

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

Achyrobichalcona obtida a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
Asteraceae: Isolamento, Caracterização, Complexação com Ciclodextrina e
Avaliação da Atividade Antitumoral

JULIANA POGLIA CARINI

PORTO ALEGRE, 2013

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

Achyrobichalcona obtida a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
Asteraceae: Isolamento, Caracterização, Complexação com Ciclodextrina e
Avaliação da Atividade Antitumoral

Tese apresentada por **Juliana Poglia Carini**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Valquiria Linck Bassani

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada com Menção de Louvor em 19.04.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fernão Castro Braga
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Guido Lenz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Carini, Juliana Poggia
Achyrobichalcona obtida a partir de Achyrocline
satureioides (Lam.) DC. Asteraceae: isolamento,
caracterização, complexação com ciclodextrina e
avaliação da atividade antitumoral / Juliana Poggia
Carini. -- 2013.
172 f.

Orientadora: Valquiria Linck Bassani.
Coorientador: Fábio Klamt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2013.

1. Achyrobichalcona. 2. Achyrocline satureioides.
3. antitumoral. I. Bassani, Valquiria Linck, orient.
II. Klamt, Fábio, coorient. III. Título.

Agradecimentos à CAPES, entidade financiadora da bolsa de estudos para a realização desta tese, ao CNPq pelo suporte financeiro para realização dos experimentos, ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e a Central Analítica, locais onde grande parte deste trabalho foi desenvolvido, localizados na Faculdade de Farmácia da UFRGS, ao Laboratório de Biologia Celular (Lab. 24) do Departamento de Bioquímica Tuisikon Dick, integrante do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, ao Laboratório de Síntese Orgânica e Materiais Inteligentes (LASOMI) do Instituto de Química da UFRGS, ao Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) pertencente ao curso de Engenharia de Materiais da UFRGS, ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ, que disponibilizaram equipamentos necessários à realização dos experimentos práticos para elaboração da presente tese.

AGRADECIMENTOS

À professora Valquiria Linck Bassani pela excelente orientação, pelos ensinamentos repassados, não somente científicos, mas também lições de vida. Fico extremamente grata por ter trabalhado junto desta profissional de postura ética, responsável e comprometida, e acima de tudo, muito motivada com o trabalho. Agradeço também pela confiança depositada em mim, pelas oportunidades, pelo pronto auxílio sempre que necessitei e pela amizade.

Ao professor Fábio Klamt pela co-orientação e ensinamentos relacionados à Biologia Celular, pela oportunidade de trabalhar em seu Laboratório, pela intensa participação na elaboração e discussão dos experimentos e resultados biológicos, pelo comprometimento com o projeto e pela amizade.

Aos professores Letícia Koester, George Ortega e Pedro Petrovick pelos ensinamentos e amizade. Em especial, agradeço ao professor Helder Teixeira pelo auxílio constante em várias etapas do projeto e pela supervisão no estágio docente.

À professora Gilda Leitão e sua equipe pelos ensinamentos científicos e pela acolhida na UFRJ e ao professor Paulo Schneider pelo auxílio na realização de alguns experimentos e interpretação de resultados.

Aos colegas de ontem, hoje e sempre do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, em especial, Alexandre, Cabral, Greice, Juliana Bidone, Leandro/Sidóca, Lísias, Regina, Samuel, Sara, Simone e Vinicius. Sem dúvidas este foi o palco da minha maior evolução como pesquisadora, mas também foi um local de construção de grandes amizades.

Aos alunos do grupo do professor Fábio Klamt pelo auxílio prestado no ensinamento de técnicas e procedimentos envolvidos com cultura celular e pela amizade. Agradeço em especial ao Marco Antônio e a Liana pelo suporte constante nos experimentos, pelo auxílio com a logística do laboratório e pela amizade.

A Juliana Bidone pela parceria tanto como colega de trabalho quanto como colega de apartamento; és uma grande amiga! Obrigada pelo suporte emocional constante, pelas conversas, pelas risadas, enfim, por tua amizade sincera durante todo esse longo trajeto do doutorado.

Aos meus familiares que foram meu suporte em todos os momentos deste trabalho: períodos de crise, dúvidas, incertezas; e também nos períodos bons, onde as certezas prevaleciam. Agradeço muito aos meus pais Joel e Belmira, e a minha irmã Mariana, pelo amparo e incentivo constantes, sem dúvida vocês fizeram e fazem a diferença na minha vida! Gostaria de agradecer também as minhas queridas tias, pelo apoio constante: Hilda, Lola e Rita.

A todos que de alguma forma colaboraram, torceram ou incentivaram a mim ou ao meu projeto.

RESUMO

“Achyrobichalcona obtida a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae: Isolamento, Caracterização, Complexação com Ciclodextrina e Avaliação da Atividade Antitumoral”

Achyrobichalcona (ACB), objeto de estudo desta tese, é um biflavonoide recentemente encontrado em *Achyrocline satureioides*. O objetivo inicial deste trabalho voltou-se ao isolamento da ACB a partir de um extrato hidroalcoólico de *A. satureioides*. Para tanto, um método semi-preparativo utilizando cromatografia em contracorrente de alta velocidade foi desenvolvido. O isolamento foi realizado em duas etapas: 1) obtenção de frações enriquecidas em ACB provenientes do fracionamento do extrato; e 2) isolamento da ACB a partir destas frações enriquecidas. A separação foi realizada utilizando-se um sistema bifásico de solventes: hexano-acetato de etila-metanol-água, nas proporções 0.8:1:0.8:1, (v/v) para a primeira etapa e 0.9:0.9:0.8:1, (v/v) para a segunda etapa. O produto resultante foi purificado, cristalizado, identificado e o seu estado sólido caracterizado. O método resultou na obtenção de ACB com bom rendimento (67%) e pureza (próximo à 90%) para uso em estudos posteriores. Um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido com o objetivo de avaliar todos os lotes de ACB isolada. Os parâmetros cromatográficos foram otimizados com o auxílio do desenho experimental Box-Behnken, gerando o sistema cromatográfico ideal para a quantificação da ACB: 37% de acetonitrila na fase móvel (63% de água/ácido ortofosfórico 1%), fluxo da fase móvel de 1,2 mL/min e 33°C de temperatura da coluna. O estudo revelou que a resolução entre impurezas e o pico da ACB e o fator de retenção foram significativamente alterados quanto os parâmetros cromatográficos foram variados. O modelo mostrou-se adequado e com boa capacidade preditiva. O método foi validado com sucesso, sendo linear, específico, exato e preciso. A robustez foi avaliada pelo desenho Plackett-Burman, demonstrando que o comprimento de onda de detecção e fluxo da fase móvel devem ser rigorosamente controlados, pois influenciam na concentração da ACB. A ACB foi instável apenas em meio alcalino; sua reação de

degradação obedeceu a uma cinética de segunda ordem. A etapa seguinte objetivou avaliar comparativamente as propriedades antitumorais apresentadas por ACB, *A. satureioides* e outros flavonoides presentes na planta: quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-*O*-metilquercetina (3OMQ). Primeiramente, uma revisão sobre esse tema foi elaborada com o objetivo de compilar as principais informações descritas na literatura a respeito das atividades quimioterapêuticas demonstradas para QCT, LUT, 3OMQ e *A. satureioides*. Subsequentemente, desenvolveu-se um estudo experimental para avaliar as propriedades antitumorais de um extrato de *A. satureioides* (EXT) e de seus principais flavonoides, isoladamente ou combinados na mesma proporção encontrada no EXT, frente à A549, uma linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células. A citotoxicidade do complexo ACB:hidroxipropil- β -ciclodextrina também foi avaliada para a A549. Os resultados demonstraram que tanto EXT (IC_{50%}: 49 μ g/mL) quanto seus flavonoides foram muito citotóxicos para a A549 (IC_{50%}: 3OMQ-7,3 μ M>ACB-13,5 μ M>LUT-14,6 μ M>QCT-51,1 μ M), especialmente 3OMQ e ACB, avaliadas pela primeira vez em uma linhagem de câncer de pulmão. O estudo revelou que os flavonoides foram as únicas substâncias responsáveis pela citotoxicidade do extrato. A complexação entre ACB:HP β CD resultou em um grande incremento na solubilidade aquosa da ACB e aumento na citotoxicidade frente à A549 (IC_{50%}: 9,15 μ M). Todas as amostras causaram morte celular por indução da apoptose, sendo que para algumas delas a via extrínseca foi ativada (3OMQ, ACB e EXT). Sendo assim, o estudo demonstrou que *A. satureioides* e seus flavonoides são promissores agentes antitumorais e que a complexação com ciclodextrinas pode representar uma estratégia tecnológica importante no intuito de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas de moléculas bioativas.

Palavras-chave: Achyrobichalcona, *Achyrocline satureioides*, isolamento, cromatografia em contracorrente de alta velocidade, cromatografia líquida de alta eficiência, otimização, validação, câncer, antitumoral, quercetina, luteolina, 3-*O*-metilquercetina.

ABSTRACT

“Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae: Isolation, Characterization, Cyclodextrin Complexation and Evaluation of Anticancer Activity”

Achyrobichalcone (ACB), object of study of this thesis, is a biflavonoid recently found in *Achyrocline satureioides*. The initial objective of this work aimed at ACB isolation from an *A. satureioides* hydroalcoholic extract. For this purpose, a semi-preparative method by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) was developed. The isolation was achieved in two steps: 1) obtaining ACB enriched fractions from the fractioning of the extract; and 2) ACB separation from these enriched fractions. The separation was obtained using a biphasic solvent system: hexane-ethyl acetate-methanol-water, at proportions 0.8:1:0.8:1 (v/v) for the first step and 0.9:0.9:0.8:1 (v/v) for the second step. The resulting product was purified, crystallized, identified and the solid state was characterized. The method resulted in ACB in good yield (67%) and purity (about 90%) for use in further studies. A stability-indicating high performance liquid chromatographic method was developed in order to evaluate all batches of ACB isolated. The chromatographic parameters were optimized by Box-Behnken design, providing the ideal chromatographic system for ACB quantification: 37% of acetonitrile on the mobile phase (63% water/orthophosphoric acid 1%), flow rate of the mobile phase of 1.2 ml/min and 33°C of column temperature. The resolution between impurities and ACB peak and retention factor were significantly changed when chromatographic parameters were altered. The model was suitable, with good predictive capacity. The method was successfully validated, being linear, specific, accurate and precise. Plackett-Burman robustness test demonstrated that detection wavelength and flow rate of mobile phase must be strictly controlled because influenced ACB concentration. ACB was unstable only in alkaline medium, and the degradation reaction was guided by a second-order kinetics. The next step aimed a comparative evaluation of the anticancer properties of ACB, *A. satureioides* extract and others flavonoids present in the plant: quercetin (QCT), luteolin (LUT) and 3-*O*-

methylquercetin (3OMQ). Firstly, a review of this theme was performed to compile the main information described in literature about chemotherapeutics activities of QCT, LUT, 3OMQ and *A. saturoioides*. Subsequently, an experimental study was carried out to evaluate the anticancer properties of an *A. saturoioides* extract (EXT) and its major flavonoids alone or combined in the same proportion found in EXT, against A549, a non-small cancer lung cell line (NSCLC). In addition, the cytotoxicity of a ACB:hydroxypropil- β -cyclodextrin (ACB:HP β CD) complex was also assessed for A549. The results showed that both EXT (49 μ g/mL) as its flavonoids were highly cytotoxic for A549 ($GI_{50\%}$: 3OMQ-7.3 μ M>ACB-13.5 μ M>LUT-14.6 μ M>QCT-51.1 μ M), especially 3OMQ and ACB, evaluated for the first time against lung cancer. The study showed that flavonoids were the unique substances responsible for the cytotoxicity of the extract. ACB:HP β CD complex allowed a great enhance in water solubility of ACB and cytotoxicity against A549 ($GI_{50\%}$: 9.15 μ M). All the samples induced cell death by apoptosis induction, and for some of them the extrinsic pathway was activated (3OMQ, ACB and EXT). Taken together, the study demonstrated that *A. saturoioides* and its derived flavonoids are promising anticancer agents and, additionally, the cyclodextrin complexation can represent an important technological strategy for improve physicochemical and biological properties of bioactive molecules.

Keywords: Achyrobichalcone, *Achyrocline saturoioides*, isolation, high speed countercurrent chromatography, high performance liquid chromatography, optimization, validation, cancer, anticancer, quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
1. <i>Achyrocline satureioides</i>	21
2. Isolamento de produtos naturais por cromatografia em contracorrente de alta velocidade	25
3. Propriedades físico-químicas de chalconas e complexação de biomoléculas com ciclodextrinas	26
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO I	35
Objetivos	37
Manuscrito: Semi-preparative isolation of achyrobichalcone from <i>Achyrocline satureioides</i> by high-speed countercurrent chromatography	39
CAPÍTULO II	61
Objetivos	63
Manuscrito: Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs	65
CAPÍTULO III	73
Objetivos	75
Manuscrito: Flavonoids from <i>Achyrocline satureioides</i> : promising biomolecules for anticancer therapy	77
CAPÍTULO IV	111
Objetivos	113
Manuscrito: Anticancer activity of <i>Achyrocline satureioides</i> and its major flavonoids against human lung cancer cell line	115
DISCUSSÃO GERAL	145

CONCLUSÕES	155
REFERÊNCIAS	159

INTRODUÇÃO GERAL

1. *Achyrocline satureioides*

Produtos de origem vegetal representam importantes fontes para a obtenção de substâncias ativas terapeuticamente (HARVEY, 2000; BINDSEIL *et al.*, 2001; CRAGG e NEWMAN, 2013). Especial interesse repousa sobre os que possuem uso tradicional, pois apresentam fortes indícios de efetividade (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001). *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae (Figura 1), também conhecida como marcela, é uma espécie muito empregada na medicina popular do sul do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2012), especialmente por suas propriedades anti-inflamatórias, digestivas e carminativas (SIMÕES *et al.*, 1988; SILVA e LANGELOH, 1994; SIMÕES *et al.*, 1998; KADARIAN *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2007). Além destas, outras inúmeras propriedades biológicas foram relacionadas à planta (Tabela 1).



Figura 1. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae (arquivo pessoal do autor).

As diversas propriedades terapêuticas atribuídas à espécie estão relacionadas, frequentemente, aos seus metabólitos secundários (RETTA *et al.*, 2012). Dentre estes, os flavonoides quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-*O*-metilquercetina (3OMQ) se destacam, sendo encontrados frequentemente nas preparações extrativas

hidroalcoólicas de suas inflorescências, em concentrações significativas (SIMÕES *et al.*, 1988; DE SOUZA *et al.*, 2002; HOLZSCHUH *et al.*, 2010). Convém mencionar, também, que uma ampla gama de estudos biológicos vem sendo desenvolvidos e confirmam a bioatividade destes flavonoides, fator que justifica ainda mais a relação destes com as propriedades terapêuticas demonstradas pela planta (HAVSTEEN, 2002; BOOTS *et al.*, 2008; RUSSO *et al.*, 2012).

Tabela 1. Propriedades biológicas relacionadas à espécie *Achyrocline satureioides*, mencionadas em estudos *in vitro*, *in vivo* e etnofarmacológicos.

Atividade biológica	Referência
Imunomodulatória	WAGNER <i>et al.</i> , 1985; PUHLMANN <i>et al.</i> , 1992; SANTOS <i>et al.</i> , 1999; CONSENTINO <i>et al.</i> , 2008
Miorrelaxante, vasorrelaxante	SIMÕES <i>et al.</i> , 1988; HNATYSZYN <i>et al.</i> , 2004
Antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana	ANESINI e PEREZ, 1993; DUARTE <i>et al.</i> , 2005; CALVO <i>et al.</i> , 2006; GONZÁLEZ e MARIOLI, 2010; JORAY <i>et al.</i> , 2011; SABATÉ <i>et al.</i> , 2011; JORAY <i>et al.</i> , 2013
Antiparasitária	DE ARIAS <i>et al.</i> , 1995; BRANDELLI <i>et al.</i> , 2009
Antioxidante	DEMACHELIER <i>et al.</i> , 1998; GUGLIUCCI e MENINI, 2002; POLYDORO <i>et al.</i> , 2004; FERRARO <i>et al.</i> , 2008
Pró-oxidante	POLYDORO <i>et al.</i> , 2004
Antiviral	ZANON <i>et al.</i> , 1999; BETTEGA <i>et al.</i> , 2004; FARAL-TELLO <i>et al.</i> , 2012; SABINI <i>et al.</i> , 2012
Hipoglicemiante	CARNEY <i>et al.</i> , 2002; GUGLIUCCI e MENINI, 2002; TROJAN-RODRIGUES <i>et al.</i> , 2012
Hepatoprotetora	KADARIAN <i>et al.</i> , 2002
Citoprotetora	ARREDONDO <i>et al.</i> , 2004
Fotoprotetora	MORQUIO <i>et al.</i> , 2005
Antiobesidade	DICKEL <i>et al.</i> , 2007
Antiulcerogênica	SANTIN <i>et al.</i> , 2010
Hipocolesterolêmica	ESPIÑA <i>et al.</i> , 2012
Anti-inflamatória	SIMÕES <i>et al.</i> , 1988; DE SOUZA <i>et al.</i> , 2007
Antitumoral	MORTON, 1975; ARISAWA, 1994; SANTOS e ELISABETSKY, 1999; RUFFA <i>et al.</i> , 2002

Recentemente, uma bichalcona de estrutura e ocorrência inédita foi isolada a partir das inflorescências da planta, denominada de achyrobichalcona (ACB) ou 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-O- 4'''-bichalcona (Figura 2) (HOLZSCHUH *et al.*, 2010). Anteriormente, DE SOUZA (2002) já havia sugerido a presença de uma chalcona em um extrato seco de *A. satureioides*. No entanto, a forma

monomérica (4,2',4'-triidróxi-6'-metóxi chalcona) dessa chalcona já foi encontrada nas partes aéreas de *Achyrocline flaccida* (NORBEDO *et al.*, 1982) e a forma monomérica glicosilada em outras plantas integrantes da família Asteraceae (MARUYAMA *et al.*, 1974; BOHLMANN e ABRAHAM, 1979). A presença desta chalcona glicosilada também já foi relatada para flores de outras espécies vegetais (ROY e PANDEY, 1994).

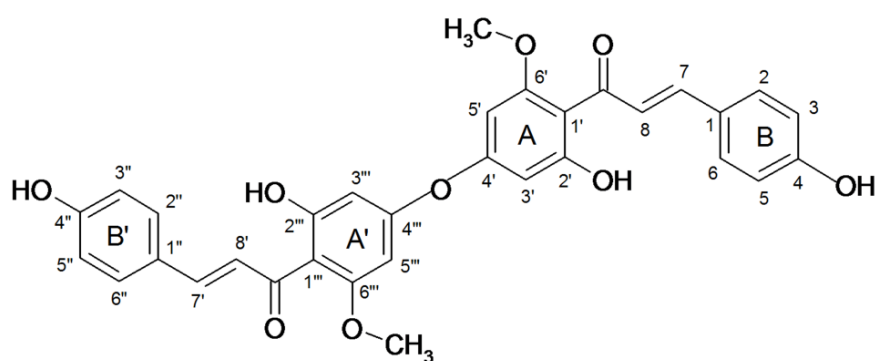


Figura 2. Estrutura química da achyrobichalcona (HOLZSCHUH *et al.*, 2010).

Estudos desenvolvidos recentemente demonstram que vários biflavonoides apresentam atividades biológicas, dentre elas, promissoras propriedades antitumorais (RAHMAN *et al.*, 2007; SUZART *et al.*, 2007). Neste tocante, o subgrupo de bichalconas se destaca, tanto as de origem natural quanto as sintéticas (MURAKAMI *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 2000; GRYNBERG *et al.*, 2002; MDEE *et al.*, 2003; ANDERSEN e MARKHAM, 2006; DANIEL *et al.*, 2007; RAHMAN *et al.*, 2007; SUZART *et al.*, 2007; MIHIGO *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2011). Convém ressaltar também que algumas bichalconas naturais mostraram-se bastante citotóxicas frente a uma ampla gama de linhagens de células tumorais (Tabela 2). A atividade citotóxica observada para essas biomoléculas está em concordância com vários estudos que já demonstraram propriedades antitumorais para chalconas (FOREJTNÍKOVÁ *et al.*, 2005; SAMOSZUK *et al.*, 2005; YE *et al.*, 2005; WON *et al.*, 2005; KIM, 2008; MOJZIS *et al.*, 2008; VOGEL *et al.*, 2008).

Tabela 2. Citotoxicidade de bichalconas naturais frente a linhagens de células tumorais.

Bichalcona	Planta de origem	Linhagens de células tumorais	Referência
Luxenchalcona	<i>Luxemburgia octandra</i>	Adenocarcinoma: pulmão (NCI-H460); renal (RXF-393); mama (MCF-7); ovariano (OVCAR-3); colorretal (HT-29)	CARVALHO <i>et al.</i> , 2004; DANIEL <i>et al.</i> , 2007
Rhuschalconas I–VI	<i>Rhus pyroides</i>	Adenocarcinoma: colorretal (HT-29, HCT-116, Colo-205, HCT-15, KM-12 e SW-620); Rhuschalcona IV: melanoma (SK-MEL-5, SK-MEL-28 e UACC-62)	MASESANE <i>et al.</i> , 2000; MDEE <i>et al.</i> , 2003

Uma particularidade observada é a semelhança estrutural da ACB com outras bichalconas naturais, as quais possuem marcante atividade antitumoral (Figura 3).

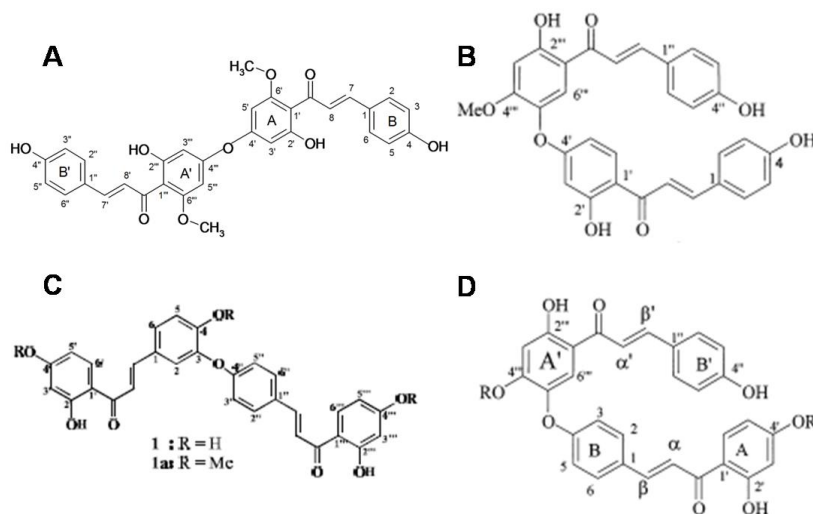


Figura 3. Estrutura química de bichalconas naturais, onde: (A) achyrobichalcona (ACB); (B) rhuschalcona IV; (C) luxenchalcona; (D) rhuschalcona I (R=R'=Me) e rhuschalcona III (R=Me, R'=H) (MASESANE *et al.*, 2000; MDEE *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2004; DANIEL *et al.*, 2007; HOLZSCHUH *et al.*, 2010).

Em especial, ACB mostra-se bastante similar à rhuschalcona IV, a mais citotóxica dentre as avaliadas por MDEE e colaboradores (2003). Neste sentido, o isolamento da ACB a partir de *A. saturoioides* abre perspectivas para investigação de

suas propriedades biológicas, em especial as antitumorais, e em paralelo, possibilita o entendimento da participação da molécula na bioatividade apresentada pela planta, além de compará-la com dados já observados para os demais flavonoides.

2. Isolamento de produtos naturais por cromatografia em contracorrente de alta velocidade

A obtenção de substâncias bioativas isoladas de plantas com pureza e rendimento adequados é essencial para a investigação mais detalhada destas. No entanto, a etapa de isolamento mostra-se muitas vezes desafiadora devido à dificuldade de separação da substância-alvo de misturas complexas que constituem os extratos vegetais. A cromatografia em contracorrente vem se destacando neste sentido, especialmente por sua capacidade de separação eficiente de misturas diversas em escala preparativa (SUTHERLAND, 2007). Esta técnica é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido que emprega duas fases líquidas imiscíveis, onde a fase estacionária é retida na coluna com a ajuda de um campo de força centrífuga enquanto a fase móvel passa pela fase estacionária (BERTHOD *et al.*, 2002). Geralmente o equipamento é composto por um sistema de tubulações (coluna) dispostas em espiral em torno de bobinas, que se movimentam por meio de giros planetários sob um eixo central (Figura 4). A separação dos componentes em uma mistura é alcançada através do particionamento do soluto entre as duas fases do sistema bifásico de solventes (MCALPINE *et al.*, 1989; SHIBUSAWA e ITO, 2004).

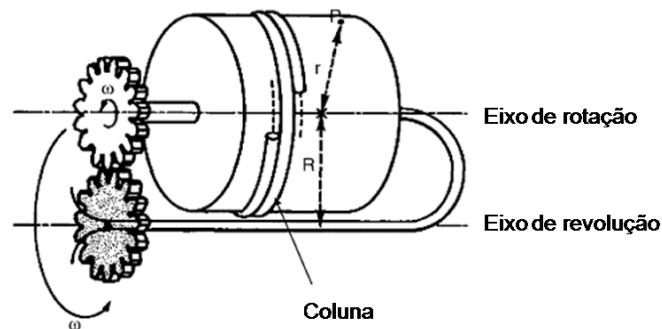


Figura 4. Desenho esquemático de uma coluna rotatória equipada com giro planetário (ITO e CONWAY, 1996).

A cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCC) é uma técnica de separação cromatográfica moderna, sendo a mais avançada em termos de eficiência de partição e tempo de separação. Além disso, mostra-se altamente preditiva, reprodutível, econômica, versátil e rápida (SHIBUSAWA e ITO, 2004; MARSTON e HOSTETTMANN, 2006). Como consequência, uma ampla gama de produtos naturais tem sido separada por CCC, especialmente com a finalidade de isolamento em escala preparativa (SHIBUSAWA e ITO, 2004; MARSTON e HOSTETTMANN, 2006; PAULI *et al.*, 2008; DUO-LONG *et al.*, 2011). Sendo assim, esta técnica torna-se uma opção interessante para o isolamento de biomoléculas em grande escala, especialmente quando estudos biológicos mais aprofundados são desejados.

3. Propriedades físico-químicas de chalconas e complexação de biomoléculas com ciclodextrinas

Chalconas são substâncias comumente conhecidas por conferirem coloração amarela a flores de algumas famílias vegetais, como Asteraceae, embora sejam também encontradas, menos frequentemente, em outros tecidos vegetais. Estes compostos são um dos mais diversos grupos de flavonoides, pois a partir de sua estrutura básica formam-se ampla gama de dímeros e oligômeros. As chalconas são precursores biossintéticos de todas as classes de flavonoides, sendo que a característica que distingue chalconas e diidrochalconas de outros flavonoides é a sequência de três carbonos de cadeia aberta unindo os anéis A e B, substituindo uma estrutura carbonada heterocíclica (Figura 5). Nas plantas, as chalconas são convertidas em suas correspondentes flavanonas por uma reação estereoespecífica catalizada pela enzima chalcona isomerase. Esta relação estrutural e biogenética entre chalconas e flavanonas explica porque elas frequentemente co-ocorrem em produtos naturais (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

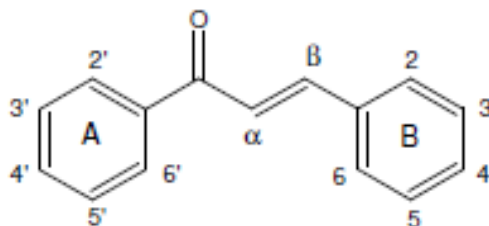


Figura 5. Estrutura química básica de chalconas (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Dentre os flavonoides, a categoria das chalconas destaca-se por englobar várias substâncias que expressam ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais, antibióticas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antimaláricas, etc. (HAMEED, 2006; HIJOVA, 2006; KATSORI e HADJIPAVLOU-LITINA, 2011; SAHU *et al.*, 2012). No entanto, observa-se que a maioria destas apresenta baixa hidrossolubilidade em condições fisiológicas, especialmente em pH 7,5, parâmetro que pode dificultar a liberação, e consequente absorção, destas substâncias *in vivo* (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2003; MOKRINI *et al.*, 2006a). Esta característica é claramente verificada pela formação de precipitados após a transformação de flavanonas em chalconas no trato gastrointestinal (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2003). Além disso, a dupla ligação $\alpha\beta$ entre carbonos integrantes da cadeia carbonada que une os anéis A e B e o grau de polarização do grupamento $-(C=O)-C=C-$ induzido pela natureza dos substituintes dos anéis aromáticos, conferem a algumas chalconas uma maior instabilidade (MOKRINI *et al.*, 2006a; 2006b).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos de origem natural ou sintética, que apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica. Estas substâncias têm sido extensivamente utilizadas como adjuvante farmacêutico com o intuito de melhorar certas propriedades de fármacos, tais como hidrossolubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade. Devido a sua estrutura, as CDs são capazes de acondicionar ampla gama de fármacos lipofílicos em suas cavidades, alterando, frequentemente, as propriedades biofarmacêuticas destas substâncias (FRIJLINK *et al.*, 1991; IRIE e UEKAMA, 1997). Neste contexto, a utilização de CDs como adjuvante de promoção da hidrossolubilidade de moléculas bioativas tem assumido grande relevância por duas razões principais. A primeira pela possibilidade de “rejuvenescer” moléculas tradicionalmente utilizadas na terapêutica,

cuja segurança e atividade são bem conhecidas, por meio da melhoria da hidrossolubilidade e de seu perfil biofarmacêutico. Como não há modificação na estrutura molecular da molécula bioativa, a aprovação de novos produtos pelas agências sanitárias tem sido rápida. A segunda razão está relacionada com surgimento anual de milhares de novas moléculas bioativas candidatas a fármacos, cuja elevada lipofilia tem se tornado um entrave para a sua inserção no arsenal terapêutico; a sua associação a CDs vem representando uma possibilidade de superação deste problema.

Neste sentido, sabe-se que a hidrossolubilidade e a habilidade de permeação por membranas biológicas são as principais propriedades físico-químicas que irão definir a bioatividade de grande parte das novas moléculas. A complexação de substâncias pouco solúveis em água com CDs gera um incremento na solubilidade aquosa destas, mas o complexo por si só é, em geral, incapaz de permear membranas biológicas. No entanto, as CDs facilitam a permeação dessas moléculas nas camadas de difusão, de natureza aquosa, existentes na superfície das membranas, como é o caso do muco presente na superfície do epitélio gastrointestinal. Em experimentos *in vitro* a permeação por essas camadas também é observada, além do incremento na atividade estar relacionado ao aumento na hidrossolubilidade de substâncias bioativas. Esta penetração também depende das propriedades físico-químicas específicas de cada substância. Por exemplo, um maior aumento é obtido para aquelas substâncias que formam complexos com constantes de estabilidade ($K_{1:1}$) entre 50-5000 M^{-1} (LOFTSSON e BREWSTER, 2011). Neste sentido, JORDHEIM e colaboradores (2009) observaram que a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) propiciou um incremento na hidrossolubilidade do agente citotóxico UA911, favorecendo a sua liberação em meio à cultura de células e difusão por membranas celulares. Outro trabalho demonstrou que o complexo curcumina:HP β CD possibilitou uma maior captação celular da curcumina e consequente aumento na atividade antiproliferativa quando comparado à sua forma livre (YADAV *et al.*, 2010). Convém mencionar que a HP β CD (Figura 6) é amplamente utilizada em experimentos *in vitro* devido à sua baixa toxicidade e alta hidrossolubilidade (RAJEWSKY e STELLA, 1996).

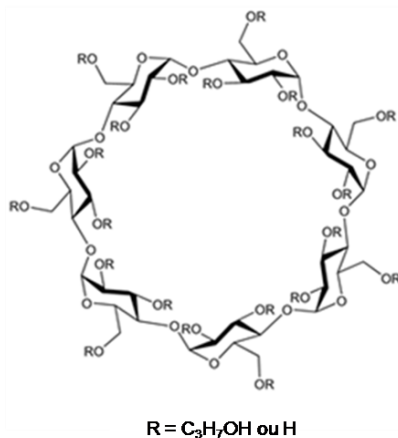


Figura 6. Estutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina (www.ashland.com).

Na literatura são encontrados alguns estudos de complexação de chalconas com CDs, onde o principal foco reside no aumento da hidrossolubilidade destas moléculas (UTSUKI *et al.*, 1993; ITO *et al.*, 1995). Outros trabalhos também são descritos para diversos flavonoides com as mesmas características de reduzida hidrossolubilidade (LI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2009; BORGHETTI *et al.* 2011; MEKJARUSKUL *et al.*, 2013), incluindo estudos com a QCT e 3OMQ, biomoléculas presentes em *A. saturoioides*. Nos trabalhos realizados por SCHWINGEL e colaboradores (2008) e BORGHETTI e colaboradores (2009), a complexação dos referidos flavonoides com β -ciclodextrina (β CD) possibilitou um incremento na solubilidade aquosa e auxiliou no processo de permeação cutânea *ex vivo* destas substâncias. Nesse sentido, a complexação de flavonoides com CDs representa uma importante estratégia tecnológica para a solubilização destes em meio aquoso, além de aumentar a capacidade de penetração por membranas e viabilizar o emprego destas moléculas em sistemas biológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Isolamento e caracterização da achyrobichalcona a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* objetivando a sua complexação com ciclodextrina e a avaliação de seu potencial antitumoral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar, em escala semi-preparativa, identificar e caracterizar, sob os aspectos físicos e físico-químicos, a achyrobichalcona a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides*;
- Desenvolver, otimizar e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar e monitorar a qualidade da achyrobichalcona;
- Investigar e comparar a atividade antitumoral *in vitro* encontrada para achyrobichalcona, quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina (em mistura e separadamente) e um extrato de *Achyrocline satureioides* frente à uma linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células, identificando os principais mecanismos moleculares envolvidos no processo;
- Realizar estudos de complexação da achyrobichalcona com hidroxipropil- β -ciclodextrina, avaliando a atividade antitumoral *in vitro* da achyrobichalcona complexada frente a uma linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células.

CAPÍTULO I: Semi-preparative isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography

Manuscrito submetido à Publicação no periódico “Journal of Separation Sciences”

Achyrobichalcona (ACB), um novo e promissor biflavonoide encontrado nas inflorescências de *Achyrocline satureioides*, é o objeto de estudo do presente trabalho. A ACB foi isolada pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa (HOLZSCHUH *et al.*, 2010), no entanto, para a realização do presente trabalho que tem por objetivo um estudo mais aprofundado desta substância, fez-se necessário o desenvolvimento de um método de isolamento para substância-alvo em escala semi-preparativa. Sendo assim, os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- Obter um extrato seco liofilizado de *Achyrocline satureioides*, partindo de um extrato hidroetanólico a 80% das inflorescências da planta, para servir como material de partida para o isolamento;
- Desenvolver um método de isolamento em escala semi-preparativa utilizando-se a técnica de cromatografia em contracorrente de alta velocidade;
- Utilizar técnicas adicionais de purificação para a obtenção de um produto isolado sólido;
- Caracterizar do estado sólido para o produto isolado;
- Caracterizar e identificar o produto isolado mediante técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

CAPÍTULO II: Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs

Manuscrito Publicado no periódico “Phytochemical Analysis”

O isolamento em escala semi-preparativa por cromatografia em contracorrente de alta velocidade resultou na obtenção de vários lotes da achyrobichalcona (ACB) na forma isolada. Com o objetivo de avaliar a qualidade destes lotes e credenciar as amostras para estudos futuros, um método indicativo de estabilidade por CLAE foi desenvolvido. Para tanto, os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- Desenvolver e otimizar um método indicativo da estabilidade por CLAE para a quantificação da ACB, utilizando o desenho experimental Box-Behnken, para a otimização de parâmetros cromatográficos;
- Utilizar os parâmetros de adequabilidade do sistema como respostas a otimização das variáveis cromatográficas;
- Validar o método analítico quanto a sua exatidão, precisão, especificidade e linearidade, de acordo com compêndios oficiais;
- Avaliar a robustez do método por meio do desenho experimental Plackett-Burman;
- Determinar a cinética de degradação da ACB em meio alcalino.

CAPÍTULO III: Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy

Manuscrito a ser submetido à Publicação no periódico "Natural Products Report"

Após o isolamento, identificação, quantificação e avaliação da qualidade da achyrochalcona (ACB) isolada, estudos biológicos foram delineados para a substância. Observando-se que várias chalconas e bichalconas descritas na literatura apresentam propriedades antitumorais, este foi o foco de investigação para a ACB. Paralelamente, também são encontrados relatos de uso popular de *Achyrocline satureioides* para o tratamento de tumores, ou seus sinais e sintomas; além disso, os demais flavonoides presentes na planta também demonstraram atividades antitumorais em estudos isolados. Observando-se a vasta gama de informações descritas na literatura a respeito desta temática, um artigo de revisão foi elaborado abordando estes aspectos, tendo como objetivos específicos:

- Revisar a importância de produtos naturais, especificamente aqueles derivados de plantas, como a principal fonte para a procura por novos agentes quimioterápicos;
- Contextualizar a importância dos flavonoides como nova classe de metabólitos secundários com propriedades antitumorais;
- Abordar as propriedades antitumorais de *A. satureioides*, tanto em estudos etnofarmacológicos, quanto em estudos *in vitro*;
- Realizar uma revisão atualizada sobre principais propriedades antitumorais descritas para os flavonoides presentes em *A. satureioides*, especialmente quercetina (QCT) e luteolina (LUT);
- Descrever os principais efeitos biológicos antitumorais, alvos moleculares e mecanismos de morte celular descritos para QCT e LUT, principalmente.
- Revisar a ação antitumoral de QCT e LUT utilizadas em co-tratamentos com fármacos quimioterápicos tradicionais.

CAPÍTULO IV: Anticancer activity of *Achyrocline satureioides* and its major flavonoids against human lung cancer cell line

Manuscrito a ser submetido à Publicação no periódico “Biochimica et Biophysica Acta”

A partir das informações relatadas no artigo de revisão a respeito das propriedades antitumorais de *Achyrocline satureioides* e de alguns de seus flavonoides, buscou-se entender o papel da achyrobichalcona (ACB) na atividade antitumoral apresentada pela planta e, paralelamente, verificar possíveis associações das propriedades desta molécula com as dos outros flavonoides presentes na espécie. Sendo assim, esta etapa do trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo entre um extrato de *Achyrocline satureioides* (EXT), ACB, 3-*O*-metilquercetina (3OMQ), luteolina (LUT) e quercetina (QCT), avaliando a atividade antitumoral *in vitro* destes em uma linhagem de câncer de pulmão. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Realizar uma avaliação comparativa entre a citotoxicidade *in vitro* apresentada por: EXT, ACB, 3OMQ, LUT, QCT e uma mistura destes flavonoides (MIX), frente à A549, uma linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células;
- Avaliar a participação dos flavonoides na citotoxicidade apresentada pelo EXT;
- Avaliar, paralelamente, a citotoxicidade da ACB frente a outras linhagens de câncer de pulmão;
- Preparar e caracterizar um complexo entre ACB:hidroxipropil- β -ciclodextrina, para posteriormente avaliá-lo frente à A549;
- Realizar testes para verificar o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos; e, adicionalmente, identificar alguns alvos moleculares envolvidos no processo.

DISCUSSÃO GERAL

CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, New York: Taylor & Francis, 2006.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, p. 119-128, 1993.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 13-20, 2004.

ARISAWA, M. Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts. *Natural Medicines*, v. 48, p. 338-347, 1994.

BARRETINA, J.; CAPONIGRO, G.; STRANSKY, N.; VENKATESAN, K.; MARGOLIN, A. A.; KIM, S.; WILSON, C. J.; LEHÁR, J.; KRYUKOV, G. V.; SONKIN, D.; REDDY, A.; LIU, M.; MURRAY, L.; BERGER, M. F.; MONAHAN, J. E.; MORAIS, P.; MELTZER, J.; KOREJWA, A.; JANÉ-VALBUENA, J.; MAPA, F. A.; THIBAUT, J.; BRIC-FURLONG, E.; RAMAN, P.; SHIPWAY, A.; ENGELS, I. H.; CHENG, J.; YU, G. K.; YU, J.; ASPESI, P. J.; DE SILVA, M.; JAGTAP, K.; JONES, M. D.; WANG, L.; HATTON, C.; PALESCANDOLO, E.; GUPTA, S.; MAHAN, S.; SOUGNEZ, C.; ONOFRIO, R. C.; LIEFELD, T.; MACCONAILL, L.; WINCKLER, W.; REICH, M.; LI, N.; MESIROV, J. P.; GABRIEL, S. B.; GETZ, G.; ARDLIE, K.; CHAN, V.; MYER, V. E.; WEBER, B. L.; PORTER, J.; WARMUTH, M.; FINAN, P.; HARRIS, J. L.; MEYERSON, M.; GOLUB, T. R.; MORRISSEY, M. P.; SELLERS, W. R.; SCHLEGEL, R.; GARRAWAY, L. A. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, v. 483, p. 603-607, 2012.

BERTHOD, A., *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*, Boston: Elsevier Science Ltd, 2002.

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M. SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 819-823, 2004.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, p. 965-977, 2008.

BICA, V. C.; CARINI, J. P.; PIRAN, S. M.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Improvement of a HPLC method for determining quercetin, luteolin, 3-O-methylquercetin and achyrobichalcone in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Manuscript submitted, 2013.

BINDSEIL, K. U.; JAKUPOVIC, J.; WOLF, D.; LAVAYRE, J.; LÉBOUL, J.; VAN DER PYL, D. Pure compound libraries: a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 6, p. 840-847, 2001.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W. Neue diterpene und weitere inhaltsstoffe aus *Helichrysum calliconum* und *Helichrysum heterolasium*. *Phytochemistry*, v.18, p.889-891, 1979.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, p. 325-337, 2008.

BORGHETTI, G. S.; LULA, I. S.; SINISTERRA, R. D.; BASSANI, V. L. Quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray drying or by physical mixture. *AAPS PharmSciTech*, 2009.

BORGHETTI, G. S.; PINTO, A. P., LULA, I. S., SINISTERRA, R. D., TEIXEIRA, H. F., BASSANI, V. L. Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 37, p. 886-893, 2011.

BRANDELLI, C. L. C., GIORDANI, R. B., DE CARLI, G. A., TASCA. Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitology Research*, v. 104, p. 1345-1349, 2009.

CALVO, D., CARIDDI, L. N., GROSSO, M., DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 48, p. 247-255, 2006.

CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofuran, a New Antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 203-205, 2002.

CARVALHO, M. G.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.15, p.146-149, 2004.

CONSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; FRANCA, M.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 501-507, 2008.

COSTA, F. N., LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 336-347, 2010.

CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. Article in press, 2013.

DE ARIAS, A. R.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan *Asteraceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 35-41, 1995.

DANIEL, J. F. S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; ROCHAI, A. B.; CARVALHO, M. G. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 39, p.184-188, 2007.

DE GROOT, P.; MUNDEN, R. F. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiologic Clinics of North America*, v. 50, p. 863-876, 2012.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. ("marcela"). *Brazilian Journal of Biological Research*, v. 31, p. 1163-1170, 1998.

DE SOUZA, K. C. B. *Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de Achyrocline satureioides (Lam.) D. C. (Marcela)*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 2002. Tese de doutorado.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 771-777, 2002.

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

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 60-71, 2007.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUO-LONG, D.; YUAN-YUAN, Z.; XIAO-FEN, C.; XIN-YI, H.; SHI-LAN, F. Advances in application of high-speed countercurrent chromatography in separation and purification of flavonoids. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 39, p. 269-275, 2011.

ESPIÑA, D. C.; CARVALHO, F. B.; ZANINI, D.; SCHLEMMER, J. B.; CORACINI, J. D.; RUBIN, M. A.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; LEAL, D. B. R.; BAIOTTO, C. R.; JAQUES, J. A. S. 2012. A more accurate profile of *Achyrocline satureioides* hypocholesterolemic activity. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, p. 347-353, 2012.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 69-75, 2001.

FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; KONCKE, E.; DAVYT, D.; CAVALLARO, L.; HEINZEN, H.; ARBIZA, J. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *The Scientific World Journal*, Article ID 174837, p. 1-5, 2012.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C. D.; PARKIN D. *GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base n° 10*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. 2010. Último acesso: 08/03/2013.

FERRARO, G.; ANESINI, C.; OUVINA, A.; RETTA, D.; FILIP, R.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; HNATYSZYN, O.; BANDONI, A. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, p. 626-628, 2008.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, p. 179-186, 2007.

FLORENCE, A. J.; SHANKLAND, N.; JOHNSTON, A. *Crystallization in final stages of purification*. In: SARKER, S. D., LATIF, Z., GRAY, A. I. *Natural Products Isolation*, 2 ed., 20, Totowa: Humana Press Inc., 2006.

FOREJNÍKOVÁ, H.; LUNEROVÁ, K.; KUBÍNOVÁ, R.; JANKOVSKÁ, D.; MAREK, R.; KARES, R.; SUCHÝ, V.; VONDRÁČEK, J.; MACHALA, M. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones *in vitro*. *Toxicology*, v. 208, p. 81-93, 2005.

FRANCO, C.; SCHWINGEL, L., LULA, I., SINISTERRA, R. D., KOESTER, L. S., BASSANI, V. L. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: inclusion complex characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 369, p. 5-11, 2009.

FRIJLINK, H. W.; FRANSSEN, E. J. F.; EISSENS, A. C. OOSTING, R.; LERK, C. F.; MEIJER, D. K. F. The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharmaceutical Research*, v. 8, p. 380-384, 1991.

GONZÁLEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 104, p. 209-213, 2010.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; TOMS-BARBERN, F. A.; FERRERES, F. Influence of industrial processing on orange juice flavanone solubility and transformation to chalcones under gastrointestinal conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 3024-3028, 2003.

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 819-822, 2002.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sciences*, v. 71, p. 693-705, 2002.

HAMEED, S. A. Electronic structure of some chalcone derivatives. 1. Ground state geometric parameters and charge density distributions, AM1-MO treatment. *JKAU: Science*, v.18, p.13-25, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, v. 5, p. 294-300, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.

HIJOVA, E. Bioavailability of chalcones. *Bratisl Lek Listy*, v. 107, p. 80-84, 2006.

HNATYZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUCK A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*, v. 11, p. 366-369, 2004.

HOLZSCHUH, M. H., GOSMANN, G., SCHNEIDER, P. H., SCHAPOVAL, E. E. S., BASSANI, V. L. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. *Pharmazie*, v. 65, p. 650-656, 2010.

ICH. *Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonization: Geneva (www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/038195en.pdf), 2005.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 147-160, 1997.

ITO, Y.; CONWAY, W. D. *High-speed countercurrent chromatography, chemical analysis*, New York: Wiley-Interscience, 1996.

ITO, S.; TORIUMI, Y.; DEMACHI, M.; ADACHI, T.; ITO, Y.; HAYASHI, H. Improvement of dissolution characteristics of 4-t-butyl-2'-carboxymethoxy-4'-(3-methyl-2-butenyloxy)chalcone by β -cyclodextrin complexation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 323-328, 1995.

JIANG, J.; WOJNOWSKI, R.; JEDINAK, A.; SLIVA, D. Suppression of proliferation and invasive behavior of human metastatic breast cancer cells by dietary supplement BreastDefend. *Integrative Cancer Therapies*, v. 10, p. 192-200, 2011.

JIANG, J.; THYAGARAJAN-SAHU, A.; LOGANATHAN, J.; ELIAZ, I.; TERRY, C., SANDUSKY, G. E.; SLIVA, D. BreastDefend™ prevents breast-to-lung cancer metastases in an orthotopic animal model of triple-negative human breast cancer. *Oncology Reports*, v. 28, p. 1139-1145, 2012.

JORAY, M. B.; ROLLÁN, M. R.; RUIZ, G. M.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina - isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. *Planta Medica*, v. 77, p. 95-100, 2011.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine*, v. 20, p. 258-261, 2013.

JORDHEIM, L. P.; DEGOBERT, G.; DIAB, R.; PEYROTTE, S.; PÉRIGAUD, C.; DUMONTET, C.; FESSI, H. Inclusion complexes of a nucleotide analogue with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.63, p.11-16, 2009.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MINO J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Pharmacological Research*, v. 45, p. 57-61, 2002.

KATSORI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 21, p. 1575-1596, 2011.

KIM, N. Butein sensitizes human leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *Archives of Pharmacological Research*, v. 31, p. 1179-1186, 2008.

LI, P.; TABIBI, E.; YALKOWSKY, S. H. Combined effect of complexation and pH on solubilization. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 87, p. 1535-1537, 1998.

LIN, L.; KUO, Y.; CHOU, C. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 627-630, 2000.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, p. 1119-1135, 2011.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, p. 181-194, 2006.

MARUYAMA, M.; HAYSAKA, K.; SASAKI, S. A new chalcone glucoside from *Gnaphalium multiceps*. *Phytochemistry*, v.13, p.286-288, 1974.

MCALPINE, J. B.; HOCHLOWSKI, J. E., in: WAGMAN, G. H.; COOPER, R. (Eds.). *Natural Products Isolation: Separation Methods for Antimicrobials, Antivirals and Enzyme Inhibitors*, New York: Elsevier Science Publishing Company Inc., p. 1-53, 1989.

MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from root bark of *Rhus pyroides*. *Journal of Natural Products*, v.66, p.559-604, 2003.

MEKJARUSKUL, C., YANG, Y., LEED, M. G. D., SADGROVE, M. P., JAY, M., SRIPANIDKULCHAIA, B. Novel formulation strategies for enhancing oral delivery of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* by SMEDDS or complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 445, p. 1-11, 2013.

MESESANE, I. B.; YEBOAH, S. O.; LIEBSCHER, J.; MÜGGE, C.; ABEGAZ, B. M. A bichalcone from the twigs of *Rhus pyroides*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 1005-1008, 2000.

MIHIGO, S. O.; MAMMO, W.; BEZABIH, M.; ANDRAE-MAROBELA, K.; ABEGAZ, B. M. Total synthesis, antiprotozoal and cytotoxicity activities of rhuschalcone VI and analogs. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 2464-2473, 2010.

MOJZIS, J.; VARINSKA, L.; MOJZISOVA, G.; KOSTOVA, I.; MIROSSAY, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research*, v. 57, p. 259-265, 2008.

MOKRINI, R.; TROUILLAS, P.; KAOUADJI, M.; CHAMPAVIER, Y.; HOUÉE-LÉVIN, C.; CALLISTE, C.; DUROUX, J. Radiolytic transformation of 2,2',4'-trihydroxychalcone. *Radiation Research*, v. 165, p. 730-740, 2006a.

MOKRINI, R.; TROUILLAS, P.; KAOUADJI, M. CHAMPAVIER, Y.; HOUÉE-LÉVIN, C.; FAGNÈRE, C.; DUROUX, J. Reactivity of chalcones with 1-hydroxymethyl radicals. *Radiation Research*, v. 166, p. 928-941, 2006b.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAIAS F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ("marcela"). *Phytoterapy Research*, v. 19, p. 486-490, 2005.

MORTON, J. F. Current folk remedies of Northern Venezuela. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, v. 13, p. 97-121, 1975.

MURAKAMI, A.; TANAKA, S.; OHIGASHI, H.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Possible anti-tumour promoters: bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 2689-2693, 1992.

NORBEDO, C.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. D. A new flavanone from *Achyrocline flaccida*. *Journal of Natural Products*, v.45, p.635-636, 1982.

OLIVEIRA, S. G. D.; DE MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, p. 428-437, 2012.

PAULI, G. F., PRO, S. M., FRIESEN, J. B. Countercurrent separation of natural products. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1489-1508, 2008.

PETROVICK, G. F. *Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de Achyrocline satureioides (Lam.) DC Asteraceae (marcela)*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 2006. Dissertação de mestrado.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOLA, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

PUHLMANN, J. *Imunologisch aktive Polysaccharide aus den Herbadrogen von Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. und Arnica montana L. sowie aus Arnica montana L. Zellkulturen*. Tese (Doutorado em Farmácia) – Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximillians-Universität, München, 1989.

RAHMAN, M.; RIAZ, M.; DESAI, U. R. Synthesis of biologically relevant biflavonoids - a review. *Chemistry & Biodiversity*, v. 4, p. 2495-2527, 2007.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 1142-1166, 1996.

REDDY, M. V. B.; SHEN, Y.; YANG, J.; HWANG, T.; BASTOW, K. F.; QIAN, K.; LEE, K.; WU, T. New bichalcone analogs as NF- κ B inhibitors and as cytotoxic agents inducing Fas/CD95-dependent apoptosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1895-1906, 2011.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*, v. 38, p. 27-38, 2012.

ROY, R.; PANDEY, V. B. A chalcone glycoside from *Clerodendron phlomidis*. *Phytochemistry*, v. 37, p. 1775-1776, 1994.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 335-339, 2002.

RUSSO, P.; DEL BUFALO, A.; CESARIO, A. Flavonoids acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 5287-5293, 2012.

SABATÉ, D. C.; GONZALÉZ, M. J.; PORRINI, M. P.; EGUARAS, M. J.; AUDISIO, M. C.; MARIOLI, J. M. Synergistic effect of surfactin from *Bacillus subtilis* C4 and *Achyrocline satureioides* extracts on the viability of *Paenibacillus larvae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, DOI 10.1007/s11274-011-0941-x, 2011.

SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; TONN, C. E.; ZANON, S. M.; CONTIGIANI, M. S.; SABINI, L. I. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. *Natural Product Research*, v. 26, p. 405-415, 2012.

SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 209-225, 2012.

SAMOSZUK, M.; TAN, J.; CHORN, G. The chalcone butein from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured with fibroblasts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.5, p.1-5, 2005.

SANTIN, J. R., LEMOS, M., KLEIN JUNIOR, L. C., NIERO, R., DE ANDRADE, S. F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 334-339, 2010.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na seleção de espécies de plantas medicinais para triagem de atividade antitumoral. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 2, p. 7-17, 1999.

SANTOS, A. L. G.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, V.L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. aqueous extracts. *Phytotherapy Research*, v. 13, p. 65-66, 1999.

SCHWINGEL, L.; FASOLO, D.; HOLZSCHUH, M.; LULA, I.; SINISTERRA, R.; KOESTER, L.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L. Association of 3-*O*-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and *ex vivo* skin permeation studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 62, p. 149-159, 2008.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization process in pharmaceutical technology and drug delivery design. *Journal of Crystal Growth*, v. 211, p. 122-136, 2000.

SHIBUSAWA, Y., ITO, Y., in: CAZES, J. (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography Update Supplement*, New York: Marcel Dekker, 2004.

SILVA, L. F.; LANGELOH, A. A comparative study of antispasmodic activity of hydroalcoholic 80 % (V/V) extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 13, p. 35-40, 1994.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Compositae*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L.A .; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. F.; STEHMANN, J. R. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul*, 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p. 108-109.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scale-up of countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1151, p. 6-13, 2007.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxenburgeria* (Ochnaceae). *Química Nova*, v. 30, p. 948-987, 2007.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 155-163, 2012.

UTSUKI, T.; IMAMURA, K.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Stoichiometry-dependent changes of solubility and photoreactivity of an antiulcer agent, 2'-carboxymethoxy-4,4'-bis(3-methyl-2-butenyloxy)chalcone, in cyclodextrin inclusion complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 81-87, 1993.

VOGEL, S.; OHMAYER, S.; BRUNNER, G.; HEILMANN, J. Natural and non-natural prenylated chalcones: synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p.4286-4293, 2008.

WAGNER, H.; PROKSCH, A.; VOLLMAR, R. M.; ODENTHAL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; LE TURDU, M.; FANG, J. N. Immunstimulierend wirkende polysaccharide (heteroglycane) aus höheren pflazen. *Arzneimittelforschung*, v. 35, p. 1069-1075, 1985.

WON, S.; LIU, C.; TSAO, L.; WENG, J.; KO, H.; WANG, J.; LIN, C. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.40, p.103-112, 2005.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R.; RAVINDRAN, J.; CHATURVEDI, M. M.; VAAHTERA, L.; PARKKINEN, J.; AGGARWAL, B. B. Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p. 1021-1032, 2010.

YE, C.; LIU, J.; WEI, D.; LU, Y.; QIAN, F. *In vivo* antitumor activity by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v.55, p.447-452, 2005.

ZANON, S. M.; CERIATTI, F. S.; ROVERA, M.; SABINI, L. J.; RAMOS, B. A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 41, p. 59-62, 1999.

