

POSSIBILIDADES DE ANÁLISE DE CRISINA EM PASSIFLORA CAERULEA POR MÉTODO QUECHERS E HPLC-DAD

Data de aceite: 01/08/2024

Caroline Tuchtenhagen Rockembach

Universidade Federal do Pampa
Itaqui - RS
<http://lattes.cnpq.br/6470222289708676>

Carlos Borges Filho

Universidade Federal do Pampa
Itaqui - RS
<http://lattes.cnpq.br/8122733865747113>

Magali Kemmerich

Universidade Federal da Fronteira Sul
Erechim - RS
<http://lattes.cnpq.br/1096743335037955>

Cristiano Ragagnin de Menezes

Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria - RS
<http://lattes.cnpq.br/1755735245826251>

entre as quais se destaca a *Passiflora caerulea*, uma planta abundante na América do Sul, porém pouco explorada para consumo humano ou outros fins. Assim, este capítulo visa apresentar estudos sobre a viabilidade de determinação de crisina de *Passiflora caerulea*, por um método simples e eficaz. Para isso, o capítulo está dividido em quatro seções. A primeira seção apresentará uma síntese dos estudos sobre a determinação de crisina. A segunda seção discutirá brevemente os flavonoides, com ênfase na crisina. A terceira seção abordará as possibilidades de extração e determinação de crisina. Por fim, a última seção apresentará as perspectivas futuras e considerações finais sobre o estudo.

PALAVRAS-CHAVE: cromatografia, preparo de amostra, maracujá, crisina.

RESUMO: A crisina, um flavonoide pertencente à classe das flavonas, tem suscitado crescente interesse devido aos seus diversos e promissores efeitos bioativos, que incluem propriedades antioxidantes, anticonvulsivantes, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antineoplásicas e antidepressivas. Este composto é encontrado de forma natural no mel e em algumas espécies de plantas,

POSSIBILITIES OF ANALYZING CHRYSLIN IN PASSIFLORA CAERULEA USING QUECHERS METHOD AND HPLC-DAD

ABSTRACT: Chrysin, a flavonoid belonging to the flavone class, has garnered increasing interest due to its diverse and promising bioactive effects, which include antioxidant, anticonvulsant, antihypertensive, anti-

inflammatory, antineoplastic, and antidepressant properties. This compound is naturally found in honey and in some plant species, among which *Passiflora caerulea* stands out, a plant abundant in South America yet underexplored for human consumption or other uses. Thus, this chapter aims to present studies on the feasibility of determining chrysin from *Passiflora caerulea* using a simple and effective method. To this end, the chapter is divided into four sections. The first section will provide a synthesis of studies on the determination of chrysin. The second section will briefly discuss flavonoids, with an emphasis on chrysin. The third section will explore the methods of extraction and determination of chrysin. Finally, the last section will present future perspectives and final considerations on the study.

KEYWORDS: chromatography, sample preparation, passion fruit, chrysin.

INTRODUÇÃO

A crisina (5,7-Dihydroxiflavona) pertence à classe flavona de flavonoides e tem sido apresentada como tendo inúmeros e promissores efeitos bioativos, como atividade antioxidante (Pushpavalli et al., 2010), anticonvulsivante (Medina et al., 1990), antihipertensiva (Villar et al., 2002), anti-inflamatória (Bae et al., 2011), antineoplásica (Pichichero et al., 2011), anti-hiperlipidêmica (Zarzecki et al., 2014) e, especialmente associada a este trabalho, atividade antidepressiva (Borges Filho et al. 2015; 2016a; 2016b; Bortolotto et al., 2018). A crisina é encontrada naturalmente em mel, própolis, e várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Passiflora* (Nabavi et al., 2015).

Apesar disso, a maioria dos bioensaios com crisina não utiliza fontes naturais para sua obtenção, sendo adquirida na forma de pó com alta pureza em empresas especializadas, elevando o custo dos experimentos e deixando de explorar produtos naturais. Entre outros fatores, isso se deve à escassez de trabalhos que demonstrem com precisão o teor de crisina em fontes naturais e meios adequados para sua extração. Isso ocorre porque a maior ênfase nos estudos com crisina é na sua biotividade, ficando muitas vezes em segundo plano a sua extração e quantificação.

O maracujá *Passiflora caerulea* é uma espécie do gênero *Passiflora* abundante e de fácil acesso na América do Sul, ocorrendo em campos, beiras de estradas e bordas de florestas (Mondin et al., 2011), sendo raramente utilizada para consumo humano ou qualquer outra finalidade. Embora os estudos sobre o *Passiflora caerulea* sejam escassos, já se sabe que suas folhas contém o flavonoide crisina (Medina et al., 1990; El-Askary et al., 2017), possuindo potencial bioativo promissor (Ozarowski et al., 2018). Assim, estabelecer um método analítico que quantifique os níveis de crisina nas folhas de *Passiflora caerulea* pode ser um grande passo para avanços nos estudos deste produto natural. Além disso, é interessante analisar o teor de crisina e o potencial bioativo das demais partes da planta, que são a polpa e a casca, que ainda não foram estudadas.

Em relação à análise de crisina em matrizes vegetais, uma etapa importante é a preparação da amostra, que geralmente consiste em uma etapa que requer várias horas e/ou alto consumo de energia para execução. Gharari et al. (2020) mostraram a

determinação de crisina em raízes e parte aérea de quatro espécies de *Scutellaria*, com secagem do material em temperatura ambiente e moagem seguidas de 48h de extração com metanol. Em seguida, o extrato foi armazenado a 4°C por 48h antes da injeção no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Hadas et al. (2017) e Ozarowski et al. (2018) avaliaram o perfil químico de folhas de *Passiflora caerulea* e, para isso, as folhas foram secas com circulação de ar (25°C, 24h), e posteriormente extraídas com metanol por 1h (n=3) e concentradas sob vácuo. Portanto, é necessário buscar alternativas mais rápidas, que também tenham baixo custo e impacto ambiental. Além disso, ainda não existem métodos validados para quantificação da crisina em outras matrizes vegetais, como polpa e casca. Em 2003, Anastassiades et al. desenvolveram o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*)), com o objetivo de minimizar o manuseio de amostras, o tempo e melhorar as recuperações para determinação de pesticidas em matrizes alimentares. Estudos recentes também relataram o uso bem sucedido do método QuEChERS para determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes alimentares (Rotta et al., 2019; Nicácio et al., 2021). Porém, esta metodologia ainda não foi aplicada para a análise da crisina em nenhuma matriz. O QuEChERS destaca-se ainda por possuir uma etapa de limpeza, favorecendo a identificação dos compostos e diminuindo possíveis danos causados pelos co-eluentes ao sistema cromatográfico. Já nos métodos até então usados para análise de crisina, esta etapa de limpeza não ocorre.

Quanto à quantificação de crisina, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) é uma excelente escolha, pois fornece limites de quantificação (LOQ) mais baixos, análise simples e de baixo custo (Gharari et al., 2020; Oroian et al., 2017; Giacomeli et al., 2020). Além disso, muitos trabalhos relataram o uso de HPLC-DAD para análise de compostos fenólicos em matrizes alimentares (Kebal et al., 2022; Rahman et al., 2022; Bueno-Herrera et al., 2020).

FLAVONOIDES

Os compostos fenólicos derivados de plantas são divididos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Nacz & Shahidi, 2004). Os flavonoides são divididos em vários grupos, incluindo flavonas, flavanonas, antocianidinas, flavanóis, flavonóis e isoflavonas, de acordo com o grau de oxidação no anel C central, a hidroxilação dos anéis, e a substituição na posição 3 (Maher et al., 2019) (Figura 1). Dentro de cada grupo, a diversidade é gerada pelo arranjo dos grupos hidroxila combinados com a glicosilação ou alquilação (Talebi et al., 2021). Os flavonoides são compostos presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal e que têm despertado interesse em decorrência da bioatividade destes compostos. Nesse contexto, flavonoides isolados de plantas, como luteolina,

hespiridina, apigenina, rutina, quercetina e crisina têm demonstrado efeitos protetores e terapêuticos em diversos transtornos, como doenças cardíacas, circulatórias, renais, hepáticas, cerebrais, e neoplásicas (Sequeto et al., 2012; Borges Filho et al., 2016a, 2016b; Talebi et al., 2021).

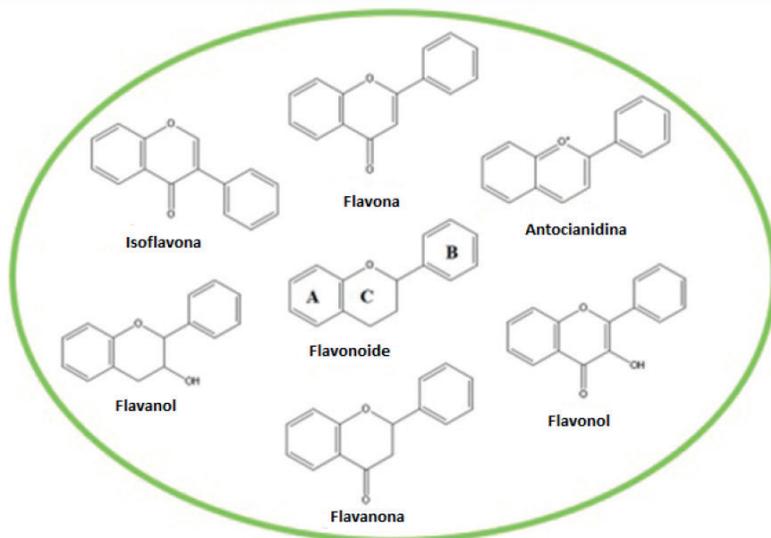


Figura 1 - Estrutura básica das principais classes de flavonoides.

Fonte: Adaptada de Talebi et al. (2021)

A crisina (5,7-Dihidroxi flavona) pertence à classe flavona de flavonoides, e é formada por dois anéis de benzeno duplos (A e B) e um anel central heterocíclico pirano contendo oxigênio (C) (Figura 2).

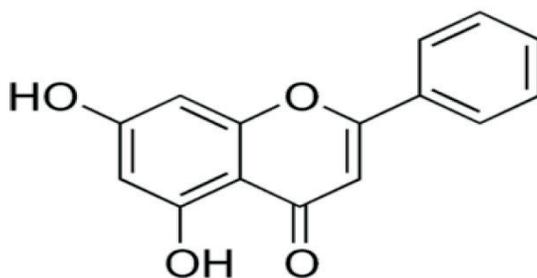


Figura 2 - Estrutura química do flavonoide crisina.

Fonte: Adaptada de Talebi et al. (2021)

O flavonoide crisina possui inúmeros efeitos bioativos. Apesar de estar presente em fontes naturais, a maioria dos bioensaios não utiliza fontes naturais para obtenção da crisina. Isto decorre da falta de trabalhos que demonstrem o teor de crisina em fontes naturais e métodos analíticos adequados. A crisina é encontrada naturalmente em mel, própolis, e várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Pelargonium*, *Passiflora* e da família *Pinaceae* (Nabavi et al., 2015). Estudos anteriores avaliaram as concentrações de crisina em vários méis. O teor de crisina é de 0,10 mg/kg em mel de melada, 5,3 mg/kg em méis florestais, e chega a 28g/L no própolis (Hadjmohammadi et al., 2010; Pichichero et al., 2010). Outra importante fonte de crisina é a planta *Passiflora caerulea*, da qual foi isolada em 1990 e apresentada como um composto com propriedades anticonvulsivantes (Medina et al., 1990). Quanto à *Passiflora caerulea*, é uma espécie do gênero *Passiflora* abundante e de fácil acesso na América do Sul, ocorrendo em campos, beiras de estradas e bordas de florestas (Mondin et al., 2011), e é considerada uma planta ornamental comestível que possui fruto adocicado. Embora seja raramente utilizada para consumo com fins alimentícios ou medicinais na maioria dos países em que é encontrada, folhas de *Passiflora caerulea* são comercializadas como erva para infusão na Argentina, com a alegação de possuírem efeito ansiolítico (Minteguiaga et al., 2021).

Embora os estudos sobre *Passiflora caerulea* sejam escassos, já se sabe que suas folhas contém o flavonoide crisina (Medina et al., 1990; El-Askary et al., 2017), e possuem potencial bioativo promissor (Ozarowski et al., 2018). Assim, estabelecer um método analítico que quantifique os níveis de crisina nas folhas de *Passiflora caerulea* pode ser um grande passo para avanços nos estudos deste produto natural. Além disso, é interessante analisar o teor de crisina e o potencial bioativo das demais partes da planta, que são a polpa e a casca, que ainda não foram estudadas.

ANÁLISE

Em relação à análise de crisina em matrizes vegetais, uma etapa importante é a preparação da amostra, que geralmente consiste em uma etapa que requer várias horas e/ou alto consumo de energia para execução. Gharari et al. (2020) mostraram a determinação de crisina em raízes e parte aérea de quatro espécies de *Scutellaria*, com secagem do material em temperatura ambiente e moagem seguidas de 48h de extração com metanol. Em seguida, o extrato foi armazenado a 4°C por 48h antes da injeção no sistema HPLC. Hadas et al. (2017) e Ozarowski et al. (2018) avaliaram o perfil químico de folhas de *Passiflora caerulea* e, para isso, as folhas foram secas com circulação de ar (25°C, 24h), e posteriormente extraídas com metanol por 1h (n=3) e concentradas sob vácuo. Portanto, é necessário buscar alternativas mais rápidas, que também tenham baixo custo e impacto ambiental. Além disso, ainda não existem métodos validados para quantificação da crisina em outras matrizes vegetais.

Procurando reduzir custos, tempo e impacto ambiental na análise de compostos fenólicos, têm sido demonstradas adaptações do método QuEChERS para a quantificação destes compostos em diferentes matrizes. O QuEChERS foi apresentado em 2003, por Anastassiades et al., com o objetivo de minimizar o manuseio de amostras, o tempo e melhorar as recuperações para determinação de pesticidas em matrizes alimentares. O método QuEChERS compreende uma etapa de extração/partição e uma etapa de limpeza, que proporcionam a extração dos compostos da amostra para um solvente orgânico apropriado por meio de extração com sais, onde é promovido um equilíbrio entre uma camada aquosa e uma orgânica, seguida de etapa de limpeza por extração dispersiva em fase sólida (d-SPE), para remoção de pigmentos ou interferentes (Rotta et al., 2019). Estudos recentes relataram o uso bem sucedido do método QuEChERS para determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes alimentares (Rotta et al., 2019; Nicácio et al., 2021). Porém, esta metodologia ainda não foi aplicada para a análise da crisina em nenhuma matriz. Além dos benefícios relacionados ao baixo custo e rapidez do método, a possibilidade do uso do QuEChERS para análise de crisina destaca-se pela existência da etapa de limpeza, que diminui substancialmente o potencial de dano ao sistema cromatográfico causado por pigmentos e interferentes. Observe-se que esta etapa de limpeza não ocorre nas metodologias já citadas na literatura para análise de crisina. Em relação à quantificação de crisina, Gharari et al. (2020) apresentaram um método analítico determinando crisina e outros compostos em plantas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), em 262nm, coluna C8, usando metanol como solvente e água-acetonitrila-metanol-ácido orfofosfórico (60:38:30:1 v/v/v/v) como fase móvel. Oroian et al. (2017) demonstraram a determinação de crisina e outros flavonoides em mel por HPLC, com detector UV na faixa de 200 a 210nm, coluna C18, utilizando acetonitrila-água (48:52 v/v) como eluente. Giacomeli et al. (2020) quantificaram crisina em nanocápsulas lipídicas através de HPLC, com detector UV em 260nm, coluna RP-18, usando acetonitrila/água (70:30 v/v) como fase móvel. Desta forma, o uso de HPLC-DAD é uma excelente escolha para análise de crisina, pois fornece limites de quantificação (LOQs) baixos, análise simples e de baixo custo (Gharari et al., 2020; Oroian et al., 2017; Giacomeli et al., 2020). O método QuEChERS tem sido utilizado com sucesso para determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes alimentares, como frutas, vegetais, ervas, especiarias, mel e bebidas (Rotta et al., 2019; Nicácio et al., 2021).

A referida técnica se destaca por ser de excelência analítica na quantificação de diversos compostos, inclusive os flavonoides como a crisina, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Como já citado o uso de HPLC-DAD permite alcançar limites de quantificação extremamente baixos, o que para matrizes alimentares que possuem baixas concentrações dos analitos é crucial. Corroborando com isto, pesquisas recentes tem demonstrado que o uso do HPLC-DAD além de apresentar confiabilidade e versatilidade na identificação de componstos fenólicos de diversas matrizes, possui baixo custo operacional, o que evidencia

a importância do seu uso na pesquisa, segurança e controle de qualidade alimentar (Bueno-Herrera et al., 2020, Kebal et al., 2022 e Rahman et al., 2022).

Utilizando espectrofotômetro UV-Vis, é possível identificar a absorvância para análise de crisina. A varredura foi realizada entre 190 e 1100 nm, e o comprimento de onda com absorvância máxima adotado para análise da crisina foi 265 nm. O método QuEChERS pode ser considerado eficiente principalmente, por causa da etapa de limpeza do extrato. Em comparação com método disponível na literatura para análise de crisina em vegetais apresentado por Gharari et al. (2020) - 48h de extração com metanol seguida de filtração e injeção no sistema - o método QuEChERS não é apenas eficiente, mas também significativamente mais rápido.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliando os métodos comumente utilizados para quantificação de crisina (Gharari et al., 2020), é possível identificar o potencial promissor na utilização do método QuEChERS na identificação e quantificação de compostos fenólicos, principalmente devido a etapa de limpeza. Este processo de limpeza da amostra diminui os danos ao sistema cromatográfico e por tanto pode apresentar maior rapidez em análises complexas, como matrizes vegetais. Além disso, o método destaca-se pela possibilidade de ser aplicado a muitos laboratórios de análises de HPLC, uma vez que em muitos casos o detector DAD é a única opção disponível em decorrência do seu baixo custo. Além das questões relacionadas a custo, tempo e impacto ambiental, o método QuEChERS apresenta excelente versatilidade, possibilitando, com algumas adaptações, realizar preparação de amostras em matrizes diferentes.

Embora naturalmente abundante, de fácil acesso e com um interessante conteúdo bioativo potencial, esta espécie de *Passiflora* é subutilizada. Dessa forma, estudos sobre a quantidade de crisina e outros compostos se torna muito importante para apoiar mais formas de inclusão em alimentos e/ou formulações nutracêuticas. Além disso, avaliar os níveis de crisina nas folhas, verdes e maduras polpa e casca verde e madura é uma forma importante de observar a distribuição deste flavonóide na planta e o comportamento da crisina no processo de maturação.

REFERÊNCIAS

Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce.** Journal of aoac international, 2, 412-431, 2003.

Bae, Y.; Lee, S.; Kim, S. H. **Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-kappab.** Toxicology and applied pharmacology, 254, 56-64, 2011.

Borges Filho, B.; Jesse, C. R.; Donato, F.; Del Fabbro, L.; Gomes, M. G. De; Goes, A. T. R.; Souza, L. C.; Boeira, S. P. **Chrysin promotes attenuation of depressive-like behavior and hippocampal dysfunction resulting from olfactory bulbectomy in mice.** *Chemico- biological interactions*, 260, 154-162, 2016b.

Borges Filho, B.; Jesse, C. R.; Donato, F.; Del Fabbro, L.; Gomes, M. G. De; Goes, A. T. R.; Souza, L. C.; Giacomeli, R.; Antunes, M.; Luchese, C.; Roman, S. S.; Boeira, S. P. **Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice.** *European journal of pharmacology*, 791, 284-296, 2016a.

Borges Filho, C.; Jesse, C. R.; Donato, F.; Giacomeli, R.; Del Fabbro, L.; Antunes, M. Da S.; Gomes, M. G. De; Goes, A. T. R.; Boeira, S. P.; Prigol, M.; Souza, L. C. **Chronic unpredictable mild stress decreases bdnf and ngf levels and Na⁺,K⁺-atpase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin.** *Neuroscience*, 289, 367-80, 2015.

Bortolotto, V. C.; Pinheiro, F. C.; Araujo, S. M.; Poetini, M. R.; Bertolazi, B. S.; Paula, M. T. De; Meichtry, L. B.; Almeida, F. P. De; Couto, S. De F.; Jesse, C. R.; Prigol, M. **Chrysin reverses the depressive-like behavior induced by hypothyroidism in female mice by regulating hippocampal serotonin and dopamine.** *European journal of pharmacology*, 822, 78-84, 2018.

Bueno-Herrera, M.; Pérez-Magarino, S. **Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD.** *Journal of cereal science*, 93, 2020.

El-Askary, H. I.; Haggag, M. Y.; Abou-Hussein, D. R.; Hussein, S. M.; Sleem, A. A. **Bioactivity-guided study of passiflora caerulea l. leaf extracts.** *Iranian journal of pharmaceutical research*, 16, 46-57, 2017.

Gharari, Z.; Bagheri, K.; Danafar, H.; Sharafi, A. **Simultaneous determination of baicalein, chrysin and wogonin in four iranian scutellaria species by high performance liquid chromatography.** *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 16, 2020.

Giacomeli, R.; Gomes, M. G. De; Reolon, J. B.; Haas, S. E.; Colomé, L. M.; Jesse, C. R. **Chrysin loaded lipid-core nanocapsules ameliorates neurobehavioral alterations induced by β -amyloid1-42 in aged female mice.** *Behavioural brain research*, 390, 2020.

Hadas, E.; Ozarowski, M.; Derda, M.; Thiem, B.; Cholewinski, M.; Skrzpczak, L.; Gryszczynska, A.; Piasecka, A. **The use of extracts from passiflora spp. in helping the treatment of acanthamoebiasis.** *Acta poloniae pharmaceutica-drug research*, 74, 921-928, 2017.

Hadjmohammadi, M. R.; Nazari, S. S. **Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design.** *Journal of separation science*, 33, 3144-3151, 2010.

Kebal, L.; Pokajewicz, K.; Djebli, N.; Mostefa, N.; Poliwoda, A.; Wieczored, P. P. **HPLC-DAD profile of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of ficus carica l. fruits from two algerian varieties.** *Biomedicine and pharmacotherapy*, 155, 2022.

Maher, P. **The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases.** *International journal of molecular sciences*, 20, 12, 2019.

Medina, J. H.; Paladini, A. C.; Wolfman, C.; Stein, M. L. De; Calvo, D.; Diaz, L. E. et al. **Chrysin (5,7-Di-oh-Flavone), A naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsivant properties.** *Biochemical pharmacology*, 40, 2227-2231, 1990.

Minteguiga, M.; Wallace, F.; Basile, P.; Ferreira, F.; Olivaro, C.; Dellacassa, E. **Passiflora caerulea L. in: medicinal and aromatic plants of south america.** Vol. 2: Argentina, Chile And Uruguay, 411-427, 2021.

Mondin, C. A.; Cervi, A. C.; Moreira, G. R. P. **Sinopse das espécies de passiflora L. (passifloraceae) do Rio Grande Do Sul, Brasil.** *Revista brasileira de biociências*, 9, 3-27, 2011.

Nabavi, S. F.; Braidy, N.; Habtemariam, S.; Orhan, I. E.; Daglia, M.; Manaiy, A.; Gortzi, O.; Nabavi, S. **Neuroprotective effects of chrysin: from chemistry to medicine.** *Neurochemistry international*, 90, 224-231, 2015.

Naczk, M.; Shahidi, F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** *Journal of chromatography A*, 1054, 95-111, 2004.

Nicácio, A. E.; Rodrigues, C. A.; Visentainer, J. V.; Naldaner, L. **Evaluation of the quechers method for the determination of phenolic compounds in yellow (brassica alba), brown (brassica juncea), and black (brassica nigra) mustard seeds.** *Food Chemistry*, 340, 2021.

Oroian, M.; Sorina, R. **Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds.** *Computers and electronics in agriculture*, 138, 148-156, 2017.

Ozarowski, M.; Piasecka, A.; Paszel-Jaworska, A.; Chaves, D. S. De A.; Romaniuk, A.; Rybczynska, M.; Gryszczynska, A.; Sawikowska, A.; Kachlicki, P.; Mikolajczak, P. L.; Seremak-Mrozikiewicz, A.; Klejewski, A.; Thiem, B. **Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of passiflora incarnata, p. caerulea and p. alata and in vitro cytotoxic potential on leukemia cell lines.** *Revista brasileira de farmacognosia*, 28, 2, 2018.

Pichichero, E.; Cicconi, R.; Mattei, M.; Canini, A. **Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and bax activation in B16-F1 And A375 melanoma cells.** *International journal of oncology*, 38, 473-483, 2011.

Pushpavalli, G.; Kalaiarasi, P.; Veeramani, C.; Pugalendi, K. V. **Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatitis in rats.** *European journal of pharmacology*, 631, 36-41, 2010.

Rahman, M. M.; Abdullah, A. T. M.; Sharif, M.; Jahan, S.; Kabir, M. A.; Motolab, M.; Khan, T. A. **Relative evaluation of in-vitro antioxidant potential and phenolic constituents by hplc-dad of brassica vegetables extracted in different solvents.** *Heliyon*, 10, 2022.

Rotta, E. M.; Rodrigues, C. A.; Jardim, I. C. S. F.; Maldaner, L.; Visentainer, J. V. **Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (passiflora spp.) using a modified quechers method and uhplc-ms/ms.** *LWT*, 100, 397-403, 2019.

Sequeto, P. L. **Efeitos dos flavonoides naringina, crisina e ghesperidina e do extrato hidroalcoólico de helianthus annuus na carcinogênese experimental do cólon.** Tese (Doutorado em bioquímica agrícola). Universidade Federal De Viçosa. Viçosa. 185p. 2012.

Talebi, M.; Farkhondeh, T.; Kopustinskiene, D. M.; Gandara, J. S.; Bernatoniene, J.; Samarghandian, S. **An updated review on the versatile role of chrysin in neurological diseases: chemistry, pharmacology, and drug delivery approaches.** Biomedicine & pharmacotherapy, 141, 2021.

Villar, I. C.; Jimenez, R.; Galisteo, M.; Garcio-Saura, M. F.; Zarzuelo, A.; Luarte, J. **Effect of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats.** Planta Medica, 68, 845-847, 2002.

Zarzecki, M. S.; Araujo, S. M.; Bortolotto, V. C.; De Paula, M. T.; Jesse, C. R.; Prigol, M. **Hypolipidemic action of chrysin on triton wr-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice.** Toxicology Reports, 1, 200-208, 2014.