

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”

BRASÍLIA, 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

**“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientadora: Dâmaris Silveira

Co-Orientadora: Pérola de O. Magalhães

BRASÍLIA
2016

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Dâmaris Silveira (presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Yris Maria Fonseca Bazzo
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luis Alberto Simeoni
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Yanna Karla de M Nóbrega
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a. Dr.^a. Claudia Masrouah Jamal
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo

Dr.^a. Paloma Michelle de Sales (suplente)
Laboratório Centra de Saúde Pública, SES-DF

Dedico este trabalho à minha pequena Sofia que veio trazendo alegria e graça para nossas vidas, ao meu amado filho e amigo Rafael e ao meu esposo Janio pelo apoio e compreensão em todo tempo!

AGRADECIMENTOS

À professora Dâmaris Silveira, pela orientação, amizade, aprendizado e estímulo constante, além da compreensão e apoio que me foram extremamente importantes.

À professora Pérola Magalhães pela co-orientação e atenção a mim concedida nos momentos de dúvidas.

Aos professores, Christopher Fagg e Sueli Maria Gomes, pelo empenho e colaboração, principalmente na coleta e identificação das espécies estudadas e fornecimento do material botânico.

À professora Inês Sabioni Resck, Instituto de Química, pelo auxílio na execução dos ensaios de RMN e pela atenção a mim concedida.

Aos professores Luiz Alberto Simeoni e Yris Fonseca pelos ensinamentos, apoio, amizade e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica Thais Leite Viana, Caio Fernandes M. Leite e Bruno Henrique M. Leite pela colaboração na parte experimental deste trabalho, pela dedicação e compromisso.

A todos os servidores que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, em especial para Patrícia Marques pela colaboração e auxílio nas atividades desenvolvidas no LCQ.

Às amigas, Cintia Matos e Paloma Michelle, pela amizade e incentivo construtivo.

Ao meu esposo, Janio Donato, que mais uma vez dispensou toda a sua compreensão, incentivo, dedicação e apoio constantes que me fazem vencer barreiras e ultrapassar obstáculos.

Às minhas irmãs, exemplos para minha vida e eternas incentivadoras.

Aos meus pais (*in memoriam*) pelos princípios e ensinamentos que levo para toda à vida.

A Deus, autor de minha vida e de minha fé, meu refúgio e fortaleza, pela minha vida e por tudo o que sou.

Ao CNPq, FUNPE, FINATEC e FAP-DF pelo suporte financeiro.

*“Pois quando a sabedoria entrar no teu coração e o
conhecimento for agradável a tua alma, o
discernimento te guardará e a inteligência te
preservará”.*
Pv 2:10-11

RESUMO

O Cerrado se constitui em importante centro de biodiversidade abrigando espécies úteis para a medicina popular., entre elas o *Erythroxylum suberosum*, arbusto da família Erythroxylaceae amplamente distribuído no território nacional. Seus frutos servem de alimento para aves, seu tronco é suberoso, sua madeira é utilizada na carpintaria e suas cascas são utilizadas no curtimento de couro. É conhecido como fruta-de-pomba-do-campo, mercureiro, sombra de touro e cabelo de nego, utilizado na medicina popular contra má digestão, reumatismo e inflamação. O presente estudo teve como objetivo realizar estudo químico, de espécie do gênero *Erythroxylum*, biomonitorado por inibição da hialuronidase. No ensaio de inibição enzimática foi utilizado método turbidimétrico, com adaptações. Os compostos foram isolados por CC de Sílica gel ou Sephadex e identificados por CCD, CLAE-DAD, e RMN de ^1H e ^{13}C . O extrato etanólico de *E. suberosum* apresentou forte potencial de inibição com $\text{IC}_{50} = 0,045 \text{ mg/mL}$, significativamente menor que o controle cromoglicato dissódico ($\text{IC}_{50} = 4,8 \text{ mg/mL}$). Do extrato etanólico foram identificados rutina, quercetina e derivados, catequina, epicatequina e derivados do ácido clorogênico e isolada mistura de hiperosídeo e isoquercitrina. Do extrato aquoso foi identificada mistura de frutose e trealose, catequina e epicatequina, e isolada a rutina. Do extrato hexânicos foram isolados ésteres alifáticos de cadeia longa. A atividade dos extratos e frações frente à enzima foi justificada, em parte, pela presença da quercetina ($\text{IC}_{50} = 0,36 \text{ mg/mL}$). A atividade antioxidante observada para os extratos aquoso, etanólico e frações foi relacionada à composição micromolecular dos mesmos. Os extratos brutos de *E. suberosum* não foram citotóxicos frente às larvas de *A. salina* com $\text{DL}_{50} > 1\text{mg/mL}$. Esses resultados revelam o potencial de *E. suberosum* no elenco de espécies brasileiras farmacologicamente úteis. A descoberta de novos inibidores da hialuronidase representam um avanço na terapêutica já que o complexo hialuronano-hialuronidase está envolvido em vários processos fisiopatológicos. Esse foi o primeiro relato, pelo que se sabe, de inibição da hialuronidase pelos extratos e flavonoides isolados das folhas de *E. suberosum*.

Palavras-chave: *Erythroxylum suberosum*; hialuronidase; flavonoides; Cerrado.

ABSTRACT

Cerrado consists in an important center of biodiversity hosting species useful for folk medicine, among which is *Erythroxylum suberosum*, a bush from Erythroxylaceae family, widely spread throughout the national territory. Its fruits serve as food to birds; its trunk is suberous, its wood is used in carpentry, and its barks are used in leather tanning. It is well known as *fruta-de-pomba-do-campo*, *mercureiro*, *sombra de touro* and *cabelo de nego*, used in folk medicine against indigestion, rheumatism, and inflammation. The current study aimed to carry out a chemical study of species of *Erythroxylum* genus bioguided by inhibition of hyaluronidase enzyme. In the enzyme inhibition assay was used the turbidimetric method, with adaptations. The compounds were isolated by Sílica gel or Sephadex® CC and identified by TLC, HPLC-DAD, and NMR of ¹H and ¹³C. The ethanolic extract of *E. suberosum* presented high potential for inhibition with IC₅₀ = 0,045 mg/mL, significantly less than the disodium cromoglycate control (IC₅₀ = 4,8 mg/mL). From the ethanolic extract were identified rutin, quercetin, and derivatives, catechin, epicatechin and derivatives of chlorogenic acid; moreover, a mixture of hyperoside and isoquercitrin was isolated from the same extract. Rutin was isolated from aqueous extract, as well as were identified a mixture of fructose and trehalose, catechin and epicatechin. From the hexane extract were isolated aliphatic esters of long chain. The activity of the extracts and fractions in the enzyme hyaluronidase was justified, in part, due to the presence of quercetin (IC₅₀ = 0,36 mg/mL). The observed aqueous, and ethanolic extracts and fractions antioxidant activity, by , was associated to the chemical composition of these mixtures. The crude extracts of *E. suberosum* were not cytotoxic to brine shrimp (*A. salina*) with LD₅₀ > 1mg/mL. These results show the potential of *E. suberosum* as a pharmacologically useful Brazilian species. The discovery of new hyaluronidase inhibitors represents an advance for the therapeutic, due to the hyaluronan-hyaluronidase complex is involved in several patho-physiological processes. This was the first report, by what is known, about the inhibition of hyaluronidase enzyme by extracts and flavonoids isolated from the leaves of *E. suberosum*.

Keywords: *Erythroxylum suberosum*; hyaluronidase, flavonoids; *Cerrado*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971)	30
Figura 2 - Representação esquemática para o processo de obtenção dos extratos brutos de espécies do gênero <i>Erythroxyllum</i>	49
Figura 3 - Representação esquemática de partição líquido – líquido do extrato tanólico bruto das folhas de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	52
Figura 4 - Perfil cromatográfico em CCD para as subfrações de FHM (1 a 18)	53
Figura 5 - Representação esquemática da determinação da atividade de inibição sobre a hialuronidase	59
Figura 6 - IC ₅₀ : ácido elágico, quercetina, ácido rosmarínico; e DSCG frente à hialuronidase	64
Figura 7 - Curvas de dose e resposta para os extratos brutos de <i>Erythroxyllum</i> frente à hialuronidase	67
Figura 8 - IC ₅₀ : extratos brutos de <i>Erythroxyllum</i> em comparação ao controle DSCG frente à hialuronidase	68
Figura 9 – Inibição (%) da hialuronidase para o extrato etanólico bruto e frações de <i>E. suberosum</i>	69
Figura 10 – Inibição (%) da hialuronidase por subfrações de FHM	69
Figura 11 – IC ₅₀ para ESE02 em comparação com EEESflh, DSCG e Quercetina frente à hialuronidase	71
Figura 12 – Núcleo fundamental dos flavonoides	72
Figura 13 - Perfil cromatográfico (CCD) padrões comerciais, extratos e frações de <i>Erythroxyllum suberosum</i>	73
Figura 14 – Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEESflh) por CLAE-DAD em 354 nm	75
Figura 15 – Espectros no UV para o pico 1 (tR = 27,12 min) exibidos no cromatograma de EEESflh em 354 nm	75
Figura 16 - Cromatograma do extrato EEESflh em CLAE-DAD (280 nm)	76
Figura 17 - Cromatograma da fração FHM por CLAE-DAD em 280 nm	77
Figura 18 - Cromatograma da fração FHM em 354 nm por CLAE-DAD	78
Figura 19 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 9,15 min), 2 (tR = 14,95 min), 3 (tR = 28,43 min), 4 (tR = 28,96 min) e 5 (tR = 30,84 min) exibidos no cromatograma de FHM em 354 nm	79

Figura 20 - Cromatograma da fração FDCM por CLAE-DAD a 354 nm	80
Figura 21 – Espectros no UV para os picos 6 (tR = 28,43 min), 7 (tR = 29,98 min), 8 (tR = 30,85 min) e 10 (tR = 47,17 min) exibidos no cromatograma da fração FDCM em 354 nm	80
Figura 22 - CCD de ESE02, extratos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	81
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE 02 (300 MHz, MeOD ₄)	82
Figura 24 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE02 - Expansão da região entre δ0 e δ5,8 (300 MHz, MeOD ₄)	82
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE02 - Expansão da região entre δ6,2 e δ8,0 (300 MHz, MeOD ₄)	83
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹³ C de ESE 02 (75 MHz, MeOD ₄)	83
Figura 27 - Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm	85
Figura 28 – Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm com adição de padrões	85
Figura 29 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 28,43 mi.), 2 (tR = 29,02 min) e 3 (tR = 30,85 min) exibidos no cromatograma de ESE02 em 354 nm	86
Figura 30 – Espectros no UV para os picos 1 (tR=9,25 min), 2 (tR=14,30 min) e 3 (tR=15,19 min) apresentados nos cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm	88
Figura 31 – Cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm	89
Figura 32 – Cromatogramas de FHM5 e FHM por CLAE-DAD	91
Figura 33 – Espectros no UV para os picos 4 (tR = 22,30 min), 5 (tR = 22,62 min), b (tR = 26,70 min) e pico 6 (tR = 27,38 min) apresentados nos cromatogramas de FHM5 e FHM6 em 354 nm	92
Figura 34 – Cromatograma de FHM9 (A) e FHM10 (B) por CLAE – DAD em 354 nm	93
Figura 35 – Espectros no UV para os picos c (tR = 28,74 min), e (tR = 31,17 min), f (tR = 32,07 min) e g (tR = 33,05 min) exibidos nos cromatogramas de FHM9 e FHM10 em 354 nm	94
Figura 36 - Cromatograma de FHM9 por CLAE-DAD em 354 nm coeluído com padrões	95
Figura 37 - Cromatograma de FHM14 por CLAE-DAD em 354 nm	96

Figura 38 – Cromatograma de FHM14 por CLAE_DAD em 354 nm com adição de padrão	96
Figura 39 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-IR: mistura frutose (tR = 7,25 min) e trealose (tR = 14,97 min)	99
Figura 40 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-DAD em 354nm	100
Figura 41 - Cromatograma do extrato aquoso (EAES) por CLAE-DAD em 280 nm	101
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE04 - Expansão da região entre δ1,0 e δ5,5 (300 MHz, MeOD ₄)	102
Figura 43 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE04 - Expansão da região entre δ6,2 e δ8,2 (300 MHz, MeOD ₄)	103
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹³ C de ESA04 (75 MHz, MeOD ₄)	103
Figura 45 - Espectro de RMN de ¹ H (A) (300 MHz, MeOD ₄) e de ¹³ C (B) (75 MHz, MeOD ₄) - do padrão rotina ESA04	104
Figura 46 - Espectro de RMN de ¹ H de ESH (05, 06, 08, 09 e 13) – Expansão da região entre δ0,85 e δ4,1 (300 MHz, CDCl ₃)	108
Figura 47 - Espectro de RMN de ¹³ C de ESH (05,06,08, 09 e 13) (75 MHz, CDCl ₃)	109
Figura 48 – Características estruturais atribuídas à atividade antioxidante dos flavonoides	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição para análise por CLAE-DAD na detecção de flavonoides	39
Tabela 2 – Dados de coleta, identificação e extração das espécies de <i>Erythroxylum</i>	47
Tabela 3 – Rendimentos dos extratos brutos das partes aéreas de <i>Erythroxylum</i>	48
Tabela 4 - Frações do extrato etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> – CC - Sílica gel	60
Tabela 5 – Frações de FHM – (CC) Sephadex® LH-20	53
Tabela 6 – Inibição (%) da hialuronidase por compostos fenólicos e DSCG	60
Tabela 7 - Inibição (%) da hialuronidase por extratos brutos de espécies de <i>Erythroxylum</i> , DSCG e quercetina	65
Tabela 8 - Estudo farmacognóstico preliminar (CCD) dos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	72
Tabela 9 - Deslocamentos químicos para ESE02 em RMN de ¹³ C (75 MHz, MeOD ₄) comparados com os dados da literatura	84
Tabela 10 - Deslocamentos químicos para ESA04 em RMN de ¹³ C (δ, CD ₃ OD, 75MHz) em comparação com dados da literatura e padrão rutina	104
Tabela 11 - Teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	110
Tabela 12 - Capacidade antioxidante total dos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ABS Absorbância

AcOEt Acetato de Etila

ACG Ácido Clorogênico

BTH Hialuronidase Testicular Bovina

BSA Soroalbumina bovina

CC Cromatografia em Coluna

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CDCI₃ Clorofórmio deuterado

CQA Ácidos Cafeiolquínicos

CFQA Ácidos Cafeiol-feruloilquínicos

IC₅₀ Concentração Inibitória Mediana

CL₅₀ Concentração Letal Mediana

CLAE-DAD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos

CTAB Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

d duplete

dd duplete duplo

DMSO Dimetilsulfóxido

DSCG Cromoglicato dissódico

EAG Equivalentes de ácido gálico

EAESflh Extrato Aquoso Bruto das folhas de *E. suberosum*

ECA Enzima Conversora de Angiotensina

EEESflh Extrato Etanólico Bruto das folhas de *E. suberosum*

EHESflh Extrato Hexânico Bruto das folhas de *E. suberosum*

EQ Equivalentes de Quercetina

FE Fase Estacionária

FDCM Fração Diclorometano

FH Fração Hexânica

FHM Fração Hidrometanólica

FM Fase Móvel

ROS *Reactive Oxygen Species* (Espécie Reativa do Metabolismo do Oxigênio)

EtOH Etanol

HA Ácido Hialurônico

Hex Hexano

HPLC *High-performance liquid chromatography*

ICAM-1 Molécula de adesão intercellular-1

J Constante de acoplamento de ^1H

m Multiplete

MeCN Acetonitrila

MeOD₄ Metanol deuterado

MeOH Metanol

MHz MegaHertz

PEG Polietilenoglicol

q.s.p quantidade suficiente para

RMN de ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s simpleto

SNC Sistema Nervoso Central

SUS Sistema Único de Saúde

t Tripleto

TMS Tetrametilsilano

δ Deslocamento químico

λ Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 BIOMA CERRADO	20
1.2 ERYTHROXYLACEAE E O GÊNERO <i>Erythroxyllum</i>	22
1.3 ÁCIDO HIALURÔNICO (HA)	27
1.4 HIALURONIDASES	29
1.5 INIBIDORES DE HIALURONIDASE	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MÉTODOS GERAIS	36
3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
3.1.1.1 Fase Estacionária (FE)	36
3.1.1.2 Eluentes (FM)	36
3.1.1.3 Reveladores	36
3.1.2 Cromatografia em Coluna	38
3.1.2.1 Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck®	38
3.1.2.2 Exclusão em gel Sephadex®	38
3.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	39
3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
3.1.4 Determinação de Fenólicos Totais	40
3.1.5 Determinação de Flavonoides Totais	41
3.1.6 Avaliação da Atividade Antioxidante	42
3.1.7 Toxicidade a Larvas de <i>Artemia salina</i>	43
3.1.8 Ensaio de Inibição Enzimática	43
3.1.8.1 Condições do Ensaio	45
3.1.8.2 Determinação da Porcentagem de Inibição Enzimática e do IC ₅₀ .	46
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	47
3.2.1 Material Vegetal: Coleta e Identificação	47
3.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos	47
3.2.3 Caracterização Farmacognóstica por CCD	49

3.2.4 Estudo Químico do Extrato Etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EEESflh)	49
3.2.4.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60	50
3.2.4.2 Partição Líquido-Líquido	51
3.2.4.3 Cromatografia em Coluna (CC) - Sephadex (Fração FHM)	52
3.2.4.4 Monitoramento por CLAE - DAD	54
3.2.5 Estudo Químico do Extrato Aquoso de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EAESflh)	54
3.2.5.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sephadex®	54
3.2.5.2 Monitoramento por CLAE-DAD e CLAE-IR	54
3.2.6 Estudo Químico do Extrato Hexânico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EHESflh)	55
3.2.6.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE	58
4.1.1 Cromoglicato Dissódico (DSCG) e Compostos Fenólicos	58
4.1.2 Extratos Brutos de Espécies de <i>Erythroxylum</i> (screening)	64
4.1.3 Frações do Ext. Etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EEESflh)	68
4.3 ESTUDO QUÍMICO DOS EXT. BRUTOS DE <i>Erythroxylum suberosum</i>	71
4.3.1 Caracterização Farmacognóstica por CCD	71
4.3.2 Constituintes Químicos no Ext. Etanólico e Frações (FHM e FDCM)	74
4.3.2.1 Rutina	74
4.3.2.2 Catequina, Epicatequina e Derivados	76
4.3.2.3 Ácidos Clorogênicos (ACGs)	77
4.3.2.4 Mistura de Hiperosídeo e Isoquercitrina	77
4.3.2.5 Quercetina e Derivados	78
4.3.2.6 ESE02	81
4.3.2.7 Constituintes Químicos nas Subfrações de FHM	87
4.3.2.7.1 Ácidos Clorogênicos (ACGs)	87
4.3.2.7.2 Mistura de Hiperosídeo, Isoquercitrina e Derivados	90
4.3.2.7.3 Quercetina	95
4.3.3 Constituintes Químicos no Extrato Aquoso (EAESflh)	98
4.3.3.1 Mistura de Açúcares: Frutose e Trealose	98
4.3.3.2 Rutina	99

4.3.3.3 Catequina e Epicatequina	100
4.3.3.4 ESA04	101
4.3.4 Constituintes Químicos no Extrato Hexânico (EHESflh)	107
4.3.4.1 Ester Alifático de Cadeia Longa (ESH05, 06, 08, 09 e 13)	107
4.4 ENSAIOS COMPLEMENTARES DE ATIVIDADE FUNCIONAL E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Erythroxylum suberosum</i>	109
4.4.1 Teor de Fenólicos e Flavonoides Totais	109
4.4.2 Atividade Antioxidante	110
4.4.3 Toxicidade a Larvas de <i>Artemia salina</i>	113
5 CONCLUSÃO	114
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

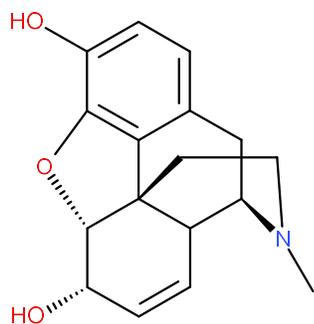
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

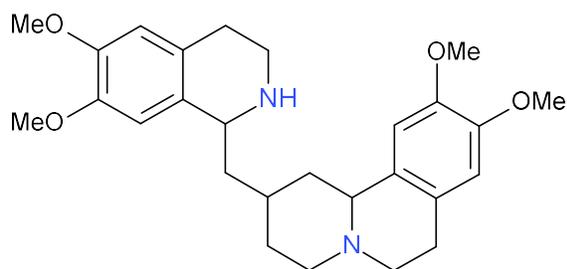
O uso de vegetais com fins terapêuticos acompanha a própria existência humana. O homem primitivo buscou na natureza soluções para satisfazer suas necessidades e dessa relação nasceu um conhecimento que evoluiu através dos tempos, passando pelas gerações, e sendo utilizado, atualmente, como base referencial primária para pesquisas de novos fármacos a partir de plantas (1, 2).

As bases da Fitoterapia encontram-se na Medicina Chinesa e Ayurvédica com relatos do uso de plantas como remédios que remontam a 2500 anos a.C. A antiga civilização egípcia já possuía informações sobre plantas medicinais, preservadas no papiro de Ebers (3), que descreveu um número significativo de doenças e os medicamentos, de origem vegetal ou animal, que poderiam ser empregados para tratá-las. Embora a medicina egípcia se apoiasse em elementos mágicos e religiosos, é sabido que já eram utilizados vegetais como o sene, o zimbros, as sementes do linho, o funcho e o rícino, além de outras plantas (4, 5).

O isolamento da morfina **(1)** de *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos em plantas (6). Alguns fármacos potentes foram então descobertos e muitos deles têm usos consagrados na terapêutica atual. Joseph Pelletier, farmacêutico francês, descreveu em 1817, o isolamento da emetina **(2)**, a partir da *Cephaelis ipecacuanha*, considerada um poderoso emético e expectorante em doses menores (7, 8).



(1)



(2)

No cenário atual, o uso de plantas medicinais tem se tornado um hábito por parte da população mundial, que busca nas preparações fitoterápicas ou nas plantas *in natura* uma alternativa mais segura e econômica para tratar suas enfermidades. A medicina tradicional baseada em plantas representa a principal, e talvez a única forma de acesso aos cuidados primários de atenção à saúde para 4,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (9).

O Brasil segue essa tendência mundial, incentivando o emprego de práticas complementares nos programas de atenção à saúde. Para isso implantou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, importantes diretrizes à pesquisa e ao desenvolvimento do uso de plantas medicinais e seus derivados (10). Além disso, foi lançada em 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais, com 71 plantas já utilizadas para fins terapêuticos, para orientar estudos e pesquisas que subsidiassem a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso seguro e eficaz por parte da população (11).

Estima-se que existam mais de 250 mil espécies de plantas superiores em todo o mundo, das quais, apenas uma pequena porcentagem tem sido exaustivamente estudada pelo seu potencial como fonte de novas moléculas (12). Entretanto, grande parte das plantas medicinais comercializadas no mundo são colhidas de forma indiscriminada e correm o risco de serem extintas (9). O Brasil com, aproximadamente, 50 mil espécies de plantas das quais 43% são endêmicas do território nacional, é o maior centro de biodiversidade vegetal no mundo, seguido por China, Indonésia, México e África do Sul (13), e celeiro para pesquisa e desenvolvimento nas áreas de Botânica, Química, Biologia, Farmacologia, Toxicologia e muitas outras.

1.1 BIOMA CERRADO

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma da América do Sul, com uma grande diversidade de espécies medicinais. Ocupa cerca de 22% território nacional com abrangência desde o Amapá e Roraima até o Paraná. Está localizado em sua maior extensão no Planalto Central principalmente no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Nessa região encontram-se nascentes das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, resultando em um elevado potencial aquífero que favorece sua biodiversidade (14-16).

É reconhecido como a savana mais rica do mundo, responsável por grande parte da biodiversidade mundial, abrigando mais de 11 mil espécies de plantas catalogadas. Destas, 220 encontram uso medicinal pelas populações nativas e 416 espécies podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento e proteção contra a erosão (15).

Sua vegetação está sob forte influência da sazonalidade, ocasionada em parte pela grande extensão territorial desse bioma, bem como pela ação de queimadas nas estações mais secas do ano. Grandes áreas do Cerrado têm sido destruídas dando lugar a pastagens e plantações de soja, milho e cana-de-açúcar (17), para produção de etanol ou outro biodiesel. Tal cenário tem contribuído para a destruição acelerada da vegetação natural e conversão de cerca de 80% do bioma Cerrado em áreas atóricas (18-20).

Apesar de possuir tanta riqueza, esse bioma está seriamente comprometido, constituindo uma das regiões com maiores riscos de extinção de espécies do planeta, e é considerado um *hotspot* mundial, ou seja, área de conservação prioritária, devido à ameaça de extinção no mais alto grau, em que se tenha perdido mais de três quartos de sua vegetação original (21, 22).

Além de servirem de alimento, as plantas do Cerrado são dotadas de propriedades medicinais e sua utilização faz parte da tradição e costumes locais. Contudo, o interesse da comunidade científica em estudar estes vegetais ocorre de forma tímida, se comparada com as das demais regiões, resultando na carência de dados que deem embasamento científico às práticas populares. Das espécies existentes, muitas são conhecidas e utilizadas como remédios supostamente eficazes para um grande número de moléstias (23). Outras não são utilizadas na etnomedicina e não se conhece ainda seu potencial terapêutico ou tóxico expondo a necessidade de estudos que mostrem a utilidade, uso e manejo adequados desses vegetais (24).

O Distrito Federal situa-se na porção central do Cerrado, onde é intenso o conflito entre medidas conservacionistas e atividades econômicas (25). Mais da metade da vegetação nativa foi destruída, devido ao crescimento desordenado das cidades, aparecimento de condomínios irregulares, assentamentos e invasões, que aniquilaram veredas, campos limpos e matas de galeria causando o desaparecimento de espécies (26).

Muitas espécies foram extintas sem que fossem estudadas, ou sequer conhecidas, eliminando a oportunidade de novas descobertas sobre a biodiversidade

desse importante bioma. Assim, além de incentivar a regeneração da cobertura vegetal para a recuperação ao menos em parte, da biodiversidade perdida, é importante o desenvolvimento de estudos que visem o conhecimento do potencial de espécies ainda não estudadas.

1.2 ERYTHROXYLACEAE E O GÊNERO *Erythroxylum*

A família Erythroxylaceae possui cerca de 240 espécies de distribuição tipicamente tropical. É composta por 4 gêneros, dos quais, *Erythroxylum* P. Browne é o mais importante, contendo maior número de espécies e ampla distribuição pelos continentes, com centro de diversidade e endemismo na América do Sul, principalmente no Brasil e na Venezuela. Os gêneros *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* ocorrem exclusivamente na África (27-29).

No Brasil foram registradas, até o momento, 127 espécies de *Erythroxylum*, grande parte em ambientes florestais da Mata Atlântica e Amazônia. O Cerrado, que ocupa a região central do Território Nacional, abriga, aproximadamente 36 espécies de *Erythroxylum* (30).

Quimicamente, o gênero se caracteriza pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre os quais se destaca a cocaína **(3)**, um alcaloide natural que é produzido, principalmente por *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*. Estima-se que *E. coca* seja cultivada na América do Sul por cerca de 5.000 anos com registros arqueológicos da utilização de suas folhas que datam de 3000 a.C. Suas folhas eram mascadas para redução da fome e cansaço e sua utilização como anestésico local data de 1879 (29).

Erythroxylum coca e *E. novogranatense* são as espécies mais importantes, do ponto de vista socioeconômico, por produzirem cocaína de forma significativa em relação a outras que apresentam apenas traços desse alcaloide em sua composição micromolecular (31, 32)

Alcaloides tropânicos constituem principal grupo de constituintes do gênero *Erythroxylum*. Um levantamento bibliográfico realizado por Oliveira *et al* (2010) apresentou 186 alcaloides tropânicos em 35 espécies de *Erythroxylum* distribuídas em todo o mundo. Essa classe de compostos contribui para caracterização quimiotaxonômica de plantas desse gênero, apresentando importantes ações farmacológicas e toxicológicas (33, 34).

Apesar da ampla distribuição geográfica, poucas espécies de *Erythroxylum* utilizadas na medicina popular foram investigadas. Os estudos realizados no gênero concentraram-se nas espécies produtoras de cocaína, sobretudo *E. coca* e *E. novogratense* (35).

Segundo Oliveira (2012) (36), em levantamento bibliográfico utilizando dados do NAPRALERT (*Natural Products ALERT*, banco de dados da Universidade de Illinois), das 230 espécies de *Erythroxylum*, apenas 61 foram avaliadas quimicamente resultando no isolamento e caracterização de 449 compostos, dos quais a maior prevalência foi para alcaloides de núcleo tropânico (32, 34, 37-39), terpenoides (40-43) e flavonoides (42), com presença em menores quantidades de outras classes como alcaloides, benzenoides, cumarinas, quinonas, alquinos, esteroides, proteínas e lipídios (36).

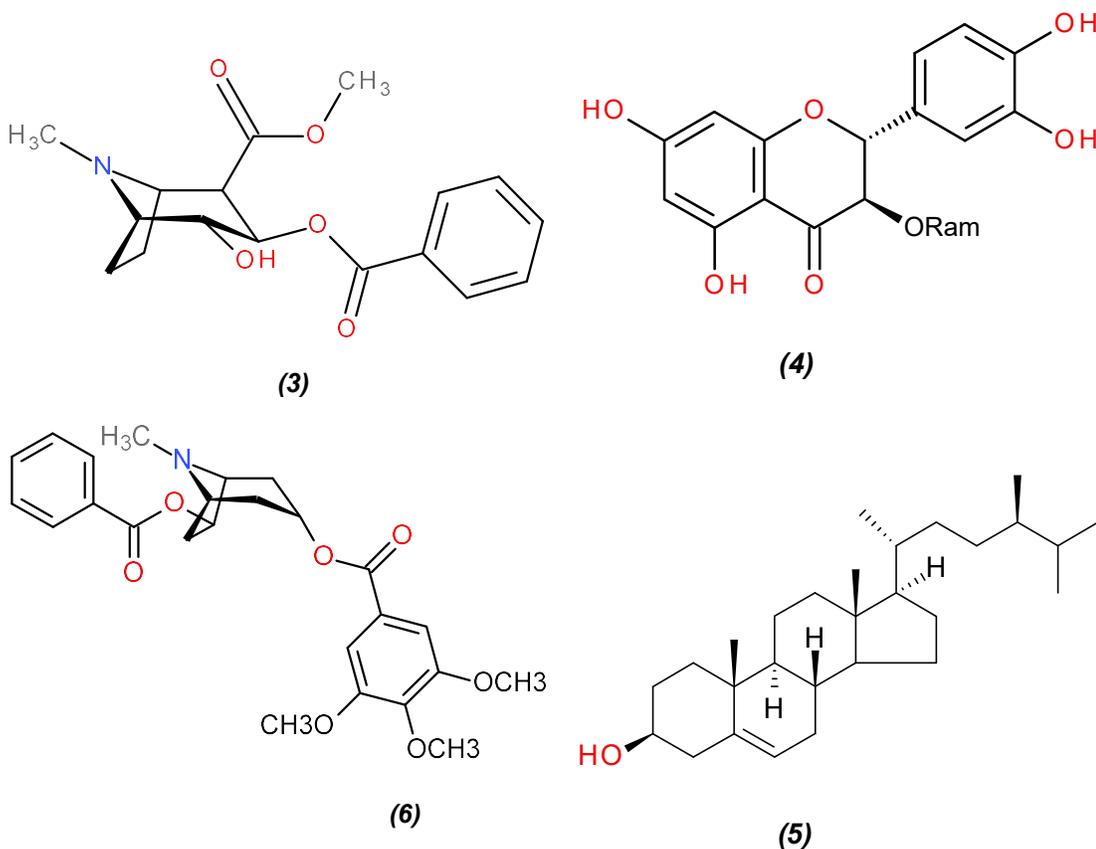
Espécies de *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano, laxante, diurético, tônico estimulante, contra hemorragias, disfunções hepáticas, renais, vesiculares e respiratórias como pneumonia, tuberculose e bronquite asmática (44, 45).

Com ampla distribuição geográfica, algumas plantas desse gênero utilizadas na medicina tradicional, são alvo de estudos que tentam relacionar a atividade biológica com a composição micromolecular de seus extratos. Das partes aéreas de *Erythroxylum gonocladum* foram isolados os compostos astilbina, β -sitosterol e uma mistura dos ácidos graxos palmítico, esteárico e linoleico. O extrato etanólico das partes aéreas de *E. gonocladum* exibiu atividade antihipertensiva por meio da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), ação atribuída à presença do composto astilbina (4) na composição dos extratos dessa espécie (46).

Um estudo feito para validar a utilização de espécies de Erythroxylaceae, predominantes na África do Sul, no tratamento doenças infecciosas, como disenteria e diarreia, comprovou a atividade antibacteriana dos extratos das folhas e cascas de: *Erythroxylum delagoense* contra *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*; *Erythroxylum emarginatum* contra *Klebsiella pneumoniae*; e *Erythroxylum pictum* contra *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* (47).

Erythroxylum caatingae exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e contra fungos, principalmente *Candida albicans*. Além disso, frações acetato de etila:metanol (95:5), acetato de etila, e clorofórmio, obtidas do caule dessa

espécie, como também o composto isolado catuabina B (**6**) induziram apoptose em células tumorais da linhagem K562, caracterizando uma ação citotóxica (48).



No Distrito Federal, 12 espécies de *Erythroxylum* podem ser encontradas nos diferentes gradientes de Cerrado (49), dentre elas *E. suberosum* A St.-Hil., *E. daphnites* Mart., *E. subrotundum* A.St.-Hil (30).

Erythroxylum daphnites é conhecida como “muxiba”, “fruta-de-pombo”, “chapadinho”, “mercúrio” e “pimenta”. Pode ser encontrada em áreas abertas do Cerrado, campo rupestre e áreas de mata ciliar (50). Das partes aéreas desta espécie foram identificados esteroides, tri e diterpenoides, flavonoides, glicerídeos e lignana (50, 51). Quanto à atividade biológica, existem relatos de ação antioxidante e ação antifúngica, com potencial inibitório sobre isolados clínicos de *Candida glabrata* (50, 52, 53). O extrato hexânico dessa espécie mostrou potencial citotóxico em estudo com câncer de boca, induzindo morte celular por apoptose (54).

Erythroxylum subrotundum é uma espécie endêmica no Brasil, ocorrendo em Estados do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Tem como domínios fitogeográficos a Caatinga, o Cerrado (latu senso) e Mata Atlântica (30). Desta espécie foram isolados dois flavonoides 3-O-glicosilados (36). Em estudo de citotoxicidade, inibiu proliferação celular de linhagens cancerígenas (NCI-H292 e K562) e carcinoma de Ehrlich havendo relatos na literatura para atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (53, 55)

Erythroxylum suberosum é um subarbusto de ocorrência comum em áreas abertas de Cerrado com ampla distribuição no território nacional. É conhecido como “fruta-de-pomba-do-campo”, “mercúrio-do-campo”, “mercureiro”, “sombra-de-touro” e “cabelo-de-nego”. Seus frutos ocorrem no período chuvoso e servem de alimentação para algumas espécies de aves; sua madeira é utilizada na carpintaria e marcenaria; e suas cascas no processo de curtimento do couro (24, 56). Na medicina popular é utilizado como remédio contra má digestão, como antireumático e como anestésico (57). Em uma análise preliminar não foi detectada cocaína nesta espécie (35).

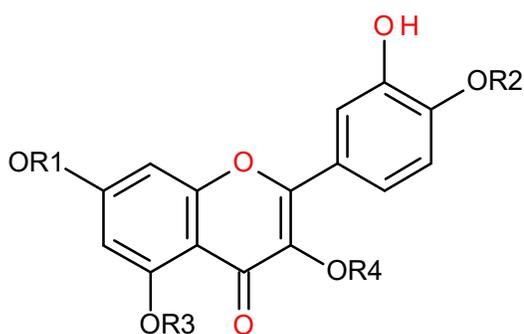
Do ponto de vista químico, *E. suberosum* foi pouco estudado, sendo relatados para a espécie até o momento, metabólitos secundários identificados nas folhas como os flavonoides quercetina (**7**) e seus derivados glicosilados hiperosídeo (**8**), isoquercitrina (**9**), ombuina-3- rutinosídeo (**10**), rutina (**11**) e o alcaloide calistegina A₃ (**12**). Da raiz foi isolada a mistura de catequina (**13**) e epicatequina (**14**). No caule foram identificados, em mistura, os esteroides campesterol (**15**), estigmasterol (**16**) e β -sitosterol (**5**) (31, 58-60).

Em estudo químico do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*, guiado pelo ensaio de letalidade para *A. salina*, foram isolados 3 diterpenos abietânicos e 2 de esqueleto tipo *ent*-kaurano, presentes na fração ativa. Quatro dos cinco diterpenos, 7- oxo-16-hidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (**17**), 7- oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (**18**), 7 α ,16-dihidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (**19**) e *ent*-7 α ,15 β -di-hidróxi-caur-16-en-19-oato de metila (**20**), apresentaram potencial efeito citotóxico frente às larvas de *Artemia salina* (60).

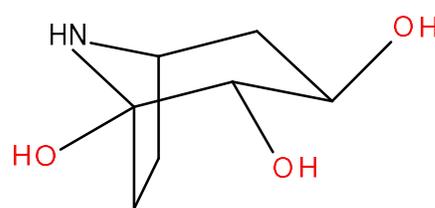
Extratos de *E. suberosum* inibiram as enzimas catepsinas K, L e V em concentrações de 5 e 50 μ g/mL (58). Em estudo realizado por Violante *et al* (2012), que avaliou a ação antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado sobre bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos, *E. suberosum* apresentou

atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (61)

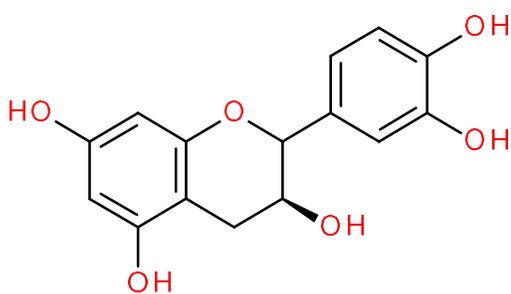
Quanto à citotoxicidade, um estudo realizado por Macedo *et al* (2016) mostrou que os extratos de *E. suberosum* apresentaram potencial atividade radiosensibilizante *in vitro* no câncer de cabeça e pescoço sendo o extrato aquoso mais ativo contra os carcinomas de língua e hipofaringe em associação à radioterapia (62).



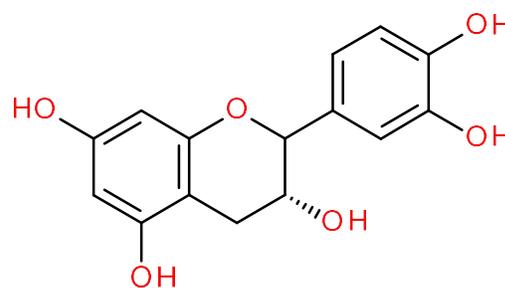
	R1	R2	R3	R4
(7)	H	H	H	H
(8)	H	H	H	gal
(9)	H	H	H	gli
(10)	Me	Me	H	ram-gli
(11)	H	H	H	ram-gli



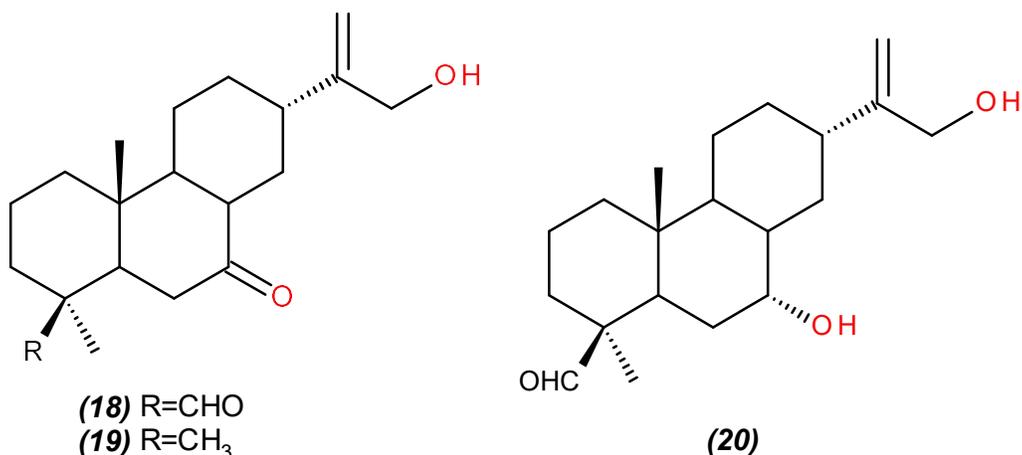
(12)



(13)



(14)



1.3 ÁCIDO HIALURÔNICO (HA)

O ácido hialurônico (hialuronano) é membro da família dos glicosaminoglicanos, juntamente com a condroitina e heparina, polímeros de alto peso molecular compostos por unidades dissacarídicas de aminoaçúcares (N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosaminas) e ácidos urônicos (glicurônico, idurônico) interligados entre si por ligações glicosídicas alternadas do tipo β -1,4 e β -1,3 (63).

Diferente dos outros glicosaminoglicanos, suas cadeias não sofrem sulfatações e estão dispostas em conformação dupla helicoidal devido à ligação de hidrogênios internos e sucessivas torções na molécula. Porém, acredita-se que em meio aquoso possa haver modificação na conformação estrutural desse biopolímero, havendo formação de fragmentos menores de conformação simples. Essas características aliadas à existência de centros hidrofóbicos na molécula, conferem ao ácido hialurônico alta flexibilidade originando soluções muito viscosas de elevado peso molecular, aumentando cerca de 1000 vezes o seu volume em meio aquoso. Nesse estado, a difusão de proteínas e eletrólitos é substancialmente facilitada (64, 65).

Sua síntese é realizada por hialuronano sintase, enzima vinculada à membrana plasmática e secretada diretamente em meio extracelular. É influenciada por vários fatores como hormônios e mediadores inflamatórios. Tem importante papel nos processos de proliferação, crescimento e migração celular bem como em metástases de células tumorais. Sua produção está aumentada em processos inflamatórios e de

cicatrização como também nos processos de morfogênese e desenvolvimento embrionário (66).

Não é de ocorrência exclusiva de vertebrados podendo ser encontrado em bactérias e vírus. É obtido, tradicionalmente, por extração a partir de tecidos animais, como humor vítreo bovino e cordões umbilicais, entretanto, a produção fermentativa por algumas cepas de *Streptococcus* promove rendimentos com maior concentração de ácido hialurônico a custos reduzidos. O processo de purificação na obtenção do ácido hialurônico gera algumas desvantagens como a degradação de suas cadeias com redução do peso molecular e de sua capacidade funcional (67).

É um dos principais constituintes da matriz extracelular, encontrado nos fluidos corporais em concentrações variadas. Na pele, que funciona como reservatório primário, concentra-se aproximadamente 50% de hialuronano do corpo. Também é encontrado no humor vítreo (0,1 a 0,4 mg/g), no fluido sinovial (3 a 4 mg/mL), na matriz produzida pelas células que circundam o oócito (0,5 mg/mL) e na matriz patológica que promove oclusão arterial (68).

Suas ações estão relacionadas à interação com uma variedade de receptores e proteínas de ligação em membranas celulares. O receptor mais estudado é o CD44 (receptor de linfócitos) expresso em diversos tipos de células com função de adesão celular, incluindo linfócitos, células mieloides, fibroblastos, retina e células gliais do Sistema Nervoso Central (SNC). Outros receptores e proteínas de ligação com o hialuronano foram identificados, dentre elas o RHAMM (receptor de motilidade AH - mediada), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular – 1) e receptor LEC (receptor de células endotéliais do fígado) (63).

Para alguns autores, os benefícios do ácido hialurônico são promovidos pelo comprimento da sua cadeia e capacidade de interagir com a água (69, 70). Suas aplicações e usos relacionam-se diretamente à sua presença em vários tecidos conectivos de animais, tais como pele e cartilagem e a importantes funções relacionadas à flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos (67). Além disto, encontra inúmeras aplicações clínicas tais como: procedimentos cirúrgicos para auxiliar os processos regenerativos; suplementação ou substituição do humor vítreo em cirurgias oftálmicas; na cicatrização de córnea, pé diabético, tendões, mucosa nasal, e no tratamento de osteoartrites (65, 71-73). Ainda, pode ser usado na tecnologia farmacêutica, melhorando a partição de fármacos, ajudando em sua

absorção pela pele humana. Conjugado com polímeros sintéticos, é utilizado em fármacos anti-inflamatórios de liberação prolongada (74).

Atualmente, uma de suas principais aplicações está na dermatologia em preenchimentos subcutâneos para corrigir depressões, rugas e sulcos. Devido às suas excepcionais propriedades físicas, o ácido hialurônico desempenha um papel predominante na estrutura e organização da derme e ajuda a garantir a flexibilidade e a firmeza da pele. É sabido que o teor de ácido hialurônico diminui com a idade, e que alterações na sua disponibilidade e síntese contribuem para o envelhecimento evidenciado pela formação de rugas e diminuição da elasticidade da pele (75, 76).

O HA de ocorrência natural é rapidamente quebrado pela enzima hialuronidase e eliminado por meio dos vasos linfáticos e pelo metabolismo hepático. Após aplicação subcutânea é absorvido gradativamente ao longo dos meses (77).

A fragmentação do hialuronano gera polímeros entre 4 a 20 mil Da, *in vivo*, e apresenta efeito paradoxal; moléculas com alto peso molecular têm propriedades anti-inflamatórias, antiangiogênicas e imunossupressoras, enquanto que fragmentos de baixo peso molecular podem se relacionar à angiogênese e estabelecimento de processos inflamatórios com liberação de citocinas que induzem respostas inflamatórias em macrófagos e células dendríticas secundárias à infecção e lesão tecidual (78).

1.4 HIALURONIDASES

As hialuronidases são classes de enzimas que degradam glicosaminoglicanos, predominantemente o ácido hialurônico; porém podem degradar condroitina e sulfato de condroitina, embora em proporções menores (63).

As hialuronidases foram denominadas inicialmente como fator de difusão (*spread factor*) e estão presentes nas cepas β -hemolíticas de *Streptococcus*, venenos de cobras, abelhas, vespas, escorpiões, nematoides e sanguessugas; têm como função auxiliar a difusão dessas toxinas no organismo das suas vítimas (79).

São encontradas em vários tecidos como testículos, olho, pele, baço, fígado, rins e útero, além de fluidos corporais como a lágrima, sangue e esperma. Em mamíferos, a hialuronidase testicular é necessária para a fertilização do óvulo (80).

Foram classificadas por Meyer, em 1971, dentro de três famílias distintas, de acordo com o mecanismo catalítico de cada uma (63) (Figura 1):

Hialuronidases (EC 3.2.1.35): são 4-glicanohidrolases que degradam o hialuronano por clivagem na ligação glicosídica β -1,4 com o tetrassacarídeo como principal produto de degradação. Essas enzimas também degradam condroitina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato como também o sulfato de dermatana em menor proporção. São encontradas em espermatozoides de mamíferos, lisossomas, venenos de himenópteros e peçonhas de serpentes.

Hialuronidases (EC3.2.1.36): são 3-glicanohidrolases que degradam o HA por clivagem nas ligações glicosídicas β -1,3 e têm como produto de degradação o tetrassacarídeo ou o hexassacarídeo. Estão presentes em sanguessugas, parasitos e crustáceos.

Hialuronidases (EC 4.2.2.1): são conhecidas como hialuronato liases que degradam o HA por uma reação de β -eliminação produzindo dissacarídeos que contêm resíduos de glicuronosil apresentando uma ligação dupla entre os carbonos 4 e 5.

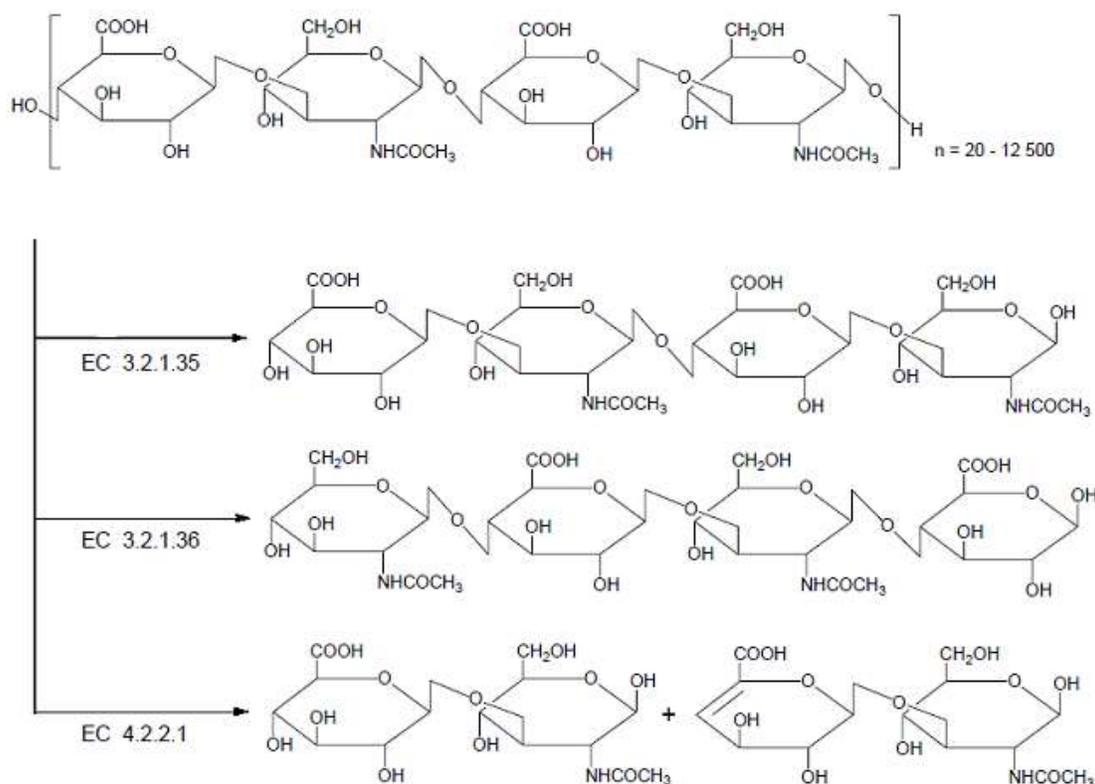


Figura 1 - Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971) (63)

Existe outra classificação, alternativa a de Meyer (1971), que divide as hialuronidases em: procarióticas e eucarióticas, onde se encontram as hialuronidases decodificadas pelo genôma humano em 3p31.3 (Hyal-1, Hyal-2 e Hyal-3), em 7q31.3 (Hyal-4, PH-20 e Hyalp-1) (63).

Assim como o ácido hialurônico, as hialuronidases têm sido utilizadas na terapêutica. A hialuronidase por sua vez, é utilizada em medicamentos injetáveis como adjuvante de difusão local que facilita a absorção por meio da redução da viscosidade do cimento intercelular. Em vacinas e em anestésicos subcutâneos, a enzima acelera a ação do fármaco e aumenta a área anestesiada (79). Além dos exemplos citados, o hialuronano e as hialuronidases também são utilizados para vários outros fins, desde diagnóstico, na cosmetologia, em cirurgias plásticas, e outros. Dessa forma, o sistema hialuronano-hialuronidase é de extrema importância.

1.5 INIBIDORES DE HIALURONIDASE

Os inibidores de hialuronidases são agentes reguladores, naturais ou sintéticos, envolvidos na manutenção do equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo do ácido hialurônico. Em geral apresentam grande diversidade estrutural, podendo ser proteínas, glicosaminoglicanos, polissacarídeos e metabólitos secundários de origem vegetal (78).

Sais de ferro, cobre e de zinco e heparina foram reportados como os primeiros inibidores de hialuronidase por Meyer, em 1951. Os glicosaminoglicanos exercem seu efeito inibidor sobre a hialuronidase devido a semelhanças na estrutura química com o hialuronano, substrato dessa enzima (63).

Fármacos anti-inflamatórios e antialérgicos, incluindo salicilatos, indometacina, fenilbutasona e dexametasona, inibiram a atividade da hialuronidase isolada de testículos e de peçonha de serpentes. Entre os fármacos antialérgicos encontra-se o cromoglicato dissódico (DSCG), inibidor conhecido da hialuronidase, que teve sua eficácia avaliada em estudos anteriores (63, 81). É utilizado no tratamento de doenças alérgicas, pois inibe a liberação de mediadores químicos e promove a estabilização da membrana celular, reduzindo a resposta alérgica e a reação inflamatória no organismo (82).

Muitos fármacos utilizados no arsenal terapêutico apresentam, em menor ou maior grau, a capacidade de inibir a hialuronidase: ácido ascórbico e seus análogos;

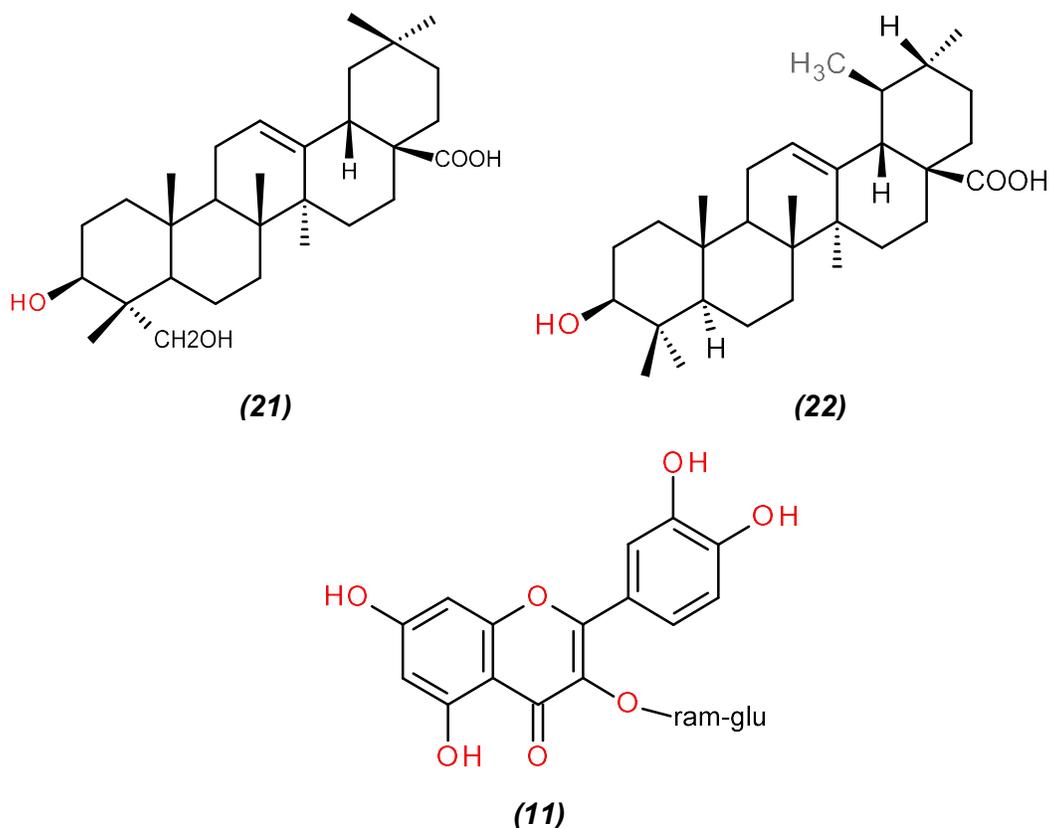
flavonoides tais como quercetina, apigenina, kaempferol, rutina, miricitrina e outros (68, 83); alcaloides como reserpina, ácido aristolóquico, ajmalicina; triterpenos e derivados do ácido cafeico (78, 84, 85).

Um grupo de 31 flavonoides foram testados, inicialmente, frente à enzima hialuronidase testicular bovina, por Kuppusamy, em 1990. Dentre os flavonoides investigados, os taninos condensados apresentaram inibição máxima da enzima em 50 μM . Outros compostos como silibina, apigenina, luteolina, morina, miricetina e quercetina, inibiram a enzima entre 29% e 76%, na concentração de 250 μM . O estudo cinético mostrou que essa inibição era competitiva e que algumas características da molécula favoreciam o efeito exercido pelo composto sobre a enzima. A presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do núcleo fundamental dos flavonoides era condição necessária para haver atividade por parte do composto; um grupo ceto na posição 4 e a introdução de hidroxilas em 5, 7 e 4' pareciam aumentar o efeito dos flavonoides; porém a presença de substituintes glicosídicos diminuía o efeito inibitório sobre a enzima testicular bovina. Dessa forma, o autor concluiu que as agliconas são melhores inibidores de hialuronidase que seus derivados glicosilados (86)

A quercetina isolada a partir de plantas mostrou-se ativa em estudos anteriores em níveis diferentes de inibição. Isoquercitrina, hiperosideo e rutina também foram ativos frente a enzima hialuronidase (87-90). Além de compostos isolados de fontes naturais, extratos vegetais têm apresentado forte potencial inibitório sobre a hialuronidase caracterizando-os como fonte promissora de novas moléculas farmacologicamente ativas (89, 91-94)

Espécies vegetais presentes em regiões de cerrado do Distrito Federal e seu entorno, estudadas por este grupo, têm revelado ser fonte de compostos com atividade antimicrobiana (23, 95), citotóxica (96, 97), anti-inflamatória e antinociceptiva, dentre outras (98-100).

Para muitos desses compostos isolados há registro de atividade de inibição da hialuronidase. Como exemplo pode ser citado derivados de hederagenina (**21**) (101), também isolados de *Sapindus saponária* (102); rutina (**11**) (103), também isolada de *Hancornia speciosa* (23) e ácido ursólico (**22**) (104), também isolado de espécies de *Pouteria* (96).



Esses achados revelam o grande potencial das espécies ocorrentes no Cerrado brasileiro, com destaque para a família Erythroxylaceae, caracterizada pela presença de metabólitos farmacologicamente ativos, como alcaloides tropânicos e flavonoides. Contudo, é necessário que haja mais estudos para conhecimento e caracterização de princípios ativos e ações farmacológicas de espécies da flora brasileira especialmente as que se encontram sob risco de extinção.

Considerando também a grande importância da hialuronidase, a identificação e caracterização de inibidores dessa enzima, potentes reguladores que mantêm a homeostase do ácido hialurônico, pode ser útil no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios, rejuvenescedores, antimicrobianos, antitumorais, contraceptivos, dentre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de espécies do gênero *Erythroxylum* em inibir a atividade da enzima hialuronidase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar estudo químico, biomonitorado por hialuronidase, do extrato da espécie que apresentar maior atividade frente à enzima hialuronidase.

Caracterizar a atividade funcional e a toxicidade da espécie mais ativa.

MATERIAS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS GERAIS

3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todas as etapas do processo extrativo e fitoquímico foram monitoradas por meio de cromatografia em camada delgada.

3.1.1.1 Fase Estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica) ativadas a 105 °C.

- Placas de sílica gel 60G (Merck) preparadas em suporte de vidro, com 0,50 mm de espessura (preparativa) ativadas a 105 °C.

- Placas de sílica gel 0,2 mm Kieselgel 60 ALUGRAM SIL G. (MACHEREY-NAGEL®).

3.1.1.2 Eluentes (FM):

FM1: AcOEt (6) : MeOH (4)

FM2: MeOH

FM3: AcOEt (100) : CH₂O₂ (11) : CH₃COOH (11) : H₂O (16)

FM4: MeOH (13,5) : AcOEt (100) : H₂O (10)

FM5: CH₂Cl₂

FM6: CH₂Cl₂ (7) : MeOH (3)

FM7: Hexano (9) : AcEt (1)

3.1.1.3 Reveladores (105)

R1 - Solução ácida de anisaldeído

Reagente para detecção de esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos, micotoxinas.

Solução A: solução de anisaldeído em ácido acético a 2%.

Solução B: solução etanólica de H_2SO_4 a 20%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida, com a solução B e foi então aquecida a temperatura aproximada de 100°C.

R2 – Reagente Dragendorff

Reagente para detecção de alcaloides e peptídeos, pelo surgimento de mancha alaranjada, imediatamente após a borrifação.

Solução A: nitrato básico de bismuto (1,7 g) foi dissolvido em 100 mL solução de ácido acético (1) : água (4)

Solução B: solução aquosa de iodeto de potássio 40%

A cromatoplaça foi borrifada com a solução, previamente preparada, composta de 5,0 mL de A; 5,0 mL de B; 20 mL de ácido acético e 70 mL de água.

R3 – Reagente NP/PEG

Reagente para detecção de flavonoides e outras substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência

Solução A: solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2%

Solução B: solução etanólica de polietilenoglicol – 400 (PEG 400) 5 %

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B e observada sob luz ultravioleta.

R4 – Reagente de Verde de Bromocresol

Reagente para detecção de ácidos carboxílicos pelo surgimento de cor amarela sobre fundo azul, imediatamente após a borrifação.

O verde de bromocresol (0,1 g) foi dissolvido em 100 mL de metanol e alcalinizado com solução NaOH (1,0 M) até que a solução apresentasse cor azul intensa.

R5 – Reagente Komarovsky

Reagente para detecção de glicosídeos (saponinas), ocorre pelo aparecimento de manchas azuis, alaranjadas ou marrons.

Solução A: Solução metanólica de 4-hidroxibenzaldeído a 2%.

Solução B: Solução etanólica de H₂SO₄ a 50%.

Imediatamente antes da utilização, o reagente foi preparado pela mistura das soluções A e B na proporção 3:2. A cromatoplaça foi borrifada com o reagente e aquecida à temperatura aproximada de 100 °C.

R6 - Radiação ultravioleta (UV)

O cromatograma foi observado sob a luz UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$), para detecção de substâncias contendo grupos cromóforos.

3.1.2 Cromatografia em Coluna (CC)

3.1.2.1 Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck®

A fase estacionária [Sílica gel 60 A (70-230 mesh), marca Merck®] foi suspensa com o solvente utilizado inicialmente como fase móvel (usualmente, hexano) e empacotada em coluna de vidro até total decantação da sílica. A amostra foi incorporada em quantidade suficiente de sílica e solvente e então foi aplicada no topo da coluna, sendo posteriormente procedida a eluição, com gradiente em ordem crescente de polaridade.

3.1.2.2 Exclusão em gel Sephadex®

O gel (Sephadex™ LH-20 Amersham Biosciences®) foi suspenso no solvente utilizado como fase móvel, mantido em repouso por 24 horas e empacotado em coluna de vidro até total decantação do gel. A sistema foi mantido sob repouso por 24 horas. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente do eluente e então aplicada no topo da coluna que foi, em seguida, eluída até completo esgotamento.

3.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) ou Índice de Refração (CLAE-IR).

Condições de análise – CLAE-DAD (59):

As análises em CLAE-DAD foram realizadas em equipamento (Hitachi) com coluna (LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e -5 μm) e pré-coluna (LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e - 5 μm) mantidas a 25°C com fluxo de 0,6 mL por minuto e tempo de análise de 55 minutos. Os eluentes usados foram: solução a 1% de ácido fosfórico (Tédia®) na bomba A e acetonitrila (Tédia®) na bomba B em sistema de eluição por gradiente (Tabela 1). Com intervalo de análise de 230 a 400 nm e dados extraídos em 280 e 354 nm. As amostras (2 mg/mL) foram dissolvidas em solvente apropriado, grau HPLC (59).

Tabela 1 - Gradiente de eluição para análise por CLAE-DAD na detecção de flavonoides

Tempo (min)	(%) Solução de Ác. Fosfórico 1%	(%) Acetonitrila	Fluxo (mL/min)
0	90	10	0,6
40	70	30	0,6
50	50	50	0,6
51	90	10	0,6
55	90	10	0,6

Condições de análise – CLAE-IR:

As análises em CLAE-IR foram realizadas em equipamento (Hitachi), coluna Lichrospher 100 NH₂, 250 mm x 4,0 mm (HP 5 μm) mantida a 30°C, com sistema de eluição isocrático. Programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20). Região de análise entre 200 nm e 400 nm.

Bomba A : acetonitrila (Tedia®)

Bomba B: água

Fluxo: 1 mL/min

Detector: por índice de refração (RI) (200 nm e 400 nm)

Sistema de eluição: isocrático

Gradiente de eluição: bomba A (80%): bomba B (20%).

3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises foram feitas no Instituto de Química da Universidade de Brasília. Os espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) foram gerados no espectrômetro de 300 MHz (Varian Mercury Plus), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram D_2O e MeOD_4 , com TMS (tetrametilsilano) como referência interna.

3.1.4 Determinação de Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas folhas de *E. suberosum* foi feita utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito em 2004 por Kumazawa *et al* (2004) com modificações (106). A análise foi baseada em reação redox entre agentes redutores e os ácidos fosfomolibdico e fosfotungstíco presentes no reagente. Durante a reação, ocorreu a formação do molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permitiu determinar a concentração das substâncias redutoras, não necessariamente, de natureza fenólica (107).

Em tubos de ensaios foram adicionados 65 μL de solução aquosa de ácido gálico (0,508; 1,016; 2,031; 4,063; 8,125; 16,25 e 32,5 mg/mL), 250 μL de solução aquosa de carbonato de sódio Na_2CO_3 10%, e 250 μL do reagente *Folin-Ciocalteu* (Sigma-Aldrich). Em seguida, o volume foi completado para 2500 μL com água destilada e homogeneizado. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e, após 1 hora de incubação, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 700 nm. A partir das absorvâncias referentes às soluções de ácido gálico utilizadas, foi construída uma curva analítica e empregada a regressão linear para a obtenção da equação da reta.

Para determinação da concentração de fenólicos totais nos extratos e frações avaliados (extrato aquoso e etanólico, e frações diclorometano e hidrometanólica do extrato etanólico) foram utilizados 65 μL das amostras (52 $\mu\text{g/mL}$ diluídos em metanol). O ensaio foi conduzido em triplicata nas mesmas condições dos padrões. Para branco, de amostra, foram adicionados 65 μL das amostras (52 $\mu\text{g/mL}$), 250 μL de Na_2CO_3 10% e o volume foi completado para 2500 μL com água desionizada. Para zerar o aparelho foi utilizada água desionizada. A partir da equação, obtida com o

padrão ácido gálico, foi possível calcular a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de fenólicos totais nos extratos e frações em questão, expressos como μg , de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por mg de extrato.

3.1.5 Determinação de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais presente nas folhas de *E. suberosum* foi determinado por metodologia descrita em 1998 por Woisky, Salatino (1998) com modificações (108, 109),. A análise foi baseada na formação de complexos estáveis entre os flavonoides e o cátion Al^{+3} . Foram preparadas soluções metanólicas de quercetina em concentrações (1, 2, 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$). Em tubos de ensaio, foram adicionados 250 μL da solução padrão nas concentrações avaliadas E 125 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5%. Em seguida, o volume foi completado para 2500 μL com água desionizada e homogeneizado. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 425 nm após 1 hora de incubação. Com uso das absorbâncias obtidas com a quercetina, foi construída uma curva analítica e determinada a equação da reta por regressão linear.

Para determinação da concentração de flavonoides nos extratos e frações avaliados (extrato aquoso e etanólico, e frações diclorometano e hidrometanólica do extrato etanólico) foram utilizados 250 μL das amostras (2 mg/mL). O ensaio foi conduzido em triplicata nas mesmas condições do padrão. Para o branco das amostras foram adicionados 250 μL das amostras (2 mg/mL) em água desionizada até 2500 μL de volume final. Para zerar o equipamento foi utilizado um branco preparado com 250 μL de metanol no lugar das amostras. A partir da equação, obtida com o padrão quercetina, foi possível calcular a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de flavonoides totais nos extratos e frações avaliados, expressos como μg , de Equivalentes de Quercetina (EQ) por mg de extrato.

3.1.6 Avaliação da Atividade Antioxidante

- Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio

A verificação *in vitro* da atividade antioxidante de extratos vegetais foi realizada pelo método descrito em 1999 por Prieto (1999), com modificações (110). A análise foi baseada na capacidade redutora do complexo fosfomolibdênio, em meio ácido, comparada a de compostos antioxidantes conhecidos (BHT, quercetina e ácido ascórbico). Para a condução do ensaio, foram utilizadas soluções estoque (1 mg/mL diluídos em etanol) de ácido ascórbico (Dinâmica®), BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) (Synth®) e quercetina (Cromadex®). A partir das soluções estoque de cada padrão a ser testado, foram preparadas diluições seriadas, em etanol, nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL. O reagente foi preparado no momento do uso misturando, em partes iguais (250 mL), as soluções aquosas de (Na_3PO_4 , 28 mM), molibdato de amônio tetrahidratado [$(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM,] e de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,6 M).

Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL da solução reagente e 0,1 mL das diluições dos padrões nas concentrações avaliadas. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95°C durante 90 min. Após o período definido, as amostras foram deixadas arrefecer até a temperatura ambiente. O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de poliestireno (caminho óptico 1 cm) (Sigma®) e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro, contra um branco (1 mL do reagente e 0,1 mL de etanol). Para cada diluição, a análise foi feita em triplicata. Os dados de absorvância foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1800) e foram construídas curvas analíticas obtendo-se as equações da reta por regressão linear.

As amostras foram analisadas sob as mesmas condições dos padrões aqui adotados. Os extratos e frações foram solubilizados em etanol na concentração de 1 mg/mL e uma alíquota de 0,1 mL das soluções foram adicionados a 1 mL do reagente. Para calcular a equivalência dos compostos analisados foram utilizadas as equações da reta obtidas com os padrões, às quais foram aplicadas as absorvâncias lidas a 695 nm. Dessa forma, foram obtidas as concentrações relativas aos controles e o resultado é dado em equivalentes de quercetina, BHT e ácido ascórbico por mg de extrato.

3.1.7 Toxicidade a Larvas de *Artemia salina*

Para condução do ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al* (1984), com adaptações (111). Dessa forma, uma solução de sal marinho sintético (36 g/L) foi preparada, com pH entre 8-9, ajustado com uma solução de NaOH 0,1 M. Essa solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *A. salina* e para o preparo das diluições dos extratos hexânico, etanólico e aquoso de *E. suberosum*. Os ovos de *A. salina* foram postos em solução salina aquosa com aeração constante e expostos à luz diurna por 48 horas para eclodir. Os extratos (20 mg) foram solubilizados em 0,2 mL de DMSO e o volume foi completado para 20 mL com a solução salina (1000 ppm). Desta solução foram preparadas diluições (500, 250 e 125 ppm), em triplicata. Em seguida, foram adicionadas 10 larvas de *A. salina* para cada tubo.

Como controle positivo foi utilizada uma amostra de 2 mg de dicromato de potássio, a qual foi submetida às mesmas condições das amostras a serem analisadas. Tubos contendo solução salina, 0,2 mL de DMSO e 10 larvas de *A. salina*, foram utilizados como controle negativo. Os tubos foram mantidos sob iluminação constante e, após 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas. O cálculo da DL₅₀ foi realizado utilizando o programa PROBITOS® (111).

3.1.8 Ensaio de Inibição Enzimática

O ensaio de inibição da hialuronidase foi realizado segundo a metodologia descrita por Di Ferrante (1956) com adaptações (112). Para condução do ensaio foram preparadas as seguintes soluções reagentes:

- Solução de hialuronidase 800 UI/mL (estoque)

Hialuronidase de testículos bovino (tipo I, Sigma Aldrich®)	1,0 mg
Tampão citrato – fosfato pH 5,0 q.s.p.	1,0 mL
Solução de uso 160 UI/1,2 mL	

- Solução Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0

Misturar as soluções A e B até pH 5,0

Solução A:

Fosfato de sódio dibásico	1,7799 g
---------------------------	----------

Cloreto de sódio	0,5844 g
Água destilada q.s.p.	100 mL
Solução B:	
Ácido cítrico	1,921 g
Água destilada q.s.p.	100 mL
- Solução de Ácido Hialurônico (HA)	
Ác. Hialurônico, (Sigma®)	2 mg
Tampão citrato-fosfato pH 5,0 q.s.p.	1 mL
- Solução de Soroalbumina bovina 2 mg/mL (BSA) (estoque)	
Soroalbumina bovina (Sigma®)	2 mg
Água destilada q.s.p.	1 mL
Solução de uso (0,2 mg/mL)	
- Solução de Brometo de hexadeciltrimetilamônio 2,5 % (CTAB)	
CTAB (Sigma®)	2,5 g
NaOH 0,5 M q.s.p.	100 mL
- Solução dos extratos vegetais	

As amostras foram diluídas de modo que a concentração em 10 μ L fosse suficiente para obter a concentração desejada no tubo teste, com volume final de 1 mL. Foram utilizados como solvente água destilada, metanol ou DMSO. O ensaio foi realizado com a parte solúvel das amostras no caso do extrato hexânico, enquanto que os extratos aquoso, etanólico e frações destes foram totalmente solubilizados.

A princípio, os extratos foram diluídos na concentração de 5 mg/mL (concentração final na reação foi de 0,1852 mg/mL) para avaliação preliminar das espécies de *Erythroxylum*. Para a construção das curvas de dose-resposta dos extratos foi preparada uma solução na concentração de 10 mg/mL, a partir da qual foram feitas diluições regressivas até a menor concentração do extrato onde não se observasse variação significativa na atividade enzimática. A concentração reacional para cada ponto das curvas de dose e resposta foram calculadas posteriormente. Os solventes utilizados para diluir as amostras também foram avaliados frente à atividade da enzima, no mesmo volume destas (10 μ L).

- Solução de cromoglicato dissódico ($C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$) (controle positivo) e compostos fenólicos avaliados.

Foi preparada solução estoque de cromoglicato dissódico (DSCG) (Sigma®) na concentração de 83,4 mg/mL em água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições seriadas e construída a curva de dose e resposta.

Além do cromoglicato dissódico, outros compostos foram testados frente à atividade da enzima, inicialmente em concentrações finais de até 1,6 mg/mL. Os compostos ácido cafeico (Sigma®), ácido gálico (Sigma®), isoquercitrina (Sigma®), ácido ferúlico (Sigma®), ácido clorogênico (Sigma®), naringenina (Sigma®), saponina (Sigma®), epicatequina (Sigma®), catequina (Sigma®), hesperitina (Sigma®), ácido rosmarínico (Sigma®) e ácido elágico (Sigma®) foram diluídos em metanol. A quercetina (Cromadex®) foi diluída em DMSO. Para construção das curvas de dose e resposta foram preparadas soluções a 4 mg/mL (concentração no meio reacional) para quercetina e ácido rosmarínico, a partir das quais, foram feitas diluições seriadas até a menor concentração onde não se observasse variação significativa na atividade enzimática. Para o ácido elágico, foi utilizada uma solução estoque a 5 mg/mL, sendo calculada, posteriormente, a concentração reacional para cada ponto da curva.

3.1.8.1 Condições do Ensaio

– Primeira etapa:

A mistura de reação foi composta de 120 µL de tampão citrato-fosfato (pH 5,0), 30 µL de solução aquosa de soroalbumina bovina - BSA (Sigma®) (2 mg/mL), 50 µL de água, 10 µL das diluições dos extratos e frações e 30 µL de solução enzimática (4 UI). Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, 30 µL de ácido hialurônico (Sigma®) (2 mg/mL) foram adicionados à mistura e os tubos foram incubados a 37°C, por 30 min. Alterações nos volumes das amostras e controle, decorrentes da difícil solubilização dos compostos nos solventes utilizados, foram compensadas por ajuste no volume da água ou do tampão.

– Segunda etapa:

Após o período determinado, a reação foi interrompida com a adição de 730 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (Sigma®) a 2,5%. As amostras foram

mantidas a 25 °C por 20 min e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu, UV-16800). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Além das amostras, foram preparadas soluções denominadas: branco de amostra, substituindo a enzima e o substrato por tampão citrato-fosfato (pH 5,0), visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal ou dos padrões testados; branco do aparelho, tubos contendo tampão citrato-fosfato (pH 5,0), soroalbumina bovina (2 mg/mL), água e CTAB (2,5%) utilizado para zerar o equipamento; controle negativo da reação, o qual avaliou a capacidade da hialuronidase em degradar o substrato na ausência de um inibidor; controle positivo da reação, teste com substrato sem a enzima para marcar o ponto máximo de inibição (100%) da atividade enzimática que foi caracterizado nesse ensaio pela não degradação do ácido hialurônico.

A atividade de inibição dos extratos brutos das partes aéreas das espécies de *Erythroxylum* foi comparada ao controle DSCG e à quercetina (Cromadex®).

3.1.8.2 Determinação da Porcentagem de Inibição Enzimática e da IC₅₀.

A atividade enzimática foi medida por meio de monitoramento do percentual de substrato não digerido, complexado com CTAB após a reação enzimática, em 600 nm. A absorbância do substrato na ausência da enzima, subtraída do branco do substrato, representou o ponto máximo (100%) de inibição (controle da reação). As porcentagens de inibição sobre a atividade da hialuronidase foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = (\text{ABS}_{\text{teste}} - \text{ABS}_{\text{branco}} / \text{ABS}_{\text{controle}} - \text{ABS}_{\text{branco}}) \times 100$$

Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para cada curva e os valores de IC₅₀ obtidos, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão e submetidos à análise de variância ANOVA associada ao teste de Tukey ou Dunett. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

Para as amostras que inibiram a atividade enzimática em mais de 50% foram construídas curvas de dose e resposta, determinando-se o valor do IC₅₀. As curvas

foram construídas com a porcentagem de inibição *versus* o logaritmo da concentração do inibidor.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Material Vegetal: Coleta e Identificação

As espécies de *Erythroxylum* avaliadas foram obtidas por meio de sucessivas coletas realizadas em áreas de cerrado do Distrito Federal pelos Botânicos: Prof. Dr. Christopher W. Fagg (Universidade de Brasília, Campus Ceilândia - DF) e pela Profa. Dra. Sueli Maria Gomes (Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro). A identificação foi realizada por comparação com exsiccatas depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB) (Tabela 2). Todos os extratos utilizados no trabalho são oriundos da coleção de extratos do grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob coordenação da Profa. Dra. Dâmaris Silveira.

Tabela 2 – Dados relacionados à coleta, identificação e extração das espécies de *Erythroxylum*

Espécie	Parte usada	Extrato	Exsicata	Locais de coleta: Cerrado - DF	Período
<i>Erythroxylum suberosum</i>			Fagg CW 2192	15° 46' 23" S 47° 52' 07" W	2009
<i>Erythroxylum daphnites</i>	Partes aéreas	Aquoso	Fagg CW & Silveira D 2193	15° 56' 29" S	2011
		Etanólico		47° 52' 37" W	
		Hexânico			
<i>Erythroxylum subrotundum</i>			Fagg CW & Silveira D 2194	15° 56' 24" S 47° 52' 23" W	2011

3.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Depois de seco à temperatura ambiente, o material botânico foi pulverizado e submetido à extração por maceração seguida de percolação, utilizando os solventes hexano, seguido de etanol, para obtenção dos extratos brutos. As soluções extrativas

obtidas foram armazenadas em frascos âmbar e concentradas à secura sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C com auxílio de rotaevaporador (Figura 2).

Os extratos aquosos foram obtidos por infusão do material botânico, seco e pulverizado, em água destilada a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40 °C, sendo então submetida à filtração. A solução extrativa resultante foi mantida a -30 °C e submetida ao processo de liofilização (Figura 2).

Os extratos brutos obtidos foram conservados em baixa temperatura (-30 °C), até sua utilização nos ensaios biológicos e fracionamento químico subsequentes. Os rendimentos foram apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimentos finais dos extratos brutos do rasurado das partes aéreas de *Erythroxylum*

Extratos/parte	Espécie	Material vegetal seco (g)	Rendimento Final (g)	Rendimento Final (%)
Etanólico/folhas		669,0	8,58	1,28
Hexânico/folhas	<i>E. suberosum</i>	669,0	65,1	9,73
Aquoso/folhas		129	5,7	4,4
Etanólico/flores		ND	4,83	ND
Etanólico/galhos		ND	6,36	ND
Hexânico/folhas	<i>E. daphnites</i>	848,63	15,53	1,83
Aquoso/folhas		79,17	1,3	1,64
Etanólico/folhas		848,63	156,1	18,4
Etanólico/folhas		436,7	7,55	1,73
Hexânico/folhas	<i>E. subrotundum</i>	436,7	4,35	0,99
Aquoso/folhas		78,05	5,3	6,8

*ND = não determinado

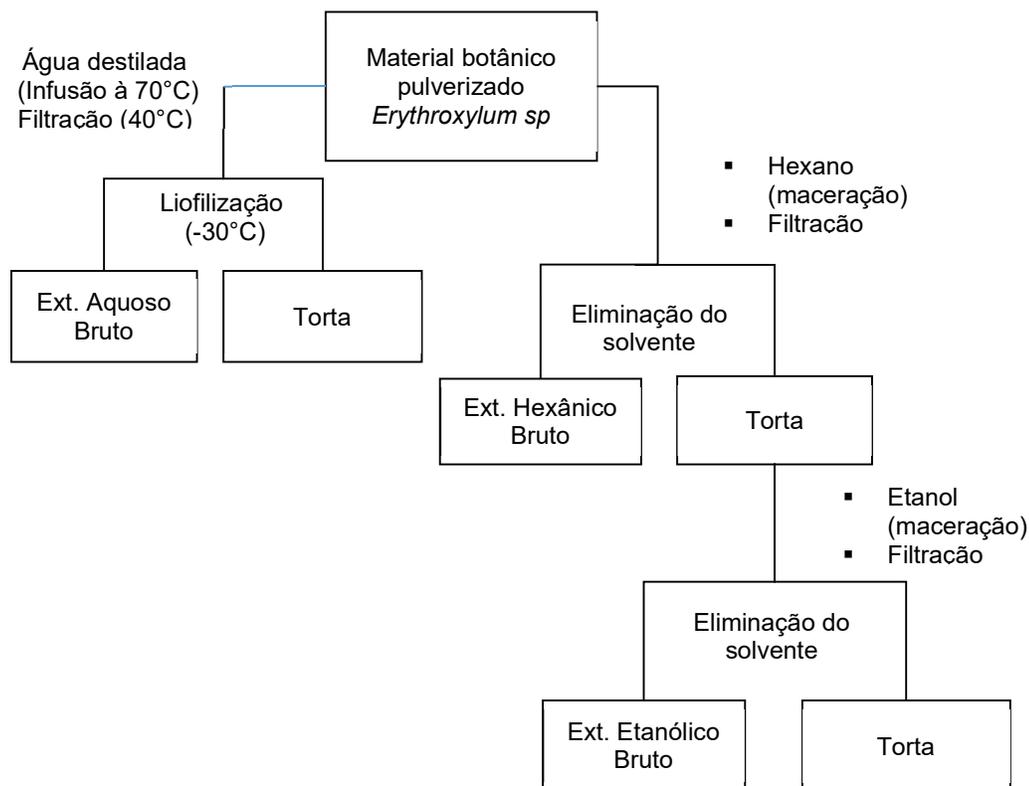


Figura 2 – Representação esquemática para o processo de obtenção dos extratos brutos de espécies do gênero *Erythroxylum*.

3.2.3 Caracterização Farmacognóstica por CCD

A caracterização farmacognóstica dos extratos e frações foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluentes FM1 a FM7 e reagentes clássicos de detecção R1, R2, R3, R4, R5 e R6 (Métodos Gerais) (105). As amostras foram analisadas quanto à presença de terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (principalmente flavonoides), saponinas e ácidos graxos de cadeia longa.

3.2.4 Estudo Químico do Extrato Etanólico de *Erythroxylum suberosum* (EEESfih)

3.2.4.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60:

Parte do extrato etanólico (5,32 g) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna (CC) de sílica gel (altura= 27 cm; diâmetro= 4,1 cm), utilizando a ordem Hexano→Acetato de etila→MeOH como gradiente de eluição.

Frações de 50 mL foram coletadas, concentradas à secura sob vácuo e monitoradas por CCD. Foram obtidas 289 frações reunidas em 24 grupos (Tabela 4).

A coluna cromatográfica (CC) foi empacotada utilizando sílica gel 60G e a CCD foi desenvolvida utilizando placas cromatográficas de sílica 60G, e reagentes de detecção R1, R3 e R6 (Métodos Gerais) para visualização (105).

As frações foram purificadas por lavagem com solventes e recristalização, permitindo o isolamento de substâncias purificadas ou misturas menos complexas. A caracterização química destes compostos foi realizada a partir de métodos espectrométricos de análise (RMN de ^1H e ^{13}C) e monitoramento por CLAE-DAD a 354 e 280 nm (Métodos Gerais).

Tabela 4 - Frações do extrato etanólico bruto de *Erythroxylum suberosum* - CC - Sílica gel 60

Grupo	Frações	Massa (g)	Rendimento %	Eluente
ES1	1-24	0,0142	0,30	Hexano
ES2	25-41	0,0300	0,60	Hexano
ES3	42-58	0,0080	0,20	Hexano
ES4	59-67	0,0766	1,44	Hexano:AcEt (9:1)
ES5	68-85	0,0411	0,80	Hexano:AcEt (9:1)
ES6	86-88	0,0039	0,08	Hexano:AcEt (9:1)
ES7	89-114	0,0865	1,62	Hexano:AcEt (8:2)
ES8	115-117	0,0359	0,70	Hexano:AcEt (8:2)
ES9	118-145	0,0308	0,60	Hexano:AcEt (8:2)
ES10	146-164	0,0420	0,80	Hexano:AcEt (8:2)
ES11	165-171	0,0153	0,30	Hexano:AcEt (7:3)
ES12	172-180	0,0224	0,50	Hexano:AcEt (7:3)
ES13	181-207	0,0633	1,20	Hexano:AcEt (7:3)
ES14	208-224	0,0258	0,50	Hexano:AcEt (6:4)
ES15	225-233	0,0192	0,40	Hexano:AcEt (3:7)
ES16	234-237	0,0688	1,30	Hexano:AcEt (3:7)
ES17	238-239	0,0045	0,10	Hexano:AcEt (1:1)
ES18	240-279	0,0725	1,36	AcEt
ES19	280-281	0,0197	0,40	AcEt:Metanol (8:2)
ES20	282	0,5880	11,05	AcEt:Metanol (1:1)
ES21	283	0,4507	8,47	AcEt:Metanol (6:4)
ES22	284-287	0,8780	16,50	AcEt:Metanol (1:1)
ES23	288	0,1396	2,62	AcEt:Metanol (4:6)
ES24	289	0,7759	14,58	Metanol

- Isolamento

ES4 (59-67): As frações 59-67, obtidas por CC do extrato etanólico, sob eluição com hexano e acetato de etila (9:1), foram tratadas com uma mistura de acetona e éter etílico (3:1) originando um precipitado floculoso que foi separado por decantação e denominado ESE03 (16,04mg). Quando avaliado por CCD (FM7, R1, Métodos gerais), ESE03 mostrou uma mancha roxa, indicando a presença de um composto isolado ou uma mistura pouco complexa.

ES5 (68-85): As frações 68-85, obtidas por CC do extrato etanólico, sob eluição com hexano e acetato de etila (9:1), foram tratadas com acetona seguida de metanol (3:1) havendo a formação de um precipitado cristalino que foi denominado ESE04. Quando avaliado por CCD (FM7, R1, Métodos gerais), revelou a presença de duas manchas, uma roxa e outra azul, indicando a presença de uma mistura simples de compostos.

ES21(283): A fração 283, obtida a partir de CC do extrato etanólico, sob eluição com acetato de etila e metanol (6:4), após duplo tratamento com acetona e clorofórmio (3:1), originou um precipitado floculoso de cor amarelada, separado do sobrenadante por decantação e denominado ESE02 (57,6 mg). O sobrenadante foi centrifugado havendo a formação de um novo precipitado amarelado amorfo que foi tratado com etanol e denominado ESE01 (16,8 mg). Quando avaliados por CCD (FM3, R3 e R6, Métodos gerais), apresentaram manchas amarelas que se intensificavam ao serem submetidas à luz UV, após revelação com NP/PEG.

3.2.4.2 Partição Líquido-líquido

Parte do extrato etanólico bruto (20 g) foi submetida a partição líquido-líquido com diferentes solventes, fornecendo três frações de diferentes polaridades. Inicialmente foi utilizado, como solvente, uma mistura de metanol e água na proporção 1:1, na qual o extrato bruto foi solubilizado sendo transferido para um balão de separação. Em seguida a solução hidrometanólica foi extraída por partição, com hexano (1:2), resultando na fração hexânica (FH) e na fração intermediária (FHM1), que foi reduzida com auxílio de rotaevaporador (60°C) para eliminação do metanol e extraída com diclorometano (1:1), originando as frações diclorometano (FDCM) e hidrometanólica (FHM), separadas por decantação (Figura 3).

As frações hexânica (FH) e diclorometano (FDCM) foram concentradas por evaporação dos respectivos solventes com rendimentos de 2,2 g (11%) e 0,5 g (2,5%), respectivamente. A fração hidrometanólica (FHM) foi liofilizada e seu rendimento foi 14,28 g (71,4%).

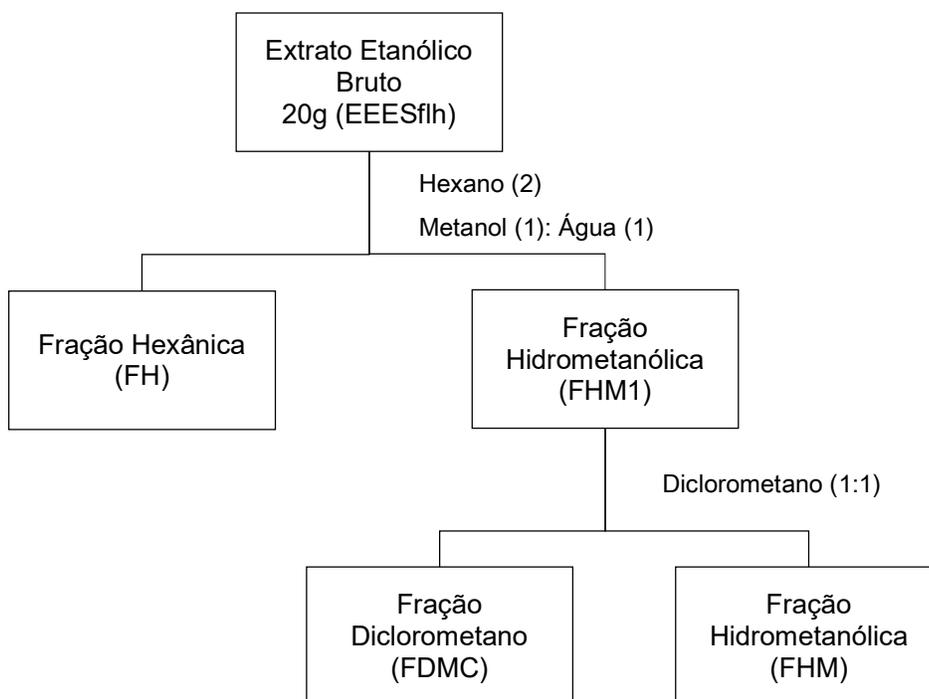


Figura 3 – Representação esquemática de partição líquido – líquido do extrato etanólico bruto das folhas de *Erythroxylum suberosum*

3.2.4.3 Cromatografia em Coluna (CC) - Sephadex® (Fração Hidrometanólica - FHM)

Foi utilizada coluna de vidro, com 21 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, preenchida com suspensão de gel Sephadex® LH-20 (22 g) em metanol (FM2, Métodos Gerais). A amostra (300 mg) foi previamente solubilizada em metanol e aplicada no topo da coluna com auxílio de pipeta volumétrica. Em seguida, a torneira da coluna foi aberta com fluxo de aproximadamente 3 mL por minuto. Frações de 5 mL foram obtidas e concentradas por evaporação do solvente com auxílio de rotaevaporador a 60°C. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo

com seus perfis cromatográficos, resultando em 62 subfrações reunidas em 18 grupos, numerados de FHM1 a FHM18 (Tabela 5), e posteriormente testadas frente à enzima hialuronidase.

Tabela 5 – Frações de FHM – (CC) Sephadex® LH-20

Grupo	Frações	Massa (g)	Rendimento %
FHM1	1 a 9	0,0224	7,50
FHM2	10 a 12	0,0531	17,70
FHM3	13 e 14	0,0172	5,73
FHM4	15	0,0015	0,50
FHM5	16 e 17	0,0061	2,03
FHM6	18 e 19	0,0054	1,80
FHM7	20 e 21	0,0089	2,96
FHM8	22	0,0036	1,20
FHM9	23 a 25	0,0129	4,30
FHM10	26 e 27	0,0059	2,00
FHM11	28 a 30	0,0046	1,53
FHM12	31 a 33	0,0036	1,20
FHM13	34 a 41	0,0094	3,13
FHM14	42 a 44	0,0026	0,86
FHM15	45 a 53	0,0062	2,06
FHM16	54 a 58	0,0024	0,80
FHM17	59 a 60	0,0015	0,50
FHM18	61 e 62	0,0911	0,40

O perfil cromatográfico para as subfrações de FHM1 a FHM18 pode ser visualizado na Figura 4

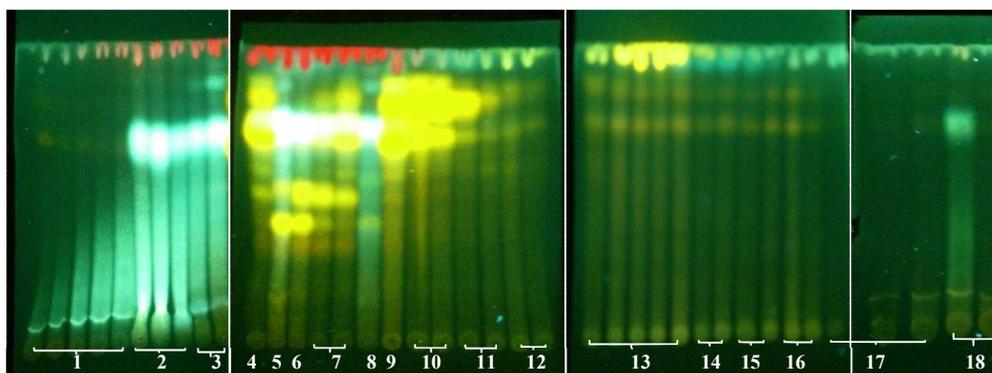


Figura 4 - perfil cromatográfico em CCD para as subfrações de FHM (1 a 18).

Fase móvel (FM3, Métodos gerais): acetato de etila (100):ácido acético (11):ácido fórmico (11):água (16); Revelador: NP/PEG - UV a 365 nm (R3 e R6, Métodos Gerais).

3.2.4.4 Monitoramento por CLAE-DAD

O extrato etanólico bruto foi dissolvido em metanol a 2 mg/mL e suas frações e subfrações em concentrações de até 1 mg/mL. Padrões analíticos (1 mg/mL), escolhidos após análise preliminar do cromatograma e dos espectros no ultravioleta obtidos para o extrato e frações, foram submetidos às mesmas condições de análise das amostras. A caracterização do extrato com relação aos padrões utilizados foi feita por comparação entre o tempo de retenção e o espectro no ultravioleta e pela intensificação da intensidade do pico pela coeluição de amostras com padrão.

O extrato bruto, as frações e os padrões foram analisados por CLAE-DAD, utilizando as condições descritas anteriormente (Métodos Gerais).

3.2.5 Estudo Químico do Extrato Aquoso de *Erythroxylum suberosum* (EAESflh)

3.2.5.1 Cromatografia em coluna (CC) – Sephadex®

Parte do extrato aquoso bruto (0,5 g) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna de Sephadex® LH20, utilizando metanol como fase móvel. Frações (5 mL) foram coletadas, concentradas sob vácuo, monitoradas por CCD e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico de cada uma. Foram obtidas 128 frações reunidas em 20 grupos. A CCD foi desenvolvida utilizando placas cromatográficas de sílica 60G e os reagentes R1 e R3 para visualização (Métodos Gerais).

Os grupos de frações 11-14, 15-18, 21-23 e 25-27 apresentaram-se como sólido amarelo amorfo. O perfil em CCD (FM3, R3 e R6, Métodos Gerais) exibiu bandas de coloração amarelada exibindo fluorescência alaranjada no UV, em tempos de retenção distintos para cada grupo. Os grupos de frações foram nomeados ESA01 (20 mg), ESA02 (50,1 mg), ESA03 (10,9 mg) e ESA04 (14,3 mg), respectivamente sendo posteriormente encaminhados para análise por RMN de ^1H e ^{13}C .

3.2.5.2 Monitoramento por CLAE-DAD e CLAE-IR

O extrato bruto foi dissolvido em água desionizada a 2 mg/mL. Padrões analíticos (1 mg/mL) escolhidos após análise preliminar dos cromatogramas e dos

espectros no ultravioleta obtidos para o extrato e frações, foram submetidos às mesmas condições de análise das amostras. A caracterização do extrato com relação aos padrões utilizados foi feita comparando o tempo de retenção e o espectro no ultravioleta.

O extrato bruto, as frações e os padrões utilizados foram analisados por CLAE DAD e CLAE-IR utilizando as condições de análise descritas anteriormente (Métodos Gerais)

3.2.6 Estudo Químico do Extrato Hexânico de *Erythroxylum suberosum* (EHESflh)

3.2.6.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60

Parte do extrato hexânico bruto (5,0 g) foi submetida a fracionamento por CC de sílica gel (altura = 22 cm; diâmetro= 4,1 cm) previamente, empacotada com hexano, utilizando a seguinte ordem de eluição: hexano; hexano:acetato de etila; acetato de etila: metanol; metanol, em diferentes proporções. Frações (30 mL) foram coletadas, concentradas sob vácuo com auxílio de rotaevaporador, monitoradas por CCD e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico de cada uma. Foram coletadas 176 frações, reunidas em 38 grupos. A coluna cromatográfica (CC) foi empacotada utilizando sílica gel 60G e a CCD foi desenvolvida utilizando placas cromatográficas de sílica 60G, e reagentes de detecção anisaldeído/ H₂SO₄ para visualização (105) (Métodos Gerais).

As frações foram tratadas com mistura dos solventes éter etílico:etanol (1:2), buscando o isolamento de substâncias purificadas ou misturas menos complexas. A caracterização química destes compostos foi realizada a partir de métodos espectrométricos de análise (RMN de ¹H e ¹³C).

- Isolamento:

Os grupos 20 (frações 94-112), 22 (frações 114-118), 23 (frações 119-125), 28 (frações 136-139) e 35 (frações 160-168), foram obtidos a partir do fracionamento por CC do extrato hexânico bruto sob eluição dos solventes hexano: acetato de etila (9:1). Cada grupo foi submetido a tratamento com mistura dos solventes éter e etanol (1:2),

originando um sobrenadante e um precipitado sólido amorfo, de cor branca e solúvel em clorofórmio (CHCl_3), para cada amostra após o tratamento. Os precipitados foram denominados de ESH 05 (0,02 g), ESH 06 (0,02 g), ESH 08 (0,02 g), ESH 09 (0,019 mg), ESH 09 (0,019 mg) e ESH12 (0,02 g), respectivamente, sendo encaminhados para análise por RMN de ^1H e ^{13}C .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE

4.1.1 Cromoglicato Dissódico (DSCG) e Compostos Fenólicos

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Di Ferrante (112), com adaptações. O método é baseado na formação de complexos insolúveis entre brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e o substrato de alto peso molecular (> 8 kDa) remanescente após a incubação com a enzima (68, 112) (Figura 5).

O ácido hialurônico é um polímero linear de dissacarídeos formados por N-acetilglicosamina e ácido glicurônico, unidos por meio de ligações glicosídicas alternadas β -1,4 e β -1,3. Em contato com a enzima hialuronidase testicular bovina (BTH) sofre degradação pela quebra das ligações glicosídicas na posição β -1,4, originando derivados oligossacarídeos contendo 4 a 12 unidades monoméricas. Na presença de um inibidor o substrato não será degradado podendo ser precipitado por diferentes reagentes como CTAB (63). Esta precipitação, ocasionada pela formação de complexos insolúveis, promove a turvação do meio e a atividade enzimática foi evidenciada pelo grau de turbidez da solução que foi mensurada, no presente estudo, em espectrofotômetro a 600 nm.

O DSCG é um fármaco antialérgico utilizado no tratamento e profilaxia da asma brônquica, que promove a estabilização da membrana celular e inibe a liberação de mediadores químicos, reduzindo a resposta alérgica e a reação inflamatória no organismo (82). A capacidade desse composto em inibir a atividade da hialuronidase é apresentada em estudos, *in vitro*, sobre a ação de agentes, naturais ou sintéticos, frente à enzima (63, 81).

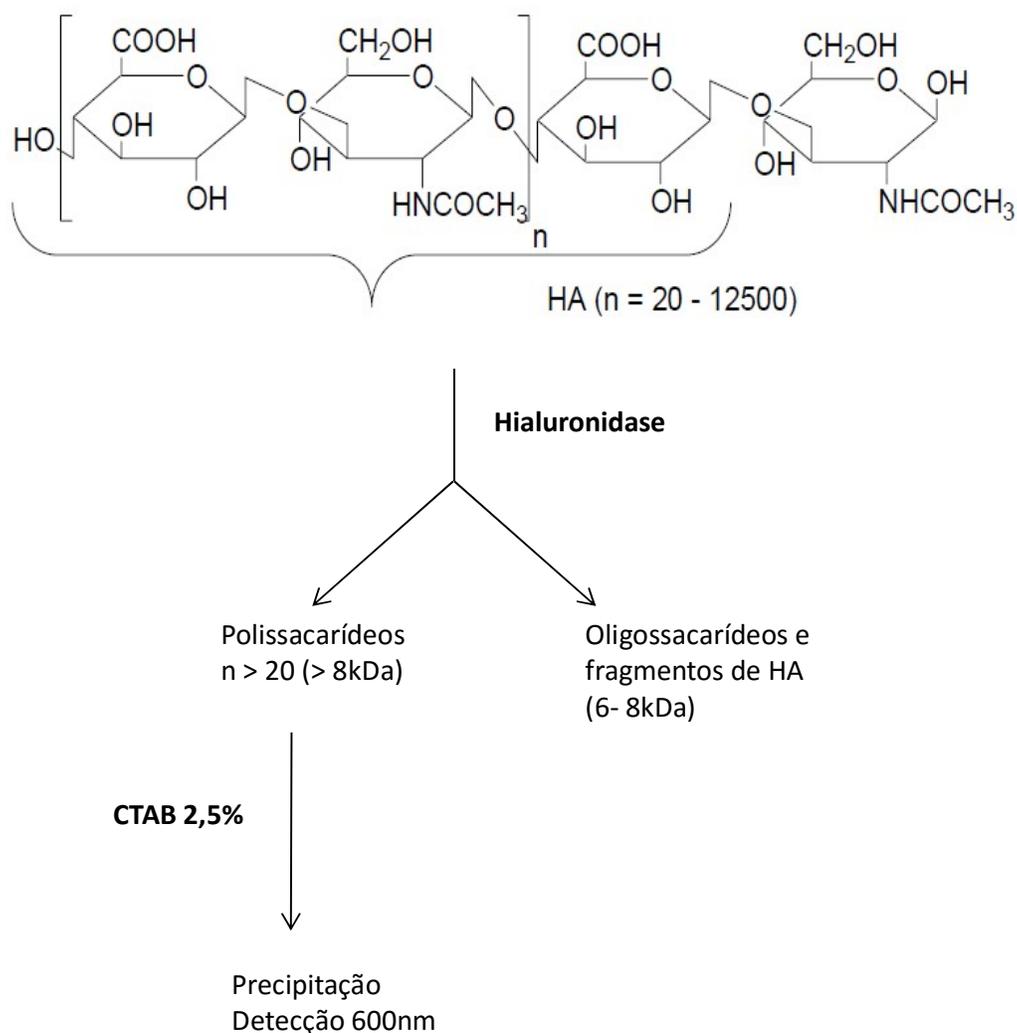


Figura 5 - Representação esquemática da determinação da atividade de inibição sobre a hialuronidase (63).

Os valores de IC_{50} para cada inibidor dependem do método utilizado e das condições em que se desenvolveu o ensaio, como tempo de incubação, tipo de enzima, concentrações da enzima e do substrato e pH do meio de reação. Uma pesquisa mostrou que alguns compostos não produziram o mesmo efeito, frente à enzima, quando submetidos a diferentes condições de ensaio. O DSCG, conhecido como forte inibidor da hialuronidase com $IC_{50} = 29 \mu M$ (113), apresentou perfil inibitório discrepante quando avaliado por turbidimetria (pH = 5) sendo considerado, pelo autor, de baixa potência frente à enzima, enquanto resultados de outro grupo de pesquisa mostrou nenhuma inibição da enzima em concentrações abaixo de 2 mM (74).

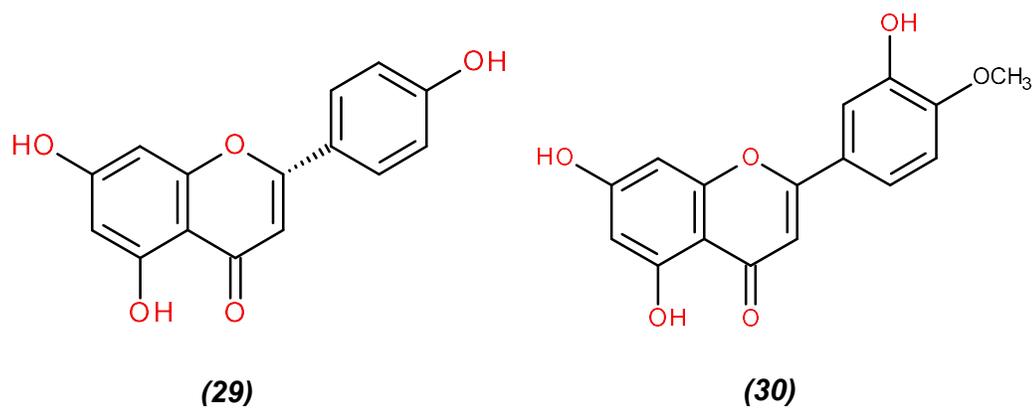
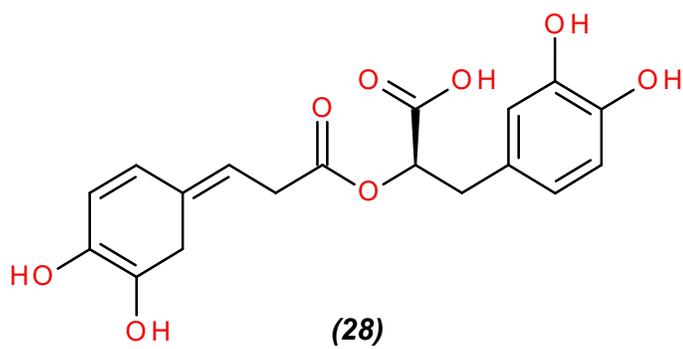
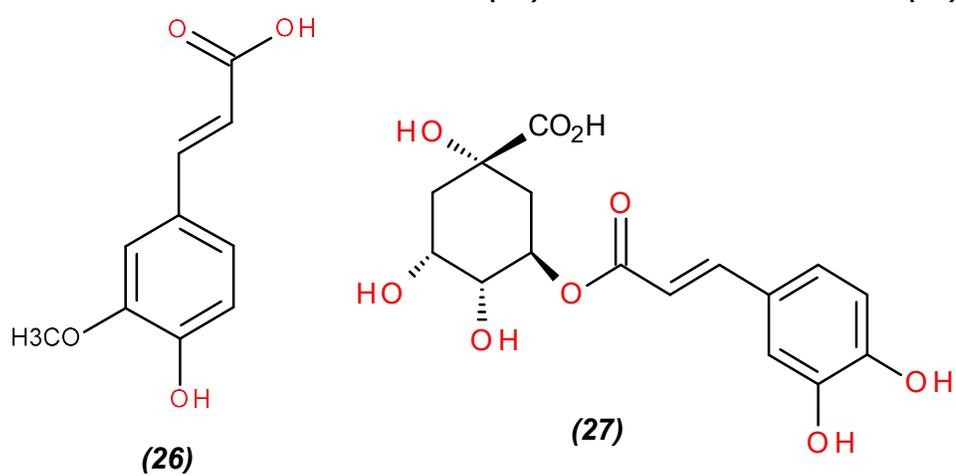
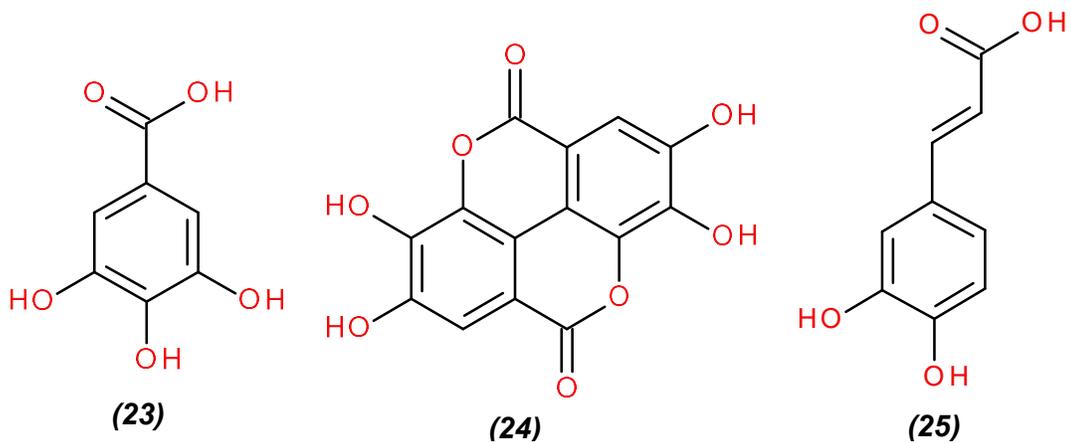
No presente estudo, o DSCG inibiu a enzima em aproximadamente 89% na concentração de 8 mg/mL. Entretanto, a baixa solubilidade desse composto, em concentrações maiores, associada ao pequeno volume de amostra utilizado na execução do teste, podem ser associadas a esse resultado frente à atividade da enzima hialuronidase testicular bovina (BHT).

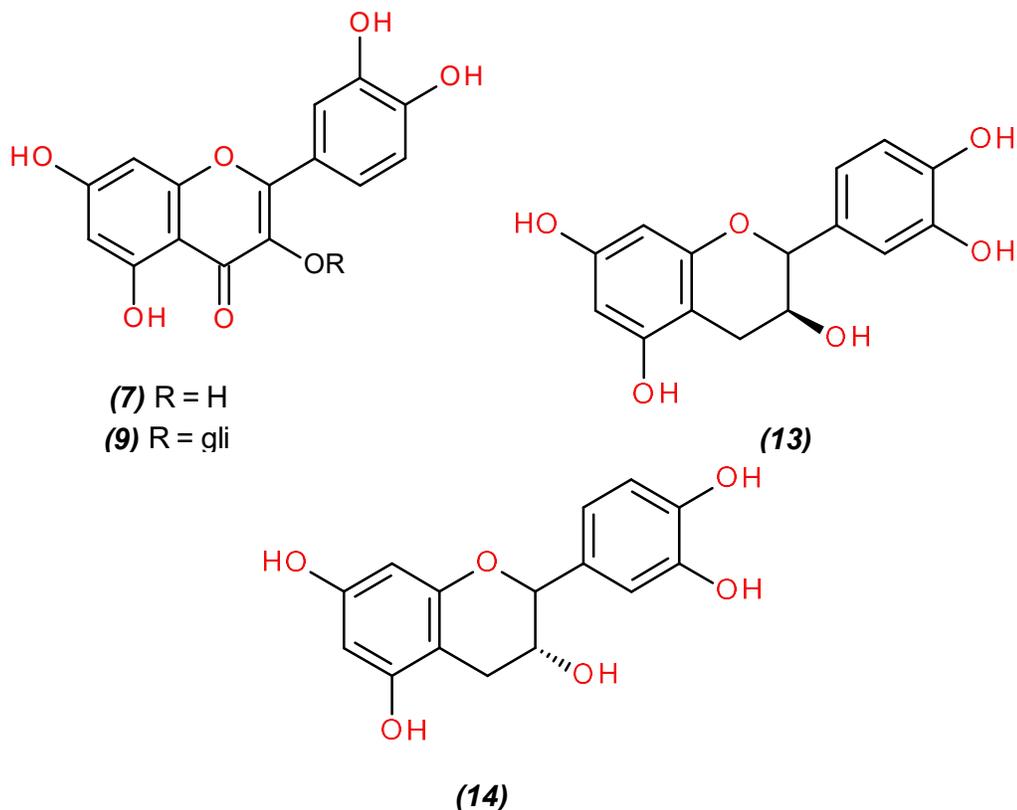
Outros compostos foram testados frente à enzima hialuronidase, dentre eles os fenólicos simples como o ácido gálico (**23**) e seu dímero de condensação ácido elágico (**24**) (derivados do ácido benzoico), ácidos cafeico (**25**) e ferúlico (**26**) (derivados do ácido cinâmico) além dos ácidos clorogênico (**27**) e rosmarínico (**28**) (ésteres do ácido cafeico e láctico, respectivamente). Também foram testados os flavonóis quercetina (**7**) e isoquercitrina (**9**), as flavanonas naringenina (**29**) e hesperitina (**30**) e as catequinas (catequina (**13**) e epicatequina (**14**)). Esses compostos foram isolados, em sua maioria, a partir de plantas e existem relatos na literatura que os caracterizam como inibidores naturais da atividade da hialuronidase (78, 93, 94, 114, 115). As amostras foram diluídas em metanol, água destilada ou DMSO e testadas inicialmente na concentração final de até 1,6 mg/mL. Os resultados estão apresentados na Tabela 6 como média \pm erro padrão (n = 3).

Tabela 6 – Inibição (%) da hialuronidase por compostos fenólicos e DSCG

Fenólicos	Concentração	Inibição (%)
(¹)Ác. Cafeico		NI
(¹)Isoquercitrina		NI
(¹)Ác. Ferulico		NI
(¹)Ác. Clorogênico		NI
(¹)Naringenina		NI
(¹)Ác. Gálico	1,6 mg/mL	23,9 \pm 0,015
(¹)Epicatequina		13,8 \pm 0,01
(¹)Catequina		21,51 \pm 0,031
(¹)Hesperitina		34,9 \pm 0,072
(²)Ác. Rosmarínico		95,3 \pm 0,04
(²)Quercetina	1 mg/mL	100 \pm 0,02
(¹)Ác. Elágico	0,2 mg/mL	99,8 \pm 0,031
(³)DSCG	8 mg/mL	89,3 \pm 0,054
(1) Metanol		NI
(2) DMSO	Solventes	NI
(3) H ₂ O		NI

(¹),(²),(³)Solventes utilizados para diluir os compostos. NI = não houve inibição, DSCG = Cromoglicato dissódico





Dos compostos fenólicos testados, o ácido elágico apresentou forte potencial inibitório, de aproximadamente 99,8%, na concentração de 0,2 mg/mL. A quercetina mostrou inibição máxima na concentração de 1 mg/mL e o ácido rosmarínico inibiu cerca de 95% na concentração de 1,6 mg/mL. A hesperitina, catequina, epicatequina e ácido gálico inibiram entre 14 e 35% e os demais compostos não foram ativos nas concentrações testadas. Os solventes também foram avaliados e não se observou alteração na atividade enzimática na presença dos mesmos.

Estudos anteriores evidenciaram que os flavonoides podem inibir a hialuronidase (86, 88, 116, 117), além de outras enzimas. Liu *et al* (2013) mostraram que quercetina, rutina, kaempferol e isoramnetina, isolados das flores de *Humulus lupulus* L., inibiram a atividade da hialuronidase numa concentração dose dependente, e que essa atividade pode estar relacionada a alterações conformacionais na estrutura da enzima por meio de alteração no sítio ativo ou impedindo a ligação com o substrato com consequente inibição de sua ação catalítica (88). O ácido elágico e o ácido rosmarínico também foram descritos na literatura como inibidores de hialuronidase (118). Este último, foi isolado das folhas de *Melissa officinalis* e inibiu a enzima com IC₅₀ 0,2 mM (115).

Estudo realizado por Kuppusamy *et al* (1990) reavaliou os efeitos de 31 flavonoides sobre a hialuronidase testicular bovina (BTH). Dentre os flavonoides investigados apenas os taninos condensados inibiram completamente a atividade da enzima na concentração de 50 μ M enquanto que kaempferol, silibina, apigenina, luteolina, miricetina e quercetina inibiram entre 29% e 76% na concentração de 250 μ M. O estudo da cinética da reação revelou que esses compostos inibem a enzima de forma competitiva. Com base nesses resultados os autores concluíram que a presença de dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 seria determinante para a inibição, enquanto que a introdução de hidroxilas nas posições 5, 7 e 4' poderiam conferir efeito inibitório mais potente sobre a enzima, porém a presença de um substituinte glicosilado reverteria esse efeito. Portanto, agliconas seriam inibidores mais potentes que seus derivados glicosilados (86, 94) o que justificaria, no presente estudo, a diferença entre o potencial inibitório da quercetina e do glicosídeo isoquercitrina (86).

Além disso, diferenças entre condições de incubação, concentração de substrato e tipo de enzima utilizado nos ensaios, podem influenciar na intensidade de ação dos inibidores sobre a hialuronidase, o que explicaria as diferenças entre valores de IC_{50} encontrados para um mesmo inibidor, frente à enzima (68).

- IC_{50} - ácido elágico, quercetina, ácido rosmarínico e DSCG

Foram construídas curvas de dose e resposta utilizando as concentrações no meio de reação de 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313; 0,0156; 0,008; 0,004 mg/mL para a quercetina e o ácido rosmarínico e de 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,006; 0,003 mg/mL para o ácido elágico. Para obtenção da curva de dose e resposta do controle DSCG foram testadas as seguintes concentrações 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 mg/mL.

Foram avaliadas concentrações de forma que a concentração necessária para 50% da atividade máxima inibitória (IC_{50}) fosse calculada. O ácido elágico apresentou IC_{50} de 0,039 mg/mL seguido pela quercetina com IC_{50} de 0,36 mg/mL e ácido rosmarínico com IC_{50} de 0,827 mg/mL. O DSCG apresentou IC_{50} de 4,8 mg/mL, significativamente maior que os demais compostos testados frente à enzima (Figura 6).

Quimicamente, os ácidos gálico e elágico entram na biossíntese dos taninos pela formação de ésteres com molécula de glicose. Uma das principais características desse grupo de compostos reside na capacidade se complexar com proteínas, provavelmente, pela formação de ligações de hidrogênio entre o sítio ativo dessas moléculas e grupos fenólicos presentes na estrutura química dos taninos (119). Dessa forma, é possível sugerir que a ação inibitória do ácido elágico, no presente estudo, frente à enzima hialuronidase, ocorra devido a capacidade, atribuída aos taninos, de precipitar proteínas.

Não foram determinados os valores de IC_{50} para a maioria dos flavonoides testados, pois grande parte deles não foi ativa ou inibiu fracamente a enzima na concentração de até 1,6 mg/mL. A baixa solubilidade desses compostos em concentrações maiores tornou-se uma limitação na metodologia utilizada.

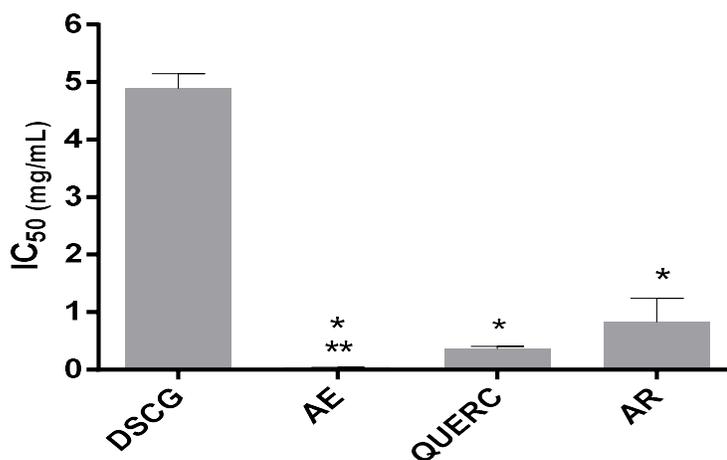


Figura 6 - IC_{50} : ácido elágico, quercetina, ácido rosmarínico; e DSCG frente à hialuronidase. Os resultados expressam os valores da média \pm erro padrão (n=3), analisados por ANOVA seguida de Tukey com $p < 0,05$. * $p < 0,0001$ (vs DSCG); ** $p < 0,05$ (vs AR). AE = ácido elágico; QUERC = quercetina; AR = ácido rosmarínico, DSCG = cromoglicato dissódico

4.1.2 Extratos Brutos de Espécies de *Erythroxyllum* (screening)

Foi avaliado o potencial de inibição de 12 extratos brutos de espécies de *Erythroxyllum* ocorrentes no Cerrado, sobre a atividade da enzima hialuronidase,

conforme descrito anteriormente (Materiais e Métodos). Os extratos foram diluídos em uma concentração inicial de 5 mg/mL a partir da qual foi determinada a concentração no meio de reação (0,1852 mg/mL). As porcentagens de inibição de cada extrato vegetal, dos solventes utilizados para diluir os extratos e dos inibidores DSCG (8 mg/mL) e quercetina (1 mg/mL) foram calculadas com base nas leituras de absorbância obtidas em 600 nm (Métodos Gerais) e apresentadas na Tabela 7 como média \pm erro padrão (n = 3).

Tabela 7 – Inibição (%) da hialuronidase por extratos brutos de espécies de *Erythroxylum*, DSCG e quercetina

Espécie	Extrato	Inibição (%)
<i>Erythroxylum suberosum</i>	¹ Aq (flh)	92,04 \pm 0,01
	¹ EtOH (flh)	100 \pm 0,01
	² Hex (flh)	⁴ NI
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	¹ Aq (flh)	1,03 \pm 0,06
	¹ EtOH (flh)	NI
	² Hex (flh)	NI
<i>Erythroxylum daphnites</i>	¹ Aq (flh)	4,37 \pm 0,002
	¹ EtOH (flh)	95,8 \pm 0,26
	¹ EtOH (flr)	89,1 \pm 1,5
	¹ EtOH (glh)	98,62 \pm 0,57
	² Hex (flh)	NI
	² Hex (flr)	NI
³ DSCG	(8 mg/mL)	89,29 \pm 0,54
² Quercetina	(1mg/mL)	100 \pm 0,02
(1) Metanol		NI
(2) DMSO	Solventes	NI
(2) H ₂ O		NI

flh: folha; flr: flor; glh: galhos; Aq: aquoso, EtOH: etanólico, Hex: hexânico; ⁴NI: não houve inibição.^{1, 2.}
³Solventes utilizados para diluir os extratos

Os resultados mostraram que os extratos etanólico e aquoso das folhas de *E. suberosum* e etanólico das folhas, flores e galhos de *E. daphnites* inibiram a enzima de forma significativa com atividade acima de 50%. Achados na literatura mostraram que extratos polares de espécies vegetais podem inibir a hialuronidase, provavelmente, devido à presença de compostos fenólicos em sua composição (91, 94). Entretanto, os extratos: aquoso de *E. daphnites*, e aquoso e etanólico de *E. subrotundum* não apresentaram atividade inibitória significativa.

Um estudo realizado com *E. daphnites*, indicou a presença dos compostos fenólicos hiperosídeo e rutina (derivados glicosilados da quercetina) e do ácido clorogênico, na composição dos extratos aquoso e etanólico e a interferência sazonal

nos níveis de fenólicos e flavonoides totais determinados para a espécie (50). Com isso, é possível sugerir que a capacidade inibitória, exercida pelos extratos de *E. daphnites* sobre a enzima hialuronidase, não se relacione apenas à natureza e à presença de fenólicos na composição dos mesmos, mas também à sazonalidade desses compostos e à forma como se apresentam (agliconas, glicosídeos ou ésteres). Contudo, a carência de dados relacionados ao estudo químico dificulta o entendimento das atividades biológicas atribuídas a estas espécies.

Os extratos hexânicos não foram ativos frente à enzima, provavelmente devido à baixa solubilidade dos compostos presentes nos solventes utilizados na execução do ensaio. Para os extratos que apresentaram atividade de inibição acima de 50%, foram construídas curvas de dose e resposta e determinados os valores da IC₅₀.

- IC₅₀ - Extratos Brutos de *Erythroxylum*

O perfil inibitório dos extratos sobre hialuronidase foi avaliado por meio da observação da capacidade de inibição em relação à concentração da amostra aplicada. Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para cada curva e os valores de IC₅₀ obtidos.

Os extratos brutos: etanólico das folhas, flores e galhos de *E. daphnites* (EEEDflh, EEEDflr e EEEDglh), aquoso e etanólico das folhas de *E. suberosum* (EEESflh e EAESflh) foram solubilizados em metanol. As curvas de dose e resposta, para cada extrato, foram obtidas por meio de diluições seriadas a partir de uma solução na concentração inicial de 10 mg/mL. As concentrações dos extratos, no meio de reação, foram calculadas em cada ponto das respectivas curvas (5,78; 11,57; 23,15; 46,30; 92,60; 185,2 e 370,4 µg/mL) apresentadas na Figura 7.

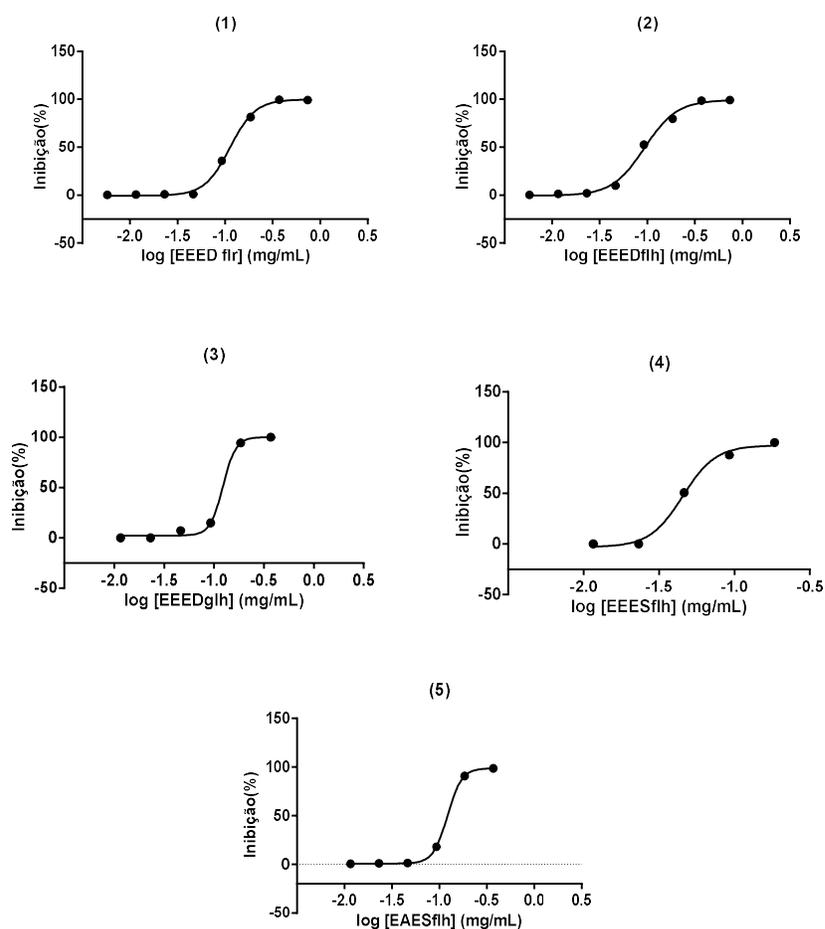


Figura 7 - Curvas de dose e resposta para os extratos brutos de *Erythroxylum* frente à hialuronidase. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão ($n=3$). Extrato etanólico das flores EEEDflr (1), folhas EEEDflh (2), e galhos EEEDglh (3) de *E. daphnites*, etanólico EEESflh (4) e aquoso EAESflh (5) das folhas de *E. suberosum*.

Todos os extratos brutos foram estatisticamente diferentes do padrão cromoglicato dissódico ($IC_{50} = 4,8$ mg/mL) nas concentrações avaliadas. Quando comparados entre si, EEED flr ($IC_{50} = 0,113$ mg/mL), EEEDglh ($IC_{50} = 0,123$ mg/mL), EEESflh ($IC_{50} = 0,045$ mg/mL) apresentaram diferença estatística significativa, enquanto que EEEDflh ($IC_{50} = 0,094$ mg/mL) e EAESflh ($IC_{50} = 0,090$ mg/mL) foram semelhantes em sua inibição. Com base nesses resultados, o extrato etanólico (EEESflh) das folhas de *E. suberosum* foi escolhido para dar continuidade ao estudo fitoquímico, biomonitorado por ensaio enzimático frente à hialuronidase, por ter apresentado o IC_{50} relativamente menor que dos demais extratos (Figura 8).

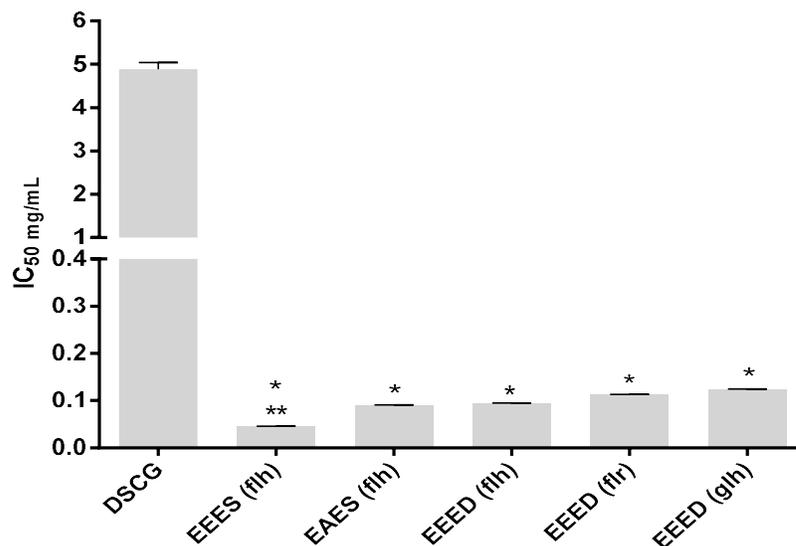


Figura 8 - IC₅₀: extratos brutos de *Erythroxyllum* em comparação ao controle DSCG frente à hialuronidase

Os resultados expressam os valores da média \pm erro padrão (n=3), avaliados por ANOVA seguida de Tukey com $p < 0,05$. * $p < 0,0001$ (vs DSCG); ** $p < 0,05$ (vs EEED flr, EEED flh, EEED glh e EAES flh) EEES – Extrato etanólico de *E. suberosum*, EEED – Extrato etanólico de *E. daphnites*, EAES – Extrato aquoso de *E. suberosum*, (flh) – folhas, (flr) – flores, (glh) – galhos, DSCG – Cromoglicato dissódico

4.1.3 Frações do Extrato Etanólico *Erythroxyllum suberosum* (EEESflh)

As frações obtidas por partição do extrato EEESflh (Parte Experimental), foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a enzima hialuronidase. A fração hidrometánolica (FHM) apresentou maior porcentagem de inibição ($99\% \pm 0,6$) em comparação com as frações hexânica FH ($74,7\% \pm 1,06$) e diclorometano FDCM ($4,2\% \pm 0,3$), assemelhando-se ao extrato bruto EEESflh ($100\% \pm 0,1$) (Figura 9).

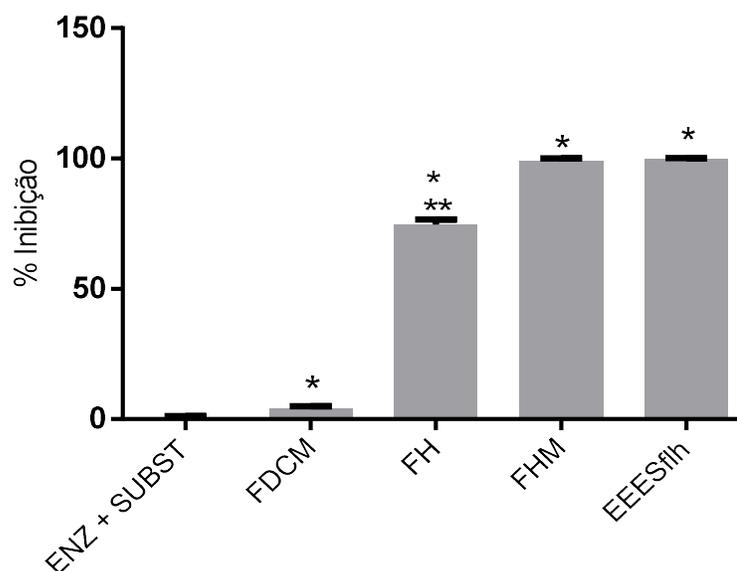


Figura 9 – Inibição (%) da hialuronidase para o extrato etanólico bruto e frações de *E. suberosum*. Os resultados representam os valores da média \pm erro padrão (n=3), avaliados por ANOVA seguida de Tukey com $p < 0,05$. * $p < 0,001$ (vs ENZ + SUBST); ** $p < 0,001$ (vs FHM e EEESflh). EEESflh = extrato etanólico bruto das folhas de *E. suberosum*; FH = fração hexânica; FDCM = fração diclorometano. ENZ+SUBST = controle negativo

- Subfrações da fração hidrometanólica (FHM)

Os 18 grupos de frações FHM1 a FHM18, obtidos por CC de Sephadex® da fração hidrometanólica (FHM) (Parte Experimental), também foram testados frente à hialuronidase e os resultados estão apresentados na Figura 10.

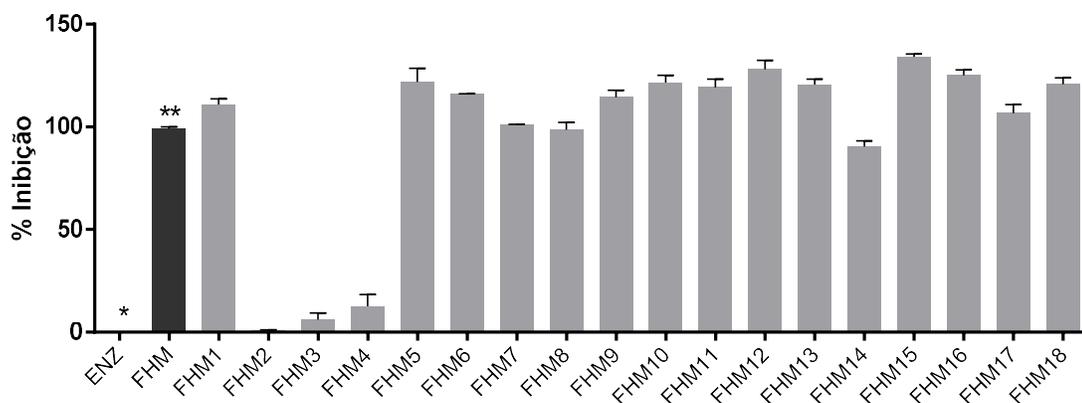


Figura 10 – Inibição (%) da hialuronidase por subfrações de FHM. Os resultados representam os valores da média \pm erro padrão (n=3), avaliados por ANOVA seguida de Dunnett com $p < 0,05$. * $p < 0,001$ (vs FHM1; FHM5-18; FHM); ** $p < 0,001$ (vs FHM2-4; FHM7, FHM10, FHM12-13, FHM15-16 e FHM18). FHM = fração hidrometanólica, ENZ = controle negativo

Os resultados mostraram que a atividade inibitória observada para o extrato bruto e fração original (FHM) foi preservada na maioria das subfrações. Os grupos FHM1 e FHM5 a FHM18 foram ativos contra a enzima, com inibição acima de 50% na concentração de aproximadamente 0,2 mg/mL no meio de reacional, a mesma utilizada para testar os extratos brutos aquoso (EAESflh) e etanólico (EEESflh) e frações hexânica (FH), diclorometano (FDCM) e hidrometanólica (FHM) de *E. suberosum*.

- ESE02

ESE02, obtido por fracionamento químico do extrato etanólico bruto de *E. suberosum* (EEESflh) (Parte Experimental) também foi testado frente à hialuronidase, apresentando máximo de inibição da atividade enzimática na concentração de aproximadamente 0,1 mg/mL (concentração no meio reacional), que constitui metade da concentração utilizada para testar o extrato bruto e suas frações.

Para construção de curva de dose resposta e determinação da IC₅₀, de ESE02, foram utilizadas diluições seriadas a partir de uma solução preparada na concentração inicial de 5 mg/mL a partir da qual foi calculada a concentração reacional de ESE02 para cada ponto da curva (0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,1 e 0,2 mg/mL). ESE02 apresentou IC₅₀ de 0,039 mg/mL, significativamente menor que do controle DSCG (IC₅₀ = 4,8 mg/mL) e da quercetina (IC₅₀ = 0,36 mg/mL). Não houve diferença estatística significativa ao ser comparado ao extrato bruto EEESflh (IC₅₀ = 0,047 mg/mL) (Figura 11).

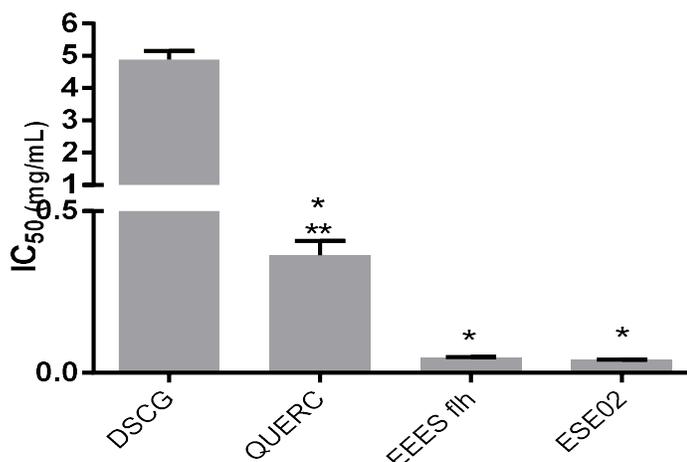


Figura 11 – IC₅₀ para ESE02 em comparação com EEESflh, DSCG e Quercetina frente à hialuronidase. Os resultados expressam os valores da média ± erro padrão (n=3), avaliados por ANOVA seguida de Tukey com $p < 0,05$. * $p < 0,0001$ (vs DSCG); ** $p < 0,05$ (vs EEES flh e ESE02). EEESflh = Extrato etanólico de *E. suberosum*; QUERC = quercetina; DSCG = Cromoglicato dissódico.

4.3 ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Erythroxyllum suberosum*

4.3.1 Caracterização Farmacognóstica por CCD

Os extratos brutos EHESflh, EEESflh e EAES e frações FHM e FDCM, obtidas por partição líquido-líquido, foram avaliadas por CCD utilizando reagentes clássicos para detecção dos principais grupos funcionais de compostos do metabolismo vegetal como terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (especialmente flavonoides), cumarinas, saponinas e ácidos de cadeia longa (Parte Experimental).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método rápido, eficiente, de baixo custo e largamente empregado em controle da qualidade de plantas medicinais, tanto em matéria-prima vegetal quanto em fitoterápicos derivados (120). Essa técnica é também utilizada no monitoramento de processos extrativos que visam separar, identificar e/ou quantificar compostos ou misturas menos complexas.

A análise preliminar com o reagente anisaldeído ácido (R1) mostrou em todos os extratos e frações a presença de bandas de coloração característica para compostos carbonílicos, terpênicos e fenólicos (Tabela 8).

Quando os cromatogramas foram analisados utilizando o reagente NP-PEG (R3) sob radiação UV (365 nm) (R6), mostraram bandas com fluorescência alaranjada, amarela ou verde, nos extratos aquoso (EAES) e etanólico (EEES), e nas frações hidrometanólica (FHM) e diclometano (FDCM), que são características de compostos fenólicos de esqueleto flavonoídico substituído por grupo OH na posição 3' e/ou 4' (Figura 12) (121).

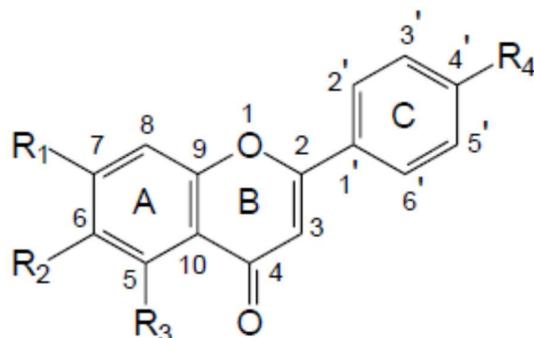


Figura 12 – Núcleo fundamental dos flavonoides

Não foram observadas bandas que caracterizam a presença de alcaloides por meio de seu revelador específico Dragendorff (R2) nos extratos brutos e frações de *E. suberosum*. A avaliação para detecção de alcaloides foi realizada, principalmente, devido à presença marcante desses compostos em várias espécies desse gênero que constituem fonte natural de cocaína, alcaloide do grupo tropânico, farmacologicamente ativo (35, 38).

Adicionalmente, foi detectada a presença de saponinas nos extratos polares (EAESflh e EEESflh) pela utilização do revelador Komarovsky (R5).

Tabela 8 - Estudo farmacognóstico preliminar (CCD) dos extratos brutos e frações de *Erythroxylum suberosum*

Reagentes	EAES	FHM	EHES	FH	FDCM	EEES
Sol. Ác. Anisaldeído (R1)	+	+	+	+	+	+
Dragendorff (R2)	-	-	-	-	-	-
NP-PEG (R3)	+	+	-	-	+	+
Verde de Bromocresol (R4)	-	-	+	-	-	+
Komarovsky (R5)	+	NA	-	NA	NA	+
Radiação UV (R6)	+	+	-	-	+	+

*NA – não avaliada

Uma avaliação posterior em CCD, utilizando NP-PEG e radiação UV (365nm) (FM3, R3 e R6, Métodos Gerais) (105), mostrou a presença dos ácidos fenólicos, cafeico e clorogênico, na composição dos extratos brutos aquoso (EAESflh) e etanólico (EEESflh) e na fração hidrometanólica (FHM) do extrato etanólico (Figura 13 - A). Também foi observada a presença, nos extratos aquoso e etanólico, do flavonol quercetina, e dos derivados glicosilados rutina e isoquercitrina na fração hidrometanólica (FHM) do extrato etanólico (Figura 13 - B). A análise foi realizada por comparação em eluições paralelas e sobreposição dos extratos com os padrões analíticos: ácido clorogênico (Sigma®), ácido cafeico (Sigma®), ácido ferúlico (Sigma®), rutina (Sigma®), isoquercitrina (Sigma®) e quercetina (Cromadex®).

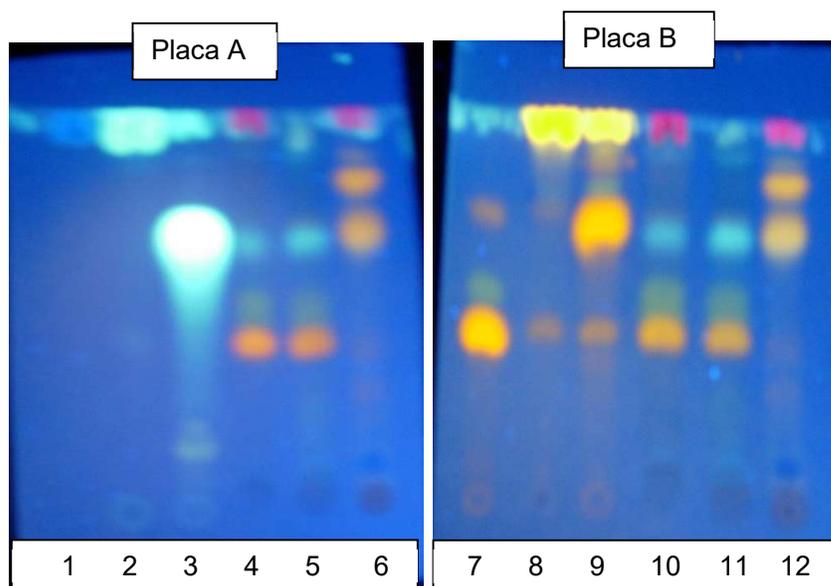


Figura 13 - Perfil cromatográfico (CCD) padrões comerciais, extratos e frações de *Erythroxylum suberosum*

A - ácido ferúlico (1), ácido cafeico (2), ácido clorogênico (3), extratos brutos EEESflh (4), EAESflh (5), FHM (6)

B: rutina (7), quercetina (8), isoquercitrina (9), EEESflh (10), EAESflh (11) e FHM (12)

Eluente = acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); Revelador = NP-PEG e radiação UV, 365nm

EAESflh = extrato aquoso, EEESflh = extrato etanólico, FHM = fração hidrometanólica

Os resultados obtidos pela análise dos extratos e frações por CCD foram corroborados por estudos realizados por este grupo de determinação quantitativa da rutina no extrato aquoso das folhas de *E. suberosum* (59), e avaliação sazonal dos

teores de hiperosídeo e isoquercitrina relacionados com atividade antioxidante nos extratos polares desta espécie (122).

A presença de flavonoides no gênero *Erythroxylum* tem sido bem caracterizada, se tornando alvo de várias pesquisas que visam a descoberta de novas moléculas farmacologicamente ativas a partir de plantas (42, 44, 123). Alguns flavonoides isolados das folhas de *E. australe* e de *E. taxa* foram utilizados como marcadores quimiotaxonômicos, contribuindo para identificação destas espécies (124, 125).

4.3.2 Constituintes Químicos no Extrato Etanólico (EEESflh) e Frações (FHM e FDCM)

O extrato EEESflh e suas frações FHM e FDCM foram analisados por CLAE-DAD em 280 nm e 354 nm, utilizando o método descrito anteriormente na seção Métodos Gerais. Os parâmetros para caracterização dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *E. suberosum* foram o tempo de retenção e o espectro no UV para cada pico comparados aos de padrões comerciais. Dessa forma foram identificados os seguintes compostos:

4.3.2.1 Rutina

O cromatograma do extrato etanólico bruto (EEESflh) em 354 nm (Figura 4.12), apresentou 3 picos majoritários em $t_R = 27,12$ min (pico 1), $t_R = 31,06$ min (pico 2) e $t_R = 43,84$ min (pico 3). A pureza do pico aliada à similaridade espectral no UV $> 0,99$ com os padrões hiperosídeo, isoquercitrina e rutina indicou a presença de flavonoide derivado de quercetina no $t_R = 27,12$ min (Figura 14). A análise por CCD do extrato EEESflh, em eluição paralela com os padrões rutina e isoquercitrina, confirmou a presença de rutina na composição desse extrato (Figura 13), corroborando os achados por CLAE-DAD.

Os picos 2 e 3 mostraram baixa similaridade com os padrões utilizados, não permitindo a identificação destes compostos por esta análise.

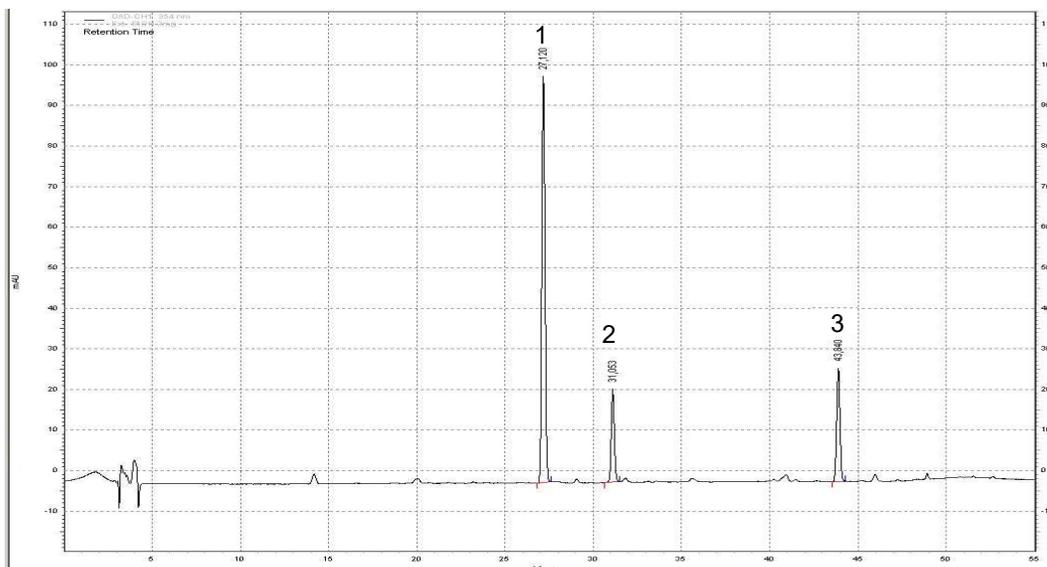


Figura 14 – Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEESflh) por CLAE-DAD em 354 nm
 Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LiChroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL/min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm

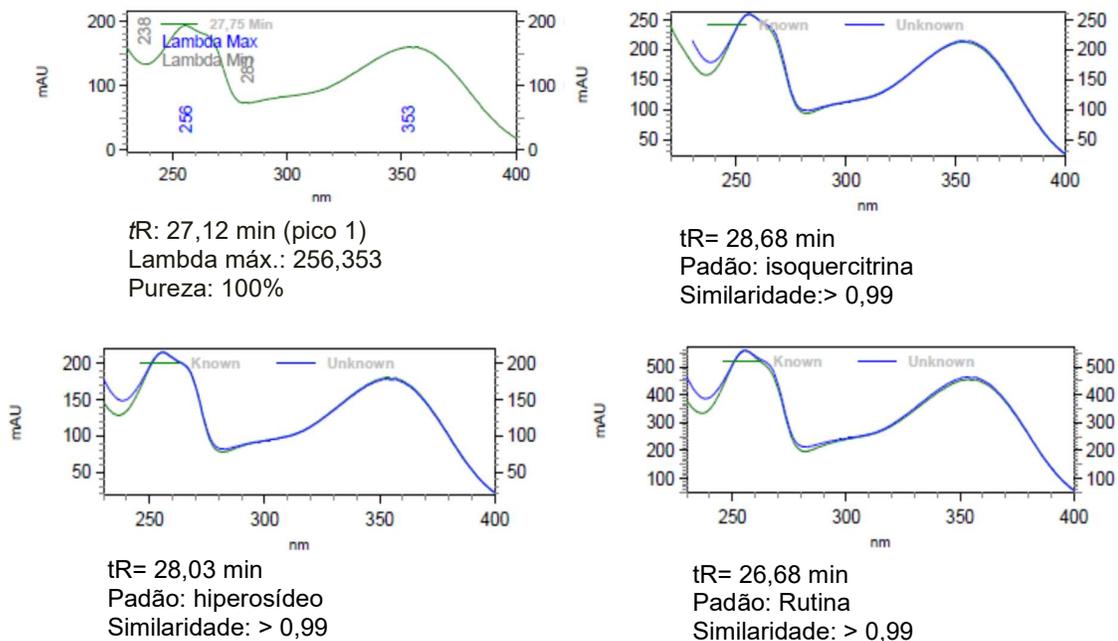


Figura 15 – Espectros no UV para o pico 1 (tR = 27,12 min) exibidos no cromatograma de EEESflh em 354 nm
 Sobreposto aos espectros de padrões: hiperosídeo (tR = 28,03 min), isoquercitrina (28,68 min) e rutina (tR = 26.68 min)

4.3.2.2 Catequina, Epicatequina e Derivados

O cromatograma do extrato EEESflh por CLAE-DAD em 280 nm (Figura 16), apresentou picos em $t_R = 14,1$ (pico 1) min, $t_R = 18,6$ min (pico 2), $t_R = 20,67$ min (pico 3), $t_R = 22,57$ min (pico 4), $t_R = 24,73$ min (pico 5) e $t_R = 26,01$ min (pico 6). A comparação com padrões comerciais indicou a presença de catequina ($t_R = 14,1$ min) no pico 1 e epicatequina ($t_R = 18,6$ min) no pico 2, com pureza e similaridade no UV $> 0,99$, além de outros derivados de catequina no $t_R = 20,67$ min (pico 3), $t_R = 22,57$ min (pico 4), $t_R = 24,73$ min (pico 5) e $t_R = 26,01$ min (pico 6) em EEESflh.

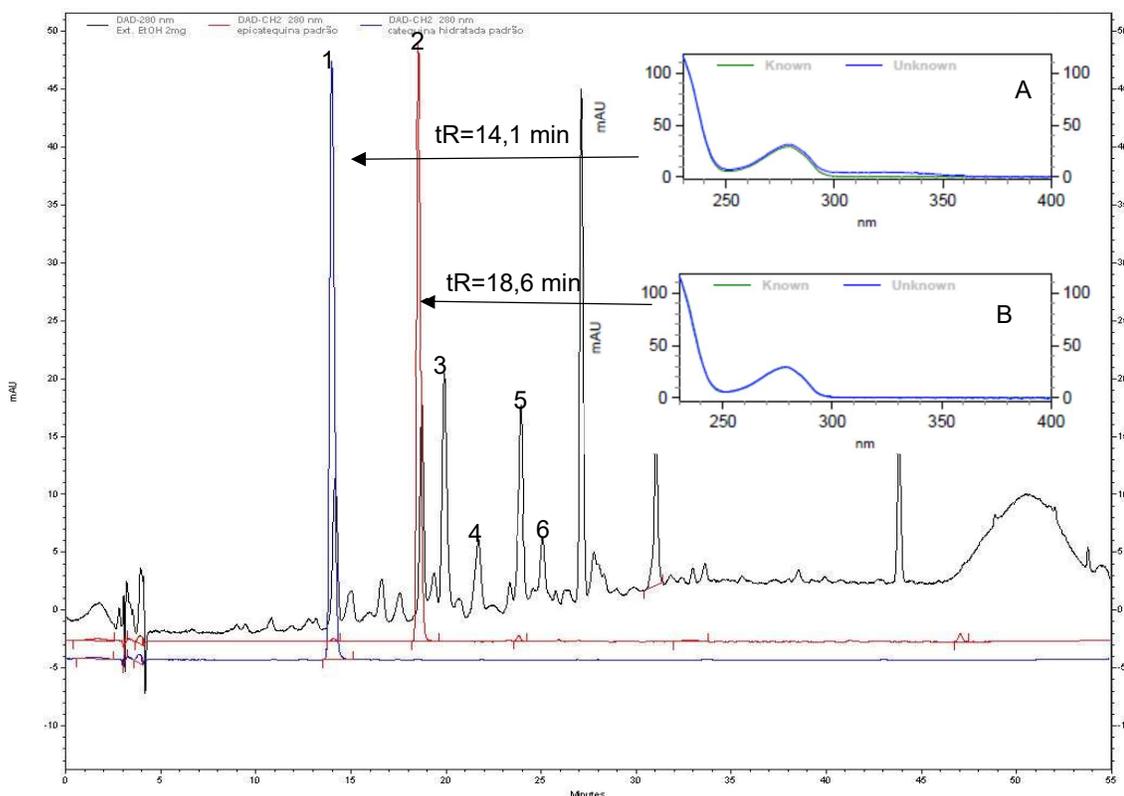


Figura 16 - Cromatograma do extrato EEESflh em CLAE-DAD (280 nm)
Espectros no UV para os picos 1 ($t_R = 14,1$ min) e 2 ($t_R = 18,6$ min) sobrepostos aos padrões catequina (A) e epicatequina (B)

O cromatograma da fração FHM apresentou picos menos intensos em 280 nm (Figura 17). A comparação com padrão comercial indicou a presença de epicatequina no pico 8 ($t_R = 18,6$ min) com similaridade no UV $> 0,99$. Os picos adicionais, em $t_R = 16,7$ min (pico 7) e $t_R = 20,89$ min (pico 9), não apresentaram níveis de pureza e similaridade satisfatória com os padrões utilizados para comparação, não sendo

possível a identificação destes compostos nesta análise. Dessa forma, é possível inferir a presença de catequina, epicatequina e derivados na composição do extrato bruto EEESflh e da fração FHM.

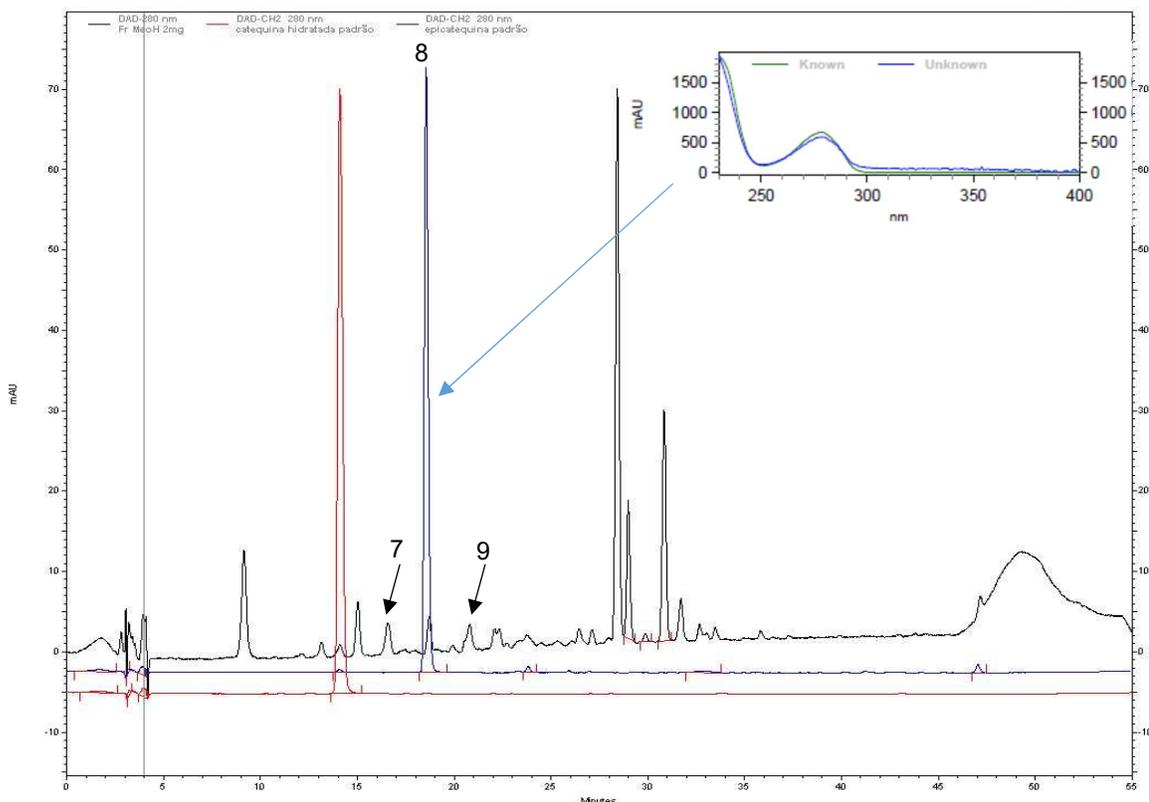


Figura 17 - Cromatograma da fração FHM por CLAE-DAD em 280 nm
Espectro no UV do pico no tR = 18,6 min sobreposto ao padrão analítico epicatequina (tR = 18,6 min)

4.3.2.3 Ácidos Clorogênicos (ACGs)

O cromatograma da fração FHM em 354 nm (Figura 18), mostrou picos em tR = 9,15 min (pico 1), tR = 14,25 min (pico 2), tR = 28,43 min (pico 3), tR = 28,96 min (pico 4) e tR = 30,84 min (pico 5). A comparação com o padrão indicou a presença de derivados do ácido clorogênico no pico 1 e no pico 2 desse cromatograma, com pureza e similaridade >0,99 no UV (Figura 19).

4.3.2.4 Mistura de Hiperosídeo e Isoquercitrina

Os picos 3 (tR = 28,43 min), 4 (tR = 28,96 min) e 5 (tR = 30,84 min) (Figura 18) apresentaram semelhança espectral no UV com derivados de quercetina (Figura 19).

A comparação com padrões comerciais indicou a presença dos flavonoides hiperosídeo ($t_R = 28,03$ min) no pico 3 e isoquercitrina ($t_R = 28,68$ min) no pico 4 (Figura 19). Adicionalmente o pico 5 em $t_R = 30,84$ min apresentou similaridade $>0,99$ no UV com o padrão analítico rutina sugerindo a presença de outro derivado de quercetina que não foi identificado na composição desta fração (Figura 19).

O cromatograma da fração FDCM em 354 nm (Figura 20) mostrou picos em $t_R = 28,43$ min (pico 6), $t_R = 29,00$ min (pico 7), $t_R = 30,84$ min (pico 8), $t_R = 31,72$ min (pico 9) e $t_R = 47,16$ min (pico 10). Os picos 6 e 7 foram identificados por comparação com padrões comerciais como hiperosídeo ($t_R = 28,03$ min) e isoquercitrina ($t_R = 28,68$ min), respectivamente (Figura 21). Os picos 8 e 9 apresentaram semelhança espectral com o flavonoide rutina ($t_R = 26,68$ min) sugerindo a presença de outros derivados de quercetina na composição desta fração que não foram identificados nesta análise.

4.3.2.5 Quercetina e Derivados

O pico 10 ($t_R = 47,17$ min) exibido no cromatograma de FDCM por CLAE-DAD em 354 nm (Figura 20) foi identificado como o flavonol quercetina por comparação com o padrão analítico ($t_R = 47,34$ min) com similaridade no UV $> 0,999$ (Figura 21).

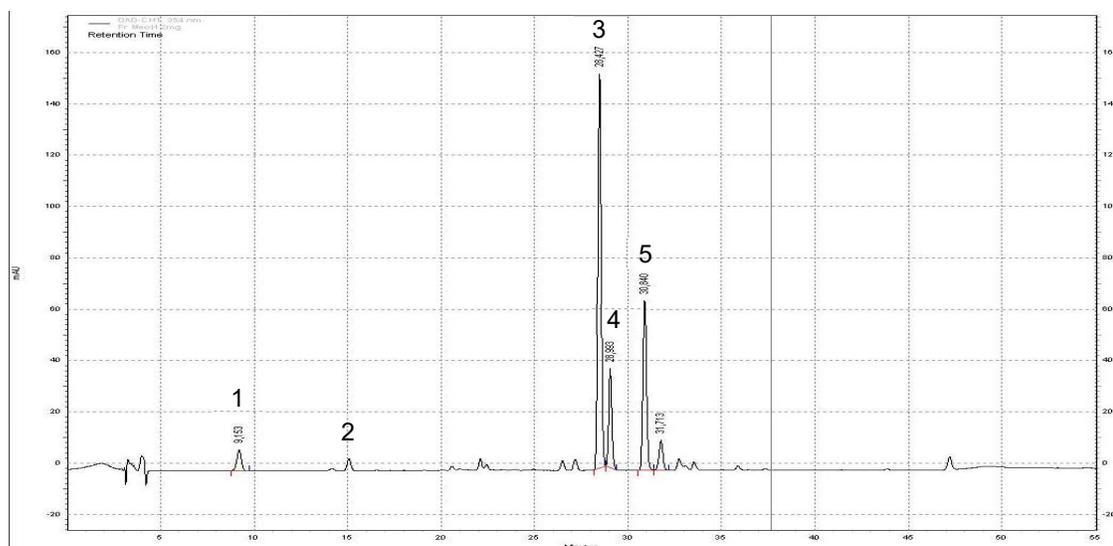


Figura 18 - Cromatograma da fração FHM em 354 nm por CLAE-DAD. Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LiChroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL/min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm

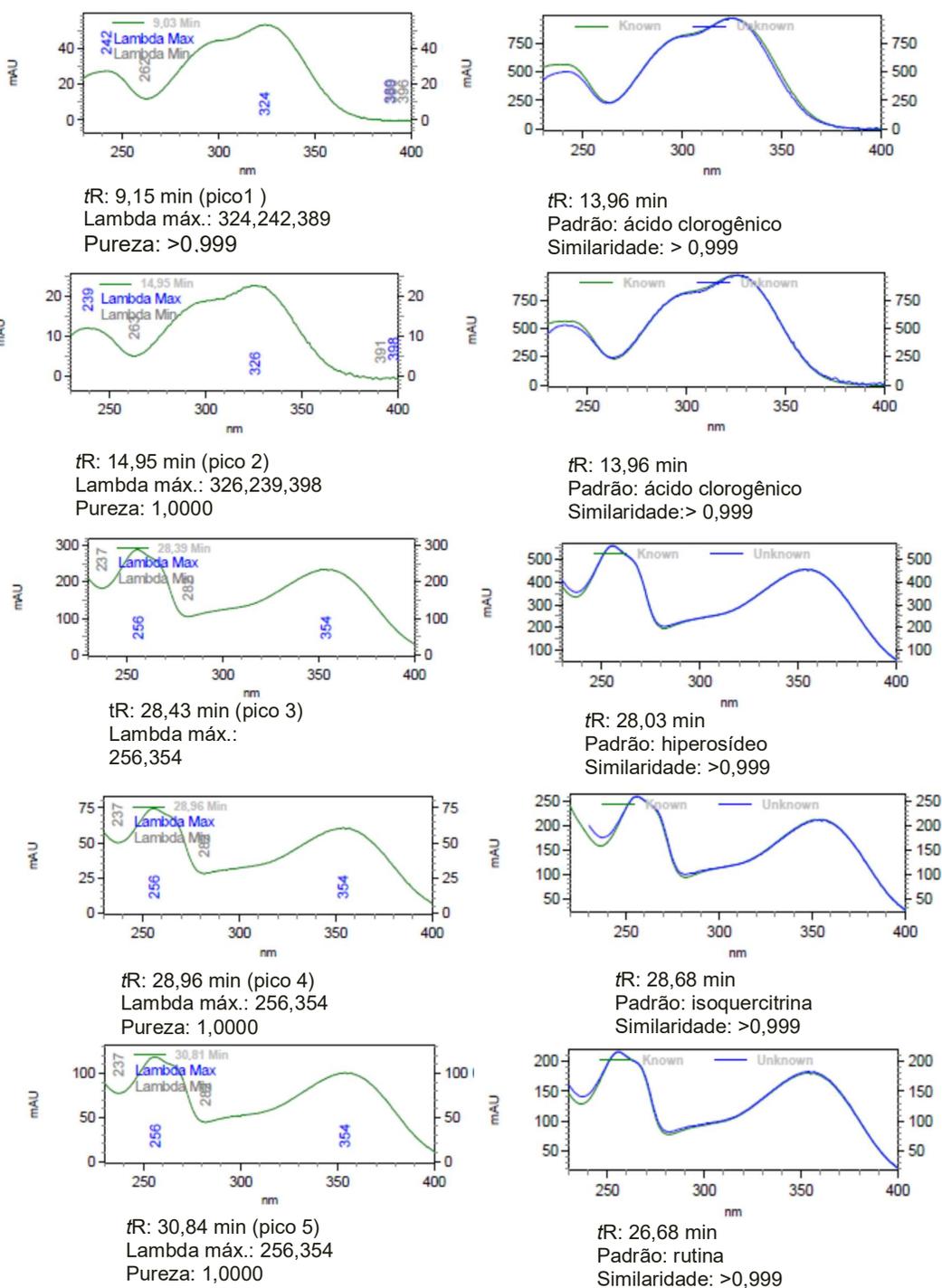


Figura 19 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 9,15 min), 2 (tR = 14,95 min), 3 (tR = 28,43 min), 4 (tR = 28,96 min) e 5 (tR = 30,84 min) exibidos no cromatograma de FHM em 354 nm Sobrepostos aos padrões analíticos: ácido clorogênico (tR = 13,96 min), hiperosídeo (tR = 28,03 min), isoquercitrina (tR = 28,68 min) e rutina (tR = 26,68 min)

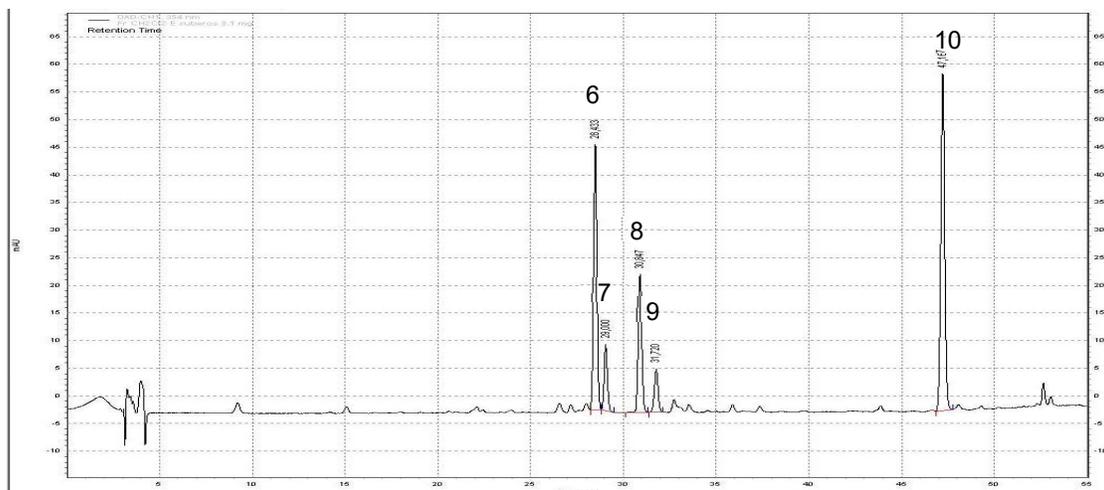
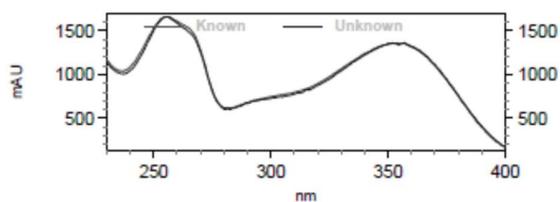
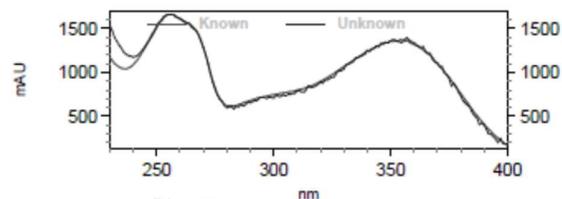


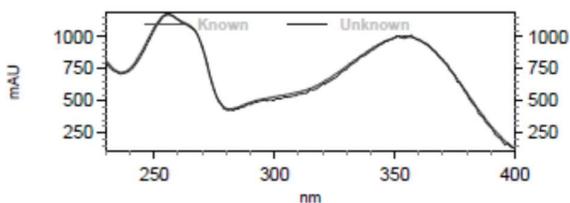
Figura 20 - Cromatograma da fração FDCM por CLAE-DAD a 354 nm
 Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LiChroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL/min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm



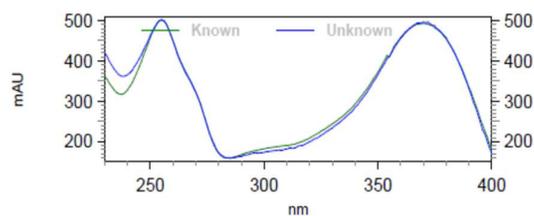
Pico 6
 tR: 28,03 min
 Padrão: hiperosídeo
 Similaridade: > 0,99



Pico 7
 tR: 28,68 min
 Padrão: isoquercitrina
 Similaridade: > 0,99



Pico 8
 tR: 26,68 min
 Padrão: rutina
 Similaridade: > 0,999



Pico 10
 tR: 47,34 min
 Padrão: quercetina
 Similaridade: > 0,999

Figura 21 – Espectros no UV para os picos 6 (tR = 28,43 min), 7 (tR = 29,98 min), 8 (tR = 30,85 min) e 10 (tR = 47,17 min) exibidos no cromatograma da fração FDCM em 354 nm
 Sobrepostos aos espectros dos padrões analíticos hiperosídeo, isoquercitrina, rutina e quercetina

4.3.2.6 ESE02

ESE02 (22,8 mg) obtido por CC de sílica gel (Parte Experimental), apresentou-se como um sólido amorfo amarelo solúvel em metanol. A avaliação por CCD em eluição paralela com padrões comerciais rutina e isoquercitrina sugeriu a presença de uma mistura de compostos que coeluíram em proximidade ao padrão isoquercitrina. na composição de ESE02 (FM3, R3 e R6, Métodos Gerais) (Figura 22).

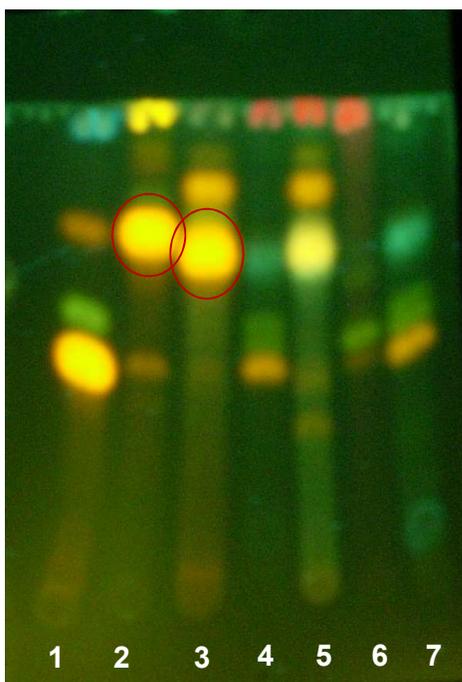


Figura 22 - CCD de ESE02, extratos e frações de *Erythroxylum suberosum*
 1 – Rutina, 2 – Isoquercitrina, 3 – ESE02, 4 – EEESfih, 5 – FHM, 6 – FDCM, 7 - EAESfih
 Eluente: acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (100:11:11:26); Revelador = NP-PEG e radiação UV, 365nm

A análise de ESE02 por RMN de ^1H (300 MHz, MeOD_4) (Figura 23) forneceu sinais referentes a hidrogênios aromáticos, dentre eles um par de dupletos em $\delta 6,39$ e $\delta 6,2$ ppm ($J = 2\text{Hz}$); além de sinais em $\delta 7,84$ ppm (d , $J = 2,1$ Hz), $\delta 7,58$ ppm (dd , $J = 8,7$ e $2,4\text{Hz}$) e $\delta 6,86$ ppm (d , $J = 8,4$ Hz) (Figura 25), característicos de hidrogênios fenólicos de esqueleto do tipo flavonol. Foram observados sinais adicionais que caracterizaram a presença de açúcar ligado ao flavonol, com destaque para o deslocamento em $\delta 5,17$ ppm (1H, d , $J = 7,8\text{Hz}$) característico de hidrogênio do carbono anomérico (C2'') da glicose (23, 126) (Figura 24).

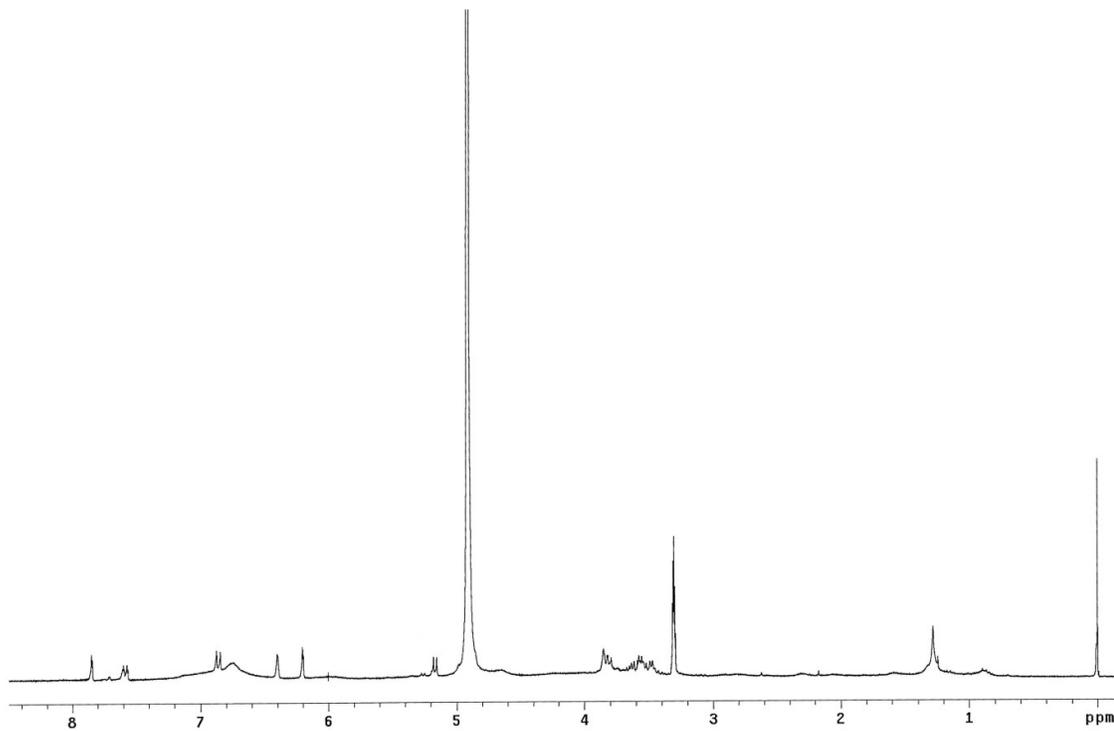


Figura 23 - Espectro de RMN de ¹H de ESE 02 (300 MHz, MeOD₄)

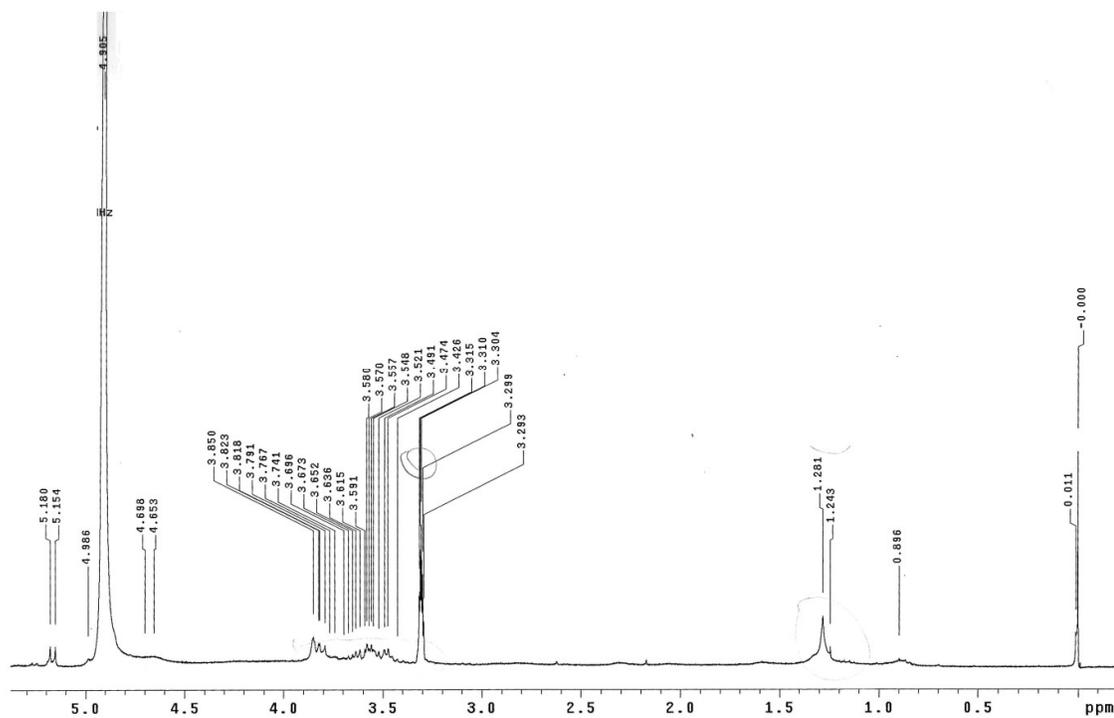


Figura 24 - Espectro de RMN de ¹H de ESE02 - Expansão da região entre δ 0 e δ 5,8 (300 MHz, MeOD₄)

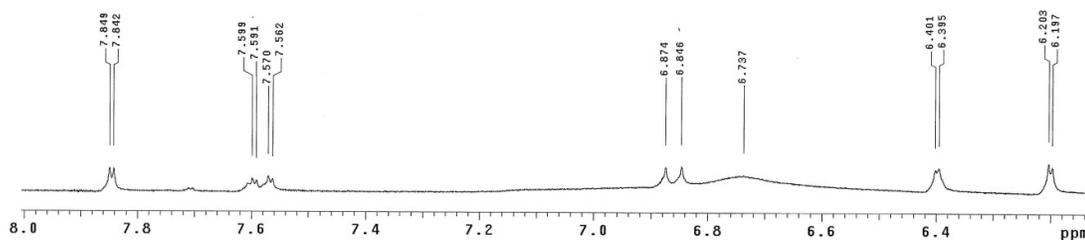


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H de ESE02 - Expansão da região entre δ 6,2 e δ 8,0 (300 MHz, MeOD_4)

A análise do espectro de RMN de ^1H e a comparação dos deslocamentos químicos, apresentados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) com dados da literatura, permitiram a identificação do glicosilflavonol isoquercitrina (**9**) na composição de ESE02 (Tabela 9).

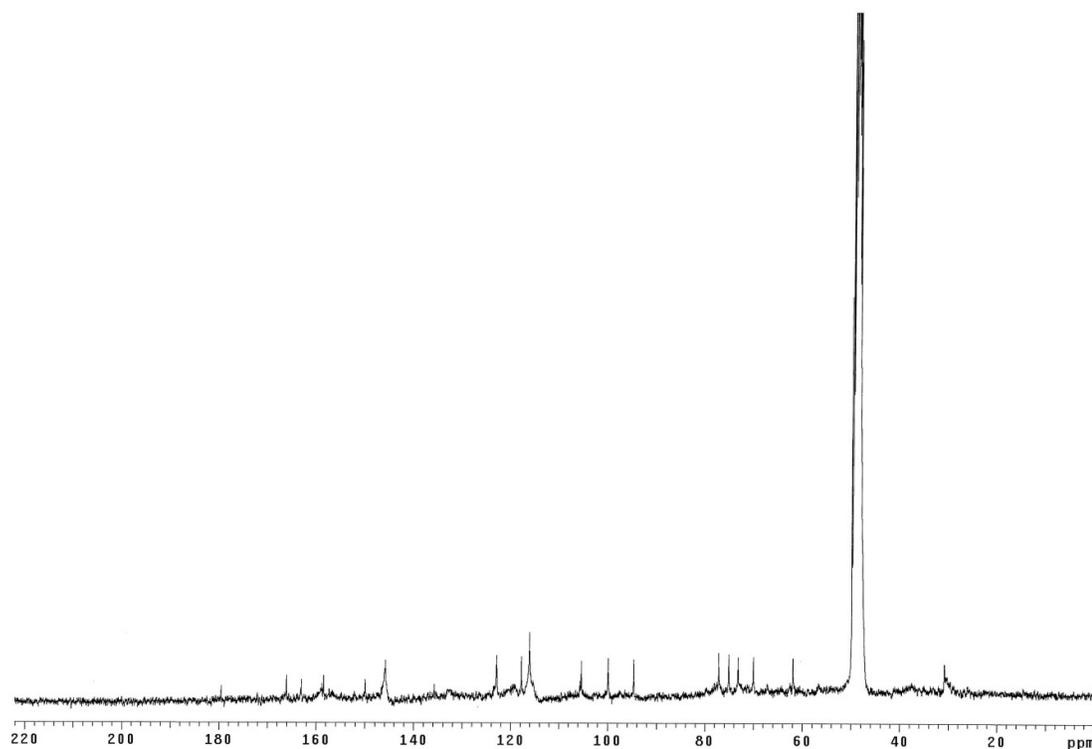


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C de ESE 02 (75 MHz, MeOD_4)

Tabela 9- Deslocamentos químicos para ESE02 em RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOD_4) comparados com os dados da literatura (δ , CDCl_3 , 100MHz e 125MHz) (127, 128)

C	ESE02 (δ)	Iso quercitrina (δ)(128)	Iso quercitrina (δ)(127)	C	ESE02 (δ)	Iso quercitrina (δ)(128)	Iso Quercitrina (δ)(127)
2	158,4	157,4	158,5	1"	105,3	103,5	104,5
3	135,7	134,5	135,7	2"	75,0	74,8	75,8
4	179,5	178,4	179,8	3"	77,1	77,2	78,4
5	162,9	162,1	163,1	4"	70,0	70,4	71,3
6	99,8	99,1	100,0	5"	77,1	77,5	78,2
7	166,0	165,5	166,0	6"	61,9	61,6	62,7
8	94,7	93,8	94,8				
9	158,7	158,2	159,1				
10	105,3	104,5	105,8				
1'	122,8	122,1	123,3				
2'	116,1	115,1	116,1				
3'	145,8	149,0	145,9				
4'	149,9	145,0	149,9				
5'	117,7	116,6	117,7				
6'	122,9	122,1	123,2				

A análise das frações ESE01, ESE03 e ESE04 obtidas por CC de sílica gel (Métodos Gerais), não forneceu dados espectrais suficientes para identificação das mesmas.

O cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm (Figura 27) mostrou sinais em $t_R = 28,43$ min (pico 1), $t_R = 29,02$ min (pico 2), $t_R = 30,85$ min (pico 3) e $t_R = 31,69$ min (pico 4). A comparação com padrões comerciais indicou a presença de hiperosídeo ($t_R = 28,03$ min) no pico 1 e da isoquercitrina ($t_R = 28,68$ min) no pico 2 com pureza e similaridade no UV $> 0,999$. Para confirmar a presença desses flavonoides na composição de ESE02, realizou-se análise por coeluição da amostra (1 mg/mL) com rutina (**11**), hiperosídeo (**8**) e isoquercitrina (**9**) diluídos em metanol na concentração de 0,3 mg/mL. O novo cromatograma em 354 nm de ESE02 (Figura 28) confirmou a presença do hiperosídeo no pico 1 ($t_R = 28,69$ min) e da isoquercitrina no pico 2 ($t_R = 29,26$ min) observada pela intensificação da área dos picos após a adição dos padrões.

Os picos 3 e 4 min exibiram similaridade espectral $>0,999$, no UV, com a rutina ($t_R = 26,68$ min) sugerindo a presença de outros derivados de quercetina na composição de ESE02 (Figura 29). O cromatograma extraído em 280 nm não exibiu sinais adicionais para ESE02, com isso, foi possível concluir que ESE 02 é composto, majoritariamente, por uma mistura de hiperosídeo e isoquercitrina e contém traços de

outros derivados de quercetina. Os resultados, por CLAE-DAD, corroboram os achados químicos em CCD e RMN de ^1H e ^{13}C .

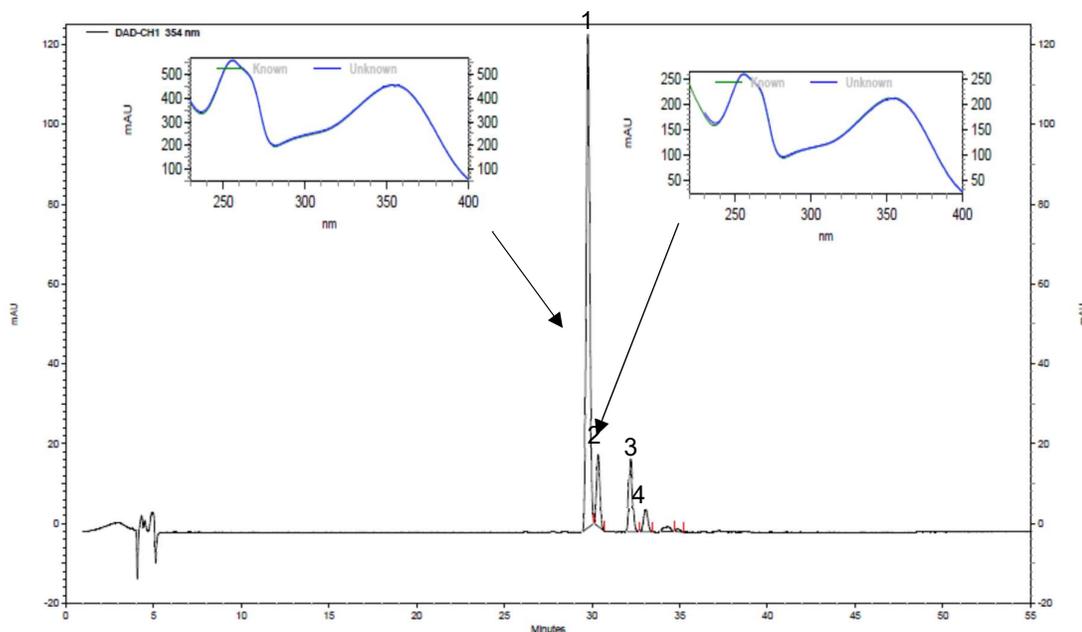


Figura 27 - Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm

Espectros no UV para os picos 1 e 2 sobrepostos sobrepostos aos padrões hiperósideo (tR = 28,03 min) e isoquercitrina (tR = 28,68 min)

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μm) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μm), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL/min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm

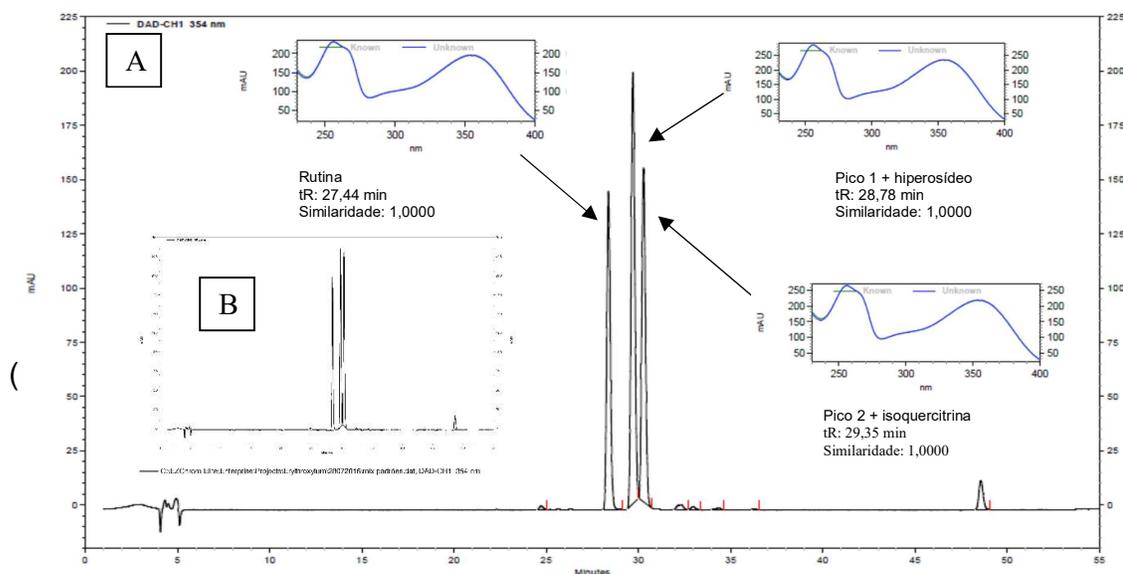


Figura 28 – Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm com adição de padrões
A - ESE02 (1 mg/mL) com adição de padrões rutina (tR = 27,36 min), hiperósideo (tR = 28,62 min) e isoquercitrina (tR = 29,26 min) (0,3 mg/mL); B – padrões (1 mg/mL) rutina (tR = 27,44 min), hiperósideo (tR = 28,78 min) e isoquercitrina (tR = 29,35 min)

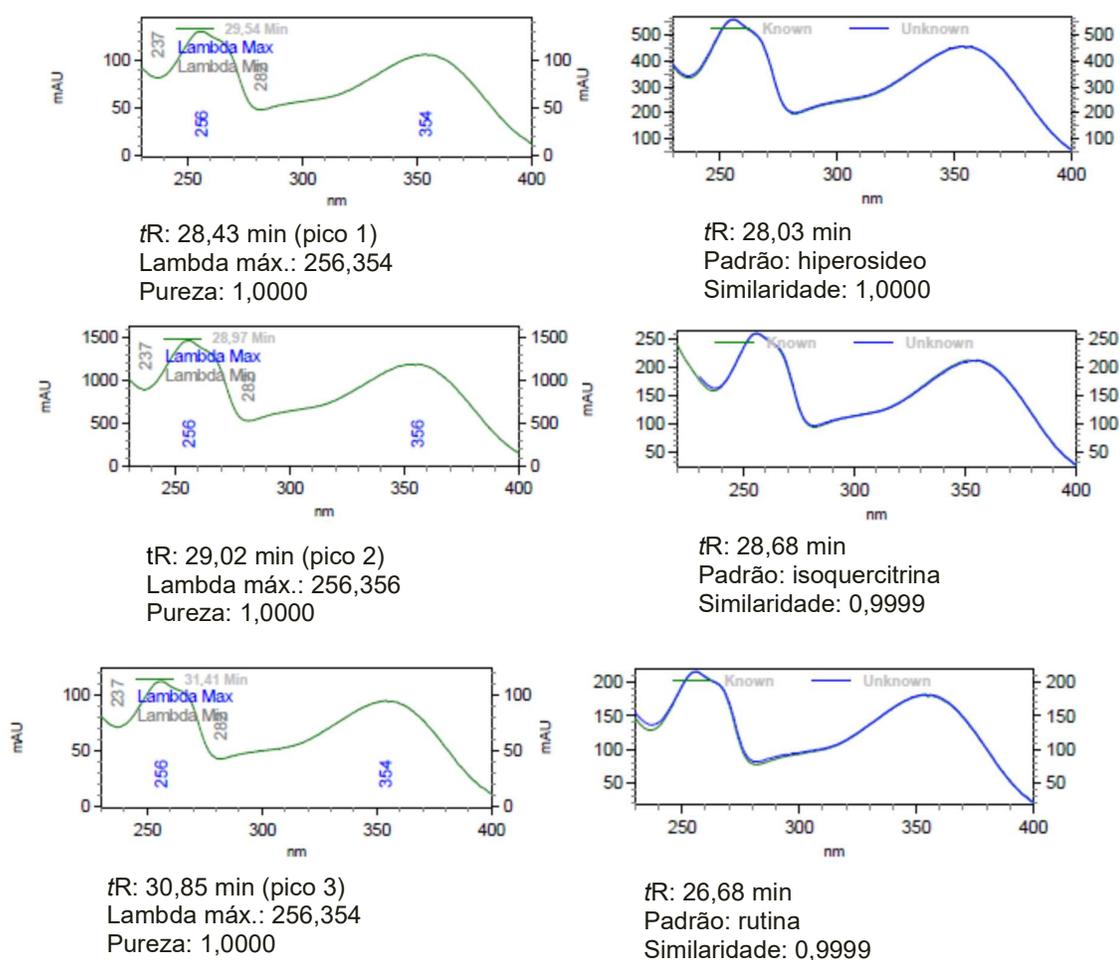
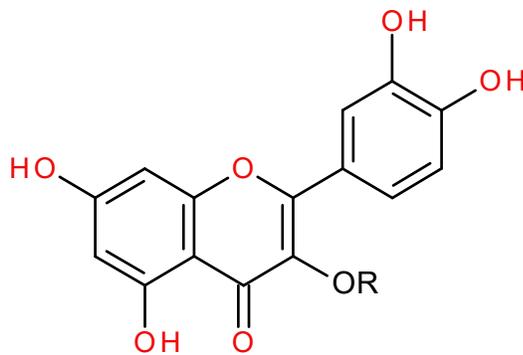


Figura 29 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 28,43 mi.), 2 (tR = 29,02 min) e 3 (tR = 30,85 min) exibidos no cromatograma de ESE02 em 354 nm Sobrepostos aos padrões hiperosídeo (tR = 28,03 min), isoquercitrina (tR = 28,68 min) e rutina (tR = 26,68 min)



- (8) R = gal
 (9) R = gli
 (11) R = ram -gli

4.3.2.7 Constituintes Químicos nas Subfrações de FHM

4.3.2.7.1 Ácidos Clorogênicos (ACGs)

Atualmente denominam-se ácidos clorogênicos (ACGs) os compostos fenólicos formados pela esterificação do ácido quínico com um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico: o ácido cafeico, o ferúlico, sinápico ou o p-cumárico (129). Podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila em: mono ésteres (ácidos cafeoilquínicos (CQA); cumaroilquínicos (CQA) e feruloilquínicos (FQA); di (diCQA), tri (triCQA) e tetra ésteres (tetraCQA) e ainda ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico (ácidos cafeiol-feruloilquínicos, CFQA) (130).

Os principais derivados encontrados na natureza são do grupo ACQ (ácidos cafeoilquínicos), principalmente o 5-O-cafeoilquínico como também os derivados AFQ (ácidos feruloilquínicos) (129-131).

As técnicas de CC e CLAE permitem a separação satisfatória dos derivados do ácido cinâmico, contudo, a CLAE é o método mais utilizado para análise de isômeros individuais do ácido clorogênico, pela simplicidade, rapidez e elevado desempenho. As condições de análise nessa metodologia permitem determinar o tempo de eluição, permitindo separação desses compostos em torno de 20 minutos no modo isocrático em coluna de fase apolar e em torno de 40 minutos no modo de gradiente (130).

A análise por CCD mostrou que as frações iniciais de FHM apresentam bandas com fluorescência característica da presença de ácidos fenólicos (Parte Experimental). O perfil cromatográfico para as subfrações FHM3 a FHM7 por CLAE-DAD, em 354nm e 280 nm (Figura 31), apresentou semelhanças na quantidade de picos na região entre 9 e 20 minutos com variações quanto à intensidade dos mesmos.

A análise dos cromatogramas em 354 nm confirmou a presença dos ácidos clorogênicos em tR = 9,25 min (pico 1); tR = 14,30 min (pico 2) e tR = 15,19 min (pico 3) nas subfrações FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7, comparados ao padrão (tR = 13,97 min) (Figura 30). Esses dados foram corroborados por estudos anteriores que identificaram os isômeros do ácido clorogênico 3-cafeoilquínico (3-ACQ), 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e 4-cafeoilquínico (4-ACQ), em amostras de café, entre 7 e 16 minutos de eluição em condições de análise semelhantes ao do presente estudo (129).

A presença do ácido clorogênico foi caracterizada ainda por análise em CCD, nos extratos brutos EEESflh e EAESflh e na fração original FHM por comparação com padrões comerciais (página 73). Contudo, a presença desses compostos parece não contribuir com a inibição da hialuronidase, visto que, a subfração FHM3 com picos no referido intervalo, foi pouco ativa frente à enzima. Corroborando estes resultados, o teste realizado com padrões isolados, frente à hialuronidase, não confirmou atividade inibitória para o ácido clorogênico, cafeico e ferúlico (página 58) o que justificaria a ausência de atividade significativa para FHM3.

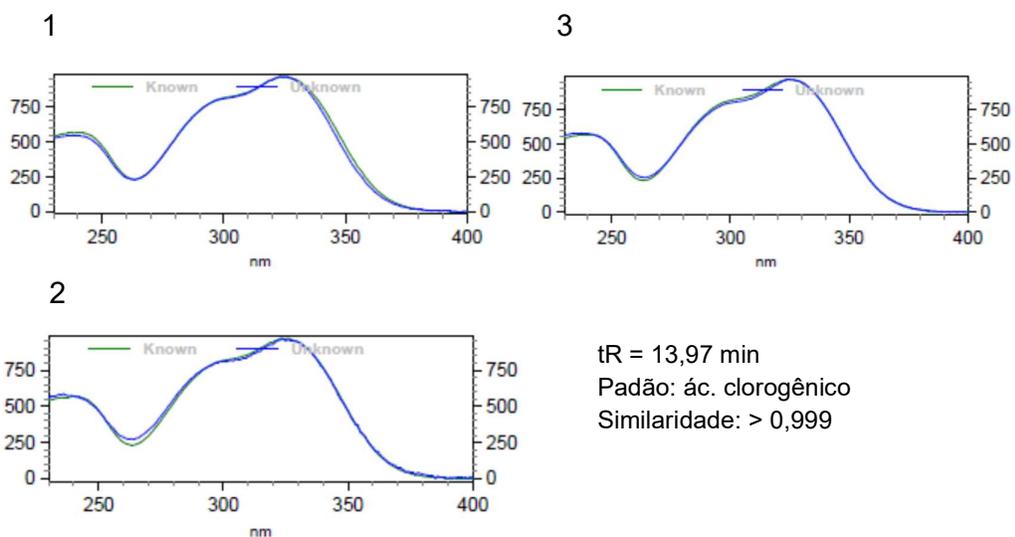
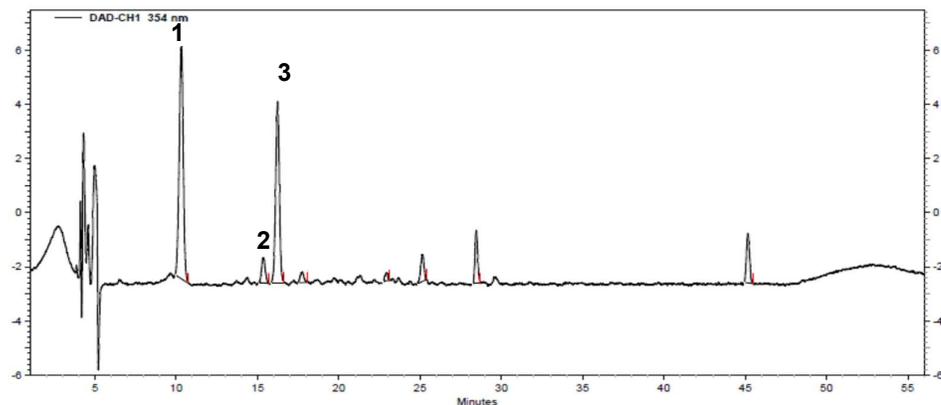
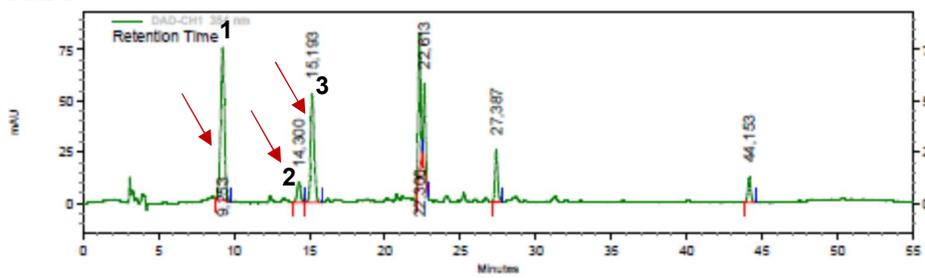


Figura 30 – Espectros no UV para os picos 1 (tR=9,25 min), 2 (tR=14,30 min) e 3 (tR=15,19 min) apresentados nos cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm Sobrepostos ao padrão ácido clorogênico (tR = 13,97 min),

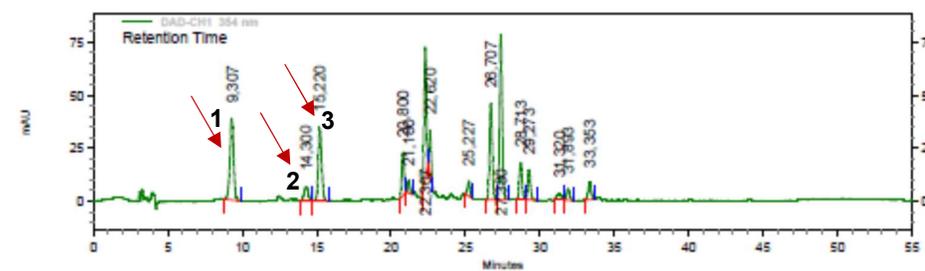
FHM3



FHM5



FHM6



FHM7

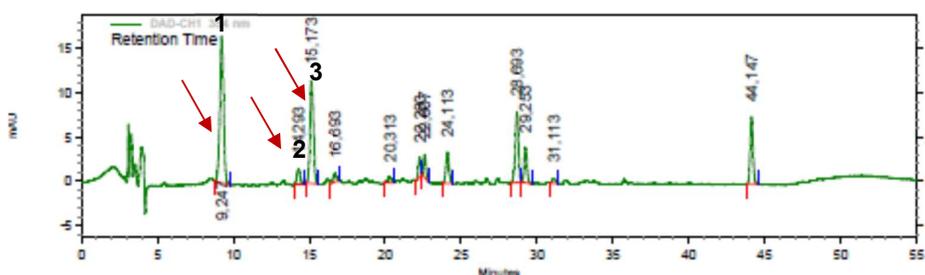


Figura 31 – Cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm

4.3.2.7.2 Mistura de hiperosídeo, isoquercitrina e derivados

As subfrações, FHM5 a FHM10, foram ativas frente à enzima hialuronidase exibindo semelhanças em seus perfis cromatográficos em 354 nm, na região entre 20 e 35 minutos.

Os cromatogramas de FHM5 e FHM6 (Figura 32 A e C) apresentaram picos semelhantes em $t_R = 22,3$ min (pico 4), $t_R = 22,69$ min (pico 5) e $t_R = 27,38$ min (pico 6). A pureza dos picos aliada à similaridade $>0,99$ nos espectros no UV com o padrão isoquercitrina confirmou a presença de flavonoides derivados da quercetina na composição das subfrações FHM5 e FHM6 nos referidos tempos de retenção (Figura 33). O pico **b** ($t_R = 26,70$ min) exibido apenas para FHM6 (Figura 32 C), também apresentou semelhança espectral com a isoquercitrina indicando que este seja outro derivado da quercetina.

Essa análise levou em consideração apenas o nível de similaridade entre os espectros UV das amostras com os padrões de flavonoides, encontrando maior similaridade com o padrão isoquercitrina. A diferença significativa entre os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas das frações em relação aos padrões analíticos não permitiu inferir identidade aos compostos referentes aos sinais mencionados para FHM5 e FHM6 sendo necessário estudos complementares para identificação dos mesmos.

Além disso, a análise do cromatograma de FHM6 em 280 nm mostrou um pico no $t_R = 28,50$ min (Figura 32 B). O nível de similaridade entre os espectros no UV da amostra em relação ao padrão catequina e a baixa definição do pico não permitiu afirmar com precisão a identidade do composto nesta análise sendo necessários estudos complementares para identificação do mesmo. Com relação à atividade biológica investigada, os padrões catequina e epicatequina, testados isoladamente, foram pouco ativos frente à hialuronidase, porém não há dados que relacione a ação dessas substâncias em mistura com outros compostos.

Considerando o perfil cromatográfico em CCD (Parte Experimental, Figura 4), onde foram observadas bandas características de flavonoides derivados de quercetina para essas subfrações, e a análise por CLAE-DAD em 354 nm, foi possível inferir que a atividade inibitória de FHM5 e FHM6, frente à hialuronidase ocorra, pelo menos em parte, devido à presença majoritária desses derivados de quercetina em t_R

= 22,3 min (pico 4), $t_R=22,69$ min (pico 5), em $t_R= 27,38$ min (pico 6) e $t_R=26,70$ min (pico b).

Os picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se repetiram nos cromatogramas de FHM5 e FHM6 nos mesmos t_R s (Figura 32 A e C). O pico **c** se repetiu para FHM 6, FHM9 e FHM10 (Figura 32 C, Figura 34 A e B). O pico **a** (FHM5) e o pico 7 (FHM6) não apresentaram definição dos espectros no UV.

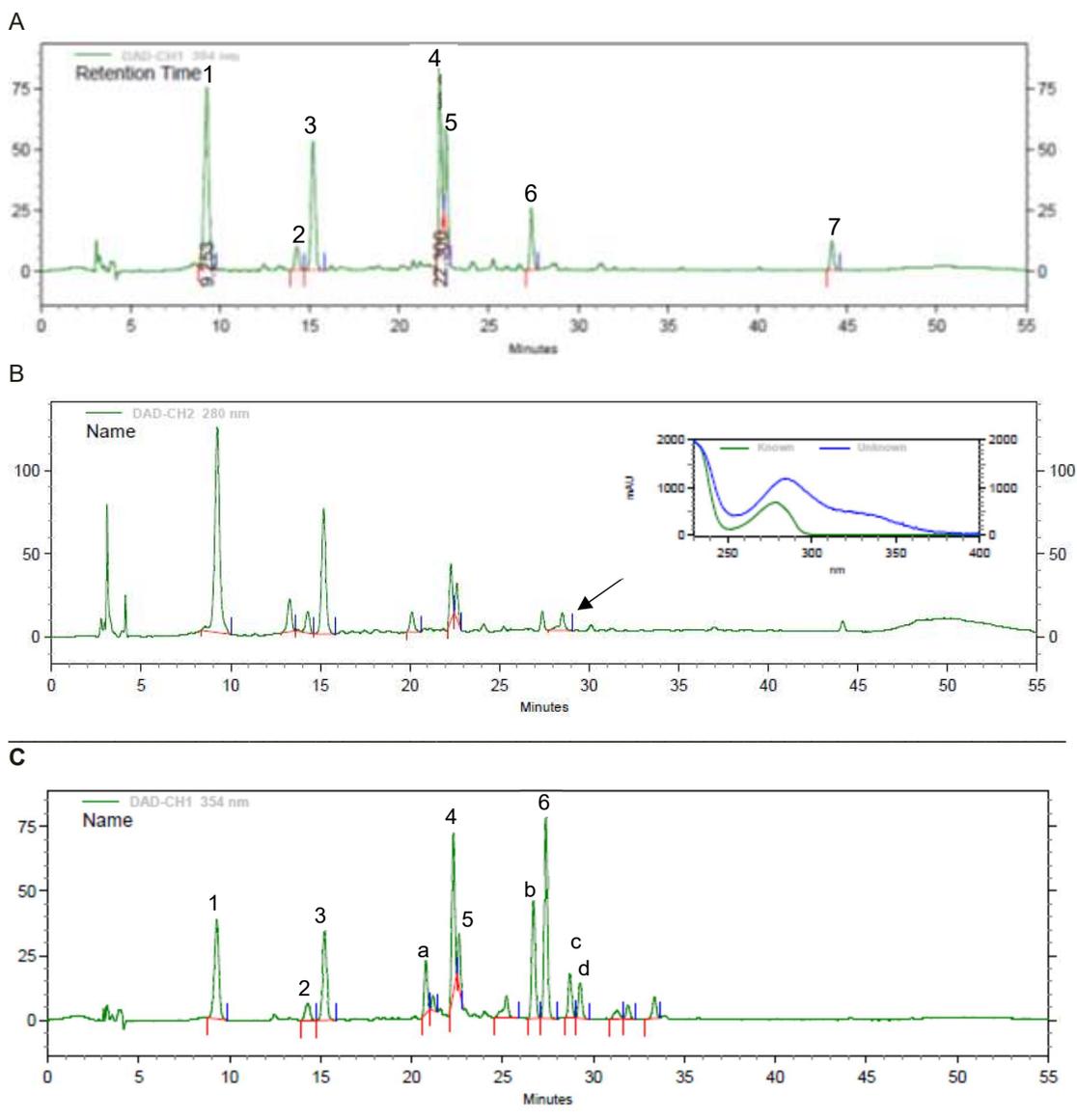


Figura 32 – Cromatogramas de FHM5 e FHM6 por CLAE-DAD

A - FHM5 em 354 nm; B – FHM5 em 280 nm com espectro no UV do pico no $t_R = 28,5$ min sobreposto ao padrão catequina ($t_R = 14,1$ min); C- FHM6 em 354 nm.

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LiChroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm e 280 nm

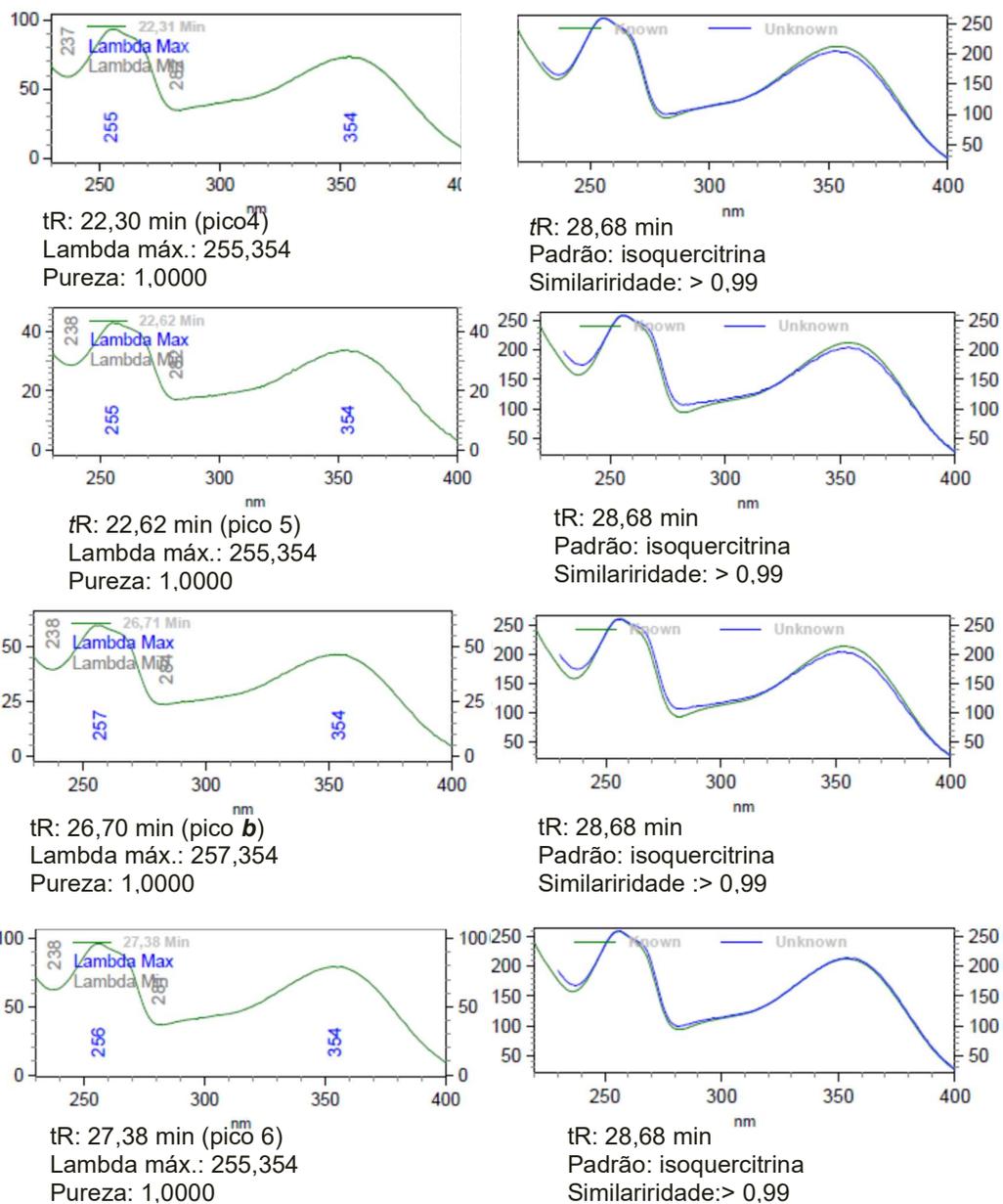


Figura 33 – Espectros no UV para os picos 4 (tR = 22,30 min), 5 (tR = 22,62 min), b (tR = 26,70 min) e pico 6 (tR = 27,38 min) apresentados nos cromatogramas de FHM5 e FHM6 em 354 nm Sobrepostos ao padrão isoquercitrina (tR = 28,68 min)

As subfrações FHM9 e FHM10 apresentaram atividade biológica e perfis cromatográficos semelhantes. Nos cromatogramas de FHM9 e FHM10 (Figura 34 A e B) foram observados 4 sinais principais em tR = 28,74 min (pico **c**), tR = 31,17 min (pico **e**), tR = 32,07 min (pico **f**) e tR = 33,05 min (pico **g**). O pico **d** (tR = 29,32 min) foi exibido com maior intensidade no cromatograma de FHM9 (Figura 34 A). A comparação com padrões indicou a presença do flavonoide hiperosídeo (tR = 28,78 min) no pico **c** (Figura 35). Para confirmar a presença desses compostos, foi realizada

análise por coeluição da amostra (FHM9 a 1 mg/mL) com os padrões rutina, hiperosídeo e isoquercitrina, diluídos em metanol na concentração de 0,3 mg/mL. O cromatograma para FHM9 em 354 nm (Figura 36), coeluído com padrões, confirmou a presença de hiperosídeo no pico **c** (tR = 28,71 min) e isoquercitrina no pico **d** (tR = 29,29 min) observada pela intensificação da área dos picos após a adição dos padrões.

O pico **e** (tR = 29,32 min) **f** (tR = 32,07 min) e o pico **g** (tR = 33,05 min) apresentaram similaridade espectral com a rutina (tR = 27,44 min) e isoquercitrina (tR = 29,32 min) indicando a presença de outros derivados de quercetina na composição destas subfrações (Figura 35). A análise dos cromatogramas em 280 nm de FHM9 e FHM10 não mostrou picos adicionais com intensidade satisfatória.

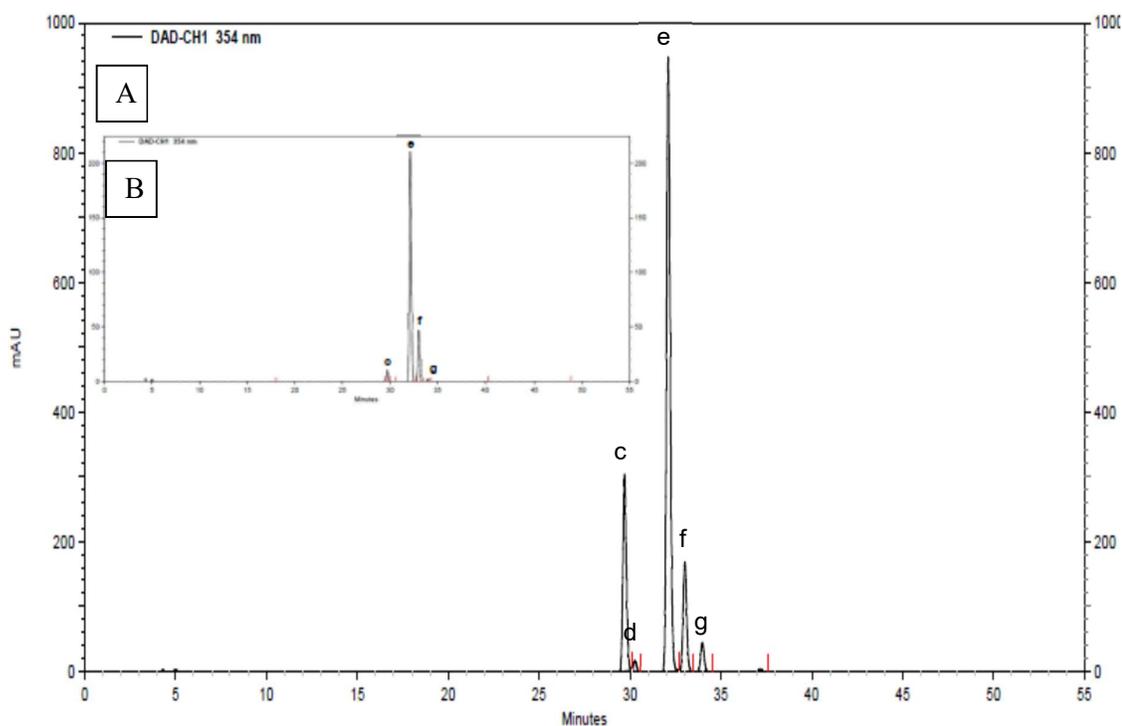


Figura 34 – Cromatograma de FHM9 (A) e FHM10 (B) por CLAE – DAD em 354 nm
Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm

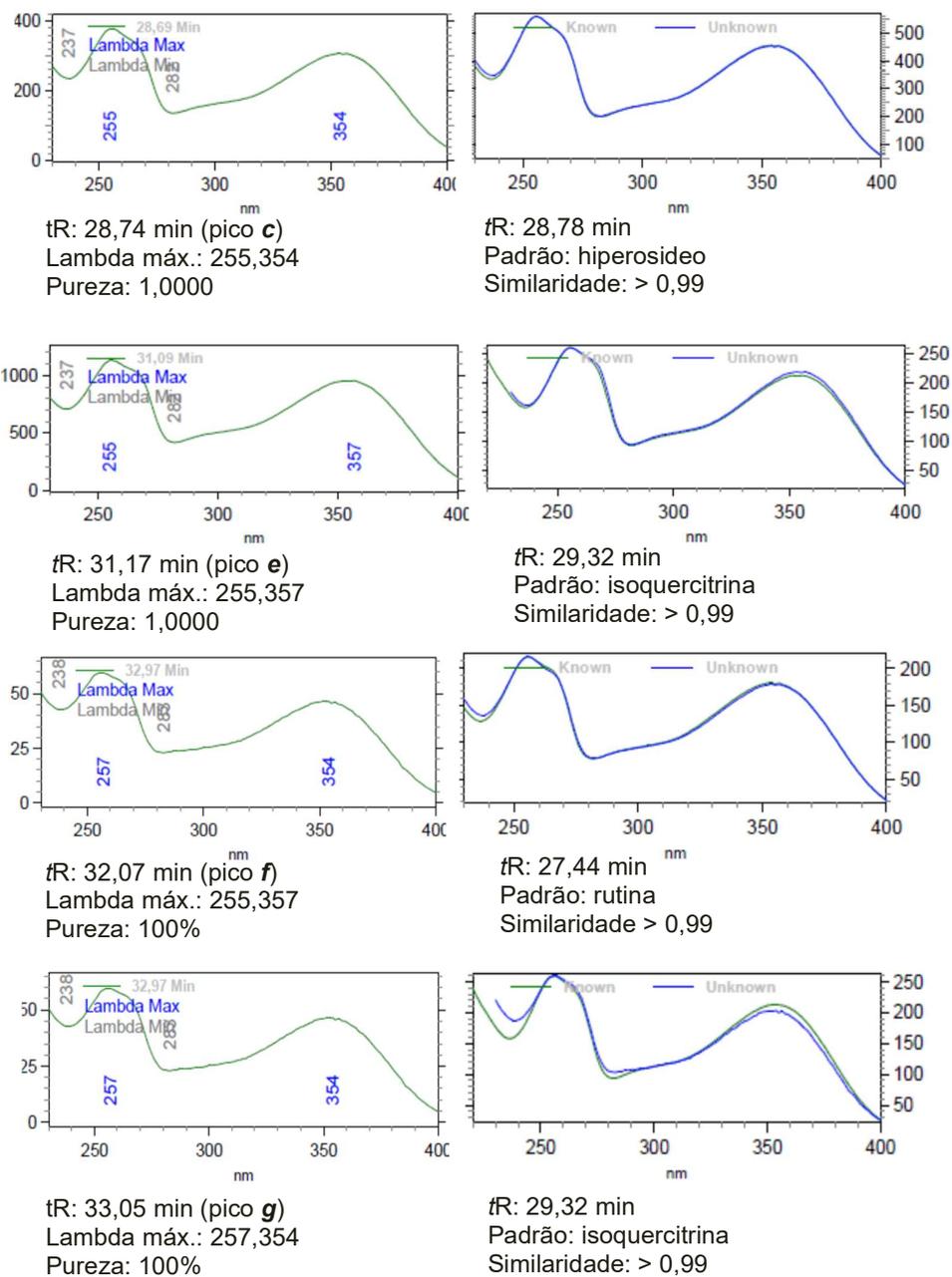


Figura 35 – Espectros no UV para os picos c (tR = 28,74 min), e (tR = 31,17 min), f (tR = 32,07 min) e g (tR = 33,05 min) exibidos nos cromatogramas de FHM9 e FHM10 em 354 nm Sobrepostos aos padrões hiperosídeo, isoquercitrina e rutina.

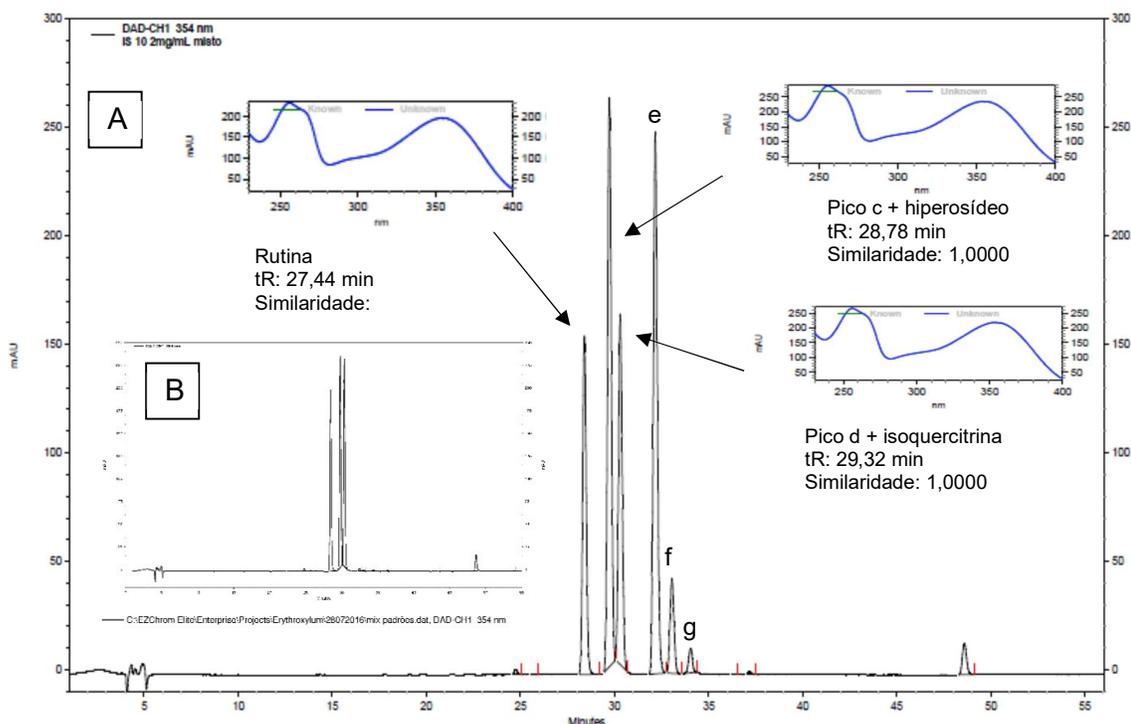


Figura 36 - Cromatograma de FHM9 por CLAE-DAD em 354 nm coeluído com padrões
 A – FHM9 (1 mg/mL) com adição de padrões rutina (tR = 27,39 min), hiperosídeo (tR = 28,71 min) e isoquercitrina (tR = 29,29 min) (0,3 mg/mL); B – padrões (1 mg/mL) rutina (tR = 27,44 min), hiperosídeo (tR = 28,78 min) e isoquercitrina (tR = 29,35 min)

4.3.2.7.3 Quercetina

O cromatograma de FHM14 em 354 nm (Figura 37) mostrou um pico majoritário no tR = 47,23 min com pureza e similaridade > 0,99 em comparação ao padrão analítico quercetina. Para confirmar a presença desse flavonoide na composição de FHM14 foi feita análise por coeluição da amostra (1 mg/mL) com o padrão comercial quercetina (0,3 mg/mL), conforme mostrado na Figura 38. A análise confirmou a presença da quercetina na composição desta subfração, observada pela intensificação da área do pico após adição do padrão. A análise em 280 nm apresentou sinais com espectros no UV de baixa definição. Com isso, foi possível concluir que a fração FHM14 é constituída, majoritariamente, pelo flavonoide quercetina.

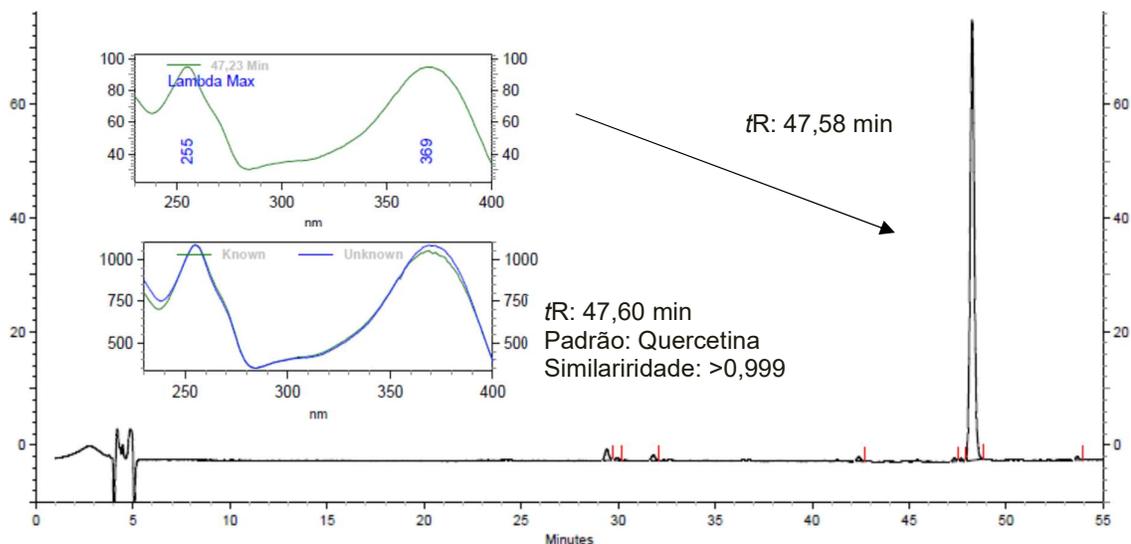


Figura 37 - Cromatograma de FHM14 por CLAE-DAD em 354 nm
Espectro de UV para o pico ($t_R = 47,23$ min) sobreposto ao espectro do padrão analítico quercetina

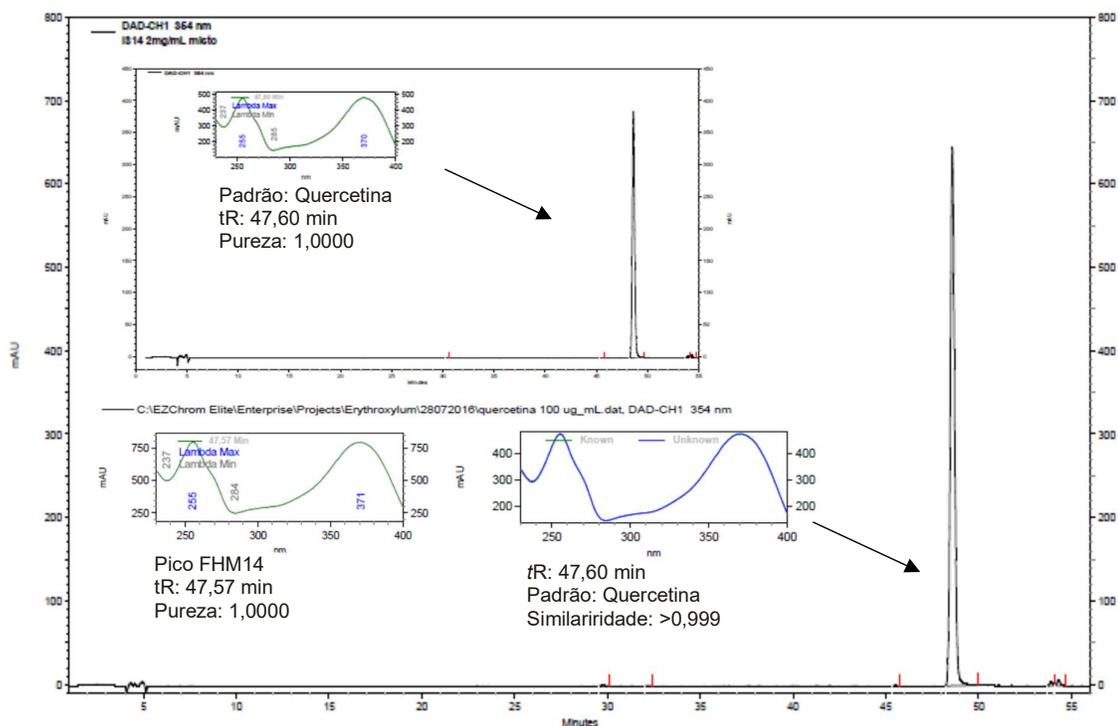


Figura 38 – Cromatograma de FHM14 em 354 nm por CLAE-DAD com adição de padrão
A – FHM14 (1 mg/mL) com adição do padrão Quercetina (0,3 mg/mL) ($t_R = 47,60$ min) e espectro no UV sobreposto ao padrão; B – padrão Quercetina (1 mg/mL) ($t_R = 47,60$ min) com espectro no UV.

As subfrações FHM7, FHM8, FHM11 a FHM13 e FHM15 a FHM18, apresentaram picos de pequena intensidade, por CLAE-DAD em 354 nm ou 280 nm, e espectros de baixa definição no UV impossibilitando a identificação das mesmas por comparação com padrões analíticos. A subfração FHM1 não foi solúvel em água ou

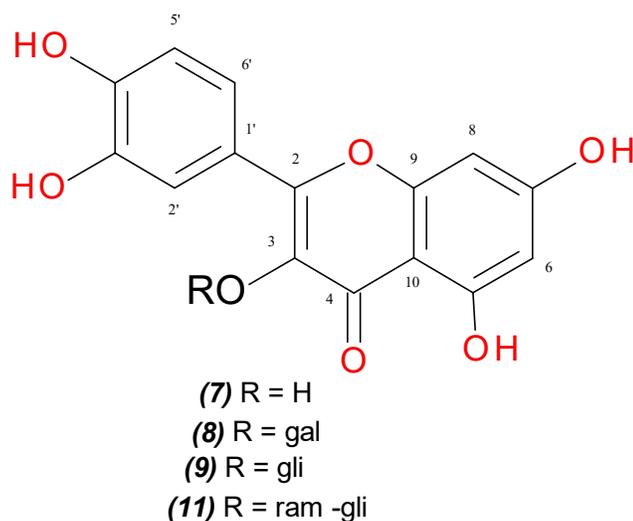
metanol inviabilizando sua análise por CLAE-DAD. Contudo, o perfil cromatográfico em CCD para a maioria dessas subfrações indicou que sejam constituídas de mistura de ácidos fenólicos e flavonoides, devido à presença de bandas com fluorescência características para esses compostos (Parte Experimental, Figura 4).

A presença do flavonol quercetina, identificado com maior intensidade na composição da subfração FHM14, pode explicar, em parte, a atividade do extrato etanólico bruto e de frações de *E. suberosum* St. Hil., frente a enzima hialuronidase. A fração FDCM também apresentou traços de quercetina em sua constituição; contudo, essa fração não inibiu a hialuronidase de forma significativa. Dessa forma, a diferença de atividade entre as frações FHM e FDCM pode ser explicada, pelo menos em parte, pela concentração dos compostos ativos nas referidas frações, evidenciada pela intensidade dos picos na análise por CLAE-DAD que se mostra maior em FHM.

O hiperosídeo e a isoquercitrina foram identificados em mistura na composição do extrato etanólico bruto (EEESflh) obtida pelo fracionamento em CC de sílica gel (Parte Experimental) e nomeados ESE02. A análise de ESE02 por RMN de ^1H e ^{13}C exibiu sinais majoritários referentes ao núcleo fundamental flavonol ligado a uma unidade de glicose identificando o composto como isoquercitrina. Entretanto, o perfil cromatográfico por CLAE-DAD exibiu mais de um pico caracterizando ESE02 como uma mistura simples de hiperosídeo e isoquercitrina com traços de outros derivados de quercetina. Esses resultados foram corroborados por estudo anterior realizado por este grupo que identificou esses flavonoides nos extratos brutos das folhas de *E. suberosum* (122).

ESE02 foi ativo frente à hialuronidase com máximo de inibição e $\text{IC}_{50} = 0,039$ mg/mL, significativamente menor que do controle DSCG ($\text{IC}_{50} = 4,8$ mg/mL) e da Quercetina ($\text{IC}_{50} = 0,36$ mg/mL). Testado isoladamente, a isoquercitrina não apresentou atividade inibitória, frente à hialuronidase, no presente estudo, indicando que a capacidade de inibição de ESE02 se deve, pelo menos em parte, ao hiperosídeo. Entretanto, a presença marcante da isoquercitrina, além de outros derivados da quercetina em mistura com o hiperosídeo, em ESE02 e no extrato etanólico e frações mais ativas (EEESflh, FDCM, FHM, FHM5, FHM6, FHM9 e FHM10) de *E. suberosum*, pode indicar algum mecanismo de inibição promovido por ação sinérgica entre esses compostos, sobre a enzima.

Na biossíntese de compostos do metabolismo secundário vegetal os monoglicosídeos isoquercitrina (**9**) e hiperosídeo (**8**), o diglicosídeo rutina (**11**) (Figura 4.36) e a aglicona quercetina (**7**) podem coexistir na mesma planta. Com isso, deve-se levar em consideração uma possível interação entre esses compostos no mecanismo de inibição enzimática, como também, a diferença de ação obtida com compostos avaliados isoladamente para aquela obtida com compostos em mistura, já que as frações caracterizadas como misturas menos complexas de hiperosídeo, isoquercitrina, quercetina e derivados, foram ativas, frente à hialuronidase, em concentrações mais baixas comparadas aos compostos isolados testados (DSCG, Quercetina, Ácido rosmarínico e outros).



4.3.3 Constituintes Químicos Presentes no Extrato Aquoso (EAESflh)

4.3.3.1 Mistura de Açúcares: Frutose e Trealose

O extrato aquoso bruto (EAESflh), obtido por infusão em água destilada das folhas de *E. suberosum* (Parte Experimental), foi monitorado por CLAE-RI (Métodos Gerais). O cromatograma obtido mostrou a presença de dois picos em tR = 7,25 min e tR = 14,97 min. A comparação com padrões analíticos identificou a presença dos açúcares frutose (tR = 7,25 min) e trealose (tR = 14,97 min) na composição desse extrato (Figura 39).

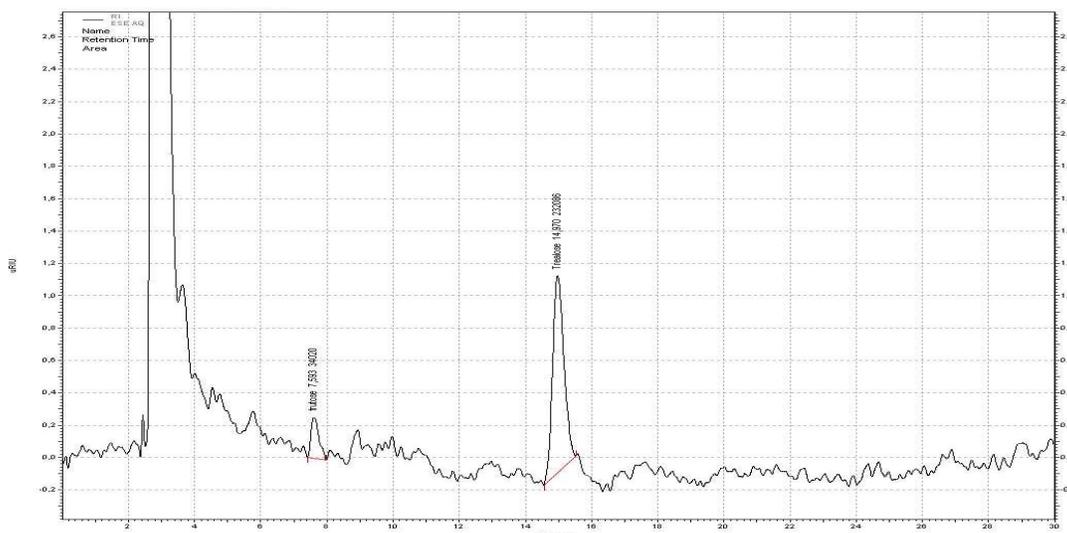


Figura 39 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-IR: mistura frutose ($t_R = 7,25$ min) e trealose ($t_R = 14,97$ min) em comparação aos padrões analíticos
 Condições de análise: coluna: Lichrospher 100 NH_2 , 250 mm x 4,0 mm (HP 5 μm) mantida a 30°C; fluxo: 1mL/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (RI); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20); Região de análise entre 200nm e 400nm

4.3.3.2 Rutina

O perfil cromatográfico para os extratos brutos EEESflh e EAESflh por CLAE-DAD em 354 nm são semelhantes na quantidade e intensidade de picos mostrados. Os espectros obtidos em 280 nm exibem picos entre 10 e 25 minutos, porém esses são mais intensos para EAESflh quando comparados aos picos dessa região para EEESflh.

O cromatograma por CLAE-DAD em 354 nm do extrato aquoso bruto (EAESflh) (Figura 40) apresentou picos majoritários em $t_R = 27,06$ min (pico 1), $t_R = 30,99$ min (pico 2) e $t_R = 47,73$ min (pico 3). A comparação com padrões analíticos indicou a presença de flavonoide com semelhança espectral no UV > 0,99 com a rutina ($t_R = 27,08$ min) no pico 1, além de outros derivados de quercetina nos picos 2 e 3 não identificados nesta análise. Um estudo que validou o método utilizado neste trabalho, para avaliação de flavonoides por CLAE-DAD em extratos vegetais, identificou e quantificou a rutina nas folhas de *E. suberosum* (59), corroborando com os resultados aqui obtidos.

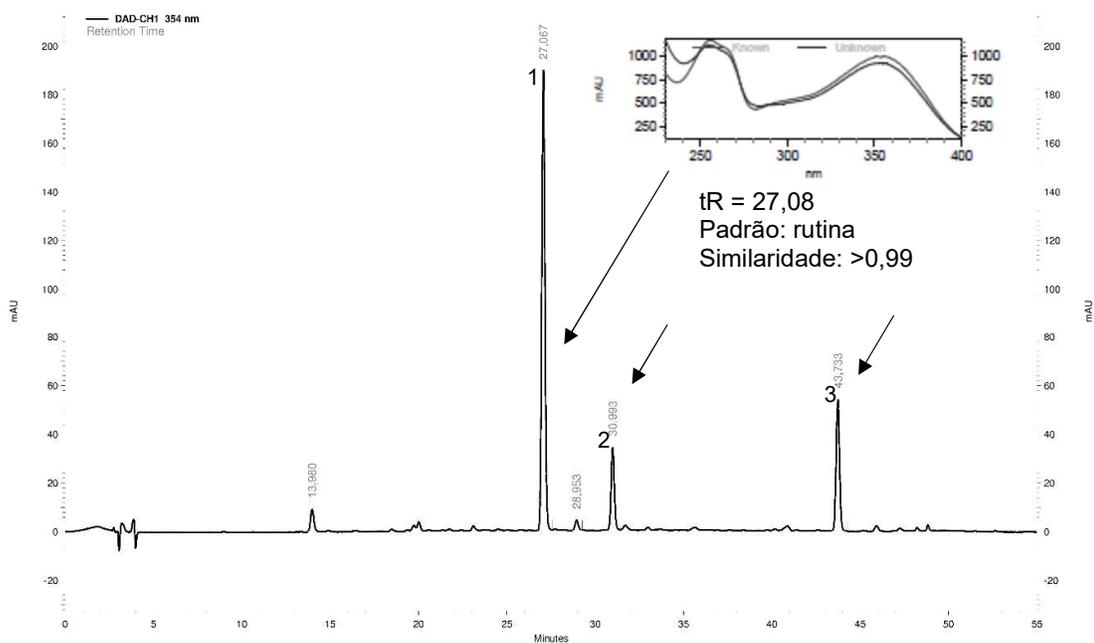


Figura 40 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-DAD em 354nm
Espectro no UV do pico tR = 27,06 min, sobreposto ao padrão analítico rutina

4.3.3.3 Catequina e epicatequina

O cromatograma do extrato EAESflh por CLAE-DAD em 280 nm (Figura 41) apresentou 13 sinais entre 10 e 25 minutos. A comparação com os padrões analíticos sugeriu a presença de catequina no tR = 14,1 min e epicatequina no tR = 18,6 min, além de outros derivados de catequina nos tRs (10,63min, 12,67min, 13,47min, 15,83min, 16,57min, 17,09min, 17,53min, 20,80min, 21,68min, 22,40min, 23,85min, 25,05 min e 25,65min) na composição desse extrato.

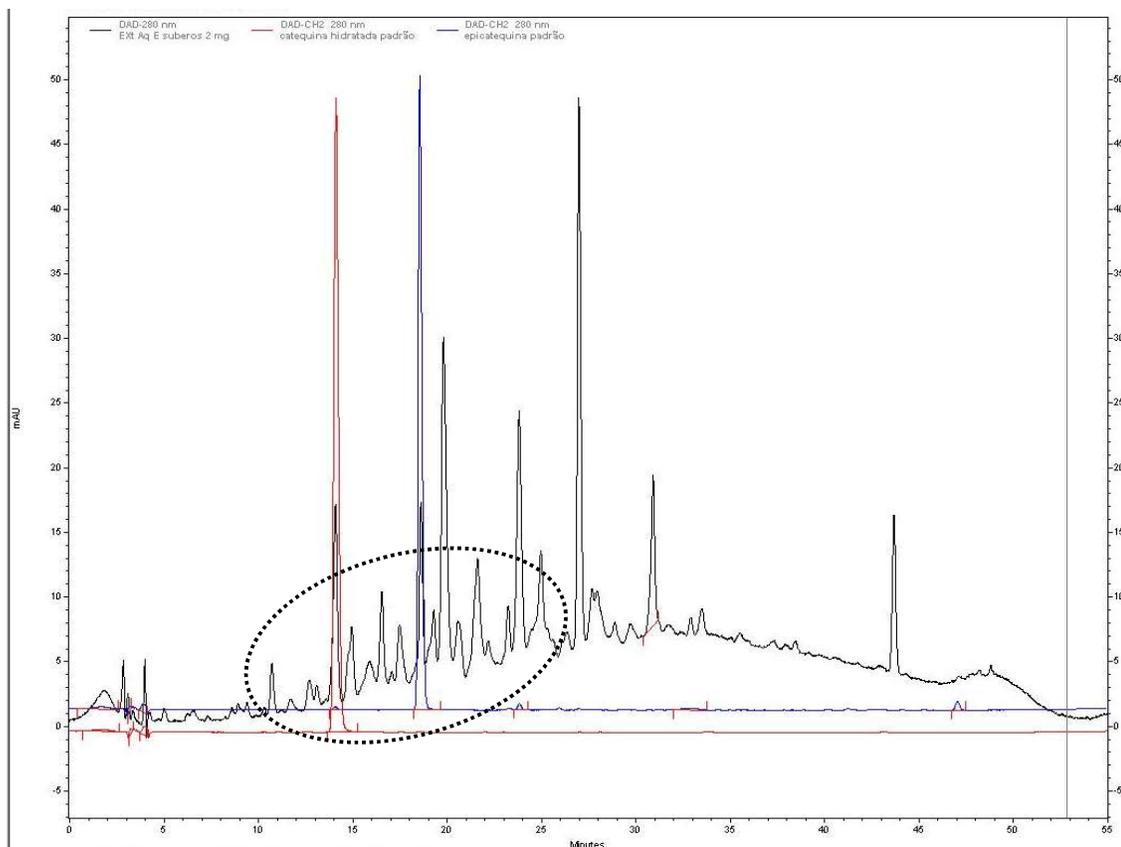


Figura 41 - Cromatograma do extrato aquoso (EAES) por CLAE-DAD em 280 nm Sobreposto aos padrões analíticos catequina (pico 1) $t_R = 14,1$ min e epicatequina (pico 2) $t_R = 16,8$ min

4.3.3.4 ESA04

ESA04 (14,3 mg) apresentou-se como um sólido amarelo pastoso, obtido por CC em Sephadex[®], conforme descrito na Parte Experimental. A análise por CCD (FM3, R3 e R6 – Métodos Gerais), mostrou manchas que emitiam fluorescência alaranjada ou verde azulada quando observadas sob luz UV (365 nm), características da presença de flavonoides e ácidos fenólicos.

O espectro de RMN de ¹H de ESA04 mostrou sinais que foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do núcleo flavanol em $\delta 6,40$ ppm e $\delta 6,21$ ppm ($J = 2,4$ Hz e $1,8$ Hz), característicos de H-6 e H-8; e sinais em $\delta 7,67$ ppm (d , $J = 1,8$ Hz), $\delta 7,63$ ppm ($J = 8,4$ e $2,1$ Hz) e $\delta 6,87$ ppm ($J = 8,4$ Hz), referentes aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' do anel B de flavonoides (Figura 42 e Figura 43) (23, 126).

A presença de sinais na região entre δ 5,20 ppm e δ 2,90 ppm permitiu inferir a presença de unidades de açúcar na molécula, corroborada pelos sinais em δ 5,1 ppm (d , $J = 7,5$ Hz) e em δ 4,51 ppm (d , $J = 1,5$ Hz), atribuídos a hidrogênios anoméricos; o sinal em δ 1,11 ppm (d , $J = 6,3$ Hz) foi atribuído a um grupo metila de uma unidade de ramnose (Figura 42).

O espectro de RMN de ^{13}C de ESA04 (Figura 44) apresentou, na região acima de δ 94,0 ppm, um total de 17 sinais majoritários, dos quais dez foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados do núcleo flavonol onde os deslocamentos em δ 135,6 ppm; δ 158,5 ppm e δ 179,4 ppm correspondem aos carbonos C3, C2 e C4, respectivamente. Foram observados os sinais referentes aos carbonos metínicos dos quais dois, em δ 102,4 ppm e em δ 105,5 ppm, foram atribuídos aos carbonos anoméricos C1'' e C1''' (ramnose e glicose, respectivamente) e o sinal em δ 69,7 ppm, foi atribuído ao carbono C6'' de glicose. A presença da ramnose foi caracterizada nesse espectro pelo sinal em δ 17,8 ppm, atribuído ao carbono de grupo metila presente na molécula desse açúcar.

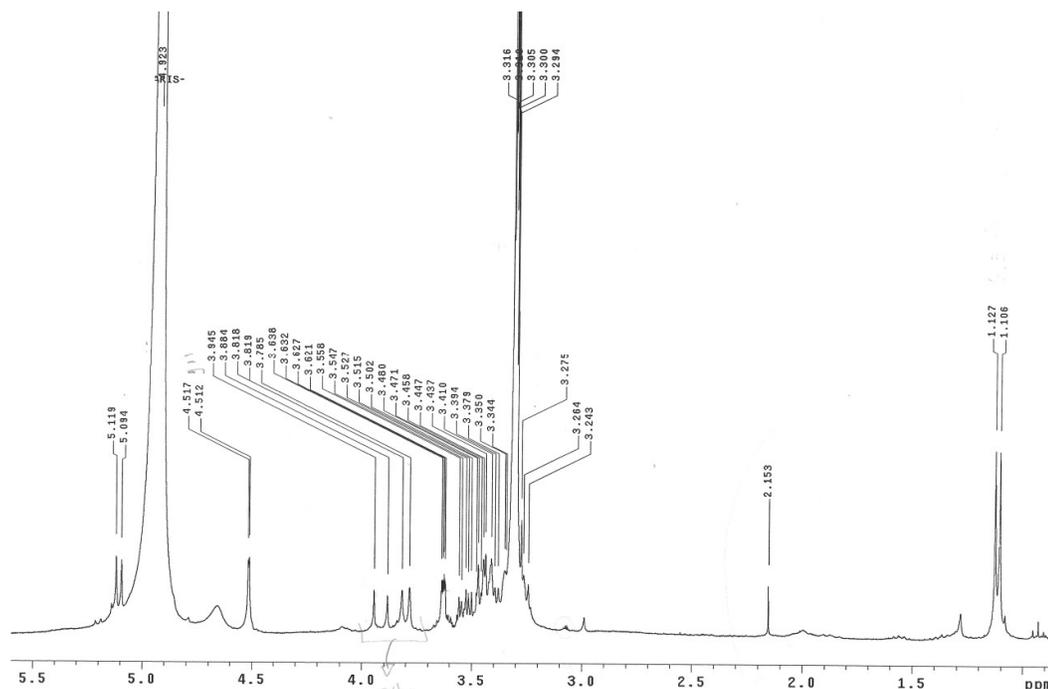


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de ESE04 - Expansão da região entre δ 1,0 e δ 5,5 (300 MHz, MeOD_4)

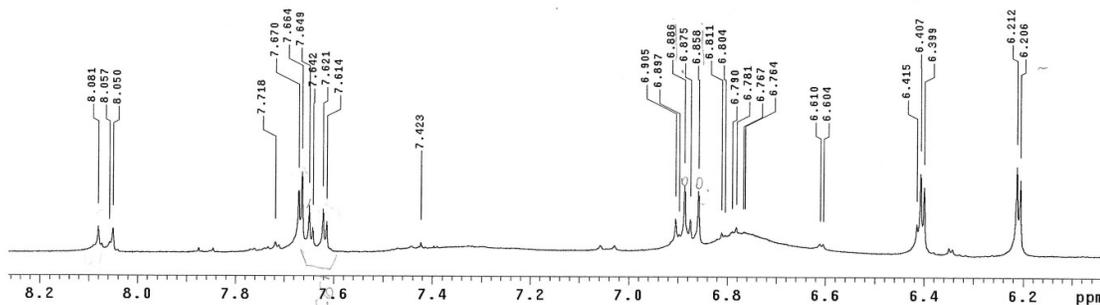


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H de ESE04 - Expansão da região entre δ 6,2 e δ 8,2 (300 MHz, MeOD_4)

Os deslocamentos químicos de ESA04 obtidos no espectro de RMN de ^{13}C foram comparados à rotina identificada por este autor na composição micromolecular de *Hancornia speciosa* (23) e aos deslocamentos de padrão analítico gerado nas mesmas condições da amostra (Figura 45). Os resultados foram apresentados na Tabela 10.

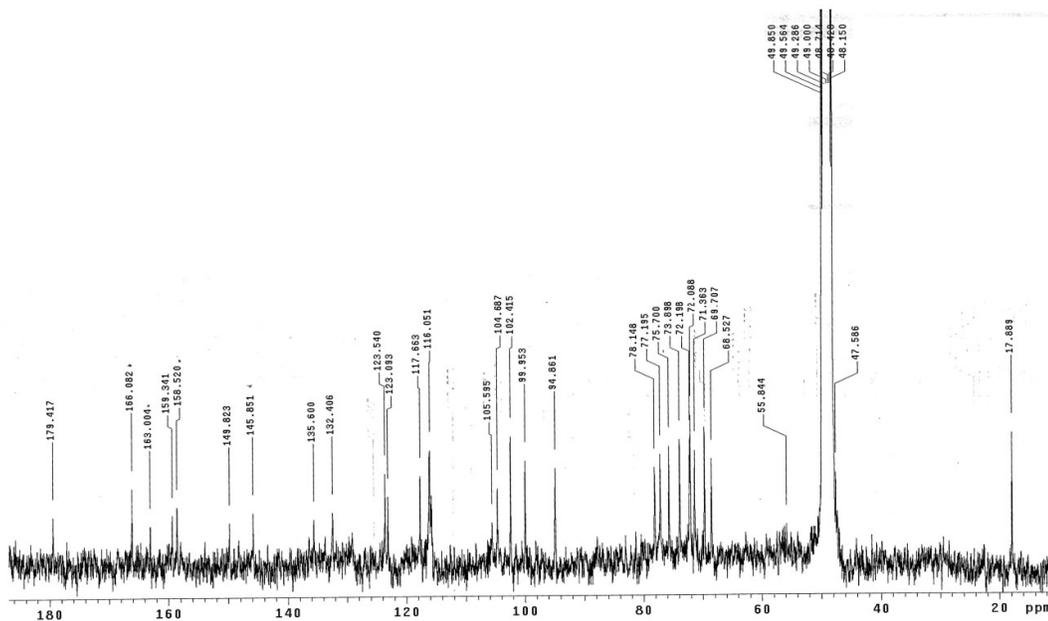


Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C de ESA04 (75 MHz, MeOD_4)

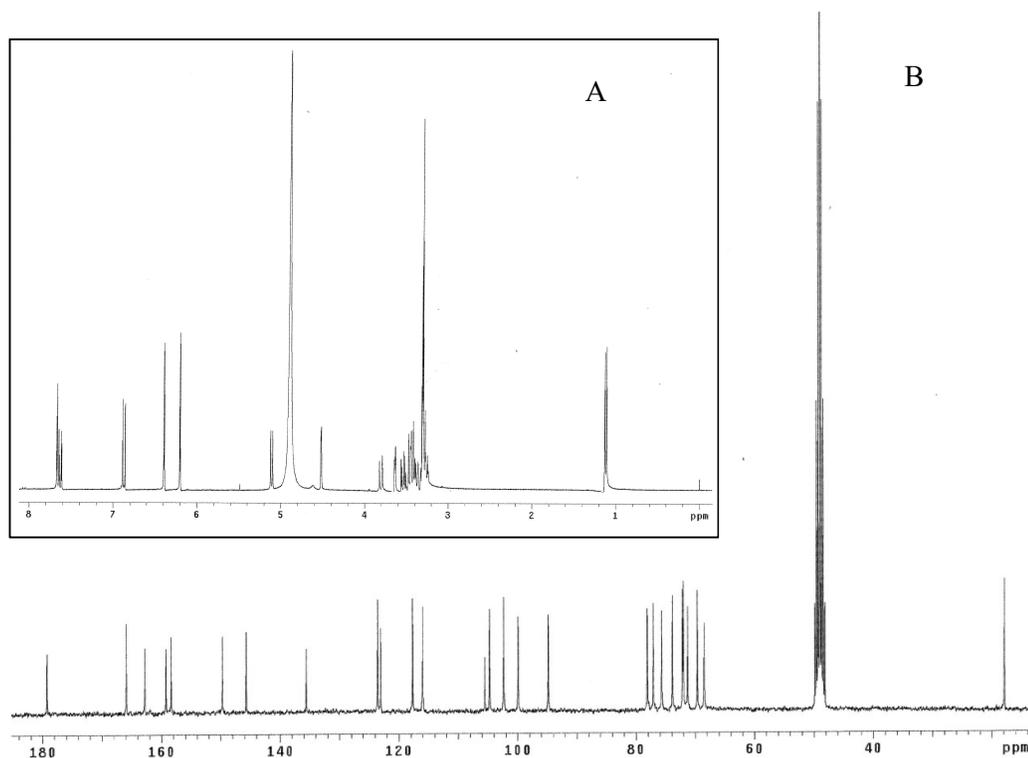
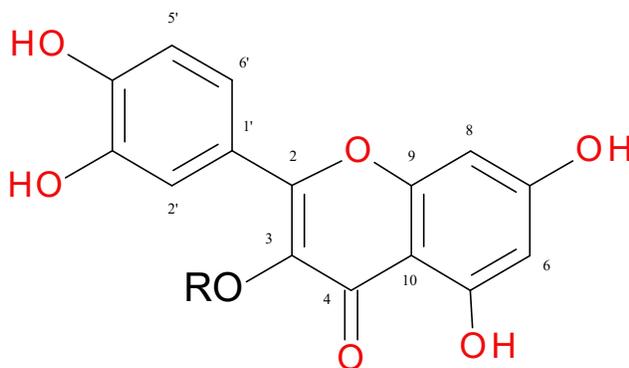


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (A) (300 MHz, MeOD_4) e de ^{13}C (B) (75 MHz, MeOD_4) - do padrão rutina ESA04

Tabela 10 - Deslocamentos químicos para ESA04 em RMN de ^{13}C (δ , CD_3OD , 75MHz) em comparação com dados da literatura e padrão rutina (11)

C	ESA4 (δ)	Rutina (23) (δ)	Rutina (δ)	C	ESA4 (δ)	Rutina (23) (δ)	Rutina (δ)
2	158,5	158,4	158,4	1''	102,4	102,3	102,3
3	135,6	135,5	135,6	2''	72,1	72,2	72,2
4	179,4	179,3	179,2	3''	77,2	77,1	77,1
5	163,0	162,9	162,8	4''	71,3	71,3	71,3
6	94,8	94,8	94,8	5''	73,9	74,0	73,9
7	166,1	165,9	165,9	6''	69,7	69,6	69,6
8	99,9	99,9	99,9	1'''	105,5	105,5	105,5
9	159,3	159,3	159,3	2'''	72,1	72,2	72,2
10	104,7	104,6	104,7	3'''	78,1	78,0	78,1
1'	123,1	123,0	123,0	4'''	75,7	75,6	75,6
2'	117,7	117,6	117,6	5'''	68,5	68,5	68,5
3'	145,8	145,7	145,7	6'''	17,9	17,9	17,9
4'	149,8	149,7	149,7				
5'	116,0	116,0	116,0				
6'	123,54	123,5	123,6				



(11) R = ram-glu

A rutina (**11**) foi o primeiro flavonoide a ser descoberto, isolado a partir de laranjas em 1930. Denominada inicialmente como vitamina P, esse composto pertence à classe dos flavonóis e encontra-se amplamente difundido no reino vegetal, apresentando em sua estrutura um dissacarídeo (glicose – ramnose) ligado na posição 3 do anel pirano (132). Suas propriedades terapêuticas têm despertado o interesse do segmento farmacêutico. A principal ação biológica da rutina é a capacidade vasoprotetora, com diminuição da permeabilidade e fortalecimento do tônus vascular. Acredita-se que a atividade exercida pela rutina sobre os vasos esteja relacionada à capacidade de inibição da enzima hialuronidase (133).

A identificação da rutina nos extratos brutos EEESflh e EAESflh de *E. suberosum*, por CCD, CLAE-DAD e RMN de ^1H e ^{13}C , justifica, pelo menos em parte, a atividade exercida por esses extratos frente à enzima hialuronidase visto que esse flavonoide é referenciado na literatura como inibidor dessa enzima (86-88, 90).

A quercetina é considerada como um precursor na biossíntese de derivados glicosilados no metabolismo vegetal. Possui várias ações biológicas, sendo reportada na literatura como antioxidante e inibidor da peroxidação lipídica, anti-inflamatório, analgésico e inibidor enzimático (134). Na determinação do perfil de inibição enzimática de compostos fenólicos (página 58), a quercetina apresentou inibição máxima em 1 mg/mL com IC_{50} de 0,36 mg/mL frente à hialuronidase. Esses resultados foram corroborados por achados na literatura que reportam esse flavonoide como potente inibidor dessa enzima (135-137).

Os padrões ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico não foram ativos, frente à enzima, portanto, foi possível concluir que a presença isolada dessas substâncias na composição micromolecular dos extrato e frações não contribuiu com a atividade

inibitória sobre a hialuronidase. A catequina e epicatequina inibiram fracamente a enzima hialuronidase quando testadas isoladamente, porém deve ser considerado que em mistura com outros compostos possa haver um sinergismo entre as ações sobre o mecanismo de ação enzimático.

O hiperosídeo e a isoquercitrina, derivados glicosilados da quercetina considerados como agentes biologicamente ativos, têm suas ações reportadas na literatura semelhantes a outros flavonóis como rutina e quercetina (138, 139). Sutar *et al.* (2010) correlacionou a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações de *Hypericum perforatum* com a presença majoritária dos compostos hiperosídeo, isoquercitrina, rutina e catequina na composição dos mesmos (140). O hiperosídeo foi citado como inibidor da hialuronidase, com IC₅₀ de 0,79 mg/mL, porém não apresentou atividade significativa quando testado em concentrações mais baixas (100 µg/mL). A isoquercitrina e a rutina também foram ativas frente à enzima com IC₅₀ de 0,78 e 0,95 mg/mL, respectivamente (89, 90). Um estudo realizado com flavonoides isolados de *Allium sativum* mostrou atividade frente à hialuronidase para isoquercitrina, maior que para a aglicona quercetina, diferindo dos resultados encontrados nesse estudo (137).

As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos são influenciadas por modificações na estrutura química desses compostos, podendo ocorrer variações após substituições incluindo: hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações. Em um estudo realizado com 31 flavonoides, a quercetina mostrou forte inibição da enzima hialuronidase comparada aos derivados glicosilados rutina, isoquercitrina e quercitrina. O poder inibitório sobre a enzima foi relacionado a diferenças estruturais no núcleo fundamental desses compostos, que foi potencializado com a presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e de hidroxilas ligadas à molécula em 5, 7 e 4'; e foi reduzida quando houve substituições no anel pirano (86, 87). Em relação ao mecanismo de ação, estudos cinéticos sugerem que quercetina e rutina interajam com a enzima de forma competitiva, ocasionando mudanças conformacionais nos sítios ativos que levam à redução da ação catalítica enzimática (88).

Os resultados no presente estudo para os padrões analíticos testados foram consistentes com estudos prévios realizados com quercetina; contudo, os níveis de atividade para o mesmo composto parecem diferir muito, possivelmente devido aos tipos de enzima utilizadas nos experimentos e à metodologia empregada (88, 91).

A hialuronidase possui vários inibidores de ocorrência natural. Entre eles encontram-se os derivados fenólicos não polimerizados flavonas e seus análogos silibina, apigenina, luteolina e kaempferol; saponinas glicirrizina e ácido glicirretínico; o alcalóide reserpina e os polifenólicos ácido tânico, proantocianidinas e taninos condensados, quercetina, rutina, hiperosídeo e isoquercitrina (63, 74).

A importância da hialuronidase e do seu substrato em muitas aplicações clínicas tem aumentado a procura por inibidores mais potentes e seletivos, porém, a dificuldade de sistematização das informações (inibição% e IC₅₀) sobre os inibidores já existentes e as diferentes condições experimentais aplicadas (tempo de incubação, tipo e concentração da enzima e do substrato) dificultam a escolha de padrões de referência e o delineamento do método a ser utilizado (68).

A análise por RMN de ¹H das frações ESA01, ESA02 e ESA03 oriundas do fracionamento do extrato aquoso bruto em CC em Sephadex®, não forneceu dados espectrais suficientes para identificação das mesmas, sendo necessário análise complementar por RMN de ¹³C.

4.3.4 Constituintes Químicos no Extrato Hexânicos (EHESflh)

4.3.4.1 Ester Alifático de Cadeia Longa (ESH05, ESH06, ESH08, ESH09 e ESH13)

As frações ESH05 (0,185 g), ESH06 (0,037 g), ESH08 (0,059 g), ESH09 (0,03 g) e ESH12 (0,051 g), obtidas a partir de CC do extrato hexânico bruto das folhas de *E. suberosum* (Parte Experimental), apresentaram-se como sólido branco amorfo, solúveis em CHCl₃.

A análise dos espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) (Figura 46), forneceu sinais entre δ0,85 ppm e δ1,63 ppm, correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos; um sinal intenso em δ1,25 ppm, corresponde a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática; e em δ0,88 corresponde a hidrogênios de grupo metila terminal. A ligação C-O de éster foi evidenciada pelos sinais em: δ2,28 ppm (2H, t, J=7,5Hz) referente aos hidrogênios próximo à carbonila e δ4,53 ppm (2H, t, J=6,7Hz) correspondente aos hidrogênios em átomo de carbono ligado a oxigênio.

A análise dos espectros de RMN de ¹³C (300MHz, CDCl₃) das referidas frações (Figura 47), mostrou sinais em δ14,1 ppm e em δ174,0 ppm atribuídos aos carbonos

de grupo metila terminal e de grupo carbonílico de éster, respectivamente. Além disso, a presença de sinais em $\delta 22,7$ ppm; $\delta 29,3$ ppm e em $\delta 31,9$ ppm caracterizou carbonos metilênicos de cadeia alifática; e os deslocamentos em $\delta 34,4$ ppm e $\delta 64,3$ ppm correspondem ao carbono ligado à carbonila de éster e ao carbono ligado ao oxigênio, respectivamente (141, 142).

Estas informações mostram a similaridade entre frações analisadas sugerindo que ESH05, ESH06, ESH08, ESH09 e ESH13 sejam constituídas majoritariamente por ésteres alifáticos de cadeia longa.

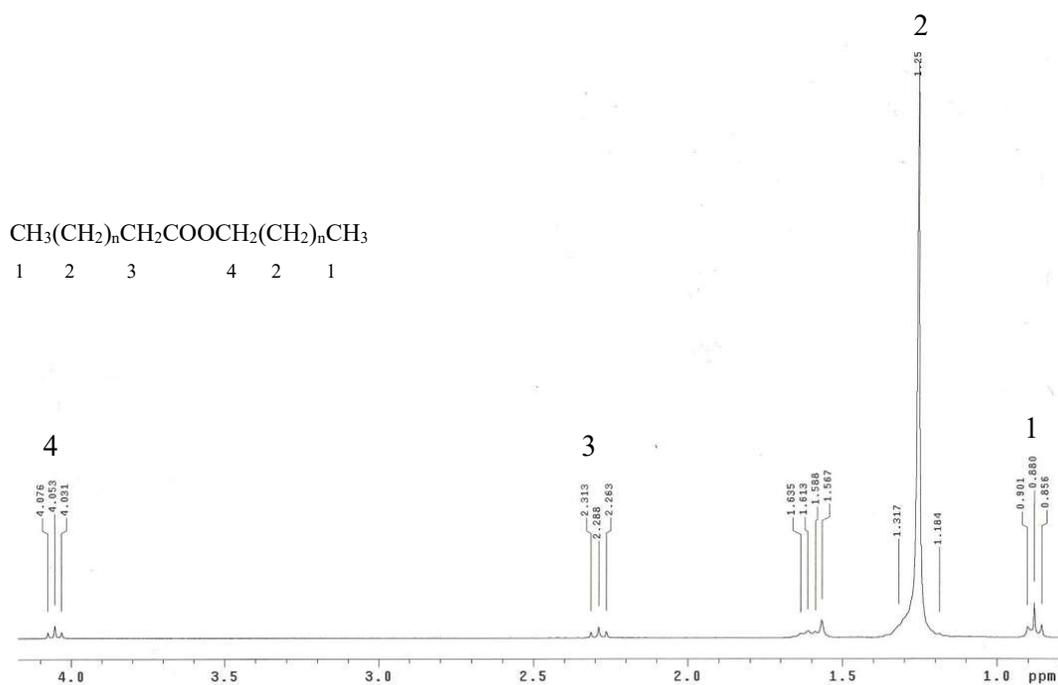


Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H de ESH (05, 06, 08, 09 e 13) - Expansão da região entre $\delta 0,85$ e $\delta 4,1$ (300 MHz, CDCl_3)

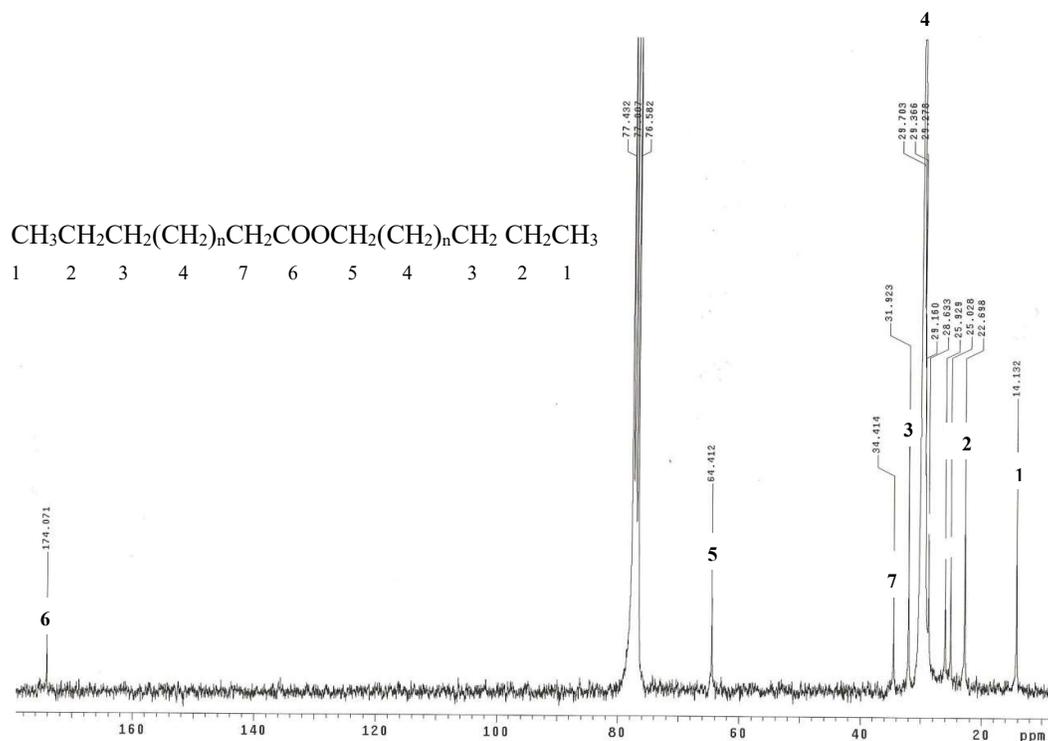


Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C de ESH (05,06,08, 09 e 13) (75 MHz, CDCl_3)

4.4 ENSAIOS COMPLEMENTARES DE ATIVIDADE FUNCIONAL E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Erythroxylum suberosum*

4.4.1 Teor de Fenólicos e Flavonoides Totais

Com base nos dados obtidos a partir das absorvâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de ácido gálico e de quercetina obtendo-se assim as respectivas equações da reta ($y = 0,07963x - 0,04678$, $r = 0,9915$) e ($y = 0,01588x - 0,00361$, $r = 0,9989$) a partir das quais foram estabelecidos os teores de polifenóis e flavonoides totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ amostra.

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários com grande representatividade no reino vegetal. São formados por várias classes de substâncias incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas (143). Seus benefícios para a saúde e nutrição são bem reconhecidos, provavelmente, promovidos por ações antioxidante, antienvhecimento, anticarcinogênica e quimioprotetora, além de outras, que estão, atualmente, relacionadas à presença destes compostos (144, 145).

Os principais métodos utilizados na quantificação de fenólicos empregam o reagente *Folin-Ciocalteu*, que tem como base uma reação redox entre compostos fenólicos e ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico presentes no reagente de *Folin-Ciocalteu* que passam a óxidos com subsequente formação de um produto de cor azul (106), medido por espectrofotometria a 700 nm (Shimadzu 1800). Todos os extratos e frações analisados apresentaram uma elevada concentração de compostos fenólicos, com ênfase para o extrato aquoso (346,3 µg/mg amostra) e fração hidrometanólica do extrato etanólico bruto (EEES) (387,93 µg/mg amostra).

Os teores de flavonoides foram determinados por espectrofotometria a 425 nm, após complexação com o cloreto de alumínio. Os resultados mostraram altos níveis de flavonoides para os extratos etanólico (35,32 µg/mg amostra) e aquoso (32,62 µg/mg amostra) e uma maior concentração foi observada para a fração hidrometanólica do extrato etanólico (87,02 µg/mg amostra). Os teores de fenólicos totais e flavonoides totais foram apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos brutos e frações de *Erythroxylum suberosum*

Amostra	Descrição	Fenólicos totais(µg/mg amostra) ^a	Flavonoides totais (µg/mg amostra) ^{ab}
EAES	Extrato aquoso	346,3±0,04	32,62±0,006
EEES	Extrato etanólico	248,77±0,04	35,32±0,01
FDCM	Fração diclorometano	166,79±0,01	55,82±0,004
FHM	Fração hidrometanólica	387,93±0,06	87,02±0,001

^aValores expressos como média± erro padrão ($n=3$); ^bOs teores de polifenóis e flavonoides são expressos em equivalentes de ácido gálico e quercetina, em µg/ mg de amostra, respectivamente

4.4.2 Atividade Antioxidante

Com base nos dados obtidos a partir das absorvâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de ácido ascórbico, quercetina e de 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol (BHT), sendo obtidas as respectivas equações da reta ($y = 2,645x - 0,1672$, $r = 0,989$), ($y = 1,92x - 0,056$, $r = 0,994$) e ($y = 0,1588x - 0,0361$, $r = 0,9785$), a partir das quais foi estabelecida a capacidade antioxidante, expressa em equivalentes de ácido ascórbico, de quercetina e BHT, por mg de amostra.

O envolvimento dos radicais livres no processo de envelhecimento e doenças degenerativas associadas, tem se confirmado a cada dia. Espécies Reativas Derivadas do Metabolismo do Oxigênio (ROS) estão presentes em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários altamente reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2^*) e hidroxila (OH^*), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (146).

Os ROS podem oxidar proteínas, causar danos ao DNA e reagir com as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados causando mudanças na estrutura e permeabilidade das membranas ocasionando morte celular (147).

Compostos antioxidantes são aqueles que possuem a capacidade de retardar ou inibir reações de oxidação em cadeia, estabilizando ou desativando os radicais livres antes que estes ataquem seus alvos biológicos (107, 148).

Os flavonoides são compostos fenólicos que se caracterizam pela sua importância e diversidade entre os demais produtos de origem vegetal. Muitas funções são atribuídas a essa classe de compostos das quais se destaca marcadamente sua atividade antioxidante. As características estruturais principais atribuídas a esta atividade, estão relacionadas ao número e posição de suas hidroxilas fenólicas ligadas ao núcleo flavônico, como por exemplo, o grupo catecol ($3'$, $4'$ - di-idroxi) no anel B, e a insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel C (Figura 4.47) (149, 150).

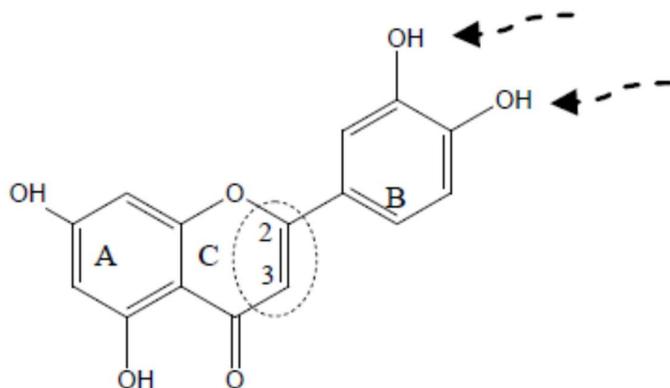


Figura 48 – Características estruturais atribuídas à atividade antioxidante dos flavonoides

O modelo utilizado baseia-se na redução do complexo de fosfomolibdênio pela transferência eletrônica do composto antioxidante para o reagente oxidante. Neste

método, a atividade é expressa em equivalentes de ác. ascórbico, quercetina e BHT (110).

Os extratos e frações das folhas de *E. suberosum* apresentaram capacidade antioxidante comparados aos controles positivos, em especial ao BHT. Os resultados (Tabela 12) foram mais significativos para os extratos aquoso e etanólico com potencial antioxidante cerca de 4 e 6 vezes maior que o BHT. Entretanto após a partição do extrato etanólico bruto a atividade antioxidante foi aumentada na fração hidrometanólica resultante.

Tabela 12 Capacidade antioxidante total dos extratos brutos e frações de *Erythroxylum suberosum*

Amostras	Média ABS	Equivalentes/mg extrato ^a		
		Ác. ascórbico	Quercetina	BHT
EHES	0,206	0,020	0,136	1,069
EAES	0,760	0,308	0,425	4,562
EEES	0,984	0,425	0,541	5,971
FDCM	0,743	0,30	0,42	4,45
FHM	1,251	0,564	0,80	7,651

^acapacidade antioxidante dos extratos em comparação com os controles positivos. EHES – extrato hexânico; EAES – extrato aquoso; EEES – extrato etanólico; FDCM – fração diclorometano; FHM – fração hidrometanólica

A presença de compostos fenólicos pode justificar a atividade antioxidante observada nos ensaios realizados. As análises químicas por CCD, CLAE-DAD e RMN de ¹H e ¹³C, identificaram os flavonoides quercetina, rutina, hiperosídeo e isoquercitrina além de catequina e epicatequina. Também foi possível observar a presença de isômeros do ácido clorogênico nos extratos e frações das folhas de *Erythroxylum suberosum* St Hil. Esses compostos são largamente conhecidos na literatura por possuírem, dentre outras, propriedades antioxidantes naturais (134, 151-153).

A quercetina, porção não glicosídica do flavonoide rutina, possui propriedades inibitórias da peroxidação lipídica por meio do sequestro de espécies reativas ao oxigênio e da quelação de metais responsáveis pela geração destas espécies (154). Assim, os resultados obtidos sugerem que a atividade do extrato aquoso e etanólico e da fração hidrometanólica, observada nos experimentos realizados, seja, ao menos em parte, devida aos achados fitoquímicos inferidos aos extratos das folhas desta espécie.

4.4.3 Toxicidade à larvas de *Artemia salina*

O bioensaio envolvendo *Artemia salina* consiste em avaliar os efeitos da exposição deste microcrustáceo a um determinado composto. É um modelo experimental econômico, rápido e confiável e tem sido utilizado nas mais diversas áreas da Biologia para avaliação preliminar de toxicidade de metais pesados, extratos de plantas além de outras substâncias químicas (155-157).

Na análise, os extratos vegetais apresentaram valores de $DL_{50} > 1$ mg/mL sendo considerados de baixa toxicidade às larvas de *A. salina de acordo* com a classificação de Meyer *et al* (1984) (111). Esses resultados são preliminares em relação à toxicidade dos extratos desta espécie.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Foram testados, frente à enzima hialuronidase, 12 extratos de partes aéreas de espécies de *Erythroxylum* ocorrentes em regiões de Cerrado do Distrito Federal, a saber: *E. daphnites*, *E. subrotundum* e *E. suberosum*.

As espécies *E. daphnites* e *E. suberosum* foram as mais ativas frente à hialuronidase, com capacidade de inibição enzimática acima de 80%. Os valores de IC₅₀ para todos os extratos ativos foram, significativamente, menores que o do controle cromoglicato dissódico (DSCG).

O extrato etanólico de *E. suberosum* foi o mais promissor quanto à inibição da hialuronidase, apresentando máximo de inibição com IC₅₀ = 0,045 mg/mL, significativamente menor que o controle DSCG e demais extratos.

Não houve redução significativa na atividade inibitória da hialuronidase, após fracionamento químico do extrato etanólico bruto, sendo preservada a atividade na maioria de suas frações.

O extrato aquoso das folhas de *E. suberosum* também se mostrou promissor no que se refere à inibição da enzima (IC₅₀ = 0,09mg/mL) e foi investigado quanto à composição micromolecular.

A atividade antioxidante observada para os extratos de *E. suberosum* foi proporcional ao teor de polifenóis e flavonoides totais encontrados nos extratos de *E. suberosum*, relacionando a ação antioxidante dos extratos à composição micromolecular.

Os extratos e frações de folhas de *E. suberosum* não apresentaram atividade citotóxica quando avaliados pelo modelo de toxicidade às larvas de *Artemia salina*.

Do extrato etanólico foram identificados:

- Rutina;
- Mistura de hiperosídeo e isoquercitrina,
- Quercetina e derivados;
- Catequina e epicatequina;
- Derivados do ácido clorogênico;

E isolados:

- Mistura de hiperosídeo e isoquercitrina (ESE02);

Do extrato aquoso foram identificados:

- Rutina

- Mistura de catequina e epicatequina

- Mistura de frutose e trealose

E isolada:

- Rutina

Do extrato hexânico foram isolados e identificados:

- Ésteres alifáticos de cadeia longa

Esse é o primeiro relato de inibição da hialuronidase por extratos de *E. suberosum* e a atividade de inibição da enzima foi relacionada à:

- Presença do flavonoide quercetina, comprovada por teste com padrão comercial ($IC_{50} = 0,36$ mg/mL);

- Presença dos flavonoides rutina, hiperosídeo e isoquercitrina, referenciados na literatura como inibidores;

- Presença de catequina e epicatequina, comprovada por teste com padrões comerciais;

Finalmente, o conhecimento da composição micromolecular, a ação antioxidante aliada à capacidade de inibição frente à enzima hialuronidase torna esta espécie promissora em estudos que buscam moléculas mais ativas e seletivas no desenvolvimento de novos produtos farmacoterapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devienne K, Raddi G, Pozetti G. Das plantas medicinais aos fitofármacos. Rev Bras Plant Medicin. 2004;11-4.
2. Ribeiro EMO, Lima LS, David JM, Vale AE, Lopes LMX, David JP. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). Phytochemistry Letters. 2013;6(2):232-5.
3. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Quím Nova. 2002;25(1):45-61.
4. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Rev MultiCiência. 2006;7:17.
5. Cunha AP. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. 2005 25/08/2016. Available from: http://www.ppmac.org/sites/default/files/aspectos_historicos.pdf.
6. Schulz V. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: Rational phytotherapy: Springer; 2001. p. 1-39.
7. Miguel MD, Miguel OG. Desenvolvimento de fitoterápicos. . Ribeirão Preto: Tecmed; 2004. 115 p.
8. Simoes CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed: UFRGS; Florianópolis: UFSC; 2001.
9. Cordell GA. Phytochemistry and traditional medicine: a revolution in process. Phytochemistry Letters. 2011;4(4):391-8.
10. Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Netto EM. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007;5(11):26-32.
11. BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Espécies vegetais. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
12. Panda LPSK. Medicinal plants: potencial to fight superiority diseases. Ann Pharma Res. 2013;1(1):8-17.
13. Fioravanti C. A maior diversidade de plantas do mundo. 2016 25/07/2016. Available from: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/?cat=ciencia>.

14. Silva JMC, Bates JM. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna *hotspot* The Cerrado, which includes both forest and savanna habitats, is the second largest South American biome, and among the most threatened on the continent. *BioScience*. 2002;52(3):225-34.
15. MMA. O Bioma Cerrado Brasil: Ministério do Meio Ambiente; 2016 [25/07/2016]. Available from: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.
16. Rigonato VD, Almeida MG. A singularidade do Cerrado: a interrelação das populações tradicionais com as fitofisionomias. VIII Encontro Regional de Geografia: a geografia no mundo da diversidade; Cidade de Goiás: Anais, UFG; 2003.
17. Klink CA, Machado RB. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv Biol*. 2005;19(3):707-13.
18. Pin Koh L. Potential habitat and biodiversity losses from intensified biodiesel feedstock production. *Conserv Biol*. 2007;21(5):1373-5.
19. Ramos LP, Wilhelm HM, editors. Current status of biodiesel development in Brazil. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals; 2005: Springer.
20. Leite RCC, Leal MRLV, Cortez LAB, Griffin WM, Scandiffio MIG. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*. 2009;34(5):655-61.
21. Foglio MA, Queiroga CL, SOUSA IMO, Rodrigues RAF. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Rev Multiciência UNICAMP*. 2006;7:1-8.
22. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, Kent J. Biodiversity *hotspots* for conservation priorities. *Nature*. 2000;403(6772):853-8.
23. Barros IMC. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
24. Aquino FG, Walter BMT, Ribeiro JF. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado-Balsas, MA. *Rev Bras de Biociências*. 2007;5(S1):pg. 147-9.
25. Corrêa RS, Silva LL, Baptista GMM. Efeito de uma cobertura morta sobre o intervalo hídrico ótimo e o desenvolvimento de ipê-roxo em área minerada no Cerrado. *Rev Pesq Aplic Eng*. 2008;1(1).
26. Romero MB. As Características do lugar e a sustentabilidade de Brasília. P@ranoá–Periódico Eletrônico de Arquitetura e Urbanismo [Internet]. 2006 25/08/2016. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/255662095_AS_CHARACTERISTICAS_DO_LUGAR_E_A_SUSTENTABILIDADE_DE_BRASILIA.

27. Lima JLC. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Erythroxyloaceae. Rodriguésia-Inst Pesq Jard Bot Rio de Janeiro. 2015;66(1):285-95.
28. Plowman T, Hensold N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae). Brittonia. 2004;56(1):1-53.
29. Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, Queiroz RT. Flora of Paraíba, Brazil: Erythroxyloaceae Kunth. Act Bot Bras. 2007;21(2):473-87.
30. Lima JLC. Erythroxyloaceae. In: Flora do Brasil 2020 em construção 2016 20/08/2016. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB111>.
31. Brock A, Bieri S, Christen P, Dräger B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxyllum* species. Phytochemistry. 2005;66(11):1231-40.
32. Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. Alkaloids of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae) species from Southern Brazil. Biochem Syst Ecol. 2001;29(8):819-25.
33. Oliveira SL, Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG, Lucena HF, Romero MA, et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxyllum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C NMR Spectral Data. Chem Biodivers. 2010;7(2):302-26.
34. Oliveira SL, Tavares JF, Branco MV, Lucena HF, Barbosa-Filho JM, Agra MF, et al. Tropane alkaloids from *Erythroxyllum caatingae* Plowman. Chem Biodivers. 2011;8(1):155-65.
35. Bieri S, Brachet A, Veuthey JL, Christen P. Cocaine distribution in wild *Erythroxyllum* species. J Ethnopharmacol. 2006;103(3):439-47.
36. Oliveira SL. Fitoquímica de espécies de *Erythroxyllum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos [Tese]. Paraíba: Universidade Federal da Paraíba; 2012.
37. Chin YW, Jones WP, Waybright TJ, McCloud TG, Rasoanaivo P, Cragg GM, et al. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxyllum pervillei* stem bark obtained in Madagascar. J Nat Prod. 2006;69(3):414-7.
38. Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, de Q. Paulo M, Hostettmann K. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxyllum vacciniifolium*. J Nat Prod. 2003;66(4):497-502.

39. Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo Mde Q, Hostettmann K. Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. J Nat Prod. 2005;68(8):1153-8.
40. Ansell SM, Pegel KH, Taylor DAH. Diterpenes from the timber of *Erythroxylum pictum*. Phytochemistry. 1993;32(4):945-52.
41. Barreiros ML, David JM, Pereira PAP, Guedes ML, David JP. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. J Braz Chem Soc. 2002;13.
42. Barreiros ML, David JM, de Queiroz LP, David JP. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. Biochem Syst Ecol. 2005;33(5):537-40.
43. Santos CC, Lima MAS, Braz Filho R, Silveira ER. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. J Brazil Chem Soc. 2006;17(7):1304-8.
44. González-Guevara JL, Vélez-Castro H, González-García KL, Payo-Hill AL, González-Lavaut JA, Molina-Torres J, et al. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. Biochem Syst Ecol. 2006;34(6):539-42.
45. Rodrigues VEG, Carvalho Dd. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia. 2001;25(1):102-23.
46. Filho MDL, Silva GC, Côrtes SF, Guia TRM, Ferraz VP, Serra CP, et al. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) OE Schulz. Phytomedicine. 2010;17(5):383-7.
47. Wet HD. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. Afr J Biotechnol. 2011;10(55):11511-4.
48. Aguiar JS, Araújo RO, do Desterro Rodrigues M, Sena KX, Batista AM, Guerra MM, et al. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. Int J Mol Sci. 2012;13(4):4124-40.
49. Barros MG. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br.(Erythroxylaceae) do Brasil. Braz J Bot. 1998;21(2):159-66.
50. Martins DHN. Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
51. Simas PH, Sarmiento UC, Almeida LHO, Dornelles CF, Garcez WS, Garcez FR. Diterpenoides, derivados de fenilpropanoides e outros constituintes químicos de *Erythroxylum daphnites* Mart. In: Anais 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Natal - RN: SBC; 2013.

52. Correia AF. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do Cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* SPP [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
53. Correia AF, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, da Silva EC, et al. Activity of crude extracts from Brazilian Cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Comp Altern Med*. 2016;16(1):1.
54. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clin Oral Invest*. 2015;19(3):637-46.
55. Aguiar JS. Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum subrotundum* A. St-Hil [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2011.
56. Neto GG, Morais R. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras*. 2003;17(4):561-84.
57. Barbosa W, Pinto L. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. *Rev Bras de Farmacogn*. 2003;13:47-9.
58. Nascimento MNGd. Estudo químico de *erythroxylum suberosum* (erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V [Dissertação]: Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão; 2014.
59. Leite CFM, Leite BHM, de Carvalho Barros IM, Gomes SM, Fagg CW, Simeoni LA, et al. Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. *Bol Lat Caribe Plant Med y Aromáticas*. 2014;13(5).
60. Nascimento CJ, Violante IMP, Garcez WS, Pott A, Garcez FR. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*. 2012;5(2):401-6.
61. Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012;43(4):1302-8.
62. Macedo TB, Elias ST, Torres HM, Silva FPY, Silveira D, Magalhães PO, et al. Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Braz Dental J*. 2016;27(1):108-12.

63. Salmen S. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase-Synthesis and structure-activity relationships [Doctoral Thesis]. Regensburg: University of Regensburg; 2003.
64. Ogston A, Stanier J. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *The Journal of Physiology*. 1953;119(2-3):244.
65. Price RD, Berry M, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plas Reconstr Ae S*. 2007;60(10):1110-9.
66. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-39.
67. Ogrodowski CS. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação e caracterização do produto [Tese]. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2006.
68. Botzki A. Structure-based design of hyaluronidase inhibitors [Doctoral Thesis]. Munchen: Universität Regensburg; 2004.
69. Petersen MTN, Klitgaard S, Skovsen E, Petersen SB, Tommeraas K, Abdellaoui KS. Biophysical properties of phenyl succinic acid derivatised hyaluronic acid. *J Fluoresc*. 2010;20(2):483-92.
70. Brown M, Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad of Dermatol*. 2005;19(3):308-18.
71. Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clin Orthop Relat R*. 1971;80:25-32.
72. Medeiros AC, Ramos AMO, Dantas Filho AM, Azevedo RdCF, Araújo FLFB. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. *Acta Cir Bras*. 1999;14(4):203-7.
73. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med - US*. 2008;53(8):397-411.
74. Spickenreither M. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidases: design, synthesis and structure-activity relationships with focus on human enzymes [Doctoral Thesis]. Regensburg: University of Regensburg; 2007.
75. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Inter Med*. 1997;242(1):61-6.

76. Rocquet C, Reynaud R. RenovHyal, a Patented Anti-Ageing Cosmetic Ingredient. *Cosm Sci Techn.* 2008;112-20.
77. Salles AG, Remigio A, Saito O, Camargo CP, Zacchi VB, Saito PL, et al. Avaliação da durabilidade de preenchimento de ácido hialurônico com ultra-som facial. *Arq Cat Med.* 2009;38(supl 1):281-3.
78. Girish K, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath B. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem.* 2009;16(18):2261-88.
79. Starr CR, Engleberg NC. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 2006;74(1):40-8.
80. Simpson MA, Lokeshwar VB. Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. *Front Biosc.* 2008;13:5664.
81. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1985;33(2):642.
82. Brogden R, Speight T, Avery G. Sodium cromoglycate (cromolyn sodium): a review of its mode of action, pharmacology, therapeutic efficacy and use. *Drugs.* 1974;7(3-4):164-282.
83. Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoehstetter J, et al. L-Ascorbic Acid 6-Hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45990-7.
84. Girish KS, Kemparaju K. Inhibition of Naja naja venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry (Mosc).* 2005;70(8):948-52.
85. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* 2007;80(21):1921-43.
86. Kuppusamy U, Khoo H, Das N. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(2):397.
87. Hertel W, Peschel G, Ozegowski JH, Müller PJ. Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes. *Arch Pharm.* 2006;339(6):313-8.
88. Liu M, Yin H, Dong J, Xiao L, Liu G, Qian Z, et al. Inhibition and Interaction with Hyaluronidase by Compounds from Hop (*Humulus lupulus* L) Flowers. *Asian J Chem.* 2013;25(18):10262.

89. Akkol EK, Süntar I, İlhan M, Aras E. In vitro enzyme inhibitory effects of *Rubus sanctus* Schreber and its active metabolite as a function of wound healing activity. J of Herb Med. 2015;5(4):207-10.
90. Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. J Ethnopharmacol. 2010;130(2):329-33.
91. Bralley E, Greenspan P, Hargrove JL, Hartle DK. Inhibition of hyaluronidase activity by select Sorghum brans. J Med Food. 2008;11(2):307-12.
92. Sahasrabudhe A, Deodhar M. Anti-hyaluroiüdase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. Int J Bot. 2010;6:1-10.
93. Xu M, Zhu HT, Cheng RR, Wang D, Yang CR, Tanaka T, et al. Antioxidant and hyaluronidase inhibitory activities of diverse phenolics in *Phyllanthus emblica*. Nat Prod Res. 2016:1-4.
94. Ono M, Masuoka C, Tanaka T, Ito Y, Nohara T. Antioxidative and antihyaluronidase activities of some constituents from the aerial part of *Daucus carota*. Food Sci Technol Res. 2001;7(4):307-10.
95. Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. Pharmacol Biochem Be. 2009;93(1):10-6.
96. Silva CAM. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart & Miq.) Baehni (Sapotaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
97. Perfeito JP, Santos ML, López KSE, Paula JE, Silveira D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. Rev Bras Farmacog. 2005;15(1):183-6.
98. Lopez KSE. Estudo químico e atividades biológicas de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk (Sapotaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2005.
99. Nunes MM. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2004.
100. Junior EAF. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* [Dissertação]. Belém Universidade Federal do Pará; 2004.
101. Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L. Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and saponinins from *Hedera helix*, *Aesculus*

hippocastanum, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie*. 1995;328(10):720-4.

102. Melo RO, Gama SM, Resck IS, Silveira D, editors. Fitoquímica do Extrato Etanólico de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae). XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília e 4º Congresso de Iniciação Científica do DF 2007; Brasil: Universidade de Brasília.

103. Li Y, Yin H, Qian Z, Miao J, Huai Q. Anti-allergic and antioxidant effects of flavonoid glycosides isolated from Hop (*Humulus lupulus* L) flowers. *Asian J Chem*. 2014;26(10):3061.

104. Abdullah NH, Thomas NF, Sivasothy Y, Lee VS, Liew SY, Noorbacha IA, et al. Hyaluronidase Inhibitory Activity of Pentacyclic Triterpenoids from *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schum: Isolation, Synthesis and QSAR Study. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):143.

105. Wagner H, Bladt S, Rickl V. Plant drug analysis: a thin layer chromatography. . Berlin: Springer Verlag; 2009.

106. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004;84(3):329-.

107. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa C, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova*. 2007;30(2):351-5.

108. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res*. 1998;37(2):99-105.

109. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quináia SP, et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. *Quím Nova*. 2009:296.

110. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269(2):337-41.

111. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Plant Med*. 1982;45(5):31-4.

112. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem*. 1956;220(1):303-6.

113. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their antiallergic actions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40(6):1439-42.
114. Samee H, Li ZX, Lin H, Khalid J, Guo YC. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2009;10(2):147-53.
115. Ippoushi K, Yamguchi Y, Itou H, Auma K, Higashio H. Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in *Lemon Balm (Melissa officinalis L.)*. *Food Sci Technol Res*. 2000;6(1):74-7.
116. Zhang Q, Zhao X, Qiu H. Flavones and flavonols: phytochemistry and biochemistry. *Natural Products*: Springer; 2013. p. 1821-47.
117. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Krishna D. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*. 2001;33(1):2-16.
118. Tokeshi I, Yoshimoto T, Muto N, Nakamura S, Ashizawa K, Nakada T, et al. Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. *J Reprod Develop*. 2007;53(4):755-64.
119. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araujo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím Nova*. 2005;28(5):892-6.
120. Valente LM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosario SL, Mazzei JL, et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Rev Bras Farmacog*. 2006;16(2):216-23.
121. Pereira CAM. Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora L* [Tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2002.
122. Morais NA. Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
123. Chávez JP, Santos ID, Cruz FG, David JM. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry*. 1996;41(3):941-3.
124. Johnson EL, Schmidt WF. Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxylum australe*. *Z Naturforsch C A J Biosci*. 2004;59:769-76.

125. Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochem Syst Ecol.* 1998;26(7):743-59.
126. Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GDCM, Duarte LP, Silva RP, et al. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quím Nova.* 2007;30(4).
127. Nhiem NX, Van Kiem P, Van Minh C, Ban NK, Cuong NX, Tai BH, et al. Phenylpropanoid glycosides from *Heterosmilax erythrantha* and their antioxidant activity. *Arch Pharm Res.* 2009;32(10):1373-7.
128. Lee JH, Ku CH, Baek N, Kim SH, Park HW, Kim DK. Phytochemical constituents from *Diodia teres*. *Arch Pharm Res.* 2004;27(1):40-3.
129. Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím Nova.* 2005;28(4):637.
130. Maria CAB, Moreira RFA. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Quím Nova.* 2004;27(4):586-92.
131. Oliveira DM, Bastos DHM. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quím Nova.* 2011;34(6):1051-6.
132. Machado H. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Ehrlich in vivo [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2006.
133. Muri EMF, Sposito MMM, Metsavaht L. Farmacologia de drogas vasoativas. *Acta Fisiátrica.* 2010;17(1).
134. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Sci World J.* 2013;2013.
135. Tatemoto H, Tokeshi I, Nakamura S, Muto N, Nakada T. Inhibition of boar sperm hyaluronidase activity by tannic acid reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Zygote.* 2006;14(04):275-85.
136. Li MW, Yudin AI, VandeVoort CA, Sabeur K, Primakoff P, Overstreet JW. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biol Reprod.* 1997;56(6):1383-9.
137. Kim MY, Kim YC, Chung SK. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J Sci Food Agri.* 2005;85(4):633-40.

138. Liu Z, Tao X, Zhang C, Lu Y, Wei D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(9):481-90.
139. Kim SJ, Um JY, Hong SH, Lee JY. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-KB activation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chinese Med.* 2011;39(01):171-81.
140. Süntar IP, Akkol EK, Yılmaz D, Baykal T, Kırmızıbekmez H, Alper M, et al. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):468-77.
141. Nogueira M. Estudo químico de *Mucuna aterrima* e da sua atividade nematocida sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3 [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1994.
142. Silverstein RM. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora SA; 2000. 460 p.
143. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann Rev of Nutr.* 2001;21(1):381-406.
144. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci.* 2007;8(9):950-88.
145. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nut Rev.* 1998;56(11):317-33.
146. Ferreira A, Matsubara L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd Bras.* 1997;43(1):61-8.
147. Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. *Food Chem.* 2004;88(2):219-24.
148. Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem.* 1998;46(10):4113-7.
149. Evans CAR, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med.* 1996;20(7):933-56.
150. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
151. Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J of Agric and Food Chem.* 1999;47(10):3963-6.

152. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(5):643-51.
153. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):25-41.
154. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Bio Med*. 1998;25(9):1057-65.
155. Subhadra S, Kanacharalapalli V, Ravindran V, Parre S, Chintala S, Thatipally R. Comparative toxicity assessment of three *Tephrosia species* on *Artemia salina* and animal cell lines. *J Nat Pharm*. 2011;2(3):143.
156. Carballo J, Hernández-Inda Z, Pérez P, García-Grávalos M. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2002;2(1):17.
157. Salinas GMM, Fernández SS. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*. 2006;3:633-8.