

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DESENVOLVIMENTO DE
FITOCOSMÉTICO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE**

Dimorphandra mollis Benth. (LEGUMINOSAE-
CAESALPINIOIDEAE)

SILVIANE ZANNI HUBINGER

ORIENTADORA: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DESENVOLVIMENTO DE
FITOCOSMÉTICO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE
Dimorphandra mollis Benth. (LEGUMINOSAE-
CAESALPINIOIDEAE)**

SILVIANE ZANNI HUBINGER

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

H878e Hubinger, Silviane Zanni
Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae/ Silviane Zanni Hubinger. – Araraquara, 2009. 148 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Raquel Regina Duarte Moreira
Co-orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1.Dimorphandra mollis. 2.Faveiro. 3.Flavonóides. 4.Farmacognosia.
I.Moreira, Raquel Regina Duarte, orient..II. Salgado, Hérica Regina Nunes, co-orient.. III.Título.

CAPES: 40300005

Dedico esta dissertação:

À Deus

“Por sua sublime presença em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espriar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade”.

Agradecimentos

Aos meus queridos pais Antonio Sergio e Maria de Lourdes, pela compreensão e por haverem me educado da melhor forma possível, dando constantes exemplos de bem proceder perante as pessoas e a sociedade.

Aos meus irmãos Alexandre e Cristiane por me ouvirem em todos os momentos e me incentivarem nos mais difíceis.

Ao Bruno, obrigada por todo amor, carinho e companheirismo e paciência dedicados a mim em todos estes anos que estamos juntos e principalmente nos dois anos de realização desse trabalho. Eu te amo muito!!!

A toda minha família, especialmente a minha avó Maria Aparecida, que sempre buscou o meu melhor, a minha prima Isabela, que foi mais do que uma amiga, e à minha madrinha Ana Paula, que sempre zelou por mim.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Irani, Ana Cristina, Moacir, Ana Lúcia, Maria Rita, Sônia, Natalina, Maximiliano, Cristina, Maria Júlia e Thiago pela atenção, dedicação e carinho em nossas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, obrigada pela sua amizade, dedicação e ensinamentos.

À Profª. Dra. Vera Lucia Borges Isaac, obrigada pela sua amizade, dedicação, ensinamentos e pela colaboração para este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso, obrigada pelos ensinamentos, atenção, amizade e pela colaboração para este trabalho.

À Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro obrigada pela sua amizade e ensinamentos, e por ter participado da banca de qualificação deste trabalho, contribuindo para seu aperfeiçoamento.

Às Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco e Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, por terem participado da banca de qualificação e defesa, respectivamente, deste trabalho, contribuindo para seu aperfeiçoamento.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, obrigada pela amizade e ensinamentos, e por ter participado da banca de defesa deste trabalho, contribuindo para seu aprimoramento

À Profa. Dra. Clarice Keiko Fujimura Leite e seu aluno Fernando pela contribuição para este trabalho.

Aos professores da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, que durante estes anos foi possível conhecê-los e ter amizade, respeito e admiração por sua dedicação.

Às secretárias Claudia, Laura e Sônia da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela atenção e paciência.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Luis Eduardo, Maria Angélica e Fátima pela colaboração para realização deste trabalho e pela amizade.

À Letícia e à Nadiége pela amizade, dedicação e todas as ajudas que me ofereceram nos momentos em que mais precisava.

Aos colegas que ajudaram de alguma forma nesse trabalho: Grace, Tatiana, Filipe, Flávio, Marcelo, Ademir, Bruna e Cássia que me ajudaram a superar novos desafios, muito obrigada.

Aos meus colegas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara: Ana Paula, Cristina, Cristiani, Emerson, Flávia Fiorentino, Flávia Chiva, Flávio, Guilherme, Jean, Jemima, José Ricardo, Juliana, Mariana, Priscila dentre tantos, pela amizade e incentivo.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e também pela amizade.

Por aqueles que em suas orações também puderam me fortalecer.

E, principalmente à minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira e minha co-orientadora, Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado. Obrigada por todos os momentos de dedicação e pela atuação essencial para a conclusão desta etapa.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS.....	13
ABREVIATURAS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Flavonóides.....	25
2.2 Atividade Antioxidante de Flavonóides.....	28
2.3 <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae).....	35
2.3.1 Descrição Botânica.....	42
3 OBJETIVOS.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Materiais e equipamentos.....	51
4.1.1 Equipamentos.....	51
4.1.2 Solventes, reagentes, soluções e meios de cultura.....	52
4.1.3 Substâncias químicas de referência.....	54
4.1.4 Cultura de células.....	54
4.1.5 Animais.....	54
4.1.6 Softwares.....	54
4.2 Métodos.....	55
4.2.1 Preparo de exsicata para identificação do material vegetal.....	55
4.2.2 Coleta e preparo do material vegetal.....	55
4.2.3 Análises físico-químicas.....	56
4.2.3.1 Determinação da perda por secagem em estufa com aquecimento e circulação de ar.....	56

4.2.3.2	Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRA TEST).....	56
4.2.3.3	Determinação do pH.....	57
4.2.3.4	Determinação do teor de cinzas totais.....	57
4.2.3.5	Determinação de cinzas insolúveis em ácido.....	57
4.2.3.6	Determinação do teor de extrativos.....	58
4.2.3.7	Determinação da densidade aparente não-compactada do pó.....	58
4.2.3.8	Análise granulométrica.....	58
4.2.4	Caracterização química de flavonóides.....	59
4.2.4.1	Extração para caracterização de flavonóides.....	59
4.2.4.2	Reações de caracterização.....	59
4.2.5	Determinação do teor de flavonóides equivalentes em rotina na droga vegetal.....	60
4.2.5.1	Curva analítica para quantificação de flavonóides totais expressos em rotina.....	60
4.2.5.2	Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal.....	61
4.2.6	Otimização das condições extrativas: variação do líquido extrator.....	62
4.2.6.1	Obtenção dos extratos.....	62
4.2.6.2	Perfil cromatográfico.....	62
4.2.6.3	Determinação do teor de flavonóides totais equivalentes em rotina nos extratos.....	63
4.2.6.3.1	Preparo da solução amostra a partir dos extratos.....	63
4.2.7	Identificação de flavonóides por CLAE-UV-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector Ultravioleta com Arranjo de Diodos).....	64
4.2.8	Controle de qualidade microbiológico do extrato.....	64
4.2.8.1	Contagem total de microrganismos no extrato.....	64
4.2.8.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	65
4.2.8.3	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65

4.2.9 Atividade <i>scavenger</i> de radicais pelo DPPH	66
4.2.10 Atividade antioxidante total pelo ABTS.....	66
4.2.11 Avaliação da atividade citotóxica “in vitro”.....	66
4.2.12 Desenvolvimento da emulsão óleo/água o extrato.....	67
4.2.13 Controle de qualidade microbiológico da emulsão.....	69
4.2.14 Avaliação da estabilidade da emulsão.....	69
4.2.14.1 Teste de centrifugação.....	69
4.2.14.2 Estabilidade preliminar.....	70
4.2.14.3 Estabilidade acelerada ou normal.....	70
4.2.14.3.1 Doseamento de flavonóides totais equivalentes em rutina na emulsão contendo extrato.....	71
4.2.15 Avaliação da toxicidade dérmica aguda.....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Preparo de exsicata para identificação do material vegetal.....	74
5.2 Coleta e preparo do material vegetal.....	75
5.3 Análises físico-químicas.....	75
5.3.1 Determinação da perda por secagem em estufa com circulação de ar.....	75
5.3.2 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST).....	76
5.3.3 Determinação do pH.....	77
5.3.4 Determinação do teor de cinzas totais.....	77
5.3.5 Determinação de cinzas insolúveis em ácido.....	78
5.3.6 Determinação do teor de extrativos.....	78
5.3.7 Determinação da densidade aparente não-compactada do pó.....	79
5.3.8 Análise granulométrica.....	79
5.4 Caracterização química de flavonóides.....	80
5.5 Determinação do teor de flavonóides equivalentes em rutina na droga vegetal.....	83

5.5.1 Curva analítica para quantificação de flavonóides expressos em rotina.....	84
5.5.2 Doseamento da solução amostra obtida a partir da droga vegetal.....	85
5.6 Otimização das condições extrativas: variação do líquido extrator.....	85
5.6.1 Obtenção dos extratos.....	85
5.6.2 Perfil cromatográfico.....	87
5.6.3 Determinação do teor de flavonóides equivalentes em rotina nos extratos.....	90
5.6.3.1 Doseamento da solução obtida a partir dos extratos.....	91
5.7 Identificação de flavonóides por CLAE-UV-DAD.....	92
5.8 Controle de qualidade microbiológico do extrato.....	95
5.9 Atividade <i>scavenger</i> de radicais pelo DPPH.....	96
5.10 Atividade antioxidante total pelo ABTS.....	98
5.11 Avaliação da citotoxicidade.....	100
5.12 Desenvolvimento da emulsão contendo o extrato.....	102
5.13 Controle de qualidade microbiológico da emulsão.....	103
5.14 Avaliação da estabilidade da emulsão.....	104
5.14.1 Teste de centrifugação.....	104
5.14.2 Estabilidade preliminar.....	105
5.14.3 Estabilidade acelerada ou normal.....	109
5.14.3.1 Doseamento de flavonóides no creme contendo extrato.....	116
5.15 Avaliação da toxicidade dérmica aguda.....	119
6 CONCLUSÕES.....	124
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXO.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonóides (2-fenil-benzopirano) e sua numeração.....	26
Figura 2. Estrutura química das subclasses mais comuns de flavonóides.....	28
Figura 3. Estruturas moleculares dos flavonóides quercetina e rutina.....	37
Figura 4. Árvore de <i>Dimorphandra mollis</i> do Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Araraquara - SP.....	43
Figura 5. <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.: a) árvore de <i>D.mollis</i> ; b) flor e folhas; c) favas maduras; d) sementes; e) vista externa do caule; f) vista interna da madeira.....	46
Figura 6. Fruto de <i>Dimorphandra mollis</i> : A) secção transversal: 1- epicarpo; 2- mesocarpo; 3- camada esclerótica; 4- endocarpo; 5- placenta; 6- feixe vascular; 7-esferocristais; B) região externa de pericarpo: 1- epicarpo; 2- células do mesocarpo; 3- estômato; C) epicarpo visto de face.....	47
Figura 7. Tamanho de partícula média do pó dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> . Media de cinco determinações.....	80
Figura 8. Curva analítica de absorbância da solução padrão de rutina.....	84
Figura 9. Rendimento em porcentagem dos extratos etanólicos em diferentes graduações, obtidos a partir dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	87
Figura 10. Placa cromatográfica para a confirmação da presença de flavonóides nos extratos de <i>Dimorphandra mollis</i> . Fase fixa: Sílica Gel G. Fase móvel: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:27). Revelador químico: ácido bórico 3% e ácido oxálico 10% (15:5). Visualização sob luz Ultravioleta (254 nm). A1: extrato etanólico absoluto de frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> , A2: extrato etanólico 80%, A3: extrato etanólico 70%, A4: extrato etanólico 50%, R: rutina, Q: quercetina.....	89

Figura 11. Comparação dos valores de teor de extrativos com os valores de teor de flavonóides dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	92
Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV-DAD do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	94
Figura 13. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD dos padrões: a) quercetina e b) rutina.....	94
Figura 14. Espectros no ultravioleta: a) pico a; b) pico b e padrão quercetina; c) pico c e padrão rutina e d) pico d.....	95
Figura 15. Gráfico dose-resposta da capacidade <i>scavanger</i> sobre o radical DPPH do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e do padrão cisteína.....	98
Figura 16. Gráfico dose-resposta da capacidade <i>scavanger</i> sobre o radical ABTS ^{•+} do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e do padrão cisteína.....	99
Figura 17. Avaliação citotóxica sobre macrófagos da linhagem J774 do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e dos flavonóides rutina e quercetina.....	101
Figura 18. Variação de pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.....	105
Figura 19. Variação da densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.....	107

Figura 20. Variação de pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	111
Figura 21. Variação da densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	113
Figura 22. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> mantida em temperatura ambiente durante o teste de estabilidade acelerada.....	114
Figura 23. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> mantida em geladeira durante o teste de estabilidade acelerada.....	114
Figura 24. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> mantida em freezer durante o teste de estabilidade acelerada.....	115
Figura 25. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> mantida em estufa durante o teste de estabilidade acelerada.....	115
Figura 26. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> mantida exposta à luz durante o teste de estabilidade acelerada.....	116
Figura 27. Curva analítica de absorbância da solução padrão de rutina.....	117
Figura 28. Variação do teor de flavonóides nas amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula percentual da preparação da emulsão e função de cada componente, descritos de acordo com a nomenclatura INCI.....	68
Tabela 2. Análise granulométrica do pó dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	79
Tabela 3. Indicadores de resultados positivos das reações para diferentes classes de flavonóides segundo Costa (1996). Reações assinaladas com (+) apresentaram resultados para <i>Dimorphandra mollis</i>	83
Tabela 4. Concentração de flavonóides em mg/g de extrato nos diferentes extratos hidroalcoólicos obtidos a partir dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	91
Tabela 5. Análise microbiológica do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	96
Tabela 6. Resultados da capacidade <i>scavanger</i> sobre o radical DPPH do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e do padrão cisteína.....	97
Tabela 7. Resultados da capacidade <i>scavanger</i> sobre o radical ABTS ^{•+} do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e do padrão cisteína.....	99
Tabela 8. Resultados obtidos na avaliação citotóxica sobre macrófagos da linhagem J774 do extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i> e dos flavonóides rutina e quercetina.....	102
Tabela 9. Análise microbiológica do creme contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	103
Tabela 10. Média, desvio padrão e variação do pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.....	106
Tabela 11. Média, desvio padrão e variação de densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> ,	

submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.....	108
Tabela 12. Média, desvio padrão e variação do pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	110
Tabela 13. Média, desvio padrão e variação de densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	112
Tabela 14. Média, desvio padrão e variação do teor de flavonóides das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de <i>Dimorphandra mollis</i> , submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.....	118
Tabela 15. Resultados obtidos no teste de toxicidade dérmica aguda para a emulsão base.....	121
Tabela 16. Resultados obtidos no teste de toxicidade dérmica aguda para a emulsão contendo extrato etanólico de frutos de <i>Dimorphandra mollis</i>	122

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa

CLAE-UV-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta com arranjo de diodos

CI₅₀: concentração inibitória 50%

CO₂: dióxido de carbono

Cu²⁺: cátion cuproso

DAD: arranjo de diodos

DL₅₀: dose letal 50%

DMTI: inibidor de tripsina de *Dimorphandra mollis*

DMTI-II: inibidor de tripsina II de *Dimorphandra mollis*

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EMB: eosina-azul de metileno

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

Fe²⁺: cátion ferroso

FRAP: poder antioxidante redutor do ferro

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IC: índice de citotoxicidade

IC₅₀: índice de citotoxicidade 50%

INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredient

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF-κB: fator nuclear kappaB

¹O₂: oxigênio singlete

O₂^{•-}: ânion superóxido

OECD: Organisation for Economic Co-operation Development

OH: radical hidroxilo

ONOO: peroxinitrito

p/p: peso por peso

p/V: peso por volume

ROO: radical peroxilo

SR: solução reagente

TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao Trolox[®]

TSI: trílice açúcar ferro

UFC: unidade formadora de colônia

USP: United States Pharmacopeia

UV-Vis: ultravioleta-visível

V/V: volume por volume

XLD: xilose-lisina-desoxicolato

WHO: World Health Organization

RESUMO

As plantas têm sido uma valiosa fonte de produtos naturais para a manutenção da saúde e da beleza humana. Diante do conhecimento da potencial atividade antioxidante dos flavonóides presentes nos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae), popularmente conhecida como faveiro, pretendeu-se desenvolver um fitocosmético antienvhecimento. Os frutos de *D. mollis* foram coletados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara-SP e sua identificação foi realizada pelo Herbário do Instituto de Biociências da UNESP- Rio Claro- SP, onde está depositada a exsicata. Após coleta, os frutos foram secos e pulverizados em moinho de facas, sendo este material utilizado para realização dos ensaios de controle de qualidade físico-químicos. Os resultados indicaram que o material vegetal encontra-se dentro dos padrões de qualidade estabelecidos para materiais vegetais. Foi, também, otimizada a condição de extração dos flavonóides presentes nos frutos de *D. mollis*, preparando-se extratos por turboextração e utilizando-se etanol em diferentes graduações como líquido extrator. Estes extratos foram submetidos ao doseamento por espectrofotometria e avaliados quanto a sua composição química utilizando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). O extrato preparado com etanol absoluto apresentou o maior teor de flavonóides e foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), confirmando a presença de rutina e quercetina. A partir deste extrato, foram realizadas avaliações da propriedade antioxidante, que mostrou atividade ligeiramente menor que o padrão cisteína, e da citotoxicidade. A emulsão contendo 0,15% do extrato etanólico absoluto, analisada quanto à contaminação microbiológica e quanto à estabilidade, não apresentou sinais de toxicidade dérmica para cobaias.

Palavras-chave: *Dimorphandra mollis*; faveiro; flavonóides; estudo farmacognóstico; atividade antioxidante; fitocosmético.

ABSTRACT

The plants have been a valuable source of natural products for the maintenance of human health and beauty. Through the antioxidant potential of the flavonoids present in *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae), it was developed an antiaging phytocosmetic. The fruits of *D. mollis*, popularly known as 'faveiro', were collected in the Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara- SP and its identification was done by Herbário do Instituto de Biociências da UNESP- Rio Claro- SP, where voucher specimen was deposited. After the collect, the fruits were dried and powdered in a knives mill and this material was used for the physico-chemical quality control techniques. The results indicate that the vegetal material was according to established standards of quality established for plant drugs in general. It was also optimized the conditions of extraction of flavonoids from the fruits of *D. mollis*, preparing the extracts by turbolysis, using ethanol in different degrees as extractor liquid. The flavonoid content was determined by spectrophotometer method and this chemical composition was evaluated by Comparative Thin Layer Chromatography. The extract prepared with absolute ethanol presented a high level of total flavonoids and it was analyzed by High Performance Liquid Chromatography, confirming the presence of rutin and quercetin. From this extract, it was carried out the evaluation of antioxidant and cytotoxicity activities. The extract was incorporated in a cosmetic formulation (oil/water cream) that was analyzed as the microbiological contamination, stability and dermal toxicity.

Keywords: *Dimorphandra mollis*; 'faveiro'; flavonoids; pharmacognostic study; antioxidant activity; phytocosmetic.

1 INTRODUÇÃO

O uso de unguentos à base de óleo de oliva e perfumes de flores ou de ervas aromáticas como "cosméticos" datam da pré-história. Sob a dominação Greco-Romana, a partir do século IV a.C., os perfumes egípcios eram reputados no mundo clássico, sendo o uso de óleos e pomadas, para a proteção da pele dos efeitos do sol, bastante difundidos (AGRA; SILVA, 1993; KAUFFMAN-SAMARAS, 1987). Na Índia, a massagem corporal com óleos perfumados e o banho com a mistura de raízes, folhas, sementes e flores de 33 espécies já era prescrita na Enciclopédia do século XII (AGRA; SILVA, 1993; MATHIAS, 1987).

Historicamente, os derivados botânicos formaram a base de todos os tratamentos médicos nos tempos que os colonizadores europeus vieram pela primeira vez à América. Estes europeus aprenderam que os índios americanos tinham uma farmacopéia extensa, baseada nas plantas nativas, que foi passada de geração para geração através da sabedoria dos homens da medicina de cada comunidade. Essas conexões com as plantas foram dominadas pelos colonizadores, levadas de volta à Inglaterra e incorporadas em alguns grupos dos primeiros livros sobre tratamentos médicos (DRAELOS, 2005).

Os extrativos vegetais formam a maior categoria de aditivos cosméticos encontrados hoje no mercado. Os extratos são obtidos de folhas, raízes, frutos, sementes, bagas, caules, galhos, cascas e flores de plantas, e podem ser facilmente adicionados a sabonetes, hidratantes, cremes de tratamento, cosméticos coloridos e máscaras faciais (DRAELOS, 2005).

Porém, deve-se considerar a qualidade dos fitocosméticos como um fator decisivo para a aceitação e permanência destes produtos no mercado. Dentre os parâmetros a se considerar com relação ao produto acabado, ressalta-se a importância de informações adequadas sobre a segurança e a eficácia dos produtos, os testes físico-químicos e microbiológicos e os estudos de estabilidade. Nesse contexto, é fundamental promover e garantir um produto final eficaz, seguro e de qualidade (SILVA et al., 2005).

Muitas empresas, estando conscientes das tendências de consumos, buscam novos ingredientes para incorporar aos produtos existentes e aos que poderão ser desenvolvidos no futuro. A tendência que está se destacando é o aumento na procura por parte da população de produtos funcionais baseados em princípios ativos vegetais (OLIVEIRA; BLOISE, 1995; ROCHA FILHO, 1995). Os consumidores vêem os fitoderivados como uma alternativa cosmética tão eficaz e com a mesma qualidade dos ativos sintéticos (VILEGAS; CARDOSO, 2007). Tendo em vista essas informações, torna-se importante realizar um controle de qualidade eficaz não só do produto acabado, mas também da matéria-prima vegetal, buscando-se estabelecer parâmetros de qualidade para drogas e extrativos vegetais.

O fator contribuinte mais importante para a atividade biológica de um fitocosmético é a fonte do material vegetal. Os constituintes químicos das diversas partes de uma planta podem se diferenciar, cada um contendo mais de 200 constituintes químicos individuais diferentes. Daí a importância de uma documentação da atividade e interação de cada um desses compostos e seus muitos metabólitos e a descoberta de uma possível toxicidade potencial desses compostos quando associados (DRAELOS, 2005).

A cada dia surgem cosméticos mais eficientes e capazes não só de prevenir, mas também de amenizar os efeitos do tempo sobre a pele, minimizando rugas e linhas de expressão. Por isso, extratos de plantas medicinais com ação antioxidante são cada vez mais procurados para o desenvolvimento de novos cosméticos de ação contra o envelhecimento cutâneo. A atual preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres se tornou essencial à compreensão do envelhecimento celular (RODRIGUES et al., 2003).

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. A produção

excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular e sua cronicidade pode estar envolvida com o envelhecimento das células e conseqüente envelhecimento da pele humana (RODRIGUES et al., 2003).

As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos vegetais. Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (RODRIGUES et al., 2003).

Os cremes anti-idade ou anti-rugas têm a capacidade de evitar ou diminuir a formação precoce das rugas, ou de atenuá-las. É muito importante nestes cremes o uso de extratos provenientes de plantas ricas em flavonóides e em outras substâncias polifenólicas, que são dotadas de ação anti-radicalar (antioxidante) e ação estimulante celular (CUNHA et al., 2004).

Os flavonóides são antioxidantes polifenólicos encontrados nos vegetais. Por possuírem largo espectro de atividades biológica e farmacológica, têm recebido ampla atenção dos pesquisadores desde a década de 90. São metabólitos secundários, sendo considerados princípios ativos em muitas plantas (REPETTO; LIESUY, 2002).

É importante ressaltar que este interesse em grande número de produtos naturais tem aumentado nos últimos anos graças ao grande desenvolvimento de metodologias que podem garantir aos produtos gerados, segurança na utilização (MIYAMARU et al., 2001). A seleção de extratos de plantas para uma determinada atividade terá maior sucesso desde os passos iniciais até a finalização ou formulação, se passos que garantam a segurança estiverem contemplados. Desta forma, além da eficiência do produto é necessária a determinação da toxicidade quando se trabalha com extratos vegetais. Muitos métodos têm sido descritos na literatura para a determinação de citotoxicidade *in vitro*, que vão desde a enumeração das

células sobreviventes (MURILLO et al., 2003), utilização de corantes indicadores ou que se baseiam na letalidade para larvas de *Artemia salina* (ASHA et al., 2003).

A inocuidade cutânea e ocular de produtos contendo extratos de plantas está relacionada com a característica química do princípio ativo e de outros componentes. Os cosméticos, dependendo de sua composição básica e da qualidade das matérias-primas utilizadas, poderão ocasionar irritação da pele e dos olhos (MIYAMARU et al, 2001).

Atualmente, cresce o interesse em se utilizar e validar o uso de plantas medicinais brasileiras não só no combate de várias enfermidades, como também para interesses do mercado cosmético. O Brasil, país detentor de grande biodiversidade, possui cerca de 120.000 espécies vegetais, das quais somente cerca de 10% foram estudadas segundo os aspectos químicos e farmacológicos (SIMÕES et al., 2007). Nesse contexto, o Cerrado sendo um dos biomas presentes no território brasileiro, é alvo de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas, na tentativa de descoberta de novos ativos para o arsenal terapêutico. (SILVA et al, 2005). O conhecimento da flora nativa e a valorização da sabedoria popular podem contribuir para a utilização racional desse bioma.

Assim sendo, o presente trabalho utilizou o extrato obtido a partir dos frutos da espécie *Dimorphandra mollis* na produção de um fitocosmético. A escolha desta espécie vegetal do Cerrado brasileiro foi fundamentada no seu fácil cultivo e por ser rica em substâncias flavonoídicas como a rutina e quercetina que apresentam várias atividades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FLAVONÓIDES

Os flavonóides constituem uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal. Encontrados em plantas, são não somente os pigmentos amarelos (do latim: “flavus” = amarelo e “oide” = forma), mas também os laranjas, azuis e vermelhos das flores. São responsáveis por funções biológicas que garantem o equilíbrio ecológico, como proteção contra a radiação ultravioleta, regulação do crescimento e desenvolvimento normal das plantas, defesa contra fungos, bactérias e vírus, além de quelarem metais tóxicos e reduzirem os agentes oxidativos lesivos à própria planta. Estão ainda envolvidos no processo de transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, respiração e fotossíntese da maioria das plantas (COOK; SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE; WILLIAM, 2000; MUSCHIETTI; MARTINO, 2007).

Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Esta classe de compostos é quase ausente em algas. Alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo somente um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontradas, mas sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia estão presentes em abundância em angiospermas, apresentando neste grupo enorme diversidade estrutural (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonóides foram descobertos em 1930 pelo prêmio Nobel Szent-Gyöngy, que extraía a citrina da casca do limão, possuindo esta substância a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, esta classe de produtos foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C₂, visto que algumas substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, dada a não confirmação destas substâncias como vitaminas, esta classificação foi abandonada em 1950 (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Estes compostos podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários de plantas que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil CoA e que participam na fase dependente de luz da fotossíntese, durante a qual catalisam elétrons (YILMAZ; TOLEDO, 2004; MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Pode-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas de A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007), como mostrado na Figura 1.

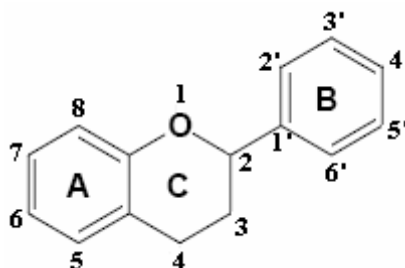


Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonóides (2-fenil-benzopirano) e sua numeração.

Até 1994 foram descritos cerca de quatro mil compostos flavonoídicos (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994). Atualmente são conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, freqüentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo ou glicosídeo. São denominados de *O*-heterosídeos quando a ligação da parte açúcar se dá por intermédio de uma hidroxila e de *C*-heterosídeos quando a ligação se dá com um átomo de carbono. Quando o flavonóide

encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo freqüentemente denominado de forma livre (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

As estruturas químicas dos flavonóides podem variar, ainda, de acordo com o processo de substituição dos grupos funcionais existentes nos anéis, os quais incluem a hidrogenação, hidroxilação, metilação, sulfatação e glicosilação (COOK; SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 subclasses, sendo os incluídos na dieta humana divididos essencialmente em 6 grupos, demonstrados na Figura 2 (YILMAZ; TOLEDO, 2004; MARTINEZ-FLORES et al., 2002). Os flavanóis possuem um grupo hidroxila na posição 3. Já os flavonóis possuem um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3. As flavonas, por sua vez, possuem um grupo carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3. As antocianidinas possuem um grupo hidroxila na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre as posições 1 e 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. As flavononas possuem um grupo carbonila na posição 4. E, por fim, os isoflavonóides possuem o anel B ligado ao restante da molécula através do carbono 3, ao invés de estar ligado ao carbono 2 (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

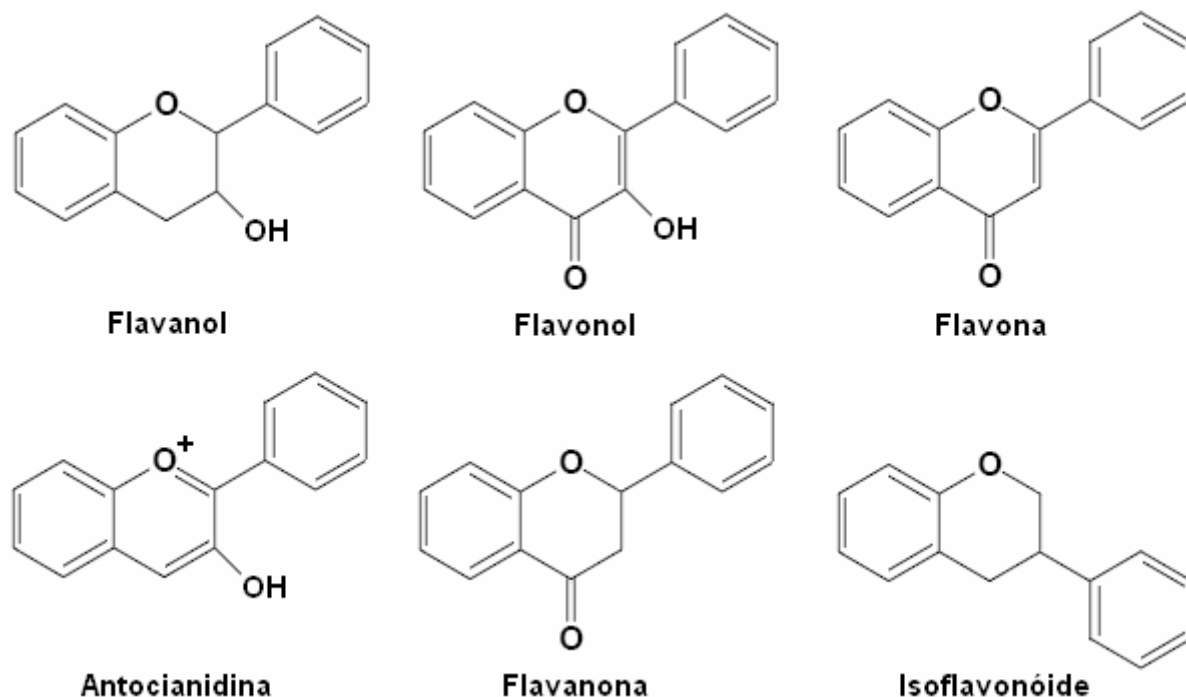


Figura 2. Estrutura química das subclasses mais comuns de flavonóides.

O interesse econômico desta classe de metabólitos é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, as cores que esses pigmentos possuem, sua importância e contribuições em nutrição e sabor dos alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica como anticarcinogênico, antiinflamatório, antioxidante, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais entre outras (SOUSA et al., 1991).

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLAVONÓIDES

Nos processos metabólicos normais das células humanas, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) é compensada por um completo sistema antioxidante endógeno. No entanto, devido a diferentes fatores, se pode produzir um excesso desses radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical peróxilo (ROO), radical hidroxilo (OH), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO), resultando numa situação de estresse oxidativo (MUSCHIETTI;

MARTINO, 2007). As enfermidades cardiovasculares e o câncer (RICE-EVANS; PARKER, 1998), os processos inflamatórios, as patologias autoimunes, desordens do sistema digestivo (REPETTO; LIESUY, 2002) e enfermidades neuro-degenerativas como o Parkinson e o Mal de Alzheimer são relacionadas a este dano oxidativo (SCHROETER et al., 2002; YODIM et al., 2004).

Os antioxidantes são compostos que protegem as células contra os efeitos daninhos causados por estas espécies reativas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007). Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido, radical hidroxilo ou radical peróxido (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

A capacidade dos flavonóides em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos (SAKIHAMA et al., 2002; VAYA et al., 2003). De fato, muitos desses compostos possuem uma atividade mais potente que o α -tocoferol (CAO et al., 1997). Diversos estudos epidemiológicos demonstraram o efeito protetor que exerce uma dieta rica em frutas frescas e vegetais contra o risco de contrair enfermidades cardiovasculares (BAZZANO et al., 2002; KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002) e certos tipos de câncer (BLOCK et al., 1992; INGRAM et al., 1997). Estes efeitos benéficos foram atribuídos, em parte, à presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonóides, os quais exerceriam estes efeitos como resultado de suas propriedades antioxidantes (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 1997).

As propriedades doadoras de elétrons dos flavonóides estão muito bem definidas e explicam a atividade antioxidante *in vitro* destes compostos (BORS et al., 1995). O conceito básico compreende uma transição redox mediante a qual a molécula antioxidante doa um elétron ao radical livre. Durante o transcurso desta transferência de elétrons, o caráter radical é transferido ao antioxidante, formando um antioxidante radical-derivado.

As capacidades antioxidantes dos flavonóides aplicam-se, sobretudo, na neutralização das espécies reativas de oxigênio (ERO), além de desempenharem uma função preventiva na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Deste modo, anulam os efeitos negativos destas espécies sobre as células (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Os flavonóides podem facilmente atuar como neutralizadores de radicais livres em meio aquoso devido a sua propriedade polifenólica. Podem também neutralizar ânions superóxidos produzidos por via química ou enzimática (YILMAZ; TOLEDO, 2004). Alguns flavonóides apresentam também a capacidade de eliminar os processos de peroxidação lipídica do ácido linoléico e dos fosfolipídeos das membranas, bem como a peroxidação dos glóbulos vermelhos (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Os flavonóides também exercem seus efeitos antioxidantes através de outros mecanismos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007). Primeiramente, podem agir como inibidores de enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido como a xantina-oxidase (HANASAKI et al., 1994), a proteína quinase C (URSINI et al., 1994), a ciclo-oxigenase, a lipo-oxigenase, a mono-oxigenase microsomal, a glutathion S-transferase, a succino-oxidase mitocondrial e a NADH oxidase, todas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (KORKINA; AFANAS'EV, 1997).

Além disso, atuam como quelantes de metais divalentes, os quais desempenham um papel importante no metabolismo do oxigênio, como captadores (*scavengers*) de EROs e como participantes da regulação da atividade de enzimas antioxidantes (VAN ACKER et al., 1996).

Recentemente demonstrou-se que certos flavonóides, como a fisetina, naringenina e o 7-monoidroxietilrutosídeo, poderiam atuar de forma similar ao antioxidante endógeno α -tocoferol (vitamina E), protegendo as membranas celulares do dano oxidativo (VAN ACKER et al., 2000).

A capacidade dos flavonóides para atuar como agentes antioxidantes depende de sua estrutura molecular. Nos últimos anos, foram publicados numerosos trabalhos sobre a atividade antioxidante *in vitro* e a relação estrutura-atividade antioxidante destes compostos (RICE-EVANS et al., 1996; ARORA et al., 1998; MODAK et al., 2005, MONTORO et al., 2005). No entanto, a eficácia antioxidante *in vivo* está muito pouco documentada, devido, provavelmente a um conhecimento limitado sobre sua absorção, biodisponibilidade e metabolismo (WILHELM FILHO et al., 2001). Só recentemente demonstrou-se que uma pequena porção dos flavonóides ingeridos na dieta é absorvida tanto na forma de agliconas como de glicosídeos, enquanto que a maior parte se degrada em diferentes ácidos fenólicos. Tanto os flavonóides absorvidos como os seus metabólitos seriam os responsáveis pela atividade antioxidante *in vivo* (PIETTA, 2000).

Quimicamente são três as características que conferem aos flavonóides suas importantes propriedades antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1997). São elas: substituintes doadores de hidrogênio (grupos hidroxilos fenólicos), que permitem aos flavonóides sofrer uma reação redox que os ajuda a capturar radicais livres mais facilmente; um sistema de deslocamento estável (anéis aromáticos e heterociclos e múltiplas uniões insaturadas), que ajuda a deslocar a distribuição de elétrons e a presença de certos grupos estruturais capazes de formar complexos quelantes de metais de transição que podem regular a produção de EROs.

Bors e colaboradores (1990) estudaram extensamente a capacidade antioxidante dos flavonóides como captadores de radicais livres. Segundo estes autores, a mesma depende, principalmente, da presença de três características estruturais: estrutura catecol ou *o*-dihidroxi no anel B; insaturação na posição C2-C3 em conjugação com a função 4-oxo do anel C e grupos hidroxilo em posição C3 e C5.

Quanto à estabilidade do radical livre flavonóide, acredita-se que é incrementada pela criação de um sistema eletrônico completamente conjugado. Isto pode acontecer através da

estrutura planar do flavonóide, favorecida pela presença de um grupo hidroxila em C-3. A substituição por um grupo metoxila nesta posição perturba a planaridade devido a um impedimento estérico transmitido pelo grupo metil, resultando na diminuição da atividade antioxidante (DUGAS et al., 2000).

Sabe-se também que a buteína e outras 3,4-diidroxi-chalconas são mais ativas do que as flavonas análogas, devido a seu maior deslocamento eletrônico. Da mesma forma, isoflavonas são muitas vezes mais ativas do que flavonas devido ao efeito estabilizante da carbonila em C4 e hidroxila em C5. A flavona baicaleína, extraída de *Schutellaria baicalensis* Georgi, e a antocianidina e acianidina, isoladas de cerejas amargas, também apresentam atividade antioxidante, sendo empregadas na indústria de alimentos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Montoro e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antioxidante em 26 flavonóides isolados de plantas medicinais, utilizadas, tradicionalmente, como antiinflamatórias. Isto porque os radicais livres são importantes nos processos inflamatórios, que são implicados na ativação do fator nuclear NF-kB, o qual induz a transcrição de moléculas inflamatórias (SAHNOUN et al., 1998).

No ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), a atividade dos derivados de miricetina sem hidroxila em C-5 era comparável aos derivados que tinham OH em C-5. Este resultado estabelece que o grupo hidroxila em C-5 não influi na atividade captadora de radicais livres. Dentro do grupo da flavonas, os derivados da luteolina foram claramente mais ativos que os da apigeninas, isto indica que indica que a ausência do *orto* di-hidroxilo no anel B produz uma diminuição da atividade, assim como a ausência da insaturação C-2,3, demonstrados nos resultados obtidos com os derivados de dihidroflavonóis e flavanonas. Quando comparou-se as atividades das agliconas a respeito dos derivados glicosilados observou-se, também, uma diminuição na atividade antioxidante. Por outro lado,

para a atividade inibitória da xantina oxidase é importante tanto a presença de grupos hidroxilas em C-5 e C-7 como a ligação em C-2,3.

Dugas e colaboradores (2000) avaliaram a atividade antioxidante de uma série de flavonóides contra radicais peróxilos gerados por hemólise térmica e estudaram a relação estrutura-atividade. O composto mais ativo foi a quercetina, seguido por seu derivado 3-glicosilado, a rutina, com atividade captadora de EROs 7 e 5 vezes maiores que o trolox (análogo da vitamina E) respectivamente.

No ensaio de poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), o qual determina diretamente a capacidade redutora de um composto, a quercetina, a fisetina e a miracetina, resultaram os flavonóides mais ativos, sendo eles 3,02, 2,52, e 2,28 vezes mais ativos que o trolox, respectivamente (FIRUZI et al., 2005).

Entre as chalconas, tem sido relatada a atividade antioxidante das retrochalconas e licochalconas A, B, C e D e da equinatina. O mecanismo de ação é devido, possivelmente, à facilidade do núcleo catecólico de sofrer oxidação e à formação de um radical *orto*-semiquinona estável. Com relação às características estruturais, ficou evidenciado que a presença de grupos *orto*-dihidróxi nas posições 3' e 4' da flavona é importante para esta atividade biológica (HARAGUCHI et al., 1998).

A dihidrochalcona floretina exibiu uma potente atividade antioxidante como captadora do radical ONOO⁻ e como inibidora da peroxidação lipídica. A comparação com compostos estruturalmente relacionados estabeleceu que o farmacóforo responsável pela atividade antioxidante da floretina é a 2,6-dihidroxiacetofenona, grupo diferente dos farmacóforos antioxidantes reportados previamente nos flavonóides (REZK et al., 2002).

A peroxidação lipídica, que envolve a degradação oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, tem sido nos últimos 50 anos objeto de intensos estudos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007). O grau e a complexidade da peroxidação são variáveis e dependentes do

mecanismo de iniciação que pode ser enzimático, não enzimático ou por oxidação mediada pelos radicais livres. Este processo degradativo se vê implicado no envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989) e em várias enfermidades incluindo a arterosclerose, artrite reumatóide e desordens neurodegenerativas (NIKI et al., 2005). Em consequência, existe um interesse considerável na busca de novos antioxidantes que protejam os ácidos graxos do dano oxidativo. Diversos flavonóides mostraram sua eficiência na inibição de processos de peroxidação lipídica do ácido linoléico ou dos fosfolipídios nas membranas (LAUGHTON et al., 1989). Desta forma, comprovou-se sua potente capacidade de inibir *in vitro* a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e reduzir a citotoxicidade das LDL oxidadas (HIRANO et al., 2001; MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002).

As substâncias quercetina, isorramnetina e ramnozina apresentam potente efeito inibidor da peroxidação microsomal de lipídeos. Esta atividade também foi observada para a luteolina, eriodictol e taxifolina. A inibição da peroxidação lipídica em microsomas também foi descrita para morina, canferol e miricetina (HARAGUCHI, 2001).

Da espécie *Baccharis grisebachii* foram identificados os flavonóides quercetina e a 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona como os compostos mais ativos na captura do radical $O_2^{\bullet-}$ na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Estes dois compostos, juntamente com a 5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona e a 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona inibiram significativamente a lipoperoxidação em eritrócitos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (TAPIA et al., 2004).

A quercetina e a genisteína a 10 e 20 mM diminuíram significativamente a peroxidação lipídica induzida por Cu^{2+} e Fe^{2+} . A combinação de ambos flavonóides nas mesmas concentrações ofereceu uma melhor proteção antioxidante. Este resultado pode ser atribuído a uma maior capacidade de captura de radicais livres ou a um aumento na capacidade quelante dos flavonóides combinados com relação aos tratamentos isolados (BOADI et al., 2003).

Todas estas contribuições sugerem que uma adequada ingestão de alimentos que contêm flavonóides poderia ser benéfica na redução do risco de certas enfermidades associadas a eventos mediados por radicais livres (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007). Do ponto de vista interdisciplinar, só a combinação de áreas de investigação definidas pode permitir a obtenção do objetivo principal: a utilização de flavonóides como agentes terapêuticos antioxidantes (TEIXEIRA et al., 2005).

Ressalta-se, ainda o uso dos flavonóides como agentes contra o envelhecimento. A atividade metabólica natural produz lixo metabólico que o organismo nem sempre consegue eliminar devidamente. Este lixo é constituído por moléculas oxidativas que podem conduzir à oxidação de outras. De fato, verifica-se um aumento de marcas de estresse oxidativo em tecidos de indivíduos, cuja acumulação nas células causa citotoxicidade (SORG, 2004). Assim, os flavonóides com capacidade antioxidante representam uma fonte viável de eliminação desse lixo metabólico.

2.3 *Dimorphandra mollis* BENTH. (LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE)

A espécie vegetal *Dimorphandra mollis*, conhecida popularmente como faveiro, barbatimão-de-folha-miúda, falso-barbatimão, cinzeiro, farinheiro, fava-danta, enche-cangalha, faveiro-do-campo e farinha-seca, é uma árvore muito comum encontrada nos estados do Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, sendo característica de Cerrado e de Campo Cerrado. Não há referências sobre a ocorrência desta espécie em outras partes do mundo (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; LORENZI, 2000, CORRÊA, 1984).

Sua madeira pode ser usada para confecção de caixas, compensados, forros, painéis, brinquedos, lenha e carvão, além da espécie poder ser utilizada em paisagismo e regeneração de áreas degradadas (LORENZI, 2000). As cascas da árvore de *D. mollis* são ricas em taninos,

bastante utilizados outrora para curtir couro (LORENZI, 2000; BRANDÃO, 1992). Popularmente, *D. mollis* (falso-barbatimão) é confundida com *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão-verdadeiro), também da família Leguminosae. Ambas possuem alto teor de taninos em suas cascas e possuem o mesmo período de florescimento (CINTRA et al., 2002; TOLEDO, 2002).

Santos e colaboradores (2002) pesquisaram a presença de taninos e compostos fenólicos em espécies de barbatimão. Foi possível determinar a presença principalmente de monômeros de taninos hidrolisáveis (catequina ou epicatequina) e oligômeros de taninos condensados nas cascas de *D. mollis*. Nas folhas foi possível identificar apenas cianidina e flavonol. Estas identificações foram feitas a partir de extratos obtidos de 20 g de cascas ou folhas e 100 mL de acetona:água 7:3. O extrato das cascas teve um rendimento de 15,2 %, contendo 59,9 mg de fenóis totais por grama de extrato, enquanto que o extrato das folhas teve rendimento de 23,6 % e 25,3 mg de fenóis totais por grama de extrato.

Martins e colaboradores (2007) fizeram um estudo fitoquímico preliminar da espécie. Todas as partes da planta analisada (raiz, casca, folha e caule) forneceram reação positiva para a presença de derivados fenólicos e taninos. As saponinas de modo geral mostraram-se ausentes nas partes amostradas da planta em questão, assim como as agliconas esteroidais e outros derivados triterpenoídicos. As amostras de casca, raiz e folhas apresentaram resultados positivos para derivados flavonoídicos, identificados como flavonóis. Foi, também, determinada a ausência de alcalóides em todas as partes do vegetal.

Dos frutos, pode-se extrair glicosídeos flavônicos, que são importantes devido à sua ação antiinflamatória. O pericarpo do fruto, quando reduzido a pó, é utilizado popularmente para o tratamento de úlceras por apresentar propriedades secante, antiinflamatória e cicatrizante. Internamente, como tônico, emprega-se o cozimento das cascas dos frutos que servem também para combater a leucorréia, blenorragia, disenterias, hemoptises e outras

espécies de hemorragias, inclusive hemorragias uterinas (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; LORENZI, 2000). A propriedade antiinflamatória deve-se principalmente ao fato de que a composição química da casca do fruto de *D. mollis* é representada basicamente por flavonóides (10-15%), sendo extraídas, principalmente, rutina (6-10%) e quercetina, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 3 (FRANCO et al., 1996; SOUSA et al., 1991).

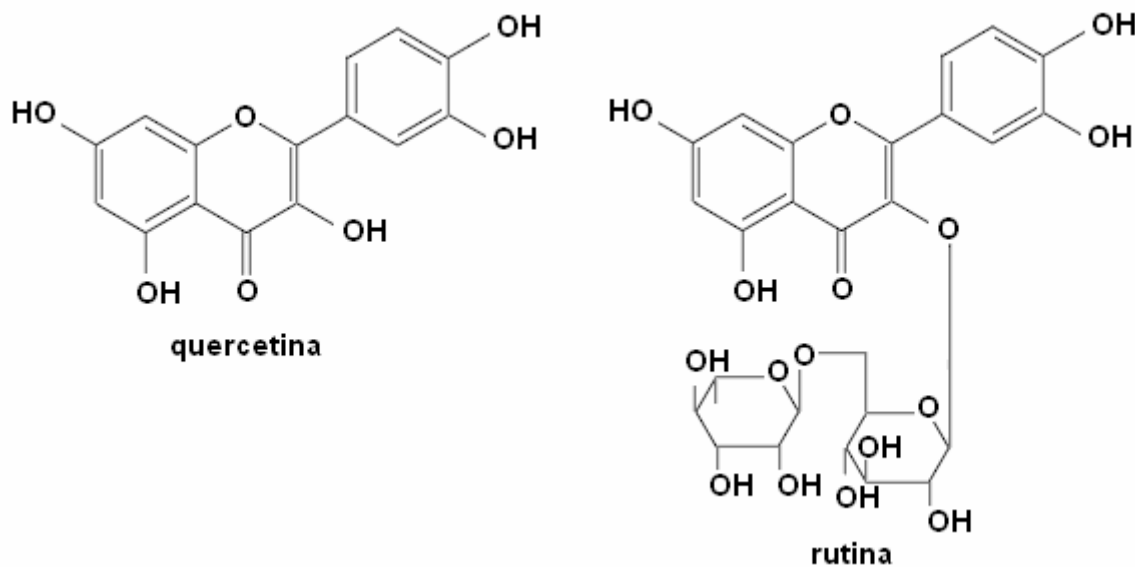


Figura 3. Estruturas moleculares dos flavonóides quercetina e rutina.

A presença dos flavonóides rutina e quercetina nos frutos de *D. mollis* indica possíveis propriedades desta espécie, tais como a ação vasoprotetora atuando sobre a resistência e permeabilidade capilar (ALONSO, 1998). Outra atividade atribuída a esta espécie é a ação antiinflamatória, podendo também ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças que envolvem radicais livres (WILHELM FILHO et al, 2001). Desta forma, o desenvolvimento de produtos a partir dessa espécie pode ser justificada pela rica fonte de flavonóides presentes em seus diversos órgãos vegetais, sendo de grande valia para o uso em cosméticos.

Silva e colaboradores (2005), tendo avaliado todos esses benefícios da espécie, desenvolveram preparações fitoterápicas contendo extrato metanólico seco de *D. mollis*.

Foram preparadas formulação fitoterápica em forma de cápsulas e a formulação fitocosmética na forma de creme água/óleo. No entanto, as formulações não foram avaliadas quanto a qualidade, eficácia e segurança.

Estudos realizados com o gênero *Dimorphandra* apresentaram, segundo Dobereiner e Tokarnia (1985), efeito nefrotóxico em gado. Lorenzi (2000) e Santos (1973) descrevem a toxicidade da espécie *D. mollis* para o gado. Os sinais apresentados pelo gado que ingere as favas são: pêlos arrepiados, perda de apetite e decúbito; o animal defeca e urina pouco, além de apresentar discreto timpanismo, com fezes ressecadas ou semilíquidas e odor fétido; desidratação (retração do globo ocular); tremores musculares; edema frio subcutâneo (abdômen, períneo, vulva e mandíbula); a morte pode ocorrer em 72 horas (curso agudo) ou após 3 a 17 dias (curso subagudo). Outro estudo avaliou se a ingestão de favas da espécie causavam aborto em vacas. As favas de *D. mollis* foram administradas por via oral a nove vacas prenhes (três estavam ao redor do 90º, três do 150º e três do 210º dia de gestação) em doses únicas de 10 e 12 g/kg; nenhuma delas abortou, porém algumas adoeceram e duas morreram (SANTOS et al., 1975).

Cintra e colaboradores (2002) reportaram as propriedades tóxicas dos extratos metanólicos das flores, pedúnculos, folhas, pecíolos e casca do tronco de *D. mollis* sobre as operárias de *Apis mellifera*. A astilbina isolada dos pedúnculos e flores como seu principal componente, apresentou atividade inseticida sobre abelhas confinadas. Os resultados obtidos indicaram que a astilbina reduziu a sobrevivência média das abelhas tratadas.

A astilbina isolada das flores de *D. mollis* foi também avaliada quanto a sua ação inseticida contra as espécies *Anticarsia gemmetalis* e *Spodoptera frugiperda* por Pereira et al. (2002). Foi observado que houve redução da fase larval para a espécie *A. gemmetalis* e prolongação das fases larval e pupal para a espécie *S. frugiperda*.

Através de técnicas de isolamento combinadas, foram isolados e purificados dois inibidores de tripsina de sementes de *D. mollis*, DMTI – inibidor de tripsina de *Dimorphandra mollis* (MACEDO et al., 2000) e DMTI-II – inibidor de tripsina II de *Dimorphandra mollis* (MELLO et al., 2001). DMTI (20 kDa) e DMTI-II (23kDa) são inibidores de tripsina pertencentes à família de Kunitz. Em vista de espécies vegetais produzirem variadas moléculas a de defender-se do ataque de insetos, Macedo e colaboradores (2002) estudaram a ação do inibidor DMTI-II sobre larvas da espécie de caruncho *Callosobruchus maculatus*. O inibidor apresentou atividade inseticida positiva, com dose necessária para causar 50% de mortalidade (DL_{50}) de 0,5% de DMTI-II na dieta artificial das larvas.

Mello (2005) analisou a ação inseticida de DMTI-II e DMTI sobre os lepidópteros *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*. Tanto DMTI-II quanto DMTI, quando incorporados ao nível de 2% na dieta artificial dos insetos, não se mostraram agentes inseticidas potenciais contra essas duas espécies. Além disso, foi estudado o envolvimento de DMTI-II e DMTI na resposta inflamatória utilizando o edema de pata em ratos como modelo experimental, os resultados mostraram que doses crescentes de DMTI-II geram uma curva dose-dependente sendo que a resposta máxima ocorre 30 minutos após a sua injeção subplantar.

Extratos etanólicos brutos dos frutos e das cascas de *D. mollis* foram testados por Bezerra e colaboradores (2002) quanto a sua atividade moluscocida frente à espécie *Biomphalaria glabrata*. Na concentração estudada (100 ppm), ambos os extratos não causaram mortalidade significativa sobre a espécie de molusco estudada.

Em um estudo mais amplo sobre a toxicidade dessa espécie sobre mamíferos, Feres e colaboradores (2006) avaliaram a segurança do extrato hidroalcoólico (etanol:água, 2:8) de frutos de *D. mollis* pelo estudo de toxicidade oral aguda e crônica (180 dias) em ratos. No estudo de toxicidade aguda, as doses de 3500 e 5000 mg/kg apresentaram efeitos reversíveis

sobre o comportamento dos animais. Já no estudo crônico, as doses de 1000 e 2000 mg/kg não provocaram mudanças significativas no peso corporal dos animais e nem em seu consumo de água e alimento. Mudanças comportamentais reversíveis e alterações em parâmetros sanguíneos foram observadas na dose de 2000 mg/kg. Nesta dose, a dosagem de hemoglobina, o hematócrito e o número de células vermelhas diminuíram, enquanto o número de plaquetas aumentou em ratos machos. Nos estudos bioquímicos do sangue, os resultados variaram muito considerando doses e sexo dos animais, não permitindo nenhuma conclusão. No exame histopatológico, foi observada hemorragia no pulmão com a dose de 2000 mg/kg. Em conclusão, o estudo sugeriu que o extrato é seguro na dose de 1000 mg/kg, enquanto que a dose de 2000 mg/kg necessita de mais estudos para avaliar os riscos de seu uso a longo prazo.

Além dos estudos de toxicidade, a espécie também foi estudada quanto à longevidade de suas sementes. Chaves e Usberti (2003) acondicionaram 8 subamostras de sementes de *D. mollis* com diferentes graus de umidade em frascos hermeticamente vedados e armazenados sob temperaturas de 40, 50 e 60 °C até obtenção de curvas completas de sobrevivência. Através desta metodologia, observaram que houve uma relação inversa entre o grau de umidade e a longevidade das sementes. Assim, sementes com menor grau de umidade foram as de maior longevidade.

Hermansen e colaboradores (2000) realizaram um estudo de pré-tratamentos para auxiliar na germinação de sementes de *D. mollis*. De acordo com o estudo, sementes não tratadas previamente resultaram em 4% de germinação, enquanto que as pré-tratadas em imersão de ácido sulfúrico por 45 minutos obtiveram 90% de germinação. Sementes pré-tratadas com imersão em ácido sulfúrico por 90 minutos obtiveram 98% de germinação e as que foram expostas por mais de 90 minutos ao ácido tiveram taxas de germinação decrescentes.

Em um estudo agronômico mais antigo, Poggiani (1974) avaliou experimentalmente o crescimento das plântulas de *D. mollis*. Constatou-se que as plântulas apresentaram um padrão típico de crescimento quando eram adicionados nutrientes ao solo do cerrado. O zinco estimulou a alongação do epicótilo e inibiu o crescimento radicular. O nitrogênio incrementou o peso da parte aérea, mas não interferiu na alongação. Por fim, o fósforo inibiu principalmente a alongação radicular.

Mais recentemente, Caldeira Júnior e colaboradores (2007) estudaram a absorção de alumínio, fósforo, cálcio e magnésio pelas árvores da espécie. Constatou-se que na camada de 0 a 20 cm de profundidade do solo, houve correlação negativa do alumínio com cálcio nas folhas. Obteve-se, também, correlação positiva do fósforo presente neste perfil com o cálcio e magnésio no solo e cálcio e magnésio nas folhas. Houve, também, correlações significativas entre cálcio no solo e magnésio no solo e nas folhas. Para a camada de 20 a 40 cm de profundidade de solo, houve correlações significativas positivas entre o alumínio no solo e cálcio nas folhas e magnésio no solo, assim como o fósforo no solo correlacionou com cálcio nas folhas e magnésio no solo.

Em uma avaliação do efeito do silicato sobre a espécie, Paula e colaboradores (2007) trataram o solo para o cultivo de sementes de *D. mollis* com cinco níveis de silicato (0, 200, 400, 600 e 800 kg/ha) com e sem correção com calcário e um tratamento com dose de silicato suficiente para elevar a saturação de bases a 60%. Constatou-se que quando não se aplicou o silicato, a produção de flavonóides foi maior do que quando se fez aplicação somente de silicato, independente da dose. No tratamento onde ocorreu aplicação somente de calcário, a produção de flavonóides foi maior do que quando comparado com os tratamentos onde se aplicou o calcário associado ao silicato.

Lourenço (1995) estudou a produção de flavonóides em cultura de tecidos (calos) dessa espécie vegetal. Apesar da dificuldade de se estabelecer uma cultura *in vitro* dos calos,

o que não permitiu manipular as condições de cultivo, a pesquisa mostrou que o acúmulo de rutina na cultura atingiu seu máximo no sexto dia após o início da germinação.

Visando a utilização da espécie na indústria alimentícia, Penegassi e colaboradores (2000) estudaram o potencial tecnológico do galactomanano de suas sementes. A partir da trituração e posterior peneiramento das sementes de *D. mollis*, foi obtido um extrato rico em galactomanano (83,2%) com proporção manose:galactose 2,7. Analisou-se que esses parâmetros são comparáveis aos obtidos para os galactomananos de uso consagrado em formulações de alimentos, tais como a goma guar e a goma locusta. Ensaio biológicos realizados demonstraram que a goma do faveiro foi considerada atóxica. Assim, concluiu-se que estes resultados sugeriram que a goma de *D. mollis* apresenta potencial para ser utilizada em formulações de alimentos.

2.3.1 Descrição botânica

Dimorphandra mollis (Figura 4) é uma árvore de porte pequeno a médio, podendo atingir de 8 a 14 m de altura, tronco de 30 a 50 cm de diâmetro com casca espessa, escura, descamante, desprendendo-se em placas espessas alongadas, irregulares e ramos novos com pilosidade ferrugínea, como visto na Figura 5 (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; LORENZI, 2000; ALMEIDA, 1998).



Figura 4. Árvore de *Dimorphandra mollis* do Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Araraquara - SP.

O fruto (Figura 5c) é do tipo simples, seco, ideiscente, proveniente de ovário unicarpelar, achatado com uma das extremidades arredondada e a outra provida de pendúnculo curvo, estriado longitudinalmente. Mede, geralmente, 12 cm de comprimento por 3 cm de largura e 1 cm de espessura. A superfície de pericarpo é rugosa e de coloração amarronzada. Observando-se lateralmente, mostra bem visível a linha da soldadura da folha carpelar e da nervura mediana. Na parte dorsal do fruto há a linha de sutura, saliente, impressa, indo do pendúnculo até o ápice do fruto, que é bem visível na maioria deles; na parte anterior há uma semi-abertura, mas não ocorre a deiscência após a secagem. O pendúnculo é persistente e de consistência lenhosa. Quando aberto, o fruto apresenta o pericarpo bem distinto. Epicarpo fino, que corresponde à camada superficial, mesocarpo de consistência farinácea, macia, marrom-escuro e o endocarpo esbranquiçado a amarelado.

Deste modo também deixa ver inúmeras sementes presas à placenta através de funículo filamentosos (FERREIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1991).

Segundo a caracterização anatômica microscópica (Figura 6), analisando-se os cortes das cascas do fruto, observa-se que o epicarpo, quando visto de face, apresenta células de contorno retangular e paredes nitidamente espessadas. Estômatos do tipo anomocítico podem ser observados nesta região. O pericarpo, quando observado em corte transversal, apresenta epicarpo provido de células de contorno retangular, alongadas no sentido radial e providas de espessamento nas paredes radiais externas. A cutícula é espessa. O mesocarpo é externamente constituído de células do tipo parenquimático, alongadas no sentido radial e, freqüentemente, incluindo cristais de rutina, em forma de ouriço. A região mais interna do mesocarpo é formada por diversas camadas de células alongadas, esclerosadas, dispostas em diversas direções. O endocarpo é formado por uma única camada celular provida de células de contorno arredondado e paredes bastante lignificadas (OLIVEIRA et al., 1991).

As sementes (Figura 5d) são de cor que varia de marrom-claro a vermelho-telha, de forma oblonga ou reniforme, deixando ver bem a rafe, o hilo e o vestígio do funículo. O comprimento médio da semente é de 12,4 mm, largura média de 5,1 mm e espessura média de 3,9 mm (FERREIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1991). Segundo Gunn (1981), as sementes das espécies leguminosas apresentam cores marrom e preta. Deste modo, a cor vermelha pode ser considerada pouco freqüente. Por outro lado, as características de sementes não devem ser usadas como caráter de identificação, pois pode-se encontrar diferenças dentro dos indivíduos de uma população e também entre diferentes procedências (FERREIRA et al., 2001).

As folhas (Figura 5b) são alternas, recompostas e paripinadas. As folhas definitivas são compostas por 6 a 12 folíolos, cada um com 7 a 22 pares de foliólulos. Os foliólulos são opostos ou alternos, ovóides ou oblongos, às vezes elípticos, bordo inteiro, ápice obtuso e

base cordiforme, pilosos com pulvínulo. Possuem 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura. Os foliólulos mais velhos são verde-escuros na face ventral e verde-claros na face dorsal, enquanto os foliólulos jovens são verde-claros em ambas as faces (FERREIRA et al., 2001).

Floresce a partir do final de outubro, prolongando-se até janeiro (LORENZI, 2000). As flores (Figura 5b) são sésseis, amareladas, em espigas corimbiformes terminais, agrupadas em forma de candelabro (FERREIRA et al., 2001). A maturação dos frutos se dá entre os meses de agosto e setembro (LORENZI, 2000).

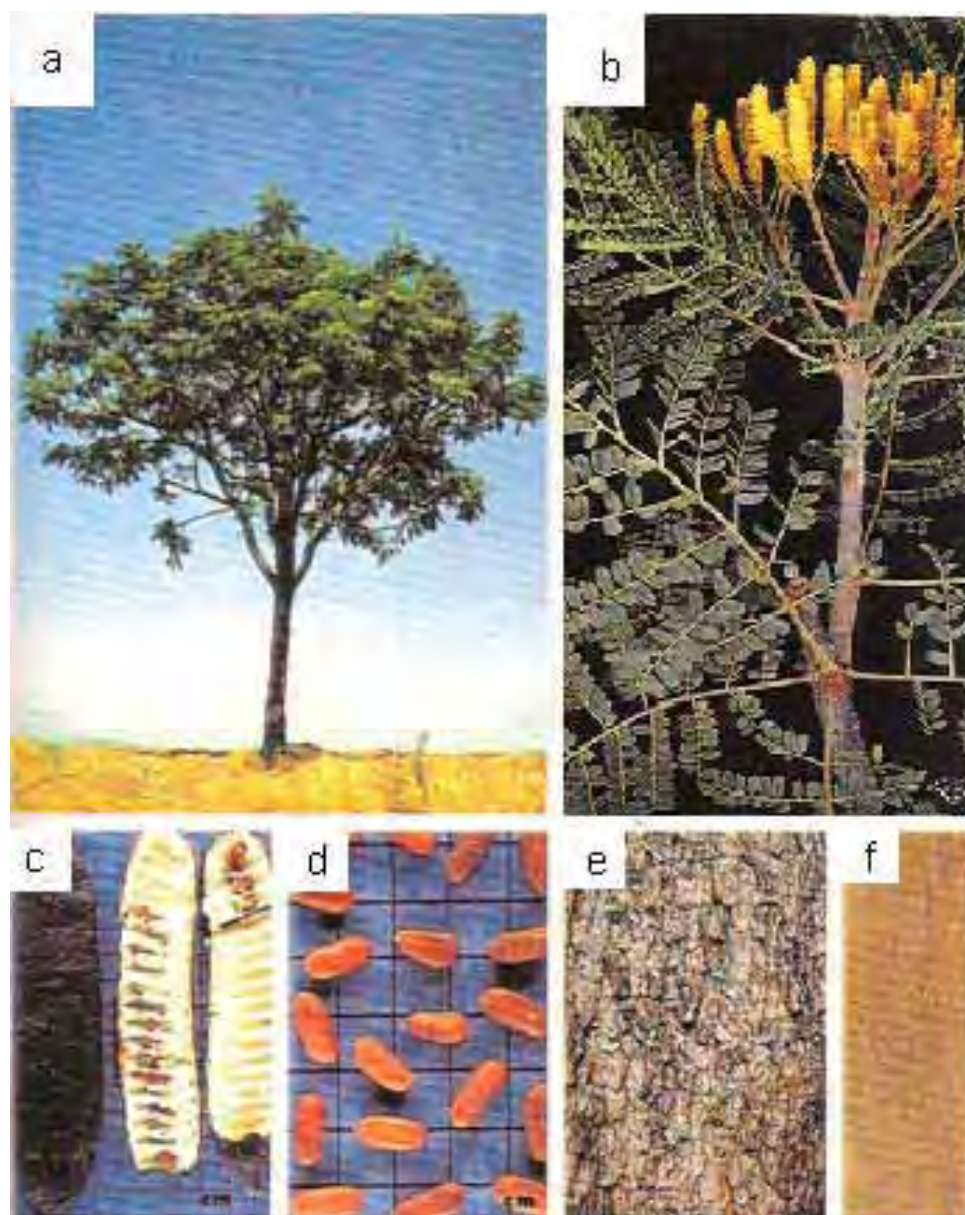


Figura 5. *Dimorphandra mollis* Benth.: a) árvore de *D.mollis*; b) flor e folhas; c) favas maduras; d) sementes; e) vista externa do caule; f) vista interna da madeira (Foto extraída de LORENZI (2000)).

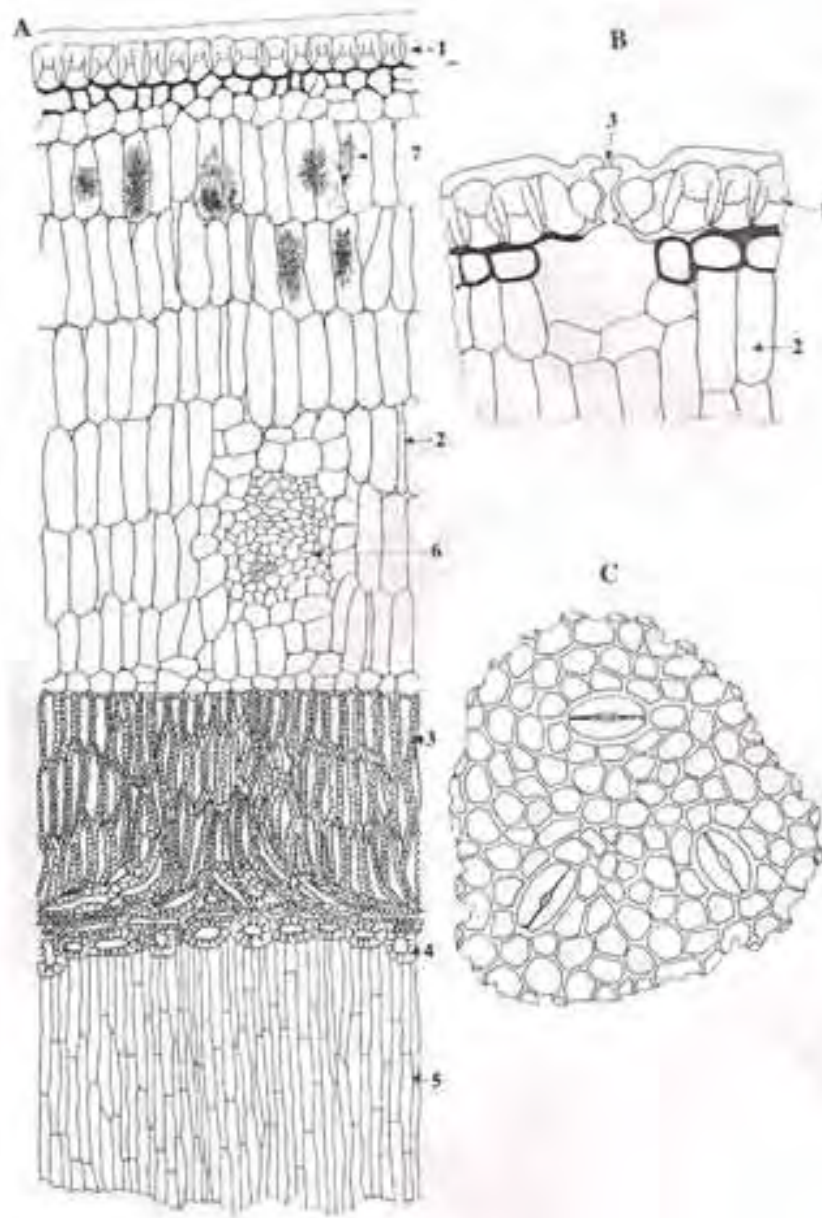


Figura 6. Fruto de *Dimorphandra mollis*: A) secção transversal: 1- epicarpo; 2- mesocarpo; 3- camada esclerótica; 4- endocarpo; 5- placenta; 6- feixe vascular; 7-esferocristais; B) região externa de pericarpo: 1- epicarpo; 2- células do mesocarpo; 3- estômato; C) epicarpo visto de face (Figura extraída de OLIVEIRA et al. (1991)).

3 OBJETIVOS

O estudo de plantas medicinais seja do ponto de vista botânico, químico, biológico, tecnológico ou farmacológico, não é tarefa simples, pois todas as etapas envolvidas na transformação de um vegetal em medicamento ou cosmético estão relacionadas com diferentes áreas de conhecimento e é necessário um longo trabalho para se chegar a um fitoderivado padronizado, sob os pontos de vista de controle de qualidade, ação biológica e riscos toxicológicos. Assim, este estudo objetiva:

- Caracterizar físico-química e quimicamente os frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. coletados no Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara;
- Preparar extratos hidroalcoólicos em diferentes graduações a partir dos frutos de *D. mollis*;
- Determinar o teor de flavonóides totais (equivalentes em rutina) nos extratos obtidos e selecionar o extrato com maior teor para prosseguir os estudos;
- Realizar testes de atividade antioxidante e citotoxicidade do extrato;
- Desenvolver e avaliar a estabilidade e contaminação microbiana de emulsão óleo/água incorporada do extrato selecionado;
- Avaliar a toxicidade dérmica aguda através de teste pré-clínico *in vivo* da emulsão preparada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1 Equipamentos

- Agitador 713 D – FISATOM[®]
- Autoclave vertical 100 L AV 100– PHOENIX[®]
- Balança analítica Mark 150 A – BEL MARK[®]
- Balança com infravermelho LP 11 – METTLER[®]
- Banho-maria Q334-14 – CALLMEX[®]
- Câmara de fluxo laminar VLFS 12 – VECO[®]
- Câmara de ultravioleta 254 nm UV – PRODICIL[®]
- Contador de colônias CP 600 – PHOENIX[®]
- Cromatógrafo Sistema Quartenário – VARIAN PRO STAR[®], modelo 420, acoplado a Detector UV-Vis com Arranjo de Diodos – VARIAN PRO STAR[®], modelo 330 e Auto-injetor – VARIAN PRO STAR[®], modelo 410.
- Dessecador de vidro 250 mm – SP LABOR[®]
- Espectrofotômetro SpectraFluor Plus – TECAN[®]
- Espectrofotômetro UV-Vis Cary 1E – VARIAN[®]
- Estufa de esterilização 400/ 5D – NOVA ÉTICA[®]
- Estufa de incubação bacteriológica CZ – OLIDEF[®]
- Estufa de secagem com ar circulante 320-SE – FANEM[®]
- Evaporador rotatório MA 120 – MARCONI[®]
- Liofilizador ALPHA 1-4 – CHRISTH[®]
- Moinho de facas TE 648 – TECNAL[®]
- Mufla nº 2764 – FORLABO[®]
- Peagômetro B374 – MICRONAL[®]

- Picnômetro 5 mL – SATÉLITE[®]
- Placa de alumínio de gel de sílica F₂₅₄ – MERCK[®]
- Reômetro HAAKE RS-1 – RHEOSTRESS[®]
- Tamisador vibratório – PRODUTEST[®]
- Tamises – TELATEST[®]

4.1.2 Solventes, reagentes, soluções e meios de cultura

- 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) – Vetec
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) – Vetec
- Acetato de chumbo – Reagen
- Acetato de etila – Labsynth
- Acetona – Labsynth
- Acetonitrila - Labsynth
- Ácido bórico – Labsynth
- Ácido clorídrico – Labsynth
- Ácido fórmico - Labsynth
- Ácido oxálico – Labsynth
- Ácido sulfúrico – Labsynth
- Ágar bismuto sulfito – Acumedia
- Ágar brain heart infusion (BHI) – Biobrás
- Ágar eosina-azul de metileno (EMB) – Difco
- Ágar MacConkey – Acumedia
- Ágar Sabouraud – Acumedia
- Ágar tioglicolato – Difco
- Ágar tríplice açúcar - ferro (TSI) – Difco

- Ágar verde brilhante – Difco
- Ágar Vogel Johnson – Oxoid
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) – Difco
- Água MILI-Q
- Caldo lactosado – Difco
- Caldo peptonado – Difco
- Caldo selenito cistina – Acumedia
- Caldo tetracionato – Acumidia
- Caldo tioglicolato – Acumedia
- Cloreto de alumínio – Reagen
- Dimetilsulfóxido – Labsynth
- Etanol – Labsynth
- Hidróxido de sódio – Labsynth
- Magnésio metálico – Reagen
- Meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich
- Resazurina – Sigma Aldrich
- Zinco metálico - Reagen

4.1.3 Substâncias químicas de referência

- Cisteína – Merck (teor mínimo 99%)
- Quercetina diidratada – Sigma (teor mínimo 98%)
- Rutina – Sigma (teor mínimo 99%)

4.1.4 Cultura de células

Para a avaliação da citotoxicidade utilizou-se cultura de células de mamíferos da linhagem de macrófagos J774.

4.1.5 Animais

Os animais utilizados foram cobaias (*Cavia porcellus*) machos, idade ao redor de 5 meses, peso de 350 a 450 g, provenientes do biotério do Instituto de Biociências- UNESP - Câmpus de Botucatu. O seu uso foi estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA tendo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara apresentado no anexo.

4.1.6 Softwares

- Excel MICROSOFT®
- Origin Pro 7.0
- REOWIN 3

4.2 MÉTODOS

4.2.1 PREPARO DA EXSICATA PARA IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Para o preparo da exsicata, o material vegetal tem de estar completo, com folha, flor e se possível fruto. Por florescer e frutificar em diferentes épocas, foram coletados primeiramente ramos com flores e, posteriormente, ramos com frutos de *D. mollis*. O material obtido passou pelo processo de prensagem, que é feito utilizando-se uma superfície lisa que

servirá de suporte, onde são intercaladas as diversas amostras da planta. Foram utilizadas correias para comprimir fortemente o material coletado. As prensas foram colocadas dentro de estufas, a temperatura de aproximadamente 60 °C, e ali permaneceram até que o material estivesse completamente seco (MING, 1996).

Para a montagem do material seco utilizou-se a amostra coletada mais representativa e completa que foi costurada em cartolina e envolvida por papel Kraft (MING, 1996). O material, acompanhado de suas descrições essenciais (procedência ou local de coleta, data de coleta, nome do coletor, observações sobre a planta e informações gerais), foi enviado ao Herbário do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro-SP, onde há exsicatas da mesma espécie para comparação e identificação.

4.2.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos de *D. mollis* foram coletados no mês de abril do ano de 2007, no Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, localizado a S21°48'51,4''; W48°12'05,1'' e 661 m de altitude. Os frutos de *D. mollis* foram secos em estufa com circulação de ar à temperatura de 40 °C. Após a secagem procedeu-se a moagem do material vegetal. Os frutos foram previamente triturados em gral de porcelana e, posteriormente, utilizou-se o moinho de facas a fim de pulverizá-los, tomando-se o cuidado de desligar o moinho a cada 5 minutos de funcionamento, evitando, assim, o aquecimento excessivo do equipamento.

4.2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram realizadas análises físico-químicas do pó obtido a partir dos frutos de *D. mollis*. Foram realizadas as seguintes análises: perda por secagem, perda por dessecação,

determinação de pH, determinação do teor de cinzas totais, determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido, determinação do teor de extrativos, densidade e análise granulométrica.

4.2.3.1 Determinação da perda por secagem em estufa com aquecimento e circulação de ar

Cerca 100 g dos frutos de *D. mollis* recém colhidos foram pesados exatamente e colocados em estufa com ar circulante a 40° C, até peso constante. As amostras foram então pesadas e obtidas, por diferença, a perda de água e de substâncias voláteis durante o processo de secagem. Foram feitas cinco determinações e os resultados expressos em porcentagem (p/p) (MELLO; PETROVICK, 2000).

4.2.3.2 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRA TEST)

Para determinar o teor de umidade no fruto de *Dimorphandra mollis* devidamente moído, foi utilizado o método de Determinação da Perda por Dessecação. O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Amostras de cerca de 4,000 g de droga vegetal seca e moída foram exatamente pesadas, em bandejas de alumínio tratadas, e desseçadas até obter-se massa constante ou com variação menor que 0,25%, à temperatura de 110 °C, com intervalo de uma hora entre cada determinação da massa (MELLO; PETROVICK, 2000).

4.2.3.3 Determinação do pH

Preparou-se uma solução a 1% p/p (1g do vegetal pulverizado e 99g de água recém-destillada) e após aquecimento da água em chapa-elétrica até ebulição por 5 minutos,

procedeu-se o método extrativo de infusão por 15 minutos. O extrato foi então filtrado com algodão e após esfriamento verificou-se o pH em peagômetro (calibrado anteriormente em pH 4 e pH 9). Esta análise foi realizada em quintuplicata e o resultado obtido pela média das cinco determinações. Para uma melhor reprodutibilidade deste teste o pH da água também foi verificado, pois pode interferir no resultado obtido (FARMACOPÉIA, 2000).

4.2.3.4 Determinação do teor de cinzas totais

O cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 minutos) e seu peso (tara) determinado em balança analítica. Posteriormente foram então adicionados cerca de 3,0 g da droga vegetal triturada, exatamente pesados em balança analítica, os quais foram primeiramente incinerados (levados ao estado de carvão) para então serem submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Após a calcinação os cadinhos foram deixados em dessecador para arrefecimento (15 minutos) logo após foram pesados. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga (p/p) e representando a média de cinco determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.3.5 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

As cinzas obtidas no item 4.3.4. foram fervidas por 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico SR (10 por cento) e filtrada em papel de filtro livre de cinza faixa azul. O papel contendo as cinzas foi lavado com água quente e as cinzas foram incineradas a uma temperatura em torno de 800 °C até peso constante. A porcentagem de cinza insolúvel em ácido foi calculada com referência ao material vegetal utilizado no início do ensaio de teor de cinzas totais (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.3.6 Determinação do teor de extrativos

Foram pesadas, exatamente, cinco amostras de 1,0 g do pó de frutos de *D. mollis*, sendo submetidas à decocção com 100 g de água recém-destilada durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL e a mistura foi filtrada em papel de filtro. Os primeiros 20 mL foram desprezados. Do restante, foi pesada uma alíquota de 20 g, que foi levada ao banho-maria até completa evaporação da água. Após isto, foi colocada em estufa a 105 °C por 2 horas, resfriada em dessecador e pesada. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, relativa à massa inicial de amostra (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.3.7 Determinação da densidade aparente não-compactada do pó

Para este teste, utilizou-se uma proveta de 250 mL, que foi previamente pesada. Preencheu-se a proveta com o pó dos frutos de *D. mollis* até a marca de 250 mL. Em seguida, a proveta cheia foi novamente pesada. Do peso final, foi subtraído o peso da proveta vazia para o cálculo da densidade aparente não compactada do pó, por meio da Equação I (MELLO; PETROVICK, 2000).

Equação I: Densidade = massa/ volume

4.2.3.8 Análise granulométrica

Baseado na Farmacopéia Brasileira (1988) e com o objetivo de padronizar a granulometria, cerca de 25 g do pó do fruto moído, exatamente pesados, foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas e coletor correspondentes a 0,125; 0,177; 0,420; 0,840; 2,00 mm, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, durante trinta minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções. Este procedimento foi realizado em quintuplicata. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de

pó do fruto recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel[®], onde foram calculadas as frequências percentuais e também as frequências percentuais cumulativas.

4.2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE FLAVONÓIDES

Como o interesse deste estudo está restrito a classe específica de flavonóides, a investigação se direcionou para a pesquisa exclusiva destes metabólitos exclusivamente. Foram realizadas as seguintes reações para caracterização de flavonóides: Reação de Shinoda, Reação de Taubock, Reação de Pew, Reação do Cloreto Férrico e Reação do Cloreto de Alumínio (COSTA, 1996).

4.2.4.1 Extração para caracterização de flavonóides

Foram colocados em béquer 3 g de droga em pó e tratados com 20 mL de éter de petróleo. A mistura foi agitada durante 10 minutos, e em seguida fez-se o aquecimento em banho-maria. A mistura foi filtrada ainda quente. O resíduo foi seco e colocado em béquer, onde foram adicionados 20 mL de metanol. A solução foi aquecida em banho-maria por 10 minutos e filtrada ainda a quente. O filtrado foi seco até a retirada total do solvente e recuperado com 10 mL de etanol (extrato final).

4.2.4.2 Reações de caracterização

Reação de Shinoda: Foi colocado 1 mL do extrato final em tubo de ensaio, adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e juntou-se gotas de ácido clorídrico concentrado. Foi observado se, após o desprendimento de hidrogênio nascente, houve aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

Reação de Taubock: Foram evaporados em banho-maria, 3 mL do extrato até a secura. O resíduo foi esfriado e umedecido com algumas gotas de acetona. Foram adicionados alguns

cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Foi evaporado novamente em banho-maria até a secura, evitando aquecimento prolongado. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e observado sob luz ultravioleta. Em caso positivo deve aparecer fluorescência amarelo-esverdeada.

Reação de Pew: Foram evaporados em banho-maria 3 mL do extrato em tubo de ensaio até a secura. Ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Foram colocadas 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. Em caso positivo deve aparecer coloração vermelha.

Reação do Cloreto Férrico: Foram adicionadas a 1 mL do extrato algumas gotas de solução de cloreto de ferro III a 2%. Deve aparecer coloração verde ou amarelo ou ainda violáceo dependendo do flavonóide presente.

Reação do Cloreto de Alumínio: Foram umedecidas áreas diferentes de papel de filtro com o extrato. Foi colocada sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. Foi observada sob luz ultravioleta a intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada, no caso de resultado positivo.

4.2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS EQUIVALENTES EM RUTINA NA DROGA VEGETAL

4.2.5.1 Curva analítica para quantificação de flavonóides totais expressos em rutina

Para a construção da curva analítica foram preparadas soluções a partir do padrão rutina. Alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL de solução etanólica de rutina a 50 µg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) em etanol. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol, obtendo-se as concentrações finais de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/mL. Como branco do sistema, 1

mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído com etanol em balão de 25 mL foi utilizada. Após 30 minutos de repouso ao abrigo da luz, procederam-se as leituras de absorvância das soluções da luz em comprimento de onda de 425 nm. Os resultados das leituras de absorvância, realizadas em triplicata, foram relacionados às concentrações de rutina nas soluções, obtendo-se a curva analítica e a equação da reta expressa em rutina (FUNARI; FERRO, 2006). Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.2.5.2 Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal

Amostras de 200,0 mg da droga vegetal de foram inicialmente extraídas com 20 mL de metanol 80% por 2 horas em temperatura ambiente, os filtrados obtidos após a extração foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL e o volume completado com metanol. Aliquotas de 1 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) em etanol. O volume final foi ajustado com etanol. Como branco do sistema, 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído com etanol em balão de 25 mL foi utilizado. Após 30 minutos de repouso ao abrigo da luz procederam-se as leituras de absorvância das soluções da luz em comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na equação da reta obtida e os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ de rutina (FUNARI; FERRO, 2006; WOISKY; SALATINO, 1998). Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.2.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXTRATIVAS: VARIAÇÃO DO LÍQUIDO EXTRATOR

4.2.6.1 Obtenção dos extratos

A seletividade química desejada para uma extração pode ser alcançada através do solvente ou mistura de solventes eleitos para o processo. Uma simples variação da concentração do etanol utilizado como solvente confere diferentes valores de constantes dielétricas, portanto, alterando de modo sensível o poder dissolvente para numerosas substâncias. Desta forma, podemos entender porque o etanol em relativa concentração elevada dissolve bem compostos mais polares - compostos fenólicos, como taninos e flavonóides (FRANCO, 2001).

Portanto, foram preparados extratos hidroalcoólicos em diferentes graduações (etanol 50%, etanol 70%, etanol 80% e etanol absoluto), utilizando-se 200 g de droga vegetal e 1000 mL de líquido extrator em cada extração. Os extratos foram obtidos utilizando-se o processo de turboextração, durante 15 minutos, com temperatura de, no máximo, 40 °C.

A seguir, ocorreu a filtração, e os filtrados foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 40 °C, de modo a eliminar todo solvente orgânico.

4.2.6.2 Perfil cromatográfico

Foram determinados os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos 50%, 70%, 80% e absoluto, obtidos a partir dos frutos de *D. mollis*, utilizando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). Nesta análise os flavonóides rutina e quercetina foram utilizados como substâncias marcadoras químicas (COLLINS et al., 1995; WAGNER et al., 1996).

Na realização da CCDC, utilizou-se como fase estacionária a sílica gel G, e como fase móvel ou solvente, uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água, na proporção 100: 11: 11: 27 (WAGNER et al., 1996). Após o solvente ter percorrido toda a placa e, após a secagem da mesma, preparou-se o revelador químico, composto de uma mistura de ácido bórico 3% e ácido oxálico 10% na proporção de 15:5 (WAGNER et al., 1996). O revelador químico foi nebulizado por toda a placa de sílica. A placa foi aquecida em estufa a 100 °C e posteriormente visualizada em lâmpada Ultravioleta (U.V.) a 254 nm. As manchas amarelo-esverdeadas indicaram a presença de flavonóides.

4.2.6.3 Determinação do teor de flavonóides totais equivalentes em rutina nos extratos

Foi verificado o teor de flavonóides totais nos extratos etanólicos 50%, 70%, 80% e absoluto, obtidos a partir dos frutos de *D. mollis*, e o extrato com maior teor de flavonóides foi considerado o extrato de escolha e utilizado para os demais testes.

A curva analítica utilizada foi a mesma descrita no item 4.2.5.1.

4.2.6.3.1 Preparo da solução amostra a partir dos extratos

A partir dos extratos obtidos, foi realizada uma diluição na proporção de 1:50. Da solução vinda da diluição foram retirados 2 mL e colocados em balão volumétrico de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) em etanol. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol. Como branco do sistema, 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído com etanol em balão de 25 mL foi utilizado. Após 30 minutos de repouso ao abrigo da luz procederam-se as leituras de absorvância das soluções em espectrofotômetro–UV-Vis, em comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na equação da reta obtida e os resultados expressos em µg/mL de rutina (FUNARI; FERRO, 2006). Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.2.7 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES POR CLAE-UV-DAD (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ULTRAVIOLETA COM ARRANJO DE DIODOS)

A aplicação de CLAE-UV-DAD pode ser considerada um método rotineiro de “screening” de flavonóides em extratos de plantas. Os espectros no UV obtidos durante a análise sugerem a subclasse de flavonóides analisados e o tipo específico de aglicona (SANTOS, 2006).

O extrato etanólico absoluto foi solubilizado em metanol e filtrado em filtro Millipore de 450 µm. Injetou-se no cromatógrafo líquido 1 µL da solução filtrada. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água (8:2) em condição isocrática, em fluxo de 1 mL/minuto a temperatura ambiente (LOURENÇO, 1995).

Os equipamentos utilizados foram: Cromatógrafo Sistema Quartenário Varian Pro Star, modelo 420, detector UV-Vis a 254 nm com arranjo de diodos (DAD) em intervalo de 200 a 400 nm, modelo 330, auto-injetor Varian Pro Star, modelo 410.

4.2.8 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DO EXTRATO

O controle de qualidade microbiológico do extrato etanólico absoluto consistiu na determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

4.2.8.1 Contagem total de microrganismos no extrato

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g do extrato para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 minutos. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL da amostra 1:10 e adicionados 20,0 mL de ágar tioglicolato para bactérias e Sabouraud para leveduras, a 47 °C

em placas de Petri, que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 horas e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) (USP, 2003; PINTO et al., 2003).

4.2.8.2 Pesquisa de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g do extrato para 90,0 mL de caldo lactosado, para a pesquisa de *Salmonella* sp e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 horas. Após este período, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para 2 tubos contendo caldo tetracionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 horas. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetracionato para 1 tubo contendo ágar verde brilhante e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo-se para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 horas. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubado a 35 °C por 24 horas. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram.

Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubados a 35 °C por 24 horas. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina-azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 horas. A confirmação de *E. coli* foi realizada através do método de Gram (USP, 2003; PINTO et al., 2003).

4.2.8.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g do extrato para 90,0 mL de caldo peptonado, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48

horas. Após este período, uma alçada foi semeada em placas de ágar Vogel Johnson e ágar cetrimida, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada pelo método de Gram (USP, 2003; PINTO et. al, 2003).

4.2.9 ATIVIDADE SCAVENGER DE RADICAIS PELO DPPH

O radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi dissolvido em etanol e utilizado nos ensaios em concentração de 60 µM. O ensaio foi realizado segundo SOARES et al. (1997), observando-se o decréscimo da absorvância em 531 nm, após 15 minutos de incubação na presença de um antioxidante (VELLOSA, 2005).

4.2.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO ABTS

O radical catiônico do ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] é corriqueiramente utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como *scavengers* de radicais (PELLEGRINI et al., 1999). O ABTS^{•+} é um radical gerado pela reação entre os sais ABTS e persulfato de potássio (PELLEGRINI et al., 1999). O ensaio foi realizado segundo Pellegrini et al. (1999) modificado, observando-se o decréscimo da absorvância em 734 nm, após 30 minutos de incubação na presença de um antioxidante (VELLOSA, 2005).

4.2.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA “IN VITRO”

Alíquotas do extrato etanólico absoluto foram testadas frente a macrófagos da linhagem J774 para determinação de Índice de Citotoxicidade (IC) ou Viabilidade. Alíquotas dos flavonóides isolados rutina e quercetina também tiveram seus Índices de Citotoxicidade avaliados. A linhagem J774 foi mantida a 37°C, com 5% de CO₂, em garrafas com superfície

em torno de 12,5 cm², contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino. A técnica consistiu em coletar células da linhagem utilizada por raspagem e centrifugação e posterior contagem do número de células ajustando para 1 x 10⁵ células/mL em meio RPMI. Desta suspensão, as células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 a 48 horas. A seguir foram preparadas diluições do extrato e dos flavonóides a serem testados, as quais foram adicionados às células após a retirada do meio, sendo novamente incubadas. A citotoxicidade das amostras foi determinada pela adição do revelador resazurina. O revelador age como indicador de crescimento celular e/ou viabilidade que para a resazurina, a cor azul que representa a ausência de crescimento/inviabilidade celular e a cor rosa crescimento ou ausência de viabilidade (AHMED et al., 1994; VISTICA et al., 1991). A leitura final foi baseada na interpretação da luminescência no SpectraFluor Plus (TECAN®).

4.2.12 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO O EXTRATO

A formulação do cosmético foi obtida por desenvolvimento de emulsão óleo/água, cuja formulação apresenta-se na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Fórmula percentual da preparação da emulsão e função de cada componente, descritos de acordo com a nomenclatura INCI.

Matéria-Prima	Fase	Função	Proporção % p/p
Cetostearyl Alcohol	oleosa	Espessante	6,00%
Ceteareth-20	oleosa	Tensoativo não-iônico	3,00%
Isopropyl Myristate	oleosa	Emoliente	4,00%
Cetostearyl Palmitate	oleosa	Emoliente	3,00%
Cyclopentasiloxane	oleosa	Emoliente	1,00%
BHT	oleosa	Antioxidante do produto	0,05 %
Propylparaben	oleosa	Conservante antimicrobiano	0,02 %
Methylparaben	aquosa	Conservante antimicrobiano	0,18%
Propylene Glycol	aquosa	Emoliente	3,00%
Laneth-50	aquosa	Co-emulsificante e agente de viscosidade	2,00%
Água	aquosa	Veículo	q.s.p. 100%

Preparou-se 1 kg da emulsão cuja formulação está descrita acima. A técnica de preparação foi a seguinte: as fases graxa e aquosa foram pesadas, separadamente, em béqueres, e aquecidas à temperatura elevada o suficiente para a fusão e ou solubilização dos sólidos; isto é, cerca de 75 a 80 °C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sob lenta e constante agitação, em agitador Fisatom, modelo 713 D, mantida até o resfriamento da preparação (RANGEL, 1998).

Esta formulação foi escolhida devido ao fato de ser uma emulsão simples e de fácil incorporação de ativos, além de ter sido aprovada por testes pré-clínicos e de estabilidade (RANGEL, 1998).

O extrato etanólico seco dos frutos de *D. mollis* foi incorporado na emulsão na concentração de 0,15%, a fim de obter uma concentração final de flavonóides de 0,05%. Esta

concentração foi escolhida baseada no trabalho de Casagrande (2005), que preparou uma formulação de creme contendo 0,05% do flavonóide quercetina, cujos resultados da eficácia antioxidante *in vivo* demonstraram que a administração da formulação desenvolvida inibiu os danos fotooxidativos-inflamatórios induzidos pela radiação UVB.

4.2.13 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DA EMULSÃO

O controle de qualidade microbiológica da preparação consistiu na determinação do número total de microrganismos, pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nestas análises foi utilizada amostra representativa do conteúdo do produto obtido neste trabalho, conforme métodos preconizados pela Farmacopéia Brasileira (1988), British Pharmacopeia (2001) e USP (2003). As metodologias estão descritas detalhadamente nos itens 4.2.8.1, 4.2.8.2 e 4.2.8.3.

4.2.14 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA EMULSÃO

A partir da emulsão preparada, avaliaram-se os parâmetros organolépticos e físico-químicos através de testes de centrifugação, estabilidade preliminar e estabilidade acelerada, submetendo as preparações a condições extremas de temperatura a fim de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme características específicas (ANVISA, 2004).

4.2.14.1 Teste de centrifugação

Antes de iniciar os testes de estabilidade, a emulsão, sem e com o extrato, foi submetida à centrifugação a 300 rpm por 30 minutos, a fim de avaliar a capacidade de não haver separação das fases aquosa e oleosa sob condições extremas (SOUZA, 2007).

4.2.14.2 Estabilidade preliminar

A estabilidade da emulsão contendo extrato foi avaliada seguindo o Guia de Estabilidade de Cosméticos (ANVISA, 2004). A preparação foi armazenada em geladeira a $5,0 \pm 1$ °C, em temperatura ambiente a 25 ± 1 °C, exposta à luz indireta, em estufa termostaticada a $45,0 \pm 1$ °C e em freezer a $-5,0 \pm 1$ °C.

Para avaliação da estabilidade preliminar, os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram observados antes de submeter as preparações às condições de estresse (tempo zero) e todos os dias, durante 15 dias de teste sendo o 15º dia o último dia de mediação (ANVISA, 2004).

Parâmetros organolépticos: aspecto, cor e odor foram comparados entre as amostras antes de submetidas às condições de estresse e depois, por 15 dias.

Avaliação do valor de pH: para a determinação do pH, a cada medição foi feita uma solução a 10% com as amostras em água recém-destilada, com posterior leitura em peagômetro. As leituras foram realizadas em triplicata.

Avaliação da densidade: foi utilizado picnômetro com capacidade de 5 mL, previamente calibrado pela determinação de sua massa quando vazio e quando contendo água recém-destilada. Após colocada a amostra no picnômetro, retirou-se o excesso e pesou-se em balança analítica, sendo a massa da amostra obtida através da diferença entre a massa do picnômetro cheio e vazio (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.14.3 Estabilidade acelerada ou normal

A formulação foi avaliada usando testes de estabilidade, segundo preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). Todos os testes foram realizados em triplicata.

A preparação foi armazenada em geladeira a $5,0 \pm 1$ °C, em temperatura ambiente a 25 ± 1 °C, exposta à luz indireta, em estufa termostaticada a $45,0 \pm 1$ °C e em freezer a $-5,0 \pm 1$ °C por um período de 90 dias. A amostra foi submetida à avaliação dos caracteres organolépticos, do pH e da densidade (metodologias descritas no item 4.2.14.2). Foi também avaliada a curva de viscosidade em reômetro HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1, utilizando sensor do tipo cone placa (C35/2°Ti). Os testes foram realizados em intervalos de 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de vida de prateleira.

4.2.14.3.1 Doseamento de flavonóides totais equivalentes em rutina na emulsão contendo extrato

Foi verificado o teor de flavonóides totais na emulsão contendo extrato etanólico obtido a partir dos frutos de *D. mollis* a fim de analisar a estabilidade desses compostos quando incorporados na emulsão. Uma curva analítica foi feita como descrito no item 4.2.5.1 e a quantificação de flavonóides totais foi realizada a partir de uma diluição na proporção de 1:10. Da solução vinda da diluição foram retirados 2 mL e colocados em balão volumétrico de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) em etanol. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol. Como branco do sistema, 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído com etanol em balão de 25 mL foi utilizada. Após 1 hora de repouso ao abrigo da luz procederam-se as leituras de absorvância das soluções da luz em comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na equação da reta obtida e os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ de rutina (FUNARI; FERRO, 2006; WOISKY; SALATINO, 1998). Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.2.15 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA

Os animais utilizados foram cobaias (*Cavia porcellus*) machos, idade ao redor de 5 meses, peso de 350 a 450 g (OECD, 2004). Os animais foram adaptados ao biotério de experimentação por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. O manuseio dos animais foi realizado conforme princípios éticos preconizados na literatura atual. Os animais, em livre acesso à alimentação e à água, foram mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 1 °C, umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

Foram utilizados 10 animais, nos quais foi realizada a tricotomia do dorso para aplicação da emulsão 24 horas antes do ensaio. Os animais foram divididos em grupos de cinco indivíduos cada (OECD, 2004), sendo que um grupo recebeu aplicação tópica única de emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis* e no outro grupo aplicou-se somente a emulsão base. Uma dose de 0,5 g das amostras foi aplicada sobre a pele tricomizada do animal, em uma área pré-determinada de 6 cm². Após a aplicação das amostras, foi colocado sobre o local um “patch” oclusivo (compressa de gaze presa por fita crepe) que foi mantido por 4 horas. Ao final do período de exposição, o “patch” foi retirado e a região lavada com água recém-destilada, para eliminar os resíduos da amostra testada, de modo a não alterar a resposta existente ou a integridade da epiderme (BRITO, 1994).

A observação dos sintomas de irritação cutânea (edema e eritema) nos animais e anotação das respostas foi efetuada após 60 minutos, 24 e 72 horas após retirar as compressas. Um período de observação mais longo (7 dias após a aplicação da amostra) foi realizado para verificar o caráter reversível ou irreversível da resposta (BRITO, 1994).

As lesões foram classificadas de acordo com o sistema empregado pelo *Federal Hazardous Substances Act of the USA*, criado por Draize et al. (1944).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DE EXSICATA PARA IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Em qualquer estudo envolvendo matéria-prima vegetal, é fundamental a identificação botânica correta da droga, que consiste na comparação com uma espécie existente em uma coleção e/ou com descrições e ilustrações encontradas na literatura. O erro de identificação pode ocorrer em pesquisas acadêmicas e na produção de medicamentos envolvendo drogas vegetais, levando, algumas vezes, a falsos resultados e produtos, com conseqüentes problemas aos consumidores. Nas pesquisas, a matéria-prima pode ser perfeitamente identificada, já que normalmente, o próprio pesquisador faz a coleta de várias partes vegetais, facilitando o processo de identificação. Na produção medicamentosa, esse processo tende a ser mais problemático, pois apenas o farmacógeno é comprado e, na maioria das vezes, na forma de droga pulverizada. Nesse caso são utilizadas algumas análises químicas como complemento na verificação da pureza e autenticidade da droga vegetal (reações químicas de caracterização, cromatografia em camada delgada, entre outras) (TOLEDO, 2002), obtidas em monografias específicas para cada droga, quando disponíveis em farmacopéias, ou em trabalhos acadêmicos, que tentam estabelecer parâmetros de controle de qualidade. A fim de evitar erros de identificação da espécie vegetal, as amostras de *D. mollis* foram coletadas para a preparação de exsicata.

A exsicata montada a partir do material vegetal coletado no Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, localizado a S21°48'51,4''; W48°12'05,1'' e 661 m de altitude, foi identificada como sendo da espécie *Dimorphandra mollis* Benth., família Leguminosae. Esta exsicata está depositada no Herbarium do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro-SP, sob o número de tombo HRCB 47735.

5.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Após a coleta, os frutos foram submetidos aos processos de secagem e moagem. A secagem tem por finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A umidade residual dependerá do tipo de órgão que constitui o material vegetal. A operação se caracteriza pela exposição a temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores à 60° C, e a longo tempo de contato, em geral em torno de 7 dias. A operação de secagem, independente de como é feita, propicia a redução de volume e de peso e facilita a moagem dos materiais. A moagem foi realizada com o auxílio do moinho de facas, cujas características são: princípio de corte em sistema contínuo, velocidade de rotação: 5 a 18 ms⁻¹, apropriado para materiais secos, moles, não friáveis ou quebradiços (SONAGLIO et al., 2007).

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Considerando-se a qualidade dos fitocosméticos, é importante salientar que a preocupação com esta questão inclui rigoroso acompanhamento das diferentes etapas de desenvolvimento e produção, desde a coleta do vegetal até o produto final. O controle de qualidade de drogas vegetais e seus extratos é essencial quando utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de fitocosméticos. Neste trabalho foram utilizadas diversas técnicas de análise físico-química (farmacopéicas e não farmacopéicas), visando estabelecer parâmetros de qualidade dos frutos de *D. mollis*, visto que na literatura atual não se encontram valores determinados para o controle de qualidade desta espécie vegetal.

5.3.1 Determinação da perda por secagem em estufa com aquecimento e circulação de ar

Amostras de 100 g de frutos de *D. mollis* recém colhidos foram colocadas em estufa com circulação de ar a 40 °C. Após sete dias de secagem o peso se manteve constante e pôde-

se determinar a perda por secagem. As amostras perderam $30,58 \pm 1,45$ (% p/p) de umidade, média de cinco determinações.

A determinação da perda por secagem de materiais vegetais se mostra importante, pois impede que o material permaneça úmido devido à secagem ineficiente ou que haja degradação de compostos por secagem excessiva. É um valor variável que depende da espécie vegetal, da parte do vegetal em análise e da maturação do material vegetal.

5.3.2 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRA TEST)

A droga vegetal contém naturalmente certa quantidade de água, que permanece mesmo com a secagem. Este valor deve ser conhecido, porque é um índice relacionado à sua boa preparação e conservação. A determinação da perda por dessecação do pó dos frutos de *D. mollis* foi realizada em balança com infravermelho à temperatura de 110 °C, com leituras de hora em hora, por um período total de 7 horas, apresentando uma perda de $7,37 \pm 0,25$ (% p/p) de umidade (média de 5 determinações), quando ocorreu estabilização do processo. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a porcentagem de água ainda encontrada em cada amostra da droga vegetal moída e seca.

Este tipo de análise é essencial uma vez que pode oferecer informações importantes com referência ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada com o seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação por ação enzimática dos constituintes químicos (SIMÕES et al., 2007). Pode-se afirmar que os valores característicos da perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de controle de qualidade dos frutos de *D. mollis*. O limite máximo de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al., 2007) e

por isso constatou-se que o pó dos frutos analisado apresentou resultado satisfatório. Com este resultado, em armazenamento adequado, é possível manter a qualidade da droga vegetal evitando contaminação e decomposição dos constituintes químicos.

5.3.3 Determinação do pH

Encontram-se nas plantas diversos ácidos minerais, mais particularmente orgânicos pertencentes a diversos grupos: aromáticos, terpenóides, heterocíclicos, em geral combinados sob a forma de sais, ésteres, lactonas, nos lipídeos, essências, resinas, proteínas, dentre outros. Uma parte destes ácidos encontra-se também no estado livre, solubilizados no citoplasma, portanto, podem ser doseados e caracterizar determinado extrato vegetal, como de caráter ácido e básico.

O pH obtido do extrato aquoso 1% de *D. mollis* foi de $4,54 \pm 0,05$, valor obtido pela média de cinco determinações tendo como base o pH da água de 5,77, o que sugere a presença de substâncias ácidas no farmacógeno estudado.

5.3.4 Determinação do teor de cinzas totais

O teor de cinzas totais é composto pelo resíduo não volátil, isento de carbono, que resulta da combustão das substâncias orgânicas em condições apropriadas. Provém fundamentalmente, dos constituintes minerais e dos organo-metálicos integrantes das plantas podendo também ser substâncias aderentes de origem terrosa (SIMÕES et al., 2007; VIGO et al., 2004).

O conteúdo de cinzas totais constitui, dentro de certos limites, um índice individual simultaneamente de identificação e pureza. Há, portanto, a necessidade de se estabelecer um âmbito de variação dentro do qual se considere o teor de cinzas totais aceitável.

O teor de cinzas totais obtido foi de $7,03 \pm 0,12$ (% p/p), valor representado pela média de cinco amostras. Como não existe valor de teor de cinzas totais na literatura para os frutos de *D. mollis*, os resultados obtidos neste trabalho tornam-se importantes no processo da padronização de parâmetros de qualidade para esta droga vegetal.

5.3.5 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

O teor de cinzas insolúveis em ácido é composto pelo resíduo não volátil e de origem inorgânica, isento de carbono, provém fundamentalmente, dos constituintes minerais (SIMÕES et al., 2007; VIGO et al., 2004). O conteúdo de cinzas insolúveis em ácido constitui dentro de certos limites, um índice de pureza. Há, portanto a necessidade de se estabelecer um âmbito de variação dentro do qual se considere o teor aceitável.

O teor de cinzas insolúveis em ácido obtido foi de $2,22 \pm 0,06$ (% p/p), valor representado pela média de cinco amostras. Também não encontra-se valor de teor de cinzas insolúveis em ácido na literatura para os frutos de *D. mollis*, portanto esse resultado também se mostra importante para estabelecer parâmetros de qualidade para esta droga vegetal.

5.3.6 Determinação do teor de extrativos

O teor de extrativos emprega a água como líquido extrator no estabelecimento do teor de constituintes extraíveis da droga vegetal. A análise foi determinada com o pó obtido a partir dos frutos de *D. mollis*, utilizando-se a decocção como processo extrativo. O resultado obtido foi de $31,84 \pm 0,45$ (% p/p) de teor de extrativos, média de cinco determinações.

O teor de extrativos avalia apenas a quantidade de substâncias que podem ser extraídas aplicando-se o método de decocção e tendo como líquido extrator a água, técnica que é padronizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), e não tem relação com a quantidade de princípios ativos contidos na planta ou no extrativo obtido.

5.3.7 Determinação da densidade aparente não-compactada do pó

O resultado obtido para densidade aparente não compactada do pó de frutos de *D. mollis* foi de $0,562 \pm 0,004 \text{ g/cm}^3$, média aritmética de cinco determinações.

5.3.8 Análise granulométrica

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Os resultados da avaliação granulométrica estão apresentados na Tabela 2.

A aplicação da análise estatística dos resultados expressos na Tabela 2 e demonstrados na Figura 7 permitiu detectar um diâmetro médio de partículas de 0,633 mm, caracterizando um pó moderadamente grosso (WHO, 1998). O valor de diâmetro médio das partículas é determinado pelo ponto de encontro da curva de regressão de passagem com a curva de regressão de retenção (Figura 7).

Tabela 2. Análise granulométrica do pó dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

Tamanho de malha (mm)	Amostra (g)					Média
	1	2	3	4	5	
2,000	2,67	3,42	2,06	2,51	3,47	2,82
0,840	5,25	6,78	5,98	6,13	5,17	5,85
0,420	13,11	11,96	10,44	14,02	13,34	12,57
0,177	1,77	1,04	3,11	0,48	1,41	1,56
0,125	1,23	1,14	2,25	1,51	0,62	1,35
Coletor	0,97	0,66	1,16	0,45	0,99	0,85

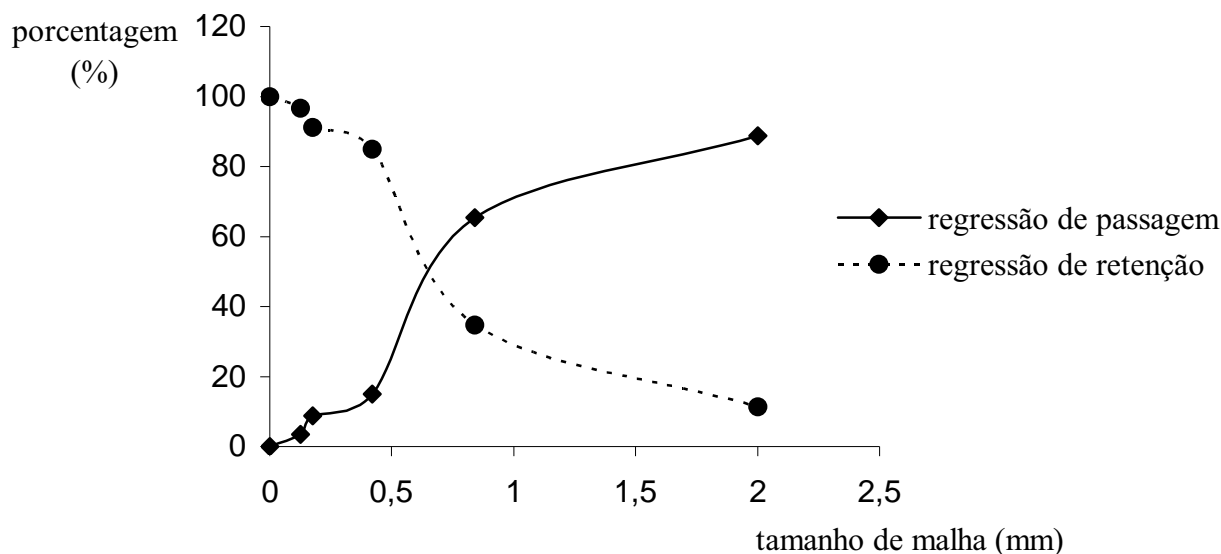


Figura 7. Tamanho de partícula média do pó dos frutos de *Dimorphandra mollis*. Média de cinco determinações.

A granulometria do pó foi determinada a fim de otimizar os processos extrativos a que são submetidas (SONAGLIO et al., 2007). A granulometria, que é o grau de divisão de pós, é expresso em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPÉIA, 1998).. Segundo a literatura (LIST; SCHMIDT, 2000), o tamanho das partículas da droga pulverizada representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo pois, para aqueles que envolvem filtração, o pó muito fino (abaixo de 0,125 mm) pode favorecer o entupimento do filtro.

5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE FLAVONÓIDES

A triagem fitoquímica de uma espécie vegetal se mostra muito importante, principalmente quando se objetiva caracterizar a presença de uma ou mais classes de metabólitos secundários que podem ser responsáveis pelas ações farmacológicas da espécie em estudo. Para a caracterização de flavonóides na amostra de frutos de *D. mollis* estudada,

foram realizados ensaios cromáticos, que se mostraram eficazes como um estágio preliminar de análise. Muitas vezes, com os resultados obtidos, é possível distinguir os flavonóides presentes na amostra entre as diversas classes desse metabólito. As cores obtidas nos ensaios variam conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

A reação de Shinoda é uma reação de caracterização dos flavonóides que se baseia na redução de compostos flavonoídicos de coloração amarela em compostos antociânicos de cor vermelho alaranjado ou vermelho-violeta. As chalconas, isoflavonas e auronas fazem exceção, dando coloração amarelada. A redução efetua-se em meio ácido. Para que haja a redução utiliza-se magnésio metálico como agente redutor e ácido clorídrico para tornar o meio ácido (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; COSTA, 1996). Obteve-se como resultado a coloração vermelha, ou seja, o resultado foi positivo para a classe de flavonóis.

A reação de Taubock utiliza o ácido bórico e o ácido oxálico, que reagem em particular com flavonóis, flavonas e chalconas, que adquirem fluorescência amarelo-esverdeada sob luz ultravioleta. Não se aplica esta reação na identificação de flavononas e isoflavonas. A reação é explicada pela formação de compostos borínicos, compostos que se obtém pela reação do ácido bórico pela substituição em sua molécula por dois radicais orgânicos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; COSTA, 1996). Obteve-se como resultado a fluorescência amarelo-esverdeada, ou seja, o resultado foi positivo para a classe de flavonóis.

A reação de Pew também se baseia na redução de compostos flavonoídicos de coloração amarela em compostos antociânicos de cor vermelho-alaranjada ou vermelho-violeta. A redução deve ocorrer em meio ácido, dado pelo ácido clorídrico concentrado e o zinco metálico atua como agente redutor (COSTA, 1996). Obteve-se como resultado a coloração vermelha, ou seja, o resultado foi positivo para todas as classes de flavonóides.

Na reação do Cloreto Férrico, a complexação do íon férrico com o núcleo fundamental dos flavonóides resulta na formação de cor que varia de verde, amarela, castanha e violeta, conforme o tipo de composto flavonoídico (COSTA, 1996). Obteve-se como resultado coloração verde-acastanhado, ou seja, o resultado foi positivo as classes de flavonóis e flavanonas.

Na reação do Cloreto de Alumínio, a complexação dos flavonóides com o alumínio resulta em intensificação da fluorescência apresentada pelo composto flavonoídico, que pode ser amarela ou de outra cor sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm (COSTA, 1996). Obteve-se como resultado a intensificação da coloração amarela sob luz ultravioleta, ou seja, o resultado foi positivo para a classe de flavonóis.

De acordo com a Tabela 3, observa-se que os resultados obtidos correspondem aos dados da classe de flavonóis, que têm como dois dos seus vários componentes a rutina e a quercetina, sendo que estes flavonóis são de interesse na pesquisa apresentada por este trabalho, já que são citados pela literatura como compostos majoritários dos frutos de *D. mollis* (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; LORENZI, 2000).

Tabela 3. Indicadores de resultados positivos das reações para diferentes classes de flavonóides segundo Costa (1996).

REAÇÃO	CLASSE DE FLAVONÓIDES				
	Flavonas	Flavonóis	Flavanonas	Chalconas	Isoflavonas
Shinoda	laranja	vermelha (+)	violeta	_____	_____
Taubock	_____	fluorescência amarelo-esverdeada	_____	_____	_____
Pew	vermelha (+)	vermelha (+)	vermelha (+)	vermelha (+)	vermelha (+)
Cloreto Férrico	Verde	verde acastanhado (+)	verde acastanhado (+)	amarela	Verde
Cloreto de Alumínio	amarelo esverdeado	fluorescência amarela (+)	amarelo	fluorescência azul- esverdeado	amarelo acastanhado

Reações assinaladas com (+) apresentaram resultado para *Dimorphandra mollis*.

5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES EQUIVALENTES EM RUTINA NA DROGA VEGETAL

A determinação do teor de substâncias ativas em uma droga vegetal se faz importante. Isto porque a proporção de metabólitos secundários produzidos pela planta depende do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, da sazonalidade, enfim, das características climáticas-edáficas a que está exposta no seu local de cultivo (VIGO et al., 2004; FREIRE et al, 2006).

5.5.1 Curva analítica para quantificação de flavonóides totais expressos em rutina

A Figura 8 representa a curva analítica construída a partir dos valores obtidos de absorvância da solução padrão de rutina, em diferentes concentrações. A partir da construção da curva analítica, pôde-se obter a equação da reta (Equação II), que relaciona de forma direta o valor de absorvância em 425 nm de uma solução (previamente preparada) com a concentração de flavonóides nela presentes. O valor de r^2 na Equação II demonstra o coeficiente de determinação da regressão linear. Quanto mais próximo de 1 estiver este valor, mais perto da perfeição estará a regressão linear obtida, ou seja, os valores obtidos experimentalmente estarão próximos à regressão linear obtida (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

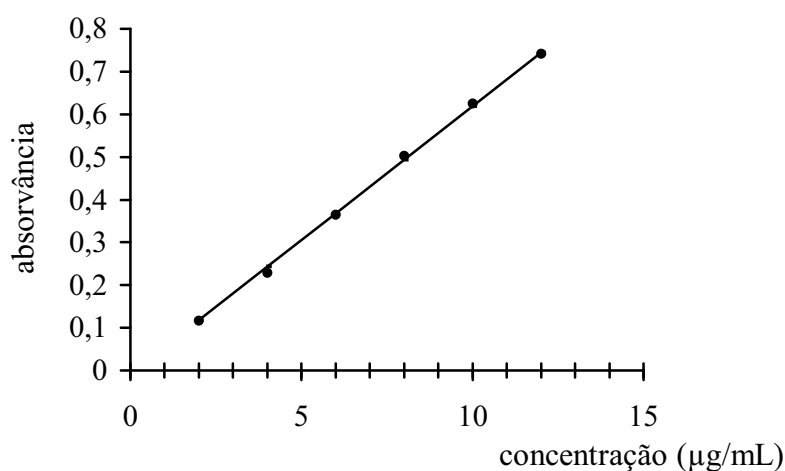


Figura 8. Curva analítica de absorvância da solução padrão de rutina.

Equação II: $y = 0,06267x + 0,00761$

$$r^2 = 0,99947$$

5.5.2 Doseamento da solução amostra obtida a partir da droga vegetal

A partir da equação da reta obtida pela curva analítica, foi calculado o teor de flavonóides dos frutos secos e pulverizados de *D. mollis*. Os valores de absorvância foram aplicados na equação da reta substituindo o valor de y e obteve-se o valor x , sendo a concentração em $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi multiplicada por 1250 (fator de diluição) para obter o valor de miligramas de flavonóides por grama de extrato.

Assim, pode-se determinar que na droga vegetal o teor de flavonóides totais é de 102,5 mg/g de extrato ou 10,25%. Tal valor pode ser considerado alto quando comparado com o teor de flavonóides encontrados no maracujá (*Passiflora incarnata*), que pode conter até 2,5% de flavonóides em suas folhas (SCHULZ et al., 2002).

5.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXTRATIVAS: VARIAÇÃO DO LÍQUIDO EXTRATOR

5.6.1 Obtenção dos extratos

Os extratos de *D. mollis* foram obtidos a partir da droga pulverizada. Quando trabalhamos com drogas vegetais, deve-se ter o conhecimento das melhores condições que levarão a uma extração eficaz de substâncias. A qualidade da solução extrativa é dada principalmente pelo solvente empregado na extração (SIMÕES et al., 2007). Para a obtenção dos extratos utilizou-se a turboextração e, como líquido extrator, álcool em diferentes graduações (etanol 50%, etanol 70%, etanol 80% e etanol absoluto).

A técnica de turboextração baseia-se na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento. A redução drástica do tamanho de partícula e conseqüente rompimento das células favorece a rápida dissolução das

substâncias ativas no líquido extrativo (VOIGT, 1993; SONAGLIO et al., 2007). Nessas circunstâncias, a difusão das substâncias dissolvidas através da membrana celular fica relegada a um plano secundário, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga. A esse incremento da eficiência somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade da técnica, que permitem a fácil utilização da turboextração em processamentos em pequena e média escala (SONAGLIO et al., 2007).

A escolha dos solventes para extração deve basear-se principalmente na seletividade que o mesmo apresenta pelas substâncias a serem extraídas. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, custo, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST; SCHMIDT, 2000).

A variação da concentração do álcool utilizado como solvente teve por objetivo criar sistemas solventes de diferentes valores de constantes dielétricas e, portanto, alterar de modo sensível o poder dissolvente para numerosas substâncias. O álcool e a água foram escolhidos devido à baixa toxicidade para o ser humano. Durante o processo de eliminação do extrato, parte do solvente pode permanecer no extrato e por isso o uso de solventes tóxicos (como o metanol, que segundo Costa (1996), é um ótimo solvente para extração de flavonóides) é limitado (SONAGLIO et al, 2007).

Neste estudo, 100 g da droga pulverizada foram utilizados para a preparação dos extratos com 1000 mL de cada sistema solvente (item 4.2.6.1). Após a extração, a mistura passou pelo processo de decantação por 24 horas, pois é difícil a separação da solução por filtração direta quando proveniente do processo de turboextração (SONAGLIO et al, 2007). Em seguida, realizou-se a filtração e a rotoevaporação dos extratos até completa retirada do solvente orgânico (etanol). Para a retirada completa de água, os extratos livres de etanol passaram pelo processo de liofilização. Todos os extratos foram mantidos sob refrigeração

para evitar a contaminação microbiana e degradação de compostos. Por fim, fez-se os cálculos de rendimento de cada extrato, que estão expressos na Figura 9.

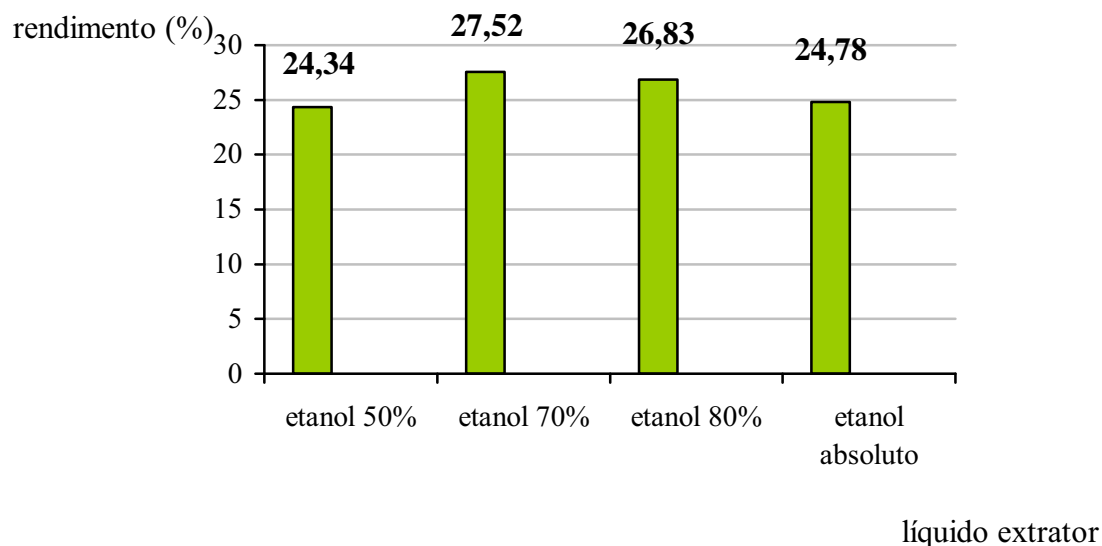


Figura 9. Rendimento em porcentagem dos extratos etanólicos em diferentes graduações, obtidos a partir dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

Pôde-se observar que o extrato obtido dos frutos de *D. mollis* com etanol 70% apresentou maior rendimento em massa, o que não significa maior rendimento de princípios ativos de interesse (flavonóides).

5.6.2 Perfil cromatográfico

Através do perfil cromatográfico é possível visualizar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos. O conhecimento da constituição fitoquímica das plantas e seus extratos é importante porque se constitui em uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade físico-químico (SOUZA, 2007).

A Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) visa, principalmente, à separação e identificação de substâncias presentes em extratos vegetais. Tanto a fase móvel

quanto a fase estacionária devem ser selecionadas em função do material a ser estudado. A descrição se dá pela diferenciação da cor da substância a ser estudada e através do Rf (Fator de Retenção: quociente entre a distância percorrida pela substância e a linha de frente). Na realização da CCDC, foram aplicadas quatro amostras: A1 (extrato etanólico absoluto dos frutos de *D. mollis*), A2 (extrato etanólico 80%), A3 (extrato etanólico 70%), e A4 (extrato etanólico 50%) e dois marcadores: R (rutina) e Q (quercetina) na placa de sílica.

As principais manchas obtidas foram marcadas e numeradas, calculando-se os fatores de retenção através da fórmula:

$$\text{Equação III: } R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

A Figura 10 mostra os resultados obtidos.

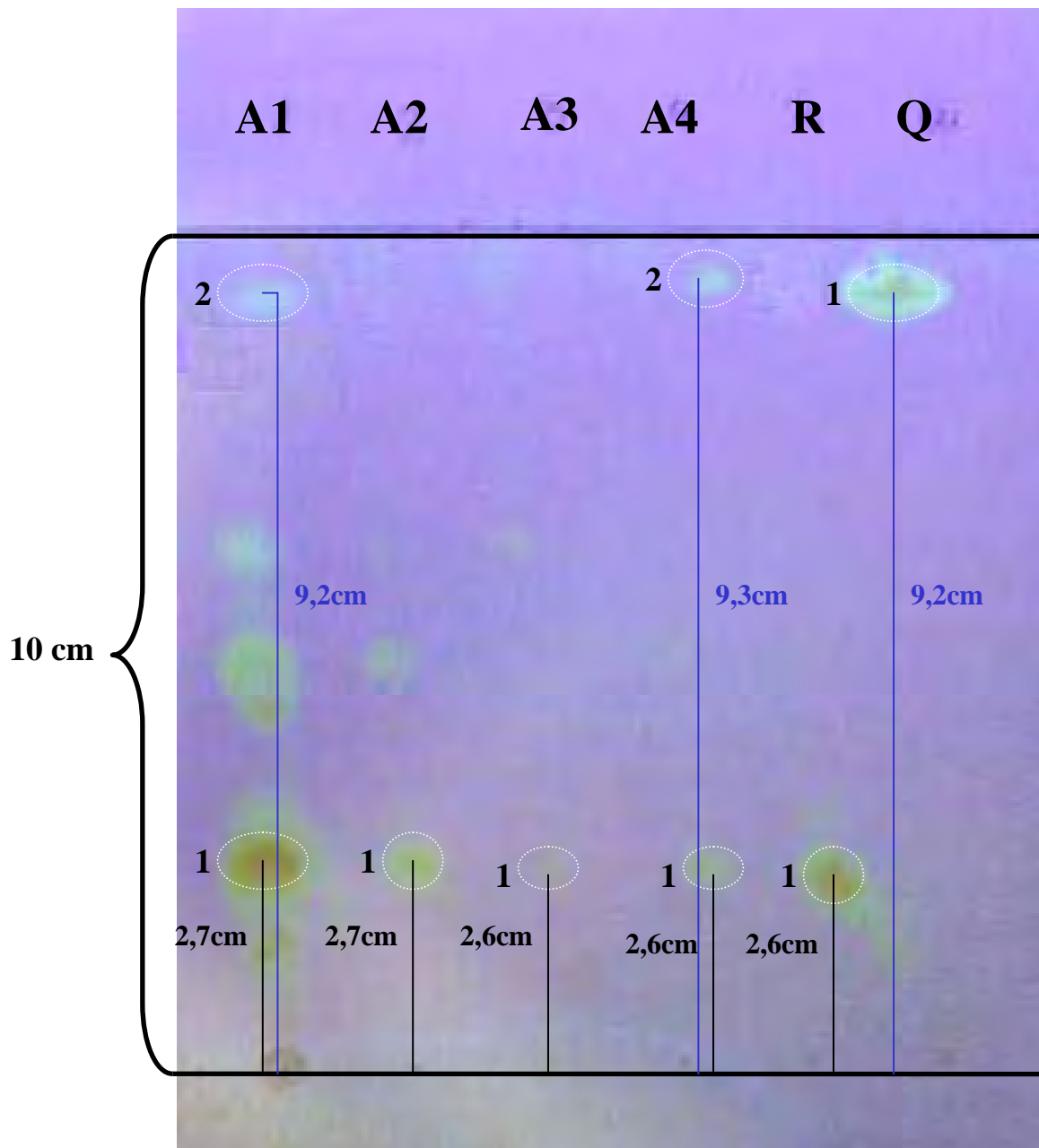


Figura 10. Placa cromatográfica para a confirmação da presença de flavonóides nos extratos de *Dimorphandra mollis*. Fase fixa: Sílica Gel G. Fase móvel: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:27). Revelador químico: ácido bórico 3% e ácido oxálico 10% (15:5). Visualização sob luz Ultravioleta (254 nm). A1: extrato etanólico absoluto de frutos de *Dimorphandra mollis*, A2: extrato etanólico 80%, A3: extrato etanólico 70%, A4: extrato etanólico 50%, R: rutina, Q: quercetina.

As principais manchas obtidas foram marcadas e numeradas. A mancha R.1 ($R_f = 0,26$), de coloração amarelo-esverdeada, representa a mancha produzida pela rutina. Analisando-se as amostras, temos que a mancha A1.1 ($R_f = 0,27$), a mancha A2.1 ($R_f = 0,27$), a mancha A3.1 ($R_f = 0,26$) e a mancha A4.1 ($R_f = 0,26$), estão na mesma altura e possuem a mesma coloração (amarelo-esverdeada) da mancha R.1 (rutina). A partir desses dados confirmou-se que as manchas A1.1, A2.1, A3.1 e A4.1 representam a substância padrão, confirmando a presença de rutina nas quatro amostras analisadas.

A mancha Q.1 ($R_f = 0,92$), de coloração amarelo-esverdeada, representa a mancha produzida pela quercetina. Analisando as amostras, temos que a mancha A1.2 ($R_f = 0,92$) e a mancha A4.2 ($R_f = 0,93$) estão na mesma altura e possuem a mesma coloração (amarelo-esverdeada) da mancha Q.1 (quercetina). Os fatores de retenção das substâncias das manchas A1.2 e A4.2 são iguais ou de valor muito próximo ao fator de retenção da quercetina (mancha Q.1). A partir desses dados, confirmou-se que as manchas A1.2 e A4.2 representam a substância padrão, confirmando a presença de quercetina nas duas amostras.

Confirmada a presença de flavonóides, especificamente rutina nos quatro extratos (etanólico 50%, etanólico 70%, etanólico 80% e etanólico absoluto) e quercetina nos extratos etanólico absoluto e etanólico 50% dos frutos de *D. mollis*, passou-se para a próxima etapa, que visou o doseamento de flavonóides totais nos extratos, a fim de determinar qual extrato possui maior teor de flavonóides. O extrato com maior teor de flavonóides foi utilizado para os demais testes previstos por este estudo.

5.6.3 Determinação do teor de flavonóides equivalentes em rutina nos extratos

Foi verificado o teor de flavonóides totais nos extratos etanólicos 50%, 70%, 80% e absoluto, obtidos a partir dos frutos de *D. mollis*. O extrato com maior teor de flavonóides foi considerado o extrato de escolha e, portanto, foi utilizado nos demais testes.

A metodologia baseia-se na formação de um complexo estável entre alumínio e flavonóide em metanol, que, em análise espectrofotométrica, absorve luz em comprimento de onda igual a 425 nm. Este comprimento de onda é maior do que o comprimento de onda absorvido por complexos formados pelo alumínio com outros compostos fenólicos. Assim, com o uso de cloreto de alumínio, é possível quantificar o teor de flavonóides sem a interferência de substâncias fenólicas (SOUZA, 2007).

5.6.3.1 Doseamento da solução amostra obtida a partir dos extratos

A partir da equação da reta obtida pela curva analítica (item 5.5.1), foi calculado o teor de flavonóides dos extratos obtidos a partir dos frutos de *D. mollis*. Os valores de absorvância foram aplicados na equação da reta substituindo o valor de y e obteve-se o valor x, sendo a concentração em $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi multiplicada por 625 (fator de diluição) para obter o valor de miligramas de flavonóides por grama de extrato, mostrados na Tabela 4. A Figura 11 faz uma comparação entre o teor de extrativos e o teor de flavonóides em cada extrato.

Tabela 4. Concentração de flavonóides em mg/g de extrato nos diferentes extratos hidroalcoólicos obtidos a partir dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

Extrato	Concentração de flavonóides totais no extrato (mg/g)
Etanólico 50%	90,8
Etanólico 70%	172,1
Etanólico 80%	160,8
Etanólico absoluto	337,1

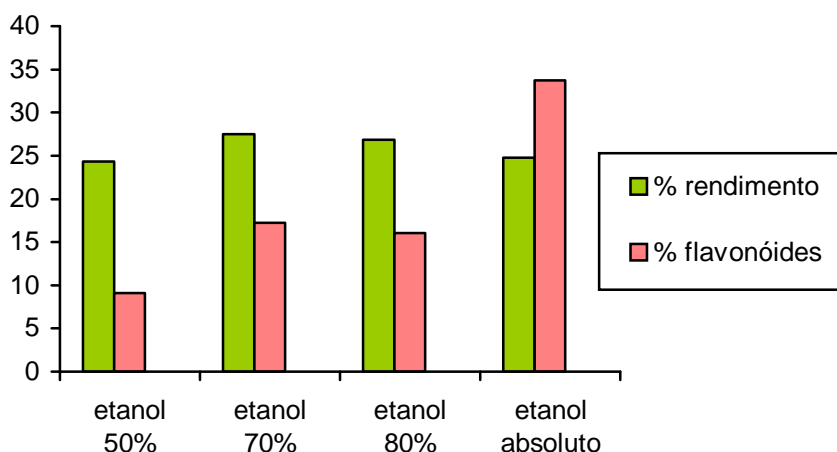


Figura 11. Comparação dos valores de teor de extrativos com os valores de teor de flavonóides dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

A partir dos resultados obtidos, identificou-se o extrato etanólico absoluto como o de maior teor de flavonóides totais, tendo 33,71% de flavonóides expressos em rutina. Este teor é considerado alto quando comparado ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, que é amplamente utilizado na fitoterapia pelo alto teor de flavonóides e contém 24% de flavonóides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Apesar de apresentar uma das menores porcentagens de rendimento em relação à massa inicial de droga vegetal, o extrato obtido a partir da turboextração com etanol absoluto é o que possui maior teor de flavonóides, indicando que o etanol absoluto é o melhor líquido extrator, dentre os estudados, para a extração de flavonóides. Assim, este extrato foi considerado o de escolha e utilizado nos demais experimentos propostos neste trabalho.

5.7 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES POR CLAE-UV-DAD

Com o uso da técnica de CLAE-UV-DAD as diferentes classes de flavonóides podem ser distinguidas através da análise dos espectros de absorção característicos no ultravioleta,

determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser atribuída à existência do anel A e a banda I ao anel B. A classe dos flavonóis, que são de interesse neste estudo, tem a banda I entre 352-385 nm (SANTOS, 2006).

O cromatograma do extrato etanólico absoluto dos frutos de *D. mollis* apresentou quatro picos intensos (Figura 12), sendo o pico *a* com tempo de retenção de 2,31 minutos (4,1%), o pico *b* em 2,98 minutos (19,8%), pico *c* em 5,53 minutos (63,1%) e o pico *d* em 6,09 minutos (13,0%). Comparando-se o tempo de retenção do padrão quercetina (Figura 13a), que foi de 2,95 minutos (98,4%) com a banda *b*, e comparando também os espectros de absorção no ultravioleta (Figura 14b), concluímos que o pico *b* representa o flavonóide quercetina. Comparando-se o tempo de retenção do padrão rutina (Figura 13b), que foi de 5,51 (98,7%) com a banda *c*, e comparando também os espectros de absorção no ultravioleta (Figura 14c), concluímos que o pico *c* representa o flavonóide rutina. Não foi possível identificar as substâncias representadas pelos picos *a* e *d*, cujos espectros no ultravioleta estão apresentados nas Figuras 14a e 14d.

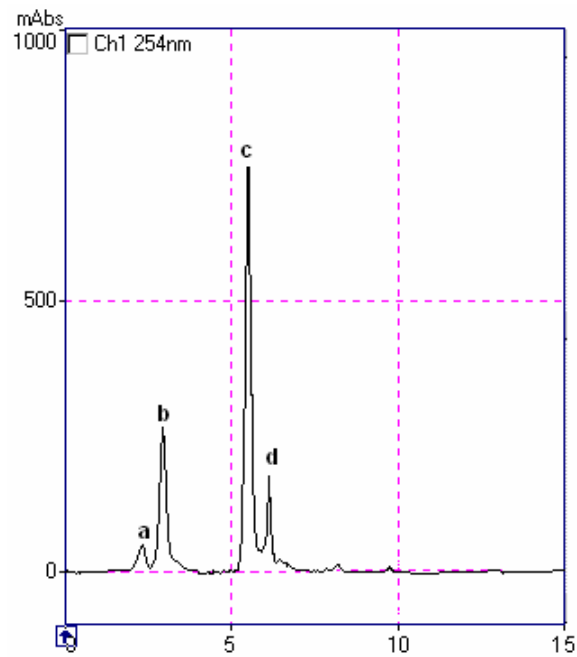


Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV-DAD do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

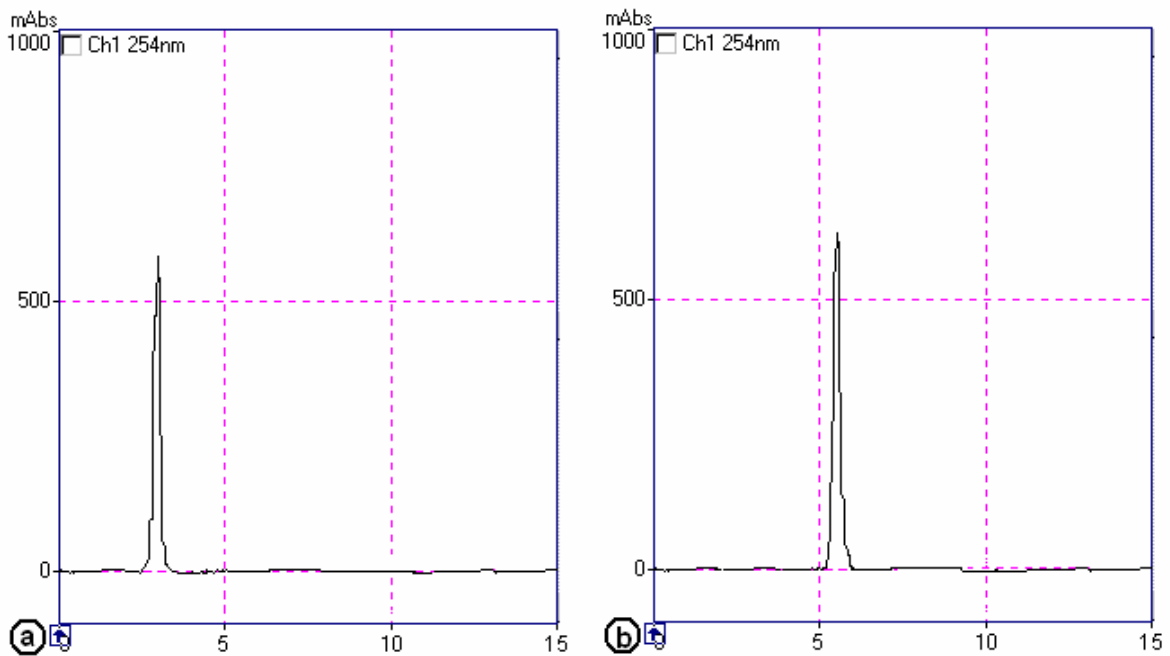


Figura 13. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD dos padrões: a) quercetina e b) rutina.

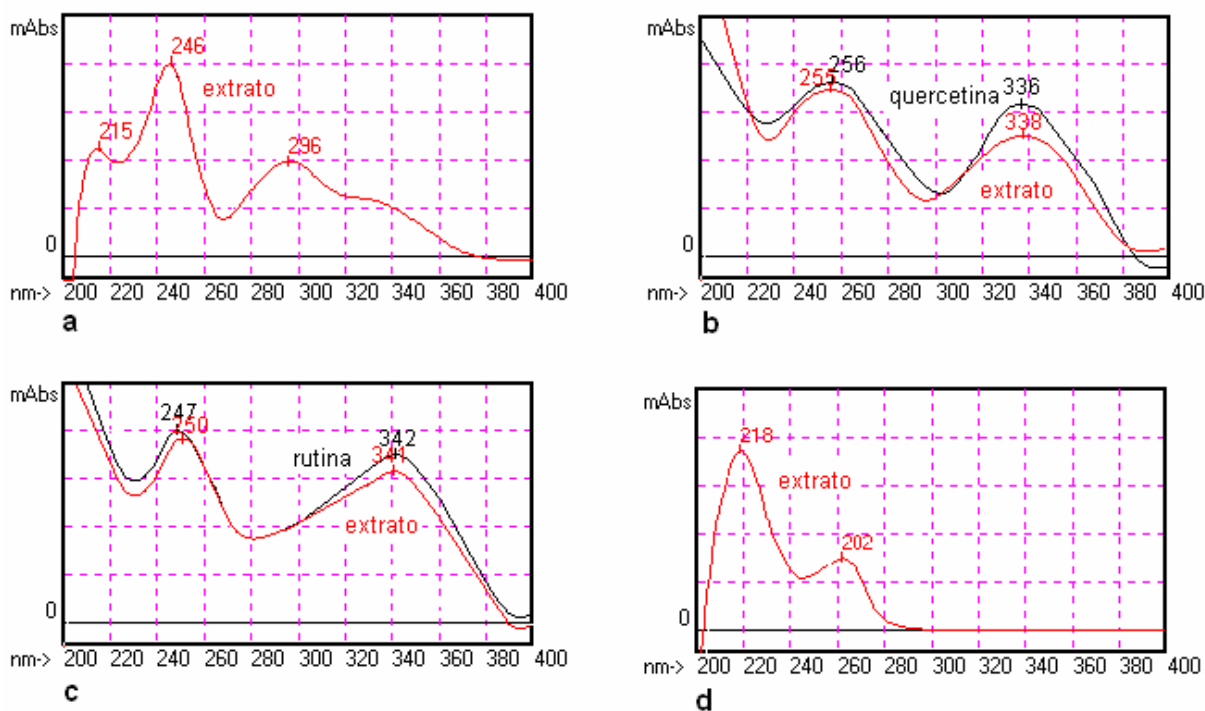


Figura 14. Espectros no ultravioleta: a) pico a; b) pico b e padrão quercetina; c) pico c e padrão rutina e d) pico d.

5.8 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DO EXTRATO

Além dos aspectos físico-químicos, o controle microbiológico é indispensável para garantir a qualidade de extratos vegetais. Em geral, os materiais vegetais contêm um grande número de fungos e bactérias pertencentes a sua microbiota natural ou que são introduzidos durante a sua manipulação, e esta contaminação pode ser intensificada com o tempo e não comprometer somente o material em si, mas também o usuário (MIGLIATO et al., 2007). Portanto, procurou-se realizar um controle microbiológico do extrato etanólico absoluto obtido a partir dos frutos de *D. mollis*.

Observou-se que não houve crescimento dos microrganismos patogênicos específicos, ou seja, *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na amostra de extrato analisada (Tabela 5). Também se observou que na contagem do número total de microrganismos o número obtido foi menor do que o permitido (Tabela 5). Segundo

as recomendações oficiais de limites de contaminação microbiana para materiais obtidos de métodos de extração de plantas, o extrato analisado foi aprovado (WHO 1998; PINTO et al., 2003; USP 2003).

Tabela 5. Análise microbiológica do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

Microrganismos	Recomendação*	Resultado
Bactérias aeróbias	$\leq 10^5$ UFC/g	300 UFC/g
Fungo e leveduras	$\leq 10^3$ UFC/g	Inferior a 10 UFC/g
Enterobactérias	$\leq 10^3$ UFC/g	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente

* Fonte: WHO 1998; Pinto et al., 2003; USP 2003.

5.9 ATIVIDADE SCAVENGER DE RADICAIS PELO DPPH

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) um dos mais utilizados nos estudos de substâncias antioxidantes (ARNAO et al., 2000). O DPPH é um radical cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 531 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO et al., 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes *scavengers* presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert e Beer, podendo ser medida

espectrometricamente a 531 nm (BLOIS, 1958). A intensidade da absorvância em 531 nm diminui e a diferença da absorvância na ausência e na presença das amostras nos fornece o gráfico dose-resposta apresentado, bem como a concentração capaz de inibir 50% dos radicais DPPH presentes na solução (CI_{50}).

A cisteína é um antioxidante muito utilizado como padrão nos ensaios de avaliação da ação de diferentes amostras sobre o radical DPPH. Neste ensaio, observou-se que a cisteína age sobre 50% do radical em solução quando sua concentração (CI_{50}) está em torno de $21 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ (Figura 15).

Os resultados obtidos, expressos na Tabela 6, mostraram que nas condições testadas, o extrato etanólico absoluto dos frutos de *D. mollis* ($CI_{50} = 38,2 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$) não foi tão eficiente quanto a cisteína (Figura 15). No entanto, a ação pode ser considerada satisfatória, pois na concentração de $300 \mu\text{g/mL}$ o extrato etanólico absoluto conseguiu inibir 92,5% dos radicais DPPH presentes no meio.

Tabela 6. Resultados da capacidade *scavanger* sobre o radical DPPH do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e do padrão cisteína.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (531 nm)	
	extrato etanólico absoluto	Cisteína
300	$0,004 \pm 0,008$	$0,002 \pm 0,002$
200	$0,078 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,005$
100	$0,141 \pm 0,018$	$0,012 \pm 0,001$
50	$0,227 \pm 0,022$	$0,065 \pm 0,015$
20	$0,371 \pm 0,030$	$0,275 \pm 0,016$
0	$0,533 \pm 0,028$	$0,533 \pm 0,028$

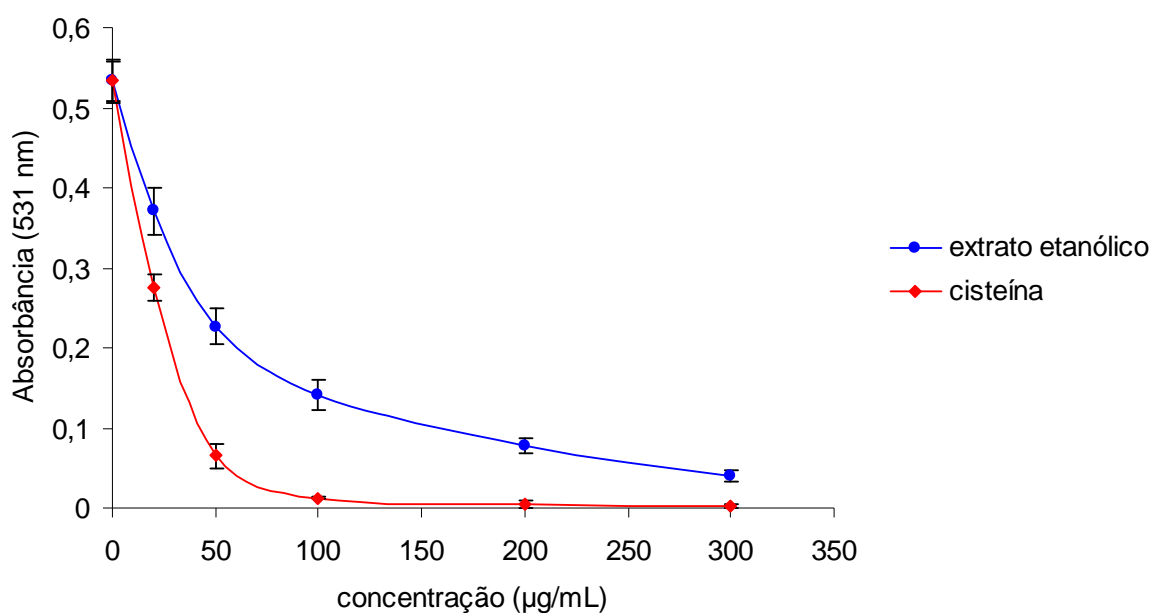


Figura 15. Gráfico dose-resposta da capacidade *scavenger* sobre o radical DPPH do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e do padrão cisteína.

5.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO ABTS

No sistema, o radical é gerado pela ação do ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] com persulfato de potássio. O radical catiônico gerado (ABTS^{•+}) apresenta 3 picos de absorção, sendo o maior em 734 nm, comprimento de onda utilizado nos ensaios (VELLOSA, 2005). Na presença de *scavengers* (raptores) deste radical, a intensidade da absorbância em 734 nm diminui e essa diminuição fornece os valores a serem relacionados nos gráficos dose-resposta.

O radical ABTS^{•+}, segundo Pellegrini et al. (1999) é usado na avaliação da habilidade *scavenger* de radicais de diferentes compostos fenólicos, o que inclui os flavonóides.

Neste ensaio, a capacidade *scavenger* do extrato etanólico absoluto dos frutos de *D. mollis* foi comparada com a capacidade da cisteína, antioxidante padrão. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos e a Figura 16 mostra o gráfico dose-resposta obtido.

Tabela 7. Resultados da capacidade *scavanger* sobre o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e do padrão cisteína.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (734 nm)	
	extrato etanólico absoluto	cisteína
20	$0,009 \pm 0,002$	0 ± 0
10	$0,015 \pm 0,003$	0 ± 0
5	$0,097 \pm 0,008$	$0,012 \pm 0,002$
2	$0,387 \pm 0,012$	$0,100 \pm 0,006$
1	$0,439 \pm 0,025$	$0,269 \pm 0,013$
0,5	$0,467 \pm 0,029$	$0,406 \pm 0,018$
0,2	$0,453 \pm 0,037$	$0,442 \pm 0,026$
0	$0,465 \pm 0,021$	$0,465 \pm 0,021$

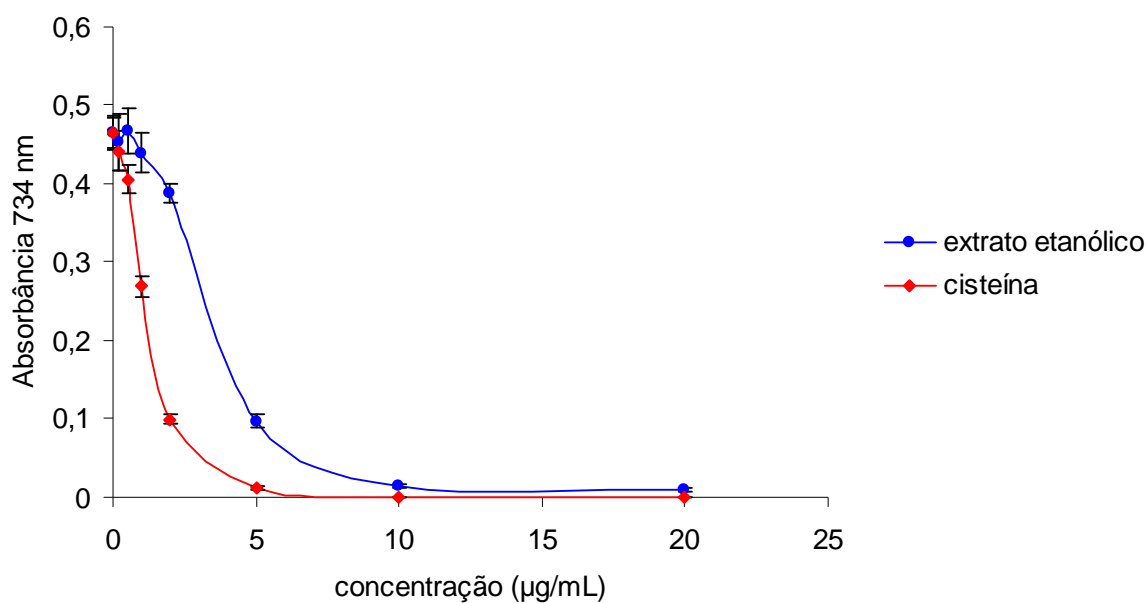


Figura 16. Gráfico dose-resposta da capacidade *scavanger* sobre o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e do padrão cisteína.

Na avaliação da atividade antioxidante pela supressão do radical ABTS^{•+}, a cisteína (CI₅₀= 1,3 ± 0,014 µg/mL) foi mais eficiente como *scavenger* do que o extrato etanólico absoluto do fruto de *D. mollis*. Apesar disto, com um valor de CI₅₀= 3,45 ± 0,071 µg/mL, o extrato apresentou uma ação antioxidante satisfatória, pois na concentração de 20 µg/mL o extrato conseguiu inibir 98,0% dos radicais ABTS^{•+} presentes no meio.

5.11 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Uma vez demonstrado o potencial antioxidante do extrato etanólico absoluto de *D. mollis*, tornou-se importante conhecer a citotoxicidade que este poderia apresentar. Para tanto, utilizou-se metodologia de determinação de morte celular referente a uma avaliação preliminar da toxicidade do extrato, segundo Ahmed et al. (1994) e Vistica et al. (1991).

Neste método, o ensaio é feito sobre monocamada de cultura de células de mamíferos da linhagem de macrófagos J774. A cultura em monocamada, inclusive de outras linhagens celulares, é um dos métodos mais amplamente utilizados entre os testes de citotoxicidade, pois oferece flexibilidade quanto ao tempo de exposição e quantificação do efeito da amostra. Geralmente, são utilizados tempos de exposição à amostra de 1 a 24 horas e o ponto de leitura do resultado está baseado no número de células como indicação de viabilidade ou capacidade metabólica. Também é um método que requer um reduzido número de células quando comparado aos outros métodos e é facilmente manipulado utilizando-se microplacas de 96 poços, o que permite ensaiar uma ampla faixa de concentrações da amostra (BUCKBERRY, 1999).

Para observar o resultado de citotoxicidade e analisar a existência de células vivas ou mortas, foi utilizado o corante denominado resazurina, também conhecido como Alamar Blue. A forma oxidada da resazurina apresenta-se não fluorescente e na coloração azul, sendo que é reduzida por atividade celular (postulado que pelas enzimas mitocondriais) à forma

fluorescente (capaz de absorver luz a 590 nm) e de coloração rosa. Portanto, na presença de células mortas, a coloração azul visualizada indica que a amostra incubada com as células causou citotoxicidade, enquanto que a coloração rosa indica ausência de citotoxicidade, uma vez que existem células vivas no meio. Sendo assim, o Alamar Blue é mais indicado como um marcador do ponto de leitura para ensaios de citotoxicidade do que para ensaios de monitoramento da cinética de crescimento celular, podendo ser identificado por espectrofotometria (O'BRIEN, 2000).

Desta forma, através da metodologia utilizada no ensaio de citotoxicidade, foi possível observar que o extrato etanólico absoluto obtido a partir dos frutos de *D. mollis* apresentou um Índice de Citotoxicidade para 50% das células (IC_{50}) de 495,6 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17). Este valor foi intermediário ao IC_{50} da rutina (60,8 $\mu\text{g/mL}$) e ao IC_{50} da quercetina (951,2 $\mu\text{g/mL}$), flavonóides presentes no extrato etanólico absoluto como determinado neste estudo. Os resultados obtidos encontram-se especificados na Tabela 8.

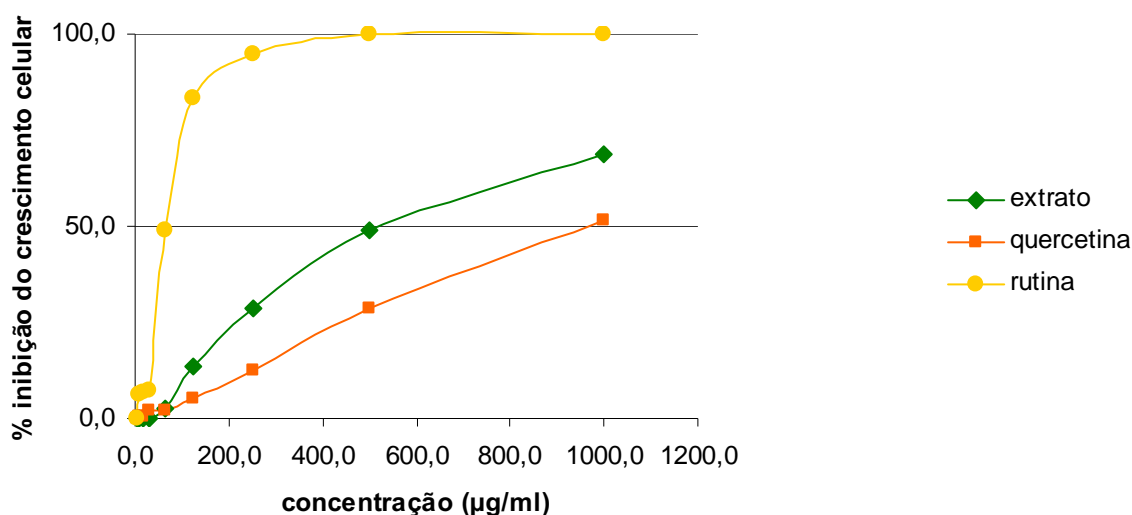


Figura 17. Avaliação citotóxica sobre macrófagos da linhagem J774 do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e dos flavonóides rutina e quercetina.

Tabela 8. Resultados obtidos na avaliação citotóxica sobre macrófagos da linhagem J774 do extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* e dos flavonóides rutina e quercetina.

CONCENTRAÇÃO (MG/ML)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR (%)		
	EXTRATO	QUERCETINA	RUTINA
3,9	0,0	0,0	0,0
7,8	0,0	0,6	6,1
15,6	0,0	0,7	6,8
31,3	0,0	2,0	7,1
62,5	2,5	2,0	49,0
125	13,4	5,1	83,1
250	28,5	12,5	94,9
500	48,9	28,9	100,0
1000	68,9	51,4	100,0

Apesar de determinar a citotoxicidade do extrato a metodologia *in vitro* e o tipo de células utilizadas ainda não fornecem dados suficientes para atestar a segurança do produto e torna-se necessário empreender novas pesquisas ou testes adicionais para avaliar a ausência de risco para os consumidores.

5.12 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO CONTENDO O EXTRATO

A forma cosmética emulsão é constituída por duas fases distintas, uma de natureza aquosa e outra oleosa, estabilizada pela presença de um terceiro componente, o tensoativo emulsificante. A grande vantagem deste tipo de preparação é a possibilidade de incorporar ativos hidrossolúveis e lipossolúveis sem perda de estabilidade e/ou modificação em suas características físicas finais (SIQUEIRA, 2004).

5.13 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DA EMULSÃO

O controle de qualidade microbiológico de produtos não-estéreis, que inclui produtos cosméticos de uso tópico, assegura que a carga microbiana presente no produto, seja no aspecto qualitativo ou no quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do usuário. Cargas microbianas elevadas podem comprometer a estabilidade do produto, enquanto que, para a segurança do consumidor, microorganismos saprófitas presentes podem se portar como agentes infecciosos oportunistas e a presença de cepas reconhecidamente patogênicas representa potencial de risco de aquisição de quadro clínico infeccioso (PINTO et al., 2003).

A ANVISA, através da Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999, estabelece os parâmetros para o controle microbiológico para produtos cosméticos (BRASIL, 1999). Em observância com a legislação, observou-se que não houve crescimento dos microrganismos patogênicos específicos, ou seja, *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na amostra da emulsão analisada (Tabela 9). Também se observou que na contagem do número total de microrganismos o número obtido encontra-se dentro dos limites permitidos (Tabela 9).

Segundo as recomendações oficiais de limites de contaminação microbiana para produtos cosméticos, a emulsão analisada está aprovada. Assim, confirmou-se que, em relação ao aspecto microbiológico, o produto desenvolvido e analisado é seguro para a utilização humana e que não houve fontes de contaminação microbiana para o produto, como matérias-primas, manipulador ou equipamentos e utensílios utilizados na manipulação.

Tabela 9. Análise microbiológica da emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis*.

Microrganismos	Recomendação*	Resultado
Bactérias aeróbias	$\leq 5 \times 10^3$ UFC/g	100 UFC/g
Fungo e leveduras	$\leq 5 \times 10^2$ UFC/g	Inferior a 10 UFC/g
Enterobactérias	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente

* Fonte: BRASIL, 1999.

5.14 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA EMULSÃO

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto na variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto. Modificações dentro de limites determinados podem não configurar motivo para reprovar o produto (ANVISA, 2004).

5.14.1 Teste de centrifugação

A emulsão óleo/água contendo extrato dos frutos de *D. mollis* não apresentou separação de componentes depois de submetida à centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, indicando que a preparação foi desenvolvida corretamente e que a incorporação do extrato não promoveu a separação das fases da emulsão.

5.14.2 Estabilidade preliminar

No decorrer de 15 dias, os caracteres organolépticos (aspecto, cor e odor) não foram alterados, permanecendo normais em todas as amostras submetidas a condições de estresse, isto quando comparadas à preparação em tempo zero.

A Figura 18 e a Tabela 10 apresentam a variação de pH das amostras da emulsão contendo o extrato dos frutos de *D. mollis*, sob condições de estresse, desde o dia zero até 15º dia. A ANVISA estabelece que durante a vida útil do produto cosmético seus parâmetros avaliados não devem variar mais do que $\pm 10\%$ (ANVISA, 2004). Assim, através da análise dos dados pôde-se observar que não houve alteração significativa do pH para nenhuma das amostras durante os 15 dias do teste de estabilidade acelerada, o que indica a estabilidade química da emulsão.

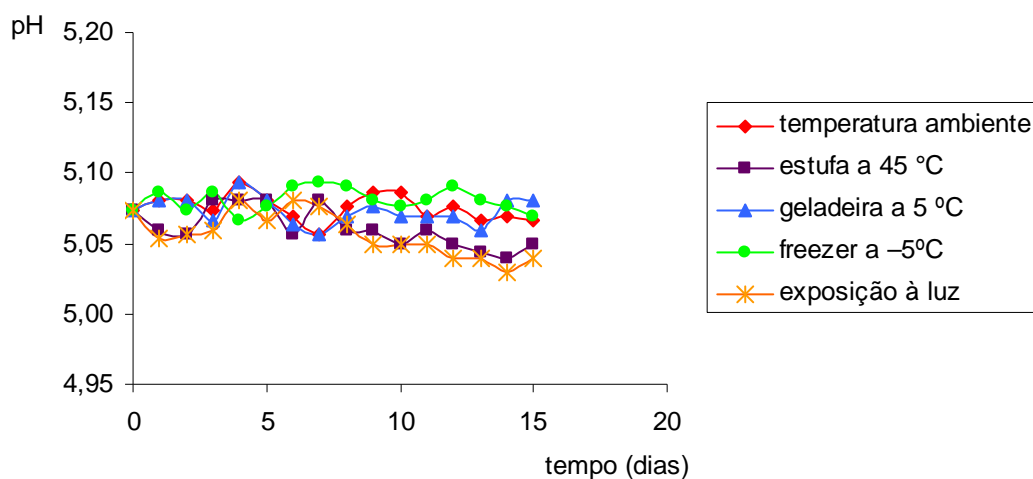


Figura 18. Variação de pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.

Tabela 10. Média, desvio padrão e variação do pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.

Dia	Condição														
	ambiente			estufa			geladeira			freezer			luz		
	média	desvio padrão	variação (%)	média	desvio padrão	variação (%)	média	desvio padrão	variação (%)	média	desvio padrão	variação (%)	média	desvio padrão	variação (%)
0	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00
1	5,08	0,02	0,13	5,06	0,05	-0,26	5,08	0,04	0,13	5,09	0,04	0,26	5,05	0,04	-0,39
2	5,08	0,02	0,13	5,06	0,04	-0,33	5,08	0,04	0,13	5,07	0,01	0,00	5,06	0,04	-0,33
3	5,07	0,06	0,00	5,08	0,02	0,13	5,07	0,01	-0,13	5,09	0,02	0,26	5,06	0,04	-0,26
4	5,09	0,05	0,39	5,08	0,05	0,13	5,09	0,04	0,39	5,07	0,05	-0,13	5,08	0,02	0,13
5	5,08	0,03	0,13	5,08	0,06	0,13	5,08	0,01	0,13	5,08	0,01	0,07	5,07	0,06	-0,13
6	5,07	0,01	-0,07	5,06	0,02	-0,33	5,06	0,05	-0,20	5,09	0,04	0,33	5,08	0,01	0,13
7	5,06	0,02	-0,33	5,08	0,08	0,13	5,06	0,06	-0,33	5,09	0,05	0,39	5,08	0,02	0,07
8	5,08	0,01	0,07	5,06	0,03	-0,26	5,07	0,02	-0,07	5,09	0,03	0,33	5,06	0,01	-0,20
9	5,09	0,02	0,26	5,06	0,04	-0,26	5,08	0,01	0,07	5,08	0,01	0,13	5,05	0,04	-0,46
10	5,09	0,02	0,26	5,05	0,01	-0,46	5,07	0,04	-0,07	5,08	0,01	0,07	5,05	0,04	-0,46
11	5,07	0,04	-0,07	5,06	0,02	-0,26	5,07	0,03	-0,07	5,08	0,05	0,13	5,05	0,05	-0,46
12	5,08	0,05	0,07	5,05	0,02	-0,46	5,07	0,02	-0,07	5,09	0,02	0,33	5,04	0,07	-0,66
13	5,07	0,01	-0,13	5,04	0,03	-0,59	5,06	0,03	-0,26	5,08	0,05	0,13	5,04	0,03	-0,66
14	5,07	0,04	-0,07	5,04	0,02	-0,66	5,08	0,05	0,13	5,08	0,03	0,07	5,03	0,05	-0,85
15	5,07	0,02	-0,13	5,05	0,03	-0,46	5,08	0,07	0,13	5,07	0,04	-0,07	5,04	0,02	-0,66

A Figura 19 e a Tabela 11 apresentam a variação da densidade das amostras da emulsão contendo o extrato, sob condições de estresse, desde o dia zero até 15º dia. Através da análise dos dados pôde-se observar que não houve alteração significativa da densidade para nenhuma das amostras durante os 15 dias do teste de estabilidade preliminar, o que indica a estabilidade física da emulsão.

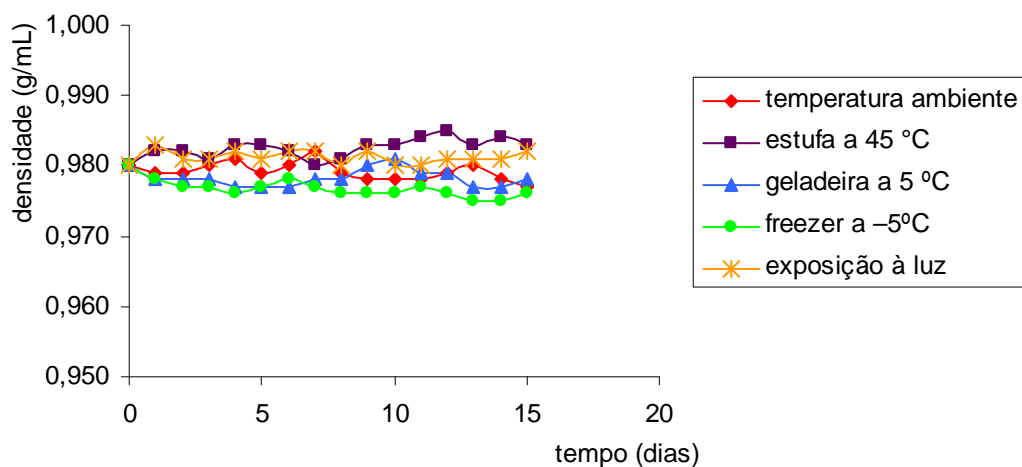


Figura 19. Variação da densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.

Tabela 11. Média, desvio padrão e variação da densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade preliminar, representada pela média de três determinações.

Dia	Condição												
	ambiente		estufa		geladeira		freezer		luz				
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
0	0,980	0,022	0,980	0,022	0,980	0,022	0,00	0,980	0,022	0,00	0,980	0,022	0,00
1	0,979	0,010	0,982	0,019	0,978	0,020	-0,20	0,978	0,02	-0,20	0,983	0,022	0,31
2	0,979	0,009	0,982	0,011	0,978	0,018	-0,20	0,977	0,019	-0,31	0,981	0,016	0,10
3	0,980	0,015	0,981	0,014	0,978	0,021	-0,20	0,977	0,015	-0,31	0,981	0,018	0,10
4	0,981	0,013	0,983	0,017	0,977	0,008	-0,31	0,976	0,008	-0,41	0,982	0,013	0,20
5	0,979	0,022	0,983	0,017	0,977	0,019	-0,31	0,977	0,013	-0,31	0,981	0,014	0,10
6	0,980	0,017	0,982	0,012	0,977	0,015	-0,31	0,978	0,021	-0,20	0,982	0,015	0,20
7	0,982	0,020	0,980	0,009	0,978	0,017	-0,20	0,977	0,016	-0,31	0,982	0,012	0,20
8	0,979	0,019	0,981	0,022	0,978	0,008	-0,20	0,976	0,015	-0,41	0,980	0,018	0,00
9	0,978	0,017	0,983	0,016	0,980	0,012	0,00	0,976	0,007	-0,41	0,982	0,02	0,20
10	0,978	0,021	0,983	0,017	0,981	0,018	0,10	0,976	0,013	-0,41	0,980	0,011	0,00
11	0,978	0,019	0,984	0,021	0,979	0,008	-0,10	0,977	0,013	-0,31	0,980	0,007	0,00
12	0,979	0,013	0,985	0,015	0,979	0,022	-0,10	0,976	0,007	-0,41	0,981	0,008	0,10
13	0,980	0,012	0,983	0,020	0,977	0,011	-0,31	0,975	0,018	-0,51	0,981	0,019	0,10
14	0,978	0,014	0,984	0,021	0,977	0,019	-0,31	0,975	0,016	-0,51	0,981	0,02	0,10
15	0,977	0,010	0,983	0,011	0,978	0,016	-0,20	0,976	0,014	-0,41	0,982	0,009	0,20

Os resultados obtidos com os testes de estabilidade preliminar indicaram a adequabilidade organoléptica e físico-química das preparações para uso.

5.14.3 Estabilidade acelerada ou normal

No decorrer de 90 dias, os caracteres organolépticos (aspecto, cor e odor) não foram alterados, permanecendo normais em todas as amostras submetidas a condições de estresse, isto quando comparadas à preparação em tempo zero.

A Tabela 12 e a Figura 20 apresentam a variação de pH das amostras da emulsão contendo o extrato dos frutos de *D. mollis*, sob condições de estresse, desde o dia zero até 90º dia. Através da análise dos dados pôde-se observar que não houve alteração significativa do pH para as amostras que foram mantidas em temperatura ambiente, em geladeira e em freezer. Assim, estas amostras se mantiveram quimicamente estáveis durante os 90 dias de teste. Ocorreu, também, uma visível variação, porém ainda não significativa (menor que 10%), do pH da amostra mantida em estufa termostática e da amostra mantida sob exposição à luz. Desta forma, foi possível determinar que a emulsão sofreu algumas alterações químicas quando submetida ao calor (temperatura de 45 °C) e quando exposta à luz, sugerindo que nessas condições ocorre degradação de componentes da emulsão.

Tabela 12. Média, desvio padrão e variação do pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

Dia	Condição														
	ambiente		estufa		geladeira		freezer		luz						
	média padrão	desvio variação (%)	média padrão	desvio variação (%)	média padrão	desvio variação (%)	média padrão	desvio variação (%)	média padrão	desvio variação (%)					
0	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00	5,07	0,01	0,00			
1	5,08	0,02	0,13	5,06	0,05	-0,26	5,08	0,04	0,13	5,07	0,04	-0,07	5,05	0,04	-0,39
7	5,06	0,02	-0,33	5,08	0,08	0,13	5,06	0,06	-0,33	5,09	0,05	0,39	5,08	0,02	0,07
14	5,07	0,04	-0,07	5,04	0,02	-0,66	5,08	0,05	0,13	5,08	0,03	0,07	5,02	0,05	-0,99
21	5,08	0,06	0,20	5,02	0,02	-1,12	5,07	0,01	-0,07	5,08	0,01	0,07	4,98	0,06	-1,84
30	5,10	0,08	0,59	5,01	0,03	-1,25	5,08	0,06	0,13	5,07	0,04	-0,07	4,98	0,07	-1,84
45	5,08	0,01	0,20	5,00	0,02	-1,45	5,09	0,02	0,33	5,08	0,01	0,13	4,96	0,10	-2,23
60	5,07	0,03	-0,07	4,97	0,06	-2,10	5,07	0,02	-0,07	5,07	0,02	-0,07	4,91	0,08	-3,22
75	5,06	0,04	-0,26	4,99	0,03	-1,71	5,08	0,03	0,13	5,08	0,04	0,13	4,91	0,08	-3,22
90	5,06	0,04	-0,26	4,97	0,02	-1,97	5,09	0,04	0,26	5,08	0,05	0,13	4,90	0,05	-3,42

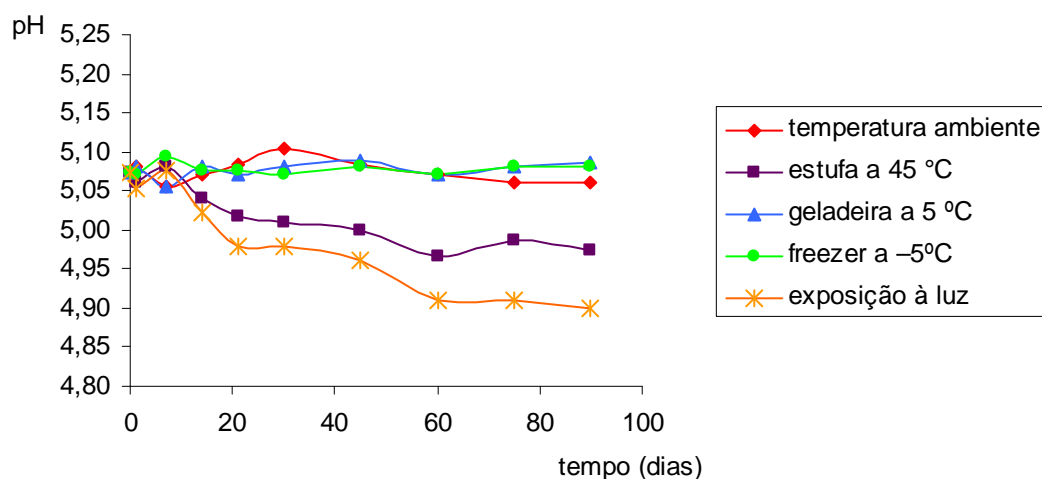


Figura 20. Variação de pH das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

A Tabela 13 e a Figura 21 apresentam a variação da densidade das amostras da emulsão contendo o extrato, sob condições de estresse, desde o dia zero até 90º dia. Através da análise dos dados pôde-se observar que não houve alteração significativa da densidade para nenhuma das amostras durante os 90 dias do teste de estabilidade acelerada, o que indica a estabilidade física da emulsão em todas as condições do teste.

Tabela 13. Média, desvio padrão e variação de densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

Dia	Condição											
	ambiente		estufa		geladeira		freezer		luz			
	média	variação (%)	média	variação (%)	média	variação (%)	média	variação (%)	média	variação (%)		
0	0,980	0,022	0,980	0,022	0,980	0,022	0,980	0,022	0,980	0,003	0,00	
1	0,979	0,010	0,982	0,019	0,978	0,020	0,978	0,020	0,983	0,022	0,31	
7	0,982	0,020	0,980	0,009	0,978	0,017	0,977	0,016	0,982	0,012	0,20	
14	0,982	0,014	0,984	0,021	0,977	0,019	0,975	0,016	0,981	0,020	0,10	
21	0,982	0,017	0,985	0,005	0,978	0,009	0,977	0,008	0,982	0,011	0,20	
30	0,980	0,009	0,984	0,007	0,978	0,015	0,977	0,011	0,983	0,006	0,31	
45	0,980	0,005	0,985	0,017	0,978	0,009	0,976	0,017	0,983	0,006	0,31	
60	0,982	0,017	0,987	0,007	0,979	0,014	0,977	0,013	0,982	0,007	0,20	
75	0,981	0,007	0,987	0,011	0,978	0,011	0,978	0,013	0,984	0,009	0,41	
90	0,982	0,011	0,988	0,006	0,979	0,011	0,978	0,015	0,983	0,011	0,31	

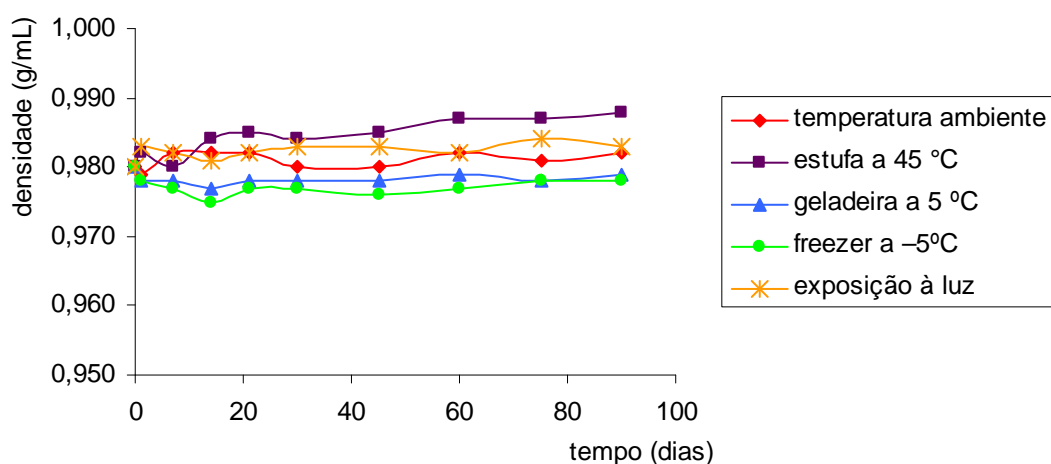


Figura 21. Variação da densidade das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

A avaliação da variação da viscosidade durante os 90 dias de teste de estabilidade acelerada mostraram pouca variação nas curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento das amostras mantidas em temperatura ambiente (Figura 22) e em geladeira (Figura 23). Alterações maiores foram verificadas nas curvas das amostras mantidas em freezer (Figura 24), em estufa (Figura 25) e exposta à luz (Figura 26), porém essas alterações não são consideradas relevantes.

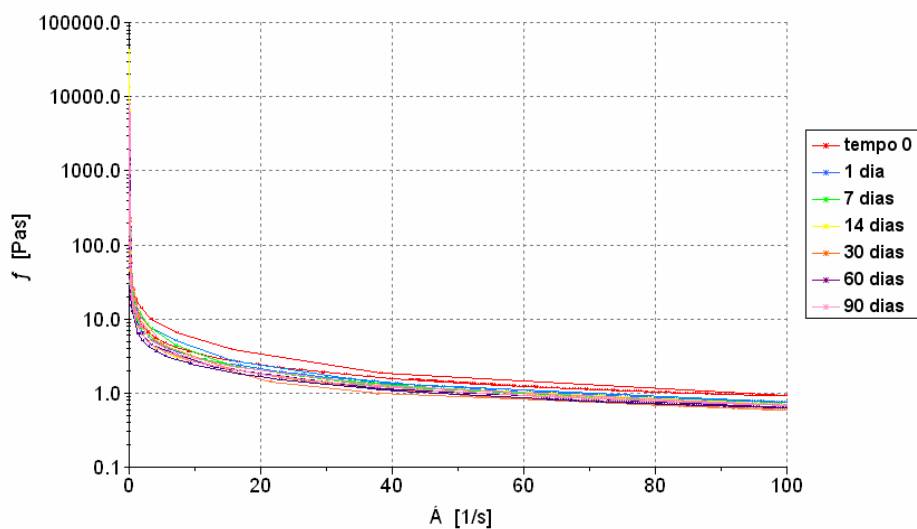


Figura 22. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* mantida em temperatura ambiente durante o teste de estabilidade acelerada.

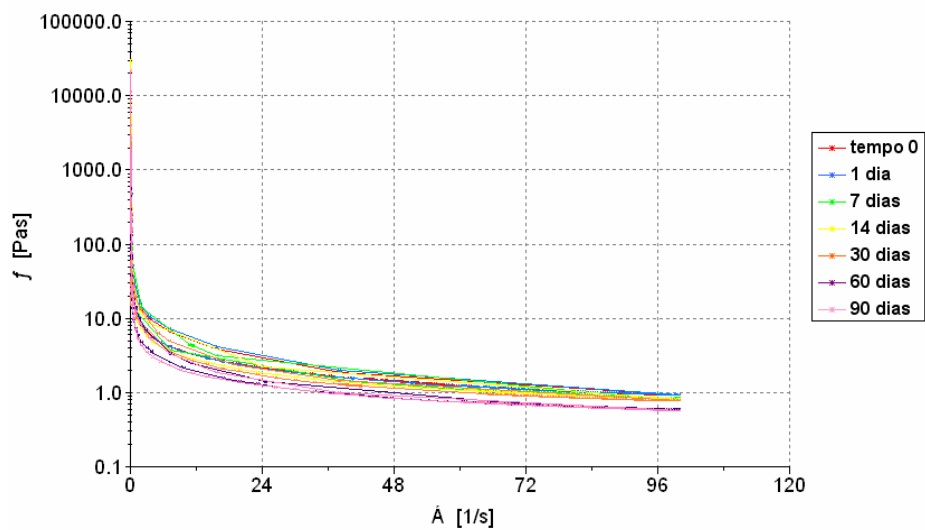


Figura 23. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* mantida em geladeira durante o teste de estabilidade acelerada.

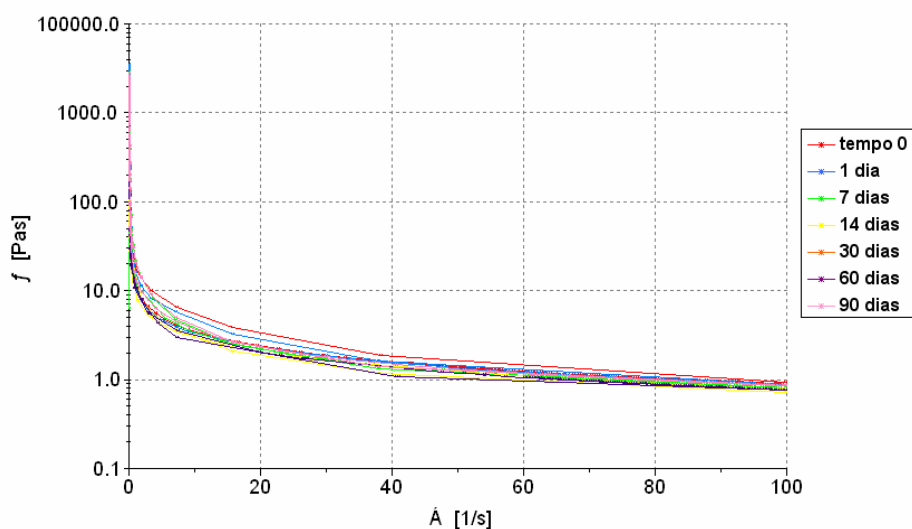


Figura 24. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* mantida em freezer a durante o teste de estabilidade acelerada.

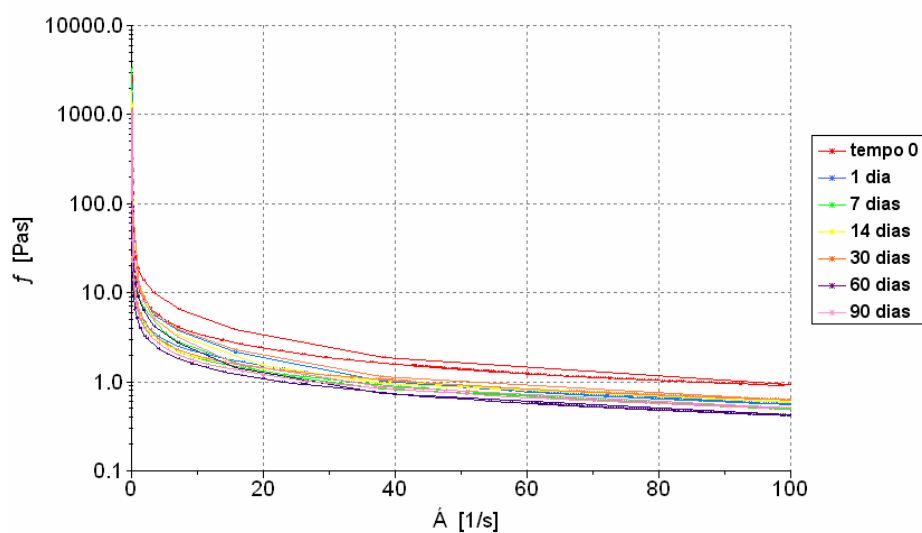


Figura 25. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* mantida em estufa a durante o teste de estabilidade acelerada.

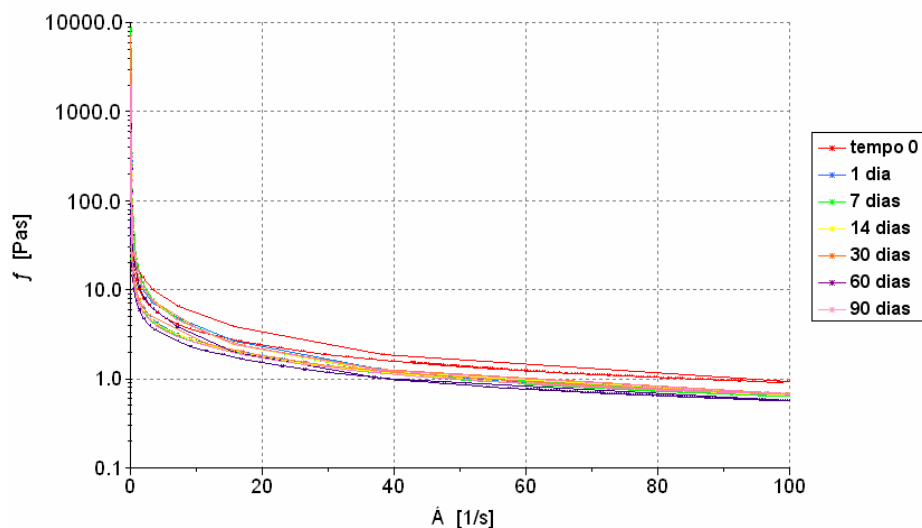


Figura 26. Curvas de viscosidade pela tensão de cisalhamento da amostra de emulsão contendo extrato etanólico absoluto dos frutos de *Dimorphandra mollis* mantida exposta à luz indireta durante o teste de estabilidade acelerada.

5.14.3.1 Doseamento de flavonóides na emulsão contendo extrato etanólico absoluto

Inicialmente, construiu-se a curva analítica para o doseamento de flavonóides, que está representada na Figura 27. Em seguida, obteve-se a equação da reta (Equação III), que relaciona de forma direta o valor de absorvância em 425 nm de uma solução (previamente preparada) com a concentração de flavonóides nela presentes.

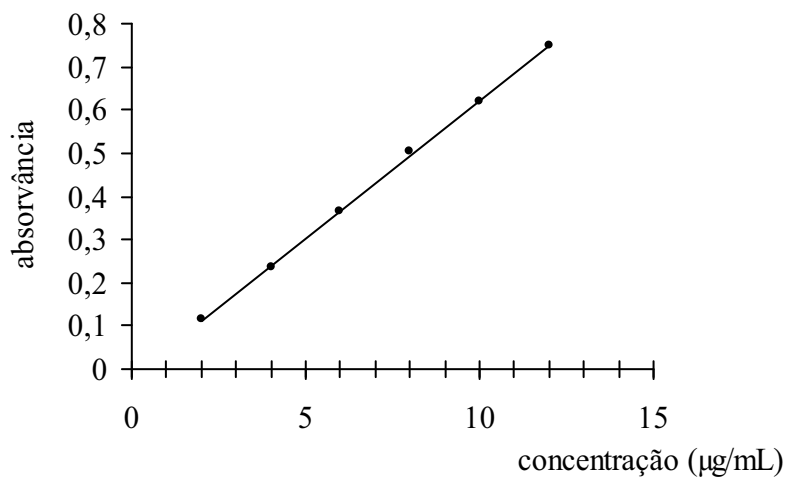


Figura 27. Curva analítica de absorvância da solução padrão de rutina.

Equação IV: $y = 0,0636x - 0,0145$

$$r^2 = 0,9994$$

A partir da equação da reta obtida pela curva analítica, foi calculado o teor de flavonóides presentes na emulsão contendo extrato etanólico absoluto obtido a partir dos frutos de *D. mollis*. Os valores de absorvância foram aplicados na equação da reta substituindo o valor de y e obteve-se o valor x , sendo a concentração em $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi multiplicada por 125 (fator de diluição) para obter o valor de miligramas de flavonóides por grama de extrato. A Tabela 14 e a Figura 28 apresentam a variação do teor de flavonóides nas amostras da emulsão contendo o extrato, sob condições de estresse, desde o dia zero até 90º dia.

Tabela 14. Média, desvio padrão e variação do teor de flavonóides das amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

Dia	Condição														
	ambiente			estufa			geladeira			freezer			luz		
	média	desvio	variação	média	desvio	variação	média	desvio	variação	média	desvio	variação	média	desvio	variação
padrão	(%)	(%)	padrão	(%)	(%)	padrão	(%)	(%)	padrão	(%)	(%)	padrão	(%)	(%)	(%)
0	0,496	0,017	0,00	0,496	0,017	0,00	0,496	0,017	0,00	0,496	0,017	0,00	0,496	0,017	0,00
1	0,496	0,023	-0,01	0,495	0,025	-0,30	0,496	0,027	0,00	0,498	0,017	0,30	0,495	0,015	-0,30
7	0,496	0,025	0,00	0,493	0,022	-0,60	0,495	0,020	-0,30	0,495	0,016	-0,30	0,492	0,021	-0,91
14	0,490	0,024	-1,21	0,486	0,023	-2,12	0,492	0,017	-0,91	0,496	0,020	0,00	0,483	0,022	-2,72
21	0,497	0,023	0,12	0,491	0,024	-1,06	0,497	0,030	0,24	0,496	0,037	0,09	0,490	0,031	-1,12
30	0,495	0,031	-0,24	0,485	0,034	-2,21	0,496	0,036	0,09	0,497	0,040	0,15	0,466	0,041	-5,96
45	0,495	0,023	-0,30	0,471	0,035	-4,96	0,495	0,030	-0,15	0,497	0,029	0,15	0,455	0,021	-8,29
60	0,492	0,032	-0,79	0,461	0,025	-7,05	0,494	0,029	-0,39	0,497	0,035	0,12	0,428	0,038	-13,64
75	0,492	0,028	-0,76	0,442	0,033	-10,95	0,495	0,038	-0,30	0,496	0,034	0,00	0,391	0,039	-21,20
90	0,492	0,030	-0,82	0,435	0,027	-12,25	0,494	0,030	-0,33	0,496	0,036	-0,09	0,347	0,036	-30,06

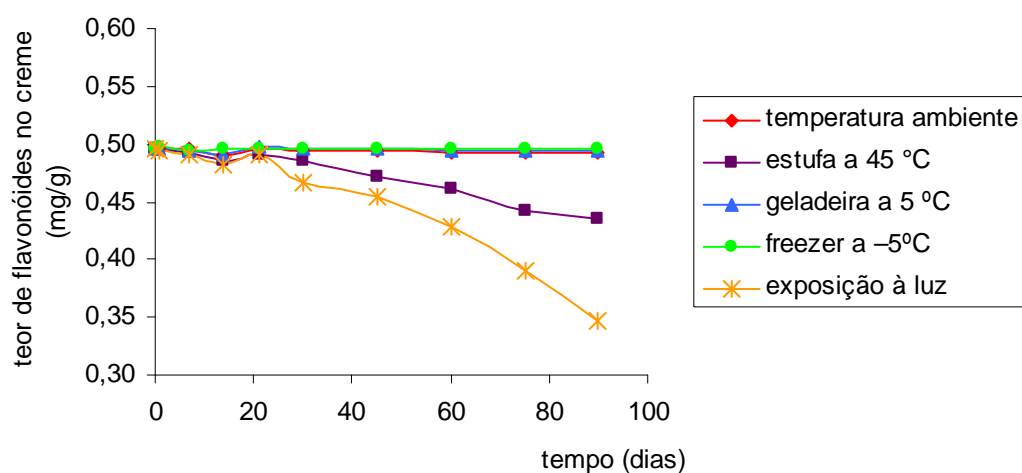


Figura 28. Variação do teor de flavonóides nas amostras da emulsão contendo extrato etanólico absoluto de *Dimorphandra mollis*, submetidas a condições de estresse durante o teste de estabilidade acelerada, representada pela média de três determinações.

Através da análise dos dados pôde-se observar que não houve alteração significativa do teor de flavonóides presentes nas amostras que foram mantidas em temperatura ambiente, em geladeira e em freezer. Isto demonstra que os flavonóides contidos no extrato incorporados na emulsão se mantiveram estáveis e que estas condições de armazenamento não favoreceram a degradação dos flavonóides. Porém, as amostras mantidas em estufa e exposta à luz, tiveram uma redução de mais de 10% no teor de flavonóides. Assim, determinou-se que essas condições favoreceram a degradação do flavonóides, indicando a sensibilidade destes compostos à luz e ao calor e mostrando a necessidade da emulsão ser acondicionada em frasco opaco e em local fresco.

5.15 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA

A avaliação da segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor, o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso (ANVISA, 2003). Com

a finalidade de atender as necessidades de mercado e assegurar a saúde dos consumidores, procurou-se neste estudo avaliar a segurança do produto fitocosmético desenvolvido através do teste de toxicidade dérmica em cobaias. Isto porque estudos de toxicidade pré-clínica são indispensáveis para futuros testes clínicos em seres humanos (ANVISA, 2003).

As reações importantes a serem observadas durante um teste de toxicidade de produtos cosméticos são formação de edema, eritema e escaras (PINTO et al., 2003).

A maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem sua fórmula, principalmente os extratos vegetais. Os extratos vegetais possuem composição química complexa e muitas vezes não conhecida por completo. Assim, eles que podem, diretamente, serem os responsáveis por qualquer efeito sistêmico e por boa parte do risco alergênico. Contudo, a fórmula do produto acabado pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes sendo responsável, também, por possíveis sinergismos, resultantes da associação de ingredientes (ANVISA, 2003). Portanto, justifica-se no trabalho a avaliação da toxicidade do produto acabado, mesmo após avaliação da toxicidade *in vitro* do extrato de *D. mollis*.

Como resultado, nenhum dos animais utilizados no teste de toxicidade dérmica aguda, tanto os do grupo tratado apenas com emulsão base quanto os do grupo tratado com emulsão contendo extrato, apresentou formação de edema ou escara no local da aplicação do produto. Apenas alguns animais apresentaram fraca formação de eritema. Seguindo o Quadro 1, que atribui uma pontuação para cada tipo de resposta observada, foram montadas as Tabelas 15 e 16, que trazem os resultados obtidos com a emulsão base e a emulsão contendo extrato para cada animal.

Respostas da pele	VALOR
FORMAÇÃO DE ERITEMA E ESCARAS	
Sem eritema	0
Eritema muito leve	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Severo eritema (vermelho beterraba) e leve formação de escara (injúrias em profundidade)	4
FORMAÇÃO DE EDEMA	
Sem edema	0
Edema muito leve (pouco perceptível)	1
Edema leve (bordas de área bem definidas, elevação bem definida)	2
Edema moderado (elevação de \cong 1 mm)	3
Edema severo (elevação > 1mm ao redor da área exposta)	4

Quadro 1. Valores de graduações a serem atribuídos às respostas obtidas no teste de irritação primária da pele (teste de toxicidade dérmica aguda). Fonte: PINTO et al., 2003.

Tabela 15. Resultados obtidos no teste de toxicidade dérmica aguda para a emulsão base.

	Leitura (h)	Animal n°					Média
		1	2	3	4	5	
Eritema e Escaras	1	0	0	0	0	1	0,2
	24	0	1	0	0	1	0,4
	76	0	0	0	0	0	0
Edema	1	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	76	0	0	0	0	0	0
						Σ	0,6

Tabela 16. Resultados obtidos no teste de toxicidade dérmica aguda para a emulsão contendo extrato etanólico absoluto de frutos de *Dimorphandra mollis*.

	Leitura (h)	Animal n°					Média
		1	2	3	4	5	
Eritema e Escaras	1	0	1	0	0	0	0,2
	24	1	1	0	0	1	0,6
	76	1	0	0	0	0	0,2
Edema	1	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	76	0	0	0	0	0	0
						Σ	1,0

Os valores de somatória (Σ) são divididos por dois (eritema e edema). De acordo com o valor obtido, as substâncias são classificadas da seguinte maneira (BRITO, 1994):

0,0 – 0,5 = não-irritante

0,6 – 1,0 = irritante leve

1,1 – 2,0 = irritante moderado

2,1 – 3,0 = irritante grave

3,1 – 4,0 = corrosivo

Assim, tanto a emulsão base (valor de 0,3) quanto a emulsão contendo extrato (valor de 0,5) podem ser consideradas não-irritantes. Sete dias após a aplicação da amostra, os animais foram submetidos a novo exame para observação da reversão do efeito irritante provocado pelas emulsões. Nenhum animal, inclusive aqueles que apresentaram reação de eritema leve no início, possuía qualquer tipo de reação eritematosa ou edematosa, o que significa que as amostras não possuem efeito irritante tardio e que as reações de edema formadas no início da experimentação são reversíveis.

O teste de aplicação única é valioso devido a sua eficiência e relativa qualidade de informações. É capaz de detectar irritantes fortes e moderados e seu valor básico consiste em identificar produtos potencialmente irritantes (PINTO et al., 2003). No entanto, uma vez que não existe extrapolação precisa para humanos dos modelos animais (FERREIRA et al., 2005), os resultados obtidos devem ser indicativos, mas ainda não conclusivos.

No caso de irritantes fortes ou moderados, a única aplicação usada neste teste é usualmente suficiente para promover a resposta. Porém, com irritantes fracos este teste tem falhado algumas vezes em predizer a toxicidade a humanos (PINTO et al., 2003). Por isso, podemos afirmar que os produtos testados não são irritantes e tóxicos para cobaias nas condições em que foram testadas. Estudos com outras espécies animais podem reforçar a validade da extrapolação desses estudos para seres humanos (BRITO, 1994). Este resultado é promissor e permite que o produto seja, então, aprovado para futuros testes de eficácia e segurança. Entretanto, nenhuma conclusão pode ser feita sobre o produto quanto a sua toxicidade em humanos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir o extrato etanólico absoluto obtido a partir dos frutos de *Dimorphandra mollis* apresenta potencial para ser utilizado em formulação fitocosmética, pelas propriedades físicas, químicas e biológicas apresentadas. Outras conclusões parciais foram:

- Confirmação botânica da espécie vegetal coletada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara- SP pelo Herbário do Instituto de Biociências da UNESP- Rio Claro- SP;
- As análises quali e quantitativas de autenticidade e pureza demonstraram que o material vegetal encontra-se dentro dos parâmetros de qualidade pré-estabelecidos para drogas vegetais, quando comparados com dados Farmacopeicos e não Farmacopeicos;
- Através de espectrofotometria de em ultravioleta, reações químicas de caracterização e Cromatografia em Camada Delgada, foi confirmada a presença dos flavonóides rutina e quercetina nos extratos e frutos de *D. mollis*.
- O extrato etanólico absoluto foi o que apresentou maior teor de flavonóides totais, sendo, portanto, selecionado para os demais testes e incorporação na formulação fitocosmética;
- Através da técnica de CLAE-UV-DAD, confirmou-se a presença de rutina e quercetina no extrato etanólico absoluto;
- O controle de qualidade microbiológico do extrato etanólico absoluto permitiu sua aprovação, uma vez que os resultados encontram-se dentro dos limites do número de microrganismos pré-estabelecido pela OMS e mostrou ausência dos microrganismos patogênicos;
- Pela avaliação *in vitro* do extrato sobre o radical ABTS^{•+} e sobre o radical DPPH, verificou-se o grande potencial do extrato estudado como fonte de compostos com ação antioxidante e anti-radical.

- O extrato etanólico absoluto obtido a partir dos frutos de *D. mollis* apresentou Índice de Citotoxicidade 50% (IC₅₀) de 495,6 µg/mL, valor intermediário ao IC₅₀ da rutina e ao IC₅₀ da quercetina;
- A emulsão contendo extrato também mostrou ausência dos microrganismos patogênicos e número de bactérias e fungos dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA;
- A emulsão não apresentou separação de fases no teste de centrifugação e no estudo de estabilidade preliminar observou-se que as amostras submetidas a condições de estresse por 15 dias mostraram-se estáveis quanto aos caracteres organolépticos e físico-químicos. No estudo de estabilidade acelerada, as amostras submetidas a condições de estresse por 90 dias permaneceram estáveis quanto aos caracteres organolépticos, pH, densidade e viscosidade. Os flavonóides do extrato de *D. mollis* contido na emulsão são instáveis quando exposto à luz e mantido em estufa a 45 °C.
- Tanto a emulsão base quanto a emulsão contendo o extrato não foram considerados irritantes segundo o teste de toxicidade dérmica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; SILVA, M.G. Plantas medicinais usadas como cosméticos na Paraíba (Brasil) e na literatura. **Rev. Bras. Farm.**, v. 74, n. 2, p.42-44, 1993.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, S.M.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J. **Cerrado: espécies úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**. 3 ed. Buenos Aires: Isis, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Séries temáticas: Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 jul. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Séries temáticas: Guia de Estabilidade de Cosméticos. v. 1., 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 jul. 2008.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox. Rep.**, v.5, p.365-370, 2000.

ARORA, R.; NAIR, M.G.; TRASBURG, G.M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

ASHA, K.N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C.M.; RASHID, M.A. Antibacterial activity and cytotoxicity of extractives from *Uvaria hamiltonii* stem bark. **Fitoterapia**, v.74, p.159-163, 2003.

BAZZANO, L.A.; HE, J.; OGDEN, L.G.; LORIA, C.M.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P.K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 93-99, 2002.

BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-430, 2002.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**. v.181, p.1199-1200, 1958 .

BOADI, W.Y.; IYERE, P.A.; ADUNYAH, S.E. Effect of quercetin and genistein on copper- and iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate. **J. Appl. Toxicol.**, v. 23, n. 5, p. 363-369, 2003.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzimol.**, v. 186, p. 343-355, 1990.

BORS, W.; MICHEL, C.; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, n. 1, p. 45-52, 1995.

BRANDÃO, M. Plantas produtoras de tanino nos cerrados mineiros. **Inf. Agropecuário**, v. 16, p. 33-35, 1992.

BRASIL. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRITISH Pharmacopeia. London, Her Majesty's Stationary Office, 2001.

BRITO, A.S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Unicamp, 1994.

BUCKBERRY, L. D. Citotoxicity testing using cell lines. In: JENKINS, N. **Animal cell biotechnology: methods and protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999. p. 239-252.

CALDEIRA JÚNIOR, C.F.; SANTOS, A.M.; PAULA, T.O.M.; ALVES D.S.; BONFIN, F.P.G.; FERNANDES, L.A.; MARTINS, E.R. Absorção de alumínio, fósforo, cálcio e magnésio por *Dimorphandra mollis* Benth. **Rev. Bras. Biociênc.**, v. 5, supl. 2, p. 555-557, 2007.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radic. Bio. Med.**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CASAGRANDE, R. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina : controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005. 229f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CHAVES, M.M.F.; USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; VIEIRA, P.C. e SILVA, F.G.F. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to Workers of *Apis mellifera*. **J. Braz.Chem. Soc.**, v. 13, n. 1, p.115-118, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1995. 279 p.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review article: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, v.1.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. v. III. 5 ed. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DOBEREINER, J. TOKARNIA, C.H. Experimental poisoning in cattle by pods of *Dimorphandra gardneriana* (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 5, n. 2, p. 47-52, 1985.

DRAELOS, Z. D. **Cosmecêuticos**. São Paulo: Elsevier, 2005. 264 p.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.Q. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 82, p. 377-389, 1944

DUGAS, A.J.; CASTAÑEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G.C.; PRICE, K.L.; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 327-331, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2000.

FERES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 450-456, 2006.

FERREIRA, R.A.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C. e MALAVASI, M.M. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 24, n. 3, p.303-309, 2001.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, v.20, supl.2, p. 28-34, 2005.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

FRANCO, S. L. Própolis: otimização do processo extrativo, desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2001. 152f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FRANCO, T.T.; RODRIGUES, N.R.; SERRA, G.E.; PANEGASSI, V.R.; BUCKERIDGE, M.S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, v. 680, p. 255-261, 1996.

FREIRE, C. M. M.; ORTIZ, M.; MARQUES, M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, p. 161-166, 2006.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GUNN, C.R. Seed topography in the Fabaceae. **Seed Sci. Technol.**, v. 9, p. 737-757, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1989.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 845-850, 1994.

HARAGUCHI, H. Antioxidative plant constituents. In: TRINGALI, C. (Ed.) **Bioactive compounds from natural sources**. London: Taylor & Francis, 2001. p. 228-245.

HARAGUCHI, H.; ISHIKAWA, H.; MIZUTANI, K.; TAMURA, Y.; KINOSHITA, T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalaconen in *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 6, p. 339-347, 1998.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HERMANSEN, L.A.; DURYEAM.L.; WEST, S.H.; WHITE, T. L.; MALAVASI, M.M. Pretreatments to overcome seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Sci. Technol.**, v. 28, n. 3, p. 581-595, 2000.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet.**, v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HIRANO, R.; SASAMOTO, W.; MATSUMOTO, A.; ITAKURA, H.; IGARASHI, O.; KONDO, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 47, n. 5, p. 357-362, 2001.

INGRAM, D.; SANDERS, K.; KOLYBABA, M.; LOPEZ, D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. **Lancet.**, v. 983, p. 990-994, 1997.

KAUFFMANN-SAMARAS, A. **Les parfums dans la civilisation grecque**. Paris: Museum National d'Histoire Naturelle, 1987.

KNEKT, L.G.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, M.; HELLOVAARA, L.; TEPPONEN, E.; PUKKALA, A.; AROMA, A. Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, n. 3, p. 223-230, 1997.

KORKINA, L.G.; AFANAS'EV, I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In: SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 151-179.

KRIS-ETHERTON, P.M.; KEEN, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, n. 1, p. 41-49, 2002.

LAUGHTON, M.J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P.J.; HOULT, J.R. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 17, p. 2859-2865, 1989.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRS Press, 2000.

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

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOURENÇO, M.V. Estudo da produção de flavonóides em cultura de tecidos de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 1995. 67f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.G.; MACHADO, O.L.T.; MANGARONI, S.; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 553-558, 2000.

MACEDO, M.L.R.; MELLO, G.C.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MATOS, D.G.G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, n.10, p.891-898, 2002.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, L.V.; MARTINS, G.T.; OLIVEIRA, D.A.; PIMENTA, M.A.S. Prospecção fitoquímica preliminar de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae). **Rev. Bras. Biociênc.**, v. 5, supl. 2, p. 828-830, 2007.

MATHIAS, M. C. **Les parfums em Inde du Nord**. Paris: Museum Nayional d'Histoire Naturelle. 256p., 1987.

MELLO, G.C. Estudo dos papeis biologicos de dois inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth.: atividades inseticida e inflamatória. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 158 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

MELLO, G.C.; OLIVA, M.L.V.; SUMIKAWAJ.T.; MACHADO, L.T. MARANGONI, S.; NOVELLO J.P.; MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 3, p. 625-632, 2001.

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

MIDDLETON, E.J.R.; KANDASWAMI, C.H. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBONE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1994. p.519-536.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A., SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skells. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora Unesp, 1996. p. 69-86.

MIYAMARU, L.L.; SANTA BÁRBARA, M.C.; IHA, M.H.; TEIXEIRA, D.A.; ZENEBO, O. Determinação do teor do princípio ativo e avaliação da inocuidade dérmica e ocular de produtos para o tratamento de ectoparasitoses contendo lindano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p.159-162, 2001.

MODAK, B.; CONTRERAS, M.L.; GONZÁLES-NILO, F.; TORRES, R. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.15, n.2, p.309-312, 2005.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chem.**, v. 92, p. 349-355, 2005.

MURILLO, J.I.; ENCARNACIÓN-DIMAYUGA, R.; MALMSTROM, J., CHRISTOPHERSEN, C.; FRANZBLAU, S. G. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. **Fitoterapia**, v.74, p.226-230, 2003.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. p. 183-207.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y., NOGUSHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, v. 338, p. 668-676, 2005.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTONS, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for testing of chemicals: Acute Dermal Toxicity – Fixed dose procedure**. Paris: OECD, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. e AKISSUE, M. K. **Farmacognosia: curso de identificação de drogas vegetais**. São Paulo: Atheneu, p.176-179, 1991.

OLIVEIRA, L.C.; BLOISE, M.I. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. **Cosmet. Toilet.**, v. 7, p. 30-37, 1995.

PAULA, T.O.M.; SANTO, A.M.; VALADARES, S.V.; CALDEIRA JUNIOR, C.F.; FERNANDES, L.A.; MARTINS, E.R.; ALVES, D.S. Influência do silicato no crescimento inicial e produção de flavonóides totais em *Dimorphandra mollis* Benth. **Rev. Bras. Biociênc.**, v. 5, supl. 2, p. 552-554, 2007.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PENEGASSI, V.R.; SERRA, G.E.; BUCKERIDGE, M.S. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 3, p. 406-415, 2000.

PEREIRA, L.G.B.; PETACCI, F.; FERNANDES, J.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.; MALASPINA, O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest. Manag. Sci.**, v. 58, n.5, p. 503-507, 2002.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

POGGIANI, F. Efeitos de alguns nutrientes sobre o crescimento inicial de duas espécies arbóreas do cerrado. **IPEF**, v. 8, p. 3-12, 1974.

RANGEL, V. L. B. I. Desenvolvimento, estabilidade e liberação in vitro de preparações lipolíticas. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998, 138f. Tese (Doutorado FÁrmacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

REPETTO, M.G.; LIESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p.523-534, 2002.

REZK, B.M.; HAENEN, G.R.M.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, v. 295, p. 9-13, 2002.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. And Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v.2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C.A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1998.

ROCHA FILHO, P.A. Fitocosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 7, p. 18-20, 1995.

RODRIGUES, H.G. DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H., NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 3, p.315-320, 2003.

SAHNOUN, Z.; JAMOUCSI, K.; ZEGHAL, K.M. Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects. **Therapie**, v. 53, n. 4, p. 315-339, 1998.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.; GRACE, S.; YMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67-80, 2002.

SANTOS, F.C.C.; FISCHER, P.; FCHTNER, S.S.; SANTOS, E.E.; VEIGA, L.S. Efeitos experimentais negativos da fava de “faveira”, *Dimorphandra mollis* Benth., como causa de aborto em bovinos. **Pesq. Agropec. Tropical**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 1975.

SANTOS, F.C.C. Intoxicação experimental de bovinos pela "faveira" *Dimorphandra mollis* Benth.. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1973. 111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, S.C.; COSTA W.F.; RIBEIRO, J.P.; GUIMARÃES, D.O.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; SERAPHIN, J.C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.

SANTOS, V.A.F.F.M. Avaliação da capacidade antioxidante e possíveis associações sinérgicas de substâncias fenólicas em *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006. 150f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R.J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, n. 5, p. 861-880, 2002.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4 ed. Barueri: Manole, 2002.

SILVA, C.C.A.; MIRANDA, E.M.; OLIVEIRA, I.G. Desenvolvimento de Fitoderivados oriundos da espécie *Dimorphandra mollis*. **Rev. Iniciação Científica**, Newton Paiva. v. 3, p. 225-234. 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007. 833p.

SIQUEIRA, V.L. Estratégias de proteção microbiológica de cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 16, p. 100-104, 2004.

SOARES, J.R.; DINIS, T.C.; CUNHA, A.P.; ALMEIDA, L.M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radic. Res.**, v. 26. p. 469-478, 1997.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. Universidade UFSC, 2007. p.577-611.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **C. R. Biol.**, v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVETRO, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1991.

SOUZA, T. M. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J. THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 155-161, 2004.

TEIXEIRA, S.; SIQUET, C.; ALVES, C.; BOAL, I.; MARQUES, M.P.; BORGES, F.; LIMA, J.L.; REIS, S. Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 39, n. 8, p. 1099-1108, 2005.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2002. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; MORAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, n. 5, p. 547-553, 1994.

UNITED States Pharmacopeia. 26th ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2003.

VAN ACKER, F.A.A.; SCHOUTEN, O.; HAENEN, G.R.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. **FEBS Lett.**, v. 473, p. 145-148, 2000.

VAN ACKER, S.A.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAYA, J.; MAHMOOD, S.; GOLDBLUM, A.; AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; SALAN, A.; MUSA, M.; TAMIR, S. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. **Phytochemistry**, v. 62, p. 89-99, 2003.

VELLOSA, JCR. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 1, p. 137-144, 2004

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. p. 155-182.

VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, v. 51, n. 10, p. 2515-20, 1991.

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

YILMAZ, Y; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 2, p. 255-260, 2004.

YOUDIM, K.A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, A.J. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n.11, p. 1683-1693, 2004.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1996. 384p.

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

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal**. São Paulo: Argos, 2001. p. 317-346.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Universidade UFSC, 2007. p.577-611.

8. ANEXO



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 06/2007 – Animais em Pesquisa

Interessado: SILVIANE ZANNI HUBINGER

Orientador: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

Título do Projeto: Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante a partir de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth (Leguminosae)

Parecer nº 22/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante a partir de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth (Leguminosae)", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 22 de junho de 2007.

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP