

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade
Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional

WO 2011/038472 A1

(43) Data de Publicação Internacional
7 de Abril de 2011 (07.04.2011)

PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61Q 19/08 (2006.01) *A61K 8/97* (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2010/000321

(22) Data do Depósito Internacional :
30 de Setembro de 2010 (30.09.2010)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
09 56806 30 de Setembro de 2009 (30.09.2009) FR

(71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : **NATURE COSMÉTICOS S.A.** [BR/BR]; Rodovia Régis Bittencourt, Km 293, 06882-700 Itapeverica da Serra - SP (BR). **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"** [BR/BR]; Rua Quirino de Andrade, 215 - Centro, 01049-010 - São Paulo - SP (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : **CAVALHEIRO, Alberto José** [BR/BR]; Rua Primo Torquato, 292, Araraquara - SP (BR). **SIQUEIRA SILVA, Dulce Helena** [BR/BR]; Av. João Sedenho, 377, Araraquara - SP (BR). **SILVA BOLZANI, Vanderlan Da** [BR/BR]; Av. Pedro Aranha do Amaral, 437 - São José, Araraquara - SP (BR). **CASTRO-GAMBOA, Ian** [BR/BR]; Rua Humaitá, 1740, Apt°. 46, Araraquara - SP (BR). **ARAÚJO, Adelson José De** [BR/BR]; Rua Domingos Sávio, 37, Bairro Santo Antônio, 79100-530, Campo Grande - MS (BR). **FUSCELLI PYTEL, Rodrigo** [BR/BR]; Rua Corinto, 521 Apto 104-A, Vila Indiana, 05530-050 - São Paulo - SP (BR). **GESZTESI, Jean-Luc** [BR/BR]; Rua Apinagés, 930, Apto. 147, 05017-000-São Paulo - SP (BR). **HURTADO MEDINA, Sandra Patrícia** [BR/BR]; Rua Herculano de Freitas 237, Apto. 125, São Paulo - SP (BR). **DI MAMBRO, Veléria**

Maria [BR/BR]; Rua Cerro Corá, 199, Apt° 62, Vila Romana, 05061-050 - São Paulo - Sp (BR). **NAKAMURA, Mary Sanae** [BR/BR]; Rua Juréia, 200-Apto 92, São Paulo - SP (BR).

(74) Mandatário : **DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA**; Caixa Postal 2142, Rua Marquês de Olinda, 70, 22251-040 - Rio de Janeiro - RJ (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de recepção de tais modificações (Regra 48.2(h))

(54) Title : STANDARDIZED PLANT EXTRACT, METHOD FOR PREPARING AN EXTRACT FROM PLANTS OF THE *SCLEROLOBIUM* GENUS, COSMETIC COMPOSITION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE OF SAID EXTRACT

(54) Título : ESTRATO VEGETAL PADRONIZADO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE PLANTAS DO GÊNERO *SCLEROLOBIUM*, COMPOSIÇÃO COSMÉTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DO REFERIDO EXTRATO

(57) Abstract : Extracts of plants of the *Sclerolobium* genus are disclosed, as well as methods for preparing same and cosmetic and pharmaceutical formulations containing these extracts. These extracts can be obtained by polar and/or apolar extraction, each fraction containing different anti-oxidants, all of which are useful for topical treatment. Also disclosed is the use of this extract in cosmetic and/or pharmaceutical formulations for topical use.

(57) Resumo : A presente invenção revela extratos de plantas pertencentes ao gênero *sclerolobium*, a processos para sua obtenção e a formulações cosmética e farmacêuticas contendo tais extratos. Tais extratos podem ser obtidos através de extrações polares e/ou apolares, cada fração contendo diferentes antioxidantes, todos úteis no tratamento tópico. É ainda revelado o uso desse extrato em formulações cosméticas e/ou farmacêuticas para uso tópico.

WO 2011/038472 A1

Relatório Descritivo de Patente de Invenção para "EXTRATO VEGETAL PADRONIZADO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE PLANTAS DO GÊNERO *SCLEROLOBIMUM*, COMPOSIÇÃO COSMÉTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DO REFERIDO EXTRATO".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para preparação de extratos obtidos de plantas do gênero *Sclerolobium* e da utilização destes extratos como antioxidantes e para atividade antienvhecimento em composições cosméticas e farmacêuticas.

Antecedentes da invenção

A pele é talvez o órgão do corpo humano mais exposto ao estresse oxidativo, incluindo fontes endógenas (enzimas, células, processos patológicos e doenças) e fontes exógenas (poluentes, gases atmosféricos, radiação e diversas substâncias químicas) de espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem radicais superóxido, radicais de óxido nítrico e oxigênio singlete. Injúria oxidativa em componentes da pele como lipídeos, DNA e proteínas podem interferir significativamente nas funções normais da pele, além de induzir processos patológicos como inflamação e câncer.

Os mecanismos mais específicos de defesa da pele contra o estresse oxidativo incluem enzimas de atuação direta (SOD, catalase, peroxidases) e de suporte (G6PD, xantina oxidase) e moléculas antioxidantes de baixo peso molecular de atuação indireta (agentes quelantes) ou de ação direta (agentes sequestradores de radicais livres). Estes últimos incluem substâncias sintetizadas pelas células (GSH, NADH, carnosina) e substâncias obtidas de fontes alimentares (carotenos, tocoferóis, polifenóis, ácidos ascórbico e lipóico, etc.). Apesar do mecanismo sequestrador de radicais livres ser efetivo somente em altas concentrações relativas dos sequestradores de radicais, suficientes para competir com os alvos biológicos em relação às espécies deletérias, ele ainda possui várias vantagens em relação ao sistema de defesa oxidativo enzimático (KOHEN et al 1999).

Estudos têm demonstrado que a epiderme tem atividade antioxi-

dante muito maior que a derme, indicando que a epiderme é muito mais susceptível ao estresse oxidativo que a derme. Foi demonstrado que em decorrência do envelhecimento da pele, ocorre uma diminuição significativa no poder redutor dos antioxidantes de baixo peso molecular da pele (KOHEN 5 1999). Assim, durante o processo de envelhecimento, é desejável que seja adicionado topicamente, substâncias contendo agentes antioxidantes a fim de restaurar, ou aumentar a concentração local dos antioxidantes no tecido cutâneo.

Agentes antioxidantes podem ser supridos pela alimentação 10 sendo encontrado em alimentos de origem vegetal como, o tomate, a melancia, a beterraba, o pimentão, a cenoura, a acerola, o mamão papaia, a laranja, o limão, o melão, o brócolis, o morango, a manga, o kiwi, a couve, a ervilha, o caju, as nozes, a avelã, a batata doce, a aveia, o abacate, os cereais integrais, a abóbora, o repolho, o espinafre, o agrião, o chá, o alecrim, o to- 15 milho, bem como de origem animal como, por exemplo, da carne, dos ovos, do leite, do peixe, das ostras, das aves e dos mariscos. Podem também ser fornecidos por suplementação alimentar.

Entretanto, sabe-se que nas etapas de absorção, solubilidade e transporte dos agentes antioxidantes ocorre uma perda significativa dessas 20 substâncias, fazendo com que apenas uma reduzida quantidade dessas substâncias efetivamente chegue à pele. A aplicação tópica, tem a vantagem de possibilitar a concentração de agentes antioxidantes na região da pele em que há maior necessidade de proteção.

No entanto, a viabilização de uma formulação contendo agentes 25 antioxidantes visando à aplicação tópica requer a transposição de alguns obstáculos, como por exemplo, a instabilidade da molécula. A instabilidade da molécula, evita a obtenção de uma formulação cosmética estável e apropriada para consumo. Além disso, muitas dessas substâncias são intensamente coloridas, restringindo as características estéticas do produto.

30 Finalmente, os antioxidantes precisam ter também efeitos fotoprotetores incluindo redução de eritema, redução de formação de "sunburn cell", redução de danos no DNA como ocorrência de dímeros de timina ou

nucleotídeos oxidados, redução da imunossupressão por UV, redução de anomalias pigmentares e, eventualmente, redução de câncer de pele e foto-envelhecimento (Pinnell, et al. 2003).

Portanto, agentes antioxidantes capazes de remover ROS ou de
5 inibir a peroxidação lipídica podem ser efetivamente utilizados na proteção ou tratamento de patologias relacionadas às espécies de radicais livres de oxigênio e para prevenir o envelhecimento (ou os sintomas de envelhecimento cutâneo).

Substâncias antioxidantes podem também ser obtidas a partir de
10 vegetais não utilizados na alimentação humana, como já documentado nas patentes US 2003/0170332 e WO 2004/009575, sendo obtidos a partir espécies da família Pinaceae (US 2003/0170332), da família Typhaceae (WO 2004/009575).

Não há registro de substâncias antioxidantes obtidas a partir de
15 espécies do gênero *Sclerolobium spp* da família *Leguminosae*, com exceção de estudos conduzidos pelos requerentes do presente pedido.

O gênero *Sclerolobium spp* pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinioideae* compreende as espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* que são arbóreas. A espécie *S. aureum*, também conhecida como fede-fede, gonçalo-do-campo e pau-bosta, tem porte médio,
20 casca áspera e descamante, clara, ramos jovens pubescentes; folhas alternas, compostas imparipinadas, com 5 a 9 folíolos opostos ou subopostos, ovais e oblongos, base obtusa a arredondada, ápice agudo a arredondado, com cerca de 7 cm de comprimento e 3,5 cm de largura, glabros a pubescentes. Suas flores são amarelo-ouro, aromáticas, dispostas em panículas
25 terminais amplas. Seus frutos são do tipo vagem oblonga, achatada, indeiscente. A espécie *S. paniculatum*, também conhecida como taxi-branco, carvoeiro e passariúva, é uma árvore de grande porte, tronco ereto, casca esbranquiçada, áspera a estriada em árvores jovens, fendilhada em árvores
30 mais velhas, ramos jovens pubérulos; folhas alternas, compostas imparipinadas, com 4 a 8 pares de folíolos glabros ou com pêlos claros esparsos na face inferior, oblongos, base arredondada a obtusa, levemente inequilátera,

ápice acuminado, com cerca de 7 a 3 cm de largura. Possui flores amarelo-esverdeadas, pequenas, dispostas em panículas terminais e fruto tipo vagem plana elipsóide (DURINGAN, et al. 2004).

As três espécies citadas ocorrem no Brasil: *S. aureum* ocorre em
5 áreas de cerrado típico e em cerradão. *S. paniculatum* ocorre na Amazônia, mas também está bem distribuída por todo o território brasileiro, em diferentes tipos de solo. Esta é uma espécie potencial para a recuperação de solos degradados e enriquecimento de capoeiras (DIAS et al 1991). Em plantios, apresenta crescimento rápido, elevada produção de liteira e capacidade de
10 associar-se com bactérias do gênero *Rhizobium*, fixadoras de N₂ potencial. *S. denudatum* é árvore endêmica da Mata Atlântica, mais frequentemente encontrada nas áreas de floresta ombrófila densa, embora atualmente rara.

Esqualeno é usado como ingrediente em formulações cosméticas por suas propriedades fotoprotetoras (HE et al 2002). O α -tocoferol (vitamina E) é um dos antioxidantes naturais mais importantes, principalmente
15 por seu efeito inibidor da peroxidação lipídica (KATSANDIS et al 1999). Administração tópica de lupeol numa dose de 1-2 mg/rato preveniu a formação e crescimento de um modelo de câncer induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (SALEEM et al 2004). Foi também de-
20 monstrado que lupeol recupera danos em fragmentos de carboidratos de DNA, causados por radicais livres, sendo também capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica microsomal induzida por ascorbato de ferro *in vitro* (SULTANA et al 2003). A administração de lupeol por 10 dias, em doses de 40-80 mg/kg de massa corpórea do animal, resultou em diminuição
25 nos teores de uréia e creatinina no sangue e diminuição da peroxidação lipídica. Simultaneamente, um aumento no conteúdo de glutatona no sangue e da atividade da catalase sob as condições de nefrotoxicidade induzida por cisplatina também foi observada (SHIRWAIKAI et al 2004). Esses dados possibilitam relacionar lupeol como um antioxidante efetivo com efeito quimi-
30 oprotetor (TOLSTIKOVA et al 2006). Lupeol inibe a peroxidação lipídica induzida por sais de cobre (ANDRIKOPOULOS et al 2003) Lupeol possui também atividade antiinflamatória, por interferir na biossíntese de prostaglandi-

nas, inibindo a síntese de PGE2 (RAMIREZ-APAN et al 2004, REYES et al 2006). Lupenona possui significativa atividade inibitória em vírus herpes simplex HSV-1 e HSV-2 e também em vírus da febre suína africana (ASFV) (MADUREIRA et al 2003). Atividades antifúngica (*Saccharomyces cerevisiae* e *Microsporum gypseum*), bactericida (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e anti-oxidante (inibição da peroxidação lipídica) da lupenona foram relatadas (KIM et al 2001).

Flavonóides, mais especificamente aqueles contendo unidades catecólicas (*orto*-diidroxifenilas) em sua estrutura química, como os derivados de quercetina e aqueles contendo unidades de pirogalol (1,2,3-triidroxifenilas), como os derivados de miricetina, podem atuar como micromoléculas antioxidantes tanto na supressão de espécies de oxigênio reativas através da inibição de enzimas e da quelação de elementos traços, ambos envolvidos na produção de radicais livres; como no seqüestro de espécies de oxigênio reativas e também na indução e proteção das defesas antioxidantes (PIETTA 2000). Mais especificamente, tem sido demonstrado que flavonóides inibem enzimas responsáveis pela produção de ânions superóxidos, como xantina oxidase e proteína C quinase. Flavonóides inibem também ciclooxygenases, lipoperoxidases, monooxygenases mitocondriais, glutathione-S-transferase, succiniloxidase mitocondrial e NADH oxigenase, todas envolvidas na formação de espécies de oxigênio reativas (URSINI et al 1994, BROWN et al 1998). Flavonóides quelam eficientemente metais traços, como ferro e cobre, que desempenham papel importante na formação de espécies reativas de oxigênio, sendo que a presença de unidades catecol, pirogalol e dos grupos 4-oxo juntamente com 5-hidróxi são fundamentais para a eficiência dessa quelação. De forma complementar, devido ao baixo potencial redox destas substâncias ($0,23 < E_7 < 0,75$ V), os flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres altamente oxidados, com potencial redox entre 2,13 – 1,0 V, tais como radicais superóxido, peroxila, alcóxila e hidroxila, através da doação de hidrogênio radicalar (BUETTNER 1993; ROBAK, & GRYGLEWISKI 1988; HUSSAIN et al 1987; TOREL

et al 1986).

A literatura patentária menciona o uso de *Sclerolobium spp* em 2 documentos, WO 00/03749 e WO 00/03748. Em ambos, este gênero é sugerido como fonte de triterpenos utilizados em processos de regulação de crescimento de cabelo.

Portanto, não há registro do uso de *Sclerolobium spp* como fonte de agentes antioxidantes.

Sumário da invenção

A presente invenção se refere a um processo de extração caracterizado por compreender as etapas de:

- a) contactar o material vegetal escolhido de plantas pertencentes ao gênero *Sclerolobium* com, pelo menos, um solvente de extração adequado;
- b) agitar a mistura; e
- c) separar a fase líquida da fase sólida.

É um objeto da presente invenção o uso de plantas do gênero *Sclerolobium spp* na obtenção de substâncias antioxidantes e/ou antiinflamatórias.

É também objeto da presente invenção, proporcionar um processo de obtenção de extratos vegetais orgânicos e hidro-alcoólicos a partir de extratos vegetais de *Sclerolobium spp*.

Mais particularmente a presente invenção refere-se a um processo para preparação de um extrato de plantas do gênero *Sclerolobium* compreendendo as etapas de submeter folhas de plantas de *Sclerolobium* a uma extração com hexano para obtenção de um extrato contendo componentes lipofílicos.

Ainda mais particularmente a presente invenção refere-se a um processo para preparação de um extrato de plantas do gênero *Sclerolobium* compreendendo as etapas de:

- a) submeter folhas de plantas de *Sclerolobium* a uma extração com hexano para obtenção de um extrato contendo componentes lipofílicos;
- b) submeter o resíduo obtido em (a) a uma extração com uma

solução aquosa de etanol para obtenção de um extrato hidroalcoólico contendo componentes hidrofílicos.

De uma forma ainda mais particular a presente invenção refere-se a um processo para preparação de um extrato de plantas do gênero *Sclerolobium* compreendendo as etapas de:

- a) submeter folhas de plantas de *Sclerolobium* a uma extração com hexano para obtenção de um extrato contendo componentes lipofílicos;
- b) submeter o resíduo obtido em (a) a uma extração com uma solução aquosa de etanol para obtenção de um extrato hidroalcoólico contendo componentes hidrofílicos;
- c) misturar os extratos obtidos em (a) e em (b) obtendo-se um extrato único contendo tanto frações enriquecidas com componentes lipofílicos quanto frações enriquecidas com componentes hidrofílicos.

O exemplo de tecido vegetal inclui, mas não se limita às folhas da espécie de *Sclerolobium spp.*

Breve descrição das figuras

A **Figura 1** mostra diagramas esquemáticos que demonstram os procedimentos utilizados para a obtenção das substâncias antioxidantes e das frações antioxidantes lipofílica (FAL) originada do extrato orgânico e hidrofílica (FAH) originada do extrato hidro-alcoólico, a partir de folhas de espécies de *Sclerolobium spp.* PE-DVB: poliestireno-divinilbenzeno.

A **Figura 2** mostra as substâncias antioxidantes presentes nos extratos e frações antioxidantes (FAH e FAL) de *Sclerolobium paniculatum*, *Sclerolobium aureum* e *Sclerolobium denudatum*: α -tocoferol (1), esqualeno (2), lupeol (3), lupenona (4), miricetina-3-O-galactopiranosídeo (5), miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (6), quercetina-3-O-galactopiranosídeo (7), quercetina-3-O-arabinopiranosídeo (8), quercetina-3-O-ramnopiranosídeo (9), miricetina-3-O-(3"-galoil-ramnopiranosídeo) (10), miricetina-3-O-(2"-galoil-ramnopiranosídeo) (11).

A **Figura 3** mostra os cromatogramas obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa dos extratos orgânicos de *Sclerolobium aureum* (A), de *Sclerolobium denudatum* (B), de *Sclerolobium panicu-*

latum (C) e de agentes antioxidantes (D) utilizados como padrão: γ -tocoferol (11,01 min), lupenona (11,96 min) α -tocoferol (12,75 min) e esqualeno (20,19 min).

5 A **Figura 4** mostra os cromatogramas obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa dos extratos hidro-alcoólicos de *Sclerolobium aureum* (A), de *Sclerolobium paniculatum* (B), de *Sclerolobium denudatum* (C) e dos padrões utilizados: miricetina (13,06 min), quercetina-3-O-arabinopiranosídeo (17,03 min), quercetina 2"-O-galoil-ramnopiranosídeo (22,38 min) (D).

10 A **Figura 5** mostra as atividades seqüestradoras do radical DP-PH apresentadas pelos extratos hidro-alcoólicos de *Sclerolobium aureum* (W: água; EtOH: etanol).

A **Figura 6** mostra as atividades seqüestradoras do radical DP-PH apresentadas pelos extratos hidro-alcoólicos de *Sclerolobium denudatum* 15 (W: água; EtOH: etanol).

A **Figura 7** mostra as atividades seqüestradoras do radical DP-PH apresentadas pelos extratos hidro-alcoólicos de *Sclerolobium paniculatum* (W: água; EtOH: etanol).

A **Figura 8** mostra a atividade seqüestradora do radical DPPH 20 pelos flavonóides glicosilados, que correspondem aos números de 5 a 11 na Figura 2. A rutina, solubilizada em metanol, foi utilizada como padrão positivo.

A **Figura 9** mostra a avaliação da proteção à peroxidação lipídica durante 1 e 2 horas de lipossomos tratados com amostras de extratos 25 obtidos de folhas de *S. aureum*. O extrato hidro-alcoólico 50% (SaHA), o extrato orgânico (SaH) e a fração dos antioxidantes lipofílicos (SaFAL) foram administrados aos lipossomos em concentrações variando de 40 e 400 μ g/ml.

A **Figura 10** mostra a avaliação durante 1 e 2 horas da proteção 30 à peroxidação lipídica de lipossomas tratados com misturas de agentes antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos obtidos de extratos de folhas de *S. aureum*: extrato hidro-alcoólico 50% (SaHA) e o extrato orgânico (SaH) 60:40 (m/m),

e a mistura contendo o extrato hidro-alcoólico 50% (SaHA) e a fração antioxidantes lipofílicos (SaFAL) 50:50 (m/m). As duas misturas foram administradas na concentração 40 µg/ml.

5 A **Figura 11** mostra o rendimento, em relação à massa de folha seca utilizada, de obtenção de todos os flavonóides glicosilados a partir dos extratos hidro-alcoólicos de três espécies de *Sclerolobium* spp.

A **Figura 12** mostra o rendimento dos derivados glicosilados dos flavonóides miricetina e quercetina nos extratos de folhas das três espécies de *Sclerolobium*. Resultado expresso em miligramas de flavonóide por grama de folhas secas.

10

A **Figura 13** mostra as fotos ilustrativas das frações e imagem da placa de CCDC em sílica gel das frações F1, F2 e F3 do extrato orgânico, após a extração em fase sólida utilizando carvão ativo.

A **Figura 14** mostra os cromatogramas das frações F1, F2 e F3 obtidas de extratos de folhas secas de *Sclerolobium aureum*, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Os cromatogramas foram obtidos em 200 nm utilizando-se coluna C18, eluída com acetonitrila a 2,0 ml min⁻¹. Cada amostra foi injetada em volume de 10 µl.

15

A **Figura 15** mostra os cromatogramas das frações XAD-A em água (A), XAD-B em água/etanol 1:1 (B), XAD-C em etanol (C) e XAD-D em acetato de etila (D), do extrato hidroalcoólico, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Os cromatogramas foram obtidos a 254nm utilizando-se coluna C18, eluída com 16 a 21% acetonitrila em 13', 21% para 35% de acetonitrila em 25min, 35% de acetonitrila até 30min com

20

25

fluxo de 1,5ml min⁻¹. Cada amostra foi injetada em volume de 20µl.

Descrição detalhada da invenção.

Para o efeito desta invenção, as seguintes siglas e abreviações serão utilizadas:

ACN – Acetonitrila

30 AcOEt – Acetato de etila

CC –Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

- CCDC- Cromatografia em camada delgada comparativa
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD- Detector de arranjo de diodos
5 DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EH – Extrato apolar ou hexânico
EHA – Extrato polar ou hidro-alcoólico
EM – Espectrômetro de massas
10 EtOH- Etanol
FAH – Fração enriquecida em antioxidantes hidrofílicos
FAL – Fração enriquecida em antioxidantes lipofílicos
Hex – Hexano
HOAc – Ácido acético
15 IES – Ionização por eletronspray
MeOH – Metanol
RMN - Ressonância magnética nuclear
SFB – Soro fetal bovino
SPMH – *Sclerolobium paniculatum* – extrato misto (hexânico +
20 hidroalcoólico)
TMS - Trimetilsilano
UV - Ultravioleta
VIS - Visível
- A presente invenção combina extratos e frações polares e apolares, associando antioxidantes e quimioprotetores hidrofílicos e lipofílicos, de forma a se obter efeitos aditivos na proteção contra a peroxidação lipídica. Além disso, na presente invenção propõem-se procedimentos para a obtenção das frações antioxidantes FAH e FAL com ausência de pigmentos, possibilitando a preparação de formulações cosméticas mais atraentes.
- 30 Na presente invenção, optou-se por estudar espécies do gênero *Sclerolobium spp*, uma vez que as espécies deste gênero são endêmicas no Brasil.

Além disso, a presente invenção propõe a padronização de extratos de folhas de *Sclerolobium spp*, visando à exploração das mesmas como matérias-primas fonte de antioxidantes naturais, aplicáveis em formulações cosméticas.

5 A madeira de espécies de *Sclerolobium* já é utilizada em carvoaria e a viabilização desta invenção utilizando as folhas de espécies deste gênero, hoje totalmente descartadas, proporcionará aumento do valor agregado ao cultivo de *Sclerolobium spp*, estimulando a agricultura familiar e a recuperação da densidade arbórea em áreas degradadas.

10 O processo de extração caracterizado por compreender as etapas de:

- a) contactar o material vegetal escolhido de plantas pertencentes ao gênero *Sclerolobium* com, pelo menos, um solvente de extração adequado;
- 15 b) agitar a mistura; e
- c) separar a fase líquida da fase sólida.

De acordo com uma concretização preferida da invenção, a etapa de agitação (b) é realizada por sonicação e a etapa de separação das fases líquida e sólida é realizada por centrifugação.

20 Preferencialmente o processo da presente invenção inclui as seguintes etapas:

- a) secagem do tecido vegetal;
- b) trituração do tecido vegetal do item a); e
- c) extração com solvente orgânico do material do item b).

25 Exemplos de tecidos de plantas são, mas não estão limitados a, *Sclerolobium aureum*, *Sclerolobium paniculatum*, *Sclerolobium denudatum* e mistura dos mesmos. Os níveis mais altos de ativos foram detectados nas folhas mas podem ser usados também caule, raiz, fruto, flores e mistura dos mesmos.

30 Como exemplo de tecido vegetal pode-se citar, sem se limitar a, folhas da espécie de *Sclerolobium spp*. Os maiores teores dos ativos foram encontrados nas folhas. Exemplos de solvente orgânico descritos no item c)

e e) são solventes orgânicos apolares, como éteres, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, sendo preferencialmente hexano.

Opcionalmente, o extrato vegetal pode ser clareado através de resinas de clareamento que é escolhida do grupo que compreende as resinas de extração de pigmentos vegetais como celite® e derivados desta, carvão ativo, divergan®F, acetato de polivinila, etil celulose, polimetilmetacrilato, copolímero metacrilatoetil-betaína/metacrilato, copolímeros de ácidos metacrílicos, copolímeros aminoalquilmetacrilatos, ftalato celulose acetato, poli-N-vinil piperidona, poli-N-vinil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-metil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-metil-2-piperidona, poli-N-vinil-4-metil-2-piperidona, poli-N-vinil-4-metil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-etil-2-pirrolidona, poli-N-vinil-4,5-dimetil-2-pirrolidona e mistura destes.

A obtenção dos extratos hidro-alcoólicos de espécies do gênero *Sclerolobium* incluem as seguintes etapas:

- a) secagem do tecido vegetal;
- b) trituração do tecido vegetal do item a); e
- c) extração com solução hidro-alcoólica do material do item b).

Um exemplo de solução hidro-alcoólica inclui, mas não se limita à solução etanol:água 1:1 (v:v) podendo ser utilizado também metanol, propanol ou isopropanol, sendo preferencialmente etanol.

Opcionalmente, o extrato vegetal pode ser clareado através de resinas de clareamento que é escolhida do grupo que compreende as resinas de extração de pigmentos vegetais como resinas de troca iônica como resinas de polímeros mistos de poliestireno-divinilbenzeno (XAD-4®), carvão ativo, divergan F (PVP), acetato polivinila, etil celulose, polimetilmetacrilato, copolímero metacrilatoetil-betaína/metacrilato, copolímeros de ácidos metacrílicos como o Eudragit L 100®, Eudragit L 125®, Eudragit L 100-55®, Eudragit L 30D-55®, copolímeros aminoalkilmetacrilatos, ftalato celulose acetato, e mistura destes, poli-N-vinil piperidona, poli-N-vinil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-metil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-metil-2-piperidona, poli-N-vinil-4-metil-2-piperidona, poli-N-vinil-4-metil-2-caprolactam, poli-N-vinil-3-etil-2-pirrolidona, poli-N-vinil-4,5-dimetil-2-pirrolidona, similares e mistura das mesmas.

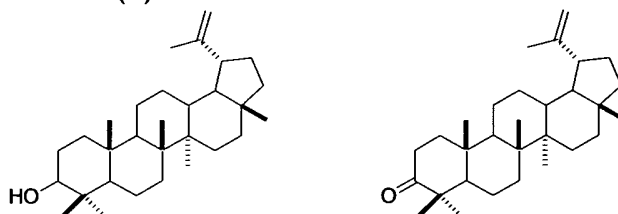
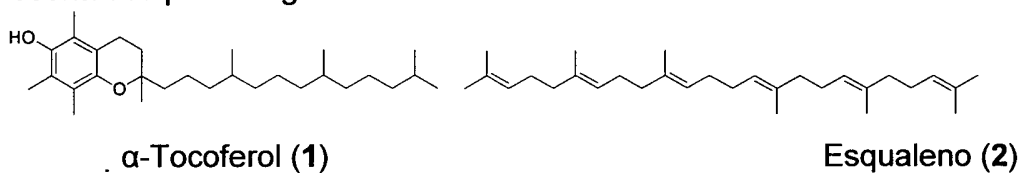
Portanto, de acordo com a presente invenção foi verificado que tecidos de espécies de *Sclerolobium*, mais especificamente folhas, quando são submetidos a extrações sucessivas com solventes orgânicos como hexano e com misturas hidro-alcoólicas, particularmente etanol/água, provêm
5 extratos e frações com propriedades antioxidantes.

Conforme já mencionado acima, o gênero *Sclerolobium* pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinioideae*. As espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* são arbóreas sendo que *S. aureum*, também conhecida como fede-fede, gonçalo-do-campo ou pau-bosta, tem porte médio, casca áspera e descamante, clara, ramos jovens pubescentes; folhas
10 arternas, compostas imparipinadas, 5 a 9 folíolos opostos ou subopostos, ovais e oblongos, base obtusa a arredondada, ápice agudo a arredondado, cerca de 7 cm de comprimento e 3,5 cm de largura, glabros a pubescentes; flores amarelo-ouro, aromáticas, dispostas em panículas terminais amplas; fruto vagem oblonga, achatada, indeiscente. Ocorre em áreas de cerrado
15 típico e em cerradão.

S. paniculatum conhecido como taxi-branco, carvoeiro ou passariúva, é uma árvore de grande porte, tronco ereto, casca esbranquiçada, áspera a estriada em árvores jovens e fendilhada em árvores mais velhas, ramos jovens pubérulos; folhas alternas, compostas imparipinadas, 4 a 8 pares
20 de folíolos glabros ou com pêlos claros esparsos na face inferior, oblongos, base arredondada a obtusa, levemente inequilátera, ápice acuminado, cerca de 7 cm a 3 cm de largura; flores amarelo-esverdeadas, pequenas, dispostas em panículas terminais; fruto vagem plana elipsóide (Duringan, G. et al.,
25 *Plantas do Cerrado Paulista*, Páginas & Letras Editora e Gráfica, São Paulo, 2004). Ocorre na Amazônia, mas também está bem distribuída por todo o território brasileiro, em diferentes tipos de solo. Em plantios, apresenta crescimento rápido, elevada produção de liteira e capacidade de associar-se com bactérias do gênero *Rhizobium*, fixadoras de N₂ – estas informações a
30 qualificam como espécie potencial para a recuperação de solos degradados e enriquecimento de capoeiras (Dias et al. *Pesq. Agropec. Bras.* 1991, 26: 69-76). *S. denudatum*, por sua vez, é árvore endêmica da Mata Atlântica,

mais frequentemente encontrada nas áreas de floresta ombrófila densa, embora atualmente rara. As espécies de *Sclerolobium* são tipicamente utilizadas na produção de celulose, de laminados e de carvão vegetal.

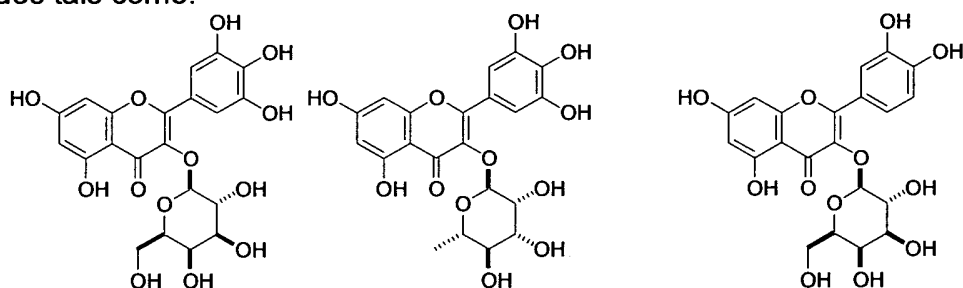
As extrações com solventes orgânicos de material de espécies de *Sclerolobium* e mais particularmente de suas folhas, levam à obtenção de frações compreendendo antioxidantes lipofílicos e antioxidantes hidrofílicos. Os antioxidantes lipofílicos incluem esqualeno, α -tocoferol, lupeol e lupenona representados pelas seguintes fórmulas:



Luperol (3)

Lupenona (4)

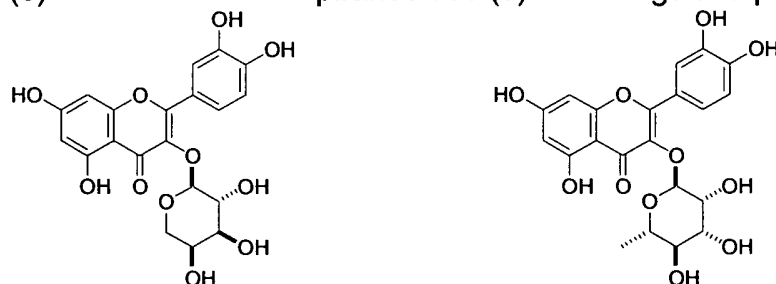
Já os antioxidantes hidrofílicos compreendem flavonóides glicosilados tais como:



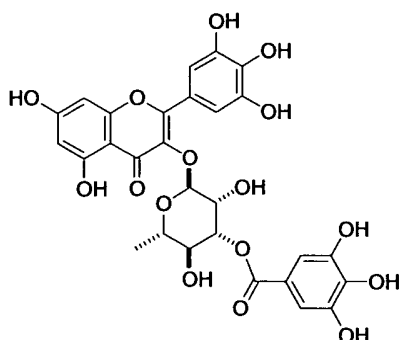
Miricetina-3-O-galactopiranosídeo (5)

Miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (6)

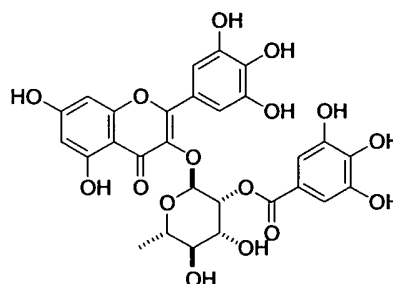
Quercetina-3-O-galactopiranosídeo (7)



15 Quercetina-3-O-arabinopiranosídeo (8) Quercetina-3-O-ramnopiranosídeo (9)



Miricetina-3-O-(3''-galoil-
ramnopiranosídeo) (10)



Miricetina-3-O-(2''-galoil-ramnopi-
ranosídeo) (11)

O extrato compreendendo as frações lipofílicas e hidrofílicas, que apresenta propriedades antioxidantes, é útil para uso em composições
5 cosméticas ou farmacêuticas.

De acordo com uma concretização preferida do processo de extração da presente invenção tecidos de espécies de *Sclerolobium*, mais especificamente folhas, são secos à sombra ou, preferivelmente, em estufa com circulação de ar a cerca de 40° C, e moídos. A seguir esse material ve-
10 getal seco e moído é submetido a extrações sucessivas com solventes orgânicos, a saber, com hexano e subsequentemente com misturas hidroalcoólicas, de preferência misturas etanol/água 1:1 (v/v).

A fração enriquecida em antioxidantes lipofílicos (FAL) e sem pigmentos interferentes, mais especificamente clorofilas, é preparada atra-
15 vés do tratamento do extrato hexânico com pelo menos um substrato adsorvente de origem natural, sendo preferencialmente utilizada proporção extrato/substrato igual a 1:4 (m/m). A fração obtida, eluída com hexano, contém esqualeno (1), α -tocoferol (2), lupenona (3) e lupeol (4). O extrato lipofílico (o extrato hexânico) e a FAL contêm preferencialmente substâncias antioxi-
20 dantes representadas pelas fórmulas 1 a 4, com teores variando entre 0,001 – 1% e 0,01 - 10 %, respectivamente. A faixa de teores de substâncias antioxi-
dantes se deve a variações sazonais e a variações interespecies.

A fração enriquecida em antioxidantes hidrofílicos (FAH) é pre-
parada através do tratamento do extrato hidroalcoólico, mais especificamen-
25 te do extrato etanol/água 1:1 (v/v), com pelo menos uma resina polimérica mista de adsorção, eluída inicialmente com água para eliminação de açúca-

res e outras substâncias polares, e em seguida com misturas de etanol/água, preferencialmente com solução etanol/água 60:40 (v/v). O extrato hidroalcoólico e a FAH contém preferencialmente substâncias antioxidantes representadas pelas fórmulas 5 a 11, com teores entre 0,001 – 1% e 0,01 – 15 %, respectivamente. A faixa de teores de substâncias antioxidantes se deve a variações sazonais e a variações interespecies.

As substâncias obtidas de acordo com a invenção e representadas pelas fórmulas químicas 1-11 acima possuem atividades antioxidantes pelas tais como atividade seqüestradora de radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). As Figuras 1 a 4 apresentam gráficos que demonstram resultados de seqüestro de radicais livres de várias frações obtidas de acordo com a presente invenção.

O extrato hexânico e o extrato hidroalcoólico foram analisados por processo de extração em fase sólida eluindo a amostra em gradiente Hex – AcOEt – MeOH sobre adsorvente de fase normal e cromatografia líquida de fase reversa respectivamente, onde foram verificados os compostos ilustrados nas figuras 1 a 11 e mencionados no fluxograma encontrado no exemplo 1 mais adiante. Estes compostos se mantêm, ou seja, são verificados nas frações antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (FAL e FAH).

Os extratos hexânicos e hidro-alcoólicos, bem como as frações FAL e FAH poderão ser adicionados isoladamente, combinados em variadas proporções ou serem combinados com outras substâncias antiradicalares para a preparação de formulações cosméticas e farmacêuticas nas quais atuarão como sistemas antioxidantes.

Exemplo 1

Material vegetal. As folhas de *Sclerolobium paniculatum* foram coletadas no Instituto Florestal de Assis, em Assis-SP, no dia 18 de julho de 2003, enquanto a espécimen *Sclerolobium aureum* foi coletada em uma pastagem, próximo ao Km 376 da SP-333, no município de Assis, na mesma data. A espécimen *Sclerolobium denutatum* foi coletada no Campus da USP, na cidade de São Paulo em setembro de 2003.

Exemplo 2 - Obtenção e quantificação dos extratos hexâni-

cos das folhas de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

Extrato hexânico: 500 mg de folhas secas à sombra e moídas foram extraídas com 5 ml de hexano por sonificação (30 min). Após centrifugação (10 min, 1200 rpm) o sobrenadante (extrato hexânico) foi removido.

- 5 Esse procedimento foi repetido 5 vezes, fornecendo os extratos hexânicos 1, 2, 3, 4 e 5, que após tomada de alíquotas para pesagem e análise por CLAE, foram reunidos. Nestes extratos foram quantificados α -tocoferol, γ -tocoferol, esqualeno e lupenona.

Exemplo 3

10 **A. Clareamento do extrato hexânico**

O extrato hexânico de *S. aureum* foi submetido à extração em fase sólida utilizando-se três fases estacionárias distintas, carvão ativo, celite® e divergan. O objetivo das extrações foi obter uma fração rica em componentes antioxidantes e com pouco ou nenhum pigmento.

15 **B. Clareamento do extrato hexânico com carvão ativo:**

- Foi utilizada uma coluna de vidro, contendo 5,0g de carvão ativo. Uma mistura contendo 9,0g de amostra e 40g de carvão ativo foi suspensa em hexano e aplicada na coluna. A eluição da amostra foi feita com: 300ml de hexano (F1), 250ml de hexano/AcOEt (9:1) (F2), e 750ml de AcOEt (F3).
- 20 A adição de 40g de carvão ativo a 9g de amostra de extrato é indispensável para o clareamento do extrato. Outras opções de solventes apolares também podem ser usadas como misturas de hexano com clorofórmio, diclorometano, acetona, isopropanol, éteres, sendo preferencialmente utilizada a mistura hexano/AcOEt.

- 25 As frações F1 e F2, eluídas com hexano e hexano/AcOEt (9:1), respectivamente, no processo de extração em fase sólida utilizando carvão ativo, apresentaram, visualmente, pouco ou nenhum pigmento, e apenas a fração F3 apresentou pigmentação verde um pouco mais intensa (Figura 13), entretanto, as análises por CCDC e CLAE (Figuras 13 e 14) mostraram
- 30 que todas as frações obtidas apresentam substâncias antioxidantes, visto que F1 é rica em esqualeno, F2 contém principalmente lupenona, alfa-tocoferol e esqualeno e F3 é rica em lupenona e esqualeno. A fração F1 re-

5 apresenta cerca de 13% do extrato hexânico bruto (Tabela 1). Pode-se concluir, portanto, que o procedimento de extração em fase sólida utilizando carvão ativo apresenta um bom potencial de utilização no processo de remoção de pigmentos, permitindo obter frações ricas em substâncias antioxidantes e com teor reduzido de pigmento.

Tabela 1. Rendimento em massa de obtenção de extrato orgânico obtido a partir de folhas secas de *Sclerolobium aureum*, de acordo com a etapa/fração do processo de remoção de pigmentos utilizando extração em fase sólida com carvão ativo.

Fração	Extrato (mg extrato./g folhas)	Rendimento (%)
F1	131	13,1
F2	53	5,3
F3	129	12,9
Total	313	31,3

10

Exemplo 4

Obtenção e quantificação dos extratos hidro-alcoólicos das folhas de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

A. Testes de extração

15 Na busca do melhor sistema de solvente para extração dos flavonóides glicosilados nas folhas de *Sclerolobium* spp, foi realizada a extração com EtOH, água e EtOH/água em três proporções distintas (25:75; 50:50 e 75:25). Os extratos hidrofílicos obtidos em cada uma das extrações foram analisados por CLAE-UV e os flavonóides glicosilados foram quantificados. O teor de flavonóides dos extratos de cada planta, em miligramas de
20 flavonóides por grama de folha seca, é mostrado na Figura 11. No mesmo experimento foi quantificado, após hidrólise, o teor das agliconas quercetina e miricetina em cada extrato obtido. O resultado desta quantificação é mostrado na Figura 12.

25 Os teores de flavonóides nos extratos apresentam diferenças significativas entre as três plantas estudadas, entretanto, o melhor rendimento de extração para as três espécies, em termos de miligrama de flavonóide

por grama de folha seca, foi obtido quando se utilizou mistura de EtOH/Água na proporção de 1:1. Nos sistemas de solventes testados a proporção de flavonóides quercetina e miricetina glicosilados permanecem praticamente inalterada, de forma que o sistema de solvente que apresenta o maior rendimento de flavonóides totais é, também, o que apresenta melhor rendimento para os derivados glicosilados de quercetina e miricetina.

B. Extrato hidro-alcoólico: o material vegetal já extraído com hexano foi submetido à extração com 5 ml MeOH/água 1:1 (v/v) por sonificação (30 min). Após centrifugação (10 min, 1200 rpm) o sobrenadante (extrato hidro-alcoólico) foi removido. Esse procedimento foi repetido 5 vezes, fornecendo os extratos hidro-alcoólicos 1, 2, 3, 4 e 5, que após tomada de alíquotas para pesagem e análise por CLAE, foram reunidos. Nestes extratos foram quantificados os flavonóides glicosilados.

Exemplo 5

15 A. Clareamento do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico de *S. aureum* foi submetido à extração em fase sólida utilizando-se três fases estacionárias distintas, carvão ativo, XAD-4 e divergan F. O objetivo das extrações era obter uma fração rica em componentes antioxidantes e com pouco ou nenhum pigmento.

20 B. Clareamento do extrato hidroalcoólico

B.1. Com carvão ativo p.a. (Synth): foi utilizada uma coluna de vidro, contendo 5,0g de carvão ativo. Uma alíquota contendo 1,0g de extrato hidroalcoólico foi suspensa em água e aplicada na coluna. A eluição da amostra foi feita com: 25ml de água (SAEC1), 25ml de EtOH/Água (1:1) (SAEC2), 25ml de EtOH (SAEC3) e 25ml de AcOEt (SAEC4). EtOH pode, em uma modalidade, ser substituído por outros alcoóis, como metanol, propanol ou isopropanol; e AcOEt pode ser substituído por acetona ou acetonitrila.

B.2. Com Divergan F (BASF): foi utilizada uma coluna de vidro, contendo 1,0g de Divergan F. Uma alíquota contendo 1,0g de extrato de hidroalcoólico e 5,0g de Divergan F foi suspensa em água e aplicada na coluna. A eluição da amostra foi feita com: 100ml de água (SAED1), 100ml de EtOH/Água (25:75) (SAED2), 100ml de EtOH/Água (50:50) (SAED3), 100ml

de EtOH/Água (75:25) (SAED4), 100ml de EtOH (SAED5) e 500ml de AcOEt (SAED6). Em uma concretização alternativa, EtOH poderia ser substituído por outros alcoóis, como metanol, propanol ou isopropanol.

B.3.Com ambertlite XAD-4 (Sigma): foi utilizada uma coluna de vidro, contendo 5,2g de XAD-4. Uma alíquota contendo 1,0g de extrato de hidroalcoólico foi suspensa em água e aplicada na coluna. A eluição da amostra foi feita com: 25ml de água (XAD-A), 25ml de EtOH/água (1:1) (XAD-B), 25ml de EtOH (XAD-C) e 25ml de AcOEt (XAD-D). EtOH, em uma concretização alternativa, pode ser substituído por outros alcoóis, como metanol, propanol ou isopropanol; AcOEt pode ser substituído por acetona ou acetonitrila.

O melhor resultado foi obtido no tratamento do extrato hidroalcoólico com XAD-4. Neste teste, foi aplicado cerca de 1g de extrato em 5g de XAD-4. As frações A e B, eluídas respectivamente com água e água/EtOH 1:1 mostraram-se constituídas principalmente por flavonóides glicosilados, representado cerca de 15% do extrato bruto de partida (Tabela 2), e com coloração castanho claro, possibilitando sua utilização como uma fração enriquecida em antioxidantes hidrofílicos e pouco colorida.

Tabela 2. Rendimento de obtenção de extrato-hidroalcoólico obtido a partir de folhas secas de *Sclerolobium spp* de acordo com a etapa/fração do processo de remoção de pigmentos utilizando extração em fase sólida com XAD-4: eluição com água (XAD-A), solução água:etanol 1:1 (XAD-B), etanol (XAD-C) e acetato de etila (XAD-D).

Fração	Extrato (mg extrato/g folhas).	Rendimento (%)
XAD -A	63,0	6,3
XAD -B	96,0	9,6
XAD -C	105,0	10,5
XAD -D	54,4	5,4
Total	318,4	31,8

Os cromatogramas das frações obtidas do tratamento com XAD-4 (Figura 15), revelam o perfil flavonoídico com picos mais intensos na fração XAD-B. A partir da fração XAD-C ocorre a co-eluição de pigmentos, com

a fração adquirindo tons mais escuros e esverdeados.

Exemplo 6

Análise quantitativa dos constituintes antioxidantes polares e apolares, presentes respectivamente nos extratos hidroalcoólicos e hexânicos de folhas de *Sclerolobium* spp.

Com o objetivo de avaliar quantitativamente o teor dos metabólitos antioxidantes presentes nos extratos polares e apolares de folhas de das três espécies de *Sclerolobium* em estudo, foram estabelecidos dois métodos cromatográficos em CLAE-DAD:

10 Análises qualitativas e quantitativas por CLAE

Extratos hexânicos: uma alíquota de 1ml de cada um dos extratos hexânicos de *Sclerolobium aureum*, *Sclerolobium paniculatum* e *Sclerolobium denudatum* foi filtrada e analisada por CLAE-DAD nas seguintes condições cromatográficas:

15 Coluna: Phenomenex C- 18,5 μ m (25 cm x 4.6 mm ID)
Fluxo: 2,0 ml min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ l
Detecção: UV- VIS, 200 e 290 nm.
Eluição: Acetonitrila
Tempo de análise: 30 min.

20 **Extratos hidro-alcoólicos:** uma alíquota de cada um dos extratos etanólicos de *Sclerolobium aureum*, *Sclerolobium paniculatum* e *Sclerolobium denudatum* foi filtrada e analisada por CLAE-DAD nas seguintes condições cromatográficas:

Coluna: Phenomenex C-18, 5 μ m (25 cm x 4.6 mm ID)
25 Fluxo: 1,5 ml min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ l
Detecção: UV, arranjo de diodos.
Eluição: gradiente linear: 16% para 21% de B em 13min, 21% para 35% de B em 25', 35% de B até 30min.

A: Ácido acético 0,5%

30 B: Acetonitrila

Cromatógrafo. Shimadzu LC-8A binário, com amostrador automático SIL-10AF e detector UV-Vis SPD=10Avp. Aquisição e tratamento de

dados foi feita com software Shimadzu CLASS-VP.

As Figuras 3 e 4 ilustram os cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos e hidro-alcoólicos de folhas de *Sclerolobium* spp., respectivamente. Para os extratos hexânicos maior semelhança entre aqueles obtido de folhas de *S. aureum* e *S. paniculatum*, enquanto o extrato hexânico de *S. denudatum* revela um perfil mais complexo, porém com picos menos intensos. Por outro lado, os extratos polares de *S. denudatum* e *S. paniculatum* se distinguem facilmente do extrato polar de folhas de *S. aureum* pela ausência picos representativos dos galatos de miricetrina (compostos 10 e 11, Figura 2).

Depois de estabelecidas as condições cromatográficas, foram iniciadas as análises quantitativas. Folhas de *S. aureum*, *S. paniculatum* e *S. denudatum* foram submetidas à extração com hexano por sonificação e após centrifugação o sobrenadante (extrato hexânico) foi removido. Esse procedimento foi repetido cinco vezes, fornecendo os extratos hexânicos 1, 2, 3, 4 e 5. O resíduo foi submetido à extração com EtOH/Água (1:1), repetindo-se o mesmo procedimento, obtendo-se os extratos hidro-alcoólicos 1, 2, 3, 4 e 5. Os rendimentos obtidos para cada um das extrações, em miligrama de extrato por grama de folha seca, estão expressos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Rendimento de obtenção dos extratos orgânicos, a partir de folhas secas de 3 espécies do gênero *Sclerolobium* spp.

Extração	<i>S. aureum</i>	<i>S. paniculatum</i>	<i>S. denudatum</i>
	(mg extrato/g folhas)	(mg extrato/g folhas)	(mg extrato/g folhas)
1 ^a .	19,0	27,0	25,8
2 ^a .	8,6	11,6	9,2
3 ^a .	6,9	7,9	6,5
4 ^a .	5,9	5,2	5,1
5 ^a .	5,1	5,1	3,9
Total	45,5 ± 0,5*	56,8 ± 0,3*	50,6 ± 0,4*

* Média ± desvio padrão (?)

Tabela 4 - Rendimento de obtenção dos extratos hidro-alcoólicos, a partir de folhas secas de 3 espécies do gênero *Sclerolobium*

spp: *Sclerolobium aureum*, *Sclerolobium paniculatum* e *Sclerolobium debudatum*.

Extração	<i>S. aureum</i>	<i>S. paniculatum</i>	<i>S. denudatum</i>
	(mg extrato/g folhas)	(mg extrato/g folhas)	(mg extrato/g folhas)
1 ^a .	158,9	345,6	139,8
2 ^a .	113,2	79,3	61,8
3 ^a .	58,5	31,0	21,8
4 ^a .	16,8	17,3	11,8
5 ^a .	17,9	10,1	6,8
Total	365,2 ± 3,5*	483,4 ± 2,3*	242,0 ± 2,1*

* Média ± desvio padrão (?)

- As análises quantitativas nos extratos hexânicos, foram realizadas utilizando α e γ -tocoferóis, lupenona e esqualeno como padrões externos (Tabela 5). Para quantificação dos flavonóides glicosilados foram utilizados três padrões: quercetina-3-O-arabinopiranosídeo para a determinação do teor dos derivados quercetina-3-O-glicopiranosídeos, miricetrina (miricetina-3-O-ramnopiranosídeo) para determinação dos derivados miricetina-3-O-glicopiranosídeos e miricetina-O-(2"-galoil-ramnopiranosídeo) para a quantificação dos galatos de miricetrina (Tabela 6). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 5. Parâmetros analíticos determinados para os padrões lipofílicos α -tocoferol, γ -tocoferol, lupenona e esqualeno.

Substância	Linearidade (μg)	Limite de detecção (ng)	Limite de quantificação (ng)
α-Tocoferol	0,05 – 10,5	6,0	20
γ-Tocoferol	0,03 – 9,0	9,0	30
Lupenona	0,10 – 10,5	6,0	20
Esqualeno	0,01 – 6,0	0,5	2

- Tabela 6.** Parâmetros analíticos determinados para os padrões polares quercetina-3-O-arab, miricetina, miricetina-2"-galoil.

Substância	Linearidade (μg)	Limite de detecção (ng)	Limite de quantificação (ng)
Quercetina-3-O-arab	0,08 – 5,0	5,2 ng	16 ng

Miricetina	0,03 – 5,0	4,3 ng	12 ng
Miricetina-2"-galoil	0,03 – 5,0	4,5 ng	14 ng

Das três espécies analisadas, a que apresentou folhas com maior teor de antioxidantes lipofílicos foi, portanto a *S. paniculatum* com 0,64% de tocoferol, 0,1% de lupenona e 0,2% de esqualeno, seguida pela *S. aureum* com 0,5% de tocoferol, e 0,04% de esqualeno. As folhas de *S. paniculatum* apresentam, ainda, 1,4mg/g de lupenona, sendo que esta não foi detectada em *S. aureum* (Tabela 7).

Tabela 7. Teores de α -tocopherol, γ -tocopherol, lupenona e esqualeno nos extratos orgânicos obtidos a partir de folhas secas de 3 espécies do gênero *Sclerolobium* spp. Média $\pm$ desvio padrão.

Substância	<i>S. aureum</i> (mg subst./g folhas)	<i>S. denudatum</i> (mg subst./g folhas)	<i>S. paniculatum</i> (mg subst./g folhas)
α-Tocoferol	3,60 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,04	5,70 $\pm$ 0,20
γ-Tocoferol	1,13 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,05
Lupenona	ND*	0,08 $\pm$ 0,01	1,46 $\pm$ 0,03
Esqualeno	0,35 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	1,99 $\pm$ 0,06

* ND- Não detectado

Os rendimentos obtidos para o extrato hexânico foram semelhantes para as três espécies de *Sclerolobium*, isto é, da ordem de 50mg de extrato por grama de folha seca.

Os rendimentos obtidos para o extrato hidro-alcoólico foram nitidamente maiores para folhas de *S. paniculatum* (483,4 mg/g) e *S. aureum* (365,4 mg/g), em relação a rendimento obtido para folhas de *S. denudatum* (242,0 mg/g). Teores maiores de flavonóides glicosilados também foram obtidos em folhas de *S. aureum* (96,5 mg/g) e *S. paniculatum* (90,7 mg/g) (Tabela 8). Desta forma, o extrato hidro-alcoólico de *S. aureum* contém 26,4% de flavonóides glicosilados, enquanto o extrato hidro-alcoólico de *S. paniculatum* contém 18,8% de flavonóides glicosilados. A presença dos flavonóides glicosilados ligados a uma unidade de ácido gálico (miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -raminopiranosídeo e miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -raminopiranosídeo) no extrato hidro-alcoólico de *S. aureum*, confere a este um

maior potencial de utilização como antioxidante frente aos outros extratos testados, visto que, quando testados com DPPH, estes flavonóides apresentaram atividade antioxidante maior do que aqueles que apresentam apenas a unidade glicosídica.

- 5 **Tabela 8.** Teores de flavonóides glicosilados totais obtidos em extratos de folhas secas de 3 espécies do gênero *Sclerolobium* spp.

	<i>S. aureum</i> (mg subst./g folhas)	<i>S. denudatum</i> (mg subst./g folhas)	<i>S. paniculatum</i> (mg subst./g folhas)
Flavonóides totais	96,5 ± 0,8	33,4 ± 0,4	90,7 ± 0,5

Exemplo 7

- 10 **Isolamento e elucidação estrutural de mais alguns metabólitos antioxidantes polares do extrato hidro-alcoólico de folhas de *S. aureum*, o extrato com perfil químico mais diversificado.**

- Parte do extrato hidro-alcoólico (~10 gramas) obtido de folhas de *S. aureum*, obtido após extração exaustiva do material vegetal com EtOH-água 1:1 (v/v), isto é, extração por pelo menos 5 vezes, foi submetido à extração em fase sólida, utilizando-se C-18 como fase estacionária, em uma
15 coluna de vidro com 10,0cm de altura e 9,5cm de diâmetro. A eluição foi realizada em ordem decrescente de polaridade, utilizando-se os seguintes eluentes: metanol/água (50:50), metanol/água (90:10), MeOH, AcOEt e tolueno, sendo obtidas as frações FM1, FM2, FM3, FM4 e FM5, respectivamente (Fig.1). A fração MeOH/Água (90:10) (FM2) foi submetida a CLAE preparativo, sendo isoladas as substâncias FM-P1 (7mg) e FM-P2 (24mg) e FM-P3
20 (3mg), FM-P4 (25mg), FM-P61 (13mg), FM-P53 (5mg) e FMP62 (17mg).

- A. Fracionamento cromatográfico.** Para cromatografia em camada delgada utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 da Merck, com espessura de 0,25mm para análises comparativas e 1mm para análises preparativas. As revelações das mesmas foram feitas pela irradiação de luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, por exposição a vapores de iodo e por nebulização com solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano.

Na cromatografia em coluna o tipo de fase estacionária utilizada

variou de acordo com a polaridade das amostras a serem analisadas, sendo utilizadas preferencialmente sílica gel Si-60, partículas de 80-230 mesh ou amberlite XAD-16.

No primeiro caso a eluição foi feita no modo gradiente, com misturas de hexano/AcOEt e posteriormente AcOEt/metanol, em ordem crescente de polaridade. No segundo caso a eluição também foi feita no modo gradiente, mas com misturas de água e metanol em ordem decrescente de polaridade.

B. Cromatógrafos

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala analítica foi realizada em um cromatógrafo da marca Varian ProStar, com sistema ternário de bombas, modelo 240, com detector de arranjo de diodos (DAD), modelo 230 e injetor Auto Sampler modelo 410. Nas análises foi utilizada uma coluna C-18 Phenomenex, com dimensões de 4,6mm x 250mm e partículas de 5 μ m.

Em escala preparativa foi utilizado um cromatógrafo preparativo Varian, constituído por duas bombas da marca Dynamax, modelo SD-1 e um detector UV-Visível modelo ProStar 320. A coluna utilizada foi uma C18 Phenomenex com dimensões de 21,20mm x 250mm e partículas de 12 μ m.

C. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian inova 500, operando a 500MHz e a 125MHz nas frequências de ^1H e ^{13}C , respectivamente. O padrão empregado como referência foi TMS e o solvente utilizado foi CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$ da marca Merck. Os deslocamentos químicos foram expressos em unidades δ e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

A substância 1, identificada como α -tocoferol, é um dos constituintes da vitamina E. Os sinais nos espectros de RMN de ^1H (Tabela 8) em δ 2,53 (1H, t, $J=7\text{Hz}$) e δ 1,70 (1H, t, $J=7\text{Hz}$), foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. O singlete em δ 1,15 foi atribuído aos hidrogênios do grupo metílico na posição 2 e o singlete em δ 2,03 foi atribuído aos hidrogênios dos grupos metílicos encontrados nas posições 5, 7 e 8. Os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos metílicos em C-4', C-8' e C-12'

aparecem como dubletos em δ 0,80. Os hidrogênios H-1' a H-12' aparecem como multipletos entre δ 1,01 e 1,50. O espectro de RMN ^{13}C apresenta sinais correspondentes a vinte e nove átomos de carbono (Tabela 8). Na análise conjunta do espectro de espectro RMN ^{13}C e do DEPT 135°, constatou-se a presença de seis sinais referentes a carbonos aromáticos quaternários em δ 117,3, 118,4, 121,0, 122,6, 145,5 e 145,6, que foram atribuídos aos carbonos C-4a, C-5, C-7, C-8, C-6 e C-8a, respectivamente. O sinal δ 74,5 foi atribuído a C-2, um carbono sp^3 ligado a um átomo de oxigênio. Foram observados ainda os sinais referentes a quatro carbonos metílicos entre δ 19,6 e 22,7, os quais foram atribuídos aos grupos metílicos em C-4', C-8' e C-12', respectivamente. Os sinais referentes às metilas ligadas aos carbonos aromáticos C-5, C-7 e C-8 aparecem entre δ 11,2 e 12,2, enquanto o sinal referente ao carbono metílico em C-2 aparece em δ 23,8. Os doze sinais referentes aos carbonos da cadeia lateral C-1' a C-12' tem deslocamento químico entre δ 24,7 e 40,0. A identificação foi confirmada, pela comparação dos dados encontrados com aqueles constantes na literatura (YEN, 1996).

A substância 2, identificada como esqualeno, é um triterpeno de cadeia aberta com seis insaturações. O espectro de RMN de ^1H (Tabela 9) mostra sinais de hidrogênios ligados a carbono sp^2 em δ 5,1 e sinais de hidrogênios de grupos metílicos em δ 1,61 e δ 1,69. Os hidrogênios dos grupos metilênicos aparecem em δ 2,1. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais referentes a doze carbonos sp^2 na região de δ 124, δ 131 e δ 134. Os sinais referentes a oito metilas aparecem em δ 15,98, δ 16,03, δ 17,6, δ 25,6 e δ 25,7. Os grupos metilênicos apresentam deslocamento entre δ 26,80 e δ 39,76 (Tabela 9). A identificação foi confirmada, pela comparação dos dados encontrados com aqueles constantes na literatura (HE, 2002).

A substância 3 foi identificada como α -lupeol. No espectro de RMN de ^1H (Tabela 10) os sinais referentes ao α -lupeol, aparecem em δ 4,54 (dl, $J = 2,0$ Hz) e 4,66 (dl, $J = 2,0$ Hz), os quais são característicos de hidrogênio de grupo metilênico terminal. O tripleto em 3,31 ($J = 2,5$ Hz) é típico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. O dubleto em δ 1,66 (d, $J = 1,5$ Hz) e os singletos em δ 1,0; 0,94; 0,90; 0,82; 0,80 e 0,76 são caracterís-

5 ticos de hidrogênios dos grupos metílicos do α -lupeol. Os sinais referentes aos hidrogênios dos demais grupos CH e CH₂, apresentam-se entre δ 0,9 e 2,4. O espectro de RMN ¹³C apresentou sinal característico de carbinólico em δ 76,7. Um sinal referente a um carbono quaternário em δ 150,4, caracte-
rístico de carbono sp². Com auxílio do DEPT pode se observar, também, sete sinais referentes a grupos metílicos em δ 28,2; 22,0; 15,9; 16,1; 14,6; 18,0 e 19,3 e o sinal referente ao carbono do grupo metilênico terminal em δ 109,2. Pode-se observar, ainda, os dez sinais referentes aos carbonos dos grupos metilênicos entre δ 18,3 e 40,0 e os sinais referentes aos cinco car-
10 bonos metínicos em δ 50,4; 49,0; 48,2; 47,9 e 38,0 (Tabela 10). A identificação foi confirmada, pela comparação dos dados encontrados com aqueles constantes na literatura (REYNOLDS, 1986; MA, 2004; MAHATO, 1994).

A substância 4, identificada como Lup-20(29)-en-3-ona (lupenona), é um triterpeno tipo lupano. Os sinais nos espectros de RMN de ¹H (Ta-
15 bela 11) em δ 4,5 (1H, dd, $J_{29,30} = 1,5$ Hz; $J_{30,30} = 2,5$ Hz) e δ 4,6 (1H, d, $J_{30,30} = 2,5$ Hz), foram atribuídos aos hidrogênios do grupo metilênico terminal H-29a e H-29b. O dubleto em δ 1,6 e os singletos em δ 0,95, δ 0,86, δ 0,88 e δ 0,72 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos H-30, H-23, H-25, H-27 e H-28, respectivamente. O singlete em δ 0,99 foi atribuído aos hi-
20 drogênios dos grupos metílicos H-24 e H-26. Os sinais referentes aos hidrogênios dos demais grupos CH e CH₂, apresentam-se entre δ 0,9 e δ 2,4. O espectro de RMN ¹³C apresentou sinal característico de carbonila de cetona em δ 218,07, atribuído ao carbono C-3. Um sinal referente a um carbono quaternário em δ 150,85, característico de carbono sp², atribuído a C-20.
25 Com auxílio do DEPT pode se determinar, também, os sete sinais dos grupos metílicos em δ 21,03, δ 26,6, δ 15,8, δ 15,9, δ 14,4, δ 18,0 e δ 19,3 atribuídos aos carbonos C-23 a C-28 e C-30, respectivamente e o sinal referente ao carbono do grupo metilênico terminal C-29 em δ 109,2. Pode-se observar ainda os dez sinais referentes aos demais carbonos dos grupos metilêni-
30 cos entre δ 19,6 e δ 40,0 e os sinais referentes aos carbonos metínicos em δ 54,97, δ 49,82, δ 38,21, δ 48,28 e δ 47,96 referentes a C-5, C-9, C-13, C-18 e C-19 (Tabela 11). A identificação foi confirmada, pela comparação dos da-

dos encontrados com aqueles constantes na literatura (KIM, 2001; MAHATO, 1994).

A substância P1, identificada como miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (5), apresenta no espectro de RMN ^1H (Tabela 12) sinais na região de hidrogênios aromáticos típicos de flavonóides. O singlete na região de δ 12,6 (1H) foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5. Os dupletos em δ 6,17 (1H) e δ 6,35 (1H), com constantes de acoplamento de 2,0 Hz, foram atribuídos a H-6 e H-8, do anel A. O singlete em δ 7,20 (2H) foi atribuído aos hidrogênios 2' e 6' do anel B. Os sinais observados (Tabela 11) são típicos de aglicona miricetina, conforme relatado na literatura (MARKHAM, 1978). Ainda, o espectro de RMN ^1H apresentou um dubleto em δ 5,30 ($J=7,5\text{Hz}$) o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar. A constante de acoplamento deste hidrogênio é típica de ligação α -glicosídica. Os multipletos na região de δ 3,38, e δ 3,60 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos e metilênicos da porção glicosídica, com base na comparação com dados da literatura. A análise do espectro de RMN ^{13}C , revelou 15 sinais referentes à aglicona e seis sinais referentes ao glicosídeo (Tabela 12). O sinal na região de δ 133,7 (C-3), com deslocamento diamagnético, bem como, os sinais em δ 156,1 (C-2), δ 177,3 (C-4) e δ 161,2 (C-5) com deslocamentos paramagnéticos em relação à miricetina, são típicos da presença de uma unidade glicosídica no C-3-O do anel C (AGRAWAL, 1989). A presença dos carbonos aromáticos oxigenados foi confirmada pela presença dos sinais em δ 161,2 (C-5), δ 164,1 (C-7), δ 145,4 (C-3' e C5') e δ 136,7 (C-4'). O espectro de RMN ^{13}C apresentou cinco sinais na região entre 60,0 - 75,9, além do carbono anomérico, típicos de uma hexose. O sinal referente ao C-1" anomérico apresenta deslocamento δ 102,2. O sinal em 60,0 foi atribuído a C-6" com base na observação do experimento de DEPT-135 onde sinal do mesmo aparece invertido, característico de carbono metilênico. Os demais sinais (Tabela 12) foram atribuídos mediante comparações com dados da literatura, aos carbonos metínicos do açúcar. (AGRAWAL, 1989; MARKHAM, 1978).

A substância P2, identificada como miricetina-3-O- α -

ramnopiranosídeo (6), apresenta no espectro de RMN ^1H (Tabela 13) sinais referentes à porção aglicona, com deslocamentos e multiplicidades semelhantes aqueles apresentados pela substância 5, sugerindo possuir a mesma aglicona, a miricetina. A região do espectro referente à unidade glicosídica

5 apresentou um singleto largo δ 5,20, o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar, típico de ligação α -glicosídica. O dubleto observado em δ 0,89 ($J=6,5\text{Hz}$), referente a H-6" metílico é característico de ramnose. Os sinais em δ 3,30, δ 3,60, δ 3,81 e δ 5,47 foram atribuídos aos hidrogênios glicosídicos em C-4", C-5", C-3" e C-2", respectivamente. As referidas atribuições foram feitas por comparação com os dados da literatura. No espectro

10 de RMN ^{13}C ocorrem 15 sinais referentes à aglicona e seis sinais referentes ao glicosídeo (Tabela 13), sendo que os sinais referentes à aglicona são semelhantes àqueles apresentados por 5, confirmando tratar-se da mesma aglicona, a miricetina. Os sinais referentes à porção glicosídica, com deslocamento químico δ 102,2 e δ 17,6 foram atribuídos ao carbono anomérico C-1" e C-6", respectivamente, sendo este último característico de carbono metílico de ramnose. Os demais sinais (Tabela 13) foram atribuídos, mediante comparações com dados da literatura, aos carbonos metínicos do açúcar (AGRAWAL, 1989; MARKHAM, 1978).

15

20 A substância P3, identificada como quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (7), apresentou no espectro de RMN ^1H (Tabela 14) sinal na região de hidrogênios aromáticos típicos de flavonóides. O singleto na região de δ 12,6 (1H) foi atribuído ao hidrogênio hidroxila em C-5. Os dubletos em δ 6,19 (1H) e δ 6,38 (1H), com constantes de acoplamento de 2,0 Hz,

25 foram atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. O dubleto em δ 7,53 ($J=2,5\text{Hz}$) foi atribuído ao hidrogênio 2'. O dubleto em δ 6,82 ($J=8,5\text{Hz}$) e o duplo dubleto em δ 7,67 ($J=2,5$ e $8,5\text{Hz}$) foram atribuídos a H-5' e H-6', respectivamente. Os sinais observados (Tabela 14) são típicos de aglicona quercetina (HARBONE, 1986). O espectro de RMN ^1H apresentou um

30 dubleto em δ 5,37 ($J=7,5\text{Hz}$), que foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar. A constante de acoplamento deste hidrogênio é típica de ligação α -glicosídica. Os multipletos na região de δ 3,38, e δ 3,60 foram atribuídos

aos hidrogênios metínicos e metilênicos da porção glicosídica. No espectro de RMN ^{13}C , a substância P3 apresentou 15 sinais referentes a aglicona e seis sinais referentes ao glicosídeo (Tabela 14). O sinal na região de δ 133,4 (C-3), com deslocamento diamagnético, bem como, os sinais em δ 156,1 (C-2), δ 177,4 (C-4) e δ 161,2 (C-5) com deslocamentos paramagnéticos em relação a quercetina, são típicos da presença de uma unidade glicosídica no C-3-O do anel C (AGRAWAL, 1989). A presença carbonos aromáticos oxigenados foi confirmada pelos sinais em δ 161,2 (C-5), δ 144,8 (C-3') e δ 148,4 (C-4') no espectro de RMN ^{13}C . O sinal referente a C-7, apesar de não se visualizar no espectro de RMN ^{13}C , pode ser confirmado pelo experimento de gHMBC, onde se observa as correlações deste carbono com os hidrogênios H-6 e H-8. O espectro apresentou, ainda, cinco sinais na região entre δ 60,02 - 75,9, além do carbono anomérico, típicos de uma hexose. O sinal referente ao C-1" anomérico apresenta deslocamento δ 102,2. O sinal em δ 60,02 foi atribuído a C-6". Os demais sinais foram atribuídos aos carbonos metínicos do açúcar, mediante análise das constantes de acoplamento e multiplicidades dos sinais (Tabela 14), bem como, comparações com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; MARKHAM, 1978).

A substância P4 foi identificada como quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (8). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (Tabela 15), referentes à porção aglicona, apresentaram deslocamentos e multiplicidades semelhantes àqueles apresentados pela substância P3, sugerindo tratar-se da mesma aglicona, a quercetina. O espectro de RMN ^1H apresentou um dubleto em δ 5,25 ($J=5,0\text{Hz}$) o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar. A constante de acoplamento deste hidrogênio é típica de ligação α -glicosídica. Os multipletos na região de δ 3,38, e δ 3,60 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos e metilênicos da porção glicosídica, pela comparação com dados da literatura (FRAISSE, 2000). No espectro de RMN ^{13}C apresentou 15 sinais referentes à aglicona e seis sinais referentes ao glicosídeo (Tabela 15), sendo que os sinais referentes à aglicona eram semelhantes aqueles apresentados por P1, confirmando tratar-se da mesma aglicona, a quercetina. Na região entre δ 64,3- 71,1 foram observa-

dos quatro sinais, além do carbono anomérico em δ 101,4, típicos de uma pentose. Os demais sinais (Tabela 15) foram atribuídos, mediante comparações com dados da literatura, aos carbonos metínicos do açúcar (FRAISSE 2000; MARKHAM, 1978).

5 A substância P6.1 foi identificada como quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (9). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (Tabela 16), referentes à porção aglicona, apresentaram deslocamentos e multiplicidades semelhantes àqueles apresentados pela substância FM-P4, sugerindo tratar-se da mesma aglicona, a quercetina. O espectro de RMN ^1H apresentou um dubleto em δ 5,26, com constante de acoplamento de 1,0 Hz, o qual
10 foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar, típico de ligação α -glicosídica. O dubleto observado em δ 0,82 ($J=6,0\text{Hz}$), referente a H-6" metílico é característico de ramnose. Os demais sinais na região entre δ 3,12 e 3,97 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos glicosídicos, pela observação da multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento no espectro de
15 RMN ^1H . No espectro de RMN ^{13}C , apresentou 15 sinais referentes à aglicona e seis sinais referentes ao glicosídeo (Tabela 16), sendo que os sinais referentes à aglicona eram semelhantes àqueles apresentados por P1, confirmando tratar-se da mesma aglicona, a quercetina. O espectro de RMN ^{13}C
20 apresentou ainda seis sinais referentes à porção glicosídica, caracterizando uma hexose. Os sinais com deslocamento químico δ 102,2 e δ 17,6 foram atribuídos ao carbono anomérico C-1" e ao carbono metílico C-6". Os demais sinais (Tabela 16) foram atribuídos aos carbonos metínicos do açúcar, mediante comparações com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; MARKHAM,
25 1978).

 A substância P6.2 foi identificada como miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (11). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H , referentes à porção aglicona, apresentaram deslocamentos e multiplicidades semelhantes àqueles apresentados pela substância P2 (Tabela 17),
30 sugerindo tratar-se da mesma aglicona, a miricetina. A região do espectro referente à unidade glicosídica apresentou um dubleto em δ 5,50 ($J=1,5\text{Hz}$), o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar, típico de ligação

α -glicosídica. O dubleto observado em δ 0,83 ($J=5,5\text{Hz}$), referente a H-6" metílico é característico de ramnose. Os sinais em δ 3,30, δ 3,60, δ 3,81 e δ 5,47 foram atribuídos aos hidrogênios glicosídicos em C-4", C-5", C-3" e C-2", respectivamente. O deslocamento químico observado para o hidrogênio anomérico (δ 5,50) e H-2" (δ 5,47), bem como, a presença no espectro de RMN ^1H de um singleto em 6,92 (2H), sugeriam a presença de um grupo aromático ligado a unidade glicosídica. O espectro de RMN ^{13}C apresentou os sinais típicos da aglicona miricetina (Tabela 17). Para a porção glicosídica, o espectro de RMN ^{13}C apresentou, um sinal com deslocamento químico δ 98,3, atribuído ao carbono anomérico C-1" e um sinal em δ 17,6, típico do carbono metílico C-6" de ramnose. Os demais sinais (Tabela 17) foram atribuídos, mediante comparações com dados da literatura, e observação das correlações no experimento gHMQC e gHMBC. A presença de um sinal em δ 165,7, deslocamento químico típico de carbonila de éster, os sinais em δ 119,4; δ 108,0; δ 145,0 e δ 138,6) típicos de carbono aromático, bem como o deslocamento químico atípico observado para C-1" e C-2", indicaram a presença de um éster de ácido gálico ligado ao carbono C-2" da ramnose, identificando a substância como sendo a miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnose. A identificação foi confirmada pela comparação dos dados obtidos com aqueles constantes na literatura (LEE, 2000; NICOLIER, 1983).

A substância P5.3 foi identificada como miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (**10**). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (Tabela 18), referentes a aglicona, e ao éster de ácido gálico foram semelhantes àqueles observados em P62, sendo constatado, apenas, diferença nos deslocamentos químicos referentes à unidade glicosídica. O espectro de RMN ^1H apresentava um dubleto em δ 5,04 ($J=2,0\text{ Hz}$), atribuído ao hidrogênio anomérico C-1". O dubleto observado em δ 0,83 ($J=5,5\text{Hz}$), referente a H-6" metílico é característico de ramnose. Os sinais em δ 3,67, δ 3,50, δ 5,03 e δ 4,3 e foram atribuídos a H-5", H-4", H-3" e H-2". O espectro de RMN ^{13}C , apresentou sinais com deslocamento químico semelhante àqueles apresentados por P62, sendo constatado divergências significativas apenas no deslocamento químico dos carbonos C-1" (δ 102,7), C-2" (δ 67,8), C-3" (δ 73,9) e C-

4" (δ 70,8), indicando que o éster de ácido gálico encontra-se ligado na unidade glicosídica na posição C-3" (Tabela 18). Os dados foram confirmados pela comparação com aqueles constantes na literatura (LEE, 2000).

Na Figura 2 estão ilustradas as estruturas de todas as substâncias isoladas e/ou identificadas a partir dos estudos fitoquímicos em folhas de *Sclerolobium*.

Tabela : Dados de RMN ^1H e ^{13}C de α -tocoferol (1) (500 MHz e 125 MHz, respectivamente, CDCl_3).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2	-----	74,5
3	1,7 t ($J=7,0\text{Hz}$)	32,7
4	2,53t ($J=7,0\text{Hz}$)	20,8
4 ^a	-----	117,4
5	-----	118,5
6	-----	145,6
7	-----	121,0
8	-----	122,6
8 ^a	-----	145,6
1'	d 1,0 m	39,9
2'		21,1
3'	1,0/1,3 (m)	37,5
4'	d 1,7 (m)	32,7
5'	1,0/1,3 (m)	37,5
6'	□ 1,1 (m)	24,8
7'	1,0/1,3 (m)	37,3
8'	1,3 (m)	32,8
9'	1,0/1,3 (m)	37,4
10'	1,1 (m)	24,8
11'	1,45 (m)	39,4
12'		28,0
2-CH ₃	1,15 (s)	23,8
5-CH ₃	2,03 (s)	11,2

7-CH ₃	2,03 (s)	12,2
8-CH ₃	2,03 (s)	11,7
4'-CH ₃	0,8 (d)	19,6
8'-CH ₃	0,8 (d)	19,7
12'-CH ₃	0,8 (d)	22,6
12'-CH ₃	0,8 (d)	22,7

Tabela : Dados de RMN ¹H e ¹³C do esqualeno (2) (500 MHz e 125 MHz, CDCl₃)

C	RMN ¹H (ppm)	RMN ¹³C (ppm)
1 e 24	1,69 (6H, dd, J= 1,0 e 1,5 Hz)	25,7
2 e 23	-----	131,2
3 e 22	5,10 (2H, m)	124,4
4 e 21	2,10 (4H)	26,7
5 e 20	2,01 (4H)	39,8
6 e 19	-----	134,9
7 e 18	5,11 (2H)	124,3
8 e 17	2,01 (4H)	28,3
9 e 16	2,01 (4H)	39,7
10 e 15	-----	135,1
11 e 14	5,10 (2H)	124,3
12 e 13	2,01 (4H)	28,3
25 e 30	1,61 (6H)	17,7
26 e 29	1,61 (6H)	16,0
27 e 28	1,61 (6H)	16,0

Tabela : Dados de RMN ¹H e ¹³C de lupeol (3) (500 MHz e 125 MHz, respectivamente, CDCl₃)

C	RMN ¹H	RMN ¹³C
1	*	33,2
2	*	25,4
3	3,35 (t, J = 2,5 Hz)	76,7
4	-----	* *

5	*	49,0
6	*	18,3
7	*	34,2
8	-----	41,0
9	*	50,4
10	-----	**
11	*	20,9
12	*	25,2
13	*	38,0
14	-----	42,9
15	*	27,4
16	*	35,6
17	-----	43,0
18	*	48,2
19	*	47,9
20	-----	150,5
21	*	29,8
22	*	40,0
23	0,94 (3H, s)	28,2
24	1,00 (3H, s)	22,0
25	0,80 (3H, s)	16,1
26	0,99 (3H, s)	15,9
27	0,82 (3H, s)	14,6
28	0,76 (3H, s)	18,0
29 ^a	4,54 (1H, dl, $J= 2,0$	109,3
29b	Hz)	
	4,66 (1H, dj, $J= 2,0$	
	Hz)	
30	1,66 (3H, d, $J_{30,29} = 1,5$	19,3
	Hz)	

* Sinais sobrepostos com os da substância FH62, deslocamentos químicos entre δ 0,9 e 2,4.

** Sinais sobrepostos.

Tabela : Dados de RMN ^1H e ^{13}C de lupenona (4) (500 MHz e 125 MHz, respectivamente, CDCl_3).

C	RMN ¹H (ppm)	RMN ¹³C (ppm)
1	1,30 (2H)	39,6
2		34,1
3	-----	218,1
4	-----	47,3
5	1,25 (1H)	55,0
6	1,36 (2H)	19,6
7	1,36 (2H)	33,6
8		40,8
9	1,31 (1H)	49,8
10		36,9
11	1,59 (2H)	21,5
12	1,63 (2H)	25,2
13	1,59 (1H)	38,2
14		42,9
15	1,00 (2H)	27,5
16	1,43(2H)	35,5
17		43,0
18	1,30 (1H)	48,3
19	2,30 (1H)	48,0
20		150,8
21	1,00 (2H)	29,8
22	1,30 (2H)	40,0
23	0,95 (3H, s)	21,0
24	0,99 (3H, s)	26,6
25	0,86 (3H, s)	15,8
26	0,99 (3H, s)	15,9
27	0,88 (3H, s)	14,4
28	0,72 (3H, s)	18,0
29a	4,50 (1H, dl, J= 2,5 Hz)	109,2
29b	4,60 (1H, dl, J= 2,5 Hz)	
30	1,61 (3H, sl)	19,3

Tabela – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P1 [miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (5)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO- d_6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		156,1*
3		134,8
4		177,7
5	12,6 (sl)	161,3
6	6,17 (d, $J=2,0$ Hz)	98,8
7		165,7
8	6,35 (d, $J=2,0$ Hz)	93,7
9		156,2*
10		103,6
1'		119,9
2'	7,20 (s)	108,5
3'		145,4
4'		136,7
5'		145,4
6'	7,20 (s)	108,5
1''	5,30 (d, $J=7,5$ Hz)	102,1
2''	3,60 (m)	71,2
3''	3,38 (m)	73,9
4''	3,64 (m)	68,0
5''	3,38 (m)	75,9
6''	3,45 (m)	60,0
5-OH	12,6 (sl)	-----

Tabela – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P2 [miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (6)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO- d_6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		157,6
3		134,4
4		177,8
5		161,4

6	6,18 (d, $J=2,0$ Hz)	98,8
7		164,4
8	6,35 (d, $J=2,0$ Hz)	93,6
9		156,5
10		104,0
1'		119,7
2'	6,88 (s)	108,0
3'		145,9
4'		136,6
5'		145,8
6'	6,88 (s)	108,0
1"	5,20(sl)	102,0
2"	3,54 (m)	70,4
3"	3,38 (m)	70,6
4"	3,15 (m)	71,4
5"	3,98 (sl)	70,1
6"	0,89 (d, $J=6,5$ Hz)	17,6
5-OH	12,6 (sl)	-----

Tabela - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P3 [quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (7)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO- d_6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		156,1*
3		133,4
4		177,4
5		161,2
6	6,19 (d, $J=2,0$ Hz)	98,7
7		164,0
8	6,40 (d, $J=2,0$ Hz)	93,5
9		156,2*
10		103,8
1'		121,0
2'	7,53 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	115,1
3'		144,8
4'		148,4

5'	6,82 (d, $J=8,5\text{Hz}$)	115,9
6'	7,67 (dd, $J=2,5$ e $8,5\text{Hz}$)	121,9
1"	5,36 (d, $J=7,5\text{ Hz}$)	101,8
2"	3,57 (t, $J=8,0\text{ Hz}$)	71,2
3"	3,38 (dd, $J= 8,0$ e $3,5\text{ Hz}$)	73,1
4"	3,64 (d $J=3,5\text{ Hz}$)	67,9
5"	3,38 (m)	75,8
6"	3,45 (m)	60,0
5-OH	12,6 (sl)	-----

Tabela - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P4 [(quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (8))] (500 MHz e 125 MHz; DMSO- d_6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		156,3
3		133,8
4		177,5
5	12,6 (sl)	161,2
6	6,18 (d, $J=1,5\text{ Hz}$)	98,7
7		164,4
8	6,38 (d, $J=1,5\text{ Hz}$)	93,6
9		156,3
10		104,0*
1'		120,9
2'	7,50 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	115,8
3'		145,0
4'		148,6
5'	6,83 (d, $J=8,5\text{Hz}$)	115,4
6'	7,61 (dd, $J=2,5$ e $8,5\text{ Hz}$)	122,0
1"	5,25 (d, $J=5,0\text{ Hz}$)	101,4
2"	3,57	70,8
3"	3,40	71,1
4"	3,57	66,1
5"	3,38	64,3

5-OH	12,6 (sl)	-----
------	-----------	-------

Tabela – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P6.1 [quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (9)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO-*d*6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		157,2
3		134,2
4		177,7
5		161,2
6	6,20 (sl)	98,6
7		164,2
8	6,38 (sl)	93,6
9		156,4
10		104,0
1'		120,7
2'	7,30 (d, $J=2,0\text{Hz}$)	115,6
3'		145,1
4'		148,4
5'	6,87 (d, $J=8,5\text{Hz}$)	115,4
6'	7,26 (dd, $J=2,0$ e $8,5\text{ Hz}$)	121,0
1''	5,25 (d, $J=1,0\text{ Hz}$)	101,8
2''	3,90 (dd, $J=1,0$ e $3,0\text{ Hz}$)	70,0
3''	3,50 (dd, $J=3,0$ e $9,5\text{ Hz}$)	70,3
4''	3,14 (t, $J=9,5\text{ Hz}$)	71,1
5''	3,21(dd, $J=6,0$ e $9,5\text{ Hz}$)	70,5
6''	0,82 (d, $J=6,0\text{Hz}$)	17,4
5-OH	12,6 (sl)	-----

Tabela – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P6.2 [miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (11)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO-*d*6).

C	RMN ^1H	RMN ^{13}C
2		157,5
3		133,4

4		177,5
5		161,3
6	6,20 (sl)	98,7
7		165,0
8	6,38 (sl)	93,6
9		156,5
10		104,0
1'		119,8
2'	6,95 (s)	108,8
3'		145,8
4'		136,6
5'		145,8
6'	6,95(s)	108,8
1"	5,50(d, $J=1,5\text{Hz}$)	98,3
2"	5,47 (dd, $J=1,5$ e $3,0\text{Hz}$)	71,7
3"	3,81 (dd, $J=3,0$ e $8,5\text{Hz}$)	70,1
4"	3,30 (t, $J=8,5$)	68,6
5"	3,6 (m)	70,4
6"	0,94(d, $J=5,5\text{Hz}$)	17,6
1'''		119,4
2'''	6,92	108,0
3'''		145,4
4'''		138,6
5'''		145,4
6'''	6,92	108,0
C=O		165,0
5-OH	12,6 (sl)	-----

Tabela – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de P5.3 [miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (10)] (500 MHz e 125 MHz; DMSO- d_6)

C	RMN ¹H	RMN ¹³C
2		157,6
3		134,8
4		177,7
5		161,3
6	6,18 (d, J=2,0Hz)	98,7
7		164,2
8	6,36 (d, J=2,0Hz)	93,5
9		156,5
10		104,0
1'		120,0
2'	7,03 (s)	108,9
3'		145,8
4'		136,5
5'		145,8
6'	7,03(s)	108,9
1''	5,04(d, J=2,0Hz)	102,7
2''	4,3 (sl)	67,8
3''	5,03	73,9
4''	3,50 (t, J=10 Hz)	70,8
5''	3,67(dd, J=10 e 6,0Hz)	68,7
6''	0,91(d,J=6,0Hz)	17,4
1'''		119,6
2'''	6,88	107,9
3'''		145,3
4'''		138,3
5'''		145,3
6'''	6,88	107,9
C=O		165,7

Exemplo 8

Avaliação das ações antioxidantes de extratos e substâncias obtidos de folhas de *Sclerolobium*.

A. DPPH. As amostras de extratos vegetais e substâncias puras
5 são solubilizadas em MeOH, obtendo-se soluções de concentrações conhe-

cidas, as quais são diluídas em placas de 96 poços, obtendo-se sete soluções de diferentes concentrações. Uma alíquota com volume de 100µl de cada solução (triplicata) é transferida para a placa de leitura, em seguida adiciona-se 200µl de solução de DPPH (40 µg ml⁻¹), a placa é colocada imediatamente ao abrigo da luz, aguarda-se por 30 minutos e faz-se a leitura.

Os extratos hidro-alcoólicos, obtidos através da extração de folhas de *Sclerolobium* spp com água, etanol ou mistura destes, e as substâncias antioxidantes representadas pelas fórmulas 5 a 11 (Figura 2) possuem propriedades antioxidantes, conforme demonstram os resultados da capacidade seqüestradora do radical DPPH (Figuras 5 a 8). Estes resultados também indicam maior potencial antioxidante para os extratos obtidos de *S. aureum* em relação aos obtidos de folhas das outras duas espécies. Também é evidente o maior potencial antioxidante (seqüestrador de radicais livres) dos galatos de miricetrina **10** e **11** (Figura 8), o que pode ser explicado pela presença de dois grupos triidroxifenílicos em cada uma dessas substâncias.

Os extratos hidro-alcoólicos de *S. aureum*, por apresentarem melhores resultados nos testes com DPPH, foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade protetora de membrana em testes de peroxidação lipídica.

B. Peroxidação lipídica. A análise de lipoperoxidação utilizou lipossomos de fostadilcolina de ovo como fonte lipídica e ferro/ácido ascórbico como iniciador de lipoperoxidação. As amostras foram incubadas a 37°C e após tempos pré-determinados, retirou-se amostras para reagirem com ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e temperatura elevada. Nesta reação forma-se o complexo malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico, que foi medido a 535nm. O MDA é um subproduto da reação de peroxidação lipídica e, portanto uma medida indireta da mesma.

Os resultados obtidos confirmam que a partir de 200mg/ml os extratos polares apresentam proteção total à peroxidação lipídica lipossomal (Figura 9).

O extrato apolar (EA), obtidos através da extração de folhas de *Sclerolobium aureum* com hexano, e frações deles obtidas através de fracio-

namento por extração em fase sólida utilizando como adsorvente carvão ativo, mais especificamente a fração FAL possuem propriedades antioxidantes, conforme demonstram os resultados obtidos em ensaios de peroxidação lipídica. (Figura 9).

5 A associação dos extratos hidro-alcoólicos (EHA) com extratos apolares (EH), mais especificamente associação dos extratos etanol/água 50:50 (v/v) com extrato hexânico de folhas de *S. aureum*, apresentaram efeito sinérgico, justificando a utilização desta combinação na preparação de fórmulas cosméticas (Figura 10).

10 Associação das frações antioxidante hidrofílica (FAH) e antioxidante lipofílica (FAL) obtidas dos extratos EHA e EH de folhas, mais especificamente de folhas de *S. aureum*, apresentaram efeito sinérgico, justificando a utilização desta combinação na preparação de fórmulas cosméticas (Figura 10).

15 A ausência de pigmentos, mais especificamente clorofilas, e o maior teor das substâncias antioxidantes 1 a 11 nas frações FAH e FAL torna mais atraente a utilização de combinação de FAH + FAL na formulação de cosmético, em relação à utilização direta dos extratos brutos EHA e EH.

Os extratos hexânicos e hidro-alcoólicos, bem como as frações
20 FAL e FAH poderão ser combinadas em quaisquer proporções para a preparação de formulações cosméticas.

Exemplo 9

Análises toxicológicas preliminares *in vitro* para avaliação de eventuais ações cito e fototóxica.

A. Teste de Ames

25 A avaliação do potencial mutagênico da substância teste SPMH através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames).

O Teste de Ames foi conduzido com a fração SPMH, utilizando-se as cepas TA97a, TA98, TA 100, TA 102 e TA 1535. O teste foi realizado com e sem ativação metabólica. A amostra foi testada em cinco concentrações 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 5,0 mg/placa.

Teste de Ames, realizado em células procariontes de *Salmonella typhimurium* com e sem ativação metabólica, conduzido com extratos polares (EHA) apolares (EH) de folhas de espécies de *Sclerolobium*, nas concentrações de 0,001 a 5,0 mg/placa, indicou ausência de potencial mutagênico nessas amostras.

B. Fototoxicidade e citotoxicidade

B.1. Análise de solubilidade e definição das concentrações

testada: a solubilidade das amostras é avaliada de acordo com ensaios padronizados internacionalmente pelo National Institute of Health dos Estados Unidos (NIH-USA). Para uma melhor solubilização das amostras em soluções aquosas como DEMEN (no ensaio de citotoxicidade) ou PBS (no ensaio de fototoxicidade) é permitida a utilização de uma concentração máxima de 1% de DMSO ou etanol. Assim, massas dos extratos vegetais variando de 10 a 30 mg foram dissolvidas em 10 ml de solução contendo 1% DMSO ou etanol em DMEM (para citotoxicidade), e 1% DMSO ou etanol em PBS (para fototoxicidade), de acordo com a melhor solubilidade de cada extrato visualmente avaliada.

A partir das soluções iniciais, foram preparadas as diluições indicadas nos testes. As concentrações empregadas nos testes de citotoxicidade e fototoxicidade, de acordo com os resultados dos testes de solubilidade das amostras, variam de 0,003 a 3 mg/ml.

B.2. Citotoxicidade: as células 3T3 são plaqueadas em placas de 96 poços estéreis, na densidade de 1×10^4 célula/poço. Depois de 24 horas as células são incubadas durante 24 horas com as amostras diluídas em meio de cultura com 5% de SFB. Posteriormente, são incubadas com *Neutral Red* durante 3 horas. O excesso de corante é lavado com PBS e os cristais formados são dissolvidos com etanol/ácido acético/água (50:1:49). A leitura é realizada a 540 nm e os resultados são utilizados para calcular a concentração em que 50% das células estão viáveis (IC_{50}). Assim quanto maior o valor de IC_{50} , menor o potencial citotóxico da amostra e vice-versa.

O teste para avaliação de citotoxicidade dos extratos polares (HA) e apolares (H) de folhas de espécies de *Sclerolobium*, através da incu-

bação das amostras com células 3T3 por 24 horas (NIH Publication 2001), indicou ausência de ação citotóxica em concentrações menores que 1,7mg/ml para os extratos polares e apolares de *S. aureum* e extrato apolar de *S. denudatum*.

5 **B.3. Fototoxicidade:** as células 3T3 foram plaqueadas em placas de 96 poços estéreis, na densidade de 1×10^4 célula/poço. São preparadas duas placas idênticas: uma delas foi irradiada com UVA e a outra será mantida no escuro, como controle. Depois de 24 horas de plaqueamento, as células foram incubadas durante 1 hora no escuro com as
10 amostras diluídas PBS. Após isso, uma delas foi irradiada com 5Joules/cm² de luz UVA, por 50 minutos. As placas foram lavadas com PBS e recebem meio de cultura com 10% de soro fetal bovino para o período de recuperação (cerca de 12 horas). No segundo dia de experimento as células foram incubadas com uma solução de Neutral Red por 3 horas. O excesso
15 de corante foi lavado com PBS e os cristais formados foram dissolvidos com etanol/ácido acético/água (50:1:49). A leitura foi realizada a 540nm e os resultados são utilizados para calcular a concentração em que 50% das células estão viáveis (IC₅₀) em cada uma das placas. A razão entre os dois valores é o Fator de Foto Irritação (PIF), que classifica a amostra como
20 fototóxica ou não.

Avaliação de ação fototóxica dos extratos polares (EHA) e apolares (EH) de folhas de espécies de *Sclerolobium* foi medida pela captação do Neutral Red pelas células 3T3 que sobrevivem à incubação com a amostra, sob radiação UVA, segundo o protocolo de Borenfreund & Puerner (1985),
25 padronizado pelo NIH (ZEBET/ECVAM/COLIPA 1998).

Os resultados obtidos nos testes de Ames em células procariontes de *S. typhimurium* e de citotoxicidade e fototoxicidade em células 3T3, validam o uso seguro dos extratos e frações deles derivadas em formulações cosméticas.

30 Composição cosmética ou farmacêutica

A composição cosmética ou farmacêutica objeto da presente invenção compreende:

(i) de 0,00001 % a 40,0 %, em massa, de extrato de *Sclerolobium spp* obtido pelo processo de extração objeto da presente invenção; e

(ii) um veículo fisiologicamente aceitável;

5 sendo todas as quantidades baseadas na massa total da composição.

Preferencialmente, esta composição compreende 0,001 a 8,0%, em massa, sendo mais preferencialmente de 0,01% a 2,00%, em massa, de um extrato de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*, preferencialmente, os ditos extratos contendo α -tocoferol, γ -tocoferol, esqualeno e lupenona.

10 Os principais exemplos de formas galênicas de produtos que podem ser preparados a partir do extrato de *Sclerolobium spp* objeto desta invenção ou a partir de sistemas de liberação de ativos compreendendo tal extrato são:

a) Emulsão fluida ou semisólida, por exemplo:

- 15
- ❖ Leite hidratante corporal;
 - ❖ Leite hidratante para o rosto;
 - ❖ Loção hidratante corporal;
 - ❖ Loção hidratante para o rosto;
 - ❖ Protetores ou bloqueadores solares de uso
- 20 adulto ou infantil, voltados ou não ao uso concomitante à prática de esportes;
- ❖ Hidratantes corporais ou faciais;
 - ❖ Produtos anti-sinais corporais ou faciais;
 - ❖ Produtos firmadores corporais ou faciais;
- 25
- ❖ Produtos autobronzeadores;
 - ❖ Produtos repelentes de insetos;
 - ❖ Hidratantes corporais ou faciais iluminadores da pele;
- ❖ Produtos para anti-celulite;
- 30
- ❖ Produtos para pele sensível.

b) Géis, por exemplo:

- ❖ Produtos para o couro cabeludo;

- ❖ Preparações farmacêuticas de aplicação tópica;
 - ❖ Preparações cosméticas corporais ou faciais para uso infantil;
 - ❖ Produtos anti-acne;
 - ❖ Produtos para anti-celulite;
 - ❖ Produtos para pele sensível;
 - ❖ Esfoliantes.
- c) Produtos para limpeza capilar e corporal, por exemplo:
- ❖ Xampus;
 - ❖ Sabonete líquido e em barra;
 - ❖ Esfoliantes.
- d) Suspensões, por exemplo:
- ❖ Pomadas;
 - ❖ Preparações cosméticas de ação localizada, específicas para região periocular, contorno dos lábios, lábios, antimanchas, antiolheiras, entre outras;
 - ❖ Linimentos;
- e) Pós, por exemplo:
- ❖ Pós faciais;
 - ❖ Talcos corporais;
 - ❖ Maquiagens.
- f) Outros exemplos:
- ❖ Batons e bases cerosas;
 - ❖ Blushes e Bases pigmentadas;
 - ❖ Tônicos.

Quanto ao veículo fisiologicamente aceitável, este consiste em uma base usual cosmética ou farmacêutica de acordo com a aplicação objetivada para a composição a ser preparada. Este veículo é constituído por compostos fisiologicamente inertes e adjuvantes usuais.

Serão listados, a seguir, alguns exemplos - de maneira não restritiva, mas apenas demonstrativa - de adjuvantes e constituintes inertes

compatíveis com as propriedades da composição aqui descrita e que, adicionalmente, podem ser empregues na presente composição cosmética e/ou farmacêutica:

5 - Água: A água é a base de diversas concretizações preferidas da composição cosmética da presente invenção, atuando como o veículo para os demais componentes. As composições da presente invenção compreendem água preferencialmente desmineralizada ou destilada em um percentual adequado (q.s.p.) para atingir 100% da fórmula com base no peso total da presente composição. Naturalmente, podem-se utilizar outros veículos cosmeticamente aceitáveis na presente invenção.

 - Agentes antioxidantes: BHT, tocoferol e/ou seus derivados, catequinas, taninos e/ou seus derivados, compostos fenólicos, hidroquinona, entre outros;

15 - Agentes conservantes: metilparabenos, propilparabenos, isotiazolinônicos, fenoxietanol;

 - Agentes formadores de filme: goma ágar, goma carragenana, alginatos, goma arábica, gelatina;

 - Agentes formadores de rede microcristalina de sustentação: dextranos, metil-acrilatos, PHB, PHA;

20 - Agentes poliméricos e/ou agentes copoliméricos: copolímeros de silicone, polímeros de siloxano e/ou silicone modificado, copolímeros de acrilato;

 - Agentes denaturantes: benzoato de denatônio;

25 - Agentes de consistência: ceras vegetais, hidrocarbonetos minerais, parafina, cera de abelha, cera branca, espermacete de baleia, manteiga de cacau, manteiga de karité, cera de cana-de-açúcar;

 - Emolientes: parafina líquida, óleo de palma, manteiga de cupuçu, lecitina, aminoácidos do leite, proteína de trigo, proteínas vegetais, óleos vegetais fosfolipídeos, ceramidas, ceramida de maracujá, esfingolipídeos, espermacete de baleia, lanolina, óleo de amêndoa, carbonato de dicapril, elastômeros de silicona, ciclometicona;

 - Agentes umectantes e/ou agentes hidratantes: glicerina, propi-

lenoglicol, ácido hialurônico, uréia, PCA;

- Agentes condicionantes: sais quaternários de amônio, siloxanos, siloxanos; e

- ativos.

- 5 Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações na forma de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Referências bibliográficas

- 10 KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress -new approaches for their evaluation. Biomed. Pharmacother., Paris, v. 53, n.4, p. 181-192, 1999.

- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and
15 topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

- DURIGAN, G. ; BAITELLO, João Batista ; FRANCO, Geraldo Antônio Daher Corrêa ; SIQUEIRA, Marinez Ferreira de . Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada. 1. ed. São Paulo: Páginas &
20 Letras, 2004. v. 1. 475 p.

- DIAS et al 1991 - Confirmar! Dias, L. E., Brienza Júnior, S., Pereira, C.A. Táxi-branco (*Sclerolobium paniculatum* Vogel), uma leguminosa arbórea nativa da Amazônia com potencial para recuperação de áreas degradadas. In: Kanashiro, M., Parrota, J. A. (Eds.). Manejo e reabilitação de
25 áreas degradadas e florestas secundárias na Amazônia. Paris: UNESCO, 1995. p. 148-153. ??? Dias, L. E., Alvarez, V. H., Jucksch, I., Barros, N. F. De, Brienza Júnior, S. Formação de mudas de táxi-branco (*Sclerolobium paniculatum*): resposta a calcáreo e fósforo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 26 (1): 69-76, 1991.

- 30 HE et al 2002 - HE, H.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and purification of Squalene from *Amaranthus* grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 368-372, 2002.

- KATSANDIS et al 1999 - KATSANIDIS, E.; ADDIS, P. B. Novel HPLC analysis of Tocopherols, Tocotrienols, and Cholesterol in tissue. *Free Radical Biology & Medicine*. 27, 11/12, 1137-1140, 1999.
- SALEEM, M, AFAQ, F, ADHAMI VM, et al. 2004. Lupeol modulates NF-kappa B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* (30): 5203-5214.
- SULTANA, S.; MOHAMMAD, S.; SHARMA, S.; KHAN, N. Lupeol, a triterpene prevents free radical induced macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 41, n. 8, p. 827-831, 2003.
- SHIRWAIKAR, A.; SETTY, M. M.; BOMMU, P.; KRISHNANAND, B. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch. – Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 42, n. 7, p. 686-690, 2004.
- TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G.; FLEKHTER, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. natural lupane derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 37-49, 2006.
- ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N. PAPAPEORGIOU, V. P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 5, p. 501-507, 2003.
- Ramirez-Apan, A.A., Perez-Castorena, A.L., and De Vivar, A.R., *Z. Naturforsch. (C)*, 2004, vol. 59, pp. 237–243.,
- REYES, C. P.; NÚÑEZ, M. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BUSSEROLLES, J.; ALCARAZ, M. J.; BAZZOCCHI, I. L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 5, p. 1573- 1579, 2006.
- MADUREIRA, A.M.; ASCENSO, J.R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J.P.; FREITAS, G.; FERREIRA, M.J.U. 2003. Evaluation of the Antiviral and Antimicrobial Activities of Triterpenes Isolated from *Euphorbia*

segetalis. *Journal Natural Products*, 17: 375-380

KIM et al 2001 - KIM, M.; JUNG, H. R.; MIN, T. Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-Lupen-3-ona from *Daedalopsis tricolor* (Bull, ex Fr.) Bond. Et Sing. Bulletin of the Korean Chemical Society. 22, 1, 59-62, 2001.

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

URSINI, F.; MAIORINO, M.; MIRAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. 1994. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 16(5), 547-53.

BROWN J E; KHODR H; HIDER R C; RICE-EVANS C A. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 3) 1173-8.

BUETTNER 1993; ROBAK, & GRYGLEWISKI 1988; HUSSAIN et al 1987; TOREL et al 1986

YEN, G.; WU, S.; DUH, P. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 7, p. 1687-1690, 1996.

HE, H.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus grain*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 2, p. 368-372, 2002.

REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S.; POPLAWSKI, J. Total assignment of ¹³C e ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potencial utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron*, v. 42, n. 13, p. 3419-3428, 1986.

MA, K.; HANO, Y.; QIU, F.; CHEN, Y.; NOMURA, T. Determination of the absolute stereochemistry of lupane triterpenoids by fucofuranoside methodo and ORD spectrum. *Tetrahedron Letters*, v. 45, n. 16, p. 3261-3263, 2004.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

- MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.;
5 MABRY, T. J. C-13 NMR studies of flavonoids .3. naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389-1397, 1978

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.

- 10 LEE, T.; QIU, F.; WALLER, G. R.; CHOU, C. Three new flavonoids from leaves of *Acacia confusa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 710-712, 2000.

NICOLLIER, G.; THOMPSON, A. C. Flavonoids of *Desmanthus illinoensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 1, p. 113-117, 1983.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração caracterizado por compreender as etapas de:
 - d) contactar o material vegetal escolhido de plantas pertencentes ao gênero *Sclerolobium* com, pelo menos, um solvente de extração adequado;
 - e) agitar a mistura; e
 - f) separar a fase líquida da fase sólida.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas espécies serem escolhidas do grupo que compreende *Sclerolobium aureum*, *Sclerolobium paniculatum*, *Sclerolobium denudatum* e mistura dos mesmos.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ser caracterizado pelo material vegetal ser escolhido dentre o grupo que compreende folha, caule, raiz, fruto, flores e mistura dos mesmos.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo solvente de extração apolar ser escolhido do grupo que compreende hexano, tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano e mistura dos mesmos.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo solvente de extração apolar ser o hexano.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, ser caracterizado pelo solvente de extração polar ser escolhido do grupo que compreende água, metanol, etanol, propanol, butanol, etileno glicol, propileno glicol, glicerol e mistura dos mesmos.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela mistura de água e etanol estar na proporção 1:1.
8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela agitação ser por meio de sonificação.
9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, ser caracterizado pela separação entre a fase líquida e a fase sólida ser realizada por centrifugação.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de adicionalmente incluir uma etapa de clareamento do extrato obtido em (c)

11. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado
5 pelo processo de clareamento do extrato compreender as seguintes etapas:

d) solubilizar o extrato em solvente adequado;

e) aplicar o extrato solubilizado do item a) em coluna contendo UM material adsorvente;

f) aplicar solução eluente à coluna do item b);

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
10 pela solubilização dos extratos vegetais da etapa d) ocorrer em solvente não polar escolhido do grupo que compreende hexano, tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, e suas misturas ou em um solvente polar selecionado de água, metanol, etanol, propanol, propileno glicol, butanol,
15 glicerol e mistura dos mesmos.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de o material adsorvente da etapa e) ser escolhido do grupo que compreende carvão ativo e/ou derivados, terra diatomácea e/ou derivados, resinas de polivinil-pirrolidona e derivados, resinas de poliestireno-divinilbenzeno e derivados e mistura dos mesmos.
20

14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo material adsorvente da etapa e) ser carvão ativo quando um extrato não polar for preparado ou resina de poliestireno-divinilbenzeno quando um extrato polar for preparado

15. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de solução eluente da etapa f) ser escolhida do grupo que compreende o hexano, o acetato de etila, água, etanol e mistura destes.
25

16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de a solução eluente da etapa f) ser uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 9:1 (v/v).
30

17. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de a solução eluente da etapa f) ser uma mistura de água e etanol

na proporção 1:1 (v/v).

18. Composição cosmética caracterizada por compreender:

a) extrato obtido através de um processo tal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17; e

5 b) veículo cosmeticamente aceitável.

19 - Composição farmacêutica caracterizada por compreender:

a) extrato obtido através de um processo tal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17; e

b) veículo cosmeticamente aceitável.

10 20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo veículo cosmeticamente aceitável ser uma loção, um creme, um shampoo, uma emulsão ou similares.

21. Uso de extrato obtível através de um processo tal como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17 caracterizado pelo
15 fato de ser para preparação de formulação cosmética ou farmacêutica apresentando atividade antioxidante.

22. Processo para preparação de extrato de plantas da espécie *Sclerolobium*, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de:

a) submeter folhas de plantas de *Sclerolobium* a uma extração
20 com hexano para obtenção de um extrato contendo componentes lipofílicos.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de ainda compreender a etapa de:

b) submeter o resíduo obtido em (a) a uma extração com uma
solução aquosa de etanol para obtenção de um extrato hidroalcoólico con-
25 tendo componentes hidrofílicos.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de ainda compreender a etapa de:

c) misturar os extratos obtidos em (a) e em (b) obtendo-se um
extrato único contendo tanto frações enriquecidas com componentes lipofíli-
30 cos quanto frações enriquecidas com componentes hidrofílicos.

25. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o extrato obtido em (a) é ainda tratado com pelo menos um

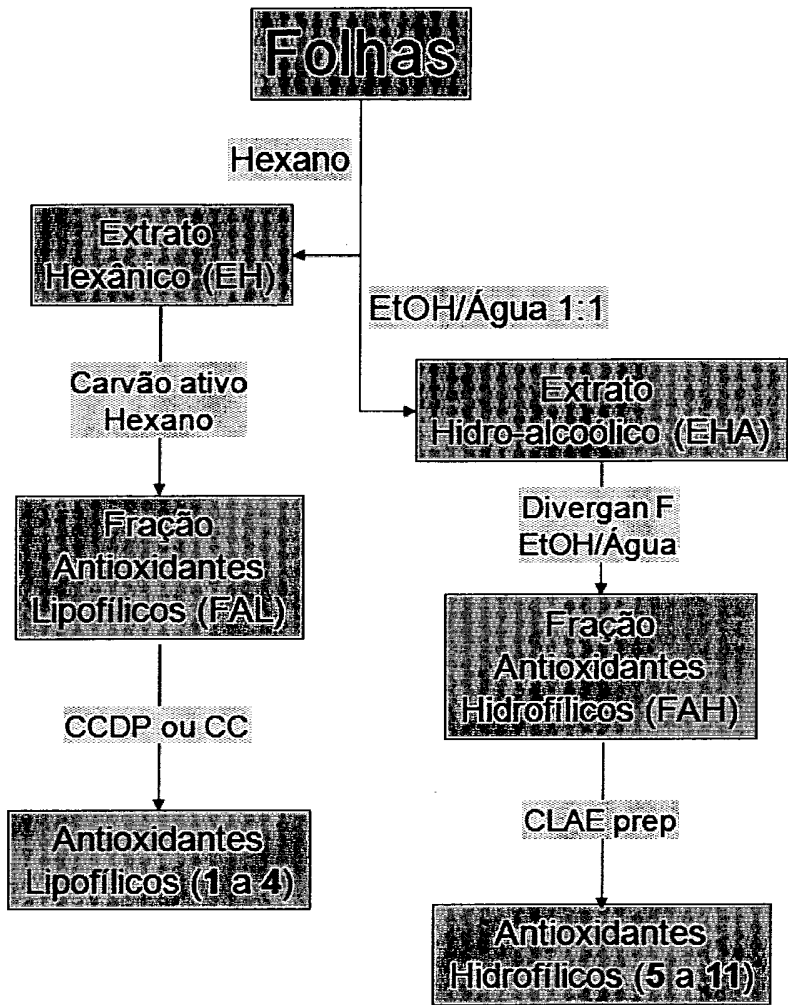
substrato adsorvente de origem natural e hexano para prover uma fração que contém esqualeno, α -tocoferol, lupeol e lupenona.

26. Processo de acordo com a reivindicação 22 ou 25, caracterizado pelo fato de que o extrato obtido em (b) é ainda tratado com pelo menos uma resina polimérica mista de adsorção, seguido por eluição com água e com mistura etanol/água para prover uma fração compreendendo flavonóides glicosilados.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, caracterizado pelo fato de que a fração hidrofílica obtida compreende Miricetina-3-O-galactopiranosídeo, Miricetina-3-O-ramnopiranosídeo, Quercetina-3-O-galactopiranosídeo, Quercetina-3-O-arabinopiranosídeo, Quercetina-3-O-ramnopiranosídeo, Miricetina-3-O-(3"-galoil-ramnopiranosídeo) e Miricetina-3-O-(2"-galoil-ramnopiranosídeo).

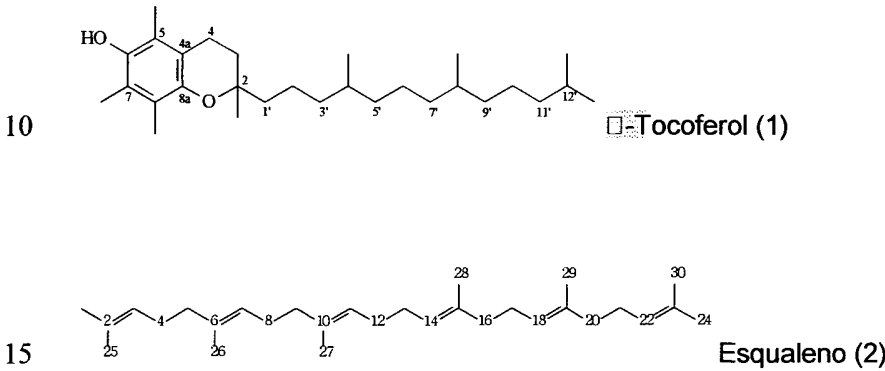
28. Composição cosmética, caracterizada pelo fato de compreender, como agente antioxidante, um extrato de plantas da espécie *Sclerolobium SSP* obténível de acordo com um processo tal como definido em qualquer uma das reivindicações 22 a 27.

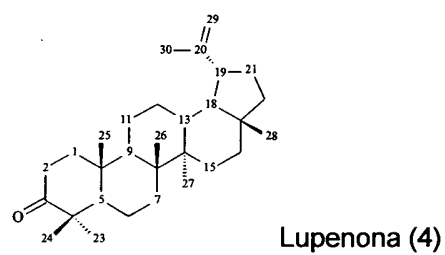
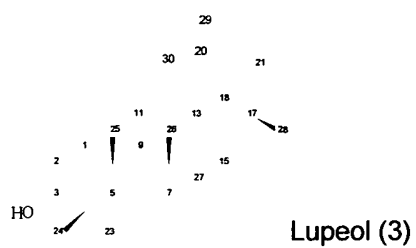
Figura 1



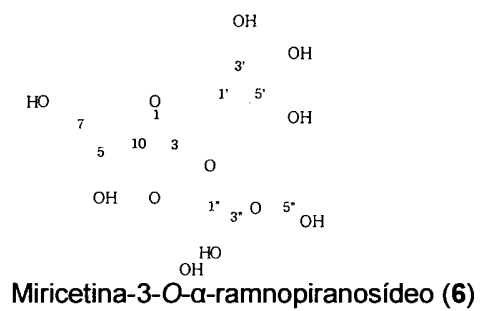
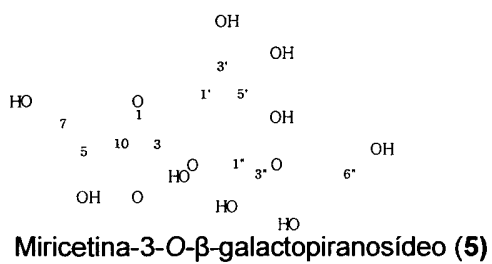
5

Figura 2.

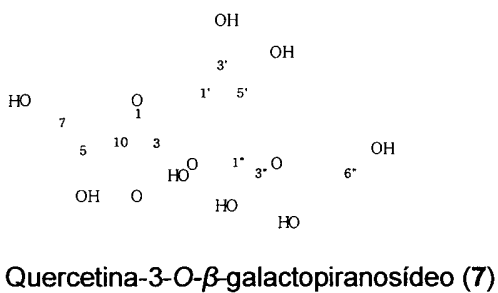




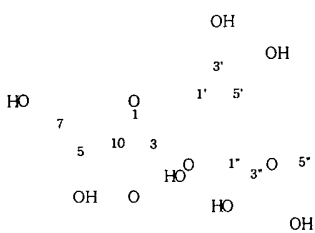
5



10

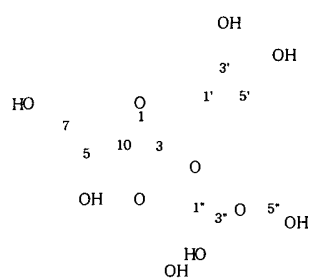


15



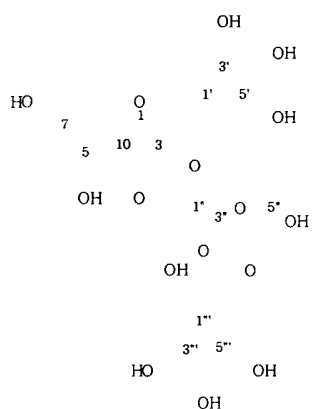
20

25



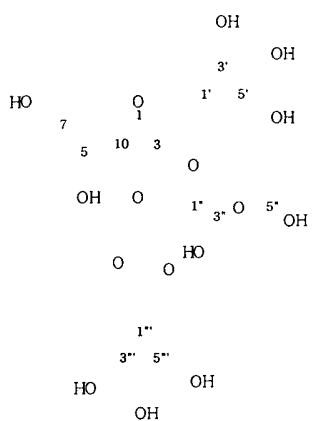
Quercetina-3-O- α -ramnopyranosídeo (9)

5



10

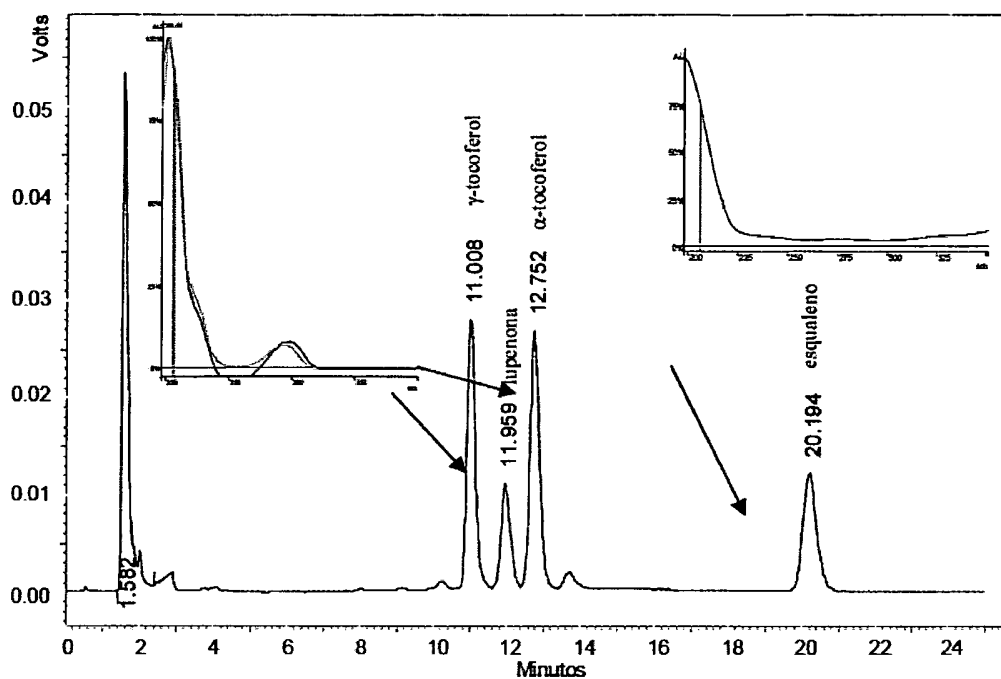
Miricetina-3-O-(3''-O-galloyl)- α -ramnopyranosídeo (10)



15

Miricetina-3-O-(2''-O-galloyl)- α -ramnopyranosídeo (11)

FIGURA 3..



Sclerolobium paniculatum - extrato hexânico

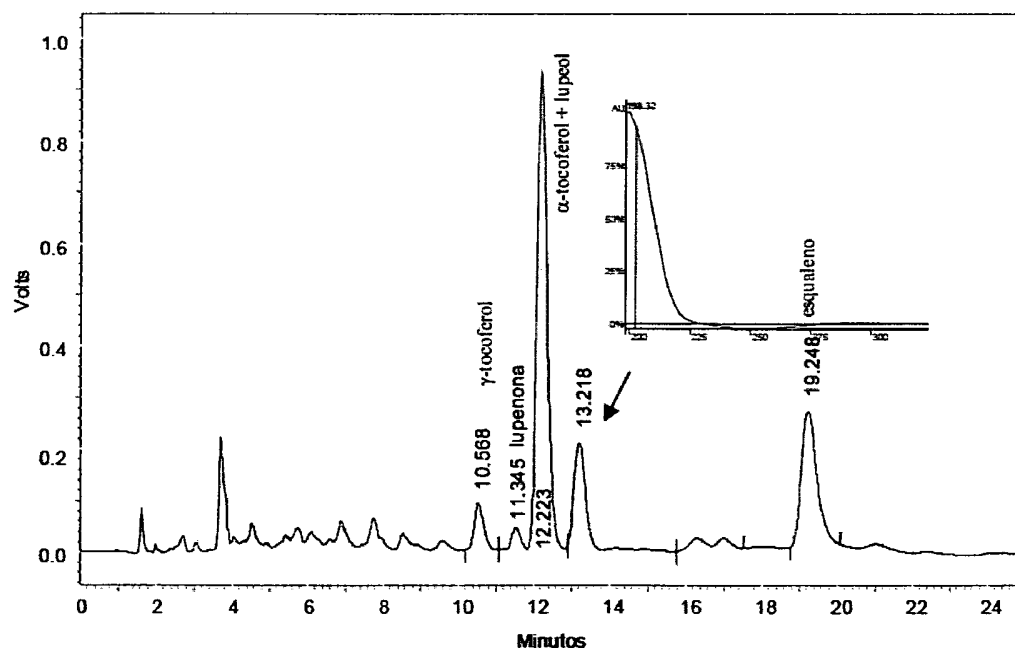
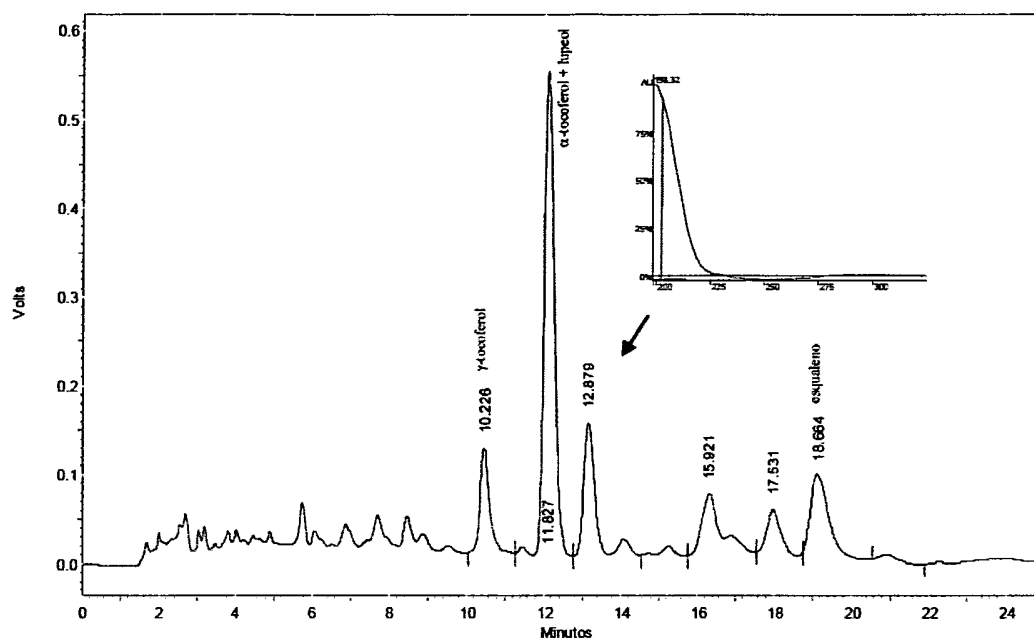


FIGURA 3 (cont.)

Sclerolobium aureum- extrato hexânico



Sclerolobium paniculatum – extrato hexânico

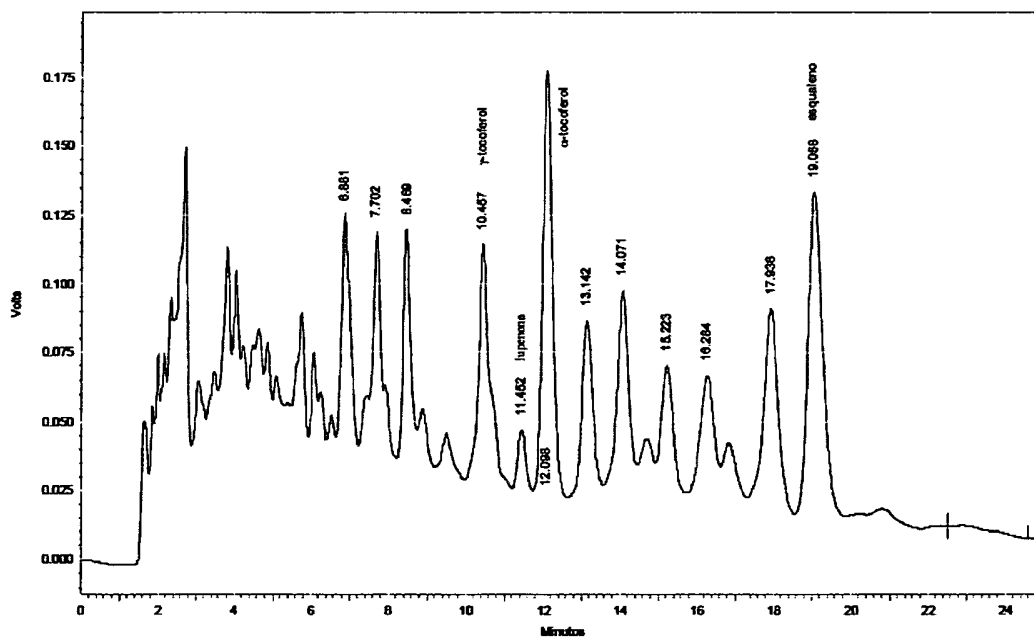
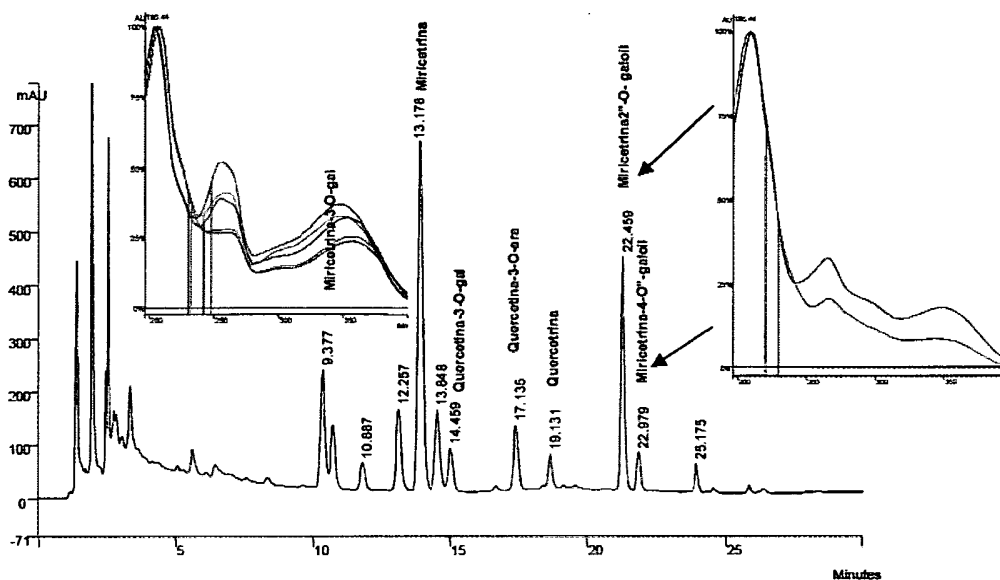


FIGURA 4.

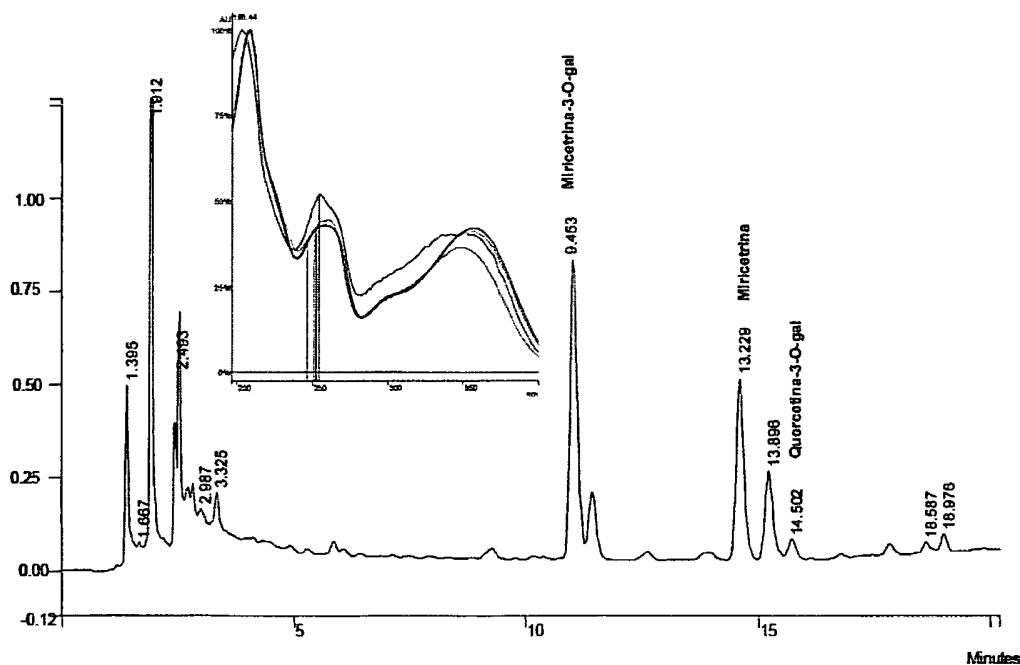
Cromatograma dos extratos hidro-alcoólico de, obtidos em CLAE-DAD e registrados em 254 nm. Coluna C18, eluída com 16% para 21% de B em 13', 21% para 35% de B em 25', 35% de B até 30min. Fluxo 1,5mL min⁻¹ (A –ac. Acético 0,5%; B- ACN).

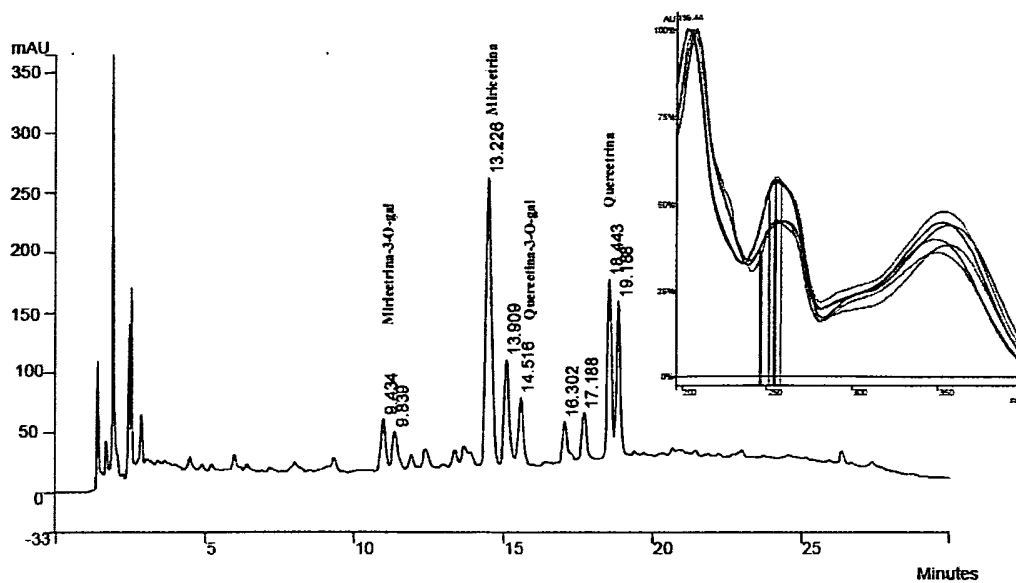
5 Injeção 20μL. Espectro no UV dos flavonóides identificados.

Sclerolium aureum



Sclerolobium paniculatum



Sclerolobium denudatum

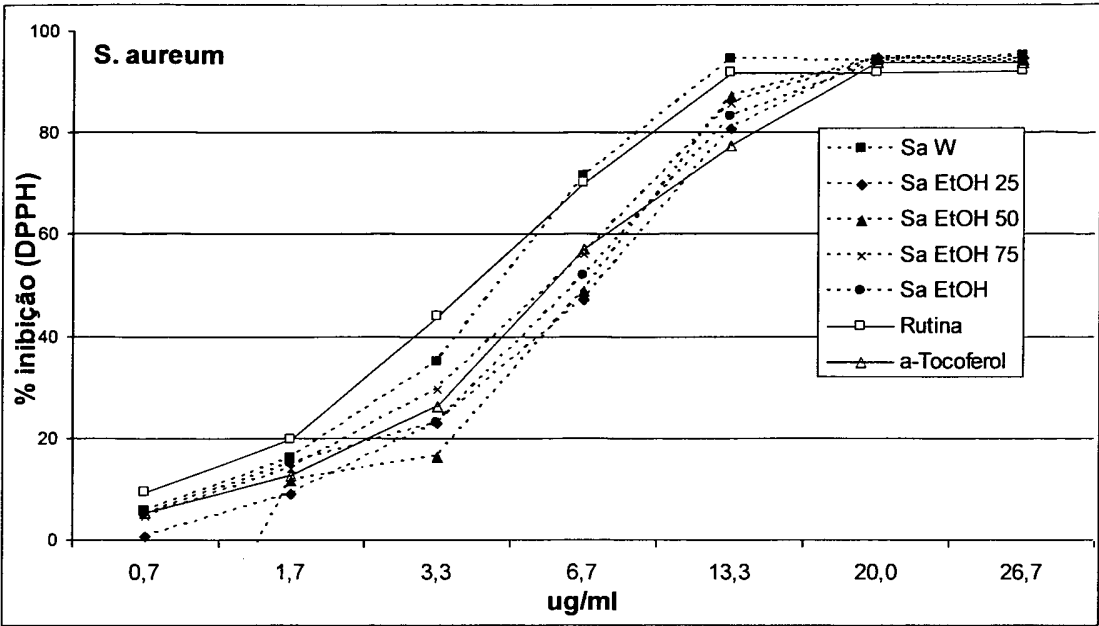


Fig 5

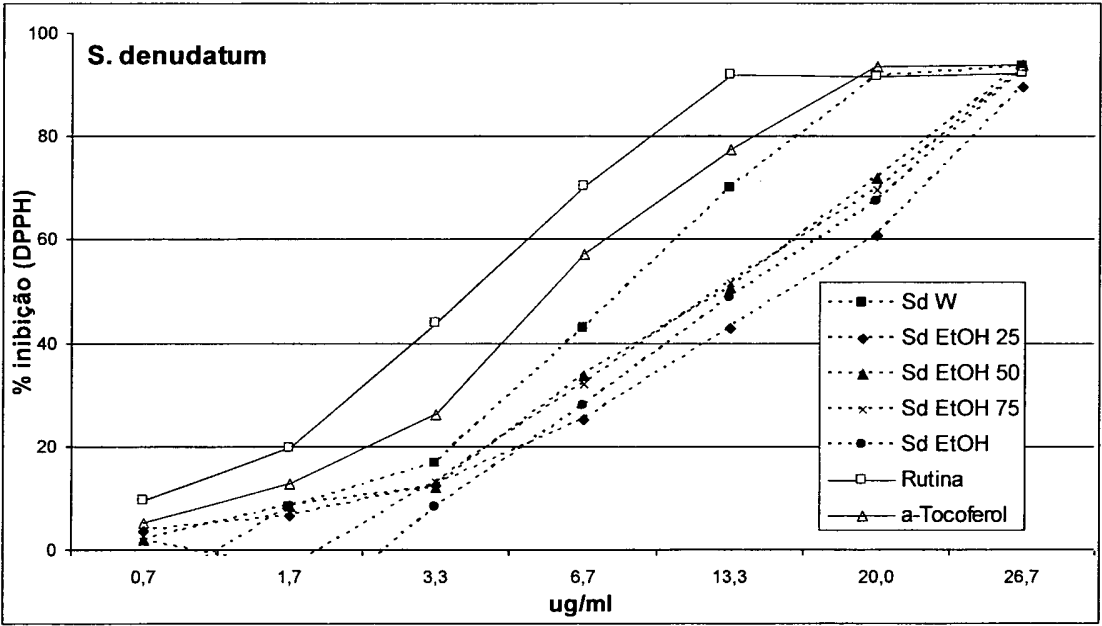


Fig 6

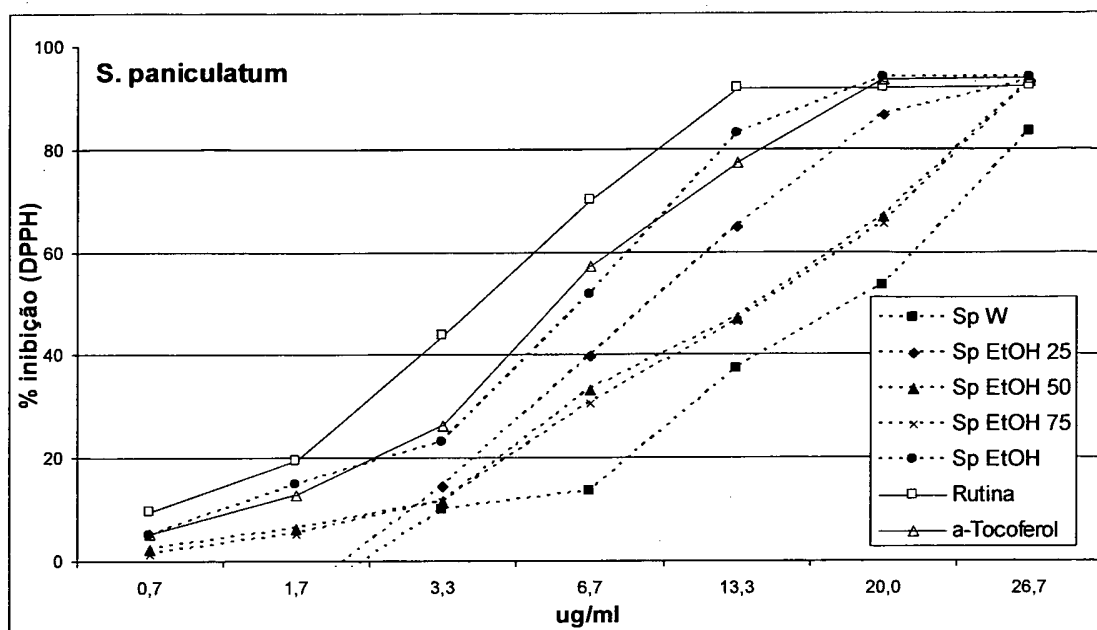


Fig 7

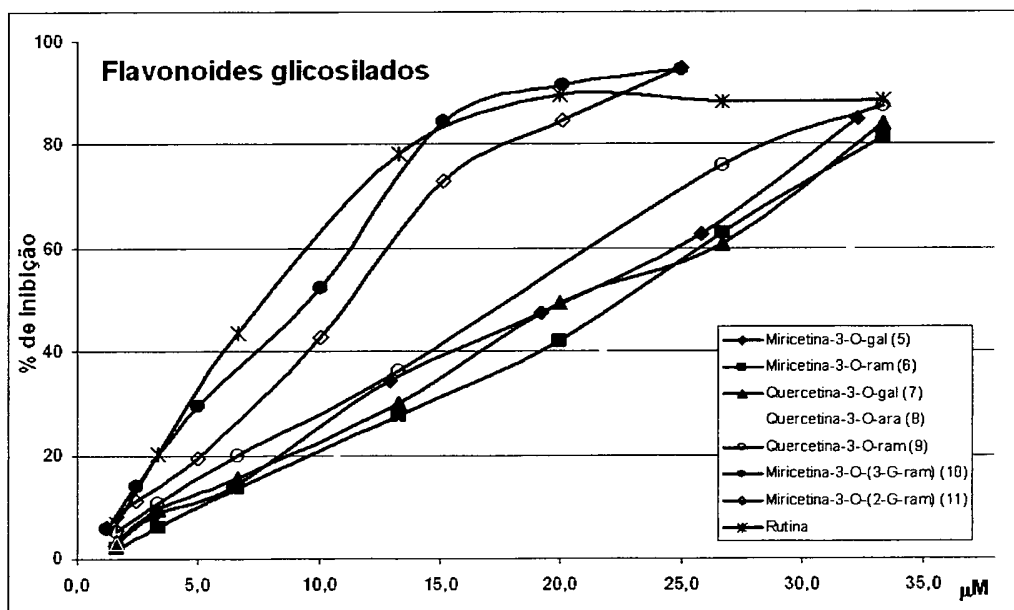


Fig. 8

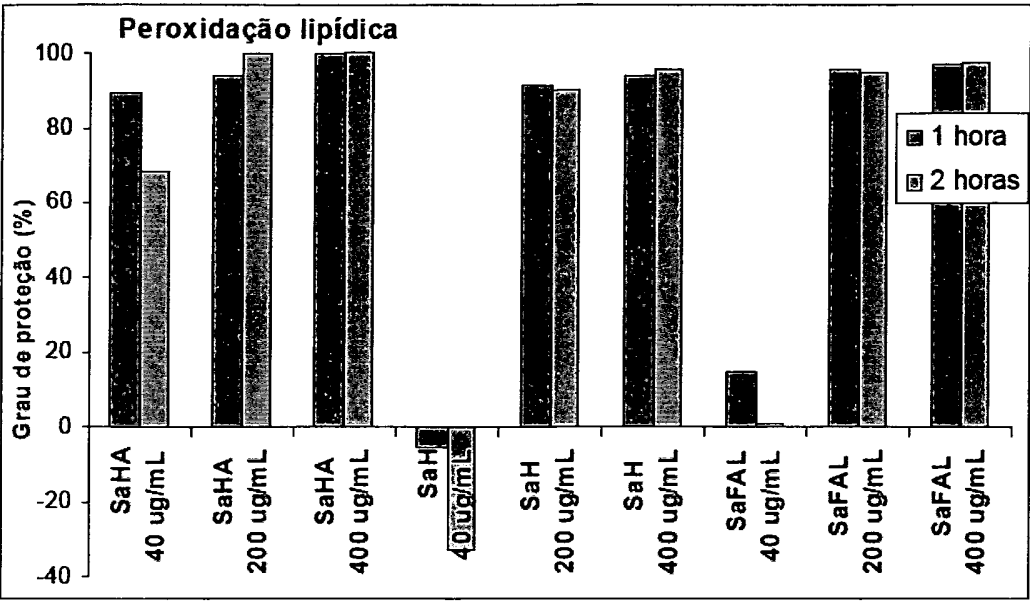
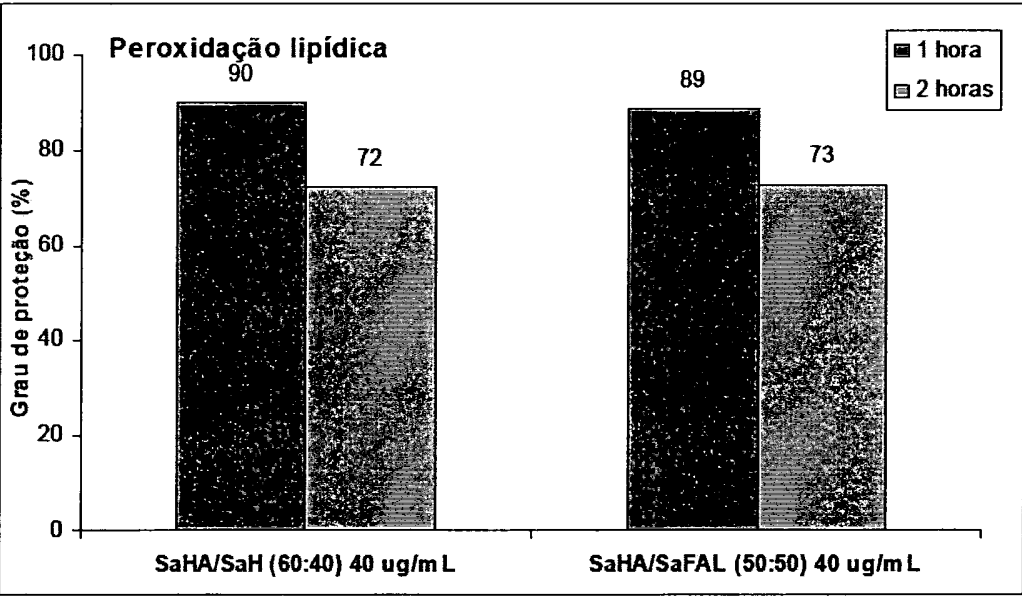


Figura 9.



5 Figura 10

11 / 15

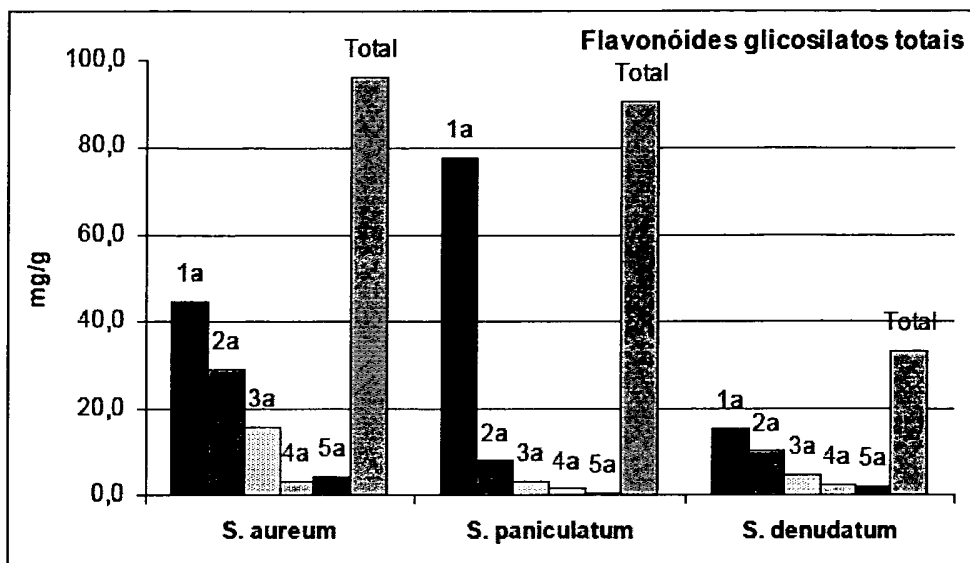


Fig 11

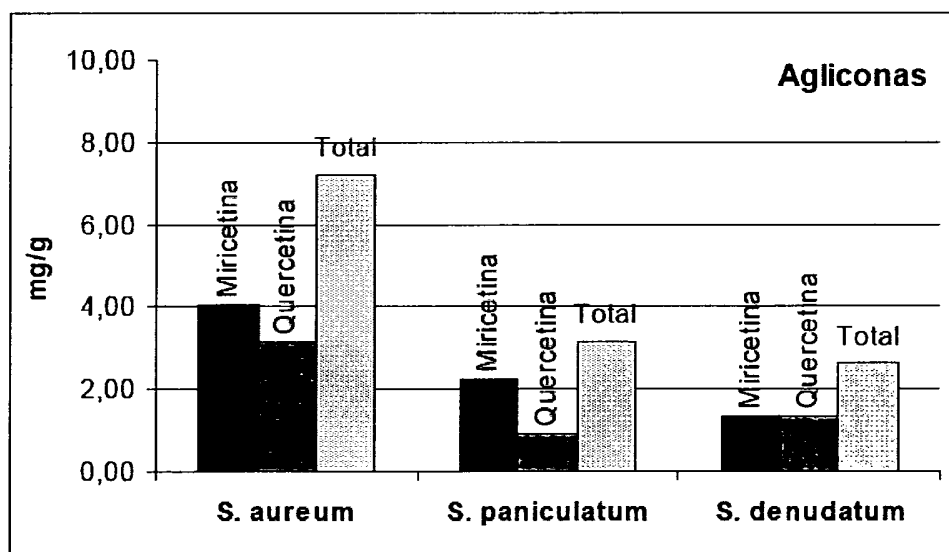


Fig 12

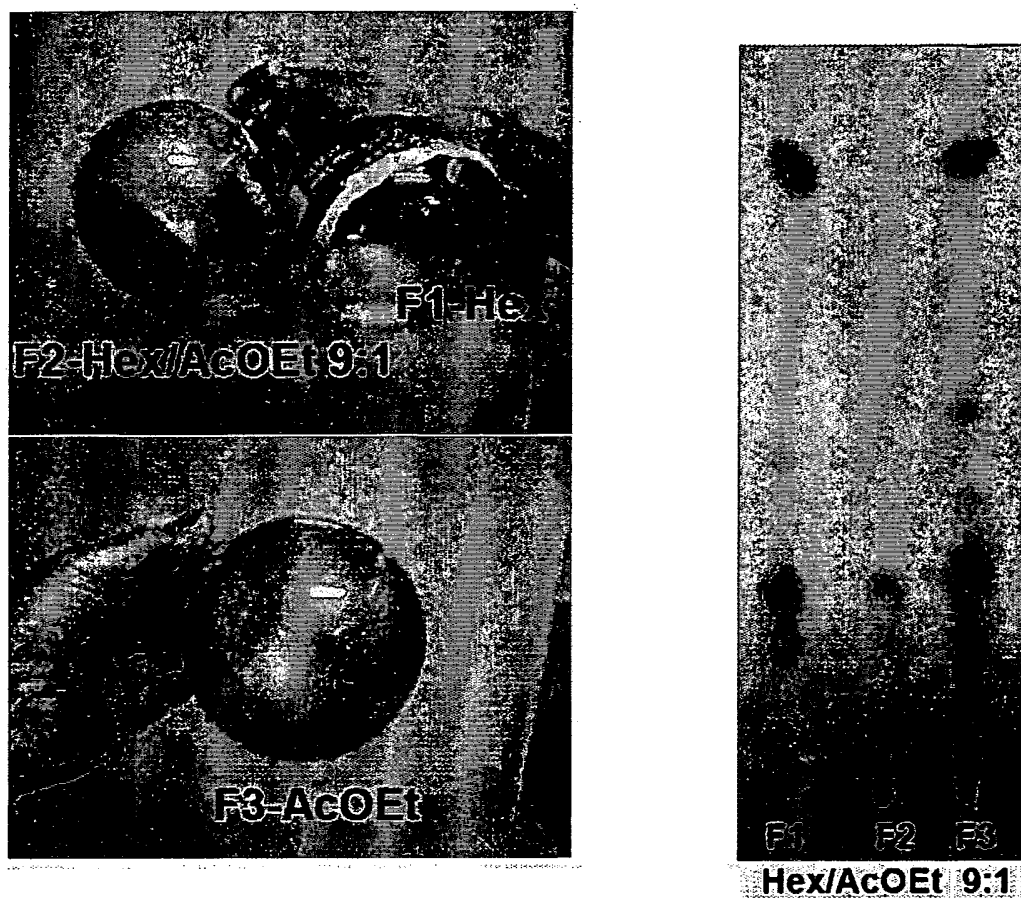


Figura 13

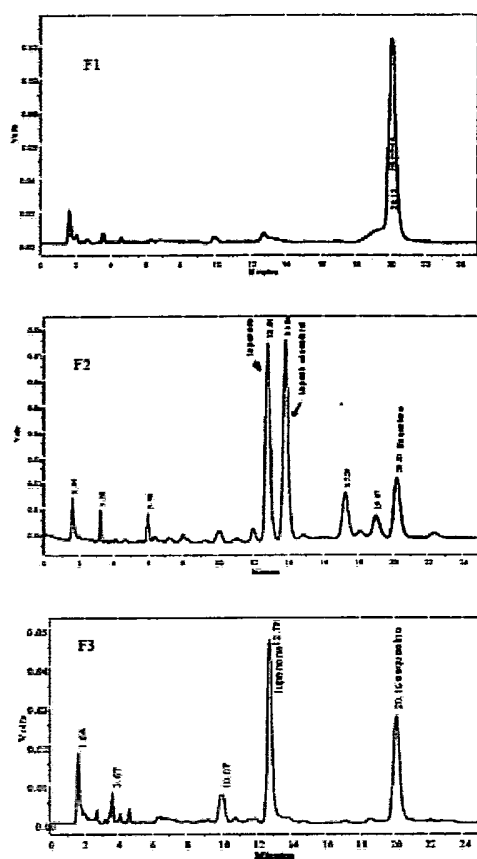


Figura 14.

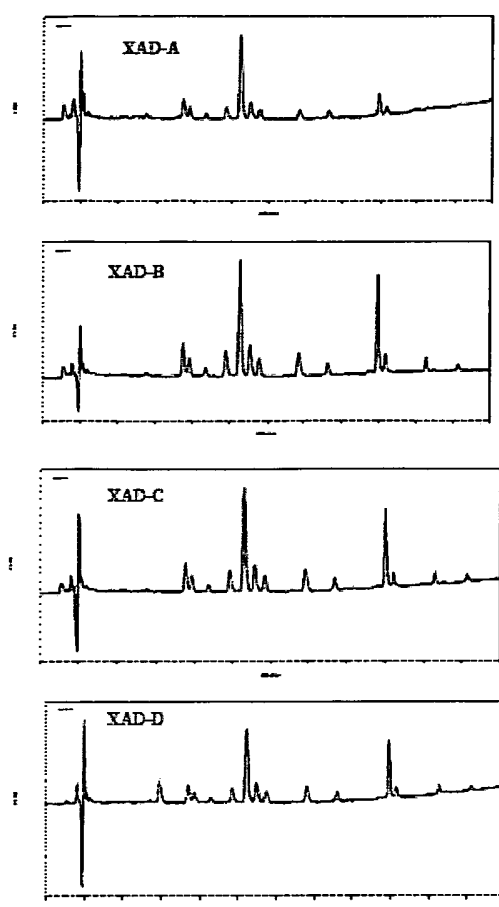
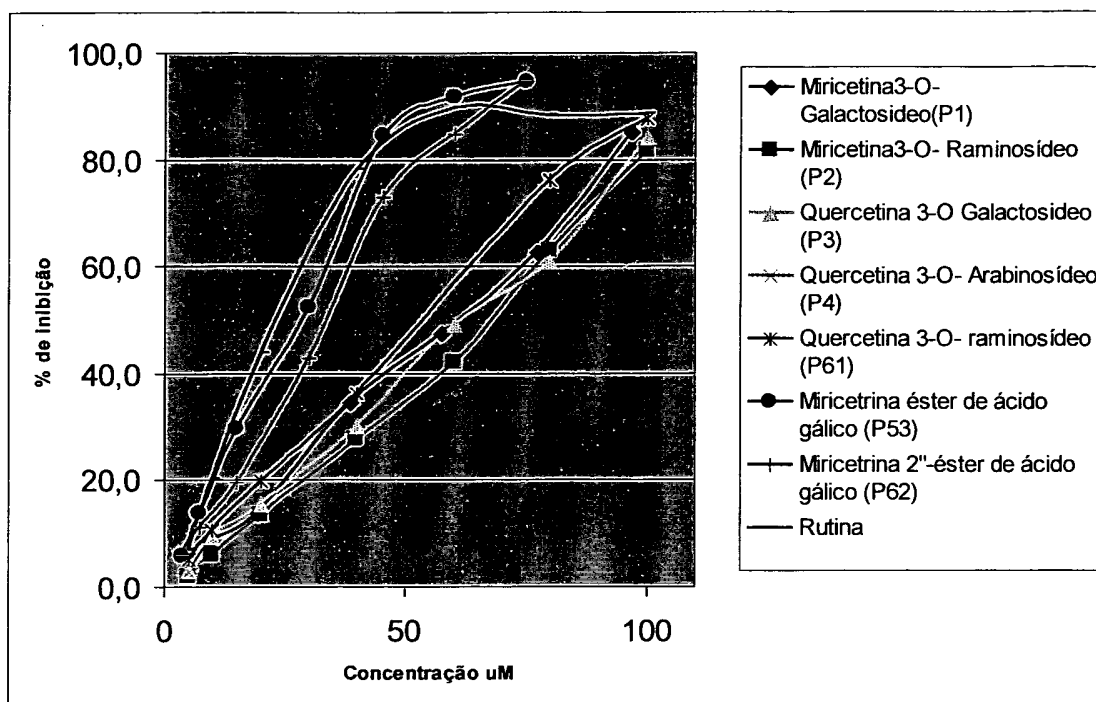


Figura 15.



Fig

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/BR2010/000321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61Q19/08 A61K8/97
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Alberto José Calvalheiro: "Validação de Sclerolobium spp. como fonte de antioxidantes naturais para cosméticos", Documentation and Information Center, Sao Paulo - Brasil 28 February 2007 (2007-02-28), XP002589924, Retrieved from the Internet: URL: http://www.bv.fapesp.br/en/projetos-pite/1045/validacao-sclerolobium-spp-fonte-antioxidantes-naturais/ [retrieved on 2010-06-30]	18,21,28
Y	the whole document ----- -/-	1-17,19, 20,22-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2011

Date of mailing of the international search report

04/03/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diebold, Alain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/BR2010/000321

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/03748 A2 (PROCTER & GAMBLE [US]) 27 January 2000 (2000-01-27) the whole document -----	1-28
Y	Voigt, Rudolf; Fahr, Alfred: "PHARMAZEUTISCHE TECHNOLOGIE FUER STUDIUM UND BERUF", 1 January 2000 (2000-01-01), DEUTSCHER APOTHEKER VERLAG, STUTTGART; DE, XP007910780, ISBN: 3-7692-2649-6 pages 445-447, the whole document -----	1-28
Y	JP 11 139952 A (SHISEIDO CO LTD) 25 May 1999 (1999-05-25) * abstract -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/BR2010/000321

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0003748	A2	27-01-2000	AU 5106299 A	07-02-2000
			JP 2002520375 T	09-07-2002
			MX PA01000578 A	08-04-2002

JP 11139952	A	25-05-1999	NONE	

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

INV. A61Q19/08 A61K8/97

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A61K A61Q

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	Alberto José Calvalheiro: "Validação de Sclerolobium spp. como fonte de antioxidantes naturais para cosméticos", Documentation and Information Center, Sao Paulo - Brasil	18,21,28
	28 Fevereiro 2007 (2007-02-28), XP002589924, Retrieved from the Internet: URL:http://www.bv.fapesp.br/en/projetos-pi te/1045/validacao-sclerolobium-spp-fonte-a ntioxidantes-naturais/ [retirado no dia 2010-06-30]	
Y	Todo o documento	1-17,19, 20,22-27
	----- -/--	

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do Quadro C☒ Ver o anexo de família da patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A"	documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.	"T"	documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.
"E"	depósito ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional.	"X"	documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.
"L"	documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial (como especificado).	"Y"	documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.
"O"	documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.	"&"	documento membro da mesma família de patentes.
"P"	documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.		

Data da conclusão da pesquisa internacional

11 Fevereiro 2011

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

04/03/2011

Nome e endereço da ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

N° de fax:

Funcionário autorizado

Diebold, Alain

N° de telefone:

Categoria*	Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado	Relevante para as reivindicações N°
Y	WO 00/03748 A2 (PROCTER & GAMBLE [US]) 27 Janeiro 2000 (2000-01-27) Todo o documento -----	1-28
Y	Voigt, Rudolf; Fahr, Alfred: "PHARMAZEUTISCHE TECHNOLOGIE FUER STUDIUM UND BERUF", 1 Janeiro 2000 (2000-01-01), DEUTSCHER APOTHEKER VERLAG, STUTTGART; DE, XP007910780, ISBN: 3-7692-2649-6 pages 445-447, Todo o documento -----	1-28
Y	JP 11 139952 A (SHISEIDO CO LTD) 25 Maio 1999 (1999-05-25) resumo -----	1-28

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº
PCT/BR2010/000321

WO 0003748	A2	27-01-2000	AU	5106299 A	07-02-2000
			JP	2002520375 T	09-07-2002
			MX	PA01000578 A	08-04-2002

JP 11139952 A 25-05-1999 **Nenhuma**
