

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Utilização de β -ciclodextrina como adjuvante na extração de flavonoides das inflorescências de *Achyrocline satureioides* por água no estado subcrítico

VICTORYA BENES RAABE

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Utilização de β -ciclodextrina como adjuvante na extração de flavonoides das inflorescências de *Achyrocline satureioides* por água no estado subcrítico

Dissertação apresentada por **Victorya Benes Raabe** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Co-orientadora: Dra. Sara Elis Bianchi

Porto Alegre, 2024

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado/Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em dia/mês/ano, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carlos Alberto Bernal Rodriguez

Universidade de Cartagena

Prof. Dra. Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Raabe, Victorya Benes

Utilização de β -ciclodextrina como adjuvante na extração de flavonoides das inflorescências de *Achyrocline satureioides* por água no estado subcrítico / Victorya Benes Raabe. -- 2024.

129 f.

Orientadora: Valquíria Linck Bassani.

Coorientadora: Sara Elis Bianchi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Flavonoides. 2. Beta-ciclodextrina. 3. Marcela. 4. Extração por água no estado subcrítico. I. Bassani, Valquíria Linck, orient. II. Bianchi, Sara Elis, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) do Departamento Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, junto à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Valquíria Linck Bassani, pela dedicação, confiança, compreensão, pelas incontáveis ideias reformuladas e pelo conhecimento disponibilizado com todo carinho.

À minha coorientadora, Dra. Sara Elis Bianchi, pelos ensinamentos técnicos e incentivo. Sem esse apoio e inspiração, eu não teria sido capaz de concluir essa etapa.

Aos meus pais, Alex e Patrícia, pelo alicerce de princípios que fizeram com que eu pudesse continuar, mesmo nos momentos de dificuldade e cansaço. Aos meus amigos de longa data Gabriela Rizzetti, Natália Piovezan e Júlia Rauber que me acolheram diversas vezes quando precisei. Em especial ao meu melhor amigo Leonardo Massoni pelo companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, que fizeram os dias de trabalho mais interessantes e divertidos.

Ao Laboratório de Catálise Molecular pela disponibilização do equipamento de SWE e colaboração, em especial ao Coordenador Prof. Dr. Jairton Dupont e aos membros do Laboratório, Dr. Gustavo Javier Chacón Rosales, Dr. Leandro Scorsi e Dr. Pedro Migowski da Silva.

À ISOBIO que me concedeu a oportunidade de me desenvolver como profissional, em especial aos colegas Dr. Fábio de Souza Barbosa, Dra. Gabriela de Carvalho Meirelles, Laura Machado, Adriane Lindemann, Isadora Sanson da Silva, e novamente, às queridas Dra. Sara Elis Bianchi e Dra. Valquíria Linck Bassani pela confiança e oportunidade.

Agradeço a todos que, de alguma maneira, colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho e proporcionaram meu crescimento nessa jornada.

RESUMO

Achyrocline satureioides tem sido utilizada na medicina popular devido às suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancer, atribuídas principalmente às agliconas flavonoídicas quercetina (QCT), luteolina (LUT), 3-O-metilquercetina (3OMQ) e achyrobichalcona (ACB). A extração por água no estado subcrítico (SWE), ou extração por água quente pressurizada (PHWE), emerge como uma alternativa sustentável para a obtenção desses compostos, evitando o uso de solventes orgânicos. No entanto, o uso de altas temperaturas pode ser uma desvantagem devido à possibilidade de degradação dos compostos de interesse. A presente dissertação propõe, pela primeira vez, a utilização de ciclodextrina na extração com água no estado subcrítico (SWE/ β -CD) para aumentar a eficiência extrativa de flavonoides de *Achyrocline satureioides*. O corpo do trabalho é constituído por uma revisão da literatura científica na forma de artigo científico sobre a extração de flavonoides com água no estado subcrítico e outro artigo contendo resultados experimentais sobre SWE/ β -CD dos flavonoides, que inicia com a otimização da extração utilizando um modelo experimental do tipo Box-Behnken Design (BBD). As condições extrativas otimizadas indicaram a concentração máxima de β -CD testada 3% (m/v) e diferentes condições de temperatura e tempo de extração para os diferentes flavonoides QCT e 3OMQ (100 °C e 30 min) e para LUT e ACB (220 °C, 0 min). Quando os resultados obtidos nas condições otimizadas SWE/ β -CD foram comparados aos resultados de dois outros métodos, Soxhlet e maceração dinâmica, o primeiro mostrou-se altamente eficaz na extração das agliconas flavonoídicas QCT, LUT, 3OMQ e ACB, confirmando a hipótese central do estudo. Esses promissores resultados evidenciam o potencial de aplicação do novo método proposto para a extração de outros analitos de baixa hidrossolubilidade a partir da biodiversidade, inclusive em maior escala, tendo em vista sua compatibilidade ambiental.

Palavras-chave: extração por água quente pressurizada; β -ciclodextrina; *Achyrocline satureioides*; flavonoides.

ABSTRACT

Achyrocline satureioides has been used in folk medicine due to its pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities, mainly attributed to the aglycones quercetin (QCT), luteolin (LUT), 3-O-methylquercetin (3OMQ), and achyrobichalcone (ACB). Subcritical water extraction (SWE) or pressurized hot water extraction (PHWE) emerges as a sustainable alternative for obtaining these compounds, avoiding the use of organic solvents. However, the use of high temperatures may be a disadvantage due to the potential degradation of the compounds of interest. This dissertation proposes, for the first time, the use of cyclodextrin in subcritical water extraction (SWE/ β -CD) to enhance the extractive efficiency of flavonoids from *Achyrocline satureioides*. The body of work consists of a literature review in the form of a scientific article on flavonoid extraction with subcritical water and another article containing experimental results on SWE/ β -CD of flavonoids, which begins with the optimization of the extraction using an experimental Box-Behnken Design (BBD) model. The optimized extractive conditions indicated the maximum concentration of β -CD tested at 3% (w/v) and different temperature and extraction time conditions for the different flavonoids QCT and 3OMQ (100 °C and 30 min) and for LUT and ACB (220 °C, 0 min). When the results obtained in the optimized SWE/ β -CD condition were compared to the results of two other methods, Soxhlet and dynamic maceration, the former proved to be highly effective in the extraction of the flavonoid aglycones QCT, LUT, 3OMQ, and ACB, confirming the central hypothesis of the study. These promising results highlight the potential application of the proposed new method for the extraction of other low water-soluble analytes from biodiversity, including on a larger scale, considering its environmental compatibility.

Key words: pressurized hot water extraction; β -cyclodextrin; *Achyrocline satureioides*; flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Aspectos macroscópicos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC obtidos do Re flora – Herbário Virtual. 32
- Figura 2.** Principais atividades biológicas dos flavonoides para saúde as aplicabilidades exógenas. 36
- Figura 3.** Estrutura bidimensional da quercetina (QCT), luteolina (LUT), 3-O-metilquercetina (3OMQ) e achyrobichalcona (ACB). 38
- Figura 4.** Estruturas representativas da β -ciclodextrina. 41

Capítulo II

- Figura 1.** Flavonoid basic structure and subclasses. 59
- Figura 2.** Criteria and flowchart for selecting scientific articles that deal with flavonoids and subcritical water extraction. 61
- Figura 3.** Temperature and pressure employed in the SWE flavonoid extraction following the analyzed studies (n=75) (a) and number of published studies regarding temperature (b). 68

Capítulo III

- Figura 1.** Results obtained by different extraction conditions of QCT, LUT, 3OMQ and ACB (mg/g of plant material) in triplicate. 106

Material suplementar

- Figura 1.** Calibration curves of QCT, LUT, 3OMQ and ACB by HPLC. 119
- Figura 2.** The differential scanning calorimetry (DSC) curves of (I) quercetin, (II) luteolin, (III) 3-O-methylquercetin, (IV) achyrobichalcone, (V) 2023 PHWE 100°C with 3% β - 122

cyclodextrin, (VI) 2023 PHWE 200 °C with 3.0% β -cyclodextrin, and (VII) β -cyclodextrin.

Figura 3. NMR of 2023 PHWE 3% β -CD (^a One dimension ^1H ; ^b 125 COSY; ^c ROESY).

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

- Tabela 1.** Conditions employed in flavonoid extraction using supercritical water extraction (SWE) in the selected reports. 71

Capítulo III

- Tabela 1.** Box Behnken Design: parameters used in flavonoid SWE extraction (*A. saturoioides* sample collected in 2017). 96
- Tabela 2.** ANOVA of regression model for QCT, LUT, 3OMQ, ACB and Σ FLAV in 2017 sample. 99
- Tabela 3.** Regression coefficients for QCT, LUT, 3OMQ and ACB for SWE extraction of *Achyrocline saturoioides* sample collected in 2017. 100
- Tabela 4.** Comparison among experimental and predicted yields of QCT, LUT, 3OMQ, ACB and Σ FLAV determined in two different optimized extraction conditions (samples of *Achyrocline saturoioides* collected in 2017). 102
- Tabela 5.** Comparative results of different extraction conditions in 2 samples of *A. saturoioides* collected in 2017 and 2023. 105

Material suplementar

- Tabela 1.** Mean values of droplet size (Z, d.nm), polydispersity index (PDI, and zeta potential (ZP, mV). 124

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB	Achyrobichalcone
BBD	Box-Behnken Design
β-CD	β -ciclodextrina
LUT	Luteolina
PHWE	Extração por água quente pressurizada
QCT	Quercetina
RSM	Metodologia de resposta de superfície
SWE	Extração por água no estado subcrítico
3OMQ	3-O-Metilquercetina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
Referências	26
OBJETIVOS	29
Objetivo geral	29
Objetivo específico	29
CAPÍTULO I: Revisão da literatura	31
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	31
Flavonoides	35
β -ciclodextrina	40
Extração por água no estado subcrítico	43
Referências	46
CAPÍTULO II: Artigo de revisão flavonoides extraídos por água quente pressurizada (PHWE)	57
Abstract	58
Introduction.....	59
Methodology.....	61
Results and discussion.....	62
Flavonoids.....	62
Subcritical water extraction.....	65
Extract analysis	71
Stability and analytical parameters.....	76
Final considerations	77
References	78
CAPÍTULO III: Artigo Box-Behnken e perfil analítico dos extratos	89
Abstract	91
Introduction.....	92
Materials and methods	94
Chemicals.....	94
Plant material	94
Liquid chromatography analysis	94
Subcritical Water Extraction of flavonoids from <i>Achyrocline satureioides</i> ...	95
Comparison among extraction methods	95
Box-Behnken Design.....	96

Statistical analysis	96
Results and discussion.....	97
Box-Behnken Design and optimization.....	97
Comparison methods	105
Conclusion.....	109
References	109
DISCUSSÃO GERAL	111
Referências	116
CONCLUSÕES	119
ANEXO I - MATERIAL SUPLEMENTAR.....	121
Thermal analysis.....	121
Nuclear magnetic resonance spectroscopy.....	121
Eletrospray ionization-mass spectroscopy	121
Droplet Size, polydispersity index, and zeta potential	122

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi redigida na forma de capítulos de acordo com as exigências das normativas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A parte experimental foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Galênico do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e no Laboratório de Catálise Molecular do Instituto de Química da UFRGS, coordenado pelo Dr. Jairton Dupont.

O trabalho está organizado em seções como a seguir discriminadas:

- Introdução: abrangência dos temas relevantes ao trabalho;
- Objetivos: gerais e específicos;
- Capítulos I – revisão geral dos temas relevantes à compreensão do trabalho;
- Capítulo II – artigo de revisão sobre o emprego da Técnica SWE na extração de flavonoides
- Capítulo III – artigo contendo os resultados experimentais do método proposto de extração de flavonoides por SWE utilizando β -ciclodextrina: otimização e comparação com outros métodos extrativos;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências.

INTRODUÇÃO

As plantas apresentam um vasto número de constituintes bioativos com diferentes características estruturais que as tornam uma fonte inesgotável de inspiração para o desenvolvimento de novos produtos. O conhecimento popular incita a utilização desses constituintes para uso terapêutico, cosmético, alimentar, entre outros. Métodos extrativos têm sido desenvolvidos para alcançar concentrações diversas desses constituintes, tanto para a sua exploração na forma de produtos mais complexos (como extratos) ou na forma de substâncias isoladas. Estas últimas também utilizadas para estudos de seu papel nas plantas e no meio ambiente (SIMÕES et al., 2010).

Entre as principais classes químicas de origem vegetal com comprovadas ações farmacológicas destaca-se os flavonoides, metabólitos secundários amplamente distribuídos pelas diferentes estruturas das plantas. Apresentam diversas funções biológicas entre as quais a de defesa e proteção da planta, além de lhe conferir pigmentação, aroma entre outras (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). A obtenção desses compostos pode ser realizada por técnicas extrativas convencionais, como maceração, percolação, hidrodestilação e extração por Soxhlet, ou por meio de abordagens mais modernas, como extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração por líquido pressurizado e extração por fluido supercrítico (KALEEM; AHMAD, 2018).

Achyrocline satureioides, conhecida como marcela ou macela, é um arbusto pertencente à família Asteraceae frequentemente encontrado na América do Sul e utilizado na medicina popular por suas propriedades terapêuticas. Dentre as quais pode-se citar ação antidisépica, antiespasmódica, emenagoga, anti-inflamatória, analgésica, antirreumática, antisséptica, antifúngica, antiviral, antibacteriana, anti-hemorrágica e sedativa (BARATA et al., 2013; BIANCHI et al., 2023; SIMÕES et al., 1988). Outros estudos investigaram sua atividade anticâncer, com ênfase na utilização das principais agliconas flavonoídicas: quercetina (QCT), luteolina (LUT), 3-O-metilquercetina (3OMQ) e achyrobichalcona (ACB) (BIANCHI et al., 2020; CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014; DONEDA et al., 2021; SOUZA et al., 2018).

A extração de flavonoides por água no estado subcrítico (SWE), também conhecida como extração por água quente pressurizada (PHWE), tem se revelado como uma alternativa sustentável e vantajosa por ser um método rápido e sem uso de solventes orgânicos. Neste método a extração ocorre numa faixa de condições de temperatura e pressão, a partir do ponto de ebulição (100 °C, 0,1 MPa) e abaixo do ponto crítico da água (374 °C, 22,1 MPa) o que mantém a água fluida, com propriedades diferentes daquelas no estado líquido. Em temperatura de 250 °C e pressão de 5 MPa conferem à água características semelhantes às de solventes orgânicos, como metanol e etanol a 25 °C (TEO et al., 2010), permitindo a extração de moléculas menos polares (CHENG et al., 2021). No entanto, a principal desvantagem é o uso de altas temperaturas, que pode levar a reações indesejadas, degradação das substâncias de interesse e redução de eficiência extrativa (MLYUKA et al., 2018).

Apesar do curto tempo de extração empregado na SWE, a preservação de constituintes bioativos termolábeis permanece um desafio. Nesse contexto, a associação dessa técnica extrativa com ciclodextrinas surge como uma alternativa promissora como estratégia de promover a solubilidade dos analitos, assim como para sua preservação. As ciclodextrinas, moléculas cíclicas formadas por ligações α -1,4-glicosídicas, podem formar complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas, aumentando sua solubilidade e/ou estabilidade (LIU et al., 2020). Outros tipos de associação são possíveis, tais como a formação de complexos de não-inclusão e formação de agregados. A β -ciclodextrina é uma molécula formada por um conjunto de 7 subunidades de glicopiranosose e possui interior com diâmetro de 6 – 6,5 Å, havendo diversos relatos de sua complexação com agliconas flavonoídicas isoladas ou presentes em frações enriquecidas (DOS SANTOS LIMA et al., 2019; PITTOL et al., 2022; SCHWINGEL et al., 2008; XAVIER et al., 2010).

A combinação de ciclodextrinas com extração com água no estado subcrítico ainda não foi documentada na literatura científica de acordo com as fontes pesquisadas até o momento (CAPES, CAFe – Comunidade Acadêmica Confederada, Brazil (<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez45.periodicos.capes.gov.br/index.php?>). A presente dissertação propõe, pela primeira vez, adicionar β -ciclodextrina ao meio de extração com água no

estado subcrítico visando aumentar a eficiência de obtenção das agliconas flavonoídicas de inflorescências de *Achyrocline satureioides*; otimizar os parâmetros de extração por meio de um modelo experimental do tipo Box-Behnken Design (BBD) e comparar a eficiência de extração com as obtidas por meio de outros métodos extrativos (Soxhlet e maceração dinâmica).

A dissertação está estruturada em capítulos, dos quais:

- O capítulo I apresenta uma a revisão da literatura científica, abordando os principais aspectos referentes ao desenvolvimento metodológico do trabalho, particularidades da matéria-prima (*Achyrocline satureioides*), moléculas alvo (QCT, LUT, 3OMQ e ACB), método extrativo (SWE estático) e ciclodextrinas (β -ciclodextrina).
- O capítulo II é apresentado na forma de minuta de um artigo de revisão intitulado “Subcritical Water Extraction of Flavonoids: An Overview on Experimental Conditions and Sustainable Approach” que discorre sobre a extração de flavonoides utilizando a água no estado subcrítico.
- O capítulo III é apresentado na forma de minuta de artigo científico intitulado Subcritical water extraction/ β -cyclodextrin (SWE/ β -CD): a new green and efficient method for flavonoid extraction from *Achyrocline satureioides*. Neste artigo são apresentados os resultados experimentais de otimização do método de extração dos flavonoides oriundos das inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando SWE/ β -CD, por meio de Metodologia de Superfície de resposta (RSM) por Box-Behnken Design (BBD) e uma comparação da eficiência de extração dos flavonoides do método otimizado com a eficiência apresentada por outras técnicas extrativas (Soxhlet e maceração dinâmica).
- No Anexo I são apresentados resultados preliminares de caracterização química, física e físico-química do extrato obtido utilizando a técnica SWE/SWE/ β -CD nas condições otimizadas definidas pelo BBD.

REFERÊNCIAS

BARATA, L. E. S. et al. Plantas Mediciniais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela). **Revista Fitos**, v. 4, n. 01, p. 120–125, 2013.

BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2133–2145, 2020.

BIANCHI, S. E. et al. ***Achyrocline satureioides* review: From the pharmacochemical diversity to the technological development of products.** **Fitoterapia** Elsevier B.V., , 1 jul. 2023.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. **Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy.** **RSC Advances**, 2014.

CHENG, Y. et al. Subcritical water extraction of natural products. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 1–38, 2021.

DONEDA, E. et al. 3-O-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*—cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 5, p. 2151–2168, 2021.

DOS SANTOS LIMA, B. et al. Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: a systematic review. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 5, p. 1337–1359, 2019.

KALEEM, M.; AHMAD, A. **Flavonoids as Nutraceuticals.** [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

LIU, Y. et al. Application of cyclodextrin in food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2020.

MLYUKA, E. et al. Strategic applications and the challenges of subcritical water extraction technology in food industries. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 45, n. 2, p. 1015–1029, 2018.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PITTOL, V. et al. The challenge of flavonoid/cyclodextrin complexation in a complex matrix of the quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2022.

SCHWINGEL, L. et al. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: Complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1–2, p. 149–159, out. 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281–293, 1988.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

SOUZA, P. O. DE et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, n. April, p. 23–33, 2018.

TEO, C. C. et al. Pressurized hot water extraction (PHWE). **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2484–2494, 2010.

XAVIER, C. R. et al. Improvement of genistein content in solid genistein/ β -cyclodextrin complexes, **Quim. Nova**. [s.l.: s.n.].

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a extração de agliconas flavonoídicas de inflorescências de *Achyrocline satureioides* por água no estado subcrítico (SWE) em presença de β -ciclodextrina determinando as melhores condições extrativas e comparando a sua eficiência de extração com as obtidas utilizando extração em Soxhlet e por maceração dinâmica.

Objetivos específicos

- Quantificar as agliconas flavonoídicas QCT, LUT, 3OMQ e ACB por cromatografia a líquido de alta eficiência na matéria prima (inflorescências de *Achyrocline satureioides*) e em extratos obtidos pela utilização de diversos métodos extrativos (SWE, SWE/ β -CD, Soxhlet e maceração dinâmica);
- Otimizar as melhores condições extrativas do método SWE/ β -CD por meio de desenho experimental Box-Behnken Design.
- Comparar os teores de agliconas flavonoídicas extraídos por SWE/ β -CD nas condições extrativas ótimas com os obtidos por extração em Soxhlet e por maceração dinâmica.
- Caracterização do produto obtido (extrato/ciclodextrina) por RMN, MS e DSC.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

***Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.**

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. ou *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. é uma planta arbustiva amplamente distribuída na América do Sul (Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela e Brasil). Nativa no Brasil, é encontrada no nordeste (Bahia), sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), com domínios fitogeográficos no Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (DEBLE, 2024).

Na nomenclatura popular, as principais denominações atribuídas à espécie são “marcela”, “vira-vira”, “marcela hembra”, “bira-bira”, “marcela del campo”, “juan blanco”, “marcelita”, “marcela blanca”, “alquitrán” (Argentina); “jate’i-caá” (língua guarani, Paraguai); “alkko wira wira”, “wira-wira” ou “huira huira” (língua quíchua, Bolívia); “macela”, “macelinha”, “macela amarela”, “macela da terra”, “macela do campo”, “chá de lagoa”, “carrapichinho de agulha”, “macela miuda” (Brasil); “erva do chivo.” (Colômbia); “marcela blanca”, “marcela hembra” (Uruguai); “viravilona” (Venezuela) (RETTA et al., 2012).

A predominância vegetativa é representada por área antrópica, campo de altitude, campo limpo, campo rupestre, restinga e vegetação com afloramentos rochosos (DEBLE, 2024). Com relação à hierarquia taxonômica é pertencente ao reino *Plantae*, filo *Anthophyta*, classe *Equisetopsida* C. Agardh, subclasse *Magnoliidae* Novák ex Takht., ordem *Asterales* Link, família *Asteraceae* Bercht. & J. Presl e gênero *Achyrocline* (Less.) DC (TROPICOS, 2024).

Outras sinónimas podem ser encontradas para denominação dentro as quais podemos citar *Achyrocline candicans* DC., *Achyrocline satureioides* var. *satureioides*, *Gnaphalium candicans* Kunth, *Gnaphalium rufum* Willd. ex Less, *Gnaphalium satureioides* Lam., *Gnaphalium saturejifolium* Poepp. ex DC. e *Gnaphalium saturejoides* var. *candicans* (Kunth) Kuntze (WFO, 2024).

A descrição botânica simplificada destaca a morfologia herbácea, caules amplamente ramificados, folhas alternadas apresentando tricomas com formato lanceolado e uninérvea, inflorescência com numerosos capítulos contendo de quatro a oito flores dimorfas pentadentadas no ápice com tricomas glandulares de coloração amarelada (MMA, 2011) (Figura 1). A descrição etnobotânica macro/microscópica completa pode ser acessada na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, volume II (2023).



Figura 1. Aspectos macroscópicos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC obtidos do Re flora – Herbário Virtual.

Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=2714874> – Acesso em 10 de Dezembro de 2023.

O período de floração e frutificação ocorrem no outono, principalmente entre março e abril. As flores são de ampla utilização na medicina tradicional na forma de infuso visando efeitos analgésicos, anti-inflamatório, antibacteriano, antioxidante, antiespasmódico, diurético, digestivo, calmante e outros (SIMÕES et al., 1988). A marcela, além de suas comprovadas atividades farmacológicas, faz parte da história e crença da região sul, sendo tradicionalmente colhida na Sexta-Feira Santa antes do amanhecer para potencializar seus efeitos, o que a levou a ser considerada Planta Medicinal Símbolo do Rio Grande do Sul pela Lei nº 11.858/2002.

Muito além da religiosidade popular, a marcela possui atividades farmacológicas cientificamente comprovadas tanto para suas frações, ou seja, um conjunto de moléculas, quanto seus constituintes isolados. Os primeiros estudos surgiram em meados de 1980 e, atualmente, é uma das plantas medicinais mais estudada na região sul para tratamento de distúrbios digestivos (GONZÁLEZ; RITTER; KONRATH, 2023). Outras abordagens incluem uso de *A. satureioides* para melhora do quadro respiratório como adjuvante no tratamento de COVID-19 (BASTOS et al., 2023), tratamento de células cancerosas (BIANCHI et al., 2020; CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014a; DONEDA et al., 2021; SOUZA et al., 2018b), pesticida (CAREZZANO et al., 2023), conservante (LANGOVÁ et al., 2023), cicatrizante tecidual (ALERICO; POSER, 2015; BALESTRIN et al., 2022), anti-inflamatório (DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007), adjuvante em disfunções crônicas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2021), moduladores enzimáticos (BRAGA et al., 2022), neuroproteção (MARTÍNEZ-BUSI et al., 2019), fotoproteção (MORQUIO; RIVERA-MEGRET; DAJAS, 2005), entre outras.

A utilização para tratamento de distúrbios digestivos pode ser corroborada por estudos que demonstram a atividade antiúlcera do extrato de *Achyrocline satureioides* (SANTIN et al., 2010), além da ação digestiva (BRAGA, 2022), hipoglicemiante (CARNEY et al., 2002), hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002) e hipocolesterolêmica (ESPIÑA et al., 2012). Um estudo realizado no

Pronto Atendimento Médico de Passo Fundo/RS em pacientes com diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias objetivou verificar as principais plantas medicinais utilizadas pela população, identificando a marcela como a mais consumida sem orientação pelos profissionais da saúde e, entre os entrevistados, 91,2% acreditavam que o uso concomitante de plantas medicinais e medicamentos não causa interação ou reações adversas no organismo (SILVA; HAHN, 2011).

Entretanto, outros estudos demonstram que é preciso cuidado na utilização desse vegetal. A exemplo, um estudo pré-clínico em ratas grávidas e lactentes demonstrou que a suplementação dos extratos de inflorescências pode levar à toxicidade *in vivo*, refletida em uma diminuição do índice de parto e da sobrevivência neonatal (MORESCO et al., 2017). Outro fato surpreendente sobre o efeito conhecidamente antioxidante e a baixa toxicidade (SALGUEIRO et al., 2016), é a discussão sobre potenciais efeitos pró-oxidantes e citotóxicos em altas concentrações de flavonoides (POLYDORO et al., 2004). O efeito imunomodulador da infusão também demonstra dependência da concentração para determinar a resposta biológica como verificado em células mononucleares do sangue periférico humano e leucócitos polimorfonucleares (COSENTINO et al., 2008).

O perfil fitoquímico publicado no estudo de revisão de Retta e colaboradores (2012) inclui a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, dentre os quais pode-se referir ácido cafeico, callerianina, ácido protocatecuico, galangina, éter galangin-3-metílico, quercetina, 3-O-metilquercetina, gnafalina, isognafalina, quercetagetina, quercetina-3-metil éter-7-diglicosídeo, tamarixetina, tamarixetina-7-glicosídeo, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, luteolina, escoparol, 5,8-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, 3-metoxi-quercetina, 3,5,7,8-tetrametoxi-flavona, 5,7,8-trimetoxiflavona, 7-hidroxi-3-5-8-trimetoxiflavona e achyrobichalcona (CARINI et al., 2014), além de cumarinas, polissacarídeos, lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, óleo essencial contendo α -pineno, β -ocimeno e β -cariofileno, pinocarveol, verbenona, 1,8-cineol, germacreno D, cariofileno-1,10-epóxido, α -copaeno, δ -cadineno e α -humuleno (BIANCHI et al., 2023a; RETTA et al., 2012).

Flavonoides

Os flavonoides são constituintes químicos produzidos em diferentes quantidades pelas plantas, incluindo angiospermas, gimnospermas e pteridófitas, de acordo com a natureza da espécie, seu ciclo de desenvolvimento e as condições ambientais (DAVIES et al., 2019). Também pode haver variações significativas em um mesmo exemplar considerando a parte da planta, o estresse ambiental sofrido e a sazonalidade da colheita (SONI; BRAR; GAUTTAM, 2015).

Considerados metabólitos secundários, ou seja, moléculas produzidas pelas plantas para proteção contra estresse biótico ou abiótico, os flavonoides são responsáveis pela cor, aroma, atração de polinizadores, filtros UV, sinalização, desintoxicantes e antimicrobianos. Apresentam diversas subclasses de acordo com a estrutura molecular dependente dos carbonos do anel C, grau de insaturação e oxidação. São representantes dessas subclasses: flavona, flavanona, flavonol, flavanol, isoflavona, etc. (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). As atividades biológicas desempenhadas pelos flavonoides de forma exógena conforme a literatura científica (WANG; LI; BI, 2018) estão resumidas na Figura 2.

A estrutura básica de um flavonoide engloba um conjunto de três anéis contendo 15 carbonos (C6-C3-C6), sendo o espaçador de 3 carbonos entre os dois anéis aromáticos (anéis A e B) forma um heterociclo contendo oxigênio (anel C) para a maioria dos representantes da classe. São encontrados na forma de agliconas ou ligados a açúcares de modo que as agliconas apresentam menor solubilidade em meio aquoso do que as forma glicosiladas o que facilita o transporte através das células enquanto as formas mais solúveis são mais bem distribuídas e metabolizadas (DIAS; PINTO; SILVA, 2021).

A composição química dos extratos de *A. saturoioides* está intimamente relacionada ao método extrativo e solventes utilizados (BIANCHI et al., 2023b). Dentre os principais ativos presentes nos extratos contendo constituintes flavonoídicos da marcela destacamos a quercetina (QCT) e luteolina (LUT), seguida por 3-O-metilquercetina (3OMQ) (SIMÕES et al., 1988) e

achyrobichalcona (ACB) (BIANCHI et al., 2020; CARINI et al., 2014; HOLZSCHUH et al., 2010a) que terão suas propriedades discutidas a seguir.

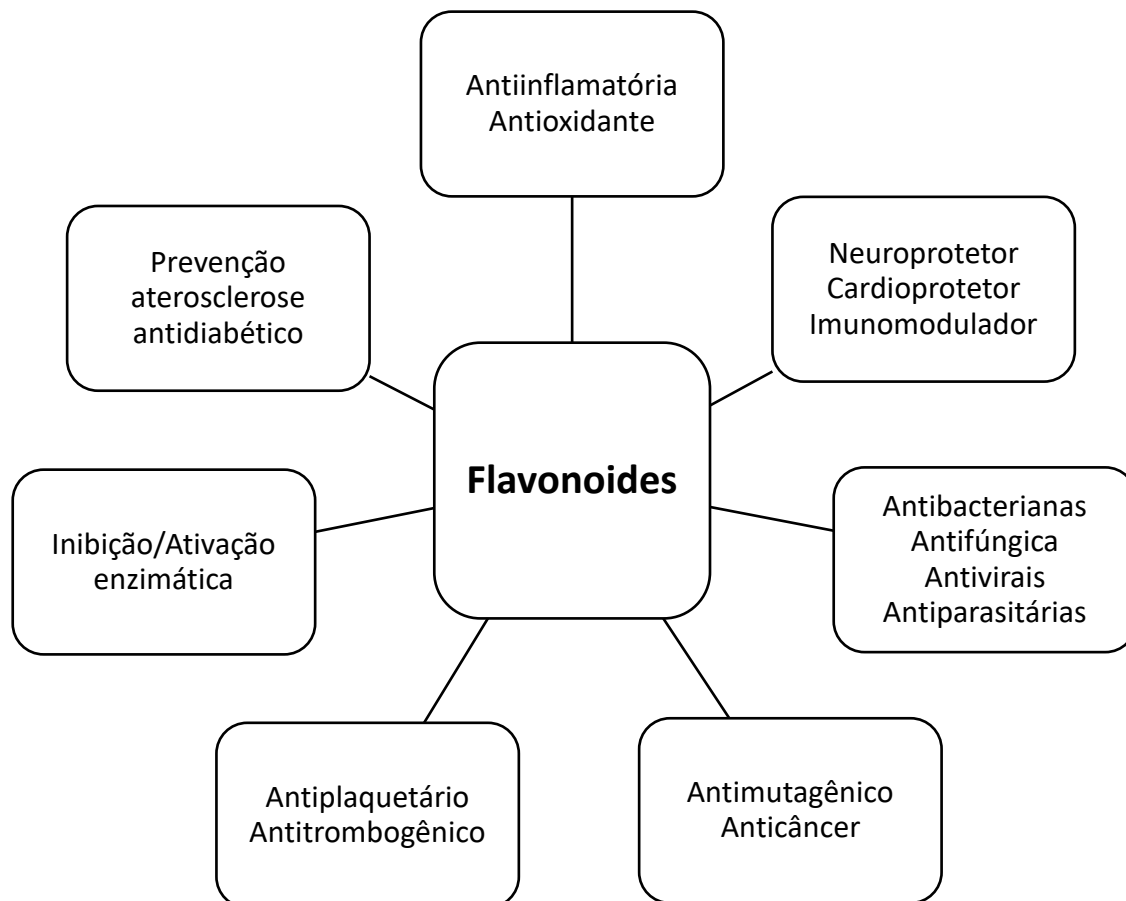


Figura 2. Principais atividades biológicas dos flavonoides para saúde humana e outras aplicabilidades exógenas.

A QCT pertence a subclasse flavonol e apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$, massa molecular de 302,23 g/mol, ponto de fusão 316,5 °C, solubilidade de 60 mg/L a 16 °C em água, sendo solúvel em etanol e muito solúvel em metanol (QUERCETIN - DRUGBANK, 2024; PUBCHEM, 2024). É descrita como um sólido cristalino amarelado e possui atividades antioxidante, antiobesidade, anticancerígena, antiviral, antibacteriana e anti-inflamatória (WANG et al., 2016). Por administração intravenosa em pacientes com câncer, a QCT apresentou dose segura de 945 mg/m². Em doses consideradas tóxicas, os principais sintomas desenvolvidos foram emese, hipertensão, nefrotoxicidade

e redução do potássio sérico. Considerando dados farmacodinâmicos a meia-vida de distribuição e eliminação, depuração e volume de distribuição foram de, respectivamente, 0,7 – 7,8 min, 3,8 – 86 min, 0,23 – 0,84 L/min/m² e 3,7 L/m² (FERRY et al., 1996).

A LUT da subclasse das flavonas, apresenta fórmula molecular C₁₅H₁₀O₆, massa molecular de 286,24 g/mol, ponto de fusão em 329,5 °C e solubilidade de 50,60 mg/L a 37 °C sendo solúvel em metanol e muito solúvel em etanol (LUTEOLIN - DRUGBANK, 2024; PUBCHEM, 2024). Possui aspecto de um sólido cristalino amarelo e apresenta atividades antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, antiamnésica, hepatoprotetora, cardioprotetora, neuroprotetora e anticancerígena (PENG; YAN, 2010; SHAKEEL et al., 2018), além de ser um promissor adjuvante analgésico (NTALOUKA; TSIRIVAKOU, 2023). Um estudo clínico recente, verificou a influência da suplementação oral de palmitoiletanolamida (PEA) e LUT combinado a técnica de treinamento olfativo para paciente com perda olfativa por COVID-19, resultando em uma melhora do quadro quando comparado ao placebo (DI STADIO et al., 2022).

A 3OMQ (também mencionada como quercetina 3-O-metil éter ou isorhamnetina), pertencente a subclasse flavonol, possui fórmula molecular C₁₆H₁₂O₇, massa molecular de 316,26 g/mol, ponto de fusão entre 307 e 314 °C e solúvel em acetona, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila e moderadamente solúvel em água soluções hidroalcoólicas (ISORHAMNETIN - DRUGBANK, 2024; PUBCHEM, 2024). Sob forma de um sólido cristalino, apresenta atividades antiviral, antioxidante, antitumoral, indutora de apoptose, protetor cardiovascular e cerebrovascular, anti-inflamatória e na prevenção da obesidade (GONG et al., 2020).

AACB, apresenta-se como uma bichalcona, de fórmula molecular C₃₂H₂₆O₉ e massa molecular de 554,55 g/mol, foi identificada pela primeira vez por Holzschuh e colaboradores (2010) e apresenta dados escassos na literatura referentes a suas propriedades físico-químicas, por tratar-se estrutura química inédita. Entretanto, comparativamente aos flavonoides, demonstra sofrer maior fotodegradação e degradação térmica (HOLZSCHUH et al., 2007, 2010b). Além disso, há evidências de sua atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares de gliomas (C6, U87 e U251), câncer de mama (MDA-MB-23) e melanoma

(A375-A7, A375-G10 e A375-PCDNA3) (CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014b; SOUZA et al., 2018a).

Entre os flavonoides destacados por este estudo, a QCT é a mais estudada em estudos clínicos, incluindo 97 ensaios clínicos observados pelo <https://clinicaltrials.gov/>, enquanto LUT foi alvo de 15 estudos. As demais moléculas não possuem estudos clínicos conhecidos. As estruturas dessas moléculas estão representadas na Figura 3.

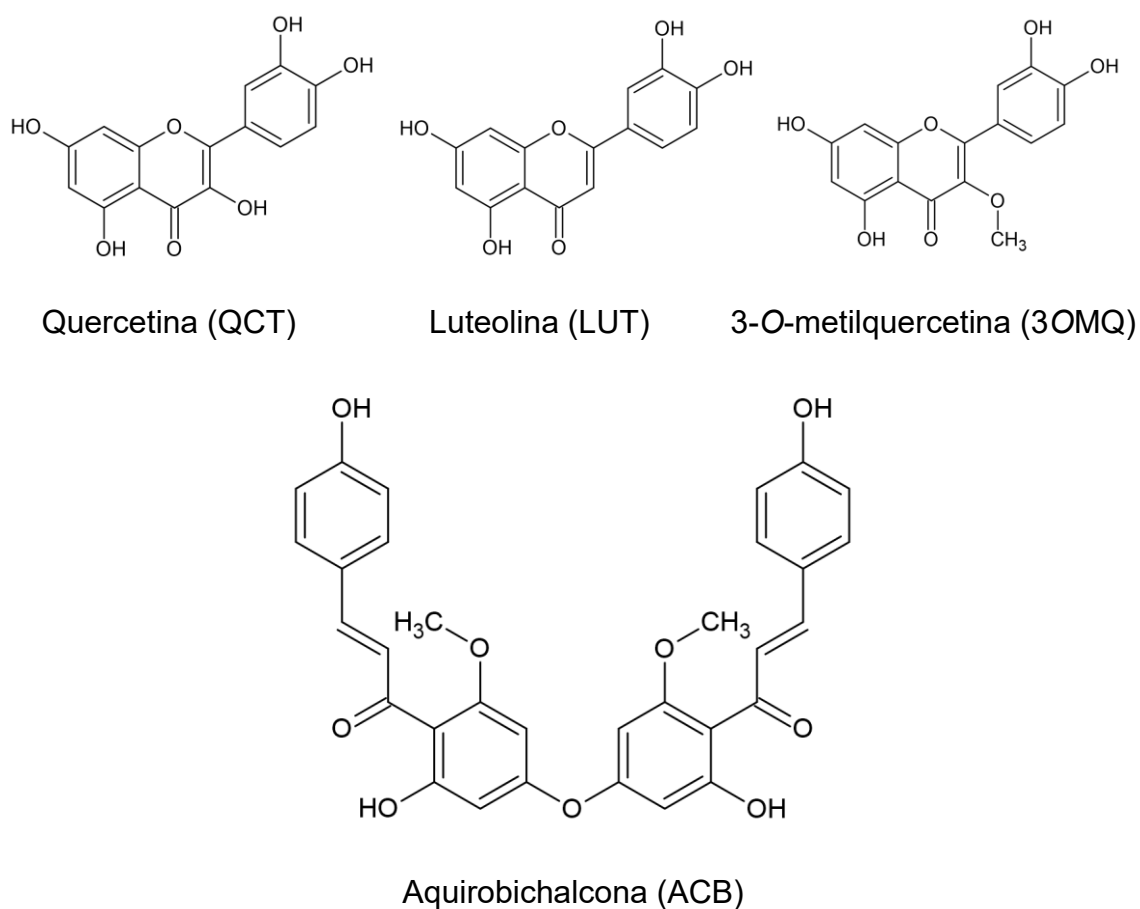


Figura 3. Estrutura bidimensional da quercetina (QCT), luteolina (LUT), 3-O-metilquercetina (3OMQ) e achirobicalcona (ACB).

A principal demanda por flavonoides advém das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (ARCT; PYTKOWSKA, 2008; BARRECA et al., 2021; KALEEM; AHMAD, 2018; RAHAMAN; MONDAL, 2020), sendo importante ressaltar que a extração desses insumos para uso humano exige processos com

alto grau de pureza e qualidade, por isso, procedimentos extrativos ecologicamente corretos com altos rendimento são necessários para ampliar sua utilização. Além disso, essas moléculas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e uma baixa biodisponibilidade *in vivo*, dificultando seu emprego. Para contornar esse empecilho, estratégias para melhorar essas características são necessárias.

Dentre as principais formas de melhorar a biodisponibilidade e solubilidade aquosa dessas moléculas temos estratégias como a transformação estrutural que provoca alterações moleculares e as tecnologias farmacêuticas como a utilização de nanotecnologia, polímeros, complexos transportadores e formação de cocrístrais (ZHAO; YANG; XIE, 2019). As ciclodextrinas foram a abordagem escolhida pelo estudo para contornar os problemas relacionados a solubilidade e visando proteger da degradação as moléculas de interesse durante o processo de extração verificando sua influência no rendimento final.

Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos unidos por ligação α -(1,4) formando um cone truncado com ampla capacidade de gerar complexos de inclusão com diferentes moléculas, aumentando assim sua hidrossolubilidade e estabilidade. Essas características são oriundas da sua estrutura composta por uma cavidade lipofílica com afinidade por substâncias apolares e exterior hidrofílico pela presença de hidroxilas que possibilita a inserção em um ambiente mais polar (BREWSTER; LOFTSSON, 1996).

A complexação de moléculas com ciclodextrina pode ser com inclusão total da molécula ou parcial, ou seja, incluindo toda ou somente uma parte específica da molécula hospede. O processo de formação de um complexo de inclusão é termodinamicamente favorecido uma vez que ocorre a substituição da água com alta entalpia do interior da cavidade da ciclodextrina por uma molécula de maior afinidade (hidrofóbica), apresentando um ΔH ($\frac{kJ}{mol}$) negativo. Outras forças importantes para formação do complexo são interações de Van de Waals, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (BREWSTER; LOFTSSON, 1996).

A β -ciclodextrina (β CD), representada na Figura 4, apresenta perfil toxicológico seguro para vias de administração oral e cutânea podendo melhorar a biodisponibilidade e penetração (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Possui sete unidades de glicopirranose, fórmula molecular $C_{42}H_{70}O_{35}$ e massa molecular média de 1134,98 g/mol. Apresenta-se como um pó branco cristalino com ponto de fusão entre 290 e 300 °C solubilidade de 1,85% em água pura (25 °C), aumentando-a sob aquecimento (β -CYCLODEXTRIN - CHEMODEX; PUBCHEM, 2024; ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

A obtenção de complexos de inclusão de moléculas com ciclodextrinas pode ser realizada por meio de diferentes técnicas de preparo, tais como, soluções, suspensões ou malaxagem, dependendo das propriedades da molécula a ser incluída na cavidade da ciclodextrina, cinética de equilíbrio e formulação desejada (DEL VALLE, 2004). São exemplos de métodos reportados *spray drying*, com a secagem concomitante do complexo obtido, irradiação de

micro-ondas e misturas de sólidos como é o caso de *kneading* e *grinding* (CID-SAMAMED et al., 2022).

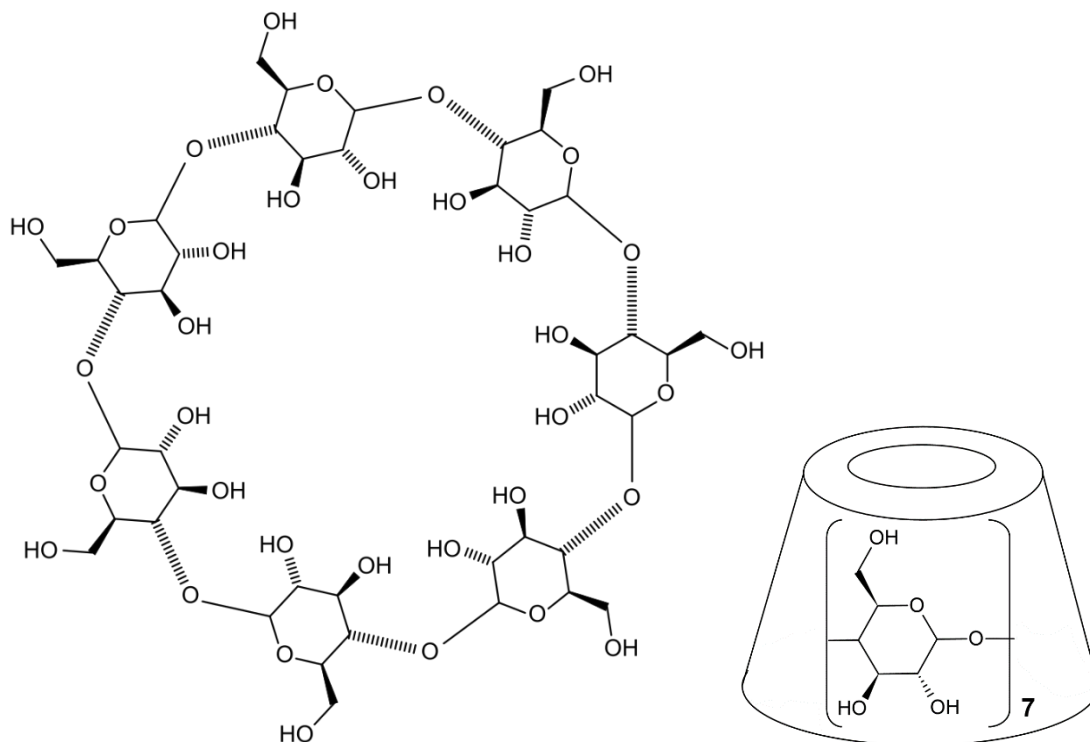


Figura 4. Estruturas representativas da β -ciclodextrina.

O método em solução é o mais utilizado em escala laboratorial, no qual uma solução de ciclodextrina é preparada em temperatura ambiente ou com aquecimento para o caso de ciclodextrinas pouco solúveis, à qual é adicionado excesso de um composto de interesse para complexação. Se o complexo é solúvel, deve-se realizar a filtração da solução e o filtrado pode ser seco por evaporação, liofilização ou *spray drying*. Se o complexo obtido é menos solúvel e satura a solução, este pode ser recolhido por precipitação, centrifugação ou filtração (JIN, 2013). No último caso, o conteúdo deve ser lavado para remoção das moléculas que não foram complexadas, podendo-se utilizar água ou outro solvente miscível como etanol e então realizar a secagem do material (JIANG et al., 2019).

A complexação das principais agliconas flavonoídicas, incluindo as oriundas da *Achyrocline satureioides*, com ciclodextrina em diferentes condições experimentais tem sido relatada por nosso grupo de pesquisa (BORGHETTI et al., 2011; DONEDA et al., 2021; PITTOL et al., 2022; SCHWINGEL et al., 2008). Pittol e colaboradores (2022) verificaram a multicomplexação de QCT, LUT e 3OMQ com (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP β CD) em uma fração enriquecida com flavonoides de *Achyrocline satureioides*, resultando numa correlação linear, indicando a formação de complexos com razão estequiométrica de 1:1, confirmado por ESI-MS.

Já o trabalho de Doneda e colaboradores (2021) investigou a incorporação de 3OMQ em hidrogel contendo diferentes β -ciclodextrinas, sendo que a formulação contendo HP β CD apresentou potencial para testes de tratamento tópico de melanoma, assim como o estudo de Schwingel e colaboradores (2008) que também verificou a associação entre 3OMQ à β CD. Além da associação com outros flavonoides de diferentes matrizes vegetais como genisteína e β CD (complexo 1:1) por Xavier e colaboradores (2010) e da daidzeína com diferentes tipos de β CD por Borghetti e colaboradores (2011).

A presente proposta pautou-se na hipótese de que a β CD possa exercer um efeito de promoção da solubilidade das agliconas flavonoídicas no meio extrativo (SWE) e uma possível proteção da degradação dos analitos pelas altas temperaturas empregadas.

Extração por água no estado subcrítico

A extração de flavonoides tem sido realizada utilizando diversos métodos, incluindo os convencionais, como maceração e a extração de Soxhlet, que apresentam diversas desvantagens como o uso de grandes quantidades de solventes, longos tempos de extração e alto consumo de energia, e as técnicas não convencionais que incluem principalmente extração assistida por ultrassom (“*UAE*”, do termo inglês *ultrassound assisted extraction*), extração assistida por micro-ondas (“*MAE*”, do termo inglês *microwave assisted extraction*), extração com fluido supercrítico (“*SFE*”, do termo inglês *supercritical fluid extraction*), extração com líquido pressurizado (“*PLE*”, do termo inglês *pressurized liquid extraction*), extração assistida por enzima (“*EAE*”, do termo inglês *enzyme assisted extraction*), dispersão de matriz em fase sólida (“*MSPD*”, do termo inglês *matrix solid phase dispersion*), campo elétrico pulsado (“*PEF*”, do termo inglês *pulsed electric field*), solventes eutéticos profundos (“*DES*”, do termo inglês *deep eutectic solvents*) e, especialmente para este trabalho, extração por água quente pressurizada (“*PHWE*” do termo inglês *pressurized hot water extraction*), ou por água no estado subcrítico (“*SWE*” do termo inglês *subcritical water extraction*).

A PHWE ou SWE utiliza água como agente extrator, sendo considerada uma alternativa sustentável e de baixo custo para a obtenção de constituintes com variada hidrossolubilidade. As alterações físico-químicas que possibilitam tal aplicação são decorrentes das variações na pressão e temperatura que permitem a manutenção do estado líquido durante a extração, diminuindo, por exemplo, a constante dielétrica, a tensão superficial e a viscosidade (TEO et al., 2010a).

Dentre as vantagens para seu uso podemos citar os tempos de extração reduzidos, a melhora da molhabilidade da matriz, da difusão do analito, da cinética de transferência de massa e da solubilidade de constituintes mais apolares, além do uso de solvente atóxico, estável, não reativo, não inflamável, inócuo e barato. Já as desvantagens são relacionadas com a redução da seletividade, degradação de compostos termolábeis e propensão a reações químicas indesejadas que podem gerar compostos tóxicos (CASTRO-PUYANA; MARINA; PLAZA, 2017).

Na extração por SWE, a eficiência extrativa depende da solubilidade, da transferência de massa e do efeito de matriz que podem ser modificados pelas variações no tempo de extração, vazão, adição de modificadores e, principalmente, pela temperatura (TEO et al., 2010b). Dentre os agentes utilizados para melhorar a extração de flavonoides destacamos os modificadores de pH (tais como os ácidos fórmico, acético, cítrico e tartárico) (FAN et al., 2016; GUTHRIE et al., 2020; SRINIVAS et al., 2011) e os cossolventes (etanol e o glicerol) (HUAMÁN-CASTILLA et al., 2020).

Esquemáticamente, SWE pode operar no modo estático ou dinâmico, ou seja, com ou sem renovação contínua do solvente durante a extração. No modo estático, a principal vantagem é que o extrato não é diluído, podendo ser realizados mais ciclos extrativos no mesmo material pela substituição do solvente. Entretanto, o maior conteúdo será extraído no primeiro ciclo. Basicamente, a instrumentalização é semelhante a extração acelerada por solvente (“ASE” do termo inglês *Accelerated Solvent Extraction*), em que a célula extrativa contendo o material vegetal e a água está localizada em uma câmara de aquecimento com controle de temperatura e pressão.

A extração pode ser realizada utilizando-se gases inertes ou mantendo as condições atmosféricas normais. No entanto, a última apresenta a desvantagem de poder promover processos oxidativos na amostra (GETACHEW; CHUN, 2017). A relação entre a quantidade sólido:líquido na extração desempenha um papel importante, visto que está relacionada com a saturação do meio e, portanto, com a eficiência extrativa (GUTHRIE et al., 2020; SONG et al., 2018).

A extração pode ser avaliada como resultado de etapas sequenciais que ocorrem a partir da molhabilidade da matriz vegetal pelo solvente, dessorção inicial dos componentes da matriz, difusão desses componentes através da matriz, partição para o solvente e difusão da camada extratora estagnada para a zona de convecção. As variáveis preponderantes para extração são a temperatura e a pressão que modifica as características da água e mantém-na no estado líquido, respectivamente. De modo geral altas temperaturas ampliam o número e a quantidade de substâncias extraídas, mas excessivamente altas podem reduzir a seletividade, gerar degradação do analito e reações químicas

indesejadas, aumentar a presença de contaminantes e dificultar a análise (PLAZA; TURNER, 2015).

A eficiência extrativa em diferentes pressões demonstra que a melhor condição extrativa não exige extremos (CVETANOVIĆ et al., 2017; KO; KWON; CHUNG, 2016), mas é um processo mais lento em baixas pressões podendo haver compensação com o aumento do tempo de extração (CVETANOVIĆ et al., 2018; LIAU et al., 2017). No caso de flavonoides, a temperatura aumenta a eficiência extrativa de acordo com suas estruturas químicas, ou seja, as mais polares são extraídas em temperaturas menores, enquanto as mais apolares em temperaturas maiores (BENJAMIN et al., 2017; CHEIGH et al., 2015). Outro parâmetro de suma importância, considerada uma vantagem da SWE, é o tempo de extração reduzido em comparação aos métodos convencionais (KIM; LIM, 2020; TEO et al., 2010b). Muito embora não seja regra geral, o uso de altas temperaturas permite reduzir o tempo de extração e em alguns casos, resultar na redução da conversão dos compostos em produtos de degradação.

Conforme discorrido, o foco deste estudo é promover a extração dos flavonoides QCT, 3OMQ, LUT e da ACB, oriundos de *A. saturoioides*, por PHWE conjuntamente com β CD, comparando os resultados com os métodos extrativos Soxhlet e maceração dinâmica, além das análises por RMN, DSC e MS dos extratos obtidos.

REFERÊNCIAS

ALERICO, G. C.; POSER, G. L. VON. **Estudo etnofarmacológico de plantas utilizadas como cicatrizantes no Rio Grande do Sul. Dissertação Mestrado UFRGS**, 2015.

ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 4, p. 347–357, 2008.

BALESTRIN, L. A. et al. Effect of hydrogel containing *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) Extract-loaded nanoemulsions on wound healing activity. **Pharmaceutics** **2022, Vol. 14, Page 2726**, v. 14, n. 12, p. 2726, 6 dez. 2022.

BARRECA, D. et al. Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. **Trends in Food Science and Technology**, n. September 2020, 2021.

BASTOS, C. I. M. et al. *Achyrocline satureioides* as an adjuvant therapy for the management of mild viral respiratory infections in the context of COVID-19: Preliminary results of a randomized, placebo-controlled, and open-label clinical trial. **Phytotherapy Research**, v. 37, n. 11, p. 5354–5365, 1 nov. 2023.

BENJAMIN, M. et al. Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and Soybean Protein Isolate. **Food Chemistry**, v. 214, p. 9–15, 2017.

BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2133–2145, 2020.

BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* review: From the pharmacochemical diversity to the technological development of products. **Fitoterapia**, v. 168, p. 105537, 1 jul. 2023a.

BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* review: From the pharmacochemical diversity to the technological development of products. **Fitoterapia**. Elsevier B.V., 1 jul. 2023b.

BORGHETTI, G. S. et al. Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 886–893, ago. 2011.

BRAGA, M. A. et al. ***Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts acting as enzyme modulators: digestion, inflammation, and hemostasis**. Disponível em:

<<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/43898/31046>>.

Acesso em: 12 dez. 2023.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. Drug Solubilization and Stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017–1025, 1996.

CAREZZANO, M. E. et al. Plant-derived essential oils and aqueous extract as potential ingredients for a biopesticide: phytotoxicity in soybean and activity against soybean mosaic virus. **Processes 2023, Vol. 11, Page 2265**, v. 11, n. 8, p. 2265, 27 jul. 2023.

CARINI, J. et al. Isolation of Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by High-Speed Countercurrent Chromatography. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 66–71, 2014.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. **Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy**. **RSC Advances**, 2014a.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Advances**, v. 4, n. 7, p. 3131–3144, 2014b.

CARNEY, J. R. et al. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 203–205, 2002.

CASTRO-PUYANA, M.; MARINA, M. L.; PLAZA, M. Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 31–36, 2017.

CHEIGH, C. I. et al. Extraction characteristics of subcritical water depending on the number of hydroxyl group in flavonols. **Food Chemistry**, v. 168, p. 21–26, 2015.

Chemodex. Disponível em: <<https://www.chemodex.com/products/beta-cyclodextrin/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

CID-SAMAMED, A. et al. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, v. 384, n. August 2021, p. 132467, 2022.

COSENTINO, M. et al. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 501–507, 28 mar. 2008.

CVETANOVIĆ, A. et al. Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 120, p. 32–42, 2017.

CVETANOVIĆ, A. et al. Subcritical water extraction as a cutting edge technology for the extraction of bioactive compounds from chamomile: Influence of pressure on chemical composition and bioactivity of extracts. **Food Chemistry**, v. 266, n. June, p. 389–396, 2018.

DAVIES, K. et al. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. **Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org**, v. 1, p. 943, 2019.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2–3, p. 102–108, 19 fev. 2007.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DI STADIO, A. et al. Ultramicronized palmitoylethanolamide and luteolin supplement combined with olfactory training to treat post-COVID-19 olfactory impairment: a multi-center double-blinded randomized placebo-controlled clinical trial. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 10, p. 2001–2012, 22 abr. 2022.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. **Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity**. *Molecules* MDPI, 1 set. 2021.

DONEDA, E. et al. 3-O-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*—cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 11, n. 5, p. 2151–2168, 1 out. 2021.

Drugbank. Disponível em <https://go.drugbank.com/drugs/DB04216>. Acesso em: 6 de Janeiro de 2024.

Drugbank. Disponível em <https://go.drugbank.com/drugs/DB15584>. Acesso em: 6 de Janeiro de 2024.

Drugbank. Disponível em <https://go.drugbank.com/drugs/DB16767>. Acesso em: 6 de Janeiro de 2024.

ESPIÑA, D. C. et al. A more accurate profile of *Achyrocline satureioides* hypocholesterolemic activity. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, n. 4, p. 347–353, jun. 2012.

FAN, R. et al. Impact of extraction parameters on chemical composition and antioxidant activity of bioactive compounds from Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) by subcritical water. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, v. 51, n. 4, p. 609–621, 2016.

Farmacopeia Brasileira. Em: 6ª edição ed. [s.l: s.n.]. v. Volume IIp. 352–362.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A. M. et al. Antioxidant, antidiabetic, and antiobesity properties, tc7-cell cytotoxicity and uptake of *Achyrocline satureioides* (Marcela) conventional and high pressure-assisted extracts. *Foods*, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

FERRY, D. R. et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition¹. v. 2, p. 659–668, 1996.

FLORA DO BRASIL. Deble, L.P. 2020. *Achyrocline* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB108826>>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2024.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds: A green waste valorization approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 3719–3727, 2017.

GONG, G. et al. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 128, n. April, 2020.

GONZÁLEZ, D. M.; RITTER, M. R.; KONRATH, E. L. **Vista de Plantas medicinales para los trastornos digestivos: Una revisión de estudios etnobotánicos realizados en el sur de Brasil**. Disponível em: <<https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/371/383>>. Acesso em: 10 dez. 2023.

GUTHRIE, F. et al. Recovery of phenolic antioxidants from green kiwifruit peel using subcritical water extraction. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 136–144, 2020.

HOLZSCHUH, M. H. et al. Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder. **Pharmazie**, v. 62, n. 12, p. 902–906, 2007.

HOLZSCHUH, M. H. et al. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Pharmazie**, v. 65, n. 9, p. 650–656, set. 2010a.

HUAMÁN-CASTILLA, N. L. et al. Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and computational chemistry calculations. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2020.

JIANG, L. et al. **Physicochemical properties of catechin/ β -cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation**. **CYTA - Journal of Food**, 2019.

JIN, Z.-Y. **CYCLODEXTRIN CHEMISTRY Preparation and Application**. v. 59

KADARIAN, C. et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 1, p. 57–61, 2002.

KALEEM, M.; AHMAD, A. **Flavonoids as Nutraceuticals**. Elsevier Inc., 2018.

KIM, D. S.; LIM, S. BIN. Extraction of flavanones from immature *Citrus unshiu* pomace: process optimization and antioxidant evaluation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

KO, M. J.; KWON, H. L.; CHUNG, M. S. Pilot-scale subcritical water extraction of flavonoids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Markovich) peel. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 175–181, 2016.

LANGOVÁ, D. et al. *Achyrocline satureioides* Hydroalcoholic extract as a hypoallergenic antimicrobial substitute of natural origin for commonly used preservatives in cosmetic emulsions. **Plants**, v. 12, n. 10, p. 2027, 1 maio 2023.

LEI Nº 11.858, DE 5 DE DEZEMBRO DE 2002. Institui a Planta Medicinal Símbolo do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Brasil, Porto Alegre, 5 dez. 2002.

LIAU, B. C. et al. Development of pressurized hot water extraction for five flavonoid glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds (byproducts). **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 296–304, 2017.

LOFTSSON, THORSTEINN.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.

MARTÍNEZ-BUSI, M. et al. Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (Compositae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2579–2591, 15 jun. 2019.

MORESCO, K. S. et al. Supplementation with *Achyrocline satureioides* inflorescence extracts to pregnant and breastfeeding rats induces tissue-specific changes in enzymatic activity and lower neonatal survival. **Biomedicine**, v. 5, n. 3, 1 set. 2017.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAJAS, F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 6, p. 486–490, jun. 2005.

NTALOUKA, F.; TSIRIVAKOU, A. **Luteolin: a promising natural agent in management of pain in chronic conditions.** *Frontiers in Pain Research* Frontiers Media S.A., 2023.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PARA O FUTURO -, P.; SUL, R. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial.**

PENG, B.; YAN, W. Solubility of luteolin in ethanol + water mixed solvents at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 1, p. 583–585, 2010.

PITTOL, V. et al. The challenge of flavonoid/cyclodextrin complexation in a complex matrix of the quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2022.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

POLYDORO, M. et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, n. 23, p. 2815–2826, 23 abr. 2004.

PubChem. **Disponível** **em:** **<**
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isorhamnetin>**>. Acesso em: 6**
de janeiro de 2024.

PubChem. **Disponível** **em:**
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444041>**>. Acesso em: 10 de**
janeiro de 2024.

PubChem. **Disponível** **em:**
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin>**>. Acesso em: 6 de**
janeiro de 2024.

RAHAMAN, S. T.; MONDAL, S. Flavonoids: A vital resource in healthcare and medicine. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 8, n. 2, p. 91–104, 2020.

RETTA, D. et al. **Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. Industrial Crops and Products**, jul. 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Edition.**

SALGUEIRO, A. C. F. et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 6–14, 24 dez. 2016.

SANTIN, J. R. et al. Antiulcer effects of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 334–339, jul. 2010.

SCHWINGEL, L. et al. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: Complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1–2, p. 149–159, out. 2008.

SHAKEEL, F. et al. Solubility, thermodynamic properties and solute-solvent molecular interactions of luteolin in various pure solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 43–50, 2018.

SILVA, B. Q.; HAHN, S. R. **Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias Farm. Hosp. Serv.**

SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281–293, 1988.

SONG, R. et al. Effect of Subcritical water on the extraction of bioactive compounds from carrot leaves. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 10, p. 1895–1903, 2018.

SONI, U.; BRAR, S.; GAUTTAM, V. K. Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 9, p. 3654, 2015.

SOUZA, P. O. DE et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51. May, p. 23–33, 2018a.

SOUZA, P. O. DE et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23–33, 1 set. 2018b.

SRINIVAS, K. et al. Pressurized solvent extraction of flavonoids from grape pomace utilizing organic acid additives. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 1, p. 90–105, 2011.

TEO, C. C. et al. Pressurized hot water extraction (PHWE). **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2484–2494, 2010.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, 2024. Disponível em <https://tropicos.org/name/100501661>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2024.

WANG, T. YANG; LI, Q.; BI, K. SHUN. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018.

WANG, W. et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 21–38, 2016.

WFO (2024): *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Disponível em <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000038434>>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2024.

XAVIER, C. R. et al. Improvement of genistein content in solid genistein/cyclodextrin complexes β . **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 587–590, 2010.

ZHAO, J.; YANG, J.; XIE, Y. Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: An overview. 2019.

CAPÍTULO II

Artigo revisão flavonoides extraídos por água quente pressurizada (PHWE)

O presente capítulo discorrerá sobre uma revisão da literatura científica sobre flavonoides extraídos por água no estado subcrítico, bem como o detalhamento referente aos principais parâmetros que influenciam na recuperação destes compostos. Dentre os tópicos abordados estarão sistematizadas as informações sobre o material vegetal, tratamento da amostra, tipos de extratores que permitem a utilização de alta temperatura e pressão, modificadores que auxiliam na extração de componentes vegetais, tratamento de extratos, associação e comparação com outras técnicas extrativas. O texto completo está compreendido entre as páginas 57 – 85.

CAPÍTULO III

Artigo Box-Behnken e perfil analítico dos extratos

O presente capítulo apresentará o artigo gerado a partir dos dados experimentais da associação entre β -ciclodextrina e a extração por água no estado subcrítico de inflorescências de *Achyrocline satureioides*. Dentre os experimentos realizados para averiguar a utilização inovadora dessa técnica, a metodologia de superfície de resposta do tipo Box-Behnken Design (BBD) foi utilizada para otimização do método. A quantificação dos flavonoides (quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e achyrobichalcona) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a comparação com outras metodologias (Soxhlet e maceração dinâmica) nas quais realizou-se análises estatísticas para determinar a diferença significativa entre os resultados. Além disso, outras análises como calorimetria exploratória diferencial (DSC), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) foram utilizadas para caracterização da amostra obtida. O texto completo está compreendido entre as páginas 89 – 108

DISCUSSÃO GERAL

A obtenção de compostos bioativos envolve uma variedade de técnicas extrativas, incluindo os métodos modernos mais sustentáveis como SWE. Essa técnica extrativa utiliza água como solvente para a extração de compostos bioativos, sendo considerada econômica e ambientalmente viável para moléculas moderadamente hidrossolúveis como flavonoides. Embora apresente vantagens como o tempo reduzido de extração e alta eficiência, seu emprego é limitado para compostos termolábeis pela aplicação de altas temperaturas.

Flavonoides compreendem uma classe de metabólitos secundários de origem vegetal amplamente utilizados para fins medicinais, cosméticos e alimentícios (DEL VALLE, 2004). As agliconas livres, devido a suas características estruturais são pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos moderadamente apolares. A utilização de SWE/PHWE tem sido amplamente investigada para esta classe de constituintes bioativos visando uma abordagem extrativa mais sustentável, como pode ser observado no artigo de revisão que constitui o capítulo II desta dissertação.

Por outro lado, ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos provenientes da degradação enzimática do amido. São amplamente utilizadas pela sua capacidade de formar de complexos com diversas substâncias hidrofóbicas (JIN, 2013). A formação de complexos de inclusão depende de diversas características físico-químicas do hospedeiro (CD) e da molécula hóspede incluindo seu tamanho e configuração química espacial, que determinam a sua entrada total ou parcial na cavidade. Outras formas de interação também podem ser estabelecidas entre as ciclodextrinas e os constituintes, tais como o estabelecimento de complexos de não-inclusão ou formação de agregados que podem influenciar a sua estabilidade e solubilidade.

Achyrocline satureioides é uma espécie de ocorrência na América do Sul, e utilizada como planta medicinal frequentemente na região sul do Brasil. Suas características químicas, farmacológicas e de desenvolvimento tecnológico estão sumarizadas em dois artigos de revisão (BIANCHI et al., 2023; RETTA et al., 2012). Entre os constituintes ativos encontrados em suas inflorescências

encontram-se as agliconas flavonoídicas quercetina (QCT), luteolina (LUT), 3-O-metilquercetina (3OMQ) e achyrobichalcona (ACB), que apresentam baixa hidrossolubilidade (HOLZSCHUH et al., 2010; SIMÕES et al., 1988). Entre os métodos de extração relatados para sua extração, destacam-se por sua eficiência, a extração em Soxhlet que utiliza solventes orgânicos como diclorometano, acetato de etila e metanol (BIANCHI et al., 2020) e a maceração dinâmica que utiliza uma solução hidroetanólica 61% de etanol (v/v) (PITTOL et al., 2019). O primeiro tem a desvantagem de utilizar solventes orgânicos tóxicos para o ser humano e poluente para o meio ambiente, além de fazer uso de calor, fator determinante da degradação das agliconas (HOLZSCHUH et al., 2007). O segundo método, apesar de utilizar solvente eco-friendly, tem a desvantagem de que sua eliminação pode representar riscos de explosão, nas escalas piloto e industrial, quando o objetivo é a produção de extratos secos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo explorar as vantagens da extração com água no estado sub-crítico e propor meios de reduzir suas limitações. A experiência prévia do grupo na obtenção de complexos das agliconas flavonoidicas de *Achyrocline satureioides* com ciclodextrinas e o aumento da solubilidade resultante, mesmo quando estas encontram-se simultaneamente numa fração (PITTOL et al., 2022) serviu de inspiração para a elaboração da hipótese de trabalho.

A hipótese central do trabalho foi, portanto, que a adição de β CD em meio extrativo por SWE seria capaz de influenciar positivamente a extração das agliconas flavonoidicas de *Achyrocline satureioides* em água no estado subcrítico, assim como protegê-las da degradação térmica. Esta abordagem, inédita na literatura apresenta grande potencial de aplicação para outros constiuintes bioativos, especialmente os termolábeis.

A dissertação está organizada em três capítulos. O primeiro capítulo aborda aspectos que subsidiam a compreensão do trabalho. Aspectos relativos à espécie *Achyrocline satureioides* como denominação científica e regional, características químicas, morfológicas, ambientais, culturais e farmacológicas. Dentre os constituintes flavonoídicos presentes na espécie destacam-se as agliconas QCT, LUT, 3OMQ e ACB. A partir das informações apresentadas é

possível verificar que todas estas possuem ponto de fusão acima de 300 °C o que poderia ser indicativo de estabilidade térmica. No entanto, esse não é o único indicador de estabilidade térmica. A estrutura química e tipo de ligação são preponderantes nesse quesito, como bem observado por HOLZSCHUH et al. (2007) em estudo de estabilidade térmica de extratos da planta.

Com relação a β -CD, seu ponto de fusão também é elevado e próximo a 300 °C. Os diferentes métodos de complexação entre a β -CD e as agliconas flavonoídicas da espécie foram abordados em estudo de nosso grupo de pesquisa, que observou a viabilidade de complexação simultânea destas em extratos de *A. saturoioides* (PITTOL et al., 2022). O último tópico do capítulo I refere-se à PHWE/SWE, ressaltando os principais aspectos relacionados às características inerentes da técnica como aplicação de elevadas temperatura e pressão para manutenção da água na sua forma líquida, agindo como agente extrator. No final do capítulo, considerando os possíveis efeitos indesejados pela utilização de temperaturas elevadas, é proposto, pela primeira vez, a adição de β -CD no meio extrativo para contorná-los e promover a extração e proteger as agliconas da degradação.

O segundo capítulo está apresentado na forma de um artigo de revisão, que será submetido para publicação, que trata da extração de flavonoides por PHWE/SWE. Aborda os principais fatores que impactam o desenvolvimento e aplicação da técnica, detalhadamente. Observa-se que, para a extração de um mesmo flavonoide, os parâmetros de extração são determinantes, sendo que a partir da modulação nas variáveis é possível encontrar condições extrativas ideais. A temperatura é o parâmetro considerado primordial para a extração de compostos e, de modo geral, substâncias mais apolares tendem a ser mais bem extraída em elevadas temperaturas enquanto as mais polares em baixas. Além da temperatura, outros fatores concorrem para definir a melhor condição de extração sendo geralmente relacionados a aspectos da própria amostra, tempo de extração, pressão, tipo de extrator utilizado, entre outros.

A maior parte dos estudos faz uso de metodologias estatísticas, principalmente análises de superfície de resposta (RSM) em desenhos experimentais do tipo Box-Behnken Design (BBD) para determinar se os

resultados obtidos são explicados pelo modelo desenvolvido e qual as melhores combinações as variáveis considerando a resposta requerida. A partir do somatório de informações orientados pela revisão, obteve-se as principais variações de temperatura, pressão e tempo de extração, bem como conhecimentos relacionados à amostra quando aplicadas à PHWE/SWE. Dessa forma, foi possível indicar as variáveis temperatura e tempo de extração como fundamentais para a extração dos compostos de interesse, assim como as faixas máximas e mínimas de trabalho que foram empregadas nos experimentos posteriormente.

O terceiro e último capítulo contém os resultados dos experimentos de extração das agliconas flavonoídicas de *Achyrocline satureioides* utilizando SWE. A SWE foi realizada em reator de alta temperatura e pressão no modo estático com parâmetros definidos em 40 bar, relação droga:solvente 1:100. Para estabelecer a melhor condição de extração foi aplicado o desenho experimental tipo Box Behenken Design (BBD), variando a temperatura (100, 150 e 200 °C), tempo após atingir a temperatura (0, 15 e 30 minutos) e concentração de β -CD (0,0, 1,5 e 3,0%, m/v). A variação da concentração de β -CD para os experimentos foi escolhida considerando que a solubilidade a 25 °C é em torno de 1,85% (m/v), ou seja, há resultados referentes aos pontos de não saturação e de saturação do sistema em temperatura ambiente.

Os resultados de BBD demonstraram que o modelo se ajustou de forma diversa para os analitos minoritários (LUT e ACB) e majoritários (QCT e 3OMQ), sendo os últimos os que menos ajustaram-se ao modelo. A quantificação dos flavonoides-agliconas foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O parâmetro que foi preponderante na extração de todos as agliconas flavonoídicas foi a concentração de β -CD que aumentou a eficiência extrativa na maior concentração testada (3%, m/v). A partir disso, houve a otimização experimental que definiu a melhor extração de QCT e 3OMQ a 100 °C e 30 minutos após o alcance do ponto subcrítico, enquanto LUT e ACB a 200 °C e 0 minutos, ambos com 3% (m/v) de β -CD. Em suma, a capacidade preditiva (%) do modelo foi melhor para os analitos minoritários, havendo grande semelhança experimental com os valores preditos. Para os analitos majoritário,

o modelo não foi capaz de prever com grande precisão, no entanto, ambos tiveram recuperações superiores às preditas.

Para configurar a aplicação das duas melhores condições definidas para os componentes minoritários e majoritários, respectivamente, duas amostras de *A. satureioides* (coletadas em 2017 e 2023) foram avaliadas. Além disto, estes resultados de extração por SWE foram comparados com a extração por dois outros métodos, extração em Soxhlet e maceração dinâmica. O resultado da comparação confirmou que a presença de β -CD em concentração de 3% (m/v) promoveu uma extração significativa para todos os analitos pelo método de SWE, mas proporcionalmente menor para 3OMQ. Esse fato pode estar ligado ao fato de que sua complexação com β -CD é limitada pela hidroxila do C3 (SCHWINGEL et al., 2019). A extração das agliconas flavonoídicas por SWE em presença de 3% (m/v) de β -CD apresentou eficiência superior na extração de todas as agliconas comparativamente ao método de maceração dinâmica e Soxhlet, exceto para a 3-OMQ em que este último logrou melhor eficiência.

Na tentativa de elucidar o fenômeno de aumento da eficiência de extração dos flavonoides com a adição de β -CD no meio de SWE, estudos preliminares utilizando ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e espectroscopia de massas de ionização por eletrospray (ESI-Q-TOF) estão sendo realizados. Entretanto o meio complexo do extrato e a alta concentração de β -CD, DSC e RMN tem sido as maiores limitações para obter resultados conclusivos. Além disto, foram realizadas análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, mas os resultados ainda não são conclusivos. Esses resultados preliminares estão apresentados no Anexo I da dissertação.

Em seu conjunto, os resultados do trabalho demonstraram que a hipótese central formulada nesta dissertação foi comprovada. A associação de SWE com β -CD propiciou um aumento significativo no teor de todos os flavonoides-agliconas de *Achyrocline satureioides*, QCT, 3OMQ, LUT e ACB na solução extrativa, comparativamente à SWE em ausência β -CD. Este efeito está possivelmente relacionado ao aumento da solubilidade destas agliconas, pela sua complexação com ciclodextrinas (PITTOL et al., 2022) e/ou prevenção de

sua termodegradação, relatada para algumas dessas agliconas em estudo de estabilidade de extratos da espécie por Holzschuh et al. (2007). Estudos estão em curso para explicar como ocorre esse efeito altamente positivo da ciclodextrina sobre a eficiência extrativa do método SWE/ β -CD para os analitos estudados.

A comparação do método SWE/ β -CD com dois outros métodos extrativos evidenciou a sua superioridade em eficiência de extração de QCT, LUT e ACB. A aplicação dos métodos a duas amostras da espécie do mesmo cultivar e diferente ano de coleta (2017 e 2023), revelaram que a coletada mais recentemente apresentou teores superiores de flavonoides, mas que houve proporcionalidade entre os métodos nos dois anos avaliados. Considerando as vantagens trazidas por SWE/PHWE como o uso de água como solvente e tempos reduzidos de extração, sua associação com β -CD propiciou um aumento significativo na extração de QCT, LUT e ACB oriundos da *A. saturoioides*, possivelmente pelo aumento de sua solubilidade e prevenção de sua degradação.

REFERÊNCIAS

BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2133–2145, 2020.

BIANCHI, S. E. et al. ***Achyrocline satureioides* review: From the pharmacochemical diversity to the technological development of products.** **Fitoterapia** Elsevier B.V., , 1 jul. 2023.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

HOLZSCHUH, M. H. et al. Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder. **Pharmazie**, v. 62, n. 12, p. 902–906, 2007.

HOLZSCHUH, M. H. et al. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Pharmazie**, v. 65, n. 9, p. 650–656, set. 2010.

JIN, Z.-Y. **CYCLODEXTRIN CHEMISTRY Preparation and Application.** v. 59

PITTOL, V. et al. Box-Behnken Design for extraction optimization followed by high performance countercurrent chromatography: production of a flavonoid-enriched fraction from *Achyrocline Satureioides*. **Planta Medica**, v. 86, n. 2, p. 151–159, 2019.

PITTOL, V. et al. The challenge of flavonoid/cyclodextrin complexation in a complex matrix of the quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2022.

RETTA, D. et al. **Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review.** **Industrial Crops and Products**, jul. 2012.

SCHWINGEL, L. C. et al. Quercetin and 3-O-methylquercetin in vitro skin layers permeation/retention from hydrogels: why only a methoxy group difference determines different behaviors? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 733–745, 1 maio 2019.

SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281–293, 1988.

CONCLUSÕES

- A associação entre extração com água no estado subcrítico e β -ciclodextrina (SWE/ β -CD) resultou em extração mais eficiente das agliconas flavonoídicas quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (3OMQ), além da achyrobichalcona (ACB) a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, quando comparado à extração SWE, em ausência de β -CD, corroborando a hipótese central formulada na dissertação.
- O desenho experimental Box Behenken Design indicou que a influência positiva da β -CD sobre a extração das agliconas flavonoídicas foi maior quando usada na concentração mais elevada de 3% (m/v).
- A otimização do método de extração por BBD revelou que as melhores condições de extração para as diferentes agliconas não são idênticas, exceto pela presença de 3% (m/v) de β -CD. Para QCT e 3OMQ as condições de SWE 100 °C, 30 minutos foi a melhor enquanto para LUT e ACB foi SWE a 200 °C, 0 minutos. O tempo para alcançar a temperatura de 100°C ou 200°C foi de 67 ± 15 minutos.
- A comparação entre SWE/ β -CD e os métodos de extração por Soxhlet e maceração dinâmica demonstrou que as diferenças na eficiência de extração não são as mesmas para todas as agliconas. Para LUT e ACB a extração SWE/ β -CD apresentou eficiência superior àquelas apresentadas pelos outros dois métodos. Na condição otimizada para os analitos QCT e 3-OMQ a extração SWE/ β -CD foi mais eficiente para a QCT comparativamente aos dois outros métodos, mas menos eficiente para a extração de 3-OMQ que a extração em Soxhlet.
- As amostras da espécie coletadas em 2017 e 2023, do mesmo cultivar e local de cultivo, apresentaram diferenças no que se refere ao teor dos analitos, mas o perfil de extração foi proporcional nos diversos métodos extrativos.
- O teor de flavonoides extraídos nas condições otimizadas de SWE/BCD demonstrou ser estatisticamente idêntica para a mesma amostra e analito.
- A comparação entre SWE/ β -CD, extração em Soxhlet e maceração

dinâmica demonstrou que o método SWE/ β -CD foi o mais eficiente para todas as agliconas, exceto para a 3-OMQ em que a extração em Soxhlet logrou maior eficiência.

- Em suma, a dissertação propõe um novo método extrativo eco-friendly associando extração com água no estado subcrítico com β -ciclodextrina (SWE/ β -CD) aplicado à extração de agliconas flavonoídicas de *Achyrocline satureioides*. Sua remarcada eficiência e vantagens abre perspectivas para sua aplicação a outros analitos de baixa hidrossolubilidade, em especial os termolábeis.

ANEXO I – MATERIAL SUPLEMENTAR

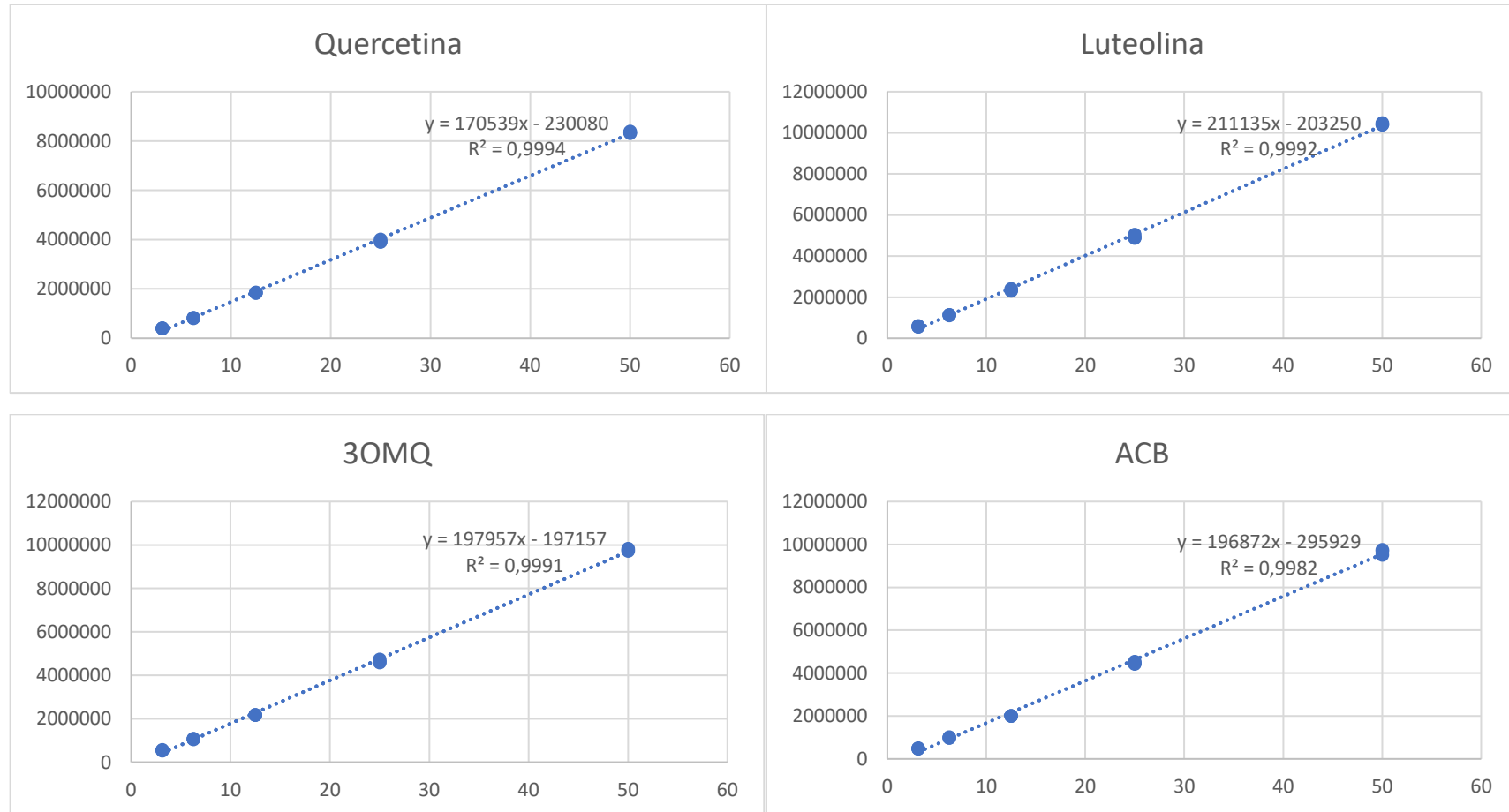


Figure 1: Calibration curves of QCT, LUT, 3OMQ and ACB by HPLC.

For characterizing the final SWE/ β -CD product, differential scanning calorimetry (DSC), nuclear magnetic resonance (^1H NMR), and Droplet Size, polydispersity index, and zeta potential were performed. Electrospray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS) will be completed as soon as possible.

Thermal analysis

Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis was performed in a DSC-60 calorimeter (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The samples were accurately weighted (1 to 2 mg) and sealed in a crimped aluminum pan, compared with an empty reference. The analysis was conducted under a dynamic nitrogen atmosphere of $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, starting the heat scanning from 25 to $300 \text{ }^\circ\text{C}$. The data were analyzed using TAnalysis Software.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR analyses were recorded using Bruker 400 MHz equipment (DRX400-AVANCE) operating at room temperature. One-dimension ^1H and 2D-Roesy spectra were acquired with a spectral width of 8012.8 and 4000.0 Hz, pulse sequences of zg30/noesygppr1d and roesyetgp, acquisition time of 2.044 and 0.256 s, with a scan number (sn) of 32 and 16, respectively. The samples (SWE extract/ β -CD) were prepared with deuterium oxide (D_2O). Data were processed using MestReNova[®] 15.0 software (Mestrelab Research[®], Santiago de Compostela, GA, Spain).

Electrospray ionization-mass spectroscopy

The analyses of electrospray ionization-mass spectroscopy were performed in a micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an ESI interface operating in positive ion mode previously calibrated with sodium formate (10mM) solution. SWE 2023 with β -CD samples were dissolved in ultrapure water before direct injection. The analysis was performed with the aid of an infusion pump with syringe. The analytical conditions of ESI-Q-TOF were

drying gas (nitrogen) at 200 °C and and flow rate of 4 L.min⁻¹, with a nebulizing gas (nitrogen) pressure of 0.4 bar. The detection mass ranges from 20 to 1000 m/z was acquired with a spectra rate of 1.00 Hz. The results were performed and analyzed using Data Analysis 4.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Droplet Size, polydispersity index, and zeta potential

The zeta potential and particle size/distribution measurements were performed on a Zetasizer model Nanoseries ZN90 (Malvern Instruments, Westborough, MA, USA). The samples were immediately dissolved before analysis in ultrapure water at 25 °C in a 1:100 (w/v) ratio, followed by ultrasonic bath for 15 min (RODRIGUES et al., 2019). All measurements were in triplicate.

Analytical characterization

Thermal analysis

The differential scanning calorimetry (DSC) curves were represented in Figure 2. It is pronounced that the thermal profile of isolated compound QCT (I) LUT (II), 3OMQ (III), ACB (IV) and flavonoids extracted with β -CD (2023 PHWE 100°C, 3% β -CD, 30 min – V; 2023 PHWE 200°C, 3% β -CD, 0 min – VI) shows a different profile, with considerable similarity to β -CD isolated (VII). This fact can be explained by the high amount of β -CD present in the associated form. Analyzing the curves, endothermic events were pronounced around 80 – 120°C for I, IV, V, VI and VII corresponding to its dehydration. QCT present an intense peak related to its dihydrate form. The second peaks corresponding to the melting point in each curve occur around 250°C (IV), 280°C (III), 300°C (V, VI), 315 – 325°C (I, II). Exothermic events were observed above 300°C, with maximum approximately in 330°C (V, VII), 350°C (I, II, III, VI) corresponding to decomposition process. For ACB more studies about its thermal events are required to understand the decompose phenomenon. These results are in consonance with previously studies for QCT (MOREIRA DA COSTA et al, 2001),

LUT (ZAFAR et al., 2023), 3OMQ (PITTOL et al., 2022) and β -CD (SPECOGNA et al., 2015).

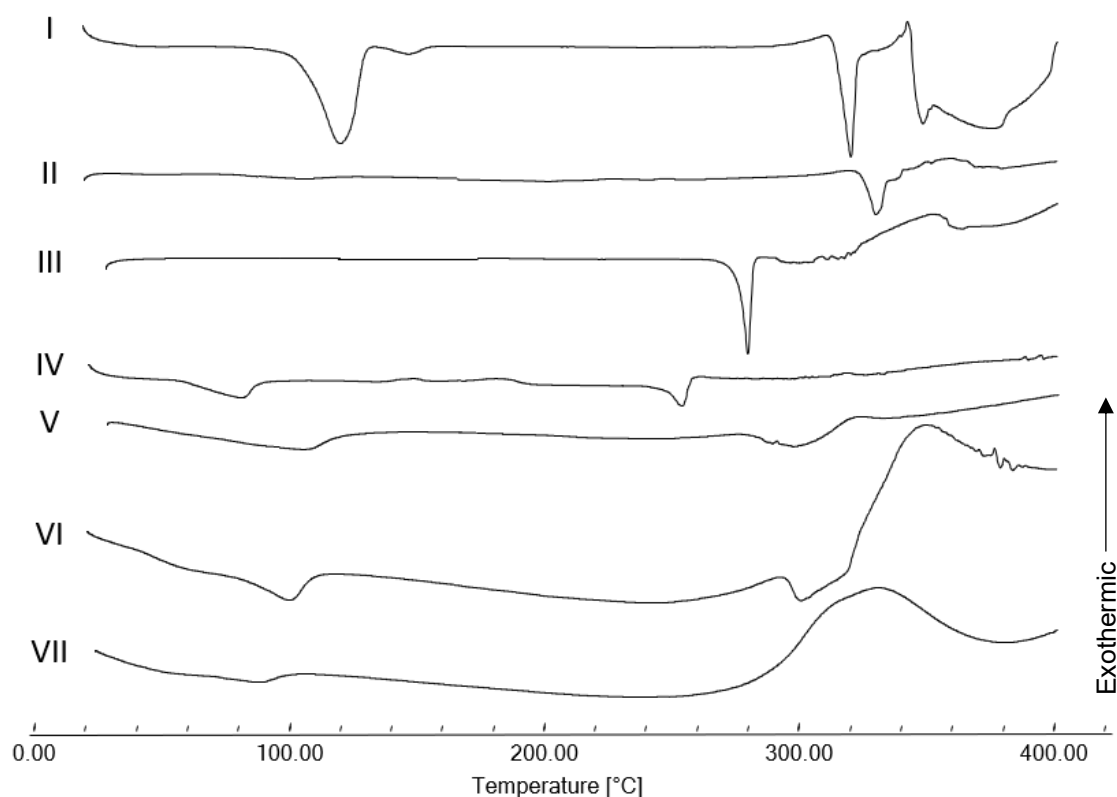


Figure 2. The differential scanning calorimetry (DSC) curves of (I) quercetin, (II) luteolin, (III) 3-*O*-methylquercetin, (IV) achyrobichalcone, (V) 2023 PHWE 100 °C with 3% β -cyclodextrin, (VI) 2023 PHWE 200 °C with 3.0% β -cyclodextrin, and (VII) β -cyclodextrin.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (^1H , Cosy and Roesy) obtained for PHWE 2023 samples with 3.0% β -CD at 100 and 200 °C were basically the same. One-dimension ^1H shows a high intensity peak in 4.71ppm referent to solvent (D_2O) and the predominant profile in spectrum is referent to β -CD (H-1, 4.97 – 4.98ppm), (H-3, 3.84 – 3.89ppm), (H-6, 3.78pmm), (H-5, 3.75pmm), and (H-2, 3.53 – 3.57ppm), and (H-4, 3.51 – 3.47pmm) (SCHNEIDER et al., 1998). Considering the peaks profile from β -CD isolated it is pronounced that there is a chemical shift to left on the spectrum (ZHUMAKOVA et al., 2022).

Other peaks with a lower intensity can be visualized but not precisely represent some isolated flavonoid of interest since there are not signals higher than 5.31 ppm and the basic flavonoid structure provide signals higher than 6.00 ppm principally from the aromatic rings (PITTOL et al., 2022).

In short, 2D experiment COSY is primarily used to determine spin connectivities between directly bound protons in a molecule, while ROESY is used to investigate the spatial interactions between nearby protons in the three-dimensional space of the molecule, regardless of whether it is directly bound. 2D-Cosy shows that β -CD present a coupling of H-2 with H-3 and H1 as expected. 2D-Roesy was performed to elucidate the possibles interaction between compounds but only β -CD were visualized showing an interaction of H-4 with H-2 and H-1, as expected as well. The concentration of samples was tested in 40 mg/mL was not effective for the investigation between flavonoids and β -CD interactions.

Electrospray ionization-mass spectroscopy

(On going)

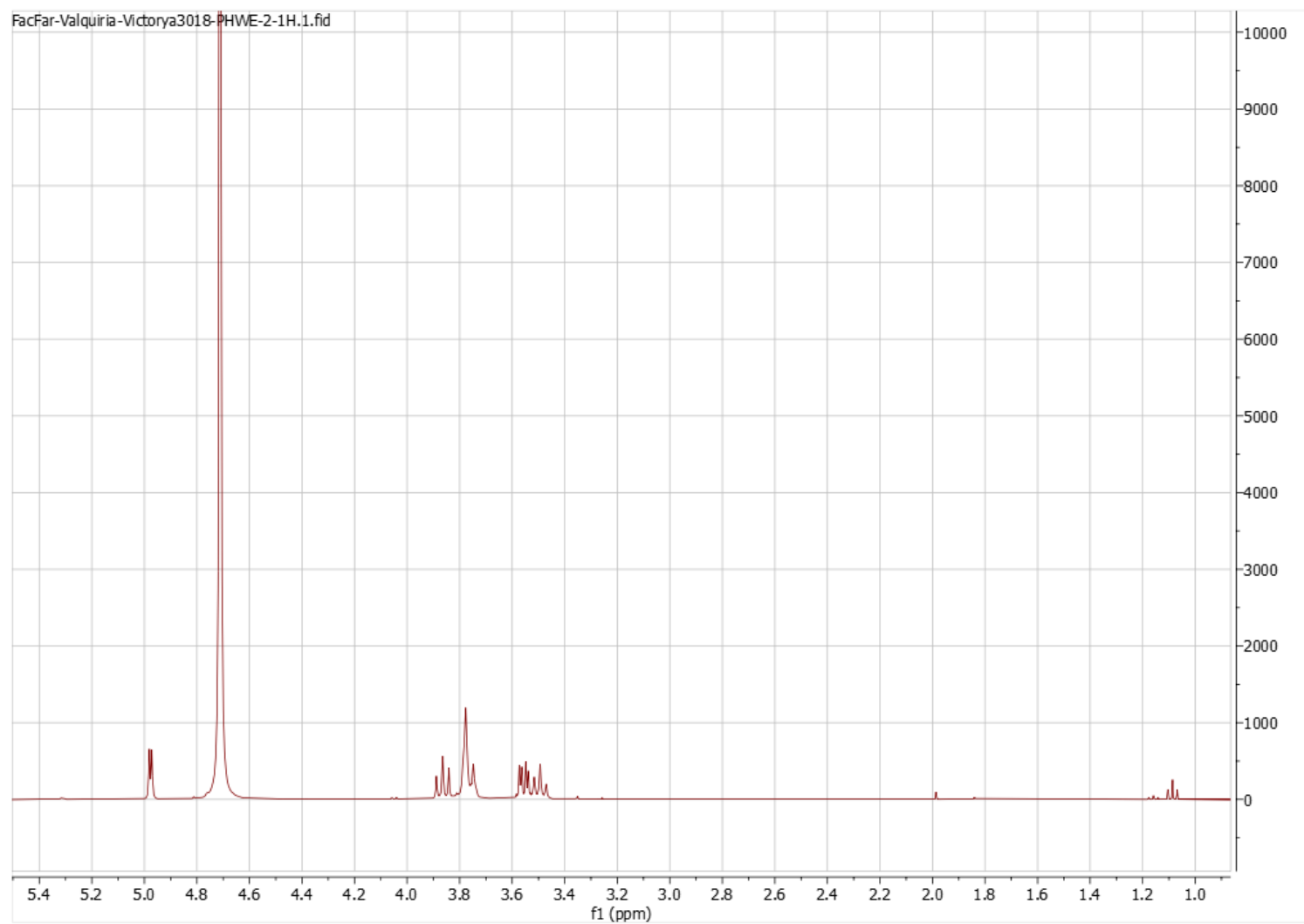
Droplet Size, polydispersity index, and zeta potential

The self-organization of cyclodextrins can improve solubility of hydrophobic molecules (RODRIGUES et al., 2019). Considering that, zeta potential and particle size/distribution measurements were performed to verify the possibility of aggregation formation. The characterization of samples showed a droplet size (Z) higher for PHWE than for β -CD itself. PHWE at 100 °C demonstrate a tendency to form structures higher than nanometric scale ($Z > 1000$ d.nm) with high polydispersity index (PDI), and low zeta potential (ZP). This round can indicate the formation of aggregates with high variety of sizes and less stability than β -CD alone.

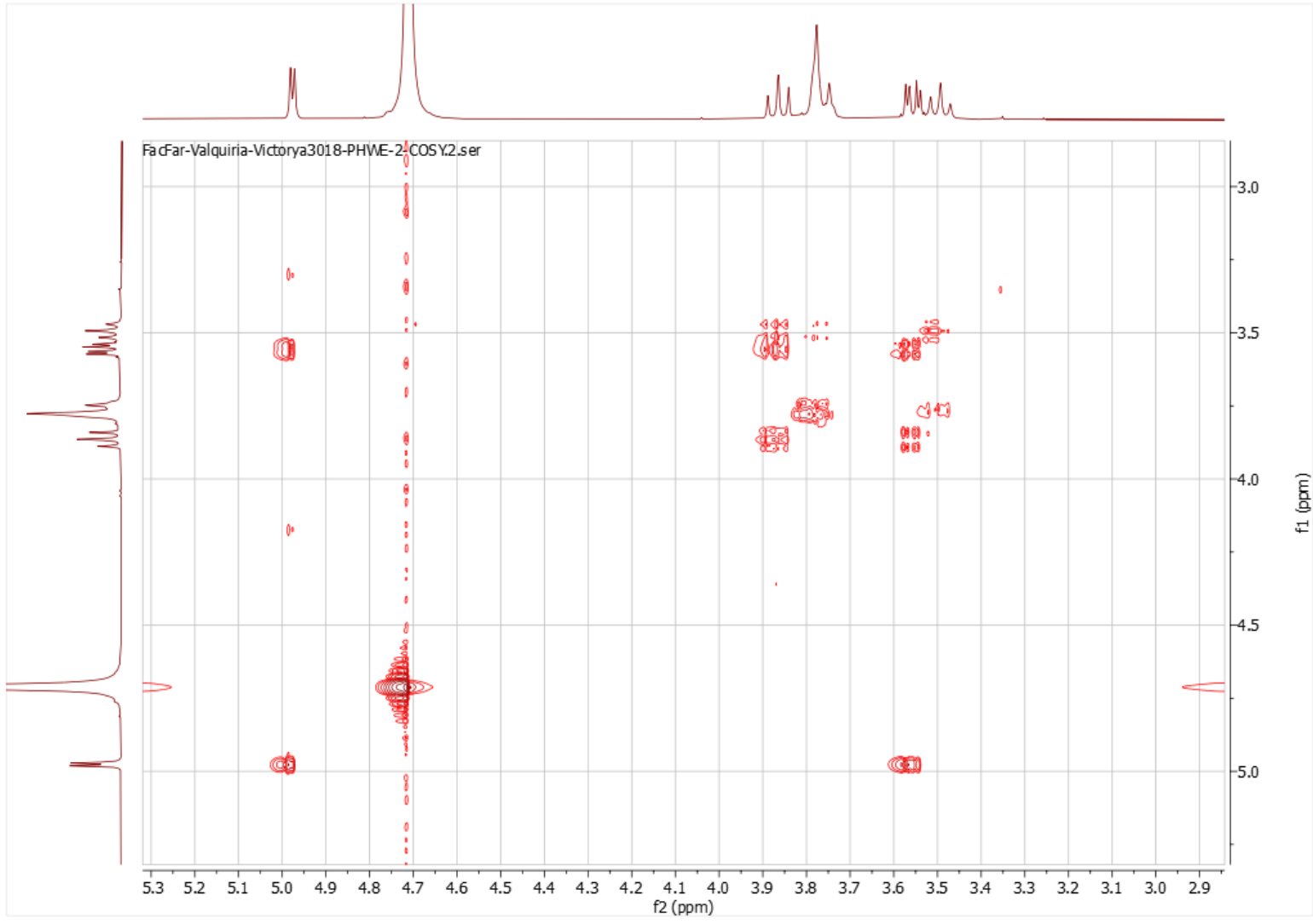
Table 1. Mean values of droplet size (Z, d.nm), polydispersity index (PDI, and zeta potential (ZP, mV).

Sample	Z (d.nm)	PDI	ZP (mV)
β -CD	236.73 \pm 23.20	0.478 \pm 0.047	-40.07 \pm 2.27
2023 PHWE 100 °C, 3% β -CD, 30 min	1041.00 \pm 9.33	0.719 \pm 0.067	-7.60 \pm 27.11
2023 PHWE 200 °C, 3% β -CD, 0 min	389.83 \pm 12.58	0.460 \pm 0.032	-17.00 \pm 0.36

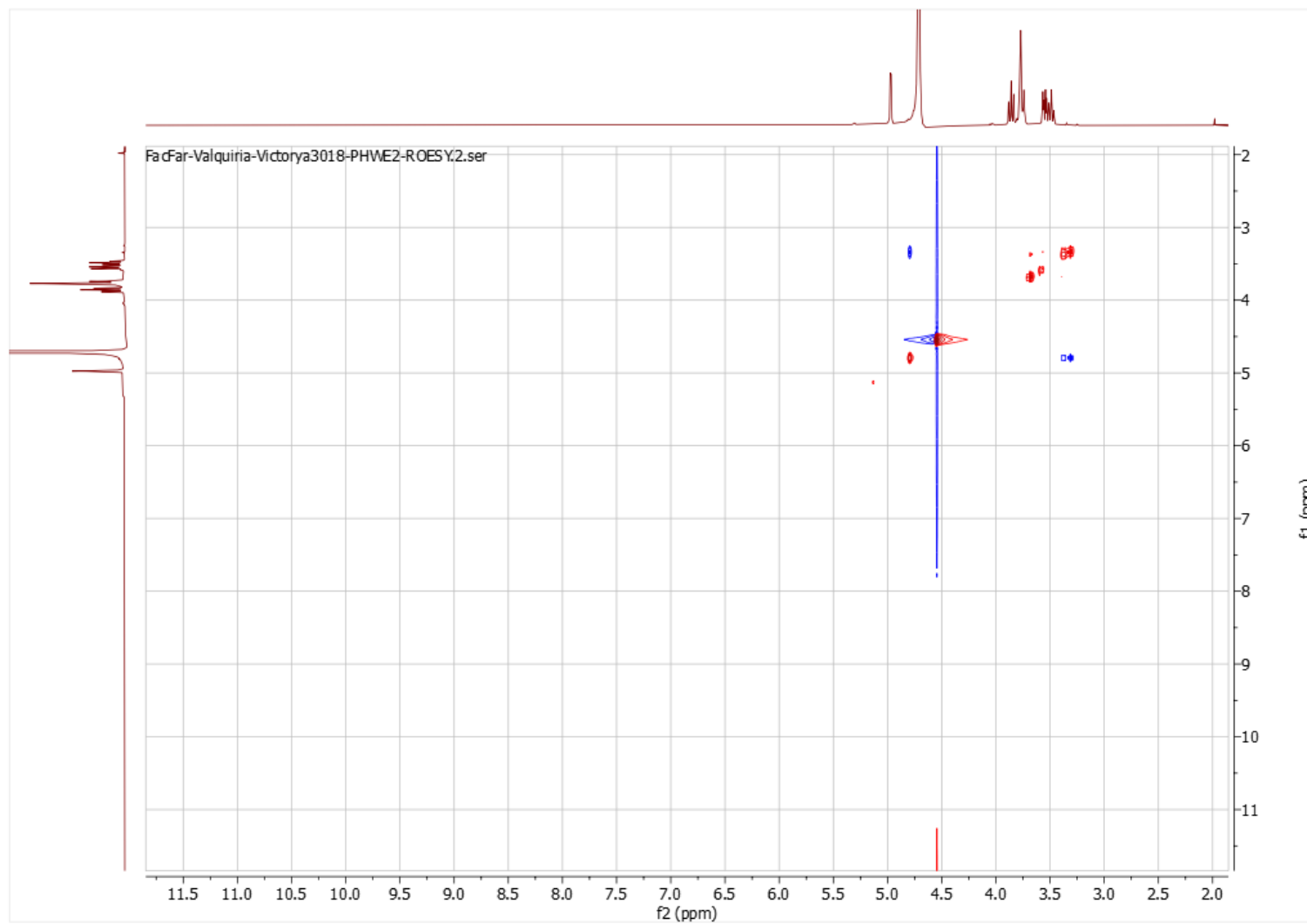
Figure 3: NMR of 2023 PHWE 3% β -CD (^a One dimension ^1H ; ^b COSY; ^c ROESY).



^aOne-dimension ^1H



²D- COSY

**²D-ROESY**