

Artigo

Avaliação da Atividade Antioxidante de Frações de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken Incorporadas em β -ciclodextrina

Lanna, E. G.; Moreira, A. M. S.; Bittencourt, V. C. S.; Sousa, O. V.;
Denadai, A. M. L.*

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (4), 1150-1164. Data de publicação na Web: 2 de setembro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

Antioxidant Activity Evaluation of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken Fractions and their Phytocomplexes with β -cyclodextrin

Abstract: The aim of this work was the synthesis, characterization and evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of phytocomplexes formed by hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol fractions of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, associated with β -cyclodextrin (β CD). After the synthesis, the phytocomplexes were characterized in solution and in solid state by UV-Vis spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA/DTG), which showed the preference of β CD by the rich flavonoid fractions (ethyl acetate and n-butanol fractions). About the evaluation of the antioxidant activity, the two methodologies employed in the studies, named DPPH and FRAP, showed that the ethyl acetate fraction suffered an improvement of its activity in presence of β CD, as result of interactions of the flavonoids with the cyclodextrin.

Keywords: *Bryophyllum pinnatum*; cyclodextrin; inclusion compounds; antioxidants; flavonoids.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de fitocomplexos produzidos pelas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken associadas à β -ciclodextrina (β CD). Após a produção, os fitocomplexos foram caracterizados em solução e no estado sólido por espectroscopia na região do UV-Vis e análise termogravimétrica, sendo possível demonstrar a preferência da β CD pelas frações ricas em flavonoides (acetato de etila e n-butanol). Quanto à avaliação da atividade antioxidante, ambas as metodologias utilizadas no estudo, DPPH e FRAP, mostraram que a fração em acetato de etila foi a que apresentou melhoria da atividade antioxidante na presença de β CD, como resultado das interações dos flavonoides com a ciclodextrina.

Palavras-chave: *Bryophyllum pinnatum*, ciclodextrina, compostos de inclusão, antioxidantes, flavonoides.

* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida, Departamento de Farmácia, Campus Governador Valadares, CEP 35010-177, Governador Valadares-MG, Brasil.

✉ angelo.denadai@ufjf.edu.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190079](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190079)

Avaliação da Atividade Antioxidante de Frações de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken Incorporadas em β -ciclodextrina

Elisa G. Lanna,^a Ana Maria M. Santos,^b Vanessa Cristina E. Bittencourt,^b
Jéferson G. da Silva,^b Orlando V. Sousa,^a Ângelo M. L. Denadai^{b,*}

^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Farmácia, Campus Juiz de Fora, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

^b Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida, Departamento de Farmácia, Campus Governador Valadares, CEP 35010-177, Governador Valadares-MG, Brasil.

* angelo.denadai@ufjf.edu.br

Recebido em 18 de outubro de 2018. Aceito para publicação em 25 de agosto de 2019

1. Introdução

2. Material e Métodos

- 2.1. Material Vegetal
- 2.2. Preparo das frações
- 2.3. Preparo dos fitocomplexos
- 2.4. Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis
- 2.5. Análise termogravimétrica
- 2.6. Ensaio Antioxidantes
- 2.7. Análise Estatística

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Caracterização espectroscópica por UV-Vis
- 3.2. Análises térmicas
- 3.3. Análise termogravimétrica dos fitocomplexos
- 3.4. Atividade antioxidante das frações e seus fitocomplexos

4. Conclusões

1. Introdução

O Brasil é um país que detém uma das maiores biodiversidades do planeta, com vasto conhecimento tradicional associado, possuindo plantas medicinais com elevado potencial para a produção de fitoterápicos e diversas outras classes de medicamentos.¹

Acredita-se que 40 % dos fármacos disponíveis na terapêutica atual tenham sido desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25 % de plantas, 13 % de micro-organismos e 3 % de animais.²

Plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse para a indústria farmacêutica, uma vez que a

presença de radicais livres no meio biológico pode causar problemas como mutação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Esses processos são intimamente relacionados aos mecanismos fisiopatológicos da formação de ateromas e ateroscleroses.³

Nesse contexto, a *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken (sinônimo: *Kalanchoe pinnata* (Lam.), Folha da Fortuna), da família Crassulaceae, se destaca por apresentar diversas substâncias antioxidantes de elevado potencial farmacológico, como flavonoides, alcaloides, cardenólídeos, esteroides, taninos e saponinas, dentre outros.⁴

B. pinnatum é uma planta nativa da África tropical e muito bem adaptada no Brasil, sendo mundialmente utilizada na medicina tradicional devido à ampla gama de atividades biológicas. Popularmente, é usada como antifúngico, antibacteriano e para o tratamento de úlceras gástricas, diarreia, vômito, queimaduras, picadas de insetos, dores no corpo e doenças inflamatórias.^{4a,5} No Brasil, o suco das folhas é utilizado para o tratamento local de quelite, doença periodontal, rachadura dos lábios, contusões, furúnculos e feridas.⁶

A utilização de composições naturais como medicamento apresenta, todavia, alguns inconvenientes que podem interferir na biodisponibilidade da droga vegetal. De modo geral, em extratos etanólicos (mais comuns), observa-se a presença de moléculas de baixa solubilidade aquosa e instabilidade química frente ao pH, temperatura e luz, que podem causar duras restrições ao uso dessas composições.⁷

Dentre as estratégias disponíveis para se superar as restrições acima citados, tem sido proposto o emprego de formulações contendo nanodispositivos carreadores capazes de favorecer o contato entre os componentes de extratos e o meio biológico. Dentre os principais, podem ser citados aqueles constituídos por polímeros biodegradáveis,⁸ vesículas lipossomais,⁹ surfactantes¹⁰ e ciclodextrinas.¹¹

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, obtidos através da degradação

enzimática do amido. As mais comuns são a α -, β - e γ -ciclodextrinas, constituídas respectivamente por 6, 7 ou 8 unidades de α -D-glicopiranoose. Esses compostos se destacam pela capacidade de formar compostos de inclusão com substâncias diversas, geralmente aumentando a sua solubilidade, estabilidade e atividade biológica.¹¹⁻¹²

O uso de ciclodextrinas como agentes de nanoencapsulamento tem sido praticado com sucesso com diversas substâncias bioativas de origem vegetal, como alcaloides,¹³ ácidos fenólicos,¹⁴ compostos polifenólicos;¹⁵ além de misturas complexas, como extratos de folha de oliva,¹⁶ própolis^{7b} e hibisco,¹⁷ sendo essas últimas, denominadas fitocomplexos.

Recentemente, temos demonstrado que o fitocomplexo formado pelo extrato etanólico de folhas de *B. pinnatum* com β -ciclodextrina (β CD) possui maior atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória se comparado com o extrato livre. Esse comportamento foi atribuído ao aumento da solubilidade de componentes do extrato bem como da intensificação da capacidade de doação de radical hidrogênio por esses constituintes, em decorrência da complexação com a β CD.¹⁸ Nesse sentido, considerando as melhorias já observadas para a incorporação do extrato etanólico de *B. pinnatum* em β CD, é igualmente importante avaliar o efeito da incorporação de suas frações na mesma ciclodextrina, uma vez que nas frações, como existem proporções diferentes dos constituintes, é de se esperar que alguma classe de compostos possa sofrer uma maior potencialização em relação a outras, com vistas à obtenção de composições mais eficientes. Além disso, até o presente momento, não foi estudado o efeito da β CD na atividade antioxidante de frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum*.

Pelas razões supracitadas, o presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de fitocomplexos formados pela de β CD com frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, obtidas a partir da fração etanólica de *B.*

pinnatum. Para isso, as interações entre a β CD com componentes das frações foram investigadas em solução por espectroscopia na região do UV-Vis. A estabilidade térmica dos fitocomplexos foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA). Finalmente, verificou-se o efeito da β CD sobre a atividade oxidante *in vitro* das composições.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Folhas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais (21° 46' 10", 46013 S e 43° 21' 49", 88313 W), em maio de 2014. A espécie foi identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena. Uma exsiccata (CESJ nº 46.575) encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

As folhas foram coletadas de forma aleatória, partes baixas e partes altas de dez indivíduos, totalizando uma massa de aproximadamente 10 kg. Após a coleta, o material foi desidratado em estufa a 50 °C por 3 semanas e posteriormente moído em moinho de faca. O material foi então peneirado em tamis de 20 mesh, para posterior maceração.

2.2. Preparo das frações

O material vegetal previamente seco e pulverizado (500,0 g) foi submetido a extração por maceração estática em etanol PA (1,5 L), com renovação semanal do solvente durante 3 meses. O processo foi feito à temperatura ambiente e sem luminosidade, com os macerados acondicionados dentro de armário. O extrato em etanol (EE) foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida

utilizando-se evaporador rotatório (BUCHI®, R II) com temperatura controlada (50-60 °C) a fim de minimizar a degradação dos constituintes. O produto final foi depositado em dessecador com sílica.

Parte do extrato em etanol (\approx 50 g) foi ressuspenso em 500 mL de mistura etanol:água (1:9) e submetido a um processo de fracionamento através de extração líquido-líquido (extração em batelada) em funil de separação de 1L, com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, obtendo as respectivas frações: fração em hexano (FH), fração em diclorometano (FD), fração em acetato de etila (FAE) e fração em n-butanol (FB). Para o processo de extração, foi adicionado um volume de 1 L de cada solvente, distribuídos em cinco bateladas de 200 mL.

2.3 Preparo dos fitocomplexos

Os fitocomplexos de FH, FD, FAE e FB com β CD foram preparados pelo método de coprecipitação seguido de liofilização. Resumidamente, foram pesadas quantidades equivalentes de FH, FD, FAE, FB e β CD na proporção 1:1 (m/m). Em seguida, foram dissolvidas em etanol PA 50 % (v/v) e submetidas a um processo de agitação a 40 °C por 24 horas e, após esse período, as amostras foram liofilizadas. Os dados relativos à caracterização físico-química e avaliação da atividade antioxidante do EE e seu fitocomplexo foram recentemente publicados.¹⁸

2.4 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis

A identificação das principais classes de cromóforos presentes nas frações, bem como a investigação das interações entre esses cromóforos com a β CD foram realizadas em solução por espectroscopia eletrônica na

região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Os espectros eletrônicos do extrato etanólico e das outras frações, na ausência e na presença de β CD, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, contendo acessório de troca automática de oito amostras, acoplado a um banho termostático peltier e gerenciado pelo software UV WinLab.

Para todas as amostras, as soluções foram obtidas dissolvendo-se 0,02 g da fração pura, ou 0,04 g do fitocomplexos, em 1 mL de etanol. Em seguida, foram retirados 75 μ L de cada amostra e diluídos em 3 mL de água destilada, de modo a se alcançar a concentração nominal de extrato $4,87 \times 10^{-4}$ g/mL. Uma solução obtida pela mistura de 3 mL de água com 0,75 μ L de etanol foi utilizada como branco. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C. Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0®.

2.5 Análise termogravimétrica

Análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em atmosfera oxidante (ar) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min para cada fração pura, β CD e fitocomplexos. Como referência, também foram usadas as respectivas misturas mecânicas (MM) obtidas pela mistura dos extratos com a β CD, sem contato prévio com nenhuma fase líquida. Durante os experimentos, foi utilizado cadinho de platina e massa de aproximada 2 mg para cada composto.

2.6 Ensaios Antioxidantes

A atividade antioxidante do extrato e frações livres e dos fitocomplexos com β CD foi determinada por dois métodos: 1) avaliação da capacidade de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•); e 2) poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), de acordo com os procedimentos descritos por Blois (1958)¹⁹ e Benzie et al. (1999)²⁰, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e rotina foi utilizado como controle positivo.

2.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•

Inicialmente, foi preparada uma solução mãe de DPPH 0,3 mM em etanol 90 %. Em seguida, 1,0 mL dessa solução foi misturada com 2,5 mL de cada solução problema, contendo as frações ou os fitocomplexos, com concentrações gradativamente maiores: 1, 3, 5, 10, 15, 30 μ g/mL. Após 30 minutos de reação sob incubação em ambiente escuro e temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 515 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis SHIMADZU® UV-1800. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada através da medida da quantidade de DPPH reduzida por cada amostra, através da equação 1:

$$\%AA = 100 - \left[\left(\frac{Abs\ amostra - Abs\ branco\ amostra}{Abs\ controle - Abs\ branco\ controle} \right) \times 100 \right] \quad \text{Eq. 1}$$

O branco das amostras foi constituído de 2,5 mL de suas respectivas soluções e 1,0 mL de etanol 90 %, sem adição do DPPH, sendo medido para cada uma das concentrações utilizadas. O controle negativo foi constituído por 2,5 mL de etanol 90 % e 1,0 mL de solução

de DPPH, seu branco foi composto somente por etanol. Soluções de rotina foram utilizadas como controle positivo, também com concentrações gradativas de 1, 3, 5, 10, 15, 30 μ g/mL. O valor de CI_{50} de cada amostra, definida como a concentração de antioxidante

necessária para sequestrar 50 % dos radicais DPPH• presentes na solução, foi calculada através de regressão não linear das curvas de concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos testados (em escala logarítmica), comparado com o percentual da capacidade de sequestro de radicais livres.²¹

2.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (FRAP)

Diferentes concentrações das amostras em 1,0 mL de MeOH foram misturadas com 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 μM (pH 6,6) e 2,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio 1 %. A mistura foi incubada em estufa a 50 °C por 20 minutos. Na sequência, foram adicionados 2,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético 10 % e a mistura foi submetida a centrifugação a 3000 rpm por 8 minutos. Após centrifugação, uma alíquota de 2,5 mL da camada superior da mistura foi transferida para tubo de ensaio e foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico 0,1 %. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 700 nm (SHIMADZU®, UV-1800). O branco das amostras foi constituído por 1 mL de água e todos os demais reagentes. Soluções de rotina foram utilizadas como controle positivo. O potencial antioxidante foi medido pela concentração efetiva para reduzir 50 % de íons ferro presentes no meio (CE_{50}).

2.6.3 Análise estatística

Os dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Para análise estatística, foi utilizado o *Graph Pad Prisms Software (version 5.0, Graph Pad Software, Inc., USA)* e a comparação das médias realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey com 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Rendimento do material e umidade

O teor de umidade do material vegetal seco em estufa a 50 °C durante duas semanas foi de 90 %. A quantidade de extrato obtido dos 500,0 g de material vegetal foi de 83 g, correspondendo a um rendimento de 16,7 %.

3.2. Caracterização espectroscópica por UV-Vis

Os espectros eletrônicos de UV-Vis das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol de *Bryophyllum pinnatum* e dos seus respectivos fitocomplexos são mostrados nas Figuras 1A-D.

O espectro de UV-Vis do extrato em etanol de *B. pinnatum*,¹⁸ mostra a presença de quatro bandas principais a 269, 374, 400 e 670 nm, sendo as duas primeiras associadas principalmente à absorção de flavonoides e componentes fenólicos e as duas últimas a absorções de moléculas da classe das clorofilas. A presença de flavonoides e demais componentes fenólicos em extratos de *B. pinnatum* tem sido descrita em diversos trabalhos.²² Esses dados são compatíveis com estudos fitoquímicos já realizados com extrato etanólico de *B. pinnatum*, onde tem sido revelada a presença de pelo menos quatro flavonoides identificados como rutina, quercetina, luteonina e luteolina 7-O- β -D-glicosídeo, sendo o último, o grupo cromóforo majoritário nas condições cromatográficas reportadas.²³

Comparando esses dados com os dos espectros das Figura 1A-D, pode-se observar que as frações em acetato de etila e n-butanol apresentam absorções próximas de 260 nm e 340 nm características de flavonoides,²⁴ enquanto que nas frações em hexano e em diclorometano é clara a presença das absorções em 412 nm e 670 nm, características de clorofilas.²⁵

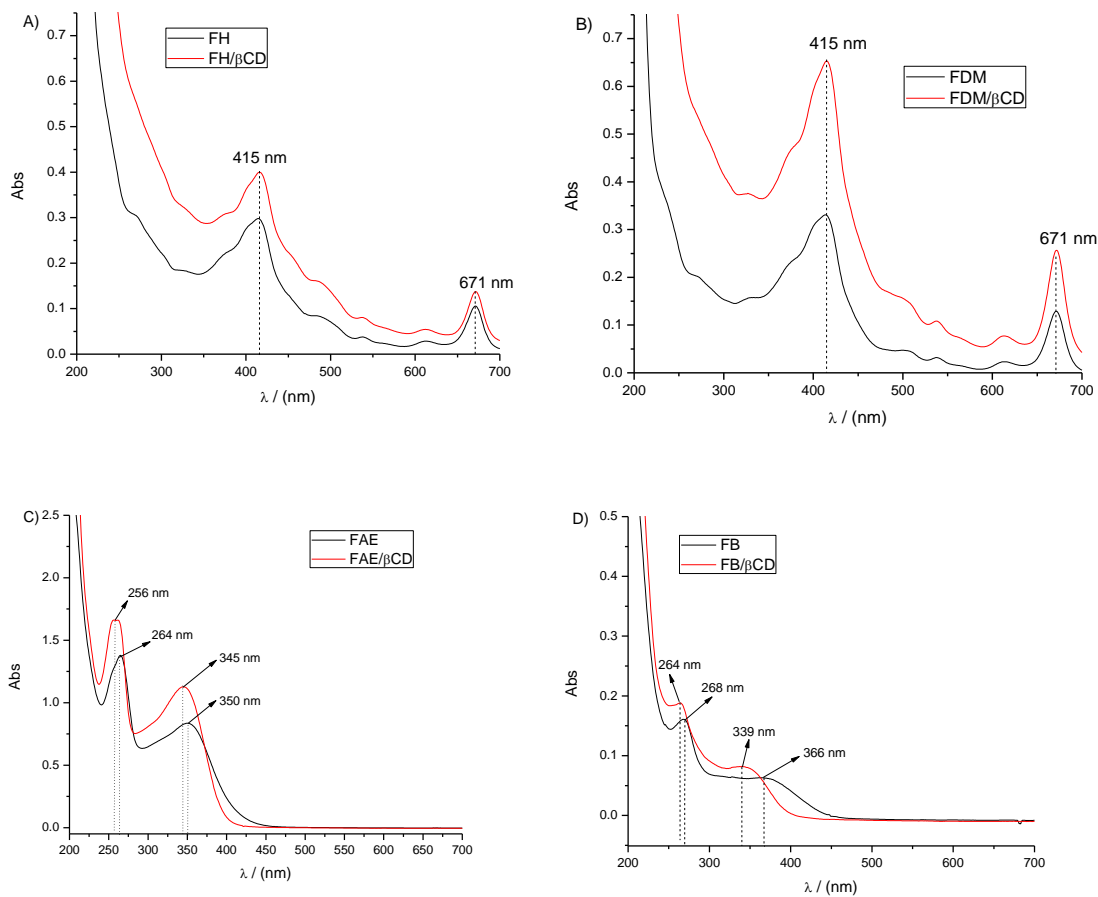


Figura 1. Espectros UV-Vis das frações FH, FDM, FAE e FB e seus respectivos fitocomplexos com β CD, obtidos pela diluição de 75 μ L de solução etanólica do extrato ou fitocomplexos em 3 mL de água (concentração nominal de extrato de $4,87 \times 10^{-4}$ g/mL). Uma mistura de 3 mL de água com 75 μ L de etanol foi utilizada como branco

A avaliação das interações intermoleculares entre a β CD e os componentes das frações foi feita por comparação entre as bandas dos espectros das espécies puras e nanoencapsuladas, utilizando-se a mesma concentração nominal de extrato nas amostras com e sem β CD.

Como pode ser visto nas Figuras 1A-D, ocorreram alterações apenas nos espectros das frações em acetato de etila e n-butanol. Na fração FAE/ β CD observaram-se deslocamentos hipsocrômicos de 264 \rightarrow 256 nm e de 350 \rightarrow 345 nm. Na fração FB/ β CD observaram-se deslocamentos hipsocrômicos de 268 \rightarrow 264 nm e de 366 \rightarrow 339 nm.

Levando-se em consideração que as frações FAE e FB apresentaram as alterações mais expressivas na presença de β CD, com

mudanças nos formatos das bandas; e sabendo-se que essas duas frações são ricas em flavonoides, praticamente não apresentando indícios de clorofilas, supõe-se que as ciclodextrinas tenham forte preferência por essas moléculas. Para esses espectros, os desvios hipsocrômicos podem ser explicados pela perturbações nos níveis de energia HOMO-LUMO dos grupos cromóforos, em decorrência da mudança de ambiente químico dos componentes das frações, do solvente para a cavidade da β CD.²⁶ Na cavidade das ciclodextrinas, os elétrons excitáveis dos componentes do extrato estabelecem novas interações eletromagnéticas com os elétrons não ligantes dos grupos C-O-C da β CD, resultando em mudanças no espectro eletrônico.

3.3. Análise termogravimétrica dos fitocomplexos

Nas Figuras 2A-H estão apresentados os dados de TGA/DTG na região de temperatura compreendida entre 40 a 400 °C, para as frações FH, FDM, FAE e FB, seus fitocomplexos, β CD pura e misturas mecânicas, obtidas pela mistura dos extratos com a β CD sem contato a fase líquida. Nas figuras são observados diferentes perfis de perda de massa, que sugerem distintos níveis de eficiência nas interações da β CD com cada fração.

O termograma da β CD mostra duas perdas de massa significativas, sendo a primeira, com máximo em 92 °C, atribuída à desidratação da ciclodextrina; enquanto a segunda, com máximo em 392 °C, foi atribuída à decomposição da ciclodextrina. Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura.^{18, 27}

A fração FH mostrou perda de massa iniciada em aproximadamente 150 °C, atribuída à perda de material volátil nesta temperatura (Figura 2A). Por volta de 270 °C, tem-se pronunciada perda de massa em duas etapas, como pode ser observada na DTG mostrada na Figura 2B, sendo o fenômeno atribuído à decomposição dos componentes do extrato. O perfil de perda de massa do fitocomplexo FH/ β CD, por sua vez, praticamente não apresentou diferenças se comparado com o FH a baixas temperaturas (40-200 °C), sugerindo que a complexação da β CD com os componentes dessa fração não deve ser tão eficiente. A diferença mais importante somente é observada a elevadas temperaturas (por volta de 317 °C), onde se observa a supressão de um dos eventos de decomposição. A presença de somente um evento de decomposição por volta de 280-290 °C também é observada para a mistura mecânica, sugerindo novamente a ocorrência de fracas interações da β CD com a fração.

Conforme relato da literatura, a clorofila possui estabilidade térmica até 90 °C.

Para a fração FDM (Figuras 2C e 2D), de maneira similar ao FH, praticamente não se observaram diferenças no perfil térmico do fitocomplexo em comparação com a fração pura, sugerindo também neste caso que as interações da β CD com os componentes desta fração também sejam fracas. A mistura mecânica apresentou comportamento muito mais próximo ao da β CD pura, mostrando que mesmo com o aquecimento a β CD permanece sem interagir com a fração.

Para as frações FAE e FB, as diferenças em relação aos respectivos fitocomplexos são muito mais significativas. A fração FAE apresentou início da decomposição em aproximadamente 150 °C (Figura 2E), com máximo na DTG próximo de 250 °C (Figura 2F). Porém, na presença de β CD, o início da perda de massa passou a ocorrer a partir de 270 °C enquanto o pico de decomposição na DTG, próximo a 250 °C (Figura 2F), foi praticamente suprimido. Considerando a existência de apenas um pico da DTG em 310 °C, acredita-se que as decomposições dos componentes da fração devam ocorrer juntamente com a decomposição da β CD. A fração FB, por sua vez, tem sua decomposição iniciada em aproximadamente 110 °C (Figuras 2H e 2I). Na presença de β CD, esse evento também foi suprimido nesta faixa de temperatura, sendo observado o início da perda de massa a partir de 150 °C. Na Figura 2H observou-se significativa atenuação do evento de perda de massa, sugerindo também para esta fração, um aumento da estabilidade térmica. Para a mistura mecânica, observou-se comportamento intermediário entre a fração livre e o fitocomplexo. Esses dados mostraram que a complexação do FDM e do FB com β CD aumenta a estabilidade térmica dos componentes dessas frações, corroborando a hipótese de que nessas duas frações existem componentes muito mais susceptíveis à interação com a β CD do que as outras duas.

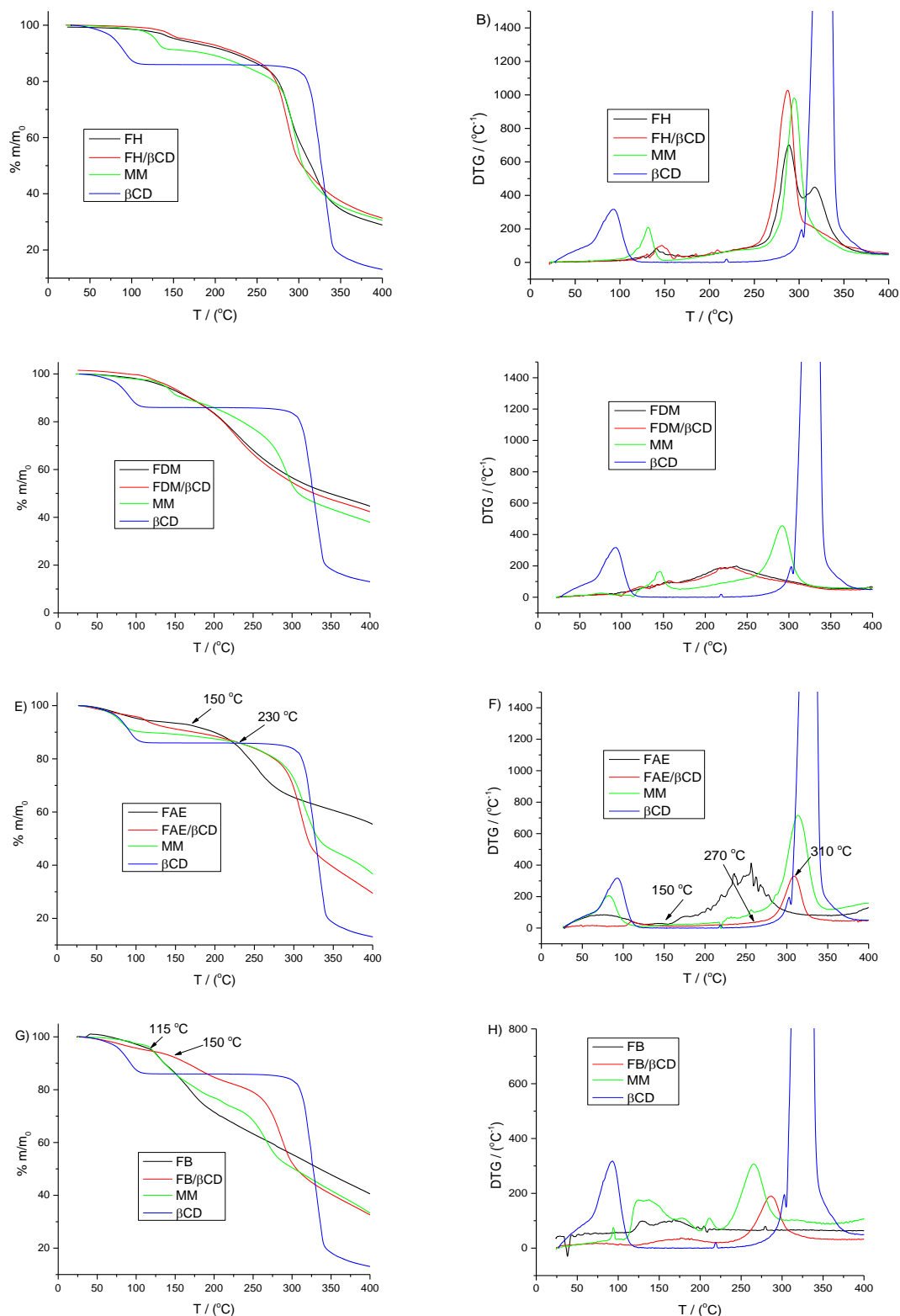


Figura 2. Termogramas das frações FH, FDM, FAE e FB, seus respectivos fitocomplexos, misturas mecânicas (MM) e β CD pura. Faixa de temperatura 40 a 400 °C e atmosfera oxidante (ar)

De fato, flavonoides apresentam afinidade muito maior com a β CD do que clorofilas. Dados da literatura mostram que sistemas

flavonoide/ β CD²⁸ exibem constantes de afinidade próximas de $K \approx 400-500 \text{ M}^{-1}$, enquanto que sistemas clorofila/ β CD²⁹

exibem valores de constantes de afinidade da ordem de $K \approx 10\text{-}15 \text{ M}^{-1}$. Essa maior afinidade dos flavonoides pelas ciclodextrinas pode ser explicada pela maior capacidade dos seus grupos aromáticos (benzoil ou cinamoil) em se ajustarem no interior da cavidade, frente às clorofilas, que apresentam anel porfirínico muito grande ou aos grupamentos alifáticos muito estreitos.

3.4. Atividade antioxidante das frações e seus fitocomplexos

Dados da literatura bem como os espectros de UV-Vis das frações FAE e FB mostram que o extrato das folhas de *B. pinnatum* é rico em flavonoides. Considerando que tais constituintes possuem expressiva atividade antioxidante,³⁰ ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar esse potencial, além de verificar se o encapsulamento do extrato e frações com β CD poderia levar a uma melhoria significativa dessa atividade.

Levando-se em conta que a atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo modelo de estudo aplicado, a realização de mais de um ensaio é recomendada, uma vez que os princípios físico-químicos dos métodos mudam de acordo com a matriz reacional.³¹ Em vista disso, duas metodologias baseadas em mecanismos distintos foram utilizadas para caracterizar a atividade antioxidante da amostra. A primeira metodologia utilizada foi a de investigação da capacidade de sequestro do radical estável DPPH•. A segunda metodologia empregada foi a de avaliação do poder de redução do ferro (FRAP). Ambas foram mensuradas por quantificação espectrofotométrica do cromóforo.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•, onde são apresentadas as quantidades de frações livres ou complexadas, necessárias para reduzir a concentração inicial do DPPH em 50 % (CI_{50}).

Conforme observado, a fração FAE ($CI_{50} = 8,13 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$) foi a que apresentou maior atividade antioxidante frente às demais. Este valor é maior do que o observado por Lanna, et al. 2016 para o extrato bruto em etanol EE ($CI_{50} = 12,27 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$),¹⁸ além de ser comparável ao controle positivo rutina ($CI_{50} = 8,37 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$).

Em relação aos fitocomplexos, no geral, houve uma intensificação da atividade antioxidante em todos os casos (Tabela 1), sendo a composição FAE/ β CD a que apresentou a melhoria mais significativa (redução de 46,87 % da CI_{50} em relação à fração pura). É importante destacar que a porcentagem de redução observada para a fração FAE/ β CD é próxima do observado para o fitocomplexo do extrato bruto EE/ β CD (redução de 42,70 % da CI_{50} em relação ao extrato puro).¹⁸ A habilidade em sequestrar o radical DPPH• é intimamente relacionada com a capacidade de doar hidrogênio que a espécie antioxidante possui,³² e a melhoria observada para os fitocomplexos pode ser atribuída a dois fatores principais: 1) mudanças na capacidade de doação do átomo de hidrogênio, como consequência do processo de encapsulamento; e 2) o aumento da solubilidade dos compostos presente na fração após o encapsulamento, o que favorece a interação dos constituintes antioxidantes como radical DPPH•.³³

Um mecanismo proposto para explicar o aumento da capacidade antioxidante se fundamenta no efeito das interações intermoleculares entre β CD e as moléculas encapsuladas. Quando os compostos presentes na fração FAE – majoritariamente flavonoides – estão conjugados com a β CD, uma ou várias ligações de hidrogênio podem ser formadas entre os átomos de hidrogênio das hidroxilas dos flavonoides com átomos de oxigênio presentes no interior da cavidade da β CD. Essas novas ligações entre os componentes da fração e a β CD enfraquecem as ligações covalentes entre o hidrogênio e o oxigênio das hidroxilas e conseqüentemente a doação de hidrogênio por esse grupamento torna-se mais fácil.³⁴

Tabela 1. Atividades antioxidantes pelos métodos de: 1) sequestro do radical DPPH•, expressos em termos de Cl_{50} ; e 2) FRAP, expressos em termos de CE_{50} . Rutina utilizada como controle positivo. Os valores dentro dos parênteses representam a porcentagem de redução da Cl_{50} em relação aos extratos puros

Amostra	DPPH – Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP – CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EE*	12,27 \pm 0,38 ^a	536,90 \pm 1,69 ^a
EE/ β CD*	7,03 \pm 0,92 ^b (-42,70 %)	387,21 \pm 1,12 ^b (-27,88 %)
FH	67,66 \pm 1,92 ^c	606,88 \pm 1,67 ^c
FH/ β CD	54,51 \pm 1,15 ^c (-19,4 %)	546,02 \pm 1,19 ^c (-9,9 %)
FDM	51,89 \pm 3,68 ^d	626,63 \pm 1,03 ^d
FDM/ β CD	49,02 \pm 1,04 ^d (-5,53 %)	502,45 \pm 0,86 ^d (-18,8 %)
FAE	8,13 \pm 0,99 ^e	222,95 \pm 1,75 ^e
FAE/ β CD	4,32 \pm 1,72 ^f (-46,87 %)	82,21 \pm 1,97 ^f (-63,2 %)
FB	28,27 \pm 0,35 ^g	1276,41 \pm 0,70 ^g
FB/ β CD	21,47 \pm 1,28 ^g (-24 %)	932,56 \pm 1,57 ^g (-26,9 %)
Rutina	8,37 \pm 0,23	206,66 \pm 1,13

Os valores correspondem à média \pm DP. Cl_{50} + DP ou CE_{50} + DP seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey para $p < 0,05$. *Os dados de atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EE) e do seu fitocomplexo com β CD (EE/ β CD), obtidos da referência Lanna, et al. 2016¹⁸, foram apresentados para fins de comparação.

Conforme citado, outra estratégia utilizada para verificação da capacidade antioxidante das frações e seus respectivos fitocomplexos foi o método de avaliação poder de redução do ferro (FRAP), cuja medida do potencial antioxidante total consiste na redução de íons Fe^{3+} a Fe^{2+} , mediante presença de compostos antioxidantes. Os resultados desse experimento estão também apresentados na Tabela 1.

Como observado, a fração FAE também foi a mais efetiva de todas, apresentando maior redução na CE_{50} , sendo a única que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Neste ensaio, a fração FB foi a menos ativa, apresentando atividade seis vezes menor que a rutina.

Em comparação com a fração FAE pura, a amostra FAE/ β CD apresentou significativo aumento na atividade antioxidante (redução de 67 % na CE_{50}).

De acordo com Alvarez-Parrilla et al. (2005),^{33b} a explicação para o aumento da atividade antioxidante neste tipo de experimento se dá principalmente pela alteração do mecanismo redox da molécula, quando presente na cavidade do β CD. Porém, é também de se esperar que o aumento da solubilidade dos componentes das frações

pela incorporação na β CD tenha uma contribuição para a alteração da atividade antioxidante, já que a maioria desses componentes são hidrofóbicos e tem solubilidade limitada. Com a solubilização, os compostos se tornariam mais acessíveis para promover a redução dos íons Fe^{3+} .

4. Conclusões

No presente estudo, as frações hexano (FH), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e n-butanol (FB), obtidas a partir do extrato etanólico *B. pinnatum*, foram incorporadas em β CD no intuito de se obter os respectivos fitocomplexos e avaliar suas capacidades antioxidantes frente aos precursores. As caracterizações físico-químicas por UV-Vis (solução) e TGA/DTG (estado sólido) mostraram que a β CD tem afinidade preferencial pelas frações ricas em flavonoides, sendo corroborados pelos ensaios de atividade antioxidante DPPH e FRAP, que por sua vez revelaram maior atividade para os fitocomplexos FAE/ β CD e FB/ β CD. Os dados mostraram que a estratégia de se utilizar β CD conjugada às frações pode ser promissora no tratamento de doenças relacionadas à formação desordenada de radicais livres. Nessa perspectiva, é fundamental o aprofundamento dos estudos com as frações de *B. pinnatum*, visando a obtenção de composições e/ou fitocomplexos ainda mais eficientes, em especial no Brasil, onde a planta é muito comum e está muito bem adaptada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG: APQ-00435-14 e APQ-03536-16), à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-PROPG/PROPESQ), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq: 311913/2017-2, MCT/CNPqNANO: 550321/2012-8 e CNPq 437418/2018-9), Financiadora de Estudos e Pesquisas (FINEP: 0633/13) e à Rede Mineira de Química (RQ-MG), financiada pela FAPEMIG (CEX - RED-0010-14).

Referências Bibliográficas

- ¹ Ribeiro, L. H. L. Analysis of medicinal plant and herbal medicine programs in the Unified Health System (SUS) from the territorial perspective. *Ciencia & Saude Coletiva* **2019**, *24*, 1732. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]
- ² (a) Calixto, J. R. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* **2019**, *91*, 1. [[CrossRef](#)]; (b) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. **2016**, *79*, 629. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]
- ³ Rodriguez-Duarte, J.; Galliussi, G.; Dapuetto, R.; Rossello, J.; Malacrida, L.; Kamaid, A.; Schopfer, F. J.; Escande, C.; Lopez, G. V.; Batthyany, C. A novel nitroalkene-alpha-tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *British Journal of Pharmacology* **2019**, *176*, 757. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]
- ⁴ a) Afzal, M.; Gupta, G.; Kazmi, I.; Rahman, M.; Afzal, O.; Alam, J.; Hakeem, K. R.; Pravez, M.; Gupta, R.; Anwar, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 853. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)] b) Milad, R.; El-Ahmady, S.; Singab, A. N. Genu *Kalanchoe* (Crassulaceae): A review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Plants* **2014**, *4*, 86. [[Link](#)]
- ⁵ Afzal, M.; Kazmi, I.; Khan, R.; Singh, R.; Chauhan, M.; Bisht, T.; Anwar, F. *Bryophyllum pinnatum*: A review. *International Journal of Research in Biological Sciences* **2012**, *2*, 143. [[Link](#)]

- ⁶ Mourao, R. H. V.; Santos, F. O.; Franzotti, E. M.; Moreno, M. P. N.; Antonioli, A. R. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD50) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Comb.) leaves picked before and during blooming. *Phytotherapy Research* **1999**, *13*, 352. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ a) Durante, M.; Lenucci, M. S.; Gazza, L.; Taddei, F.; Nocente, F.; De Benedetto, G. E.; De Caroli, M.; Piro, G.; Mita, G. Bioactive composition and sensory evaluation of innovative spaghetti supplemented with free or alpha-cyclodextrin chlorinated pumpkin oil extracted by supercritical CO₂. *Food Chemistry* **2019**, *294*, 112. [CrossRef] [PubMed]; b) Sharaf, S.; El-Naggar, M. E. Wound dressing properties of cationized cotton fabric treated with carrageenan/cyclodextrin hydrogel loaded with honey bee propolis extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *133*, 583. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Liu, M. H.; Teng, C. P.; Win, K. Y.; Chen, Y. S.; Zhang, X. Y.; Yang, D. P.; Li, Z. B.; Ye, E. Y. Polymeric Encapsulation of Turmeric Extract for Bioimaging and Antimicrobial Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2019**, *40*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Liu, J. N.; Tan, Y. B.; Zhou, H. L.; Mundo, J. L. M.; McClements, D. J. Protection of anthocyanin-rich extract from pH-induced color changes using water-in-oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering* **2019**, *254*, 1. [CrossRef]
- ¹⁰ Zhang, Y.; Shang, Z. H.; Gao, C. H.; Du, M.; Xu, S. X.; Song, H. W.; Liu, T. T. Nanoemulsion for Solubilization, Stabilization, and In Vitro Release of Pterostilbene for Oral Delivery. *Aaps Pharmscitech* **2014**, *15*, 1000. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Moreira, A. M. D.; Bittencourt, V. C. E.; Costa, F. L. S.; de Lima, M. E.; Lopes, M. T. P.; Borges, W. S.; Martins, G. F.; Nascimento, C. S.; da Silva, J. G.; Denadai, A. M. L.; Borges, K. B. Hydrophobic Nanoprecipitates of beta-Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against *Aedes aegypti* Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 7275. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² a) Gontijo, S. M. L.; Guimaraes, P. P. G.; Viana, C. T. R.; Denadai, A. M. L.; Gomes, A. D. M.; Campos, P. P.; Andrade, S. P.; Sinisterra, R. D.; Cortes, M. E. Erlotinib/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2015**, *83*, 267. [CrossRef]; b) Monteiro, A. P. F.; Rocha, C.; Oliveira, M. F.; Gontijo, S. M. L.; Agudelo, R. R.; Sinisterra, R. D.; Cortes, M. E. Nanofibers containing tetracycline/beta-cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *156*, 417. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ Hazra, S.; Hossain, M.; Kumar, G. S. Studies on alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrin inclusion complexes of isoquinoline alkaloids berberine, palmatine and coralyne. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2014**, *78*, 311. [CrossRef]
- ¹⁴ Cheng, J. R.; Liu, X. M.; Zhang, W.; Chen, Z. Y.; Wang, X. P. Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of concentrated mulberry juice-enriched dried-minced pork slices during preparation and storage. *Food Control* **2018**, *89*, 187. [CrossRef]
- ¹⁵ Folch-Cano, C.; Guerrero, J.; Speisky, H.; Jullian, C.; Olea-Azar, C. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/beta-cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2014**, *78*, 287. [CrossRef]
- ¹⁶ Jaski, J. M.; Barao, C. E.; Liao, L. M.; Pinto, V. S.; Zanoelo, E. F.; Cardozo, L. beta-Cyclodextrin complexation of extracts of olive leaves obtained by pressurized liquid extraction. *Industrial Crops and Products* **2019**, *129*, 662. [CrossRef]
- ¹⁷ Zhang, Y.; Sang, J.; Chen, F. F.; Li, C. Q. beta-Cyclodextrin-assisted extraction and green chromatographic analysis of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins and the effects of

- gallic/ferulic/caffeic acids on their stability in beverages. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2018**, *12*, 2475. [CrossRef]
- ¹⁸ Lanna, E. G.; Bittencourt, V. C. E.; Moreira, A. M. S.; Da Silva, J. G.; Sousa, O. V.; Denadai, A. M. L. Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in beta-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2016**, *85*, 247. [CrossRef]
- ¹⁹ Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199. [CrossRef]
- ²⁰ Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, *239*, 70-76. [CrossRef] [Pubmed]
- ²¹ Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitao, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitao, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* **2001**, *15*, 127. [CrossRef] [Pubmed]
- ²² a) Majaz, Q. A.; Tatiya, A. U.; Khurshid, M.; Nazim, S.; Siraj, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): A phytochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* **2011**, *2*, 1478. [Link]; b) Nielsen, A. H.; Olsen, C. E.; Moller, B. L. Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2829. [CrossRef] [Pubmed].
- ²³ Chibli, L. A.; Rodrigues, K. C. M.; Gasparetto, C. M.; Pinto, N. C. C.; Fabri, R. L.; Scio, E.; Alves, M. S.; Del-Vechio-Vieira, G.; Sousa, O. V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *154*, 330. [CrossRef] [Pubmed]
- ²⁴ Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 3268. [CrossRef] [Pubmed]
- ²⁵ Cotton, T. M.; Trifunac, A. D.; Ballschm.K; Katz, J. J. State of chlorophyll a invitro and invivo from electronic-transition spectra, and nature of antenna chlorophyll. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1974**, *368*, 181. [CrossRef] [Pubmed]
- ²⁶ a) Gornas, P.; Neunert, G.; Baczynski, K.; Polewski, K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 190. [CrossRef]; b) Divakar, S.; Maheswaran, M. M. Structural studies on inclusion compounds of beta-cyclodextrin with some substituted phenols. *Journal Of Inclusion Phenomena And Molecular Recognition In Chemistry* **1997**, *27*, 113. [CrossRef]
- ²⁷ Marini, A.; Berbenni, V.; Bruni, G.; Massarotti, V.; Mustarelli, P.; Villa, M. Dehydration of the cyclodextrins - a model system for the interactions of biomolecules with water. *The Journal of Chemical Physics* **1995**, *103*, 7532. [CrossRef]
- ²⁸ Chakraborty, S.; Basu, S.; Basak, S., Effect of beta-cyclodextrin on the molecular properties of myricetin upon nano-encapsulation: Insight from optical spectroscopy and quantum chemical studies. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *99*, 116. [CrossRef] [Pubmed]
- ²⁹ Dentuto, P. L.; Catucci, L.; Cosma, P.; Fini, P.; Agoastiano, A.; D'Accolti, L.; Trevithick-Sutton, C. C.; Foote, C. S., Effect of cyclodextrins on the physicochemical properties of chlorophyll a in aqueous solution. *J Phys Chem B* **2005**, *109* (3), 1313-1317. [CrossRef] [Pubmed]
- ³⁰ a) Anandam, S.; Selvamuthukumar, S. Fabrication of cyclodextrin nanosponges for quercetin delivery: physicochemical characterization, photostability, and antioxidant effects. *Journal of Materials Science* **2014**, *49*, 8140. [CrossRef]; b) Hadrich, G.; Monteiro, S. O.; Rodrigues, M. R.; de Lima, V. R.; Putaux, J. L.; Bidone, J.; Teixeira, H. F.; Muccillo-Baisch, A. L.; Dora, C. L. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. *Drug Development and Industrial*

- Pharmacy* **2016**, *42*, 1165. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]; c) Penalva, R.; Gonzalez-Navarro, C. J.; Gamazo, C.; Esparza, I.; Irache, J. M. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2017**, *13*, 103. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]
- ³¹ a) Magalhaes, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *613*, 1. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]; b) Moon, J. K.; Shibamoto, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agr Food Chemistry* **2009**, *57*, 1655. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]
- ³² Yang, J. X.; Guo, J.; Yuan, J. F. In vitro antioxidant properties of rutin. *Lwt-Food Science and Technology* **2008**, *41*, 1060. [[CrossRef](#)]
- ³³ a) Strazisar, M.; Andrensek, S.; Smidovnik, A. Effect of beta-cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 636. [[CrossRef](#)]; b) Alvarez-Parrilla, E.; De la Rosa, L. A.; Torres-Rivas, F.; Rodrigo-Garcia, J.; Gonzalez-Aguilar, G. A. Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by beta-cyclodextrin (beta-CD). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2005**, *53*, 121. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ a) Nguyen, T. A.; Liu, B. G.; Zhao, J.; Thomas, D. S.; Hook, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry* **2013**, *136*, 186. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]; b) Mercader-Ros, M. T.; Lucas-Abellan, C.; Fortea, M. I.; Gabaldon, J. A.; Nunez-Delicado, E. Effect of HP-beta-cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry* **2010**, *118*, 769. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]