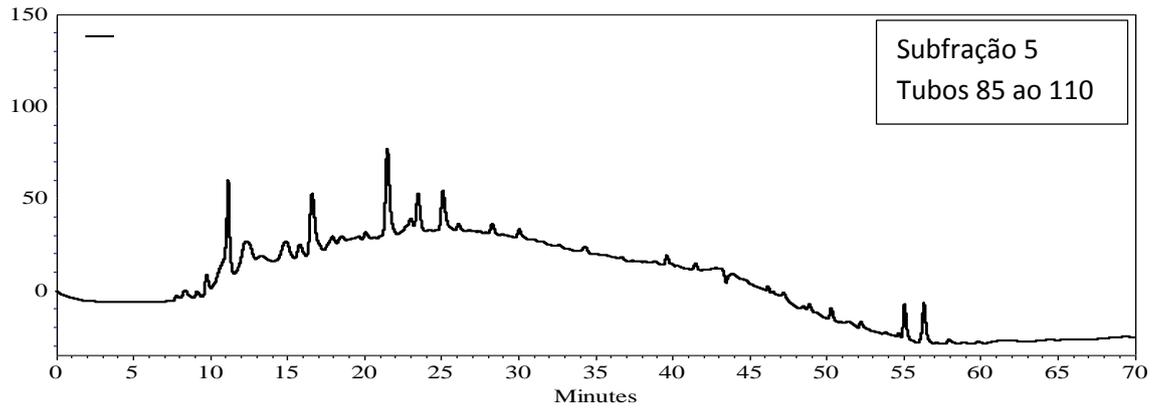
Rodrigues (2007) estudando a composição química da mangabeira, desenvolveu um método em CLAE utilizando também uma coluna do tipo fase reversa com um tempo de análise de 65 min. No entanto a falta de resolução do perfil cromatográfico como o alargamento da base do pico levou-o a separar a porção polimérica do restante das substâncias do extrato, sendo que na fração polimérica foram identificados por espectrometria de massas, trímeros e tetrâmeros, enquanto que na fração que apresentou resolução em CLAE continham monômeros e dímeros de taninos condensados.

Já Rigaudi et al. (1993) utilizaram para a análise química do extrato de cacau uma coluna do tipo fase normal, com tempo de corrida de 80 min, e na porção sem resolução analítica e com alargamento da base do pico, através da técnica de permeação em gel foi determinado a média do peso molecular desses compostos que variaram de 1900 a 9150  $\mu$ .

Mais recentemente Hellenbrand et al. (2015), mostraram que esses “morros” são compostos por cluster de procianidinas com diferentes graus de polimerização. Os autores desenvolveram dois métodos analíticos em CLAE para análise da pureza dos oligômeros e polímeros isolados, em um dos métodos utilizaram como fase estacionária coluna Luna do tipo fase reversa, e como fase móvel, água, metanol e ácido trifluoroacético. Já no segundo método utilizaram uma coluna Diol tipo fase reversa e fase móvel composta de acetonitrila e metanol/ água (95:5; v/v) ambos os métodos utilizando a coluna em temperatura de 40 °C.

Portanto sem um padrão estabelecido como a melhor forma de monitoramento de taninos condensados de alto peso molecular o monitoramento das subfrações da F2 do barbatimão, se deu então pela análise em CLAE com gradiente de 73 min, com análises de 5 em 5 tubos até o tubo 140, e de 10 em 10 tubos, do tubo 150 até 440, sendo que por semelhança cromatográfica foram reunidos, originando 12 subfrações da F2 e o perfil cromatográfico de cada subfração com a abrangência dos respectivos tubos estão dispostos na figura 20.





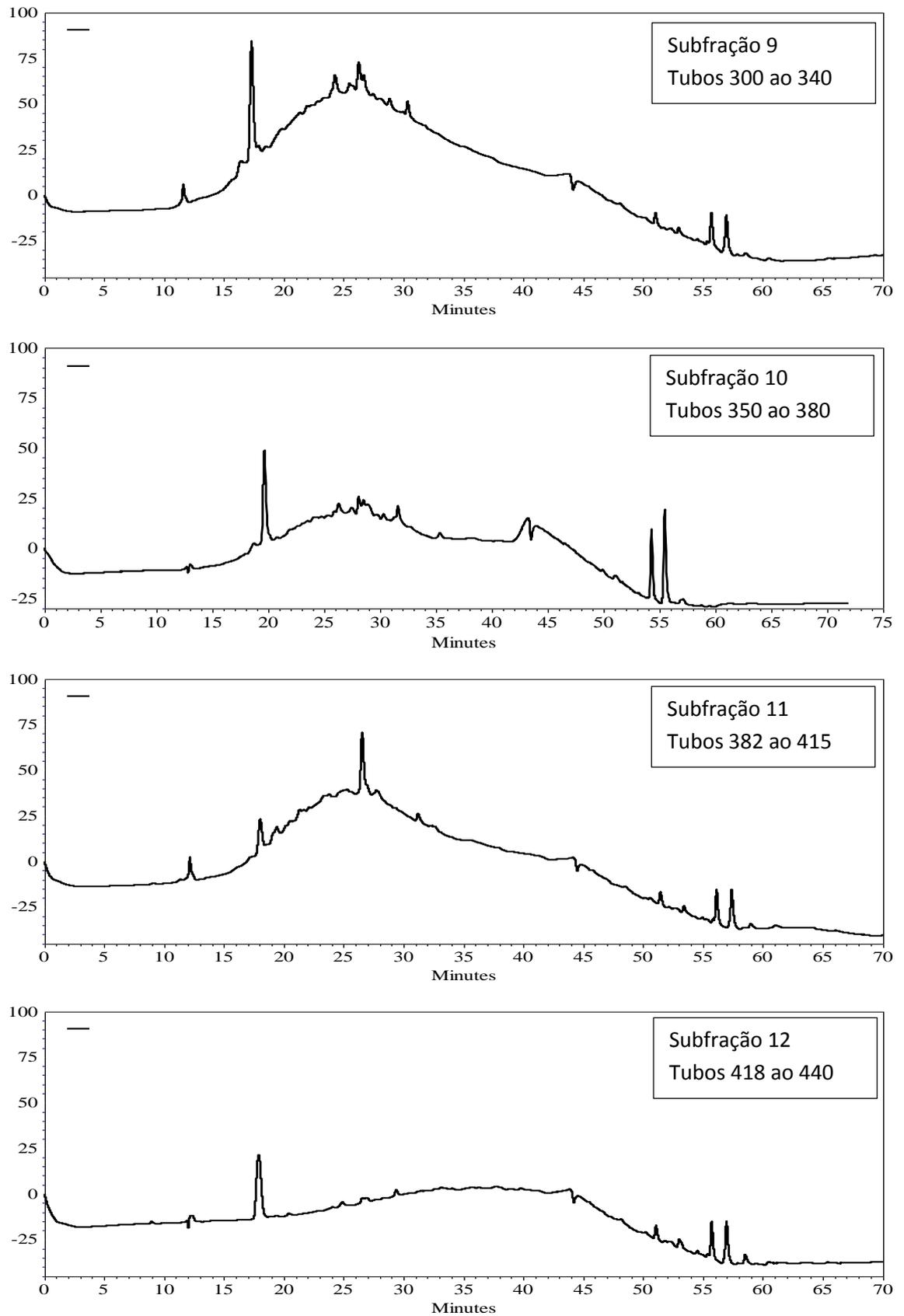


Figura 20. Perfil cromatográfico por CLAE das 12 subfrações originadas por cromatografia em coluna em Sephadex LH-20 da F2. Gradiente de eluição de 73 min. Fase móvel: água, metanol e isopropanol acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Fase estacionária: coluna analítica C18.

## 5.6 Identificação dos constituintes presentes na fração aquosa por LC-DAD-MS

Com base nos perfis cromatográficos obtidos através de análise em CLAE das subfrações originadas a partir da F2, foram selecionadas as subfrações 1, 3, 4, 5, 11 e 12 para realizar a caracterização química por espectrometria de massas.

A análise das 6 subfrações por LC-DAD-MS no modo negativo originou os cromatogramas apresentados na figura 21. O tempo de retenção dos picos, absorvância no UV, valores de íon para o modo negativo e positivo e seus fragmentos estão dispostos na tabela 7.

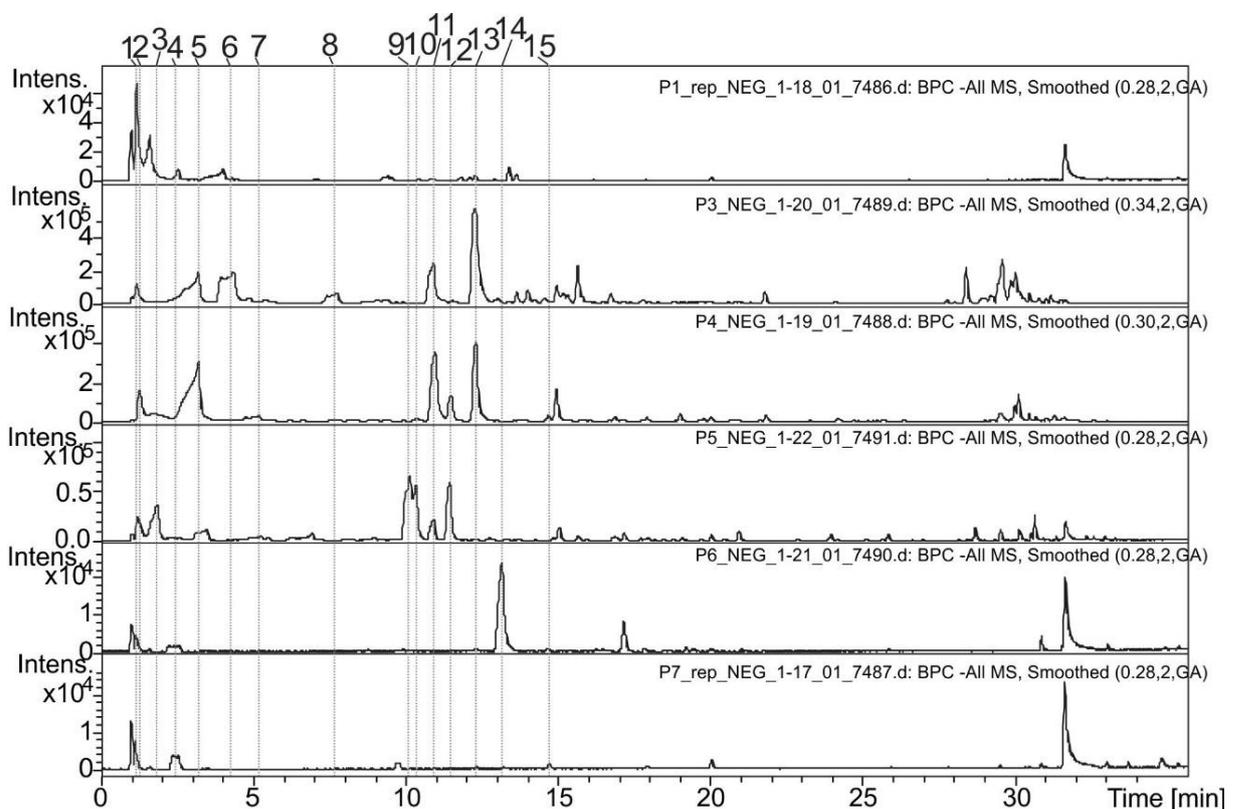


Figura 21. Cromatogramas das subfrações 1, 3, 4, 5, 11 e 12 obtidos por análise LC-DAD-MS, modo negativo.

Tabela 7- Compostos identificados nas subfrações 1, 3, 4, 5, 11 e 12, sugeridos através da análise por espectrometria de massas.

Pico	TR	Composto	UV (nm)	FM	Modo Negativo (m/z)		Modo Positivo
					[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)
1	1.2	Acido citrico	-	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0200	-	-
2	1.3	NI	275	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	331.1049	-	-
3	1.7	NI	-	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	287.0784	-	289.0930
4	2.4	Acido Galico <sup>r</sup>	278	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.0152	-	171.0284

5	3.2	Dimethoxy hydroquinona O-hexose	278	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	331.1045	169	-
6	4.3	O-hexose acido protocatecuico	313	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	315.0731	152	-
7	5.0	Dimethoxy hydroquinona O-hexose	278	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	331.1047	168, 153	333.1170
8	7.7	Derivado fenolico	280, 330 <sup>sh</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>1</sub> 4	491.1419	251, 233, 209, 191	493.1514
9	10.1	O-methyl O-hexose prorobinetinidina	280	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>1</sub> 1	465.1430	303, 166	467.1565
10	10.3	C-hexose 5,7-dihydroxychromona	256, 290, 320 <sup>sh</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0897	233, 205, 191, 163	355.1036
11	10.9	C-hexose O-pentose 5,7-dihydroxychromona	256, 295, 320 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>1</sub> 3	485.1329	353, 245, 233, 215, 205, 191	487.1444
12	11.4	C-hexosel 5,7-dihydroxychromona	257, 294, 320 <sup>sh</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0896	263, 245, 233, 205, 191	355.1021
13	12.3	C-hexose O-pentose 5,7-hihydroxychromona	256, 295, 320 <sup>sh</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>1</sub> 3	485.1330	353, 275, 275, 233, 215, 2015, 191	487.1438

Todas as 5 frações analisadas por LC-DAD-MS, apresentavam algum nível de resolução, provavelmente isso justifica o fato de não ter sido encontrado em sua composição substâncias de alto peso molecular correspondente aos polímeros de taninos condensados. No entanto, frações sem resolução também foram encaminhadas para análise por MALDI-TOF. Devido às dificuldades técnicas referentes às amostras, foram analisadas, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios, portanto aguarda-se pelos resultados de uma segunda tentativa de análise.

## 5.7 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

Através da análise de LC-DAD-MS pode-se observar pelo espectro de UV que o constituinte, cromona C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxychromone, (Figura 22) está presente em maior quantidade na subfração 3, e o espectro de RMN de carbono dessa subfração está disposto na figura 23. Os dados dos sinais de RMN de <sup>13</sup>C da subfração 3, que provavelmente correlacionam-se como sendo de uma cromona, juntamente com os dados encontrados na literatura referente a substância utilizada como referência estão descritos na tabela 8.

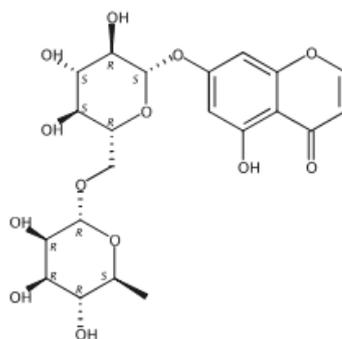


Figura 22. Exemplo de uma cromona C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxychromone: (5,7 dihydroxycromona-7-O-rutinosídeo) substância utilizada como referência para comparar os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  disponíveis na literatura com os dados obtidos da subfração 3.

Tabela 8- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração 3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para confirmação da presença de C-hexosyl O-pentosyl 5,7-dihydroxychromone.

Posição do Carbono	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) literatura*
C 2	157.6090	157.44
C3	110.0113	110.81
C4	181.42	181.59
C5	161.2309	161.27
C6	99.5485	99.39
C7	162.5470	162.64
C8	94.6962	94.58
C9	158.8531	158.08
C10	106.2645	106.59

\*(HAITAO et al., 2012)

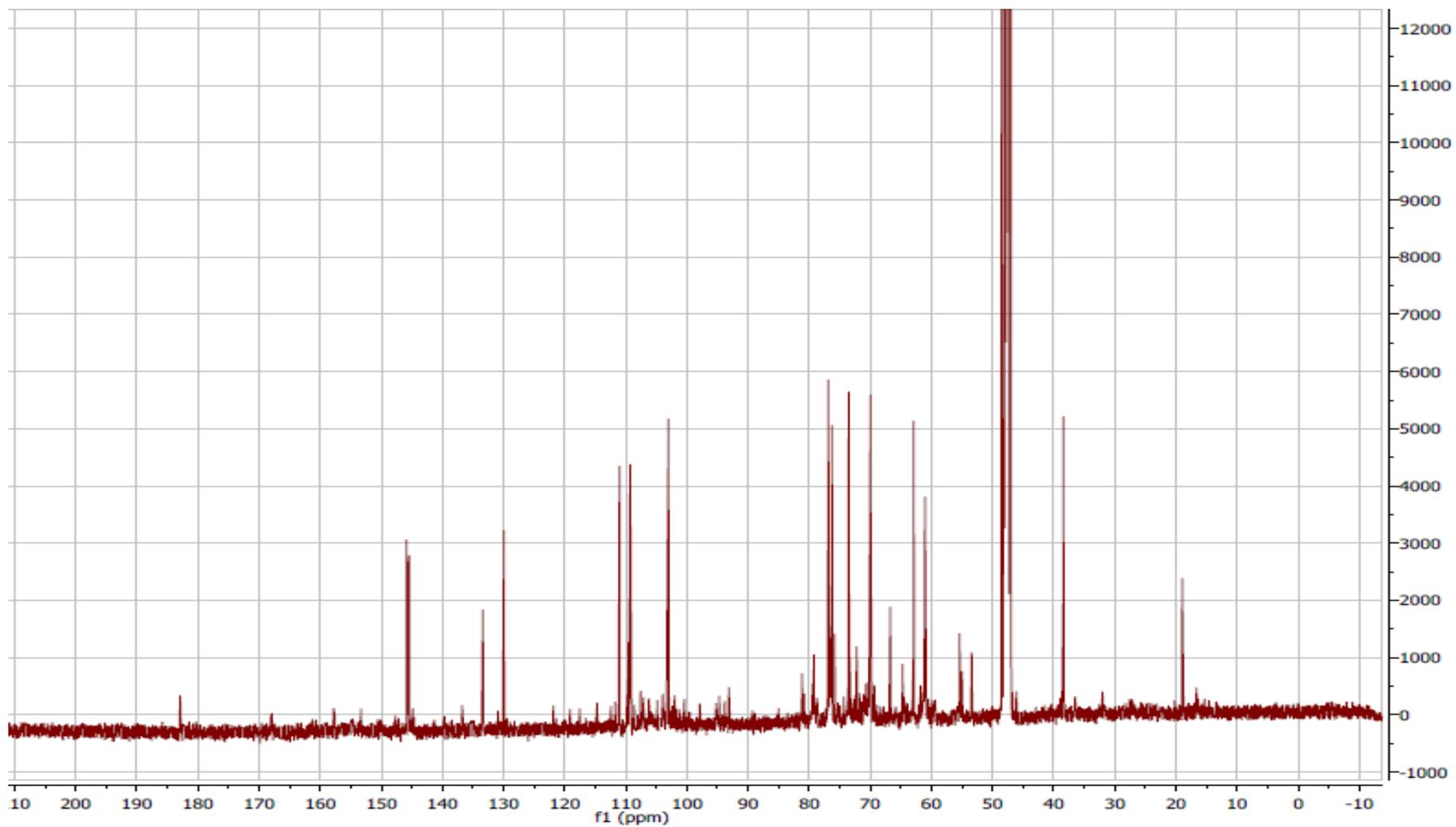


Figura 23. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da subfração 3.

### 5.8 Citotoxicidade da F2 em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y

O efeito da F2 na viabilidade de células de neuroblastoma foi avaliado primeiro pelo ensaio de MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de F2 por 24 e 48 h. Como demonstrado na figura 24, o tratamento de células SH-SY5Y com a F2 resultou numa redução significativa na viabilidade das células ( $p < 0,05$ ) a partir da concentração de 0,48  $\mu\text{g/mL}$  (91% de viabilidade) no tempo avaliado de 24 h. Já no tempo de 48 h, a menor concentração de F2 que diminuiu a viabilidade de forma significativa ( $p < 0,05$ ) foi de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  (65% de viabilidade).

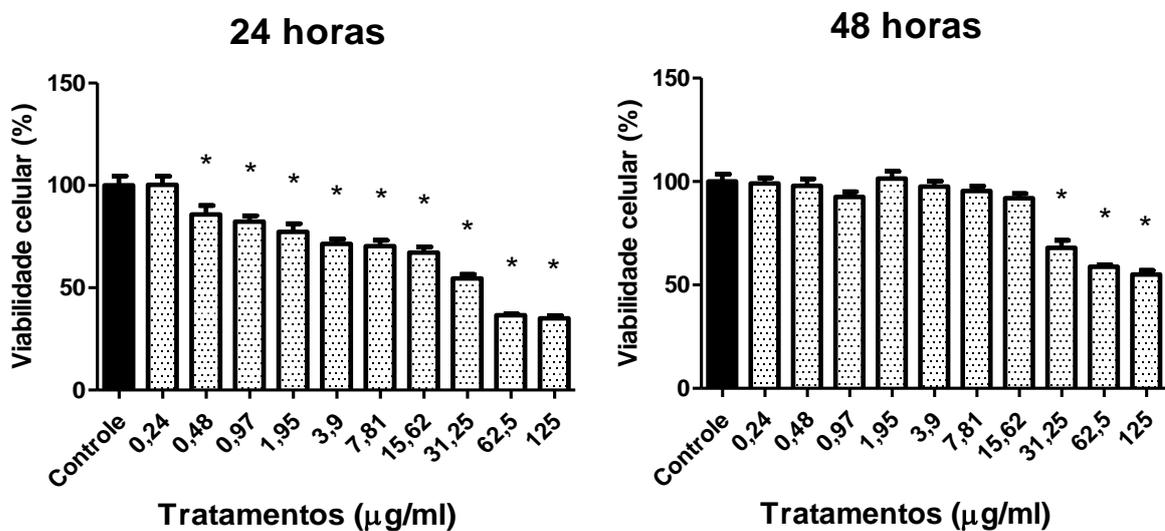


Figura 24. Avaliação da citotoxicidade de concentrações de 0,24 a 125  $\mu\text{g/mL}$  de F2 pela técnica de MTT em dois períodos de tempo, **A**: 24 h e **B**: 48 h. **Barras contendo \*** = concentrações onde houve um declínio da viabilidade estatisticamente significativa em relação ao Controle.

Já na avaliação de citotoxicidade pelo método de Vermelho neutro, pode-se observar durante o desenvolvimento da técnica que as concentrações 62,5 e 125  $\mu\text{g/mL}$  de F2 interferiram na correta avaliação da citotoxicidade (interação da F2 com o vermelho neutro), mesmo disponibilizando dos valores de controle de cor de cada concentração testada. Desta forma conforme figura 25, pode-se concluir que no tempo avaliado de 24 h a redução estatisticamente significativa da viabilidade celular, sem interferentes, ficou compreendida entre (0,97  $\mu\text{g/ml}$  com a redução da viabilidade para 64%) até a concentração de (31,25  $\mu\text{g/ml}$  reduzindo a viabilidade para 51%). Já no período de 48 h a menor concentração capaz de diminuir de forma significativa a viabilidade das células foi de (3,90  $\mu\text{g/ml}$  reduzindo a viabilidade para 84%) e a concentração de (31,25  $\mu\text{g/ml}$  com uma redução para 43%).

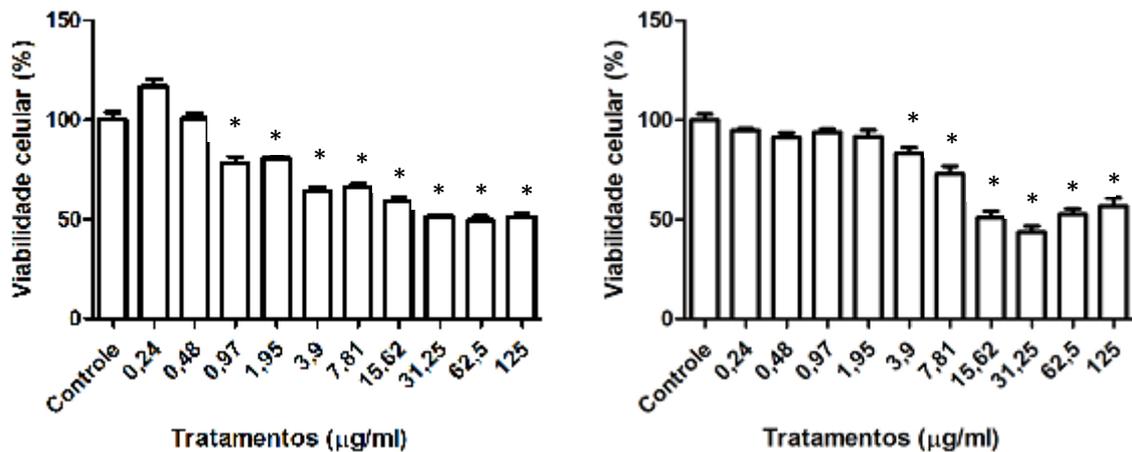


Figura 25. Avaliação da citotoxicidade de concentrações de 0,24 a 125 µg/mL de F2 pela técnica de vermelho neutro em dois períodos de tempo, **A**: 24 h e **B**: 48 h. **Barras contendo \*** = concentrações onde houve um declínio da viabilidade estatisticamente significativa em relação ao Controle.

Diferentemente desses resultados é a atividade exercida pela fração acetato de etila de barbatimão, onde foi observado uma pequena diminuição na proliferação celular somente em concentração de 1000 µg/mL, demonstrando portanto indícios de sua atoxicidade em linhagem de neuroblastoma humano *in vitro* (dados ainda não publicados).

Singhi et al. (2009), demonstraram que as proantocianidinas de até 13 unidades monoméricas presentes na Cranberry exerceram efeitos citotóxicos em células de neuroblastoma SMS-KCNR e de câncer de ovário SKOV-3, sendo que a concentração de 62 µg/mL diminuiu a viabilidade para próximo de 70% das células (SMS-KCNR) e 40% (SMS-KCNR), em um período de tratamento de 48 h. E em células de fibroblastos mesmo em concentrações de 1000 µg/mL não foi observado citotoxicidade.

Chen et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade de proantocianidinas das sementes da uva em linhagens celulares de câncer cervical, HeLa and SiHa. O tratamento das células HeLa com concentração de 40 µg/mL por 48 h reduziu a viabilidade celular para próximo de 40% e em concentração de 60 µg/mL resultou na redução de até 90% das células, efeitos muito semelhantes de diminuição na viabilidade celular foram observados para SiHa.

Ishida et al. (2009) avaliou a toxicidade do EB de barbatimão e suas frações em células Vero. As concentrações citotóxicas de 50% (CC<sub>50</sub>) para o EB foi de 150, 160 para a F1 e 125 µg/mL para F2.

Sabino et al. (2017) demonstraram que a fração aquosa de extrato aceto aquoso das folhas de barbatimão reduziu o conteúdo proteico de linhagens celulares de câncer de mama, com valores de IC<sub>50</sub> de 76,31 para células MCF-7 e 186,83 µg/mL para MDA-MB-435. Com alterações celulares morfológicas, redução e condensação nuclear além de aumentar a

expressão de genes pré-apoptóticos. No entanto, o valor de IC<sub>50</sub> para células primárias da medula óssea de ratos, não cancerosa, foi de 14,453 µg/mL.

Rebecca et al. (2002) avaliaram a toxicidade *in vivo* e observaram que o tratamento de ratos Wistar por 30 dias com o EB ocasionou toxicidade, com aumento do peso dos animais, involução do timo, e níveis elevados de glicose e de aspartil aminotransferase no plasma. Posteriormente, foi demonstrado que o EB também interferiu no metabolismo energético hepático dos animais (REBECCA et al., 2003).

Resultados de citotoxicidade da F2 também foi avaliado por Costa et al. (2010) que relataram que a fração não demonstrou atividade genotóxica e que doses inferiores a 2000 mg/kg não ocasionou a morte de animais e a DL<sub>50</sub> encontrada foi de 3015 mg/kg. Posteriormente na avaliação de sua citotoxicidade crônica por 90 dias em ratos Wistar, os resultados bioquímicos, hematológicos e histopatológicos variaram entre o sexo dos animais e a dose da droga administrada, porém segundo os autores tais alteração não apresentaram um perfil linear e as alterações estavam dentro dos limites considerados normais para a espécie do animal. Além disso, não acarretou mudança nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, sugerindo que a fração não exerceu alteração neurocomportamental nos animais (COSTA et al., 2013).

### **5.9 Proteção da F2 contra danos induzidos pela proteína $\beta$ A<sub>25-35</sub> em linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

Os resultados da avaliação do efeito protetor da fração F2 frente ao dano causado pelo peptídeo  $\beta$  amiloide<sub>25-35</sub> em linhagem celular SH-SY5Y pela técnica do MTT está representado conforme (Figura 26), onde observa-se que na avaliação da proteção da F2 pelo período de 48 h, que não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular entre o controle de células (controle negativo) e as células que receberam diferentes concentrações de F2 (E1; E2; E3; E4). E quando as células pré-tratadas com F2 foram acrescidas da droga  $\beta$ A (A1; A2; A3; A4) foi verificado uma diminuição da proliferação celular, de forma similar à do controle positivo onde as células receberam somente o peptídeo  $\beta$ A (controle positivo), demonstrando que as concentrações avaliadas de F2 não conferiram proteção à linhagem celular contra os danos gerados pela droga  $\beta$ A.

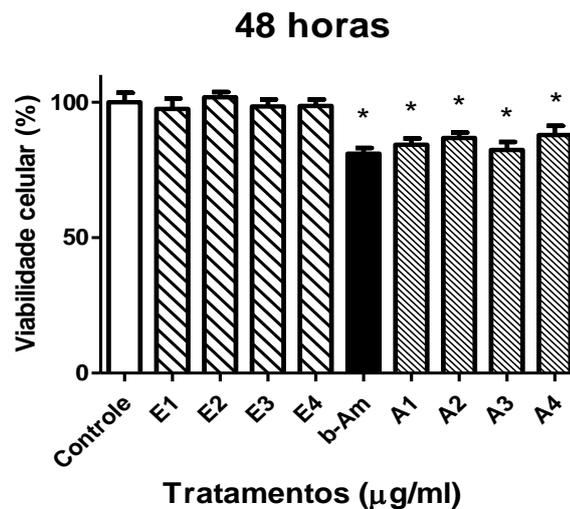


Figura 26. Avaliação da proteção F2 contra danos induzidos pelo peptídeo  $\beta A_{25-35}$ . **Controle:** (células + meio); **E1:** (células + 0,25 µg/mL de F2 + meio); **E2:** (células + 0,5 µg/mL de F2 + meio); **E3:** (células + 1,95 µg/mL de F2 + meio); **E4:** (células + 3,90 µg/mL de F2 + meio); **b- Am:** (células +  $\beta A$  + meio); **A1:** (células + 0,25 µg/mL de F2 +  $\beta A$  + meio); **A2:** (células + 0,5 µg/mL de F2 +  $\beta A$  + meio); **A3:** (células + 1,95 µg/mL de F2 +  $\beta A$  + meio); **A4:** (células + 3,90 µg/mL de F2 +  $\beta A$  + meio).

Bastianetto et al. (2006) avaliaram a ação protetora de monômeros de taninos contra a toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta A_{25-35}$  em cultura de células primária do hipocampo de ratos, concluíram que dentre as substâncias estudadas a EGCG foi a mais efetiva contra a citotoxicidade causada pela droga, além da EGCG, a ECG e o ácido gálico também protegeram as células dos danos, enquanto que a epigallocatequina e a epicatequina não desempenharam o mesmo papel. Além disso somente a EGCG, ECG e o ácido gálico inibiram eventos apoptóticos induzidos por  $\beta A_{25-35}$ .

Na mesma linha de resultados demonstraram Rezai-Zadeh et al. (2005), que a EGCG é capaz de inibir a formação do peptídeo  $\beta A$  (1-40 e 1-42), em células primárias SweAPPN2a e TgAPPsw, em dose dependente de 5 a 20 µM. Em concentrações de 20 µM reduziu a geração da  $\beta A_{1-42}$  em 61% em células SweAPPN2a e de 38% em TgAPPsw. Já na contramão desses benefícios foi a atividade exercida pela EGC e EC que promoveram a produção do peptídeo  $\beta A$  nas duas linhagens celulares, e que EGCG na presença dessas substâncias também teve sua atividade diminuída em inibir a formação do peptídeo, e igualmente menor foi a atividade do extrato de chá verde em relação a substância EGCG isolada.

Boer et al. (2006) demonstraram que ECG e EGCG estimulou SIRT1 de forma mais eficaz do que EC e EGC, uma vez que grupos galóis e catecol são essenciais para promover o reparo de dano ao DNA.

Já a fração acetato de etila de barbatimão, rica em substâncias com grupamentos galóis, quando avaliado seu efeito protetor, demonstrou proteger as células SH-SY5Y contra os danos induzidos pelo peptídeo  $\beta A_{25-35}$  no tempo de 24 h. Tal efeito protetor provavelmente

pode estar associado à inibição da expressão do gene MAPT, que codifica para a produção da proteína Tau, o qual foi demonstrado por meio da técnica de PCR (dados ainda não publicados).

## 6. Conclusão

Até o momento pode se concluir que a fração aquosa é uma matriz complexa o que dificulta o isolamento e identificação de suas substâncias.

Pelo método cromatográfico utilizado foi possível identificar uma substância por espectrometria de massas e RMN de  $^{13}\text{C}$ , como sendo a cromona C-hexosil-O-pentosil-5,7-dihidroxicromona.

Nas avaliações *in vitro* a fração aquosa demonstrou citotoxicidade mesmo em baixas concentrações e não desempenhou atividade protetora contra os danos causados pelo peptídeo  $\beta\text{A}_{25-35}$  em linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y.

## REFERÊNCIAS

- ADLARD, P.; BUSH, A. Metals and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.**, v. 10, n. (2-3), p. 145–163, 2006.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement.**, v.10, n.2, p. 47–92, 2016.
- ALVES, M. M. B. M.; ALVES JUNIOR, V. V.; LOPES, M. N. T.; CARBONARI, V. Efeito do resíduo de extrato floral de Barbatimão, em soro fisiológico, na longevidade de *Apis mellifera*. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 11, Teresina. *Anais*. Teresina, p. 325, 1996.
- ALVES, M. M. B. M.; ARBONARI, V.; ALVES JUNIOR, V. V. Efeito tóxico do barbatimão (extrato/nectário em água destilada) na longevidade de abelhas operárias *Apis mellifera* confinadas. In: Encontro de Biólogos da 1º Região do Conselho Regional de Biologi, Campo Grande. **Resumos**. Campo Grande, p. 66, 1999.
- ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodunurundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. **Cienc Rural**, v. 40, n.1, p. 200-203, 2010.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da Consulta de Produtos de Empresas-Medicamento. Disponível em: <https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisald=1011806050056>. Acesso em: 26 de janeiro de 2018.
- ANAND, R.; MESSINA, J., HARTMAN, R. Dose-response effect of rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psychopharmacol**, v. 2, n.2, p. 68–72, 2000.
- ARDISSON, L.; GODOY, J. S.; FERREIRA, L. A. M.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). **Rev Bras de Farmacogn.**, v.12, n.1, p. 27-34, 2002.
- ARLT, S.; MÜLLER-THOMSEN T.; BEISIEGEL, U.; KONTUSH, A. Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease. **Neurochem Res**, v. 37, n.12, p. 2706–2714, 2012.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P. de; NAKAMURA, C. V.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytother Res**, v.13, n.3, p. 264-266, 1999.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, C. E. M.; SANTOS, F. S.; BELLANDA, P. R.; ALVES DO PRADO, W.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; SAKURAGUI, C. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; MELLO, J. C. P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta farm Bon.**, v. 23, n.3, p. 328-333, 2004.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Appl Environ Microbiol.**, v.57, n.7, p. 2101-2103, 1991.
- BAUM, L.; LAM, C. W. K.; CHEUNG, S. K.; KWOK, T.; LUI, V.; TSOH, J.; LAM, L.; LEUNG, V.; HUI, E.; NG, C.; WOO, J.; CHIU, H. F. K.; GOGGINS, W. B.; ZEE, B. C.; CHENG, K. F.; FONG, C. Y. S.; WONG, A.; MOK, H.; CHOW, M. S. S.; HO, P. C.; IP, S. P.; HO, C. S.; YU, X. W.; LAI, C. Y. L.; CHAN, M.; SZETO, S.; CHAN, I. H. S.; MOK, V. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. **J Clin Psychopharmacol**, v. 28, n.1, p. 110–113, 2008.
- BASTIANETTO, S.; YAO, Z.; PAPADOPOULOS, V.; QUIRION, R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against b-amyloid-induced toxicity. **Eur J Neurosci**, vol. 23, n.1, p. 55–64, 2006.
- BATEMAN, R. J.; XIONG, C.; BENZINGER, T. L. S.; FAGAN, A. M.; GOATE, A.; FOX, N. C.; MARCUS, D. S.; CAIRNS, N. J.; XIE, X.; BLAZEY, T. M.; HOLTZMAN, D. M.; SANTACRUZ, A.; BUCKLES, V.; OLIVER, A.; MOULDER, K.; AISEN, P. S.; GHETTI, B.; KLUNK, W. E.; MCDADE, E.; MARTINS, R. N. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v.367, n. 9, p.795–804, 2012.
- BAUMGART, M.; SNYDER, H. M.; CARRILLO, M. C.; FAZIO, S.; KIM, H.; JOHNS, H. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. **Alzheimers Dement**, v. 11, n.6, p. 718–26, 2015.

- BENTHAM, G. Revision of the suborder Mimoseae. **Trans Lim Soc London**, v.30, n.3, p. 335-375, 1875.
- BENTHAM, G. **Notes on Mimoseae, with a synopsis of species**. Journal of Botany (Hooker), v.4, n.31, p. 318-392, 494-528, 1842.
- BEKRIS, L. M.; YU, C. E.; BIRD, T. D.; TSUANG, D. W. Genetics of Alzheimer disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 23, n.4, p. 213–27, 2010.
- BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n.5, p. 428-430, 2002.
- BERNAYS, E. A.; COOPER DRIVER, G.; BILGENER, M. Herbivores and plant tannins. **Adv Ecol Res**, v.19, p. 673-678, 1989.
- BILIKIEWICZ, A.; GAUS, W. Colostrinin (a naturally occurring, proline-rich, polypeptide mixture) in the treatment of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 6, n.1, p. 17–26, 2004.
- BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 26, n.1, 2006.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L.. **Molecules**, v. 18, n.6, p. 6852-6865, 2013.
- BOER, V. C. J.; GOFFAU, M. C.; ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H.; KEIJER, J. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. **Mech Ageing Dev**, v.127, p. 618–627, 2006.
- BORENFREUD, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult Methods**, v.9, n.1, p.7-9, 1985.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde; p. 156, 2012.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC nº 10, de 10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 52-59, 2010.
- Farmacopeia Brasileira 5ª Edição**. Brasília, DF: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. v. 2, p. 922-927, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebenson-Wiss. Technol**, v.28, p.25-30, 1995.
- BÜRGER, M. E.; AHLERT, N.; BALDISSEROTTO, B.; LANGELOH, A.; SCHIRMER, B.; FOLETTTO, R. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, v. 36, n.6, p. 296-299, 1999.
- BUTTERFIELD, D. A.; SWOMLEY, M. A.; SULTANA, R. Amyloid b-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n.8, p. 823-835, 2013.
- CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n.3, p. 975-981, 2012.
- CHEN, C.; YU, R.; OWUOR, E. D; KONG, A. N. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. **Arch Pharm Res**, v. 23, n.6, p. 605-612, 2000.
- CHEN, Q.; LIU, X, F.; ZHENG, P.S. Grape Seed Proanthocyanidins (GSPs) Inhibit the Growth of Cervical Cancer by Inducing Apoptosis Mediated by the Mitochondrial Pathway. **PloS One**, v.9, n.9, 2014.
- COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B; PONTES, E. R. J. C. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellaneda*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. **Rev Col Bras Cir**, v. 37, n.1, p. 45-51, 2010.
- COMMENGES, D.; SCOTET, V.; RENAUD, S.; JACQMIN-GADDA, H.; BARBERGER-GATEAU, P.; DARTIGUES, J. F. Intake of flavonoids and risk of dementia. **Eur J Epidemiol**, v. 16, n.4, p. 357–363, 2000.
- COSTA, M. A.; ISHIDA, K.; KAPLUM, V.; KOSLYK, E. D. D.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer- rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. **Reg Toxicol Pharmacol**, v. 58, n.2, p. 330-335, 2010.

- COSTA, M. A.; MELLO, J. C. P.; KANESHIMA, E. M.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; AUDI, E. A.; NAKAMURA, C. V. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. **Evid. Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York. p. 595-598, 1981.
- CUMMINGS, J. L.; COLE G. Alzheimer disease. **JAMA - J Am Med Assoc**, v. 287, n.18, p. 2335–2338, 2002.
- CUMMINGS, J.; FROELICH, L.; BLACK, S.E.; BAKCHINE, S.; BELLELLI, G.; MOLINUEVO, J.L.; KRESSIQ, R.W.; DOWNS, P.; CAPUTO, A.; STROHMAIER. Randomized, double-blind, parallel-group, 48-week study for efficacy and safety of a higher-dose rivastigmine patch (15 vs. 10 cm<sup>2</sup> in Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v.33, n.5, p.341–353, 2012.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochem. Rev.**, v.14, n.2, p. 299–315, 2015.
- DESCHAMPS, V.; BARBERGER-GATEAU, P.; PEUCHANT, E.; ORGOGOZO, J. M. Nutritional factors in cerebral aging and dementia: epidemiological arguments for a role of oxidative stress. **Neuroepidemiology**, v. 20, n.1, p. 7–15, 2001.
- DILVESTRO, R. A.; JOSEPH, E.; ZHAO, S.; BOMSER, J. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. **Nutrition J**, v.11, p. 79-87, 2012.
- DRAYER, B. P.; HEYMAN, A.; WILKINSON, W.; BARRETT, L.; WEINBERG, T. Early-onset Alzheimer's disease: an analysis of CT findings. **Ann Neurol**, v. 17, n.4, p. 407–410, 1985.
- DYSKEN, M. W.; SANO, M.; ASTHANA, S.; VERTREES, J. E.; PALLAKI, M.; LLORENTE, M.; LOVE, S.; SCHELLENBERG, G. D.; MCCARTEN, J. R.; MALPHURS, J.; PRIETO, S.; CHEN, P.; LORECK, D. J.; TRAPP, G.; BAKSHI, R. S.; MINTZER, J. E.; HEIDBRINK, J. L.; VIDAL-CARDONA, A.; ARROYO, L. M.; CRUZ A. R.; ZACHARIAH, S.; KOWALL, N. W.; CHOPRA, M. P.; CRAFT, S.; THIELKE, S.; TURVEY, C. L.; WOODMAN, C.; MONNELL, K. A.; GORDON, K.; TOMASKA, J.; SEGAL, Y.; PEDUZZI, P. N.; GUARINO, P. D. Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. **JAMA - J Am Med Assoc**, v. 10, n.1, p. 36–44, 2014.
- ENGELHART, M. J.; GEERLINGS, M. I.; RUITENBERG, A.; VAN SWIETEN, J. C.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C.; BRETELER, M. M. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. **JAMA - J Am Med Assoc**, v. 287, n.24, p. 3223–3229, 2002.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect**, v. 109, n.1, p. 69–75, 2001.
- FARLOW, M.; ALVA, G.; MENG, X.; OLIN, J. A 25-week, open label trial investigating rivastigmine transdermal patches with concomitant memantine in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a post hoc analysis. **Curr Med Res Opin**, v. 26, n.2, p. 263–269, 2010.
- FARLOW, M. A clinical overview of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Int Psychogeriatr.**, v.14, n.1, p. 93–126, 2002.
- FARRER, L.A.; CUPPLES, L.A.; HAINES, J.L.; HYMAN, B.; KUKULL, W.A.; MAYEUX, R.; MEYERS, R.H.; PERICOK-VANCE, M.A.; RISCH, N.; VAN DUJIP, C.M. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A metaanalysis. **JAMA - J Am Med Assoc**, v.278, n.16, p.1349–56, 1997.
- FARROW, T. F.; THIYAGESH, S. N.; WILKINSON, I. D.; PARKS, R. W.; INGRAM, L.; WOODRUFF, P. W. Fronto-temporal-lobe atrophy in early-stage Alzheimer's disease identified using an improved detection methodology. **Psychiatry Res**, v. 155, n.1, p. 11–19, 2007.
- FAUX, N.; RITCHIE, C.; GUNN, A.; REMBACH, A.; TSATSANIS, A.; BEDO, J.; HARRISON, J.; LANNFELT, L.; BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H.; INGELSSON, M.; MASTER, C.L.; TANZI, R.; CUMMINGS, J. L.; HERD, C.M.; BUSH, A. I. PBT2 rapid, improves cognition in Alzheimer's disease: additional phase II analyses. **J Alzheimers Dis**, v. 20, n.2, p. 509–516, 2010.
- FELIPE, A. M. M.; RINCÃO, V. P.; BENATI, F. J.; LINHARES, R. E. C.; GALINA, K. J.; TOLEDO, C. E. M.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n.6, p. 1092-1095, 2006.
- FELDMAN, H.; DOODY, R.; KIVIPELTO, M.; SPARKS, D.; WATERS, D.; JONES, R.; J.; SCWAM, E.; SCHINDLER, R.; HEY- HADAV, J.; DeMICCO, D. A.; BREAZNA, A. Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. **Neurology**, v. 74, n.12, p. 956–964, 2010.
- FERRI, M. G. **Plantas do Brasil: espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blucher. p. 192, 1969.

- FORERO, E. Studies in *Stryphnodendron* (Leguminosae-Mimosoideae) including two new Taxa. **Brittonia**, v. 24, p. 143-147, 1972.
- FORLENZA, O.; DINIZ, B.; RADANOVIC, M.; SANTOS, F.; TALIB, L.; GATTAZ, W. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. **Br J Psychiatry**, v. 198, n.5, p. 351–356, 2011.
- FREITAS, A. L. D.; KAPLUM, V.; ROSSI, D. C. P.; SILVA, L. B. R.; MELHEM, M. S. C.; TABORDA, C.P.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **J. Ethnopharmacol**, v.126, p. 184-190, 2018.
- FROHNE, D.; JENSEN, U. **Systematik des Pflanzenreichs**. 5 ed. Editora mbH: Stuttgart, p. 174-175, 1998.
- GALASKO, D. R.; PESKIND, E.; CLARK, C. M.; QUINN, J. F.; RINGMAN, J. M.; JICHA, G. A.; COTMAN, C.; COTTRELL, B.; MONTINE, T. J.; THOMAS, R. G.; AISEN, P. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. **Arch Neurol**, v. 69, n.7, p. 836–841, 2012.
- GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Disease modifying treatments for Alzheimer's disease. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 4, n.4, p. 203–216, 2011.
- GANGULI, M.; CHANDRA, V.; KAMBOH, M. I.; JOHNSTON, J. M.; DODGE, H. H.; THELMA, B. K.; JUYAL, R. C.; PANDAV, R.; BELLE, S. H.; DEKOSKY, S. T. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo-US Cross-National Dementia Study. **Arch. Neurol**, v.57, n.6, p. 824-830, 2000.
- GAUTHIER, S.; AISEN, P.; FERRIS, S.; SAUMIER, D.; DUONG, A.; HAINE, D.; GARCEAU, D.; SUHY, J.; OH, J.; LAU, W.; SAMPALIS, J. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. **J Nutr Health Aging**, v. 13, n.6, p. 550–557, 2009.
- GOATE, A.; HARDY, J. Twenty years of Alzheimer's disease causing mutations. **J Neurochem**, v. 120, n.1, p. 3–8, 2012.
- GOLDMAN, J. S.; HAHN, S. E.; BIRD, T. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. **Genet Med**, v. 13, n.6, p. 597–605, 2011.
- GOMES, R. T.; SANTOS, V. R.; OLIVEIRA, R. R.; CORTES, M. E.; BRANDÃO, M. G. L. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **Int J Dent**, v.8, n.1, p. 1-5, 2009.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **An Acad Bras Ciênc**, v. 66, p. 205-210, 1994.
- GOYARZU, P.; MALIN, D. H.; LAU, F. C.; TAGLIALATELA, G.; MOON, W. D.; JENNINGS, R.; MOY, E.; MOY, D.; LIPPOLD, S.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. **Nutr Neurosci**, v.7, n.2, p. 75–83, 2004.
- GRAHAM, H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev Med**, v. 21, n.3, p. 334-350, 1992.
- GREEN, R. C.; CUPPLES, L. A.; GO, R.; BENKE, K. S.; EDEKI, T.; GRIFFITH, P. A.; WILLIAMS, M.; HIPPS, Y.; GRAFF-RADFORD, N.; BACHMAN, D.; FARRER, L.A. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. **JAMA - J Am Med Assoc**, v. 287, n.3, p. 329-36, 2002.
- GRIFFIN, W. Inflammation and neurodegenerative diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n.2, p. 470–474, 2006.
- GU, Y.; NIEVES, J. W.; STERN, Y.; LUCHSINGER, J. A.; SCARMEAS, N. Food combination and Alzheimer disease risk: A protective diet. **Arch Neurol**, v.67, p. 699–706, 2010.
- GURA, T. Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. **Nat Med**, v. 14, n.9, p. 894, 2008.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n.1, p. 1-93, 2006.
- HAITAO, L.; SHANSHAN, Z.; YAODONG, Q.I.; YINGXIA, Z.; XINGBO, L.I.; BENGANG, Z. Quantitative determination of four compounds and fingerprint analysis in the rhizomes of *Drynaria fortunei*(Kunze) J. Sm. **J Nat Med**, v. 66, n.2, p. 413–419, 2012.
- HANG, M. K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. **Exp Mol Med**, v. 35, n.2, p. 136–139, 2003.
- HARDY, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. **J Neurochem**, v.110, n.4, p.1129–34, 2009.

- HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, v. 9, p. 505-560, 1975.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. **J Nat Prod**, v. 59, n.2, p. 205-215, 1996.
- HASLAM, E. **Practical polyphenols-** from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University, p. 422, 1998.
- HEBERT, L.E.; BIENIAS J.L.; AGGARWAL, N.T.; WILSON, R.S.; BENNETT, D.A.; SHAH, R.C.; EVANS, D. A. Change in risk of Alzheimer disease over time. **Neurology**, v. 75, n.9, p. 786–791, 2010.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.
- HELLENBRAND, N.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; SENDKER, J.; HENSEL, A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in the aerial parts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)\*. **Planta Med**, v 81, p. 1175–1181, 2015.
- HERNANDES, L.; PEREIRA, L. M. S.; PALAZZO, F.; MELLO, J. C. P. Wound-healing evaluation ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Braz J Pharm Sci**, v.46, n.3, p. 431-436, 2010.
- HERZOG-SOARES, J.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev Bras Farmacog**, v. 12, n.1, p. 1-2, 2002.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford University Press London, p. 149, 1978.
- HOLTZMAN, D. M.; HERZ, J.; BU, G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: Normal biology and roles in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.2, n.3, 2012.
- HOWARD, O.; MCSHANE, R.; LINDESAY, J.; RITCHIE, C.; BALDWIN, A.; BARBER, R.; ALISTAIR BURNS, A.; TOM DENING, T., FINDLAY, D.; HOLMES, C.; HUGHES, A.; ROBIN JACOBY, R.; JONES, R.; JONES, R.; MCKEITH, F. I.; MACHAROUTHU, A.; O'BRIEN, J.; PETER PASSMORE, P.; SHEEHAN, B.; JUSZCZAK, E.; KATONA, C.; HILLS, R.; KNAPP, M.; BALLARD, C.; BROWN, R.; BANERJEE, S.; ONIONS, C.; GRIFFIN, M.; ADAMS, J.; GRAY, R.; JOHNSON, T.; BENTHAM, P.; PHILLIPS, P. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 366, n.10, p. 893–903, 2012.
- HSU, F. L.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Isolation and characterization of procyanidins in *Dioscorea cirrhosa* LOUR. **Chem Pharm Bull**, v.33, n.8, p. 3293-3298, 1985.
- IMBIMBO B. P.; DEL GIUDICE, E.; COLAVITO, D.; D'ARRIGO, A.; DALLE CARBONARE, M.; VILLETTI, G.; FACCHINETTI, F.; VOLTA, R.; PIETRINI, V.; BAROC, M.F.; SERNEELS, L.; DE STROOPER, B.; LEON A. 1-(3',4'-Dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic acid (CHF5074), a novel gamma-secretase modulator, reduces brain beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease without causing peripheral toxicity. **J. Pharmacol Exp Ther**, v.323, n.3, p. 822-830, 2007.
- IMBIMBO, B. P.; GIARDINA, G. A.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n.12, p. 1555–1570, 2011.
- ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G. D.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Chemotherapy**, v. 58, n.5, p. 942-949, 2006.
- ISHIDA, K.; ROZEMAL, S.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 5, n.29, p. 29-33, 2009.
- JACK, C. R.; PETERSEN, R. C.; XU, Y. C.; O'BRIEN, P. C.; SMITH, G. E.; IVNIK, R. J.; BOEVE, B. F.; WARING, S. C.; TANGALOS, E.G.; KOKMEN, E. Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. **Neurology**, v.52, n.7, p. 1397–1403, 1999.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v.275, p.218-220, 1997
- JANG, J. H.; SURH, Y. J. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid induced oxidative PC12 cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n.8, p. 1100–1110, 2003.

- JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T. JR. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, n.18, p. 4693–4697, 1993.
- JEON, S. Y.; BAE, K.; SEONG, Y. H.; SONG, K. S. Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n.22, p. 3905–3908, 2003.
- JOSEPH, J. A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N. A.; BIELINSKI, D.; MARTIN, A.; MCEWEN, J. J.; BICKFORD, P. C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. **J Neurosci**, v. 19, n.18, p. 8114–8121, 1999.
- JOSEPH, J. A.; DENISOVA, N. A.; ARENDASH, G.; GORDON, M.; DIAMOND, D.; SHUKITTHALE, B.; MORGAN, D. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. **Nutr Neurosci**, v. 6, n.3, p. 153–162, 2003.
- KATZMAN, R. The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: A major killer. **Arch Neurol**, v. 33, n.4, p. 217–218, 1976.
- KATZMAN, R.; SAITOH, T. Advances in Alzheimer's disease. **FASEB J**, v. 5, n.3, p. 278–286, 1991.
- KEW ROYAL BOTANIC GARDENS. 2016. Acessado em 26 de janeiro de 2018. Disponível em: <https://stateoftheworldsplants.com/2016/>
- KINGSTON, D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **J Nat Prod**, v.74, n.3, p. 496–511, 2011.
- KOH, S. H.; KIM, H.; KWON, Y.; PARK, K. S.; KIM, C. W.; SONG, J.; KIM, M. H.; KIM, H. J.; YU, J. S.; HENKEL, H. K. Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 118, p. 72-81, 2003.
- KOLA I, LANDIS J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n.8, p. 711–715, 2004.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 147-155, 2005.
- KURZ, A.; PERNECZKY, R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.35, n.2, p.373–379, 2011.
- LANÇAS, F.M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p. 13-19, 2012.
- LAUTENSCHLAGER, N.T.; CUPPLES L.A.; RAO, V.S.; AUERBACH, S.A.; BECKER, R.; BURKE J. CHUI, H.; DUARA, R.; FOLEY, E.J.; GLATT, S.L.; GREEN, R. C.; JONES, R.; KARLINSK, H.; KUKULL, W. A.; KURZ, A.; LARSON, E.B.; MARTELLI, K.; SADOVINICH, A. D.; VOLICER, L.; GOWDON, J. H.; FARRER, L. A. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE Study: What is in store for the oldest old? **Neurology**, v.46, n.3, p.641–650, 1996.
- LEE, S. Y.; LEE, J. W.; LEE, H.; YOO, H. S.; YUN, Y. P.; OH, K. W.; HA, T. Y.; HONG, J. T. Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 140, p. 45–54, 2005.
- LEITE, M. A. Isolamento e identificação estrutural de polifenóis em *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) 96f. Dissertação (mestrado), Curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, Maringá. 2014.
- LEMESHOW, S.; LETENNEUR, L.; DARTIGUES, J.F.; LAFONT, S.; ORGOGOZO, J. M.; COMMENGES, D. Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. *Personnes Ages Quid*. **Am J Epidemiol**, v. 148, n.3, p. 298–306, 1998.
- LEVITES, Y.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YODIM, M. B. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. **FASEB J**, v.17, n.8, p. 952–954, 2003.
- LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew. Great Britain. p. 369, 1987.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, p.1-19, 2005
- LIM, G. P.; CHU, T.; YANG, F.; BEECH, W.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **J Neurosci**, v. 21, n.21, p. 8370–8377, 2001.
- LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; de SOUZA Jr, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phyther res**, v. 12, p. 218-220, 1998.

- LOPES, G. C.; MACHADO, F. A. V.; TOLEDO, C. E. M.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Chemotaxonomic significance of 5- deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. **Biochem Systematics and Ecol**, v. 36, n.12, p. 925-931, 2008.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; TOLEDO, C. E. M.; ISLER, A. C.; MELLO, J. C. P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Braz J Pharm Sci**, v.45, n.1, p. 35-143, 2009.
- LOPEZ, O. L. The growing burden of Alzheimer's disease. **Am J Manag Care**, v.17, n.13, p. 339-345, 2011.
- LOY, C.T.; SCHOFIELD, P.R.; TURNER, A.M.; KWOK, J.B.J. Genetics of dementia. **Lancet**, v.383, p.828-40, 2014.
- LUCENA, M. N.; MENDES, M. M.; BRANDEBURGO, M. I. H. Avaliação da estabilidade à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e sua eficácia na neutralização dos efeitos induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. **Horizonte Cient**, v.3, n.1, p. 1-29, 2009.
- LUIZ, R. L.; VILA, T. V.; MELLO, J. P. C.; NAKAMURA, C. V.; ROZENTAL, S.; ISHIDA, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n.1, p. 1-5, 2015.
- LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, p. 1-10, 2005.
- MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G.P.; CALDAS, E.F.; D. GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservation International do Brasil, Brasília, p.1-25, 2004.
- MANDEL, S.; MAOR, G.; YODIM, M. B. Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs Rapomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **J. Mol. Neurosci.**, v. 24, n.3, p. 401-416, 2004.
- MARTIUS, C.F.P. **Herbarium Florae Brasiliensis.Jena**, Velag Von Gustava Fisher. v. 20, p. 117, 1837.
- MARTINEZ, A.; PEREZ, D. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease?. **J Alzheimers Dis**, v. 15, n.2, p. 181-191, 2008.
- MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. S.; RAO, V. S. N. The acetone soluble fraction bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytother Res**, v. 16, n.5, p. 427-431, 2002.
- MCSHANE, R.; AREOSA, S. A.; MINAKARAN, N. Memantine for dementia. **Cochrane Database Syst Rev**,v. 19, n.2, 2006.
- MCDOWELL, I.; XI, G.; LINDSAY, J.; TIERNEY, M. Mapping the connections between education and dementia. **J Clin Exp Neuropsychol**, v. 29, n.2, p. 127-41, 2007.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. de S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora Vascular do Bioma Cerrado, checklist com 12.356 espécies. In: SANO, M. S.; ALMEIDA, P. S.; RIBEIRO, J. F.(Eds). **Cerrado: ecologia e flora**. Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF:Embrapa Cerrados, v.2, p. 423-442, 2008.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n.3, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n.3, p. 857-862, 1996b.
- MELLO, J. C. P. Taninos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville – Mimosaceae – barbatimão. **Caderno de Farmácia**, v.13, n.2, p.105-109,1997.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Monomeric Flavan-3-ols from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. **Planta Med**, Stuttgart, v. 59, p. A607-A607, 1993.
- MELO, J. O.; ENDO, T. H.; BERSANI-AMADO, L. E.; SVIDZINSKI, A. E.; BARONI, S.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. **Braz J Pharm Sciences**, v. 43, n.3, p. 465-469, 2007.
- MELO-SILVA, F. M.; PAULA, J. E, ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, n.6, p. 511-517, 2009.
- MENDELSON, R.; BALICK, M. J. The value of Undiscovered Pharmaceuticals in Tropical Forests. **Econ Bot**, v.49, n.2, p. 223-228, 1995.
- MINATEL, D. G.; PEREIRA, M. A. S.; CHIARATTI, T. M.; PASQUALIN, L.; OLIVEIRA, J. C. N.; COUTO, L. B.; LIA, R. C. C.; CINTRA, J. M.; BEZZON, M. F. A.; FRANCA, S. C. Estudo clínico para

- validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. **Rev Bras Med**, v.67, n.7, p. 250-256, 2010.
- MOREY, A. T.; SOUZA, F.C; SANTOS, J. P.; PEREIRA, C. A.; CARDOSO, J. D.; ALMEIDA, R. S. C.; COSTA, M. C.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n.4, p. 365-375, 2016.
- MORIMOTO, S.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Isolation and characterization of Flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark (*Cinnamomum cassia* BLUME). **Chem Pharm Bull**, v. 34, n.2, 633-642, 1986.
- MORRIS, M. C.; EVANS, D. A.; BIENIAS, J. L.; TANGNEY, C. C.; BENNETT, D.A.; AGGARWAL, N.; WILSON, R. S.; SCHERR, P. A. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. **JAMA - J Am Med Assoc**, v. 287, n.24, p. 3230–3237, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOYERS, S. B.; KUMAR, N. B. *Green tea* polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. **Nutr Rev**, v. 62, n.5, p. 204–211, 2004.
- 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. **Rev Ciênc Farm Básica Apli**, v. 33, n.2, p. 225-232, 2012.
- NAVARRO, M.; MOREIRA, I.; ARNAEZ, E.; SILVIA QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; ALVARADO, D.; MONAGAS, M.J. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. **Plants**, v.6, n.4, 2017.
- NEVES, M. do C. L. C.; JORGE NETO, J.; IFA, D. R.; FRACASSO, J. F.; SILVA, R. F. P.; LEPERA, E. Z. P. Estudos dos efeitos farmacológicos de hamamelis e barbatimão. In: Simpósio de Plantas Mediciniais Do Brasil, v. 12, 1992, Curitiba. **Resumos**, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992.
- NASCIMENTO, M. A. Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. 159f. Dissertação (mestrado), curso de pós graduação da UFMG, Belo Horizonte. 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v.79, n.3, p. 629-661, 2016.
- OCHIONI, P. Duas novas espécies para a flora do Brasil. **Rev Brasil Biol**, v. 19, n.2, p. 207-209, 1959.
- OCHIONI, E. M. L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Bot Bras**, v. 4, n.2, p.153-158, 1990.
- OCHIONI- MARTINS, E. M. Nova espécie de *Stryphnodendron* para a flora Amazônica. **Leandra**, v. 2, p. 121-123, 1972.
- OCCHIONI-MARTINS, E. M. *Stryphnodendron* Mart. Leg. Mim. As espécies do nordeste, sudeste e sul do Brasil II. **Leandra**, v. 4, p. 53-56, 1974.
- OCCHIONI-MARTINS, E. M. Nova espécie de *Stryphnodendron* para a flora do Cerrado. **Leandra**, v. 7, p. 19-21, 1977.
- OCCHIONI- MARTINS, E. M. Distribuição geográfica do gênero *Stryphnodendron* com descrição de nova espécie (Leg. Mim.). **Rev Brasil Biol**, v. 40, p. 729-732, 1980.
- OLIVEIRA, S. S.; VANZELER, M. L. A. Avaliação dos efeitos do extrato metabólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville por gavagem no ciclo estral de ratas. **Rev Eletrônica Farm**, v.8, n.1, p. 22-28, 2011.
- ONO, K.; YOSHIIKE, Y.; A. TAKASHIMA, A.; HASEGAWA,K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 87, n.1, p.172–181, 2003.
- PAULA, R. C.; SANCHEZ, E. F.; COSTA, T. R.; MARTINS, C. H. G.; PEREIRA, P. S.; LOURENÇO, M. V.; SOARES, A. M.; FULY, A. L. Antiophidian properties of plant extract against *Lachesis muta* venom. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v.16, n.2, p. 311-323, 2010.
- PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em taninos na casca e sua propriedade cicatrizante. **Rev Ciênc Farm**, Araraquara, v. 10, p. 101-106, 1998.
- PEREIRA, E. M. R.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, V. R. *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. **Planta Med**, v. 77, n.4, p. 401-404, 2011.

- PINTO, S.; BUENO, F.; PANIZZON, G.; MORAES, G.; SANTOS, P.; BAESSO, M.; LEITE- MELLO, E.; MELLO, J. C. P. *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med**, v. 81, p. 1090-1096, 2015.
- POLLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.(eds) Advances in Legume systematic, part.1. In: MABBERLEY, D.J.(ed.) **The plant- book**. Cambridge University Press, p. 320-32, 1981.
- RAJBHAR, K.; DAWDA, H.; MUKUNDAN, U. Polyphenols: Methods of extraction. **Sci. Revs. Chem. Commun**, v.5, n.1, p.1-6, 2015.
- RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **Eur J Pharmacol**, v.545, n.1, p.51-64, 2006.
- RAINA, P.; SANTAGUIDA, P., ISMAILA, A.; PATTERSON, C.; COWAN, D.; LEVINE, M.; BOOKER, L.; OREMUS, M. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. **Ann Intern Med**, v.148, n.5, p.379–397, 2008.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol**, v.39, n.2001, p. 603-613, 2001.
- REBECCA, M. A.; IWAMOTO, E. L. I.; GRESPLAN, R.; CUMAN, R. K. N.; ASSEF, S. M. C.; MELLO, J. C. P.; AMADO, C. A. B. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J Ethnopharmacol**, v. 83 (1/2), p. 101-104, 2002.
- REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; KELMER-BRACHT, A. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; MELLO, J. C. P.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicol. Lett**, v. 143, n.9, p. 55-63, 2003.
- REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 34, n.35, p. 349-357, 1992.
- REDDY, V.; ZHU, X.; PERRY, G.; SMITH, M. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 16, n.4, p. 763–774, 2009.
- REZAI-ZADEH, K.; SHYTLER, D.; SUN, N.; MORI, T.; HOU, H.; JEANNITON, D.; EHRHART, J.; TOWNSEND, K.; ZENG, J.; MORGAN, D.; HARDY, J.; TOWN, T.; TAN, J. *Green tea* epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. **J Neurosci**, v. 25, n.38, p. 8807–8814, 2005.
- RINGMAN, J.M.; FRAUTSCHY, S.A.; TENG, E.; BEGUM, A.N.; BARDENS, J.; BEIGI, M.; GYLYS, K.H.; BADMAEV, V.; HEATH, D.D.; APOSTOLOVA, L.G.; PORTER, V.; VANEK, Z.; MARSHALL, G.A.; HELLEMANN G.; SUGAR, C.; MASTERMAN, D.L.; MONTINE, T.J.; CUMMINGS, J.L.; COLE, G.M. Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. **Alzheimer's Res Ther**, v. 4, n.5, p. 4230, 2012.
- RIGAUD, J.; ESCRIBANO-BAILON, M. T.; PRIEUER, C.; SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V. Normal-phase high- performance liquid Chromatography separation of procyanidins from *cacao beans* and *grape seeds*. **J Chromatogr A**, v. 654, n.2, p. 255-260, 1993.
- RIZZINI, C. T.; HERINGER, E. E.; As espécies anãs de *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae). **Ver Brasil Biol**, v.47, p. 447-454, 1987.
- RODRIGUES, C. M. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007.197f. Tese de doutorado em Química- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP) (in Portuguese). In Comunicado técnico online ed.; EMBRAPA: Fortaleza, 2006.
- SABINO, A. P. L.; EUSTÁQUIO, L. M. S.; MIRANDA, A. C. F.; BIOJONE, C.; MARIOSA, T. N.; GOUVÊA, C. M. C. P. *Stryphnodendron adstringens* ("Barbatimão") leaf fraction: chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity towards human breast cancer cell lines. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 1-15, 2017.
- SADOWSKY, C. H.; GALVIN, J. E. Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. **J Am Board Fam Med**, v. 25, n.3, p. 350–366, 2012.
- SALLOWAY, S.; SPERLING, R.; KEREN, A. P.; PORSTEINSSON, C. H.; VAN DYCK, P. N.; TARIOT, S.; GILMAN, D.; ARNOLD, S.; ABUSHAKRA, C.; HERNANDEZ, G.; CRANS, E.; LIANG, G.; QUINN, M.; BAIRU, A.; PASTRAK, J. M.; CEDARBAUM, R.; SPERLING, R.; KEREN, A. P.; PORSTEINSSON, C.H.; VAN DYCK, P.N.; TARIOT, S.; GILMAN, D.; ARNOLD, S.; ABUSHAKRA, C.; HERNANDEZ, G.; CRANS, E.; LIANG, G.; QUINN, M.; BAIRU, A.; PASTRAK, J. M.; CEDARBAUM. ELND005-AD201 Investigators (2011) A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. **Neurology**, v. 77, n.13, p.1253–1262, 2011.

- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS F. B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, n.1, p. 101-107, 2005.
- SANTA-MARIA, I.; HERNÁNDEZ, F.; DEL RIO, J. MORENO, F.; AVILA, J. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of Tau. **Mol Neurodegener**, v. 6, p. 2-17, 2007.
- SANTOS FILHO, P.R. Ffeito de extratos de folhas de barbatimão sobre o dano oxidativo e a genotoxicidade induzida por ciclofosfamida 41f. Dissertação (mestrado), Curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL, Belo Horizonte, 2008.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. 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**. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.24, p. 615-56, 2007.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J Sci Food Agric**, v. 80, n.7, p.1094-1117, 2000.
- SAUNDERS, A.M.; STRITTMATTER, W.J.; SCHMECHEL, D.; GEORGE-HYSLOP, P.H.; PERICAK-VANCE, M.A.; JOO, S.H.; ROSI, B.L.; GUSILLA, J.F.; CRAPPER- MAC-LACHLAN, D.R.; ALBERTS, M.J. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. **Neurology**, v.43, n.8, p.1467–72, 1993.
- SCANNELL, J.W.; BLANCKLEY, A.; BOLDON, H.; WARRINGTON, B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n.3, p. 191–200, 2012.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.15, p.371-400, 2007.
- SCHEUNER, D.; ECKMAN, C.; JENSEN, M.; SONG, X.; CITRON, M.; SUZUKI, N.; BIRD, T. D.; HARDY, J.; HUTTON, M.; KUKULL, W.; LARSON, E.; LEVY-LAHAD, E.; VIITANEN, M.; PESKIND, E.; POORKAJ, P.; SCHELLENBERG, G.; TANZI, R.; WASCO, W.; LANNFELT, L.; SELKOE, D.; YOUNKIN, S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 2, n.8, p. 864–870, 1996.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para ciências da saúde**.1 ed. São Paulo: Manole, p.386, 2002.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **J Agric Food Chem**, v. 50, n.8, p. 2432–2438, 2002.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n.2, p. 741–766, 2001.
- SILVA, L. F.; SILVA, J. A.; LIMA, C. R. O.; DAMBROS, C. E.; CARDOSO, V. S. Uso popular do Barbatimão In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I (Eds), **Manual do barbatimão**, Ed. Kelps, Goiânia, p. 81, 2010a.
- SILVESTRI, R. Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Med Res Rev**, v. 29, n.2, p. 295–338, 2009.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 299, p.152-178, 1999.
- SINGH, A. P.; RAKESH K. SINGH, R.K.; KIM, K.K.; SATYAN, K.S.; NUSSBAUM, R.; TORRES, M.; BRARD, L.; VORSA, N. Cranberry Proanthocyanidins are Cytotoxic to Human Cancer Cells and Sensitize Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells to Paraplatin, **Phytother Res**. v. 23, n.8, p.1066–1074, 2009.
- SMALL, B. J.; FRATIGLIONI, L.; BACKMAN, L. Canaries in a coal mine: cognitive markers of preclinical Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, n.9, p.859–860, 2001.
- SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade antiséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Braz J Pharmacogn**, v. 17, n.1, p. 71-75, 2007a.
- SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R., Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities in the bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **J Bas Appl Pharm Sci**, v. 28, n.2, p. 221-226, 2007b.

- SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amilase and  $\beta$ -glucosidase by plants extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Med**, v. 78, n.4, p. 393-399, 2012b.
- SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Rev Odonto Ciênc**, v. 23, n.2, p.141-144, 2008.
- SOUSA, N. C.; CARVALHO, S.; SPANÓ, M. A.; GRAF, U., Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ Mol Mutagen**, v. 41, n.4, p. 293-299, 2003.
- SPINNEY, L. Alzheimer's disease: The forgetting gene. **Nature**, v.8, p. 510-526, 2014.
- STRUMEYER, D. H.; MALI, M.J. Condensed tannins in grain sorghum: Isolation, fractionation and Characterization. **J. Agric.Food Chem**, v.23, n.5, p. 909-914, 1975.
- SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.**, v.14, n.4, p. 263- 269, 2012.
- THE PLANT LIST, 2018. Acessado em 26 de janeiro de 2018. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Stryphnodendron>
- THE PLANT LIST, 2018. Acessado em 26 de janeiro de 2018. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Leguminosae/>
- TEUTENBERG, T. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. **Anal Chim Acta**, v. 643, p. 1-12, 2009.
- TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae. 92f. Dissertação (mestrado), Curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara. 2002.
- TRUELSEN, T.; THUDIUM, D.; GRONBAEK, M. Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. **Neurology**, v. 59, n.9, p. 1313–1319, 2002.
- TURNER, R. S.; THOMAS, R. G.; CRAFT, S.; DYCK, C. H.; MINTZER, J.; REYNOLDS, B. A.; BREWER, J. B.; RISSMAN, R. A.; RAMAN, R.; AISEN, P. S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v.85, n.16, p.1383-1391, 2015.
- TURSCH, B.; TURSH, E.; HARRISON, I. T.; BRAZÃO da SILVA, G. B. C. T.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B. MORS, W. B.; DJERASSI, C. Terpenoides. LIII. Demonstration of ring conformation changes in triterpenes of the  $\beta$ - amyrin class isolated from *Stryphnodendron coriaceum*. **J Org Chem**, Washington, v. 28, p. 2390- 2394, 1963.
- TURSCH, B.; DALOZE, D.; TURSCH, E.; CHIURDOGLU, G. Triterpenes II (\*). Les sapogenines J et L de *Stryphnodendron coriaceum*. **Bull Soc Chim Belges**, v. 75, p. 26-28, 1966.
- VASSAR, R.; BENNETT, B. D.; BABU-KHAN, S.; KAHN, S.; MENDIAZ, E. A.; DENIS, P.; TELOW, D. B.; ROSS, S.; AMARANTE, P.; LOELOFF, R.; LUO, Y.; FISHER, S.; FULLER, J.; EDENSON, S.; LILE, J.; JAROSINSKI, M. A.; BIERE, A. L.; CURRAN, E.; BURGESS, T.; LOUIS, J. C.; COLLINS, F.; TREANOR, J.; ROGERS, G.; CITRON, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science**, v. 286, p.735–741, 1999.
- VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **J Adv Pharm Tech Res**, v. 3, n.4, p. 200-201, 2012
- VERPOORTE, R. Evidence Based Medicine, A need for paradigm Shift! In: Muklerjee, .P.K. Evidence Based Validation of Herbal Medicine, 1ed. Elsevier, p.13, 2015.
- VETRIVEL, K. S, ZHANG, Y. W.; XU, H.; THINAKARAN, G. Pathological and physiological functions of presenilins. **Mol Neurodegener**, v. 1, n.4, p.1-12, 2006.
- VICENTE, R. A.; LEITE, E.; SILVA, V. R.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; BEDIN, V. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of a cream containing the *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville bark extract for suppressing terminal hair growth. **JEAD**, v. 23, n.4, p. 410-414, 2009.
- VIEIRA, F. C.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P.de. Cicatrização cutânea em feridas de ratos após aplicação tópica de pomadas de barbatimão e nebacetin. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Departamento de Psicobiologia e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina, p. 188, 1998.
- VILLEMAGNE, V. L.; BURNHAM, S.; BOURGEAT, P.; BROWN, B.; ELLIS, K. A.; SALVADO, O.; SZOEKE, C.; MACAULAY, L. S.; MARTINS, R.; MARUFF, P.; AMES, D.; ROWE, C. C.; MASTERS, L. C. Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. **Lancet Neurol**, v. 12, n.4, p. 357–367, 2013.

- VINALD, M. C.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; JUNIOR, R. S. L.; BEZERRA, J. C. B. Avaliação da atividade de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* ssp. sobre miracídios e cercarias de *Schistosoma mansoni*. **Rev Patol Trop**, v.34, n.2, p. 137-143, 2005.
- VLASSENKO, A. G.; BENZINGER, T. L.; MORRIS, J. C., PET amyloidbeta imaging in preclinical Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n.3, p. 370–379, 2012.
- WARD, A.; TARDIFF, S.; DYE, C.; ARRIGHI, H. M. Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: A systematic review of the literature. **Dement Geriatr Cogn Dis Extra**, v. 3, n.1, p. 320–332, 2013.
- WIMO, A.; PRINCE M. World Alzheimer Report 2010: The global economic impact of dementia. (London: Alzheimer's Disease International), p.1-56, 2010.
- WONG, G.; MANFRA, D.; POULET, F.; ZHANG, Q.; JOSIEN, H.; BARA, T. Chronic treatment with the  $\gamma$ -secretase inhibitor LY-411,575 inhibit  $\beta$ -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 279, n.13, p.12876–12882, 2004.
- YIANNOPOULOU, K.; KARYDAKIS, K.; SAKKA, P. Therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Prim Psychiatry**, v.16, p. 29–36, 2009.
- YOKOSUKA, A.; KAWAKAMI, S.; HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y. Seven new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. **Phytochem. Lett**, v.4, n.3, p.259-266, 2011.
- YOKOSUKA, A.; KAWAKAMI, S.; HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y. Stryphnosides A-F, six new triterpeneglycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. **Tetrahedron**, v.64, p. 1474-1481, 2008.
- YOKOSUKA, A.; OKOBE, G.; TATSURO, S.; MIMAKI, J. Stryphnosides G-P, 10 new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. **Carbohydr Res.**,v. 434, p. 18-26, 2016.
- ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n.4, p. 1085-1113, 2015.
- ZHANG, H.; MA, Q.; ZHANG, Y.; XU, H. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. **J Neurochem**, v.120, n.1, p. 9-21, 2012.
- ZHENG, H.; KOO, E.H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. **Mol Neurodegener** v.1, n.5, p. 1-12, 2006.
- ZOCOLER, A. M. D.; SANCHES, A. C. C.; ALBRECHT, I.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Braz J Pharm Sci.**, v. 45, n.3, p. 443-452, 2009.