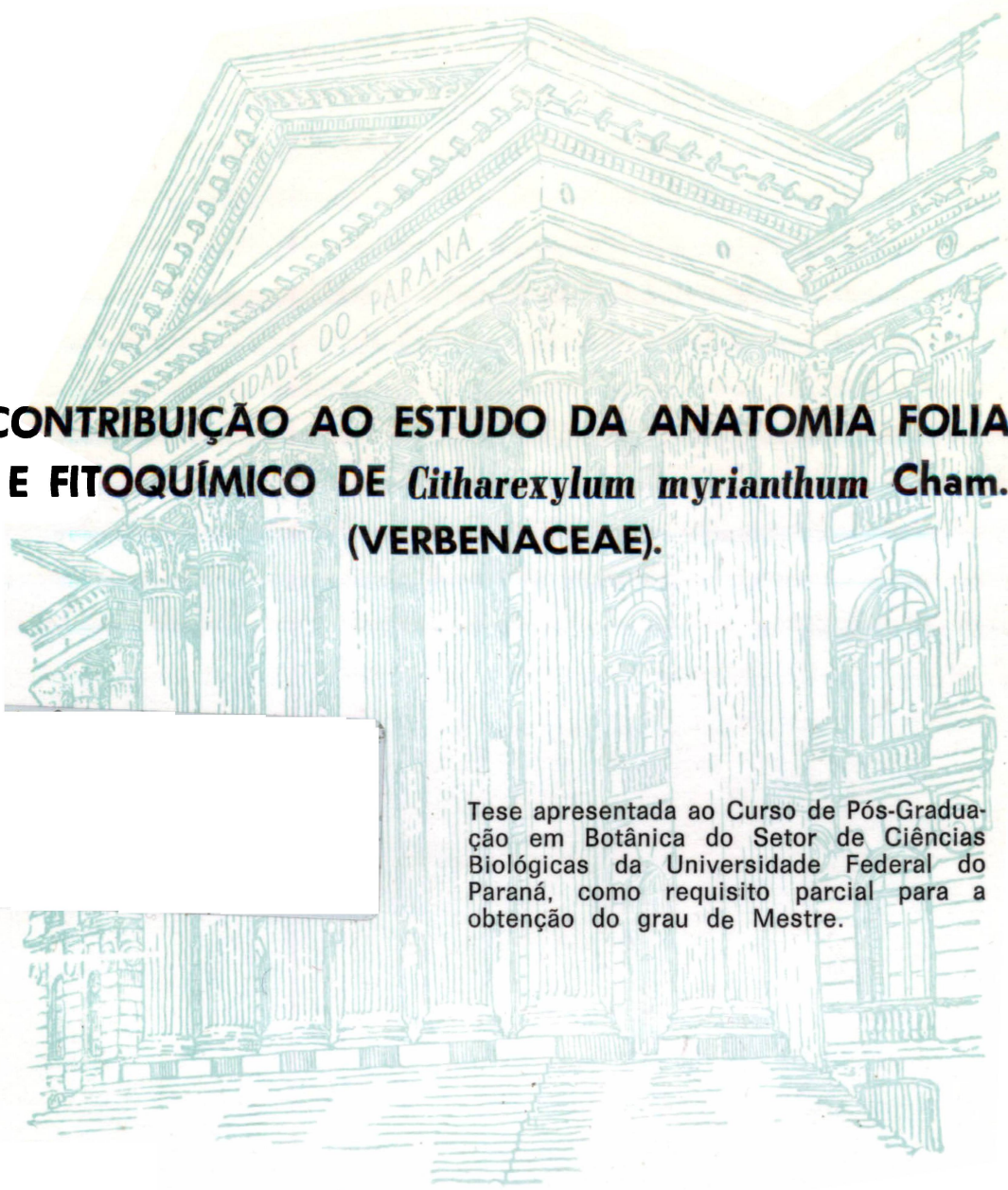


DÉBORA BITTENCOURT FIRMAN JUCK



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR
E FITOQUÍMICO DE *Citharexylum myrianthum* Cham.
(VERBENACEAE).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1997

DÉBORA BITTENCOURT FIRMAN JUCK

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR
E FITOQUÍMICO DE *Citharexylum myrianthum* Cham.
(VERBENACEAE).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1997

Orientadora

Prof^a. Dr^a. TOMOE NAKASHIMA



Ministério da Educação e do Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR E FITOQUÍMICO DE
Citharexylum myrianthum Cham. VERBENACEAE”.**

por


DÉBORA BITTENCOURT FIRMANN JUCK

**Tese aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre no Curso de Pós-
Graduação em Botânica, pela Comissão for-
mada pelos Professores:**

Orientador:


Profª Drª Tomoe Nakashima (Orientador)


Prof. Dr. Yedo Alquini (Titular)


Profª. Drª. Jocélia Jansen (Titular)

Curitiba, 10 de julho de 1997

Ao me pai Silvio Ihor Firman Juck, à minha mãe Ivone Bittencourt Firman Juck e à minha irmã Cyntia Bittencourt Firman Juck, por todo amor, carinho e compreensão, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, sempre presente.

À **natureza**, cuja flora foi matéria-prima na elaboração deste trabalho.

Em especial, à minha orientadora e amiga, **Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima**, do Departamento de Farmácia, pelo constante estímulo, valiosa e sábia orientação, que possibilitou que este trabalho se tornasse realidade, meu eterno reconhecimento.

Ao **Dr. Yedo Alquini**, professor e Coordenador do Curso de Pós-graduação em Botânica, pelos ensinamentos de Botânica e como Coordenador dedicado, sempre demonstrou constante prontidão em colaborar.

Ao **Dr. Armando Carlos Cervi**, professor do Departamento de Botânica, pela coleta, identificação, herborização e descrição da espécie estudada.

Ao **Prof. João Carlos Possamai**, pela atenção dedicada, colaboração em estatística e elaboração dos gráficos de farmacologia.

Ao **Dr. Gert Hatschbach**, Diretor do Museu Botânico Municipal e dedicado pesquisador, por sua colaboração na coleta e identificação do material botânico.

Às **Prof^{as}. Dr^{as}. Maria Consuelo Andrade Marques, Dr^a. Ana Maria Soares Arruda e à Dr^a. Lia Rieck**, do Departamento de Farmacologia, pela colaboração nos ensaios Farmacológicos.

À **Prof^a. Adriana Contin**, do Departamento de Farmácia e o **Sr. Arie C. Hoek** - Leiden University-Holanda pelos espectros de RNM¹H.

Ao **Prof. Olavo A. Guimarães**, do Departamento de Botânica, que permitiu o acesso às coleções de Verbenaceae do Herbário do mesmo Departamento.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** da Universidade Federal do Paraná, pelo atendimento quando na realização de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - **CNPq**, pelo apoio financeiro.

Às **bibliotecárias** do Departamento de Farmácia e do Setor de Ciências Biológicas, pelo atendimento sempre gentil.

À **Elisabeth França**, secretária do Curso de Pós-Graduação em Botânica pela atenção e simpatia com que sempre me atendeu.

Ao funcionário e colega **Nilson Belém Filho**, pelo auxílio em Microtécnica Vegetal.

Aos colegas e amigos de Pós-Graduação em Botânica, em especial, **Leila Teresinha Maranhão, Lúcia Regina Pérego Grupo e Cláudio José Alves de Brito** pela companhia e amizade.

Aos colegas farmacêuticos **Fabiano Linhares Frehse**, mestrando em Química e **Fabiana Silveira**, aluna do curso de Especialização em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pelos ensaios Microbiológicos.

À colega farmacêutica **Maria da Graça Teixeira de Toledo**, da Disciplina de Fitoquímica do Departamento de Farmácia, pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais.

Ao Prof. **Márcio Chimelli**, do Departamento de Farmácia pela colaboração nos ensaios fotográficos microbiológicos.

À todos os professores, colegas e funcionários do **Departamento de Botânica** e do **Departamento de Farmácia**, pela atenção e convivência agradável durante a realização do curso.

À Universidade Federal do Paraná (**UFPR**), pela oportunidade que permitiu meu aperfeiçoamento profissional, tanto na Graduação em Farmácia e Bioquímica como na Pós-Graduação.

À todos àqueles que, de alguma forma, ajudaram na elaboração deste trabalho, meu sincero agradecimento.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos Professores componentes da Banca Examinadora, **Dr^a. Jocélia Jansen**, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, **Dr. Yedo Alquini**, **Dr^a. Tomoe Nakashima** e **Dr. Cid Aimbiré M. Santos (suplente)**, da Universidade Federal do Paraná, que atenciosamente aceitaram o convite para integrar a comissão examinadora.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I INTRODUÇÃO	1
1.1 Posição Sistemática.....	5
1.2 Sinônimos e Nomes Populares.....	5
1.3 Estudo Botânico, Químico e Farmacológico de Flavonóides.....	5
1.4 Revisão da literatura para o gênero <i>Citharexylum</i>	12
1.5 Objetivos.....	14
II MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Coleta, identificação e exsicata.....	16
2.2 Botânica: Anatomia Foliar	16
2.2.1 Material Botânico.....	16
2.2.2 Procedimento.....	16
2.3 Fitoquímica	18
2.3.1 Material Botânico.....	18
2.3.2 Metodologia.....	18
2.3.2.1 Ensaio Preliminares.....	18
2.3.2.1.1 Preparo dos extratos para os ensaios preliminares.....	19
2.3.2.1.2 Pesquisa de metabólitos secundários.....	19
2.3.2.2 Preparação dos extratos.....	23
2.3.2.3 Análise dos extratos.....	27
2.3.2.4 Isolamento da substância.....	28
2.3.2.5 Caracterização da substância.....	33
2.4 Farmacologia	34
2.4.1 Material Botânico.....	33
2.4.2 Teste geral de atividade e determinação da Dose letal 50 % (DL ₅₀).....	33

2.4.2.1 Animais.....	33
2.4.2.2 Doses de extrato e vias de administração.....	33
2.4.2.3 Procedimento.....	33
2.4.3 Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária.....	34
2.4.3.1 Animais.....	34
2.4.3.2 Concentração do extrato e via de administração.....	34
2.4.3.3 Drogas e reagentes.....	35
2.4.3.4 Procedimento.....	35
2.5 Microbiologia.....	35
2.5.1 Material Botânico.....	35
2.5.2 Procedimento.....	36
2.5.2.1 Preparo dos extratos.....	36
2.5.2.2 Metodologia.....	36
III RESULTADOS.....	37
3.1 Botânica.....	37
3.1.1 Aspectos Botânicos.....	37
3.1.2 Anatomia Foliar.....	38
3.2 Fitoquímica.....	48
3.2.1 Ensaio preliminares.....	48
3.2.2 Propriedade físico-química de F. ME 1A.....	49
3.2.3 Análises espectrométricas.....	50
3.2.3.1 Espectrometria de Ultra Violeta (UV).....	50
3.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ¹ H), 300 Mhz.....	55
3.3 Farmacologia.....	56
3.3.1 Teste geral de atividade e DL ₅₀	56
3.3.2 Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária.....	58
3.4 Microbiologia.....	61
IV DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	62
4.1 Botânica.....	62
4.2 Fitoquímica.....	64
4.2.1 Análises espectrométricas.....	64

4.2.1.1 Espectrometria de Ultra Violeta.....	64
4.2.1.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ¹ H),300 Mhz da F. ME 1A.....	66
4.3 Farmacologia.....	67
4.3.1 Teste geral de atividade e Dose letal 50 %.....	67
4.3.2 Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária.....	68
4.4 Microbiologia.....	68
V CONCLUSÕES.....	69
5.1 Botânica.....	69
5.2 Fitoquímica.....	69
5.3 Farmacologia.....	70
5.4 Microbiologia.....	70
ANEXO 1 Fitoquímica.....	72
ANEXO 2 Farmacologia.....	76
ANEXO 3 Microbiologia.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

01 A- Vista geral do hábito de <i>Citharexylum myrianthum</i> Cham., Morretes, Paraná. B- Pormenor da planta. C- idem a B.....	4
02 Núcleo fundamental de flavonóides.....	6
03 Estrutura química dos diversos flavonóides.....	7
04 Cromatografia em C.C.D, em celulose, das frações (33-42) obtidas da cromatografia em coluna.....	31
05 Epiderme da folha de <i>Citharexylum myrianthum</i> Cham. (Microscopia Fotônica - MF). A- Vista frontal da face adaxial; B- Face abaxial; C- idem a A, com polarização; D- Face adaxial registrando estômato.....	40
06 Detalhes das epidermes. A- Face adaxial - Detalhe de tricoma tector (Microscopia eletrônica de varredura - MEV); B- Face abaxial (MF); C- Face abaxial (estômatos de diferentes tamanhos) (MF); D- Face abaxial - estômatos anomocíticos e estrias epicuticulares (MF).....	41
07 Face abaxial (MEV). A- Vista geral, com tricomas tectores e glandulares; B- Detalhe da figura anterior, com estrias epicuticulares.....	42
08 Secção transversal da lâmina foliar (MF); A-Vista geral; B- Detalhe do mesofilo.....	43
09 Limbo foliar em secção transversal (MF). A- Extensão de bainha; B- Próximo à nervura principal, com vários estratos epidérmicos em ambas as faces, bem como de parênquima clorofiliano paliçádico.....	44
10 Folha em secção transversal (MF). A- Detalhe do limbo em polarização; B- Vista geral da nervura principal.....	45
11 Nervura principal em secção transversal (MF). A- Face adaxial; B- Face abaxial.....	46
12 Detalhe da nervura principal (MF). A- Detalhe destacando feixe e câmbio; B- idem em polarização.....	47
13 Espectro UV de F. ME 1A em metanol.....	51
14 Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + NaOH.....	51
15 Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + AlCl ₃	52
16 Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + AlCl ₃ + HCl.....	52

17 Espectro UV de F. ME 1A em CH ₃ OH + NaOAc.....	53
18 Espectro UV de F. ME 1A em CH ₃ OH + NaOAc + H ₃ BO ₃	53
19 Espectro de RMN ¹ H, 300 Mhz, da substância F. ME 1A em metanol deuterado.....	55
20 Determinação da dose letal à 50 %.....	57
21 Migração celular, aumento e diminuição de células totais no peritônio x 10 ⁶ em função do tratamento e do tempo.....	59
22 Migração celular, n ^o de células totais no peritônio x 10 ⁶	60
23 Ensaio microbiológico dos extratos hidroalcoólico bruto das folhas e casca de <i>Citharexylum myrianthum</i> Cham. A-branco; B-casca; C-folha (40µl) e D- folha (20 µl).....	61

RESUMO

No presente trabalho, *Citharexylum myrianthum* Cham., família Verbenaceae, foi estudado quanto as características anatômicas das folhas e composição química da casca e folhas. Foi realizada a descrição da anatomia foliar a partir de técnicas convencionais para Microscopia Fotônica e Microscopia Eletrônica de Varredura. A venação da folha é do tipo pinada, camptódroma, eucamptódroma. Estômatos do tipo anomocítico ocorrem em ambas as faces, sendo a folha anfihipoestomática. Tricomas tectores e glandulares foram constatados em ambas as faces. A lâmina foliar tem organização dorsiventral. A epiderme da face abaxial apresenta paredes anticlinais sinuosas. Investigação química das folhas resultou no isolamento provável de heterosídeo flavônico, da fração metanólica, identificado através de métodos espectrométricos de Ultra Violeta e Ressonância Magnética Nuclear Protônica, porém a estrutura ainda não foi totalmente elucidada e novas determinações estão sendo efetuadas. Análises farmacológicas preliminares foram realizadas com o extrato aquoso bruto liofilizado das folhas: Teste Geral de Atividade, Dose Letal Média (DL₅₀) e Capacidade Anti-inflamatória. A DL₅₀, por via intraperitoneal, foi de 5,0 g/kg. O extrato aquoso bruto liofilizado das folhas não demonstrou efeito anti-inflamatório no experimento realizado por método de Migração Leucocitária. Análises microbiológicas demonstraram que o extrato hidroalcoólico bruto das folhas, pelo método de difusão em ágar, na concentração de 40 µl, (400 µg) apresentou atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

This work presents the specie *Citharexylum myrianthum* Cham. from the family Verbenaceae focalizing structural aspects of the leaves and chemistry composition of the barks and leaves. The anatomy features were studied using both light and scanning electron microscopy. The venation pattern is pinnate, camptodromous, eucamptodromous. Stomata of the anomocytic type occur on both surfaces of the leaf, having stomata predominantly on the abaxial surface. Simple and glandular trichomes occur on both surfaces of the leaf. The mesophyll has dorsiventral organization. The epidermis of the abaxial surface exhibits sinuates anticlinal walls. The leaves investigation resulted in the probable isolation of the flavonoid, of the methanolic fraction, recognized through Ultraviolet Spectral analysis and by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, however, the chemistry structure still was not totally elucidated and news determinations were being realized. The preliminarys pharmacologys analisis was realized with the aqueous brute lyophilisates extract of the leaves, with the following: General Test of Activity (TGA), determination of Dose Letal 50 %, and Extravascular mobilizatin of leukocytes. From the determination of DL₅₀, injected intraperitoneally, the result was 5,0 g/kg and from the Extravascular Mobilization of leukocytes, the aqueous brute extract of the *Citharexylum myrianthum* Cham. didn't show any response anti-inflammatory with the methodology utilized. The microbiological analisis demonstrated that the hydroalcoholic brute extract of the leaves, in the concentration of 40 µl (400µg), shown completely inhibited growth of the *Staphylococcus aureus*.

I- INTRODUÇÃO

Diante da preocupação em tratar e resolver os problemas de saúde que afligem o homem, as plantas sempre despertaram um grande interesse, quer pelas suas propriedades químicas, quer por suas ações terapêuticas. As pesquisas com plantas medicinais tem recebido a atenção não só de químicos, que buscam determinar a constituição química, isolar e purificar metabólitos secundários, mas também de farmacologistas, interessados nas pesquisas de suas propriedades farmacológicas, além da toxicidade da substância isoladamente ou do conjunto de substâncias. Além disso os botânicos que se preocupam com a identificação macroscópica e microscópica da planta.

O Brasil possui uma rica flora, onde muitas plantas são usadas na medicina tradicional e na indústria de medicamentos. A segurança em se utilizar uma planta, considerada como medicinal, seja pelos conhecimentos populares ou pela indicação da literatura, requer um estudo interdisciplinar.

A descoberta de novas substâncias pode vir a constituir não só matéria prima para a síntese de produtos iguais ou análogos aos existentes, mas também como fonte de novos medicamentos e ainda na obtenção de produtos aproveitáveis pela indústria.

Trataremos, no presente trabalho, de uma espécie de *Citharexylum* (Verbenaceae), onde foram isolados três iridoides e identificados três flavonóides por NAKASHIMA (1993), que também pesquisou as atividades biológicas de *Citharexylum myrianthum* Cham. e de duas espécies de *Lippia*, também de Verbenaceae. NAKASHIMA (1993) demonstrou a ação antifúngica e a ação antiviral, onde foram testados nove espécies de fungos patogênicos aos vegetais e aos animais, dos extratos liofilizados e metanólicos de *Citharexylum myrianthum* Cham., de *Lippia alba* N. E. Brown e *Lippia multiflora* Mold. A ação antiviral foi estudada sobre quatro vírus. De acordo com NAKASHIMA (1993), os extratos aquosos e metanólicos de *C. myrianthum* Cham. apresentaram um título de redução viral superior à 2 log₁₀. Os liofilizados demonstraram ser ativos sobre os vírus herpéticos e o vírus da poliomielite.

O gênero é encontrado na América tropical e subtropical, ao sul dos Estados Unidos, México, América Central, nas Antilhas, Caribe, Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Dos 15 representantes do gênero existentes no Brasil, são citadas particularmente as

espécies: *C. myrianthum* Cham. e *C. myrianthum* var. *bahiense* Mold. Na Argentina são citadas *C. jorgensii* (Lillo) Mold., na Bolívia, *C. andinarum* Mold., *C. ilicifolium* H.B.K. e *C. puntactum* Greenm., no Paraguai, *C. myrianthum* Cham., *C. montevidense* (Spr.) Mold. e *C. macranthum* Hay. (NAKASHIMA, 1993).

No Brasil, *Citharexylum myrianthum* Cham. tem ampla distribuição, desde Pernambuco até Rio Grande do Sul (MATIDA, *et al.* 1983/1984). É encontrado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, (CERVI, 1996).

O gênero *Citharexylum* apresenta madeira resistente à umidade, é própria para confecção de objetos e marcenaria em geral (NAKASHIMA, 1993). *Citharexylum quadrangulare* Poir., (DUHAMEL, 1985 citado por NAKASHIMA, 1993), apresenta madeira ideal para a construção de esqueleto de animais. A madeira de *Citharexylum montevidense* é utilizada para a carpintaria em geral. As espécies de *C. barbinervis* Cham. e *C. cinereum* L. fornecem madeira para fabricar objetos de luxo, instrumentos musicais e marcenaria em geral. As flores são utilizadas em perfumaria. (PIO CORRÊIA, 1974, 1984 citado por NAKASHIMA, 1993). Na Jamaica, o lenho de *Citharexylum myrianthum* Cham. é apropriado para a fabricação de instrumentos musicais principalmente violinos, violões etc. (BARROSO, 1986). A etimologia do gênero é “madeira de cítara”.

Revisão da literatura apresenta estudo químico realizado em espécies de *Citharexylum* e com ações terapêuticas. Entretanto, são espécies pouco estudadas sob pontos de vista anatômico, químico e farmacológico. O estudo realizado por NAKASHIMA (1993), despertou o interesse por esta família e em especial para esta espécie, por apresentar comprovadas ações antifúngica e antiviral. Pode-se citar o estudo anatômico da madeira, realizado por GOMES, *et al.* (1989), o qual mostra a presença de um raro tipo de perfuração de placas em vasos de *Citharexylum myrianthum* Cham. Diante disso, o presente trabalho apresenta o estudo da anatomia foliar, onde mostra a descrição da estrutura anatômica da folha, com a finalidade de contribuir para caracterização desta espécie.

A constituição química global desta espécie foi demonstrada pelas análises fitoquímicas preliminares. Elegeu-se o grupo flavonoídico para o estudo fitoquímico, por apresentar-se em maior concentração nesta espécie, pelas diversas ações farmacológicas

atribuídas a este grupo de metabólito secundário e pela possibilidade de haver alguma associação entre os flavonóides já isolados com as ações biológicas já comprovadas.

As análises farmacológicas preliminares e a pesquisa de atividade antibacteriana vêm, complementar e contribuir com informações que integram a pesquisa com plantas medicinais.

A figura 01 apresenta vista geral do hábito de *Citharexylum myrianthum* Cham.



Fig. 01- A- Vista geral do hábito de *Citharexylum myrianthum* Cham., Morretes, Paraná. B- Pormenor da planta. C- idem a B.

1.1- Posição Sistemática

Posição sistemática da espécie, segundo CRONQUIST, (1981)

Divisão: **Magnoliophyta**

Classe: **Magnoliopsida**

Subclasse: **Asteridae**

Ordem: **Lamiales**

Família: **Verbenaceae** St.Hill.

Gênero: *Citharexylum* L.

Espécie: *Citharexylum myrianthum* Cham.

1.2- Sinônimos e Nomes Populares

O **Index Kewensis** cita como sinônimos do gênero *Citharexylum*: *Rauwolfia* R. et Pav. (Fl.ii. 26 t. 152 (1799)) e *Poeppigia* Bert. (in Bull. Férussac, xxiii (1830), 109); como sinônimos da espécie: *C. cinereum*, Spreng., *C. scabrum*, Willd ex Cham. e *C. rigidum*, Briq. sinônimo de *C. myrianthum* var *rigidum* Briq. (NAKASHIMA, 1993).

Popularmente, *Citharexylum myrianthum* Cham. é conhecido, no estado de São Paulo, como pau-de-viola, pimenteira, pombeira e tucaneira. No estado do Paraná como: tucaneira, baga-de-tucano, tarumã-branco, jacareúba e jacataúva. No estado de Santa Catarina como pau-de-gaiola, pau-de-pomba, pau-de-tamanco, tucaneiro, tarumã e torumã e no estado do Rio Grande do Sul como pau-de-tamanco e tucaneira (BARROSO, 1986).

1.3- Estudo Botânico, Químico e Farmacológico de flavonóides:

Os flavonóides são pigmentos vegetais que contêm 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental e este apresenta a configuração C₆-C₃-C₆, sendo dois anéis aromáticos unidos por três unidades de carbono que podem ou não formar um terceiro anel. Por conveniência os anéis são classificados A, B e C (MARKHAM, 1982) (Fig. 02)

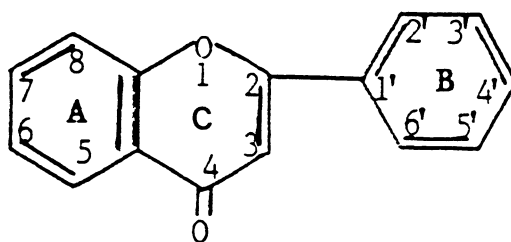


Fig. 02- Núcleo fundamental de flavonóides.

Os flavonóides ocorrem tanto em estado livre como heterosídico, constituindo o grupo mais amplo de fenóis naturais. TREASE & EVANS (1991), relata que é conhecido mais de 2000 destes compostos, sendo que uns 500 são encontrados em estado livre.

As agliconas flavonoídicas ocorrem em uma variedade de formas estruturais: (a) flavona, (b) flavonol, (c) flavanona, (d) flavanonol, (e) antocianidina, (f) flavandiol-3,4 (leucoantocianidina), (g) catequina, (h) chalcona, (i) aurona, (j) isoflavona e (k) neoflavona (DOMINQUEZ, 1973) (Fig. 03).

Muitos taninos também são derivados de flavonóides (MARKHAM, 1982). A maioria destes são *O*-heterosídeos, porém se conhece um número considerável de *C*-heterosídeos flavonoídicos. Também se conhece compostos dímeros, que possuem, por exemplo, uma união 5', 8-carbono-carbono, os biflavonóides (TREASE & EVANS, 1991). Os biflavonóides têm raramente sido encontrados como glicosídeos (MARKHAM, 1982).

O esqueleto de carbono de compostos flavonoídicos pode ser visto como duas unidades, uma benzoílica e outra cinamoílica (MABRY, *et al.* 1970). Estas duas unidades possuem rotas biossintéticas diferentes. Através de experimentos com radioatividade, classificou-se compostos de flavonóides originários de “unidades acetato” e de um intermediário fenilpropanóide derivado da via do ácido shikímico. Basicamente, o anel A é formado por condensação de três unidades acetato enquanto o anel B e o anel C, provêm de um precursor fenilpropanóide. Através de estudos enzimáticos obteve-se conhecimentos mais detalhados da natureza química dos precursores e da reação de formação (HARBORNE, *et al.* 1975).

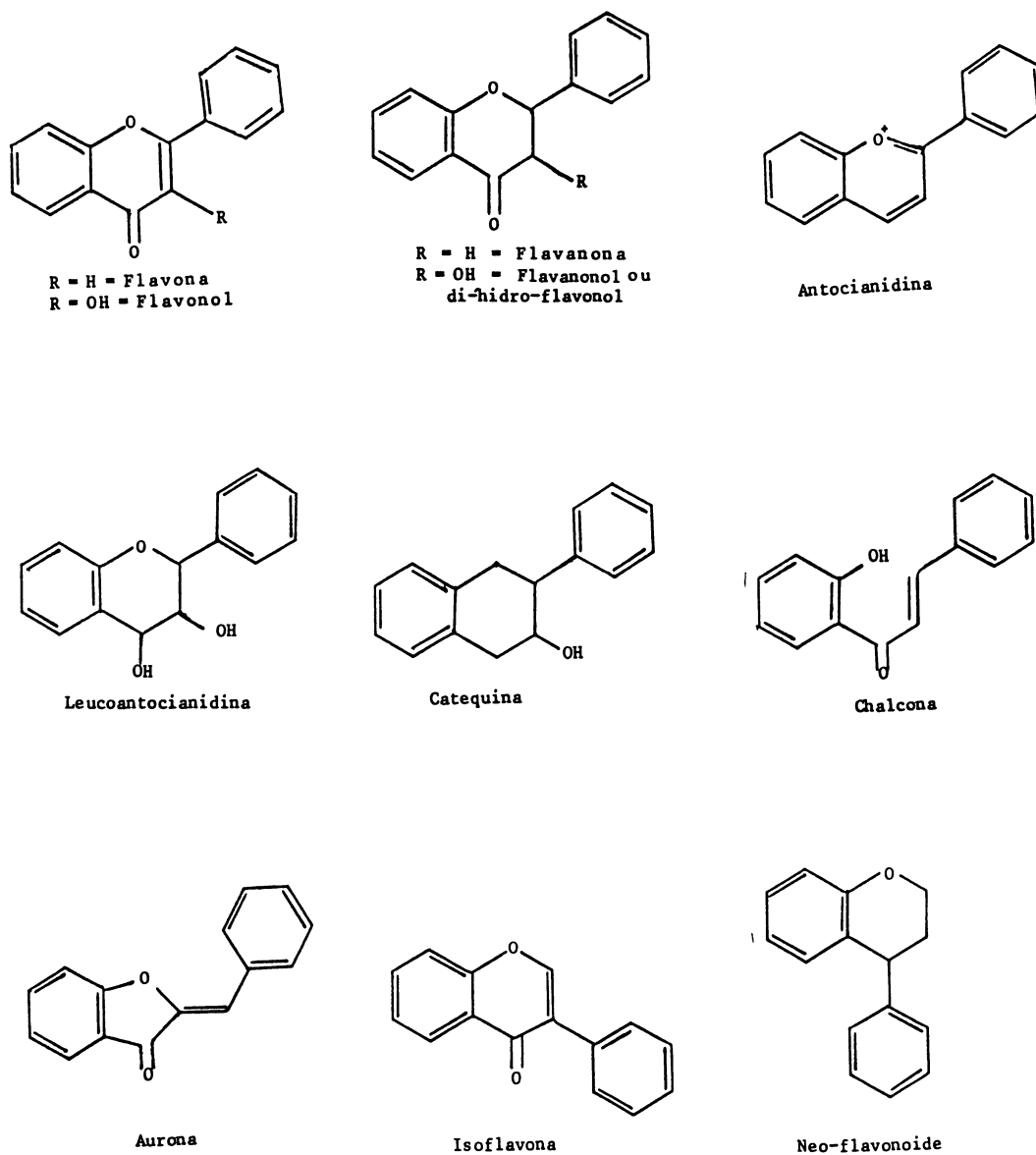


Fig. 03- Estrutura química dos diversos flavonóides.

Os heterosídeos são geralmente solúveis em água e álcool, porém insolúveis nos solventes orgânicos, as geninas são ligeiramente solúveis em água, porém solúveis em éter. Os flavonóides se dissolvem nos álcalis, dando soluções amarelas que, por adição de ácidos, passam a incolores (TREASE & EVANS, 1991). Como regra geral, os flavonóides são insolúveis em éter de petróleo, o que permite desengordurar um material antes da extração dos flavonóides (DOMINGUEZ, 1973).

Os flavonóides possuindo um número de grupos hidroxila substituíntes, ou um açúcar, são compostos polares, são moderadamente solúveis em solventes polares: etanol (ETOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), acetona, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil formamida (DMF), água, etc. A presença de um açúcar tende a render ao flavonóide mais solubilidade em água. Agliconas menos polares as isoflavonas, flavanonas e flavonas altamente metoxiladas e flavonóis, tendem a ser mais solúveis em éter e clorofórmio (MARKHAM, 1982). Os flavonóides podem ocorrer em uma variedade de cores em tecidos de plantas (HERBERT, 1989). As flavonas e os compostos estreitamente relacionados com eles podem ser amarelos (do latim, *flavus*, amarelo). A intensidade da sua cor amarela cresce com o número do pH. A flavona pura, que é incolor, se encontra na superfície de algumas espécies de *Primula*. Muitas flavonas são derivados fenólicos ou metoxilados e constituem heterosídeos solúveis na seiva. (TREASE & EVANS, 1991).

A função biológica dos flavonóides na planta está relacionada com a atração de insetos polinizadores e proteção contra os nocivos, reação contra infecções virais e fúngicas (fitoalexinas), colaboração com hormônios no processo de crescimento, inibição de ações enzimáticas e participação dos sistemas redox das células (MARTINS, *et al.* 1995).

Os flavonóides estão presentes em todas as plantas vasculares, mas em algumas classes são amplamente distribuídas; enquanto que flavonas e flavonóis são universais. As isoflavonas e biflavonóides são encontrados somente em algumas famílias. (HARBORNE, 1984).

Os flavonóides são constituintes característicos de plantas verdes, com exceção de algas. Eles ocorrem em todas as partes da planta incluindo folhas, raízes, madeira, casca, pólen, néctar, flores, bagas e sementes (MARKHAM, 1982). As agliconas são mais frequentes em tecidos lenhosos (DOMINGUEZ, 1973). Estão amplamente distribuídos na natureza, porém são mais frequentes nas plantas superiores e nos tecidos jovens, onde se encontram as

células que contém seiva. São abundantes nas Polygonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Umbelliferae e Compositae (TREASE & EVANS, 1991).

Há um grupo de flavonóides que ocorrem nas plantas numa forma conjugada, por ligação covalente com um ou mais resíduos de sulfato inorgânico unidos a um grupamento fenólico ou ao açúcar (HARBORNE, 1977 citado por MARKHAM, 1982). A ocorrência destes compostos parecem ser restritos a Angiospermas e especialmente aquelas Angiospermas das quais têm uma associação ecológica com habitats aquáticos (HARBORNE, 1975 citado por MARKHAM, 1982).

Biflavonóides apresentam uma distribuição restrita, ocorrendo predominantemente em Gymnospermas (MARKHAM, 1982).

Comumente, os representantes da família Verbenaceae produzem substâncias iridoides, em menor frequência a presença de alcalóides, saponinas ou outros compostos triterpenóides, é altamente frequente 6-metilado ou 8- hidróxi-flavonóis, raramente ocorrem taninos (CRONQUIST, 1981).

Em 1936 RUSZNYAK & SZENT-GYORGYI, observaram que preparações contendo ácido ascórbico obtido de fontes naturais, eram mais eficazes no tratamento de sangramento capilar subcutâneo que preparações contendo ácido ascórbico puro. Posteriormente, estes pesquisadores isolaram de *Capsicum annuum* e de *Citrus limon* uma das substâncias que acompanhavam o ácido ascórbico em suas preparações, com características de uma flavona e a chamaram de vitamina P (HARBORNE, *et al.* 1975). Eles relataram que a vitamina P reduzia hemorragias e aumentava o efeito do ácido ascórbico. A vitamina P foi também chamada de citrina (TREASE & EVANS, 1991) ou ainda hesperitol (HARBORNE, *et al.* 1975), (MATOS & MATOS, 1989). O conceito vitamina foi posteriormente abandonado (GILMAN, *et al.* 1983).

A substância primeiramente conhecida como citrina é uma mistura de ramnoglicosídeos do eridictiol (tetrahidroxiflavona) e metileriodictiol (hesperetina). Entre os produtos comerciais deste tipo, produzem-se alguns pela indústria de cítricos que contém hesperidina. Um heterosídeo similar, a rutina ou rutósido, ramnoglicosídeo da quercetina, glucosídeo cuja aglicona é constituída da quercetina (3,5,7,3',4'-penta-hidróxi-flavona) e se une por sua hidroxila da posição 3 a um dissacarídeo (rutinose) formado por uma molécula de glicose e por outra de ramnose (MATOS, & MATOS, 1989), é encontrado em muitas plantas

e é elaborado em escala industrial a partir de resíduos de tabaco, *Sophora* e *Eucaliptus* spp; o trigo sarraceno, *Fagopyrum esculentum*, contém ao redor de 3-4 % (TREASE & EVANS, 1991). Medicinalmente, conserva a resistência capilar e fortifica os vasos.

Muitas pesquisas têm enfatizado os efeitos terapêuticos de vários flavonóides, primeiramente a rutina, seus derivados metilados e as flavanonas de frutas cítricas (KEFFORD & CHANDLER, 1970; GRIFFITH *et al.*, 1955 citado por HARBORNE, 1975).

DeEds (1968), concluiu que flavonóides com hidroxilas livres nas posições 3,'4' exercem efeitos fisiológicos benéficos nos capilares perfeitos, prolonga ação da epinefrina pela inibição do *O*-metiltransferase e estimula o eixo pituitária adrenal (HARBORNE, *et al.* 1975).

Além das propriedades antitrombóticas e vasoprotetoras, este grupo é conhecido por seus efeitos anti-inflamatórios e anti-alérgicos, pela inibição da promoção de tumores e como protetores da mucosa gástrica. Estes efeitos têm sido atribuídos à influência dos flavonóides sobre o metabolismo do ácido araquidônico (ALCARAZ & FERRANDIZ, 1987 citado por TREASE & EVANS, 1991). RAMANATHAN, *et al.* (1993), demonstraram a atividade antitumoral em células cancerígenas humanas.

Flavonóides naturais e lignanos são potentes agentes citostáticos contra células leucêmicas HL-60 humanas (HIRANO, *et al.* 1994).

O efeito anti-úlceras de flavonóides foi estudado por IZZO, *et al.* (1994). A naringina mostrou-se ativa em grandes doses.

Entre os compostos que possuem atividades farmacológicas, destacam-se a apigenina, taxofolina, morina, naringenina, genisteína e epicatequina. A naringenina reúne atividades anti-PAF (atividade inibidora do fator de agregação plaquetária), indutora da formação de hemoglobina, anti-espasmódica e anti-hepatotóxica (Di STASI, 1996). A naringenina, uma flavanona, possui atividade anti-úlceras.

São anti-escleróticos e anti-edematosos (rutina e oxietilrutina), espasmolíticos e anti-hepatotóxicos (silimarina), coleréticos, diuréticos, antimicrobianos e anti-inflamatórios (artemetina). São essenciais para a completa absorção da vitamina C, ocorrendo naturalmente onde quer que haja esta vitamina (MARTINS, *et al.* 1995).

Alguns flavonóides possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas (TREASE & EVANS, 1991).

As flores de *Sambucus nigra* têm sido utilizadas durante muito tempo em medicina doméstica e veterinária, especialmente em forma de unguento. Contém ácido *p*-cumárico, rutina e canferol. Uma série de flavolignanós, como silibina e silimarina (1,4- dioxano produzido pela combinação oxidativa de taxifolina e álcool coníferílico), possuem propriedades anti-hepatotóxicas e os extratos de plantas que os contém, como o *Silybum marianum* (*Carduus marianus*), Compositae, são muito utilizadas na Alemanha para o tratamento de doenças hepáticas. Os frutos de *S. marianum* contém silibina, silidianina e silicristina. (TREASE & EVANS, 1991).

A atividade anti-oxidante foi estudada por URSINI, *et al.* (1994). Foram ainda atribuídas a esta classe de compostos, atividades a nível cardíaco (COSTA, 1987), bem como ação benéfica sobre as vias aéreas superiores (GOODMAN, & GILMAN, 1967).

Apresentam atividade antiviral (quercetina e quercetrina), atividade inibitória da xantino-oxidase, abrindo um novo campo de uso (tratamento de gota) (SHIMER, 1986 citado por KERBER, 1988). Foi relatada uma possível ação anticancerígena, citostática e/ou citotóxica para a quercetina.

Alguns flavonóides são corantes e tânicos (TREASE & EVANS, 1991). Vários compostos desta natureza também são usados na produção de odores, sabores de alimentos e bebidas de origem vegetal (Di STASI, 1996).

Os rotenóides são inseticidas (HERBERT, 1989).

A grande vantagem dos flavonóides é a sua baixíssima toxicidade (MARTINS, *et al.* 1995). Entretanto, substâncias desta natureza apresentaram um resultado positivo em testes de mutagenicidade, representando um alerta ao seu uso indiscriminado, mas não havendo resultados suficientes para calcular um risco real (SHIMER, 1986 citado por KERBER, 1988).

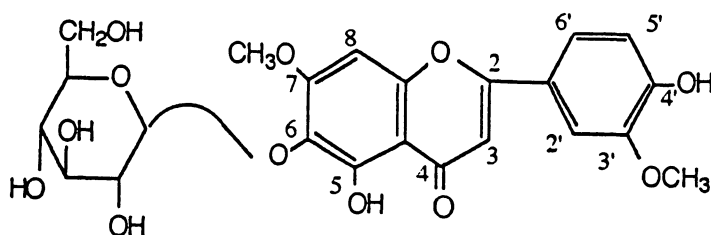
Os rotenóides apresentam uma baixa toxicidade aos mamíferos (por exemplo, DL₅₀ de 3,0 g/kg por rotenona em coelhos), mas são extremamente potentes inibidores da oxidação mitocondrial em insetos e em peixes ao nível de 1 mg (FUKAMI & NAKAJIMA, 1971 citado por HARBORNE, *et al.* 1975).

Flavonas e isoflavonas foram considerados por ANJANEXULU & RAMACHANDRAROW (1964) tóxicos ao peixe, e CHARI & SESHADRI (1948) demonstraram que chrisina (5,7-diidroxi-) e galangina (3,5,7-triidróxi-flavona) são consideravelmente tóxicos aos peixes, enquanto flavonas, tendo mais grupos hidroxila são

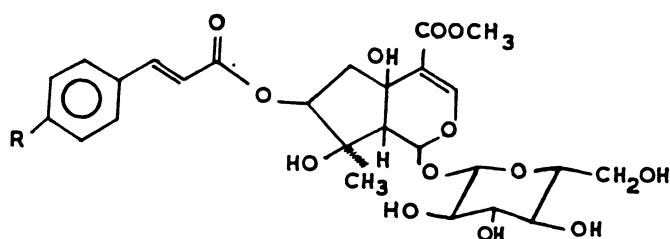
somente ligeiramente tóxicos. A metilação de um grupo hidroxila aumenta a toxicidade (HARBORNE, *et al.* 1975).

1.4- Revisão da literatura para o gênero *Citharexylum*:

Um glicosídeo flavônico foi isolado de *Citharexylum subserratum* e identificado como 4',5-dihidróxi-3',7-dimetoxiflavona-6-glucosídeo (MATHURAM, 1976). A fórmula estrutural é a seguinte:



Nas folhas de *Citharexylum subserratum* foram detectados duranteosídeo 1 e duranteosídeo 2, metil-*p*-metóxi cinamato, metilcinamato, β -sitosterol, β -sitosterol glicosídeo e ácido ursólico (GANAPATY, 1983).



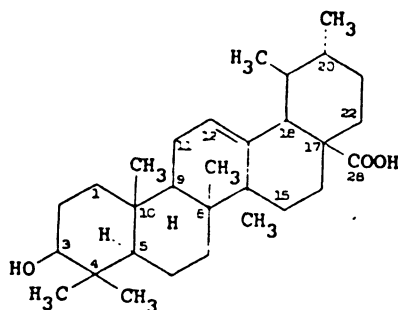
durantosídeo 1 (1), duranteosídeo 2 (2)

1- R= H

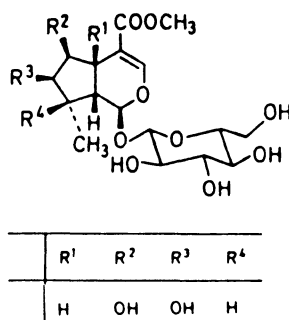
2- R= OCH₃

Das cascas de *Citharexylum subserratum* foram isolados *n*-octacosanol, β -sitosterol e ácido ursólico (GANAPATY, 1984).

Em *Citharexylum myrianthum* Cham. também foi detectada a ocorrência de ácido ursólico (MATIDA, *et al.* 1987), cuja fórmula estrutural é a seguinte:



Iridoides glicosídicos foram detectados nas folhas de *Citharexylum fruticosum* L. (GANAPATY, 1988):



5- deoxipulchelosídeo

Foram isolados três iridoides de *Citharexylum myrianthum* Cham. e ainda foram identificados três flavonóides: 4',5-diidróxi-3',7-dimetoxiflavona 6-glucosídeo, 4',5,6-triidróxi-3', 7-dimetoxiflavona e 5,4'-diidróxi, 7,3'-dimetoxi, 6-metilflavona, por NAKASHIMA (1993).

NAKASHIMA (1993), estudou a ação antiviral e antifúngica de *C. myrianthum* Cham., sendo estudada a ação antiviral sobre quatro vírus (HSV-1, HSV-2, vírus da

poliomielite e vírus da estomatite vesicular de bovinos (VSV). Os extratos aquosos e metanólicos de *C. myrianthum* apresentaram um título de redução viral superior à $2 \log_{10}$. Os liofilizados foram particularmente ativos sobre os vírus herpéticos e o vírus da poliomielite ($\geq 3,5 \log_{10}$).

Foram testados nove espécies de fungos patogênicos aos vegetais e aos animais, quanto à ação antifúngica de extratos liofilizados e metanólicos. Nenhum extrato provocou a inibição total do crescimento, mas alguns mostraram uma inibição parcial (NAKASHIMA, 1993).

Um infuso ou decocto de folhas de *Citharexylum fruticosum* é utilizado no tratamento de artrite e dispepsia (ADJANOHOUN, 1985 citado por NAKASHIMA, 1993). As folhas de *Citharexylum macrophyllum* são usadas como febrífugo, colagogo e diurético (GRANAND, 1987).

1.5- OBJETIVOS

Constituem-se objetivos deste trabalho:

- Descrever a anatomia das folhas da espécie *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae).
- Analisar qualitativamente a composição química da folha e da casca.
- Extrair, purificar, isolar e identificar flavonóide biossintetizado nas folhas.
- Realizar os testes farmacológicos preliminares: a) - Teste geral de atividade e determinação da Dose letal 50 % (DL₅₀); b) - Determinação de Capacidade anti-inflamatória do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas.
- Realizar o teste de atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto das folhas e da casca.

PARTE EXPERIMENTAL

II- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Coleta, identificação e exsicata

As coletas foram realizadas no período de agosto de 1995 a novembro de 1996, na região de Sapitandúva, litoral do Paraná- Brasil. O material vegetal destinado à realização de exsicata, foi coletado em Morretes, litoral do Paraná-Brasil, no mês de novembro de 1996.

O material vegetal foi herborizado e encontra-se registrado no herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (UPCB) sob o número 28640. Para o estudo da anatomia foliar foi utilizada, também, exsicata do herbário do mesmo Departamento, sob número 22641.

2.2- Botânica: Anatomia Foliar

2.2.1- Material Botânico

O material botânico em estudo compreende folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae).

2.2.2- Procedimento

Procedeu-se o preparo de lâminas semipermanentes e permanentes com folhas selecionadas a partir do 4^o nó.

Lâminas semipermanentes foram montadas a partir de material fixado em F.A.A 50%, segundo JOHANSEN (1940).

Foram realizadas secções a mão livre, da região mediana da folha. Após as secções fez-se a clarificação das amostras, com hipoclorito de sódio a 20 %.

A coloração foi efetuada com fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1962) ou azul de toluidina (HADDAD, 1989). As lâminas foram montadas com glicerina diluída a 50 % ou gelatina glicerinada (BERLYN & MIKSCHE, 1976), e posteriormente lutadas com esmalte incolor.

Lâminas permanentes foram montadas a partir de material herborizado e material fixado. O material herborizado foi reidratado em água aquecida, em seguida permaneceu em hidróxido de sódio a 10 % por uma hora. A venação foliar, foi analisada em folhas diafanizadas de acordo com o método proposto por FOSTER (1949); processou-se a clarificação em hipoclorito de sódio P.A. a 20 %. Uma vez clarificado, lavou-se com água destilada várias vezes, uma vez em água acidulada e novamente em água destilada. Seguiu-se a desidratação em série alcoólico-etílica ascendente, álcool-xilol 1:1 e posterior coloração em safranina 0,5 % (JOHANSEN, 1940) em solução álcool-xilol 1:1. Em seguida, álcool-xilol e xilol puro. As lâminas foram montadas em Entellan.

Lâminas permanentes foram montadas a partir de material fixado para evidenciar compostos fenólicos (sulfato ferroso, formol e água destilada), segundo JOHANSEN (1940). O material foi desidratado em série alcoólico-etílica ascendente, álcool-xilol 3:1, 1:1, 1:3 e xilol puro. A seguir, foram processadas infiltração e inclusão em parafina, de acordo com SASS (1951). A microtomização foi realizada em micrótomo rotatório, tendo-se obtido secções isoladas de 10-12 micrômetros de espessura, em secções transversais.

A colagem e distensão das secções foi efetuada com uso de adesivo de Bissing, segundo BISSING (1974).

Para a coloração, empregou-se fucsina básica e azul de astra diluídos a 0,5 % em solução alcoólica a 50 % (ROESER, 1962). Como meio de montagem utilizou-se Entellan.

O material foi emblocado em glicol metacrilato. Nesta técnica, o material foi fixado em F.A.A 70 %, desidratado em série etílica, infiltrado e emblocado em glicol metacrilato (GMA) JB-4 Polysciences, de acordo com FEDER, *et al.* (1968). Os blocos foram microtomizados em micrótomo rotatório, obtendo-se secções de 15 micrômetros de espessura. A coloração empregada neste material foi à base de azul de toluidina 0,05 % em água, de acordo com HADDAD (1989).

Foram executadas fotomicrografias em microscópio óptico.

Uma escala micrométrica foi fotografada e ampliada nas mesmas condições das fotos.

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram fixadas em F.A.A 70 % (JOHANSEN, 1940) e desidratadas em série alcoólico etílica crescente até álcool absoluto. Os materiais foram desidratados via ponto crítico em equipamento "Balzers CPD

010”(SILVEIRA, 1989) e, após montagem em suporte metálico, foram submetidos à metalização com ouro, em aparelho “Balzers Sputtering SCD 030”.

As fotografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura SEM 505 Phillips e as escalas foram projetadas nas mesmas condições ópticas.

Na descrição do tipo de venação foliar adotou-se o sistema de classificação de HICKEY (1973) e para os complexos estomáticos e tricomas, a classificação de METCALFE & CHALK (1979).

2.3- Fitoquímica

2.3.1- Material Botânico

Após a coleta, o material vegetal foi dessecado e estabilizado em estufa à temperatura de 40°C. Os testes preliminares foram realizados com as folhas e casca secas e moídas.

2.3.2- Metodologia

A metodologia utilizada para a determinação dos ensaios preliminares foi segundo MOREIRA (1978), modificado por NAKASHIMA (1993).

2.3.2.1- Ensaios Preliminares

Nos ensaios preliminares foram efetuadas as seguintes análises: a)- Alcalóides, b)- Cumarinas, c)- Flavonóides, d)- Quinóides, e)- Triterpenóides e/ou Esteróides, f)- Taninos: Condensados e Hidrolisáveis, g)- Heterosídeos Saponínicos, h)- Heterosídeos Antociânicos e h)- Amino Grupos.

2.3.2.1.1- Preparo dos extratos para os ensaios preliminares:

Preparou-se o extrato aquoso a 20 % por maceração, sobre o BM a 60⁰ C, utilizando-se como líquido extrator, água deionizada.

O extrato hidroalcoólico à 20 % foi preparado por maceração à frio, utilizando-se como líquido extrator, álcool etílico à 70 % v/v.

Os extratos foram filtrados por papel de filtro. Efetuou-se a análise dos caracteres organolépticos e a determinação da cor e do pH.

2.3.2.1.2- Pesquisa de metabólitos secundários

a)- Alcalóides

Técnica de detecção: precipitação frente a reagentes gerais: Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand (ver anexo).

Foi evaporado à secura, 50 ml de extrato hidroalcoólico. O resíduo foi dissolvido com 1 ml de etanol e adicionado 20 ml de ácido clorídrico a 1 %. Foi transferido para 5 tubos de ensaio, 1 ml do extrato clorídrico (em cada tubo) e efetuou-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais. O aparecimento de precipitado indica reação positiva.

Para confirmar a reação: foram transferidos 15 ml do extrato aquoso para um funil de separação e alcalinizou-se com hidróxido de amônio até pH 9-10. Extraíu-se com uma mistura de éter: clorofórmio (3:1), duas vezes de 15 ml. Os extratos etéreo-clorofórmio-amoniacoal foram reunidos e levados à secura em BM; ao resíduo adicionou-se 0,5 ml de álcool etílico e 5 ml de solução aquosa de ácido clorídrico a 1%. Aqueceu-se ligeiramente e dividiu-se em 5 tubos de ensaio. Foi efetuada a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais para alcalóides. A formação de precipitados confirmam reação positiva. Adição de até 2 ml de solução etanólica de ácido tartárico a 5 % deve dissolver os precipitados.

b)- Cumarinas

Técnica de detecção: sublimação e fixação em papel alcalino ou extração com solvente orgânico e posterior tratamento com solução alcalina: observar sob raios de ultravioleta, o desenvolvimento de fluorescência.

Foram transferidos para um bequer 50 ml do extrato hidroalcoólico e adicionado 2 ml de ácido clorídrico N, o volume foi reduzido em BM até 10 ml. Ao resíduo foi adicionado 5 ml de água deionizada e extraído em funil de separação com éter etílico (3 x 5 ml), reduziu-se o volume do extrato orgânico até 5 ml. Depositou-se 3 gotas do extrato etéreo em papel de filtro, previamente demarcados. Deixou-se secar e foi adicionada 1 gota de hidróxido de sódio sobre as manchas 1 e 2. Com a mancha 2 encoberta por uma moeda, observou-se, sob raios ultravioleta. A presença de fluorescência de azul a amarela indica reação positiva.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 5 ml do extrato etéreo e 2 ml de hidróxido de amônio SR, agitou-se e observou-se sob raios ultravioleta. A presença de fluorescência de azul a amarela indica reação positiva.

c)- Flavonóides

Técnica de detecção: Formação de cianidinas pela reação com ácido clorídrico concentrado em presença de magnésio metálico.

Em tubo de ensaio foram transferidos 5 ml do extrato hidroalcoólico. Juntou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 ml de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas, violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis.

Limitação da técnica: chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração, porém algumas chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

d)- Quinóides

Técnica de detecção: reação de Borntraeger.

Em um balão (fundo chato ou redondo de 100 ml ou 250 ml) foram transferidos 30 ml do extrato hidroalcoólico e adicionados 5 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro. Ao filtrado foi adicionado 30 ml de água deionizada e transferido para um funil de separação e foi extraído com éter etílico (2 x 10 ml). A fase orgânica foi separada e concentrada em BM até 5 ml e transferido para um tubo de ensaio, foram adicionados 5 ml de solução de hidróxido de amônio SR. Agitou-se lentamente. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas; o

desenvolvimento de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e se houver desenvolvimento de coloração azul está indicada a presença de benzoquinonas.

e)-Triterpenóides e/ou Esteróides

Técnica de detecção: segundo Lieberman-Burchard.

Em um becker, foram evaporados à secura 30 ml do extrato hidroalcoólico em BM a 60⁰C. O resíduo seco foi dissolvido com 5 ml de clorofórmio. Filtrar. Foram pipetados alíquotas de 0,1 ml, 0,5 ml e 1,0 ml do extrato clorofórmico para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2,0 ml com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio, 1 ml de anidrido acético e 1 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de Lieberman-Burchard). O desenvolvimento de coloração de azul a verde indica a provável presença de núcleo esteroidal e o aparecimento de coloração vermelha, rósea, púrpura ou violácea indica a presença provável de policíclicos triterpênicos.

f)- Taninos

Técnica de detecção: desenvolvimento de coloração e formação de precipitados, conforme as etapas seguintes:

Reação com cloreto férrico 1 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso adicionou-se 3-5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marron ou formação de precipitado indicam a presença de tanóides.

Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso, foram adicionados 2 gotas de sulfato de ferro amoniacal solução aquosa a 1 %. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de tanóides.

Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v)

A 5 ml do extrato aquoso, foram adicionados 5 ml de ácido acético a 10 % e gota a gota, 5 ml de acetato de chumbo solução aquosa a 10 %. A formação de precipitado indica a presença de tanóides.

Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9 %

Foram transferidos para tubos de ensaio: 0,5 ml; 1,0 ml e 2,0 ml do extrato aquoso. Adicionou-se em cada tubo 2,0 ml da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de tanóides.

Reação com formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão (de fundo chato ou redondo) de 100 ml de capacidade, 30 ml do extrato aquoso, 6,0 ml de formaldeído e 4,0 ml de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora. Foi filtrado ainda à quente e separado o filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 %. Gotejou-se sobre o resíduo, gotas de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

g)- Heterosídeos antociânicos

Técnica de detecção: caráter anfótero dos antocianos: mudança de cor devido a mudança de pH; em meio ácidos reagem formando sais de oxônio de coloração vermelha e em meio básico reagem com as hidroxilas fenólicas livres formando quinóides, adquirindo coloração azul.

Em três tubos de ensaio foram separadas três porções de 5 ml do extrato aquoso. O primeiro foi acidificado com ácido sulfúrico N (pH 1); o segundo foi alcalinado com hidróxido de sódio (pH 9-10) e o terceiro foi neutralizado (pH 7). O desenvolvimento de diferentes colorações indicam a presença de heterosídeos antociânicos.

h)- Heterosídeos saponínicos.

Técnica de detecção: Formação e persistência de espuma.

Os três tubos de ensaio anteriores foram agitados energeticamente por cinco minutos. Deixado em repouso por trinta minutos. Mediu-se a espuma formada. Espuma persistente, maior ou igual a um centímetro indicam a presença de heterosídeos saponínicos.

i)- Amino-grupos

Técnica de detecção: reação da Ninhidrina.

Em um becker foram transferidos 10 ml do extrato aquoso e concentrados a 5 ml em BM a 50⁰C. Depositou-se sobre o papel de filtro, 5 gotas do extrato concentrado em pontos previamente determinados. Deixou-se secar e nebulizou-se o reativo de Ninhidrina. Aqueceu-se em estufa a 100⁰C por 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-violeta indica a presença de amino-grupos. O desenvolvimento de coloração rosa indica a presença de fenilalanina e vermelha a presença de triptofano. As prolinas e hidróxi- prolinas desenvolvem coloração amarela.

2.3.2.2- Preparação dos extratos:

PROCESSO 1

O material vegetal foi extraído exaustivamente em Soxhlet com *n*-hexano. A pré-extração com *n*-hexano é freqüentemente utilizada para livrar o material vegetal de esteróides, carotenóides, clorofilas, etc embora este tratamento possa causar a perda (por extração) de certas agliconas flavonoídicas (HARBORNE, *et al.* 1975). O extrato *n*-hexânico foi concentrado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se 27,3 g de extrato concentrado (EH).

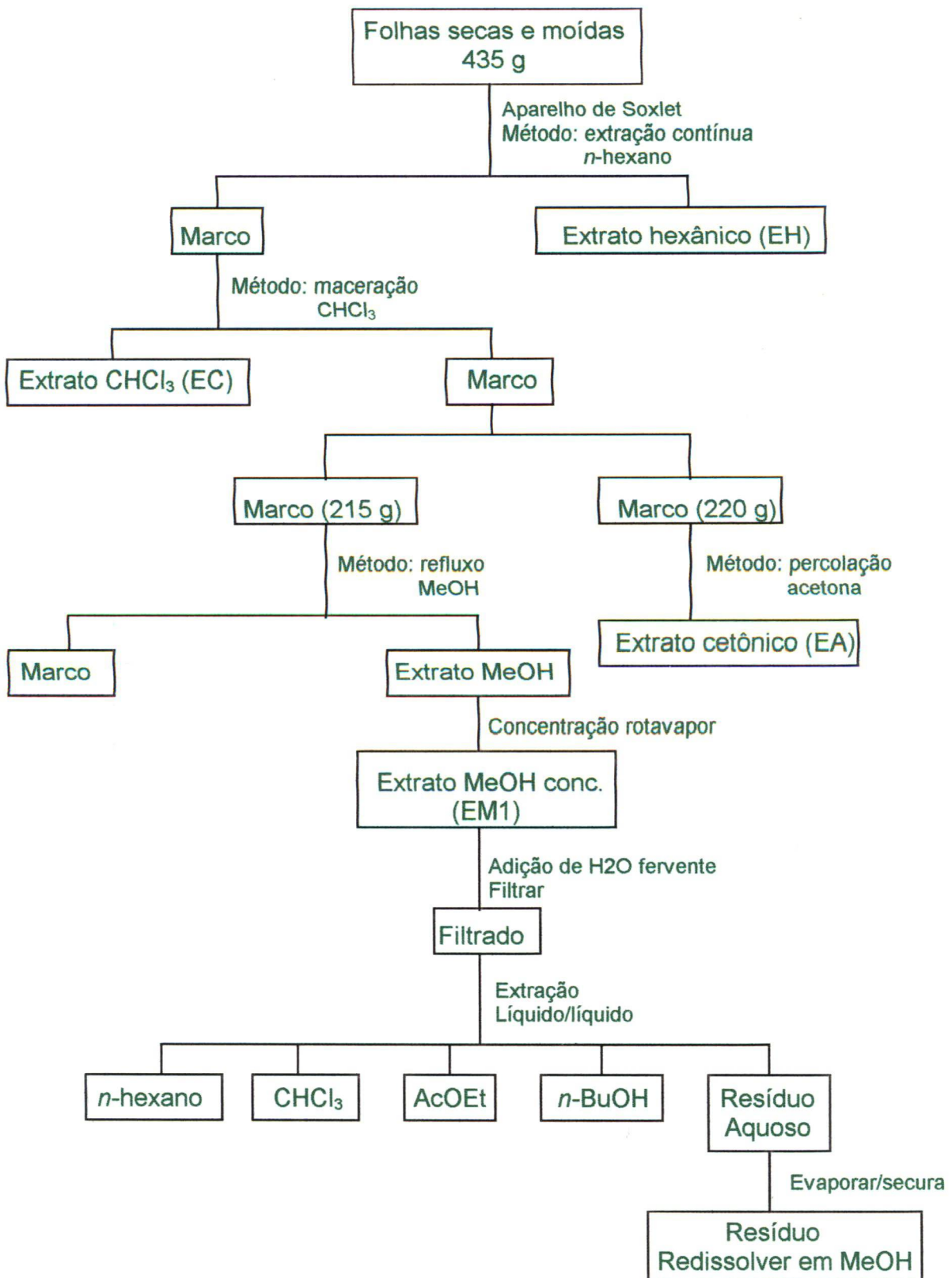
Após evaporação do *n*-hexano do material vegetal, prosseguiu-se a extração com clorofórmio, por maceração. O extrato obtido foi filtrado por papel de filtro e concentrado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se 77,5 g de extrato concentrado (EC). O material vegetal foi extraído com clorofórmio sucessivas vezes para livrar de clorofilas e outros pigmentos que poderão interferir posteriormente (MARKHAM, 1982).

Prosseguiu-se a extração, parte do material vegetal foi extraído em refluxo com metanol até esgotamento total e a outra parte por percolação com acetona, gota a gota, até o esgotamento.

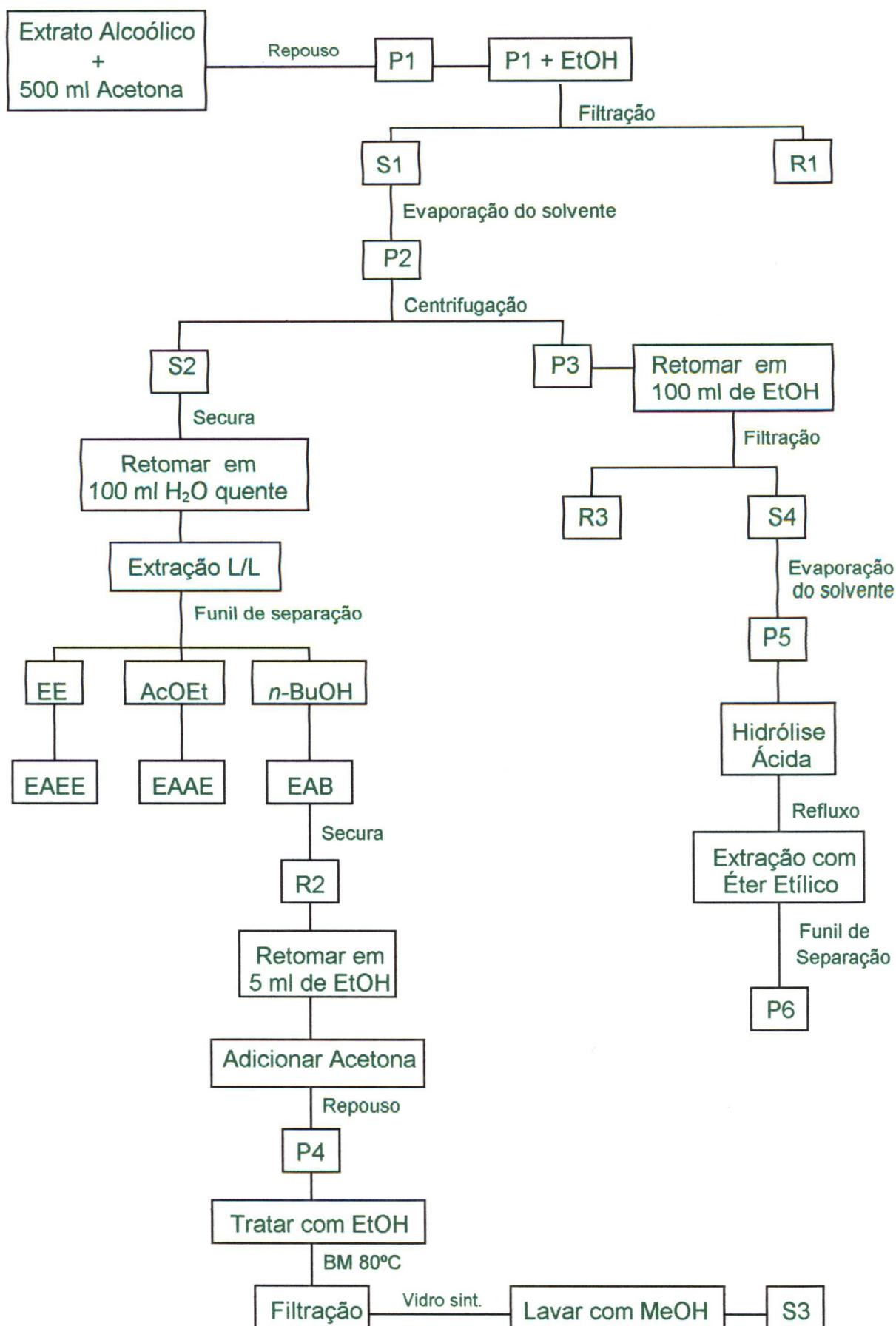
O extrato obtido por refluxo foi filtrado por papel de filtro e concentrado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se o extrato metanólico concentrado (EM1). O EM1 foi retomado em água fervente (700 ml), filtrado extraído em funil de separação, por extração líquido-líquido, com *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se EMH, EMC, EMAE e EMB (Fluxograma 1).

PROCESSO 2

O extrato obtido por percolação com acetona foi concentrado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se 38,0 g de extrato acetônico concentrado (EA). O extrato EA foi dissolvido em 500 ml de acetona e deixado em repouso por 24 horas, de acordo com o método proposto por MATHURAM, *et al.* (1976). Após 24 horas de repouso, houve formação de precipitado (P1). O P1 foi separado por centrifugação obtendo-se 13,5 g de precipitado P1. O P1 foi dissolvido em etanol e aquecido. Filtrou-se por papel de filtro, obtendo-se o resíduo (R1) e o sobrenadante (S1). Foi deixado evaporar o solvente do S1. Houve formação de precipitado (P2), que foi decantado e separado por centrifugação. Obteve-se o sobrenadante (S2) e o precipitado (P3). O S2 foi concentrado em evaporador rotatório à vácuo até a secura e tratado com 100 ml de água quente. Prosseguiu-se a extração L/L, em funil de separação, com éter etílico, acetato de etila e *n*-butanol. Foram obtidos os extratos EAEE, EAAE e EAB, concentrados em evaporador rotatório à vácuo. O extrato *n*-butanólico (EAB) foi deixado concentrar até a secura, e o resíduo obtido (R2) foi retomado em 5 ml de etanol e adicionado 20 a 30 ml de acetona e deixado em repouso por um dia. O precipitado (P4) formado, foi separado por centrifugação. O precipitado P3 foi retomado em 100 ml de etanol e aquecido. Filtrou-se por papel de filtro, obtendo-se o resíduo (R3) e o sobrenadante (S4). Foi deixado evaporar o etanol naturalmente do S4, obtendo-se 112,3 mg de precipitado (P5). Ao P5 foi adicionado 20 ml de etanol em balão de 50 ml e 2 ml de ácido clorídrico 1 N. Levou-se ao Refluxo à 90^oC por 12 horas. Extraiu-se em funil de separação com éter etílico. O éter etílico foi deixado evaporar em BM à 60^oC. Houve formação de precipitado (P6) (Fluxograma 2).



Fluxograma 1 - Processo de extração e obtenção das frações



Fluxograma 2 - Continuação: Preparo dos extratos e obtenção das frações

PROCESSO 3

Foram extraídas 1200 g de material vegetal, em refluxo com metanol, até esgotamento total. Filtrou-se por papel de filtro. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se 316,3 g de extrato metanólico concentrado (EM2). O precipitado formado foi separado por centrifugação, obtendo-se 6,2 g de precipitado (P7).

2.3.2.3- Análise dos extratos

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada (C.C.D) analítica em sílica e em celulose.

Os sistemas de detecção utilizados foram a emissão de fluorescência sob luz ultra violeta (254 e 360 nm) e reação com reagentes cromogênicos projetados sobre a placa por nebulização.

Sistemas cromatográficos utilizados:

Adsorvente sílica gel G MERCK:

n-hexano : acetato de etila (93 : 7)

tolueno : acetato de etila : ácido acético (80 : 18 : 2)

clorofórmio : metanol (98 : 2)

clorofórmio : metanol (90 : 10)

clorofórmio : metanol (85 : 15)

clorofórmio : metanol (2 : 8)

metanol : acetato de etila (7 : 3)

metanol : acetato de etila (7 : 3)

n-butanol : ácido acético : água (BAW- 4 : 1 : 5)

n-butanol : metanol : água (4 : 1 : 5)

acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético : água (100 : 11 : 11 : 27)

acetato de etila : metanol (7 : 3)

acetato de etila : butanona : ácido fórmico : água (50 : 30 : 10 : 10)

tolueno : ácido fórmico : acetato de etila (50 : 20 : 40)

tolueno : ácido acético (4 : 1)

n-butanol : acetona : sol. aquosa à 6 % de fosfato de sódio (4 : 5 : 1)

Cromatoplaça de Celulose MERCK ou Papel Watmann 1 e 3

ácido acético à 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %

ácido acético : água (1 : 1)

clorofórmio : metanol (98 : 2)

clorofórmio : metanol : água (65 : 25 : 4)

metanol : água (9 : 1)

acetato de etila : butanona : ácido fórmico : água (50 : 30 : 10 : 10)

n-butanol : metanol : água (4 : 1 : 5)

t-butanol : ácido acético : água (TBA-3 : 1 : 1)

n-hexano : acetato de etila (97 : 3)

n-hexano : acetato de etila (8 : 2)

Reagentes cromogênicos:

Reativo de Neu, reativo citrobórico, tricloreto de alumínio (1 % em etanol), tricloreto de antimônio (10 % em clorofórmio), vapores de amônia, reativo de Thymol à 1 % e luz ultra violeta de 254 e 360 nm.

2.3.2.4- Isolamento da substância:

O extrato acetato de etila (EMAE), obtido pelo processo 1 (19,6 g), foi cromatografado em coluna (C.C) com 100 g de sílica (Silicagel 60). Utilizou-se, como eluentes, o clorofórmio

com proporções crescentes de metanol; metanol com proporções crescentes de acetato de etila e metanol puro. Foram obtidas 154 frações. As frações foram concentradas em evaporador rotatório à vácuo, até um volume médio de 0,5 ml. As frações as quais apresentaram o mesmo comportamento por C.C.D, foram reunidas. As frações 84 e 85 foram reunidas e cromatografadas em papel Whatman 3 MM, em ácido acético a 25 %, descendente, percurso de 25 cm. A mancha correspondente a uma região onde não absorve luz ultra violeta, foi recortada e o extraído com metanol. Foi deixada evaporar o metanol em BM à 60°C (amostra A1). A amostra A1 foi dissolvida em metanol e analisada no espectrofotômetro de absorção de luz na região do UV.

Ao precipitado (P4), obtido pelo processo 2, foi adicionado 30 ml de etanol e aquecido em BM à 80°C. A solução etanólica foi filtrada em funil com fundo de vidro sinterizado número 1 e lavada com metanol. O sobrenadante obtido (S3) foi deixado evaporar o metanol em BM à 60°C, sendo denominada de amostra A2.

O extrato metanólico (EM2), obtido pelo processo 3, foi pré-purificado através de filtração em coluna de sílica gel. Através da coluna com sílica fez-se passar éter de petróleo, *n*-hexano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol e metanol até esgotar. Foram obtidas cinco frações metanólicas. Todas as frações foram concentradas em evaporador rotatório à vácuo, até um volume médio de 5 ml. As frações metanólicas foram concentradas, até quase secura, obtendo-se as frações FM1, FM2, FM3, FM4 e FM5. As FM3 e FM4 foram reunidas. O precipitado formado foi separado por centrifugação, obtendo-se o precipitado (P8) e o sobrenadante (S5). O S5 foi cromatografado em papel Whatman 3 MM, em ácido acético à 15 %, descendente, corrida de 25 cm. A mancha correspondente a uma região onde não absorve luz ultra violeta foi recortada e o papel lavado com metanol. Filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotatório à vácuo, até a secura. O precipitado formado foi lavado com metanol e filtrado por papel de filtro para separar o sobrenadante (S). O sobrenadante S foi transferido para um balão e completado o volume para 50 ml de metanol e denominada de amostra A3. A amostra (A3) foi analisada por espectros de absorção de luz na região do ultra violeta, da solução metanólica. A amostra A3 apresentou-se semi pura.

Com a amostra semi pura, foi efetuada a cromatografia em camada delgada preparativa, em metanol : água (9 : 1), em celulose. A região onde não absorve luz ultra violeta, correspondente à mancha de fluorescência laranja, revelada com reativo de Neu, a uma altura de Rf 0,35, foi raspada e a celulose foi lavada com metanol. A amostra foi analisada por espectros de absorção de luz na região do UV, da solução metanólica. A amostra (A4) apresentou-se pura, porém em baixa concentração. Prosseguiu-se o processo de isolamento da substância, através de cromatografia em coluna de celulose (20,5 cm de compr. por 9,5 cm de diâm.) com 20 g de celulose. Utilizou-se como eluentes, metanol puro inicialmente e metanol : água (9 : 1), 15 gotas por minuto. Foram obtidas 66 frações. As frações foram deixadas evaporar naturalmente até um volume médio de 0,5 ml. As frações as quais apresentaram o mesmo comportamento por C.C.D em metanol : água (85 : 15), foram reunidas. As frações de 33 a 42 foram reunidas (Fig. 04), obtendo-se a amostra denominada de F. ME 1A. A amostra foi analisada por espectros de absorção de luz na região do UV, da solução metanólica em uma diluição de 9 : 1 (Fluxograma 3).

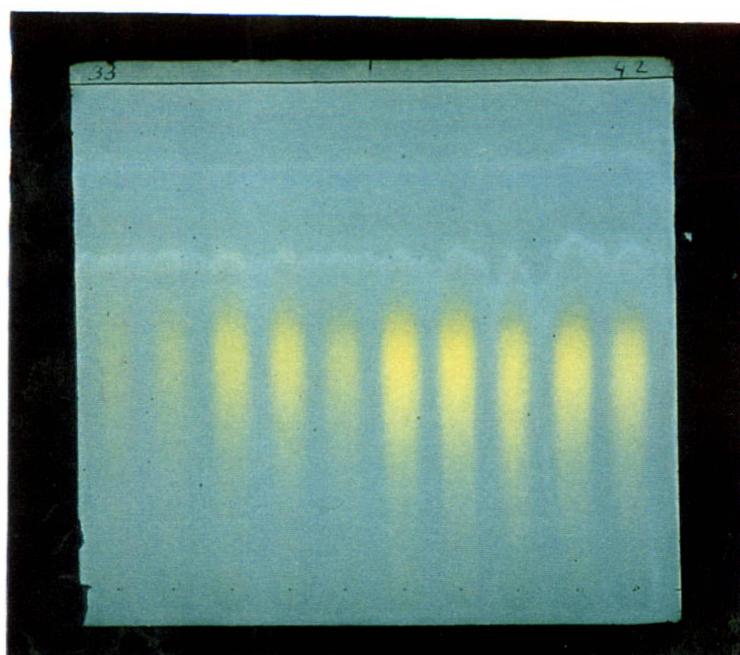
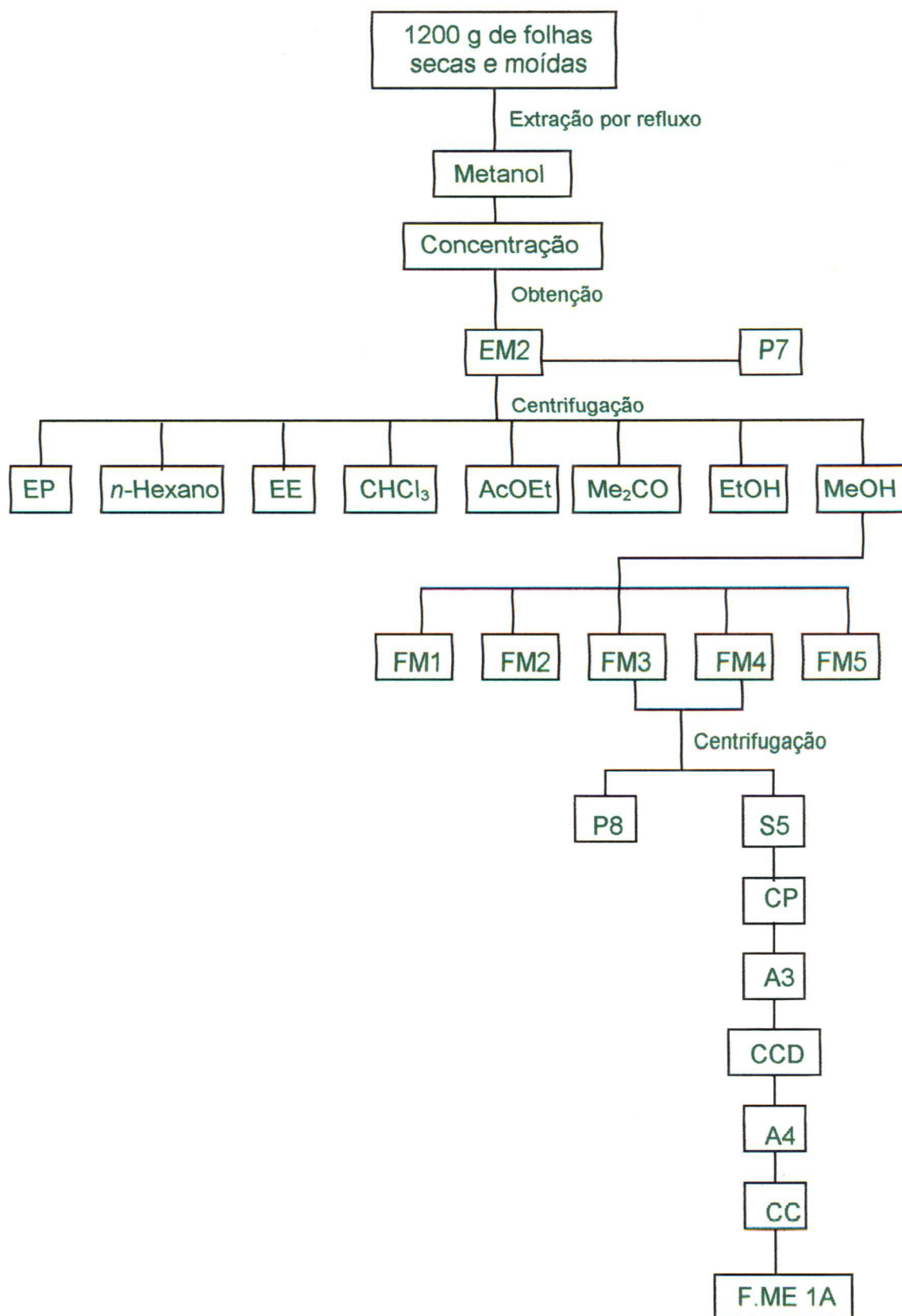


Fig. 04- Cromatografia em C.C.D, em celulose, das frações (33-42) obtidas da cromatografia em coluna.



Fluxograma 3 - Isolamento da substância F. ME 1A

2.3.2.5- Caracterização da substância

A substância foi caracterizada através de dados espectroscópicos Ultra Violeta (UV) e Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^1H), 300 Mhz.

A interpretação dos espectros UV e RMN ^1H foi realizada de acordo com MABRY; MARKHAM, & THOMAS, (1970), MARKHAM (1982) e SILVERSTEIN; BASSLER & MORRILL (1979).

2.4- Farmacologia

2.4.1- Material Botânico

Extrato bruto liofilizado das folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham., diluído em água destilada e deionizada no momento do uso.

2.4.2- Teste geral de atividade e determinação da Dose letal 50 % (DL₅₀):

2.4.2.1- Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), swiss, machos, adultos, pesando entre 17 g e 30 g.

Os camundongos, durante o tempo experimental, foram mantidos com alimentação constituída de ração balanceada e água à vontade.

2.4.2.2- Doses de extrato e vias de administração

O extrato bruto liofilizado das folhas foi aplicado nas seguintes doses: 1,0 g/kg, 2,0 g/kg, 2,5 g/kg, 5 g/kg, 7,5 g/kg e 10 g/kg. A administração foi por via oral, através de cânula de Gavage (cânula metálica) e por via intraperitoneal, através de seringas hipodérmicas.

2.4.2.3- Procedimento:

Os camundongos foram inicialmente pesados e marcados para identificação. Até o momento da administração das doses os camundongos foram mantidos em gaiolas de arame.

Foram utilizados 43 camundongos, divididos em grupos. Para as doses de 1,0 g/kg e 2,0 g/kg foram utilizados dois animais para cada dose, um para aplicação via oral e outro para via intraperitoneal. Para as doses de 2,5 g/kg e 7,5 g/kg, os grupos foram de oito camundongos, para a dose de 2,5 g/kg, sete camundongos receberam extrato via intraperitoneal e um animal recebeu via oral. Para a dose de 7,5 g/kg todos os animais receberam o extrato por via intraperitoneal. Para a dose de 5,0 g/kg foi utilizado um grupo de onze animais, nove para via intraperitoneal e dois para via oral. Para a dose de 10,0 g/kg, foi utilizado um grupo de doze animais, seis por via oral e seis por via intraperitoneal. Após receberem as doses de extrato, os animais foram colocados em uma mesa e observados. Os efeitos foram observados por um período de quatro horas, sem interrupção, e de hora em hora num período de sete dias (JUCK, 1995).

2.4.3- Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária:

Foi efetuado o teste de capacidade anti-inflamatória, de acordo com FRURMAN, (1991). Foram estimadas as medidas descritivas básicas referente à média, variância e desvio padrão. Para a comparação dos grupos, foi aplicado o Test “t” de Student, comprovando desigualdade ou igualdade de resultados ao nível de 5 % de significância (VIEIRA, 1983).

2.4.3.1- Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), swiss, machos, de 60 dias, pesando entre 20 e 24 g. Os animais foram separados em quatro grupos de seis, pesados, identificados e alojados em gaiolas de arame. Os animais receberam ração balanceada e água, antes e durante o experimento.

2.4.3.2- Concentração do extrato e via de administração

A concentração de extrato foi de 600,0 mg/ml administrado por via oral através de cânula de Gavage.

2.4.3.3- Drogas e reagentes

As drogas e os reagentes utilizados nos ensaios farmacológicos estão relacionados em anexo.

2.4.3.4- Procedimento

Grupo I- receberam, por via intraperitoneal 0,1 ml de solução salina à 0,9 %.

Grupo II- receberam, por via intraperitoneal, 0,1 ml de ovoalbumina 10,0 mg/ml.

Grupo III- receberam, por via intraperitoneal, 10,0 mg/kg de Dexametasona.

Grupo IV- receberam, via oral, a dose de 7,5 g/kg de extrato bruto liofilizado das folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham., diluído em água destilada e deionizada.

Os animais dos grupo III e IV receberam após uma hora, 0,1 ml de solução de ovoalbumina 10,0 mg/ml, por via intraperitoneal.

Os animais foram anestesiados e sacrificados por exangüinação. Seguiu-se a injeção de 3 ml de PBS/Heparina 5 U/ml no peritônio seguido de massagem suave. Foi colhido 2 ml do exsudato em seringa descartável e colocado 1,0 ml em líquido de TURK (0,05 ml) para posterior contagem das células. O exsudato permaneceu à temperatura de 10⁰ C até a contagem das células.

2.5- Microbiologia

2.5.1- Material Botânico

Foi empregado o extrato bruto hidroalcoólico das folhas e da casca de *Citharexylum myrianthum* Cham., na concentração de 40 µl (400µg).

2.5.2- Procedimento

2.5.2.1- Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados a partir de folhas e da casca estabilizadas e moídas. Pesou-se 1 g de folhas e casca e macerou-se em 10 ml de solvente, equivalentes a 100 mg/ml. Deixou-se o extrato em maceração por, no mínimo, 12 horas, à temperatura ambiente.

2.5.2.2- Metodologia

A atividade antimicrobiana das folhas e da casca de *Cihtarexylum myrianthum* Cham. foi realizada de acordo com o método de difusão em ágar, também conhecido por metodologia de KIRBY-BAUER, segundo os autores DELLAR, *et al.* (1994), OSAWA, *et al.* (1994), TOPÇU *et al.* (1993), BRAVO & LAZO (1993), GÖREN, *et al.* (1992) e WOISKY; GIESBRECHT & SALATINO (1994).

III- RESULTADOS

3.1- Botânica

3.1.1- Aspectos Botânicos

A- Descrição Botânica

A espécie *Citharexylum myrianthum* Cham. é uma árvore de 8 a 18 m de altura, tronco de 40 a 60 cm de diâmetro, caducifolia. Folhas membranáceas a subcoriáceas, opostas, simples, inteiras, ápice agudo e base decurrente, discolores de 10 a 20 cm de comprimento por 3 a 7 cm de largura. Pecíolo canaliculado com um par de glândulas na base da lâmina foliar. Inflorescência multiflora em panículas axilares e terminais, de 8 - 22 cm compr. Flores andróginas, cálice tubuloso a campanulado de 0,4 - 0,5 cm compr. com 5 dentes curtos e desiguais. Corola hipocrateriforme de 1,5 - 2,0 cm compr. Tubo da corola amarelo-esverdeado e pétalas alvas. Androceu com 5 estames inclusos. Gineceu com ovário súpero, bicarpelar e bilocular com 2 rudimentos seminiais por lóculo; estilete de aproximadamente 1,5 mm de compr.; estigma de 0,5 mm de compr., arredondado. Fruto drupa arredondada de aproximadamente 1,5 cm de compr. por 0,8 - 0,9 cm de larg., vermelho vivo quando maduro, polpa carnosa com 2 pirênios e cada um com duas sementes. Sementes oblongas, alvas, achatadas e amêndoa bipartida.

B- Fenologia e Ecologia

No Paraná *Citharexylum myrianthum* Cham. floresce de outubro a dezembro e a frutificação de janeiro a princípios de março.

Citharexylum myrianthum Cham. é uma árvore da vegetação secundária, principalmente de capoeirões, situados nas várzeas úmidas e planícies quaternárias da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) nas formações Aluvial e Baixa Montana. É uma planta decídua, heliófita e seletiva higrófito.

3.1.2- Anatomia Foliar

A venação da folha é do tipo pinada, camptódroma, eucamptódroma. As últimas ramificações delimitam no mesófilo pequenas áreas ou aréolas de tipos quadrangular e/ou pentagonal. Nas aréolas ocorrem terminações vasculares livres, simples do tipo linear e curvada e ramificadas. Algumas terminações vasculares de fundo cego são observadas (Fig. 05).

A epiderme da face adaxial revela células de contorno poliédrico de paredes anticlinais retas em vista frontal (Fig. 05-D).

Os complexos estomáticos são do tipo anomocítico e ocorrem em ambas as faces, com maior incidência destes na face abaxial, caracterizando a folha como anfihipoestomática. Estes são constituídos por duas células reniformes, as células estomáticas, circundadas por quatro ou mais células epidérmicas, de formato irregular, caracterizando o estômato como do tipo anomocítico (Figs. 05-D e 06).

Na face abaxial ocorrem estômatos de diferentes tamanhos (Fig. 06-C).

A epiderme apresenta-se uniestratificada ou pluriestratificada, quando na nervura principal e na região de extensão de bainha. As células epidérmicas variam em formato e dimensão, conforme a região e a face da lâmina foliar (Figs. 08 e 09).

Não foram registrados estômatos na epiderme que recobre as nervuras (Fig. 06-B).

A lâmina foliar tem organização dorsiventral ou bifacial. O mesófilo apresenta dois estratos de parênquima paliádico, sendo o primeiro, constituído de células mais estreitas e longas em oposição ao mais interno onde as células são mais curtas e menor ocorrência de espaços intercelulares (Figs. 08 e 09).

O parênquima lacunoso é multiestratificado, provido de grandes lacunas (Figs. 08 e 09).

As células epidérmicas da face abaxial, em vista frontal, apresentam paredes anticlinais sinuosas (Fig. 06-B, C e D).

Na região sobre as nervuras, as células em ambas as faces, apresentam formato poligonal e alongadas, no sentido longitudinal da folha (Fig. 06-B).

Tricomas tectores e glandulares são encontrados em ambas as faces da lâmina foliar (Figs. 06-A e 07).

Os tricomas tectores são simples, unicelulares ou pluricelulares com duas e três células, unisseriados, apresentando-se longos com extremidades afiladas. Também ocorrem tricomas de formas simples, curtos (Figs. 06-A, 07 e 09-B).

Os tricomas glandulares são multicelulares, constituídos de quatro a mais células, no “caput”(Figs. 05-B e 07).

Os tricomas encontram-se localizados em maior quantidade na epiderme da face abaxial, próxima à nervura principal, região onde ocorre grande quantidade de tricomas tectores longos e delgados (Fig. 07).

A nervura principal em secção transversal revela uma proeminência na face adaxial constituída predominantemente por parênquima (Figs. 10-B e 11-A).

A face abaxial constitui a parte principal da nervura. Nesta região, internamente à epiderme, ocorrem diversos estratos de colênquima seguidos de 12 estratos de parênquima (Figs 10-B e 11-B).

O feixe vascular da nervura principal é colateral, descrevendo um arco ao longo da nervura. A nervura principal apresenta esclerênquima, floema, metaxilema, protoxilema, dispostos em anéis. A região central é ocupada por parênquima medular (Figs. 10-B e 11-B).

O pequeno feixe vascular localizado no parênquima medular é anficrival (Fig. 12-A).

As nervuras de médio porte, no limbo foliar, apresentam-se envolvidas por uma bainha com uma ou mais camadas de células compactadas, que formam extensão de bainha (Figs. 08-B e 09-A).

Circundando o feixe vascular grande número de idioblastos portando drusas se fazem presentes, assim como em toda a extensão do mesofilo (Figs. 10-A e 12-B).

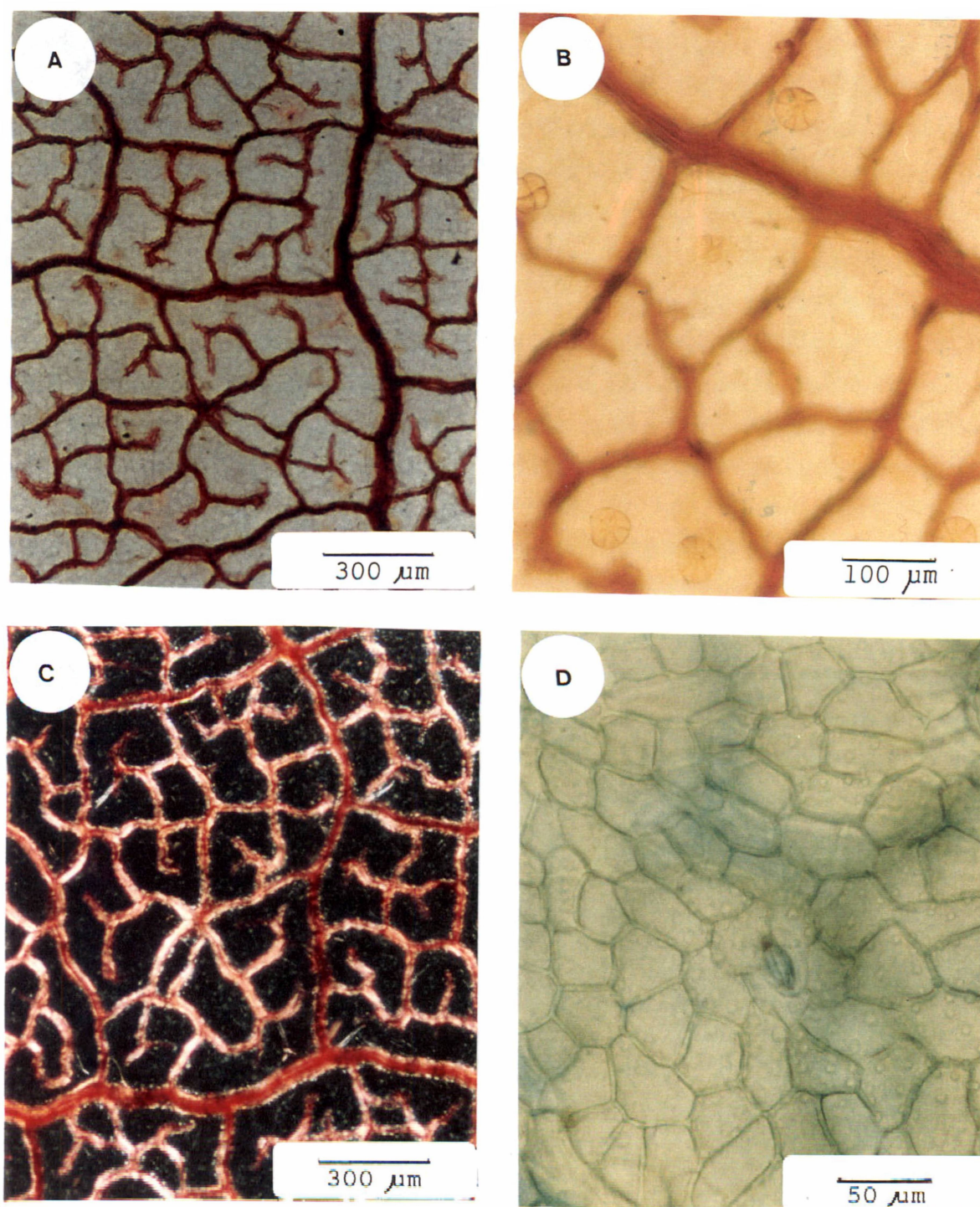


Fig. 05- Epiderme da folha de *Citharexylum myrianthum* Cham. (Microscopia Fotônica- MF). A- Vista frontal da face adaxial; B- Face abaxial; C- idem a A, com polarização; D- Face adaxial registrando estômato.

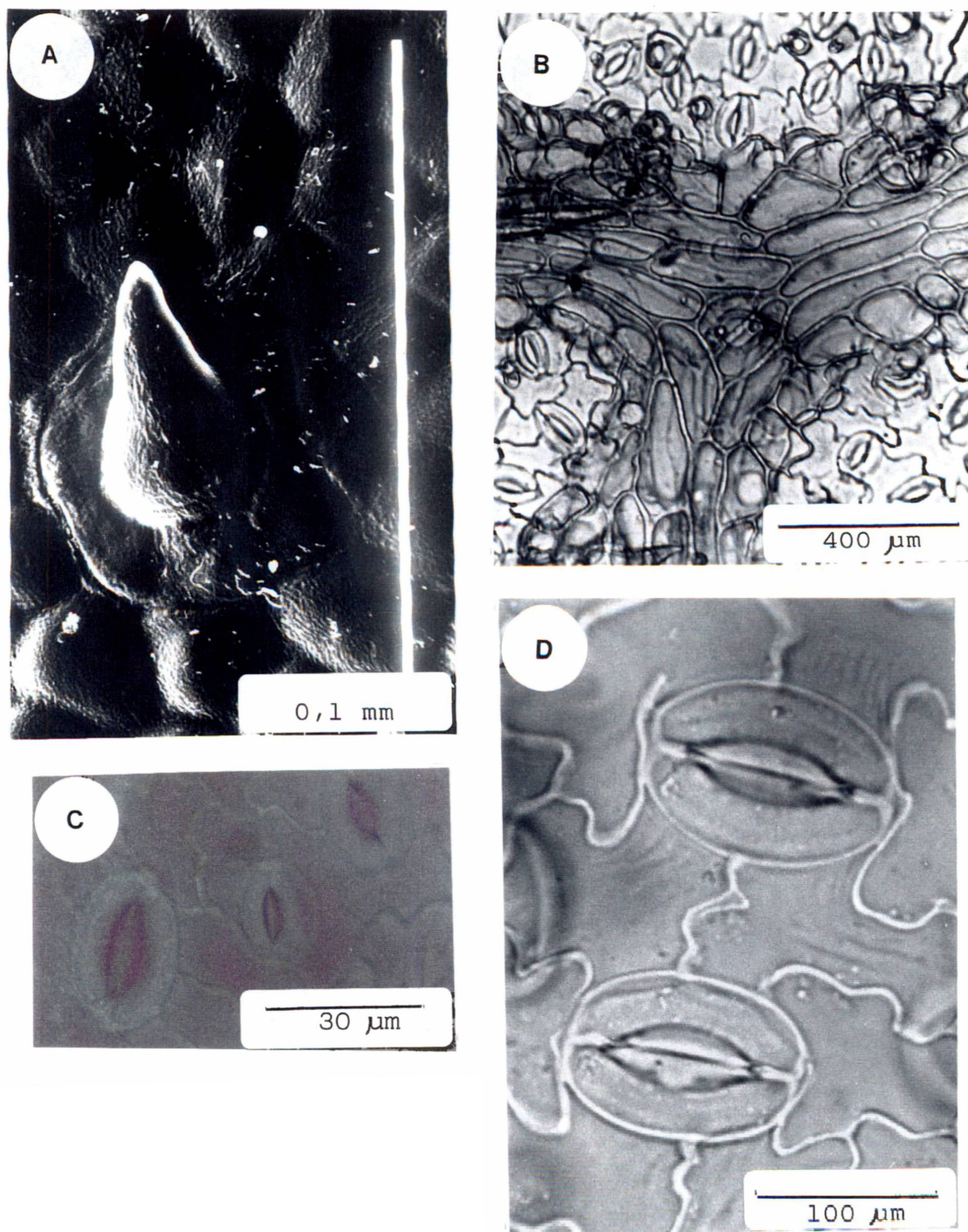


Fig. 06- Detalhes das epidermes. A- Face adaxial - Detalhe de tricoma tector (Microscopia eletrônica de varredura- MEV); B- Face abaxial (MF); C- Face abaxial (estômatos de diferentes tamanhos) (MF); D- Face abaxial - estômatos anomocíticos e estrias epicuticulares (MF).

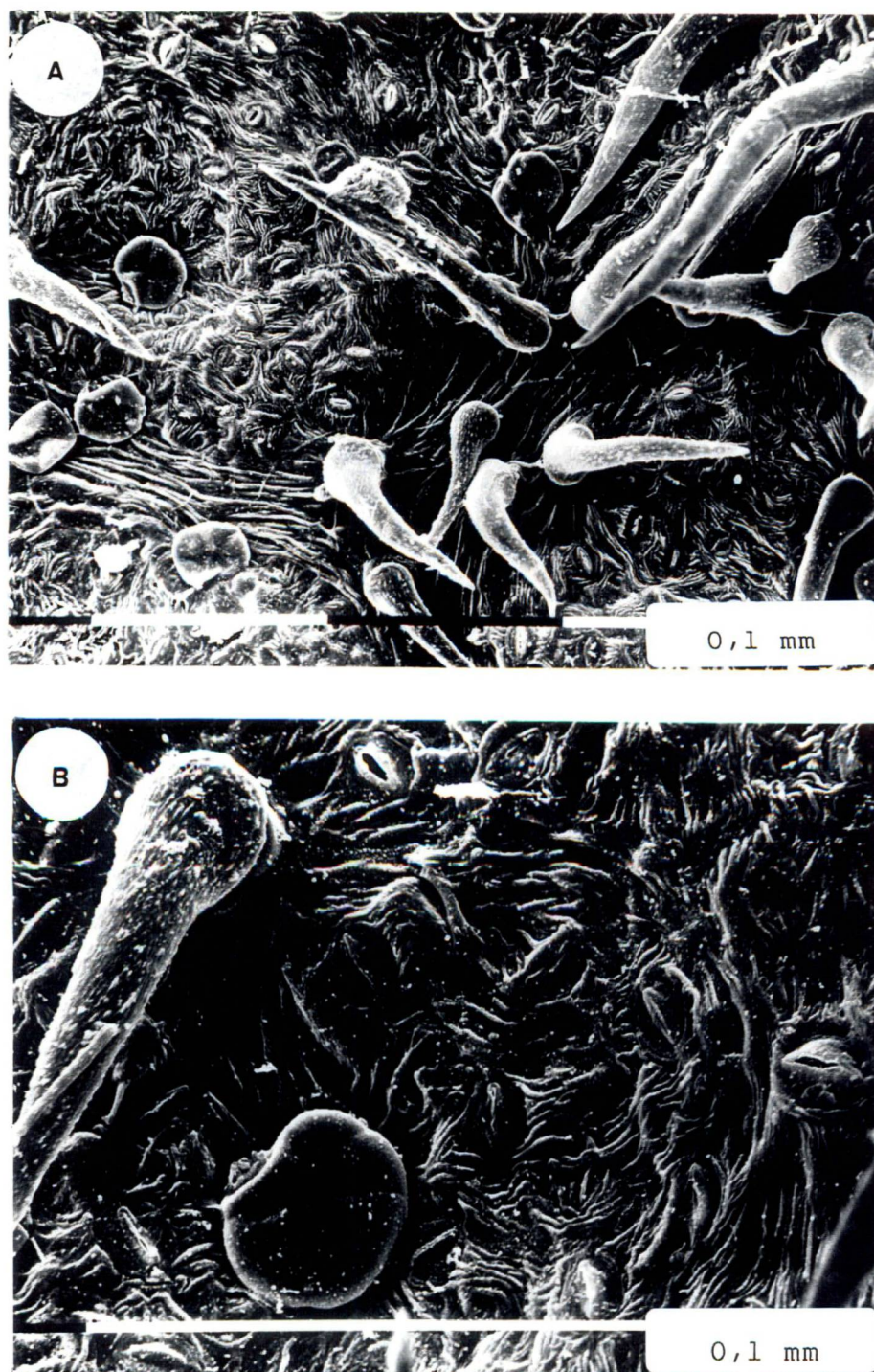


Fig. 07- Face abaxial (MEV). A- Vista geral, com tricomas tectores e glandulares; B- Detalhes da figura anterior, com estrias epicuticulares.

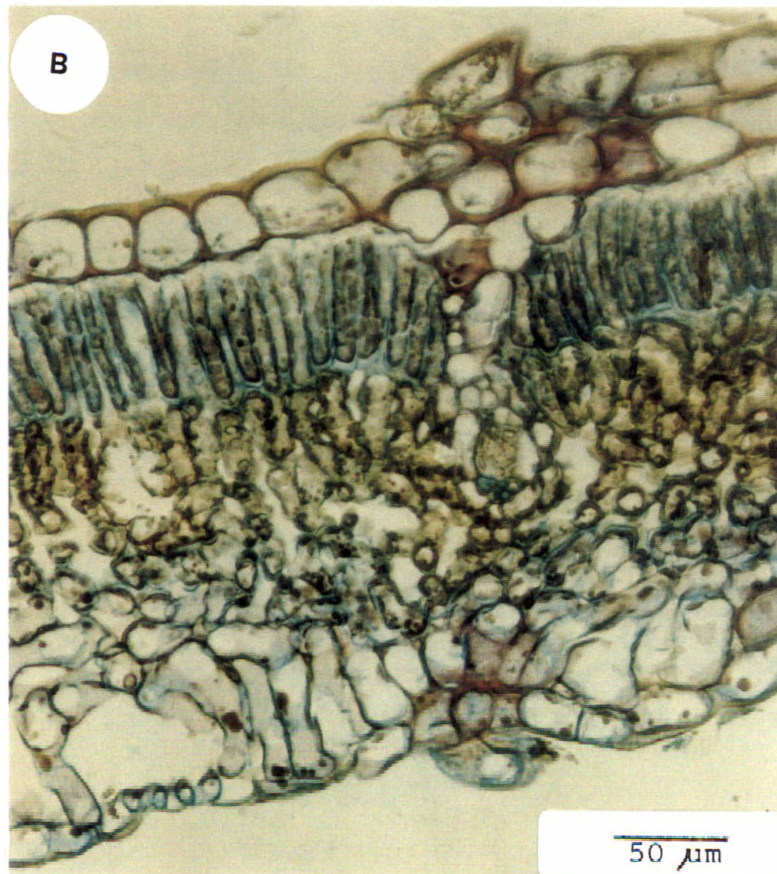
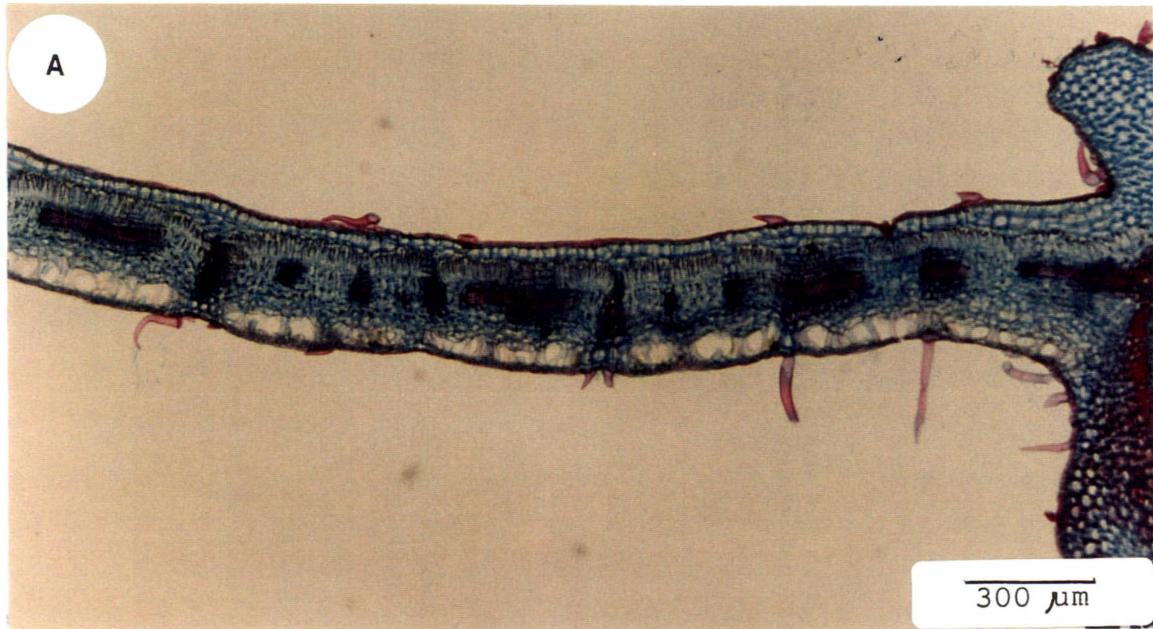


Fig. 08- Secção transversal da lâmina foliar (MF); A- Vista geral; B- Detalhe do mesofilo.

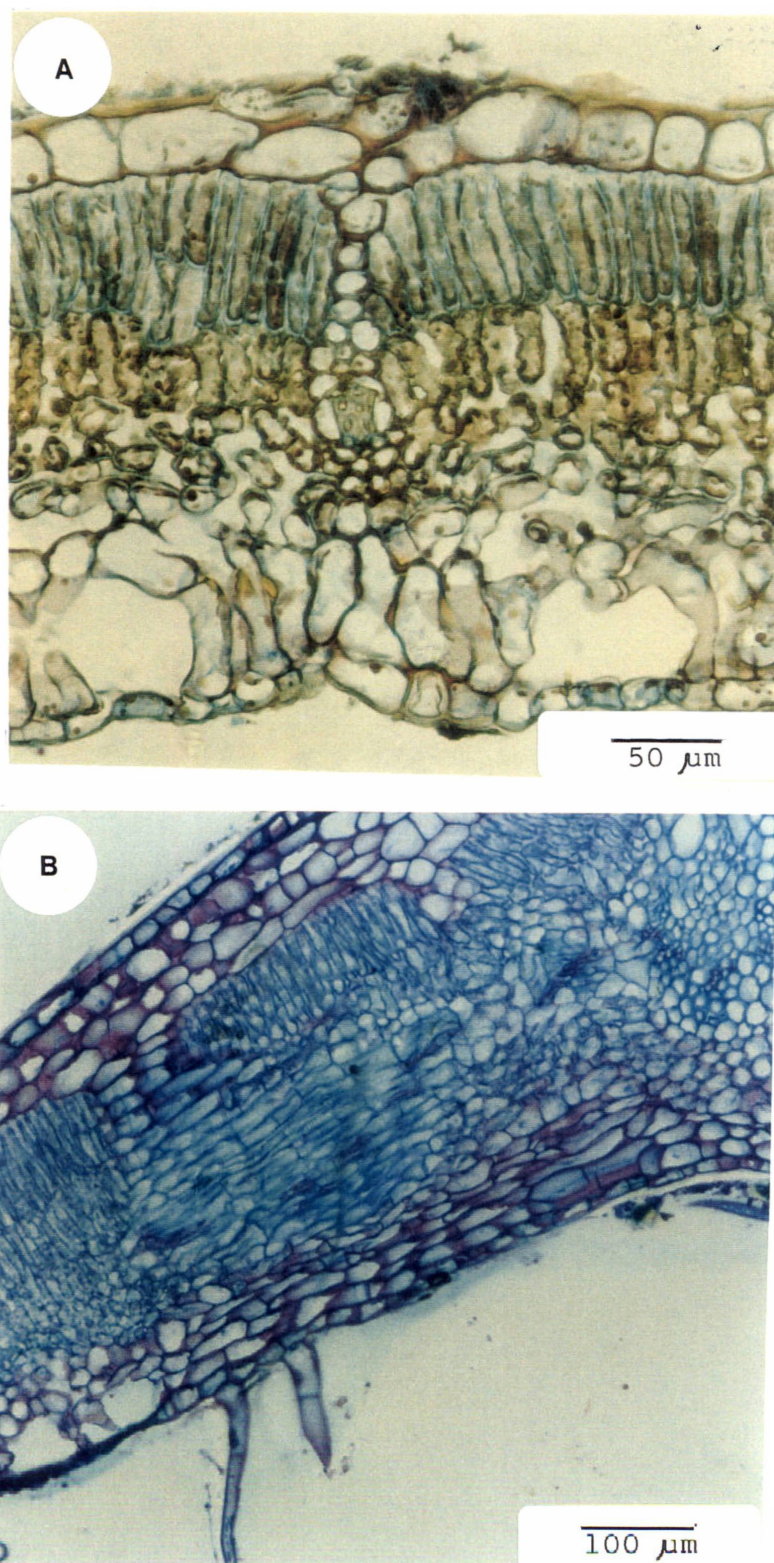


Fig. 09- Limbo foliar em secção transversal (MF). A- Extensão da bainha; B- Próximo à nervura principal, com vários estratos epidérmicos em ambas as faces, bem como de parênquima clorofiliano paliçádico.

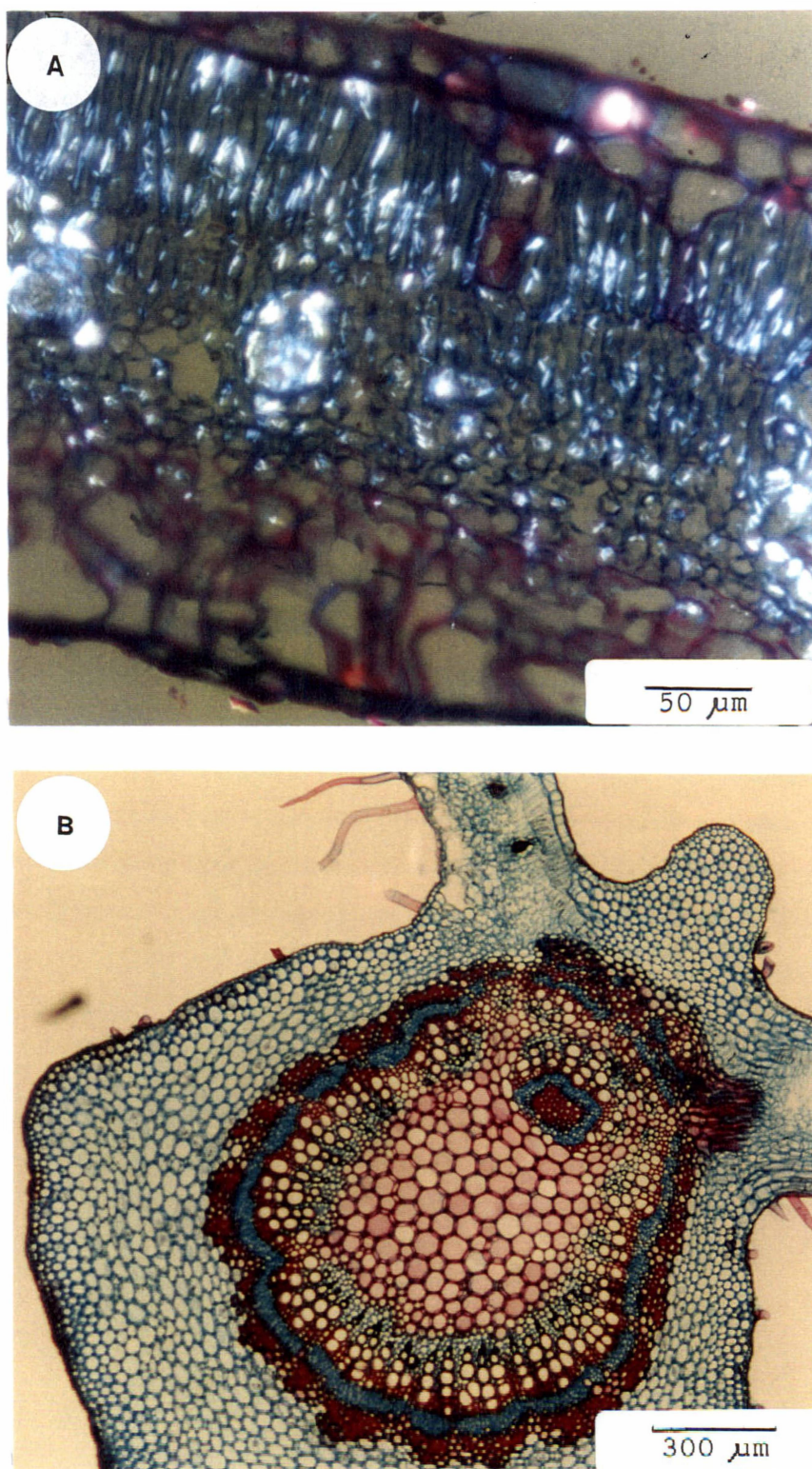


Fig. 10- Folha em secção transversal (MF). A- Detalhe do limbo em polarização; B- Vista geral da nervura principal.

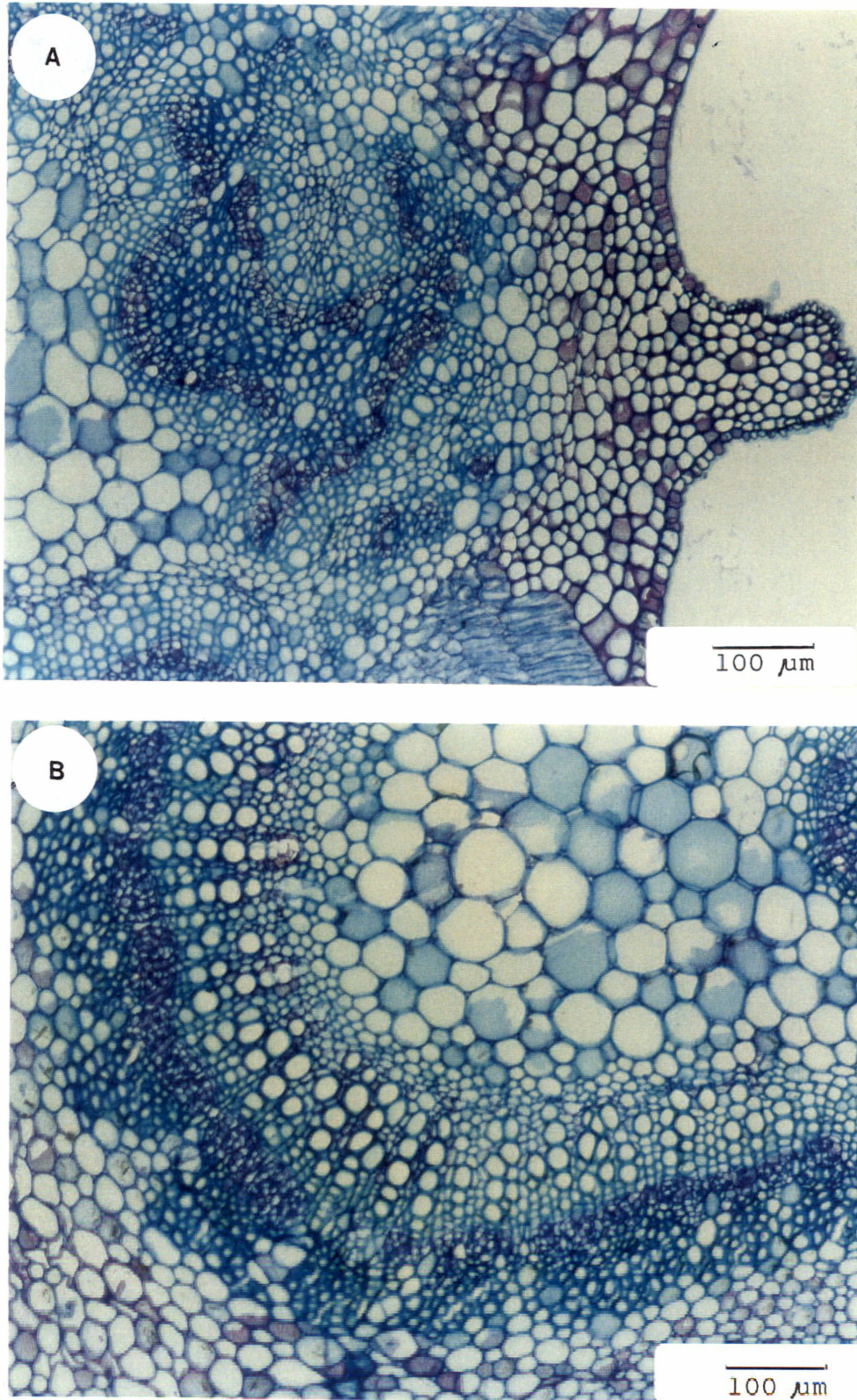


Fig. 11- Nervura principal em secção transversal (MF). A- Face adaxial; B- Face abaxial.

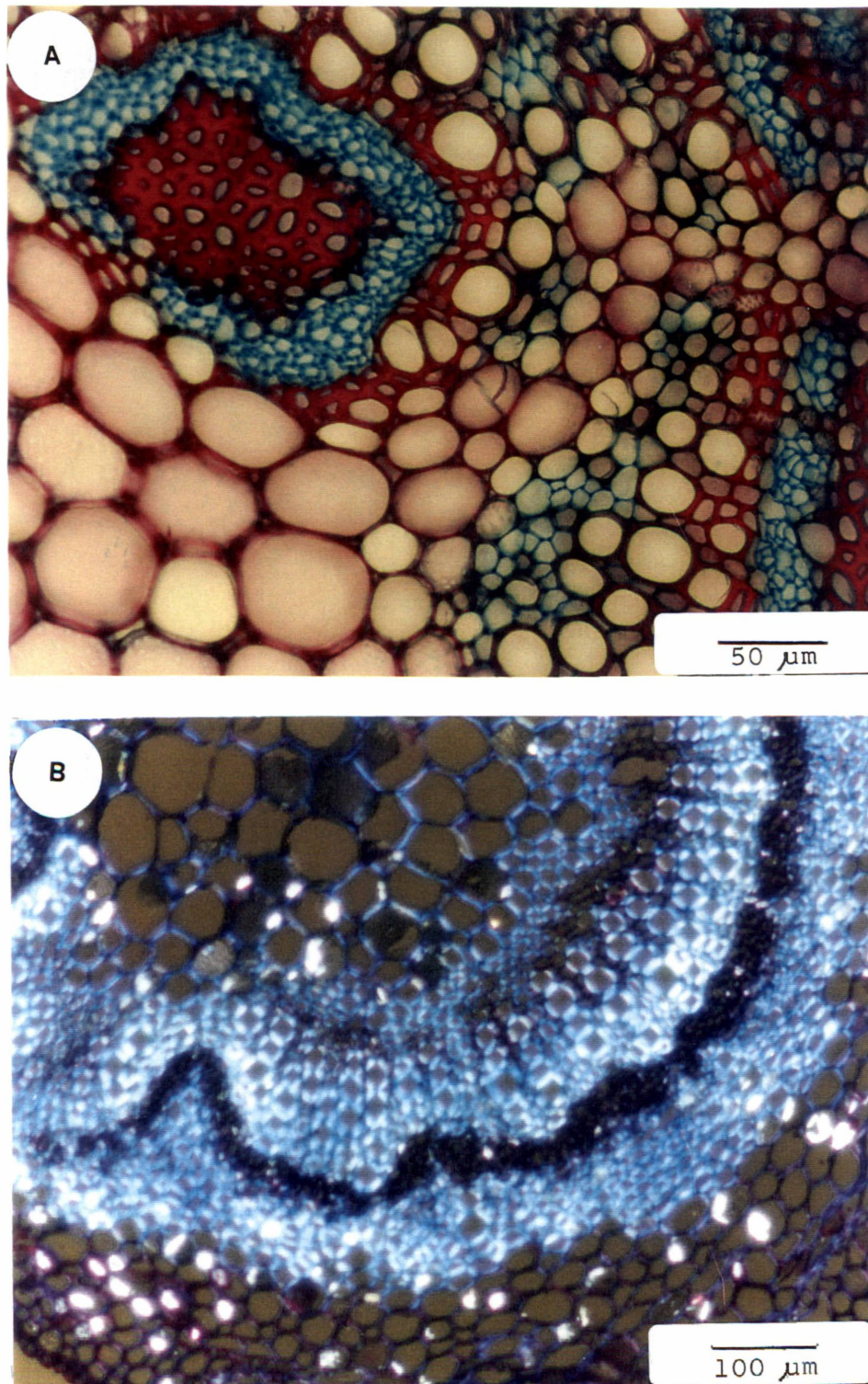


Fig. 12- Detalhe da nervura principal (MF). A- Detalhe destacando feixe e câmbio; B- idem em polarização.

3.2 - Fitoquímica

3.2.1 - Ensaio preliminares

Extrato hidroalcoólico à 20 %

Metabólitos secundários	Resultados	
	folha	casca
Alcalóides		
MAYER	positivo	negativo
BERTRAND	positivo	negativo
BOUCHARDAT	positivo	negativo
DRAGENDORFF	precipita	negativo
Cumarinas		
Papel alcalino de NaOH	negativo	negativo
Flavonóides		
R. de SHINODA	vermelho	amarelo
Quinóides		
R. de BORNTRAEGER	vermelho	amarelo
Esteróides e/ou triterpenos		
R. de LIEBERMAN-BOUCHARD	verde	verde

Extrato aquoso à 20 %

Metabólitos secundários	Resultados	
	folha	casca
Taninos		
a) cloreto férrico	verde	esverdeado
b) sulfato de ferro amoniacal a 1 %	verde	esverdeado
c) acetato de chumbo a 10 %	negativo	precipita
d) NaCl / gelatina a 2,5 %	precipita	negativo
e) formol-clorídrico:		
(taninos condensados)	verde	negativo
(taninos hidrolisáveis)	negativo	azulado
Antociânicos		
Caráter anfótero	positivo	positivo
Saponinas		
Agitação		
a) Adição de ácido	< 1 cm	> 1 cm
b) Adição de base	< 1 cm	< 1 cm
c) Neutralização	< 1 cm	= 1 cm
Amino Grupos		
R. da Ninhidrina	rosa	rosa
Determinação do pH	5,0- 6,0	5,0- 6,0

3.2.2 - Propriedade físico-química de F. ME 1A

A substância isolada tem p.f. 166⁰C.

3.2.3 - Análises espectrométricas

3.2.3.1 - Espectrometria de Ultra Violeta (UV)

O espectro UV de F. ME 1A apresentou $\lambda_{\text{máx.}}(\text{MeOH}) = 343 \text{ nm}$ (banda I) e 274 nm (banda II). Na tabela abaixo estão relacionadas as bandas obtidas com os diversos reativos.

Tabela: Espectro UV de F. ME 1A em metanol e na presença de reativos:

Solventes e Reativos	Comprimento de onda (nm)			Interpretação
	Bandas			
	I	II	III	
CH ₃ OH	343	274	253	flavona ou flavonol (3-hidroxil substituído)
CH ₃ OH + NaOH	388	267	211	OH livre em 4'
CH ₃ OH + AlCl ₃	374	285	263	OH livre em 5
CH ₃ OH + AlCl ₃ + HCl	369	287	261	OH em 3 e/ou 5
CH ₃ OH + NaOAc	408	346	272	OH livre em 7
CH ₃ OH + NaOAc + H ₃ BO ₃	343	274	209	Sistema ortodihidroxila

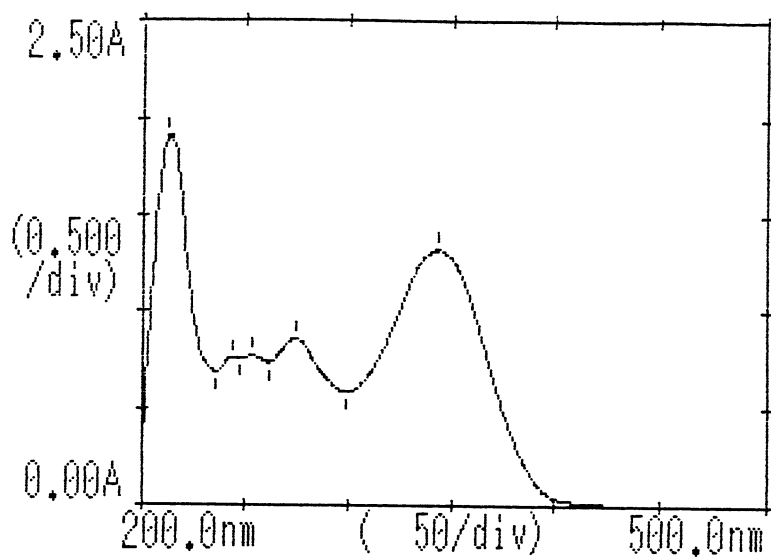
Espectro UV da amostra F. ME 1A $\lambda_{\text{máx.}} (\text{MeOH}) = 343 \text{ nm}$ 

Fig. 13- Espectro UV de F. ME 1A em metanol.

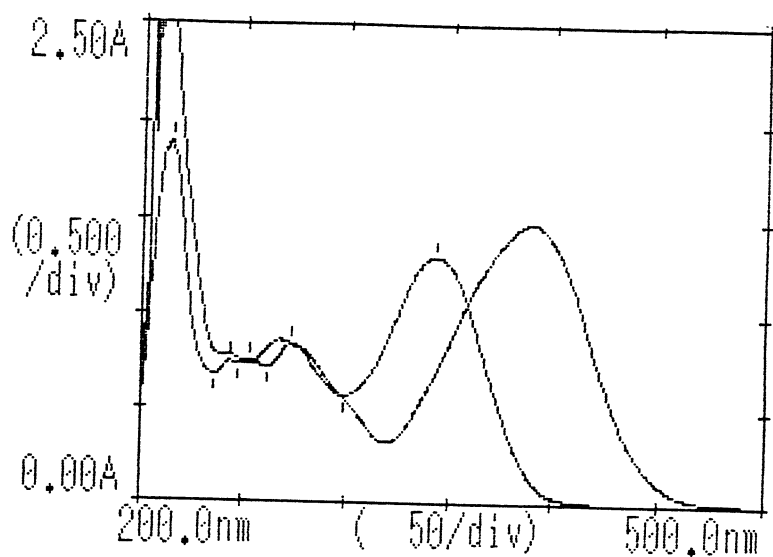
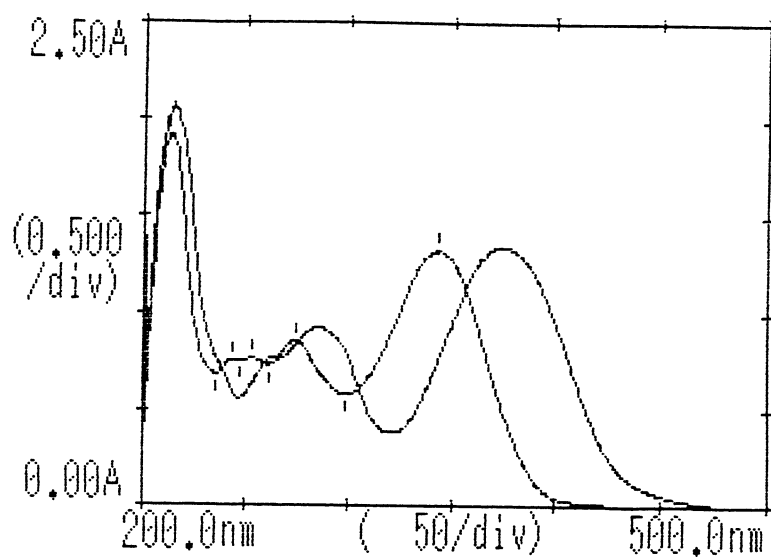
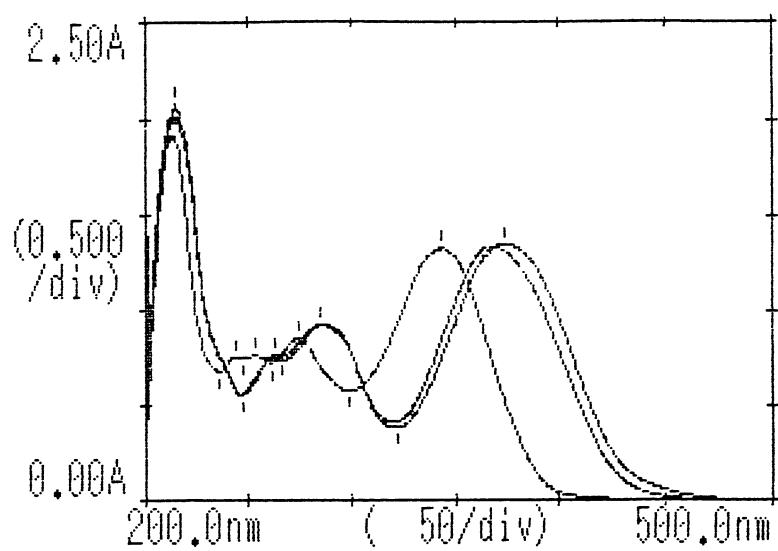
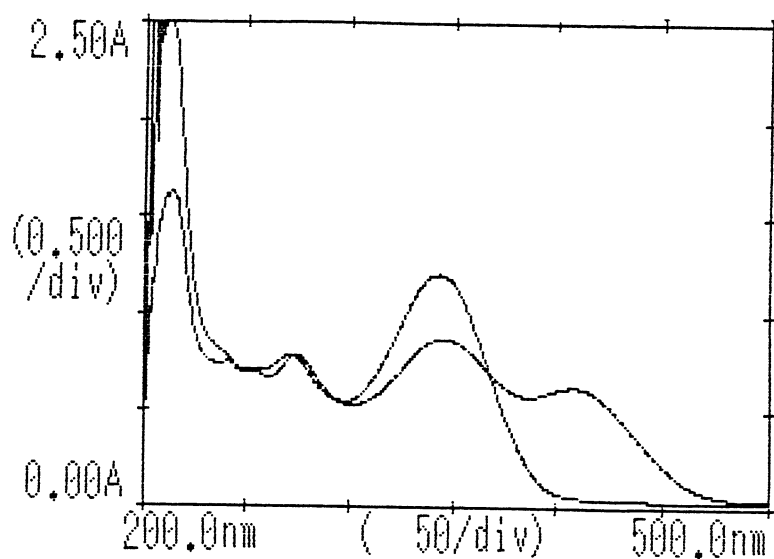
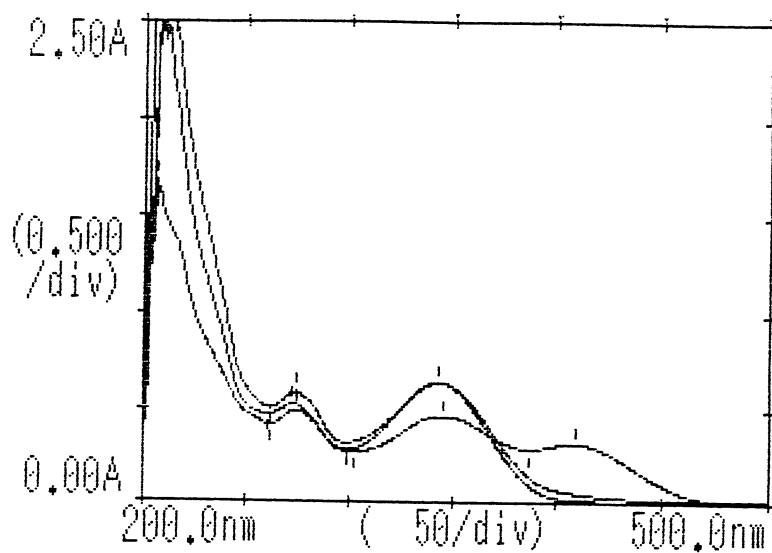
Espectro UV $\lambda_{\text{máx.}} (\text{MeOH} + \text{NaOH}) = 388 \text{ nm}$ 

Fig. 14- Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + NaOH.

Espectro UV $\lambda_{\text{máx.}} (\text{MeOH} + \text{AlCl}_3) = 374 \text{ nm}$ Fig. 15- Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + AlCl₃.Espectro UV $\lambda_{\text{máx.}} (\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}) = 369 \text{ nm}$ Fig. 16- Espectro UV de F. ME 1A em MeOH + AlCl₃ + HCl.

Espectro UV $\lambda_{\text{máx.}} (\text{CH}_3\text{OH} + \text{NaOAc}) = 408 \text{ nm}$ Fig. 17- Espectro UV de F. ME 1A em $\text{CH}_3\text{OH} + \text{NaOAc}$.Espectro UV $\lambda_{\text{máx.}} (\text{CH}_3\text{OH} + \text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3)$ Fig. 18- Espectro UV de F. ME 1A em $\text{CH}_3\text{OH} + \text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$.

Espectro UV de F. ME 1A após a hidrólise ácida:

$\lambda_{\text{máx.}}$ (MeOH) = 341 nm pela banda I e 282 nm pela banda II.

Tabela : Espectro UV de F. ME 1A em metanol e na presença de reativos, após a hidrólise ácida:

Solvente e Reativos	Comprimento de onda máximo (nm)	
	Bandas	
	I	II
CH ₃ OH	341	282
CH ₃ OH + NaOH	391	299
CH ₃ OH + AlCl ₃	374	296
CH ₃ OH + AlCl ₃ + HCl	370	295
CH ₃ OH + NaOAc	401	351
CH ₃ OH + NaOAc + H ₃ BO ₃	336	282

3.2.3.2 - Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^1H), 300 Mhz:

A amostra F. ME 1A apresentou o espectro abaixo:

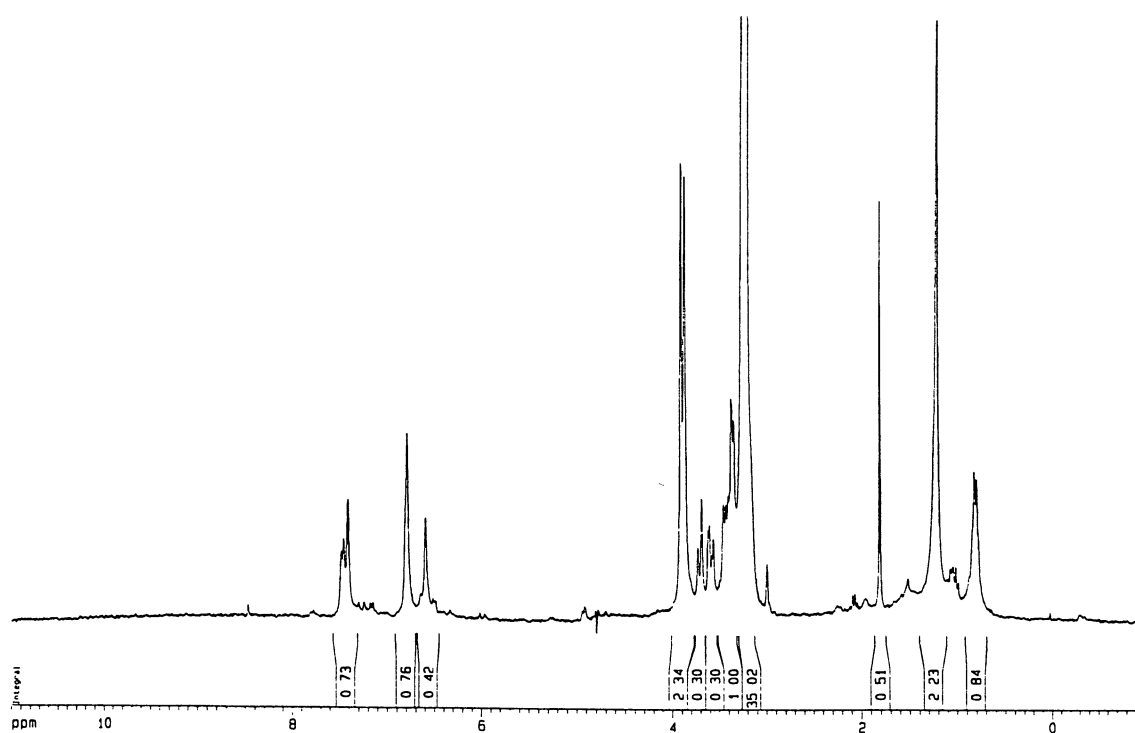


Fig. 19- Espectro de RMN ^1H , 300 Mhz, da substância F. ME 1A em metanol deuterado.

3.3 - Farmacologia

3.3.1 - Teste geral de atividade e DL_{50}

Nos camundongos que receberam as doses de 1,0 g/kg a 10,0 g/kg, por via intraperitoneal, foi observado alteração do tonus muscular, diminuição de motilidade, contorção abdominal, alteração respiratória, perda de apreensão das patas, ptose palpebral, dificuldade de deambulação, chegando à convulsão e morte com intensa dificuldade respiratória.

Por via oral, os camundongos apresentaram sinais e sintomas característicos de estimulação do sistema nervoso central, que são a hipersensibilidade ao tato, agitação e movimentos estereotipados. Por esta via de administração não houve morte e aparentemente os animais apresentaram-se normais após terem ficado sete dias em observação.

A DL_{50} por via intraperitoneal foi de 5,0 g/kg. O valor da DL_{50} foi usado como orientação para se determinar a dose máxima a ser usada nos experimentos, sem produção de efeitos tóxicos.

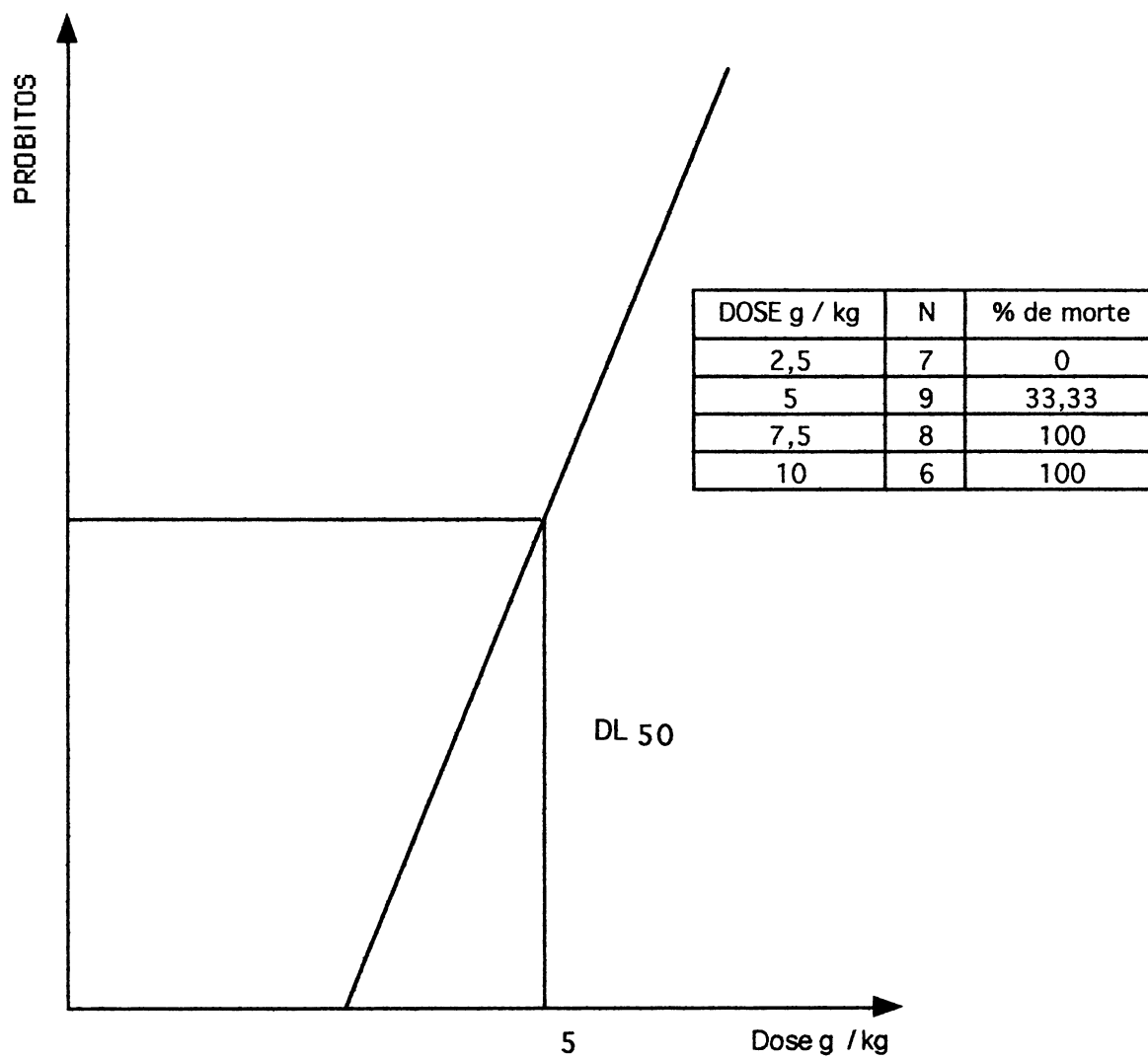


Fig. 20- Determinação da dose letal à 50 %.

3.3.2 - Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária

Número de células totais em 1 ml de exsudato no peritônio x 10^6 , em função do tratamento e do tempo:

Tratamento	Tempo	
	4 horas	24 horas
S/ tratamento / Salina IP	7,3 +/- 2,43	11,6 +/- 3,39 **
S/ tratamento / Ovoalbumina IP	12,5 +/- 4,49	19,5 +/- 10,45
Dexametasona / Ovoalbumina IP	6,9 +/- 2,05 ***	7,6 +/- 4,20***
Extrato V.O / Ovoalbumina IP	11,2 +/- 3,83	21,8 +/- 7,92

* cada valor significa a média de sete a onze animais e desvio padrão $\geq 0,05$.

** e *** estatisticamente significante em relação ao grupo sem tratamento / ovoalbumina.

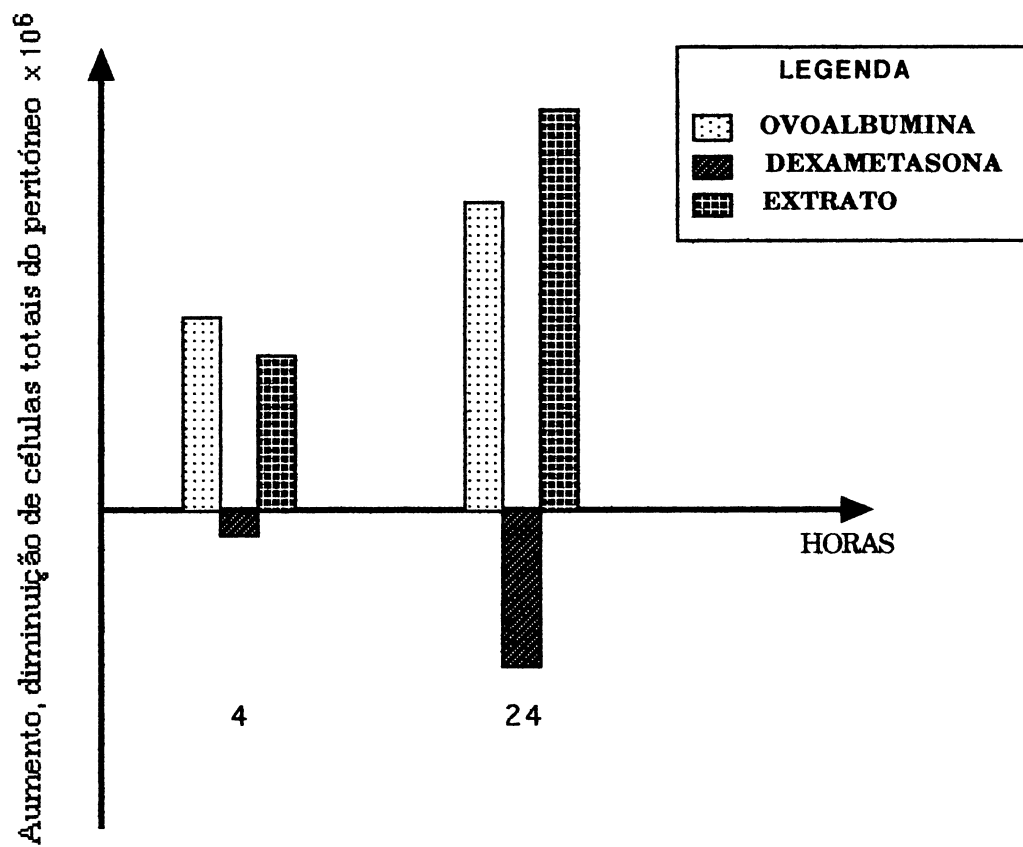


Fig. 21- Migração celular, aumento e diminuição de células totais no peritônio x 10⁶ em função do tratamento e do tempo.

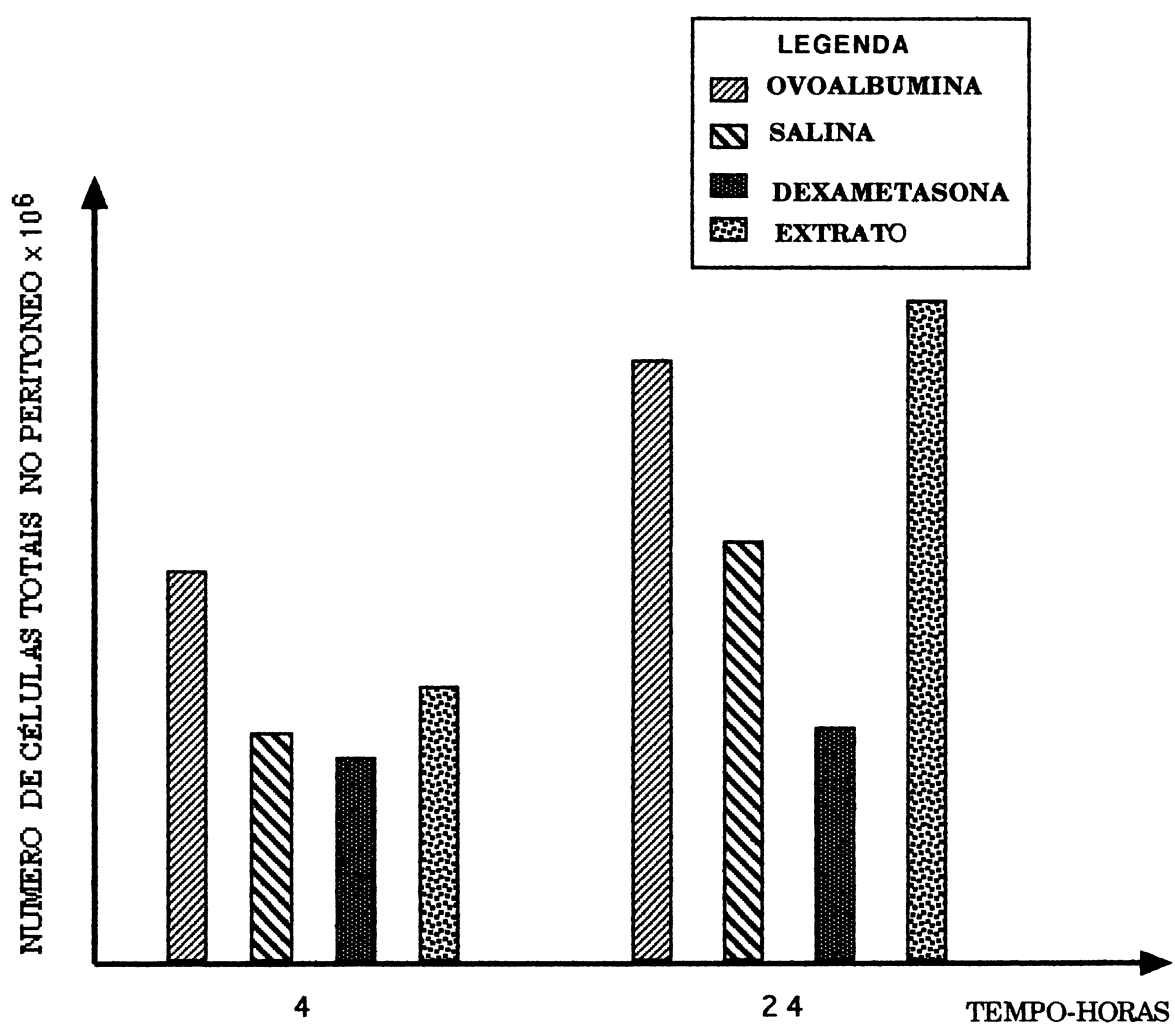


Fig. 22- Migração celular, n^o de células totais no peritônio x 10⁶.

3.4 - Microbiologia

As análises microbiológicas demonstraram que o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham. apresenta atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*, pelo método de difusão em ágar ou metodologia de KIRBY-BAUER. O extrato hidroalcoólico da casca não apresentou atividade antimicrobiana, pela mesma metodologia (Fig. 23).

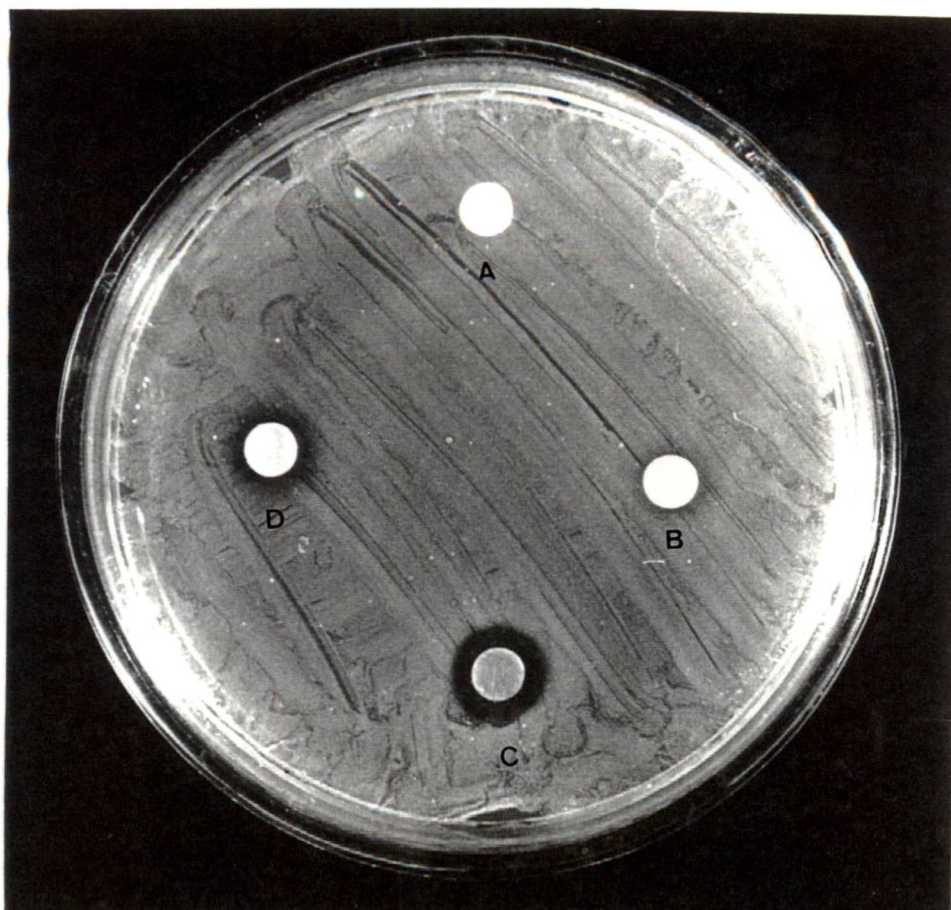


Fig. 23- Ensaio microbiológico dos extratos hidroalcoólico bruto das folhas e casca de *Citharexylum myrianthum* Cham. A- branco; B- casca; C- folha (40 μ l) e D-folha (20 μ l).

IV- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1- Botânica

A epiderme tem geralmente a espessura de uma camada de células. Em algumas plantas, porém, a protoderme das folhas divide-se paralelamente à superfície (periclinalmente) e as derivadas dessas divisões dividem-se, por sua vez, de modo a produzir um tecido de várias camadas ontogeneticamente relacionadas. Tal tecido é identificado como epiderme múltipla (ESAU, 1985).

A epiderme da espécie estudada apresenta regiões uniestratificadas e pluriestratificadas com duas ou mais camadas de células.

SOLEREDER (1908), relata a presença de uma hipoderme de várias camadas, na face adaxial da folha em espécies de *Avicennia*, também representante da família Verbenaceae.

METCALFE & CHALK (1979) revisaram a terminologia já existente para identificar os diferentes tipos de estômatos. De acordo com essa classificação, as folhas de *C. myrianthum* Cham. possuem estômato do tipo anomocítico, o que é freqüente no gênero *Citharexylum* (METCALFE, 1950).

De acordo com METCALFE (1950), os estômatos no gênero *Citharexylum* podem estar presentes em ambas as faces da folha ou apenas na face abaxial. A folha da espécie estudada é anfihipoestomática.

Observou-se que os complexos estomáticos da face abaxial apresentam-se em diferentes tamanhos.

SOLEREDER (1908) cita como regra para a família Verbenaceae, que os estômatos são circundados por um considerável número de células epidérmicas, mas o tipo cariofiláceo, tipo diacítico na terminologia de METCALFE & CHALK (1979), com células subsidiárias posicionadas transversalmente ao poro, também pode ocorrer.

Em *C. quadrangulare* o desenvolvimento do aparelho estomatal segue o tipo crucífero (SOLEREDER, 1908). Tipo anisocítico na terminologia de METCALFE & CHALK (1979).

Na família Verbanaceae é freqüente a presença de tricomas de diversos tipos, glandulares ou não glandulares. Em *Citharexylum* é citado a ocorrência de tricomas glandulares multicelulares (METCALFE, 1950). A espécie em estudo apresenta tricomas

tectores e glandulares em ambas as faces da lâmina foliar. Os tricomas glandulares são multicelulares, constituídos de quatro ou mais células.

No gênero *Citharexylum* pode ocorrer a presença de tricomas curtos, em forma de disco ou peltado (METCALFE, 1950).

C. myrianthum Cham. apresenta tricomas tectores simples, unicelulares ou pluricelulares unisseriados, apresentando-se longos e delgados. Também ocorrem tricomas de formas simples, curtos.

Tricomas simples unisseriados são amplamente distribuídos em Verbenaceae (SOLEREDER, 1908).

Nectários podem ocorrer na superfície da folha ou pecíolo em espécies de *Citharexylum* e outras espécies da família Verbenaceae (METCALFE, 1950).

A lâmina foliar em Verbenaceae apresenta organização dorsiventral ou isobilateral, com uma ou mais camadas de parênquima paliçádico (METCALFE, 1950).

Em *C. myrianthum* Cham. a lâmina foliar tem organização dorsiventral.

No gênero *Citharexylum* o parênquima paliçádico pode consistir de um ou mais estratos de células parenquimáticas (METCALFE, 1950). A espécie estudada apresenta o parênquima paliçádico biestratificado.

Na família Verbenaceae ocorrem cristais de oxalato de cálcio de várias formas comumente presentes em algumas das células do tecido parenquimático (CRONQUIST, 1981).

Cristais em forma de pequenas agulhas ou prismas, são amplamente distribuídos no tecido parenquimático da folha. Pequenas ou grandes agulhas se fazem presentes no gênero *Citharexylum*. Cristais de forma prismática grandes ou pequenos ocorrem em *C. caudatum* Linn. e *C. hexangulare* Greenm (METCALFE, 1950).

Oxalato de cálcio, na forma de pequenos cristais aciculares ou prismáticos, algumas vezes com ápices octaédricos, ou cristais em forma de lança são comuns em espécies de *Citharexylum* e outros gêneros da família Verbenaceae, no tecido parenquimático da folha e também nos raios medulares. Os cristais podem ser agregados ou solitários; os últimos são grandes e de rara ocorrência (SOLEREDER, 1908).

MATHEW (1984) citado por NAKASHIMA (1993), relata a ocorrência de diferentes substâncias minerais em trinta e cinco espécies de Verbenaceae: potássio, ferro, magnésio,

alumínio, sulfato de sódio e trítio em proporções variáveis. *C. subserratum* Sw., apresenta em suas folhas, cascas e caule, cristais aciculares e de forma prismática.

A nervura principal em secção transversal revela uma proeminência na face adaxial constituída predominantemente por parênquima. A face abaxial constitui a parte principal da nervura. Nesta região, constatam-se internamente à epiderme diversos estratos de colênquima seguidos de vários estratos de parênquima.

Os tecidos associados aos feixes vasculares maiores formam saliências (costelas) na superfície do limbo, geralmente na face abaxial. Frequentemente, o colênquima acompanha estes feixes de um ou de ambos os lados, internamente a epiderme. Os feixes menores, localizados no mesofilo, apresentam-se envolvidos por uma ou mais camadas de células parenquimáticas que se dispõem compactamente, constituindo a bainha de feixe a qual forma extensão de bainha (ESAU, 1974).

De acordo com ESAU (1974), as bainhas envolvem as terminações vasculares da tal maneira que xilema e floema em seu transcurso na folha não ficam expostos ao ar contido nos espaços intercelulares.

Em muitas dicotiledôneas, as bainhas de feixes são ligadas à epiderme por meio de conjuntos de células que lembram estruturalmente as células da bainha. Estes conjuntos recebem o nome de extensão de bainha (WYLIE, 1952 citado por ESAU, 1974).

4.2- Fitoquímica

4.2.1- Análises espectrométricas:

4.2.1.1- Espectrometria de Ultra Violeta:

A análise do espectro de absorção na região do ultra violeta da substância F.ME 1A, em metanol, apresentou uma intensa banda a 343 nm e outra de menor intensidade a 274 nm.

O espectro metanólico de flavonas e flavonóis exibem picos de maior absorção na região de 240 a 400 nm. Estes dois picos se referem as banda I (usualmente 300 a 380 nm) e banda II (usualmente 240 a 280 nm). A banda I é considerada ser associada com absorção

própria ao anel B, sistema cinamoil e a banda II com absorção envolvendo o anel A, sistema benzoil.

O espectro metanólico de flavonas apresentam picos de maior absorção na região de 304 a 350 nm, correspondente à banda I. Flavonóis com grupamento hidroxila na posição 3 do anel C substituído (metilado ou glicosilado) apresentam picos de maior absorção na região de 328 a 357 nm, correspondente à banda I e flavonóis com grupamento hidroxila livre na posição 3, apresentam picos de maior absorção na região de 352 a 385 nm.

Flavonas e flavonóis oxigenados no anel A, mas não no anel B, tendem a dar espectros, em metanol, com uma pronunciada banda II e uma pequena banda I, mas em moléculas similares que também possuem anel B oxigenado, a banda I é mais pronunciada.

O efeito batocrômico sobre a banda I, de aproximadamente 40 a 65 nm, sem decréscimo de intensidade do pico, causado pela adição de metóxido de sódio à solução metanólica, é diagnóstico da presença de um grupamento hidroxila livre na posição 4' do anel B.

A análise do espectro metanólico de F. ME 1A, com adição de metóxido de sódio, apresentou um efeito batocrômico sobre a banda I de 45 nm, sem decréscimo de intensidade do pico correspondente à banda I, indicando um grupamento hidroxila na posição 4' do anel B.

A adição de acetato de sódio ao espectro metanólico é diagnóstico de detecção específica de grupamento hidroxila na posição 7 do anel A. O efeito batocrômico de 5 a 20 nm, sobre a banda II, causado pela adição de acetato de sódio, indica grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A em flavona ou flavonol.

A análise do espectro metanólico de F. ME 1A, com adição do acetato de sódio, demonstrou um efeito batocrômico de 72 nm, sobre a banda II, indicando que a substância não possui um grupamento hidroxila livre na posição 7 do anel A.

Na presença de acetato de sódio, o ácido bórico forma quelato com grupamentos ortodihidroxila em todas as localizações do núcleo flavonóide, com exceção nos carbonos de posições 5 e 6 do anel A.

Flavonas e flavonóis que possuem grupamentos ortodihidroxila no anel B mostram um efeito batocrômico de 12 a 30 nm, sobre a banda I, na presença de acetato de sódio e ácido bórico.

Grupamentos ortodihidroxila em carbonos nas posições 6 e 7 e carbonos 7 e 8 também são detectados através de um efeito batocrômico de 5 a 10 nm sobre a banda I na presença de acetato de sódio e ácido bórico.

A substância analisada apresentou um efeito batocrômico de 1 nm ou imperceptível, sobre a banda I, em adição de ácido bórico ao sistema com acetato de sódio, indicando que não há grupamentos hidroxila na posição orto, no anel A.

O efeito hipsocrômico de aproximadamente 30 a 40 nm, sobre a banda I ou banda Ia, detecta a presença de grupamentos dihidroxila na posição orto, no anel B de flavonas e flavonóis, pela comparação do espectro na presença de cloreto de alumínio com o obtido em adição de ácido clorídrico à solução de cloreto de alumínio.

A presença de três grupamentos hidroxilas adjacentes no anel B dão somente um efeito hipsocrômico de 20 nm, sobre a banda I, em adição do ácido à solução metanólica que já contém cloreto de alumínio.

A substância analisada apresentou um efeito batocrômico de 26 nm, sobre a banda I em adição de ácido clorídrico à solução metanólica de cloreto de alumínio. Não há a presença de grupamentos dihidroxila em posição orto nos carbonos 3' e 4' do anel B. Entretanto, com a reação de AlCl_3 em adição de HCl houve um deslocamento batocrômico de 26 nm, indicando que houve formação de complexo. Se não há a ocorrência de posição orto dihidroxila no anel B e o C-3 do anel C não apresenta grupamento hidroxila livre, isto sugere que há um grupamento hidroxila na posição C-5 do anel A da substância analisada.

4.2.1.2- Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^1H), 300 Mhz da substância F. ME 1A

A região do espectro de ressonância magnética nuclear protônica correspondente aos prótons dos anéis A e B do núcleo flavonóide apresenta-se em nível de δ 6,0 a 8,0, indicando a região aromática. Os sinais de prótons correspondentes ao anel B aparecem em δ 6,7 a 7,9.

Anel B oxigenado no C-4', 4 picos de 2 dupletes (cada $J = 8,5$ cps) são observados.

A região aromática do espectro de F. ME 1A apresenta sinais de prótons em δ 7,4 - 7,5, de constante de acoplamento próximo a 8,5 cps, indicando ser correspondentes aos

prótons de C-2', C-3' e C-5' e C-6' (acoplamento orto), embora a amostra não apresente o típico padrão de 2 dupletos.

Em flavonóides, sinais de prótons de metoxila, com algumas exceções, aparecem na região de δ 3,5 a 4,1.

Em δ 3,9 e 3,8 aparecem dois singletes que correspondem a dois grupamentos metoxilas.

Um sinal, ao nível de 3,23 ppm, corresponde aos prótons do metanol.

Um singlete em δ 6,6 pode ser correspondente ao próton do C-3, do anel C, que aparece perto de 6,3 ppm em flavona.

Os açúcares ligados ao núcleo flavonóide aparecem ao nível de δ 3,5 a 5,0. A amostra de F. ME 1A apresenta um sinal ao nível de 5 ppm típico de manose, sugerindo a presença de manose ligado a estrutura.

A região ao nível de δ 0,8 a 2,0 indica a presença de grupamentos metil. A amostra F. ME 1A, apresenta sinais de grupamentos metil, sugerindo a presença de grupamentos metil na estrutura.

4.3- Farmacologia

4.3.1- Teste geral de atividade e Dose letal 50 %

Os dados obtidos revelaram que os efeitos provocados pelo extrato aquoso bruto liofilizado da espécie estudada age de forma diferente dependendo da via de administração.

A dificuldade respiratória, a alteração da motilidade, a perda da postura e a diminuição de apreensão das patas sugerem ter sido provocadas por uma alteração da musculatura esquelética ou pela depressão do sistema nervoso central (S.N.C), sendo interessante para essas investigações um teste em órgão isolado como, diafragma de rato ou em reto abdominal de sapo ou outro músculo esquelético; e teste de sono barbitúrico, além de testes mais específicos sobre o sistema nervoso central.

Observou-se catatonia nos camundongos, nos quais foi administrado a dose de 7,5 g/kg de extrato, que pode ser decorrente de uma depressão no sistema nervoso central, sendo interessante realizar um teste de sono barbitúrico e/ou outros mais específicos.

Convulsão, agitação e estereotipia são efeitos característicos de estimulação do sistema nervoso central.

4.3.2- Teste de capacidade anti-inflamatória: Migração leucocitária

Observou-se que houve aumento e diminuição do número de células totais no peritônio em 4 e 24 horas.

O aumento de células foi causado pela administração intra peritoneal de ovoalbumina. Esta migração celular foi causada pela reação inflamatória provocada pelo agente flogógeno.

A diminuição de células totais no peritônio foi devido à administração intra peritoneal de Dexametasona, um corticóide de ação anti-inflamatória.

Comparando-se o resultado do extrato bruto liofilizado das folhas da espécie estudada administrado por via oral, observou-se que não ocorreu diminuição de células totais no peritônio de camundongo.

Os grupos tratados por salina intra peritoneal no tempo de 24 horas e os grupos Dexametasona intraperitoneal / ovoalbumina intraperitoneal, no tempo de 4 e 24 horas apresentaram valores estatisticamente significantes em relação ao grupo tratado por ovoalbumina intraperitoneal, isto é, as médias não são iguais.

4.4- Microbiologia

Os ensaios microbiológicos com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham. pelo método de difusão em ágar demonstraram atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*. Entretanto, recomenda-se determinar a Concentração mínima inibitória (MIC), para confirmação do resultado, do extrato bruto, bem como, dos metabólitos secundários isolados.

V- CONCLUSÕES

5.1- Botânica

A venação da folha é do tipo pinada, camptódroma, eucamptódroma.

A epiderme apresenta regiões uniestratificadas e pluriestratificadas com duas ou mais camadas de células epidérmicas.

Os complexos estomáticos são do tipo anomocítico.

A folha é anfihipoestomática.

A lâmina foliar tem organização dorsiventral ou bifacial.

Tricomas tectores e glandulares são encontrados em ambas as faces da lâmina foliar.

O feixe vascular da nervura principal é colateral, descrevendo um arco ao longo da nervura.

O pequeno feixe vascular localizado no parênquima medular é anficrival.

Apresenta extensão de bainha.

Circundando o feixe vascular assim como em toda a extensão do mesofilo ocorrem a presença de cristais.

A espécie estudada apresenta características anatômicas que são freqüentes na família Verbenaceae e muitas dessas características que são freqüentes no gênero *Citharexylum*, assim como o tipo de estômato, a presença de tricomas tectores e glandulares e a ocorrência de cristais.

5.2- Fitoquímica

A substância isolada da fração metanólica, de provável natureza flavonoídica, não foi totalmente elucidada através dos métodos espectrométricos de Ultra Violeta e Ressonância Magnética Nuclear Protônica tendo em vista que é necessário realizar espectrometria de Massa, Infra Vermelho e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono para a completa compenação da estrutura química. Entretanto novas determinações estão sendo efetuadas.

O extrato bruto das folhas de *Citharexylum myrianthum* Cham. apresenta atividades biológicas antimicrobianas e antivirais, demonstrando que há princípios ativos de grande

interesse terapêutico, de modo que o isolamento e identificação de metabólito secundário desta espécie pode vir a ser, no futuro, de grande importância para a terapêutica, despertando para a continuação da pesquisa com esta espécie medicinal.

5.3- Farmacologia

Os testes preliminares, Teste geral de atividade e Dose letal 50 %, realizados com o extrato bruto liofilizado das folhas são auxiliares para testes farmacológicos futuros e mais específicos.

Através dos dados estatísticos, conclui-se que o extrato bruto liofilizado das folhas de *C. myrianthum* Cham. não apresentou ação de diminuição de células totais no peritônio de camundongo, portanto não demonstrou capacidade anti-inflamatória no experimento realizado pela metodologia de migração leucocitária, entretanto outras metodologias devem ser pesquisadas.

5.4- Microbiologia

O extrato hidroalcoólico bruto das folhas, na concentração de 40 μ l apresentou atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*, pelo método de difusão em ágar ou metodologia de KIRBY-BAUER.

ANEXO

ANEXO 1- Fitoquímica

1.1- Preparo de soluções e reativos

O preparo de soluções foi realizado segundo ASSUMPÇÃO & MORITA (1968) e de reativos, segundo a FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil (1959).

1.2- Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro ultra violeta Shimadzu UV 1601 com impressora Citizen 200 GX
- Câmara de Luz ultra violeta de 254 e 360 nm
- Evaporador rotatório com válvula para vácuo modelo Fisatom acoplado a um banho-maria
- Microscópio de Ponto de Fusão tipo Köfler
- Balança Mettler
- Balança analítica E. Mettler
- Deionizador de água modelo Permutation
- Banho-maria Ética equipamentos científicos S.A.
- Estufa Soc. Fabbe Ltda & Fanem Ltda

1.3- Solventes e Reagentes

Foram utilizados álcool etílico, ácido clorídrico concentrado, ácido clorídrico a 1%, ácido clorídrico N, éter etílico, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, hidróxido de sódio a 5 %, clorofórmio, magnésio metálico, anidrido acético, ácido sulfúrico concentrado, ácido sulfúrico a 10 %, ácido sulfúrico N, cloreto férrico a 1 %, sulfato de ferro amoniacal a 1 %, acetato de chumbo a 10 %, gelatina, cloreto de sódio 0,9 %, ácido acético, ácido acético a 10 %, formaldeído, acetato de sódio, ninhidrina, *n*-hexano, metanol, acetona, acetato de etila, *n*-butanol, éter de petróleo, e papel indicador de pH Universal.

Os solventes e reagentes são de procedência Merck ou Reagen.

1.4- Cromatografia

- Celulose para cromatografia em camada delgada e para cromatografia em coluna de procedência Merck

-Sílica para cromatografia em camada delgada (GF₂₅₄) e silicagel 60 para cromatografia em coluna (0,063 - 0,200 mm de diâmetro) de procedência Merck.

-Papel Watmann n^o 1 e n^o 3 (46 x 57 cm)

-Cuba para cromatografia em papel e cubas para CCD

-Coluna de 62,5 cm de comprimento por 10,5 cm de diâmetro

-Coluna de 21 cm de comprimento por 33 cm de diâmetro

-Coluna de 20,5 cm de comprimento por 9,5 cm de diâmetro

1.5- Reveladores para cromatoplasas

Flavonóides:

1. Reativo de NEU (NAKASHIMA, 1993)

Solução A : Ácido 2-aminoetildifenilbórico	1g
Metanol	100 ml
Solução B: PEG 4000	5 g
Etanol	100 ml

Obs: PEG - Polietilenoglicol 4000

Nebulizar o cromatograma e observar na câmara de luz UV a 365 nm.

2. Reativo Citro-bórico:

Ácido bórico	5 g
Ácido cítrico	5 g
Metanol	100 ml

Nebulizar o cromatograma e observar na câmara de luz UV a 365 nm.

Esteróides e Terpenos:

1. Anisaldeído sulfúrico:

Anisaldeído	0,5 ml
Ácido sulfúrico	1,0 ml
Ácido acético	50,0 ml

Nebulizar a cromatograma, estufa a 110⁰C durante 5 a 10 minutos.

2. Vanilina sulfúrico clorídrico:

Vanilina	1,0 g
Ácido clorídrico	3,5 ml
Ácido sulfúrico 50 % (EtOH)	8,0 ml
Etanol (EtOH)	70,0 ml

Nebulizar a cromatograma. Estufa a 110⁰C durante 5 a 15 minutos.

3. Vanilina sulfúrica

A: Vanilina	1,0 g
Etanol	100 ml
B: Ácido sulfúrico	5,0 ml
Etanol	95,0 ml

No momento do uso misturar volumes iguais de A e B, agitar e nebulizar.

Estufa a 100⁰C durante 5 a 10 minutos.

1.6- Reativos de precipitação :**Alcalóides:**

1. Reagente de Dragendorff

Subnitrato de bismuto 1,7 % (m/V) em Ácido acético 20 % (V/V)	5 ml
Iodeto de potássio 40 % (m/V)	5 ml
Ácido acético glacial	2 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

2. Reagente de Mayer

Cloreto de mercúrio II	1,35 g
Iodeto de potássio	3,95 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

3. Reagente de Bertrand

Ácido sílico-tungstico 5 % (m/v)

4. Reagente de Bouchardat (Solução de iodo-iodetada)

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

1.7- Análises espectrométricas**1.7.1- Espectrometria de Ultra Violeta**

Foram utilizados como solventes e reativos:

- Metanol (MeOH)
- Metóxido de sódio (NaOMe): Solução saturada de hidróxido de sódio em metanol.
- Cloreto de alumínio (AlCl_3) à 5 % em metanol.
- Ácido clorídrico (HCl) à 50 %.
- Acetato de sódio (NaOAc): cristais.
- Ácido bórico (H_3BO_3):

Procedimento I: cristais de H_3BO_3 .

Procedimento II: solução saturada de H_3BO_3 em metanol.

1.7.2- Ressonância Magnética Nuclear Protônica de 300 Mhz.

Os espectros de RNM¹H foram realizados na Universidade de Leiden - Holanda.

ANEXO 2- Farmacologia

2.1- Drogas e reagentes

Anestésico: éter etílico P.A.(Cinética Química Ltda)

Solução injetável de NaCl 0,9 % (J.P. Ind. Farm. S.A. e Geyer Medicamentos)

Dexametasona: Decadron (21-fosfatodissódico de Dexamatasona), 2,0 mg/ml, injetável (Prodome Química e Farmacêutica Ltda)

Ovoalbumina (BDH Chemicals Ltda Poole England), 10,0 mg/ml em solução fisiológica

Solução de PBS (Phosphate Buffered Saline)

Solução de PBS/ heparina 5 U/ml

Líquido de Turk (Cristal violeta 0,05 % em ácido acético à 30 %)

Álcool etílico

2.2- Equipamentos

Câmara para anestesia

Algodão hidrófilo

Gaiolas de arame

Mesa cirúrgica

Tesoura

Pinça

Seringas 25x 7 e 40x16

Estante para tubos de ensaio

Vidraria em geral (tubos, becher, pipetas graduadas)

Balança (para animais)

Balança analítica BOCH

Balança semi-analítica MARTE

Microscópio óptico E. LEITZ WTZLAR GERMANY

Câmara de NEUBAUER IMPROVED

ANEXO 3- Microbiologia

3.1- Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o ágar Mueller-Hinton (MHA), que apresenta boa reprodutividade de lote para lote e com crescimento satisfatório para a maioria dos patógenos. O pH do meio deve ficar entre 7,2 e 7,4 à temperatura ambiente (FONTANA, *et al.* 1993).

3.2- Microorganismo

O microorganismos utilizados são cêpas puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas auruginosa* ATCC 27853, fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUMPCÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de Soluções Reagentes & Solventes.** (Padronização-Preparação-Purificação). Ed. da Universidade de São Paulo: Edgard Blücher, 1968. 627 p.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Univ. Fed. de Viçosa, M.G., 1986. v. 3.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry.** Iowa : Iowa State University Press, 1976.
- BISSING, D. R. Haupt's adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections slides. **Stain technol.**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 439- 4463, 1974.
- BRAVO, H. R.; LAZO, W. Antimicrobial activity of cereal hydroxamic acids and related compounds. **Phytochemistry**, Chile, v. 33, n. 3, p. 569-571, June, 1993.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 3. ed. Lisboa : Calouste Gulbenkian, 1987. v. 2.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York : Columbia University Press, 1981. 1262 p.
- DELLAR, J. E. *et al.* Antimicrobial sesquiterpenes from *Prostanthera* aff. *melissifolia* and *P. rotundifolia*. **Phytochemistry**. Glasgow, v. 36, n. 4, p. 957-960, July, 1994.
- Di STASI, L.C. **Plantas Mediciniais : Arte e Ciência.** São Paulo : Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.
- DOMINGUES, X. A. **Métodos de Investigación Fitoquímica.** México : Limusa, 1973. 281 p.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** São Paulo : Edgar Blücher, 1974. 293 p.
- _____. **Anatomia vegetal.** 3. ed. Barcelona : Omega, 1985. 160 p.
- FARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo : Indústria Gráfica Siqueira, 1959. v. 2.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique : some principles and new methods. **Amer. J. Bot.** 55 (1) : p. 123-142, 1968.
- FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy.** New York : Van Nostrand, 1949.

- FRURMAN, G. J. Extravascular mobilization of Neutrophils. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, 1991, v. 113, p. 968-1002.
- GANAPATY, S.; VENDRATA RAO, D. V. Chemical constituents of the leaves of *Cithaxylum subserratum*. **Fitoterapia**, Milano, v.54, n. I, p. 13 - 15, 1983. **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 99, n. 25, p. 405. Dec. 1983. Ref. 209812 e. Resumo.
- _____. Chemical examination of the bark of *Citharexylum subserratum*. **Indian J. Pharm. Sci.** Kanpur, **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 100, n.11, p.303. Mar. 1984, Ref.82779f. Resumo.
- GANAPATY, S. ; JOSEF, H. ; VENDRATA RAO , D. *et al.* Iridoide glicosides from the leaves of *Citharexylum fruticosum*. **Planta Med.**, Stuttgart, n.1 , p.42-43, 1988.
- GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. J.; GILMAN, A., eds. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 6. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1983. v. 2, p. 1365.
- GOMES, A. V.; TEIXEIRA, L. L.; SCHAITZA, E. G. *et al.* Perforation plates in vessels of *Citharexylum myrianthum* Cham. (Verbenaceae). **Iawa Bull.**, v. 10, n. 1, p. 27-34, 1989. **Biological Abstracts**, Philadelphia, v. 88, n. 2, p. AB 578, Jul. 1989. Ref. 16723. Resumo.
- GOODMAN, L. J.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 3. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1967. p. 1529-30.
- GÖREN, N. *et al.* Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum densum* subsp. *sivasicum*. **Phytochemistry**, Turkey, Germany, USA, v. 31, n. 1, p. 101-104, January, 1992.
- GRANAND, P. ; MORETTI, C. & JACQUEMIN, H. **Pharmacopées Traditionnelles en Guyane**. Paris : Editions de Iorstom, 1987, p.423-424, 512-51 j.
- HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semi-finos. In : HADDAD, A. *et al.* **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. S. 1, Sociedade brasileira de microscopia eletrônica, 1989.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. London : Chapman and Hall, 1973. 278p.
- _____. **Phytochemical Methods : A guide to modern techniques of plant analysis**. 2. ed. London : Chapman and Hall, 1984. 288 p.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. New York : Academic Press, 1975. 1204p.

- HERBERT, R. B. **The Biosynthesis of Secondary Metabolites**. 2. ed. London. New York : Chapman and Hall, 1989. 231 p.
- HICKEY, L .J. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. **Amer. J. Bot**, Columbus, v.60, n.1, p. 17-33, 1973.
- HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. **Life Sci.**, Japan, 55 (13), p. 1061-9, 1994. **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 121, n. 15, p. 63, Oct. 1994. Ref. 170005 q. Resumo.
- INDEX KEWENSIS. **Plantarum Pharnorogarum**. Oxford : Oxonii- University Press, 1886-
- IZZO, A. A.; Di CARLO, G.; MASCOLO, N. *et al.* Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytother. Res.**, Italy, 8 (3), p. 179-81. **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 121, n. 21, p. 131, Nov. 1994. Ref. 245805 m. Resumo.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York : McGraw-Hill, 1940. 523 p.
- JUCK, D. B. F. **Contribuição ao Estudo de *Citharexylum myrianthum* Cham. Verbenaceae**. Curitiba, 1995. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- KERBER, V. A. **Flavonóides e cumarinas de *Acacia* L. (Andr.) Willd. Leguminosae - Mimosoideae (flores)**. Porto Alegre, 1987. 170 p. Tese (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York : Heidelberg, 1970. 354 p.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification**. London : Academic Press, 1982. 113 p.
- MARTINS, E. R., *et al.* **Plantas Medicinai**s. Viçosa : UFV, Impr. Univ., 1995. 220p.
- MATHURAM, S. ; KOZIPARAMBIL, K. P.; AYYAPPATH, S. & CONNOLLY, J. D. A new flavone 6- glucoside from *Citharexylum subserratum*. **Phytochemistry**, Oxford,v. 15 , n. 5 ,p. 838, 1976.
- MATIDA, A. K. ; RABENHORST, E. & ZELNIK, R. The occurrence of ursolic acid in *Citharexylum myrianthum* (Verbenaceae) . **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 47/48, p. 139-142, 1983/1984. **Biological Abstracs**, Philadelphia, n.10, p. AB950, May 1987. Ref.101447. Resumo.

- MATOS, J. M. D. ; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia**. Curso Teórico-Prático. Fortaleza : Edições UFC, 1989. 245 p.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford : Clarendon Press, 1950. v. 2.
- _____. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2. ed. Oxford : Clarendon Press, 1979.
- NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae : *Lippia alba* N. E. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** Toulouse, 1993. 199p. Thèse (Docteur), Intitut National Polytechnique de Toulouse, França.
- OSAWA, N. *et al.* Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani*. **Phytochemistry**, Japan, v. 36, n. 5, p. 1287-1291, July, 1994.
- RAMANATHAN, R.; DAS, N. P.; TAN, C. H. Inhibitory effects of 2- hydroxi chalcone and other flavonoids on human cancer cell proliferation. **Int. J. Oncol.**, Singapore, 3 (1), p. 115-19. **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 121, n. 9, p. 22, Aug., 1994. Ref. 99061 x. Resumo.
- ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Iowa : The Iowa State College Press, 1951.
- SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In : SUZA, W. de. **Manual sobre técnicas básicas em Microscopia Eletrônica : Técnicas básicas**. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v. 1.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 3 ed. Rio de Janeiro : Ed. Guanabara S.A., 1987. 299 p.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of dicotyledons**. Oxford : Clarendon Press, 1908. v. 2. 1182 p.
- TREASE, G. E.; EVANS, W.C. **Farmacognosia**. 13. ed. México : McGraw-Hill, 1991, 901 p.
- TOPÇU, G. *et al.* Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Imula graveolens*. **Phytochemistry**, Turkey, USA, v. 33, n. 2, p. 407-410, May, 1993.
- URSISI, F. *et al.* A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radical Biol. Med.**, Italy, 16 (5), p. 547-53. **Chemical Abstracts**, Columbus, v. 121, n. 9, p. 49, Aug., 1994. Ref. 99281 u. Resumo.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 2. ed. Rio de Janeiro : Ed. Campus, 1983, 294 p.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, A. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 30, n.1, p. 19-21, janeiro-junho, 1994.