

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO POLAR *IN*
NATURA E VEICULADO DE FLORES DE *Sambucus nigra* L.

DEISE INOCÊNCIO PEREIRA

OURO PRETO

2018

DEISE INOCÊNCIO PEREIRA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO POLAR *IN*
NATURA E VEICULADO DE FLORES DE *Sambucus nigra* L.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Ouro Preto como requisito
parcial para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Henrique Bianco de Souza

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Glenda
Nicioli da Silva

OURO PRETO

2018

P414i

Pereira, Deise Inocência .

Investigação do potencial antitumoral do extrato polar in natura e veiculado de flores de *Sambucus nigra* L. [manuscrito] / Deise Inocência Pereira. - 2018.

xxi ;107f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

1. Flavonoides. 2. Plantas medicinais. 3. Moléculas. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de . II. Silva, Glenda Nicioli da . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 634.747

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 19 dias do mês de abril do ano de 2018, às 08:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Deise Inocencio Pereira, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Gustavo Henrique Bianco de Souza (Presidente - UFOP), pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pelo Prof. Sidney Augusto Vieira Filho (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Deise Inocencio Pereira 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Investigação do Potencial Antitumoral do Extrato Polar in Natura e Veiculado de Flores de Sambucus Nigra L.", na área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara; segundo, Prof. Sidney Augusto Vieira Filho; terceiro, Prof. Gustavo Henrique Bianco de Souza. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 19 de abril de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Mestrando: Deise Inocencio Pereira

À minha mãe, portadora de todo carinho e dedicação que já pude receber;

Ao meu pai, o anjo que zela por mim;

Ao meu noivo por todo o amor doado sem hesitação;

Aos meus irmãos e meu padrasto por todo o apoio;

Aos meus amigos por estarem sempre presentes;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por eu ter tanta saúde e infinitas oportunidades, não poderia deixar de agradecer um só dia por todos os privilégios que recebi durante a minha caminhada.

À minha mãe, que não hesitou em fazer o papel de pai e mãe na minha vida, um exemplo de amor, carinho e dedicação incondicionais.

Ao meu pai, meu anjo, que zela por mim onde quer que você esteja.

Ao meu noivo Diego por ser o sinônimo de paz, aconchego e amor ao chegar em casa, mesmo nos momentos mais difíceis sempre me deu forças para recomeçar.

Aos meus irmãos Gisele e Fábio por me incentivarem a conquistar meus sonhos.

Ao meu padrasto por ser tão prestativo e por todas as brincadeiras que me divertiram tanto.

À minha sobrinha Giovana, motivo dos meus melhores sorrisos.

Amo vocês!

Aos meus amigos de Ouro Branco, que nos finais de semana me proporcionavam momentos de alegria e descontração.

Ao meu orientador Gustavo por ter me aceito no grupo de pesquisa e compartilhado tantos conhecimentos, por ter tido tanta paciência para ensinar e contribuído muito além do conhecimento científico, mas também para o meu amadurecimento. Serei eternamente grata pela oportunidade que me foi dada!

À minha co-orientadora Glenda pela confiança e oportunidade, por ter me aceito mesmo sem me conhecer como aluna, por todo o conhecimento compartilhado e pelo carinho recebido. Muito obrigada!

À equipe do laboratório de Fitotecnologia pela receptividade e carinho, além dos excelentes e divertidos encontros fora do trabalho, tantas risadas que ficarão na memória. Devo agradecer em especial aos amigos Fernanda Senna, Fernanda Perasoli, Karen e Simone que tornaram a minha caminhada mais leve. À Tatiane e Tamires por toda a ajuda e paciência nos experimentos, muito obrigada!

Ao prof. Orlando por toda a contribuição, ajuda e ideias no desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Geraldo Célio primeiramente pelo auxílio nas análises de CLUE-DAD-EM/EM, em seguida por sempre estar sorrindo e disponível para me ensinar.

Ao professor Luiz Orlando e a professora Eliana Camargo pela colaboração.

Ao prof. Barichello que me incentivou muito para realizar esse trabalho e não me deixou desistir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Agradeço às agências de fomento CNPq e Fapemig pelo financiamento do projeto.

E a todos que de alguma forma contribuíram com a amizade, conhecimento, ideais e eventualmente não tenham sido mencionados.

Meu muito obrigada!!!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt.

RESUMO

A espécie *Sambucus nigra* L. é originária da Europa e foi introduzida no Brasil devido seu disseminado uso na medicina popular na forma de infusão, pelas suas propriedades diuréticas e depurativas associadas a enfermidades como febre, doenças renais e gripe. Entretanto, há necessidade de expandir os estudos sobre essa espécie, principalmente com foco na sua atividade antitumoral. O câncer, atualmente, é uma doença que acomete grande parte da população mundial, por isso tornou-se frequente alvo de pesquisas. Para o Brasil, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no biênio de 2018-2019, estimam-se 6.690 novos casos de câncer de bexiga em homens e 2.790 novos casos em mulheres. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antitumoral do extrato e frações das flores de *S. nigra* L. em células de carcinoma urotelial (linhagem T24) e sua seletividade utilizando células humanas de fibroblastos (MRC-5). Extrato Etanólico Bruto (EEB) e frações (hexânica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica) das flores de *S. nigra* L. foram obtidos por percolação e partição líquido:líquido, sendo posteriormente caracterizados por CLUE-DAD-EM/EM. Foram identificadas 9 moléculas de flavonoides na F-BuOH (rutina, isoquercitrina, isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo, canferol-3-*O*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-rutinosídeo, luteolina-4'-*O*-rutinosídeo, isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo, luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo e *selgin-7-*O*-glucoside*). Na avaliação da atividade citotóxica, no tempo de 24 horas, observou-se atividade do EEB e da F-BuOH nas menores concentrações avaliadas para linhagem T24. Entretanto, não houve redução da viabilidade das células MRC-5, indicando seletividade. Pelo estudo fitoquímico, observou-se que a atividade da F-BuOH pode estar correlacionada majoritariamente com o alto teor de flavonoides totais presentes, principalmente a rutina. A F-BuOH foi veiculada em soluções micelares de F127 pelo método de dispersão a frio (DF), e os resultados da citotoxicidade observados para as formulações contendo a F-BuOH incorporada demonstraram que a formulação com maior concentração de F127 e menor concentração de F-BuOH foi citotóxica para as células T24. A formulação com menor concentração de F127 e maior concentração de F-BuOH não induziu redução na viabilidade celular em nenhuma concentração avaliada. Por meio desses resultados concluiu-se que o aumento da concentração de F127 na formulação potencializou os efeitos citotóxicos da fração. O ensaio de liberação *in vitro* da formulação com a fração butanólica incorporada utilizando a rutina como biomarcador demonstrou que as micelas liberam a fração em proporção similar e gradualmente ao longo do tempo, mas a

quantidade liberada foi muito pequena, devido a uma possível interação dos flavonoides presentes na F-BuOH com as cadeias poliméricas do F127. Os resultados obtidos demonstram que os flavonoides presentes nas flores de *S. nigra* L. são os possíveis responsáveis pela atividade citotóxica nas células de carcinoma de bexiga, ademais as soluções micelares atuam conjuntamente para aumentar a ação da F-BuOH e podem se tornar uma abordagem interessante para um futuro tratamento do tumor de bexiga.

Palavras-chaves: *Sambucus nigra* L., flavonoides, atividade citotóxica, câncer de bexiga, micelas poliméricas, Pluronic® F127.

ABSTRACT

The species *Sambucus nigra* L. is native from Europe and was introduced in Brazil due to its widespread use in folk medicine in the continent of origin, for its diuretic and depurative properties associated with diseases such as fever, kidney disease and influenza. However, there is a need to expand studies on this species, mainly focusing on its antitumor activity. Cancer is currently a disease that affects a large part of the world's population, so it has become a major concern. According to estimates by the National Cancer Institute (INCA), in the 2018-2019 biennium, 6,690 new cases of bladder cancer are estimated in men and 2,790 new cases in women. Thus, the objective of this study was to evaluate the antitumor activity of extracts and fractions of *S. nigra* L. flowers on urothelial carcinoma cells (T24 line) and their selectivity using human fibroblast cells (MRC -5). *S. nigra* L. gross ethanol extract (EEB) and fractions (hexanic, ethyl acetate, butanolic and hydromethanolic) were obtained by percolation and liquid:liquid partition, and were later characterized by CLUE-DAD-MS/MS where 9 flavonoid molecules were identified in the F-BuOH (rutin, isoquercitrin, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, kaempferol-3-*O*-glucoside, luteolin-7-*O*-rutinoside, luteolin-4'-*O*-rutinoside, isorhamnetin-7-*O*-rutinoside, luteolin-7-*O*-glucopyranoside e selgin-7-*O*-glucoside). In the evaluation of the cytotoxic activity in the 24 hours, the activity of the EEB and the F-BuOH was observed in the lowest concentrations tested in the T24 lineage but it is not reduced in the viability of MRC-5 cells, indicating selectivity. Through the phytochemical study, it was observed that the activity of the F-BuOH may be correlated mainly with the high content of total flavonoids present, mainly the rutin. The F-BuOH has been incorporated in micellar solutions of F127 by the cold dispersion method (DF), and the cytotoxicity results observed for the formulations containing the incorporated F-BuOH showed that the formulation with higher concentration of F127 and lower concentration of F-BuOH was cytotoxic for T24 cells. The formulation with lower concentration of F127 and higher concentration of F-BuOH no induced reduction in cellular viability at any concentration evaluated. By mean of these results it is concluded that increasing the concentration of F127 in the formulation potentiated the cytotoxic products of the fraction. The *in vitro* release assay of the formulation with the incorporated butanolic fraction using rutin as a biomarker demonstrated that the micelles release the fraction in a similar proportion and gradually over time, but the amount released was very small due to a possible interaction of the flavonoids present in the F-BuOH with the polymer chains of F127. The results obtained so far show that the flavonoids present in flowers of *S. nigra* L. are the possible responsible for

cytotoxic activity in bladder carcinoma cells, in addition the micellar solutions act together to increase the action of the F-BuOH and can become an interesting approach to a future treatment of the bladder tumor.

Keywords: *Sambucus nigra* L., flavonoids, cytotoxic activity, bladder cancer, polymeric micelles, Pluronic® F127.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Câncer	3
2.2. Câncer de bexiga.....	5
2.3. A importância dos produtos naturais	7
2.4. Família Caprifoliaceae e gênero <i>Sambucus</i>	7
2.5. A espécie <i>Sambucus nigra</i> L.	8
2.6. Nanoformulações	13
2.6.1. <i>Micelas poliméricas</i>	15
2.6.2. <i>Pluronic® F127</i>	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Obtenção do material vegetal.....	19
4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB).....	19
4.3. Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto	19
4.4. Teor de compostos fenólicos totais.....	21
4.5. Teor de flavonoides totais.....	21

4.6.	Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE-DAD-EM/EM).....	22
4.7.	Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF).....	24
4.8.	Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas nas formulações.....	25
4.9.	Liberação da fração butanólica a partir das micelas utilizando como biomarcador o flavonoide rutina.....	25
4.9.1.	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	25
4.9.2.	<i>Solubilidade</i>	27
4.9.3.	<i>Liberação in vitro da FFB 3%</i>	27
4.10.	Avaliação da atividade citotóxica	28
4.11.	Análise Estatística	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1.	Obtenção e fracionamento do EEB.....	30
5.2.	Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE-DAD-EM/EM).....	31
5.3.	Avaliação do teor de compostos fenólicos totais.....	61
5.4.	Avaliação do teor de flavonoides totais	62
5.5.	Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF).....	64
5.6.	Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas presentes nas formulações	65
5.7.	Liberação da fração butanólica a partir das micelas utilizando como biomarcador o flavonoide rutina.....	67
5.7.1.	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	67
5.7.2.	<i>Solubilidade</i>	74
5.7.3.	<i>Liberação in vitro da FFB 3%</i>	75
5.8.	Avaliação da atividade citotóxica	79
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

7. CONCLUSÃO	91
8. REFERÊNCIAS	92
9. ANEXOS	106

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
F-AcOEt	Fração acetato de etila
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
F-BuOH	Fração butanólica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
EQ	Equivalentes de quercetina
eV	Elétron-volt
FFB 10%	Formulação da Fração Butanólica (2mg/mL) contendo 10% F127
FFB 3%	Formulação Fração Butanólica (4mg/mL) contendo 3% F127
F127 10%	Formulação pura F127 10%
F127 3%	Formulação pura F127 3%
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
F-Hex	Fração Hexânica
F-HMeOH	Fração Hidrometanólica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato Monopotássico
kV	Quilovolts
m/z	Razão massa/carga
MeOH	Metanol

mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mV	Milivolts
n	Número de amostras
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
nm	Nanômetros
Nº	Número
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay-Lussac
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
tr	Tempo de retenção
u.m.a	Unidade de massa atômica
U/mL	Unidades por mililitro
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta – visível
XTT	Cloreto de Tetrazólio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de flores de <i>Sambucus nigra</i> L.	9
Figura 2. Exemplos de estruturas químicas de flavonoides presentes nas flores de <i>Sambucus nigra</i> L. 1-rutina, 2- isoquercitrina e 3- isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo-7- <i>O</i> -glicose.	10
Figura 3. Modelo multicêntrico de carcinogênese e efeitos potenciais de polifenóis na progressão do câncer (RAMOS, 2007, modificado).	12
Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide (KARABIN <i>et al.</i> , 2015).	13
Figura 5. Fórmula química estrutural do Pluronic [®] F127, EO=óxido de etileno, PO=óxido de propileno (KABANOV & ALAKHOV, 2002).	17
Figura 6. Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (F-Hex), acetato de etila (F-AcOEt), butanólica (F-BuOH) e hidrometanólica (F-HMeOH) de flores de <i>Sambucus nigra</i> L.	20
Figura 7. Cromatograma <i>full scan</i> do EEB de flores de <i>S. nigra</i> , obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.	31
Figura 8. Cromatograma <i>full scan</i> da fração F-AcOEt do extrato flores de <i>S. nigra</i> , obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.	32
Figura 9. Cromatograma <i>full scan</i> da fração F-BuOH do extrato flores de <i>S. nigra</i> , obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.	32
Figura 10. Cromatograma <i>full scan</i> da fração F-HMeOH do extrato flores de <i>S. nigra</i> , obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.	33
Figura 11. Regiões da estrutura química básica dos flavonoides, responsáveis pelas bandas de absorção I e II no UV (CUNHA, 2013, modificado).	34
Figura 12. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal <i>m/z</i> 609, em 2,70 min.	34
Figura 13. Espectro de massas do sinal de <i>m/z</i> 609 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o <i>tr</i> = 2,70 min..	35
Figura 14. Estrutura da molécula de rutina identificada na fração BuOH, no <i>tr</i> = 2,70 min. .	36
Figura 15. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 2,70 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	37
Figura 16. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal <i>m/z</i> 463, em 2,84 min.	38

Figura 17. Espectro de massas do sinal de m/z 463 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 2,84$ min.	38
Figura 18. Estrutura da molécula de isoquercitrina identificada na fração BuOH, no $t_r = 2,84$ min.	39
Figura 19. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 2,84 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	40
Figura 20. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 593, em 3,02 min.	41
Figura 21. Espectro de massas do sinal de m/z 593 (A) obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,02$ min.	42
Figura 22. Espectro de massas do sinal de m/z 593 (B) obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,02$ min.	42
Figura 23. Estrutura da molécula de luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,02$ min.	43
Figura 24. Estrutura da molécula de luteolina-4'- <i>O</i> -rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,02$ min.	44
Figura 25. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,02 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	45
Figura 26. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 623, em 3,09 min.	46
Figura 27. Espectro de massas do sinal de m/z 623 (C) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,09$ min.	47
Figura 28. Espectro de massas do sinal de m/z 623 (D) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,09$ min.	47
Figura 29. Estrutura da molécula de isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,09$ min.	48
Figura 30. Estrutura da molécula de isoramnetina-7- <i>O</i> -rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,09$ min.	49
Figura 31. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,09 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	50
Figura 32. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 447, em 3,11 min.	51

Figura 33. Espectro de massas do sinal de m/z 447 (E) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,11$ min.....	52
Figura 34. Espectro de massas do sinal de m/z 447 (F) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,11$ min.....	52
Figura 35. Estrutura da molécula de canferol-3- <i>O</i> -glicosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,11$ min.	53
Figura 36. Estrutura da molécula de luteolina-7- <i>O</i> -glicopiranosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,11$ min.....	53
Figura 37. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,11 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	54
Figura 38. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,11 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	55
Figura 39. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 477, em 3,19 min.	56
Figura 40. Espectro de massas do sinal de m/z 477 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,19$ min.	57
Figura 41. Estrutura da molécula de <i>selgin 7-O-glucoside</i> , identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,19$ min.....	58
Figura 42. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,19 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i> obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.	59
Figura 43. Teor de compostos fenólicos totais do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.....	61
Figura 44. Teor de flavonoides totais do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH. Resultados apresentados com média \pm desvio padrão.	63
Figura 45. Curva de calibração da rutina ($\mu\text{g/mL}$) obtida por CLAE-DAD.	67
Figura 46. Cromatograma de rutina obtida por CLAE-DAD a partir de uma solução padrão.	70
Figura 47. Cromatograma da fração F-BuOH obtido por CLAE-DAD com sinal intenso no $t_r = 8,54$ min.....	71
Figura 48. Sobreposição do cromatograma da fração F-BuOH com o cromatograma do padrão de rutina obtidos por CLAE-DAD.....	72
Figura 49. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 8,54 min da fração BuOH de flores de <i>S. nigra</i>	73

Figura 50. Quantificação de rutina presente na fração F-BuOH (mg/g). Resultados apresentados com média \pm desvio padrão.	73
Figura 51. Curva analítica de rutina obtida por CLAE-DAD para quantificação de FFB 3% liberado e presente no meio receptor	77
Figura 52. Porcentagem de FFB 3% liberada ao longo do tempo utilizando como biomarcador o flavonoide rutina.....	78
Figura 53. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com o EEB e as frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.....	80
Figura 54. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem MRC-5, 24 horas após o tratamento com o EEB e as frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.	81
Figura 55. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com os padrões puros de rutina e a quercetina. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.	84
Figura 56. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com a FFB 10%. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.	86
Figura 57. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com a FFB 3%. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de CLUE-DAD-EM/EM utilizadas para análise do EEB e das frações AcOEt, BuOH e HMeOH.....	23
Tabela 2. Composição das formulações de soluções micelares contendo fração butanólica (FFB) e soluções de F127 puras utilizadas como controle.....	24
Tabela 3. Condições cromatográficas (CLAE-DAD) para quantificação da fração butanólica utilizando rutina como biomarcador.....	26
Tabela 4. Rendimentos das frações F-Hex, F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH em relação ao EEB, obtido a partir das flores de <i>S. nigra</i>	30
Tabela 5. Absorção máxima em UV/Vis ($\lambda_{\text{máx}}$ - nm) e fragmentos gerados (EM/EM – m/z), em modo negativo, para os compostos identificados na fração butanólica (F-BuOH) do extrato de flores de <i>S. nigra</i>	60
Tabela 6. Tamanho médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de dispersão a frio (DF).....	65
Tabela 7. Linearidade do método a partir de uma solução do padrão rutina diluída em metanol com as suas respectivas áreas, médias de três repetições autênticas.	68
Tabela 8. Ensaio de precisão intra-corrída com os valores médios das áreas dos sinais na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ do padrão rutina.	69
Tabela 9. Exatidão do método para três níveis de amostragem na determinação de rutina. ...	69
Tabela 10. Resultados da solubilidade de rutina na solução receptora.....	75
Tabela 11. Valores de IC_{50} para fibroblastos de pulmão humano MRC-5 e células de carcinoma urotelial T24 e seus respectivos índices de seletividade (IS).	82

1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga encontra-se na 11ª posição entre os cânceres mais comuns no mundo, apresentando uma incidência de 429.793 (3,1%) casos e uma taxa de mortalidade de 165.084 (2%), sendo o tipo mais comum o carcinoma urotelial (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Com o aumento da incidência e mortalidade provocadas pelo câncer, a indústria farmacêutica, aliada às universidades, procura por fármacos mais eficazes e modernos.

De acordo com a PhRMA (*The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*), em 2008, cerca de 633 produtos terapêuticos biotecnológicos estavam em desenvolvimento, sendo que 254 eram para tratamento de diferentes tipos de câncer. Em 2008, o FDA aprovou 31 novos medicamentos biotecnológicos indicados para o tratamento contra o vírus da gripe sazonal, tratamento de artrite reumatoide moderada e grave, câncer renal, entre outros (ALMEIDA & AMARAL & LOBÃO, 2011).

Dentro desse contexto, para se encontrar novos fármacos antitumorais, os produtos naturais apresentam-se como alternativa indispensável, uma vez que fármacos com propriedades medicinais provem de diversas fontes como das plantas, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados. Dessas fontes foram descobertos inúmeros fármacos com atividades terapêuticas de grande importância, que incluem agentes anticancerígenos como a pentostatina, peplomicina e a epirubicina (THOMAS *et al.*, 2011).

A *Sambucus nigra* L. é uma planta originária da Europa, cultivada no sul do Brasil e utilizada na medicina tradicional por apresentar propriedades terapêuticas como diurética, antipirética, antisséptica, cicatrizante e anti-inflamatória (MATTE & MATA; 2015).

Os usos da *Sambucus nigra* L. podem ser justificados devido a sua composição química, constituída majoritariamente por flavonoides, que apresentam várias atividades biológicas tais como anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e anticancerígena (VIAPIANA & WESOLOWSKI, 2017).

Como o uso de produtos naturais na sua forma *in natura* são degradados rapidamente no organismo, e em muitas vezes não atingem o local de ação nas concentrações necessárias, torna-se importante a utilização de estratégias de veiculação desses compostos para que ocorra o aumento da disponibilidade dos mesmos no local de ação gerando o aumento da eficácia terapêutica.

Os sistemas de liberação de fármacos são muito utilizados na área farmacêutica. Esses sistemas corrigem problemas associados às características físicas do fármaco veiculado, que afetam a estabilidade, a solubilidade e a rápida eliminação do organismo (KABANOV & ALAKHOV, 2002).

Dentro desses sistemas de liberação, estão inclusas as micelas poliméricas que permitem encapsular os fármacos ativos e com isso aumentar a quantidade do agente entregue às células tumorais, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo seus efeitos adversos (BROMBERG, 2008).

Dessa forma, diante dos possíveis usos terapêuticos dos flavonoides como agentes antineoplásicos e os benefícios da utilização de sistemas micelares como forma de veiculação dessas substâncias, no presente estudo foram desenvolvidas soluções micelares de Pluronic® F127 contendo extrato e frações das flores de *Sambucus nigra* L. A atividade do extrato bruto e as frações *in natura* foram avaliadas em modelos celulares de tumor de bexiga e em células normais de fibroblastos humanos. O mesmo teste foi realizado para as frações veiculadas em soluções micelares de F127.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

O câncer, atualmente, é uma doença que acomete grande parte da população mundial, por isso tornou-se motivo de grande preocupação. Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem vir a invadir tecidos e órgãos (INCA, 2018).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Cerca de 80% dos casos de câncer estão ligados ao meio ambiente, devido a maior exposição a fatores de risco. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. Dessa forma, as mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA *et al.* 2005; INCA, 2018).

Baseado no documento *World Cancer Report*, divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014, observa-se que o câncer é um grande problema de saúde pública, sendo mais grave em países em desenvolvimento. Os números sugeridos são alarmantes, pois estima-se que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2018).

Em 2017 a OMS divulgou que houve um aumento no número de óbitos por câncer em países de baixa renda, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer frente a média registrada em 2012 de 8,2 milhões de mortes, sendo que um dos fatores contribuintes está ligado à demora entre o diagnóstico e o início do tratamento. De acordo com o divulgado pela OMS, esse número é duas vezes e meia maior que o número de óbitos acometidos por complicações relacionadas a HIV/AIDS, tuberculose e malária combinadas.

Doenças prevalentes como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças crônicas de pulmão, juntamente com o câncer, são responsáveis por 40 milhões (70%) das 56 milhões de mortes no mundo, estimados no ano de 2015 (OMS, 2017).

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer por idade, no período de 1990 a 2008, demonstram que tanto para homens quanto para mulheres, a idade que ocorre mais óbitos está

entre 60 e 69 anos, totalizando um número de óbitos para homens de 310.771 e para mulheres um total de 227.886 (INCA, 2016).

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor, de acordo com o descrito por Almeida (2005):

- Estágio de iniciação: É o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar um tumor clinicamente.

- Estágio de promoção: As células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio.

- Estágio de progressão: É o terceiro e último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos. O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese.

O tratamento para o câncer pode ser dividido em cirúrgico, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea e imunoterapia. De acordo com a Sociedade Americana de Química, a quimioterapia é um dos tratamentos mais eficazes e mais utilizados para destruição de pequenos tumores que sofreram metástase e que se encontram longe do alcance da cirurgia e da radioterapia (FONTES & CESAR & BERARDO, 2005).

A quimioterapia vista como a abordagem mais tradicional de tratamento, interfere nas diferentes fases do ciclo celular, de forma a interferir no crescimento da célula e gera sua morte. Muitos desses tratamentos atuam de forma direta ou indireta sobre a síntese e replicação do

DNA, como exemplo o bloqueio de enzimas, como a topoisomerase, ou a inibição da formação dos microtúbulos, necessários para a mitose (FIGUEIREDO & FORONES & MANOUKIAN, 2014).

Em consequência da ação dos medicamentos para o tratamento do câncer, por não serem específicos para as células malignas, há uma grande ocorrência de efeitos adversos. Os efeitos adversos muitas vezes levam à baixa adesão ao tratamento pelo paciente, o que inclui aumento nas taxas de hospitalização. Esses fatores contribuem para o aumento da toxicidade medicamentosa, pois os intervalos entre as medicações não são seguidos, podendo gerar graves danos para a saúde do paciente (FIGUEIREDO & FORONES & MANOUKIAN, 2014).

2.2. Câncer de bexiga

O câncer de bexiga é o tipo de tumor mais comum que acomete o sistema do trato urinário, sendo que seu principal fator de risco é o tabagismo e acomete mais homens que mulheres (LOPES & NASCIMENTO & ZAGO, 2016).

Conhecido também como carcinoma urotelial, tem como principal sintoma a hematúria, presença de glóbulos vermelhos na urina, em quantidade e frequência variáveis (LOPES & NASCIMENTO & ZAGO, 2016).

Dados demonstram que nos EUA o câncer de bexiga é o quarto tumor de maior incidência em homens e o nono, em mulheres, estando em nono lugar como o tumor que mais provoca óbitos. A incidência do câncer de bexiga aumenta diretamente com a idade, sendo diagnosticado com mais frequência em idosos (REV. ASSOC. MED. BRAS., 2008).

Em 2012, registraram-se 430.000 novos casos de câncer de bexiga no mundo, e um total de 165.000 mortes por esse tipo de tumor. Cerca de dois terços dos pacientes que possuem câncer de bexiga, apresentam tumores superficiais, enquanto um terço apresenta a forma mais invasiva da doença, que está associada à metástase (YANG *et al.*, 2018).

Para o Brasil, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no biênio de 2018-2019, estimam-se 6.690 novos casos de câncer de bexiga em homens e 2.790 novos casos em mulheres. Para homens, o tumor de bexiga no Brasil encontra-se na sétima posição entre os tipos de câncer mais prevalentes (INCA, 2018).

Dentre as causas prováveis de desenvolvimento do tumor de bexiga, citam-se fatores como irritação crônica por cálculo, infecções urinárias frequentes, exposição ocupacional a aminas aromáticas e solventes orgânicos, além do fato que fumantes excretam aminas aromáticas na urina, sendo esses metabólitos responsáveis por 50% dos casos de câncer de bexiga nesse grupo de indivíduos (REV. ASSOC. MED. BRAS., 2008).

Pessoas que apresentam o hábito de fumar apresentam incidência de câncer de bexiga até quatro vezes maior quando comparadas com indivíduos não-fumantes (REV. ASSOC. MED. BRAS., 2008).

A forma mais comum de diagnóstico do câncer de bexiga é através da cistoscopia, e posterior análise patológica do tecido. A cistoscopia consiste em um método de análise demorado e muitas vezes doloroso para o paciente (GLEICHENHAGEN *et al.*, 2018).

Estudos clínicos apontam que 80% dos casos diagnosticados como câncer de bexiga estão em um estágio não invasivo da doença (LOPES & NASCIMENTO & ZAGO, 2016). Mas apesar dos avanços em relação à detecção e tratamento desse tipo de tumor, ainda há uma grande taxa de reincidência e taxas de mortalidade elevadas associadas ao câncer de bexiga (YANG *et al.*, 2018).

Os tratamentos mais comuns para o câncer de bexiga constituem na cirurgia para a remoção de células cancerosas, bem como administração de fármacos através de imunoterapia intravesical, como por exemplo pirarubicina, epirrubicina e mitomicina C, e também o uso da quimioterapia (YANG *et al.*, 2018).

Os fármacos atualmente disponíveis para a quimioterapia oral possuem um baixo índice terapêutico. Esse fator está, muitas vezes, associado a um maior risco de ocorrência de eventos adversos (GOODIN *et al.*, 2011).

Apesar da imunoterapia intravesical e da quimioterapia, 80% dos pacientes com câncer de bexiga superficial desenvolvem novos tumores, dentre os quais 20% a 30% evoluem para estágios mais avançados do tumor (HADASCHIK *et al.*, 2008).

Dessa forma, torna-se necessário a descoberta de novas terapias para o tratamento do câncer de bexiga em estágio inicial, para prevenir a recorrência da doença e sua progressão (HADASCHIK *et al.*, 2008). É necessário também a busca de terapias menos agressivas para o paciente, que visem a redução de efeitos adversos com o consequente aumento da adesão do paciente ao tratamento farmacológico.

2.3. A importância dos produtos naturais

A Conferência das Nações Unidas sobre meio Ambiente e Desenvolvimento, UNCED, realizada no Rio de Janeiro em 1992 apresentou a importância do estudo da biodiversidade em todas as suas facetas como prioridade global (GRANATO *et al.*, 2005).

Os produtos naturais possuem uma enorme importância como especialidade química, pois constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos. Ao se comparar as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e bibliotecas virtuais), a diversidade química associada aos produtos naturais é maior do que qualquer outra fonte, o que justifica a contínua necessidade de se avaliar novas moléculas para ensaios contra um número crescente de alvos moleculares (YUNES & CALIXTO, 2001).

Um estudo realizado por Newman & Cragg (2007) demonstra que, aproximadamente, 63-75% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para combate ao câncer e doenças infecciosas são, respectivamente, produtos naturais ou derivados destes.

Em 2010, os medicamentos fitoterápicos representavam em média 15% do capital da indústria farmacêutica mundial (MATTE & MATA; 2015).

2.4. Família Caprifoliaceae e gênero *Sambucus*

A família Caprifoliaceae apresenta 18 gêneros e 450 espécies distribuídas em diversas regiões do mundo, a exemplo da Europa, América do Norte, centro-oeste da Ásia, norte da África e uma menor distribuição no Hemisfério Sul (SCOPEL *et al.*, 2007).

O gênero *Sambucus* possui cerca de 25 espécies. As espécies que mais se destacam no gênero são as *Sambucus canadensis* L., *Sambucus ebulus* L., *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl., devido aos seus usos medicinais (MARIA *et al.*, 2011).

Na América do Sul, o único gênero com espécies nativas é o *Sambucus*, que apresenta duas espécies, a saber, a *Sambucus peruviana* presente no nordeste da Argentina, na região dos Andes na América do Sul e na América Central. A segunda espécie *Sambucus australis* ocorre no Brasil nas regiões Sul e Sudeste, no Paraguai, Uruguai e Argentina (SCOPEL *et al.*, 2007).

A espécie *Sambucus nigra* L. é de origem europeia e apresenta-se como árvore ou arbusto ramificado de até 7 metros de altura. Suas flores são comercializadas para diversos usos terapêuticos, nas formas de infusão ou decocção (SCOPEL *et al.*, 2007).

2.5. A espécie *Sambucus nigra* L.

A espécie *Sambucus nigra* L. apresenta-se como um arbusto ou árvore pequena muito comum na Europa. Há relatos de seu uso desde a antiguidade tanto para tratar doenças quanto para uso em alimentos como doces e bebidas (VALLČS & BONET & AGELET, 2004).

Como supracitado, a espécie é de origem europeia, precisamente da Europa Central e Meridional, e foi trazida para o Brasil pelos portugueses e espanhóis, devido ao seu disseminado uso medicinal no continente de origem (NETO, 2007).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição, as flores da espécie *S. nigra* apresentam odor fraco e aromático, com sabor fracamente amargo. Apresentam coloração amareladas ou brancas, são pequenas, pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas, gamopétalas, actinomorfas, hermafroditas, medindo 3,0 mm a 5,0 mm de diâmetro, cada uma apresentando até três diminutas brácteas verdes, distribuídas no pedicelo, receptáculo e/ou base do cálice. Os androceus são formados por cinco ou quatro estames, dispostos alternadamente às pétalas, com filetes aderidos ao tubo da corola. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª EDIÇÃO, v.2).

O seu uso inclui várias partes como as folhas, as flores e os frutos, os quais são fontes de flavonoides e apresentam diversas propriedades medicinais (DAWIDOWICZ & WIANOWSKA & BARANIAK, 2006).

Seu uso na medicina tradicional destaca-se devido às suas propriedades terapêuticas, dentre eles as propriedades diurética, antipirética, antisséptica, cicatrizante, anti-inflamatória e contra problemas respiratórios (MATTE & MATA; 2015).

As flores são os órgãos da planta mais utilizados na fitoterapia, **Figura 1**, como infuso, devido a suas propriedades diuréticas e depurativas associadas a enfermidades como febre, doenças renais e gripe (SCOPEL *et al.*, 2007). Além do uso na medicina, as flores também são usadas na alimentação para preparar refrescos e chás (NETO, 2007).

O infuso das flores é utilizado para diminuir o inchaço, tratar irritações oculares, reduzir desconfortos gastrointestinais, além de tratar a tosse e apresentar propriedades diuréticas (MATTE & MATA; 2015).



Figura 1. Foto de flores de *Sambucus nigra* L.

Fonte: <https://pixabay.com/pt/sabugueiro-sambucus-nigra-847024/>

Além das propriedades terapêuticas apresentadas, estudos recentes realizados com a casca da planta apresentaram a presença da proteína inativadora de ribossomos não tóxicos (RIP), gerando a inibição da síntese proteica, o que constitui uma estratégia para uma nova terapia do câncer (MANGANELLI *et al.*, 2005). Outros estudos evidenciaram que a planta apresenta uma importante atividade antiviral para o vírus da Influenza humano tipo A e tipo B (MATTE & MATA; 2015).

De acordo com a triagem fitoquímica realizada por Matte e Mata, 2015, dos extratos aquoso, etanólico e acetato de etila, obtidos das flores de *Sambucus nigra* L., evidenciou-se a presença de flavonoides com maior intensidade nos extratos aquoso e etanólico, e com menor intensidade no extrato acetato de etila. Compostos como taninos, saponinas, antraquinonas e alcaloides não foram observados.

As flores são constituídas quimicamente de flavonoides glicosilados e não glicosilados (rutina e quercetina, majoritariamente) e ácidos orgânicos que podem justificar sua utilização como anti-inflamatório e antioxidante (CLAPE & ALFONSO, 2011; MATTE & MATA; 2015). Alguns autores sugerem que a ingestão de produtos provenientes da *Sambucus nigra* L. auxiliam na prevenção de doenças neurodegenerativas e vasculares, câncer e diabetes, devido à grande presença de flavonoides (MIKULIC *et al.*, 2016).

Alguns exemplos de flavonoides presentes nas flores de *Sambucus nigra* L. estão representados na **Figura 2** (DAWIDOWICZ & WIANOWSKA & BARANIAK, 2006; CHRISTENSEN *et al.*, 2010).

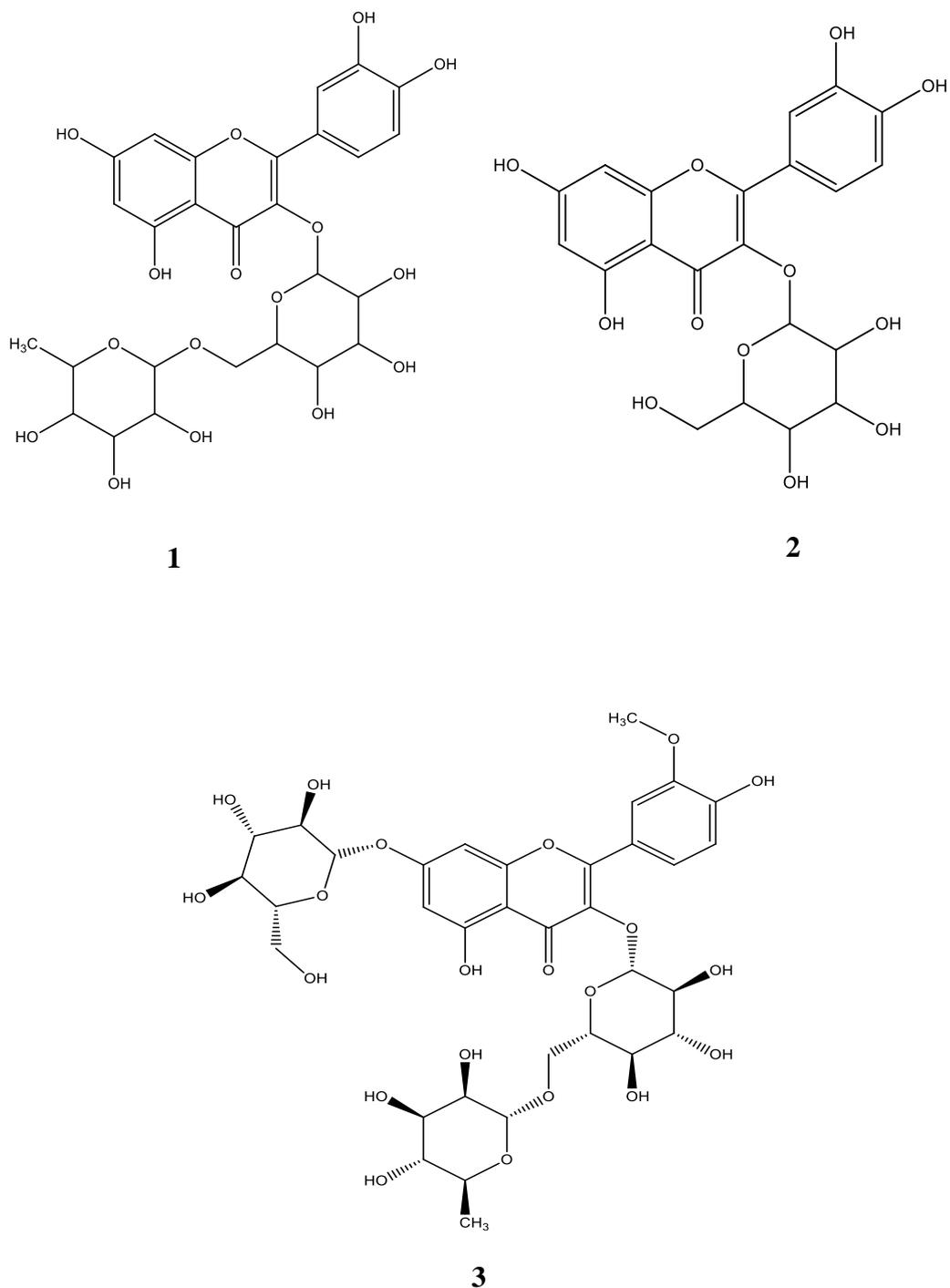


Figura 2. Exemplos de estruturas químicas de flavonoides presentes nas flores de *Sambucus nigra* L. 1-rutina, 2- isoquercitrina e 3- isoramnetina-3-O rutinosídeo-7-O-glicose.

Os flavonoides são substâncias fenólicas presentes nas plantas e desenvolvem funções como antioxidantes, antimicrobianos e fotorreceptores. Eles foram descritos também como agentes promotores da saúde em humanos, com efeitos *in vitro* e *in vivo* comprovados, tais como efeitos antioxidantes, modulação da atividade enzimática, inibição da proliferação celular, anticancerígeno e anti-inflamatório (KARABIN *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Ramos, 2007, demonstraram que vários flavonoides testados, dentre eles, a quercetina, a apigenina e a luteolina exerceram efeitos apoptóticos de maneira seletiva, ou seja, utilizando-se as mesmas concentrações eles induziram apoptose em cultivos de células de câncer, mas não em células normais.

A **Figura 3** representa o modelo da carcinogênese que apresenta diversos passos até a metástase. É possível observar que os flavonoides podem intervir em diferentes passos da carcinogênese, através de vários mecanismos, a exemplo através da inibição da atividade da topoisomerase I/II, alteração do número de espécies reativas de oxigênio, atuação na expressão proteica, modulação das vias de proliferação e sobrevivência e indução da apoptose, por exemplo (RAMOS, 2007).

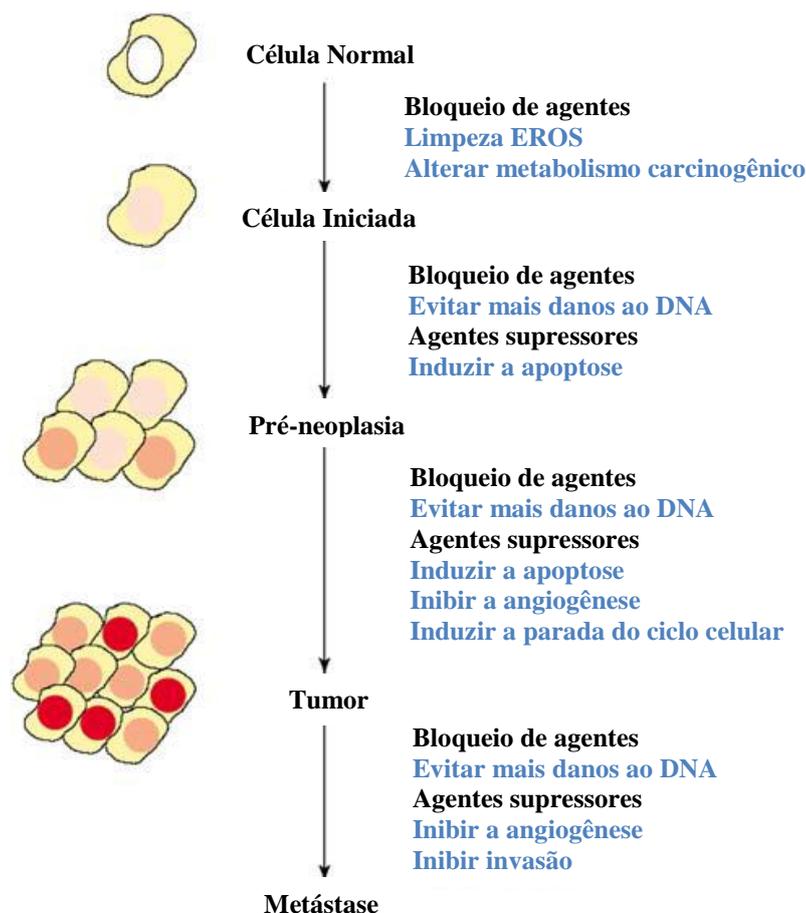


Figura 3. Modelo multicêntrico de carcinogênese e efeitos potenciais de polifenóis na progressão do câncer (RAMOS, 2007, modificado).

De acordo com o descrito por Behling e colaboradores em 2004, a quercetina participa da regulação do ciclo celular, interage com os locais de ligação do estrogênio tipo II, reduz a resistência às drogas e induz a apoptose de células tumorais. De forma adicional, a quercetina inibiu a atividade da tirosina quinase e bloqueou as etapas de iniciação e promoção de um melanoma em ratos. A linhagem celular MDA MB 468, tumor de mama humano, teve sua proliferação celular inibida quando administrada quercetina.

Os flavonoides apresentam como estrutura básica dois anéis aromáticos (A e B), ligados através de uma cadeia de três carbonos, organizados com um anel pirano heterocíclico oxigenado (C) **Figura 4**. Os três anéis podem sofrer substituições por grupamentos hidroxilas (-OH), sendo mais frequentes em seus carbonos 3, 4', 5', 5, e 7. Quanto maior o número de grupamentos -OH maior a solubilidade dos flavonoides (KARABIN *et al.*, 2015).

Os flavonoides podem ser subdivididos em 13 classes: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonol, flavanonas, flavanol, flavandioli, antocianidinas, isoflavonoides, bioflavonoides e proantocianinas. Eles podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides (BEHLING *et al.*, 2004).

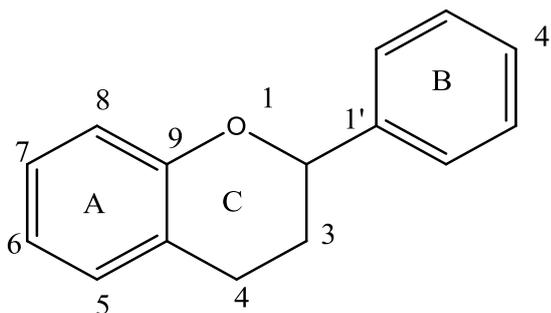


Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide (KARABIN *et al.*, 2015).

A estrutura química dos flavonoides está fortemente ligada a sua atividade biológica, pequenas modificações na sua estrutura resultam em variações na sua atividade (KARABIN *et al.*, 2015).

Diante do exposto, como as flores de *Sambucus nigra* L. apresentam diversas propriedades terapêuticas importantes e com um uso disseminado na cultura popular, e sua constituição é majoritariamente de flavonoides, justifica-se a proposta de avaliar a atividade citotóxica da planta, já que estudos que avaliem essa atividade em relação as flores de *S. nigra* são escassos. Além disso, os flavonoides apresentam grande potencial de indução da apoptose celular e inibição da proliferação celular em culturas de células cancerosas (RAMOS, 2007), podendo se tornar uma potencial alternativa para uma nova terapia para o tratamento de câncer.

2.6. Nanoformulações

Nos dias atuais, a indústria farmacêutica se depara com o desafio de aumentar a sua produtividade e a inovação dos seus produtos em um ritmo, muitas vezes, bem acelerado em decorrência da grande demanda da medicina moderna. Sendo assim, os seus maiores obstáculos têm sido a descoberta, o desenvolvimento e a síntese de um grande número de novas entidades químicas capazes de suprir este déficit de inovação.

Nesse contexto, a pesquisa científica é de extrema importância para o desenvolvimento de substâncias que tenham potencial para se tornarem fármacos que combatam doenças endêmicas no Brasil e no mundo a exemplo do câncer.

O termo “nanotecnologia” foi definido pela primeira vez em 1974 por Norio Taniguchi e compreende um campo científico que utiliza equipamentos e materiais para manipulação de substâncias em escalas moleculares. Em geral, a nanotecnologia é utilizada para materiais, dispositivos e estruturas com dimensões inferiores a 100 nanômetros (SAEED & REN & WU, 2018).

Em 1959 Richard Feynman declarou que “há muito espaço no fundo”, para o sucesso da ciência e que os cientistas deveriam compreender os fenômenos em pequena escala. A nanotecnologia aliada às técnicas biológicas constituem uma estratégia de sucesso para melhoria de produtos e serviços relacionados à vida (SAEED & REN & WU, 2018).

Na área farmacêutica, a nanotecnologia oferece amplas possibilidades para o desenvolvimento de formas de liberação e dosagens de fármacos. Esses sistemas de nano partículas são classificados como partículas de fármaco ativo de tamanho nanométrico, ou substratos de tamanho nano que permitem encapsular ingredientes farmacêuticos ativos (IFA), de forma conjugada, inserida, complexada ou sintetizada na nano-dimensão (TYAGI & SUBRAMONY, 2018).

Os sistemas de liberação de fármacos permitem prever como ocorrerá a liberação do fármaco e têm sido muito utilizados na área farmacêutica. Esses sistemas podem corrigir problemas como as características físicas do fármaco veiculado, que afetam a estabilidade, a solubilidade e a rápida eliminação do organismo (KABANOV & ALAKHOV, 2002).

Como na terapia para o câncer um dos maiores problemas citado anteriormente encontra-se na alta toxicidade dos fármacos, os sistemas de liberação permitem a correção dessa toxicidade através do desenvolvimento de um fármaco que seja seletivo e atinja somente o local no qual o tumor se encontra.

De acordo com Tyagi e colaboradores, 2018, as nanopartículas quando utilizadas em terapias farmacológicas orais resultaram em melhoras na absorção e na biodisponibilidade dos fármacos, o que resulta em concentrações mais eficientes do medicamento em seu local de ação.

Adicionalmente, de acordo com a literatura, pode-se observar que a espécie *Sambucus nigra* L. apresenta grande porcentagem de flavonoides expressos em sua forma livre e glicosilados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª EDIÇÃO, v.2). Como os flavonoides mais presentes (heterosídeos ligados a genina) são pouco solúveis em água, ou seja, apresentam

natureza bioativa hidrofóbica, e apresentam grande potencial antitumoral, os sistemas de liberação de fármacos constituem estratégia de sucesso para serem utilizados como veículos para encapsular essa classe de substâncias (KABANOV & ALAKHOV, 2002).

2.6.1. Micelas poliméricas

Os copolímeros compostos de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em meio aquoso são capazes de formar estruturas denominadas micelas (SÁEZ *et al.*, 2004). As micelas são partículas coloidais esféricas que se formam em solução de maneira espontânea, são sistemas auto estruturados também conhecidas como *self-assemblies* (VILLANOVA & OREFICE, 2010).

Esses sistemas micelares contém frações do fármaco ligadas de forma covalente ou encapsuladas, através de estruturas de copolímeros montadas em bloco sobre um núcleo hidrofóbico contendo o fármaco e o exterior hidrofílico (VILLANOVA & OREFICE, 2010).

As micelas são sistemas atrativos pois podem melhorar a eficácia terapêutica de vários fármacos de baixo peso molecular, além de apresentar um núcleo hidrofóbico que facilita a incorporação de fármacos hidrofóbicos (SÁEZ *et al.*, 2004).

Dentre as vantagens dos sistemas micelares de liberação medicamentosa, destacam-se o diâmetro apropriado para um tempo de meia vida prolongado na corrente sanguínea, não acumulação a longo prazo, alta solubilidade em água, alta estabilidade estrutural e o microdepósito do fármaco ativo no núcleo hidrofóbico (SÁEZ *et al.*, 2004).

Diante das vantagens dos sistemas micelares, um dos seus principais usos está na preparação de medicamentos parenterais ativos que apresentam baixa hidrossolubilidade, o qual são incorporados nas micelas (VILLANOVA & OREFICE, 2010).

As micelas apresentam uma distribuição de cargas que permitem a retenção de carga do exterior aquoso para a formação de um núcleo interno hidrofóbico contendo o fármaco, cercado de segmentos hidrofílicos, que permitem uma maior acumulação do fármaco no alvo, além de uma alta estabilidade com uma baixa taxa de dissociação (KATAOKA & HARADA & NAGASAKI, 2001).

A constante pesquisa por novos sistemas que melhorem a terapia do câncer é referida como nanomedicina do câncer. Essa busca por novas tecnologias para fármacos anticancerígenos incluem vantagens terapêuticas como melhora da biodisponibilidade dos

fármacos, aumentos dos efeitos de permeação e retenção e melhor carreamento do fármaco até o tumor e conseguinte liberação do ativo (ZHOU *et al.*, 2018).

As micelas poliméricas fornecem os benefícios procurados pela nanomedicina do câncer, já que é possível encapsular os fármacos ativos e com isso aumentar a quantidade do agente entregue às células tumorais, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo seus efeitos adversos (BROMBERG, 2008).

Ao contrário da administração intravenosa de fármacos na terapia do câncer, que é conhecida por não ser seletiva e resultar em efeitos adversos sistêmicos ao atingir células saudáveis, a quimioterapia oral utilizando-se sistemas micelares pode resultar em uma exposição do tumor prolongada ao fármaco, mas com concentrações relativamente mais baixas, conseqüentemente resultando em uma terapia mais segura. Além da melhor eficácia e segurança, a quimioterapia oral apresenta outras vantagens como flexibilidade nas dosagens e custo econômico menor, o que, conseqüentemente, aumenta a adesão do paciente ao tratamento (BROMBERG, 2008).

2.6.2. *Pluronic*[®] F127

Os copolímeros começaram a ser utilizados no final de 1950 e desde então têm sido propostos para diversas aplicações farmacêuticas (DUMORTIER *et al.*, 2006).

O Pluronic[®] F127 consiste de copolímeros de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) dispostos em uma estrutura tribloco OE-OP-OE, de perfil anfifílico como mostrado na **Figura 5**. Eles são sintetizados por polimerização sequencial de monômeros de OE e OP na presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, e apresentam em soluções aquosas propriedade termorreversível, o que gera grande interesse para formulação e otimização de fármacos (DUMORTIER *et al.*, 2006).

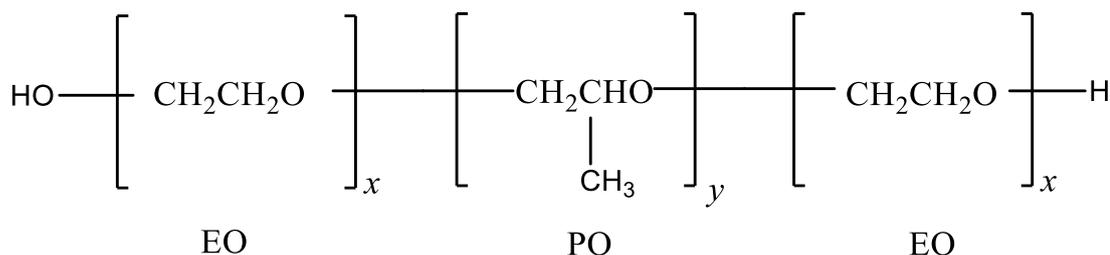


Figura 5. Fórmula química estrutural do Pluronic® F127, EO=óxido de etileno, PO=óxido de propileno (KABANOV & ALAKHOV, 2002).

O uso do Pluronic® F127 inclui diferentes vias de administração, sendo elas intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, retal, ocular, tópica, intramuscular e nasal, com a entrega de fármacos em seu local de ação (KABANOV & ALAKHOV, 2002). O Pluronic® F127 é aprovado pela FDA para os usos citados e é classificado como inerte para o preparo desses tipos de formulações (DUMORTIER *et al.*, 2006).

Alguns estudos, como o publicado por Li e colaboradores, 2017, indicaram que a veiculação de fármacos em sistemas micelares constituídos por Pluronic® reduziram o efeito da resistência aos fármacos utilizados para o tratamento de câncer de mama, através de um aumento da absorção das micelas e consequente aumento de entrega do fármaco ao seu local de ação, o que constitui uma estratégia de sucesso para veiculação de fármacos para tratamento oncológico (LI *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Obter extratos e frações das flores de *Sambucus nigra* L. e avaliar a atividade citotóxica em células tumorais e normais.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter extratos e frações polares das flores de *S. nigra*;
- Realizar a dosagem de fenólicos e flavonoides totais;
- Caracterizar a fração polar por análises em CLUE-DAD-EM/EM;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos *in natura* em células das linhagens T24 e MRC-5;
- Veicular a fração *in natura* em soluções micelares de F127 pelo método de dispersão a frio (DF);
- Caracterizar as micelas contendo o extrato em relação ao tamanho médio e carga superficial;
- Realizar o ensaio de liberação *in vitro* da fração veiculada a partir de soluções micelares de F127 por diálise regular;
- Avaliar a atividade citotóxica das soluções micelares contendo a fração e comparar com a atividade citotóxica *in natura*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal utilizado foram flores da espécie *Sambucus nigra* L., obtidas através do fornecedor Natural Amazon, lote interno 0189-IF, lote fabricante RSAB0001B6/14, com certificado de análise de controle de qualidade aprovado pela Naturell Indústria e Comércio Ltda em 30/06/2014, na quantidade de 1 kg (**ANEXO I**). Após a obtenção do material vegetal, as flores foram trituradas até o estado de pó fino em moinho de facas (MR Manesco®, Brasil).

O material vegetal foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número do cadastro **A3E7C8F**.

4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB)

O material vegetal triturado (flores de *Sambucus nigra* L.) foi submetido à extração por percolação com etanol comercial 92,8°GL (Topázio®, Brasil), à temperatura ambiente. Foram realizadas ao total 8 percolações (2000 mL), com intervalo médio de 5 dias de extração entre cada percolação. Em seguida, o extrato etanólico bruto obtido foi filtrado em papel de filtro e o solvente completamente removido, utilizando-se rotaevaporador (Fisatom®, Brasil) à pressão reduzida e sob temperatura de 40 °C. O processo de secagem foi realizado até a eliminação, quase que total, do solvente. Posteriormente, o EEB foi submetido à secagem em estufa 30-40 °C (Fanem®, Brasil) e dessecador até eliminação total do solvente.

4.3. Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto

O EEB (15g) foi solubilizado em 200 mL de MeOH: H₂O (8:2) e submetido a sucessivas partições líquido-líquido em funil de separação, utilizando solventes em ordem crescente de polaridades, sendo eles hexano, acetato de etila e butanol (4 x 200 mL) (Química Moderna®, Brasil). Foram obtidas as frações hexânica (F-Hex), acetato de etila (F-AcOEt), butanólica (F-BuOH) e hidrometanólica (F-HMeOH) como demonstrado na **Figura 6**.

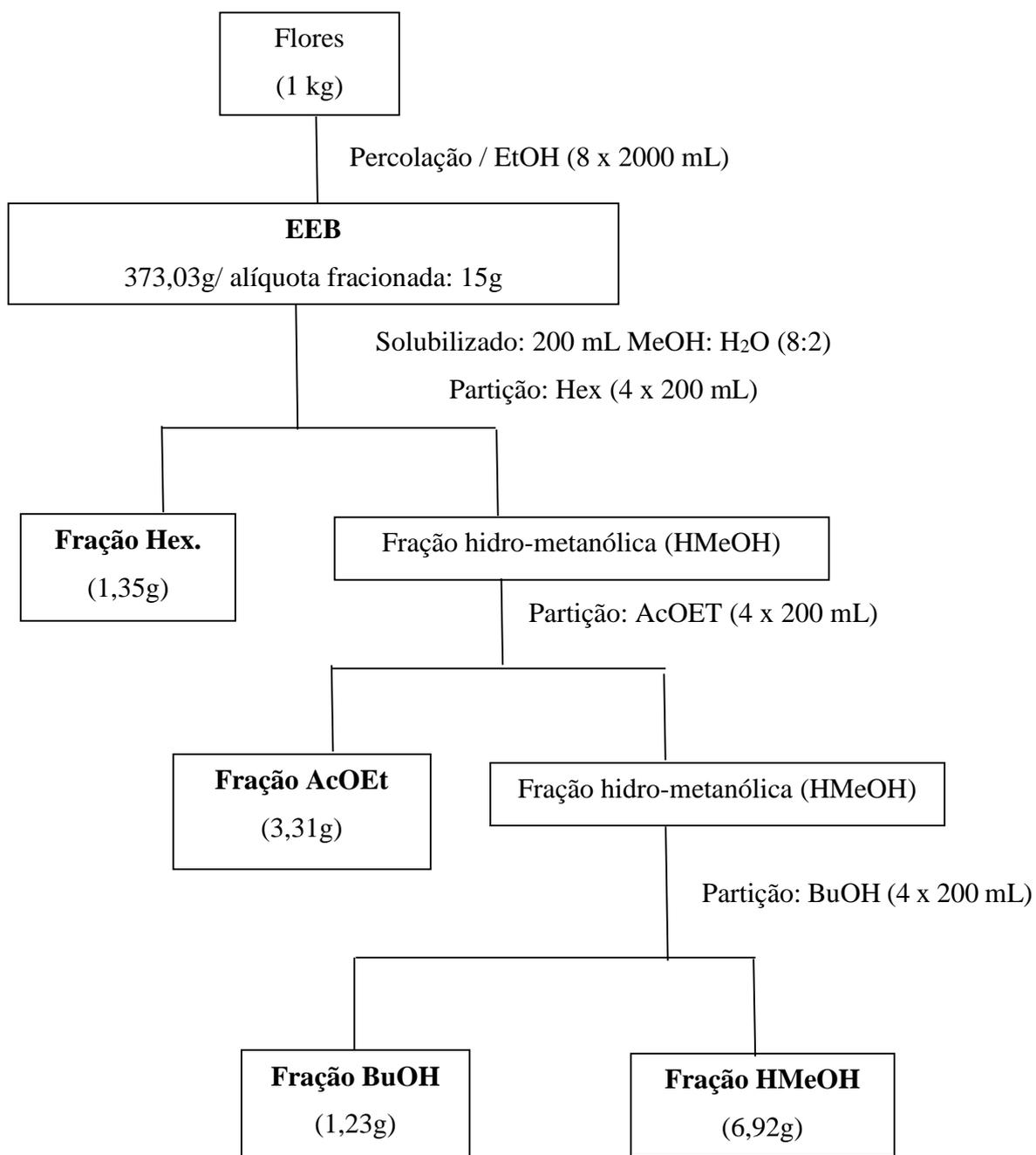


Figura 6. Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (F-Hex), acetato de etila (F-AcOEt), butanólica (F-BuOH) e hidrometanólica (F-HMeOH) de flores de *Sambucus nigra* L.

4.4. Teor de compostos fenólicos totais

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada através método do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Bonoli e colaboradores, com modificações (BONOLI *et al.*, 2004).

Foram preparadas soluções estoque do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas de 80 µL dessas soluções foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e foram adicionados 60 µL de água destilada e 10 µL de reagente Folin-Ciocalteu (Cromoline[®], Brasil). Em seguida a placa foi agitada por 1 min e foram adicionados 40 µL de carbonato de sódio (Vetec[®], Brasil) a 15% p/v. Após agitação por 30 segundos, foram adicionados 10 µL de água destilada para que a concentração final obtida fosse 2,0 mg/mL.

Para construção da curva de calibração, foi feita uma solução estoque de ácido gálico (Vetec[®], Brasil) a 1 mg/mL em etanol 95%. Alíquotas dessa solução foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 10 a 350 µg/mL, com volume ajustado com água destilada. Os mesmos procedimentos das amostras foram realizados.

Após incubação por 2 horas, a leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 650 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados obtidos para o padrão (ácido gálico), foi construída uma curva de calibração e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado pela interpolação dos resultados das amostras com a equação obtida. Os resultados foram expressos em EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de amostra.

4.5. Teor de flavonoides totais

A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada através método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl₃), segundo Chang e colaboradores, com modificações (CHANG *et al.*, 2002).

Foram preparadas soluções estoque do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas de 100 µL dessas soluções foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e foram adicionados 40 µL de etanol 95%, 4 µL de AlCl₃ (Synth[®], Brasil) a 10% p/v e 4 µL de acetato de potássio (Hannover[®]) a 1 mol/L.

O volume foi ajustado com 52 μL de água destilada para que a concentração final obtida fosse 2,5 mg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado, sem adição de AlCl_3 , para os brancos.

Para construção da curva de calibração, foram feitas soluções estoque de quercetina a 0,2 mg/mL. Alíquotas dessas soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 2 a 45 $\mu\text{g/mL}$, com volume ajustado com etanol. Os mesmos procedimentos das amostras foram realizados.

Após incubação por 40 min, foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de ELISA a 405 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados obtidos para o padrão (quercetina), foi construída curva de calibração e o teor de flavonoides totais foi determinado pela interpolação dos resultados das amostras com as equações obtidas. Os resultados foram expressos em EQ (equivalentes de quercetina) por grama de amostra.

4.6. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE-DAD-EM/EM)

Para identificação dos compostos, utilizou-se a CLUE-DAD-EM/EM. O EEB e as frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH foram solubilizadas em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (97:3), depois submetidas ao *clean-up*, em coluna de fase reversa (C-18).

As análises foram realizadas em equipamento UPLC ACQUITY (Waters®), no Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia – UFMG, nas condições cromatográficas apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Condições de CLUE-DAD-EM/EM utilizadas para análise do EEB e das frações AcOEt, BuOH e HMeOH.

Equipamento	Waters Acquity Ultra Performance LC
Coluna cromatográfica	RP- 18 Acquity UPLC BHE (partículas 1,7 µm; 50 x 2,1 mm) - detector PDA, λ e TQ Detector
Fase móvel	H ₂ O 0,1% ácido fórmico; Acetonitrila (ACN) 0,1% ácido fórmico
Eluição	Linear 5-95% de ACN em 10 min, isocrática 95% de ACN por 1 min
Volume injetado	4 µL
Forno da coluna	40 °C
Fluxo	0,3 mL/min
Detecção UV	220-400 nm
<i>Electrospray ionization</i>	Voltagem: capilar (3,5 kV); cone (5 kV)
Tempo de eluição	13 min

O volume injeção de amostra foi 4 µL, sendo a eluição em gradiente com H₂O (0,1% ácido fórmico) /ACN (0,1% ácido fórmico). O parâmetro cromatográfico usado compreendeu período de eluição linear (5 – 95% ACN de 0 a 10 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% ACN de 10 a 11 min), retornando a condição de eluição inicial 11 a 13 min (5% ACN).

Os espectros de massas foram obtidos com ionização por *spray* de elétrons sendo registrados em varredura completa (*full scan*) e sequencial ou tandem (EM/EM), nos modos positivo e/ou negativo no equipamento Waters ACQUITY® TQD, equipado com analisador quadrupolo. As condições gerais de operação do equipamento durante as análises foram: voltagem do capilar: 3,5 kV; temperatura do capilar: 320 °C; temperatura de dessolvatação: 320 °C; voltagem do cone: 5kV; voltagem de ionização: -4kV; voltagem do orifício: -60 kV. As amostras foram injetadas por bomba de injeção automática com fluxo contínuo de 0,1 µl/min.

Os espectros de ESI/EM/EM foram registrados com energia de 30 eV na faixa de m/z 100 a 2000 u.m.a.

4.7. Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF)

As soluções micelares contendo a fração butanólica foram preparadas pelo método de dispersão a frio. Foi pesada uma quantidade de F127, conforme mostrado na **Tabela 2**, no qual houve variação na porcentagem de F127 utilizada. Este foi adicionado a um béquer contendo água ultrapura, mantido em banho de gelo sob agitação magnética moderada até completa dispersão do polímero. A solução foi colocada em geladeira por 24h. A fração butanólica foi veiculada à solução do polímero e dispersa sob agitação em agitador magnético, conforme variação da concentração demonstrada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Composição das formulações de soluções micelares contendo fração butanólica (FFB) e soluções de F127 puras utilizadas como controle.

Formulações	Pluronic® F127 (g)	Fração Butanólica (g)	Água ultrapura (mL)
FFB 10%	0,2	0,004	1,79
FFB 3%	0,06	0,008	1,93
F127 10%	0,2	-	1,8
F127 3%	0,06	-	1,94

4.8. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas nas formulações

A distribuição de tamanho e o tamanho médio das micelas foram determinados a partir da espectroscopia de correlação de fótons, conhecida também como espalhamento de luz dinâmico, utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern, modelo Nano ZS). As amostras foram diluídas com água ultrapura e adicionadas em cubeta de quartzo. As leituras foram realizadas a 25°C, em triplicata, e as medidas foram efetuadas com ângulo de espalhamento incidente de 90°. Os resultados foram expressos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IP).

O potencial zeta foi determinado pelas medidas de mobilidade eletroforética das micelas em suspensão. O equipamento utilizado, Zetasizer (Malvern, modelo Nano ZS), dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada terminal de um tubo em forma de "U", onde as amostras diluídas foram adicionadas para análise. As leituras foram realizadas a 25°C, em triplicata, e os resultados foram expressos em milivolts (mV).

4.9. Liberação da fração butanólica a partir das micelas utilizando como biomarcador o flavonoide rutina

4.9.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A metodologia para liberação *in vitro* da fração butanólica a partir das micelas utilizando como biomarcador a rutina foi feita seguindo o descrito por ASSIS, 2014 de acordo com os parâmetros da **Tabela 3**.

Tabela 3. Condições cromatográficas (CLAE-DAD) para quantificação da fração butanólica utilizando rutina como biomarcador.

Equipamento	Waters Alliance 2695
Fase móvel	H ₂ O 0,1% ácido fórmico; Acetonitrila (ACN) 0,1% ácido fórmico- linear 5% a 95%.
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20,0 µl
Tempo de eluição	30 minutos
Detector	UV/Vis 2996 – λ 350
Temperatura	30°C
Coluna	Octadecil - C18, Phenomenex® (250,0 mm x 4,6 mm x 5,0µm)
Pré-coluna	Octadecil - C18, Phenomenex®

O volume injeção de amostra foi 20 µL, sendo a eluição em gradiente com H₂O (0,1% ácido fórmico) /ACN (0,1% ácido fórmico). O parâmetro cromatográfico usado compreendeu período de eluição linear (5 – 95% ACN de 0 a 23 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% ACN de 23 a 25 min), retornando a condição de eluição inicial 25 a 30 min (5% ACN).

Foi utilizado o padrão de flavonoide rutina para composição da curva de calibração (área do pico X massa em µg) com cinco concentrações diferentes (25 µg/mL, 10 µg/mL, 8 µg/mL, 5 µg/mL e 2 µg/mL). Estas concentrações foram definidas com base em concentrações analisadas por ASSIS, 2014.

Cada amostra referente aos pontos da curva foram filtradas com unidade HV Millex com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45µm, antes de sua injeção no aparelho.

O procedimento foi realizado em triplicata e as áreas médias dos picos referentes aos padrões foram plotados em função das concentrações nominais num gráfico, obtendo-se uma curva média. Foram feitas co-injeções das amostras previamente, adicionadas ao padrão puro e comparados seus tempos de retenção.

A fim de avaliar a eficiência do método analítico, a linearidade de cada curva analítica foi analisada após o cálculo do coeficiente de correlação linear (r^2), assim como foram analisados os parâmetros de precisão e exatidão do método, calculados também seus limites de detecção e quantificação (NUNES, *et al.* 2005).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações (Eq. 1) e (Eq. 2), respectivamente, onde DP_a é o desvio-padrão do intercepto com o eixo Y de no mínimo, 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = DP_a \times 3/IC \text{ (Eq. 1)}$$

$$LQ = DP_a \times 10/IC \text{ (Eq. 2)}$$

O coeficiente de variação das análises estatísticas foi avaliado os padrões determinados pela ANVISA, 2003. Essa mesma curva foi utilizada para determinação da concentração real do biomarcador. A curva de calibração foi refeita para o teste de solubilidade e o ensaio de liberação *in vitro*.

4.9.2. Solubilidade

O estudo da condição *sink* foi realizado através da avaliação do ensaio de solubilidade do padrão do flavonoide rutina, no qual adicionou-se 3,8 mg de rutina (excesso de 80% à quantidade incorporada na formulação) em 100 mL de solução receptora, respeitando-se as condições *sink*. As análises foram feitas em triplicata, as soluções foram agitadas em banho de ultrassom a 32,5° C por 1 hora. As amostras foram diluídas para a obtenção da concentração de 19 µg/mL para injeção no CLAE, filtrada em unidade HV Millex com membrana Durapore® de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45µm e posteriormente feita a quantificação do flavonoide (RISSI, 2013).

4.9.3. Liberação *in vitro* da FFB 3%

A liberação da FFB 3% foi realizada pelo método de diálise regular, conforme descrito por NECKEL & LEMOS-SENNA, 2005. O procedimento consistiu na utilização de sacos de diálise, constituídos por membrana sintética de diálise de celulose (*Dialysis tubing cellulose*

membrane D9777- 100FT, 25x16 mm - Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA), no qual cada saco de diálise foi amarrado em um bastão de vidro por ambas as extremidades, foi adicionado 1,0 mL de formulação em cada um. Em um béquer, foram adicionados 200 mL de meio receptor (PBS- Solução Salina tamponada com fosfato 10x- Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA), onde também foram inseridos os bastões de vidro contendo os sacos de diálise. O procedimento foi feito em triplicata.

A diálise foi realizada à temperatura de 37°C e agitação horizontal, com retiradas de alíquotas de 1,0 mL do meio receptor sendo o volume retirado do meio substituído por igual quantidade de solução receptora, mantendo o sistema nas mesmas condições de trabalho. A alíquota referente ao meio receptor foi analisada como o percentual da real quantidade de fração BuOH liberada através do biomarcador rutina capaz de ultrapassar a membrana de diálise.

Os tempos de coleta foram de: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas; a formulação submetida ao ensaio de liberação foi a solução micelar FFB 3% contendo fração butanólica na concentração de 4 mg/mL.

A quantificação da fração foi determinada por CLAE-DAD, utilizando como biomarcador o flavonoide rutina, presente na fração butanólica.

4.10. Avaliação da atividade citotóxica

Para a avaliação dessa atividade foram utilizadas duas linhagens celulares, sendo uma de carcinoma urotelial humano: T24 (tumor grau 3, invasivo, com mutação no gene *TP53*), e como controle, células normais da linhagem estabelecida MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). As células de carcinoma urotelial humano da linhagem T24 (tumor grau 3, com mutação no gene *TP53*) foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células MRC-5 (fibroblasto humano) foram gentilmente doadas pelo prof. Dr. Luiz Orlando Ladeira do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Ambas as linhagens foram mantidas em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL estreptomicina e mantidas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ (SÁVIO *et al*, 2014). O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Penicilina G, estreptomicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, EUA). Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab Ltd. (Campinas, Brasil).

Meio de cultura branco (DMEM sem fenol vermelho) foi adquirido da Invitrogen® (Carlsbad, EUA).

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado utilizando o Kit Cell Proliferation II (XTT) adquirido da ROCHE Diagnostics® (Mannheim, Alemanha). As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^4 células/poço) e, após 24h, as células foram tratadas com o EEB, e as frações AcOET, BuOH e HMeOH nas concentrações escolhidas de acordo com o citado por Kšonžeková e colaboradores (2016), com modificações, no intervalo de 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, 400µg/mL, 600µg/mL, 800µg/mL, 1000µg/mL até 1200µg/mL. Após a incubação de 24 horas, as células foram lavadas com solução de Hank's (0,4g de KCl; 0,06g de KH_2PO_4 ; 0,04g de Na_2HPO_4 ; 0,35g de NaHCO_3 ; 1g de glicose e 8g de NaCl em 1L de água). Para a realização da leitura, foi adicionado meio de cultura branco nos poços e posteriormente foram adicionados 12 µL da solução teste de XTT (50 partes XTT solução *labeling*: 1 parte reagente *electron-coupling*) em cada poço e a absorbância medida a 492 e 690 nm depois de aproximadamente 60 minutos. Os valores de leitura das absorbâncias são proporcionais à quantidade de células viáveis. Os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi: % de células viáveis = (média das absorbâncias / média das absorbâncias do controle) *100 (SÁVIO *et al*, 2014).

O mesmo procedimento foi realizado com as formulações FFB 10%, FFB 3%, F127 10% e F127 3% nas concentrações de 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, 400µg/mL e 600µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o ensaio de citotoxicidade com os padrões puros de flavonoides rutina e quercetina nas concentrações de 2µg/mL, 4µg/mL, 6µg/mL, 8µg/mL e 10µg/mL (SRIVASTAVA *et al*, 2016). Foram utilizadas como controle células sem tratamento com o EEB e frações, e com soluções micelares de F127 sem a fração butanólica incorporada.

4.11. Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5. Como os dados dos resultados dos testes de citotoxicidade, dosagem de fenólicos, dosagem de flavonoides e liberação *in vitro* da fração butanólica apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, com o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e fracionamento do EEB

O extrato etanólico bruto (EEB) das flores foi obtido a partir de 987,3 g do material vegetal seco e pulverizado. Após a realização da extração exaustiva via percolação, com renovação de solvente (8 x de 2 L etanol/cada), os extratos foram evaporados e reunidos no final do processo, até completa evaporação do solvente, obtendo-se 373,03 g de EEB, totalizando um rendimento de 37,3%.

Após a obtenção do EEB, realizou-se o fracionamento do mesmo, no qual foram obtidas as frações hexânica (F-Hex), acetato de etila (F-AcOEt), butanólica (F-BuOH) e hidrometanólica (F-HMeOH), cujos rendimentos estão expressos na **Tabela 4**, após completa evaporação dos solventes.

Tabela 4. Rendimentos das frações F-Hex, F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH em relação ao EEB, obtido a partir das flores de *S. nigra*.

Frações	Massas (g)*	Rendimento % (m/m)
Hexânica	1,35	9 %
Acetato de Etila	3,31	22 %
Butanólica	1,23	8 %
Hidro-metanólica	6,97	46 %

* Cálculo rendimento para 15g de amostra de EEB.

Pode-se observar, que entre as frações, a que obteve maior rendimento foi a hidrometanólica (F-HMeOH) (46%). O alto rendimento da fração HMeOH pode ser justificado, por ser a fração aquosa residual, onde encontram-se maiores concentrações de compostos inorgânicos e altamente polares (AMPARO, 2016). A fração acetato de etila (F-AcOEt) também apresentou um rendimento maior (22%), quando comparadas as frações hexânica (F-Hex) e butanólica (F-BuOH), e justifica-se esse valor pois de acordo com Simões e colaboradores (2001), substâncias como ceras e pigmentos podem ser extraídos quando se

utiliza solventes de polaridades intermediárias, como o acetato de etila, elevando o rendimento da fração AcOEt. A fração butanólica apresentou um rendimento menor, devido à presença do solvente metanol, que por ser altamente polar, extraiu açúcares presentes no EBB. A fração hexânica por ser muito apolar, não foi objeto de estudo do trabalho, já que os flavonoides de interesse não se encontram nessa fração.

5.2. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE-DAD-EM/EM)

Com o objetivo de identificar as substâncias presentes no EEB e nas frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH efetuou-se o estudo do perfil químico, através das análises de CLUE-DAD-EM/EM.

As **Figuras 7, 8, 9, e 10** representam os cromatogramas *full scan* do EEB e das frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH, respectivamente.

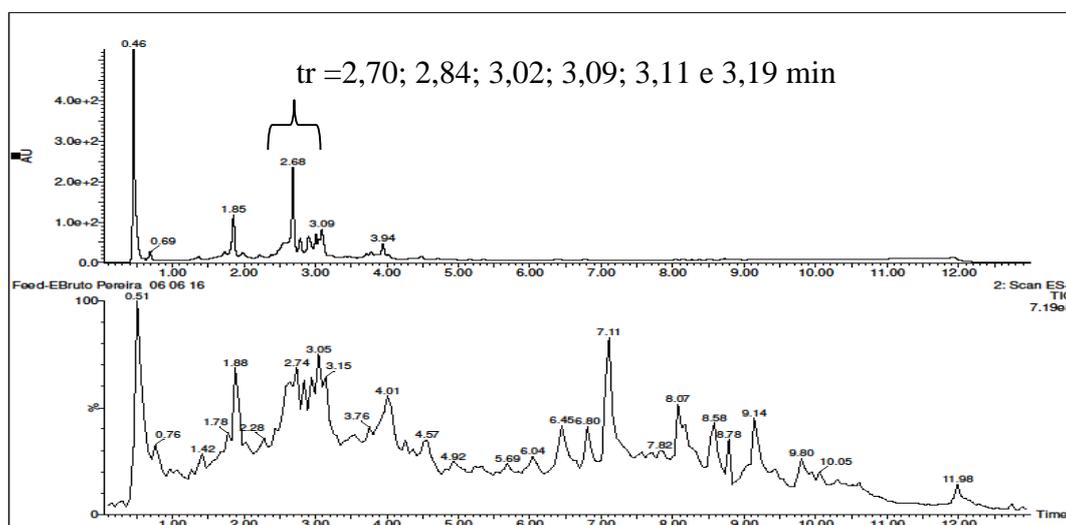


Figura 7. Cromatograma *full scan* do EEB de flores de *S. nigra*, obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.

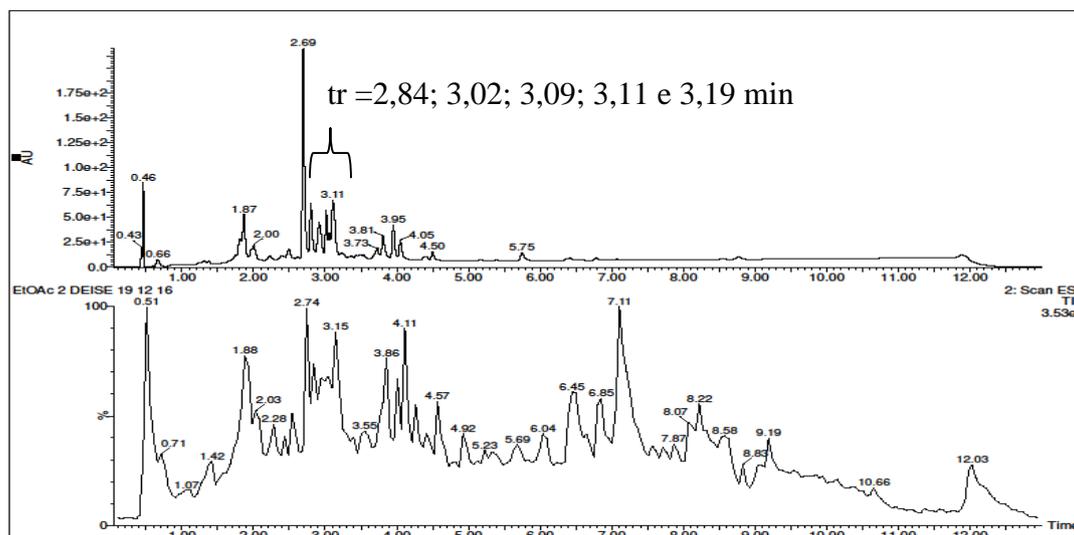


Figura 8. Cromatograma *full scan* da fração F-AcOEt do extrato flores de *S. nigra*, obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.

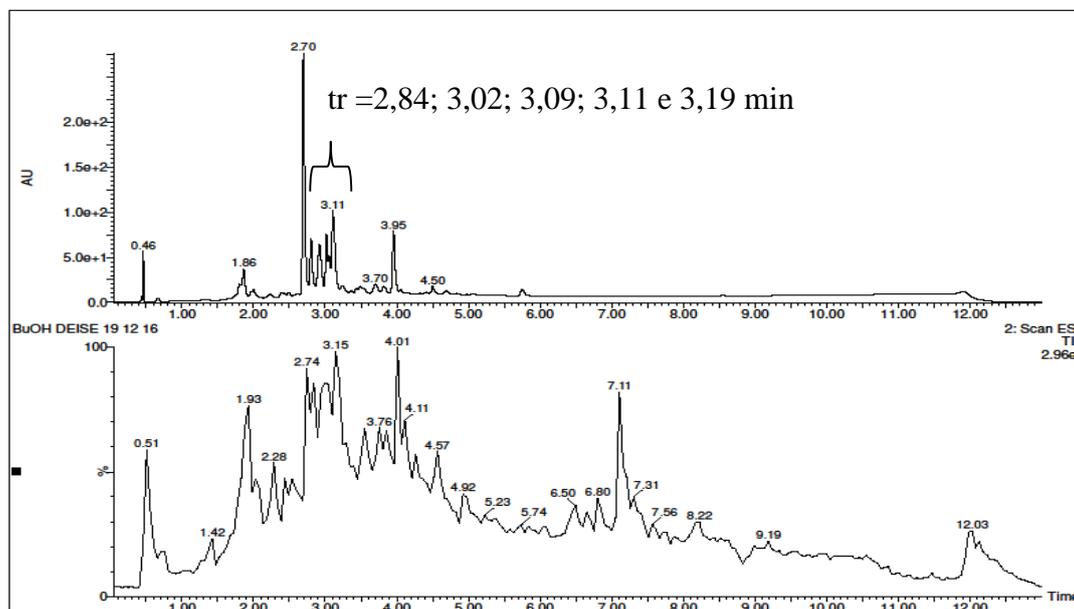


Figura 9. Cromatograma *full scan* da fração F-BuOH do extrato flores de *S. nigra*, obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.

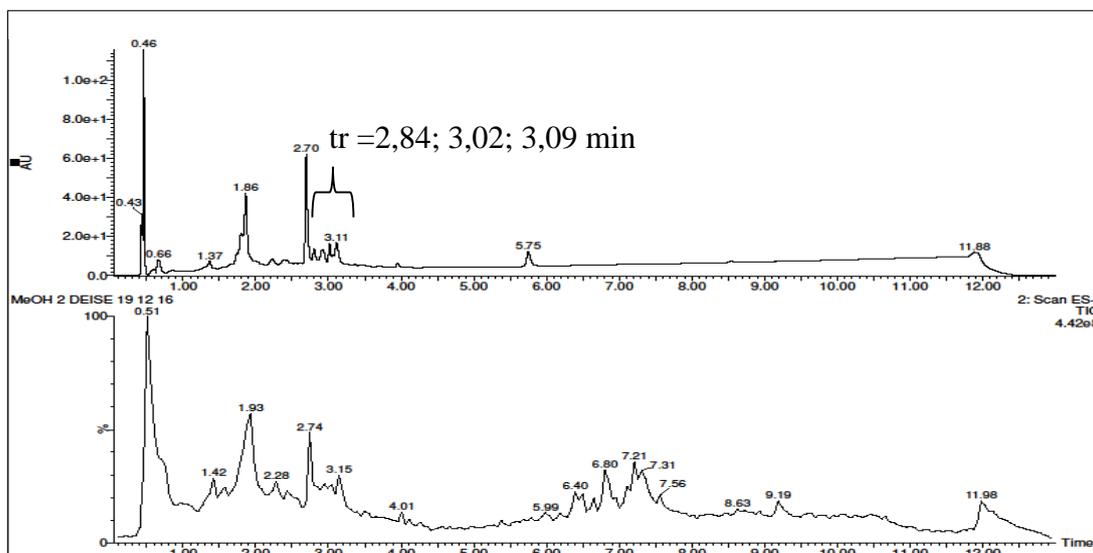


Figura 10. Cromatograma *full scan* da fração F-HMeOH do extrato flores de *S. nigra*, obtido por CLUE-DAD-EM/EM, extraído em 254 nm.

Os picos em 2,70, 2,84, 3,02, 3,09 min foram observados no EEB e em todas as frações, já os picos 3,11 e 3,19 min apareceram no EEB e nas frações F-AcOEt e F-BuOH. Como os picos apareceram na fração F-BuOH de forma mais intensa, eles foram selecionados e analisados em DAD e EM a partir dessa fração, visto que os espectros de UV correspondentes a esses picos foram considerados como característicos da classe de flavonoides, como explicado no parágrafo seguinte. O aparecimento dos mesmos picos em diferentes frações indica que o fracionamento do EEB não foi totalmente eficaz. O pico em 5,75 min foi identificado como um possível contaminante.

Os espectros no ultravioleta correspondentes aos picos selecionados foram característicos de flavonoides, pois consistem de duas bandas de absorção. A banda I está associada à absorção de um sistema cinamoil e a banda II associada à absorção de um sistema benzoil, **Figura 11**. Os flavonóis exibem absorção da banda I entre 350 e 390 nm, já as flavonas exibem a absorção da banda I entre 300 e 350 nm. A absorção da banda II para ambos os compostos está entre 240 e 280 nm (CUNHA, 2013).

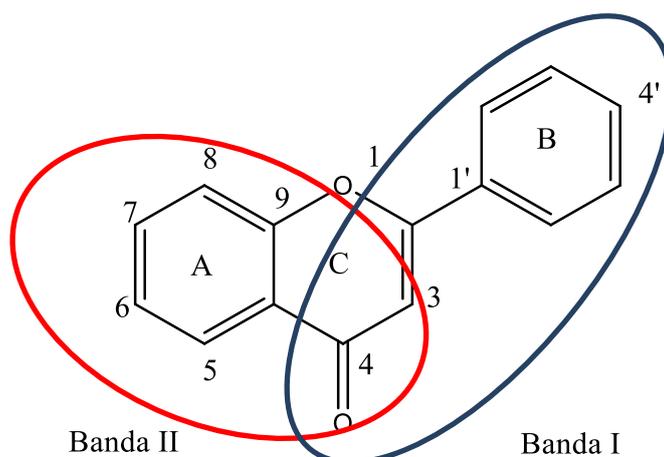


Figura 11. Regiões da estrutura química básica dos flavonoides, responsáveis pelas bandas de absorção I e II no UV (CUNHA, 2013, modificado).

De acordo com o espectro de massa obtido para o pico em 2,70 min, o sinal de m/z 609 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao sinal de m/z 611 indicou a presença de um flavonol 3-OH substituído. A **Figura 12** representa o cromatograma do sinal m/z 609.

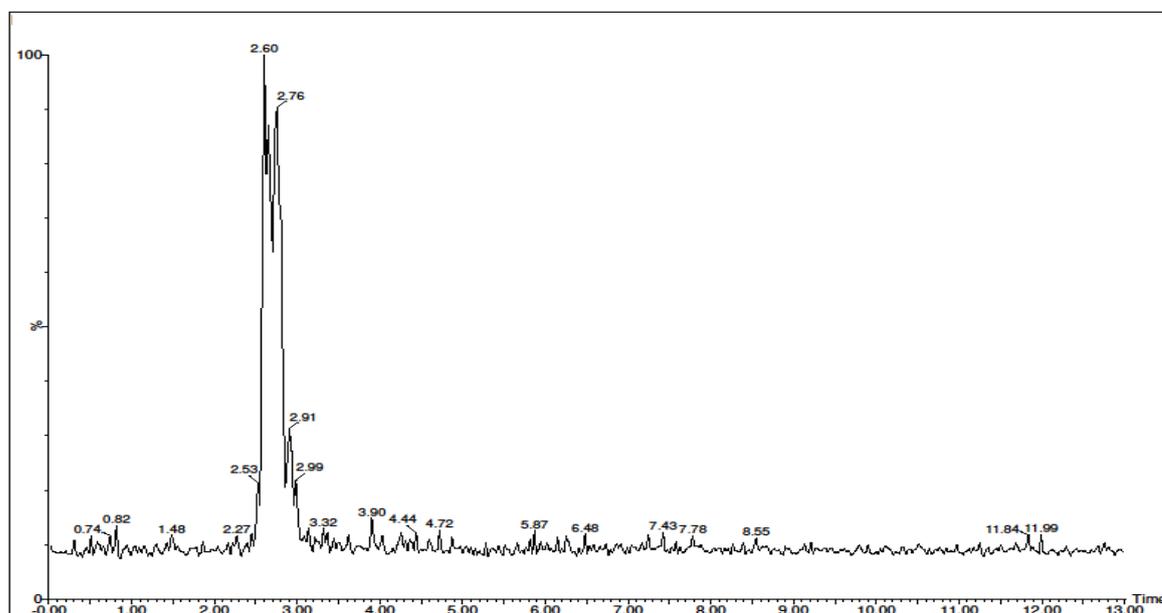


Figura 12. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 609, em 2,70 min.

Para confirmar a identificação, o sinal m/z 609 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM) conforme demonstrado na **Figura 13**.

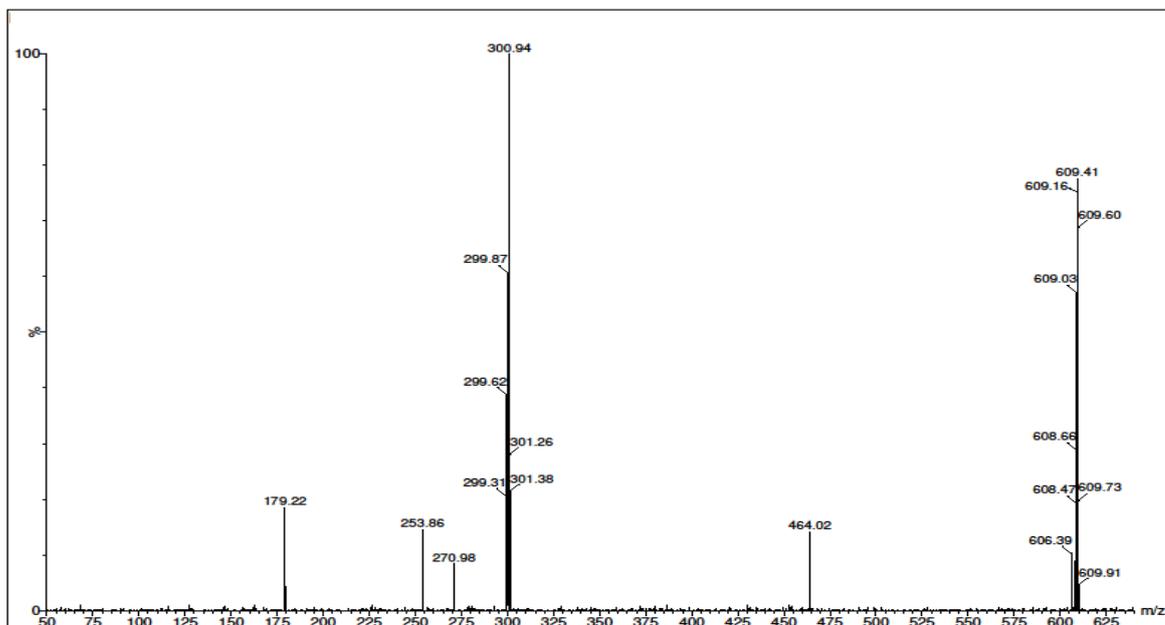


Figura 13. Espectro de massas do sinal de m/z 609 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 2,70$ min.

Baseado nos dados encontrados na literatura e pelo padrão de fragmentação demonstrado, confirmou-se a presença de rutina, **Figura 14** (PEREIRA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; KAZUMA *et al.*, 2003; DOURADO & LADEIRA, 2008). O sinal m/z 300.94 é relativo a perda do açúcar rutinose (ramnose e glicose) da estrutura, já o sinal m/z 179.22 se refere à retrociclização do anel aromático.

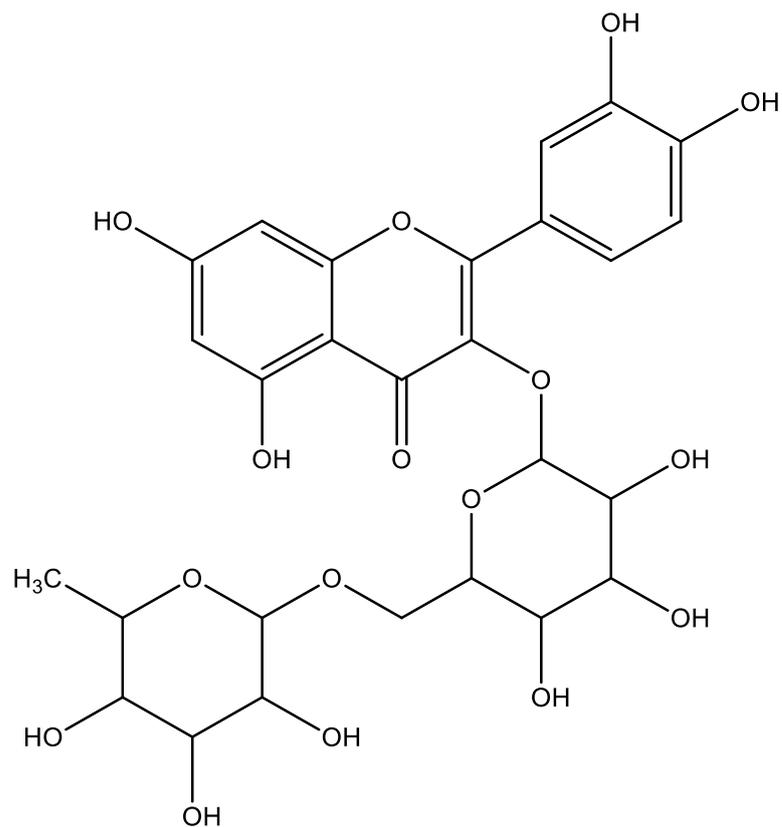


Figura 14. Estrutura da molécula de rutina identificada na fração BuOH, no $t_r = 2,70$ min.

O espectro no ultravioleta (**Figura 15**) para o sinal m/z 609 corrobora com o encontrado na literatura, característico do flavonoide rutina, com banda II em 255 nm e a banda I em 354 nm (PEREIRA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; KAZUMA *et al.*, 2003; DOURADO & LADEIRA, 2008).

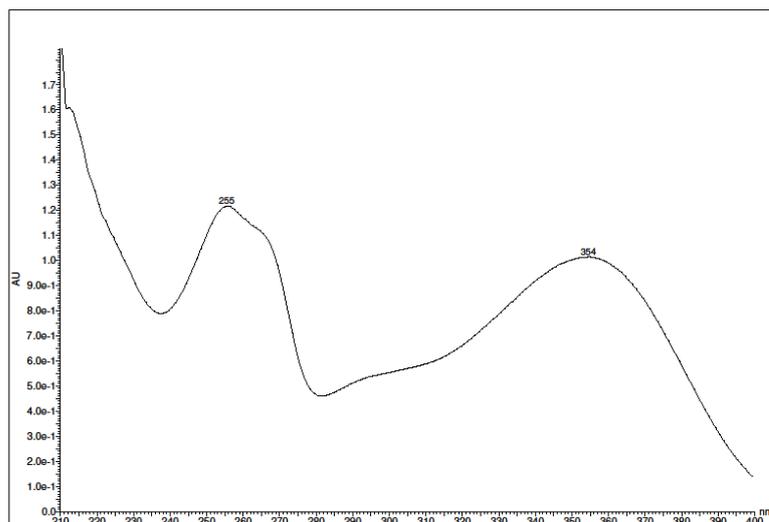


Figura 15. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 2,70 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

Conforme demonstrado na literatura, o flavonoide rutina já foi isolado das flores de *S. nigra* (DAWIDOWICZ & WIANOWSKA & BARANIAK, 2006; CHRISTENSEN *et al.*, 2010).

O espectro de massas obtido para o pico em 2,84 min, apresentou o sinal de m/z 463 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao sinal de m/z 465, o que indica a presença de um flavonol 3-OH substituído. A **Figura 16** representa o cromatograma do sinal m/z 463.

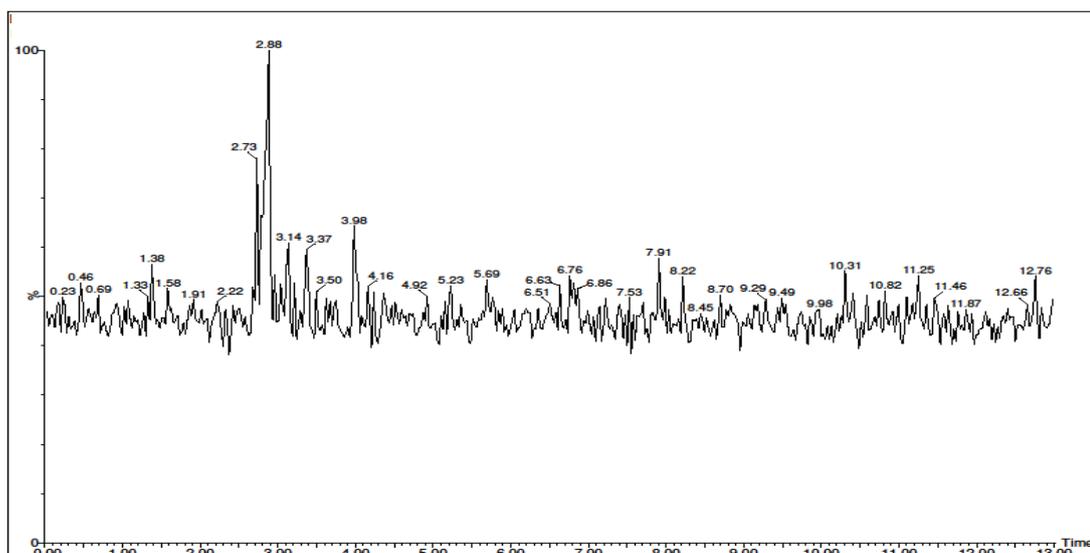


Figura 16. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 463, em 2,84 min.

Para confirmar a identificação, o sinal m/z 463 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), **Figura 17**.

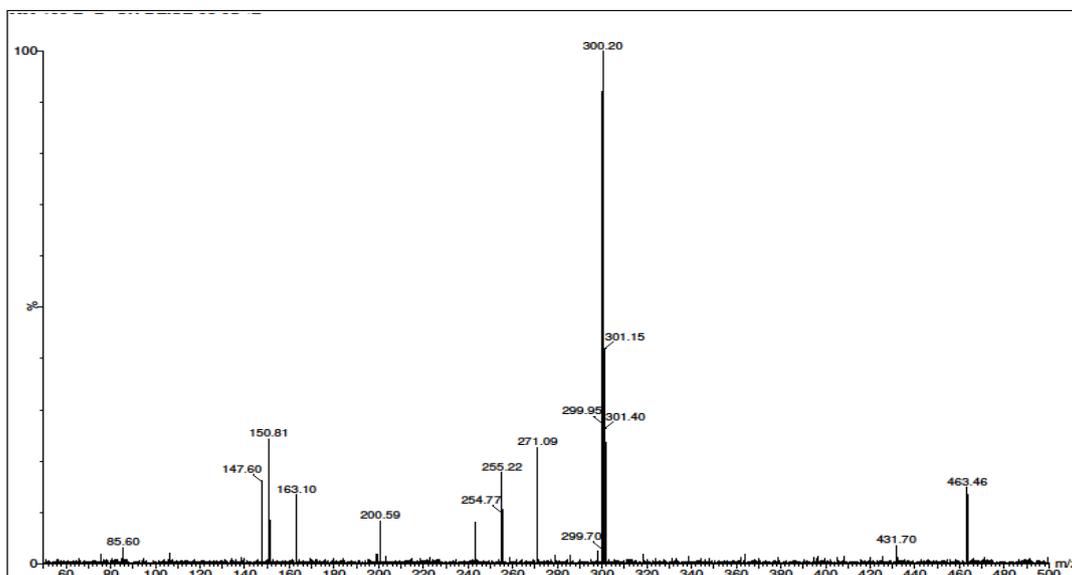


Figura 17. Espectro de massas do sinal de m/z 463 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 2,84$ min.

Baseado nos dados encontrados na literatura e pelo padrão de fragmentação demonstrado, confirmou-se a presença de isoquercitrina, **Figura 18** (SAIT *et al.*, 2015; LI *et*

al., 2018; TIBERTI *et al.*, 2007.). O sinal m/z 300.20 é relativo ao radical aglicona após a perda da molécula de açúcar da estrutura.

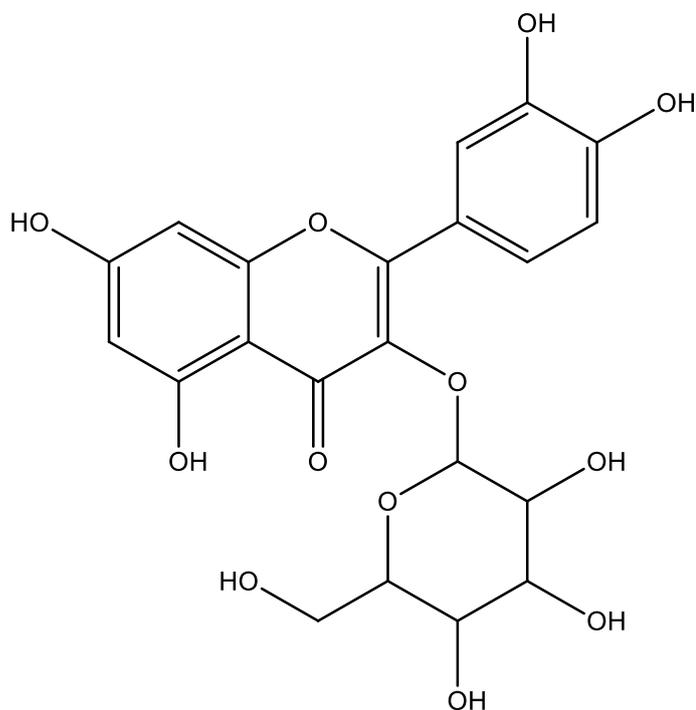


Figura 18. Estrutura da molécula de isoquercitrina identificada na fração BuOH, no $t_r = 2,84$ min.

O espectro no ultravioleta (**Figura 19**) do sinal m/z 463 corrobora com o encontrado na literatura, característico do flavonoide isoquercitrina, com banda II em 255 nm e a banda I em 354 nm (SAIT *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018; TIBERTI *et al.*, 2007.)

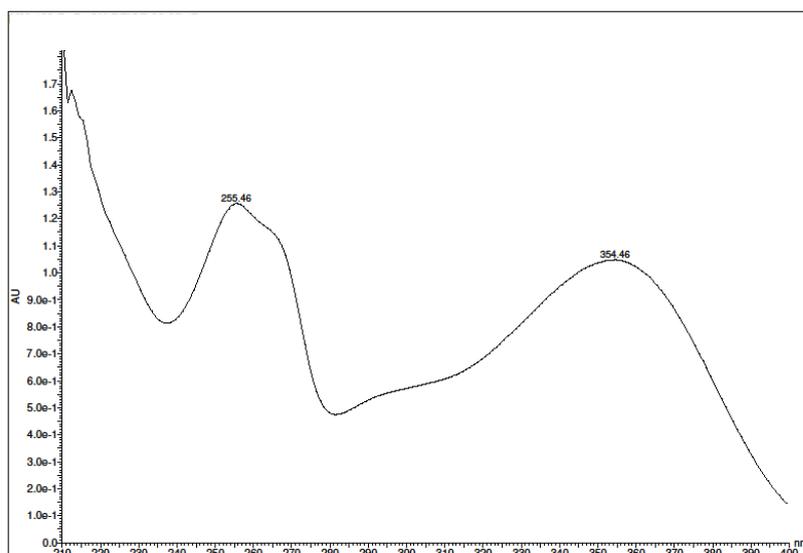


Figura 19. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 2,84 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

Baseado na literatura, o flavonoide isoquercitrina encontra-se presente nas flores de *S. nigra*, em conformidade com o resultado encontrado no padrão de fragmentação (DAWIDOWICZ & WIANOWSKA & BARANIAK, 2006; CHRISTENSEN *et al.*, 2010).

O espectro de massas obtido para o pico em 3,02 min apresentou o sinal de m/z 593 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao sinal de m/z 595, indicou a presença de uma flavona substituída.

O sinal m/z 593 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), na **Figura 20** observa-se que o cromatograma obtido apresenta dois sinais de m/z 593.

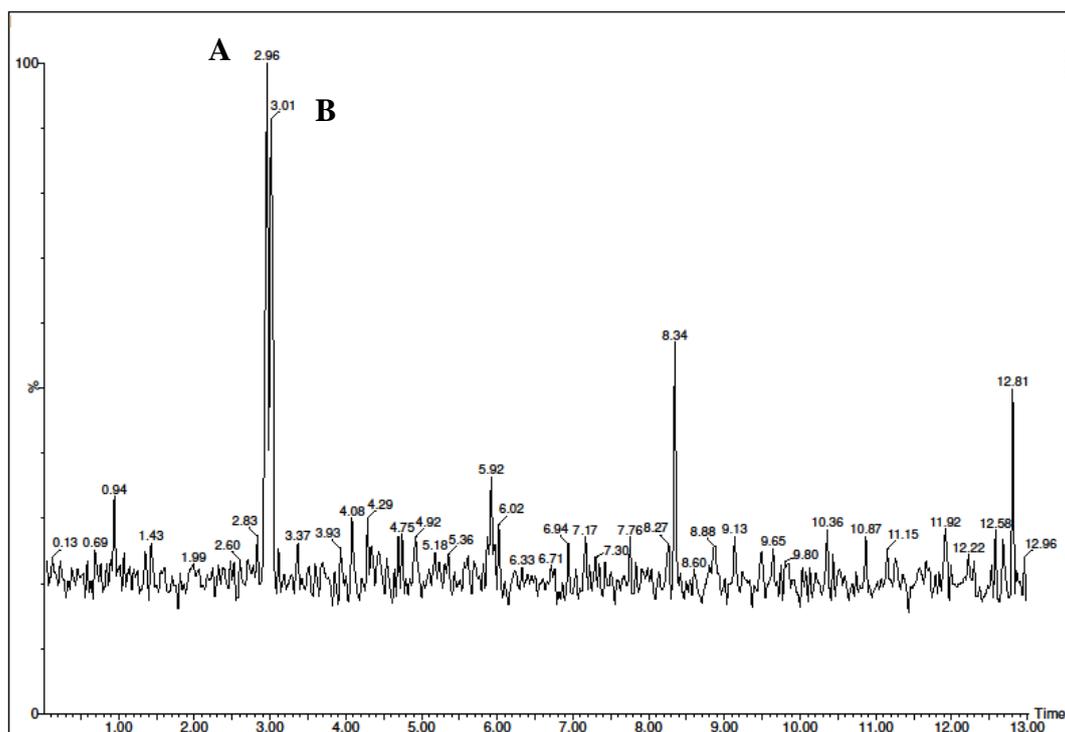


Figura 20. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 593, em 3,02 min.

Para confirmar a identificação, os sinais m/z 593 foram selecionados e analisados em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), **Figura 21** e **Figura 22**.

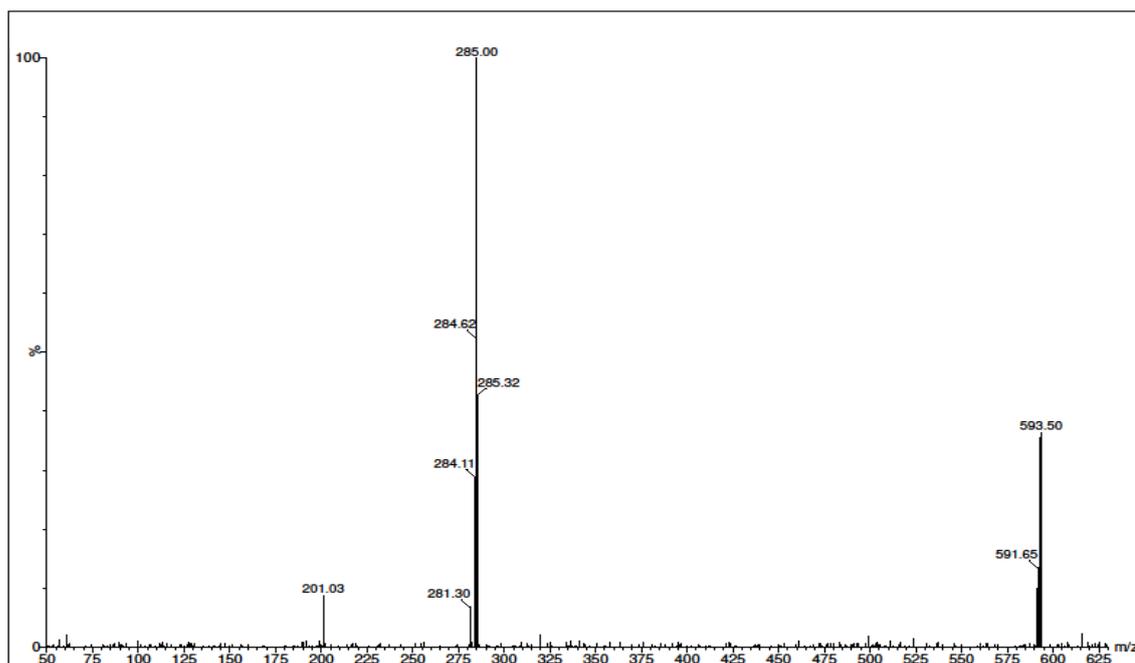


Figura 21. Espectro de massas do sinal de m/z 593 (A) obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,02$ min.

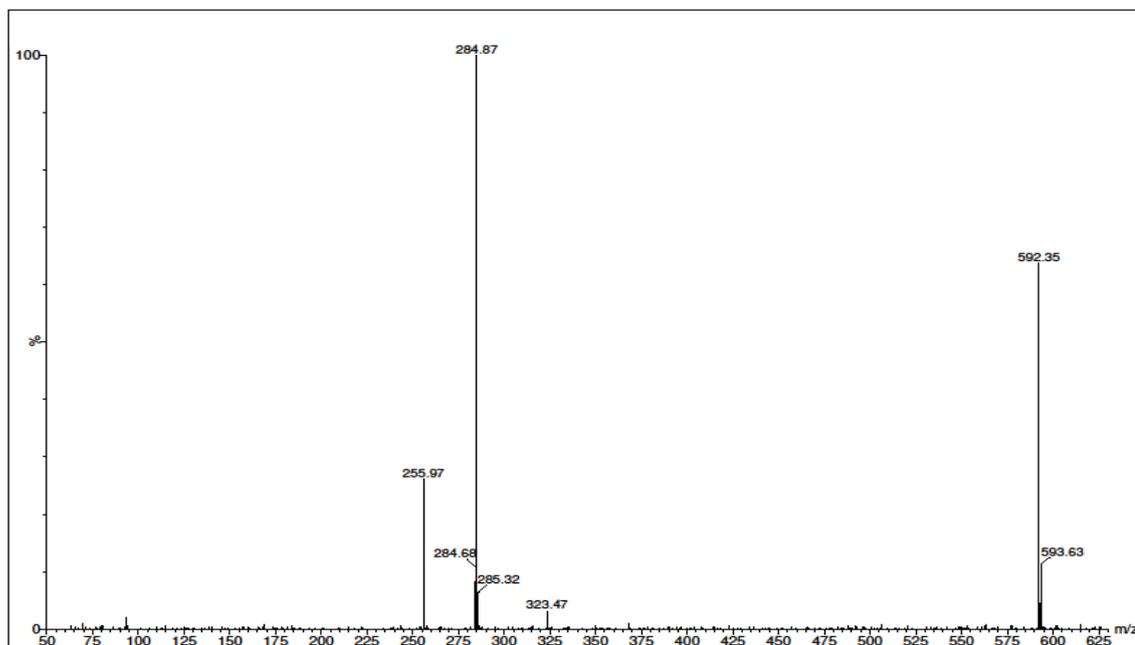


Figura 22. Espectro de massas do sinal de m/z 593 (B) obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,02$ min.

Baseado nos dados encontrados na literatura, e pelo padrão de fragmentação de demonstrado, sugere-se a presença dos isômeros luteolina-7-*O*-rutinosídeo (**Figura 21** e **Figura 23**) e luteolina-4'-*O*-rutinosídeo (**Figura 22** e **Figura 24**), respectivamente (OLA *et al.*, 2009; PLAZONI *et al.*, 2009). O sinal m/z 285.00 e m/z 284.87 correspondem ao ânion aglicona (luteolina) das substâncias.

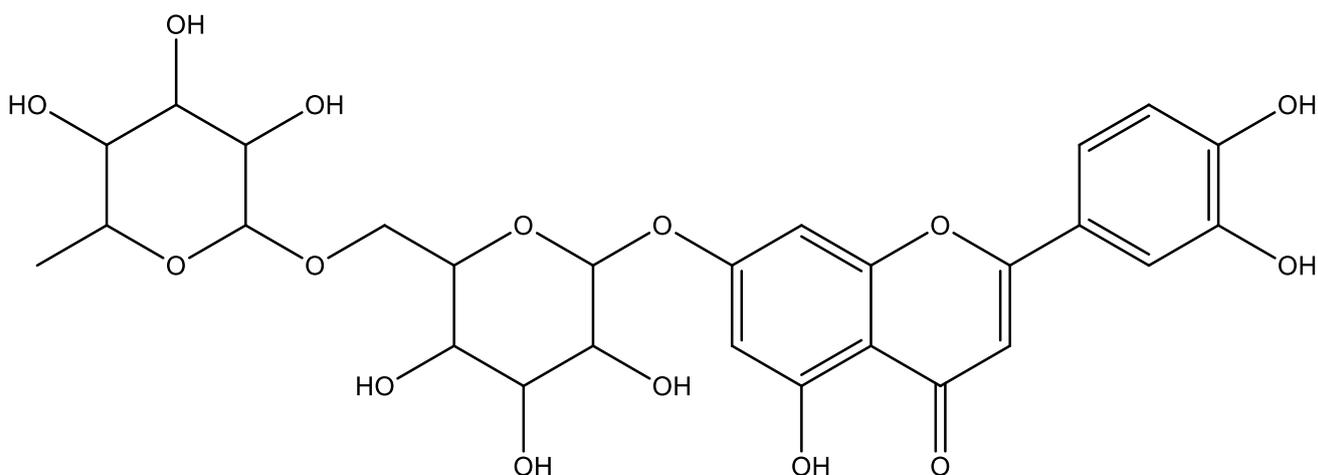


Figura 23. Estrutura da molécula de luteolina-7-*O*-rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,02$ min.

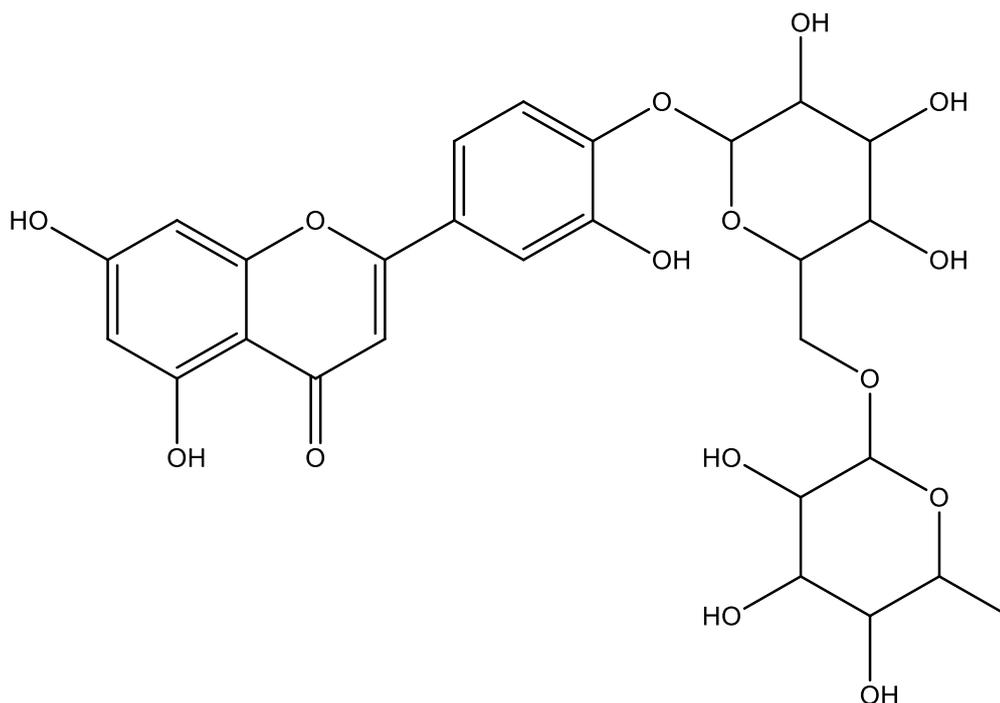


Figura 24. Estrutura da molécula de luteolina-4'-*O*-rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,02$ min.

Para confirmar a identificação dos isômeros, foi obtido o espectro no ultravioleta (**Figura 25**) para o sinal m/z 593 no tempo de 3,02 min de acordo com a fragmentação da substância apresentada na **Figura 22** (luteolina-4'-*O*-rutinosídeo), já para o sinal representado pela fragmentação da substância apresentada na **Figura 21** (luteolina-7-*O*-rutinosídeo) não foi possível a obtenção do espectro no ultravioleta, pois ele estava sobreposto com outras substâncias. O espectro no ultravioleta obtido em modo negativo corrobora com o encontrado na literatura, característico do flavonoide luteolina-4'-*O*-rutinosídeo, com banda II em 253 nm e a banda I em 336 nm (OLA *et al.*, 2009; PLAZONI *et al.*, 2009).

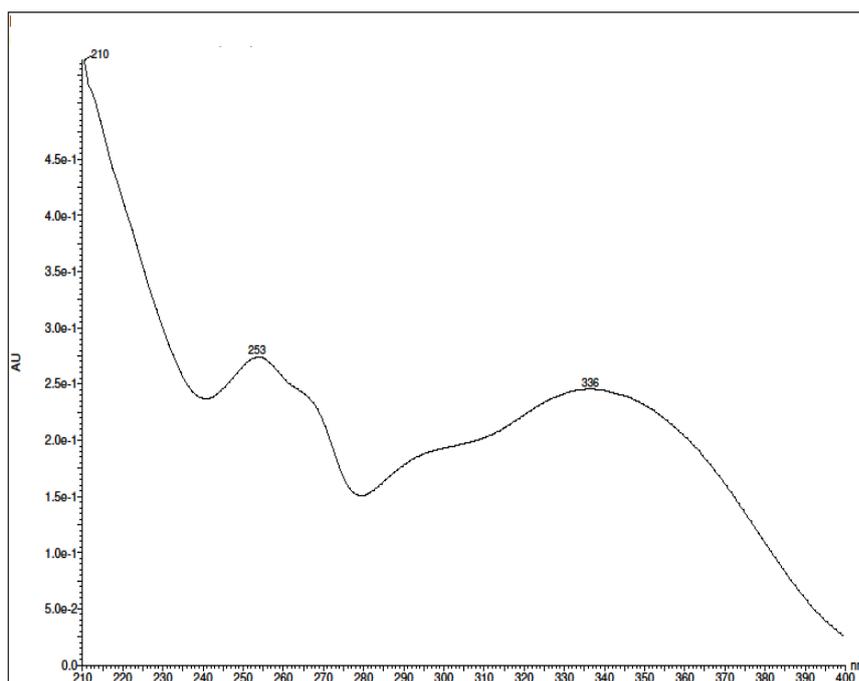


Figura 25. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,02 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

Ainda de acordo com OLA e colaboradores, 2009, ao se comparar as duas substâncias, o flavonoide luteolina-4'-*O*-rutinosídeo apresenta maior tempo de retenção, conforme encontrado nos resultados obtidos no presente estudo (**Figura 20**), podendo sugerir a identificação das estruturas isômeras. Não foram encontrados dados na literatura com a identificação dos isômeros do flavonoide luteolina para a espécie de *S. nigra*, tanto nos extratos de flores, quanto nos extratos de frutos da planta. Porém há relatos do flavonoide presente em outras espécies de plantas da família Caprifoleaceae (LEUNGA *et al.*, 2005; LÁZARO, 2009).

Ao analisar o espectro de massa obtido para o pico em 3,09 min, o sinal de m/z 623 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao sinal de m/z 625 indicou a presença de um flavonol 3-OH substituído.

O sinal m/z 623 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), na **Figura 26**, observa-se que o cromatograma obtido, apresenta dois sinais de m/z 623.

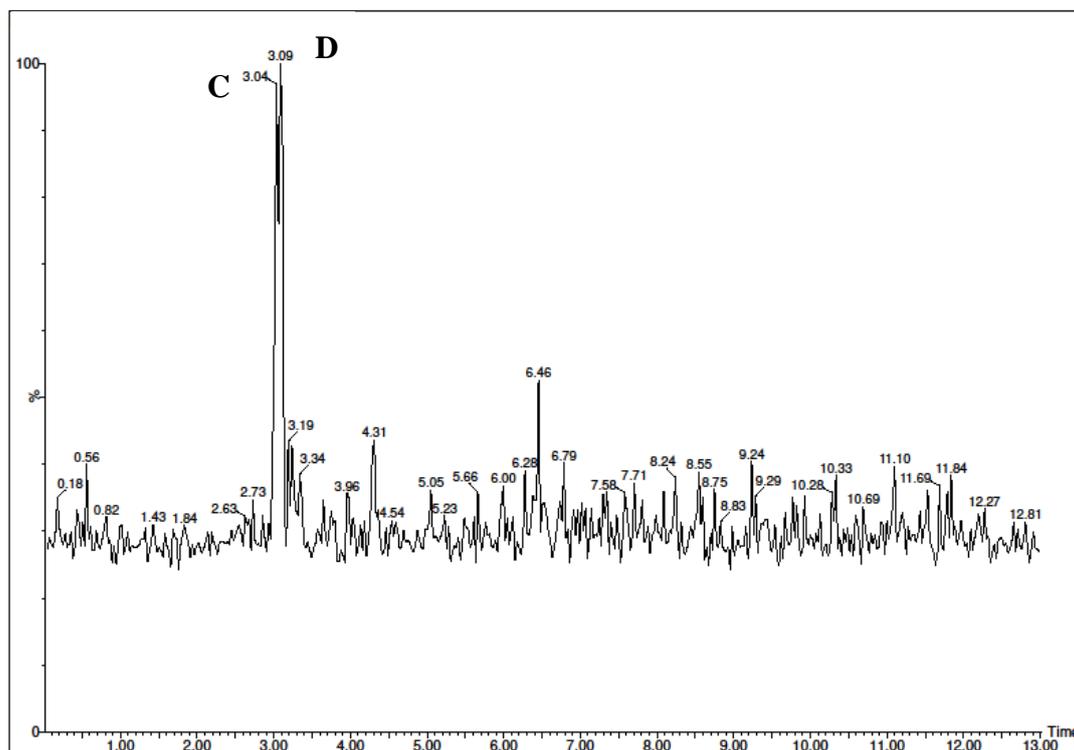


Figura 26. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 623, em 3,09 min.

Para confirmar a identificação, os sinais m/z 623 foram selecionados e analisados em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), **Figura 27** e **Figura 28**.

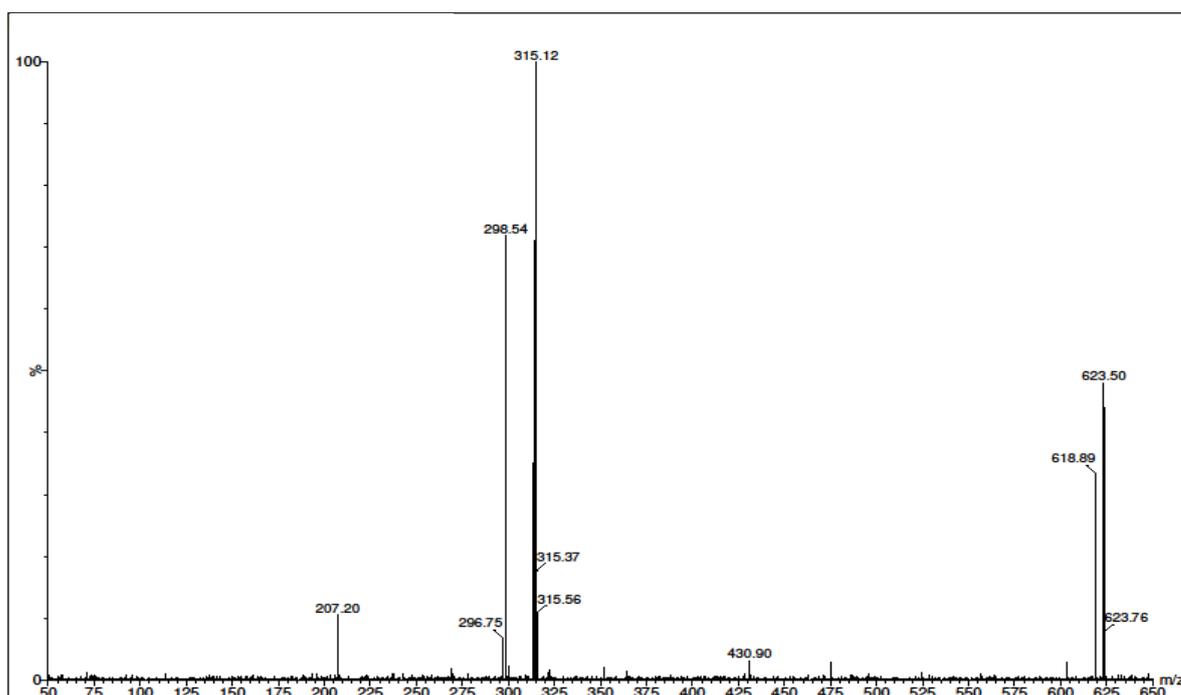


Figura 27. Espectro de massas do sinal de m/z 623 (C) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,09$ min.

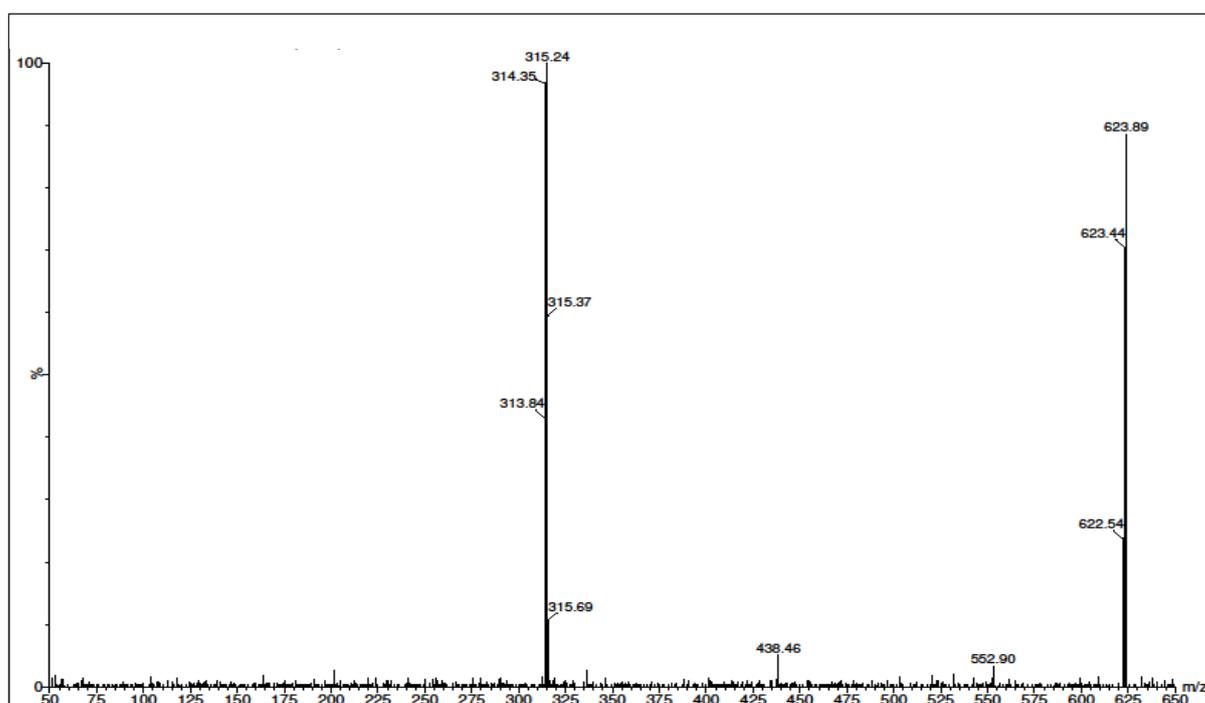


Figura 28. Espectro de massas do sinal de m/z 623 (D) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,09$ min.

De acordo nos dados encontrados na literatura, e pelo padrão de fragmentação demonstrado, sugere-se a presença dos isômeros isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo (**Figura 27** e **Figura 29**) e isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo (**Figura 28** e **Figura 30**), respectivamente (WILLEMS & LOW, 2018; DOU *et al.*, 2017; HARPUT *et al.*, 2004; TRUCHADO *et al.*, 2009).

O sinal m/z 315.12 e m/z 315.24 correspondem ao ânion aglicona da isoramnetina, e a perda neutra de m/z 308.6 corresponde a fração de carboidrato das substâncias (WILLEMS & LOW, 2018).

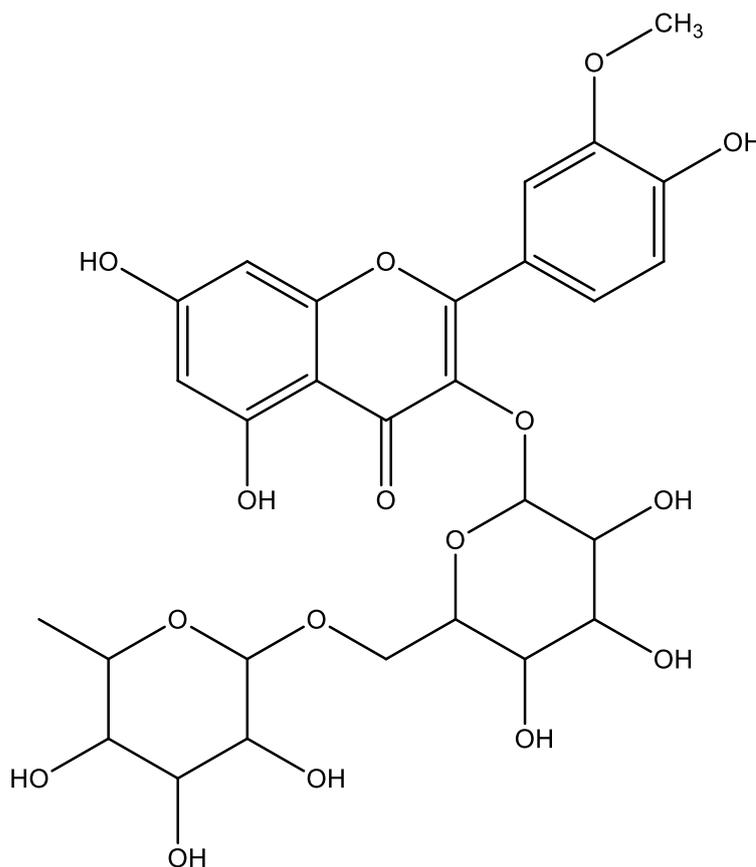


Figura 29. Estrutura da molécula de isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo identificada na fração BuOH, no $t_r = 3,09$ min.

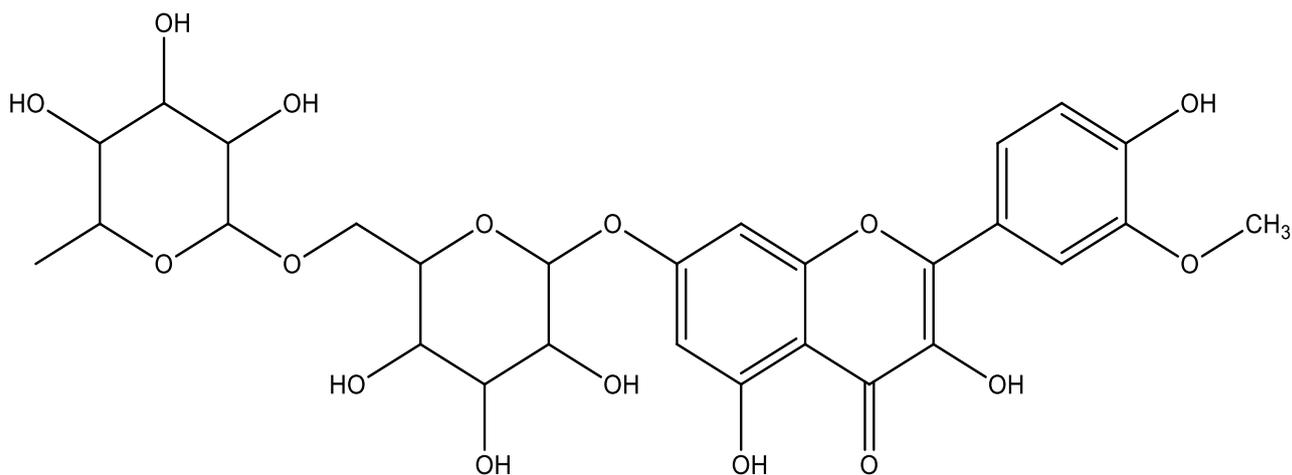


Figura 30. Estrutura da molécula de isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo, identificada na fração BuOH, no tr = 3,09 min.

Para confirmar a identificação dos isômeros, foi obtido o espectro no ultravioleta (**Figura 31**) para o sinal m/z 623 no tempo de 3,09 min de acordo com a fragmentação da substância apresentada na **Figura 27** (isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo), já para o sinal representada na **Figura 28** (isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo), não foi possível a obtenção do espectro no ultravioleta, pois ele estava sobreposto com outras substâncias. O espectro no ultravioleta corrobora com o encontrado na literatura, característico do flavonoide isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo, com banda II em 253 nm e a banda I em 345 nm (WILLEMS & LOW, 2018; DOU *et al.*, 2017; HARPUT *et al.*, 2004).

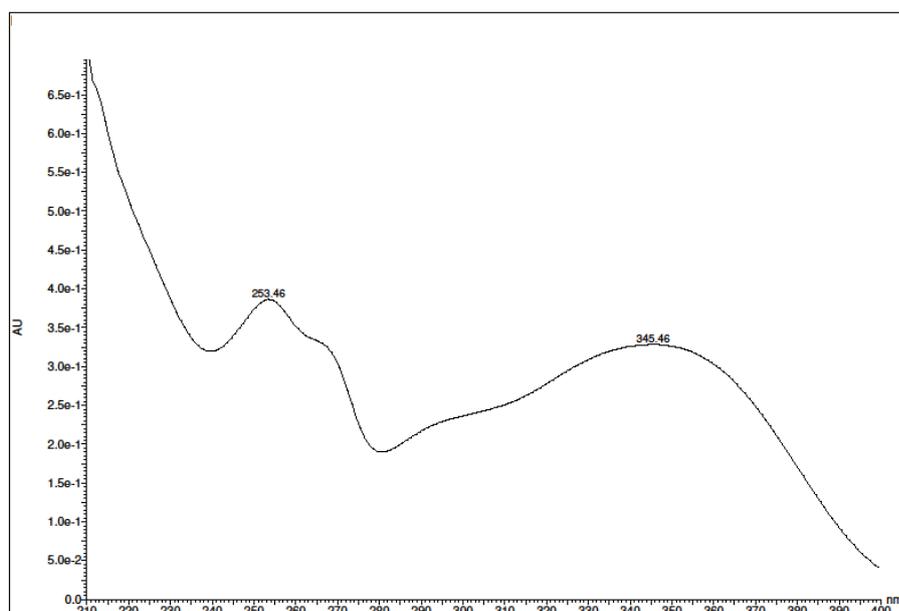


Figura 31. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,09 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

Conforme TRUCHADO e colaboradores, 2009, o padrão de fragmentação para o flavonoide isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo obtido foi idêntico ao do presente estudo. Além disso, o referido trabalho também não obteve os espectros de ultravioleta para a substância identificada, já que o mesmo se encontra escondido por outros, ou em traços, sugerindo-se dessa forma a identificação das substâncias isômeras, de acordo com o apresentado.

O composto identificado como isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo já foi identificado em extratos de flores de *S. nigra*, conforme identificado no presente estudo (HO *et al.*, 2017; SENICA *et al.*, 2017). Não foram encontrados relatos na literatura a respeito da identificação do isômero isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo em extratos de flores e frutos de *S. nigra*.

A análise do espectro de massas obtido para o pico em 3,11 min apresentou o sinal de m/z 447 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao sinal de m/z 449 indicou a presença de um flavonol 3-OH substituído.

O sinal m/z 447 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM), na **Figura 32** observa-se que o cromatograma obtido apresenta dois sinais de m/z 447.

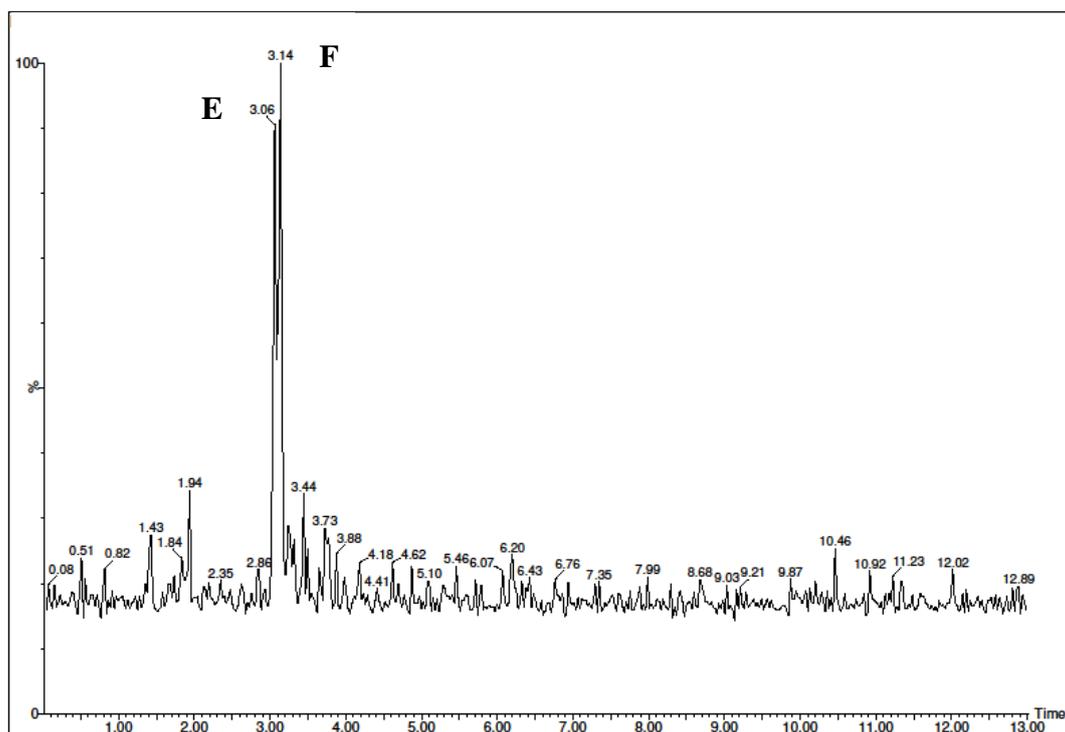


Figura 32. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 447, em 3,11 min.

Para confirmar a identificação, os sinais m/z 447 foram selecionados e analisados em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM) conforme demonstrado na **Figura 33** e na **Figura 34**.

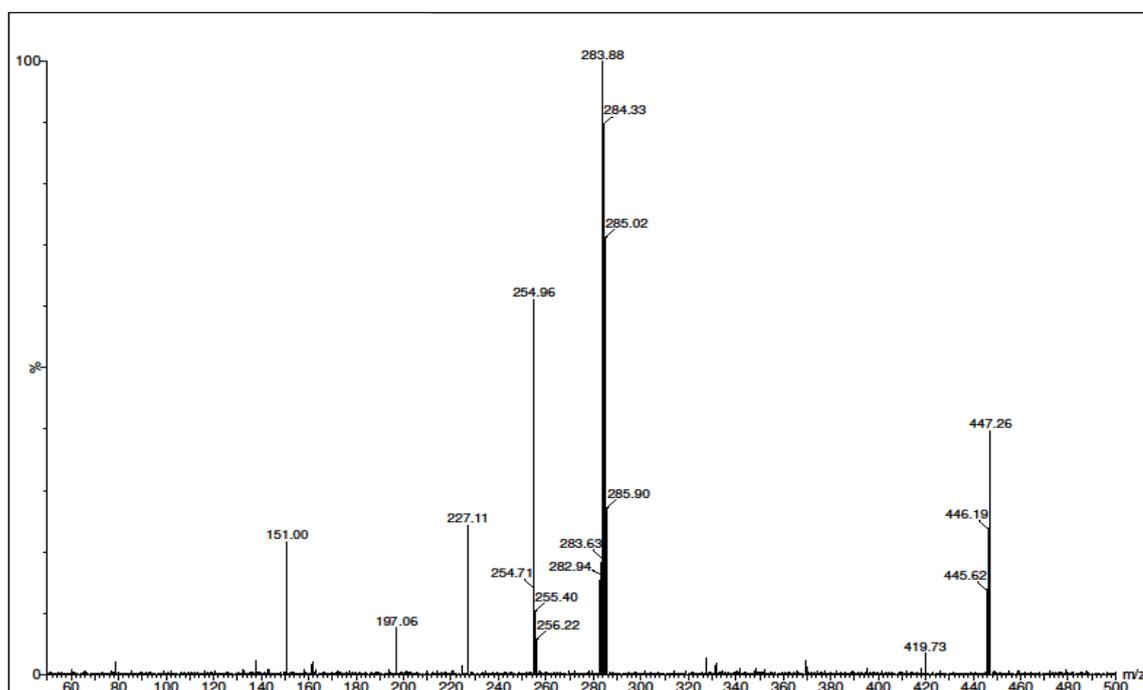


Figura 33. Espectro de massas do sinal de m/z 447 (E) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,11$ min.

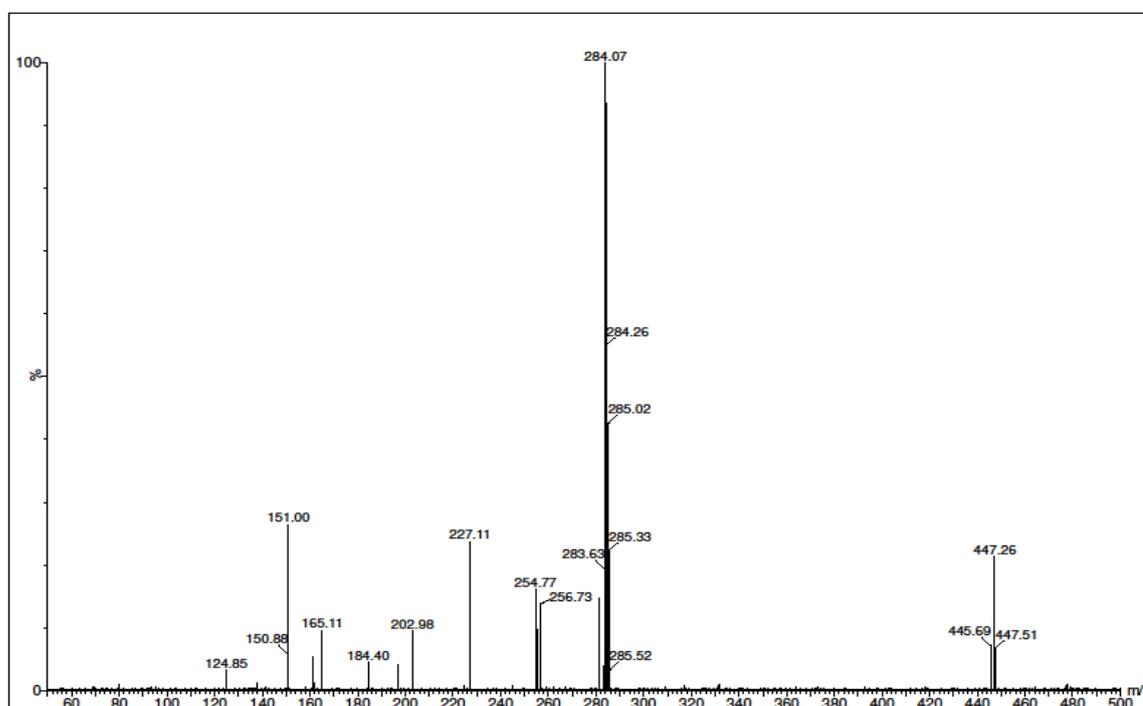


Figura 34. Espectro de massas do sinal de m/z 447 (F) obtido por CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,11$ min.

De acordo nos dados encontrados na literatura, e pelo padrão de fragmentação demonstrado, sugere-se a presença dos isômeros canferol-3-*O*-glicosídeo e luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo, **Figura 35** e **Figura 36**, respectivamente (SOHN *et al.*, 2004; BAO *et al.*, 2018; CIRIC *et al.*, 2017; PLAZONI *et al.*, 2009; AKDEMIR *et al.*, 2003).

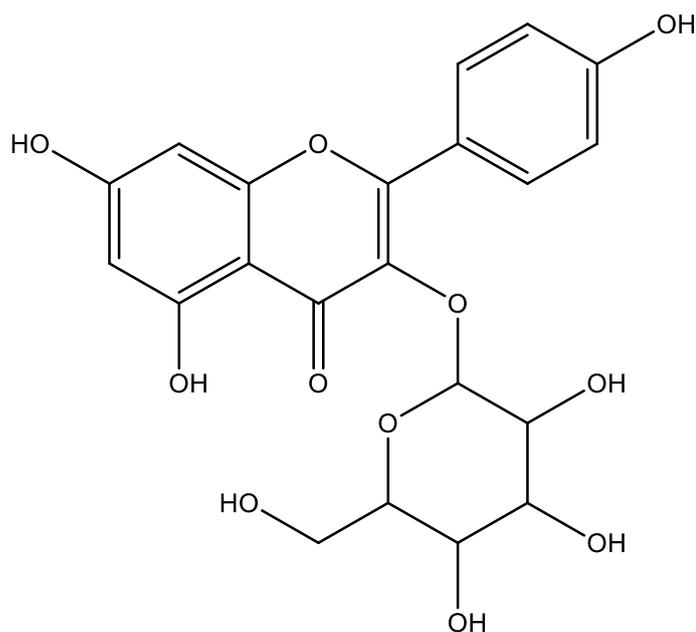


Figura 35. Estrutura da molécula de canferol-3-*O*-glicosídeo, identificada na fração BuOH, no tr = 3,11 min.

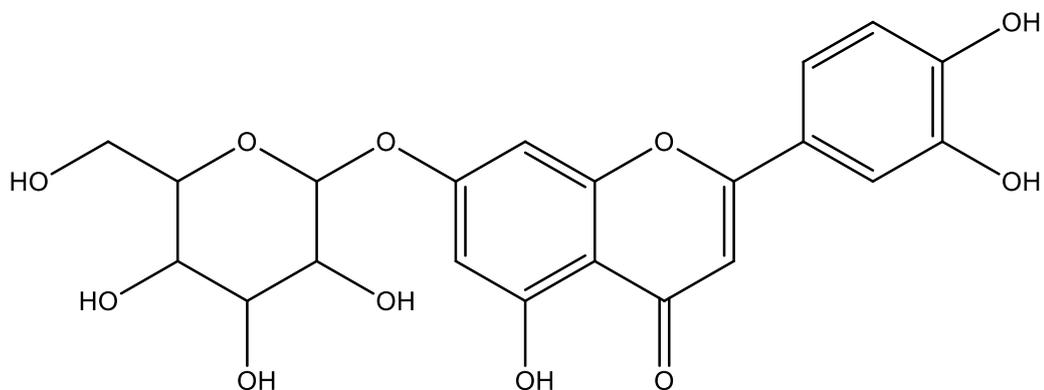


Figura 36. Estrutura da molécula de luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo, identificada na fração BuOH, no tr = 3,11 min.

O sinal m/z 283.88 e m/z 284.07 correspondem a perda de m/z 162 unidades, ou seja, a saída da fração de carboidrato das substâncias, a molécula de glicose (SOHN *et al.*, 2004; BAO *et al.*, 2018; CIRIC *et al.*, 2017; PLAZONI *et al.*, 2009; AKDEMIR *et al.*, 2003).

Para confirmar a identificação dos isômeros, foi obtido o espectro no ultravioleta (**Figura 37**) para o sinal m/z 447 no tempo de 3,11 min de acordo com a fragmentação da substância apresentada na **Figura 33**, e para a substância representada pela fragmentação apresentada na **Figura 34**, também foi retirado o espectro no ultravioleta (**Figura 38**).

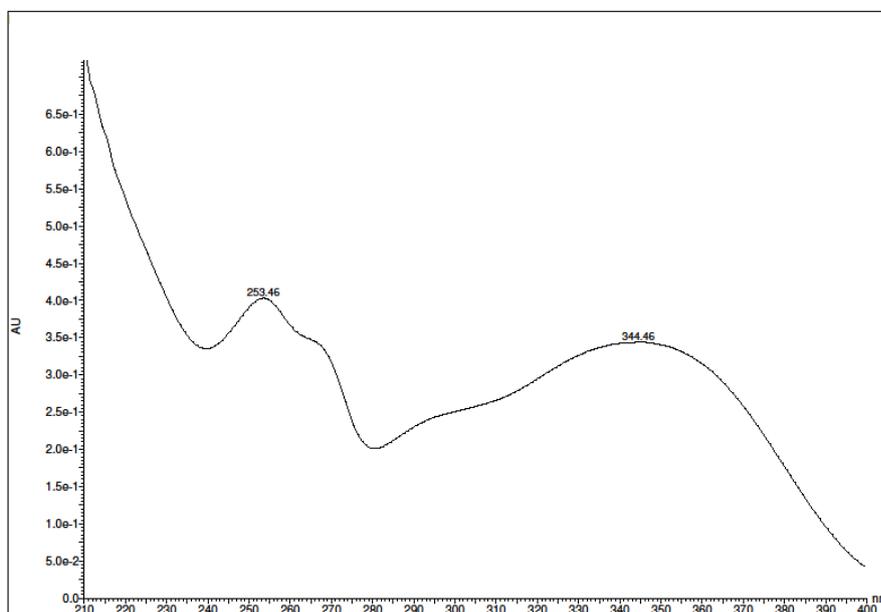


Figura 37. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,11 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

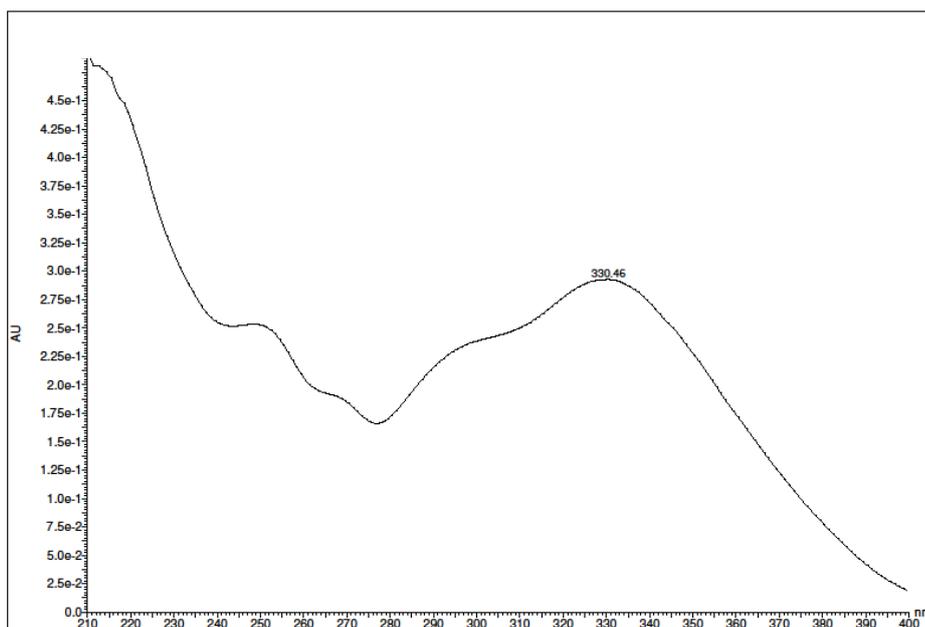


Figura 38. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,11 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

O padrão de fragmentação e espectro no ultravioleta obtido para o flavonoide canferol-3-*O*-glucoside (**Figuras 33, Figura 35 e Figura 37**) corrobora com o encontrado na literatura, possuindo com banda II em 253 nm e a banda I em 344 nm, característico de flavonol, pois como apresenta oxigenação na posição 03, a banda I possui valores maiores (SOHN *et al.*, 2004; BAO *et al.*, 2018; CIRIC *et al.*, 2017).

Através do espectro no ultravioleta foi possível diferenciar os isômeros, pois apesar de possuírem o mesmo padrão de fragmentação, o flavonoide luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo (**Figuras 34, Figura 36 e Figura 38**) apresenta o espectro no ultravioleta com banda II em 330 nm, uma banda mais baixa, característica de flavonas.

O composto identificado como canferol-3-*O*-glicosídeo, já foi identificado em extratos de flores de *S. nigra*, conforme identificado no presente estudo (HO *et al.*, 2017; SENICA *et al.*, 2017). Para o composto luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo não foram encontrados dados na literatura com a sua identificação para a espécie de *S. nigra*, tanto nos extratos de flores, quanto nos extratos de frutos da planta. Porém há relatos do flavonoide presente em outras espécies de plantas da família Caprifoleaceae (LEUNGA *et al.*, 2005; LÁZARO, 2009).

De acordo com o espectro de massas obtido para o pico em 3,19 min, o sinal de m/z 477 atribuído ao íon $[M-H]^-$, no modo negativo e no modo positivo, o íon $[M+H]^+$ relacionado ao

sinal de m/z 479 indicou a presença de uma flavona. A **Figura 39** representa o cromatograma obtido para o sinal m/z 477.

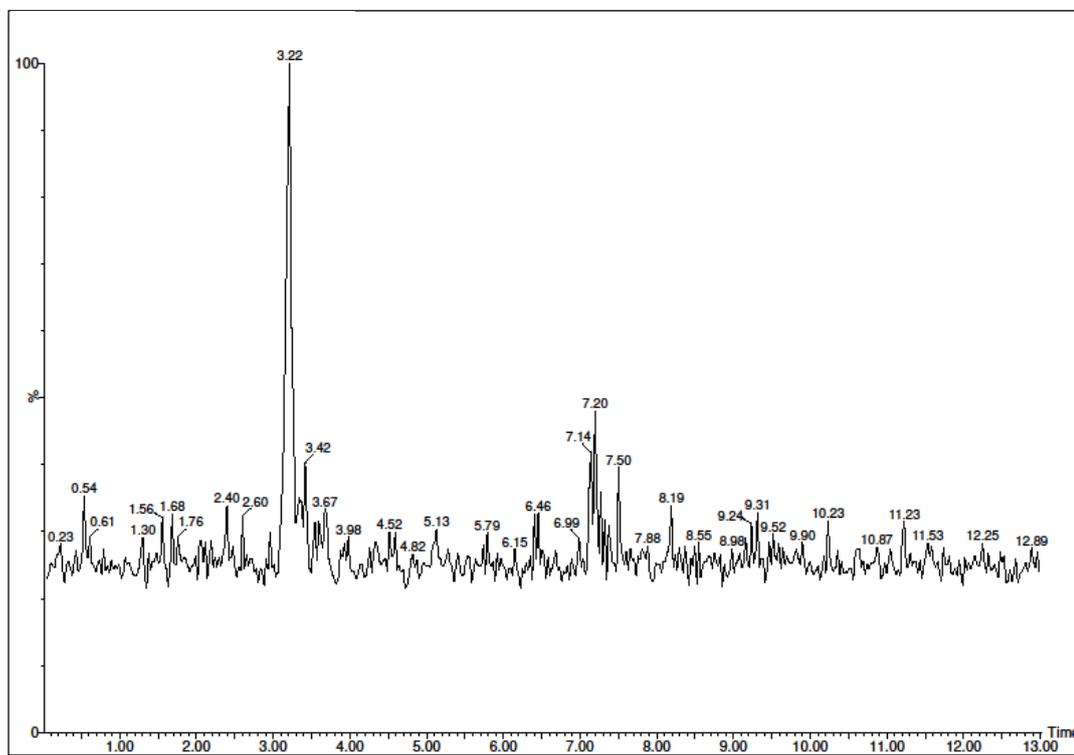


Figura 39. Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM/EM, do sinal m/z 477, em 3,19 min.

Para confirmar a identificação, o sinal m/z 477 foi selecionado e analisado em espectrometria de massas sequenciais (CLUE-DAD-EM/EM) conforme demonstrado na **Figura 40**.

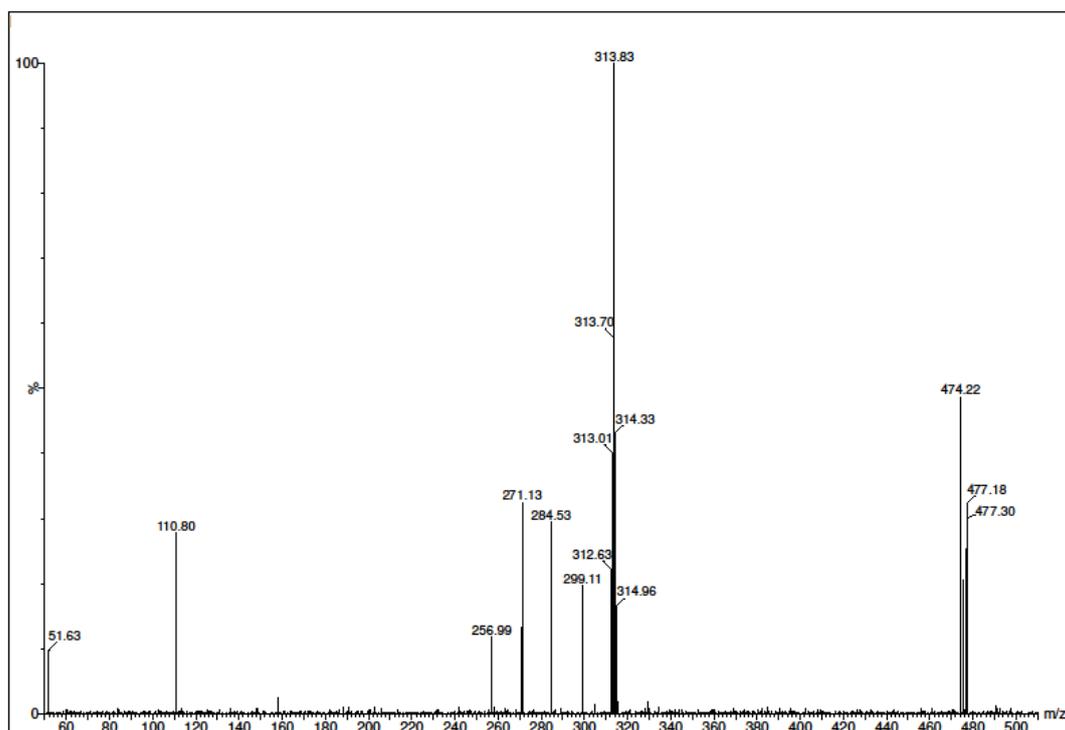


Figura 40. Espectro de massas do sinal de m/z 477 obtido através da CLUE-DAD-EM/EM, modo negativo, para o $t_r = 3,19$ min.

Baseado nos dados encontrados na literatura e pelo padrão de fragmentação demonstrado, confirmou-se a presença do flavonoide *selgin 7-O-glucoside*, **Figura 41** (MARIN *et al.*, 2004; BONGCHEEWIN *et al.*, 2014).

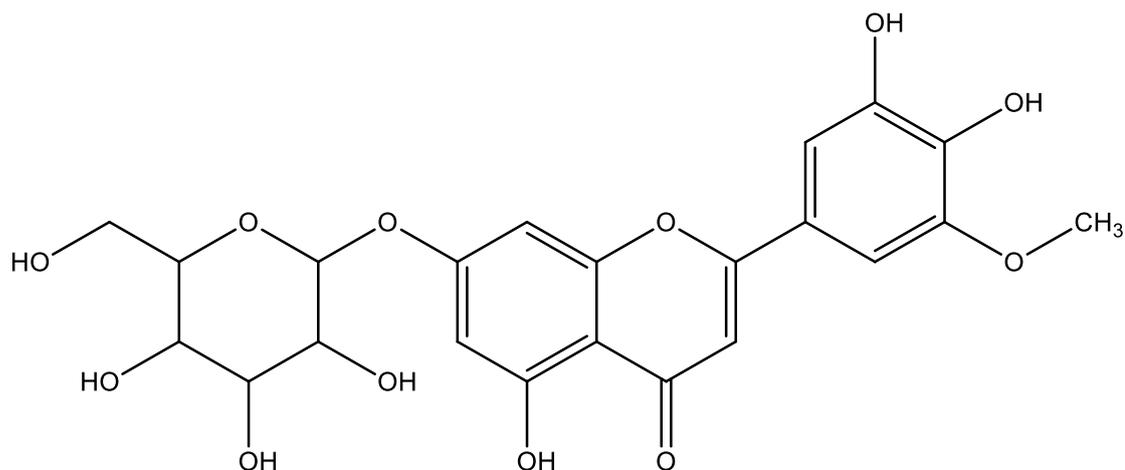


Figura 41. Estrutura da molécula de *selgin 7-O-glucoside*, identificada na fração BuOH, no tr = 3,19 min.

Por ser um flavonoide raro, pouco encontrado nas espécies vegetais, há poucas referências na literatura sobre essa substância. Sugere-se que o sinal m/z 313 corresponde a aglicona após a perda da molécula de açúcar do flavonoide. O espectro no ultravioleta (**Figura 42**) obtido corrobora com o encontrado na literatura, característico do flavonoide *selgin 7-O-glucoside*, com banda II em 253 nm e a banda I em 340 nm, característico de flavona (MARIN *et al.*, 2004; BONGCHEEWIN *et al.*, 2014).

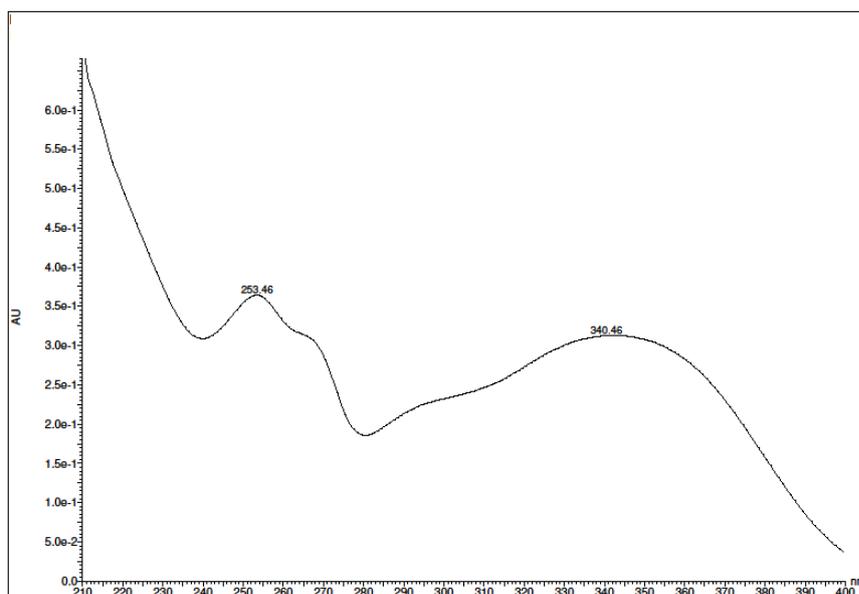


Figura 42. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 3,19 min da fração BuOH de flores de *S. nigra* obtido através de CLUE-DAD-EM/EM.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a presença desse flavonoide nas flores e frutos de *Sambucus nigra L*, nem em outras espécies da mesma família. Porém o flavonoide foi identificado em folhas de espécies dos sub-gêneros *Stachys* e *Betonica*, ricas em flavonoides (MARIN *et al.*, 2004).

Os flavonoides identificados na fração BuOH do extrato de flores de *S. nigra* encontram-se descritos na **Tabela 5**, identificados por seus tempos de retenção (min), massa molecular, absorção máxima em UV/Vis ($\lambda_{\text{máx}}$ - nm) e fragmentos gerados (EM/EM - m/z), em modo negativo, bem como as referências utilizadas para a identificação das substâncias.

Tabela 5. Absorção máxima em UV/Vis ($\lambda_{\text{máx}}$ - nm) e fragmentos gerados (EM/EM – m/z), em modo negativo, para os compostos identificados na fração butanólica (F-BuOH) do extrato de flores de *S. nigra*.

Substância	Tempo de retenção (min)	Massa(g)	UV/VIS $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	Referências
Rutina	2,70	610.52	255; 354	609.91	300.94; 179.22	PEREIRA <i>et al.</i> , 2008; ZHANG <i>et al.</i> , 2010; KAZUMA <i>et al.</i> , 2003; DOURADO; LADEIRA, 2008.
Isoquercitrina	2,84	464.38	255; 354	463.46	300.20	SAIT <i>et al.</i> , 2015; LI <i>et al.</i> , 2018; TIBERTI <i>et al.</i> , 2007.
Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	3,02	594.52	-	593.50	285.00	OLA <i>et al.</i> , 2009; PLAZONI <i>et al.</i> , 2009.
Luteolina-4'- <i>O</i> -rutinosídeo	3,02	594.52	253; 336	593.63	284.87	OLA <i>et al.</i> , 2009.
Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	3,09	624.54	253; 345	623.76	315.12	WILLEMS; LOW, 2018; DOU <i>et al.</i> , 2017; HARPUT <i>et al.</i> , 2004.
Isoramnetina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	3,09	624.54	-	623.89	315.24	TRUCHADO <i>et al.</i> , 2009.
Luteolina-7- <i>O</i> -glicopiranosídeo	3,11	448.38	330	447.26	284.07	PLAZONI <i>et al.</i> , 2009; AKDEMIR <i>et al.</i> , 2003.
Canferol-3- <i>O</i> -glicosídeo	3,11	448.38	253; 344	447.26	283.88	SOHN <i>et al.</i> , 2004; BAO <i>et al.</i> , 2018; CIRIC <i>et al.</i> , 2017.
<i>Selgin 7-O-glucoside</i>	3,19	478.40	253; 340	477.30	313.83	MARIN <i>et al.</i> , 2004; BONGCHEEWIN <i>et al.</i> , 2014.

5.3. Avaliação do teor de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais do EEB e das frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH foram estabelecidos através da interpolação das medidas das absorbâncias com a curva de calibração obtida para o ácido gálico (Eq. 3), na qual y = concentração do ácido gálico e x = absorbância, à 650 nm. Obteve-se o coeficiente de correlação (r^2) entre x e y no valor de 0,9926 adequados ao valor de precisão. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg) por grama de amostra (EAG/g).

$$y = 0,0067x + 0,9111 \quad r^2 = 0,9926 \quad (\text{Eq. 3})$$

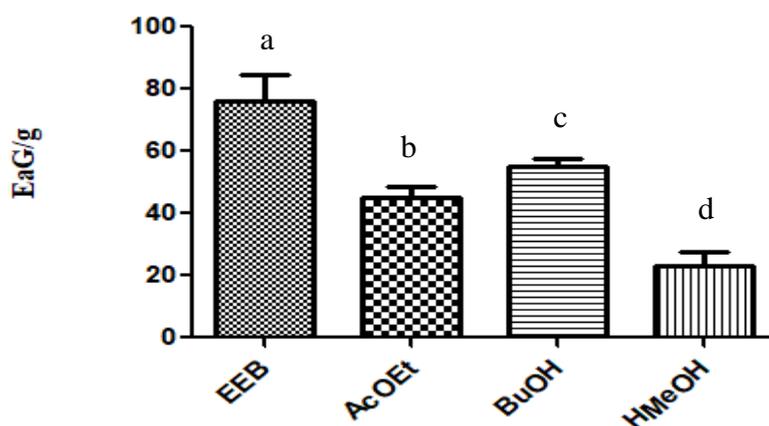


Figura 43. Teor de compostos fenólicos totais do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH.

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam diferença significativa $p < 0,05$

De acordo com os resultados encontrados (**Figura 43**), observa-se que houve diferença significativa entre o teor de compostos fenólicos totais encontrados (análise de grupos) para o EEB (76,07 \pm 2,77 mg EAG/g) e para as frações F-AcOEt (45,00 \pm 1,18 mg EAG/g), F-BuOH (54,87 \pm 0,83 mg EAG/g) e F-HMeOH (23,08 \pm 1,56 mg EAG/g), **Figura 43**.

Através da metodologia utilizada (método do reagente de Folin-Ciocalteu), nota-se que os compostos fenólicos estão presentes em maiores concentrações no EEB e na fração F-BuOH, o que corrobora com a ideia de que o EEB deve conter o teor total de fenólicos pois não foi

fracionado, e as frações mais concentradas foram a F-AcOEt e a F-BuOH, já que os solventes acetato de etila e butanol são os mais eficientes para a extração de compostos fenólicos (AZEVEDO *et al.*, 2014).

Alves e colaboradores em 2014, categorizaram os compostos fenólicos como baixo (<10 mg EAG/g), médio (10 – 50 mg EAG/g) e alto (> 50 mg EAG/g). Sendo assim, pode-se dizer que o EEB e a fração F-BuOH são considerados ricos em compostos fenólicos, e as demais frações com concentrações médias.

Os resultados encontrados por Jarzycka *et al.* 2013 condizem com os resultados achados no presente estudo, onde os teores maiores de compostos fenólicos se concentraram na fração de acetato de etila já que não foi realizado o fracionamento e obtenção da fração F-BuOH no referido estudo.

Ademais, os resultados apresentados mostram-se em conformidade com os resultados obtidos nas análises de CLUE-DAD-EM/EM, na qual a fração com sinais mais intensos foi a F-BuOH.

5.4. Avaliação do teor de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais do EEB e das frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH foram estabelecidos através da interpolação das medidas das absorbâncias com a curva de calibração obtida para a quercetina (Eq. 4), na qual y = concentração de quercetina e x = absorbância, à 450 nm. Obteve-se o coeficiente de correlação (r^2) entre x e y no valor de 0,9569 adequados ao valor de precisão. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra (EQ/g).

$$y = 0,0265x + 0,236 \quad r^2 = 0,9569 \text{ (Eq. 4)}$$

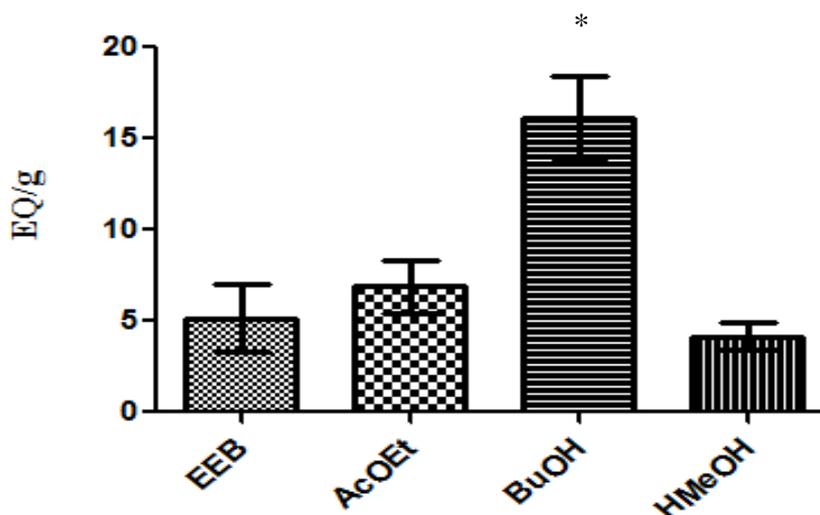


Figura 44. Teor de flavonoides totais do EEB e frações AcOEt, BuOH e HMeOH. Resultados apresentados com média \pm desvio padrão.

* Diferença significativa $p < 0,05$

De acordo com os resultados encontrados (**Figura 44**), observa-se que não houve diferença significativa entre o teor de flavonoides totais encontrados para o EEB (5,16 \pm 0,62 mg EQ/g) e para as frações F-AcOEt (6,89 \pm 0,48 mg EQ/g) e F-HMeOH (4,15 \pm 0,25 mg EQ/g), já para a fração F-BuOH (16,16 \pm 0,75 mg EQ/g) houve diferença significativa, **Figura 44**.

Os resultados apresentados demonstram que a metodologia utilizada foi bastante precisa ao se notar que os flavonoides estão presentes em maiores concentrações na fração F-BuOH, o que corrobora com o descrito por Azevedo e colaboradores 2014, de que o solvente butanol é mais eficiente para a extração de flavonoides glicosilados, pois permite a obtenção dos heterosídeos (flavonoides ligados a açúcares), quando comparado ao solvente acetato de etila, o qual é mais eficiente na extração da aglicona (flavonoide não ligado ao açúcar) (AZEVEDO *et al.*, 2014).

O baixo teor de flavonoides obtido para o EEB pode ter se dado pela presença de outros compostos que podem ter interferido na dosagem de flavonoides totais, já que o EEB contém ceras e pigmentos, além de outros metabólitos secundários, que não são reagentes com a metodologia.

Os resultados encontrados por Jarzycka *et al.* 2013 condizem com os resultados achados no presente estudo, onde os teores maiores de flavonoides se concentraram na fração de acetato de etila, já que não foi realizado o fracionamento e obtenção da fração F-BuOH no referido

estudo, assim, quando não há fracionamento com o solvente butanol, o segundo solvente preferencial para a extração de flavonoides é o acetato de etila (AZEVEDO *et al.*, 2014; JARZYCKA *et al.* 2013).

Os resultados apresentados mostram-se em conformidade com os obtidos nas análises de CLUE-DAD-EM/EM, na qual a fração com sinais mais intensos foi a F-BuOH, além do que os flavonoides identificados são heterosídeos, pois contém uma ou mais unidades de açúcar ligadas a genina, indicando que o fracionamento com o butanol foi eficiente para extrair a maior quantidade de flavonoides glicosilados para essa fração, corroborando o descrito por Azevedo e colaboradores 2014.

5.5. Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF)

O preparo das soluções micelares foi realizado através do método de dispersão a frio. As soluções micelares apresentaram-se límpidas conforme esperado. Para a incorporação da fração F-BuOH na formulação de F127 foi necessário agitação do béquer em banho de gelo durante 30 minutos para completa solubilização.

O F127 é um copolímero que tem a propriedade de formar soluções aquosas a baixas temperaturas, mas em temperaturas superiores a 25°C, ele transforma-se em gel quando estiver em concentrações superiores a 15%. Essa temperatura pode ser modulada, variando-se a concentração de F127 utilizada, em concentrações acima de 20%, a gelificação é explicada devido a reorganização das micelas, que formam um gel altamente viscoso e elástico. Com o aumento da temperatura, ocorre uma desidratação, que gera uma aproximação das cadeias hidrofóbicas, levando a formação do gel (DUMORTIER *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2013; PETKOVA-OLSSON *et al.*, 2017).

O resultado obtido no presente trabalho encontra-se de acordo com o referido na literatura, pois as formulações desenvolvidas contendo 3% e 10% de F127 apresentaram-se nas formas de soluções aquosas límpidas, sem ocorrer a transformação em gel (DUMORTIER *et al.*, 2006).

5.6. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas presentes nas formulações

A análise do tamanho médio e do potencial zeta das formulações obtidas pelo método utilizado (dispersão a frio) estão apresentadas na **Tabela 6**. Os resultados são expressos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IP) para análise do tamanho, e os resultados dos valores do potencial zeta são fornecidos em milivolts (mV).

Tabela 6. Tamanho médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de dispersão a frio (DF).

Formulações	Tamanho médio \pm dp (nm)	IP \pm dp	Potencial zeta \pm dp (mV)
FFB 10%	180,8 \pm 16,54	0,558 \pm 0,14	-29,5 \pm 2,93
FFB 3%	259,6 \pm 20,85	0,704 \pm 0,142	-22 \pm 3,3
F127 10%	72,03 \pm 40,42	0,186 \pm 0,011	-43,2 \pm 2,77
F127 3%	247,3 \pm 76,33	0,528 \pm 0,155	-34,6 \pm 2,55

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 6**, observa-se que as formulações FFB 10% (Formulação da Fração Butanólica (2mg/mL) contendo 10% F127) e a FFB 3% (Formulação Fração Butanólica (4mg/mL) contendo 3% F127) apresentaram tamanho de partícula maiores que as formulações F127 10% e F127 3%, respectivamente, que contém somente o F127. O tamanho micelar representa o raio hidrodinâmico das partículas no movimento browniano, o aumento no tamanho das micelas é explicado através do possível aprisionamento da fração F-BuOH na parte hidrofóbica do núcleo micelar. No entanto a FFB 3% mesmo contendo uma concentração maior de fração obteve um aumento do tamanho médio menor que a FFB 10%, quando comparadas às formulações de F127 sem a incorporação da

fração F-BuOH. Isso pode ser explicado devido à presença de uma maior quantidade de substâncias contidas na fração F-BuOH que podem ter melhorado a interação entre as cadeias hidrofóbicas, resultando em uma estrutura mais compacta (BUTT *et al.*, 2012).

O índice de polidispersão (IP) indica a homogeneidade da população de partículas presentes na formulação em relação ao diâmetro das mesmas. De acordo com Zhang e colaboradores, 2007, valores de IP abaixo de 0,3 classificam a formulação como monodispersa, e valores acima classificam como polidispersa (ZHANG & KOSARAJU, 2007). Pode-se observar que as distribuições de tamanho das micelas são polidispersas, indicando que há variação no diâmetro das mesmas mediante à população, exceto para a F127 10%, que apresentou-se como monodispersa, apesar de preparada pelo mesmo método. A variação nas dimensões das partículas da FFB 10% e da FFB 3% podem ser explicadas devido a existência de ligações físicas específicas entre carbono, hidrogênio e oxigênio presentes na fração BuOH, que podem ser responsáveis pela modificação no diâmetro das micelas frente à população (NITA *et al.*, 2015).

O potencial zeta, também denominado como potencial eletrocinético é o potencial de deslizamento de uma partícula coloidal movendo-se sob um campo elétrico, ou seja, ele representa a carga presente na superfície da micela. Dessa forma, altos valores de potencial zeta, em módulo, geram forças repulsivas que tendem a evitar a agregação das micelas, indicando a estabilidade da formulação gerada (BHATTACHARJEE, 2016).

Ademais é possível observar que o potencial zeta das formulações apresentam elevados valores negativos em módulo, com valores muito próximos entre as formulações que contém a fração F-BuOH e as preparadas pelo mesmo método somente com o F127. O elevado valor do potencial zeta para as formulações FFB 3% e FFB 10% indicam uma alta eficiência no aprisionamento da fração F-BuOH na micela polimérica, além de demonstrar que a formulação desenvolvida é estável (BHATTACHARJEE, 2016; RAFAEL *et al.*, 2018).

Ao se analisar os resultados em conjunto, optou-se por utilizar a FFB 3% para o ensaio de liberação *in vitro*, visto que é a formulação que apresenta maior concentração de F-BuOH incorporada e menor concentração do polímero F127.

5.7. Liberação da fração butanólica a partir das micelas utilizando como biomarcador o flavonoide rutina

5.7.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a realização do teste de liberação *in vitro* da fração F-BuOH das micelas foi realizado primeiramente a quantificação do flavonoide rutina na fração F-BuOH utilizado como biomarcador já identificado na fração anteriormente (ASSIS, 2014). A curva de calibração obtida está representada na **Figura 45**.

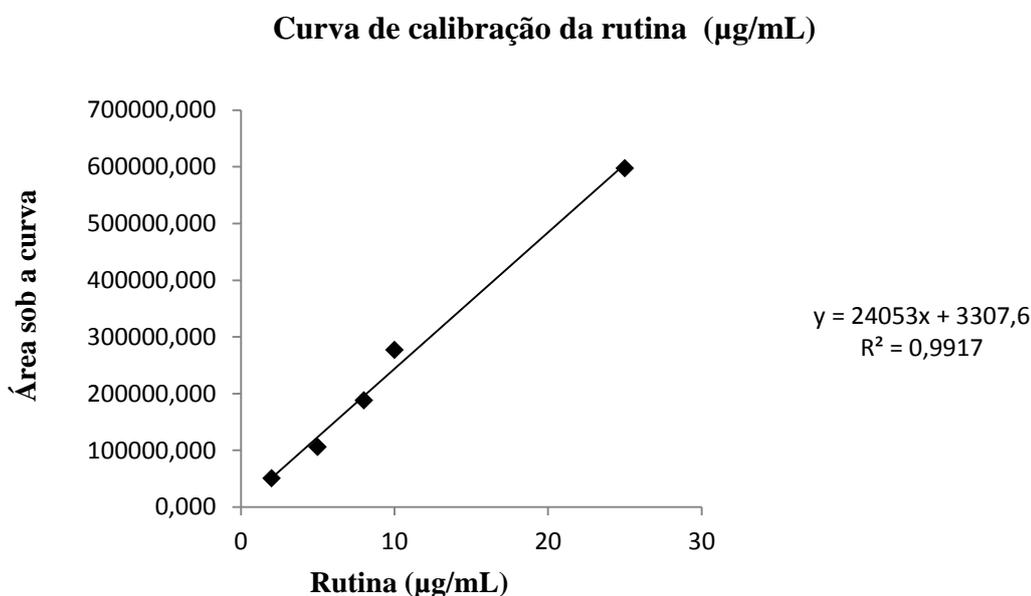


Figura 45. Curva de calibração da rutina ($\mu\text{g/mL}$) obtida por CLAE-DAD.

Na **Figura 45** está representada a equação da reta obtida, na qual y = concentração de rutina e x = absorvância, à 350 nm. Obteve-se o coeficiente de correlação (r^2) entre x e y no valor de 0,9917 adequados ao valor de precisão.

Para avaliação da eficiência do método analítico, foram analisados os parâmetros de linearidade de cada curva analítica, precisão e exatidão do método (NUNES, *et al.* 2005). As curvas analíticas elaboradas para o padrão rutina demonstraram linearidade na faixa avaliada de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 2 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$ pontos), conforme apresentado na **Figura 45** e **Tabela 07**. O limite de detecção (LD) obtido foi de 0,11 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de 0,38

$\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos demonstram que o método é sensível para detectar e quantificar os níveis de concentração de rutina presente na fração F-BuOH. O limite de detecção determina a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado, já o limite de quantificação é a menor concentração de um analito que pode ser quantificada em uma amostra.

Tabela 7. Linearidade do método a partir de uma solução do padrão rutina diluída em metanol com as suas respectivas áreas, médias de três repetições autênticas.

Rutina ($\mu\text{g/mL}$)	Área do sinal da amostra			Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação %
	C ₁	C ₂	C ₃			
2	50891	51016	50766	50891,00	125	0,245
5	105105	105707	106309	105707,00	602	0,569
8	187322	189037	187833	188064,00	880,52	0,468
10	278256	276032	277144	277144,00	1112	0,401
25	595502	597372	599243	597372,33	1870,50	0,313

Os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos indicam linearidade na faixa avaliada, ao considerar que valores de CV abaixo de 5% são considerados aceitáveis de acordo com os parâmetros descritos pela ANVISA (2003).

A precisão intermediária do método foi avaliada através da repetibilidade de diversas medições realizadas em dias alternados com as mesmas condições cromatográficas pelo mesmo analista, de acordo com o apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Ensaio de precisão intra-corrida com os valores médios das áreas dos sinais na concentração de 8 µg/mL do padrão rotina.

Repetições	Áreas dos sinais da amostra	Rutina (8 µg/mL)
1	187322	7,6503
2	189037	7,7216
3	187833	7,6716
4	189091	7,7239
5	187322	7,6503
6	186913	7,6333
Média	187919,66	7,6752
Desvio Padrão	933,35	0,0388
Coefficiente de Variação %	0,496	0,5055

Os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos indicam uma precisão aceitável para o método analítico utilizado, ao considerar que valores de CV abaixo de 5% são considerados aceitáveis de acordo com os parâmetros descritos pela ANVISA (2003).

Para a avaliação da exatidão do método, foi determinada a porcentagem de recuperação média do analito nas concentrações baixa (2 µg/mL), média (8µg/mL) e alta (25 µg/mL) da curva, conforme descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9. Exatidão do método para três níveis de amostragem na determinação de rutina.

Amostragem (µg/mL)	Média áreas dos sinais			Média Concentrações (µg/mL)			Média Recuperação %	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação %
2 (baixa)	50891	51016	50766	1,97	1,98	1,97	98,91	0,259	0,26
8 (média)	187322	189037	187833	7,65	7,72	7,67	96,01	0,457	0,47
25 (alta)	595502	597372	599243	24,77	24,69	24,77	98,99	0,179	0,18

A recuperação ficou entre 96,01% e 98,99 %, estando de acordo com o descrito pela ANVISA (80% - 120%). O coeficiente de variação manteve-se abaixo de 5% de acordo com as especificações.

A **Figura 46** representa um cromatograma de rutina obtido a partir de uma solução padrão. Como observado o tempo de retenção da rutina nas condições cromatográficas de análise foi de 8,55 minutos.

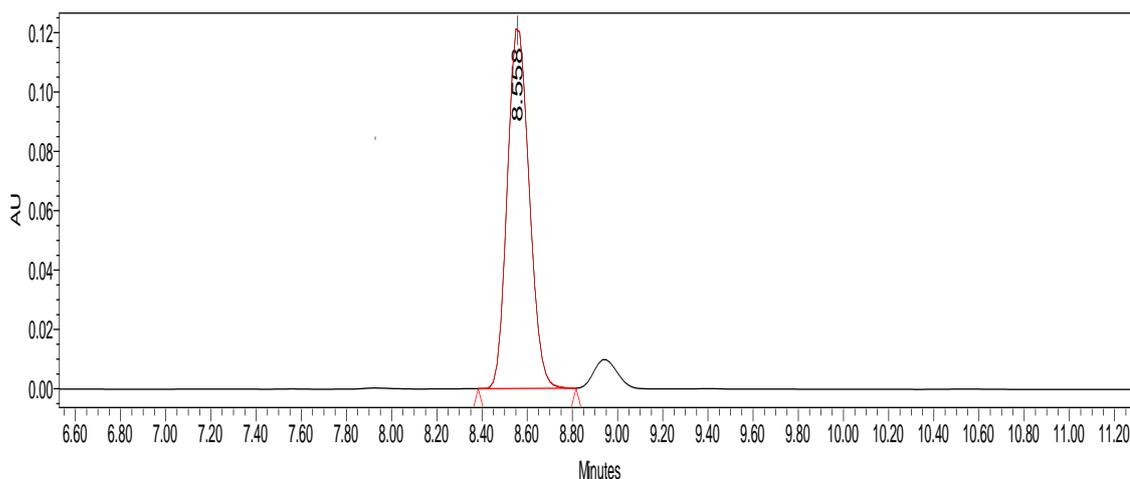


Figura 46. Cromatograma de rutina obtida por CLAE-DAD a partir de uma solução padrão.

A **Figura 47** representa o cromatograma da fração F-BuOH com o sinal mais intenso representado pela substância identificada como o flavonoide rutina. Na fração o flavonoide apresentou o tempo de retenção de 8,54 min, compatível com o tempo de retenção obtido pela solução padrão de rutina (8,55 min).

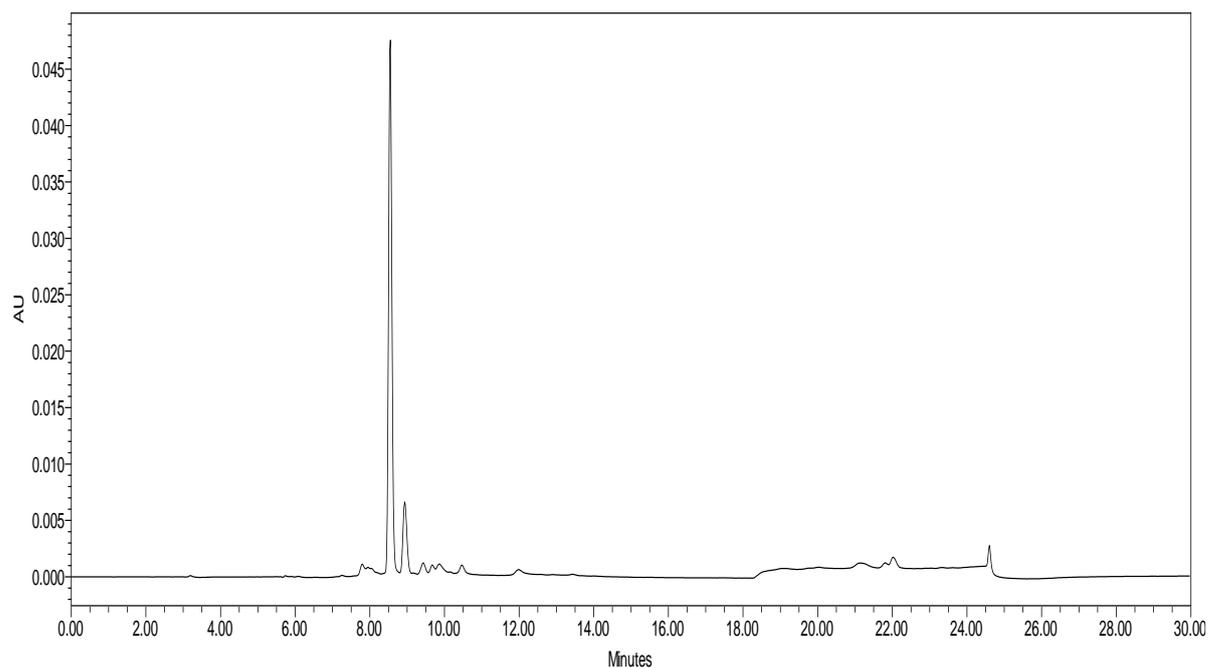


Figura 47. Cromatograma da fração F-BuOH obtido por CLAE-DAD com sinal intenso no $t_r=8,54$ min.

A **Figura 48** representa a sobreposição do cromatograma da fração F-BuOH representada em azul, com o cromatograma do padrão rutina, representada em verde. Observa-se que o sinal mais intenso é o sinal representado pela rutina, e tanto na fração F-BuOH, quanto na solução padrão, a substância apresenta o mesmo tempo de retenção 8,54 e 8,55 min, respectivamente.

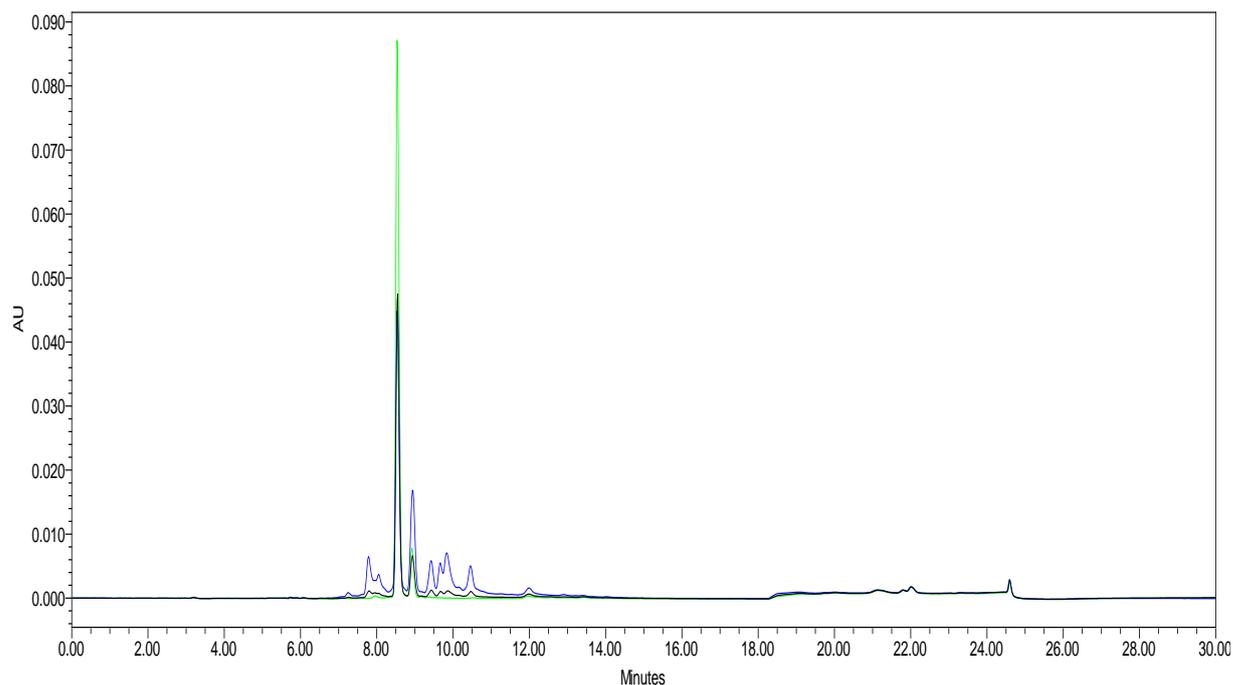


Figura 48. Sobreposição do cromatograma da fração F-BuOH com o cromatograma do padrão de rutina obtidos por CLAE-DAD.

A fim de se confirmar que o sinal mais intenso da fração F-BuOH é o flavonoide rutina, além da comparação dos tempos de retenção da fração e da solução padrão, foi obtido também o espectro no ultravioleta a 350 nm, conforme demonstrado na **Figura 49**. Conforme demonstrado na literatura (PEREIRA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; KAZUMA *et al.*, 2003; DOURADO; LADEIRA, 2008), os valores encontrados para a banda I (352.9 nm) e a banda II (254 nm) do flavonoide rutina estão de acordo com o encontrado na literatura, confirmando que o sinal encontrado em 8,54 min na fração F-BuOH pela metodologia utilizada, refere-se à rutina.



Figura 49. Espectro no ultravioleta (UV) do sinal em 8,54 min da fração BuOH de flores de *S. nigra*.

A partir das análises realizadas foi possível obter a concentração presente do biomarcador rutina na fração F-BuOH. A **Figura 50** representa o teor de rutina presente na fração butanólica (F-BuOH), representada por miligrama (mg) de rutina por grama de fração F-BuOH. Foi quantificado um valor de 379,6mg/g, onde cada grama de fração F-BuOH contém 379,6 mg de rutina, mostrando que a fração é rica no flavonoide identificado.

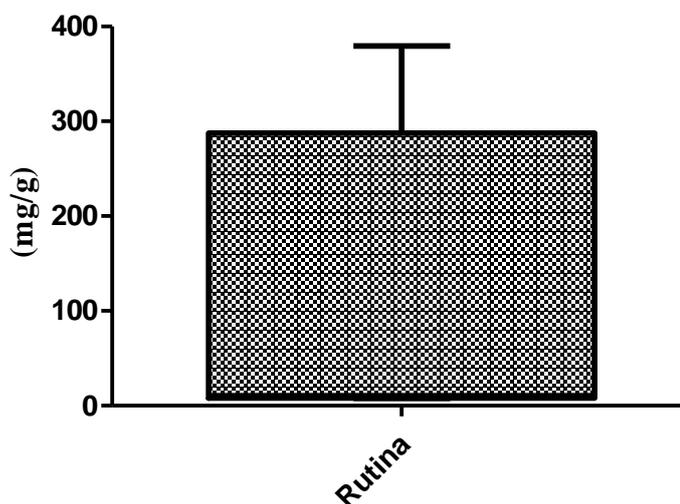


Figura 50. Quantificação de rutina presente na fração F-BuOH (mg/g). Resultados apresentados com média \pm desvio padrão.

No estudo realizado por Dawidowicz e colaboradores, 2006, um alto teor de rutina foi encontrado no extrato etanólico de flores de *S. nigra*. Variações na quantificação de rutina na fração F-BuOH das flores da planta podem ser observadas devido a diferenças na quantidade de extrações realizadas para obtenção do EEB, a metodologia utilizada para a aquisição das frações, como também o método utilizado para a quantificação do flavonoide. No presente estudo foram encontrados altos valores de rutina na fração F-BuOH, pois como já explicado anteriormente, o solvente butanol permite a extração de maiores quantidades de flavonoides glicosilados, como a rutina, de forma a aumentar sua concentração na fração F-BuOH, conforme encontrado nos resultados anteriores. Como foram realizadas 8 percolações para obter o EEB, permite-se inferir que houve o esgotamento da planta, extraído-se ao máximo os metabólitos secundários, o que resultou em um EEB com altas concentrações de flavonoides e conseqüentemente a fração F-BuOH altamente concentrada. Não foram encontrados dados na literatura que contivessem concentrações do flavonoide rutina na fração F-BuOH.

Ademais, os resultados apresentados mostram-se em conformidade com os resultados obtidos nas análises de CLUE-DAD-EM/EM, na qual o sinal mais intenso presente na fração F-BuOH foi identificado como o flavonoide rutina.

5.7.2. Solubilidade

A escolha de um meio receptor adequado é determinante para o sucesso do ensaio de liberação *in vitro*. O meio receptor deve se apresentar como uma solução tampão com pH fisiológico e manter a temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para seguir a condição *sink* do experimento (RISSI, 2013). O termo condição *sink* significa que a concentração de fármaco no meio receptor não deve ser superior a 20% da sua concentração de saturação, identificada pela determinação de sua solubilidade, garantindo que o meio receptor não fique saturado, o que pode impedir a liberação do fármaco a partir da formulação (CARNEIRO, 2013).

O estudo da condição *sink* foi realizado através da escolha do PBS como solução receptora, pois apresenta-se como uma solução tampão de pH=7,2. A concentração do biomarcador rutina foi quantificada no meio através da preparação de uma curva analítica obtida para a mesma substância (Eq. 5) na qual y = concentração de rutina e x = absorvância, à

350 nm. Obteve-se o coeficiente de correlação (r^2) entre x e y no valor de 0,9972 adequados ao valor de precisão. Os resultados obtidos estão expressos na **Tabela 10**.

$$y = 40665x - 30081 \text{ (Eq. 5)}$$

Tabela 10. Resultados da solubilidade de rutina na solução receptora.

Rutina ($\mu\text{g/mL}$)	Área média dos picos*	Quantidade solubilizada ($\mu\text{g/mL}$) **	Quantidade solubilizada em %
38 $\mu\text{g/mL}$	600187	30,9980	81,5738
38 $\mu\text{g/mL}$	596619	30,8225	81,1120
38 $\mu\text{g/mL}$	590159	30,5048	80,2759
Média	595655	30,7751	80,9872
Desvio Padrão	5083,0274	0,2499	0,6578
Coefficiente de Variação %***	0,8533	0,8123	0,8123

* Média das 3 áreas em triplicata.

** Corrigido com o fator de diluição (2x) utilizado

*** CV- coeficiente de variação, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

Os resultados obtidos demonstraram que a rutina obteve uma solubilização média de 80,9% na solução receptora, garantindo as condições *sink* do ensaio de liberação *in vitro*, o coeficiente de variação se manteve abaixo de 5%, respeitando os valores preconizados na legislação vigente (ANVISA, 2003).

5.7.3. Liberação *in vitro* da FFB 3%

Com o objetivo de se avaliar a quantidade de fármaco liberada da formulação em função do tempo, realizou-se o estudo de liberação *in vitro*. Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais capazes de carregar grandes quantidades de fármacos e tem sido muito utilizados em múltiplas estratégias de entrega de fármacos. O mecanismo de liberação terapêutica dos polímeros podem ser controlados tanto pela temperatura, quanto pelo pH do meio (TATINI, *et al.*, 2015).

A liberação de um fármaco em formulações de Pluronic® F127 depende diretamente do conteúdo de polímero contido na formulação. Sabe-se que à medida que se aumenta o teor de polímero nos hidrogéis, ocorre um aumento da densidade da micela, aumentando também o espaço intersticial dos poros aquosos, de forma a contribuir para o aumento no caminho de difusão de um fármaco, e conseqüentemente reduzir o coeficiente de difusão do fármaco para o meio receptor (FENGBIN *et al.*, 2011). Portanto a liberação do fármaco depende diretamente da difusão deste através da parede polimérica com conseqüente liberação final para o meio receptor. Dessa forma a membrana escolhida não deve limitar o transporte do fármaco e o meio receptor deve garantir as condições *sink* do sistema (RISSI, 2013), permitindo que o equilíbrio entre o fármaco contido na micela e o meio receptor.

Para a avaliação da liberação de um fármaco, o método de diálise regular é o mais versátil e popular. Neste método ocorre a separação física do fármaco através o uso de uma membrana de diálise que permite a coleta do meio receptor de forma simples e em intervalos de tempos periódicos. Essa técnica consiste na introdução da formulação em um saco de diálise, o qual é selado e adicionado em um béquer contendo o meio receptor, em geral o volume utilizado de formulação varia em torno de 1 a 10 mL, enquanto o volume do meio receptor varia de 40 a 200 mL (D´SOUZA, 2014; NECKEL & LEMOS-SENNA, 2005).

Para o cálculo das concentrações da FFB 3% liberada no meio receptor foi feita uma curva analítica do padrão rotina, obtida por CLAE-DAD (**Figura 51**).

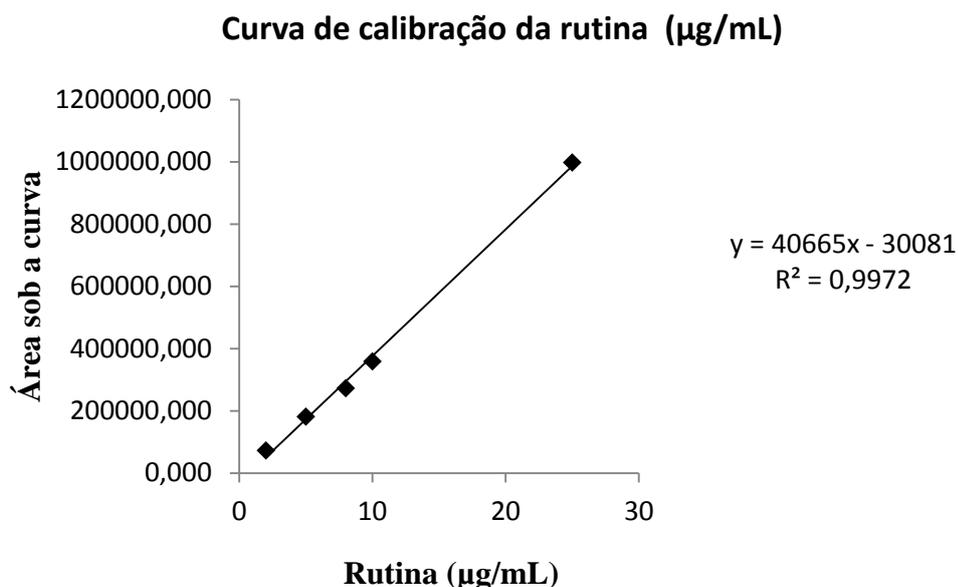


Figura 51. Curva analítica de rutina obtida por CLAE-DAD para quantificação de FFB 3% liberado e presente no meio receptor

De acordo com o recomendado pela legislação, o coeficiente de correlação linear apresentou um valor $r^2 = 0,9972$, demonstrando linearidade da faixa de trabalho 25 $\mu\text{g/mL}$ a 2 $\mu\text{g/mL}$. O cálculo final da concentração da fração liberada foi realizado pela proporcionalidade das concentrações de FFB 3% obtidas no meio receptor nos tempos avaliados, utilizando-se como biomarcador o flavonoide rutina. O resultado foi exibido como porcentagem de FFB3% liberada (**Figura 52**).

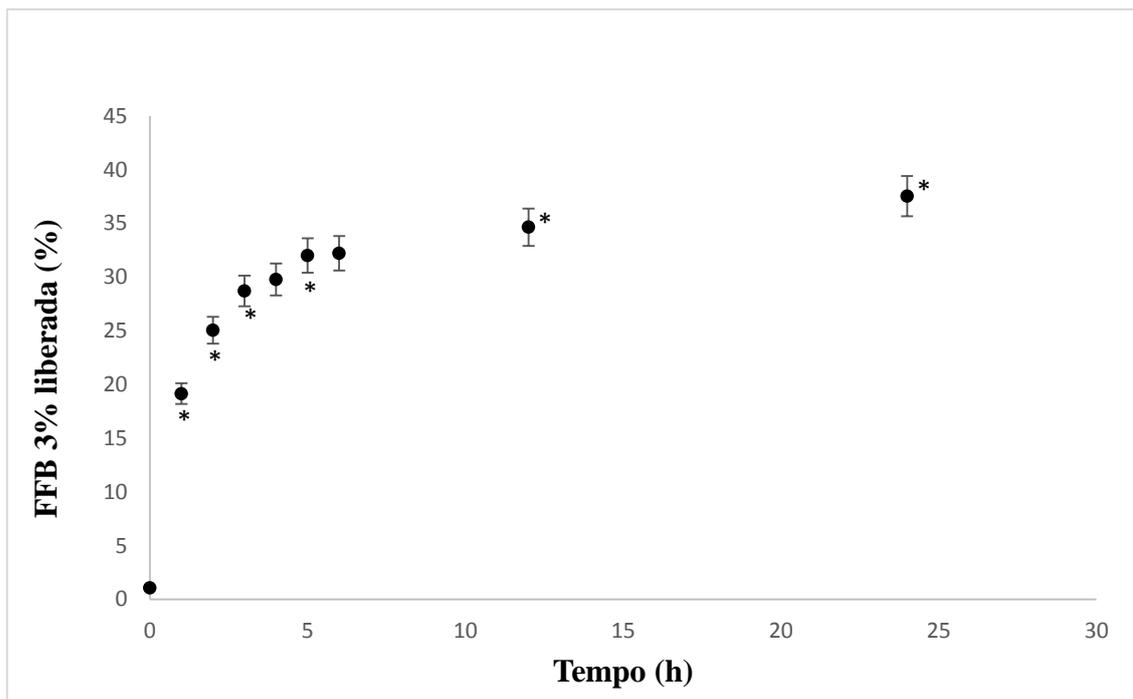


Figura 52. Porcentagem de FFB 3% liberada ao longo do tempo utilizando como biomarcador o flavonoide rutina.

*Diferença significativa $p < 0,05$

De acordo com o demonstrado na **Figura 52**, pode-se observar que a porcentagem de FFB 3% liberada em cada tempo isolado seguiu uma proporção similar, ou seja, a quantidade liberada aumentou com o passar das horas. Na análise estatística realizada observou-se diferença significativa de concentração de FFB 3% entre quase todos os tempos avaliados, exceto entre o intervalo de tempo entre 3 e 4 horas, que não demonstraram diferença significativa na concentração de fração no meio receptor, o mesmo ocorreu para o intervalo entre 5 e 6 horas. Apesar de ter sido constatada a liberação de FFB 3% pela micela no meio receptor, a quantidade liberada foi muito pequena já que no tempo de 1 hora houve uma liberação de $1,45 \mu\text{g/mL}$ (19,1%) na quantificação do biomarcador rutina e no tempo de 24 horas a liberação total foi de $2,85 \mu\text{g/mL}$ (37,5%), frente ao teórico esperado de $7,6 \mu\text{g/mL}$ de rutina em 1 mL de meio receptor, caso houvesse uma liberação de 100%. O ensaio de liberação *in vitro* seguiu os parâmetros de linearidade testados, e as quantificações realizadas ficaram dentro dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados. O teste de diálise garantiu também as condições *sink* durante a liberação, já que não houve saturação do meio receptor, calculados através do teste de solubilidade.

A escolha da FFB 3% para o ensaio de liberação *in vitro* foi baseada na informação que com o aumento do teor de polímero na formulação, menor é a taxa de difusão do fármaco para o meio receptor. Diante disso, a FFB 3% contém uma menor quantidade de polímero quando comparada à FFB 10%, ademais a FFB 3% contém uma concentração maior da fração BuOH incorporada.

Uma possível explicação para a pequena porcentagem de liberação de FFB 3% da micela pode ser devido a composição da fração BuOH e a composição do Pluronic® F127. Os flavonoides glicosilados presentes na fração escolhida apresentam muitas hidroxilas livres, como o F127 contém cerca de 70% de óxido de etileno (**Figura 5**), pode-se sugerir que as hidroxilas livres dos flavonoides se ligaram fortemente ao óxido de etileno presente no F127 através de ligações de hidrogênio, resultando no aprisionamento dos flavonoides dentro da micela, o que contribuiu para sua baixa taxa de liberação (ALMEIDA *et al.*, 2012). O resultado obtido corrobora com o encontrado na literatura, pois no estudo realizado por Chuacharoen e Sabliov, 2016, o fármaco testado apresentou interações com as cadeias poliméricas do F127, o que resultou no retardo da liberação *in vitro*.

Wang e colaboradores, 2016, demonstraram que ao alterar o comprimento da região da coroa das micelas poliméricas, altera-se a capacidade de solubilização das mesmas, modulando o comportamento da liberação *in vitro* das micelas.

5.8. Avaliação da atividade citotóxica

Para a avaliação da citotoxicidade, no presente trabalho foram utilizadas células das linhagens T24 (células tumorais) e MRC-5 (células normais). O EEB e as frações foram testados *in natura*, bem como as formulações FFB 10% e FFB 3%. Foram avaliados também dois flavonoides puros, a rutina e a quercetina.

O resultado da avaliação da citotoxicidade do EEB e das frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH em células da linhagem T24, 24 horas pós-tratamento, são mostrados na **Figura 53**.

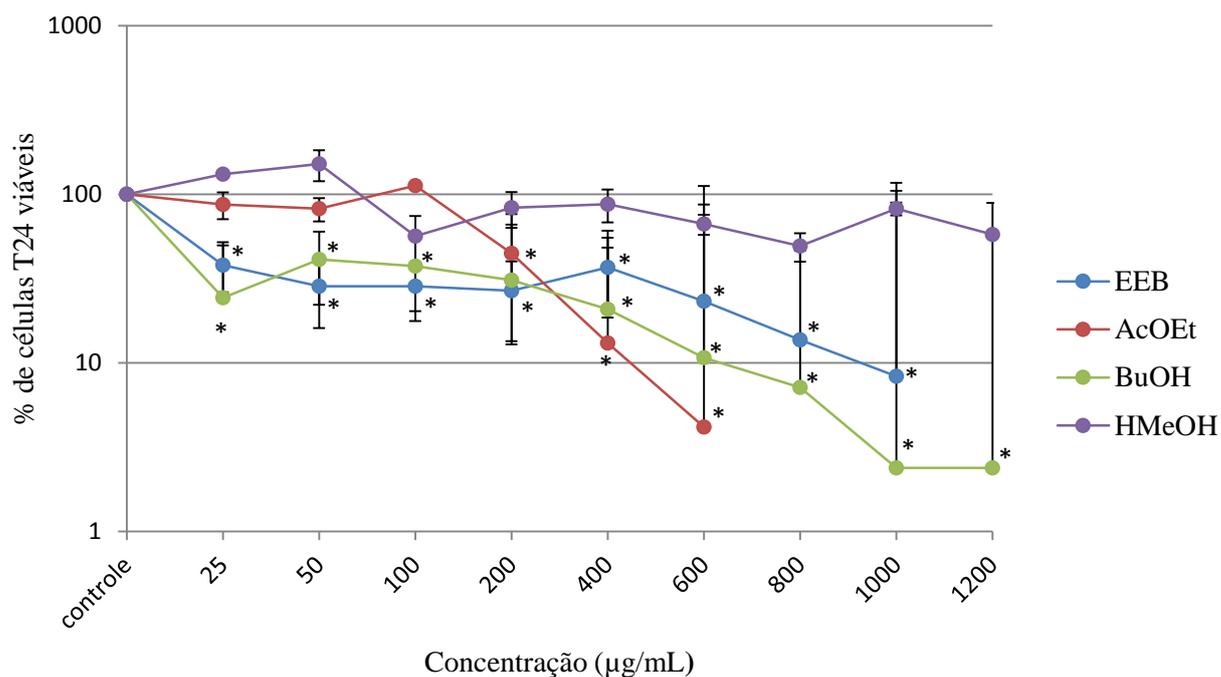


Figura 53. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com o EEB e as frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.

*Diferença significativa $p < 0,05$

De acordo com o exposto na **Figura 53**, houve redução significativa da viabilidade das células T24 tratadas com o EEB em todas as concentrações testadas. A fração F-AcOEt reduziu significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 200 µg/mL. A fração F-BuOH apresentou resultados semelhantes ao EEB, havendo diferença significativa na redução da viabilidade celular nas células T24 tratadas em todas as concentrações testadas. Por outro lado, a fração F-HMeOH, quando comparada aos outros grupos testados, não reduziu a viabilidade celular.

Na **Figura 54** são apresentados os resultados da avaliação da citotoxicidade do EEB e das frações em células da linhagem MRC-5, 24 horas pós-tratamento.

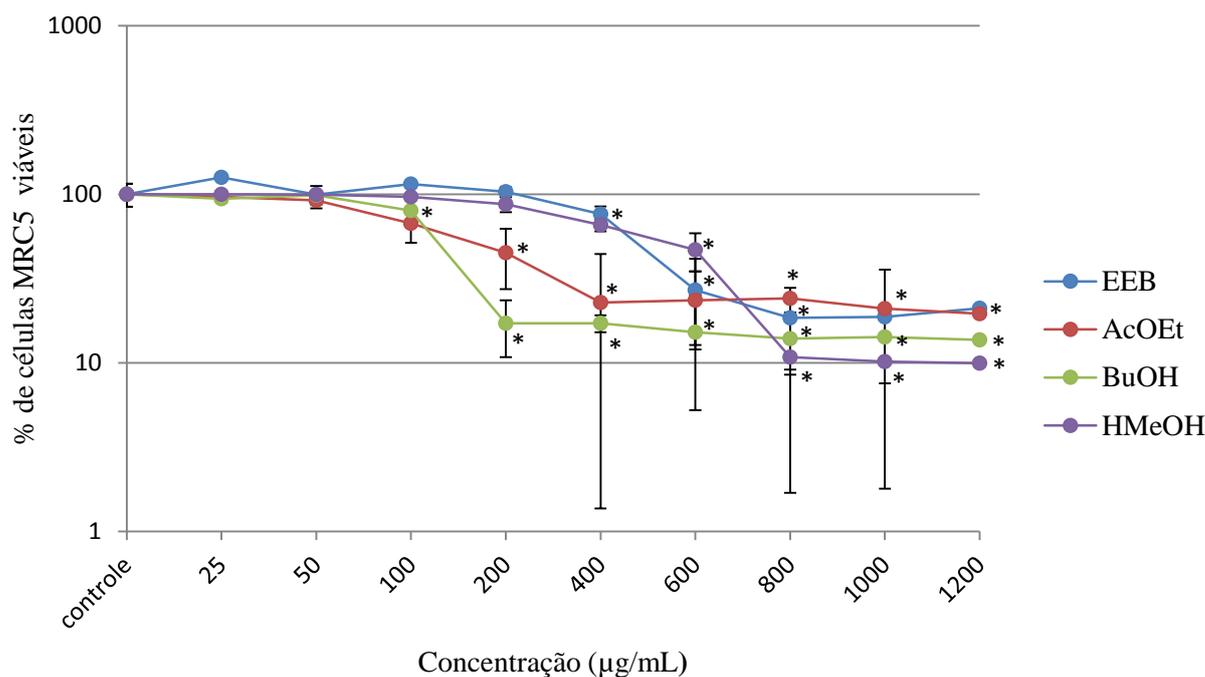


Figura 54. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem MRC-5, 24 horas após o tratamento com o EEB e as frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.

*Diferença significativa $p < 0,05$

Para a linhagem MRC-5 foi observada uma redução significativa da viabilidade nas células tratadas com o EEB e a fração F-BuOH em concentrações superiores às aquelas apresentadas na linhagem T24. Enquanto nas células da linhagem T24, o EEB e a fração F-BuOH apresentaram redução significativa na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, na linhagem celular MRC-5, o EEB reduziu significativamente a viabilidade celular a partir da concentração 400 µg/mL, e a fração F-BuOH a partir de 100 µg/mL. Células MRC-5 tratadas com a fração F-AcOEt apresentaram redução significativa da viabilidade a partir de 100 µg/mL, enquanto nas células da linhagem T24, a menor concentração que apresentou a redução na porcentagem de células viáveis foi a 200 µg/mL. O comportamento da fração F-HMeOH apresentou-se parecido na linhagem MRC-5 quando comparado a linhagem T24, até a concentração de 200 µg/mL, sem haver redução da viabilidade celular. Entretanto, a partir de 400 µg/mL, houve diferença significativa para a linhagem MRC-5.

Os resultados apresentados demonstram que o EEB e a fração F-BuOH foram os que apresentaram seletividade, ou seja, nas menores concentrações (25 e 50 µg/mL) foram tóxicos

para as células tumorais, mas não apresentaram toxicidade para as células normais. Esse resultado demonstra-se promissor, já que a fração BuOH é a fração mais rica em flavonoides, conforme demonstrado nos resultados anteriores. As frações F-AcOEt e F-HMeOH não apresentaram seletividade nas menores concentrações, por isso não foram selecionadas para serem testadas nas formulações micelares. A busca por novos medicamentos contra o câncer baseia-se principalmente na seletividade da citotoxicidade, já que o fármaco ideal é aquele que nas menores concentrações apresenta ação contra as células tumorais, mas não tem efeito em células sadias. Assim, o EEB e a fração F-BuOH apresentaram os resultados mais promissores.

De acordo com os resultados obtidos foram calculados o IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o número de células em cultura) e o índice de seletividade (IS) do EEB e das frações, **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de IC₅₀ para fibroblastos de pulmão humano MRC-5 e células de carcinoma urotelial T24 e seus respectivos índices de seletividade (IS).

	MRC-5	T24	
	IC ₅₀	IC ₅₀	IS
	µg/mL		
EEB	859,98	23,33	36,86
F-BuOH	418,4	21,57	19,39
F-AcOEt	230,2	209,5	1,09
F-HMeOH	575,84	1217,7	0,47

IC₅₀ = Concentração capaz de inibir em 50% o número de células em cultura.

IS = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ T24

O índice de seletividade (IS) do EEB e das frações foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ encontrado para células normais (MRC-5) sobre o IC₅₀ das células tumorais (T24). Quanto maior o valor de IS, significa que o extrato ou a fração analisada é mais ativa contra a linhagem tumoral e menos citotóxica para a linhagem normal. Considera-se como um promissor candidato antitumoral, a substância que apresentar um IS > 3 (CHELOPO *et al.*, 2013). Dessa forma, observa-se de acordo com a **Tabela 11**, que o EEB e a F-BuOH foram os que apresentaram índice de seletividade superiores a 3, ou seja, foram mais ativos nas células tumorais do que nas células normais.

Apesar do EEB ter apresentado resultados satisfatórios, ele não foi objeto de estudo para as formulações, já que seu teor de flavonoides foi menor que o apresentado pela fração F-BuOH, de acordo com os resultados apresentados anteriormente. Ademais, o EEB contém outros compostos como ácidos fenólicos, ceras e pigmentos que podem influenciar na sua atividade biológica. Como o objetivo do estudo é avaliar a atividade citotóxica dos flavonoides, escolheu-se a fração mais enriquecida para ser formulada já que contém a maior quantidade de compostos ativos. De acordo com Gadéa, 2008, sugere-se que a presença de atividade biológica nas frações provenientes do EEB de compostos vegetais ocorre justamente devido a maior concentração dos compostos ativos.

Nos resultados encontrados por Kšonžeková e colaboradores, 2016, para o extrato hidroalcolico de frutos de *S. nigra*, as concentrações testadas de 50, 100, 200 e 400 µg/mL não apresentaram redução significativa na viabilidade celular pelo teste de MTT para a linhagem IPEC-1 (células epiteliais intestinais de suínos). Adicionalmente foi reportado que após 24h de tratamento, o extrato de *S. nigra* não exerceu citotoxicidade nas concentrações testadas, sem apresentar diferença na redução da viabilidade celular.

Dessa forma, os resultados encontrados no presente trabalho para a fração F-BuOH apresentam-se promissores, já que na menor concentração testada (25 µg/mL) houve uma redução significativa da viabilidade celular, destacando que a fração testada por ser a mais rica em flavonoides, possui potencial citotóxico considerável, uma vez que sua toxicidade foi bastante representativa para as células T24 (tumerais) e ao mesmo tempo não se apresentou citotóxica para células saudáveis (MRC-5).

A fim de se averiguar que a atividade da fração F-BuOH está intimamente ligada a alta concentração de flavonoides presentes na mesma, foram testados os padrões puros de rutina e quercetina. A rutina foi identificada no presente trabalho e quantificada na fração F-BuOH, a qual apresentou altas concentrações do referido flavonoide. O padrão de quercetina também foi avaliado pois apesar de não ter sido identificado na fração, dados da literatura demonstram que as flores de *S. nigra* são ricas em quercetina (CLAPE & ALFONSO, 2011; MATTE & MATA; 2015).

A **Figura 55** apresenta os resultados da avaliação da citotoxicidade dos flavonoides rutina e quercetina em células da linhagem T24, 24 horas pós-tratamento.

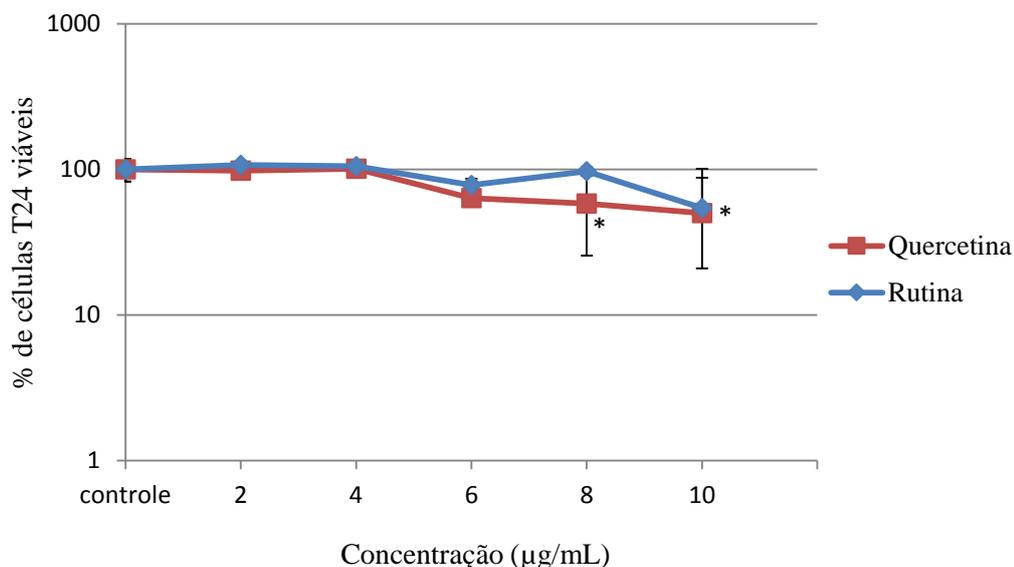


Figura 55. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com os padrões puros de rutina e a quercetina. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.

*Diferença significativa $p < 0,05$

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5%, e demonstram diferença significativa na redução da viabilidade celular da linhagem T24 nas maiores concentrações testadas. A quercetina apresentou redução na porcentagem de células viáveis nas concentrações de 8 µg/mL e 10 µg/mL, já a rutina apresentou atividade significativa somente na maior concentração (10 µg/mL). Os resultados encontram-se de acordo com a atividade apresentada pela fração F-BuOH na concentração de 25 µg/mL, pois de acordo com o resultado da quantificação de rutina na fração, há 9,4 µg/mL de rutina em 25 µg/mL de fração F-BuOH, ou seja, a rutina como composto majoritário, juntamente aos outros flavonoides presentes na fração, indicam ser os possíveis responsáveis pela atividade citotóxica apresentada.

A vantagem de se utilizar frações enriquecidas ao invés de substâncias puras está ligada à concentração utilizada, já que as frações por terem maiores quantidades de compostos atuando juntamente na redução da viabilidade celular, permite a administração de menores concentrações, quando comparadas com a substância pura.

De acordo com o encontrado por Curti e colaboradores, 2017, a quercetina exerce atividade pró-apoptótica em células cancerosas através da modulação das vias envolvidas na proliferação e morte celular de uma maneira dose dependente. Nos estudos realizados por

Borska e colaboradores, 2012, foi relatado que a quercetina inibiu a expressão de P-gp, uma proteína amplamente expressa em células cancerosas.

A literatura relata que os flavonoides como a rutina e a quercetina agiram como pró-oxidantes em certas concentrações, esgotando os sistemas de defesa antioxidantes, levando ao dano oxidativo do DNA, por consequência exercendo sua atividade citotóxica (CARIDDI, *et al.*, 2012).

Além disso, estudos realizados por Srivastava e colaboradores 2016 reforçam a atividade antitumoral dos flavonoides, já que no referido estudo camundongos portadores de tumores ao serem tratados com quercetina apresentaram redução no tamanho do tumor, através da indução da via intrínseca da apoptose, além de aumento da sobrevivência e efeitos colaterais mínimos.

Com os resultados obtidos, verificou-se que os flavonoides presentes na fração BuOH podem ser os responsáveis pela atividade citotóxica observada nas células da linhagem T24. Além da atividade relatada, a fração apresentou seletividade e alto teor na dosagem de flavonoides totais, por isso foi a escolhida para ser incorporada na formulação de Pluronic®.

Desta forma após a obtenção das formulações FFB 10% e FFB 3%, ambas foram avaliadas em relação à sua atividade citotóxica. Como a fração BuOH apresentou redução na viabilidade celular a partir da concentração mais baixa, um intervalo menor de concentrações foi escolhido para ser testado (25 µg/mL a 600 µg/mL). A **Figura 56** apresenta os resultados da avaliação da citotoxicidade da formulação FFB 10% em células da linhagem T24, 24 horas pós-tratamento.

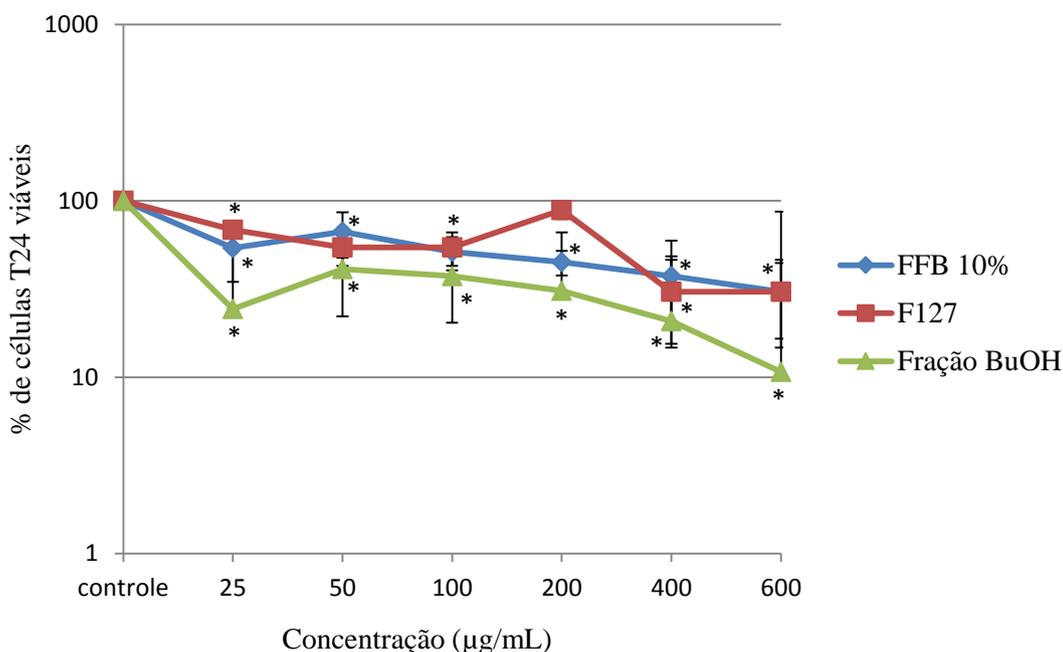


Figura 56. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com a FFB 10%. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. *Diferença significativa $p < 0,05$

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 56**, pode-se observar que todas as concentrações testadas de FFB 10% apresentaram redução da viabilidade celular. Em contrapartida, a formulação de F127 pura, sem a incorporação da fração F-BuOH, também apresentou redução da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, exceto na concentração de 200 µg/mL. Ainda é possível avaliar que mesmo que a FFB 10% tenha apresentado redução significativa na porcentagem de células viáveis, a fração F-BuOH *in natura* obteve resultados melhores, pois na menor concentração (25 µg/mL), a redução do número de células viáveis foi maior que a apresentada pela FFB 10%.

A atividade reduzida da FFB 10% quando comparada à fração F-BuOH *in natura* pode ser explicada devido ao possível aprisionamento da fração às cadeias poliméricas do F127, conforme demonstrado e discutido no ensaio de liberação *in vitro*.

O F127 10% pode ter apresentado diferença significativa na redução da viabilidade celular, pois na literatura há relatos de que os polímeros Pluronic® F127 e o Pluronic® P 85 quando associados a outros compostos apresentaram atividade citotóxica superior em comparação com a droga livre. Os polímeros citados aumentaram os níveis de genes pró-

apoptóticos em ratos portadores de tumor e impediram a ativação da defesa celular anti-apoptótica *in vitro* (BATRAKOVA & KABANOV, 2008).

Adicionalmente, estudos realizados por Rapoport e colaboradores 2003 demonstraram que micelas contendo 10% de polímero Pluronic® sem fármacos incorporados apresentaram ação citostática, na qual houve 56% de inibição do crescimento celular, o que impediu efetivamente a proliferação celular.

De acordo com os resultados apresentados para a formulação FFB 10%, foi realizada a avaliação da atividade citotóxica da FFB 3%, que apresenta uma concentração superior de fração BuOH incorporada, e também uma porcentagem menor do polímero F127. Os resultados da avaliação da citotoxicidade da formulação FFB 3% em células da linhagem T24, 24 horas pós-tratamento são apresentados na **Figura 57**.

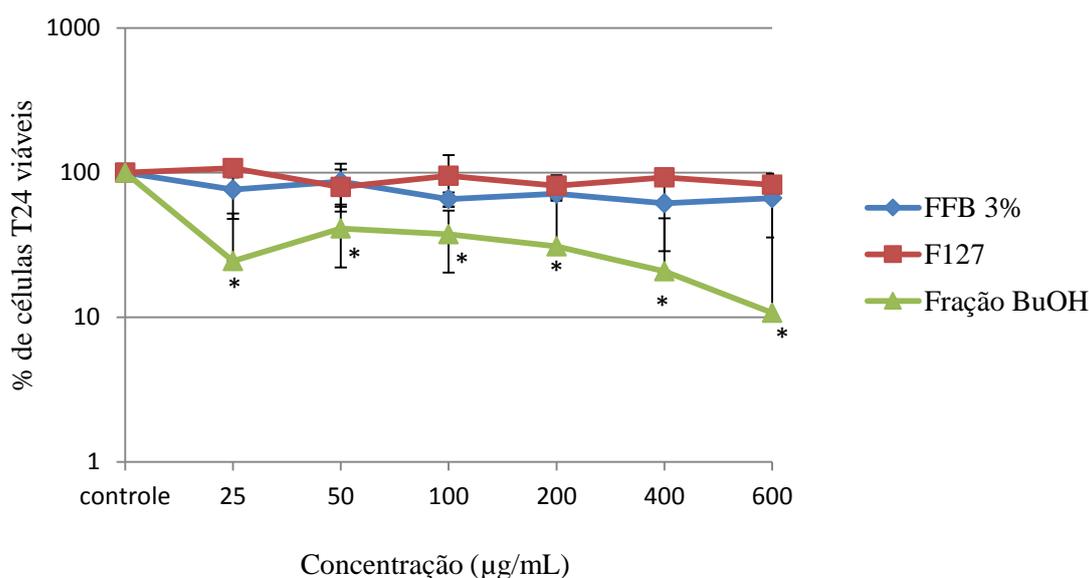


Figura 57. Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com a FFB 3%. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.

*Diferença significativa $p < 0,05$

Somente a fração F-BuOH reduziu significativamente a viabilidade celular. Tanto a FFB 3% quanto o F127 3% puro, sem a incorporação da fração F-BuOH, não apresentaram diferença significativa na redução de células viáveis, de acordo com o demonstrado na **Figura 57**. Os resultados obtidos para a FFB 3% podem ser justificados de acordo com o ensaio de liberação *in vitro*, no qual demonstrou-se que pode ter havido um aprisionamento da fração F-BuOH às

cadeias poliméricas do F127, que gerou sua baixa liberação e consequente falta de atividade biológica no teste de citotoxicidade.

Apesar da FFB 3% conter maior concentração de fração F-BuOH incorporada na micela (4mg/mL) quando comparada a FFB 10% (2 mg/mL), a primeira não apresentou atividade citotóxica, enquanto a segunda apresentou redução na viabilidade celular. Isso pode ser explicado primeiramente devido a pequena porcentagem de liberação da fração F-BuOH, conforme relatado no ensaio de liberação *in vitro*. Adicionalmente, conforme encontrado na literatura e citado anteriormente, somente as micelas de Pluronic® 10% puras apresentaram inibição da proliferação celular, o que pode ter ocasionado um efeito sinérgico juntamente à fração F-BuOH incorporada na FBB 10%, que apesar de ter uma concentração menor de fração apresentou redução na porcentagem de células viáveis.

Ao observar os resultados obtidos, nota-se que a associação da fração F-BuOH ao F127 é benéfica para obtenção da atividade citotóxica, apesar das formulações testadas no presente estudo não terem apresentado resultados ideais. É possível perceber que um bom equilíbrio entre a porcentagem de F127 e a fração F-BuOH mais rica em flavonoides pode proporcionar resultados promissores, já que foi comprovado que os flavonoides presentes na fração são os possíveis responsáveis pela atividade biológica apresentada. Ademais, a associação da formulação de F127 com a fração F-BuOH representa uma estratégia nova e promissora para a terapia do câncer, pois tanto os flavonoides quanto o Pluronic® são capazes de exercer efeitos pró-apoptóticos em células tumorais, de modo a reduzir o tamanho de tumores e inibir a proliferação celular.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram obtidos o EEB e suas frações F-AcOEt, F-BuOH e F-HMeOH provenientes de flores de *Sambucus nigra* L. A fração F-BuOH mostrou-se mais concentrada em flavonoides e nela foram identificados 9 compostos dentre eles a rutina, isoquercitrina, isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo e canferol-3-*O*-glicosídeo que encontram-se de acordo com o descrito na literatura para as flores de *S. nigra*. Os flavonoides luteolina-7-*O*-rutinosídeo, luteolina-4'-*O*-rutinosídeo, isoramnetina-7-*O*-rutinosídeo e luteolina-7-*O*-glicopiranosídeo já foram encontrados na família Caprifoliaceae, mas não foram identificados nas flores de *S. nigra*, o flavonoide *selgin 7-O-glucoside* foi identificado pela primeira vez nesta espécie.

Foram preparadas soluções micelares de F127 contendo a fração F-BuOH e estas foram avaliadas juntamente com as frações *in natura* quanto as suas atividades antitumorais utilizando células tumorais de bexiga da linhagem T24 e células normais de fibroblasto de pulmão humano da linhagem MRC-5 para avaliação de seletividade. As formulações foram desenvolvidas utilizando o método de dispersão a frio (DF) e caracterizadas quanto aos testes físico-químicos. De acordo com as análises de tamanho e IP, foram obtidas formulações nanométricas e polidispersas.

A liberação da fração F-BuOH a partir das micelas foi realizada através da utilização do biomarcador rutina, presente nesta fração, que se mostrou altamente concentrada (379,6mg de rutina/g de fração). O ensaio de liberação *in vitro* da FFB 3% através da rutina como biomarcador demonstrou que as micelas liberam a fração em proporção similar e gradualmente ao longo do tempo, mas a quantidade liberada foi muito pequena, devido a uma possível interação dos flavonoides presentes na fração F-BuOH com as cadeias poliméricas do F127.

Na avaliação da citotoxicidade após 24 horas de tratamento, a fração F-BuOH e o EEB foram citotóxicos para as células de T24 nas menores concentrações testadas (25, 50 e 100 µg/mL), mas não reduziram a viabilidade nas células MRC-5 indicando seletividade. Para confirmar que a atividade citotóxica da fração F-BuOH está ligada aos flavonoides presentes, foram testados os flavonoides puros rutina e quercetina, com 24 horas de tratamento em células T24. Os resultados demonstraram que ambos os flavonoides foram citotóxicos para as células tumorais nas maiores concentrações avaliadas.

Na avaliação da citotoxicidade das formulações FFB 10% e FFB 3% contendo a fração BuOH, somente a FFB 10% demonstrou-se citotóxica em todas as concentrações testadas para as células T24. Já a FFB 3% não apresentou redução na viabilidade celular em nenhuma concentração avaliada. Esses resultados indicaram que o aumento da concentração de F127 na formulação potencializou os efeitos citotóxicos da fração F-BuOH.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que os flavonoides possuem papel fundamental na atividade citotóxica, apresentada pela fração F-BuOH, das flores de *S. nigra* L. Entretanto, as soluções micelares atuam conjuntamente para aumentar a ação da fração BuOH nas células tumorais avaliadas, através da ação citostática do polímero Pluronic® F127, conforme discutido nos resultados apresentados.

Neste sentido, esse estudo abriu perspectivas para estudos futuros investigativos e de entendimento do mecanismo de ação tanto de frações enriquecidas quanto de substâncias isoladas.

Sendo assim, tornam-se promissores futuros estudos abordando a fração F-BuOH juntamente com a formulação desenvolvida, na geração de uma nova forma de tratamento para o tumor de bexiga.

8. REFERÊNCIAS

AKDEMIR, Z.S.; TATLI, I.I.; BEDIR, E.; KHAN, I.A. Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. **Journal of Pharmaceutical Sciences (FABAD)**, v. 28, p. 71-75, 2003.

ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Comparative study of sustained-release lipid microparticles and solid dispersions containing ibuprofen. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.2, p.199 – 207, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A., REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 118-129, 2005.

ALVES, A. M. Caracterização física e química, compostos bioativos e capacidade antioxidante de frutas nativas do cerrado. 2013. 65 f. Dissertação de Mestrado – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

AMPARO, T. R. Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. 2016. Dissertação de Mestrado – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Cipharma, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG.

ASSIS, M.L.V. Determinação do Potencial Antioxidante e Quantificação de Compostos Fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. 2014. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ.

AZEVEDO, L. F. P.; FARIA, T. S. A.; PESSANHA, F. F.; ARAUJO, M. F.; LEMOS, G. C. S. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.16, n.2, 2014.

BAO, L.; BAO, X.; LI, P.; WANG, X.; AO, W. Chemical profiling of *Malva verticillata* L. by UPLC-Q-TOF-MSE and their antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.50, p.420-426, 2018.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v.130, p.98–106, 2008.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, C. M.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BONGCHEEWIN, B.; GRAYNER, R. J.; PORTER, E. A.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. J.; INGROUILLE, M. J.; PATON, A. J. A chemosystematic study of the genus *Gomphostemma* and related genera (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.57, p.305-316, 2014.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.5195, 2004.

BORSKA, S.; CHMIELEWSKA, M.; WYSOCKA, T.; DRAG-ZALESINSKA, M.; ZABEL, M.; DZIEGIEL, P. *In vitro* effect of quercetin on human gastric carcinoma: targeting cancer cells death and MDR. **Food and Chemical toxicology**, v.50, p.3375–3383, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

BROMBERG, L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, v.128, p.99-112, 2008.

BUTT, A. M.; AMIN, M. C. I. M.; KATAS, H.; SARISUTA, N.; WITOONSARIDSILP, W.; BENJAKUL, R. *In Vitro* Characterization of Pluronic F127 and D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate Mixed Micelles as Nanocarriers for Targeted Anticancer-Drug Delivery. **Journal of Nanomaterials**, v.2012, p.11, 2012.

Câncer de bexiga: diagnóstico. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 100-101, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acessado em 15 de janeiro de 2018.

CARIDDI, L.; ESCOBAR, F.; SABINI, C.; TORRES, C.; REINOSO, E.; CRISTOFOLINI, A.; COMINI, L.; MONTOYA, S. N.; SABINI, L. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 155–161, 2012.

CARNEIRO, S. P. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas por polimerização *in situ* para tratamento de psoríase. 2013. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto – MG.

CHANG C., YANG M., WEN H., CHERN J. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food Drug Anal.** v.10, p. 178-182, 2002.

CHELOPO, M. P.; PAWAR, S. A.; SOKHELA, M. K.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; MAGUIRE, G. E. M. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.66, p. 407–414, 2013.

CHRISTENSEN, K.B.; PETERSEN, R.K.; KRISTIANSEN, K.; CHRISTENSEN, L.P. Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. **Phytotherapy Research**, v.24, p.129–S132, 2010.

CHUACHAROEN, T.; SABLIOV, C. M. Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.503, p.11–18, 2016.

CIRIC, A.; JELIKIC-STANKOV, M.; CVIJOVIC, M.; DJURDJEVIC, P. Statistical optimization of an RP-HPLC method for the determination of selected flavonoids in berry juices and evaluation of their antioxidant activities. **Biomedical Chromatography**. 2017.

CLAPE, L. O.; ALFONSO, C. A. Caracterización fármaco-toxicológica de la planta medicinal *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (L). **Revista Cubana de Farmacia**, v.45, n.4, p. 586-596, 2011.

CUNHA, C. P. Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides. 2013. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Rio de Janeiro.

CURTI, V.; LORENZO, A. D.; DACREMA, M.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. **Seminars in Cancer Biology**, v.46, p.119–131, 2017.

DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p.308–315, 2006.

DOU, LI-LI.; DUAN, L.; GUO, L.; LIU, LE-LE.; ZHANG, YU-D.; LI, P.; LIU E-HU. An UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of quercetin 3-*O*-rutinoside, kaempferol 3-*O*-rutinoside, isorhamnetin 3-*O*-rutinoside, bilobalide and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic study of Xingxiong injection. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.15, n.9, p.0710-0720, 2017.

DOURADO, R. S.; LADEIRA, A. M. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Botânica.**, v.31, n.4, p.611-620, 2008.

D'SOUZA, S. A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p.12, 2014.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J.L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J.C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, V. 23, p. 2709-2728, 2006.

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª edição. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA 2010**, volume 2.

FENGBIN Y.; YAGHMUR, A.; JENSEN, H.; LARSEN, S. W.; LARSEN, C.; ØSTERGAARD, J. Real-time UV imaging of drug diffusion and release from Pluronic F127 hydrogels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, p.236–243, 2011.

FIGUEIREDO, J.; FORONES, A. G.; MANOUKIAN, N. Study on adherence to capecitabine among patients with colorectal cancer and metastatic breast cancer. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 186-191, 2014.

FONTES, A.P.S.; CESAR, E.T.; BERBALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. Química Nova na Escola. **Química Inorgânica e Medicina**, nº 06, São Paulo, julho 2005.

GÁDEA, S. F. M. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e suas frações de *glischrothamnus ulei* (molluginaceae) do semi-árido baiano. 2008. Dissertação de Mestrado – 2013. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA.

GLEICHENHAGEN, J.; ARNDT, C.; CASJENS, S.; MEINIG, C.; GERULLIS, H.; RAIKO, I.; BRÜNING, T.; ECKE, T.; JOHNEN, G. Evaluation of a New Survivin ELISA and UBC® Rapid for the Detection of Bladder Cancer in Urine. **International Journal of Molecular Science**. v. 19, n.1, p. 226, 2018.

GOODIN, S., GRIFFITH, N., CHEN, B., CHUK, K., DAOUPHARS, M., DOREAU, C., MEIER, K. Safe Handling of Oral Chemotherapeutic Agents in Clinical Practice: Recommendations From an International Pharmacy Panel. **Journal of Oncology Practice**, v.7 p.7-12, 2011.

GRANATO, A. C.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; SELEGHIM, M. H. R; BERLINCK, R. G. S.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. & CAVALCANTI, B. C. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v.28, n.2, p.192-198, 2005.

HADASCHIK, B. A.; ADOMAT, H.; FAZLI, L.; FRADET, Y.; ANDERSEN, R. J.; GLEAVE, M. E., ALAN, I. Intravesical chemotherapy of high-grade bladder cancer with HTI-286, a synthetic analogue of the marine sponge product hemiasterlin. **Clinical Cancer Research**, v.14, n.5, p.1510-1518, 2008.

HARPUT, U. S.; GLU, I. S.; OGIHARA, Y. Methoxyflavonoids from *Pinaropappus roseus*. **Turkish Journal of Chemistry**, v.28, p.761, 2004.

HO, G. T. T.; WANGENSTEEN, H.; BARSETT, H. Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW 264.7 Macrophages and Dendritic Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.3, p.584, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2016*: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>> Acessado em 15 de janeiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2018*: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018>> Acessado em 15 de março de 2018.

JARZYCKA, A. A.; SKA, B. A. L.; GANCARZ, R. A.; WILK, K. A. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.128, p.50–57, 2013.

KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, n.1, p.1–73, 2002.

KARABIN, M.; HUDCOVA, T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1063– 1090, 2015.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, n.1, p.113-131, 2001.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v.62, p.229–237, 2003.

KŠONŽEKOVÁ, P.; MARIYCHUK, R.; ELIASOVA, A. *In vitro* study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.1093–1100, 2016.

LÁZARO, M. L. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.9, p.31-59, 2009.

- LEUNGA, H. W. C.; WUB, C. H.; LINC, C. H.; LEE, H. Z. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v.508, p.77– 83, 2005.
- LI, J.; JIANG, K.; WANG, L. J.; YIN, G.; WANG, J.; WANG, Y.; JIN, Y. B.; LI, Q.; WANG, T. J. HPLC-MS/MS determination of flavonoids in *Gleditsiae Spina* for its quality assessment. **Journal of separation Science**, 2018.
- LI, Z.; CAI, Y.; ZHAO, Y.; YU, H.; ZHOU, H.; CHEN, M. Polymeric mixed micelles loaded mitoxantrone for overcoming multidrug resistance in breast cancer via photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.6595-6604, 2017.
- LOPES, M.; NASCIMENTO, C. L.; ZAGO, F. M. M. Paradoxo da vida entre sobreviventes do câncer de bexiga e tratamentos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 2, 2016.
- MANGANELLI, R.E.U.; ZACCARO, L.; TOMEI, P.E. Antiviral activity *in vitro* of *Urtica dioica* L. *Parietaria diffusa* M. and *Sambucus nigra* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n.3, p. 323-27, 2005.
- MARIA, M.; DUDEK, D.; TONETE, T.; JORGE, T.; SANCHES, A. Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Hamamelis virginiana* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. **Visão Acadêmica**, v.11, n.22, 2011.
- MARIN, P. D.; GRAYER, R. J.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; KITE, G. C.; VEITCH, N. C. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. **Phytochemistry**, v.65, p. 1247, 2004.
- MATTE, A. K.; A.K. A.R.; MATA, P.T.G. Phytochemical screening and evaluation of the antibacterial activity of *Sambucus nigra* L. flower extracts (Caprifoliaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.4, n.17, p.1049-1054, 2015.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; IVANCIC, A.; SCHMITZER, V.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F. Comparison of major taste compounds and antioxidative properties of fruits and flowers of different *Sambucus* species and interspecific hybrids. **Food Chemistry**, v.200, p.134-40, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acessado em 15 de janeiro de 2018.

NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do ácido poli(D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, p.504–511, 2005.

NETO, F.C. Sabugueiro: suas potencialidades. **Direção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes e Alto Douro, Mirandela**. Folheto 15 , 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NITA, L. E.; CHIRIAC, A. P.; BERCEA, M.; NISTOR, M. T. Static and dynamic investigations of poly (aspartic acid) and Pluronic F127 complex prepared by self-assembling in aqueous solution. **Applied Surface Science**, v.359, p.486–495, 2015.

NUNES, R.S.; SENNA, B.A.A.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.86, n.3, p.87-91, 2005.

OLA, S. S.; CATIA, G.; MARZIA, I.; FRANCESCO, V. F.; AFOLABI, A. A.; NADIA, M. HPLC/DAD/MS characterization and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetable. **Food Chemistry**, v.155, p. 1568-1574, 2009.

OLIVEIRA, R. P. C. M.; ABRANTES, C. F. C.; SILVA, E. M. C. T.; MARINHO, C. A.; SOUSA, V. M. L.; CASTRO, L. R. C. O. A. P. Invasive bladder urothelial carcinoma, plasmacytoid variant: case report. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.52, n.4, p.262 – 265, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS, 2017). *OMS: Câncer mata 88 milhões de pessoas anualmente no mundo*. Disponível em: [https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no mundo/](https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/). Acessado em 15 de janeiro de 2018.

PLAZONI, A.; BUCAR, F.; MALEŠ, Ž.; MORNAR, A.; NIGOVI, B.; KUJUNDŽI, N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos*), using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.14, p.2466–2490, 2009.

PEREIRA, A. C.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CAVALHEIRO, A. J.; CARVALHO, D. A.; SOUZA, L. P.; CHALFOUN, S. M. Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, n.3, p.427-432, 2008.

PETKOVA-OLSSON, Y.; ALTUN, S.; ULLSTEN, H.; JÄRNSTRÖM, L. Temperature effect on the complex formation between Pluronic F127 and starch. **Carbohydrate Polymers**, v.166, p. 264-270, 2017.

RAFAEL, D.; MARTINEZA, F.; ANDRADE, F.; SERAS-FRANZOSO, J.; GARCIA-ARANDA, N.; GENERA, P.; SAYÓS, J.; ARANGO, D.; ABASOLO, I.; SCHWARTZ JR. S. Efficient EFGR mediated siRNA delivery to breast cancer cells by Cetuximab functionalized Pluronic® F127/Gelatin. **Chemical Engineering Journal**, 2018.

RAMOS S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.427–42, 2007.

RAPOPORT, N.; PITT, W. G.; SUN, H.; NELSON, J. L. Drug delivery in polymeric micelles: from *in vitro* to *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v.91, p.85–95, 2003.

RISSI, N.C. Correlação entre estrutura e propriedades de sistemas líquidos cristalinos para a liberação prolongada de fármacos. 2013. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara – SP.

ROCHE Molecular Biochemicals/Mannheim, DE. **Cell Proliferation Kit II**, Roche Diagnostics, version 2005.

SAEED, M.; REN, W.; WU, A. Therapeutic applications of iron oxide based nanoparticles in cancer: basic concepts and recent advances. **Biomaterials Science**, 2018.

SÁEZ, V.; HERNÁEZ, E.; ÂNGULO, L.S.; KATIME, I. Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.5, n.2, 2004.

SAIT, S.; HAMRI-ZEGHICHI, S.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MADANI, K.; RIGOU, P.; BRIGHENTI, V. HPLC-UV/DAD and ESI-MSⁿ analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: *Paronychia argentea* Lam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.111, p. 231-240, 2015.

SÁVIO, A. L. V.; SILVA, G. N.; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutation Research**, v.762, p.40–46, 2014.

SCOPEL, M.; NUNES, E.; SILVA, M. V.; VENDRUSCOLO, G. S.; HENRIQUES, A. T.; MENTZ, L. A. Caracterização farmacobotânica das espécies de *Sambucus* (Caprifoliaceae) utilizadas como medicinais no Brasil. Parte I. *Sambucus nigra* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p. 249-261, 2007.

SENICA, M.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; PETKOVSEK, M. The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, p. 2623–2632, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: UFSC, 2001.

SOHN, S. J.; KWON, Y. S.; KIM, S. S.; CHUN, W. J.; KIM, C. M. Chemical constituents of the leaves of *Staphylea bumald*. **Natural Product Sciences**, v.10, p.173–176, 2004.

SRIVASTAVA, S.; SOMASAGARA, R.R.; HEGDE, M. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Scientific Reports**, v.6, p.24049, 2016.

TATINI, D.; TEMPESTI, P.; RIDI, F.; FRATINI, E.; BONINI, M.; BAGLIONI, P. Pluronic/gelatin composites for controlled release of actives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.135, p.400–407, 2015.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p. 100-105, 2007.

THOMAS, A. T.; RAO, J. V.; SUBRAHMANYAM, V. M.; CHANDRASHEKHAR, H. R.; MALIYAKKAL, N.; KISAN, T. K.; JOSEPH, A.; UDUPA, N. *In vitro* anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.2, p.279 – 287, 2011.

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.7241–7248, 2009.

TYAGI, P.; SUBRAMONY, J. A. Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery: Key learnings and future outlooks as we think small. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p.159–168, 2018.

VALLČS, J.; BONET, M. Ā.; AGELET, A. Ethnobotany of *Sambucus nigra* L. in catalonia (Iberian Peninsula): The integral exploitation of a natural resource in mountain regions. **Economic Botany**, v. 58, n. 3, p. 456-469, 2004.

VIAPIANA, A.; WESOLOWSKI, M. The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.72, p.82–87, 2017.

VILLANOVA, J. C. O., OREFICE, R. L. & CUNHA, A. S. Pharmaceutical applications of polymers. **Revista Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, n.1, p.51- 64, 2010.

WANG, P.; WANG, Q.; REN, T.; GONG, H.; GOU, J.; ZHANG, Y.; CAI, C.; TANG, X. Effects of Pluronic F127-PEG multi-gel-core on the release profile and pharmacodynamics of Exenatide loaded in PLGA microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 360–367, 2016.

WILLEMS, J. L.; LOW, N. H. Structural identification of compounds for use in the detection of juice-to-juice debasing between apple and pear juices. **Food Chemistry**, v.241, p.346–352, 2018.

YANG, X.; ZHAO, L.; LI, M.; YAN, L.; ZHANG, S.; MI, Z.; REN, L.; XU, J. Lidocaine enhances the effects of chemotherapeutic drugs against bladder cancer. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.598, 2018.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó-SC, **Argos-Editora Universitária UNOESC-Campus Chapecó**, 2001.

ZHANG, L., KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v.43, n.7, p.2956-2966, 2007.

ZHANG, M.; DJABOUROVB, M.; BOURGAUXA, C.; BOUCHEMAL, K. Nanostructured fluids from pluronic® mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v.454, p.599– 610, 2013.

ZHANG, W.; XU, M.; YU, C.; ZHANG, G.; TANG, X. Simultaneous determination of vitexin-4-O-glucoside, vitexin-2-O-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC–ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v.878, p.1837–1844, 2010.

ZHOU, Y.; HUANG, F.; YANG, Y.; WANG, P.; ZHANG, Z.; TANG, Y.; SHEN, Y.; WANG, K. Paraptosis-Inducing Nanomedicine Overcomes Cancer Drug Resistance for a Potent Cancer Therapy. **Journal: Small**, 2018.

9. ANEXOS

ANEXO I - Dados do fornecedor da planta *Sambucus nigra* L.

A3E7C8F - Número do cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

SABUGUEIRO (RASURA)	
Lote Interno: 0189-IF	
Procedência: Brasil	Origem: Polônia
Fab. 05/2012	Val. 05/2016
Nome Científico: <i>Sambucus nigra</i> L.	
Fabricante: Natural Amazon	Lote Fab: RSAB0001B6/14
Quantidade: 500g	Data Frac: 10/07/2014
Conservação: Armazenar em local seco e arejado, longe de calor e umidade. Em temperatura ambiente.	
RT.: Marina Gomez CRF - SP: 61174	
	NATURELL INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA ME AV. DOM PEDRO I, 957 VL. CONCEIÇÃO - DIADEMA - SP CEP: 09991-000 TEL.: 0800 761 4949 - Fax: 11 4053-2738 R: 738 CNPJ: 62.069.760/0001-02 - I.E: 286.105.606-114 e-mail: naturell@naturell.com.br



Naturell Indústria e Comércio Ltda.
Av. Dom Pedro I, 957 - Vila Conceição
CEP: 09991-000 Diadema - SP

Marina Gomez

Marina Gomez
CRP-SP 61.174
RESP TÉCNICO

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Nome do Produto: SABUGUEIRO RASURADO	
Nome Científico: Sambucus nigra L.	
Lote Interno: 0189-IF	Lote Fabricante: RSAB0001B6/14
Data de Fabricação: 05/2012	Data de Validade: 05/2016
Família Botânica: Caprifoliaceae	Parte Utilizada: Flor
Procedência: Brasil	Origem: Polônia
Irradiação/Esterelização: Houve	

Ensaio	Especificações	Resultados
Caracteres Organolépticas	Flor rasurada de coloração amarela amarronzada, sabor e odor característico.	De acordo
Perda por dessecação	Maximo 11,00%	9,70%
Cinzas Totais	Maximo 9,00%	9,00%
Matéria Estranha	Máximo 2%	Ausente
Bactérias totais	Máximo 10000 UFC/g	De acordo
Fungos e leveduras	Máximo 1000 UFC/g	De acordo
Salmonella SP	Ausente	De acordo
Escherichia Coli	Ausente	De acordo
Staphylococcus Aureus	Ausente	De acordo
Pseudomonas Aeruginosa	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo

APROVADO	DATA: 30/06/2014	CONTROLE DE QUALIDADE
<p>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Método do fabricante, Metodologia interna, Farmacopéia Brasileira 5ª ED. PÁG. 1265. Conservação: Armazenar em local seco e arejado, longe de calor e umidade. Em temperatura ambiente. Observação: A alteração na cor poderá ocorrer por se tratar de produto de origem natural.</p>		