

ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT OBTIDOS POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Denise Taffarello

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900 SP – SP / Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Michelle Pedroza Jorge, Ilza Maria de Oliveira Sousa, Marta Cristina Teixeira Duarte, Glyn Mara Figueira, Nubia de Cassia Almeida Queiroz, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, João Ernesto de Carvalho, Ana Lucia Tasca Ruiz Goes e Mary Ann Foglio*

Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

José Manuel Riveros

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900, SP – SP, Brasil

Marcos Nogueira Eberlin e Elaine Cristina Cabral

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 14/9/12; aceito em 15/10/12; publicado na web em 20/2/13

ACTIVITY OF *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) VERLOT EXTRACTS OBTAINED BY BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES ON FIBROBLAST AND HUMAN TUMOR CELLS. *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot is a plant popularly known as Pariri and this species is a known source of anthocyanins, flavonoids and tannins. This report describes an approach involving enzymatic treatment prior to extraction procedures to enhance *A. chica* crude extract anticancer activity. Anticancer activity in human cancer cell lines *in vitro* using a 48 h SRB cell viability assay was performed to determine growth inhibition and cytotoxic properties. The final extraction yield without enzyme treatment was higher (24.28%) compared to the enzyme-treated material (19.03%), with an enhanced aglycones anthocyanin ratio as determined by HPLC- DAD and LC-MS with direct infusion.

Keywords: *Arrabidaea chica*; xylanases; antiproliferative activity.

INTRODUÇÃO

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Bignoniaceae), encontrada principalmente na Região Amazônica, é popularmente conhecida como cajuru, carajuru, pariri e chica. Quando as folhas são submetidas à fermentação com anileira (*Indigofera* spp) fornecem um corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo, isômero do ácido anísico, insolúvel em água, sendo utilizado pelos índios para pintura do corpo e utensílios.^{1,2} O uso popular de *A. chica* na medicina foi descrito por Pio Correa para o tratamento de leucemia, diarreias sanguinolentas, banho de assento e enfermidades da pele.^{2,3} Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a capacidade cicatrizante do extrato bruto de *A. chica*, com o aumento da produção de fibroblasto, ação tripanocida *in vitro* e atividade antimicrobiana.⁴

Nas folhas de *A. chica* foi relatada a presença de (1) 6,7,3',4'-tetra-hidroxí-5-metoxiflavílio, (2) 6,7,3'-tri-hidroxí-5-metoxiflavílio e a carajurina (3), 6,7-di-hidroxí-5,4'-dimetoxiflavílio (Figura 1) além de fito-esteróis, taninos, flavonoides identificados como 7,4'-di-hidroxí-5-metoxiflavona e 6,3',4'-tetra-hidroxí-5-metoxiflavona (carajuriflavona).⁵ Glicosilxantonas foram isoladas do caule de *A. samydoides* e apresentaram propriedades antioxidantes.⁶

A Biotecnologia é uma atividade baseada em conhecimentos multidisciplinares, que utiliza agentes biológicos para viabilizar a produção de medicamentos, como os antibióticos, bem como resolver problemas com a biorremediação.⁷

O enriquecimento da extração de pigmentos vermelhos pela incubação prévia do material vegetal na presença de xilanases, oriunda

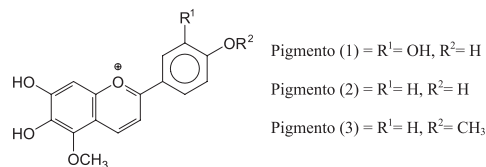


Figura 1. Estrutura química das 3 deoxiantocianinas isoladas de *A. chica* Verlot. (1) (6,7,3',4'-tetra-hidroxí-5-metoxiflavílio), (2) (6,7,4'-tri-hidroxí-5-metoxiflavílio) e carajurina (3) 6,7-di-hidroxí-5,4'-dimetoxiflavílio

de *Bacillus* sp, foi estudado por Kim e colaboradores. A incubação prévia com xilanases de *Bacillus* sp. aumentou o rendimento de extração dos pigmentos em 80% e reduziu o tempo de extração, além de apresentarem diversas atividades farmacológicas.⁸ O interesse pela descoberta de novos antioxidantes seguros de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido à suspeita de atividade como promotores de carcinogênese.⁹

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do processo de fermentação enzimática de folhas de *A. chica* Verlot sobre a atividade farmacológica, empregando-se modelos de atividade anticâncer *in vitro* sobre células tumorais humanas, estímulo de crescimento de fibroblastos e ação antioxidante (DPPH).

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Em 2005 foram introduzidos nove acessos da espécie *Arrabidaea*

*e-mail: foglioma@cpqba.unicamp.br

chica (Humb. & Bonpl.) Verlot, oriundos de diferentes localidades do País (Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará e Amazonas) no campo experimental do CPQBA/Unicamp, localizado no município de Paulínia, Estado de São Paulo. As exsiccatas das plantas foram identificadas pela Dra. G. M. Figueira, estando depositadas no Herbário do CPQBA/Unicamp. Foram coletadas folhas mensalmente para realização de estudos da sazonalidade da espécie. A planta foi seca durante 48 h em estufa, marca Fabbe®, a 40 °C, com ventilação forçada, e posteriormente moída em moinho de facas com peneira de 40 mesh.

Preparo do extrato sem tratamento enzimático

Aproximadamente 100 ± 10 mg de folhas secas e moídas foram extraídas com metanol/ácido cítrico 0,3% (1:5, v/v) a temperatura ambiente, sob agitação constante em agitador oscilatório, em três ciclos de 1 h e 30 min. O extrato foi concentrado utilizando vácuo, protegido da luz. O extrato resultante foi submetido a tratamento por extração em fase sólida (EFS), para eliminação de clorofilas, para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Padronização da extração enzimática

Para padronização do processo foi realizado um planejamento experimental. As 17 amostras de *A. chica* secas e moídas foram submetidas a tratamento enzimático em diferentes condições, variando-se os tempos de incubação em 30, 60, 90, 120 e 150 min e a concentração enzimática de 10 a 13 U mL⁻¹ preparada a partir de caldo bruto de enzima xilanases com 180 U mL⁻¹. O pH das amostras foi mantido em 8,8 e a temperatura de incubação em 60 °C.

Eliminação de clorofilas dos extratos brutos por extração em fase sólida (EFS)

Os extratos produzidos com e sem tratamento enzimático foram submetidos à limpeza, para eliminação das clorofilas, utilizando-se cartucho C-18 marca Strata Phenomenex®, com capacidade de 3 mL, e 100 mg de fase estacionária acoplada em um Manifold, marca J.T. Baker®, sob vácuo, condicionado com 6 mL de solução ácida de H₃PO₄ em pH 2,0, descartando-se essa fração. Em seguida, dissolveu-se o extrato bruto em 2 mL de MeOH grau cromatográfico e adicionou-se ao cartucho C18 condicionado com água acidificada com H₃PO₄ e pH 2,0. Em seguida, eluiu-se o cartucho com aproximadamente 6 mL de MeOH. A fração foi recolhida em balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume até 10 mL, aferindo pelo menisco do balão volumétrico. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm marca Millex® e armazenada em frasco âmbar para análise por CLAE.

Condições cromatográficas

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com bomba Shimadzu®, LC 10 atm acoplada a detector de arranjo de diodos UV-Shimadzu® M10AVP e coluna C18 Gemine-Phenomenex®, de 5 µm 110 Å (250 x 4,6 mm x 5 µm). As condições cromatográficas e gradiente da fase móvel foram de dois solventes denominados A (H₂O + H₃PO₄; pH 2,0 ± 0,10) e B (metanol). Do tempo 0 até 5 min utilizaram-se 55% de A e 45% de B. Na faixa de 5,1 até 20 min diminuiu-se para 10% da mistura A e 90% de metanol. De 20-30 min utilizou-se exclusivamente metanol. A partir de 30 min retomou-se o primeiro gradiente. O volume de injeção foi de 20 µL, vazão de fluxo 1 mL min⁻¹, comprimento de onda 470 nm, utilizou-se forno CTO-10ASVP a 35 °C e software Class VP-5®. Os tempos de retenção dos compostos foram (1) 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio em 7,0-7,5 min; (2) 6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio

em 10,0-10,8 min e (3) carajurina 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio em 17,0-17,9 min.

Avaliação da precisão da extração enzimática

A precisão foi determinada através do teste de repetitividade das extrações com tratamento enzimático, utilizando mesmo método, mesmo analista, mesmo equipamento e laboratório, analisando 6 amostras, conforme resolução da ANVISA.¹⁰ A precisão intermediária foi realizada utilizando mesmo método, número de amostra, equipamento, em dias e analistas diferentes.

Isolamento de 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (carajurina)

A carajurina (3) presente no extrato bruto das folhas de *A. chica* foi purificada por coluna de resina Sephadex LH20 (Aldrich®), 1 g de extrato bruto/ g de Sephadex LH 20, eluente gradiente H₂O:MeOH-TFA de 0,3 a 0,7%. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada.

Preparação de amostras para análises por IES-EM (+) e IES(+)-EM/EM

Os extratos brutos obtidos com e sem tratamento enzimático (10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de MeOH/H₂O com 7% de ácido fórmico. Posteriormente, 10 µL de alíquota foram retirados e diluídos em 990 µL do mesmo solvente.

As amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas com auxílio de uma bomba seringa (Harvard Apparatus®) com fluxo de 10 µL min⁻¹. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 min. Os espectros IES-EM bem como os de IES-EM/EM foram obtidos no modo positivo através do equipamento QToF Micromass® (Manchester, Reino Unido) de configuração de ESI-QToF. As condições de operação do equipamento foram: 2.5 kV de voltagem do capilar, 100 °C de temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 100 °C e voltagem do cone de 20 V. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 a 1000.

Atividade farmacológica

A avaliação das atividades antiproliferativa, o estímulo de crescimento e produção de fibroblastos *in vitro* e atividade antioxidante foram realizadas em todos os extratos obtidos durante o estudo de sazonalidade, permitindo assim estabelecer um perfil químico com relação aos efeitos farmacológicos observados.

Teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas

Para os ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro*, foram utilizadas 9 linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-03 (ovário), 786-0 (rim) e K562 (leucemia). Estas linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI/EUA), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e ambiente úmido.

Uma mistura de penicilina e estreptomicina (1 µg mL⁻¹:1 UI mL⁻¹) foi adicionada às culturas experimentais. Células tumorais humanas (100 µL de suspensão celular por compartimento, densidade de inoculação entre 3 x 10⁴ e 6,5 x 10⁴ cel mL⁻¹) foram expostas a diferentes concentrações das amostras em DMSO/RPMI/SFB 5% (0,25; 2,5; 25

e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 , em ambiente úmido, por 48 h. Após esse período, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50%. O conteúdo proteico celular foi determinado através da quantificação por espectrofotometria medida a 540 nm, usando-se o teste de sulforrodamina B.¹¹ A partir da curva de proliferação celular em função da concentração de amostra, calculou-se a concentração efetiva ITC (concentração que produz inibição total do crescimento) através de regressão não linear usando o software Origin 7.5[®] (OriginLab Corporation).¹²

Estímulo de crescimento de fibroblasto *in vitro*

A avaliação dos extratos brutos de *A. chica* (com e sem fermentação) foi realizada em fibroblastos de camundongos, linhagem 3T3, seguindo-se o protocolo descrito por Jorge *et al.*⁴

Atividade sequestrante de radicais livres DPPH

Os extratos brutos de *A. chica* (com e sem fermentação) foram avaliados quanto a sua capacidade de sequestrar radicais livres DPPH, utilizando-se a técnica de microplaca.⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a padronização da matéria-prima e exploração sustentável da espécie *Arrabidaea chica* Verlot, foi realizado estudo no CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas) identificando marcadores microssatélites para caracterização genética de exemplares disponíveis no banco de germoplasma. Os espectros de IES(+)-EM gerados para as amostras dos diferentes acessos de *A. chica*, cultivados sob as mesmas condições, demonstraram que os acessos 3 e

5, oriundos do Paraná, apresentaram carajiruna abaixo do limite de detecção do equipamento, comparados aos outros acessos (Figura 2a e b). A partir desse estudo foi selecionado o acesso 6, oriundo de Manaus (excisata 1865), para dar continuidade com o estudo, pois foi o acesso que apresentou maior teor das agliconas carajiruna e carajiruna.^{4,13} O estudo da variação sazonal da espécie foi realizado com e sem tratamento enzimático, coletando-se as folhas mensalmente de janeiro de 2007 a janeiro de 2008.¹⁴

A partir dos dados gerados pelo planejamento experimental foi estabelecido que as amostras fermentadas previamente ao processo de extração seriam produzidas utilizando 1,0 g de folhas de *A. chica*. Adicionaram-se 10,0 mL de tampão Tris (pH 8,0), 10 U mL^{-1} de xilanase, submetidas à agitação oscilatória de 80 rpm, à temperatura de 45 °C por 2 h. O material vegetal fermentado foi posteriormente extraído à temperatura ambiente, sob agitação oscilatória, em solução de metanol/ácido cítrico 0,3%, obtendo-se 33,2% de rendimento.

Os extratos obtidos com e sem tratamento enzimático foram avaliados por CLAE DAD e analisados por IES (+)-EM, monitorando-se os componentes com razão *m/z* 285, 299 e 301 correspondentes às agliconas e os antocianosídeos majoritários com razão *m/z* 463 e 477 (Figura 2).

A influência do processo de fermentação na atividade biológica de *A. chica* foi avaliada por comparação com o extrato sem tratamento. Os resultados demonstraram que a antocianidina 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio teve variação significativa na sua concentração relativa (de $11,6 \pm 0,2\%$ para $16,00 \pm 0,05\%$) após 60 min de tratamento prévio das folhas de *A. chica* com a mistura de xilanases. As outras duas antocianidinas (6,7,3,4'-tetra-hidroxi-5-metoxiflavílio e 6,7,4'-tri-hidroxi-5-metoxiflavílio) não sofreram alterações significativas após processo de fermentação das folhas.¹⁵ Contatou-se que o processo de hidrólise enzimático favoreceu o aumento do rendimento global da carajiruna (Figura 3).

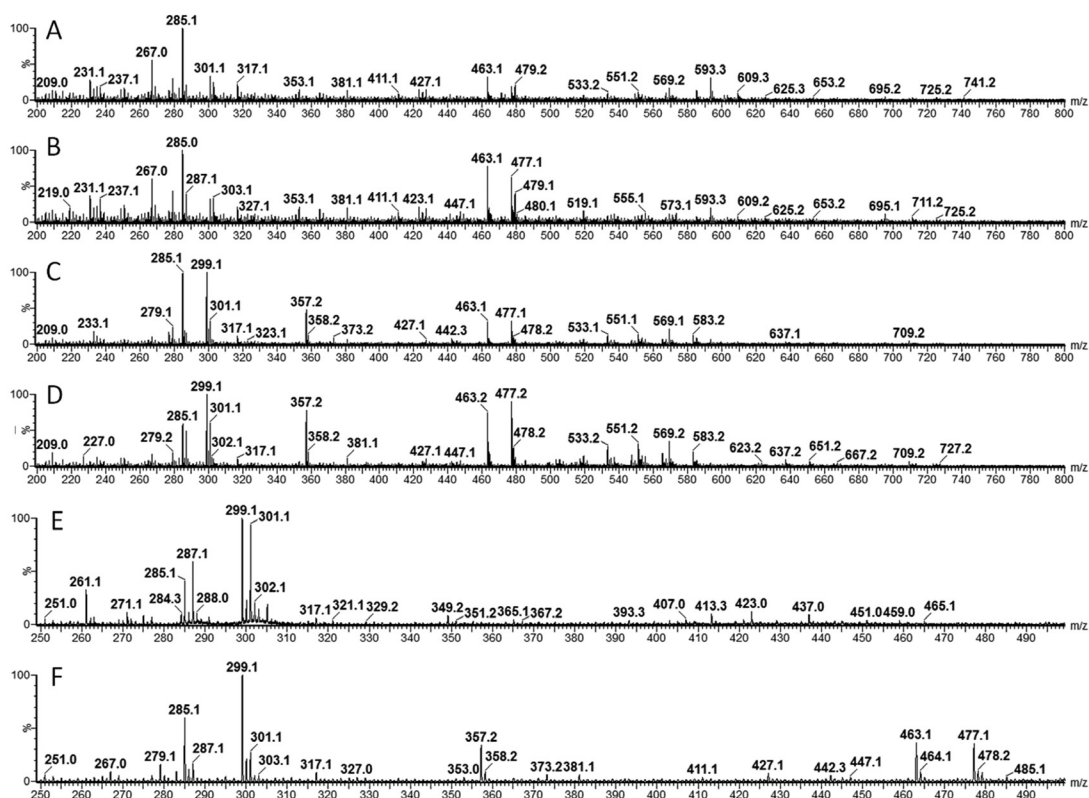


Figura 2. Espectros de IES(+)-EM obtidos para as amostras denominadas: A) acesso 3, B) acesso 5, C) acesso 6, D) acesso 9, E) acesso 6 sem tratamento enzimático e F) acesso 6 com tratamento enzimático

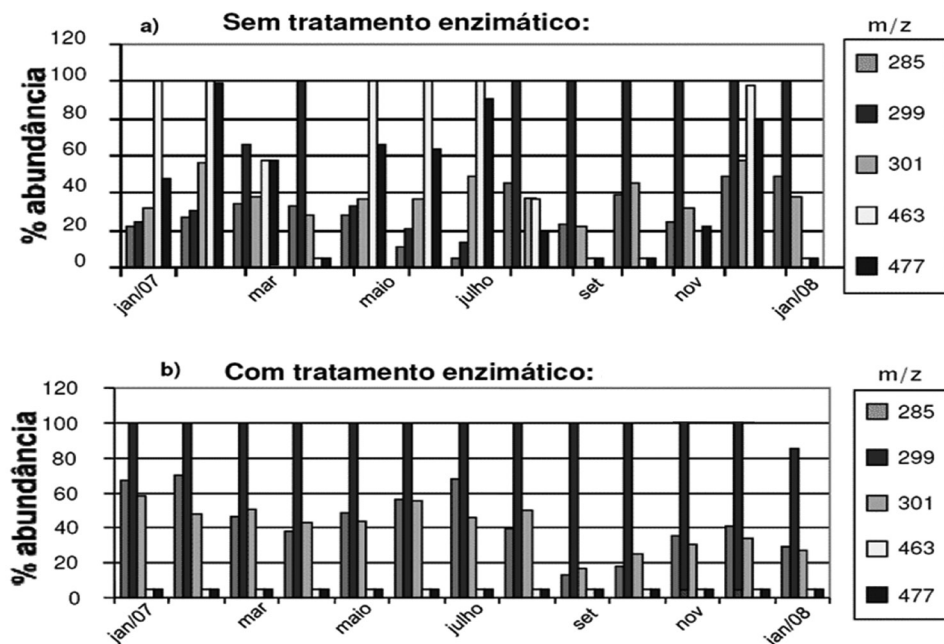


Figura 3. Intensidades relativas das antocianinas de m/z 285, 299, 301, 463 e 477 detectadas por IES(+)-EM para as amostras sazonais extraídas: a) sem tratamento prévio com xilanasas e b) com tratamento prévio com xilanasas, por 2 h a 40 °C

Através dos perfis avaliados por IES (+)-EM, observou-se que nos extratos obtidos sem tratamento enzimático, as intensidades dos íons referentes às agliconas e aos glicosídeos apresentaram variação sazonal ao longo do ano.

Apesar dos rendimentos médios das duas extrações terem sido análogos ($36 \pm 3\%$ para sem tratamento e $33 \pm 2\%$ com tratamento enzimático), o perfil químico observado apontou que houve um enriquecimento no conteúdo de antocianinas nos extratos obtidos após o processo de fermentação das folhas (Figura 2e e f).

Através do ensaio de indução de crescimento celular verificou-se que os extratos brutos obtidos das folhas de *A. chica* sem tratamento prévio com xilanasas estimularam o crescimento de fibroblastos da linhagem 3T3, nas concentrações de 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a melhor atividade foi observada para os meses de janeiro a junho. Por outro lado, os extratos obtidos após o tratamento enzimático diminuíram a viabilidade celular, com exceção dos meses de janeiro e fevereiro que apresentaram crescimento moderado de fibroblastos.

Todos os extratos diminuíram a concentração efetiva ITC celular em 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4).

A comparação desses resultados com o perfil químico (Figura 2) sugeriu que a indução de crescimento de fibroblastos e, conseqüentemente, a ação cicatrizante dos extratos pode estar relacionada à presença das antocianinas, uma vez que os extratos ricos em antocianinas (agliconas) não estimularam o crescimento celular (Figura 3).

O composto com íon m/z 463 apresentou maior concentração nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2007 para as amostras sem tratamento enzimático, apresentando maior crescimento dos fibroblastos, sugerindo que esse componente deve estar envolvido com essa atividade. Já a análise dos extratos obtidos após o tratamento enzimático das folhas demonstrou uma redução significativa na concentração desse composto e, conseqüentemente, um menor crescimento de fibroblastos. O estudo do perfil químico por IES(+)-EM sugeriu ainda que outros compostos glicosilados podem estar envolvidos no mecanismo de estímulo, visto que os extratos produzidos

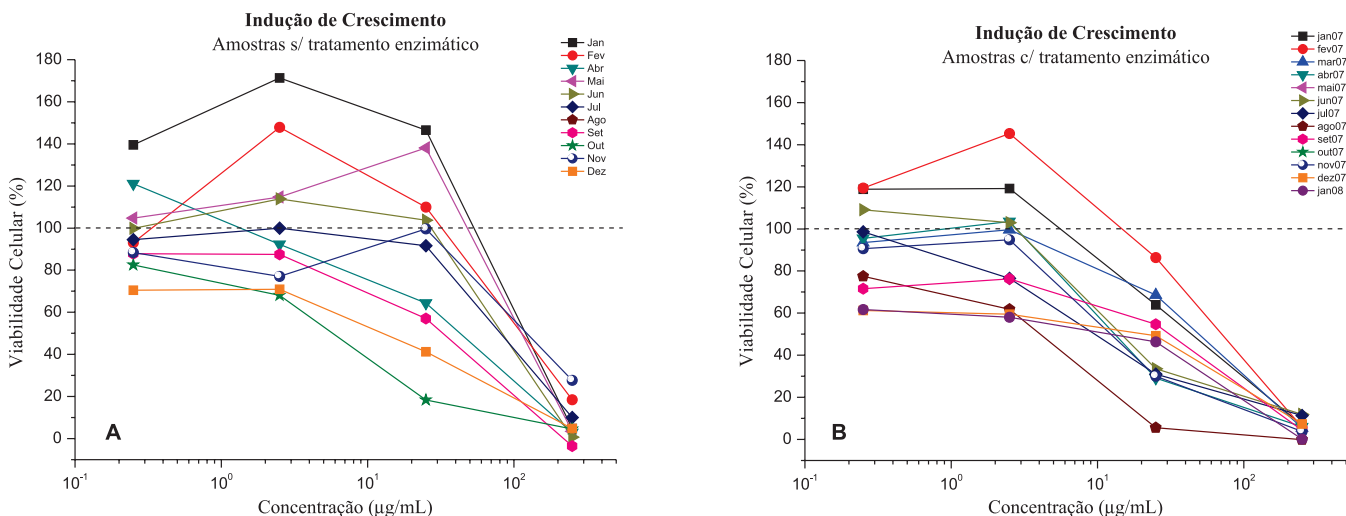


Figura 4. Efeito estimulante do extrato de *A. chica* em fibroblastos humanos. A) Extratos que não foram submetidos ao tratamento com xilanasas de *B. pumilus* previamente à extração. B) Extratos submetidos ao tratamento enzimático

Tabela 1. ITC ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Inibição total de crescimento (*Total Growth Inhibition*) – concentração de extrato de *A. chica* necessária para que não ocorra crescimento celular

	U	M	A	7	4	P	O	H	K
Doxo	0,31	1,70	>25	>25	>25	1,07	>25	>25	>25
jan/07 I	>250	>250	>250	>250	>250	>250	0,85	>250	>250
jan/07 II	>250	39,9	153,4	190,1	66,8	>250	1,6	194,7	>250
fev/07 I	>250	>250	250	>250	>250	>250	250	250	>250
fev/07 II	27,1	46,5	48,3	72,4	130,0	35,3	>250	>250	>250
mar/07 I	78,7	>250	>250	169,8	>250	>250	>250	>250	>250
mar/07 II	36,8	41,9	37,7	157,7	>250	34,2	>250	>250	>250
abr/07 I	16,8	>250	>250	130,1	>250	>250	>250	>250	>250
abr/07 II	50,9	80,5	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
mai/07 I	>250	>250	79,87	>250	>250	43,92	>250	>250	27,6
mai/07 II	8,7	35,8	81,1	>250	>250	71,5	50,2	90,9	11,1
jun/07 I	>250	>250	>250	>250	>250	187,2	>250	>250	2,59
jun/07 II	7,4	37,5	66,7	>250	>250	108,5	45,5	95,9	25,6
jul/07 I	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
jul/07 II	62,7	73,3	0,88	137,2	>250	>250	47,6	110,8	>250
ago/07 I	65,4	>250	63,8	250	>250	>250	>250	>250	>250
ago/07 II	125,3	45,5	2,6	>250	>250	>250	81,5	104,5	>250
set/07 I	81,3	250	35,2	79,9	>250	>250	>250	>250	>250
set/07II	124,5	>250	>250	40,2	>250	>250	>250	>250	>250
out/07 I	>250	43,7	73,9	>250	63,8	>250	>250	>250	>250
out/07 II	38,9	250	>250	>250	102,7	>250	177,8	>250	>250
nov/07 I	>250	>250	>250	>250	>250	>250	65,4	>250	>250
nov/07 II	13,6	250	>250	>250	98,3	>250	1,9	>250	>250
dez/07 I	40,3	171,0	>250	>250	78,4	37,4	25,8	250	>250
dez/07 II	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
jan/08 I	>250	31,1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
jan/08 II	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

I = EB não tratado com xilanases; II = EB tratado com xilanases; U = UACC-62, M = MCF-7, A = NCI-ADR/RES, 7 = 786-0, 4 = NCI-H460, P = PC-3, O = OVCAR-3, H = HT-29, K = K562.

a partir das folhas coletadas nos meses de maio, junho e julho de 2007 apresentaram perfil químico semelhante quanto à presença do composto *m/z* 477, porém não estimularam de maneira semelhante o crescimento dos fibroblastos 3T3 (Figura 4).

Estudos farmacológicos destacam o alto poder antioxidante das antocianinas em doenças metabólicas,¹⁶ dentre as quais podemos destacar atividade anti-inflamatória e anticâncer.¹⁷ Neste contexto, a influência da variação na proporção relativa das antocianinas nos extratos de *A. chica*, preparados com e sem tratamento enzimático prévio, a partir de folhas coletadas durante os 13 meses, frente à atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada em um painel de 9 linhagens de células tumorais humanas [MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT29 (cólon), OVCAR-03 (ovário), 786-0 (rim) e K562 (leucemia)] enquanto a atividade antioxidante potencial foi observada através do ensaio de DPPH.

A atividade antiproliferativa foi expressa através de valores de inibição total de crescimento ITC (TGI - *Total Growth Inhibition*), que representa a concentração de amostra necessária para que não ocorra crescimento celular (efeito citostático máximo).¹⁸ Os resultados obtidos para os diversos extratos de *A. chica* estão resumidos na Tabela 1.

Fouche *et al.*¹⁹ descreveram parâmetros para avaliação do potencial antiproliferativo com base nos valores médios de ITC. Assim, para ser ativo um extrato precisa apresentar média de ITC $\leq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por este parâmetro, todos os extratos avaliados foram inativos. Porém, foi interessante observar que os extratos resultantes de amostras submetidas à hidrólise enzimática das folhas, previamente

ao processo de extração, apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* (amostras coletadas nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho e agosto). Os extratos obtidos nos meses de maio e de junho de 2007 apresentaram efeito citostático para a linhagem UACC-62 (melanoma) com valores de ITC iguais a 8,7 e 7,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, comparado ao valor acima de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as mesmas amostras sem o tratamento enzimático.

Em relação à atividade antioxidante, o ensaio de DPPH permitiu avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres. Neste trabalho observamos uma moderada atividade antioxidante para os extratos brutos de *A. chica* sem tratamento prévio (T2I) com um aumento da atividade para os extratos das folhas tratadas previamente com xilanases de *B. pumilus* (T3II) (Tabela 2), indicando que tal atividade foi favorecida pela presença de antocianinas. Após o processo de fermentação da planta ocorreu a liberação das agliconas, aumentando a atividade antioxidante, resultado corroborado pelos estudos de Cai *et al.*,²⁰ que relataram que a glicosilação dos flavonoides diminui sua capacidade antioxidante quando comparada com suas agliconas correspondentes (Tabela 2).

CONCLUSÃO

Através do monitoramento por IES(+)-EM estabeleceu-se o perfil de antocianosídeos e suas respectivas agliconas, de plantas de *A. chica* provenientes de diferentes origens geográficas (acessos), permitindo a seleção de uma variedade com características específicas para produção de extratos com atividade farmacológica.

Tabela 2. Efeito antioxidante dos extratos de folhas de *A. chica*, coletadas ao longo do ano, não tratadas com xilanases (T2I) e tratadas com xilanases de *B. pumilus* (T3I) em ensaio com DPPH

Amostra	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	T _{EC50} (min)	AE*
Trolox	5,40 ± 0,58	0,1	1,9 ± 0,2
jan/07 T3I	75,96 ± 2,13	0,1	0,132 ± 0,004
fev/07 T2I	234,29 ± 77,76	0,1	0,06 ± 0,02
fev/07 T3I	75,43 ± 4,42	0,1	0,133 ± 0,008
mar/07 T2I	97,90 ± 7,41	0,1	0,103 ± 0,007
mar/07 T3I	42,44 ± 0,58	0,1	0,236 ± 0,003
abr/07 T2I	142,08 ± 8,76	0,1	0,071 ± 0,004
abr/07 T3I	83,25 ± 12,57	5	0,0025 ± 0,0003
mai/07 T2I	121,92 ± 13,70	0,1	0,084 ± 0,009
mai/07 T3I	45,00 ± 0,75	0,1	0,222 ± 0,004
jun/07 T2I	138,01 ± 4,22	0,1	0,073 ± 0,002
jun/07 T3I	43,27 ± 3,48	0,1	0,23 ± 0,02
jul/07 T2I	41,4783 ± 1,46	5	0,0048 ± 0,0002
jul/07 T3I	52,70 ± 10,64	0,1	0,21 ± 0,05
ago/07 T2I	67,55 ± 3,52	0,1	0,149 ± 0,008
ago/07 T3I	204,42 ± 11,96	0,1	0,049 ± 0,003
set/07 T2I	94,36 ± 8,60	0,1	0,11 ± 0,01
set/07 T3I	357,54 ± 11,85	5	0,000561 ± 0,00002
jan/07 T2I	133,43 ± 7,48	0,1	0,075 ± 0,004
out/07 T2I	44,47 ± 2,91	0,1	0,23 ± 0,02
out/07 T3I	60,05 ± 8,69	0,1	0,17 ± 0,03
nov/07 T2I	61,09 ± 1,39	5	0,00328 ± 0,00007
nov/07 T3I	30,79 ± 1,14	0,1	0,33 ± 0,01
dez/07 T2I	28,86 ± 1,86	0,1	0,35 ± 0,02
dez/07 T3I	63,18 ± 2,71	0,1	0,158 ± 0,007
jan/08 T2I	29,26 ± 3,89	0,1	0,35 ± 0,05
jan/08 T3I	83,40 ± 7,54	0,1	0,12 ± 0,01

EC₅₀: concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, T_{EC50}: tempo necessário para atingir a EC₅₀, AE: Eficiência Antirradicalar (AE = 1/(EC₅₀*T_{EC50})).

Os resultados sugerem que parâmetros como processamento pós-colheita e método de extração influenciam a composição química e, conseqüentemente, a atividade farmacológica observada para o produto final.

Estudos de biologia molecular utilizando marcadores microssatélites permitiram estabelecer algumas das características genotípicas importantes para padronização dos insumos para produzir extratos com os efeitos farmacológicos descritos neste estudo.¹⁴

Este estudo contribuiu com dados relevantes para a padronização da matéria-prima vegetal, contribuindo para a compreensão dos parâmetros necessários ao produto para atender as necessidades de eficácia, segurança e reprodutibilidade imprescindíveis ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CAPES, CNPq.

REFERÊNCIAS

- Chapman, E.; Perkin, A. G.; Robinson, R.; *J. Chem. Soc.* **1927**, 49, 3015.
- Corrêa, M. P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Re-edição*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.; *Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas*, 1ª ed., Instituto Platarum: São Paulo, 2002.
- Jorge, M. P.; Madjarof, C.; Ruiz, A. L. T. G.; Fernandes, A. T.; Rodrigues, R. A. F.; Sousa, I. M. O.; Foglio, M. A.; Carvalho, J. E.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 118, 361; Barbosa, W. L. R.; Nascimento Pinto, L.; Quignard, E.; Vieira, J. M. S.; Silva Jr., J. O. C.; Albuquerque, S.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 18, 544; Höfling, J. F.; Anibal, P. C.; Obando-Pereda, G. A.; Peixoto, I. A. T.; Furletti, V. F.; Foglio, M. A.; Gonçalves, R. B.; *Braz. J. Biol.* **2010**, 70, 1065.
- Castaneda-Ovando, A.; Pacheco-Hernandez, M. L.; Paez-Hernandez, M. E.; Rodriguez, J. A.; Galan-Vidal, C. A.; *Food Chem.* **2009**, 113, 859.
- Scogin, R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1927**, 8, 273; Harborne, J. B.; *Phytochemistry* **1967**, 6, 1643; Harborne, J. B.; Williams, C. A.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 310; Takemura, O. S.; Iinuma, M.; Tosa, H.; Miguel, O. G.; Moreira, E. A.; Nozawa, Y.; *Phytochemistry* **1995**, 38, 1299; Zorn, B.; García-Pineros, A. J.; Castro, V.; Murillo, R.; Mora, G.; Merfort, I.; *Phytochemistry* **2001**, 56, 831; Devia, B.; Llabres, G.; Wouters, J.; Dupont, L.; Escribano-Bailon, M. T.; De Pascual-Teresa, S.; Angenot, L.; Tits, M.; *Phytochem. Anal.* **2002**, 13, 63; Alcerito, T.; Barbo, F. E.; Negri, G.; Santos, D. Y. A. C.; Meda, C. I.; Young, M. C. M.; Chávez, D.; Blatt, C. T. T.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, 30, 677; Pauletti, P. M.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D. H. S.; Young, M. C. M.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Bolzani, V. S.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1384.
- Março, P. H.; Poppi, R. J.; Scarminio I. S.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 1218.
- Poorna, C. A.; Prema, P.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, 32, 106.
- Kim, D. H.; Kim, J. H.; Bae, S. I.; Seo, J. H.; Oh, T. K.; Lee, C. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2541.
- Li, H.-B.; Wong, C.-C.; Cheng, K.-W.; Chen, F.; *LWT – Food Sci. Technol.* **2008**, 2, 104.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. *Diário Oficial da União* de 30/05/2003.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757.
- Shoemaker, R. H.; *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 813.
- Figueira, G. M.; Ramelo, P. R.; Ogasawara, D. C.; Montanari, I.; Zucchi, M. I.; Cavallari, M. M.; Foglio, M. A.; *Am. J. Bot.* **2010**, 98, 283.
- Duarte, M. C. T.; Pellegrino, A. C. A.; Portugal, E. P.; Ponezi, A. N.; Franco, T. T.; *Braz. J. Microbiol.* **2001**, 31, 90.
- Taffarello, D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
- Zafra-Stone, S.; Yasmin, T.; Bagchi, M.; Chatterjee, A.; Vinson, J. A.; Bagchi, D.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 51, 675.
- Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R.; *Phytochemistry* **2003**, 64, 923.
- Fouche, G.; Cragg, G. M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N.; Maharaj, V. J.; Senabe, J.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 119, 455.
- Cai, Y.-Z.; Xing, J.; Sun, M.; Zhan, Z.-Q.; Corke, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9940.