

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

***Guazuma ulmifolia* Lam., STERCULIACEAE: ESTUDO
BOTÂNICO, QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO**

KAREN JANAINA GALINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

***Guazuma ulmifolia* Lam., STERCULIACEAE: ESTUDO
BOTÂNICO, QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO**

KAREN JANAINA GALINA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

2003

TERMO DE APROVAÇÃO

KAREN JANAINA GALINA

“*Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: Estudo Botânico, Químico e Microbiológico”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
UEM – Maringá – PR

Prof. Dra. Hérica Regina Nunes Marona
UNESP – Araraquara – SP

Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui
UEM – Maringá – PR

Araraquara, 23 de janeiro de 2003

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Galina, Karen Janaina

G158g Guazuma ulmifolia Lam., Sterculiaceae: estudo químico, botânico e
microbiológico . / Karen Janaina Galina . – Araraquara, 2003.
111 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello

1.Guazuma ulmifolia. 2.Taninos condensados. 3. Análise botânica.
4.Atividade antibacteriana. I.Mello, João Carlos Palazzo de , orient. .II.
Título.

CDD: 581.634

CAPES: 40300005

Dedico esse trabalho aos meus pais

Jair e Vera Galina,

pelo apoio e confiança todos os

momentos da minha vida.

E ao meu avô *Alberto Rodrigues,*

que, apesar de não

estar mais presente comigo, sempre

acreditou muito em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu o conhecimento e o discernimento.

Ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela aceitação como orientanda, pela orientação, pela introdução na pesquisa farmacêutica, os meus mais sinceros agradecimentos.

À minha irmã Danielly Simone Galina e ao meu namorado Vagner Meneguetti Sylvestre, pela paciência e apoio nas horas de dificuldade.

A toda minha família, especialmente minha avó Iracema de Brito Rodrigues, pela confiança.

Ao meu amigo Marcelo de Faveri, pela amizade e contribuição nesse trabalho.

Aos meus amigos Cleyton Toledo, Rita Gonçalves, Rodrigo Kitagawa, Kelley Coelho, Osman Batista, José Ricardo Alberton, Kelen Dalben, Fabiana Gasparin e Vivian Renesto, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos Walter, Andréia, Tânia, Wadilson, Lorena, Emi, Patrícia, Silvia, Mislaine, Marilene, Moisés, Letícia, Bruno e Ricardo, e todos aqueles que convivi durante todo esse tempo, pela amizade.

Aos amigos Cláudio, Sônia, Helena e Leocir, pela paciência, amizade e apoio.

Ao Sr. Carlos Pagnussatti e ao Ademir Lima Marques pela confiança e contribuição à realização desse trabalho.

Ao Admir e à D. Nair (Farmacognosia – UEM), à Ângela (Botânica – UEM) e à Marinete (Microbiologia – UEM), pela colaboração no decorrer desse trabalho.

À Ivânia (Departamento de Química – UEM), pelos espectros de RMN.

À Laura e à Sônia (Secretaria de Pós-Graduação da UNESP) pela paciência e auxílio durante o período desse trabalho.

À professora Dra. Cássia Mônica Sakuragui, do Departamento de Biologia - UEM, pela contribuição quanto à análise botânica.

Ao professor Dr. Celso Vatare Nakamura, do Departamento de Análises Clínicas - UEM, pelo acompanhamento nos ensaios microbiológicos.

Ao Dr. Heinrich Luftmann, do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pelos espectros de massa.

Ao professor Dr. Silvio José Sarti (*in memoriam*) e à professora Dra. Hérica Regina Nunes Marona, pela contribuição à melhoria desse trabalho.

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia – UEM, por possibilitar a execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNESP, pela oportunidade de concretizar esse trabalho.

À CAPES, pela liberação de recursos financeiros para que fosse possível a realização desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação desse trabalho.

Apresentações de partes do presente trabalho em Congressos:

Guazuma ulmifolia Lam.: microbial and chemical study. Galina, K.J.; Sakuragui, C.M.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Mello, J.C.P. de. *Revista de Fitoterapia*, v.2, supl.I, p. 300, 2002. In: 50th Annual Congress of the Society for Medicinal plant Research, Barcelona, Espanha, de 8 a 12 de setembro, 2002.

Caracterização farmacognóstica da Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae). Galina, K.J.; Sakuragui, C.M.; Mello, J.C.P. de. In: III Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, *Resumos...*, Curitiba, Paraná, Brasil, de 26 a 28 de setembro de 2001.

Constituição química da *Guazuma ulmifolia* Lam., STERCULIACEAE. Galina, K.J.; Mello, J.C.P. de. In: III Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, *Resumos...*, Curitiba, Paraná, Brasil, de 26 a 28 de setembro de 2001.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. SISTEMÁTICA VEGETAL.....	6
3.1.1. A família Sterculiaceae Vent.....	6
3.1.2. O gênero <i>Guazuma</i>	7
3.1.3. A espécie <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	9
3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO <i>Guazuma</i>	12
3.3. USOS POPULARES E TESTES BIOLÓGICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Guazuma</i>	13
3.4. FLAVAN-3-ÓIS E PROANTOCIANIDINAS.....	15
3.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. MATERIAL.....	22
4.1.1. Equipamentos.....	22
4.1.2. Solventes, reagentes e soluções.....	23
4.2. ANÁLISE BOTÂNICA DA <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	24
4.2.1. Coleta do material.....	24
4.2.2. Identificação botânica do material.....	25
4.2.3. Estudo morfológico da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	25
4.2.4. Estudo anatômico da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	25
4.2.4.1. Lâminas semipermanentes.....	25
4.2.4.2. Lâminas permanentes.....	26
4.3. CONTROLE DE QUALIDADE DA <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	27
4.3.1. Análises químicas.....	27

4.3.1.1. Análise fitoquímica preliminar.....	27
4.3.1.2. Análises quantitativas.....	27
4.3.1.2.1. Determinação do teor de flavonóides totais.....	27
4.3.1.2.2. Determinação do teor de taninos totais.....	28
4.3.2. Análises físico-químicas.....	29
4.3.2.1. Perda por secagem.....	30
4.3.2.2. Determinação da perda por dessecação.....	30
4.3.2.3. Determinação do teor de extrativos.....	30
4.3.2.4. Determinação do teor de resíduo seco.....	31
4.4. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS.....	31
4.4.1. Extrato bruto (EB)	31
4.4.2. Fração acetato de etila (FA) e fração aquosa (FW).....	31
4.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	32
4.5.1. Cromatografia em coluna (CC) da FA.....	32
4.5.1.1. CC das subfrações.....	32
4.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	33
4.5.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	33
4.6. DERIVATIZAÇÃO.....	34
4.7. ANÁLISE ESTRUTURAL.....	34
4.8. HIDRÓLISE DE DÍMEROS.....	34
4.8.1. Unidade superior.....	34
4.8.2. Unidade inferior.....	35
4.9. ENSAIO ANTIBACTERIANO DA <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	35
4.9.1. Microrganismos.....	35
4.9.1.1. Padronização da suspensão bacteriana.....	35
4.9.2. Método de diluição.....	36
4.9.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	36
4.9.2.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	95
7. BIBLIOGRAFIA	96
ANEXO I.....	107

LISTA DE FIGURAS

ITEM		PÁGINA
1	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam., Sterculiaceae [(Lorenzi,1992)]...	10
2	Monômeros básicos de taninos condensados.....	15
3	Estruturas exemplos de proantocianidinas diméricas	17
4	Preparo da diluição seriada em placa de 96 poços.....	36
5	Árvore adulta da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	41
6	Folha da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	41
7	Flor da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	42
8	Fruto maduro da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	43
9	Sementes da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	43
10	Corte transversal da folha, mostrando o limbo foliar [(A– aumento 100x; B-aumento 400x)].....	45
11	Nervura principal da folha da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [(aumento 40x)].....	45
12	Epiderme foliar da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [A-epiderme abaxial; B-epiderme adaxial (aumento 100x)].....	46
13	Diagrama do pecíolo da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam., em corte transversal [(aumento 100x)].....	46
14	Células parenquimáticas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam., com conteúdo polifenólico, em corte transversal [(aumento 400x)].....	47
15	Tricoma estrelado, na epiderme do pecíolo da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	47
16	Corte transversal da casca da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [(aumento 400x)].....	48
17	Periderme da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [(aumento 400x)].....	49
18	Raios xilemáticos presentes na casca da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [A-corado com azul de astra; B-corado com FeCl ₃].	49
19	Rota biogenética dos compostos fenólicos.....	57
20	Cromatograma das 26 subfrações da FA.....	64

21	Espectro de massas da substância I	66
22	Fragmentação da substância I	67
23	¹ H RMN da substância I [(300 MHz; CD ₃ OD relativo para TMS)].....	69
24	¹ H/ ¹ H COSY da substância I [(300 MHz; CD ₃ OD relativo para TMS)].....	70
25	HETCOR da substância I [300 MHz; CD ₃ OD relativo para TMS)].....	71
26	¹ H RMN da substância I acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	73
27	Estrutura da substância I , epicatequina.....	74
28	Espectro de massas da substância II	77
29	¹ H RMN da substância II acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	78
30	¹ H/ ¹ H COSY da substância II acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	80
31	Estrutura da substância II , procianidina B ₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina].....	81
32	Espectro de massas da substância III	83
33	¹ H RMN da substância III acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	85
34	¹ H/ ¹ H COSY da substância III acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	86
35	Estrutura da substância III , epiafzelequina-(4β→8)-epicatequina.....	88

LISTA DE TABELAS

ITEM		PÁGINA
1	Características das variedades da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	11
2	Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos.....	16
3	Seqüência dos solventes empregados na CC da FA.....	32
4	Seqüência dos solventes empregados, em proporção volumétrica, na CC das subfrações da FA.....	33
5	Principais diferenças morfológicas evidenciadas nas duas espécies: <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. e <i>Guazuma crinita</i> Mart.....	43
6	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.: características morfológicas da variedade <i>tomentella</i>	44
7	Análise fitoquímica preliminar das cascas de <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	52
8	Determinação do teor de umidade das cascas frescas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	53
9	Controle do teor de umidade das cascas secas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. coletadas no verão.....	54
10	Teor de extrativos obtidos a partir do extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	55
11	Determinação do resíduo seco da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	56
12	Resíduo seco de diferentes vegetais em soluções extrativas etanol:água (1:1).....	56
13	Teor de flavonóides totais das cascas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	57
14	Teor de taninos totais das cascas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	58
15	Diferença na quantidade de taninos entre as cascas frescas e as secas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	59

16	Relação entre o teor de taninos nas cascas frescas e secas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	59
17	Teor de taninos totais das folhas da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	60
18	Rendimento das subfrações obtidas a partir da FA.....	63
19	Deslocamentos da substância I , [(300 MHz; CD ₃ OD relativo para TMS)].....	68
20	Deslocamentos da substância I acetilada [(300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	72
21	Dados de ¹ H RMN da substância II acetilada [(300MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	79
22	Dados de ¹ H RMN da substância III acetilada [(300MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)].....	84
23	Concentração inibitória mínima do extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. (µg/ml).....	90
24	Concentração inibitória mínima controle com antibacterianos padrões.....	91
25	Concentração bactericida mínima do extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. (µg/ml).....	92
26	Atividade antibacteriana do extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	92
27	Concentração inibitória mínima (µg/ml) das subfrações e substâncias isoladas a partir da FA.....	93

LISTA DE FLUXOGRAMAS

ITEM		PÁGINA
1	Sistemática vegetal da espécie <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam...	8
2	Fracionamento químico a partir do EB.....	62
3	Fracionamento cromatográfico da FA5.....	65
4	Fracionamento cromatográfico da FA7.....	74
5	Fracionamento cromatográfico da FA8.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- ^{13}C RMN - Ressonância magnética nuclear de carbono
- ^1H RMN - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY - RMN de correlação hidrogênio – hidrogênio
- Abs - Absorvância
- BV - Balão volumétrico
- CBM - Concentração bactericida mínima
- CC - Cromatografia em coluna
- CCD - Cromatografia em camada delgada
- CCDP - Cromatografia em camada delgada preparativa
- CIM - Concentração inibitória mínima
- EB - Extrato bruto
- EM - Espectro de massas
- EtOH - Álcool etílico
- FA - Fração acetato de etila
- FW - Fração aquosa
- GUA - Cascas da *Guazuma ulmifolia* Lam. coletadas no Paraná
- GUB - Cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam. coletadas em São Paulo
- h - Altura da coluna cromatográfica
- HETCOR - RMN de correlação carbono – hidrogênio
- HUM - Herbário da Universidade Estadual de Maringá
- MeOH - Álcool metílico
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PNA – Polifenóis não absorventes
- PPD - Perda por dessecação
- PPS - Perda por secagem
- PT - Polifenóis totais
- RE - Resíduo da partição
- Rf - Relação de frente
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- SA - Solução amostra
- SC - Solução comparativa

SM - Solução mãe

TE - Teor de extrativos

TT - Teor de taninos

UEL - Universidade Estadual de Londrina – PR

UEM - Universidade Estadual de Maringá – PR

UFC - Unidade formadora de colônia

UV - Ultravioleta

var. - Variedade

RESUMO

Guazuma ulmifolia Lam., Sterculiaceae, conhecida popularmente como “mutamba”, possui ampla distribuição geográfica, existindo desde o México até o sul do Brasil . O interesse pelo estudo químico e microbiológico é devido ao seu uso popular para tratamento capilar. Essa propriedade pode ser atribuída aos taninos, os quais apresentam atividade farmacológica, como anti-inflamatórios, antioxidantes, antiulcerogênicos, antimicrobianos, antivirais, ação de proteção capilar e, previnem radicais livres. O material foi coletado na região de Londrina, Paraná e, região de Guariroba, São Paulo, que, após análise botânica, foi identificado como *Guazuma ulmifolia* Lam., var. *tomentella*. Na análise microscópica, grandes canais secretores entre as células do parênquima e pêlos tectores estrelares sobre a epiderme foram detectados. Na análise química realizou-se a separação de compostos a partir do extrato bruto por cromatografia em coluna Sephadex® LH-20. Do ponto de vista biológico, observou-se a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato bruto e suas frações semipurificadas, pelo método de microdiluição. O resultado da análise da atividade frente *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* foi mostrada pela fração aquosa do extrato bruto (CIM 31,25 µg/ml e CBM 250 µg/ml; CIM 125 µg/ml e CBM 500 µg/ml, respectivamente). Ainda, a fração acetato de etila apresentou alguma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM 250 µg/ml). O estudo químico preliminar indicou a presença de taninos, flavonóides e saponinas. Do fracionamento do extrato bruto das cascas *G. ulmifolia*, com a fração acetato de etila, isolou-se um flavan-3-ol (epicatequina) e dois dímeros de tanino condensado [procianidina B₂ e epiafzelequina-(4β→8)-epicatequina], os quais foram caracterizados através de métodos espectroscópicos por RMN, EM e comparação com dados da literatura.

PALAVRAS-CHAVE: *Guazuma ulmifolia*; Sterculiaceae; taninos condensados; análise botânica, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Guazuma ulmifolia Lam., Sterculiaceae, popularly known as “mutamba”, presents wide geographical distribution, ranging from Mexico to Southern Brazil. The interest in the microbial and chemical study is due to its use for treatment for hair loss. This activity can be attributed to tannins that have many pharmacological activities such anti-inflammatory, anti-oxidant, radical scavenging, anti-ulcer, anti-microbial, anti-viral and capillary protective action. The material was collected in the field vicinity of Londrina, Paraná state and, in the field vicinity of Guariroba, São Paulo state, and, after botanical analyses, the identification confirmed the material being *Guazuma ulmifolia* Lam., var. *tomentella*. In the microscopic analyses, big secretory ducts among the cells of the parenchymal tissue and star-shaped trichoms on the epidermis were detected. In the chemical analyses was carried out the separation of compounds from the crude extract by a column chromatography on Sephadex® LH-20. By the biologic point of view, observed the *in vitro* anti-bacterial activity from crude and semi-purified extracts, by microdilution method. The result for activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* was showed by the aqueous fraction of crude extract (MIC 31.25 µg/ml, and MBC 250 µg/ml; MIC 125 µg/ml and MBC 500 µg/ml, respectively). Moreover, the ethyl acetate fraction presented some activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 250 µg/ml). Phytochemical approach proved the presence of tannins, flavonoids and saponins. From the fractionation of a crude extract of *G. ulmifolia* stem bark, with the ethyl acetate fraction, led to the isolation of one flavan-3-ol (epicatechin) and two dimmers of condensed tannin [procyanidin B₂ and epiafzelechin-(4β→8)-epicatechin], whole characterized by spectroscopic methods by NMR, MS and comparison with literature values.

KEYWORDS: *Guazuma ulmifolia*; Sterculiaceae; condensed tannins; botanical analyses, antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, as plantas são um recurso terapêutico ao alcance do ser humano. Durante milênios, o homem, empiricamente, aprofundou seus conhecimentos visando à melhoria nas condições de alimentação e à cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. É fato que no passado, o homem, quando acometido de seus males, recorria à alguma fonte de poder curativo. Na perspectiva da pesquisa natural, o homem encontrou, nas plantas, virtudes, cujo valor tornou-se reconhecido e, por tantas vezes, foi considerado como mágico e até alquimista, sendo transmitido de geração a geração.

O uso das plantas como medicamento é provavelmente tão antigo quanto à própria humanidade. Nas Ilhas Oceânicas, por exemplo, há séculos a planta cava-cava (*Piper methysticum* Forster) é usada como calmante. Durante muito tempo, foi utilizada em cerimônias religiosas, para um tipo de “efeito místico”. Depois, cientistas alemães comprovaram que seu extrato tem efeito no combate à ansiedade ([Fitoterapia...](#), 2002).

A partir do século XIX, com o avanço da química, ainda que rudimentar, a humanidade tinha diante de si um amplo arsenal terapêutico, presente nas espécies vegetais. A descoberta de substâncias que, em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuíam atividades farmacológicas, muitas vezes confirmadas pelo uso popular, passou a gerar interesses e incentivos institucionais e governamentais (Miguel e Miguel, 1999).

No século XX, após a revolução industrial e o grande desenvolvimento da química orgânica, ocorreu uma preferência mundial por produtos sintéticos. Assim, a fitoterapia ficou como uma opção para populações pobres ou como superstições religiosas sem valor terapêutico.

No final do mesmo século, o aproveitamento dos recursos naturais assumiu valor estratégico para governos e instituições privadas. Como resultado desse fenômeno, o trabalho de preservação e estudo de espécies vegetais merece hoje atenção especial dos países em desenvolvimento e dos países do primeiro mundo.

Os cientistas reconhecem que as matas, especialmente na América Latina, guardam o segredo da cura de muitas enfermidades. As plantas constituem um verdadeiro tesouro verde: carregam complexos coquetéis, os chamados princípios ativos, preparados pela engenharia química da natureza em milhões de anos de eventos e testes evolutivos. O controle e o conhecimento desse tesouro são hoje motivo da cobiça desde o curandeiro que comercializa folhas na praça até os grandes laboratórios (Verde..., 2002).

Atualmente percebe-se um fenômeno surpreendente. A busca e intensificação do uso de plantas pela população, com fins medicinais, ocorrem até mesmo nas sociedades mais industrializadas.

O mercado fitoterápico vem crescendo nos últimos 15 anos. Europa e Estados Unidos, por exemplo, movimentaram cerca de US\$ 7 bilhões e US\$ 5 bilhões, respectivamente, apenas em 1999, e assim, atraiu ainda mais a atenção das grandes companhias farmacêuticas (Calixto, 2000).

De acordo com Calixto (2000), resultados de uma pesquisa norte-americana mostram que as plantas medicinais são empregadas por cerca de 60 milhões de americanos com idade acima de 18 anos, para tratar gripes, dor de cabeça, depressão, diarreia e menopausa, entre outras. Cada americano gasta, em média, US\$ 54/ano comprando medicamentos para essas enfermidades.

A fitoterapia tem assumido tal dinamismo nos EUA e Europa, que a Universidade de Harvard está instituindo um centro de pesquisas nessa área. A Faculdade de Medicina será o setor responsável pela análise da eficiência dos tratamentos, cujos benefícios terapêuticos vêm sendo mais do que comprovados em milhões de pessoas que fazem uso das ervas medicinais ([A importância...](#), 2002).

Cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo possuem princípios ativos que provêm de plantas. De 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número razoavelmente grande das substâncias sintéticas são, também, obtidas a partir de precursores vegetais (Rates, 2001).

O Brasil, nos últimos anos, passou por grandes mudanças no plano econômico, gerando severos danos aos programas sociais de saúde e a descontinuidade desses programas tem provocado um impacto negativo sobre o consumo de medicamentos. Num país onde a população carente não só tem dificuldades para obter os medicamentos convencionais, mas também adoecer muito mais, o uso criterioso da fitoterapia no sistema público de saúde pode ser uma alternativa para a redução do custo dos medicamentos.

De acordo com a OMS, devido à pobreza e ao difícil acesso à medicina moderna, cerca de 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas medicinais como primeiro recurso ao cuidado com a saúde (Calixto, 2000).

Exemplo de iniciativa bem sucedida no Brasil de uso de medicamentos não convencionais ocorre no estado do Ceará. Em 1983, a Universidade Federal do Ceará (UFC) implantou o programa Farmácias Vivas, sob a coordenação do Professor Dr. Francisco José de Abreu Matos. Seguindo recomendações da OMS, o programa oferece assistência farmacêutica fitoterápica de base científica às comunidades carentes de Fortaleza.

O programa vem mostrando, desde 1995, resultados em que, por exemplo, casos de amebíase e giardíase (doenças parasitárias muito comuns em países pouco desenvolvidos) são tratados com cápsulas de hortelã a um custo de R\$ 0,96 enquanto o medicamento convencional, Flagyl® (Rhodia), tem um custo de R\$ 4,12 ([Fitoterapia...](#), 2002).

Quando utilizados de maneira adequada, os medicamentos fitoterápicos apresentam efeitos terapêuticos, às vezes, superiores aos medicamentos convencionais, com efeitos colaterais minimizados. Os medicamentos sintéticos vêm se tornando, em algumas situações, ineficientes ou inseguros. O excesso de efeitos colaterais, o uso abusivo e a prescrição indiscriminada resultam em

uma razão não ideal de risco/benefício, que pode levar graves riscos ao paciente, podendo acarretar, em muitos casos, em dependências.

Um exemplo é a valeriana (*Valeriana officinalis* L.) que vem sendo usada no tratamento de insônia e que, ao contrário dos medicamentos convencionais, não provoca dependência nem tolerância. Entretanto, em grandes quantidades e por tempo muito prolongado, pode ser tóxica ao fígado (Fitoterapia..., 2002).

A utilização inadequada dos fitoterápicos, como a automedicação, pode trazer uma série de efeitos colaterais, entre eles estão reações alérgicas, efeitos tóxicos graves em vários órgãos e até mesmo desenvolvimento de certos tipos de câncer. Estudos mostram que 4% das causas de internação de pacientes em hospitais da Coreia do Sul ocorrem devido ao uso abusivo de plantas medicinais (Dalen, 1998).

O nosso país possui cerca de 120.000 espécies vegetais das quais menos de 1% já foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (Martins *et al.*, 1994). Estudos realizados na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) apontam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos, todos envolvendo plantas medicinais, soma aproximadamente U\$ 400 bilhões/ano, o que dá a dimensão da enorme oportunidade existente para os produtos brasileiros (Barata e Queiroz, 1995).

Dessa forma, compreende-se a necessidade de validar as pesquisas com plantas medicinais e desenvolver novas tecnologias para assegurar uma terapêutica mais segura. O estudo dessas plantas, seja do ponto de vista botânico, químico, biológico, tecnológico e farmacológico, não é tarefa das mais simples, pois todas as etapas que compreendem esses estudos envolvem diferentes áreas de conhecimento, sendo necessário um determinado tempo para se chegar ao medicamento padronizado, do ponto de vista do controle de qualidade, da eficácia e da segurança.

Dentro das perspectivas atuais e no interesse de conhecer melhor nossa biodiversidade, buscou-se estudar uma espécie vegetal conhecida popularmente por mutamba, a *Guazuma ulmifolia* Lam., da família Sterculiaceae, que se encontra disseminada por todo Brasil e em alguns países da América do Sul e Central, além de ser amplamente cultivada na Ásia. Seu uso, preconizado pela população, é bem amplo, sendo empregada como depurativo, adstringente, contra sífilis, moléstias da pele, queda de cabelo e afecções parasitárias do couro cabeludo (Corrêa, 1974).

2. OBJETIVOS

De acordo com o relato popular das propriedades da droga vegetal como sendo antibacteriana e antifúngica (Caceres *et al.*, 1987; Caceres *et al.*, 1990; Caceres *et al.*, 1993b; Navarro *et al.*, 1996), depurativa (Rutter, 1990), citotóxica (Nascimento *et al.*, 1990), diaforética (Cruz, 1995), anti-hiperglicemiante (Alarcon *et al.*, 1998), sendo utilizada em problemas de pele, como dermatite, erisipela, ferimentos (Dominguez e Alcorn, 1985; Caceres *et al.*, 1987) e também para o tratamento da queda de cabelo (Corrêa, 1974; Rutter, 1990), verificou-se a necessidade de se estudar mais profundamente essa espécie vegetal.

Diante das características apresentadas pela *G. ulmifolia* Lam., o presente trabalho tem por objetivos:

- a) caracterizar a espécie vegetal morfológica e anatomicamente, a fim de comprovar a originalidade do vegetal;
- b) delimitar taxonomicamente a espécie estudada e suas variedades através do estudo morfológico e anatômico, de modo a fornecer subsídios para se identificar qual a variedade estudada;
- c) realizar o controle de qualidade da droga vegetal coletada em duas estações do ano, para o conhecimento adequado de suas características químicas e físicas;
- d) isolar e identificar compostos fenólicos presentes em extrato liofilizado das cascas secas, coletadas no estado do Paraná;
- e) avaliar a atividade antibacteriana dos extratos bruto e semipurificado obtido por partição líquido-líquido.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SISTEMÁTICA VEGETAL

3.1.1. A família Sterculiaceae Vent.

A família Sterculiaceae Vent., com cerca de 68 gêneros e 1100 espécies, possui distribuição pantropical, sendo rara em regiões temperadas. No Brasil, ocorrem 11 gêneros e cerca de 115 espécies (Barroso, 1978).

As plantas pertencentes a essa família apresentam hábitos variados, podendo ser herbáceas, arbustivas ou arbóreas. De acordo com Heywood (1993), as principais características morfológicas para o reconhecimento do grupo são: folhas alternas com estípulas, simples ou divididas, às vezes com presença de tricomas estrelados; as flores são bissexuais ou unissexuais, dispostas em inflorescências; cálice com 3 a 5 sépalas valvares, livres ou parcialmente unidas entre si; corola com ou sem pétalas, livres; androceu com 5 a 10 estames ou mais, em geral unidos formando um tubo; ovário súpero formado de dois ou mais carpelos, óvulos de 2 a muitos por lóculo; fruto do tipo baga ou cápsula, sementes com ou sem endosperma.

A família pertence à ordem Malvales, com posicionamento taxonômico próximo às famílias Tiliaceae, Bombacaceae e Malvaceae. São reconhecidas duas subfamílias dentro de Sterculiaceae: *Byttnerioideae* e *Sterculioideae* (Takhtajan, 1996). A subfamília *Byttnerioideae* é distinta por apresentar flores bissexuais, geralmente com pétalas presentes, além de apresentar carpelos unidos na maioria dos casos, ao contrário de *Sterculioideae*, que apresenta, em geral, flores unissexuais, pétalas ausentes e carpelos livres. A maior parte das espécies brasileiras encontra-se posicionada dentro da primeira, *Byttnerioideae*, distribuídas nas seguintes tribos: *Helictereeae*, *Byttnerieae*, *Theobromeae* e *Hermannieae*.

Dentre as espécies ocorrentes no Brasil, destacam-se aquelas do gênero *Helicteres*, conhecidas popularmente como saca-rolhas dos cerrados, também espécies de *Sterculia*, conhecidas no Nordeste vulgarmente como chichás; chamam atenção também aquelas do gênero em estudo, *Guazuma*, cujas árvores são conhecidas vulgarmente como mutamba (Joly, 1975).

Do ponto de vista econômico, as espécies mais conhecidas da família Sterculiaceae são o cacau (*Theobroma cacao* L.) e a cola [*Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. e *C. acuminata* (Pal.) Schott & Endl.], sendo essa última uma importante planta medicinal utilizada em toda a África (Heywood, 1993). Existem, ainda, algumas espécies da família frequentemente utilizadas como ornamentais, sendo *Dombeya* Cav., o gênero mais conhecido no Brasil.

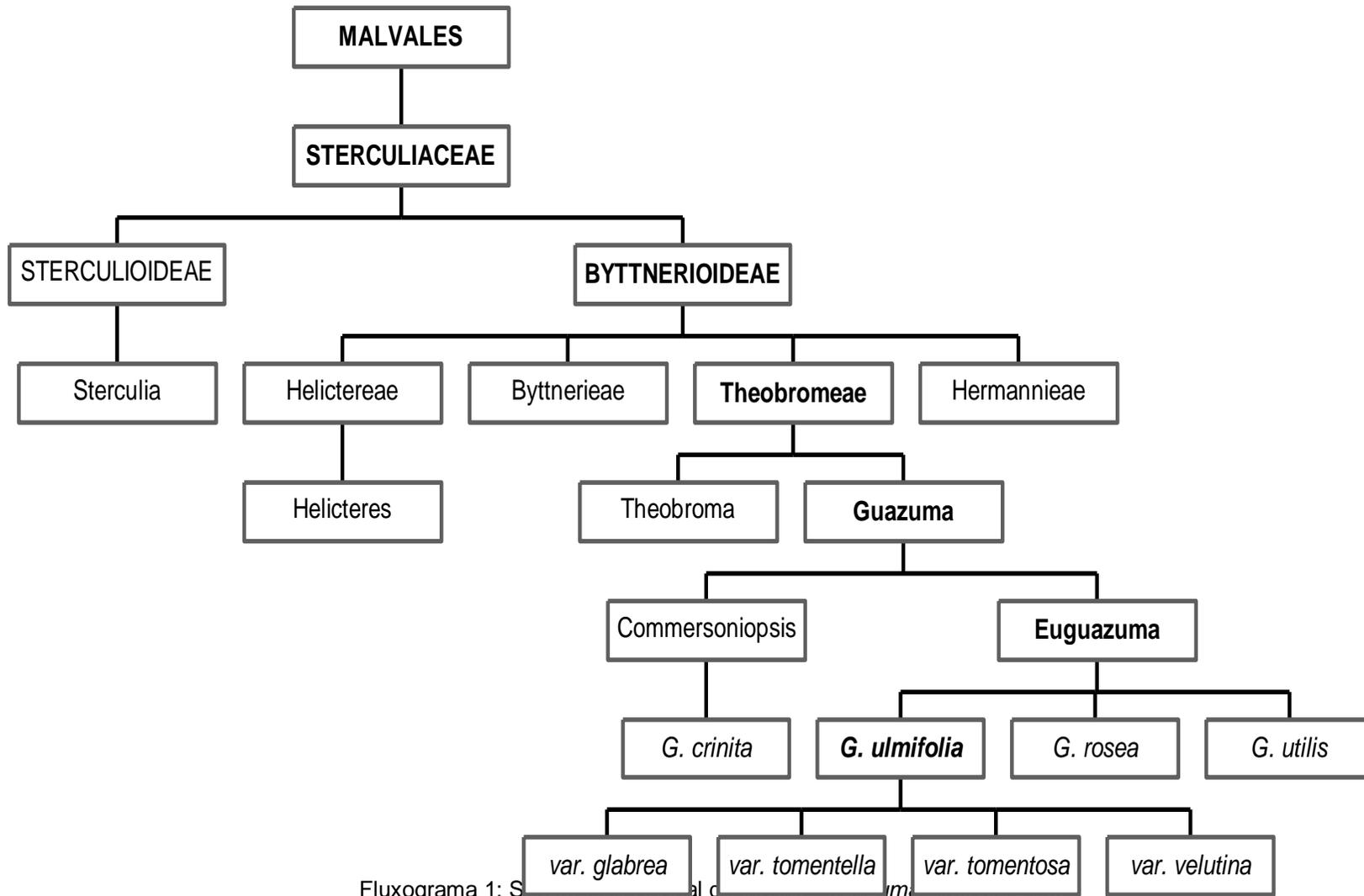
3.1.2. O gênero *Guazuma*

Segundo Takhtajan (1996), o gênero pode ser incluído dentro da subfamília *Byttnerioideae*, tribo *Theobromeae*, estando próximo, taxonomicamente, ao gênero *Theobroma*. Muitas espécies hoje reconhecidas no gênero *Guazuma* foram inicialmente descritas dentro de *Theobroma*.

O gênero apresenta quatro espécies distribuídas pela América do Sul e México, sendo que apenas duas ocorrem no Brasil: *Guazuma ulmifolia* Lam. e *Guazuma crinita* Mart.

Baseando-se principalmente em aspectos morfológicos do fruto e sementes, as espécies do gênero foram posicionadas em duas seções: *Commersoniopsis* (*Guazuma crinita* Mart.) e *Euguazuma* (*G. ulmifolia* Lam., *G. rosea* Poepp. et Endl. e *G. utilis* Poepp. et Endl.) (Schumman,

1886). Um resumo apresentando a sistemática da família Sterculiaceae chegando às variedades de *Guazuma ulmifolia* Lam. é dado no fluxograma 1.



Fluxograma 1: S...

3.1.3. A espécie *Guazuma ulmifolia* Lam.

Guazuma ulmifolia Lam. é a espécie do gênero com distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo desde o México até o Brasil meridional, com coleções na Venezuela e Peru, além de ser amplamente cultivada na Ásia. Também é a espécie de maior variação morfológica, tanto das partes vegetais como das partes florais.

O nome mutamba pode ser aplicado tanto à *G. ulmifolia* Lam. quanto à *G. crinita* Mart. (Corrêa, 1974). Porém, o fato dessa última possuir distribuição geográfica restrita ao estado do Rio de Janeiro, sugere que a espécie, em geral utilizada e conhecida como mutamba, refere-se à *G. ulmifolia* Lam.

De acordo com Corrêa (1974), a mutamba (fig. 1) é uma árvore regular, de aproximadamente 20 metros de altura, tendo o tronco entre 30 e 60 centímetros de diâmetro. Possui ramos na extremidade estreitados-tomentosos; folhas com limbo oblongo, margens denteadas, ambas as superfícies com revestimento de tricomas estrelados, especialmente sobre as nervuras principais; inflorescências racemosas ou paniculadas, axilar, tão longa quanto os pecíolos, flores pequenas, alvas, pétalas eretas e cuculadas; fruto preto, gelatinoso-sacarino, comestível para o gado.

Segundo a região, a mutamba pode possuir a sinonímia de embira, embireira, embirú, mutamba verdadeira, pau-de-motamba, camaca, periquiteira, piriquiteira, envireira, mutambo, pau-de-bicho, guaximo-macho, pojó, guaxima-torcida e, araticum-bravo (Corrêa, 1974).

Figura 1: *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae (Lorenzi, 1992)



Schumann (1886) reconheceu quatro variedades para a espécie, sendo elas, *G. ulmifolia* var. *glabra*, *G. ulmifolia* var. *tomentella*, *G. ulmifolia* var. *tomentosa* e *G. ulmifolia* var. *velutina*.

Tabela 1: Características das variedades de *Guazuma ulmifolia* Lam.

Variedade	Características
<i>G. ulmifolia</i> var. <i>glabra</i>	folhas ovais folhas adultas glabras na parte inferior poucos tricomas nas nervuras 5-8 x 2-4 cm pecíolo tomentoso fruto tipo cápsula deiscente
<i>G. ulmifolia</i> var. <i>tomentella</i>	folhas oblongas – lanceoladas 10-12 x 4-6 cm margens serradas fruto tipo cápsula deiscente
<i>G. ulmifolia</i> var. <i>tomentosa</i>	folhas ovais – lanceoladas 10-12 x 4-7 cm margens serradas fruto tipo cápsula indeiscente
<i>G. ulmifolia</i> var. <i>velutina</i>	folhas ovais a ovais – oblongas ápice acuminado e base cordada 8-11 x 4-5 cm margens serradas aspecto aveludado

Fonte: Schumann, 1886

3.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GÊNERO *Guazuma*

Em relação aos constituintes químicos da *Guazuma ulmifolia* Lam., verifica-se poucos trabalhos com essa espécie que possui sua maior utilização pela população indígena (Frei *et al.*, 1998).

Hör *et al.* (1995) realizaram o fracionamento a partir do extrato bruto etanólico das cascas de *G. ulmifolia* Lam. e isolaram proantocianidinas poliméricas que, após análise química, comprovou-se tal polímero ser constituído, principalmente, por unidades de epicatequina.

Uma análise química preliminar do extrato bruto de *G. ulmifolia* Lam. apresentou uma fração contendo procianidinas com grau de polimerização maior que oito unidades de monômeros, a qual mostrou-se com maior atividade de inibição de secreção clorídrica intestinal (Hör *et al.*, 1996).

Outros grupamentos químicos podem ser também encontrados na mutamba, porém sem conhecimento da substância química definida. Pode-se encontrar flavonóides, alcalóides, saponinas, resinas, mucilagens, ácidos graxos e terpenos (Guazuma..., 2002).

3.3. USOS POPULARES E TESTES BIOLÓGICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Guazuma*

A mutamba vem sendo utilizada pela população, como medicamento natural, em praticamente todos os locais em que está presente. Suas cascas e folhas são empregadas medicinalmente, porém, há relatos de que os frutos também são aproveitados (Burkill, 1935).

O chá das cascas é utilizado no Brasil como diaforético (sudorífero), sendo empregado em casos de febre, tosse, bronquite, asma, pneumonia e problemas de fígado (Cruz, 1995). No Peru, as cascas bem como as folhas secas, na forma de chá, são usadas para distúrbios renais, problemas de fígado e disenterias (Ramirez *et al.*, 1988). Em outras regiões do Peru e na Amazônia, a mutamba é usada em casos de alopecia, asma, bronquite, dermatoses, diarreia, disenteria, elefantíase, febres, hepatite, hanseníase, malária, nefrite e sífilis (Rutter, 1990).

A mutamba, conhecida por guacima ou guasima, no México, possui uma longa história de uso indígena. Essa população empregava as cascas frescas fervidas em água para auxiliar no parto, em problemas gastrintestinais, asma, diarreia e disenteria, feridas e febres (Dominguez e Alcorn, 1985).

Na Guatemala, com as folhas secas faz-se um decocto e ingere-se para febres, distúrbios renais e problemas de pele, e ainda, utiliza-se externamente para feridas, contusões, dermatites, irritações de pele e erisipela (Caceres *et al.*, 1987). Morton (1977) descreveu que, na Guatemala e em Yucatã, México, os frutos maduros e secos da mutamba eram moídos e com o pó preparava-se um xarope utilizado em casos de tosse.

O extrato, tanto aquoso quanto alcoólico, das cascas da mutamba, demonstrou, em estudos *in vivo*, ser fraco depressivo cardíaco, mas que possui atividade cardiotônica, hipotensiva, relaxante da musculatura lisa e, atividade na estimulação uterina (Vieira, 1968). Gonzales e Silva (1987) também indicaram o uso das cascas da mutamba na estimulação da contração uterina.

Alarcon *et al.* (1998) sugerem que a *G. ulmifolia* Lam. possui um satisfatório efeito anti-hiperglicemiante, podendo, assim, ser útil no tratamento da diabetes mellitus.

Na realização de uma triagem com 84 plantas utilizadas na Guatemala para o tratamento de distúrbios intestinais, Caceres *et al.* (1990) constataram que dentre outras, a *G. ulmifolia* Lam. exibiu alguma atividade antibacteriana. Esse resultado indica, portanto, um indício do uso do extrato dessa planta contra enterobactérias infecciosas.

Caceres *et al.* (1995) sugerem que a mutamba possa agir sobre a gonorréia (*Neisseria gonorrhoeae*), já que estudos *in vitro* realizados com a sua tintura alcoólica mostraram atividade intermediária contra tal bactéria. As atividades antibacteriana e antifúngica da mutamba foram também demonstradas através de outros estudos (Caceres *et al.*, 1987; Caceres *et al.*, 1993a e b; Navarro *et al.*, 1996).

Hör *et al.* (1995) testaram no cólon distal de coelhos o extrato aquoso das cascas de *G. ulmifolia* Lam. A secreção clorídrica foi estimulada por toxina colérica e por prostaglandinas E2 (PGE2). Observaram, então, que o extrato inibiu completamente a secreção induzida pela toxina, entretanto, não inibiu a ação das PGE2. Esses resultados indicam uma ação indireta sobre a atividade anti-secretora.

Do ponto de vista contra hospedeiros intermediários, o extrato das cascas da mutamba apresentou fraca atividade moluscicida (Sousa e Rouquayrol, 1974).

Um estudo da atividade citotóxica de plantas do estado de Pernambuco, Brasil, revelou que a *G. ulmifolia* Lam. apresenta capacidade de inibir o crescimento celular em mais de 90%. O experimento foi realizado *in vitro*, empregando-se células KB nas quais o extrato das folhas inibiu o crescimento em 97,3% (Nascimento *et al.*, 1990).

No teste de toxicidade aguda das folhas de *G. ulmifolia* Lam., foram utilizados camundongos e ratos. Os resultados dos testes indicaram que até a maior dose aplicada (1250 mg/kg do peso corporal dos camundongos e 2500 mg/kg do peso corporal dos ratos) nenhuma morte foi observada. Sintomas tóxicos e anormalidades morfológicas também não foram visualizados. Com isso, a dose letal mediana (DL₅₀) não foi definida, mas confirmou-se que as folhas de mutamba não têm toxicidade significativa (Donatus, 1997).

3.4. FLAVAN-3-ÓIS E PROANTOCIANIDINAS

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, que possuem a capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (Mello e Santos, 2002). Nas plantas superiores, os taninos são metabólitos secundários que constituem dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Porter, 1989).

Taninos hidrolisáveis são metabólitos caracterizados por uma ou mais unidades de ácido gálico esterificadas com um poliol. Ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos que indicam essas substâncias estarem restritas às Choripetales, não sendo encontradas em Sympetales (Mello e Santos, 2002).

Taninos condensados, também chamados de proantocianidinas ou leucoantocianidinas (Haslam *et al.*, 1975) são formados por cadeias de unidades de flavan-3-ol (monômeros) (Porter, 1989). Ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, sendo distribuídos em plantas lenhosas.

No grupo das proantocianidinas, a cadeia mais comum é constituída por unidades de catequina e/ou epicatequina com ligações 4→6 ou 4→8 entre o carbono da unidade superior e da unidade inferior, respectivamente.

Ainda, outros monômeros são também bastante encontrados, como galocatequina, epigalocatequina, robinetinidol e fisetinidol.

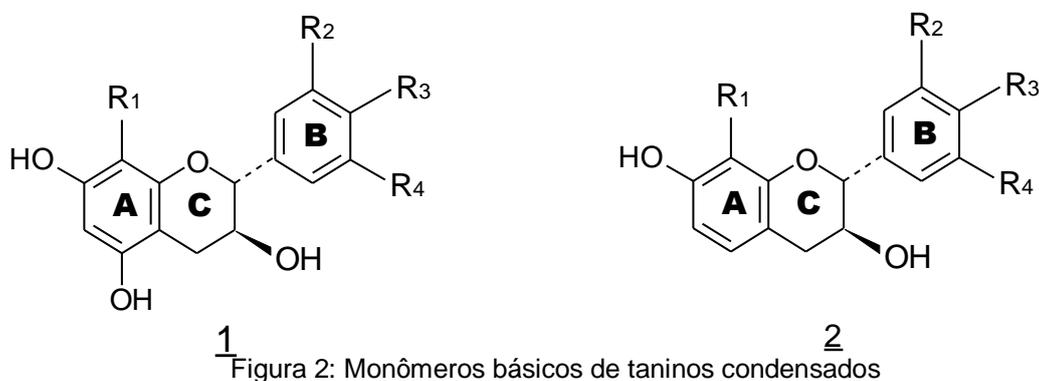


Tabela 2: Taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos

Tipo	Monômero (nome trivial)	Substituinte			
		R1	R2	R3	R4
1	distenina	H	H	H	H
	afzlequina	H	H	OH	H
	catequina	H	OH	OH	H
	galocatequina	H	OH	OH	OH
2	guibourtinidol	H	H	OH	H
	fisetinidol	H	OH	OH	H
	robinetinidol	H	OH	OH	OH
	oritina	OH	H	OH	H
	mesquitol	OH	OH	-	H

Fonte: Mello e Santos, 2002.

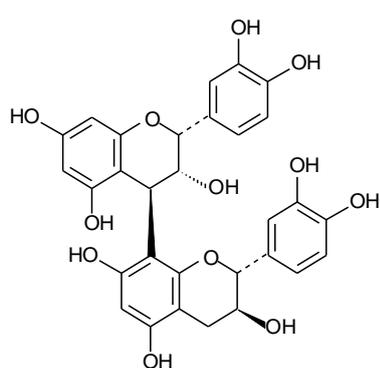
A nomenclatura comum dos flavan-3-óis e proantocianidinas derivam originalmente de Weinges *et al.* (1968a e 1968b) e de Thompson *et al.* (1972).

Os dímeros de procianidinas foram caracterizados através do nome usual e divididos em dois grupos, designados por A (C₃₀H₂₄O₁₂) e B (C₃₀H₂₆O₁₂) (Mello e Santos, 2002). O grupo do tipo B é o mais comumente encontrado na natureza, tendo sido isolado de diversas espécies vegetais (fig. 3) (Thompson *et al.*, 1972).

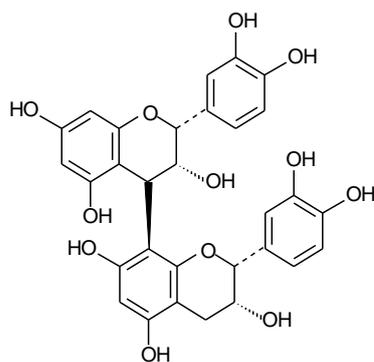
Das raízes da *Prunus armeniaca* L. foram isoladas três proantocianidinas, que foram identificadas como isômeros de proantocinidinas tipo A (Rawat *et al.*, 1999).

Um grande número de proantocianidinas trímeras são conhecidas, como por exemplo, os trímeros de epicatequina isolados das cascas de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. por Geiss *et al.* (1994).

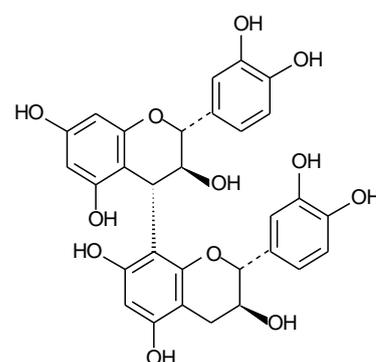
Através da análise de frações obtidas do extrato das sementes de uva (*Vitis vinifera* L.) pode-se identificar a presença de procianidinas diméricas e triméricas, dentre elas, procianidina B₁, procianidina B₂, procianidina T₃ (Sun *et al.*, 1999).



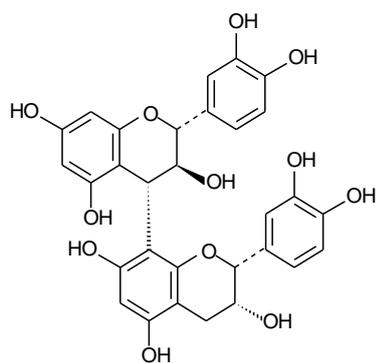
epicatequina-(4 β →8)-
catequina (B₁)



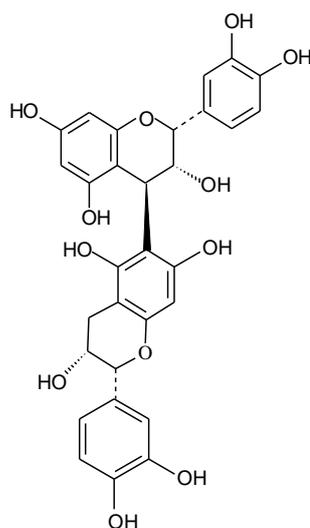
epicatequina-(4 β →8)-
epicatequina (B₂)



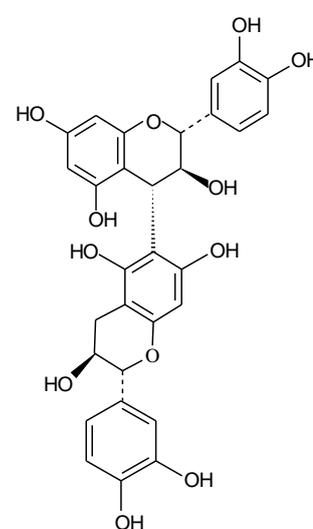
catequina-(4 α →8)-
catequina (B₃)



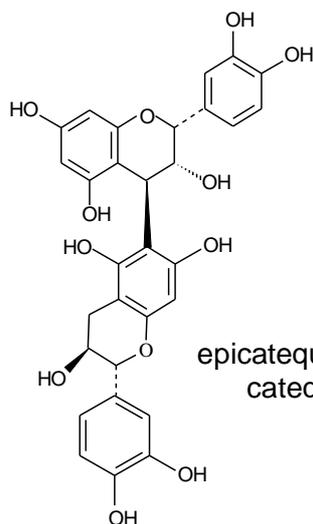
catequina-(4 α →8)-
epicatequina (B₄)



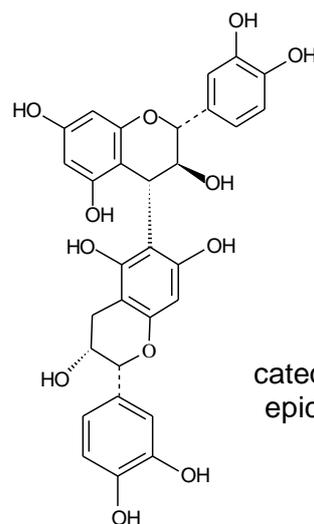
epicatequina-(4 β →6)-
epicatequina (B₅)



catequina-(4 α →6)-
catequina (B₆)



epicatequina-(4 β →6)-
catequina (B₇)



catequina-(4 α →6)-
epicatequina (B₈)

Figura 3: Estruturas exemplos de proantocianidinas diméricas

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios (Haslam, 1996). Assim, vários grupos, nas últimas décadas, vêm investigando as atividades farmacológicas e biológicas dos taninos, obtendo resultados satisfatórios.

Testes toxicológicos, realizados com procianidinas B₂ extraídas do suco de maçã (*Malus sylvestris* Mill.), não apresentaram nenhuma contra-indicação quanto ao seu uso no tratamento da alopecia. Essa indicação baseia-se no fato das proantocianidinas possuírem atividade no crescimento capilar através da estimulação das células do epitélio capilar (Takahashi *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001).

Monômeros galoilados demonstraram atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie (Otake *et al.*, 1991; Nakahara *et al.*, 1993).

Scholz (1994) demonstrou que os taninos possuem atividade antibacteriana, tanto contra bactérias gram-negativas como gram-positivas.

Proantocianidinas oligoméricas possuem atividade sobre o sistema circulatório, que se baseia na dilatação das paredes coronarianas e efeito inotrópico positivo (Weinges *et al.*, 1971). Essas propriedades foram demonstradas pelos flavonóides e procianidinas de *Crataegus monogyna* Jacq. e *C. oxyacantha* L., Rosaceae (Ammon e Kaul, 1994a, b e c).

Polifenóis encontrados em uvas diminuem a síntese de endotelina-1 (ET-1) em células do endotélio da aorta bovina, pela supressão da transcrição do gene ET-1. Com isso se pode explicar as propriedades cárdio-protetoras de vinhos e, conseqüentemente, dos polifenóis, já que esse peptídeo vasoativo, ET-1, é fundamental no desenvolvimento de aterosclerose (Corder *et al.*, 2001).

O extrato das cascas de *Erythrophleum suaveolens* Brenan apresentou potente atividade antiinflamatória e analgésica, sendo as procianidinas presentes no vegetal responsáveis por essas propriedades (Dongmo *et al.*, 2001).

Hatano *et al.* (1989) observaram que os flavan-3-óis, as proantocianidinas e os taninos hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar os radicais livres do oxigênio que são importantes no processo inflamatório. Os estudos demonstraram que essa ação é dependente do grau de hidroxilação do anel B, do grau de polimerização e do grau de galoilação. Os autores observaram a diminuição do efeito tóxico dos radicais ânion-superóxidos e atribuíram essa atividade à estabilidade dos radicais fenóxi.

Fejes *et al.* (1999) demonstraram que o sinergismo de flavonóides e compostos fenólicos (proantocianidinas) presentes no extrato aquoso da *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.), Apiaceae, possui atividade antioxidante, sendo indicado em distúrbios causados pela produção em excesso de radicais livres.

Proantocianidinas do tipo A, isoladas do extrato das folhas de *Dioclea lasiophylla* Benth., mostraram considerável atividade antioxidante (AA=35) quando comparadas a antioxidantes de referência, como α -tocoferol (AA=27) e *n*-propil-galato (AA=49) (Barreiros *et al.*, 2000).

3.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Entre as várias atividades biológicas referentes às substâncias fenólicas, a atividade antibacteriana é uma das estudadas.

Taninos e compostos fenólicos vêm sendo amplamente reconhecidos por possuir alto potencial antibiótico, afirmação que confirma o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis como drogas com efeito anti-séptico (Kolodziej *et al.*, 1999)

Em um *screening* com plantas mexicanas, às quais se atribuem propriedades antibióticas, 20 espécies vegetais selecionadas foram avaliadas frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8937), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Dentre os resultados, o extrato dos frutos da mutamba demonstrou atividade inibitória do crescimento microbiano (CIM), de 10, 20, 20 e 40 mg/ml, frente aos microrganismos acima descritos, respectivamente (Navarro *et al.*, 1996).

Uma fração de proantocianidinas, isolada da espécie *Vaccinium macrocarpon* Ait., foi testada frente à *Escherichia coli*, apresentando potente atividade biológica por inibir a aderência da bactéria nas células uroepiteliais (Foo *et al.*, 2000).

Plantas populares usadas na Guatemala para o tratamento da gonorréia foram testadas *in vitro* contra *Neisseria gonorrhoeae*. Das 46 plantas testadas, 13 (28,3%) mostraram evidente atividade, 7 (15,2%) mostraram fraca atividade e, 26 (56,5%) não mostraram atividade frente à bactéria (Caceres *et al.*, 1995).

De 92 plantas analisadas que são utilizadas em Honduras, num estudo antibacteriano, apenas 19 delas revelaram ter as propriedades conhecidas. Dentre as culturas empregadas, *Escherichia coli* demonstrou ter a maior resistência, sendo que apenas a espécie *Piper aduncum* L. demonstrou ter atividade sobre esse microrganismo (Lentz *et al.*, 1998).

Proantocianidinas isoladas da *Pavetta owariensis* L. (Rubiaceae) não demonstraram atividade contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Baldé *et al.*, 1990). Entretanto, uma revisão realizada por Scholz (1994), indica atividade antibacteriana para prociandinas.

O extrato acetônico das cascas de *Syzygium jambos* (L.) Alston mostrou ter atividade frente à *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus warneri* devido à presença dos taninos. Um mesmo ensaio realizado com o extrato acetônico, onde houve prévia extração dos taninos, indicou a perda da atividade antimicrobiana do extrato (Djipa *et al.*, 2000).

Uma investigação da atividade antibacteriana de diversos taninos frente à *Staphylococcus aureus* demonstrou que o ácido tânico é um ótimo adjuvante no tratamento de infecções da pele (Akiyama *et al.*, 2001).

Taninos isolados da espécie *Vaccinium vitis-idaea* L., testados contra patógenos periodontais (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) apresentaram potente atividade antimicrobiana, podendo assim, ser essa planta útil no tratamento de doenças periodontais (Ho *et al.*, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento Fisatom 753-A
- Autoclave
- Balança analítica AND HR-200
- Balança semi-analítica Marte AL500
- Banho maria Marte MB
- Bomba a vácuo IBAV BRD4
- Câmara clara
- Câmera digital Mavica FD-71
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200
- Espectrofotômetro UV-VIS
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ
- Espectrômetro para RMN Gemini 300 BB
- Estufa de secagem e esterilização Fanem 315 SE
- Estufa incubadora
- Evaporador rotatório Büchi R-114 e R-153
- Liofilizadores Christ Alpha 1-2 e Alpha 1-4
- Microscópio óptico Lambda
- Micrótomo Leica
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- Sistema de posicionamento global (GPS) Garmin etrex legend v.2.24.
- Turbolisador Skymesen LSV 04
- Ultra-som Cleaner USC 1450

4.1.2. Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes, exceto quando especificados, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), sendo Merck® ou Sygma®. Foi utilizado etanol comercial 93,6 ° (COCAMAR).

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido clorídrico
- Ágar Mueller Hinton Difco
- Álcool metílico
- Anidrido acético
- Azul de toluidina, solução aquosa 1%
- Caldo Mueller Hinton Difco
- Cloridrato de pelargonidina padrão
- Clorofórmio deuterado Isotec®
- Epicatequina padrão
- FAA (álcool 50°: ácido acético glacial: formaldeído, 90:5:5; V/V)
- Glicerina
- Glutaraldeído
- Hipoclorito de sódio a 33%
- Histoiresina Leica®
- Metanol deuterado (MeOH d₄) Isotec®
- Nitrogênio líquido
- Parafina
- Penicilina (antibiótico padrão)
- Piridina
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteau 2N Laborclin
- Solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06%
- Solução aquosa de TTC a 2% (cloreto de 2,3,5 – trifenil tetrazólio)
- Solução aquosa de urotropina a 0,5%

- Solução de safrablau alcoólica (safranina 1%: azul de astra 1%; 7:3)
- Solução metanólica de ácido acético a 5%
- Solução metanólica de cloreto de alumínio a 0,5% e a 2%
- Tetracilcina (antibiótico padrão)
- Vancomicina (antibiótico padrão)
- Xilol

4.2. ANÁLISE BOTÂNICA DA *Guazuma ulmifolia* Lam.

4.2.1. Coleta do material

O material vegetal (cascas, folhas, flores e frutos) foi coletado no norte do estado do Paraná, próximo ao Rio Tibagi, Fazenda Doralice, no município de Ibioporã (S 23°18'15,6"; W 050°58'33,1"; 384 m altitude) (GUA), e na região norte do estado de São Paulo, no município de Guariroba, Rodovia SP-333, km 166 (S 21°30'46,2"; W 048°40'12,2"; 540 m altitude) (GUB). As amostras foram coletadas em ambos os locais no inverno de 2000 e no verão de 2001.

Os materiais foram coletados com auxílio de tesouras de poda manual ou de poda alta, sendo preparados de acordo com as técnicas usuais de herborização (Radford *et al.*, 1979). As exsicatas, com casca, folhas, flores e frutos quando presentes, foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, onde procedeu-se ao estudo e identificação das mesmas. Durante as coletas, foram realizadas observações sobre o aspecto geral da planta, período de floração e ambiente de ocorrência, além de dados sobre porte, coloração, frutos e flores quando presentes e outros aspectos da planta que poderiam ser perdidos durante o processo de herborização.

Foram coletados em separado, partes da casca, folhas e partes do caule para o estudo anatômico.

As cascas foram rasuradas e deixadas secar à temperatura ambiente, em local arejado e ao abrigo da luz solar.

4.2.2. Identificação botânica do material

O material foi identificado até o nível específico sempre que possível com o auxílio de literatura especializada contendo chave para gêneros e espécies (Schumann, 1886; Takhtajan, 1996).

Após esse procedimento foram realizadas visitas ao Herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), para a confirmação das identificações.

4.2.3. Estudo morfológico da *Guazuma ulmifolia* Lam.

O estudo morfológico baseou-se nos espécimes coletados no Paraná e em São Paulo, e em material do herbário da UEL. Para a terminologia das partes vegetais e reprodutivas foram empregados os trabalhos de Radford *et al.* (1979) e Stearn (1995). As dimensões foram tomadas com auxílio de paquímetro. As folhas foram caracterizadas pelos seguintes

parâmetros: largura e comprimento, número de nervuras, coloração, consistência e características de limbo. As flores caracterizaram-se por largura e comprimento dos verticilos, número e tamanho dos pedúnculos. Os frutos e sementes, por largura, comprimento e número. A casca foi caracterizada segundo aspectos de consistência e coloração.

4.2.4. Estudo anatômico da *Guazuma ulmifolia* Lam.

O material botânico utilizado no estudo anatômico constou de caule (crescimento primário e secundário) e folhas. O material fresco foi fixado em FAA¹ e glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M sendo após no mínimo 24 h, transferido para um recipiente com álcool 70%, onde ficou armazenado para sua conservação. Foram preparadas lâminas semipermanentes e permanentes, que se diferenciam pela sua preparação a partir do material fixado.

4.2.4.1. Lâminas semipermanentes

Foram realizados cortes à mão livre utilizando-se lâmina de barbear. Os cortes foram obtidos com dois movimentos rápidos e conjugados (um para dentro e outro para a direita, ou para esquerda) da lâmina sobre o material a ser cortado. Após, os cortes foram levados, com o auxílio de pincel fino, para uma placa de petri com água destilada, escolhendo-se os melhores para a coloração. Os cortes mais finos são os mais transparentes e, portanto, os mais recomendados (Oliveira *et al.*, 1998).

Efetuuou-se o clareamento dos cortes com o auxílio de solução de hipoclorito de sódio 33%, onde os cortes permaneceram até completa descoloração (Oliveira *et al.*, 1998). Tal operação foi efetuada com o auxílio de estilete. Após a descoloração, o material foi lavado com água destilada, por 3 vezes, para retirada do hipoclorito de sódio.

Os cortes descorados foram corados com as seguintes soluções, separadamente:

- Solução alcoólica de cloreto férrico 2%
- Solução aquosa de azul de toluidina 1%
- Solução de Safrablau alcóolica²

Em todos os casos, os cortes permaneceram no corante por 2-5 min. Após esse tempo, os cortes foram retirados do corante e novamente lavados em água destilada por três vezes.

Sobre a lâmina de vidro, colocou-se uma gota de glicerina, transportando a seguir, com todo cuidado, o corte para a gota com o auxílio de estilete. Cobriu-se, com todo cuidado, o corte e a gota de glicerina com a lamínula. A glicerina não deve extravasar, todavia, deve preencher totalmente o espaço da lamínula.

Com o intuito de conservar por mais tempo a preparação, efetuou-se a fixação da lamínula à lâmina. Para isso, aplicou-se ao seu redor, esmalte de unha (Colorama®).

A técnica descrita é uma técnica adaptada a partir de Roesler (1972) por Souza *et al.* (1995).

¹ FAA= álcool etílico 50%: ácido acético glacial: formaldeído (90:5:5; V/V)

² Solução de Safrablau alcóolica= safranina 1%: azul de astra 1% (7:3; V/V) (Bukatsch, 1972)

A visualização das estruturas celulares foi feita a partir de fotomicrografias tomadas em microscópio óptico Lambda (aumentos de 40x, 100x e 400x), com auxílio de câmera digital.

4.2.4.2. Lâminas permanentes

As peças fixadas foram desidratadas em série de álcool etílico (álcool 50, 70, 90 e 100%), passando em seguida por uma série de solução alcoólica de xilol (3:1, 1:1 e 1:3). Após, foram incluídas em parafina e então, cortadas em micrótomo (Sass, 1951). A seguir, os cortes foram corados e a lâmina foi montada em Permount®.

Outra metodologia empregada foi segundo Gerrits *et al.* (1991), onde se utilizou inclusão em historesina (GMA – glicolmetacrilato). Da mesma maneira descrita anteriormente, o material foi seccionado em micrótomo, corado e montado em Permount®.

Em ambos os casos, a espessura de corte realizada foi de 10 a 15 µm.

4.3. CONTROLE DE QUALIDADE DA *Guazuma ulmifolia* Lam.

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopéicas presentes na Farmacopéia Brasileira e em outras Farmacopéias e, outras técnicas não farmacopéicas.

4.3.1. Análises químicas

4.3.1.1. Análise fitoquímica preliminar

Essas análises objetivaram estabelecer o conhecimento de grupos químicos referenciados nos trabalhos de Hör *et al.* (1995; 1996) e Guazuma... (2002). Entre os diferentes ensaios, realizaram-se os seguintes (Harborne, 1998): 1) glicosídeos flavônicos; 2) glicosídeos de núcleo cumarina; 3) glicosídeos cianogênicos; 4) compostos antracênicos; 5) compostos polifenólicos; 6) taninos; 7) glicosídeos cardiotônicos; 8) pesquisa de anel esteroidal; 9) saponinas; 10) mucilagens e 11) alcalóides.

4.3.1.2. Análises quantitativas

4.3.1.2.1. Determinação do teor de flavonóides totais (Farmacopéia Brasileira, 1996)

Em balão de fundo redondo de 100 ml foram colocados 0,400 g de droga moída com granulometria 1,000-0,800 mm, exatamente pesada, acrescido de 1 ml de solução de urotropina a 0,5%, 20,0 ml de acetona R e 2 ml de ácido clorídrico R. Aqueceu-se sobre manta de aquecimento, mantendo-se sob refluxo, por 30 min. Filtrou-se através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico (BV) de 100 ml. O resíduo da droga e o algodão foram lavados, em balão de fundo redondo, com duas porções de 20 ml de acetona, sob refluxo, por 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para BV, completando-se o

volume com acetona. Em funil de separação, foram adicionados, 20 ml da solução acetônica, 20 ml de água destilada e extraídos com 15 ml de acetato de etila R, repetindo-se por três vezes, com porções de 10 ml.

As frações acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50 ml de água destilada e colocadas em BV de 50 ml, completando-se o volume com acetato de etila (solução-mãe - SM).

Adicionou-se 1 ml do reagente de cloreto de alumínio a 10 ml da SM, diluindo-se a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R (solução-amostra--SA). Ao mesmo tempo, 10 ml da SM foram diluídas a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R (solução-comparativa - SC). Após 30 min mediu-se a absorvância da SA a 425 nm, em cubeta com 1,000 cm de espessura contra SC.

O cálculo do teor baseia-se na absorvância específica da quercetina, $E=500$, segundo a fórmula:

$$Q = \frac{Abs. * 62500}{500 * e * (100 - t)} (\%; m / m)$$

onde: Abs. = absorvância medida;

e = massa da droga em g;

t = perda por dessecação (%; m/m).

O resultado é fornecido em percentual (m/m) de flavonóides calculados como quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$).

4.3.1.2.2. Determinação do teor de taninos totais (Glasl, 1983)

Uma amostra de 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer com 150 ml de água, deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80-90 °C. Após, resfriou-se o erlenmeyer em água corrente sendo transferido, seu conteúdo, para balão volumétrico de 250 ml, lavando-se e completando-se o volume com água. Tomou-se cerca de 80 ml do extrato e filtrou-se através de papel filtro, desprezado-se os primeiros 50 ml. O filtrado foi denominado solução-mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu 2N) e 10 ml de água para balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para béquer e agitados durante 60 min. Após, filtrou-se a solução. Cinco mililitros do filtrado foram diluídos com água para 25 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu 2N) e 10 ml de água para balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de

carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625 \times Abs.}{1000}$$

$$PNA = \frac{15625 \times Abs.}{1000}$$

1000

x

m

1000 x m

$$TT = PT - PNA$$

onde:

PT	=	Polifenóis totais (%)
PNA	=	Polifenóis não adsorventes (%)
Abs	=	Absorvância medida
m	=	massa da droga em g
TT	=	teor de taninos totais (%)

4.3.2. Análises físico-químicas

Com a droga vegetal coletada nas estações de inverno e verão, foram realizadas as técnicas a seguir, em sua maioria, farmacopéicas.

4.3.2.1. Perda por secagem (Mello e Petrovick, 2000)

Cerca de 2,0 g, exatamente pesados, da droga vegetal fresca foram colocados a secar a temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, através da média de três determinações.

4.3.2.2. Determinação da perda por dessecação (Mello e Petrovick, 2000)

Amostras de 2,0 g de droga vegetal moída foram exatamente pesadas em pesa-filtros previamente tarados e colocadas em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 min. Esse procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

3.3.2.3. Determinação do teor de extrativos (Mello e Petrovick, 2000)

Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foi submetido à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado a 100,0 ml. A solução restante foi filtrada em papel de filtro e, os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Do restante do filtrado, pesou-se uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e evaporou-

se até secura em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

onde: TE = teor de extrativos (%; m/m)

g = massa de resíduo seco (g)

m = massa da amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

3.3.2.4. Determinação do teor de resíduo seco (Mello e Petrovick, 2000)

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até secura em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações.

4.4. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

4.4.1. Extrato bruto (EB)

As cascas da mutamba (GUA), secas, foram moídas em moinho de martelos. O extrato bruto foi preparado por turbólise, durante 15 min, com temperatura de, no máximo, 40 °C. O extrato foi preparado a 10% (p/V), sendo utilizado como líquido extrator a mistura acetona:água (7:3; V/V) (Cork e Krockenberger, 1991). Após, ocorreu filtração em algodão, repetindo-se por 3 vezes. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 40 °C, de modo a eliminar todo o solvente orgânico. O extrato concentrado foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se o EB.

4.4.2. Fração acetato de etila (FA) e fração aquosa (FW)

O EB liofilizado foi ressuspenso em água destilada (50 g em 500 ml) e levado à partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 500 ml) (Mello *et al.*, 1996). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas e liofilizadas, sendo denominada fração acetato de etila (FA). Com a fase aquosa procedeu-se da mesma maneira originando a fração aquosa (FW).

No processo de partição, uma terceira subfração é formada, já que uma terceira fase se precipita, a qual é insolúvel tanto em água quanto em acetato de etila sendo denominada de resíduo da partição (RE).

4.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Na obtenção de frações semipurificadas, auxiliando o isolamento de substâncias químicas, foram empregados alguns métodos cromatográficos.

4.5.1. Cromatografia em coluna (CC) da FA (Mello *et al.*, 1996)

A fração FA foi fracionada empregando-se coluna de vidro (h: 750 mm; Ø 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após ter sido limpa com acetona:água (7:3; V/V) e em seguida com ácido acético a 2%, a mesma foi estabilizada com etanol 50%. Dez gramas da FA foram solubilizados completamente em etanol 50% e após, adicionados no topo da coluna. Em seguida, utilizou-se a sequência de fase móvel constante na tabela 3.

Tabela 3: Seqüência dos solventes empregados na CC da FA

Solvente	Quantidade (l)
EtOH:H ₂ O (1:1)	7
EtOH	5
MeOH	1
Acetona	1

As frações foram recolhidas a cada 10 minutos com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento das frações foi realizado por cromatografia em camada delgada (seção 4.5.2; p.33), obtendo-se 26 subfrações, as quais foram reunidas, concentradas, congeladas e liofilizadas.

4.5.1.1. CC das subfrações

Algumas subfrações obtidas a partir da FA foram submetidas novamente à CC (h:320 mm; Ø 30 mm) contendo Sephadex® LH-20. O sistema eluente empregado encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Seqüência dos solventes empregados, em proporção volumétrica, na CC das subfrações da FA

Solvente	Quantidade (ml)
EtOH:H ₂ O (2:8)	300
EtOH:H ₂ O (3:7)	300
EtOH:H ₂ O (4:6)	300
EtOH:H ₂ O (5:5)	300
EtOH	200
MeOH	200
Acetona: H ₂ O (1:1)	200

O monitoramento das frações foi realizado por CCD (seção 4.5.2; p.33), sendo as frações reunidas por similaridade, concentradas e liofilizadas.

4.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada a partir das frações obtidas das CC (seção 4.5.1.1; p.32), utilizando-se cromatoplasmas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®); fase móvel acetato de etila:ácido fórmico: água (90:5:5; V/V). A detecção das placas ocorreu primeiramente sob luz ultravioleta (254 nm) e depois reveladas com solução de cloreto férrico a 2% em metanol.

4.5.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Com as frações semipurificadas, obtidas através de derivatização (seção 4.6), realizou-se CCDP, sendo desenvolvidas em placas de vidro (20 x 20 cm) preparadas com gel de sílica PF₂₅₄ (Merck®) com gesso, na espessura de 0,75 mm. O sistema eluente empregado na cromatografia foi tolueno:acetona (7:3; V/V). Sob luz UV, as faixas das substâncias foram demarcadas, sendo calculado o valor de R_f das mesmas. A região da substância foi raspada e solubilizada em clorofórmio. A mistura permaneceu em ultra-som por cerca de 5 min, e depois, filtrada em filtro G3, eliminando-se o clorofórmio sob pressão reduzida em evaporador rotatório. A amostra foi deixada na capela à temperatura ambiente de modo a ocorrer a completa eliminação do solvente, sendo depois congelada e liofilizada.

4.6. DERIVATIZAÇÃO (Mello *et al.*, 1996)

No intuito de auxiliar a identificação estrutural, as frações puras e semipuras foram acetiladas. Para até 100 mg da amostra, foram adicionados 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético, em balão de fundo redondo de 100 ml. Deixou-se em repouso, a temperatura ambiente, por 24 h. Após esse período, o balão foi levado a banho de gelo por 2 h. Para auxiliar no resfriamento, gelo picado foi colocado dentro do balão. Após o resfriamento, filtrou-se a vácuo em filtro G3, sendo a substância acetilada lavada com água gelada em abundância para eliminação da piridina. A substância foi, então, solubilizada em clorofórmio, sendo o solvente orgânico eliminado por concentração. A substância acetilada foi transferida para um frasco pequeno, sendo colocada na capela à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Depois, a fração foi congelada e liofilizada.

4.7. ANÁLISE ESTRUTURAL

A análise estrutural das substâncias isoladas foi realizada por métodos espectroscópicos RMN 1D (¹H, ¹³C), RMN 2D (¹H/¹H COSY, HETCOR) e espectroscopia de massas (EM). Os espectros obtidos foram comparados com dados existentes na literatura, de modo a auxiliar na elucidação estrutural.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro, de 300 MHz para ¹H

e 75 MHz para ^{13}C , empregando-se solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3). Os espectros de massas foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha.

4.8. HIDRÓLISE DE DÍMEROS (Mello *et al.*, 1996)

4.8.1. Unidade Superior

Colocou-se 1 mg da substância acetilada em 2 ml de solução de HCl 5% em etanol, em balão de fundo afunilado de 25 ml. Deixou em refluxo por 60 min, ou até a solução tornar-se claramente vermelha. Realizou-se CCD em celulose com sistema eluente ácido fórmico:HCl:água (10:1:3; V/V). Foram utilizados cloridrato de pelargonidina e epicatequina como substâncias referência.

4.8.2. Unidade Inferior

Colocou-se 1 mg da substância livre (não acetilada) em 2 ml de solução de HCl 0,1N em etanol. Deixou-se em banho-maria a 60 °C por 15 min. Conseguiu-se a identificação através de CCD como descrito na seção 4.5.2 (p.33) em comparação com substâncias referência.

4.9. ENSAIO ANTIBACTERIANO DA *Guazuma ulmifolia* Lam.

As propriedades antimicrobianas do extrato total e frações semipurificadas da *G. ulmifolia* foram avaliadas pelo Método de Diluição (Woods e Washington, 1995).

4.9.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Os microrganismos foram mantidos em ágar Mueller Hinton (AMH), sendo repicados em caldo Mueller Hinton (CMH), de modo a fornecer uma cultura de 24 h.

4.9.1.1. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir da cultura em CMH de 24 h. Em um tubo, contendo salina estéril, adicionou-se gota a gota a cultura da bactéria até a obtenção de turvação igual à encontrada na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Realizou-se, logo após, diluição 1/10 em tubo eppendorf, de modo a obter-se uma suspensão de 10^7 UFC/ml, cujo inóculo foi empregado no ensaio.

4.9.2. Método de diluição

4.9.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Preparou-se a solução estoque a 20 mg/ml, em água, do extrato bruto e suas frações a serem testadas. Em caldo Mueller Hinton, fez-se uma diluição 1/10, obtendo-se solução a 2 mg/ml (2000 µg/ml), que foi a solução teste (ST).

Em placa de 96 poços, pipetou-se 100 µl de caldo Mueller Hinton em cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas. No experimento realizaram-se 7 diluições.

A partir da ST, pipetou-se 100 µl para o primeiro poço, obtendo-se concentração inicial de 1000 µg/ml. Fez-se então, uma diluição seriada 1/2 homogeneizando e transferindo-se 100 µl do primeiro poço para os poços subseqüentes, obtendo-se concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/ml. A última fileira de poços foi utilizada como controle da bactéria, portanto, sem a ST (fig. 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1000 µg/ml
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	500 µg/ml
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	250 µg/ml
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	125 µg/ml
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	62,5 µg/ml
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	31,25 µg/ml
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	15,625 µg/ml
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Controle da bactéria

Pipetou-se 5 µl da suspensão 10^7 UFC/ml em cada poço, adicionando-se, portanto, 50000 UFC/poço. Após, incubou-se a microplaca em estufa a 37 °C por 24 h.

A CIM foi definida como a menor concentração da droga onde houve inibição do crescimento bacteriano. Essa inibição foi confirmada pela adição de 20 µl de TTC (cloreto de 2,3,5 – trifênil tetrazólio) 2%, facilitando a visualização por colorir de vermelho as suspensões nos poços com crescimento bacteriano.

Paralelamente, realizou-se controle com antibacterianos clássicos. Os antibióticos de referência utilizados foram: I - penicilina para *S. aureus* e *P. aeruginosa*; II - vancomicina para *B. subtilis*; III – tetraciclina para *E. coli* (Woods e Washington, 1995).

4.9.2.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM foi realizada a partir de todos os poços onde houve inibição do crescimento bacteriano (CIM).

Ns poços com as diluições que não resultaram em crescimento, realizou-se subcultura para placa com ágar Mueller Hinton por meio de alça calibrada de 10 µl. Incubou-se as placas em estufa a 37 °C por 24 h.

A CBM foi definida como a menor concentração da droga que apresentou subcultura negativa ou somente uma colônia.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toda sociedade humana acumula um acervo de informações sobre o ambiente que a cerca, que vai lhe possibilitar interagir com ele para prover suas necessidades de sobrevivência. Nesse acervo, inscreve-se o conhecimento relativo ao mundo vegetal com o qual essas sociedades estão em contato.

A abordagem ao estudo de plantas medicinais a partir de seu emprego por sociedades autóctones, de tradição oral, pode, pois, fornecer muitas informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre essas plantas (Stasi, 1996).

O emprego terapêutico de plantas medicinais não é prática exclusiva dos povos indígenas. Ao contrário, a população em geral usa indiscriminadamente as drogas vegetais, devido ao desconhecimento da possível existência de toxicidade e mesmo de sua comprovada ação.

Existe a idéia errônea de que: “planta, se não fizer bem, mal também não faz”, sabendo-se que, dependendo da dose, pode-se ter plantas medicinais ou tóxicas. Como exemplo cita-se: *Digitalis purpurea* L. (dedaleira), espécie vegetal que contém glicosídeos cardiotônicos, utilizada em casos de insuficiência cardíaca, com dose terapêutica muito próxima à dose tóxica. Uma dose um pouco mais elevada pode causar intoxicação, provocando a morte por parada cardíaca.

No Brasil, embora existam normas para garantir a qualidade dos fitoterápicos (WHO, 1998; RDC n.17/2000-ANVISA; dentre outras), essas nem sempre são cumpridas, podendo gerar produtos sem qualidade e sem eficácia terapêutica. Esse fato justifica a necessidade de estudos que caracterizem as drogas vegetais, na obtenção dessa qualidade.

Um dos problemas nesse sentido é a utilização de nomes populares em vez do nome científico do vegetal. Muitas vezes uma mesma planta pode ter diversos nomes populares e, a certificação da espécie vegetal só poderá ser reconhecida em outras partes do estado, país, através do seu nome científico correto. Por exemplo, a *Casearia silvestris* Swartz, é conhecida por chá de bugre nos estados do Sul do Brasil, e por guaçatonga em outras regiões do país. Por outro lado, o mesmo nome popular pode significar diferentes espécies, como, por exemplo, a macela (ou marcela), que tanto pode ser duas espécies do gênero *Achyrocline* [*A. satureoides* (Lam.) DC. e *A. vauthieriana* DC.], bem como *Anthemis nobilis* L., também conhecida por camomila romana. Por outro lado, o nome camomila é usado para *Anthemis nobilis* L., e também para *Matricaria chamomilla* L. (Mentz e Bordignon, 2002).

Com a espécie vegetal estudada também acontece esse problema. Corrêa (1974) descreve para a espécie *Guazuma ulmifolia* Lam., além de mutamba, vários nomes populares como mutambo, embira, embireira, mutamba verdadeira, periquiteira, pau-de-bicho, pojó, dentre outros. Da mesma maneira, o nome popular mutamba pode ser dado, segundo Lorenzi (1992), para a *Guazuma ulmifolia* Lam. e para a *Luehea candicans* Mart. et Zucc.

Dessa forma, o presente trabalho inclui um estudo de sistemática e morfologia envolvendo a coleta, herborização, estudo morfológico e identificação do vegetal *Guazuma ulmifolia* Lam.

A natureza cria individualidades. Não existe sequer dois indivíduos iguais. Entretanto, em indivíduos pertencentes a uma mesma espécie, prevalecem as semelhanças, ficando as diferenças

restritas a certos limites. Graças a esse fato é possível, após análises adequadas, concluirmos que uma certa planta pertence a uma determinada espécie.

A espécie vegetal ou partes dessa podem ser reconhecidas através de várias características, específicas para cada uma delas: a forma e a organização são os aspectos fundamentais utilizados na identificação de uma espécie.

As exsicatas da mutamba foram identificadas no Laboratório de Sistemática Vegetal da UEM pela Prof^a. Dr^a. Cássia Mônica Sakuragui. A confirmação da identificação foi feita pela Prof^a. Ana Odete dos Santos Vieira, do herbário da UEL. Os exemplares estão tombados no Herbário da UEM sob os números de registro HUM 1182 para a coleta de inverno/2000 no Paraná (GUA) e HUM 1300 para a coleta de inverno/2000 em São Paulo (GUB).

O uso de caracteres morfológicos para delimitação e identificação de táxons tem sido largamente utilizado em trabalhos de taxonomia vegetal.

Cada espécie vegetal possui centenas de características morfológicas externas e internas, além de características embriológicas, químicas e genéticas, de forma a classificá-la nos diferentes táxons. As características morfológicas externas podem possibilitar a classificação de uma espécie vegetal em qualquer nível hierárquico (Poser e Mentz, 2002). Por exemplo, uma análise dos dados morfológicos e anatômicos das folhas de duas espécies diferentes do gênero *Hibiscus* (*H. tiliaceus* L. e *H. pernambucensis* Arruda) comprovou que tais características possuem valor diagnóstico para se distinguir as espécies (Rocha e Neves, 2000).

Dez diferentes espécies do gênero *Cestrum* foram estudadas anatomicamente e apresentaram, cada uma delas, características foliares particulares, capazes de serem identificadas morfolologicamente (Jauregui *et al.*, 2001).

Dessa forma, a identificação botânica realizada com a *Guazuma ulmifolia* Lam., considerando as estruturas morfológicas do vegetal possui um papel relevante no estudo botânico. Trata-se de uma análise que permite fazer julgamento sobre a droga em questão, verificando sua identidade, sua autenticidade.

Com a identificação e confirmação da espécie, a sistemática vegetal da mutamba foi definida de acordo com a literatura existente (Joly, 1975; Schumman, 1886; Takhtajan, 1996), onde as informações obtidas permitiram a elaboração de um fluxograma (flux. 1), que facilitou a identificação taxonômica da mutamba.

No estudo da mutamba, encontrou-se dificuldade no que diz respeito à literatura específica de *Guazuma ulmifolia* Lam. Apenas Corrêa (1974) fez uma descrição morfológica e Schumann (1886) descreveu as folhas e frutos das diferentes variedades da *G. ulmifolia*, do ponto de vista morfológico. Do ponto de vista macroscópico, a *Guazuma ulmifolia* Lam. é uma planta arbórea (fig. 5), com 6-16 m de altura. Árvores adultas possuem o tronco com um diâmetro que varia de 30 a 50 cm e os ramos apresentam-se pilosos. A árvore floresce a partir do final do mês de setembro, prolongando-se até o final de novembro. A maturação dos frutos ocorre em agosto-setembro.

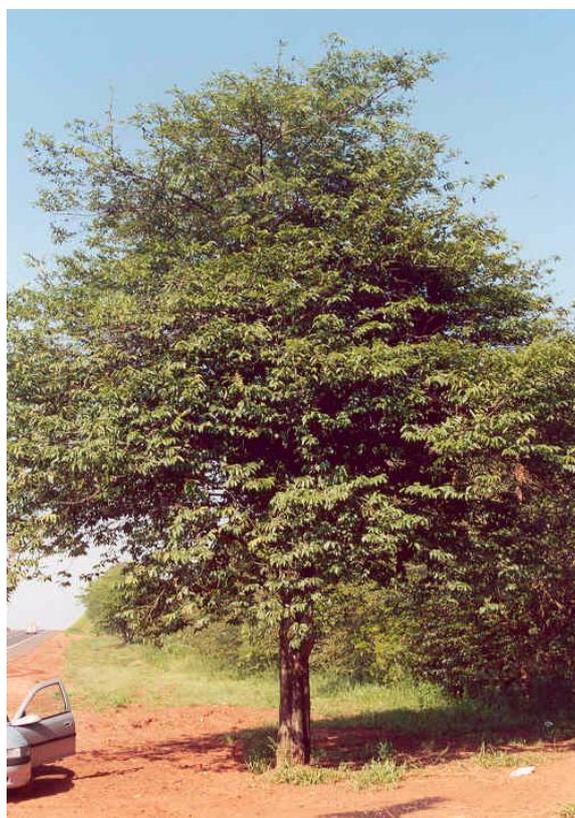
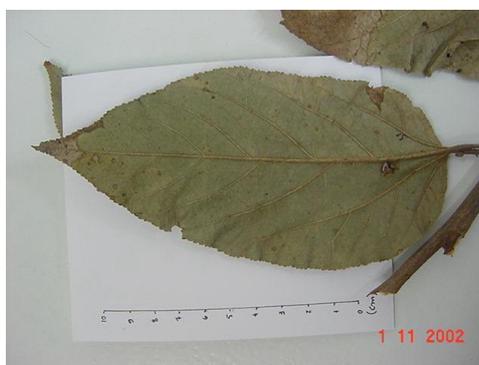


Figura 5: Árvore adulta da *Guazuma ulmifolia* Lam.

As folhas são simples e alternas. O pecíolo, marrom-esverdeado, tem de 1,5 a 3 cm de comprimento, com secção transversal circular, é levemente estriado e muito piloso. A lâmina foliar apresenta-se do tipo membranácea, com 8 a 15 cm de comprimento e 4 a 7 cm de largura, tem coloração verde clara, sendo concolor, oblongada, com base redonda a levemente cordiforme e ápice agudo a acuminado, possui margens levemente serradas.



A nervação é do tipo peninérvea, com cinco nervuras na inserção do pecíolo, proeminentes na face abaxial. As nervuras secundárias apresentam-se em intensa anastomose. Tricomas

estrelares são encontrados por toda lâmina foliar, principalmente na nervura principal, sendo mais abundantes na superfície abaxial.

As flores (fig. 7) apresentam-se em inflorescência racemosa tipo paniculada, axilar. Mais de 10 flores foram visualizadas por inflorescência, em vários estágios de desenvolvimento, algumas em botões, outras mais desenvolvidas. O pedúnculo, com 0,6 a 1,5 cm de comprimento, apresenta-se de coloração marrom, revestido de tricomas estrelados. As flores são actinomorfas, pediceladas (pedicelos com cerca de 2 mm de comprimento). O cálice (3 a 4 mm) é trilobado, dialissépalo, de coloração creme, sendo piloso. A corola é dialipétala, pentâmera, alva, as pétalas são curvadas para o lado do gineceu, apresentando finos prolongamentos levemente delineados com aproximadamente 5 mm de comprimento, pilosos interna e externamente.



Figura 7: Flor da *Guazuma ulmifolia* Lam.

O androceu apresenta 6 estames soldados à base e entre si, formando um tubo. Os filetes possuem, em média, 2 mm de comprimento e as anteras, 0,5 mm. O ovário, com aproximadamente 1 mm de comprimento, é súpero, pentalocular, com vários óvulos por lóculo. Os estigmas, em número de 5, com 1 mm de comprimento, apresentam nectários acima do ovário.

No fruto, encontra-se pedicelo com 2 a 3,5 cm de comprimento. O fruto seco, do tipo cápsula septicida, possui cerca de 2,1 a 2,6 cm de diâmetro e 6 a 10 cm de circunferência, é deiscente, capsular, possui forma arredondada com projeções pontiagudas por toda superfície. A coloração é negra quando maduro (fig. 8), com abertura na região terminal, que corresponde aos 5 carpelos.



Figura 8: Fruto maduro da *Guazuma ulmifolia* Lam.

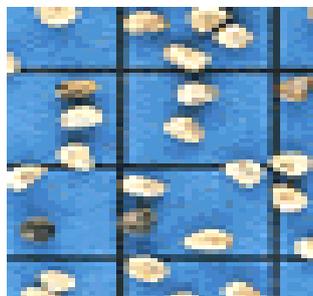


Figura 9: Sementes da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Num mesmo ramo pode-se encontrar frutos em três estágios: maduros (negro), intermediários (verde forte) e mais jovens (verde claro). Cada fruto apresenta, aproximadamente, 85 sementes, dispostas longitudinalmente nos cinco carpelos.

As sementes são ovaladas irregularmente, de coloração marrom acinzentada, com cerca de 4 mm de comprimento e 3,5 mm de largura (fig. 9). Um quilograma de frutos fornece aproximadamente 164.000 sementes (Lorenzi, 1992).

De acordo com os resultados apresentados, comparados com a literatura, pode-se identificar a espécie estudada como *Guazuma ulmifolia* Lam. A espécie *Guazuma crinita* Mart., apesar de próxima à *G. ulmifolia* Lam., apresenta características morfológicas diferentes das encontradas para a espécie vegetal coletada (tab. 5).

Tabela 5: Principais diferenças morfológicas evidenciadas nas duas espécies: *Guazuma ulmifolia* Lam. e *Guazuma crinita* Mart.

Espécie	G. ulmifolia	G. crinita
Ramos	sem estípulas	com estípulas
Folhas	oblongada, com ambas as faces revestidas por tricomas estrelados	ovais, glabras
Inflorescência	racemosa	opositifolia
Fruto	cápsula glabra, negra	cápsula com pêlos cinzentos

Fonte: Côrrea, 1974.

Baseando-se nas características das quatro variedades, folhas e frutos (tab. 1, p.11), identificou-se a espécie como *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*. Esse dado é fornecido pelo confronto das características dos órgãos estudados com as da literatura (Schumann, 1886) (tab. 6).

Tabela 6: *Guazuma ulmifolia* Lam.: características morfológicas da variedade *tomentella*

	Segundo Schumann (1886)	Material vegetal em estudo
FOLHAS	oblongas – lanceoladas	oblongadas
	10-12 x 4-6 cm	8-15 x 4-7 cm
	margens serreadas	margens levemente serreadas
FRUTO	cápsula deiscente	cápsula deiscente

As diferenças morfológicas também foram capazes de diferenciar duas espécies do gênero *Tynanthus*, a *T. elegans* Miers. e a *T. fasciculatus* Miers., conhecidas popularmente com o nome de cipó-cravo. Apesar da semelhança quanto à distribuição geográfica e à estrutura microscópica, as características macroscópicas (hábito, folhas, folíolos, ovário e fruto), como no caso da mutamba, são relevantes para a diferenciação das espécies (Costa, 1935).

Anatomicamente, os dados obtidos com o estudo da mutamba, podem ser acrescentados à literatura existente. Como nenhuma descrição anatômica foi encontrada na pesquisa bibliográfica realizada, o resultado obtido contribui para posteriores estudos com a mutamba.

Estudos anatômicos são utilizados com frequência para caracterizar espécies, especialmente aquelas com dificuldade para delimitação por serem muito semelhantes a outras espécies do mesmo gênero. Por exemplo, a organização tecidual permitiu a diferenciação de dez espécies do gênero *Cestrum* L., que apresentaram características foliares particulares quanto ao tipo e densidade dos tricomas, posição dos estômatos, forma dos parênquimas paliçádico e lacunoso, presença de cutícula e esclerênquima (Jauregui *et al.*, 2001).

Apesar da grande similaridade anatômica entre as espécies *Plantago major* e *Plantago australis*, Rocha *et al.* (2001) realizaram um estudo anatômico detalhado que permitiu diferenciá-las quanto ao feixe da nervura mediana, organização tecidual do pecíolo e presença de tricomas tectores e secretores.

Através dos cortes histológicos e, de acordo com os corantes empregados, pode-se ter uma visão da organização tecidual da *Guazuma ulmifolia* Lam.

O corte transversal das folhas da mutamba forneceu a visualização de mesofilo dorsiventral (fig. 10A). O parênquima paliçádico apresenta 2 a 3 camadas de células alongadas bem organizadas e unidas (fig. 10B). O parênquima lacunoso possui 3 a 5 camadas de células pequenas e/ou grandes alongadas, desorganizadas no mesofilo. Intercalam-se feixes vasculares transversais (nervuras secundárias) entre as células do mesofilo.

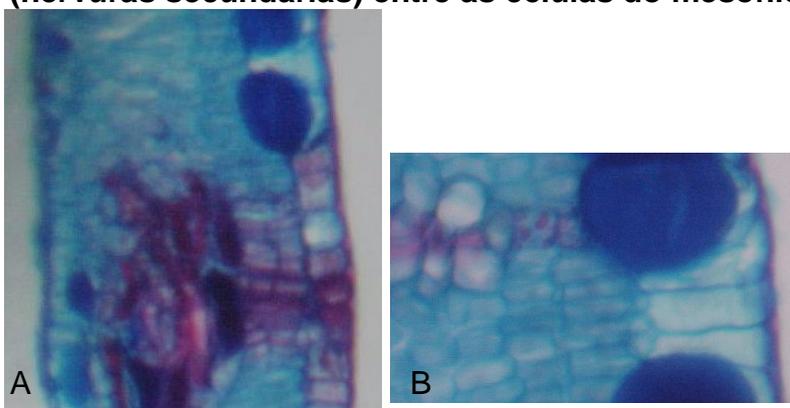


Figura 10: Corte transversal da folha, mostrando o limbo foliar
A – aumento 100x; B – aumento 400x

A nervura principal (fig. 11) mostra-se organizada com a epiderme apresentando células maiores na face adaxial, colênquima angular com camadas de células arredondadas, parênquima que circunda o feixe vascular com ilhas de células com conteúdo polifenólico (fig. 11 e 12). O feixe apresenta metaxilema com cerca de 5 grupos de 2-5 células paralelamente distribuídas. Xilema e floema estão rodeados por fibras.

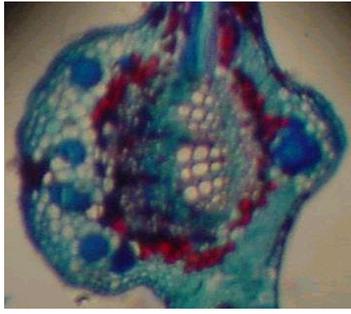


Figura 11: Nervura principal da folha da *Guazuma ulmifolia* Lam. (aumento 40x)

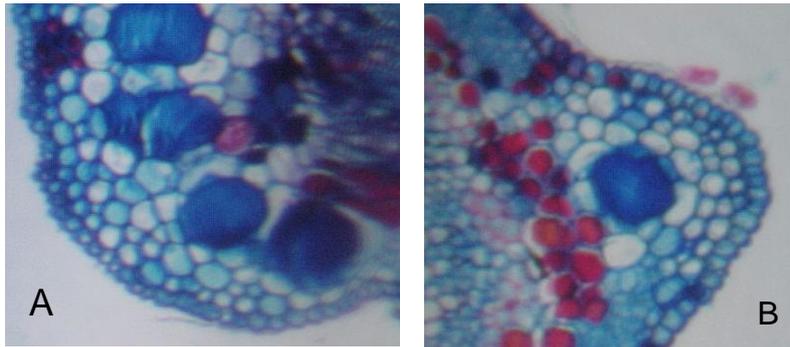


Figura 12: Epiderme foliar da *Guazuma ulmifolia* Lam. A – epiderme abaxial; B – epiderme adaxial; (aumento 100x).

O parênquima da região da nervura possui células grandes e, seguindo a superfície da epiderme adaxial, na lâmina foliar, alguns canais secretores.

A epiderme adaxial apresenta células grandes levemente ovaladas (fig. 12B), já a epiderme abaxial (fig. 12A), possui células menores. O estrato cuticular é pouco desenvolvido, porém contínuo, mais evidente na face adaxial.

O pecíolo (fig. 13) apresenta epiderme uniestratificada seguida de 4-6 camadas de colênquima angular. O parênquima cortical tem 10 ou mais camadas, apresentando vários canais secretores entre as células parenquimáticas.

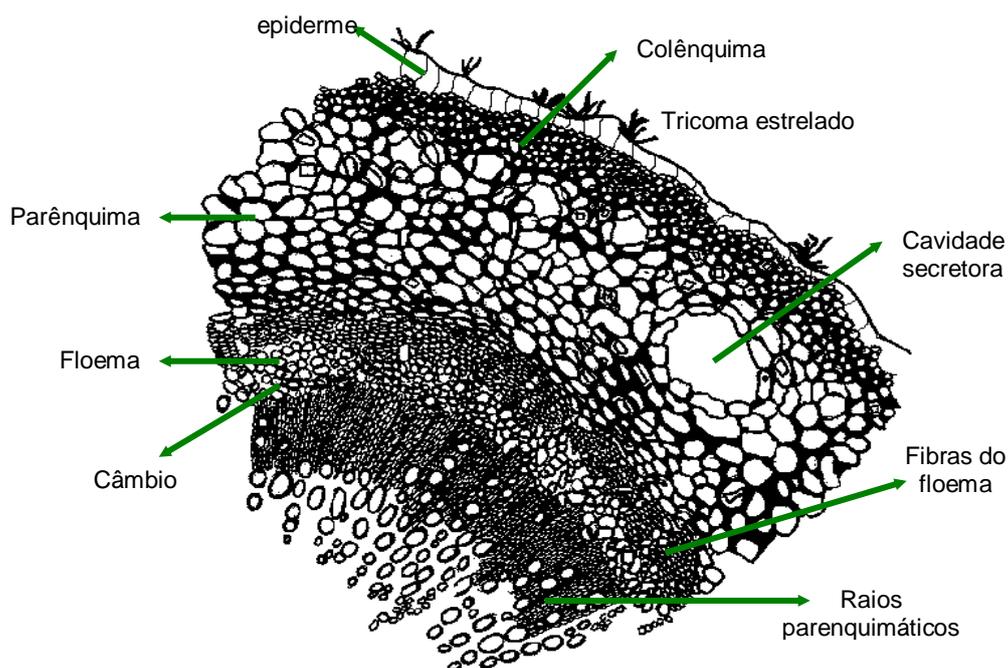


Figura 13: Diagrama do pecíolo da *Guazuma ulmifolia* Lam., em corte transversal (aumento 100x)

O parênquima central apresenta células com conteúdo polifenólico, facilmente visualizadas na figura 14 por apresentarem coloração verde.

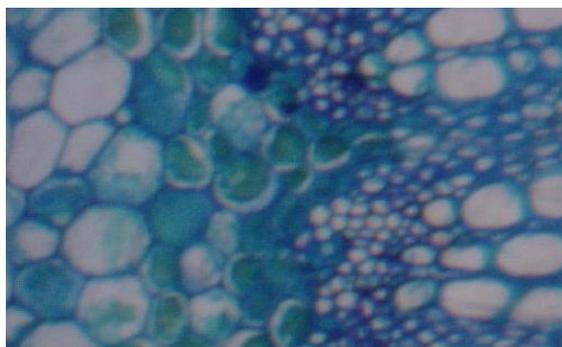


Figura 14: Células parenquimáticas da *Guazuma ulmifolia* Lam., com conteúdo polifenólico, em corte transversal (aumento 400x)

Células com conteúdo polifenólico foram também visualizadas no barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae, uma espécie rica em taninos (cerca de 18-20%) (Toledo, 2002).

O feixe vascular apresenta 5 regiões definidas. Distribui-se por todo o parênquima cortical, idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio (fig. 13). Na epiderme, pode-se visualizar nitidamente tricomas estrelados (fig. 13 e 15).

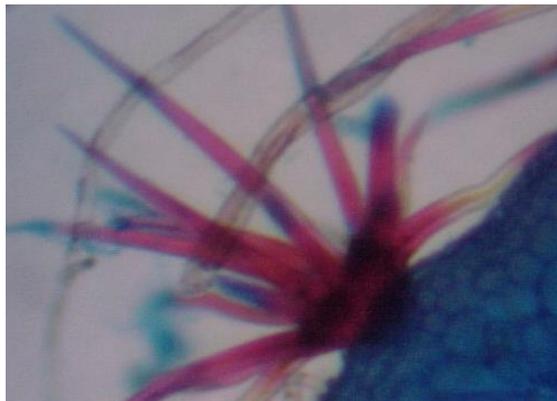


Figura 15: Tricoma estrelado, na epiderme do pecíolo da *Guazuma ulmifolia* Lam. (aumento 400x)

Tricomas com esse formato podem ser visualizados em outras espécies vegetais. A epiderme do pecíolo de *Hibiscus tiliaceus* L. revela numerosos tricomas pluricelulares, ramificados, com forma estrelada (Rocha e Neves, 2000). O estudo anatômico das espécies *Miconia tristis* Spring e *Miconia doriana* Cogn. revelou a presença de tricomas estrelados na epiderme das folhas e do pecíolo (Souza e Marquete, 2000).

Na microscopia do caule preparou-se lâminas com cortes de diferentes regiões das cascas do caule.

O caule jovem apresentou apenas epiderme em início de crescimento secundário. As cascas coletadas próximas ao ápice do tronco apresentaram periderme de origem subepidérmica.

Nas cascas coletadas em regiões amadurecidas do caule, há uma única periderme com súber apresentando grande número de camadas ou múltiplas peridermes originadas internamente. As células são levemente alongadas com alta quantidade de conteúdo pardo avermelhado (fig. 16). Há células mais ovaladas intercaladas, provenientes do floema.

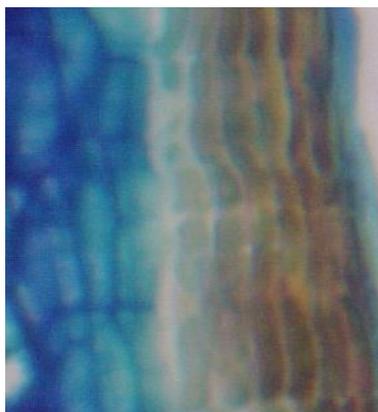


Figura 16: Corte transversal da casca da *Guazuma ulmifolia* Lam. (aumento 400x)

As células suberosas englobam grupos de células pequenas e alongadas. Em meio ao súber existem grupos de fibras alongadas distribuídas tangencialmente. Estão em número reduzido, vistas nas camadas mais internas.

Fibras semelhantes a essas células podem ser encontradas na camada floemática mais interna do caule. São células floemáticas mais antigas não funcionais devido ao crescimento secundário do caule da planta.

Paralelamente à medula, vê-se camadas com cerca de 10 células bem pequenas enfileiradas em disposição contínua. Elas envolvem intimamente o parênquima mais interno e até mesmo englobam grupos de fibras. São células retangulares que possivelmente representam a feloderme. O felogênio é pouco visível, sendo mais evidente somente em algumas regiões.

A periderme apresenta-se bem evidenciada, formada por células retangulares (fig. 17). Em algumas regiões do caule forma-se o ritidoma.



Figura 17: Periderme da *Guazuma ulmifolia* Lam. (aumento 400x)

No caule da espécie *Monttea aphylla* (Miers) Benth e Hooks, pode-se também visualizar o ritidoma, sendo esse escamoso, com acumulação de 4 ou mais camadas celulares (Giménez *et al.*, 1998).

A região xilemática apresenta raios bastante espessos. Caracteriza-se pela presença de grandes cavidades secretoras com disposição radial, de tamanhos variados, em séries regularmente paralelas entre si.

Em torno da circunferência desses canais há uma camada de células mais delgadas e alongadas (fig. 18).

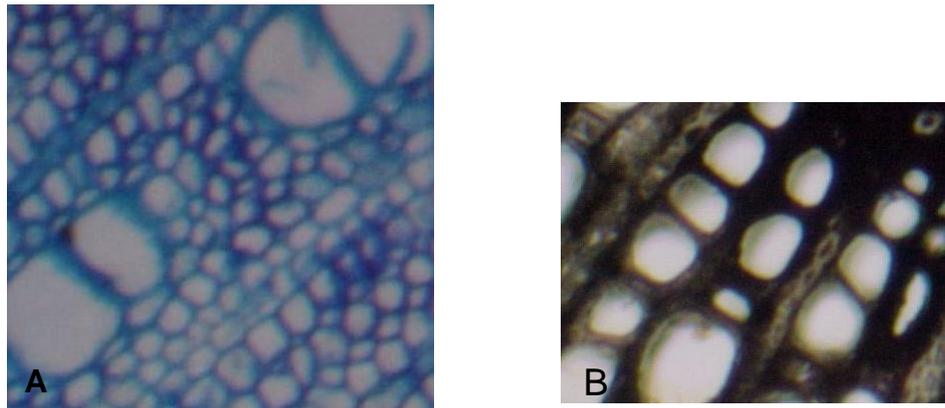


Figura 18: Raios xilemáticos presentes na casca da *Guazuma ulmifolia* Lam. A – corado com azul de astra; B – corado com FeCl_3

Entre as fileiras de canais secretores há formação de aglomerados de fibras em disposição radial mais irregular se comparado aos canais. As fibras são pequenas, de paredes espessadas, em grupos mais ou menos volumosos.

O parênquima liberiano está repleto de conteúdo polifenólico no interior de suas células observado pela coloração vermelha ou verde, dependente do corante empregado.

Há, ainda, a presença de um raio medular secundário estreito, com cerca de 2 a 3 fileiras de células, um pouco mais alongadas que as demais células parenquimáticas, seguindo orientação radial.

Algumas características mostradas são úteis na identificação da espécie, principalmente quando a droga a ser analisada encontrar-se na forma de pó. Por exemplo, os pêlos tectores encontrados sobre a epiderme do pecíolo e das nervuras das folhas, tipo estrelado (fig. 15, p. 47) auxiliam na identificação, já que a presença de outro tipo de pêlo indica, com segurança, fraude ou contaminação.

Nas folhas, microscopicamente, algumas estruturas podem caracterizar a espécie. A presença de mesófilo assimétrico (fig. 10, p. 45), com parênquima paliçádico na face adaxial e parênquima lacunoso na face abaxial é uma delas. Outra característica é a diferença no tamanho celular das epidermes adaxial e abaxial (fig. 12, p. 46). As células epidérmicas, ovais, apresentam-se visivelmente maiores na epiderme adaxial.

A presença de cinco regiões definidas no feixe vascular principal do pecíolo, quando visualizado em corte transversal, pode estar relacionado com as nervuras foliares, já que na folha pode-se verificar cinco nervuras na inserção do pecíolo.

As cavidades secretoras encontrados entre as células do parênquima cortical (fig. 13, p. 46) e a presença da periderme, com células retangulares (fig. 17, p. 49) são características que auxiliam na identificação das cascas da mutamba. A presença dessas cavidades é uma característica não exclusivamente da espécie *Guazuma ulmifolia* Lam., mas sim, da ordem Malvales, da qual a mutamba se encontra (Frohne e Jensen, 1998).

O grande número de células parenquimáticas com conteúdo fenólico (fig. 14, p. 47), além de ser uma característica marcante, confirma a presença desses compostos no vegetal. Essas células, que contém taninos como inclusão celular, algumas vezes podem apresentar-se um pouco mais

aumentadas que a demais células parenquimáticas devido à grande quantidade de taninos (Esau, 1974).

Com o atual interesse mundial pela fitoterapia, reforça-se a preocupação com a utilização de produtos naturais de qualidade comprometida e sem o prévio conhecimento da ação de seus princípios ativos. Entretanto, a fitoterapia ainda é carente de estudos científicos que garantam segurança, eficácia e qualidade.

Análises físico-químicas farmacopéicas são de importância limitada à droga vegetal. Entretanto, nem todas possuem parâmetros estabelecidos que possam contribuir ao controle de qualidade. Assim, várias técnicas, apesar de simples, auxiliam na identificação do material vegetal com os dados pré-estabelecidos. Muitas são as variáveis possíveis de interferir nesse estabelecimento, porém, mesmo que de forma insípida, duas coletas em épocas e locais diferentes podem sugerir um perfil para a elaboração de uma monografia da espécie em estudo. Entretanto, um número maior de coletas em diferentes épocas e seqüencialmente auxiliará na determinação final dessa monografia.

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, terpenos, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climáticas-edáficas. Entretanto, ocorrem princípios ativos característicos nos vegetais, sendo que esses podem servir de parâmetro para uma forma de caracterização e identificação.

A presença de taninos no barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, é uma característica de identificação do vegetal, visto ser esse grupamento químico o responsável pela atividade farmacológica (Toledo, 2002). O maracujá, *Passiflora alata* Dryander, é caracterizado, dentre outras análises, pela presença de flavonóides e alcalóides (Soulimani *et al.*, 1997)

Os dados da análise fitoquímica preliminar (seção 4.3.1.1; p. 27) realizada com as cascas da mutamba, apresentados pela tabela 7 mostram grupos de substâncias químicas que podem ser empregados para a caracterização da matéria-prima, como flavonóides, taninos, saponinas e mucilagens.

São os grupamentos químicos existentes na mutamba os responsáveis pela sua atividade terapêutica. Esses grupamentos caracterizados e alguns dos usos populares podem ser relacionados, indicando uma explicação quanto à ação farmacológica do vegetal.

Tabela 7: Análise fitoquímica preliminar das cascas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Princípio ativo	Resultado
Compostos fenólicos	+++
Taninos	+++
Glicosídeos flavônicos	++
Saponinas	++
Mucilagens	++
Pesquisa de anel esteroidal	++
Glicosídeos de núcleo cumarina	-
Glicosídeos cianogênicos	-
Compostos antracênicos	-
Glicosídeos cardiotônicos	-
Alcalóides	-

+ = presença do grupo químico; - = ausência do grupo químico

A positividade para taninos pode ser uma explicação quanto ao uso das cascas como antibacteriano ou mesmo antiinflamatório (Hatano *et al.*, 1989; Caceres *et al.*, 1990 e 1995). Os taninos também provavelmente estão relacionados ao uso das cascas da mutamba no tratamento da queda de cabelo (Rutter, 1990; Takahashi *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001). As mucilagens presentes podem estar relacionadas com o uso da mutamba, na Indonésia, como inibidor do apetite (Guazuma..., 2002).

A avaliação do teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na droga vegetal é importante na medida em que serve de parâmetro para uma futura produção em nível industrial. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias.

A determinação da perda por secagem (PPS) da mutamba foi realizada à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) com a droga vegetal fresca. A estabilização no processo de secagem ocorreu após sete dias, fornecendo o valor médio da PPS para a mutamba de 41,88%. O período correspondente ao verão demonstrou ser a estação do ano que se obtém uma maior quantidade de massa seca do vegetal. Quando se observa o comportamento da planta nos diferentes locais de coleta (Paraná, GUA e São Paulo, GUB) verifica-se que não houve alteração de massa vegetal obtida (tab. 8).

Na perda por dessecação (PPD), onde a planta é dessecada em estufa à 105 °C, observou-se também, que a droga coletada no verão é a que possui uma maior quantidade de massa seca (tab. 8).

Tabela 8: Determinação do teor de umidade das cascas frescas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Amostra		% PPS	% PPD
GUA	Inverno/00	48,98	40,75
	Verão/01	33,31	35,50
GUB	Inverno/00	48,86	45,64
	Verão/01	36,35	56,62

No controle de qualidade realizado com a *Petiveria alliacea* L., o vegetal também foi avaliado quanto à técnica de secagem, PPS e PPD, com a planta fresca. Os resultados obtidos foram, respectivamente, $65,88 \pm 1,06\%$ e, $65,21 \pm 0,96\%$ (Audi *et al.*, 2001).

A carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] estabeleceu um teor de umidade (PPD) de $33,24 \pm 0,97\%$ para a droga fresca (Mello e Petrovick, 2000). Já para a mutamba, esse teor de umidade pode ser definido como $41,87 \pm 0,82\%$ para PPS e, $44,63 \pm 0,90\%$ para PPD.

Comparando-se os teores de umidade das diferentes espécies citadas acima, pode-se verificar valores característicos para cada vegetal, o que confirma dizer que a determinação de umidade em uma droga vegetal, além de informação tecnológica importante, serve também de parâmetro de controle de qualidade.

Pelos resultados da perda por secagem (PPS) e por dessecação (PPD) da mutamba, verifica-se que a droga coletada no verão tende a apresentar uma menor perda de água e/ou substâncias voláteis, conseqüentemente produzindo uma maior quantidade de massa seca. Isso não representa, no entanto, que essa massa produzida em maior quantidade possa representar algum ganho em termos de quantidade de substâncias químicas ativas.

A determinação de umidade na planta seca também é importante, visto que pode-se verificar se o armazenamento dessa droga está mantendo sua qualidade. A absorção de água pela droga seca pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos. O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14% para a droga seca, com poucas exceções especificadas nas monografias (Farias, 2002).

Mello e Petrovick (2000) estabeleceram, para a carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] um teor de umidade (PPD) de $5,75 \pm 0,06\%$ para a droga seca. Para a calêndula, a Farmacopéia Brasileira (1996) determina o teor de umidade (PPD) de, no máximo, 12% para a droga vegetal seca.

A mutamba, de acordo com os dados obtidos (tab. 9), manteve-se com peso constante. O armazenamento adequado, em sacos de papel, dentro de barriletes de papelão fechados, ao abrigo de luz e umidade, é fator fundamental para esses resultados de estabilidade da droga vegetal.

Tabela 9: Controle do teor de umidade das cascas secas da *Guazuma ulmifolia* Lam. coletadas no verão

Período de armazenamento	% PPD	
	GUA	GUB
1 semana	35,50	56,62
1 mês	33,61	52,47
6 meses	36,58	50,26
12 meses	33,34	52,50

Normalmente a secagem de drogas vegetais se faz, ou à temperatura ambiente com diferentes métodos e cuidados ou em estufas ou assemelhados com circulação de ar, em até 60 °C. No entanto, apesar da secagem em estufa a altas temperaturas extrair uma maior quantidade de água das cascas da mutamba (perda por dessecação emprega temperaturas de 100 a 105 °C), essas podem alterar quimicamente as substâncias ativas, alterando, portanto, de alguma forma a ação farmacológica. É importante se ter muito cuidado nessa etapa de secagem, pois o excesso de água permanecendo no vegetal, pode favorecer a proliferação microbiana e alterar os constituintes químicos logo, a perda do material vegetal (Farias, 2002).

Quando se fala de produção em escala industrial, deve-se ter conhecimento das melhores condições que levarão à uma extração produtiva da droga vegetal. A qualidade da solução extrativa é definida pelo solvente empregado na extração (Sonaglio *et al.*, 2002).

O teor de extrativos emprega a água como líquido extrator, no estabelecimento do teor de constituintes extraíveis da droga vegetal. Entretanto, procurou-se estabelecer, como parâmetro de avaliação, o uso de diferentes líquidos extratores. A análise foi determinada com as cascas e as folhas da mutamba, utilizando-se a decocção como processo extrativo (tab. 10).

Tabela 10: Teor de extrativos obtido a partir do extrato da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Solvente (V/V)	Folhas (%)	Cascas (%)
Água	24,59	20,79
Acetona:água (7:3)	34,06	23,12
Acetona:água (1:1)	36,24	23,38
Metanol:água (1:1)	30,15	22,43
Etanol:água (1:1)	31,17	24,79

A água como líquido extrator, original na técnica, foi o que proporcionou o pior rendimento, tanto nas folhas (24,59%) como nas cascas (20,79%). Empregou-se a mistura etanol:água (1:1; V/V), entre outras, e essa foi a que resultou em maior extratibilidade para as cascas (24,79%).

Para as folhas, a mistura acetona:água (1:1; V/V) apresentou o melhor rendimento (36,24%). Embora a parte da droga vegetal utilizada para preparação de extratos foram as cascas, o teor de

extrativos foi definido também para as folhas, já que esse resultado também pode servir de parâmetro para auxiliar no controle de qualidade do vegetal.

Como nas cascas da mutamba, Audi *et al.* (2001) também obtiveram melhores resultados extrativos para a *Petiveria alliacea* L. utilizando a mistura etanol:água. O teor de extrativos obtido com a água como líquido extrator foi de 21,83%, enquanto para etanol:água (1:1; V/V) foi de 21,25%.

A mistura acetona:água, foi o solvente de escolha para a preparação de extratos (Mello, 1995; Rawat *et al.*, 1999), apesar da extração ter ocorrido em menor quantidade nas cascas do que a extração com a mistura etanol:água. Apesar do metanol ter uma extração qualitativamente melhor, o uso da acetona promove o bloqueio da associação tanino-proteína, tornando uma extração quantitativamente maior. A presença da água aumenta o rendimento da extração dos compostos fenólicos (Cork e Krockenberger, 1991; Mello e Santos, 2002).

Para a determinação do resíduo seco, a partir da solução extrativa 10% obtida através de diferentes solventes, obteve-se o melhor rendimento quando se utilizou acetona:água (7:3; V/V). O rendimento dessa extração foi de 13,58%, enquanto que com os demais solventes não ultrapassaram os 10% de substâncias extraídas (tab. 11).

Tabela 11: Determinação do resíduo seco da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Solvente (V/V)	Rendimento (%)
Acetona:água (7:3)	13,58
Etanol:água (7:1)	9,60
Etanol:água (1:1)	8,94
Metanol:água (1:1)	6,64

Esse dado pode ser mais um parâmetro de avaliação da qualidade da droga vegetal, visto ser um resultado particular da mutamba. Já que quando se determina o resíduo seco de outras drogas vegetais, os resultados são diferenciados, mesmo que seja empregado o mesmo solvente, como podemos verificar na tabela 12.

Tabela 12: Resíduo seco de diferentes vegetais em soluções extrativas etanol:água (1:1)

Droga vegetal	Resíduo seco (%)
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	8,94
¹ <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	3,14
² <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	29,95

¹: Consolaro *et al.*, 1999; ²: Mello e Petrovick, 2000.

A avaliação da qualidade da mutamba foi complementada por análises quantitativas de seus constituintes originais.

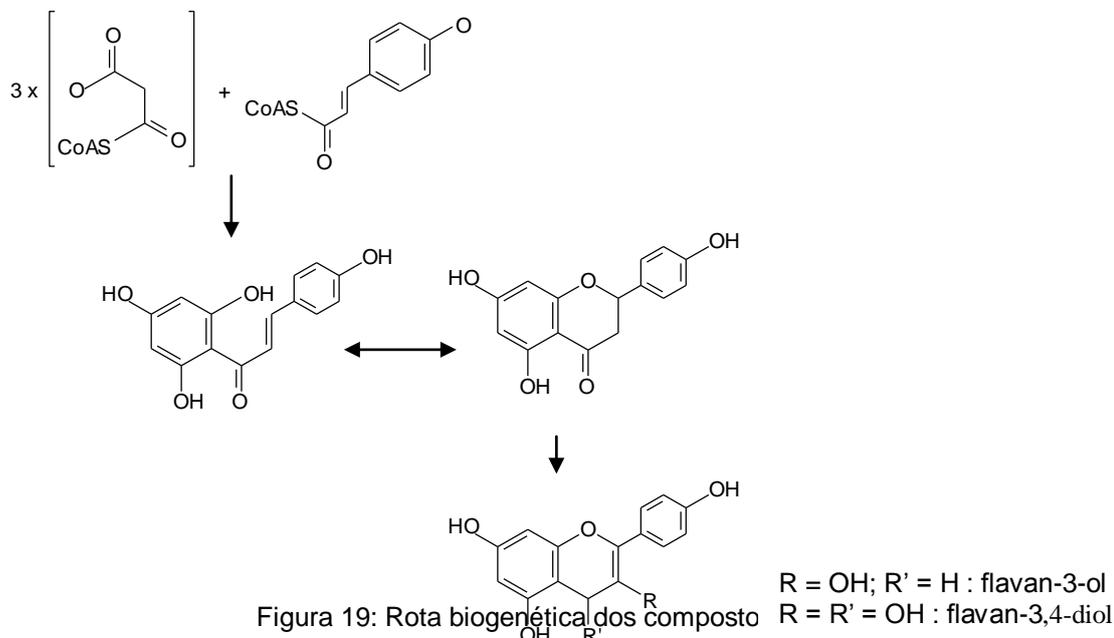
O doseamento de flavonóides apresentou maior porcentagem desse grupamento químico na coleta de verão que na coleta de inverno, como mostra a tabela 13.

Tabela 13: Teor de flavonóides totais das cascas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Amostra	Verão (%)	Inverno (%)
GUA	2,23	1,30
GUB	2,51	1,31

Esse doseamento não implica que essas substâncias produzam a ação farmacológica estudada, porém ela serve de parâmetro para as demais análises realizadas (substância marcadora - RDC nº. 17/2000 ANVISA). Galina *et al.* (1998) também realizaram o doseamento de flavonóides, utilizando-os como substância marcadora no controle de qualidade do *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.

Ainda, os flavonóides possuem a mesma rota biogenética dos taninos (fig. 19), e assim a sua presença e concentração são importantes, tanto para as análises do comportamento de produção de substâncias polifenólicas como para o controle de qualidade do vegetal.



No doseamento de taninos, foi no verão que ocorreu maior síntese desse grupamento químico pela planta, como mostra a tabela 14. Essa análise indicou, principalmente, a melhor estação para coletar a mutamba.

Como esse trabalho fundamenta-se no estudo de compostos fenólicos, quanto maior sua quantidade, maior será a chance no isolamento de compostos estruturalmente diferenciados.

Tabela 14: Teor de taninos totais das cascas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Coleta	Verão (%)	Inverno (%)
GUA	5,24	4,95
GUB	4,84	4,72

No *Crataegus oxyacantha* L. (cratego), a monografia da Kommission E (1994) determinou um teor de taninos de 3%. Para o *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão), a Farmacopéia Brasileira (1959) estipula um teor mínimo de 20%. As cascas da ratânia (*Krameria triandra* Ruiz et Pavon), droga vegetal clássica para taninos, possui um teor de cerca de 10% de taninos, sendo a maior parte em taninos condensados (Kommission, 1994).

Comparando esses teores apresentados pela literatura com o teor de taninos apresentado pela mutamba (cerca de 5%) pode-se dizer que apesar de não ser abundante como no barbatimão, a quantidade de taninos na mutamba pode ser considerada razoável.

Com as cascas da mutamba coletadas no verão, realizou-se uma análise quantitativa mais detalhada quanto ao teor de taninos, já que esse grupamento químico foi estudado quimicamente.

Verificou-se a diferença do teor de taninos entre a parte interna (3,21%) e externa (2,40% - súber) das cascas, com a região interna apresentando os melhores resultados.

Essa informação é interessante, pois indica que o vegetal preserve em sua região externa (súber) taninos, mas em menor quantidade. Dessa forma, pode-se estabelecer que os taninos realmente podem atuar como um mecanismo de defesa para o vegetal.

Estudos mostram os resultados de investigações feitas com várias plantas e herbívoros onde ocorreu inibição na alimentação desses herbívoros com plantas contendo altos teores de taninos (Mole e Waterman, 1987a e b; Butler, 1989; Bernays *et al.*, 1989). Os modos de ação propostos seriam: diminuição da palatabilidade pelo sabor adstringente, dificuldade na digestão devido à complexação dos taninos com proteína e/ou enzimas e, produtos tóxicos formados a partir da hidrólise dos taninos, no trato digestivo.

Realizou-se, ainda, um ensaio para se verificar a diferença que ocorre entre a quantidade de taninos presentes nas cascas frescas e secas (tab. 15).

Tabela 15: Diferença na quantidade de taninos entre as cascas frescas e as secas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Cascas (verão/01)	GUA (%)	GUB (%)
Frescas	4,03	2,12
Secas	5,24	4,84

A análise de teor de taninos, realizada com as cascas frescas e secas, permitiu verificar se durante o período de secagem da mutamba poderia ocorrer alguma perda de princípio ativo, por degradação, reação enzimática ou qualquer outro tipo de modificação.

De acordo com os resultados descritos na tabela 16, não ocorreram alterações consideráveis, observadas pelo método de quantificação empregado. A diferença entre as cascas secas e frescas é dada por essa última possuir um teor de água elevado. Em uma relação direta, desconsiderando-se o teor de umidade presente nas cascas frescas (35,5%), pôde-se verificar a correspondência quanto ao teor de taninos.

Tabela 16: Relação entre o teor de taninos nas cascas frescas e secas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Cascas (verão/01)	% Taninos	
Secas	5,24	
Frescas	Valor teórico	Valor real
	6,25	5,78

Realizou-se ainda, doseamento do teor de taninos presentes nas folhas, jovens e adultas, da mutamba (tab. 17), com o intuito de se estabelecer comparação entre essas e as cascas.

Tabela 17: Teor de taninos totais das folhas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Coleta (verão/01)	Folhas jovens (%)*	Folhas adultas (%)**
GUA	1,41	2,16
GUB	1,74	2,18

*Folhas de coloração verde claro

**Folhas de coloração verde escuro

No confronto de resultados, a diferença é grande, já que nas cascas da mutamba o teor de taninos é de cerca de 5% e nas folhas, sejam elas jovens ou adultas, não chega à metade desse teor que seria de cerca de 2,5%. Para o barbatimão (*S. adstringens*), também ocorre essa diferença. Enquanto nas cascas o teor de taninos é de 18-20%, nas folhas Toledo *et al.* (1998) observaram um teor de 8-11%.

Essa análise confirma que a população utiliza, mesmo de forma empírica, a parte do vegetal com o maior teor de princípios ativos. No caso da mutamba, sua maior utilização é através das cascas (Vieira, 1968; Ramirez *et al.*, 1988; Rutter, 1990; Cruz, 1995).

De acordo com as análises realizadas e os resultados obtidos durante esses dois anos de pesquisa em controle de qualidade, pode-se dizer que as cascas da mutamba coletadas no verão apresentaram as melhores condições tanto de estabilidade quanto no teor de substâncias fenólicas, indiferente da sua origem geográfica. Importante ressaltar que para uma conclusão final há a necessidade de se analisar o vegetal coletado nas outras estações (primavera e outono) e por um período de tempo maior, como o observado para o *Gingko biloba* (Sticher, 1993).

A pesquisa química tem por objetivo conhecer as substâncias presentes nas espécies vegetais. A análise química preliminar indicou os grupos de metabólitos secundários importantes na mutamba. Como o interesse foi restrito a uma classe específica de constituintes (compostos fenólicos), a investigação foi direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural dos mesmos.

A droga vegetal utilizada (cascas) na preparação dos extratos, utilizados na análise fitoquímica, foi coletada no verão/2001, no município de Iporã, Paraná (GUA) (Exsicata número HUM 1182).

As cascas, após coletadas, foram secas ao ar livre, à sombra. A secagem teve por finalidade a retirada da água impedindo reações de hidrólise e/ou óxi-redução e, de crescimento microbiano. Antes porém, as cascas foram seccionadas, visto a secagem ser tanto mais rápida quanto mais

dividido estiver o material vegetal a secar, pois desse modo, oferece uma maior área de superfície à evaporação (Falkenberg *et al.*, 2002). Pelo mesmo motivo, o material vegetal foi disposto em camadas finas durante o tempo de secagem.

A estabilização do processo de secagem ocorreu após sete dias, sendo as cascas antes seccionadas, agora moídas, em moinho de martelos. A moagem teve por finalidade reduzir, mecanicamente, o vegetal em pó, de modo a facilitar o processo de extração.

O extrato bruto foi preparado por turbólise a 10% (m/V) com acetona:água (7:3; V/V), apresentando um rendimento de 13,58% no extrato liofilizado (EB) (flux. 2).

O método de extração escolhido foi a turbólise (ou turbo-extração) devido à eficiência da técnica (Voigt, 1993), somada à simplicidade, rapidez e versatilidade, permitindo a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Hör *et al.* (1995) empregaram o mesmo processo de extração no isolamento de proantocianidinas da *Guazuma ulmifolia* Lam.

Entre os inconvenientes dessa técnica cabe mencionar: difícil separação da solução extrativa, já que na turbólise ocorre a redução drástica do tamanho das partículas da droga devido às forças de cisalhamento geradas (Sonaglio *et al.*, 2002) e, geração de calor durante o processo, obrigando controlar a temperatura.

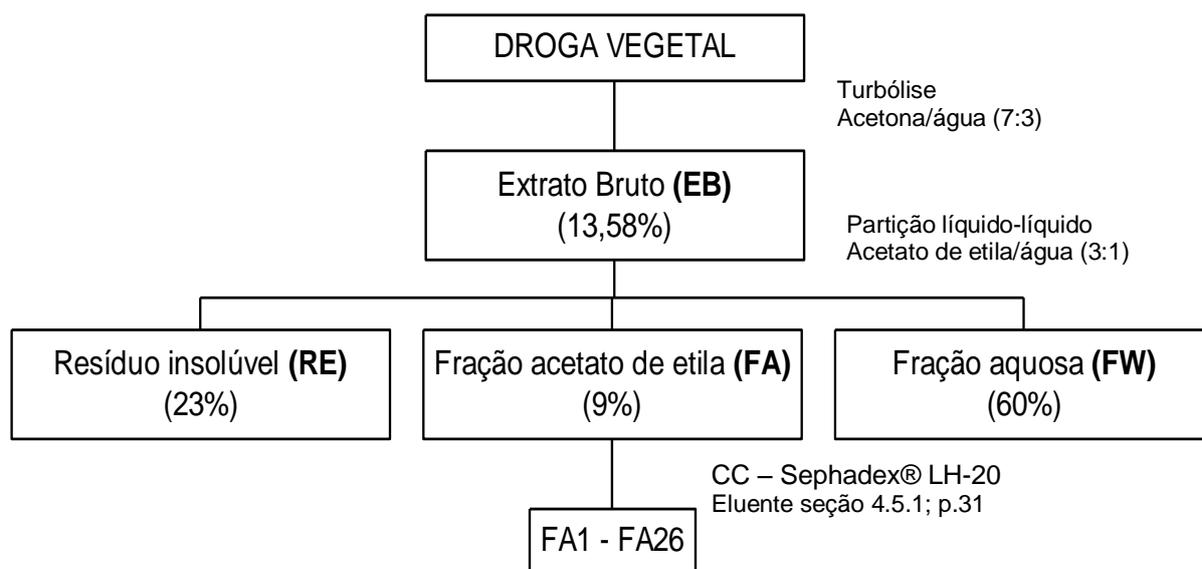
Para contornar esses inconvenientes, a filtração foi realizada em duas etapas, uma filtração preliminar, utilizando-se algodão e, uma filtração terminal, através de papel de filtro, à vácuo. No controle da temperatura, a técnica, com duração de 15 min foi realizada em três etapas de 5 min, com intervalos de 2 min a cada etapa, para resfriamento do sistema.

A escolha do líquido extrator baseou-se nas informações obtidas no controle de qualidade realizado (tab. 10; p. 55).

Após filtração, concentração e liofilização, através de particionamento líquido-líquido com acetato de etila, o EB forneceu duas frações, FA e FW, além do precipitado insolúvel (RE). O rendimento, a partir de 100 g de EB, foi de 9 g para a FA (9%), 60 g para a FW (60%) e 23 g (23%) do RE (flux. 2). A quantidade restante (8%) trata-se das perdas ocorridas durante o processo de produção.

Essa perda é elevada devido à precipitação de uma resina insolúvel em vários solventes orgânicos (água, acetona, éter, clorofórmio, álcool, hexano).

Empregou-se na partição, para cada 50 g de EB, 500 ml de água destilada para a dissolução do extrato e, 500 ml x 3 de acetato de etila.



Fluxograma 2: Fracionamento químico a partir do EB

A partir da FA iniciou-se o processo de isolamento e identificação de compostos fenólicos das cascas da *G. ulmifolia* Lam. O isolamento de proantocianidinas a partir das raízes de *Prunus armenica* L., também ocorreu a partir da fração FA, por CC (Rawat *et al.*, 1999). Monômeros de epicatequina foram isolados das cascas de *Byrsonima crassifolia* Kunth a partir da fração FA do EB (Geiss *et al.*, 1994).

Com a FA (10 g) realizou-se cromatografia em coluna com Sephadex® LH-20, utilizando o sistema eluente descrito na seção 4.5.1 (p. 32) (Thompson *et al.*, 1972).

Através de CCD pode-se reunir 26 subfrações (FA1 – FA26), que foram agrupadas de acordo com a semelhança visualizada na CCD (seção 4.5.2; p. 33).

Após a liofilização de cada uma das frações (FA1 - FA26) fez-se novamente CCD, para visualizar o comportamento das subfrações (fig. 20). Os rendimentos de cada subfração (FA1-FA26) foram calculados e encontram-se na tabela 18.

Tabela 18: Rendimento das subfrações obtidas a partir da FA.

Fração	Eluente (V/V)	Quantidade (g)	%
FA1	Etanol:água (1:1)	-	-
FA2	Etanol:água (1:1)	-	-
FA3	Etanol:água (1:1)	0,159	1,63
FA4	Etanol:água (1:1)	0,1047	1,08
FA5	Etanol:água (1:1)	0,1274	1,31
FA6	Etanol:água (1:1)	0,4119	4,24
FA7	Etanol:água (1:1)	0,4091	4,21
FA8	Etanol:água (1:1)	0,6568	6,44
FA9	Etanol:água (1:1)	0,1483	1,52
FA10	Etanol:água (1:1)	0,623	0,64
FA11	Etanol:água (1:1)	0,681	7,0
FA12	Etanol:água (1:1)	0,0875	0,9
FA13	Etanol:água (1:1)	0,0567	0,58
FA14	Etanol:água (1:1)	0,0611	0,63
FA15	Etanol:água (1:1)	0,2313	2,38
FA16	Etanol:água (1:1)	0,650	0,67
FA17	Etanol:água (1:1)	0,650	0,67
FA18	Etanol:água (1:1)	0,1813	1,83
FA19	Etanol:água (1:1)	0,1346	1,38
FA20	Etanol:água (1:1)	0,1257	1,29
FA21	Etanol	0,1275	1,31
FA22	Etanol	0,0529	0,54
FA23	Etanol	0,0299	0,31
FA24	Etanol	0,1273	1,31
FA25	Metanol	0,0979	1,01
FA26	Acetona	1,2496	12,85

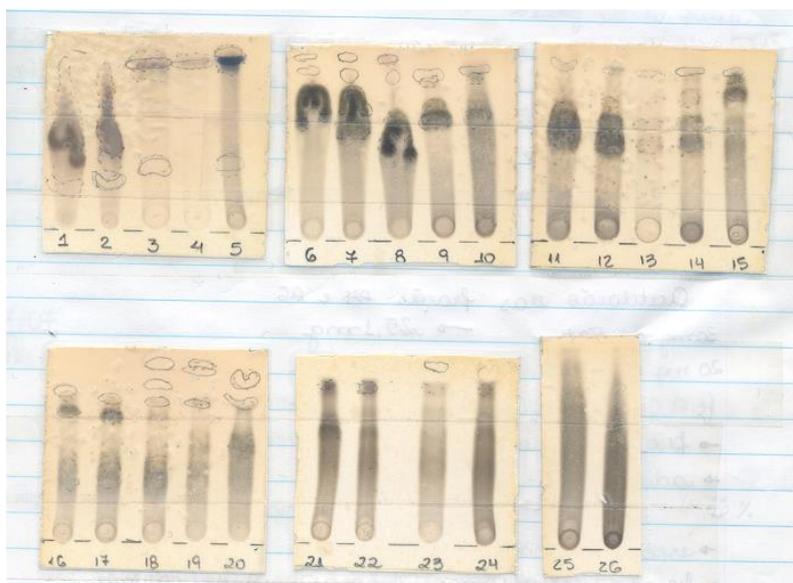


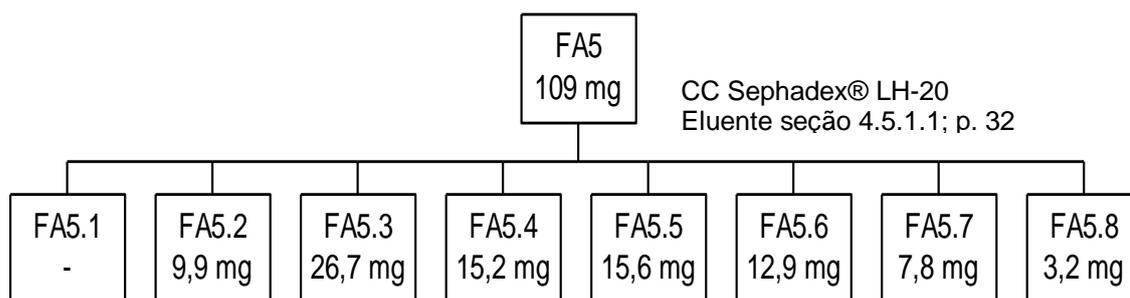
Figura 20: Cromatograma das 26 subfrações da FA

As frações FA1 e FA2, após concentração e liofilização forneceram pequena quantidade de amostra e tornaram-se instáveis prejudicando, assim, suas análises.

Com as frações FA3 e FA4, por apresentarem aparentemente apenas uma mancha no cromatograma, partiu-se para análise de RMN, com amostras acetiladas e não acetiladas. Nos dois casos, os espectros mostraram-se tratar, possivelmente, de algum polímero. As amostras, enviadas para a realização do espectro de massas, Universidade de Münster, Alemanha, não mostraram valores de pico base nem de massa molecular. Portanto, não foi possível trabalhar na elucidação da estrutura molecular.

Devido ao estudo focado no isolamento e identificação de compostos fenólicos, e, na expectativa de se obter substâncias puras, foram realizados novos fracionamentos, por CC (seção 4.5.1.1; p. 32), com as subfrações FA5, FA7 e FA8, baseado no cromatograma constante na figura 20. A subfração FA6 apresentou uma única mancha cromatográfica, indicando tratar-se de substância pura, e então, com essa fração partiu-se direto para análise estrutural.

Pelas características cromatográficas (fig. 20) da FA5, cerca de 100 mg foram fracionadas através de CC (seção 4.5.1.1; p. 32), resultando em 8 subfrações, como se pode ser observado no fluxograma 3.



Fluxograma 3: Fracionamento cromatográfico da FA5

As subfrações FA5.2 à FA5.6 foram medidas por espectroscopia de RMN de hidrogênios. Todos os espectros mostraram-se inviáveis após análise criteriosa, tanto pela quantidade de amostra, como pelas impurezas ou misturas observadas.

A fração FA6 (30 mg) foi acetilada, analisada e identificada como **substância I**. FA6 apresentou uma mancha de coloração azul intenso, quase preto após revelação com FeCl_3 , com valor de R_f de 0,73. Essa mancha é característica, no sistema eluente empregado (seção 4.5.1; p. 32) para taninos condensados monoméricos do tipo catequina/epicatequina (Mello, 1995).

Na análise do espectro de massa, o pico molecular $[M+\text{Na}^+]^+ = 313$ encontrado está em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z=290$) não derivatizada (fig. 21).

O processo de fragmentação proposto da substância pode ser observado na figura 22, estando de acordo com a literatura (Pallenbach, 1992; Mello, 1995).

Figura 21: Espectro de massas da **substância I** $[M+Na]^+$

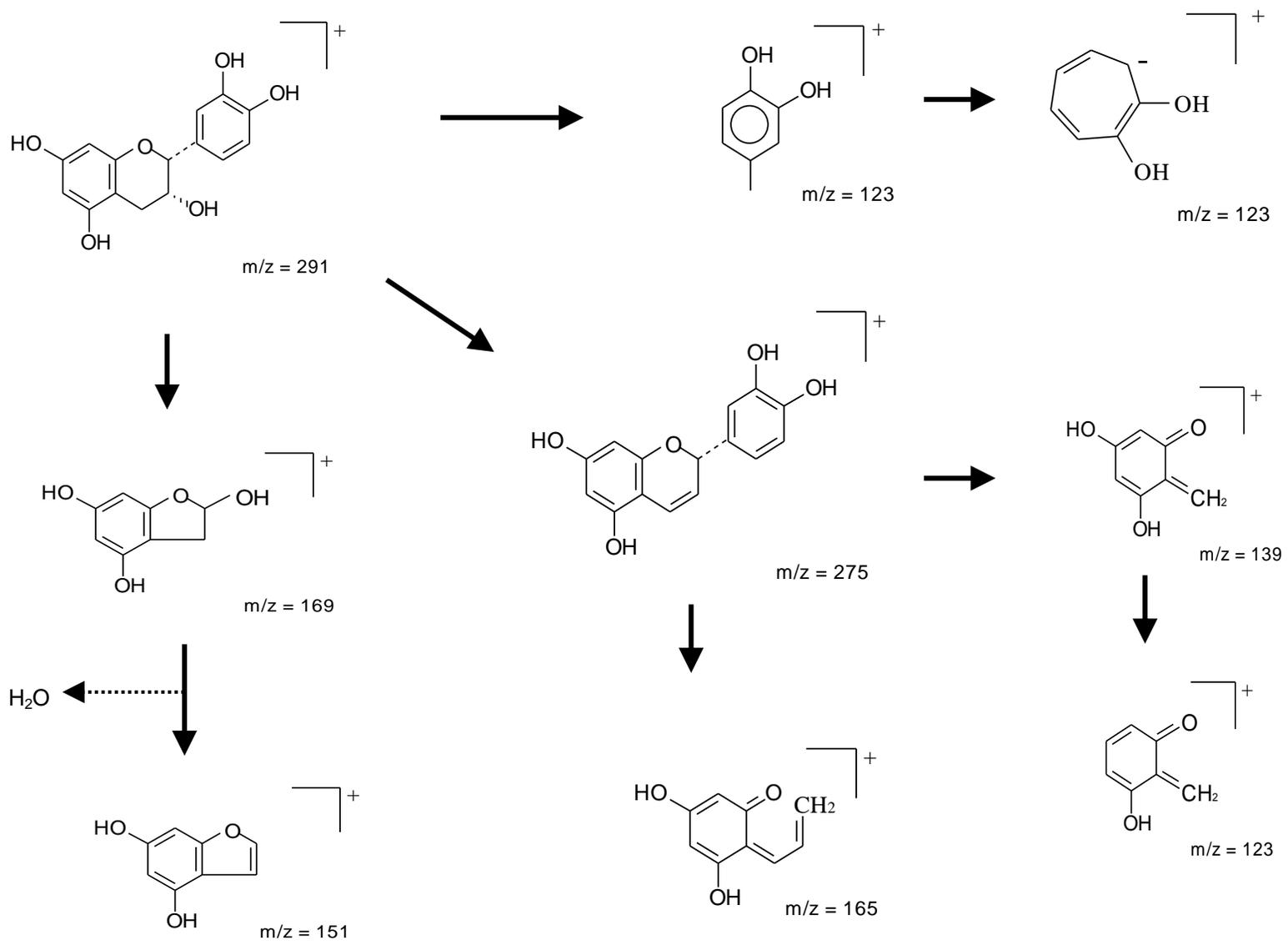


Figura 22: Fragmentação da **substância I**

O espectro de ^1H RMN (fig. 23) da **substância I** com as hidroxilas livres, mostram para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) uma constante de acoplamento $J_{\text{H-2,H-3}}$ menor que 1 Hz (Weinges *et al.*, 1968a e b) comprovando uma configuração 2,3-*cis*. O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta uma constante de acoplamento pequena com o hidrogênio H-4_{ax}(C) no valor de 2,85 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma $J_{\text{H-3,H-4eq}}$ de 4,5 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância I** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges *et al.* (1968a e b) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2(C) e H-3(C) com aproximadamente 8 Hz demonstra uma configuração relativa *trans* e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 2 Hz do tipo *cis*. O sistema AMX de spins na região aromática comprova a di-hidroilação no anel B. Nesse espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) em δ 5,91 e 5,94. Esses hidrogênios, em solução, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro (Petereit, 1992). Os dados de deslocamento são mostrados na tabela 19.

Tabela 19: Deslocamentos da **substância I** (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	$^1\delta$ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2 x H-4 (C)	2,80	2,7 – 2,86	dd	$J_{\text{H-3, H-4ax}} = 2,8$ $J_{\text{H-3, H-4eq}} = 4,5$
H-2 (C)	4,80	4,85	s	$J_{\text{H-2, H-3}} < 1$
H-3 (C)	4,16	4,21	m	$J_{\text{H-2, H-3}} < 1$ $J_{\text{H-3, H-4eq}} = 4,5$ $J_{\text{H-3, H-4ax}} = 2,8$
H-6 (A)	5,91 ou 5,94	5,94	d	
H-8 (A)	5,91 ou 5,94	6,02	d	
H-2', H-5', H-6' (B)	6,50 – 6,96	6,81 – 7,04	m	

¹: Foo *et al.*, 2000 ; s: singlete; d: dublete; dd: duplo dublete; m: multiplete

Os espectros de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY e HETCOR) (fig. 24 e 25) mostram as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância I**.

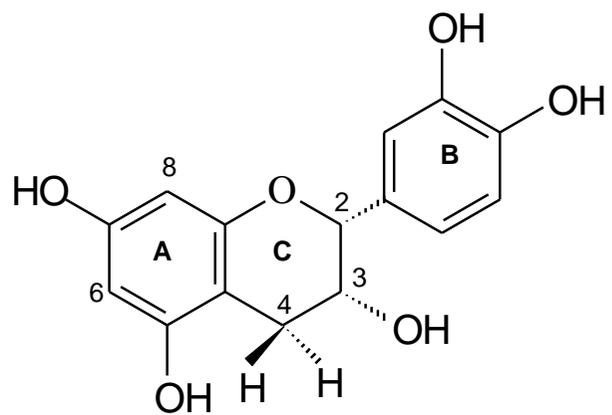


Figura 23: ^1H RMN da **substancia I** (300 MHz; CD_3OD relativo para TMS)

Figura 24: $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY da **substância I** (300 MHz; CD_3OD relativo para TMS)

Figura 25: HETCOR da **substância I** (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS)

A elucidação estrutural de flavan-3-ol com hidroxilas livres é relativamente simples com o auxílio de ressonância magnética nuclear (RMN). Isso, entretanto, não é verdadeiro para proantocianidinas, face aos sinais rotaméricos presentes nos espectros quando as substâncias encontram-se com as hidroxilas livres, tornando-se, assim, de difícil interpretação. Devido a essas dificuldades, realiza-se a derivatização (acetilação) das substâncias como forma de facilitar a investigação analítica. Como substâncias acetiladas, as mesmas apresentam comportamento químico estável e mostram-se nos espectros de RMN com sinais padrão (Outtrup e Schaumburg, 1981).

Assim, os espectros de RMN de hidrogênios (1D) e $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY (2D) apresentam características próprias para a identificação dos compostos analisados. Os dados obtidos e a comparação com dados da literatura permitem estabelecer uma identificação segura. Os espectros de ^1H RMN da **substância I** acetilada foram realizados em clorofórmio deuterado, relativo para TMS.

O espectro de ^1H RMN da **substância I** acetilada (fig. 26), bem como a tabela 20, relacionando os deslocamentos dos hidrogênios, mostram algumas nuances referentes ao processo de derivatização. Os hidrogênios alifáticos H-2(C) e H-3(C) trocam de posição e se deslocam no espectro para campos baixos (desprotegidos). O hidrogênio H-3(C), em 4,16 ppm (fig. 23), desloca-se com 1,2 ppm, indo para 5,38 ppm. Já o hidrogênio H-2(C), em 4,80 ppm, desloca-se para 5,11 ppm (cerca de 0,3 ppm). Os hidrogênios do anel A [H-6(A) e H-8(A)] permanecem fixos e foram estabelecidos em 6,57 e 6,67 ppm, respectivamente (Mello *et al.*, 1996).

Tabela 20: Deslocamentos da **substância I** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	$^1\delta$ Literatura (ppm)	Multiplicidade
H-4 eq. (C)	2,93	2,89	dd
H-4 ax. (C)	3,00	3,00	dd
H-2 (C)	5,11	5,12	s
H-3 (C)	5,38	5,41	d
H-6 (A)	6,57	6,59	d
H-8 (A)	6,68	6,69	d

¹: Ueffing, 1988; s: singleto; d: dubleto; dd: duplo dubleto; m: multiplete

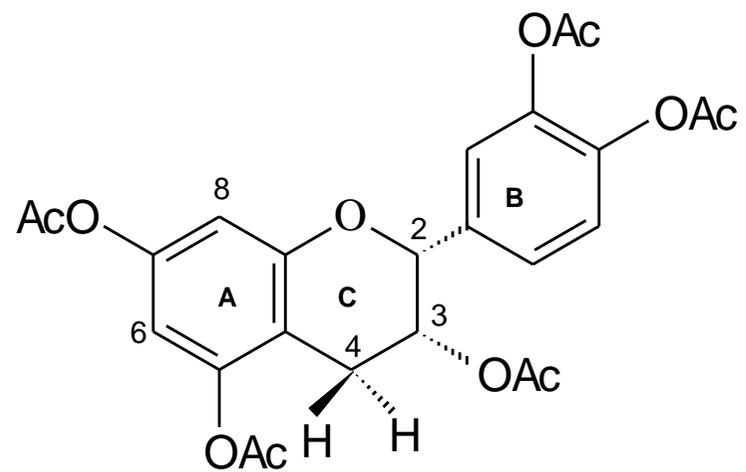


Figura 26: ^1H RMN da **substância I** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

De acordo com as análises realizadas de CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (tab. 19 e 20, fig. 21, 22, 23, 24, 25 e 26) e, quando comparados com os dados de literatura, confirmam a **substância I** como sendo **EPICATEQUINA** (fig. 27).

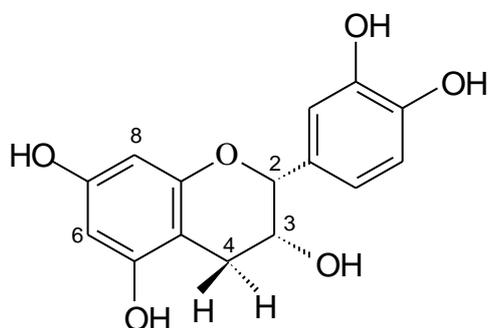
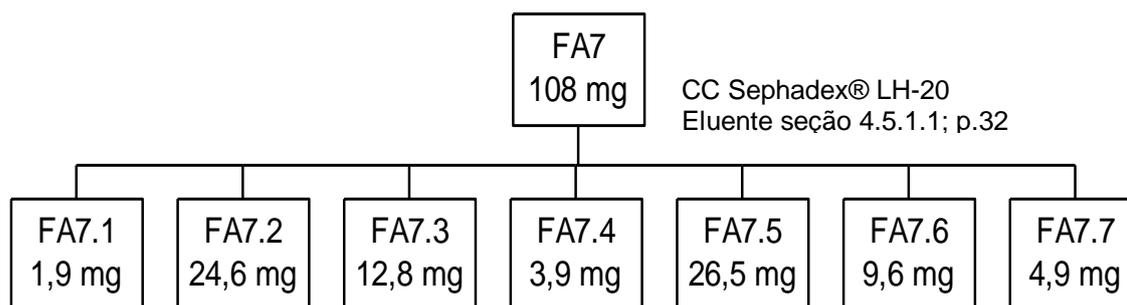


Figura 27: Estrutura da **substância I**, epicatequina

Com a FA7 (108 mg), $R_f = 0,70$, realizou-se fracionamento por CC obtendo-se sete subfrações, que estão representadas no fluxograma 4.



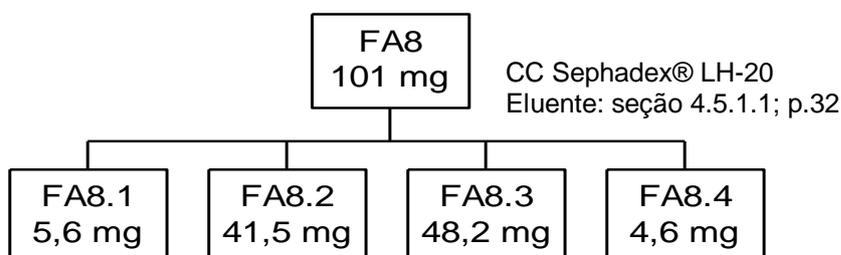
Fluxograma 4: Fracionamento cromatográfico da FA7

Das subfrações, devido à mancha apresentada em CCD, apenas FA7.3 (10 mg), com R_f de 0,80, foi analisada.

Entretanto, após análise de ^1H RMN e EM, observou-se tratar-se da substância anteriormente isolada na FA6, a epicatequina (fig. 27).

De acordo com o fracionamento obtido a partir da FA, partiu-se para análise da fração seguinte, a FA8, que em CCD apresentou mancha semelhante à FA6 e FA7, mas com R_f de 0,57 (FA6: R_f de 0,73 e, FA7: R_f de 0,81).

O fracionamento da FA8 (101 mg), realizado como descrito na seção 4.5.1.1 (p. 32), forneceu 4 subfrações, como mostra o fluxograma 5.



Fluxograma 5: Fracionamento cromatográfico da FA8

Das quatro subfrações obtidas a partir da FA8, FA8.2 e FA8.3 tiveram continuidade na análise.

A análise do espectro de ^1H RMN de FA8.2 e FA8.3, indicou, provavelmente, tratarem de procianidinas diméricas.

A análise de procianidinas diméricas está relacionada com a análise de massas, ^1H RMN, polarimetria e dicroísmo circular.

A interpretação dos espectros de RMN 1D (^1H) e 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) fornece subsídios iniciais suficientes para a elucidação estrutural desses compostos.

Fletcher *et al.* (1977) mostraram através de estudos de RMN de procianidinas peracetiladas que as ligações (4→6) e (4→8) encontram-se em duas conformações energéticas protegidas. Como critério de diferenciação para o tipo de ligação, os autores utilizam a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações do tipo (4→6) é na proporção de 1:1, enquanto que das substâncias com ligações do tipo (4→8) existe uma conformação de rotâmeros dominante. A duplicidade dos sinais depende da rigorosidade da temperatura de medida e do tipo de solvente empregado (Outtrup e Schaumburg, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway *et al.* (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas (B_1/B_7 e B_2/B_5) (fig. 3, p. 17) do sistema de spins AB dos hidrogênios do anel A das substâncias com ligação (4→6) como estando em campos mais baixos (desprotegido) (δ 6,7), enquanto os sinais da ligação análoga (4→8) em campos mais altos (δ 6,1). Entretanto esse critério de diferenciação, entre (4→6) e (4→8), somente é válido para substâncias com uma configuração 4R (Kolodziej, 1989). Adicionalmente, o hidrogênio H-2 de substâncias ligadas (4→8) apresentam-se com deslocamentos entre δ 4,37 e δ 5,01, enquanto de substâncias ligadas (4→6) entre δ 5,04 e δ 5,35 (Hör *et al.*, 1995).

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de ^1H RMN, até a configuração absoluta deixa-se “transparente” através do C-4(C) da ligação entre as unidades interflavan, quando a unidade superior for do tipo catequina (2R, 3S). Isso é devido a essa substância ter uma constante de acoplamento grande, pois essa fornece uma ordem pseudoequatorial. No entanto, quando a unidade superior for epicatequina, o C-4(C) apresentará sempre uma constante de acoplamento pequena e não poderá, nesse caso, se afirmar a configuração absoluta, pois esse composto possibilita tanto uma configuração 4R (posição diequatorial do hidrogênio) como 4S (acoplamento axial-equatorial) (Petereit, 1992).

Um método apropriado, portanto, para determinar a configuração absoluta de C-4 é através do dicroísmo circular (CD).

Thompson *et al.* (1972) indicaram a medida em CD de procianidinas diméricas como significativo pelo “efeito Cotton” em 275 nm. Procianidinas diméricas com configuração 4*S*, como a B₂, mostram-se através de um efeito Cotton negativo, enquanto que substâncias 4*R*, uma curva espelhada (efeito Cotton positivo). É possível, ainda, utilizar outro comprimento de onda para fazer a diferenciação, como na região entre 220-240 nm (Mello, 1995).

A subfração FA8.2 (**substância II**) apresentou, após revelação da CCD com FeCl₃, mancha com coloração azul escura, com R_f de aproximadamente 0,70, que de acordo com a literatura (Ueffing, 1988) indica, provavelmente, a presença de substância fenólica. Pelo EM (fig. 28), o pico molecular [M+Na⁺]⁺ = 601 concorda com substância dimérica de catequina/epicatequina.

O espectro de ¹H RMN da **substância II** acetilada (fig. 29), facilita a identificação dos hidrogênios, já que nesse caso, as hidroxilas não estão livres. Os dados de deslocamento (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 21.

Figura 28: Espectro de massas da **substância II**

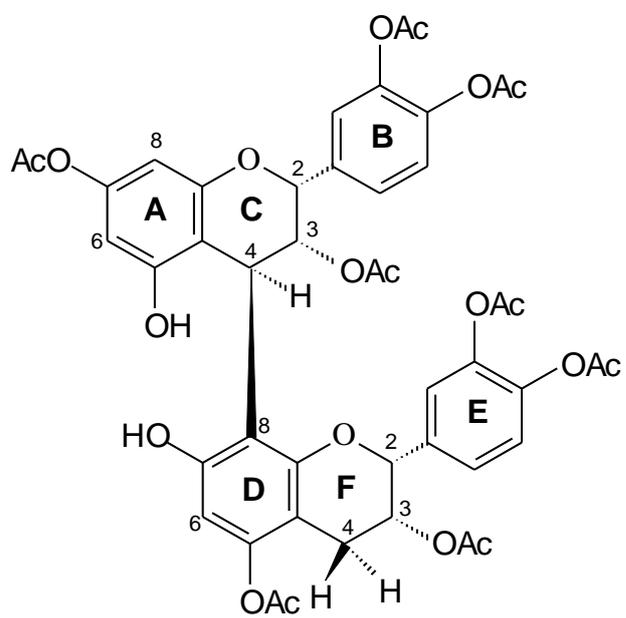


Figura 29: ^1H RMN da **substância II** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Tabela 21: Dados de ^1H RMN da **substância II** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	$^1\delta$ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (F)	2 x 2,86 – 3,05	2 x 2,90 – 2,95	m	
H-4 (C)	4,46	4,47	d	$J_{\text{H-3, H-4}} = 1,6$
H-2 (F)	4,54	4,54	s	$J_{\text{H-2, H-3}} < 1$
H-3 (F)	5,11	5,09	m	$J_{\text{H-2, H-3}} < 1$
H-3 (C)	5,16	5,15	dd	$J_{\text{H-3, H-4}} = 1,6$ $J_{\text{H-2, H-3}} < 1$
H-2 (C)	5,57	5,56	s	$J_{\text{H-2, H-3}} < 1$
H-6 (A)	5,99	5,99	s	$J_{\text{H-6, H-8}} = 2,2$
H-8 (A)	6,23	6,19	d	$J_{\text{H-6, H-8}} = 2,2$
H-6 (D)	6,66	6,63	s	
H (aromático)	6 x 6,76 – 7,36	6 x 6,90 – 7,41	m	

¹: Ueffing, 1988; s: singleto; d: dubleto; dd: duplo dubleto; m: multipletto

Os hidrogênios do anel A, H6-(A) e H8-(A), aparecem em δ 5,99 e 6,24, respectivamente, com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{\text{H6-H8}} = 2,2$ Hz, enquanto que o hidrogênio H-6(D), em δ 6,66, apresenta-se como um singleto.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4(F)] apresentam-se idênticos, em 2,90 ppm, sendo os hidrogênios mais protegidos da molécula. Já o hidrogênio alifático H-4(C) do monômero superior apresenta-se em campo menos protegido, 4,46 ppm.

A constante de acoplamento do hidrogênio H-3(C) com o hidrogênio H-4(C) de $J_{\text{H3-H4}} = 1,6$ Hz é pequena. O acoplamento entre os hidrogênios H-2(C) e H-3(C) possui uma constante inferior a 1 Hz. Esses dados dos hidrogênios alifáticos da unidade superior, estabelecem uma configuração do tipo 2,3-*cis*, 3-4-*cis*. Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3(F) e H-2(F), apresentam deslocamentos em δ 5,10 e 4,54, respectivamente. É perfeitamente visível, no espectro de RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY; fig. 30), a correlação desses hidrogênios. Os mesmos apresentam uma constante de acoplamento inferior a 1 Hz, confirmando a configuração 2,3-*cis* e 3,4-*cis*, também, para a unidade inferior.

Figura 30: $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY da **substância II** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Dessa forma, a **substância II** possui uma configuração do tipo 2*R*:3*R* e 2'*R*:3'*R*, para as unidades superior e inferior, respectivamente.

A identificação das unidades superior e inferior foi auxiliada pela hidrólise do dímero, com a metodologia descrita na seção 4.8 (p. 34). Utilizou-se como substância referência, além da definida pela técnica (cloridrato de pelargonidina), a epicatequina, identificada na FA6.

A unidade superior, após revelação da CCD com FeCl₃, apresentou mancha semelhante ao padrão epicatequina, mostrando valor de R_f de aproximadamente 0,70. O valor de R_f da epicatequina padrão foi de 0,73.

Da mesma maneira, a unidade inferior, apresentou mancha semelhante à epicatequina, com valor de R_f de 0,71.

Assim, identificam-se as unidades superior e inferior como sendo epicatequina. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados por Langhammer *et al.* (1981) e Ueffing (1988).

Após análise dos dados espectroscópicos e comparação com os dados de literatura, pode-se concluir que a **substância II** trata-se da procianidina B₂ (fig. 31), epicatequina-(4β→8)-epicatequina.

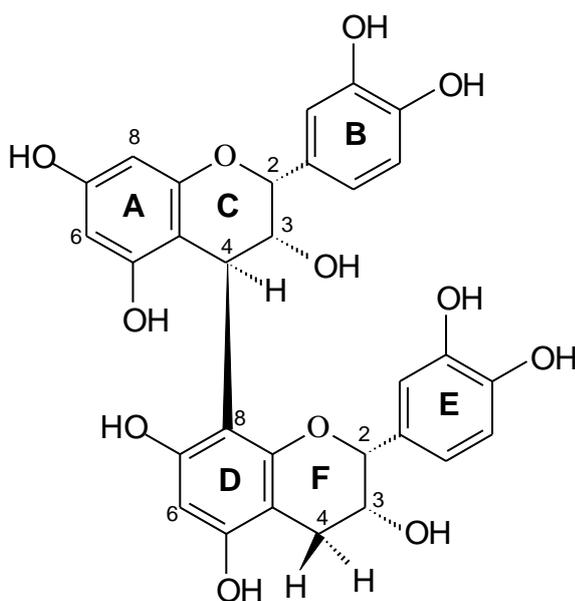


Figura 31: Estrutura da **substância II**, procianidina B₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina]

A identificação do dímero procianidina B₂ representa uma confirmação importante do ponto de vista farmacológico. De acordo com Takahashi *et al.* (1999), as procianidinas B₂ produzem estimulação das células do epitélio capilar, tendo, portanto, atividade no crescimento capilar. Takahashi *et al.* (2001) testaram clinicamente a procianidina B₂ e verificaram um resultado

significativamente positivo quanto ao crescimento capilar. Segundo Rutter (1990) a mutamba é utilizada, principalmente, em casos de alopecia.

Assim, a confirmação da presença de procianidina B₂ no extrato da mutamba é uma informação promissora quanto às pesquisas na área de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, principalmente relacionados à dermatologia.

A subfração FA8.3, com Rf de aproximadamente 0,72, apresentou mancha azul escura, indicando a presença de substância fenólica. Tanto pelo EM (fig. 32) quanto pelo espectro de ¹H RMN (fig. 33), pode-se verificar que tal subfração trata-se de uma mistura, onde pode-se identificar a **substância II**, procianidina B₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina] e uma outra substância, denominada inicialmente de **substância III**.

No EM (fig. 32), dois picos moleculares podem ser detectados. O pico molecular [M+Na⁺]⁺ = 601 concorda com a **substância II**, procianidina B₂. No entanto verifica-se outro pico molecular [M+Na⁺]⁺ = 585 que pode corresponder ao pico molecular da **substância III**.

O espectro de ¹H RMN da **substância III** acetilada (fig. 33), facilita a identificação dos hidrogênios, já que as hidroxilas não se encontram livres. Os dados de deslocamento (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento encontram-se na tabela 22.

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior [2 x H-4 (F)] apresentam-se idênticos, em δ 2,90 ppm, aproximadamente, sendo os hidrogênios mais protegidos da molécula e com constante de acoplamento inferior a 2 Hz. Já o hidrogênio alifático H-4 (C) do monômero superior, encontra-se mais desprotegido, em δ 3,10 ppm, também com uma pequena constante de acoplamento.

Figura 32: Espectro de massas da **substância III**

Tabela 22: Dados de ^1H RMN da **substância III** acetilada (300 MHz; CDCl_3 relativo paraTMS)

Hidrogênio	δ (ppm)	$^{1,2} \delta$ literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (F)	2 x 2,89 – 3,05	2 x 2,90 – 2,95	m	
H-4 (C)	3,10	2,90	d	$J_{\text{H-3, H-4}} = 3,9$
H-2 (F)	4,54	4,54	s	$J_{\text{H-3, H-2}} < 1$
H-3 (F)	5,11	5,09	m	$J_{\text{H-3, H-2}} < 1$
H-3 (C)	5,40	5,15	dd	$J_{\text{H-3, H-4}} = 3,9$ $J_{\text{H-3, H-2}} < 1$
H-2 (C)	5,30	5,56	s	$J_{\text{H-3, H-2}} < 1$
H-6 (A)	5,99	5,99	s	$J_{\text{H-6, H-8}} = 2,1$
H-8 (A)	6,23	6,19	s	$J_{\text{H-6, H-8}} = 2,1$
H-6 (D)	6,66	6,58	s	
H-2', H-5', H-6' (E)	6,76 – 7,50	6,90 – 7,41	m	
H-2', H-6' (B)	7,46	7,43	d	$J = 8,7$
H-3', H-5' (B)	7,09	7,09	d	$J = 8,7$

¹: Ueffing, 1988; ²: Drewes *et al.*, 1992

Os hidrogênios alifáticos da unidade inferior, H-3 (F) e H-2 (F), em δ 5,11 e 4,54, respectivamente, possuem constante de acoplamento inferior a 1 Hz, sendo visualizado no espectro 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) (fig. 34), a correlação entre esses hidrogênios.

Esses dados favorecem o estabelecimento da configuração do tipo 2,3-*cis* para a unidade inferior. Como pode-se também verificar a configuração relativa do tipo 3,4-*cis*, para a unidade inferior pode-se determinar a configuração absoluta como sendo do tipo 2*R*:3*R*:4*R*. Dessa forma, identifica-se o monômero inferior da **substância III** como sendo epicatequina (Petereit, 1992). Esses dados são confirmados pelos valores encontrados por Langhammer *et al.* (1981) e Ueffing (1988).

Figura 34: $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY da **substância III** acetilada
(300 MHz; CDCl_3 relativo para TMS)

Para a unidade superior, a constante de acoplamento do hidrogênio H-3 (C) com o hidrogênio H-4 (C) é de 3,9 Hz. A constante de acoplamento dos hidrogênios H-2 (C) e H-3 (C) é inferior a 1 Hz. Assim, confirma-se a configuração relativa da unidade superior como sendo do tipo 2,3-*cis* e 3,4-*cis*. No anel A, pode-se identificar facilmente os hidrogênios H-6 (A) (δ 5,99) e H-8 (A) (δ 6,23), com constante de acoplamento de 2,1 Hz, estando de acordo com o proposto por Kolodziej (1986) para dímeros com ligação do tipo (4 \rightarrow 8), desde que a configuração relativa da unidade superior seja 2,3-*cis*, bem como uma configuração 4*R*.

No anel B, verifica-se o sistema AA'BB', confirmando a presença de apenas uma hidroxila nesse anel, em posição *para*. No espectro de $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY (fig. 34), apesar de uma certa confusão na região de hidrogênios aromáticos, devido à mistura das **substâncias II e III**, pode-se visualizar perfeitamente o acoplamento dos hidrogênios H-2' e H-6' (B) com H-3' e H-5' (B), e ambos com constante de acoplamento de 8,7 Hz. Esses dados estão de acordo com Drewes *et al.* (1992), que identifica a unidade superior como sendo do tipo afzelequina.

Hsu *et al.* (1985) isolaram o dímero afzelequina-(4 α \rightarrow 8)-epicatequina, o qual apresenta características semelhantes à **substância III**, especialmente em relação ao sistema AA'BB' do anel B, na unidade superior. Hsu *et al.* ainda descrevem que os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN dessa substância são complicados devido ao isomerismo causado pelas interações entre as duas unidades. A confirmação da substância ocorreu principalmente pelo EM e pelos sinais aromáticos dos hidrogênios do anel B.

Drewes *et al.* (1992) isolaram o monômero afzelequina, onde a identificação baseia-se nos sinais dos hidrogênios do anel B no espectro de ^1H RMN, onde os hidrogênios H-2' e H-6' (B) e H-3' e H-5' (B), possuem constante de acoplamento de $J = 8,5$ Hz.

Após a análise dos espectros (EM e RMN), comparando com os dados obtidos de literatura, pode-se dizer que a **substância III** trata-se do dímero epiafzelequina-(4 β \rightarrow 8)-epicatequina (fig. 35).

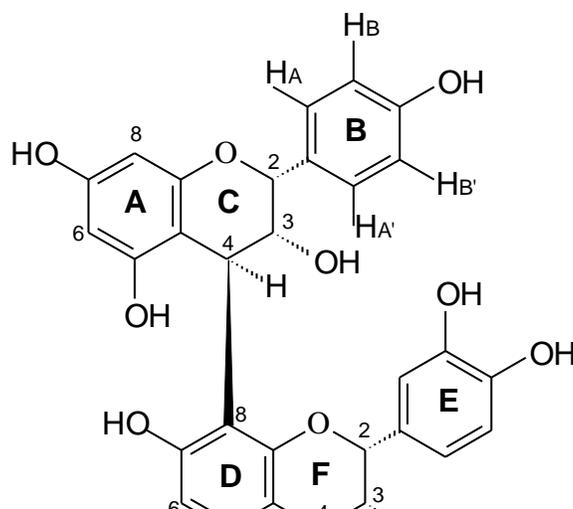


Figura 35: Estrutura da **substância III**, epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina

O impacto das doenças infecciosas, na evolução humana, é de difícil avaliação, tanto pela sua complexidade em si, como pela escassez de dados e pontos obscuros.

O surgimento de infecções bacterianas, promove uma crescente necessidade de combatê-las, principalmente devido à resistência que os microorganismos adquirem aos antibióticos utilizados. A necessidade da introdução de novos ativos no arsenal farmacêutico é absoluta, devido ao aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes, principalmente, do uso indiscriminado de antibióticos.

Dentro desse contexto, o interesse em plantas com propriedades antimicrobianas têm evoluído com amplas perspectivas, face à possibilidade que se tem em isolar substâncias conhecidas ou inéditas a partir das mais variadas espécies vegetais. Assim, o uso de plantas medicinais ou seus possíveis derivados vem crescendo gradativamente ao longo das últimas décadas, devido a vários fatores como: o respaldo e a confiabilidade repassados pelas populações; a fácil aquisição; os baixos custos e, pouco ou nenhum efeito adverso (Recio *et al.*, 1989).

O interesse em se conseguir novos fármacos com atividade bacteriana levou à realização de testes dessa atividade com o extrato bruto e semipurificado da *Guazuma ulmifolia* Lam. Tal interesse é diretamente relacionado com os usos populares descritos para a mutamba, como infecções da pele (Caceres *et al.*, 1987; Rutter, 1990), desordens gastrintestinais (Dominguez e Alcorn, 1985; Caceres *et al.*, 1990) e erisipela (Caceres *et al.*, 1987).

Scalbert (1991) relaciona que plantas e extratos com alto teor em taninos possuem ação bactericida. Kolodziej *et al.* (1999) confirmaram a atividade antibacteriana dos taninos através de um estudo dessa atividade utilizando 27 diferentes moléculas de taninos frente a 6 diferentes bactérias, sendo 2 Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e 4 Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*).

A análise da atividade antibacteriana da mutamba foi realizada utilizando-se o extrato bruto (EB) e suas frações semipurificadas (FA, FW e RE). O ensaio ocorreu frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*).

Em decorrência da simplicidade tecnológica e baixo custo, o método empregado para esse ensaio (seção 4.9.2.1; p. 36) tem apresentado alto potencial de utilização universal (Telles e Mosca, 2000).

Navarro *et al.* (1996) consideram ter atividade antibacteriana o extrato que produzir efeito nas concentrações de 10 mg/ml ou menos para *S. aureus* e, entre 10 e 20 mg/ml para *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Nesse estudo da atividade antibacteriana da *Guazuma ulmifolia* Lam., considerou-se, para os quatro microorganismos, que o extrato mostrando CIM menor de 100 µg/ml, apresenta boa atividade antimicrobiana, de 100 a 500 µg/ml a atividade antimicrobiana é moderada, até 1000 µg/ml foi considerada fraca atividade e, acima de 1000 µg/ml, o extrato foi dito inativo. Tais resultados foram também definidos por Holetz *et al.* (2002).

Os resultados obtidos para a avaliação da CIM do EB e suas frações (FA, FW e RE) estão representados na tabela 23.

Tabela 23: Concentração inibitória mínima do extrato de cascas da *Guazuma ulmifolia* Lam. (µg/ml)

Microorganismo	EB	FA	FW	RE
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5	62,5	31,25	>1000
<i>Bacillus subtilis</i>	125	250	125	>1000
<i>Escherichia coli</i>	1000	1000	1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	250	1000	>1000

Para *G. ulmifolia* Lam., os resultados foram satisfatórios. Os valores obtidos para a atividade antibacteriana mostram que o extrato das cascas da mutamba tem melhor ação frente a bactérias Gram-positivas, especialmente para *S. aureus* (CIM_{EB} 62,5 µg/ml).

Essa atividade frente ao *S. aureus* já foi demonstrada por Navarro *et al.* (1996), através do extrato metanólico dos frutos da mutamba, obtendo-se CIM de 10 µg/ml.

Entretanto, nota-se também atividade para bactérias Gram-negativas. No caso da *P. aeruginosa*, bactéria resistente a antibióticos, pode-se obter, apesar de fraca, atividade bacteriostática com a FA.

Quando se compara a atividade entre as frações analisadas, a melhor atividade bacteriostática foi a da FW (CIM_{FW} 31,25 µg/ml) frente ao *S. aureus*, comparando-a com EB (CIM_{EB} 62,5 µg/ml) e FA (CIM_{EB} 62,5 µg/ml). Isso pode ser indício da existência de substâncias no EB que inibem a atividade de outras substâncias e, após partição (flux. 2 – p.61), as substâncias ativas apresentam-se na FW. Já para *P. aeruginosa*, as substâncias com tal atividade devem estar presentes, em maior quantidade, na FA (CIM_{FA} 250 µg/ml).

Dessa forma, com esses resultados pode-se dizer que a *G. ulmifolia* Lam. possui boa ação bacteriostática frente à *S. aureus*, atividade moderada para *B. subtilis* e, fraca atividade às bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Stickler e King (1992) já haviam demonstrado que bactérias Gram-negativas são mais resistentes a agentes antimicrobianos que Gram-positivas.

Uma triagem realizada com o extrato bruto de 21 plantas medicinais usadas na África do Sul indicou que todas possuem atividade bactericida, entretanto apenas o extrato metanólico da *Warburgia salutaris* Bertol. f. Chiov. mostrou atividade contra *E. coli*, e mesmo assim, apenas bacteriostática (Rabe e Staden, 1997).

Proantocianidinas extraídas da espécie *Hamamelis virginiana* L. apresentaram CIM de 1000-2000 µg/ml, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A procianidina B₂, isolada, mostrou atividade antibacteriana, com o valor da CIM de 1000 µg/ml para *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* e, 2000 µg/ml para *E. coli* (Kolodziej *et al.*, 1999).

Considerando que a FA possui taninos, como a epicatequina e a procianidina B₂, isoladas e identificadas nesse trabalho, e comparando a atividade apresentada por essa fração (tab. 23), verifica-se que o ensaio realizado também demonstrou ser a *E. coli* o microrganismo mais resistente ao extrato de mutamba. Entretanto, o EB, FA e FW testadas nesse trabalho mostraram-se mais ativas que o trabalho apresentado por Kolodziej *et al.* (1999).

Um ensaio com antibióticos de referência (tab. 24), serviu de controle do processo, de modo a se confirmar que as cepas dos microrganismos utilizados não eram resistentes. Os valores obtidos foram comparados com a CIM dos antibióticos descritos pela literatura (Woods e Washington, 1995) e, com essas informações, a metodologia empregada pode ser tida como adequada para a avaliação que se deseja.

O resultado do controle com os antibacterianos é mostrado na tabela 24.

Tabela 24: Concentração inibitória mínima controle com antibacterianos padrões.

Antibiótico	Microrganismo	CIM (µg/ml)	
		Literatura*	Valor obtido
Penicilina	<i>S. aureus</i>	≤ 0,12	0,09
	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 64/2	3,125

Vancomicina	<i>B. subtilis</i>	≤ 4	0,00975
Tetraciclina	<i>E. coli</i>	≤ 4	0,78

* Woods e Washington, 1995.

Para verificação da atividade bactericida da mutamba, a partir da CIM realizou-se a CBM, do EB e suas frações, com exceção da RE, já que, pelos resultados da tabela 23, pode-se notar que tal fração foi inativa nas concentrações testadas frente aos microrganismos avaliados.

Os valores obtidos estão demonstrados na tabela 25.

Tabela 25: Concentração bactericida mínima do extrato da *Guazuma ulmifolia* Lam. (µg/ml)

Microrganismo	EB	FA	FW
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	250	250
<i>Bacillus subtilis</i>	250	250	1000
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000

No ensaio da CBM, apenas frente à *S. aureus* e *B. subtilis*, bactérias Gram-positivas, os extratos de mutamba apresentaram ação bactericida. Para Gram-negativas, não houve morte dos microrganismos, apenas inibição de seu crescimento. Com a retirada do agente antimicrobiano (EB, FA e FW), as bactérias retornaram às atividades de crescimento e multiplicação celular.

Estudos da atividade antibacteriana de plantas do sul da África [*Combretum cafrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze, *Salix capensis* Thunb., *Schotia latifolia* Jacq.] indicaram que as espécies apresentaram significativa atividade contra bactérias Gram-positivas, com CIM de 0,1-5,0 mg/ml, entretanto, não apresentaram qualquer atividade contra bactérias Gram-negativas, nem bacteriostática (Masika e Afolayan, 2002).

Avaliando a atividade antibacteriana (CIM e CBM) apenas frente à *S. aureus*, microrganismo menos resistente entre os testados, pode-se dizer que as substâncias que são capazes de inibir o crescimento de uma bactéria nem sempre são eficazes quanto à atividade bactericida (tab. 26).

Tabela 26: Atividade antibacteriana do extrato da *Guazuma ulmifolia* Lam. frente a *Staphylococcus aureus*

Microrganismo	Concentração do extrato (µg/ml)		
	EB	FA	FW

<i>S. aureus</i>	CIM	62,5	62,5	31,25
	CBM	125	250	250

Embora os resultados tenham sido satisfatórios, os valores obtidos apresentaram-se acima da CIM dos antibióticos clássicos. Mas para isso, poderia se explicar o fato de que as amostras testadas tratam-se de frações semipurificadas, que possuem várias substâncias químicas. Isso torna o princípio ativo ou o conjunto de substâncias ativas, menos concentradas, sendo que os antibióticos clássicos são substâncias puras.

Dessa forma, realizou-se um ensaio da CIM das subfrações utilizadas no isolamento químico, bem como as substâncias isoladas. Os microrganismos empregados foram os mesmos já mencionados.

Entretanto, pode-se observar pela tabela 27 que os resultados obtidos não foram muito satisfatórios.

Tabela 27: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) das subfrações e substâncias isoladas a a partir da FA

Amostra	Microrganismos			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
FA3	1000	1000	> 1000	> 1000
FA4	1000	1000	> 1000	> 1000
FA6	> 100	> 100	> 100	> 100
FA7	1000	> 1000	> 1000	> 1000
FA8	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
FA8.2	> 100	> 100	> 100	> 100
FA8.3	> 100	> 100	> 100	> 100

FA3, FA4, FA7 e FA8: subfrações

FA6: epicatequina; FA8.2: procianidina B2; FA8.3: epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina

Para FA6, FA8.2 e FA8.3 utilizou-se a diluição máxima de 100 $\mu\text{g/ml}$, valor padronizado pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, para substâncias puras. Já no caso das subfrações, as concentrações foram as mesmas utilizadas para EB, FA e FW.

Pela tabela pode-se dizer que nas concentrações empregadas, nenhuma amostra apresentou resultados satisfatórios. Entretanto, como já discutido anteriormente, tanto o EB quanto as frações FA e FW apresentaram alguma atividade antibacteriana. A explicação para esses resultados pode ser dada pelo fato de que as substâncias atuam em sinergismo, onde isoladas, a atividade é diminuída ou mesmo, anulada.

Apesar disso, os testes realizados foram promissores, proporcionando dados que permitem confirmar a atividade antibacteriana da *Guazuma ulmifolia* Lam., explicando assim, seu uso popular com essa finalidade (Dominguez e Alcorn, 1985; Ramirez, 1988), principalmente no caso da FW frente às bactérias Gram-positivas.

6. CONCLUSÕES

A análise macroscópica permitiu a identificação botânica da espécie vegetal até sua variedade, tratando-se, dessa forma da *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*. Tal conclusão baseou-se, principalmente, nas características morfológicas das folhas (oblongadas, com margens serradas, 10-12 x 4-6 cm) e, frutos (cápsula deiscente) do vegetal.

Segundo a análise microscópica, a presença de tricomas estrelados e vários canais secretores entre as células parenquimáticas são representativos da *G. ulmifolia* Lam., auxiliando na identificação da espécie, evitando-se assim, possíveis adulterações.

As análises físico-químicas farmacopéicas e não farmacopéicas determinaram as condições mínimas da droga vegetal. Juntamente com as análises macro e microscópicas, contribuem à elaboração de monografia do tipo farmacopéica.

Foram isolados e identificados, a partir do extrato das cascas da mutamba, os seguintes taninos condensados: epicatequina, procianidina B₂ [epicatequina-(4β→8)-epicatequina] e epiafzelequina-(4β→8)-epicatequina, com o auxílio de dados espectroscópicos e de literatura.

Confirma-se o extrato da mutamba possuir atividade antibacteriana contra as cepas testadas. A fração FW mostrou a melhor atividade bacteriostática frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Já para a atividade bactericida a mutamba foi eficaz apenas frente às bactérias Gram-positivas, sendo o EB com melhor atividade frente à *S. aureus*.

Reunindo todos os dados obtidos com o trabalho, pode-se dizer que a espécie vegetal *Guazuma ulmifolia* Lam. demonstra um futuro promissor para a medicina. Exemplo disso é a procianidina B₂ isolada do extrato da mutamba, que possui ação estimulante sobre o epitélio capilar. Somando-se à atividade bactericida do extrato, que pode contribuir na assepsia da região capilar, são informações importantes que podem e devem levar ao início de estudos mais detalhados para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico eficaz e seguro no tratamento da queda de cabelo.

6. BIBLIOGRAFIA

- A IMPORTÂNCIA crescente da Fitoterapia no mundo. Disponível em: <http://planeta.terra.com.br/saude/opportunidades/index.htm#Fitoterapia%201>. Acessado em 26 jun. 2002.
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.48, v.4, p.487-491, 2001.
- ALARCON, A. F. J.; ROMAN, R. R.; PEREZ, G. S.; AGUILAR, C. A.; CONTRERAS, W. C. C.; FLORES, S. J. L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiadetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, n.2, p.101-110, 1998.
- AUDI, E.A.; CAMPOS, E.J.V. de; RUFINO, M.; CORTEZ, D.G.; BERSANI-AMADO, C.A.; SOAREZ, L.A.L.; PETROVICK, P.R.; MELLO, J.C.P. de. *Petiveria alliacea* L.: Plant drug quality control, hydroalcoholic extract standardization and pharmacological assay of lyophilized extract. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.20, n.3, p.225-232, 2001.
- AMMON, H.P.T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegussextrakten, Flavanoiden und Pocyamidinen, Teil 1: Historisches und Wirkstoffe. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.32, p.2433, 1994a.
- AMMON, H.P.T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegussextrakten, Flavanoiden und Pocyamidinen, Teil 1: Wirkungen auf das Herz. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.34, p.2521, 1994b.
- AMMON, H.P.T.; KAUL, R. Crataegus Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegussextrakten, Flavanoiden und Pocyamidinen, Teil 1: Wirkungen auf den Kreislauf. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.134, p.2631, 1994c.
- BALDÉ, A.M.; van HOOF, L.; PIETERS, L.A.; van der BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Plant antiviral agents. VII Antiviral and antibacterial proanthocyanidins from the bark of *Pavetta wariensis*. **Phytoterapy Research**, v.4, p.182, 1990.
- BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. Contribuição efetiva ou potencial do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade. Estudo elaborado para o programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Sub-Programa de Planejamento e Gestão em Ciência e Tecnologia (PGCT). **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Campinas: 1995.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; QUEIROZ, L.P.; DAVID, J.M. A-type proanthocyanidin antioxidant from *Dioclea lasiophylla*. **Phytochemistry**, v.55, p.805-808, 2000.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: USP, v.1, 1978.
- BERNAYS, E.A.; COOPER DRIVER, G.; BILGENER, M. Herbivores and plant tannins. **Advances in Ecological Research**, v.19, p.263-302, 1989.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**. Stuttgart: v.61, n.8, p.255, 1972.
- BURKILL, I.H. **A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula**. London: University Press Oxford, v.I, 1935.

- BUTLER, L.G. Effects of condensed tannins on animal nutrition. In: HEMINGWAY, R.W.; KARCHESY, J.J.; BRANHAM, S.J. **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum, p.391-402, 1989.
- CACERES, A.; GIRÓN, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.20, n.3, p.223-237, 1987.
- CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.30, n.1, p.55-73, 1990.
- CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2. Evaluation of activity of 16 plants against Gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.1, p.77-82, 1993a.
- CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.38, n.1, p.31-38, 1993b.
- CACERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Anti-gonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.48, n.2, p.85-88, 1995.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.
- CONSOLARO, M.E.L.; MARQUES, L.C.; MELLO, J.C.P. de. Análisis farmacognóstico de *Centella asiatica* (L.) Urban: aspectos botánicos, físico-químicos y enfoque químico preliminar. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.18, n.2, p.115-120, 1999.
- CORDER, R.; DOUTHWAITE, J.L.; LEES, D.M.; HAN, N.Q.; SANTOS, A.C.V.; WOOD, E.G.; CARRIER, M.J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature**, v.414, p.863, 2001.
- CORK, S.J.; KROCKENBERGER, A.K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.17, p.123, 1991.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.5, 1974.
- COSTA, O. de A. Estudo farmacognóstico do cipó cravo: *Tynnanthus fasciculatus* Miers. e *Tynnanthus elegans* Miers. Revista da Flora Medicinal, ano I, n.10, 1935.
- CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: 1995.
- DALEN, J.E. Conventional and unconventional medicine. Can they be integrated? **Archives of Internal Medicine**, v.158, n.9, p.2179-2181, 1998.
- DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECRERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.307-313, 2000.

DOMINGUEZ, X.A.; ALCORN, J.B. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of Northeastern Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, n.2, p.19-156, 1985.

DONATUS, I.A.; **Uji ketoksikan akut seduhan daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lam.) pada Mencit dan Tikus**, Indonésia, 23p., 1997.

DONGMO, A.B.; KAMANYI, M.S.; ANCHANG, B.; NKEH, B.C.A.; NJAMEN, D.; NGUELEFACK, T.B.; NOLE, T.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extracts of *Erythrophleum suaveolens* (Caesalpiniaceae), Guillemin & Perrottet. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.137-141, 2001.

DREWES, S.E.; TAYLOR, C.W.; CUNNINGHAM, A.B. (+)-Afzelechin 3-rhamnoside from *Cassipourea gerrardii*. **Phytochemistry**, v.31, n.3, p.1073-1075, 1992.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 293p., 1974.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, cap.10, p.165-182, 2002.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, cap.12, p.199-222, 2002.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1996.

FEJES, S.; BLÁZOVICS, A.; LUGASI, A.; LEMBERKOVICS, E.; PETRI, G. e KÉRY, A. In vitro antioxidant activity of *Antroriscus cerefolium* L. (Hoffm.) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, n.2, p.259-265, 1999.

FITOTERAPIA: entre o conhecimento popular e o científico. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/framereport.htm>. Acessado em 27 jun.2002.

FLETCHER, A.C.; PORTER, L.J.; HASLAM, E.; GUPTA, R.K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. **Journal of Chemical Society, Perkin Trans. I**, p.1628, 1977.

FOO, L.Y.; LU, Y.; HOWELL, A.B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. **Phytochemistry**, v.54, p.173-181, 2000.

FREI, B.; BALTISBERGER, M.; STICHER, O.; HEINRICH, M. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, México): Documentation and assessment of indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.149-165, 1998.

FROHNE, D.; JENSEN, U. **Systematic des pflanzenreichs**. 5. Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, p. 194-196, 1998.

GALINA, K.J.; GONÇALVES, R.C.R.; MELLO, J.C.P. The vegetable raw-material *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae quality evaluation. In: II CONGRESSO MUNDIAL DE PLANTAS

AROMÁTICAS Y MEDICINALES PARA EL BIENESTAR DE LA HUMANIDAD, Mendoza, Argentina. **Resúmenes**, p.466, 1998.

GEISS, F.; HEIRINCH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins with (+)- epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v.39, n.3, p.635-643, 1994.

GERRITS, P.O.; EPPINGER, B.; GOOR, H.V.; HOROBIN, R.W. A versatile, low toxicity glycol methacrylate embedding medium for use in biological research, and for recovered biomaterials prostheses. **Cell & Materials**, v.1, p.189-198, 1991.

GIMÉNEZ, A.M.; LUGONEZ, G.M. de; FEMENÍA, J.H. Anatomía de leño y corteza de *Monttea aphylla* (Miers.) Benth et Hook, Scrophulariaceae. **Quebracho**, n.6, p.44-52, 1998.

GLASL, H. *Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung* - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.123, p.1979, 1983.

GONZALES, F.; SILVA, M. A survey of plants with antifertility properties described in the South America folk medicine. **Abstract Princess Congress 1 Bangkok Thailand**, Chile: 20p., 1987.

GUAZUMA: Medicinal plants from Indonésia. Disponível em: http://www.haldin-natural.com/techdata/guazuma_a.html. Acessado em 28 jun. 2002.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis**, Chapman and Hall, 302p., 1998.

HASLAM, E.; HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, p.505-560, 1975.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.

HATANO, T., EDAMATSU, R., HIRAMATSU, M., MORI, A., FUJITA, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, T. e OKUDA, T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, p.2016, 1989.

HEMINGWAY, R.W.; FOO, L.Y.; PORTER, L.J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins. **Journal of Chemical Society, Perkin Trans.**, p.1209, 1982.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 335p., 1993.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, CC. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, n.2, p.187-191, 2001.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.;CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro: v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HÖR, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. **Planta Medica**, v.61, n.3, p.208-212, 1995.

HÖR, M.; HEINRICH, M.; RIMPLER, H. Proanthocyanidin polymers with antisecretory activity and proanthocyanidin oligomers from *Guazuma ulmifolia* bark. **Phytochemistry**, v.42, n.1, p.109-119, 1996.

HSU, F.L.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XXXI. 1) Isolation and characterization of proanthocyanidins in *Kandelia candel* (L.) Druce. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.33, n.8, p.3142-3152, 1985.

JAUREGUI, D.; RIOS, N.R. de; ROJAZ, C.E.B. de. Estudios anatómicos foliares en solanaceae de Venezuela. VI. Anatomía foliar de diez especies de *Cestrum* L. **Acta Científica Venezuela**, v.52, n.4, p.248-260, 2001.

JOLY, A.B. **Botânica, introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 2.ed., p.398-406, 1975.

KOLODZIEJ, H. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. **Phytochemistry**, v.25, p.1209-1215, 1986.

KOLODZIEJ, H. Tannins of medicinal plants: application of ¹H NMR parameters to the analysis of procyanidins. **Farmaceutisch tijdschrift voor België**, v.66e, p.44, 1989.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Medica**, n.65, p.444-446, 1999.

KOMMISSION E. Bundesanzeiger n° 133 de 19.07.1994. **Liste der Monographien**. Bundesgesundheitsamt: Institut für Arzneimittel, 1994.

LANGHAMMER, L.; RAUWALD, H.W.; SCHULZE, G. Neu-Untersuchung von *Tiliae* flos DAB 8. **Archiv der Pharmazie**, v.314, p.424-432, 1981.

LENTZ, D.L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMER, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. Antimicrobial properties of Honduras medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p.253-263, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, p.327, 1992.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1994.

MASIKA, P.J.; AFOLAYAN, A.J. Antimicrobial activity of some plants used for treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, n.1-2, p.129-134, 2002.

MELLO, J.C.P. de. **Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae)**. 1995. 236 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

MELLO, J.P. de, PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.42, p.857, 1996.

MELLO, J.C.P. de; PETROVICK, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.19, n.3, p.211-215, 2000.

MELLO, J.C.P. de; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 4.ed., cap.24, p.527-554, 2002.

MENTZ, L.A.; BORDIGNON, S.A.L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 4.ed., cap.9, p.149-164, 2002.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Rose Editorial, p.11-26, 1999.

MOLE, S. ; WATERMAN, P.G. Tannins as antifeedants to mammalian herbivores-still an open question. Allelochemicals: role in agriculture and forestry. In: Symposium Series 330 of the American Chemistry Society. **Resumos...**, Washington, Waller: G.R.ed., p.572-587, 1987a.

MOLE, S. ; WATERMAN, P.G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p.137-147, 1987b.

MORIMOTO, S.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidins oligomers from *Cassia* bark (*Cinamomum cassia* Blume). **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v.34, p.633-642, 1986.

MORTON, J.F. Some folk medicine plants of central american markets. **Quartely Journal of Crude Drugs Research**, v.15, p.165-192, 1977.

NAKAHARA, K.; KAWABATA, S.; ONO, H.; OGURA, K.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. **Applied an Environmental Microbiology**, v.59, p.968, 1993.

NASCIMENTO, S.C.; CHIAPPETA, A.A.; LIMA, R.M.O.C. Antimicrobial and citotoxic activites in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v.61, n.4, p.353-355, 1990.

NAVARRO, V.; VILARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican tradicional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.143-147, 1996.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998.

OTAKE, S.; MAKIMURA, M.; KUROKI, T.; NISHIHARA, Y.; HIRASAWA, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Research**, v.25, p.438, 1991.

OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Research Communications**, v.46, p.43, 1981.

PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze Cistus incanus L. (Cistaceae)**, 1992. Tese (Doutorado), Universidade de Münster, Alemanha, 1992.

PORTER, L.J. Tannins. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.) **Method in plants biochemistry**. London: Academic press, v.1, p.389, 1989.

POSER, G.L.V.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 4.ed., cap.4, p.63-76, 2002.

RABE, T.; STADEN, J. van. Antibacterial activity of South Africa plants used for medicine purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.56, n.1, p.81-87, 1997.

RADFORD, A.E.; DICKISON, W.C.; MASSEY, J.R.; BELL, C.R. Vascular plant systematics. **Haper e Row Publishers**: New York, 891p., 1979.

RAMIREZ, V.R.; MOSTACERO, L.J.; GARCIA, A.E.; MEJIA, C.F.; PELAEZ, P.F.; MEDINA, C.D.; MIRANDA, C.H. Vegetables empleados en Medicina Tradicional Norperuana. **Banco Agrario del Peru e Nacional Universidade de Trujillo**, Peru, 54p., 1988.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

RAWAT, M.S.M.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANT, G. Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots. **Phytochemistry**, v.50, p.321-324, 1999.

RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytoterapy research**, v.3, n.4, p.117-125, 1989.

ROCHA, J.C.; NEVES, L.J. Anatomia Foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceas). **Rodriguésia**, v.51, n.78/79, p.113-132, 2000.

ROCHA, J.F.; ROSA, M.M.T. da; FRADE, C.C.M.; DIERSMANN, E.D. Estudo Anatômico e Histoquímico em Folhas de *Plantago major* L. e *Plantago australis* Lam. (Plantaginaceae), **Revista Universidade Rural**. Rio de Janeiro, RJ: Série Ciências Humanas, v.22, n.1, 2001.

ROESLER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v.61, n.2, p.33-36, 1972.

RUTTER, R.A. Catalogo de plantas utiles de la Amazonia Peruana. **Yarinacocha: Instituto Linguístico de Verano**, 349p., 1990.

SASS, J. **Botanical microtechnique**. Iowa: Iowa College Press, 228 p., 1951.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHUMMAN, C. Sterculiaceae, Tiliaceae, Bombacaceae, Malvaceae I. In: Martius, C.F. (Ed.) **Flora Brasiliensis**. Lehre: J.Cramer, v.12, parte 3, 1886. p. 2-114.

SCHOLZ, E. pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.134, p.3167, 1994.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 4.ed., cap.13, p.223-260, 2002.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.1, p.11-20, 1997.

SOUSA, M.P. de; ROUQUAYROL, M.Z. Molluscicidal activity o plants from northeast Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v.7, n.4, p.389-393, 1974.

SOUZA, H.C., LUQUE, R.E. e KRAUS, J.E. Revisão e padronização das metodologias de dupla coloração com azul-de-astra ou azul-de-alcian versus fucsina básica ou safranina. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46, 1995, Ribeirão Preto. **Resumos...**, Ribeirão Preto: USP, 1995.

SOUZA, R.C.O.S. de; MARQUETE, O. *Miconia tristis* Spring e *Miconia doriana* Cogn. (Melastomataceae): anatomia do eixo vegetativo e folhas. **Rodriguésia**, v.51, n.78/79, p.133-142, 2000.

STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 230p., 1996.

STEARN, W.T. **Botanical latin**, 4. ed., Timber Press, 560 p., 1995.

STICHER, O. Quality of ginkgo preparations. **Planta Medica**, v.59, p.2-11, 1993.

STICKLER, D.J.; KING, J.B. Bacterial sensitivity and resistance. Intrinsic resistance. In: RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.211-224, 1992.

SUN, B.; BELCHIOR, P.; SILVA, J.R.M.; SPRANGER, M.I. Isolatin and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. **Journal of Chromatography**, v.841, p.115-121, 1999.

TAKAHASHI, T.; YOKOO, Y.; INOUE, T.; ISHII, A. Toxicological studies on procyanidin B-2 for external application as a hair growing agent. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, n.5, p.545-552, 1999.

TAKAHASHI, T.; KAMIMURA, A.; YOKOO, Y.; HONDA, S.; WATANABE, Y. The first clinical trial of topical application of procyanidin B-2 to investigate its potential as a hair growing agent. **Phytotherapy Research**, v.15, p.327-330, 2001.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 643p., 1996.

TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n.1-2, p.15-19, 2000.

THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. **Journal of Chemical Society**, Perkin Trans. I, p.1387-1399, 1972.

TOLEDO, C.E.M. de. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]. 2002. 116 f. Tese (Mestrado) – UNESP-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2002.

TOLEDO, C.E.M. de; SANTOS, F.S.; MELLO, J.C.P. Controle de qualidade da matéria-prima vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae (barbatimão). In: XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lindóia, SP. **Resumos**, 1998.

UEFFING, I. **Untersuchung von Procyanidinen in Tilia spec. – ein Beitrag zur qualitativen und quantitativen HPLC-Analytik von Flavanolen**. 1988. 164 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Münster, Alemanha, 1988.

VERDE ameaçado: Plantas Mediciniais Brasileiras. Disponível em: <http://www.estado.estadao.com.br/edição/especial/plantas/profes4.html>. Acessado em 26 jun. 2002.

VIEIRA J.E.V. Pharmacologic screening of plants from northeast Brazil. **II Revista Brasileira de Farmacologia**, v.49, p.67-75, 1968.

VOIGT, R. **Pharmazeutische technologie**. 7. Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

WEINGES, K.; KALTENHÄUSEN, W.; MARX, H.D.; NADER, E.; NADER, F.; PERNER, J.; SEILER, D. Procyanidine aus Früchten. **Liebigs Annalen der Chemie**, v.711, p.184-204, 1968a.

WEINGES, K.; GÖRITZ, K.; NADER, F.; PERNER, J. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XI Konfigurationbestimmung von C₃₀H₂₆O₁₂ – Procyanidinen und Strukturauflösung eines neuen Procyanidins. **Liebigs Annalen der Chemie**, v.715, p.164-171, 1968b.

WEINGES, K.; KLOSS, P.; TRUNZLER, G.; SCHULER, E. Über kreislaufwirksame dimere und oligomere Dehydro-catechine. **Planta Medica**, n. Suppl., p.61, 1971.

WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R.; BARRON, E.J.; PFALLER, M.A.; TECNOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, 6.ed., cap.113, p.1327-1341, 1995.

ANEXO I

Monografia da *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae

MUTAMBA (O)

Guazuma ulmifolia Lam. - STERCULIACEAE

A droga vegetal é constituída de cascas secas, contendo, no mínimo, 4% de taninos.

SINONÍMIA VULGAR

Embira, embireira, embirú, mutamba verdadeira, pau-de-motamba, camaca, periquiteira, piriquiteira, envireira, pau-de-bicho, guaximo-macho, pojó, guaxima-torcida, araticum-bravo.

CARACTERES ORGANOLÉPTICOS

A droga apresenta odor de madeira, característico. Tem sabor levemente adstringente.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

As cascas apresentam-se em pedaços de tamanhos bastante variados. A casca, proveniente do tronco, mostra-se com pequenas fissuras por toda a superfície. A superfície externa da casca é de coloração marrom, com placas esbranquiçadas, quando recoberta de líquens; sua superfície interna é de coloração parda-avermelhada, com grande quantidade de fibras, em sentido longitudinal.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

O periderma desta casca é bastante evidenciado, formado por células retangulares. Em algumas regiões do caule forma-se o ritidoma. O súber apresenta grande número de camadas, com células levemente alongadas com alta quantidade de conteúdo pardo avermelhado; em meio ao súber existem grupos de fibras alongadas distribuídas tangencialmente. O parênquima cortical, muito desenvolvido, caracteriza-se pela presença de várias cavidades secretoras entre as células parenquimáticas; distribui-se

ainda, pelo parênquima cortical, idioblastos contendo oxalato de cálcio. Paralelamente à medula, vê-se camadas com células bem pequenas, retangulares, enfileiradas em disposição contínua, envolvendo o parênquima mais interno, que representam a feloderma. No feixe vascular, pode-se visualizar os raios xilemáticos, com grandes cavidades secretoras, em disposição radial, em séries paralelas entre si. No parênquima liberiano, as células estão repletas de conteúdo polifenólico. Nos ramos, pode-se encontrar ainda, na epiderme, grande quantidade de tricomas estrelados.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DO PÓ

O pó atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São característicos: a cor marrom avermelhada, tricomas estrelados, grandes cavidades secretoras, células com conteúdo polifenólico, drusas de oxalato de cálcio.

IDENTIFICAÇÃO

A. Adicionar a 20,0 ml do extrato aquoso bruto, 5 gotas da seguinte mistura: 1,0 ml de solução de cloreto férrico a 1% (p/v) + 1,0 ml de solução de ferrocianeto de potássio a 1% (p/v). O aparecimento de uma coloração azul-esverdeada indica presença de compostos polifenólicos.

B. Em 2,0 ml do extrato aquoso a 5 % (decocto), adicionar 0,5 ml de solução de vanilina a 1% e 1,0 ml de ác. clorídrico concentrado. Se ocorrer formação de cor vermelha, indica presença de taninos condensados.

C. Evaporar 5,0 ml do extrato etanólico a 20 % em cápsula de porcelana em banho-maria até a secura. Lavar o extrato com clorofórmio para a eliminação de clorofila. Dissolver o resíduo em álcool (etanol absoluto) e colocar em tubo de ensaio. Adicionar 200 mg de magnésio em pó e 1 ml de HCl concentrado. Deixar reagir durante 15 minutos e observar. Desenvolvimento de coloração rósea ou vermelha indica a presença de glicosídeos flavônicos.

D. Cromatografia em camada delgada, utilizando cromatoplaça de gel de sílica GF₂₅₄, como fase estacionária, e mistura de acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5), como fase móvel. Aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 30 µl da solução amostra e 10 µl da solução de referência, ambos preparados como segue.

Solução amostra: preparar uma solução extrativa 10% em acetona/água (7:3), por turbólise;

Solução referência: dissolver 10 mg de epicatequina em metanol.

Desenvolver o cromatograma em percurso de aproximadamente 10 cm. Deixar a placa secar em capela e depois, revelar com solução metanólica de cloreto férrico 2%. O cromatograma deverá apresentar uma mancha de coloração azul intensa na mesma altura que a obtida com a solução referência da epicatequina (R_f aproximadamente 0,73).

ENSAIOS DE PUREZA

Determinação de água: No máximo 6%.

Teor de extrativos: No mínimo 20%, para solução aquosa 10% das cascas secas.

Resíduo seco: No mínimo 13%, para uma solução extrativa 10% das cascas, como líquido extrator acetona:água (7:3).

DOSEAMENTO

A. TANINOS: No mínimo 4%.

B. FLAVONÓIDES: No mínimo 2%.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em sacos de papel acondicionados em barricas de papelão, bem fechados, ao abrigo da luz, calor e umidade.