



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



MILENA DUARTE LIMA

**CAMPTOSEMA CORIACEUM BENTH.: DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO
DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE FLAVONÓIDES**

**Maceió
2012**

MILENA DUARTE LIMA

**CAMPTOSEMA CORIACEUM BENTH.: DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO
DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE FLAVONÓIDES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio
Goulart Sant'Ana

Maceió
2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L732c Lima, Milena Duarte
Camptosema coriaceum Benth.: desenvolvimento e padronização de metodologia para análise de flavonoides / Milena Duarte Lima. – 2012. 97f. : il., grafs. e tabs.

Orientador: Antonio Euzebio Goulart Sant'Ana.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia. f. 90-97.

1. Nutracêuticos. 2. Flavonóides . 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Espectrometria de massas de alta resolução. I. Título.

CDU: 547.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km 14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384
Email: ccqgb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Milena Duarte Lima**, intitulada: "**Camptosema coriaceum Benth: Desenvolvimento e Padronização de Metodologia para Análise de Flavonóides**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 04 de outubro de 2012, às 10 horas, no Auditório do Renorbio UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador/Presidente - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
UFS


Prof.ª Dr.ª Eurica Adélia Nogueira Ribeiro
ESENFA/UFAL


Prof.ª Dr.ª Terezinha da Rocha Ataíde
FANUT/UFAL


Prof.ª Dr.ª Andréa Pires Fernandes
IQB/UFAL


Prof. Dr. Alessandro Riffel
EMBRAPA/Pesquisador do IQB/PPGQB/UFAL

À minha filha, o meu grande amor.

A minha família, meu porto seguro.

E aos meus amigos, a família que eu escolhi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nas horas mais difíceis e que permitiu a finalização deste trabalho.

Ao professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, pela orientação e amizade durante esta jornada

Ao professor Dr. Josué Carinhanha, pela orientação na realização dos ensaios antioxidantes e também por sua amizade e apoio constantes.

A professora Dra. Isis Figueiredo pela colaboração com as ciclodextrinas.

A pesquisadora Dra. Marili Villa Nova Rodrigues pela colaboração nos ensaios de validação.

Ao professor Marcos Nogueira Eberlin, pela oportunidade de obter os espectros de massa de alta resolução no ThoMSon Mass Spectroscopy Laboratory.

Aos amigos dos laboratórios do CPQBA e da Unicamp, que tornaram a realização deste trabalho menos árdua e muito mais divertida;

Aos amigos do laboratório de pesquisa em recursos naturais (LPqRN) da UFAL pela parceria, amizade e divertimento desde os tempos do mestrado...

À todos os professores e funcionários do IQB-UFAL.

A CAPES, CNPq pelo financiamento;

RESUMO

Entre os fitoterápicos atualmente estudados, os flavonóides ocupam posição de destaque em virtude de seu amplo espectro de atividades terapêuticas já demonstradas. Neste trabalho foi possível a obtenção de uma fração rica em flavonóides da espécie *Camptosema coriaceum* Benth, uma Leguminosae. Através da técnica de CLAE-DAD-EM foi possível o isolamento e identificação de 6 flavonóides glicosilados. A rutina, um glicosídeo bem conhecido foi eleita como marcadora da fração enriquecida em flavonóides, esta foi quantificada e seu método de validação foi estabelecido. Os resultados obtidos mostraram que a metodologia analítica desenvolvida para a quantificação da rutina é exata, reprodutível e linear no intervalo de concentração 8 - 48 µg/mL de rutina (R= 0,99943). No intuito de tornar esta fração enriquecida em flavonóides como um produto tecnológico, foi realizado a encapsulação das moléculas de rutina em α -ciclodextrina e foram realizados testes antioxidantes do material encapsulado e do não encapsulado, visando avaliar a eficiência do método farmacotécnico. Foi observado que a rutina quando encapsulada tem sua atividade antioxidante reduzida. Adicionalmente, testes biológicos de linfoproliferação sobre diversas linhagens de carcinoma, foram realizados com o extrato bruto da espécie *C. coriaceum*, com a fração enriquecida em flavonóides e com a rutina, sendo o extrato bruto o mais ativo.

Palavras-chave: Nutracêuticos. Flavonóides. Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectrometria de massas de alta resolução.

ABSTRACT

Among the herbal drugs currently studied flavonoids occupy a prominent position due to its broad spectrum of therapeutic activities already demonstrated. This work was possible to obtain a fraction rich in flavonoids species *Camptosema coriaceum* Benth, a Leguminosae. Through the technique of HPLC-DAD-MS was possible to isolate and identify six flavonoid glycosides. Rutin, a glycoside well known was elected as a marker of flavonoid-enriched fraction, this was quantified and its validation method was established. The results showed that the analytical methodology developed for the quantification of rutin is accurate, reproducible and linear over the concentration range 8-48 mg / ml of rutin ($R = 0.99943$). In order to make this flavonoid-enriched fraction as a technological product, was performed the encapsulation of molecules in β -cyclodextrin rutin and antioxidant tests were made of the material encapsulated and unencapsulated, to evaluate the efficiency of the method pharmaceuticals. It was observed that when encapsulated rutin has reduced its antioxidant activity. Additionally, biological tests lymphoproliferation on various carcinoma cell lines were conducted with the crude extract of the species *C. coriaceum*, with the fraction enriched in flavonoids and rutin, being the most active crude extract.

Keywords: Nutraceuticals. Flavonoids; High performance liquid chromatography. Mass spectroscopy high resolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pirâmide dos alimentos.....	16
Figura 2 - Pirâmide de Willett.....	17
Figura 3 - Classes de substâncias mais comuns em plantas.....	21
Figura 4 - Esqueleto básico dos flavonoides.....	21
Figura 5 - Biossíntese dos flavonoides.....	23
Figura 6 - Hidrólise da Rutina.....	27
Figura 7 - (a) estrutura cíclica das ciclodextrinas (b) Esquema das moléculas de glicopiranoses unidas pelas ligações (1-4).....	33
Figura 8 - Espectro de RMN H do extrato bruto em etanol das raízes de <i>C. coriaceum</i> , Bruker 400 MHz, em CDCl ₃	56
Figura 9 - Gradiente exploratório do extrato bruto em etanol das raízes <i>Camptosema coriaceum</i>	57
Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de <i>Camptosema coriaceum</i>	58
Figura 11 - Espectros de RMN 1H das frações obtidas na partição líquido-líquido: (A) hex; (B) CHCl ₃ ; (C) AcOEt.....	59
Figura 12 - Exemplo de cromatograma das frações obtidas na partição líquido-líquido. (1) Fração hexano, (2) Fração clorofórmio, (3) Fração acetato de etila, (4) Fração butanol, (5) Fração Hidroalcolica.....	60
Figura 13 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 70:30 H ₂ O/MeOH, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 254 nm.....	63
Figura 14 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 80:20 0,2%HAc/ACN, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 254 nm.....	64
Figura 15 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 80:20 0,2%HAc/ACN, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 350 nm.....	65
Figura 16 - Espectro de massas ESI da quercetina. m/z [M+H] ⁺ 303.....	66

Figura 17 - Estruturas das agliconas canferol e quercetina isoladas após hidrólise ácida.....	66
Figura 18 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z [M+H] 757.....	67
Figura 19 - Ramp(1→6)-[Galp(1→2)]-Ramp(1→3)-quercetina.....	68
Figura 20 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z [M+H] 741.....	69
Figura 21 - Ramp(1→6)-[Ramp(1→2)]-Galp(1→3)-canferol.....	69
Figura 22 - Espectro de massas ESI(+)-MS full scan da substância de m/z [M+H] 611.....	70
Figura 23 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z [M+H] 611.....	71
Figura 24 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação do íon m/z [M+H] 1221.....	71
Figura 25 - Ramp(1→6)-Glc(1→3)-quercetina (rutina).....	72
Figura 26 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z [M+H] 597.....	73
Figura 27 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z [M+H] 595.....	73
Figura 28 - Ramp(1→6)-Glc(1→3)-canferol, uma das possíveis Conformações da substância Fr7.....	74
Figura 29 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z [M+H] 465.....	74
Figura 30 - Glc(1→3)-quercetina (isoquercetina) ouGalp(1→3)-quercetin (hiperosídeo).....	75
Figura 31 - Cromatograma da fração 30%MeOH pela técnica de LC-MS.....	76
Figura 32 - Cromatograma do massas da fração 30% MeOH.....	76
Figura 33 - Cromatograma do marcador da fração enriquecida em flavonóides Fase móvel 20 – 50%B em 30 minutos,fluxo 0,3ml/min, detecção 350nm.....	77
Figura 34 - Cromatograma de massas do marcador da fração enriquecida em flavonóides.....	77
Figura 35 - Faixa linear da rutina.....	78

Figura 36 - Curva da adição de padrão.....	79
Figura 37 - Rutina após encapsulação com –CD.....	82
Figura 38 - Substâncias empregadas como padrões nos testes de capacidade antioxidante.....	82
Figura 39 - Gráfico da atividade anticâncer da doxorrubicina (controle positivo) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.....	85
Figura 40 - Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Etanólico das Raízes de <i>C. coriaceum</i> em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.....	86
Figura 41- Gráfico da atividade anticâncer da fração enriquecida em flavonóides (30%MeOH) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.....	86
Figura 42 - Gráfico da atividade anticâncer da rutina, marcadora da fração enriquecida em flavonóides, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.....	87
Figura 43 - Gráfico da atividade anticâncer de triterpeno isolado da espécie <i>C. coriaceum</i> , em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de substâncias fenólicas.....	24
Tabela 2 - Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência natural em plantas.....	25
Tabela 3 - Precisão intra-dia do método de validação da rotina na fração enriquecida em flavonoides.....	79
Tabela 4 - Adição de padrão e precisão inter-dia.....	80
Tabela 5 - Resumo dos parâmetros de validação avaliados no método.....	81
Tabela 6 - Resultados dos ensaios antioxidantes empregando ácido gálico como padrão.....	83
Tabela 7 - Resultados do ensaio ABTS empregando canferol como Padrão.....	84
Tabela 8 - Valores de TGI (inibição total do crescimento) do extrato bruto de <i>C. coriaceum</i> , da fração enriquecida em flavonóides, da rutina e da doxorubicina em $\mu\text{g/ml}$	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE-MS	Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry
CLAE	Cromatografia Líquida da Alta Eficiência
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ESI-MS/MS	Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry
Gal	galactose
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
Hex	hexose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MeOH	Metanol
M.M	Massa molecular
[M-Cl]-	Aduto de cloro
[M+H]+	Molécula protonada

[M-H]-	Molécula desprotonada
MS	Mass spectrometry
MS/MS ou MS ⁿ -Tandem	mass spectrometry
m/z	Razão massa sobre carga
OH	Hidroxila
OMe	Metoxila
PPB	Parte por bilhão (µL/L)
Q	Quadrupolo
Rha	raminose
RMN	Ressonância magnética nuclear
TIC	Total Ion Current
Tof	Time of flight analyser
USDA	United States Departamento of Agriculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Flavonóides como Alimento Funcional	20
1.2	Encapsulação de Princípios Ativos	32
1.3	Controle de Qualidade de Espécies Vegetais	35
1.4	<i>Camptosema coriaceum Benth</i> e o Projeto IMSEAR	39
2	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo Geral	42
2.2	Objetivos Específicos	42
3	EXPERIMENTAL	43
3.1	Equipamentos e Materiais	43
3.2	Espécies Vegetais	44
3.2.1	Coleta.....	44
3.2.2	Procedimento Inicial.....	44
3.2.3	Preparo e Fracionamento do Extrato Bruto.....	44
3.2.4	Partição líquido-líquido do Extrato Bruto.....	44
3.3	Técnicas Cromatográficas	45
3.3.1	Preparo da sílica de fase reversa C ₁₈	45
3.3.2	Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	45
3.3.3	Colunas cromatográficas.....	45
3.3.4	Preparo das amostras usadas no HPLC.....	46
3.4	Obtenção dos Espectros de Massas	46
3.5	Validação da Metodologia	47
3.5.1	Soluções Padrão e calibração.....	47
3.6	Encapsulação	47
3.7	Atividade Antioxidante	47
3.7.1	Preparo das soluções.....	47
3.7.2	Testes para avaliação da atividade antioxidante.....	49
3.7.2.1	Método de Folin – Denis.....	49
3.7.2.2	DPPH – 2,2 difenil-1-picril-hidrazil.....	50
3.7.2.3	ABTS.....	50

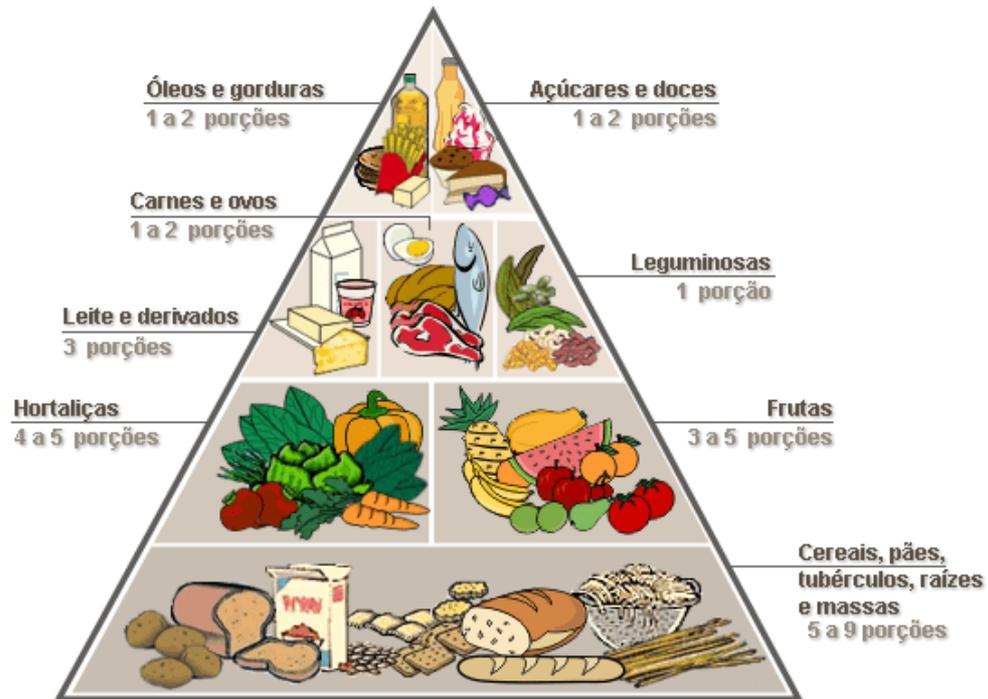
3.7.2.4DMPD.....	50
3.8 Testes Biológicos.....	51
3.8.1 Células.....	51
3.8.2 Cultivo celular.....	51
3.8.3 Ensaio para a determinação da atividade anticâncer dos extratos, Frações e substâncias.....	52
3.8.4 Diluição das amostras.....	53
3.8.5 Determinação da citotoxicidade das amostras.....	54
3.8.6 Análise dos resultados.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Partição líquido-líquido.....	58
4.2 Isolamento de substâncias da Fração Acetato de Etila.....	61
4.2.1 Cromatografia de Fase Reversa da fração AcOEt: Coluna C₁₈	62
4.2.2 Otimização das condições de HPLC.....	62
4.3 Tratamento da fração 100%H₂O.....	65
4.3.1 Hidrólise ácida:Busca das Agliconas.....	65
4.3.2 Isolamento de aglicona.....	65
4.4 Da fração 30% MeOH.....	67
4.5 Da fração 60% MeOH.....	75
4.6 Validação de método analítico para quantificação da Rutina através de HPLC-DAD-MS.....	75
4.6.1 Especificidade e Seletividade.....	75
4.6.2 Linearidade.....	77
4.6.3 Precisão intra-dia.....	78
4.6.4 Exatidão e Precisão inter-dia.....	79
4.7 Encapsulação da Rutina com β-CD.....	81
4.8 Potencial antioxidante da fração enriquecida em flavonóides, rutina e rutina β-CD.....	82
4.9 Avaliação Linfoproliferativa De Princípios Ativos Da C. Coriaceum	84
5 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da saúde dos indivíduos deveria começar pela prevenção dos possíveis males inerentes a eles. Manter um equilíbrio constante das taxas de inúmeras substâncias que trazem benefícios à saúde é uma boa forma de iniciar este processo. Sabe-se que nós, seres humanos, necessitamos da ingestão diária de carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, sais minerais. Contudo, com a velocidade da vida moderna essas necessidades muitas vezes não conseguem ser supridas através da dieta. Cada vez mais observamos os armários e refrigeradores domésticos vazios e as cadeias de *fast-food* lotadas.

Alimentação saudável é tema muito discutido em todo cenário mundial, e que vêm passando por modificações, devido ao surgimento de doenças relacionadas à alimentação dos seres humanos. A fim de tornar didático a forma de manter a saúde a partir do que ingerimos, em 1991 foi elaborado pelo USDA – United States Department of Agriculture, um guia de orientação das necessidades alimentares que nosso organismo necessita diariamente para sua manutenção, este guia foi denominado de “Pirâmide Alimentar” ou “Pirâmide dos Alimentos”, **figura 1**. A pirâmide facilita a escolha da combinação dos alimentos que devem constar no menu diário, pois como nenhum alimento possui todos os nutrientes necessários ao organismo, é preciso equilibrar a quantidade consumida de cada grupo para evitar excessos ou deficiências nutricionais.

Figura 1 - Pirâmide dos Alimentos. USDA



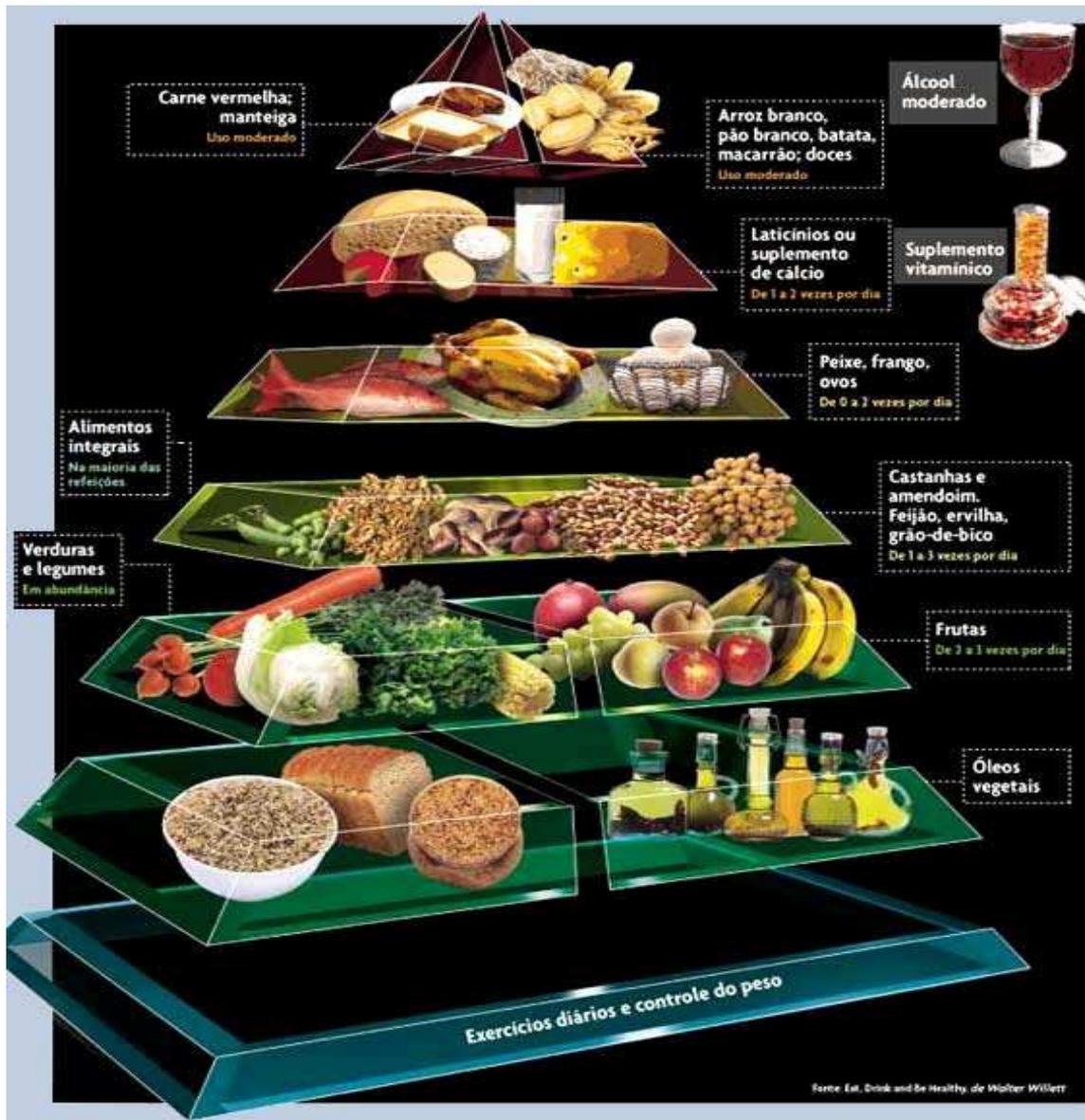
Fonte: United States Department of Agriculture – USDA (1991).

Entretanto, com desenvolvimento dos estudos acerca de como os alimentos agem em nosso organismo, em especial a participação dos metabólitos secundários e de outras substâncias que podem trazer benefícios ao organismo (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; ULLAH; KHAN, 2008), pesquisadores do Departamento de Nutrição da Escola de Saúde Pública da renomada Universidade de Harvard – EUA, liderados pelo pesquisador Walter Willett, defenderam uma revisão radical das recomendações dietéticas utilizadas nos Estados Unidos (KAUFER-HORWITZ et al., 2005). Nessa nova estrutura, **figura 2**, baseada em inúmeros estudos sobre alimentação e saúde, alguns tipos de alimentos antes considerados os vilões de qualquer dieta ganharam local de destaque.

Hoje sabe-se que nem todo tipo de gordura compromete a saúde do indivíduo, muitas delas são necessárias como as monoinsaturadas e poliinsaturadas. Por este motivo óleos vegetais agora ocupam a base da nova pirâmide alimentar, juntamente com os carboidratos integrais. Os demais tipos de carboidratos que formavam a base da antiga pirâmide de alimentos, agora estão no ápice, que em conjunto com as gorduras saturadas constituem o grupo alimentar que deve ser consumido em menor quantidade ou até banidos do cardápio diário. O

mais interessante a ser observado nessa nova estrutura alimentar é a inclusão de suplementos alimentares, e a ingestão de vinho com moderação, devido ao seu alto teor de polifenóis.

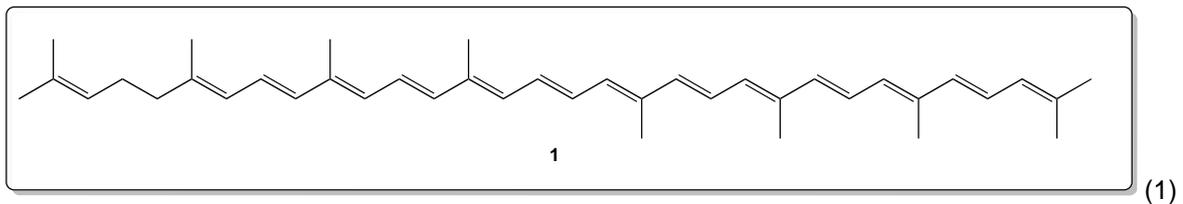
Figura 2 -Pirâmide de Willett



Fonte: Willett (2001).

Um dos fatores importantes para esta reformulação foi a descoberta de que existem diversas substâncias presentes em determinados alimentos que contribuem positivamente para a melhoria da saúde. O licopeno (1), um carotenóide presente em vegetais de coloração vermelha, como o tomate e o mamão, atua como um

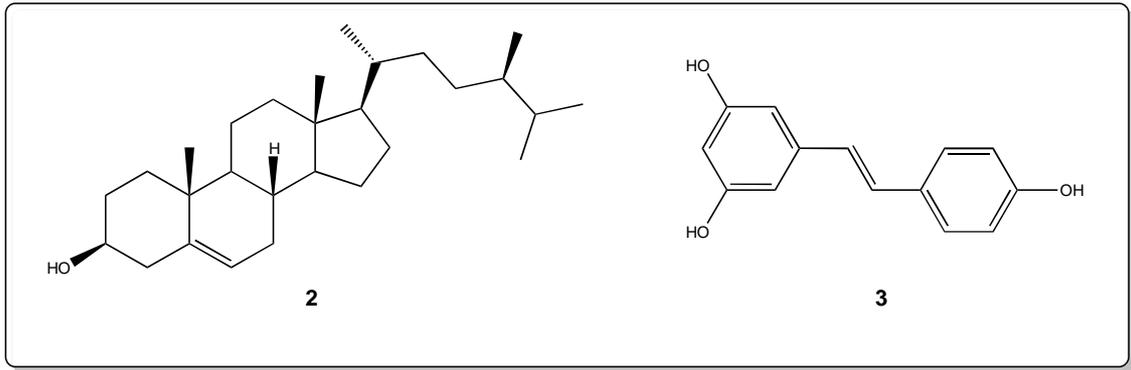
potente antioxidante. No alho (*Allium sativum*) foram identificadas centenas de fitoquímicos bioativos, sendo os de maior destaque os compostos sulfurados como a alicina e aliina, presentes no alho em quantidades três vezes maiores do que em outros vegetais também ricos nestes compostos, como a cebola e o brócolis (FARBMAN, 1993; DORANT, 1995).



O termo *alimento funcional* surgiu no Japão, por volta de 1980, quando o governo japonês iniciou um programa de redução de custos de seguro saúde. Para diminuir as despesas com medicamentos, foi implantado um programa denominado Foshu (comida para uso específico de saúde, na sigla em inglês), que consistia em avaliar quais alimentos teriam benefícios comprovados à saúde da população, cumprindo funções específicas no organismo (YAMADA et al., 2008). O fenômeno não é isolado e nem aconteceu por acaso, ele está inserido numa profunda mudança de hábitos e costumes ao longo dos últimos vinte anos.

Os **alimentos funcionais** são portanto, aqueles produtos que afirmam onde existe uma relação confirmada entre um alimento específico e a melhoria da saúde, ou que um alimento pode reduzir o risco de uma doença em particular. No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os Alimentos Funcionais através das seguintes resoluções: ANVISA, 16/99; ANVISA 17/99; ANVISA 18/99; ANVISA 19/99.

Baseado nessa tendência é crescente a chegada ao mercado de inúmeros produtos denominados “nutracêuticos”. Os nutracêuticos são formas farmacêuticas contendo o princípio ativo isolado. São comercializados desde os mais comuns como: cálcio, cromo, vitaminas, proteínas; até inúmeros metabólitos secundários, a exemplo os **fitosteróis**– como o sitosterol **(2)**– que possuem propriedades hipocolesterolêmicas devido a competição na absorção intestinal entre os ésteres do glicerol e o colesterol; e os **antioxidantes** – como o resveratrol **(3)**, um polifenol extraído da casca da uva.



Um número expressivo de estudos epidemiológicos mostra o efeito protetor à saúde do consumo de frutas e hortaliças. Assim, as substâncias ativas presentes nestes alimentos foram alçadas de seu posto de simples metabólitos a uma classe de substâncias com uma miríade de aplicações para a manutenção ou promoção da saúde (DANIEL et al., 1999; PARÉ, 1999).

Portanto provada a eficiência do consumo dos alimentos funcionais, qual seria a melhor forma de ingestão? Através de alimentos frescos ou de suplementos?

A exemplo, o resveratrol (RSV), onde já foi constatado que o menu diário, incluindo a ingestão de vinho com segurança, poderia fornecer de 6 - 8 mg de RSV e numerosos outros fitoquímicos. Em contraste, uma cápsula fornece entre 20 a 500 mg do puro trans-RSV, ou seja entre 3 a 83 vezes o que poderia ser oferecido em uma dieta (CHACHAY et al., 2011).

Todavia, para que um nutracêutico se torne disponível ao consumo humano, uma série de etapas devem ser cumpridas, desde a busca por sua fonte, comprovação de sua atividade incluindo segurança, eficácia e ausência de toxicidade, e otimização de metodologia que garanta a integridade deste suplemento até seu local de ação. Grupos de pesquisa no mundo inteiro, tem trabalhado intensivamente para que cada vez mais produtos desta natureza cheguem para nosso consumo, de forma prática e acessível a todos.

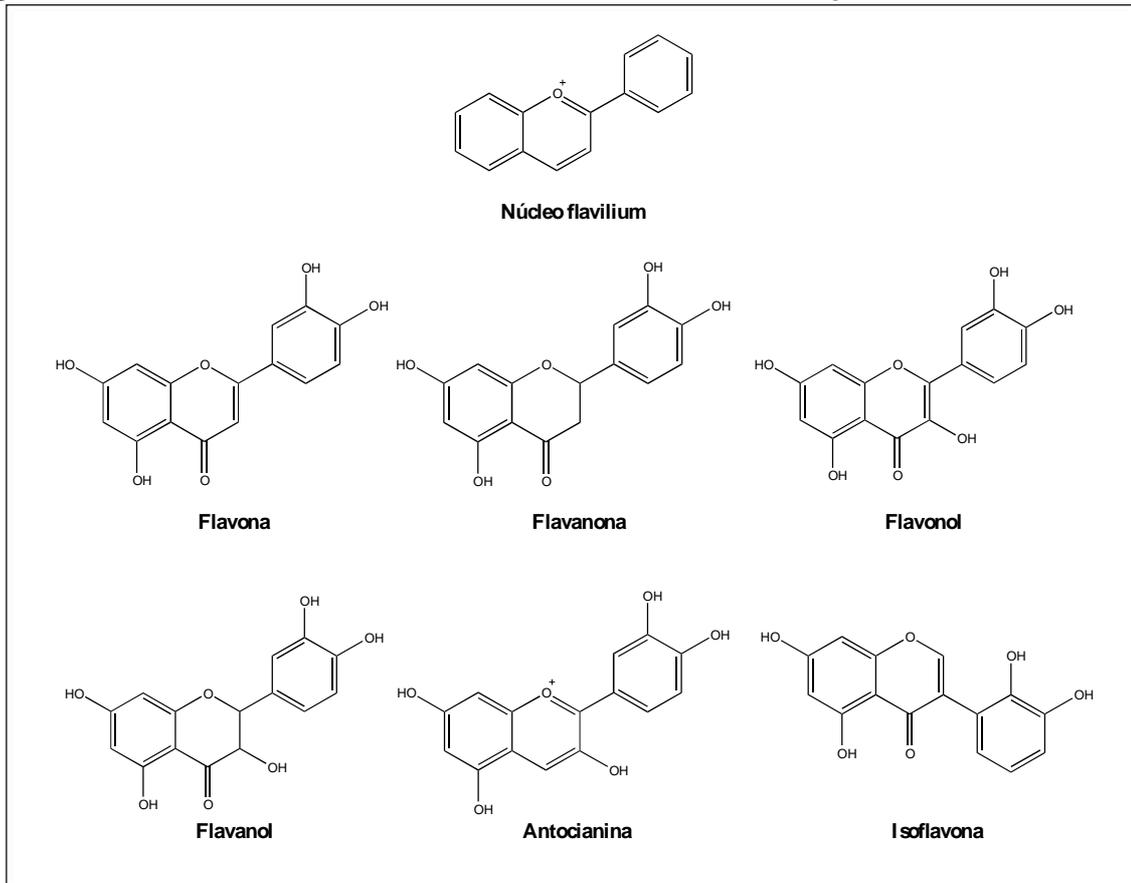
1.1 Flavonóides como Alimento Funcional

Os benefícios trazidos a saúde obtidos com o consumo de frutas e vegetais são muitas vezes atribuídos, em parte, ao seu alto teor de substâncias polifenólicas. O consumo destes polifenóis através da dieta muitas vezes supera o consumo de outros fitoquímicos e vitaminas (MANACH et al., 2004). Entre os polifenóis os flavonóides tem atraído uma atenção considerável, pois estudos epidemiológicos tem encontrado que há uma relação entre o aumento da ingestão de flavonóides na dieta e a diminuição dos risco de doenças crônicas como certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 2002; ARTS; HOLLMAN, 2005). Middleton (1998) em seus estudos acerca dos flavonóides, os considera como modificadores nutricionais naturais de respostas biológicas. Atualmente são classificados como compostos bioativos em alimentos, ao lado dos derivados de ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos, todos compostos fenólicos (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008).

Flavonóides são metabólitos secundários exclusivos de plantas que possuem importância ímpar tanto para o organismo produtor quanto para quem faz uso dessas substâncias. Constituem uma ampla classe de substâncias, com mais de 8.000 estruturas identificadas (PIETA, 2000) e possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os diversos sistemas biológicos. (HARBONE; WILLIAMS, 2000). Para a planta, a função dos flavonóides é a defesa contra predadores naturais, por isso são produzidos. Sua estrutura conjugada oferece proteção contra raios UV, estando desta forma protegida contra reações fotooxidativas. Uma outra função é a de sinalizar contra predadores naturais (HARTLEY, 1999; SOARES et al., 2000). Condições de solo inadequadas, rústicas, sob estresse, fazem com que as plantas produzam uma maior quantidade destes compostos fenólicos.

Flavonóides, passou a ser o nome generalizado usado para designar classes de substâncias quimicamente semelhantes, como pode ser observado na **figura 3**. As principais características deste grupo é a quantidade de hidroxilas fenólicas presentes em suas moléculas e a presença de anéis aromáticos conjugados.

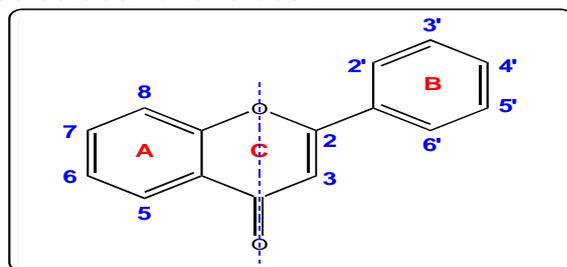
Figura 3 - Classes de substâncias fenólicas mais comuns em plantas



Fonte: Autora (2012).

Quimicamente estamos falando de polifenóis, substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona ($C_6-C_3-C_6$), o núcleo flavilium. O esqueleto básico dos flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono, **figura 4**, resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático B e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel A do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato (**figura 5**).

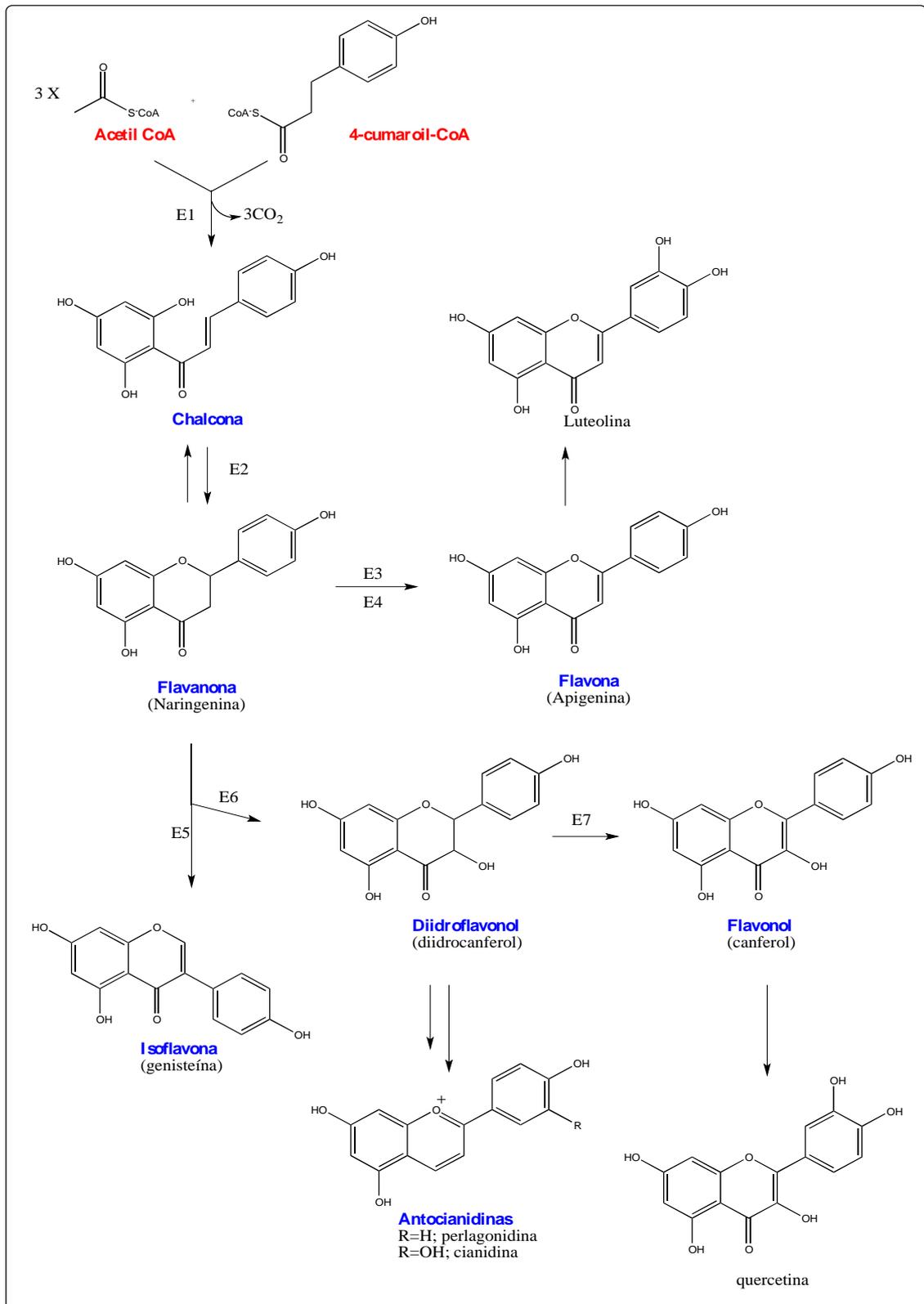
Figura 4 - Esqueleto básico dos flavonóides.



Fonte: Autora (2012).

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são derivadas desta através de várias outras rotas (MARKAN, 1982; DEWICK, 2001). A chalcona é formada pela condensação de 4-cumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, através da ação da chalcona sintase, enzima limítrofe da síntese de flavonóides, pois catalisa a formação do esqueleto C₁₅, e deste modo a entrada de hidroxicinamatos na biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma ligação dupla entre C₂ e C₃. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavona sintase: flavona sintase I (dioxigenase) e flavona sintase II (monoxigenase). A monoxigenase dependente da citocromo P-450, que também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase (DEY; HARBONE, 1997; HELDT, 1997). A **figura 5** indica as reações enzimáticas envolvidas na produção de algumas classes de flavonóides.

Figura 5 -Biossíntese dos flavonóides [E-1: chalcona sintase, E-2: chalcona isomerase, E-3: flavona sintase I (2-hidroxi flavanona sintase), E-4: flavona sintase II (2- hidroxi flavanona sintase), E-5: isoflavona sintase (2-hidroxiisoflavona sintase), E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase]; (DEWICK, 2001)].



Fonte: Dewick (2001).

O valor nutracêutico atribuído a compostos fenólicos e flavonoides, além da capacidade antioxidante, tem sido altamente considerado na pesquisa em Nutrição, já que os seus alimentos-fonte são de baixo custo e comumente consumidos por populações de países em desenvolvimento. Sabe-se que comunidades que estão em risco nutricional e de saúde, devido a inúmeros fatores, necessitam de alimentos que forneçam proteção suplementar no sentido de melhorar as defesas orgânicas e prevenir doenças.

As principais classes de flavonóides – flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavona, diidroflavonóis, e chalconas – são encontradas principalmente em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e folhas (VAN ACKER et al., 1996), ver **tabela 1**.

Tabela 1 - Principais classes de substâncias fenólicas

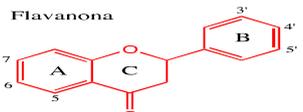
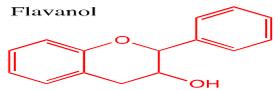
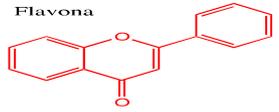
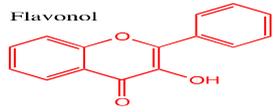
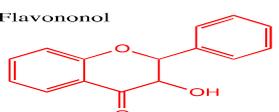
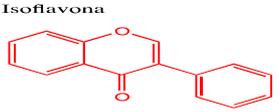
Classes	Cor	Flavonóides representativos	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho, violeta	Cianidina	Frutas de coloração vermelha e roxa e flores
Flavanol	Incolor e amarelo	Catequinas, epicatequinas, procianidina	Maçã, chá, cerveja, suco de uva, vinho, chocolate
Flavanona	Incolor e amarelo	Hesperidina, naringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Miricetina, quercetina e rutina	Cebolas, maçãs, chá, tomate, trigo sarraceno
Isoflavona	Incolor	Genisteína, diizeína	Soja e derivados

Fonte: Adaptação de Van Acker et al. (1996).

Os flavonóides são encontrados em grandes quantidades na dieta humana. Os níveis de flavonóides totais e individuais na alimentação são influenciados por fatores genéticos das espécies vegetais e condições ambientais. Fatores naturais como radiação solar, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estação do ano influenciam no metabolismo e produção destas substâncias (MACHADO, 2005).

A cinética de absorção dos flavonóides varia consideravelmente entre os alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo flavona. Os flavonóides são usualmente absorvidos passando pelos enterócitos, em seguida sofrem principalmente reações de conjugação com o ácido glicurônico (glicuronidação), também podem sofrer reações de sulfatação ou metilação, no fígado e intestino delgado (HOLLMAN et al., 1995). Ao sofrerem estas modificações os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou, serem eliminados caso tornem-se mais polares. O acompanhamento do teor de flavonóides e de seus metabólitos presentes no plasma humano já é realizado há algum tempo comprovando os mecanismos de absorção e distribuição destes compostos pelo corpo humano (ERLUND, 2004).

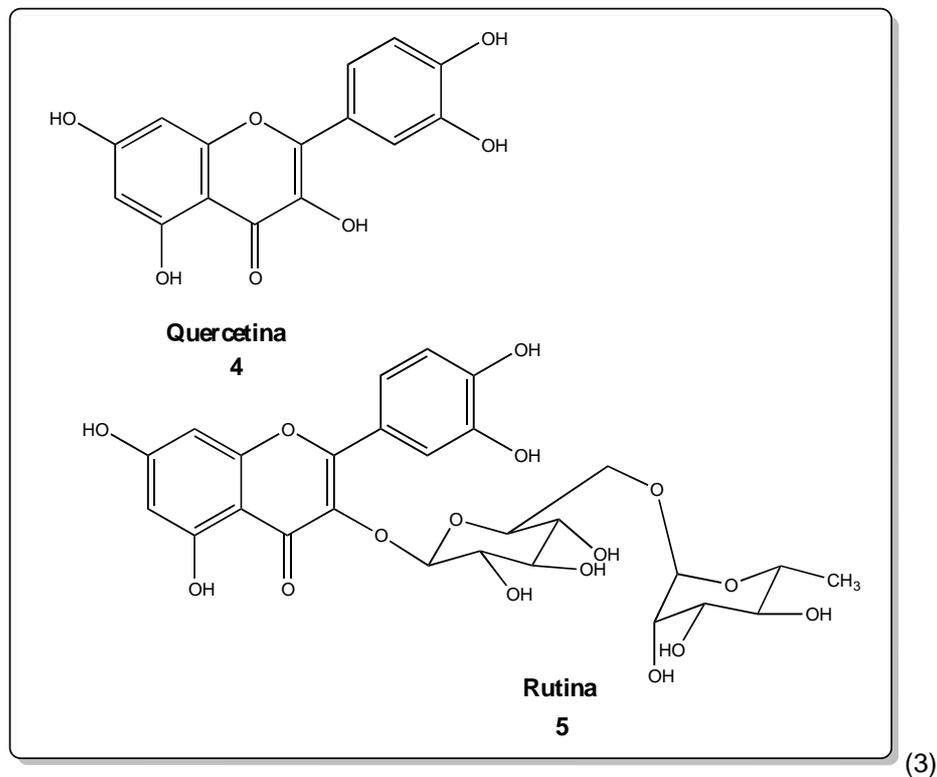
Tabela 2- Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência natural em plantas.

Fórmula estrutural	Flavonóides	Substituições					
		5	6	7	3'	4'	5'
<p>Flavanona</p> 	<p>Eriodictiol</p> <p>Hesperitina</p> <p>Narigenina</p>	OH	H	OH	OH	OH	H
<p>Flavanol</p> 	<p>Catequina</p> <p>Galocatequina</p>	OH	H	OH	OH	OH	H
<p>Flavona</p> 	<p>Apigenina</p> <p>Crisina</p> <p>Luteolina</p>	OH	H	OH	H	OH	H
<p>Flavonol</p> 	<p>Canferol</p> <p>Quercetina</p> <p>Miricetina</p>	OH	H	OH	H	OH	H
<p>Flavononol</p> 	<p>Taxifolina</p>	OH	H	OH	OH	OH	H
<p>Isoflavona</p> 	<p>Daidazina</p> <p>Genistefna</p> <p>Glicitefna</p> <p>Formononetina</p>	H	H	OH	H	OH	H

Fonte: Birt, Hendrich e Wang (2001).

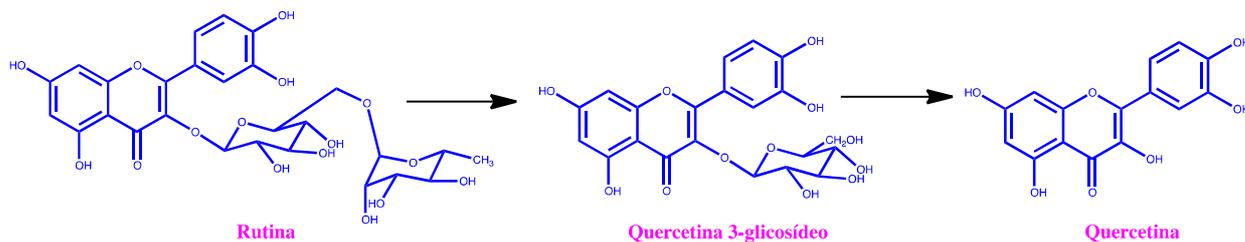
A atividade biológica dos flavonóides e de seus metabólitos depende de sua estrutura química. Apesar de serem estruturalmente semelhantes, as etapas de absorção e mecanismo de ação da substância podem variar de acordo com as possíveis formas de substituições.

A rutina (4), um flavonol que apresenta um dissacarídeo (raminose e glicose) ligados na posição 3 do anel pirano, tem sido objeto de muitos estudos devido a sua atividade vasculoprotetora.



Manach e colaboradores em 1997, demonstraram que a rutina foi completamente hidrolisada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a quercetina-3-glicosídica e a quercetina, como apresentado na **figura 6**.

Figura 6 - Hidrólise da Rutina



Fonte: Autora (2012).

Após a hidrólise dos açúcares estas moléculas passam a apresentar maior afinidade pelas membranas das células epiteliais e, portanto, são melhores absorvidas (BORKKENHEUSER; SHACKLETON; WINTER, 1987). Entretanto a Hollman et al. (1995) citam que a quercetina glicosilada (Q3G) é mais bem absorvida que a quercetina na forma aglicona devido a Q3G ligar-se a transportadores de glicose nas células epiteliais. Manach et al. (1997) descrevem que rutina e quercetina apresentam metabólitos similares como diosmetina (**6**), isohamnetina (**7**) e tamariximetina (**8**), após 24 horas do início da dieta contendo 0,2% de quercetina ou 0,4% de rutina. A rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas, atua principalmente na melhora dos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede vascular. Os efeitos da rutina são potencializados quando associada ao ácido ascórbico (PATHAK, D; PATHAK, K; SINGLA, 1991).

Os flavonóides podem modular enzimas do tipo hidroxilases, oxirredutases, DNA sintetases, RNA polimerases, fosfatases, fosfocinases, oxigenases e aminoácido. Ainda assim, o consumo de flavonoides a partir da dieta não promove desequilíbrio generalizado no metabolismo, pois seus efeitos se restringem a vias metabólicas específicas. Esse grau considerável de tolerância a compostos que são, quimicamente, substâncias reativas, estruturalmente muito próximas a vários compostos integrantes da bioquímica dos seres humanos, pode ser explicada, em parte, por sua pouca solubilidade em água, o que mantém baixa sua concentração fisiológica, à sua meia-vida curta e à compartimentalização orgânica em órgãos e suas células (HAVSTEEN, 2002).

Biologicamente, os flavonoides mostram uma variedade de efeitos farmacológicos. Flavonoides da classe isoflavona podem atuar como hormônios em vegetais e animais, dada a semelhança estrutural com os estrógenos naturais, sendo usado em terapias de reposição hormonal em mulheres. (NAGATA, 2001). A marcante ação antioxidante dos flavonóides é determinada pela presença de numerosas hidroxilas em certas posições adicionada de uma dupla ligação entre os carbonos das posições C₂ e C₃. Este efeito pode ser reduzido, por exemplo, pela adição de moléculas de açúcar (hexoses e pentoses) na estrutura hidroxilada do flavonóide.

A principal repercussão do poder antioxidante dos flavonóides é, sem dúvida, sobre as doenças coronarianas, especialmente aquelas em que o ponto de origem é a elevação do colesterol LDL (low density lipoprotein) ou colesterol ruim, visto que estas proteínas podem ser modificadas por radicais livres. Dessa forma, tornam-se tóxicas para o endotélio dos vasos sanguíneos sendo facilmente absorvida por macrófagos. Todo este processo culmina na formação de placas de gorduras, que denominamos aterosclerose.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os flavonóides inibem essa modificação oxidativa de LDLs pelos macrófagos através de um desses dois mecanismos: pela inibição da hidroxilação da LDL ou por oxidação preventiva do α -tocoferol, que está presente em lipoproteínas (STEINBERG et al., 1989). Estes mesmos autores sugerem que os radicais livres acentuam a trombogênese pelo aumento da agregação plaquetária. Foi sugerido que os flavonóides podem inibir a atividade das enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase – justificando sua ação anti-inflamatória -levando a diminuição da agregação de plaquetas e conseqüentemente a redução da tendência à formação de trombos.

Uma evidencia marcante sobre os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos, em especial os flavonóides do vinho tinto, foi demonstrada por Frankel, Waterhouse e Teissedre em 1995. Segundo os autores, essa ação protetora cardiovascular poderia explicar o “paradoxo francês”, um fenômeno que refere-se à baixa incidência de doenças cardiovasculares observada na população do sul da França, que contrastava com sua dieta rica em gordura saturada. A explicação para

esse paradoxo seria o elevado consumo de vinho tinto, visto que esta bebida contém um alto teor de flavonóides.

Outros efeitos incluem: promoção da vasodilatação (efeito anti-hipertensivo e vasotônico), antitumoral, antimicrobiana, hipoglicemiante, antiproliferativa, vasotônica entre outras (HARBONE; WILLIAMS, 2000; STOBIECKI, 2000; KIM et al., 2004; SALEM et al., 2011).

Na China, o Ministério da Saúde aprovou doses de própolis, que é um composto extremamente rico em flavonóides e demais compostos fenólicos, para serem vendidas nos supermercados, com a proposta de prevenir doenças tais como inflamação, doenças do coração, diabetes e alguns tipos de câncer (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001). Para garantir a eficácia destas substâncias, pesquisas químicas, farmacológicas e clínicas objetivam entender sua bioatividade e estabelecer critérios para seu controle de qualidade. (CAO; WANG; YUAN, 2004).

Diferentes métodos são empregados para análise de flavonóides entre eles se destacam: métodos espectrofotométricos, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) e eletroforese capilar (EC/CE). Métodos espectrofotométricos baseados em coloração de reações são frequentemente aplicados para avaliar o teor total de flavonóides. CCD é muito útil para uma rápida varredura em uma amostra, antes de análise instrumental mais detalhada. CG propicia uma excelente resolução, mas, necessita de derivação prévia da amostra. Eletroforese capilar é um método novo e considerado alternativo ao HPLC para análise de flavonóides; apresenta, algumas vantagens como boa qualidade de separação, rapidez e baixo custo (JIANG et al., 2008), mas a repetibilidade é inferior ao CLAE. Isto faz com que o CLAE utilizando de fase estacionária apolar (C_{18}) seja a técnica de escolha para análise de desses polifenóis (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

Os métodos hifenados CL-DAD (cromatógrafo líquido acoplado ao detector de arranjos de diodos) e CL-EM (cromatógrafo líquido acoplado ao detector de massas) são os tradicionalmente escolhidos. Os estudos na maioria das vezes objetiva a determinação simultânea de diversos flavonóides em uma amostra de forma simples

e rápida. Aditivamente, o método escolhido deve resguardar o suporte técnico para qualidade, garantindo sua reprodutibilidade e eficiência.

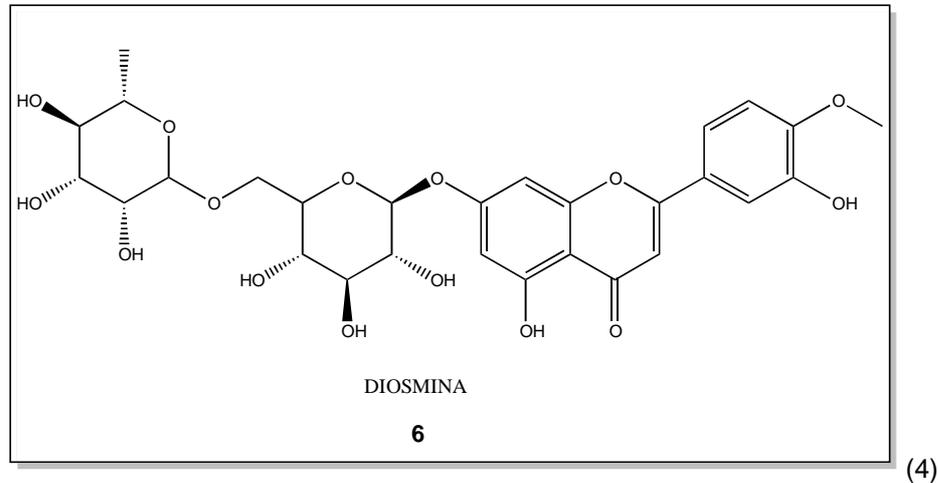
O LC-MS, de fato, representa uma poderosa ferramenta para caracterização de substâncias fenólicas presentes em uma matriz, mas é um método de alto custo e geralmente não está disponível para a maioria dos laboratórios de pesquisa. Já o DAD é muito mais comum e mais barato, providencia informações de confirmação de identidade (classe química) do analito e habilita a varredura do espectro, ou seja, a aquisição simultânea de diversos cromatogramas com comprimentos de onda diferentes. Dessa forma disponibiliza ao analista informações importantes como a pureza da banda cromatográfica.

Com relação a identificação estrutural de flavonóides uma potente ferramenta tem ganhado espaço antes só ocupado pela ressonância magnética nuclear (RMN): o espectrômetro de massas. Atualmente contando com técnicas modernas de ionização de moléculas, e contando com a adição de potentes detectores - tempo de voo (TOF) e armadilha de íons (Ion Trap), podendo obter íons de gerações até MS¹⁶- a espectrometria de massas tornou possível a identificação estrutural sem a necessidade de isolamento da substância, tipo de análise não realizada via RMN.

A análise de massas com a fragmentação de íons selecionados permite a identificação de fragmentos característicos das estruturas dos flavonóides glicosilados fazendo a elucidação de tipo de anel de açúcar presente na molécula e sua posição, bem como a identificação de flavonas O-glicosiladas aciladas (FERRERES et al., 2011; PAREJO et al., 2004; TRUCHADO; FERRERES; TOMAS-BARBERÁN, 2011).

Muitos flavonóides isolados, testados biologicamente e em seguida clinicamente, já alcançaram as prateleiras das farmácias e estão ao nosso dispor. Entre eles podemos citar o medicamento de nome **Fitoscar**, uma pomada obtida a partir de extrato seco de barbatimão (*Stryphdendron adstringens*), que possui atividade cicatrizante é comercializada na concentração de 60 mg de extrato bruto de *S. Adstringens*, nos quais encontram-se 30 mg de fenóis totais. Outro exemplo é o medicamento vasculoprotetor extensamente prescrito, Diosmin[®], se trata da mistura

de dois flavonóides presentes em frutos cítricos, laranja principalmente: diosmina (6) 450 mg e hesperidina 50 mg.



A quercetina (4), rutina (5), crisina, apigenina, flavonóides frequentemente encontrados em espécies vegetais, são rotineiramente prescritas em formulações magistrais com indicações múltiplas: antioxidantes, vasculoprotetor, anti-estrogênico, dislipidêmicos.

Infelizmente, os flavonóides não podem ser sintetizados biologicamente pelo corpo humano, sendo nossa dieta a única fonte de obtenção destas importantes substâncias. Nos últimos anos o interesse por este tipo de substância tem aumentado, promovido por sua visibilidade devido a seus efeitos benéficos à saúde.

No entanto, alguns flavonoides ministrados como suplementos, e não pelo consumo alimentar, dependendo da dosagem podem ser mutagênicos *in vitro* (SKIBOLA; SMITH, 2000). Por outro lado, em doses fisiológicas são capazes de modular a atividade de enzimas associadas à ativação e detoxificação de carcinógenos, de reduzir o dano oxidativo do DNA e de modular a expressão de genes relacionados à apoptose, proliferação celular e angiogênese envolvidos com a progressão de neoplasias (GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2004).

1.2 Encapsulação de Princípios Ativos

Analisando a estrutura química dos flavonóides, percebemos a quantidade de hidroxilas fenólicas presentes e o quanto elas são passíveis de oxidação resultando na perda da integridade dessas moléculas. Em se tratando de preparados contendo flavonóides, como chás, extratos, podemos dizer que estas moléculas estão mais “protegidas”, mas quando a intenção passa a ser a comercialização da substância pura, uma questão a ser levantada é a forma de se obter uma formulação estável e que conserve a integridade da molécula.

A microencapsulação é o processo pelo qual pequenas quantidades de líquidos, sólidos ou gases são cobertos com material que forma uma barreira para o ambiente ou reações químicas como aquecimento e oxidações (FINCH,1993; GREEBLATT et al., 1993).

Inicialmente a matriz encapsulante mais usada era a lactose, posteriormente foi sendo substituída pela goma arábica. Além da goma arábica, outros polímeros naturais são usados como microencapsulantes, são eles a goma xantana, ágar, alginato, carragena e amidos (GREBLATT et al., 1993; BERISTAIN, 1995).

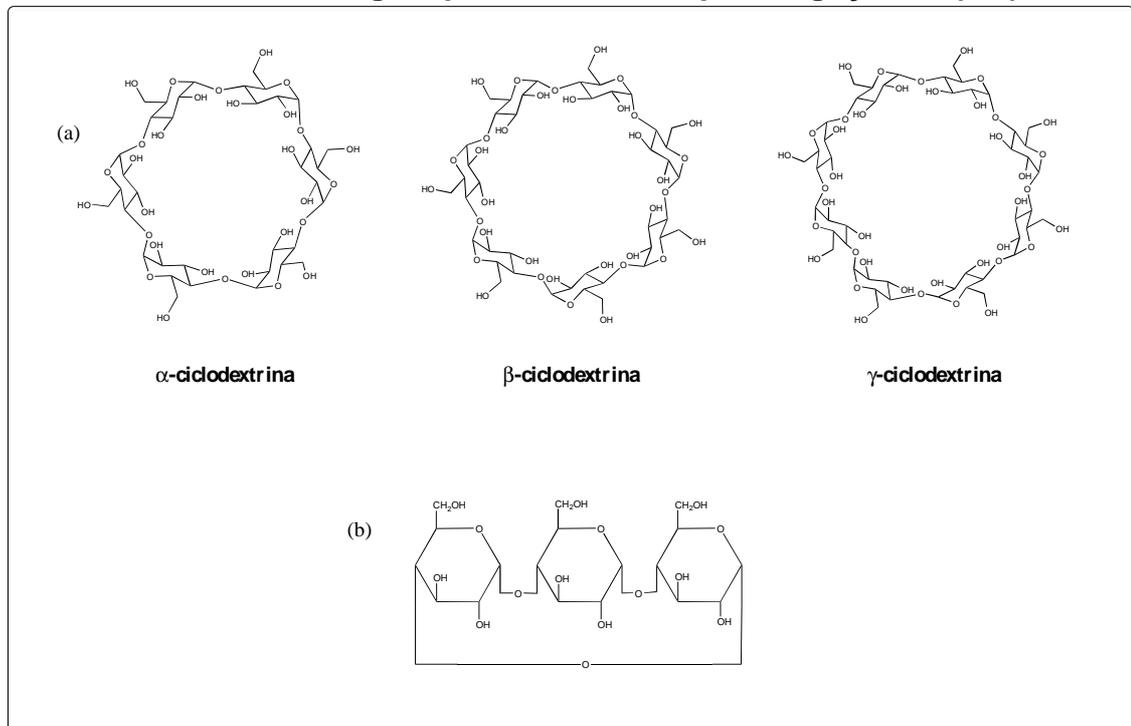
Um bom agente encapsulante deve apresentar as seguintes características: estável em emulsão, higroscopicidade, baixa viscosidade, gosto suave, ausência de aroma, baixa toxicidade e baixo custo.

As ciclodextrinas (CDs) apresentam as seguintes vantagens no que diz respeito à encapsulação molecular: podem encapsular grande número de compostos, apresentam modificações vantajosas nas propriedades físicas e químicas das moléculas encapsuladas e o método utilizado é barato e simples.

Quimicamente as CDs constituem uma classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glicopiranosose, que unidas pelas ligações $\alpha(1-4)$ originam estruturas cíclicas (**figura 7b**). As CDs obtidas com maior rendimento, conhecidas como naturais, contêm seis, sete e oito unidades de glicose, **figura 7a**, sendo denominadas de α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -

ciclodextrina (γ -CD) respectivamente, sendo a β -CD a de maior aplicação industrial (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999; SÁ-BARRETO; CUNHA FILHO, 2007).

Figura 7 - (a) estrutura cíclica das ciclodextrinas α , β , γ . (b) Esquema das moléculas de glicopirranose unidas pelas ligações \square (1-4)



Fonte: Autora (2012).

As ciclodextrinas apresentam cavidade hidrofóbica de dimensões médias (0,57nm, 0,78 nm, 0,95 nm) e superfície hidrofílica. O número de unidades de glicose determina a dimensão e o tamanho da cavidade. Compostos hidrofóbicos de cadeias longas formam complexos mais fortes do que compostos hidrofílicos de cadeias curtas. As moléculas são encapsuladas de maneira total ou parcial, a depender de seus respectivos tamanhos (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999, SÁ-BARRETO; CUNHA FILHO, 2007).

Bellinger et al. (1995) realizaram estudos sobre a toxicidade da ciclodextrina em ratos e cachorros, durante 52 semanas. Concluíram ser não tóxica até níveis de 12.500 ppm e 50.000 ppm em ratos e cachorros respectivamente.

A encapsulação com ciclodextrinas já está bem estabelecida, e desempenha muito bem esse papel protetor. Essa proteção dada a molécula garante um maior tempo de prateleira, protegendo essas substâncias de reações não desejadas como

fotooxidações, hidrólises, como também, e tão importante quanto, o poder de auxiliar no processo de liberação pós ingestão, fazendo com que permaneça íntegra até sua absorção no local desejado.

A indústria farmacêutica e a indústria de cosméticos utilizam a formação de complexos de CD com o objetivo de melhorar as características do produto final (solubilidade, estabilidade e fotoestabilidade), assim como para facilitar a absorção e liberação de princípios ativos em seus locais específicos, evitando assim perda dos ativos no metabolismo fisiológico. A encapsulação de fármacos com CDs já é realizada com frequência na indústria, a exemplo temos: nimesulida, ciclosporina, temazepan, dexametasona, além de outros mais. A resistência à oxidação da vitamina D3 é notavelmente aumentada ao formar complexo com a CD (RAJEWSKI; STELLA, 1996; UEKAMA 2004).

Adicionalmente, as CDs também encontram aplicações na indústria de alimentos. A exemplo, frutas e vegetais quando cortados, descascados ou prensados para produzir sucos, frequentemente sofrem reação de escurecimento enzimático que se reflete na qualidade do alimento. O uso de sulfito tem causado reações alérgicas, e como resultado o FDA - órgão regulador americano de alimentos e medicamentos - tem limitado sua utilização. O escurecimento enzimático em sucos de maçã, pêra e uva branca pode ser inibido com β -CD. Estudos realizados por Hicks et al. (1996) mostraram que, 1% de β -CD e 0,5% de fosfato adicionados ao suco de maçã inibem completamente o escurecimento por 1 dia na temperatura ambiente e por 2 a 3 semanas a 4 °C.

Na química analítica as CDs têm encontrado aplicações em diversos campos, tanto em técnicas espectroscópicas como em cromatográficas. A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas origina aumento na seletividade e sensibilidade do método analítico empregado. Em HPLC, a β -CD tem sido usada para melhorar a resolução e reprodutividade. Em colunas de cromatografia a gás, CDs são usadas na fase estacionária para facilitar as análises rápidas de rotina. No que diz respeito a separação de enantiômeros as CDs são usadas como material de preenchimento de colunas de CG e HPLC.

1.3 Controle de Qualidade de Espécies Vegetais

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. O controle da qualidade das matérias primas vegetais torna-se mais complexo em virtude de uma série de variáveis inerentes ao produto: seleção da espécie, sazonalidade, clima, método de colheita e preparo de extratos, estabilidade frente a luz e temperatura.

De uma maneira geral, as plantas podem possuir centenas de constituintes, alguns deles presentes em concentrações mínimas, dificultando os estudos de identificação e atribuição de atividade biológica das substâncias presentes no extrato vegetal. Com os avanços tecnológicos ocorridos com a instrumentação analítica (CLAE, RMN, Massas, etc) é possível estabelecer critérios para padronizar e manter o controle de qualidade dos fitoterápicos com maior rapidez (FARIAS, 2001).

Os extratos padronizados são a base dos fitoterápicos e fitoquímicos. O rigor na padronização foi exigido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) com a portaria RDC 48/2004 de 16.03.2004, que estabeleceu uma legislação específica, que se baseia na “garantia de qualidade (...) exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos”, o que só pode ser alcançado se as empresas se utilizarem de extratos padronizados e estabelecerem um rígido controle de qualidade.

No entanto, a maioria dos princípios ativos existentes nas plantas medicinais brasileiras são desconhecidos. Para contornar esta dificuldade a lei permite um controle via “marcadores”. Marcador fitoquímico é uma substância ou classe de substâncias presentes na matéria-prima vegetal com regularidade, não sendo necessariamente o princípio ativo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Para algumas plantas, que já dispõem de informações fitoquímicas e farmacológicas, a padronização via marcadores é um processo mais simples, como o extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) que pode ser dosado tomando por base a

caféina. Entretanto, quando se trata de extratos vegetais ativos como a pata de vaca (*Bauhinia forficata*) com atividade hipoglicemiante ou a espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), planta antiulcerogênica, nas quais seus princípios ativos ainda não foram descritos, a padronização não é feita com base nas substâncias ativas. No caso da espinheira santa a padronização é feita tomando como base o teor de taninos, uma classe importante de substâncias fenólicas.

Sem padronização o produto perde a qualidade e a indústria não pode garantir a eficácia prometida já que desconhece a concentração do(s) princípio(s) ativo(s) do produto a venda. A ausência de padronização provoca afastamento dos fitoterápicos por parte dos médicos, que não se sentem seguros em receitá-los à seus pacientes. Para garantir que o método analítico empregado no controle de qualidade gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (BARATA, 2005).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. A RDC 48/04 exige os estudos de validação para a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos como parte essencial das Boas Práticas de Fabricação. O objetivo da validação é assegurar concentração do princípio ativo, bem como a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação do erro analítico através da aplicação sistemática de testes de precisão e exatidão.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Estes testes, que objetivam a determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, são realizados mediante a checagem de alguns parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade), precisão intermediária, exatidão, e robustez.

Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Pode ser determinada pela pureza das bandas cromatográficas, quando se utiliza de detector de arranjos de diodos ou pela identificação pelo detector de massas. A pureza do pico demonstra que o mesmo é atribuído a um só componente da amostra.

Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir o intervalo de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo.

O coeficiente de correlação (r) deve ser no mínimo igual a 0,99.

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma serie de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta será determinada em dois diferentes níveis:

- a) Repetibilidade (precisão intra-dia): concordância entre os resultados dentro d eum curto período de tempo com o memso analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 6 determinações a 100% da concentração do teste;

b) Precisão intermediária (precisão inter-dia): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

Pode ser expressa como os desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma serie de medidas. É calculado pela fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

(5)

Onde:

DPR = Desvio padrão relativo

DP = Desvio padrão

CMD: Concentração média determinada

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

(6)

Neste estudo a exatidão será calculada pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) à amostra.

O parâmetro da exatidão é validado utilizando-se no mínimo 3 concentrações (alta, média e baixa) ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com no mínimo 5 determinações por concentração. Os valores de exatidão aceitos podem variar de 80 a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85 a 115% para os demais pontos. A exatidão da metodologia foi avaliada junto com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das concentrações dos 5 dias de análises.

Recuperação

A recuperação mede a eficiência do método em extrair os analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% são desejáveis, embora admita-se valores menores, desde que a metodologia seja precisa, exata.

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

1.4 *Camptosema coriaceum* Benth e o Projeto IMSEAR

A espécie *Camptosema coriaceum* Benth pertencente a família Leguminosae (Fabaceae), sub-família Faboideae, é um arbusto, nativa das regiões de cerrado. A família Leguminosae, possui ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais. É subdividida em 3 subfamílias muito distintas: *Faboideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* (BARROSO, 2002).

Para a subfamília *Faboideae* estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais, sendo que algumas dessas espécies tem grande importância medicinal (DI STASI, 2002).

Até o momento não existe na literatura relatos de estudos químicos nem registro de uso por parte de alguma população relativos a espécie *C. coriaceum*. Esta espécie faz parte do bioma da região Semi-árida do Brasil e se encontra inserida no projeto IMSEAR – Instituto do Milênio e do Semi-Árido.

A iniciativa de implantar Institutos do Milênio em certas regiões estratégicas do Brasil: Semi-Árido, Amazônia e Oceano Atlântico (incluindo áreas litorâneas), foi sem dúvida o reconhecimento por parte do MCT, que, para tais regiões, faltavam informações básicas sobre a caracterização, funcionamento e potencialidades dos seus recursos naturais, o que gerava um atraso científico e tecnológico em relação às demais regiões do país.

As 23 instituições participantes se reuniram para definir quais eram os maiores problemas relacionados aos 20 milhões de habitantes da região, e como eles poderiam ser abordados a partir de pesquisas científicas. Dois dos maiores desafios encontrados na região são a degradação ambiental devido ao uso inadequado e descontrolado da terra por mais de quatro séculos e, juntamente com ele, uma grave falta de conhecimento sobre a biodiversidade do Bioma das Caatingas, com seus fatores altamente especializados a partir dos quais os habitantes sobrevivem. Os recursos hídricos e seu uso racional podem auxiliar a agricultura na região, enquanto uma melhor compreensão de sua biota única e seu uso sustentável, especialmente no combate a doenças, podem também fornecer uma rica fonte de renda, bem como promover saúde às comunidades locais, ao mesmo tempo em que ajuda a preservar o ambiente. O IMSEAR teve dois focos principais de pesquisa. O primeiro aborda estudos biológicos e está dividido em três programas (biodiversidade, bioprospecção e recursos genéticos) e o segundo foco do IMSEAR é o estudo de diferentes aspectos da hidrologia da bacia de dois grandes rios: o São Francisco e de Contas.

O Programa de Biodiversidade visa elaborar bancos de dados e publicar esse conhecimento. O plano tem sido reunir informações para catalogar e mapear a biodiversidade do Bioma das Caatingas, assim como detectar espécies endêmicas ameaçadas de extinção. Para o levantamento da fauna, levou-se em conta a bibliografia e os espécimes coletados no Nordeste disponíveis nos museus brasileiros. Para o levantamento das plantas e fungos foram utilizados, além da

bibliografia e dos espécimes depositados nos herbários da Região, coletas randômicas em áreas específicas do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia, dentro do programa de coleta das instituições participantes. As plantas coletadas constituíram a base dos **Programas de Bioprospecção** e de **Recursos Genéticos** do Instituto.

O Programa de Bioprospecção visa através de análises fitoquímicas, farmacológicas, imunológicas e toxicológicas encontrar fitoterápicos para algumas das doenças de maior ocorrência no Semi-árido, tais como leishmaniose cutânea e visceral, chagas, esquistossomose e malária. Ao mesmo tempo, compostos foram testados quanto a sua atividade antibiótica e anticancerígena.

O Programa de Recursos Genéticos trabalha com as espécies promissoras, que serão caracterizadas tanto através de sua diversidade genética como de análises moleculares. Paralelamente, serão conservadas 'ex situ', por meio de conservação das sementes, propagação e formação de bancos de germoplasmas. O DNA da maior parte das plantas coletadas foi extraído e armazenado em um banco de DNA para análises futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolamento de flavonóides e flavonóides glicosilados da espécie *Camptosema Coriaceum Benth*;

2.2 Objetivos Específicos

- Obter uma fração enriquecida em compostos fenólicos das raízes de *C. coriaceum*, identificar e quantificar os compostos fenólicos majoritários.
- Desenvolver e validar uma metodologia de análise para detecção da **rutina** em uma fração enriquecida de flavonóides;
- Encapsular a rutina e avaliar sua atividade antioxidante.
- Avaliar potencialidade de inibição de crescimento em linhagens de carcinoma celular.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e Materiais

Para obtenção do extrato foram utilizados solventes grau P.A. da marca Vetec. Os extratos vegetais foram concentrados em aparelho evaporador rotatório da marca BUCHI.

Foram utilizados solventes ultrapuros grau HPLC nas análises cromatográficas de alta eficiência da marca J.T. Baker (Philipsburg, PA, EUA).

A água deionizada utilizada no sistema de CLAE foi obtida através do sistema de filtração Milli-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).

Foram utilizados para clean-up de amostras cartuchos de extração em fase sólida (SPE) C₁₈ da Supelco;

As amostras injetadas no cromatógrafo líquido foram previamente filtradas em filtro seringa da marca Millipore[®], com membrana de nylon de 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro.

Os solventes utilizados nas análises em CLAE foram filtrados a vácuo através de uma membrana de nylon Millipore[®] de 0,45 µm e em seguida desgaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ¹H e ¹³C e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro BRUKER de 400 MHz, no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizados solventes deuterados Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) para ressonância de hidrogênio, carbono treze e como referência interna o próprio solvente e TMS.

Para as medidas espectrofotométricas foi empregado um espectrofotômetro Femto (600S, Brasil) equipado com cubetas de polietileno de 1,0 cm de caminho óptico. Para as medidas de pH foi utilizado um medidor de pH Marte (MB-10, Brasil) e, para a pesagens dos reagentes e padrões visando o preparo de soluções foi empregada uma balança analítica Bel com precisão de 0,1 mg.

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em um espectrômetro Q-TOF Waters. O software usado foi o Masslinxs.

3.2 Espécies Vegetais

3.2.1 Coleta

As raízes de *Camptosema coriaceum* foram adquiridas através da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS, e fazem parte do projeto IMSEAR. Foram coletadas no município de Rio de Contas-Ba e sua excicata está depositada no herbário da UEFS sob número AMG 2016 (1816).

3.2.2 Procedimento Inicial

Todo material vegetal foi seco através da luz solar durante 3 dias e em seguida pulverizado em máquina forrageira no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

3.2.3 Preparo e Fracionamento do Extrato Bruto

O pó das raízes de *Camptosema coriaceum* (2 Kg) foi colocado em um percolador utilizando como solvente extrator o etanol (6000 mL), ficando em maceração por 3 dias. O macerado foi retirado através de uma torneira, concentrado em aparelho evaporador rotatório e o solvente foi adicionado novamente no percolador. Este processo se repetiu por mais três vezes, obtendo-se assim o extrato bruto seco das raízes de *Camptosema coriaceum* (700 g).

3.2.4 Partição Líquido-líquido do Extrato Bruto

O extrato bruto seco das raízes de *Camptosema coriaceum* (200g) foi solubilizado em uma solução Metanol/ Água 2:3 e em seguida extraídos com solventes seguindo a ordem crescente de polaridade: Hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Originando as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidroalcólica.

3.3 Técnicas Cromatográficas

3.3.1 Preparo da sílica de fase reversa C₁₈

A sílica C₁₈ usada foi preparada no laboratório seguindo o protocolo do Prof. Brás H. de Oliveira (**anexo 1**) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

3.3.2 Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SISTEMA 1: Cromatógrafo líquido SHIMADZU composto por uma bomba LC-10ADvp, desgaseificador DGU-12A, equipamento de gradiente de baixa pressão FCV-10ALvp, injetor manual RHEODYNE, forno CTO-10AVp, detector por arranjos de fotodiodos SPD-M10Avp, ligados a uma interface SCL-10Avp. A análise dos dados foi registrada através do software CLASS-VP 5.0.

SISTEMA 2: Cromatógrafo líquido SHIMADZU composto por 2 bombas preparativas LC-6AD, injetor manual RHEODYNE, detector por arranjos de fotodiodos SPD-M10Avp, ligados a uma interface SCL-10Avp. A análise dos dados foi registrada através do software CLASS-VP 5.0.

SISTEMA 3: Cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695 Separations Module, equipado para análises em gradiente, injetor automático, forno, detector por arranjos de diodos. A análise dos dados foi registrada através do software EMPOWER.

SISTEMA 4: Cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695 Separations Module, equipado para análises em gradiente, injetor automático, forno, detector de massas. A análise dos dados foi registrada através do software EMPOWER.

3.3.3 Colunas cromatográficas

Foram utilizadas colunas comerciais analíticas C₄ e C₁₈ das marcas:

- a) Shimadzu ShimPack[®] (150 x 4,6 mm com partícula de 3 µm)
- b) Azahipak[®] (250 x 4,6 mm com partícula de 5 µm)

A coluna preparativa utilizada no trabalho foi a SHIMADZU ShimPack[®] (250 x 20 mm).

3.3.4 Preparo das amostras usadas no HPLC

O extrato bruto das raízes de *C. coriaceum* (10mg) foi solubilizado em 1 ml de metanol grau hplc e filtrado em cartucho millipore 0,45 μ m.

A fração enriquecida em flavonóides foi preparada solubilizando 10mg da fração em 5 ml de metanol grau hplc em seguida filtrada em cartucho millipore 0,45 μ m. O volume de injeção foi de 10 μ l.

As substâncias isoladas foram preparadas solubilizando 1mg da substancia em 1 ml de metanol grau hplc em seguida filtrada em cartucho millipore 0,45 μ m. O volume de injeção foi de 10 μ l.

Para cromatografia preparativa da fração enriquecida em flavonóides, para isolamento dos flavonóides, foram preparadas soluções com concentração de 300mg/ml. O volume de injeção foi de 300 μ l.

3.4 Obtenção dos espectros de massas

As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo negativo e/ou positivo através do equipamento QT of Micromass (Manchester - Reino Unido) e de um FT-ICR-MS Thermo Scientific (Bremen – Alemanha). As condições de operação dos equipamentos para as análises foram: voltagem do capilar: 3.0-4.0 kV; temperatura da fonte: 100 $^{\circ}$ C; temperatura de dessolvatação: 100 $^{\circ}$ C; voltagem do cone: 20-40 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10 μ L min⁻¹ ou através do Nanomate Adivion (EUA) com fluxo contínuo de 200 nL min⁻¹. Os espectros de full scan foram adquiridos na faixa de m/z 50 a 1500. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de 10-30 e V a partir de m/z 50 até um valor pouco acima do íon em estudo. Os espectros foram tratados com os softwares Mass Lynx 4.1 e Scalibur 2.0 SR2.

3.5 Validação da Metodologia

3.5.1 Soluções Padrão e calibração

Todas as soluções padrão foram preparadas em 0,2% HCOOH/ACN 80:20. A fração enriquecida de flavonóides (30% MeOH) e a rutina (padrão) foram precisamente pesadas e solubilizadas em balões volumétricos de 25mL para obtenção de soluções stock de 400 µg/mL. A solução stock foi diluída com 0,2% HCOOH/ACN 80:20 para o preparo de uma série de soluções de trabalho com diferentes concentrações.

Após a otimização da metodologia, foi construída uma curva de calibração para a rutina com 6 concentrações diferentes: 4,8 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 24 µg/ml, 32 µg/ml, 40 µg/ml, 48 µg/ml, 64 µg/ml.

Na curva de calibração, aplicou-se métodos estatísticos de regressão linear.

3.6 Encapsulação

Para o preparo da β-CD foi pesado 10µg da mesma e dissolvidos em água Milli-Q. A concentração da solução resultante foi de $1,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida foi diluída para a concentração desejada e realizada à razão molar entre Rutina: β-CD nas proporções 1:1, 1:2, 1:5, 1:10. As soluções resultantes foram deixadas em contato por 48h sob agitação magnética.

3.7 Atividade Antioxidante

3.7.1 Preparo das soluções

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico de pureza.

As soluções preparadas para o desenvolvimento do trabalho descrito utilizaram como solvente majoritário água deionizada (condutividade 18.2 MΩ.cm@25°C) obtidas a partir de purificador Simplicity UV, Millipore.

Para o preparo da solução de Fe^{III} ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi pesado 0,0241g do sal $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck) e solubilizado em uma solução de HCl ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$). A

solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com solução de ácido clorídrico.

A solução estoque de referência de ácido gálico $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi preparada solubilizando-se $0,050 \text{ g}$ de ácido gálico (Sigma) em 50 mL de uma solução tampão acetato ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{COONa}$) $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ com valor de pH ajustado para $4,0 \pm 0,1$. As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a diluição adequada da solução estoque empregando uma solução $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato com pH ajustado para $4,0 \pm 0,1$.

A solução estoque de quercetina (Sigma) 100 mg L^{-1} foi preparada em uma solução hidroalcolica $50\%(v/v)$, após dissolver $5,0 \text{ mg}$ do composto para um volume final de 50 mL .

O reagente de Folin-Denis foi sintetizado como segue: em um balão foram colocados 100 mL de água destilada, a este foram adicionados $10,0 \text{ g}$ de tungstato de sódio (Carlo Erba) e 300 mg de ácido fosfomolibidico (Merck) acrescidos de $5,0 \text{ mL}$ de ácido fosfórico (Vetec) concentrado. A mistura foi deixada em aquecimento em refluxo por cerca de 2 horas. Após esse período, o aquecimento foi desligado, quando a mistura reacional atingiu a temperatura ambiente, adicionou-se água à mistura até um volume final de 200 mL .

Para o preparo da solução de carbonato de sódio (75 mg L^{-1}) foram pesados $7,5 \text{ g}$ do composto Na_2CO_3 (Reagen Quimibrás) e solubilizado em água. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água.

Para o preparo da solução de persulfato de potássio ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi pesado $0,027 \text{ g}$ do sal $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) e solubilizado em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água. Em seguida retirou-se $5,0 \text{ mL}$ desta solução e transferiu-se para outro balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água. A concentração final da solução foi de $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (**DPPH^{••}**) $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 11,83 mg de DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, Sigma) em 50 mL de metanol (SHARMA, BHAT, 2009).

A solução estoque do radical derivado do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (**ABTS^{••}**) 5 mmol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 26 mg de ABTS ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$, Sigma) e 4 mg de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) em 10 mL de água. Após 16 h de incubação ao abrigo da luz, a solução foi diluída para 25 mL com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para $7,4 \pm 0,1$ (ARTS; HOLLMAN, 2005).

A solução de DMPD $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 29,30 mg de DMPD ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{SO}_4$, Aldrich) em 50 mL de uma solução tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH $4,0 \pm 0,1$) e armazenada em frasco âmbar. A solução estoque de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, necessária a realização do teste, foi preparada dissolvendo-se 28,8 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Fluka) em 50 mL em água. A solução de trabalho de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela diluição adequada da solução estoque em uma solução $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Sinth).

3.7.2 Testes para avaliação da atividade antioxidante

3.7.2.1 Método de Folin – Denis (Compostos Fenólicos Totais)

Para realização do ensaio, foram adicionados, a um balão volumétrico de 5,0 mL, 500 μL do reagente de Folin–Denis, 500 μL de Na_2CO_3 (75 g L^{-1}) e 2,0 mL da amostra ou solução de referência. O volume final de 5,0 mL foi completado com água deionizada e aguardou-se 15 minutos. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 770 nm.

O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Ácido gálico foi empregado como referência para obtenção da curva analítica e, a partir dos dados da curva, a concentração total de compostos fenólicos na amostra foi calculada.

3.7.2.2 DPPH– 2,2 difenil-1-picril-hidrazil

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula possui uma cor violeta, caracterizada por uma banda de absorção em 520nm. Quando uma determinada substância doadora de átomos de hidrogênio, entra em contato com a solução de DPPH ocorre uma mudança da cor violeta do radical para amarelo pálido, relativa a hidrazina formada na reação.

Os procedimentos relativos ao método com DPPH procedeu-se da seguinte forma: em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 0,42 mL da solução estoque do radical DPPH^{•+}, 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 30 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 517 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico.

3.7.2.3 ABTS

Para o método empregando o radical ABTS^{•+} procedeu-se de forma semelhante ao DPPH, sendo que em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS^{•+}, 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 10 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico. A curva analítica para ambos os procedimentos empregando DPPH^{•+} e ABTS^{•+} foi construída empregando-se ácido gálico como padrão de calibração. Ácido gálico e a rutina foram empregados como referência para obtenção da curva analítica

3.7.2.4 DMPD

Para a realização dos testes de atividade antioxidante empregando o radical DMPD, é necessário uma etapa de geração de radical que se faz misturando 500 ml da solução de DMPD, 50 ml de tampão acetato 0,1M (pH 5,25) e 0,1ml de cloreto férrico 0,05M. Para o teste procedeu-se da seguinte forma: em um balão volumétrico de 5,00 mL adicionou-se 140µL da solução estoque do radical DMPD, 140µL da

solução $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $2,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , e 500 μl da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água. Aguardou-se 30 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a leitura em 505 nm empregando-se cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico.

O ácido gálico foi empregado como referência para obtenção da curva analítica.

3.8 Testes Biológicos

Os testes biológicos de linfoproliferação foram realizados no laboratório de Farmacologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas da Universidade de Campinas (CPQBA-Unicamp).

3.8.1 Células

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos. Todos os procedimentos abaixo foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB2). Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi mantido à temperatura ambiente, e seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15mL. O volume foi completado para 10mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, NY, USA) e centrifugado a 2000 rpm (rotações por minuto) por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado contendo as células foi ressuspenso cuidadosamente para evitar a formação de grumos, em 5mL de RPMI/SFB. A solução (5mL) celular foi transferida para frascos de manutenção de 25cm³ (T25) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em ambiente úmido.

3.8.2 Cultivo celular

As células foram mantidas em frascos de 25cm³, com 5mL de meio RPMI/SFB e repicadas quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência (ou seja, uma vez por semana) em meio RPMI/SFB. Para as células em suspensão (K562 - leucemia) o repique era realizado pela retirada de um volume previamente determinado de um frasco de manutenção e transferido para outro,

sendo completado o volume para 5mL, no caso de frascos de culturas de 25cm² (T25) e 10mL para os frascos de 75cm² (T75). A diluição utilizada foi dependente das características de cada linhagem celular ou ainda dos objetivos dos experimentos realizados. Estes frascos foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido. Para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessária a tripsinização, ou seja, o despreendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foram adicionados 500µL de tampão de Hank's (Sigma Chemical® Co, St Louis, MO, USA) banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 500µL de tripsina-EDTA (2,5g/L) a 37°C. O frasco foi incubado de 25 a 30 segundos, sendo logo em seguida banhado com RPMI/SFB. A partir deste ponto, quando as células se apresentaram em suspensão, foi utilizado o mesmo procedimento para as células leucêmicas.

3.8.3 Ensaio para a determinação da atividade anticâncer dos extratos, frações e substâncias.

A avaliação da atividade anticâncer foi realizada em nove linhagens tumorais humanas, sendo plaqueados 100µL de células, em placas de 96 compartimentos, em meio RPMI/SFB/gentamicina (50µg/mL), nas suas respectivas densidades de inoculação (**tabela 2**), determinadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP. Cada placa continha apenas uma linhagem, sendo possível a avaliação de cinco amostras distintas, exceto uma placa de controle celular (T0). Antes da adição das amostras, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 3 - Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios anticâncer.

Linhagem Celular	Nome	Densidade da Inoculação
Pulmão	NCI-H460	4×10^4 células/mL
Mama	MCF-7	6×10^4 células/mL
Ovário com fenótipo resistência multidrogas	NCI-ADR/RES	5×10^4 células/mL
Cólon	HT-29	4×10^4 células/mL
Próstata	PC-3	5×10^4 células/mL
Melanoma	UACC-62	5×10^4 células/mL
Ovário	OVCAR-3	7×10^4 células/mL
Renal	786-O	$4,5 \times 10^4$ células/mL
Leucemia	K-562	4×10^4 células/mL

Fonte: Autora (2012).

3.8.4 Diluição das amostras

O extrato bruto de *C. coriaceum*, sua fração enriquecida de flavonóides e a substância marcadora foram submetidos ao ensaio de atividade antiproliferativa sendo diluídos em dimetilsulfóxido[®] (DMSO) (Sigma Chemical Co , St Louis, MO, USA) na concentração de 0,1g/mL, resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Após a diluição, 100µL do extrato ou fração a ser testado foram adicionados à placa de 96 compartimentos, exceto na T0 (placa controle), nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. Neste momento, também se realizou a fixação da placa T0 pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Merck , Darmstadt, Germany) determinando assim, a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas. Os desenhos das placas controle (T0) e placa tratada estão ilustrados nas **Figuras 5 e 6**. As demais placas foram incubadas por 48 horas e, após este período, o experimento foi interrompido através da fixação das células pela adição de 50µL de TCA a 50%, e incubação por 1 hora a 4°C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

3.8.5 Determinação da citotoxicidade das amostras

Para determinar a quantidade de células após 48 horas de tratamento, as células fixadas foram coradas com 50µL de sulforrodamina B (SRB) (Sigma Chemical Co , St Louis, MO, USA) (corante protéico) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, por 30 minutos a 4°C. As placas foram lavadas por 3 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150µL de Trizma Base (10µM) (Sigma Chemical Co , St Louis, MO, USA). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em leitor de microplacas a 540nm. A sulforrodamina B é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN et al.,1990).

3.8.6 Análise dos resultados

Com os dados de absorbância foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração de extrato ou fração. Além disso, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresentou IC.

Se $T \geq T_0$ e $< C$, a droga foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$.

Se $T < T_0$ a droga foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$ Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T_0 é o controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Com esses resultados foram produzidos gráficos relacionando a concentração da amostra e seu efeito. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente, preferencialmente apresentando seletividade para os tipos celulares.

Através da regressão sigmóide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento, são calculados os valores TGI (*total growth inhibition*), ou seja, concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. Esses valores são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciando a seletividade

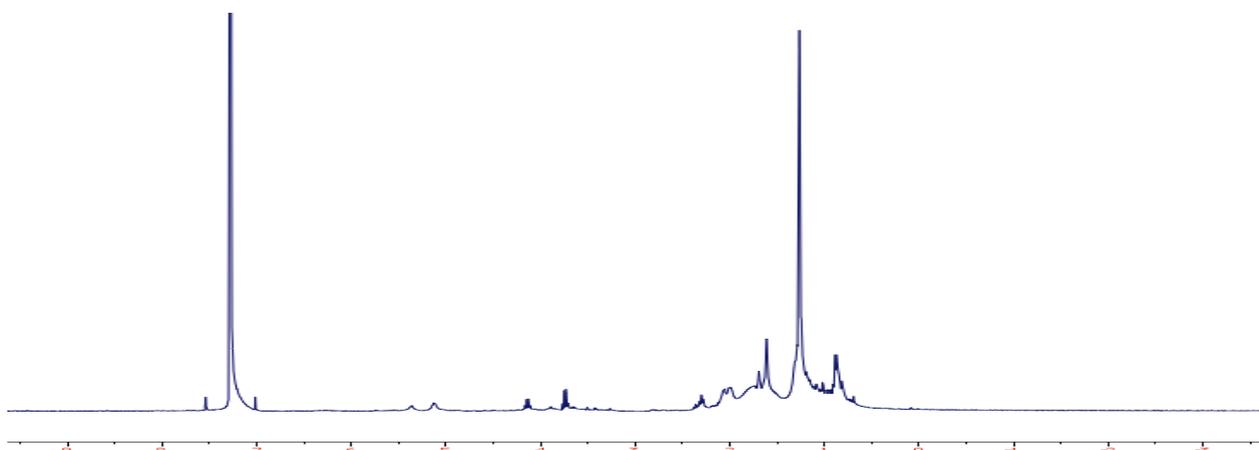
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos relacionados a produtos naturais tem ganhado nos últimos tempos uma importante ferramenta de análise, os *fingerprints*. Estes podem ser obtidos através das mais variadas técnicas: por cromatografia, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear. Com estas análises podemos obter o perfil de um extrato bruto antes mesmo de começarmos sua descomplexação, ou seja, antes de obter frações mais purificadas deste extrato.

Para se ter uma ideia da composição química do extrato bruto das raízes de *Camptosema coriaceum* Benth, foi realizada a análise do extrato por RMN ^1H (**figura 8**). Esse tipo de análise funciona como um *fingerprint* da amostra fica claro que não dá para realizar identificações estruturais de moléculas presentes no extrato, mas se tem uma ideia qual classe de substancia é predominante: triterpenos, flavonóides, saponinas, por exemplo.

O espectro de RMN ^1H do extrato bruto etanólico das raízes de *C. coriaceum*, mostrou maior intensidade de sinais na região entre 1 e 2 ppm. Sinais nestas regiões sugerem a presença de grupamentos $-\text{CH}_2$. No caso dos produtos naturais, podemos sugerir que há uma alta concentração de triterpenos e/ou outras substâncias apolares no extrato bruto. Outros sinais podem ser observados, como os que aparecem na região entre 6 e 7 ppm, sugerindo presença de substâncias aromáticas, mas em menor intensidade.

Figura 8 - Espectro de RMN H do extrato bruto em etanol das raízes de *C. coriaceum*, Bruker400 MHz, em CDCl_3



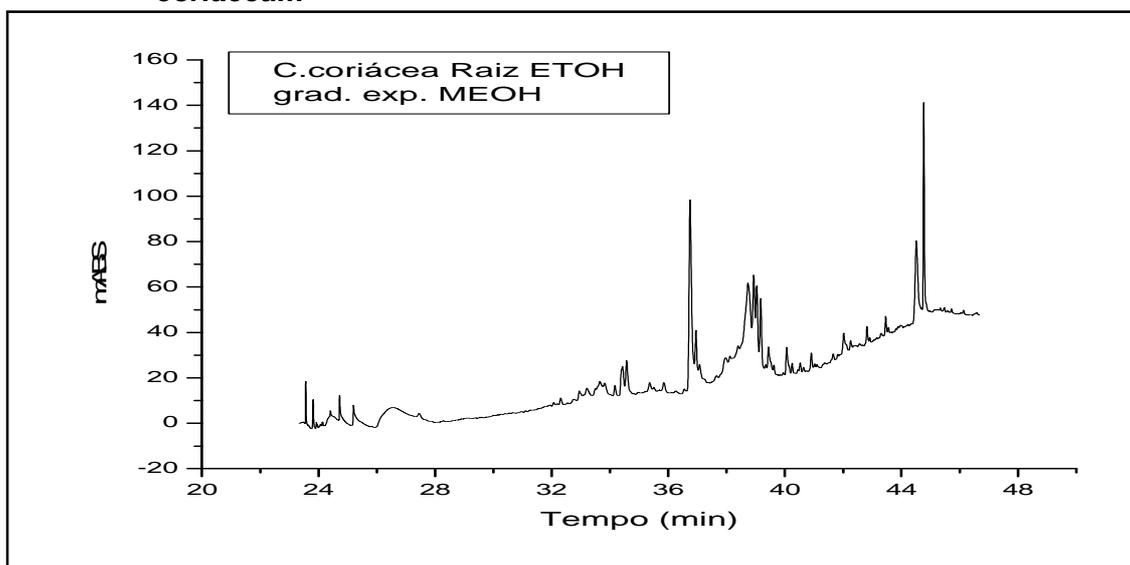
Fonte: Autora (2011)

Para avaliar a complexidade química, ou seja, a quantidade e a natureza química (lipofílica/hidrofílica) das substâncias presentes no extrato bruto etanólico de *C. coriaceum*, foi realizado estudo usando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo a amostra um extrato vegetal, este trabalho tende a ser mais laborioso. A grande complexidade química contida em amostras desta natureza - de substâncias altamente polares como açúcares e flavonóides glicosilados a substâncias apolares como triterpenos - dificulta o processo de separação.

Para contornar este problema a primeira opção é utilizar gradiente de solventes. O uso da eluição gradiente em condições de ampla faixa de força da fase móvel é tido como exploratório e pode ser usado de modo a fornecer um cromatograma *fingerprint* (impressão digital) da amostra em análise (CASS, DEGANI, 2001). O cromatograma *fingerprint* obtido no HPLC é a melhor maneira de identificar a fase móvel mais eficiente para sua separação.

Dessa forma, foi obtido o cromatograma *fingerprint* das raízes de *C. coriaceum* (**figura 9**), empregando água deionizada (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente teve início com 5% de B e variou até 100%B em 60 minutos. No *fingerprint* podemos observar a presença de substâncias ao longo de todo o cromatograma, desde as mais polares (início) até as mais apolares, que eluíram no final da análise.

Figura 9 - Gradiente exploratório do extrato bruto em etanol das raízes *Camptosema coriaceum*

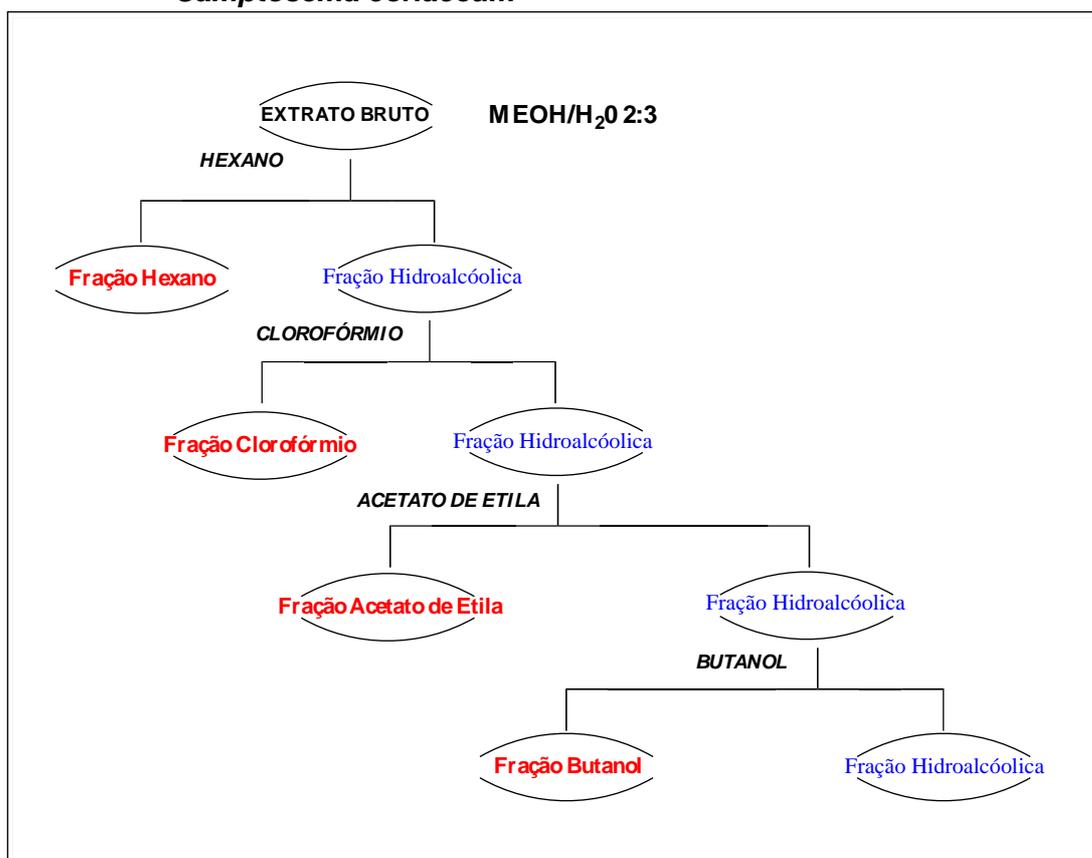


Fonte: Autora (2011)

4.1 Partição líquido-líquido

O passo seguinte à análise do extrato bruto foi a obtenção de frações a partir de solventes específicos. O método escolhido foi a partição líquido-líquido, usando solventes com grau crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, conforme descrito no esquema abaixo, **figura 10**.

Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de *Camposema coriaceum*



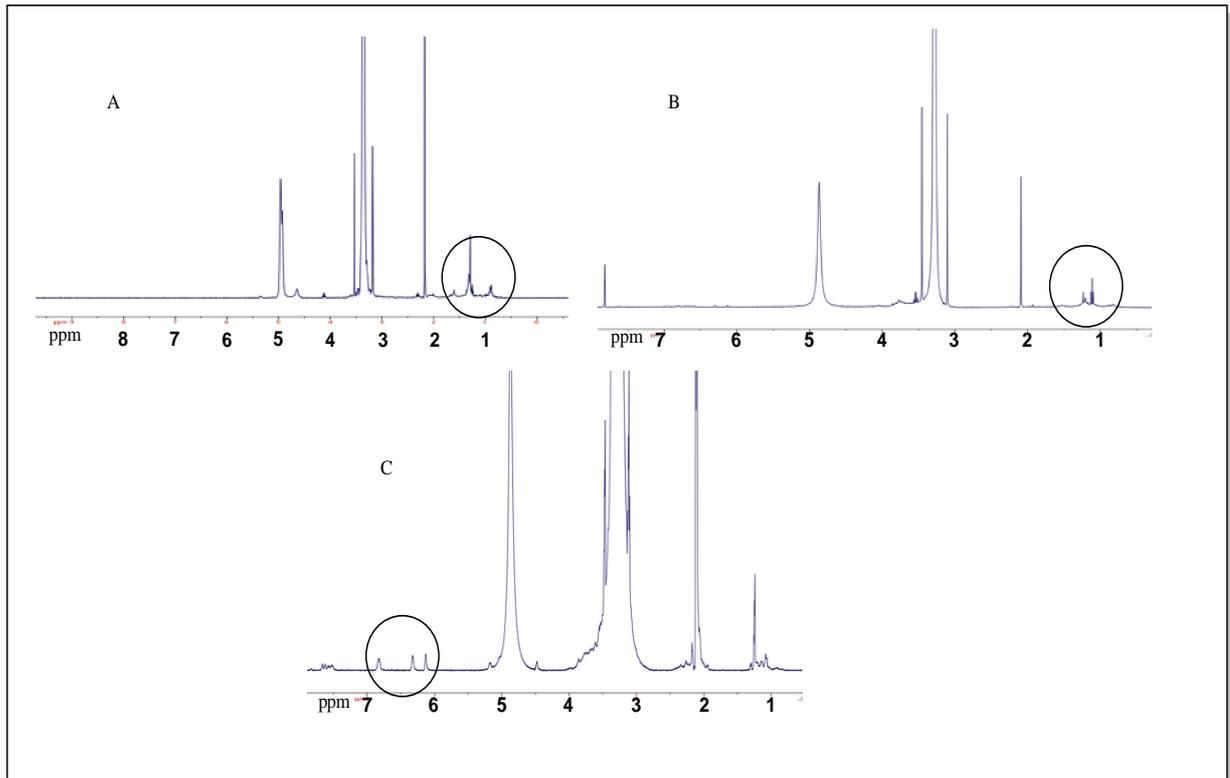
Fonte: Autora (2011)

Todas as frações obtidas na partição líquido-líquido foram analisadas por RMN ^1H e CLAE-FR, seguindo os mesmos procedimentos aplicados ao extrato bruto.

Através dos espectros de RMN ^1H podemos diferenciar as frações obtidas no processo de partição. Como esperado encontramos na fração hexânica apenas sinais que sugerem a presença de triterpenos, ou seja presença de sinais com deslocamento na região entre 1-2 ppm. A fração clorofórmio ainda apresentou sinais na região entre 1-2 ppm, porém bem menos intensos em comparação com a fração

hexânica. Na fração acetato de etila observamos sinais bem intensos nos intervalos de δ 3 – 4 e δ 6 – 7ppm, sugerindo a presença açúcares e de anéis aromáticos, em produtos naturais é indicativo de flavonóides glicosilados.

Figura 11 - Espectros de RMN 1H das frações obtidas na partição líquido-líquido: (A) hexano; (B) clorofórmio; (C) acetato de etila

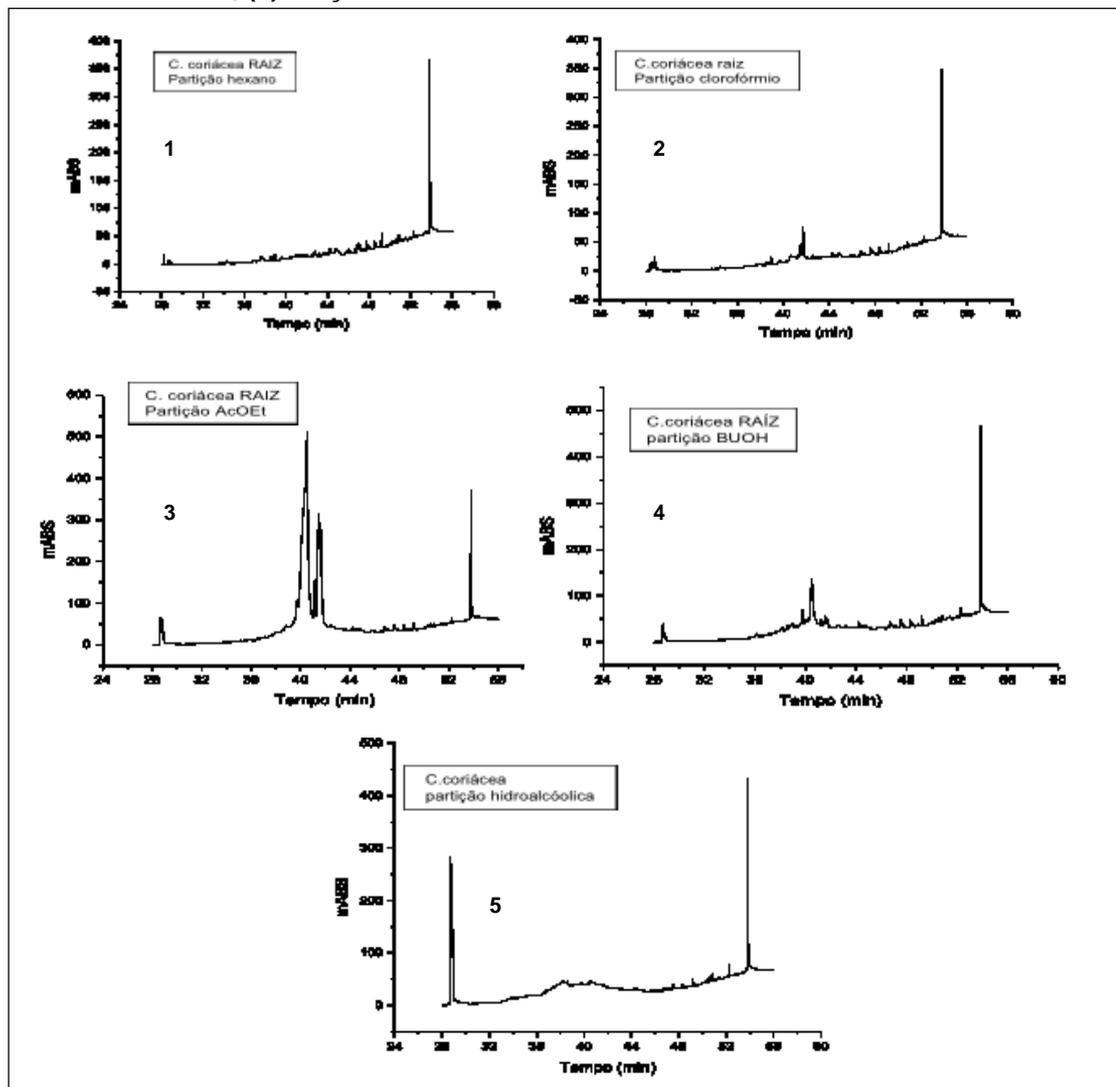


Fonte: Autora (2011).

O *fingerprint* das frações foi realizado nas mesmas condições do extrato bruto: gradiente linear com 5% de B até 100%B em 60 minutos (B=MeOH). A análise em HPLC é uma etapa muito importante no processo do conhecimento de um extrato vegetal, visto que fornece um perfil químico de todos os constituintes presentes no extrato. De posse deste cromatograma podemos traçar estratégias de isolamento, otimizando gasto com solventes, evitando o isolamento da mesma substância diversas vezes, e principalmente: tempo.

Na **figura 12** temos os *fingerprints* de todas as frações obtidas no processo de partição do extrato bruto das raízes de *C.coriaceum*. A figura ilustra o que foi mencionado acima, da importância do uso do HPLC nas separações de extratos de plantas.

Figura 12 - Exemplo de cromatograma das frações obtidas na partição líquido-líquido. (1) Fração hexano, (2) Fração clorofórmio, (3) Fração acetato de etila, (4) Fração butanol, (5) Fração hidroalcoólica.



Fonte: Autora (2011)

A fração hexânica, concordando com respectivo espectro de RMN ^1H , só apresentou substâncias apolares, que eluíram com tempo de retenção (t_R) próximo aos 60 minutos, no final da análise. Ou seja, essas substâncias formaram uma forte ligação com a fase estacionária C_{18} apolar.

A fração clorofórmica também apresentou as bandas referentes a substâncias apolares como observado na fração hexânica. Além destas foram observadas bandas menos intensas no intervalo entre 20 e 40 minutos da análise, estando neste intervalo com a composição da fase móvel entre 30% e 60%B (MeOH) e com absorção em 350 nm, indicando presença de compostos fenólicos.

Na fração acetato de etila, estas bandas apresentadas na fração clorofórmio, com t_R intermediário (20 – 40 minutos) e com absorção no UV em 350 nm se mostraram bem mais intensas. Juntando os dados mostrados no espectro de RMN 1H com os obtidos nas análises cromatográficas, na fração acetato de etila sugerimos um alto teor de substâncias fenólicas, mais especificamente flavonóides glicosilados.

A fração butanólica também apresentou bandas intermediárias semelhantes à fração acetato de etila, todavia em concentração bem menor.

Contrariando as expectativas, na fração hidroalcoólica além das bandas que eluíram no início do cromatograma (substâncias altamente polares), a banda principal da fração hexânica (60 min), correspondente a uma substância apolar, também foi observada na fração hidroalcoólica. E em todas as outras frações analisadas. Esta banda, provavelmente, é uma substância tão abundante no extrato que se faz presente em todas as frações, possivelmente um triterpeno. Não curiosamente o espectro de RMN 1H do extrato bruto (**figura 8**), mostra apenas sinais de substâncias apolares, mesmo tendo em seu conteúdo substâncias fenólicas, flavonóides glicosilados e açúcares.

Neste trabalho foi escolhida a opção em se trabalhar com a fração acetato de etila, em virtude de seu conteúdo de flavonóides e flavonóides glicosilados, utilizando-se de suas propriedades antioxidantes e todos os seus efeitos benéficos a saúde humana, de modo a isolar, quantificar, testar e formular um produto obtido de espécies vegetais ricas nesse tipo de substância.

4.2 Isolamento de substâncias da Fração Acetato de Etila

A fração acetato de etila (AcOEt) foi a escolhida para estudos fitoquímicos em virtude de seu alto teor de compostos fenólicos como foi evidenciado através das análises de espectroscópicas.

4.2.1 Cromatografia de Fase Reversa da fração AcOEt: **Coluna C₁₈**

O primeiro tratamento submetido à fração AcOEt foi a separação de grupos de constituintes em uma coluna de sílica modificada (C₁₈), obtida em nosso laboratório (ver experimental). O objetivo desta separação cromatográfica foi obter sub-frações mais simples para análise e posterior isolamento de substâncias através do HPLC. As sub-frações eluídas na coluna C₁₈ foram: 100%H₂O, 30%MeOH, 60%MeOH, 100%MeOH, nomeadas de acordo com o solvente usado para obtê-las.

Cada uma destas frações foram submetidas a análises de RMN ¹H eHPLC.

A fração 100%H₂O, de coloração escura, concentra quase que a totalidade de açúcares simples presentes na fração acetato de etila. As análises deRMN ¹H apresentou sinais característicos de flavonóides glicosilados. É a fração de maior rendimento.

A fração 30%MeOH, de coloração amarelo escuro, possui aspecto de cristal. O espectro deRMN ¹H se apresentou mais limpo em relação as fração 100% H₂O, com sinais dos hidrogênios aromáticos, em δ 6 e 7 ppm, mais intensos e definidos, e os sinais entre δ 3 e 4 ppm apresentando os desdobramentos característicos de açúcares.

Surpreendentemente, a fração 60%MeOH voltou a apresentar coloração mais escura, semelhante a primeira fração. Porém seu espectro de RMN ¹H mostrou sinais limpos, relativos a flavonóides glicosilados, contrastando com sua aparência. Na análise em CLAE foi observado que as substâncias que eluíram no início da análise tiveram maior intensidade no sinal do detector, sugere-se que estas substâncias muito polares, solúveis em água, sejam açúcares simples, justificando a coloração escura da fração.

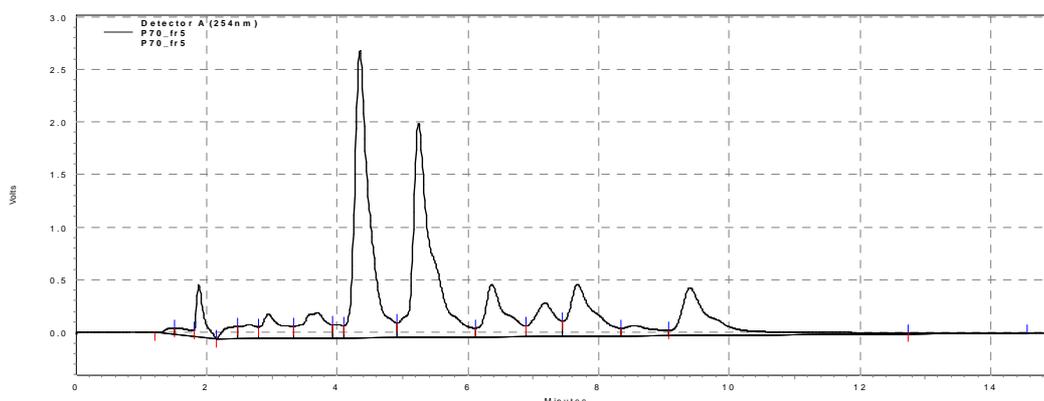
A fração 100%MeOH foi de pouco rendimento, como o objetivo do trabalho é a busca de flavonóides, esta foi desconsiderada.

4.2.2 Otimização das condições de HPLC

a) Composição da fase móvel

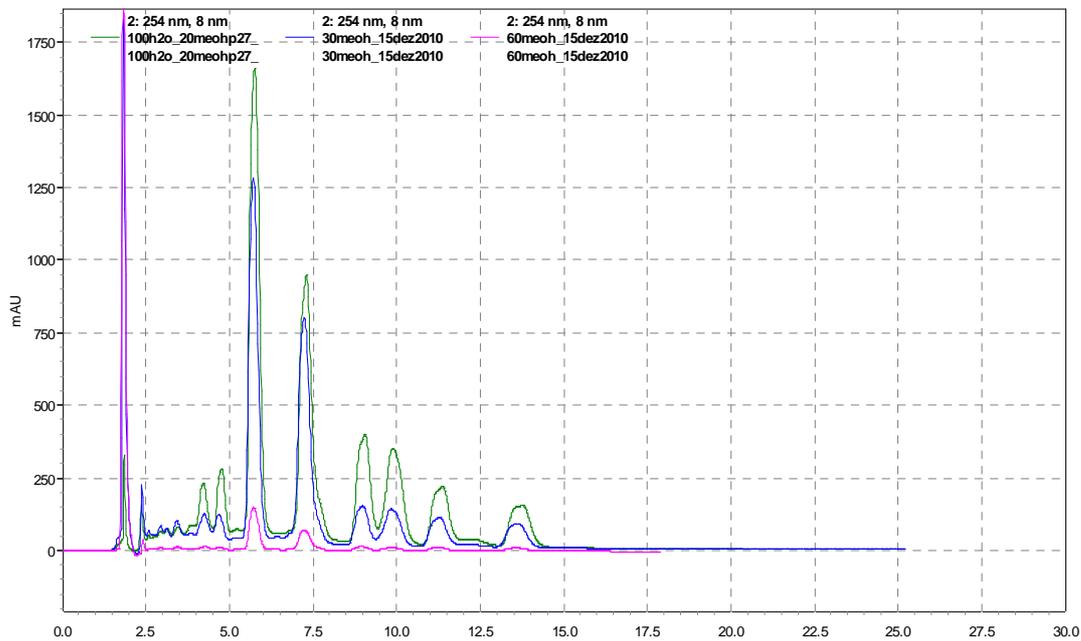
Observando os cromatogramas apresentados até o momento, podemos observar uma baixa resolução entre as bandas cromatográficas. Sendo necessário um ajuste de fase móvel a fim que se torne ideal para a separação dos flavonóides presentes nas amostras. Para análise de flavonóides é necessário um pH ácido devido à interação entre a hidroxilas fenólicas e a fase estacionária, sendo este efeito da acidificação da fase móvel na separação é o primeiro fator a ser avaliado. A composição da fase móvel com água com pH entre 2 – 3 e metanol e/ou acetonitrila foi testada. Após análises foi verificado que, usando acetonitrila como solvente orgânico as bandas cromatográficas apresentaram melhor resolução. A fase móvel inicial mais adequada para a separação foi: 0.2% de ácido acético em água/acetonitrila 80:20 (v/v). Abaixo, nas **figuras 13 e14**, exemplo do emprego do ácido na composição da fase móvel para separação de flavonóides. No cromatograma da **figura 15** a fase móvel consistia apenas de água e solvente orgânico (metanol), dessa forma as bandas cromatográficas não apresentaram resolução adequada para análise e/ou isolamento dos constituintes. Ao passo que é feito o ajuste da fase móvel, nesse caso adicionando ácido fórmico no solvente aquoso e substituindo o metanol por acetonitrila, é observada uma drástica mudança no perfil cromatográfico da mesma fração analisada, **figura 14**.

Figura 13 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 70:30 H₂O/MeOH, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 254 nm.



Fonte: Autora (2011).

Figura 14 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 80:20 0,2%HAc/ACN, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 254 nm.



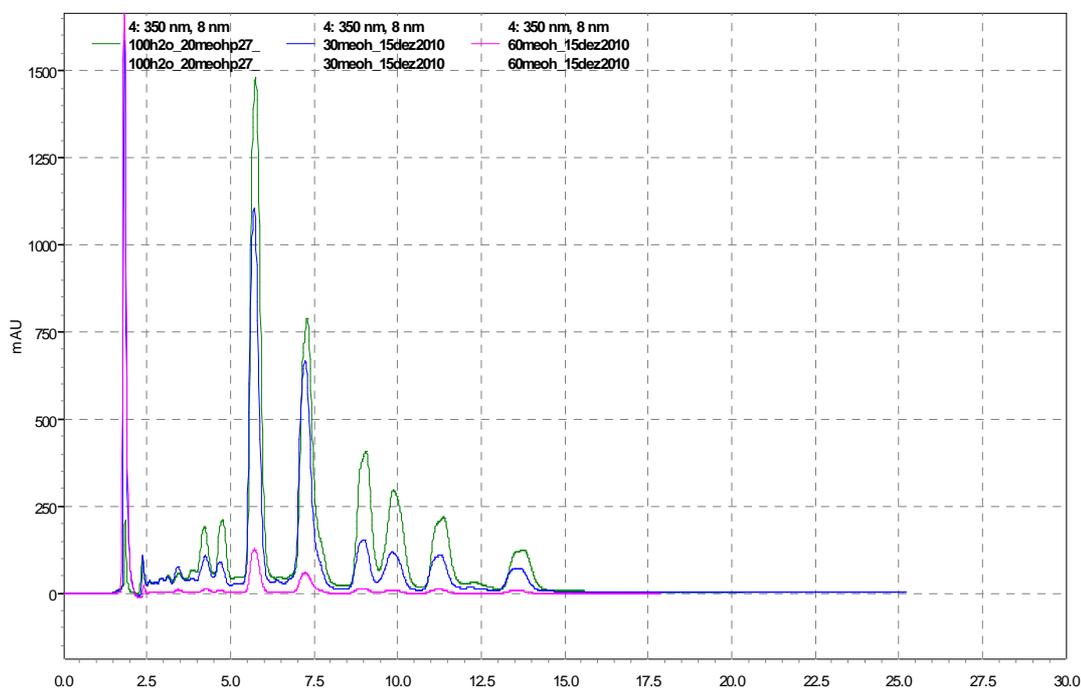
Fonte: Autora (2011)

b) Otimização do diodo array detector (DAD)

Flavonóides contém dois anéis aromáticos em diferentes posições e assim possuem duas absorções máximas (RIJKE et. al., 2006), que ficam entre os intervalos de 254-277 nm e 312-371 nm. Para garantir a sensibilidade para todos os analitos e tornar o processo de validação mais fácil, a detecção foi monitorada em dois comprimentos de onda: 254 nm e 350 nm.

A análise cromatográfica através da CLAE das frações obtidas da coluna C₁₈, revelou grande similaridade química entre elas. Provavelmente a maioria dos constituintes são comuns em todas elas.

Figura 15 - Exemplo de cromatograma da fração 30%MeOH. Fase móvel: 80:20 0,2%HAc/ACN, 1,0mL/min, coluna ShimPack 15x0,46cm, detecção em 350 nm



Fonte: Autora (2011).

4.3 Tratamento da fração 100%H₂O

4.3.1 Hidrólise ácida: Busca das Agliconas

A fração 100%H₂O foi a eleita para o experimento de hidrólise pois apresentou dois requisitos importantes: fração de maior rendimento e presença de flavonóides atestada por RMN ¹H.

Com a fração das agliconas foram realizadas algumas separações usando coluna Sephadex, mas infelizmente não foi possível isolamento. A segunda opção obviamente foi o HPLC.

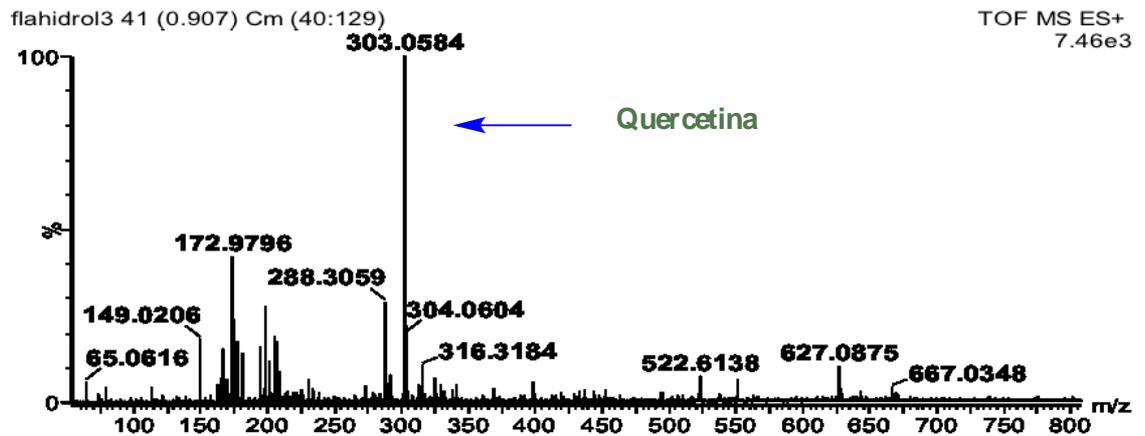
4.3.2 Isolamento de Agliconas

Para o isolamento das agliconas foi empregado uma coluna preparativa Shim Pack ODS SHIMADZU 250 x 20 mm. Foi realizada eluição gradiente com fase móvel inicial 0.2%HAc/acetoneitrila 80:20 até 50%B em 30 minutos, com fluxo de 10mL/min. Foi possível o isolamento de 2 agliconas: quercetina e canferol. Como são

substâncias já bem conhecidas os espectros de RMN e massas foi de fácil interpretação.

Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo de ionização - ESI(+)-MS - a primeira aglicona gerou o pico com m/z [M+H] 303, referente a quercetina.

Figura 16 - Espectro de massas ESI da quercetina. m/z [M+H] 303.

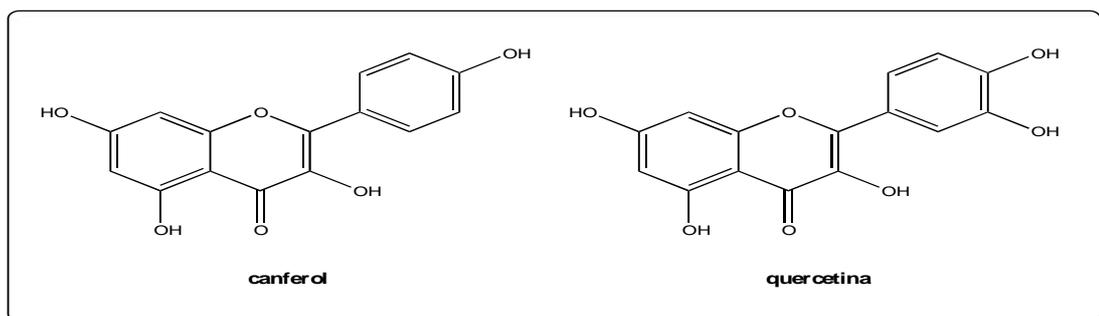


.Fonte: Autora (2011).

O núcleo aglicona quercetina, é um dos flavonóides mais comumente encontrados em espécies vegetais, juntamente com o canferol e a miricetina.

A segunda aglicona identificada foi o canferol, com sinal de massa m/z [M+H] 287.

Figura 17 - Estruturas das agliconas canferol e quercetina isoladas após hidrólise ácida.



.Fonte: Autora (2011)

4.4 Da fração 30% MeOH

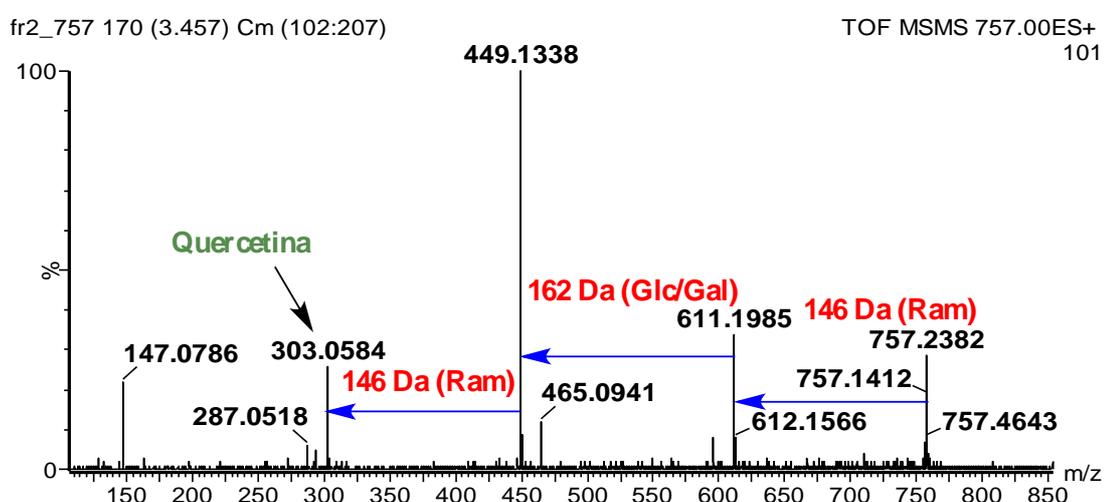
Na fração 30% MeOH o objetivo foi isolar e identificar os dois flavonóides glicosilados mais abundantes – possíveis marcadores - e todos os outros passíveis de identificação em virtude de suas quantidades. Foi usada a mesma condição cromatográfica empregada para o isolamento das agliconas.

Nesta fração, foram isolados 6 flavonóides glicosilados (*Fr2*, *Fr3*, *Fr5*, *Fr6*, *Fr7* e *Fr8*) e 1 aglicona (*30MeOH 8*).

a) Substância Fr2

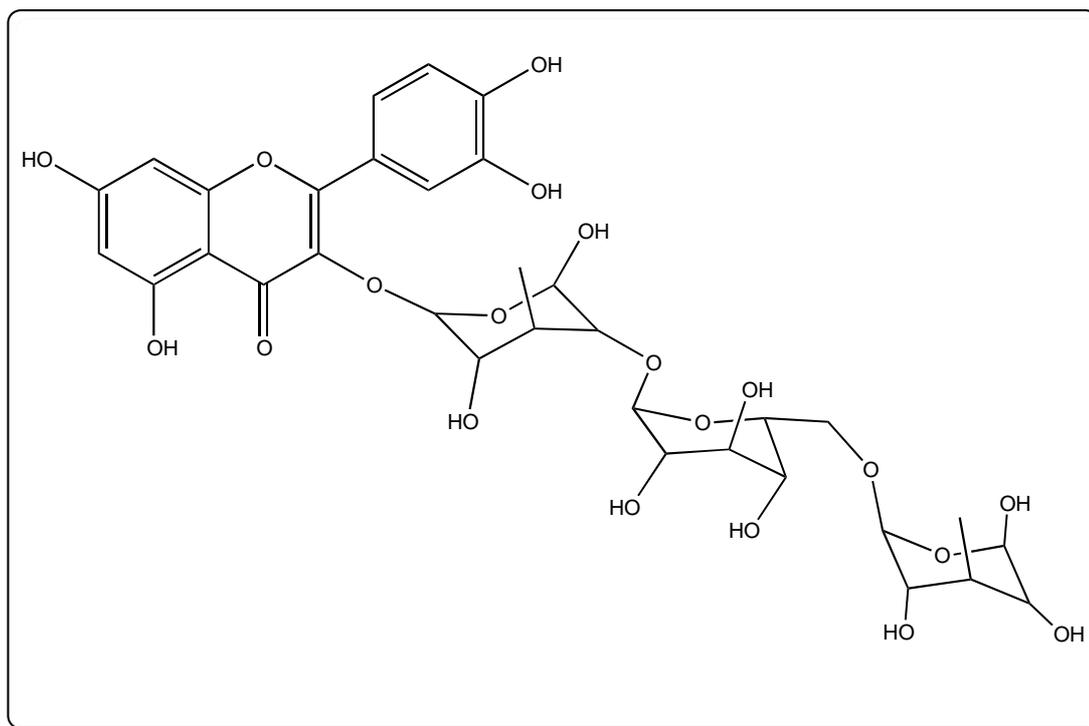
A substância Fr2 foi identificada através de espectrometria de massas de alta resolução e RMN 400MHz 1D e 2D. O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular com m/z [M+H] 757 e fragmentos de m/z [M+H] 611, 449, 303 como mostrado no espectro da **figura 20**. De acordo com dados da literatura e com o perfil de fragmentação, estes espectros indicam a presença do flavonóide glicosilado *Ramp*-(1→6)-[*Ramp*-(1→2)]-*Galp*-(1→3)-*quercetina*, uma vez que os íons fragmentos coincidem com a proposta de fragmentação da estrutura mostrada na **figura 21**.

Figura 18 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z [M+H] 757.



Fonte: Autora (2011).

Figura 19 - Ramp-(1→6)-[Galp-(1→2)]-Ramp-(1→3)-quercetina

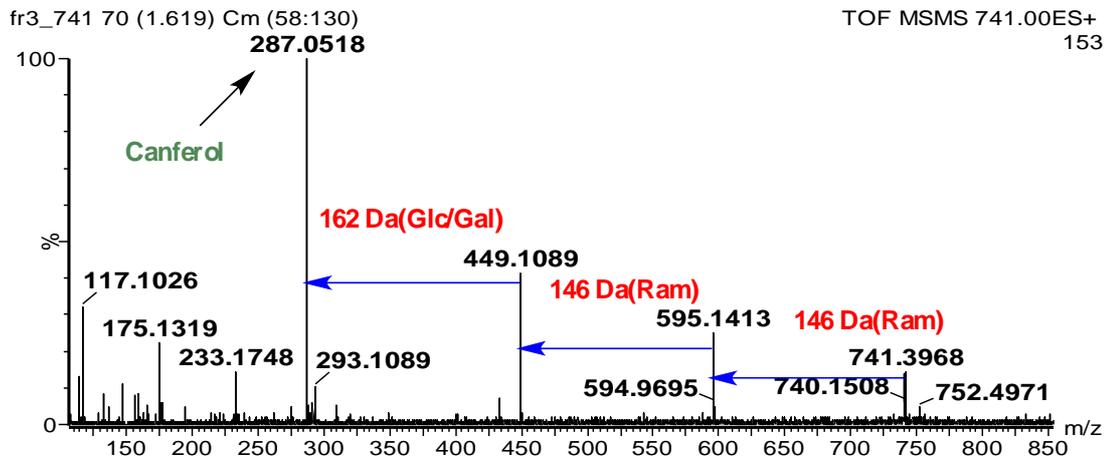


Fonte: Autora (2011).

b) Substância Fr3

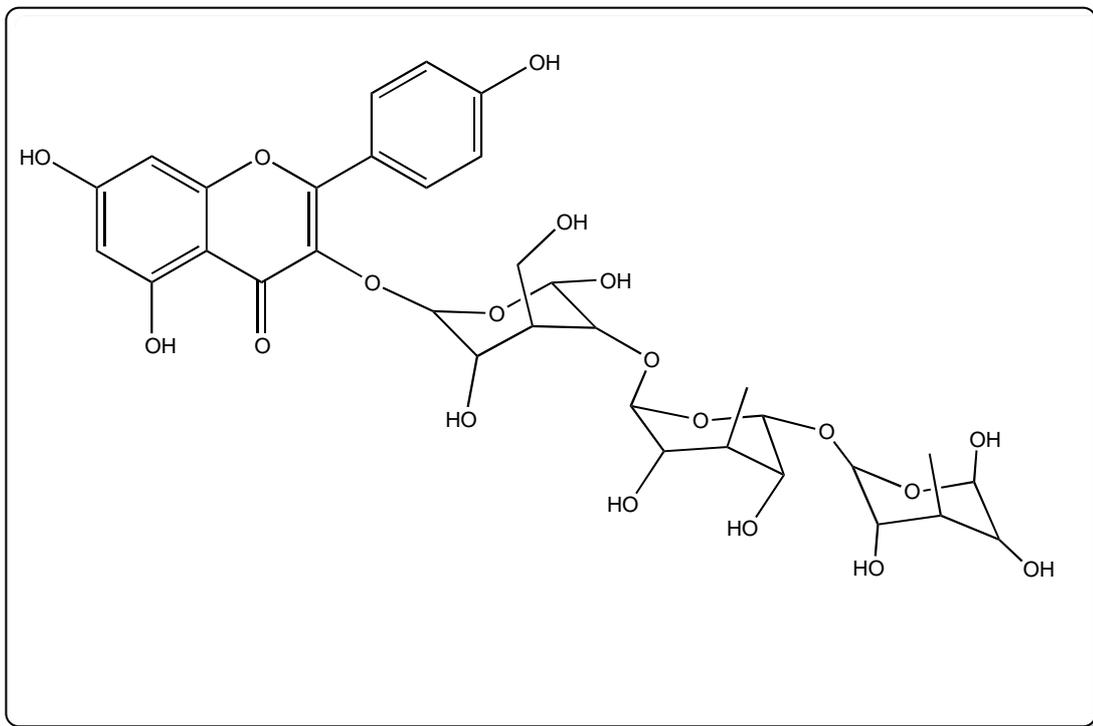
A substância foi identificada através de espectrometria de massas de alta resolução e RMN 400MHz 1D e 2D. O espectro de massas ESI(+)-MS apresentou o pico do íon molecular com m/z $[M+H]$ 741 e através do MS/MS obtivemos os fragmentos de m/z $[M+H]$ 595, 449, 287. Este perfil de fragmentação refere-se a perda consecutiva de 3 açúcares: ramnose, ramnose e glicose/galactose. Sugere-se portanto, com base em dados da literatura, que a substancia Fr3 seja o flavonóide glicosilado Ramp-(1→6)-[Ramp-(1→2)]-Galp-(1→3)-canferol, **figura 23**.

Figura 20 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z $[M+H]^+$ 741.



Fonte: Autora (2011).

Figura 21 - Ramp(1→6)-[Ramp(1→2)]-Galp(1→3)-canferol

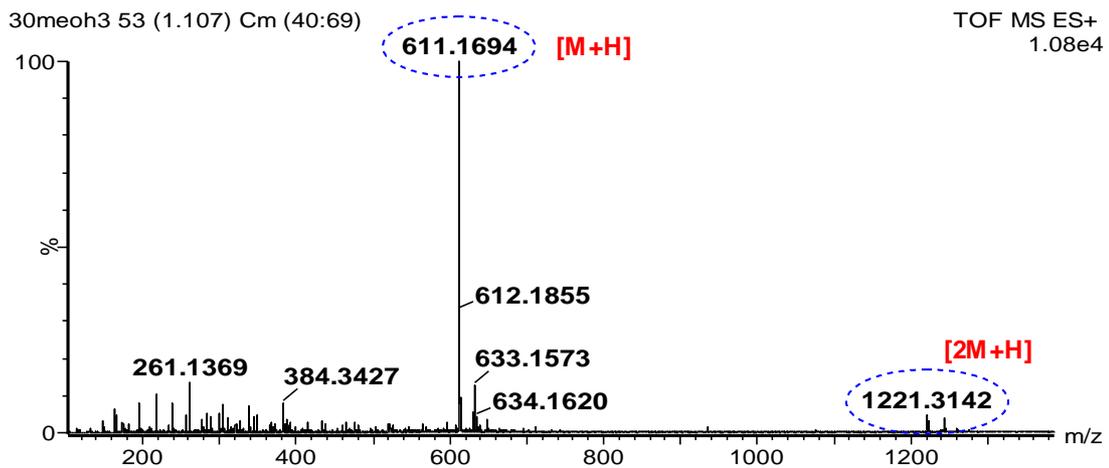


Fonte: Autora (2011).

c) Substância Fr5

O espectro de massas de alta resolução da substância Fr5, mostra o pico do íon molecular com massa de m/z $[M+H]$ 611.1694, como observado no espectro de massas full-scan da substância, **figura 22**.

Figura 22 - Espectro de massas ESI(+)-MS full scan da substância de m/z $[M+H]$ 611.

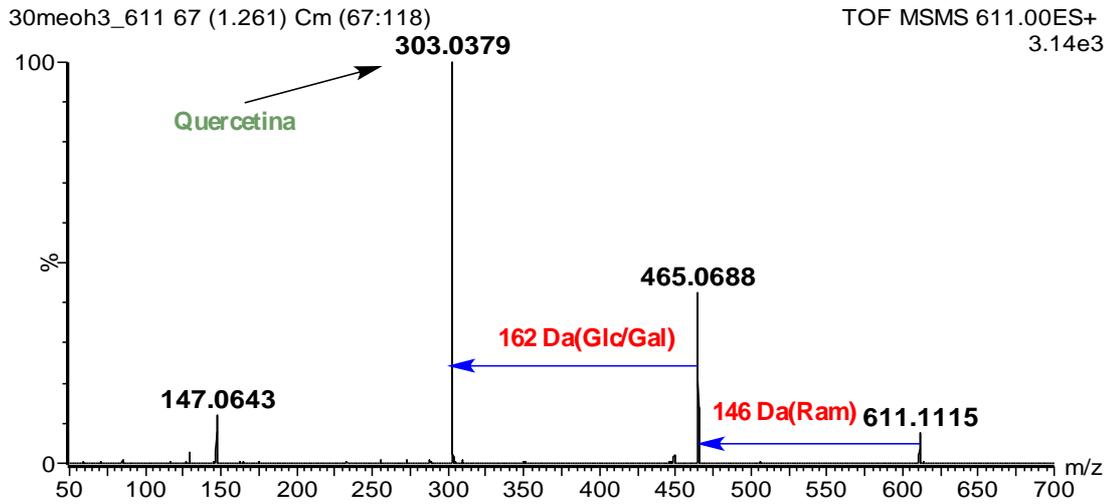


Fonte: Autora (2011).

A fragmentação do íon molecular m/z $[M+H]$ 611, gerou os seguintes íons filhos: m/z 465 (referente a perda de uma ramnose), m/z 303 (referente a perda de uma galactose/glicose, identificando a aglicona quercetina).

Com base nessas informações dos espectros de massas podemos dizer que a molécula analisada se trata do flavonóide glicosilado $Ramp-(1\rightarrow6)-Glc-(1\rightarrow3)-$ quercetina. Também conhecido como rutina.

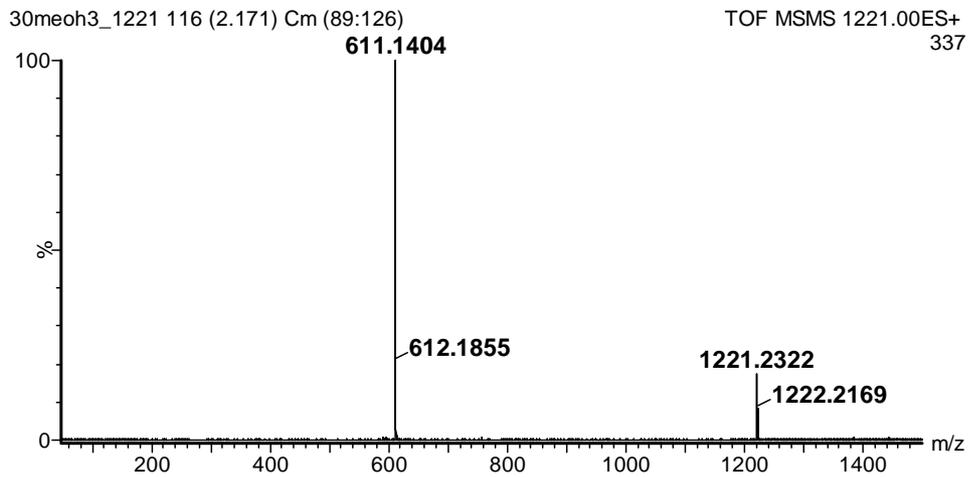
Figura 23 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do glicosídeo de m/z [M+H] 611.



Fonte: Autora (2011).

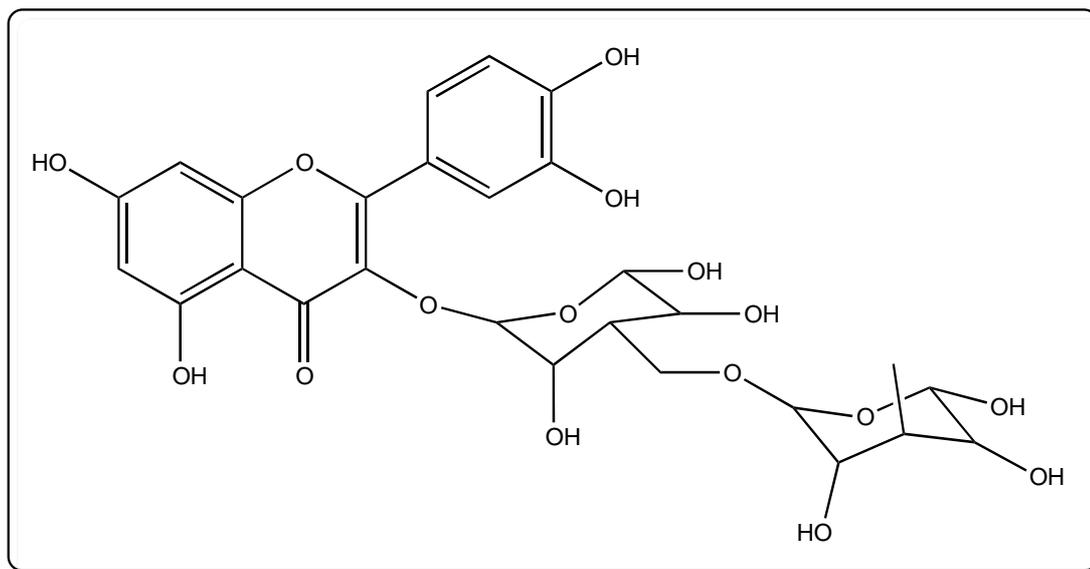
A pureza da molécula pode ser observada no espectro pela presença de dímero protonado de massa m/z 1221, **figura 24**.

Figura 24 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação do íon m/z [M+H] 1221.



.Fonte: Autora (2011).

Figura 25 - *Ramp*-(1→6)-*Glc**p*-(1→3)-quercetina (rutina)



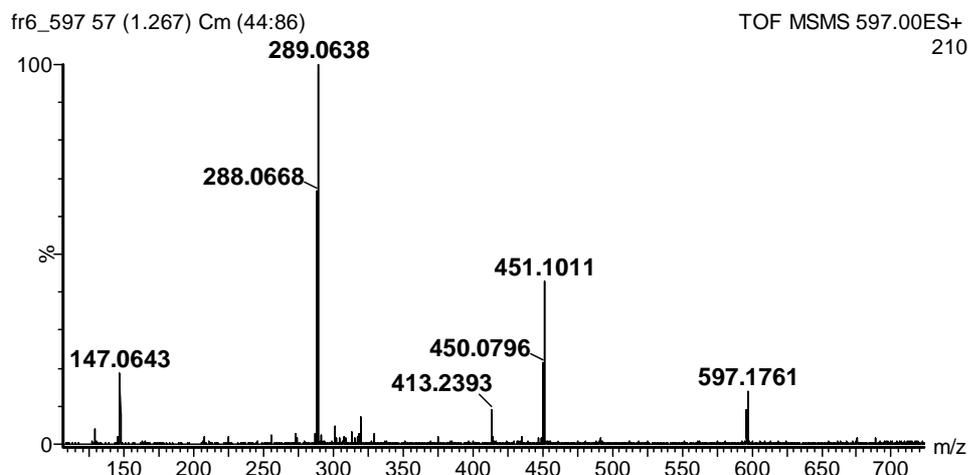
Fonte: Autora (2011).

A rutina, foi escolhida como marcador da fração 30%MeOH. A esta fração daremos o nome de “fração enriquecida em flavonóides”. O passo seguinte é a quantificação da rutina na fração e posteriormente o desenvolvimento de um método de validação para este flavonóide.

d) Substância Fr6

A substancia Fr6 apresentou m/z $[M+H]$ 597.1761. Esta molécula ao ser fragmentada gerou os íon de m/z 451 (após a perda de uma ramnose) e m/z 289 (após a perda de 162 Da, ou seja glicose/galactose). Este íon de massa m/z 289 é referente a catequina.

Figura 26 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z [M+H] 597.

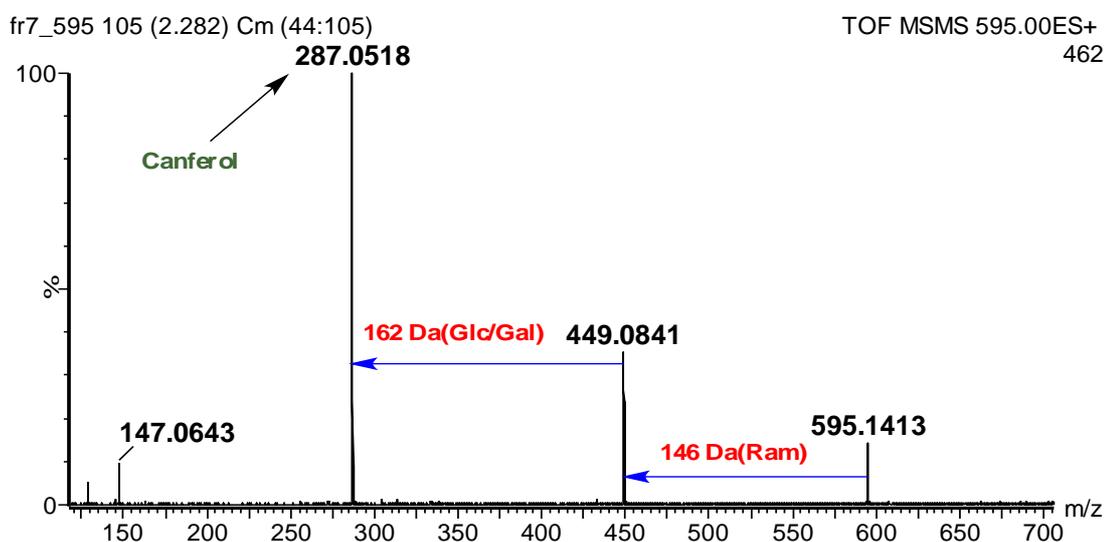


Fonte: Autora (2011).

e) Substância Fr7

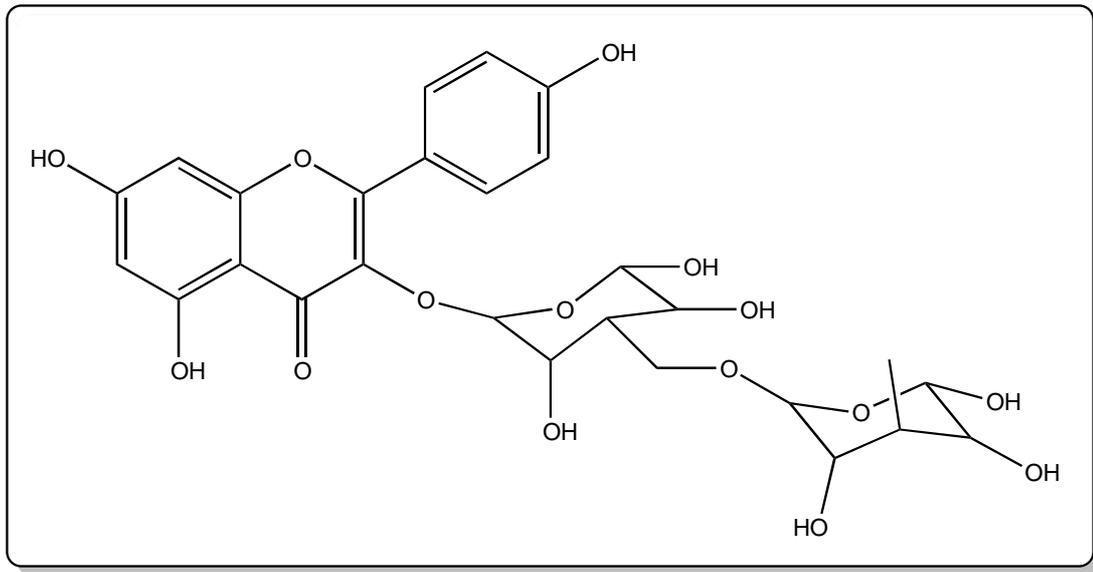
A substância Fr7 apresentou em seu espectro de massas o pico do íon molecular com massa $m/z[M+H]$ 595. A primeira quebra é de uma unidade de açúcar de massa $m/z[M+H]$ 147, uma ramnose. O sinal seguinte é o $m/z[M+H]$ 287, que identifica o núcleo canferol e foi obtido após a perda de uma hexose, podendo ser glicose ou galactose. Para obter a identidade da hexose é necessário recorrer a RMN 2D.

Figura 27 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z [M+H] 595.



Fonte: Autora (2011).

Figura 28 - Ramp-(1→6)-Glc-(1→3)-canferol, uma das possíveis conformações da substância Fr7

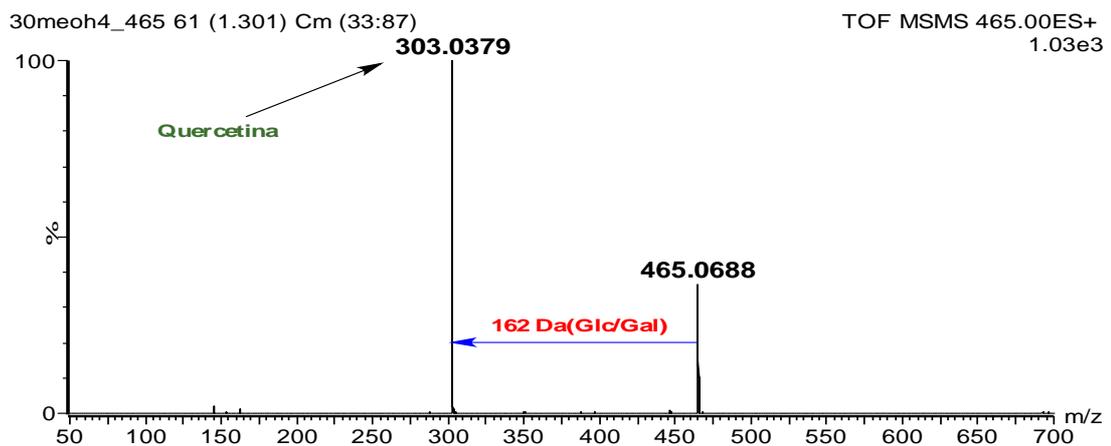


Fonte: Autora (2011).

f) Substância Fr8

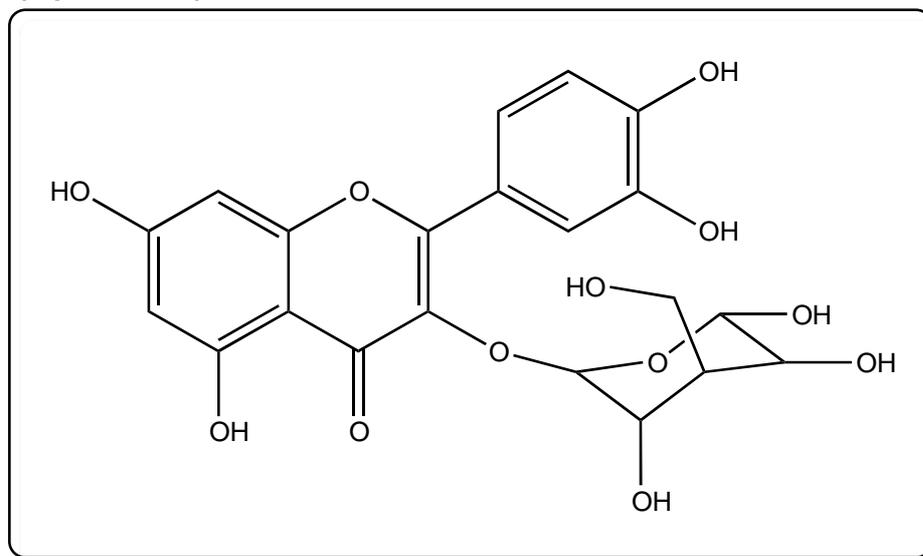
De acordo com o espectro de massas, esta molécula de massa $m/z[M+H]$ 465 ao fragmentar-se gera o íon de massa $m/z[M+H]$ 303, a quercetina. A perda é de 162 unidades de massa, ou seja uma hexose.

Figura 29 - Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fragmentação da substância de m/z $[M+H]$ 465.



Fonte: Autora (20110).

Figura 30 - Glcp-(1→3)-quercetina (isoquercetina) ou Galp-(1→3)-quercetina (hiperosídeo)



Fonte: Autora (2011).

4.5 Da fração 60% MeOH

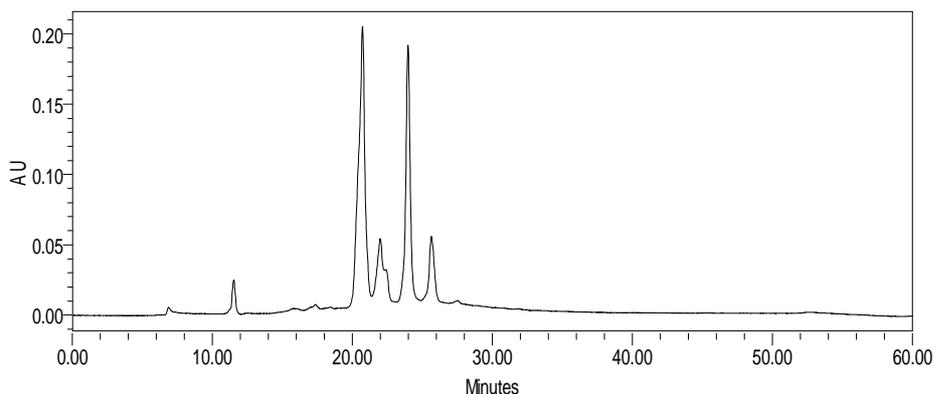
As 2 substâncias isoladas desta fração foram as mesmas isoladas da fração 30%MeOH, a Fr5 e Fr7.

4.6 Validação de método analítico para quantificação da Rutina através de HPLC-DAD-MS.

4.6.1 Especificidade e Seletividade

A seletividade do método, que confirma a identidade da substância padrão, foi avaliada usando a técnica de LC-MS. Para análise no detector de massas algumas condições na análise tiveram que ser reavaliadas em virtude na necessidade de fluxo reduzido para emprego deste detector. As condições adequadas foram encontradas usando a coluna Asahipak™ C₄ com fluxo de 0.3 ml/min em eluição gradiente onde o percentual do solvente B (acetonitrila) variou de 20 a 50% no intervalo de 30 minutos (**figura 29**).

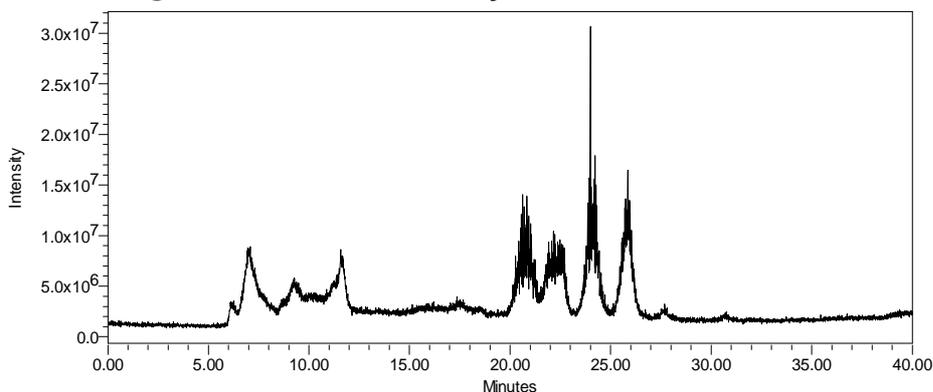
Figura 31 - Cromatograma da fração 30%MeOH pela técnica de LC-MS.



Fonte: Autora (2011).

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo de ionização. As condições do massas foram: capilar 3500, cone, extrator, temperatura do bloco 100°C, temperatura de dessolvatação 80°C.

Figura 32 - Cromatograma do massas da fração 30% MeOH

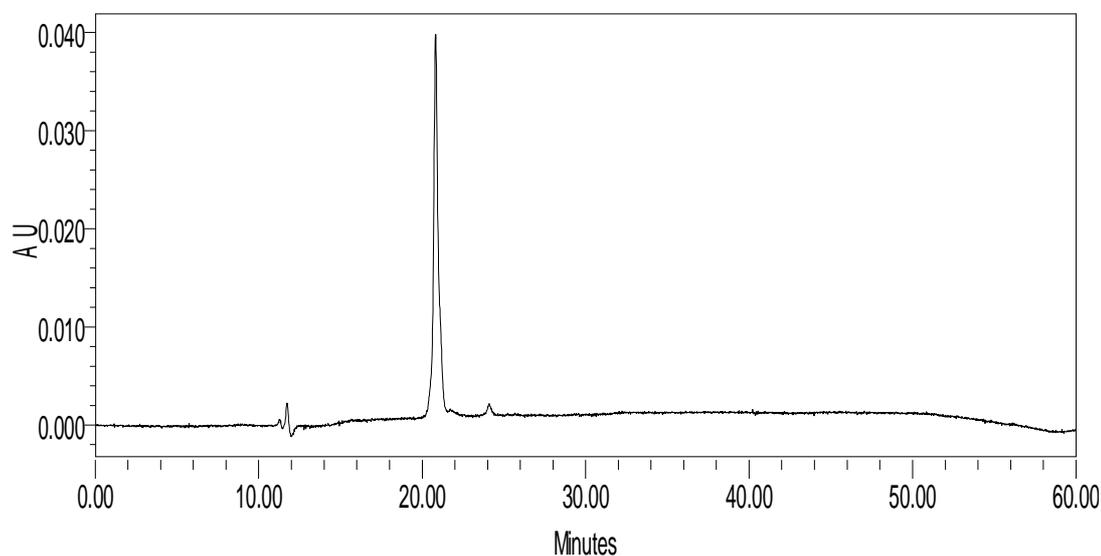


Fonte: Autora (2011).

No espectro de massas da fração enriquecida em flavonóides foi possível observar o pico do íon molecular m/z $[M+H]^+$ 611 da substância eluída com $t_R=20.6$, (figura 32).

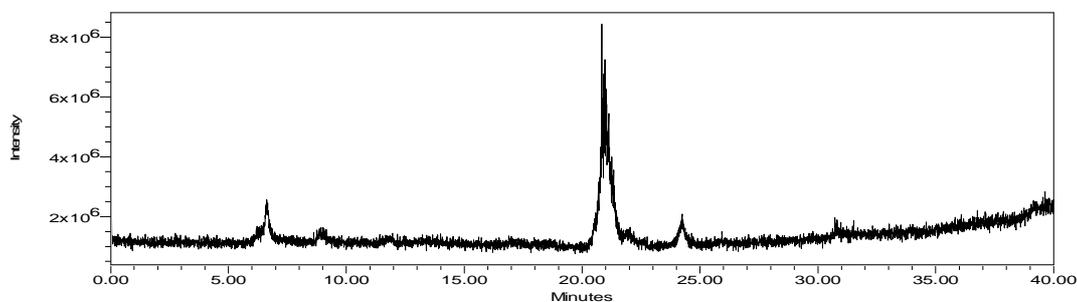
A rutina, isolada da fração enriquecida em flavonóides, foi analisada nas mesmas condições da fração que lhe deu origem. E seu espectro de massas revelou ser a mesma substância presente na fração enriquecida em flavonóides

Figura 33 - Cromatograma do marcador da fração enriquecida em flavonóides. Fase móvel 20 – 50%B em 30 trinta minutos, fluxo 0,3ml/min, detecção 350nm.



Fonte: Autora (2011).

Figura 34 - Cromatograma de massas do marcador da fração enriquecida em flavonóides



Fonte : Autora (2011).

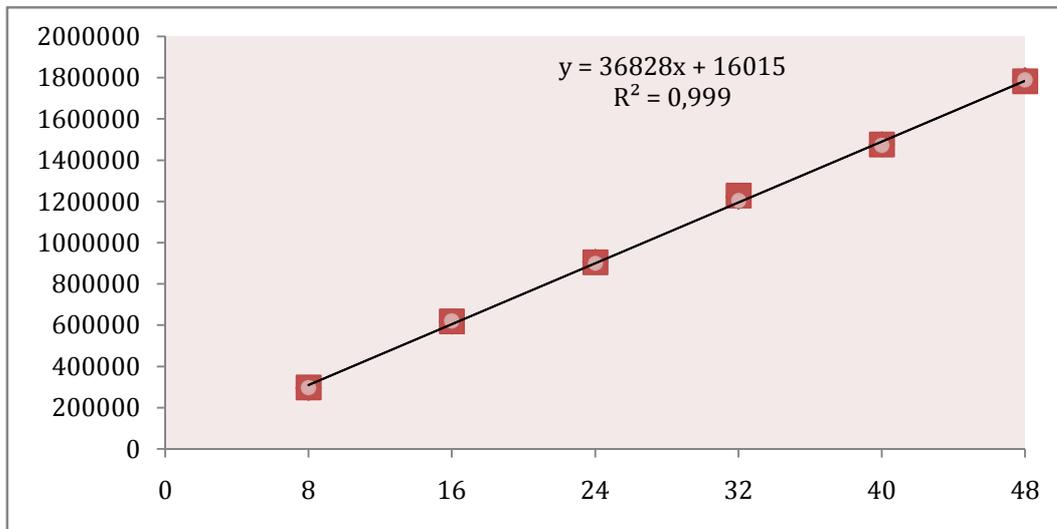
4.6.2 Linearidade

Para estabelecer a linearidade do método foi construída uma curva de calibração para a rutina em diversas concentrações, plotando a área da banda cromatográfica (mAU min) frente a concentração ($\mu\text{g/mL}$). Foram injetadas em triplicata seis concentrações de rutina, a figura 31 ilustra típico cromatograma obtido na construção da curva.

A faixa linear observada foi entre o intervalo de 8µg/ml a 48 µg/ml de miricetrina, com o coeficiente de regressão $R=0,99943$, salientando que o valor de R ideal é o mais próximo de 1.

A figura 30 representa a curva de calibração e linearidade do padrão rotina. O eixo Y representa a área do padrão (A) e o eixo X representa a concentração do analito expressa em microgramas por mililitro.

Figura 35 - Faixa linear da rotina



Fonte: Autora (2011).

4.6.3 Precisão intra-dia

As análises foram realizadas em 3 dias diferentes. A tabela tal apresenta os valores de precisão intra-dia. Foram preparadas seis alíquotas de mesma concentração da fração enriquecida de flavonóides (30%MeOH). O valor da precisão intra-ensaio, medido pelo coeficiente de variação, foi 0,39%, valor considerado satisfatório segundo critério da ANVISA que estabelece o máximo de 5%.

Tabela 3 - Precisão intra-dia do método de validação da rotina na fração enriquecida em flavonóides

		200 µg/ml	400µg/ml	10 mg	MEDIA	DESVIO	CV (%)
P1	1559632	6,239	12,48	311,967	12,50	0,049	0,394
P2	1567947	6,268	12,54	313,378			
P3	1569235	6,272	12,54	313,596			
P4	1550970	6,210	12,42	310,497			
P5	1562263	6,248	12,50	312,413			
P6	1569589	6,273	12,55	313,656			

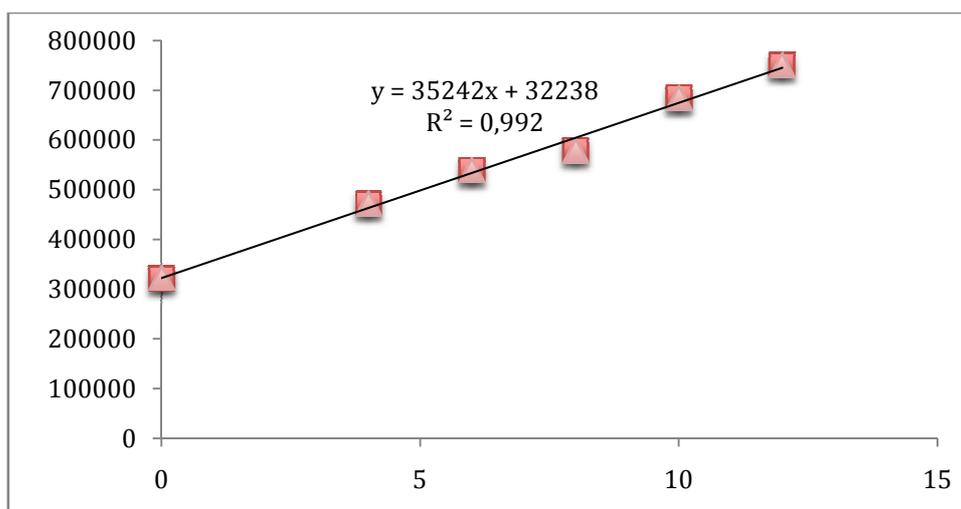
Fonte: Autora (2011).

4.6.4 Exatidão e Precisão inter-dia

A forma escolhida para verificar a exatidão do método foi a realização do teste de recuperação do analito, também conhecido como adição de padrão. Ou seja, quantidades conhecidas e crescentes do padrão foram adicionadas na fração enriquecida em flavonóides de concentração fixa.

Cincos pontos de adição, preparados em triplicata, foram usados para construir a curva e a exatidão foi calculada pelo percentual de recuperação do padrão.

Figura 36 - Curva da adição de padrão



Fonte: Autora (2011).

Na tabela abaixo estão expostos a média da área obtida nos cromatogramas para cada concentração, os valores do desvio padrão, o coeficiente de variação, e a recuperação.

Tabela 4 - Adição de padrão e precisão inter-dia. Onde Fr= fração 30%MeOH, pd= padrão rotina.

PONTOS	MÉDIA	DESVI O	CV	µg/ml	µg enc	% recup	media % rec
Fr	321153	860,85	0,27	8,29			
Fr + 100µl pd	471643	370,63	0,08	12,37	4,09	102,16	96,71
Fr + 150 µl pd	538341	383,02	0,07	14,18	5,90	98,29	
Fr + 200 µl pd	578338	510,77	0,09	15,27	6,98	87,29	
Fr + 250 µl pd	684392	559,68	0,08	18,15	9,86	98,63	
Fr + 300 µl pd	750542	227,60	0,03	19,94	11,66	97,16	

Fonte: Autora (2011).

No primeiro ponto não houve percentual de recuperação, obviamente por não ter sido fortificado com o padrão. A média de recuperação das análises foi de 96,7%, indicando uma excelente exatidão do método analítico. Na curva de adição de padrão não há intercessão entre os eixos, visto que a concentração da fração a ser fortificada possui aproximadamente 8 µg/ml do padrão. O coeficiente de variação das análise variou apenas entre 0,03 a 0,3; obtendo-se a média de 0,10%, indicando uma excelente precisão do método.

Este ensaio de adição de padrão, não só fornece a exatidão do método, ainda nos fornece um outro parâmetro intrínseco à validação do método, a especificidade. Este parâmetro foi determinado na fortificação da fração, nesse processo apenas a banda cromatográfica correspondente ao padrão tem sua concentração aumentada.

A tabela abaixo resume os parâmetros avaliados na validação do método analítico para quantificação da rutina na fração enriquecida em flavonóides.

Tabela 5 – Resumo dos parâmetros e validação avaliados no método.

PARÂMETROS	RESULTADOS
Seletividade	Seletivo
Linearidade	0,99943
Intervalo	8,0 a 48,0 µg/ml
Precisão intra-dia (CV %, n=6)	0,39%
Precisão inter-dia (CV %, n=6)	0,10%
Exatidão	96,71% de recuperação
Robustez	Não checada

Fonte: Autora (2011).

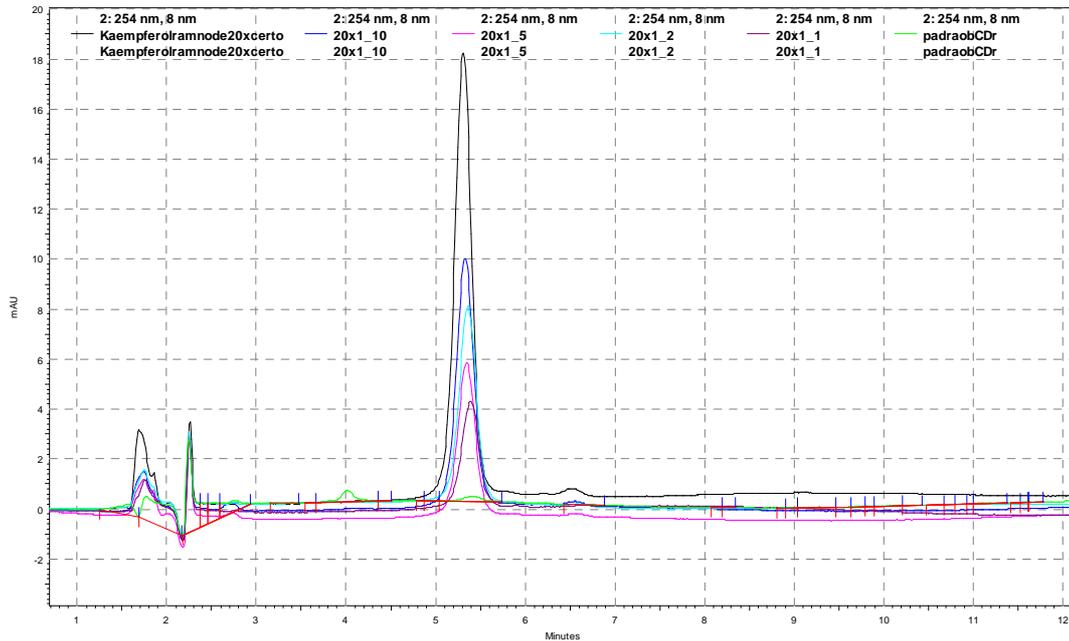
4.7 Encapsulação da Rutina com β -CD

A rutina, substancia marcadora da fração enriquecida de flavonóides, foi encapsulada em β -CD com a finalidade de assegurar sua integridade química, visto que sua estrutura contendo inúmeras hidroxilas fenólicas são facilmente degradadas.

A rutina foi encapsulada em diversas concentrações de β -CD, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10. Para análise do encapsulamento foram realizadas análises cromatográficas no HPLC-DAD nas mesmas condições de análise do padrão rutina, já estabelecidas anteriormente, ou seja, fase móvel HAc/ACN 80:20, fluxo de 1,0mL/min, detecção em 254 e 350nm.

Na **figura 35**, temos o cromatograma referente esta análise, onde todas as proporções de encapsulamento estão sobrepostas, inclusive o padrão livre de β -CD e a β -CD pura. No cromatograma há um aumento da intensidade de absorção das bandas na medida em que se aumenta a proporção de ciclodextrina, dessa forma confirmando o encapsulamento. Ainda presente no cromatograma da **figura 35**, as análises feitas com os padrões de β -CD (verde) e rutina (preto).

Figura 37 - Rutina após encapsulação com β -CD. Nas proporções 1:1 (roxo), 1:2 (azul), 1:5 (rosa), 1:10 (azul escuro), rutina (preto), β -CD(verde).

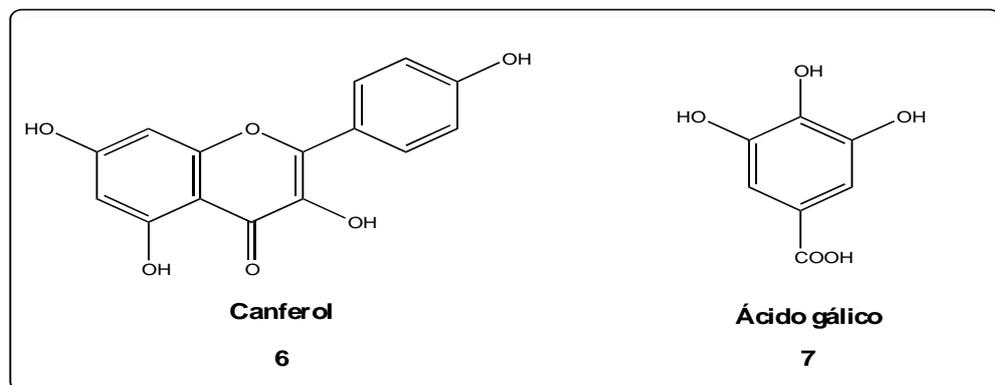


Fonte: Autora (2011).

4.8 Potencial antioxidante da fração enriquecida em flavonóides, rutina e rutina β -CD

O extrato bruto de *C. coriaceum*, a fração enriquecida em flavonóides a rutina e a rutina β -CD foram avaliados com relação ao seu potencial antioxidante de acordo com os ensaios: Folin-Ciocateu (FC), DPPH, ABTS e DMPD empregando como padrão de calibração o ácido gálico e canferol.

Figura 38 - Substâncias empregadas como padrões nos testes de capacidade antioxidante



Fonte: Autora (2011).

Para o ensaio de FC (compostos fenólicos totais) a fração enriquecida em flavonóides apresentou maior teor de fenólicos totais em relação ao extrato (**tabela 1**). Esta constatação foi corroborada com os ensaios para capacidade antioxidante, com exceção do ensaio do DPPH (**tabela 1**). Como a fração é rica em flavonóides glicosilados estes compostos devem interagir de forma mais efetiva com os radicais ABTS⁺ e DMPD⁺ (comparando com o extrato) que com o DPPH. Este resultado está associado a reações preferencial do radical DPPH com compostos lipofílicos e menos volumosos.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios antioxidantes empregando ácido gálico como padrão.

Ensaio mg/L em ácido gálico				
AMOSTRA	FOLIN	ABTS	DPPH	DMPD
RUT (0,2mg/ml)	136	152	148	22
Fração (1mg/ml)	690	757	49	94
Extrato(1mg/ml)	122	204	6,9	1
RUT β-CD 1:1	-	52	83	-
RUT β -CD 1:2	-	45	46	-

Fonte: Autora (2011).

Tabela 7 - Resultados do ensaio ABTS empregando canferol como padrão.

ABTS	
AMOSTRA	Canferol
RUT (0,2mg/ml)	242
Fração (1mg/ml)	610
Extrato(1mg/ml)	289
RUT β -CD 1:1	143
RUT β -CD 1:2	116

Fonte: Autora (2011).

O efeito da encapsulação da rutina com a β -CD foi avaliado pelos ensaios do DPPH e ABTS, sendo que para o último também foi empregado o flavonóide canferol (6) para calibração (**tabela 2**). De forma geral, foi observado que o encapsulamento da RUT conduz a redução da atividade antioxidante (AA), possivelmente pelo bloqueio dos grupos reativos aos radicais. O emprego do canferol como padrão de calibração apresentou tendência de redução da atividade antioxidante semelhante aos resultados obtidos com ácido gálico para o ensaio do ABTS.

Apesar da redução da atividade, investigações quanto a caracterização do complexo de inclusão, estabilidade e liberação deste flavonóide estão em andamento.

4.9 Avaliação Linfoproliferativa de Princípios Ativos da C. Coriaceum

A incidência de câncer tem aumentado anualmente e o interesse em terapias alternativas e no uso de fármacos originários de produtos naturais está crescendo, especialmente aqueles derivados de plantas. Com a finalidade de buscar novas fontes de fármacos anticâncer, muitos extratos e princípios ativos de plantas estão sendo estudados em modelos *in vitro* e *in vivo*. O modelo *in vivo* tem a importância de confirmar a atividade anticâncer observada em cultura de células, superando as

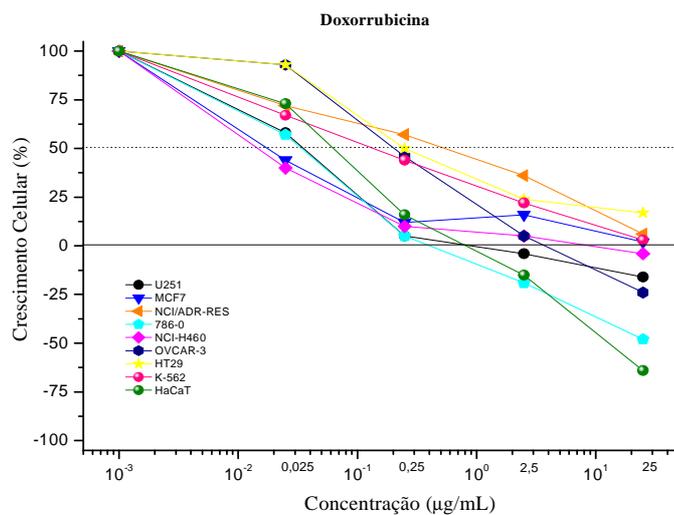
limitações dos modelos *in vitro*.

A triagem inicial da atividade anticâncer da *Camptosema coriaceum* foi realizada com o extrato bruto etanólico das raízes, através de testes de citotoxicidade em cultura de células tumorais humanas. Em seguida e da mesma forma, foram testados a fração enriquecida de flavonóides, extraída desta espécie e sua substância marcadora, o flavonóide rutina.

O gráfico abaixo se refere à ação do extrato de *C. coriaceum* em cultura de células tumorais humanas e relacionam a porcentagem de crescimento com a concentração do extrato. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento enquanto os negativos (abaixo de zero) representam morte celular, pois a quantidade de células (aferida pela absorbância no final do experimento), no segundo caso, é menor do que aquela que iniciou o experimento (absorbância do T0).

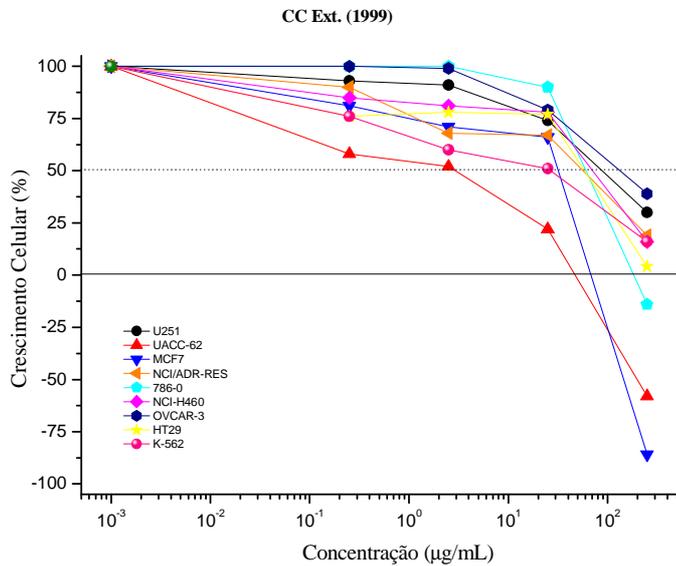
O gráfico (**figuras 37 e 38**) representa a atividade anticâncer do extrato bruto etanólico das raízes de *C. coriaceum* e também do quimioterápico doxorubicina (controle positivo).

Figura 39 - Gráfico da atividade anticâncer da doxorubicina (controle positivo) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato



Fonte: Autora (2011).

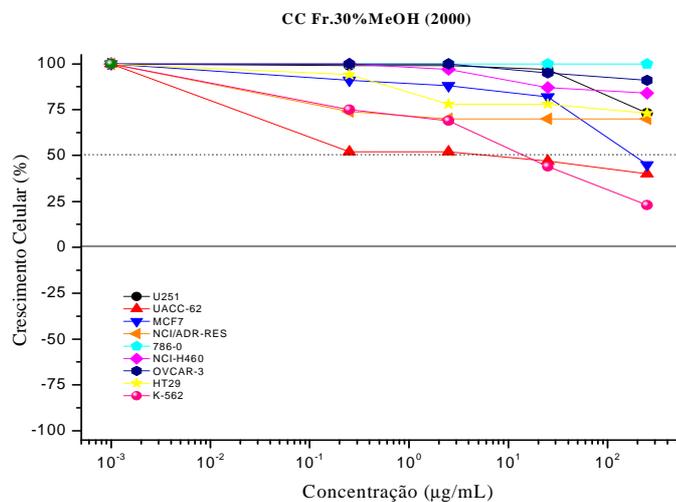
Figura 40 - Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Etanólico das raízes de *C. coriaceum* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.



Fonte: Autora (2011).

O extrato bruto etanólico das raízes de *C. coriaceum* produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento da linhagem de melanoma (UACC-62) na concentração de 2,5 µg/mL e em concentrações mais elevadas inibiu o crescimento de todas as linhagens testadas. Na maior concentração, apresentou atividade citotóxica para as linhagens UACC-62, MCF7 e 786-0 (figura 39).

Figura 41 - Gráfico da atividade anticâncer da fração enriquecida em flavonóides (30%MeOH) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

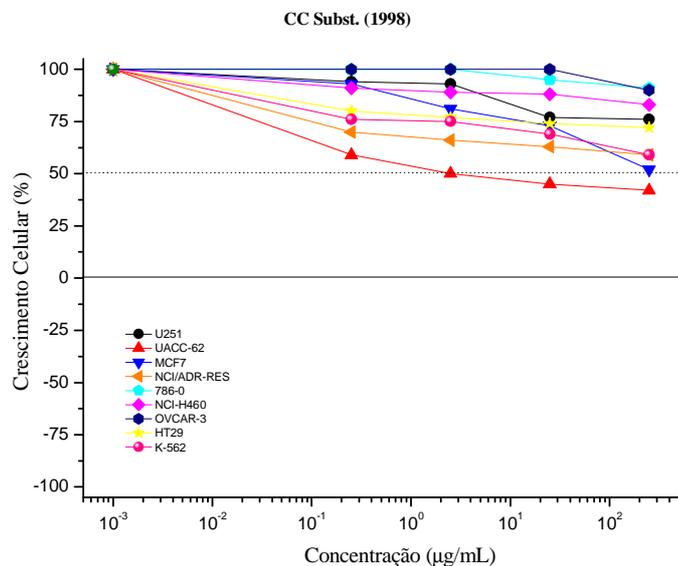


Fonte: Autora (2011).

A fração enriquecida em flavonóides (30%MeOH), apresentou atividade citostática para as linhagens de mama (MCF7), melanoma (UACC-62) e leucemia (K-562) na maior concentração, sendo inativo para todas as outras linhagens (figura39).

O flavonóide glicosilado (CCsubst), marcador da fração enriquecida em flavonóides, apresentou atividade citostática para a linhagem de melanoma (UACC-62), sendo inativo para todas as demais linhagens.

Figura 42 - Gráfico da atividade anticâncer da rutina, marcadora da fração enriquecida em flavonóides, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.



Fonte: Autora (2011).

A tabela abaixo resume os valores de inibição de crescimento total (TGI) das amostras testadas. Verifica-se que a ação evidenciada no extrato bruto não se repete para a fração enriquecida de flavonóides e conseqüentemente para a rutina. Sugere-se dessa forma que outro tipo de substância ou sinergismo entre elas, é a responsável pela ação citotóxica desempenhada pelo extrato bruto etanólico desta espécie, em especial frente a linhagem de mama (MCF7) que apresentou valor inferior em comparação ao padrão utilizado, a doxorrubicina.

Fonte: Autora (2011).

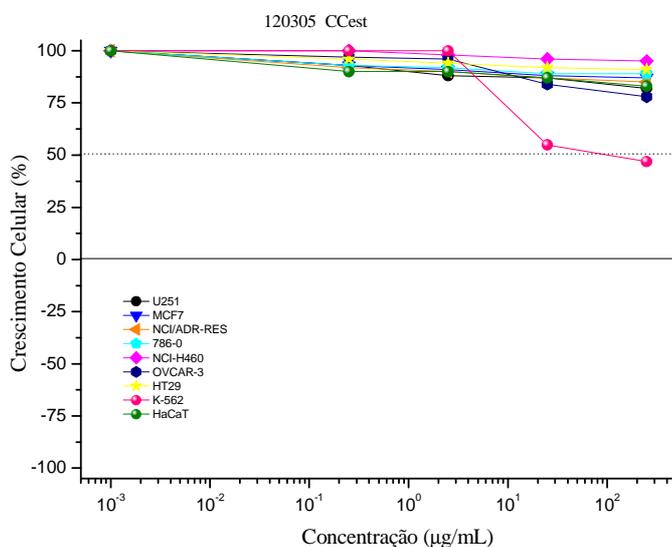
Tabela 8 - Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto de *C. coriaceum*, da fração enriquecida em flavonóides (FEF), da rutina (RUT) e da doxorubicina(Dox) em µg/mL.

Linhagem/Extrato	EBE	FEF	RUT	Dox
U251	>250	>250	>250	0,72
UACC-62	30,09911	>250	>250	2,01
MCF7	60,34015	>250	>250	237,42
NCI/ADR-RES	>250	>250	>250	18,15
786-0	204,4854	>250	>250	0,92
NCI-H460	>250	>250	>250	4,50
OVACR-3	>250	>250	>250	15,21
HT29	>250	>250	>250	36,33
K-562	>250	>250	>250	1,99

Fonte: Autora (2011).

Em paralelo, na tentativa de descobrir qual substancia presente no extrato bruto da *Camptosema coriaceum* tem atividade linfoproliferativa, outra substancia isolada desta espécie foi avaliada. Desta vez um triperpeno de estrutura ainda não elucidada. Porém o triterpeno(CCest) apresentou atividade citostática apenas para a linhagem de leucemia (K-562), **figura 40**.

Figura 43 - Gráfico da atividade anticâncer triterpenos isolado da espécie *C. coriaceum*, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.



Fonte: Autora (2011).

5 CONCLUSÕES

Através de técnicas cromatográficas foi possível a obtenção de uma fração enriquecida em flavonóides glicosilados da espécie *C. coriaceum*.

Da fração enriquecida em flavonóides foi possível o isolamento de cinco flavonóides glicosilados e uma catequina também glicosilada.

O método de validação da rotina na fração enriquecida com flavonóides do extrato seco das raízes de *C. coriaceum* encontra-se devidamente validado com os parâmetros de validação consoantes com a regulação.

A eficiência da encapsulação da rutina em β -CD foi comprovada mediante os ensaios da capacidade antioxidantes, comparando a rutina encapsulada com a não-encapsulada.

Através dos testes de linfoproliferação, comprovamos a atividade citostática do extrato bruto de *C. coriaceum*, da fração enriquecida em flavonóides e da rutina sobre o crescimento celular de diversas linhagens de células tumorais. Sendo o extrato bruto o mais eficaz e com atividade citocida frente as linhagens de melanoma, mama e renal.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 dez. 1999a.

_____. Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 maio 1999b.

_____. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 dez. 1999c.

_____. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 maio 1999d.

AL-SAYED, E. et al. HPLC-PDA-ESI-MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC. **Food Chem.**, Barking, v. 133, n. 3, p. 1017-1024, Aug. 2012. ISSN 0308-8146.

ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 81, suppl. 1, p. 317S-325S, 2005. ISSN 0002-9165.

ARUNG, E. T. et al. Anti-melatonogenesis properties of quercetina and its derivative-rich extract from *Allium cepa*. **Food Chem.**, Barking, v. 124, n. 3, p. 1024-1028, 2011. ISSN 0308-8146.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, London, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001. ISSN 0951-418X.

BARATA, L. E. C. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Cien. Cult.**, Campinas, v. 57, n. 4, p. 4-5, 2005. ISSN 0009-6725.

BARRECA, D. et al. Elucidation of the flavonoid and furanocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. **Food Chem.**, Barking, v. 129, n. 4, p. 1504-1512, 2011. ISSN 0308-8146.

BARROS, L. et al. Characterization of phenolic compound in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1576-1582, 2012. ISSN 0278-6915.

BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora da UNESP 2002.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 133, n. 10, p. 3248S-3254S, 2003. ISSN 0022-3166.

BELLINGER, M. E. et al. Beta-cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995. ISSN 0278-6915.

BEN SGHAIER, M. et al. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 32, n.3, p. 336-348, 2011. ISSN 1382-6689.

BERISTAIN, C. I.; VERNON-CARTER, E. J. Studies on the interaction of arabic (*Acacia Senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gums as emulsion stabilizing agents for spray drier encapsulated Orange peel oil. **Drying Technol.**, Singapore, v.13, n. 1, p. 455-461, 1995. ISSN 0737-3937.

BIRT, D. F.; HENDRISCH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids e isoflavonoids. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001. ISSN 0163-7258.

BORKKENHEUSER, V.D.; SHACKLETON, C.H.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochem. J.**, London, v. 348, n. 3, p. 953-956, 1987. ISSN 0264-6021.

CAO, Y. H.; WANG, Y.; YUAN, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 59, n. 1-2, p. 135-140, 2004. ISSN 0009-5893.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p. (Série Apontamentos).

CHACHAY, V. S. et al. Resveratrol: pills to replace a healthy diet? **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 72, n.1, p. 27-38, 2011. ISSN 0306-5251.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 854, p. 435-442, 1998. ISSN 0077-8923.

CROZIER, A. et al. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 761, n. 1-2, p. 315-321, 1997. ISSN 0021-9673.

DANIEL, O. et al. Selected phenolics compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications and modulation by pesticides. **Environ Health Perspect.**, Research Triangle Park, v. 107, suppl. 1, p. 109-114, 1999. ISSN 0091-6765.

DE RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 1112, n. 1-2, p. 31-63, 2006. ISSN 0021-

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 2th ed. London: J. Wiley, 2001.

DEY, P. M.; HARBONE, J. B. **Plant biochemistry.** London: Academic Press, 1997,

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica.** 2. ed. São Paulo: Editora da UNESP, 2002.

DORANT, E. Allium vegetal consumption, garlic supplement intake and female breast carcinoma incidence. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v. 33, p. 163-170, 1995. INNS 0167-6806.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Polímeros de ciclodextrina: Características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 23-31, 1999. ISSN 0102-0323.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetina, hesperetin, and narigenin. dietary sources, bioatividades, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, New York, v. 24, p. 851-874, 2004. ISSN 0271-5317.

_____. et al. Validated method for the quantification of quercetina from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.727, n. 1-2, p. 179-189, 1999. ISSN 1387-2273.

FARBMAN, K. S. Antibacterial activity of garlic and onions: a historical perspective. **J. Pediatr. Infec. Dis.**, Amsterdam, v. 12, n.7, p. 613-614, 1993. ISSN 1871-0336.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora UFRGS; Editora UFSC, 2000. cap. 12, p. 197-220.

FASOLO, D. et al. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetina and metilquercetin in topical nanoemulsions. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 1174-1177, 2007. ISSN 0731-7085.

FERRERES, F. et al. Approach to the study of C-glycosyl flavones acylated with aliphatic and aromatic acids from *Spergularia rubra* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, Chichester, v. 25, n. 6, p. 700-712, 2011. ISSN 0951-4198.

FINCH, C. A. Industrial microcapsulation: polymers for microcapsule walls. In: KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. A. (Ed.) **Encapsulation and controlled release**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 148-162.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.43, n. 4, p. 890-894, 1995. ISSN 0021-8561.

_____. et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolics substances in red wine. **Lancet**, London, v. 341, n.8843, p. 454-457, 1993. ISSN 0140-6736.

GARCIA-GÓMEZ L.; SÁNCHEZ-MUNIZ F. Revisión: efectos cardiovasculares Del Ajo (*Alliumsativum*). **Arch. Latinoam. Nutr.**, Caracas, v. 50, n. 3, p.219-227, 2000. ISSN 0004-0622.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 4, p.1220-1234, 2006. ISSN 0731-7085. Disponível em: <http://hera.ugr.es/doi/1665738x.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2011.

GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. **J. Med. Food.**, Larchmont, v. 8, n. 3, p. 281-290, 2004. ISSN 1096-620X.

GRAHAM, D. Y. Garlic or jalapeno peppers for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 94, n. 5, p. 1200-1202, 1999. ISSN 0002-9270.

GREEBLATT, H. C. et al. Encapsulation and controlled release of flavous and fragrances. In: KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. A. (Ed.) **Encapsulation and controlled release**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p 1-12.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000. ISSN 0031-9422.

HARTLEY, S. E. Are gall insects large rhizobia? **Oikos**, v. 84, n. 2, p. 333-342, 1999.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeut.**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov./Dez. 2002.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology**. Oxford; New York: Oxford University Press, 1997, p. 522.

HERTOG, M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, London, v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993. ISSN 0140-6736.

HERTOG, M. G. et al. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. **Nutr. Cancer**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p.175-184,1994. ISSN 0163-5581.

HICKS, K. B. et al. Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of b-cyclodextrin alone or in combination with phosphates. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.44, n. 9, p. 2591-2594, 1996. ISSN 0021-8561.

HOLLMAN, P. C. et al. Relative bioavailability of the flavonoid quercetina from various food in man. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 418, n. 1, 152-156, 1995.

JIANG, L. Q. et al. Analysis of flavonoids in propolis and Ginkgo biloba by micellarelectrokinetic capillary chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.56, n. 24 p. 11571-11577, 2008. ISSN 0021-8561.

KAUFER-HORWITZA, M. T. et al. A comparative analysis of the scientific basis and visual appeal of seven dietary guideline graphics. **Nutr.Res.**, New York, v. 25, p. 335-347, 2005. ISSN 0271-5317.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.**, Kyoto, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004. ISSN 1347-8613.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002. ISSN 0002-9165.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am. J. Med.**, New York, v. 113 suppl. 9B, p. 71S-88S, 2002. ISSN 0002-9343.

MACEDO, Elizabeth Valverde; GEMAL, André L. A produção de fitomedicamentos e a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v. 90, n.4, p. 290-297, 2009. ISSN 0370-372X.

MELO, L. F. C. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringenina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MANACH, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetina in rats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 409, n. 1, p.12-16, 1997.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 79, p. 727-747, 2004. ISSN 0002-9165.

MARKHAN, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MIDDLETON JÚNIOR, E. Effect of plant flavonoids on immune and antiinflammatory cell function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 439, p. 175-182, 1998. ISSN 0065-2598.

MIN, Y. et al. Characterization of flavonoids in *Millettianitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ. **J. Pharm. Anal.**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2012. ISSN: 2095-1779.

MORRIS, J. C. et al. Quercetin, a fluorescent bioflavonoid, inhibits *Trypanosomabrucei* hexokinase 1. **Exp. Parasitol.**, New York, v.127, n. 2, p. 423-428, Feb. 2011. ISSN 0014-4894.

NAGATA, C. et al. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a communitybased prospective study. **Am J Epidemiol.**, Baltimore, v. 153, n. 8, p. 790-793, 2001. ISSN 0002-9262.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, A. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 989-993, 2008.

PARÉ, P. Biological activity and future directions for flavonoids. In: YEARS OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH: PAST, PRESENT AND FUTURE, Amsterdam, 1999. **Proceedings...** Amsterdam: Phytoconsult, 1999.

PAREJO, I. et al. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, Chichester, v. 18, p. 2801-2810, 2004. ISSN 0951-4198.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Milano, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991. ISSN 0367-326X.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** 2005. Dissertação (Mestrado) –Universidade de São Paulo, São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas., 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. ISSN 0163-3864.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, n. 4, p. 513-523, Jun. 2011. ISSN 0367-326X.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical application of ciclodextrinas. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 85, n.11, p. 1142-1169, 1996. ISSN 0022-3549.

RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1112, n. 1-2, p. 31-63, 2006. ISSN 0021-9673.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetina in disease prevention and therapy: facts and fancies. **Biochem.Pharmacol.**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 6-15, 2011. ISSN 0006-2952. Doi:10.1016/j.bcp.2011.08.010.

SÁ BARRETO, L. C. L.; CUNHA FILHO, M. S. S. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, 1, p. 1-9, 2007. ISSN 1808-4532.

SALEM, J. H. et al. Biological activities of flavonoids from *Nitrariaretusa*(Forssk.). **Food Chem.**, Barking, v. 124, 2011. ISSN 0308-8146.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000. ISSN 0022-3166.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.**, Barking, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009. ISSN 0308-8146.

SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanumjabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009. ISSN 0100-4042.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, Bethesda, v.82, n. 13, p. 1107-1112, 1990. ISSN 0027-8874.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radic. Bio. Med.**, New York, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000. ISSN 0891-5849.

SOARES, G. L. G. et al. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea: Brachyscelidae) em folhas de *Rolliniaaurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, v. 2, p. 103-116, 2000. ISSN 0101-8175.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.**; Boston, v. 320, n. 14, p. 915-924, 1989. ISSN 0028-4793.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, New York, v. 54, n. 3, p. 237-256, 2000.

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERÁN, F. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis allows the simultaneous characterization of C-glycosyl and O-glycosyl flavonoids in stingless bee honeys. **J. Chromatogr. A**, New York, v. 1218, n. 42, p. 7601-7607, 2011.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 52, n. 8, p. 900-915, 2004.

ULLAH, M. F.; KHAN, M. W. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, Bangkok, v. 9, p. 187-195, 2008. ISSN 1513-7368.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Center for Nutrition Policy and Promotion. Is total fat consumption really decreasing? **Nutrition insights**, Washington, n. 5, Apr. 1998. Disponível em: <<http://www.cnpp.usda.gov/Publications/NutritionInsights/insight5.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

VAN ACKER, S. A..et al. Structural aspects os antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996. ISSN 0891-5849.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematic**: part 10 - higher level systematics. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 5-35.

YAMADA, K. et al. Health claim evidence requirements in Japan. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 138, n. 6, p. 1192S -1198S, 2008. ISSN 0022-3166.6

ZAND, R. S. R.; JENKINS, D. J. A.; DIAMANDS, E. P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v. 777, n. 1-2, p. 219-232, 2002. ISSN 1570-0232.