

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

**Estudo Químico de Extratos de Farelo Desengordurado de Linhaça-marrom
(*Linum usitatissimum* L.)
e Screening Antifúngico**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VICENTE SIMON HAAS

PORTO ALEGRE, 2015

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

**Estudo Químico de Extratos de Farelo Desengordurado de Linhaça-marrom
(*Linum usitatissimum* L.) e Screening Antifúngico**

Dissertação apresentada por **Vicente
Simon Haas** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi

PORTO ALEGRE – 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.05.15, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Aline Rigon Zimmer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Raquel Brandt Giordani
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Simon Haas, Vicente
Estudo Químico de Extratos de Farelo
Desengordurado de Linhaça Marrom (*Linum Usitatissimum*
L.) e Screening Antifúngico / Vicente Simon Haas. --
2015.
104 f.

Orientador: José Ângelo Zuanazzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Linhaça. 2. Lignanas. 3. Seicoisolariciresinol.
4. Antifúngicos. I. Zuanazzi, José Ângelo, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Laura, que foi extraordinária e esteve sempre ao meu lado, incansável, me apoiando de forma incondicional. A nossa filha Pietra, que acompanhou muita coisa ainda na barriga da mãe. Eu amo vocês!

Aos meus pais, Roberto e Solange, minha irmã Adele, sogro e sogra Pedro e Neca, minha cunhada Rafaela, que sempre tiveram palavras de incentivo nos momentos em que eu mais precisava.

A minha grande amiga Michele Rambo, por sua incrível generosidade e ajuda na execução das análises biológicas.

Aos meus amigos Douglas e Renata Rambo, que além da imensa ajuda na parte experimental, proporcionaram bons momentos e companhia nos incontáveis dias que fiquei em Porto Alegre.

Ao farmacêutico e amigo Benoni Squizani, com quem pude trabalhar e aprender, por ter me incentivado a seguir o curso de Farmácia.

Ao meu orientador, Dr. José Ângelo Zuanazzi, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança deposita em mim, por sua presteza em responder a todas as dúvidas, sua sabedoria para lidar com questões humanas, Levo do Professor Zé Ângelo um exemplo de cidadão e ser humano.

Ao Dr. Alexandre Fuentefria, por ter sido sempre tão prestativo, pelos seus ensinamentos e ajuda indispensável em uma área de pesquisa que não me é familiar.

Aos meus professores de graduação e pós graduação, que permitiram o embasamento técnico para a realização desse trabalho.

Ao corpo técnicos, em especial a Maribete, pela ajuda com os espectros de massa.

A coordenação do curso, em especial a Professora Stela Maris Kuze Rates, pela paciência e auxílio na resolução de contratempos que surgiram durante o percurso.

Aos meus colegas de pós graduação, Luciana, Letícia, Andressa, Pablo, Luiz, Juliana, Daiane, Maurício, Grazielle, por toda a ajuda, pela generosidade, por compartilhar conhecimento, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração que tivemos.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. REFERENCIAL TEÓRICO	27
3.1 Linho e Linhaça.....	29
3.2 Lignanas e Ligninas	31
3.3 Métodos de Extração	40
3.4 Infecções Fúngicas	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Reagentes e Solventes	51
4.2 Equipamentos e Acessórios	51
4.3 Material Vegetal	52
4.4 Obtenção do Extrato Bruto.....	52
4.5 Hidrólise Ácida do SDG Substância Referência	55
4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	55
4.7 Quantificação do SDG nos Extratos Brutos e nas Amostras de Farelo de Linhaça Desengordurada	57
4.8 Análises por UPLC-TOF-MS	57
4.9 Avaliação da Atividade Antifúngica	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 Extrato Bruto	63
5.1.2 Hidrólise Alcalina do Extrato Bruto	64
5.1.3 Hidrólise Ácida do Extrato Bruto.....	64
5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	65
5.3 Quantificação do SDG nos Extratos Brutos e nas Amostras de Farelo de Linhaça Desengordurado	80
5.4 Co-injeção de SDG Substância Referência.....	81
5.5 Análise por UPLC –TOF-MS	82
5.6 Avaliação da Atividade Antifúngica dos Extratos	84
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	99
Anexo 1 – Material vegetal utilizado nos processos de extração.....	101
Anexo 2 – Extratos.....	102
Anexo 3 - Processo de extração	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: compostos fenólicos da linhaça (1) secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG); (2) ácido p-coumarico e ácido ferúlico glicosilados; (3) oligômero de SDG com o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA).....	30
Figura 2: porção da macromolécula em que uma das unidades formadoras do oligômero é HDG.	31
Figura 3: (1) unidade fenilpropânica e (2) esqueleto de lignana mostrando a ligação entre os carbonos β	32
Figura 4: formação do álcool p-coumarílico através da rota biossintética dos fenilpropanoides.....	32
Figura 5: (1) álcool coumarílico (2) álcool coniferílico, (3) álcool sinapílico.....	32
Figura 6: síntese do pinosresinol pelo acoplamento de duas unidades de álcool coniferílico.....	33
Figura 7: biossíntese de lignanas à partir do pinosresinol.	33
Figura 8: Representação de um segmento do polímero de lignina.....	34
Figura 9: Estruturas de algumas lignanas de ocorrência frequente.	35
Figura 10: Comparação entre as fórmulas estruturais da genisteína, enterolactona e estradiol, evidenciando a disposição das hidroxilas responsáveis pela interação com os receptores estrogênicos.	36
Figura 11: Classes e estruturas de alguns fitoestrógenos.	36
Figura 12: Biotransformação do SDG em enterodiol (ED) e enterolactona (EL).	37
Figura 13: Mecanismo da hidrólise alcalina de ésteres	42
Figura 14: Mecanismo de hidrólise ácida de ésteres.....	43
Figura 15: mecanismo da reação de formação de acetal.	43
Figura 16: Formação de hemiacetal.....	44
Figura 17: Rompimento da ligação glicosídica e formação do íon oxônio intermediário.	45
Figura 18: Reação do íon oxônio com a água, formação de glicose e regeneração do ácido.	45
Figura 19: Aproximação das hidroxilas para formação de anel tetrahidrofurano.	45
Figura 20: Fechamento do anel, com eliminação de água e formação do ANSECO.	46
Figura 21: Desidratação da glicose e formação de HMF.....	46
Figura 22: cromatograma (280 nm) do extrato bruto EB1 (10 mg/mL), pico maior centrado em 18 minutos atribuído a macromolécula contendo SDG.	65
Figura 23: Espectro UV do pico com tempo de retenção de 17.80 minutos, atribuído a macromolécula contendo SDG, obtido de EB1.	65
Figura 24: cromatograma (280 nm) do extrato bruto EB2 (10 mg/mL), pico maior centrado em 18 minutos atribuído a macromolécula contendo SDG.	66
Figura 25: Espectro UV do pico com tempo de retenção de 17.79 minutos, atribuído a macromolécula contendo SDG, obtido de EB2.	66
Figura 26: (1) ácido p-coumárico glicosídeo, (2) ácido ferúlico glicosídeo, (3) SDG, (4,5 e 6) flavonoides, (7) HDG.	67
Figura 27: espectro UV e fórmula estrutural do ácido p-coumárico glicosídeo.	67
Figura 28: espectro UV e fórmula estrutural do ácido ferúlico glicosídeo.	68
Figura 29: Espectro UV do composto 4.....	68
Figura 30: espectro UV do composto 5.	69
Figura 31: espectro UV do composto 6.	69
Figura 32: Espectro UV e estrutura molecular do herbacetin diglicosídeo (7)	70

Figura 33: Perfil cromatográfico (280 nm) da hidrólise com HCl 1 M, temperatura de 50°C e tempo de 6 horas de EB1	71
Figura 34: Espectro UV e tempo de retenção (16.12 minutos) do pico destacado no cromatograma da hidrólise com HCl 1M	71
Figura 35: Perfil cromatográfico (280 nm) da hidrólise de EB1 com HCl 3 M	72
Figura 36: Espectro UV e tempo de retenção (16.12 minutos) do pico destacado e numerado 1 no cromatograma da hidrólise com HCl 3M.....	72
Figura 37: Espectro UV e tempo de retenção (17.12 minutos) do pico 2 no cromatograma da hidrólise com HCl 3M.	73
Figura 38: Perfil cromatográfico (280 nm) obtido após a hidrólise ácida do SDG substância referência.	74
Figura 39: Espectro UV do pico 1 (HMF).....	74
Figura 40: Espectro UV do pico 2 (ANSECO)	75
Figura 41: Cromatograma (280 nm) da mistura de SDG, SECO e SDG submetido à hidrólise ácida.	75
Figura 42: espectro UV e tempo de retenção (16.11 minutos) do SDG	76
Figura 43: espectro UV e tempo de retenção (17.91 minutos) do SECO	76
Figura 44: Espectro UV e tempo de retenção (19.22 minutos) do ANSECO	76
Figura 45: Curva de calibração do SDG obtida por CLAE. Coeficiente de regressão linear (r^2) = 0,9998. Equação da reta $y = 4603114x - 375221$ onde y é a área do pico e x a concentração de SDG.....	77
Figura 46: perfil cromatográfico (280 nm) do SDG substância referência na concentração de 1 mg/mL.....	78
Figura 47: espectro UV e tempo de retenção do SDG substância referência a 1 mg/mL.....	78
Figura 48: perfil cromatográfico (280 nm) de EAL1 e pico correspondente ao SDG, destacado no cromatograma.....	79
Figura 49: perfil cromatográfico (280 nm) de EAL2 e pico correspondente ao SDG em destaque.	79
Figura 50: espectro UV e tempo de retenção (16.10) do pico destacado em EAL1 (SDG).....	80
Figura 51: espectro UV e tempo de retenção (16.06 minutos) do pico destacado em EAL2.....	80
Figura 52: Co-injeção de SDG substância referência na amostra EAL1	82
Figura 53: Espectro de massas da fração obtida por hidrólise alcalina do extrato bruto, onde se observam os picos atribuídos ao SDG. Massa teórica de $[M-H]^+ = 687,28$ e $[M-Na]^+ = 709,26$	83
Figura 54: Espectro de massas da fração obtida por hidrólise alcalina do extrato bruto, onde se observam os picos atribuídos ao HDG. Massa teórica de $[M-H]^+ = 627,15$ e $[M-Na]^+ = 649,14$	83
Figura 55: Espectro de massas do SDG substância de referência submetida a hidrólise ácida, onde se observam os picos atribuídos ao ANSECO. Massa teórica de $[M-H]^+ = 345,17$ e $[M-Na]^+ = 367,15$	84
Figura 56: semente de linhaça antes da extração do óleo	101
Figura 57: Farelo de linhaça desengordurado	101
Figura 58: Extrato bruto	102
Figura 59: Extrato obtido por hidrólise alcalina.....	102
Figura 60: Extrato obtido por hidrólise ácida	103
Figura 61: Farelo de linhaça desengordurado durante a maceração.....	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições experimentais testadas na hidrólise ácida	54
Tabela 2: Valores de massa de extrato bruto (EB) com o uso de diferentes relações FL/solvente para FL1 e FL2	63
Tabela 3: Valores de concentração da curva de calibração:	77
Tabela 4: Resultados da quantificação do SDG	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANSECO	Anidrosecoisolariciresino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standart Institute
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAL1	Extrato obtido por hidrólise alcalina 1
EAL2	Extrato obtido por hidrólise alcalina 2
EAC-1M	Extrato obtido por hidrólise ácida HCL 1M
EB	Extrato bruto
EB1	Extrato bruto 1
EB2	Extrato bruto 2
FL	Farelo de linhaça
FL1	Farelo de linhaça amostra 1
FL2	Farelo de linhaça amostra 2
HDG	Herbacetin diglicosídeo
HMGA	Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico
SDG	Secoisolariciresinol diglicosídeo
SECO	Secoisolariciresinol
TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometry
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar a extração de lignanas e outros compostos fenólicos do farelo de linhaça desengordurado e avaliar a atividade antifúngica dessas frações frente a fungos leveduriformes do gênero *Candida*. Obteve-se o extrato bruto através de maceração com solução hidroalcolica. O extrato bruto foi hidrolisado em condições básicas e ácidas, objetivando-se o isolamento de heterosídeos e agliconas, respectivamente. A lignana secoisolariciresinol diglicosídeo foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência. O flavonoide herbacetin diglicosídeo e a lignana anidrosecoisolariciresinol foram identificados por espectrometria de massas. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada *in vitro* e foi observado que tanto o extrato bruto como o extrato obtido por hidrólise alcalina inibiram o desenvolvimento de *Candida krusei* CK 02 e *Candida parapsilosis* RL 20 na concentração de 500 µg/mL. O extrato obtido por hidrólise ácida, na mesma concentração, apresentou atividade inibitória frente a *Candida krusei* CK 02, *Candida parapsilosis* RL 20 e *Candida tropicalis* ATCC 750. A investigação das condições de hidrólise ácida, a melhor caracterização de seus componentes e a avaliação da ação antifúngica dos extratos frente a outros gêneros de fungos constituem perspectivas para trabalhos futuros.

Palavras-chave: linhaça (*Linum usitatissimum* L.), lignanas, secoisolariciresinol, antifúngicos, *Candida*.

ABSTRACT

The aim of the present work was carry out the extraction of lignans and other phenolic compounds from defatted flaxseed meal and evaluate the antifungal activity of these fractions against yeast fungi of *Candida* genus. The crude extract was obtained by maceration with a hydroalcoholic solution. The crude extract was hydrolyzed in basic and acidic conditions, aiming the isolation of glycosides and aglycones, respectively. Secoisolariciresinol diglucoside was quantified by high-performance liquid chromatography. The flavonoid herbacetin diglucoside and the lignan anhydrosecoisolariciresinol were identified by mass spectrometry. The avaluation of antifungal activity was performed *in vitro* and it was observed that both the crude extract and the extract obtained by alkaline hydrolysis inhibited the development of *Candida krusei* CK 02 and *Candida parapsilosis* RL 20 at a concentration of 500 ug/mL. The extract obtained by acid hydrolysis, in the same concentration, showed inhibitory activity against *Candida krusei* CK 02, *Candida parapsilosis* RL 20 and *Candida tropicalis* ATCC 750. The investigation of acid hydrolysis conditions, a better characterization of its components and the avaluation of antifungal activity against other fungi genera represents good potencial for future work.

Keywords: flaxseed, (*Linum usitatissimum* L.) lignans, secoisolariciresinol, antifungals, *Candida*.

1. INTRODUÇÃO

A extraordinária complexidade química encontrada na natureza tem sido por muito tempo o alicerce de novas descobertas no campo das moléculas bioativas, e sem dúvida é uma das fontes mais preciosas para o desenvolvimento de novos medicamentos. Ao mesmo tempo, representa um enorme desafio do ponto de vista da elucidação estrutural e da separação de seus componentes.

A investigação das propriedades químicas e biológicas de produtos naturais vem sendo facilitada à medida que novas tecnologias são colocadas à disposição dos pesquisadores, permitindo que esses produtos sejam explorados de forma mais rápida e eficiente. Empregando-se as técnicas atuais de separação, identificação e quantificação, consegue-se muitas vezes determinar a composição química de uma amostra em uma fração menor do tempo que seria necessário a uma ou duas décadas atrás (VALLI *et al.*, 2012).

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta utilizada desde a antiguidade para a obtenção de fibras empregadas na fabricação de tecidos, e também para fins alimentares, pois sua semente, a linhaça, possui elevado valor nutricional (SIMÕES *et al.*, 2004).

O óleo extraído da linhaça contém alto teor de ácidos graxos insaturados, entre os quais predomina o ácido α linolênico. Ao ser exposto ao ar, o óleo sofre um processo de oxidação e polimerização, sendo por isso empregado nas indústrias de tintas e vernizes (SIMÕES *et al.*, 2004).

Além do elevado conteúdo de óleo (cerca de 40%), as sementes são ricas em proteínas (20 a 25%) e fibras solúveis (3 a 10%). São também fontes de diversos compostos fenólicos, especialmente lignanas, as quais são encontradas em níveis centenas de vezes maiores do que em qualquer outro alimento de que se tenha conhecimento (FRANK *et al.*, 2004). Após o processamento da semente para obtenção do óleo, resta a chamada “torta” ou “farelo” de linhaça, constituída por fibras, proteínas, amido, pequeno teor de gordura e altíssimo teor de compostos fenólicos, que permanecem na semente processada por serem insolúveis no óleo extraído. Esse subproduto da extração do óleo é utilizado na produção de rações para alimentação animal, e em muito pequena escala, para uso como suplemento alimentar humano.

Aumentar o valor de um produto através do seu processamento, obtendo derivados isolados de maior valor econômico, se constitui em uma forma interessante de gerar riquezas. A extração de lignanas e demais compostos

fenólicos da linhaça, desde que justificada por pesquisas que demonstrem propriedades biológicas importantes e promissoras, poderia resultar em uma atividade economicamente viável.

Lignanas representam um grupo de compostos fenólicos formados pela dimerização de unidades fenilpropanóides, através do acoplamento oxidativo do ácido cinâmico ou seus derivados, originando uma estrutura baseada no esqueleto do 2,3 difenilbutano (SIMÕES *et al.*, 2004). São substâncias universalmente distribuídas no reino vegetal, especialmente nas sementes, raízes, frutos e partes lenhosas de plantas vasculares, e se supõe que estejam relacionadas com a interação entre plantas (alelopatia) e defesa contra fungos e insetos herbívoros (SIMÕES *et al.*, 2004; SAARINEN *et al.*, 2005; ; HYVARINEN; PIHLAVA; HIIDENHOVI, 2006; ZHANG *et al.*, 2007).

As lignanas mais comumente encontradas na semente da linhaça são o secoisolariciresinol, isolarinresinol, matairesinol e pinoresinol, na forma de glicosídeos e oligômeros esterificados com o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico. Dentre essas, a lignana presente em maior concentração é o secoisolariciresinol, na forma de diglicosídeo (FRANK *et al.*, 2004). Também são encontrados ácidos fenólicos e flavonoides (STRUJIS *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2008).

As lignanas possuem várias atividades biológicas comuns a outros compostos fenólicos, talvez a mais conhecida e relatada seja a ação antioxidante (HU; YUAN; KITTS, 2009). Estudos também têm demonstrado uma ação estrogênica similar a das isoflavonas (WUTTKE *et al.*, 2003), atividade anticarcinogênica, antidiabética e antiaterogênica (PRASAD, 2000; 2001; CHEN *et al.*, 2003; BLOEDON; SZAPARY, 2007; LI *et al.*, 2008). Alguns estudos apresentam resultados divergentes, o que leva a crer que novas pesquisas são necessárias para esclarecer melhor o papel das lignanas na saúde humana (FRANK *et al.*, 2004).

A atividade antimicrobiana das lignanas também vem sendo alvo de estudos. Extratos alcoólicos de *Podophyllum peltatum* contendo podofilotoxina já vêm sendo empregados no combate ao papiloma vírus desde 1942 (CHARLTON, 1998).

Em um estudo com farinha de linhaça integral, foi encontrada uma atividade fungistática equivalente a 0,2% de ácido propiônico, quando está era usada na concentração de 12% na fabricação de macarrão fresco. Os autores, no entanto, não avaliaram quais componentes da farinha seriam os responsáveis pela atividade relatada (XU *et al.*, 2008).

As infecções causadas por fungos podem ser extremamente graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos, nos quais esse tipo de infecção pode representar um risco à vida. Existe ainda a preocupante questão do surgimento de cepas resistentes aos fármacos tradicionalmente empregados na terapia, o que torna a procura e o desenvolvimento de moléculas com atividade antifúngica de imensa importância para o desenvolvimento de novos medicamentos (LIMA *et al*, 2006; DA SILVA, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo utilizar um resíduo industrial – farelo de linhaça desengordurado – extrair, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes, especialmente lignanas, e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* desses extratos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver metodologia para a extração do extrato bruto do farelo de linhaça desengordurada compatível com escalonamento industrial.
- ✓ Desenvolver metodologia para realizar a hidrólise alcalina do extrato bruto e obter lignanas e compostos fenólicos na forma de glicosídeos.
- ✓ Desenvolver metodologia para realizar a hidrólise ácida do extrato bruto e obter lignanas e ácidos fenólicos na forma de agliconas.
- ✓ Avaliar de forma qualitativa e quantitativa os extratos obtidos.
- ✓ Determinar a atividade antifúngica do extrato bruto e das frações hidrolisadas, frente a fungos leveduriformes do gênero *Candida*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Linho e Linhaça

As primeiras indicações do uso do linho como fonte de fibras têxteis datam de mais de 30.000 anos (KVAVADZE *et al.*, 2009). A sua utilização na alimentação humana também remonta aos primórdios da civilização, quando através do cultivo e manejo, começaram a serem desenvolvidas as primeiras variedades de maior produtividade e com sementes maiores (ALLABY *et al.*, 2005).

Sua distribuição original incluía a região da mesopotâmia, onde se espalhou para regiões do delta do Nilo, Europa central, até chegar à China e Índia a cerca de 5.000 anos. Hoje o linho é extensivamente cultivado no Canadá, China, Rússia, Estados Unidos e regiões temperadas da América do Sul, especialmente na Argentina.

O cultivo do linho já foi bastante difundido no Rio Grande do Sul, com uma área plantada de mais de 50.000 hectares, valor que praticamente caiu a zero na década de 90 do século passado. Nos últimos anos tem havido um crescimento considerável na área cultivada, sendo uma alternativa para as lavouras de trigo como cultivo de inverno (EMATER, 2014).

O linho faz parte do gênero *Linum*, família Linaceae, da qual existem mais de duzentas espécies descritas. Algumas são plantas perenes, mas o linho é uma planta anual, com um ciclo de aproximadamente cem dias, que se adapta bem a climas temperados (ALLABY *et al.*, 2005).

Existem dezenas de variedades, algumas destinadas exclusivamente para a produção de fibras, outras voltadas para a produção de semente e óleo.

As variedades de linhaça marrom e linhaça dourada diferem muito pouco em termos de composição química do óleo, entretanto a linhaça marrom possui uma casca mais espessa, o que pode significar diferenças mais acentuadas em termos de compostos fenólicos, pois é sabido que estes são encontrados em maior quantidade nessa parte da semente (STRUJIS *et al.*, 2008; TOURÉ *et al.*, 2010).

A concentração de lignanas no linho varia consideravelmente conforme a parte da planta analisada, sua localização geográfica, e também de acordo com o método de extração e a forma de quantificação (STRUJIS *et al.*, 2008; TOURÉ; XUEMINH 2010).

As principais lignanas encontradas na linhaça, segundo FRANK *et al.*, 2004 são o secoisolariciresinol (SECO), isolarinresinol, matairesinol e pinioresinol, na

forma de glicosídeos e oligômeros esterificados com o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA). A lignana presente em maior concentração é o secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG).

Segundo TOURÉ e XUEMING (2010) a semente de linhaça contém entre 0,7 a 1,9% de SDG. Por outro lado YUAN e colaboradores (2008) relatam que a farinha desengordura pode conter entre 0,6 a 2,9% de SDG, o que corresponde a um teor de SECO entre 0,30 a 1,50%. Em estudo realizado por ELIASSON (2003) ao quantificarem compostos fenólicos de 27 variedades de linhaça cultivadas na Suécia, foram encontrados valores de (+)-SDG variando entre 1,19% (variedade Lager) e 2,59% (variedade Jupiter). Nesse mesmo artigo, os autores quantificaram o enantiômero minoritário (-)-SDG e o encontraram em teores variando entre 0,22% (variedade Niagara) a 0,50% (variedade SWA9101). Considerando a soma dos dois enantiômeros, a variedade que apresentou a maior concentração de lignana foi a Júpiter, com 2,93% de SDG na semente.

As lignanas presentes na linhaça formam uma macromolécula (oligômero ou polímero, depende do autor), onde o HMGA serve de elo entre as unidades de SDG. Também fazem parte dessa estrutura os ácidos ferúlico e *p*-coumárico, ambos na forma de glicosídeos e geralmente incorporados nas porções terminais da macromolécula, também através de ligações éster (STRUJIS, 2009). A macromolécula e alguns de seus componentes estão representados na Figura 1.

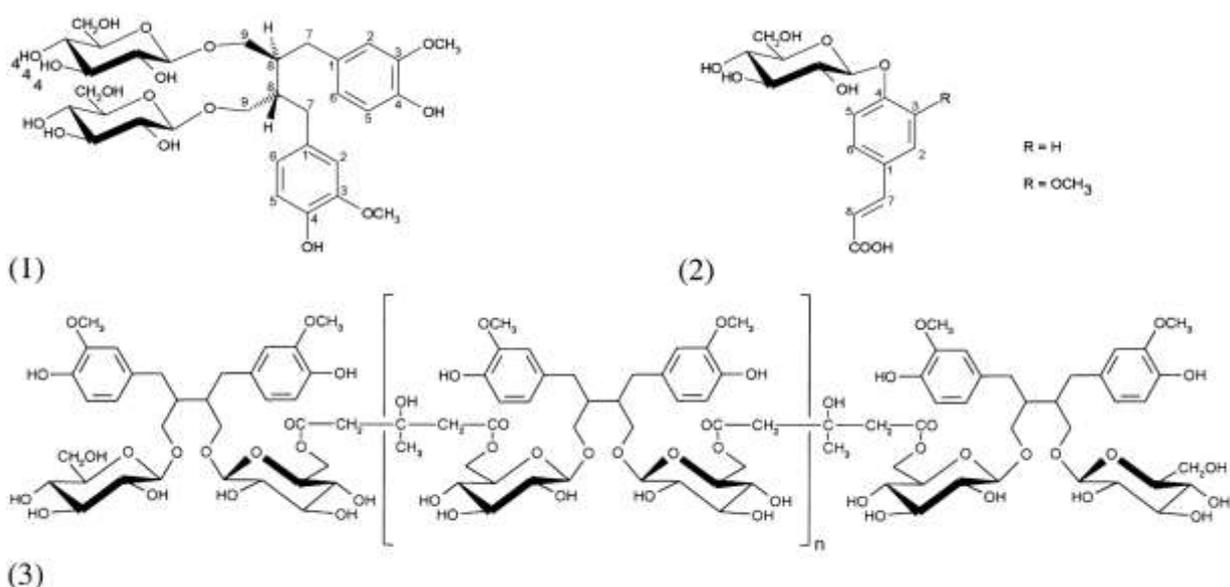


Figura 1: compostos fenólicos da linhaça (1) secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG); (2) ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico glicosilados; (3) oligômero de SDG com o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA).

A presença de outros compostos fenólicos, como flavonoides, vem sendo motivo de estudo há algum tempo. Relatos de herbacetin diglicosídeo (HDG) da ordem de 0,2% foram relatados por (STRUIJS, 2009). Em um artigo publicado recentemente (FLINIAUX, 2014) foi encontrado um valor de 0,57% para este flavonoide. De acordo com os dois artigos, a molécula de HDG compõe a estrutura da macromolécula da mesma forma que o SDG, porém em menor quantidade. A Figura 2 esquematiza a estrutura da macromolécula com a incorporação do HDG:

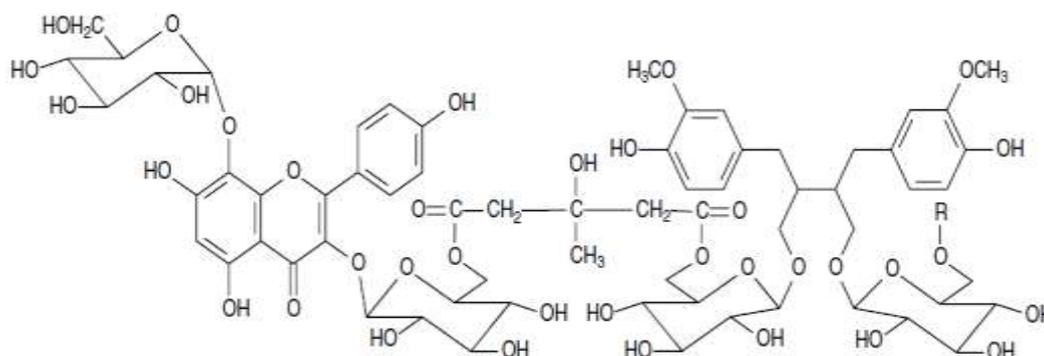


Figura 2: porção da macromolécula em que uma das unidades formadoras do oligômero é HDG.

A variação na quantidade de HDG observada entre as duas publicações pode ser atribuída à matéria vegetal utilizada. Enquanto a primeira utilizou o farelo desengordurado, a segunda utilizou a casca das sementes.

3.2 Lignanas e Ligninas

As **ligninas** estão entre as biomoléculas mais abundantes da natureza, sua quantidade na superfície da Terra só é inferior a dos carboidratos. Associadas à celulose, contribuem para a rigidez e resistência mecânica de troncos, caules, raízes e folhas de todas as plantas vasculares. São macromoléculas poliméricas, de elevado peso molecular, constituídas pela união de milhares de unidades fenilpropânicas (SIMÕES *et al.*, 2004). Segundo a mesma referência, as **lignanas**, por outro lado, são moléculas menores, também largamente espalhadas na natureza, resultantes do metabolismo secundário de plantas e responsáveis por inúmeras atividades biológicas importantes.

Quimicamente, podem ser descritas como dímeros formados pela união de duas unidades fenilpropânicas, ligadas através do carbono 8 (também designado

carbono β). Outra definição as descreve como sendo derivadas do 1,4-diarilbutano (SAINVITU *et al.*, 2012). A Figura 3 ilustra a definição.

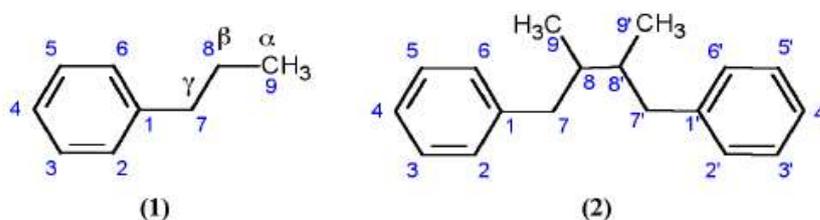


Figura 3: (1) unidade fenilpropânica e (2) esqueleto de lignana mostrando a ligação entre os carbonos β .

A biossíntese das ligninas e lignanas se inicia com a conversão da fenilalanina em ácido cinâmico. Através de várias etapas, o ácido cinâmico origina os três mais importantes monolignóis, álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool coumarílico. A Figura 4 mostra algumas etapas dessa biossíntese enquanto na Figura 5 são mostradas as estruturas dos monolignóis.

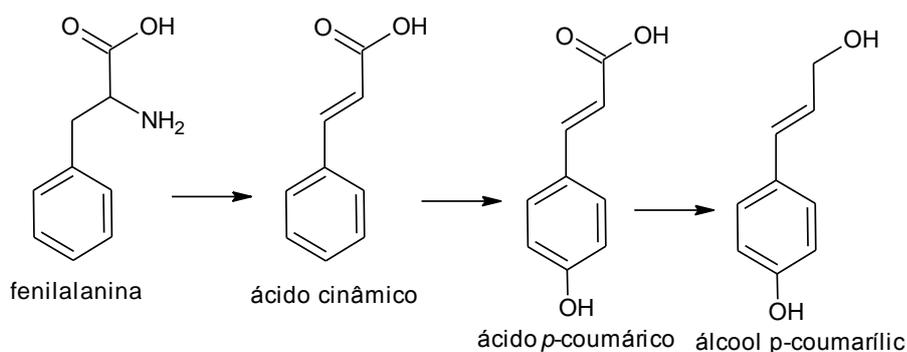


Figura 4: formação do álcool p-coumarílico através da rota biossintética dos fenilpropanoides.

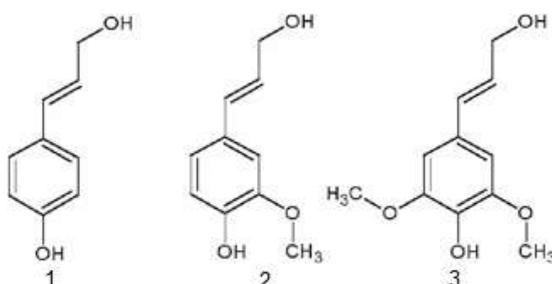


Figura 5: (1) álcool coumarílico (2) álcool coniferílico, (3) álcool sinapílico.

O acoplamento de duas unidades de álcool coniferílico, através de uma reação que envolve a formação de um radical estabilizado por ressonância, origina o pinoresinol, como se observa na Figura 6.

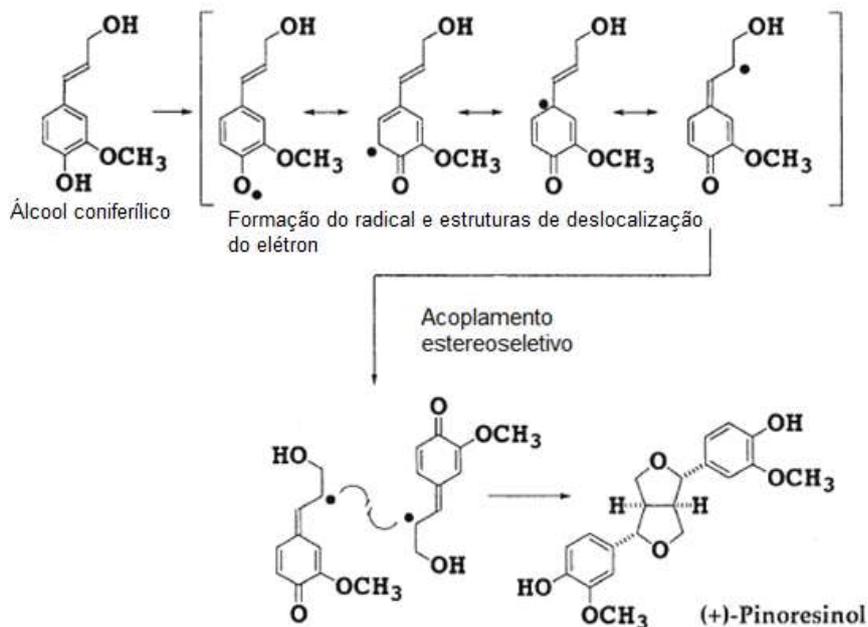


Figura 6: síntese do pinoresinol pelo acoplamento de duas unidades de álcool coniferílico.

O pinoresinol é biotransformado em outras lignanas, incluindo o secoisolariciresinol, conforme Figura 7:

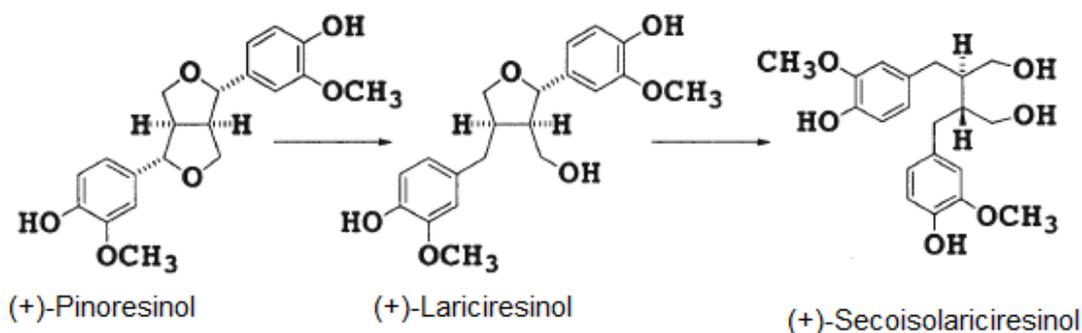


Figura 7: biossíntese de lignanas à partir do pinoresinol.

A ligação de várias centenas de unidades de monolignóis através de acoplamentos oxidativos dá origem as ligninas, polímeros de elevada massa molecular e alta complexidade química, conforme Figura 8.

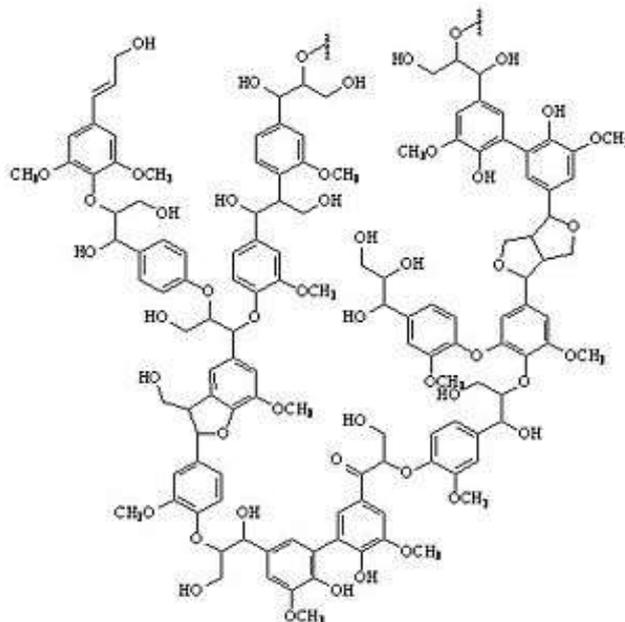


Figura 8: Representação de um segmento do polímero de lignina.

Com a descoberta de novas estruturas unidas diferentemente, e com graus variados de oxidação, termos como neolignanas, alolignanas, norlignanas entre outros, foram adotados para melhor classificar essa crescente família de compostos naturais (SIMÕES et al., 2004).

Na Figura 9 estão apresentadas as estruturas de algumas lignanas de ocorrência frequente.

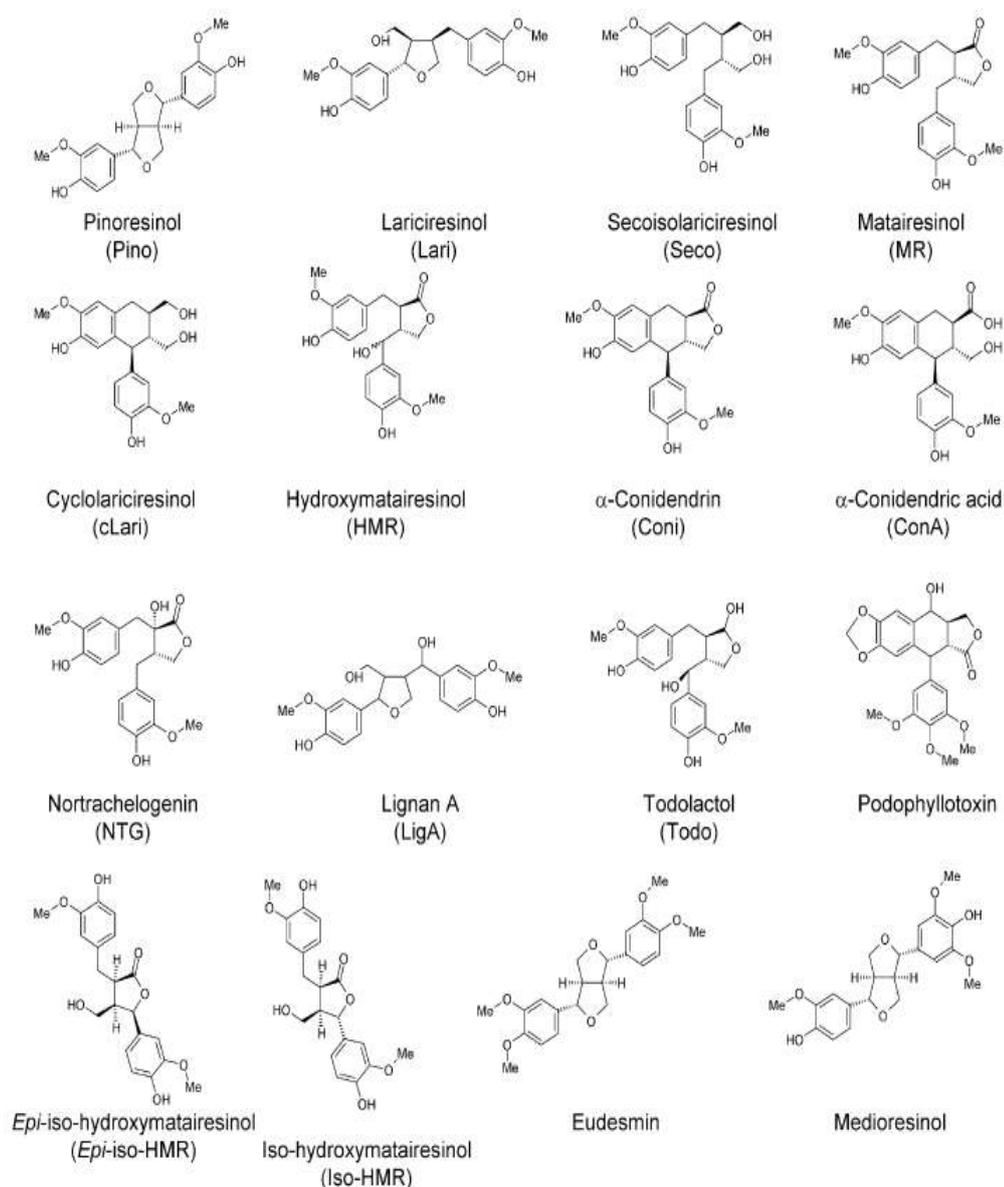


Figura 9: Estruturas de algumas lignanas de ocorrência frequente.

3.2.1 Atividade Estrogênica e Antitumoral

Vários estudos demonstram que o consumo regular de lignanas pode ser benéfico para aliviar os sintomas da menopausa, além de reduzir a incidência de câncer de mama (LIU *et al.*, 2009). Fitoestrógenos são moléculas que estruturalmente se assemelham ao estradiol, sendo por isso capazes de ligarem-se aos receptores estrogênicos, (ER α e ER β), com uma ação agonista sobre os mesmos. Na Figura 10 estão apresentadas as relações estruturais entre fitoestrógenos e estradiol.

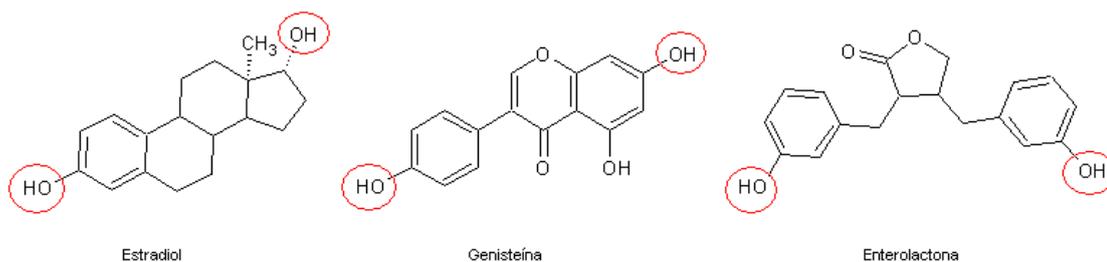


Figura 10: Comparação entre as fórmulas estruturais da genisteína, enterolactona e estradiol, evidenciando a disposição das hidroxilas responsáveis pela interação com os receptores estrogênicos.

Na Figura 11 estão apresentadas algumas classes de fitoestrógenos.

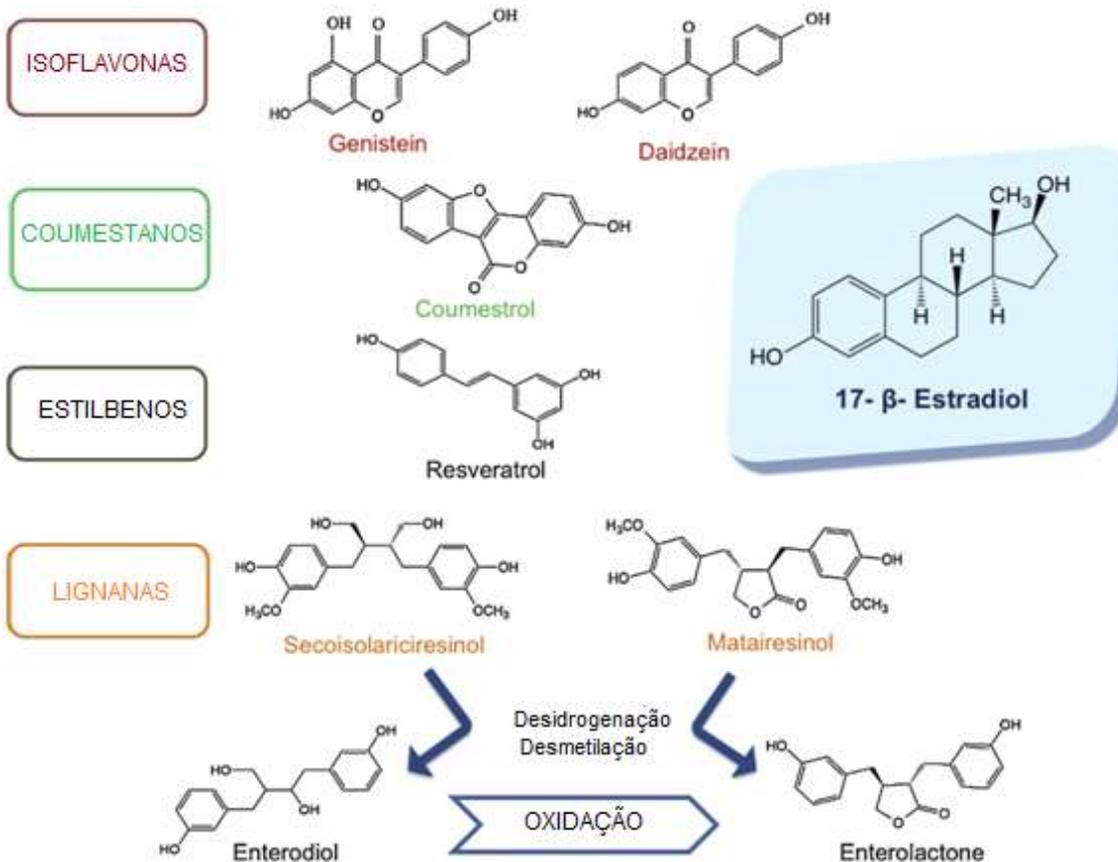


Figura 11: Classes e estruturas de alguns fitoestrógenos.

As lignanas apresentam atividade estrogênica, mais especificamente os metabólitos produzidos pelos microrganismos intestinais.

Secoisolariciresinol, pinocresinol, lariciresinol, e matairesinol são extensamente metabolizados pela microbiota intestinal humana, originando as chamadas enterolignanas. Apenas traços de SDG são detectados no sangue ou na urina após sua ingestão (LIU *et al*, 2009; RAFAELLI, 2002). Na Figura 12 pode-se observar a conversão do SDG nas enterolignanas pela ação das bactérias intestinais.

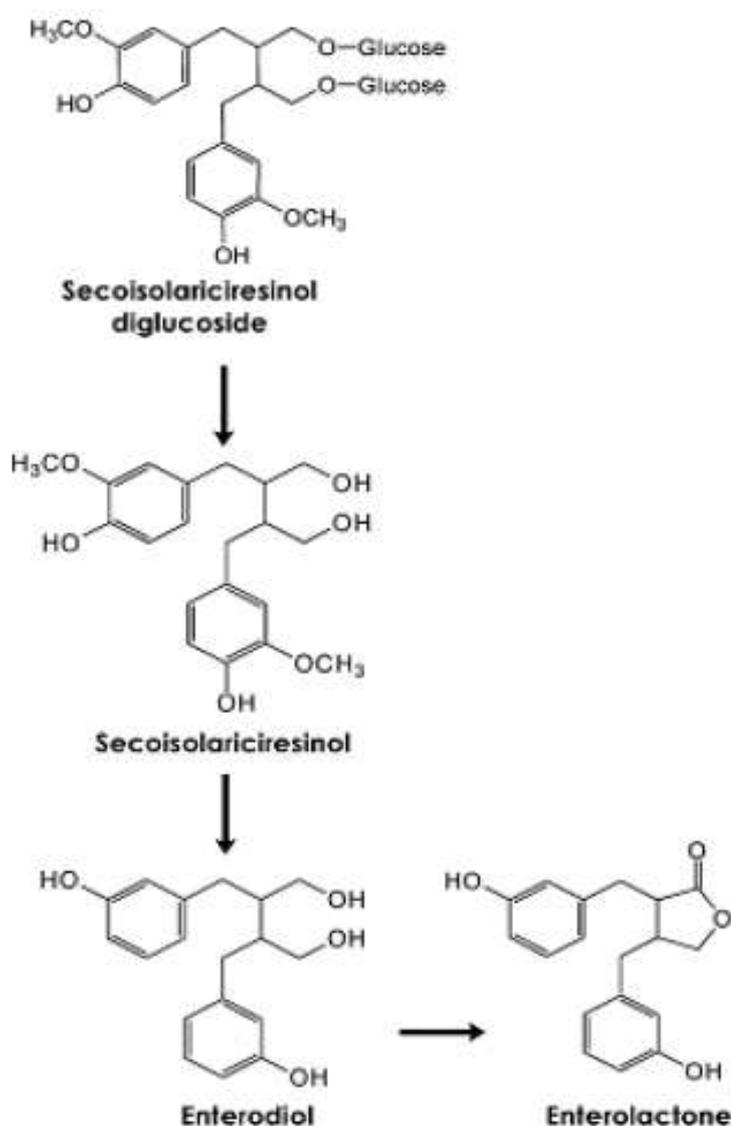


Figura 12: Biotransformação do SDG em enterodiol (ED) e enterolactona (EL).

3.2.2 Atividade Antioxidante

A capacidade de neutralizar radicais livres é uma propriedade conhecida de inúmeros compostos fenólicos, e está diretamente relacionada com a possibilidade que estas moléculas apresentam de deslocalizar elétrons através de formas de ressonância envolvendo o anel aromático. Em um estudo realizado por Hu e colaboradores (2007), avaliou-se a ação antioxidante *in vitro* de SDG, SECO, ED e EL através do ensaio com DPPH[•], onde foi demonstrado que SDG e SECO eram ativos na faixa 25-200 μ M, enquanto ED e EL não se mostraram efetivos nas mesmas concentrações. A explicação que os autores oferecem para a baixa atividade desses metabólitos é a inexistência dos grupamento 3-metóxido-4-hidroxila, presente nas lignanas, mas ausente nas enterolignanas.

Por outro lado, no mesmo artigo, os autores demonstraram que SDG, SECO, ED e EL foram capazes de impedir o dano ao DNA induzido por um azo composto gerador de radicais livres (2,20-azo-bis(2-amidinopropano) dicloridrato), concluindo que as enterolignanas são também providas de atividade antioxidante.

De acordo com PATEL e colaboradores (2012), em estudo de revisão, SDG, EL e ED se mostraram muito ativos na eliminação de radicais livres *in vitro*, tanto em meio aquoso como em meio lipídico. As três moléculas foram capazes de inibir significativamente a peroxidação do ácido linolêico. Por outro lado, enterodiol e enterolactona não foram capazes de prevenir o dano ao DNA por exposição ao peróxido de hidrogênio.

3.2.3 Atividade Antilipídêmica

Em uma meta análise que avaliou 28 publicações no período de 1990 e 1998 referentes ao efeito da administração de linhaça (óleo, sementes, ou suplementos enriquecidos com lignanas) no perfil lipídico de homens e mulheres, concluiu-se que a semente de linhaça integral ou suplementos contendo lignanas, mas não o óleo, resultou em diminuição do colesterol total e do LDL, sem alterações estatisticamente significativas no HDL e nos triglicerídios. Segundo os autores, as lignanas da linhaça e as fibras solúveis (presentes na semente e nos suplementos, mas não no óleo) são os prováveis responsáveis pelos efeitos observados. Não foi possível determinar se as lignanas sozinhas resultariam em efeitos similares, pois há poucos estudos disponíveis (PAN *et al.*, 2009).

3.2.4 Atividade Antidiabética

Existem evidências de que o SDG pode prevenir o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo II. Em um estudo promovido por PRASAD (2000) ratos Zucker foram divididos em grupos. Sabe-se que sem tratamento, esse tipo de rato desenvolve diabetes tipo II por volta dos 70 dias de vida. Um dos grupos recebeu suplementação de SDG equivalente a 40 mg/kg do peso corporal, administrada oralmente. Após setenta e dois dias, 100% dos ratos que não receberam suplementação desenvolveram diabetes, contra apenas 20% dos ratos tratados com SDG. O autor sugere que espécies reativas de oxigênio e processos oxidativos podem estar relacionados ao desenvolvimento da diabetes tipo II.

3.2.5 Atividade Antimicrobiana

A atividade antifúngica da linhaça foi investigada por XU e colaboradores (2008), em um estudo que analisou a adição de farinha de linhaça integral na preparação de macarrão e o efeito inibitório sobre o crescimento de *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium sp.* Os pesquisadores concluíram que a adição de 15% de farinha de linhaça era equivalente a inibição produzida por 0,2% de ácido propiônico. Nesse artigo foi sugerido que a farinha de linhaça poderia ser usada como um ingrediente multifuncional, tanto pelos benefícios à saúde como também pela atividade fungistática encontrada. Não foi feita nenhuma investigação para determinar qual ou quais os compostos que seriam os responsáveis pela atividade observada.

Em um estudo realizado por HWANG (2001), a lignana lariciresinol mostrou potente atividade antifúngica em cepas de *Candida albicans*, *Trichosporon beigellii* e *Malassezia furfur*, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 25, 12,5 e 25 µg/mL respectivamente. Os autores sugerem que o mecanismo de ação se relaciona com interação na membrana plasmática fúngica e seu rompimento.

CHO e colaboradores (2007) avaliaram a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos por três lignanas isoladas de extrato metanólico de sementes de *Myristica fragrans* e identificadas como austrobailignana, ácido dihidroguaiarético e nectandrina. A atividade antimicrobiana foi atribuída à inibição do crescimento do micélio fúngico, com um IC₅₀ de apenas 20 ppm de ácido dihidroguaiarético para o caso da inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*.

MORAES e colaboradores (2015) investigaram a atividade antifúngica de frações solúveis e insolúveis em água de polifenóis obtidos de cascas de *Uncaria tomentosa*, contra cepas de cândidas. O estudo concluiu que a fração insolúvel apresentava significativa atividade antifúngica em várias espécies de cândida resistentes à terbinafina, fluconazol e anidulafungina. Alterações microscópicas e físico-químicas visíveis na parede celular indicaram ser este o principal alvo de ação dos compostos.

KOROISHI e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antifúngica (antidermatófito) de neolignanas obtidas de extratos de *Piper regnellii*. O trabalho utilizou a técnica de microdiluição, sendo que o extrato hidroalcoólico apresentou forte atividade para os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*,

Microsporium canis, e *Microsporium gypseum*, com CIMs de 15,62, 15,62, 15,62 e 62,5 ug/ml, respectivamente. O estudo concluiu assim, que esta planta pode ser utilizada por seu potencial antifúngico, e que após estudos preliminares de validação, prosseguir com o seu uso medicinal.

DA SILVA (2010) avaliou a atividade antifúngica de extratos de *Ocotea acutifolia*, rico em alcaloides, apresentando potencial efeito fungitóxico. A concentração inibitória mínima do extrato alcaloídico contra as cepas de *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* foi de 7,8 µg/mL. Para o extrato etanólico das folhas e cascas do caule, os melhores resultados foram frente a *C. neoformans* (62,5 µg/mL) e para *C. tropicalis* (15,6 µg/mL), respectivamente.

Em um estudo de revisão sobre a atividade antiviral de lignanas, realizado por CHARLATON (1998), o autor relata que extratos alcoólicos de *Podophyllum peltatum* contendo podofilotoxina vêm sendo empregados no combate ao papiloma vírus desde 1942. Segundo o mesmo autor, derivados dessa lignana apresentaram atividade sobre o vírus da herpes HSV-1. Há vários mecanismos de atividade antiviral associados com lignanas, incluindo a ligação à tubulina, a inibição da transcriptase, a inibição da integrase, e a inibição da topoisomerase.

3.3 Métodos de Extração

A extração de compostos de interesse de matérias vegetais depende de alguns fatores básicos. A polaridade da molécula, sua estabilidade térmica e oxidativa, sua concentração na amostra e a eficiência desejada para o processo (PRISTA *et al.*; 2008).

A polaridade da molécula vai determinar o tipo de solvente a ser empregado. Heterosídeos e demais compostos de alta polaridade são extraídos com água ou misturas hidro-alcólicas, óleos fixos como hexano ou ciclo-hexano. Entre esses dois extremos há uma vasta gama de possibilidades. Definida a polaridade do solvente, é preciso avaliar seu custo, toxicidade, impacto ambiental e facilidade de remoção após a extração (SIMÕES *et al.*, 2004).

Se as moléculas de interesse são sabidamente estáveis, pode-se empregar aquecimento para facilitar a extração, aumentar o rendimento ou diminuir o tempo necessário para o processo. O aumento da temperatura favorece a dissolução tanto por diminuir a viscosidade do líquido, permitindo uma melhor penetração no material vegetal, como também pelo aumento da entropia do soluto. Para exemplificar, a

solubilidade da cafeína em água é de 21,7 g/L a 25°C e 660 g/L a 100C (O'NEIL, 2006).

Quando a matéria vegetal é escassa ou se a substância a ser extraída se encontra em baixa concentração, técnicas de extração exaustivas como a percolação ou Soxhlet são preferíveis à maceração (SIMÕES *et al.*, 2004).

3.3.1 Extrato Bruto

O extrato bruto é constituído por todas as substâncias solúveis no solvente escolhido para a extração. Sendo assim, sua composição será definida em grande parte pela polaridade do solvente. Extratos brutos obtidos com água irão conter açúcares, proteínas, e íons inorgânicos. Apenas compostos orgânicos muito polares estarão presentes, sendo possível encontrar heterosídeos, taninos, catequinas, antocianinas. Em pH ácido são extraídos alcaloides e em pH básico ácidos carboxílicos e compostos fenólicos, caso o pH seja superior a 10. No extremo oposto, extratos obtidos com hexano só poderão conter moléculas muito apolares, como gorduras, ceras, resinas, terpenoides, esteroides e correlatos. Dessa forma, o solvente permite que se faça uma seleção do tipo de moléculas que serão obtidas, mesmo assim, dependendo do material vegetal, um extrato bruto pode conter várias dezenas de substâncias químicas diferentes (PRISTA *et al.*; 2008). A macromolécula formada pelo SDG e demais compostos fenólicos é bastante hidrofílica, e sua extração deve ser efetuada com solventes de elevada polaridade. A observação de sua estrutura, onde as unidades de glicose se estendem por toda a extensão, faz parecer que a água poderia ser um solvente apropriado para a extração. No entanto, a água não é o solvente ideal, tendo em vista que a solubilidade da macromolécula é de aproximadamente 0,50 g/L, dependendo de sua exata composição e peso molecular. Alcoóis de cadeia curta como metanol ou etanol apresentam elevada polaridade, mas ainda não são suficientemente polares para interagir e solvatar as unidades de glicose que compõe a estrutura da macromolécula, resultando em baixa solubilidade. A extração é facilitada pela utilização de misturas contendo de 20 a 30% de água em solvente orgânico polar (CHAVAN, AMAROWICZ, 2013).

Entre as misturas empregadas pode-se citar metanol 70% (SAINVITU *et al.*, 2012), etanol 70% (ZHANG *et al.*, 2007), acetona 70% (WILLFOR, SMEDS, HOLBOM, 2006).

Após a extração da macromolécula, é necessário realizar a sua hidrólise, de forma a liberar os compostos fenólicos para uma posterior análise e quantificação.

3.3.2 Hidrólise Alcalina

No processo de hidrólise alcalina, uma solução de uma base forte, geralmente hidróxido de sódio, realiza a quebra da ligação éster. A hidrólise é realizada pelo íon OH^- , conforme mecanismo mostrado na Figura 13.

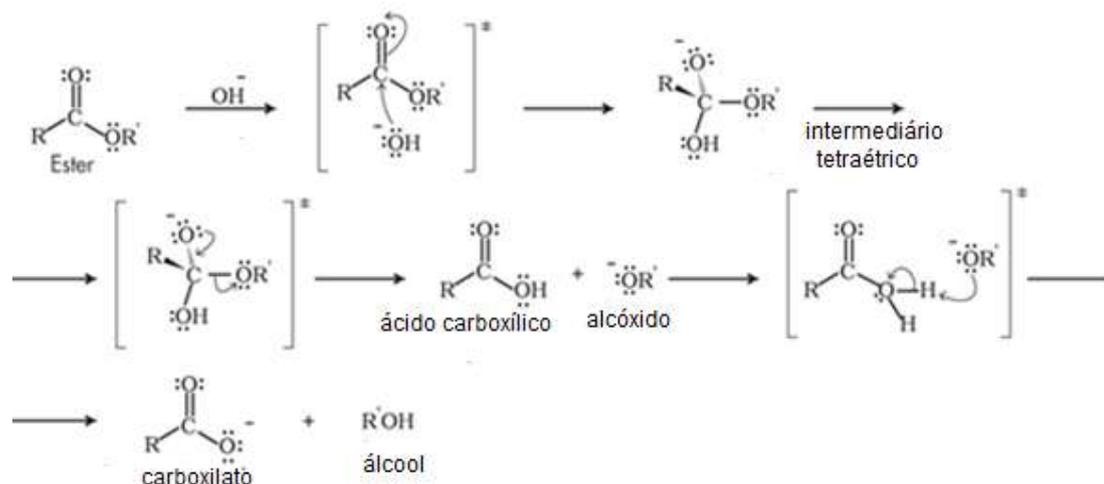


Figura 13: Mecanismo da hidrólise alcalina de ésteres

Nessa reação, o ânion OH^- não é apenas um catalisador, mas é consumido no processo com formação de um sal de ácido carboxílico. A concentração de OH^- e a temperatura influenciam na velocidade da reação (ALLINGER *et al.*, 1976). A formação do ânion carboxilato, estabilizado por ressonância, determina uma reação termodinamicamente favorável, com energia livre negativa, tornando a reação quantitativa (ALLINGER *et al.*, 1976; HENDRICKSON, CRAM, HAMMOND, 1970). Essa reação também é conhecida como saponificação.

3.3.3 Hidrólise Ácida

A reação de desesterificação em meio ácido geralmente não é quantitativa, já que nesse caso se forma um ácido carboxílico, que não pode assumir as mesmas formas de ressonância do ânion carboxilato. Como consequência, a variação de entalpia da reação é próxima de zero, como também é a variação de entropia (resultando em $\Delta G \approx 0$). O equilíbrio será definido pela concentração dos reagentes, se a água estiver em maior concentração irá predominar a reação de hidrólise, porém se a reação for feita em meio alcoólico, o equilíbrio irá se deslocar para a

formação do éster. (ALLINGER *et al.*, 1976; HENDRICKSON, CRAM, HAMMOND, 1970). Na Figura 14 observa-se um exemplo de hidrólise de éster catalisada por ácido.

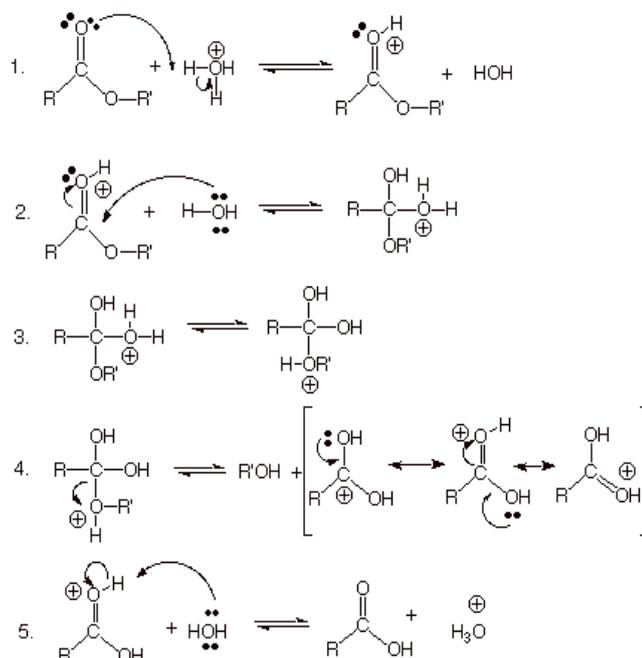


Figura 14: Mecanismo de hidrólise ácida de ésteres.

3.3.4 Hidrólise de Ligações Glicosídicas

As ligações glicosídicas são ligações do tipo acetal. São semelhantes a uma ligação éter, com a diferença de que o oxigênio que liga o açúcar à aglicona apresenta maior reatividade pelo efeito retirador de elétrons provocado pela ação dos oxigênios vizinhos (ALLINGER *et al.*, 1976; HENDRICKSON, CRAM, HAMMOND, 1970). A hidrólise alcalina de um éster envolve a formação de um intermediário tetraédrico, situação que não é possível em um acetal, pela ausência da carbonila. Um acetal não pode ser hidrolisado por bases, essa é uma reação que se processa apenas em meio ácido. A Figura 15 mostra o mecanismo dessa reação.

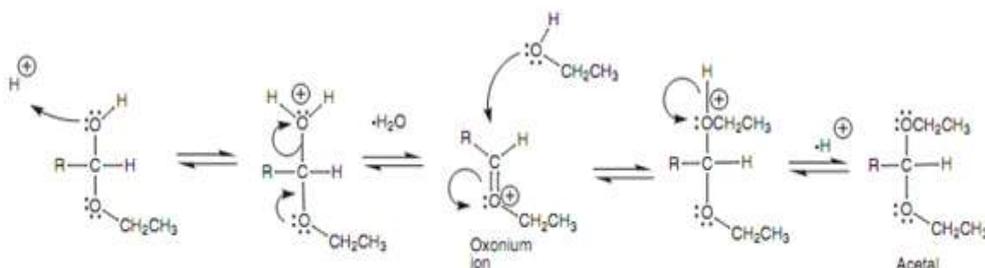


Figura 15: mecanismo da reação de formação de acetal.

Em um monossacarídeo existe uma função aldeído (ou cetona) e várias hidroxilas alcoólicas. Nesse caso, carboidratos contendo cinco ou mais átomos de carbono são capazes de formar ciclos não tensionados, formando um hemiacetal (ou hemicetal), como apresentado na Figura 16.

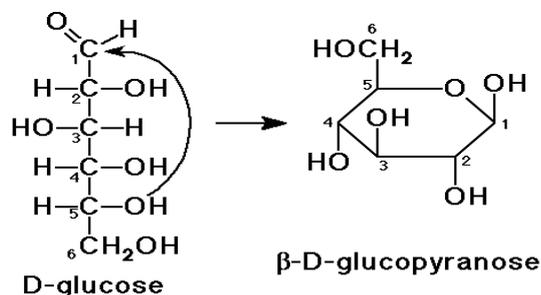


Figura 16: Formação de hemiacetal

A reação é termodinamicamente favorável, com entalpia negativa e sem variação de entropia significativa (o número de moléculas não muda durante a reação).

A ligação glicosídica que une a molécula de açúcar a uma aglicona envolve a conversão de um hemiacetal em um acetal. Nesse caso a reação é desfavorável, a variação de entropia é negativa e se estabelece um equilíbrio químico entre reagentes e produtos.

No caso do SDG, a hidrólise ácida apresenta maiores dificuldades devido ao impedimento estérico imposto pela molécula de secoisolariciresinol. Esse impedimento torna a velocidade da reação mais lenta, sendo necessário o uso de temperaturas elevadas e maior concentração de ácido para que a reação ocorra em um tempo razoável.

Nas Figuras 17 e 18 são mostradas as etapas envolvidas no rompimento de uma das ligações glicosídica do SDG.

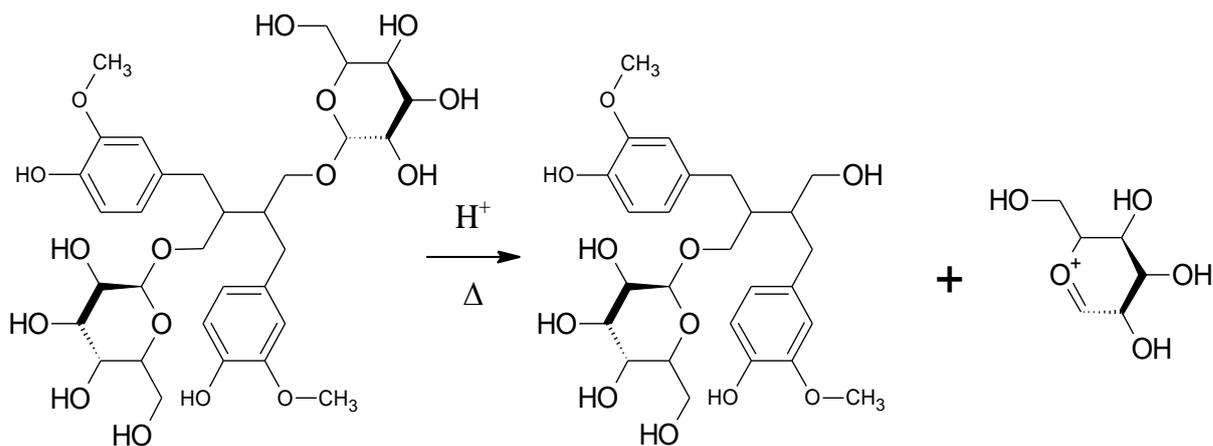


Figura 17: Rompimento da ligação glicosídica e formação do íon oxônio intermediário.

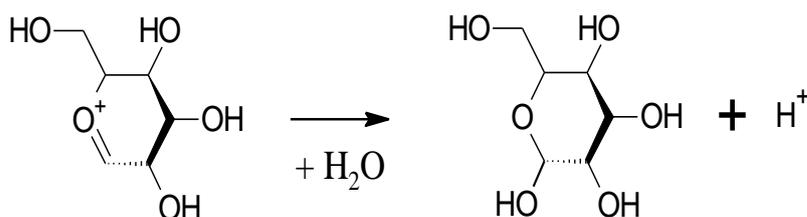


Figura 18: Reação do íon oxônio com a água, formação de glicose e regeneração do ácido.

A aplicação de temperaturas elevadas traz algumas complicações na obtenção do SECO. Como pode ser observado na figura 18, existem duas hidroxilas alcoólicas separadas por quatro átomos de carbonos, que podem assumir uma posição em que se tornam vizinhas. Em condições ácidas, essas hidroxilas vão se condensar formando um anel de tetrahydrofurano, com eliminação de uma molécula de água (Figura 19). Essa reação é favorecida pelo aumento da temperatura, pois a entropia do sistema aumenta. A concentração do ácido também influencia na reação, já que a protonação da hidroxila é uma das etapas necessárias para a eliminação de água e o fechamento do anel (Figura 20).

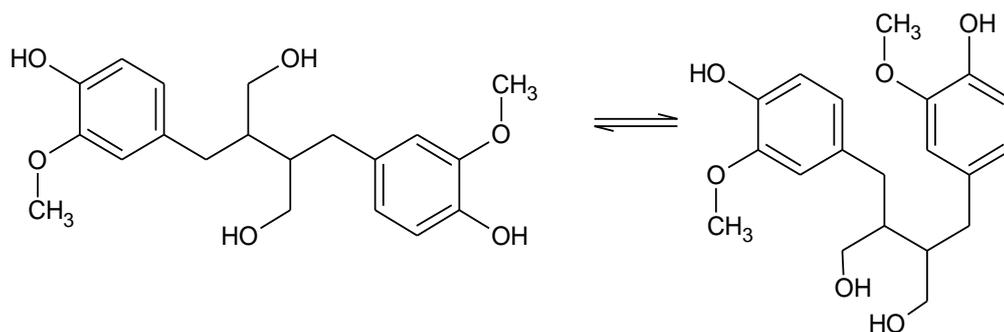


Figura 19: Aproximação das hidroxilas para formação de anel tetrahydrofurano.

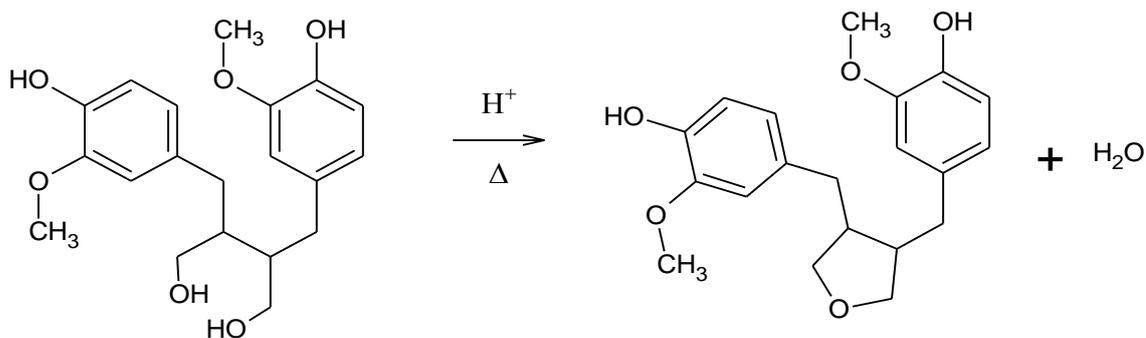


Figura 20: Fechamento do anel, com eliminação de água e formação do ANSECO.

Esse novo composto, chamado anidrosecoisolariciresinol (ANSECO) ou também shonanina (CHARLET *et al.*, 2002), desperta interesse, pois é uma molécula mais lipofílica, o que provavelmente aumente sua capacidade de permeação através de barreiras biológicas. Outro aspecto relacionado ao ANSECO é a falta de informações quanto a sua biodisponibilidade e possíveis atividades biológicas *in vivo*.

Sabe-se que o SDG é metabolizado intensamente pelas bactérias intestinais, originando as enterolignanas (RAFAELLI *et al.*, 2002), mas não foram encontrados na literatura dados a respeito da farmacocinética do ANSECO.

Outra dificuldade relacionada ao processo de hidrólise ácida do SDG é a presença de glicose, que nas condições da reação sofre desidratação com formação de hidroximetilfurfural (HMF) e produtos derivados de sua degradação e condensação, que conferem ao extrato uma coloração escura e maior dificuldade na análise cromatográfica. (LI *et al.*, 2008).

Na Figura 21 está apresentada a formação do HMF por desidratação da glicose em meio ácido.

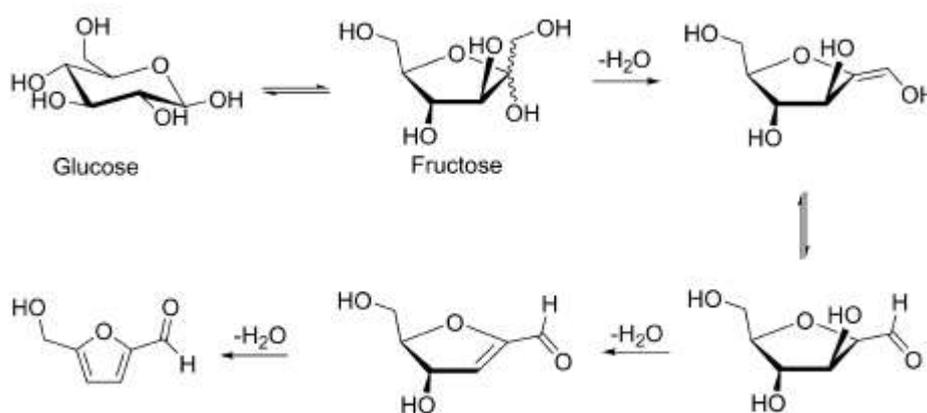


Figura 21: Desidratação da glicose e formação de HMF.

3.4 Infecções Fúngicas

As infecções fúngicas são uma ameaça contínua e importante para a saúde humana, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A resistência aos medicamentos antifúngicos tem sido um grande problema, sendo necessária a pesquisa de novos compostos antifúngicos com alta eficácia, menor toxicidade e baixa resistência. Os agentes antifúngicos convencionais utilizados no tratamento de infecções fúngicas são os azóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol), polienos (anfotericina B e nistatina), equinocandinas (caspofungin, anidulafungina e micafungina) e alilaminas (naftifina e terbinafina). Atualmente, os azóis são os agentes antifúngicos mais utilizados, devido ao seu elevado índice terapêutico, largo espectro de ação e maior segurança para o paciente, com reduzidos efeitos colaterais (SEYEDEH, 2015; LIMA *et al.*, 2006; HASHEMI *et al.*, 2015).

Em geral as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos. Esta resistência aos antifúngicos é a baixa susceptibilidade que um micro-organismo apresenta ao agente antimicrobiano, o que é avaliado pelo teste de sensibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória mínima do fármaco supera o limite do ponto de corte definido para este microrganismo. A resistência ocorre quando as alterações na rota da biossíntese dos esteróis e da expressão do gene ERG 11 envolvidos na síntese da enzima 14 DM reduzem o acúmulo intracelular da droga e a inativação da mesma (MORAES *et al.*, 2015; ZARDO, MEZZARI, 2004)

Quando a resistência ocorre sem prévia exposição do fármaco, é denominada resistência primária, ou então, quando a resposta ocorre em decorrência da exposição ao fármaco, é conhecida como resistência secundária ou adquirida, sendo dependente de uma alteração na expressão de genes (LIMA *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2015; RAMBO, 2014).

O gênero *Candida* é formado por 163 espécies, sendo que são reconhecidas como as leveduras mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A espécie mais importante é a *Candida albicans*, responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas pelo gênero *Candida*. No entanto, outras espécies podem também estar relacionadas com processos patogênicos, tais como: *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*. As espécies de *Candida spp.*

crecem em presença de oxigênio (aerobiose), suportam pH entre 2,5 e 7,5 e temperatura de 20 °C a 38 °C, sendo que suas colônias crescem em meio Sabouraud e ágar sangue e apresentam textura cremosa, membranosa e úmida, não formando hifas aéreas (CASTRO *et al.*, 2006).

Uma grande quantidade de fármacos obtidos por síntese orgânica têm sido utilizados no tratamento de infecções micóticas. Também óleos essenciais, que constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e que exercem defesa contra microrganismos, vêm sendo testados. Sabe-se que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem atividades antifúngicas (LIMA *et al.*, 2006).

Devido às dificuldades encontradas no tratamento de pacientes com micoses, devido a resistência aos antifúngicos, é recomendável, o isolamento do agente responsável pela infecção e a determinação da concentração inibitória mínima das drogas passíveis de utilização, determinando-se assim, drogas mais eficazes e com menores efeitos colaterais (CASTRO *et al.*, 2006).

É importante a adequação de métodos que possibilitem avaliar a suscetibilidade antifúngica devido ao aumento da resistência e a redução do arsenal terapêutico disponível. É preciso, que o método de determinação seja reprodutível, econômico, fácil, rápido e com boa correlação clínica. Os métodos disponíveis são os de difusão em disco, E-teste, métodos colorimétricos e o de macro e microdiluição em caldo e de discodifusão em ágar. Para o CLSI, o método de diluição em caldo é o de referência, com uma reprodutibilidade acima de 90% (ZARDO; MEZZARI, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes utilizados na parte experimental possuíam grau analítico, os solventes utilizados nas análises cromatográficas possuíam grau HPLC.

- ✓ Acetato de etila P.A. (Nuclear®);
- ✓ Acetona P.A. (Vetec®);
- ✓ Ácido clorídrico P.A. (Vetec®);
- ✓ Ácido fórmico (Tedia®);
- ✓ Ácido trifluorácetico P.A. (Nuclear®);
- ✓ Água ultrapura;
- ✓ Água purificada por osmose reversa;
- ✓ Dimetilsulfóxido P.A.(Merck)®;
- ✓ Etanol 95 P.A. (Química moderana)®;
- ✓ Hexano P.A. (Nuclear®);
- ✓ Hidróxido de sódio P.A. (Vetec)®;
- ✓ Metanol grau HPLC(Merck)®;
- ✓ Metanol P.A. (Nuclear®);
- ✓ Metanol P.A. (Synth)®;
- ✓ Polissorbato 80 (Synth)®;
- ✓ Secoisolariciresinol diglicosídeo substância referência (Sigma-Aldrich)®;
- ✓ Secoisolariciresinol substância referência (Sigma-Aldrich)®.

4.2 Equipamentos e Acessórios

- ✓ Autoclave vertical Phoenix, modelo AV 50;
- ✓ Balança analítica Shimadzu;
- ✓ Balança de precisão Denver, modelo TL 104;
- ✓ Balança semi analítica Shimadzu;
- ✓ Banho de ultrasson Transsonic 460 (Elma);
- ✓ CLAE Waters 2695, detector PDA Waters 2998;
- ✓ Coluna Kinetex C18 (4,6mm x 250 mm, 5 µm);
- ✓ Coluna C18 Hypersil Gold (2.1 mm × 100 mm, 1.9 µm);
- ✓ Estufa de secagem digital com circulação interna (SPLABOR);
- ✓ Evaporador rotatório R 114 (Büchi);
- ✓ Liofilizador modular Edwards Modulyo 4K;

- ✓ Membrana para filtração, 0,22 μm (Millipore®);
- ✓ Membrana para filtração, 0,45 μm (Millipore®);
- ✓ UPLC Waters Acquity, Q-ToF Micromass.

4.3 Material Vegetal

O farelo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) foi gentilmente cedido pela Indústria de óleos Vegetais Giovelli, com sede na cidade de Guarani Das Missões – RS. A empresa faz a extração do óleo com o uso de hexano, a partir de sementes de linhaça cultivadas na região. Após a obtenção do óleo, que é destinado à indústria química, o farelo é utilizado em formulações de rações para a alimentação de bovinos, suínos, equinos e aves.

Duas amostras de farelo de linhaça foram adquiridas, uma em maio de 2013 (FL1) e outra em dezembro de 2014 (FL2). As sementes utilizadas para a obtenção do óleo são armazenadas nos silos da empresa, que as recebe dos produtores da região. A maior parte é constituída pela variedade marrom, muito mais comum na área de cultivo.

4.4 Obtenção do Extrato Bruto

A obtenção do extrato bruto foi realizada utilizando-se metodologia adaptada de Zhang e colaboradores (2007). Na referida metodologia, foi otimizado o processo de extração de lignanas da linhaça através de maceração com misturas de etanol/água, temperaturas e tempo de extração variados. O solvente utilizado nessa metodologia se encaixava nos aspectos de viabilidade econômica, impacto ambiental, toxicidade e capacidade extratora para os compostos de interesse, sendo viável para aplicação em larga escala, tendo sido por isso adotado nesse trabalho.

Na otimização do processo de extração desenvolvido por Zhang e colaboradores (2007), a análise das variáveis resultou em uma curva de resposta onde a máxima eficiência de extração foi atingida utilizando-se como solvente etanol/água entre 56,6-83,4%, um tempo de extração entre 26,7-27,9 horas e uma temperatura entre 38,7-40,1C. Na referida metodologia não foi estabelecida qual a melhor relação droga/solvente a ser usada, utilizando-se neste trabalho uma relação 1:6. A determinação dessa relação é bastante relevante para a aplicação em um processo industrial do ponto de vista econômico, de forma que outras proporções foram testadas.

Para a obtenção do extrato bruto, foi utilizado etanol a 70%, temperatura de 45C, e tempo de 24 horas. Além disso, foram testadas três relações FL/solvente: 1:6, 1:5 e 1:4 com o objetivo de avaliar qual delas apresentaria o melhor desempenho em termos de custo/benefício em um âmbito industrial.

Foram pesados 100 g das amostras FL1 e FL2 para cada uma das análises. O volume de etanol 70% utilizado variou de 400 mL na relação 1:4 até 600 mL na relação 1:6. Todas as análises foram realizadas em triplicada, em um total de dezoito experimentos.

Após as 24 horas de maceração a 45C, o extrato obtido foi filtrado à vácuo e a massa de linhaça úmida foi prensada, obtendo-se mais líquido que foi também submetido à filtração à vácuo. Todo o líquido obtido de cada amostra foi recolhido em erlenmeyer e seu volume medido em proveta graduada para avaliar a porcentagem retida no farelo de linhaça. O extrato hidro-alcoólico foi evaporado em rotavapor, em temperatura de 40C até a obtenção de uma pasta viscosa.

A secagem foi feita em estufa com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 45C por 24 horas, seguido de secagem em dessecador de vidro contendo gel de sílica por 48 horas. Cada amostra foi pesada em balança analítica, e os valores encontrados foram usados para obter a média e o desvio padrão relativo.

Após a pesagem e aquisição dos dados para avaliação do rendimento de cada extração, as amostras obtidas de FL1 foram trituradas em gral de porcelana, dando origem ao extrato bruto 1 (EB1), enquanto as amostras obtidas de FL2 produziram o extrato bruto 2 (EB2).

4.4.1 Hidrólise Alcalina do Extrato Bruto

A hidrólise alcalina foi realizada utilizando-se 5,0 g do extrato bruto das amostras EB1 e EB2. Cada amostra foi dissolvida em 200 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. Após completa solubilização dos extratos, as soluções foram aquecidas em banho Maria até 50C e mantidas nessa temperatura por 2 horas. Após esse período, as soluções hidrolisadas foram deixadas esfriar até temperatura ambiente e então neutralizadas até pH 6,0 com HCl 3 M, sendo o pH final verificado com pHmetro digital Hanna, modelo pH 21.

Após a neutralização, os precipitados obtidos de cada amostra foram filtrados à vácuo, lavados com três porções de 50 mL de água gelada e então secos em

estufa com circulação forçada de ar a 45°C graus por 6 horas, sendo então colocados em dessecador contendo gel de sílica, onde permaneceram até o dia seguinte. A amostra obtida de EB1 produziu o extrato alcalino 1 (EAL1), a amostra obtida de EB2 produziu o extrato alcalino 2 (EAL2). Essas amostras hidrolisadas foram utilizadas para identificar os compostos fenólicos presentes no extrato bruto e também na quantificação do SDG.

4.4.2 Hidrólise Ácida do Extrato Bruto

Para a realização da hidrólise ácida, foram testadas diferentes temperaturas, solventes e concentrações de ácido, de forma a verificar as condições nas quais se obtém o SECO e em que condições predomina a formação de seu produto de desidratação, o ANSECO. Cada um dos experimentos foi realizado utilizando-se 2,5 g de extrato bruto EB1 triturado até pó fino em gral de porcelana. O volume de solução ácida utilizada foi de 200 mL para cada amostra. Na tabela abaixo estão listadas as condições experimentais testadas.

Tabela 1: Condições experimentais testadas na hidrólise ácida

Concentração de HCl (M)	Solvente	Temperatura	Tempo
0,60	Água	90°C	1 hora
0,60	Água	90°C	2 horas
1,0	Água	50°C	6 horas
1,2	Água	100°C	2 horas
1,2	Etanol 70%	70°C	2 horas
3,0	Água	100°C	2 horas
3,0	Água	50°C	6 horas

Após a hidrólise, as amostras foram deixadas resfriar até atingir a temperatura ambiente e neutralizadas até pH 6,0 com hidróxido de sódio 3 M.

Para a obtenção do SECO e ANSECO, se fez partição líquido/líquido utilizando-se quatro porções de 60 mL de acetato de etila em cada condição de hidrólise testada. A fração orgânica foi evaporada em rotavapor a 40°C até quase a

secura, o produto resultante foi recolhido e mantido em dessecador com sílica gel por 3 dias.

4.5 Hidrólise Ácida do SDG Substância Referência

Não foi encontrado disponível comercialmente o ANSECO substância referência. Na tentativa de investigar as condições da hidrólise ácida em uma matriz menos complexa do que a existente no extrato bruto, foi feita a hidrólise do Substância Referência SDG. Para tanto, cerca de 1 mg de SDG foi dissolvido em 5 mL de metanol, ao qual foram adicionados 5 mL de HCl 1 M.

A solução, contida em um Becker, foi colocada em chapa de aquecimento e o líquido foi evaporado até a secura, mantendo a temperatura próxima a 70°C. Para garantir a evaporação completa do ácido, adicionou-se mais 5 mL de metanol, novamente aquecido até a secura, o Becker foi mantido em capela de exaustão de gases até o dia seguinte. O resíduo foi dissolvido em 1,0 mL de metanol e analisado por CLAE.

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Utilizou-se da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificar as moléculas de interesse SDG e SECO, através da comparação com os padrões. Para tanto foi utilizado método adaptado de SAINVITU e colaboradores (2012), sendo a fase móvel A ácido trifluoracético a 0,05% em água e a fase móvel B metanol. A análise cromatográfica seguiu através de um gradiente linear com os seguintes parâmetros: tempo 0, A 85%; 0-4 minutos, A 72%; 4-8 minutos, A 45%; 8-12 minutos A 30%; 12-16 minutos A 30%; 16-20 minutos, A 15% e 20-25 minutos, A 15%. O fluxo foi estabelecido em 0,60 mL/min.

O equipamento utilizado foi um Waters HPLC 2695 acoplado com detector PDA Waters 2998, coluna Kinetex C18 (4,6mm x 250 mm, 5 µm) e temperatura constante de 25°C. Todos os cromatogramas apresentados neste trabalho mostram os espectros no comprimento de onda de 280 nm. No eixo x o tempo é dado em minutos e no eixo y a área sob a curva (AU) é dada em $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.6.1 Perfil Cromatográfico dos Extratos Brutos

Os extratos brutos EB1 e EB2 foram dissolvidos em metanol, na concentração de 10 mg/mL, filtrados com filtro 0,45 µm e analisados por CLAE, através de metodologia já descrita.

4.6.2 Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos por Hidrólise Alcalina

Os hidrolisados EAL1 e EAL2 foram dissolvidos em metanol em uma concentração de 4,0 mg/mL. As amostras foram analisadas por CLAE, utilizando-se a metodologia já descrita. Utilizou-se o tempo de retenção e o espectro UV para identificar o SDG, em comparação com a substância referência.

4.6.3 Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos por Hidrólise Ácida

Após a reação de hidrólise ácida, as amostras de cada condição experimental testada foram dissolvidas em metanol em uma concentração de 4,0 mg/mL. As amostras foram analisadas por CLAE, utilizando-se a metodologia já descrita.

4.6.4 Perfil Cromatográfico da Hidrólise Ácida do SDG Substância Referência

A amostra contendo o SDG substância referência submetido à hidrólise ácida foi analisada por CLAE conforme a metodologia já descrita. O cromatograma obtido foi comparado com os cromatogramas contendo os padrões SDG e SECO, tempo de retenção e espectro UV foram usados para investigar o resultado da hidrólise.

4.6.5 Perfil Cromatográfico da Mistura dos Padrões SDG, SECO e do SDG Hidrolisado

Foram misturados 100 µL de SDG hidrolisado, 50 µL de SDG substância referência (1 mg/mL) e 50 µL de SECO (1 mg/mL) substância referência. Após homogeneização, foi feita a análise por CLAE.

4.6.6 Curva de Calibração do SDG Substância Referência

A curva de calibração foi efetuada através da injeção do SDG substância referência dissolvido em metanol, nas concentrações de 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,2 mg/mL. As soluções foram preparadas através da pesagem de 1,60 mg do SDG em balança analítica de cinco casas, dissolução em 0,80 mL de metanol, resultando em uma solução de concentração 2,0 mg/mL, que foi posteriormente diluída com o mesmo solvente para obter as concentrações desejadas. As amostras foram injetadas no CLAE, e as análises feitas em triplicata.

4.6.7 Quantificação do SDG nos Extratos Alcalinos

As amostras EAL1 e EAL2 foram dissolvidas em metanol em uma concentração inicial de 4,0 mg/mL. Após filtração com filtro 0,45 µm, as amostras

foram analisadas por CLAE, para verificar se a área do pico de interesse (SDG) se encontrava dentro dos limites da curva de calibração que havia sido obtida. As amostras foram analisadas em triplicata, determinou-se a média da área do pico correspondente ao SDG e o desvio padrão relativo. Com a equação obtida a partir da curva de calibração, foi calculada a concentração de SDG em cada amostra.

4.7 Quantificação do SDG nos Extratos Brutos e nas Amostras de Farelo de Linhaça Desengordurada

Após a determinação do teor de SDG nas amostras hidrolisadas, foi possível, por regressão, calcular a concentração média de SDG no extrato bruto e nas duas amostras de farelo de linhaça desengordurado.

4.8 Análises por UPLC-TOF-MS

A confirmação da identidade do SDG, a identificação do ANSECO e do HDG, foi realizada através de seus espectros de massas, utilizando-se um sistema UPLC (Waters Acquity UPLC), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Tof Micromass, operando através da técnica de ionização por eletrospray e modo positivo. A detecção foi feita na faixa m/z de 50 a 1000. As separações foram realizadas utilizando coluna C18 Hypersil Gold (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm) e temperatura constante de 30°C. O método usado nas análises por CLAE foi adaptado para o UPLC, sendo a fase móvel A ácido fórmico a 0,1% em água e a fase móvel B metanol. A análise cromatográfica seguiu através de um gradiente linear, com fluxo de 0,386 mL/min, utilizado-se os parâmetros descritos no quadro a seguir.

Quadro 1: Parâmetros do gradiente usados no UPLC:

Tempo (minutos)	Fase A %	Fase B%
0	85	15
0,05	72	28
0,32	72	28
0,59	45	55
0,73	15	85
0,86	15	85
1,00	15	85
1,25	15	85
1,50	85	15
2,00	85	15

4.9 Avaliação da Atividade Antifúngica

As amostras (EB1, EAL1, EAC-1M) foram pesadas em balança de precisão Denver, modelo TL 104. Estas foram dissolvidas em uma mistura de DMSO 2%, polissorbato 80 2% e água estéril, obtendo-se uma concentração final de 1 mg/mL.

Tomou-se como referencial, o método de microdiluição, segundo as recomendações do *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2008 e 2012). Foram seguidos os protocolos de preparação do inóculo fúngico de acordo com os documentos M27-S4 e M38-A2. As leituras dos inóculos foram realizadas em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus e a homogeneização dessas amostras no meio foi através de vórtex IKA, modelo Lab Dancer.

Foram selecionadas as cepas *Candida albicans* CA 04, *Candida glabrata* CG185, *Candida krusei* CK 02, *Candida parapsilosis* RL 20, *Candida tropicallis* ATCC 750.

O teste de susceptibilidade aos extratos foi feito de acordo com as recomendações dos documentos aprovados pelo *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2008), e os resultados foram avaliados quanto a inibição ou não do crescimento fúngico. Os ensaios foram desenvolvidos em quadriplicata, sendo realizado, portanto, quatro experimentos para cada cepa estudada. As microplacas foram incubadas a 35 °C durante 2 dias para leveduras em estufa DeLeo e a leitura para determinação da atividade foi realizada pelo método visual, comparando com os controles do teste, sendo um controle positivo do meio (RPMI 1640) e o outro o controle do diluente da amostra (DMSO 2% + Polissorbato 80 2%).

A avaliação da potência antifúngica dos extratos foi realizada de acordo com as recomendações dos documentos aprovados pelo *Clinical and Laboratory Standart*

Institute (CLSI, 2008), e os resultados expressos em concentração inibitória mínima (CIM). Os ensaios foram desenvolvidos em quadriplicata, sendo realizado, portanto, doze experimentos para cada cepa estudada. As microplacas foram incubadas a 35 °C durante 2 dias e a leitura para determinação da CIM de cada amostra testada foi realizada pelo método visual, comparando com os controles do teste, sendo um controle positivo do meio (RPMI 1640) e o outro o controle do diluente da amostra (DMSO 2% + Polissorbato 80 2%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extrato Bruto

Após a extração com o solvente, prensagem e filtração, foram obtidas soluções com coloração amarelo claro a amarelo acastanhado, dependendo da relação FL/solvente utilizada. Após a evaporação do solvente no rotavapor, todas as amostras apresentaram o mesmo aspecto de pasta viscosa, marrom escura. Após a secagem, obteve-se em todas as amostras, sólido castanho, com aspecto cristalino. Não foi observada variação estatisticamente significativa na massa de extrato bruto obtida com o uso de diferentes relações FL/solvente, no entanto foi observada variação estatisticamente significativa entre as amostras FL1 e FL2, com um valor de $p=0,01$. A tabela 2 abaixo apresenta a média dos resultados obtidos, e o desvio padrão relativo.

Tabela 2: Valores de massa de extrato bruto (EB) com o uso de diferentes relações FL/solvente para FL1 e FL2

FL/SOLVENTE	EB1(n=3)	DPR	EB2 (n=3)	DPR
1:6	7,54 g	3,44%	6,48g	1,88%
1:5	7,19 g	2,98%	6,44g	4,03%
1:4	7,15g	3,72%	6,60g	4,50%

Como a utilização de uma razão FL/solvente de 1:4 não apresentou diferença estatisticamente significativa daquelas em que um maior volume de solvente foi empregado, pode-se considerar que esta é uma proporção adequada para a obtenção de lignanas em escala industrial, tendo em vista que uma razão FL/solvente menor que 1:4 é quase que inteiramente absorvida pelo material vegetal, resultando em uma mistura de maior viscosidade, mais difícil de trabalhar e mais difícil de prensar. A quantidade de solvente que permaneceu retida na FL apresentou variação entre 7,1 e 7,7%, considerando o volume de solvente adicionado e o volume obtido. Essa retenção pode ser atribuída ao elevado teor de fibras presentes na FL. A fibra presente na semente de linhaça é uma mucilagem, altamente ramificada, contendo os ácidos D-galacturônico, e manurônico, e os açúcares D-galactose, L-ramose, D-xilose e L-arabinose (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Conforme as especificações do fabricante, o teor de fibra bruta é inferior a 12%, mas a literatura aponta valores que podem chegar a 30% (ZANGH *et al.*, 2007). Ao se adicionar água ao farelo de linhaça, ocorre intumescimento e formação de uma massa gelatinosa, provocada pela hidratação da mucilagem.

5.1.2 Hidrólise Alcalina do Extrato Bruto

As amostras de extrato bruto EB1 e EB2 se mostraram facilmente solúveis em hidróxido de sódio 0,5 M, com formação de solução límpida de coloração castanha. A solubilidade do extrato bruto nesse meio se deve a presença dos compostos fenólicos que formam o polímero. Em condições suficientemente básicas ($\text{pH} > 10$) ocorre ionização dos grupamentos fenólicos, e a interação íon-dipolo que se estabelece com as moléculas de água aumenta a energia de solvatação, favorecendo a dissolução.

Ao final da hidrólise, as soluções se mantiveram límpidas, mas perceptivelmente mais escuras. Com a neutralização, formou-se um precipitado de coloração marrom, constituído por SDG, ácido ferúlico glicosídeo, ácido *p*-coumárico glicosídeo e HDG. O ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMGA), por ser um ácido carboxílico solúvel em água, é eliminado durante a filtração (O'NEIL, 2006). A lavagem com água retira possíveis impurezas, tais como cloreto de sódio (formado na reação de neutralização) e açúcares que possam ter sido extraídos pela mistura hidro-alcoólica e permanecidos no extrato bruto.

A literatura cita várias condições de hidrólise, por exemplo 0,500g de material vegetal em 20 mL de MeOH a 70% e NaOH variando entre 0,1 e 1M (ELIASSON *et al.*, 2003; POPOVA *et al.*, 2009).

A hidrólise direta do farelo de linhaça é descrita como sendo viável para a obtenção de SDG e demais compostos fenólicos presentes na linhaça (ELIASSON *et al.*, 2003). No entanto, esse procedimento não parece o mais apropriado, tendo em vista que o extrato bruto é mais fácil de manusear e armazenar. Além disso, a hidrólise alcalina feita diretamente no material vegetal expõe os demais constituintes da semente, como proteínas, fibras solúveis, carboidratos a um pH próximo a 14, condição essa que gera inúmeros produtos de degradação, aumentando a complexidade da matriz, dificultando a extração seletiva dos compostos de interesse.

5.1.3 Hidrólise Ácida do Extrato Bruto

Como característica geral da hidrólise ácida, pode-se citar a formação de coloração escura em todas as condições testadas. Esse escurecimento, que variou do marrom ao preto, ocorreu de forma mais acelerada nas amostras em que se utilizou ácido mais concentrado, sendo também dependente do tempo de aquecimento.

Após o resfriamento e neutralização das soluções, percebeu-se a presença de partículas escuras que permaneciam em suspensão. Durante a partição com acetato de etila, a fase orgânica se corava com intensidade similar a da fase aquosa. Ao término da partição, o acetato de etila apresentava coloração ligeiramente mais clara que a fase aquosa. Após a evaporação do solvente e secagem, todas as amostras se apresentavam na forma de um sólido escuro.

5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.2.1 Perfil Cromatográfico dos Extratos Brutos

Os extratos brutos obtidos de EB1 e EB2 foram avaliados por CLAE, os cromatogramas e espectros UV resultantes se observam nas figuras abaixo.

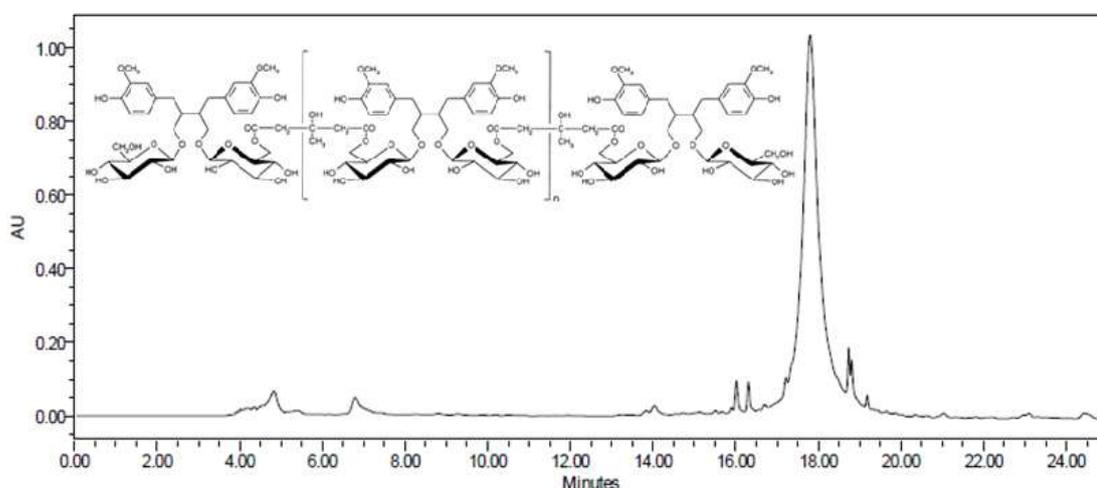


Figura 22: cromatograma (280 nm) do extrato bruto EB1 (10 mg/mL), pico maior centrado em 18 minutos atribuído a macromolécula contendo SDG.

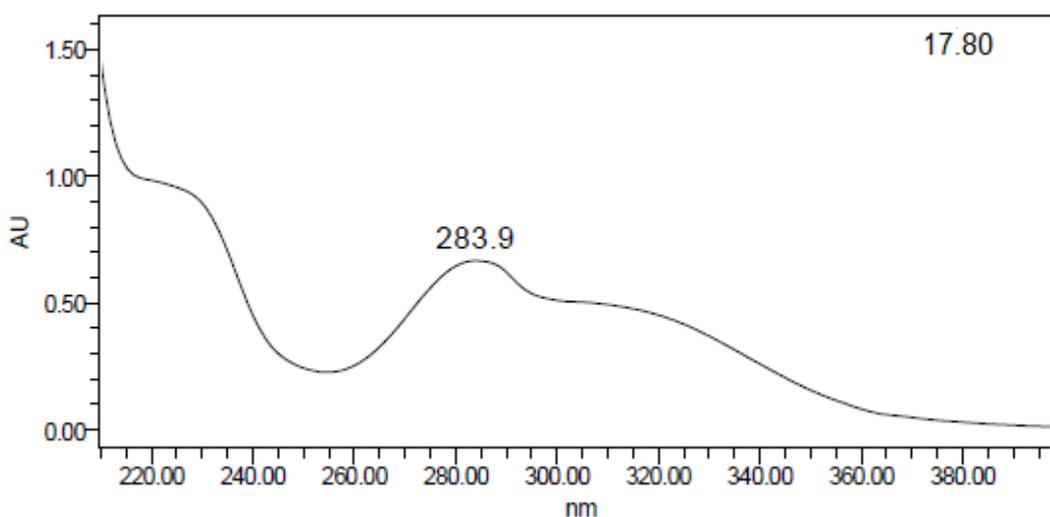


Figura 23: Espectro UV do pico com tempo de retenção de 17.80 minutos, atribuído a macromolécula contendo SDG, obtido de EB1.

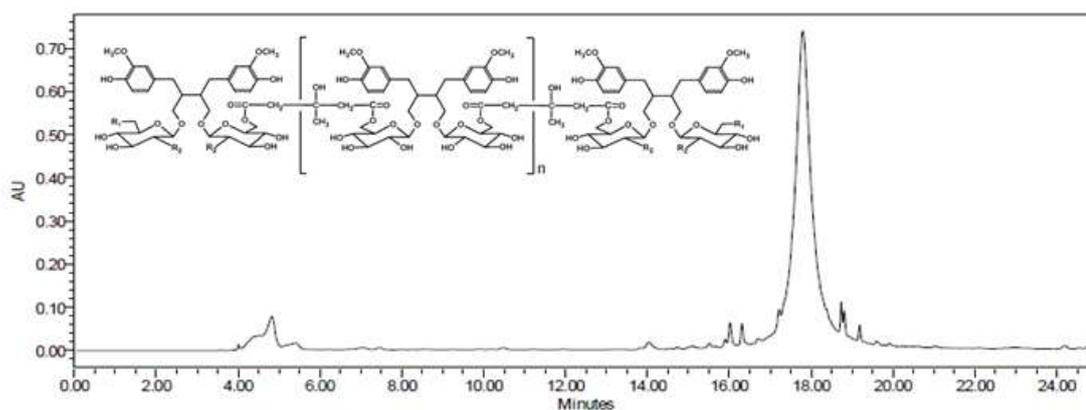


Figura 24: cromatograma (280 nm) do extrato bruto EB2 (10 mg/mL), pico maior centrado em 18 minutos atribuído a macromolécula contendo SDG.

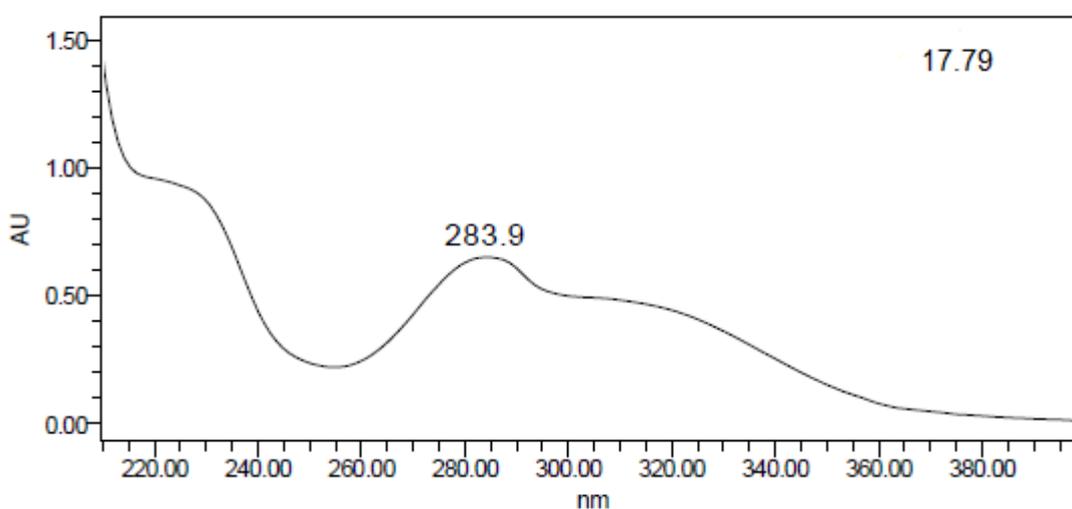


Figura 25: Espectro UV do pico com tempo de retenção de 17.79 minutos, atribuído a macromolécula contendo SDG, obtido de EB2.

Em ambos os cromatogramas se percebe um pico alargado, com tempo de retenção próximo a 18 minutos, e que corresponde a macromolécula contendo os ácidos fenólicos, lignanas e flavonóides. O espectro UV mostra uma forte absorção em 283,9 nm característica desses compostos fenólicos. O espectro se estende além dos 340 nm, região que compreende a banda I de absorção UV de flavonoides. (LI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2004).

Ambos os cromatogramas indicam que os extratos brutos obtidos são quase que inteiramente formados pela macromolécula de interesse, que o método de extração utilizado apresenta alta seletividade e é portanto adequado para realizar essa extração.

5.2.2 Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos por Hidrólise Alcalina

Com a hidrólise alcalina, são quebradas as ligações éster que formam a estrutura da macromolécula, estes componentes são então liberados, resultando em um cromatograma mais complexo que o observado no extrato bruto. Na Figura 26 abaixo pode-se observar o perfil cromatográfico da amostra após a hidrólise alcalina.

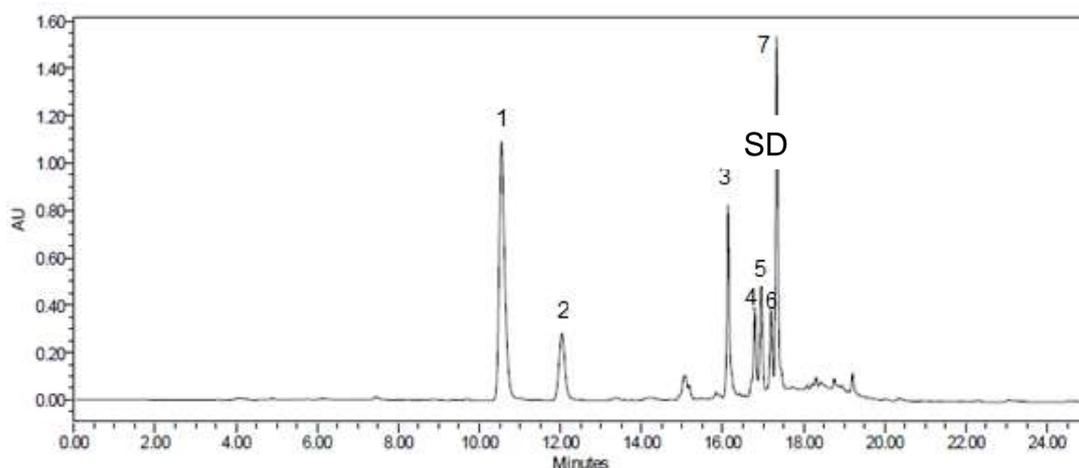


Figura 26: (1) ácido *p*-coumárico glicosídeo, (2) ácido ferúlico glicosídeo, (3) SDG, (4,5 e 6) flavonoides, (7) HDG.

Os compostos 1 e 2 correspondem aos ácidos *p*-coumárico e ferúlico, na forma de glicosídeos, dois ácidos fenólicos cuja presença na linhaça tem sido extensamente relatada. (STRANDAS *et al.*, 2008, STRUIJIS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). Suas estruturas e espectros de absorção podem ser vistos nas Figuras 27 e 28 a seguir.

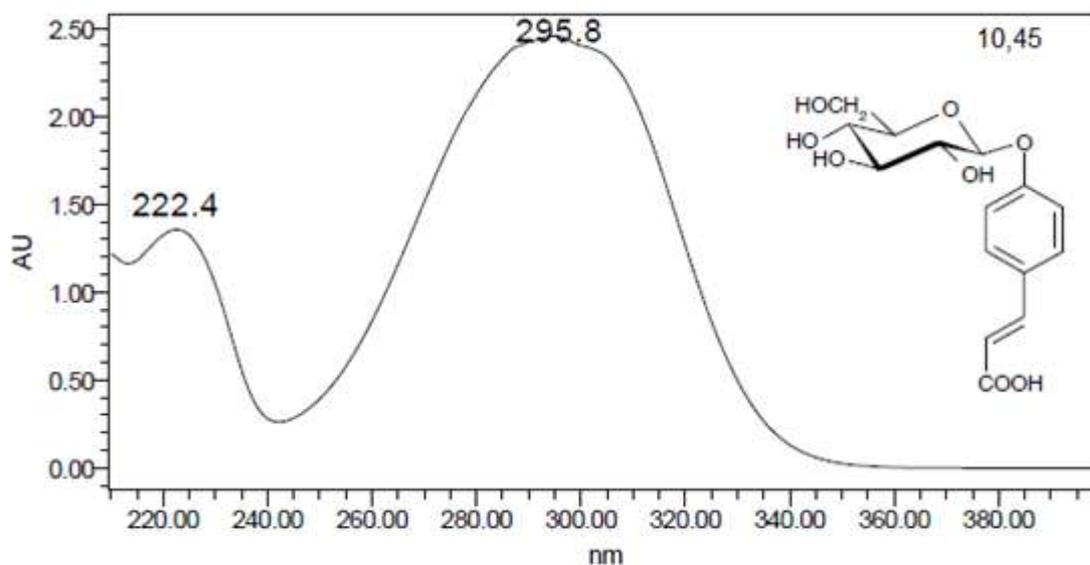


Figura 27: espectro UV e fórmula estrutural do ácido *p*-coumárico glicosídeo.

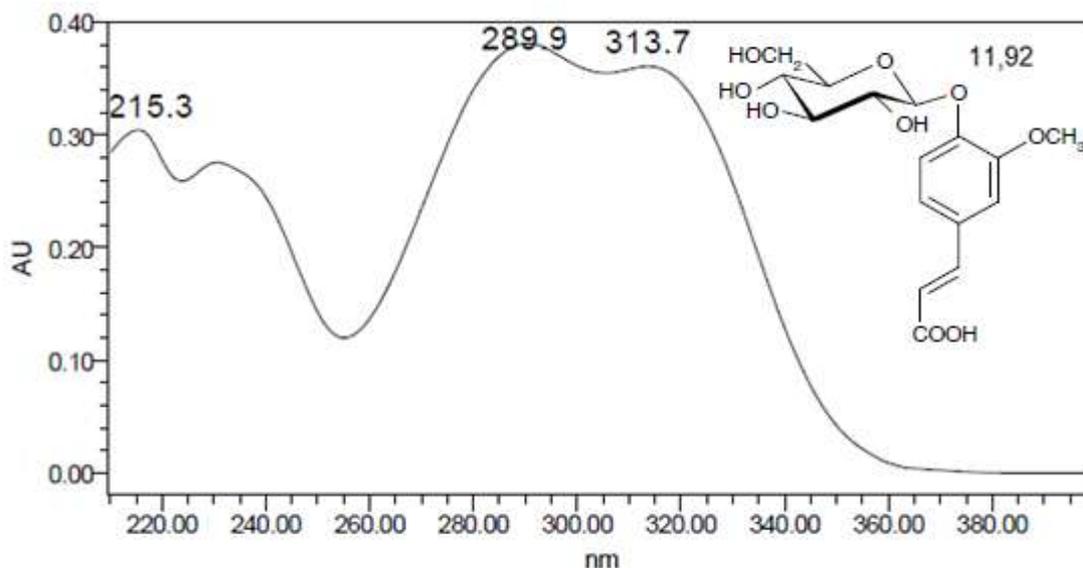


Figura 28: espectro UV e fórmula estrutural do ácido ferúlico glicosídeo.

O composto assinalado em 3 foi identificado como sendo o SDG, através da comparação com a substância referência através da análise por CLAE.

Os compostos em 4,5,6 e 7 são provavelmente flavonóides, considerando seus espectros de absorção muito característicos, com a presença das bandas I e II e máximos de absorção em 323,2 nm, 322 nm e 308,9 nm, respectivamente.

O composto representado pelo pico 7 é o flavonoide herbacetina, na forma de diglicosídeo, como foi demonstrado pelo seu espectro de massas. Nas Figuras 29, 30, 31 e 32 estão apresentados os espectros UV dos compostos 4,5,6 e 7, sendo que nesse último se mostra também a estrutura molecular do flavonoide.

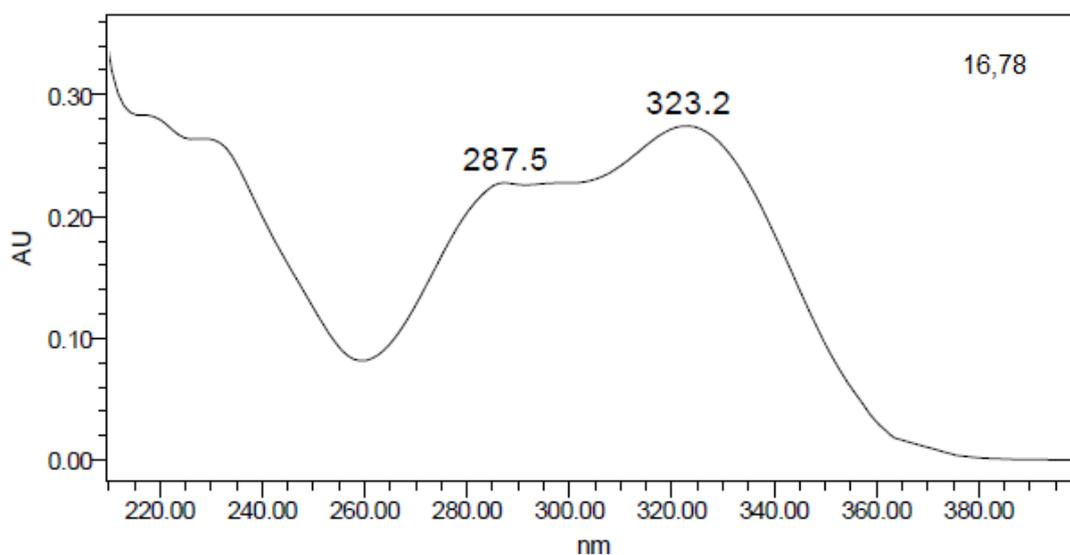


Figura 29: Espectro UV do composto 4.

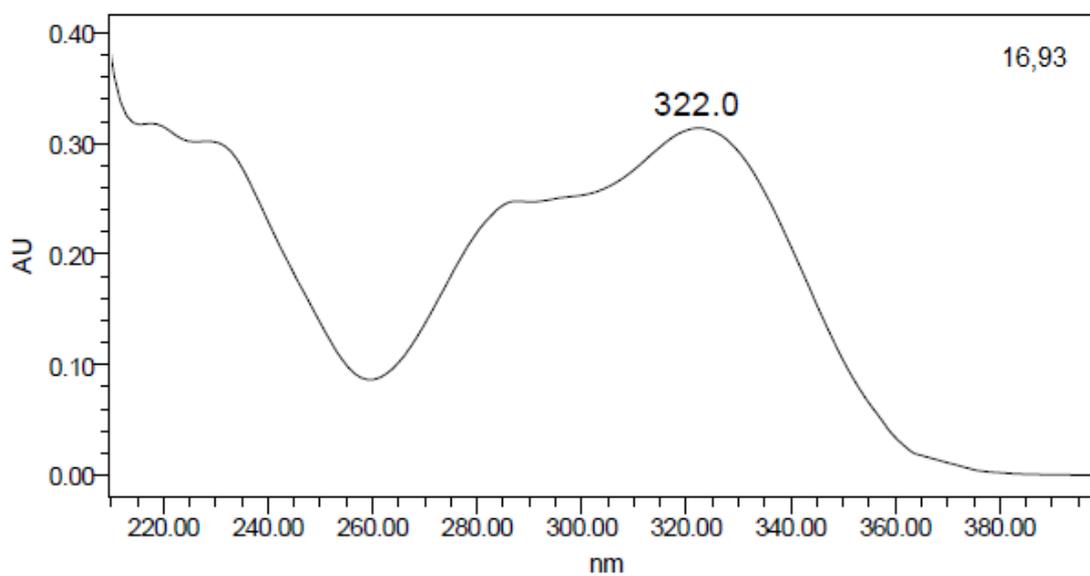


Figura 30: espectro UV do composto 5.

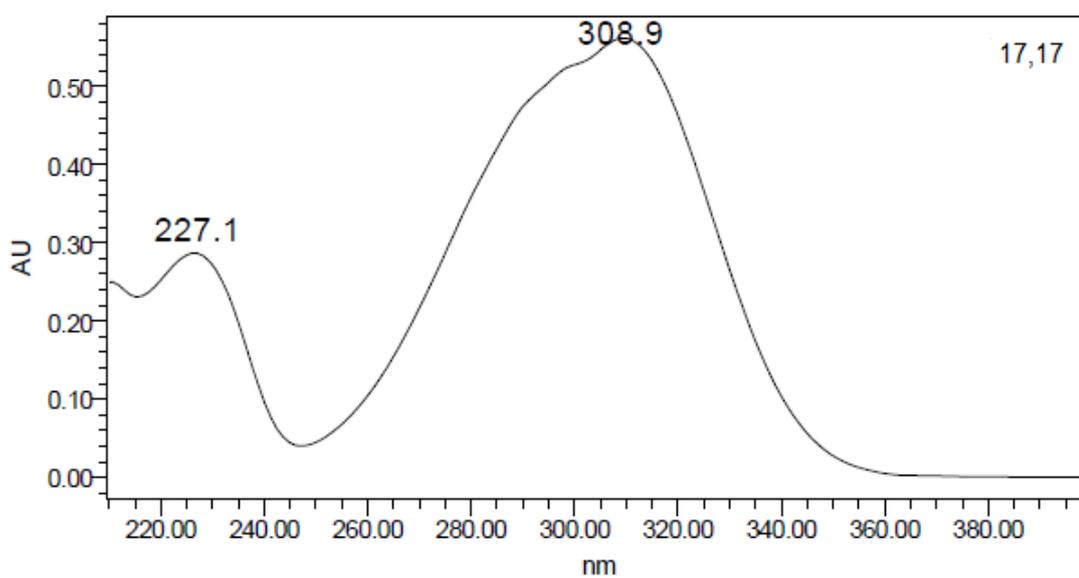


Figura 31: espectro UV do composto 6.

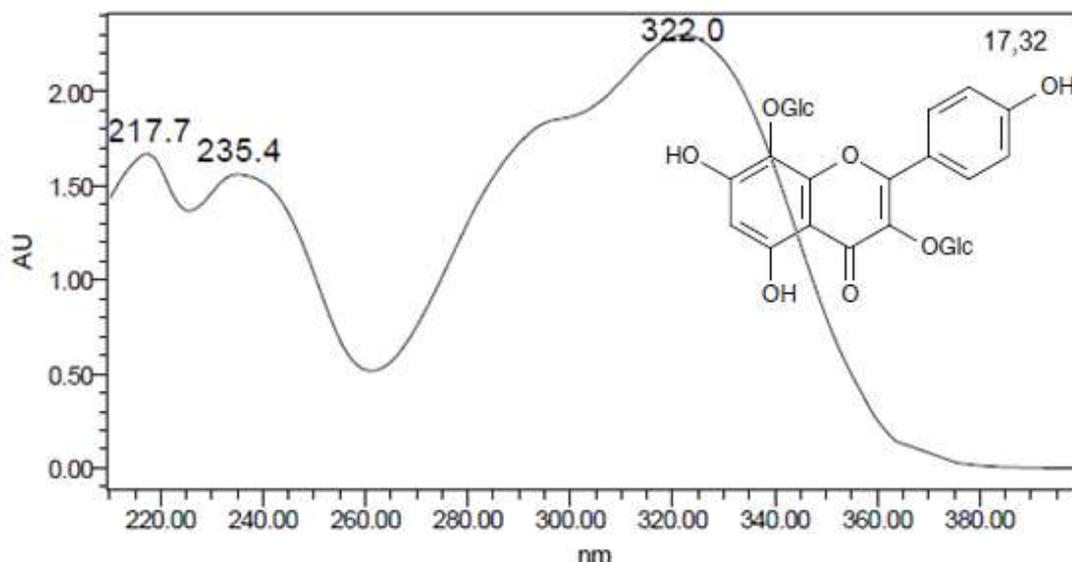


Figura 32: Espectro UV e estrutura molecular do herbacetin diglicosídeo (7)

5.2.3 Perfil Cromatográfico dos Extratos Obtidos por Hidrólise Ácida

Os cromatogramas obtidos a partir das diferentes condições de hidrólise ácida se mostraram semelhantes em dois aspectos: formação de vários produtos de degradação, que impossibilitaram uma separação adequada dos componentes pela metodologia adotada e diminuição acentuada do pico correspondente ao SDG.

A análise desses resultados indica que houve hidrólise parcial do SDG em todas as condições testadas. Não foi possível identificar a presença de SECO ou ANSECO, tendo em vista que na região onde essas moléculas deveriam ser observadas no cromatograma, forma-se uma mistura de compostos que não se conseguiu separar com a metodologia empregada.

Os picos que aparecem entre 6 e 8 minutos correspondem ao HMF ou mais provavelmente um produto de degradação. A presença de HMF resulta na formação de novos compostos, já que se trata de uma molécula de alta reatividade. Há também o relato de que em condições ácidas o herbacetin forma um carbocátion reativo, modificando o perfil cromatográfico da amostra (STRUIJS *et al.*, 2007).

Para exemplificar, podemos observar os cromatogramas obtidos em duas condições de hidrólise ácida, conforme mostra a Figura 33.

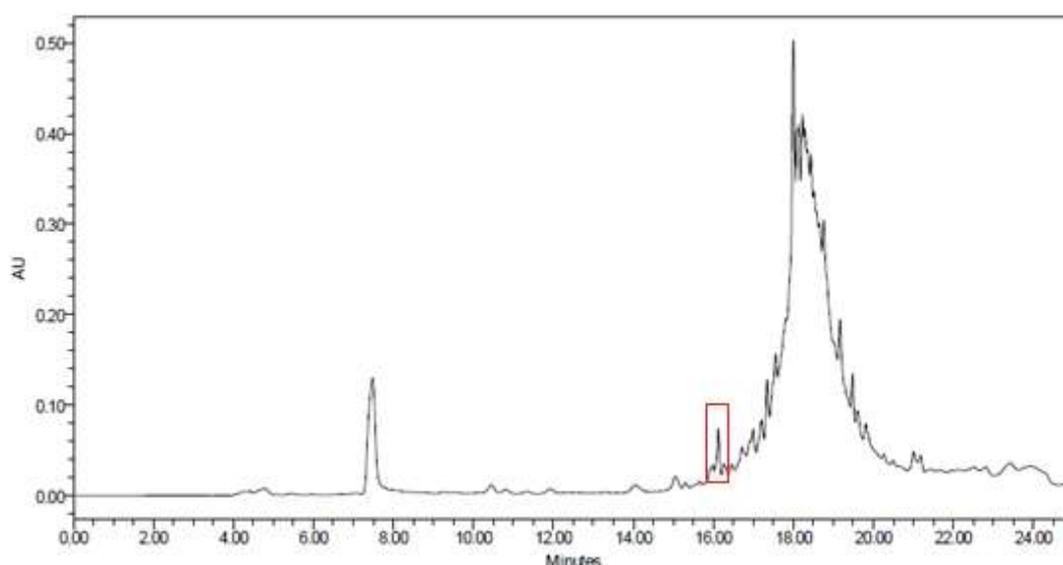


Figura 33: Perfil cromatográfico (280 nm) da hidrólise com HCl 1 M, temperatura de 50°C e tempo de 6 horas de EB1

O pico entre 6 e 8 minutos é provavelmente produto de degradação do HMF (LI *et al.*, 2008). O pico destacado é provavelmente SDG, conclusão que pode ser feita ao observar seu espectro UV e tempo de retenção, mostrados na Figura 34.

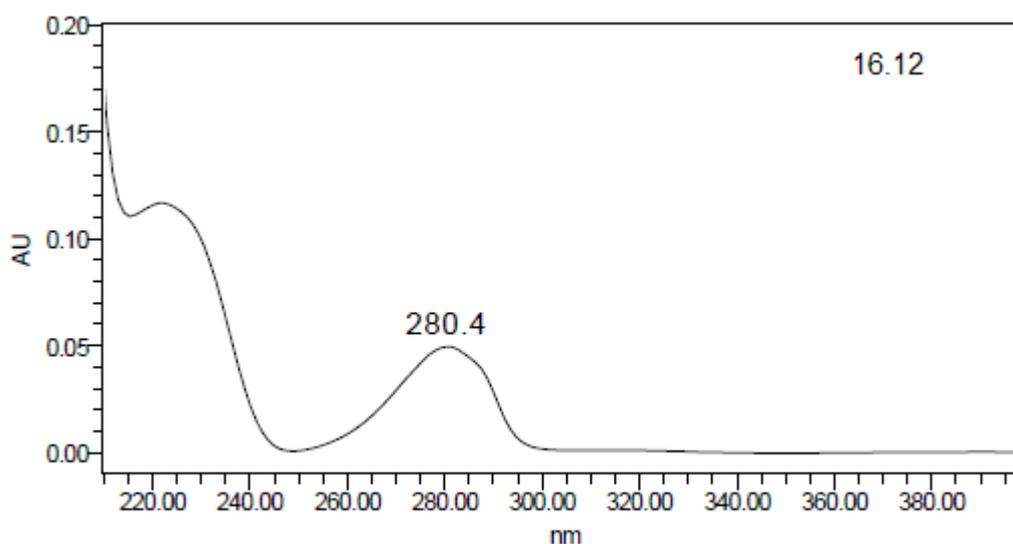


Figura 34: Espectro UV e tempo de retenção (16.12 minutos) do pico destacado no cromatograma da hidrólise com HCl 1M

Ao se analisar o cromatograma, conforme Figura 35, obtido em outra situação, ou seja, HCl 3M, temperatura de ebulição e tempo de 2 horas, observa-se uma situação bastante similar.

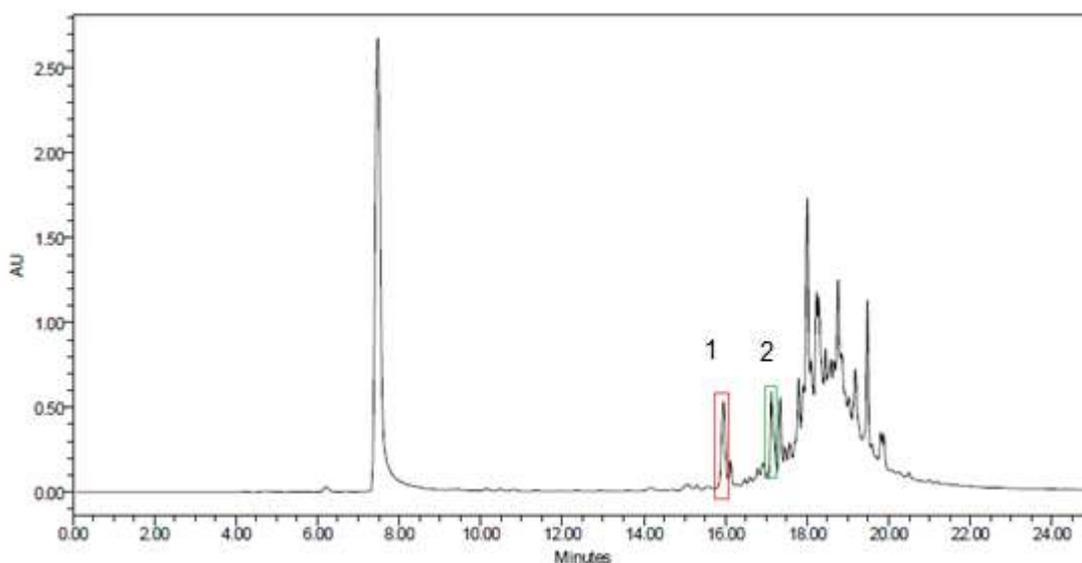


Figura 35: Perfil cromatográfico (280 nm) da hidrólise de EB1 com HCl 3 M

O pico destacado e numerado 1 deve novamente corresponder ao SDG, porem o pico destacado e numerado 2 deve ser uma nova substância. Seu espectro UV é idêntico ao do SDG, SECO e ANSECO, mas seu tempo de retenção é intermediário entre o do SDG e SECO (Figuras 36 e 37). Acredita-se que possa tratar-se de secoisolariciresinol monoglicosídeo (SMG).

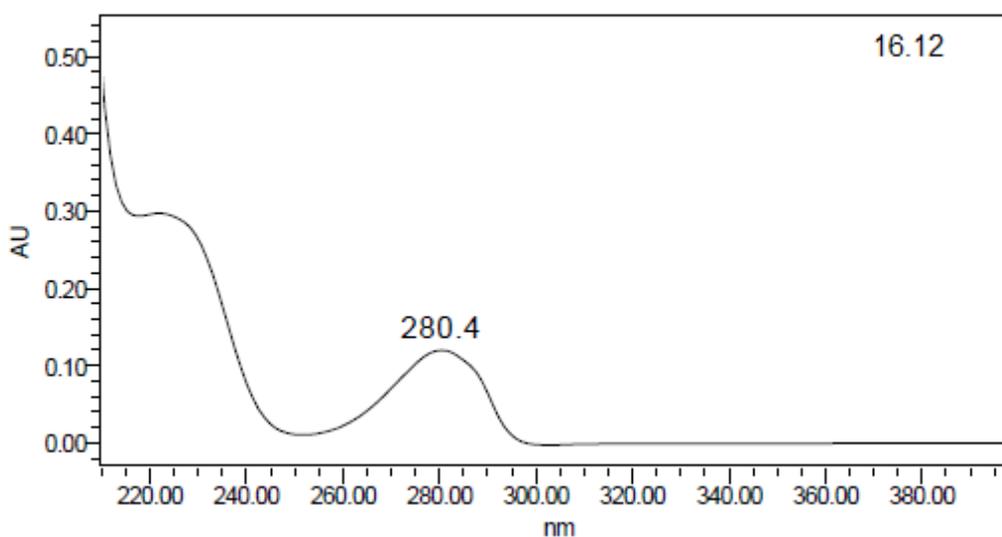


Figura 36: Espectro UV e tempo de retenção (16.12 minutos) do pico destacado e numerado 1 no cromatograma da hidrólise com HCl 3M.

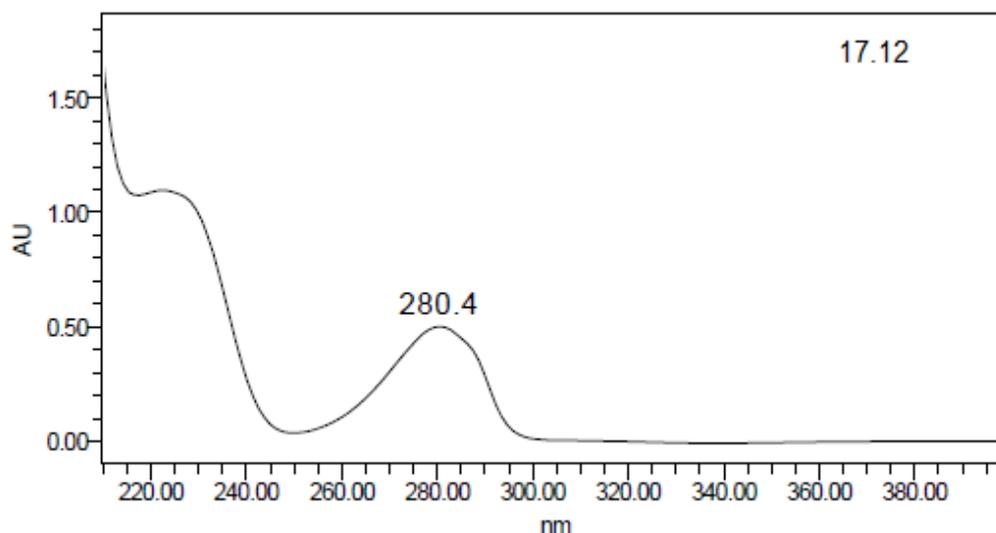


Figura 37: Espectro UV e tempo de retenção (17.12 minutos) do pico 2 no cromatograma da hidrólise com HCl 3M.

5.2.4 Perfil Cromatográfico da Hidrólise Ácida do SDG Substância Referência

A figura 38 mostra o cromatograma do SDG Substância Referência após a hidrólise ácida. O pico com tempo de retenção de 19.24 minutos corresponde ao ANSECO. Essa conclusão pode ser feita com base no espectro de absorção UV, que se mostra idêntico ao dos compostos SDG e SECO. Os três compostos possuem os mesmos grupamentos cromóforicos, o que se reflete em um mesmo espectro UV.

O maior tempo de retenção se relaciona com a diminuição da polaridade da molécula, fato esperado ao se converter um diol em éter cíclico (anel tetrahydrofurânico).

O pico com tempo de retenção próximo a seis minutos é provavelmente hidroximetilfurfural, resultante da desidratação da glicose, e que de acordo com a literatura (O'NEIL, 2006), apresenta máximo de absorção em 282 nm, em conformidade com o espectro UV observado nas figuras 38, 39 e 40 apresentadas a seguir.

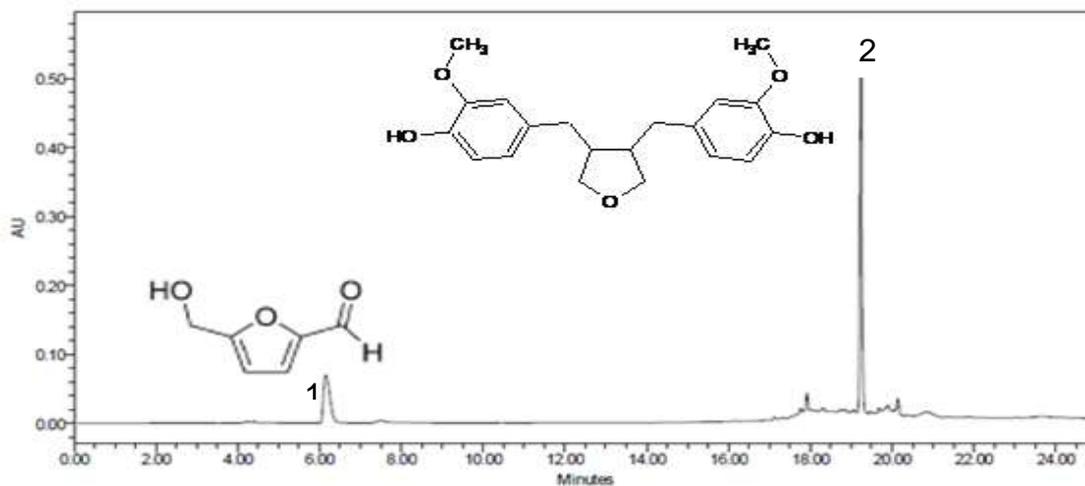


Figura 38: Perfil cromatográfico (280 nm) obtido após a hidrólise ácida do SDG substância referência.

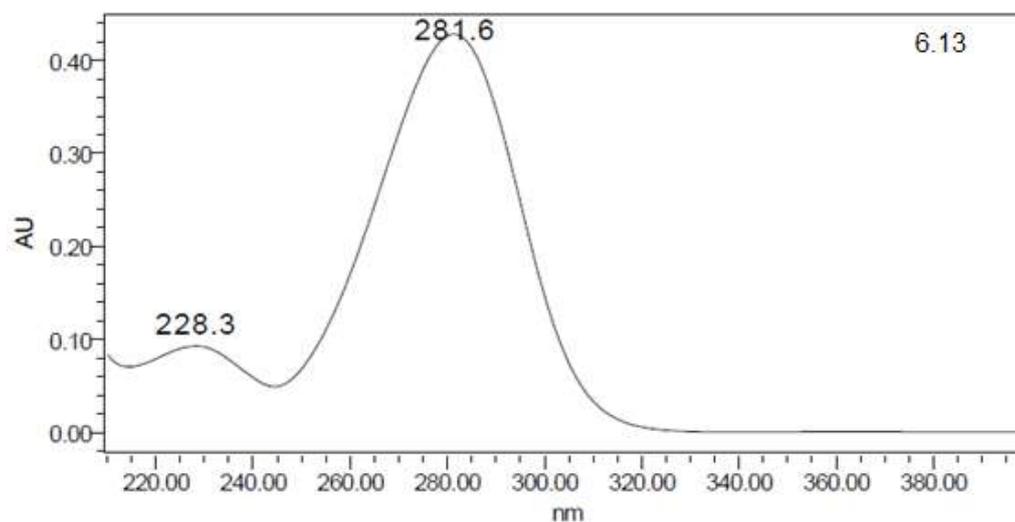


Figura 39: Espectro UV do pico 1 (HMF).

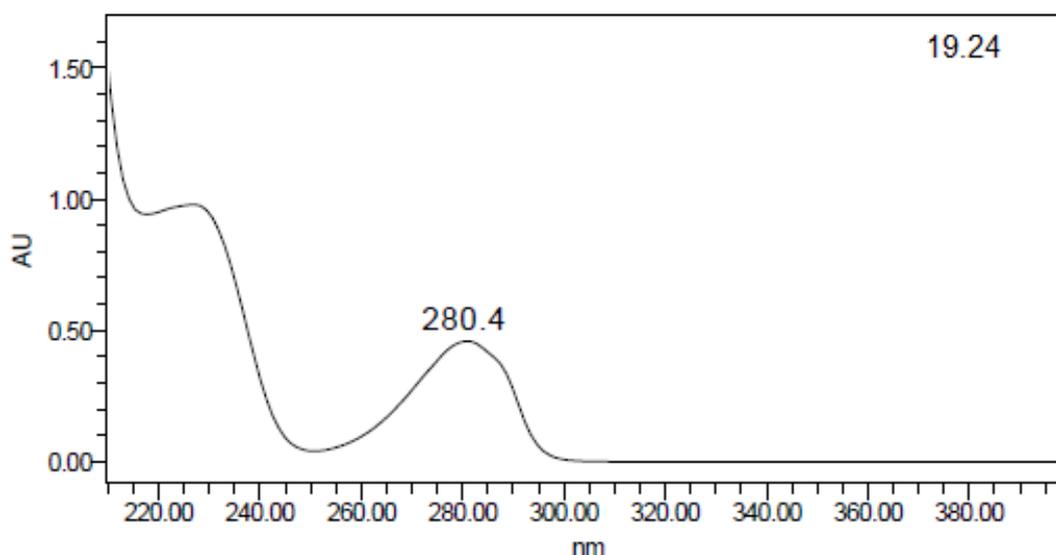


Figura 40: Espectro UV do pico 2 (ANSECO)

5.2.5 Perfil Cromatográfico da Mistura de SDG, SECO e do SDG Substância Referência Submetido à Hidrólise Ácida

Na figura 41 se encontra o cromatograma resultante da mistura dos dois padrões e do SDG submetido à hidrólise ácida. Observa-se um aumento do tempo de retenção à medida que decresce a polaridade das moléculas, enquanto os espectros de absorção UV mantêm-se inalterados, conforme mostra a Figura 41 a seguir.

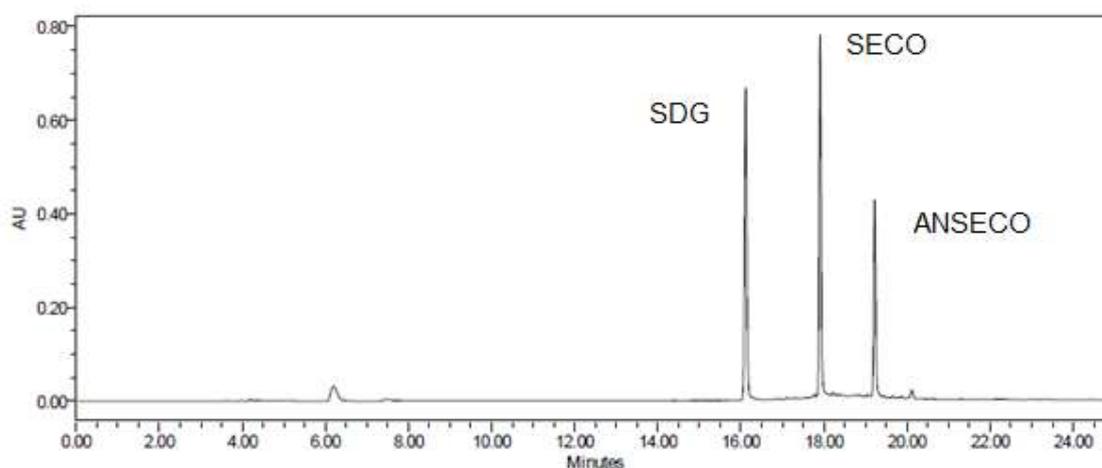


Figura 41: Cromatograma (280 nm) da mistura de SDG, SECO e SDG submetido à hidrólise ácida.

Nas Figuras 42, 43 e 44 são mostrados os espectros associados a cada pico e seus respectivos tempos de retenção.

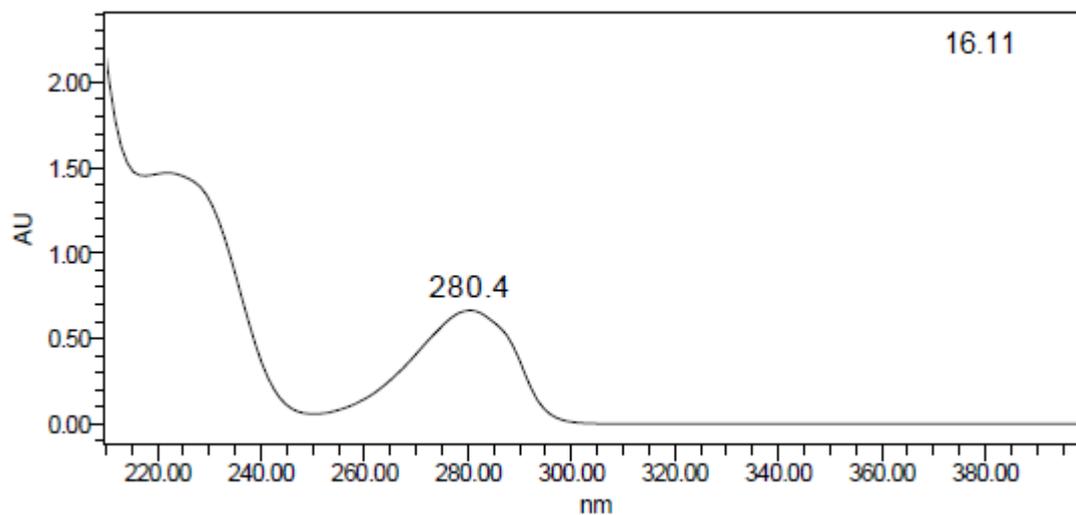


Figura 42: espectro UV e tempo de retenção (16.11 minutos) do SDG

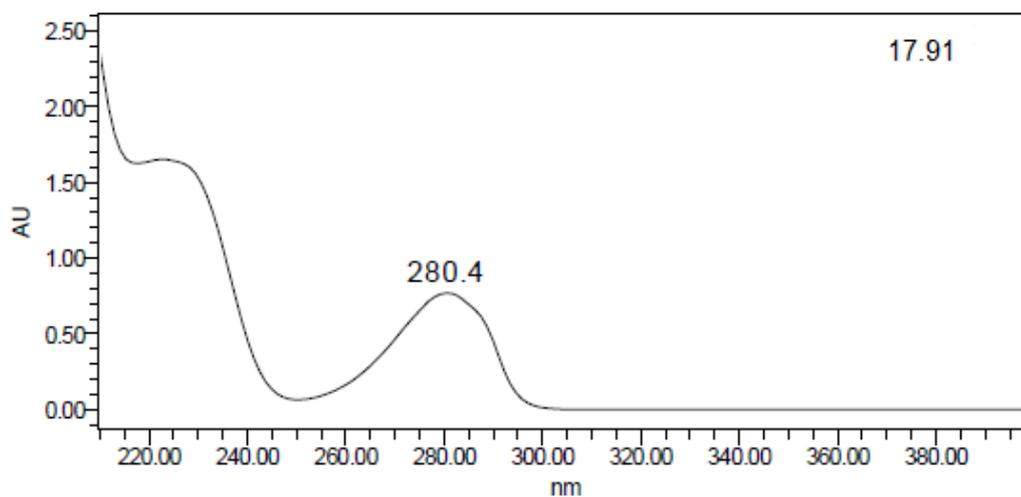


Figura 43: espectro UV e tempo de retenção (17.91 minutos) do SECO

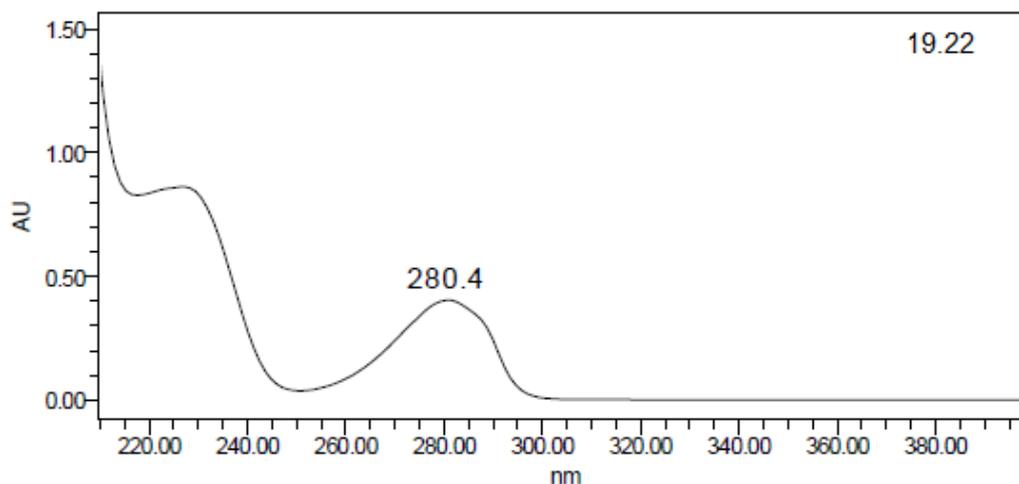


Figura 44: Espectro UV e tempo de retenção (19.22 minutos) do ANSECO

5.2.6 Curva de Calibração do SDG Substância Referência

A curva de calibração do SDG foi efetuada através da injeção do Substância Referência em concentrações variando entre 0,4 e 1,2 mg/mL, todos os pontos foram aplicados em triplicata. Os valores das médias das áreas de cada pico e os coeficientes de variação em cada ponto podem ser observados na tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Valores de concentração da curva de calibração:

Concentração mg/mL	Área média mV.s-1	C.V.
0,40	1488670	2,53%
0,60	2359310	0,05%
0,80	3291910	0,46%
1,00	4250020	0,15%
1,20	5146430	0,52%

Com os valores obtidos, obteve-se a curva de calibração, a equação da reta e um valor de R^2 de 0,9998, conforme apresentado na figuras 45. Nas Figuras 46 e 47 é mostrado o perfil cromatográfico do SDG a 1 mg/mL e seu espectro de absorção.

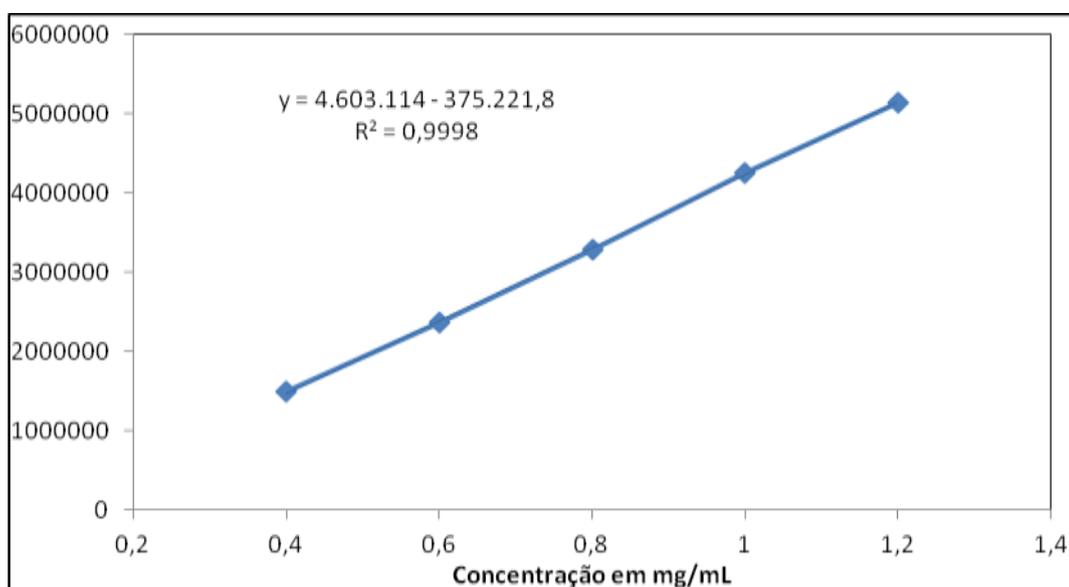


Figura 45: Curva de calibração do SDG obtida por CLAE. Coeficiente de regressão linear (r^2) = 0,9998. Equação da reta $y = 4603114x - 375221$ onde y é a área do pico e x a concentração de SDG.

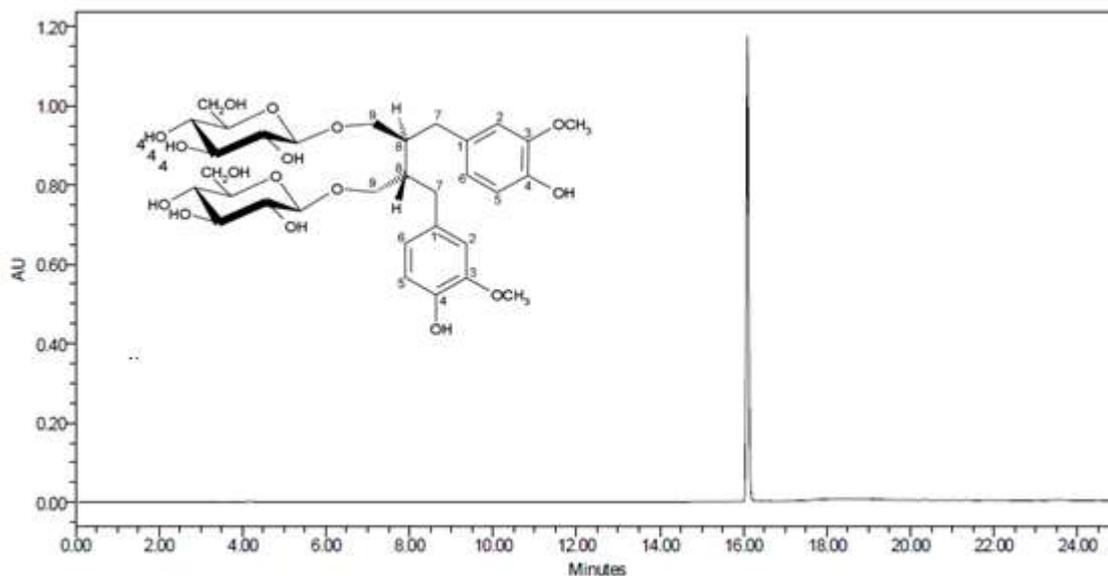


Figura 46: perfil cromatográfico (280 nm) do SDG substância referência na concentração de 1 mg/mL.

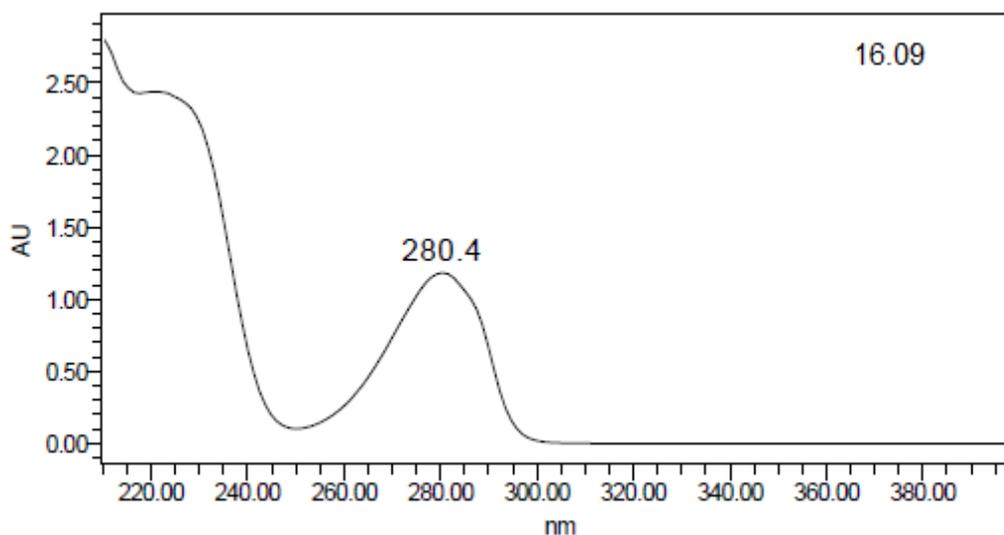


Figura 47: espectro UV e tempo de retenção do SDG substância referência a 1 mg/mL.

5.2.7 Quantificação do SDG nos Extratos Obtidos por Hidrólise Alcalina

Através da equação obtida na curva de calibração, foi possível determinar o teor de SDG nas amostras submetidas a hidrólise alcalina. As amostras EAL1 e EAL2 foram dissolvidas em metanol, em uma concentração inicial de 4,0 mg/mL. Essa solução foi posteriormente diluída com o mesmo solvente, para que a área do pico de interesse apresentasse um valor adequado para a quantificação, ou seja, dentro da faixa abrangida pela curva de calibração. A concentração final empregada para ambas as amostras foi de 2,0 mg/mL. Todas as análises foram realizadas em

triplicata, a área média, o coeficiente de variação, e o teor de SDG são mostrados na tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Resultados da quantificação do SDG

Amostra	Área média	C.V.	SDG	SDG %
EAL1	3434278	1,25%	0,83 mg	41,5%
EAL2	4233353	1,66%	1,00 mg	50,0%

Na Figura 48 apresentada a seguir observa-se o cromatograma da amostra EAL1, onde o pico correspondente ao SDG está destacado.

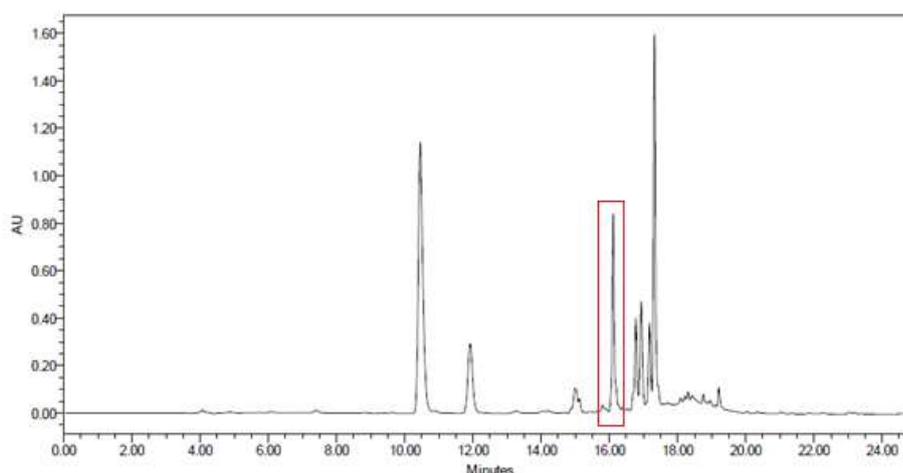


Figura 48: perfil cromatográfico (280 nm) de EAL1 e pico correspondente ao SDG, destacado no cromatograma.

Na Figura 49, observa-se o cromatograma da amostra **EAL2**, onde o pico corresponde ao SDG está destacado.

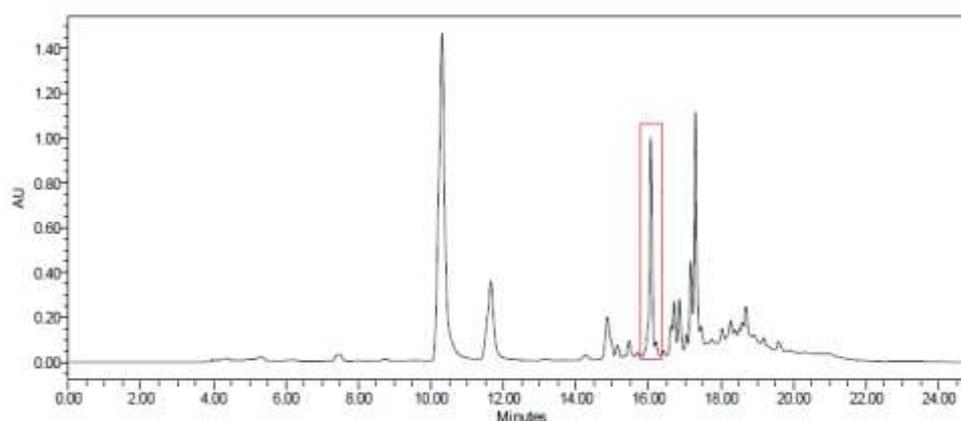


Figura 49: perfil cromatográfico (280 nm) de EAL2 e pico correspondente ao SDG em destaque.

Nas Figuras 50 e 51 a seguir estão apresentados os espectros de absorção no UV e tempo de retenção dos picos selecionados das amostras EAL1 e EAL2, respectivamente.

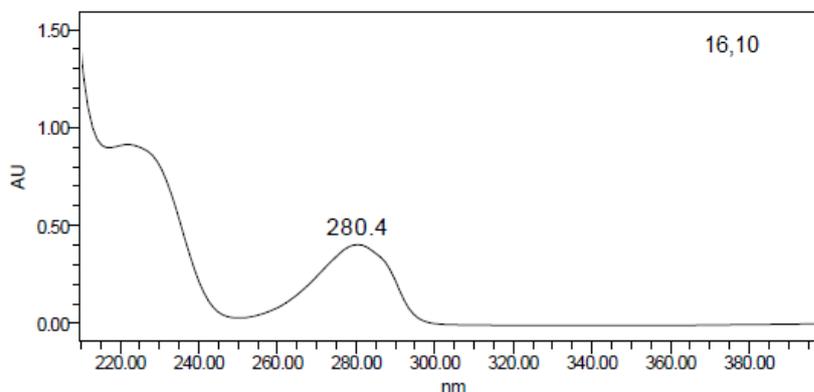


Figura 50: espectro UV e tempo de retenção (16.10) do pico destacado em EAL1 (SDG)

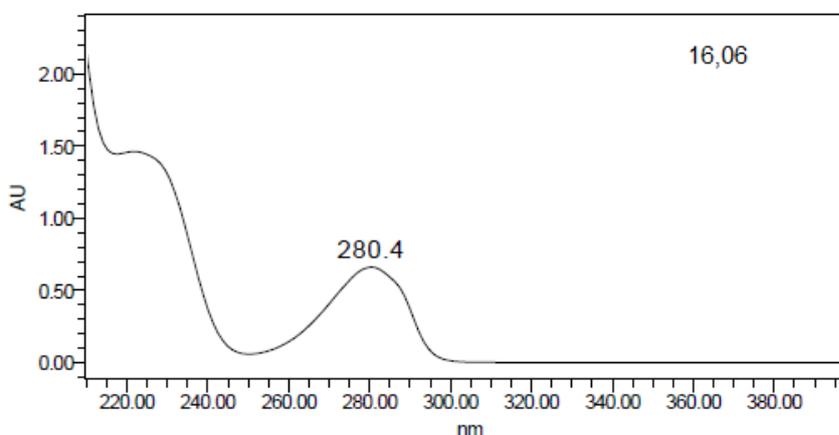


Figura 51: espectro UV e tempo de retenção (16.06 minutos) do pico destacado em EAL2

5.3 Quantificação do SDG nos Extratos Brutos e nas Amostras de Farelo de Linhaça Desengordurado

Após a determinação do teor de SDG nas amostras obtidas por hidrólise alcalina, foi possível determinar o teor médio de SDG no extrato bruto e nas amostras de farelo de linhaça.

Para tanto, calculou-se o rendimento do hidrolisado alcalino obtido à partir dos extratos brutos, determinando-se a concentração média de SDG presente no EB1 e EB2, conforme tabela abaixo.

Tabela 5: concentração média de SDG nas amostras de extrato bruto

Amostra	Rendimento em EAL	SDG%	C.V.
EB1	59,60%	24,73%	2,20%
EB2	62,20%	31,10%	3,46%

O teor de SDG nas duas amostras de farelo de linha desengordurado (FL1 e FL2) foi calculado tendo por base a média de extrato bruto obtida de cada amostra, os resultados estão expressos na tabela abaixo.

Tabela 6: concentração média de SDG nas amostras de farelo de linhaça

Amostra	Rendimento em EB	SDG%	C.V.
FL1	7,29%	1,80%	0,88%
FL2	6,51%	2,02%	2,07%

5.4 Co-injeção de SDG Substância Referência

Na amostra EAL1 se adicionou 50 µL da solução de SDG substância referência. O cromatograma resultante mostra claramente um aumento no pico correspondente ao SDG, sem modificação nos demais picos. Essa é uma boa indicação de que o SDG é quantitativamente detectado na região com tempo de retenção de 16 minutos.

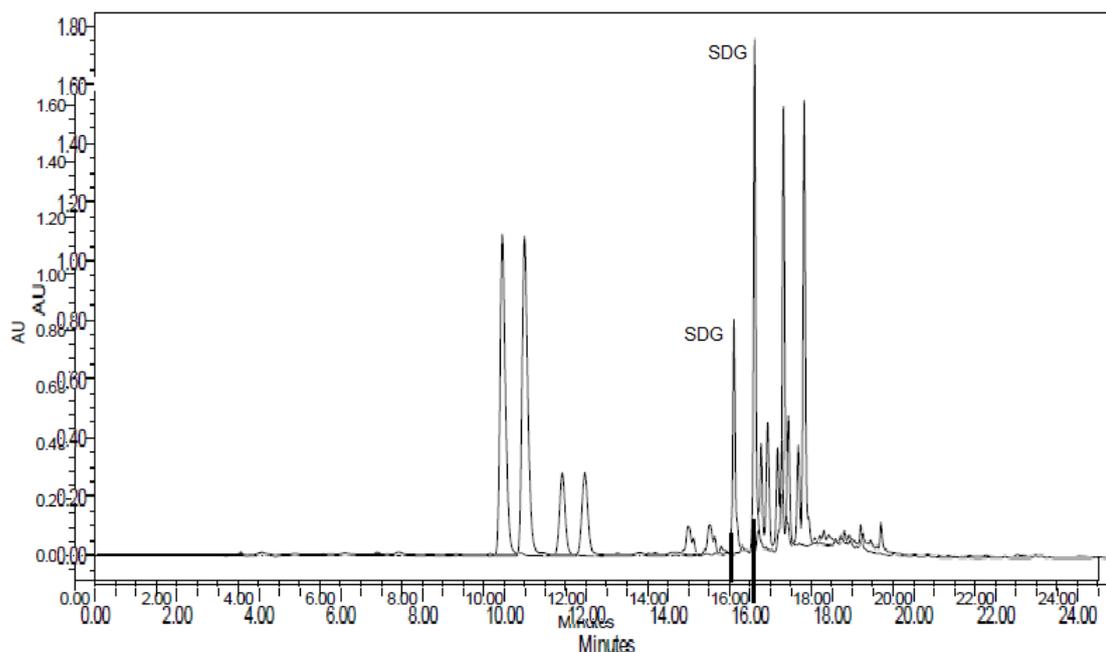


Figura 52: Co-injeção de SDG substância referência na amostra EAL1

5.5 Análise por UPLC –TOF-MS

5.5.1 Análise da Amostra Obtida por Hidrólise Alcalina

A amostra EAL1 foi analisada por espectrometria de massas, conforme metodologia já descrita, tendo sido possível identificar SDG e HDG, através dos íons $[M-H]^+$ e dos adutos $[M-Na]^+$, observados em ambas as moléculas. As massas encontradas nos experimentos estão em conformidade com os valores teóricos esperados. Nas Figuras 53 e 54 a seguir estão apresentados os espectros de massa dos dois compostos, SDG e HDG.

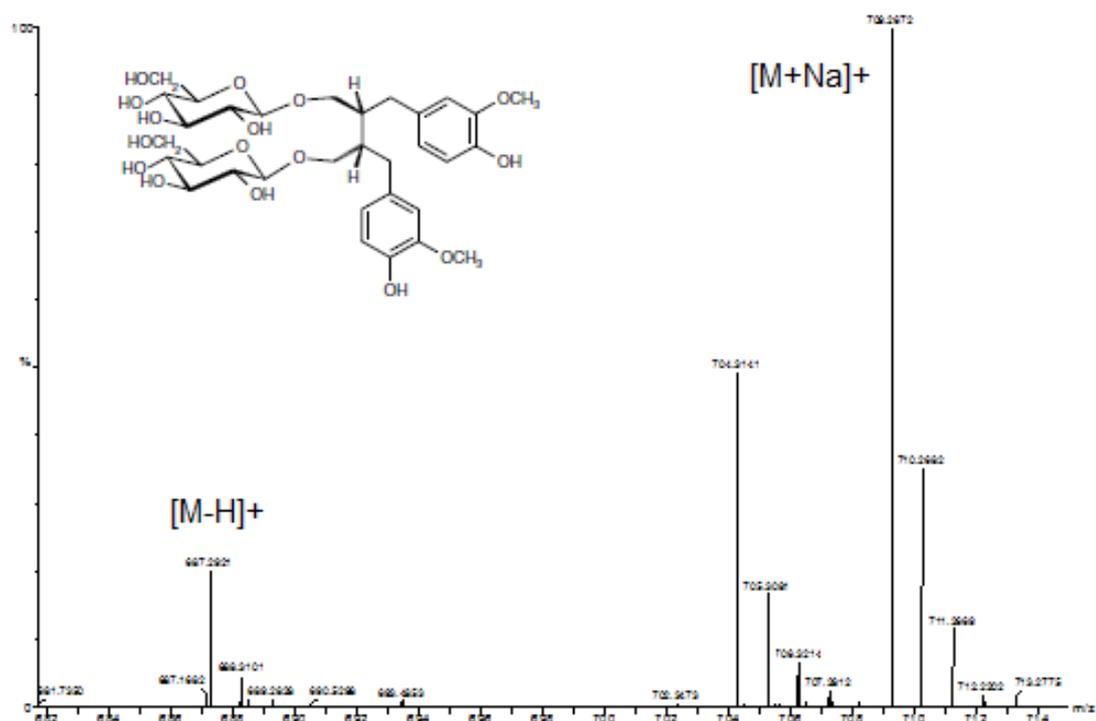


Figura 53: Espectro de massas da fração obtida por hidrólise alcalina do extrato bruto, onde se observam os picos atribuídos ao SDG. Massa teórica de $[M-H]^+$ = 687,28 e $[M-Na]^+$ = 709,26.

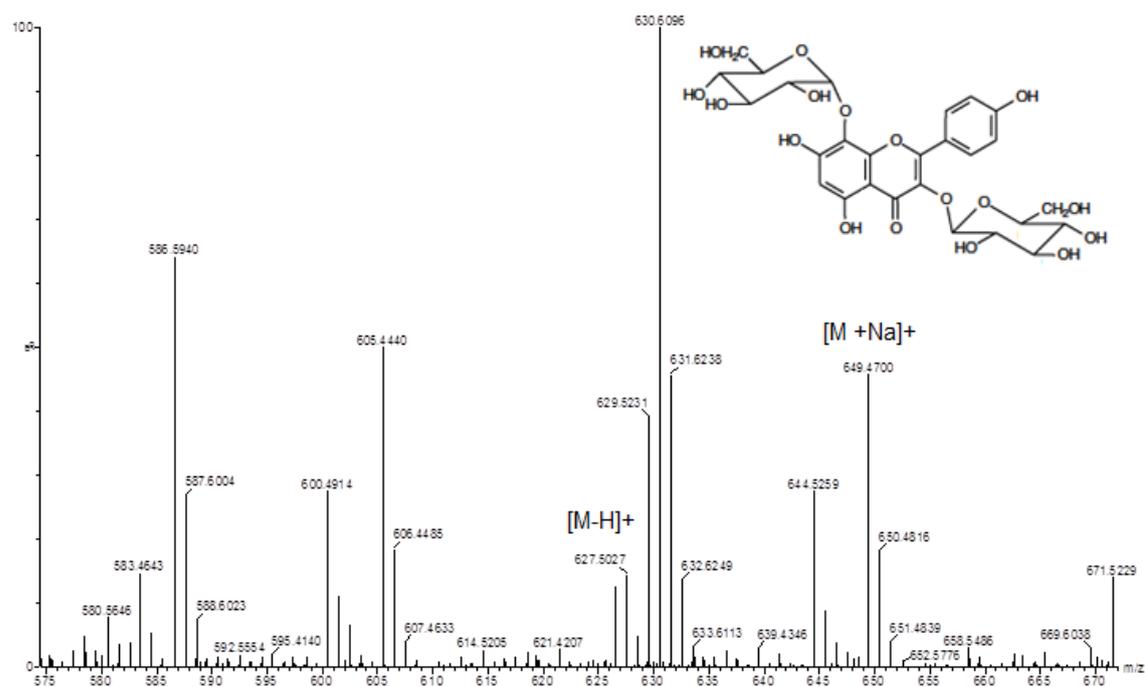


Figura 54: Espectro de massas da fração obtida por hidrólise alcalina do extrato bruto, onde se observam os picos atribuídos ao HDG. Massa teórica de $[M-H]^+$ = 627,15 e $[M-Na]^+$ = 649,14.

5.5.2 Análise da Hidrólise Ácida do SDG Substância Referência

A presença do ANSECO foi confirmada pelos picos representados por $[M-H]^+$ e $[M-Na]^+$. A espectrometria de massas ajudou a confirmar que em condições ácidas, ocorre a desidratação do SECO, conforme apresentado na Figura 55.

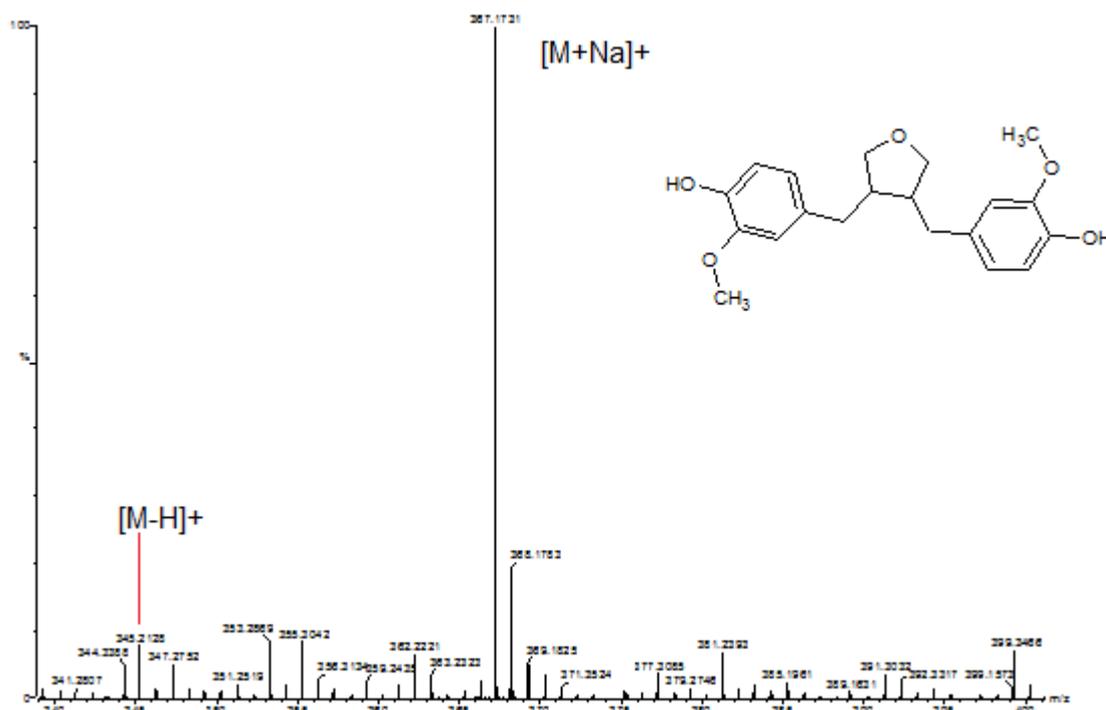


Figura 55: Espectro de massas do SDG substância de referência submetida a hidrólise ácida, onde se observam os picos atribuídos ao ANSECO. Massa teórica de $[M-H]^+$ = 345,17 e $[M-Na]^+$ = 367,15

5.6 Avaliação da Atividade Antifúngica dos Extratos

O ensaio para avaliação de atividade antifúngica foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos padronizados pelo CLSI M27-S4. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. As amostras utilizadas nesse estudo foram testadas frente a 5 cepas, sendo elas *Candida albicans* CA 04, *Candida glabrata* CG 185, *Candida krusei* CK 02, *Candida parapsilosis* RL 20, *Candida tropicalis* ATCC 750.

No experimento testaram-se as amostras de extrato bruto, extrato obtido por hidrólise alcalina e extrato obtido por hidrólise ácida.

Os ensaios foram comparados com os controles positivos do teste, sendo um o diluente utilizado nas amostras e o outro o meio RPMI 1640 com o inóculo. Nesses dois controles positivos sempre foi observado o crescimento do microrganismo. Como referência do controle negativo, foi utilizado apenas o meio RPMI 1640 na

placa de 96 poços. Nesse poço em nenhum momento foi observado crescimento microbiológico e caso houvesse o crescimento de microrganismos o experimento seria rejeitado por apresentar contaminação no meio. A leitura dos resultados foi realizada pelo método visual.

Na tabela 5 a seguir estão apresentados os resultados de *screening* frente as cepas de *Candidas* testadas.

Tabela 6: Resultados obtidos do *Screening* em fungos leveduriformes do gênero *Candida*

	Extrato Bruto	Extrato Alcalino	Extrato Ácido	Controle Diluente	C +	C -
<i>C. albicans</i> CA 04	+	+	+	+	+	-
<i>C. glabata</i> CG 185	+	+	+	+	+	-
<i>C. krusei</i> CK 02	-	-	-	+	+	-
<i>C. parapsilosis</i> RL 20	-	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	+	+	-	+	+	-

Os extratos demonstraram um perfil de atividade muito similar, todos inibindo o crescimento das cepas de *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Esses resultados são coerentes tendo em vista que a diferença entre o extrato bruto e o extrato alcalino não é propriamente a composição química, mas o fato de que em um os constituintes estão ligados em uma estrutura polimérica, enquanto no extrato alcalino os compostos estão livres. É de se supor que as esterases fúngicas sejam capazes de hidrolisar o extrato bruto em seus componentes.

O extrato ácido apresentou um comportamento semelhante, mas houve a inibição do crescimento de *C. tropicalis*, o que não se observou nos outros extratos. Na hidrólise ácida se formam novas moléculas, entre elas ANSECO, o que poderia explicar a atividade frente a essa cepa em particular. Para o ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme preconizado pelo CLSI. Foram utilizadas as três cepas que se mostraram sensíveis no *screening*. Todas as amostras testadas apresentaram uma concentração inibitória mínima de 500 µg/mL, ou seja, a concentração necessária para a inibição do crescimento fúngico foi a mesma observada no *screening*, não se observando diferença na potência antifúngica nos extratos utilizados frente aos microrganismos pesquisados.

6. CONCLUSÕES

A obtenção do extrato bruto a partir do farelo de linhaça desengordurado se mostrou plenamente viável com o método empregado. O método utiliza matéria-prima vegetal amplamente disponível, emprega um sistema solvente barato e de baixa toxicidade, apresenta excelentes rendimentos, o que deixa aberta a possibilidade do seu emprego em âmbito industrial.

O extrato bruto se mostrou altamente enriquecido no composto de interesse, o perfil cromatográfico mostra a presença de impurezas em baixa concentração.

A hidrólise alcalina do extrato bruto permitiu a obtenção dos compostos fenólicos presentes na macromolécula de forma quantitativa, com o uso de reagentes baratos e de fácil acesso e com baixo consumo de energia, novamente deixando aberta a possibilidade de seu emprego em escala industrial.

A quantificação do SDG presente no extrato bruto obtido de duas amostras de farelo de linhaça coletados em épocas diferentes revelou uma variação na concentração de SDG nessas amostras, com valores variando entre 41,5% e 50,0%.

O teor de SDG presente nas amostras de farelo de linhaça desengordurado foi de 1,80% na amostra FL1 e 2,02% na amostra FL2.

A análise cromatográfica e por espectrometria de massas revelou que além da presença dos ácidos ferúlico e *p*-coumárico, a macromolécula apresentava teores aparentemente elevados de flavonoides, especialmente herbacetin, presente na forma de diglicosídeo. A identificação e quantificação desses flavonoides merece ser investigada, pois na literatura pesquisada esses compostos não são encontrados na linhaça em altas concentrações.

A hidrólise ácida da macromolécula foi acompanhada pelo surgimento de vários compostos de degradação, que impossibilitaram a identificação do SECO ou ANSECO.

A hidrólise do SDG padrão realizada sem a interferência de outros compostos demonstrou a formação quantitativa de ANSECO, indicando que a hidrólise do SECO em condições ácidas leva a formação de seu produto de desidratação.

O extrato bruto, o extrato obtido por hidrólise alcalina e o extrato obtido por hidrólise ácida demonstraram ação inibitória em cepas de *Candida*, com CIM de 500 µg/mL em todas as cepas nas quais o *screening* havia demonstrado ação antifúngica.

O presente trabalho mostrou a viabilidade de realizar a extração de compostos fenólicos de interesse a partir de um resíduo da indústria de óleos vegetais.

A hidrólise ácida da macromolécula é passível de novos estudos, já que não se conseguiu obter os compostos na forma de agliconas. A identificação e quantificação dos flavonóides presentes também constitui uma possibilidade para trabalho futuros, como também a investigação da ação antifúngica em outros gêneros e a ação sinérgica desses extratos com antifúngicos de uso corrente.

REFERÊNCIAS

- ALLABY, R.; PETERSON, G.; MERRIWETHER, D.; FU, Y-B. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus. **Journal Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 1, p. 58-65, 2005.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Organic Chemistry**. 2 ed. New York: Worth Publishers, 1976.
- BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O.; Flaxseed and Cardiovascular Risk. **Nutrition Reviews**, vol. 62, n. 1, p. 18-27, jan. 2007.
- BRASIL. EMATER. Disponível em <http://www.emater.tche.br/>. Acesso em: 14 de outubro de 2014.
- CASTRO, T.L.; COUTINHO, H.; GEDEON, C.; SANTOS, J.; SANTANA, W.; SOUZA, L. Mecanismos de resistência da Candida SP WWA Antifúngicos. **Infarma**, v.18, nº9/10. 2006.
- CHARLET, S.; BENSADDEK, L.; RAYNAUD, S.; GILLET, F.; MESNARD, F.; FLINIAUX, M-A. Na HPLC procedure for the quantification of anhydrosecoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 225-229, 2002.
- CHAVAN, U.D.; AMAROWICZ, R. Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). **International Food Research Journal**, v. 20, n.3, p. 1139-1144, 2013.
- CHEN, J.; TAN, K. P.; WARD, W. E.; THOMPSON, L. U. Exposure to Flaxseed or Its Purified Lignan during Suckling Inhibits Chemically Induced Rat Mammary Tumorigenesis. **Experimental Biological Medicine**, vol. 228, p. 951-958, 2003.
- CHARLTON, J. L. Antiviral Activity of Lignans. **Journal Nature Products**, vol. 61, p. 1447-1451, 1998.
- CHO, J.Y.; CHOI, G.J.; SON, S.W.; JANGM K.S.; LIM, H.K.; LEE, S.O.; SUNG, N.D.; CHO, K.Y.; KIM, J.C. Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. **Pest Management Science**, v. 63, p. 935-940, 2007.
- DA SILVA, A. F. G. **Estudo químico e avaliação de atividades citotóxica, genotóxica e antifúngica de *Ocotea acutifolia* (NEES) MEZ. (Lauraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- ELIASSON, C.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. High-performance liquid chromatographic analysis fo secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. **Journal of Chromatography A**, vol. 1012, p. 151-159, 2003.
- FLINIAUX, O; CORBIN,C.; RAMSAY, A.; RENOUARD, S.; BEEJMOHUN, V.; DOUSSOT, J.; FALGUIÉRES, A.; FERROUD, C.; LAMBLIN, F.; LAINÉ, E.; ROSCHER, A.; GRAND, E.; MESNARD, F.; HANO, C. Microwave-Assisted Extraction

of Herbacetin Diglucoside from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Cakes and Its Quantification using an RP-HPLC-UV System. **Molecules**, vol. 19, p.3025-3037, 2014.

FRANK, J.; ELIASSON, C.; LEROY-NIVARD, D.; BUDEK, A.; LUNDH, T.; VESSBY, B.; AMAN, P.; KAMAL-ELDIN, A. Dietary secoisolariciresinol Diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats. **British Journal of Nutrition**, vol. 92, p. 169-176, 2004.

HASHEMI, S.M.; BADALI, H.; IRANNEJAD, H.; SHOKRZADEH, S.E. Synthesis and biological evaluation of fluconazole analogs with triazole-modified scaffold as potent antifungal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 16. FEB. 2015.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S. **Organic Chemistry**. 3 ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1970.

HWANG, B.; CHO, J.; HWANG, I-S.; JIN, H-G.; WOO, E-R.; LEE, D.G. Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, p. 489-493, 2011.

Hu, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 45, p. 2219-2227, 2009.

HYVARINEN, H.K.; PIHLAVA, J.; HIIDENHOVI, J. A. Effect of Processing and Storage on the Stability of Flaxseed Lignan Added to Dairy Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, p. 8788-8792, 2006.

KOROISHI, A.; FOSS, S.; CORTEZ, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.; DIAS FILHO, B. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethno-pharmacology**, vol.117, p. 270-277, 2008.

KVAVADZE, E.; BAR-YOSER, O.; BELFER-COHEN, A.; BOARETTO, E.; JAKELI, N.; MATSKEVICH, Z.; MESHVELIANI, T. 30,000 – Year-Old Wild Flax Fibers. **Science**, v. 325, n.5946, p. 1359, 2009.

LI, X.; YUAN, J-P.; XU, S-P.; WANG, J-H.; LIU, X. Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v.1185, p. 223-232, 2008.

LIMA, I.; OLIVEIRA, R.; LIMA, E.; FARIAS, N.; SOUZA, E. Atividade Antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197-201, jun. 2006.

LIU, Z-H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. **Water Reserach**, (in press), xxx, I-II 2009.

MORAES, R.C.; DALLA LANA, A.J.; KAISER, S.; CARVALHO, A.R.; OLIVEIRA, L.F.; FUENTEFRIA, A.M.; ORTEGA, G.G. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (WILD.) D.C. against resistant non-albicans *Candida* isolates. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p.7-14, jan.2015.

O'NEIL MJ. **The Merck Index**. 14th ed. Whitehouse Station(NJ): Merck & Co., Inc, 2006.

PAN, A.; YU, D.; DEMARK-WALNEFRID, W.; FRANCO, O.H.; LIN, X. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.90, p. 288-297, 2009

PATEL, D.; VAGHASIYA, J.; PANCHOLI, S.S.; PAUL, A Therapeutic Potential of Secoisolariciresinol Diglucoside: A Plant Lignan. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v.4, n.1, p. 15-18, 2012.

POPOVA, I.E.; HALL, C.; KUBÁTOVÁ, A. Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 217-229, 2009.

PRASAD, K. Oxidative Stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: Effect of Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG). **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol. 209, p. 89-96, 2000.

PRASAD, K. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, vol. 138, n. 1, p. 32-39, jul. 2001.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. **Tecnologia Farmacêutica vol I**. 7 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

RAFFAELLI, B.; HOIKKALA, A.; LEPPALA, E.; WAHALA, K. Enterolignans. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 29-43, 2002.

RAMBO, M. A. Óleos voláteis de espécies de ocotea nativas do Rio Grande do Sul: Composição química e atividade antioxidante, anti-inflamatória e antifúngica. 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

SAARINEN, N. M.; PENTTINEN, P.E.; SMEDS, A.I.; HURMERINTA, T.T.; MAKELA, S.I. Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses in vivo. **Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology**, vol. 93, p. 209-219, 2005.

SAINVITU, P.; NOTT, K.; RICHARD, G.; BLECKER, C.; JÉRÔME, C.; WATHELET, J-P.; PAQUOT, M.; DELEU, M. Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. **Biotechnology Agronomy Society**, v.16, n.1, p. 115-124, 2012.

SIMÕES, M. O.S.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELO, J. C., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

STRANDÁS, C.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. Composition and properties of flaxseed phenolic oligomers. **Food Chemistry**, v.110, p. 106-112, 2008.

STRUIJS, K.; VINCKEN, J-P.; VERHOEF, R.; VORAGEN, A.; GRUPPEN, H. Hydroxycinnamic acids are ester-linked directly to glucosyl moieties within the lignan macromolecule from flaxseed hulls. **Phytochemistry**, v.69, p. 1250-1260, 2008.

STRUIJS, K.; VINCKEN, J-P.; VERHOEF, R.; CASTEREN, W.; VORAGEN, A.; GRUPPEN, H. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1227-1235, 2007.

STRUIJIS, K.; VINCKEN, J-P.; DOESWIJIK, T.; VORAGEN, A.; GRUPPEN, H. The chain lenght of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides. **Phytochemistry**, v.70, p. 262-269, 2009.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Japan Wood Research Society**, v. 53, p. 273-284, 2007

TOURÉ, A.; XUEMINH, X. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-active Components, and Health Benefits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p. 261-269, 2010.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SIQUEIRA SILVA, D.H.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAUJO, A.R.; FURLAN, M.; NASSER LOPES, M.; BOLZANI, V. Tropical Biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medical chemistry. **Química Nova**, v. 35, n.11, p. 2278-2287, 2012.

XU, Y.; HALL, C.; WOLF-HALL, C.; MANTHEY, F. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 121, p. 262-267, 2008.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por Candida SP. **NewsLab**, v.63, p.136-146, 2004.

ZHANG, Z.; LI, D.; WANG, L.; OZKAN, N.; CHEN, X. D.; MAO, Z.; YANG, H. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, vol. 57, p. 17-24, 2007.

WILLFOR, S.M.; SMEDS, A.I.; HOLMBOM, B.R. Chromatographic analysis of lignans. **Journal of Chromatography A**, V. 1112, p. 64-77, 2006.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; BECKER, T.; SCHULTENS, A.; CHRISTOFFEL, V.; GORKOW, C.; SIDLOVÁ-WUTTKE, D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or

replacement for hormone replacement therapy? **The European Menopause Journal**, vol. 44, suppl. 1, p. 9-20, 2003.

YUAN, J-P.; LI, X.; XU, S-P.; WANG, J-H.; LIU, X. Hydrolysis Kinetics of Secoisolariciresinol Diglucoside Oligomers from Flaxseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 10041-10047, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Material vegetal utilizado nos processos de extração

Figura 56: semente de linhaça antes da extração do óleo



Figura 57: Farelo de linhaça desengordurado

Anexo 2 – Extratos

Figura 58: Extrato bruto



Figura 59: Extrato obtido por hidrólise alcalina



Figura 60: Extrato obtido por hidrólise ácida

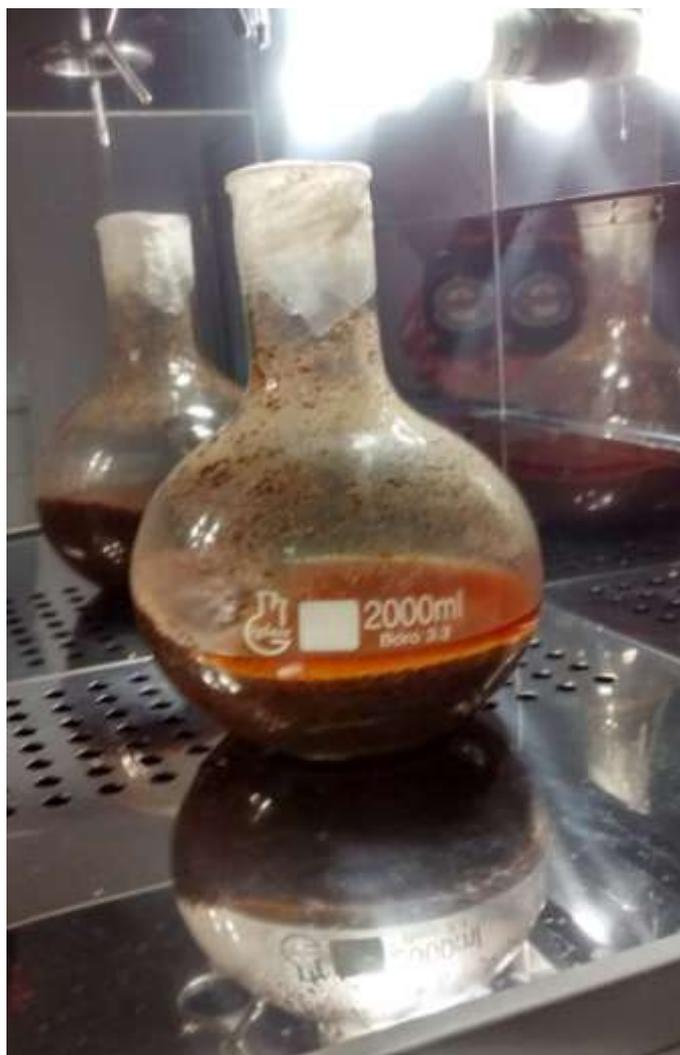
Anexo 3 - Processo de extração

Figura 61: Farelo de linhaça desengordurado durante a maceração