

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG**

Valéria de Moura Leite Naves

**Caracterização química e biológica *in vitro* de
extratos de *Garcinia brasiliensis* e avaliação do seu
perfil de permeação cutânea em formulações
dermatológicas**

Alfenas/MG

2014

Valéria de Moura Leite Naves

Caracterização química e biológica *in vitro* de extratos de
Garcinia brasiliensis e avaliação do seu perfil de permeação
cutânea em formulações dermatológicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Alfenas/MG

2014

Naves, Valéria de Moura Leite.

Caracterização química e biológica *in vitro* de extratos de *Garcinia brasiliensis* e avaliação do seu perfil de permeação cutânea em formulações dermatológicas. / Naves, Valéria de Moura Leite. - 2014. 89 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. *Garcinia*. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes. I. Santos, Marcelo Henrique dos. II. Título.

CDD: 615.53

Valéria de Moura Leite Naves

Caracterização química e biológica *in vitro* de extratos de
Garcinia brasiliensis e avaliação do seu perfil de permeação
cutânea em formulações dermatológicas

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Aprovada em: _13/_01/_2014_

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

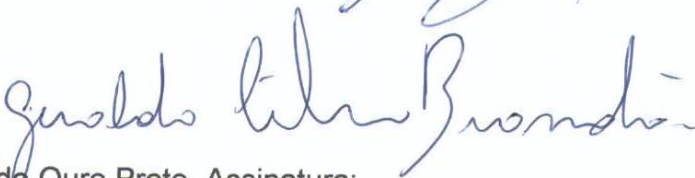
Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Assinatura:



Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto Assinatura:



Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



A todos que me apoiaram incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar minhas escolhas e por fortalecer minha perseverança para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e ao Marcelo Dias que foram anjos presentes em todos os momentos desta jornada.

Ao professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela orientação, compreensão, confiança e ensinamentos.

Ao meu tio Antônio Luengo Garcia pelo incentivo e esclarecimentos iniciais.

Aos professores colaboradores, Amanda Latércia T. Dias, Geraldo Alves das Silva, Gislaine Ribeiro Pereira e Marcelo Ap. da Silva pela constante disponibilidade.

À toda equipe do laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a todos do LFQM pelo suporte prestado, especialmente a Ingridy Ribeiro Cabral.

Enfim, a todos que me ajudaram a concluir esta etapa da minha vida, meu sinceros agradecimentos.

RESUMO

A espécie *Garcinia brasiliensis* Mart. (sinonímia: *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana) é uma planta também conhecida como “bacuri”. É uma espécie muito utilizada por suas propriedades farmacológicas. O presente estudo tem a finalidade de caracterizar quimicamente e avaliar a atividade biológica dos extratos etanólicos e aquosos das folhas, cascas e sementes da *G. brasiliensis*. O teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante foram avaliados. O extrato que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi o extrato aquoso da folha, com $343,98 \pm 4,8$ mg AG/g. O teores de flavonoides mais expressivos encontrados foram no extrato etanólico da semente e no extrato aquoso da folha, com valores respectivamente de $47,10 \pm 0,2$ e $45,62 \pm 0,7$ mg quercetina/g de extrato. Quanto à atividade antioxidante, o que apresentou maior atividade foi o extrato etanólico da semente, com 86,57 % de sequestro de radical DPPH. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de microdiluição em placa para bactérias e fungos. Considerando a CIM₅₀, o extrato que se mostrou mais ativo foi o extrato aquoso da folha, com uma CIM₅₀ de 1 µg/mL, atividade bem próxima ao do padrão cloranfenicol, que possui CIM₅₀ de 0,975 µg/mL contra a bactéria *S. aureus*. Quanto à atividade antifúngica, constatou-se que nenhum extrato apresentou atividade contra a *C. albicans* na faixa de concentração testada e com exceção do extrato etanólico da folha, os outros extratos foram considerados bioativos contra a *C. krusei*. A caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada no extrato aquoso da folha e detectou a presença da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo) e da fukugetina. Com este mesmo extrato realizou-se testes de citotoxicidade em fibroblastos humanos e linhagens tumorais, não apresentando toxicidade para as culturas celulares testadas. Foram preparadas formulações contendo este extrato aquoso de *G. brasiliensis* e com elas foram realizados testes de permeação e retenção cutânea em “Célula de Franz”. Por ser um produto natural oriundo de uma fonte renovável como as folhas, este extrato é um potencial candidato ao desenvolvimento de novos fármacos para tratar lesões da pele causados pelos microrganismos testados.

Palavras-chave: *Garcinia brasiliensis*. Compostos fenólicos. Antioxidantes. Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The species *Garcinia brasiliensis* Mart. (synonym: *Rheedia brasiliensis* Planch and Triana) is a plant also known as "bacuri". It is a specie commonly used for its pharmacological property. The present study aims to chemically characterize and evaluate the biological activity of ethanol and aqueous extracts of leaves, bark and seeds of *G. brasiliensis*. The contents of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity were evaluated. The leaf aqueous extract showed a high content of phenolic compounds with 343.98 ± 4.8 mg GA / g. The most significant amounts of flavonoids were found in the seed's ethanolic extract and leaf's aqueous extract, respectively, with values of 47.10 ± 0.2 and 45.62 ± 0.7 mg of quercetin / g of extract. For antioxidant activity, the most active was the seed's ethanolic extract, with 86.57 % of scavenging activity. The antimicrobial activity was evaluated by microdilution plate test for bacteria and fungi. Considering the MIC₅₀, the leaf's aqueous extract was the most active, with a MIC₅₀ of 1 mg / mL, activity very close to chloramphenicol as standard, which showed a MIC₅₀ of 0.975 mg / mL against the bacteria *S. aureus*. For antifungal activity, no extract showed activity against *C. albicans* in the range of tested concentrations. Excluding the leaf's ethanolic extract, all other extracts were considered bioactive against *C. krusei*. The chemical characterization by high performance liquid chromatography was performed on the leaf's aqueous extract and it was detected the presence of fukugetin-7''-O-β-D- glucoside (fukugeside) and fukugetin. With this same extract it was carried out cytotoxicity tests in human fibroblasts and tumor cell lines, showing no toxicity of the cell's cultures tested. Formulations containing *G. brasiliensis* aqueous extract were prepared and skin permeation and retention tests on "Franz cell" were performed. For being a natural product derived from a renewable source like leaves, this extract is a potential candidate of new drugs development for skin lesions treatment caused by microorganisms tested.

Keywords: *Garcinia brasiliensis*. Fenolic compounds. Antioxidant. Antimicrobial action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Folhas e frutos de <i>Garcinia brasiliensis</i>	22
Figura 2 -	Semente e polpa de <i>Garcinia brasiliensis</i> em fruto cortado transversalmente.....	22
Figura 3 -	Estrutura geral de um flavonoide com os anéis A, B e C e sistema de numeração para diferenciação das posições dos carbonos.....	23
Figura 4 -	Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: A – ácidos benzoicos; B – ácidos cinâmicos; C – cumarinas.....	24
Figura 5 -	Estrutura da pele.....	29
Figura 6 -	Vias de penetração dos fármacos através do estrato córneo.....	30
Figura 7 -	Célula de Franz.....	32
Figura 8 -	Perfil cromatográfico do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , realizado em CLAE, monitorado em 254 nm.....	55
Figura 9 -	Perfil cromatográfico do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , realizado em CLAE, monitorado em 350 nm.....	56
Figura 10 -	Perfil cromatográfico dos padrões: fukugesídeo, fukugetina, gutiferona A e 7-epiclusianona, realizado em CLAE, monitorado em 254 nm, demonstrando os espectros UV/ Vis da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo) e fukugetina.....	57
Figura 11 -	Perfil cromatográfico dos padrões: fukugesídeo, fukugetina, gutiferona A e 7-epiclusianona, realizado em CLAE, monitorado em 350 nm, demonstrando os espectros UV/ Vis da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo) e fukugetina.....	58
Figura 12 -	Representação estrutural da fukugetina.....	59
Figura 13 -	Representação estrutural da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	60
Figura 14 -	Viabilidade celular relativa obtida com o ensaio de MTS dos fibroblastos.....	60

Figura 15 - Viabilidade celular relativa obtida com o ensaio de MTS das linhagens de células tumorais.....	61
Figura 16 - Perfil cromatográfico do gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando o pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador.....	63
Figura 17 - Perfil cromatográfico do meio receptor coletado após 12 h, em teste de permeação e retenção cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	64
Figura 18 - Perfil cromatográfico da formulação retida nas fitas adesivas extraídas após 12 h, em teste de retenção cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	64
Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato da pele de orelha de porco após 12 h, em teste de permeação cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	65
Figura 20 - Perfil cromatográfico do creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando o pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador.....	65
Figura 21 - Perfil cromatográfico do meio receptor coletado após 12 h, em teste de permeação e retenção cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	66
Figura 22 - Perfil cromatográfico da formulação retida nas fitas adesivas extraídas após 12 h, em teste de retenção cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	66
Figura 23 - Perfil cromatográfico do extrato da pele de orelha de porco após 12 h, em teste de permeação cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da <i>G. brasiliensis</i> , demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da formulação de creme lanette.....	42
Tabela 2 - Composição da formulação de gel de natrosol.....	42
Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos (mg AG/g amostra) dos extratos etanólicos e aquosos de <i>G. brasiliensis</i>	46
Tabela 4 - Teor de flavonoides dos extratos etanólicos e aquosos (mg quercetina/g amostra) de <i>G. brasiliensis</i>	47
Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método do sequestro de radical livre DPPH dos extratos etanólicos e aquosos de <i>Garcinia brasiliensis</i>	49
Tabela 6 - Determinação das concentrações inibitórias (CIM ₅₀) e (CIM ₁₀₀) em µg/mL para bactérias e fungos.....	52
Tabela 7 - Valores de IC ₅₀ µg/mL, calculados a partir de dados obtidos do ensaio de MTS por células tumorais.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG -	Ácido gálico
ATCC -	American Type Culture Colletion
BHA -	2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHI -	Brain heart infusion
BHT -	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol
CIM ₁₀₀ -	Concentração inibitória mínima 100%
CIM ₅₀ -	Concentração inibitória mínima 50%
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DPPH -	2,2 difenil -1- picrilhidrazil
EAC -	Extrato aquoso da casca
EAF -	Extrato aquoso da folha
EAS -	Extrato aquoso da semente
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEC -	Extrato etanólico da casca
EEF -	Extrato etanólico da folha
EES -	Extrato etanólico da semente
ERO's -	Espécies reativas de oxigênio
IC ₁₀₀ -	Concentração inibitória 100%
IC ₅₀ -	Concentração inibitória 50%
LFQM -	Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
MTS -	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT -	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NCI -	National Cancer Institute
UV/Vis -	Ultra violeta/ visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	16
2.2	FAMÍLIA CLUSIACEAE.....	18
2.2.1	O gênero <i>Garcinia</i>	20
2.2.1.1	A espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	21
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	22
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	26
2.5.1	Antimicrobianos naturais	26
2.6	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	28
2.7	ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA.....	29
3	OBJETIVO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
4.1.1	Coleta e identificação do material vegetal	34
4.1.2	Preparação do material vegetal	34
4.1.3	Obtenção dos extratos	35
4.2	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	35
4.3	TEOR DE FLAVONOIDES.....	36
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE DPPH.....	36
4.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	37

4.5.1	Microrganismos testados	37
4.5.2	Avaliação do perfil de sensibilidade	38
4.5.3	Extratos analisados	38
4.5.4	Controles do ensaio	38
4.5.5	Leitura e interpretação dos resultados	39
4.6	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	39
4.7	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	40
4.7.1	Condições de cultura celular	40
4.7.2	Estudo de viabilidade celular	40
4.8	ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA.....	41
4.8.1	Preparo das formulações contendo extrato de <i>G. brasiliensis</i> utilizadas nos estudos de permeação e retenção cutânea	41
4.8.2	Preparação da pele de orelha de porco	43
4.8.3	Estudo de permeação e retenção <i>in vitro</i> de formulações	43
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS.....	45
5.2	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAL.....	46
5.3	TEOR DE FLAVONOIDES.....	47
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE DPPH.....	49
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS.....	51
5.6	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	55
5.7	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	60
5.8	ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA.....	63

6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais muitas vezes representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Seu uso no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (AMOROZO; GELY, 1988; PRANCE, 1992).

Os relatos populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais devem ser considerados, pois contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Infelizmente, na maioria destas plantas observa-se uma escassez de conhecimento científico de seus constituintes, de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, ou de possíveis interações que envolvam as inúmeras moléculas presentes no extrato da planta (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Mesmo assim, as plantas medicinais têm sido muito úteis na contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários que atuam de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares (CALIXTO, 2005).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal na atualidade, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural (ISERHARD, 2009).

Devido ao elevado número de casos de doenças infecciosas, dos relevantes efeitos colaterais causados pelos antimicrobianos disponíveis e a resistência antimicrobiana, intensifica-se a busca por novos agentes antimicrobianos (BELLA CRUZ et al., 2010). Por esta razão, há necessidade de estimular o estudo e avaliação de produtos naturais com fins terapêuticos e principalmente com atividade antibiótica no intuito de criar novas drogas ou associar com as já existentes para que voltem a ter atividade (COUTINHO et al., 2004).

Desta forma, no presente trabalho foi realizada a caracterização química, a avaliação da atividade antioxidante e da atividade anti-fúngica e anti-bacteriana de extratos de partes da planta *Garcinia brasiliensis* com intuito de selecionar o mais promissor sob o ponto de vista fitoquímico e microbiológico para o preparo de uma

formulação de uso tópico com atividade antimicrobiana e com ela realizar testes de permeação cutânea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004, fitoterápico “é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente derivados de drogas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”. Fitofármaco é “a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Plantas, insetos, fungos, bactérias e organismos marinhos são fontes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais mostra ao longo de toda a humanidade que, pela própria necessidade humana, elas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados (MARTINS, 1994; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 65 a 80% da população mundial busca nas plantas fins terapêuticos, seja por motivo de pobreza, aceitabilidade ou descrédito do Sistema Público de Saúde (CALIXTO, 2000; BATISTA, 2009).

Os escritos mais antigos sobre plantas medicinais são provenientes das civilizações da Mesopotâmia e do Egito (LEITE, 2009). Como exemplo, cita-se o Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C., com mais de 20 metros de comprimento, que relaciona mais de 700 substâncias medicinais presentes em mais de 800 fórmulas quantitativas (DIAS, 2005).

De acordo com Simões, Schenkel e Simon (2001) e Vale (2002) existem registros fitoterápicos datados de milhares de anos antes de Cristo. Porém, a partir do século XIX que se iniciou a busca sistemática por princípios ativos presentes nas plantas medicinais (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008) e no século XX, iniciou-se a tendência de se isolar os princípios ativos (BRASIL, 2005). Segundo Cunha, (2010), além do isolamento, deu-se início a determinação da estrutura de constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais.

Além da herança cultural e da riqueza molecular, outros fatores foram e são responsáveis pelo incremento das pesquisas sobre plantas medicinais, tais como: insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis de muitos dos medicamentos sintéticos (CZEPULA, 2006). O processo de descoberta de um novo fármaco tem duração estimada em 10 anos (BUTLER, 2004) e custo aproximado de US\$ 800 milhões (DICKSON; GAGNON, 2004). Estima-se que somente um em cada 5.000 protótipos moleculares atinge a fase de estudos clínicos e é aprovado para uso humano (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Além das estruturas estericamente complexas dos produtos naturais, eles são distintos por uma combinação característica de grupos farmacofóricos. Essas características ressaltam a diversidade de compostos que podem ser obtidos destes produtos, que, por outro lado, seriam perdidos usando técnicas sintéticas (HENKEL et al., 1999). Portanto, uma das estratégias para reduzir os custos de desenvolvimento de novos fármacos é a utilização de produtos naturais como protótipos moleculares (NEWMAN; CRAGG, 2007; BRAGA, 2009).

Os processos usados para obter uma substância derivada de planta envolvem trabalho interdisciplinar em botânica, farmacognosia, farmacologia, química, microbiologia e toxicologia (HOSTETTMANN et al., 1997).

Neste contexto, o Brasil apresenta pelo menos três características favoráveis à consolidação da indústria farmacêutica nacional baseada em produtos naturais de plantas. A primeira é a competência científica instalada no país, que liderou na América Latina a produção científica relacionada a plantas medicinais nos últimos 25 anos, respondendo por 42 % das publicações (CALIXTO, 2005). Em segundo lugar, destaca-se que o país possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 50.000 espécies de plantas superiores descritas, ou seja, 20 a 22 % do total existente no planeta (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008). Por fim, destaca-se a grande

diversidade cultural das populações tradicionais do país, com extensa utilização de plantas medicinais (BRAGA, 2009).

A título de exemplo, cabe salientar o desenvolvimento do anti-inflamatório tópico totalmente pesquisado e desenvolvido no Brasil, o alfa-humuleno (Acheflan®) do Laboratório Aché, produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*. Foram despendidos sete anos de estudo e mais de US\$ 5 milhões em investimentos (CALIXTO, 2005; BRAGA, 2009).

O mercado mundial de medicamentos movimenta aproximadamente US\$ 300 bilhões por ano e os fitoterápicos, cerca de US\$ 21,7 bilhões. No Brasil, estima-se que esse mercado gire em torno de US\$ 160 milhões por ano, com crescimento acima de 15 % nas vendas internas, contra um crescimento de 4 % nas vendas de medicamentos sintéticos (DORES; REHDER; DUARTE, 2010). Em levantamento recente, junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) foi encontrado o total de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 simples, ou seja, obtidos de derivados de uma espécie vegetal (CARVALHO, 2008).

Os produtos naturais causam grande fascínio à ciência, principalmente por suas atividades medicinais, que vêm recebendo especial atenção de inúmeros pesquisadores. Muitos dos compostos naturais, sejam de origem vegetal ou animal, têm apresentado relevante atividade biológica, possibilitando, portanto que estes se tornem potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos medicamentos (RASKIN et al., 2002; NIERO et al., 2003).

2.2 FAMÍLIA CLUSIACEAE

A família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae, é composta por plantas tropicais e abrange cerca de 30 gêneros e 1150 espécies (KERRIGAN; COWIE; DIXON, 2011). Esta família tem apresentado mais de 100 substâncias isoladas de cerca de 20 espécies diferentes, com diferentes atividades biológicas (FRUTUOSO et al., 2007). Citam-se gêneros como: *Vismia* (NGUEMEVINGA et al., 2006), *Garcinia* (DEACHATHAL et al., 2006), *Clusia* (DIAS et al., 2006), *Cratoxylum*

(BOONSRIA et al., 2006) *Harungana* (TIH et al., 2006), *Mesua* (UAWONGGUL et al., 2006), *Hypericum* (MÁRTONFI; REPČÁK; ZANVIT, 2006), *Kielmeyera* (ZAGOTO et al., 2006).

São plantas caracteristicamente lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas e sem estípulas. Possuem flores geralmente vistosas, isoladas ou reunidas em inflorescência, podendo ser cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado com simetria radial (JOLY, 1993).

Com ampla distribuição no Brasil, ocorrem 21 gêneros e 183 espécies (BARROSO et al., 2002). Englobam árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas (ARQUIMEDES JUNIOR et al., 2005).

As principais classes de compostos encontradas nesta família são as xantonas, cumarinas, biflavonóides e benzofenonas, produzidas principalmente por mecanismos de defesa das plantas (ACUÑA; JANCOVSKI; KENNELLY, 2009). As benzofenonas poliisopreniladas, especialmente a 2,4,6-triidroxi-benzofenona, apresentaram considerável atividade antibacteriana contra importantes patógenos (ALMEIDA et al., 2008). Graças a essa variedade de constituintes, outras diversas atividades biológicas têm sido relatadas para as espécies desta família como antidepressiva (MEDINA et al., 2006), citotóxica (BOONSRI et al., 2006), antioxidante (RAO et al., 2004), antimalárica (LEE et al., 2003), antiaflatoxinogênica (JOSEPH et al., 2005), tripanosomicida (LENTA et al., 2007a; LENTA et al., 2007b; ABE et al., 2004), antiproliferativa (WABO et al., 2010; PAN et al., 2010), inibidor de acetilcolinesterase (AWANG et al., 2010) e anti-inflamatória (ACUÑA; JANCOVSKI; KENNELLY, 2009).

2.2.1 O gênero *Garcinia*

O gênero *Garcinia*, também denominado como *Rheedia* (ALMEIDA et al., 2008), é comumente encontrada nas planícies e florestas tropicais do sudeste da Ásia, África Ocidental e Oriental, América Central e América do Sul (SORDAT-DISERENS et al., 1989) e apresentam várias substâncias com propriedades farmacológicas (ALMEIDA et al., 2008).

Panthong et al. (2006) isolaram cowaxantonas A-E do fruto da *G. cowa* e atribuíram a elas a atividade antibacteriana. Guttiferonas de diferentes gêneros e espécies da família Clusiaceae, apresentaram efeito citopático *in vitro* contra o HIV (vírus da imunodeficiência humana) (GUSTAFSON et al., 1992). Já a atividade anticancerígena foi demonstrada por Guo et al. (2006) ao analisarem o ácido gambógico isolado da resina extraída da árvore de *G. hanburyi*.

Iwu et al. (2002) constataram em sementes de *G. kola* uma complexa mistura de biflavonóides, benzofenonas preniladas e xantonas. Já ao óleo volátil extraído do pericarpo de *G. brasiliensis* atribuíram-se propriedades antiinflamatória (MARTINS et al., 2008).

Em estudos químicos realizados por Santos et al. (1999) de frutos de *G. gardneriana*, demonstraram-se a presença de alguns constituintes com considerável poder antioxidante. Efeito analgésico (CECHINEL-FILHO et al., 2000), antibacteriano (VERDI et al., 2004) e antiinflamatório (CASTARDO et al., 2008) também podem ser acrescentados a essa espécie.

Jayaprakasha; Negi; Jena, (2006) atribuíram atividade antioxidante e antimutagênica aos extratos de *G. pedunculata*. O extrato de *G. cambogia* vem sendo utilizado no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003).

Segundo Billo et al. (2005), extratos de *G. pedicillata* apresentaram atividade contra a forma amastigota de *L. amazonenses*, assim como atividade contra forma promastigota de *L. donovani* pelo extrato bruto de *G. lucida* (FOTIE et al., 2007). Aos compostos isolados de *G. livingstonei* foram atribuídos propriedades leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. infantum* (MBWANBO et al., 2006).

Vários estudos têm mostrado que compostos isolados da *G. mangostana* apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas,

citotóxicas, antiproliferativas (OBOLSKIY et al., 2009) e quimiopreventivas do câncer (JUNG et al., 2006).

Também às outras espécies do gênero *Garcinia* foram atribuídas vários efeitos, como antioxidante e antitumoral às guittiferona H e gambogenona, extraídas da *G. xantochymus*, antitumoral às Garcinialliptona FA e Garcinialliptona FB isoladas da *G. subelíptica* (DALMOLIN, 2009), antioxidante e antimutagênica à *G. cowa* (NEGI; JAYAPRAKASHA; JENA, 2010), antidiabético à *G. indica* (KIRANA, H.; SRINIVASAN, B. P., 2010), hepatoprotetor à *G. kola* (MADUBUNYI, 2010), apoptótico aos compostos isolados de *G. paucinervis* e derivados poliprenilados de *G. multiflora* (GAO et al., 2010; LIU et al., 2010), inibição de células leucêmicas HL-60 de xantonas isoladas da *G. bracteata* (NIU et al., 2012), ação contra a diarreia induzida pela lactose da *G. buchananii* (BOAKYE et al., 2012) e inibição da enzima alfa-glicosidase de xantonas isoladas da *G. nobilis* (FOUOTSA et al., 2012).

2.2.1.1 A espécie *Garcinia brasiliensis*

A espécie *G. brasiliensis* Mart. (sinonímia: *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana) é cultivada em todo o território brasileiro, sendo conhecida como “bacuri”, “bacupari”, “porocó” e “bacuripari”, e na Bolívia como “guapomo”. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (MORTON, 1987). Na medicina popular suas folhas são utilizadas no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926). Porém, o maior problema para sua utilização terapêutica no tratamento convencional das diversas patologias é a falta de dados científicos que comprovem a eficácia e a segurança dos extratos obtidos a partir dessa planta.

O bacuparizeiro é uma árvore de porte médio, copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce nos meses de agosto a setembro (Figura 1) (CORRÊA; PENNA, 1984; GUIMARÃES et al., 2004). As folhas são em formato de lança e as flores abundantes e polígamas. Os frutos são amarelos, ovais, com polpa mucilaginoso, branca e comestível (CORRÊA; PENNA, 1984; GUIMARÃES et al., 2004), apresentando casca (pericarpo) elástica e amarela, a qual é facilmente

removida e normalmente possui de 2 a 3 sementes (MORTON, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha ao passo que, internamente são branco-amarelada e exsudam látex amarelo (Figura 2) (NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2002).

Estudos têm comprovado diversas atividades da *G. brasiliensis*, como propriedades antimicrobianas (ALMEIDA et al., 2008), antinociceptivas e anti-inflamatórias (SANTA-CECÍLIA et al., 2011) e antiproteolítica, leishmanicida e antioxidante (GONTIJO et al., 2012).

Figura 1 - Folhas e frutos de *Garcinia brasiliensis*.



Fonte: Junior D. (2012)

Figura 2 - Semente e polpa de *Garcinia brasiliensis* em fruto cortado transversalmente.



Fonte: Derogis P. (2008).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

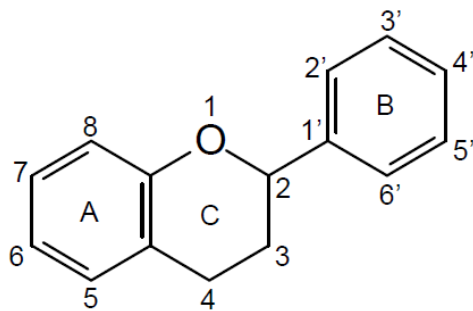
Compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Englobam uma grande variedade de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, por sua composição química, possuem propriedades antioxidantes (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos existentes na natureza podem ser classificados em: pouco e largamente distribuídos na natureza. Um número reduzido deles está no grupo dos pouco distribuídos na natureza. Já no grupo dos que são largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino

vegetal; os chamados flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados e cumarinas) (SOARES, 2002).

Os flavonoides atuam como antioxidantes tanto em compartimentos celulares lipofílicos como hidrofílicos, inativando os radicais livres. Possuem a capacidade de doar átomos de hidrogênio inibindo assim as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ARORA et al., 1998). Estes compostos possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6 (Figura 3), sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Consistem em dois anéis aromáticos interligados por três carbonos que geralmente forma uma estrutura heterocíclica oxigenada (BRAVO, 1998).

Figura 3 - Estrutura geral de um flavonoide com os anéis A, B e C e sistema de numeração para diferenciação das posições dos carbonos.

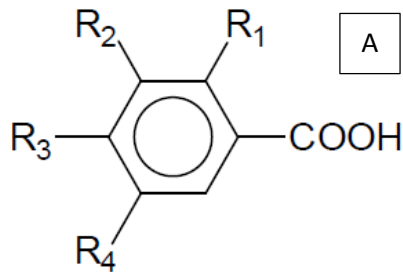


Fonte: Bravo (1998)

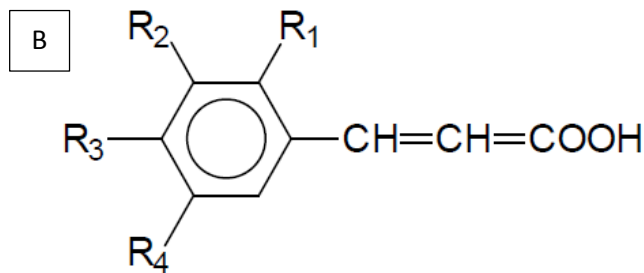
Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, chalconas e isoflavonas.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: os ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os mais simples encontrados na natureza. Os ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo os mais encontrados no reino vegetal e as cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 4) (SOARES, 2002).

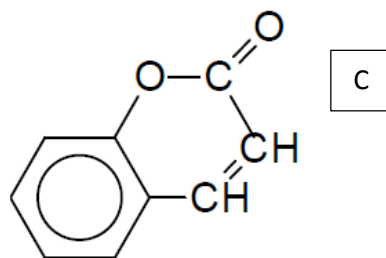
Figura 4 - Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: A – ácidos benzoicos; B – ácidos cinâmicos; C – cumarinas.



R1=OH: ácido salicílico;
 R1=R4=OH: ácido gentístico;
 R3=OH: ácido *p*-hidroxibenzoico;
 R2=R3=OH: ácido protocatequínico;
 R2=OCH3 R3=OH: ácido vanílico;
 R2=R3=R4=OH: ácido gálico;
 R2=R4=OCH3 R3= OH: ácido siríngico.



R1=R2=R3=R4=H: ácido cinâmico;
 R1=OH: ácido *o*-cumárico;
 R2=OH: ácido *m*-cumárico;
 R3=OH: ácido *p*-cumárico;
 R2=R3=OH: ácido caféico;
 R2=OCH3 R3=OH: ácido ferúlico;
 R2=R4=OCH3 R3= OH: ácido sinápico.



Fonte: Soares (2002)

Estudos epidemiológicos têm mostrado a correlação entre o aumento do consumo de compostos fenólicos com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (RICE-EVANS et al., 1996; COOK; SAMMAN, 1996).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma ampla definição para compostos com atividade antioxidante é a seguinte: “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

As indústrias de alimentos utilizam os antioxidantes para evitar a deterioração e manter o valor nutricional dos produtos. Os antioxidantes também são de grande interesse para os bioquímicos e profissionais da saúde, pois podem ajudar na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO's) e doenças degenerativas (SHAHIDI, 1996). Estas ERO's podem ocorrer no corpo humano durante o stress ambiental, sendo assim muito perigoso, pois pode resultar em danos significativos às estruturas celulares (GÜLÇİN, 2012), levando a doenças como aterosclerose, doenças coronárias, envelhecimento e câncer (LI et al., 2008).

Os antioxidantes são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas de lipídeos. Podem agir diminuindo a concentração de oxigênio, interceptando o oxigênio singlete; evitando a fase de iniciação da oxidação pelo sequestro de radicais hidroxila; quelando íons metálicos ou decompondo produtos primários a compostos que não são radicais (SHAHIDI, 1996).

A fim de diminuir os efeitos nocivos das ERO's, os antioxidantes naturais obtidos a partir de plantas, como também os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, podem ser utilizados. No entanto, a utilização destas moléculas possui certos riscos (SUN; FUKUHARA, 1997). Nos últimos anos, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido restringido em muitos países, o interesse pelos antioxidantes naturais tem aumentado cada vez mais. A maioria dos consumidores está preferindo antioxidantes naturais a sintéticos (GÜLÇİN, 2010; KÖKSAL; GÜLÇİN, 2008). Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas medicinais (GÜLÇİN et al., 2009) e esta propriedade biológica tem sido atribuída aos compostos fenólicos (GARZÓN et al., 2010), que são metabólitos secundários amplamente encontrados em frutas e vegetais e são representados principalmente pelos flavonoides e ácidos fenólicos. Estas substâncias apresentam um grande potencial antioxidante e estudos

demonstraram que seu consumo regular tem grande importância, principalmente para a prevenção de doenças relacionadas com o stress oxidativo (BALASUNDRAM; SUNDRAN; SAMMAN, 2006). Estes compostos são capazes de interromper reações em cadeia de oxidação por doação de um átomo de hidrogênio ou quelantes de metais, agindo assim, como agentes antioxidantes e redutores.

Muitos estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos de plantas exibem propriedades antioxidantes. Estes compostos antioxidantes doam um elétron para o radical livre e os converte em uma molécula inócua (GÜLÇİN et al., 2006; BURSAL et al., 2013).

As principais fontes de antioxidantes naturais na dieta humana são os cereais, plantas e frutas (POKORNY, 2007; VIJAYA KUMAR REDDY; SREEMULU; RAGHUNATH, 2010). Antioxidantes naturais, que estão disponíveis nessas fontes, protegem o corpo humano contra os radicais livres e stress oxidativo, desempenhando um papel muito importante na saúde humana (SERBETÇI TOHMA; GÜLÇİN, 2010).

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.5.1 Antimicrobianos naturais

Apesar da produção de novos antibióticos ter aumentado nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também vem aumentando (LOGUERCIO et al., 2005), devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas (SILVA et al., 2010), além da identificação de várias cepas novas de microrganismos mutantes. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos e sofrem mutação buscando adaptação a ambientes inóspitos.

A resistência bacteriana é um permanente e crescente desafio, acarretando em incertezas na perspectiva da produção e do uso de fármacos antimicrobianos, exigindo contínuo fluxo de esforços e investimentos na busca por novas alternativas terapêuticas (LOGUERCIO et al., 2005). Pesquisas com a finalidade de obter novos

medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, vêm reassumindo um importante papel nos últimos anos (SILVEIRA et al., 2009). Assim, o uso de extratos e metabólitos secundários vegetais que possuem conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir um importante significado em novos tratamentos terapêuticos (LOGUERCIO et al., 2005), aliados ao desenvolvimento e otimização de testes antimicrobianos *in vitro* que permitem a seleção de extratos brutos de plantas com propriedades potenciais de uso em estudos químicos e farmacológicos (PINTO et al., 2002), representando assim uma ferramenta fundamental às estratégias de prospecção de novos candidatos a fármacos.

As plantas medicinais são meios naturais frequentemente usados no tratamento de várias doenças (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004) e constituem uma importante fonte de novos componentes biologicamente ativos (PORTILLO et al., 2001). O uso das plantas e preparações feitas a partir delas para tratar infecções é uma prática antiga, utilizada por boa parte da população mundial, principalmente onde há uma dependência na medicina tradicional para uma variedade de doenças como ocorre em países em desenvolvimento (AHMAD; MEHMOOD; MOHAMMAD, 1998). A cultura popular sobre o uso e eficácia das plantas medicinais é relevante para a investigação *in vitro* de meios alternativos na terapêutica de muitos processos infecciosos (MENEZES et al., 2009).

Algumas plantas como *Achillea colina* L. (Mil-folhas), *Baccharis dracunculifolia* Dc. (Vassoura do campo), *Casearia sylvestris* SW (Guaçatonga), *Moringa oleifera* Lam. (Moringa), *Cyperus articulatus* L. (Piprioca) entre muitas outras podem ser citadas como plantas com propriedades antimicrobianas utilizadas no Brasil (DUARTE, 2006).

Os componentes antimicrobianos das plantas podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos do que aqueles presentes nos antimicrobianos sintéticos ou naturais terapeuticamente disponíveis e têm um significativo valor clínico (ELOFF, 1988).

O estudo de plantas não se deve somente por elas se constituírem um recurso terapêutico alternativo, mas devido a possibilidade de isolamento de substâncias que apresentam eficácia significativa e com menor índice de desvantagens (MENEZES et al., 2009), podendo proporcionar menor custo, menor toxicidade, efeitos colaterais mais brandos e maior disponibilidade de matéria-prima.

2.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

O teste de citotoxicidade *in vitro* é um sistema biológico que visa analisar o efeito em que o material a ser analisado exerce nas células quando em contato direto com culturas celulares. Nesta técnica, é possível estudar o comportamento celular em meio controlado, livres das complexas interações do organismo (FRESHEY, 2000). Como o uso de animais em laboratório está tendo controle cada vez mais rigoroso, aumenta, portanto, a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de um material para uso em seres humanos (ROGEROA, et al., 2003).

A avaliação quantitativa da viabilidade celular pode ser realizada por meio de métodos colorimétricos, utilizando corantes como o MTT, brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) e o MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio.

O MTT é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial resultando em um sal de formazano de cor púrpura. Esta redução ocorre somente nas células vivas. Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazano formados. A desvantagem da utilização deste corante é a necessidade do uso de solventes orgânicos como o DMSO ou o isopropanol para dissolver os cristais de formazano que são insolúveis em água.

O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT, pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazano. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, pois além de limitar o número de variáveis experimentais por ter o controle ambiental das células, possui período de teste mais curto e podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, de fácil execução, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (FRESHEY, 2000; ROGEROA, et al., 2003).

Muitas plantas medicinais têm sido utilizadas de forma indiscriminada, sem estudos que demonstrem sua eficiência e segurança (FACURY NETTO, et al., 2004).

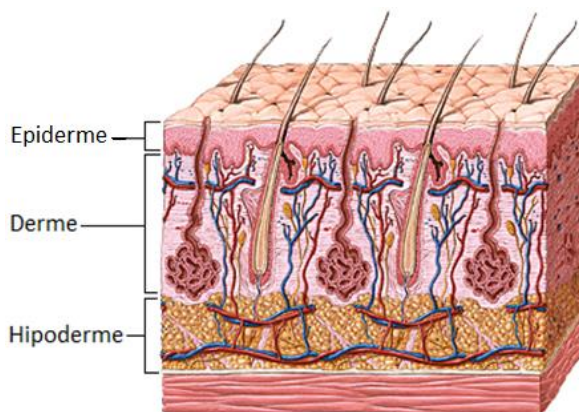
Por este motivo novos produtos ou produtos de ação ainda desconhecida devem ser analisados por meio de estudos *in vitro* de cultivo celular, seguidos por experimentos em animais para posteriormente ter uma aplicação clínica em humanos.

2.7 ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

A pele humana constitui uma barreira natural contra agentes exteriores prevenindo a entrada de micro-organismos, de substâncias químicas, de várias formas de radiação além de proteger os fluidos e tecidos corporais. A pele também é capaz de receber estímulo sensorial e ajudar a regular a temperatura do corpo e excretar substâncias não desejadas (BARRY, 2002).

Ela é histologicamente estruturada em duas camadas, a epiderme (estrato córneo e epiderme viável) e a derme, logo abaixo da derme um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado de hipoderme (FOLDVARI, 2000; RIBEIRO, 2010).

Figura 5 – Estrutura da pele



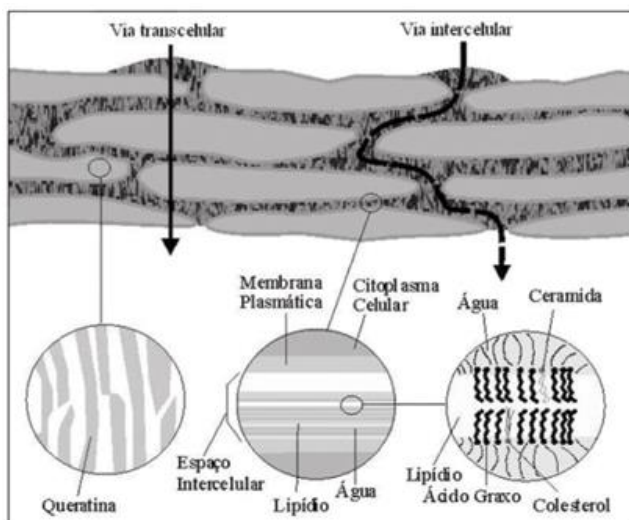
Fonte: CASTRO, M. A. Histologia animal. Queimaduras. Disponível em <<http://www.mundoeducacao.com/biologia/queimaduras.htm>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

O estrato córneo tem como função fornecer proteção física e barreira química e é formado por uma camada compacta de células chamadas corneócitos. Estas células alongadas, mortas e desidratadas são formadas a partir do produto final da

diferenciação das células produzidas na epiderme viável (ZATZ, 1993; BOUWSTRA et al., 2003).

Três possíveis mecanismos de permeação de um fármaco através do estrato córneo podem ocorrer. O primeiro é através dos apêndices presentes na pele por meio dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e poros, sem a necessidade de hidratação de estrato córneo. O segundo por via intercelular, por onde o soluto difunde-se ao redor dos corneócitos permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica, sendo considerada a rota predominante em condições normais segundo evidências experimentais. E o terceiro mecanismo é por via transcelular, o soluto passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária (Figura 5) (ABRAHAM; CHADHA; MITCHELL, 1995; HADGRAFT, 2004).

Figura 6 - Vias de penetração dos fármacos através do estrato córneo.



Fonte: Gratieri, et al. (2008).

Nos estudos de liberação *in vitro*, a capacidade da substância ativa em ser liberada do carreador (veículo) é avaliada antes que ela entre em contato com a superfície epidermal e esteja disponível para penetração no estrato córneo e nas camadas inferiores da pele. Estes estudos podem servir como uma importante ferramenta para uma avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produto e podem servir para avaliar a biodisponibilidade (GETLE et al., 2002).

No entanto, obter a permeação de princípios ativos através das camadas da pele e fornecer eficácia clínica são problemas que devem ser enfrentados ao administrar fármacos pela pele (MORGANTI et al., 2001).

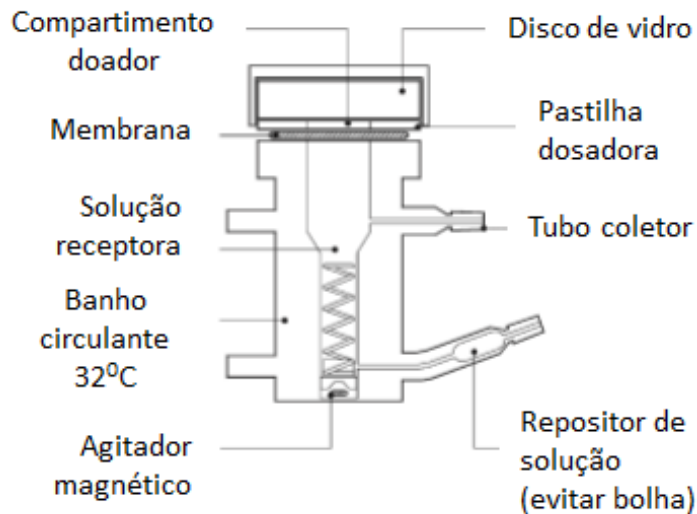
Um produto dermatológico deve ser diferenciado de um transdérmico, pois possuem mesma via de administração. Um produto dermatológico tem a pele como órgão alvo, ou seja, é destinado a liberar o fármaco na pele exercendo ação farmacológica local. Exige-se, portanto, uma máxima atuação na pele e mínima exposição à toxicidade sistêmica (SHAH et al., 1992).

A permeação é intensamente dependente das características físico-químicas do permeante, sendo que a mais importante é a habilidade de particionar através da camada intercelular. As diferenças existentes nos fluxos de compostos permeados através da pele se devem principalmente à concentração do permeante aplicado, ao coeficiente de partição do permeante entre o estrato córneo e o veículo e da capacidade que o composto possui de difundir dentro do estrato córneo (MORGANTI et al., 2001).

O transporte químico através da pele é importante tanto para otimização da liberação tópica quanto transdermal. Sistemas *in vitro* têm sido desenvolvidos para facilitar a estimativa da absorção percutânea (PLAGLIARA et al., 1999).

Estes estudos de liberação são normalmente realizados utilizando um dispositivo conhecido como "célula de Franz" ou célula de difusão vertical. Um aparelho utilizado em testes *in vitro* com finalidade de medir a taxa de liberação de produtos tópicos, reproduzindo assim a cinética de permeação da pele. É composto por um compartimento doador, membrana e um meio receptor que é analisado para determinar a concentração do fármaco. As células de difusão são amplamente utilizados para o teste de taxa de liberação de semissólidos (HANSON, 2010).

Figura 7 – Célula de Franz.



Fonte: Adaptado de Hanson (2010).

Um aparelho de teste de célula de difusão inclui tipicamente um agrupamento de seis células para o ensaio da taxa de liberação simultânea de seis amostras. Uma unidade celular controla a mistura de cada uma das câmaras do receptor de célula ao longo do teste, e um banho de circulação fornece água aquecida às células encamisadas para manter uma temperatura constante de 32 ° C para aplicações na pele. As amostras são retiradas manualmente, e o meio receptor é substituído também manualmente para manter uma constante interface de média-membrana. O teste de célula de difusão pode ser automatizado com um amostrador programável e coletor (HANSON, 2010).

Após estudos de liberação é necessário avaliar a penetração de substâncias ativas na pele ou através dela. Para a realização destes estudos são utilizadas normalmente pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia ou pele de orelha de porco, que é considerado o melhor modelo de pele, pois esta possui propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana além de ter maior disponibilidade (PAGLIARA et al., 1999).

Portanto, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* são úteis para avaliar a biodisponibilidade de substâncias ativas e comparar formulações em desenvolvimento. Em muitos casos, somente resultados comparativos são necessários (WESTER; MALBACH, 1990).

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, as atividades biológicas e a citotoxicidade dos extratos aquosos e alcoólicos de cascas, folhas e sementes de *Garcinia brasiliensis* e realizar estudos de permeabilidade e penetração cutânea do extrato com melhor atividade em formulações dermatológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

Os frutos e folhas da *Garcinia brasiliensis* foram coletadas em março de 2012, de árvores cultivadas sob condições controladas no herbário da Universidade Federal de Viçosa (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste), Minas Gerais, Brasil. A identificação botânica das amostras foram registradas sob o número VIC2604 do herbário da Universidade Federal de Viçosa.

4.1.2 Preparação do material vegetal

As folhas, cascas e sementes da *G. brasiliensis* foram dispostas em bandejas e secas até peso constante em estufa de ar circulante com temperatura controlada em torno de 40°C.

As sementes foram submetidas à turbolização com água (para posterior extração por infusão) e com etanol 95% (para posterior extração por percolação).

As cascas e as folhas foram trituradas em moinhos de facas para obtenção dos pós, sendo estes posteriormente padronizados quanto ao seu tamanho médio de partícula (granulometria). A granulometria foi estabelecida de acordo com a farmacopeia Brasileira 5^o Ed. (2010), utilizando agitador de peneiras – eletromagnético (BerTel®) contendo um conjunto de tamises com malhas variando de 355 µm a 1,7 mm sob uma vibração pré-estabelecida anteriormente por um período de 15 minutos. A vibração adequada utilizada foi selecionada por meio da passagem forçada dos pós pelas peneiras utilizando intensidades variadas, sendo estabelecidas como padrões para análises granulométricas as que apresentaram maior rendimento.

A partir dos resultados obtidos para os pós das folhas e cascas da *G. brasiliensis* foram calculadas os tamanhos médios de partícula.

4.1.3 Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos extratos etanólicos, as folhas e cascas pulverizadas e as sementes turbolizadas foram submetidos à extração exaustiva por percolação utilizando etanol 95% (v/v) como solvente extrator. Os percolados foram concentrados em evaporador rotativo com pressão reduzida e a uma temperatura média de 45°C para eliminação do etanol. Posteriormente os materiais obtidos foram armazenados em frascos âmbar, e mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

Os extratos aquosos foram obtidos por meio da infusão dos pós e das sementes turbolizadas. Os extratos foram submetidos ao processo de liofilização. Os extratos aquosos secos obtidos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em dessecador (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1998).

Sendo assim, foram obtidos para as análises posteriores os extratos etanólicos da casca (EEC), folha (EEF), semente (EES) e extratos aquosos da casca (EAC), folha (EAF), semente (EAS) de *Garcinia brasiliensis*.

4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de cada um dos extratos (0,5 mL), na concentração de 0,1 mg/mL, foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de carbonato de sódio 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 750 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (SINGLETON; ORTHOFER;

LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Os limites de detecção e quantificação usados para este método foram de 3,45 mg/g e 10,45 mg/g respectivamente.

4.3 TEOR DE FLAVONOIDES

Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos, na concentração de 1,5 mg/ mL, foi misturada com 1,5 mL de etanol, 0,1 ml de cloreto de alumínio 10% (m/v), 0,1 mL de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada, totalizando 5 mL de reação. Após 30 minutos, a absorbância foi medida a 425 nm. A curva padrão para flavonoides totais foi feita usando como padrão solução de quercetina. O total de flavonoides foi expresso como equivalentes de quercetina (mg quercetina/g extrato), e os valores foram apresentados como média das análises em triplicata (KALIA et al., 2008). Os limites de detecção e quantificação usados para este método foram de 3,59 mg/g e 10,89 mg/g respectivamente.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE DPPH

A propriedade dos extratos etanólicos e aquosos de sequestrar radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por Yen et al. (2005). Diferentes concentrações dos extratos (entre 400 e 1,56 µg/mL, em diluição seriada de razão 2) em uma solução etanólica (2 mL) foram misturados com 0,5 mL de DPPH (0,5 mM, diluído em etanol). Depois da incubação por 30 min, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 517 nm. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto os extratos. Ácido ascórbico, quercetina e BHT foram utilizados como controle positivo. A propriedade de sequestro foi calculada como porcentagem de radicais DPPH sequestrados, com os extratos a 100 µg/mL, usando a seguinte equação:

Sequestro de radical DPPH (%) = [(absorbância do branco – absorbância da amostra) / (absorbância branco)] x 100.

Os valores foram apresentados como média das análises em triplicata. O valor EC₅₀ é a concentração efetiva que pode sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução.

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os extratos etanólicos e aquosos foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana por meio do ensaio de microdiluição em caldo utilizando placa de 96 poços.

4.5.1 Microrganismos testados

As bactérias e leveduras utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias em estudo são linhagens padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC) e pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG.

As bactérias Gram-positivas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As leveduras utilizadas foram do gênero *Candida*: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

As amostras de bactérias foram mantidas em meio ágar BHI, a amostra de *S. pyogenes*, em meio ágar sangue e as leveduras, em meio ágar Sabouraud, a 8°C, até o momento de realização dos testes.

4.5.2 Avaliação do perfil de sensibilidade

Foram avaliadas as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (CIM₅₀) e 100% (CIM₁₀₀). As determinações do perfil de sensibilidade foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição para leveduras conforme documento M27A3 (CLSI, 2008) e para bactérias conforme documento M7A6 (CLSI, 2003) tendo sido feita algumas modificações, como a suplementação do meio Caldo Mueller Hinton com 5% de sangue lisado de carneiro e incubação em condições de microaerofilia, para o *S. pyogenes*.

Para a realização deste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato que são compostas por colunas numeradas de 1 a 12 e fileiras de A a H.

4.5.3 Extratos analisados

Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos 100 vezes no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO, nesta concentração, e sem os derivados, foi utilizado no ensaio como controle da diluição. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 10; 8; 4; 2; 1 e 0,5 µg/mL para as bactérias e leveduras. Para a bactéria *S. pyogenes*, os extratos foram testados nas concentrações de 1000; 250; 125; 100; 80; 40; 20 e 5 µg/mL.

4.5.4 Controles do ensaio

O meio de cultura caldo Mueller Hinton acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foram utilizados como controle negativo. As drogas padrões utilizadas como controle positivo no teste foram o antifúngico Fluconazol, nas concentrações de 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125;

0,0625 e 0,03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o antibiótico Cloranfenicol, nas concentrações de 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122 e 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5.5 Leitura e interpretação dos resultados

Os valores de CIM_{50} e CIM_{100} foram determinados após 24 horas para as bactérias e leveduras. As leituras foram feitas a 530 nm em leitora espectrofotométrica de microplacas. Os testes foram realizados em duplicata.

4.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise foi realizada em cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A com coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B). Os extratos analisados foram dissolvidos em metanol/ água (1:1) e injetados no volume de 20 μL . O fluxo foi de 1,0 mL/min. A análise foi realizada em gradiente de 50% até 100% de B nos 10 min iniciais. Em seguida, a concentração de B foi mantida por 15 min e reduzida a 50% em 26 min. Para preparar a coluna para a próxima análise seguiu-se com 50% de B até 40 min. Após as análises de varredura espectral na região do UV/ Vis dos compostos e das formulações, foram selecionados os comprimentos de ondas de 254 nm e de 350 nm, utilizando software LC solution, com finalidade de evitar sobreposição dos picos.

4.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

4.7.1 Condições de cultura celular

Linhagens derivadas de cânceres humanos (A549, carcinoma de pulmão; MCF-7, câncer de mama) e cultura primária de pele humana foram utilizadas no presente estudo. As culturas foram mantidas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, Brasil), e antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100UI/mL, Sigma). As culturas foram mantidas em incubadora (37°C) contendo 5% CO₂. As culturas primárias de fibroblastos foram obtidas a partir de amostras de pele humana derivadas de descartes cirúrgicos (blefaroplastia). Os pacientes assinaram um termo de consentimento informado, conforme determinado pelo comitê de ética.

4.7.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico como descrito previamente por Cory et al. (1991). As células foram semeadas em placas de 96 poços a densidade de 5×10^3 (A549) ou 1×10^4 (MCF7 e cultura primária de pele humana) por poço.

Após a aderência (24h), as células foram tratadas durante 48 h com extrato aquoso da folha (EAF) da *G. brasiliensis* em diferentes concentrações (0,5 - 1000 µg/mL). Neste ensaio, o sal MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio é convertido a sua forma reduzida (formazano) por atividade enzimática (desidrogenases). Considerando que o formazano absorve luz a 490 nm, a quantidade produzida do referido composto em cada amostra foi determinada em leitor de Elisa. Os valores de absorbância entre culturas controles e tratadas, foram comparados para a determinação da viabilidade relativa, sendo que a quantidade de formazano produzida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Curvas de regressão foram obtidas através do programa

GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), as quais permitiram determinar os valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento). Os experimentos foram realizados em triplicadas e réplicas foram obtidas para confirmação dos dados. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão, considerando as triplicatas. A cisplatina, uma droga altamente tóxica utilizada em tratamento quimioterápico, foi usada como controle positivo.

4.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

4.8.1 Preparo das formulações contendo extrato de *Garcinia brasiliensis* utilizadas nos estudos de permeação e retenção cutânea.

Foram preparadas duas formulações de uso tópico no laboratório de farmacotécnica da Universidade Federal de Alfenas. Sendo uma formulação um creme com bases auto-emulsionantes iônica (Lanette), (Tabela 1) e outra um gel não-iônico (Natrosol), (Tabela 2) contendo extrato aquoso da folha de *Garcinia brasiliensis* (EAF), para tratamento de lesão da pele devido suas atividades antimicrobianas.

Tabela 1 - Composição da formulação de creme lanette (emulsão O/A).

Matérias primas	%
A) Base auto emulsionante iônica – Lanette	15,00
(álcool ceto estearílico sulfatado (emulsificante)	
Miritrato de isopropila (emoliente)	3,00
Vaselina líquida (emoliente)	15,00
BHT (antioxidante)	0,05
Propilparabeno (conservante)	0,05
B) Glicerina (umectante)	4,00
EDTA (antioxidante)	0,10
Metilparabeno (conservante)	0,15
Água destilada qsp	100,00
C) Propilenoglicol (umectante e solubilizante)	6,00
Extrato aquoso da folha de <i>G. brasiliensis</i> (princípio ativo)	5,00

Fonte: Do autor

As fases A e B foram aquecidas a 70°C e misturadas a esta temperatura sob constante agitação até resfriamento à temperatura ambiente. Após 24 horas, em um balão foi solubilizado o extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis* em propilenoglicol e adicionou-se esta fase C a formulação aos poucos até completa homogeneização. Sendo o pH final ajustado para 5,6.

Tabela 2 - Composição da formulação de gel de natrosol

Matéria prima	%
A) Natrosol - Hidroxietilcelulose (agente de consistência)	2,00
EDTA (antioxidante)	0,14
Metilparabeno (conservante)	0,15
Propilparabeno (conservante)	0,05
Propilenoglicol (umectante e solubilizante)	4,00
Água destilada qsp	100,00
B) Propilenoglicol (umectante e solubilizante)	1,00
Extrato aquoso da folha de <i>G. brasiliensis</i> (princípio ativo)	5,00

Fonte: Do autor

A fase A foi aquecida a 70°C sob constante agitação até resfriamento à temperatura ambiente. Após 24 horas, em um gral foi solubilizado o extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis* em propilenoglicol e adicionou-se esta fase B a formulação aos poucos até completa homogeneização. Sendo o pH final ajustado para 5,74.

4.8.2 Preparação da pele de orelha de porco

As orelhas de porco foram obtidas dentro de 2 horas após o sacrifício dos animais. A pele total foi cuidadosamente retirada da cartilagem com auxílio de um bisturi. O tecido cutâneo foi removido e a pele foi estocada a -4°C por até 30 dias antes do uso (LOPEZ et al., 2003).

4.8.3 Estudo de permeação e retenção *in vitro* de formulações

As formulações preparadas foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração e retenção dos componentes do extrato na pele de orelha de porco.

Os estudos de penetração foram conduzidos segundo Vicentini, (2003) adaptado, utilizando-se células de Franz com compartimento de solução receptora com capacidade para 12 mL e área de difusão de 1,77 cm². O meio receptor consistiu de um tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) e mantido a 32°C sob constante agitação de 300 rpm em barra magnética.

A pele de orelha de porco cortada 2,5 x 2,5 cm, foi colocada na parte superior da célula receptora, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor da célula de difusão. Todo o cuidado foi tomado para se evitar a formação de bolhas de ar entre a pele e a solução receptora. Foi colocada sobre a pele 200 mg de cada formulação (creme) e ou (gel) contendo 5% do extrato.

Amostras de 1,0mL das soluções receptoras foram coletadas após 2, 4, 6 e 12 horas, filtradas e a quantidade de fukugesídeo, usado como marcador do extrato aquoso da *G. brasiliensis* presente na formulação foi analisada por CLAE.

Ao final de 12 horas, as peles de orelha de porco foram retiradas, limpas com papel absorvente e lavadas cuidadosamente com água. A camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirada pressionando-se uniformemente 15 fitas adesivas tipo “durex” (*tape stripping*). A primeira fita foi descartada e as demais foram picotadas, colocadas em um tubo de fundo cônico contendo 4 mL de metanol:água (50:50) e submetidas a banho de ultra-som por 15 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 2 minutos e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e transferido para novo tubo de fundo cônico e analisado por CLAE.

A pele remanescente (epiderme viável + derme) foi submetida também ao processo de extração. Adicionou-se 4 mL de solvente extrator no tubo contendo as peles picotadas, triturou-se utilizando “Ultraturrax” e deixou-se em banho de ultra-som por 15 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 2 minutos e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado e transferido para o tubo de fundo cônico para que os compostos sejam analisados por CLAE.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados do teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides e atividade antioxidante foi realizada por meio do software SISVAR 5,3, pela análise de variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Scott-Knott para observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$) (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois influenciará o processo extrativo (MIGLIATO et al., 2007). A planta moída gera um aumento da superfície de contato, disponibilizando, portanto uma área muito maior para a interação entre o líquido extrator e as células vegetais danificadas, no qual os constituintes extraíveis são expostos e difundem-se para o líquido extrator (SOARES, 2001).

O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPEIA, 2010). Após a tamisação os valores do tamanho médio das partículas das folhas e cascas de *G. brasiliensis* encontrados foram de $508,84 \pm 202,62 \mu\text{m}$ e de $451,00 \pm 222,44 \mu\text{m}$ respectivamente.

Os processos extrativos sofrem grande influência da fragmentação e classificação de drogas. Podem ocorrer problemas devido à execução inadequada dessas etapas de processamento, como períodos excessivamente longos de extração, entupimento de um percolador (LIST; SCHIMIDT, 1989) além da influência de pós que estejam excessivamente finos, na diminuição da eficiência de extração por percolação pela compactação da droga no percolador. Por estes motivos, a preocupação com a determinação dos parâmetros de distribuição granulométrica fica centrada nos aspectos técnicos dos procedimentos de extração (LIST; SCHIMIDT, 1989; SONAGLIO, 2000).

Sendo assim, segundo Alves et al. (2010), a pulverização da matéria-prima vegetal constitui uma etapa crítica na produção de medicamentos fitoterápicos, pois este produto pulverizado, será um insumo indispensável para a obtenção de preparações intermediárias, portanto, o controle da tenuidade de pós é uma etapa óbvia no processo de produção.

5.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos etanólicos e aquosos das folhas, cascas e sementes da *G. brasiliensis* foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

Os resultados foram apresentados como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g) e estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos (mg AG/g amostra) dos extratos etanólicos e aquosos de *G. brasiliensis*.

Extrato	Teor de fenólicos totais (mg AG/g)*
EEC	118,96 ± 5,1 ^c
EAC	82,82 ± 6,5 ^d
EEF	159,85 ± 7,9 ^b
EAF	343,98 ± 4,8 ^a
EES	115,70 ± 7,6 ^c
EAS	127,24 ± 6,1 ^c

Fonte: Do autor

Notas: EEC = Extrato etanólico 95% da casca de *G. brasiliensis*; EAC = Extrato aquoso da casca de *G. brasiliensis*; EEF = Extrato etanólico 95% da folha de *G. brasiliensis*; EAF = Extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis*; EES = Extrato etanólico 95% da semente de *G. brasiliensis*; EAS = Extrato aquoso da semente de *G. brasiliensis*.

*Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

Entre os extratos analisados, o extrato aquoso da folha (EAF) foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos, com 343,98 ± 4,8 mg AG/g, seguido pelo extrato etanólico da folha (EEF), com 159,85 ± 7,9 (Tabela 3). Verificou-se então, que com relação às partes analisadas de *G. brasiliensis*, os compostos fenólicos se concentraram na folha.

Acuña et al. (2012), na busca de identificar novas fontes de antioxidantes a partir de plantas comestíveis menos utilizadas, investigaram a composição e as

propriedades antioxidantes de extratos de sete espécies de *Garcinia*, em comparação com a bem conhecida espécie denominada *G. mangostana*. Neste estudo, a *G. intermedia* se destacou apresentando teor de compostos fenólicos de $476,9 \pm 40,8$ mg AG/g do extrato da fruta seca enquanto a *G. mangostana* apresentou um teor de $263,3 \pm 6,4$ mg AG/g do extrato da fruta seca. No presente estudo, o extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis* apresentou um teor de compostos fenólicos totais superior ao do extrato da fruta seca da *G. mangostana*.

Os efeitos biológicos atribuídos aos compostos fenólicos relacionados à expressão da atividade antioxidante tornam sua quantificação importante por ser uma forma de avaliar as propriedades antioxidantes de uma espécie vegetal (KRSHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

5.3 TEOR DE FLAVONOIDES

Os resultados do teor de flavonoides totais presentes nos extratos aquosos e etanólicos da *G. brasiliensis* estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de flavonoides dos extratos etanólicos e aquosos (mg quercetina/g amostra) de *G. brasiliensis*.

Extrato	Teor de flavonóides totais (mg quercetina/g)*
EEC	$10,86 \pm 0,3^d$
EAC	$6,51 \pm 0,2^e$
EEF	$32,22 \pm 0,9^c$
EAF	$45,62 \pm 0,7^b$
EES	$47,10 \pm 0,2^a$
EAS	$11,17 \pm 0,2^d$

Fonte: Do autor

Notas: EEC = Extrato etanólico 95% da casca de *G. brasiliensis*; EAC = Extrato aquoso da casca de *G. brasiliensis*; EEF = Extrato etanólico 95% da folha de *G. brasiliensis*; EAF = Extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis*; EES = Extrato etanólico 95% da semente de *G. brasiliensis*; EAS = Extrato aquoso da semente de *G. brasiliensis*.

*Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott $p < 0,05$).

Os flavonoides são o grupo mais comum de compostos fenólicos da dieta humana e são encontrados nas plantas em geral. A quercetina é um conhecido flavonoide derivado de plantas e alguns estudos demonstraram que eles podem ter propriedade antioxidante (DAVIS et al., 2009).

Nesta quantificação, os maiores teores de flavonoides encontrados foram no extrato etanólico da semente (EES) e no extrato aquoso da folha (EAF), com valores respectivamente de $47,10 \pm 0,2$ e $45,62 \pm 0,7$ mg quercetina/g de extrato (Tabela 4). Este resultado sugere que no grupo de compostos fenólicos desses extratos, 40,71% e 13,26% respectivamente, correspondem a compostos classificados como flavonoides.

Pereira, et al. (2009), realizaram um trabalho para determinar concentrações de flavonoides de sete amostras comerciais dos chás preto e verde de *Camellia sinensis*, muito conhecida pela sua riqueza em compostos fenólicos antioxidantes e constataram que os teores de flavonoides presentes na amostras variam de 0,46 a 1,10 mg de quercetina/g de amostra. Já os teores de flavonoides da *G. brasiliensis* variaram entre 6,51 e 47,10 mg de quercetina/g de amostra, sendo o maior valor aproximadamente 43 vezes maior que o maior valor dos chás.

A presença dos flavonoides nos compostos presentes naturalmente no reino vegetal é justificada pela capacidade de proteção das plantas contra a radiação ultravioleta, preservando assim seu material genético contra os danos fisiológicos em nível de DNA provocados por esta radiação (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Dentre os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonoides, destacam-se as ações antioxidante, anti-inflamatória, antiplaquetária e antialergênicas. Eles podem tanto inibir enzimas como a prostaglandina sintetase, lipoxigenase e ciclooxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese, como induzir enzimas do sistema desintoxicante como a glutathione S-transferase. Quando em alimentos, os flavonoides agem de forma a poupar o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres (KOO; SUHAILA, 2001).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE DPPH

Diferentes métodos têm sido utilizados para se estudar a atividade antioxidante. Alguns passos para a padronização, com a finalidade de avaliar os efeitos antioxidantes de extratos e compostos isolados foram sugeridos. Estes seriam a quantificação e a identificação dos compostos fenólicos presentes, seguidos pela determinação da atividade sequestrante de radical (BECKER et al., 2004). Os resultados estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método do sequestro de radical livre DPPH dos extratos etanólicos e aquosos de *Garcinia brasiliensis*.

Extratos	% Sequestro de radical DPPH (a 100 µg/mL)*	EC ₅₀ (µg/mL)
EEF	82,06 ± 0,7 ^e	23,81
EAF	77,68 ± 2,2 ^d	40,45
EEC	82,35 ± 0,1 ^e	47,94
EAC	60,88 ± 1,0 ^b	79,84
EES	86,57 ± 0,3 ^f	23,10
EAS	37,09 ± 1,2 ^a	135,64
Quercetina	81,44 ± 0,2 ^e	4,57
Ácido Áscórbico	90,43 ± 0,3 ^g	6,49
BHT	63,70 ± 0,1 ^c	70,11

Fonte: Do autor

Notas: EEF = Extrato etanólico 95% da folha de *G. brasiliensis*; EAF = Extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis*; EEC = Extrato etanólico 95% da casca de *G. brasiliensis*; EAC = Extrato aquoso da casca de *G. brasiliensis*; EES = Extrato etanólico 95% da semente de *G. brasiliensis*; EAS = Extrato aquoso da semente de *G. brasiliensis*.

*Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

Foi possível observar na Tabela 5, pela porcentagem de sequestro de radical DPPH, que a maior atividade foi do extrato etanólico da semente (EES), com 86,57 % de sequestro, sendo mais bioativo que os padrões quercetina e BHT. Os extratos

etanólicos da casca (EEC) e da folha (EEF) também apresentaram elevados valores, com atividade de 82,35 e 82,06% respectivamente, sendo estatisticamente iguais a quercetina e superior ao BHT.

Com relação à análise do EC_{50} dos extratos, observou-se que o extrato mais bioativo foi o etanólico da semente (EES), com 23,10 $\mu\text{g/mL}$, seguido pelo etanólico da folha (EEF), com 23,81 $\mu\text{g/mL}$. Tais resultados foram melhores que o EC_{50} apresentado pelo BHT.

Acuña et al (2012) analisaram a atividade antioxidante pelo EC_{50} de outras 8 espécies do gênero *Garcinia* e foram encontrados valores entre 60,1 e 205,1 $\mu\text{g/mL}$. Ao avaliar os resultados na Tabela 5, foi possível verificar que *G. brasiliensis* é mais bioativa que as outras espécies avaliadas neste estudo.

A atividade de sequestro radicalar é de grande importância, pois a produção excessiva de radicais livres acelera a oxidação dos lipídeos nos alimentos reduzindo assim sua qualidade. Radicais de DPPH (DPPH^{\bullet}) têm sido amplamente utilizados para medir a capacidade de eliminação de radicais de várias substâncias antioxidantes (GÜLÇİN, 2009). Este ensaio foi realizado por ser suficientemente sensível para detectar compostos naturais em baixas concentrações e por um método simples e rápido (GÜLÇİN, et al., 2009). Baseia-se na redução do radical DPPH^{\bullet} de cor roxa para um composto de hidrazina de coloração amarela. Quando o DPPH^{\bullet} reage com doadores de hidrogênio ou outros radicais (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005), um decréscimo de absorvância pode ser detectado espectrofotometricamente a λ 515 - 528 nm (GONTIJO, et al., 2012).

Quando diversas amostras são avaliadas (*screening*), a porcentagem de inibição é mais indicada por ser de execução mais simples e rápida. Já o método de EC_{50} se torna o mais indicado quando se pretende avaliar de forma mais detalhada a ação do antioxidante, determinando qual a massa necessária desse para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH^{\bullet} no meio (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Neste estudo, foram medidas as atividades antioxidantes dos extratos e padrões. DPPH^{\bullet} fornece uma forte absorção em 517 nm por causa de seu elétron ímpar. Como esse elétron torna-se emparelhado na existência de um sequestrante de radicais livres, a absorção desaparece (TALAZ et al., 2009).

De acordo com Gontijo et al, (2012), a atividade de eliminação de radicais observados é devido à capacidade destes compostos para doar radicais hidrogênio, o que é favorecido pela estabilização do radical fenoxil oxidante em DPPH.

A correlação entre os parâmetros de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante foi determinada por meio da análise de Pearson.

Entre o teor de compostos fenólicos e flavonoides, a correlação apresentou-se positiva, de moderada a forte ($r=0,6$). Isto significa que o teor de flavonoides dos extratos de *Garcinia brasiliensis* aumenta com o aumento do teor de compostos fenólicos totais.

Para a atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais, a correlação ($r=0,17$), apesar de mostrar-se positiva, foi de fraca a moderada.

Já para a atividade antioxidante e o teor de flavonoides, a correlação ($r=0,61$) foi positiva, de moderada a forte. Isto sugere que, dentro do grupo dos compostos fenólicos, especificamente os flavonoides possuem importante função na atividade antioxidante dos extratos.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

A determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais foi realizada por meio da avaliação da menor quantidade da amostra necessária para inibir o crescimento dos microrganismos; esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM) ou IC_{100} . Aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações devem ser levados em consideração para determinar a CIM de extratos vegetais (OSTROSKY et al., 2008).

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos etanólicos e aquosos das folhas, cascas e sementes da *Garcinia brasiliensis* estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Determinação das concentrações inibitórias (CIM₅₀) e (CIM₁₀₀) em µg/mL para bactérias e fungos.

Substâncias testadas	Índice	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Fluconazol	CIM ₅₀	-	-	-	-	-	1	32
Cloranfenicol	CIM ₅₀	0,975	62,5	1,95	0,975	31,2	-	-
EAC	CIM ₅₀	*	12,5	5	*	100	12,5	0,5
	CIM ₁₀₀	*	*	1000	*	*	*	50
EEC	CIM ₅₀	10	50	5	50	50	50	0,5
	CIM ₁₀₀	100	100	1000	*	100	*	50
EAF	CIM ₅₀	1	25	5	100	100	100	0,5
	CIM ₁₀₀	100	100	250	100	100	*	100
EEF	CIM ₅₀	8	50	5	50	50	50	0,5
	CIM ₁₀₀	*	*	1000	*	*	*	*
EAS	CIM ₅₀	25	50	5	50	50	50	50
	CIM ₁₀₀	100	*	1000	*	*	*	100
EES	CIM ₅₀	25	50	1000	50	50	*	1
	CIM ₁₀₀	*	*	*	100	*	*	*

Fonte: Do autor

Notas: EAC = Extrato aquoso da casca de *G. brasiliensis*; EEC = Extrato etanólico 95% da casca de *G. brasiliensis*; EAF = Extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis*; EEF = Extrato etanólico 95% da folha de *G. brasiliensis*; EAS = Extrato aquoso da semente de *G. brasiliensis*; EES = Extrato etanólico 95% da semente de *G. brasiliensis*.

*Sem ação na faixa de concentração testada.

Segundo Holets et al. (2002), os extratos que apresentarem CIM menores que 100 µg/mL, podem ser considerados com boa atividade antimicrobiana, CIM entre 100 – 500 µg/mL, moderadamente ativos, entre 500 – 1000 µg/mL são pouco ativos e maior de 1000 µg/mL, são considerados como substâncias inativas. Portanto, ao analisar a Tabela 6, verificou-se que todos os extratos que apresentaram atividade antibacteriana na faixa de concentração testada, foram considerados com boa atividade, pois apresentam CIM menores que 100 µg/mL. Com exceção do *S. pyogenes*, em que somente o extrato aquoso da folha (EAF) apresentou moderada atividade e todos outros extratos mostraram-se pouco ativos.

Entretanto, considerando o CIM₅₀, o extrato que se mostrou mais ativo, foi o extrato aquoso da folha (EAF), com uma CIM₅₀ de 1 µg/mL, atividade bem próxima ao do padrão cloranfenicol que possui CIM₅₀ de 0,975 µg/mL contra o *S.aureus*.

Quanto à atividade antifúngica, pode-se observar na Tabela 6, que todos os extratos não apresentaram atividade contra a *C. albicans* na faixa de concentração testada. Porém, com exceção do o extrato etanólico da folha (EEF) e o extrato etanólico da semente (EES), os outros extratos foram considerados com boa atividade contra a *C. krusei*, pois apresentam CIM menores que 100 µg/mL. Estes resultados se destacaram principalmente quando comparados ao padrão fluconazol, pois algumas das espécies que apresentam mais resistência a este medicamento são *C. krusei* e *C. glabrata* que também são citados por sua baixa sensibilidade (REX; RINALDI; PFLER, 1995).

A avaliação da atividade biológica de plantas da família Clusiaceae vem possibilitando a identificação de moléculas com potente capacidade de interferir na atividade celular de diferentes organismos, entre eles fungos e bactérias (MARQUEES; EL-BACHÁ; CRUZ, 2009).

Estudos químicos do gênero *Garcinia* têm demonstrado uma grande diversidade de classes estruturais, podendo citar dentre elas as benzofenonas polisopreniladas, flavonóides, xantonas e cumarinas (TAHER et al., 2005). Outro estudo realizado com a *G. mangostana* segundo Pedraza - Chaverri et al. (2008), demonstraram que o pericarpo é uma fonte de xantonas e outras substâncias bioativas e que seus extratos possuem ação antioxidante, antitumoral, antialérgica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiviral.

O mecanismo de ação farmacológico de um extrato de planta não é de fácil

determinação, principalmente devido ao alto grau de interação da diversidade de seus milhares de componentes. Um mecanismo predominante muitas vezes pode ser potencializado por mecanismos inferiores. Esta combinação pode gerar resposta mais favorável do que apenas um componente isolado (BIAVATTI, 2009).

Vanden Berghe e Vlietinck (1991) alertam que extratos com atividade inibitória contra uma ou várias bactérias não prediz necessariamente um efeito seletivo ou de amplo espectro. A potência das substâncias ativas somente pode ser determinada quando testadas isoladamente e usando uma metodologia padronizada.

Segundo Yoo; Murata e Duarte, (2011), os efeitos antimicrobianos de compostos polifenóis presentes em plantas causam danos estruturais ou funcionais na membrana celular da bactéria. A presença de hidroxilas e ligações duplas conjugadas desta estrutura podem estar envolvidos na ligação a componentes da parede celular. Substâncias derivadas de plantas afetam negativamente células microbianas através de vários mecanismos de ação que atacam a bicamada de fosfolipídios da membrana celular perturbando assim os sistemas enzimáticos (PROESTOS, et al., 2008).

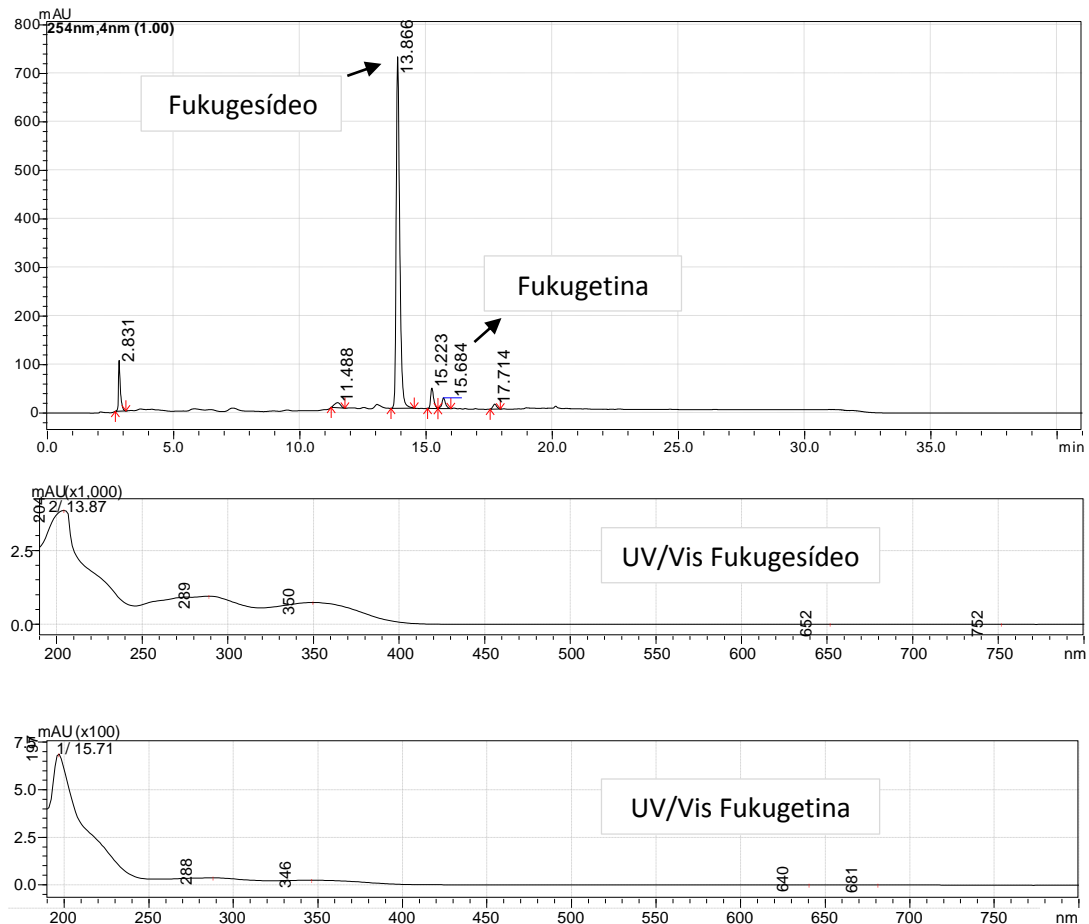
Devido a este fator autores sugerem que os extratos podem ser usados juntamente com os antimicrobianos comerciais para aumentar a sua eficácia clínica ou reduzir as suas doses com finalidade de evitar efeitos adversos (BIAVATTI, 2009).

Os extratos hexânicos e clorofórmicos de cascas e frutos da *G. cowa* e *G. pendunculata* apresentaram atividade antibacteriana contra diversas bactérias patogênicas como *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*. A CIM variou de 15 a 500 µg/mL para a *G. cowa* e de 30 – 1250 µg/mL para a *G. pedunculata*. (NEGI; JAYAPRAKASHA; JENA, 2008). Já estudos envolvendo compostos isolados da *G. gardneriana* como o fukugesídeo, apresentou CIM de 1000 µg/mL contra *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (VERDI, et al., 2004).

5.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

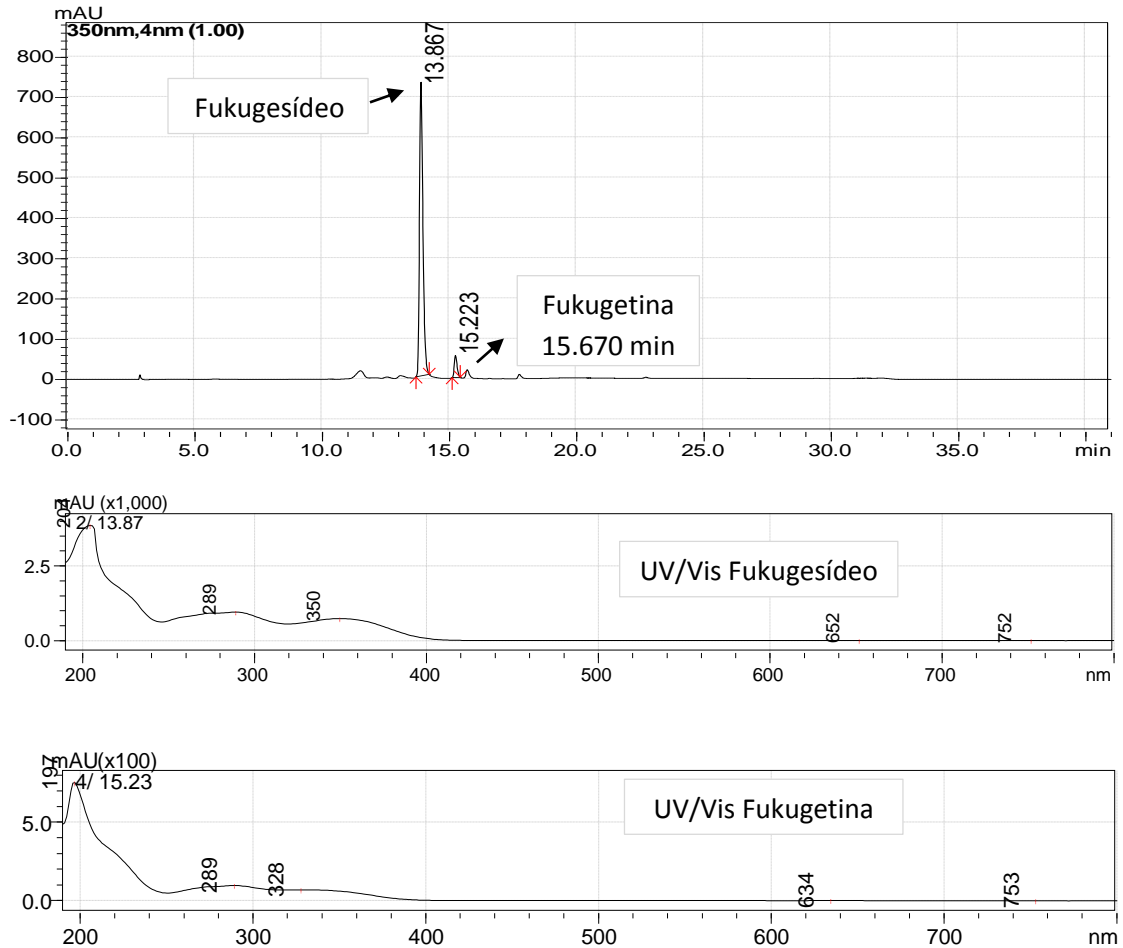
Os cromatogramas das Figuras 8 e 9 demonstram os principais picos e tempo de retenção nos espectros UV/Vis do extrato aquoso das folhas da *Garcinia brasiliensis* (EAF).

Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, realizado em cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 254 nm.



Fonte: Do autor

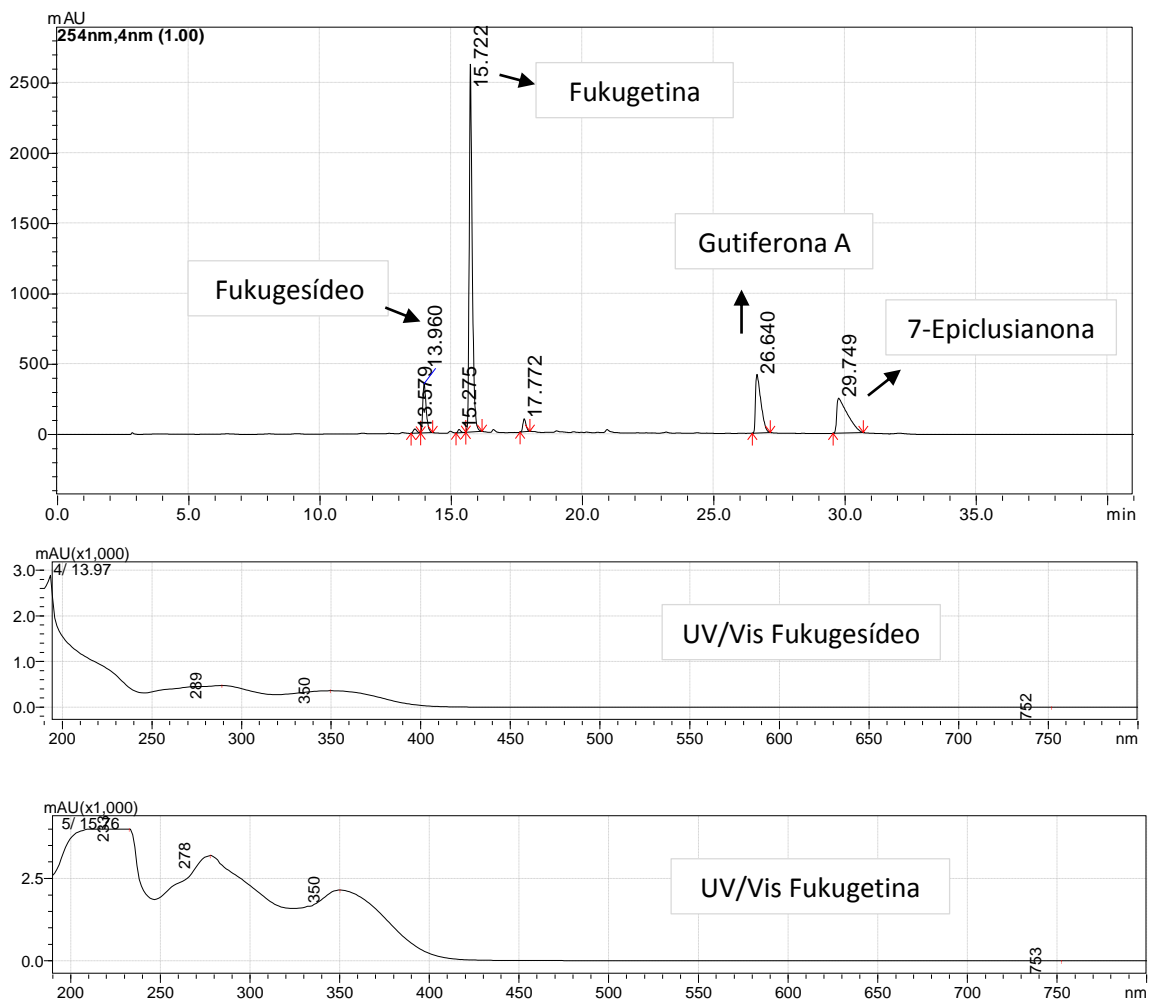
Figura 9 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, realizado em cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



Fonte: Do autor

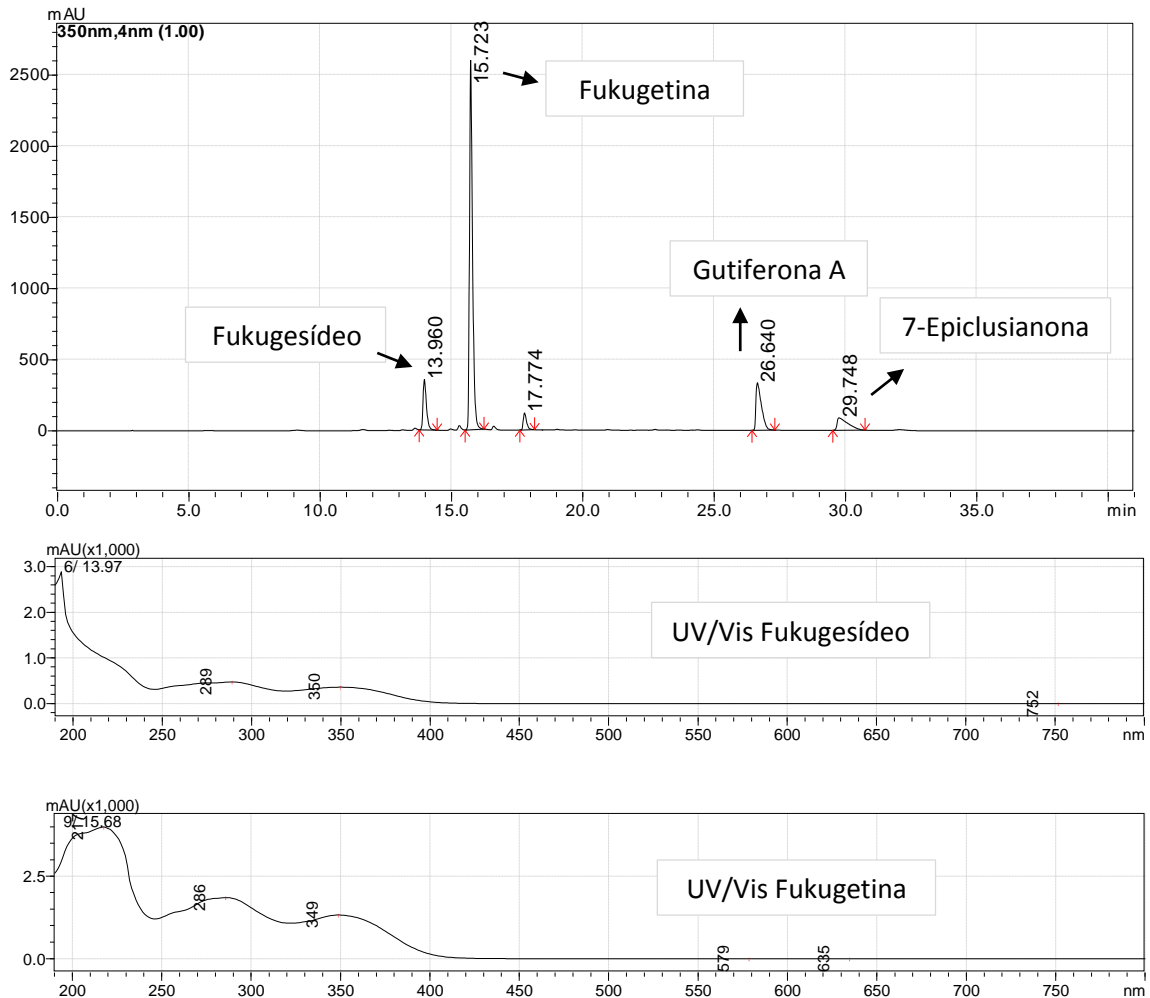
Os cromatogramas das Figuras 10 e 11 apresentam os picos e tempo de retenção nos espectros UV/Vis dos padrões: fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), fukugetina, gutiferona A e 7-epiclusianona.

Figura 10 – Perfil cromatográfico dos padrões: fukugesídeo, fukugetina, gutiferona A e 7-epiclusianona, realizado em cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (elute A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (elute B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 254 nm, demonstrando os espectros UV/ Vis da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo) e fukugetina.



Fonte: Do autor

Figura 11 - Perfil cromatográfico dos padrões: fukugesídeo, fukugetina, gutiferona A e 7-epiclusianona, realizado em cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm, demonstrando os espectros UV/ Vis da fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo) e fukugetina.

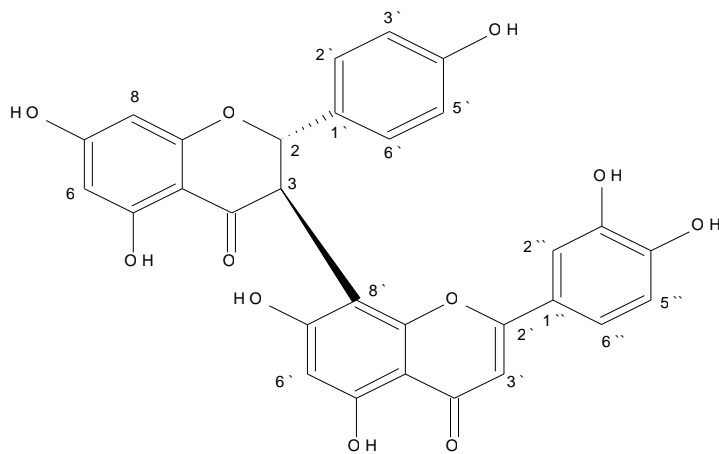


Fonte: Do autor

Foram caracterizados no cromatograma, os compostos do extrato das folhas de *G. brasiliensis* absorvidos na região UV/Vis naqueles específicos comprimentos de onda.

Ao observar os cromatogramas, verifica-se nas Figuras 8 e 9 um pico em 15.684 min em 254 nm e de 15.670 min em 350 nm do extrato aquoso da folha (EAF), identificados como fukugetina (Figura 12) quando comparados com os tempos de retenção e a absorbância no UV/Vis dos padrões, indicados nas Figuras 10 e 11.

Figura 12 - Representação estrutural da fukugetina

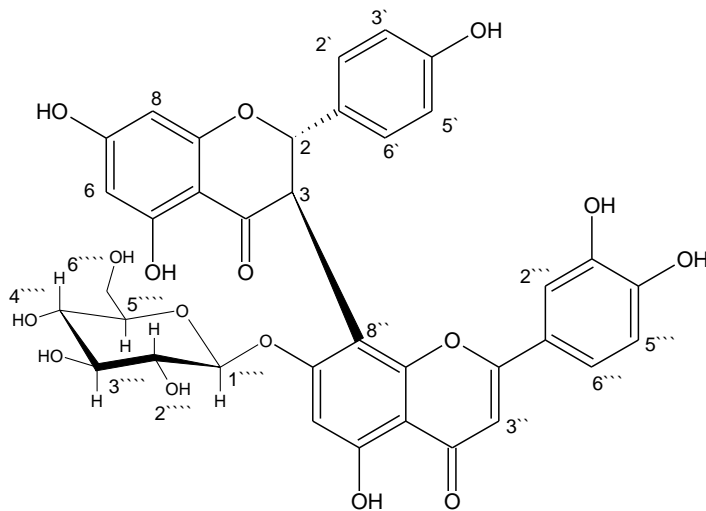


Fonte: Gontijo, et al. (2012).

A fukugetina (morelloflavona) é um biflavonoide (composto polifenólico) frequentemente encontrado com grande abundância no gênero *Garcinia*. Essa substância tem sido investigada quanto as suas propriedades medicinais, obtendo resultados promissores na maioria dos casos. Os biflavonoides possuem uma grande diversidade estrutural devido, principalmente, aos diferentes padrões de glicosilação, hidroxilação, metoxilação e sulfatação. A ocorrência destes metabólitos foi registrada em 32 espécies do gênero *Garcinia* (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012).

Ao analisar os cromatogramas nas Figuras 8 e 9, observamos que o pico que apresentou maior absorção em 254 nm e 350 nm, foi o de 13.866 min e de 13.867 min respectivamente, confirmando ser a fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo, uma fukugetina glicosilada (Fukugesídeo) (Figura 13), quando comparado com o tempo de retenção do padrão fukugesídeo nos cromatogramas das Figuras 10 e 11. Seus espectros UV/Vis coincidem com os da fukugetina, porém possuem maior polaridade, pois sua eluição antecedeu ao da fukugetina, possivelmente devido à presença de uma molécula glicose. Esta molécula foi anteriormente isolada no LFQM por Gontijo, et al. (2012).

Figura 13 - Representação estrutural da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo).

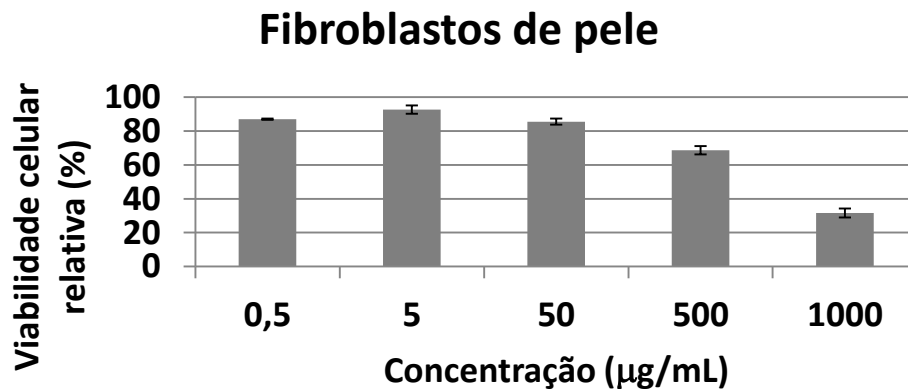


Fonte: Gontijo, et al. (2012).

5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

As culturas primárias são muito úteis como modelos experimentais, porque reproduzem melhor os eventos fisiológicos observados em tecido (*in vivo*) a partir do qual foram derivadas. Este aspecto é muito importante, considerando que EAF pode ser ainda utilizado em formulações para o tratamento de lesão da pele devido às suas atividades antibacterianas e antifúngicas.

Figura 14 - Viabilidade celular relativa obtida com o ensaio de MTS. Os fibroblastos foram tratados durante 48 h com EAF em diferentes concentrações. A viabilidade celular foi significativamente reduzida quando foram usadas concentrações elevadas. O valor de IC_{50} foi de $664,5 \pm 124,5 \mu\text{g/mL}$.



Fonte: do autor

Os resultados mostraram que o EAF apresentou baixa citotoxicidade em fibroblastos humanos (Figura 14). O valor de IC_{50} foi de $664,5 \pm 124,5 \mu\text{g/mL}$ em comparação com a cisplatina que apresentaram $IC_{50} = 25,5 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$.

Apesar de EAF apresentar baixa atividade citotóxica contra fibroblastos humanos normais, foram avaliados seu efeito sobre linhagens de células de câncer.

Dois linhagens celular de câncer humano (A549 e MCF7, derivadas de câncer de pulmão e de mama, respectivamente) foram utilizados no presente estudo para avaliar o potencial citotóxico do EAF.

Figura 15 - Viabilidade celular relativa obtida com o ensaio de MTS. As linhagens de células tumorais foram tratadas durante 48 h com EAF em diferentes concentrações. A viabilidade celular só foi reduzida quando foram utilizadas concentrações superiores a $100 \mu\text{g/mL}$. Os valores de IC_{50} foram $312,0 \pm 15,45 \mu\text{g/mL}$, e $366,9 \pm 25,6 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, para as linhagens de células MCF7 e A549.

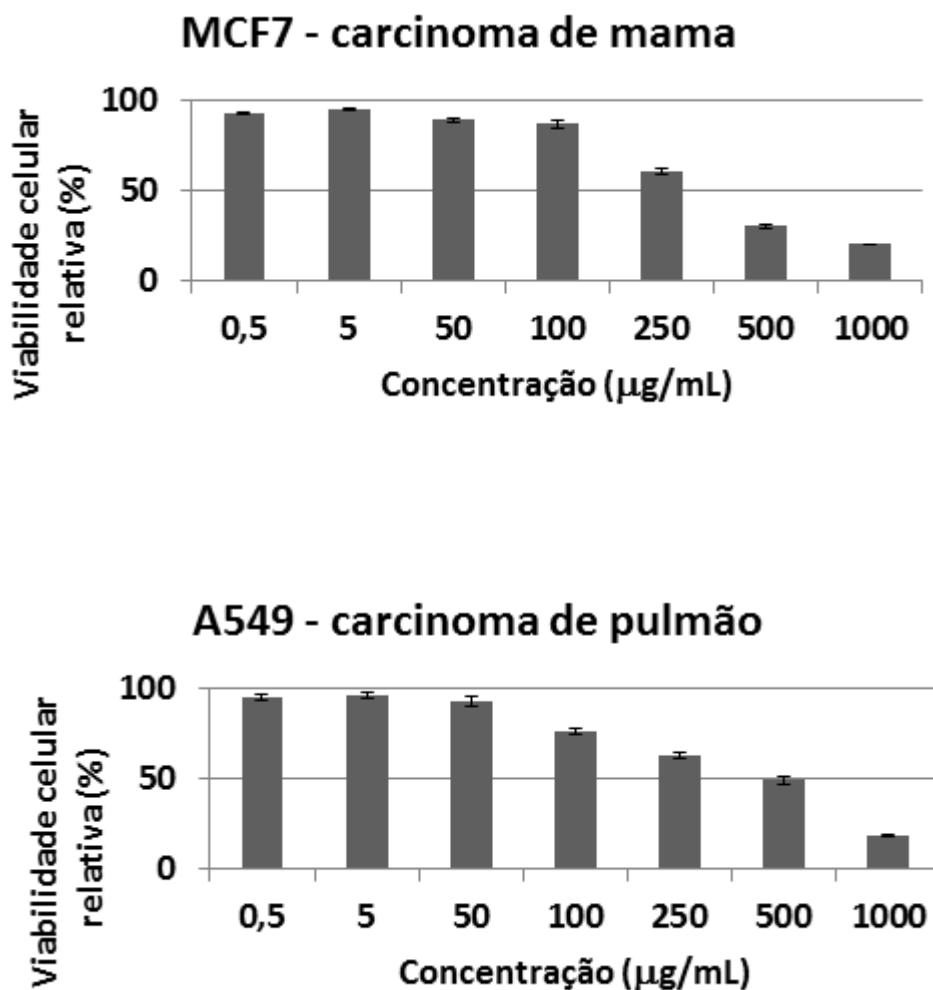


Tabela 7 - Valores de IC₅₀ µg/mL, calculados a partir de dados obtidos do ensaio de MTS para células tumorais.

Cultura celular	EAF µg/mL	Cisplatina µg/mL
MCF7	312,0 ± 16,45	23,05 ± 1.43
A549	366,9 ± 25,5	6,52 ± 0.57

Fonte: Do autor

Os resultados mostraram que a viabilidade celular foi afetada apenas quando o extrato foi usado em concentrações acima de 100 µg/mL (Figura 15). O valor de IC₅₀ encontrados eram 312,0 ± 16,45 µg/mL e 366,9 ± 25,5 µg/mL, respectivamente, para as linhagens de células MCF7 e A549. A cisplatina foi utilizada como controle positivo no ensaio citotóxico (Tabela 7). Considerando os resultados obtidos no presente estudo, o EAF apresentou baixa atividade citotóxica contra a linhagens de células de câncer estudadas. De acordo com o National Cancer Institute americana (NCI), o limite de IC₅₀ para considerar um extrato promissor para futuras investigações é um valor inferior a 30 µg/mL (Suffness e Pezzutto, 1990).

A análise por HPLC mostrou que o EAF apresentou o Fukugesídeo como componente principal. Assim, os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com os descritos por Bagget et al. (2005) que relataram fraca atividade citotóxica do Fukugesídeo em linhagem de células de câncer de cólon (SW- 480) após 72h (IC₅₀ superior a 143,72 µg/mL).

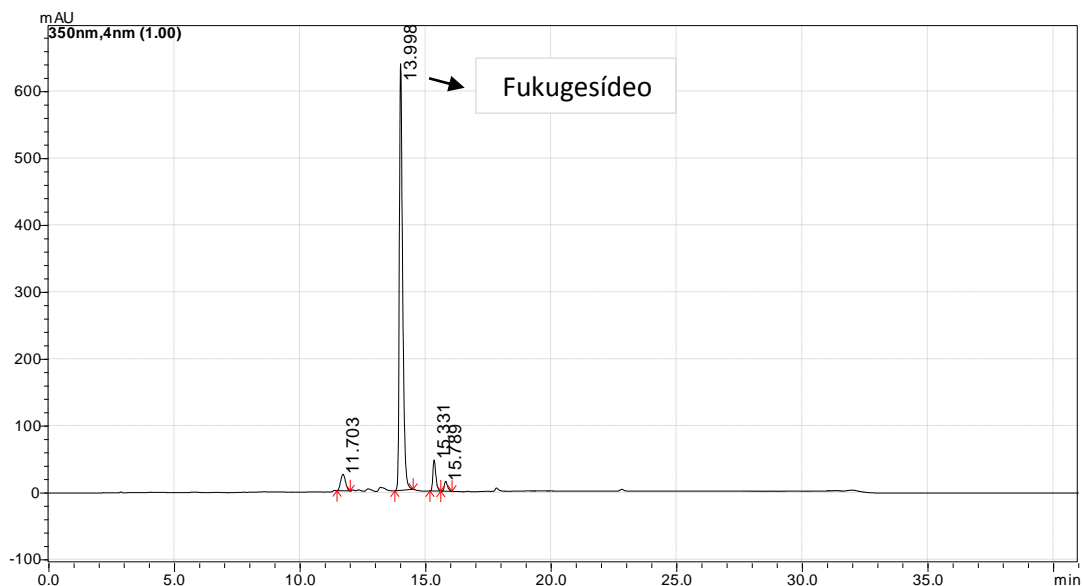
Mesmo que os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* não tenham uma correlação direta com os testes *in vivo*, pode-se afirmar que, se um material induz uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que desenvolva toxicidade quando aplicado em tecido vivo (TORABINEJAD, 1995).

Os resultados demonstraram que o extrato estudado não apresentou atividade citotóxica relevante em células normais nem de câncer, pois não ocasionaram grande diminuição da população celular. Podendo, posteriormente em uma segunda etapa de avaliação pré-clínica, ser testados em animais.

5.8 ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

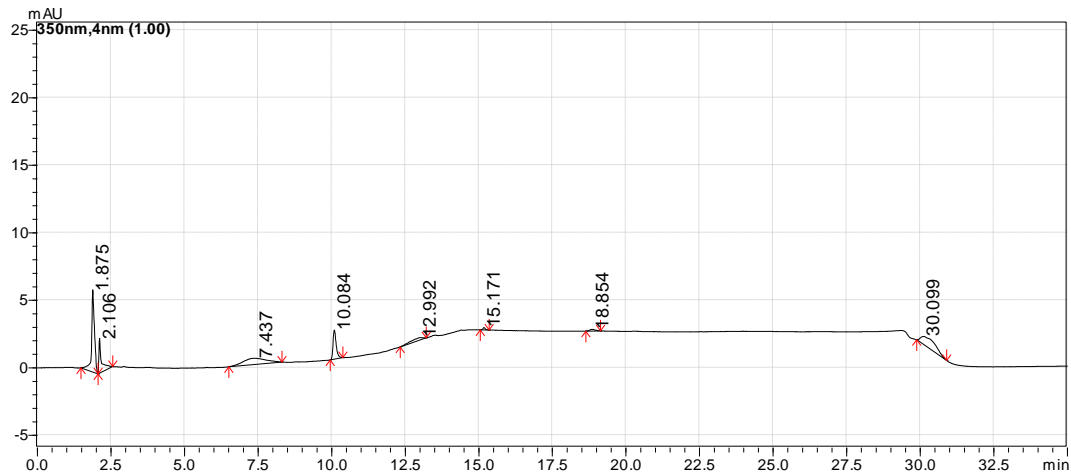
Nas análises das amostras realizadas por CLAE não foram detectados os picos referentes ao marcador fucogesídeo do EAF de *G. brasiliensis* presente nas formulações utilizadas nos testes de permeação e retenção como pode ser observado ao compararmos a Figura 16 com as Figuras 17, 18 e 19 e a Figura 20 com as Figuras 21, 22 e 23. Isto se deve ao fato de que o fucogesídeo (biflavonoide glicosilado) é uma molécula de alto peso molecular, o que dificultou sua penetração cutânea. Outro motivo seria devido ao uso de formulações ineficientes como carreador para este ativo, sendo necessário portanto, realizar novos testes utilizando promotores de permeação.

Figura 16 – Perfil cromatográfico do gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando o pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fucogesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



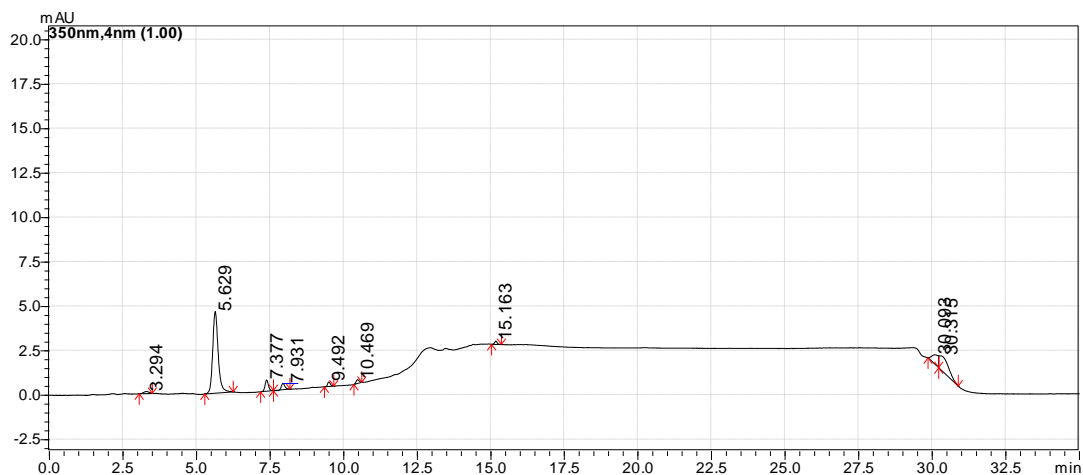
Fonte: Do autor

Figura 17 – Perfil cromatográfico do meio receptor coletado após 12 h, em teste de permeação e retenção cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



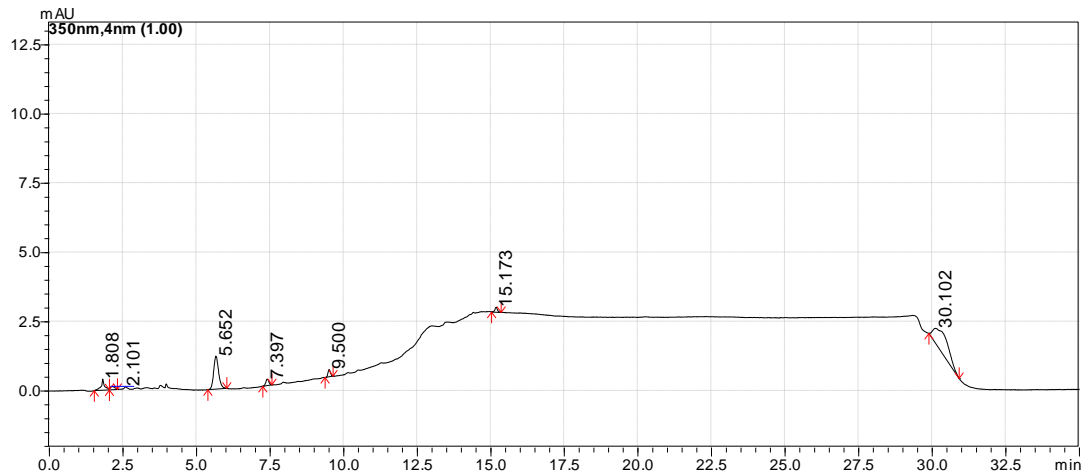
Fonte: Do autor

Figura 18 – Perfil cromatográfico da formulação retida nas fitas adesivas extraídas após 12 h, em teste de retenção cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



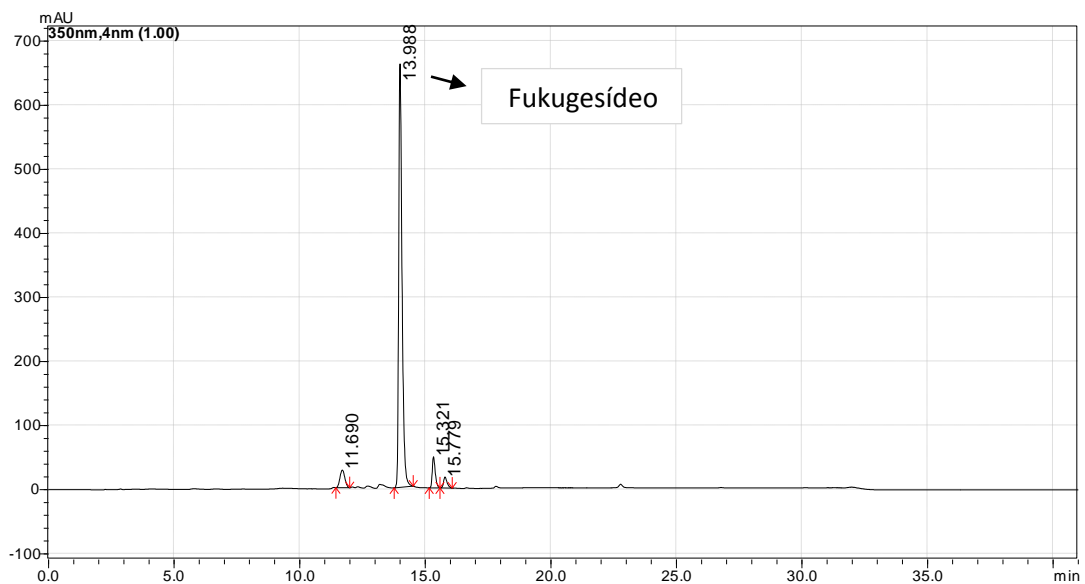
Fonte: Do autor

Figura 19 – Perfil cromatográfico do extrato da pele de orelha de porco após 12 h, em teste de permeação cutânea realizado com o gel contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



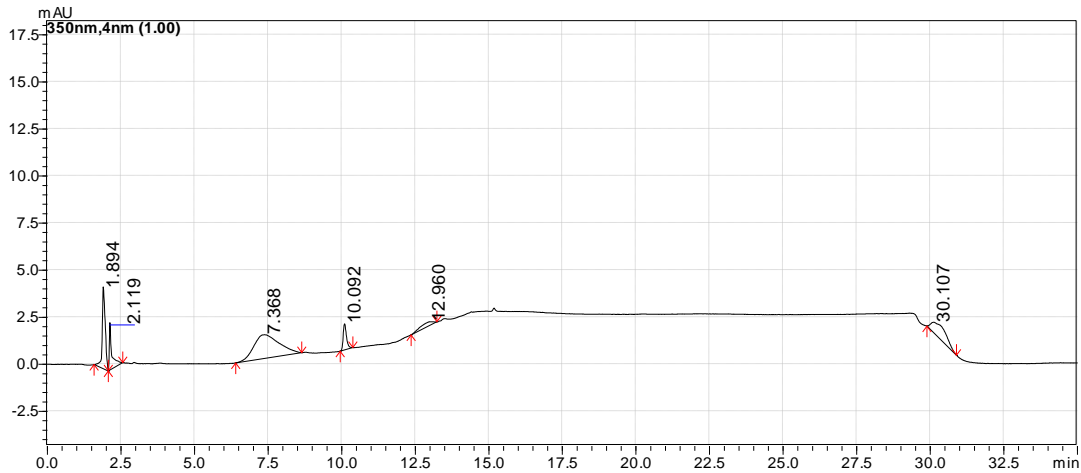
Fonte: Do autor

Figura 20 – Perfil cromatográfico do creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando o pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



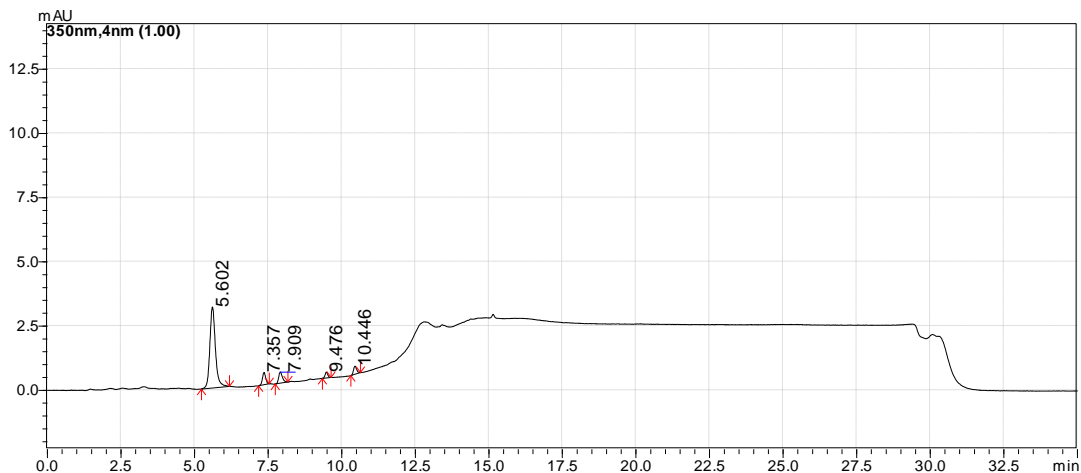
Fonte: Do autor

Figura 21 – Perfil cromatográfico do meio receptor coletado após 12 h, em teste de permeação e retenção cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



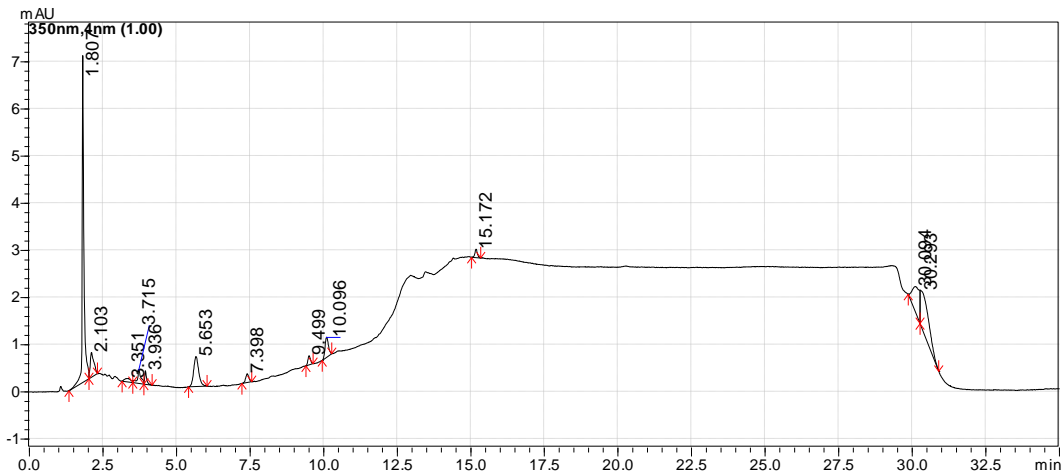
Fonte: Do autor

Figura 22 – Perfil cromatográfico da formulação retida nas fitas adesivas extraídas após 12 h, em teste de retenção cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluyente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluyente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



Fonte: Do autor

Figura 23 – Perfil cromatográfico do extrato da pele de orelha de porco após 12 h, em teste de permeação cutânea realizado com o creme lanette contendo 5% do extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, demonstrando a ausência pico da fukugetina-7''-O- β -D-glicosídeo (fukugesídeo), usado como marcador. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu UPLC 20 A, coluna Shimadzu VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5 μ m de tamanho de partícula), com fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B) e fluxo de 1,0 mL/min, monitorado em 350 nm.



Fonte: Do autor

Estudo de permeação realizado por Park, et. al. (2012) com compostos isolados da *Suaeda asparagoides* mostra que o kaempferol teve uma permeação mais eficiente que a astragalina (Kaempferol-3-O-glicosídeo) e isto se deve principalmente devido sua estrutura celular, pois a astragalina, um flavonoide glicosilado, possui maior peso molecular e polaridade que o kaempferol aglicosilado.

Os desafios implicados no desenvolvimento de formas farmacêuticas transdérmicas são direcionados, sobretudo, a favorecer a eficiente liberação e permeação dos princípios ativos através das camadas da pele, que se apresentam como barreira à penetração de fármacos. Assim, diversas estratégias têm sido pesquisadas e os modernos estudos farmacêuticos apontam para o uso de promotores de permeação.

Os promotores químicos de penetração são adjuvantes farmacologicamente inertes capazes de reduzir a habilidade do fármaco em interagir com os constituintes estruturais da pele aumentando o transporte através das camada epiteliais (LOFTSSON; MÁSSON, 2001; WALTERS, 1989; BARRY, 1987).

Vários promotores de penetração são comumente associados a formulações, com finalidade de aumentar a permeabilidade das moléculas bioativas. Por exemplo,

etanol, álcoois graxos, ácidos insaturados, aminas e amidas (LOFTSSON; MÁSSON, 2001), terpenos, tensoativos, e recentemente ciclodextrinas (CHATTARAJ; WALKER, 1995; LOFTSSON, et al., 1998; MÁSSON, et al., 1999) bem como o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento e produção de sistemas de liberação de fármacos com capacidade de promover sua permeação através da pele. Como exemplo podemos citar os lipossomos (VERMA, et al., 3003), as microemulsões, nanoemulsões e nanopartículas, que apresentam propriedades físico-químicas e parâmetros farmacotécnicos adequados para o uso transdérmico (SILVA, et al., 2010).

Estas substâncias e estruturas auxiliam na penetração de moléculas através da pele por aumentarem a fluidez da membranas biológicas ao alterar sua estrutura lamelar (BARRY, 2001; LOFTSSON; MÁSSON, 2001).

Estudo realizado por Vicentini et al., (2008), descreve uma potencial aplicação de microemulsão como sistema carreador tópico para liberação de quercetina aumentando sua penetração cutânea.

Já Xavier, (2006), associou a isoflavona genisteína com a β - ciclodextrina e observou que esta prévia complexação promoveu um incremento de até 6,74 vezes em sua hidrossolubilidade e em meio líquido exerceu influência positiva e significativa no aumento da permeabilidade cutânea da genisteína.

É importante ressaltar que a não detecção de picos no meio receptor é um resultado positivo, pois quando se deseja um efeito tópico, a permeação cutânea extensiva não é conveniente, é preferível um efeito local sustentado (KOHEN, 1999; MORGANTI et al., 2001).

6 CONCLUSÕES

Entre os extratos analisados de *G. brasiliensis*, o extrato aquoso da folha foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos, seguido pelo extrato etanólico da folha. Verificou-se então, que com relação às partes analisadas, os compostos fenólicos se concentraram na folha. Já os teores de flavonoides mais expressivos encontrados foram no extrato etanólico da semente e no extrato aquoso da folha.

O extrato que apresentou maior atividade antioxidante foi o extrato etanólico da semente, sendo mais bioativo que os padrões quercetina e BHT. Os extratos etanólicos da casca e da folha também apresentaram elevados valores, com atividades estatisticamente iguais à quercetina e superior ao BHT. Com relação à análise do EC₅₀ dos extratos, observou-se que o extrato mais bioativo foi o etanólico da semente seguido pelo etanólico da folha e tais resultados foram melhores que o EC₅₀ apresentado pelo BHT.

Todos os extratos que apresentaram atividade antibacteriana na faixa de concentração testada foram considerados com boa atividade. Com exceção do *S. pyogenes*, em que somente o extrato aquoso da folha apresentou moderada atividade e todos outros extratos mostraram-se pouco ativos. Considerando o CIM₅₀, o extrato que se mostrou mais ativo, foi o extrato aquoso da folha, atividade bem próxima ao do padrão cloranfenicol contra a bactéria *S. aureus*. Quanto à atividade antifúngica, constatou-se que nenhum extrato apresentou atividade contra a *C. albicans* na faixa de concentração testada. Porém, com exceção do extrato etanólico da folha e o extrato etanólico da semente, os outros extratos foram considerados bioativos contra a *C. krusei*.

O extrato aquoso da folha de *G. brasiliensis* foi considerado como o mais promissor. Com ele foram preparadas formulações tópicas com atividade antimicrobiana. Em estudos de permeação e retenção cutânea realizados com estas formulações, não foram detectados picos no meio receptor, sendo um resultado positivo quando se deseja um efeito tópico.

Em sua caracterização química realizada por CLAE, detectou-se a presença da molécula fukugetina-7''-O-β-D-glicosídeo (fukugesídeo) e da fukugetina.

Nos testes de citotoxicidade em fibroblastos humanos e linhagens tumorais,

este extrato, não apresentou toxicidade para as culturas celulares testadas.

Perante os resultados obtidos, conclui-se que o extrato aquoso da folha da *G. brasiliensis*, por ser um produto natural oriundo das folhas, uma fonte renovável da planta, torna-se um potencial candidato ao desenvolvimento de novos fármacos para tratar lesões da pele causados pelos microrganismos testados e que apresentaram suscetibilidade a baixas concentrações.

Tendo portanto como perspectivas para a continuidade do trabalho, o desenvolvimento de novas formulações contendo este extrato, bem como o estudo do mecanismo de ação das moléculas identificadas e do extrato.

REFERÊNCIAS

ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 141-143, 2004.

ABRAHAM, M. H.; CHADHA, H. S.; MITCHELL, R. C. The factors that influence skin penetration of solutes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 47, n. 1, p. 8 - 16, 1995.

ACUÑA, U. M. et al. Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array and biflavonoids in eight *Garcinia* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 215-220, 2012.

ACUÑA, U. M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E. J. Polyisoprenylated benzophenones from clusiaceae: Potential drugs and lead compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1560-1580, 2009.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobials properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p.183-193, 1998.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891, 2008.

ALVES, K. S. M. et al. Análise farmacognóstica das folhas de Arrabidaea chica (Humb & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Brasil. v. 20, n.2, p. 215-221, Abr./Mai. 2010.

AMOROZO, M. C. M.; GELY, A. Uso de Plantas Mediciniais por Caboclos do Baixo Amazonas; Barcarena: PA; Museu Paraense Emílio Goeldi. **Nova Série**, Belém, v. 4, p. 47-131, 1988.

ARORA, A., MURALEEDHARAN, G. N., STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**. New York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

ARQUIMEDES JUNIOR, G. et al. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, p. 371-376, 2005.

AWANG, K. et al. 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7873-7877, 2010.

BAGGETT, S. et al. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. **Journal of Natural Products**. v. 68, p. 354 - 360, 2005.

BALASUDRAM, N.; SUDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARRERO, E. J.; BOLSANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2 ed. Viçosa:UFV, 2002.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M. E. **Pharmaceutics the Science of Dosage Form Design**. London: Churchill Livingstone, p. 499 - 533, 2002.

BARRY, B. W. Is transdermal drug delivery research still importante today? **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 19, p. 967 - 971, 2001.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 6, p. 85 - 97, 1987.

BATISTA, L. M. Ensino, Pesquisa e Regulação em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. In: SIMPÓSIO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA EM PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE, 1, 2008, Cuiabá. **Relatório Final**. Brasília: Conselho Federal de Farmácia, 2009, p.71-77.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BELLA CRUZ, A. B. et al. Métodos “*In Vitro*” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILH, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: 2010. Cap. 7. p. 175-205.

BIAVATTI, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Brasil. v. 45, n. 3, jul./sep. 2009.

BILLO, M. et al. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Oxford, v. 96, n. 3, p. 569-575, jan. 2005.

BOAKYE, P. A. et al. *Garcinia buchananii* bark extract is an effective anti-diarrheal remedy for lactose-induced diarrhea **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 539-547, 2012.

BOONSRI, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 723-727, 2006.

BOUWSTRA et al. Water Distribution and Related Morphology in Human Stratum Corneum at Different Hydration Levels. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, p. 750 - 758, 2003.

BRAGA, F. C. Pesquisa Fitoquímica. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 4, p. 99-112.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de medicina natural e práticas complementares-PMNPC**. Brasília, DF, 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BURSAL, E. et al. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. **Food Research International**, v. 51 p. 66-74, 2013.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A person view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98 - 106, 2008.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw edema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.

CASTRO, M. A. Histologia animal. **Queimaduras**. Disponível em <<http://www.mundoeducacao.com/biologia/queimaduras.htm>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

CECHINEL- FILHO, V. et al. I3-naringenin-II8-4'-OMe-eriodictyol: A new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, p. 820-823, 2000.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolonum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 105-108, 2004.

CHATTARRAJ, S. C.; WALKER, R. L. In: **Penetration Enhancer Classification, Percutaneous Penetration Enhancers** (MAIBAACH, H. I. ANS SMITH, E. W.), Boca Raton: CRC Press, 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition Biochemistry**. Woburn, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, p. 232-234, 1926.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, v. 3, p. 207 - 212. 1991.

COUTINHO, H. D. M., et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Revista Conceitos*, v. 6, p. 77-85, 2004.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>, Acesso em: 10 out. 2010.

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola drilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia padulosa*) (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica *in vivo***. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.

DALMOLIN, M. M. **Isolamento, identificação e avaliação farmacológica de extratos, frações e compostos obtidos das partes aéreas da *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae)**, 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

DAVIS, J. M. et al. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, p.1071-1077, 2009.

DEACHATHAI, S. et al. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 464-469, 2006.

DEROGIS, P. B. M. C. **Atividade antioxidante das benzofenonas e extrato hexânico do pericarpo dos frutos de *Rheedia brasiliensis***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Alfenas Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008.

DIAS, A. T. C. et al. Aboveground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 226, n. 1-3, p. 364-367, 2006.

DIAS, J. P. S. **A farmácia e a história: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica**. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2005.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 417-429, 2004.

DORES, R. G. R.; REHDER, V. L. G.; DUARTE, M. C. T. Validação do uso popular de alguns extratos e óleos essenciais medicinais. **Informe Agropecuário**, v. 31, p. 40-46, 2010.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a história de produtos naturais: Multiciência, Campinas, 2006.

ELOFF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, p. 1-8, 1988.

FACURY NETTO, M. A. et al. Systematic use of *Solidago microglossa* DC In the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 207 - 210. 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n. 6, p. 1039 - 1042, 2011.

FERREIRA, O. F.; CARVALHO M. A.; SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova**, v.. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs the skin: Challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science e Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417 - 425, 2000.

FOTIE, J. et al. Trypanocidal and antileishmanial dihydrochelerythrine derivatives from *Garcinia lucida*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1650-1653, 2007.

FOUOTSA, H. et al. Xanthones inhibitors of α -glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 236-239, 2012.

FRESHEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4^a Ed. Indianapolis, In: Wiley-Liss. 2000.

FRUTUOSO, V. S. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Rheedia longifolia* Planch & Triana. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 91-96, 2007.

GAO, X. M. et al. Identification and evaluation of apoptotic compounds from *Garcinia paucinervis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4957-4964, 2010.

GARZÓN, G. A. et al. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 122, p. 980-986, 2010.

GETIE, M. et al. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, Eschborn, v. 57, p. 320 - 322, 2002.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural bioflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GRATIERI, T. et al. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**. v. 31, n. 6, p. 1490 – 1498, 2008.

GUIMARÃES, C. L. et al. Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana*-NA. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v. 12, n. 48, p. 6 - 12, 2004.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-396, 2012.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of L-adrenaline: An activity-structure insight. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 71-80, 2009.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative. Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, p. 210-218, 2010.

GÜLÇİN, İ. et al. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 195-212, 2009.

GÜLÇİN, İ. et al. Screening of antioxidant and antiradical activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* Tuber. **Phytomedicine**, v. 13, p. 343-351, 2006.

GULÇİN, İ.; ALICI, H.A.; CESUR, M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 281-285, 2005.

GUO, Q. et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Life Sciences**, v. 78, n. 11, p. 1238-1245, fev. 2006.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV_inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, p. 291 - 299, 2004.

HANSON, R. A. Primer on Release-Rate Testing of Semisolids. CEO Hanson Research Corporation, 9810 Variel Ave, Chatsworth, CA 91311. **Dissolution Technologies**, p. 33 - 35, 2010.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. USA 55 (2000), p. 481-504.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. New York, v. 15, n. 3, p. 145-182, 1990.

HAYAMIZU, K. et al. Effects of *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Current Therapeutic Research**, v. 64, n. 8, p. 551-567, set.-out. 2003.

HENKEL, T. et al. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie, International Edition English**. v. 38, p. 643-647, 1999.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some slants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Médica**. v. 63, p. 2-10, 1997.

ISERHARD, A. R. M. et al. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 13, n. 1, p.116-22. Jan./Mar., 2009.

IWU, M. M. et al. *Garcinia Kola*: a new look at an old adaptogenic agent. **Advances in Phytomedicine**, p. 191-199, 2002.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**. Oxon, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENA, B. S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, n. 3, p. 246-250, set. 2006.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 6 ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

JOSEPH, G. S. et al. Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 153-160, 2005.

JUNG, H.A. et al. Antioxidant xanthenes from pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2077-2082, 2006.

JUNIOR, D. **Bacupari-mirim (*Garcinia brasiliensis*)**. Disponível em: <<http://daeljunior.blogspot.com.br/2012/03/bacupari-mirim-garcinia-brasiliensis.html>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosan-guinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10129-10134, 2008.

KERRIGAN, R. A.; COWIE, I. D.; DIXON, D. J. Em *Clusiaceae*; Short, P. S.; COWIE, I. D., eds.; Northern Territory Herbarium: Australia, 2011.

KIRANA, H.; SRINIVASAN, B. P. Aqueous extract of *Garcinia indica* Choisy restores glutathione in type 2 diabetic rats. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, p. 265-268, 2010.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 53, n. 4, p. 181 - 192, 1999.

KÖKSAL, E.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 32, p. 65 - 78, 2008.

KOO, H. M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v. 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

KRSHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**. India, v. 89, p. 217-233, 2011.

LEE, K. et al. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 535-541, 2003.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

LENTA, B. N. et al. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 8-12, 2007b.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007a.

Li, H. B. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 385-390, 2008.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. Quality assurance of phytopharmaceuticals. In:_____. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden; Son Limited, 1989. p. 341–359.

LIU, X. et al. Apoptotic effects of polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 8, p. 1355-1359, 2010.

LOFFTSSON, T. et al. Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery. **Phamazie**, v. 53, p. 137 - 139, 1998.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15 - 30, 2001.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells). **Ciência Rural.**; v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LOPEZ, R. F. V. et al. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 77, p. 304 - 308, 2003.

MADUBUNYI, I. I. Antihepatotoxic principles of *Garcinia kola* seeds. **Comparative Clinical Pathology**, DOI 10.1007/s00580-010-1023-4, 2010.

MARQUES, E. J.; EL-BACHÁ, R. S.; CRUZ, F. G. Citotoxicidade de benzofenona e triterpeno isolado de *C. cruva* contra células GL-15 de glioblastoma humano. 32^o Reunião Anual da Sociedade de Química, 2009.

MARTINS, E.R. **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994.

MARTINS, F. T. et al. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 251-258, 2008.

MÁRTONFI, P.; REPČÁK, M.; ZANVIT, P. Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. **Biochemical systematics and ecology**, v. 34, n. 1, p. 56-59, 2006.

MÁSSON, M. et al. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 107 - 118, 1999.

MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic Activity of Some Xanthenes and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 369-372, 2006.

MEDINA, M. A. et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Science**, v. 79, n. 2, p.105-111, jun. 2006.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extrato de plantas de região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil. v. 17, n. 1, p. 94 -101, Jan./Mar. 2007.

MORGANTI, P. V. et al. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 19, n. 4, p. 489 - 501, 2001.

MORTON, J. **Fruits of warm climate**. Miami: Julia F. Morton, 1987.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 555-558, 2002.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rings of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. **Food science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1857-1861, 2008.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Evaluation of antioxidant and antimutagenic activities of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa*. **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 1256-1265, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NGUEMEVING, J. R. et al. Laurentixanones A and B, antimicrobial xanones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 13, p. 1341-1346, 2006.

NIERO, R. et al. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. p. 11-56, 2003. In: **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

NIU, S. et al. Xanones from the stem bark of *Garcinia bracteata* with growth inhibitory effects against HL-60 cells. **Phytochemistry**, v. 77, p. 280-286, 2012.

OBOLSKIY, D. et al. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1047-1065, 2009.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAGLIARA, A. et al. Evaluation and prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, p. 1339 - 1357, 1999.

PAN, E. et al. An antiproliferative xanthone of *Symphonia pauciflora* from the Madagascar rainforest. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 751-754, 2010.

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, mai. 2006.

PARK, S. N. et. al. *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Sueda asparagoides* extracts. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 18, p. 680 - 683, 2012.

PEDRAZA-CHAVERRI, J. et al. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Food and Chemical toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3227-3239, 2008.

PEREIRA, A. V. et al. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 31, n. 2, p. 119 - 124, 2009.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo. v. 25, n. 1, p. 45-61, jan./fev. 2002.

POKORNY, J. Are natural antioxidants better-and safer-than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Sciences and Technology**, v. 109, p. 629-642, 2007.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 93-98, 2001.

PRANCE, G. T. *Out of the Amazon*; HMSO: London, 1992, p. 83. TUROLLA, M.S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

PROESTOS, C. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. **Food Technology and Biotechnology**, p. 46, n. 2, p. 151-156, 2008.

RAO, L. J. M. et al. Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2004.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1-8, 1995.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. 2a edição, São Paulo: Pharmabooks, 2010.

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

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA, 2001.

ROGEROA, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317 - 320, 2003.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 280 – 285, 2011.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654-660, 1999.

SERBETÇI TOHMA, H.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 657-671, 2010.

SHAH, V. P. et al. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 82, p. 21 - 28, 1992.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In:_____. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. **Newfoundland**: AOCS press, 1996. chap. 1, p. 1-11.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, J. A. et. al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências VICENTINI, F. Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125 - 131, 2010.

SILVA, V. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides Cham.* Sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; SIMON, D. **O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita**. Rio de Janeiro: Campus, 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (falsa-melissa) Verbenaceae** / Luciano Soares. – Florianópolis, 2001.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2000. p. 221-258.

SORDAT-DISERENS, I. et al. Novel prenylated xanthenes from *Garcinia gerrardii*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, p. 1001- 1007, 1989.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN K (Ed), **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. Academic Press, London, p. 71 – 133, 1990.

SUN, B.; FUKUHARA, M. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug metabolizing enzymes in mice. **Toxicology**, v. 122, p. 61-72, 1997.

TAHER, M. et al. A polyisoprenylated ketone from *Calophyllum enervosum*. **Phytomedicine**, v. 66, p. 723- 726, 2005.

TALAZ, O. Antioxidant activity of 5,10-dihydroindeno [1,2-*b*]indoles containing substituents on dihydroindeno part. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6583-6589, 2009.

TIH, A. E. et al. Minor constituents of *Harungana madagascariensis* stem bark. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 3, p. 267-269, 2006.

TORABINEJAD, M. et al. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 21, p. 295 - 299. 1995.

TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289 - 306, 2006.

UAWONGGUL, N. et al. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 201-207, 2006.

VALE, N.B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-380, 2002.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In DEY, P. M. and HARBONE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**, p. 47-69, London: Academic Press, 1991.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, 2005.

VERDI, L. G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-367, 2004.

VERMA, D. D. et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 141 - 151, 2003.

VICENTINI, F. T. et al. Quercetin in w/o micremulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB- induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948 - 957, 2008.

VIJAYA KUMAR REDDY, C.; SREEMULU, D.; RAGHUNATH, M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. **Food Research International**, v. 43, p. 285-288, 2010.

VILLAGÓMEZ ROJAS, A. **Estudio preliminar de la densidad morfológica distribución, producción y comercialización del achachairu (*Rheedia spp.*) en Santa Cruz de la Sierra**. Santa Cruz de la Sierra: Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Facultad de Ciencias Agrícolas, 1990.

WABO, H. K. et al. Xanthonas and a benzophenone from the roots of *Pentadesma butyracea* and their antiproliferative activity. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p.104-107, 2010.

WALTERS, K. A. Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. In: HADGRAFT, J., GUY, R. H., eds. **Transdermal drug delivery: Developmental issues and research initiatives**. New York: Marcel Dekker, p. 197 - 246, 1989.

WESTER, C. R.; MAIBACH, H. L. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations In: OSBORNE, D. W., AMAMNN, A. H. **Topical Drug Delivery Formulations**. New York: Marcel Dekker, p. 213 - 220, 1990.

XAVIER, C. R. **Associação da isoflavona genisteína com β – Ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea**. 2006. 149f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

YEN, W.J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **LWT- Food Science and Technology**. v. 38, n. 1, p. 193-200, 2005.

YOO, S.; MURATA, R. M.; DUARTE, S. Antimicrobial traits of tea-and cranberryderived polyphenols against *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 45, n. 4, p. 327-335, 2011.

ZAGOTO, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy-metabolism in the rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 47-54, 2006.

ZATZ, J. L. Scratching the surface: Rationale and approaches to skin permeation. In:___ **Skin Permeation – Fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. Cap.1, p.11-31.