

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

JULIANA CRISTINA BORGUEZAM ROCHA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, ESTUDO QUÍMICO, HISTOLÓGICO
E DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE EXTRATOS DAS CASCAS DE
Guazuma ulmifolia LAM. VAR. *tomentella*, STERCULIACEAE**

MARINGÁ

2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

JULIANA CRISTINA BORGUEZAM ROCHA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, ESTUDO QUÍMICO, HISTOLÓGICO
E DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE EXTRATOS DAS CASCAS DE
Guazuma ulmifolia LAM. VAR. *tomentella*, STERCULIACEAE**

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientadora: Prof^ª Dr.^a. Luzmarina Hernandes.

MARINGÁ

2005

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

R672a Rocha, Juliana Cristina Borguezam, 1977-
Avaliação da qualidade, estudo químico,
histológico e de permeação cutânea de extratos das
cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam. Var. *tomentella*,
Sterculiaceae / Juliana Cristina Borguezam Rocha. --
Maringá : [s.n.], 2005.
157 f. : il. color., figs., tabs.

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

Co-orientadora : Prof^a Dr^a Luzmarina Hernandes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2005.

1. *Guazuma ulmifolia* - Análise fitoquímica. 2.
Extrato bruto - folículo piloso, permeação cutânea,
antioxidantes e taninos condensados. 3. Mutamba. I.
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas. II. Título.

CDD 22.ed. 615.321

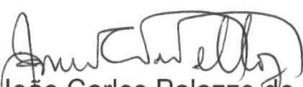
GlauCIA Volponi de Souza CRB 9/948



Fundação Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ATA DO EXAME DE DISSERTAÇÃO DA PÓS-GRADUANDA JULIANA CRISTINA BORGUEZAM ROCHA, REALIZADA NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, NO DIA ONZE DO MÊS DE JULHO DO ANO DE DOIS MIL E CINCO.

Aos onze dias do mês de julho do ano de dois mil e cinco, às nove horas, no Bloco K-80, Sala 12, realizou-se o exame de dissertação "Avaliação da qualidade das cascas, estudo químico, capacidade antioxidante, atividade sobre o crescimento de pêlo em ratos e ensaio de permeação cutânea *in vitro* de extratos de *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*.", da pós-graduanda Juliana Cristina Borguezam Rocha, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração produtos naturais biologicamente ativos. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello (presidente/orientador), Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos (membro convidado) e Dra. Maria Raquel Marçal Natali (membro convidado). Concluídos os trabalhos de apresentação e argüição, a pós-graduanda foi aprovada, obtendo o título de mestre. E para constar, foi lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
(Presidente da Banca – orientador)


Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos
(Membro convidado)


Dra. Maria Raquel Marçal Natali
(Membro convidado)

Aos meus pais, Idilio e Nilza;

A minha irmã, Gabriela;

Aos meus avós:

Anísio e Ida (ambos *in memoriam*),

Batista (*in memoriam*) e Olga.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, justiça e indulgência para com toda a humanidade.

Aos meus pais, pelo incentivo nos estudos, pelos esforços realizados em prol desse incentivo e pela formação do meu caráter; minha imensa gratidão, respeito e amor.

A minha irmã, por seu apoio, preocupações e carinhos; meu amor fraterno, saudades e boas lembranças.

Ao meu querido Caetano Bocchi Pedroso, pela sua companhia, paciência, pelos inúmeros favores, e pelo seu amor.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela orientação, conhecimentos compartilhados, confiança e dedicação.

À Profa. Dra. Luzmarina Hernandes, pela co-orientação, conhecimentos compartilhados, confiança, e pela parceria no trabalho realizado.

Ao Dr. Heinrich Luftmann do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pelos espectros de massas e auxílio na interpretação.

Ao Dr. Frank Petereit do Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha, por alguns dos espectros de RMN realizados e auxílio na interpretação.

À Dra. Ivânia T. Shunquel pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela gentileza ao me receber no laboratório de farmacognosia da UFPR, e pelo auxílio no desenvolvimento de uma das metodologias realizadas neste trabalho. Agradeço também à Fernanda Venâncio da Silva e Patrícia Rigloski Menezes pela ótima recepção e pela assistência.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas do mestrado, em especial à Gisele Takahashi, Marcia Maluf, Elza Yamaguti, Mônica B. Pessuto, Fátima A. V. Machado, Valéria, Elaine, Daniele Felipe, Ivens Camargo Filho, Fausto, Kelly Ishida, Daniel e Andrea.

À Francisca Helena Mesquita de Carvalho – DFF, pela sua amizade, paciência e carinho ao longo desses anos; e por seu imenso coração...

À Sônia Lemes Batista da Silva – DFF, por sua amizade, compreensão e carinho ao longo desses anos.

À Profa. Msc. Gisleine Elisa Cavalcanti da Silva pela amizade desenvolvida durante o estágio que realizei nos últimos anos da graduação, pelo seu fundamental apoio no momento da minha inscrição do mestrado; muito obrigada pelo incentivo, pela amizade e preocupações.

À Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso & família, pela amizade desenvolvida no estágio ao longo da graduação e no mestrado, pelos conhecimentos compartilhados, por seu respeito, confiança, e pelos tantos e agradáveis momentos em família (caronas e almoços); muito obrigada.

À Profa. Dra. Selma Lucy Franco pela amizade, carinho, conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez pela amizade, pela simpatia de pessoa e pelo seu profissionalismo.

À Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski e ao Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini, pelo exemplo de trabalho e conhecimentos transmitidos.

A todos os colaboradores do DFF, do setor de Toxicologia do DAC, do setor de histologia e fisiologia do DCM, do Orquidário pertencente ao DBI, do restaurante universitário (RU), da Vigilância Patrimonial, do DSM, do Ambulatório; da FEN, vocês são memoráveis!

À Maria Inês, secretária do Programa de Mestrado em Ciência da Computação da UEM, pela sua ajuda nos momentos difíceis.

Ao CAFES: na pessoa de Cleves William Roque e Elisângela Silveira Rocha dos Reis (*in memoriam*) pelos serviços prestados.

Aos amigos de longe e de perto, de longa data ou não, de conversa no portão, de telefone, de e-mail, da universidade: Ademilson Ribeiro de Souza, Alba & família, Alisson José Demengeon (sua família) & sua esposa Daslainy, Anderson Rodrigo de Souza, André Massao Noce, Andréia Cristina Conegero Sanches, Angelita dos Santos Pacheco & família, Camila Turcatel Alves & família, Carlos Aparecido dos Santos, Daiane Felin, Daniel Adriano Schmohl, Denise Davanço Pelegrini, Edilaine Nakamura & família, Eliana & Roberto, Elimara, Fabiana Paula Cappellesso & família, Fabrício Inácio Brandão & família, Francieli Rodrigues Domene e Danieli Rodrigues Domene & família, Francine Ferreira das Neves, Giovana Brito Bertolini, Gisele Strini & André, José Carlos de Melo, Juliana Peña e Luciana Peña, Ketylin Fernanda Migliato, Luiz C. Virmond, Marcos “Maranhão”, Márcio Rocha, Marina Ferreira Ramos, Paulo Henrique Souza Almeida, Renata da Silva, Ricardo Nunes, Rodrigo Alexandre de Souza, Rogério Cattelan, Rosely Ferreira de Moraes & família, Silvia

Karina, Talita G. Barbosa & família, Tamiko & esposo, Valdir & Alzira e família, Vanessa Tagawa; é uma honra tê-los conhecido e meus votos de reencontrá-los...

A todas as pessoas que conheci e convivi (umas mais outras menos) durante a realização do mestrado. Na Farmacognosia: à todos do grupo Mello (em especial: à Ingrid Glalber, Angelita, Isis,) Mariele C. M. N. P., Lara; de outro departamento: DCM Angélica C. M. Marese, Angélica Soares, Isaelle Mari Volpato, Luciana Patrícia Roldi, Luciana Maria Garcia de Souza, Márcia Izumi Sakamoto, Priscila de Freitas.

À Ana Cristina Isler e Fernanda Michely Nicoli; pela convivência, compreensão e amizade.

À uma família de queridos amigos, representada por Salete Dettoni da Rocha e à Antonia Salete Lopes, pela amizade de tantos anos e pelo carinho.

À um jovem casal de amigos, Ângela M. M. S. Marques & Paulo Henrique Marques, e a pequena Esther A. S. M. pelos inúmeros momentos em família, almoços de domingo, pela amizade, carinho, e pelas alegres companhias nas viagens de volta à terrinha nos feriados.

À Raíssa Bocchi Pedroso & família, pela amizade, consideração e apoio durante esta etapa; muito obrigada.

Aos progenitores do clã dos Nazanio, dos Borguezam, dos Gomide, e dos Rocha, além dos tios, e primos... de todos os graus de parentesco; obrigada pela convivência familiar tão rica e tão diversa.

Aos amigos de todas as horas... de diferentes etapas da vida & às suas famílias: Cleber Saes, Helder Marcos Guerreiro, Elyandra Ito, Sueila dos Santos Rocha e Guilherme Minoru Takeda, obrigada pela consideração, e amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro no laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

“O vento é o mesmo: mas sua resposta é diferente, em cada folha” Cecília Meireles

**A senda é longa.
A romagem solícita o esforço
das horas incessantes.
Sigamos improvisando o bem,
por onde, passarmos.
André Luiz**

RESUMO

As cascas de mutamba, *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella* – Sterculiaceae, são utilizadas popularmente para o tratamento de enfermidades gastrintestinais, afecções de pele e contra a queda de cabelos. O controle de qualidade da matéria-prima vegetal coletada no município de Ibiporã, PR, em duas épocas do ano (inverno e verão) seguiu parâmetros farmacopéicos. Na análise fitoquímica preliminar foram evidenciados a presença de taninos, flavonóides e saponinas. A perda por secagem obtida para droga lote inverno (DI) foi de 56,59%, não tendo sido realizada para droga lote verão (DV). A perda por dessecação para a droga realizada após 2, 5, 12 meses ficou abaixo de 13,5%. Os melhores solventes segundo os teores de extrativos foram acetona:água (1:1) para DI (16,56%) e acetona:água (7:3) para DV (10,97%). Segundo o resíduo seco o melhor solvente para extração foi acetona:água (7:3) (0,1683 g e 0,1425 g) para ambos os lotes. No doseamento de flavonóides foram obtidos 0,0044% para DI e 0,0090% para DV. O diâmetro médio das partículas realizado através da tamisação foi calculado para DI (0,373 mm) e DV (0,377 mm). Foram isoladas e identificadas nove substâncias, a partir de um extrato semipurificado: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, 4'-*O*-metil-epiafzelequina (substância inédita), epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina (PB1) (inédita no gênero), epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (PB2), e epicatequina-(4 β →8)-epigalocatequina. Para o estudo da capacidade antioxidante *in vitro* foram realizadas duas técnicas (fosfomolibdênio e DPPH[•]) com extrato bruto e semipurificados. Todos os extratos diferiram significativamente do padrão (vitamina C) na avaliação do complexo fosfomolibdênio. Os valores obtidos no DPPH[•] para a fase acetato de etila foram (IC₅₀): DI= 3,409 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e DV= 3,227 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ambos diferiram significativamente do padrão (vitamina C). Preparou-se uma loção capilar teste com extrato bruto e outra controle para ser empregada na avaliação do crescimento de pêlos em ratos Wistar. A avaliação morfológica (microscópica) realizada através das análises morfométrica e de proliferação celular epitelial não evidenciaram o desenvolvimento do folículo piloso atribuído, popularmente, à mutamba. Na espectroscopia fotoacústica foi demonstrada a permeação da formulação farmacêutica.

Palavras-chave: Antioxidantes, folículo piloso, *Guazuma ulmifolia*, permeação cutânea, Sterculiaceae, taninos condensados.

ABSTRACT

Barks of “mutamba”, *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*, has been popularly used for the treatment of gastrointestinal illness, skin diseases and against hair fall. Quality control of the vegetable drug collected in two different seasons (winter and summer) was followed by pharmacopoeial assays. Phytochemical screening indicated the presence of tannins, flavonoids and saponins. The loss on drying obtained from the fresh winter drug (WD) was 56.59%, for the fresh summer drug (SD) this analyses was not done. Loss on drying obtained from the milled drug (winter and summer) and done after 2, 5, 12 months was below 13.5%. The best results for the solvents according to the determination of extractives was the acetone:water (1:1) for WD (16.56%) and acetone:water (7:3) for SD (10.97%). According to dry residue the best solvent was acetone:water (7:3) for the both drugs (0.1683 g and 0.1425 g). The flavonoids were obtained 0,0044% for WD and 0,0090% for SD. The mean diameter of granulometric analyses assayed was calculated for WD (0.373 mm) and for SD (0.377 mm). There were isolated and identified nine substances from a semipurified extract: catechin, epicatechin, galocatechin, epigallocatechin, 4'-*O*-methyl-epiafzelechin (new substance), epiafzelechin-(4 β →8)-epicatechin, epicatechin-(4 β →8)-catechin (PB1), epicatechin-(4 β →8)-epicatechin (PB2), and epicatechin-(4 β →8)-epigallocatechin. For the *in vitro* antioxidant capacity evaluation, two technics were made (phosphomolibdenum and DPPH \bullet) with crude and semipurified extracts. All extracts were statistically significant by phosphomolibdenum assay against C vitamin as standard. Among all the samples tested in the DPPH \bullet technic, the best results were obtained with the ethyl-acetate phase (IC₅₀: WD= 3,409 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e SD= 3,227 $\mu\text{g ml}^{-1}$), both differed significantly to the standard (C vitamin). A capilar lotion was prepared to be used in a study about hair growing activity in wistar rats. A morphological avaluation (microscopic) were realized through the morphometric and the epithelial celular proliferation analysis, but there were no evidence of the development of the hair follicle attributed, popularly, to “mutamba”. In the photoacoustic spectrometry was demonstrated the permeation of the pharmaceutical formulation.

Keywords: antioxidants, condensed tannins, *Guazuma ulmifolia*, hair follicles, skin permeation, Sterculiaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição natural da mutamba.....	26
Figura 2 – Árvore de mutamba nativa.....	27
Figura 3 A e B – 3A: Folhas, flores e frutos de mutamba. 3B: Tronco de mutamba com parte da casca retirada.....	27
Figura 4 – Sementes de mutamba.....	29
Figura 5 – Desenho esquemático da pele fina.....	40
Figura 6 – Localização de estruturas do folículo piloso em humanos.....	41
Figura 7 – Desenho esquemático de um folículo piloso.....	41
Figura 8 – Ciclo de desenvolvimento dos folículos pilosos.....	43
Figura 9 – Esquema da técnica do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante.....	64
Figura 10 – Esquema do método de DPPH• para avaliação da capacidade antioxidante.....	66
Figura 11 – Arranjo experimental da Espectroscopia Fotoacústica para medidas <i>in vitro</i>	69
Figura 12 – Curvas de retenção e passagem da droga inverno após tamisação.....	77
Figura 13 – Curvas de retenção e passagem da droga verão após tamisação.....	78
Figura 14 – Cromatograma geral das frações obtidas através de CC.....	82
Figura 15 – Espectro de RMN ¹ H da substância I (CDCl ₃ , 300 MHz).....	86
Figura 16 – Espectro de RMN ¹ H da substância I (acetona-d ₆ , 300 MHz).....	87
Figura 17 – Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância I (CDCl ₃ , 300 MHz).....	88
Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H da substância II (CDCl ₃ , 300 MHz).....	91
Figura 19 – Espectro de RMN ¹ H da substância II (acetona-d ₆ , 300 MHz).....	92
Figura 20 – Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância II (acetona-d ₆ , 300 MHz).....	93
Figura 21 – Espectro de RMN ¹³ C das substâncias I e II, respectivamente (acetona-d ₆ , 300 MHz).....	94
Figura 22 – Espectro de RMN ¹ H da substância III (CDCl ₃ , 300 MHz).....	97
Figura 23 – Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância III (CDCl ₃ , 300 MHz).....	98
Figura 24 – Espectro de RMN ¹ H da substância IV (CDCl ₃ , 300 MHz).....	101
Figura 25 – Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância IV (CDCl ₃ , 300 MHz).....	102
Figura 26 – Espectro de RMN ¹³ C das substâncias III e IV, respectivamente (CDCl ₃ , 300 MHz).....	103
Figura 27 – Espectro de RMN ¹ H da substância V (CDCl ₃ , 300 MHz).....	106

Figura 28 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância V (CDCl_3 , 300 MHz).....	107
Figura 29 – Espectro de RMN ^1H da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz)	111
Figura 30 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz).....	112
Figura 31 – Espectro de RMN ^1H da substância VII (CDCl_3 , 300 MHz).....	115
Figura 32 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VII (CDCl_3 , 300 MHz)	116
Figura 33 – Espectro de RMN ^1H da substância VIII (CDCl_3 , 500 MHz).....	119
Figura 34 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VIII (CDCl_3 , 500 MHz).....	120
Figura 35 – Espectro de RMN ^1H da substância IX (CDCl_3 , 300 MHz)	123
Figura 36 – Espectro de RMN ^1H da substância IX (acetona- d_6 , 300 MHz)	124
Figura 37 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância IX (CDCl_3 , 300 MHz).....	125
Figura 38 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância IX (acetona- d_6 , 300 MHz)	126
Figura 39 – Capacidade antioxidante realizada pelo método do fosfomolibdênio.....	127
Figura 40 – Comparação entre valores de CAR realizados pelo método do fosfomolibdênio.	128
Figura 41 – Capacidade antioxidante da vitamina C pelo método do DPPH•	129
Figura 42 – Comparação entre valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) realizados pelo método do DPPH•. 130	
Figura 43 – Proliferação celular em folículos pilosos	133
Figura 44 – Análise morfométrica dos folículos pilosos.....	133
Figura 45 – Espectros de absorção realizados pelo método de espectroscopia fotoacústica. 136	
Figura 46 – Espectros de absorção para pele tratada e controle de 13 dias.....	136
Figura 47 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 7 dias.....	137
Figura 48 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 10 dias.....	137
Figura 49 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 13 dias.....	138
Figura 50 – Valores de área sob o espectro de absorção das amostras tratadas normalizados pelos valores de área das amostras controles.....	138

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Sistemática vegetal da espécie <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	25
Fluxograma 2 – Preparação de extratos a partir das cascas de <i>Guazuma ulmifolia</i> e fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna	80
Fluxograma 3 – Fracionamento químico à partir da FR 13.....	84
Fluxograma 4 – Fracionamento químico à partir da FR 12.....	96
Fluxograma 5 – Fracionamento químico à partir da FR 14.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das alopecias segundo o tempo de aparecimento dos sintomas.	44
Tabela 2 – Classificação das alopecias cicatriciais segundo morfologia clínica.....	45
Tabela 3 – Classificação das alopecias não cicatriciais segundo morfologia clínica.....	45
Tabela 4 – Moduladores endógenos do ciclo de vida do folículo piloso em humanos.	47
Tabela 5 – Moduladores exógenos do ciclo de vida do folículo piloso em humanos.....	48
Tabela 6 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FAE.....	60
Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FR 12.4.....	61
Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FR 13.2.....	62
Tabela 9 – Análise fitoquímica preliminar.	71
Tabela 10 – Determinação da perda por dessecação (PPD).....	73
Tabela 11 – Teor de extrativos para DI e DV, empregando-se solventes em proporção volumétrica.....	74
Tabela 12 – Teor de resíduo seco para DI e DV, empregando-se solventes em proporção volumétrica.....	74
Tabela 13 – Teor de flavonóides das cascas de mutamba nos períodos de inverno e verão. ...	75
Tabela 14 – Teor de taninos nas cascas de mutamba.	76
Tabela 15 – Análise granulométrica da droga inverno.....	76
Tabela 16 – Análise granulométrica da droga verão.	77
Tabela 17 – Apresentação das 29 frações obtidas por CC.	81
Tabela 18 – Dados de RMN ¹ H da substância I (catequina) em CDCl ₃ e acetona- <i>d</i> ₆ (300 MHz).....	85
Tabela 19 – Dados de RMN ¹ H da substância II (epicatequina) em CDCl ₃ e acetona- <i>d</i> ₆ (300 MHz).....	90
Tabela 20 – Dados de RMN ¹ H da substância III (galocatequina) em CDCl ₃ (300 MHz)	96
Tabela 21 – Dados de RMN ¹ H da substância IV – epigalocatequina em CDCl ₃ (300 MHz).	100
Tabela 22 – Dados de RMN ¹ H da substância V - 4'- <i>O</i> -metil-epiafzelequina, em CDCl ₃ (300 MHz).....	105
Tabela 23 – Dados de RMN ¹ H da substância VI (epiafzelequina-(4β→8)–epicatequina) em CDCl ₃ (500 MHz).....	110

Tabela 24 – Dados de RMN ^1H da substância VII , epicatequina-(4 β →8)-catequina (CDCl_3 ; 500 MHz).....	114
Tabela 25 – Dados de RMN ^1H da substância VIII , epicatequina-(4 β →8)-epicatequina ou PB2, em CDCl_3 (500 MHz).....	118
Tabela 26 – Dados de RMN ^1H da substância IX , epicatequina-(4 β →8)-epigallocatequina, em CDCl_3 (300 MHz).....	122
Tabela 27 – Teor de taninos totais %	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

≈	Aproximadamente igual
¹³ C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BV	Balão volumétrico
C ₃ D ₆ O	Acetona deuterada
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DPPH•	2,2 Difetil-1-picrilhidrazil
EB	Extrato bruto
EBM	Extrato bruto de mutamba
EM	Espectrometria de massas
F 1....	Sub-frações obtidas através de CCCAV ou CC
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
FR 1....	Frações obtidas através de CC da FAE
H	altura
HETCOR	Espectroscopia de correlação heteronuclear
LCI	Loção inócua
LCT	Loção teste
m	Multiplete
m/v	massa / volume
mg	miligramas
ml	mililitros

mm	milímetros
Ø	Diâmetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pró ou para análise
RES	Resíduo
s	Singleto
UV	Luz ultravioleta
UV/VIS	Luz ultravioleta / visível
v/v	volume / volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 <i>Guazuma ulmifolia</i>	24
2.1.1 Aspectos botânicos e agronômicos.....	24
2.1.2 Aspectos gerais da árvore e etnofarmacológicos.....	29
2.1.3 Aspectos químicos.....	31
2.1.4 Aspectos farmacológicos, microbiológicos e toxicológicos	31
2.2 Antioxidante	33
2.2.1 Aspectos gerais.....	33
2.2.2 Tipos de ensaio	38
2.3 Histofisiologia da pele e folículos pilosos	39
2.3.1 Caracterização histológica.....	39
2.3.2 Anexos da epiderme – pêlos.....	40
2.3.3 Patologias relativas aos folículos pilosos	44
2.3.4 Moduladores do crescimento capilar.....	45
3 OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Equipamentos.....	51
4.2 Soluções, solventes e reagentes	52
4.3 Coleta do vegetal.....	53
4.4 Identificação do material vegetal	54
4.5 Secagem, moagem e armazenamento.....	54
4.6 Análise fitoquímica preliminar.....	54
4.7 Análise granulométrica da droga vegetal.....	54
4.8 Análises físico-químicas	55
4.8.1 Perda por secagem.....	55
4.8.2 Determinação da perda por dessecação	55
4.8.3 Determinação do teor de extrativos.....	55

4.8.4 Determinação do teor de resíduo seco.....	56
4.9 Análise quantitativa.....	56
4.9.1 Determinação do teor de flavonóides totais	56
4.9.2 Determinação do teor de taninos totais	57
4.10 Extrato bruto de mutamba (EBM)	58
4.11 Isolamento de compostos fenólicos.....	59
4.11.1 Preparação da fase acetato de etila (FAE).....	59
4.11.2 Cromatografia em coluna (CC) da FAE.....	59
4.12 Outros métodos cromatográficos	60
4.12.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	60
4.12.2 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)	61
4.12.3 Cromatografia em coluna das frações FR 12.4 e FR 13.2.....	61
4.12.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	62
4.13 Derivatização.....	63
4.14 Elucidação estrutural	63
4.15 Capacidade antioxidante.....	64
4.15.1 Método do fosfomolibdênio	64
4.15.2 Método do radical DPPH [•]	65
4.16 Desenvolvimento de forma farmacêutica	66
4.17 Estudo do crescimento de pêlos.....	66
4.17.1 Estudo da proliferação celular epitelial nos folículos pilosos	67
4.17.2 Medidas da espessura e do tamanho dos folículos pilosos.....	67
4.18 Análises Estatísticas.....	68
4.19 Estudo de permeação cutânea	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Material vegetal	70
5.2 Análise fitoquímica preliminar.....	70
5.3 Análises físico-químicas – análise da qualidade.....	72
5.4 Análise granulométrica da droga vegetal.....	76
5.5 Produtos intermediários – EB, FAE, FAQ e RES	79
5.6 Isolamento químico.....	80
5.6.1 Substância I - catequina.....	83
5.6.2 Substância II - epicatequina.....	88

5.6.3 Substância III - galocatequina	95
5.6.4 Substância IV – epigalocatequina	98
5.6.5 Substância V - 4'-O-metil-epiafzelequina.....	104
5.6.6 Proantocianidinas diméricas	107
5.6.6.1 Substância VI - epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina	109
5.6.6.2 Substância VII - epicatequina-(4 β →8)-catequina ou PB1.....	112
5.6.6.3 Substância VIII - epicatequina-(4 β →8)-epicatequina ou PB2	116
5.6.6.4 Substância IX - epicatequina-(4 β →8)-epigalocatequina.....	120
5.7 Ensaio antioxidante	126
5.7.1 Método do fosfomolibdênio	127
5.7.2 Método do radical DPPH [•]	128
5.8 Desenvolvimento de forma farmacêutica	131
5.9 Estudo do crescimento de pêlos.....	132
5.10 Estudo de permeação cutânea	134
6 CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS	140
ANEXO A.....	153
ANEXO B.....	155
ANEXO C.....	157

1 INTRODUÇÃO

Desde as mais antigas civilizações, há relatos de que o homem sempre procurou na natureza, cura para os seus males. Os conhecimentos empíricos foram passando de geração em geração, e cada povo tem o seu arsenal de conhecimentos populares no combate às suas enfermidades; muitos anos depois, a era da ciência veio comprovar ou refutar o valor desse conhecimento adquirido em séculos.

Hipócrates (460-377 a.C.) e Claudius Galeno (130-200 d.C.), filósofo e médico-farmacêutico respectivamente, muito contribuíram na evolução da química, farmácia e medicina, e são considerados marcos na história do desenvolvimento das ciências da saúde (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Yunes e Cechinel Filho (2001) fazem um relato histórico da fitoterapia. Eles dividiram a história do desenvolvimento de fármacos a partir de plantas em três períodos, os quais serão brevemente descritos a seguir.

O período compreendido entre 1770 e 1900 foi marcado por grandes nomes da ciência como Lavoisier, considerado o fundador da química moderna. Nesta época, apesar dos recursos limitados, os químicos isolavam e determinavam as estruturas de compostos ativos de plantas conhecidas popularmente e geralmente incorporadas nas farmacopéias da época. As plantas eram de grande importância na área médica. Dessa forma, alguns potentes fármacos foram descobertos, e muitos deles ainda são utilizados, um exemplo é a morfina, isolada em 1806 por Setürner da *Papaver somniferum* L., porém sua fórmula estrutural foi elucidada somente em 1925, por Robinson.

O segundo período, de 1901 a 1970/80, marcado pela revolução industrial que ocorrera no século XIX, foi caracterizado pelo paradigma ocidental da terapêutica: o fármaco é uma molécula pura, geralmente oriunda de síntese, cujo modelo foi a aspirina (AAS). A química avançou a tal ponto que as pesquisas foram direcionadas para a síntese de substâncias. As plantas medicinais foram consideradas sem valor científico, e eram utilizadas por pessoas sem cultura científica. Nesse período a fitoquímica avançou no conhecimento de estruturas dos metabólitos secundários e suas possíveis funções nas plantas, esclarecendo os mecanismos de biossíntese e desenvolvendo uma nova área, a quimiotaxonomia.

O terceiro período (1970/80) que vem até os dias de hoje, teve início devido aos altos custos para a obtenção de novos fármacos, modificando-se o padrão da química medicinal “clássica” (molécula pura obtida por síntese). Diversos fatores contribuíram para isso, tais

como a biologia molecular e as técnicas genéticas, a química combinatória e a computacional. Nesse período renasce o interesse mundial pelas plantas medicinais, além de uma forte intensificação nas pesquisas.

Basicamente, existem três tipos de critérios para a seleção de espécies medicinais para investigação farmacológica: randômico, etnofarmacológico e quiomiotaxonômico (RICHTER et al., 2002).

Hostettmann e colaboradores (2003) utilizaram o esquema proposto por Cragg et al. (1997), que classifica as fontes de agentes terapêuticos em: produtos sintéticos, biológicos, produtos naturais, derivados de produtos naturais e produtos sintéticos modelados a partir de produtos naturais, sendo que os três últimos representam 44% de todas as novas drogas.

O mercado de medicamentos da América do Norte (considerando Canadá e EUA) é de US\$ 187,8 bilhões, já a Europa liderada por cinco países (Alemanha, França, Reino Unido, Itália e Espanha) movimenta US\$ 88,2 bilhões. O Japão (incluindo hospitais) movimenta US\$ 59,0 bilhões e a América Latina (guiada pelo México, Brasil e Argentina) gasta US\$ 13,7 bilhões, destes a parcela do Brasil é de US\$ 5,2 bilhões. Esse total é quase o gasto da Austrália/Nova Zelândia, de US\$ 5,4 bilhões. Esses dados compreendem o período de março de 2004 a março de 2005 (IMS HEALTH, 2005).

A maioria da população, dos países em desenvolvimento, ainda confia nas plantas medicinais para satisfazer suas necessidades em saúde. As plantas medicinais são freqüentemente utilizadas para promoverem serviços primários e atendimento básico em saúde. Ambos para pessoas que moram em regiões de difícil acesso, caracterizadas pelo único serviço em saúde disponível, e para pessoas que vivem em áreas pobres, os quais se mostram como únicos remédios disponíveis. Mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis, o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (WHO, 1998a).

A não regulamentação do setor ou o uso inapropriado das chamadas medicinas e práticas tradicionais, podem ter efeitos negativos e perigosos. Como exemplos: 1) a erva “Ma Huang” (Ephedra) é tradicionalmente utilizada na China para congestão respiratória. Nos Estados Unidos, essa erva foi comercializada como um auxiliar dietético, cuja sobredose conduziu no mínimo a 12 mortes, ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais; 2) na Bélgica, no mínimo 70 pessoas necessitaram de transplante renal ou diálise devido à fibrose intersticial do rim, após tomar uma preparação feita com espécies erradas de plantas que eram utilizadas para o tratamento emagrecedor (BAGOZZI, 2005). Segundo artigos publicados

pelo EMEA (1997, 2000), a planta responsável por este problema renal é do gênero *Aristolochia*.

Plantas medicinais constituem importantes fontes de novos medicamentos para a indústria farmacêutica (WHO, 1998a). O crescente interesse pelo uso, criou a necessidade de uma melhor precisão no preparo e na avaliação, e estimulou a pesquisa em plantas, seus vários usos e aplicações (WHO, 1993). A legislação brasileira que trata dos fitoterápicos é prova do esforço coletivo em prol da otimização de recursos e procedimentos com intuito de garantir à população produtos eficazes, seguros e com qualidade (BRASIL, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância e estimula o uso das plantas medicinais pela população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso através da distribuição de manuais para orientar estudos científicos, que confirmem sua segurança e eficácia clínica (CALIXTO, 2001).

Na China, preparações tradicionais de plantas são estimadas em 30 a 50% do consumo medicinal total. Na Europa, na América do Norte, e em outras regiões industrializadas, mais de 50% da população já utilizou, ao menos uma vez, a chamada medicina alternativa ou complementar. Na Alemanha, 90% da população já utilizou um remédio natural em algum momento de suas vidas. O mercado global de medicamentos a base de plantas ultrapassa 60 bilhões anualmente e está crescendo continuamente. Diz-se que 25% dos medicamentos são feitos de plantas utilizadas primeiramente na medicina tradicional (BAGOZZI, 2004).

Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico e de Produtos para a Promoção da Saúde (ABIFITO), o setor movimentou R\$ 1 bilhão por ano em toda sua cadeia produtiva, conta com 200 empresas associadas e emprega 100 mil pessoas no Brasil. Esses dados foram computados até março de 2002, e foram lembrados em reportagem de abril de 2005. Estima-se que 82% da população brasileira utiliza produtos a base de ervas (ABIFITO, 2002; Jornal do Comércio, 2005). Pennafort (2005) cita, segundo dados do setor, que os medicamentos fitoterápicos movimentam US\$ 400 milhões por ano e que já representam 7% do segmento farmacêutico no Brasil, com perspectivas de aumento nos próximos anos.

Entretanto, a grandeza da biodiversidade brasileira não é exatamente conhecida devido à sua complexidade, e estima-se a existência em mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos (GUERRA; NODARI, 2003). O Brasil é o país com a maior diversidade genética do mundo, e conta com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000–550.000, segundo Guerra e Nodari (2003).

De acordo com Revilla (2001) das 25 mil espécies existentes na Amazônia Brasileira e na Internacional, cerca de cinco mil já estão catalogadas e com suas propriedades conhecidas. Há muito que pesquisar, mas há também muito a se proteger. A preservação de espécies, extração sustentável, cultivo e formas de manejo são pontos fundamentais a se considerar na pesquisa e/ou na produção industrial.

Entre as espécies vegetais da biodiversidade brasileira, uma árvore que se destaca pelo porte, pelo potencial econômico, pela importância que representa no crescimento de diversas outras espécies vegetais, é a *Guazuma ulmifolia* Lam.

Alguns trabalhos realizados com *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*, Sterculiaceae, conhecida por "mutamba(o)" (GALINA, 2003), e o uso popular das cascas do vegetal para diversas situações (CORRÊA, 1974) auxiliam na justificativa deste trabalho.

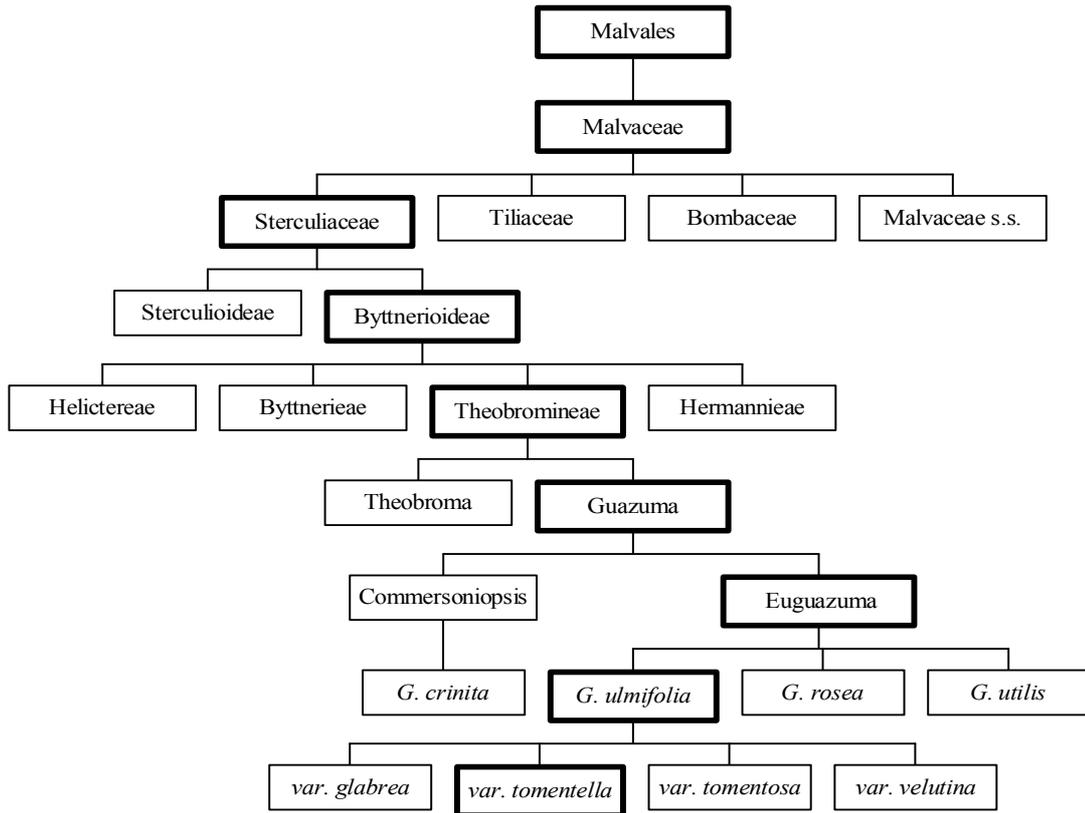
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Guazuma ulmifolia*

2.1.1 Aspectos botânicos e agronômicos

Segundo Judd e colaboradores (1999), uma das principais famílias compreendida pela Ordem Malvales é a Malvaceae. Esta família tem sido dividida em outras quatro: Tiliaceae, Sterculiaceae, Bombacaceae e Malvaceae (propriamente dita). Tradicionais diferenças entre essas famílias são arbitrárias e inconsistentes. Takhtajan (1996) reconheceu duas sub-famílias dentro de Sterculiaceae: Sterculioideae e Byttnerioideae. Barroso e colaboradores (2002) distinguiu tribos e gêneros subordinados a subfamília Byttnerioideae. No Brasil, a família Sterculiaceae possui cerca de 68 gêneros e 1100 espécies. Schumann (1967) classificou e diferenciou os gêneros *Theobroma* e *Guazuma*. Com relação a aspectos morfológicos dos frutos e sementes, as espécies do gênero *Guazuma* foram separadas em dois subgêneros. Foram descritas quatro espécies de *Guazuma* e suas variedades. A sistemática da espécie em estudo é apresentada no Fluxograma 1.

Em relação à economia, Judd e colaboradores (1999) cita plantas da família Malvaceae que são importantes na alimentação: *Theobroma cacao* (chocolate, a partir das sementes), *Cola nitida* (noz de cola) e *C. acuminata* (sementes de cola; a *C. nitida*). Alguns exemplos de plantas ornamentais encontrados na família Malvaceae são: *Hibiscus*, *Malva* e *Dombeya*. Joly (1998) cita as seguintes plantas, dentre outras, que aparecem no Brasil: *Waltheria* (planta baixa dos campos e cerrados), *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu, encontrado na região amazônica, do mesmo gênero do cacão). A *Guazuma* (mutamba) é citada como uma árvore pertencente à região amazônica e do nordeste.



Fluxograma 1 – Sistemática vegetal da espécie *Guazuma ulmifolia* Lam.

Segundo Corrêa (1974) duas plantas são conhecidas como mutamba: *Guazuma crinita* Mart., com localização restrita ao Rio de Janeiro, e a segunda, e mais popular (mais distribuída no Brasil), *Guazuma ulmifolia* Lam. (sinonímia botânica: *Theobroma guazuma* L.). Popularmente a mutamba é conhecida, no Brasil, como embira, embireira, em Marajó; embirú no Rio Grande do Sul; mutamba verdadeira, camaca, no Pará; envireira, mutambo, pau-de-bicho, em Mato Grosso; Guaxima-macho, araticum-bravo, em São Paulo. Sinonímias estrangeiras são: guácimo, na Venezuela, Honduras e El Salvador; guácima, guácima cimarrona, na República Dominicana; guácima de caballo, em Cuba; guacimilla, majaqua de toro, tablote, guazima, no México; chicharrón, em El Salvador; guacimillo, em Nicarágua; guácimo blanco, na Costa Rica; canlote, na Colômbia; Iumanasi, Papayillo, no Peru; coco, na Bolívia; cambaacá, guazuma, na Argentina; bastard-cedar, na Jamaica e Trindade; west indian elm, em Trindade; bois d'orme, na França; bois de hêtre, hêtre gris, em Guadalupe; caulote, na Guatemala. Outras sinonímias segundo Cruz (1979) são: Ibixuma ou Cambá-aça. A distribuição da mutamba na América Latina pode ser vista na Figura 1.

Para Francis (2005), a mutamba cresce em toda extensão das costas do México a partir da latitude 27 °N em direção ao sul. A distribuição continua pela América Central e América

do Sul, entrando pelo norte da Argentina e Paraguai até aproximadamente a latitude 28 °S. A espécie também é encontrada nas Antilhas maiores e menores e é plantada no Hawaii, onde possivelmente tenha se naturalizado. Segundo informações (WINROCK..., 1997), a mutamba tem sido cultivada na Índia por cerca de 100 anos, e foi recentemente introduzida na Indonésia.



Figura 1 – Distribuição natural da mutamba.
Fonte: Francis (2005)

Árvore de tamanho médio com altura de 8–16 metros (até 20 metros), com tronco de 30-50 cm (até 60 cm) de diâmetro, com numerosos ramos e de copa larga, com folhas de configuração oval, brilhantes e recortadas nas margens, tendo flores miúdas e irregulares. O fruto, que é redondo e de cor negra, contém uma substância mucilaginosa e é comestível (CRUZ, 1979; LORENZI, 2000). Um exemplar de mutamba pode ser observado na Figura 2, com aproximadamente 7 m de altura.

Planta semidecídua, heliófita, pioneira, característica das formações secundárias da floresta latifoliada da bacia do Paraná. Sua dispersão é ampla, porém irregular e descontínua, ocorrendo também em outras formações vegetais até altitudes de 800 m. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis. Além dessas informações ecológicas, Lorenzi (2000) descreve informações sobre fenologia, obtenção de sementes e produção de mudas e também contém fotos: da árvore, frutos, sementes e casca. Folhas, flores e frutos; e parte do tronco (com a casca retirada) pode ser visto nas Figuras 3 A e B; outras fotos podem ser vistas em Gentry (2005) e Arboles...(2005a).



Figura 2 – Árvore de mutamba nativa
Foto: João Carlos P. de Mello (2005)



Figura 3 A e B – 3A: Folhas, flores e frutos de mutamba. 3B: Tronco de mutamba com parte da casca retirada.

Fotos: João Carlos P. de Mello (2003)

Em um estudo avaliando a técnica de plantio adensado em sistemas agro-florestais, a *Guazuma ulmifolia* foi classificada como pertencente ao 3º grupo sucessional: formado por espécies de ciclo de vida mais longo, e apresentou excelente poder de germinação e desenvolvimento (ROSÁRIO et al., 2005). Giraldo (2005) revisou o potencial da mutamba como componente de forragem para sistemas silvopastoris, concluindo que ela pode ser

incorporada nesses sistemas, devido a sua produção de biomassa, sua composição química e sua avaliação nutricional preliminar.

Segundo informações da Conabio (2005), descreve-se que a mutamba pode crescer em áreas com altitude de 0 a 1200 (1500) m. Desenvolve-se em temperaturas de 20 a 30 °C, com períodos secos de 4 a 7 meses (2 a 7 meses segundo Francis (2005)) e com precipitação anual de 700 a 1500 (2000) mm. Adapta-se a condições secas ou úmidas e a uma grande série de solos, com pH maior que 5,5. É uma espécie de rápido crescimento especialmente sob as seguintes condições: solos com textura leve, altitude abaixo de 800 m, com precipitações de 900 a 1500 mm, com estação seca marcada. A espécie chega a crescer de 2,4 a 2,9 m/ano. As cinzas da madeira servem para fazer sabão; e o néctar é digno da produção de um mel de alta qualidade

Para Francis (2005) a mutamba é muito intolerante à sombra, a maioria das árvores produzem raízes profundas e abundantes. São exemplos de insetos que produzem efeitos daninhos para a mutamba: *Phelypera distigma* (Curculionidae), *Lirimiris truncala* (Notodontidae), *Hylesia lineata* (Saturniidae) e outros que se alimentam das folhas.

Ngulube (1989) fez um estudo de germinação de sementes de várias plantas incluindo a mutamba. Utilizando seis métodos diferentes de tratamentos aplicados nas sementes e média de 21 dias para a germinação, a *Guazuma ulmifolia* apresentou melhores resultados com dois métodos: escarificação (73%) e água fervente (77%). O aspecto das sementes pode ser visto na Figura 4.

Araújo Neto e colaboradores (1999, 2002) estudaram o desenvolvimento ontogenético de plântulas de *Guazuma ulmifolia* cuja metodologia de germinação de sementes utilizava uma escarificação química com ácido sulfúrico durante 50 min, e as sementes foram colocadas para germinar em meio de cultura, a 30 °C, e 8 h de fotoperíodo. Além disso, eles caracterizaram morfologicamente os frutos, sementes e plântulas de mutamba. Os autores encontraram que as temperaturas ótimas de germinação das sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia*) estão entre 25 e 30 °C, com temperaturas máximas entre 35 e 39 °C, e mínima em torno de 10 °C. Considerando a influência da luz no comportamento germinativo de sementes, recém-colhidas (de frutos maduros), foi constatado que as luzes branca e vermelha têm efeito promotor na germinação. A luz vermelha-extrema e a ausência de luz inibem a germinação das sementes recém-colhidas. Após um ano de armazenamento as sementes mostraram-se insensíveis à luz para germinação.

A germinação é epígea e começa aproximadamente no 8º dia. As sementes secretam uma capa gelatinosa que parecem inibir a germinação. Somente 5% das sementes germinaram

sem tratamento. O tratamento com banho de água fervendo durante 30 s, resultou numa germinação de 87% das sementes. A escarificação e o tratamento com ácido também se mostraram efetivos (FRANCIS, 2005).

Segundo dados publicados por Vieira e Fernandes. (1997), para as sementes de mutamba aplicam-se os seguintes métodos de quebra de dormência: ácido sulfúrico durante 5 min, ou água (90 °C) durante 1 min.

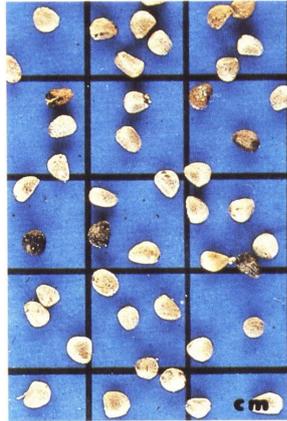


Figura 4 – Sementes de mutamba
Fonte: Lorenzi (2000)

Importante citar algumas espécies parecidas com a mutamba, para evitar confusões na coleta e/ou adulterações. *Trema micrantha* tem folhas muito parecidas, mas são ásperas ao tato; os frutos são drupas pequenas, verdes tornando-se vermelhas ao amadurecer. Também pode confundir-se com *Muntingia calabura*, que tem folhas com base desigual e a parte abaxial (inferior) branco-cinzento, mas suas flores são brancas e os frutos são bagas globosas, verdes, tornando-se vermelhos ao amadurecer (ARBOLES..., 2005b).

2.1.2 Aspectos gerais da árvore e etnofarmacológicos

Segundo Corrêa (1974) a madeira de guazuma é branca, pouco compacta, boa para tanoaria (tonéis), caixotaria e fabrico de coronhas de armas e para produção de pasta celulósica. O líber (a casca) fornece fibras de boa qualidade para cordoaria e mesmo para tecidos, muito resistentes (CRUZ, 1979). O decocto da casca é adstringente e depurativo, utilizado na medicina caseira contra a sífilis e as moléstias da pele. É também usada contra a queda dos cabelos e as afecções parasitárias do couro cabeludo (CORRÊA, 1974).

De acordo com Lorenzi (2000) a madeira também serve para confecção de tonéis e construções internas. O lenho produz ótimo carvão que pode ser transformado em pólvora de

excelente qualidade. Devida a sua bela copa e grande sombra, a árvore também pode ser empregada com sucesso no paisagismo em geral.

Lorenzi (2000) descreve que os frutos de mutamba são muito apreciados por macacos e outros animais. Por essa qualidade e pelo rápido crescimento, é uma planta indispensável nos reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente.

Janzen (1982) fez um estudo com os frutos e sementes de guacimo (mutamba) e observou que cavalos e gado bovino são os principais animais a se alimentarem com os frutos (e sementes) dessa planta, e que antas, cervos, cavalos, gado bovino comem as folhagens quando estas ainda estão pequenas.

Heinrich e colaboradores (1992) realizaram um estudo etnofarmacológico, no qual a raiz de *Guazuma ulmifolia* era usada via oral para o tratamento de diarreias. Ela é utilizada pelos índios em San Juan, Oaxaca, México e também pela comunidade Huastec, e essa planta está descrita na Farmacopéia Mexicana. Segundo critérios bem estabelecidos, a *Guazuma ulmifolia* foi classificada em eficaz nível 2A. De uma escala que vai de zero a três, significa que em adição aos dados etnobotânicos; informações fitoquímicas ou farmacológicas também validaram seu uso pela população local; e que as plantas nessa categoria presumivelmente exercem uma ação fisiológica no paciente, outro critério avaliado foi a frequência de uso e de uma escala de A até C, que vai da mais citada para a menos, percebe-se que a mutamba é muito utilizada pela população local.

Frei e colaboradores (1998) fizeram um estudo etnofarmacológico em Isthmus, Sierra, Oaxaca, México. Segundo as curandeiras da comunidade, chamada de Zapotec, espécies com propriedades adstringentes, como *Psidium* spp., *Juliania adstringens* (sinonímia botânica: *Amphipterygium adstringens*), *Guazuma ulmifolia*, e portanto, com altos níveis de taninos, são consideradas úteis para o tratamento das doenças gastrintestinais. Estas incluem: diarreia, disenteria, cólica, e menos frequentemente citadas: espasmos, gastrites, úlceras, náusea, vômitos, problemas hepáticos. Para esse fim, as curandeiras Zapotec utilizam frutos e sementes de *Guazuma ulmifolia*. As raízes, frutos e sementes de *Guazuma tomentosa* aparecem na lista de plantas utilizadas para febres, incluindo malária.

Domínguez e Alcorn (1985) realizaram um trabalho etnofarmacológico com os maias Huastec do nordeste do México. A casca de *Guazuma ulmifolia* é utilizada para erupções cutâneas, em partos (contrações uterinas), cólicas gastrintestinais, disenterias, feridas e febre. A raiz de *Guazuma ulmifolia* também é utilizada em partos (contrações uterinas), e partes não especificadas do vegetal são utilizadas para asma e imposição espiritual (“doenças mágicas”

e/ou feitiços malignos). De acordo com este estudo, as cascas de mutamba apresentaram baixo efeito na inibição da germinação de sementes de feijões.

A medicina tradicional no Panamá descreve o uso de uma decocção de cascas de guacimo no tratamento de hipertensão (CABALLERO-GEORGE et al., 2002).

2.1.3 Aspectos químicos

Na análise do óleo fixo do extrato hexânico das folhas de mutamba, Arriaga e colaboradores (1996) encontraram 24 constituintes; dentre eles: o ácido palmítico (26,51%), ácido linoléico (19,05%), heptatriacontano (12,88%), ácido oléico (12,35%), ácido esteárico (7,59%), nonacosano (4,13%), ácido araquídico (3,55%) e ácido mirístico (2,14%).

Domínguez e Alcorn (1985) fizeram uma triagem fitoquímica que resultou na presença de taninos e na suspeita da presença de flavonóides, enquanto Heinrich et al. (1992) determinaram que as folhas e cascas são ricas em taninos.

Hör e colaboradores (1996) avaliaram o extrato hidroalcoólico das cascas de mutamba, de onde foram isolados polissacarídeos e proantocianidinas oligoméricas. Os autores, isolaram, a partir do extrato bruto etanólico, as proantocianidinas responsáveis por inativar a toxina do cólera: epicatequina, procianidina B2, procianidina B5, procianidina C1, epicatequina-(4 β →6)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →6)-epicatequina, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina. A média do grau de polimerização das substâncias ativas variou entre 14,4 a 32,0. Os polímeros consistiram basicamente de unidades de epicatequina. Nos polímeros predominaram entre as unidades de flavanóis as ligações do tipo (4→8), e menos freqüentemente as do tipo (4→6).

Galina e colaboradores (2005) determinaram alguns dados de controle de qualidade para a droga vegetal *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*. Além disso, Galina (2003) isolou e identificou 3 substâncias fenólicas: epicatequina (flavan-3-ol), e dois dímeros de taninos condensados: procianidina B2 e epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina.

2.1.4 Aspectos farmacológicos, microbiológicos e toxicológicos

Caballero-George e colaboradores (2002) realizaram um estudo *in vitro* de inibição da ligação da angiotensina II-[³H] com o receptor humano AT1, causado pelas proantocianidinas

das cascas de *Guazuma ulmifolia*. Foi observado que há uma correlação entre a atividade e o decréscimo de polimerização das proantocianidinas. A substituição de ligantes específicos do receptor AT1 por componentes da casca de mutamba pode explicar o uso tradicional de seu decocto para o tratamento de hipertensão, apesar da falta de elucidação sobre o metabolismo pela flora intestinal e a absorção após o uso oral das proantocianidinas.

Alarcon-Aguilara e colaboradores (1998) estudaram o efeito anti-hiperglicêmico de várias plantas usadas como antidiabéticas, em coelhos machos. Um decocto das folhas de mutamba foi preparado causando uma diminuição significativa no pico hiperglicêmico (22,2%) e na área sob a curva (21,3%) durante o GTT, em relação ao controle ($p < 0,05$). Desse modo a mutamba poderia ser útil no tratamento da diabetes mellitus.

Hör e colaboradores (1996) apresentaram uma evidência direta da interação específica de polifenóis com a subunidade A da toxina da cólera. Outras toxinas bacterianas têm estruturas e modo de ação parecida com a toxina colérica e também causam diarreias. Essas toxinas podem ser inibidas por certos taninos e talvez isso explicaria o uso freqüente das cascas de mutamba e outras drogas que contém taninos em sistemas de uso indígena e medicina popular.

Sousa e Rouquayrol (1974) realizaram um estudo sobre a atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro e encontraram, para extratos aquosos e extratos alcoólicos de caules de *Guazuma ulmifolia*, fraca atividade moluscicida (apenas nos extratos de alta concentração a 10.000 ou 1.000 ppm).

Navarro e colaboradores (1996) fizeram um extrato metanólico dos frutos de *Guazuma ulmifolia* e testaram contra quatro microorganismos. Houve atividade significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e baixa atividade contra *Candida albicans*, de acordo com alguns critérios adotados pelos autores.

Camporese e colaboradores (2003) demonstraram que cascas de mutamba possuem atividade antibacteriana. O extrato hexânico reduziu o crescimento de *Escherichia coli*, enquanto uma inibição de *Pseudomonas aeruginosa* foi obtida com o extrato metanólico. Em outro estudo antimicrobiano realizado por Cáceres e colaboradores (1987), feito com tintura das folhas de mutamba, a qual mostrou-se efetiva contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no primeiro teste, e *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* no segundo teste. Posteriormente o extrato macerado etanólico (50%) das folhas de mutamba demonstrou inibição intermediária contra *Salmonella typhi* e inibição positiva contra *Shigella dysenteriae* (CÁCERES et al., 1990).

Uma série de estudos foi realizada por Cáceres e colaboradores (1993a, 1993b, 1995) nos quais a *Guazuma ulmifolia* era uma das muitas plantas estudadas. Os extratos (metanólico, acetônico e *n*-hexânico) de folhas de *Guazuma ulmifolia* tiveram fraca ou baixa inibição frente a bactérias enteropatogênicas, e contra bactérias Gram-positivas responsáveis por infecções do trato respiratório. Uma tintura preparada com as cascas de mutamba teve atividade inibitória intermediária contra *Neisseria gonorrhoeae*.

Alves e colaboradores (2000) realizaram uma triagem biológica com diversas plantas medicinais brasileiras, nas quais um extrato metanólico das cascas de *Guazuma ulmifolia* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Galina (2003) realizou testes para atividade antibacteriana de extratos bruto e semi-purificado das cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam, var. *tomentella* e observou que o extrato aquoso mostrou a melhor atividade bacteriostática frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Para a atividade bactericida a mutamba foi eficaz apenas frente às bactérias Gram-positivas, sendo o extrato bruto com melhor atividade frente à *S. aureus*.

Em um estudo realizado com as folhas de *Guazuma ulmifolia*, foi encontrada uma atividade citotóxica representada por 97,3% de inibição do crescimento em células KB (NASCIMENTO et al., 1990).

2.2 Antioxidante

2.2.1 Aspectos gerais

Oxidação de um substrato orgânico pode ser definida de três formas: 1) através da adição de um oxigênio, 2) através da remoção de um hidrogênio, 3) ou através da remoção de elétrons, do substrato (DONOHOE, 2000). Para Pietta (2000), oxidação é a transferência (retirada) de elétron(s) de um átomo (molécula ou íon) para outro e representa importante parte do metabolismo aeróbico. Resumidamente, agentes oxidantes são aqueles que retiram elétron(s).

O oxigênio é o último aceptor de elétrons no sistema de fluxo de elétrons na produção de energia na forma de ATP (STRYER, 1990), mais especificamente na etapa da fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias. O metabolismo oxidativo é essencial para a sobrevivência das células, embora exista a contínua formação de radicais livres e outras

espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam mudanças oxidativas (ANTOLOVICH et al., 2002).

ERO são intermediários da redução parcial do oxigênio, os produtos finais seriam H_2O e CO_2 . As ERO são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (HO^{\bullet}), o radical peroxil (ROO^{\bullet}), e o oxigênio singlete (1O_2), os dois últimos são os responsáveis pela lipoperoxidação (WILHELM FILHO et al., 2001). Pietta (2000) cita também o radical alcóxil (RO^{\bullet}) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). Wilhelm Filho et al. (2001) citaram outros autores responsáveis por difundirem o termo: espécies reativas de nitrogênio (ERN), grupo formado por: monóxido de nitrogênio ou óxido nítrico (NO), e que quando combinado com o $O_2^{\bullet-}$, forma o peroxinitrito ($ONOO^-$). Radicais livres são aqueles que possuem elétron(s) desemparelhado(s), ou seja são ávidos por elétrons; mas nem todas as ERO são radicais, portanto o termo ERO é mais abrangente.

As ERO estão envolvidas numa série de eventos *in vivo*, algumas são positivas, como a produção de energia (mitocôndrias), a fagocitose (em processos inflamatórios), a regulação do crescimento celular, a sinalização intercelular, e a síntese de compostos biológicos importantes (HALLIWELL, 1997). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem estimular a formação de GMPc (uma espécie de segundo mensageiro). O óxido nítrico (NO), por sua vez, controla o relaxamento da musculatura lisa vascular e a inibição da adesão plaquetária. Outro papel fisiológico dos radicais livres ou seus derivados inclui a percepção da tensão de oxigênio, e a regulação das funções que são controladas por essa tensão (ex: produção de eritropoetina) (BELLÓ-KLEIN, 2002).

Segundo Pietta (2000) as ERO em excesso podem ser muito prejudiciais pois podem atacar os lipídios das membranas celulares, causando danos à membrana, as proteínas dos tecidos, as enzimas, os carboidratos (causando danos teciduais); e o DNA alterando-o; todos através da indução de oxidações. A ativação do metabolismo do ácido araquidônico e a fagocitose excessiva, que ocorrem em inflamações crônicas, também são processos geradores de ERO (fontes endógenas) (SOUSSOLIER; BERTHON, 1988; JAY et al., 1998). Os mecanismos da oxidação em lipídios podem ocorrer de diversas maneiras: foto-oxidação, auto-oxidação, e oxidação enzimática (SILVA et al., 1999). Fennema (1976), Llesuy (2002) e Antolovich e colaboradores (2002) são alguns dos autores que citaram os mecanismos de auto-oxidação dos lipídios e são classicamente divididas em iniciação (formação dos radicais livres), propagação (reação em cadeia dos radicais livres) e terminação (formação de produtos não radicais ou estáveis).

Para Belló-Klein (2002) há três formas do organismo reagir ao estresse oxidativo: a) adaptação, através do aumento na atividade dos sistemas antioxidantes, que podem proteger a célula contra danos oxidativos futuros; b) dano tecidual através da agressão feita aos lipídios, proteínas e carboidratos; c) morte celular, através da apoptose ou necrose.

Se o processo de respiração produz ERO constantemente, então são necessários mecanismos de proteção a esse processo. Para Belló-Klein (2002) faz um balanço entre as ERO e o consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e as defesas orgânicas e seus mecanismos de reparo (ANTOLOVICH et al., 2002). Quando o balanço ERO x defesas/reparo for afetado o organismo reage da forma citada no parágrafo anterior.

Essas alterações têm sido atribuídas como causadoras ou desencadeantes do envelhecimento e de muitas doenças degenerativas, tais como: doenças do coração, aterosclerose, diabetes, cataratas, disfunções cognitivas, injúria de isquemia-reperfusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, enfisema e câncer (PIETTA, 2000; BELLÓ-KLEIN, 2002).

Fontes exógenas de radicais livres são radiação ultravioleta (em especial o UVA), que reage com fotossensibilizadores e com cromóforos da pele como a melanina; fatores ambientais (pesticidas, poluição, fumaça do cigarro), radiação ionizante, medicamentos antitumorais e estilos de vida não saudáveis (SOUSSOLIER; BERTHON, 1988; HALLIWELL, 1994; JAY et al., 1998).

Dessa forma é necessário conhecer o que se opõe aos agentes oxidantes. Os antioxidantes 'ideais' são aqueles que: 1) não causam efeitos fisiológicos prejudiciais; 2) não contribuem com o odor, sabor ou cor desagradável onde forem utilizados; 3) são efetivos em baixas concentrações; 4) são solúveis; 5) permaneçam no meio para que possam efetivamente proteger o sistema em que estiverem presentes; 6) são prontamente disponíveis e, 7) são econômicos (FENNEMA, 1976). Os antioxidantes devem inibir ou retardar a oxidação do substrato e são classificados em dois tipos: primários ou antioxidantes que quebram a cadeia de reação (inibem e/ou retardam a oxidação) e, os secundários ou antioxidantes preventivos são aqueles que retardam a taxa de oxidação (FENNEMA, 1976; HASLAM, 1996; JADHAV, 1996 apud ANTOLOVICH et al., 2002; FUKUMOTO; MAZZA, 2000; LLESUY, 2002).

Os sistemas de proteção podem ser endógenos (produzidos pelo organismo) ou exógenos (obtidos da dieta). Os endógenos incluem dois tipos: a) defesas enzimáticas, como as *Se*-glutathion peroxidase, catalase, e superóxido dismutase, as quais metabolizam

superóxido, peróxido de hidrogênio, e peróxidos lipídicos, prevenindo a formação da maioria dos HO• tóxicos e, b) defesas não enzimáticas, como as glutatonas, peptídios-histidina, as proteínas ligantes de ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipóico, CoQ₁₀ reduzida (ubiquinol 10 ou coenzima Q₁₀), melatonina, urato (ácido úrico), e tíóis proteínas plasmáticas (albuminas séricas), sendo que as duas últimas são consideradas as maiores responsáveis pela ação protetora desempenhada pelo plasma. Essas defesas são complementares porque agem contra diferentes espécies de agentes oxidantes em diversos compartimentos celulares (PIETTA, 2000; ANTOLOVICH et al., 2002; LLESUY, 2002; HIRATA, 2004)

Como nenhum sistema de defesa é perfeito, o organismo tem um sistema de antioxidantes de reparo dos danos causados pelas ERO. Esse sistema é composto por: proteases, lipases, transferases e enzimas de reparo do DNA (PIETTA, 2000; LLESUY, 2002; HIRATA, 2004).

Fontes de proteção exógenas, ou seja, antioxidantes advindos da dieta são: vitaminas C, E, A, carotenóides e licopeno (PIETTA, 2000; WILHELM FILHO et al., 2001). Outras substâncias presentes em frutas, verduras, vegetais, sementes, flores e folhas, como p.ex.: chá-verde, vinho tinto, maçã, uva, brócolis, cebola, crategos, cação, pêssego entre outros, podem ser consideradas como protetoras, como a classe de polifenóis que incluem: fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e lignanas. Entre a classe de flavonóides, as de maior interesse são: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavanóis, flavan-3-óis e antocianidinas, biflavonas, chalconas, auronas e cumarinas. Taninos hidrolisáveis, proantocianidinas ou taninos condensados (oligômeros de flavan-3-óis), cafeatos ou ácido caféico, e lignanas são classificados separadamente. (PIETTA, 2000; WILHELM FILHO et al., 2001; HERRMANN, 2002; SALVADOR et al., 2002).

Geralmente as pessoas que praticam uma alimentação variada e abundante em frutas e vegetais têm um estilo de vida mais saudável, e isto pode ser um fator importante na sua resistência contra doenças crônicas (PIETTA, 2000). Entretanto, diversos estudos epidemiológicos tentam provar a relação inversa existente entre dieta x aparecimento de doenças.

O mecanismo de ação antioxidante dos fenóis e polifenóis das plantas conhecido é a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e as lipoxigenases *in vitro* (HASLAM, 1996). Estudos têm demonstrado sua habilidade em capturar radicais como hidroxil, superóxido e peroxil, importantes em estados celulares pró-oxidantes.

Têm-se demonstrado que os flavonóides possuem efeitos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, porém não possuem seu mecanismo de efeito protetor bem conhecido.

Esses estudos contribuíram para um aumento exagerado no consumo de plantas contendo flavonóides, bem como suplementos alimentares que possuam essas substâncias. O consumo médio de flavonóides, normalmente, e por diversas fontes, situa-se entre 500 – 1000 mg/dia (SILVA et al., 2002). Pietta (2000) considera o consumo entre 50–800 mg/dia dependendo do consumo de vegetais e frutas, e de bebidas específicas como o chá, vinho tinto e cerveja não filtrada.

A vitamina C é conhecida por sua ação antioxidante *in vivo*, ela regenera a vitamina E das membranas e lipoproteínas. Todavia, paradoxalmente, *in vitro*, a vitamina C também é capaz de uma atividade pró-oxidante, ou seja, gerar radicais livres. É sabido, por exemplo, que a combinação de ascorbato e íons ferro geram radicais hidroxil, os quais podem induzir a peroxidação lipídica (HASLAM, 1996).

Haslam (1996) alerta que assim como a vitamina C em algumas circunstâncias mostra características pró-oxidantes, os polifenóis também poderiam ter essa ação, porque é sabido que eles são capazes de reagir com íons ferro na presença de peróxido de hidrogênio e formar ERO, as quais poderiam subseqüentemente danificar outras moléculas biológicas.

Grande número dos flavonóides remove eficientemente traços de metais (quelantes), os quais têm uma importante função no metabolismo do oxigênio. Ferro livre e cobre são potentes intensificadores da formação das ERO, entretanto, deve ser lembrado que esses metais são essenciais para muitas das funções fisiológicas. São constituintes das hemoproteínas e cofatores de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na defesa antioxidante (ferro na catalase, cobre na ceruloplasmina e cobre-zinco-superóxido dismutase) (PIETTA, 2000).

Se *in vivo* os lipídios podem ser atacados pelas ERO, eles também são vulneráveis ao seu ataque na natureza, esse fenômeno é espontâneo, e é chamado de (per)oxidação lipídica. Têm implicação direta no valor comercial dos ácidos graxos e de todos os produtos que são formulados a partir deles, tais como: alimentos, cosméticos e medicamentos, através da redução do tempo de prateleira ou vida útil (SILVA et al., 1999). Nos alimentos a peroxidação lipídica causa perda de qualidade, especificamente em relação às propriedades organolépticas (sabor, cor, textura), alterando-os quimicamente e resultando em rancidez e/ou deterioração das propriedades nutricionais e perda da própria segurança alimentar (SILVA et al., 1999; FUKUMOTO; MAZZA, 2000; ANTOLOVICH et al., 2002).

Recentemente, houve expansão do interesse por antioxidantes que fossem naturalmente encontrados e que pudessem substituir os sintéticos utilizados em alimentos e

para provável uso *in vivo*. Fontes potenciais desses antioxidantes são as plantas que possuem polifenóis com ação primária (quebra da cadeia) (FUKUMOTO; MAZZA, 2000).

2.2.2 Tipos de ensaio

A atividade antioxidante não pode ser medida diretamente, mas mais exatamente pelos efeitos do antioxidante em controlar a extensão da oxidação. Existe uma grande variedade de métodos, alguns deles envolvem uma etapa de oxidação distinta seguida de medida dos resultados ou conseqüências (ANTOLOVICH et al., 2002).

Os critérios de uma oxidação são o substrato, o oxidante, o iniciador, o intermediário e os produtos finais, e a medida de qualquer um deles pode ser usada para taxar a atividade antioxidante. Deve-se sempre considerar a fonte de ERO e o substrato alvo, quando se estuda a atividade antioxidante (ANTOLOVICH et al., 2002).

O uso de uma série de medidas da atividade está se tornando um padrão nos estudos publicados. A maioria dos métodos é baseada em medidas que podem ser diretas ou indiretas da taxa ou extensão de: a) diminuição do substrato ou da substância teste ou do consumo de oxigênio; b) formação de produtos da oxidação; c) formação ou queda dos radicais livres em teste. Uma relação dos métodos mais comuns utilizados, bem como da substância teste e unidades de medida é dada por Antolovich e colaboradores (2002).

- 1) testes de estabilidade acelerada (utilizados em alimentos);
- 2) valor de peróxido;
- 3) conjugação de dienos;
- 4) espécies reativas ao ácido tio-barbitúrico (TBARS);
- 5) medidas do hexanal e produtos finais relacionados;
- 6) medidas dos radicais livres,
 - 6.1) espectrometria de ressonância do spin do elétron
 - 6.2) ensaio do ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfônico)
 - 6.3) Ensaio do DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
- 7) outras medidas
 - 7.1) Teste do poder antioxidante férrico redutor (FRAP)
 - 7.2) teste da ficoeritrina
 - 7.3) ensaios armadilha ou parâmetro antioxidante de remoção total radicalar (TRAP)

2.3 Histofisiologia da pele e folículos pilosos

2.3.1 Caracterização histológica

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa 16 % do peso corporal. A pele adulta normal consiste de duas camadas: (1) um epitélio superficial (epiderme), estratificado queratinizado, avascular, que repousa sobre uma lâmina basal, que o separa da derme, e (2) a derme, que é uma camada de tecido conjuntivo, rica em colágeno, e provê suporte e nutrição ao epitélio, sendo observados apêndices da pele, pelos e glândulas. Eles derivam do epitélio e se ligam a ele, mas se projetam profundamente na derme. As células mais abundantes do epitélio são os queratinócitos. A epiderme apresenta ainda outros três tipos de células: os melanócitos (que produzem melanina), as células de Langerhans (células apresentadoras de antígeno), e as células de Merkel, que são mecanoreceptoras (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A hipoderme, constituída por tecido conjuntivo frouxo, contém quantidades variáveis de gordura, não faz parte da pele, servindo de suporte e união da pele com os órgãos subjacentes. A textura e a espessura da pele variam nas diferentes regiões do corpo. Em sua maior parte, a epiderme varia de 0,07 a 0,12 mm, com espessamentos localizados nas palmas das mãos e na sola dos pés (cuja espessura pode variar entre 0,8 a 1,4 mm) (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Um desenho esquemático da pele e de suas estruturas pode ser visto na Figura 5.

A pele tem importantes funções: a) proteção: tecidos moles subjacentes, protege contra lesões, invasão bacteriana, dessecação e atrito, contra os raios ultravioletas através da melanina; b) termorregulação e excreção: através dos seus vasos, tecido adiposo e glândulas (sudorese); c) recepção: de sensações contínuas do meio ambiente (tato, temperatura e dor) através de suas terminações nervosas; d) absorção de certa quantidade de radiação ultravioleta (UV) solar para a síntese de vitamina D (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além disso, o seu aspecto pode auxiliar no diagnóstico de determinadas patologias.

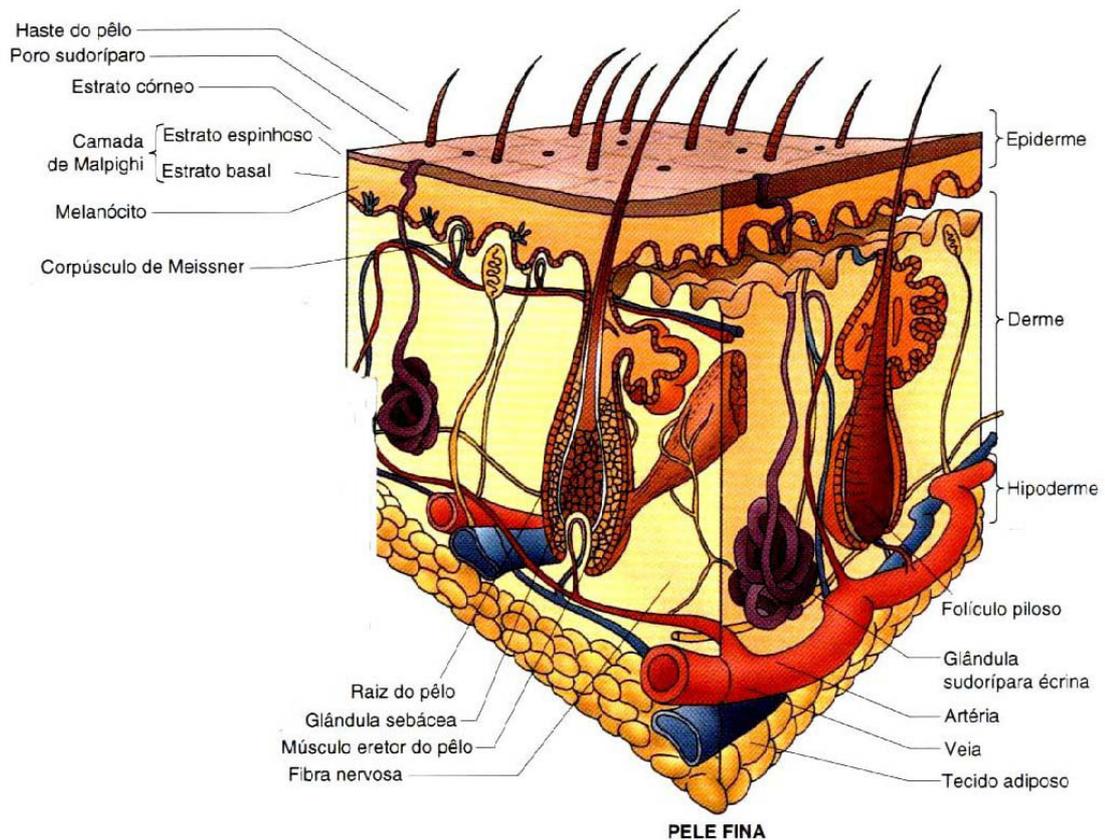


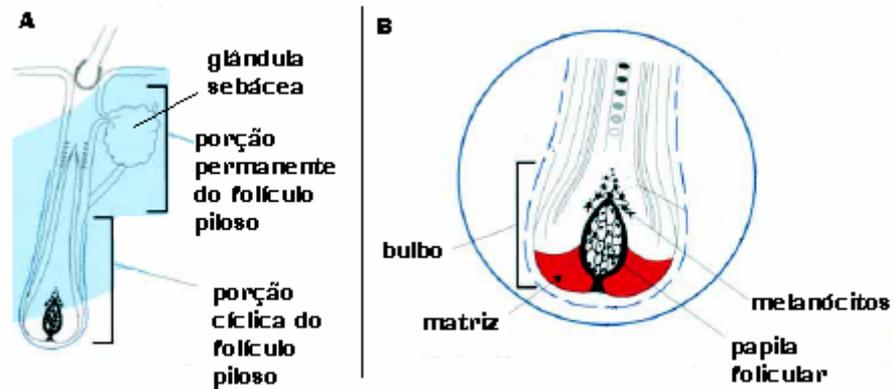
Figura 5 – Desenho esquemático da pele fina.
Fonte: Gartner; Hiatt (2003)

2.3.2 Anexos da epiderme – pêlos

Os pêlos, unhas, glândulas sudoríferas e sebáceas são estruturas anexas da pele. Os pêlos são estruturas delgadas e queratinizadas, que se desenvolvem a partir de uma invaginação da epiderme (folículo piloso) (Figura 7). A cor, tamanho e disposição dos pêlos variam de acordo com a raça e a região do corpo. Eles estão presentes praticamente em toda superfície corporal, com exceção de algumas regiões bem delimitadas (GARTNER; HIATT, 2003). Os pêlos desempenham as funções de proteção do meio através da dispersão dos produtos das glândulas sudoríferas e sebáceas (PAUS; COTSARELIS, 1999; DE MIGUEL, 2005).

Os folículos pilosos variam consideravelmente no tamanho e forma, dependendo da sua localização, mas eles apresentam a mesma estrutura básica (PAUS; COTSARELIS, 1999). Na fase de crescimento, um folículo piloso apresenta-se como uma dilatação terminal, o bulbo piloso, em cujo centro se observa a papila dérmica que é composta de tecido conjuntivo com fibroblastos especializados, que acredita-se controla o número de células da

matriz e desta forma o tamanho do pêlo. As células (da matriz) que recobrem a papila dérmica formam a raiz, de onde emerge o eixo do pêlo (Figura 6) (PAUS; COTSARELIS, 1999).



Fase anágena: figura B detalhe da parte final da figura A.

Figura 6 – Localização de estruturas do folículo piloso em humanos.

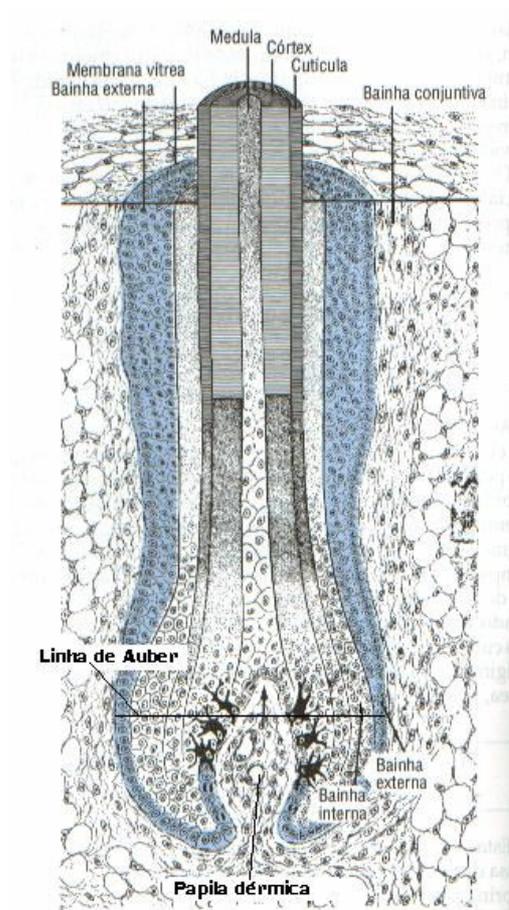


Figura 7 – Desenho esquemático de um folículo piloso.

Adaptado de: Junqueira; Carneiro (2004)

Na fase de crescimento, as células da matriz se multiplicam e diferenciam-se (queratinização) em vários tipos celulares, que darão origem ao pêlo propriamente dito com

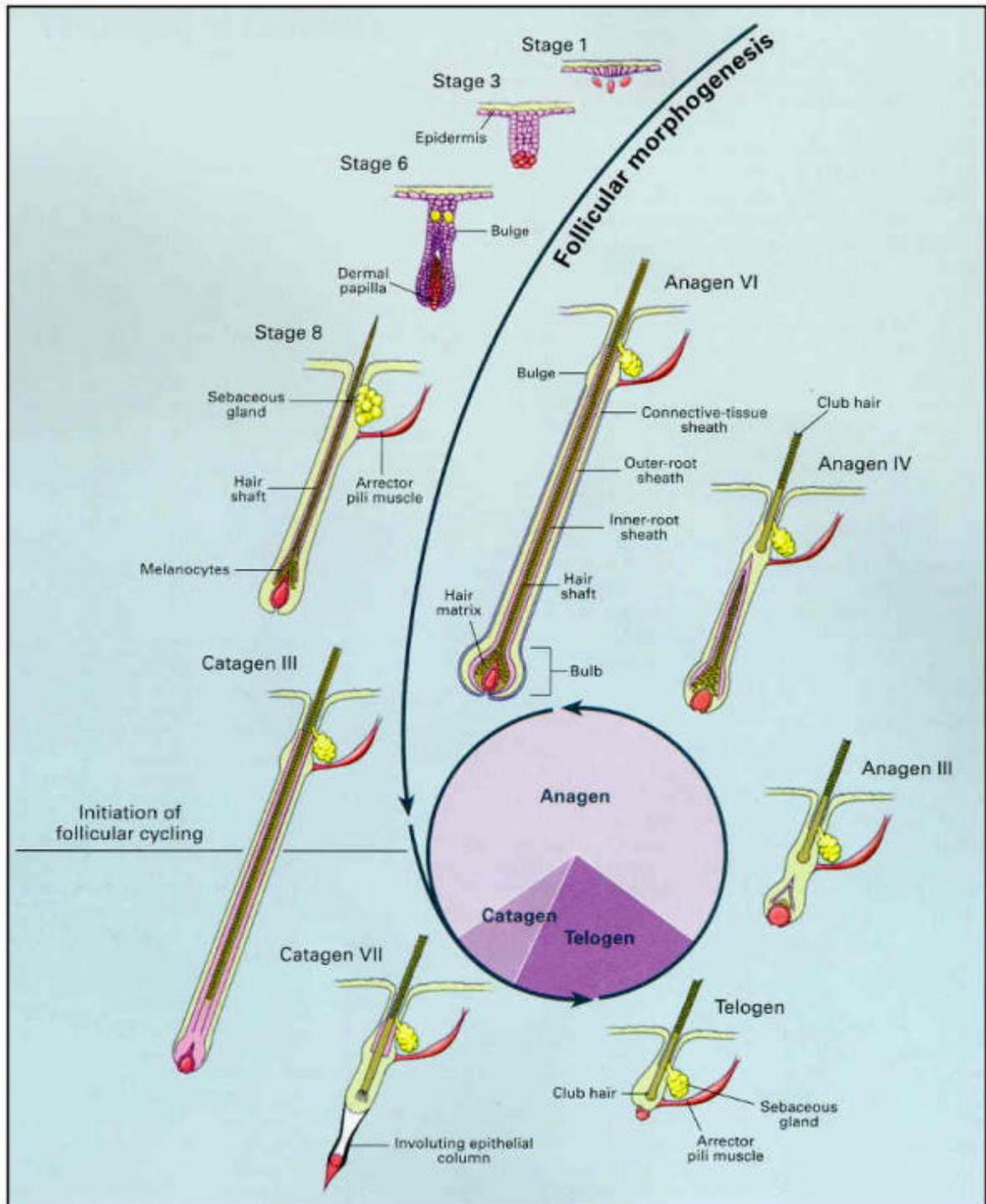
as suas camadas: medula, córtex e cutícula. À medida, em que elas se diferenciam, movem-se para cima, são comprimidas e afuniladas em sua forma final, cujas dimensões e curvatura determinam a forma do pêlo (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; PAUS; COTSARELIS, 1999).

Finalmente, as células epiteliais mais periféricas do folículo originam duas bainhas epiteliais (uma interna e outra externa) que envolvem o eixo do pêlo na sua porção inicial. A bainha externa continua com a epiderme, enquanto a interna desaparece na altura da região onde desembocam as glândulas sebáceas no folículo. Uma membrana basal bem desenvolvida, a membrana vítrea, separa o folículo do tecido conjuntivo envolvente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O pigmento da haste do pêlo é produzido por melanócitos localizados entre as células da matriz.

Os folículos pilosos sofrem transformações cíclicas que vão de fases de crescimento ativo, rápida proliferação dos queratinócitos foliculares e alongamento e espessamento da haste do pelo (fase anagênica), seguida por uma fase de regressão dirigida via apoptose (fase catagênica), até relativa quiescência ou repouso (fase telogênica) (DRY, 1926; ROH et al., 2002). Conforme as três fases do ciclo fisiológico do pêlo, 90% destes estão na fase anagênica (de crescimento), com um crescimento médio de 0,3 mm/dia. A duração dessa fase é diferente em cada zona da superfície cutânea, e isso é o que determina o tamanho dos pêlos. Os folículos do couro cabeludo ficam na fase anagênica durante dois até oito anos, com aumento do comprimento capilar. Nas sobrancelhas, este processo dura de dois a três meses, resultando num pêlo curto. A fase catagênica (transição) é uma fase curta (duas a três semanas), em que as células da matriz do pêlo param de se dividir e eventualmente se queratinizam. Portanto, os pêlos cessam seu crescimento, e supõe-se que 1 % dos cabelos esteja nessa fase. A fase telogênica (queda), dura aproximadamente três meses, e 9 % dos cabelos estão nessa fase, o pêlo cai e uma nova matriz é gradualmente formada a partir de células tronco da camada basal da bainha epitelial externa. O novo pêlo começa a crescer e o folículo está de volta na fase anagênica (Figura 8) (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; DE MIGUEL, 2005).

Em pequenos roedores tais como camundongos e ratos, os ciclos de crescimento de pelagem ocorrem várias vezes ao ano, e são influenciados pelos ciclos sazonais relacionados à duração do dia e à atividade endócrina (HARDY, 1992). Humanos têm um modelo mais variado, enquanto em muitos animais essa atividade segue um modelo simétrico (WILKINSON; MOORE, 1990). Nos ratos, a reposição dos pêlos começa no ventre, e as faixas de atividade e mudança progridem dos lados para o dorso, para estender-se para as regiões da cabeça e do rabo. Por contraste, em humanos, no couro cabeludo cada um dos

fóliculos parece ser independente de seus vizinhos. O crescimento do pêlo em ratos pode ser de mais de 1 mm em 24 horas.



Os números romanos indicam substádios morfológicos da fase anágena e catágena; o gráfico de pizza mostra a proporção de tempo que o folículo piloso passa em cada estágio.

Figura 8 – Ciclo de desenvolvimento dos folículos pilosos.

Fonte: Paus; Cotsarelis (1999)

2.3.3 Patologias relativas aos folículos pilosos

Nas últimas décadas a importância psicológica e social do pêlo foi descrita por diversos autores (WILKINSON; MOORE, 1990; PAUS; COTSARELIS, 1999). Contudo Wilkinson e Moore (1990) preocuparam-se em relatar a evolução do ser humano ao longo da história e as mudanças consideráveis no padrão de pelagem, enquanto Paus e Cotsarelis, (1999) referem-se ao surgimento de uma indústria multibilionária em função da demanda por drogas que estimulem o crescimento capilar.

A queda dos cabelos é um fenômeno fisiológico e somente é considerado patológico (alopécia) quando for excessiva ou quando seguir um padrão anormal (WILKINSON; MOORE, 1990).

As alopecias foram classificadas em dois tipos de acordo com o tempo de aparecimento dos sintomas (WILKINSON; MOORE, 1990) e de acordo com a morfologia clínica (DE MIGUEL, 2005).

A perda de pêlos pode ser rápida ou gradual (WILKINSON; MOORE; 1990). Trocas súbitas de cabelo são freqüentes e passageiras, mas a perda gradual, observada pelo efeito à longo prazo, geralmente é crônica e irreversível como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das alopecias segundo o tempo de aparecimento dos sintomas.

Perda rápida	Eflúvio telógeno (cai a haste do pêlo)	Parto (alopécia pós-parto); Alopecia pós febril; Associado a hipo ou hipertireoidismo; deficiência de ferro; ingestão de anfetaminas; mais de 50% dos casos sem causa definida.
	Eflúvio anágeno (um pêlo em crescimento mudado procedente de um folículo ativo)	Após uso de fármacos citotóxicos; a alopecia aerata (por regiões), parece ocorrer de forma similar.
Perda gradual	Calvície segundo um padrão simétrico	Alopecie masculina ou androgenética
		Alopecias difusas, maioria em mulheres, equivalente a do homem, hereditária (fator androgenético).

Adaptado de: Wilkinson; Moore (1990)

Em relação à classificação morfológica, as alopecias foram divididas em: cicatriciais e não cicatriciais (DE MIGUEL, 2005). Basicamente as alopecias cicatriciais são resultado de mal-formação, lesão ou destruição dos folículos pilo-sebáceos, que são substituídos por tecido

cicatricial, sendo um problema irreversível (Tabela 2). As alopecias não cicatriciais formam um grupo complexo e podem ser causadas por duas situações: a) entrada de muitos folículos na fase telogênica do ciclo; b) pela transformação de pêlo terminal em pêlo velo (Tabela 3).

Tabela 2 – Classificação das alopecias cicatriciais segundo morfologia clínica

Primária (a patologia é centrada no folículo)	Congênita Adquirida
Secundária (o folículo é destruído durante o curso de outra patologia)	Infecções Neoplasias Físicas

Adaptado: De Miguel (2005)

Tabela 3 – Classificação das alopecias não cicatriciais segundo morfologia clínica

Alopécia androgenética

Alopécia aerata

Alopécia não cicatricial associada a alterações sistêmicas

- Eflúvio telógeno
- Estados deficitários (nutricionais ou metabólicos)
- Enfermidades endócrinas
- Medicamentos
- Infecções

Alopécia não cicatricial traumática

- Tricotilomania
- Alopécia por tração

Fonte: De Miguel (2005)

2.3.4 Moduladores do crescimento capilar

O ciclo de vida dos folículos pilosos é profundamente influenciado por inúmeros fatores endógenos e exógenos (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; PAUS; COTSARELIS, 1999). Dentre esses fatores citam-se, citocinas, hormônios, neuropeptídeos e produtos farmacêuticos, e também fatores psicossomáticos (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; PAUS; COTSARELIS, 1999; ROH et al., 2002). Apesar dos vários fatores, os hormônios androgênicos são a causa mais freqüente de alopecia.

Durante os estágios anagênico e telogênico, os hormônios androgênicos ligam-se em receptores localizados no citoplasma e núcleo de células da papila dermal e de algumas

células da bainha do folículo (CHONDRHRY et al., 1992). O complexo receptor-hormônio se desloca para o núcleo celular e possibilita a expressão de genes que codificam citocinas que são produzidas e secretadas por células da papila dermal. Estas substâncias controlam o crescimento e diferenciação das células da matriz do folículo (RANDALL et al., 1993).

Nos folículos andrógeno-dependentes, os andrógenos têm diversos efeitos sobre os pêlos em diferentes regiões do corpo, por exemplo, na região parietal do couro cabeludo, as citocinas agem como inibidores, e levam o folículo à atrofia, enquanto no restante do corpo agem como ativadores do crescimento (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; PRICE, 2003).

Entre todos os andrógenos, as células da papila dermal são mais afetadas pela 5- α -dihidrotestosterona (DHT), que é sintetizada nestas células a partir da testosterona numa reação catalizada pela enzima 5- α -redutase (tipo I e II), levando à regressão folicular e calvície em pessoas geneticamente predispostas (JANKOVIC; JANKOVIC, 1998; ROH et al., 2002). As Tabelas 4 e 5 apresentam diversos fatores que interferem no crescimento capilar.

A prevalência da alopecia androgenética (AA) é de 50 % em homens caucasianos com idade entre 40 e 50 anos, 30 % dos homens com 30 anos de idade e 50 % das mulheres com 60 anos de idade. Os caucasianos são 4 vezes mais propensos a desenvolver alopecia quando comparados com homens negros. Nos asiáticos, americanos natos e afro-americanos a prevalência de AA é bem menor e é menos severa (SINCLAIR; DAWBER, 2001; HOFFMANN, 2002).

Na sociedade moderna, a importância psicológica e social do cabelo no homem se opõe à sua carência de função vital. No entanto, esta importância se reflete na pesquisa e no desenvolvimento de produtos medicamentosos que tenham por objetivo curar, reduzir, retardar ou contrabalançar um fenômeno ou incapacidade não estética resultante de alguma anormalidade na fisiologia do couro cabeludo (WILKINSON; MOORE, 1990).

A pesquisa de novos produtos é muitas vezes baseada nos conhecimentos etnobotânicos das plantas. Como exemplo, cita-se que diversas plantas têm sido tradicionalmente utilizadas contra a queda de cabelos na medicina oriental (ROH et al., 2002) e popularmente utilizadas no mundo.

Tabela 4 – Moduladores endógenos do ciclo de vida do folículo piloso em humanos.

Fatores endógenos	Ação
Hormonais	
Andrógenos (principalmente a DHT)	Têm ações diferentes no organismo. A) promove miniaturização dos folículos e encurta a duração da fase anágena através da liberação de citocinas. B) no restante do corpo agem como ativadores do crescimento.
Estrógenos	Prolongam a fase anágena. A redução na secreção de estrógeno que ocorre no período pós-parto causa eflúvio telógeno.
Hormônio do crescimento	Atua sinergicamente com andrógenos durante a virilização na adolescência.
Prolactina	Pode induzir o hirsutismo.
Tiroxina	Baixos níveis causam eflúvio telógeno, altos níveis podem ter um efeito similar.
Outros	
Fator de crescimento básico do fibroblasto (<i>bFGF</i>)	Agem nas células da papila dérmica, aumentando o crescimento capilar em humanos.
Fator de crescimento derivado de plaqueta (<i>PDGF</i>)	
Fator de crescimento transformante beta (<i>TGF-β</i>)	Age nas células da papila dérmica, diminuindo o crescimento capilar em humanos
Interleucina 1-alpha (<i>IL-1-α</i>)	
Fator de crescimento do fibroblasto tipo 5 (<i>FGF5</i>) e epidermal (<i>EGF</i>)	Agem nas células da matriz capilar, diminuindo o crescimento capilar em humanos.
Fator de crescimento I <i>like</i> - insulina (<i>IGF-I</i>)	Age nas células da matriz capilar, aumentando o crescimento capilar em humanos
1,25-diidroxivitamina D3	Baixas concentrações atuam aumentando o crescimento capilar em humanos; altas concentrações têm efeito contrário.
Fator de crescimento endotelial vascular (<i>VEGF</i>)	produzido pelas células da papila dermal e por queratinócitos da bainha externa do folículo piloso; estimula a angiogênese na fase anágena;

Adaptado de: Jankovic; Jankovic (1998); Paus; Cotsarelis (1999).

Tabela 5 – Moduladores exógenos do ciclo de vida do folículo piloso em humanos

Fatores exógenos	Ação
Medicamentosos	
Esteróides anabolizantes	Ação semelhante àquela dos andrógenos, aceleram a alopecia androgenética e agravam o hirsutismo.
Antagonistas β adrenérgicos	Podem causar eflúvio telógeno.
Ciclosporina	Causam hipertricose.
Estrógenos	Prolongam a duração da fase anágena, neutralizando o eflúvio telógeno e alopecia androgenética.
Finasteride	Bloqueia a DHT tipo II; inibe a miniaturização; prolonga a fase anágena nos folículos andrógeno-dependentes do couro cabeludo; converte pêlo velo em terminal.
Minoxidil	Inicialmente prescrita para problemas cardíacos (abrem canais de potássio, diazoxida também); a ativação do crescimento capilar foi observada como efeito adverso do medicamento, tal efeito fez com que a sua principal indicação fosse o crescimento capilar.
Contraceptivos orais	Cessaçãõ pode causar eflúvio telógeno.
Fenitoína e carbamazepina	Causa hipertricose.
Retinóides	Induz a passagem da fase anágena para uma telófase prematura, cai a haste do pêlo; manifestada como eflúvio telógeno.
Psicológicos	Geralmente afetam negativamente os fatores endógenos, expressando-se através da queda de cabelos de modos diferentes. As mulheres são mais afetadas por esses fatores.

Adaptado de: Jankovic; Jankovic (1998) e Paus; Cotsarelis (1999).

Takahashi e colaboradores (1998) analisaram cerca de 1000 tipos de extratos de plantas com o objetivo de encontrar materiais que promovessem o crescimento de células do folículo piloso *in vitro* e convertessem o ciclo celular do pêlo *in vivo*. A avaliação da epicatequina não demonstrou ter ação. Entretanto, as proantocianidinas na concentração de 3 % em solução tópica durante 19 dias demonstrou ser ativa (de 80 a 90 %) em camundongos.

Estudos toxicológicos mostraram que a PB2, isolada do suco de maçã, não é mutagênica, causa poliploidia, mas não causa aberrações estruturais. A dose letal (dl_{50}) é maior que 2000 mg/kg (injeção subcutânea; em ratos) e não mostrou irritação primária tópica em testes realizados com coelhos, sugerindo que a PB2 é segura. A concentração de 1 % nas soluções tópicas foi aplicada em camundongos na dose de 200 μ l durante 19 dias. Foi demonstrado que os dímeros de proantocianidinas possuem o nível mais elevado de promoção

do crescimento. *In vivo*, a atividade de crescimento dos pêlos na indução da fase anagênica mostrou-se quase equivalente entre dímeros e trímeros (TAKAHASHI et al., 1999a, 1999b).

O primeiro estudo clínico para investigar a aplicação tópica de PB2 como agente potencial no crescimento de pêlos foi elaborado por Takahashi e colaboradores (2001). A PB2, extraída de maçã, na concentração de 1 % na loção capilar foi aplicada diariamente, contendo cerca de 30 mg PB2, em um estudo duplo cego realizado com 29 homens durante 4 meses. Nos vários tipos de análises realizadas o grupo PB2 foi o que demonstrou melhores resultados comparados ao grupo placebo.

Kamimura e Takahashi (2002) realizaram um estudo procurando elucidar o mecanismo de ação da PB2 em relação ao crescimento capilar. Demonstraram que o dímero regula uma menor expressão e a inibição da translocação das isoenzimas (α , β I, β II e η) da proteína kinase C (PKC) nas células epiteliais capilares. Provavelmente a PKC seja um importante fator no ciclo de regulação capilar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Diante das características apresentadas pela mutamba, a presente dissertação tem por meta realizar o estudo químico e biológico dos extratos das cascas de *Guazuma ulmifolia* Lam. var. *tomentella*, Sterculiaceae.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise da qualidade da droga vegetal, coletada no norte do estado Paraná, confirmando suas características botânicas, físicas e físico-químicas, através da comparação entre duas coletas realizadas em épocas diferentes.
- Isolar compostos fenólicos em um extrato liofilizado semipurificado, preparado a partir das cascas secas.
- Desenvolver uma loção capilar para ser empregada no tratamento para a avaliação do crescimento de pêlos em animais de laboratório.
- Avaliar morfológicamente, através de análises morfométricas e da análise da proliferação celular epitelial, a ação do extrato bruto sobre o desenvolvimento do folículo piloso em ratos Wistar; comparando-a com uma solução inócua.
- Realizar o estudo da permeação cutânea das loções (teste e controle negativa) através de espectroscopia fotoacústica.
- Avaliar a capacidade antioxidante de extrato bruto e semipurificados através de ensaios *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento – Fisatom 752A
- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear – Varian Mercury 300 BB
- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear – Varian Inova 500 MHz
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Balança analítica Ohaus® MB-200 com sistema de secagem por infravermelho
- Balança semi-analítica Marte AL-500
- Banho-maria – Fanem Mod 120/3
- Banho-maria – Marte MB
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Bomba de vácuo – IBAV BRD4
- Câmara de ultravioleta 365 nm – Germetec
- Câmera fotográfica digital Sony-Cybershot modelo DSCW1 5.1 Mega pixels
- Coletor de frações – ISCO Modelo 328
- Coletor de frações – Pharmacia Biotech FRAC-200
- Espectrofotômetro UV/VIS Cary 1E Varian
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ Micromass, Manchester, UK
- Estufa bacteriológica Mod JP 101, J. Prolab
- Estufa de ar circulante Quimis®
- Estufa de secagem e esterilização – Fanem 315SE
- Evaporadores rotatórios Büchi R-114, R-153 e R-3000
- Liofilizadores Christh Alpha 1-2, Alpha 1-4, Alpha 1-4 LD e Beta 1-16
- Máquina de gelo – Everest refrigeração Mod EGC 50
- Microscópio Olympus modelo BX41TF Japan
- Micrótomo rotativo Leitz 1512
- Moinho de facas Tecnal TE-048

- Moinho de martelos Tigre mod. ASN5
- Turbolisador Skymesen LVS-5
- Ultra-turrax® UTCK AS
- Ultra-som – Transsonic 460 ELMA®
- Ultra-som – Ultra Sonic Cleaner – Unique USC 1450, 25 KHz

4.2 Soluções, solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Synth®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila
- Acetato neutro de chumbo
- Acetona
- Acetona:água (7:3; v/v)
- Ácido acético glacial
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Anidrido acético
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado Isotec®
- DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) Fluka
- Eosina
- Etanol
- Etanol 96 °GL Cocamar® ou da Ilha® 92,8 °GL
- Éter etílico
- FAA [(álcool 50%:ácido acético glacial:formaldeído 90:5;5 v/v/v)]
- Ferrocianeto de potássio
- Formaldeído
- Glicerina
- Hematoxilina
- Hidróxido de potássio
- Loção capilar controle negativo (Inócua)

- Loção tratamento (contendo extrato bruto)
- Magnésio em pó
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec®
- Nitrogênio líquido
- Parafina
- Permout®
- Piridina
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de folin-Ciocalteau 2 mol l⁻¹ Laborclin®
- Salina 0,9%
- Sephadex® LH-20 Fluka
- Solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06%
- Solução aquosa de urotropina a 0,5%
- Solução aquosa saturada de ácido pícrico (Bouin)
- Solução metanólica de ácido acético a 5%
- Solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%
- Solução etanólica de cloreto férrico a 1%
- Sulfato de vincristina
- Xilol

4.3 Coleta do vegetal

As coletas foram realizadas na região de Ibiporã, norte do estado do Paraná (S 23°18'15,2"; W 050°58' 32,7"; 396 m de altitude; Garmin v.2.24). O material vegetal (cascas, folhas e frutos) foi coletado com auxílio de tesouras de poda manual e foi preparado de acordo com as técnicas usuais de herborização (RADFORD et al., 1979). Os materiais prensados, foram encaminhados ao herbário HUM (Herbário da Universidade Estadual de Maringá) para identificação.

4.4 Identificação do material vegetal

O estudo taxonômico da espécie foi realizado no Laboratório de Sistemática Vegetal da UEM, pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, com o auxílio de literatura especializada contendo chave para gêneros e espécies, por comparação com o tipo nomenclatural. As exsiccatas de mutamba foram depositadas no Herbário da UEM sob os números de registro HUM 10.242 para a coleta de inverno/2003 e HUM 10.491 para a coleta de verão/2004.

4.5 Secagem, moagem e armazenamento

Após a coleta, as cascas de mutamba foram rasuradas com auxílio de tesouras de poda manual para melhor secagem. A droga inverno (DI) foi seca à sombra em temperatura ambiente e local arejado. A droga verão (DV) foi seca em estufa de ar circulante Quimis®, com temperatura controlada em torno de 30 °C. Após a secagem a DI e a DV foram cominuídas (separadamente) em moinho de martelos. O material moído foi acondicionado em sacos de papel *kraft*, devidamente etiquetados e guardados dentro de uma barrica de papelão bem fechada e armazenada à temperatura ambiente.

4.6 Análise fitoquímica preliminar

Foram realizados testes qualitativos de identificação de compostos polifenólicos, taninos e reação de Stiasny, glicosídeos flavônicos, teste de espuma (saponinas), pesquisa de núcleo esteroidal, glicosídeos de núcleo cumarina, compostos antracênicos livres e alcalóides, segundo técnicas descritas em Harborne (1984).

4.7 Análise granulométrica da droga vegetal

Previamente à tamisação os tamises e o coletor foram limpos e pesados. A droga vegetal seca e moída (30 g) foi submetida à análise granulométrica empregando-se um jogo de tamises de 0,840; 0,710; 0,600; 0,420; 0,300 e 0,250 mm de abertura de malha e coletor. A amostra foi tamisada durante 25 minutos a 70 vibrações por min, utilizando -se um tamisador

vibratório Produtest. Após a tamisação, procedeu-se a pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada um dos tamises (VOIGT, 1993).

O resultado foi expresso em relação a 100 g da droga, através da média de três determinações para a DI e para a DV. O método algébrico para determinação do diâmetro médio das partículas foi calculado segundo Ansel e colaboradores (2000), através da seguinte fórmula:

$$DM = \frac{\sum (FRCg\% \cdot Abertura \ Média \ Tamis)}{100}$$

4.8 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com técnicas especificadas pela Farmacopéia Brasileira (2000) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998b).

4.8.1 Perda por secagem

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal fresca foram colocados para secar à 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.

4.8.2 Determinação da perda por dessecação

Amostras pesando exatamente cerca de 2,0 g de droga vegetal moída foram dispersas em bandejas de alumínio taradas de uma balança de infravermelho, e desseçadas por 30 min, à temperatura de 110 °C. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de cinco determinações.

4.8.3 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foi submetida 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 foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até securo em banho de água, sob agitação ocasional. O resíduo foi colocado em balança de infravermelho, à temperatura de 110 °C por 30 min. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de cinco determinações segundo a equação:

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

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

g = massa de resíduo seco (g)

m = massa da amostra (g)

FD = fator de diluição (5)

4.8.4 Determinação do teor de resíduo seco

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado, e evaporada até securo em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi colocado em balança de infravermelho, à temperatura de 110 °C por 30 min. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de cinco determinações.

4.9 Análise quantitativa

4.9.1 Determinação do teor de flavonóides totais

Em balão de fundo redondo de 100 ml foram colocados cerca de 0,400 g de droga vegetal moída (com granulometria 1,000-0,800 mm), exatamente pesada, foi acrescido de 1 ml de uma solução de urotropina (hexametilenotetramina) a 0,5 % (p/v), 20,0 ml de acetona R e 2 ml de ácido clorídrico R e 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. Lavou-se o resíduo da droga e o algodão, 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 de 100 ml, 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 de 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, completou-se o volume com acetato de etila (solução-mãe – SM).

Adicionou-se 1 ml do reagente de cloreto de alumínio¹ à 10 ml da SM, diluído a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R² (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 baseou-se na absorvância específica da

quercetina, $E_{1cm}^{1\%} = 500$, segundo a fórmula:

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

onde: Abs. = absorvância medida;

e = massa da droga em g;

t = perda por dessecação (%; m/m).

O resultado foi expresso em percentual (m/m) de flavonóides calculados como quercetina (C₁₅H₁₀O₇).

4.9.2 Determinação do teor de taninos totais

Foram transferidos para um erlenmeyer com 150 ml de água, 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesada, e deixado durante 30 min em banho-maria à uma temperatura de 80-90 °C. Após, resfriou-se o erlenmeyer em água corrente, seu conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, lavou-se e completou o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foram filtrados através de papel filtro, e os primeiros 50 ml foram desprezados. O filtrado foi denominado Solução-Mãe (SM).

¹ Reagente de cloreto de alumínio: dissolver 1 g de cloreto de alumínio com solução metanólica de ácido acético R a 5% (V/V) em balão volumétrico de 50 ml. Complete o volume.

² Solução metanólica de ácido acético R a 5% (V/V): Em balão volumétrico de 100 ml, colocar 5 ml de ácido acético R e completar o volume com metanol.

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros desta solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 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 um béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada. 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) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06 %. Após 15 min da adição da primeira solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foram realizados sob proteção da ação da luz direta (Glasl, 1983).

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625 \cdot Abs}{1000 \cdot m} \qquad PNA = \frac{15625 \cdot Abs}{1000 \cdot m}$$

$$TT = PT - PNA$$

onde:

PT	=	Polifenóis Totais (%)
PNA	=	Polifenóis não Adsorventes (%)
Abs	=	Absorvância medida
m	=	Massa da droga em g
TT	=	Teor de Taninos Totais (%).

4.10 Extrato bruto de mutamba (EBM)

O material vegetal cominuído (empregado sem separação granulométrica) foi macerado por 25 min sob agitação. O extrato bruto foi preparado por turbólise em Ultraturrax®, durante 15 min, com intervalos de 15 min, para que a temperatura não excedesse 40°C. A proporção de droga utilizada foi de 10% (m/v) com: acetona:água (7:3 v/v) (MELLO et. al., 1996a). O extrato foi filtrado em pano filtro de nylon® com diâmetro de poros de 10

µm e papel de filtro, com auxílio de uma bomba a vácuo. Após, foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com temperatura abaixo de 40 °C, até completa eliminação do solvente orgânico. O extrato foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto de mutamba (EBM).

4.11 Isolamento de compostos fenólicos

Para a obtenção das frações semipurificadas e purificadas, foram empregados diversos métodos cromatográficos, que possibilitaram o isolamento de substâncias fenólicas.

4.11.1 Preparação da fase acetato de etila (FAE)

Cinquenta gramas de extrato bruto de mutamba foram re-suspensos em 500 ml de água e particionado com 500 ml de acetato de etila (5 vezes). A fase aquosa (FAQ) e a acetato de etila (FAE) foram separadas, concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até eliminação completa do solvente orgânico, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. No processo de partição, houve a formação de uma terceira fase que se precipita, denominada de resíduo (RES).

4.11.2 Cromatografia em coluna (CC) da FAE

A cromatografia em coluna (CC) foi utilizada na separação de frações da fase acetato de etila. Empregou-se uma coluna de vidro (h: 750 mm, Ø: 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada com acetona:água (7:3 v/v) para eliminação de prováveis resíduos anteriores e estabilização em ácido acético a 2 %, foi novamente estabilizada com o primeiro solvente da fase móvel a ser utilizado, álcool 20 %. Aplicou-se 19,03 g da FAE, que foram previamente re-suspensos em etanol 20%, no topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Todos os solventes foram eluídos de forma ininterrupta em proporção volumétrica (Tabela 6).

Tabela 6 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FAE.

Fase móvel	Volume (ml)
Etanol 20%	3220
Etanol 30%	1800
Etanol 40%	4830
Etanol 50%	3950
Etanol 100% (92,8°)	1570
Metanol:água (1:1)	2240
Acetona:água (7:3)	6000

Foram recolhidos 10 ml em cada tubo de ensaio com fluxo de 1 ml.min⁻¹. O monitoramento das frações foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD) a cada 10 tubos. Obtiveram-se 29 frações (F1 à F29), que foram reunidas por semelhança conforme perfil da CCD. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada.

4.12 Outros métodos cromatográficos

Para o isolamento das substâncias empregou-se cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) a partir das frações obtidas da CC (FR 4 a 14). Foi empregado cromatografia em coluna das sub-frações para purificação das substâncias, quando necessário. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizada quando não houve possibilidade de purificação pelos métodos anteriores e somente após a derivatização química por acetilação. Esses métodos auxiliaram o isolamento e/ou a purificação das substâncias.

4.12.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O acompanhamento das cromatografias em coluna (CC) e da cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) foi feito através da cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso foram utilizadas cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), com 0,200 mm de espessura. Utilizou-se como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5; v/v). Após a eluição e secagem em capela da placa, observou-se em

lâmpada de ultra-violeta à 254 nm e, em seguida, utilizou-se como revelador solução de cloreto férrico à 1% em etanol.

4.12.2 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)

Utilizou-se cromatógrafo de contra corrente de alta velocidade, com rotação média de 800 rpm e fluxo contínuo de 1,0 ml.min⁻¹. O sistema eluente empregado foi preparado com acetato de etila: *n*-propanol:água (140:8:80; v/v/v). a fase superior foi empregada como fase móvel e a fase inferior como fase fixa. Em cada tubo de ensaio foram coletados 3 ml e as frações foram reunidas através do perfil em CCD. Foi realizada a CCCAV com as seguintes frações: 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14.

4.12.3 Cromatografia em coluna das frações FR 12.4 e FR 13.2

A CC foi utilizada para obter subfrações a partir das frações provenientes da CCCAV. As sub-frações (12.4 e 13.2) foram novamente cromatografadas em coluna, visando a separação de duas substâncias presentes em cada fração.

Empregou-se uma coluna de vidro (h: 280 mm, Ø: 10 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna, após limpeza apropriada com acetona:água (7:3; v/v) para eliminação de prováveis resíduos anteriores e estabilização em ácido acético a 2 %, foi preparada para uso com o primeiro solvente da fase móvel a ser utilizado (álcool 25% para a FR 12.4 e álcool 5% para a FR 13.2).

Aplicaram-se 13,0 mg da FR 12.4, que foram previamente re-suspensos em pequena quantidade de etanol 5% (1,2 ml), no topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Todos os solventes foram eluídos de forma ininterrupta em proporção volumétrica (Tabela 7).

Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FR 12.4.

Fase móvel	Volume (ml)
Etanol 25%	190
Etanol 29%	224
Etanol 33%	65
Acetona:água (7:3)	≈ 200

Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 3 ml com fluxo de 1,0 ml/min para obtenção das diferentes sub-frações. O monitoramento foi efetuado através de CCD. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente orgânico, congelada, liofilizada, pesada e armazenada em freezer.

Aplicaram-se 62,0 mg da FR 13.2, que foram previamente re-suspensos em etanol 5%, no topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Todos os solventes foram eluídos de forma ininterrupta em proporção volumétrica (Tabela 8).

Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizada para CC da FR 13.2

Fase móvel	Volume (ml)
Etanol 5%	≈ 320
Etanol 10%	280
Etanol 20%	110
Acetona:água (7:3)	260

Em cada tubo de ensaio foram recolhidos 4 ml com fluxo de 1,0 ml.min⁻¹ para obtenção das diferentes sub-frações. O monitoramento foi efetuado através de CCD. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente orgânico, congelada, liofilizada, pesada e armazenada em freezer.

4.12.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As substâncias isoladas passaram por um processo de derivatização química por acetilação. As amostras acetiladas foram aplicadas, em placas de CCDP (no máximo 30 mg substância/placa), na forma de linha com auxílio de uma pipeta Pasteur e algodão.

As placas para CCDP constituem-se de placas de vidro de 20x20 cm que foram preparadas no laboratório. As placas foram limpas com acetona e recobertas com uma suspensão de gel de sílica PF₂₅₄ contendo gesso (Merck®) na proporção de 72 g sílica para 240 ml de água, com espessura de 0,75 mm. A fase móvel empregada foi tolueno: acetona (7:3; v/v). Antes do uso, as placas foram ativadas, colocando-as durante 10 min em estufa a 100 °C.

As bandas correspondentes às substâncias foram demarcadas sob luz UV à 254 nm, medindo-se o valor do R_f para cada substância. A numeração das substâncias segue a partir

do menor valor de Rf para a de maior valor de Rf. Em seguida raspou-se a área e filtrou-se a vácuo com acetona e com auxílio de um funil de vidro sinterizado direto para um frasco previamente pesado. Após a filtração, o solvente orgânico foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e os frascos liofilizados e pesados novamente.

Passaram por esse procedimento as seguintes frações acetiladas: 4.4, 4.5, 6.2, 7.2, 8, 9.2, 10.1, 10.5, 11.1, 12.1, 12.3, 12.4, 13.1, 13.2, 14.1, 14.4.

4.13 Derivatização

Em balão de fundo redondo, de 100 ml, para até 100 mg da fração desejada, adicionaram-se 1 ml de anidrido acético e 1 ml de piridina, seguindo esta ordem de adição. Agitou-se levemente, fechou-se com tampa e cobriu-se o balão com papel alumínio, deixando-se em repouso, à temperatura ambiente, por 24 h. Após esse período foi colocado dentro do balão gelo de água destilada picado e o balão foi imerso em gelo para auxiliar no resfriamento, por um período de 2 h. Após esse tempo, filtrou-se a vácuo em filtro sinterizado G4, lavando-se com água (destilada) fria em abundância para eliminação da piridina. O precipitado obtido no filtro sinterizado G4 foi solubilizado em acetona, e o solvente orgânico eliminado por concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A substância acetilada foi congelada e liofilizada (MELLO et al.; 1996a).

4.14 Elucidação estrutural

A análise estrutural das substâncias puras foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (Varian Mercury 300 BB, Departamento de Química da UEM e Varian Inova 500 MHz, Organisch-Chemisches Institut da Universidade de Münster, Alemanha) (RMN) ^1D (^1H , ^{13}C) e 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HSQC, HMBC), ópticos (CD, $[\alpha]_D^{20}$), espectrometria de massas (EM). Os espectros das substâncias foram analisados por comparação com dados constantes em literatura. Tais espectros foram obtidos no Institut für Pharmazeutische Chemie e Organisch-Chemisches Institut da Universidade de Münster, Alemanha, e Departamento de Química da UEM, Maringá.

4.15 Capacidade antioxidante

4.15.1 Método do fosfomolibdênio

Uma alíquota (0,3 ml) da solução amostra (200 µg/ml) foi colocada em tubo de ensaio com 3,0 ml da solução reagente [ácido sulfúrico (0,6 mol l⁻¹), fosfato de sódio (28 mmol l⁻¹) e molibdato de amônio (4 mmol l⁻¹) em água destilada] Os tubos foram incubados em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após seu retorno à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 695 nm contra o branco (3 ml de solução reagente e 0,3 ml do mesmo solvente utilizado na amostra). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em relação ao ácido ascórbico (0,3 ml de solução a 2 mmol l⁻¹), utilizado como padrão, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1 (100%) (PRIETO et al., 1999; HIRATA, 2004). Um desenho esquemático pode ser visto na Figura 9.

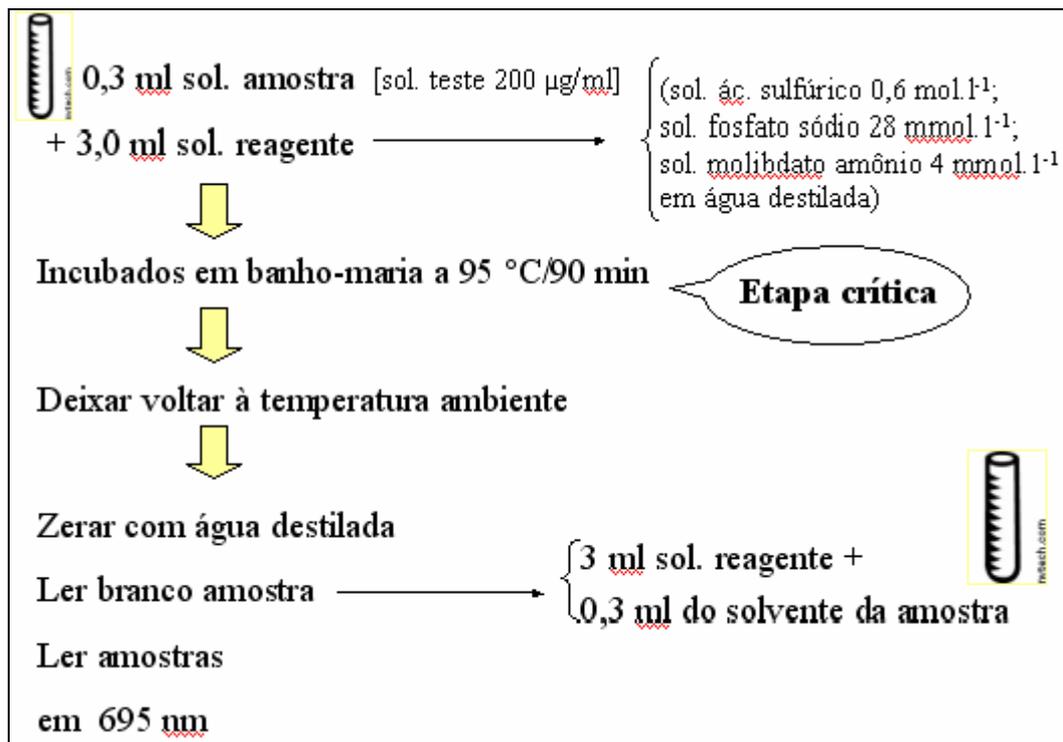


Figura 9 – Esquema da técnica do fosfomolibdênio para avaliação da capacidade antioxidante
 Fonte desenhos: NVTech, 2005.

4.15.2 Método do radical DPPH•

A atividade antioxidante do EB, FAE e FAQ foi realizada através do método de seqüestro de radical DPPH•. Foi realizada uma triagem nas seguintes concentrações: 0,0064; 0,16; 0,8; 4; 20; 100; e 500 µg/ml.

Foram realizadas baterias com cinco tubos para o EB, FAE, FAQ, RES e VIT C, nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; e 20 µg/ml em metanol. Após, foi acrescentado, em todos os tubos, 0,5 ml de uma solução de DPPH• a 1 mmol l⁻¹. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 s, mantidos em temperatura ambiente por 30 min e em seguida, fez-se a leitura da absorvância em 517 nm. O branco foi preparado com 4 ml de metanol, adicionado de 0,5 ml de solução de DPPH• a 1 mmol l⁻¹, a qual foi reduzida com 2 mg de butil-hidróxi-tolueno (BHT) (AMAROWICZ et al., 2004).

A atividade anti-radicalar (RSA – radical scavenging activity) foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH•, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ RSA} = (1 - A_a / A_c) \times 100$$

onde:

A_a = absorvância da solução quando um extrato foi adicionado em determinada concentração,

A_c = absorvância da solução do radical DPPH•.

Os resultados foram reportados como IC₅₀, que representa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DDPH•. Esses cálculos foram realizados através da regressão linear (HARRIS, 2005; MILONE, 2004), e representam a média de três determinações para cada bateria (EB, FAE, FAQ, RE, e VIT C). Um exemplo de cálculo do IC₅₀ pode ser observado no Anexo A. Um desenho esquemático pode ser visto na Figura 10.

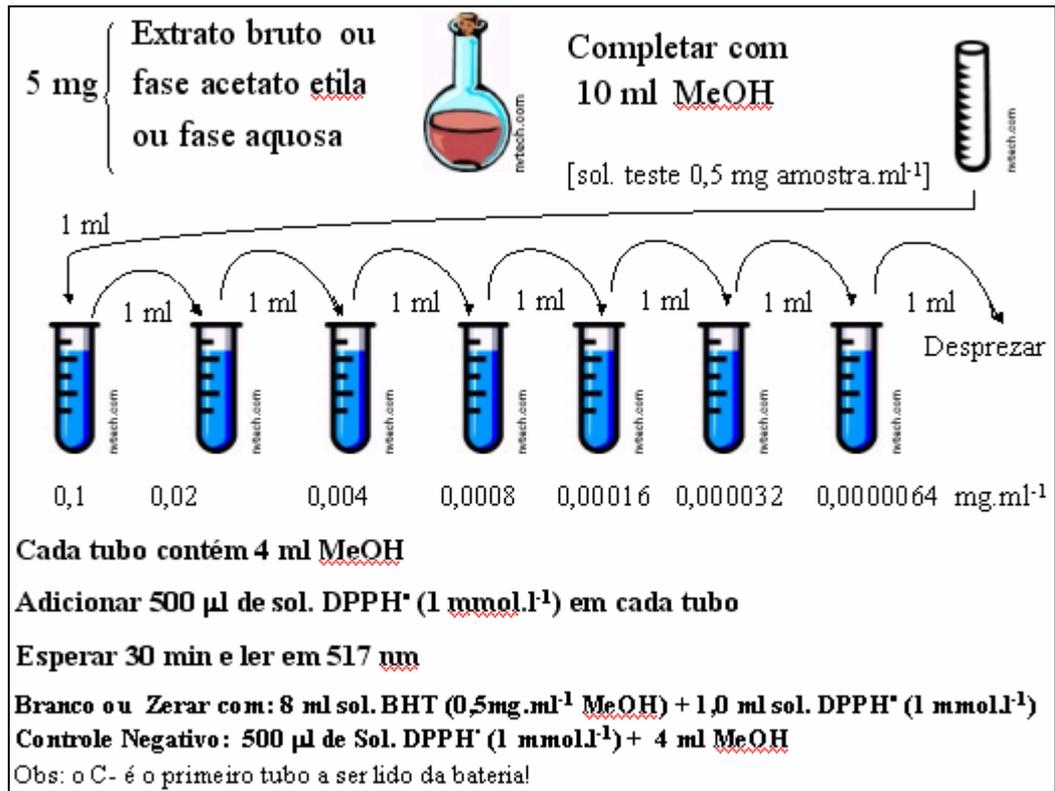


Figura 10 – Esquema do método de DPPH[•] para avaliação da capacidade antioxidante
Fonte desenhos: NVTech, 2005.

4.16 Desenvolvimento de forma farmacêutica

Foram feitas adaptações das formulações publicadas por Takahashi (1998, 1999a, 1999b, 2001). Pesquisaram-se os excipientes que melhor se adaptassem às condições do preparo da formulação de uma loção capilar que contivesse a substância marcadora (taninos) em concentração conhecida pelo teor de taninos totais (loção teste) (KIBBE; 2000); ou não tivesse o princípio ativo (loção controle negativa). Não foi necessária adição de corretor de pH e não foi adicionado perfume.

4.17 Estudo do crescimento de pêlos

Para a avaliação da ação da loção teste contendo extrato bruto de *Guazuma ulmifolia* sobre o crescimento de pêlos, foram utilizados 30 ratos Wistar adultos, machos, com 74 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual de Maringá.(Anexo B).

Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, os animais foram depilados, manualmente, no dorso, próximo à região cervical. Sobre a superfície depilada foram realizadas aplicações diárias da loção teste nos animais do grupo experimental (n=15) e da loção controle negativa (solução inócua) nos animais do grupo controle (n=15). Os animais foram mortos após um período de tratamento de 7, 10 e 13 dias, sendo que para cada tempo de tratamento foram mortos cinco animais do grupo controle e cinco do grupo experimental.

Duas horas antes da morte de cada animal, foi injetado via endovenosa (veia peniana) sulfato de vincristina (1mg/kg de peso corporal), um bloqueador de mitoses. Os animais foram mortos por overdose de anestésico e a pele foi removida.

A pele retirada foi fixada com solução fixadora de Bouin (solução saturada de ácido pícrico, formaldeído, ácido acético glacial; 75:25:5; v/v/v) por um período de 24 h. Após, o material foi processado rotineiramente para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina

4.17.1 Estudo da proliferação celular epitelial nos folículos pilosos

Nos cortes histológicos foram selecionados folículos pilosos tomando-se como padrão aqueles seccionados ao nível do maior diâmetro e que apresentavam bulbo contendo papila dérmica visível e contínua com o tecido conjuntivo dermal. Foram contadas as metáfases bloqueadas pelo sulfato de vincristina em 15 folículos pilosos/animal para cada tempo de tratamento, nos grupos dos animais tratados e controles.

4.17.2 Medidas da espessura e do tamanho dos folículos pilosos

Os folículos selecionados obedeceram aos mesmos critérios da avaliação anterior. A espessura dos folículos foi medida em nível do maior diâmetro do bulbo (linha de Auber), em folículos com papila dermal claramente visível. Foram medidos 15 folículos pilosos para cada tempo de tratamento, para cada extrato estudado, em tratados e controles. Os dados obtidos a partir das análises foram submetidos ao teste *t* de Student (YANO et al., 2001).

4.18 Análises Estatísticas

As análises estatísticas empregadas neste trabalho foram:

- 1) Capacidade antioxidante: Regressão linear, análise de variância (Anova de uma via) e teste de comparação múltipla de Tukey.
- 2) Estudo de crescimento de pêlos: Teste *t* de Student. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

4.19 Estudo de permeação cutânea

As análises de permeação cutânea foram realizadas no laboratório do Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos (GEFF). O arranjo experimental para as medidas de espectroscopia fotoacústica em amostras *ex vivo* está esquematizado na Figura 11 e é explicado em detalhes em Pedrochi (2004).

O tratamento dos animais com as loções teste e controle seguiu-se como descrito anteriormente, em material e métodos. Após um período de 7, 10 e 13 dias de tratamento (dois animais/grupo), os animais foram mortos por overdose de anestésico tiopental (40mg/kg de peso corporal). A pele foi removida e encaminhada imediatamente ao laboratório de fotoacústica para análise da permeação cutânea.

As amostras de pele tiveram seu tamanho reduzido e sua espessura mensurada com um micrômetro digital, permanecendo entre 1,19 e 1,74 mm. As medidas foram tomadas pela parte interna (dermal) da pele.

Foram realizadas medidas com a espectroscopia fotoacústica para verificar a região espectral de absorção de um de seus componentes, assim como das loções, entre 200 e 800 nm. Para as medidas, o extrato bruto de mutamba (em pó) foi depositado na cavidade do porta-amostra, dentro da câmara fotoacústica para medida de absorção. Enquanto que o diluente (solução controle) foi depositado em uma cubeta de quartzo que foi alojada no caminho do feixe de luz, próximo ao foco, mas fora da câmara fotoacústica. Deste modo, pode-se detectar a absorção da substância por meio de uma medida de transmissão da luz, já que a luz que passa através da amostra é absorvida por um pó (padrão) que se encontra, dentro da célula fotoacústica.

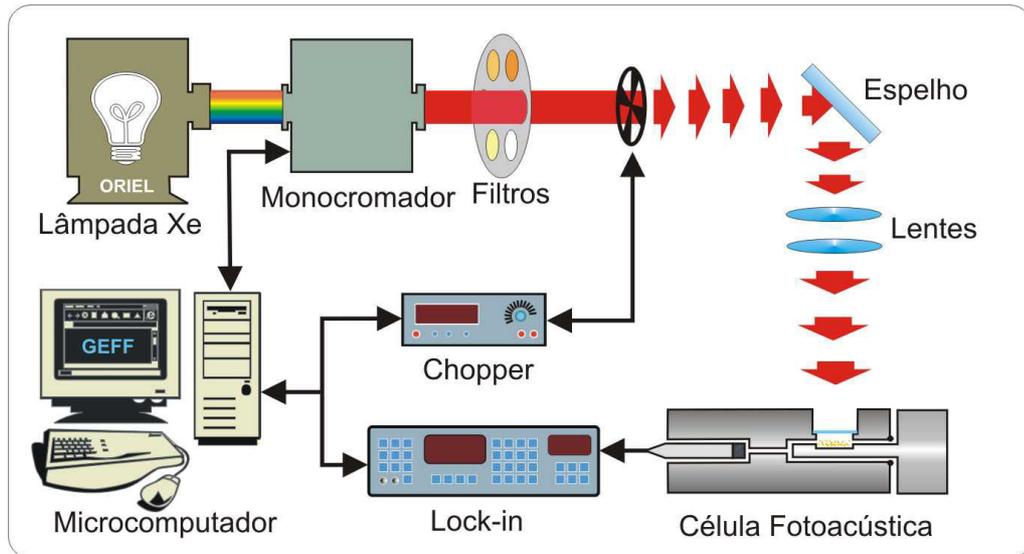


Figura 11 – Arranjo experimental da Espectroscopia Fotoacústica para medidas *in vitro*.
Fonte: Pedrochi (2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Material vegetal

As coletas foram realizadas em duas épocas diferentes do ano, para que fosse realizado o estudo comparativo de controle de qualidade da droga vegetal. A coleta de maio/2003 foi denominada de coleta de “inverno” e a dezembro/2003 foi denominada de “verão”.

A correta identificação do vegetal é fator importante em qualquer área, cujo resultado reflita na saúde da população, seja na certificação dos estudos e trabalhos realizados com plantas, seja previamente ao desenvolvimento de um produto fitoterápico, para o cultivo ou coleta sustentável e para os fornecedores de matéria-prima das farmácias de manipulação e/ou indústrias. A identificação botânica é a primeira etapa na certificação da matéria-prima, fator importante para evitarem equívocos e adulterações.

5.2 Análise fitoquímica preliminar

Os dados da análise fitoquímica preliminar realizada com as cascas de mutamba, apresentados na Tabela 9, conforme demonstrado previamente por Galina e colaboradores (2005), mostraram que os taninos são um grupo de substâncias químicas que podem ser empregados para a caracterização da matéria-prima. Flavonóides e saponinas também são classes de substâncias presentes na mutamba.

Os ensaios de qualidade de matérias-primas vegetais são preconizados nas Farmacopéias e em monografias elaboradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS); que além de objetivarem a verificação da identidade botânica do material, também preocupam-se com a pureza e caracterização dos constituintes químicos da espécie, principalmente aqueles envolvidos na atividade terapêutica e seus doseamentos. Nas análises de matérias-primas é recomendada a realização em triplicata, calculando-se a média e o coeficiente de variação (FARIAS, 2003).

Tabela 9 – Análise fitoquímica preliminar.

Análise	DI	DV
Compostos fenólicos	+++	+++
Taninos	+++	+++
Reação de Stiasny		
Taninos condensados	+++	+++
Taninos hidrolisáveis	-	-
Glicosídeos flavônicos	++	++
Saponinas	++	+++
Compostos antracênicos	-	-
Glicosídeos de núcleo cumarina	-	-
Glicosídeos cardiotônicos	-	-
Pesquisa de anel esteroidal	+	+
Alcalóides	-	-

+ = fraca positividade; ++= moderada positividade; +++= forte positividade; - = ausência do grupo químico; DI= droga inverno; DV= droga verão.

Com esse objetivo foi realizada a análise fitoquímica preliminar, que é um conjunto de reações consideradas qualitativas, e que foram realizadas segundo Harborne (1984). Farias (2003) considera que são métodos simples, de rápida execução e baixo custo. Estas reações são geralmente inespecíficas, ocorrendo através de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias. Classicamente, segundo Falkenberg e colaboradores (2003), essas reações são aquelas em que há o aparecimento de coloração e/ou precipitado característico.

A positividade para taninos na mutamba pode explicar seu uso popular como antimicrobiano, antiinflamatório, problemas gastrointestinais e relacionados com queda de cabelos (DOMÍNGUEZ; ALCORN, 1985; HEINRICH et al., 1992; NAVARRO et al., 1996; FREI et al., 1998; CAMPORESE et al., 2003).

Além da análise fitoquímica preliminar, outras técnicas (químicas, físicas e físico-químicas) de controle de qualidade farmacopéicas foram realizadas com o objetivo de caracterizar a droga vegetal em estudo de acordo com parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 – ANVISA. As técnicas foram: perda por secagem, perda por dessecação, teor de extrativos, resíduo seco, determinação do teor de flavonóides totais e determinação do teor de taninos totais.

5.3 Análises físico-químicas – análise da qualidade

Com relação à perda por secagem (PPS), a droga inverno (DI) foi seca à sombra em temperatura ambiente e local arejado. A observação foi realizada durante 14 dias, no nono dia choveu e a estabilização somente ocorreu após o décimo dia. A droga verão (DV) foi seca em estufa de ar circulante, com temperatura controlada em torno de 30 °C. Caracteriza-se como método de escolha, haja vista que é melhor que a secagem ao ar livre e porque diminui o tempo necessário para estabilização da droga. A técnica de PPS serve para acompanhar o material vegetal durante seu processo de secagem, principalmente quando for realizado ao ar livre. A PPS para a DI foi de 56,59 % \pm 15,64 (CV%=27,63 %) e não foi realizado para a DV. Após a secagem a DI e a DV foram cominuídas em moinho de martelos, e foram convenientemente armazenadas em sacos de papel dentro de uma barrica de papelão.

A secagem tem por finalidade a retirada de água, de forma a impedir as reações de hidrólise e de crescimento microbiano (bactérias e fungos). Além disso, o excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, que podem levar à degradação dos constituintes químicos (EVANS, 1996; WHO, 1998b; FALKENBERG et al., 2003).

Para determinação do teor de umidade, diversos métodos podem ser empregados, dentre eles, o método gravimétrico também denominado de perda por dessecação (PPD). A técnica é de simples execução, e consiste na determinação do percentual de material volatilizado (água e/ou substâncias voláteis) após a dessecação. Recomenda-se para a análise entre 2 e 5 g de material rasurado, e alternativamente podem ser empregadas balanças acopladas a sistema de secagem por irradiação infra-vermelha (CARDOSO, 2002; FARIAS, 2003).

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopéicas existentes na Farmacopéia Brasileira (2000), em outras Farmacopéias, e em diretrizes publicadas pela OMS. Segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004–ANVISA, que estabeleceu normas para o registro de medicamentos fitoterápicos, esta dispõe que a partir da droga vegetal até o medicamento fitoterápico, são necessárias as aquisições de informações em todas as suas fases de produção (controle de processos), para garantir os três princípios essenciais de um medicamento – segurança, qualidade e eficácia terapêutica.

Tabela 10 – Determinação da perda por dessecação (PPD)

Datas	Droga	*PPD (%) ± dp (CV%)
2 meses após a coleta	Inverno	12,50 ± 0,5944 (4,75)
	Verão	11,92 ± 0,4438 (3,72)
5 meses após a coleta	Inverno	11,75 ± 0,0548 (0,49)
	Verão	13,54 ± 0,1949 (1,44)
12 meses após a coleta	Inverno	13,28 ± 0,3834 (2,89)
	Verão	12,38 ± 0,3114 (2,51)

* n= 3

Com o objetivo de acompanhar a umidade da droga armazenada, as análises foram realizadas ao longo de um ano para cada lote (DI e DV) (Tabela 10). O teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias, com poucas exceções especificadas nas monografias, varia entre 8 e 14 % (FARIAS, 2003). Assim, a droga em estudo ficou de acordo com essa determinação.

Sob o aspecto tecnológico, a PPS e a PPD podem indicar a eficiência no processo de secagem. Audi e colaboradores (2001) encontraram para a *Petiveria alliacea*, valores de PPS = 65,88 %, e a PPD = 65,21 % da planta fresca; da planta moída a PPD = 91,47 %. Pode-se notar que são valores característicos para cada planta, pois os valores da mutamba situam-se bem abaixo desses.

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de substâncias extraíveis em um determinado solvente a partir de uma determinada quantidade do material vegetal (WHO, 1998b; CARDOSO, 2002). É empregado para materiais para os quais ainda não se têm ensaios biológicos ou químicos satisfatórios. Para Audi e colaboradores (2001) esse método é utilizado para conhecer as propriedades da droga após a secagem, e quando ainda não se conhecem os constituintes ativos da droga.

A técnica do teor de extrativos, preconizada pela OMS (WHO, 1998b), emprega água como líquido extrator. No entanto, no intuito de estabelecer parâmetros de avaliação, fez-se a técnica com diferentes líquidos extratores. A análise foi determinada com as cascas de mutamba, utilizando-se o refluxo como processo extrativo.

Tabela 11 – Teor de extrativos para DI e DV, empregando-se solventes em proporção volumétrica

Solvente	DI *	DV *
	g % ± dp (CV%)	g % ± dp (CV%)
Acetona:Água (7:3)	12,54 ± 0,4765 (3,80)	10,97 ± 0,2287 (2,08)
Acetona:Água (1:1)	16,56 ± 0,4386 (2,65)	7,06 ± 0,1664 (2,36)
Metanol:Água (1:1)	11,02 ± 0,5393 (4,89)	10,90 ± 0,4579 (4,20)
Etanol:Água (1:1)	11,42 ± 0,4050 (3,55)	6,27 ± 0,3761 (5,99)
Água	9,88 ± 1,3012 (13,17)	5,06 ± 0,1992 (3,94)

* representa a média de três determinações.

Como pode ser observado na Tabela 11, o solvente responsável pelo maior rendimento de substâncias, para DI é acetona:água (1:1) e para a DV é acetona:água (7:3). Foi realizada uma adaptação da técnica original com objetivo de comparação. Esse procedimento é adequado em casos de ausência de estudos e, auxiliado pela análise fitoquímica preliminar.

Sabe-se que nas cascas de mutamba possuem taninos, e que este grupo é sensível a altas temperaturas e luminosidade. Portanto, para a escolha do melhor líquido extrator, foi determinado o teor de resíduo seco (RS), servindo de parâmetro na avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal.

Tabela 12 – Teor de resíduo seco para DI e DV, empregando-se solventes em proporção volumétrica

Solvente	DI *	DI	DV *	DV
	g ± dp (CV%)	Rend %	g ± dp (CV%)	Rend %
Acetona:Água (7:3)	0,1683 ± 0,0049 (2,91)	8,41	0,1425 ± 0,0049 (3,44)	7,21
Acetona:Água (1:1)	0,1526 ± 0,0048 (3,14)	7,63	0,1120 ± 0,0055 (4,91)	5,60
Metanol:Água (1:1)	0,1475 ± 0,0061 (4,14)	7,37	0,1123 ± 0,0054 (4,81)	5,61
Etanol:Água (1:1)	0,1457 ± 0,0034 (2,33)	7,28	0,1131 ± 0,0042 (3,71)	5,65
Água	0,0979 ± 0,0033 (3,37)	4,89	0,0774 ± 0,0011 (1,42)	3,87

* representa a média de cinco determinações.

A acetona:água (7:3) foi o solvente que produziu a melhor extração, tanto para DI, quanto para DV (Tabela 12). A pequena diferença que ocorreu em relação ao teor de extrativos entre as DI e DV deve-se à época de coleta do material. A técnica de resíduo seco permite que o seu desenvolvimento seja testado de forma aleatória ou que seja realizado igual ao procedimento de preparo do extrato bruto.

Para os taninos, o processo extrativo deve ser a frio, e assim, deve-se avaliar o método extrativo para estabelecer o melhor líquido extrator. Entretanto, esta técnica deve ser acompanhada de uma técnica de doseamento do princípio ativo ou de um grupo químico presente na droga vegetal. Sem este procedimento de doseamento, essa relação é somente proporcional. A escolha do solvente e do método extrativo está diretamente relacionada ao tipo de substâncias que se pretende extrair e conseqüentemente da ação terapêutica desejada (CARDOSO, 2002). A mistura acetona:água (7:3), utilizada como líquido extrator está de acordo com os resultados do RS e com a literatura (HAGERMAN, 1988; MELLO, 1995; RAWAT et al., 1999).

A avaliação da qualidade da mutamba foi complementada com análises quantitativas de alguns constituintes detectados na análise fitoquímica. Para isso foram realizadas as determinações do teor de flavonóides totais e a do teor de taninos totais, sem no entanto levar em consideração a umidade residual da matéria-prima vegetal (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 – Teor de flavonóides das cascas de mutamba nos períodos de inverno e verão.

Droga	g (%) \pm dp (CV%)
Inverno	0,00445 \pm 0,0002 (4,49)
Verão	0,00900 \pm 0,0018 (20,00)

As quantidades detectadas dos flavonóides totais são muito baixas, e a droga verão foi a que apresentou maior quantidade desse analito. Segundo a literatura consultada, a classe de substâncias responsáveis pela ação terapêutica, em estudo, diz respeito aos taninos. Isso, no entanto, não implica que os flavonóides não possam contribuir para a ação farmacológica. As baixas concentrações encontradas dificultaram a obtenção de um valor com maior precisão.

Em virtude da grande positividade apresentada na análise fitoquímica preliminar, optou-se por fazer o teor de taninos totais (Tabela 14). O melhor resultado para o teor de taninos foi encontrado na droga inverno. Entretanto, quando se comparam esses dados com aqueles obtidos por Galina e colaboradores (2005), os valores encontram-se invertidos, não significando que haja discrepância nos valores absolutos de forma a prejudicar as análises, mas sim, que os valores obtidos estão parcialmente alterados. Essa diferença nos achados pode ser explicada pelas interferências dos fatores edafo-climáticos, anteriormente mencionados, os quais causam alterações na fisiologia vegetal.

Tabela 14 – Teor de taninos nas cascas de mutamba.

Droga	g (%) ± dp (CV%)	Literatura*
Inverno	4,24 ± 0,2478 (5,84)	4,95
Verão	3,79 ± 0,3245 (8,56)	5,24

* Galina et al. (2005)

Segundo a Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 – ANVISA, marcador é o componente ou classe de substâncias presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente aquela que tenha correlação com o efeito terapêutico; que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e/ou dos medicamentos fitoterápicos. Considerando isso, o marcador de escolha para a mutamba é o grupo de taninos, e dessa forma, o doseamento do teor de taninos totais foi repetido posteriormente.

5.4 Análise granulométrica da droga vegetal

A Figura 12 representa as curvas de retenção e passagem através da análise granulométrica por tamisação da droga inverno rasurada, empregando-se os dados fornecidos pela Tabela 15. A maior percentagem de partículas encontra-se entre os tamises com abertura de malha entre 0,400 mm e o coletor. O diâmetro médio das partículas da droga inverno, calculado através do método algébrico, é de 0,373 mm.

Tabela 15 – Análise granulométrica da droga inverno.

ABERTURA DE MALHA (M) DO TAMIS (mm)	CLASSE GRANULOMÉTRICA M mín – M máx (mm)	ABERTURA MÉDIA M (mm)	FRAÇÃO RETIDA CORRIGIDA FRC (g %)	FRAÇÃO RETIDA ACUMULADA FRA (%)	FRAÇÃO DE PASSAGEM FP (%)
0,840	0,840 – 1,00	0,920	16,42	16,42	83,57
0,710	0,710 – 0,840	0,775	5,86	22,28	77,72
0,600	0,600 – 0,710	0,655	4,34	26,62	73,38
0,420	0,420 – 0,600	0,510	15,63	42,25	57,74
0,300	0,300 – 0,420	0,360	10,72	52,97	47,03
0,250	0,250 – 0,300	0,275	10,07	63,05	36,95
coletor	0,00 – 0,250	0,125	36,95	100,00	0,00

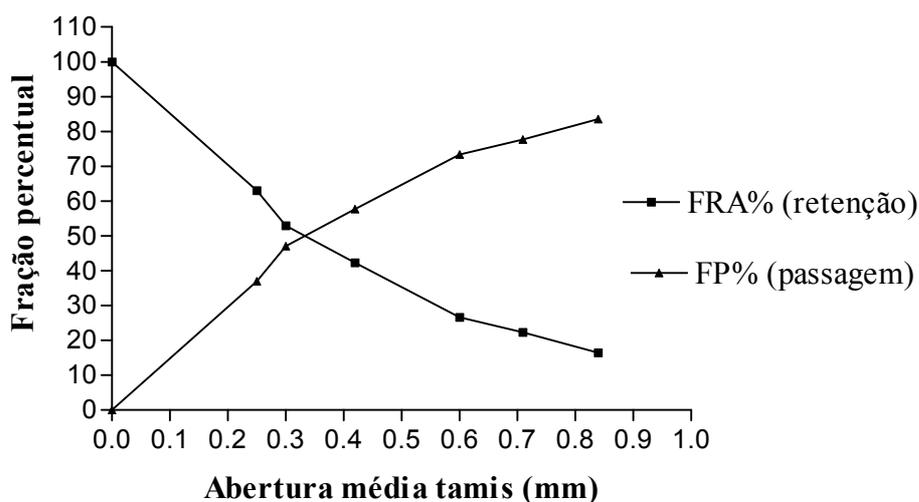


Figura 12 – Curvas de retenção e passagem da droga inverno após tamisação

A Figura 13 representa as curvas de retenção e passagem através da análise granulométrica por tamisação da droga verão rasurada; empregando-se os dados fornecidos pela Tabela 16. As maiores percentagens de partículas encontram-se também entre os tamises com abertura de malha entre 0,400 mm e o coletor. O diâmetro médio das partículas da droga verão, calculado através do método algébrico, é de 0,377 mm.

Tabela 16 – Análise granulométrica da droga verão.

ABERTURA DE MALHA (M) DO TAMIS (mm)	CLASSE GRANULOMÉTRICA M mín – M máx (mm)	ABERTURA MÉDIA M (mm)	FRAÇÃO REETIDA CORRIGIDA FRC (g %)	FRAÇÃO RETIDA ACUMULADA FRA (%)	FRAÇÃO DE PASSAGEM FP (%)
0,840	0,840 – 1,00	0,920	18,94	18,94	81,06
0,710	0,710 – 0,840	0,775	6,27	25,21	74,79
0,600	0,600 – 0,710	0,655	4,26	29,47	70,53
0,420	0,420 – 0,600	0,510	13,32	42,79	57,21
0,300	0,300 – 0,420	0,360	9,24	52,03	47,97
0,250	0,250 – 0,300	0,275	9,08	61,12	38,88
coletor	0,00 – 0,250	0,125	38,89	100,00	0,00

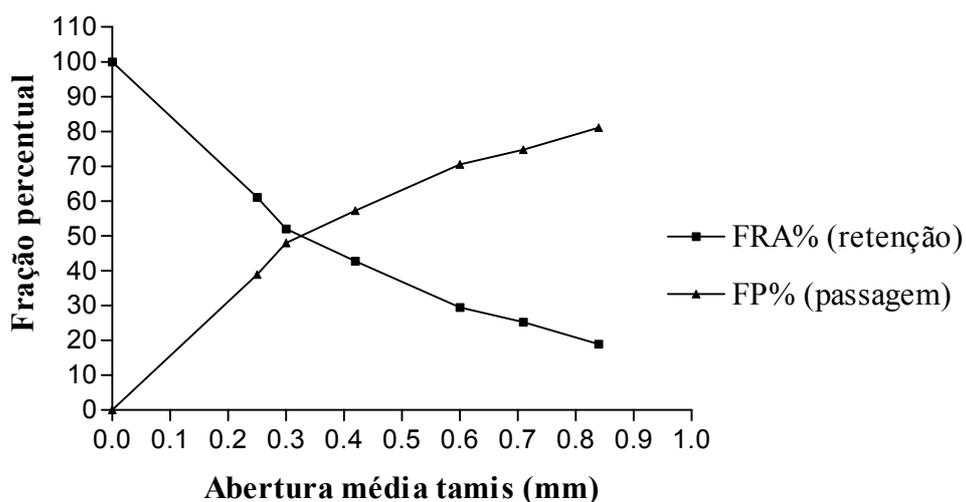


Figura 13 – Curvas de retenção e passagem da droga verão após tamisação

A OMS (WHO, 1998b) classificou os pós em espesso (grosso), moderadamente espesso, moderadamente fino, fino e muito fino. No entanto, a Farmacopéia Brasileira (1988) classifica os pós de forma semelhante com algumas alterações, tais como: grosso, moderadamente grosso, semi-fino, fino e finíssimo. De acordo com essa classificação tanto a droga rasurada inverno quanto a droga verão se enquadram na categoria de moderadamente fino, considerado um nível intermediário de granulometria.

A análise granulométrica trata-se de um método físico de análise. Previamente à extração deve-se considerar uma série de fatores que podem interferir no processo extrativo, tais como a parte do material vegetal a ser utilizada, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a método de extração (FALKENBERG et al., 2003).

Dentre esses fatores, segundo Falkenberg e colaboradores (2003), o grau de divisão do material tem influência direta na eficiência da extração. Para que o solvente consiga alcançar eficientemente os tecidos do material a ser extraído, considera-se que quanto mais rígido for o material (p. ex. cascas, xilema) menor deve ser sua granulometria.

Importante citar que a granulometria tem certo limite de aceitação. Materiais extremamente finos não são corretamente extraídos devido a sua incapacidade de se misturar convenientemente com os solventes. Isso está relacionado às pequenas dimensões das partículas em contato com o líquido extrator.

5.5 Produtos intermediários – EB, FAE, FAQ e RES

A extração, para a obtenção de solução extrativa, bem como a obtenção dos extratos secos (produtos intermediários: EB, FAE, FAQ e RES), foi realizada com os lotes inverno e verão.

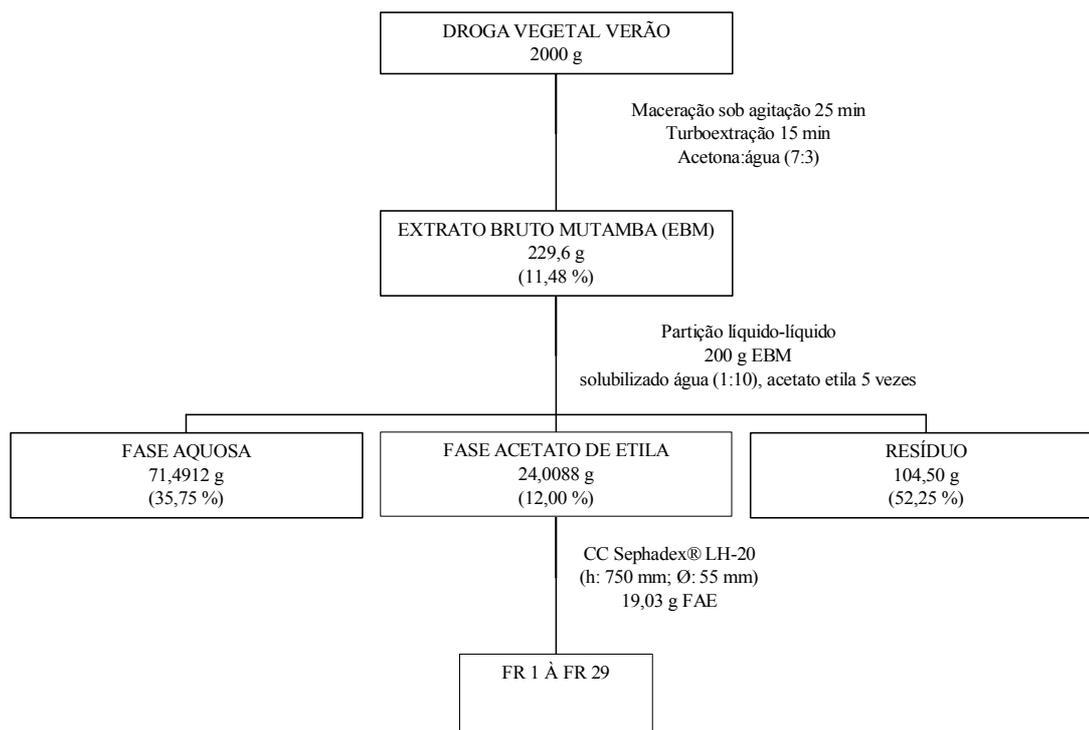
Foram coletados 7,8 kg para DI e 6,3 kg para DV. A DI foi submetida à secagem ao ar livre e a DV em estufa de ar circulante. As cascas secas foram moídas e forneceram 3,2 kg para DI (41,03 %) e 2,9 kg DV (46,03 %).

A escolha do líquido extrator baseou-se nas informações obtidas no controle de qualidade de acordo com a Tabela 12 e empregou-se o mesmo método de extração utilizado por Hör e colaboradores (1995). A turboextração é um método de extração à frio, simples, rápido, e pode ser usado em pequena e média escala. Elevadas forças de cisalhamento geradas através de um rotor em altas velocidades (5000 a 20000 rpm) promovem uma eficiente extração concomitantemente com a diminuição drástica no tamanho das partículas, portanto, favorecendo uma rápida dissolução das substâncias. Geração de calor somada à uma difícil separação da solução extrativa são os inconvenientes da técnica, contudo podem ser controladas. Os tempos de extração são da ordem de minutos e há quase o esgotamento da droga (VOIGT, 1993; SONAGLIO et al., 2003).

O pó moderadamente fino não comprometeu a extração e a análise granulométrica confirmou o fato da filtração demorar. Por esse motivo, foi empregado um pano filtro de nylon[®] com porosidade inferior a 10 µm de diâmetro logo abaixo do papel de filtro, para tornar o processo mais rápido. Para a produção em escala industrial é conveniente o emprego de filtros-prensa para melhorar o rendimento, e conseqüentemente, reduzir custos (CARDOSO, 2002).

Após a filtração da solução extrativa, de sua concentração e liofilização, obteve-se o EBM, que de forma resumida, as etapas realizadas e seus rendimentos podem ser visualizados no Fluxograma 2.

Apesar de todo cuidado, perdas inevitáveis ocorrem durante o processo de produção, aliado à formação de um resíduo entre as fases no processo de particionamento em quantidade considerável (52,25%). O rendimento do EBM está próximo do valor obtido nos ensaios de teor de resíduo seco (Tabelas 14) com perda de cerca de 4,7%. Para se conseguir perdas inferiores a essa é necessário a realização de processos de extração/filtração em linha.



Fluxograma 2 – Preparação de extratos a partir das cascas de *Guazuma ulmifolia* e fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna

5.6 Isolamento químico

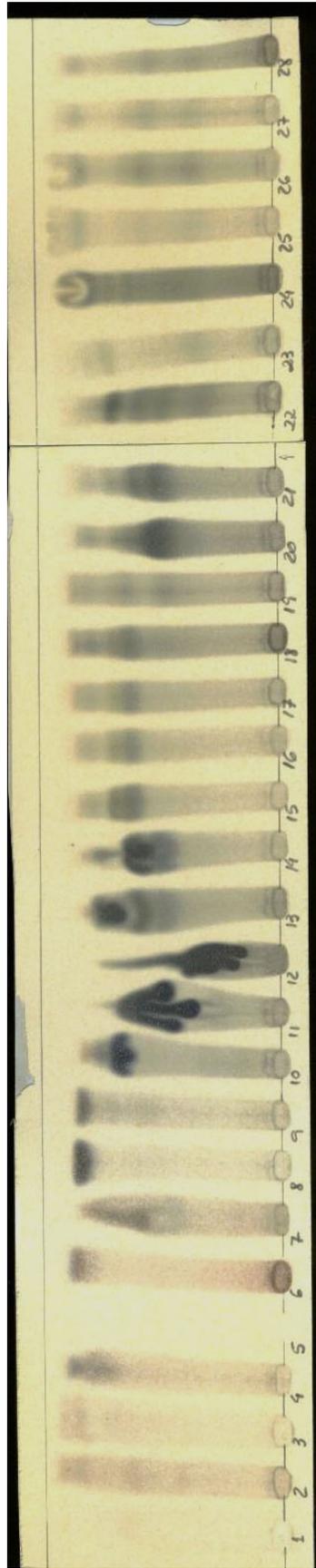
Uma das características da mutamba é a presença marcante de substâncias fenólicas, principalmente as derivadas de catequina ou flavan-3-óis, ou seja, taninos condensados, tais como citado por Hör e colaboradores (1995) ou mais recentemente por Galina (2003). Deste modo, direcionou-se a pesquisa ao isolamento e elucidação estrutural de compostos fenólicos (taninos).

No isolamento químico foi utilizado o lote correspondente ao da coleta de verão. A cromatografia em coluna (CC) contendo Sephadex® LH-20 realizada com a fase acetato de etila (19,03 g), conforme o Fluxograma 2, produziu 29 frações (Figura 14) apresentadas na Tabela 17 com seus respectivos rendimentos.

Para a separação das 29 frações foi utilizada a CCD, pelo acompanhamento dos tubos de ensaio por semelhança cromatográfica após revelação com FeCl_3 a 1% em etanol.

Tabela 17 – Apresentação das 29 frações obtidas por CC.

FRAÇÃO	ELUENTE (v/v)	Volume (ml)	TUBOS inicial – final	m (g)	Rendimento (%)
1	Etanol:Água (2:8)	1290	585ml – 1 – 99	2,0147	11,1594
2	Etanol:Água (2:8)	390	100 – 139	0,0904	0,5007
3	Etanol:Água (2:8)	490	140 – 189	0,3367	1,8649
4 e 5	Etanol:Água (2:8)	1050	190-249 – 296	0,3996	2,2134
6	Etanol:Água (3:7)	420	297 – 339	0,1118	0,6193
7	Etanol:Água (3:7)	390	340 – 379	0,3335	1,8473
8	Etanol:Água (3:7)	990	380 – 479	0,0927	0,5135
9	Etanol:Água (4:6)	690	480 – 549	0,2117	1,1726
10	Etanol:Água (4:6)	290	550 – 579	0,1796	0,9948
11	Etanol:Água (4:6)	350	580 – 615	0,5230	2,8969
12	Etanol:Água (4:6)	490	616 – 665	0,7089	3,9266
13	Etanol:Água (4:6)	550	670 – 725	0,3758	2,0816
14	Etanol:Água (4:6)	1480	726 – 874	1,8011	9,9763
15	Etanol:Água (4:6)	490	875 – 924	0,2626	1,4545
16	Etanol:Água (4:6)	490	925 – 974	0,1728	0,9571
17	Etanol:Água (1:1)	490	975 – 1024	0,1374	0,7611
18	Etanol:Água (1:1)	500	1025 – 1075	0,1372	0,7599
19	Etanol:Água (1:1)	590	1076 – 1135	0,1701	0,9422
20	Etanol:Água (1:1)	1030	1136 – 1239	1,0621	5,8830
21	Etanol:Água (1:1)	940	1240 – 1334	0,7534	4,1731
22	Etanol:Água (1:1)	400	1335 – 1375	0,2793	1,5470
23	Etanol	600	1376 – 1436	0,5241	2,9030
24	Etanol	570	1437 – 1494	1,1348	6,2857
25	Etanol	400	1495 – 1535	0,2762	1,5299
26	Metanol:Água (1:1)	490	1536 – 1585	0,2291	1,2690
27	Metanol:Água (1:1)	490	1586 – 1635	0,1884	1,0435
28	Metanol:Água (1:1)	1260	1636 – 1762	0,3606	1,9974
29	Acetona:Água (7:3)	6000	Recolhido em balão	5,1862	28,7264
TOTAL	—	23610	—	18,0538	100,0001



Gel de sílica F254; sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5 v/v/v); revelação com FeCl_3 a 1 % em etanol.

Figura 14 – Cromatograma geral das frações obtidas através de CC.

Apesar da quantidade, as frações 1, 2 e 3 não apresentaram o perfil cromatográfico desejado em CCD e portanto não foram utilizadas na seqüência do trabalho.

A cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV) é uma técnica muito utilizada na área de produtos naturais para o isolamento de substâncias de extratos brutos, frações semipuras, em quantidades que variam de miligramas a gramas e também para separar substâncias isoméricas, como os monômeros catequina e epicatequina (TOLEDO, 2002). Dentre as vantagens dessa técnica citam-se: a recuperação quantitativa da amostra, não existe adsorção irreversível da amostra, riscos reduzidos de degradação da amostra e baixo consumo de solventes (HOSTETTMANN et al., 1998, 2003). Esse sistema é útil em separação de substâncias polares e com similaridade química. Assim, a CCCAV foi fundamental no isolamento das substâncias, principalmente pelo fato de que os flavan-3-óis possuem várias características estruturais semelhantes, o que pode ser comprovado analisando os cromatogramas em camada delgada como a reatividade frente ao revelador cromogênico.

As frações 4 a 9, apesar de terem sido utilizadas nos processos de separação por cromatografia em CCCAV, CCD e CCDP, nenhuma das substâncias obtidas apresentaram condições de interpretação, pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN). Assim, somente a partir da fração 10 e até a 14 foi possível obter resultados capazes de serem analisados e interpretados, que podem ser observados nos Fluxogramas 3 a 5.

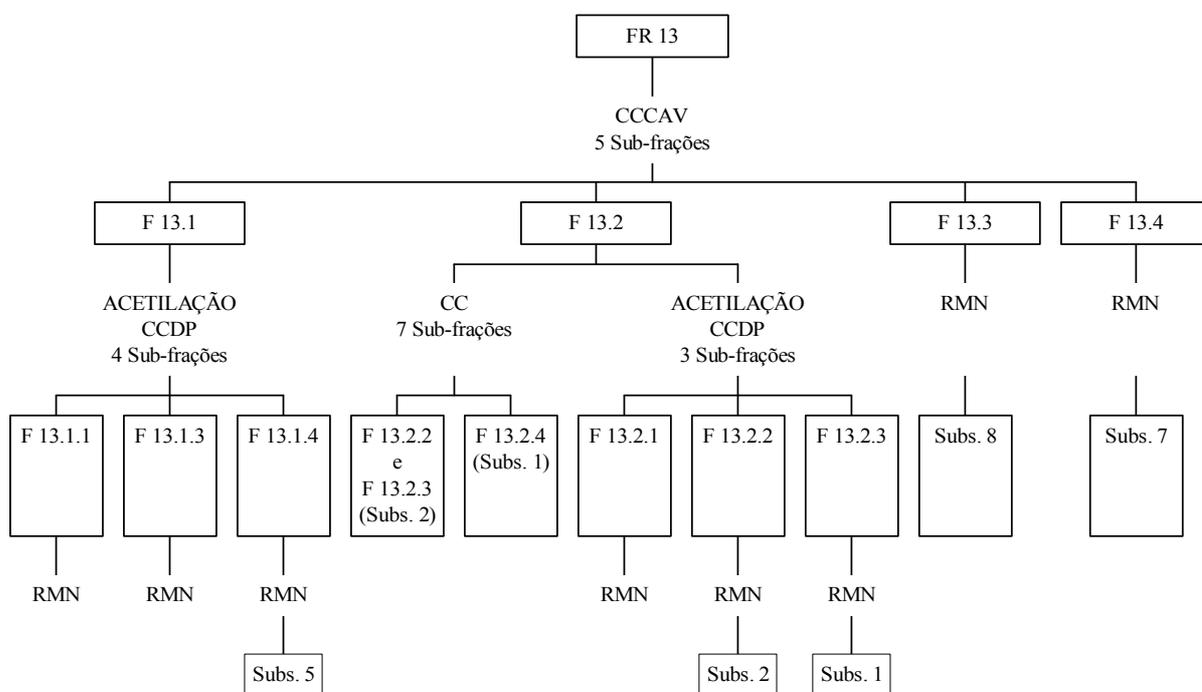
5.6.1 Substância I - catequina

A fração 13 após separação por CCCAV forneceu cinco subfrações, das quais a 13.2 (123,1 mg) apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 , com $R_f = 0,87$. Isso forneceu indícios característicos de taninos condensados. Após 28,2 mg foi derivatizada por acetilação. Assim, a subfração 13.2.3 (14,2 mg) com $R_f = 0,59$ apresentou quantidade suficiente para análises espectroscópicas, resultando no isolamento da **substância I** (Fluxograma 3).

A análise do espectro de massas da subfração 13.2.3, denominada **substância I**, forneceu o íon pseudo-molecular $[\text{M}+\text{Na}^+]$ m/z 313 encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z = 290$) não derivatizada.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 relativo para TMS (Figura 15) da **substância I** apresenta para os hidrogênios alifáticos H-3(C) (δ 5,25 ppm) e H-2(C) (δ 5,15 ppm) uma constante de acoplamento $J_{\text{H-2,H-3}}$ de 8,9 Hz. Este valor comprova uma configuração relativa

2,3-*trans* de acordo com Weinges et al. (1969). O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta uma constante de acoplamento com o hidrogênio H-4_{ax}(C) no valor de 6,6 Hz, enquanto que com o H-4_{eq}(C) possui uma constante de acoplamento de 5,1 Hz. Portanto, pode-se afirmar que existe uma configuração relativa para a **substância I** do tipo 2,3-*trans*, 3,4_{ax}-*trans* e 3,4_{eq}-*cis*. Entre δ 7,17 e 7,28 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', comprovando, assim, a di-hidroxilação do anel B. No espectro de RMN ¹H em acetona-*d*₆ relativo para TMS (Figura 16) o sistema AMX pode ser observado entre δ 7,26 e 7,38 ppm, correspondendo aos mesmos hidrogênios H-2', H-5' e H-6'. Na Figura 15 (CDCl₃) observa-se, ainda, os hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A) na região aromática em δ 6,59 e δ 6,66 ppm. Os dados de deslocamento podem ser visualizados na Tabela 18.



Fluxograma 3 – Fracionamento químico à partir da FR 13.

O espectro de RMN 2D (¹H/¹H COSY) em CDCl₃ relativo para TMS (Figura 17) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância I**.

Assim, de acordo com as interpretações anteriores e de acordo com a literatura analisada (USHIROBIRA, 2003), a **substância I** trata-se, seguramente, de **catequina**.

Tabela 18 – Dados de RMN ^1H da **substância I** (catequina) em CDCl_3 e acetona- d_6 (300 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm) em CDCl_3	δ (ppm) em acetona- d_6	Multiplicidade	J (Hz) ($\text{CDCl}_3/\text{acetona}-d_6$)
H4ax (C)	2,54	2,66	2,73	dd	$J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,8/16,8$ $J_{\text{H4ax-H3}} = 6,6/6,3$
H4eq (C)	2,92	2,87	2,86	dd	$J_{\text{H4eq-H4ax}} = 16,8/16,8$ $J_{\text{H4eq-H3}} = 5,1/4,8$
H2 (C)	4,57	5,15	5,28	d	$J_{\text{H2-H3}} = 8,9/6,3$
H3 (C)	3,99 – 4,06	5,25	5,32	ddd	$J_{\text{H3-H2}} = 8,9/6,3$ $J_{\text{H3-H4eq}} = 5,1/5,1$ $J_{\text{H3-H4ax}} = 6,6/6,6$
H6 (A)	5,88	6,59	6,61	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,1/2,1$
H8 (A)	6,03	6,66	6,68	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,1/2,1$
H5' (B)		7,17	7,28	d	$J_{\text{H5'-H6'}} = 8,1/8,7$
H6' (B)	6,77 – 6,91	7,28	7,36	dd	$J_{\text{H6'-H5'}} = 8,1/8,7$ $J_{\text{H6'-H2'}} = 2,1/1,8$
H2' (B)		7,28	7,30	d	$J_{\text{H2'-H6'}} = 2,1/1,8$

* (Kombal, 1993)

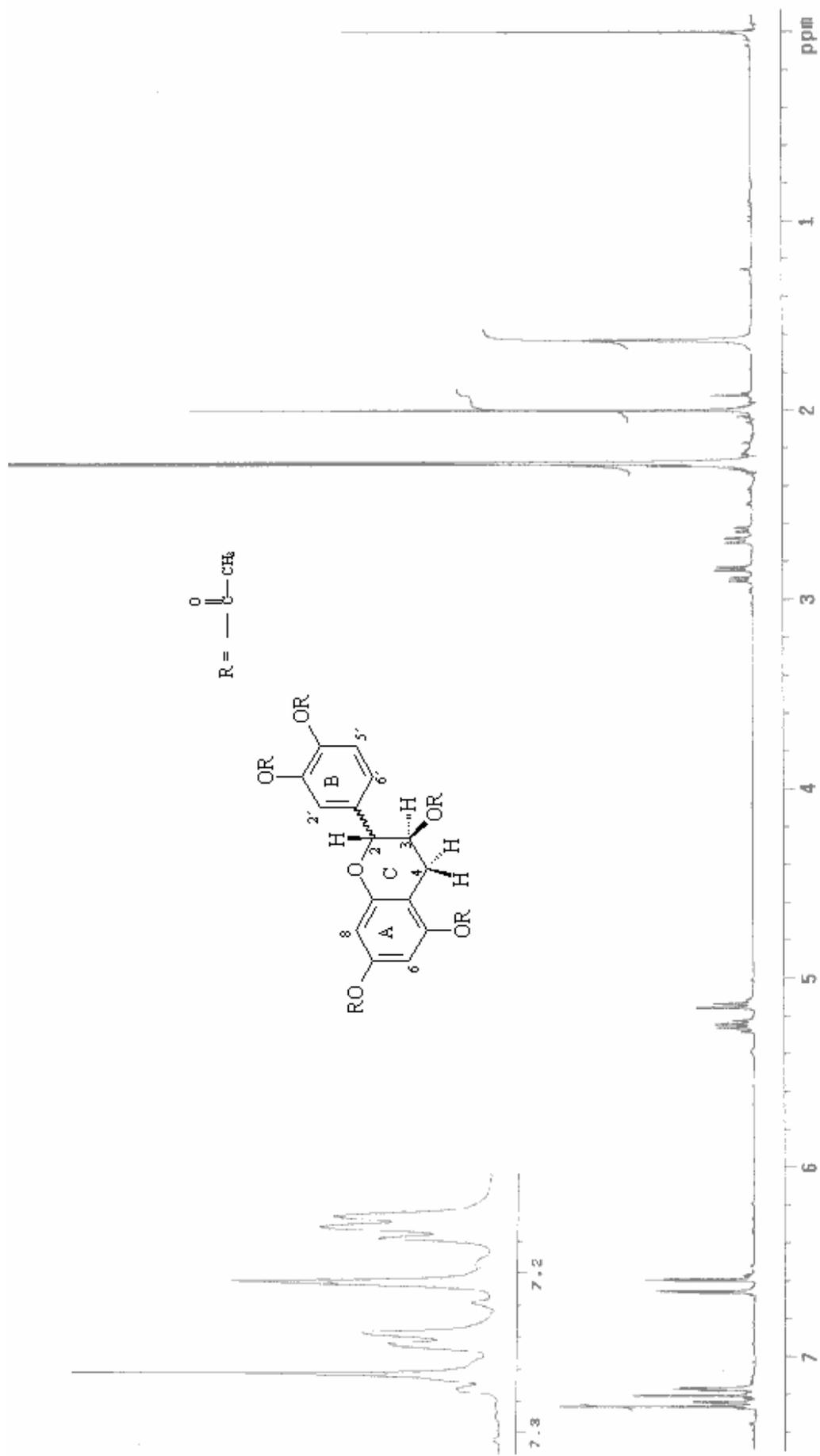
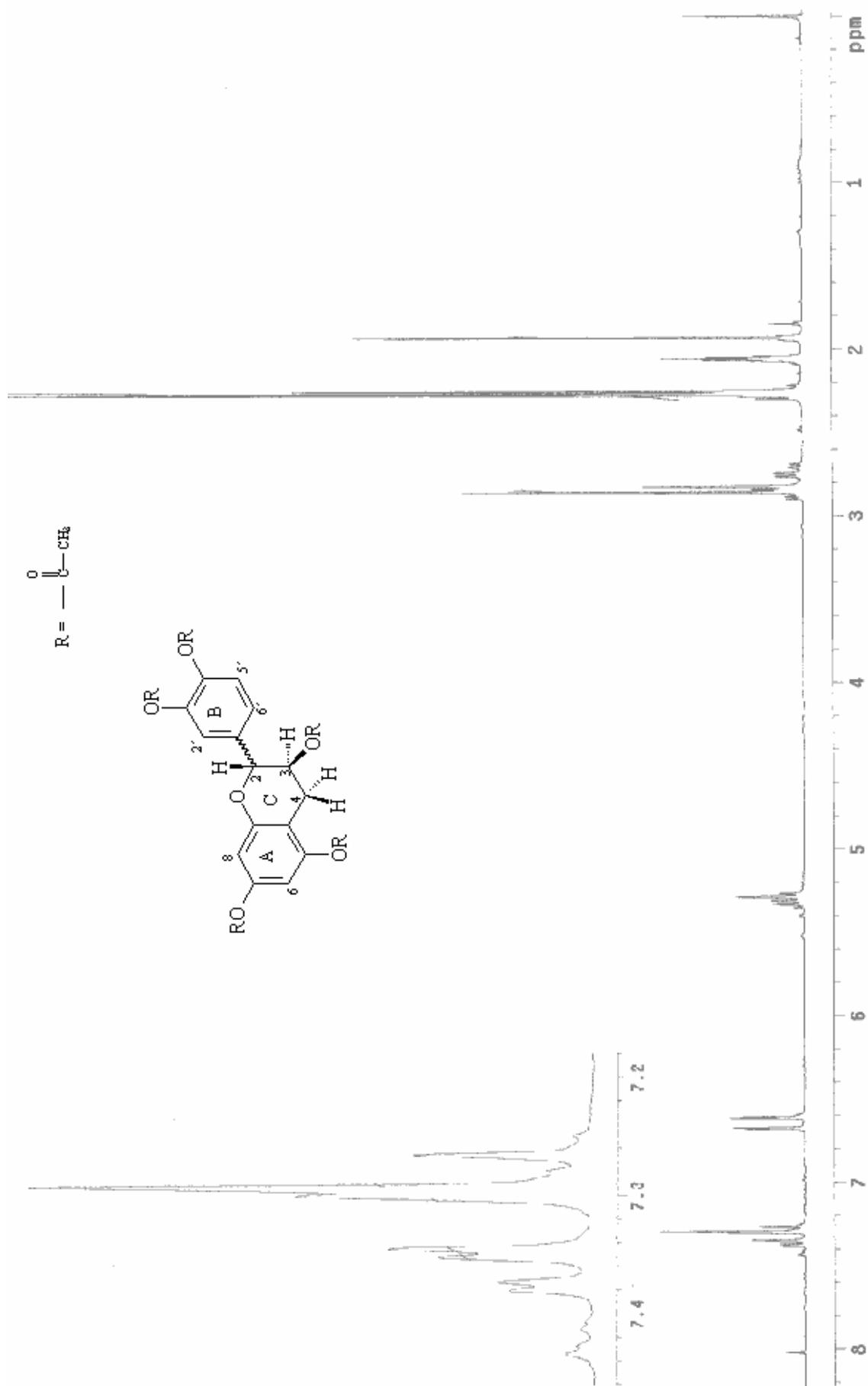


Figura 15 – Espectro de RMN ^1H da substância I (CDCl_3 , 300 MHz)

Figura 16 – Espectro de RMN ^1H da substância I (acetona- d_6 , 300 MHz)

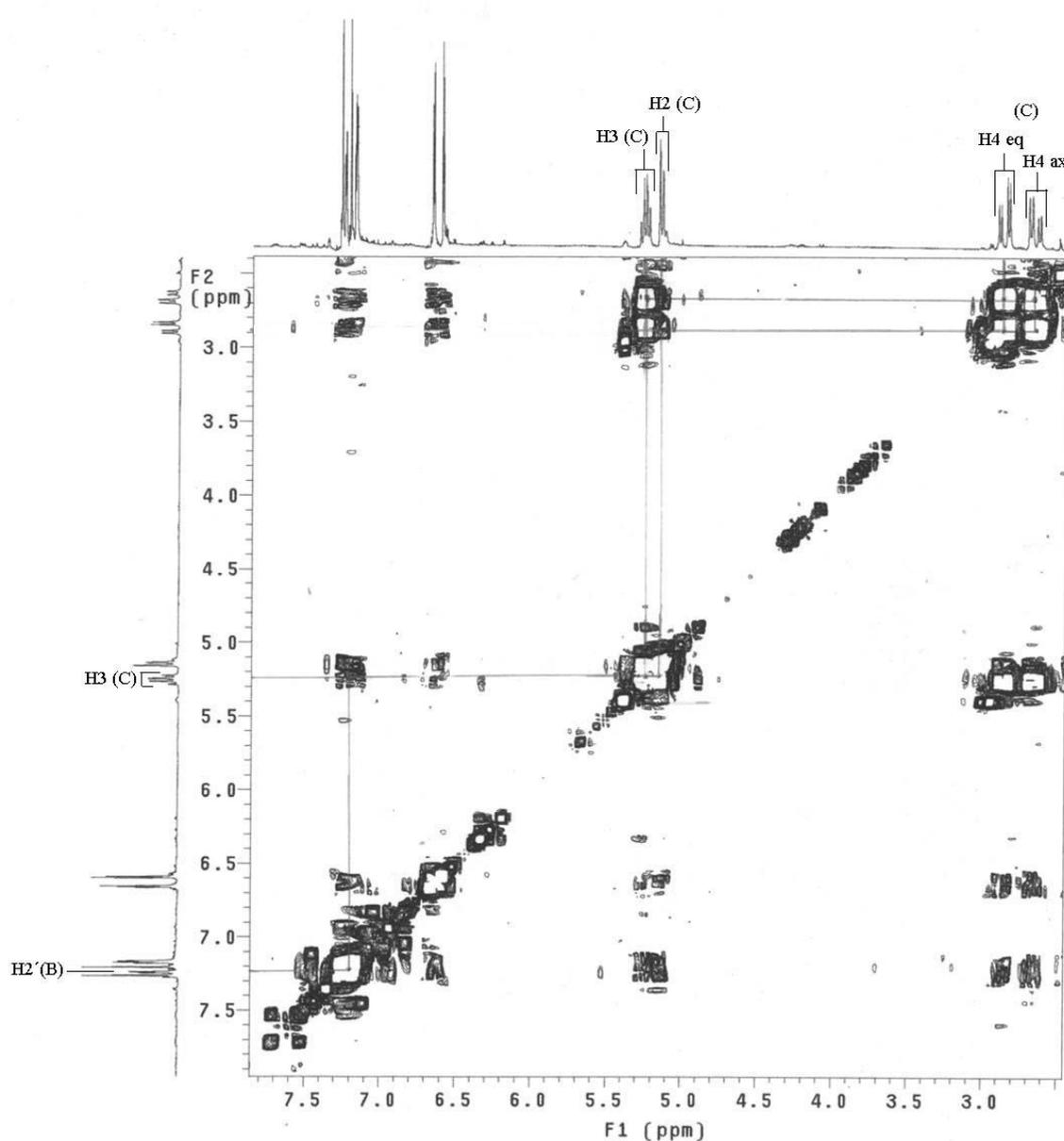


Figura 17 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância I (CDCl_3 , 300 MHz)

5.6.2 Substância II - epicatequina

A **substância II** foi isolada em diversas frações: 10.2, 11.2, 12.2, 13.2.2; como pode ser observado no Fluxograma 3, porém, optou-se por mostrar os dados da subfração 13.2.2.

A fração 13 após separação por CCCAV forneceu cinco subfrações, das quais a 13.2 (123,1 mg) apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 , com $R_f=0,87$. Isso forneceu indícios característicos de taninos condensados. Após 28,2 mg foi derivatizada por acetilação. Assim, a subfração 13.2.2 (13,1 mg) com $R_f= 0,54$

apresentou quantidade suficiente para análises espectroscópicas, resultando no isolamento da **substância II** (Fluxograma 3).

O espectro de massas da **substância II**, forneceu o íon pseudo-molecular $[M+Na^+]$ m/z 313 encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z=290$) não derivatizada, está de acordo com a literatura (PALLENBACH, 1992; MELLO, 1995).

O espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (Figura 18), da **substância II** mostra para os hidrogênios alifáticos H-3(C) (δ 5,39 ppm) e H-2(C) (δ 5,11 ppm) uma constante de acoplamento $J_{H-2,H-3}$ menor que 1 Hz comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (WEINGES et al., 1969). O hidrogênio alifático H-3(C) apresenta uma constante de acoplamento pequena com o hidrogênio H-4_{ax}(C) com valor de 2,1 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento com H-4_{eq}(C) de 4,2 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a **substância II** do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges e colaboradores (1968, 1969) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2(C) e H-3(C), com aproximadamente 6 a 8 Hz demonstram uma configuração relativa 2,3-*trans*, e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1 Hz a ordem 2,3-*cis*. Entre δ 7,20 e 7,36 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' referentes ao anel B. Pela dificuldade em visualizar os sinais do sistema AMX, optou-se por realizar uma análise de RMN 1H em acetona- d_6 . Dessa maneira é possível verificar o sistema AMX (Figura 19), com os sinais em δ 7,43 ppm para H-2', δ 7,26 ppm para H-5' e δ 7,42 ppm para o H-6', comprovando assim, a di-hidroilação no anel B, como pode ser observado na Tabela 19. No espectro (Figura 18) observam-se, ainda, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) na região aromática em δ 6,57 e δ 6,67 ppm. Esses hidrogênios, quando em solução, permanecem sem posição definida, estando em constante intercâmbio um com o outro, desde que a substância se encontre com as hidroxilas livres, não sendo o caso da **substância II** (PETEREIT, 1992). Os dados de deslocamento estão demonstrados na Tabela 19.

O espectro de RMN 2D ($^1H/^1H$ COSY) em acetona- d_6 (Figura 20) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da **substância II**.

Na Figura 21 observam-se os espectros de RMN ^{13}C em acetona- d_6 das **substâncias I** e **II**. Pode ser observado que a diferença entre ambas relaciona-se ao sinal em δ 78,8 ppm para catequina e δ 79,3 ppm para epicatequina, correspondendo ao carbono 2. De acordo com

Czochanska et al (1979) e Cai et al. (1991), os epímeros, catequina e epicatequina, podem ser seguramente diferenciados por esta análise.

Assim, de acordo com as interpretações realizadas e de acordo com a literatura analisada (USHIROBIRA, 2003), a **substância II** trata-se, seguramente, de **epicatequina**.

Tabela 19 – Dados de RMN ^1H da **substância II** (epicatequina) em CDCl_3 e acetona- d_6 (300 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm) em CDCl_3	δ (ppm) em acetona- d_6	Multiplicidade	J (Hz) (CDCl_3 /acetona- d_6)
H4ax (C)	2,7 – 2,86	2,87	2,84	dd	$J_{\text{H4ax-H4eq}} = 17,7/17,7$ $J_{\text{H4ax-H3}} = 2,1/1,5$
H4eq (C)		2,98	3,09	dd	$J_{\text{H4eq-H4ax}} = 17,7/17,7$ $J_{\text{H4eq-H3}} = 4,2/4,5$
H2 (C)	4,85	5,11	5,39	s	$J_{\text{H2-H3}} = < 1/< 1$
H3 (C)	4,21	5,39	5,52	m	$J_{\text{H3-H2}} = < 1/< 1$
H6 (A)	5,94	6,57	6,60	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,1/2,1$
H8 (A)	6,02	6,67	6,68	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,1/2,1$
H5' (B)		7,20	7,26	d	$J_{\text{H5'-H6'}} = 8,4/9,0$
H6' (B)	6,81 – 7,04	7,27	7,42	dd	$J_{\text{H6'-H5'}} = 8,4/9,0$ $J_{\text{H6'-H2'}} = 1,8/1,8$
H2' (B)		7,36	7,43	d	$J_{\text{H2'-H6'}} = 1,8/1,8$

*Foo et al. (2000)

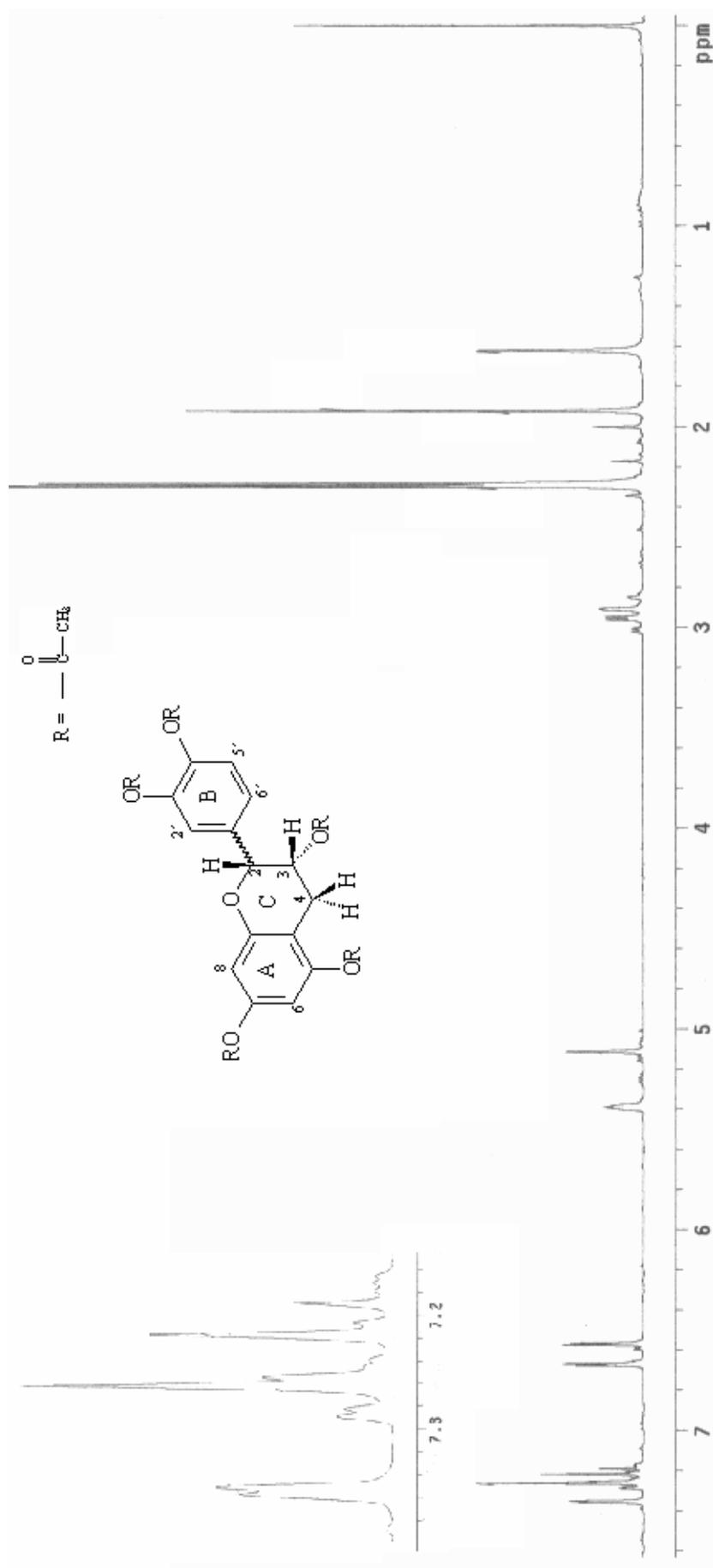
Figura 18 – Espectro de RMN ^1H da substância II (CDCl_3 , 300 MHz)

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H da substância II (acetona- d_6 , 300 MHz)

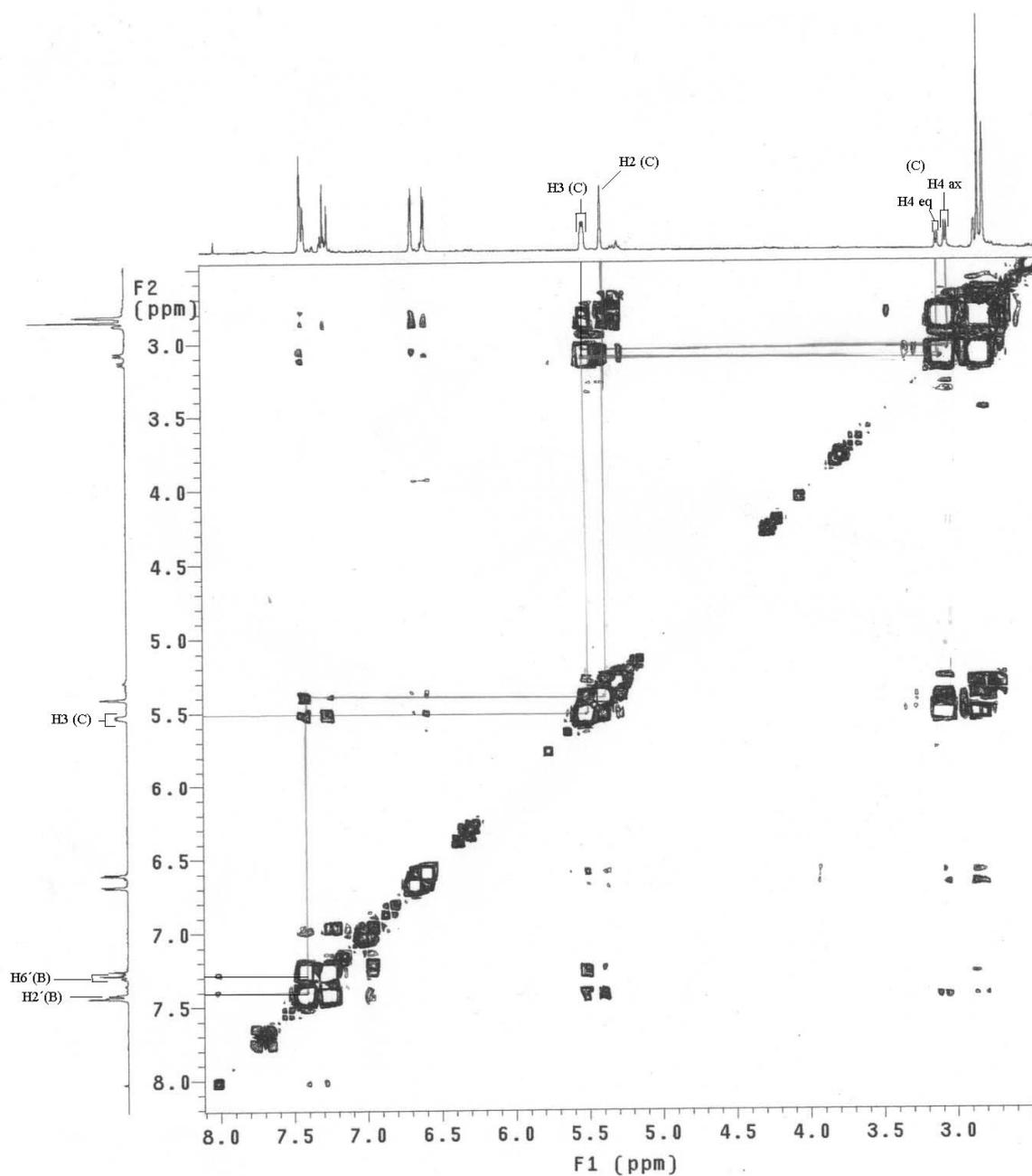


Figura 20 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância II (acetona- d_6 , 300 MHz)

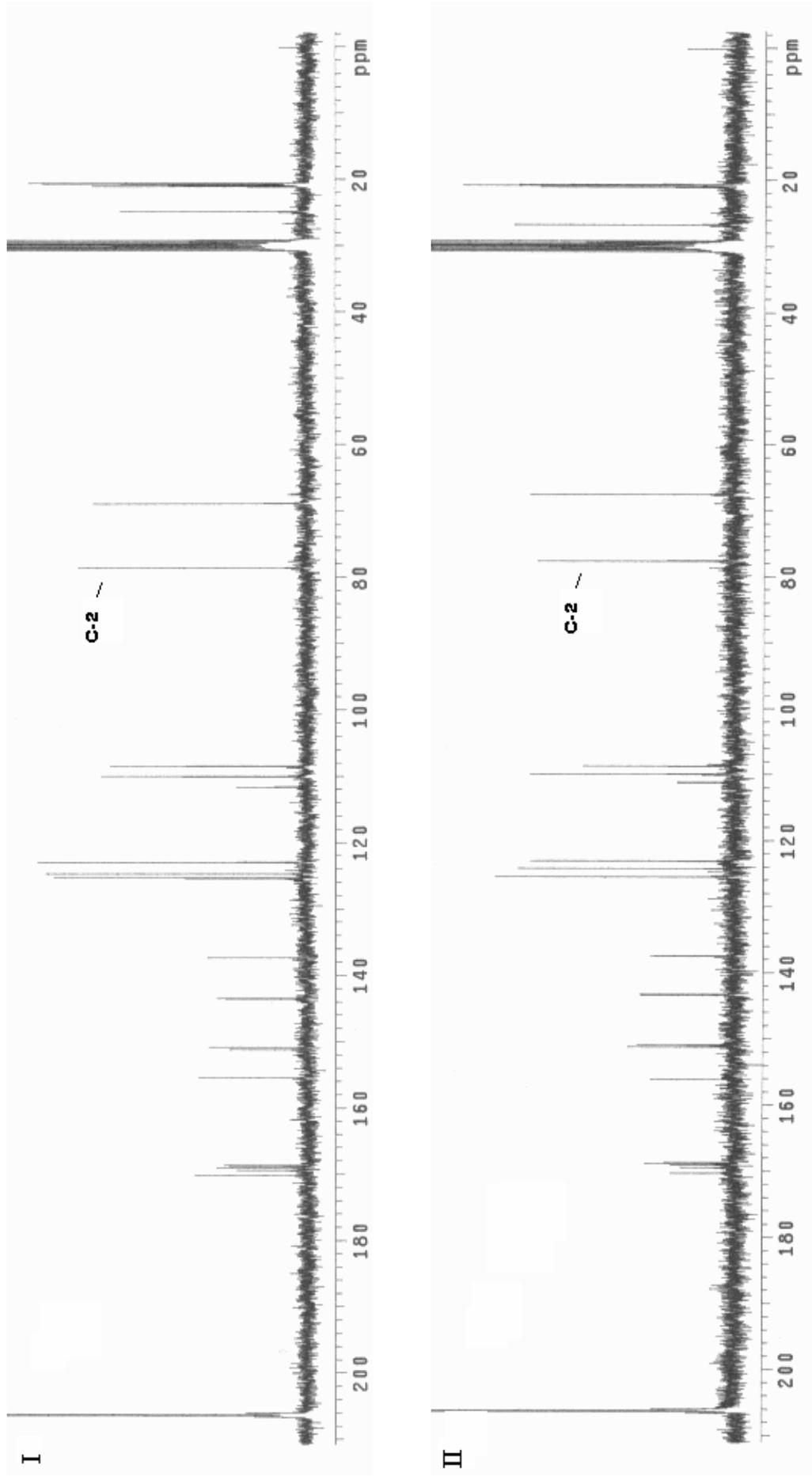


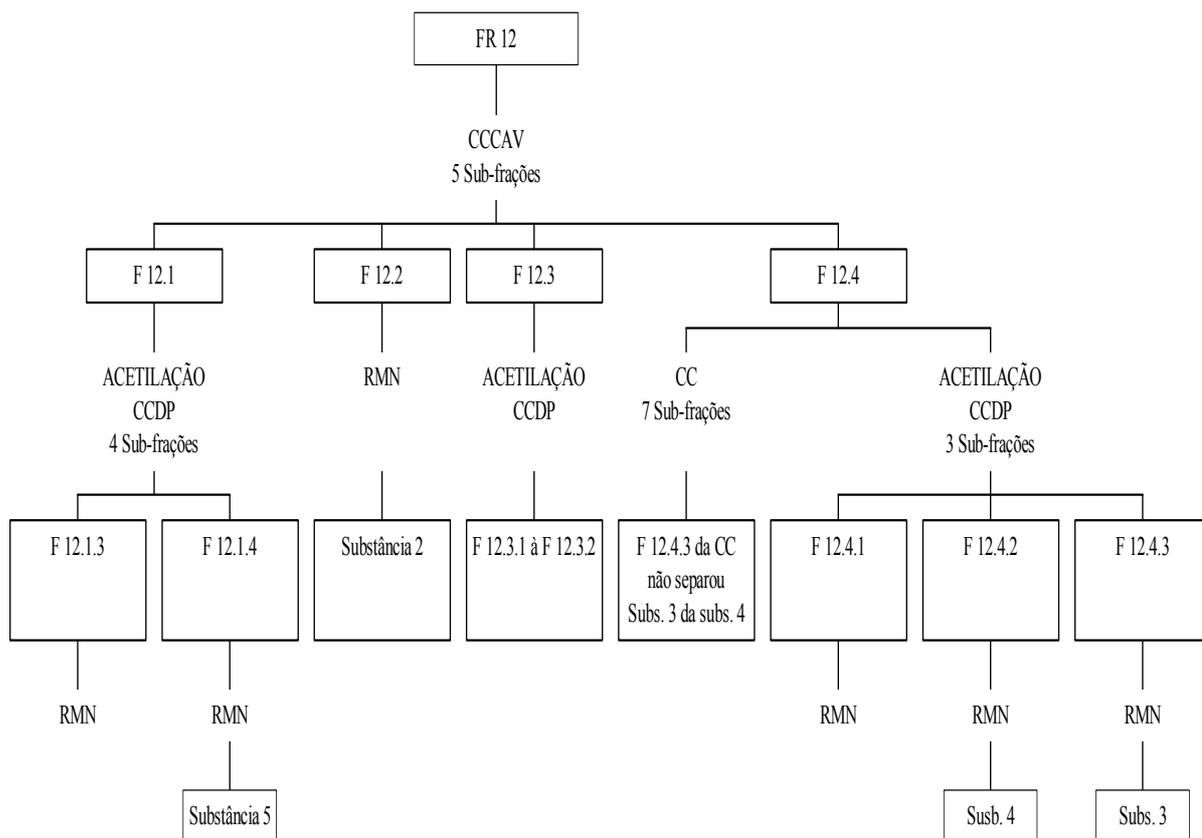
Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C das substâncias I e II, respectivamente (acetona- d_6 , 300 MHz)

5.6.3 Substância III - galocatequina

A fração 12 após separação por CCCAV forneceu cinco subfrações, das quais a fração 12.4 (31,0 mg), na CCD apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 , com $R_f=0,82$. Isso forneceu indícios característicos de taninos condensados. A fração 12.4 foi derivatizada por acetilação, e após cromatografada em CCDP, obteve-se a subfração 12.4.3 com $R_f=0,48$ que apresentou quantidade suficiente para análises espectroscópicas, resultando no isolamento da **substância III** (Fluxograma 4).

No espectro de massas foi possível observar o pico do íon pseudo-molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 329 (100%) e em $[\text{M}+\text{H}]^+$ o íon molecular em m/z 307,1 (51%). Esses dados estão de acordo com a literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002).

Na Tabela 20 encontram-se os deslocamentos (δ em ppm) de RMN ^1H em CDCl_3 (Figura 22) obtidos para a **substância III** acetilada comparados com aqueles encontrados na literatura (MELLO, 1995), sendo característico de monômero de flavan-3-ol peracetilado. É possível observar os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como 2 duplos dubletos em δ 2,66 e δ 2,92 ppm respectivamente. A constante de acoplamento entre os hidrogênios H-2 (C) e H-3 (C) $J_{\text{H-2-H-3}}= 6,3$ Hz caracterizou o monômero como tendo uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* (WEINGES et al., 1969). Pode-se comprovar a triidroxilação do anel B em C-3', C-4' e C-5' pela presença de um singlete referente aos deslocamentos de H-2' e H-6', pelo fato de serem quimicamente equivalentes. Tornou-se possível, pelo espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ em CDCl_3 (Figura 23), verificar o acoplamento entre H-3 e H-4_{ax} ($J= 6,6$ Hz), comprovando a identidade desses hidrogênios. Os sinais em δ 6,60 e 6,66 ppm correspondem aos hidrogênios H-6(A) e H-8(A), como demonstrado anteriormente nas **substâncias I e II**. Assim identificou-se a **substância III** como sendo **galocatequina**, de acordo com essa interpretação e os dados da literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002).



Fluxograma 4 – Fracionamento químico a partir da FR 12.

Tabela 20 – Dados de RMN ^1H da **substância III** (galocatequina) em CDCl_3 (300 MHz)

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4ax (C)	2,66	2,66	dd	$J_{\text{H4ax-H4eq}} = 16,8$ $J_{\text{H4ax-H3}} = 6,6$
H4eq (C)	2,92	2,91	dd	$J_{\text{H4eq-H4ax}} = 16,8$ $J_{\text{H4eq-H3}} = 5,1$
H2 (C)	5,12	5,12	d	$J_{\text{H2-H3}} = 6,3$
H3 (C)	5,19	5,21	ddd	$J_{\text{H3-H2}} = 6,3$ $J_{\text{H3-H4eq}} = 5,1$ $J_{\text{H3-H4ax}} = 6,6$
H6 (A)	6,60	6,60	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,1$
H8 (A)	6,66	6,66	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,1$
H2'/H6'(B)	7,12	7,12	s	

*Mello (1995)

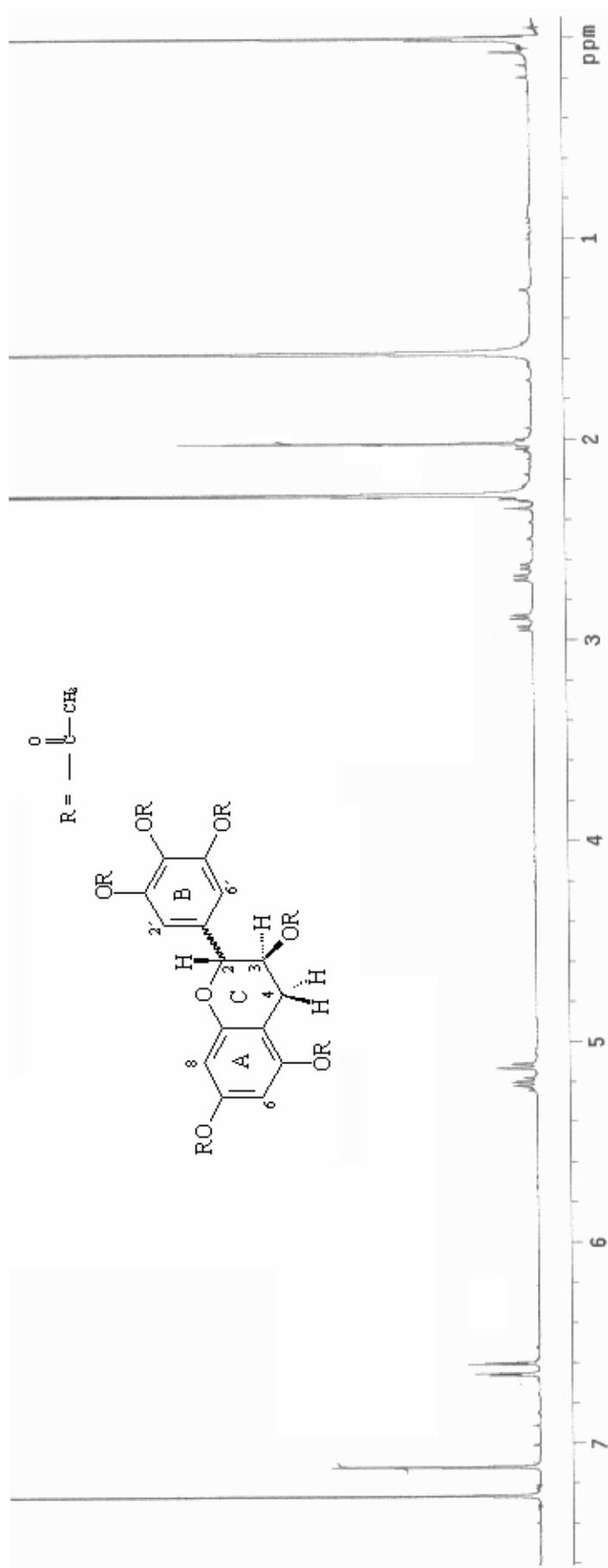


Figura 22 – Espectro de RMN ^1H da substância III (CDCl_3 , 300 MHz)

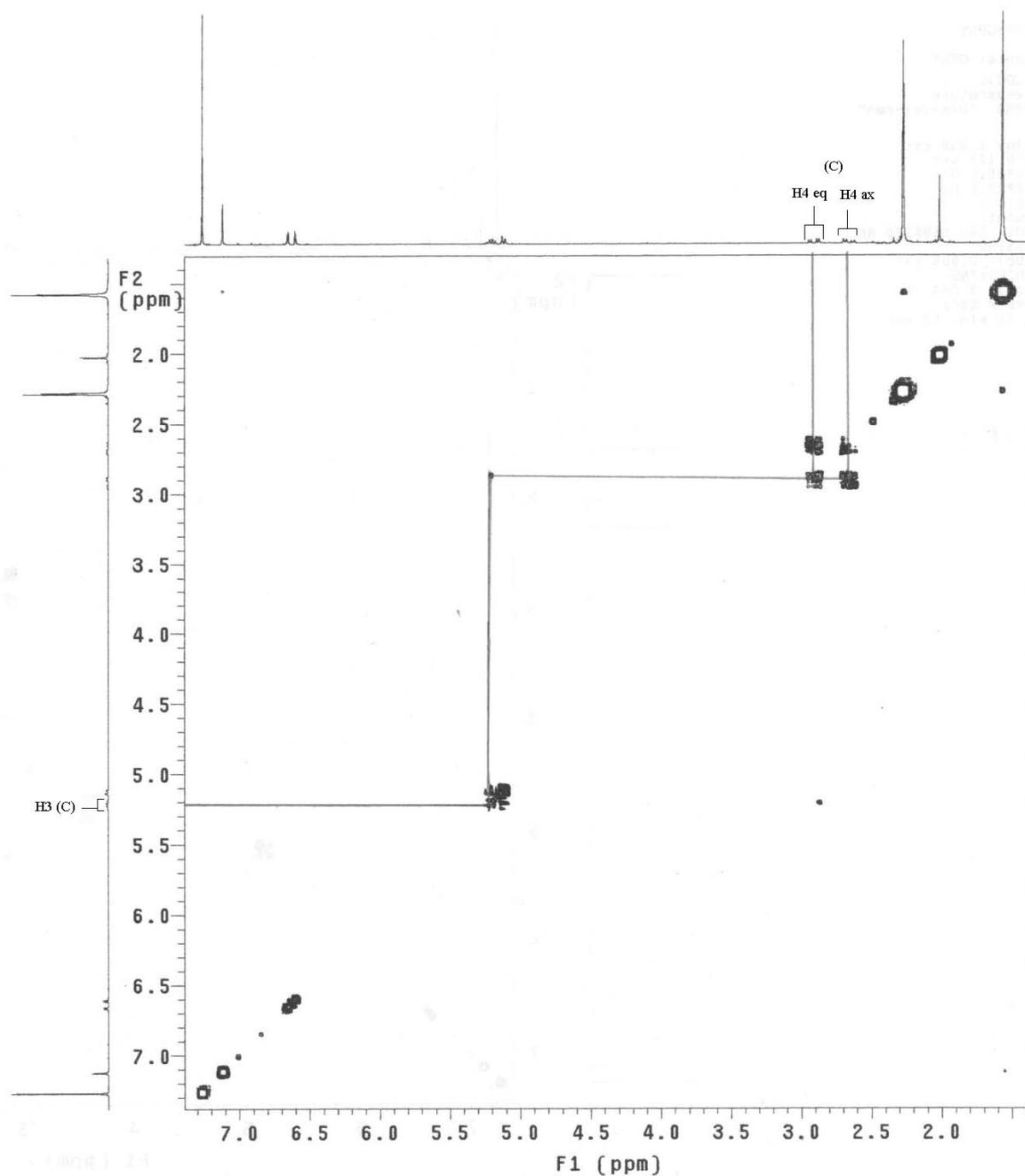


Figura 23 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância III (CDCl_3 , 300 MHz)

5.6.4 Substância IV – epigalocatequina

A substância IV foi isolada em diversas frações: 10.4, 11.4, 12.4.2; como pode ser observado no Fluxograma 4, porém, optou-se por mostrar os dados da subfração 12.4.2.

A fração 12 após separação por CCCAV forneceu cinco subfrações, das quais a fração 12.4 (31,0 mg), na CCD apresentou-se como uma mancha de coloração azul intenso após

revelação com FeCl_3 , com $R_f=0,82$. Isso forneceu indícios característicos de taninos condensados. Após, a quantidade de 11,6 mg foi derivatizada por acetilação. Assim, a subfração 12.4.2 (1,4 mg) com $R_f=0,43$ apresentou quantidade mínima para análises espectroscópicas, resultando no isolamento da **substância IV** (Fluxograma 4).

A **substância IV** forneceu dados semelhantes aos da **substância III**, para valores próximos de R_f e coloração em CCD e para o pico do íon pseudo-molecular $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ ($m/z=305,1$ (100%)) e em $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ o íons molecular em $m/z=289,1$ (62%). Assim foi possível confirmar uma substância de estrutura semelhante à galocatequina (**substância III**) ou do tipo $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$.

Os deslocamentos referentes à **substância IV** encontram-se na Tabela 21 e, na Figura 24, o espectro de RMN ^1H em CDCl_3 . Não foi possível visualizar a diferença entre H-4_{ax} e H-4_{eq} , apresentando-se com um multipletto entre δ 2,82 e 3,04 ppm. A constante de acoplamento H-2(C) e H-3(C) foi muito pequena, inferior a 1 Hz, não sendo possível determiná-la. O pico referente a H-2 apresenta-se como um pseudo singletto e H-3 como um multipletto resultante do acoplamento com H-4 (equatorial e axial). Segundo Weinges et al. (1969), a pequena constante de acoplamento entre H-2 e H-3 caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo *2,3-cis*. Os demais deslocamentos se assemelham àqueles obtidos para **substância III**. No espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (Figura 25) foi possível verificar o acoplamento entre H-3 e H-4 (equatorial e axial) que, após comparação com dados da literatura (MELLO, 1995; TOLEDO, 2002), confirma a **substância IV** como sendo **epigalocatequina**.

Outra possibilidade de identificação ocorre pela da análise do espectro de RMN ^{13}C , através do deslocamento do sinal correspondente ao C-2 dos epímeros. Na Figura 26, observam-se os espectros de RMN ^{13}C em CDCl_3 das **substâncias III** e **IV**. Pode ser observado que a diferença entre ambas relaciona-se ao sinal entre δ 75,0 e 78,0 ppm para galocatequina e entre δ 77,0 e 79,0 ppm para epigalocatequina, correspondendo ao carbono 2. De acordo com Czochanska et al (1979) e Cai et al. (1991), os epímeros, galocatequina e epigalocatequina, podem ser seguramente diferenciados por esta análise.

Tabela 21 – Dados de RMN ^1H da **substância IV** – epigalocatequina em CDCl_3 (300 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4ax / H4eq	2,82 - 3,04	2,89 – 3,04	m	
H2 (C)	4,75	5,09	s	
H3 (C)	4,16	5,38	m	
H6 (A)	5,90	6,57	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,1$
H8 (A)	5,93	6,67	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,1$
H2'/H6' (B)	6,51	7,23	s	

*Mello (1995)

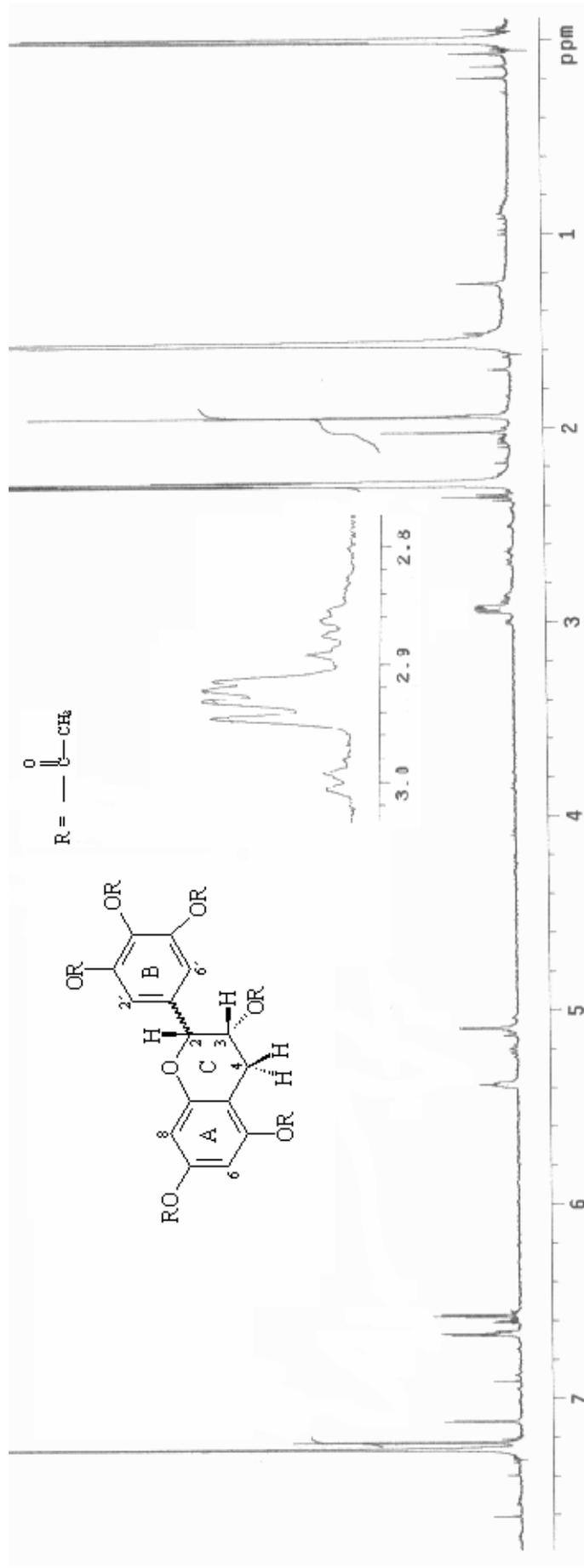


Figura 24 – Espectro de RMN ^1H da substância IV (CDCl_3 , 300 MHz)

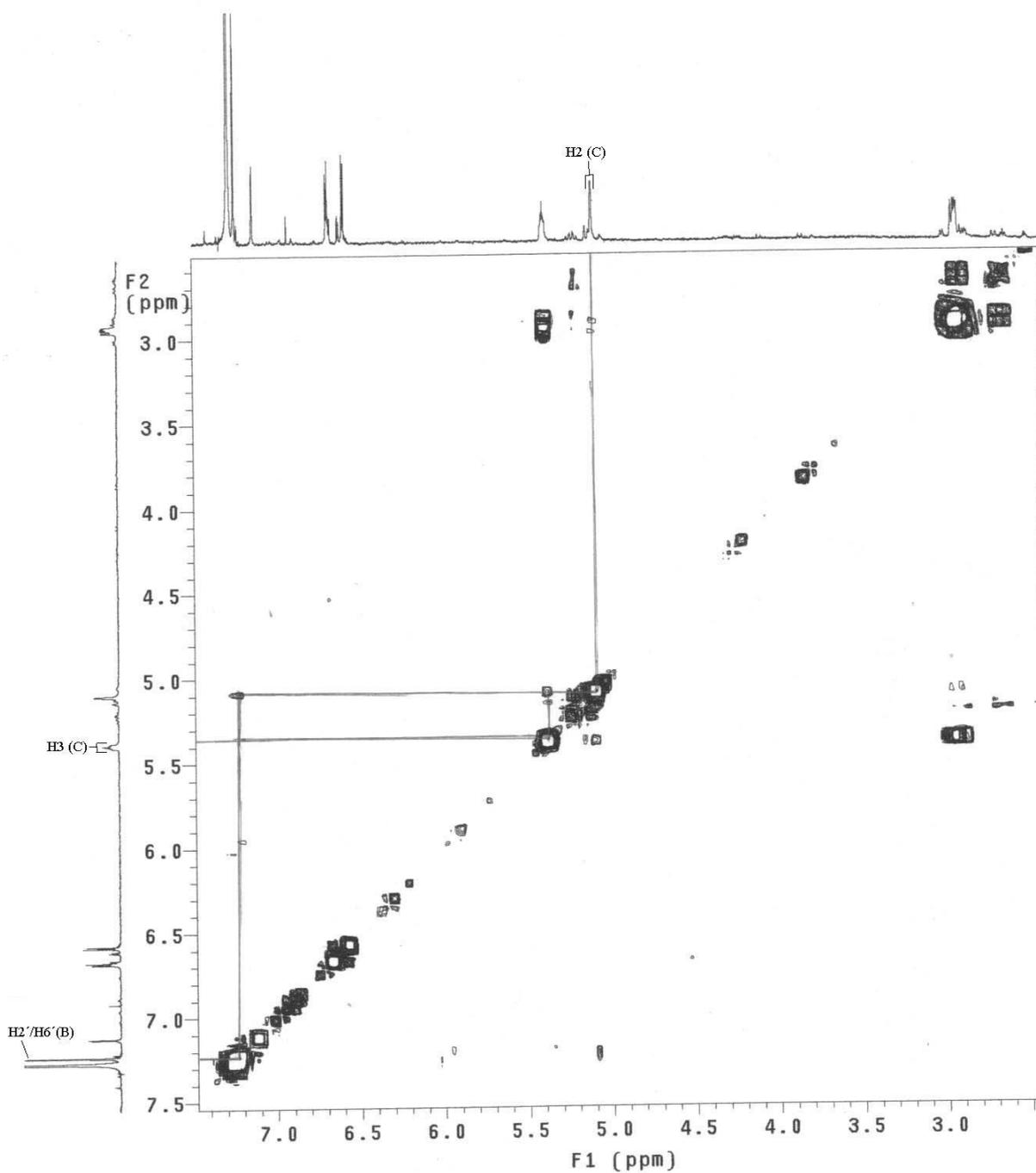


Figura 25 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância IV (CDCl_3 , 300 MHz)

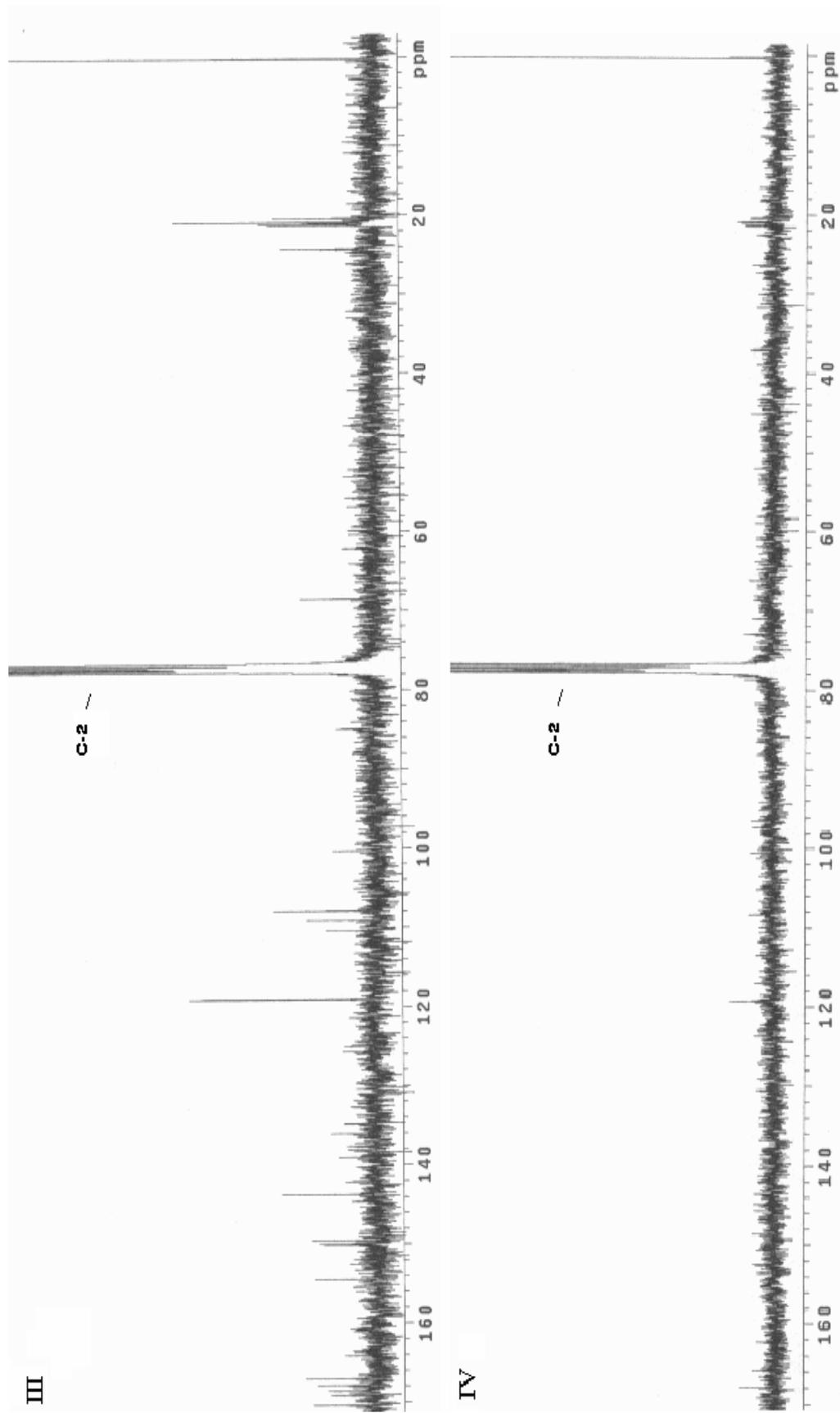


Figura 26 – Espectro de RMN ^{13}C das substâncias III e IV, respectivamente (CDCl_3 , 300 MHz)

5.6.5 Substância V - 4'-*O*-metil-epiafzelequina

A substância V foi isolada de duas frações: 12.1.4, 13.1.4; como pode ser observado nos Fluxogramas 4 e 3 respectivamente, porém, optou-se por mostrar os dados da fração 13.1.4.

A fração 13 após separação por CCCAV forneceu cinco subfrações, das quais a 13.1 (47,8 mg), na CCD apresentou-se como uma mancha de coloração azul escuro intenso após revelação com FeCl₃, com Rf=0,92 e também mostrando características de polifenóis. Após, cerca de 45 mg foram derivatizados por acetilação e limpa por CCDP, fornecendo 4 subfrações. A fração 13.1.4 (2,2 mg) com Rf=0,54 apresentou quantidade suficiente para análises espectroscópicas, resultando na **substância V** (Fluxograma 3).

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Figura 27) apresentou similaridades com a galocatequina (**substância III**) (Tabela 22) com duas exceções, sendo uma para um sigleto na região de δ 3,89 ppm atribuído a três hidrogênios equivalentes do grupamento metoxila e a outra relacionada com dois dubletos, sendo um na região de δ 7,12 ppm, atribuído a dois hidrogênios aromáticos equivalentes nas posições 3' e 5' e um dubleto na região de δ 7,45 ppm, atribuídos a dois hidrogênios aromáticos também com deslocamentos químicos equivalentes nas posições 2' e 6', ambos os sinais relacionam-se ao anel B (SILVERSTEIN et al., 1994). No ácido *p*-hidróxibenzóico os hidrogênios em posição *orto* ao grupo carboxílico (Ha/Ha') tem deslocamento químico (δ) equivalente, da mesma forma que os hidrogênios *orto* ao grupo hidróxi (Hb/Hb'). Em anéis benzênicos *para*-dissubstituídos, *J*_{ab} e *J*_{a'b'} são iguais, com valor entre 7-10 Hz, aproximadamente, enquanto *J*_{a'b} e *J*_{ab'} são iguais, porém com valor menor entre 0 e 1 Hz. Como Ha e Ha' se acoplam de maneira diferente com um outro hidrogênio específico, eles não são magneticamente equivalentes. Conforme os substituintes *para* tornam-se mais parecidos um com outro (nas suas propriedades de blindagem) o sistema tende ao padrão dubleto tipo AA' BB' ou A₂B₂ (SILVERSTEIN et al., 1994). No espectro de COSY ¹H/¹H (Figura 28), observam-se as correlações entre Ha e Hb. Além disso, observa-se a correlação entre o dubleto em δ 7,45 ppm, referente aos hidrogênios H-2' e H-6' e o sigleto em δ 5,12 ppm referente ao H-2 (C), confirmando o estabelecido por Silverstein e colaboradores (1994), definindo assim, a posição do sinal referente aos hidrogênios do anel B.

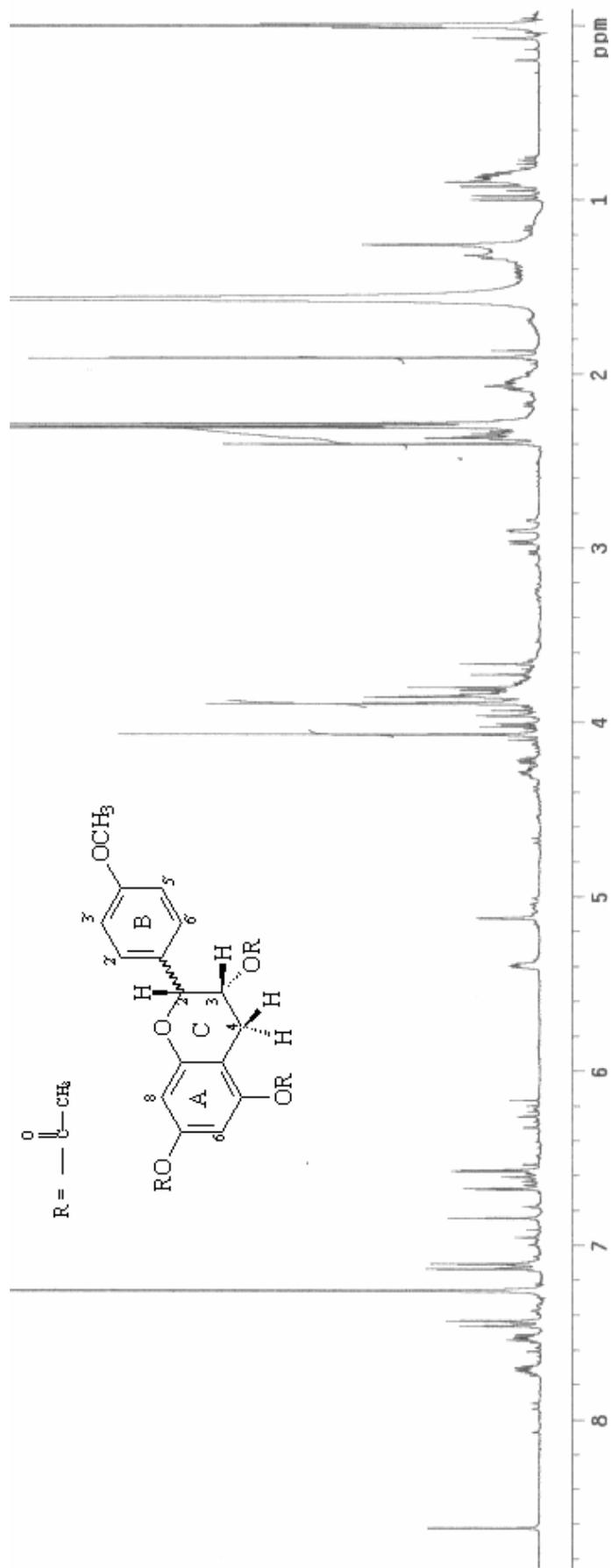
Os hidrogênios heterocíclicos exibiram um sistema ABMX característico para o *spin* padrão de 2,3-*cis* flavan-3-ol (*J*_{2,3} < 1,0 Hz) (MELLO et al., 1996a). Pelo espectro COSY

$^1\text{H}/^1\text{H}$ (Figura 28) pode-se verificar o acoplamento entre H-3 e H-4_{ax} e H-4_{eq}. A posição do grupamento metoxila no C-4' foi determinada com base nos resultados de experimentos HETCOR (HMQC) e HETCOR-LR (HMBC) (espectros não inclusos) os quais mostraram correlações entre o C-4' e os hidrogênios H-2'/6' e os hidrogênios da metoxila (δ 3,89 ppm). Assim, essa substância foi identificada como sendo **4'-O-metil-epiafzelequina**, a qual até o momento não foi isolada de nenhuma outra fonte, sendo, portanto, a primeira vez que se descreve esta substância.

Tabela 22 – Dados de RMN ^1H da **substância V** - 4'-O-metil-epiafzelequina, em CDCl_3 (300 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
OCH3 ou H4 (B)	3,77	3,89	s	
H4ax (C)	2,78	2,87	d	$J_{\text{H4ax-H4eq}} = 18$ $J_{\text{H4ax-H3}} = 2,1$
H4eq (C)	2,90	3,00	d	$J_{\text{H4eq-H4ax}} = 17,7$ $J_{\text{H4eq-H3}} = 4,5$
H3 (C)	5,15	5,39	m	$J_{\text{H3-H2}} < 1$
H2 (C)	5,56	5,12	d	$J_{\text{H2-H3}} < 1$
H6 (A)	5,99	6,57	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,1$
H8 (A)	6,19	6,68	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,1$
H3'/H5' (B)	7,09	7,12	d	$J_{\text{H3'/H5'}} = 9$
H2'/H6' (B)	7,43	7,45	d	$J_{\text{H2'/H6'}} = 9$

*Mello et al., 1999; Ueffing, 1988; Drewes et al., 1992.

Figura 27 – Espectro de RMN ^1H da substância V (CDCl_3 , 300 MHz)

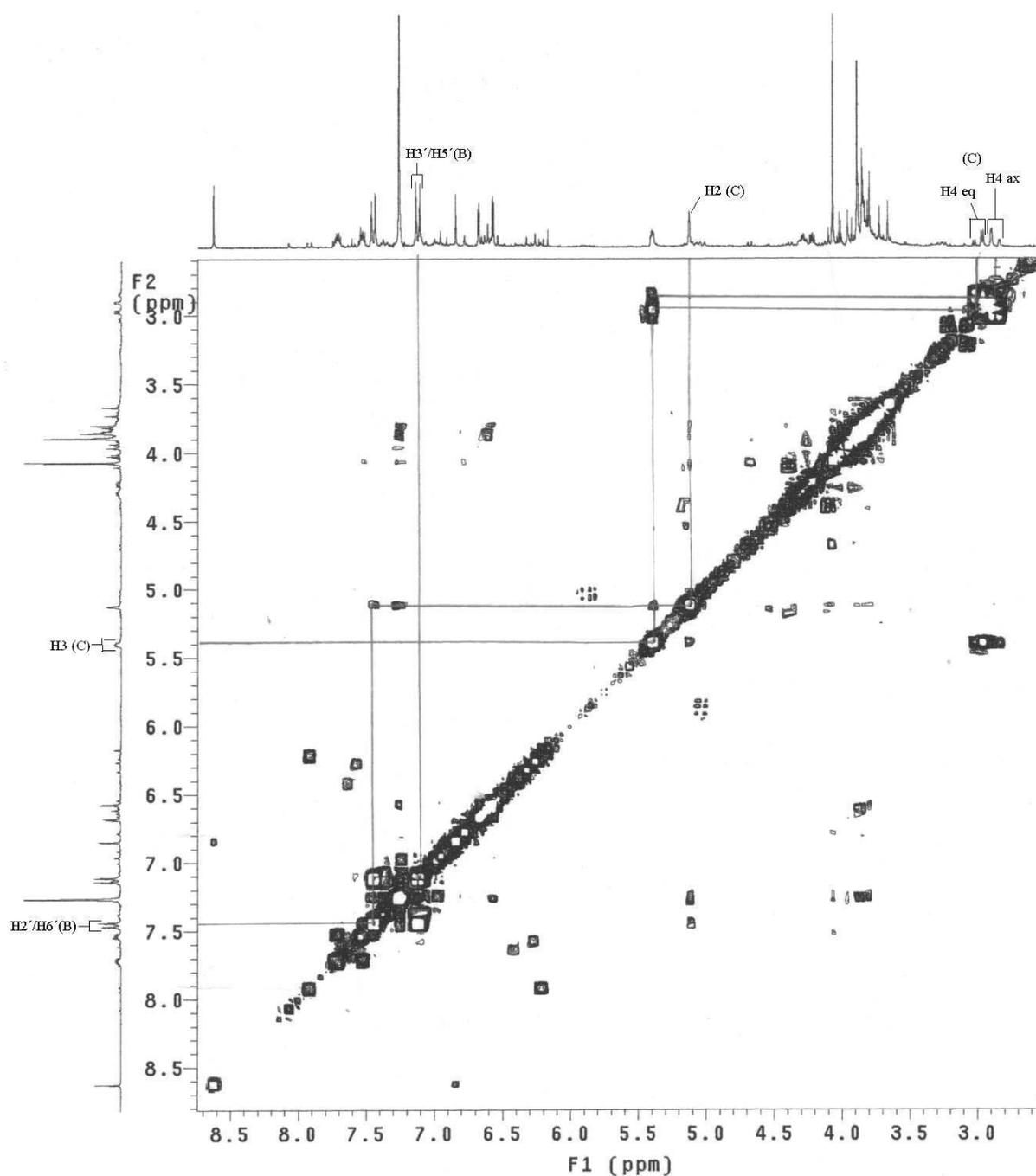


Figura 28 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância V (CDCl_3 , 300 MHz)

5.6.6 Proantocianidinas diméricas

Fletcher e colaboradores (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 utilizaram a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com

ligações 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; SCHAUMBURG, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway e colaboradores (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas (B_1/B_7 e B_2/B_5) do sistema de spins AB dos hidrogênios do anel A das substâncias com ligações (4→6) como estando em campos mais baixos (desprotegido) (δ 6,7 ppm), enquanto os sinais da ligação análoga (4→8) em campos mais altos (δ 6,1 ppm). Entretanto esse critério de diferenciação, somente é válido para substâncias com uma configuração 4*R* (Kolodziej, 1992). Adicionalmente, o hidrogênio H-2 de substâncias com ligação 4→8 apresentam-se com deslocamentos entre δ 4,37 e 5,01 ppm, enquanto substâncias ligadas 4→6, entre δ 5,04 e 5,35 ppm (HÖR et al., 1995).

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de RMN ^1H , até a configuração absoluta deixa-se “transparecer” através do C-4 (C) da ligação entre as unidades de interflavanóis, quando a unidade superior for do tipo catequina (2*R*, 2*S*). Isso é devido a essa substância ter uma constante de acoplamento grande, pois 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 4*R* (posição diequatorial do hidrogênio) como 4*S* (acoplamento axial-equatorial) (PETEREIT, 1992). O método apropriado para determinar a configuração absoluta de C-4 é através do dicroísmo circular (CD). Thompson e colaboradores (1972) indicaram a medida em CD de procianidinas diméricas significativamente pelo efeito “cotton” em 275 nm. Procianidinas diméricas com configuração 4*S*, mostram-se através de um efeito negativo, enquanto que substâncias 4*R*, uma curva espelhada (efeito positivo). É possível, ainda, utilizar outro comprimento de onda para fazer a diferenciação, como na região entre 220-240 nm (MELLO et al., 1996a, 1996b).

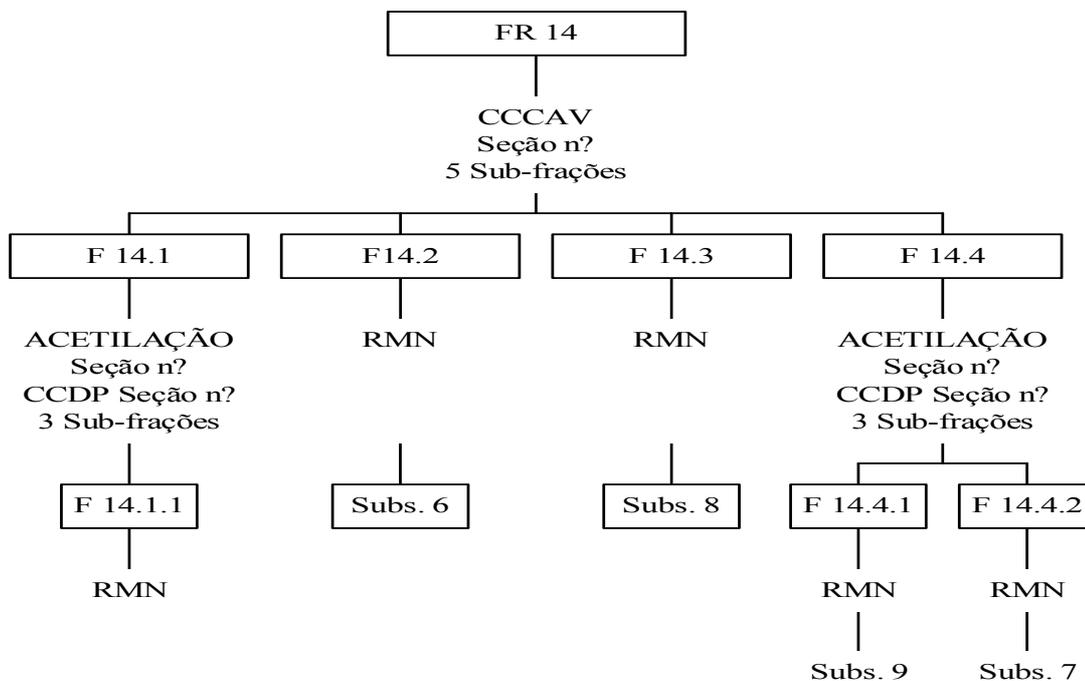
5.6.6.1 Substância VI - epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina

Com a fração 14 (1156,5 mg) empregou-se a CCCAV fornecendo cinco subfrações (Fuxograma 5). A subfração 14.2 (198,1 mg) mostrou-se visivelmente pura em CCD com valor de Rf=0,87 e com coloração azul escura intensa com solução etanólica a 1 % de FeCl₃.

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Figura 29) da **substância VI** acetilada, após purificação em CCDP, e através da análise das correlações obtidas no espectro de COSY ¹H/¹H da **substância VI** (Figura 30), forneceu os dados que se encontram na Tabela 23.

O espectro de RMN ¹H da **substância VI** mostra um sistema AMX e dois sistemas ABMX na região heterocíclica atribuídos aos anéis C e F, respectivamente. Um sistema ABMX mostrou sinais em δ 5,60, 5,19 e 4,44 ppm com constante de acoplamento inferior a 1,0 Hz para os três sinais, referentes aos hidrogênios H-2, H-3 e H-4, respectivamente, sugerindo uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*-3,4-*cis* para o anel C. O outro sistema ABMX do anel F compreende um singlete largo em δ 4,57 ppm para H-2 e um multiplete em δ 5,17 ppm para H-3. A configuração 2,3-*cis* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor inferior a 1,0 Hz. Dois duplos dubletos distintos podem ser verificados em δ 2,87 e 2,91 ppm com constante de acoplamento de 18 Hz, típico para H-4_{ax} e H-4_{eq}, respectivamente, justificando o resto do sistema do anel heterocíclico F. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*cis*, para a unidade inferior. O espectro de RMN ¹H mostra, ainda, na região aromática dois dubletos característicos de um sistema do tipo A₂B₂ referentes a quatro hidrogênios correspondendo ao anel B, em δ 7,14 ppm [H-3' e H-5'] e δ 7,42 ppm [H-2' e H-6'], com constante de acoplamento de 8,7 Hz para ambos. O sistema AMX, referente aos hidrogênios do anel E, podem ser visualizados entre δ 6,90 e 7,40 ppm. A posição dos hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A) em δ 6,00 ppm e δ 6,22 ppm, respectivamente, indica, provavelmente, uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway e colaboradores (1982), Kolodziej (1986), Danne (1994) e Mello (1995). De outra forma, a posição de ressonância do hidrogênio H-2 (F) em δ 4,57 ppm sugere uma ligação (4 β →8) (Kolodziej, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN ¹H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,23, 5,34 e 5,39 ppm, entre outros, característico de ligação do tipo (4→8) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981). Esses dados são parcialmente confirmados pelos valores encontrados por Balde e colaboradores (1995) e Malan e colaboradores (1996).

O espectro de massas forneceu dois picos. O pico do íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 601 assemelha-se ao da procianidina B2. No entanto, verifica-se outro pico molecular $[M+Na]^+ = 585$ que pode corresponder ao pico molecular da **substância VI**. Em comparação com a literatura (Galina, 2003), confirma-se a **substância VI** como sendo **epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina**.



Fluxograma 5 – Fracionamento químico à partir da FR 14

Tabela 23 – Dados de RMN 1H da **substância VI** (epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina) em $CDCl_3$ (500 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4 (F)	2 X 2,80 – 3,05	2 X 2,87 – 2,91	m	
H4 (C)	4,44	4,4	d	
H2 (F)	4,54	4,57	s	
H3 (F)	5,11	5,17	m	
H3 (C)	5,15	5,19	m	
H2 (C)	5,59	5,60	s	
H6 (A)	5,99	6,00	d	$J_{H6-H8} = 2,1$
H8 (A)	6,23	6,22	d	$J_{H8-H6} = 2,1$
H6 (D)	6,66	6,62	s	
H2'/H 5'/H6'(E)	6,76 – 7,50	6,90 – 7,40	m	
H2'/H6'(B)	7,46	7,42	d	$J_{H2'/H6'} = 8,7$
H3'/H5'(B)	7,09	7,14	d	$J_{H3'/H5'} = 8,7$

*Drewes et al. (1992.); Galina (2003)

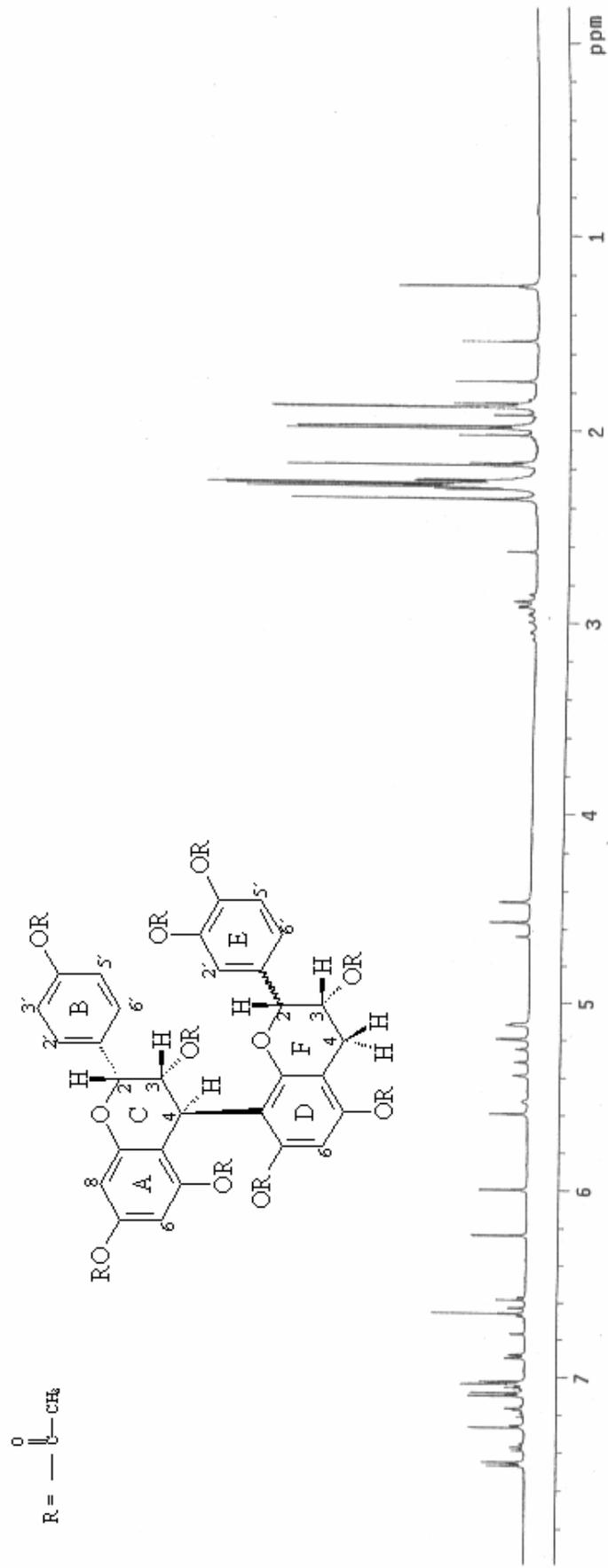


Figura 29 – Espectro de RMN ^1H da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz)

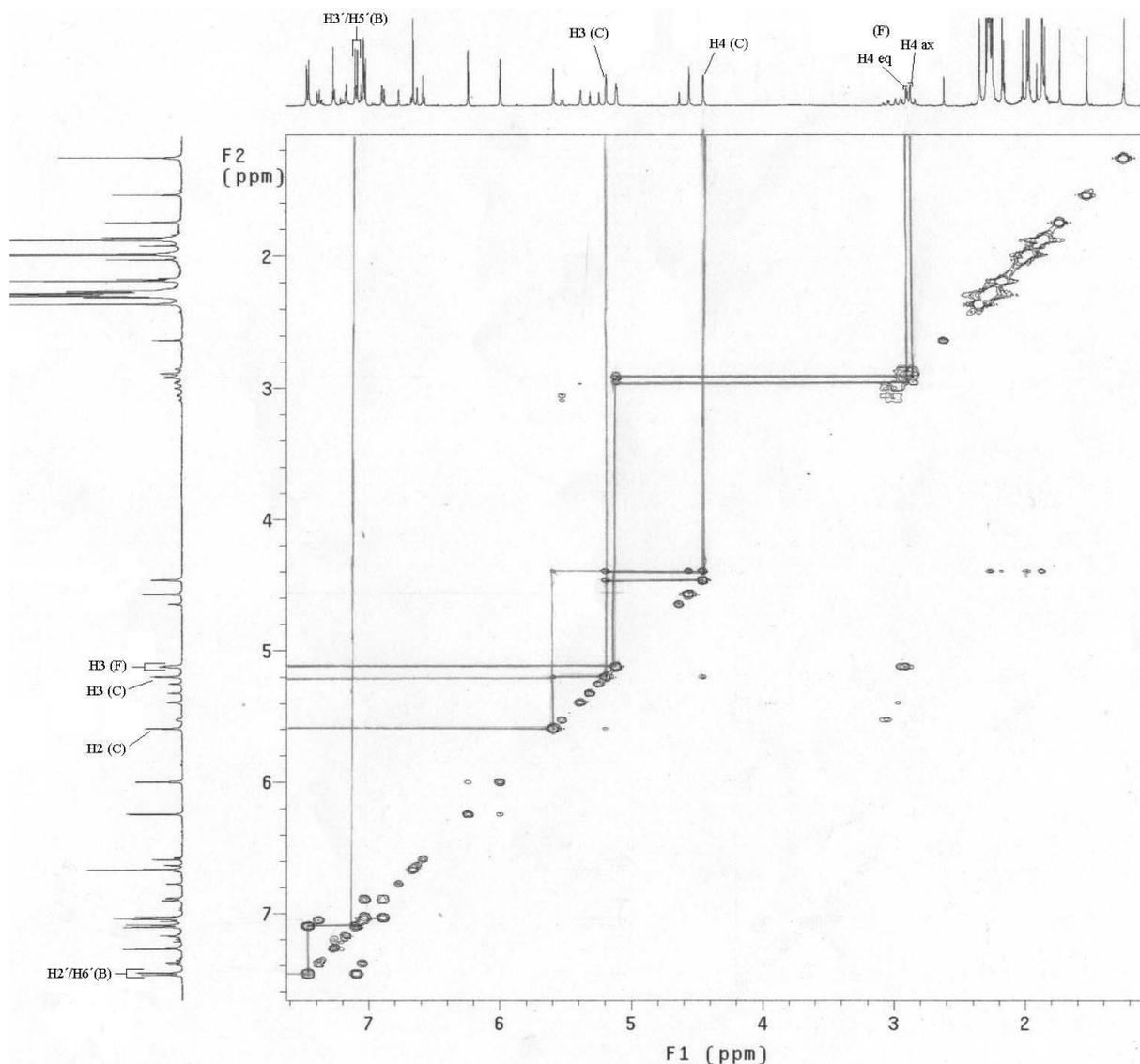


Figura 30 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz)

5.6.6.2 Substância VII - epicatequina-(4 β →8)-catequina ou PBI

A **substância VII** foi isolada de duas frações: 13.4, 14.4.2; como pode ser observado nos Fluxogramas 3 e 5, porém, optou-se por mostrar os dados da subfração 14.4.2.

Com a fração 14 (1156,5 mg) empregou-se a CCCAV fornecendo cinco subfrações (Fluxograma 5). A subfração 14.4 (41,0 mg) mostrou-se em CCD com valor de $R_f=0,72$ e com coloração azul intensa com FeCl_3 , foi acetilada e obteve-se a subfração 14.4.2 (4,8 mg) que mostrou-se pura em CCDP com valor de $R_f=0,32$ e com coloração azul escura intensa com solução de FeCl_3 a 1 % em etanol.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (Figura 31) da **substância VII** acetilada, após purificação em CCDP, forneceu os dados que se encontram na Tabela 24.

O espectro de RMN ^1H da **substância VII** (Figura 31) mostra dois sistemas AMX (anéis B e E) e ABMX na região heterocíclica atribuídos aos anéis C e F, respectivamente. Os dois sistemas AMX mostraram sinais entre δ 6,87 e 7,30 ppm com diferentes constante de acoplamento e os sinais referem-se aos hidrogênios dos anéis B e E. O sistema ABMX do anel F compreende um duplo duplo dubleto em δ 5,05 ppm para H-3 e um dubleto em δ 4,33 ppm para H-2. A configuração *2,3-trans* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor de 9,9 Hz. Dois duplos dubletos distintos podem ser verificados em δ 2,56 e 3,21 ppm com constante de acoplamento de 16,8 Hz típico para H-4ax e H-4eq, respectivamente, justificando o restante do sistema do anel heterocíclico F. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo *3,4-trans* para a unidade inferior. O outro sistema ABMX, relativo ao anel C (unidade superior), demonstrou dois sinais em δ 5,45 e 5,15 ppm referentes aos hidrogênios H-2 e H-3 como singletos largos. O sinal referente ao H-4 (C) apresenta-se como um singlete largo em δ 4,42 ppm. O espectro de RMN ^1H mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6 (A), H-8 (A) e H-6 (D) em δ 5,99, δ 6,29 e δ 6,68 ppm, respectivamente, indicando, provavelmente, uma ligação ($4\beta\rightarrow 8$) conforme as observações de Hemingway e colaboradores (1982), Kolodziej (1986), Danne (1994) e Mello (1995). De outra forma, a posição de ressonância do hidrogênio H-2 (F) em δ 4,33 ppm sugere uma ligação ($4\beta\rightarrow 8$) (Kolodziej, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN ^1H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,21 e 5,35 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo ($4\rightarrow 8$) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981). As correlações dos hidrogênios foram observadas no espectro de $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY em CDCl_3 (Figura 32).

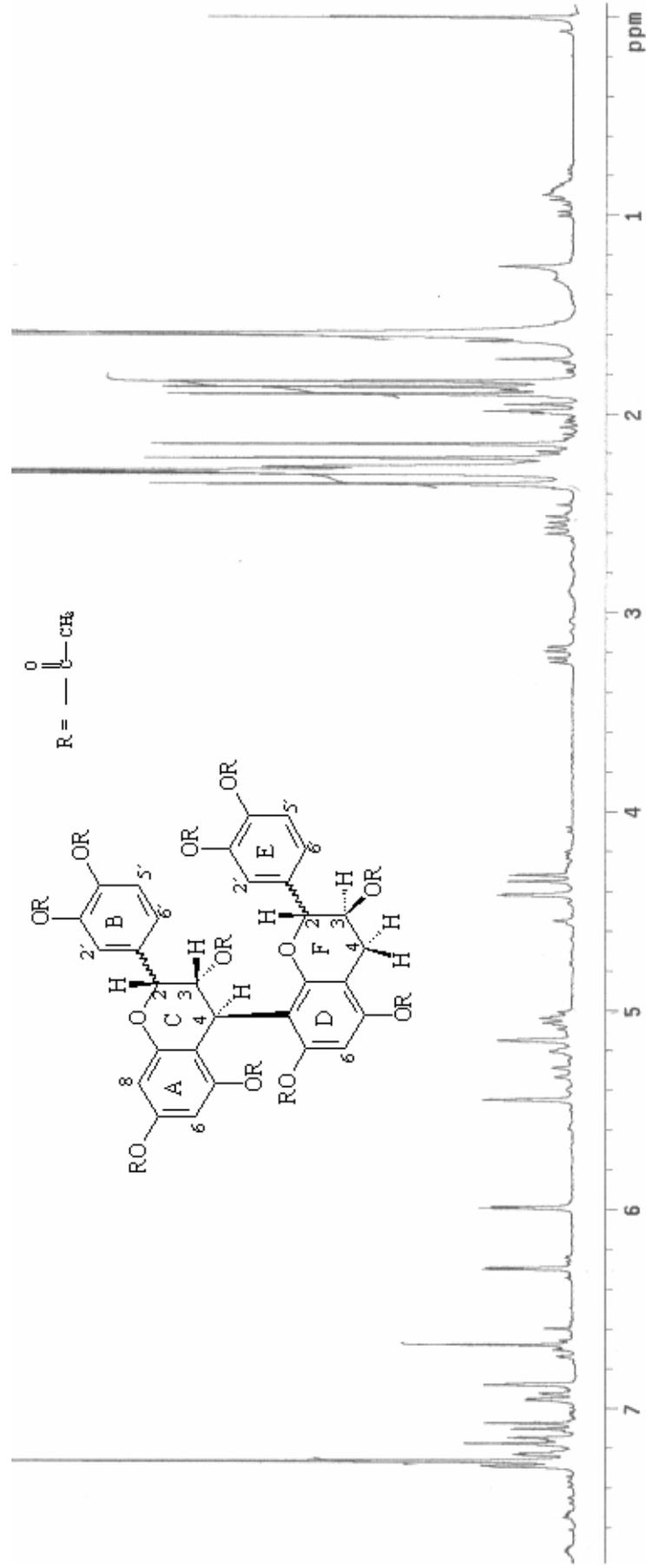
Foram realizadas para a **substância VII**, as análises de ^{13}C RMN em CDCl_3 (1D), HSQC e HMBC (espectros não mostrados).

Esses dados são confirmados pelos valores encontrados por Fletcher e colaboradores (1977), Ueffing (1988), Kolodziej (1986) e Petereit e colaboradores (1991). Em comparação com a literatura, confirma-se a **substância VII** como sendo **epicatequina-($4\beta\rightarrow 8$)-catequina**, ou também denominada de procianidina B1 (PB1). Esta substância já foi isolada de diversas fontes naturais, entretanto esta é a primeira vez que é descrita para o gênero *Guazuma*.

Tabela 24 – Dados de RMN 1H da **substância VII**, epicatequina-(4 β →8)-catequina (CDCl₃; 500 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4ax (F)	2,55	2,56	dd	$J_{H4ax-H4eq} = 16,8$ $J_{H4ax-H3} = 9,3$
H4eq (F)	3,17	3,21	dd	$J_{H4eq-H4ax} = 16,8$ $J_{H4eq-H3} = 6,6$
H4 (C)	4,43	4,42	s	
H2 (F)	4,33	4,33	d	$J_{H2-H3} = 9,9$
H3 (F)	5,04	5,05	ddd	$J_{H3-H2} = 9,9$ $J_{H3-H4ax} = 9,3$ $J_{H3-H4eq} = 6,6$
H3 (C)	5,12	5,15	m	
H2 (C)	5,46	5,45	s	
H6 (A)	5,99	5,99	d	$J_{H6-H8} = 2,1$
H8 (A)	6,27	6,29	d	$J_{H8-H6} = 2,1$
H6 (D)	6,68	6,68	s	
H5' (B)	6,80 – 7,30	7,16	d	$J_{H5'-H6'} = 8,4$
H6' (B)	6,80 – 7,30	7,25	dd	$J_{H6'-H5'} = 8,4$ $J_{H6'-H2'} = 1,8$
H2' (B)	6,80 – 7,30	6,88	d	$J_{H2'-H6'} = 1,8$
H5' (E)	6,80 – 7,30	6,95	d	$J_{H5'-H6'} = 8,4$
H6' (E)	6,80 – 7,30	7,09	dd	$J_{H6'-H5'} = 8,4$ $J_{H6'-H2'} = 1,8$
H2' (E)	6,80 – 7,30	6,92	d	$J_{H2'-H6'} = 1,8$

*Ueffing (2000)



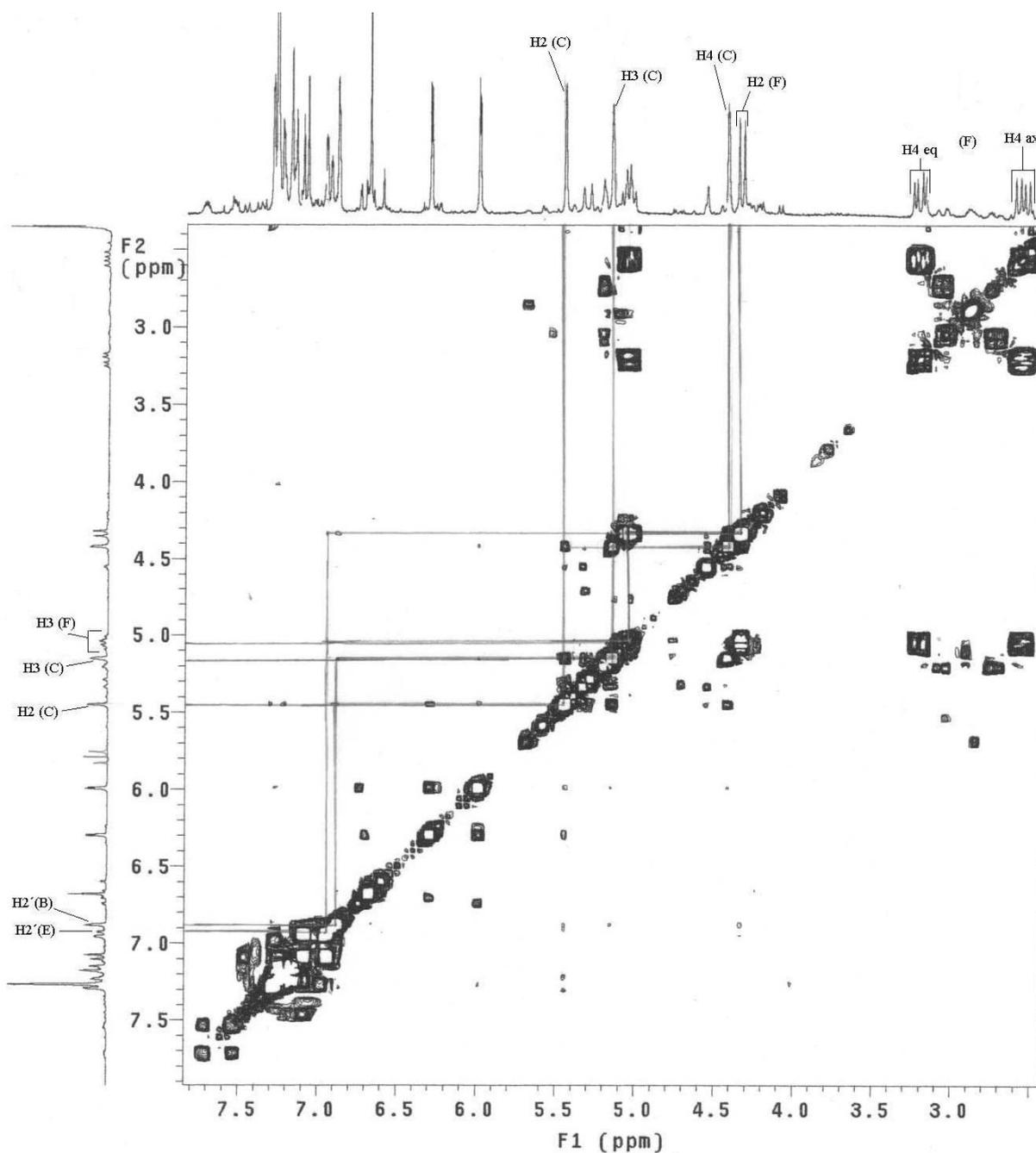


Figura 32 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VII (CDCl_3 , 300 MHz)

5.6.6.3 Substância VIII - epicatequina-(4 β →8)-epicatequina ou PB2

A **substância VIII** foi isolada de duas frações: 13.3 e 14.3; como pode ser observado nos Fluxogramas 3 e 5, porém, optou-se por mostrar os dados da fração 14.3.

Com a fração 14 (1156,5 mg) empregou-se a CCCAV fornecendo cinco frações (Fluxograma 5). A subfração 14.3 (711,2 mg) mostrou-se visivelmente pura em CCD com

valor de $R_f=0,75$ e com coloração azul escura intensa em revelação com solução de $FeCl_3$ a 1% em etanol.

O espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (Figura 33) da **substância VIII** acetilada, após purificação em CCDP, forneceu os dados que se encontram na Tabela 25.

O espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ da **substância VIII** mostra dois sistemas AMX (anéis B e E) e ABMX na região heterocíclica atribuídos aos anéis C e F, respectivamente. Os dois sistemas AMX mostraram sinais entre δ 6,87 e 7,37 ppm com diferentes constantes de acoplamento e os sinais referem-se aos hidrogênios dos anéis B e E (H-2', H-5' e H-6'). O sistema ABMX do anel F compreende um multipletto em δ 5,10 ppm para H-3 e um singletto largo em δ 4,54 ppm para H-2. A configuração 2,3-*cis* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor inferior a 1,0 Hz. Não foi possível a diferenciação entre H-4_{ax} e H-4_{eq}, apresentando-se com um multipletto entre δ 2,85 – 2,93 ppm. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*cis* para a unidade inferior. O outro sistema ABMX, relativo ao anel C (unidade superior), demonstrou dois sinais em δ 5,58 e 5,17 ppm referentes aos hidrogênios H-2 e H-3 como singletos largos. O sinal referente ao H-4 (C) apresenta-se como um singletto largo em δ 4,46 ppm. Desta forma é possível estabelecer a configuração relativa do anel heterocíclico C como sendo do tipo 2,3-*cis*-3,4-*cis*. O espectro de RMN 1H mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6 (A), H-8 (A) e H-6 (D) em δ 5,99, 6,23 e δ 6,65 ppm, respectivamente, indicando, provavelmente, uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway e colaboradores (1982), Kolodziej (1986), Danne (1994) e Mello (1995). Somando-se a isto, a posição de ressonância do hidrogênio H-2 (F) em δ 4,54 ppm sugere uma ligação (4 β →8) (Kolodziej, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN 1H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,23 e 5,38 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo (4→8) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981).

Esses dados são confirmados pelos valores encontrados por Fletcher e colaboradores (1977), Kolodziej (1986), Ueffing (1988) e Galina (2003). As correlações dos hidrogênios foram observadas no espectro de $^1H/^1H$ COSY em $CDCl_3$ (Figura 34). Foi realizada, ainda, para a **substância VIII**, a análise de HSQC (espectro não mostrado).

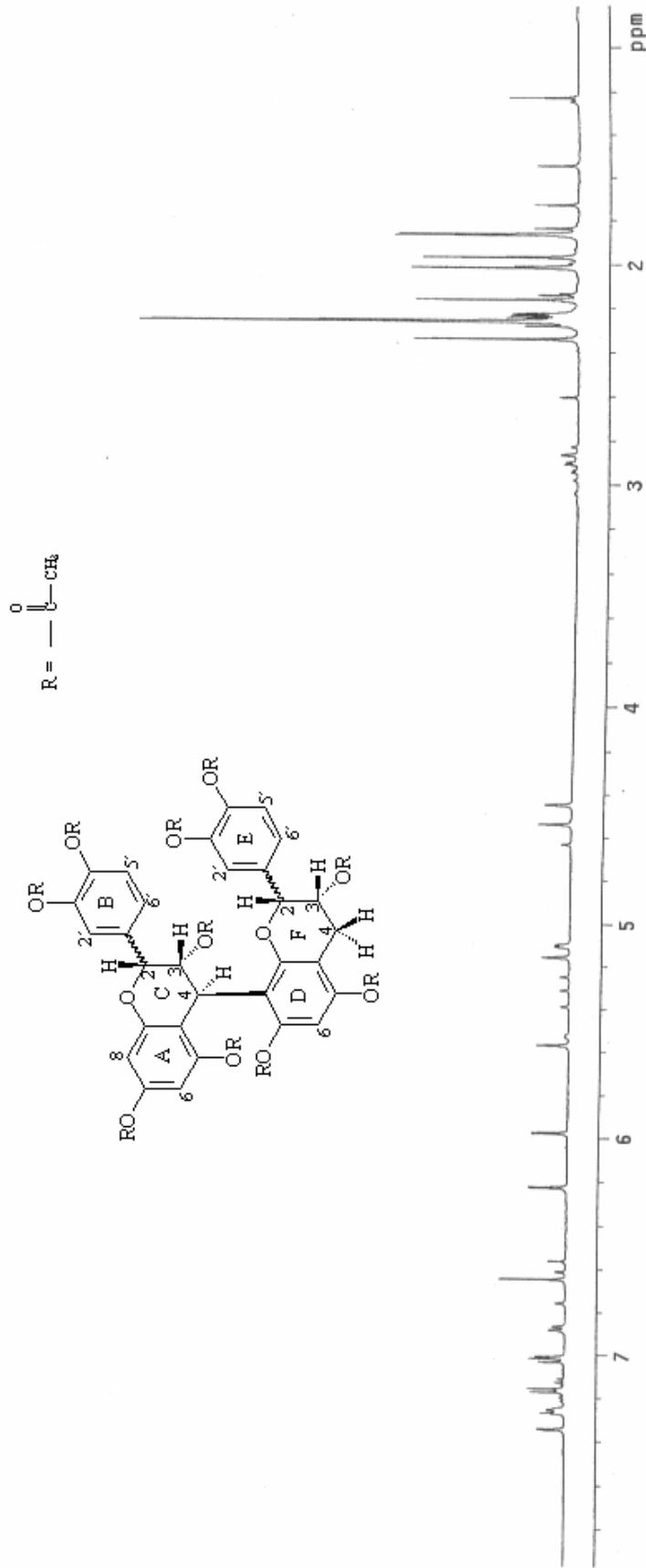
O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em m/z 601 concorda com substância dimérica do tipo catequina/epicatequina. Em comparação com a literatura,

confirma-se a **substância VIII** como sendo **epicatequina-(4 β →8)-epicatequina**, ou também denominada de procianidina B2 (PB2).

Tabela 25 – Dados de RMN ^1H da **substância VIII**, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina ou PB2, em CDCl_3 (500 MHz)

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4 (F)	2 X 2,90 – 2,95	2 X 2,79 – 2,97	m	
H4 (C)	4,47	4,42	s	
H2 (F)	4,54	4,51	s	
H3 (F)	5,09	5,07	m	
H3 (C)	5,15	5,13	m	
H2 (C)	5,56	5,54	s	
H6 (A)	5,99	5,95	d	$J_{\text{H6-H8}} = 1,5$
H8 (A)	6,19	6,19	d	$J_{\text{H8-H6}} = 1,5$
H6 (D)	6,63	6,62	s	
H6' (E)	6 X 6,90 – 7,41	6,85	dd	$J_{\text{H6'-H2'}} = 2,0$ $J_{\text{H6'-H5'}} = 8,5$
H2' (E)	6 X 6,90 – 7,41	6,98	d	$J_{\text{H2'-H6'}} = 2,0$
H5' (E)	6 X 6,90 – 7,41	6,99	d	$J_{\text{H5'-H6'}} = 8,5$
H5' (B)	6 X 6,90 – 7,41	7,14	d	$J_{\text{H5'-H6'}} = 8,5$
H6' (B)	6 X 6,90 – 7,41	7,24	dd	$J_{\text{H6'-H2'}} = 2,0$ $J_{\text{H6'-H5'}} = 8,5$
H2' (B)	6 X 6,90 – 7,41	7,32	d	$J_{\text{H2'-H6'}} = 2,0$

*Ueffing (1988)

Figura 33 – Espectro de RMN ^1H da substância VIII (CDCl_3 , 500 MHz)

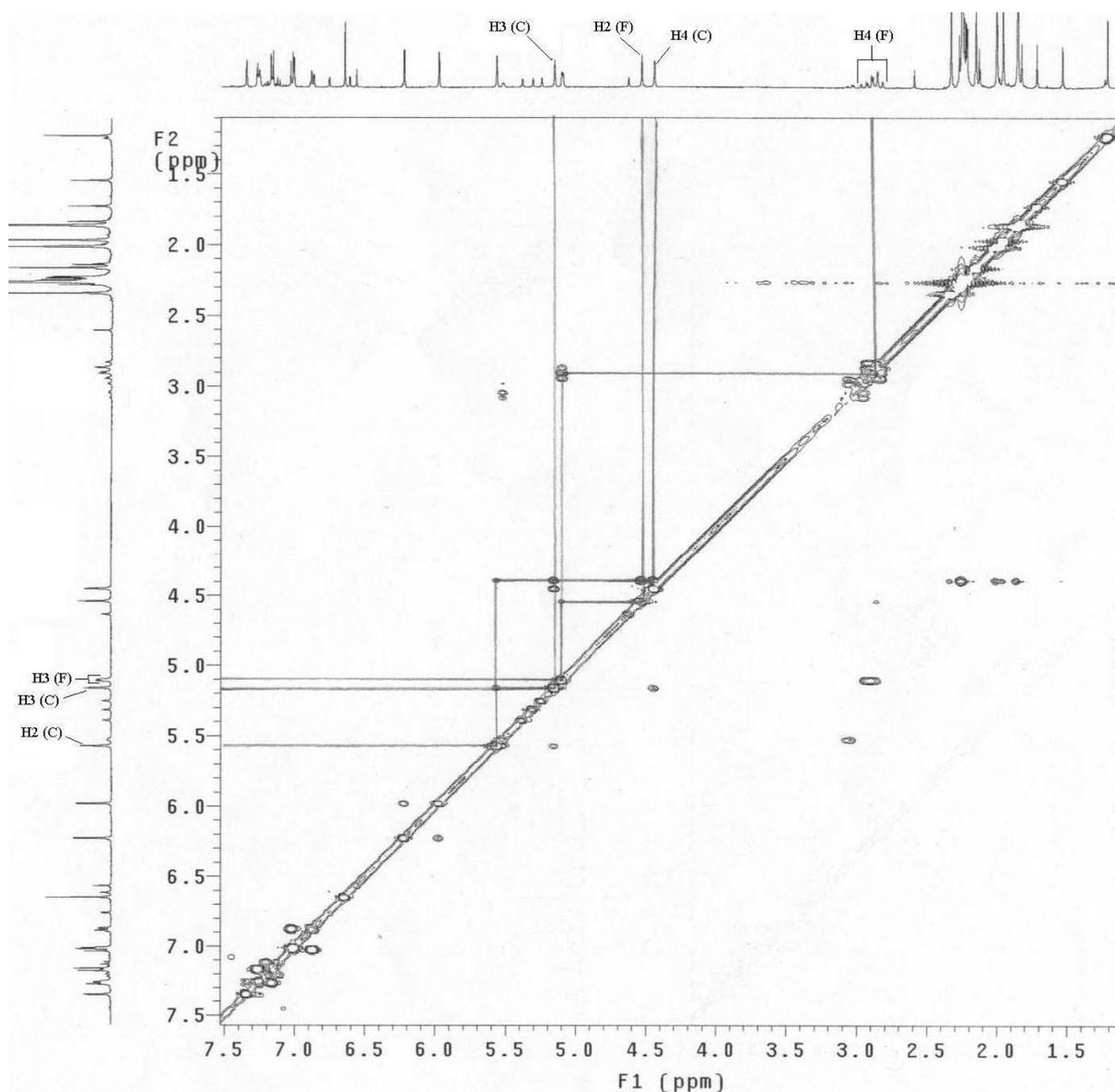


Figura 34 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância VIII (CDCl_3 , 500 MHz)

5.6.6.4 Substância IX - *epicatequina-(4 β →8)-epigallocatequina*

Com a fração 14 (1156,5 mg) empregou-se a CCCAV fornecendo cinco subfrações (Fluxograma 5). A subfração 14.4 (41,0 mg) mostrou-se em CCD com valor de $R_f=0,72$ e com coloração azul intensa com solução a 1 % de FeCl_3 em etanol. Esta foi acetilada e obteve-se a subfração 14.4.1 (4,9 mg) que mostrou-se pura em CCDP com valor de $R_f=0,22$ e com coloração azul escura intensa com solução a 1 % de FeCl_3 em etanol.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 e em acetona- d_6 (Figuras 35 e 36, respectivamente) da **substância IX** acetilada, após purificação em CCDP, forneceu os dados que se encontram na Tabela 26.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (Figura 35) da **substância IX** mostra com alguma interferência do solvente no sistema AMX na região aromática que foi solucionado com a troca de solvente para acetona- d_6 (Figura 36). A região heterocíclica apresenta dois sistemas ABMX atribuídos aos anéis C e F, respectivamente nos dois solventes. Na Figura 35 (CDCl_3) o sistema AMX mostrou sinais entre δ 7,15 e 7,37 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios do anel B (H-2', δ 7,36 ppm, d, $J=1,8$ Hz; H-5', δ 7,17 ppm, d, $J=8,4$ Hz; H-6', δ 7,26 ppm, dd, parcialmente coberto pelo solvente, $\delta J=2,1$ e 13,5 Hz) confirmam a dihidroxilação do anel B. Já o singlete em δ 6,89 ppm, corresponde aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel E, confirmando a trihidroxilação deste anel. A outra forma de confirmação da hidroxilação dos anéis pode ser observado pelo espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ em CDCl_3 (Figura 37) e acetona (Figura 38), pela correlação entre o sinal em δ 6,89 ppm (H-2' e H-6') e o sinal de H-2 (F) em δ 4,51 ppm e, a correlação dos sinais em δ 7,36 e 7,26 [H-2' e H-6' (B)] e o sinal em δ 5,57 ppm [H-2 (C)]. O sistema ABMX do anel F compreende um multipletto em δ 5,10 ppm para H-3 e um singlete em δ 4,51 ppm para H-2. A configuração 2,3-*cis* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor inferior a 1,0 Hz. Um sinal em δ 2,90 ppm como um dubleto (pseudo-dubleto, já que deveria ser um duplo duplo dubleto) corresponde aos dois hidrogênios H-4, justificando o restante do sistema do anel heterocíclico F. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*cis* para a unidade inferior. O outro sistema ABMX, relativo ao anel C (unidade superior), demonstrou dois sinais em δ 5,57 e 5,14 ppm referentes aos hidrogênios H-2 e H-3 como singlete e multipletto, respectivamente. O sinal referente ao H-4 (C) apresenta-se como um dubleto em δ 4,47 ppm. Desta forma é possível estabelecer a configuração relativa do anel heterocíclico C como sendo do tipo 2,3-*cis*-3,4-*cis*. O espectro de RMN ^1H em acetona- d_6 (Figura 36) mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6 (A), H-8 (A) e H-6 (D) em δ 6,06, 6,25 e 6,65 ppm, respectivamente, indicando, provavelmente, uma ligação ($4\beta \rightarrow 8$) conforme as observações de Hemingway e colaboradores (1982), Kolodziej (1986), Danne (1994) e Mello (1995). A posição de ressonância do hidrogênio H-2 (F) em δ 4,51 ppm sugere, ainda, uma ligação ($4\beta \rightarrow 8$) (Kolodziej, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN ^1H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 2,95 e 5,50 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo ($4 \rightarrow 8$) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981).

Esses dados são confirmados pelos valores encontrados por Fletcher e colaboradores (1977) e Kolodziej (1986). Em comparação com a literatura, confirma-se a **substância IX**

como sendo **epicatequina-(4 β →8)-epigalocatequina**. Esta substância já foi isolada de diversas fontes naturais; entretanto esta é a primeira vez que é descrita para o gênero *Guazuma*.

Tabela 26 – Dados de RMN ^1H da **substância IX**, epicatequina–(4 β →8)-epigalocatequina, em CDCl_3 (300 MHz).

Hidrogênio	* δ Literatura (ppm)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H4 (F)	2 X 2,90 – 2,95	2,90	m	
H4 (C)	4,47	4,47	m	
H2 (F)	4,54	4,51	S	
H3 (F)	5,09	5,10	m	
H3 (C)	5,15	5,14	m	
H2 (C)	5,56	5,57	s	
H6 (A)	5,99	6,06	d	$J_{\text{H6-H8}} = 2,4$
H8 (A)	6,19	6,25	d	$J_{\text{H8-H6}} = 2,4$
H6 (D)	6,63	6,65	s	
H2' (B)	6,77 – 7,41	7,36	d	$J_{\text{H2'-H6'}} = 1,8$
H5' (B)	6,77 – 7,41	7,17	d	$J_{\text{H5'-H6'}} = 8,4$
H6' (B)	6,77 – 7,41	7,25	dd	$J_{\text{H6'-H5'}} = 8,4$ $J_{\text{H6'-H2'}} = 1,8$
H2' / H6' (E)	6,77 – 7,41	6,89	s	

* Foo et al. (2000); Mello (1995).

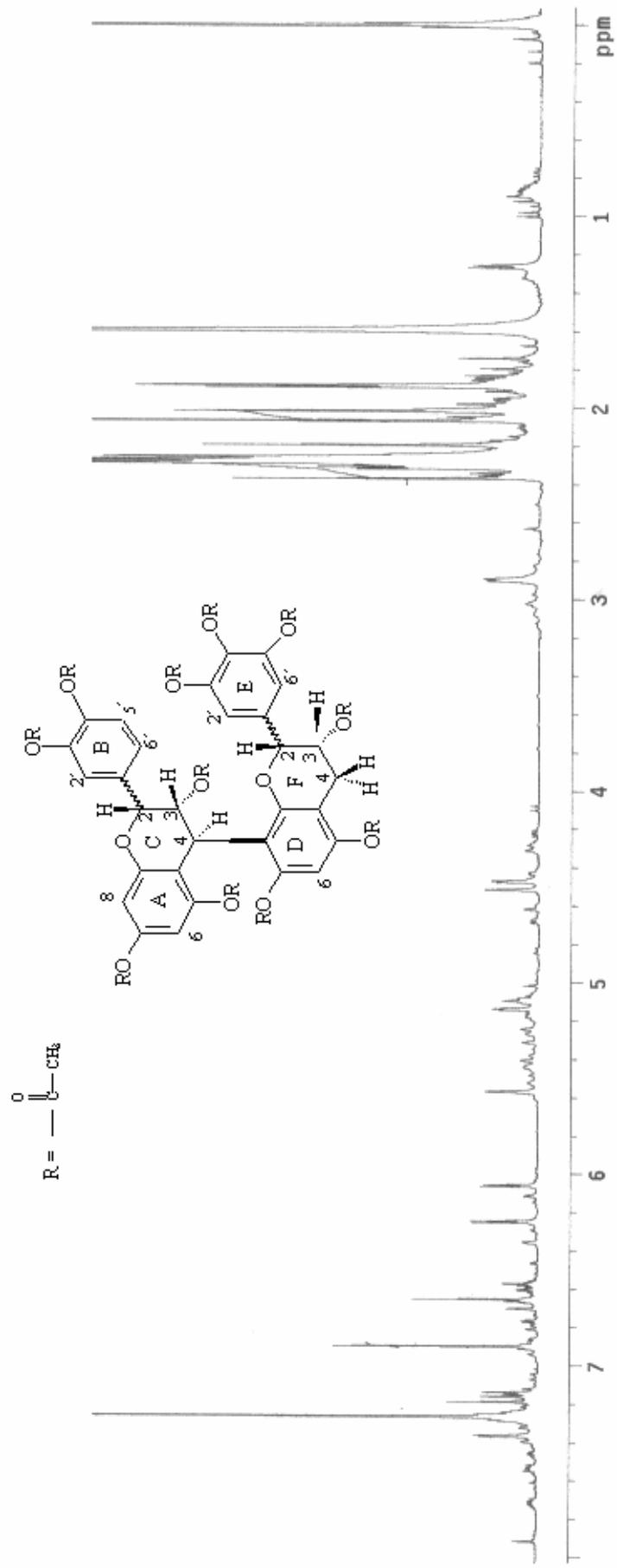


Figura 35 – Espectro de RMN ^1H da substância IX (CDCl_3 , 300 MHz)

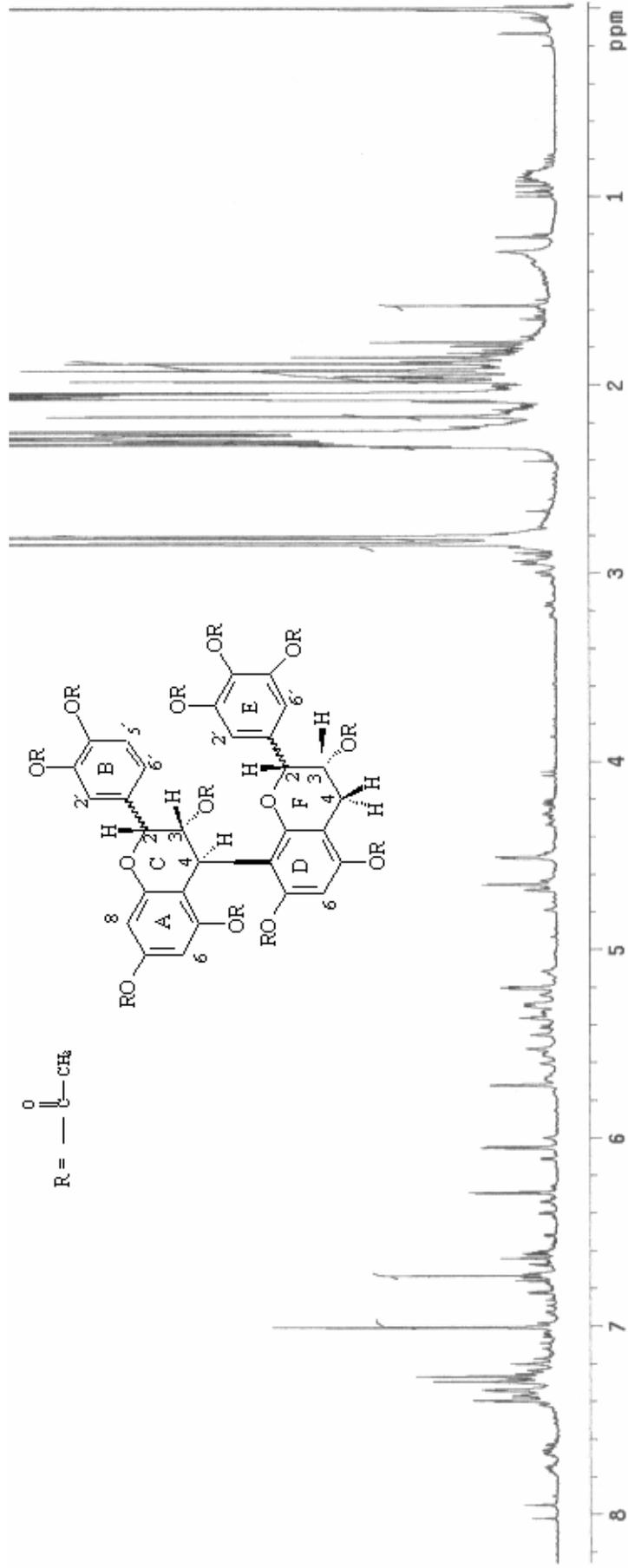


Figura 36 – Espectro de RMN ^1H da substância IX (acetona- d_6 , 300 MHz)

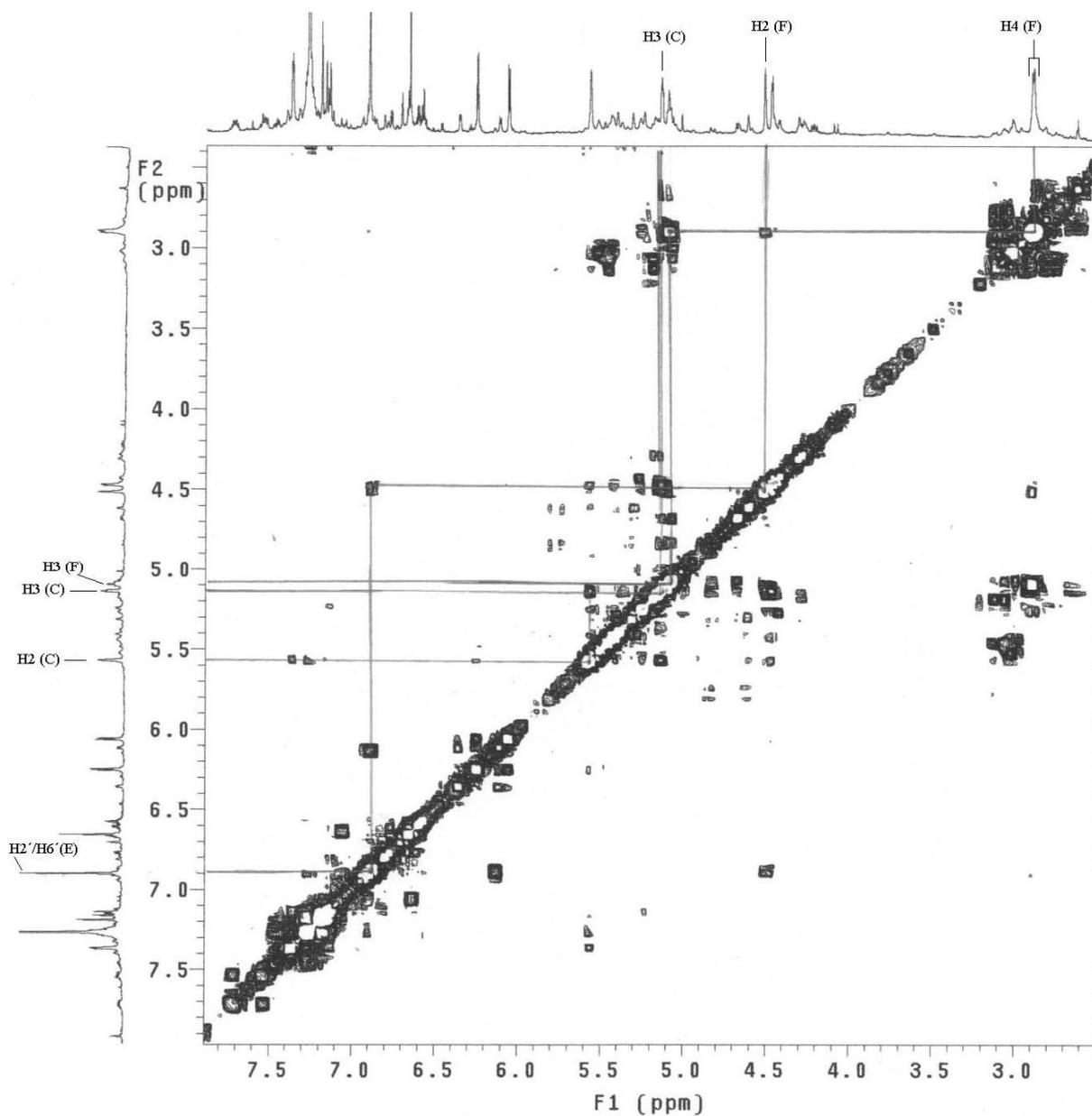


Figura 37 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância IX (CDCl_3 , 300 MHz)

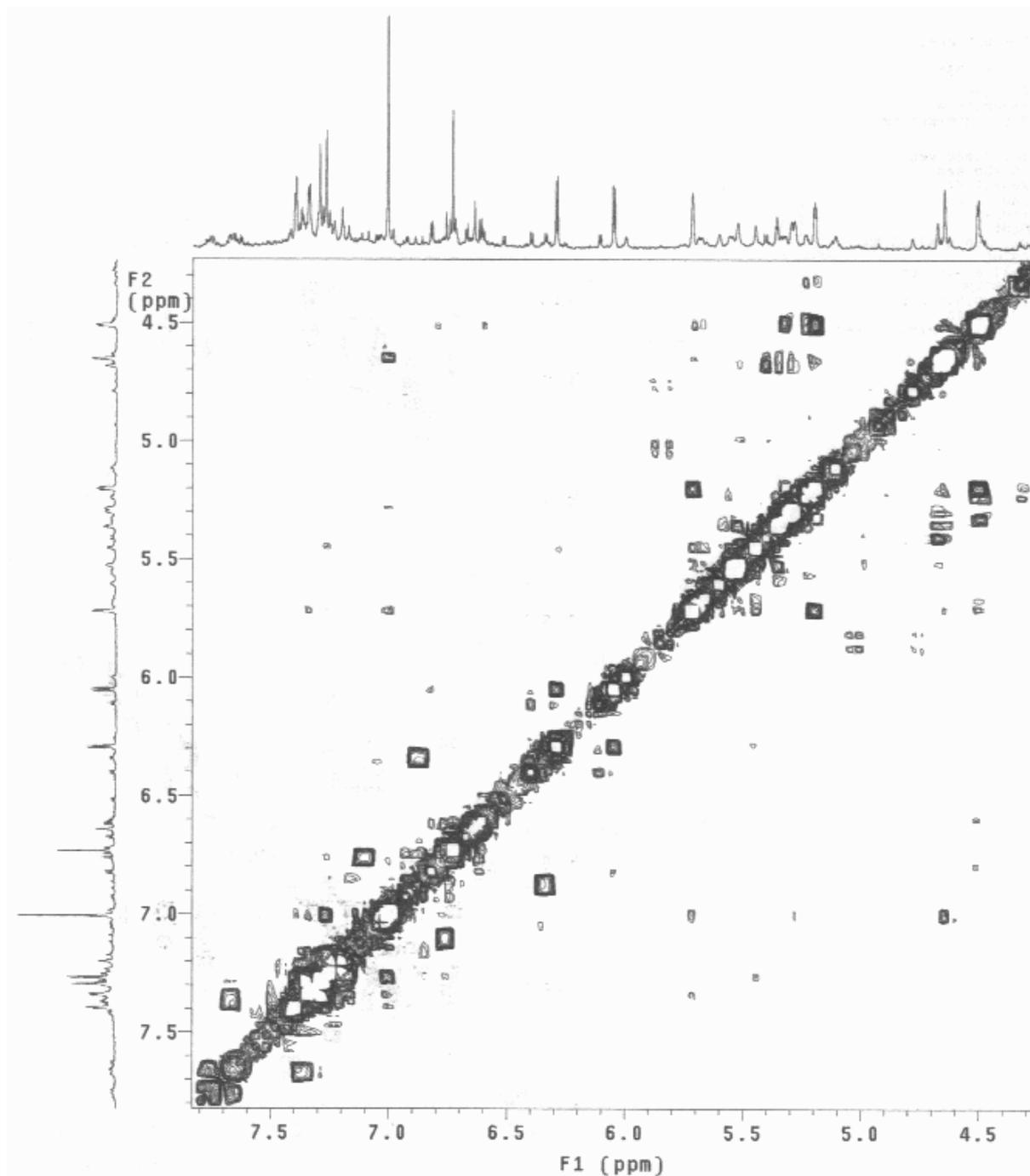


Figura 38 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância IX (acetona- d_6 , 300 MHz)

5.7 Ensaio antioxidantes

Flavonóides e outros polifenóis encontrados em plantas, como os ácidos fenólicos, taninos, lignanas e ligninas, são comuns em folhas, tecidos florais, e partes lenhosas tais como caules, cascas, e raízes de plantas. Esses polifenóis têm atividade antioxidante principalmente devido às suas propriedades redox, permitindo-os atuarem como agentes redutores ou

doadores de átomos de hidrogênio. Consequentemente funcionam como sequestradores de radicais livres e interrompedores de cadeia (AMAROWICZ et al.; 2004).

5.7.1 Método do fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante. Esse método baseia-se na redução do Mo(IV) ao Mo(V) pelo agente antioxidante pesquisado e a subsequente formação de um complexo verde fosfato/Mo(V) em pH ácido.

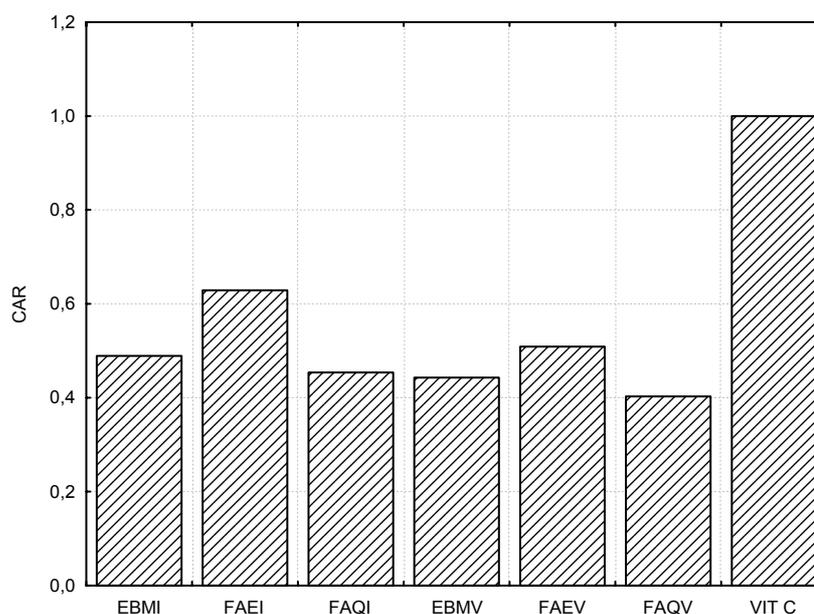
Com este método é possível utilizar padrões lipossolúveis (α -tocoferol) e hidrossolúveis (ácido ascórbico). Quanto mais redutor for o agente antioxidante testado, maior a absorvância da amostra e mais evidente é a coloração verde do complexo que é lido no espectrofotômetro em λ específico (PRIETO et al., 1999).

A avaliação da redução do complexo fosfomolibdênio é considerada simples, de baixo custo e é utilizada para comparar a capacidade antioxidante de uma série de extratos (HIRATA; 2004).

Foram realizadas baterias de análise, como as da Figura 39, para os lotes de inverno e de verão com: extrato bruto de mutamba, fase acetato de etila, fase aquosa, na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ em metanol, sempre em triplicata.



Figura 39 – Capacidade antioxidante realizada pelo método do fosfomolibdênio.



Valores de CAR realizados pelo método do fosfomolibdênio EBMI (0,4890), FAEI (0,6292), FAQI (0,4539), EBMV (0,4434), FAEV (0,5089), FAQV (0,4026). Os valores representam a média de 3 determinações e os valores de *dp* e CV% foram omitidos; porque esses dados serão repetidos.

Figura 40 – Comparação entre valores de CAR realizados pelo método do fosfomolibdênio.

A Figura 40 mostra os valores encontrados para a capacidade antioxidante de diversas amostras em relação à vitamina C (200 µg/ml), substância reconhecida pelo seu poder antioxidante e que assume o valor da unidade (100% de atividade) nesse tipo de ensaio (HIRATA, 2004). Observou-se nas amostras que seus valores foram menores e que todos apresentaram diferenças significativas em relação ao padrão, com $p < 0,001$. Porém, esses valores foram maiores que os encontrados por Hirata (2004) para a rutina (CAR≈0,3), flavonóide abundante em frutas e vegetais. Dentre as amostras avaliadas, a que apresentou maior potencial para reduzir o complexo fosfomolibdênio foi a fase acetato de etila inverno com CAR 0,6292.

5.7.2 Método do radical DPPH•

O DPPH• é um radical orgânico relativamente estável e que tem sido muito utilizado na determinação da atividade antioxidante de compostos específicos bem como de diversos extratos de plantas (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; KULISIC et al., 2004).

O método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH[•] na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. Soluções de DPPH[•] mostram forte absorvância em 517 nm, com coloração violeta (roxa). A absorvância desaparece e a descoloração resultante é estequiométrica (proporcional) em relação ao grau de redução. O restante de DPPH[•] (que não foi reduzido; e que foi medido após determinado tempo) corresponde inversamente à atividade sequestrante do radical exercida pelo antioxidante testado (KULISIC et al., 2004).

Por ser um método realizado à temperatura ambiente, elimina-se o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET et al., 1997). Os resultados foram expressos como valores de IC50, e que representam a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH[•] (ANTOLOVICH et al.; 2002).

Foram realizadas baterias de análise como as da Figura 41 para os lotes de inverno e de verão com: extrato bruto de mutamba, fase acetato de etila, fase aquosa; nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; e 20 µg/ml em metanol.

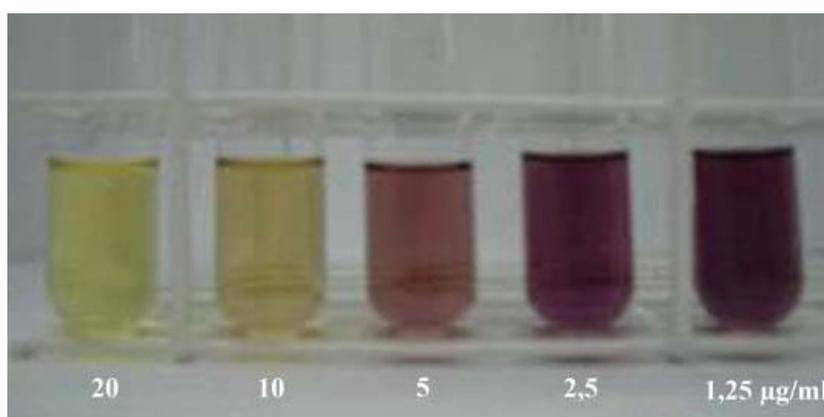
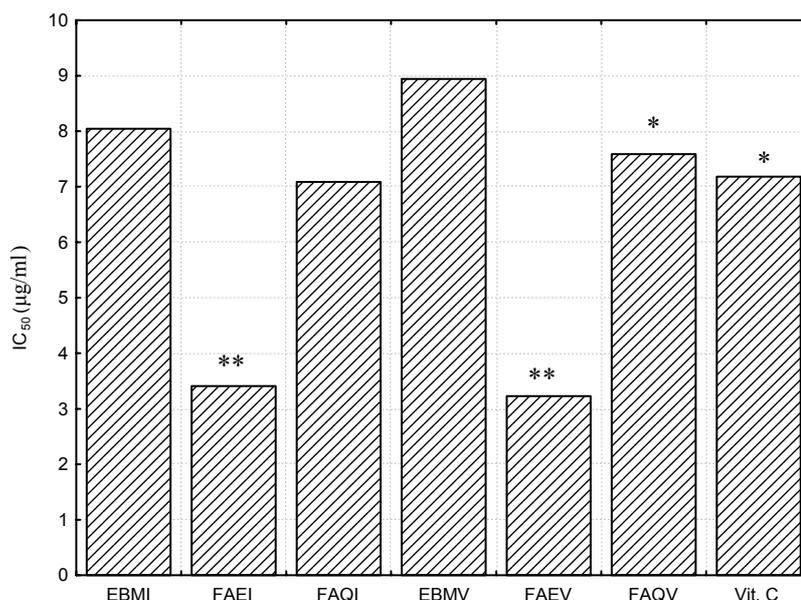


Figura 41 – Capacidade antioxidante da vitamina C pelo método do DPPH[•]

Paralelamente à realização da capacidade antioxidante (Figuras 40 e 42) da mutamba, fez-se o teor de taninos totais (Tabela 27), com o intento de verificar se existe uma relação direta entre ambos.



Valores de IC₅₀ realizados pelo método do DPPH[•] apresentados pela vitamina C (7,18 µg/ml ± 0,26; cv%= 3,56), EBMI (8,043 µg/ml ± 0,218; cv%= 2,71), FAEI (3,409 µg/ml ± 0,165; cv%= 4,84), FAQI (7,087 µg/ml ± 0,000118; cv%= 1,58), EBMV (8,94 µg/ml ± 0,129; cv%= 1,45), FAEV (3,227 µg/ml ± 0,180; cv%= 3,23), FAQV (7,589 µg/ml ± 0,105; cv%= 1,38). * ausência de diferença significativa entre FAQV e Vit C; ** ausência de diferença significativa entre FAEI e FAEV.

Figura 42 – Comparação entre valores de IC₅₀ (µg/ml) realizados pelo método do DPPH[•].

Tabela 27 – Teor de taninos totais %

Análise	g (%) ± dp (CV%)
DI	4,9823 ± 0,1586 (3,18)
EBMI	45,4436 ± 0,7123 (1,57)
FAEI	40,2433 ± 0,5787 (1,44)
FAQI	48,0489 ± 0,9677 (2,01)
DV	4,8057 ± 0,1029 (2,14)
EBMV	44,598 ± 2,1192 (4,75)
FAEV	37,3079 ± 1,3263 (3,56)
FAQV	48,8641 ± 1,1771 (2,40)

DI= droga inverno; EBMI= extrato bruto inverno;
FAEI= fase acetato de etila inverno; FAQI= fase aquosa inverno; DV= droga verão; EBMV= extrato bruto verão; FAEV fase acetato de etila verão;
FAQV= fase aquosa verão.

O baixo teor de taninos apresentado pelo extrato bruto (inverno e verão) refletiu-se na avaliação antioxidante com um alto valor de IC₅₀. Isso representa uma capacidade

antioxidante inferior quando comparada aos valores apresentados para a fase acetato de etila (inverno e verão), cujos valores de IC₅₀ foram os menores encontrados. Somado a isso, observou-se que a fase acetato de etila tanto do lote inverno como do lote verão apresentaram valores de IC₅₀ inferiores aos da vitamina C (padrão). No entanto, a tabela 27 apresenta os valores de taninos totais e pode-se observar que este teor na fase acetato de etila é superior ao extrato bruto e fração aquosa. Nesta relação deve-se levar em conta o percentual destas frações, como pode se observar no Fluxograma 2 (p. 80). Em apenas 12% da fração acetato de etila tem-se 37,31% em taninos totais, enquanto que tanto para a fração aquosa como para o extrato bruto, apesar de nominalmente apresentar um teor superior em taninos totais, a relação no entanto é inferior em cerca de 3 vezes.

De modo geral, com relação à técnica de DPPH[•], todos os resultados obtidos para *Guazuma ulmifolia*, apresentaram alta capacidade antioxidante quando comparados com valores obtidos de outras espécies, como é o caso da *Bauhinia microstachya* (escada de macaco) (IC₅₀ = 5,50 µg/ml), *Jacaranda micrantha* (caroba) (IC₅₀ = 46,29 µg/ml), *Picrasma crenata* (pau-tenente) (IC₅₀ = 136,70 µg/ml), dentre outras (MENEZES et al., 2004). Entretanto deve-se ressaltar que nesse estudo os autores utilizaram extratos aquosos a 5 % para a realização da técnica de DPPH[•], portanto a comparação realizada teve por objetivo a comparação de valores e não de efetividade das plantas mencionadas.

Mediante a avaliação das duas técnicas realizadas, pode-se observar que há uma variação no potencial antioxidante entre as amostras obtidas através dos dois processos. Por essa razão é que a literatura recomenda a realização de várias técnicas com princípios diferentes para que se possa também tentar descobrir em qual classe de antioxidante se enquadra a amostra a ser testada (FRANKEL et al., 2000).

5.8 Desenvolvimento de forma farmacêutica

Para o desenvolvimento de extratos que serviram de base para a obtenção de extratos secos e posteriormente da loção; foi escolhido o lote da coleta de inverno, devido ao maior conteúdo de taninos apresentado (Tabela 27). As fórmulas adaptadas da literatura (TAKAHASHI et al., 1998, 1999a, 1999b, 2001) aparecem a seguir.

FÓRMULAS:

LOÇÃO EBM:

EBM (ativo)	3 % p/p
PROPILENOGLICOL (umectante*)	18 % p/v
ETANOL 70% (solvente, antimicrobiano, boa absorção na pele*)	70 % p/v
METABISSULFITO DE SÓDIO (antioxidante*)	0,3 % p/p
EDTA (quelante*)	0,1 % p/p
METILPARABENO (NIPAGIN M) (antifúngico*)	0,2 % p/p
CITRATO DE SÓDIO (corretor de pH*)	0,1 % p/p
ÁGUA PURIFICADA	q.s.p.100 ml

LOÇÃO CONTROLE:

PROPILENOGLICOL (umectante*)	18 % p/v
ETANOL 70% (solvente, antimicrobiano, boa absorção na pele*)	70 % p/v
METABISSULFITO DE SÓDIO (antioxidante*)	0,3 % p/p
EDTA (quelante*)	0,1 % p/p
METILPARABENO (NIPAGIN M) (antifúngico*)	0,2 % p/p
CITRATO DE SÓDIO (corretor de pH*)	0,1 % p/p
ÁGUA PURIFICADA	q.s.p.100 ml

*Segundo (KIBBE; 2000).

5.9 Estudo do crescimento de pêlos

A procianidina B2 (PB2) foi extraída das cascas de mutamba utilizando-se 3% na loção capilar, foi aplicado aproximadamente 0,0812 mg PB2/dia, considerando-se a aplicação de cerca de 350 µL de loção/dia em cada rato. O estudo duplo cego foi realizado com cinco animais para cada grupo de tratamento (7, 10, 13 dias).

Os resultados demonstraram que a aplicação de uma loção capilar contendo 3% de extrato bruto de *Guazuma ulmifolia*, não estimulou a atividade proliferativa dos queratinócitos de folículos pilosos de ratos após 7, 10 e 13 dias de aplicação (Figura 43). Observou-se também, através da análise morfométrica, que após 13 dias de tratamento a largura dos folículos dos animais tratados com mutamba foi significativamente menor do que nos controles (Figura 44).

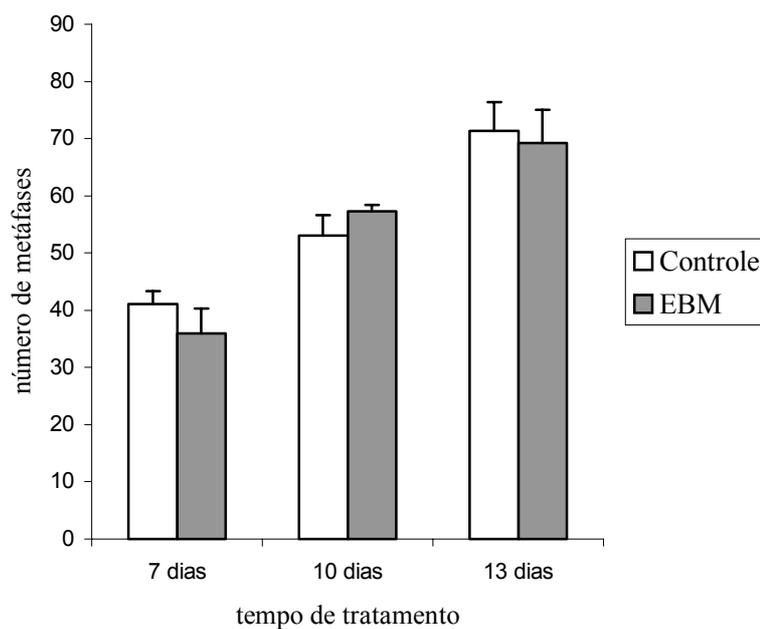


Figura 43 – Proliferação celular em folículos pilosos

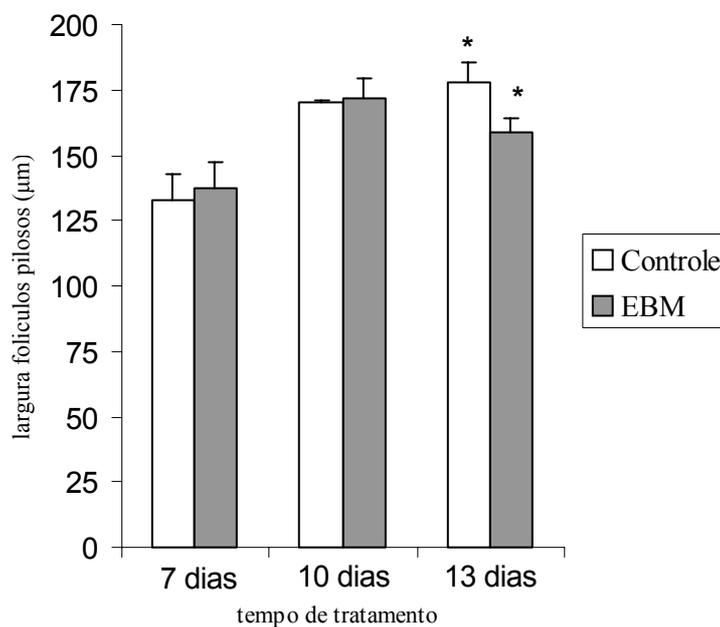


Figura 44 – Análise morfométrica dos folículos pilosos

Takahashi e colaboradores (1998) isolaram e identificaram as proantocianidinas a partir de sementes de uva, e pela primeira vez atribuíram a estas moléculas a atividade proliferativa nos folículos pilosos.

Posteriormente Takahashi e colaboradores (1999b) compararam procianidinas de diferentes graus de polimerização (monômeros, dímeros e trímeros) (epicatequinas, PB2 e

PC1) quanto à atividade promotora de crescimento sobre os queratinócitos dos folículos pilosos. Observaram que os dímeros (PB2) apresentaram maior eficácia em comparação com os trimeros (PC1). Porém ao testarem a concentração ótima para a obtenção de atividade estimulatória máxima obtiveram a seguinte ordem: trimeros<dímeros<monômeros.

Nos estudos *in vivo*, com camundongos, após aplicação tópica de procianidinas, a menor área de cobertura de pelos ocorreu nos animais tratados com PB2 (69,6%), enquanto naqueles tratados com PC1 foi 78,3 % e PB3 foi 80,9 %. (TAKAHASHI et al., 1999b). Os autores concluíram que a atividade de crescimento de pêlo induzida por flavan-3-óis deve estar associada com a estrutura das moléculas.

Tendo como referencial os estudos de Takahashi e colaboradores (1998, 1999a, 1999b, 2001), atribuímos algumas possibilidades à falta de atividade proliferativa do extrato estudado: 1) a menor concentração de PB2 na loção teste, em comparação com os estudos já realizados; 2) considerando a função de barreira da pele, esta poderia ter dificultado a disponibilidade dos ativos em quantidade suficiente para desempenharem seu efeito biológico; 3) devemos considerar a presença de outros taninos, em maior concentração, presentes no extrato bruto, e sua capacidade de complexação com as proteínas (HASLAM, 1996), inviabilizando a ação das moléculas com potencial para promover o crescimento do folículo piloso. Foram isoladas e identificadas neste trabalho, a partir do EBM, nove substâncias sendo cinco monômeros: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-epiafzelequina e quatro dímeros: procianidina B1, procianidina B2, epiafzelequina 4 β →8 epicatequina, epicatequina 4 β →8 epigalocatequina. Com relação a este aspecto, e considerando ainda a efetiva presença dos taninos na parte mais profunda da pele, como comprovado através dos experimentos de fotoacústica, é possível que estes taninos, ao longo do tempo de tratamento tenham exercido um pequeno efeito de constrição, que tenha se refletido na menor largura mensurada, nos folículos da pele tratada com a loção capilar (Figura 44).

5.10 Estudo de permeação cutânea

A espectroscopia fotoacústica tem sido amplamente utilizada na física, como também na química, biologia, medicina e engenharia. Esta técnica possui algumas vantagens, sobre a espectroscopia convencional (de transmissão, reflexão e espalhamento). Uma destas diferenças (ou vantagens) é que a espectroscopia fotoacústica é uma medida direta da

absorção (mede apenas a radiação absorvida que relaxa na forma de calor), de forma que a luz transmitida, refletida ou espalhada não interfere nas medidas. Deste modo, a técnica fotoacústica pode ser aplicada no estudo de uma ampla gama de materiais, assim como materiais opacos, pouco absorvedores, géis, na forma de pó ou amorfos, que são materiais nos quais a espectroscopia óptica convencional não é adequada (PEDROCHI, 2004).

Outra diferença é que o detector de radiação na espectroscopia fotoacústica é a própria amostra, o que significa que a técnica pode ser usada em qualquer intervalo do espectro eletromagnético. Além disso, permite estudar não só propriedades ópticas do material como também as propriedades térmicas, e mais que isso, ela tem a capacidade única de permitir a análise do perfil de profundidade dos componentes absorvedores da amostra. Isto porque a espessura atingida na amostra depende da difusividade térmica da mesma e da frequência de modulação da luz empregada na geração do sinal fotoacústico (SEHN et al., 2003; SEHN et al., 2005).

Outra importante vantagem da espectroscopia fotoacústica consiste no fato de que esta é uma técnica não destrutiva e que, sobretudo, permite a realização de estudos em sistemas biológicos *in vivo* e *ex vivo* de forma não invasiva, como por exemplo estudos da propagação de substâncias através da pele humana ou de animais (PEDROCHI, 2004).

Pode-se observar no espectro (Figura 45) uma região de absorção entre 200 e 300 nm. Para o extrato bruto de mutamba têm-se ainda mais três bandas, centradas em, aproximadamente, 465 nm, 565 nm e 650 nm. No espectro da loção teste existe três bandas embora a terceira seja muito sutil em relação à loção controle. No espectro da loção controle, por sua vez não há mais bandas de absorção.

Uma análise de varredura no espectro de ultravioleta das substâncias isoladas neste trabalho (substâncias 6 e 8) mostrou bandas de absorção em torno de 450 e 470 nm, respectivamente. Já as substâncias epicatequina e epigallocatequina (substâncias 2 e 4) não mostraram bandas de absorção no espectro de varredura em regiões acima de 300 nm. Sugere-se, assim, que substâncias diméricas possuem bandas de absorção na região de 460 nm e que provavelmente, substâncias triméricas ou mesmo tetraméricas, como as já isoladas por Hör et al. (1995), podem ser as responsáveis pelas absorções nas regiões de 565 e 650 nm, respectivamente. Outra análise feita com as frações acetato de etila e aquosa demonstraram bandas de absorção nas regiões apontadas para o extrato bruto ou extrato de tanino pó (Figura 45), comprovando a hipótese anterior (resultados não mostrados). Isto pode ser inferido pois a fração acetato de etila deve conter substâncias com nível de condensação variável entre duas a seis unidades, como já demonstrado por Fletcher et al. (1977) e Holetz et al. (2005).

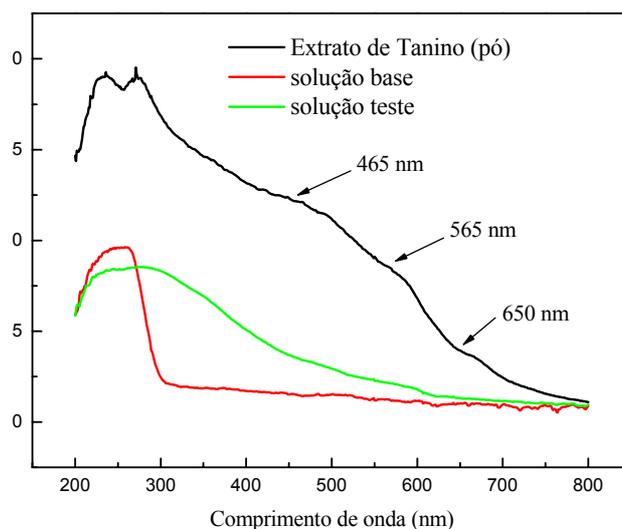


Figura 45 – Espectros de absorção realizados pelo método de espectroscopia fotoacústica.

Na Figura 46 estão representados os espectros de absorção das duas amostras de pele (rato teste e controle) para o grupo de ratos tratados por 13 dias. A frequência de modulação da luz utilizada foi de 15 Hz e a potência da lâmpada regulada em 800 W. A região espectral até 300 nm foi evitada uma vez que, a radiação ultra-violeta é absorvida tanto pelo medicamento quanto pela pele podendo até mesmo danificá-la.

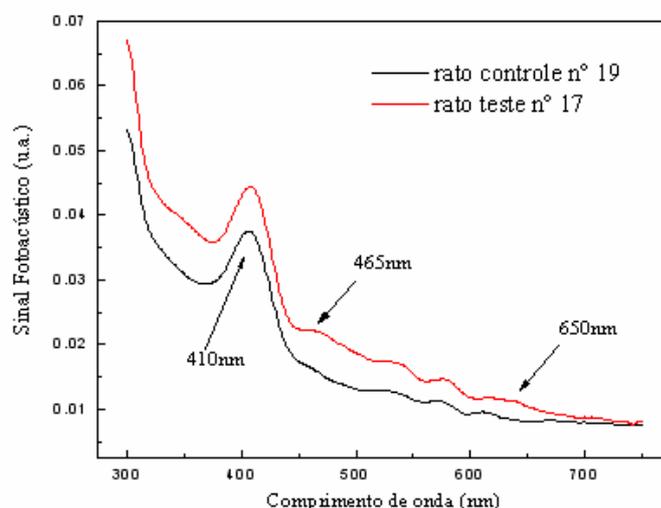


Figura 46 – Espectros de absorção para pele tratada e controle de 13 dias

O pico com centro próximo à 410 nm se refere a absorção gerada pela presença de sangue na amostra, como pode-se verificar há a presença da banda tanto no rato teste, quanto no controle. A variação da intensidade da banda pode ser devido às variações da quantidade de sangue, da espessura, assim como da quantidade de gordura na amostra. Já as bandas com

centros em aproximadamente 465 e 650 nm se apresentam apenas nas medidas realizadas com os ratos testes, como se pode observar com maior detalhe nas Figuras 47 a 49.

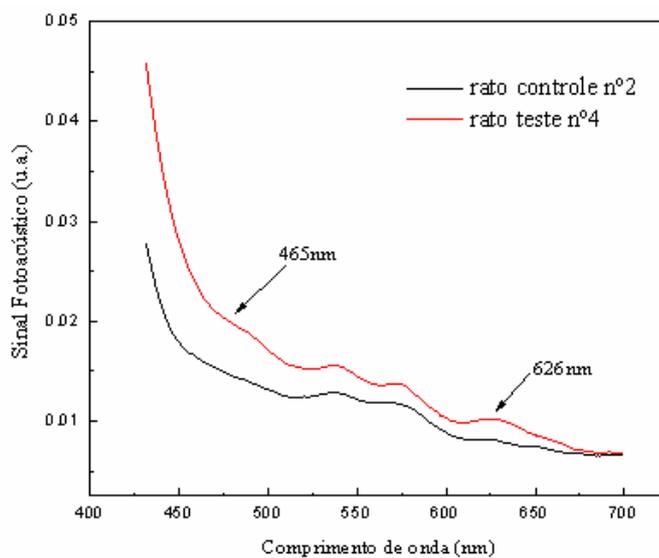


Figura 47 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 7 dias

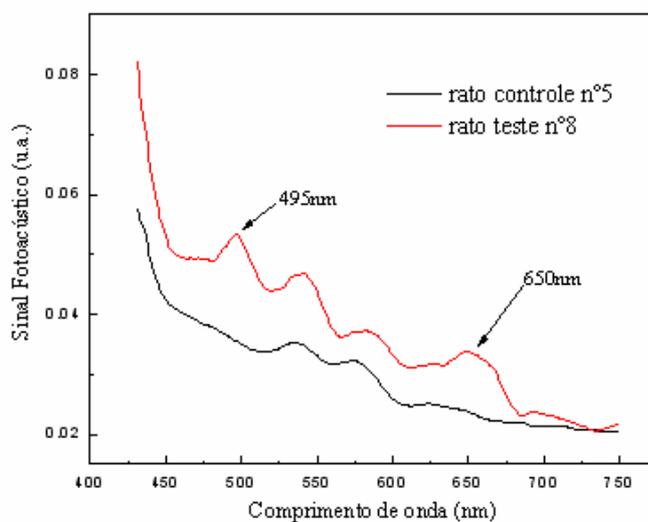


Figura 48 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 10 dias

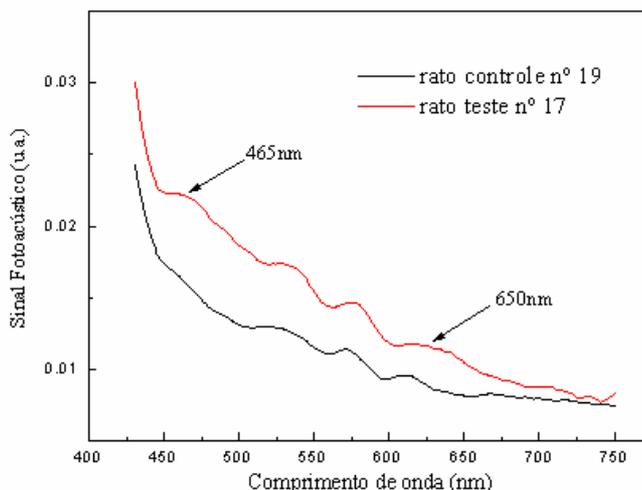


Figura 49 – Espectros de absorção para amostra tratada e controle de 13 dias

As Figuras 47, 48 e 49 apresentam bandas absorvedoras da loção nas três amostras de pele dos ratos tratados. Ocorreram apenas pequenos deslocamentos dos centros das bandas.

Para avaliar a evolução da absorção das loções foi realizado um cálculo da área sob os espectros de absorção tanto das amostras teste como controle, restringindo o intervalo do espectro entre 430 à 700 nm. Os valores obtidos para as amostras teste foram devidamente normalizados pelos valores obtidos para as amostras controle. Assim como estes também foram normalizados para uma melhor visualização da evolução da absorção das loções, ou seja, deste modo pode-se observar apenas a razão de absorção (Figura 50). Conforme houve aumento no tempo de tratamento, ocorreu um aumento na proporção de loção teste absorvida quando comparado com a loção controle negativa.

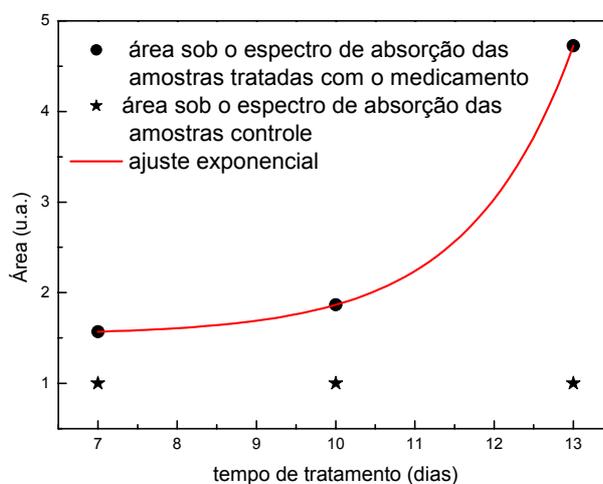


Figura 50 – Valores de área sob o espectro de absorção das amostras tratadas normalizados pelos valores de área das amostras controles

6 CONCLUSÕES

- O controle de qualidade físico-químico permitiu estabelecer dados comparativos entre as coletas de verão e inverno. Os taninos podem ser utilizados como marcadores na avaliação da qualidade para a droga vegetal e seus extrativos.
- O estudo químico de extratos semipurificados das cascas de mutamba demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados. Foram isoladas e identificadas nove substâncias: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, 4'-*O*-metil-epiafzelequina, epiafzelequina-(4 β →8)-epicatequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina (PB1), epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (PB2) e epicatequina-(4 β →8)-epigalocatequina. Das substâncias citadas, foi identificada a substância inédita, 4'-*O*-metil-epiafzelequina.
- O estudo da capacidade antioxidante dos EBM, FAE e FAQ revelou o potencial da mutamba como agente redutor (doador de hidrogênio), especialmente a FAE, de acordo com os métodos utilizados.
- As análises morfométrica e de proliferação celular epitelial não evidenciaram o desenvolvimento do folículo piloso atribuído à mutamba nas condições utilizadas.
- A avaliação da permeação cutânea através da espectroscopia fotoacústica detectou a presença da loção teste nas amostras tratadas comprovando sua eficácia em estudos de materiais biológicos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABIFITO. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <<http://notes.visywork.com.br/Empresas/Abifito/abifito.nsf>> Acesso em: 26 abr. 2005.
- ALARCON-AGUILARA, F. J.; ROMAN-RAMOS, R.; PEREZ-GUTIERREZ, S.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; CONTRERAS-WEBER, C. C.; FLORES-SAENZ, J. L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 2, p. 101-110, 1998.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian praries. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANSEL, H. C.; et al. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ed., Colombia: Editorial Premier, 2000.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ARAÚJO NETO, J. C. De.; AGUIAR, I. B. De; FERREIRA, V. M.; RODRIGUES, T. J. D. Temperaturas cardeais e efeito da luz na germinação de sementes de mutamba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 460-465, 2002.
Disponível em: <<http://www.agriambi.com.br/revista/v6n3/460.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2005.
- ARAÚJO NETO, J. C. De; AGUIAR, I. B. DE. Desarrollo ontogénico de plántulas de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 47, n. 4, San José, Dec. 1999.
- ARBOLES del area del canal de Panama: *Guazuma ulmifolia* Lam. **Smithsonian**. 2005a.
Disponível em: <<http://striweb.si.edu/ctfs/webatlas/plant.photos/guazul.flor.jpg>>. Acesso em: 14 mar. 2005.
- ARBOLES del area del canal de Panama: *Guazuma ulmifolia* Lam. **Smithsonian**. 2005b.
Disponível em: <<http://ctfs.si.edu/webatlas/english/guazul.html>>. Acesso em: 14 mar. 2005.
- ARRIAGA, A. M. C.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; POULIQUEN, Y. B. M. Análise do óleo fixo de *Guazuma ulmifolia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 2, p. 45-46, 1996.

AUDI, E. A.; CAMPOS, E. J. V.; 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.

BAGOZZI, D. **Traditional medicine**. World Health Organization Fact sheet nº 134. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em 14 mar. 2005.

BALDE, A.; BRUYNE, T. De; PIETERS, L.; KOLODZIEJ, H.; BERGHE, D. V.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. Tetrameric proanthocyanidins containing a double interflavanoid (A-type) linkage from *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, New York, v.40, n.3, p. 933-8, 1995.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, Rio de Janeiro:USP; Viçosa: UFV, v. 1, 2. ed., p. 158-159, 179, 186-190, 286, 2002.

BELLÓ-KLEIN, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH[•] free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft un-Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft un-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 48 de 16.3.2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 18.3.2004.

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P. M. L.; DE BRUYNE, T. ; SHAHAT, A.-A.; HEUVEL, H. V. den; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. *In vitro* inhibition of [³H]-angiotensin II binding of the human AT1 receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. **Planta Medica**, v. 68, p. 1066-1071, 2002

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 Dermat mucosal 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.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, O.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. 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.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. 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.

CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M. H.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v.30, p. 2033-2040, 1991.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.(orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CAMPORESE, A.; BALICK, M. J.; ESPOSITO, R. G.; MORSELLINO, N.; DE SIMONE, F.; TUBARO, A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 103-107, 2003.

CARDOSO, M. L. C. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas e Tecnológicas na Obtenção de Extratos Secos Nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) UNESP – Araraquara, 2002.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.

CHONDRHRY, R.; HODGINS, M. B.; VAN-DER KWAST, T. H.; et al. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. **Journal of Endocrinology**, v. 133, p. 467-475, 1992.

CONABIO. *Guazuma ulmifolia* Lam. (1789) – Sterculiaceae. Encyclopédie Méthodique, Botanique, 3: 52. 1789. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. Disponível em: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/66-sterc1m.pdf>. Acesso em: 14 mar 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.5, p. 280-281, 1974.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52, 1997.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Civilização Brasileira S. A., p. 467, 1979.

CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; PORTER, L. J. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, p. 375-377, 1979.

DANNE, A. Polyphenole aus den traditionellen Arzneipflanzen *Cistis incanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae), Münster, Alemanha, Pharmazeutisch Biologie und Phytochemie, Tese Doutorado, 1994.

DE MIGUEL, V. A. Acné y Alopecia. Disponível em <<http://www.uv.es/~vicalagr/CLindex/CLacne/CLacne.htm>>. Acesso em 10 abr. 2005.

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. 139-156, 1985.

DONOHUE, T. J. **Oxidation and reduction in organic synthesis**. New York: Oxford University Press Inc., 2000.

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

DRY, E. The coat of the mouse (*Mus musculus*). **JOURNAL OF GENETICS (J. Genet.)**, p. 287-340, 1926.

EMA. Summary Report – Aristolochi. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products** – Committee for veterinary medical products. 1997. Disponível em <<http://www.eu.int/pdfs/vet/mrls/027197en.pdf>>. Acesso em 14 ago. 2004.

EMA. Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochi species*. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products** – Working Party on Herbal Medicinal Products. 2000. Disponível em <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/hmpc/002300en.pdf>>. Acesso em 08 ago. 2004.

EVANS, W. C. **Trease and Evans's Pharmacognosy**. 14. ed., WB Saunders Company Ltda., 1996.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 2000.

FENNEMA, O. R. **Principles of food science: Part I: Food Chemistry**. 10. ed., New York: Marcel Dekker Inc.

FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. **Journal Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 1628–1637, 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.

FRANCIS, J. K. *Guazuma ulmifolia* Lam. Guácima Sterculiaceae família del cacao. Disponível em: <<http://www.fs.fed.us/global/iitf/Guazumaulmifolia.pdf>>. Acesso em: 14 mar 2005.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 48, p. 648, 2000.

FREI, B.; BALTISBERGER, M.; STIVHER, 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.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597-3604, 2000.

GALINA, K. J. ***Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: Estudo botânico, químico e microbiológico**. 2003. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara, São Paulo, 2003.

GALINA, K. J.; SAKURAGUI, C. M.; ROCHA, J. C. B.; LORENZETTI, E. R.; MELLO, J. C. P. De. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico da mutamba (*Guazuma ulmifolia* – Sterculiaceae). **Acta Farmacêutica bonaerense**. v. 24, n. 2, p. 225-233. 2005.

GARTNER, L.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia – em cores**. 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2003.

GENTRY A. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://mobot.org/cgi-bin/search_vast?w3till=MOA-04018_001.jpg>. Acesso em: 02 e 14 mar. 2005.

GIRALDO V., L. A. Potencial de la arborea guácimo (*Guazuma ulmifolia*), como componente forrajero en sistemas silvopastoriles. Disponível em: <<http://www.fao.org/WAICENT/FaoInfo/Agricult/AGA/AGAP/FRG/AGROFOR1/Girald13.pdf>>. Acesso em: 23 mar 2005.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

GUERRA, M.P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 453-461, 1988.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 44-52, 1997.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2. ed., London: Chapman and Hall, 1984, 288 p.

HARDY, M. H. The secret life of the hair follicle. **Trends in Genetics (TIG)**, v. 8, n. 2, p. 55-61, fev. 1992.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed., Rio de Janeiro: LTC editora, 2005.

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

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 63-80, 1992.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins. **J.Chem. Soc., Perkins Trans. I (Easton)**, p.1209-1216, 1982.

HERRMAN, S. M. Aspectos Nutricionais dos Flavonóides. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.

HIRATA L. L.; **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. Dissertação de Mestrado UFPR, 2004.

HOFFMANN, R. Male androgenetic alopecia. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 377 – 386, 2002.

HOLETZ, F. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 397-401, Julho de 2005.

HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones e flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1081-1093, 2000.

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.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative Chromatography Techniques – Applications in Natural Product Isolation**. 2° ed rev. e ampl.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1998.

HOSTETTMANN, K.; QUEIRÓZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores** — série de textos da escola de verão em química IV. EdUFSCar, São Carlos, 2003.

IMS HEALTH. Sales through retail pharmacies.2005. Disponível em: <<http://open.imshealth.com/download/mar2005.pdf>> Acesso em [2005].

JANKOVIC, S. M.; JANKOVIC, S. V. The control of hair growth. **Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://dermatology.cdlib.org/DOJvol4num1/original/jankovi.html>>. Acesso em: 31 abr. 2005.

JANZEN, D. H. Natural history of Guacimo fruits (Sterculiaceae: *Guazuma ulmifolia*) with respect to consumption by large mammals. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 8, p. 1240-1250, 1982.

JAY, V.; BERTHON, J. Y.; HAGEGE, D.; POUGET, M. P.; LEJEUNE, B.; POURRAT, H. New active ingredient for aging prevention. **Cosmetics & Toiletries**. v. 113, p. 71-77, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 2. ed., p. 398-406, 1998.

JORNAL do Comércio. A lei dos fitoterápicos.29 mar. 2005. Recebido por email do IBPM.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc., p. 5, 6, 329-333, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAMIMURA, A.; TAKAHASHI, T. Procyanidin B-2, extracted from apples, promotes hair growth: a laboratory study. **British Journal of Dermatology**, v. 146, p. 41-51, 2002.

KIBBE, A. H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3 ed. American Pharmaceutical Association – USA, 2000.

KOLODZIEJ, H. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. **Phytochemistry**, New York, v. 25, n.5, p.1209-15, 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. ^1H NMR spectral studies of procyanidin derivatives: derivation of diagnostic ^1H NMR parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. In: HEMINGWAY, R. W; LAKS, P. E. (eds.). **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum, v. 59, p. 295-320, 1992.

KOMBAL, R. Untersuchung der Flavan-3-ole und Flavanoide in *Potentilla anserina* L. Tese (Doutorado em Ciências Naturais). Münster, Alemanha, 1993. 180f. Universidade de Münster, Alemanha, 1993.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85 p. 633–640, 2004.

LLESUY, S. F. Introducción y Especies Activas de Oxígeno. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras; manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 3. ed., v. 1, p. 327, 2000.

LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High Performance Liquid Chromatography - Fundamental Principles and Practice**. London: Chapman & Hall;. 1996.

MALAN, E.; SWINNY, E.; FERREIRA, D.; STEYNBERG, P. The structure and synthesis of proguibourtinidins from *Cassia abbreviata*. **Phytochemistry**, New York, v.41, n.4, p.1209-13, 1996.

MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 1º ed, 2002, 189 p.

MECKLENBURG, L.; TOBIN, D. J.; MÜLLER-ROVER, S.; HANDJISKI, B.; WENDT, G.; PETERS, E. M. J.; POHL, S.; MOLL, I.; PAUS, R. Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. **Journal of investigative dermatology**, v. 114, n. 5, Maio, 2000.

MELLO, J. C. P. Untersuchung zur struktur der flavan-3-ole und proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae). 1995. Tese (Doutorado)–Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 857-862, 1996b.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.
- MENEZES, P. R.; SCHWARZ, E. A., SANTOS, C. A. M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 1999. 115 p.
- MILONE, G. **Estatística: geral e aplicada**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.
- NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A. A.; LIMA, R. M. O. C. Antimicrobial and Citotoxic Activities in Plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v. 61, n. 4, p. 353-355, 1990.
- NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 143-147, 1996.
- NGULUBE, M. R.. Seed germination, Seedling growth and biomass production of eight Central-American multipurpose trees under nursery conditions in Zomba, Malawi. **Forest Ecology and Management**, v. 27, p. 21-27, 1989.
- NVTech Clip Art. [2004]. Disponível em: <<http://dir.coolclips.com>> Acesso em: [2004, 2005].
- OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Research Communications (Copenhagen)**, v. 46, p.3-52, 1981.
- PALLENBACH, E. **Proanthocyanidine aus *Quercus petrea* (Mattuschka) Lieblein**. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Freiburg, Alemanha, 1992. 175f. Universidade Albert-Ludwig de Freiburg, 1992.
- PANTELEYEV, A. A.; JAHODA, C. A. B.; CHRISTIANO, A. M. Hair follicle predetermination. **Journal of Cell Science**. v. 114, n. 19, p. 3419-3431, 2001.
- PAUS, R; COTSARELIS, G. The biology of hair follicles. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 7, p. 491-497, 1999.
- PEDROCHI, F. **Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica**. 2004. 96 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

- PEDROCHI, F.; SEHN, E.; MEDINA, A. N.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; STORCK, A.; GESZTESI, J. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin *in vivo*. **Journal de Physique**, no prelo, 2005.
- PENNAFORT, R. Brasileiro adere aos fitoterápicos. 4 abr. 2005. **Jornal O Estado de São Paulo**.
- PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. **Phytochemistry**, New York, v.30, n.3, p.981-5, 1991.
- PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur Entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae)**. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Münster, Alemanha, 1992, 234f. Univesidade de Münster, 1992.
- PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products** v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PRICE, V. H. Androgenetic alopecia in women. **Journal of Investigative Dermatology (JID) Symposium Proceedings**, v 8, n. 1, p. 24-27, Junho 2003.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1 **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.
- RADFORD, A.E.; DICKISON, W.C.; MASSEY, J.R.; BELL, C.R. **Vascular plant systematics**. New York: Harper e Row, 1979. 891p.
- RANDALL, V. A.; THORNTON, M. J.; MESSENGER, A. G.; et al. Hormones and hair growth: variations in androgen receptor content of dermal papilla cells cultured from human and red deer (*Cervus elaphus*) hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, suplemento 1, p. 1145-1205, 1993.
- RAWAT, M.S.M.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANT, G. Proanthocyanidins from *Prunus americana* roots. **Phytochemistry**, v. 50, p. 321-324, 1999.
- RICHTER, M. F.; LIMA, M. F. S.; BORDIGNON, S. A. L.; SCHWARTSMANN, G. A. Flora Brasileira e seu Potencial Antioxidante. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.
- ROH, S-S.; KIM, C. D.; LEE, M.-H.; HWANG, S.-L.; RANG, M.-J.; YOON, Y.-K. The hair growth promoting effect of *Sophora flavescens* extract and its molecular regulation. **Journal of Dermatological Science**, v. 30, p. 43-49, 2002.
- ROSÁRIO, A. A. S.; PENEIREIRO, F. M.; GONÇALO, E. N.; OLIVEIRA, A. C. De; BRILHANTE, N. A. Avaliação técnica do plantio adensado em sistemas com relação ao controle de plantas invasoras. Disponível em:

<http://www.agrofloresta.net/artigos/plantio_adensado_saf_peneireiro.pdf>. Acesso em: 23 mar 2005.

SALVADOR, M.; PICADA, J. N. Os Vinhos como Antioxidantes. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.

SANCHES, A. C. C. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. 2004. 210 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Taninos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. p.

SCHUMANN, C. “Sterculiaceae, Tiliaceae, Bombacaceae, Malvaceae”. In: MARTIUS, C. F.; EICHLER, A. G.; URBAN, I. (Ed.) **Flora Brasiliensis**. Lehre: Verlag von J.Cramer, v. XII , n. 3, 1886-1892. Alemanha: reimpresso, 1967.

SEHN, E.; SILVA, K. C.; RETUCI, V. S.; MEDINA, A. N.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 1, Janeiro, 2003.

SEHN, E.; SILVA, K. C.; BENTO, A. C.; BAESSO, M. L.; FRANCO, S. L. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: *in vivo* test in humans. **Journal de Physique**, no prelo, 2005.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HERRMANN, S. M. A Genotoxicidade dos Flavonóides. In: MARRONI, N. P. (organizadora). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, 189 p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SINCLAIR, R. D.; DAWBER, R. P. R. Androgenetic alopecia in men and women. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 167-178, 2001.

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.

SOUSSOLIER, L.; BERTHON, J. Y. Phytobioactivies and their role in preventing skin aging. **Happi**. December, p. 93-96, 1988.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1990.

TAKAHASHI, T.; KAMIYA, T.; YOKOO, Y. Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells *in vitro* and convert hair cycle *in vivo*. **ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA (Acta Derm Venereol)** (Stockh), v. 78, p. 428-432, 1998.

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, p. 545-552, 1999a.

TAKAHASHI, T.; KAMIYA, T.; HASEGAWA, A.; YOKOO, Y. Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells *in vitro* and activate hair follicle growth *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, n. 3, p. 310-316, 1999b.

TAKAHASHI, T.; KAMIMURA, A.; YOKOO, Y.; HONDA, S.; WATANABE, Y. The first clinical trial of topical application of procyanidin B-2 to Investigate its potencial as a hair growing agent. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 331-336, 2001.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, p. 232-233, 1996.

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

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). UNESP – Araraquara. 2002.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística**, 7ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1999.

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

USHIROBIRA, T. M. A. **Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná)**, Dissertação (Metrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2003.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Rio de Janeiro: Campos, 1981.

VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. Métodos de quebra de dormência de sementes. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/dormencia.asp>>. Acesso em: 14 mar 2005.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Techonologie**. 7. Auf. Berlin: Ullstein Mosby, p.65-69, 1993.

WEINGES, K.; GÖRITZ, K.; NADER, F. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XI Konfigurationberstimmung von C₃₀H₂₆O₁₂ – Procyanidinen und Strukturalklärung eines neuen Procyanidins. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 715, p164-171, 1968.

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschritte der Chemical Organischer Naturstoffe**, v. 27, p. 158-260, 1969.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. **Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: Díaz de Santos, S. A., 1990.

WINROCK INTERNATIONAL. **FACT 97-04S. Una guía útil para los árboles fijadores de nitrógeno del mundo**. USA, junho, 1997. Disponível em: <http://www.winrock.org/forestry/factpub/Sp_guazuma.htm>. Acesso em: 14 mar 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the appropriate use of herbal medicines**. Manila, 1998a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998b.

YANAGIDA, A.; KANDA, T.; SHOJI, T.; OHNISHI-KAMEYAMA, M. NAGATA, T. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 181-190, 1999.

YANO, K.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. Control of hair growth and follicles size by VEGF – mediated angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 4, p. 409-417, fevereiro, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.(orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ANEXO A

Exemplo de cálculo do IC₅₀ através da regressão linear.

A primeira bateria de tubos corresponde a uma tabela abaixo (primeira determinação-d=1). Para a segunda e a terceira determinações são feitas mais duas tabelas.

Tubos	Exemplo de concentração (mg/ml)	Abs observada	cor	% RSA calculada
1	0,02			
2	0,01			
3	0,005			
4	0,0025			
5	0,00125			

A atividade anti-radicalar (RSA – radical scavenging activity) foi calculada como a percentagem de descoloração do radical DPPH[•], usando a seguinte equação:

$$\% \text{ RSA} = (1 - A_a / A_c) \times 100$$

onde:

A_a = absorvância da solução quando um extrato foi adicionado em determinada concentração,

A_c = absorvância da solução do radical DPPH[•].

Para cada bateria de 5 tubos (determinação) faz-se o cálculo e obtém-se 3 equações da reta (d= 1, d=2 e d=3). O cálculo da equação da reta é realizado a partir da tabela a seguir:

Tubos	X (concentração em mg/ml)	Y (%RSA calculada)	X ²	Y ² (utilizado para o cálculo do r)	XY
1					
2					
3					
4					
5					
	ΣX	ΣY	ΣX ²	ΣY ²	ΣXY

$$a = \frac{(n \sum XY) - (\sum X \cdot \sum Y)}{(n \sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{(\sum Y) \cdot (a \sum X)}{n}$$

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \cdot \sum Y}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2][n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

onde:

a = coeficiente angular da reta

b = coeficiente linear da reta (intercepto no eixo Y)

n = número de concentrações (ou tubos) que foram escolhidos como pontos para confecção da reta. Neste exemplo igual a 5.

r = coeficiente de correlação (pode variar de -1 a + 1), quanto mais próximo de 1 melhor, porque quando r = 1 diz-se que há uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis (VIEIRA, 1981; MILONE, 2004).

A equação da reta é dada por: $Y = a \cdot X + b$

Onde:

Y = % RSA

X = Concentração

a e b = foram calculados

desse modo, tem-se: $\%RSA = a \cdot \text{Concentração} + b$

para saber em qual concentração terá 50% de inibição (IC₅₀), tem-se:

$$50 = a \cdot \text{concentração} + b \quad \text{ou seja,} \quad IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Observação: neste exemplo o IC₅₀ foi obtido em mg/ml, os valores foram transformados para µg/ml.

ANEXO B

Folha de aprovação do comitê de ética na experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá.



COMITÊ DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

REGISTRO N° 022/2004

PARECER N° 014/2004

Responsável pelo Experimento: JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO			
Centro/Departamento: CCS/Departamento de Farmácia e Farmacologia			
Título do projeto: Avaliação química, analítica e atividade sobre o crescimento capilar de extratos liofilizados de cascas de <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. var. <i>Tomentella</i>, <i>Sterculiaceae</i>			
Data da Reunião: 13 de julho de 2004		Situação: APROVADO	
Relatório Anual/Final para Comitê:	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	Data:
Considerações:			
Somos de parecer favorável a aprovação da pesquisa que tem como objetivos:			
<ul style="list-style-type: none"> I. Realizar o controle de qualidade da droga vegetal, coletada no norte do estado do Paraná, confirmando suas características botânicas, físicas e físico-químicas. II. Isolar compostos fenólicos no extrato liofilizado semipurificado, preparado a partir das cascas secas coletadas na região norte do estado do Paraná. III. Desenvolver um tônico capilar para ser empregado no tratamento para o crescimento capilar. IV. Realizar controle analítico do extrato semipurificado e total, se possível, através do uso da cromatografia líquida de alta eficiência. V. Avaliar morfológicamente, através de análises morfométricas e da análise da proliferação celular epitelial, a ação dos extratos brutos, semipurificado e substância pura, obtidos das cascas de <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. var. <i>tomentella</i> sobre o crescimento capilar, em ratos Wistar. 			
 Prof. Dr. Evanilde Benedito Cecilio Presidente		 Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes Vice-Presidente	



Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA

Comunicação Interna

DE: CEEA	CI N° 022/04
PARA: PROF. JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO - DFF	DATA: 15/07/04
REFERÊNCIA: Informa parecer CEEA	

Senhor Professor:

Informamos que o projeto registrado nesta Comissão sob protocolo n° 022/2004-CEEA - "Avaliação química, analítica e atividade sobre o crescimento capilar de extratos liofilizados de cascas de *Guanuma ulmifolia* Lam. var. *Tomontella*, *Sterculiaceae*", foi analisado e obteve o parecer anexo.

Atenciosamente,

RECEBI

Profa. Dra. Evanilde Benedito Cecilio
Presidente do CEEA

DATA

ASSINATURA

ANEXO C

Acta Farm. Bonaerense 24 (2): 225-33 (2005)
Recibido el 5 de enero de 2005
Aceptado el 31 de enero de 2005

Trabajos originales

Contribuição ao Estudo Farmacognóstico da mutamba (*Guazuma ulmifolia* - Sterculiaceae)

Karen Janaína GALINA¹; Cassia Mônica SAKURAGUI²; Juliana Cristina BORGUEZAM ROCHA³;
Emi Rainildes LORENZETTI²; João Carlos PALAZZO DE MELLO*^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, Rod. Araraquara-Jaú,
km 1, Araraquara, SP, 14801-902, Brasil

² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia,
Av. Colombo 5790, Maringá, PR, 87020-900, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá,
Av. Colombo, 5790, Maringá, P.,R. 87020-900, Brasil

RESUMO. *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae, conhecida popularmente como mutamba, possui ampla distribuição geográfica, existindo desde o México até o sul do Brasil. O interesse pelas suas propriedades químicas deveu-se principalmente pela sua aplicação no tratamento capilar. Esta propriedade pode ser atribuída aos taninos, os quais apresentam atividade farmacológica, antiinflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana, ação de proteção capilar e prevenção na formação de radicais livres. Na análise microscópica das cascas e das folhas foram detectados: grandes canais secretores entre as células do parênquima e tricomas tectores estrelados sobre a epiderme, respectivamente. Um dos objetivos do estudo anatômico das cascas de *G. ulmifolia* foi detectar tecidos em que havia acúmulo de polifenóis. Como resultado, dois tecidos mostraram-se ricos em idioblastos contendo esta substância: a região floemática e a periderme. A análise química preliminar realizada com as cascas da mutamba mostrou positividade para os grupos químicos flavonóides, taninos, saponinas e mucilagens.

SUMMARY. "Contribution to the pharmacognostic study of mutamba (*Guazuma ulmifolia* - Sterculiaceae)". *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae, popularly known as mutamba, has a wide geographical distribution, ranging from Mexico to Southern Brazil. The interest in its chemical properties is due to its popular use for hair loss treatment. This activity can be attributed to tannins that have many pharmacological activities such anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, anti-microbial, anti-viral, capillary protective action and radical scavenging properties. In the microscopic analysis of barks and leaves, large secretor ducts could be detected among the parenchyma cells, as well as star shaped trichoms on the epidermis. One of the aims of the anatomical study was to detect tissues with polyphenolic compounds. The results indicated two tissues rich in these compounds: the phloematic region and the periderm. Chemical analyses were carried out on the bark and showed the presence of the following chemical groups: flavonoids, tannins, saponins and mucilages.

INTRODUÇÃO

Guazuma ulmifolia, conhecida vulgarmente como mutamba, vem sendo utilizada pela população como medicamento natural em praticamente todos os locais onde ocorre. As partes geralmente empregadas são cascas e folhas, porém, há relatos de que os frutos também são aproveitados¹. O chá das cascas é utilizado no Brasil como sudorífero, sendo também empregado em casos de febre, tosse, bronquite, asma, pneumonia e problemas de fígado². Popularmente, a mutamba (cascas e folhas) é empregada em diversos países da América do Sul e Central em casos de problemas gastrintestinais, dis-

túrbios renais, alopecia, tosse, febre e problemas de pele³⁻⁷.

Diversos autores demonstraram algumas atividades de extratos de mutamba, entre elas destacam-se: atividade anti-hiperglicemiante⁸, antibacteriana e antifúngica^{6,9-11}, citotóxica¹², anti-secretora¹³. A DL50 não foi definida entretanto, confirmou-se que as folhas da mutamba não possuem toxicidade¹⁴.

Diante das características apresentadas pela *G. ulmifolia* Lam., o presente trabalho objetivou caracterizar as folhas e cascas da espécie vegetal morfológica e anatomicamente e, delimitar taxonomicamente a espécie, além de estabelecer al-

PALAVRAS CHAVE: Análise Botânica, Avaliação Farmacognóstica, *Guazuma ulmifolia*.

KEY WORDS: Botanical analyses, Pharmacognostic evaluation, *Guazuma ulmifolia*.

* Autor a quem a correspondência deverá ser enviada. E-mail: mello@uem.br