

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE  
AMOREIRA COM POTENCIAL FITOESTROGÊNICO PARA  
USO NO TRATAMENTO DOS SINTOMAS DO CLIMATÉRIO.”**

**Patrícia Luísa de Souza Bergo\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA  
ORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim**

**\* bolsista CNPq (146902/2011-4) e FAPESP (2011/24137-0)**

**São Carlos - SP  
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B499p      Bergo, Patrícia Luísa de Souza  
              Padronização de extratos de folhas de amoreira com  
              potencial fitoestrogênico para uso no tratamento dos  
              sintomas do climatério / Patrícia Luísa de Souza  
              Bergo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
              259 p.

              Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
              Carlos, 2015.

              1. Padronização de extrato. 2. Morus alba. 3.  
              Climatério. 4. Fitoestrógenos. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Patricia Luisa de Souza Bergo, realizada em 13/08/2015:

---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar

---

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto  
IQSC/USP

---

Prof. Dra. Márcia Regina Cominetti  
UFSCar

---

Prof. Dr. Fernão Castro Braga  
UFMG

---

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro  
UFSCar

*Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
irmãos e esposo que sempre estiveram  
ao meu lado física e espiritualmente ao  
longo dessa caminhada.*

“É frio, é calor  
Virtudes da menopausa  
Todo o corpo é um ardor  
Sem que se veja uma causa.  
É um constante veste e despe  
De noite tapa e destapa  
Isto parece uma peste  
A que a gente não escapa.  
Usa o leque, abre a janela  
Todos olham espantados  
O que se passa com ela?  
Parafusos desapertados?  
É um corpo diferente  
Do que eu estava habituada  
Mas por mais que me impaciente  
Não posso fazer nada.”

Paula Boaventura *em* “Poema com rima - A menopausa”

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Moacir, à Profa. Ceci Lopes e à Dra. Maria Luiza Montanari a oportunidade de poder participar desse projeto. Ao Dr. Antônio Porto pela ajuda valiosa, pois sem as folhas de amoreiras cultivadas sob a sua supervisão, não teria sido possível desenvolver o trabalho no nível em que ele foi feito.

Ao Prof. Andrei Leitão pela ajuda inestimável, abrindo as portas do LabECel e dedicando parte do seu tempo a me ensinar a trabalhar com as culturas celulares, desde a manutenção básica de rotina até o desenvolvimento dos estudos realizados. Aos seus alunos que me auxiliaram no dia-a-dia.

Aos Prof. Edenir e Renato pela ajuda com as análises quimiométricas e principalmente pela paciência com os questionamentos nas aulas de quimiometria. E à Prof. Helga Aleme (Unifesp) pela ajuda “off-campus”).

À Prof. Quézia, pelos conselhos e orientações, sugestões e ensinamentos em cromatografia.

Aos Dr. Marcelo Bemquerer (Embrapa), Prof. Alexandre Santos e Prof. Wanderson Romão (UFES) por terem viabilizado as análises de FT-ICR-MS. À Gabriela e Liliane por terem realizado as análises.

Ao doutorando Bruno Perlatti, pela verdadeira parceria profissional principalmente nos momentos em que o espectrômetro de massas parava de funcionar. Às Dras. Bárbara Sayuri e Tatiani Bondância e Dr. Leonardo Tóffano pela companhia e convivência no laboratório, principalmente nos momentos mais tensos e angustiantes do trabalho. Ao Carlos Filho da AJLab por me ajudar a pensar “fora da caixa”.

À minha família, pelo apoio incondicional nas minhas decisões, principalmente ao meu marido, Andrei, pelo suporte profissional e emocional nos momentos de turbulência.

A todos os meus ex-orientadores: Profs. Rosária Justi, Rossimirian Freitas, Cláudia Carvalinho, Luiza Marilac, Cláudio Donnici, Fernando Egreja, Zenilda Cardeal, Marcelo Bemquerer; Rodinei Augusti, Laurie Hudson, Jim Liu, Chris Enke, e Oliver Schmitz. Se não fossem os ensinamentos de cada um deles, eu não teria me tornado a profissional que sou hoje.

Ao CNPq e à FAPESP pelas bolsas concedidas.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho acontecesse.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	fonte de ionização à pressão atmosférica
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
AST	astragalina
C.V.	coeficiente de variação
CAD	gás de colisão ativada por dissociação
CE	energia de colisão
CID	dissociação induzida por colisão
C-MALGLC	campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo)
C-RUT	campferol 3-O-rutinosídeo
CUR	cortina de gás
CXP	potencial de saída da cela de colisão
DA	análise discriminante
DAD	detector de arranjo de diodos
DC	corrente contínua
DHEA	dihidroepiandrosterona
DMEM	meio de cultura <i>eagle</i> modificado pela Dubelco
DMSO	dimetilsulfóxido
DoE	planejamento experimental
DP	potencial de dessolvatação
D <sub>total</sub>	função desejabilidade total
E <sub>2</sub>	17- $\beta$ -estradiol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	potencial de entrada
EPR	erro padrão relativo
ER	receptor estrógeno
ESI	fonte de ionização eletrospray
EtOH	etanol
FBS	soro de feto bovino
FBS-CS	soro de feto bovino tratado com dextran/carvão-ativo
FP	potencial de focalização
FSH	hormônio folículo-estimulante
FTICR-MS	Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier
g.l.	graus de liberdade
GAE	equivalentes de ácido gálico
GAS 1	gás secante
GAS 2	gás nebulizador
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
HCA	análise de agrupamento hierárquico
HCOOH	ácido fórmico
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HER2/neu	receptor do fator de crescimento epidermal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HRT	terapia de reposição hormonal
IFAV	Insumo farmacêutico ativo vegetal
IN	Instrução Normativa
IS	potencial aplicado no capilar
ISO	Organização Internacional para Padronização

ISOQ	isoquercetina
k	fator de retenção
KNN	k-ésimo vizinho mais próximo
LC-DAD	cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos
LC-MS	cromatográfica líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
m/z	razão massa/carga
MeOH	metanol
MF	medicamento fitoterápico
MQ	média quadrática
MS	espectrometria de massas em modo de varredura total
MS/MS	espectrometria de massas sequencial
MTT	Metil-Tiazolil-Tetrazólio
N	número de pratos teóricos
NAD	adenosina dinucleotídeo
NADH	adenosina dinucleotídeo reduzida
NHRT	terapia de reposição não-hormonal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	solução tampão fosfato
PCA	análise de componentes principais
PDA	detector de arranjo de fotodiodos
PLS-DA	mínimos quadrados parciais para análise discriminante
PR	receptor de progesterona
PTF	produto tradicional fitoterápico
PVDF	fluoreto de polivinilideno
Q1	primeiro quadrupolo do analisador triplo-quadrupolo
Q2	cela de colisão do analisador triplo quadrupolo
Q3	terceiro quadrupolo do analisador triplo-quadrupolo
RDC	Resoluções de Diretoria Colegiada (RDCs)
RF	radiofrequência
RRE	resposta relativa ao E <sub>2</sub>
R <sub>s</sub>	resolução cromatográfica
RUT	rutina
Q-MALGLC	quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo)
SDS	dodecilsulfato de sódio
SERM	modulador seletivo do receptor estrógeno
SNRI	inibidor seletivo de recaptura de norepinefina
SQ	soma quadrática
SRM	modo de monitoramento de reação selecionada
SSRI	inibidor seletivo de recaptura de serotonina
TCM	medicamento tradicional chinês
THF	tetrahidrofurano
TIC	cromatograma de íons totais
TQMS	triplo quadrupolo
t <sub>r</sub>	tempo de retenção
u.m.a.	unidade de massa atômica
WHI	Iniciativa para a saúde da mulher
α	fator de separação
ω <sub>c</sub>	frequência ciclotrônica



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Atividade biológica descrita para extratos preparados com diferentes partes da amoreira para as espécies mais comuns .....	21
TABELA 3.1 - Níveis utilizados na etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental para a avaliação dos parâmetros da extração em dois níveis. ....	53
TABELA 3.2 - Parâmetros do espectrômetro ESI-FT-ICR ajustados para as análises dos extratos de folhas de amoreira .....	66
TABELA 3.3 - Condições experimentais utilizadas na análise exploratória inicial para a seleção da fase estacionária .....	68
TABELA 3.4 - Parâmetros cromatográficos avaliados na etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental .....	69
TABELA 3.5 - Parâmetros cromatográficos otimizados na etapa de modelagem de respostas do planejamento experimental. ....	70
TABELA 3.6 - Parâmetros espectrométricos otimizados na etapa de modelagem de respostas do planejamento experimental .....	72
TABELA 3.7 - Condições cromatográficas utilizadas durante a otimização dos parâmetros espectrométricos .....	73
TABELA 3.8 - Condições do espectrômetro de massas utilizadas nas análises de perfil químico para os extratos testados nos ensaios celulares.....	73
TABELA 3.9 - Parâmetros de espectrometria de massas sequencial otimizados por planejamento experimental de composto central. ....	74
TABELA 3.10 - Condições cromatográficas utilizadas durante a validação do método analítico .....	76
TABELA 3.11 - Parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação da robustez do método analítico por LC-DAD.....	77
TABELA 3.12 - Procedimentos utilizados nos métodos de referência para extração.....	80
TABELA 4.1 - Rendimentos em massa obtidos para os extratos preparados nos experimentos realizados para o planejamento fatorial fracionado.....	89
TABELA 4.2 - Rendimento das extrações realizadas com diferentes composições etanólicas no solvente extrator .....	104
TABELA 4.3 - Valores de EC obtidos a partir das curvas concentração-resposta construídas para os extratos preparados com um percentual alcoólico .....	131
TABELA 4.4 - Resultados da análise de fenólicos totais para os extratos de folhas de amoreira .....	133
TABELA 4.5 - Compostos fitoestrogênicos identificados nos espectros de massas de altíssima resolução dos extratos de folhas de amoreira.....	141
TABELA 4.6 - Parâmetros de seletividade para os solventes orgânicos comumente utilizados na fase móvel em HPLC.....	145
TABELA 4.7 - Tabela ANOVA para o modelo gerado pelo planejamento de composto central para a otimização dos parâmetros cromatográficos .....	150
TABELA 4.8 - Parâmetros cromatográficos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta.....	151
TABELA 4.9 - Tabela ANOVA para o modelo gerado pelo planejamento de composto central para otimização dos parâmetros espectrométricos .....	154
TABELA 4.10 - Parâmetros espectrométricos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta.....	155
TABELA 4.11 - Tabela ANOVA para o modelo gerado para otimização dos parâmetros espectrométricos de fragmentação .....	163

TABELA 4.12 - Parâmetros espectrométricos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta.....	164
TABELA 4.13 - Classificação dos extratos em função da atividade estrogênica segundo o modelo de DA .....	175
TABELA 4.14 - Coeficientes dos modelos lineares para a quantificação dos flavonoides nos extratos .....	188
TABELA 4.15 - Teores de flavonoides encontrados nos extratos preparados com diferentes composições hidroalcoólicas .....	189
TABELA 4.16 - Concentração dos padrões de referência no extrato com 30%de etanol.....	193
TABELA 4.17 - Teste t-pareado e teste F para a seletividade do método analítico	194
TABELA 4.18 - Equações matemáticas dos modelos de regressão linear obtidos para os padrões de referência dos flavonoides .....	195
TABELA 4.19 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos lineares de regressão para cada padrão de referência utilizado na validação do método analítico .....	196
TABELA 4.20 - Coeficientes de variação para a repetibilidade do método analítico .....	197
TABELA 4.21 - Teste F e t-Student para comparação dos dados obtidos para precisão intermediária .....	197
TABELA 4.22 - Coeficientes de variação para a precisão intermediária do método .....	198
TABELA 4.23 - Exatidão obtida para o método analítico em 3 níveis de concentração dos analitos de referência.....	199
TABELA 4.24 - Índices pluviométricos (em mm) durante os 60 dias que precederam a coleta das folhas de amoreira.....	217
TABELA 4.25 - Teores de flavonoides encontrados em amostras de cápsulas comerciais de amora em % (m/m de extrato seco) .....	222

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação do ciclo fértil da mulher.....	4
FIGURA 1.2 - Corte histológico mostrando o desenvolvimento dos folículos ovarianos de acordo com a fase do ciclo reprodutivo feminino .....	4
FIGURA 1.3 - Representação do ciclo de liberação hormonal nas diferentes fases do ciclo reprodutivo feminino.....	5
FIGURA 1.4 - Reação de conversão da androstenodiona em testosterona e estradiol.....	5
FIGURA 1.5 – Esquema representativo da liberação de estradiol nas diferentes fases do ciclo fértil da mulher .....	7
FIGURA 1.6 - Esquema representativo das interações dos hormônios produzidos nos ovários (estrogênio e progesterona) em diferentes regiões cerebrais.....	8
FIGURA 1.7 - Representação do controle termoregulatório durante a pré-menopausa e no climatério.....	10
FIGURA 1.8 - Requisitos estruturais necessários para um metabólito secundário de planta candidato a fitoestrógeno.....	15
FIGURA 1.9 - Rota biosintética das principais classes de fitoestrógenos .....	18
FIGURA 1.10 - Diferentes morfologias observadas para folhas de uma mesma espécie de amoreira.....	19
FIGURA 1.11 - Fruto de <i>Morus alba</i> , espécie comumente encontrada no Brasil .....	20
FIGURA 1.12 - Estruturas químicas de substâncias identificadas e/ou isoladas de espécies de amoreira .....	22
FIGURA 1.13 - Culturas de células utilizadas em ensaios <i>in vitro</i> para extratos com potencial fitoestrogênico .....	26
FIGURA 1.14 - Reação de redução do sal de tetrazólio com produção de formazan.....	27
FIGURA 1.15 - Cristais de formazan eliminados para o meio celular e solubilizados após a adição de um agente solubilizante.....	28
FIGURA 1.16 - Estruturas químicas dos sais de tetrazólio utilizados nas análises colorimétricas dos ensaios de estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade.....	28
FIGURA 1.17 - Esquema representativo da “formação” dos íons em uma fonte ESI.....	33
FIGURA 1.18 - Espectrômetro de massas com analisador FT-ICR e o esquema do funcionamento de uma ICR.....	35
FIGURA 1.19 - Interações intermoleculares que governam a separação cromatográfica.....	36
FIGURA 1.20 - Representação do binômio seletividade – eficiência que rege a separação cromatográfica .....	37
FIGURA 1.21 – Influência dos parâmetros $\alpha$ , $k$ e $N$ na separação cromatográfica ..	38
FIGURA 1.22 - Analogia entre $N$ e o número de pratos de uma coluna de destilação fracionada.....	39
FIGURA 1.23 - Esquema representativo do funcionamento de um detector DAD..	41
FIGURA 1.24 - Esquema de funcionamento de um analisador triplo-quadrupolo. ...	42
FIGURA 1.25 - Diferentes modos de análise possibilitados pelo uso do espectrômetro de massas como detector do sistema cromatográfico .....	43
FIGURA 3.1 - Cultura de amoreiras na fazenda experimental da APTA (Gália - SP).....	51
FIGURA 3.2 - Fluxograma geral de execução dos experimentos da etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental.....	54

FIGURA 3.3 - Fluxograma do experimento para determinação da quantidade ótima de células a serem utilizadas nos ensaios biológicos.....	57
FIGURA 3.4 - Fluxograma para otimização do tempo de incubação com o MTT.....	59
FIGURA 3.5 - Sequência de otimização das condições experimentais para a realização do teste de estrogenicidade .....	60
FIGURA 3.6 - Fluxograma para o ensaio de estrogenicidade .....	63
FIGURA 3.7 - sequência utilizada na avaliação das figuras de mérito para validação do método analítico por LC-DAD .....	75
FIGURA 3.8 - grupos de folhas utilizados no estudo de exposição ao sol .....	82
FIGURA 3.9 - Partes da amoreira avaliadas em relação ao teor de flavonoides.....	83
FIGURA 4.1 - Esquema representativo da distribuição dos experimentos em níveis no planejamento fatorial .....	87
FIGURA 4.2 - Gráfico normal de contrastes baseado no rendimento em massa para os extratos preparados nos experimentos que compuseram o planejamento fatorial fracionado para otimização da extração de compostos bioativos.....	90
FIGURA 4.3 - Avaliação do período de incubação das células da linhagem MCF-7 com o MTT. ....	92
FIGURA 4.4 - Perfil de crescimento celular para uma linhagem cultivada <i>in vitro</i> ....	92
FIGURA 4.5 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células MCF-7 .....	93
FIGURA 4.6 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células BALB/c .....	94
FIGURA 4.7 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células MDA-MB-231 .....	95
FIGURA 4.8 - Estrutura química do indicador vermelho fenol em comparação com compostos estrogênicos .....	96
FIGURA 4.9 - Avaliação da influência de potenciais interferentes na estimulação do crescimento celular para a linhagem MCF-7 .....	97
FIGURA 4.10 - Estudo de citotoxicidade para o etanol utilizado na preparação dos extratos de folhas de amoreira. ....	98
FIGURA 4.11 - Estudo da estimulação do crescimento celular da linhagem MCF-7 por diferentes concentrações de E <sub>2</sub> .....	99
FIGURA 4.12 - Proliferação celular estimulada por E <sub>2</sub> após 6 dias de incubação. .	100
FIGURA 4.13 - Ensaio de estrogenicidade para os extratos preparados nos experimentos da etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental. ...	102
FIGURA 4.14 - Gráfico normal de contrastes baseado na atividade estrogênica...	103
FIGURA 4.15 - Correlação entre o rendimento da extração e a atividade estrogênica para os experimentos da triagem de variáveis do planejamento experimental .....	103
FIGURA 4.16 - Ensaio de estrogenicidade para os extratos preparados nos experimentos da etapa de otimização do extrato com potencial fitoterápico.....	105
FIGURA 4.17 - Curvas de estimulação do crescimento celular para extratos de folhas de amoreira em função da composição alcoólica do solvente extrator.. ..	106
FIGURA 4.18 - Imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de estrogenicidade realizado em linhagem MCF-7.....	107
FIGURA 4.19 - Imagens de microscopia de campo claro com aumento de 400 x para o estudo de estrogenicidade após 2 dias de incubação. ....	113
FIGURA 4.20 - Estudo de concentração-dependência para os extratos preparados com soluções etanólicas 75, 85 e 95% (v/v) em células MCF-7.....	115
FIGURA 4.21 - Ensaio de citotoxicidade para os extratos de folhas de amoreira incubados por 6 dias com as células Balb-c 3T3 clone A31.....	117

FIGURA 4.22 - Imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de citotoxicidade realizado em linhagem BALB/c 3T3 clone 31.....	118
FIGURA 4.23 - Ensaio de seletividade para os extratos de folhas de amoreira incubados por 6 dias com as células MDA-MB-231 .....	123
FIGURA 4.24 - Imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de seletividade realizado em linhagem MDA-MB-231 .....	125
FIGURA 4.25 - Valores de EC <sub>50</sub> para os extratos de folhas de amoreira em função da composição etanólica do solvente extrator.....	131
FIGURA 4.26 - Curva de calibração para o ácido gálico utilizada na análise de fenólicos totais para os extratos de folhas de amoreira.....	132
FIGURA 4.27 - Falta de correlação entre o teor de fenólicos totais e o resultado da atividade biológica para os extratos de folhas de amoreira preparados com diferentes soluções etanólicas.....	134
FIGURA 4.28 - Espectros de massas de altíssima resolução para os extratos de folhas de amoreira testados nos ensaios <i>in vitro</i> .....	135
FIGURA 4.29 - Dendrograma da HCA realizada com os espectros de massas FT-ICR extratos de folhas de amoreira .....	137
FIGURA 4.30 - Variância do modelo explicada por cada PC realizada com base nos espectros de massas dos extratos de folhas de amoreira.....	139
FIGURA 4.31 - Análise de componentes principais realizada com base nos espectros de massas dos extratos de folhas de amoreira.....	139
FIGURA 4.32 - Estruturas químicas dos fitoestrógenos e ácidos cafeoilquínicos identificados nos espectros de massas obtidos por FT-ICR-MS .....	141
FIGURA 4.33 - Cromatogramas das análises para escolha da fase estacionária..	143
FIGURA 4.34 - Gráfico normal de contrastes para a etapa de triagem de variáveis da otimização dos parâmetros cromatográficos. ....	147
FIGURA 4.35 - Representações da distribuição dos experimentos no planejamento de composto central .....	148
FIGURA 4.36 - Superfícies de resposta obtida para a otimização dos parâmetros cromatográficos .....	150
FIGURA 4.37 - Gráfico dos valores experimentais <i>versus</i> previstos pelo modelo matemático; gráfico da distribuição dos resíduos para a otimização dos parâmetros cromatográficos .....	150
FIGURA 4.38 - Condições cromatográficas otimizadas para o método analítico. ...	151
FIGURA 4.39 - Superfícies de resposta obtida para a otimização dos parâmetros espectrométricos .....	153
FIGURA 4.40 - A: gráfico de valores experimentais <i>versus</i> valores preditos pelo modelo quadrático; gráfico da distribuição dos resíduos para a otimização dos parâmetros espectrométricos .....	154
FIGURA 4.41 - Análise cromatográfica do <i>pool</i> de extratos com detecção em DAD e nas condições otimizadas para os parâmetros espectrométricos nos modos negativo e positivo. ....	155
FIGURA 4.42 - Superfície de contorno de absorção da região espectral de 200 a 400 nm para a amostra do pool de extratos utilizado na otimização do método analítico. ....	156
FIGURA 4.43 - Superposição dos cromatogramas para os 21 extratos de folhas de amoreira testados para a atividade estrogênica obtidos em 260 nm e 320 nm .....	157
FIGURA 4.44 - Dendrogramas da HCA realizadas com os cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira obtidos em 260 nm e 320 nm .....	158
FIGURA 4.45 - Variância explicada por cada PC na PCA realizada com base nos cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira obtidos em 260 nm. ....	158

FIGURA 4.46 - Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para a PCA (PC1xPC2xPC4) realizada com base nos cromatogramas obtidos em 260 nm para os extratos. ....	159
FIGURA 4.47 - Espectros de absorção na região de 200 a 500 nm para as bandas identificadas nos cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira.....	161
FIGURA 4.48 - Superfície de resposta obtida para a otimização dos parâmetros espectrométricos de fragmentação. ....	163
FIGURA 4.49 - Gráfico de valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo quadrático. Gráfico de resíduos para os parâmetros espectrométricos de fragmentação.....	164
FIGURA 4.50 - Espectros MS/MS em modos negativo e positivo obtidos para os analitos 1, 2, 3 e 4, com as possíveis estruturas químicas.....	166
FIGURA 4.51 - Espectro MS/MS em modo negativo obtido para o analito 5 .....	167
FIGURA 4.52 - Espectros MS/MS em modos negativo e positivo obtidos para o analito 6 .....	167
FIGURA 4.53 - Espectros MS/MS em modos negativo e positivo obtidos para os analitos 7 e 11 .....	168
FIGURA 4.54 - Espectro MS/MS em modo negativo obtido para o analito 8 .....	169
FIGURA 4.55 - Espectros MS/MS em modos negativo e positivo obtidos para o analito 9 .....	169
FIGURA 4.56 - Espectros MS/MS em modos negativo e positivo obtidos para os analitos 10 e 12 .....	170
FIGURA 4.57 - Dendrogramas da HCA realizadas apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas obtidos em 260 nm .....	171
FIGURA 4.58 - Variância explicada por cada PC na PCA realizada apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas em 260 nm .....	171
FIGURA 4.59 - Gráficos de <i>cores</i> e <i>loadings</i> para a PCA realizada apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas em 260 nm .....	172
FIGURA 4.60 - Gráfico da exatidão da validação cruzada para o modelo de classificação KNN dos extratos em função dos resultados de estrogenicidade .....	173
FIGURA 4.61 - Modelo de classificação PLS-DA dos extratos em função dos resultados de estrogenicidade.....	176
FIGURA 4.62 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade e seletividade realizados com o extrato preparado com 20% de etanol.....	178
FIGURA 4.63 Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade e seletividade realizados com o extrato preparado com 45% de etanol.....	180
FIGURA 4.64 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade e seletividade realizados com o extrato preparado com 75% de etanol.....	182
FIGURA 4.65 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade e seletividade realizados com o extrato preparado com 85% de etanol.....	183
FIGURA 4.66 - Cromatograma LC-MS/MS obtido no modo de perda neutra para os 6 principais flavonoides identificados nos extratos de folhas de amoreira.. .....	185
FIGURA 4.67 - Análises de correlação entre a resposta analítica de um flavonoide e a resposta total obtida para o par de homólogos por LC-MS/MS e LC-DAD.....	186
FIGURA 4.68 - Cromatograma de um extrato de folhas da amoreira ao qual foi adicionada naringina (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). .....	187
FIGURA 4.69 - Análise dos teores de flavonoides em função da composição etanólica do solvente extrator e da atividade biológica avaliada.....	190

FIGURA 4.70 - Análise comparativa das substâncias de referência e os respectivos flavonoides no extrato preparado com 30% Etanol. ....	192
FIGURA 4.71 - Modelos de regressão linear para a avaliação da linearidade na faixa de 1 a 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (em água) para rutina, isoquercetina e quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) .....	194
FIGURA 4.72 - Gráficos de resíduos dos modelos de regressão linear para os 3 flavonoides de referência .....	195
FIGURA 4.73 - Gráfico normal de contrastes para avaliação da robustez do método cromatográfico.....	201
FIGURA 4.74 - Cromatograma de referência para a avaliação da robustez do método cromatográfico.....	202
FIGURA 4.75 - Avaliação do tratamento de secagem das folhas de amoreira na preparação do extrato. ....	204
FIGURA 4.76 - Avaliação do tempo de maceração das folhas de amoreira na preparação do extrato.. ....	205
FIGURA 4.77 - Avaliação da proporção de folhas moídas em relação ao solvente na preparação do extrato. ....	206
FIGURA 4.78 - Avaliação do número de extrações sequenciais para a obtenção do perfil de flavonoides.....	208
FIGURA 4.79 - Montagem para extração soxhlet semelhante à que foi utilizada no estudo de comparação com os métodos farmacopeicos.....	209
FIGURA 4.80 - Análise comparativa entre o método de extração utilizado nesse trabalho e os métodos extratores de referência. ....	210
FIGURA 4.81 - Análises de correlação entre os teores individuais de flavonoides obtidos pelo método de maceração a frio utilizado nesse trabalho e os métodos de extração de referência.....	210
FIGURA 4.82 - Efeito da poda hiberna na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira.....	211
FIGURA 4.83 - Efeito das estações do ano na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira.. ....	212
FIGURA 4.84 - Efeito da exposição das folhas de amoreira ao sol na produção dos flavonoides.. ....	214
FIGURA 4.85 - Efeito do horário de coleta das folhas de amoreira ao sol na produção dos flavonoides.....	215
FIGURA 4.86 - A idade da planta na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira.. ....	216
FIGURA 4.87 - Efeito da precipitação na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira.....	218
FIGURA 4.88 - Distribuição dos flavonoides em diferentes partes aéreas da amoreira.....	219
FIGURA 4.89 - Amostras de cápsulas de amora comerciais que foram usadas para análise do teor de flavonoides. ....	220
FIGURA 4.90 - Cromatogramas de amostras de cápsulas comerciais de amora..	221

## RESUMO

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA COM POTENCIAL FITOESTROGÊNICO PARA USO NO TRATAMENTO DOS SINTOMAS DO CLIMATÉRIO.** As folhas de amoreira são popularmente utilizadas por mulheres no alívio das ondas de calor e sudoreses noturnas, sintomas decorrentes da produção irregular de estrogênio no climatério. Um problema recorrente no uso comum de produtos naturais com fins medicinais é o comprometimento da eficácia, pois não há controle de qualidade dos produtos. Neste trabalho foi realizada a padronização química qualitativa e quantitativa de extratos hidroetanólicos de folhas de *Morus alba* com potencial para uso no tratamento desses sintomas. Em testes *in vitro* de estrogenicidade com células ER<sub>+</sub> (MCF-7) extratos com até 35% (v/v) de etanol:água estimularam o crescimento celular como o 17-β-estradiol. Aqueles contendo entre 35 e 75% de álcool atuaram como agonistas parciais, enquanto extratos com elevado teor alcoólico induziram a morte celular. Nos estudos de seletividade para o receptor estrógeno com células ER<sub>-</sub> (MDA-MB-231), extratos preparados com até 55% etanol foram inativos, enquanto os demais levaram à morte das células. Estudos com células de fibroblastos não tumorais (BALB/c 3T3 clone 31) mostraram citotoxicidade para extratos com percentual alcoólico superior a 60%. Assim, extratos preparados com 0-35% etanol foram os mais indicados para uso como fonte de fitoestrógenos em NHRT e aqueles com 50 - 60% foram indicados como antitumorais em câncer de mama triplo-negativo. Ferramentas quimiométricas multivariadas aplicadas na análise do perfil químico dos extratos por FT-ICR-MS e LC-DAD-MS associaram a atividade estrogênica aos derivados 3-O-(6"-glicosil), 3-O-(6"-rutinosil) e 3-O-(6"-malonilglicosil) dos flavonoides quercetina e campferol, os quais foram selecionados como marcadores químicos para a padronização quantitativa do extrato em teor de flavonoides totais. Nos extratos com perfil de agonismo total, o teor máximo encontrado foi inferior a 3% (m/m), enquanto naqueles com agonismo parcial e com elevada citotoxicidade, os teores médios foram respectivamente 4,8% e 4,4%. A influência de fatores ambientais no teor dos compostos bioativos em folhas de amoreira também foi avaliada. Estações do ano: o maior teor foi encontrado no início da primavera (4,9%) e o menor no início do outono (2,0%). Ciclo circadiano: o valor máximo foi obtido no início da manhã (2,38%), com redução gradual ao longo do fotoperíodo. Senescência: crescimento no teor total dos flavonoides a uma taxa mensal média de 0,53%. Estresse hídrico: valores mais altos (2,0%) foram obtidos em períodos de estiagem. Análises quantitativas dos marcadores também foram realizadas em amostras de medicamentos fitoterápicos comerciais de amora, mostrando grande variabilidade nos teores (0,28 a 13,88%), evidenciando a falta de padronização dos extratos nas formulações. Esse trabalho mostrou que extratos hidroetanólicos de folhas de *Morus alba* possuem fitoestrógenos e têm potencial aplicação em medicamentos fitoterápicos. Além disso, o controle da composição do solvente extrator é fundamental para garantir a eficácia do extrato, visto que pequenas alterações podem tanto alterar significativamente a atividade biológica esperada, como manter a concentração dos compostos bioativos em uma faixa ótima, mesmo quando a sua produção é desfavorecida por fatores ambientais.



## ABSTRACT

### STANDARDIZATION OF MULBERRY LEAF EXTRACTS WITH HIGH PHYTOESTROGENIC POTENTIAL FOR USE IN CLIMACTERIC SYMPTOMS TREATMENT.

Mulberry leaves are commonly used by women to alleviate hot flashes, shivering and night sweats. These symptoms appear due to the irregular estrogen secretion by ovaries during climacteric and are often alleviated using natural products for non-hormonal replacement therapy (NHRT). A recurrent issue regarding the use of plant extracts as therapeutics is the lack of standardization, compromising their efficacy. In the present work, hydroethanolic extracts of *Morus alba* leaves with pharmaceutical potential were qualitatively and quantitatively standardized. All extracts were screened by *in vitro* assays for estrogenicity based in estrogen receptor cell model (ER+ MFC-7). The ones containing up to 35% ethanol (v/v) induced cell proliferation like 17- $\beta$ -estradiol. The extracts with alcohol level between 35 and 75% behaved as partial agonists, while higher alcohol content extracts killed the cells. In ER selectivity *in vitro* assay based on ER- cell model (MDA-MB-231), extracts prepared with up 55% ethanol were inactive and the others killed them. Cell-based assays using non-tumoral fibroblasts showed cytotoxicity for extracts with ethanol concentration higher than 60%. Thus, extracts prepared using 0-35% ethanol were the more suitable for phytoestrogenic sources in NHRT. Ethanol solutions (50-60%) were the best ones to get an extract with antitumoral potential for triple negative breast cancer subtype. Multivariate exploratory techniques were applied to analyze the chemical profile provided by FT-ICR-MS and LC-DAD-MS. Extracts with estrogenic activity had 3-O-(6"-glycosyl), 3-O-(6"-rutinosyl) e 3-O-(6"-malonylglycosyl) derivatives of quercetin and kaempferol. These 6 compounds were then defined as chemical markers for the quantitative standardization of mulberry leaf extracts, expressed as total flavonoids content (TFC). The maximum TFC was below 3% (w/w) in the total agonistic-like extracts. In the partial agonist-like and highly toxic ones the average levels were 4.8% and 4.4% respectively. The influence of environmental factors over the bioactive compounds content in mulberry leaves was also investigated. Four-seasons: the highest TFC was found in the beginning of spring (4.9%) and the lowest one in autumn (2.0%). Circadian cycle: the maximum TFC was reached in early morning (2.4%), gradually reducing throughout the photoperiod. Senescence: TFC average increment at 0.53% monthly. Hydric stress: higher TCF values (2.0%) were found during drought periods. Quantitative analysis of the chemical markers was also performed in samples of mulberry-based herbal drugs. The TCF results showed a huge variability among them (0.28 to 13.88%), clearly evidencing the lack of standardization of raw materials to be used in formulations. This work highlighted that mulberry leaf hydroethanolic extracts are sources for phytoestrogens and hence have promising potential for treatment of climacteric symptoms, but the control of extraction solvent composition is the key to efficacy. Small changes on it can interfere substantially in the expected biological activity, hence the concentration of bioactive compounds must be kept under an optimal range, even in an unfavorable environmental condition.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xix</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>xxi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - Climatério, andropausa e menopausa .....	3
1.2 - A fisiologia do climatério .....	3
1.3 - Os sintomas do climatério.....	6
1.3.1 - As ondas de calor.....	8
1.4 - Os tratamentos de reposição (não-)hormonal.....	10
1.4.1 - O uso de fitoestrógenos em terapia de reposição.....	13
1.4.1.2 - A amora nos tratamentos de reposição.....	19
1.5 - Avaliação do potencial fitoestrogênico de um extrato com potencial para uso em NHRT .....	23
1.6 - O controle de qualidade no uso de fitoestrógenosna terapia de reposição .....	29
1.6.1 - Os métodos mais utilizados para monitorar a qualidade de extratos fitoestrogênicos .....	30
1.6.1.1 - Análise de fenólicos totais.....	30
1.6.1.2 - Análises qualitativa e quantitativa de perfil químico .....	31
1.6.1.2.1 Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier como fonte de ionização eletrospray (ESI-FT-ICR-MS) ..	32
a) A fonte de ionização eletrospray (ESI).....	32
b) A espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR-MS).....	33
1.6.1.2.2 - Cromatografia Líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas de baixa resolução (LC-DAD-MS).....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
2.1 - Objetivo geral .....	47
2.2 - Objetivos específicos .....	47
<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>49</b>
3.1 - Preparação dos extratos.....	51
3.1.1 - Material Vegetal - folhas de <i>Morus alba</i> .....	51
3.1.2 - Planejamento experimental para otimização do extrato de folhas de amoreira ..	52
3.1.2.1 - Triagem de variáveis.....	52
3.1.2.2 - Modelagem da superfície de respostas.....	54
3.2 - Ensaio Celulares.....	55
3.2.1 - Manutenção das culturas das linhagens celulares utilizadas .....	55

3.2.2. - Método colorimétrico para proliferação e viabilidade celular .....	57
3.2.3 - Estudo de estrogenicidade (E-SCREEN modificado) .....	59
3.2.4 - Estudos de citotoxicidade e seletividade .....	64
3.2.5 - Curvas concentração-resposta de estimulação para os extratos .....	64
3.3 - Caracterização Química dos Extratos de folhas de amoreira .....	65
3.3.1 - Análises de fenólicos totais .....	65
3.3.2 - Análises de perfil químico .....	66
3.3.2.1 - Análises por Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier como fonte de ionização eletrospray (ESI-FT-ICR-MS) .....	66
3.3.2.2. - Análises por Cromatografia Líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos e Espectrometria de massas de baixa resolução (LC-DAD-MS) .....	67
3.3.2.2.1 - Desenvolvimento do método analítico .....	67
a) Otimização dos parâmetros cromatográficos .....	67
- a escolha da fase estacionária .....	68
- planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: triagem de variáveis .....	68
- planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: modelagem da superfície de respostas .....	69
b) Otimização dos parâmetros espectrométricos .....	70
3.3.2.2.2 - Aplicação do método analítico para a obtenção do perfil químico dos extratos de folhas de amoreira .....	73
a) Análise dos extratos testados nos ensaios celulares .....	73
b) Análise dos meios de cultura após a incubação das células de MCF-7 e MDA-MB-231 .....	74
c) Quantificação dos analitos presentes nos extratos de folhas de amoreira .....	74
3.3.3 - Validação do método analítico para os marcadores químicos de autenticidade do material vegetal .....	75
3.3.4 - Aplicação do método analítico na padronização do extrato de folhas de amoreira .....	78
3.3.4.1 - Manipulação do material vegetal para a preparação do extrato. ....	78
3.3.4.2 - Análises de variabilidade atribuída a fatores naturais. ....	80
3.3.4.3 - Análise de formulações fitoterápicas comerciais .....	83
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
4.1 - Preparação dos extratos .....	87
4.1.1 - Triagem de variáveis .....	87
4.2 - Ensaios celulares .....	91
4.2.1 - Período de incubação com o MTT .....	91
4.2.2 - Concentração ideal de células para os ensaios celulares .....	92
4.2.3 - Estudo de estrogenicidade (E-SCREEN modificado) .....	95
4.2.4 - Estudos de citotoxicidade e seletividade para extratos de folhas de amoreira ..	116
4.2.5 - Etapa final da otimização do extrato de folhas de amoreira com potencial fitoestrogênico .....	129

4.3 - Caracterização Química dos Extratos de folhas de amoreira.....	132
4.3.1 - Análises de fenólicos totais .....	132
4.3.2 - Análises de perfil químico dos extratos de folhas de amoreira .....	135
4.3.2.1 - Análises por Espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier como fonte de ionização eletrospray (ESI-FT-ICR-MS).....	135
4.3.2.2 - Análises de Cromatografia Líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos e Espectrometria de massas de baixa resolução (LC-DAD-MS).....	142
4.3.2.2.1 - desenvolvimento do método analítico.....	142
a) Otimização dos parâmetros cromatográficos .....	142
- a escolha da fase estacionária .....	142
- planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: triagem de variáveis .....	144
- Modelagem da superfície de resposta .....	148
b) Otimização dos parâmetros espectrométricos .....	151
4.3.2.2.2 - Aplicação do método analítico para a obtenção do perfil químico dos extratos de folhas de amoreira. ....	155
a) Análise dos extratos testados nos ensaios celulares para estrogenicidade ..	155
b) Análise do meio extracelular dos sistemas incubados com diferentes extratos de folhas de amoreira .....	177
c) Quantificação dos flavonoides presentes nos extratos de folhas de amoreira .....	184
4.3.3 - Validação do método analítico para os marcadores químicos .....	191
4.3.4 - Aplicação do método analítico na padronização do extrato de folhas de amoreira.....	202
4.3.4.1 - Manipulação do material vegetal para a preparação do extrato. ....	203
4.3.4.2 - Análises de variabilidade atribuída a fatores naturais. ....	211
4.3.4.3 - Análise de formulações fitoterápicas comerciais.....	219
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>223</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>227</b>

## ***INTRODUÇÃO***

---

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - CLIMATÉRIO, ANDROPAUSA E MENOPAUSA

O termo climatério vem do grego *klimacter* e significa período de mudanças. No século XIX, era utilizado para descrever certas épocas da vida do homem e da mulher, nas quais, acreditava-se passar por mudanças radicais<sup>1</sup>. Naquela época, não havia qualquer distinção prática entre menopausa e climatério e por isso, não havia esforços para se estabelecer alguma relação endócrina entre as duas condições. Acreditava-se que a menopausa iniciava o climatério e por isso esses dois termos não poderiam ser tratados separadamente. Em 80 a 90% das mulheres, a menopausa estava intimamente relacionada com os sintomas do climatério, os quais coincidiam com a interrupção definitiva da menstruação, porém com uma defasagem de alguns anos<sup>2</sup>. Ainda hoje, muitas vezes o termo menopausa é erroneamente utilizado para definir a transição do período de fertilidade para o de infertilidade feminina, período no qual aparecem diferentes sintomas decorrentes das alterações hormonais características desse período. No entanto, a menopausa deve-se referir apenas à última menstruação<sup>3</sup>.

O climatério não é uma fase exclusiva das mulheres e também afeta os indivíduos do sexo masculino. Durante esse período os homens passam por um processo conhecido como andropausa<sup>4</sup>, que, embora possa soar semelhante, não é análoga à menopausa. Em termos hormonais, o climatério masculino é caracterizado pela redução nas taxas de testosterona livre, o que é causado tanto pelo funcionamento irregular dos testículos, quanto pelas alterações na secreção de gonadotrofina pelas glândulas pituitárias. No entanto, o que realmente diferencia o climatério feminino do masculino, é a velocidade com que as mudanças hormonais ocorrem. Enquanto na mulher, o nível de estrogênio cai abruptamente, no homem, a queda nos níveis de testosterona é gradual<sup>5,6</sup>.

## 1.2 - A FISILOGIA DO CLIMATÉRIO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o ciclo fértil da mulher pode ser dividido em etapas<sup>7</sup> (FIGURA 1.1). A pré-menopausa se inicia com a primeira menstruação da mulher, a menarca. Na adolescência, a mulher possui uma reserva de aproximadamente 400.000 folículos ovarianos. Esse número reduz gradualmente a uma taxa de  $1000 \text{ folículos.mês}^{-1}$  durante o seu ciclo fértil até a

extinção completa, marcada pela menopausa<sup>8</sup>. Apenas uma pequena parte dos folículos ovarianos se desenvolve completamente até a maturação do ovócito que se forma em seu interior. A maioria deles morre por apoptose. Quando a idade da mulher se aproxima dos 35 anos, há uma redução na qualidade dos folículos, resultado em uma menor maturação e conseqüentemente da fertilidade (FIGURA 1.2). No entanto, os indícios do fim da pré-menopausa e início do climatério começam a aparecer a partir dos 40 anos, quando o ciclo menstrual torna-se irregular e os folículos já estão com a qualidade muito comprometida e com uma taxa muito baixa de maturação dos ovócitos, extinguindo-se completamente à época da menopausa. O último sangramento pode ocorrer entre 40 e 60 anos, sendo mais comum após os 50 anos<sup>9,10</sup>.

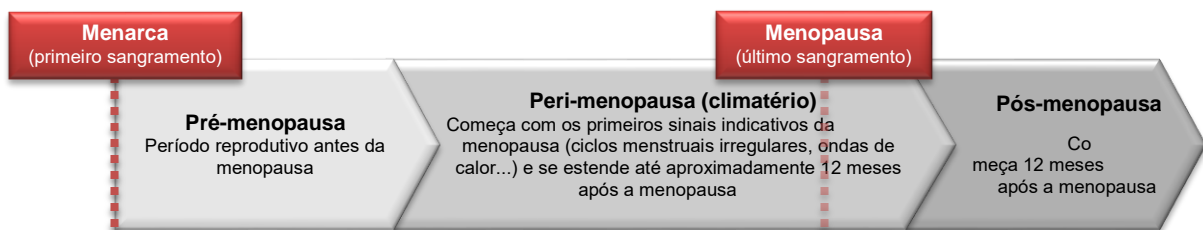


FIGURA 1.1 - Representação do ciclo fértil da mulher, segundo a OMS<sup>7</sup>

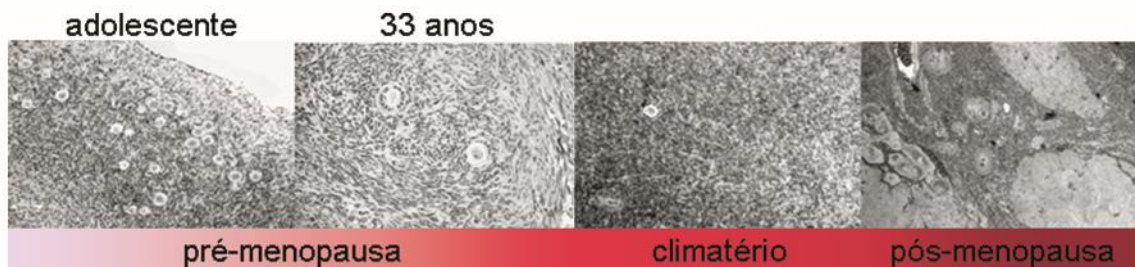


FIGURA 1.2 - Corte histológico mostrando o desenvolvimento dos folículos ovarianos de acordo com a fase do ciclo reprodutivo feminino (adaptado de PERHEENTUPA e HUHTANIEMI<sup>8</sup>)

O ciclo reprodutivo feminino é um mecanismo controlado pela tríade hipotálamo - glândula pituitária - ovário. Durante a pré-menopausa, o processo se inicia com a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) na glândula pituitária pelos neurônios do hipotálamo (FIGURA 1.3A)<sup>11</sup>. Quando as moléculas de GnRH interagem nos sítios receptores nessa glândula, ocorre a ativação do processo de síntese e liberação de gonadotrofinas: o hormônio folículo-estimulador (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Os dois últimos são transportados para os ovários, onde exercem funções importantes no ciclo reprodutivo. O LH se liga nos receptores presentes em um tipo de célula ovariana, a tecal. Quando ocorre essa

interação, é ativada a síntese da androstenodiona (um androgênio)<sup>12</sup>. Em paralelo, o FSH interage nos sítio receptor em outro tipo de célula ovariana, a granulosa. Essa interação leva à ativação do metabolismo do androgênio, que por aromatização do anel A, é convertido em 17-β-estradiol (E<sub>2</sub>, um estrogênio) (FIGURA 1.4). O desenvolvimento dos folículos ovarianos mencionados anteriormente também é um processo regulado pelo FSH. Quando os folículos atingem o estágio de maturação, eles se rompem, liberando o ovócito. Após a liberação, as paredes do folículo se transformam no corpo lúteo, uma glândula endócrina que finalmente libera o estrogênio, a progesterona e as inibinas A e B. Os quatro hormônios produzidos nos ovários são então liberados e transportados de volta (*feedback* negativo) ao hipotálamo e à glândula pituitária, onde regulam a liberação do FSH.

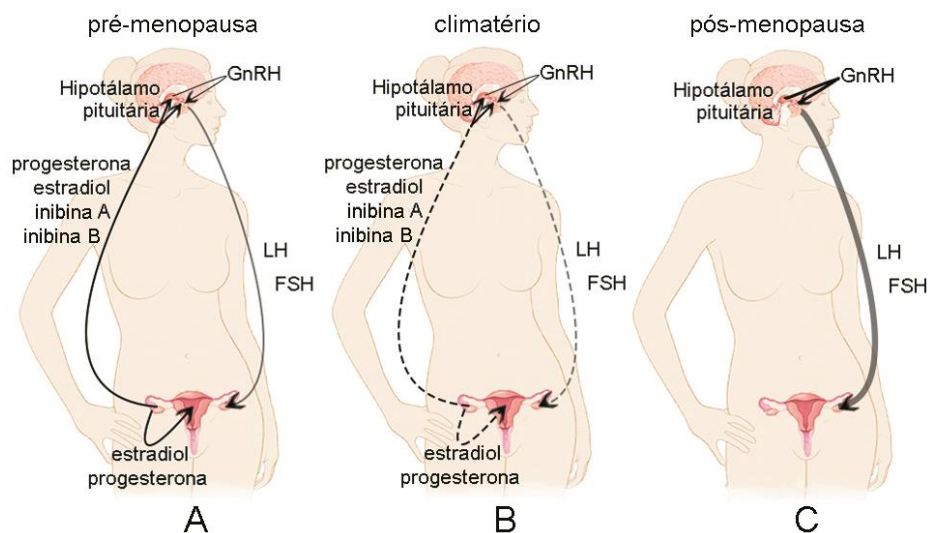


FIGURA 1. 3 - Representação do ciclo de liberação hormonal nas diferentes fases do ciclo reprodutivo feminino.

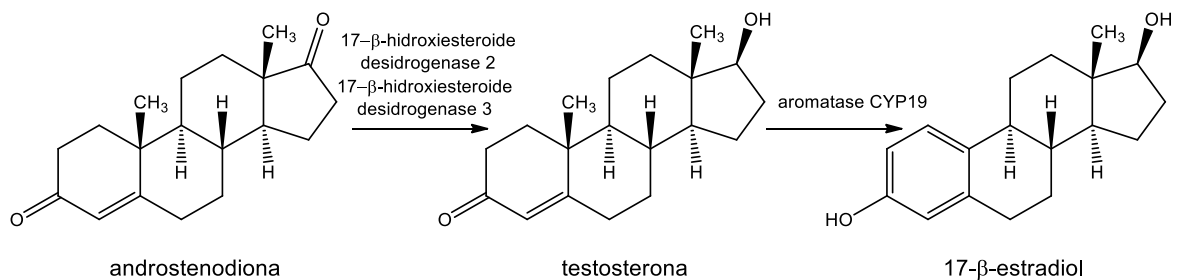


FIGURA 1.4 - Reação de conversão da androstenodiona em testosterona e estradiol

Na transição da pré-menopausa para o climatério, ocorre uma redução da atividade ovariana, diminuindo a quantidade liberada das inibinas A e B, da progesterona e do estradiol. Em consequência disso, a regulação da produção de FSH e LH na glândula pituitária fica comprometida e a concentração desses



hormônios no sangue aumenta (FIGURA 1.3B). Durante o climatério, a atividade ovariana reduz gradualmente, reduzindo o desenvolvimento dos folículos (e a formação do corpo lúteo), o que resulta na diminuição gradativa da liberação de progesterona e principalmente do estradiol no sangue, levando ao aumento gradual dos níveis de FSH.

Após a menopausa e durante a transição do climatério para a pós-menopausa, não há mais atividade ovariana, e, em função disso, também acaba a liberação de estradiol, progesterona e inibinas. Como não há hormônio chegando à glândula pituitária, a liberação do GnRH aumenta e, por consequência, os níveis de LH e FSH elevam significativamente (FIGURA 1.3C). Durante a pós-menopausa, ocorre uma maior estimulação da hipófise, levando a um aumento na produção do GnRH, que acaba por bloquear os receptores na pituitária, inibindo gradualmente a produção de LH e FSH<sup>13</sup>.

### 1.3 - OS SINTOMAS DO CLIMATÉRIO

Na pré-menopausa, a liberação dos hormônios, principalmente o estradiol ocorre com uma periodicidade regular, que corresponde ao ciclo menstrual (FIGURA 1.5). Durante o climatério, os níveis de estradiol oscilam irregularmente entre não detectáveis até valores superiores àqueles encontrados na fase anterior. Isso faz com que os níveis de FSH e LH variem entre concentrações muito elevadas até concentrações muito baixas<sup>14</sup>. Com a variação dos níveis desses hormônios, a formação do corpo lúteo fica comprometida, levando ao primeiro indício do climatério, a irregularidade do ciclo menstrual. Essa irregularidade inclui o aparecimento de uma amenorreia (ausência de menstruação) por um período de aproximadamente 60 dias (dois ciclos menstruais), que precede o último sangramento, a menopausa<sup>15</sup>.

A oscilação nos níveis de estrogênio leva ao surgimento de alguns sintomas característicos desse período, os quais podem ser classificados em psicológicos, somáticos, físicos<sup>16</sup>:

a) sintomas psicológicos: irritabilidade, queda da libido<sup>17</sup>, tendência à depressão e alterações de humor<sup>18</sup>.

b) sintomas somáticos: enxaquecas<sup>19</sup>, tonturas<sup>20</sup>, fadigas<sup>21</sup>, e insônia<sup>22</sup>.

c) sintomas físicos: alterações no trato urogenital<sup>23</sup>, osteoporose<sup>24</sup> e alterações vasomotoras, as quais incluem calafrios<sup>25</sup>, sudoreses excessivas e ondas

de calor<sup>26</sup>.

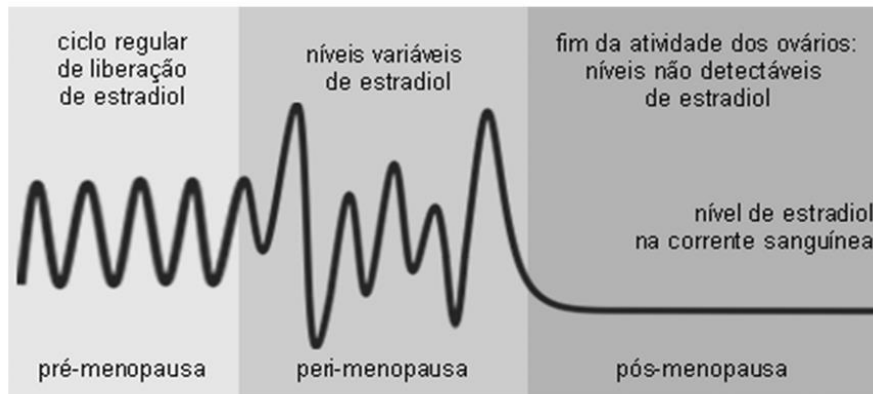


FIGURA 1.5 – Esquema representativo da liberação de estradiol nas diferentes fases do ciclo fértil da mulher. Adaptado de DEECHER e DORRIES<sup>14</sup>

Há tempos, existe uma discussão na comunidade médica e científica se apenas os sintomas físicos, principalmente as alterações vasomotoras e a do trato urogenital, estariam relacionados diretamente à variação nos níveis de estrogênio característica desse período, enquanto que os demais seriam secundários ou estariam relacionados de outra forma ao envelhecimento<sup>15</sup>. No entanto, na prática, a separação dos sintomas segundo essa premissa é muito complicada, uma vez que eles não se manifestam isoladamente. Mulheres que reclamam de ondas de calor também relatam distúrbios do sono e estados de fadiga. Em outros casos, a manifestação de atrofia vulvovaginal e secura vaginal levam às disfunções sexuais femininas pós-menopausais<sup>27</sup>, dentre as quais está a redução da libido<sup>28</sup>. O surgimento de múltiplos sintomas acontece devido à presença de grandes concentrações de receptores estrógenos distribuídos principalmente pelo cérebro, em regiões como hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo e a medula, regiões diretamente relacionadas com o controle cognitivo, de humor e termorregulatório. Quando o estrogênio, sobretudo o estradiol, é liberado irregularmente pelos ovários e chega ao cérebro, ocorre um desequilíbrio nas interações com os sítios ativos dos receptores localizados nos órgãos mencionados, desencadeando os sintomas<sup>29</sup> (FIGURA 1.6). Embora o mecanismo ainda não tenha sido esclarecido, acredita-se, por exemplo, que o estradiol esteja envolvido na modulação de sistemas monoaminérgicos, aumentando a neurotransmissão de serotonina e norepinefrina no hipotálamo, dois componentes importantes na manutenção do humor. Quando há variações nos níveis de estradiol, a quantidade liberada dos neurotransmissores acima também se desestabiliza, e felizmente é

rapidamente controlada pelos inibidores de recaptura dos mesmos. Isso sugere que a cada flutuação hormonal, o cérebro da mulher tem que se adaptar à nova condição hormonal, o que poderia explicar as variações de humor<sup>30</sup>. Na pós-menopausa, os sintomas vasomotores tendem a desaparecer, uma vez que nessa fase os hormônios ovarianos não são mais produzidos.

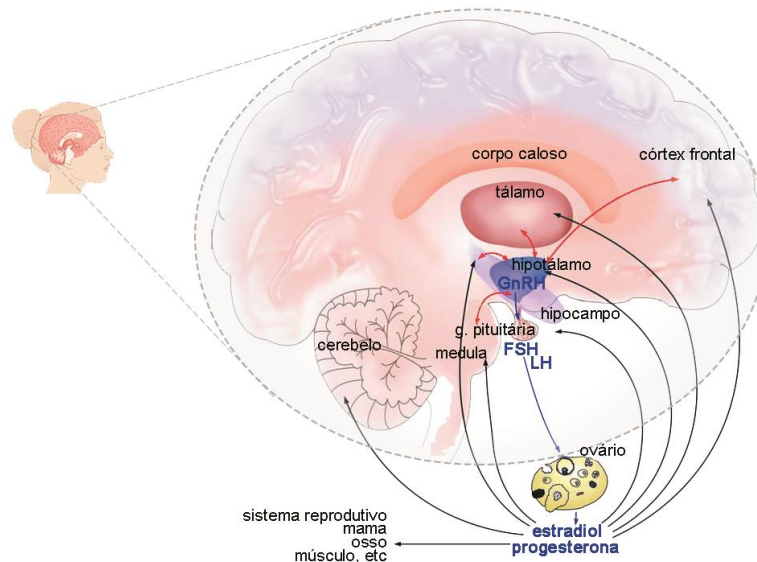


FIGURA 1.6 - Esquema representativo das interações dos hormônios produzidos nos ovários (estrogênio e progesterona) em diferentes regiões cerebrais. Adaptado de MORRISON et al.29.

### 1.3.1 - AS ONDAS DE CALOR

De todos os sintomas característicos do climatério, os vasomotores são os mais frequentemente relatados por mulheres que estão passando pelo período do climatério como aqueles que mais comprometem a sua qualidade de vida<sup>31</sup>. Além disso, muitas delas se queixam de acordarem frequentemente durante a noite devido à sudorese excessiva que as acomete durante a manifestação desses eventos<sup>32</sup>.

As ondas de calor consistem em sensações intensas e rápidas de calor, acompanhadas de enrubescimento e aumento de fluxo sanguíneo na pele. Duram entre 1 e 5 minutos, podendo se estender até 60 minutos<sup>33</sup> e geralmente são seguidas de calafrios. Tais sensações estão associadas às alterações no funcionamento do sistema termorregulatório, o qual é responsável por conservar ou dissipar o calor, através de vasoconstrição, vasodilatação e transpiração<sup>16</sup>.

A homeostasia térmica também é realizada por uma tríade: cérebro

(mais precisamente a região anterior do hipotálamo), cavidade corporal interna e o sistema circulatório periférico<sup>34</sup>. Acredita-se que os neurotransmissores serotonina e norepinefrina sejam peças-chave na regulação da temperatura corpórea<sup>35</sup>. Estudos realizados em modelos *in vivo* sugeriram que os subtipos 1a e 2a dos receptores de serotonina localizados nos neurônios pós-sinápticos estejam diretamente envolvidos na regulação da temperatura. Quando o subtipo 1a fosse ativado, ocorreria uma redução da temperatura corpórea, enquanto a estimulação do subtipo 2a levaria a um estado de hipertermia<sup>36,37</sup>. A ação do estradiol no sistema termorregulatório ainda não está totalmente elucidada, mas conhece-se de estudos *in vitro* e *in vivo* que esse hormônio é um neuromodulador dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico<sup>38,39</sup>. Em uma situação normal, como durante a pré-menopausa, a serotonina e a norepinefrina são liberadas na fenda sináptica e há um equilíbrio entre a sua interação com os receptores de cada subtipo, e ainda há a recaptura dos mesmos pelo neurônio pré-sináptico, fazendo com que a temperatura corpórea seja mantida em uma faixa ótima, cuja diferença entre os limites superior e inferior é de 0,4°C (FIGURA 1.7A).

Quando a concentração de estradiol que chega ao hipotálamo está abaixo do normal, a quantidade liberada de norepinefrina aumenta e a de serotonina diminui, havendo um desequilíbrio entre a ativação dos dois receptores e a recaptura pelo neurônio pré-sináptico. Por causa desse desequilíbrio, há um estreitamento da faixa ótima e uma mínima alteração da temperatura corpórea já ultrapassa o limite superior<sup>40,41</sup>. Na tentativa de se restaurar a temperatura normal, ocorre uma dilatação dos vasos sanguíneos, para a dissipação do calor, o que também faz com que aumente a transpiração, podendo chegar a uma sudorese excessiva, que geralmente acontece durante a noite. Como esse processo é extremamente rápido e faixa ótima de temperatura está reduzida, geralmente a queda da temperatura ultrapassa o limite inferior, o que provoca uma rápida vasoconstrição, na tentativa de se manter o calor e aumentar a temperatura interna (FIGURA 1.7B)<sup>14</sup>. Por isso, quando a mulher sente a onda de calor, logo em seguida é comum aparecerem calafrios.

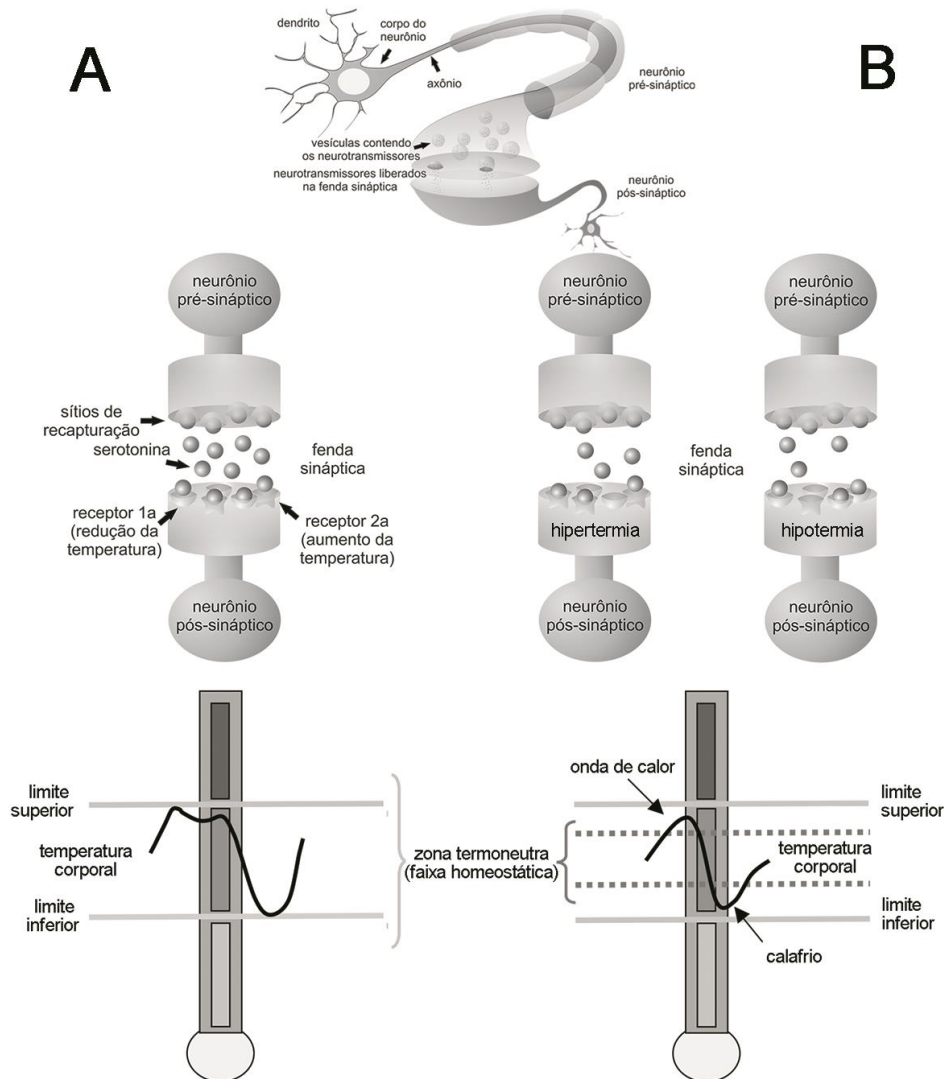


FIGURA 1.7 - Representação do controle termoregulatório durante a pré-menopausa (A) e no climatério (B). Adaptado de Deecher e Dorries<sup>14</sup>.

## 1.4 - OS TRATAMENTOS DE REPOSIÇÃO (NÃO-)HORMONAL

Na maioria das vezes, as ondas de calor desaparecem com o fim do climatério, pois o funcionamento normal do sistema termorregulatório é reestabelecido na pós-menopausa. No entanto, por ser um sintoma que traz bastante desconforto para as mulheres, muitas procuram tratamentos que “acelerem” o reestabelecimento do sistema ainda no climatério por meio de intervenções farmacológicas conhecidas como terapias de reposição hormonal (HRTs) ou não-hormonal (NHRTs)<sup>42,43</sup>.

Nas NHRTs, são utilizados fármacos que atuam diretamente no sistema nervoso central, de forma a restaurar o equilíbrio nos receptores de serotonina<sup>44</sup>. Uma das mais utilizadas é baseada no uso de inibidores seletivos de recaptura de serotonina (SSRIs) ou de inibidores seletivos de recaptura de

norepinefrina (SNRIs). Esses compostos interagem nos sítios ativos de recaptura dos neurotransmissores localizados no neurônio pré-sináptico. Com isso, a quantidade de neurotransmissores disponíveis para se ligar nos receptores de serotonina aumenta, reestabelecendo o equilíbrio fundamental para a manutenção da temperatura corpórea. O problema relacionado a este tipo de terapia advém do fato dos SSRIs ou SNRIs alterarem a concentração destes neurotransmissores de forma geral, com consequentes efeitos colaterais.

As HTRs utilizam hormônios na tentativa de se reestabelecer as concentrações nos níveis normais no período em que as mesmas se tornam inconstantes. Nessa linha existem 3 vertentes:

- a) as terapias baseadas em estrogênio isoladamente;
- b) as terapias baseadas na combinação de estrogênio e progesterona;
- c) as terapias baseadas em androgênios.

As HRTs baseadas em estrogênio (principalmente estradiol) são utilizadas há bastante tempo. Apresentam como principais vantagens a amenização das ondas de calor e da atrofia vulvovaginal<sup>45</sup>. Além disso, em baixas dosagens, pode contribuir para o aumento do HDL (lipoproteínas de alta densidade ou colesterol bom) e redução do LDL (lipoproteínas de baixa densidade ou colesterol ruim)<sup>46</sup> e reduzir o risco de doenças cardíacas<sup>47</sup>. No entanto, o uso contínuo de estradiol, mesmo em baixa dosagem, pode levar ao desenvolvimento de tromboembolia, além de potencializar o crescimento de tumores hormônio-dependentes: mama, ovário e endométrio<sup>48</sup>. Por causa dos riscos associados a doenças cardiovasculares, as terapias baseadas em hormônios bioidênticos surgiram como alternativa às HRTs clássicas<sup>49</sup>. O hormônio bioidêntico mais utilizado é o estriol, empregado em uma concentração aproximadamente 10 vezes maior que a de estradiol<sup>50</sup>. Além disso, há poucos estudos com esses hormônios, o que coloca em dúvida se são realmente melhores que o E<sub>2</sub><sup>51</sup>.

O risco de câncer de endométrio foi reduzido com a introdução de progestogênos (como as progestinas). No entanto a combinação de progesterona com estradiol potencializa ainda mais o risco de câncer de mama<sup>52</sup>. A Iniciativa pela Saúde da Mulher (Women's Health Initiative, WHI) vem investigando desde 1993 a influência das duas modalidades de HRTs na incidência de câncer mamário<sup>53</sup>. Em um estudo iniciado naquele ano, um grupo constituído por 16.608 mulheres utilizou HRT baseada na combinação de estrogênio e progestina durante 5 a 6 anos.

Paralelamente, em um segundo grupo, 10.739 mulheres que haviam sido submetidas à histerectomia (retirada do útero) utilizaram HRT baseada apenas na reposição do estrogênio durante 7 anos. Todas as mulheres de ambos grupos tinham idade entre 50 e 79 anos (sendo 25% delas entre 50 e 59 anos) e estavam na pós-menopausa. No primeiro conjunto de voluntárias a combinação dos hormônios estimulou o crescimento dos tumores de mama, e, mais seriamente, mascarou o diagnóstico precoce dos mesmos, levando à detecção somente quando já se encontravam em metástase. No segundo grupo, o uso do hormônio isolado praticamente não estimulou o crescimento de tumores. Os resultados publicados pela WHI contrariam muitos trabalhos que vêm sendo publicados na literatura associando o uso prolongado de estrogênio com o aumento de incidência de câncer de mama<sup>54,55</sup>.

A progesterona administrada isoladamente pode aliviar as ondas de calor, mas apresenta muitos efeitos colaterais que desencorajam a sua utilização com essa finalidade<sup>56</sup>. Após a divulgação dos resultados do estudo da WHI, as agências regulatórias passaram a recomendar o uso por um tempo reduzido de doses ultrabaixas da combinação de hormônios ou mesmo do estradiol isolado<sup>57</sup>. Essas baixíssimas dosagens têm-se mostrado eficientes em relação ao alívio das ondas de calor e da dispneúria, sem potencializar o risco de câncer, tanto de endométrio, quanto de mama<sup>58,59</sup>.

Existe ainda uma quarta modalidade de HRT, baseada em androgênios, principalmente testosterona. Essas terapias são recentes e direcionadas principalmente para o aumento da libido<sup>60</sup>. O uso contínuo e prolongado de androgênios por mulheres, porém, é desaconselhado, pois pode levar a um quadro de hirsutismo (aparecimento de características masculinas)<sup>61,62</sup>. Como alternativa, muitas mulheres recorrem à dihidroepiandrosterona (DHEA), que é um precursor da testosterona e do estradiol<sup>63</sup>. No entanto, em um guia de orientação lançado recentemente pela Sociedade Americana de Endocrinologia e apoiado por diferentes organizações na área, incluindo a Sociedade Internacional para a Menopausa, o uso de HRT baseado em testosterona e DHEA é desencorajado, sob a alegação de que não há estudos em quantidade suficiente que demonstrem a relação entre os androgênios e os sintomas da menopausa<sup>64</sup>.

### 1.4.1 - O USO DE FITOESTRÓGENOS EM TERAPIA DE REPOSIÇÃO

As HRTs, quando utilizadas continuamente durante um período inferior a 5 anos geralmente são seguras. Em períodos mais prolongados, porém, podem apresentar os riscos já mencionados, fazendo muitas mulheres as abandonarem antes que os sintomas desaparecessem por completo. Um estudo realizado com 254 mulheres que interromperam a HRT após 7 anos de uso contínuo mostrou que em 71,7% dos casos os sintomas voltaram a se manifestar após o primeiro ano, com a diminuição da intensidade acontecendo somente após o terceiro ano de interrupção. Uma parte dessas mulheres optou então por mudar o tratamento, escolhendo terapias de ultrabaixa dosagem, porém uma grande parcela elegeu o uso de fitoestrógenos como tratamento<sup>65</sup>.

Fitoestrógeno é o termo utilizado para designar compostos não-esteroidais identificados em plantas que conseguem mimetizar a ação do estrogênio, interagindo no mesmo sítio ativo do receptor estrógeno (ER)<sup>66</sup>. Para que essa mimetização aconteça, é necessário que o candidato a fitoestrógeno apresente conformação espacial e polaridade semelhantes ao E<sub>2</sub>. Em outras palavras, a distância entre as hidroxilas dos grupos fenólicos presentes na molécula deve ser o mais próximo possível daquela entre a hidroxila do grupo fenólico na posição 3 e a hidroxila do álcool na posição 17 do esqueleto esteroidal da molécula do 17β-estradiol, que é de aproximadamente 1,2 nm (FIGURA 1.8)<sup>67</sup>. Caso não haja uma hidroxila em alguma das posições, mas as densidades eletrônicas da molécula naquelas regiões sejam semelhantes às do estradiol, o critério também se aplica. Por serem estruturalmente semelhantes ao E<sub>2</sub>, os fitoestrógenos podem atuar como agonistas nos receptores estrógenos ER<sub>α</sub> e ER<sub>β</sub>, competindo com o hormônio pelos receptores<sup>68</sup>. De acordo com os dados de afinidades de ligação e transativação dos receptores estrógenos apresentados por Becher e Zsarnovszky<sup>69</sup> para vários fitoestrógenos, esses compostos apresentam, de modo geral, maior afinidade pelo subtipo β. Isso poderia explicar as variações na ação dos mesmos em diferentes tecidos celulares, nos quais essas duas proteínas estão expressas em quantidades distintas, visto que o ER<sub>α</sub> está mais relacionado ao mecanismo de proliferação celular, ao passo que o ER<sub>β</sub> está envolvido no processo de diferenciação celular<sup>70</sup>. Lamartiniere e colaboradores<sup>71</sup> mostraram, em estudos *in vivo*, que, em animais do sexo feminino, a genisteína, um fitoestrógeno presente nos grãos de soja, atuou diretamente no mecanismo de sinalização do fator de crescimento epidermal do



tecido mamário, o qual está relacionado ao mecanismo de diferenciação celular. Nos animais do sexo masculino, a genisteína não interferiu no mecanismo de sinalização do ER $\beta$ , porém reduziu a expressão do ER $\alpha$ , levando à inibição do crescimento de tumores prostáticos.

Embora não sejam tão potentes como o estradiol, estudos recentes mostraram que os fitoestrógenos, além de diminuir a intensidade e a frequência das ondas de calor e de melhorar a qualidade do sono, também foram capazes de minimizar outros sintomas do climatério, como a atrofia vaginal, a incidência de doenças cardiovasculares e tromboembolia. Um estudo clínico duplo-cego realizado por Zhang e colaboradores durante 24 meses com 85 mulheres na pós-menopausa, no qual foram avaliados fitoestrógenos derivados da *Epimedium brevicornum maxim*, mostrou que esses compostos conseguiram manter os níveis de densidade mineral óssea estáveis em relação àqueles encontrados no grupo controle, sem, no entanto, provocar hiperplasia no endométrio<sup>72</sup>. Em outros estudos descritos na literatura, mulheres que fizeram uso de fitoestrogênios não apresentaram risco em potencial de desenvolverem câncer de mama ou de endométrio<sup>73,74</sup>.

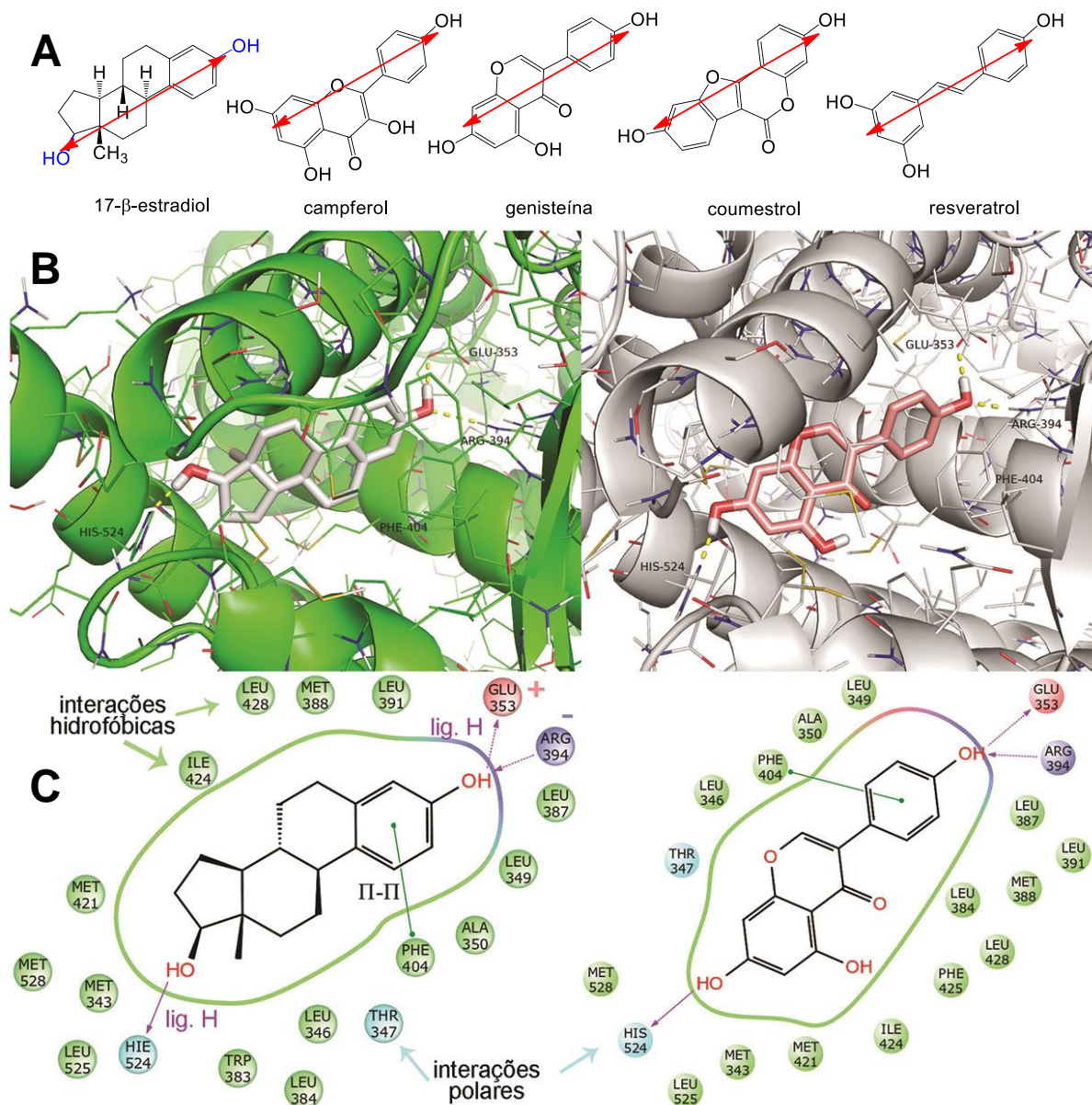


FIGURA 1.8 - Requisitos estruturais necessários para um metabólito secundário de planta candidato a fitoestrógeno. A: análise comparativa das distâncias entre as hidroxilas dos grupos fenólicos nas moléculas de alguns fitoestrógenos e a distância entre a hidroxila do grupo fenólico na posição 3 e a hidroxila do álcool na posição 17 na molécula de 17 $\beta$ -estradiol. B: estrutura cristalográfica de raios X com o modo de interação do estrogênio (esq.) ou de um fitoestrogênio (dir.) no receptor estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). C: interações intermoleculares entre a molécula do estradiol (esq.) ou da genisteína (esq.) e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do receptor. Adaptado de COS et al.<sup>68</sup> e POLUZZI et al.<sup>67</sup>

Os fitoestrógenos são resultantes do metabolismo secundário de plantas (FIGURA 1.9). As plantas superiores produzem uma enorme gama de metabólitos secundários e muitos possuem atividade biológica de diversa natureza, sendo que apenas uma minoria apresenta potencial fitoestrogênico. De acordo com essa característica, os metabólitos secundários podem ser divididos em 3 grandes classes: estilbenos, flavonoides e lignanas. Todos eles são provenientes de uma

rota biossintética comum que se inicia com a formação do ácido 4-cumárico, a qual pode ocorrer por dois caminhos: (i) reação de eliminação do grupo amino da molécula de tirosina; ou (ii) reação de eliminação do grupo amino da molécula de fenilalanina, com a formação do ácido cinâmico, o qual é hidroxilado na presença de NADPH e  $O_2$ <sup>75</sup>.

As lignanas são polifenóis resultantes de uma reação radicalar de oxidação seguida de uma dimerização do álcool coniferol, que, por sua vez, provém de etapas de hidroxilação e metilação sofridas pela molécula do ácido 4-cumárico (FIGURA 1.9). No intestino, as lignanas são metabolizadas pela flora bacteriana em enterolactonas e enterodiol, substâncias encontradas no tecido mamário<sup>76</sup>. Esses metabólitos são mais encontrados em sementes e grãos. Um estudo realizado com 90 mulheres indicou que extratos de linhaça (ricos em secoisolariciresinol) apresentaram efeito positivo na redução dos sintomas da menopausa durante 6 meses, sem provocar efeitos colaterais significativos<sup>77</sup>.

Os estilbenos e flavonoides são moléculas envolvidas no sistema de defesa da planta contra predadores (microrganismos, como fungos e bactérias, ou herbívoros). Suas rotas biossintéticas se originam de uma reação em cadeia do ácido 4-cumárico com moléculas de malonil-coenzima A (malonil-CoA), catalisada respectivamente pelas enzimas estilbeno sintase e chalcona sintase. Os estilbenos são quimicamente caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos separados em *trans* por uma ligação dupla. Para a sua formação, a molécula resultante da reação com o malonil-CoA passa por etapas de reação aldólica, hidrólise de éster, descarboxilação e desidratação, todas catalisadas pela estilbeno sintase. Os estilbenos são encontrados facilmente em cascas de uvas (e nos vinhos), em amendoim e frutas vermelhas e estão relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares à diminuição do LDL e são quimiopreventivos, por isso eles podem ser benéficos para mulheres na menopausa, embora não atuem diretamente nas ondas de calor<sup>78</sup>. Eles são considerados fitoestrógenos porque podem contribuir para o desenvolvimento dos folículos ovarianos, aumentando a quantidade de ovócitos maduros<sup>79</sup>.

Os flavonoides são quimicamente caracterizados por uma estrutura constituída de dois anéis aromáticos (A e B) interconectados por uma cadeia de 3 átomos de carbono, o qual pode ser cíclico (anel C) ou não. Biossinteticamente resultam da reação de condensação de Claisen seguida de enolização sofridas pelo

mesmo precursor dos estilbenos. Os flavonoides com propriedades fitoestrogênicas podem ainda ser subdivididos em três classes: flavonóis, isoflavonas e coumestanas.

Os flavonóis são formados por uma hidroxilação na posição 2 do anel heterocíclico (C), seguida de uma eliminação 1,2. São encontrados em frutas e vegetais, nas diferentes partes dos mesmos<sup>80,81</sup>. Diferentes estudos já relacionaram flavonóis, como o campferol com a prevenção de tumores e doenças cardiovasculares<sup>82</sup>. Um estudo com 32 mulheres na pós-menopausa com um quadro de hipercolesterolemia mostrou que a ingestão de uma bebida preparada com flavonóis extraídos do cacau levou a um aumento de 11% na concentração de marcadores solúveis para adesão celular na parede do vaso sanguíneo. Quanto maior a concentração desses marcadores no sangue, menor a chance de um entupimento das artérias, o que pode ocorrer devido à elevada taxa de HDL<sup>83</sup>.

As isoflavonas são caracterizadas principalmente pelo fato de o anel C estar ligado em meta ao anel B, devido a uma migração aril 1,2 durante a sua biossíntese. Em relação à atividade biológica, são os fitoestrógenos há mais tempo estudados e podem ser encontradas tanto em grãos, quanto em folhas e sementes. As três maiores fontes de isoflavonas utilizadas nas terapias de reposição hormonal são a soja, o cravo vermelho e uma planta popularmente conhecida na América do Norte e Europa como *Black Cohosh (Cimicifuga racemosa)*. Estudos realizados com extratos dessas plantas mostraram que esses flavonoides reduziram os sintomas da menopausa em até 36% e, ao mesmo tempo, baixaram os níveis de LDL, além de prevenir osteoporose e amenizar os sintomas psicológicos, embora o mecanismo de ação nesses casos ainda não esteja totalmente esclarecido. Além disso, não apresentaram efeitos tóxicos, tais como aumento de peso ou aumento da pressão arterial, mesmo em concentrações mais elevadas<sup>84,85,86</sup>.

As coumestanas são caracterizadas pela presença de um núcleo cumarínico (anel aromático A fundido a uma lactona) e são produzidas a partir das isoflavonas. Geralmente são encontradas em brotos de feijão, alfafa e soja e também no cravo vermelho, porém poucas apresentam estrogenicidade quando isoladas<sup>87</sup>.



### 1.4.1.2 - A AMORA NOS TRATAMENTOS DE REPOSIÇÃO

A amoreira é uma planta do gênero *Morus*, família Moraceae, ordem Urticales, classificada morfológicamente pela primeira vez por Lineu em 1753<sup>88</sup>. É bastante usada na prática da sericultura, como fonte exclusiva de alimento para o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), podendo também ser utilizada como forragem para animais, principalmente ovinos, ou como cerca-viva em projetos paisagísticos. É uma planta de origem asiática, mas que, devido à produção de seda, se espalhou ao redor do mundo com fácil adaptação, sobretudo aos climas tropical e subtropical, podendo ser cultivada tanto na forma de árvore quanto arbusto. Mais de 150 espécies de amoreira foram catalogadas baseadas na classificação de Lineu, porém o avanço das técnicas de biologia molecular permitiu identificar por estudos filogenéticos que muitas “espécies” eram na verdade variações fenotípicas para um mesmo genótipo<sup>89</sup>. Em uma espécie de amoreira, às vezes em um único exemplar, é possível encontrar as folhas com diferentes formatos (FIGURA 1.10).



FIGURA 1.10 - Diferentes morfologias observadas para folhas de uma mesma espécie de amoreira.

As espécies de amoreira mais conhecidas são a *Morus alba*, *Morus nigra* e *Morus rubra*, que receberam essas denominações por causa da forma dos frutos. No Brasil, a mais popular é a *Morus alba*, que possui frutos mais alongado (FIGURA 1.11). A amoreira tem uma longa história de uso na medicina tradicional oriental, principalmente na China, Japão e Coreia. Na China, além do uso bastante intenso na sericultura, partes da amoreira são utilizadas nas composições de medicamentos tradicionais chineses (TCMs), nos quais são conhecidas como Sang Gen (raiz), Sang Bai Pi (casca da raiz), Sang Zhi (caule); Sang ye (folha) ou Sang

shen (fruto) e indicadas respectivamente para (i) hipertensão, epilepsia, vermelhidão ocular, estomatite micótica, inflamação muscular; (ii) antitussígeno; (iii) hipertensão, dores e dormência nas juntas; (iv) resfriado, tosse seca, tontura, dor de cabeça, olhos avermelhados e embaçamento da visão; (v) constipação por alteração sanguínea, diabetes, tontura, insônia, palpitação, (vi) antioxidante<sup>90</sup>.



FIGURA 1.11 - Fruto de *Morus alba*, espécie comumente encontrada no Brasil

Estudos *in vitro* e *in vivo* vem demonstrando que extratos preparados com as raízes, caule, folhas ou frutos das espécies mencionadas apresentaram atividades biológicas de diferentes naturezas (TABELA 1.1). No Brasil, as folhas de amoreira são muito utilizadas na medicina popular para o preparo de infusões (chás) que amenizam o desconforto causado pelas ondas de calor. A amoreira vem sendo alvo de estudos para diferentes atividades biológicas, mas o seu potencial para esse propósito em particular é pouco conhecido. No final da década de 1990, experimentos realizados com a larva do bicho-da-seda mostraram que o estrogênio sintético (17- $\beta$ -estradiol), quando absorvido por ingestão, interferia na atividade das glândulas produtoras da seda, estimulando principalmente a síntese de proteínas diretamente relacionadas à qualidade do casulo produzido<sup>91,92</sup>. Recentemente, outro estudo, publicado por Yang e colaboradores<sup>93</sup>, mostrou que extratos preparados com a pupa do bicho-da-seda levaram a um aumento no nível de 17- $\beta$ -estradiol em ratas ovariectomizadas.

TABELA 1.1 - Atividade biológica descrita para extratos preparados com diferentes partes da amoreira para as espécies mais comuns

Parte da planta	Espécie	Atividade	Referência
folha	<i>Morus alba</i>	Antileucêmica	94
raiz	<i>Morus sp.*</i>	Anti-inflamatória	95
raiz	<i>Morus alba</i>	Antimetastática para melanoma	96
fruto	<i>Morus alba</i>	Antibacteriana	97
caule	<i>Morus alba</i>	Antineuroinflamatória	98
caule	<i>Morus nigra</i>	Antioxidante	99
folhas	<i>Morus nigra</i>	hipoglicêmica	100
folhas	<i>Morus rubra</i>	Antiaterosclerose	101
folha	<i>Morus rubra</i>	Antidiabetes	102
fruto	<i>Morus rubra</i>	Adjuvante em tratamento periodontal	103

\* espécie não informada.

Como a única fonte de alimento para o animal é a folha de amoreira, pode-se inferir que essa parte do vegetal contém fitoestrógenos, os quais estariam envolvidos na sinalização para a produção da seda. A hipótese da presença de compostos com esse perfil foi reforçada recentemente, pelo patenteamento de extratos alcoólicos da espécie *Morus alba* para uso no tratamento de sintomas do climatério, em tratamentos de câncer de mama e/ou útero e osteoporose<sup>104</sup>, embora no texto da patente constem apenas informações obtidas de estudos *in vitro* com linhagens celulares que expressam o receptor estrógeno e não há qualquer informação acerca da composição química dos extratos .

Há diferentes estudos nos quais são identificados metabólitos secundários nas espécies do gênero *Morus*, porém poucos são direcionados para a identificação de fitoestrógenos. KIM e colaboradores isolaram os flavonoides glicosilados quercetina 3-O-glicosídeo (isoquercetina) e quercetina 3,7-O-diglicosídeo de folhas de *Morus alba*<sup>94</sup> (FIGURA 1.12). DOI e colaboradores isolaram outro flavonoide glicosilado, o campferol 3-O-glicosídeo (astragalina), das folhas da mesma espécie, além da isoquercetina<sup>105</sup>. Pawlowska e colaboradores isolaram de frutos das espécies *Morus nigra* e *Morus alba*, os flavonoides glicosilados quercetina 3-O-rutinosídeo, campferol 3-O-rutinosídeo e a isoquercetina<sup>106</sup>. SONG e colaboradores por sua vez identificaram dois estilbenos, o oxiresveratrol e o resveratrol em frutos das espécies *Morus multicaulis* Perr. e em folhas da espécie *Morus atropurpurea* Roxb<sup>107</sup>. Nesses estudos, entretanto, quando houve avaliação da atividade biológica, a estrogenicidade não foi investigada. O potencial estrogênico



dos flavonoides glicosilados identificados em espécies de amoreira foi observado em um estudo *in vitro* realizado por LEE e colaboradores, que isolaram as moléculas da *Artemisia vulgaris* L., uma planta comumente utilizada na medicina tradicional chinesa para aumentar o fluxo menstrual em casos de desequilíbrio hormonal como na oligomenorreia<sup>108</sup>. Mais recentemente, DAT e colaboradores isolaram de folhas de *Morus alba* os flavonoides kuwanon S, ciclomulberrina, sanggenona J, sanggenona K, ciclomorusina, morusina, atalantoflaavona, campferol e dequelina, todos na forma aglicona<sup>109</sup>. Devido à similaridade estrutural com o 17- $\beta$ -estradiol, poderiam ser candidatos a fitoestrógenos. Os mesmos autores realizaram um ensaio *in vitro* com a linhagem MCF-7, um modelo bastante utilizado em estudos de estrogenicidade, mas nas concentrações testadas, todos os flavonoides apresentaram citotoxicidade.

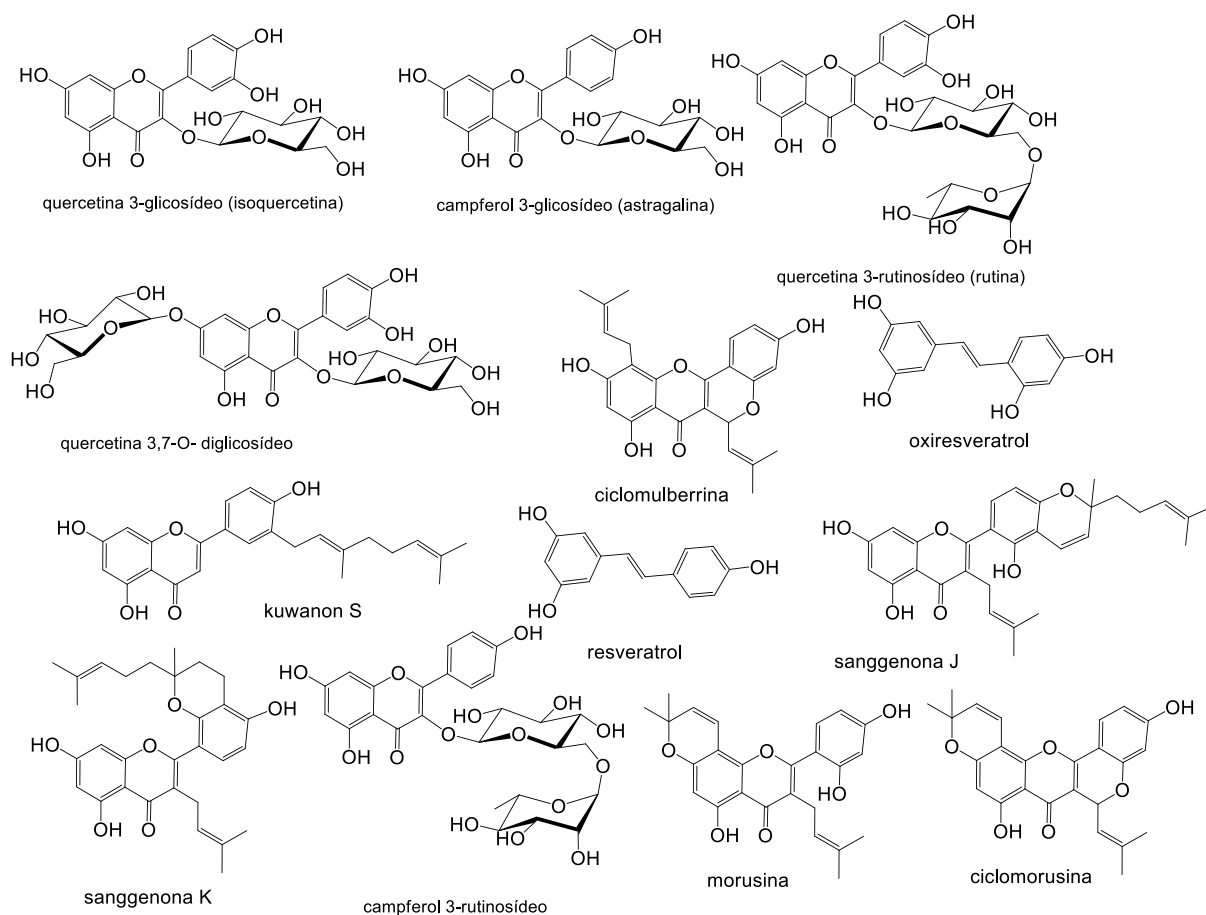


FIGURA 1.12 - estruturas químicas de substâncias identificadas e/ou isoladas de espécies de amoreira

A presença de resíduos de açúcar como substituintes nos flavonoides confere uma maior solubilidade em água, o que facilita o transporte e o armazenamento na planta<sup>110</sup>. Em uma formulação fitoterápica, o aumento da

solubilidade também torna-se interessante por facilitar a administração do medicamento. A grande maioria dos derivados glicosilados é metabolizado no intestino, sofrendo uma reação de desglicosilação e sendo absorvidos na forma aglicona<sup>111,112</sup>, embora também possam ser absorvidos na forma não-metabolizada<sup>113</sup>. A perda da molécula de açúcar de modo geral aumenta o potencial estrogênico da molécula.

O fato de conhecidos fitoestrógenos, como o campferol, ter provocado citotoxicidade para uma linhagem celular na qual se esperaria observar o efeito oposto, perfil característico de compostos como o estradiol, reflete a importância de se padronizar e regulamentar o uso de extratos em formulações fitoterápicas para tratamentos de sintomas do climatério. Em relação à atual legislação brasileira, até o presente momento não foi encontrada qualquer orientação oficial da ANVISA sobre a utilização de partes da amoreira para essa finalidade nas edições vigentes da Farmacopeia Brasileira<sup>145</sup>, do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira<sup>154</sup>, da Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado, e tampouco na Lista de Produtos Tradicionais Fitoterápicos de Registro Simplificado<sup>114</sup>, embora cápsulas de amora sejam facilmente encontradas em farmácias de manipulação.

Pensando em explorar o potencial fitoestrogênico das folhas da amoreira e a grande variabilidade de fatores envolvidos no uso de plantas para reposição hormonal, foi desenvolvido esse trabalho, que propôs a padronização de um extrato preparado com folhas de *Morus sp* com potencial para ser utilizado na amenização das ondas de calor, sintoma característico da fase do climatério. Desta forma, métodos analíticos devem ser aplicados para auxiliar na padronização das características de interesse do extrato, combinados com estudos *in vitro* para observar a atividade biológica de interesse.

## 1.5 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOESTROGÊNICO DE UM EXTRATO COM POTENCIAL PARA USO EM NHRT

Como mencionado anteriormente, para um extrato apresentar potencial fitoestrogênico é necessário que ele possua em sua composição uma molécula (ou um conjunto delas) que mimetize a ação do estradiol no sítio de interação do receptor estrógeno (ER), ativando a sinalização celular. Os testes que medem a capacidade do extrato (ou um composto isolado) de simular a ação do estradiol

recebem o nome de testes de estrogenicidade e podem ser divididos em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os ensaios *in vivo* são geralmente realizados em ratazanas (*Rattus norvegicus* e a raça mais utilizada é a Wistar) ovariectomizadas, para que esses animais não sejam capazes de produzir naturalmente os hormônios ovarianos. O extrato é administrado ao animal e, após um período correspondente a alguns ciclos reprodutivos (ciclo estral), é feita uma análise colpocitológica de esfregaço vaginal. Assim como na mulher, durante o ciclo reprodutivo das ratazanas, ocorre uma oscilação periódica dos níveis de estrogênio no sangue, levando a uma alteração no epitélio vaginal, a qual pode ser detectada pelo esfregaço<sup>115</sup>. Para a realização de ensaios *in vivo* é necessária a aprovação prévia de um comitê de ética e os resultados obtidos são bastante complexos. Além disso, os experimentos requerem um elevado número de animais, que na grande maioria das vezes são mortos em seguida, e os resultados apresentam uma grande variabilidade. Em um estudo para avaliação dos efeitos farmacológicos do Menoprogen®, um medicamento fitoterápico para o tratamento dos sintomas do climatério, Lu e colaboradores não conseguiram observar diferenças morfológicas por microscopia entre o grupo de ratas testes e o grupo controle<sup>116</sup>. Poucos anos depois, Ma e colaboradores conseguiram observar que o mesmo medicamento promoveu a recuperação da atrofia uterina e da glândula adrenal, além de reestabelecer os níveis de estradiol, estrona e progesterona no sangue<sup>117</sup>.

Em virtude das implicações relacionadas aos ensaios *in vivo*, os ensaios *in vitro* estão sendo utilizados preferencialmente para as triagens iniciais de perfil fitoestrogênico de extratos. Os testes bioquímicos são os mais simples de serem executados. Neles, os extratos são testados no alvo isolado, no caso o ER<sup>118,119</sup>. Esse tipo de teste fornece apenas uma resposta do tipo “sim ou não”, além de quantificar a afinidade pelo alvo macromolecular. Como o alvo está isolado, não é possível observar como a interação da molécula com o mesmo está inserida no contexto de sinalização celular. Neste ensaio é possível inferir se haverá uma ação agonista (ativando o receptor) ou antagonista (inibindo a sua ação) por meio de alterações na conformação da hélice 12 do receptor.<sup>120</sup> No entanto, isto depende de informações provenientes de métodos biofísicos como cristalografia de raios-X, que não é trivial principalmente para uma mistura de substâncias. Além disso, a informação estrutural por si só não é suficiente para determinar o padrão de

resposta celular. O raloxifeno é um fármaco modulador seletivo do receptor estrógeno (SERM) de segunda geração que pode atuar como agonista ou antagonista do ER, dependendo do tipo celular no qual o receptor está localizado. Ele atua como agonista regulando a densidade óssea em casos de osteoporose em mulheres na pós-menopausa<sup>121</sup> e, por esta razão, é utilizado nas HRTs. Por outro lado, a mesma molécula atua como antagonista do ER em células do tecido mamário, bloqueando a proliferação de células tumorais, com uso na quimioterapia para o câncer de mama<sup>122</sup>.

Ainda no âmbito dos ensaios *in vitro*, devido à limitação dos testes bioquímicos, os ensaios celulares vêm ganhando cada vez mais espaço. Um dos mais utilizados nessa categoria é o E-SCREEN®, teste desenvolvido inicialmente por Soto e colaboradores<sup>123</sup> para quantificar a estrogenicidade de xenobióticos e verificar se eles poderiam ter efeito acumulativo ou mesmo causar alterações sexuais em diferentes espécies antes que os mesmos fossem liberados no meio ambiente. Experimentalmente, mede-se a proliferação celular induzida por compostos bioativos presentes nos extratos em comparação àquela obtida pela ação do 17- $\beta$ -estradiol em linhagem de células MCF-7, um modelo de células humanas de adenocarcinoma mamário cuja replicação é estimulada pelo hormônio.

As linhagens de células humanas de câncer de mama são classificadas em quatro subtipos principais, conforme a expressão de 3 proteínas biomarcadoras: o receptor estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PR) e o receptor do fator de crescimento epidermal HER2/neu. O subtipo que expressa os receptores hormonais (ER+/PR+/HER-) é o mais comum e o de melhor diagnóstico, enquanto o subtipo que não expressa qualquer um dos três marcadores (ER-/PR-/HER-), também conhecido como triplo negativo, advém do tipo de câncer considerado mais agressivo, o mais difícil de ser diagnosticado e o que menos responde aos tratamentos quimioterápicos<sup>124</sup>. A linhagem MCF-7 expressa os receptores hormonais, principalmente o receptor estrógeno<sup>125</sup>. Nesse caso, se uma molécula agonista do receptor estrógeno (como o 17- $\beta$ -estradiol) interage com o ER, a replicação será estimulada e levará a um número muito maior de células quando comparada à cultura celular na ausência de agonistas. MCF-7 é uma linhagem que tende a formar colônias durante o crescimento celular, muitas vezes havendo superposição de camadas de célula (FIGURA 1.13).

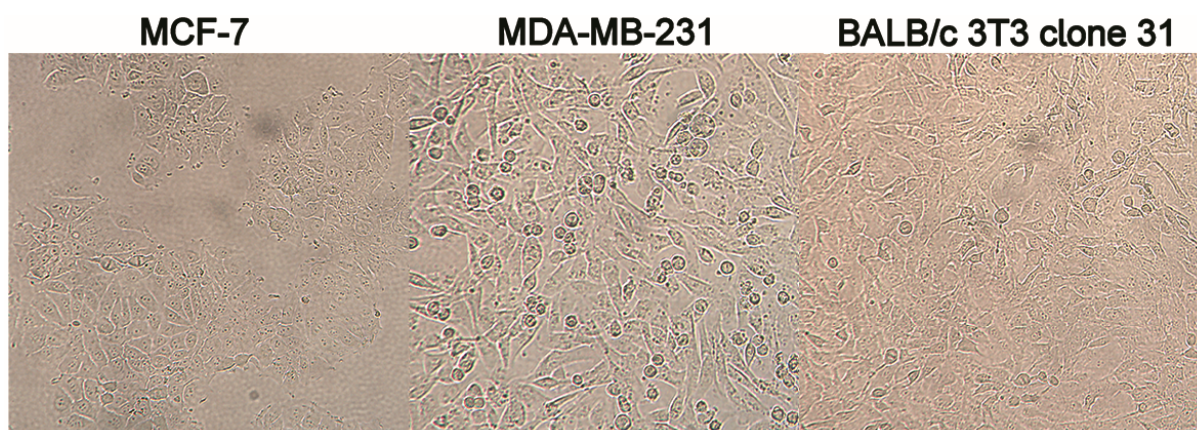


FIGURA 1.13 - Culturas de células utilizadas em ensaios *in vitro* para extratos com potencial fitoestrogênico

O teste de estrogenicidade é fundamental para avaliar se um extrato é fitoestrogênico. No entanto, para que esse extrato se torne um candidato em potencial para ser utilizado em terapia de reposição hormonal, estudos de seletividade e citotoxicidade são recomendáveis previamente aos estudos *in vivo*. O teste de seletividade busca avaliar se o extrato é seletivo ao ER, o qual está diretamente envolvido na modulação da sinalização celular do sistema termorregulatório. Experimentalmente, a avaliação pode ser realizada com base em um modelo de células humanas de adenocarcinoma mamário que não expressem o receptor estrógeno, como a MDA-MB-231. Ao contrário da MCF-7, essa linhagem é do subtipo triplo negativo, pois não expressa qualquer um dos 3 marcadores citados anteriormente. Por essa razão, a replicação celular não é estimulada por hormônios ou por moléculas que mimetizem a ação dos mesmos. Dentre as linhagens triplo-negativas, também conhecidas por subtipo basal, a MDA-MB-231 é uma das mais utilizadas em estudos sobre mutação gênica e metástase<sup>126</sup>. É uma linhagem que replica rapidamente e preferencialmente em monocamadas (FIGURA 1.13).

Os testes de citotoxicidade são realizados com a finalidade de se investigar se o extrato com potencial fitoestrogênico também apresenta algum efeito tóxico em células saudáveis. Esse estudo também é feito por meio de ensaios *in vitro* e é uma etapa preliminar bastante importante antes de se passar para um estudo *in vivo* mais complexo, que demandam custo e tempo maiores. Se o extrato apresentar toxicidade no ensaio *in vitro*, a probabilidade de ele vir a ser testado *in vivo* será muito baixa. Esses testes são baseados em medidas de viabilidade celular, realizada em modelos de células de fibroblastos. Uma das linhagens mais utilizadas é a BALB/c 3T3 clone 31, recomendada pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA

para essa finalidade<sup>127</sup>. A linhagem BALB/c 3T3 (comumente conhecida apenas como BALB/c) é uma linhagem de fibroblastos isolados de embriões (com até 17 dias gestacionais) de camundongos albinos da raça BALB/c (*Mus musculus*). É uma linhagem de fácil manuseio que sempre cresce rapidamente em monocamadas. É capaz de se dividir infinitamente, porém quando atingem 100% de confluência, ocupando toda a superfície do frasco de cultura, a divisão é interrompida<sup>128</sup> (FIGURA 1.13).

Nesses 3 ensaios, as células são incubadas com o extrato diluído em meio de cultura por um determinado período de tempo. A quantificação do crescimento ou da viabilidade celular é expressa pelo número de células vivas na cultura, por isso ela requer então um método analítico. Para se quantificar o número de células vivas em uma cultura, existem diferentes métodos, como os de contagem direta dos núcleos celulares marcados<sup>123</sup> ou ainda os métodos colorimétricos envolvendo a incorporação de vermelho neutro<sup>129</sup> ou a redução de um sal tetrazólio<sup>130</sup>. O sal de tetrazólio em solução apresenta uma cor amarela e ao ser reduzido, leva à formação do formazan, que é insolúvel em água e apresenta coloração azul/violeta (FIGURA 1.14).

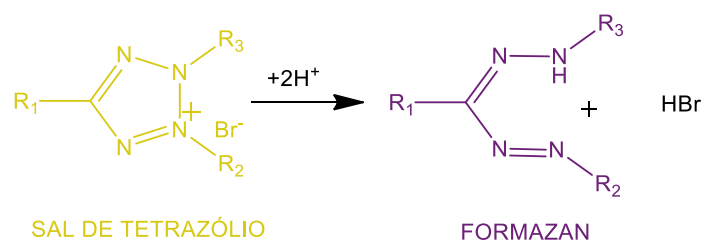


FIGURA 1.14 - Reação de redução do sal de tetrazólio com produção de formazan

Como possuem uma carga positiva, os íons tetrazólio são transportados para o citoplasma via diferença de potencial da membrana plasmática e tendem a interagir em regiões aniônicas, principalmente grupos fosfato ligados ao retículo endoplasmático<sup>131</sup>. Essa mesma organela produz o NADH, que, ao ser oxidado a NAD, leva à redução do sal de tetrazólio à formazan, cujos (micro)cristais são armazenados em vesículas lipídicas ou eliminados por exocitose para o meio extracelular (FIGURA 1.15A).

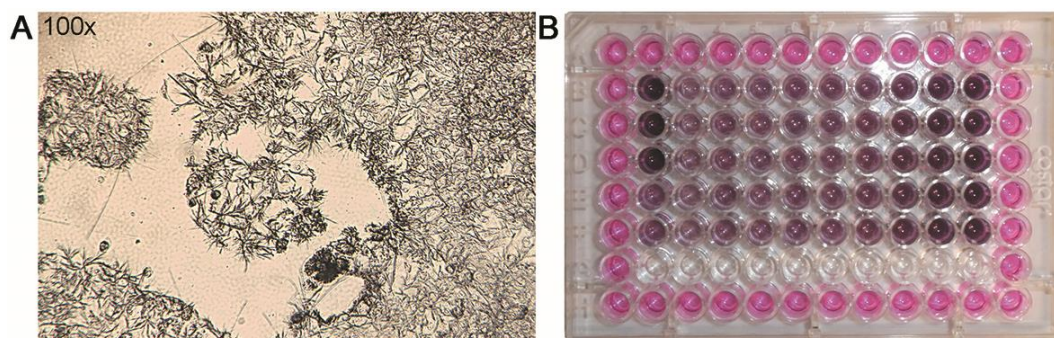


FIGURA 1.15 - Cristais de formazan: (A) eliminados para o meio celular e (B) solubilizados após a adição de um agente solubilizante

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, também conhecido como Metil-Tiazolil-Tetrazólio (MTT) é o sal de tetrazólio mais comumente utilizado nos métodos colorimétricos para estudos de viabilidade<sup>132</sup> ou proliferação celular<sup>130</sup> e também foi o escolhido para os estudos deste trabalho. No entanto, outros sais, como o XTT (brometo de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e o NBT (brometo de nitroazul de tetrazólio) também são utilizados nesses tipos de ensaio (FIGURA 1.16)<sup>133</sup>.

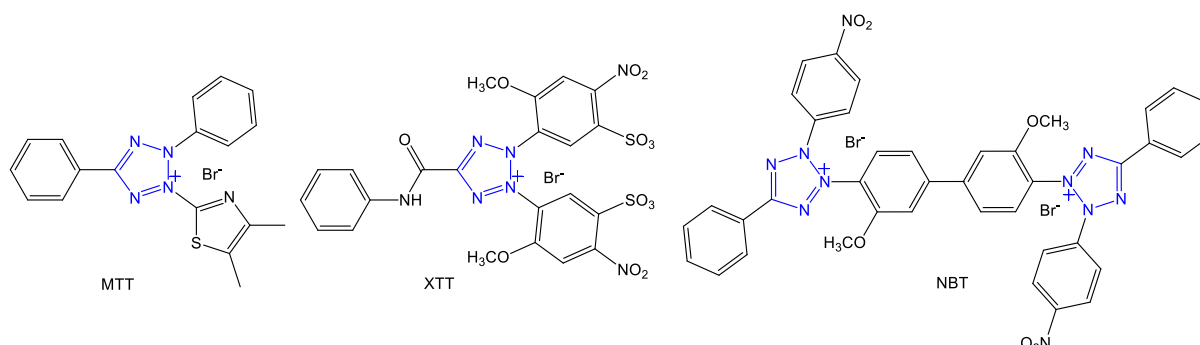


FIGURA 1.16 - Estruturas químicas dos sais de tetrazólio utilizados nas análises colorimétricas dos ensaios de estrogénicidade, citotoxicidade e seletividade

Como os cristais de formazan formados são armazenados em vesículas lipídicas no citoplasma da célula, é necessário adicionar um agente solubilizante constituído por um tensoativo (geralmente dodecilsulfato de sódio, SDS; e um solvente orgânico – dimetilsulfóxido - DMSO) para romper a membrana celular e solubilizar os cristais<sup>134</sup>. Quando a solução está homogênea e translúcida, é feita uma análise colorimétrica na região do visível (FIGURA 1.15B).

## 1.6 - O CONTROLE DE QUALIDADE NO USO DE FITOESTRÓGENOS NA TERAPIA DE REPOSIÇÃO

O uso de fitoestrógenos em terapias de reposição vem crescendo continuamente. Pensando na eficiência de sua utilização em uma terapia de reposição hormonal, o nível de compostos bioativos absorvidos pelo organismo deve ser constante para que não haja grandes variações nos sintomas. Muitas vezes, os fitoestrógenos são consumidos na forma de alimentos *in natura* (frutas ou legumes) ou infusões (chás), dificultando esse controle<sup>135</sup>. Os hábitos alimentares variam bastante de país para país e, conseqüentemente, a quantidade de fitoestrógenos também. Os alimentos à base de soja, ricos em isoflavonas, são muito populares nos países asiáticos, enquanto os europeus, de forma geral, consomem uma maior quantidade de grãos e cereais, ricos em lignanas. Já aqueles que vivem próximos do mar mediterrâneo apresentam um consumo significativo de vinho, ricos em estilbenos e flavonoides. Apenas para ilustrar a variabilidade na quantidade de fitoestrógenos consumidos em diferentes países, um levantamento publicado em 2007<sup>136</sup> mostrou que o consumo entre adultos no Japão era de 50 a 200 mg.dia<sup>-1</sup>, enquanto em outros países asiáticos era de 20 a 150 mg.dia<sup>-1</sup> e nos países ocidentais, aproximadamente 2 mg.dia<sup>-1</sup>.

Além disso, os metabólitos secundários de plantas têm a sua produção bastante suscetível à interferência de fatores externos, como a qualidade do solo, a quantidade de chuva, a exposição ao sol, as estações do ano, o período de coleta, etc. Soma-se ainda o fato de que a produção e distribuição desses metabólitos não ocorrem de maneira uniforme pelas diferentes partes da planta<sup>81</sup>. No caso de formulações comerciais, como os suplementos nutricionais e chás, deve-se considerar também a manipulação e preparo dessas formulações. Em outras palavras, é imensa a quantidade de variáveis envolvidas no preparo de um extrato rico em fitoestrógenos, o que o torna muito suscetível a variações. Dessa forma, é necessário um controle da qualidade, segurança e eficiência das formulações fitoterápicas.



## 1.6.1 - OS MÉTODOS MAIS UTILIZADOS PARA MONITORAR A QUALIDADE DE EXTRATOS FITOESTROGÊNICOS

### 1.6.1.1 - ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS

Entende-se por composto fenólico toda molécula que possuir em sua estrutura química um ou mais anéis aromáticos com no mínimo uma hidroxila como substituinte<sup>137</sup>. Muitos compostos polifenólicos apresentam estruturas químicas semelhantes ao estradiol e por isso possuem ação estrogênica<sup>138,139</sup> ou antiestrogênica<sup>140,141</sup>.

O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu é o mais amplamente utilizado para análise de fenólicos totais<sup>142,143</sup>, sendo presente em diferentes farmacopeias<sup>144</sup>. A farmacopeia brasileira recomenda o método de Folin-Denis para determinação de taninos<sup>145</sup>, polifenóis produzidos a partir da mesma rota biossintética que leva à formação do ácido 4-cumarínico e do ácido cafeico<sup>146</sup> (FIGURA1.9). São os taninos que conferem a adstringência a alimentos não-maduros e a bebidas como chás.

O método original foi proposto por Folin e Denis<sup>147</sup> para determinação de fenóis livres em urina. Ele é baseado em uma reação de oxi-redução em meio básico (pH ~10) entre os íons fosfomolibdato e fosfotungstato que compõem os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu (ambos de coloração amarela) e os íons fenolato dos compostos fenólicos (os quais se encontram desprotonados naquele pH), resultando em uma coloração azul bastante intensa. O mecanismo exato da reação não é conhecido, mas acredita-se que a reação aconteça por formação de complexo e a mudança na coloração esteja associada à redução do Mo(VI) (amarelo) para Mo(V) (azul)<sup>148</sup>. O fosfomolibdato e o fosfotungstato são instáveis em meio básico, exigindo uma maior concentração de compostos fenólicos, que, por sua vez levaria à precipitação de sais insolúveis. Para contornar o problema, Folin e Ciocalteu<sup>149</sup> adicionaram sulfato de lítio ao reagente, que passou então a ser conhecido como reagente de Folin-Ciocalteu.

As análises de fenólicos totais geralmente são acompanhadas de análises de potencial antioxidante, visto que tais compostos podem inibir o processo de reação em cadeia iniciado por radicais livres produzidos metabolicamente, exercendo uma ação protetora processo de estresse oxidativo celular por meio da remoção de espécies reativas<sup>150,151</sup>. Entretanto, também pode ser utilizado em uma análise preliminar para fitoestrógenos, que também são polifenóis.

### 1.6.1.2 - ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE PERFIL QUÍMICO

As análises de fenólicos totais apenas servem para estimar o conteúdo de compostos fenólicos presentes em um determinado extrato. No entanto, para classificar um polifenol como fitoestrógeno, são necessárias análises muito mais complexas.

As análises qualitativas fornecem informações sobre a natureza química dos componentes de um determinado extrato, principalmente em relação à presença de substâncias que atendam ao critério apresentado na seção 1.4.1 e que possam ser consideradas fitoestrógenos. Pelas análises quantitativas é possível saber qual a concentração dos compostos bioativos necessária para se observar determinada atividade biológica. A análise quantitativa também permite saber como essa concentração está sendo alterada sob a ação de fatores externos, como umidade, temperatura, exposição ao sol, etc., uma vez que o metabolismo das plantas é bastante influenciado pelos mesmos e conseqüentemente influencia a eficácia da formulação fitoterápica.

Além disso, conhecendo-se o perfil químico do extrato, torna-se possível identificar um ou mais marcadores químicos, que são compostos característicos da planta de origem. Esses marcadores não têm que ser necessariamente os responsáveis pela atividade biológica em questão, porém são fundamentais para assegurar a autenticidade do material vegetal que está sendo utilizado na preparação do extrato<sup>152</sup>.

O monitoramento da qualidade dos extratos, desde a matéria-prima até o produto final, deve seguir os parâmetros recomendados pelas autoridades sanitárias do país onde ele será utilizado. No Brasil, tais parâmetros estão reunidos na Farmacopeia Brasileira<sup>153</sup> e em Resoluções atualizadas periodicamente, ambas elaboradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No ano de 2014, a ANVISA emitiu a Instrução Normativa (IN) nº 4, na qual preconiza o controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos (MF) e os produtos tradicionais fitoterápicos (PTF). Essa classificação em MF e PTF é baseada principalmente na segurança e eficácia do produto final: o MF precisa ter estes parâmetros comprovados em estudos clínicos, enquanto para o segundo isto é feito por tempo de uso descrito na literatura técnico-científica. No entanto o documento reitera que o controle de qualidade deve apresentar critérios semelhantes para ambos. De acordo

com a regulamentação da ANVISA, todo fitoterápico (MF e PTF) tem que ser constituído apenas de Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais (IFAV), descritos no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB)<sup>154</sup>, não podendo conter em sua formulação o princípio ativo isolado ou em elevado grau de pureza<sup>155</sup>.

O controle de qualidade do fitoterápico, desde a sua produção até a formulação final inclui a obtenção do perfil químico e a validação do método analítico. Ele é realizado em relação aos IFAVs e os métodos cromatográficos são os recomendados pela ANVISA para esta finalidade. As recomendações para a avaliação da qualidade estão organizadas em monografias publicadas em farmacopeias ou constam em Resoluções de Diretoria Colegiada (RDCs) que são revisadas pela ANVISA periodicamente.

Além das técnicas cromatográficas, outras técnicas analíticas são bastante utilizadas, principalmente na obtenção do perfil químico do extrato.

#### 1.6.1.2.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER COMO FONTE DE IONIZAÇÃO ELETROSPRAY (ESI-FT-ICR-MS)

A ESI-FTICR-MS não faz parte do atual escopo de técnicas analíticas utilizadas para o controle de qualidade. Entretanto essa é uma técnica bastante promissora que vem sendo utilizada na elucidação estrutural de produtos naturais. Graças à sua altíssima resolução, na ordem de 1 a 2 ppm, ela permite determinar com exatidão e precisão a massa exata dos fitoestrógenos presentes em um extrato com potencial fitoterápico<sup>156</sup>.

##### a) A fonte de ionização eletrospray (ESI)

As fontes de ionização à pressão atmosférica (API) foram um divisor e águas no âmbito das análises químicas por tornar possível analisar amostras incompatíveis com equipamentos de cromatografia a gás, embora mesmo nos equipamentos que utilizam essas fontes, a detecção continua acontecendo em fase gasosa. Uma das mais utilizadas é a fonte ESI, por permitir a análise de moléculas em soluções altamente polares, como as aquosas. A amostra é introduzida na fonte por um capilar a uma vazão muito baixa (geralmente 1 - 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Entre o capilar e a primeira lente focalizadora na entrada do analisador de massas, aplica-se uma diferença de potencial (3 - 6 kV), gerando um campo elétrico forte. Devido à força do

campo, as gotas formadas na saída do capilar passam a apresentar excesso de carga (positiva ou negativa) na superfície. Devido à tensão superficial, o formato das gotas é alterado, formando assim o *Cone de Taylor*. Com o volume reduzido, a força de repulsão entre íons de mesma carga aumenta substancialmente e, as gotículas, são expelidas para a fase gasosa, formando assim o eletrospray. Para ajudar na redução do volume das gotículas, por meio da evaporação do solvente, um gás de nebulização ( $N_2$ ) aquecido é injetado em vazão alta coaxialmente ao capilar (FIGURA 1.17A). Após passar pela lente focalizadora, o spray atravessa uma região aquecida e preenchida por uma “cortina” de um gás inerte (geralmente  $N_2$  ou Ar), com a função de remover as últimas moléculas de solventes que interagem com o íon e chega ao analisador de massas<sup>157</sup>. Todo o processo até esse ponto acontece à pressão atmosférica. Entretanto, para evitar interações entre os íons durante a análise, os analisadores de massa operam em pressões muito baixas. Uma lente focalizadora com abertura muito pequena, chamada *skimmer*, é colocada na interface para conduzir os íons durante a transição da pressão atmosférica para baixa pressão (FIGURA 1.17B).

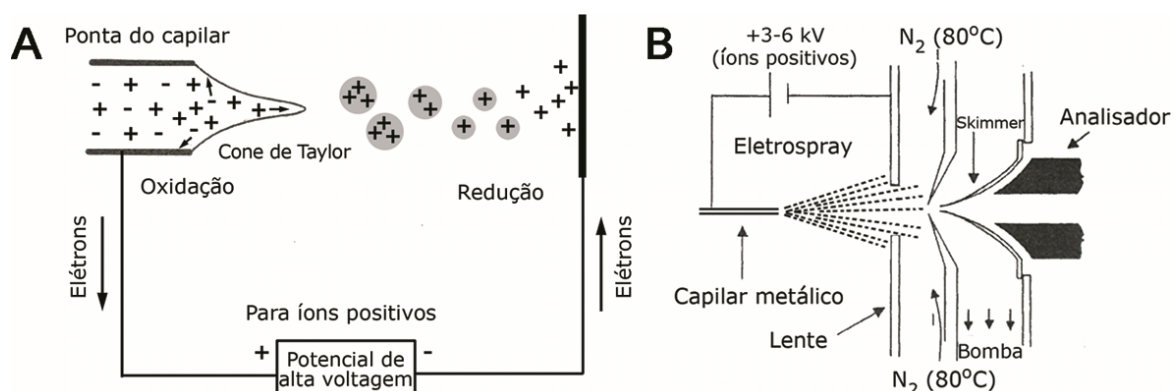


FIGURA 1.17 - Esquema representativo da “formação” dos íons (A) em uma fonte ESI (B). Adaptado de DE HOFFMANN e STOOBANT<sup>157</sup>

## b) a espectrometria de massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR-MS)

As análises espectrométricas em um equipamento com analisador de massas do tipo FT-ICR são baseadas nas trajetórias descritas pelos íons de diferentes  $m/z$  quando os mesmos são submetidos à ação de um campo magnético. Os íons que entram no analisador são conduzidos desde um funil de íons dual, passando por um conjunto de lentes focalizadoras e por um quadrupolo (ou hexapolo) até a cela de ressonância ciclotrônica (ICR) por meio de diferenças de

potencial aplicadas as diferentes partes. A ICR está posicionada no centro de um magneto supercondutor, o qual gera um campo magnético da mais alta homogeneidade possível<sup>158</sup>. Ela é composta por 3 tipos de eletrodos: eletrodos de aprisionamento, de excitação e de detecção (FIGURA 1.18). O campo magnético unidirecional gerado pelo magneto está alinhado aos eletrodos de excitação e emissão, perpendicularmente aos eletrodos de aprisionamento. Quando entram na cela, devido à ação do campo magnético, eles adquirem uma trajetória circular (movimento ciclotrônico), cujo sentido dependerá da polaridade da carga da partícula<sup>158</sup>. A trajetória que eles descrevem possui um raio pequeno, distante dos eletrodos de detecção. Para que os íons possam ser detectados, um pulso de radiofrequência (RF) é aplicado nos eletrodos de excitação, excitando os íons que passam a percorrer uma órbita de raio maior, se aproximando dos eletrodos. A frequência associada a essa nova trajetória é denominada frequência ciclotrônica ( $\omega_c$ ) e, matematicamente, é inversamente proporcional à razão  $m/z$  do íon:

$$\omega_c = \frac{q \cdot B}{m}, \quad \text{eq. 1.1}$$

onde  $q$  é a carga do íon,  $B$  é a força do campo magnético e  $m$  é a massa do íon. Como se pode notar,  $\omega_c$  não depende nem da velocidade com que os íons entram na cela de ICR, nem da sua energia, o que ajudaria a explicar a altíssima resolução (até 1:1.000.000) proporcionada pela técnica<sup>159</sup>. Quando o íon se aproxima dos eletrodos de detecção, uma corrente alternada é gerada e amplificada diferencialmente em um sinal de RF. Utilizando-se a transformada de Fourier, os valores de RF são deconvoluídos em um gráfico de frequências ciclotrônicas individuais, as quais são convertidas em  $m/z$ , por meio da equação 1.1 (FIGURA 1.18).

O princípio de ressonância ciclotrônica é conhecido desde os anos de 1930<sup>160</sup>, mas foi apenas nos anos 1970 que ele foi aplicado na área de espectrometria de massas, quando foi desenvolvido o primeiro espectrômetro com um analisador de massas do tipo FT-ICR<sup>161,162</sup>. Por causa da altíssima resolução exatidão, essa é uma técnica amplamente usada na área de petroleômica<sup>163</sup>, mas vem sendo bastante usada também para estudos em sistemas biológicos, direcionados para o metabolismo de fármacos<sup>164</sup>, descoberta de biomarcadores e análises de complexos não-covalentes, por exemplo, proteína-ligante<sup>165</sup>. Na área de produtos naturais a sua principal aplicação é na elucidação estrutural<sup>156</sup>, mas também pode ser uma técnica muito interessante para estudos de biossíntese<sup>166</sup> ou

mesmo para estudos de degradação<sup>167</sup>.

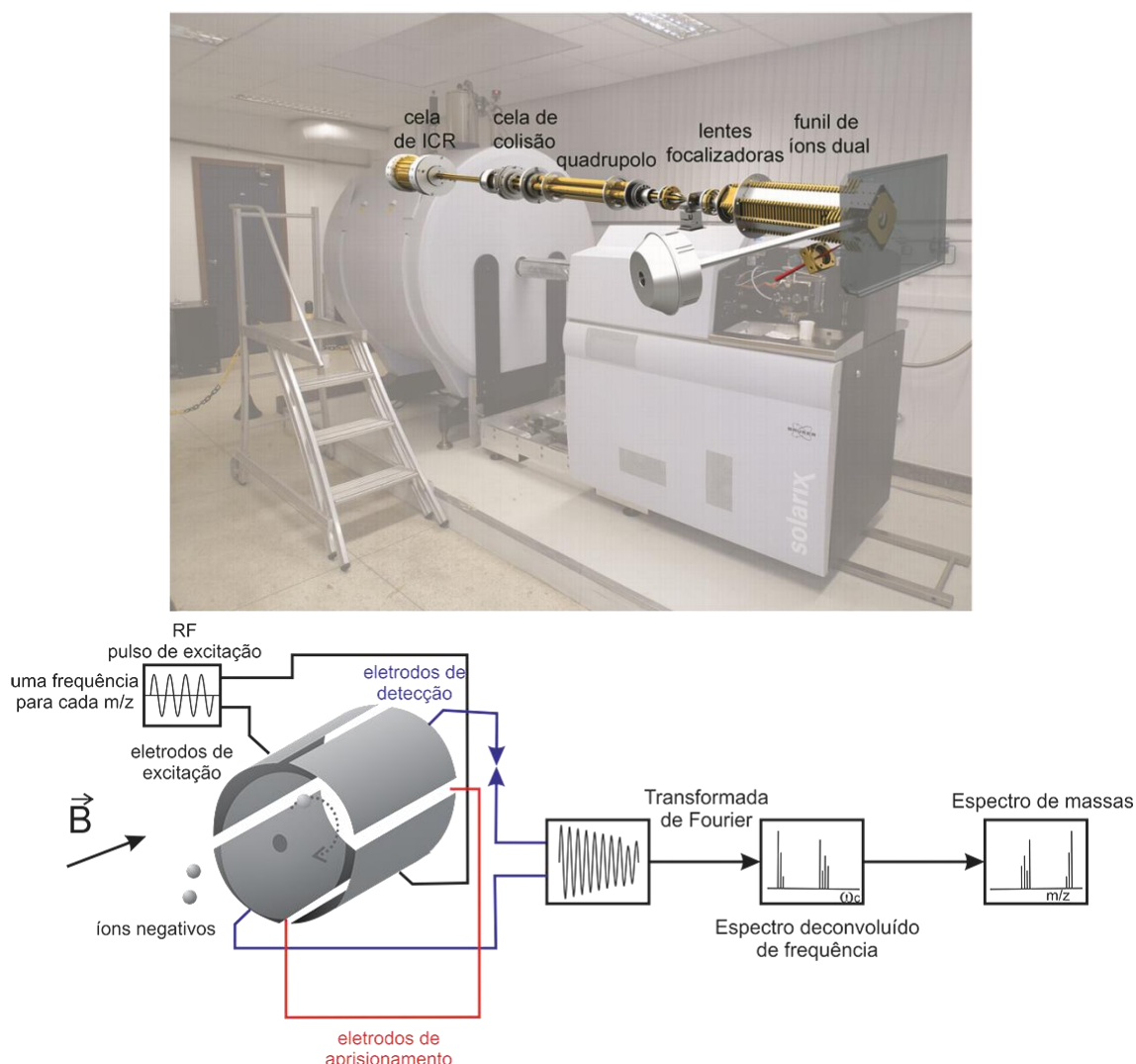


FIGURA 1.18 - Espectrômetro de massas com analisador FT-ICR e o esquema do funcionamento de uma ICR

#### 1.6.1.2.2 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE BAIXA RESOLUÇÃO (LC-DAD-MS)

A técnica de HPLC acoplada a múltiplos detectores, baseados em diferentes propriedades físico-químicas dos analitos, é uma das ferramentas mais amplamente utilizada para estudos de perfil químico de extratos vegetais<sup>168</sup>, principalmente quando se acredita que o mesmo possua alguma atividade biológica<sup>169,170,171</sup>.

A cromatografia líquida se baseia na separação dos analitos presentes em uma amostra de acordo com as interações dos mesmos com a fase estacionária

(retenção) e a fase móvel (eluição), as quais podem ocorrer principalmente por meio de diferentes interações intermoleculares (FIGURA 1.19). Quando a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, diz-se cromatografia em modo reverso e a retenção é regida principalmente pela hidrofobicidade<sup>172</sup>. Quanto maior for o caráter apolar do analito, maior será a sua interação com a fase estacionária e menor ela será em relação à fase móvel.

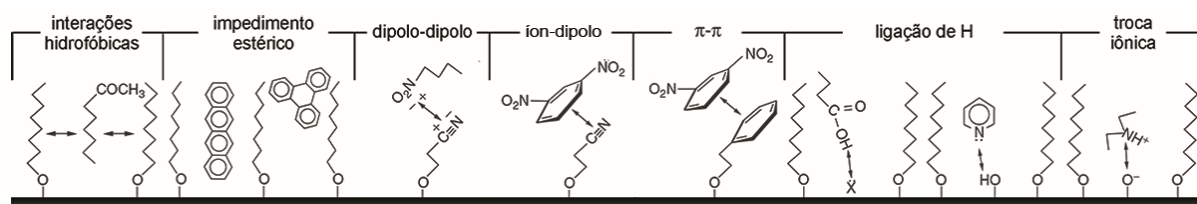


FIGURA 1.19 - Interações intermoleculares que governam a separação cromatográfica. Adaptado de SNYDER et al.<sup>173</sup>

Na cromatografia em modo reverso, a fase móvel é geralmente constituída por uma mistura de água e solvente orgânico. Por razão da (i)miscibilidade há uma limitação em relação aos solventes que podem ser utilizados com essa finalidade, sendo a acetonitrila (ACN), o metanol (MeOH) e o tetrahidrofurano (THF) os mais comumente utilizados. Quanto maior a proporção de água, menor a força da fase móvel, favorecendo a eluição de compostos hidrofílicos (mais polares) e aumentando a retenção dos compostos hidrofóbicos (menos polares), os quais serão eluídos apenas com uma fase móvel mais forte (maior porcentagem de solvente orgânico).

Ainda em relação à composição da fase móvel, a cromatografia em modo reverso pode ser realizada no modo de eluição isocrático, no qual a composição da fase móvel é mantida constante, ou no modo de eluição gradiente, onde a proporção de solvente orgânico na fase móvel aumenta gradualmente. Quando se tem uma amostra complexa, como os extratos vegetais, contendo analitos com diferentes polaridades (geralmente pertencentes a diferentes classes químicas) o modo gradiente é o mais indicado, pois o aumento gradativo da força da fase móvel permite uma melhor retenção dos diferentes analitos, levando a uma boa separação dos mesmos.

O tempo em que um analito fica retido na fase estacionária até ser eluído da coluna pela fase móvel é denominado tempo de retenção ( $t_r$ ) e deve ser característico de cada analito. A separação dos diferentes componentes de uma

amostra é representada graficamente por um cromatograma, que registra a resposta do detector em função do tempo. O sinal correspondente a um analito que foi eluído após um tempo de retenção específico é chamado banda cromatográfica e segue uma distribuição gaussiana.

A separação cromatográfica é baseada no binômio seletividade-eficiência (FIGURA 1.20). A primeira mede a capacidade do sistema analítico em distinguir quimicamente dois analitos em uma amostra. Quanto maior a separação de duas bandas cromatográficas em relação à linha de base, maior a seletividade do método. A segunda está relacionada ao alargamento da banda cromatográfica: quanto mais estreita for a banda, menor a dispersão dos dados e, portanto mais eficiente é a separação.

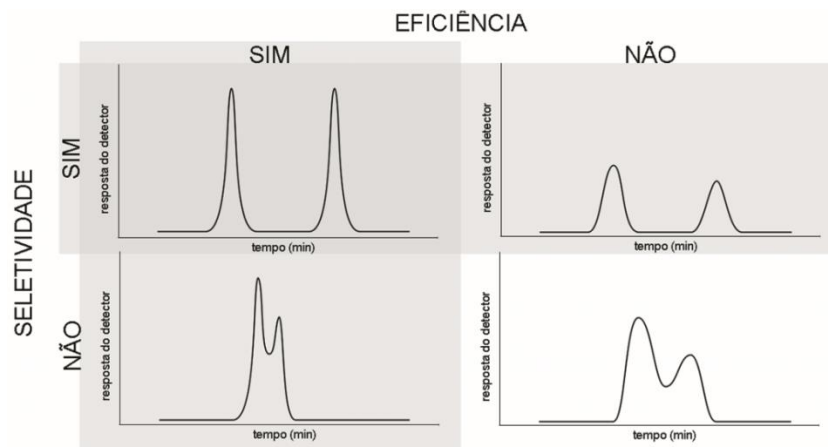


FIGURA 1.20 - Representação do binômio seletividade – eficiência que rege a separação cromatográfica

A medida quantitativa da separação de duas bandas cromatográficas em relação à linha de base do cromatograma é a resolução cromatográfica ( $R_s$ ), calculada pela equação:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} \equiv \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_{0,51} + w_{0,52}} \quad \text{eq. 1.2}$$

onde  $t_{r1}$  e  $t_{r2}$  são os tempos de retenção,  $w_1$  e  $w_2$  as respectivas larguras das duas bandas cromatográficas adjacentes; e  $w_{0,5}$  as larguras dos mesmos picos à meia altura. Quando o valor de  $R_s$  é igual ou superior a 1,5, as bandas são ditas bem resolvidas (separadas), tornando-se possível usar a integração da área sob a curva da banda cromatográfica em uma análise quantitativa, visto que a área é diretamente proporcional à concentração do analito. Valores abaixo de 1,5 para  $R_s$



indicam uma coeluição parcial dos analitos, havendo assim a necessidade de se otimizar o método cromatográfico até que  $R_s$  apresente um valor satisfatório.

A resolução é influenciada pela retenção, seletividade e eficiência do método, por meio de 3 parâmetros cromatográficos: número de pratos teóricos ( $N$ ), fator de retenção ( $k$ ) e fator de separação ( $\alpha$ ), (FIGURA 1.21), os quais estão matematicamente relacionados à  $R_s$  pela seguinte equação:

$$R_s = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left( \frac{k}{1+k} \right) \times (\alpha - 1) \quad \text{eq. 1.3}$$

eficiência
retenção
seletividade

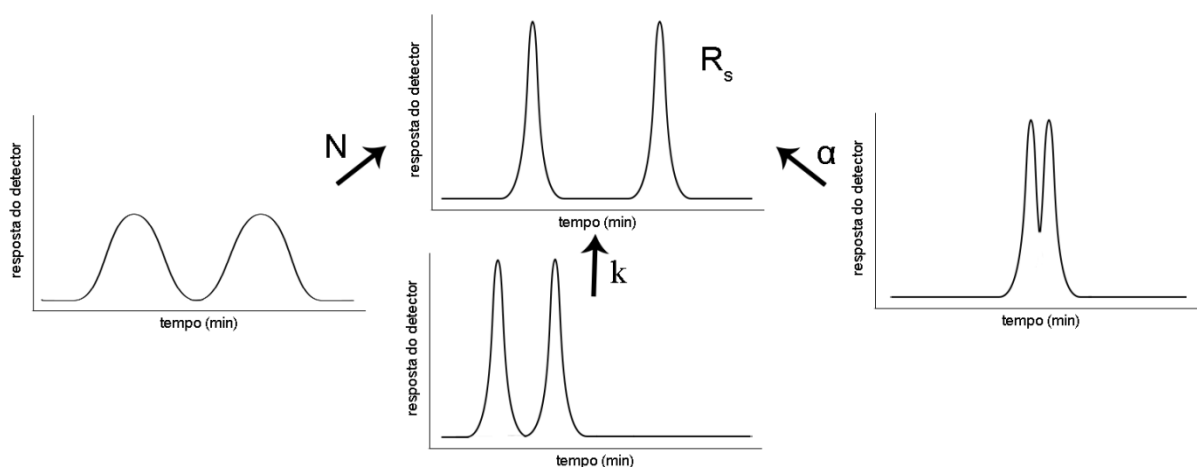


FIGURA 1.21 – Influência dos parâmetros  $\alpha$ ,  $k$  e  $N$  na separação cromatográfica

O número de pratos teóricos ( $N$ ) vem de uma analogia à coluna de destilação fracionada de petróleo<sup>174</sup>, na qual os componentes do petróleo no estado de vapor entram pela base que está a uma temperatura elevada e se distribuem conforme as respectivas densidades. Quanto menor o número de átomos de carbono, menor a densidade e maior a distância que o vapor percorrerá no interior da coluna, o qual é preenchido por pratos posicionados ao longo da mesma e cuja temperatura diminui com a altura. Quando a temperatura na coluna se iguala à temperatura de ebulição da substância, o vapor condensa, se acumulando no prato mais próximo até ser transferido para um condensador na parte externa.

Quanto maior o número de pratos, menor a distância entre eles e mais eficiente é a separação. Analogamente, na coluna cromatográfica, em cada prato teórico há um equilíbrio de partição do analito entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior o equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. Como o equilíbrio de partição é característico de cada analito, quanto maior o valor de  $N$ , maior o número de moléculas de uma

mesma substância eluídas em um determinado  $t_r$  e mais estreita torna-se a banda cromatográfica (FIGURA 1.22). Matematicamente,  $N$  se relaciona com o tempo de retenção ( $t_r$ ) e a largura na base da banda ( $w_b$ ) por meio da equação:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad \text{eq. 1.4}$$

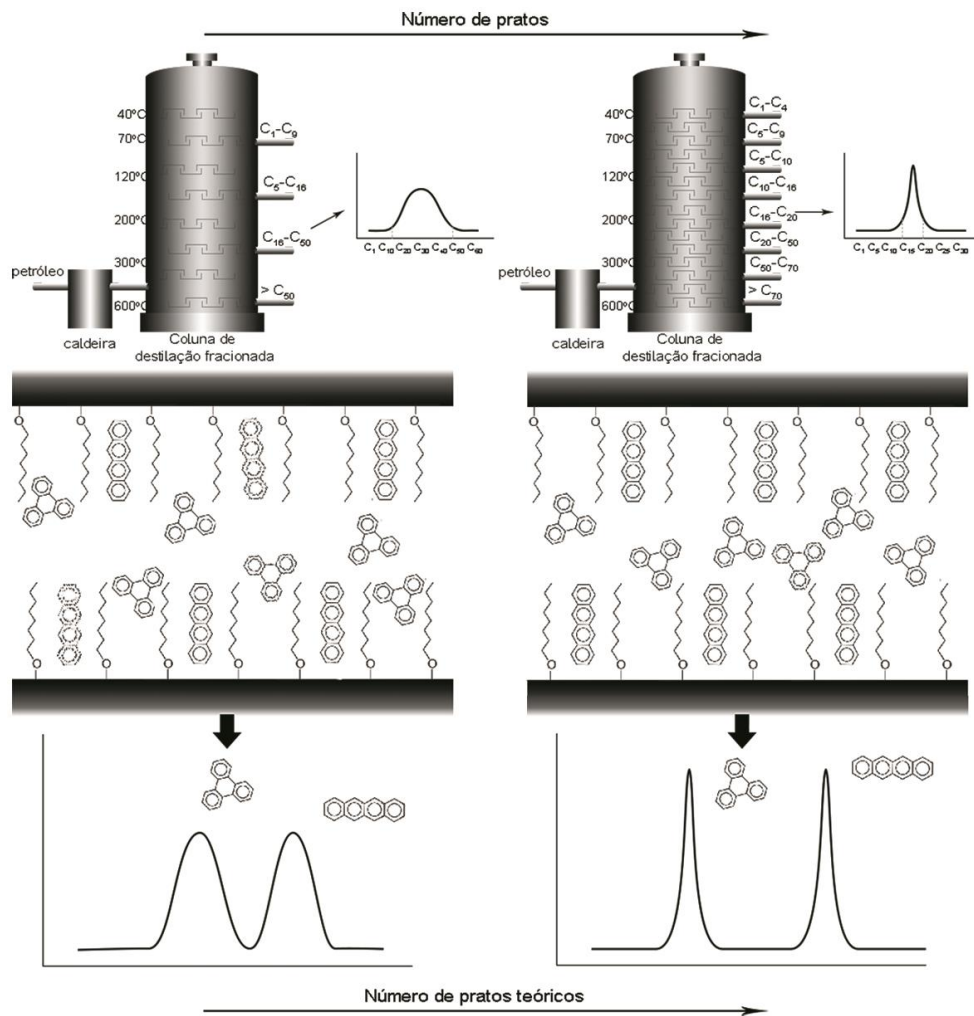


FIGURA 1.22 - Analogia entre  $N$  e o número de pratos de uma coluna de destilação fracionada. Adaptado de SNYDER et al.<sup>173</sup>.

O fator de retenção ( $k$ ) está diretamente relacionado com as interações analito - fase estacionária e analito - fase móvel. Ele mede a proporção entre a quantidade de moléculas do analito presentes na fase móvel e a quantidade de moléculas do mesmo retidas na fase estacionária. Matematicamente,  $k$  pode ser calculado pela equação:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{eq. 1.5}$$

onde  $t_r$  é o tempo de retenção do analito e  $t_0$  é o tempo de eluição dos analitos que

não ficaram retidos na coluna. Um valor baixo para  $t_r$  e, por consequência, valor pequeno para  $k$ , indica que o analito tem maior afinidade pela fase móvel que pela fase estacionária. Da mesma forma,  $k$  muito grande indica maior afinidade do analito pela fase estacionária, sendo a fase móvel considerada fraca. Para uma boa separação cromatográfica, o valor de  $k$  deve ficar entre 1 e 5. No modo gradiente, pelo fato de ocorrer um aumento gradual da força da fase móvel,  $k$  é assumido como o mesmo para todas as bandas e é representado por  $k'$ .

O fator de separação ( $\alpha$ ) está diretamente relacionado à seletividade do método analítico, pois mede a sua capacidade em distinguir dois analitos que possuem bandas cromatográficas adjacentes. Matematicamente,  $\alpha$  pode ser calculado pela razão entre os fatores de retenção de duas bandas cromatográficas vizinhas (eq. 1.6).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{eq. 1.6}$$

Associando-se as equações 1.5 e 1.6, tem-se que

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} \quad \text{eq. 1.7}$$

onde  $t_{r1}$  refere-se à primeira banda cromatográfica e  $t_{r2}$ , à banda subsequente. Quando as bandas cromatográficas estão bem separadas em relação à linha de base,  $t_{r2}$  é significativamente maior que  $t_{r1}$ , levando a um valor alto para  $\alpha$ .

Nos sistemas de cromatografia, é possível utilizar um ou mais detectores, que medem diferentes propriedades físico-químicas do analito. O detector de arranjo de diodos (DAD) ou arranjo de fotodiodos (PDA) quantifica a absorvância molecular, que é diretamente proporcional à concentração do composto, conforme a lei de Lambert-Beer ( $A = \epsilon bc$ ). Em linhas gerais, a radiação eletromagnética emitida tanto por uma lâmpada de deutério na região do ultravioleta, entre 200 e 400 nm, quanto por um filamento de tungstênio com emissão na região do visível, de 400 a 800 nm, é focalizada para a cela de fluxo por uma pequena abertura em um anteparo. Após atravessar a cela, a radiação atinge uma grade de difração, na qual ocorre a sua decomposição nos diferentes comprimentos de onda, que são detectados simultaneamente e individualmente pelos fotodiodos, geralmente 512 ou 1024 diodos, cujos sinais são convertidos em um espectro de absorção (FIGURA 1.23).

Como o espectro de absorção é característico para cada analito, esse detector torna-se especialmente interessante para distinguir dois componentes de

uma mistura em casos de coeluição de analitos, principalmente quando esgotadas todas as tentativas de ajustes dos parâmetros do método analítico<sup>173</sup>. Os metabólitos secundários de produtos naturais, na grande maioria, possuem grupos cromóforos em sua estrutura química, por isso métodos de HPLC com detector DAD são bastante utilizados em análises qualitativa e quantitativa de extratos<sup>175,176,177</sup>.

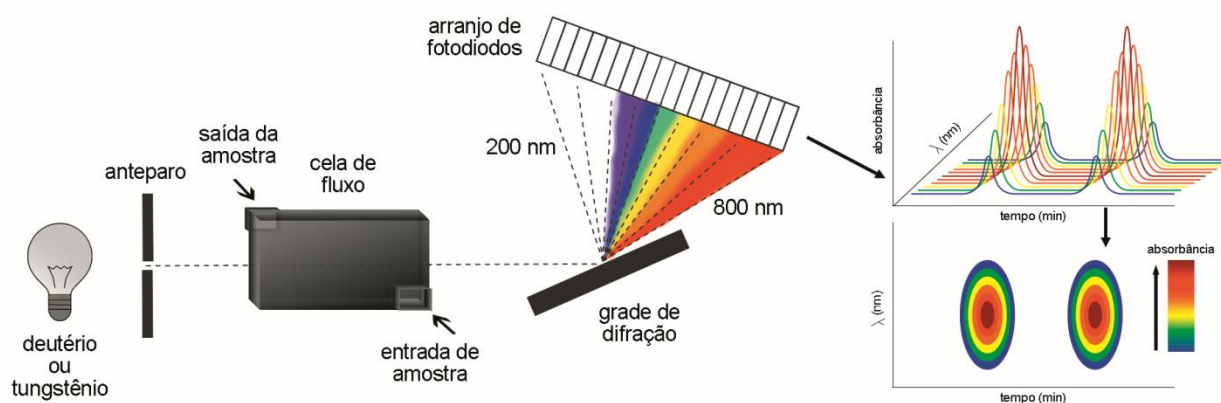


FIGURA 1.23 - Esquema representativo do funcionamento de um detector DAD. Adaptado de Snyder et al.<sup>173</sup>.

A utilização da espectrometria de massas, como método de detecção cromatográfica (LC-MS) só foi possível com o desenvolvimento das fontes APIs<sup>178</sup>. Os espectrômetros podem ser classificados como baixa ou alta resolução, conforme a capacidade do analisador de massas em diferenciar razões  $m/z$  com valores muito próximos. Os equipamentos pertencentes à primeira classe, como o triplo quadrupolo (TQ-MS) têm resolução unitária, possibilitando distinguir moléculas com diferenças máxima de  $m/z$  de 1 u.m.a. No segundo grupo, tem-se os analisadores, como o de tempo de voo ou *orbitrap*<sup>179</sup>. Recentemente, essa classe se dividiu originando uma terceira, a de altíssima resolução que pode chegar a 1:1.000.000, como o FT-ICR-MS descrito anteriormente.

O analisador de massas TQ-MS consiste em 3 quadrupolos alinhados em série (FIGURA 1.24). Durante a análise, os íons da amostra provenientes da fonte de ionização passam por um conjunto de lentes focalizadoras, atravessam os quadrupolos e são detectados em uma cela fotomultiplicadora de elétrons. Cada quadrupolo é formado por quatro polos distribuídos simetricamente, nos quais são aplicados potenciais de radiofrequência (RF) e corrente direta (DC), que fazem os íons oscilarem longitudinalmente, em uma frequência diretamente relacionada à razão  $m/z$  de cada íon. Os valores de RF e DC são ajustados para que os íons de uma determinada razão  $m/z$  oscilem ao longo do eixo dos quadrupolos a uma

frequência de baixa amplitude, enquanto os íons com outras  $m/z$  se movimentarão com frequências de grandes amplitudes, se aproximando dos quadrupolos e escapando entre eles.

O princípio de funcionamento do TQ-MS possibilita diferentes formas de análises quando ele é utilizado como detector (FIGURA 1.25). Na análise exploratória no modo de varredura completa, RF e DC são aplicados no primeiro quadrupolo (Q1) com um aumento linear, mantendo-se a razão RF/DC e a frequência de oscilação constantes. Com isso, há um aumento contínuo nos valores de  $m/z$  dos íons detectados, gerando o espectro de massas. Nos outros quadrupolos (Q2 e Q3) é aplicada apenas a RF, transformando-os em linhas de transferências de íons para o detector<sup>159</sup>.

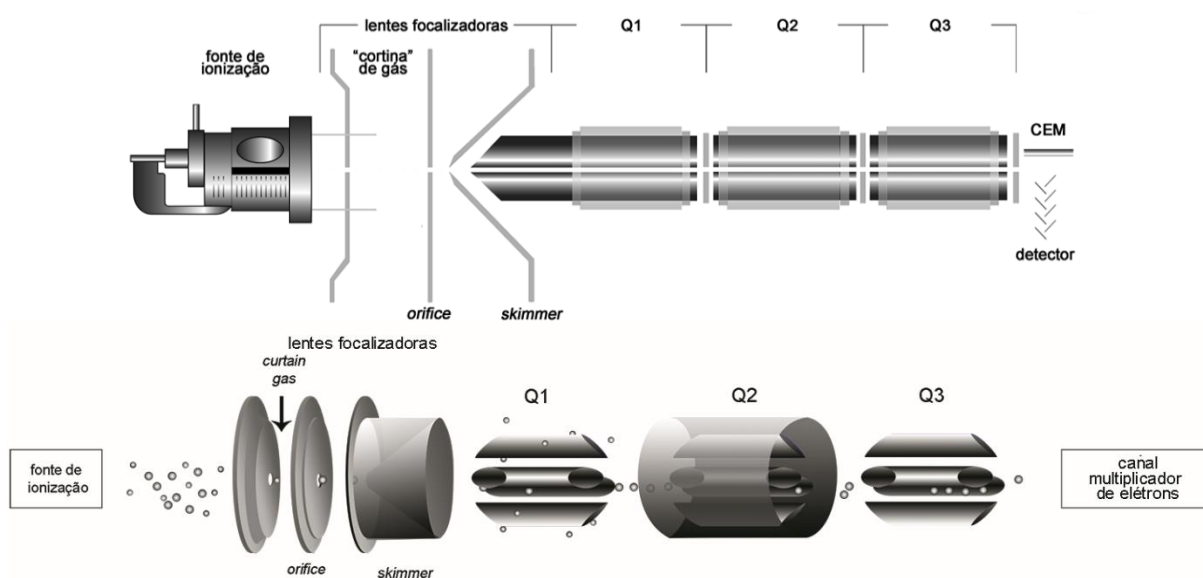


FIGURA 1.24 - Esquema de funcionamento de um analisador triplo-quadropolo. Adaptado de AB Sciex<sup>180</sup>

Quando a amostra é conhecida ou se deseja obter informações a respeito da estrutura química dos analitos, pode-se utilizar o modo de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Os potenciais de RF e DC aplicados no Q1 são ajustados de forma que apenas os íons com razão  $m/z$  de interesse permaneçam no interior do quadropolo, sendo transferidos para o Q2, no qual são aplicados potenciais para aumentar a energia cinética e provocar a dissociação dos íons por colisão (CID). Os íons-fragmento são transferidos para o Q3 e detectados de forma semelhante àquela descrita para o Q1 na análise exploratória<sup>173</sup>. Esse é o modo clássico de análise MS/MS também chamado de íons-produto, porém existem variações, como a análise de perda (de moléculas) neutra, onde Q1 e Q3 operam

em modo exploratório e o Q2 em modo de fragmentação. Cruzam-se as informações provenientes do Q1 e do Q3 e somente são registrados os íons que, durante a dissociação, levaram à perda de moléculas neutras com  $m/z$  igual à que foi previamente selecionado. Há ainda o modo de íon precursor, no qual se fixa a  $m/z$  de um íon fragmento no Q3 e faz-se uma varredura exploratória no Q1 de forma a identificar o íon que gerou aquele sinal. Um quarto modo, muito utilizado em análises quantitativas é o de monitoramento de reação selecionada (SRM), nos quais se ajustam os potenciais aplicados no Q1 e no Q2 para fragmentar uma determinada  $m/z$  e no Q3 para reterem apenas um ou dois íons-fragmento provenientes daquela dissociação.

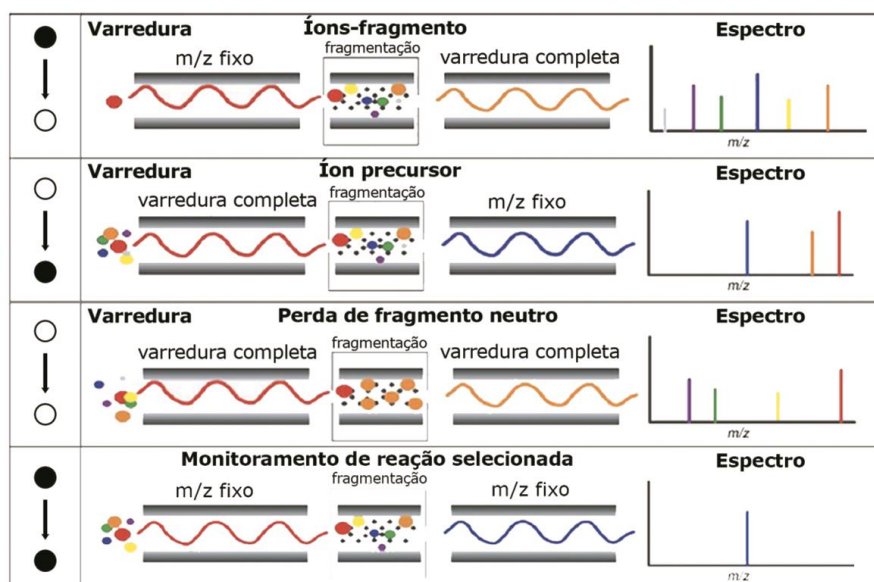


FIGURA 1.25 - Diferentes modos de análise possibilitados pelo uso do espectrômetro de massas como detector do sistema cromatográfico. Adaptado de Huestis e Smiths<sup>181</sup>.

## ***OBJETIVOS***

---

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto de pesquisa foi padronizar quimicamente um extrato de folhas de amoreira que apresentasse potencial fitoestrogênico para o tratamento dos sintomas do climatério, visando à repetibilidade de preparo do extrato e garantindo assim a qualidade do mesmo.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral seria alcançado por meio dos objetivos específicos descritos a seguir:

- obter um extrato de folhas de amoreira que apresentasse atividade estrogênica e ao mesmo tempo, não apresentasse toxicidade para células sadias em ensaios *in vitro*;
- caracterizar quimicamente o extrato preparado de *Morus alba* por técnicas analíticas de espectrometria de massas e cromatografia;
- identificar o(s) marcador(es) característico(s) para a folha de amoreira, matéria-prima para o preparo dos extratos;
- desenvolver e validar um método analítico para a análise (semi)quantitativa dos marcadores selecionados nos estudos;
- aplicar o método analítico validado para estudos de variabilidade para os marcadores químicos;
- aplicar o método validado na análise de formulações fitoterápicas comerciais de extratos de folhas de amoreira.



## ***PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS***

---

### 3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

##### 3.1.1 - MATERIAL VEGETAL - FOLHAS DE *Morus alba*.

As folhas de amoreira foram obtidas em uma fazenda experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) localizada na cidade de Gália – SP (Latitude: 22 0 17' 29" S, Longitude: 49 0 33' 10" W, Altitude: 561 m), em colaboração com o Dr. Antônio José Porto, atual diretor da unidade (FIGURA 3.1). O cultivar IZ 56/4 foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho por possuir uma boa quantidade de folhas por ramo, característica que o tornou um dos mais procurados por produtores de amoreiras para sericicultura. Esse cultivar foi desenvolvido na década de 1970 no Instituto de Zootecnia (IZ) e resultou do cruzamento de duas variedades de *Morus alba*: Catânia Paulista e Formosa (essa última de origem asiática). A identificação da espécie *Morus alba* também foi confirmada pelo Dr. Sérgio Romaniuc Neto, curador do Herbário do Instituto de Botânica - USP.



FIGURA 3.1 - Cultura de amoreiras na fazenda experimental da APTA (Gália - SP)

As amoreiras foram cultivadas em solo Latossolo Vermelho-Amarelo álico textura média e as folhas foram coletadas manualmente entre março de 2012 e abril de 2014, sempre no período da manhã, entre 10 e 12 h, exceto quando mencionado explicitamente.

O material vegetal foi lavado em água corrente sem o uso de tensoativos e secas à sombra, durante aproximadamente 10 dias. Após a secagem total, foram moídas e peneiradas em peneira granulométrica ASTM/TYLER 500 mesh (Bertel, Caieiras, Brasil) para controle de granulometria. O material moído foi acondicionado em sacos plásticos herméticos, e estocados ao abrigo de luz e calor até o início dos experimentos. Este procedimento foi adotado para a maior parte dos

experimentos.

### 3.1.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE AMOREIRA

O método escolhido para o preparo dos extratos foi a maceração, utilizando uma mistura Etanol/H<sub>2</sub>O como solvente extrator. O procedimento descrito a seguir foi comum para todos os experimentos relacionados à otimização do extrato, nos quais foram utilizadas as folhas coletadas em março de 2012.

Em cada experimento da otimização do extrato foram pesados 150,0 mg de folhas secas moídas aos quais foram adicionados 6,00 mL de solvente extrator (proporção 1:40). Cada sistema foi agitado por 30 s (agitador Vórtex modelo AP56, Phoenix, Araraquara, Brasil) e mantido ao abrigo de luz durante o período de maceração. Em seguida, os extratos foram centrifugados por 20 min, a 4°C e 18.500 xg (centrífuga termostatizada Eppendorf® 5810R, Hamburg, Alemanha), filtrados em membrana PVDF 0,22µm (Nova Analítica, São Paulo, Brasil) e secos sob pressão reduzida (CentriVap® Concentrador, acoplado a um refrigerador Cold Trap®, e uma bomba de vácuo 117, Labconco, Kansas City, EUA). Os extratos secos tiveram a massa aferida para o cálculo de rendimento (Microbalança analítica Sartorius com precisão 0,001 mg, modelo CPA26P, Göttingen, Alemanha) e foram armazenados a -20°C até o momento de uso.

O etanol (EtOH) utilizado no preparo dos extratos foi grau HPLC (99%, PanReac, Barcelona, Espanha) e a água deionizada ultrapura foi obtida por um sistema de filtração Direct-Q® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

#### 3.1.2.1 - TRIAGEM DE VARIÁVEIS

Na etapa inicial do planejamento experimental, foram avaliados os cinco parâmetros relacionados ao método de maceração e que podem interferir no extrato obtido: (i) homogeneização por turbólise; (ii) composição etanólica do solvente extrator; (iii) temperatura de extração; (iv) tempo de maceração; e (v) agitação periódica.

Nos experimentos que envolviam o uso homogeneização por turbólise, imediatamente após a agitação inicial em vórtex por 30 s, o sistema foi submetido à homogeneização em Ultraturrax® (IKA T10, Staufen, Alemanha) por 1 min em rotação máxima (20.000 rpm). Para avaliar a influência da composição etanólica no

solvente extrator nos experimentos foi utilizado um dos dois extratos hidroalcoólicos: um extrato predominantemente aquoso, contendo 25% EtOH (v/v) e outro com maior teor alcoólico, 75% EtOH (v/v). Em parte dos experimentos, a maceração foi realizada em uma das duas temperaturas distintas: 22°C (temperatura ambiente do laboratório) ou 40°C, ambas monitoradas por termômetro de infravermelho (Alla France, Chemillé, França) ao abrigo de luz. Nos experimentos realizados a 40°C, os extratos foram mantidos em banho-maria termostatizado (Nova Instruments, Piracicaba, Brasil) durante o tempo de maceração, protegidos da exposição à luz. Para se avaliar o tempo de extração, em alguns experimentos, o sistema foi mantido em maceração por 1 h e nos outros experimentos, por 4 h. Nos experimentos com agitação periódica, a cada intervalo de 30 min no período de maceração, o tubo era agitado em vórtex por 30 s.

A avaliação desses parâmetros foi realizada por meio de um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  em dois níveis (TABELA 3.1). A geratriz utilizada na composição dos experimentos foi I=ABCDE. Os padrões de confundimento para os contrastes foram:

$$\begin{array}{lll}
 I_A = A + BCDE & I_{AB} = AB + CDE & I_{BD} = BD + ACE \\
 I_B = B + ACDE & I_{AC} = AC + BDE & I_{BE} = BE + ACD \\
 I_C = C + ABDE & I_{AD} = AD + BCE & I_{CD} = CD + ABE \\
 I_D = D + ABCE & I_{AE} = AE + BCD & I_{CE} = CE + ABD \\
 I_E = E + ABCD & I_{BC} = BC + ADE & I_{DE} = DE + ABC
 \end{array}$$

TABELA 3.1 - Níveis utilizados na etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental para a avaliação dos parâmetros da extração em dois níveis.

Fatores	níveis	
	-1	+1
A - Técnica de homogeneização	turbólise	nada
B - %EtOH no solvente extrator	25%	75%
C - Temperatura de extração	22°C	40°C
D - Tempo de maceração	1 h	4 h
E - Agitação periódica	não	sim

Todos os experimentos foram executados aleatoriamente, seguindo o fluxograma apresentado na FIGURA 3.2. Como variáveis dependentes foram utilizadas o rendimento (em massa/massa) e a resposta para a avaliação da atividade estrogênica.

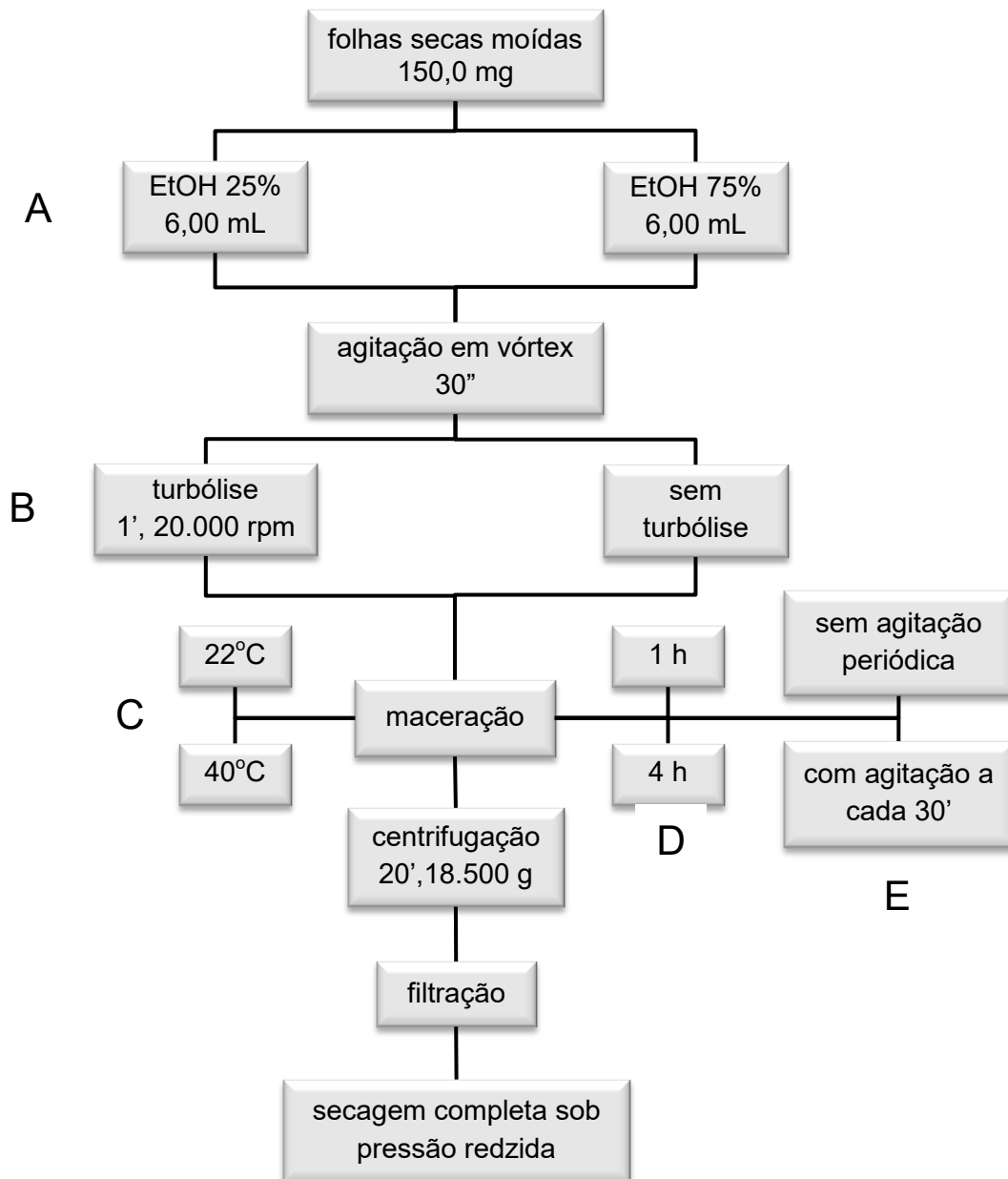


FIGURA 3.2 - Fluxograma geral de execução dos experimentos da etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental. As letras indicam os fatores avaliados.

### 3.1.2.2 - MODELAGEM DA OTIMIZAÇÃO - PLANEJAMENTO UNIVARIADO

Para a etapa final de otimização foram preparados 21 extratos, nos quais se variou a concentração de etanol no solvente extrator em 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 99% (v/v). Cada tubo foi agitado inicialmente por 30 s em vórtex, seguido de turbólise por 1 min a 20.000 rpm. O tempo de maceração foi de 1 h à temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Após o período de maceração, os extratos foram centrifugados por 20

min, a 4°C e 18.500 x g, filtrados em membrana PVDF 0,22mm, secos sob pressão reduzida e armazenados a -20°C até o momento de uso. Como variável dependente foi utilizada a resposta para a atividade biológica (estrogenicidade e citotoxicidade).

## 3.2 - ENSAIOS CELULARES

Esta parte do trabalho constituiu-se de ensaios celulares para estrogenicidade (principal), citotoxicidade e seletividade (complementares), que foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Andrei Leitão, responsável pelo Laboratório de Ensaio Celulares (LabECel) do Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED), no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP).

### 3.2.1 - MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DAS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS

Para os ensaios de estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade foram escolhidas, respectivamente, as linhagens MCF-7, BALB/c 3T3 clone 31 e MDA-MB-231 (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As três linhagens de células aderentes foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle Modificado pela Dubelco, Cultilab, Campinas, Brasil) contendo indicador vermelho fenol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração 15,0 mg.L<sup>-1</sup> e tamponado em pH 7,40 com NaHCO<sub>3</sub> 18 mmol.L<sup>-1</sup>. O meio foi ainda suplementado com 3,5 g.L<sup>-1</sup> de glicose (≥99,9%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 10% (v/v) de soro de feto bovino (FBS, Vitrocell, Campinas, Brasil) e 1% (v/v) de solução dos antibióticos penicilina 10000 Uι.mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 10 mg.mL<sup>-1</sup> (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em frascos de cultura T-75 (TPP, Trasadingen, Suíça) a 37°C e em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> (incubadora Sanyo, São Paulo, Brasil) . A cada intervalo de 48 h de incubação, fazia-se a troca do meio de cultura.

Ao atingir entre 75 e 80% de confluência, ou seja, 75 a 80% da cobertura da superfície total do frasco, era feita uma passagem das células para novas subculturas. Para as linhagens MDA-MD-231 e BALB/c, esse procedimento consistia na incubação das células com solução de tripsina/EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) por 5 min. Ao término da incubação adicionava-se o mesmo volume do meio de cultura para inativar a tripsina, centrifugavam-se as células a 400 xg por 5 min (centrífuga de rotor móvel Quimis, Diadema, Brasil) e as

ressuspensão em meio DMEM fresco. Para a linhagem MCF-7, muito mais aderente que as outras, o procedimento de passagem das células incluiu a lavagem inicial das células com a solução de tripsina/EDTA, e em seguida com solução de tampão fosfato (PBS) sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  no pH 7,40 (Cultilab, Campinas, Brasil), ambas por 1 min cada antes da incubação com a solução de tripsina/EDTA por 10 min. O restante do procedimento seguiu-se conforme descrito anteriormente. Nos ensaios descritos nesse trabalho, todas as células utilizadas estavam entre as passagens 5 e 18. Após a passagem 19, o material era descartado.

Para os ensaios de atividade biológica, o procedimento foi realizado conforme representado no fluxograma da FIGURA 3.3. Após a ressuspensão das células no meio DMEM era feita a contagem de indivíduos em câmara de Neubauer (KASVI, Curitiba, Brasil) e o volume final de meio era aferido para que se obtivesse a concentração de células necessária para cada experimento. A concentração ideal de células a ser utilizada nos ensaios foi ajustada para cada uma das linhagens. Para isso, as células de cada linhagem foram transferidas em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  para as placas de 96 poços (Falcon-Corning, Tewksbury, EUA) nas concentrações de  $1 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^3$ ,  $1 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^5$  e  $5 \cdot 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$  e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  durante um período de 1 a 6 dias. Para a linhagem BALB/c a concentração mais alta não foi testada. A cada 48 h de incubação, o meio de cultura das placas era trocado por meio DMEM fresco contendo indicador vermelho fenol fresco. Uma análise pelo método colorimétrico com MTT foi realizada a cada ciclo de 24 h de incubação, durante os 6 dias. Para cada concentração foram realizadas 8 replicatas, distribuídas uniformemente em dois experimentos independentes. Isto significa que todos os ensaios foram realizados 2 vezes, em dias distintos e com células de passagens diferentes, de forma a minimizar os erros relacionados ao preparo e manipulação de amostras.

Nos estudos de estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade, a concentração de células foi ajustada em  $5 \cdot 10^4$  células. $\text{mL}^{-1}$ . Essa suspensão de células era transferida para placas de 96 poços e incubada por 24 h, de forma a garantir a sua máxima aderência. Posteriormente, o meio DMEM era removido por aspiração, com lavagem das células usando PBS e adição do meio contendo o material a ser avaliado. Ao final do período de incubação era realizada a análise pelo método colorimétrico de MTT descrito na seção 3.2.2.

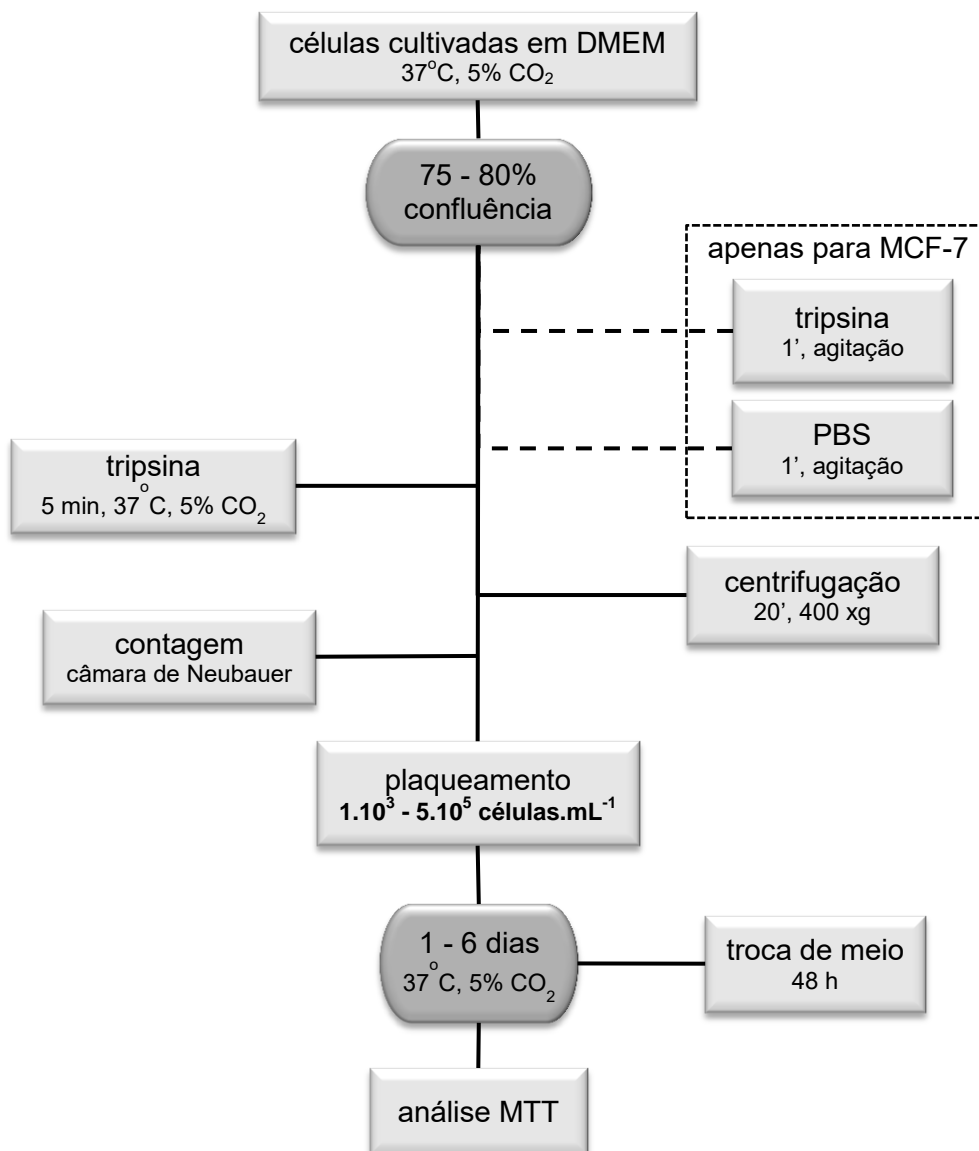


FIGURA 3.3 - Fluxograma do experimento para determinação da quantidade ótima de células a serem utilizadas nos ensaios biológicos

### 3.2.2. - MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Para a quantificação do número de células vivas nos ensaios de estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade foi escolhido o método colorimétrico com metabolismo do sal de tetrazólio. Uma solução estoque de MTT ( $\geq 97,5\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparada na concentração de  $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  em PBS. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de PVDF  $0,22 \text{ mm}$  (Millex®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e mantida a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de uso,



quando era diluída 5 vezes em meio de cultura. Para o branco de absorvância, foi utilizado PBS diluído 5 vezes em meio de cultura.

Ao final de cada ensaio celular, o meio de cultura era completamente removido dos poços por aspiração, sendo substituído por alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da solução de MTT ou do branco diluídos. Para avaliar se o período de incubação de 3 h era suficiente para a metabolização do reagente, foi realizado um teste com as células da linhagem MCF-7, conforme o esquema representado na FIGURA 3.4. As células foram transferidas para placas de 96 poços na concentração de  $1.10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$  e, após as 24 h iniciais, o reagente MTT foi adicionado. Após o tempo de incubação de 0,5; 1; 2; 3; 4 ou 5 horas, o meio foi aspirado novamente e o mesmo volume de agente solubilizante foi adicionado. O agente solubilizante foi constituído por uma solução de dodecilsulfato de sódio (SDS,  $\geq 98,5\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)  $100 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$  em dimetilsulfóxido (DMSO,  $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) acidificado com ácido acético glacial ( $\geq 99,7\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)  $0,6\%$  (v/v). Para garantir a homogeneidade da solução, após a adição do agente solubilizante, as placas foram mantidas sob agitação constante (agitador Kline Quimis, São Paulo, Brasil) durante 1 h. A leitura da absorvância foi realizada em 570 nm (leitor de placas Synergy HT, BioTek, Winooski, EUA). Para cada tempo de incubação, foram realizadas 10 replicatas distribuídas uniformemente em dois experimentos independentes.

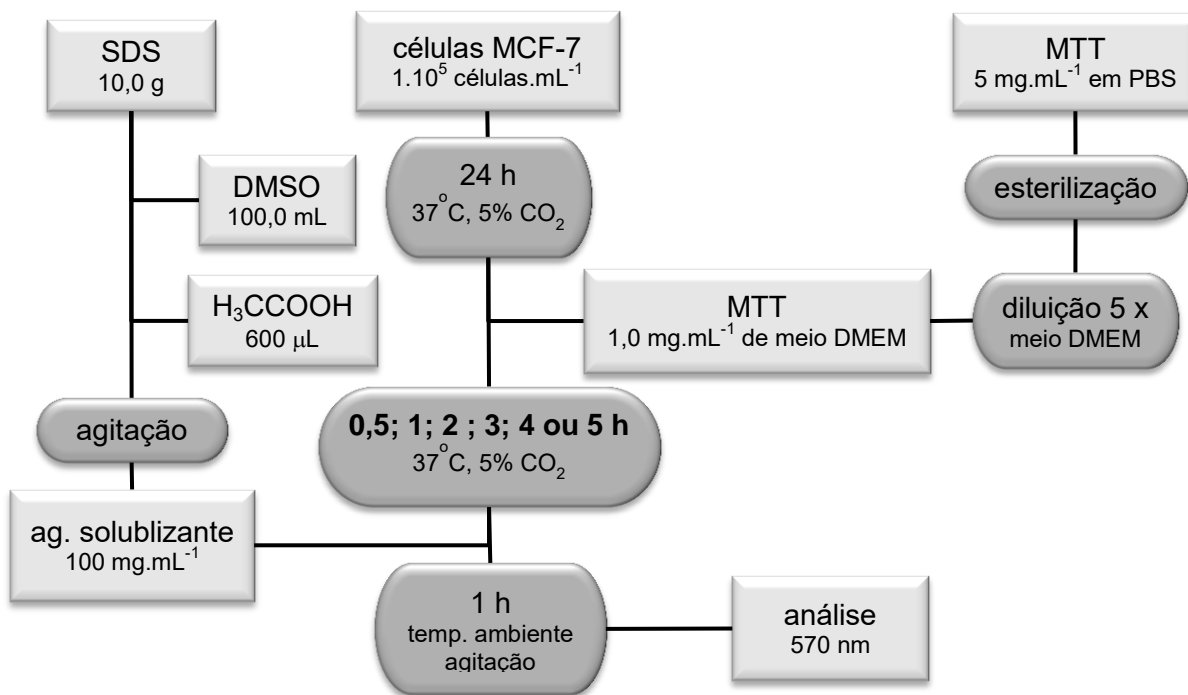


FIGURA 3.4 - Fluxograma para otimização do tempo de incubação com o MTT

Após essa avaliação inicial, o tempo de incubação das células com o MTT foi mantido em 3 h para os 3 estudos (estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade). Passado esse tempo, o excesso do reagente foi removido e o agente solubilizante adicionado. O restante do procedimento foi realizado como descrito anteriormente. Todas as análises e tratamentos estatísticos dos dados obtidos nos ensaios celulares foram realizados no software Prisma, v. 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

### 3.2.3 - ESTUDO DE ESTROGENICIDADE (E-SCREEN MODIFICADO)

A atividade estrogênica dos extratos foi determinada por meio da proliferação celular induzida por compostos bioativos presentes nos mesmos que mimetizassem a ação do 17- $\beta$ -estradiol, em uma adaptação do E-SCREEN (teste desenvolvido inicialmente por Soto e colaboradores)<sup>123</sup>. Antes do teste com os extratos, alguns parâmetros foram ajustados para que esse ensaio pudesse ser executado adequadamente nas condições de trabalho, conforme a sequência apresentada na FIGURA 3.5.

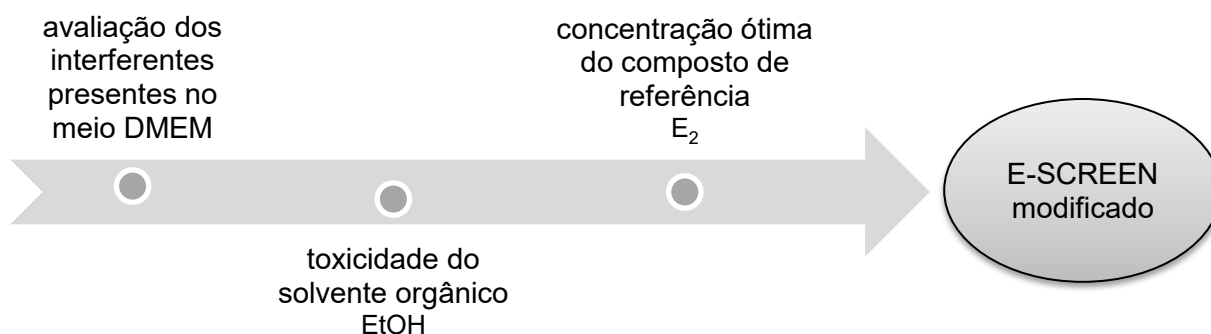


FIGURA 3.5 - Sequência de otimização das condições experimentais para a realização do teste de estrogenicidade

No meio de cultura DMEM há alguns potenciais interferentes que poderiam interagir no receptor estrógeno estimulando o crescimento celular: o indicador vermelho fenol e os hormônios endógenos presentes no FBS. Para verificar a interferência do indicador vermelho fenol na proliferação das células de MCF-7, o meio DMEM foi preparado sem a adição do mesmo. Os hormônios endógenos foram removidos do FBS antes que o mesmo fosse adicionado ao meio de cultura.

Comercialmente, é possível encontrar no mercado o FBS já tratado, porém com um custo bastante elevado. Alternativamente, existem alguns procedimentos descritos na literatura que possibilitam fazer essa remoção no próprio laboratório, com elevada eficiência. Nesse trabalho foram testados dois desses procedimentos. O primeiro foi adaptado daquele descrito por Yohay e colaboradores<sup>182</sup> e consistiu em adicionar um volume de 200,0 mL de solução tampão Tris 100mM, em pH 8,00 ( $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a uma mistura de 0,5000 g de carvão ativo (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 0,0500 g de dextran T-70 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A suspensão ficou em agitação a 4°C por aproximadamente 10 horas, sendo, em seguida, centrifugada a 400 xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 50,0 mL de FBS inativado por calor. O sistema foi incubado por 45 min a 45°C, e posteriormente centrifugado a 1000 xg por 20 min. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o FBS foi esterilizado por filtração em membrana PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  (Stericup®, Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha) e adicionado ao meio de cultura DMEM sem vermelho fenol. O segundo procedimento foi adaptado de Haynes e colaboradores<sup>183</sup>. A uma mistura contendo 0,5000 g de carvão ativo e 0,0500 g de dextran foram adicionados 50,0 mL de FBS

inativado por calor. A suspensão foi mantida sob agitação a 4°C por 30 min, seguido de repouso a 4°C por 15min. Após esse período o sistema foi centrifugado a 2500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado nas mesmas condições por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o FBS foi esterilizado por filtração em membrana PVDF 0,22 µm e adicionado ao meio de cultura sem vermelho fenol.

Para o ensaio de interferência foi adicionado nas placas de 96 poços um dos seguintes meios de cultura:

- i. meio DMEM com vermelho e com 10% (v/v) de FBS sem tratamento.
- ii. meio DMEM sem vermelho fenol e com 10% (v/v) de FBS sem tratamento.
- iii. meio DMEM sem vermelho fenol, com 10% (v/v) de FBS tratado vendido comercialmente (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).
- iv. meio DMEM sem vermelho fenol, com 10% (v/v) de FBS tratado de acordo com Yohay.
- v. meio DMEM sem vermelho fenol, com 10% (v/v) de FBS tratado de acordo com Haynes.

As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 1 a 7 dias, com troca de meio a cada 48 h de incubação. A cada 24 h de incubação era realizada uma análise com MTT, conforme descrito na seção 3.2.2. Sete replicatas foram realizadas em cada ensaio em dois experimentos independentes (n=14). Para diferenciar o FBS tratado do FBS não tratado, o primeiro será identificado no decorrer do texto como FBS-CS (do inglês *charcoal stripped*).

Como os extratos foram solubilizados em solvente orgânico, também foi realizado um estudo com etanol nas mesmas concentrações testadas nos extratos para verificar se o solvente poderia levar à morte das células por toxicidade. Nos poços com células aderidas, foi adicionado então o meio DMEM sem vermelho fenol, suplementado com 10% de FBS-CS, contendo etanol (o mesmo utilizado na preparação dos extratos) nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 ou 2,0% (v/v). No controle negativo do experimento, foi adicionado o meio de cultura sem solvente orgânico. As células foram incubadas por um período de 6 dias, ocorrendo a troca de meio a cada 48 h.

O último parâmetro a ser ajustado foi a concentração do composto de referência que seria utilizado como controle positivo em todos os demais estudos. Uma solução estoque de 17-β-estradiol (E<sub>2</sub>, ≥98%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)

foi preparada na concentração de  $1\text{mmol.L}^{-1}$  em etanol, esterilizada por filtração em membrana de PVDF  $0,22\ \mu\text{m}$  e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição da solução estoque nas concentrações de  $0,1\ \text{nmol.L}^{-1}$  a  $100\ \mu\text{mol.L}^{-1}$  em etanol estéril. Todas as soluções foram diluídas 100 vezes em meio de cultura para que a concentração de solvente no experimento permanecesse em 1% (v/v). Após a lavagem das células plaqueadas com PBS, foi adicionado o meio DMEM sem indicador vermelho fenol, suplementado com 10% de FBS-CS, contendo  $\text{E}_2$  nas concentrações de  $1,00\ \text{pmol.L}^{-1}$ ,  $10,0\ \text{pmol.L}^{-1}$ ,  $100\ \text{pmol.L}^{-1}$ ,  $1,00\ \text{nmol.L}^{-1}$ ,  $10,0\ \text{nmol.L}^{-1}$ ,  $100\ \text{nmol.L}^{-1}$  e  $1,00\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Às células do controle negativo foi adicionado o meio de cultura contendo apenas EtOH na concentração de 1% (v/v). As células foram incubadas por um período de até 8 dias, com troca de meio a cada 48 h.

Após o ajuste das condições, foram testados os extratos preparados conforme descrito na seção 3.1.2. Os extratos secos foram ressolubilizados nos respectivos solventes extratores para a concentração de  $50\ \text{mg.mL}^{-1}$ , compondo as soluções estoque, que foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização nos experimentos de atividade biológica e caracterização química.

Nos ensaios de atividade estrogênica, para que os extratos pudessem ser administrados às células, os mesmos foram diluídos em meio de cultura. As soluções estoque foram diluídas 200 vezes em meio DMEM sem vermelho fenol, com 10% FBS-CS, de forma que a concentração final fosse  $250\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com concentração máxima de etanol no meio de cultura igual a 0,38% (v/v) para os extratos da etapa de triagem de variáveis; e 0,5% (v/v) para os extratos da etapa de modelagem da superfície de respostas. Após a diluição, o meio com o extrato foi esterilizado por filtração em membrana de PVDF  $0,22\ \mu\text{m}$ . Para o controle positivo, a solução estoque de  $\text{E}_2$  ( $1\ \text{mmol.L}^{-1}$  em etanol) foi diluída em meio DMEM sem vermelho fenol com 10% FBS-CS, para atingir a concentração final de  $10\ \text{nmol.L}^{-1}$ , com 1% EtOH (v/v). Para o controle negativo, o etanol esterilizado por filtração em membrana de PVDF  $0,22\ \mu\text{m}$  foi diluído no mesmo meio de cultura para uma concentração final de 1% (v/v).

O ensaio de estrogenicidade foi realizado conforme ilustrado no fluxograma da FIGURA 3.6. As amostras diluídas de extrato, composto de referência e EtOH foram adicionadas em cada poço em soluções de  $100\ \mu\text{L}$  de DMEM sem vermelho fenol e suplementado com FBS-CS (10%). O meio de cultura foi trocado a

cada dois dias com a reposição dos extratos/E<sub>2</sub>/solvente na mesma concentração inicial até atingir o período de incubação de seis dias. Os ensaios foram realizados em quadruplicata, em 2 experimentos independentes (n=8). Para os extratos preparados na etapa de modelagem da superfície de respostas foi realizado ainda um segundo estudo ao longo de 7 dias, nas mesmas condições.

Os extratos obtidos com o solvente extrator contendo 75, 85 e 95% EtOH foram utilizados em um estudo de inibição do crescimento celular da MCF-7. As respectivas soluções estoque foram diluídas em meio de cultura para as concentrações finais de 0,100; 1,00; 5,00; 10,0; 25,0; 50,0; 100; 250 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo imediatamente esterilizadas por filtração em membrana PVDF 0,22 µm. Em cada poço com células aderidas foram adicionados 100 µL do meio DMEM sem vermelho-fenol, com 10% FBS-CS, contendo os extratos ou E<sub>2</sub> na concentração de 10 nM ou etanol na concentração de 1% (v/v). O tempo de incubação foi de 6 dias e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h com a reposição dos extratos/E<sub>2</sub>/solvente na mesma concentração inicial. Para cada concentração de cada extrato foram realizadas quadruplicatas, em 2 experimentos independentes (n=8).

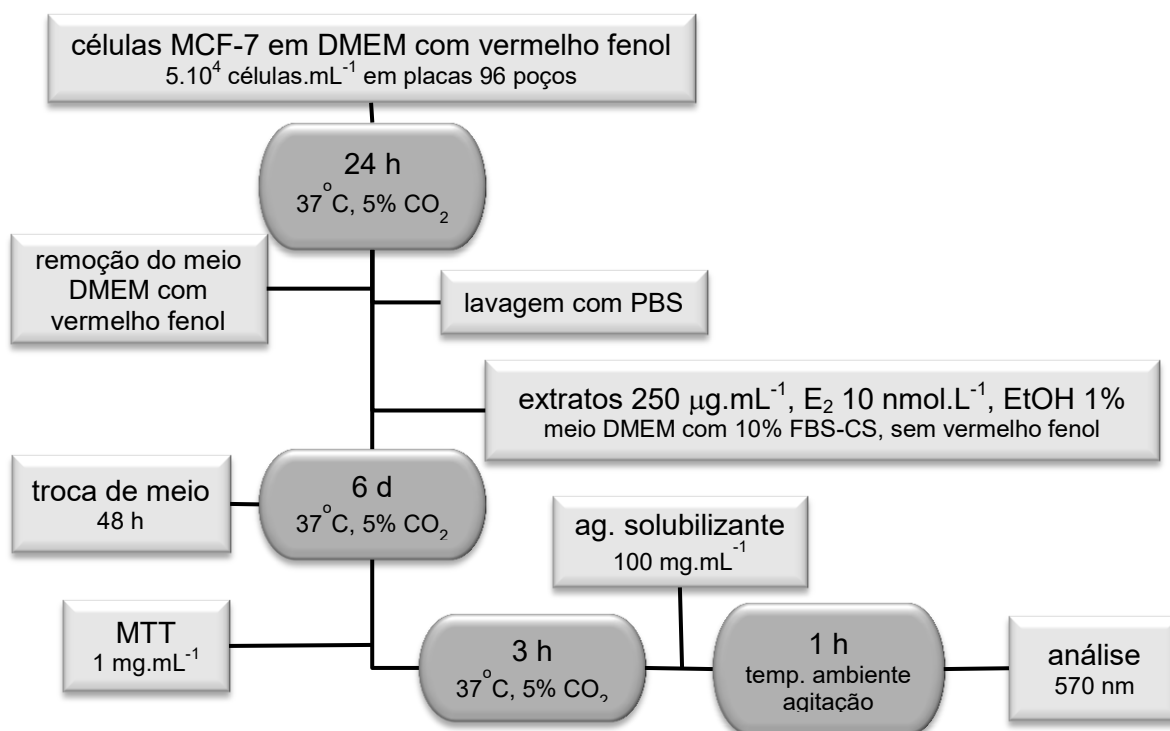


FIGURA 3.6 - fluxograma para o ensaio de estrogenicidade

### 3.2.4 - ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E SELETIVIDADE

Nos estudos de citotoxicidade e seletividade com as linhagens BALB/c 3T3 clone A31e MDA-MB-231 respectivamente, todos os parâmetros experimentais foram mantidos os mesmos descritos para o estudo de estrogenicidade na seção 3.2.3.

Os extratos utilizados nesses ensaios foram obtidos nos 21 experimentos que compuseram o planejamento univariado de modelagem da otimização do extrato de folhas de amoreira com potencial estrogênico (seção 3.1.2.2). Os experimentos foram realizados de forma semelhante àquela ilustrada no fluxograma da FIGURA 3.6, sem a lavagem das células com PBS após a remoção do meio DMEM com indicador vermelho fenol. Foram adicionados aos poços 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura contendo os extratos na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $\text{E}_2$  na concentração de 10 nM. Às células do controle negativo foi adicionado o meio de cultura contendo apenas etanol na concentração de 1% (v/v). Durante o período de incubação de 6 dias, houve troca de meio com a cada 48 h com a reposição dos extratos/ $\text{E}_2$ /solvente na mesma concentração inicial. Para cada extrato foram realizadas 5 replicatas em 2 experimentos independentes (n=10).

### 3.2.5 - CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DE ESTIMULAÇÃO PARA OS EXTRATOS

Cada extrato preparado com o solvente extrator contendo 1, 5, 10, 15, 20, 25 ou 30% de etanol foi diluído em meio de cultura DMEM com 10% de FBS-CS sem vermelho fenol de forma que as concentrações finais fossem 0,100; 1,00; 5,00; 10,0; 25,0; 50,0; 100; 250; 500 e 1,00.10<sup>3</sup>  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com concentração máxima de etanol no meio de cultura igual a 2% (v/v). Após a diluição, o meio com o extrato foi esterilizado por filtração em membrana de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$ .

Após a lavagem das células aderidas com PBS, 100  $\mu\text{L}$  do meio contendo um dos extratos ou  $\text{E}_2$  na concentração de 10 nM foram adicionados nos poços. Às células do controle negativo foi adicionado o meio contendo apenas etanol na concentração de 1% (v/v). O tempo de incubação foi de 6 dias e a troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 h com a reposição dos extratos/ $\text{E}_2$ /solvente na mesma concentração inicial. Para cada concentração de cada extrato foram realizadas 5 replicatas em 2 experimentos independentes (n=10).

### 3.3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA

#### 3.3.1 - ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS

As análises de fenólicos totais nos extratos de amora foram realizadas pelo método Folin-Ciocalteu, conforme o protocolo recomendado pela *International Organization for Standardization (ISO)*<sup>184</sup> para determinação de fenólicos totais em chás. Para minimizar a quantidade de reagentes que posteriormente teriam que ser descartados, foi feita uma miniaturização do método para as análises desse trabalho, procedimento que vem sendo cada vez mais utilizado<sup>185,186,187</sup>.

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque 50,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  dos extratos utilizados nos ensaios biológicos foi diluída 200 vezes em água deionizada para que a concentração final fosse 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Uma solução estoque de ácido gálico monohidratado, ( $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparada na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em água deionizada. Para a curva de calibração, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  também em água deionizada.

Em microtubos de 2,00 mL, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada para o controle do experimento ou 100  $\mu\text{L}$  de cada um dos padrões de calibração ou 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa 10% (v/v) do reagente Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados em cada tubo, que foi rapidamente homogeneizado. Após 6 min, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de uma solução 7,5% (m/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O sistema foi novamente agitado e mantido ao abrigo de luz por 60 min. Após esse período, todas as amostras foram transferidas para placas de 96 poços e fez-se a leitura da absorbância em 765 nm. As análises foram realizadas em quintuplicatas.

As amostras e as soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes do uso e descartadas logo após as análises.



### 3.3.2 - ANÁLISES DE PERFIL QUÍMICO

#### 3.3.2.1 - ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER COMO FONTE DE IONIZAÇÃO ELETROSPRAY (ESI-FT-ICR-MS)

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque dos extratos utilizados nos ensaios biológicos previamente preparados com diferentes quantidades de etanol variando de 1 a 99% (v/v) foi diluída 10 vezes no respectivo solvente extrator para que a concentração final fosse  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dessas soluções foram diluídas 10 vezes em MeOH grau HPLC ( $\geq 99,8\%$ , JT Baker, Center Valley, EUA). Como modificador orgânico foi utilizado  $\text{NH}_4\text{OH}$  grau HPLC (27%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,4% (v/v).

As análises foram feitas em um espectrômetro FT-ICR MS modelo SolariX (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e os parâmetros experimentais ajustados estão listados na TABELA 3.1. Todos os dados obtidos foram processados por meio do software Compass DATAanalysis v. 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e analisados por ferramentas quimiométricas de reconhecimentos de padrões por meio do software Statistica v. 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

TABELA 3.2 - Parâmetros do espectrômetro ESI-FT-ICR ajustados para as análises dos extratos de folhas de amoreira

	<b>parâmetro</b>	<b>condições</b>
<b>ESI</b>	pressão do gás nebulizador	1,0 psi
	vazão do gás secante	$4,0 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$
	potencial aplicado no capilar	3,0 kV
	temperatura de transferência do capilar	$250^\circ\text{C}$
	vazão de inserção	$5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
<b>FT-ICR</b>	campo magnético	9,4T
	modo de ionização	negativo
	modo de análise	varredura completa
	faixa de trabalho em m/z	200 - 1000 u.m.a.
	tempo de voo no hexapolo	0,750 ms
	tempo de acumulação de íons	1 a 5 ms
número de varreduras acumuladas para obtenção do espectro	8	

### 3.3.2.2. - ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE BAIXA RESOLUÇÃO (LC-DAD-MS)

#### 3.3.2.2.1 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

No desenvolvimento do método por HPLC-DAD-ESI foram utilizados os extratos preparados com etanol nas concentrações de 20 a 30% (v/v). Esses extratos foram selecionados por terem apresentado os melhores resultados nas atividades biológicas. Um volume de 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque de cada extrato (50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi retirado para a preparação da amostra e diluído em água deionizada em um microtubo de 1,50 mL, de forma que a concentração total e final de extrato de folhas de amoreira fosse igual a 6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essa solução de trabalho foi transferida para um microtubo e utilizada nas etapas de otimização dos parâmetros cromatográficos e dos parâmetros do espectrômetro de massas.

O método analítico foi desenvolvido em um sistema de HPLC modelo 1200 series (Agilent, Santa Clara, EUA), composto por uma bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379, injetor automático de amostra G1367B e forno de coluna G1311A, acoplado a um detector DAD modelo G1315D acoplado ainda a um espectrômetro de massas com fonte ESI e analisador triplo-quadrupolo modelo API 2000 (AB Sciex, Framingham, EUA). Os dados obtidos foram processados utilizando-se o programa Analyst v. 1.5.1 (AB Sciex, Framingham, EUA). Os solventes orgânicos, metanol e acetonitrila, utilizados no desenvolvimento do método eram grau LC-MS ( $\geq 99,9\%$ , PanReac, Barcelona, Espanha), assim como o aditivo ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) (98% Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Estratégias de planejamento experimental (DoE) foram aplicadas na otimização dos parâmetros instrumentais, com tratamento dos dados realizado por meio do programa Statistica v. 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA ).

#### a) otimização dos parâmetros cromatográficos

Na otimização dos parâmetros cromatográficos, apenas o detector DAD foi utilizado, uma vez que os parâmetros do espectrômetro de massas ainda teriam que ser ajustados. Em todas as análises, foi feita uma varredura de comprimentos de onda de 200 a 800 nm.

## - a escolha da fase estacionária

A primeira etapa na otimização das condições cromatográficas de separação foi a escolha da fase estacionária. Foram avaliadas 3 diferentes fases para separação em modo reverso: (i) coluna Gemini<sup>®</sup> C18 (Phenomenex, Torrance, EUA), nas dimensões 150x4,6 mm, 5 µm; (ii) coluna Luna<sup>®</sup> fenil-hexil (Phenomenex, Torrance, EUA), nas dimensões 250x4,6 mm, 5 µm; e (iii) coluna Zorbax<sup>®</sup> fenil (Agilent, Torrance, EUA), nas dimensões 250x4,6 mm, 5 µm. Para cada uma das fases estacionárias, foi feita uma análise exploratória nas condições sugeridas por Snyder e colaboradores<sup>172</sup> (TABELA 3.3).

TABELA 3.3 - Condições experimentais utilizadas na análise exploratória inicial para a seleção da fase estacionária

<b>parâmetros</b>	<b>condições</b>
Modo de eluição	gradiente
Fase móvel	A: H <sub>2</sub> O, 0,1% HCOOH (v/v) B: ACN, 0,1% HCOOH (v/v) 5-100%B, 60 min 100%, 10 min
Vazão	1000 µL.min <sup>-1</sup>
Temperatura	40°C
Volume de injeção	5 µL
Faixa de varredura DAD	200 – 800 nm

## - planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: triagem de variáveis

Na etapa inicial do planejamento experimental, o objetivo principal foi verificar quais parâmetros cromatográficos influenciavam diretamente a separação analítica dos componentes do *pool* de extratos. Foram avaliados 6 fatores por meio de um planejamento fatorial fracionado 2<sup>(6-1)</sup> (resolução VI) em dois níveis, totalizando 32 experimentos (TABELA 3.4). A geratriz utilizada foi I=ABCDEF. Os padrões de confundimento para os contrastes foram:

$$\begin{array}{llll}
I_A = A + BCDEF & I_{AD} = AD + BCEF & I_{CE} = CE + ABDF & I_{ABF} = ABF + CDE \\
I_B = B + ACDEF & I_{AE} = AE + BCDF & I_{CF} = CF + ABDE & I_{ACD} = ACD + BEF \\
I_C = C + ABDEF & I_{AF} = AF + BCDE & I_{DE} = DE + ABCF & I_{ACE} = ACE + BDF \\
I_D = D + ABCEF & I_{BC} = BC + ADEF & I_{DF} = DF + ABCE & I_{ACF} = ACF + BDE \\
I_E = E + ABCDF & I_{BD} = BD + ACEF & I_{EF} = EF + ABCD & I_{ADE} = ADE + BCF \\
I_F = F + ABCDE & I_{BE} = BE + ACDF & I_{ABC} = ABC + DEF & I_{ADF} = ADF + BCE \\
I_{AB} = AB + CDEF & I_{BF} = BF + ACDE & I_{ABD} = ABD + CEF & I_{AEF} = AEF + BCD \\
I_{AC} = AC + BDEF & I_{CD} = CD + ABEF & I_{ABE} = ABE + CDF & 
\end{array}$$

TABELA 3.4 - Parâmetros cromatográficos avaliados na etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental

Fatores	níveis	
	-1	+1
A - pH da fase móvel*	2,74	3,05
B - vazão da fase móvel ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )	600	1.000
C - natureza do modificador orgânico (fase B)	MeOH	ACN
D - tempo do gradiente ( $t_G$ ) (min)	15	30
E - temperatura do forno ( $^{\circ}\text{C}$ )	35	45
F - concentração inicial do modificador orgânico ( $\%B_i$ )	10	20

\* medido experimentalmente após a adição de HCOOH na fase A ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Todos os experimentos foram realizados aleatoriamente, mantendo-se constantes:

- i. volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$  do *pool* dos extratos;
- ii. concentração final do modificador orgânico ( $\%B_f$ ): 40% B;
- iii. aditivo adicionado na fase móvel: HCOOH; e
- iv. fase estacionária: C18.

Como variáveis dependentes foram utilizadas as resoluções cromatográficas ( $R_s$ ) entre bandas cromatográficas adjacentes.

- planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: modelagem da superfície de respostas

A estratégia de planejamento de composto central foi empregada na etapa de modelagem da superfície de respostas com 18 experimentos (8 na parte cúbica, 6 na axial e 4 replicatas no ponto central) considerando-se apenas os fatores quantitativos significativos identificados na etapa de triagem de variáveis ( $\% B_i$ ,  $t_G$  e pH). Os demais parâmetros cromatográficos foram fixados em:

- i. modificador orgânico utilizado como fase B: ACN;
- ii. aditivo adicionado na fase móvel: HCOOH;

- iii. volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$  do *pool* dos extratos;
- iv. concentração final do modificador orgânico (%B<sub>f</sub>): 40% B;
- v. temperatura: 40°C;
- vi. vazão da fase móvel: 600  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; e
- vii. fase estacionária: C18.

Como variáveis dependentes foram utilizadas as resoluções cromatográficas ( $R_s$ ) entre bandas cromatográficas adjacentes.

Assim como na etapa anterior, todos os experimentos foram realizados aleatoriamente. Os níveis escolhidos para cada variável estão apresentados nas TABELAS 3.5 .

TABELA 3.5 - Parâmetros cromatográficos otimizados na etapa de modelagem de respostas do planejamento experimental.

Fatores	níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
A-concentração inicial de B (%B <sub>i</sub> )	5	10	15	20	25
B- tempo do gradiente ( $t_G$ ) (min)	10	15	20	25	30
C- pH da fase móvel* (concentração do HCOOH em %)	2,80 (0,0040)	2,85 (0,0035)	2,90 (0,0030)	2,96 (0,0025)	3,05 (0,0020)

\* medido experimentalmente após a adição de HCOOH na fase A (H<sub>2</sub>O)

## b) otimização dos parâmetros espectrométricos

Os parâmetros instrumentais relacionados a potenciais e gases descritos a seguir foram selecionados para a otimização do planejamento experimental, com o qual se desejava obter o sinal mais intenso para as bandas cromatográficas principais:

- cortina de gás (CUR): gás inerte, N<sub>2</sub> injetado na interface da fonte de ionização com o analisador de massas, ortogonalmente à entrada na amostra, sendo função era reduzir a quantidade de solvente e interferentes (principalmente moléculas neutras) que entrariam no analisador.

- potencial no capilar (IS): potencial aplicado à saída do capilar para ajudar a promover a repulsão entre as cargas das partículas (íons parcialmente solvatados).

- gás secante (GAS 1): gás inerte (N<sub>2</sub>) injetado coaxialmente ao fluxo

da amostra com o objetivo de ajudar na dessolvatação dos íons na formação das gotículas.

- gás nebulizador (GAS 2): gás injetado coaxialmente ao fluxo da amostra com o objetivo principal de formar o “spray” de íons por nebulização, acelerando a evaporação das moléculas de solvente.

- potencial de dessolvatação (DP): diferença de potencial aplicada entre as placas *orifice* e *skimmer* (lente focalizadoras) de forma a minimizar, ou mesmo eliminar a esfera de solvatação dos íons, reduzindo também a quantidade de moléculas de solvente que entram no analisador.

- potencial de focalização (FP): potencial aplicado no *skimmer* (uma lente focalizadora), para focalizar e guiar os íons durante sua passagem pela lente.

- potencial de entrada (EP): Diferença de potencial aplicada no Q0, sendo esse quadrupolo posicionado imediatamente após a placa *orifice*, que tem a função única e exclusivamente de focalizar os íons em sua trajetória até a entrada no Q1.

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada em uma única etapa de modelagem de superfície de respostas, pois todos os parâmetros acima se mostraram significativos em um planejamento fatorial fracionado realizado inicialmente. Devido ao elevado número de fatores (7), foi escolhida a estratégia de planejamento reduzido composto central, no qual a parte cúbica dos experimentos correspondia a um planejamento fatorial fracionado  $2_{IV}^{7-3}$ , a parte axial era composta por 14 experimentos e foram realizadas 3 replicatas no ponto central. Como variáveis dependentes foram utilizadas as intensidades observadas para as 10 maiores bandas cromatográficas.

As geratrizes utilizadas foram I=ABCG = ACDF = ABDE. Os padrões de confundimento para os contrastes foram:

$$\begin{aligned}
I_A &= A + CDF + ACDEG + BDE + EFG + ABCEF + BCG + ABDFG \\
I_B &= B + ABCDF + BCDEG + ADE + ABEFG + CEF + ACG + DFG \\
I_C &= C + ADF + DEG + ABCDE + ACEFG + BEF + ABG + BCDFG \\
I_D &= D + ACF + CEG + ABE + ADEFG + BCDEF + ABCDG + BFG \\
I_E &= E + ACDEF + CDG + ABD + AFG + BCF + ABCEG + BDEFG \\
I_F &= F + ACD + CDEFG + ABDEF + AEG + BCE + ABCFG + BDG \\
I_G &= G + ACDFG + CDE + ABDEG + AEF + BCEFG + ABC + BDF \\
I_{AB} &= AB + BCDF + ABCDEG + DE + BEFG + ACEF + CG + ADFG \\
I_{AC} &= AC + DF + ADEG + BCDE + CEF + ABEF + BG + ABCDFG \\
I_{AD} &= AD + CF + ACEG + EB + DEFG + ABCDEF + BCDG + ABFG \\
I_{AE} &= AE + CDEF + ACDG + BD + FG + ABCF + BCEG + ABDEFG \\
I_{AF} &= AF + CD + ACDEFG + BDEF + EG + ABCE + BCFG + ABDG \\
I_{AG} &= AG + CDFG + ACDE + BDEG + EF + ABCEFG + BC + ABDF \\
I_{CE} &= CE + ADEF + DG + ABCD + ACFG + BF + ABEG + BCDEFG \\
I_{ACE} &= ACE + DEF + ADG + BCD + CFG + ABF + BEG + ABCDEFG
\end{aligned}$$

As variáveis e os níveis utilizados estão apresentados na TABELA 3.6.

As amostras foram inicialmente submetidas à separação cromatográfica nas condições otimizadas anteriormente e listadas na TABELA 3.7. Na saída da coluna cromatográfica foi colocado um divisor de fluxo ajustado para uma taxa de 1:20, de forma que a vazão de entrada da fase móvel fosse  $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  no espectrômetro de massas e  $570 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  no detector DAD. Todas as análises do planejamento foram realizadas de forma aleatória e simultaneamente nos modos de ionização positivo e negativo. Os únicos parâmetros espectrométricos mantidos constantes foram a temperatura do gás secante (fixada em  $400^\circ\text{C}$ ) e o aquecimento da interface da fonte de ionização com o analisador.

TABELA 3.6 - Parâmetros espectrométricos otimizados na etapa de modelagem de respostas do planejamento experimental

fatores	níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
A - cortina de gás (CUR)	30	35	40	45	50
B - potencial no capilar (IS)	2500	3000	3500	4000	4500
C - gás secante (GAS 1)	40	50	60	70	80
D - gás nebulizador (GAS 2)	10,0	13,8	17,5	21,2	25,0
E - potencial de dessolvatação (DP)	0,0	50,0	100,0	150,0	200,0
F - potencial de focalização (FP)	50,0	137,5	225,0	312,0	400,0
G - potencial de entrada (EP)	1,0	3,8	6,5	10,2	12,0

TABELA 3.7 - Condições cromatográficas utilizadas durante a otimização dos parâmetros espectrométricos

<b>parâmetros</b>	<b>condições</b>
fase móvel	A: H <sub>2</sub> O, 0,025% HCOOH (v/v) B: ACN, 0,025% HCOOH (v/v) 18 – 40%B, 10 min 40%, 5 min
vazão	600 µL.min <sup>-1</sup>
temperatura	40°C
volume de injeção	5 µL
faixa de varredura DAD	200 – 800 nm

### 3.3.2.2.2 - APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA.

#### a) análise dos extratos testados nos ensaios celulares

Uma alíquota de 100 µL de cada solução estoque dos extratos utilizados nos ensaios biológicos, os quais foram preparados com soluções hidroalcoólicas contendo de 1 a 99% EtOH, foi diluída 20 vezes no respectivo solvente extrator para que a concentração final fosse 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Essas soluções foram transferidas para vials e analisadas por LC-DAD-MS utilizando o método previamente desenvolvido. As condições experimentais para cromatografia estão listadas na TABELA 3.7 e para os parâmetros espectrométricos, na TABELA 3.8. O sistema e os solventes utilizados nas análises foram os mesmos descritos anteriormente (seção 3.3.2.1).

TABELA 3.8 - Condições do espectrômetro de massas utilizadas nas análises de perfil químico para os extratos testados nos ensaios celulares

<b>parâmetro</b>	<b>condição experimental</b>
cortina de gás (CUR)	45 psi
potencial aplicado no capilar (IS)	4000 V
gás nebulizador (GAS 1)	50 psi
gás secante (GAS 2)	13,3 psi
potencial de dessolvatação (DP)	50 V
potencial focalizador (FP)	312 V
potencial de entrada (EP)	10,2 V
cela multiplicadora de elétrons (CEM)	1900



Nas análises para identificação estrutural dos principais analitos presentes nos extratos de folhas de amoreira, foi utilizado o extrato preparado com solvente extrator contendo 50% EtOH (v/v). O espectrômetro de massas operou no modo sequencial (MS/MS) e os parâmetros relacionados à fragmentação foram otimizados por planejamento experimental composto central, após a identificação dos íons quasimoleculares ( $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ ), buscando a maior intensidade do sinal das bandas cromatográficas correspondentes. Os níveis utilizados nos experimentos realizados aleatoriamente estão listados na TABELA 3.9. As demais condições experimentais foram aquelas listadas na TABELA 3.7.

TABELA 3.9 - Parâmetros de espectrometria de massas sequencial otimizados por planejamento experimental de composto central.

fatores	níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
A - densidade do gás de colisão ativada por dissociação (CAD)	0	3	6	9	12
B - energia de colisão (CE)	5	36	67	98	129
G - potencial de saída da cela de colisão (CXP)	1	15	29	43	57

#### b) análise dos meios de cultura após a incubação das células de MCF-7 e MDA-MB-231

Para essas análises foram selecionados os experimentos nos quais as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram incubadas com os extratos preparados com 20, 45, 75 e 85% de etanol no solvente extrator. Os meios de cultura desses sistemas foram coletados após 2, 4 e 6 dias de incubação e analisados por LC-DAD nas condições listadas na tabela 3.7. Foram analisadas amostras controle, além dos respectivos extratos preparados por diluição das soluções estoque em meio de cultura e em água na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Todas as amostras foram filtradas em membrana PVDF  $0,22 \mu\text{m}$  previamente à injeção no cromatógrafo.

#### c) quantificação dos analitos presentes nos extratos de folhas de amoreira

Soluções estoque de rutina ( $\geq 94,0\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), isoquercetina ( $\geq 90,0\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e quercetina 6"-malonil (3-O-glicosídeo) ( $\geq 85,0\%$ , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram preparadas na

concentração de 5,00 mg.mL<sup>-1</sup> em etanol grau HPLC. O flavonoide glicosilado naringina (≥90,0%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizado com padrão interno (PI) para o qual também foi preparada uma solução estoque na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> em etanol grau HPLC.

As análises foram realizadas em triplicata pelo método de adição de padrão para os extratos preparados com 25, 40, 55, 70, 85 e 99% de etanol, os quais foram diluídos em água para a concentração final de 2,50 mg.mL<sup>-1</sup>. Amostras dos extratos foram fortificadas com volumes de padrões de referência para as concentrações finais de 1,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; e 100 µg.mL<sup>-1</sup> e com um volume de PI para a concentração final de 50,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

Uma curva de calibração por padronização externa também foi construída em triplicata, para a qual soluções de trabalho dos analitos foram preparadas por diluições das soluções estoque em água nas concentrações de 1, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>. A concentração do PI em cada uma delas foi 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

As condições de análise foram aquelas listadas na TABELA 3.7. no comprimento de 260 nm foi escolhido para a quantificação.

### 3.3.3 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA OS MARCADORES QUÍMICOS DE AUTENTICIDADE DO MATERIAL VEGETAL

O método analítico por LC-DAD foi validado para os flavonoides rutina, isoquercetina e quercetina 6"-malonil (3-O-glicosídeo) conforme as recomendações da ANVISA dispostas nos documentos vigentes RE n°. 899 de 29 de maio de 2003<sup>188</sup> e RDC n°. 27 de 17 de maio de 2012<sup>189</sup>. A validação foi realizada segundo a sequência apresentada na FIGURA 3.7, nas condições experimentais listadas na TABELA 3.10 e sem o uso de padrão interno.

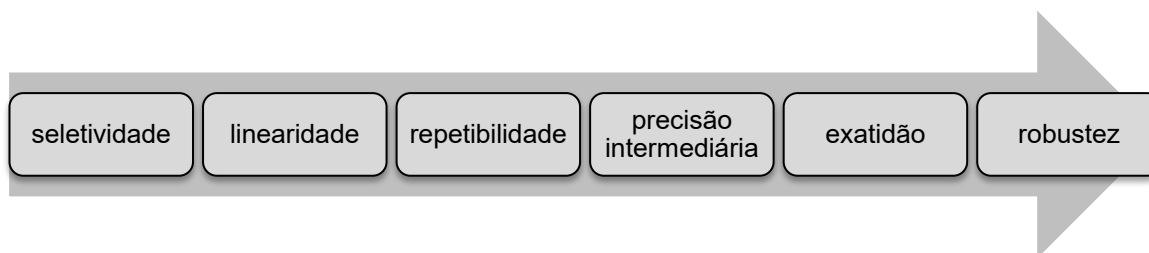


FIGURA 3.7 - sequência utilizada na avaliação das figuras de mérito para validação do método analítico por LC-DAD

TABELA 3.10 - Condições cromatográficas utilizadas durante a validação do método analítico

parâmetros	condições
fase móvel	A: H <sub>2</sub> O, 0,025% HCOOH (v/v) B: ACN, 0,025% HCOOH (v/v) 18 – 40%B, 10 min 40%, 5 min
vazão	600 µL.min <sup>-1</sup>
temperatura	40°C
volume de injeção	5 µL
comprimento de onda para quantificação	260 nm

Para a avaliação da seletividade, soluções de trabalho dos analitos foram preparadas em triplicata por diluições das respectivas soluções estoque em água nas concentrações de 1,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Amostras não-fortificadas do extrato com 30% de etanol foram preparadas em 6 replicatas por diluição de 20 vezes da solução estoque em água para a concentração final 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Outras 6 amostras do extrato na mesma concentração final em água foram fortificadas com os padrões de referência nas concentrações de 3,00; 50,0 e 75,0 µg.mL<sup>-1</sup>. A seletividade foi avaliada comparando-se as concentrações estimadas nas amostras não fortificadas e nas amostras nas quais foram adicionados padrões de referência.

Na avaliação da linearidade, soluções de trabalho dos analitos foram preparadas em triplicata por diluições das respectivas soluções estoque em água nas concentrações de 1,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100 µg.mL<sup>-1</sup>. A linearidade foi avaliada com base no modelo de regressão gerado a partir dos resultados obtidos para as 7 concentrações.

Para as análises de repetibilidade, soluções de trabalho dos analitos de referência foram preparadas em triplicata por diluições das respectivas soluções estoque em água nas concentrações de 3, 50 e 75 µg.mL<sup>-1</sup>. Essas soluções foram analisadas aleatoriamente no decorrer de um único dia. Para a precisão intermediária, essas soluções foram preparadas em quintuplicata e analisadas em dois dias não consecutivos. Em cada dia foi preparado um novo conjunto com todas as amostras.

A exatidão foi avaliada utilizando-se amostras do extrato com 30% EtOH preparadas em triplicata a partir de uma diluição de 20 vezes da solução

estoque em água, de forma que a concentração final fosse 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Outras amostras do extrato preparadas em triplicata na mesma concentração final foram fortificadas com as soluções estoque dos padrões analíticos, de forma que as concentrações finais dos mesmos fossem 3, 50 e 75 µg.mL<sup>-1</sup>. Todas as amostras preparadas foram analisadas aleatoriamente em um único dia.

A última figura de mérito avaliada foi a robustez do método, o que foi realizado por meio de um planejamento experimental fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup> (resolução V) em 2 níveis, totalizando 16 experimentos realizados aleatoriamente. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram o pH e a vazão da fase móvel, o tempo do gradiente, a temperatura do forno e a concentração inicial do modificador orgânico (TABELA 3.11). A geratriz utilizada foi I=ABCDE e os padrões de confundimento para os contrastes foram:

$$\begin{array}{lll}
 I_A = A + BCDE & I_{AB} = AB + CDE & I_{BD} = BD + ACE \\
 I_B = B + ACDE & I_{AC} = AC + BDE & I_{BE} = BE + ACD \\
 I_C = C + ABDE & I_{AD} = AD + BCE & I_{CD} = CD + ABE \\
 I_D = D + ABCE & I_{AE} = AE + BCD & I_{CE} = CE + ABD \\
 I_E = E + ABCD & I_{BC} = BC + ADE & I_{DE} = DE + ABC
 \end{array}$$

Na avaliação da robustez foram mantidos constantes:

- i. volume de injeção: 5 µL do o extrato preparado com 30% EtOH na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>;
- ii. concentração final do modificador orgânico (%B<sub>f</sub>): 40% B; e
- iii. aditivo adicionado na fase móvel: HCOOH.

TABELA 3.11 - Parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação da robustez do método analítico por LC-DAD

Fatores	níveis	
	-1	+1
A - pH da fase móvel*	2,94	2,98
B - vazão da fase móvel (µL.min <sup>-1</sup> )	550	650
C - tempo do gradiente (t <sub>G</sub> ) (min)	9	11
D - temperatura do forno (°C)	38	42
E - concentração inicial do modificador orgânico (%B <sub>i</sub> )	16	20

\* medido experimentalmente após a adição de HCOOH na fase A (H<sub>2</sub>O)

### 3.3.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO NA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE AMOREIRA

#### 3.3.4.1 - MANIPULAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL PARA A PREPARAÇÃO DO EXTRATO.

Nessa etapa foram estudados alguns parâmetros envolvidos no preparo do material vegetal que poderiam alterar o perfil de flavonoides com a melhor atividade biológica: (i) tratamento de secagem das folhas; (ii) tempo mínimo de maceração; (iii) proporção de massa de material vegetal em relação ao volume de solvente extrator; e (iv) número de extrações sequenciais.. Para isso, extratos foram preparados em diferentes condições, mantendo-se a composição do solvente extrator em 30% de etanol. Todos os extratos foram preparados com agitação em vórtex por 30 s, turbólise por 1 min em 18.500 x g e maceração à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após o preparo, foram centrifugados por 20 min, a 12000 rpm, 4°C, filtrados em membrana PVDF 0,22 µm e secos à pressão reduzida. Cada extrato foi ressolubilizado na mesma composição do solvente extrator na concentração de 5,00 mg.mL<sup>-1</sup> e analisados por LC-DAD nas condições mesmas condições utilizadas na etapa de validação do método analítico, apresentadas na TABELA 3.10.

Em relação à secagem do material vegetal foram considerados 3 procedimentos: secagem à sombra e temperatura ambiente, secagem em estufa e utilização da folha fresca, recém colhida. O material utilizado foi coletado no mês de setembro de 2012 e o procedimento de limpeza das folhas foi realizado conforme descrito na seção 3.1.1. Para cada tratamento foram preparadas triplicatas constituídas de 15 folhas de amoreira selecionadas aleatoriamente. A secagem à temperatura ambiente foi realizada à sombra durante 10 dias. A secagem em estufa foi realizada a 40°C durante 72 h (estufa de secagem Q317M, Quimis, São Paulo, Brasil). Os materiais secos foram moídos e peneirados em peneira granulométrica 500 mesh. Para o terceiro procedimento, após a higienização inicial, o excesso de água foi retirado em toalha absorvente e as folhas foram trituradas. Os extratos foram preparados mantendo-se a proporção de 150,0 mg de material vegetal moído/triturado para 6,00 mL de solvente extrator e o tempo de extração em 1h.

Para verificar se o tempo mínimo de maceração poderia ser reduzido sem comprometer a extração, foram preparados extratos com o material vegetal coletado em março de 2012, mantendo-se a proporção de 150,0 mg de material

vegetal moído para 6,00 mL de solvente extrator. Foram avaliados os tempos de 0,0; 5,0; 10; 30 ou 60 min para maceração à temperatura ambiente.

A proporção de massa de material vegetal para volume de solvente extrator também foi avaliada em relação a possíveis alterações no perfil ativo com as folhas coletadas em março de 2012. Foram preparados extratos em triplicata nas condições 1:40 (150,0 mg / 6,00 mL); 1:20 (300,0 mg / 6,00 mL), 1:10 (600,0 mg / 6,00 mL). O tempo de maceração foi de 60 min.

O próximo parâmetro avaliado foi o número de extrações sequenciais necessárias. Com o material coletado em março de 2012, foram preparados 5 sistemas, em cada qual foram utilizados 150,0 mg de folhas secas moídas para 6,00 mL de solvente extrator. O tempo de maceração foi de 60 min.

Para o primeiro sistema, após a centrifugação, o sobrenadante foi seco sob pressão reduzida e ressuspensionado na concentração de 5,00 mg.mL<sup>-1</sup> na mesma composição do solvente extrator. Para o segundo, o sobrenadante foi reservado para secagem e um novo processo de extração foi realizado com o resíduo do material vegetal. O novo sobrenadante foi misturado ao primeiro, seco sob pressão reduzida e ressuspensionado na concentração de 5,00 mg.mL<sup>-1</sup> na mesma composição do solvente extrator. Para os sistemas 3, 4 e 5, o processo de extração foram repetidos por 2, 3 e 4 vezes respectivamente. Cada sobrenadante foi acumulado, seco sob pressão reduzida e resolubilizado nas mesmas condições dos sistemas anteriores. Para cada sistema foram preparadas 3 replicatas.

Para finalizar os experimentos relacionados à manipulação do material vegetal e o preparo dos extratos, foi realizada uma comparação dos extratos obtidos pelo método de maceração à temperatura ambiente utilizado nesse trabalho com aqueles obtidos por métodos de referência estabelecidos pelas farmacopeias brasileira<sup>145,153</sup> e americana<sup>190</sup> Erro! Indicador não definido. e pelo método mais utilizado na medicina popular para o tratamento dos sintomas do climatério (TABELA 3.12).

Em todas as extrações foram utilizadas as mesmas folhas secas e moídas, coletadas em março de 2012. A solução etanólica 30% (v/v) foi utilizada nos métodos de maceração e extração soxhlet. Na infusão foi utilizado somente água. A proporção de massa de folhas / volume de solvente também foi mantida em 1:40. Todos os extratos foram centrifugados e preparados para as análises conforme o procedimento geral descrito no início da seção.

Uma amostra do extrato também foi preparada utilizando-se 1,00 g das

folhas secas moídas para 40,00 mL do solvente extrator, sendo em seguida agitado em vórtex por 30 s e submetido à turbólise por 1 min em rotação máxima. O tempo de maceração a frio foi de 60 min, seguidos de centrifugação por 20 min, a 18.500 xg, 4°C. Após a separação do sobrenadante, uma nova extração foi realizada nas mesmas condições com o resíduo do material vegetal. Os dois sobrenadantes foram combinados, filtrados e uma amostra (2,00 mL) foi seca sob pressão reduzida.

TABELA 3.12 - Procedimentos utilizados nos métodos de referência para extração

<b>Método</b>	<b>Massa de folhas</b>	<b>Volume de solvente</b>	<b>procedimento</b>
Maceração a frio	1,00 g	40,0 mL	Ao material seco e moído foi adicionado o solvente extrator; o tempo de maceração a frio foi 7 h com agitação frequente e 17 h sem agitação.
Maceração a quente	2,50 g	100 mL	Ao material seco e moído foi adicionado o solvente extrator; O sistema foi agitado, ficando pela próxima 1 h em repouso; um condensador de refluxo foi acoplado ao frasco e manteve-se o sistema em fervura por 1 h. Após o resfriamento do sistema, reajustou-se o volume para o valor original (100 mL).
Soxhlet*	2,50 g	100 mL	O material seco e moído foi depositado em um cartucho feito de papel de filtro que foi colocado no extrator soxhlet; após 6 h de extração, o volume foi reajustado para o volume original e uma amostra desse material (1,00 mL) foi retirada para análise, a qual foi seca e ressolubilizada no solvente extrator na concentração de 5 mg.mL <sup>-1</sup> . A extração prosseguiu por outras 6 h. O volume final foi reajustado para o inicial novamente.
Infusão <sup>#</sup>	2,50 g	100 mL	A massa de folhas moídas pesadas foram transferidas para um cartucho ao qual foi adicionada a água após entrar em ebulição. O sistema ficou em infusão por 5 min.

\* - recomendado apenas pela farmacopeia brasileira; # - medicina popular.

### 3.3.4.2 - ANÁLISES DE VARIABILIDADE ATRIBUÍDA A FATORES NATURAIS.

Nessa etapa os métodos de extração e análise foram utilizados para investigar como fatores naturais poderiam influenciar a produção dos fitoestrógenos

e, conseqüentemente, o seu armazenamento nas folhas. Para isso, foram coletadas amostras compostas de folhas de amoreira. Em outras palavras, as folhas foram coletadas aleatoriamente em cinco ramos de amoreira e tratadas como descrito anteriormente. Os extratos foram preparados em triplicata com materiais coletados em diferentes condições. Para cada extrato, 1,00 mL de solução etanólica 30% foi adicionado a 25,00 mg de folhas secas moídas. Cada microtubo contendo a mistura foi submetido à agitação em vórtex por 30 s, turbólise por 1 min em 20.000 rpm e maceração à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após o preparo, foram centrifugados por 20 min, a 18.500 xg, 4°C, filtrados em membrana PVDF 0,22 µm e secos à pressão reduzida. Cada extrato foi ressolubilizado na mesma composição do solvente extrator na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> e analisados por LC-DAD nas mesmas condições utilizadas na validação do método (TABELA 3.10).

O primeiro fator avaliado foi a poda hiberna, prática agrícola comumente utilizada no início do inverno. Para esse estudo, alguns exemplares de amoreira foram divididos em 2 grupos. Em um deles, foi realizada a poda próxima à base do arbusto no mês de maio de 2012. O outro grupo foi formado por exemplares nos quais não foi realizada a poda. Para que o material tivesse o mesmo tempo de desenvolvimento, em cada conjunto foram selecionadas as folhas que brotaram na mesma época. As folhas foram coletadas aleatoriamente em setembro de 2012, aproximadamente 3 meses após o brotamento. Em cada grupo foram coletados 3 conjuntos compostos de 15 folhas.

O período anual foi o segundo fator analisado. Um conjunto de exemplares foi separado para esse experimento. Em cada amostragem, foram coletados 3 grupos formados por 15 folhas selecionadas aleatoriamente. Foram realizadas 4 coletas, sempre no final do mês: setembro de 2012; novembro de 2013; janeiro de 2013; e março de 2013, correspondente ao início e final da primavera, verão e outono, respectivamente.

A influência da incidência de raios solares na produção dos metabólitos foi investigada de duas formas. No primeiro experimento foram coletados 2 grupos de folhas, cada qual formado por 3 conjuntos de 15 unidades escolhidas aleatoriamente. O primeiro grupo consistiu de folhas que se desenvolveram próximo à base do ramo e, portanto, à sombra de outras folhas. A segunda amostragem foi composta por folhas localizadas na parte superior do mesmo ramo, as quais receberam maior incidência de raios solares (FIGURA 3.8).



No segundo experimento, foi avaliado o horário de coleta do material vegetal. Foram coletados 4 grupos de folhas, cada qual formado por 3 conjuntos de 15 unidades escolhidas aleatoriamente. Os dois primeiros grupos consistiam de folhas coletadas no período matinal, sendo o primeiro às 7h e o segundo às 11 h. O terceiro grupo foi formado por folhas coletadas no meio da tarde, às 15 h e o quarto, por folhas coletadas no período noturno, às 19 h.



FIGURA 3.8 - grupos de folhas utilizados no estudo de exposição ao sol

O estágio de desenvolvimento das folhas no momento da coleta foi o próximo fator a ser avaliado. Foram coletados 4 grupos de folhas, cada qual formado por 3 conjuntos de 15 unidades escolhidas aleatoriamente. As amoreiras foram podadas no final do mês de novembro de 2013. O primeiro grupo foi coletado ao final do mês de janeiro de 2014 (60 dias), o segundo foi coletado 30 dias depois (90 dias), o terceiro foi coletado em março (120 dias) e o último em abril (150 dias).

Entre os fatores naturais foi ainda estudado como o estresse hídrico pode afetar o metabolismo secundário das plantas e o armazenamento dos fitoestrógenos nas folhas. Para isso, um grupo de exemplares foi reservado para o estudo no qual 3 amostras de folhas foram coletadas durante 3 anos consecutivos (2012 a 2014), sempre no mês de março. Cada amostra era constituída por 3 conjuntos de 15 unidades escolhidas aleatoriamente.

Para finalizar, foi realizado um último estudo que não estava diretamente relacionado com fatores naturais, mas com a distribuição dos metabólitos em partes aéreas da planta. Nesse experimento foi utilizado o material vegetal coletado em setembro de 2012, o qual foi separado em 3 grupos: frutos,

pedúnculo (haste que liga a folha ao caule do ramo) e folhas (FIGURA 3.9). Cada grupo foi composto de 3 conjuntos com 15 unidades. Todas as partes foram provenientes dos mesmos ramos escolhidos aleatoriamente.

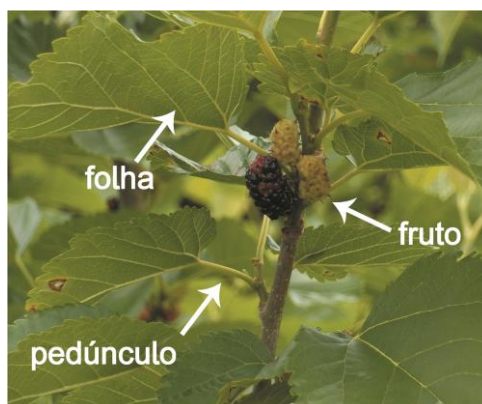


FIGURA 3.9 - Partes da amoreira avaliadas em relação ao teor de flavonoides

### 3.3.4.3 - ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS COMERCIAIS

Nessa etapa do trabalho foram analisadas em triplicata amostras de cápsulas de amora comercializadas por farmácias de manipulação. As amostras foram adquiridas em 4 estabelecimentos da cidade de Ribeirão Preto (SP). Além destas, também foram analisadas cápsulas de amora comercializadas como suplemento alimentar nos EUA pela empresa “Swanson Health Products” (lote 183135, fabricado em janeiro/2011).

Para todas as replicatas, foram preparados extratos utilizando-se 25,00 mg do conteúdo da cápsula para 1,00 mL de uma solução hidroalcoólica 50%. Para as cápsulas americanas foi utilizada a proporção de 600,0 mg (peso de 1 cápsula) para 24,0 mL do solvente, devido à dificuldade de desagregação do material. Todos os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 30 s e turbólise por 1 min em 20.000 rpm. O tempo de maceração foi de 60 min, seguido de centrifugação por 20 min, a 18.500 xg, 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF 0,22 µm e reservado. O procedimento de extração foi realizado novamente e os sobrenadantes foram combinados e secos sob pressão reduzida. Cada sobrenadante foi ressolubilizado no mesmo solvente de extração para a concentração final de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de cada replicata foram transferidas para microtubos e analisadas por LC-DAD nas condições utilizadas para validação do método (TABELA 3.10).

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

#### 4.1.1 - TRIAGEM DE VARIÁVEIS

O planejamento fatorial é uma ferramenta quimiométrica que permite otimizar um processo, seja ele uma extração, tal como realizado nesse trabalho, uma reação química, uma biotransformação, etc., por meio de um número reduzido de experimentos. Isso se torna especialmente interessante quando há uma restrição na disponibilidade de um determinado reagente ou mesmo quando se demanda um tempo bastante longo para a sua execução. De acordo com o princípio de Pareto, 20% das variáveis explicam 80% da informação obtida para um determinado sistema, também chamado de espaço experimental<sup>191</sup>. Por isso, na etapa de triagem de variáveis, testam-se o maior número de fatores ou parâmetros em diferentes níveis, para que só aqueles realmente significativos sejam utilizados na modelagem da superfície de respostas (FIGURA 4.1).

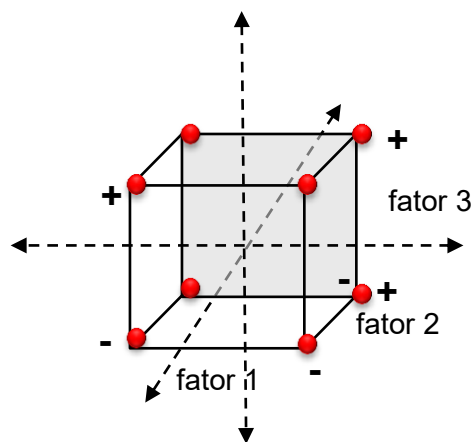


FIGURA 4.1 - Esquema representativo da distribuição dos experimentos em níveis no planejamento fatorial

No planejamento experimental, todos os parâmetros são testados simultaneamente, permitindo identificar interações entre eles, o que não é possível perceber quando se trabalha cada variável independentemente. Como o número de experimentos necessários cresce exponencialmente com o número de fatores, o uso do planejamento experimental fracionado torna-se especialmente interessante por permitir avaliar um grande número de fatores em um menor número de experimentos<sup>192</sup>.

A técnica de homogeneização (A), mais especificamente o uso do turbólise, poderia favorecer a extração de fitoestrógenos. Em sua grande maioria, os fitoestrógenos são metabólitos secundários produzidos em diferentes tecidos celulares e armazenados em vacúolos<sup>193</sup>, organelas presentes nas folhas. Durante o processo de homogeneização, o movimento das hastes do Ultraturrax<sup>®</sup> em direções opostas leva redução do tamanho das partículas, com possíveis rompimentos de paredes das células vegetais, expondo os reservatórios de fitoestrógenos ao contato com o solvente extrator.

Uma alteração na composição química do solvente extrator (B) pode levar a uma mudança na polaridade da solução, levando à extração preferencial de uma determinada classe de moléculas. Se essa classe fosse a responsável pela atividade biológica do extrato, controlando-se a polaridade do solvente seria possível obter um extrato com maior potencial para aquela atividade. Na triagem de variáveis, entretanto, o objetivo foi apenas avaliar se essa variação de polaridade seria suficiente para se alterar a estrogenicidade dos extratos. A escolha do etanol como solvente orgânico foi baseada em uma possível aplicabilidade do extrato em formulações farmacêuticas fitoterápicas, uma vez que esse solvente é classificado como baixa toxicidade (classe 3) pela Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para registros de produtos farmacêuticos para uso humano<sup>155</sup>.

Muitas vezes, a temperatura (C) mais alta pode levar a um aumento da solubilidade, resultando em um ganho na eficiência de extração de compostos bioativos. O uso de temperaturas muito elevadas, porém, pode também levar à degradação dos mesmos<sup>194</sup>.

O tempo de maceração (D) é outro parâmetro importante quando se pensa na extração como um equilíbrio de partição entre o solvente extrator e o resíduo sólido. Após um determinado tempo de exposição do material vegetal ao solvente extrator, o sistema tende a entrar em equilíbrio e a quantidade de compostos extraídos, bioativos ou não, se estabiliza. Às vezes, o tempo necessário para se atingir esse equilíbrio pode ser relativamente pequeno e um período mais prolongado de maceração torna-se desnecessário.

A agitação periódica (E) foi o último parâmetro escolhido para avaliação porque, ainda que rápida, provoca uma perturbação no sistema durante a maceração. Isso leva a um aumento na superfície de contato do material vegetal

com o solvente extrator e conseqüentemente, pode levar a um aumento da eficiência da extração.

No planejamento fatorial fracionado realizado, os contrastes principais estavam confundidos com os de mais alta ordem de interação (4 fatores), os menos significativos, enquanto os efeitos resultantes das interações de dois fatores estavam confundidos com os resultantes das interações de terceira ordem. Não se pode saber exatamente a contribuição de cada variável (ou interação) para o contraste, porém é conhecido que o efeito de primeira ordem (variáveis principais) tem um grau de importância superior ao efeito devido às interações de segunda ordem (entre duas variáveis), que, por sua vez, é maior que o devido às interações de terceira ordem (entre três variáveis) e assim sucessivamente. Com isso, foi possível avaliar os contrastes principais de forma independente daqueles devidos às interações de primeira ordem. Para a identificação das variáveis significativas era necessário utilizar algum parâmetro de resposta para os experimentos. No planejamento experimental esse parâmetro é denominado variável dependente. Nesse trabalho, o rendimento em massa obtido para os extratos foi a variável dependente escolhida inicialmente para a análise do planejamento fatorial fracionado.

TABELA 4.1 - Rendimentos em massa obtidos para os extratos preparados nos experimentos realizados para o planejamento fatorial fracionado

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	-1	-1	-1	-1	1	33,22%
2	-1	-1	-1	1	-1	32,90%
3	-1	-1	1	-1	-1	36,12%
4	-1	-1	1	1	1	35,45%
5	-1	1	-1	-1	-1	25,97%
6	-1	1	-1	1	1	31,35%
7	-1	1	1	-1	1	30,59%
8	-1	1	1	1	-1	27,66%
9	1	-1	-1	-1	-1	23,48%
10	1	-1	-1	1	1	31,39%
11	1	-1	1	-1	1	23,80%
12	1	-1	1	1	-1	27,17%
13	1	1	-1	-1	1	14,89%
14	1	1	-1	1	-1	13,13%
15	1	1	1	-1	-1	16,15%
16	1	1	1	1	1	27,26%

O gráfico normal de contrastes, construído a partir do rendimento obtido para cada experimento, sugeriu que os parâmetros com maior influência na extração foram o uso de turbólise (A) e a composição etanólica no solvente extrator (B) (FIGURA 4.2). Com base no rendimento da extração, pode-se dizer que as demais variáveis, bem como as interações entre os parâmetros analisados não foram significativas, ou seja, não contribuíram para a otimização da extração.

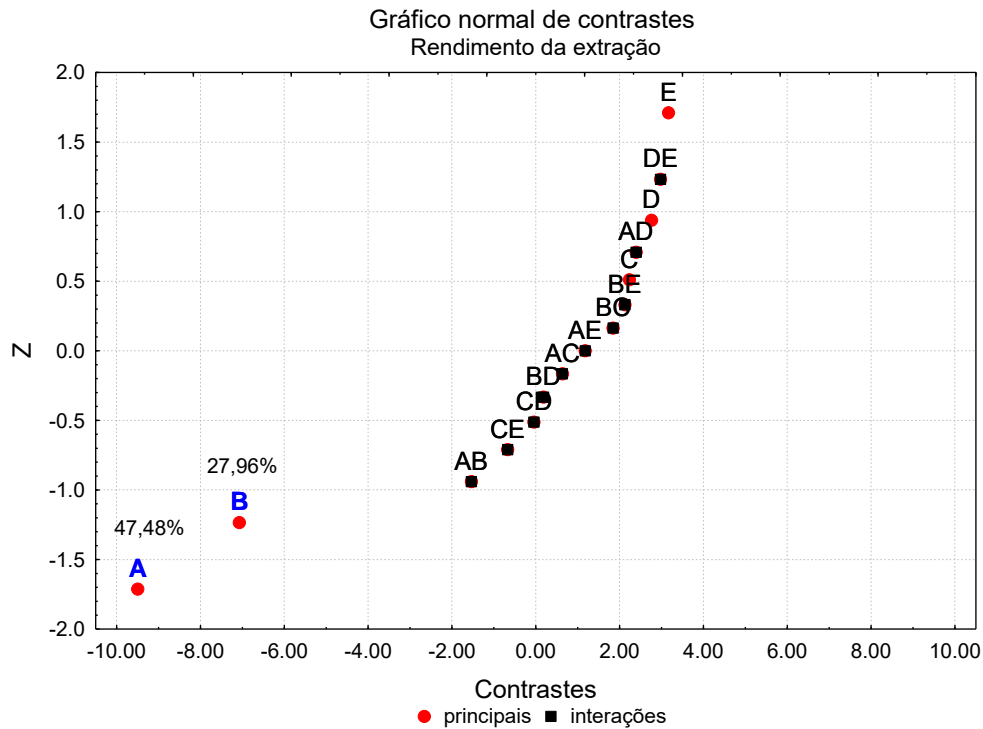


FIGURA 4.2 - Gráfico normal de contrastes baseado no rendimento em massa para os extratos preparados nos experimentos que compuseram o planejamento fatorial fracionado para otimização da extração de compostos bioativos.

O trabalho, porém, tinha o objetivo específico de se obter um extrato com potencial fitoestrogênico para uso no tratamento dos sintomas do climatério, e o rendimento da extração, portanto, não seria o parâmetro de resposta mais apropriado para a avaliação dos 5 parâmetros em questão. Dessa forma, a análise foi realizada novamente utilizando-se a resposta biológica como variável dependente.

## 4.2 - ENSAIOS CELULARES

### 4.2.1 - PERÍODO DE INCUBAÇÃO COM O MTT

Uma das etapas mais importantes do ensaio com o MTT é o período de incubação das células com o sal de tetrazólio, visto que a reação de redução é catalisada por uma enzima que trabalha a um taxa de conversão ótima. Um tempo de incubação muito curto pode não ser suficiente para que o formazan seja produzido em quantidades suficientes para a detecção pelo método colorimétrico. Em contrapartida, períodos maiores de incubação acabam sendo desnecessários, pois, após ser formado em uma quantidade ótima, o formazan leva à inibição da atividade enzimática, mesmo quando se tem o metabólito em excesso.

O ensaio no qual se variou o tempo de incubação das células com o MTT entre 0,5 e 5 h foi realizado para se verificar qual seria o melhor intervalo de tempo para que houvesse a produção de formazan em quantidade adequada para a realização dos estudos celulares.

Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da FIGURA 4.3 e sugeriam haver uma tendência à estabilização entre 2 e 3 h de incubação. Para períodos inferiores a 2 h as enzimas pareciam ainda ser capazes de reduzir o MTT. Por outro lado, para tempo de incubação superiores a 3 h a quantidade de formazan produzido pareceu ter atingido o valor ótimo, iniciando-se a inibição da atividade enzimática.

Uma análise de variância (ANOVA) com comparações múltiplas foi realizada com o teste de Tukey para os resultados obtidos. Quando se faz um tratamento estatístico de dados envolvendo comparações múltiplas como nesse caso, a informação que se consegue inferir da tabela ANOVA é se existem ou não diferenças significativas no conjunto de dados. No entanto, não é possível saber como é a diferença entre as médias. Os testes *ad hoc*, como o de Tukey, são utilizados com essa finalidade e são baseados em comparações de médias. Para o ensaio de incubação com o MTT, o teste de Tukey indicou não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos para os períodos de 2 a 5 h. No entanto, decidiu-se manter o tempo de incubação igual a 3 h para todos os ensaios posteriores, pois nesse tempo seria possível assegurar que a produção do formazan já estaria estabilizada.



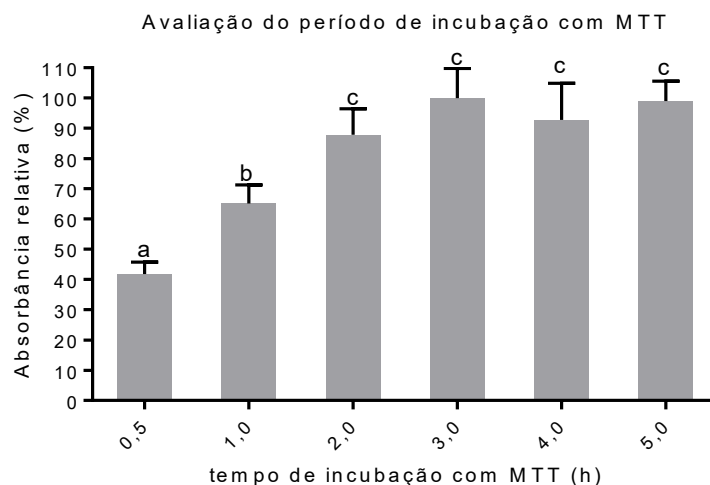


FIGURA 4.3 - Avaliação do período de incubação das células da linhagem MCF-7 com o MTT. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2.2 - CONCENTRAÇÃO IDEAL DE CÉLULAS PARA OS ENSAIOS CELULARES

De uma forma geral, a curva de crescimento celular para uma linhagem cultivada *in vitro* apresenta um perfil sigmoidal, que pode ser dividido em estágios: (i) *lag* - período de adaptação das células às condições de cultura, com reduzida divisão celular; (ii) logarítmico ou *log* - período de crescimento exponencial; (iii) *plateau* ou estacionário - período no qual a confluência já está alta, levando à redução da velocidade de replicação celular; e (iv) declínio - período onde o meio de cultura já está pobre em nutrientes e predomina a morte celular<sup>195</sup> (FIGURA 4.4).

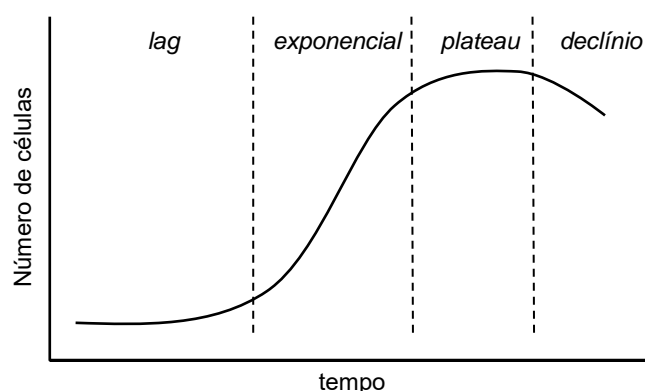


FIGURA 4.4 - Perfil de crescimento celular para uma linhagem cultivada *in vitro*.

As curvas de crescimento celular obtidas para as concentrações de células MCF-7 testadas indicaram que  $5 \cdot 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> não seria uma concentração apropriada para os ensaios, porque em um período curto (24-48 h) a

quantidade de células já estava bastante elevada, conseqüentemente o crescimento celular estava no final da fase exponencial (FIGURA 4.5). As concentrações  $5.10^4$  e  $1.10^5$  células.mL<sup>-1</sup> seriam as mais indicadas para os estudos de 1 semana, por apresentarem toda a fase exponencial de crescimento nesse período. Para ensaios mais longos (entre 7 e 15 dias), a concentração de  $1.10^4$  células.mL<sup>-1</sup> poderia ser usada; enquanto as concentrações mais baixas ( $5.10^3$  e  $1.10^3$  células.mL<sup>-1</sup>) seriam mais apropriadas para estudos muito longos (até 30 dias). De acordo com dados da literatura, os estudos de estimulação celular são realizados por um período de até 7 dias<sup>196,197</sup>, por isso, todos os ensaios celulares relacionados à estrogênicidade desse trabalho foram realizados com a concentração de  $5.10^4$  células.mL<sup>-1</sup>. Além disso, observou-se também que, para a concentração escolhida, o crescimento celular chega ao final da fase exponencial entre o 5º e o 6º dias de incubação, entrando na fase *plateau*, na qual a velocidade em que as células se multiplicam é reduzida.

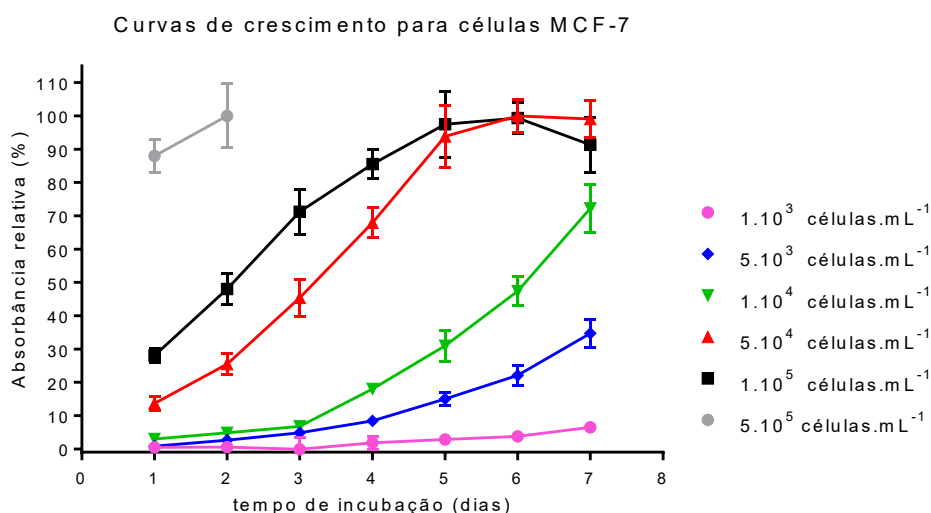


FIGURA 4.5 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células MCF-7

O crescimento das células BALB/c apresentou uma tendência diferente daquele observado para a linhagem MCF-7, permanecendo na fase *log* até o último dia do experimento (FIGURA 4.6). De acordo com dados encontrados na literatura, as células dessa linhagem entram na fase estacionária somente após 20 dias de incubação<sup>198</sup>. O objetivo do ensaio de citotoxicidade era verificar se, durante o mesmo tempo de incubação para avaliação de estrogênicidade, os extratos em teste poderiam apresentar alguma toxicidade a células saudáveis. No período de 6 dias, a concentração de  $1.10^3$  células.mL<sup>-1</sup> apresentou valores muito baixos para a

absorbância e foi descartada. As concentrações  $5.10^3$  e  $1.10^4$  células.mL<sup>-1</sup> estavam fase *lag*, período de adaptação das células às condições de cultura e por isso, também foram descartadas. Tanto a concentração  $5.10^4$  células.mL<sup>-1</sup>, quanto  $1.10^5$  células.mL<sup>-1</sup> apresentaram a fase exponencial de crescimento durante todo o período de incubação, condição ideal para a realização do ensaio, embora elas não atingissem a fase estacionária no fim do experimento. A concentração  $5.10^4$  células.mL<sup>-1</sup> foi definida, portanto, como ideal para o teste de citotoxicidade por ser a concentração padronizada no teste de estrogénicidade.

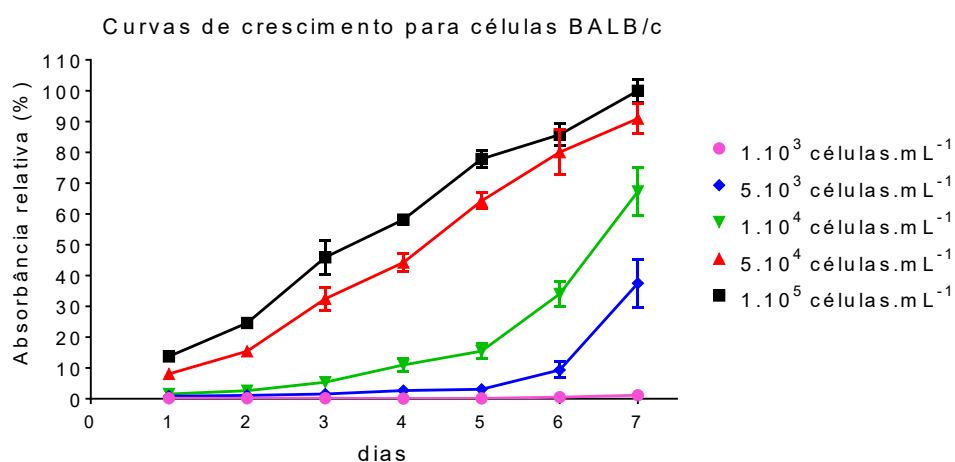


FIGURA 4.6 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células BALB/c

As curvas de crescimento para diferentes concentrações de células MDA-MB-231 mostraram que, durante o período de 6 dias de incubação, as concentrações mais baixas testadas ( $1.10^3$ ,  $5.10^3$  e  $1.10^4$  células.mL<sup>-1</sup>) permaneceram na fase *lag* de crescimento, na qual as células ainda estão se adaptando às condições do experimento, com crescimento lento, como pode ser observado pelo baixo valor de absorvância apresentado na análise colorimétrica de MTT (FIGURA 4.7). As concentrações de  $5.10^4$  a  $5.10^5$  células.mL<sup>-1</sup> se mostraram as mais adequadas para o experimento, pois estavam na fase exponencial do crescimento e entraram na fase estacionária entre o 5º e o 6º dias de incubação. No entanto, a concentração de  $5.10^5$  células.mL<sup>-1</sup> apresentou valores muito elevados para a absorvância, o que dificultaria uma análise em caso de estimulação do crescimento. Dentre as duas concentrações restantes, definiu-se que a concentração de  $5.10^4$  células.mL<sup>-1</sup> seria a de trabalho, por ser a concentração padronizada no teste de estrogénicidade e também utilizada no ensaio de citotoxicidade.

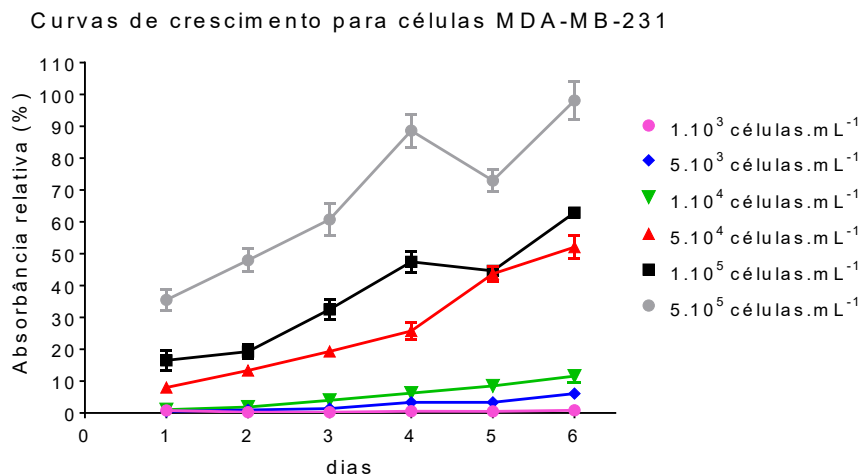


FIGURA 4.7 - Curvas de crescimento para diferentes concentrações de células MDA-MB-231

#### 4.2.3 - ESTUDO DE ESTROGENICIDADE (E-SCREEN MODIFICADO)

Há 20 anos, os principais ensaios para medir a estrogenicidade eram realizados em modelos animais. O E-SCREEN foi pioneiro no fato de que, usando um ensaio *in vitro* baseado em células de mamíferos, era possível chegar a resultados similares àqueles obtidos em testes *in vivo*, porém com um pequeno número de falso negativos ou falso positivos, além de permitir que uma grande quantidade de compostos fosse testada simultaneamente<sup>123</sup>.

Para que os extratos preparados fossem avaliados em relação à atividade estrogênica, foi necessário otimizar inicialmente alguns parâmetros relativos às condições experimentais dos ensaios celulares.

Um dos parâmetros avaliados estava relacionado à presença de interferentes no meio de cultura que poderiam mascarar o resultado dos testes biológicos realizados com os extratos. Um deles é o vermelho fenol, um indicador ácido-base bastante utilizado em culturas celulares por ter o pKa 7,90, próximo ao pH fisiológico. O problema do vermelho-fenol está em sua estrutura química, na qual a distância entre a hidroxila e o grupo sulfônico é bastante similar àquela entre os grupos hidroxila na molécula de 17- $\beta$ -estradiol e em substâncias estrogênicas não esteroidais (FIGURA 4.8). Isso lhe confere um perfil de agonista parcial do receptor estrógeno com uma afinidade de aproximadamente 0,0001% em comparação ao E<sub>2</sub> nas concentrações em que é utilizado em culturas celulares (15 - 45  $\mu$ M)<sup>199</sup>. Em outras palavras, mesmo as células utilizadas como “controle negativo” estão tendo o seu crescimento estimulado por um agonista, levando à perda de confiabilidade do

resultado do experimento. Apesar da baixa afinidade, ainda há uma estimulação celular devido à concentração usada no meio de cultura ( $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Por isso, o indicador vermelho fenol não pode ser adicionado ao meio de cultura utilizado nos testes de estrogenicidade.

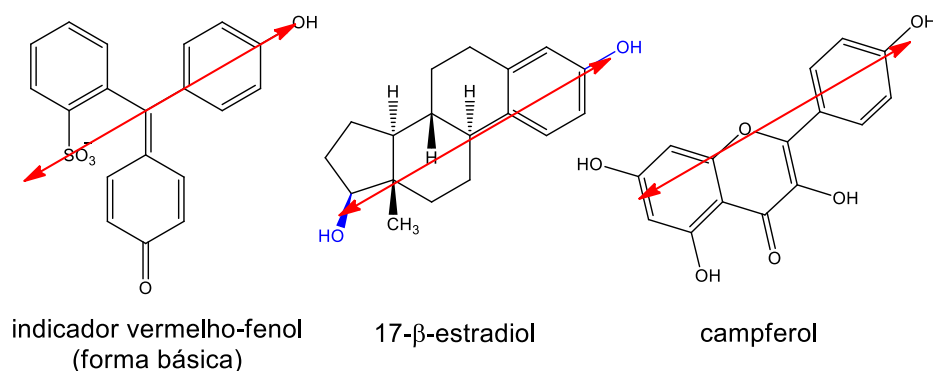


FIGURA 4.8 - Estrutura química do indicador vermelho fenol em comparação com compostos estrogênicos

Os outros interferentes avaliados estavam presentes no soro de feto bovino adicionado ao meio de cultura, fonte de estrogênios endógenos. Como não seria possível utilizar o meio de cultura sem o FBS, os hormônios teriam que ser removidos do soro antes que o mesmo fosse adicionado ao meio de cultura. O tratamento mais comumente utilizado para isso é feito com uma combinação de carvão ativo e dextran, onde os hormônios são retidos por adsorção no carvão ativo. No entanto, o mesmo também é capaz de adsorver proteínas, alterando a composição do FBS. Para evitar que isso aconteça, é utilizada uma mistura de carvão ativo e dextran, na qual se acredita que o carboidrato recubra a superfície do adsorvente, permitindo que apenas moléculas menores, como os hormônios livres, alcancem a superfície do carvão ativo<sup>200</sup>.

Nesse estudo, os efeitos que os interferentes presentes no meio de cultura produziram no crescimento celular foram avaliados simultaneamente, em curvas de crescimento para as células cultivadas em meios DMEM cuja única diferença era a presença do vermelho fenol (curvas preta e vermelha, FIGURA 4.9). Nas curvas de crescimento obtidas, foi possível observar que houve uma estimulação do crescimento pela presença do indicador ácido-base. Um teste t-Student pareado foi realizado para comparar os dois conjuntos de dados e confirmou que essa diferença é significativa com 95% de confiança ( $t_{6,7} = 3,329$ ,  $p = 0,0158$ ).

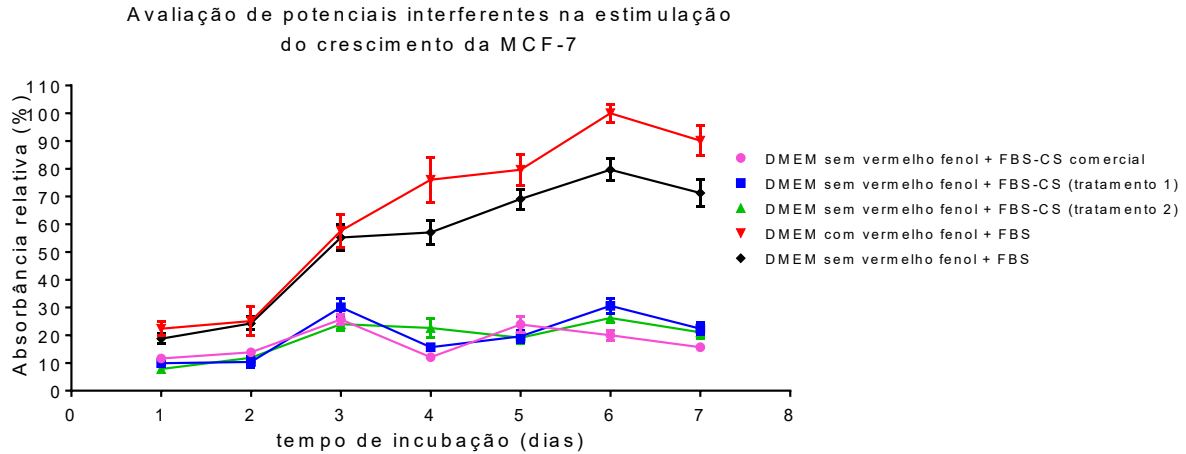


FIGURA 4.9 - Avaliação da influência de potenciais interferentes na estimulação do crescimento celular para a linhagem MCF-7

Em relação aos hormônios endógenos presentes do FBS, comparando-se as curvas de crescimento para as células cultivadas em meio DMEM sem vermelho fenol com FBS não tratado (curva preta) e para aquelas cultivadas em meio cujo FBS passou pelo tratamento de remoção dos hormônios (FBS-CS, curvas verde, azul ou rosa na FIGURA 4.9), observou-se que a presença desses interferentes levou a uma estimulação bastante significativa do crescimento celular. Portanto, a remoção dos hormônios previamente à adição do FBS ao meio de cultura seria fundamental para o teste de estrogenicidade.

Os dois tratamentos para a remoção dos hormônios endógenos realizados no laboratório foram avaliados visando principalmente verificar se os tratamentos resultariam em um FBS tratado equivalente àquele comercialmente disponível. Na comparação dos resultados obtidos, foi realizada uma ANOVA com o teste de Dunnet ( $p < 0,001$ ), utilizando como referência os dados da curva de crescimento das células cultivadas em DMEM sem vermelho fenol com FBS-CS comercial. O teste de Dunnet é um teste *ad hoc* para comparações múltiplas, assim como o teste de Tukey, com a diferença de que um fator é escolhido como controle e os demais são comparados a ele. Os resultados dessas análises sugeriram que estatisticamente não havia diferenças significativas entre o FBS-CS comercial e os obtidos pelos tratamentos realizados. Isso significava que ambos tratamentos foram eficientes, dispensando assim a necessidade de compra de um reagente caro, o que oneraria o trabalho no laboratório. Como o primeiro tratamento envolvia um maior número de etapas, demandando maior tempo e manipulação do material, optou-se por utilizar apenas o segundo tratamento para preparar o FBS-CS no laboratório.

O último fator analisado estava relacionado à toxicidade do etanol para as células MCF-7, visto que tanto os extratos de folhas de amoreira quanto o estradiol foram solubilizados nesse solvente ou misturas das quais ele faz parte. Com o período de incubação de 6 dias, o tempo no qual as células estariam expostas ao solvente orgânico seria relativamente alto. Tal exposição prolongada eventualmente poderia levar a um efeito tóxico que mascararia os resultados dos testes de estrogenicidade. Por isso, a fim de verificar se esse solvente poderia interferir nos ensaios de proliferação celular, foi realizado um teste de toxicidade para o etanol em células de MCF-7. Por ser um experimento de toxicidade, os resultados foram expressos em viabilidade celular que mede a quantidade de células vivas. Em nenhuma das concentrações analisadas o etanol apresentou toxicidade para as células (FIGURA 4.10). A ANOVA com teste de Dunnet ( $p < 0,001$ ) confirmou a observação, visto que não houve diferença significativa entre o controle negativo e qualquer uma das concentrações avaliadas.

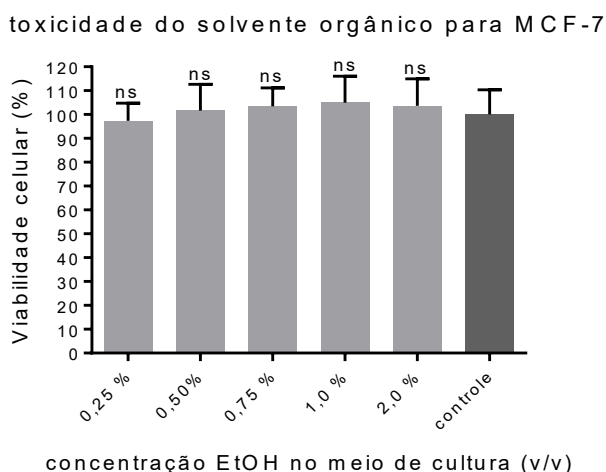


FIGURA 4.10 - Estudo de citotoxicidade para o etanol utilizado na preparação dos extratos de folhas de amoreira.

Após a avaliação dos interferentes, o último parâmetro a ser ajustado antes da análise dos extratos seria a concentração ótima do composto de referência que seria utilizado como controle positivo nos experimentos posteriores. A linhagem MCF-7 tem como característica principal a expressão dos receptores hormonais, sobretudo do receptor estrógeno, do qual o 17- $\beta$ -estradiol é classificado como um agonista total. Na presença desse hormônio, ocorre a estimulação máxima da proliferação celular. Por isso, o E<sub>2</sub> foi definido como controle positivo nos ensaios que tiveram como objetivo avaliar a proliferação celular induzida por fitoestrogênios.

A ação do E<sub>2</sub> no crescimento celular é concentração-dependente e atinge o seu máximo com a concentração fisiológica do hormônio, de 1,00 a 10,0 nmol.L<sup>-1201</sup>.

Com o objetivo de se encontrar a concentração ótima de E<sub>2</sub> para as condições experimentais do laboratório, foi realizado um estudo no qual se variou a concentração do hormônio adicionado às células. Os resultados obtidos e apresentados na FIGURA 4.11 sugeriram que, ao final de 8 dias, o E<sub>2</sub> na concentração de 1,00 pmol.L<sup>-1</sup> não estimulou o crescimento das células (curva azul). Nas concentrações de 100 nmol.L<sup>-1</sup> e 1 μmol.L<sup>-1</sup> (curvas laranja e roxa respectivamente) houve uma estimulação muito elevada em relação ao controle negativo, porém não foi possível observar a estabilização do crescimento celular entre o 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias de incubação, conforme visto para as demais concentrações e nos experimentos anteriores. As concentrações de 10,0 e 100 pmol.L<sup>-1</sup> (curvas verde e vermelha respectivamente) apresentaram valores de absorvância próximos àqueles obtidos para controle negativo.

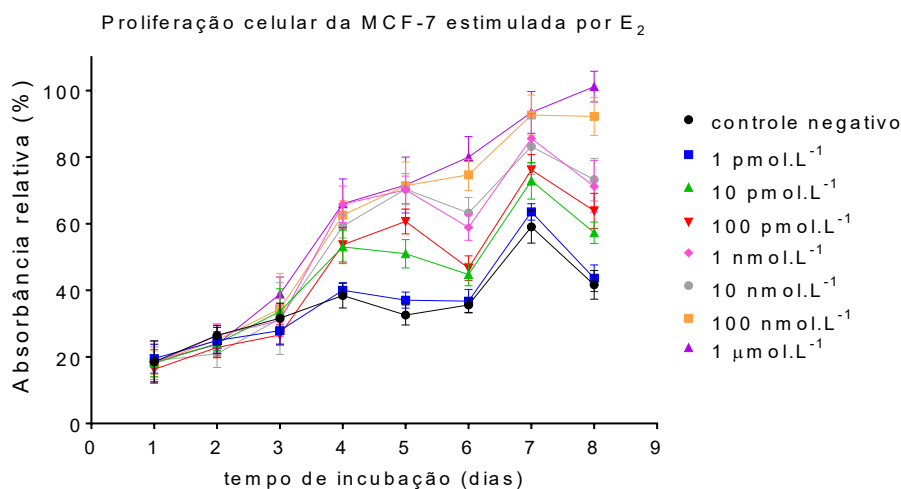


FIGURA 4.11 - Estudo da estimulação do crescimento celular da linhagem MCF-7 por diferentes concentrações de E<sub>2</sub>

A diferença de aproximadamente 10% poderia dificultar ou até mesmo mascarar a resposta de um estudo de agonistas parciais como os fitoestrógenos, visto que para esse tipo de composto espera-se obter um valor intermediário para a absorvância, compreendido entre aquele obtido para o E<sub>2</sub> (agonista total) e a absorvância das células na ausência do E<sub>2</sub>. Dessa forma, 1,00 e 10,0 nmol.L<sup>-1</sup> (curvas rosa e cinza respectivamente) foram as melhores concentrações para o composto de referência nas condições experimentais e ambas estão na faixa da concentração fisiológica<sup>201</sup>.



No mesmo gráfico de crescimento celular notou-se ainda uma deflexão geral na absorbância, sobretudo nos dias 6 e 8, o que possivelmente estaria associado ao meio de cultura já pobre em nutrientes e à quantidade de células elevadas, iniciando-se um processo de morte celular. Por isso, em todos os experimentos, cujo tempo de incubação fosse superior a dois dias, ocorria a troca do meio de cultura a cada 48 h.

Quando foram analisados apenas os resultados após 6 dias de incubação, período total do teste de estrogenicidade, notou-se uma semelhança entre as absorbâncias obtidas para as diferentes concentrações de E<sub>2</sub> testadas (FIGURA 4.12). Uma análise estatística ANOVA com o teste de Tukey indicou o agrupamento das respostas em 4 conjuntos distintos (identificados na figura como a, b, c ou d), confirmando as observações anteriores. O teste de Tukey, assim como outros testes *ad hoc* para comparações múltiplas sem referencial, pode apresentar problemas de ambiguidade. Esses testes estatísticos são baseados em análises de pares, podendo classificar em um mesmo grupo um par de médias que também seria não significativo em relação a outros dois valores, os quais, por sua vez, difeririam estatisticamente entre si. Foi o que aconteceu com o controle negativo e as concentrações de 1,00 e 10,0 pmol.L<sup>-1</sup> na análise dos dados apresentados na FIGURA 4.12. Na prática, ambiguidades como essa não apresentam significância e cabe ao analista interpretá-la da forma mais apropriada para explicar o conjunto de dados.

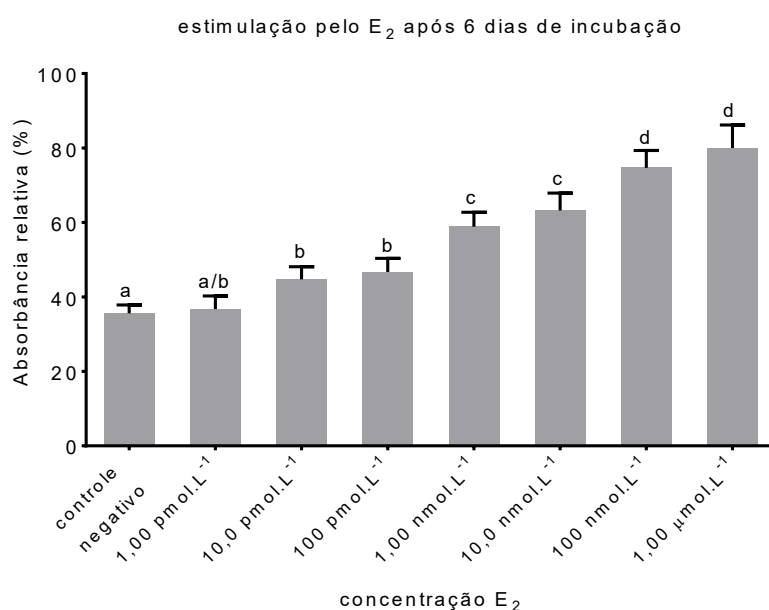


FIGURA 4.12 - Proliferação celular estimulada por E<sub>2</sub> após 6 dias de incubação. Letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,001$ ).

As concentrações de 1,00 e 10,0 nmol.L<sup>-1</sup> foram as que apresentaram os resultados mais satisfatórios no perfil de crescimento celular e, de acordo com o teste de Tukey, estatisticamente não apresentaram diferenças significativas entre si. Para os testes de estrogenicidade, a concentração de 10 nM foi escolhida por estar no limite superior da concentração fisiológica.

Todos os parâmetros experimentais relativos ao teste de estrogenicidade foram bem ajustados às condições experimentais do laboratório. No entanto, pelo fato de as concentrações ótimas e o método utilizado para a quantificação das respostas biológicas estarem diferentes daqueles utilizados originalmente para o E-SCREEN<sup>123</sup>, os testes de estrogenicidade realizados nesse trabalho serão referidos como E-SCREEN modificado. A interpretação do teste foi baseada em uma análise comparativa, utilizando-se como referencial a resposta de um agonista total (E<sub>2</sub>) (controle positivo). As medidas de absorbâncias obtidas para os extratos foram expressas em termos de resposta relativa ao E<sub>2</sub> (RRE), no qual a resposta do controle positivo foi considerada como 100% e as demais respostas foram normalizadas em relação a ela.

De acordo com os resultados do E-SCREEN modificado, os 16 extratos preparados na etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental (seção 3.1.2.1) apresentaram valores de RRE na faixa esperada para agonistas parciais do receptor estrógeno, entre os valores para o controle negativo e o E<sub>2</sub> (FIGURA 4.13). Como o objetivo do trabalho foi obter um extrato com potencial para uso fitoterápico no alívio de sintomas do climatério, era necessário que o mesmo apresentasse compostos bioativos que mimetizassem a ação do estrogênio (os fitoestrógenos). Por isso, no planejamento experimental para a otimização do extrato, as medidas de RRE foram então utilizadas como variável dependente do planejamento experimental, descrito na seção 3.1.2.1. A tabela com os valores de RRE e os respectivos experimentos está apresentada no ANEXO 1..

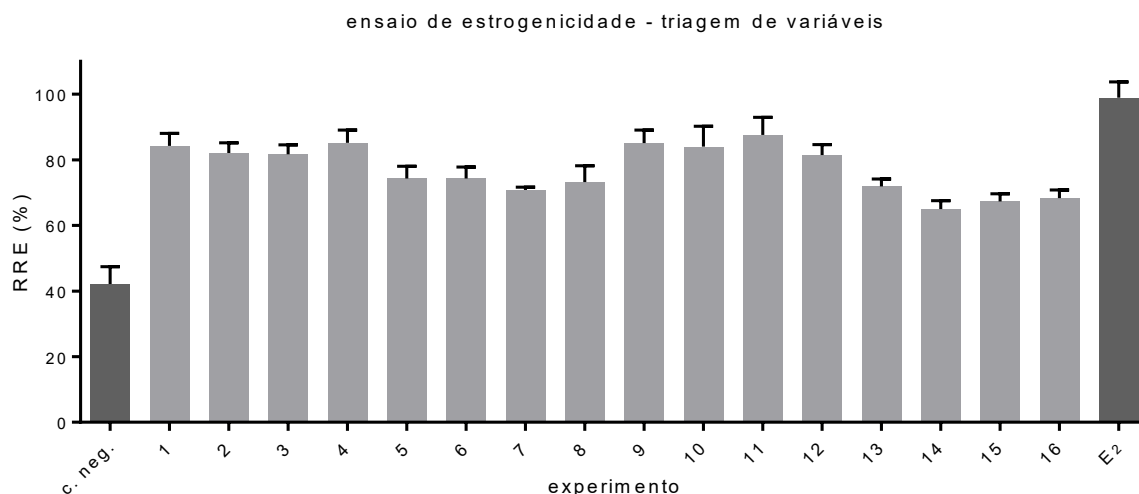


FIGURA 4.13 - Ensaio de estrogenicidade para os extratos preparados nos experimentos da etapa de triagem de variáveis do planejamento experimental.

O gráfico normal de contrastes para a estrogenicidade (FIGURA 4.14) sugeriu que a composição etanólica do solvente extrator (B) foi a única variável significativa (83,34%). O seu efeito negativo sugeriu que a atividade biológica diminuía com o aumento da quantidade de etanol no solvente. Comparando-se esses resultados com o gráfico normal de contrastes no qual foi utilizado o rendimento da extração (FIGURA 4.2), notou-se que o uso da turbólise, o parâmetro mais significativo no segundo caso, não apresentou efeito algum na atividade, embora a sua interação com a variável B tenha influenciado a estimulação do crescimento celular em uma proporção muito menor (4,67%) que a composição do solvente extrator. Se os 5 parâmetros fossem avaliados um de cada vez, haveria uma grande possibilidade de que alguns deles fossem considerados significativos, mesmo que não influenciassem o resultado, aumentando desnecessariamente o número de experimentos da otimização, o que implica em maior consumo de tempo e material. Em contrapartida, outros parâmetros poderiam ser considerados não significativos e descartados, ainda que fossem de fato importantes para a otimização do extrato. Além disso, não seria possível verificar se interações entre os fatores estariam contribuindo para as respostas desejadas, como aconteceu para a atividade biológica.

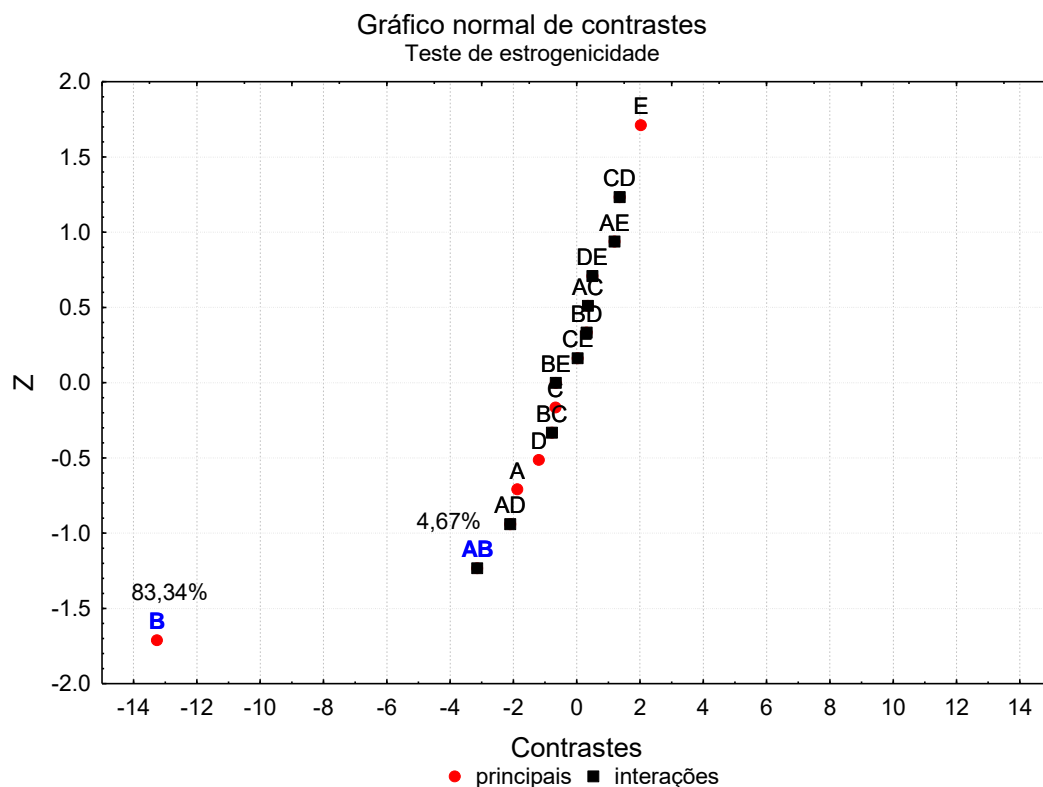


FIGURA 4.14 - Gráfico normal de contrastes baseado na atividade estrogênica. Onde A: técnica de homogeneização do extrato; B: composição etanólica do solvente extrator; C: temperatura de extração; D: tempo de maceração; E: agitação periódica

Apesar da composição do solvente extrator ter sido significativa, com efeito semelhante para o rendimento da extração e para a atividade biológica, cujo aumento da quantidade de álcool levou à uma diminuição em ambas respostas, a correlação linear entre elas foi considerada fraca. Isso significa que não é possível associar um aumento no rendimento da extração com um aumento na estrogenicidade do extrato (FIGURA 4.15).

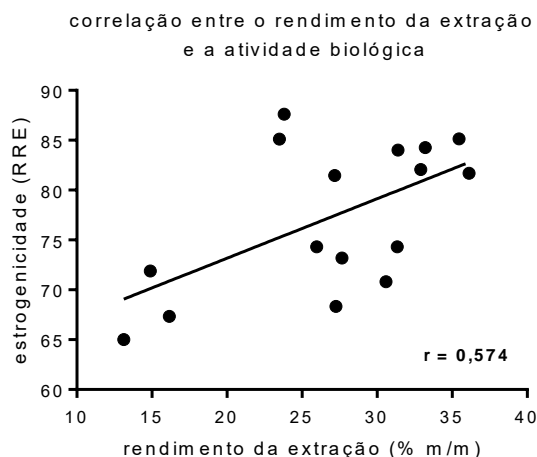


FIGURA 4.15 - Correlação entre o rendimento da extração e a atividade estrogênica para os experimentos da triagem de variáveis do planejamento experimental

Utilizando-se apenas a variável significativa, foi planejado um conjunto de experimentos com o objetivo de construir um modelo matemático que permitisse prever as condições nas quais se obtivesse um extrato com o maior potencial fitoestrogênico no espaço experimental de trabalho. Quando se tem mais de uma variável contínua significativa, o modelo é chamado multivariado e gera uma superfície de respostas na qual é possível visualizar a região com a maior probabilidade de obter os maiores valores para a variável dependente, no caso, a atividade estrogênica. Nesse trabalho, como houve apenas uma variável contínua significativa, a otimização do preparo do extrato seguiu um modelo univariado. As extrações apresentaram um rendimento que variou de 7 a 43% (m/m) (TABELA 4.2).

TABELA 4.2 - Rendimento das extrações realizadas com diferentes composições etanólicas no solvente extrator

<b>% EtOH no solvente extrator (v/v)</b>	<b>rendimento (% m/m de extrato seco)</b>
1	34,37
5	37,89
10	42,19
15	43,02
20	43,04
25	42,70
30	40,07
35	40,35
40	39,02
45	36,07
50	32,82
55	31,39
60	30,61
65	31,34
70	30,83
75	30,58
80	26,51
85	28,17
90	27,39
95	12,01
99	7,00

Os resultados das análises realizadas para os novos extratos ao final do período de incubação de 6 dias mostraram que aqueles preparados com uma solução contendo até 75% de etanol (v/v) apresentaram atividade estrogênica característica de agonistas parciais (FIGURA 4.16). No entanto, os extratos preparados com solventes com teor alcoólico superior a 75% (v/v) apresentaram uma atividade semelhante àquela esperada para antagonistas do receptor estrógeno, uma vez que os valores de RRE para esses extratos foram inferiores àquele obtido para o controle negativo, no qual foi adicionado apenas meio de cultura contendo 1% de etanol. No gráfico da FIGURA 4.16 foi possível ainda observar a distribuição dos extratos em 4 grandes grupos: (i) os que estimularam o crescimento celular de forma semelhante ao E<sub>2</sub>, como agonistas totais (1 a 35% EtOH); (ii) os que apresentaram estimulação característica de agonistas parciais (40 a 75% EtOH); (iii) os que levaram à morte celular de parte das células (80 e 85% EtOH); e finalmente (iv) os que levaram à morte de todas as células (90 a 99% EtOH). O teste estatístico *ad hoc* de Tukey ( $p < 0,001$ ) confirmou essa classificação, embora tenha apresentado uma subdivisão no grupo dos agonistas parciais com baixa ambiguidade.

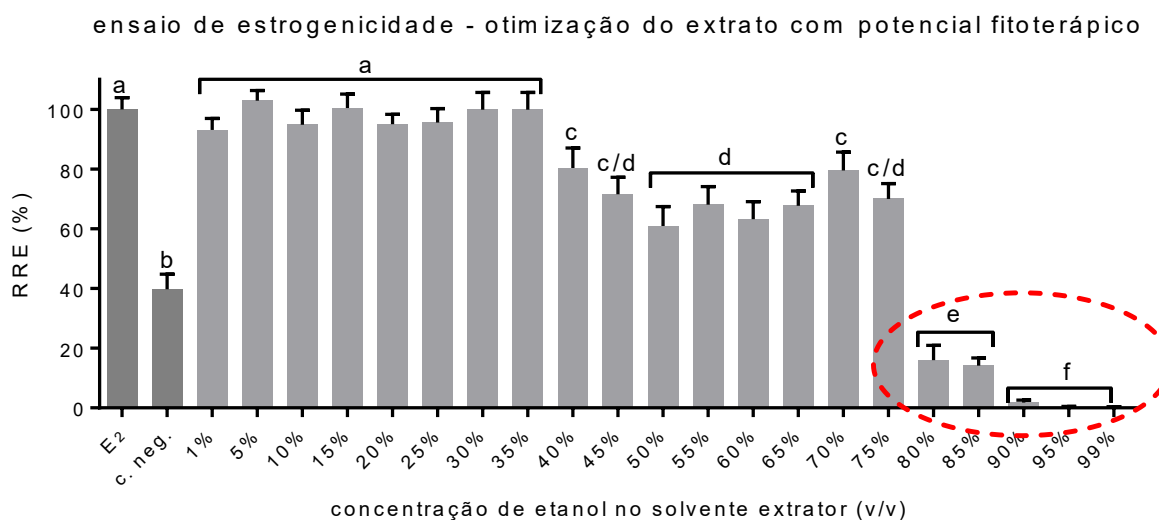


FIGURA 4.16 - Ensaio de estrogenicidade para os extratos preparados nos experimentos da etapa de otimização do extrato com potencial fitoterápico

Devido aos resultados que indicaram antagonismo, o experimento foi realizado novamente durante um período de 7 dias, em intervalos de 24 h. Analisando-se os resultados das curvas de estimulação celular (FIGURA 4.17), notou-se que os extratos preparados com soluções etanólicas 90, 95 ou 99% (v/v) levaram à morte celular após as primeiras 48 h de incubação. Os extratos

preparados com soluções 80 e 85% (v/v) de etanol induziram o processo de morte celular somente após 96 h de incubação. Nesse intervalo, o meio de cultura foi trocado com reposição dos extratos por duas vezes. Os demais extratos estimularam o crescimento celular com um efeito de proliferação relativa superior a 70%, sendo que aqueles preparados com solução hidroalcoólica de 1 a 20% de etanol apresentaram um perfil de crescimento muito semelhante àquele obtido para o E<sub>2</sub>.

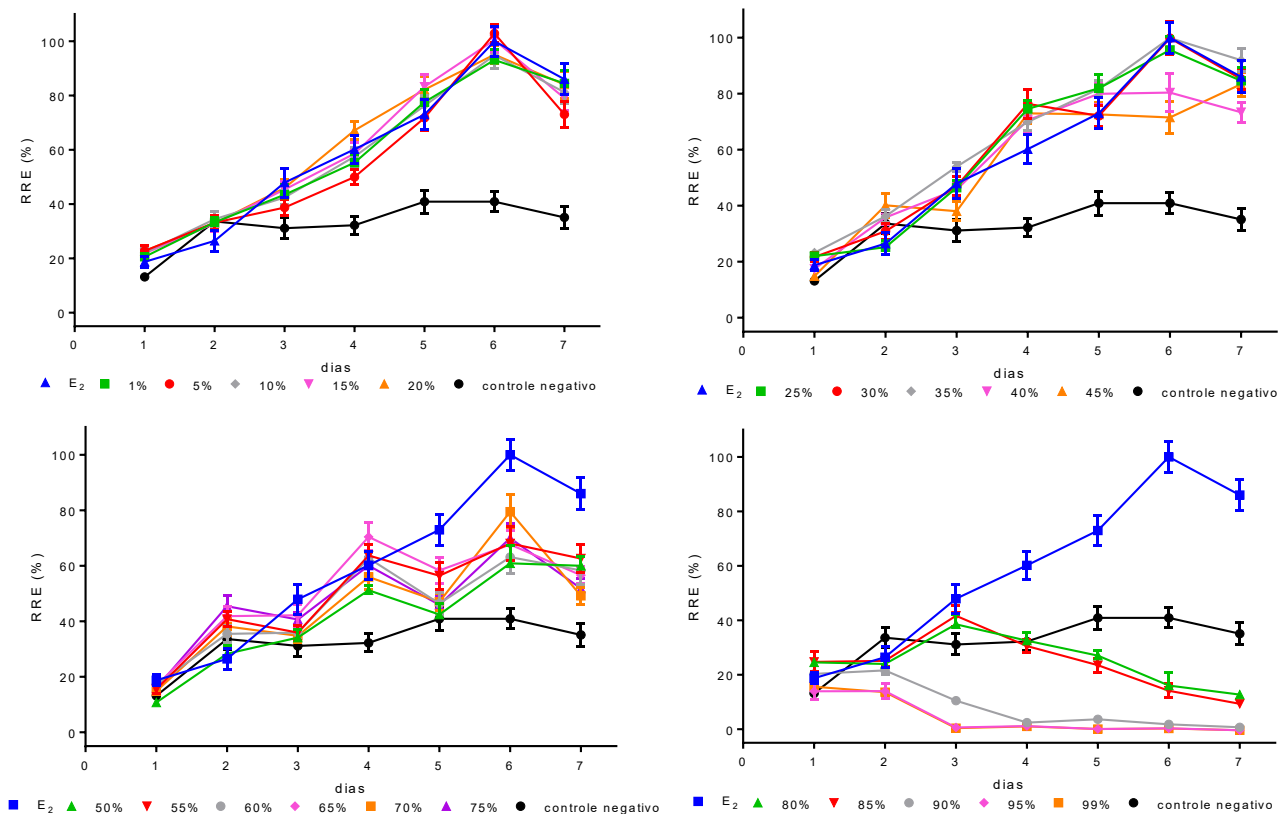


FIGURA 4.17 - Curvas de estimulação do crescimento celular para extratos de folhas de amoreira em função da composição alcoólica do solvente extrator. Os teores alcoólicos (v/v) utilizados estão indicados abaixo dos respectivos gráficos.

A microscopia de campo claro é uma ferramenta bastante utilizada em estudos *in vitro*, pois pode fornecer informações muito importantes sobre alterações morfológicas provocadas nas células por agentes externos, como os extratos de folhas de amoreira. Nas análises realizadas com aumento de 100 vezes, notou-se que, durante os 6 dias de ensaio, para os sistemas nos quais as células foram incubadas com etanol (controle negativo), estradiol (controle positivo), ou com um dos extratos preparados com até 75% EtOH (v/v), as células MCF-7 estavam bem aderidas no fundo do poço e o crescimento celular ocorria por meio de formação de colônias, conforme era esperado para essa linhagem (FIGURA 4.18).

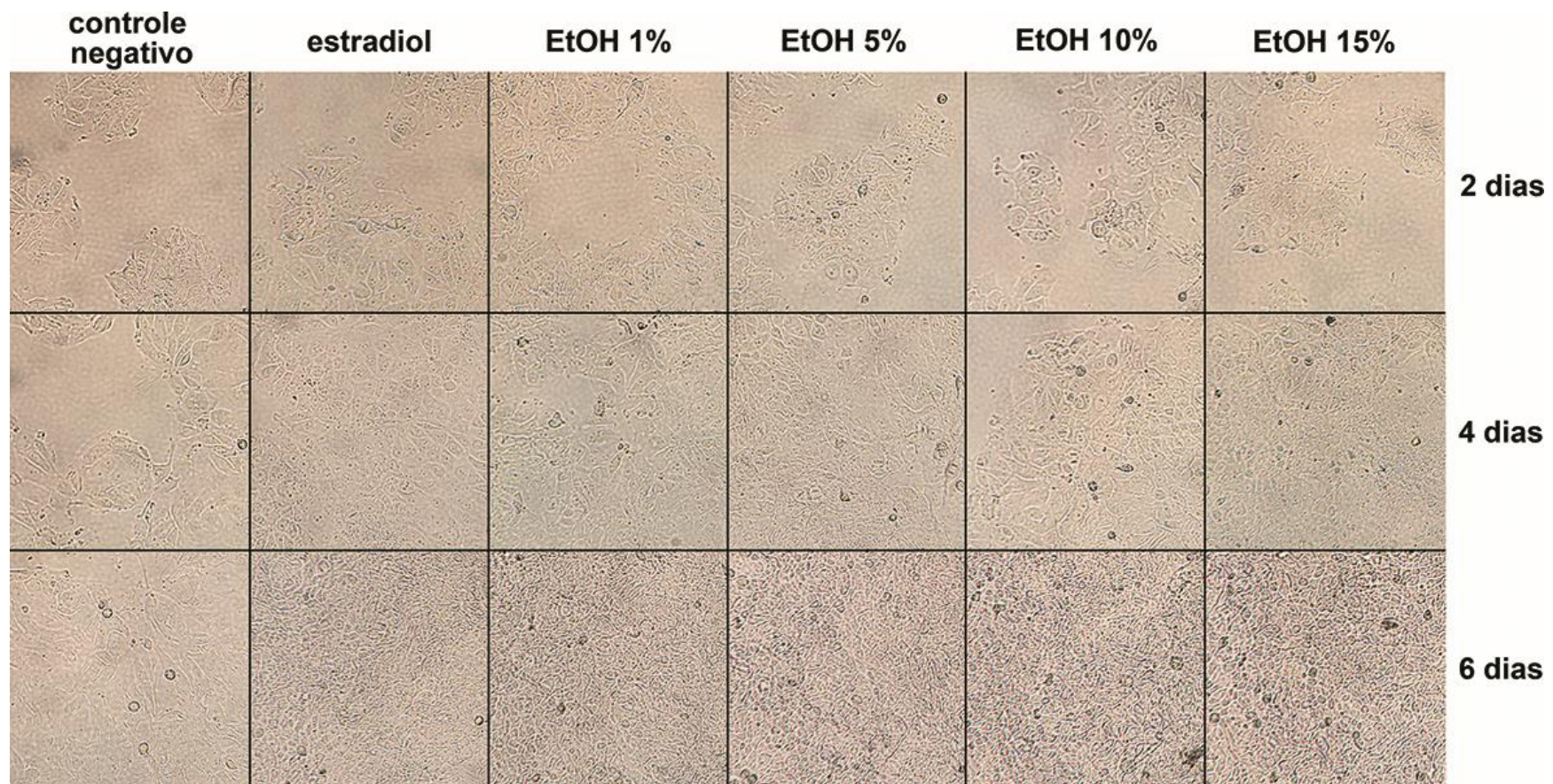


FIGURA 4.18 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de estrogenicidade realizado em linhagem MCF-7



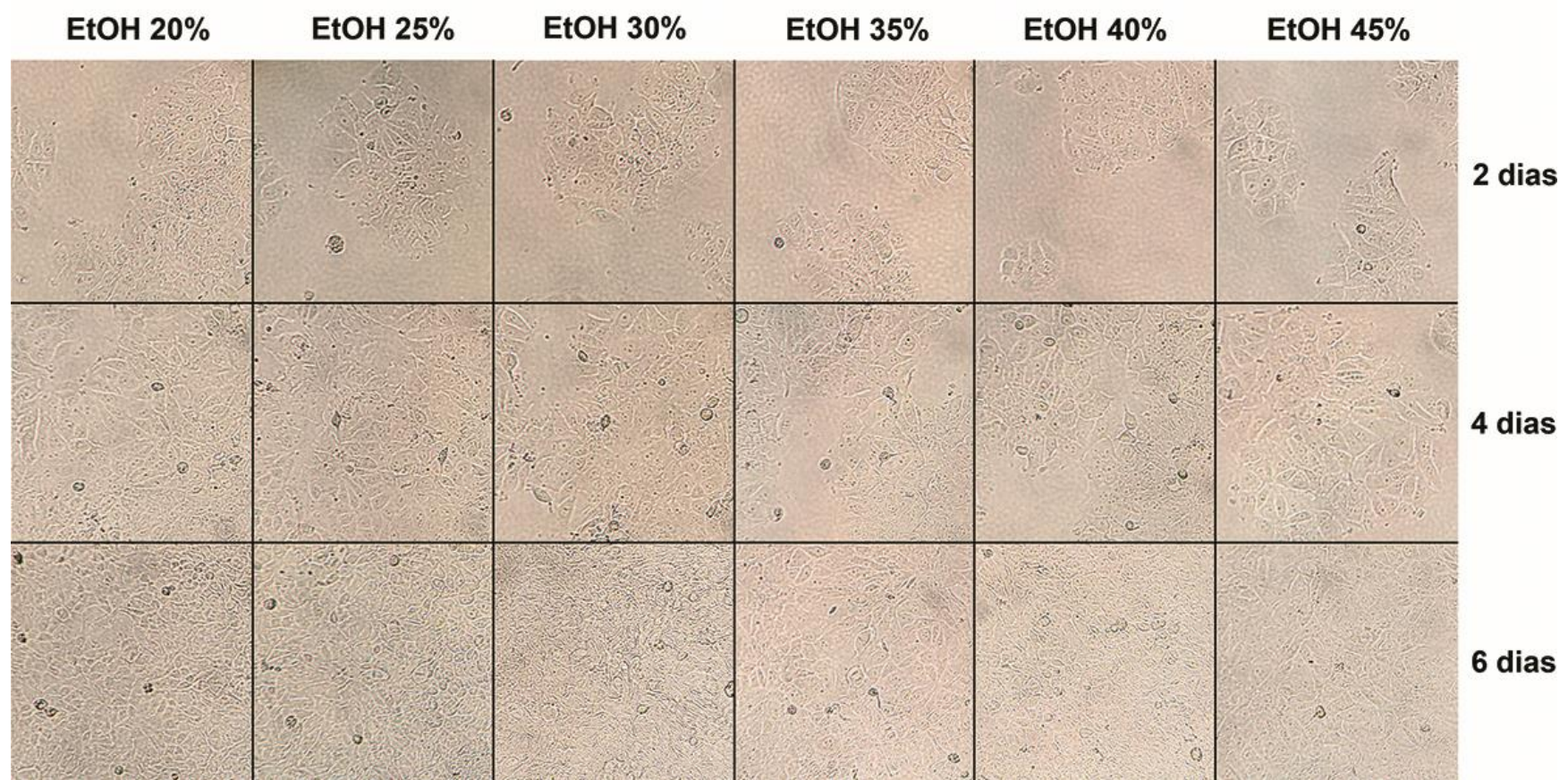


FIGURA 4.18 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de estrogênicidade realizado em linhagem MCF-7 (continuação)

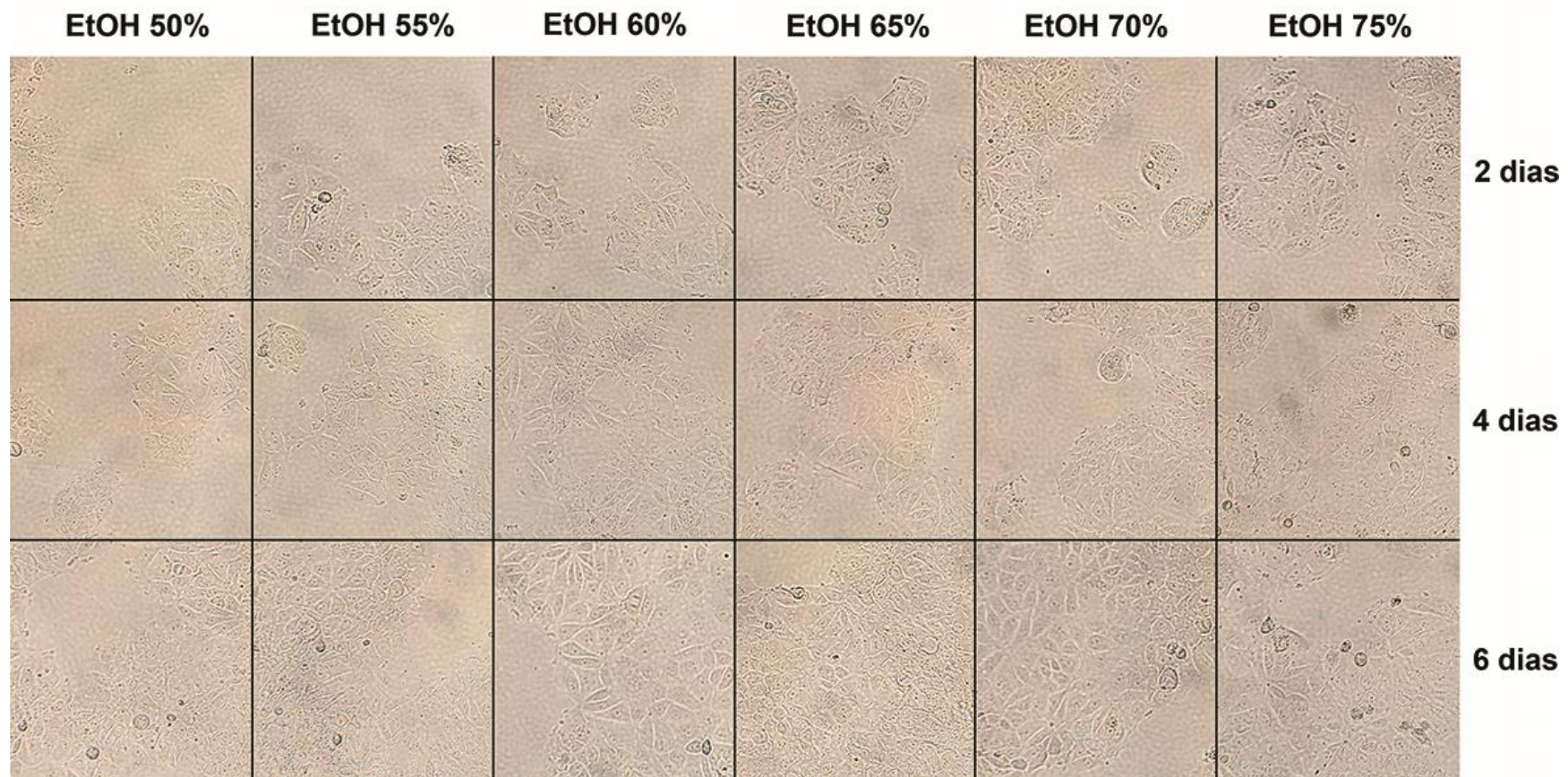


FIGURA 4.18 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de estrogenicidade realizado em linhagem MCF-7 (continuação)

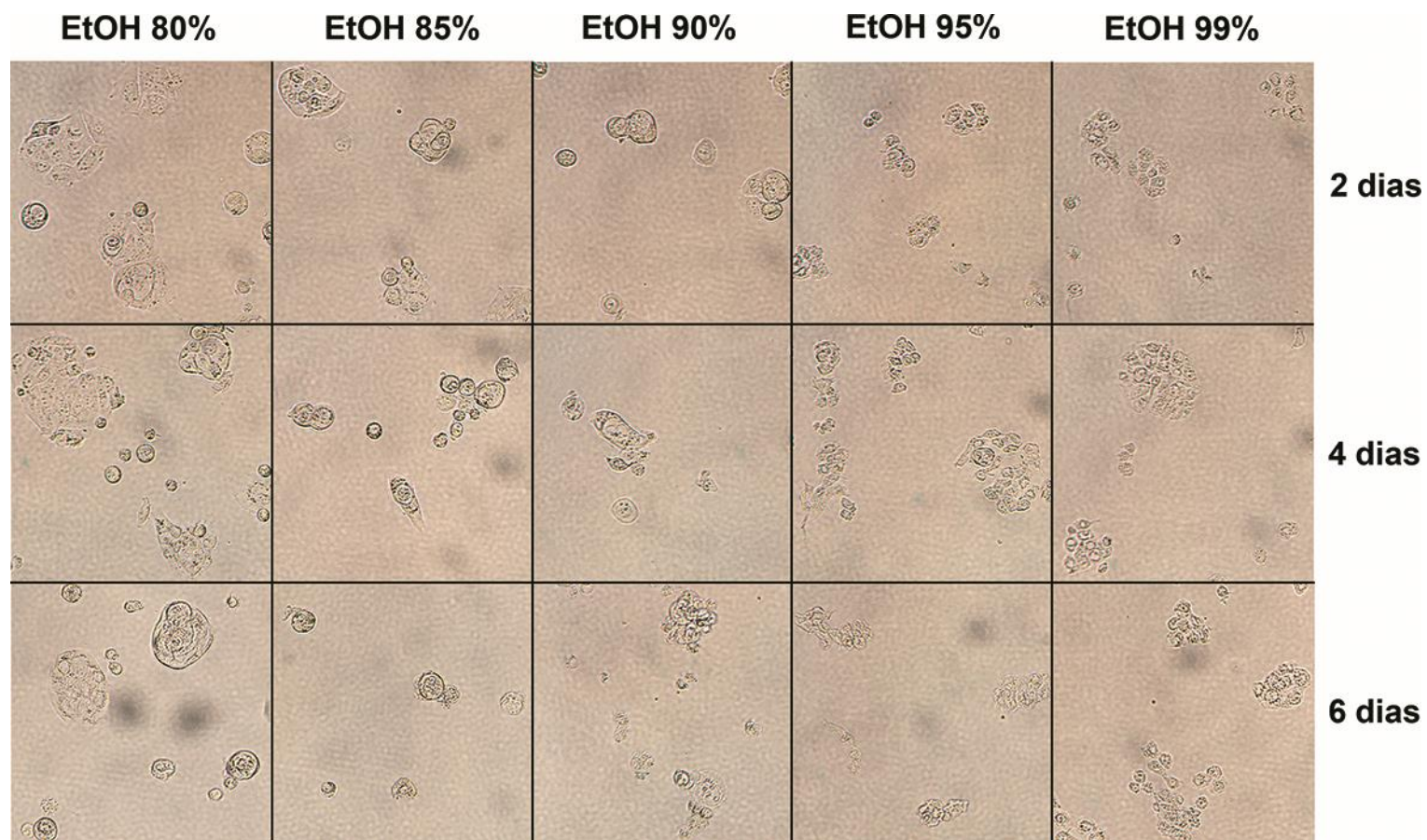


FIGURA 4.18 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de estrogenicidade realizado em linhagem MCF-7 (continuação)

Comparando-se os perfis de crescimento das células às quais foram adicionados esses extratos com aquele obtido para o estradiol, foi possível observar uma alta similaridade, sobretudo para os extratos preparados com até 30% EtOH. Para os extratos preparados com 35 a 45% de álcool (v/v), a similaridade ainda foi elevada, embora nas imagens obtidas após os 6 dias de incubação a quantidade de células aparentemente fosse menor que nos casos anteriores. Para os sistemas nos quais as células foram incubadas com os extratos preparados com 50 a 75% de etanol, as imagens sugeriram que os perfis de crescimento se assemelhavam mais àquele obtido para o controle negativo, embora os resultados quantitativos das análises de MTT indicassem que os mesmos extratos apresentaram comportamento de agonistas parciais. Essa diferença se deveu principalmente ao fato de as imagens de microscopia terem sido obtidas individualmente, enquanto os resultados das análises de MTT foram médias de múltiplas replicatas.

Para o sistema no qual as células foram incubadas com o extrato contendo a 80% EtOH (v/v), após 4 dias de incubação, parte das células possuía formato arredondado, um indicativo de que as mesmas estavam em processo de morte e perderam a aderência. Após os 6 dias de incubação, predominavam as células com formato arredondado, e, portanto em processo de morte celular, o que explicava o baixo metabolismo do MTT no ensaio quantitativo. Além disso, para esse último quadro, também se observou o aparecimento de vacúolos no citoplasma, sugerindo tratar-se de um processo de morte por apoptose.

Nos poços que tinham as células incubadas com o extrato a 85% EtOH (v/v), após os 2 primeiros dias de incubação, observou-se que a maior parte das células apresentava morfologia bastante alterada, inclusive com a presença de vacúolos no seu interior. Após os 6 dias de incubação, o número de células arredondadas (e em processo de morte celular) aumentou significativamente e a quantidade de células vivas era muito baixa, o que explicava o RPE abaixo de 20% na análise de MTT.

No caso do ensaio realizado com o extrato a 90% EtOH (v/v), a quantidade de células arredondadas foi bastante elevada já após os 2 primeiros dias de incubação. Após 4 dias de incubação, observaram-se também fragmentos de células, os quais aumentaram significativamente após os 6 dias de incubação. Isso demonstrou que essas células estavam em um estágio bastante avançado no processo de morte celular logo nos 2 primeiros dias. Esse quadro foi ainda mais

evidente para os poços nos quais as células foram incubadas com os extratos preparados com 95% e 99% de etanol, visto que logo após os dois primeiros dias de incubação houve um predomínio dos fragmentos de células, indicando que esses 3 extratos apresentam uma elevada citotoxicidade.

De forma geral, os extratos induziram o aparecimento de grânulos no citoplasma das células dependendo da concentração de etanol usada, conforme foi observado na análise das imagens de microscopia de campo claro com aumento de 400x (FIGURA 4.19C-L), obtidas após 48 h de incubação. A granulação não foi observada nos extratos com concentrações mais baixas de etanol, mas estava presente nos extratos com porcentagem mais alta de álcool, sobretudo acima de 70%. Esta granulação foi muito mais intensa para os extratos preparados com maior teor alcoólico, principalmente para aqueles que levaram à morte das células (FIGURA 4.19K e L). O aparecimento de grânulos no citoplasma pode estar relacionado com o envelhecimento ou com uma resposta da célula a um ou mais compostos tóxicos, que podem levar a uma redução do metabolismo ou mesmo à morte celular<sup>183</sup>. Entretanto, cabe ressaltar que estudos mais aprofundados em biologia celular são necessários para se confirmar se essa granulação está diretamente relacionada com a morte celular nesses casos.



FIGURA 4.19 - Imagens de microscopia de campo claro com aumento de 400 X para o estudo de estrogêniciade após 2 dias de incubação. A: controle negativo, B: E<sub>2</sub>; Extratos com distintas porcentagens de etanol (v/v): C: 1%; D: 10%; E: 25%; F: 30%; G: 40%; H: 50%; I: 60%; J: 70%; K: 80%; L: 95%.

Devido aos resultados apresentados anteriormente para os extratos preparados com 80 a 99% de etanol (v/v), os quais levaram à morte celular, duas hipóteses foram levantadas: (i) esses extratos induziram a morte celular porque a concentração na qual eles foram testados ( $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) estava muito elevada, causando a toxicidade para as células; ou (ii) esses extratos induziram a morte celular porque são muito tóxicos mesmo em concentrações mais baixas.

Para verificar as hipóteses acima, fez-se um novo experimento para os quais foram utilizados os extratos preparados com 75%, 85% ou 95% de etanol (v/v). Os três extratos foram escolhidos porque na concentração de  $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ , (i) o extrato preparado com 75% EtOH levou à estimulação do crescimento celular, sem efeito tóxico para as células; (ii) o extrato preparado com 85% EtOH, assim como aquele preparado com 80%, apresentou efeito tóxico moderado, visto que após o período de incubação ainda havia metabolismo de MTT (RRE aproximadamente igual a 20%; e (iii) o extrato preparado com 95% EtOH, assim como aqueles preparados com 90% ou 99%, apresentou efeito tóxico elevado, uma vez que levou à morte celular já no início do período de incubação.

Nos sistemas nos quais as células foram incubadas com o extrato preparado com 75% EtOH (v/v) (FIGURA 4.20A) observou-se que a estimulação do crescimento celular começou a ser efetiva na concentração de  $5,00\mu\text{g.mL}^{-1}$  (teste de Tukey,  $p < 0,001$ ) e aumentava proporcionalmente à concentração do extrato, sendo que as repostas obtidas para as concentrações 100 e  $250\mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentaram diferença significativa entre elas (teste de Tukey,  $p < 0,001$ ). Esse perfil já era esperado para o extrato preparado com 75% EtOH (v/v), uma vez que no teste inicial de estrogenicidade, ele estimulou a proliferação das células.

Nos sistemas nos quais as células foram incubadas com o extrato preparado com 85% de álcool (v/v) (FIGURA 4.20B), observou-se um perfil de estimulação a partir da concentração de  $5,00\mu\text{g.mL}^{-1}$  até a concentração de  $50,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com RRE para essa última semelhantes àquele obtido para as concentrações mais elevadas testadas para o extrato com 75% de álcool (v/v). Nas concentrações mais altas, o extrato passou a induzir a morte celular, comprometendo o metabolismo do MTT. Já o extrato preparado com 95% de etanol (v/v) se mostrou bastante tóxico em concentrações a partir de  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ , visto que houve uma redução no metabolismo do MTT (FIGURA 4.20C). Nas concentrações abaixo de  $50,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o extrato pouco estimulou a proliferação celular, visto que o

RPE máximo obtido não atingiu sequer a 60% quando comparado com o estradiol.

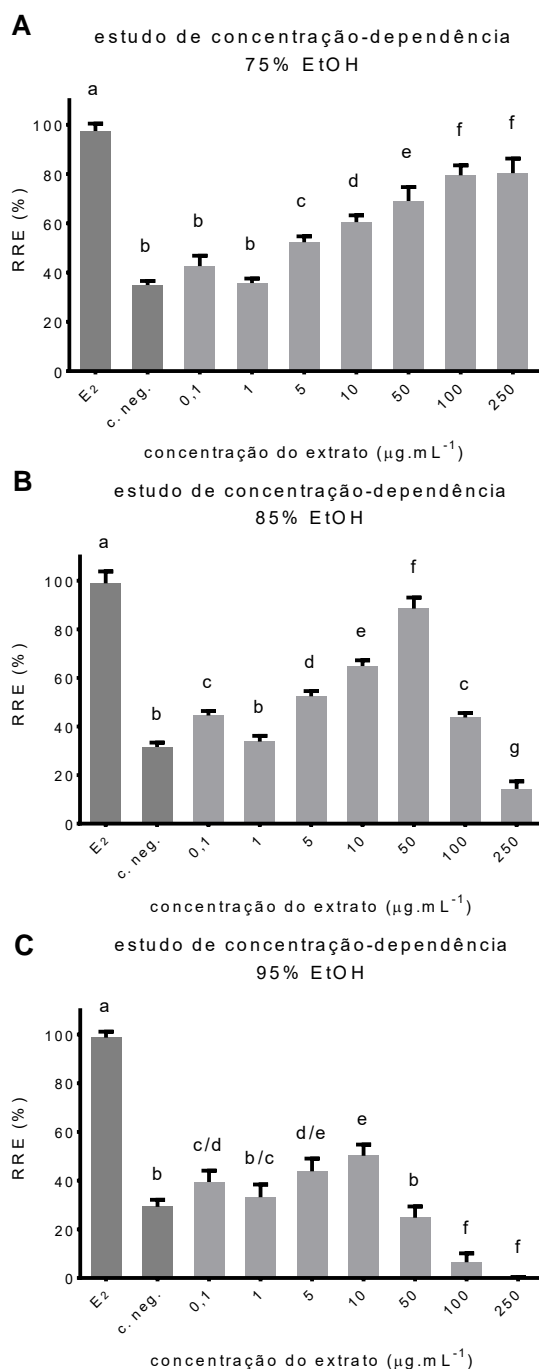


FIGURA 4.20 - Estudo de concentração-dependência para os extratos preparados com soluções etanólicas 75 (A), 85 (B) e 95% (v/v) (C) em células MCF-7

Diante dos resultados obtidos nesse experimento, foi possível concluir que os extratos preparados com até 35% de álcool (v/v) no solvente extrator apresentaram atividade estimulatória máxima para as células MCF-7, sendo que 40-75% (v/v) foram considerados intermediários. Portanto, para se obter um extrato de folhas de amora com perfil estrogênico, a quantidade máxima de álcool utilizada no



solvente extrator deveria ser preferencialmente 35% (v/v), embora teores até 75% (v/v) de etanol também seriam aceitáveis.

Os extratos contendo 90, 95 e 99% EtOH foram bastante tóxicos para células MCF-7 em concentrações iguais ou superiores a 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e possuíam baixa atividade estrogênica em concentrações inferiores a esse valor. O extrato preparado com 85% de etanol (v/v), assim como aquele preparado com 80% (v/v), por sua vez, apresentou toxicidade em concentrações iguais ou superiores a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , porém, em concentrações mais baixas, apresentou atividade estrogênica comparável aos demais extratos testados inicialmente.

O etanol utilizado no preparo desses extratos foi totalmente evaporado em uma etapa prévia aos ensaios celulares. Além disso, após a ressolubilização em soluções hidroalcoólicas, os extratos foram diluídos em meio de cultura e o teor máximo de EtOH no meio não ultrapassou 1% (v/v), o que, em um experimento anterior, indicou não ser tóxico para as células dessa linhagem. Dessa forma, a toxicidade observada foi devida a componentes tóxicos presentes no extrato e não ao solvente orgânico utilizado na extração.

Devido ao efeito tóxico apresentado por alguns extratos para a linhagem MCF-7 era crucial a realização de um teste de citotoxicidade em um modelo de células saudáveis, o qual será descrito em seguida. Além disso, era necessário observar se os extratos com atividade estrogênica apresentam baixa citotoxicidade para estimar o seu uso em estudos posteriores.

#### 4.2.4 - ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E SELETIVIDADE PARA EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA

O estudo de citotoxicidade teve como objetivo principal verificar se os extratos de folhas de amoreira apresentariam efeito tóxico para células saudáveis, principalmente aqueles que induziram a morte das células MCF-7. Por isso, as respostas para esse ensaio foram expressas em termos de viabilidade celular, ou seja, quantidade relativa de células vivas, utilizando o controle negativo como referencial (100%). Os resultados das análises realizadas após 6 dias de incubação sugeriram que os extratos preparados com até 30% de etanol (v/v) não apresentaram efeito tóxico para as células de fibroblastos (FIGURA 4.21). Os extratos preparados com 35 a 60% de de etanol (v/v) apresentaram baixa toxicidade, visto que a viabilidade celular estava em cerca de 80%. Os extratos preparados com

65 a 90% de EtOH (v/v) apresentaram toxicidade que aumentava progressivamente com o aumento do teor alcoólico do solvente extrator. Os extratos preparados com 95 e 99% de álcool foram extremamente tóxicos, levando à morte de 100% das células BALB/c. De acordo com os resultados do teste de Tukey com  $p < 0,001$ , apenas o estradiol foi estatisticamente não significativo em relação ao controle negativo, o que o classificaria como não tóxico. No entanto, os extratos preparados com até 30% EtOH também podem ser incluídos nesse grupo, visto que a viabilidade celular para os mesmos foi da ordem de 90% e estão dentro da faixa aceitável para não toxicidade (linha pontilhada na FIGURA 4.21).

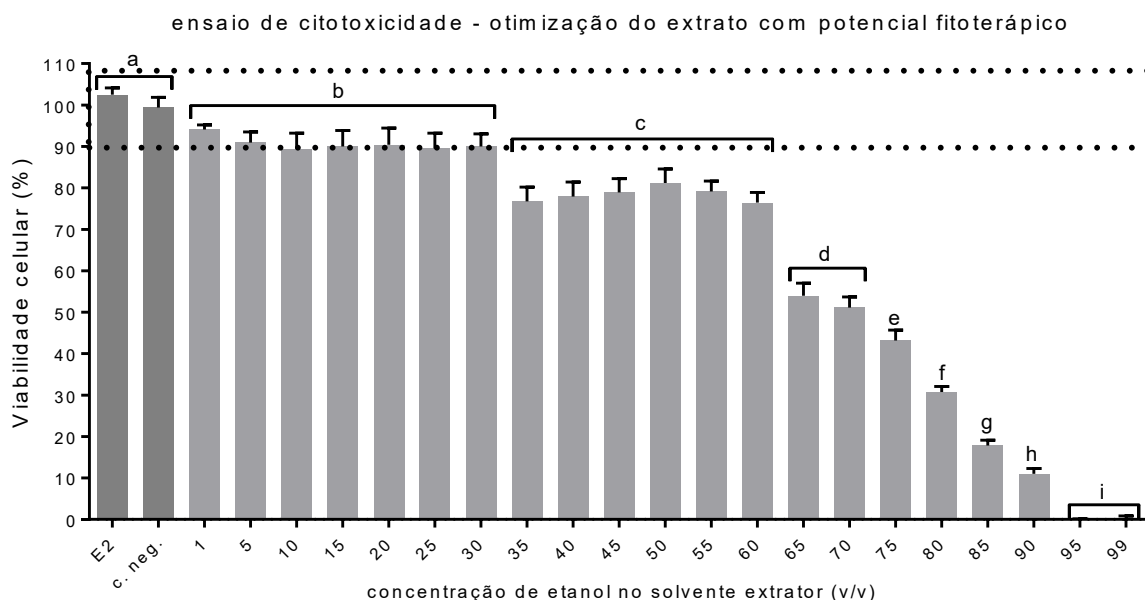


FIGURA 4.21 - Ensaio de citotoxicidade para os extratos de folhas de amoreira incubados por 6 dias com as células Balb-c 3T3 clone A31

Nas análises de microscopia de campo claro com aumento de 100x (FIGURA 4.22), não foi possível observar alterações na morfologia das células para os sistemas nos quais as células foram incubadas na presença de solvente, do estradiol ou dos extratos preparados com até 60% de etanol (v/v), embora as análises quantitativas tenham mostrado que há toxicidade para os extratos com 35 a 60%. Nos sistemas nos quais as células foram incubadas com os extratos preparados com 65 a 75% EtOH (v/v), pode-se observar uma alteração na morfologia das células ao final do período de incubação, sugerindo que as células estavam em processo de morte. No entanto, houve ainda muitas células saudáveis aderidas, como pode ser visto pelos valores de viabilidade celular entre 40 e 60%.

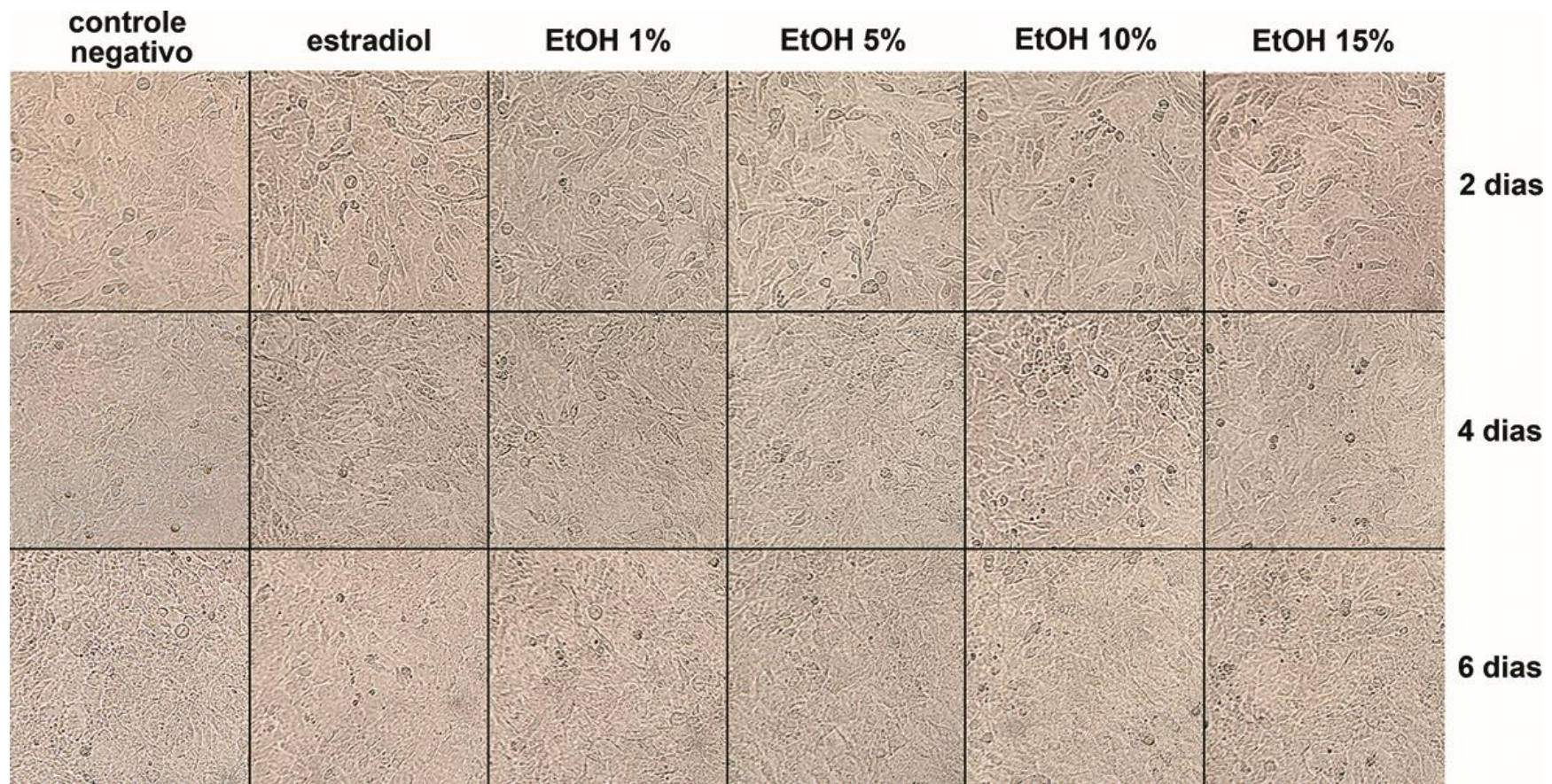


FIGURA 4.22 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de citotoxicidade realizado em linhagem BALB/c 3T3 clone 31

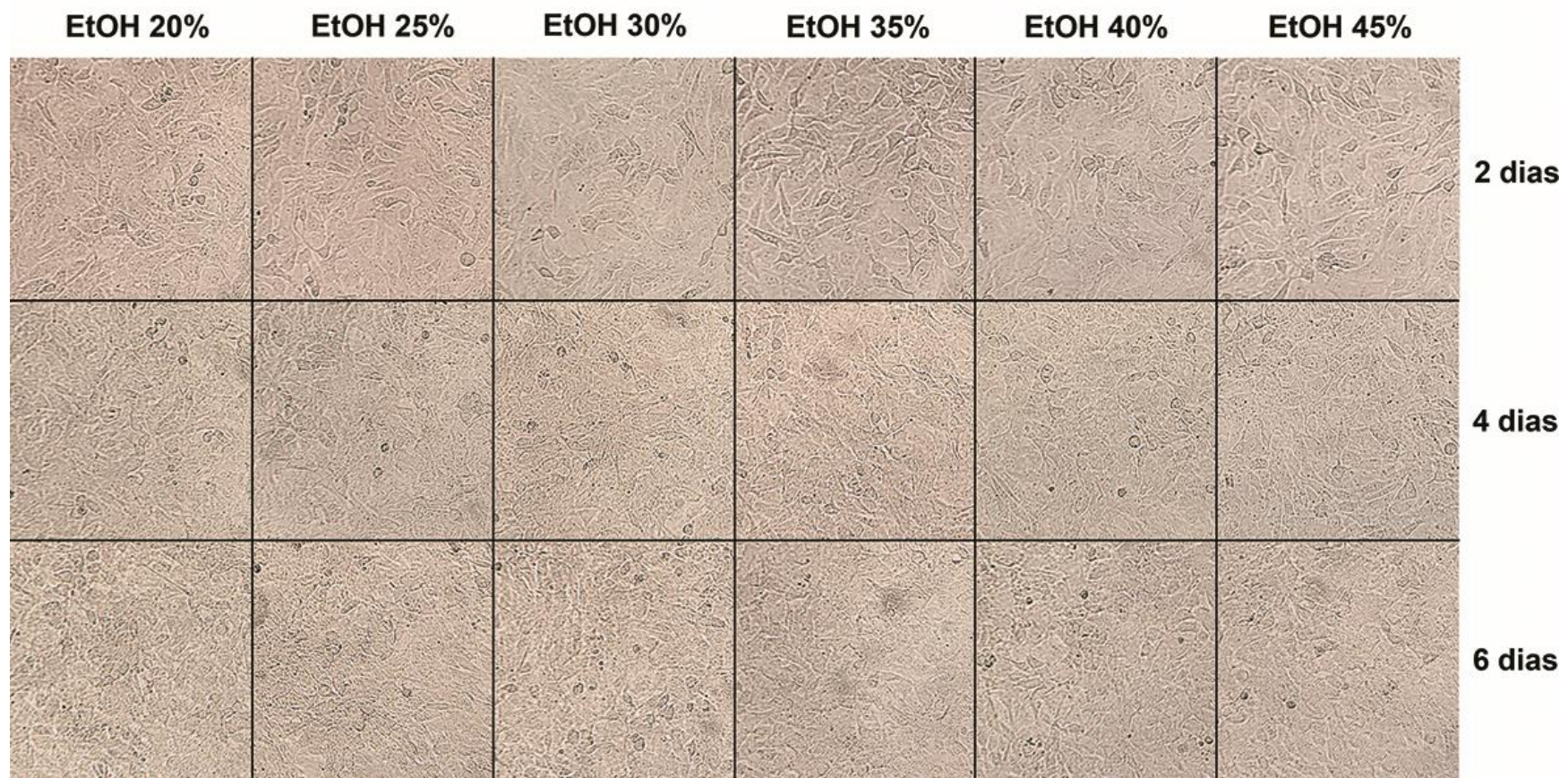


FIGURA 4.22 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de citotoxicidade realizado em linhagem BALB/c 3T3 clone 31 (continuação)

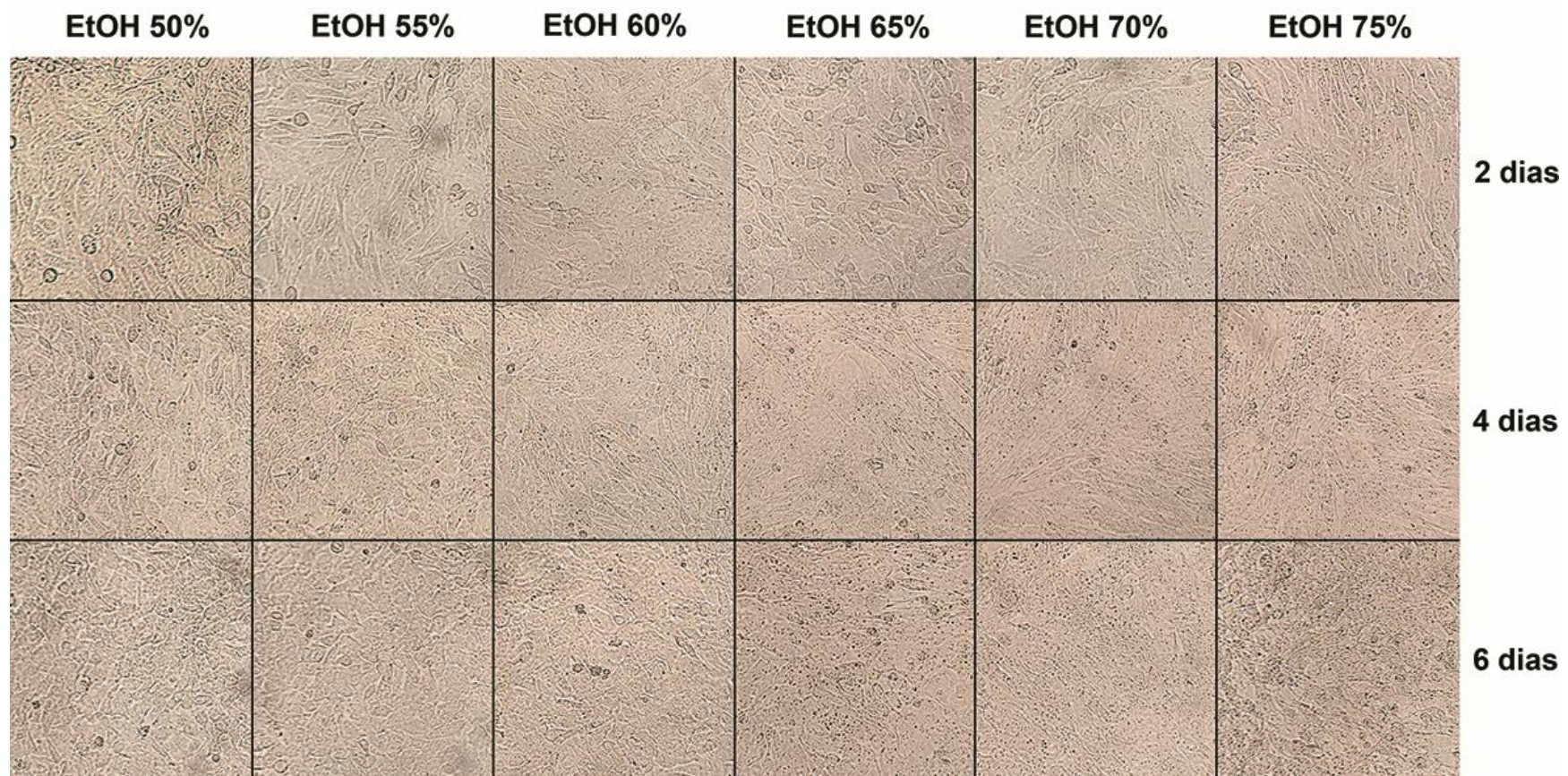


FIGURA 4.22 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de citotoxicidade realizado em linhagem BALB/c 3T3 clone 31 (continuação)

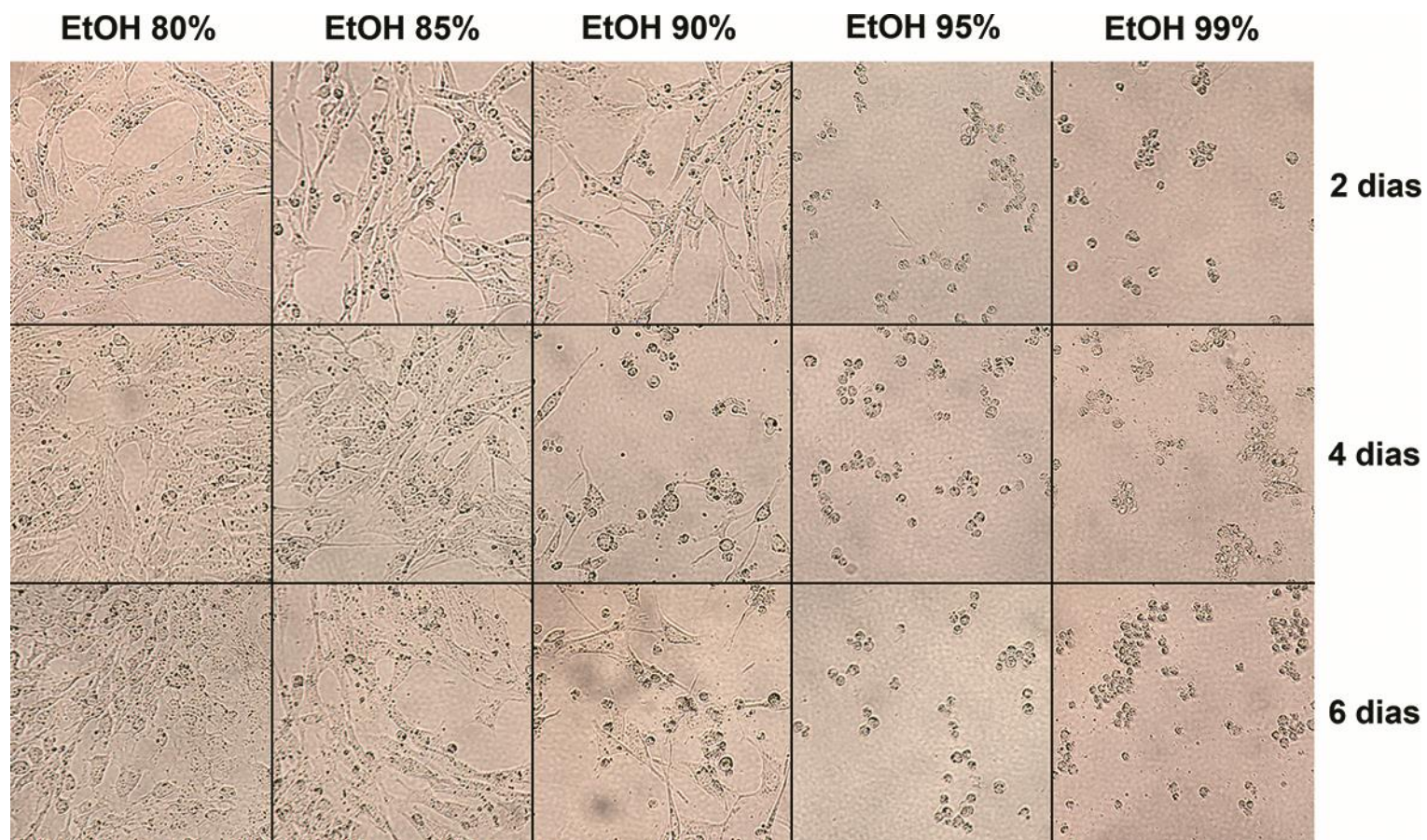


FIGURA 4.22 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de citotoxicidade realizado em linhagem BALB/c 3T3 clone 31 (continuação)

A incubação com os extratos preparados com 80 ou 85% de álcool, a alteração na morfologia das células foi bastante significativa logo após os dois primeiros dias de incubação. No entanto, havia ainda células aderidas, o que explicaria a viabilidade celular entre 17 e 30%. Já para os extratos preparados com 90% EtOH, após os dois primeiros dias de incubação as células apresentaram morfologia bastante alterada, conforme também foi observado para os extratos com 80 e 85%. Entretanto, ao contrário dos anteriores, após 4 dias de incubação havia poucas células aderidas e muitas células arredondadas, já em processo de morte. Além disso, era possível observar a presença de fragmentos de células. A citotoxicidade foi mais elevada para os extratos com 95 ou 99% de etanol, onde apenas fragmentos de células foram observados logo após os dois primeiros dias de incubação, mostrando que esses extratos foram extremamente tóxicos para a BALB/c, assim como o foram para a MCF-7.

Nos sistemas nos quais as células foram incubadas com extratos preparados com teor etanólico a partir de 65% (v/v), notou-se também o aparecimento de granulação no citoplasma durante o período de incubação (FIGURA 4.22). Essa granulação foi semelhante àquela observada para a linhagem MCF-7 na imagem com aumento de 400 x (FIGURA 4.20), e, como dito anteriormente, pode estar relacionada com o envelhecimento celular ou com uma resposta do organismo a um composto tóxico, levando à redução do metabolismo ou à morte celular. A granulação foi ainda mais pronunciada nos extratos com alta porcentagem de etanol (acima de 80%, v/v), sendo observadas logo em seguida as alterações na morfologia e posterior morte celular. Sendo assim, acredita-se que nesse caso, a granulação está diretamente relacionada com a resposta da célula aos compostos tóxicos.

Outro estudo complementar realizado paralelamente ao ensaio de citotoxicidade foi o de seletividade. Sabe-se que o E<sub>2</sub> é um agonista total do receptor estrógeno. Isso significa que, em linhagens como a MCF-7, que expressam esse receptor hormonal em grande quantidade, a ativação do receptor por um agonista levará à estimulação da replicação celular, a qual ocorrerá mais rapidamente.

No ensaio de estrogenicidade, alguns extratos apresentaram um perfil de estimulação semelhante ao do E<sub>2</sub>, outros apresentaram um perfil característico de agonistas parciais, e ainda tiveram aqueles que induziram a morte celular (FIGURA 4.16). Para verificar se os extratos que apresentaram atividade estrogênica

estimularam o crescimento celular pela mesma via de sinalização do E<sub>2</sub>, ou seja, pela ativação do receptor estrógeno, foi realizado um estudo de seletividade. A linhagem escolhida para o ensaio foi a MDA-MB-231, que é uma linhagem de câncer de mama do tipo triplo negativa, pelo fato de não expressar qualquer um dos três biomarcadores para a classificação do câncer de mama: receptor estrógeno, receptor de progesterona e receptor do fator de crescimento epidermal HER2/neu. Se os extratos estimulassem o crescimento da MCF-7 pela via de ativação do receptor estrógeno, esperava-se que os mesmos não influenciassem o crescimento das células MDA-MB-231.

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio de seletividade (FIGURA 4.23) notou-se a distribuição dos extratos em 3 grandes grupos. Os extratos preparados com até 55% EtOH não estimularam o crescimento das células MDA-MB-231, assim como o estradiol, visto que os valores de RPE obtidos para os mesmos estatisticamente não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo, sugerindo que a estimulação da proliferação celular para a MCF-7 tenha ocorrido pela via de ativação do receptor estrógeno. Isso mostrou que esses extratos foram seletivos para a linhagem hormônio-dependente.

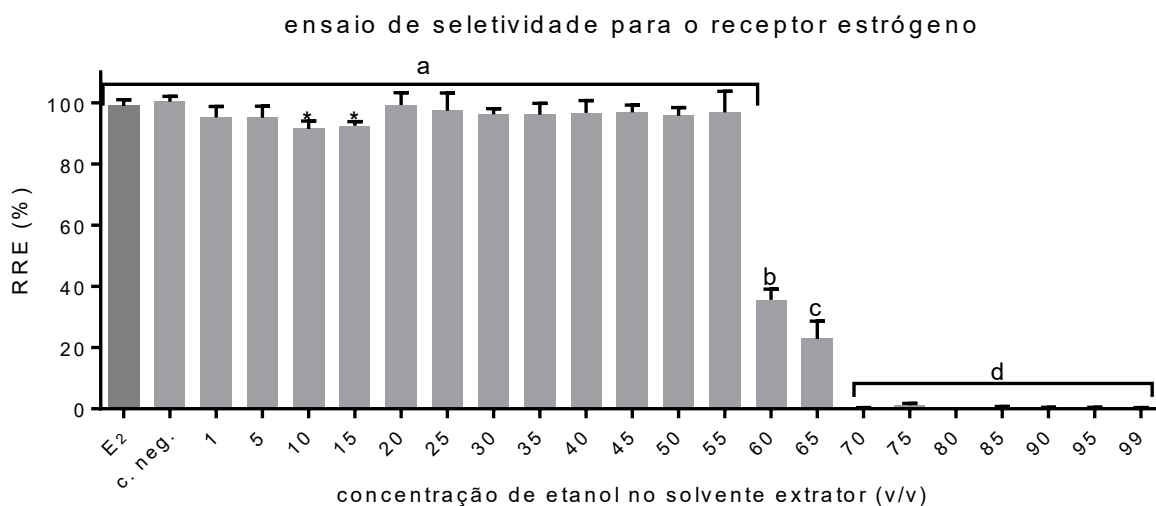


FIGURA 4.23 - Ensaio de seletividade para os extratos de folhas de amoreira incubados por 6 dias com as células MDA-MB-231

De acordo com o resultado do teste de Tukey para esse ensaio ( $p < 0,001$ ) os controles positivo (E<sub>2</sub>) e negativo não apresentaram diferença significativa em relação aos extratos preparados com até 55% EtOH (v/v), com exceção daqueles contendo 10 e 15% (marcados com \* no gráfico da FIGURA 4.21). Entretanto, de acordo com o mesmo teste, esses dois extratos estatisticamente não



apresentaram diferença significativa em relação aos demais classificados no mesmo grupo. Como em termos de resultado experimental, essa diferença não é relevante, ela foi desconsiderada para as análises.

Em contrapartida, os extratos preparados com 80 a 99% EtOH (v/v) apresentaram efeito tóxico para a MDA-MB-231, assim como o fizeram para a MCF-7, ainda que para essa última linhagem os extratos com 80 e 85% de etanol (v/v) não tenham provocado a morte de 100% das células.

Outros resultados que também devem ser destacados foram obtidos para os extratos preparados com 60 a 75% de etanol.(v/v) Estes extratos induziram a morte celular para a linhagem MDA-MB-231, embora, na mesma concentração, tenham apresentado atividade estrogênica nas células MCF-7. Os extratos com 70 ou 75% (v/v) EtOH levaram à morte de 100% das células MDA-MB-231. Esses resultados indicaram um segundo tipo de seletividade, no qual o mesmo extrato, nas mesmas condições experimentais, pode levar a dois efeitos completamente opostos (estímulo de crescimento ou efeito tóxico), conforme a linhagem celular ao qual ele está sendo administrado. Desta forma, os extratos com 70 ou 75 % de álcool apresentaram atividade citotóxica seletiva para a MDA-MB-231, que é uma linhagem celular que apresenta resistência múltipla a quimioterapia.

As análises por microscopia de campo claro com aumento de 100x mostraram que os sistemas nos quais as células foram incubadas com solvente (controle negativo), estradiol ou com um dos extratos preparados com até 55% EtOH apresentaram o mesmo perfil de crescimento durante os 6 dias de incubação, confirmando os resultados apresentados pela análise quantitativa de MTT (FIGURA 4.24).

Nos sistemas nos quais as células foram incubadas com extratos preparados com um percentual alcoólico mínimo de 60% (v/v), notou-se logo após os dois primeiros dias de incubação, que parte das células apresentou alterações em sua morfologia, tornando-se mais arredondada, o que indica um processo de morte celular. A partir de 4 dias de incubação foi possível perceber o aparecimento de fragmentos de células, os quais aumentam no decorrer do período de incubação, indicando que o processo de morte celular já está avançado. A citotoxicidade é ainda maior para os extratos com 80 ou 85% de etanol (v/v), seguindo a tendência observada nos outros ensaios. Comparando-se as imagens das duas linhagens de câncer de mama para esses mesmos extratos (FIGURAS 4.18 e 4.24), pode-se dizer

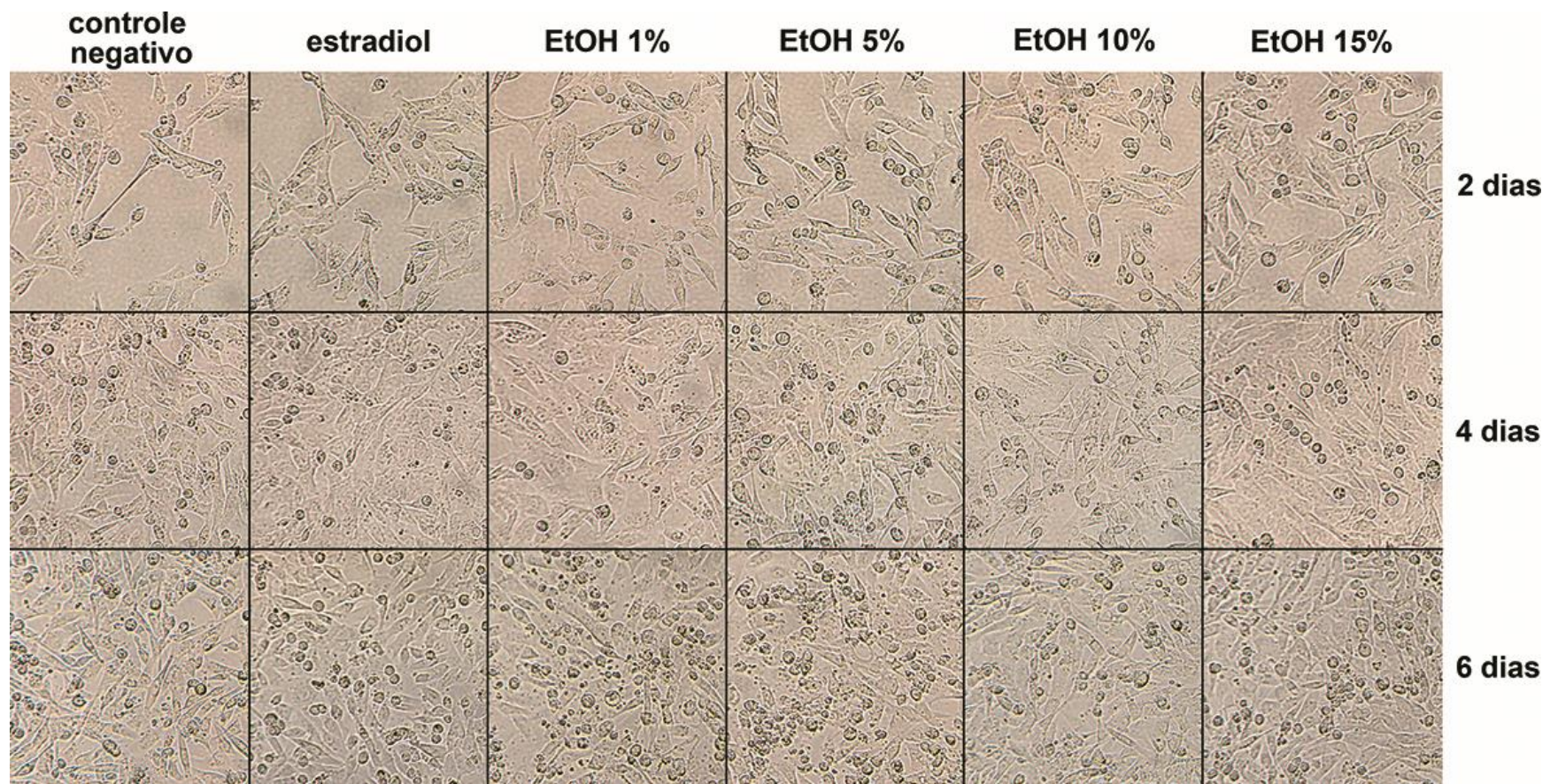


FIGURA 4.24 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de seletividade realizado em linhagem MDA-MB-231

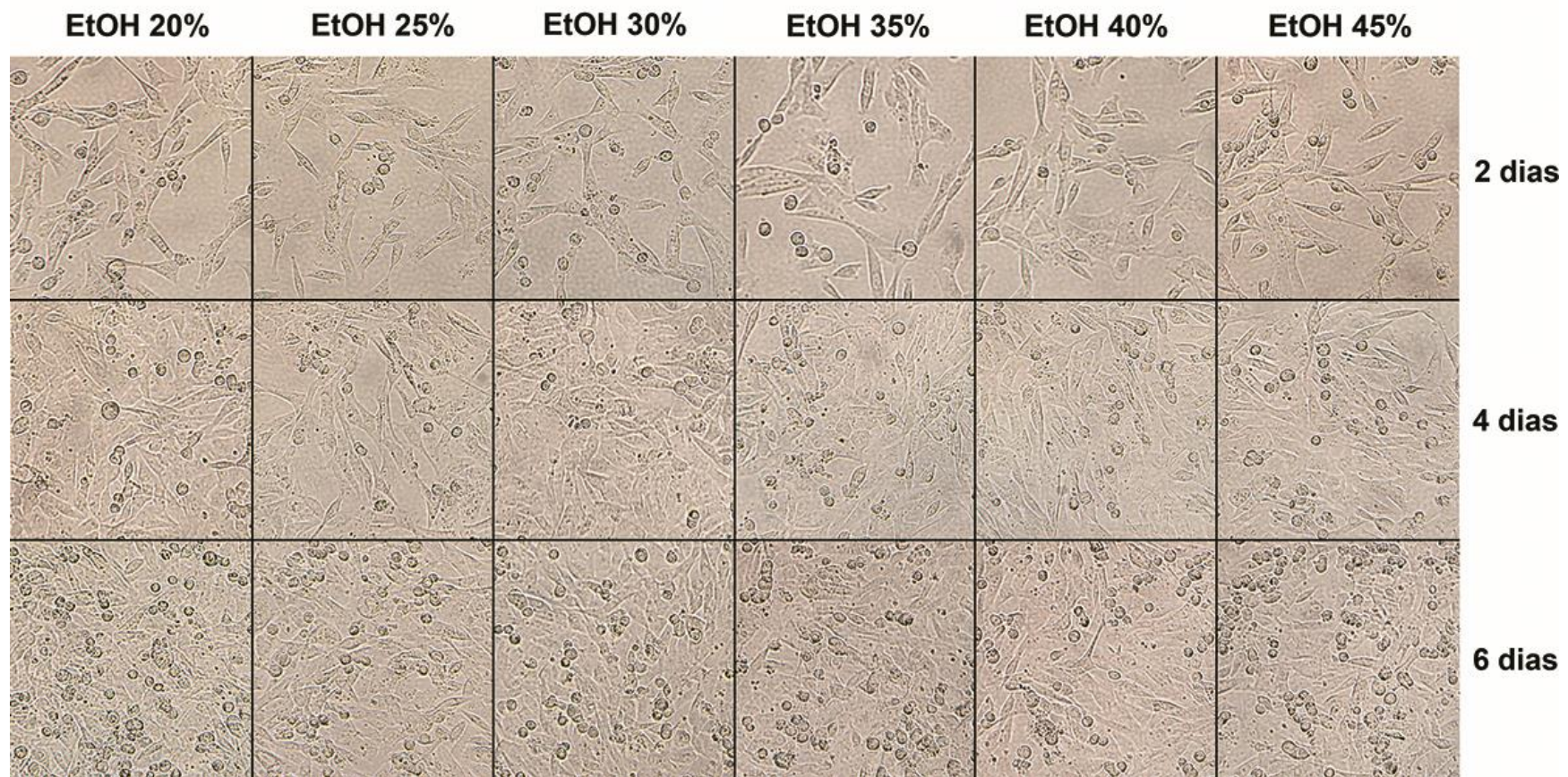


FIGURA 4.24 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de seletividade realizado em linhagem MDA-MB-231 (continuação)

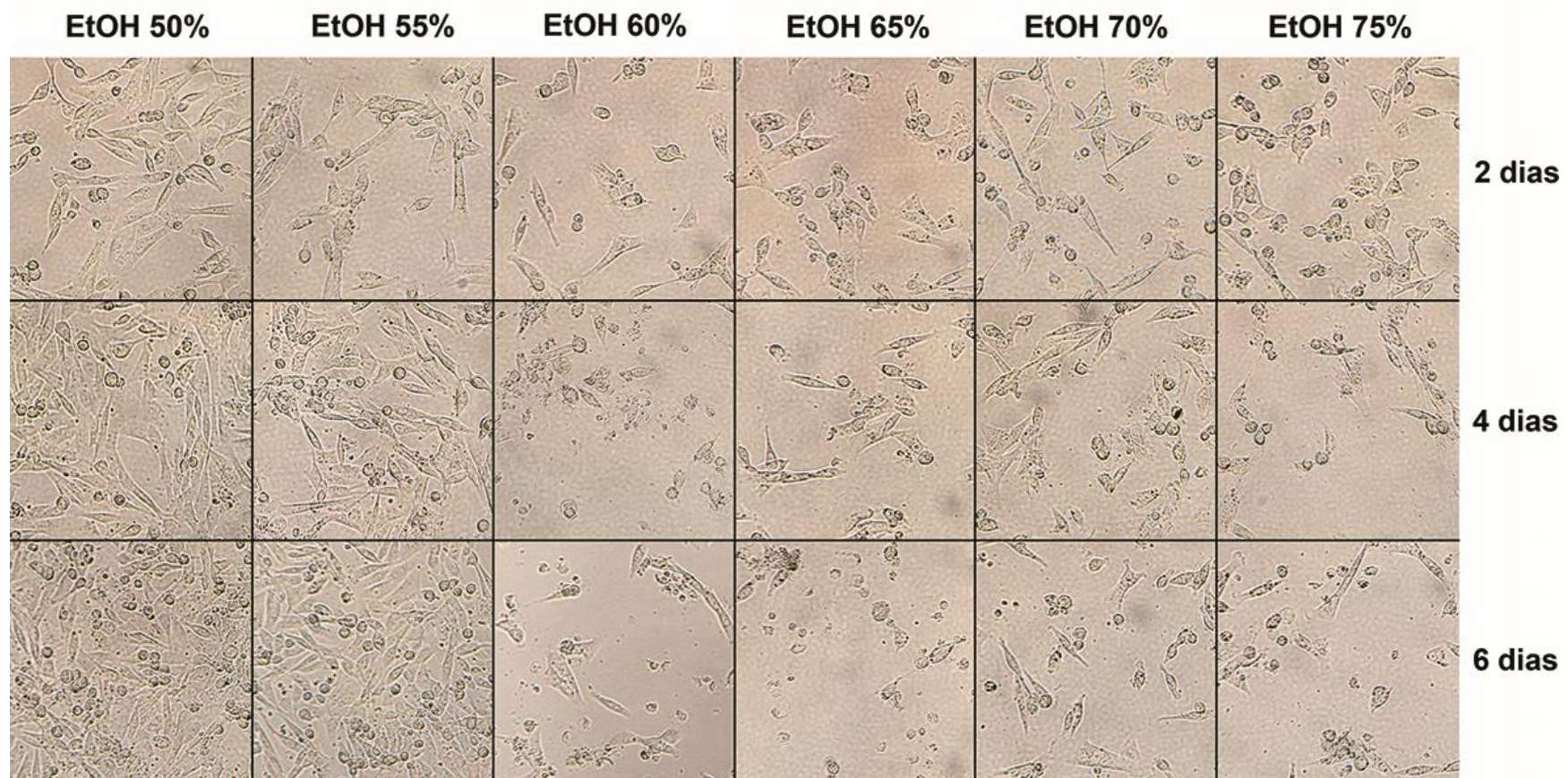


FIGURA 4.24 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de seletividade realizado em linhagem MDA-MB-231 (continuação)

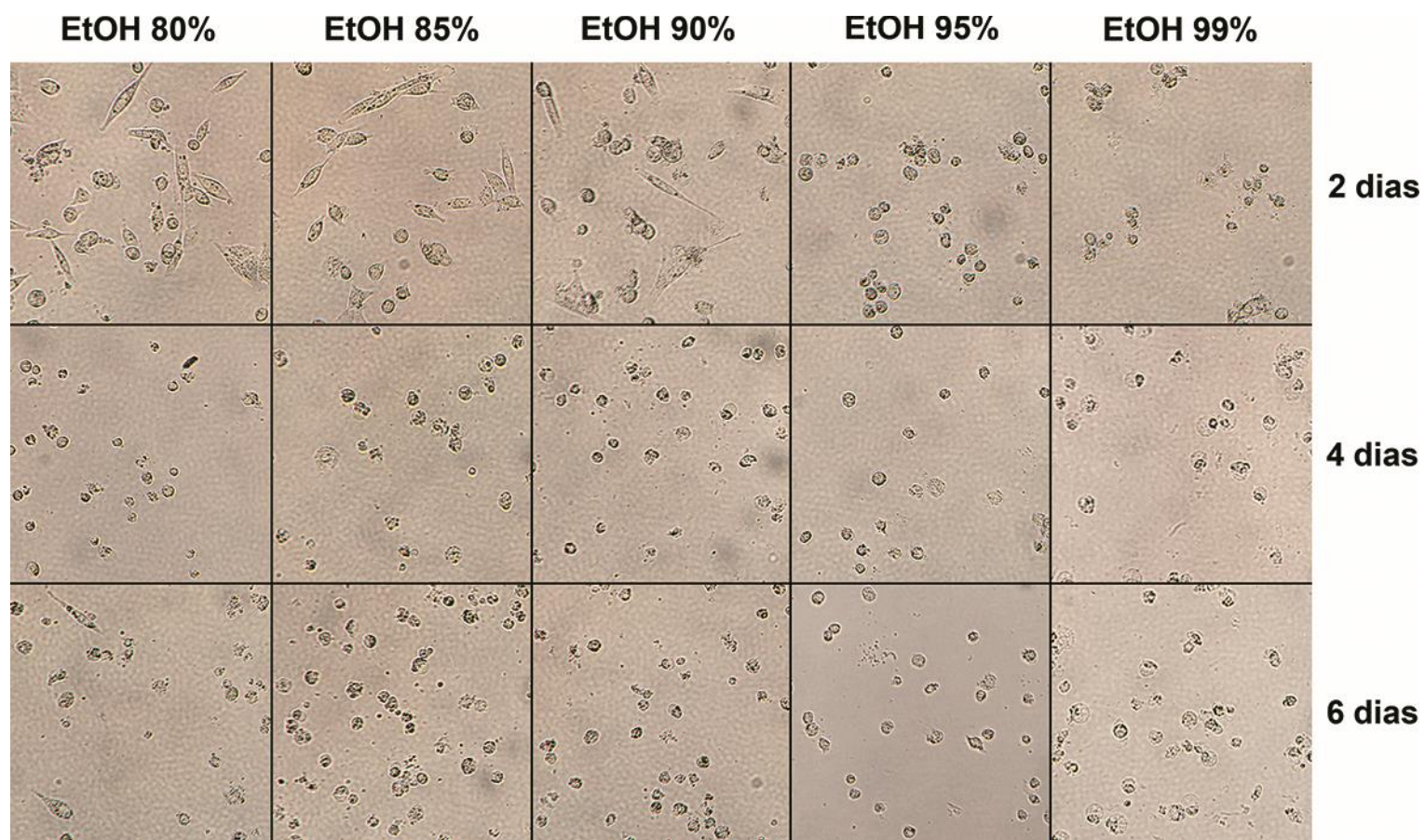


FIGURA 4.24 - imagens de microscopia de campo claro com aumento de 100 x para o estudo de seletividade realizado em linhagem MDA-MB-231 (continuação)

que os extratos foram mais tóxicos para a linhagem triplo-negativa, por ter levado à morte das células mais rapidamente que para a MCF-7.

Finalmente, nos sistemas nos quais as células foram incubadas na presença dos extratos preparados com 90 a 99% EtOH,(v/v) houve indução da morte celular, assim como aconteceu com a linhagem MCF-7. Isso mostra que os extratos não apresentaram seletividade, sendo tóxicos para ambas linhagens.

Fazendo-se uma análise comparativa entre os resultados dos ensaios de estrogenicidade, citotoxicidade e seletividade realizados nas mesmas condições experimentais (concentrações de células, concentração do extrato, meio de cultura utilizado, tempo de incubação), observa-se que o extrato preparado com 60% de etanol levou à estimulação do crescimento celular para a MCF-7, à morte celular para a MDA-MB-231 e apresentou baixa toxicidade para a BALB/c, com viabilidade celular na ordem de 80%. Atualmente, um dos principais problemas relacionados à quimioterapia no tratamento de câncer de mama, sobretudo para o subtipo triplo-negativo, é a baixa seletividade entre as células cancerígenas e não cancerígenas. O extrato mencionado seria então um bom candidato para estudos de atividade antitumoral, uma vez que foi seletivo induzindo a morte celular apenas da linhagem triplo-negativa (subtipo mais agressivo de câncer), com baixa citotoxicidade para as demais linhagens.

#### 4.2.5 - ETAPA FINAL DA OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE AMOREIRA COM POTENCIAL FITOESTROGÊNICO

No planejamento experimental proposto nesse trabalho para otimização do extrato de folhas de amoreira, as condições ótimas para se obter o extrato com o maior potencial fitoterápico seriam determinadas por meio de um modelo matemático. Para isso, seria então necessário utilizar uma variável quantitativa. A melhor forma de quantificar a eficiência de um composto ou, nesse caso, um extrato se daria por meio da concentração efetiva para estimular o crescimento de 50% da população de células ( $EC_{50}$ ), a qual é calculada a partir de uma curva concentração-resposta.

Devido aos resultados do ensaio de toxicidade que apontaram efeitos tóxicos para os extratos preparados com teor alcoólico a partir de 35%, a composição do solvente extrator para a otimização do extrato de folhas de amoreira com melhor potencial fitoestrogênico foi restrita ao limite máximo de 30% de etanol

em água. Para a curva concentração-resposta desses extratos, foram realizados novos experimentos nos quais as suas concentrações variaram de 0,100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  até  $1,00.10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foram convertidas para  $\text{mg.mL}^{-1}$ , que é a unidade mais comumente utilizada para esse tipo de curva. Os resultados foram expressos em porcentagem de efeito proliferativo relativo (RPE)<sup>123</sup>. No cálculo do RPE, a absorbância do controle negativo é subtraída da absorbância obtida para cada extrato e para o E<sub>2</sub>. Os valores resultantes são então ajustados para uma escala de 0 a 100, considerando-se o valor do controle negativo (sem adição de estradiol) como 0% e com a adição de E<sub>2</sub> como 100%.

Com exceção do extrato preparado com solvente extrator contendo 1% EtOH), os demais levaram à morte celular na concentração mais alta de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a qual foi retirada desse estudo (ANEXO 2). De modo geral, os resultados de RPE obtidos para as concentrações mais baixas (até  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle no qual as células foram incubadas com 20% de etanol, conforme o teste de Dunnett a 95% de confiança. No entanto, esses valores foram importantes para a construção da curva concentração-resposta.

Para o extrato com 1% de etanol não foi possível obter os dados para as concentrações de 500 e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , devido à contaminações cruzadas com bactérias. Os experimentos foram realizados simultaneamente em uma placa de 96 poços. Por isso, acredita-se que essa contaminação estivesse ocorrendo na etapa de esterilização após a diluição do extrato no meio de cultura, possivelmente por danificação da membrana de filtração, visto que a contaminação foi recorrente em diferentes replicatas e restrita às duas concentrações mais altas.

As curvas concentração-resposta apresentaram bons ajustes nos modelos de regressão para todas as composições etanólicas ensaiadas (ANEXO 5) e os valores de EC<sub>50</sub> obtidos a partir dessas curvas foram inferiores a  $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para todos os extratos (TABELA 4.3).

Na etapa final do planejamento experimental, foi construído um gráfico dos valores de EC<sub>50</sub> em função do teor alcoólico do solvente extrator. De acordo com o conjunto de dados apresentados, não foi possível ajustar um modelo que explicasse os resultados obtidos, sendo somente realizada uma análise comparativa entre as concentrações de etanol e a potência (FIGURA 4.25). Nesta análise, foi observado que os valores de EC<sub>50</sub> separaram os extratos em dois grandes grupos.

O primeiro compreendia os extratos preparados com 1 a 15% de etanol (v/v) no solvente extrator (linha vermelha tracejada na FIGURA 4.25). Todos esses extratos apresentaram os valores mais altos para o EC<sub>50</sub>, portanto foram menos potentes mas estimularam a replicação celular em valores próximos a 100%, observado para o E<sub>2</sub>.

O segundo grupo consistiu nos extratos preparados com 20 a 30% EtOH (v/v) (linha azul tracejada na FIGURA 4.25). Nesse grupo, os extratos apresentaram maior potência, traduzida em valores baixos de EC<sub>50</sub>, porém o valor máximo médio de RPE obtido para esses extratos estava em aproximadamente 90%, sendo que o extrato com 20% Etanol (v/v) chegou a níveis máximos de estimulação equiparáveis ao estradiol (com RPE entre 90 e 100%).

TABELA 4.3 - Valores de EC obtidos a partir das curvas concentração-resposta construídas para os extratos preparados com um percentual alcoólico máximo de 30%

% etanol no solvente extrator	EC <sub>50</sub>
1	67,2±2,0 µg.mL <sup>-1</sup>
5	132,0±5,6 µg.mL <sup>-1</sup>
10	80,7±3,6 µg.mL <sup>-1</sup>
15	102,4±4,8 µg.mL <sup>-1</sup>
20	24,7±1,7 µg.mL <sup>-1</sup>
25	42,5±1,7 µg.mL <sup>-1</sup>
30	13,68±0,94 µg.mL <sup>-1</sup>

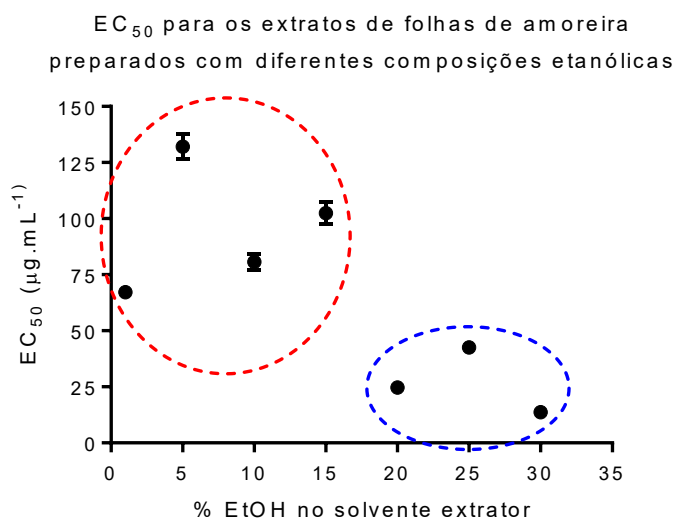


FIGURA 4.25 - Valores de EC<sub>50</sub> para os extratos de folhas de amoreira em função da composição etanólica do solvente extrator



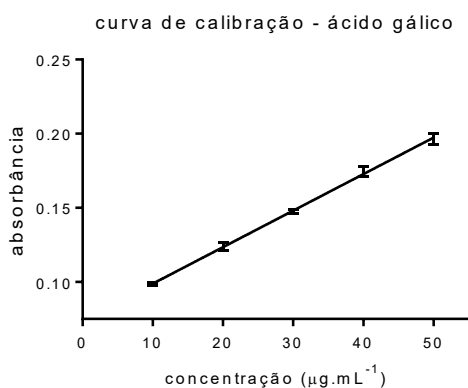
Desta forma, foi observado que os extratos contendo até 15% de álcool (v/v) tiveram menor potência do que aqueles preparados com soluções etanólicas na faixa de 20-30% (v/v), mas estimularam uma maior replicação celular do que os últimos. Ponderando-se entre a potência do extrato e a estimulação máxima obtida, pode-se dizer que, de todos os extratos avaliados, os extratos preparados com 20% a 30% de etanol foram os que apresentaram melhor potencial fitoestrogênico em estudos *in vitro* e são, portanto, bons candidatos para testes nas etapas mais avançadas do desenvolvimento de uma formulação fitoterápica, como os ensaios *in vivo*.

### 4.3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA

#### 4.3.1 - ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS

A análise de fenólicos totais é um procedimento recomendado por diferentes farmacopeias. Nesse trabalho ela foi realizada como uma análise inicial na tentativa de se identificar o perfil(is) químico(s) que levara(m) às atividades biológicas observadas, uma vez que os fitoestrógenos são compostos polifenólicos. O método de Folin-Ciocalteu foi usado para determinar a quantidade de polifenóis totais expressa por meio de equivalentes de ácido gálico. As medidas de absorbância obtidas nesse experimento geraram o modelo linear apresentado na FIGURA 4.26 e descrito pela equação:

$$y = (0,0742 \pm 0,0013) + (0,002464 \pm 0,000038)x, r^2 = 0,9945 \quad \text{eq. 4.1}$$



ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	0,03027	1	0,03027	4159	<0,0001
Resíduo	1,7.10 <sup>-4</sup>	23	7,3.10 <sup>-6</sup>		
F. ajuste	2,5.10 <sup>-5</sup>	3	8,3.10 <sup>-6</sup>	1,168	0,3627
Erro puro	1,4.10 <sup>-4</sup>	20	7,2.10 <sup>-6</sup>		
total	0,03044	24			
% variação máxima explicada				99,45	
% variação máxima explicável				99,53	

FIGURA 4.26 - Curva de calibração para o ácido gálico utilizada na análise de fenólicos totais para os extratos de folhas de amoreira. SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; F: valor calculado para o teste F; p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ); F. ajuste: falta de ajuste

A partir dos valores de absorvância obtidos para os extratos, foi determinado o conteúdo total de polifenóis para as amostras, os quais foram expressos em porcentagem em relação à massa de extrato seco (mg de equivalentes de ácido gálico - GAE - por 100 mg de extrato seco), conforme recomendação da ISO 14502-1:2005 (TABELA 4.4).

TABELA 4.4 - Resultados da análise de fenólicos totais para os extratos de folhas de amoreira

% Etanol no solvente	% mg GAE /100 g extrato seco	% Etanol no solvente	% mg GAE /100 g extrato seco
1	1,334 ± 0,034	55	1,523 ± 0,020
5	1,231 ± 0,032	60	1,705 ± 0,014
10	1,091 ± 0,029	65	1,529 ± 0,025
15	1,376 ± 0,026	70	1,295 ± 0,038
20	1,347 ± 0,057	75	1,295 ± 0,038
25	1,503 ± 0,014	80	0,734 ± 0,021
30	1,3344 ± 0,0089	85	0,721 ± 0,019
35	1,461 ± 0,014	90	0,760 ± 0,011
40	1,789 ± 0,042	95	0,711 ± 0,020
45	1,731 ± 0,095	99	1,081 ± 0,035
50	1,195 ± 0,048		

De modo geral, os resultados obtidos estão em concordância com os teores de fenólicos totais encontrados nas folhas de amoreiras da espécie *Morus nigra*<sup>202</sup>. Em uma comparação com análise de fenólicos totais realizadas pelo método de Folin-Ciocalteu com extratos de folhas de amoreira cultivadas em diferentes países, os resultados obtidos nesse trabalho foram:

- i. aproximadamente 10 vezes menores que aqueles obtidos para extratos aquosos preparados com folhas de amoreira cultivadas na Polônia<sup>203</sup>;
- ii. aproximadamente metade daqueles obtidos para extratos hidroalcoólicos (60% EtOH) preparados com folhas de amoreira cultivadas na Tailândia<sup>204</sup>; e
- iii. aproximadamente 25 vezes menor que aqueles obtidos para extratos hidroalcoólicos (70% EtOH) preparados com folhas de amoreira cultivadas na China<sup>205</sup>.

Essas diferenças refletem a complexidade de um estudo envolvendo metabólitos secundários, pois vários fatores, como o solo, o clima e a época do ano

de coleta influenciam substancialmente a produção dos polifenóis e, conseqüentemente, influenciarão na atividade biológica dos mesmos.

Com os dados da TABELA 4.4, fez-se uma tentativa de correlacionar o conteúdo de fenólicos totais e as atividades biológicas observadas, não encontrando qualquer correlação entre os dados (FIGURA 4.27). O método Folin-Ciocalteu não é seletivo para compostos fenólicos, pois nos extratos de folhas de amoreira podem estar presentes outros agentes redutores, como açúcares, que podem reagir com o reagente, mascarando o resultado para os fenólicos totais<sup>148</sup>. Por isso, o uso de outras ferramentas analíticas com maior seletividade é essencial para o estudo químico, como descrito no próximo item.

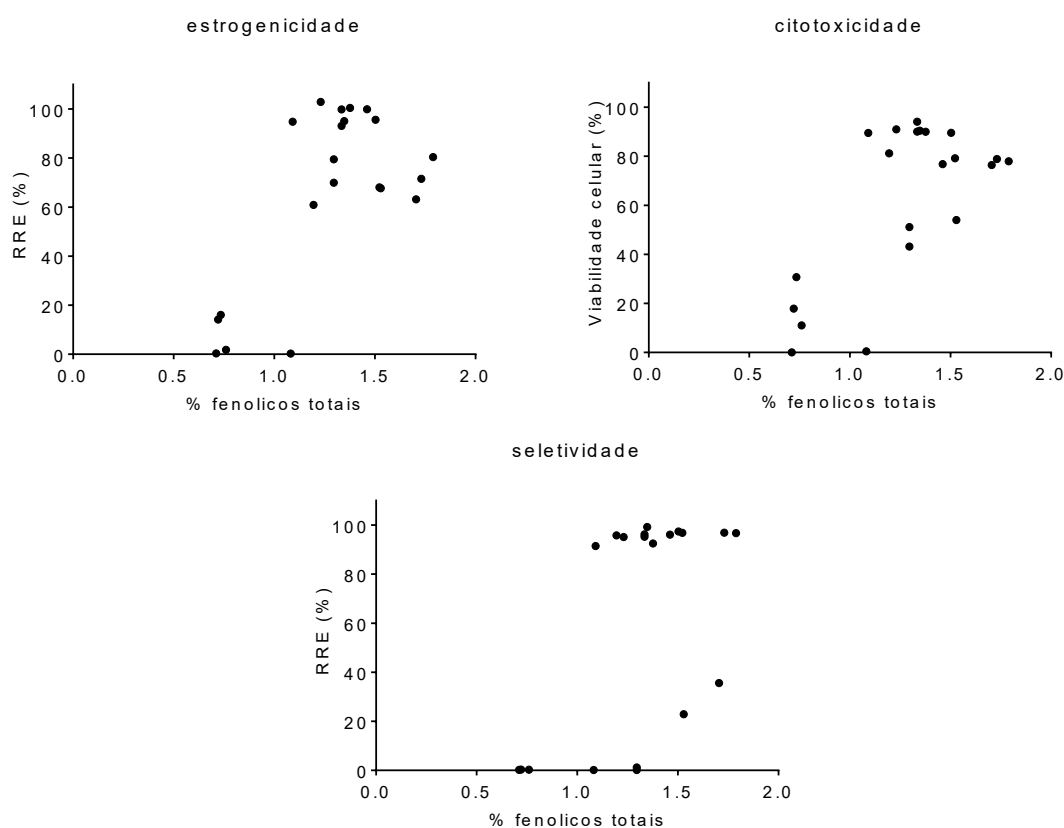


FIGURA 4.27 - Falta de correlação entre o teor de fenólicos totais e o resultado da atividade biológica para os extratos de folhas de amoreira preparados com diferentes soluções etanólicas

## 4.3.2 - ANÁLISES DE PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA

### 4.3.2.1 - ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER COMO FONTE DE IONIZAÇÃO ELETROSPRAY (ESI-FT-ICR-MS)

Alterando-se a polaridade do solvente extrator em função do seu percentual alcoólico, esperava-se observar variações no perfil químico dos extratos que pudessem explicar as diferenças observadas em relação à atividade biológicas.

Uma primeira tentativa nesse sentido foi uma análise visual dos espectros de massas obtidos para os extratos (FIGURA 4.25).

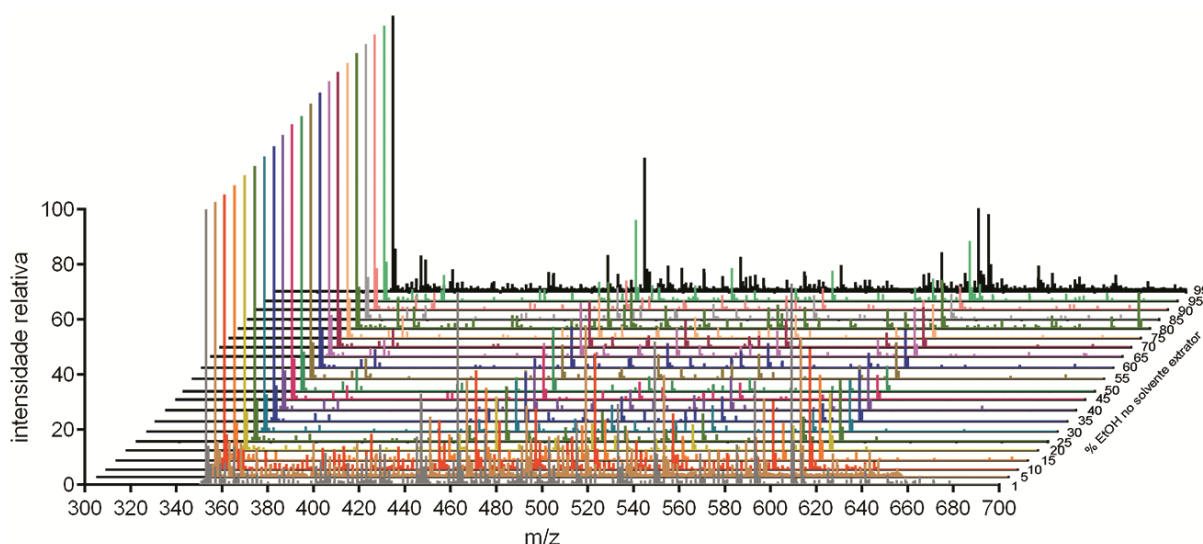


FIGURA 4.28 - Espectros de massas de altíssima resolução para os extratos de folhas de amoreira testados nos ensaios *in vitro*.

Nessa análise, muitos sinais de solventes e impurezas foram observados entre 200 e 350 u.m.a. e nenhum sinal acima de 700 u.m.a. (dados não mostrados). No entanto, na faixa de 350 a 700 u.m.a. estava a “impressão digital” dos extratos. Os extratos preparados com 1 a 10% de etanol (v/v) apresentaram uma grande quantidade de sinais de baixa intensidade nessa região, assim com o extrato preparado com 99%. De um modo geral, os perfis obtidos foram muito semelhante, sugerindo que a mudança de polaridade do solvente extrator causada pela variação do teor alcoólico não foi suficiente para se extrair uma grande diversidade de classes de metabólitos secundários. Devido à elevada similaridade visual, análises quimiométricas exploratórias e de reconhecimento de padrões foram

realizadas com os dados espectrométricos no sentido de se tentar identificar componentes presentes nos extratos que poderiam explicar a atividade observada nos ensaios *in vitro*.

As ferramentas de análise exploratória e reconhecimento de padrões são utilizadas para classificar as amostras, nesse caso, os extratos, em grupos de acordo com a similaridade entre elas a partir de um conjunto de parâmetros medidos experimentalmente (dados multivariados), como as intensidades das razões m/z. Para que essas ferramentas fossem aplicadas corretamente, era fundamental que todos os dados estivessem em uma mesma escala e alinhados em relação às variáveis (razões m/z). A primeira condição foi alcançada por meio da normalização das intensidades absolutas em uma escala de intensidade relativa, entre 0 e 100%. A segunda foi alcançada por meio da ferramenta de consolidação de dados do programa Excel® v. 2010 (Microsoft, Redmond, EUA) Para reduzir o número de variáveis, facilitando o processamento dos dados, considerou-se o valor de corte para a intensidade dos sinais nos espectros de massas igual a 1%. Em seguida, foi realizado o auto-escalamento dos conjuntos de dados, para que todas as variáveis fossem analisadas com a mesma importância. O auto-escalamento é especialmente interessantes quando se utiliza espectrometria de massas, visto que nessa técnica analítica, a intensidade do sinal observada está diretamente relacionada à facilidade com que cada analito é ionizado e não com a concentração do mesmo na amostra. O auto-escalamento foi realizado com base na equação 4.2:

$$resposta_{auto-escalada} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{S(x_{ij} - \bar{x}_j)} \quad \text{eq. 4.2}$$

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória baseada em agrupamento hierárquico (HCA). A similaridade entre os extratos foi calculada através da distância euclidiana entre os pontos. Com base nos valores obtidos para essas distâncias, as amostras foram gradualmente conectadas umas às outras (da menor distância para a maior), conforme o método de Ward (soma dos quadrados das distâncias entre o ponto central de cada grupo). O dendrograma obtido mostrou 5 grupos de amostras (FIGURA 4.29). Comparando-se o perfil de agrupamento obtido na HCA com o resultado do teste de estrogenicidade (FIGURA 4.16), observou-se que 4 dos 5 grupos formados na HCA continham extratos que

apresentaram atividade estrogênicas similares, agonismo total, agonismo parcial ou citotoxicidade. No entanto, no grupo formado pelos extratos preparados com 45, 50, 95, 99% de etanol (v/v) havia tanto extratos que estimularam o crescimento celular, como os dois primeiros, quanto outros extremamente tóxicos, como os dois últimos.

Com base na HCA, concluiu-se que existe uma tendência no perfil químico dos extratos que poderia explicar a estrogenicidade. Entretanto com essa ferramenta quimiométrica não foi possível saber qual(is) componente(s) do extrato estaria(m) relacionado(s) com a atividade biológica.

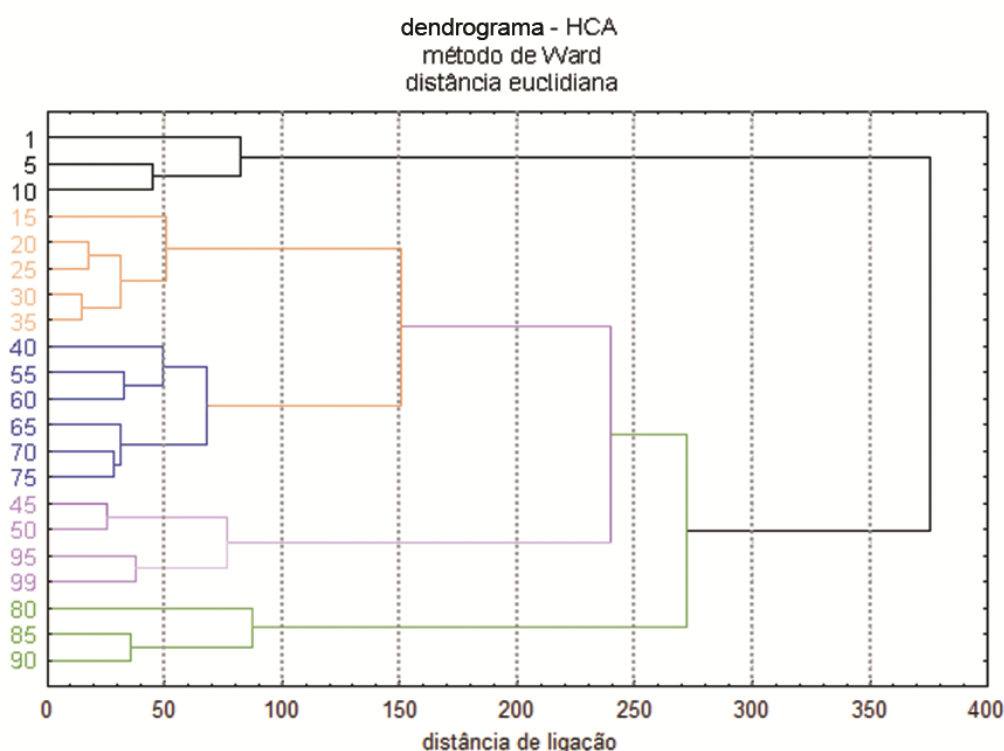


FIGURA 4.29 - Dendrograma da HCA realizada com os espectros de massas FT-ICR extratos de folhas de amoreira

Dessa forma, outra análise de classificação não supervisionada de padrões foi realizada. A ferramenta quimiométrica escolhida para essa finalidade foi a análise de componentes principais (PCA). A PCA tem como objetivo principal reduzir a dimensionalidade do conjunto multivariado de dados. Com essa ferramenta, a matriz original de dados ( $\mathbf{X}$ ) é decomposta em duas matrizes: os escores ( $\mathbf{T}$ ) e os *loadings* ( $\mathbf{P}$ ) por meio da relação matemática:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T \quad \text{eq. 4.3}$$

Os *scores* representam a localização das amostras, nesse caso, os extratos no espaço das componentes principais (PCs). Os *loadings*, por sua vez, estão relacionados ao peso das variáveis originais, como as razões m/z. Eles representam as novas dimensões rotacionadas no sentido da maior variância dos dados. Todas as PCs são ortogonais, isto é, a correlação entre elas é zero. Cada PC é formada por um par de *score* e *loading*, onde a variância do conjunto de dados é explicada de forma decrescente pelas PCs. Como a PCA é uma análise não supervisionada é importante que exista uma variância entre as amostras para uma mesma variável, o que é fundamental para a diferenciação das mesmas. Analisando-se os espectros de massas da FIGURA 4.28, notou-se que a razão m/z de 353,09 u.m.a. foi o pico base do espectro, com 100% de intensidade relativa) para todos os extratos. Como a variância para essa m/z foi nula, o íon foi excluído do conjunto de dados para que a PCA pudesse ser realizada. Após a retirada da variável, o conjunto de dados foi novamente normalizado em uma escala de 0 a 100.

A análise de componentes principais com 4 componentes explica 80,6% da variância total do conjunto de dados (FIGURA 4.30). A partir da sétima componente, a variância explicada é muito baixa e provavelmente essas PCs subsequentes estariam explicando o ruído das análises e não mais as informações químicas dos extratos. Em outras palavras, a dimensionalidade do espaço no qual estão inseridas as amostras foi reduzida de aproximadamente 5000 para apenas 6 dimensões!

Os *escores* da PCA representam as coordenadas das amostras no novo espaço de n dimensões. Quanto maior fosse a similaridade entre as informações químicas contidas nas amostras, mais próximas as amostras estariam nesse espaço. De acordo com os gráficos da FIGURA 4.31, a PC1 explicou 38,65%, enquanto a PC2 explicou 21,87%, totalizando aproximadamente 60% de toda a variância contida no conjunto de dados. No gráfico de *escores* para as duas primeiras componentes (PC1 e PC2), observou-se que as amostras de extratos estariam classificadas em 4 grupos (FIGURA 4.31A), resultado semelhante àquele obtido na HCA, considerando-se a distância euclidiana de 40% do valor máximo observado, com exceção dos extratos preparados com 45 e 50% EtOH (v/v). Pensando-se também na atividade estrogênica, observou-se a formação de dois grupos maiores: (i) os que estimularam o crescimento celular (destacados em azul) e (ii) os que levaram à morte celular (destacados em preto).

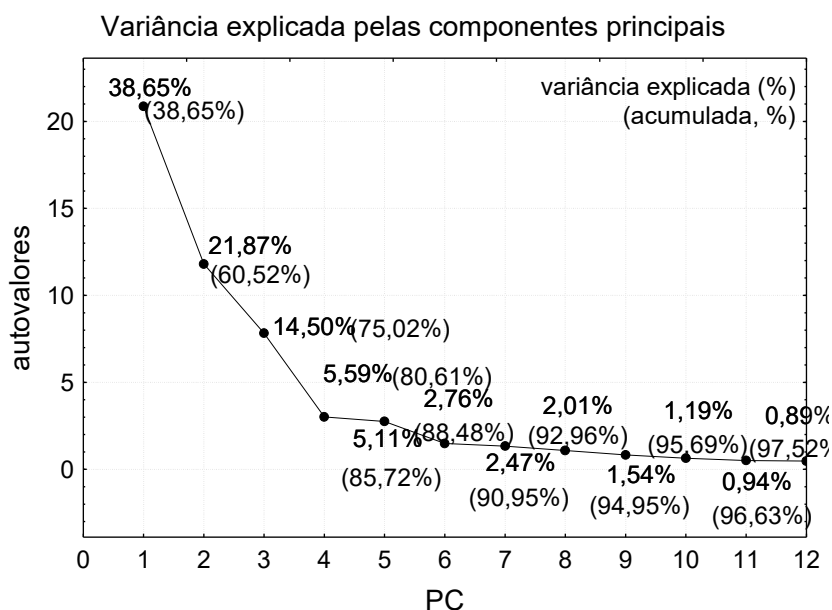


FIGURA 4.30 - Variância do modelo explicada por cada PC realizada com base nos espectros de massas dos extratos de folhas de amoreira

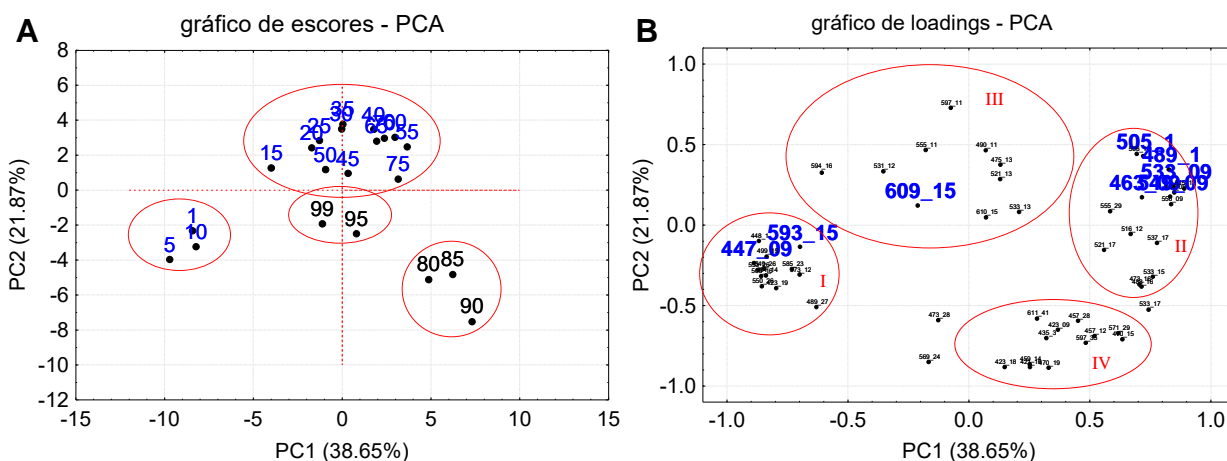


FIGURA 4.31 - Análise de componentes principais realizada com base nos espectros de massas dos extratos de folhas de amoreira

Os *loadings* representam o peso que cada variável tem na separação das amostras nos grupos observados no gráfico de escores. Por isso, analisando-se o gráfico de *loadings* seria possível verificar as razões *m/z* com maior influência na separação e classificação das amostras. Foram identificados 4 conjuntos de variáveis principais marcados como I, II e III (FIGURA 4.31B). Dentre as variáveis presentes no grupo I, foram identificadas as *m/z* 447,09 e 593,15. Com base nos dados de massa exata em alta resolução, com quatro casas decimais, essas razões foram atribuídas respectivamente aos íons quasimoleculares ( $[M-H]^-$ ) dos fitoestrógenos campferol-3-glicosídeo e campferol-3-rutinosídeo (FIGURA 4.32). No grupo II foram identificadas as *m/z* 489,10 e 533,10 atribuídas aos íons



quasimoleculares do fitoestrógenos campferol 6"-malonil-(3-glicosídeo); 463,09 associada à quercetina 3-glicosídeo; e 489,1 e 549,09 atribuídas à quercetina 6"-malonil-(3-glicosídeo). No grupo III foi identificado o fitoestrógeno quercetina 3-rutinosídeo ( $[M-H]^- = 609,15$ ). Todos esses íons quasimoleculares já foram identificados em folhas de *Morus sp.* de diferentes países<sup>106,206,207,208</sup>. Os íons 533,10 e 549,09 são pouco estáveis e muitas vezes não são detectáveis no espectro de massas. Facilmente sofrem a eliminação de uma molécula de CO<sub>2</sub>, proveniente do substituinte malonil, formando respectivamente os íons 489,10 e 505,10. Como esses extratos apresentaram potencial estrogênico, pode-se dizer que essas moléculas estão diretamente relacionadas com a atividade observada, visto que fitoestrógenos como o campferol e seus derivados glicosilados já são conhecidos por ter atividade estrogênica<sup>209,210</sup>. A razão m/z 353,09 que foi excluída do conjunto de dados por ausência de variância, foi atribuída aos ácidos cafeoilquínicos que também já foram identificados em folhas de amoreira, dentre os quais está o ácido clorogênico<sup>211</sup>.

Todas as atribuições foram realizadas sem ambiguidade com resolução ( $m/\Delta m_{50}$ ) acima de 350.000, calculada pelo método da largura total de banda em 50% da altura do pico e exatidão abaixo de 2 ppm (TABELA 4.5).

As análises por espectrometria de massas de FT-ICR forneceram informações importantes para a identificação dos fitoestrógenos presentes nos extratos. Entretanto, para saber como esses compostos estão variando entre os extratos, foi necessário utilizar outra ferramenta analítica: a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

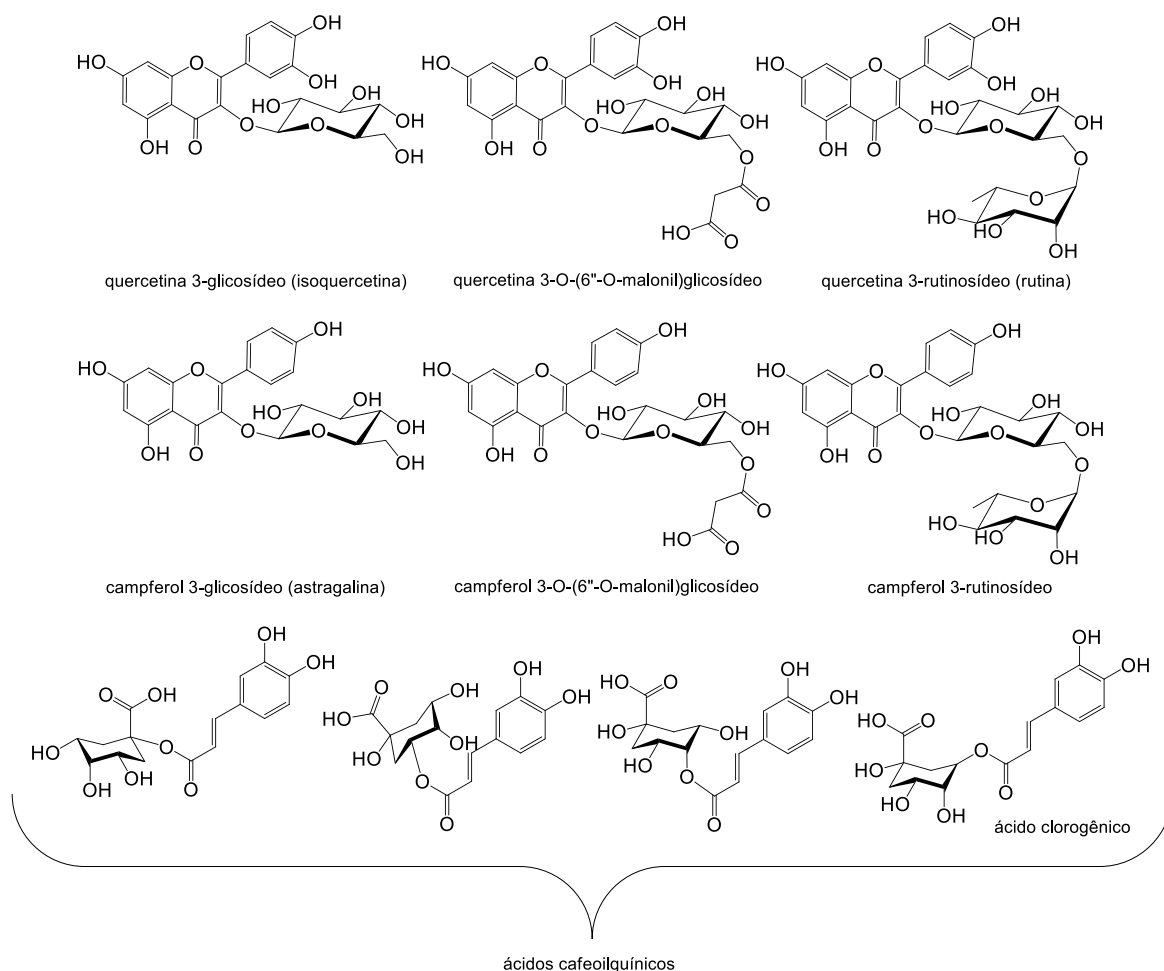


FIGURA 4.32 - Estruturas químicas dos fitoestrógenos e ácidos cafeoilquínicos identificados nos espectros de massas obtidos por FT-ICR-MS

TABELA 4.5 - Compostos fitoestrogênicos identificados nos espectros de massas de altíssima resolução dos extratos de folhas de amoreira

fitoestrógeno	[M-H] <sup>-</sup> calculado	[M-H] <sup>-</sup> observado	resolução	exatidão (ppm)
ácidos cafeoilquínicos	353,0873	353,0881	603.240	0,92
campferol-3-glicosídeo	447,0927	447,0938	490.952	1,48
quercetina 3-glicosídeo	463,0877	463,0887	463.993	1,43
campferol	489,1033	489,1044	439.441	1,48
6''-malonil-(3-glicosídeo)	533,0931	533,0944	406.020	1,75
quercetina	505,0982	505,0994	431.404	1,48
6''-malonil-(3-glicosídeo)	549,0880	549,0894	393.354	1,22
campferol-3-rutinosídeo	593,1506	593,1521	362.761	1,84
quercetina 3-rutinosídeo	609,1456	609,1470	357.129	1,31

## 4.3.2.2 - ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE BAIXA RESOLUÇÃO (LC-DAD-MS)

### 4.3.2.2.1 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

#### a) otimização dos parâmetros cromatográficos

A otimização das condições cromatográficas foi centrada na separação dos analitos, medida quantitativamente pela resolução cromatográfica ( $R_s$ ). Como já foi dito anteriormente,  $R_s$  está relacionada com três parâmetros analíticos principais:  $N$ ,  $k$  e  $\alpha$ .

#### - a escolha da fase estacionária

A primeira etapa na otimização do método cromatográfico desenvolvido nesse trabalho foi o número de pratos teóricos ( $N$ ), diretamente relacionado com a fase estacionária que seria utilizada para as análises dos extratos de folhas de amoreira. Foram avaliadas 3 fases estacionárias bastante utilizadas em análises de extratos de plantas: octadecila (C18), fenila e fenil-hexila<sup>212,213</sup>. Todas possuíam partículas de mesmo diâmetro: 5  $\mu\text{m}$ . Em relação às dimensões, o diâmetro interno foi 4,6 mm, sendo igual para as 3 colunas avaliadas, embora o comprimento fosse variável, sendo 150 mm para C18 e 250 mm para as outras duas.

A natureza química da fase estacionária é a principal influência da coluna cromatográfica na seletividade do método analítico, devido às possíveis interações intermoleculares entre as moléculas dos analitos e os grupos substituintes da fase estacionária. As interações comuns às 3 fases estacionárias avaliadas eram hidrofóbicas e exclusão estérica. Para as fases fenil e fenil-hexil, somam-se ainda as interações  $\pi$ - $\pi$ . Com base nos cromatogramas obtidos, apresentados na FIGURA 4.33, a fenil foi a fase que apresentou a pior de separação. Na coluna com fase estacionária fenil, as interações entre os analitos presentes em uma mistura e os substituintes da fase estacionária ocorrem principalmente por interações  $\pi$ - $\pi$ . No entanto, quando a acetonitrila é utilizada na fase móvel, como foi o caso da análise exploratória, o grupo ciano ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ) presente nas moléculas do solvente passa a competir com os analitos pelas interações com os grupos fenil, interferindo significativamente na retenção dos mesmos, o que explicaria o resultado observado<sup>173</sup>.

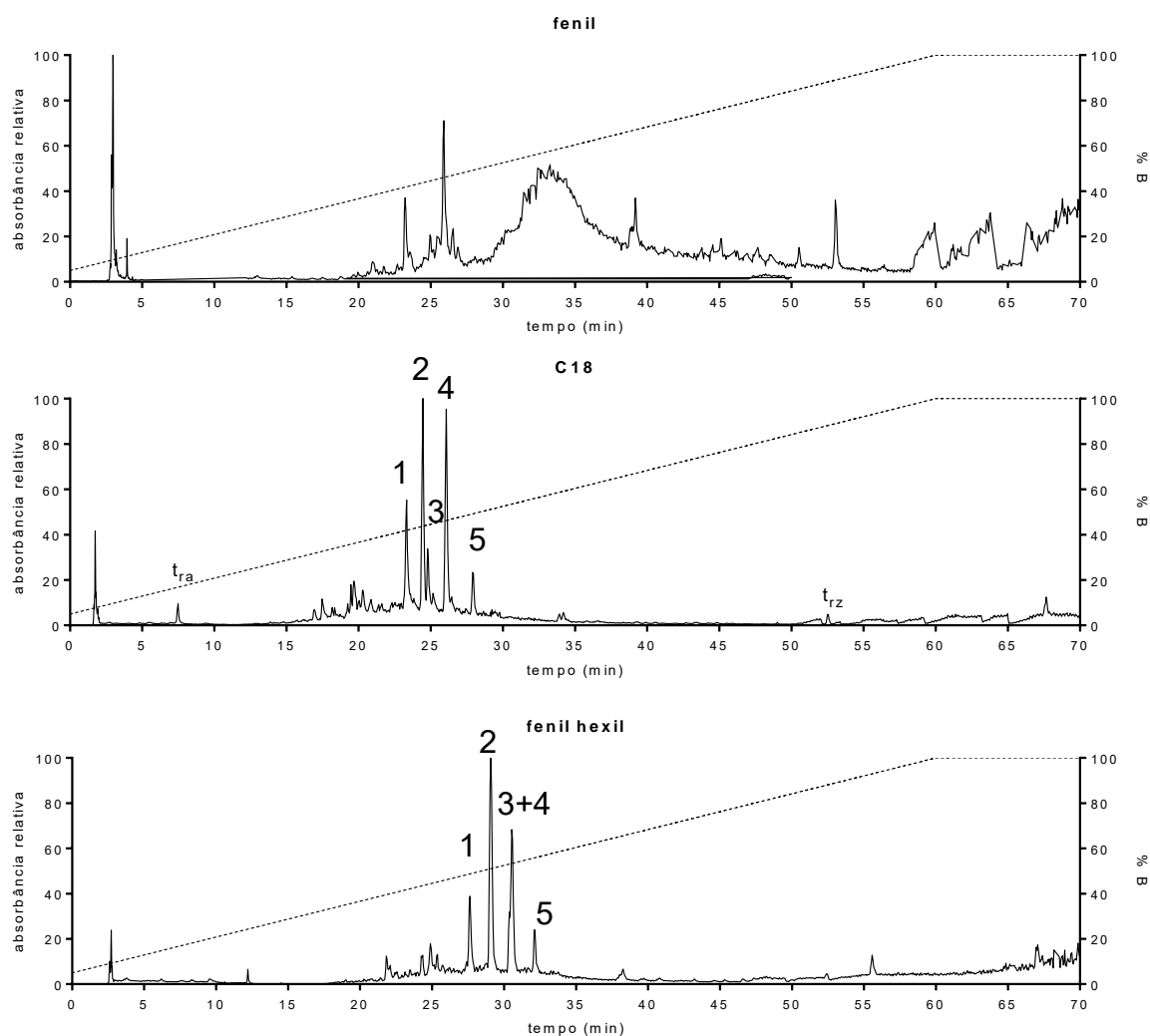


FIGURA 4.33 - Cromatogramas das análises para escolha da fase estacionária. Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,1%; Fase B: ACN/HCOOH 0,1%; Gradiente: 5 -100%, 60min, 100% 10 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão: 1000  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vol. injeção: 5  $\mu\text{L}$ ; Temperatura: 40°C

A fase estacionária também influencia significativamente a eficiência do método, através de  $N$ . Nesse caso, não é a natureza da fase estacionária, mas o tamanho da coluna cromatográfica é que influencia diretamente  $N$ . Pensando na analogia com a coluna de destilação, quanto maior o comprimento da coluna, maior o número de pratos teóricos e, portanto, maior o número de eventos de equilíbrio de partição do analito com a fase móvel e a fase estacionária. Dessa forma, quando a força da fase móvel é alterada por uma pequena diferença, como o aumento na concentração da fase orgânica, as moléculas de um analito tendem a ser eluídas em um curto intervalo de tempo, tornando a banda cromatográfica mais estreita.

As colunas Gemini<sup>®</sup> C18 e Luna<sup>®</sup> Fenil-hexil apresentaram uma boa separação cromatográfica na análise inicial. Essas colunas possuem comprimentos

de 150 mm e 250 mm, respectivamente, o que tornava a coluna fenil-hexil a mais indicada. Com base nos cromatogramas obtidos, foi calculada a média do N obtido para as bandas cromatográficas mais intensas ( $N_{\text{médio}}$ ) para cada uma delas, obtendo-se 256.450 pratos. $m^{-1}$  para C18 e 115.771 pratos. $m^{-1}$  para fenil-hexil, respectivamente o que as tornava boas opções.

Como as bandas cromatográficas principais estavam bastante estreitas para as duas fases estacionárias, a escolha foi feita com base nos aspectos práticos da análise, principalmente em rotinas de laboratório. A coluna contendo a fase C18 foi escolhida pelo fato de ser uma coluna menor, o que requereria um tempo menor de reequilíbrio entre corridas em uma eluição gradiente.

No cromatograma obtido para a fase C18, é possível ainda observar que a primeira banda cromatográfica teve um  $t_r$  de 7,48 min ( $t_{ra}$ ) e a última, um  $t_r$  de 52,20 min ( $t_{rz}$ ). De acordo com o método proposto por Snyder e Dolan<sup>214</sup>, se a razão da diferença entre os tempos e retenção da primeira e da última bandas cromatográficas e o tempo de gradiente ( $t_G$ ) exceder 0,40, a faixa de retenção para a amostra é muito ampla para um modo de eluição isocrático e deve-se optar pelo modo de eluição gradiente. Para o *pool* dos extratos, a razão foi 0,75 e, portanto, modo de eluição gradiente foi utilizado.

#### - planejamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico: triagem de variáveis

Com a definição da fase estacionária, N estava ajustado, mas ainda faltavam  $k$  e  $\alpha$ , os quais foram ajustados por estratégias de planejamento experimental. O parâmetro  $k$  foi ajustado para a faixa apropriada através do controle da força da fase móvel, aumentado ou diminuindo a proporção de água ou solvente orgânico na mesma. O fator de retenção  $\alpha$  foi ajustado pela escolha do solvente orgânico a ser utilizado na fase móvel, que poderia influenciar a separação das bandas por meio de 3 parâmetros de seletividade fundamentados nas interações com as moléculas do analito: aceitação de prótons ( $x_e$ ), doação de prótons ( $x_d$ ) e atrações dipolares ( $x_n$ )<sup>215</sup>. Entre os 3 solventes mais comumente utilizados na cromatografia em modo reverso, metanol (MeOH), tetraidrofurano (THF) e acetonitrila (ACN), o primeiro apresenta maior perfil para  $x_d$ , ao passo que o último tem maior caráter para  $x_e$  e tem características semelhantes ao THF em relação a  $x_n$  (TABELA 4.6).

TABELA 4.6 - Parâmetros de seletividade para os solventes orgânicos comumente utilizados na fase móvel em HPLC. Extraído de SNYDER<sup>215</sup>

<b>solvente</b>	<b><math>\alpha_e</math></b>	<b><math>\alpha_d</math></b>	<b><math>\alpha_n</math></b>
ACN	0,31	0,27	0,42
MeOH	0,48	0,22	0,31
THF	0,38	0,20	0,42

Além desses, outros fatores que também poderiam influenciar  $k$  e  $\alpha$ , como o pH e a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna cromatográfica foram incluídos no planejamento experimental. Amostras como os extratos vegetais geralmente possuem compostos ionizáveis. Nesses casos, ajustar corretamente o pH da fase móvel seria essencial para obter uma boa separação cromatográfica, visto que, moléculas ionizadas teriam o seu caráter hidrofóbico reduzido devido à presença da carga, diminuindo a interação com a fase estacionária e possivelmente a seletividade, principalmente se a diferença entre os tempos de retenção dos analitos for pequena.

O aumento da temperatura poderia levar a uma diminuição das interações hidrofóbicas dos analitos com a fase estacionária levando a uma menor retenção. Já o aumento da vazão da fase móvel representaria uma maior quantidade de fase móvel em contato com a fase estacionária por intervalo de tempo, resultando em maior na afinidade dos analitos retidos pela fase móvel, o que reduziria  $\alpha$ . Com a vazão alta, poderia ocorrer também a coeluição de bandas cromatográficas, com perda de seletividade. Por outro lado, com a vazão baixa, a quantidade de solvente pode não ser suficiente para promover a eluição de um maior número de moléculas em um curto intervalo de tempo, levando a um alargamento de banda e comprometendo assim a eficiência do método.

De um modo geral, durante o desenvolvimento de um método cromatográfico, todos os fatores acima são otimizados usando a estratégia de uma variável de cada vez. Essa estratégia, no entanto, apresenta uma série de desvantagens, como um número muito grande de experimentos. Muitas vezes as condições consideradas ótimas para alguns parâmetros podem desfavorecer outros e, talvez o mais importante, as possíveis interações entre as variáveis não são observadas.

A utilização de ferramentas quimiométricas na otimização de um método cromatográfico é uma prática bastante utilizada por minimizar o número de experimentos necessários para esta finalidade. Isto leva a uma economia de tempo

e de solventes orgânicos e por permite visualizar interações entre as variáveis, na maioria das vezes relevante para uma boa separação dos analitos, principalmente em casos de misturas muito complexas<sup>216</sup>.

A avaliação dos fatores mencionados em relação à influência na separação dos analitos presentes nos extratos das folhas de amoreira foi realizada por um planejamento fatorial fracionado com 32 experimentos, nos quais os contrastes principais estavam confundidos com os de mais alta ordem de interação (5 fatores), os de menor contribuição.

Sabe-se que quanto mais alta a ordem, maior o efeito da interação no contraste, sendo que o efeito das variáveis principais tem o maior grau de importância, embora não seja possível quantificar a contribuição de cada variável (ou interação) para o contraste. Os efeitos resultantes das interações de dois fatores estavam confundidos com os resultantes das interações de quarta ordem, assim como os de terceira ordem estavam confundidos entre si. Dessa forma, foi possível avaliar os contrastes principais de forma independente daqueles devidos às interações de primeira ordem.

Como o objetivo principal dessa otimização era obter o maior número de bandas cromatográficas bem resolvidas na linha de base, o valor de  $R_s$  calculado conforme a equação 1.2 para duas bandas cromatográficas adjacentes foi escolhido como variável dependente para essa etapa do planejamento<sup>217</sup>. Como a análise exploratória inicial mostrou que há mais de uma banda cromatográfica no pool de extratos, os valores de  $R_s$  foram convertidos em um único valor por meio da função matemática da desejabilidade total,  $D_{total}$  (ANEXO 3):

$$d_n = \begin{cases} 0,1; & \text{se } y < 1 \\ \left(\frac{y-1}{2-1}\right)^s; & \text{se } 1 \leq y \leq 2 \\ 1, & \text{se } y > 2 \end{cases} \quad \text{eq. 4.4}$$

$$D_{total} = \sqrt[n]{d_1^{s_1} \times d_2^{s_2} \times d_3^{s_3} \times d_4^{s_4} \times \dots \times d_n^{s_n}} \quad \text{eq. 4.5}$$

onde  $y$  é a  $R_s$  e  $s$  é o peso que foi atribuído da seguinte forma: se a  $R_s$  entre dois picos fosse igual ou maior que 2 em todos os experimentos, o peso atribuído para aquela  $R_s$  seria 1, caso contrário seria 2.<sup>218</sup>

Uma análise do gráfico de contrastes sugeriu que, dos seis fatores estudados, 4 foram significativos (A - pH da fase móvel, C - natureza do modificador orgânico, D - tempo do gradiente e F - concentração inicial de modificador orgânico

na fase móvel), FIGURA 4.34. Além disso, 3 interações entre duas variáveis (AF, DF e CF) também foram significativas.

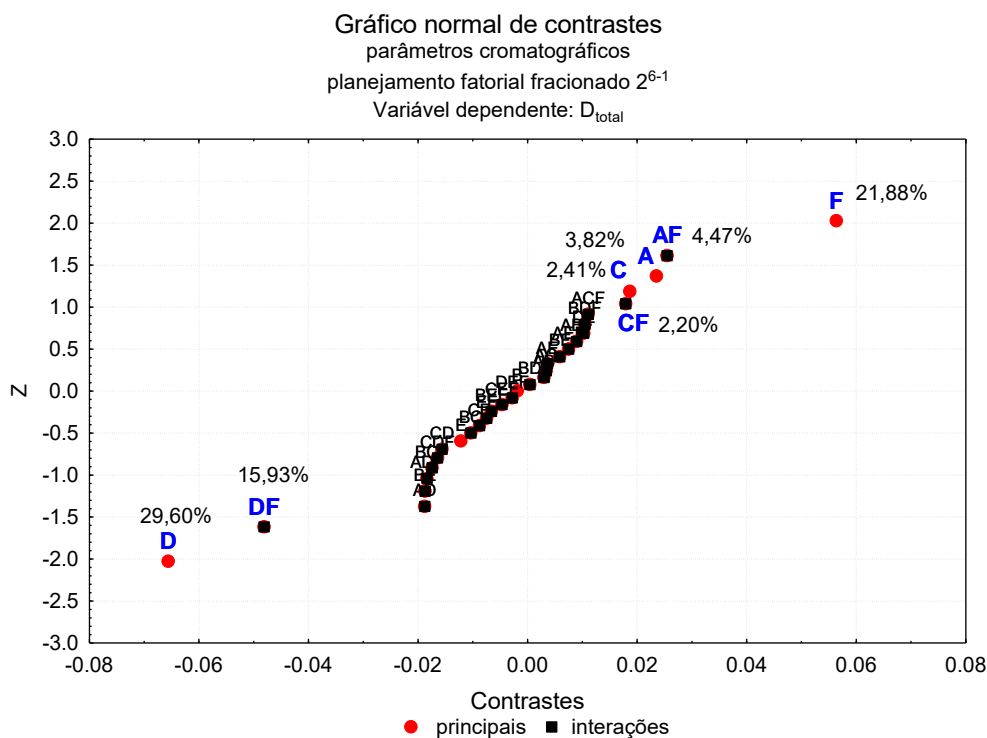


FIGURA 4.34 - Gráfico normal de contrastes para a etapa de triagem de variáveis da otimização dos parâmetros cromatográficos. A: pH da fase móvel; B: vazão da fase móvel; C: natureza do modificador orgânico; D: tempo de gradiente; E: temperatura do forno e F: concentração inicial do modificador orgânico na fase móvel.

Comparando-se os valores em módulo dos contrastes, observou-se que as interações AF e DF apresentaram uma influência maior que as variáveis principais A e C. Além disso, as três interações significativas envolviam fatores que afetam  $\alpha$  diretamente. Se essa mesma otimização tivesse sido realizada por metodologia de “*uma variável de cada vez*”, as interações não teriam sido observadas.

Inicialmente, essa otimização foi pensada como uma combinação do planejamento fatorial fracionado com a estratégia de misturas, com o objetivo de se obter a composição ideal para a fase móvel, com base na combinação dos parâmetros de seletividade  $x_e$ ,  $x_b$  e  $x_n$ <sup>219</sup>. Como o equipamento utilizado (Agilent 1200 series) contém partes internas e conexões constituídas por PEEK® (polietil éter cetona), o uso de THF foi descartado por reagir com o material polimérico; e os modificadores ACN e MeOH foram incorporados ao planejamento como uma variável a ser avaliada e significativa. O gráfico normal de contrastes (Figura 4.34) mostrou que o solvente utilizado na fase móvel apresentou um efeito positivo para a



seletividade, ou seja, quando se passou de MeOH para ACN a separação das bandas cromatográficas aumentou. Por isso, optou-se por utilizar ACN como modificador orgânico na próxima etapa da otimização.

#### - Modelagem da superfície de resposta

A etapa de modelagem da superfície de resposta é a otimização do método cromatográfico propriamente dito. O objetivo principal identificar qual a região do espaço químico de trabalho na qual seria possível obter a melhor separação. Entre as estratégias utilizadas para a modelagem da superfície, o planejamento de composto central é o que permite que os experimentos sejam realizados em um maior número de níveis: 2 na parte cúbica, 2 axiais e 1 central (FIGURA 4.35), levando a um melhor ajuste do modelo que descreve as condições ótimas.

As resoluções entre as bandas cromatográficas foram utilizadas como variáveis dependentes, assim como foi feito na etapa anterior. Nesse trabalho, o método seria utilizado em todo o estudo de caracterização do extrato de folhas de amoreira, mas ele também poderia ser utilizado em análises de rotina para monitoramento da qualidade dos extratos e principalmente, para o monitoramento da autenticidade do material vegetal. Dessa forma, decidiu-se que o tempo de retenção para o último analito observado ( $t_{rz}$ ) também deveria ser considerado como variável dependente no planejamento, visto que em análises de rotina, um menor tempo de análise é desejável por reduzir o consumo de solventes.

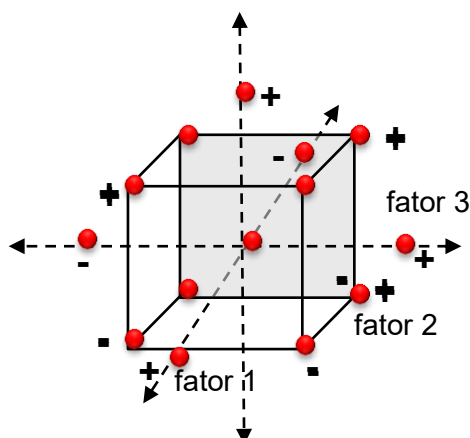


FIGURA 4.35 - Representações da distribuição dos experimentos no planejamento de composto central

Devido ao número de variáveis dependentes, os valores de Rs nessa etapa também foram transformados em funções de desejabilidade individuais, de acordo com as equações 4.3 e 4.4. Para a transformação dos valores de  $t_{rz}$ , foi utilizada a função matemática abaixo (equação 4.5), uma vez que o objetivo era minimizar o tempo total de análise, sem comprometer a seletividade e a eficiência do método.

$$d_{t_{rz}} = \begin{cases} 1; & \text{se } t_{rz} < L_i \\ \left( \frac{U_i - t_{rz}}{U_i - L_i} \right) & ; \text{se } L_i \leq t_{rz} \leq U_i \\ 0; & \text{se } t_{rz} > U_i \end{cases} \quad \text{eq. 4.6}$$

onde  $L_i$  e  $U_i$  são respectivamente o menor e o maior valor observados para  $t_{rz}$ . Os valores de  $D_{total}$  (calculados pela equação 4.3) obtidos para planejamento estão apresentados no ANEXO 4. As superfícies de respostas obtidas com base em um modelo matemático quadrático ( $r^2 = 0,8355$ ), descrito pela equação 4.6 (onde  $x_n$  representa o valor codificado para uma das 3 variáveis) estão ilustradas na FIGURA 4.36.

$$D_{total} = (0,118 \pm 0,022) + (0,0341 \pm 0,0097)x_1^2 + (0,0544 \pm 0,0097)x_2^2 + (0,0387 \pm 0,0097)x_3^2 \quad \text{eq. 4.7}$$

De acordo com os valores apresentados na análise ANOVA (TABELA 4.7), o modelo quadrático está bem ajustado ao conjunto de dados, o que também pode ser observado no gráfico de valores experimentais *versus* preditos (FIGURA 4.37A). O gráfico de resíduos, por sua vez, mostra que há homocedasticidade nas respostas observadas, visto que os resíduos não apresentam uma tendência (os valores flutuam em torno do zero) (FIGURA 4.37B). Além disso, o modelo explica 77,4% da variância total dos dados. Embora, à primeira vista esse valor possa parecer baixo, ele é satisfatório, uma vez que a função  $D_{total}$  resultou da combinação matemática de muitas respostas experimentais.

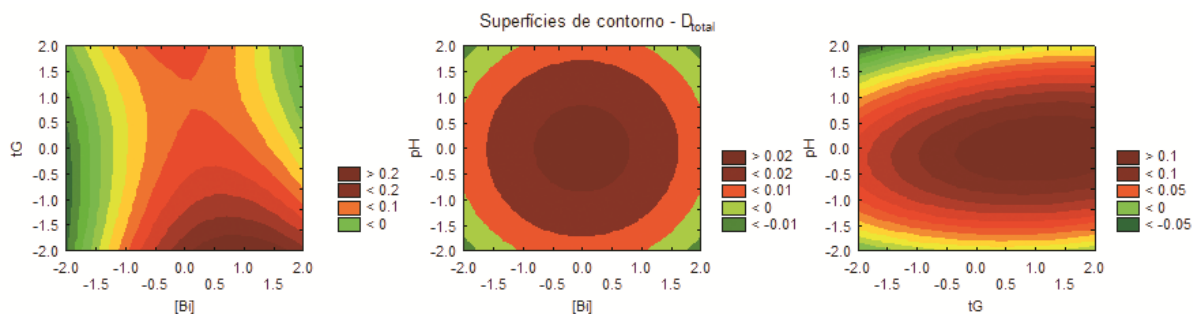


FIGURA 4.36 - Superfícies de resposta obtida para a otimização dos parâmetros cromatográficos. A terceira variável foi fixada no valor ótimo previsto pelo modelo.

TABELA 4.7 - Tabela ANOVA para o modelo gerado pelo planejamento de composto central para a otimização dos parâmetros cromatográficos

ANOVA – otimização para cromatografia					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	0,1010	3	0,03366	15,98	<0,0001
Resíduo	0,02949	14	0,02107		
F. ajuste	8,72E-5	11	7,93E-6	3,247	0,0662
Erro puro	7,33E-6	3	2,44E-6		
total	0,1305	17			
% variação máxima explicada				77,39	
% variação máxima explicável				99,99	

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; F: valor calculado para o teste F; p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ); F. ajuste: falta de ajuste

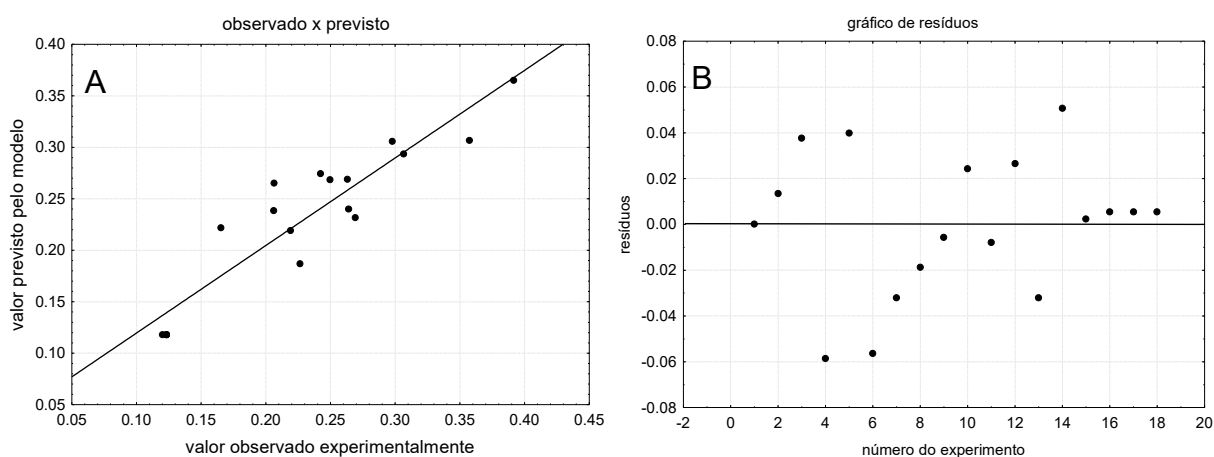


FIGURA 4.37 - A: Gráfico dos valores experimentais *versus* previstos pelo modelo matemático; B: gráfico da distribuição dos resíduos para a otimização dos parâmetros cromatográficos

Nas superfícies de contorno apresentadas na FIGURA 4.36 notou-se que no espaço experimental avaliado, havia uma região na qual seria possível obter boa seletividade em um tempo reduzido de análise. Uma condição foi escolhida

então nessa região e, de acordo com o modelo, a desejabilidade máxima ( $D_{max}$ ) seria 0,396 (TABELA 4.8). Experimentalmente o valor alcançado para  $D_{max}$  foi 0,364, próximo do valor teórico. Nessas condições, o método apresentou uma boa seletividade, eficiência e uma faixa de retenção bem distribuída no curto tempo de gradiente (FIGURA 4.38). Sendo assim, decidiu-se utilizar essas condições em todas as análises subsequentes do trabalho.

TABELA 4.8 - Parâmetros cromatográficos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta

Condições experimentais	%B <sub>i</sub>	t <sub>G</sub> (min)	pH	D <sub>max</sub> prevista	D <sub>max</sub> obtida
	18 (0,6)	10 (-2)	2.96 (+1)	0,396	0,364

Os valores entre parêntese indicam os fatores codificados no planejamento experimental

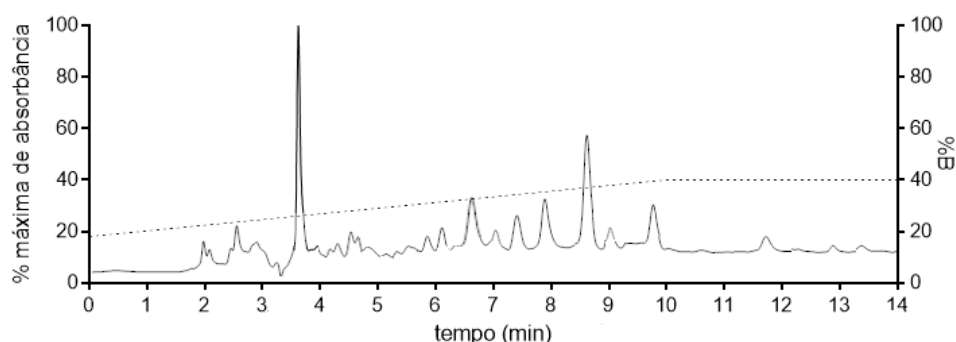


FIGURA 4.38 - Condições cromatográficas otimizadas para o método analítico. Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,025%; Fase B: ACN/HCOOH 0,025%; Gradiente: 18 -40%, 10min, 40% em 5 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão: 600  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vol. injeção: 5  $\mu\text{L}$ ; Temperatura: 40°C

## b) otimização dos parâmetros espectrométricos

Uma análise por espectrometria de massas é baseada em medidas de quantidades de íons. Portanto, para que os analitos separados na cromatografia sejam detectados em um espectrômetro é fundamental que os mesmos estejam ionizados. Uma vez carregados, os analitos ionizados são “conduzidos” desde o cone de Taylor (na fonte ESI) até o fotomultiplicador (detector do espectrômetro) por diferenças de potencial aplicadas nas diversas partes que constituem o espectrômetro. O ajuste correto dessas diferenças de potencial -ou energias- aplicadas, somado ao controle da pressão dos gases que ajudam na dessolvatação e eliminação de interferentes, foi de grande importância tanto para a identificação dos analitos quanto para a sensibilidade analítica de um método quantitativo. Caso os potenciais não estivessem bem ajustados, poucos íons atingiriam o detector,

comprometendo a análise.

A intensidade observada para as bandas cromatográficas principais foi escolhida como variável dependente. O espectrômetro utilizado (API 2000), todavia, possuía uma limitação técnica no tempo necessário para aquisição dos dados referentes a uma varredura completa da faixa de m/z de 200 a 800 u.m.a. Por isso, a faixa total de massas foi subdividida em intervalos de 100 u.m.a. e as análises foram realizadas simultaneamente nos modos de ionização positivo e negativo.

As intensidades observadas para cada subdivisão e, em cada polaridade, foram transformadas em funções de desejabilidade (equação 4.7), com o objetivo de maximizar a resposta do detector. As funções individuais foram então combinadas na  $D_{total}$  conforme a equação 4.4 com valores apresentados no ANEXO 5.

$$d_{int_n} = \begin{cases} 0; & \text{se } int_n < L_i \\ \left(\frac{int_n - L_i}{U_i - L_i}\right) & ; \text{se } L_i \leq int_n \leq U_i \\ 1; & \text{se } int_n > U_i \end{cases} \quad \text{eq. 4.8}$$

onde  $int_n$  é a intensidade observada no cromatograma de íons totais (TIC) para uma banda cromatográfica,  $L_i$  e  $U_i$  são respectivamente o menor e o maior valor observados para  $int_n$ .

As superfícies de respostas obtidas (FIGURA 4.39) foram baseadas em no modelo quadrático descrito pela equação 4.8 (onde  $x_n$  representa o valor codificado para uma das 7 variáveis).

$$y = (0,0339 \pm 0,0069)x_1 + (0,0238 \pm 0,0069)x_2 - (0,0242 \pm 0,069)x_3 - (0,0427 \pm 0,069)x_4 - (0,0741 \pm 0,0069)x_5 + (0,0256 \pm 0,0062)x_5^2 + (0,0269 \pm 0,0069)x_6 + (0,0325 \pm 0,0069)x_7 + (0,0327 \pm 0,0085)x_1x_2 - (0,0268 \pm 0,0085)x_1x_3 - (0,0340 \pm 0,0085)x_1x_4 - (0,0231 \pm 0,0085)x_1x_5 - (0,0240 \pm 0,0085)x_1x_6 \quad \text{eq. 4.9}$$

De acordo com os valores apresentados na ANOVA (TABELA 4.9), o modelo quadrático está bem ajustado ao conjunto de dados, o que também pode ser observado no gráfico de valores experimentais *versus* preditos (FIGURA 4.40A). O gráfico de resíduos, por sua vez, mostra que há homocedasticidade nas respostas observadas, visto que os resíduos não apresentam uma tendência, flutuando os valores em torno do zero (4.40B).

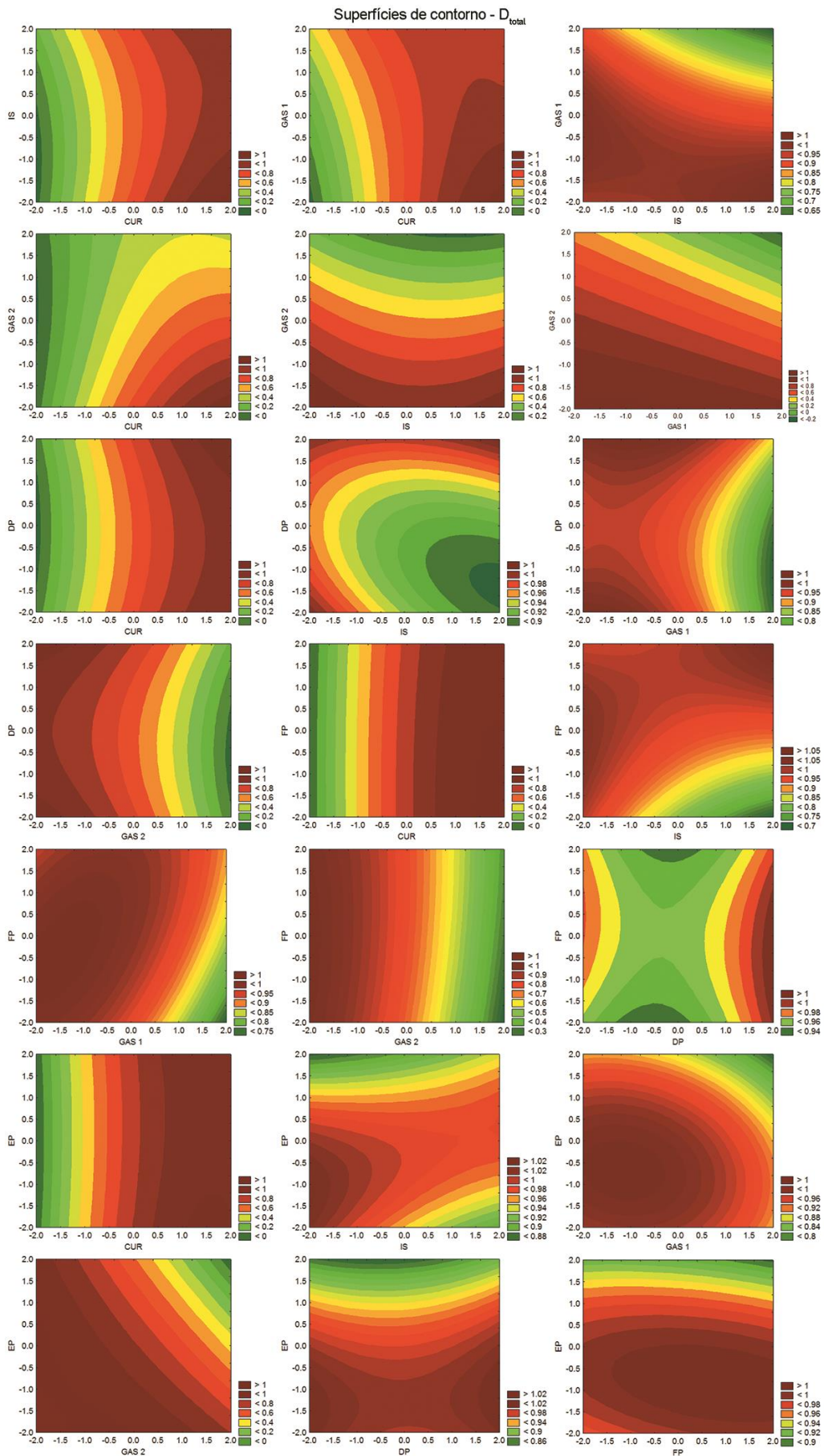


FIGURA 4.39 - Superfícies de resposta obtida para a otimização dos parâmetros espectrométricos. A terceira variável foi fixada no valor ótimo previsto pelo modelo.

TABELA 4.9 - Tabela ANOVA para o modelo gerado pelo planejamento de composto central para otimização dos parâmetros espectrométricos

ANOVA – otimização para espectrometria					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	0,3679	12	0,03066	64,85	<0,0001
Resíduo	0,009457	20	4,73E-4		
F. ajuste	8,33E-10	18	4,63E-11	1,389	0,2401
Erro puro	6,67E-11	2	3,33E-11		
total	0,3774	32			
% variação máxima explicada				97,49	
% variação máxima explicável				100,00	

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; F: valor calculado para o teste F; p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ); F. ajuste: falta de ajuste

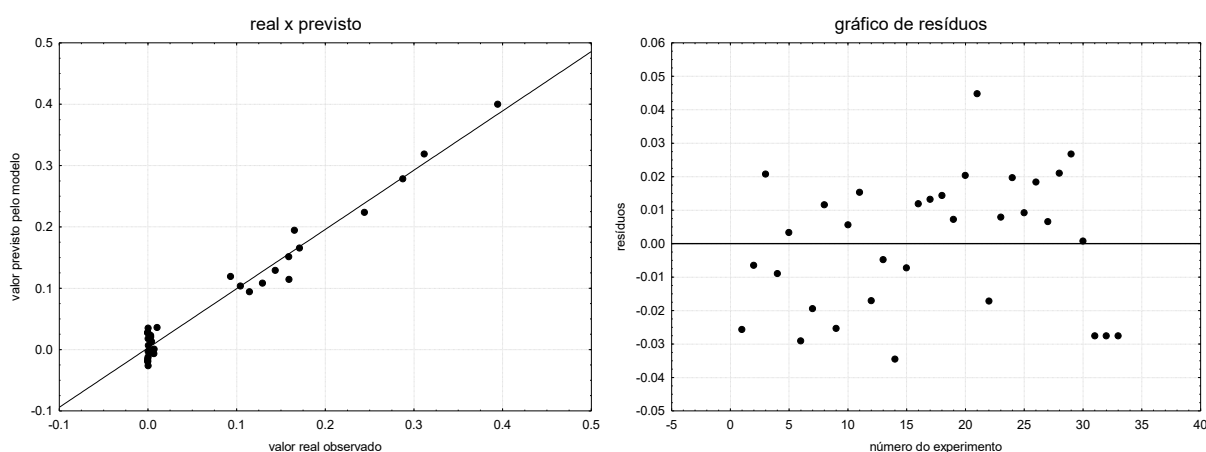


FIGURA 4.40 - A: gráfico de valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo quadrático. B: gráfico de resíduos para a otimização dos parâmetros espectrométricos

Nas superfícies de contorno apresentadas foi possível observar que, no espaço experimental avaliado, havia uma região onde seria possível obter as intensidades mais altas para as bandas cromatográficas no TIC do extrato. Nessa região, foram escolhidas as condições apresentadas na TABELA 4.10. De acordo com o modelo, a  $D_{total}$  obtida nessas condições seria 0,3996. Experimentalmente o valor alcançado para a variável dependente foi 0,3947 e o cromatograma de íons totais obtido apresentou boa intensidade para todas as faixas de  $m/z$  avaliadas (200-700 u.m.a) tanto no modo positivo, quanto no modo negativo de análise (FIGURA 4.38). Sendo assim, decidiu-se utilizar essas condições nas análises LC-MS subsequentes.

TABELA 4.10 - Parâmetros espectrométricos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta

Condições experimentais	CUR	IS	GAS 1	GAS 2	DP	FP	EP	D <sub>max</sub> prevista	D <sub>max</sub> obtida
	45 (1)	4.000 (1)	50 (-1)	13,3 (-1)	50 (-1)	312 (1)	10,2 (+1)	0,3996	0,3947

Os valores entre parêntese indicam os fatores codificados no planejamento experimental

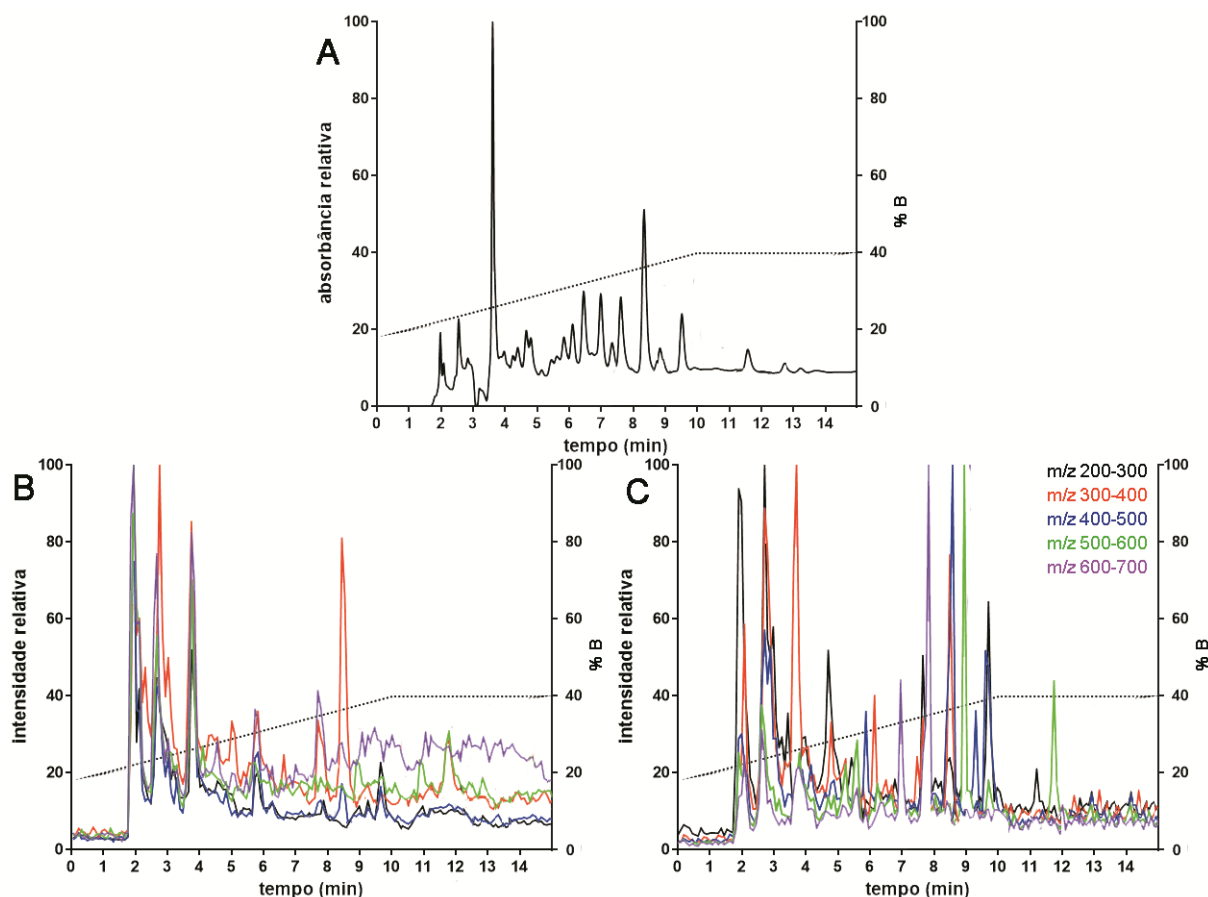


FIGURA 4.41 - Análise cromatográfica do *pool* de extratos com detecção em DAD (A) e nas condições otimizadas para os parâmetros espectrométricos nos modos negativo (B) e positivo (C). Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,025%; Fase B: ACN/HCOOH 0,025%; Gradiente: 18 - 40%, 10min, 40% em 5 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão: 600  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>. Vol. injeção: 5  $\mu$ L; Temperatura: 40°C. CUR: 45 psi; IS: 4keV; TEMP: 400; GAS 1: 50 psi; GAS 2: 13,3 psi; DP: 50 eV; FP: 312 eV; EP: 10,2 eV.

#### 4.3.2.2.2 - APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA.

a) análise dos extratos testados nos ensaios celulares para estrogenicidade

Todos os extratos testados nos ensaios celulares (seção 3.2) foram analisados por LC-DAD-MS nas condições experimentais otimizadas. Ferramentas



quimiométricas de análise exploratória e reconhecimento de padrões foram aplicadas para identificar o perfil químico que melhor explicasse a atividade estrogênica. Para essas análises foram utilizados os cromatogramas obtidos com detecção por DAD.

Na análise da mistura de extratos utilizada para a otimização do método analítico, notou-se que a absorbância era mais intensa nas regiões de 260 nm e de 320 nm para a maioria das bandas cromatográficas (FIGURA 4.42). A fim de maximizar o sinal analítico, esses dois comprimentos de onda foram selecionados para a obtenção dos cromatogramas utilizados nas análises qualitativas e quantitativas dos extratos que estão descritas a partir dessa seção.

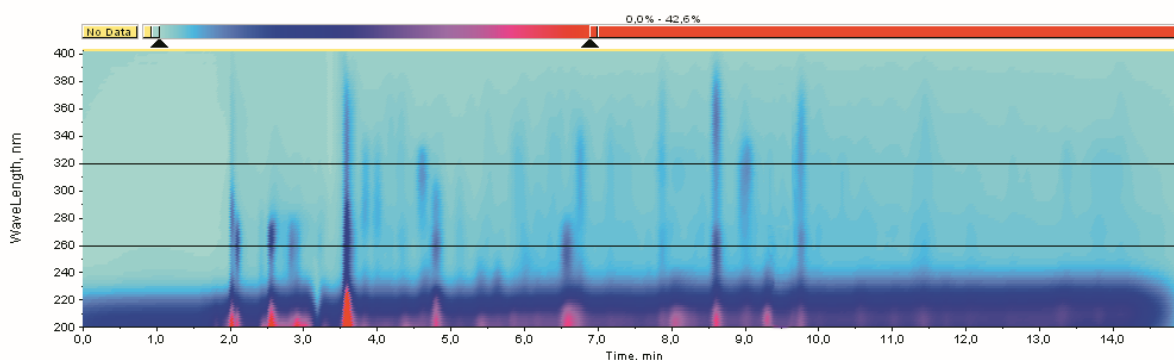


FIGURA 4.42 - Superfície de contorno de absorção da região espectral de 200 a 400 nm para a amostra do pool de extratos utilizado na otimização do método analítico.

A superposição dos cromatogramas dos 21 extratos analisados mostrou que, em termos qualitativos, os mesmos apresentaram um perfil químico bastante similar nos dois comprimentos de onda selecionados (FIGURA 4.43). As análises quimiométricas de reconhecimento de padrões foram então realizadas com base nas áreas obtidas para as bandas cromatográficas numeradas de 1 a 13, as quais foram submetidas previamente a um auto-escalamento (eq. 4.2) para que as contribuições dos analitos na classificação tivessem pesos similares, não sendo influenciadas pelas respectivas absorvidades ou concentrações.

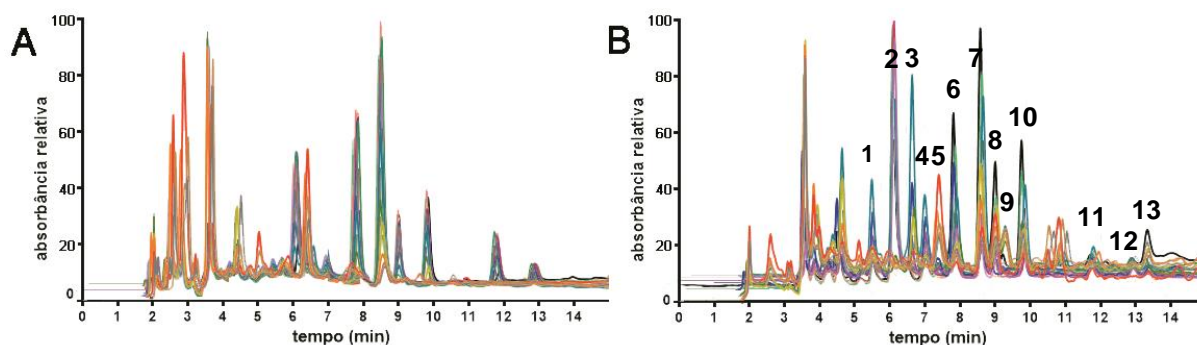


FIGURA 4.43 - Superposição dos cromatogramas para os 21 extratos de folhas de amoreira testados para a atividade estrogênica obtidos em 260 nm (A) e 320 nm (B). Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,025%; Fase B: ACN/HCOOH 0,025%; Gradiente: 18 - 40%, 10min, 40% em 5 min; Detecção: DAD 200-400 nm; Vazão: 600  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vol. injeção: 5  $\mu\text{L}$ ; Temperatura: 40°C.

Uma análise exploratória baseada em agrupamento hierárquico (HCA) foi realizada inicialmente, na qual a similaridade foi calculada através da distância euclidiana entre as amostras e as conexões foram realizadas conforme o método de Ward. O dendrograma obtido para o comprimento de onda de 260 nm mostrou a formação de 4 grupos (FIGURA 4.44A). Em três deles, houve uma correspondência entre o resultado observado no ensaio de estrogenicidade: agonismo total para os dois grupos localizado nas parte superior do dendrograma e citotoxicidade para o grupo na parte inferior. No outro grupo, um extrato que levou à morte das células, aquele preparado com 80% EtOH (v/v) foi agrupado com alta similaridade juntamente com os extratos preparados com 50 a 75% EtOH (v/v), que estimularam o crescimento celular).

O dendrograma da HCA realizado com os cromatogramas obtidos no comprimento de onda 320 nm também mostrou a formação de quatro agrupamentos principais (FIGURA 4.44B). Os resultados para esse segundo dendrograma mostraram agrupamentos que melhor se aproximavam dos conjuntos observados no teste de estrogenicidade, embora um extrato que estimulou o crescimento celular,, preparado com 75% etanol (v/v) tenha sido agrupado juntamente com os que levaram à morte das células.

Nas análises de HCA foram observados grupos importantes que poderiam estar associados à atividade biológica. No entanto, nenhuma informação em relação às bandas cromatográficas que mais estariam contribuindo para os agrupamentos poderia ser obtida por HCA. Sendo assim, os mesmos conjuntos de dados foram analisados por PCA.

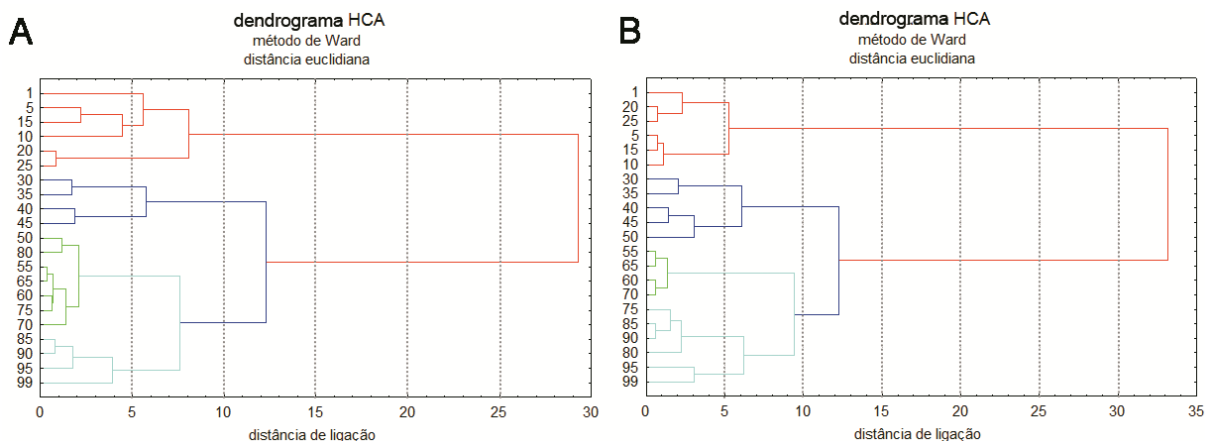


FIGURA 4.44 - Dendrogramas da HCA realizadas com os cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira obtidos em 260 nm (A) e 320 nm (B)

Na PCA realizada com os cromatogramas obtidos em 320 nm não foi possível obter um modelo no qual se observasse a formação de grupos que pudessem explicar a atividade biológica. Em contrapartida, a análise com 4 componentes principais explica 96,6% da variância total do conjunto de dados (FIGURA 4.42).

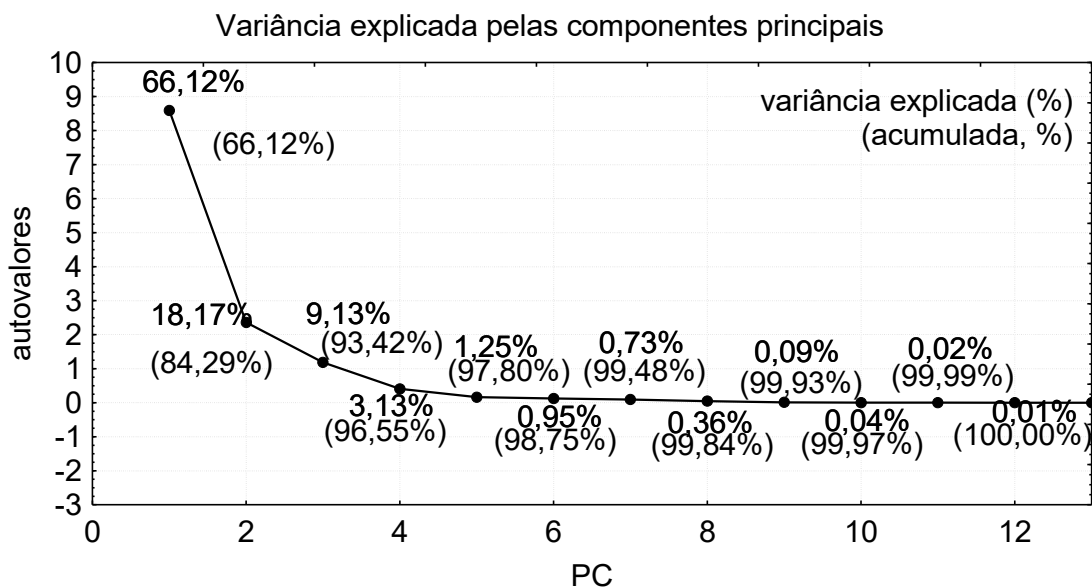


FIGURA 4.45 - Variância explicada por cada PC na PCA realizada com base nos cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira obtidos em 260 nm.

Inicialmente tentou-se fazer uma análise com as 3 primeiras componentes (PC1, PC2 e PC3), que explicaram 66,12%, 18,17%.e 9,13% da variância total respectivamente. Entretanto, o resultado dessa análise foi inconclusivo Quando se substituiu a PC3 pela PC4, que explicou 3,13%, totalizando aproximadamente 87% de toda a variância contida no conjunto de dados foi possível

obter uma classificação dos extratos que se assemelhava aos resultados obtidos no teste de estrogenicidade. No gráfico de escores para essas três componentes, observou-se que as amostras dos extratos foram separadas em 3 grupos: (i) aqueles que estimularam o crescimento celular como agonistas totais (preto); (ii) os que estimularam como agonistas parciais (azul) e (iii) os que induziram a morte celular (vermelho e verde) (FIGURA 4.46A). A classificação apresentou uma boa associação com o resultado da atividade biológica, mesmo não conseguindo separar os extratos que foram muito tóxicos para as células daqueles que apresentaram toxicidade moderada, o que aconteceu provavelmente devido ao baixo número de amostras representativas dessa classe.

Na análise do gráfico de escores (FIGURA 4.46A), as 3 componentes foram necessárias para explicar a separação descrita. A PC1 separou principalmente os extratos mais estrogênicos dos demais. A PC2 contribuiu para separar aqueles que estimularam o crescimento daqueles que levaram à morte das células. A PC4, por sua vez, foi importante para separar os extratos que estimularam parcialmente o crescimento daqueles que induziram o processo apoptótico, o que não foi possível observar na PC1.

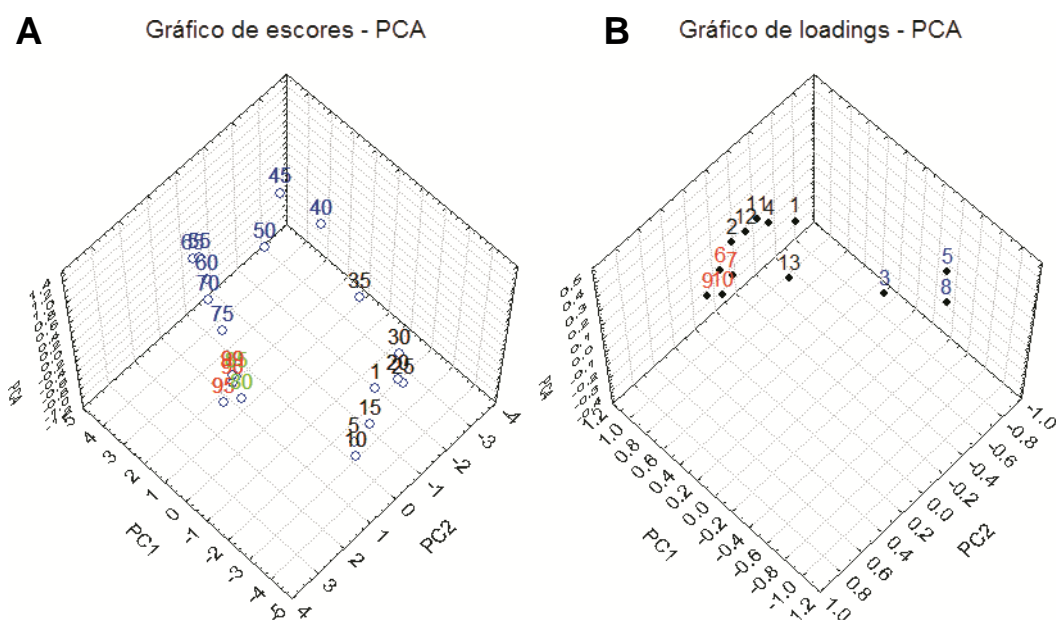


FIGURA 4.46 - Gráfico de *scores* e *loadings* para a PCA (PC1xPC2xPC4) realizada com base nos cromatogramas obtidos em 260 nm para os extratos.

No gráfico de *loadings*, as áreas das bandas cromatográficas **3**, **5** e **8** (Figura 4.43) tiveram valores positivos para a PC1, o que indica que elas tiveram um

peso maior na formação do grupo de maior estrogenicidade (FIGURA 4.43B). Na PC2, as áreas das bandas cromatográficas **6, 7, 9 e 10** (Figura 4.43) apresentaram valores pequenos e positivos, tendo um peso maior no agrupamento das amostras que levaram à morte celular. Na PC4, os pesos para as áreas das mesmas bandas cromatográficas possuíam valores negativos, indicando novamente que elas influenciaram o agrupamento dos extratos tóxicos. Já as áreas das bandas **1,2, 4, 11, 12 e 13** (Figura 4.43) apresentaram valores positivos para essa componente e, portanto, tiveram um peso maior na separação dos extratos que estimularam parcialmente o crescimento celular.

Semelhanças entre alguns perfis de absorção foram observadas nas análises dos espectros UV das bandas cromatográficas de **1 a 13**, indicando que esses analitos pertenceriam a uma mesma classe química (FIGURA 4.47). As informações provenientes do detector DAD, associadas aos cromatogramas obtidos por LC-MS contribuíram para a identificação dos analitos, confirmando os resultados obtidos nas análises FT-ICR-MS.

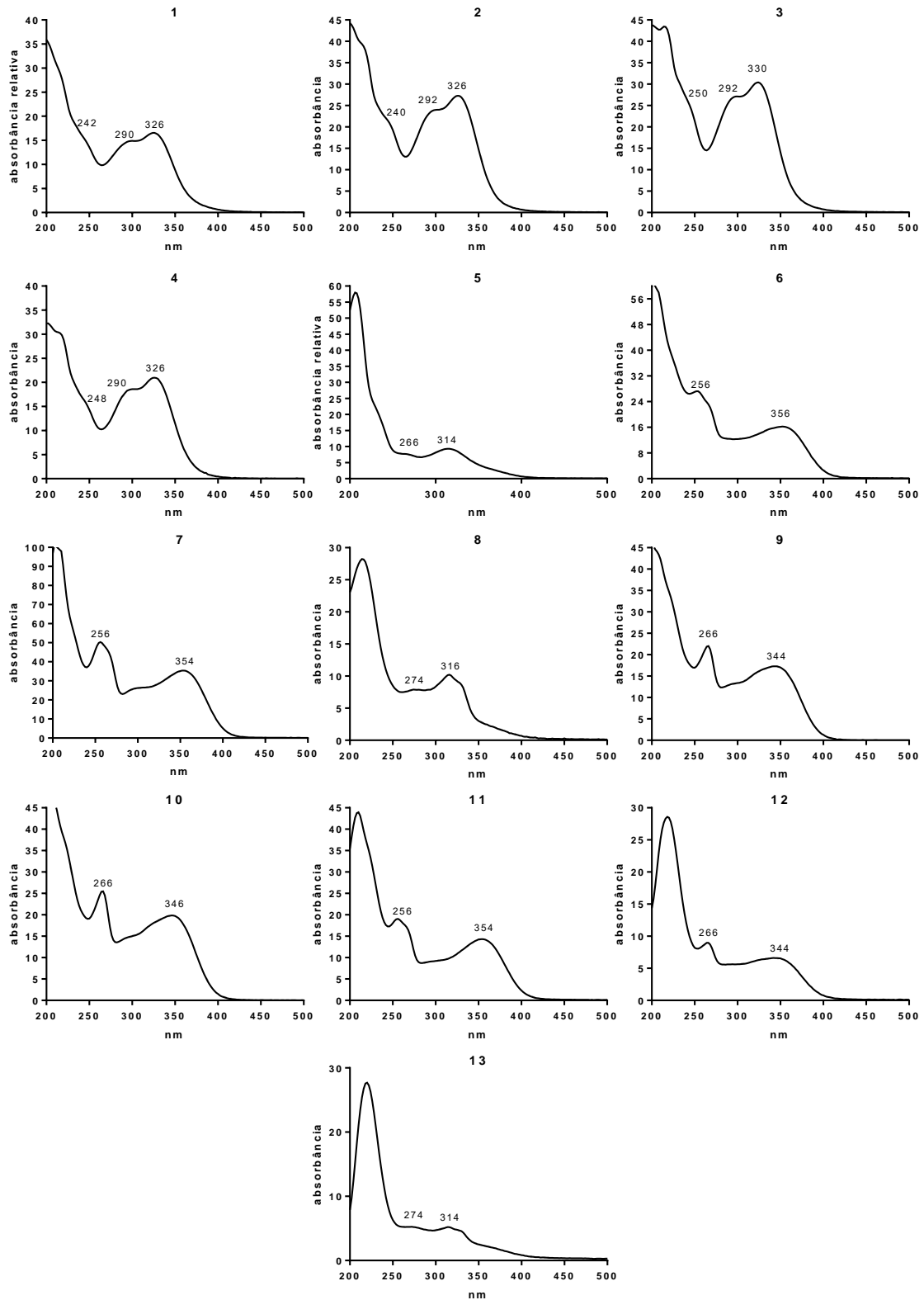


FIGURA 4.47 - Espectros de absorção na região de 200 a 500 nm para as bandas identificadas nos cromatogramas dos extratos de folhas de amoreira da figura 4.43

Para a identificação desses analitos, os espectros de absorvância foram analisados conjuntamente com os espectros de massas sequenciais (MS/MS). Cromatogramas LC-MS foram obtidos paralelamente aos espectros LC-DAD utilizados nas análises quimiométricas e forneceram informações relacionadas aos possíveis íons quasimoleculares presentes nos analitos. Para obter informações relacionadas à estruturas químicas associadas às bandas **1** a **13**, uma boa fragmentação do íon quasimolecular seria fundamental e ela somente seria alcançada com o ajuste apropriado dos parâmetros instrumentais. A escolha do extrato preparado com solução hidroalcoólica 50% (v/v) foi devido ao fato de que esse extrato possuiu as bandas cromatográficas com as maiores intensidades.

Para uma análise MS/MS, além dos parâmetros já otimizados anteriormente, havia outros, diretamente relacionados à fragmentação dos íons de interesse que deveriam ser ajustados. O gás de colisão ativada por dissociação (CAD) é um gás inerte, aqui usado N<sub>2</sub>, injetado na cela de colisão (Q2) para colidir, como o próprio nome diz, com os íons precursores, gerando assim os íons fragmentos. A CE é uma diferença de potencial aplicada entre o Q0 e o Q2, que acelera os íons precursores para a entrada no Q2, aumento a energia dos mesmos, favorecendo as colisões com as moléculas do CAD e conseqüentemente fragmentando estes íons. O último parâmetro é a CXP, uma diferença de potencial aplicada entre a saída do Q2 e entrada do Q3, que tem como objetivo acelerar os íons fragmento em direção ao terceiro quadrupolo. Os 3 parâmetros foram ajustados por meio de um planejamento de composto central com 16 experimentos executados aleatoriamente. Como o objetivo seria obter sinais mais intensos para assim fazer a elucidação estrutural dos analitos, as intensidades máximas observadas nos cromatogramas de íons produto para cada analito (nos modos positivo e negativo de análise) foram utilizadas como variáveis dependentes no planejamento. Essas intensidades foram transformadas em funções de desejabilidade de acordo com as equações 4.3 e 4.4. Os experimentos realizados estão apresentados no ANEXO 6.

A superfície de resposta obtida (FIGURA 4.48) foi baseada em um modelo quadrático descrito pela equação 4.9 (onde x<sub>n</sub> representa o valor codificado para uma das 3 variáveis).

$$y = (0,022478 \pm 0,00092) + (0,01660 \pm 0,00035)x_1 - (0,19212 \pm 0,00035)x_2 + (0,02058 \pm 0,0035)x_2^2 - (0,06393 \pm 0,0035)x_3 - (0,02068 \pm 0,00035)x_3^2 - (0,01271 \pm 0,00049)x_1x_2 + (0,09215 \pm 0,00049)x_2x_3 \quad \text{eq. 4.10}$$

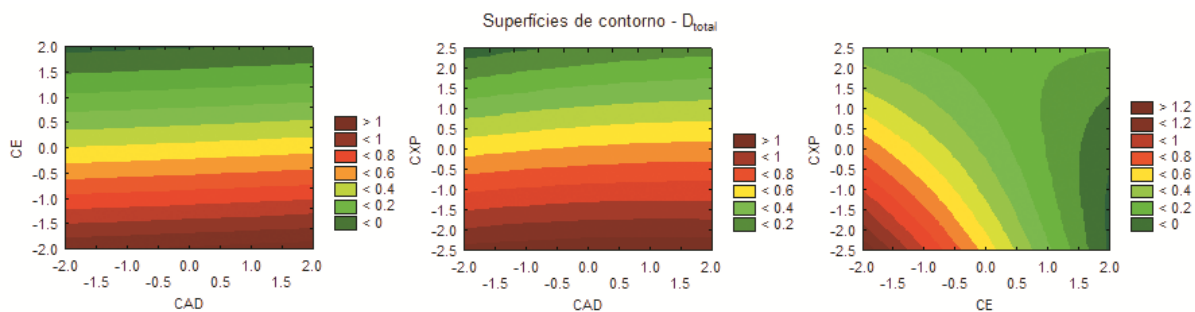


FIGURA 4.48 - Superfície de resposta obtida para a otimização dos parâmetros espectrométricos de fragmentação. A terceira variável foi fixada no valor ótimo previsto pelo modelo.

De acordo com os valores apresentados na ANOVA (TABELA 4.11), o modelo quadrático foi bem ajustado ao conjunto de dados, o que também pode ser observado no gráfico de valores experimentais *versus* preditos (FIGURA 4.49A). O gráfico de resíduos, por sua vez, mostrou que houve homocedasticidade nas respostas observadas, visto que os resíduos não apresentaram uma tendência, variando os valores em torno do zero (4.49B).

TABELA 4.11 - Tabela ANOVA para o modelo gerado para otimização dos parâmetros espectrométricos de fragmentação

<b>ANOVA – otimização para espectrometria</b>					
<b>variação</b>	<b>SQ</b>	<b>g.l.</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Regressão	0,7435	15	0,04957	20,53	<0,0001
Resíduo	0,0131	8	0,002414		
F. ajuste	5,51E-4	7	7,87E-5	2,351	0,08436
Erro puro	3,35E-5	1	3,35E-5		
total	0,7630	15			
% variação máxima explicada				97,44	
% variação máxima explicável				99,99	

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática;  
 F: valor calculado para o teste F; p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ); F. ajuste: falta de ajuste



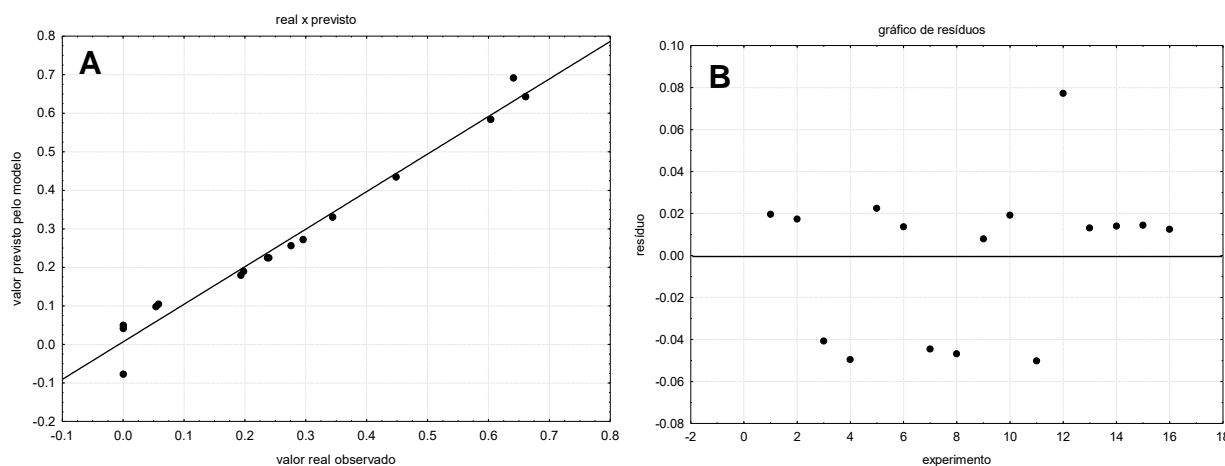


FIGURA 4.49 - A: gráfico de valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo quadrático. B: gráfico de resíduos para os parâmetros espectrométricos de fragmentação

Nas superfícies de contorno apresentadas na FIGURA 4.48, foi observado que, no espaço experimental avaliado, havia uma região onde seria possível obter as intensidades mais altas para as bandas cromatográficas no cromatograma de íons totais do extrato. Nessa região, foram escolhidas as condições listadas na TABELA 4.12. De acordo com o modelo, a  $D_{total}$  obtida nessas condições seria 0,6437. Experimentalmente o valor alcançado para a variável dependente foi 0,6611 e os espectros MS/MS apresentaram intensidade satisfatória para todos os íons. Para alguns analitos não foi possível obter os espectros MS/MS nos dois modos de ionização devido à baixa intensidade do sinal do íon precursor, que poderia ser devido à baixa concentração daquele composto ou à sua baixa capacidade de ionização, porém os espectros obtidos auxiliaram na sua identificação estrutural.

TABELA 4.12 - Parâmetros espectrométricos selecionados no espaço experimental na região ótima sugerida pelo modelo de superfície de resposta

Condições experimentais	CAD	CE	CXP	$D_{max}$ prevista	$D_{max}$ obtida
	9 (1)	36 (-1)	15 (-1)	0,6437	0,6611

Os valores entre parêntese indicam os fatores codificados no planejamento experimental

Os analitos **1 a 4** apresentaram um espectro de absorção característico dos ácidos cafeoilquínicos, com uma banda intensa na região de 324 nm e um ombro na região de 298 nm. Os espectros de massa sequenciais de íon-produto no modo negativo de ionização foram bastante similares para esses analitos, com o mesmo íon quasimolecular ( $[M-H]^-$ ) em  $m/z$  353 e íons-produtos em  $m/z$  191 (ácido

quínico), 179 (ácido cafeico) e 135 (perda da carboxila do ácido cafeico) indicando tratar-se de 4 isômeros estruturais de ácidos cafeoilquínicos. De acordo com resultados publicados na literatura, os quatros isômeros já identificados em extratos de folhas de amoreira seriam os ácidos 3-cafeoilquínico, clorogênico (5-cafeoilquínico), 4-cafeoilquínico e 1-cafeoilquínico<sup>220</sup> (FIGURA 4.50). No entanto, com base somente nos dados obtidos experimentalmente, sem o uso de padrões de referência, não foi possível associar as bandas cromatográficas com os respectivos isômeros.

O analito **5** apresentou um perfil de absorção característica de flavonoides (di-)*p*-cumaroilglicosilados, mais precisamente do campferol di-*p*-cumaroilglicosilado, com um ombro na região de 266 nm e uma banda mais intensa e mais larga na região de 314 nm<sup>221</sup>. O espectro de massas de íons produto em modo negativo sugere a presença desse analito pelos íons de  $m/z$  739 ( $[M-H]^-$ ),  $m/z$  593 (perda de uma molécula de ácido *p*-cumárico),  $m/z$  447 (perda da segunda molécula de ácido *p*-cumárico),  $m/z$  285 (campferol) e  $m/z$  163 (ácido *p*-cumárico) (FIGURA 4.51). Essa substância já foi identificada em folhas de *Morus alba* L<sup>222</sup>, porém nesse trabalho ela foi identificada apenas nos extratos preparados com um teor alcoólico máximo de 35%

Os analitos **6**, **7** e **11** apresentaram espectros de absorção bastante semelhantes, com duas bandas mais intensas de absorção, uma da região de 256 nm e a outra na região de 355 nm. Esse perfil é característico de flavonoides 3-O-glicosilados, principalmente dos derivados da quercetina. Os respectivos espectros de massas de íons produto, nos modos positivo e negativo confirmaram a classe pela presença do íon diagnóstico da quercetina,  $m/z$  301 (negativo) e  $m/z$  303 (positivo). O analito **6** foi identificado por MS/MS no modo negativo e no modo positivo como quercetina 3-O-rutinosídeo (rutina), pela presença do íon quasimolecular  $[M-H]^-$  ( $[M+H]^+$ ) em  $m/z$  609 (611) e dos íons produto em  $m/z$  463 (465), indicando a perda de uma molécula de ramnose, e em  $m/z$  301 (303), indicando a perda de uma molécula de glicose (FIGURA 4.52).

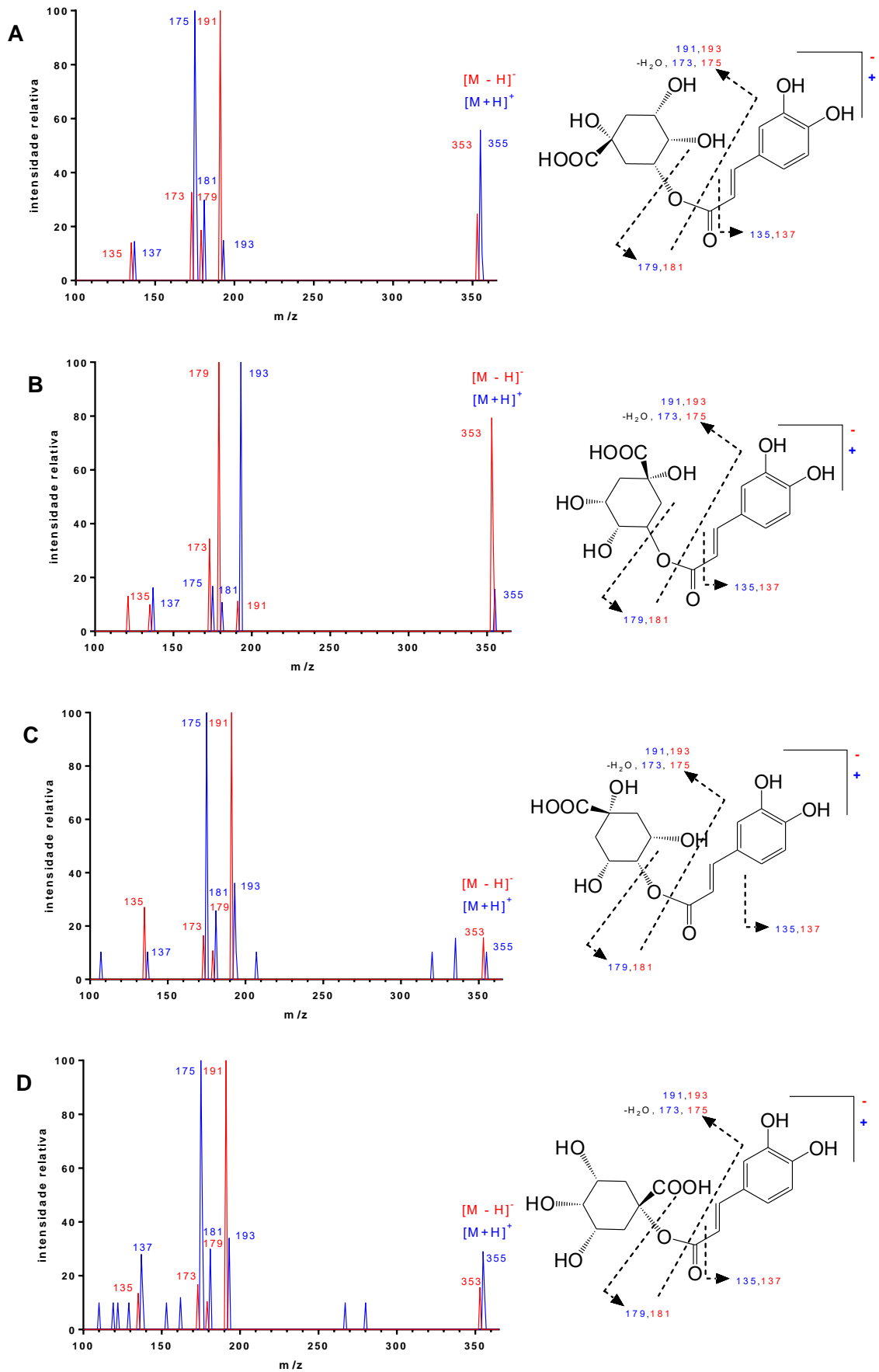


FIGURA 4.50 - Espectros MS/MS em modos negativo (vermelho) e positivo (azul) obtidos para os analitos 1, 2, 3 e 4, com as possíveis estruturas químicas.

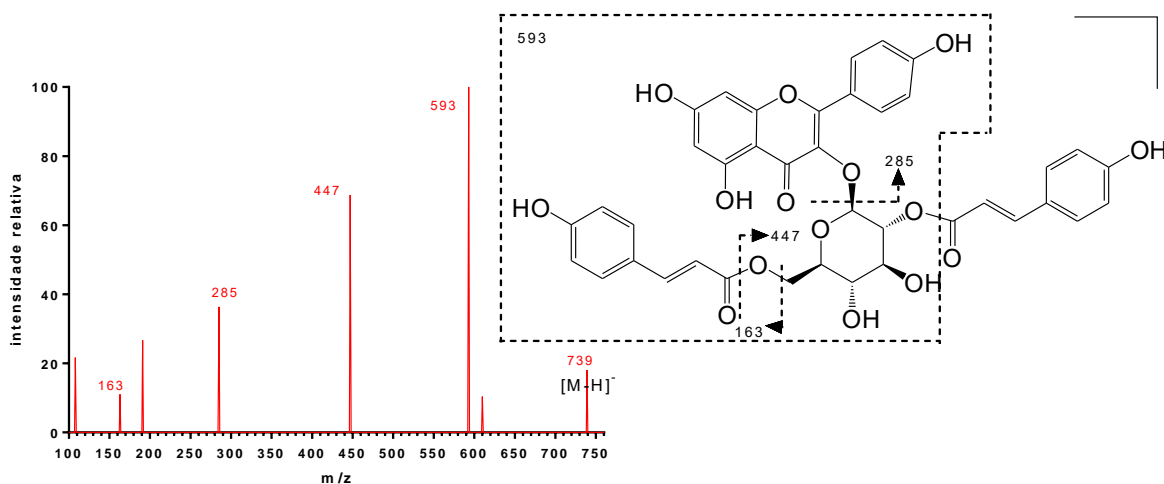


FIGURA 4.51 - Espectro MS/MS em modo negativo obtido para o analito 5

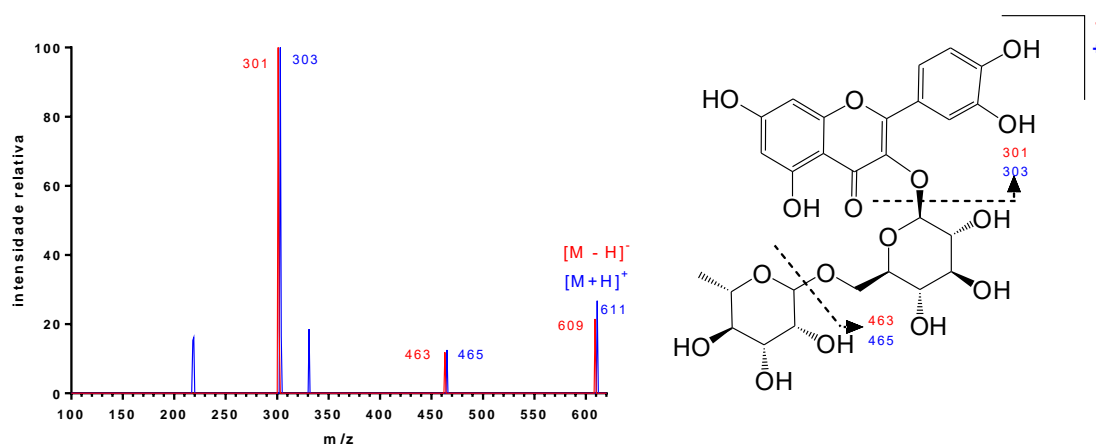


FIGURA 4.52 - Espectros MS/MS em modos negativo (vermelho) e positivo (azul) obtidos para o analito 6

O analito 7 foi identificado por MS/MS como quercetina 3-O-glicosídeo (isoquercetina), pela presença do íon quasimolecular  $[M-H]^-$  ( $[M+H]^+$ ) em m/z 463 (465) e dos íons-fragmento correspondente à perda de uma molécula de glicose em m/z 301 (303). O analito 11 foi identificado como quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) pela presença do íon quasimolecular em m/z 549 (551). Esse íon é de difícil detecção e se fragmenta facilmente no íon de m/z 505 (507) (descarboxilação do substituinte malonil). Essa labilidade dificulta a identificação do analito, uma vez que o derivado 3-O-(6"-acetil glicosídeo) (m/z 505) também já foi detectado em folhas de amoreira<sup>220</sup>. O espectro desse analito ainda apresentou íons fragmento em m/z 463 (465) (descarboxilação do acetil-glicosídeo) e 301 (303) perda de uma molécula de glicose (FIGURA 4.53).

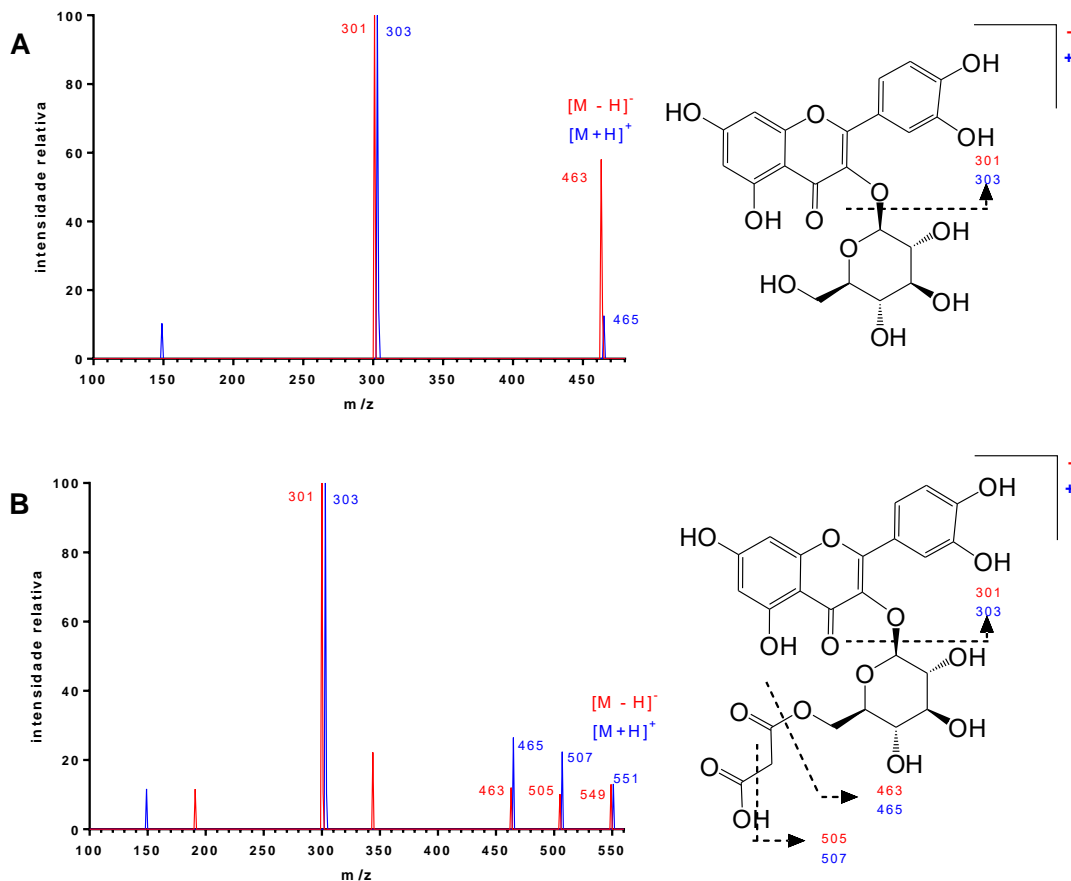


FIGURA 4.53 - Espectros MS/MS em modos negativo (vermelho) e positivo (azul) obtidos para os analitos **7** (A) e **11** (B)

Os analitos **8** e **13** apresentaram espectros de absorção semelhantes, com um ombro na região de 274 nm, uma banda mais intensa na região de 316 nm e outro ombro na região de 330 nm. Esse perfil é característico de derivados glicosídicos da moracina M-6, um 2-arilbenzenofurano identificado inicialmente em espécies de amoreira pertencentes à família Moraceae, de onde vem o nome do analito **8**, identificado como mulberrosideo F (Figura 4.54) Para o analito **13** não foi possível obter o espectro de massas sequencial devido à baixa intensidade dos sinais.

Os analitos **9**, **10** e **12** apresentaram espectros de absorção bastante semelhantes, com duas bandas mais intensas de absorção, uma da região de 266 nm e a outra na região de 344 nm, perfil característico de flavonoides 3-O glicosilados derivados do campferol. Os respectivos espectros de massas de íons produto, nos modos positivo e negativo confirmaram essa classe pela presença do íon diagnóstico do campferol, m/z 285 (negativo) e m/z 287 (positivo). O analito **9** foi identificado por MS/MS nos modos negativo e positivo como campferol 3-O-

rutinosídeo, pela presença do íon quasimolecular  $[M-H]^-$  ( $[M+H]^+$ ) em  $m/z$  593 (595) e dos íons produto em  $m/z$  447 (449), indicando a perda de uma molécula de ramnose, e em  $m/z$  285 (287), indicando a perda de uma molécula de glicose (FIGURA 4.55).

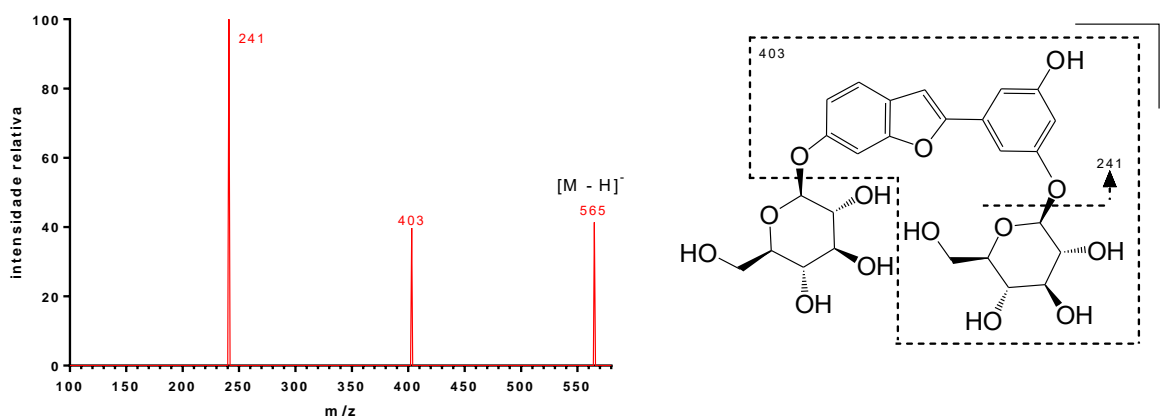


FIGURA 4.54 - Espectro MS/MS em modo negativo obtido para o analito **8**

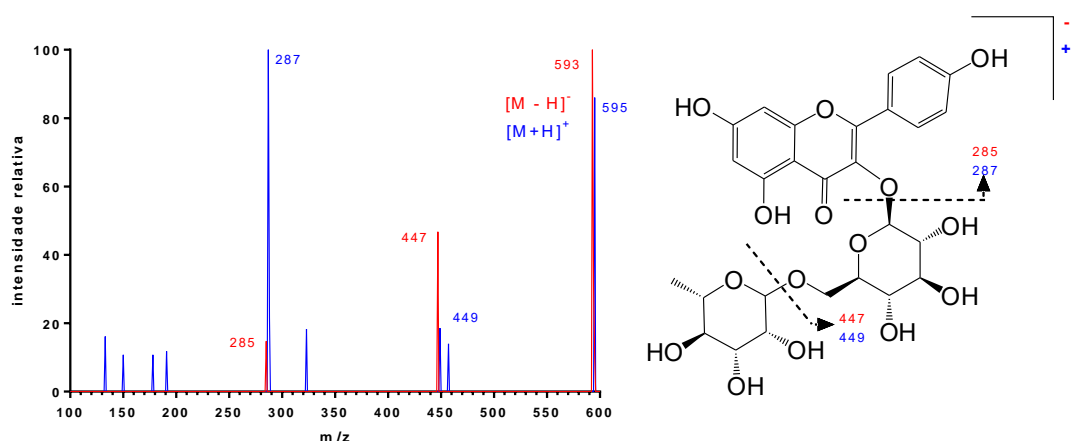


FIGURA 4.55 - Espectros MS/MS em modos negativo (vermelho) e positivo (azul) obtidos para o analito **9**

O analito **10** foi identificado por MS/MS como campferol 3-O-glicosídeo (astragalina), pela presença do íons quase-molecular  $[M-H]^-$  ( $[M+H]^+$ ) em  $m/z$  447 (449) e do íon-fragmento correspondente à perda de uma molécula de glicose em  $m/z$  285 (287), FIGURA 4.56A. O analito **12** foi identificado como campferol 3-O-(6"-malonil glicosídeo), pela presença do íon quasimolecular em  $m/z$  533 (535). Assim como o análogo derivado da quercetina, esse íon também é de difícil detecção e se fragmenta facilmente no íon de  $m/z$  489 (491) (descarboxilação do substituinte malonil). Essa labilidade dificulta a identificação do analito, pois o derivado 3-O-(6"-acetil glicosídeo) ( $m/z$  489) também já foi detectado em folhas de amoreira<sup>220</sup>. O

espectro desse analito ainda apresentou íons fragmento em  $m/z$  447 (449) (descarboxilação do acetil-glicosídeo) e 285 (287) correspondentes à perda de uma molécula de glicose (FIGURA 4.56B).

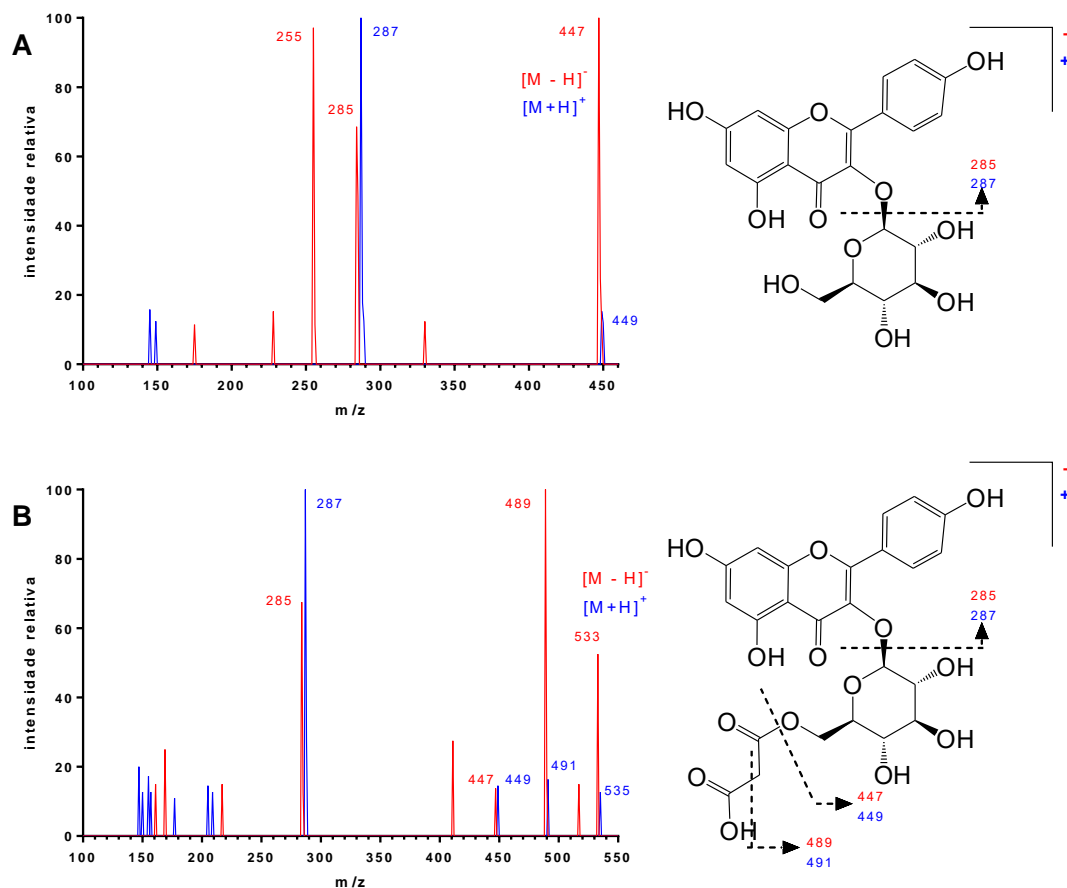


FIGURA 4.56 - Espectros MS/MS em modos negativo (vermelho) e positivo (azul) obtidos para os analitos **10** (A) e **12** (B)

Os seis flavonoides e os ácidos cafeoilquínicos já haviam sido identificados nos espectros de FT-ICR-MS. O mulberrosídeo F e o campferol p-cumaroil glicosilado foram identificados apenas por HPLC-DAD-MS.

Derivados glicosilados dos flavonoides quercetina e campferol (analitos **6**, **7**, **9**, **10**, **11** e **12**) já foram associados à atividade estrogênica<sup>223,224</sup>. Para o campferol p-cumaroil glicosilado não há registros para esse tipo de atividade biológica, embora ele seja um potencial candidato a fitoestrógeno.

Pensando na possibilidade de os flavonoides **6**, **7**, **9**, **10**, **11** e **12** serem os principais responsáveis pela atividade estrogênica observada, as análises quimiométricas foram realizadas novamente considerando-se apenas as áreas das 6 bandas cromatográficas mencionadas. A análise de HCA mostrou a formação de 3 grupos com elevada similaridade entre os componentes, cuja distância euclidiana foi

inferior a 10% da distância total) (FIGURA 4.54). Os agrupamentos seguiram o mesmo padrão observado para a atividade estrogênica na FIGURA 4.13.

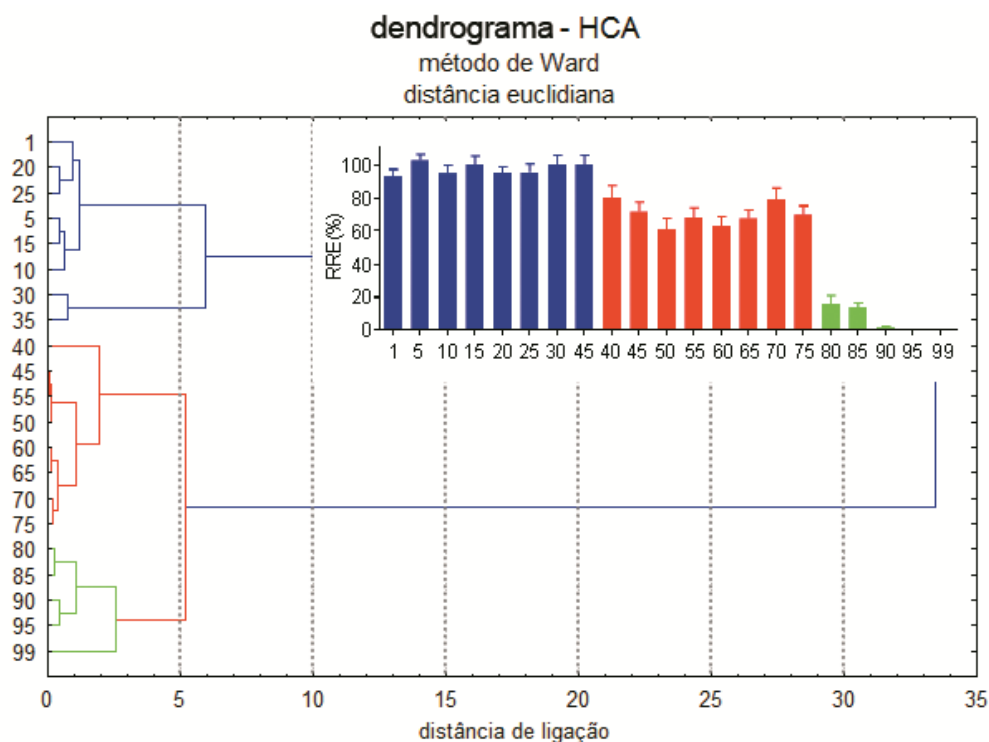


FIGURA 4.57 - Dendrogramas da HCA realizadas apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas obtidos em 260 nm

Com o mesmo conjunto de dados foi realizada uma análise classificatória não supervisionada por PCA, cujas 3 primeiras componentes explicaram 99,34% da variância total (FIGURA 4.57).

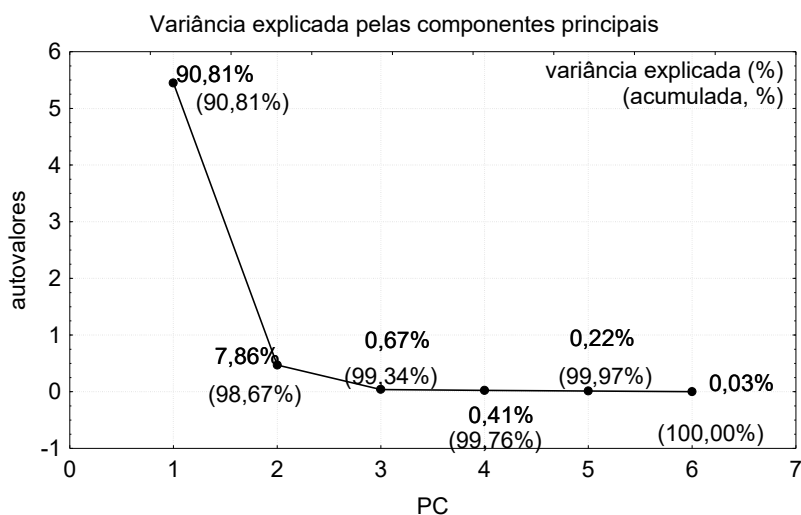


FIGURA 4.58 - Variância explicada por cada PC na PCA realizada apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas em 260 nm



A PC1 explicou aproximadamente 91% da variância total enquanto a PC2 explicou aproximadamente 8% da variância restante. O gráfico de escores para essas componentes (PC1 e PC2) apresentou a separação dos extratos nos mesmos 3 grupos observados na análise de HCA. A primeira componente separou os extratos com maior potencial estrogênico dos demais (FIGURA 4.59A). A segunda componente separou os extratos agonistas parciais daqueles que levaram à morte celular. O gráfico de *loadings* para a PC1 e para a PC2 mostrou que as áreas dos 6 flavonoides apresentaram valores negativos para a PC1 (FIGURA 4.59B). Os flavonoides 11 e 12 foram os que apresentaram os maiores valores na PC1 e por isso apresentaram peso para a separação dos extratos mais estrogênicos. Na PC2 esses flavonoides foram importantes para a separação dos extratos com atividade estrogênica daqueles que levaram à morte celular. Os derivados malonil-glicosídicos do campferol e da quercetina apresentaram valores positivos para a PC2 e, portanto, tiveram um peso maior na formação do grupo que estimulou o crescimento da linhagem MCF-7. Os derivados glicosídicos e rutinosídicos apresentaram um peso negativo na mesma componente, influenciando a formação do grupo que levou à morte celular.

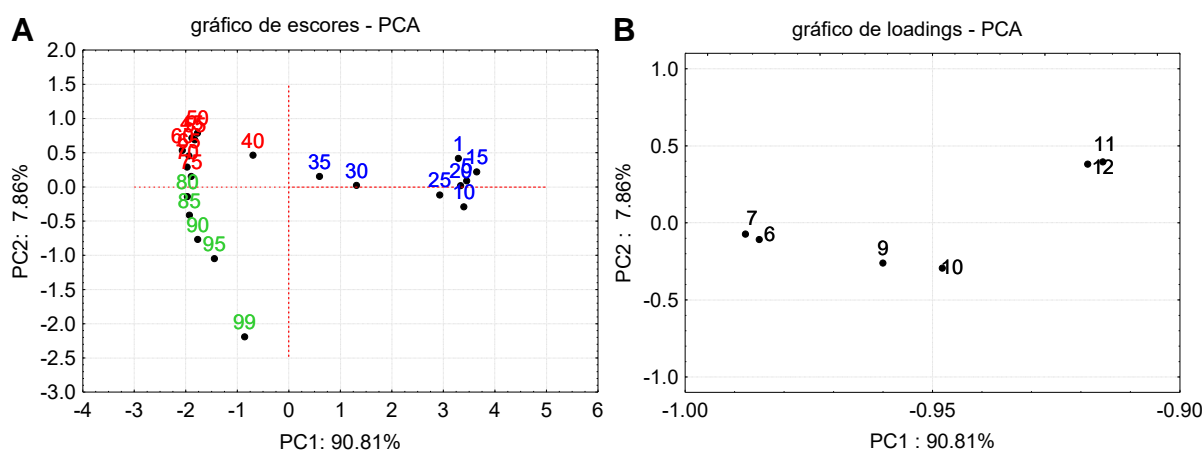


FIGURA 4.59 - Gráficos de escores e *loadings* para a PCA realizada apenas com as bandas cromatográficas dos flavonoides glicosilados nos cromatogramas em 260 nm

Diante dos resultados obtidos nas análises não supervisionadas, foram realizadas análises de reconhecimento supervisionado de padrões com o objetivo de verificar se, com base no conjunto de dados disponível (as áreas dos 6 flavonoides glicosilados), seria possível obter a correta classificação dos extratos nos 3 grupos: (1) agonismo total do receptor estrógeno, de maior estimulação do crescimento

celular, (2) agonismo parcial do receptor estrógeno, de menor estimulação do crescimento celular e (3) indução de morte celular.

Essas análises são baseadas em modelos matemáticos de regressão e se dividem em etapas: treinamento (modelagem) e validação do modelo, nas quais são utilizadas amostras conhecidas pertencentes às diferentes classes. De acordo com os resultados obtidos no teste de atividade estrogênica, as amostras dos 21 extratos deveriam ser classificadas da seguinte forma: 8 extratos como pertencentes à classe 1 (agonismo total); 8 deveriam ser classificados como 2 (agonismo parcial) e 5 como classe 3 (morte).

A primeira análise realizada foi baseada no método do K-ésimo vizinho mais próximo (KNN). Assim como a HCA, o KNN se baseia na distância euclidiana entre as amostras. Devido ao número reduzido de amostras, foi utilizada a validação cruzada na segunda etapa da análise, a qual consistiu na retirada de algumas amostras do conjunto de dados, entre 25 e 40%, que foram “reservadas” para a validação do método, enquanto as demais foram utilizadas então na modelagem da seguinte forma. Uma amostra foi retirada do conjunto de dados e com as restantes construiu-se o modelo de classificação. A amostra foi “devolvida” ao conjunto original e uma segunda amostra foi então reservada para a validação. Esse ciclo de retirada foi realizado consecutivamente até que 25 a 40% do conjunto de dados tivessem sido utilizados para a validação do modelo. Utilizando-se a validação cruzada com 70% das amostras no conjunto de treinamento ( $n = 14$ ), o modelo foi capaz de classificar corretamente todas as amostras do conjunto de validação ( $n = 7$ ) com um vizinho próximo (FIGURA 4.60).

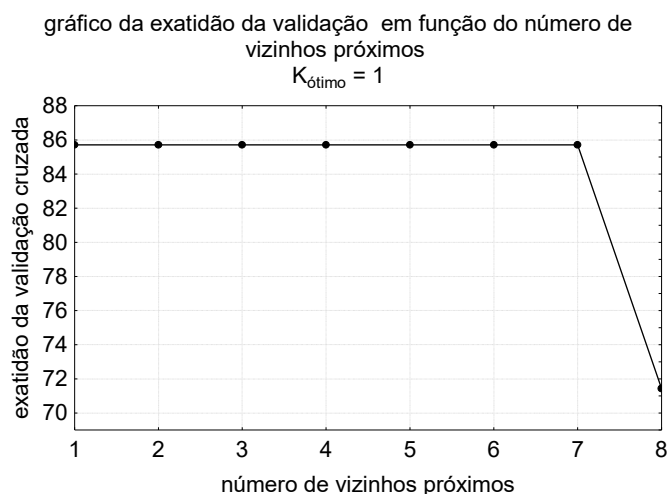


FIGURA 4.60 - Gráfico da exatidão da validação cruzada para o modelo de classificação KNN dos extratos em função dos resultados de estrogenicidade

A segunda classificação foi baseada na análise discriminante (DA) e teve como objetivo principal de quais as variáveis (nesse caso, os flavonoides) estariam discriminando as 3 classes mencionadas anteriormente. Matematicamente, a DA foi realizada em etapas com base em testes F de comparações múltiplas, nos quais foram determinados valores de corte para incluir ( $F_{\text{inclusão}}$ ) ou excluir ( $F_{\text{exclusão}}$ ). Em cada etapa, os valores das variáveis foi comparado nas 3 classes. Se houvesse diferença significativa e o valor de F fosse maior que o  $F_{\text{inclusão}}$ , a variável seria considerada discriminante e se for menor que o  $F_{\text{exclusão}}$  ela seria excluída do modelo. Aquela que apresentasse o maior poder discriminante (maior valor de F) seria incluída no modelo e as demais seguiriam para uma nova etapa de análises comparativas do teste F. As comparações e seleções de variáveis seguiram em sucessivas etapas até que o valor de F não fosse mais superior a  $F_{\text{inclusão}}$ . A validação cruzada também foi utilizada nesse modelo nas mesmas condições descritas para o KNN.

Na DA realizada com as áreas das bandas cromatográficas dos flavonoides, apenas o campferol 3-O-rutinosídeo (**9**) e a quercetina 3-O-(6"-malonilglicosídeo) (**11**) foram, nessa ordem, as variáveis discriminantes na classificação. Ao contrário do KNN, o qual foi baseado em agrupamentos por distâncias, a DA é um modelo probabilístico. Em outras palavras, ela forneceu a probabilidade de cada extrato ser classificado em cada uma das 3 classes da atividade estrogênica. Pelos resultados observados, o modelo baseado em DA somente não classificou corretamente o extrato com 80% de etanol, o qual teria probabilidade muito próxima de ser classificado como pertencente à classe 2 (agonismo parcial) ou classe 3 (morte celular) (TABELA 4.13).

TABELA 4.13 - Classificação dos extratos em função da atividade estrogênica segundo o modelo de DA

% Etanol no extrato	classificação observada	probabilidade de classificação		
		classe 1 (a. total)	classe 2 (a. parcial)	classe 3 (morte cel.)
1	1	1,000000	0,000000	0,000000
5	1	1,000000	0,000000	0,000000
10	1	1,000000	0,000000	0,000000
15	1	1,000000	0,000000	0,000000
20	1	1,000000	0,000000	0,000000
25	1	1,000000	0,000000	0,000000
30	1	0,999998	0,000002	0,000000
35	1	0,947167	0,052833	0,000000
40	2	0,000001	0,999996	0,000003
45	2	0,000000	0,999963	0,000037
50	2	0,000000	0,999990	0,000010
55	2	0,000000	0,999943	0,000057
60	2	0,000000	0,999559	0,000441
65	2	0,000000	0,998509	0,001491
70	2	0,000000	0,993731	0,006269
75	2	0,000000	0,989069	0,010931
80	3	0,000000	0,504716	0,495284
85	3	0,000000	0,063750	0,936250
90	3	0,000000	0,003578	0,996422
95	3	0,000000	0,006782	0,993218
99	3	0,000000	0,000001	0,999999

A terceira e última análise de classificação realizada foi baseada em um modelo de mínimos quadrados parciais para a análise discriminante (PLS-DA). O PLS é um modelo de regressão linear no qual variáveis latentes foram geradas a partir das variáveis preditoras dos conjuntos de dados, no caso, as bandas cromatográficas. Assim como na PCA, a transformação em variáveis latentes teve como objetivo principal analisar os efeitos de um maior número de variáveis, mas com redução da dimensionalidade da matriz de dados. O modelo PLS é uma análise quantitativa baseada em variáveis latentes e variáveis dependentes, que geralmente são contínuas. No entanto, quando a variável dependente é categórica, como na DA, o PLS passa a ter um caráter classificatório e o modelo recebe então o nome PLS-DA. Na análise dos extratos também foi utilizada a validação cruzada nas mesmas condições do modelo KNN, com 70% das amostras para treinamento e 30% para validação. O modelo PLS-DA com 2 variáveis latentes explicou 79,3% ( $r^2$ ) a variância total do conjunto de dados, com uma capacidade preditiva de 69,6% ( $Q^2$ ) e com

baixo erro relacionado à validação cruzada, sendo RMSECV = 0,152 para classe 1; 0,255 para classe 2 e 0,216 para a classe 3 (FIGURA 4.61).

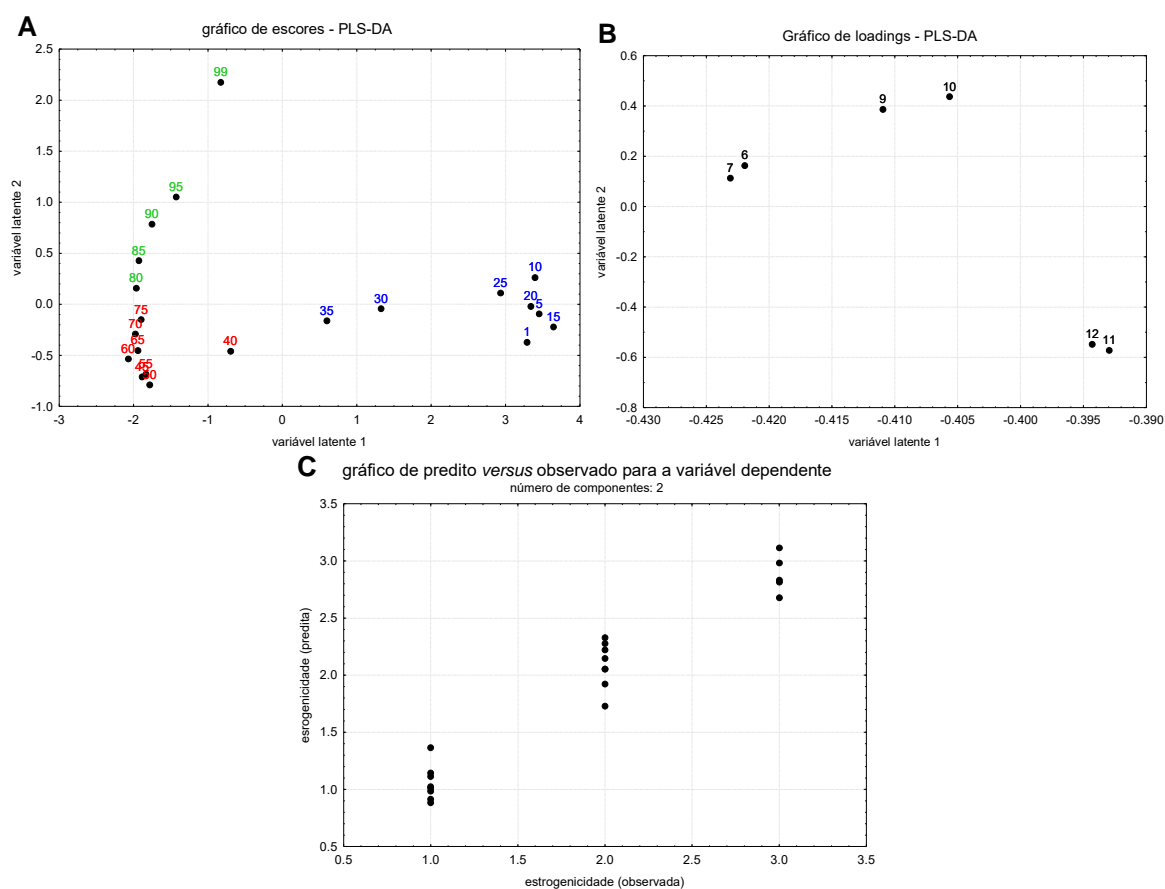


FIGURA 4.61 - Modelo de classificação PLS-DA dos extratos em função dos resultados de estrogenicidade

No gráfico de escores para PLS-DA, foi possível observar a variável latente 1 separou a classe dos extratos agonistas totais (classe 1) das demais, enquanto a variável latente 2 separou a classe dos agonistas parciais (classe 2) daquela formada pelos extratos que levaram à morte celular (classe 3) (FIGURA 4.61A). A formação das classes 1, 2 e 3, também havia sido observada no gráfico de escores da PCA, mas com uma distribuição nas novas dimensões diferente daquela observada na análise não supervisionada (FIGURA 4.59). No gráfico de *loadings* do modelo PLS-DA, os flavonoides malonil-glicosídicos (11 e 12) tiveram um peso maior na formação da classe 1, pois apresentaram os valores mais altos (ainda que negativos) para essa variável (FIGURA 4.58B). Na variável latente 2, os mesmos flavonoides apresentaram valores negativos e tiveram um peso maior na separação da classe 2, enquanto os demais contribuíram mais para a separação da classe 3, por terem apresentado valores positivos para essa variável. A FIGURA 4.58C

mostrou que os resultados preditos pelo modelo PLS-DA apresentaram uma boa correlação com a classificação observada no estudo de estrogenicidade.

As mesmas análises de classificação supervisionadas foram realizadas com as áreas de todas as bandas cromatográficas indicadas no cromatograma da FIGURA 4.43B. No entanto, nessas análises não apresentaram bons resultados com um número elevado de amostras classificadas erroneamente pelos modelos.

#### b) análise do meio condicionado dos sistemas incubados com diferentes extratos de folhas de amoreira

Os meios extracelulares nos quais os extratos foram incubados com as células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram analisados pelo método analítico desenvolvido anteriormente (seção 4.3.2.2.1) com o objetivo de se tentar identificar evidências de que os 6 flavonoides identificados como os possíveis compostos bioativos esteja de fato sendo introduzidos e biotransformados pelas células nos modelos escolhidos para os ensaios de estrogenicidade e seletividade. Para esse estudo, foram selecionados extratos representativos dos resultados observados para ambos.

O extrato preparado com 20% EtOH estimulou o crescimento da MCF-7 como um agonista total no teste de estrogenicidade e foi considerado um dos melhores estimulantes desta função (Figura 4.25). A análise do meio extracelular indicou que os flavonoides **6**, **7**, **9**, **10** e **11** permearam para o interior das células, visto que a quantidade dos mesmos no meio após os dois primeiros dias de incubação (curva verde na FIGURA 4.62A) era significativamente menor que aquela encontrada antes do início do experimento (curva vermelha na FIGURA 4.62A).

Após 4 e 6 dias de incubação (curva azul na FIGURA 4.62A), o sinal analítico dos flavonoides **6**, **7**, **9** e **11** no meio de cultura era bastante similar àquele obtido após 48 h de incubação, sugerindo haver um valor ótimo para a quantidade desses compostos no citoplasma, visto que a cada dois dias era realizada a troca de meio com reposição do extrato na mesma concentração inicial. Para o campferol 3-O-(6"-malonilglicosídeo) (**12**) observou-se que à medida que o tempo de incubação aumentava, menos composto estava permeando a membrana celular, sugerindo que o metabolismo da célula foi reduzido devido à chegada na fase estacionária final.

Na análise dos meios de cultura notou-se o aparecimento de duas bandas cromatográficas com  $t_r=8,25$  e  $10,34$  min após o início do estudo,

provavelmente associadas ao metabolismo dos compostos bioativos, porém não foi possível realizar a identificação desses metabólitos.

No teste de seletividade, o extrato com 20% de etanol apresentou resultado semelhante ao controle negativo, não interferindo no crescimento da MDA-MB-231. Na análise dos meios de cultura coletados em diferentes intervalos de tempo durante o ensaio (FIGURA 4.62B), observou-se uma elevada similaridade nos perfis de todas as amostras, sugerindo que a quantidade de flavonoides que permeou a membrana celular era muito baixa, o que poderia explicar a inatividade observada na linhagem MDA-MB-231, em contraste com os resultados positivos alcançados para MCF-7.

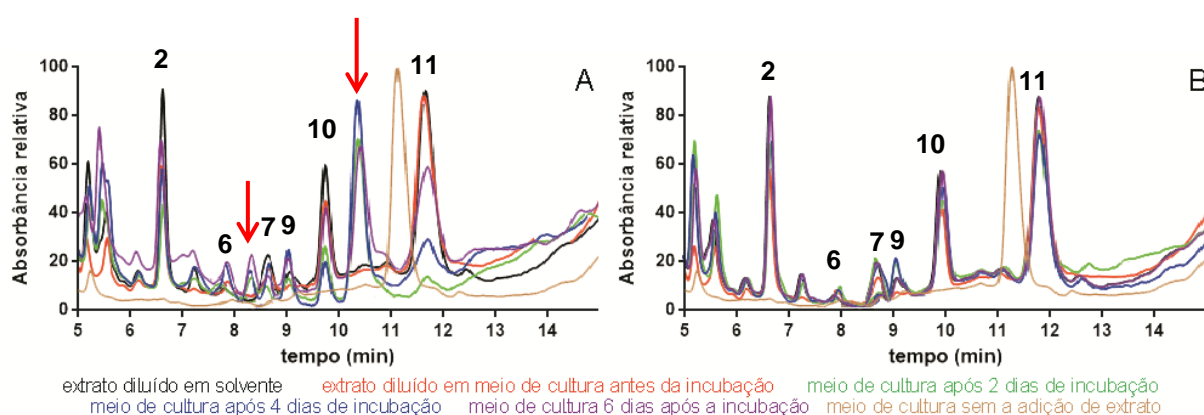


FIGURA 4.62 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade (A) e seletividade (B) realizados com o extrato preparado com 20% de etanol.

As setas vermelhas indicam as bandas cromatográficas possivelmente associadas ao metabolismo dos compostos bioativos

O extrato preparado com 45% de etanol apresentou agonismo parcial no teste de estrogenicidade. Na análise dos meios extracelulares, percebeu-se que o ácido clorogênico (**2**) foi totalmente permeado para o interior da célula, inclusive após as reposições dos extratos durante as trocas de meio (FIGURA 4.63A). Os flavonoides malonil-glicosilados (**11** e **12**) apresentaram uma redução bastante significativa nos níveis extracelulares após o início da incubação. Os sinais observados para os flavonoides **6**, **7** e **9** apresentaram uma pequena redução nas amostras coletadas após o segundo e o sexto dias de incubação, sugerindo que parte desses analitos também estaria permeando a membrana celular.

Os sinais obtidos após 4 dias de incubação foram ainda menores, o que reflete uma maior quantidade de analito no meio intracelular. Os sinais observados após o sexto dia foram similares àqueles observados para 2 dias de incubação, sugerindo que poderia haver um mecanismo de sinalização no sentido

de reduzir a entrada de analitos na célula ou, mais provavelmente, o metabolismo da célula foi reduzido devido à chegada na fase estacionária final. A hipótese de que o metabolismo celular é o principal fenômeno observado é corroborada com a análise em 2 dias, similar à de 6 dias, pois as células estão na fase estacionária inicial (*lag*), sendo que após 4 dias houve uma redução desses constituintes pelo fato das células estarem na fase de crescimento exponencial (fase *log*). Este mesmo fenômeno foi observado para o extrato com 20% EtOH.

Para a astragalina (**10**) a intensidade da banda cromatográfica após os 6 dias de experimento apresentou elevada similaridade àquela observada antes da incubação, enquanto nas amostras coletadas em intervalos anteriores o sinal apresentou menor intensidade. Esse resultado sugeriu que a concentração intracelular desse flavonoide teria alcançado um valor ótimo após 4 dias de incubação, novamente corroborando com a hipótese do metabolismo celular.

Além das variações nos sinais analíticos dos extratos, também observou-se o aparecimento de bandas cromatográficas possivelmente associadas à metabólitos liberados no meio extracelular em  $t_r = 6,80$ ;  $11,42$ ; e  $12,30$  min, cuja identificação também não pode ser realizada.

No teste de seletividade, o extrato com 45% EtOH não influenciou o crescimento da linhagem MDA-MB-231, assim como o extrato com 20% EtOH. No entanto, diferentemente desse último, a análise do meio extracelular indicou haver permeação do ácido clorogênico (**2**) e dos flavonoides malonil-glicosilados (**11** e **12**) em um período curto de incubação, uma vez que após 2 dias de incubação, a quantidade desses analitos era muito baixa (FIGURA 4.63B).

Após 6 dias de incubação, os flavonoides **6**, **7**, **9** e **10** apresentaram níveis muito baixos no meio extracelular, diferentemente das análises feitas nos intervalos anteriores, cujos níveis foram mais elevados. Isto demonstra que o perfil de metabolismo entre MDA-MB-231 e MCF-7 é bem distinto, como observado para o extrato a 20% EtOH. Esta diferença no metabolismo pode ser um fator essencial para explicar a seletividade observada entre estas duas linhagens celulares.

Além disso, foi possível observar o aparecimento de uma banda cromatográfica em  $t_r = 10,50$  min provavelmente associadas a metabólitos produzidos pelas células.



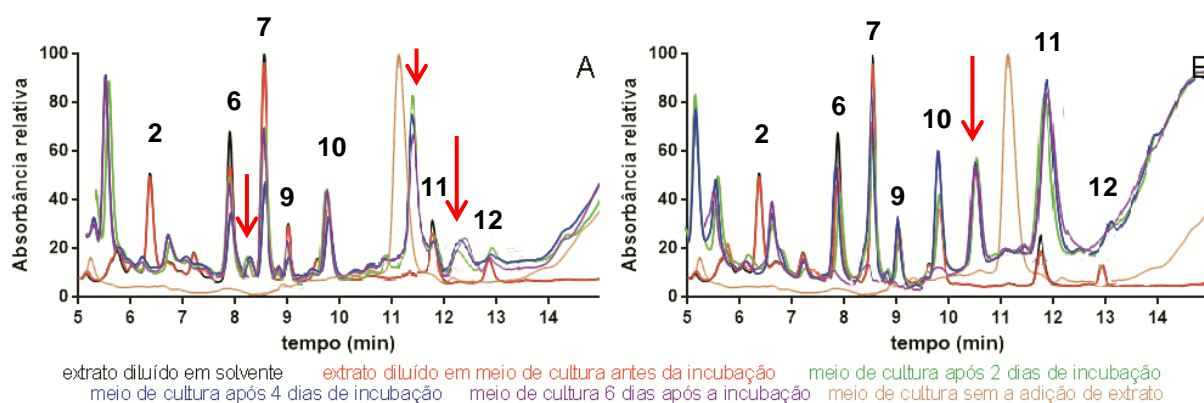


FIGURA 4.63 Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade (A) e seletividade (B) realizados com o extrato preparado com 45% de etanol. As setas vermelhas indicam as bandas cromatográficas possivelmente associadas ao metabolismo dos compostos bioativos

O extrato preparado com 75% EtOH apresentou estimulação do crescimento celular da MCF-7 característica de agonista parcial, assim como o fez o extrato com 45% EtOH. A análise do meio extracelular também mostrou um perfil semelhante entre os dois extratos para o ácido clorogênico (2), mas para os flavonoides o perfil foi um pouco diferente. Para os derivados da quercetina 6 e 7 e para os derivados do campferol 9 e 10, as bandas cromatográficas das amostras coletadas até 4 dias de incubação apresentaram intensidades próximas àquela observada antes do início do experimento, sugerindo baixa permeação desses analitos para o interior da célula. Após 6 dias de incubação, notou-se uma diminuição do sinal analítico para esses flavonoides no meio extracelular, sugerindo haver uma maior permeação dos compostos na etapa final do experimento (FIGURA 4.64A).

Para os derivados malonil-glicosídicos da quercetina (11) e do campferol (12) observou-se uma redução gradual na intensidade das bandas cromatográficas à medida que o tempo de incubação aumentava, sugerindo que um aumento progressivo na permeação desses analitos (FIGURA 4.64A).

Além disso, percebeu-se o aparecimento de uma banda cromatográfica apenas para a amostra que foi coletada após 2 dias de incubação em  $t_r = 10,38$  min, mesmo tempo de retenção observado no cromatograma da FIGURA 4.63A, possivelmente associada a algum metabólito que não pode ser identificado. Uma segunda banda, também possivelmente associada a metabólitos, foi observada em  $t_r = 12,20$  min. Esse sinal também foi encontrado no sistema incubado com o extrato com 45% de etanol, sugerindo assim que essa banda cromatográfica poderia estar relacionada a uma rota metabólica comum para os dois extratos.

Ao contrário do anterior, o extrato preparado com 75% EtOH induziu um processo de morte celular das células da linhagem MDA-MB-231 no ensaio de seletividade. Na microscopia de campo claro observou-se que a maior parte das células entrou em processo de morte celular logo nos primeiros dias de incubação, o que, *a priori*, comprometeria a permeação dos flavonoides para o interior das células e seu metabolismo. A análise do meio extracelular não apresentou sinal analítico para o ácido clorogênico (**2**) após o início do experimento, sugerindo que o analito em sua totalidade havia entrado na célula (FIGURA 4.64B). Para os flavonoides **6**, **7**, **9** e **10**, foram observadas bandas cromatográficas após os dois primeiros dias de dimensões semelhantes àsquelas de antes do experimento. Dois dias depois, não foi observado traços desses mesmos analitos no meio de cultura, sugerindo que os mesmos estariam permeando a célula em processo de morte, ou que poderiam ser metabolizados por enzimas que estivessem em contato com estes analitos mesmo no meio extracelular. Os respectivos sinais analíticos voltariam a aumentar na última amostra, coletada após o período de 6 dias. Como ocorria a troca de meio a cada 48 h de incubação, com a reposição do extrato, esse aumento do sinal pode estar associado ao fato de as células estarem mortas, com as enzimas já estariam inativadas.

A banda cromatográfica em  $t_r=10,38$  min que apareceu somente após o início do ensaio apresentou as mesmas dimensões para as amostras coletadas durante o período de incubação. Se esse sinal estivesse associado ao metabolismo das células, esperava-se uma alteração de intensidade semelhante àquela observada na amostra coletada no quarto dia de incubação. A elevada similaridade então levou a duas hipóteses: (i) havia células vivas que estariam metabolizando os compostos bioativos; ou (ii) o sinal analítico observado não corresponderia a um metabólito, mas a uma substância presente na célula (ou mesmo um fragmento) que foi liberado durante o processo de morte. Para tentar verificar essas hipóteses, tentou-se analisar os espectros de UV para o analito nas diferentes amostras e o perfil de absorvância foi semelhante àquela observado para os flavonoides derivados do campferol, sugerindo assim tratar-se mesmo de um metabólito. A análise por LC-MS não foi conclusiva, por limitações técnicas do equipamento no modo de varredura completa, principalmente para amostras em baixas concentrações. Nos ensaios de seletividade e estrogenicidade, o extrato foi diluído em meio de cultura para a concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

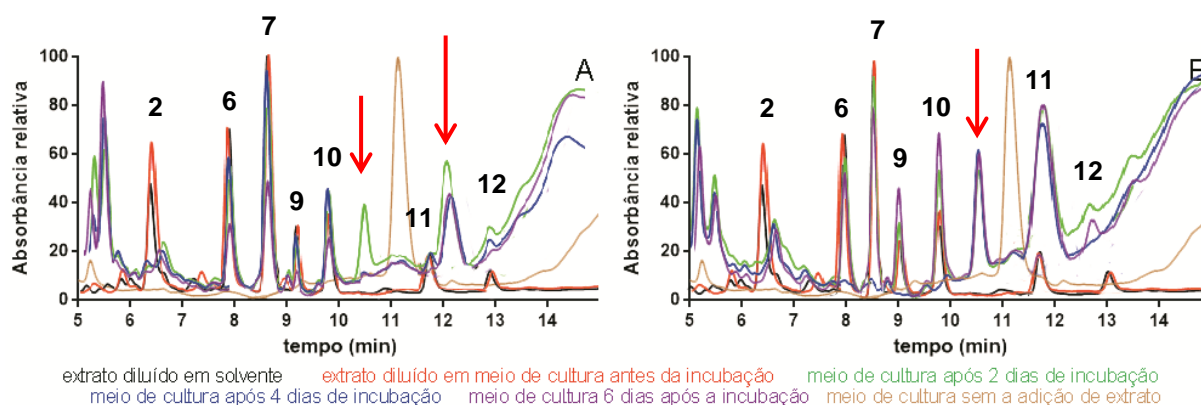


FIGURA 4.64 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade (A) e seletividade (B) realizados com o extrato preparado com 75% de etanol. As setas vermelhas indicam as bandas cromatográficas possivelmente associadas ao metabolismo dos compostos bioativos

A última análise de meio extracelular foi realizada para os sistemas incubados com o extrato preparado com 85% de etanol. Esse extrato induziu a morte celular tanto no teste de estrogenicidade quanto no teste de seletividade. Nas análises dos meios extracelulares do primeiro teste, notou-se uma elevada similaridade na intensidade dos sinais analíticos para **6**, **7**, **9** e **10** até a amostra coletada no quarto dia de incubação, sugerindo que os analitos não estariam permeando a membrana celular (FIGURA 4.65A). Uma redução significativa na intensidade desses sinais aconteceu no último dia de incubação, sugerindo que esses compostos conseguiram de alguma forma permear para o interior da célula.

Para os analitos **2**, **11** e **12**, observou-se a redução na intensidade do sinal logo nos dois primeiros dias de incubação, o qual permaneceu baixo e estável nos dias subsequentes, sugerindo que os analitos estavam passando para o interior da célula mesmo com o processo de morte celular iniciado. O aparecimento das bandas cromatográficas com  $t_r = 10,40$ ;  $11,30$  e  $12,20$  min, possivelmente associadas a metabólitos, nas amostras coletadas durante o período de incubação sugeriu que no meio das células em processo de morte celular também haveria células que continuariam metabolizando os compostos bioativos. O aumento contínuo no sinal analítico em  $t_r = 10,40$  min em detrimento da redução da intensidade das bandas cromatográfica dos flavonoides seria uma forte evidência da atividade metabólica por células viáveis.

Na análise dos meios de cultura do teste de seletividade, não foi possível observar alterações significativas nas intensidades dos sinais analíticos

para os flavonoides **9** a **12**, sugerindo que esses compostos não estariam sendo metabolizados pelas células em processo de morte (FIGURA 4.65B). Para os flavonoides derivados da quercetina (**6** e **7**), notou-se uma redução gradativa na intensidade das bandas cromatográficas à medida que o tempo de incubação aumentava, sugerindo que esses compostos estariam permeando a célula e seriam metabolizados. Além disso, a banda cromatográfica em  $t_r=10,40$  min apresentou uma elevada similaridade nas 3 amostras coletadas durante o período de incubação, sugerindo a existência de células que estariam metabolizando regularmente os compostos bioativos.

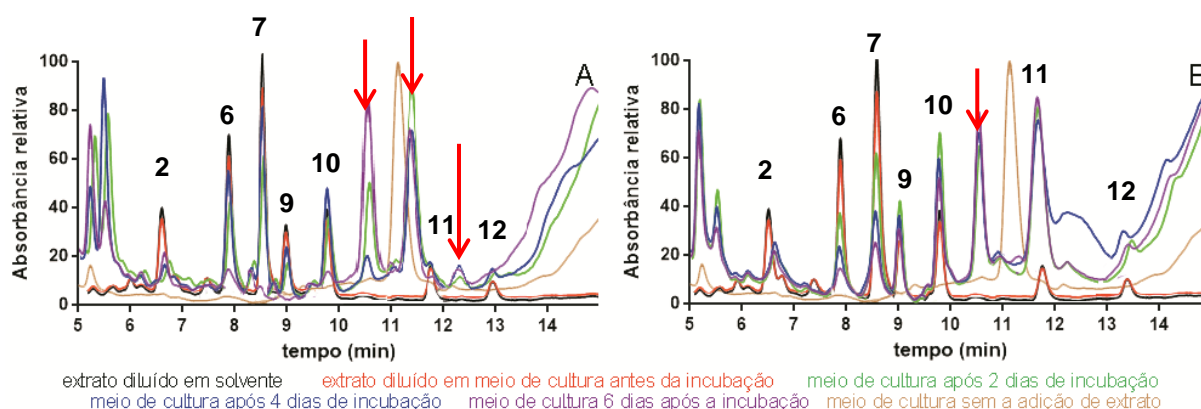


FIGURA 4.65 - Análise do meio extracelular dos ensaios e estrogenicidade (A) e seletividade (B) realizados com o extrato preparado com 85% de etanol. As setas vermelhas indicam as bandas cromatográficas possivelmente associadas ao metabolismo dos compostos bioativos

Tanto o extrato preparado com 45 % de etanol (v/v) quanto aquele preparado com 75% (v/v) apresentaram o mesmo tipo de atividade estrogênica, com agonismo parcial. Dessa forma, esperava-se em princípio que as análises dos meios extracelulares apresentassem perfis semelhantes. No entanto, o que se pode perceber foram algumas diferenças nos perfis para os sistemas que foram incubados cada tipo de extrato. Essas análises sugeriram então que o efeito biológico observado, a estimulação do crescimento celular, poderia não estar diretamente relacionado com os flavonoides de forma independente, mas com interações entre mais de um composto bioativo presente.

Uma possibilidade que está em aberto se refere a avaliação do tipo de estresse metabólico que ocorre nas células que leva a uma diferença de consumo dos compostos para estes extratos. Outra característica importante a ser avaliada se refere a possibilidade de reação destas substâncias no próprio meio extracelular, seja por enzimas excretadas ou por compostos reativos derivados do processo de

morte celular.

### c) quantificação dos flavonoides presentes nos extratos de folhas de amoreira

A quantificação dos 6 principais flavonoides identificados nos extratos foi realizada com o objetivo de se verificar se haveria possíveis sinergismos entre eles relacionados à atividade estrogênica. Durante o período em que as análises quantitativas foram realizadas, não foi possível obter padrões analíticos comerciais para todos os analitos devido ao tempo necessário para a importação de alguns deles. O isolamento e a purificação se tornariam inviáveis, visto que todos os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados em escala analítica de poucos mililitros. Para se obter quantidades suficientes dos flavonoides para os estudos quantitativos, seria necessário inicialmente escalonar o processo de extração, o que demandaria certo tempo e uma grande quantidade de material vegetal. Por outro lado, seria possível utilizar o padrão analítico de uma substância para estimar a concentração das demais. Para isso, uma boa correlação deve existir entre a resposta analítica do padrão de referência e a resposta total dos analitos para os quais foi usada a curva de calibração<sup>225</sup>.

No conjunto dos principais flavonoides presentes nos extratos de folhas de amoreira, foram identificados pares de compostos bastante similares que se diferenciavam por uma hidroxila em meta no anel B, mas que possuíam a mesma molécula de açúcar como substituinte na mesma posição. A astragalina e a isoquercetina possuíam uma molécula de glicose ligada ao núcleo da respectiva aglicona. A rutina e o campferol 3-O-rutinosídeo tinham uma molécula de rutinose como substituinte comum. Os outros dois possuíam como característica comum uma molécula de glicose substituída por um grupo malonil na posição 6 do anel do açúcar.

Para verificar se haveria correlação entre as concentrações desses analitos nos extratos em diferentes níveis, análises LC-UV (260 nm) e LC-MS/MS (no modo de perda neutra) foram realizadas com o extrato preparado com 50% EtOH, uma vez que esse extrato que apresentou os sinais mais intensos para os flavonoides. As análises de perda neutra foram escolhidas por permitirem monitorar a perda do substituinte glicosídico, característica comum para o par de flavonoides e que foi observada em todos os espectros MS/MS no modo de íons produto. Para o

par isoquercetina / astragalina, foi monitorada a perda de 162 u.m.a., correspondente a uma molécula de glicose. Para a rutina / campferol 3-O-rutinosídeo, foi monitorada a perda de 308 referente à perda do dissacarídeo rutinose e para a quercetina / campferol 3-O-(6"-malonil glicosídeo), foi monitorada a perda de 248 u.m.a. atribuída à perda de uma molécula de glicose malonil substituída (FIGURA 4.66). As análises foram realizadas no modo positivo de ionização por este ter apresentado as bandas cromatográficas mais intensas.

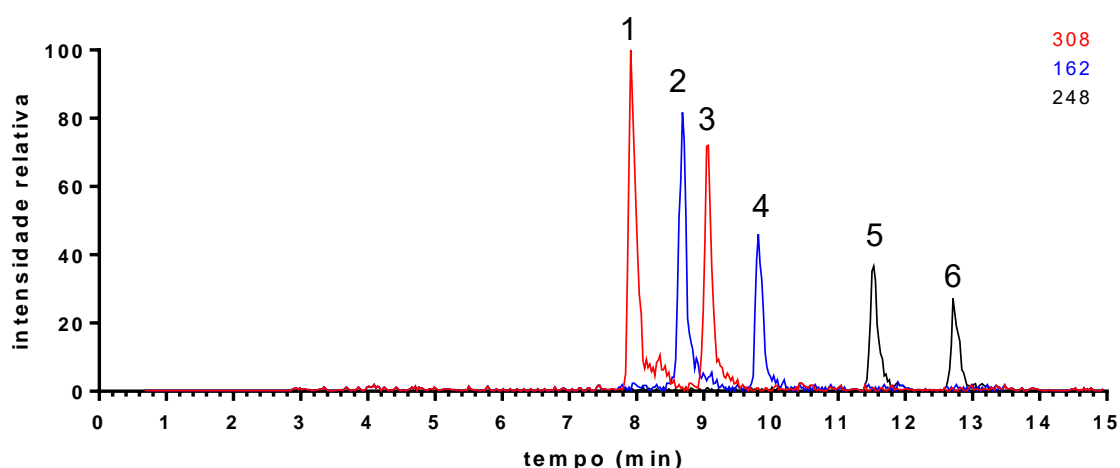


FIGURA 4.66 - Cromatograma LC-MS/MS obtido no modo de perda neutra para os 6 principais flavonoides identificados nos extratos de folhas de amoreira. 1: rutina; 2: isoquercetina; 3: campferol 3-O-rutinosídeo; 4: astragalina; 5: quercetina 3-(6"- malonil-glicosídeo); 6: campferol 3-(6"- malonil-glicosídeo). Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,025%; Fase B: ACN/HCOOH 0,025%; Gradiente: 18 - 40%, 10min, 40% em 5 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão: 600  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>. Vol. injeção: 5  $\mu$ L; Temperatura: 40°C. CUR: 45 psi; IS: 4keV; TEMP: 400; GAS 1: 50 psi; GAS 2: 13,3 psi; DP: 50 eV; FP: 312 eV; EP: 10,2 eV; CAD: 9 psi; CE: 36 eV; CXP: 15 eV; Dwell time: 100ms.

As análises de correlação foram realizadas entre as áreas do flavonoide derivado da quercetina (analito de referência) e a soma das áreas dos dois análogos. Essas correlações foram avaliadas em três níveis de concentração do extrato preparado com 50% EtOH: 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, 2,50 mg.mL<sup>-1</sup> e 5,00 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que as respostas analíticas dos pares de flavonoides que possuíam a mesma molécula de açúcar como substituinte apresentaram elevada correlação tanto nas análises LC-MS/MS quanto nas análises LC-UV para os 3 níveis de concentração dos extratos testadas (FIGURA 4.67). Sendo assim, a curva de calibração de um flavonoide poderia ser utilizada para estimar a concentração do seu análogo no mesmo extrato.

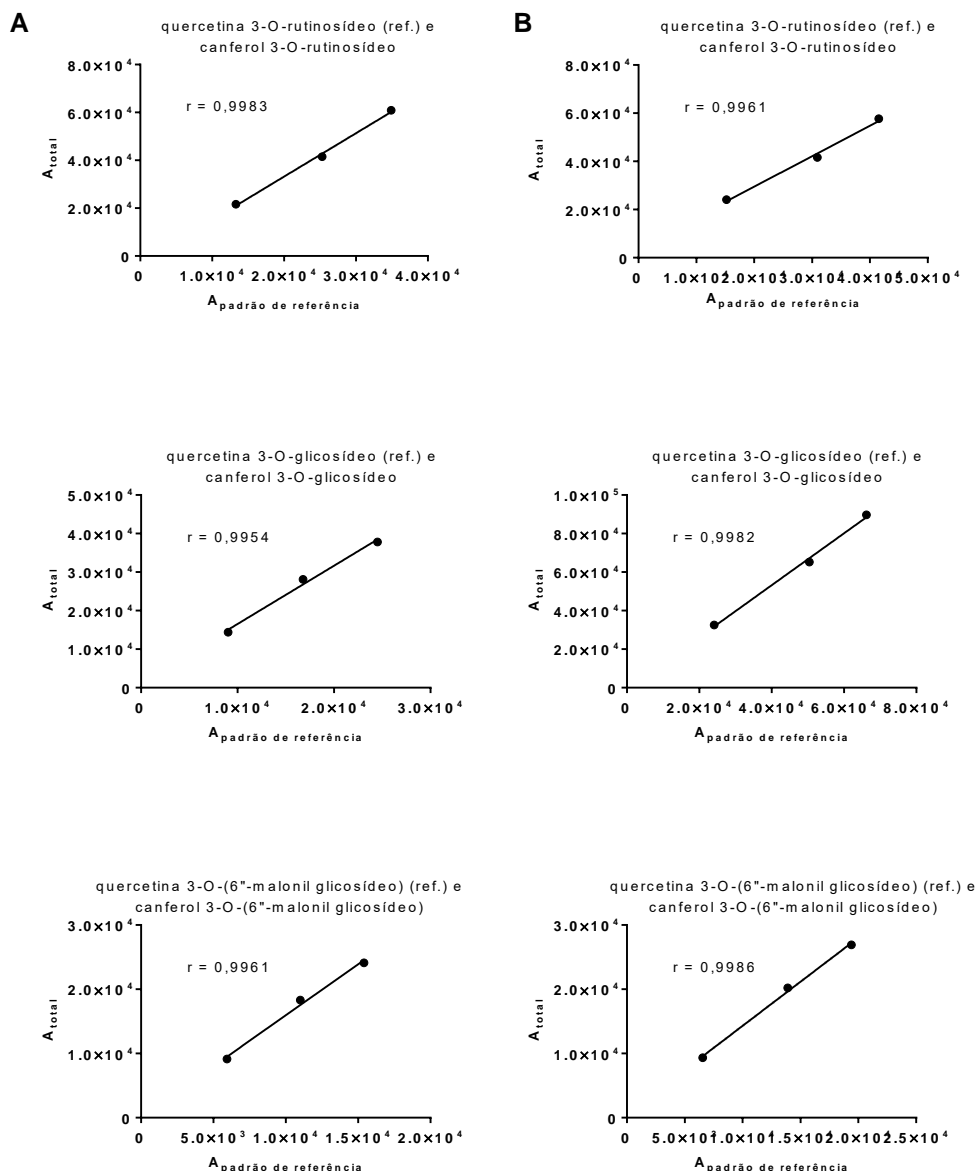


FIGURA 4.67 - Análises de correlação entre a resposta analítica de um flavonoide e a resposta total obtida para o par de homólogos por LC-MS/MS (A) e LC-DAD (B).

O método mais apropriado para se determinar a concentração de um analito em uma matriz complexa seria a adição-padrão, pois ele minimizaria possíveis efeitos de matriz. No entanto, pelos princípios do método, não seria possível utilizá-lo para estimar a concentração de um composto análogo a partir dos dados de um padrão de referência. Nesse caso o método mais apropriado seria o de padronização externa.

Para que a padronização externa pudesse ser utilizada como método para quantificação dos flavonoides, seria necessário inicialmente verificar se os extratos possuíam compostos que estivessem eluindo juntamente algum dos analitos de interesse, causando uma interferência no resultado da análise. Nesse

sentido, para 6 extratos preparados com misturas 25, 40, 55, 70, 85 e 99% EtOH (v/v) curvas de calibração por adição-padrão foram construídas em triplicata. Amostras de cada extrato na concentração de  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram fortificadas com volumes conhecidos dos os 3 padrões de referência, os derivados glicosilados da quercetina. Também foram construídas em triplicata, curvas de calibração externa para os mesmos 3 padrões de referência. Em ambas, a naringina (flavanona 7-O-glicosídeo) foi utilizada como padrão interno para corrigir pequenas variações do sinal analítico decorrentes do preparo de amostra e da análise. A naringina é um derivado glicosídico da flavanona narigenina, encontrada em folhas de frutas cítricas e ausente em folhas de amoreira. No método analítico desenvolvido nesse trabalho, esse analito apresentou retenção próxima aos flavonoides de interesse, sem comprometer a resolução dos mesmos (FIGURA 4.68)

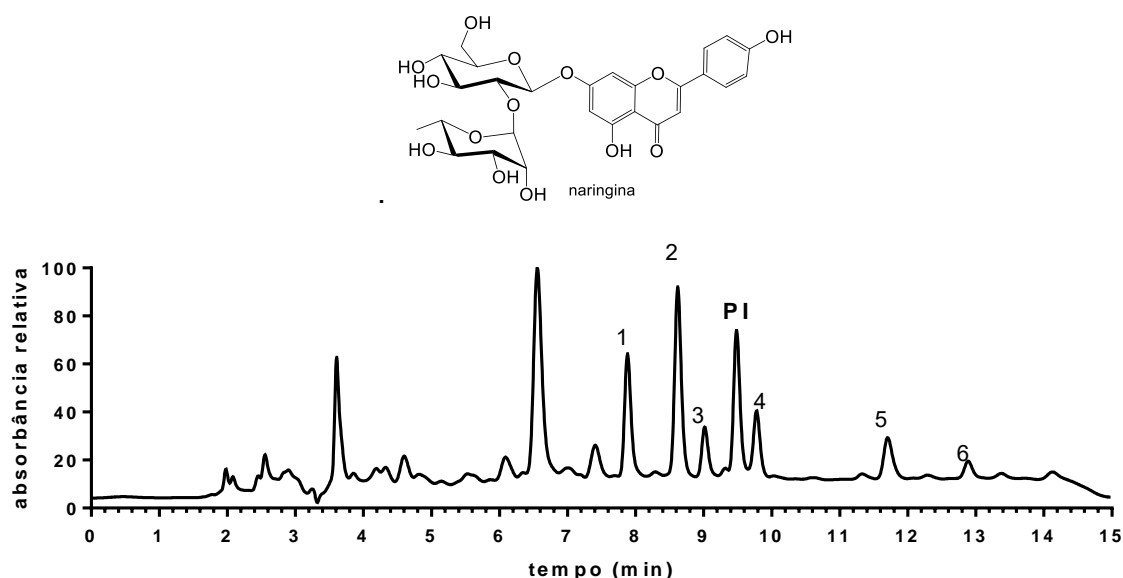


FIGURA 4.68 - Cromatograma de um extrato de folhas da amoreira ao qual foi adicionada naringina ( $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (PI). 1: rutina; 2: isoquercetina; 3: campferol 3-O-rutinosídeo; 4: astragalina; 5: quercetina 3-(6"- malonil-glicosídeo); 6: campferol 3-(6"- malonil-glicosídeo). PI: padrão interno, naringina. Fase A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$  0,1%; Fase B:  $\text{ACN}/\text{HCOOH}$  0,1%; Gradiente: 5 -100%, 60min, 100% 10 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão:  $600 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ . Vol. injeção:  $5 \text{ }\mu\text{L}$ ; Temperatura:  $40^\circ\text{C}$ .

Os métodos de adição-padrão e padronização externa apresentaram boa linearidade, com modelos lineares bem ajustados, capazes de explicar mais de 99% da variância total dos dados para cada um dos padrões de referência em todos os extratos. Os gráficos dos modelos lineares mostraram que os ajustes dos dois métodos levaram a duas retas paralelas (ANEXO 10). Isso significa que os extratos não apresentaram interferentes que pudessem comprometer a quantificação dos analitos, haja visto que os modelos gerados pelo método de adição-padrão e



padronização externa foram equivalentes. Os valores dos coeficientes angulares obtidos pelas equações de reta para os dois modelos estavam bastante próximos, evidenciando o paralelismo entre as curvas de regressão e confirmando assim a equivalência (TABELA 4.14).

TABELA 4.14 - Coeficientes dos modelos lineares para a quantificação dos flavonoides nos extratos

método	padrão de referência ( $y = b_0 + b_1x$ )					
	rutina		isoquercetina		quercetina 3-O-(6''-malonil glicosídeo)	
PE	$b_0 = 0,027 \pm 0,018$ $b_1 = 0,03769 \pm 0,00032$ $r^2 = 0,9986$		$b_0 = 0,039 \pm 0,028$ $b_1 = 0,04868 \pm 0,00051$ $r^2 = 0,9979$		$b_0 = 0,053 \pm 0,040$ $b_1 = 0,04752 \pm 0,00071$ $r^2 = 0,9957$	
ANOVA	$F_{Reg} = 13552$ $F_{faj} = 1,805$	$p = < 0,0001$ $p = 0,2041$	$F_{Reg} = 9029$ $F_{faj} = 2,409$	$p = < 0,0001$ $p = 0,09753$	$F_{Reg} = 4400$ $F_{faj} = 2,212$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1238$
AP 25%	$b_0 = 0,202 \pm 0,027$ $b_1 = 0,03732 \pm 0,00049$ $r^2 = 0,9968$		$b_0 = 0,545 \pm 0,045$ $b_1 = 0,04891 \pm 0,00081$ $r^2 = 0,9949$		$b_0 = 0,221 \pm 0,037$ $b_1 = 0,04812 \pm 0,00063$ $r^2 = 0,9967$	
ANOVA	$F_{Reg} = 5919$ $F_{faj} = 2,650$	$p = < 0,0001$ $p = 0,07329$	$F_{Reg} = 3706$ $F_{faj} = 2,950$	$p = < 0,0001$ $p = 0,05171$	$F_{Reg} = 5739$ $F_{faj} = 1,887$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1845$
AP 40%	$b_0 = 0,851 \pm 0,034$ $b_1 = 0,03742 \pm 0,00061$ $r^2 = 0,9950$		$b_0 = 1,618 \pm 0,035$ $b_1 = 0,04939 \pm 0,00063$ $r^2 = 0,9969$		$b_0 = 0,328 \pm 0,054$ $b_1 = 0,04940 \pm 0,00096$ $r^2 = 0,9928$	
ANOVA	$F_{Reg} = 3781$ $F_{faj} = 2,586$	$p = < 0,0001$ $p = 0,07904$	$F_{Reg} = 6110$ $F_{faj} = 0,7476$	$p = < 0,0001$ $p = 0,6484$	$F_{Reg} = 2620$ $F_{faj} = 2,932$	$p = < 0,0001$ $p = 0,05282$
AP 55%	$b_0 = 1,173 \pm 0,040$ $b_1 = 0,03756 \pm 0,00072$ $r^2 = 0,9931$		$b_0 = 2,126 \pm 0,051$ $b_1 = 0,04942 \pm 0,00091$ $r^2 = 0,9936$		$b_0 = 0,515 \pm 0,051$ $b_1 = 0,04913 \pm 0,00090$ $r^2 = 0,9936$	
ANOVA	$F_{Reg} = 2735$ $F_{faj} = 2,384$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1005$	$F_{Reg} = 2950$ $F_{faj} = 2,009$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1587$	$F_{Reg} = 2959$ $F_{faj} = 2,932$	$p = < 0,0001$ $p = 0,05277$
AP 70%	$b_0 = 1,224 \pm 0,040$ $b_1 = 0,03813 \pm 0,00072$ $r^2 = 0,9933$		$b_0 = 1,872 \pm 0,041$ $b_1 = 0,04962 \pm 0,00073$ $r^2 = 0,9959$		$b_0 = 0,386 \pm 0,055$ $b_1 = 0,04941 \pm 0,00098$ $r^2 = 0,9926$	
ANOVA	$F_{Reg} = 2817$ $F_{faj} = 2,198$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1260$	$F_{Reg} = 4615$ $F_{faj} = 0,4004$	$p = < 0,0001$ $p = 0,6762$	$F_{Reg} = 2549$ $F_{faj} = 2,945$	$p = < 0,0001$ $p = 0,05201$
AP 85%	$b_0 = 0,872 \pm 0,037$ $b_1 = 0,03664 \pm 0,00065$ $r^2 = 0,9940$		$b_0 = 1,547 \pm 0,050$ $b_1 = 0,04935 \pm 0,00089$ $r^2 = 0,9938$		$b_0 = 0,232 \pm 0,053$ $b_1 = 0,4838 \pm 0,00094$ $r^2 = 0,9932$	
ANOVA	$F_{Reg} = 3148$ $F_{faj} = 2,251$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1181$	$F_{Reg} = 3046$ $F_{faj} = 0,6243$	$p = < 0,0001$ $p = 0,6925$	$F_{Reg} = 2775$ $F_{faj} = 2,909$	$p = < 0,0001$ $p = 0,05421$
AP 99%	$b_0 = 0,793 \pm 0,034$ $b_1 = 0,03745 \pm 0,00061$ $r^2 = 0,9950$		$b_0 = 1,322 \pm 0,050$ $b_1 = 0,04918 \pm 0,00090$ $r^2 = 0,9937$		$b_0 = 0,264 \pm 0,051$ $b_1 = 0,04684 \pm 0,00090$ $r^2 = 0,9930$	
ANOVA	$F_{Reg} = 3781$ $F_{faj} = 1,060$	$p = < 0,0001$ $p = 0,4908$	$F_{Reg} = 2997$ $F_{faj} = 2,497$	$p = < 0,0001$ $p = 0,08779$	$F_{Reg} = 2695$ $F_{faj} = 2,113$	$p = < 0,0001$ $p = 0,1397$

PE - padronização externa; AP - adição de padrão;  $F_{Reg}$ : valor calculado para o teste F (modelo de regressão);  $F_{faj}$ : valor calculado para o teste F (falta de ajuste do modelo) p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ )

A equivalência entre os métodos de adição-padrão e padronização permitiu que esse último fosse utilizado para estimar a concentração dos 6 flavonoides nos extratos preparados, que inicialmente foram calculadas em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e em seguida teores (%m/m de extrato seco) (TABELA 4.15). Pelos valores obtidos, notou-se que a concentração dos flavonoides aumentava com um maior percentual alcoólico no solvente extrator.

TABELA 4.15 - Teores de flavonoides encontrados nos extratos preparados com diferentes composições hidroalcoólicas

% Etanol no extrato	RUT (%)	ISOQ (%)	C-RUT (%)	AST (%)	Q-MALGLC (%)	C-MALGLC (%)	total (%)
1	0,06	0,18	0,02	0,12	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,38
5	0,28	0,16	0,03	0,10	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,57
10	0,24	0,10	0,06	0,07	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,47
15	0,15	0,18	0,01	0,06	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,40
20	0,16	0,56	0,04	0,12	0,00 <sup>#</sup>	0,00 <sup>#</sup>	0,87
25	0,22	0,44	0,07	0,14	0,18	0,10	1,16
30	0,58	0,92	0,15	0,30	0,14	0,06	2,14
35	0,76	1,11	0,24	0,36	0,19	0,10	2,75
40	0,91	1,31	0,38	0,45	0,27	0,16	3,48
45	1,40	1,97	0,55	0,55	0,47	0,22	5,15
50	1,38	1,88	0,51	0,51	0,45	0,21	4,94
55	1,25	1,72	0,63	0,61	0,42	0,25	4,87
60	1,44	1,81	0,54	0,53	0,42	0,20	4,93
65	1,65	2,06	0,63	0,60	0,46	0,23	5,62
70	1,28	1,51	0,60	0,58	0,31	0,20	4,49
75	1,36	1,72	0,54	0,54	0,34	0,18	4,68
80	1,15	1,48	0,50	0,48	0,26	0,15	4,03
85	0,95	1,25	0,66	0,63	0,19	0,17	3,87
90	1,73	2,25	0,80	0,77	0,31	0,18	6,04
95	1,31	1,74	0,60	0,63	0,21	0,12	4,61
99	0,85	1,07	0,65	0,66	0,22	0,05	3,50

RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo)  
<sup>#</sup> - abaixo do limite inferior de quantificação

Analisando-se comparativamente esses resultados com os perfis de atividade biológica, pode-se perceber que nos três testes realizados, os flavonoides quando considerados individualmente não influenciaram significativamente a resposta observada. Entretanto, notou-se que o aumento no teor total de flavonoides, houve uma diminuição da atividade estrogênica (FIGURA 4.69A) e o aparecimento de citotoxicidade para células sadias (FIGURA 4.69B). Já no teste de seletividade, os flavonoides pareceram não influenciar os resultados obtidos, pois

não foi possível observar uma tendência que pudesse relacionar o aumento na concentração total de flavonoides com a atividade observada (FIGURA 4.69C).

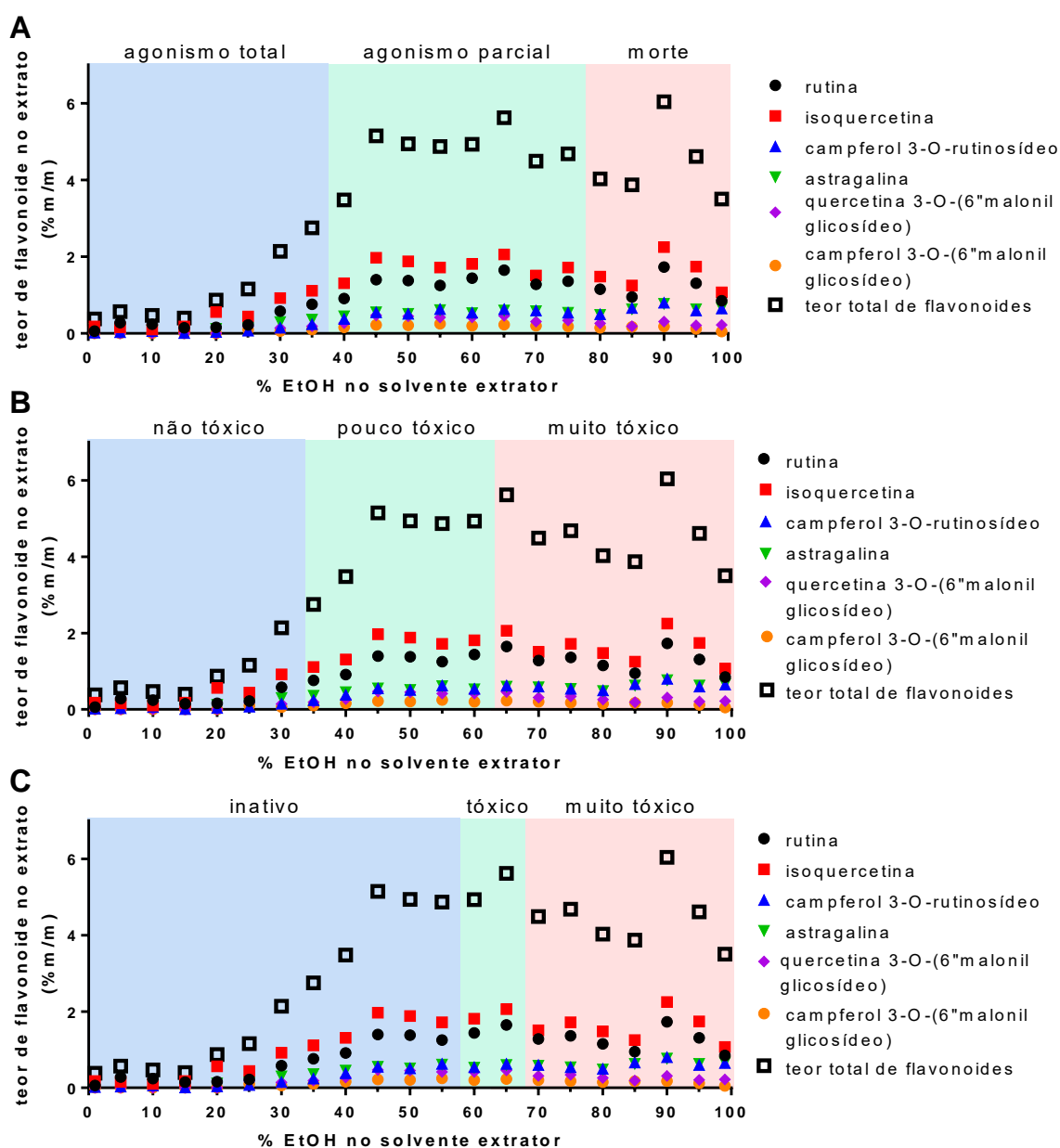


FIGURA 4.69 - Análise dos teores de flavonoides em função da composição etanólica do solvente extrator e da atividade biológica avaliada. A: estrogenicidade (MCF-7), B: citotoxicidade (BALB/c 3T3 clone A31), C: seletividade (MDA-MB-231).

Com base nos resultados das análises de perfil químico apresentadas até aqui, conclui-se que os seis flavonoides identificados nos extratos de folhas de amoreira estariam relacionados com a atividade estrogênica, e, portanto, poderiam ser considerados fitoestrógenos. Por estarem relacionados com a atividade biológica e já terem sido identificados em folhas de amoreiras em diferentes estudos, os seis

compostos foram escolhidos como marcadores químicos para o controle de qualidade do material vegetal utilizado no preparo dos extratos, o que inclui a análise de autenticidade do material. Cabe ressaltar, no entanto, que para que esses mesmos flavonoides sejam selecionados como marcadores químicos para o controle de qualidade do extrato como IFAV na formulação de MFs ou PTFs, estudos *in vivo* têm que ser realizados, ou ao menos, um número maior de relatos de atividade terapêutica tem que ser publicado na literatura científica.

A isoquercetina (quercetina 3-O-glicosídeo), um dos flavonoides majoritários em todos os extratos, também está relacionada com o fato da folha de amoreira ser o alimento exclusivo do bicho-da-seda. Juntamente com a morina, flavonoide característico das espécies *Morus sp.* e com óleos essenciais, é responsável por atrair o bicho-da-seda e está diretamente relacionada à mordida, sem necessariamente estar envolvida no processo de ingestão<sup>226</sup>. Apenas para ilustrar a sua importância nesse processo, substituindo-se a glicose pela ramnose ou mesmo a rutinose na molécula desse flavonoide, a planta deixa de ter um efeito atrativo e passa a apresentar um efeito repulsivo ao bicho-da-seda<sup>227</sup>. A morina, entretanto, não foi detectada nos extratos preparados nesse trabalho.

#### 4.3.3 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA OS MARCADORES QUÍMICOS

Usando os resultados apresentados anteriormente, seis flavonoides glicosilados (3 pares de análogos) foram selecionados como marcadores químicos para análises de monitoramento da qualidade da matéria-prima utilizada no preparo dos extratos biologicamente ativos. Na seção 4.3.2.2.2, alínea “c” foi mostrado que, utilizando-se padrões de referência para 3 flavonoides, seria possível estimar as concentrações dos seus respectivos análogos. Logo, para que essas estimativas fossem válidas, o método teria que ser confiável. A melhor forma de se ter credibilidade em um método analítico é por meio da validação das figuras de mérito, relacionadas às análises. As figuras de mérito e os valores aceitáveis na validação dependem das diretrizes utilizadas para essa finalidade, as quais variam de acordo com a aplicabilidade das análises e geralmente são propostas por autoridades regulamentadoras e/ou fiscalizadoras.

Nesse trabalho o método desenvolvido foi validado para os flavonoides rutina, isoquercetina e quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) com base nas

recomendações da ANVISA dispostas nas resoluções RE n°. 899 de 29 de maio de 2003<sup>188</sup> e RDC n°. 27 de 17 de maio de 2012<sup>189</sup>. De acordo com as orientações da agência regulamentadora para “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos” divulgadas pela Gerência de Medicamentos Isentos, Específicos, Fitoterápicos e Homeopáticos (GMEFH - ANVISA), “a validação da metodologia analítica para fitoterápicos deve ser feita de acordo com o disposto na RE 899/03, porém, os resultados podem seguir os níveis de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade da matéria-prima vegetal”<sup>225</sup>. Níveis esses que estão publicados na resolução 27/2012.

A seletividade do método mede a sua capacidade em identificar e quantificar um analito de interesse na presença de interferentes, tais como impurezas, produtos de degradação e outras substâncias constituintes de uma matriz complexa. No trabalho, esse parâmetro foi avaliado por meio de análise comparativa entre os cromatogramas obtidos para os padrões de referência comerciais e o cromatograma obtido para o extrato de folhas de amoreira preparado com 30% EtOH. Esse extrato, dentre aqueles com melhor atividade biológica, preparados com 20 a 30% de etanol, foi o que apresentou os maiores teores de flavonoides. A análise dos cromatogramas obtidos mostrou que não havia coeluição de interferentes para qualquer um deles (FIGURA 4.70).

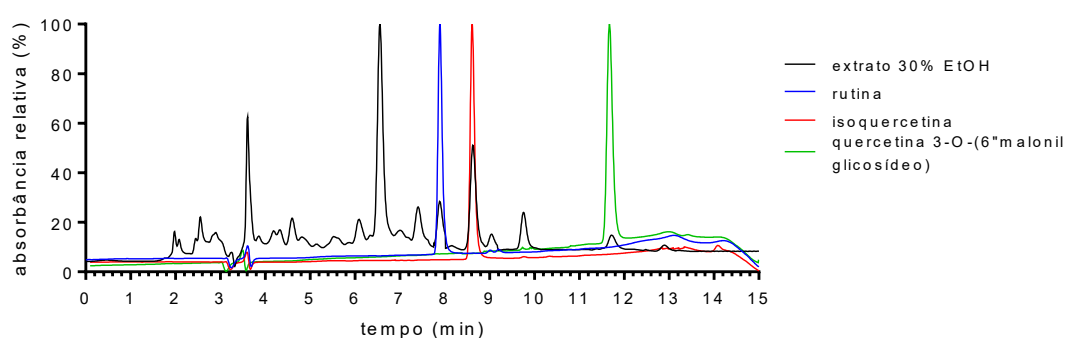


FIGURA 4.70 - Análise comparativa das substâncias de referência e os respectivos flavonoides no extrato preparado com 30% Etanol. Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,1%; Fase B: ACN/HCOOH 0,1%; Gradiente: 5 -100%, 60min, 100% 10 min; Detecção: DAD 200-800 nm; Vazão: 1000  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vol. injeção: 5  $\mu\text{L}$ ; Temperatura: 40°C

A seletividade também foi analisada com base nos resultados das estimativas de concentração dos 3 analitos em amostras do extrato com 30% EtOH, sem a adição dos padrões e fortificadas nas concentrações de 3, 50 e 75  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essas 3 concentrações foram escolhidas por serem respectivamente: (i) 3 vezes o

limite inferior de quantificação; (ii) próximo aos limites inferior e superior de quantificação; e (iii) 75% do limite superior de quantificação.

As concentrações dos marcadores de referência foram estimadas a partir de uma curva de calibração em água (padronização externa). Nas amostras que foram fortificadas, foram calculadas as concentrações totais, sendo em seguida subtraída a concentração do padrão de referência que foi adicionado (TABELA 4.16).

TABELA 4.16 - Concentração dos padrões de referência no extrato com 30% de etanol

analito	rutina	isoquercetina	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)
<b>sem fortificação</b>	14,462±0,077 µg.mL <sup>-1</sup>	22,933±0,089 µg.mL <sup>-1</sup>	3,424±0,047 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>3,0 µg.mL<sup>-1</sup></b>	14,487±0,096 µg.mL <sup>-1</sup>	23,00±0,10 µg.mL <sup>-1</sup>	3,460±0,026 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>50 µg.mL<sup>-1</sup></b>	14,440±0,096 µg.mL <sup>-1</sup>	22,92±0,10 µg.mL <sup>-1</sup>	3,438±0,021 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>75 µg.mL<sup>-1</sup></b>	14,440 ± 0,022 µg.mL <sup>-1</sup>	22,969 ± 0,088 µg.mL <sup>-1</sup>	3,449±0,027 µg.mL <sup>-1</sup>

Dois testes estatísticos (F e t-Student pareado) foram aplicados para verificar se os valores estimados eram significativos usando os dados das amostras não certificadas como referencial. O primeiro teve como objetivo verificar se as variâncias dos conjuntos de dados seriam comparáveis. O último buscava verificar se os valores obtidos para as concentrações seriam estatisticamente equivalentes. O teste F mostrou que, no nível de confiança de 95%, as variâncias dos conjuntos de dados foram comparáveis em qualquer um dos níveis de fortificação, indicando que todos os valores poderiam ser utilizados para se calcular a variância global do modelo. O teste t-pareado mostrou que no mesmo nível de confiança não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras com 95% de confiança (TABELA 4.17). Com esses resultados, pode-se concluir que o método foi seletivo para os analitos de interesse, sem efeito de matriz devido a outros componentes presentes no extrato.

TABELA 4.17 - Teste t-pareado e teste F para a seletividade do método analítico

analito	Nível	g.l	teste F		teste t-student	
			F	p	t	p
rutina	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	1,336	0,7586	0,6131	0,5535
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	1,533	0,6507	0,4397	0,6695
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	2,084	0,4395	0,5519	0,5931
	não fortificado	5				
isoquercetina	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	1,327	0,7640	1,155	0,2748
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	1,281	0,7905	0,1546	0,8802
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	1,009	0,9920	0,7090	0,4945
	não fortificado	5				
quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	3,283	0,2180	1,648	0,1304
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	4,969	0,1032	0,6440	0,5341
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5	3,018	0,2507	1,122	0,2881
	não fortificado	5				

A linearidade é o parâmetro que avalia se a resposta analítica é diretamente proporcional à concentração dos analitos em um dado intervalo. Nesse trabalho, ela foi avaliada em triplicata para os 3 padrões de referência, na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Analisando-se os gráficos com os modelos de regressão para cada padrão de referência, observou-se que uma relação linear entre as áreas e as concentrações de cada analito (FIGURA 4.71).

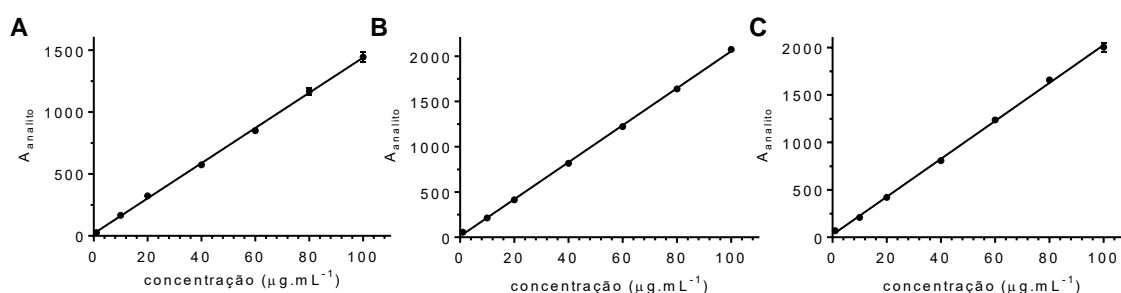


FIGURA 4.71 - Modelos de regressão linear para a avaliação da linearidade na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (em água) para rutina (A), isoquercetina (B) e quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) (C).

Matematicamente, as relações lineares foram descritas por equações obtidas pelo método dos mínimos quadrados (TABELA 4.18). Em todas as concentrações utilizadas para a construção dos 3 modelos, o desvio padrão relativo proveniente das análises das replicatas foi inferior a 10% e, portanto dentro das condições aceitas pela ANVISA (máximo de 20% para o limite inferior de quantificação e 15% para os demais pontos). Os coeficientes de correlação apresentaram valores acima de 0,999, com uma magnitude acima do mínimo preconizado pela agência regulamentadora ( $r > 0,99$ ). Além disso, os gráficos de resíduos mostraram uma homocedasticidade dos dados, visto que os resíduos se mantiveram próximos a zero (FIGURA 4.72).

TABELA 4.18 - Equações matemáticas dos modelos de regressão linear obtidos para os padrões de referência dos flavonoides

analito	equação do modelo linear	coeficiente de correlação
rutina	$y=(18,9\pm 8,1)+(14,22\pm 0,14)x$	$r=0,9990$
isoquercetina	$y=(11,8\pm 7,8)+(20,43\pm 0,14)x$	$r=0,9995$
quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	$y=(27\pm 10)+(19,99\pm 0,19)x$	$r=0,9991$

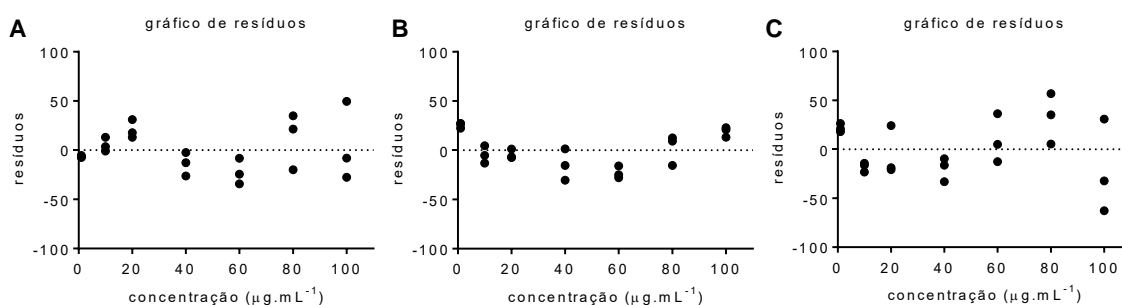


FIGURA 4.72 - Gráficos de resíduos dos modelos de regressão linear para os 3 flavonoides de referência: rutina (A), isoquercetina (B) e quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) (C).

A análise de variância (ANOVA) realizada para cada modelo linear mostrou que todos eles apresentaram bons ajustes aos conjuntos de dados e foram capazes de explicar mais de 99,5% de toda a variância total (TABELA 4.19).

Diante desses resultados, conclui-se que o modelo linear teve um bom ajuste às respostas analíticas dos três conjuntos de dados avaliados em função da concentração do padrão de referência. Portanto, as concentrações dos flavonoides no extrato poderiam ser corretamente estimadas na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



TABELA 4.19 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos lineares de regressão para cada padrão de referência utilizado na validação do método analítico

<b>ANOVA - rutina</b>					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	4135853	1	4135853	7984	<0,0001
Resíduo	8288	16	518,0		
F, ajuste	3254	4	813,4	1,974	0,1613
Erro puro	4945	12	412,09		
total	4144141	17			
% variação máxima explicada				99,80	
% variação máxima explicável				99,88	
<b>ANOVA - isoquercetina</b>					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	8433365	1	8433365	8325	<0,0001
Resíduo	7596	16	474,8		
F, ajuste	3436	4	859,1	2,543	0,08737
Erro puro	4054	12	337,8		
total	8440962	17			
% variação máxima explicada				99,91	
% variação máxima explicável				99,95	
<b>ANOVA - quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)</b>					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	8529633	1	8529634	9396	<0,0001
Resíduo	14525	16	907,8		
F, ajuste	6757	4	1689	2,686	0,07531
Erro puro	7548	12	629,0		
total	8544159	17			
% variação máxima explicada				99,83	
% variação máxima explicável				99,91	

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; F: valor calculado para o teste F; p: probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ( $\alpha = 0,05$ ); F, ajuste: falta de ajuste

A precisão é um parâmetro através da qual se avalia a dispersão dos dados obtidos para diferentes amostras provenientes de um mesmo produto, nesse caso, do mesmo extrato. Para a avaliação desse parâmetro, foram preparadas amostras dos 3 padrões de referência em 3 níveis de concentração: baixo ( $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), médio ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alto ( $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A precisão pode ser dividida em repetibilidade (ou intracorridas) e precisão intermediária. A primeira buscava avaliar a dispersão dos dados ao longo de um dia. Por isso, amostras foram preparadas em triplicata para cada nível de concentração e analisadas aleatoriamente no mesmo dia. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para a repetibilidade estavam, para todos os níveis avaliados, abaixo dos 5%, muito melhor do que o limite de 15%

aceito pela ANVISA. Isso significa que as replicatas preparadas para esse ensaio apresentaram pouca dispersão dos dados (TABELA 4.20).

TABELA 4.20 - Coeficientes de variação para a repetibilidade do método analítico

analito	CV (%)		
	3 µg.mL <sup>-1</sup>	50 µg.mL <sup>-1</sup>	75 µg.mL <sup>-1</sup>
rutina	4,07	1,89	1,47
isoquercetina	3,17	1,73	1,46
quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	4,44	1,72	1,18

A precisão intermediária (ou intercorridas) visava avaliar a concordância de resultados obtidos em dias diferentes. Para isso, amostras contendo os padrões de referência foram preparadas em quintuplicata nos mesmos 3 níveis de concentração. Elas foram analisadas em dois dias não-consecutivos. O teste F e o teste t-Student mostraram que, no nível de 95% de confiança, as variâncias eram comparáveis e estatisticamente não havia diferença entre os dados obtidos para cada analito em cada um dos dias (TABELA 4.21). Portanto, os dados poderiam ser analisados em conjunto para a obtenção do coeficiente de variância global.

TABELA 4.21 - Teste F e t-Student para comparação dos dados obtidos para precisão intermediária

analito	concentração	dia	g.l	teste F		teste t-Student																																																																						
				F	p	t	p																																																																					
rutina	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,140	0,4794	0,2963	0,7745																																																																					
		2	4					50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,700	0,6198	0,2499	0,8089	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,153	0,4759	0,1720	0,8677	2	4	isoquercetina	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,061	0,5010	0,6180	0,5538	2	4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,716	0,6136	0,4089	0,6932	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,935	0,3218	0,8668	0,4113	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2	4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694
	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,700	0,6198	0,2499	0,8089																																																																					
2		4	75 µg.mL <sup>-1</sup>					1	4	2,153	0,4759	0,1720	0,8677	2	4	isoquercetina	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,061	0,5010	0,6180	0,5538	2	4		50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,716	0,6136	0,4089	0,6932	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,935	0,3218	0,8668	0,4113	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2		4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4			
75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4		2,153	0,4759	0,1720	0,8677																																																																					
	2	4	isoquercetina					3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,061	0,5010	0,6180	0,5538	2		4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,716	0,6136	0,4089	0,6932	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,935	0,3218	0,8668	0,4113	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2		4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4												
isoquercetina	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1		4	2,061	0,5010	0,6180		0,5538																																																																			
		2		4				50 µg.mL <sup>-1</sup>		1	4	1,716	0,6136	0,4089	0,6932	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	2,935	0,3218	0,8668	0,4113	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2		4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4																					
	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,716	0,6136	0,4089	0,6932																																																																					
2		4	75 µg.mL <sup>-1</sup>					1	4	2,935	0,3218	0,8668	0,4113	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2	4	50 µg.mL <sup>-1</sup>		1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4																																
75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4		2,935	0,3218	0,8668	0,4113																																																																					
	2	4	quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)					3 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	3,040	0,3070	0,5208	0,6166	2		4	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4																																									
quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	3 µg.mL <sup>-1</sup>	1		4	3,040	0,3070	0,5208		0,6166																																																																			
		2		4				50 µg.mL <sup>-1</sup>		1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545	2	4	75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4																																																		
	50 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4	1,894	0,5515	0,6169	0,5545																																																																					
2		4	75 µg.mL <sup>-1</sup>					1	4	1,694	0,6223	0,06600	0,9490	2	4																																																													
75 µg.mL <sup>-1</sup>	1	4		1,694	0,6223	0,06600	0,9490																																																																					
	2	4																																																																										

Na análise conjunta com todas as replicatas, o método apresentou coeficientes de variação com valores maiores que aqueles obtidos para a repetibilidade na precisão intermediária (TABELA 4.22). Mesmo assim, todos os valores obtidos para os 3 analitos de referência nos 3 níveis de concentração analisados estavam abaixo dos valores máximos aceitos pela ANVISA (TABELA 4.23).

TABELA 4.22 - Coeficientes de variação para a precisão intermediária do método

analito	CV (%)		
	3 µg.mL <sup>-1</sup>	50 µg.mL <sup>-1</sup>	75 µg.mL <sup>-1</sup>
rutina	6,85	3,61	4,94
isoquercetina	5,96	3,53	2,93
quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo)	8,51	4,08	3,55

A exatidão é um parâmetro que avalia a concordância entre o resultado experimental e o valor de referência acreditado como verdadeiro. A forma ideal de se avaliar a exatidão de um método seria fortificar uma amostra isenta do analito com uma concentração definida do mesmo e observar o quanto o resultado experimental (no caso a concentração) se aproxima do valor real. No entanto, para amostras complexas como os extratos vegetais, não é possível obter a matriz isenta do analito, por isso a avaliação da exatidão é feita de outra forma.

Nesse trabalho a exatidão do método foi avaliada com base em análises de amostras de extrato fortificadas com quantidades conhecidas dos analitos de referência em 3 níveis de concentração: baixo (3,0 µg.mL<sup>-1</sup>), médio (50 µg.mL<sup>-1</sup>) e alto (75 µg.mL<sup>-1</sup>). O extrato foi utilizado na concentração de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> para que as respostas analíticas obtidas para as amostras fortificadas estivessem dentro da faixa linear. Amostras do extrato não-fortificado também foram analisadas para se conhecer a concentração dos analitos de referência no extrato.

Determinadas as concentrações de cada analito nas duas amostras (fortificada e não-fortificada), subtraía-se o valor correspondente à concentração do analito componente do extrato. O valor restante corresponderia à quantidade do composto de referência que foi adicionado ao extrato. A exatidão foi calculada pela equação:

$$\text{exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica ou nominal}} \times 100\% \quad \text{eq. 4.11}$$

Outra forma de se expressar a exatidão do método é pelo erro padrão relativo (EPR) que mede o distanciamento do valor experimental em relação ao valor teórico (ou nominal):

$$\text{EPR} = \frac{\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} \times 100\% \quad \text{eq. 4.12}$$

Nesse estudo, os valores de exatidão ficaram próximos a 100% com baixa dispersão de dados para cada um dos analitos de interesse (TABELA 4.21). Os valores de EPR também mostraram boa proximidade com os valores teóricos e foram menores que o máximo aceito pela ANVISA (15%).

TABELA 4.23 - Exatidão obtida para o método analítico em 3 níveis de concentração dos analitos de referência

<b>analito</b>	<b>concentração</b>	<b>exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>rutina</b>	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,9 $\pm$ 2,2	0,85
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,95 $\pm$ 0,19	0,044
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,972 $\pm$ 0,072	0,028
<b>isoquercetina</b>	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	102,1 $\pm$ 3,4	2,13
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,98 $\pm$ 0,20	0,017
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,05 $\pm$ 0,12	0,048
<b>quercetina 3-O-(6''-malonil glicosídeo)</b>	3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	101,21 $\pm$ 0,87	1,21
	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,027 $\pm$ 0,042	0,027
	75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,044 $\pm$ 0,041	0,044

O intervalo de aplicação é a faixa de concentração delimitada pelos limites de quantificação inferior e superior na qual o método apresenta boa linearidade, precisão e exatidão e que será aplicado para análises de amostras nas quais se deseja quantificar o analito para o qual os parâmetros mencionados foram validados. A concentração deste nas amostras deve estar dentro do intervalo especificado. Caso contrário, é necessário manipular a amostra por diluição ou concentração para que essa condição seja atendida.

Nesse trabalho, observou-se que o método analítico apresentou boa linearidade, precisão e exatidão para os flavonoides de referência rutina, isoquercetina e quercetina 3-O-(6''-malonil-glicosídeo) na faixa de 1 a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nessa faixa, foi possível quantificar os seus teores no extrato com 30% EtOH diluído para as concentrações de 2,5 a 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

A robustez é um parâmetro que mede a capacidade do método em resistir a pequenas variações nas condições cromatográficas, indicando a sua confiabilidade para análises de rotina. No caso de um método cromatográfico, ela avalia se pequenas variações nas condições experimentais de análise interferem na separação cromatográfica. Nessa etapa, o maior número de parâmetros experimentais deve ser avaliado para assegurar uma maior confiabilidade ao método, implicando em um grande número de experimentos. O planejamento experimental, nesse caso, torna-se especialmente interessante por permitir analisar muitas variáveis com poucos experimentos, principalmente quando o método envolve a quantificação de muitos analitos<sup>228</sup>.

No planejamento experimental de fração meia com 16 experimentos, os contrastes principais estavam confundidos com os de mais alta ordem de interação (4 fatores). Dessa forma, foi possível avaliar se pequenas variações nos parâmetros cromatográficos em questão comprometeriam a separação cromatográfica e conseqüentemente a quantificação dos analitos de interesse. As resoluções entre as bandas cromatográficas dos flavonoides foram utilizadas como variável dependente no planejamento. Por serem múltiplas respostas, elas foram convertidas em um único valor de deseabilidade total por meio das equações 4.4 e 4.5 (ANEXO 8).

Uma análise do gráfico de contrastes sugeriu que dos cinco fatores avaliados, apenas o pH da fase móvel (A) apresentou variações que afetaram significativamente a separação cromatográfica (FIGURA 4.73). Além dela, foi possível observar que 2 interações também se mostraram significativas, embora estivessem contribuindo com aproximadamente metade do efeito observado para a variável principal acima. O tempo de gradiente foi a variável comum envolvida nas duas interações, das quais também participaram o pH e a vazão da fase móvel. No caso das interações, com exceção do pH, as outras duas variáveis principais (que possuem um efeito de maior ordem quando comparado com aquele apresentado por uma interação entre duas variáveis) não apresentaram efeitos significativos. Sendo assim, embora a interação BC tenha apresentado um efeito numericamente maior que o da interação AC, essa última se torna mais relevante pelo fato de a variável principal ter apresentado um efeito significativo.

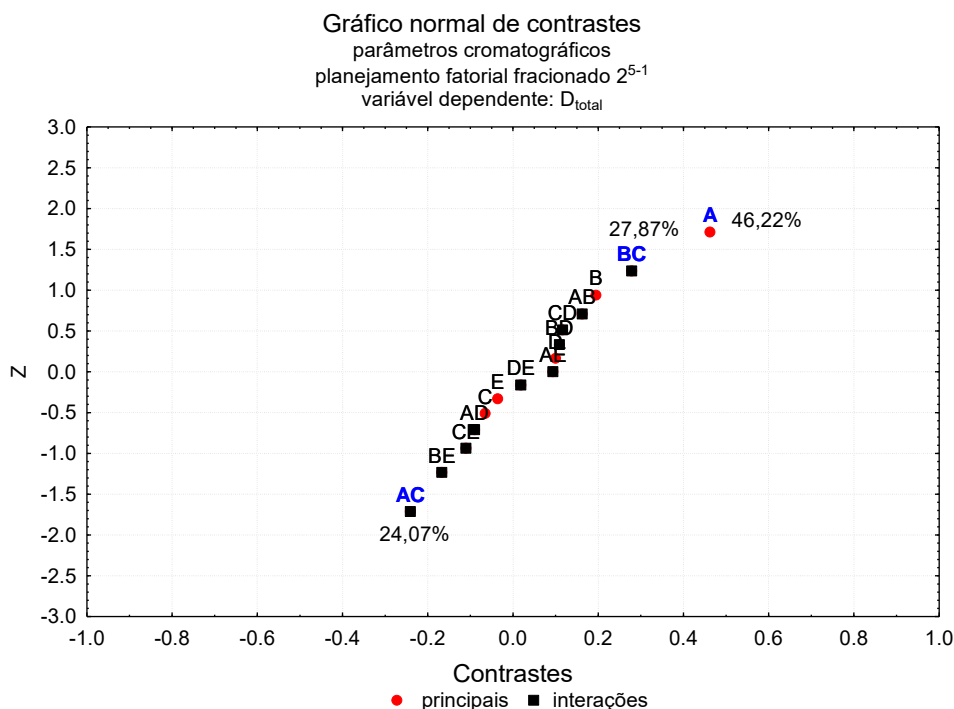


FIGURA 4.73 - Gráfico normal de contrastes para avaliação da robustez do método cromatográfico

Quando a quantidade de ácido fórmico foi aumentada, diminuindo o pH na fase móvel em 0,04 unidades, (nível “-1” do planejamento experimental), observou-se uma coeluição parcial apenas nas bandas cromatográficas da isoquercetina e do campferol 3-rutinosídeo (bandas 2 e 3 no cromatograma da FIGURA 4.74), o que refletiu em uma redução da resolução cromatográfica para os dois analitos. Nessas condições, a separação dos demais flavonoides não foi comprometida. Para a análise do planejamento experimental, os valores de  $R_s$  foram convertidos em uma única variável dependente, a desejabilidade total. Como essa função é uma média geométrica de todas as  $R_s$ s, com um peso maior para os valores inferiores a 2,0 (eq. 4.4 e 4.5), a co-eluição ainda que parcial entre os analitos 2 e 3 levou a uma redução no valor da desejabilidade total para os experimentos realizados com a fase móvel em um pH mais alto.

A coeluição parcial pode ser um problema quando se utiliza sistemas LC-UV para quantificação, o que geralmente é feito em análises de rotina, uma vez que os instrumentos dessa natureza apresentam menor custo. Nesse caso, o pH da fase móvel tem que ser ajustado corretamente. Quando é possível utilizar sistemas LC-DAD para análises quantitativas, a coeluição parcial de dois analitos com tempos de retenção muito próximos deixa de ser um problema, pois com ferramentas de deconvolução (presentes em muitos programas de gerenciamento) é possível

quantificar um analito na presença de interferentes.

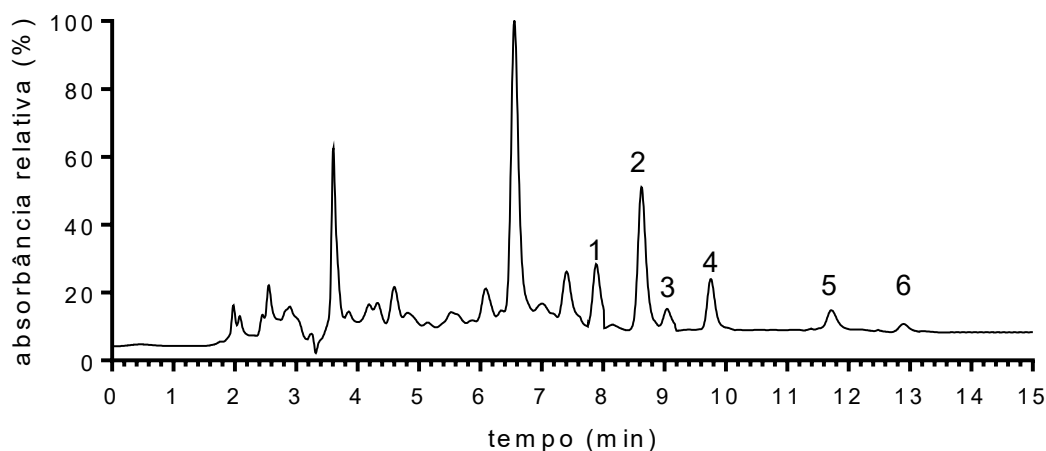


FIGURA 4.74 - cromatograma de referência para a avaliação da robustez do método cromatográfico. 1: rutina; 2: isoquercetina; 3: campferol 3-O-rutinosídeo; 4: astragalina; 5: quercetina 3-(6"- malonil-glicosídeo); 6: campferol 3-(6"- malonil-glicosídeo).

De um modo geral, pode-se dizer que o método desenvolvido nesse trabalho é um método robusto, porém ele requer que o pH da fase móvel seja ajustado corretamente para que as análises quantitativas sejam realizadas com sucesso, principalmente quando se utiliza sistemas cromatográficos mais simples como LC-UV.

#### 4.3.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO NA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE AMOREIRA

Os extratos de folhas de amoreira utilizados nos ensaios celulares e nos estudos de caracterização química foram preparados a partir do material vegetal coletado em um determinado período (março) de um ano específico (2012). Sabe-se, porém, que a produção de metabólitos secundários não ocorre de maneira uniforme na planta, sofrendo influências de diferentes fatores internos e externos. Além disso, a forma como o material vegetal é manipulado também pode interferir no teor dos fitoestrógenos presentes nos extratos, devido a perdas tanto por degradação do material quanto por formas ineficazes de extração. Pensando na aplicabilidade do extrato em formulações fitoterápicas para o tratamento dos sintomas do climatério, essa flutuação nos teores de fitoestrógenos poderia comprometer a eficiência do produto.

Dessa forma, a etapa final desse trabalho buscou avaliar se a

manipulação do material vegetal (e os fatores diversos relacionados ao desenvolvimento da planta) estariam comprometendo os teores de fitoestrógenos presentes no extrato.

#### 4.3.4.1 - MANIPULAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL PARA A PREPARAÇÃO DO EXTRATO.

Algumas variáveis relacionadas à manipulação do material vegetal para o preparo do extrato foram mantidas constantes nos estudos anteriores. Nessa etapa elas foram investigadas em relação à sua influência na extração dos fitoestrógenos. Por isso, o extrato preparado com 30% de etanol (v/v) foi utilizado em todos os estudos como referência para eventuais alterações.

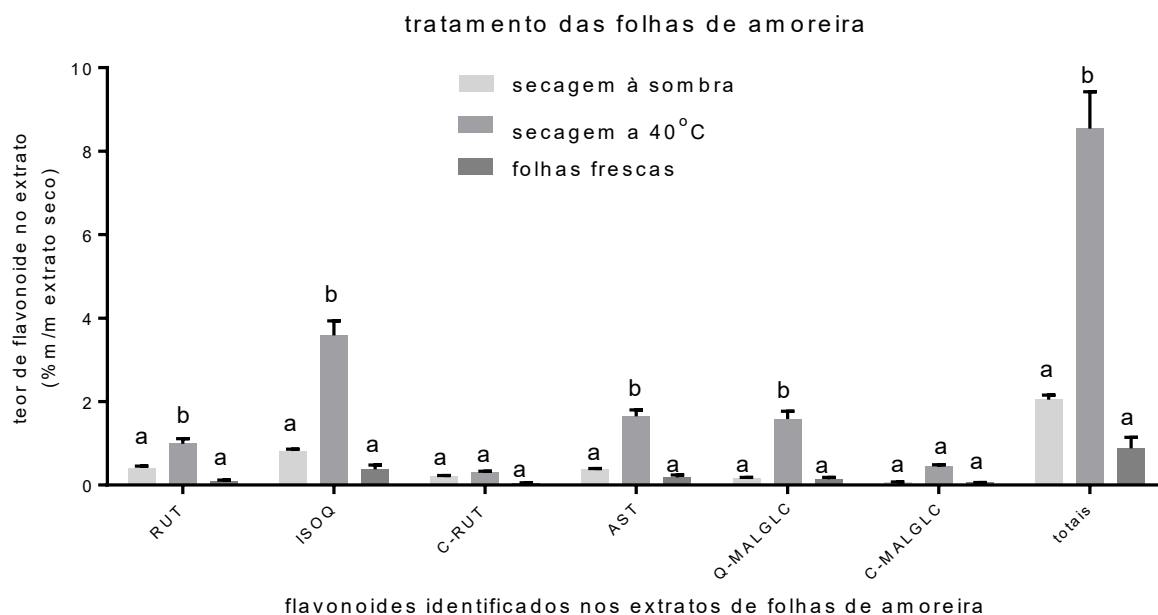
Três tratamentos foram avaliados para o material vegetal em relação à secagem para a preparação do extrato: secagem à sombra e temperatura ambiente (referência), secagem em forno a 40°C e utilização do material fresco, logo após a colheita. Sabe-se que temperaturas elevadas podem levar a degradação de metabólitos secundários de plantas<sup>194</sup>, ao passo que à sombra e em temperatura ambiente, o material fica suscetível a variações na umidade relativa do ar, o que pode acelerar ou retardar o processo de secagem e eventualmente levar ao aparecimento de fungos nas folhas. A utilização de folhas frescas, recém-colhidas, teve como objetivo principal observar se a secagem das folhas poderia ocasionar perdas significativas de flavonoides, sobretudo por degradação.

Analisando-se comparativamente as concentrações dos flavonoides, observou-se que a secagem a 40°C favoreceu a extração de alguns fitoestrógenos, como a rutina, a isoquercetina, a astragalina e a quercetina 3-O-(6"-malonil glicosídeo) (FIGURA 4.75). Como o tratamento favoreceu seletivamente alguns compostos bioativos, ele alterou o perfil que levou à atividade biológica observada. Dessa forma, esse tratamento foi desconsiderado.

A análise de variância com teste *ad hoc* de Bonferroni ( $p < 0,001$ ) mostrou que não houve diferença significativa entre a secagem à sombra e o uso de folhas frescas. O teste de Bonferroni é similar ao teste de Tukey realizado nos ensaios de atividade biológica. A diferença entre eles é que o primeiro é mais conservador e por isso funciona melhor quando o número de comparações é reduzido (até 5 grupos). O uso das folhas frescas nesse trabalho se tornaria pouco viável, pois elas deveriam ser moídas pouco tempo após a coleta, que foi realizada a



uma distância de 200 km do laboratório onde o material foi processado. Dessa forma, concluiu-se que a secagem à sombra e temperatura ambiente, mesmo sendo um processo mais longo, seria a melhor para o preparo do extrato e optou-se por também utilizá-la nos demais experimentos.



**FIGURA 4.75 - Avaliação do tratamento de secagem das folhas de amoreira na preparação do extrato.** RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ )

Na etapa de triagem do planejamento experimental para a otimização do extrato com potencial estrogênico, observou-se que o tempo de maceração não era uma variável significativa e decidiu-se utilizar o tempo de 1 h por ter sido esse o menor tempo avaliado no intervalo (TABELA 3.1). Nesse estudo, o objetivo principal foi avaliar se seria possível reduzir ainda mais o tempo de extração, sem comprometimento da composição do extrato que apresentou bons resultados para atividade biológica. Quando se analisou o teor dos flavonoides individualmente, observou-se que o tempo de maceração não influenciou significativamente o teor de cada um deles no extrato (Bonferroni,  $p < 0,001$ ) (FIGURA 4.76). Porém para o teor total de flavonoides, o tempo de 60 min levou a um maior conteúdo no extrato. Sabe-se que um maior teor total de flavonoides reduz a atividade estrogênica, porém esse foi o perfil que apresentou a melhor atividade biológica. Acredita-se que possivelmente os outros extratos apresentariam atividade estrogênica similar com um valor maior para  $EC_{50}$ . Dessa forma, decidiu-se por manter o tempo de

incubação de 60 min para o preparo dos extratos e nos demais experimentos.

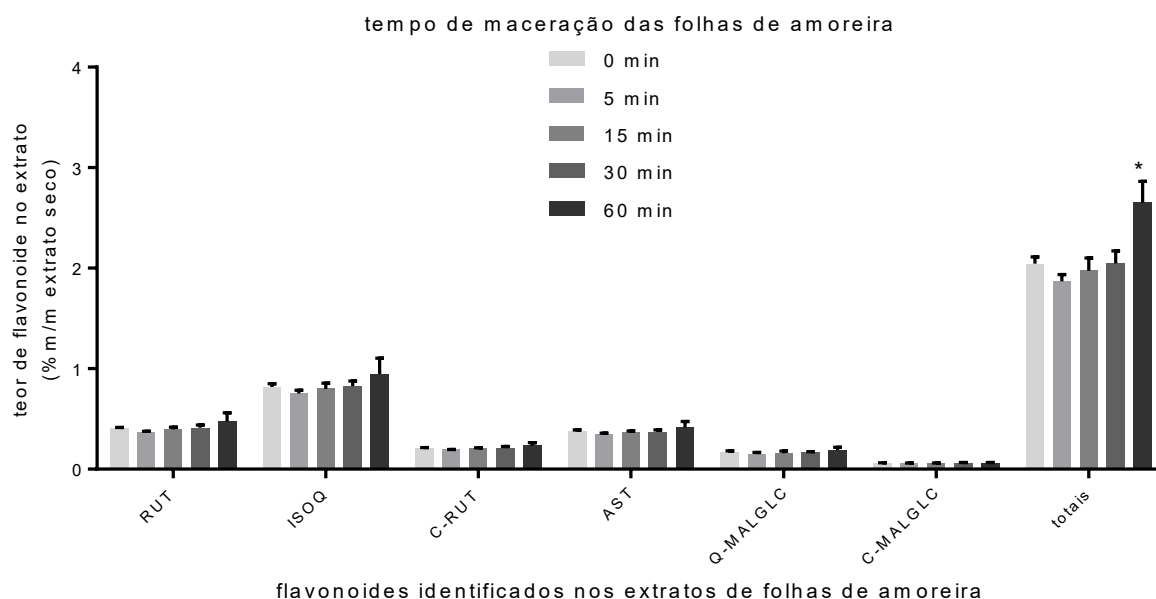


FIGURA 4.76 - Avaliação do tempo de maceração das folhas de amoreira na preparação do extrato. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). \* indica diferença significativa em relação aos demais elementos do grupo (teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

A proporção massa de folhas / volume de solvente utilizado na extração é bastante importante para a eficiência do processo. Quando se utiliza um volume muito pequeno em relação à quantidade de material vegetal, o solvente pode atingir a saturação muito rapidamente, o que não necessariamente significa que o solvente tenha carregado predominantemente as substâncias bioativas, dificultando ou até mesmo bloqueando a extração de compostos de interesse. Por outro lado, volumes muito grandes de solvente podem tornar a extração muito lenta, pois demandarão um tempo muito maior para atingir o equilíbrio. Além disso, após o processo, o solvente geralmente é eliminado para a obtenção do extrato seco e nesse caso, um volume muito grande de solvente implicaria não apenas em um tempo longo para o processo, mas principalmente em uma grande quantidade de resíduo gerada.

Na otimização do extrato com potencial fitoestrogênico, fixou-se a quantidade de folhas moídas e solvente extrator na proporção de 1:40 (150 mg de folhas e 6,00 mL de solvente). Nessa etapa, foi então avaliado se, aumentando a quantidade de folhas em relação ao volume de solvente utilizado, seria possível obter um perfil semelhante àquele que apresentou boa estrogenicidade, porém com

uma quantidade menor de solvente. Na prática, essa avaliação foi realizada aumentando-se a quantidade de massa de folhas e mantendo-se o volume de solvente constante.

Uma redução no volume de solvente comprometeria o correto funcionamento e conseqüentemente a eficiência da turbólise, pois o mesmo não estaria totalmente em contato com as pás giratórias do instrumento. Entre as proporções avaliadas, 1:20 foi a que promoveu a maior extração de flavonoides totais, porém ela também o fez seletivamente para rutina e isoquercetina, alterando o perfil do extrato (FIGURA 4.77). A proporção de 1:10 não apresentou alterações significativas para os teores individuais dos flavonoides, embora o teste de Bonferroni ( $p < 0,001$ ) tenha indicado o oposto para a isoquercetina. No entanto, o teor total de flavonoides para essa proporção aumentou significativamente, o que poderia implicar em redução da estrogenicidade. Por isso, concluiu-se que a proporção de 1:40 seria a melhor para o preparo do extrato e optou-se por também utilizá-la nos demais experimentos.

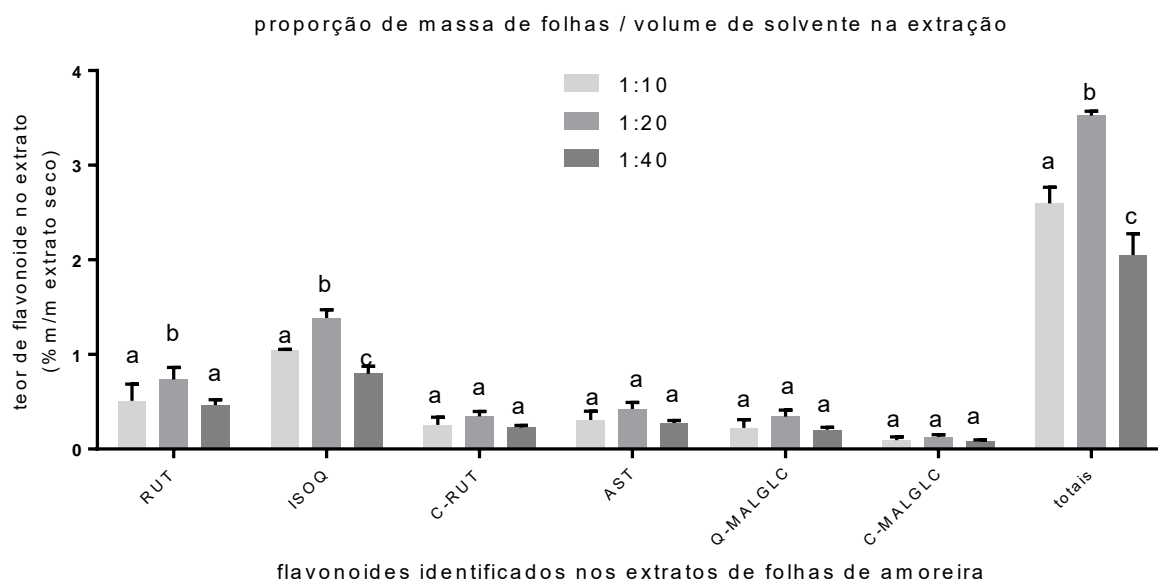


FIGURA 4.77 - Avaliação da proporção de folhas moídas em relação ao solvente na preparação do extrato. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6<sup>o</sup>-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6<sup>o</sup>-malonil-glicosídeo). Letras diferentes significam diferença estatística (teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ )

Um procedimento bastante comum em trabalhos envolvendo produtos naturais é o uso de extrações sequenciais. Inicialmente adiciona-se o solvente extrator no material vegetal e executa-se a extração. Após a separação do sobrenadante, um novo volume de solvente é adicionado ao resíduo do material

vegetal e uma nova extração é realizada, com a separação do novo sobrenadante. Esse processo é repetido exaustivamente até que não se observe mais a presença de substâncias no solvente extrator. Nesse ponto, o solvente do sobrenadante é eliminado até obter o resíduo seco. Normalmente são necessárias 3 a 5 repetições para a exaustão. O problema, porém, é que o “fim do processo exaustivo” na prática está associado à ausência de coloração no solvente extrator e, na grande maioria das vezes, a cor é devida à presença de substâncias, como as clorofilas, que não possuem a atividade desejada. Com isso, se gasta um tempo desnecessário com a extração de compostos que podem inclusive comprometer a atividade esperada para aquele extrato.

Durante o planejamento para otimização do extrato, utilizou-se um único processo de extração, pois o objetivo era extrair a maior quantidade de compostos em um menor número de extrações sequenciais. Essa etapa, então, teve como objetivo avaliar se apenas uma execução foi suficiente para se extrair ao máximo os fitoestrógenos ou se mais processos extrativos seriam ainda necessários para essa finalidade. A análise dos 5 sistemas mostrou que a segunda extração levou a um aumento proporcional dos teores individuais dos extratos sem alterar, portanto, o perfil observado (FIGURA 4.78). A partir da segunda extração, o acréscimo nos teores de cada flavonoide não foi significativo, embora o teste de Bonferroni ( $p < 0,001$ ) tenha indicado o contrário apenas para a isoquercetina. Isso significou que os flavonoides presentes nas folhas que poderiam ser extraídos pelo método adotado já haviam sido carregados pelo solvente utilizado nas duas primeiras extrações e as demais, portanto, estariam extraíndo outros compostos não fitoestrogênicos que poderiam reduzir a atividade, ou ainda causariam uma maior citotoxicidade.

Para o teor total de flavonoides foi observado um aumento significativo na segunda extração em relação a primeira. Nesse caso, esse incremento foi resultado do aumento proporcional de todos os flavonoides sem o favorecimento de um ou outro individualmente, e por isso, acredita-se que não seria significativo a ponto de causar uma redução na estrogenicidade esperada. Sendo assim, concluiu-se que 2 extrações sequenciais seriam suficientes para se obter a quantidade máxima de flavonoides na folha sem comprometimento do perfil dos compostos bioativos e conseqüentemente da atividade biológica de interesse. As duas

extrações sequenciais também foram realizadas nos próximos experimentos descritos.

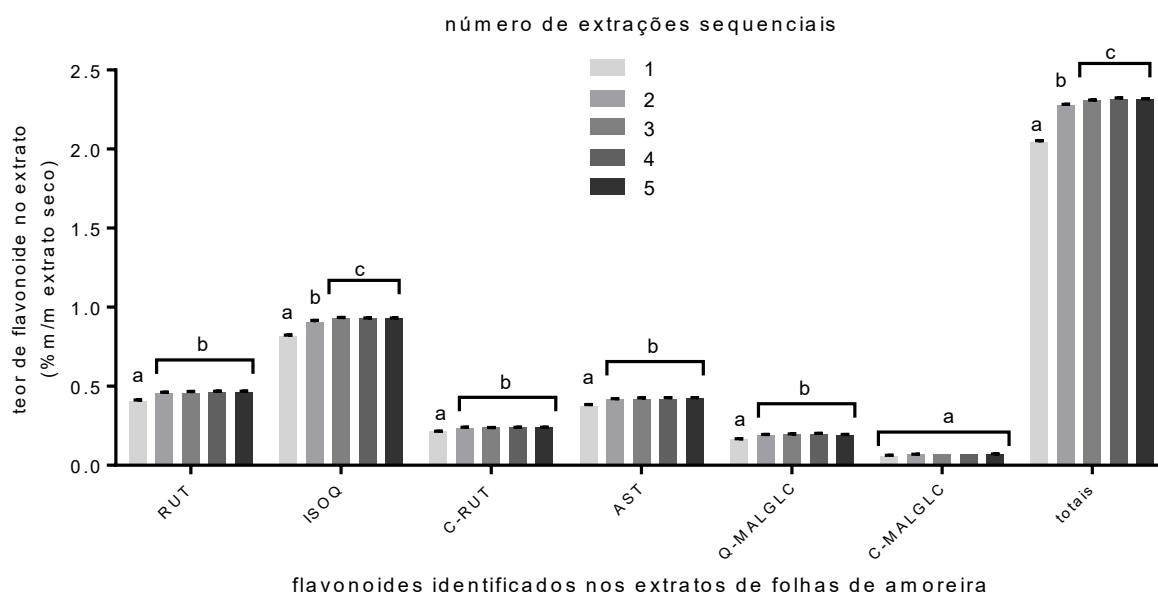


FIGURA 4.78 - Avaliação do número de extrações sequenciais para a obtenção do perfil de flavonoides. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras idiferentes significam diferenças estatísticas (testes de Bonferroini,  $p < 0,001$ )

O método de extração utilizado nesse trabalho não foi um método farmacopeico. Por isso na última etapa que envolvia estudos relacionados à manipulação do material vegetal, o método aqui utilizado foi comparado com métodos farmacopeicos de referência. As farmacopeias brasileira e americana recomendam a maceração como um dos métodos para preparo de extratos vegetais, porém a primeira também recomenda o método soxhlet. Essa última é uma técnica bastante utilizada no preparo de extratos vegetais, onde o solvente extrator é aquecido e seus vapores percorrem o interior de uma coluna de vidro, na qual está depositado o cartucho contendo a amostra, até atingirem o condensador na entrada da coluna. O solvente na fase líquida desce para o extrator soxhlet, entrando em contato com a amostra, carregando as substâncias extraídas. Esse ciclo de vaporização/condensação acontece repetidamente até a extração ser interrompida (FIGURA 4.79).



FIGURA 4.79 - Montagem para extração soxhlet semelhante à que foi utilizada no estudo de comparação com os métodos farmacopeicos. A diferença foi a acomodação do material vegetal em um cartucho de papel filtro

Na maceração à quente, o material vegetal fica em contato com o solvente extrator dentro de um balão de fundo redondo ao qual é acoplado um condensador de refluxo. O balão de fundo redondo é mantido aquecido por uma manta durante a extração. Tanto a maceração a quente quanto a extração soxhlet envolvem certo risco de refluxo e exigem a atenção constante do operador. Esses dois sistemas demandam bastante tempo, o que aumenta a probabilidade de degradação térmica de compostos bioativos, devido à exposição constante a temperaturas elevadas por um período prolongado.

O método de maceração a frio realizado nesse trabalho mostrou resultados muito próximos dos teores individuais e totais de flavonoides daqueles obtidos pela extração soxhlet, porém em um processo mais rápido (aproximadamente 1,5 h contra 6,0 h e 12 h). Os métodos de maceração recomendados pela farmacopeia apresentaram resultados bastante similares entre eles, sugerindo que a temperatura não influenciou na extração dos compostos bioativos. Essa mesma evidência já havia sido observada na triagem de variáveis para otimização do extrato. Uma análise comparativa dos resultados obtidos quando se empregou os métodos de maceração mostrou que os teores de flavonoides obtidos pelo método utilizado nesse trabalho foram maiores que aqueles obtidos pelos métodos farmacopeicos (FIGURA 4.80). Acredita-se que esse aumento possa estar associado ao uso de turbólise, técnica não utilizada nos métodos de referência. A análise do extrato obtido por infusão (que é o método utilizado na medicina popular) mostrou que de todos os métodos avaliados, esse foi o que levou aos teores mais baixos de flavonoides. O teor total dos flavonoides foi aproximadamente 50% do valor observado para o método de maceração a frio nesse trabalho.

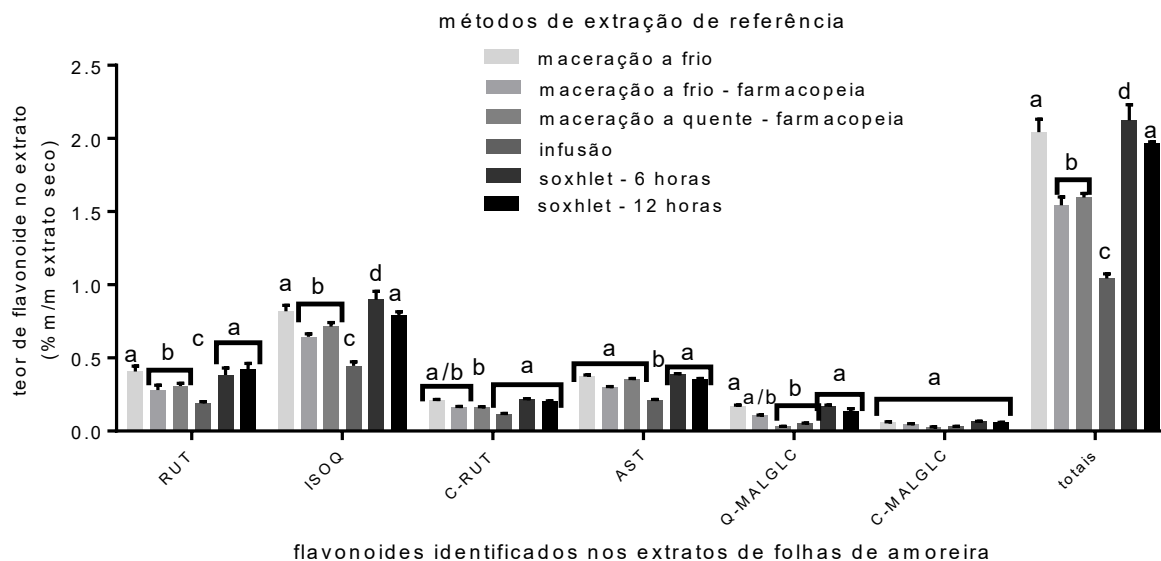


FIGURA 4.80 - Análise comparativa entre o método de extração utilizado nesse trabalho e os métodos extratores de referência. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey,  $p < 0,001$ )

O método de extração a frio empregado na preparação dos extratos desse trabalho não é um método farmacopeico oficial. Por isso, foram realizadas análises de correlação dos teores de cada flavonoide obtidos por esse método e por um método de referência. Os resultados dessas análises mostraram uma elevada correlação entre os teores encontrados em ambos, com um coeficiente de Pearson superior a 0,99, exceto para o método de maceração a quente, cujo coeficiente foi superior a 0,98 (FIGURA 4.81).

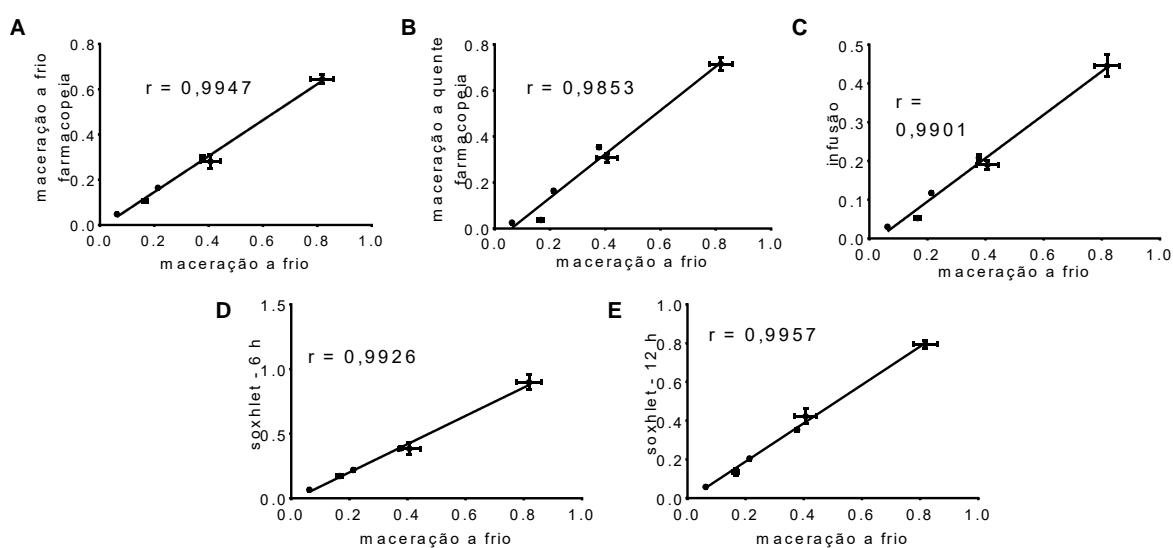


FIGURA 4.81 - Análises de correlação entre os teores individuais de flavonoides obtidos pelo método de maceração a frio utilizado nesse trabalho e os métodos de extração de referência. (A) maceração a frio - farmacopeia; (B) maceração a quente - farmacopeia; (C) infusão (medicina popular); (D) soxhlet 6 h e (E) soxhlet 12 h

#### 4.3.4.2 - ANÁLISES DE VARIABILIDADE ATRIBUÍDA A FATORES NATURAIS.

Nessa etapa do trabalho, o foco principal foi investigar como a produção dos flavonoides e o seu armazenamento nas folhas é influenciado por diferentes fatores ambientais. Sabe-se que a produção dos mesmos é influenciada pela umidade relativa do ar, pela idade da planta, pela época do ano, pela exposição ao sol, etc. Muitas vezes essas variações nos teores de flavonoides são suficientemente significativas para comprometer a qualidade e eficiência de uma formulação fitoterápica. Para verificar se os extratos que apresentaram maiores potenciais fitoestrogênicos seriam influenciados por tais fatores, foram realizados os estudos descritos a seguir, usando como referência o extrato preparado com solução etanólica a 30%, por este ter sido o que apresentou os maiores teores de flavonoides sem causar efeito citotóxico nas células de fibroblasto.

A poda hibernal foi o primeiro fator examinado. Trata-se de uma prática agrícola amplamente utilizada para plantas frutíferas. Ela é realizada no início do inverno, logo após a queda das últimas folhas (desfolhamento) e visa aumentar a produção de frutos<sup>229</sup>. Nas análises realizadas com os extratos de folhas de amoreira, não se observou qualquer efeito significativo da poda hibernal na produção dos flavonoides (teste t-Student pareado,  $t_{3,3} = 2,053$ ,  $p = 0,0859$ ) (FIGURA 4.82).

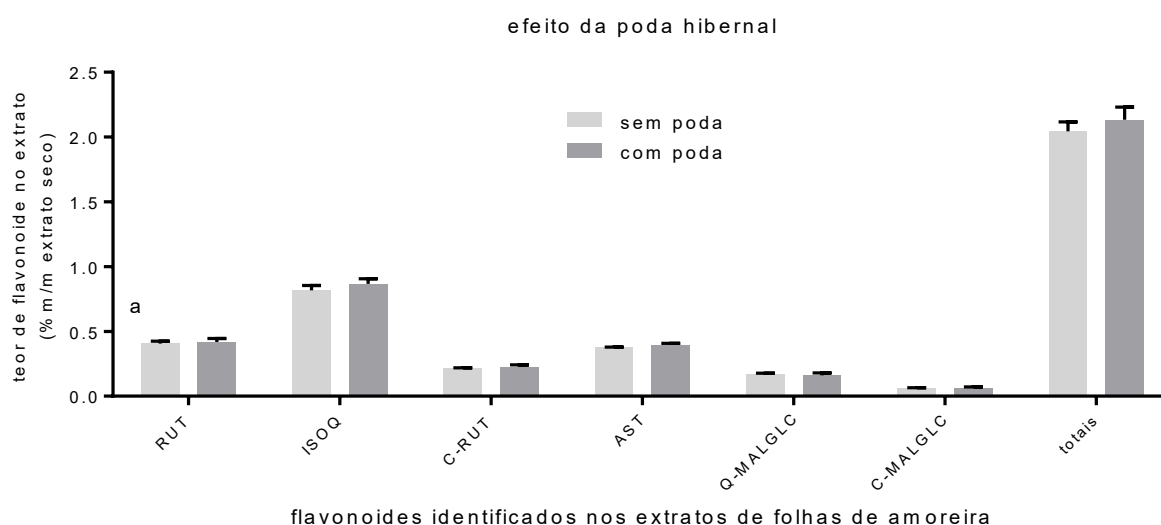


FIGURA 4.82 - Efeito da poda hibernal na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo).



As estações do ano influenciam significativamente o desenvolvimento das plantas, pois ocorrem variações na temperatura, no índice pluviométrico e no período de exposição ao sol. A influência é tão grande que muitas plantas florescem e outras frutificam apenas em determinados períodos do ano, resultado de alterações no seu metabolismo. Por isso, o estudo de como a produção dos flavonoides é influenciado pelas estações do ano é fundamental para verificar se essas mudanças poderiam comprometer a eficácia de uma formulação fitoterápica. O material vegetal utilizado nesse estudo foi coletado no início da primavera (setembro/2012), no final da primavera (novembro/2012), no verão (janeiro/2013) e no outono (março/2013). Não foi possível coletar amostras no inverno devido à ausência das mesmas no período.

De acordo com os resultados obtidos, no início da primavera encontrou-se a maior concentração de flavonoides nas folhas, entre os quais predominavam rutina e isoquercetina (FIGURA 4.83). No verão predominam os derivados glicosídicos (isoquercetina e astragalina). Entre o final da primavera e o verão ocorreu uma redução significativa na produção dos derivados malonil-glicosídicos, que voltaram a ser produzidos no outono. Houve uma variação muito grande nos teores de flavonoides totais durante o período do estudo, chegando a uma diferença superior a 130% do teor mais alto para o mais baixo encontrados nesse período.

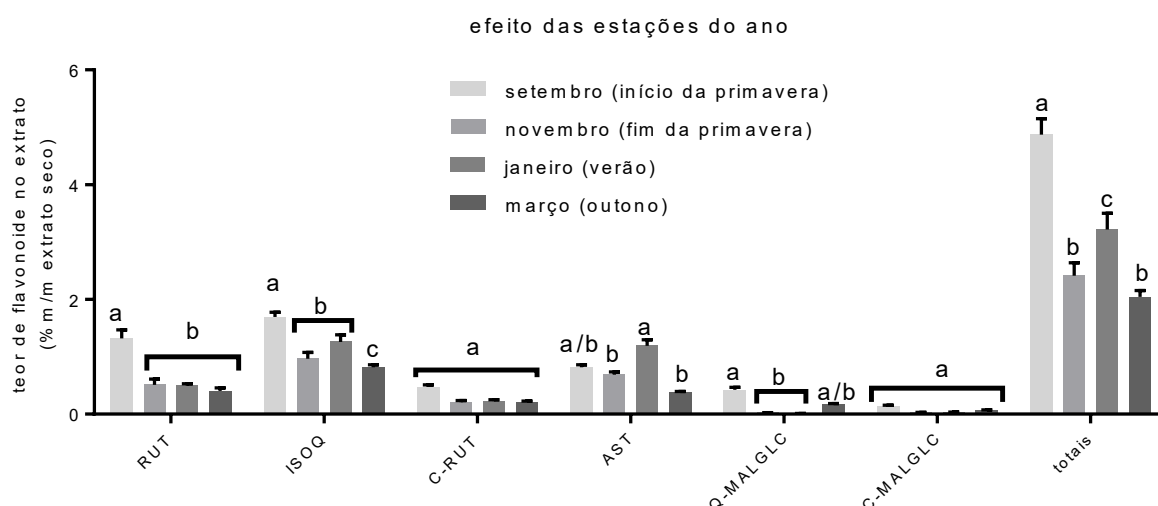


FIGURA 4.83 - Efeito das estações do ano na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

O conhecimento acerca das alterações na produções dos flavonoides em diferentes épocas do ano é essencial para a preparação do extrato com potencial fitoestrogênico, principalmente caso venha a ser comprovado em estudos futuros que essas substâncias sejam de fato as responsáveis pela atividade estrogênica das folhas de amora. A produção do medicamento fitoterápico, que independe da estação, deve ser realizada ininterruptamente ao longo do ano. As informações obtidas nesse estudo, podem ser utilizadas por exemplo, para alterar a composição do solvente extrator de forma a extrair uma maior quantidade de compostos em um período no qual a sua produção pela planta estaria em níveis mais baixos. Uma composição etanólica que, em condições normais levaria à obtenção de um extrato tóxico, poderia ser interessante nessa nova situação para obter os compostos bioativos em quantidades próximas àquelas necessárias para o efeito terapêutico.

No estudo anterior, observou-se que os teores de flavonoides foram maiores nos meses com maior incidência de sol, sendo que houve uma mudança nos flavonoides majoritários com a intensificação da exposição à radiação característica do verão. Durante a coleta das folhas para aquele estudo, observou-se que nem todas as folhas da planta estavam expostas ao sol com a mesma intensidade e acabavam “ficando na sombra das folhas mais altas”. Por isso, decidiu-se coletar separadamente folhas que ficavam na parte superior do ramo e folhas da porção inferior.

De um modo geral, observou-se que os teores individuais de flavonoides aumentaram significativamente nas folhas da parte superior, com maior exposição à luz do sol. Em relação aos flavonoides totais, esse aumento foi superior a 100% (FIGURA 4.84). Com base nesses resultados, pode-se dizer que a produção dos flavonoides é estimulada pela incidência de raios solares. Quando se passou das folhas selecionadas na base da planta para aquelas do topo, o teor médio total de flavonoides passou de 1,31% para 2,78%. Pensando em uma possível aplicação em formulações fitoterápicas, esse resultado mostrou que a seleção das folhas para o preparo é extremamente importante e uma escolha inadequada pode comprometer a eficácia do extrato. Nesse sentido, um bom método de controle de qualidade é de grande importância, tanto para uma inspeção inicial do material vegetal, no sentido de verificar se os teores de flavonoides estão nos níveis adequados. Caso isso não aconteça, com os resultados da análise inicial do material, hipoteticamente, há uma

possibilidade de se alterar as condições de extração no sentido de se obter os compostos em níveis próximos dos desejados.

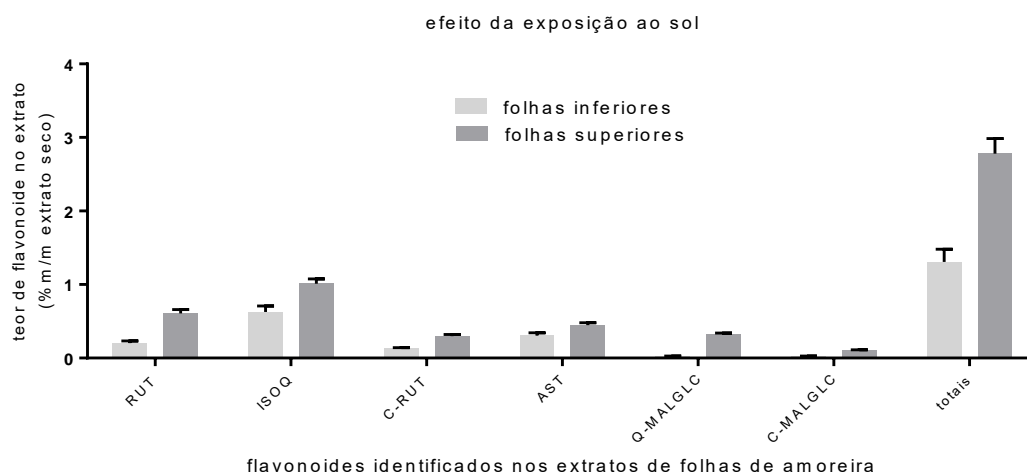


FIGURA 4.84 - Efeito da exposição das folhas de amoreira ao sol na produção dos flavonoides. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo).

Nos experimentos realizados até aqui, todas as amostras de folhas foram coletadas no período matutino, das 10 às 12 horas (11 às 13 horas no horário de verão brasileiro). Como os resultados anteriores sugeriram que a luz do sol estimularia o metabolismo da planta, um novo estudo foi realizado visando observar diferenças nos teores dos flavonoides devidas ao horário de coleta das folhas, uma vez que o período do dia está diretamente relacionado à intensidade da radiação solar.

Os resultados obtidos mostraram uma tendência de redução dos teores individuais dos flavonoides que possuem a glicose como substituinte (isoquercetina e astragalina) ao longo do dia (FIGURA 4.85). Para os demais flavonoides não houve redução significativa. A produção dos flavonoides foi maior no início da manhã, mas houve uma redução de aproximadamente 50% no período de maior intensidade dos raios solares (15 h). O material coletado às 19 h apresentou os menores teores de flavonoides, o que seria esperado, visto que a incidência de raios solares nesse período é muito baixa.

Com base nos resultados desse estudo, pode-se dizer que o período da manhã é o mais indicado para a coleta do material vegetal que será utilizado para o preparo de extratos para formulações fitoterápicas. As folhas coletadas às 7 h apresentaram os maiores teores, e o material coletado às 11 h também apresentou uma concentração significativa, com uma variação de 13% em relação ao anterior,

ou seja, dentro da margem aceitável pela ANVISA. Nos demais horários, fazendo-se pequenos ajustes nas condições de extração ainda seria possível obter os flavonoides nos níveis desejados, como por exemplo, aumentando a proporção de massa de material vegetal em relação à quantidade de solvente extrator.

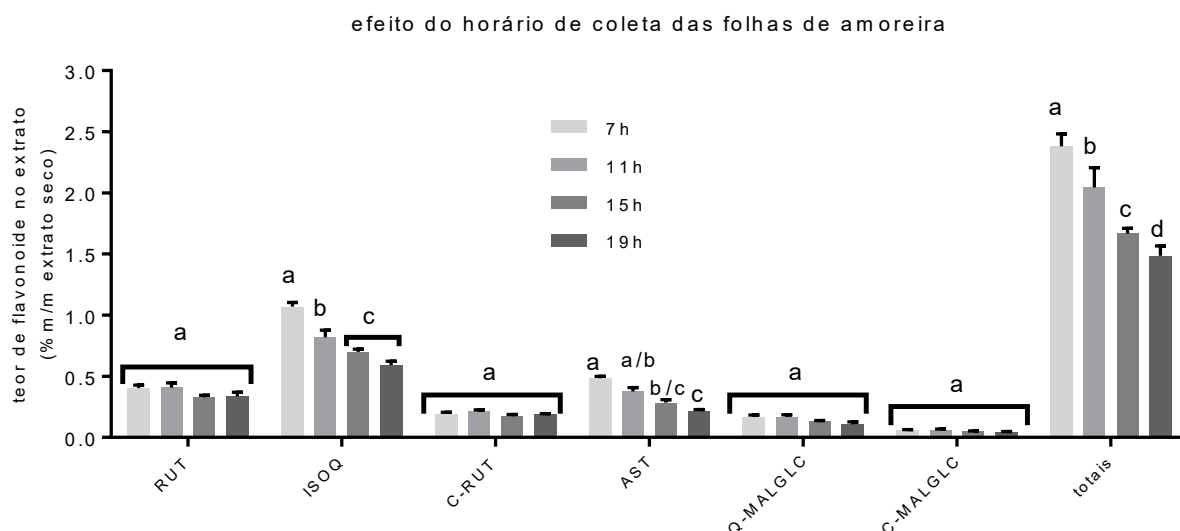


FIGURA 4.85 - Efeito do horário de coleta das folhas de amoreira ao sol na produção dos flavonoides RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas e a sua produção está diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento da planta. Por isso, nessa etapa do trabalho o objetivo foi investigar como o teor de flavonoides varia conforme a idade da planta, desde o seu brotamento. As amostras de folhas foram coletadas em 60, 90, 120 e 150 dias após o brotamento. Após esse período começaram a aparecer os primeiros frutos, por isso o estudo foi interrompido. Devido a uma forte estiagem que ocorreu nos meses de novembro e dezembro de 2013, não foi possível obter amostras das folhas com 30 dias de desenvolvimento.

A análise mostrou que as concentrações dos flavonoides glicosilados isoquercetina e astragalina aumentou gradativamente com a idade da folha, enquanto para os demais flavonoides o aumento não foi significativo (FIGURA 4.86). Consequentemente o teor total de flavonoides também aumentou com a idade da planta. De acordo com as recomendações da ANVISA, é aceitável uma variação em até 15% no teor do princípio ativo em uma formulação farmacêutica.

Em relação ao teor total de flavonoides, os extratos preparados com as

folhas coletadas com 60 e 150 dias apresentaram variações de aproximadamente 47% e 31% em relação aos 90 dias, que foi a idade das folhas utilizadas no desenvolvimento do trabalho. Além disso, para esses dois extratos, foram observadas variações no teor individual de alguns flavonoides, o que poderia também comprometer a atividade esperada para o mesmo. O extrato preparado com as folhas coletadas após 120 dias do brotamento apresentou um perfil mais similar ao que foi utilizado como referência, sendo que a variação no teor de flavonoides totais não atingiu 5%.

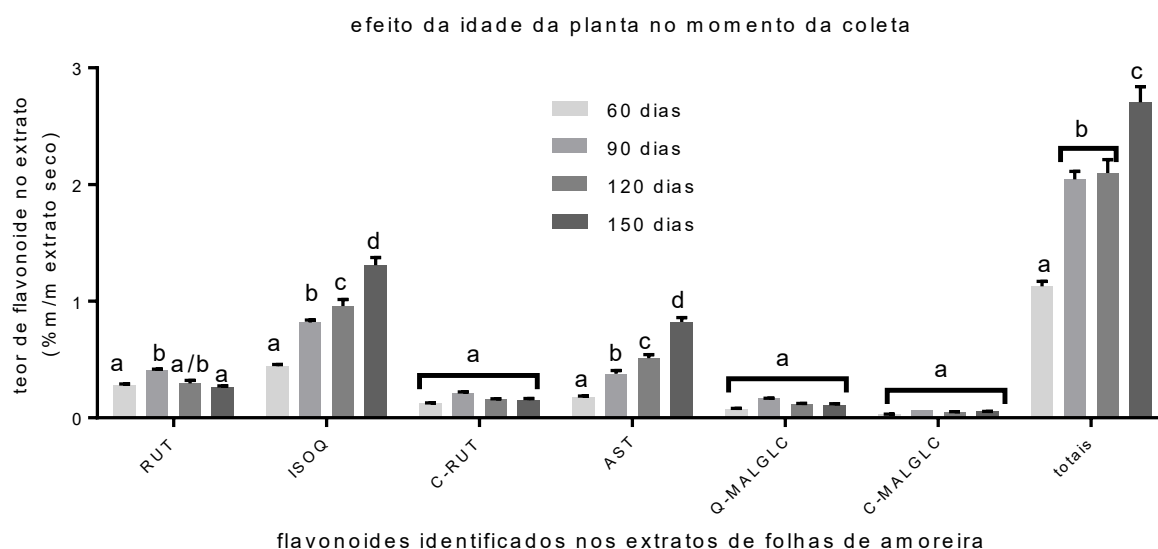


FIGURA 4.86 - A idade da planta na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

O excesso ou a falta de chuva são problemas muito sérios enfrentados por agricultores, pois a água, quando não está nos níveis ideais, compromete toda uma plantação, gerando elevados prejuízos para todos os envolvidos na cadeia de consumo. Períodos de estiagem geram estresses hídricos que interferem profundamente no metabolismo das plantas e, conseqüentemente, na produção dos flavonoides<sup>230</sup>.

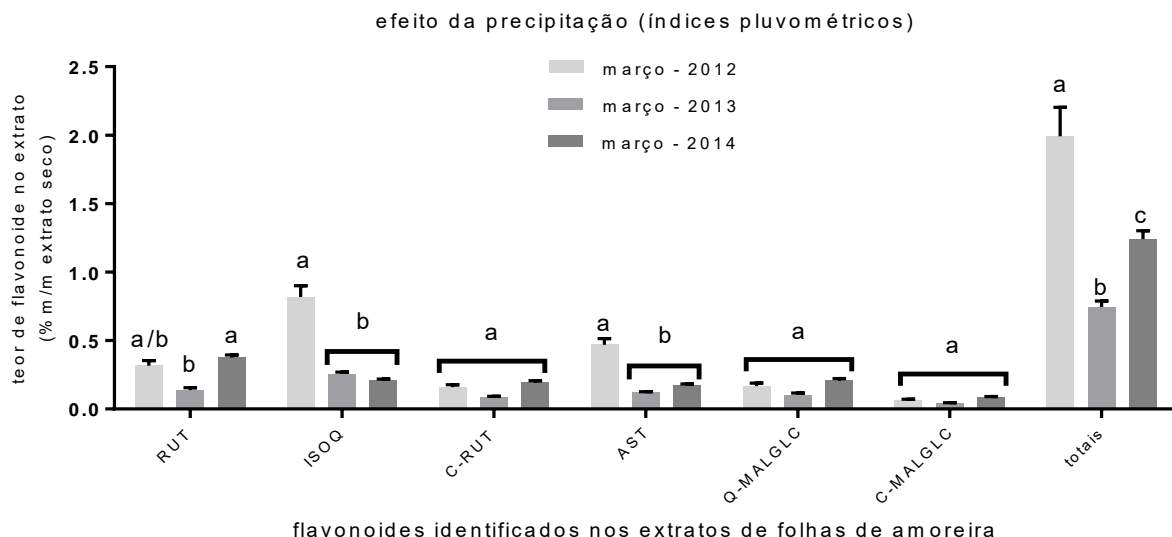
Os índices pluviométricos apresentados na TABELA 4.24 mostraram que, o volume de chuvas caiu 25% no mês de fevereiro de 2013 em relação ao mesmo período no ano de 2012. Já no mês seguinte, período em que foram coletadas as folhas, a situação se inverteu e o volume de água dobrou em relação ao mesmo período no ano anterior.

TABELA 4.24 - Índices pluviométricos (em mm) durante os 60 dias que precederam a coleta das folhas de amoreira

<b>ano</b>	<b>fevereiro</b>	<b>março</b>
<b>2012</b>	215,6	101,0
<b>2013</b>	165,5	240,0
<b>2014</b>	102,3	109,3

Analisando-se os teores de flavonoides obtidos nesses dois anos, observou-se uma redução significativa na concentração desses compostos nas folhas coletadas no período de maior quantidade de chuvas. (2013). Os flavonoides são metabólitos secundários associados ao mecanismo de defesa da planta. Por isso, acredita-se que, com a queda no índice pluviométrico em 2012, houve uma estimulação da produção dos flavonoides como uma forma da planta se defender da seca (FIGURA 4.87). Os teores de flavonoides encontrados nos extratos preparados com as folhas coletadas no último ano do experimento corroboram essa hipótese.

No final de 2013 e início de 2014 houve um grande período de estiagem. A precipitação no mês que precedeu a última coleta atingiu um valor próximo ao nível obtido dois anos antes, quando o experimento se iniciou. em março de 2014, quando a coleta foi realizada, o volume de chuva se manteve praticamente no mesmo nível do mês de fevereiro e praticamente 50% do nível observado para o mesmo período no ano anterior. Devido ao baixo volume de chuva, o desenvolvimento das amoreiras foi comprometido, acontecendo mais tardia e lentamente. Analisando-se os teores de flavonoides obtidos no último ano do experimento, notou-se que, de um modo geral, houve um aumento na produção dos metabólitos em relação àquela observada nas folhas que foram coletadas durante um período de maior precipitação. (FIGURA 4.87).



**FIGURA 4.87** - Efeito da precipitação na produção dos flavonoides presentes nas folhas de amoreira. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

Pensando na utilização das folhas para o preparo de um extrato fitoterápico, pode-se dizer que o período de baixa precipitação seria o melhor para a obtenção do material vegetal, porém o monitoramento da precipitação nos dois meses que precederam a colheita também seria importante para se observar se a planta estaria no estágio apropriado de desenvolvimento. No entanto, conhecendo-se a forma como o estresse hídrico interfere na produção dos flavonoides pela planta, é possível se ajustar as condições do método de extração com o objetivo de se tentar manter os mesmos teores de compostos ativos e, conseqüentemente uma atividade biológica reprodutiva.

Para finalizar essa seção, foi realizado um estudo com o objetivo principal foi investigar como os flavonoides de interesse se distribuem por algumas partes da planta. Sabe-se que os flavonoides são produzidos em diferentes tecidos e armazenados principalmente nos vacúolos presentes nas folhas<sup>193</sup>. No entanto, esses compostos já foram identificados em diferentes partes a amoreira<sup>98</sup>.

Os resultados obtidos para esse estudo mostraram que os flavonoides se concentram predominantemente nas folhas da amoreira. Por outro lado, as quantidades encontradas no pedúnculo e no fruto foram bastante semelhantes e muito inferiores àquelas encontradas nas folhas (FIGURA 4.86).

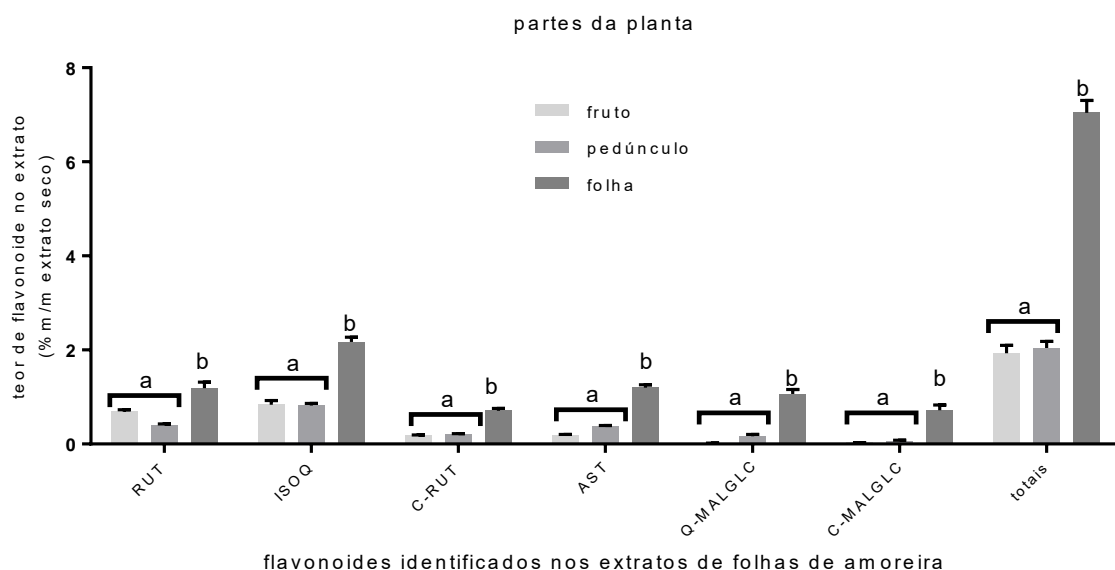


FIGURA 4.88 - Distribuição dos flavonoides em diferentes partes aéreas da amoreira. RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo). Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

Os baixos teores presentes nos frutos podem ser atribuídos à rota metabólica das antocianinas, principais constituintes dos frutos e das quais os flavonoides são precursores<sup>75</sup>. Não foi possível obter informações em relação ao teor de flavonoides no caule dos ramos, devido ao elevado teor de fibras no mesmo, o que torna o método de extração aplicado nesse trabalho ineficiente.

Em relação ao preparo do extrato para formulações fitoterápicas, o pedúnculo poderia ser utilizado concomitantemente com as folhas, pois o aumento nas concentrações de cada flavonóide seria proporcional, o que possivelmente não comprometeria o perfil estrogênico observado.

#### 4.3.4.3 - ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS COMERCIAIS

Para finalizar, o método foi aplicado na análise de formulações fitoterápicas que são comercializadas em farmácias de manipulação na forma de "cápsulas de amora". Na atual legislação vigente não existe regulamentação para o preparo de formulações fitoterápicas baseados em extratos de partes da amoreira. Como consequência, não existe padronização da matéria-prima e tampouco do produto final. Das cinco amostras analisadas, uma era comercializada como "pó de *Morus nigra*" (amostra 2), enquanto as demais eram descritas como "extrato seco de amora (amostras 3 e 4) ou "extrato de folhas de amora" (amostra 1). Uma análise



visual dos materiais vegetais tornou ainda mais evidente a falta de padronização, pois uma das amostras apresentava coloração avermelhada, característica do fruto seco (amostra 5), enquanto as outras apresentavam coloração verde a esverdeada (mais próxima das folhas) (FIGURA 4.89).

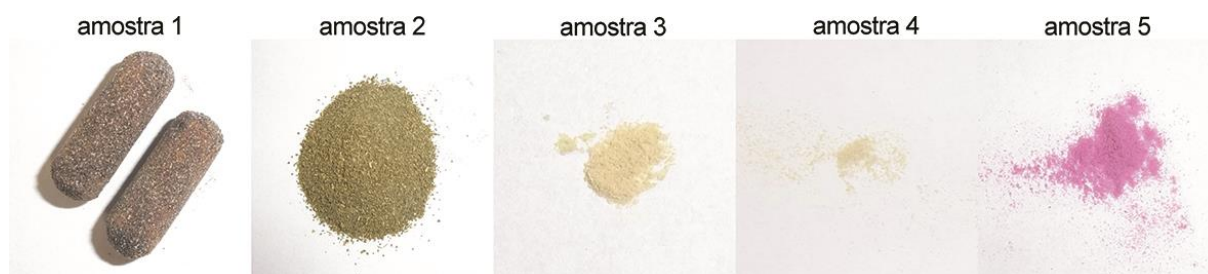


FIGURA 4.89 - Amostras de cápsulas de amora comerciais que foram usadas para análise do teor de flavonoides.

As extrações foram realizadas para estas amostras nas mesmas condições utilizadas nas análises da sessão anterior, porém a composição do solvente extrator foi de 50% de etanol (v/v), na tentativa de se obter uma maior quantidade de informações acerca do extrato. Como referência foi utilizado um extrato preparado conforme as condições padronizadas nesse trabalho.

A análise qualitativa do perfil químico mostrou que as replicatas da amostra 2 foram as que apresentaram uma maior semelhança com o extrato de referência (FIGURA 4.90). Acredita-se que isso seja devido ao fato de que o material de partida utilizado nessas análises também tenha sido folhas secas moídas. As replicatas das amostras 3 e 4 apresentaram certa semelhança entre os seus perfis, porém a intensidade dos sinais diferiram significativamente das anteriores. Essas duas amostras foram provenientes de extratos secos, os quais possivelmente teriam sido produzidos a partir de um protocolo comum, o que explicaria a elevada similaridade entre eles. As replicatas da amostra 1, por sua vez, apresentaram um perfil dos ácidos cafeoilquínicos semelhante às amostras 1, 2 e de referência. Por outro lado, o perfil de flavonoides para esse medicamento mostrou-se mais semelhantes àquele das amostras 3 e 4. As replicatas da amostra 5 não apresentaram qualquer sinal de flavonoide no perfil cromatográfico e por isso não foram quantificadas.

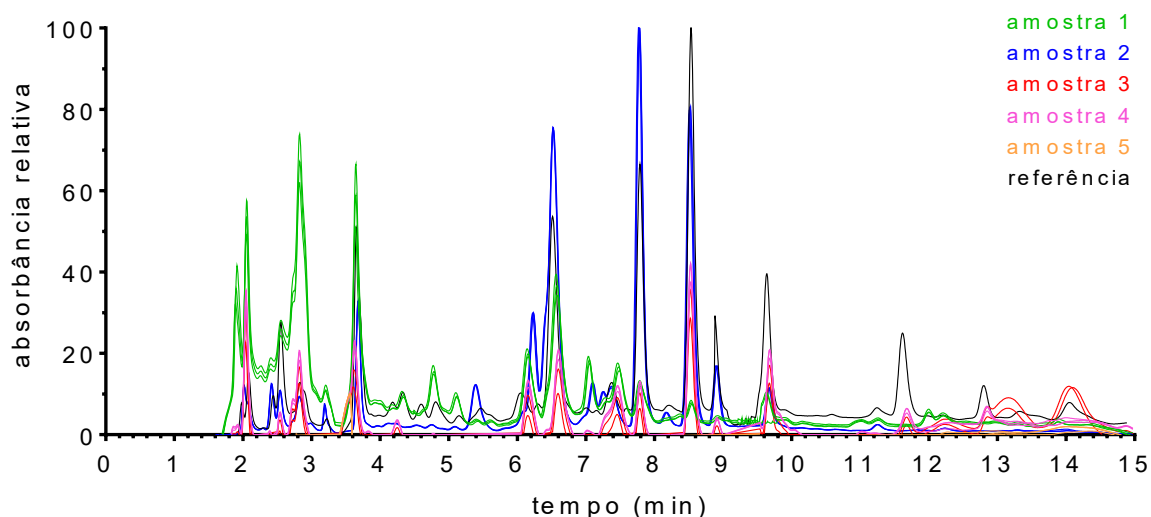


FIGURA 4.90 - Cromatogramas de amostras de cápsulas comerciais de amora. Fase A: H<sub>2</sub>O/HCOOH 0,025%; Fase B: ACN/HCOOH 0,025%; Gradiente: 18 - 40%, 10min, 40% em 5 min; Detecção: DAD 200-400 nm; Vazão: 600  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vol. injeção: 5  $\mu\text{L}$ ; Temperatura: 40°C.

A análise quantitativa dos extratos mostrou uma grande variabilidade nos teores individuais e totais dos flavonoides (TABELA 4.25). A amostra 1 é um medicamento fitoterápico de livre comércio nos EUA e, segundo o fabricante, é padronizada em 15% de flavonoides (quercetina e isoquercetina). Entretanto o valor encontrado para o teor total de flavonoides não atingiu sequer 0,5%. Como o extrato de folhas de amoreira não é padronizado por monografias em farmacopeias, não foi possível identificar qual o método utilizado pelo fabricante para a padronização do medicamento fitoterápico. As demais foram obtidas em farmácias de manipulação e os resultados das análises refletiram a necessidade de padronização para esses produtos.

TABELA 4.25 - Teores de flavonoides encontrados em amostras de cápsulas comerciais de amora em % (m/m de extrato seco)

flavonoide	amostra 1	amostra 2	amostra 3	amostra 4	referência*
<b>RUT</b>	0,172 ±0,023	7,68 ±0,21	0,0189 ±0,022	0,0412 ±0,011	2,51 ±0,41
<b>ISOQ</b>	0,057 ±0,011	4,32 ±0,12	0,1451 ±0,0063	0,1791 ±0,0,018	3,45 ±0,57
<b>C-RUT</b>	0,0162 ±0,0013	1,097 ±0,040	0,02782 ±0,00091	0,03444 ±0,00051	0,92 ±0,14
<b>AST</b>	0 <sup>#</sup>	0,66 ±0,11	0,1163 ±0,0054	0,1456 ±0,0067	1,05 ±0,17
<b>Q-MALGLC</b>	0,0322 ±0,0013	0,0935 ±0,0030	0,0021 ±0,0017	0 <sup>#</sup>	1,15 ±0,21
<b>C-MALGLC</b>	0 <sup>#</sup>	0,02668 ±0,00075	0 <sup>#</sup>	0,0019 ±0,0018	0,511 ±0,097
<b>totais</b>	0,278 ±0,020	13,88 ±0,48	0,310 ±0,016	0,4148 ±0,0057	9,6 ±1,6

RUT - rutina; ISOQ - isoquercetina; C-RUT - campferol 3-O-rutinosídeo; AST - astragalina; Q-MALGLC - quercetina 3-O-(6"-malonil-glicosídeo); C-MALGLC - campferol 3-O-(6"-malonil-glicosídeo)

# abaixo do limite inferior de quantificação

\* método de extração padronizado nesse trabalho

## **CONCLUSÕES**

---

## 5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, os extratos de folhas de amoreira apresentam compostos fitoestrogênicos. Além disso, no processo de preparação por maceração a frio, a definição da composição do solvente extrator se mostrou ser fundamental para que o extrato apresentasse estrogenicidade, uma vez que pequenas alterações levaram a grandes mudanças na atividade biológica em estudos *in vitro*.

Associando-se ferramentas quimiométricas multivariadas a um método analítico preciso, exato e robusto, foi possível identificar um conjunto de compostos bioativos (os marcadores químicos para padronização), cujas variações nas concentrações estavam relacionadas diretamente a alterações observadas na atividade biológica e citotoxicidade observadas.

Por meio de análises quantitativas precisas dos marcadores químicos, foi possível observar ainda como fatores ambientais influenciam na produção dos mesmos na planta, podendo comprometer a eficácia do extrato como matéria-prima em formulações fitoterápicas.

Isto foi observado nas análises quali e quantitativas dos compostos bioativos em amostras de cápsulas de amora comercializadas em farmácias de manipulação, que evidenciaram a total falta de controle de qualidade do produto, o principal problema do uso de “medicamentos naturais”.

Finalmente, nos estudos *in vitro*, as folhas de *Morus alba* apresentaram um grande potencial ainda pouco explorado para atividade antitumoral, principalmente para o tipo triplo-negativo de câncer de mama, um dos mais agressivos atualmente. Esta é a primeira vez que este tipo de atividade é descrita para extratos de folhas de amoreira com base no levantamento bibliográfico realizado durante a execução deste trabalho.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STOLBERG, M. "From the 'climateric disease' to the 'male climateric'. The historical origins of a modern concept." *Maturitas*, **58** (2): 111, 2007.
2. DONALD, H. R. "The female climacteric and the menopause." *Brit. Med. J.*, **1** (4030): 727, 1938.
3. BLUEMEL, J. E.; LAVIN, P.; VALLEJO, M. S. & SARRA, S. "Menopause or climacteric, just a semantic discussion or has it clinical applications?" *Climacteric*, **17** (3): 235, 2014.
4. KABIR, M R., AL-AMIN, M. A. & SIDDIQUE, M. A. "Andropause: The Male Climacterium". *Teach. Assoc. J.*, **21** (1): 1, 2008.
5. WANG, C. "Gonadotropins and testicular function in aging." *Enc. Endocrin. Dis.* **2**: 322, 2004.
6. HELLER, C. G, MYERS, G. B. "The male climacteric, its symptomatology, diagnosis and treatment". *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **126** (8): 472, 1944.
7. WHO Scientific Group. "Research on the Menopause in the 1990s". IN: WHO technical report series. WORLD HEALTH ORGANIZATION (Ed). Geneva, WHO, 1996. p. 16.
8. PERHEENTUPA, A.; HUHTANIEMI, I. "Aging of the human ovary and testis." *Mol. Cel. Endocrinol.*, **299** (1): 2, 2009.
9. TREOLAR, A. E. "Menstrual cyclicity and the pre-menopause." *Maturitas*, **3** (3-4): 249, 1981.
10. PRIOR, J. C. "Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition." *Endocrin. Rev.* **19** (4): 397, 1998.
11. HALL, J. E. "Neuroendocrine control of the menstrual cycle". In: *Yen And Jaffe's Reproductive Endocrinology*. STRAUSS, J. F. & BARBIERI, R. L. (Eds.). Philadelphia, Elsevier, 2004. p. 195 - 211.
12. BRUCE, D. & RYMER, J. "Symptoms of the menopause." *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **23** (1): 25, 2009.
13. HALL, J. E. "Neuroendocrine physiology of the early and late menopause." *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*, **33** (4): 637, 2004.
14. DEECHER, D. C. & DORRIES, K. "Understanding the pathophysiology of vasomotor symptoms (hot flushes and night sweats) that occur in perimenopause, menopause, and postmenopause life stages." *Arch. Womens Ment. Health*, **10** (6): 247, 2007.
15. NELSON, H D. "Menopause." *Lancet*, **371** (9614): 760, 2008.
16. WRIGHT, A. L. "On the calculation of climacteric symptoms." *Maturitas*, **3** (1): 55, 1981.

17. WOODS, N. F.; MITCHELL, E. S. & SMITH-DI JULIO, K. "Sexual desire during the menopausal transition and early postmenopause: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study." *J. Womens Health*, **19** (2): 209, 2010.
18. WEBER, M. T.; MAKI, P. M. & MCDERMOTT, M. P. "Cognition and mood in perimenopause: A systematic review and meta-analysis". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **142** : 90, 2014.
19. MACGREGOR, E. A. "Estrogen replacement and migraine". *Maturitas*, **63** (1): 51, 2009.
20. PARK, J. H. & VIIRRE, E. "Vestibular migraine may be an important cause of dizziness/vertigo in perimenopausal period." *Med. Hypotheses*, **75** (5): 409, 2010.
21. WILBUR, J.; SHAVER, J.; KOGAN, J.; BUNTIN, M. & WANG, E. "Menopausal transition symptoms in midlife women living with fibromyalgia and chronic fatigue." *Health Care Women Int.* **27** (7): 600, 2006.
22. LUCCHESI, L. M.; HACHUL, H.; YAGIHARA, F.; SANTOS-SILVA, R.; TUFIK, S. & BITTENCOURT, L. "Does menopause influence nocturnal awakening with headache?" *Climacteric*, **16** (3): 362, 2013.
23. BULCHANDANI, S. & TOOZS-HOBSON, P. "Urogynecological effects of menopause." *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, **9** (1): 73, 2014.
24. CRANDALL, C. J.; ARAGAKI, A.; CAULEY, J. A.; MANSON, J. E.; LEBLANC, E.; WALLACE, R.; WACTAWSKI-WENDE, J.; LACROIX, A.; O'SULLIVAN, M. J.; VITOLINS, M. & WATTS, N. B. "Associations of menopausal vasomotor symptoms with fracture incidence". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **100** (2): 524, 2015.
25. MELBY, M. K. "Chilliness: a vasomotor symptom in Japan." *Menopause*, **14** (4): 752, 2007.
26. HUNTER, M. S & CHILCOT, J. "Testing a cognitive model of menopausal hot flushes and night sweats." *J. Psychosom. Res.* **74** (4): 307, 2013.
27. SIMON, J. A. "Identifying and treating sexual dysfunction in postmenopausal women: the role of estrogen." *J. Women Health*, **20** (10): 1453, 2011.
28. FREEDMAN, M. A. "Quality of life and menopause: the role of estrogen." *J. Women Health*, **11** (8): 703, 2002.
29. MORRISON, J. H.; BRINTON, R. D.; SCHMIDT, P. J. & GORE, A. C. "Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women." *J. Neurosci.*, **26** (41):10332, 2006.
30. SOARES, C. N. "Depression in peri- and postmenopausal women: prevalence, pathophysiology and pharmacological management." *Drugs Aging*, **30** (9): 677, 2013.
31. SANTORO, N. "Symptoms of menopause: hot flushes." *Clin. Obstet. Gynecol.*, **51** (3): 539, 2008.



32. BACHMANN, G. A. "Menopausal vasomotor symptoms. A review of causes, effects and evidence-based treatment options." *J. Reprod. Med.*, **50** (3): 155, 2005.
33. KRONENBERG, F.; COTEI, L. J.; LINKIE, D. M.; DYRENFURTH, I. & DOWNEY, J. A. "Menopausal hot flashes: thermoregulatory, cardiovascular, and circulating catecholamine and LH changes." *Maturitas*, **6** (1): 31, 1984.
34. DEECHER, D. C. "Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms." *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **14** (4): 435, 2005.
35. SHANAFELT, T. D.; BARTON, D. L.; ADJEI, A. A. & LOPRINZI, C. L. "Pathophysiology and treatment of hot flashes." *Mayo Clin. Proc.* **77** (11): 1207, 2002.
36. BERENDSEN, H. H. "The role of serotonin in hot flashes." *Maturitas*, **36** (3):155, 2000.
37. SALMI, P. & AHLENIUS, S. "Evidence for functional interactions between 5-HT1A and 5-HT2A receptors in rat thermoregulatory mechanisms." *Pharmacol. Toxicol.*, **82** (3): 122, 1998.
38. TEMEL, S.; LIN, W.; LAKHLANI, S. & JENNES, L. "Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge." *Endocrinology*, **143** (10): 3974, 2002.
39. LU, H.; OZAWA, H.; NISHI, M.; ITO, T. & KAWATA, M. "Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta." *J. Neuroendocrinol.* **13** (10): 839, 2001.
40. FREEDMAN, R. R. "Pathophysiology and treatment of menopausal hot flashes." *Semin. Reprod. Med.*, **23** (2): 117, 2005.
41. STURDEE, D. W. "The menopausal hot flush - Anything new?" *Maturitas*. **60** (1): 42, 2008.
42. MORROW, P. K.; MATTAIR, D.N. & HORTOBAGYI, G. N. "Hot Flashes: A Review of Pathophysiology and Treatment Modalities." *Oncologist*, **16** (11):1658, 2011.
43. ANDRIKOULA, M. & PRELEVIC, G. "Menopausal hot flashes revisited." *Climacteric*, **12** (1): 3, 2009.
44. HICKEY, M.; SAUNDERS, C. M. & STUCKEY, B. G. "Non-hormonal treatments for menopausal symptoms." *Maturitas*, **57** (1): 85, 2007.
45. JUDD, H. L.; CLEARY, R. E.; CREASMAN, W. T.; FIGGE, D. C.; KASE, N.; ROSENWAKS, Z. & TAGATZ, G. E. "Estrogen Replacement Therapy." *Obstet. Gynecol.*, **58** (3): 267, 1981.

46. WALSH, B. W.; SCHIFF, I.; ROSNER, B.; GREENBERG, L.; RAVNIKAR, V. & SACKS, F. M. "Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins." *N. Engl. J. Med.* **325** (17): 1196, 1991.
47. BARRETT-CONNOR, E. & GRADY, D. "Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations." *Annu Rev Public Health.* **19**: 55, 1998.
48. RODRIGUEZ, C.; PATEL, A.V.; CALLE, E. E.; JACOB, E. J. & THUN, M. J. "Estrogen Replacement Therapy and Ovarian Cancer Mortality in a Large Prospective Study of US Women." *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*; **285** (11): 1460, 2001.
49. MAHMUD, K. "Natural hormone therapy for menopause." *Gynecol. Endocrinol.*, **26** (2): 81, 2010.
50. CURCIO, J. J.; WOLLNER, D. A.; SCHMIDT, J. W. & KIM, L. S. "Is bio-identical hormone replacement therapy safer than traditional hormone replacement therapy? A critical appraisal of cardiovascular risks in menopausal women." *Treat Endocrinol.*, **5** (6): 367, 2006.
51. BOOTHBY, L. A.; DOERING, P. L.; KIPERSZTOK, S. "Bioidentical hormone therapy: a review." *Menopause*, **11** (3): 356, 2004.
52. LAMBRINOUDAKI, I. "Progestogens in postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer." *Maturitas*, **77** (4): 311, 2014.
53. CHLEBOWSKI, R. T. & ANDERSON, G. L. "Menopausal hormone therapy and breast cancer mortality: clinical implications." *Ther. Adv. Drug Saf.* **6** (2): 45, 2015.
54. MAGNUSSON, C.; BARON, J. A.; CORREIA, N.; BERGSTRÖM, R.; ADAMI, H. O. & PERSSON, I. "Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy." *Int. J. Cancer*, **81**(3):339, 1999.
55. CLEMONS, M. & GOSS, P. "Estrogen and the risk of breast cancer." *N. Engl. J. Med.*, **344** (4): 276, 2001.
56. GRADY, D. "Management of menopausal symptoms." *N. Engl. J. Med.*, **355** (22): 2338, 2006.
57. STUTE, P.; BECKER, H. G.; BITZER, J.; CHATSIPROIOS, D.; LUZUY, F.; VON WOLFF, M.; WUNDER, D. & BIRKHAEUSER, M. "Ultra-low dose - new approaches in menopausal hormone therapy." *Climacteric*, **18** (2): 182, 2015.
58. SIMON, J. A. & MAAMARI, R. V. "Ultra-low-dose vaginal estrogen tablets for the treatment of postmenopausal vaginal atrophy." *Climacteric*, **16** (S1): 37, 2013.
59. STEVENSON, J. C.; DURAND, G.; KAHLER, E. & PERTYNSKI, T. "Oral ultra-low dose continuous combined hormone replacement therapy with 0.5 mg 17 $\beta$ -oestradiol and 2.5 mg dydrogesterone for the treatment of vasomotor symptoms: results from a double-blind, controlled study." *Maturitas*, **67** (3): 227, 2010.
60. PANZER, C. & GUAY, A. "Testosterone replacement therapy in naturally and surgically menopausal women." *J. Sex. Med.* **6** (1): 8, 2009.

61. BRAUNSTEIN G. D. "Management of female sexual dysfunction in postmenopausal women by testosterone administration: safety issues and controversies." *J. Sex. Med.*, **4** (4 Pt 1): 859, 2007.
62. BRAUNSTEIN, G. D. "Safety of testosterone treatment in postmenopausal women." *Fertil. Steril.*, **88** (1): 1, 2007.
63. GENAZZANI, A. D.; LANZONI, C.; GENAZZANI, A. R. "Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly?" *Drugs Aging*, **24** (3): 173, 2007.
64. WIERMAN, M. E.; ARLT, W.; BASSON, R.; DAVIS, S. R.; MILLER, K. K.; MURAD, M. H.; ROSNER, W. & SANTORO, N. "Androgen therapy in women: a reappraisal: an endocrine society clinical practice guideline." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99** (10): 3489, 2014.
65. PERRONE, G.; CAPRI, O.; GALOPPI, P.; PATACCHIOLI, F. R.; BEVILACQUA, E.; DE STEFANO, M. G. & BRUNELLI, R. "Menopausal symptoms after the discontinuation of long-term hormone replacement therapy in women under 60: a 3-year follow-up." *Gynecol. Obstet. Invest.* **76** (1): 38, 2013.
66. TURNER, J. V.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S. & GLASS, B. D. "Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors." *J. Pharm. Sci.*, **96** (8): 1879, 2007.
67. POLUZZI, E.; PICCINNI, C.; RASCHI, E.; RAMPA, A.; RECANATINI, M. & DE PONTI, F. "Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective." *Curr. Med. Chem.*, **21** (4): 417, 2014.
68. COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; BERGHE, D. V.; PIETERS, L. & VLIETINCK, A. J. "Phytoestrogens: recent development." *Planta Med*, **69** (7): 589, 2003.
69. BECHER, S. M. & ZSARNOVSKY, A. "Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299** (2): 408, 2001.
70. NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. "Estrogen receptor transcription and transactivation: basic aspects of estrogen action." *Breast Cancer Res.* **2** (5):360, 2000.
71. LAMARTINIERE, C. A.; COTRONEO, M. S.; FRITZ, W. A.; WANG, J.; MENTOR-MARCEL, R. & ELGAVISH, A. "Genistein Chemoprevention: Timing and Mechanisms of Action in Murine Mammary and Prostate." *J. Nutr.* **132** (3): 552S, 2002.
72. ZHANG, G.; QIN, L.; SHI, Y. "Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial." *J. Bone Miner. Res.* **22** (7): 1072, 2007.

73. BEDELL, S.; NACHTIGALL, M. & NAFTOLIN, F. "The pros and cons of plant estrogens for menopause." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **139**: 225, 2014.
74. GENCEL, V. B.; BENJAMIN, M. M.; BAHOU, S. N. & KHALIL, R. A. "Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease." *Mini-Rev. Med. Chem.*, **12** (2): 149, 2012.
75. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3a ed. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., 2009. p. 550.
76. CLAVEL, T.; BORRMANN, D.; BRAUNE, A.; DORE, J. & BLAUT, M. "Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans." *Anaerobe*, **12** (3): 140, 2006.
77. COLLI, M. C.; BRACHT, A.; SOARES, A. A.; DE OLIVEIRA, A. L.; BOER, C. G.; MARQUES DE SOUZA, C. G. & PERALTA, R. M. "Evaluation of the efficacy of flaxseed meal and flaxseed extract in reducing menopausal symptoms." *J. Med. Food*, **15** (9): 840, 2012.
78. HUNTLEY, A. L. "Grape flavonoids and menopausal health." *Post. Reprod. Health*, **13** (4): 165, 2007.
79. KONG, X. X.; FU, Y. C.; XU, J. J.; ZHUANG, X. L.; CHEN, Z. G. & LUO, L. L. "Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis." *J. Endocrinol. Invest.* **34** (11): e374, 2011.
80. WOLLENWEBER, E. & DIETZ., V. H. "Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants." *Phytochemistry*, **20** (5): 869, 1981.
81. AHERNE, S. A. & O'BRIEN, N. M. "Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism." *Nutrition*, **18** (1): 75, 2002.
82. CALDERÓN-MONTAÑO, J. M., BURGOS-MORÓN, E. PÉREZ-GUERRERO, C. & LÓPEZ-LÁZARO M. "A review on the dietary flavonoid kaempferol." *Mini Rev Med Chem.*, **11** (4): 298, 2011.
83. WANG-POLAGRUTO, J. F.; VILLABLANCA, A. C., POLAGRUTO, J. A.; LEE, L.; HOLT, R. R.; SCHRADER, H. R.; ENSUNSA, J. L.; STEINBERG, F. M.; SCHMITZ, H. H. & KEEN, C. L. "Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **47** (2): S177, 2006.
84. HIDALGO, L. A.; CHEDRAUI, P. A.; MOROCHO, N.; ROSS, S.; SAN MIGUEL, G. "The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." *Gynecol. Endocrinol.*, **21** (5): 257, 2005.
85. VIERECK, V.; EMONS, G; WUTTKE, W. "Black cohosh: just another phytoestrogen?" *Trends Endocrinol. Metab.*; **16** (5): 214, 2005.
86. FERRARI, A. "Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms." *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **35** (6): 1083, 2009.

87. KIEFER, D. "Alternatives to synthetic drugs ease menopausal symptoms." Life Ext. Mag., 2004. disponível em: <http://www.lef.org/Magazine/2004/10/aas/Page-01?p=1&checked=1>. Acesso em junho/2015.
88. LINNAEI, C. *Species plantarum* - Vol. 2. Stockholm, Laurentii Salvii, 1753. p. 986.
89. WEIGUO, Z.; YILE, P.; SHIHAI, Z. Z. J.; XUEXIA, M. & YONGPING, H. "Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and trnL-F sequences." Afr. J. Biotechnol., **4** (6): 563, 2005.
90. CENTER FOR BIOINFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY. *Traditional chinese medicines integrated database*. Disponível em: <http://www.megabionet.org/tcmid/>. Acesso em: agosto/2015.
91. KESHA, B. & RAY, A. K. "Action of estradiol 17-beta on the synthetic activity of the silk gland in *Bombix mori* L." J. Insect Physiol., **44** (5-6): 491, 1998.
92. KESHA, B. & RAY, A. K. "Estradiol 17- $\beta$  in *Bombix mori*: possible significance and its effects on silk production" J. Insect Physiol. **46** (6): 1061, 2000.
93. YANG, H. J.; LEE, J. W.; LEE, S. H.; RYU, J. S.; KWAK, D. H.; NAM, K. S.; PARK, Y. I.; LEE, Y. C.; JUNG, K. Y. & CHOO, Y. K. : Estrogenic activity produced by aqueous extracts of silkworm (*Bombyx mori*) pupae in ovariectomized rats." Am. J. Chin. Med., **38** (1): 89, 2010.
94. KIM, S. Y.; GAO, J. J. & KANG, K. "Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induced differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line." Biol. Pharm. Bull., **23** (4): 451, 2000.
95. ROLLINGER, J. M.; BODENSIECK, A.; SEGER, C.; ELLMERER, E. P.; BAUER, R.; LANGER, T. & STUPPNER, H. "Discovering COX-inhibiting constituents of *Morus* root bark: activity-guided versus computer-aided methods." Planta Med., **71** (5): 399, 2005.
96. AHN, S. C.; KIM, B. Y.; OH, W. K.; PARK, Y. M.; KIM, H. K. & AHN, J. S. "Colorimetric heparinase assay for alternative anti-metastatic activity." Life Sci., **79** (17): 1661, 2006.
97. YANG, J. Y. & LEE, H. S. "Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of morin isolated from mulberry fruits (*Morus alba* L.)." J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., **55** (4): 485, 2012.
98. RIVIÈRE, C.; KRISA, S.; PÉCHAMAT, L.; , NASSRA, M.; DELAUNAY, J. C.; MARCHAL, A.; BADOUC, A.; WAFFO-TÉGUO, P.; MÉRILLON, J. M. "Polyphenols from the stems of *Morus alba* and their inhibitory activity against nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia." Fitoterapia, **97**: 253, 2014.
99. ABBAS, G. M.; ABDEL BAR, F. M.; BARAKA, H. N.; GOHAR, A. A. & LAHLOUB, M. F. "A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L." Nat Prod Res., **28** (13): 952, 2014.

100. ABD EL-MAWLA, A. M.; MOHAMED, K. M. & MOSTAFA, A.M. "Induction of biologically active flavonoids in cell cultures of *Morus nigra* and testing their hypoglycemic efficacy." *Sci. Pharm.*, 79 (4): 951, 2011.
101. SHARMA, S. B.; TANWAR, R. S.; RINI, A. C.; SINGH, U. R.; GUPTA, S. & SHUKLA, S. K. "Protective effect of *Morus rubra* L. leaf extract on diet-induced atherosclerosis in diabetic rats." *Indian J Biochem Biophys.*, 47 (1): 26, 2010.
102. SHARMA, S. B.; GUPTA, S.; AC, R.; SINGH, U. R.; RAJPOOT, R. & SHUKLA, S. K. "Antidiabetogenic action of *Morus rubra* L. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats." *J. Pharm. Pharmacol.*, 62 (2): 247, 2010.
103. OZAN, F.; TEPE, B.; POLAT, Z. A. & ER, K. "Evaluation of in vitro effect of *Morus rubra* (red mulberry) on survival of periodontal ligament cells." *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 105 (2): e66, 2008.
104. COHEN, I. (BioNovo, Inc., USA) "Estrogenic extracts of *Morus alba* and uses therefore." US Patent 7.815.949 B2, Outubro, 2010.
105. DOI, K.; KOJIMA, T.; MAKINO, M.; KIMURA, Y. & FUJIMOTO, Y. "Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L." *Chem. Pharm. Bull.* 49 (2) 151, 2001.
106. PAWLOWSKA, A. M.; OLEZEK, W. & BRACA, A. "Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (moraceae) fruits." *J. Agric. Food Chem.*, 56 (9): 3377, 2008.
107. SONG, W.; WANG, H. J.; BUCHELI, P.; Zhang, P. F.; WEI, D. Z. & LU, Y. H. "Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China." *J. Agric. Food Chem.* 57 (19): 9133, 2009.
108. LEE, S. J.; CHUNG, H. Y.; MAIER, C. G. A.; WOOD, A. R.; DIXON, R. A. & MABRY, T. J. "Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L." *J. Agric. Food Chem.*, 46 (8): 3325, 1998.
109. DAT, N. T.; BINH, P. T. X.; QUYNH, L. T. P. MINH, C. V.; HUONG, H. T. & LEE, J. J. "Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*." *Fitoterapia*, 81 (8): 1224, 2010.
110. GLEASON, F. K. & CHOLLET, R. *Plant biochemistry*. 1 ed. Sudbury, Jones & Bartlett Learning, 2012, p. 248.
111. POSSEMIERS, S.; BOLCA, S.; VERSTRAETE, W. & HEYERICK, A. "The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals", *Fitoterapia*, 82 (1): 53, 2011.
112. DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G. & CROZIER, A. "Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases" *Antioxid. Redox Signal.*, 18 (14): 1818, 2013
113. SPENCER, J. P. E.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. & RICE-EVANS, C. "The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids." *FEBS Lett.* 485 (2): 224, 1999.,

114. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado". In: *Instrução Normativa Nº 2, DE 13 DE MAIO DE 2014*. Brasília, ANVISA, 2014, p. 32.
115. STORTI-FILHO, A; ESTIVALET SVIDIZINSKI, T. I., DA SILVA SOUZA, R. J.; DE MELLO, I. C.; DA COSTA SOUZA, P. & LOPES CONSOLARO, M. E. "Oncotic colposcopy stained with Harris-Shorr in the observation of vaginal microorganisms." *Diagn Cytopathol.*, **36** (6) 358, 2008.
116. LU, Y., MA, H. & LIU, D. "Pharmacological investigations of the unique herbal formula Menoprogen in rats: Estrogenic activity and mechanism." *Gynecol. Endocrinol.*, **24** (3): 161, 2008.
117. MA, H., CHUNG, M. H., LU, Y., NISHIHARA, T. & HATTORI, M. "Estrogenic effects of the herbal formula 'menoprogen' in ovariectomized rats." *Biol. Pharm. Bull.*, **33** (3): 455, 2010.
118. STOESSEL, S. & LECLERCQ, G. "Competitive binding assay for estrogen receptor in monolayer culture: measure of receptor activation potency." *J. Steroid Biochem.*, **25** (5A): 677, 1986.
119. FANG, H.; TONG, W.; PERKINS, R.; SOTO, A. M.; PRECHTL, N. V. & SHEEHAN, D. M. "Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities." *Environ. Health Perspect.*, **108** (8): 723, 2000.
120. ASCENZI, P.; BOCEDIC, A.; MARINO, M. "Structure–function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : Impact on human health." *Mol. Aspects Med.*, **27** (4): 299, 2006.
121. BRYANT, H. U.; GLASEBROOK, A. L.; YANG, N. N. & SATO, M. "An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69** (1-6): 37, 1999.
122. JORDAN, V. C. "Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: today and tomorrow." *J. Natl. Cancer Inst.*, **90** (13):967, 1998.
123. SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N. & SERRANO, F. O. "The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants." *Environ. Health Perspect.* **103** (Suppl7): 113, 1995.
124. BRENTON, J. D.; CAREY, L. C.; AHMED, A. A. & CALDAS, C. "Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?" *J. Clin. Oncol.* **23** (29): 7350, 2005.
125. BROOKS, S. C.; LOCKE, E. R. & SOULE, A. D. "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma." *J. Biol. Chem.* **248** (17): 6251, 1973.
126. CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V. & LIPKOWITZ, S. "Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer." *Breast Dis.* **32**(1-2): 35, 2010.

127. INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). *In Vitro Cytotoxicity Test Methods For Estimating Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests*. Publication n<sup>o</sup>: 07-4519,. Research Triangle Park, NIH, 2006, p. 404.
128. SAKAI, A. "BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity." *Proceedings of the 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (AATEX)*. Tokyo, JP, 2007, vol. 14 (special issue), p. 367-373.
129. REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity". *Nat Protoc.*, **3** (7):1125, 2008.
130. ABU, N.; AKHTAR, M. N.; YEAP, S. K.; LIM, K. L.; HO, W. Y.; ZULFADLI, A. J.; OMAR, A. R.; SULAIMAN, M. R.; ABDULLAH, M. P. & ALITHEEN, N. B. "Flavokawain A Induces Apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and Inhibits the Metastatic Process *In Vitro*." *PLoS ONE*, **9** (10): e105244, 2014.
131. STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W. & VILLANUEVA, A. "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets." *Acta Histochem.*, **114** (8): 785, 2012.
132. RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J. & MINOR, L. "Cell Viability Assays." In: *Assay Guidance Manual*. SITTAMPALAM, G. S. (ed), Bethesda, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004, p. 1-23.
133. BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M. & TAN, A. S. "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnol Annu Rev.* **11**: 127, 2005.
134. MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods.*, **65** (1-2): 55, 1993.
135. MANACH,C.; SCALBERT,A.; MORAND,C.; RÉMÉSY,C. & JIMENEZ, L. "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am. J. Clin. Nutr.*, **79** (5):727, 2004.
136. MOUTSATSOU, P. "The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding." *Hormones*, **6** (3): 173, 2007.
137. CROZIER, A.; JAGANATH, B. & CLIFFORD, M. N. "Phenols, polyphenols and tannins: an overview." In: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N. & ASHIHARA, H. (eds.), Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2006. p. 1-24.
138. GHEM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P. Y. & JAMERSON, J. L. "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94** (25): 14138, 1997.



139. VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F. & SALOMONE, S. "Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability." *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **38** (1): 15, 2013.
140. PLAZUK, D.; VESSIERES, A.; HILLARD, E. A.; BURIEZ, O.; LABBE, E.; PIGEON, P.; PLAMONT, M. A.; AMATORE, C.; ZAKREWSKI, J. & JAOUEN, G. "A [3]Ferrocenophane polyphenol showing a remarkable antiproliferative activity on breast and prostate cancer cell lines." *J. Med. Chem.* **52** (15): 4964, 2009.
141. WU, L. S.; WANG, X. J.; WANG, H.; YANG, H.W.; JIA, A. Q. & DING, Q. "Cytotoxic polyphenols against breast tumor cells in *Smilax china* L." *J. Ethnopharmacol.*, **130** (3): 460, 2010.
142. BAJAJ, K. L. & KAUR, G. "Colorimetric determination of capsaicin in capsicum fruits with the Folin-Ciocalteu reagent." *Microchim. Acta*, **71**: 81, 1979.
143. BLAINSKI, A.; LOPES, G. C & DE MELLO, J. C. P. "Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L." *Molecules*, **18** (6): 6852, 2013.
144. EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE. *European Pharmacopeia*. 6a ed. Strasbourg, Concil of Europe, 2007. p. 3308.
145. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira - volume 2 - Monografias*. 5a ed. Brasília, ANVISA, 2010. p. 904.
146. GRUNDHÖFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G. & GROSS, G. G. "Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins." *Phytochemistry.*, **57** (6): 915, 2001.
147. FOLIN, O. & DENIS, W. "A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine." *J. Biol. Chem.* **22**: 305, 1915.
148. SANCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. & JACOBO-VELAZQUEZ, D. "The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination." *Anal. Methods*, **5** (21): 5990, 2013.
149. FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins." *J. Biol. Chem.* **73**: 627, 1927.
150. SONG, F. L.; GAN, R. Y.; ZHANG, Y.; XIAO, Q.; KUANG, L. & LI, H. B. "Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants." *Int. J. Mol. Sci.*, **11** (6):2362, 2010.
151. AHMED, I. A.; MIKAIL, M. A.; IBRAHIM, M. B.; HAZALI, N. B.; RASAD, M. S. B. A.; GHANI, R. A.; WAHAB, R. A.; ARIEF, S. J. & YAHYA, M. N. A. "Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit." *Food Chem.*, **172**: 778, 2015.

152. Masullo, M.; Montoro, P.; Mari, A.; Pizza, C.; Piacente, S. "Medicinal plants in the treatment of women's disorders: analytical strategies to assure quality, safety and efficacy." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, no prelo.
153. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira - volume 1 - Monografias*. 5a ed. Brasília, ANVISA, 2010. p. 546.
154. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. 1ª ed., Brasília, ANVISA, 2011. p. 126.
155. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico". In: *Instrução Normativa Nº 4, DE 18 DE JUNHO DE 2014.*, Brasília, ANVISA, 2014, p. 123.
156. FENG, X. & SIEGEL, M. M. "FTICR-MS applications for the structure determination of natural products." *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (5): 1341, 2007.
157. DE HOFFMANN, E. & STOOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2a ed. New York, John Wiley & Sons, LTD, 2002. p. 407.
158. BRUKER DALTONICS. *SolarisX – user manual*. 3a ed. Bremen, Bruker Daltonik GmbH, 2011. p. 60.
159. FAULL, K. F.; DOOLEY, A. N.; HALGAND, F.; SHOEMAKER, L. D.; NORRIS, A. J.; RYAN, C. M.; LAGANOWSKY, A.; JOHNSON, J. V. & KATZ, J. E. "An introduction to the basic principles and concepts of mass spectrometry." In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. BARCELO, D. (ed.) Amsterdam, Elsevier, 2009. p 1-46.
160. LAWRENCE, E. O. & LIVINGSTON, M. S. "The production of high-speed light ions without the use of high voltages." *Phys. Rev.* **40** (1): 19, 1932.
161. MARSHALL, A. G. & GROSSHANS, P. B. "Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: the teenage years." *Anal. Chem.* **63** (4): 215A, 1991.
162. MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L. & JACKSON, G. S. "Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer." *Mass Spectrom. Rev.* **17** (1): 1, 1998.
163. CHO, Y.; AHMED, A.; ISLAM, A. & KIM, S. "Developments in FT-ICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics." *Mass Spectrom. Rev.* **34** (2): 248, 2015.
164. BROWN, S. C.; KRUPPA, G. & DASSEUX, J. L. "Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry." *Mass Spectrom. Rev.*, **24** (2): 223, 2005.
165. ZHANG, J.; MCCOMBIE, G.; GUENAT, C. & KNOCHENMUSS, R. "FT-ICR mass spectrometry in the drug discovery process." *Drug Discov. Today*, **10** (9): 635, 2005.
166. POLLIER, J.; MORREEL, K.; GEELEN, D. & GOOSSENS, A. "Metabolite profiling of triterpene saponins in *Medicago truncatula* hairy roots by liquid

chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." J. Nat. Prod., **74** (6): 1462, 2011.

167. COSTA, H. B.; SOUZA, L. M.; SOPRANI, L. C.; OLIVEIRA, B. G.; OGAWA, E. M.; KORRES, A. M. N.; VENTURA, J. A. & ROMAO, W. "Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS." Food Chem. **174**: 139, 2015.

168. PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; GARRO, G.; MANGANIELLO, G.; CHIANESE, L.; COPPOLA, R. & ADDEO, F. "Profiling of anthocyanins for the taxonomic assessment of ancient purebred *V. vinifera* red grape varieties." Food Chem. **146**: 15, 2014.

169. SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, R. S. & HEBER, D. "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*." J. Agric. Food Chem. **54** (25): 9329, 2006.

170. CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; COSTA, N.; ARBIZU, C.; PEDRESCHI, R. & LARONDELLE, Y. "Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity." Food Chem. **106**: 1285, 2008.

171. GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. "Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts." J. Funct. Foods **3** (4): 290, 2011.

172. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2a ed, New York, John Wiley and Sons Inc, 1997. p. 800.

173. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3a ed, Hoboken, John Wiley & Sons Inc, 2010. p. 912.

174. MARTIN, A. J. P. & SYNGE, R. L. M. "A new form of chromatogram employing two liquid phases." Biochem J., **35** (12): 1358, 1941.

175. DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; DA ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F.; GUMA, F. T. C. R. & EMANUELLI, T. "Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits." J. Food Drug Anal., 2015, no prelo.

176. ZENGIN, G.; UYSAL, S.; CEYLAN, R. & AKTUMSEK, A. "Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: a phytochemical study." Ind. Crops Prod. **70**: 1, 2015.

177. BAE, J. Y.; KIM, C. Y.; KIM, H. J.; PARK, J. H. & AHN, M. J. "Differences in the chemical profiles and biological activities of *Paeonia lactiflora* and *Paeonia obovata*." J. Med. Food, **18** (2): 224, 2015.

178. HUANG, E. C.; WACHS, T.; CONBOY, J. J. & HENION, J. D. "Atmospheric pressure ionization mass spectrometry." Anal. Chem. **62** (13): 713A, 1990.

179. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M. & Cooks, R. G. "The orbitrap: a new mass spectrometer". *J. Mass Spectrom.*, 40 (4): 430, 2005.
180. AB SCIEX. "Triple quadrupole power and performance, at a single quadrupole price". In: *API 2000 LC/MS/MS system advertisement prospectum*. 1a ed. Foster City, AB Sciex, 2010. p.8.
181. HUESTIS, M. A. & SMITH, M. L. "Modern analytical technologies for the detection of drug abuse and doping". *Drug Discov. Today Technol.*, 3 (1): 49, 2006.
182. YOHAY, D. A.; ZHANG, J.; THRAILKILL, K. M.; ARTHUR, J. M. & QUARLES, L. D. "Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts." *J. Cell Physiol*, 158 (3): 467, 1994.
183. HAYNES, M. K.; STROUSE, J. J.; WALLER, A.; LEITÃO, A.; CURPAN, R. F.; BOLOGA, C.; OPREA, T. I.; PROSSNITZ, E. R.; EDWARDS, B. S.; SKLAR, L. A.; THOMPSON, T. A. "Detection of intracellular granularity induction in prostate cancer cell lines by small molecules using the Hypercyt high-throughput flow cytometry system." *J. Biomol. Screen.*, 14 (6): 596, 2009.
184. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea – Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea – Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent*. 3a ed, Geneva, ISO 14502-1:2005, 2015, p. 8.
185. AINSWORTH, E. A. & GILLESPIE, K. M. "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent." *Nat. Protoc.* 2 (4): 875, 2007.
186. ATTARD, E. "A rapid microliter plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols." *Cent. Eur. J. Biol.* 8 (1): 48, 2013.
187. AGBOR, G. A.; VINSON, J. A. & DONNELLY, P. E. "Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay." *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* 3 (8): 147, 2014.
188. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003*. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003. p. 15.
189. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012*. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de maio de 2012. p. 12.
190. USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. *U.S. Pharmacopeial Convention Herbal Medicines Compendium*. Disponível em: <http://hmc.usp.org/>. Acesso em junho/2015.
191. GUERRIERO, V. "Power Law Distribution: Method of Multi-scale Inferential Statistics". *J. Mod. Math. Fr.*, 1 (1): 21, 2012.
192. LEARDI, R. "Experimental design in chemistry: a tutorial." *Anal. Chim. Acta*, 652 (1-2): 161, 2009.

193. PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S. & VIANELLO, A. "Plant flavonoids -biosynthesis, transport and involvement in stress responses." *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (7):14950, 2013.
194. ELHAMIRAD, A. H. & ZAMANIPOOR, M. H. "Thermal stability of some flavonoids and phenolic acids in sheep tallow olein." *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **114** (5): 602, 2012.
195. SIGMA-ALDRICH & EUROPEAN COLLECTION OF CELL CULTURES (ECACC). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*, 2a ed, Saint Louis, Sigma Aldrich, 2012. p. 64.
196. OH, S. M.; KIM, Y. P. & CHUNG, K. H. "Biphasic Effects of Kaempferol on the Estrogenicity in Human Breast Cancer Cells." *Arch. Pharm. Res.*, **29** (5): 354, 2006.
197. LEHRAIKI, A.; ATTOUMBRE, J.; BIENAIMEÉ, C.; MATIFAT, F.; BENSADDEK, F.; NAVA-SAUCEDO, E.; FLINIAUX, M. A.; OUADID-AHIDOUCH, H.; & BALTORA-ROSSET, S. "Extraction of lignans from flaxseed and evaluation of their biological effects on breast cancer mcf-7 and mda-mb-231 cell lines" *J. Med. Food*, **13** (4): 834, 2010.
198. SCOTT, R. E.; FURCHT, L. T. & KERSEY, J. H. "Changes in Membrane Structure Associated with Cell Contact." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73** (12): 3631, 1973.
199. BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2496, 1986.
200. BAULIEU, E. E. in the General Discussion session of JUNGBLUT, P. W.; HUGHES, A.; LITTEL, M.; MCCANN-HUGHES, S.; ROSENFELD, G. C. & WAGNER, R. K. "Origin and properties of target organ estradiol binders." In *Schering Workshop on Steroid Hormone 'Receptors'*, Berlin - ALE, 1970. *Advances in The Biosciences - Volume 7*. RASPÉ, G. (ed.), Amsterdam, Elsevier, 2013, p. 137-154.
201. LIPPMAN, M.; BOLAN, G. & HUFF, K. "The effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture." *Cancer Res.* **36** (12): 4595, 1976.
202. ERCISLI, S.; TOSUN, M.; DURALIJA, B.; VOĆA, S.; SENGUL, M. & TURAN, M. "Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) mulberry genotypes." *Food Technol Biotechnol*, **48** (1): 102, 2010.
203. FLACZYK, E.; KOBUS-CISOWSKA, J.; PRZEOR, M.; KORCZAK, J.; REMISZEWSKI, M.; KORBAS, E. & BUCHOWSKI, M. "Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba* L. leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes." *Agri Sci.* **4** (5B): 141, 2013.

204. SUWANSRI, S.; KHAOPRASERT, S.; RATANATRIWONG, P. & PROMBOON, A. "Natural preservative from Thai mulberry: the antioxidant and antibacterial properties of leaf extracts from different cultivars." *Acta Hortic.*, **786**: 115, 2008.
205. ZOU, Y.; LIAO, S.; SHEN, W.; LIU, F.; TANG, C.; CHEN, C. Y. O. & SUN, Y. "Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in southern China." *Int. J. Mol. Sci.* **13** (12): 16544, 2012.
206. ZHANG, W.; HAN, F.; HE, J. & DUAN, C. "HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and antioxidant activities of nonanthocyanin phenolics in mulberry (*Morus alba* L.)." *J. Food Sci.*, **73** (6): C512, 2008.
207. KATSUBE, T.; IMAKAWA, N.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y. SHIWAKU, K. & YMANE, Y. "Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity." *Food Chem.*, **97**: 25, 2006.
208. SUN, F.; SHEN, L. & MA, Z. "Screening for ligands of human aromatase from mulberry (*Mori alba* L.) leaf by using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." *Food Chem.*, **126**: 1337, 2011.
209. ZOECHLING, A.; REITER, E.; EDER, R.; WENDELIN, S.; LIEBNER, F. & JUNGBAUER, A. "The flavonoid kaempferol is responsible for the majority of estrogenic activity in red wine." *Am. J. Enol. Vitic.* **60** (2): 223, 2009.
210. CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M. "A review on the dietary flavonoid kaempferol." *Mini Rev. Med. Chem.*, **11** (4): 293, 2011.
211. HUNYADI, A.; MARTINS, A.; HSIEH, T. J.; SERES, A. & ZUPKÓ, I. "Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats." *PLoS ONE*, **7** (11): e50619, 2012.
212. GANZERA, M.; CHOUDHARY, M. I. & KHAN I. A. "Quantitative HPLC analysis of withanolides in *Withania somnifera*." *Fitoterapia*, **74** (1-2): 68, 2003.
213. STEENKAMP, P. A.; HARDING, N. M.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN WYK, B. E. "Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry." *Forensic Sci. Int.* **145** (1): 31, 2004.
214. SNYDER, L. R. & DOLAN, J. W. "Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run." *J. Chromatogr. A*, **721** (1): 3, 1996.
215. SNYDER, L. R. "Classification of the solvent properties of common liquids." *J. Chrom. A*, **92** (2): 223, 1974.
216. HIBBERT, D. B. "Experimental design in chromatography: a tutorial review." *J. Chromatogr. B*, **910**: 2, 2012.
217. STOJANOVIĆ, B. J. "Factorial-based design in liquid chromatography." *Chromatographia*, **76**: 227, 2013.

218. NEMUTLU, E., KIR, S.; KATLAN, D. & BEKSAC, M. S. "Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone." *Talanta*, **80** (1): 117, 2009.
219. DEJAEGHER, B. & HEYDEN, Y. V. "Experimental Designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications." *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56** (2): 141, 2011.
220. DUGO, P.; DONATO, P.; CACCIOLA, F.; GERMANÒ M. P.; RAPISARDA, A. & MONDELLO, L. "Characterization of the polyphenolic fraction of *Morus alba* leaves extracts by HPLC coupled to a hybrid IT-TOF-MS system." *J. Sep. Sci.* **32** (21): 3627, 2009.
221. TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. & TOMAS-LORENTE, F. "Flavonoid p-coumaroylglucosides and 8-hidroxyflavone allosylglucosies in some Labiatae." *Phytochemistry*, **31** (9): 3097, 1992.
222. NAOWARATWATTANA, W.; DE-EKNAMKUL, W. & DE MEJIA, E. G. "Phenolic-containing organic extracts of mulberry (*Morus alba* L.) leaves inhibit HepG2 hepatoma cells through G2/M phase arrest, induction of apoptosis, and inhibition of topoisomerase II $\alpha$  activity." *J. Med. Food*, **13** (5): 1045, 2010.
223. PROUILLET, C.; MAZIÈRE, J. C.; MAZIÈRE, C.; WATTEL, A.; BRAZIER, M. & KAMEL, S. "Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway." *Biochem. Pharmacol.*, **67** (7): 1307, 2004.
224. ZAVA, D. T. & DUWE, G. "Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro." *Nutr. Cancer*, **27** (1): 31, 1997.
225. GMEFH - Gerência de Medicamentos Isentos, Específicos, Fitoterápicos e Homeopáticos. *Orientações sobre o controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos.*, 1a ed. Brasília, ANVISA, p. 6. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle\\_qualidade\\_extratos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf) (acesso em junho/2015).
226. RODRÍGUEZ, F. C. *Biotecnología ambiental*. 1a ed. Madrid, Editorial Tebar, 2005. p. 614.
227. HARBORNE, J. B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4a ed. San Diego, Academic Press, 1994, p. 384.
228. MAPIHAN, K. L.; VIAL, J. & JARDY, A. "Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test." *J. Chromatogr. A*, **1061** (2): 149, 2004.
229. NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY EXTENSION PROGRAM. *Best Management Practices for Field Production of Nursery Stock*, disponível em: [http://www.bae.ncsu.edu/programs/extension/ag-env/nursery/W\\_pruning.html](http://www.bae.ncsu.edu/programs/extension/ag-env/nursery/W_pruning.html). (acesso em junho/2015)

230. CHAVES, N.; ESCUDERO, J. C. & GUTIERREZ-MERINO, C. "Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate." J. Chem. Ecol. **23** (3): 579, 1997.



***ANEXOS***

---

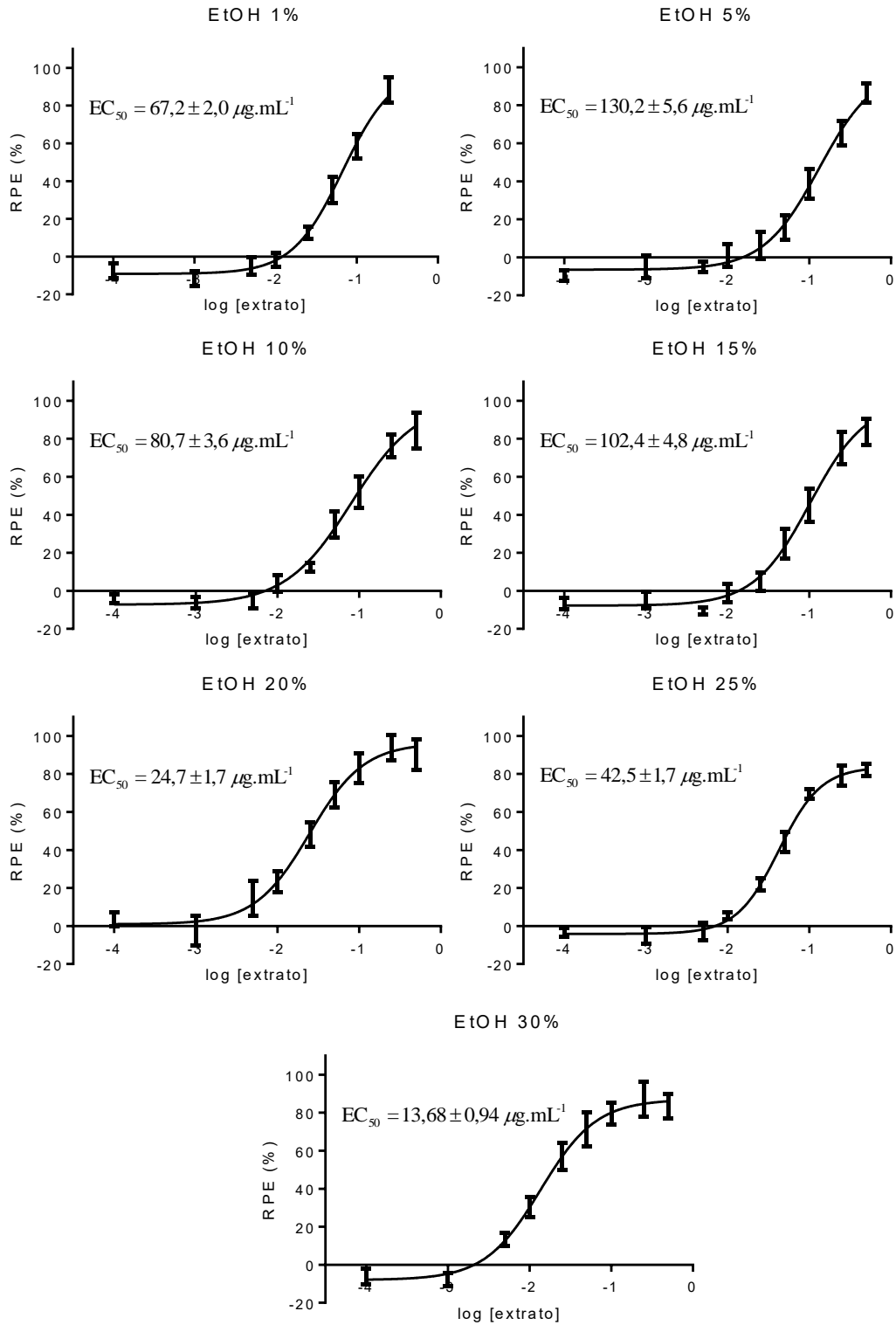
## Anexo 1

MEDIDAS DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA PARA OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO DA ETAPA DE TRIAGEM DE VARIÁVEIS DE OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE AMOREIRA (SEÇÃO 3.1.2.1)

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>RRE (%)</b>
1	-1	-1	-1	-1	1	84,27
2	-1	-1	-1	1	-1	82,06
3	-1	-1	1	-1	-1	81,68
4	-1	-1	1	1	1	85,15
5	-1	1	-1	-1	-1	74,32
6	-1	1	-1	1	1	74,32
7	-1	1	1	-1	1	70,82
8	-1	1	1	1	-1	73,19
9	1	-1	-1	-1	-1	85,12
10	1	-1	-1	1	1	84,01
11	1	-1	1	-1	1	87,62
12	1	-1	1	1	-1	81,45
13	1	1	-1	-1	1	71,89
14	1	1	-1	1	-1	65,01
15	1	1	1	-1	-1	67,35
16	1	1	1	1	1	68,33

## Anexo 2

CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA OS EXTRATOS PREPARADOS COM SOLVENTE EXTRATOR CONTENDO 1 A 30% ETOH.



## TABELAS ANOVA PARA O AJUSTE DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA

EtOH 1%					
EC <sub>50</sub> = 67,2±2,0 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	P
Regressão	78561	3	26187	827,7	<0,0001
Resíduo	2405	76	31,64		
F. ajuste	204,3	4	50,09	1,853	0,1839
Erro puro	2179	72	30,26		
total	80966	79			
% variação máxima explicada				97,03	
% variação máxima explicável				97,31	

EtOH 5%					
EC <sub>50</sub> =132,0±5,6 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	P
Regressão	94404	3	31468	867,2	<0,0001
Resíduo	3121	86	36,29		
F. ajuste	325,8	5	65,16	1,917	0,1684
Erro puro	2753	81	33,99		
total	97526	89			
% variação máxima explicada				96,80	
% variação máxima explicável				97,18	

EtOH 10%					
EC <sub>50</sub> =80,7±3,6 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	91341	3	30447	797,5	<0,0001
Resíduo	3283	86	38,18		
F. ajuste	344,5	5	68,89	1,890	0,1759
Erro puro	2953	81	36,46		
total	94625	89			
% variação máxima explicada				96,53	
% variação máxima explicável				96,88	

SQ-soma quadrática;  
MQ - média quadrática;  
g.l.- graus de liberdade

EtOH 15%					
EC <sub>50</sub> =102,4±4,8 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	107555	3	35852	797,4	<0,0001
Resíduo	3866	86	44,96		
F. ajuste	421,2	5	82,24	2,012	0,145
Erro puro	3391	81	41,86		
total	111421	89			
% variação máxima explicada				96,53	
% variação máxima explicável				96,96	

EtOH 20%					
EC <sub>50</sub> =24,7±1,7 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	111162	3	33721	686,2	<0,0001
Resíduo	4226	86	49,14		
F. ajuste	473,2	5	94,63	2,020	0,1428
Erro puro	3795	81	46,85		
total	105388	89			
% variação máxima explicada				95,99	
% variação máxima explicável				96,40	

EtOH 25%					
EC <sub>50</sub> =42,5±1,7 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	121448	3	40483	2380	<0,0001
Resíduo	1463	86	17,01		
F. ajuste	121,2	5	24,25	1,472	0,330
Erro puro	1335	81	16,48		
total	122910	89			
% variação máxima explicada				98,81	
% variação máxima explicável				98,91	

EtOH 30%					
EC <sub>50</sub> =13,68±0,94 µg.mL <sup>-1</sup>					
ANOVA					
variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	103521	3	34507	785,7	<0,0001
Resíduo	3777	86	43,92		
F. ajuste	205,1	5	41,01	0,9299	0,6329
Erro puro	3572	81	44,10		
total	107298	89			
% variação máxima explicada				96,48	
% variação máxima explicável				96,67	

### Anexo 3

VALORES OBTIDOS PARA  $D_{TOTAL}$  NOS EXPERIMENTOS DA ETAPA DE TRIAGEM DE VARIÁVEIS PARA OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Experimento	A	B	C	D	E	F	$D_{total}$
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,1059
2	-1	-1	-1	-1	1	1	0,1408
3	-1	-1	-1	1	-1	1	0,0774
4	-1	-1	-1	1	1	-1	0,1134
5	-1	-1	1	-1	-1	1	0,2358
6	-1	-1	1	-1	1	-1	0,1047
7	-1	-1	1	1	-1	-1	0,0913
8	-1	-1	1	1	1	1	0,0973
9	-1	1	-1	-1	-1	1	0,1746
10	-1	1	-1	-1	1	-1	0,0973
11	-1	1	-1	1	-1	-1	0,0782
12	-1	1	-1	1	1	1	0,0983
13	-1	1	1	-1	-1	-1	0,1381
14	-1	1	1	-1	1	1	0,1375
15	-1	1	1	1	-1	1	0,1092
16	-1	1	1	1	1	-1	0,0947
17	1	-1	-1	-1	-1	1	0,1889
18	1	-1	-1	-1	1	-1	0,1165
19	1	-1	-1	1	-1	-1	0,1001
20	1	-1	-1	1	1	1	0,0896
21	1	-1	1	-1	-1	-1	0,1113
22	1	-1	1	-1	1	1	0,3092
23	1	-1	1	1	-1	1	0,1121
24	1	-1	1	1	1	-1	0,1038
25	1	1	-1	-1	-1	-1	0,1233
26	1	1	-1	-1	1	1	0,2194
27	1	1	-1	1	-1	1	0,1318
28	1	1	-1	1	1	-1	0,0779
29	1	1	1	-1	-1	1	0,3158
30	1	1	1	-1	1	-1	0,0889
31	1	1	1	1	-1	-1	0,0866
32	1	1	1	1	1	1	0,0967

## Anexo 4

VALORES OBTIDOS PARA  $D_{TOTAL}$  NOS EXPERIMENTOS DA ETAPA DE  
MODELAGEM DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA OTIMIZAÇÃO  
CROMATOGRÁFICA

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b><math>D_{total}</math></b>
1	-1	1	-1	0,21903
2	-1	1	1	0,30670
3	-1	-1	-1	0,26932
4	-1	-1	1	0,20639
5	1	1	-1	0,22650
6	1	1	1	0,16537
7	1	-1	-1	0,24224
8	1	-1	1	0,24969
9	-2	0	0	0,26316
10	2	0	0	0,26414
11	0	2	0	0,29777
12	0	-2	0	0,39155
13	0	0	-2	0,20623
14	0	0	2	0,35748
15	0	0	0	0,12015
16	0	0	0	0,12327
17	0	0	0	0,12328
18	0	0	0	0,12328

## Anexo 5

VALORES OBTIDOS PARA  $D_{TOTAL}$  NOS EXPERIMENTOS DA MODELAGEM DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA OTIMIZAÇÃO ESPECTROMÉTRICA

experimento	A	B	C	D	E	F	G	Dtotal
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,0104
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,0004
3	-1	-1	1	-1	-1	1	1	0,2441
4	-1	-1	1	1	1	-1	1	0,0043
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,0002
6	-1	1	-1	1	-1	1	1	0,1654
7	-1	1	1	-1	1	1	-1	0,0031
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0,0056
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,0934
10	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0,1716
11	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,0001
12	1	-1	1	1	-1	1	-1	0,0031
13	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0,3947
14	1	1	-1	1	1	-1	-1	0,0002
15	1	1	1	-1	-1	-1	1	0,3117
16	1	1	1	1	1	1	1	0,0002
17	-2	0	0	0	0	0	0	0,0067
18	2	0	0	0	0	0	0	0,1436
19	0	-2	0	0	0	0	0	0,0061
20	0	2	0	0	0	0	0	0,1144
21	0	0	-2	0	0	0	0	0,1591
22	0	0	2	0	0	0	0	0,0003
23	0	0	0	-2	0	0	0	0,1591
24	0	0	0	2	0	0	0	0,0001
25	0	0	0	0	-2	0	0	0,2873
26	0	0	0	0	2	0	0	0,0001
27	0	0	0	0	0	-2	0	0,0072
28	0	0	0	0	0	2	0	0,1293
29	0	0	0	0	0	0	-2	0,0003
30	0	0	0	0	0	0	2	0,1044
31	0	0	0	0	0	0	0	0,0001
32	0	0	0	0	0	0	0	0,0002
33	0	0	0	0	0	0	0	0,0001

## Anexo 6

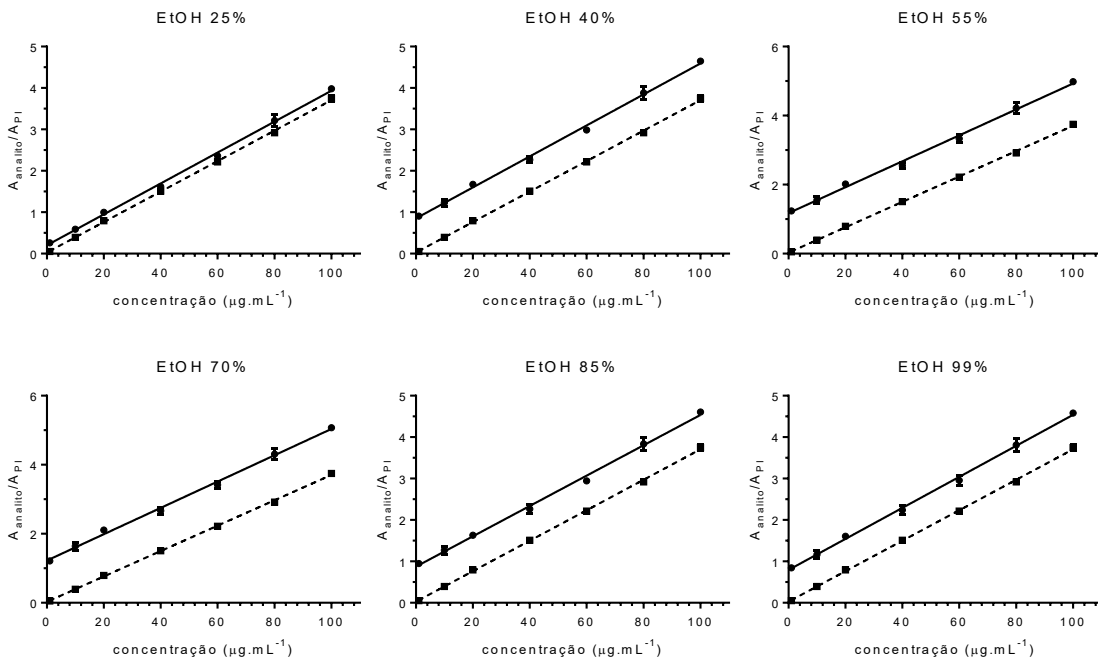
VALORES OBTIDOS PARA  $D_{TOTAL}$  NOS EXPERIMENTOS PARA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS DE FRAGMENTAÇÃO

Experimento	A	B	C	$D_{total}$
1	-1	-1	-1	0,6036
2	1	-1	-1	0,6611
3	-1	1	1	0,0001
4	1	1	1	0,0001
5	-1	-1	1	0,2954
6	1	-1	1	0,3440
7	-1	1	1	0,0539
8	1	1	1	0,0583
9	-2	0	0	0,1977
10	2	0	0	0,2753
11	0	-2	0	0,6412
12	0	2	0	0,0001
13	0	0	-2	0,4484
14	0	0	2	0,1936
15	0	0	0	0,2373
16	0	0	0	0,2455

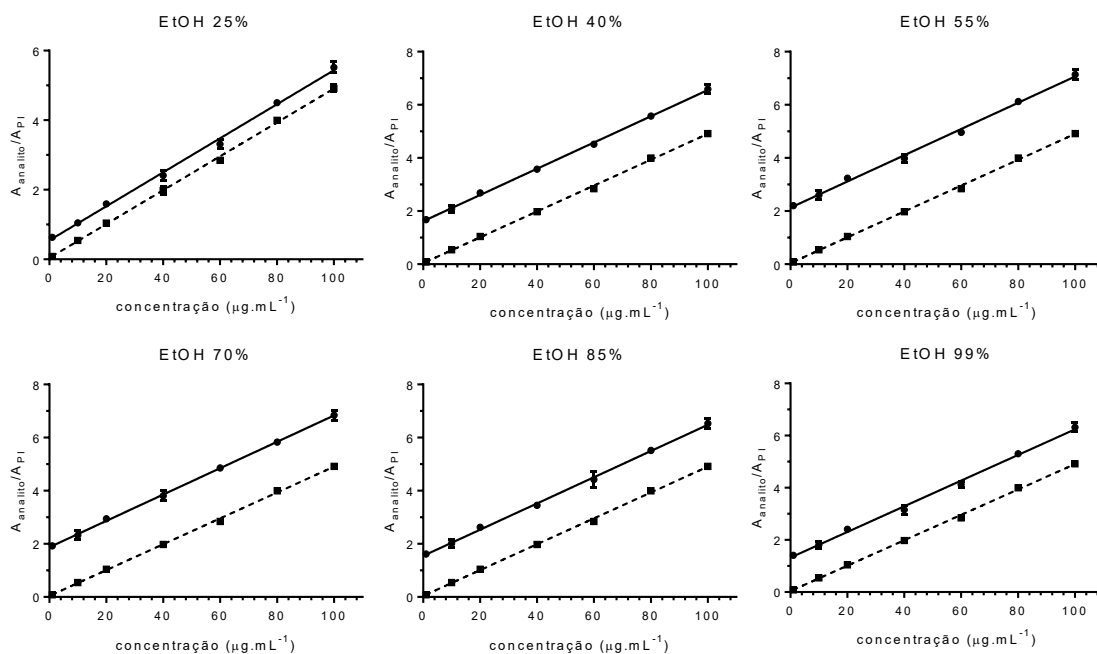


## Anexo 7

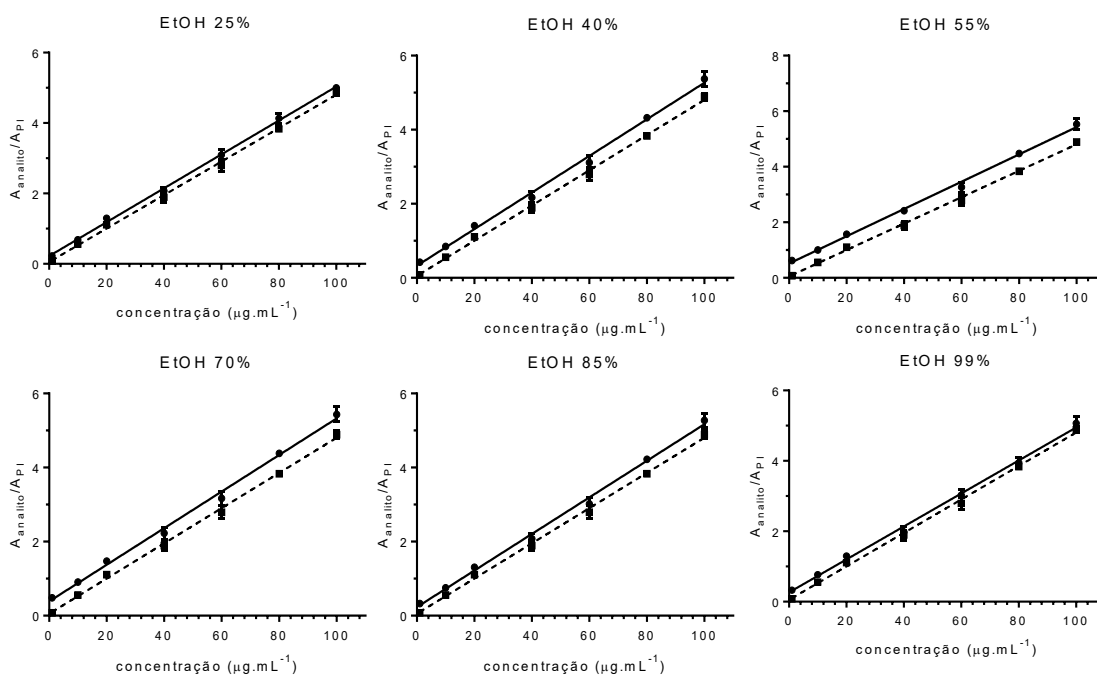
MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR PARA O FLAVONOIDE RUTINA EM DIFERENTES EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> (LINHA CHEIA: ADIÇÃO-PADRÃO; LINHA TRACEJADA: PADRONIZAÇÃO EXTERNA).



MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR PARA O FLAVONOIDE ISOQUERCETINA EM DIFERENTES EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> (LINHA CHEIA: ADIÇÃO-PADRÃO; LINHA TRACEJADA: PADRONIZAÇÃO EXTERNA).



MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR PARA O FLAVONOIDE QUERCETINA 3-O-(6"-MALONIL-GLICOSÍDEO EM DIFERENTES EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> (LINHA CHEIA: ADIÇÃO-PADRÃO; LINHA TRACEJADA: PADRONIZAÇÃO EXTERNA).



## Anexo 8

VALORES OBTIDOS PARA  $D_{TOTAL}$  NOS EXPERIMENTOS DA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Experimento	A	B	C	D	E	$D_{total}$
1	-1	-1	-1	-1	1	0,4718
2	-1	-1	-1	1	-1	0,2902
3	-1	-1	1	-1	-1	0,2343
4	-1	-1	1	1	1	0,3589
5	-1	1	-1	-1	-1	0,1559
6	-1	1	-1	1	1	0,1508
7	-1	1	1	-1	1	0,1777
8	-1	1	1	1	-1	1,0000
9	1	-1	-1	-1	-1	0,8806
10	1	-1	-1	1	1	1,0000
11	1	-1	1	-1	1	0,3857
12	1	-1	1	1	-1	0,2880
13	1	1	-1	-1	1	1,0000
14	1	1	-1	1	-1	1,0000
15	1	1	1	-1	-1	0,9832
16	1	1	1	1	1	1,0000