

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RAFAEL APARECIDO CARVALHO SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS E GALHOS DE *Endlicheria paniculata*
E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E
NEOLIGNANAS**

UBERLÂNDIA

2021

RAFAEL APARECIDO CARVALHO SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS E GALHOS DE *Endlicheria paniculata*
E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E
NEOLIGNANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel M. F. Sousa

UBERLÂNDIA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729e
2021 Souza, Rafael Aparecido Carvalho, 1990-
Estudo fitoquímico das folhas e galhos de *Endlicheria paniculata* e
avaliação das atividades biológicas dos extratos e neolignanas [recurso
eletrônico] / Rafael Aparecido Carvalho Souza. - 2021.

Orientador: Alberto de Oliveira.
Coorientadora: Raquel M. F. Sousa.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5539>
Inclui bibliografia.

1. Química. I. Oliveira, Alberto de, 1979-, (Orient.). II. Sousa, Raquel
M. F., 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 121, PPGQUI				
Data:	Vinte e cinco de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	[19:00]
Matrícula do Discente:	11713QMI008				
Nome do Discente:	Rafael Aparecido Carvalho Souza				
Título do Trabalho:	Estudo fitoquímico das folhas e galhos de <i>Endlicheria paniculata</i> e avaliação das atividades biológicas dos extratos e neolignanas				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo químico e biológico de espécies do Cerrado				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link <https://meet.google.com/vxr-zyfh-cqp>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Luís Carlos Scalon Cunha, do Instituto Federal do Triângulo Mineiro; Marcelo Henrique dos Santos, da Universidade Federal de Viçosa; Carlos Henrique Gomes Martins e Marcos Pivatto, da Universidade Federal de Uberlândia e Alberto de Oliveira, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Alberto de Oliveira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 19:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 19:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Gomes Martins, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luís Carlos Scalon Cunha, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique dos Santos, Usuário Externo**, em 26/08/2021, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2962453** e o código CRC **3C5F5F8B**.

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo e apoio em todos os momentos da vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família pela ajuda e compreensão durante esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Alberto de Oliveira pela orientação, oportunidade, confiança, parceria e, principalmente disposição na excussão deste projeto de doutorado.

A coorientadora Dr^ª. Raquel M. F. de Sousa, a quem não tenho palavras para agradecer toda a parceria ao longo destes quatro anos e ajuda em cada uma das etapas deste projeto.

A Prof^ª. Dr^ª. Fernanda de Assis Araújo e aos doutorandos Bruno Antônio Ferreira e Francycelle Borges Rosa de Moura pelas análises de atividade anti-inflamatória.

Ao Prof. Dr. João Lago pelo fornecimento da planta estudada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Franca Faria por ter tido a paciência de ensinar a realizar e analisar os dados de docking molecular.

Ao doutorando Allisson Benatti Justino pelas análises de inibição enzimáticas e antiglicação.

Ao Dr. Flaysner Magayver Portela pelas análises de RMN.

Ao Laboratório Multiusuários do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia (FINEP/2013 INFR13 01.13.0371.00) por disponibilizar o equipamento e suporte técnico para realização dos experimentos de CG-EM que foram realizadas pela doutoranda Andressa Tironi Vieira.

Aos professores e colegas do NUPPEN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) pelo suporte técnico, em especial a doutoranda Tiara Da Costa Silva com quem iniciei este projeto e, aos alunos de iniciação científica, Tais Adriano e Felipe Cavalcanti, que em algum momento contribuíram para o andamento deste projeto.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPq pelas bolsas de estudos e a FAPEMIG pelo apoio financeiro (Projeto APQ-01612-18).

Ao NUPPEN, ao Instituto de Química da UFU e a UFU pelo espaço cedido para a realização deste projeto.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro.”

(René Descartes)

RESUMO

Endlicheria paniculata é uma árvore frutífera da família Lauraceae, nativa da Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado. Neste estudo foi realizada a identificação e a composição química de extratos hexânico e metanólico das folhas (EHF e EMF) e dos galhos (EHG e EMG) desta espécie. Além disso, o potencial antioxidante e os teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas foi avaliado, tendo apresentado baixos valores para todos. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostraram a presença de dois compostos majoritários nos EHF e EHG, que foram isolados e identificados como sendo o *O*-metildesidrodieugenol B (I) e o desidrodieugenol B (II), duas neolignanais. Além destes, outros compostos foram isolados e identificados: β -sitosterol (III) presente no EHG, o estigmasterol (IV) presente no EHF, o canferol (V) presente no EMG e o ácido palmítico (VI) presente no EMF. Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C e por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) através dos índices de similaridade. Através da análise de CG-EM foi possível identificar ácidos graxos, ésteres, neolignanais, fenilpropanoides, sesquiterpenos e esteroides presentes nos EHF e EHG. As neolignanais I e II foram avaliadas quanto à atividade inibidora das enzimas α -glicosidase e lipase pancreática, e quanto a atividade inibidora de glicação, em todos os casos as neolignanais apresentaram baixa inibição. As neolignanais I e II também foram analisadas por docking molecular com as enzimas ciclo-oxigenases 1 e 2 (Cox-1 e Cox-2) para avaliá-las quanto ao potencial anti-inflamatório e os resultados foram comparados aos obtidos para fármacos comerciais. Diante dos resultados promissores, a atividade anti-inflamatória *in vivo* (inflamação crônica induzida por implantes de esponja em camundongos pretos - C57Bl/6) de EHF, EHG, I e II foi avaliada nas dosagens de 10, 100 e 1000 ng. O tratamento dos camundongos com o EHF teve efeitos anti-inflamatórios, fibrogênicos e antiangiogênicos, enquanto o tratamento com o EHG teve efeitos pró-inflamatórios, antiangiogênicos e antifibrogênico em todas as doses avaliadas. A neolignana I apresentou efeitos antifibrogênico e antiangiogênico em todas as doses, anti-inflamatório na dose de 100 ng e pró-inflamatório na dose de 1000 ng, enquanto que a neolignana II apresentou efeitos anti-inflamatórios, antifibrogênico e antiangiogênicos em todas as doses avaliadas. A análise *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos de I e II suportam o potencial delas como candidatas a fármacos, pois seguem todas as regras propostas por Lipinski, Ghose, Veber e Egan.

PALAVRAS-CHAVE: *Endlicheria paniculata*, α -glicosidase, glicação, lipase pancreática, neolignanais, atividade anti-inflamatória, docking molecular, parâmetros farmacocinéticos.

ABSTRACT

Endlicheria paniculata is a fruit tree in the Lauraceae family, native to Amazon Rainforest, Atlantic Forest, and Cerrado. In this study, the identification of the chemical composition of the hexane and methanolic extracts of leaves (EHF and EMF) and branches (EHG and EMG) of this species were evaluated. In addition, the antioxidant potential and the levels of total phenols, flavonoids, and proanthocyanidins were evaluated, showing low values for all. High-performance liquid chromatography (CLAE) analyzes showed the presence of two major compounds in EHF and EHG, which were isolated and identified as *O*-methyldehydrodieugenol B (**I**) and dehydrodieugenol B (**II**), two neolignans. In addition, other compounds were isolated and identified: β -sitosterol (**III**) present in EHG, stigmasterol (**IV**) present in EHF, kaempferol (**V**) present in EMG, and palmitic acid (**VI**) present in EMF. The compounds were characterized by ^1H and ^{13}C NMR and by gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC–MS) through similarity indices. Through GC–MS analysis, it was possible to identify fatty acids, esters, neolignans, phenylpropanoids, sesquiterpenes, and steroids present in EHF and EHG. Neolignans **I** and **II** were evaluated for the inhibitory activity of α -glucosidase and pancreatic lipase enzymes, and for glycation inhibitory activity, in all cases, the neolignans showed low inhibition. Neolignans **I** and **II** were also analyzed by molecular docking with enzymes cyclooxygenases 1 and 2 (Cox-1 and Cox-2) to assess their anti-inflammatory potential and the results were compared to those obtained for commercial drugs. Given the promising results of molecular docking, the *in vivo* anti-inflammatory activity (chronic inflammation induced by sponge implants in black mice - C57Bl/6) of EHF, EHG, **I**, and **II** was evaluated at dosages of 10, 100, and 1000 ng. Treatment of mice with EHF had anti-inflammatory, fibrogenic, and anti-angiogenic effects, while treatment with EHG had pro-inflammatory, anti-angiogenic, and anti-fibrogenic effects at all doses evaluated. Neolignan **I** had antifibrogenic and antiangiogenic effects at all doses, anti-inflammatory at a dose of 100 ng and pro-inflammatory at a dose of 1000 ng, while neolignan **II** had anti-inflammatory, antifibrogenic and antiangiogenic effects at all doses evaluated. The *in silico* analysis of the pharmacokinetic parameters of **I** and **II** support their potential as drug candidates, as they follow all the rules proposed by Lipinski, Ghose, Veber, and Egan.

KEYWORDS: *Endlicheria paniculata*, α -glycosidase, glycation, pancreatic lipase, neolignans, anti-inflammatory activity, molecular docking, pharmacokinetic parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de alguns dos primeiros sucessos no desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais.	31
Figura 2 – Fármacos aprovados de janeiro de 1981 a setembro 2019.....	32
Figura 3 – Fármacos de pequenas moléculas aprovados de janeiro de 1981 a setembro 2019.	32
Figura 4 – Visão geral da via do chiquimato.....	34
Figura 5 – Biossíntese de monômeros de fenilpropanoides.	35
Figura 6 – Esquema geral da biossíntese de neolignananas.....	36
Figura 7 – Subtipos de neolignananas (NL).....	37
Figura 8 – Biogêneses do O-metildesidrodieugenol B (I) e do desidrodieugenol B (II).....	38
Figura 9 – Neolignananas com atividade microbiana (NLM).....	39
Figura 10 – Neolignananas com atividade antiviral (NLV).....	40
Figura 11 – Neolignananas com atividade anticâncer (NLC).	41
Figura 12 – Neolignananas com atividade antineorodegenerativas (NLN).	41
Figura 13 – Mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e de transferência de elétrons (TE) na atividade antioxidante de compostos fenólicos.	46
Figura 14 – Reação do α -tocoferol para produção do radical fenoxila.	47
Figura 15 – Estruturas químicas da glicose.....	47
Figura 16 – Esquema de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicose.	49
Figura 17 – Estruturas dos diferentes tipos de AGEs formados a partir da glicação.	50
Figura 18 – Estrutura molecular dos inibidores de α -glicosidase.....	52
Figura 19 – Esquema de reação da clivagem de triglicerídeos pela lipase pancreática.	54
Figura 20 – Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica.	57
Figura 21 – Fluxograma de docking molecular.....	61
Figura 22 – Esquema de um mapa de grid.	62
Figura 23 – Distribuição geográfica do gênero <i>Endlicheria</i>	68
Figura 24 – Distribuição geográfica de <i>E. paniculata</i>	68
Figura 25 – <i>Endlicheria paniculata</i>	72
Figura 26 – Distribuição geográfica da espécie <i>E. paniculata</i>	73
Figura 27 – Procedimento de preparação dos extratos das folhas.....	79
Figura 28 – Procedimento de preparação dos extratos dos galhos.....	79

Figura 29 – Compostos isolados dos extratos de <i>E. paniculata</i>	85
Figura 30 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHG.....	86
Figura 31 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHF parte 1.	87
Figura 32 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHF parte 2.	88
Figura 33 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EMG.....	89
Figura 34 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EMF.....	90
Figura 35 – Caixa de grade de 28 × 44 × 36, localizada no sítio ativo da Cox-1.....	100
Figura 36 – Caixa de grade de 40 × 34 × 38, localizada no sítio ativo da Cox-2.....	100
Figura 38 – Cromatograma da neolignana I obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).....	107
Figura 39 – Cromatograma do composto I obtido por CLAE–ELSD.....	108
Figura 37 – Estrutura da neolignana I isolado de <i>E. paniculata</i>	109
Figura 40 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 3,1–6,9) do composto I (400 MHz, CDCl ₃).	111
Figura 41 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 6,2–6,9) do composto I (400 MHz, CDCl ₃).	112
Figura 42 – Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (δ _C 40–150) do composto I (100 MHz, CDCl ₃).	113
Figura 43 – Espectro de RMN DEPT135 do composto I (100 MHz, CDCl ₃).	114
Figura 44 – Mapa de contorno COSY do composto I (400 MHz, CDCl ₃).	115
Figura 45 – Mapa de contorno HSQC do composto I (400 MHz, CDCl ₃).	116
Figura 46 – Cromatograma da fração EMFC2F3 obtido por CG–EM.....	117
Figura 47 – EM–IE do <i>O</i> -metildesidrodieugenol B (I) obtido por CG–EM.....	117
Figura 48 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o <i>O</i> -metildesidrodieugenol B (I).	118
Figura 50 – Cromatograma do composto II obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).....	119
Figura 51 – Cromatograma do composto II obtido por CLAE–ELSD.	119
Figura 49 – Estrutura da neolignana II isolado de <i>E. paniculata</i>	121
Figura 52 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 3,0–7,0) do composto II (400 MHz, CDCl ₃).	123
Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 6,4–7,0) do composto II (400 MHz, CDCl ₃).	124
Figura 54 – Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (δ _C 40–150) do composto II (100 MHz, CDCl ₃).	125
Figura 55 – Espectro de RMN DEPT135 do composto II (100 MHz, CDCl ₃).....	126

Figura 56 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto II (400 MHz, CDCl ₃)....	127
Figura 57 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto II (400 MHz, CDCl ₃)....	128
Figura 58 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto II (400 MHz, CDCl ₃). .	129
Figura 59 – Cromatograma da fração EHGC4F4 obtido por CG–EM.....	130
Figura 60 – EM–IE do desidrodieugenol B (II) obtido por CG–EM.....	130
Figura 61 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o desidrodieugenol B (II).	131
Figura 62 – Estrutura do esteroide III isolado de <i>E. paniculata</i>	133
Figura 63 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 0,5–5,0) do composto III (400 MHz, CDCl ₃).	135
Figura 64 – Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (δ _C 10–140) do composto III (100 MHz, CDCl ₃).	136
Figura 65 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto III (100 MHz, CDCl ₃).	137
Figura 66 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto III (400 MHz, CDCl ₃)..	138
Figura 67 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto III (400 MHz, CDCl ₃)..	139
Figura 68 – Cromatograma da fração EHGC4F1 obtido por CG–EM.....	140
Figura 69 – EM–IE do β-sitosterol (III) obtido por CG–EM.	140
Figura 70 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o β-sitosterol (III) parte 1.....	141
Figura 71– Propostas de mecanismos de fragmentação para o β-sitosterol (III) parte 2.....	142
Figura 72 – Estrutura do esteroide IV isolado de <i>E. paniculata</i>	144
Figura 73 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ _H 6,1–8,1) do composto IV (400 MHz, CDCl ₃).	146
Figura 74 – Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (δ _C 10–140) do composto IV (100 MHz, CDCl ₃).	147
Figura 75 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto IV (100 MHz, CDCl ₃).	148
Figura 76 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto IV (400 MHz, CDCl ₃). .	149
Figura 77 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto IV (400 MHz, CDCl ₃). .	150
Figura 78 – Cromatograma da fração EHFC2F1 obtido por CG–EM.	151
Figura 79 – EM–IE do estigmasterol (IV) obtido por CG–EM.	151
Figura 80 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o estigmasterol (IV) parte 1..	152
Figura 81– Propostas de mecanismos de fragmentação para o estigmasterol (IV) parte 2....	153
Figura 82 – Estrutura do flavonoide V isolado de <i>E. paniculata</i>	155

Figura 83 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,1–8,1) do composto V (400 MHz, DMSO).	157
Figura 84 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 40–150) do composto V (100 MHz, DMSO).	158
Figura 85 – Espectro de RMN DEPT135 do composto V (100 MHz, DMSO).	159
Figura 86 – Mapa de contorno COSY do composto V (400 MHz, DMSO).	160
Figura 87 – Mapa de contorno HSQC do composto V (400 MHz, DMSO).	161
Figura 88 – Mapa de contorno HMBC do composto V (400 MHz, DMSO).	162
Figura 89 – Estrutura do ácido graxo VI isolado de <i>E. paniculata</i>	164
Figura 90 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,7–2,5) do composto VI (400 MHz, CDCl_3).	166
Figura 91 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto VI (100 MHz, CDCl_3).	167
Figura 92 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto VI (100 MHz, CDCl_3).	168
Figura 93 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto VI (400 MHz, CDCl_3). ..	169
Figura 94 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto VI (400 MHz, CDCl_3). ..	170
Figura 95 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto VI (400 MHz, CDCl_3). ..	171
Figura 96 – Cromatograma da fração EMFC2F3 obtido por CG–EM.	173
Figura 97 – EM–IE do ácido palmítico (VI) obtido por CG–EM.	173
Figura 98 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o ácido palmítico (VI) parte 1.	174
Figura 99 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o ácido palmítico (VI) parte 2.	175
Figura 100 – Mecanismos de seta curva das estruturas de ressonância do íon de m/z 60 u. ...	176
Figura 101 – Mecanismos de seta curva das estruturas de ressonância do íon de m/z 73 u. ...	176
Figura 102 – Cromatograma do EHF (A) e EMF (B) obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).	178
Figura 103 – Cromatograma do EHF (A) e EMF (B) obtido por CLAE–ELSD.	178
Figura 104 – Cromatograma do EHG obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).	180
Figura 105 – Cromatograma do EHG obtido por CLAE–ELSD.	180
Figura 106 – Espectros de DAD–UV da análise por CLAE dos compostos I e II , respectivamente.	182
Figura 107 – Cromatograma do EHF obtido por CG–EM.	183
Figura 108 – Cromatograma do EHG obtido por CG–EM.	183

Figura 109 – EM–IE do 1-[(7 <i>R</i>)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-hidroxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4-hidroxi-5-hidroxibenzeno (XIV) obtido por CG–EM.	183
Figura 110 – EM–IE do 1-[(7 <i>R</i>)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno (XV) obtido por CG–EM.	184
Figura 111 – Estrutura química dos compostos identificados por CG–EM.	186
Figura 112 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o 1-[(7 <i>R</i>)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-hidroxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4-hidroxi-5-hidroxibenzeno (XIV).	188
Figura 113 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o 1-[(7 <i>R</i>)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno (XV).	189
Figura 114 – Esteroides identificados por CG–EM.	191
Figura 115 – Cromatograma da fração EFHC1F1 obtido CG–EM.	191
Figura 116 – EM–IE do 22,23-dihidrobrassicasterol (XVI) obtido por CG–EM.	191
Figura 117 – Espectro de absorção UV–Vis do radical DPPH e do DPPH exposto a uma substancia oxidante (DPPH-H).	192
Figura 118 – Mecanismo de reação dos compostos fenólicos com DPPH'.	193
Figura 119 – Estruturas de ressonância do radical fenoxila.	193
Figura 120 – Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do RFC.	196
Figura 121 – Estrutura básica de um flavonoide.	198
Figura 122 – Formação do complexo quercetina–Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.	198
Figura 123 – Mecanismo de reação entre a vanilina e um tanino condensado em meio ácido.	200
Figura 124 – Coeficiente de correlação entre os AA, fenóis totais (TPC), flavonoides (TF) e proantocianidinas (TP) dos extratos de <i>E. paniculata</i>	202
Figura 125 – Mecanismo de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicose.	204
Figura 126 – Reação da hidrólise do <i>p</i> -NFG pela α -glicosidase.	206
Figura 127 – Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica com (A) retenção da configuração e (B) inversão da configuração.	207
Figura 128 – Mecanismo da reação enzimática do <i>p</i> -NFP catalisada pela lipase.	209
Figura 129 – Sobreposição do diclofenaco cocristalizado com a melhor conformação após o re-docking.	211
Figura 130 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o diclofenaco.	212

Figura 131 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o celecoxibe.	213
Figura 132 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o ibuprofeno.	213
Figura 133 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-1 e o composto I	214
Figura 134 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-1 e o composto II	214
Figura 135 – Sobreposição do diclofenaco cocristalizado com a melhor conformação após o redocking.	215
Figura 136 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o celecoxibe.	217
Figura 137 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o diclofenaco.	218
Figura 138 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o Ibuprofeno.	218
Figura 139 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-2 e o composto I	219
Figura 140 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-2 e o composto II	219
Figura 141 – Análise histológica de mastócitos de implantes com 9 dias de idade.	224
Figura 142 – Análise histológica de implantes de 9 dias em cortes corados com hematoxilina-eosina, com aumento de 400x.	224
Figura 143 – Representação gráfica da quantificação de mastócitos dos EHF, EHG, I e II	225
Figura 144 – Efeito do tratamento com EHF, EHG, I e II na avaliação da atividade da enzima MPO.	226
Figura 145 – Efeito do tratamento com EHF, EHG, I e II na avaliação da atividade da enzima NAG.	227
Figura 146 – Efeitos dos tratamentos com EHF, EHG, I e II no conteúdo de hemoglobina.	230
Figura 147 – Número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos dos tratamentos com EHF, EHG, I e II	231
Figura 148 – Análise histológica da deposição de colágeno de seções coradas com picrosírius red (ampliação de 100 ×) em animais tratados com EHF, EHG, I e II , sem e com um filtro polarizador.	234

Figura 149 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno total nos implantes subcutâneos.....	235
Figura 150 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno do tipo I nos implantes subcutâneos.....	235
Figura 151 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno do tipo III nos implantes subcutâneos.....	236
Figura 152 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na quantidade de colágeno solúvel nos implantes subcutâneos.....	237
Figura 153 – Espectro de RMN de ^1H do composto I (400 MHz, CDCl_3).	278
Figura 154 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto I (100 MHz, CDCl_3).	279
Figura 155 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,0–4,0) do composto I (400 MHz, CDCl_3).	280
Figura 156 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 5,0–6,1) do composto I (400 MHz, CDCl_3).	281
Figura 157 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto I (400 MHz, CDCl_3). ..	282
Figura 158 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto I (400 MHz, CDCl_3). ..	283
Figura 159 – Espectro de RMN de ^1H do composto II (400 MHz, CDCl_3).....	284
Figura 160 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto II (100 MHz, CDCl_3).	285
Figura 161 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,0–4,0) do composto II (400 MHz, CDCl_3).	286
Figura 162 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 5,0–6,0) do composto II (400 MHz, CDCl_3).	287
Figura 163 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto II (400 MHz, CDCl_3)..	288
Figura 164 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto II (400 MHz, CDCl_3)..	289
Figura 165 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto II (400 MHz, CDCl_3). 290	
Figura 166 – Espectro de RMN de ^1H do composto III (400 MHz, CDCl_3).	291
Figura 167 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto III (100 MHz, CDCl_3).	292
Figura 168 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,6–1,1) do composto III (400 MHz, CDCl_3).	293
Figura 169 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,0–2,4) do composto III (400 MHz, CDCl_3).	294
Figura 170 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,5–5,4) do composto III (400 MHz, CDCl_3).	295

Figura 171 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 12,0–58,0) do composto III (100 MHz, CDCl_3).	296
Figura 172 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 (δ_{C} 21,0–43,0) do composto III (100 MHz, CDCl_3).	297
Figura 173 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto III (400 MHz, CDCl_3).	298
Figura 174 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto III (400 MHz, CDCl_3).	299
Figura 175 – Espectro de RMN de ^1H do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	300
Figura 176 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto IV (100 MHz, CDCl_3).	301
Figura 177 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,7–0,9) do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	302
Figura 178 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,0–1,3) do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	303
Figura 179 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,3–2,3) do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	304
Figura 180 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,3–2,3) do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	305
Figura 181 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 12,0–58,0) do composto IV (100 MHz, CDCl_3).	306
Figura 182 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 (δ_{C} 21,0–43,0) do composto IV (100 MHz, CDCl_3).	307
Figura 183 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	308
Figura 184 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto IV (400 MHz, CDCl_3).	309
Figura 185 – Espectro de RMN de ^1H do composto V (400 MHz, DMSO).	310
Figura 186 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto V (100 MHz, DMSO).	311
Figura 187 – Espectro de RMN de ^1H do composto VI (400 MHz, CDCl_3).	312
Figura 188 – EM–IE do eugenol (VII) obtido por CG–EM.	321
Figura 189 – EM–IE do espatulenol (VIII) obtido por CG–EM.	321
Figura 190 – EM–IE do óxido de cariofileno (IX) obtido por CG–EM.	321
Figura 191 – EM–IE do hexadecanoato de metila (X) obtido por CG–EM.	322
Figura 192 – EM–IE do (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila (XI) obtido por CG–EM.	322
Figura 193 – EM–IE do (<i>E</i>)-octadec-9-enoato de metila (XII) por CG–EM.	322
Figura 194 – EM–IE do octadecanoato de metila (XIII) obtido por CG–EM.	323

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificidade dos anti-inflamatórios não-esteroidais utilizados no tratamento de doenças inflamatórias.	60
Tabela 2 – Espécies de Lauraceae e seu uso na medicina popular. (continua)	66
Tabela 3 – Espécies de <i>Endlicheria</i> e as respectivas atividades biológicas investigadas dos extratos e/ou compostos isolados.	70
Tabela 4 – Compostos isolados das folhas, galhos e/ou raízes de espécies de <i>Endlicheria</i> . (continua).....	70
Tabela 5 – Sinônimos de <i>E. paniculata</i> encontrados na literatura.	72
Tabela 6 – Faixa de concentração dos extratos das folhas e galhos utilizados na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.....	92
Tabela 7 – Curva de calibração do ácido gálico.....	93
Tabela 8 – Curva de calibração da quercetina em solução de AlCl ₃	94
Tabela 9 – Curva de calibração da catequina.	95
Tabela 10 – Rendimento da extração por maceração das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i> . .	105
Tabela 11 – Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i>	107
Tabela 12 – Dados de RMN do composto I em CDCl ₃	110
Tabela 13 – Dados de RMN do composto II em CDCl ₃ ^a	122
Tabela 14 – Dados de RMN do composto III em CDCl ₃ ^a	134
Tabela 15 – Dados de RMN do composto IV em CDCl ₃ ^a	145
Tabela 16 – Dados de RMN do composto V em DMSO ^a	156
Tabela 17 – Dados de RMN do composto VI em CDCl ₃ ^a	165
Tabela 18 – Compostos presentes nos EHF e EHG identificados por CG–EM.....	185
Tabela 19 – Valores de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i>	194
Tabela 20 – Teores de fenóis totais dos extratos das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i>	196
Tabela 21 – Teores de flavonoides dos extratos das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i>	199
Tabela 22 – Teores de proantocianidinas dos extratos das folhas e galhos de <i>E. paniculata</i> . 201	
Tabela 23 – Resultados de atividade antioxidante, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides agrupados.....	202
Tabela 24 – Percentual de inibição da atividade de glicação dos compostos I e II isolados dos galhos de <i>E. paniculata</i>	205

Tabela 25 – Percentual de inibição da α -glicosidase dos compostos I e II isolados dos galhos de <i>E. paniculata</i>	208
Tabela 26 – Percentual de inibição e CI_{50} da lipase pancreática dos compostos I e II isolados dos galhos de <i>E. paniculata</i>	209
Tabela 27 – Resultados do docking molecular entre os compostos I e II e a enzima Cox-1.	212
Tabela 28 – Resultados do docking molecular entre os compostos I e II e a enzima Cox-2.	216
Tabela 29 – Estudos <i>in silico</i> dos parâmetros de Lipinski, Ghose, Veber e Egan.	221
Tabela 30 – Quantificação de mastócitos (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%)......	225
Tabela 31 – Atividade da enzima MPO (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%)......	227
Tabela 32 – Atividade da enzima NAG (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%)......	228
Tabela 33 – Resultados gerais dos efeitos dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado inflamatório.	228
Tabela 34 – Teor de hemoglobina (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%)......	230
Tabela 35 – Número de vasos formados (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%)......	231
Tabela 36 – Resultados gerais dos efeitos dos tratamentos sobre a angiogênese.....	231
Tabela 37 – Concentração (em %) de colágeno total nos implantes em relação ao grupo CT (100%)......	235
Tabela 38 – Concentração (em %) de colágeno do tipo I nos implantes em relação ao grupo CT (100%)......	236
Tabela 39 – Concentração (em %) de colágeno do tipo III nos implantes em relação ao grupo CT (100%)......	236
Tabela 40 – Concentração (em %) de colágeno solúvel nos implantes em relação ao grupo CT (100%)......	237
Tabela 41 – Resultados gerais dos tratamentos sobre a deposição de colágeno.	238
Tabela 42 – Dados de RMN do composto I em $CDCl_3^a$	314
Tabela 43 – Dados de RMN do composto II em $CDCl_3^a$	315
Tabela 44 – Dados de RMN do composto III em $CDCl_3^a$	316
Tabela 45 – Dados de RMN do composto IV em $CDCl_3^a$	317
Tabela 46 – Dados de RMN do composto V em $DMSO^a$	318

Tabela 47 – Dados de RMN do composto VI em CDCl ₃ ^a	319
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorbância
AGEs	Produtos de glicação avançada
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ASC	Área sob a curva
CA	Concentração da amostra
CAG	Concentração em equivalentes de ácido gálico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Metade da concentração efetiva máxima
CEC	Concentração em equivalentes de catequina
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquido de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COSY	<i>Homonuclear correlation spectroscopy</i>
Coxs	Ciclo-oxigenases
Cox-1	Ciclo-oxigenase 1
Cox-2	Ciclo-oxigenase 2
CQ	Concentração em equivalentes de quercetina
CT	Controle
DAD	Detetores de arranjo de diodo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHF	Extrato hexânico das folhas
EHG	Extrato hexânico dos galhos
ELSD	Detector de espalhamento de luz evaporativo
EMF	Extrato metanólico das folhas
EMG	Extrato metanólico dos galhos
EQ	Equivalente de quercetina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
f-AG	Fração enriquecida da enzima α -glicosidase
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
Gln	Glutamato
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	<i>Heteronuclear multiplebond coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IA	Índice aritmético
IF	Intensidade de fluorescência
Ile	Lisidina
Ki	Constante de inibição
Leu	Leucina
m/z	Razão massa/carga
Met	Metionina
MPO	Mieloperoxidase
NAG	<i>N</i> -Acetil- β -D-glucosaminidase
NL	Neolignanas
NLC	Neolignanas com atividade anticâncer
NLF	Neolignanas com atividade antifúngica
NLN	Neolignanas com atividade antineorodegenerativas
NLV	Neolignanas com atividade antiviral
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina/polietileno glicol

NUPPEN	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
<i>p</i> -NFG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
<i>p</i> -NFP	<i>p</i> -nitrofenil-palmitato
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteu
RMN	Ressonância magnética nuclear
Ser	Serina
TF	Flavonoides
TMS	Trimetilsilanol
TP	Proantocianidinas
TPC	Teores de fenóis
TPSA	Área de superfície polar topológica
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosinase
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
	2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	33
	2.1.1 Neolignanas.....	35
	2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
	2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	47
	2.3.1 Atividades antidiabética.....	47
	2.3.2 Lipase pancreática.....	53
	2.3.3 Atividade anti-inflamatória.....	56
	2.4 DOCKING MOLECULAR.....	61
	2.5 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DA FAMÍLIA DAS LAURACEAE.....	63
3	OBJETIVOS.....	74
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	74
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	75
	4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	75
	4.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	75
	4.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	76
	4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	76
	4.3.2 Cromatografia em coluna (CC).....	76
	4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	76
	4.3.4 Cromatografia gasosa.....	77
	4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	78
	4.5 PREPARO DOS EXTRATOS.....	78
	4.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	80
	4.7 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	82
	4.8 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	91
	4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E PROANTOCIANIDINAS.....	91
	4.9.1 Atividade antioxidante.....	91
	4.9.2 Determinação do teor de fenóis totais.....	92

4.9.3	Determinação do teor de flavonoides	93
4.9.4	Determinação do teor de proantocianidinas	94
4.9.5	Análise estatística entre a atividade antioxidante, teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas	95
4.10	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIDIABÉTICA E ANTI OBESIDADE <i>IN VITRO</i>	96
4.10.1	Determinação do potencial de inibição de glicação	96
4.10.2	Inibição da atividade da α -glicosidase.....	97
4.10.3	Inibição da atividade da lipase pancreática	98
4.11	DOCKING MOLECULAR	99
4.12	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	101
4.12.1	Animais.....	101
4.12.2	Procedimento cirúrgico e técnica de implantação	101
4.12.3	Regime de tratamento com extratos e compostos	102
4.12.4	Remoção dos implantes	102
4.12.5	Dosagem de hemoglobina (avaliação indireta da neovascularização)	102
4.12.6	Avaliação da atividade da MPO	103
4.12.7	Avaliação da atividade de NAG	103
4.12.8	Avaliação da deposição de colágeno solúvel	103
4.12.9	Análise histológica das matrizes esponjosas	104
4.12.10	Análises estatísticas	104
4.13	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	105
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	105
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	105
5.2	CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE <i>E. paniculata</i>	107
5.2.1	Identificação do O-metildesidrodieugenol B (I)	107
5.2.2	Identificação do desidrodieugenol B (II)	119
5.2.3	Identificação do β -sitosterol (III).....	132
5.2.4	Identificação do estigmasterol (IV).....	143
5.2.5	Identificação do canferol (V).....	154
5.2.6	Identificação do ácido palmítico (VI)	163
5.3	ANÁLISE POR CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>E. paniculata</i>	176

5.4 ANÁLISES DE DAD–UV DOS EXTRATOS E DOS COMPOSTOS I E II ISOLADOS DE <i>E. paniculata</i>	181
5.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EHF E EHG POR CG–EM.....	182
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTEROIDES POR CG–EM	190
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E PROANTOCIANIDINAS	192
5.7.1 Análise da atividade antioxidante.....	192
5.7.2 Análise do teor de fenóis totais	195
5.7.3 Análise do teor de flavonoides	197
5.7.4 Análise do teor de proantocianidinas (taninos condensados).....	199
5.7.5 Análise estatística	201
5.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIDIABÉTICA	203
5.8.1 Atividade inibitória da glicação.....	203
5.8.2 Atividade inibitória da α -glicosidase.....	206
5.8.3 Atividade inibitória da lipase pancreática	209
5.9 DOCKING MOLECULAR	210
5.9.1 Análise da inibição da enzima Cox-1	210
5.9.2 Análise da inibição da enzima Cox-2.....	215
5.10 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO <i>O</i> -METILDESIDRODIEUGENOL B (I) E DESIDRODIEUGENOL B (II).....	220
5.11 .AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EHF E EHG E DAS NEOLIGANANS <i>O</i> -METILDESIDRODIEUGENOL B (I) E DESIDRODIEUGENOL B (II).....	223
5.11.1 Efeitos dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado inflamatório.	223
5.11.2 Efeitos dos tratamentos sobre a angiogênese	229
5.11.3 Avaliação dos tratamentos sobre a deposição de colágeno	232
REFERÊNCIAS	241
APÊNDICE A – AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN.....	277
APÊNDICE B – DADOS DE RMN DOS COMPOSTOS ISOLADOS COMPARADOS AOS DA LITERATURA	313
APÊNDICE C – EM–IE por CG–EM dos EHF e EHG.....	320
APÊNDICE D – PRODUÇÃO ACADÊMICA	324

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

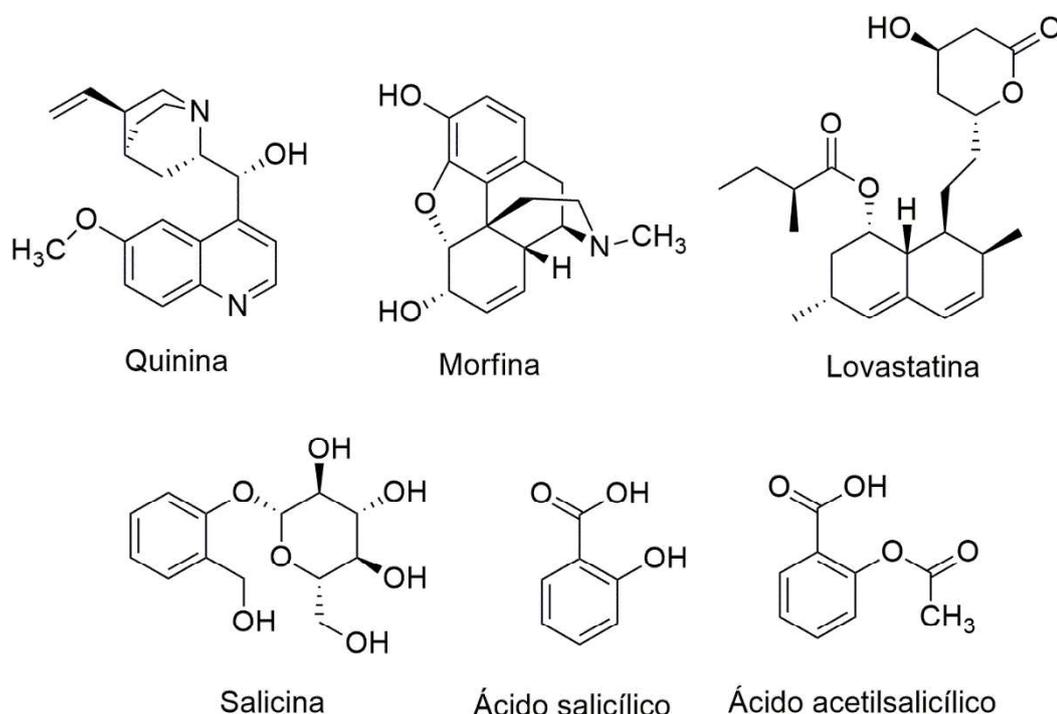
Os seres humanos têm usado produtos naturais (metabólitos de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos) como medicamentos para aliviar e tratar doenças desde os tempos pré-históricos. Por exemplo, foram encontrados registros fósseis datados em mais de 60 mil anos que evidenciam o uso de plantas como medicamentos (SOLECKI, 1975). O uso de produtos naturais como remédios representava um enorme desafio para os primeiros humanos, pois ao buscar alimentos frequentemente consumiam plantas venenosas que por sua vez, causavam vômitos, diarreias, coma ou outras reações tóxicas, que podem ter levados até a morte. Entretanto, ao longo dos anos os humanos foram capazes de desenvolver conhecimentos sobre as plantas que permitiu o uso na alimentação e como medicamentos (GAO et al., 2007 apud YUAN, MA, YE, PIAO, 2016). As plantas também têm sido utilizadas há séculos no tratamento de diversas doenças como hipertensão, colesterol, eczema, diarreia, câncer, doenças cardiovasculares, doenças degenerativas e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HOLETZ et al., 2002; LIU, 2003; ASRES, BUCAR, 2005; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019). Na China, por exemplo, existem registros de cultivo de plantas utilizadas no tratamento de doenças a mais de 5 mil anos (UNASUS, 2021).

Dentre os produtos naturais, as plantas são verdadeiros laboratórios bioquímicos que, dentre várias substâncias, sintetizam princípios ativos naturais. Esses compostos bioativos são produzidos a partir do metabolismo vegetal, um conjunto de reações químicas que dão origem a uma infinidade de compostos químicos que são produzidos a partir de duas vias metabólicas, o metabolismo primário (central) e secundário (especializado) (FILHO, 2010; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019). O metabolismo central produz compostos essenciais para o funcionamento dos vegetais, bem como seu crescimento e desenvolvimento, sendo presente em todas as plantas e sua formação está relacionada com processos fotossintéticos que produzem ácidos carboxílicos, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios (SIMOES, 2017). Já o metabolismo especializado fornece compostos que são específicos das espécies e participam das interações intra e intercelular do próprio organismo (ou células) ou com outros organismos, além da interação com o ambiente. Esses compostos estão frequentemente envolvidos na proteção das plantas contra estresses bióticos ou abióticos (FILHO, 2010; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019). Alguns metabólitos especializados produzidos por plantas são usados pelos seres humanos na fabricação de medicamentos, sabores, fragrâncias, inseticidas e corantes e possuem grande valor econômico (TORSSELL, 1997; PAGARE, BHATIA, TRIPATHI, BANSAL, 2015).

Atualmente, há um interesse crescente no uso de plantas como fontes naturais nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética em todo o mundo. Os compostos bioativos de plantas, tais como fenóis, alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas etc., são utilizados nessas indústrias como medicamentos, suplementos dietéticos, alimentos e embalagens de alimentos, etc.

Entre alguns dos primeiros sucessos no desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais, pode-se mencionar os alcaloides antimaláricos da árvore da cinchona, os analgésicos como a morfina, assim como a salicina que deu origem a aspirina (Figura 1). A quinina, originalmente isolada das cascas das árvores cinchona, *Cinchona succirubra*, foi um dos principais agentes antimaláricos utilizados na época (OLIVEIRA, SZCZERBOWSKI, 2009). A morfina (Figura 1), o principal alcaloide do *Papaver somniferum*, foi isolada pela primeira vez entre 1803–1806 (BROOK, BENNETT, DESAI, 2017) e foi amplamente utilizada para o alívio da dor no início de 1830, mas também foi reconhecida por causar dependência química (SHARMA, PATNAIK, RAY, DEY, 2004). O ácido acetilsalicílico foi sintetizado inspirado na salicina (Figura 1), um glicosídeo isolado das cascas do salgueiro branco, *Salix alba*, entre 1825–1826. Inicialmente foi sintetizado o ácido salicílico que se mostrou potente como antipirético e foi utilizado em todo o mundo. Porém, apresentou grave toxicidade gastrointestinal e foi convertido em ácido acetilsalicílico (Figura 1) por acetilação e começou a ser comercializado pela Bayer sob o nome comercial de aspirina a partir 1899 (SNEADER, 2000; MINER, HOFFHINES, 2007). Depois de quase 90 anos de uso clínico, a aspirina continua sendo um dos medicamentos mais amplamente usados no mundo e ainda é reconhecida como o agente analgésico/antipirético/anti-inflamatório, padrão pelo qual os medicamentos mais novos são avaliados (CLISSOLD, 1986; DESBOROUGH, KEELING, 2017). A doxorrubina e o paclitaxel (agentes antitumorais), a ciclosporina A e o tacrolimus (agentes imunossupressores) e a lovastatina (agente redutor do colesterol) (Figura 1) estão entre os medicamentos de origem natural mais conhecidos e amplamente utilizados (SIMPSON, NOBLE, 2005; AGRAWAL, 2007; VALENTOVIC, 2007; SKYTTE et al., 2010; TEDESCO, HARAGSIM, 2012; KHANNA, ROSENBERG, VAIL, 2015; NEWMAN, CRAGG, 2020). Isso sugere claramente que os produtos naturais são fontes importantes para novos agentes terapêuticos e têm contribuído significativamente no desenvolvimento de medicamentos.

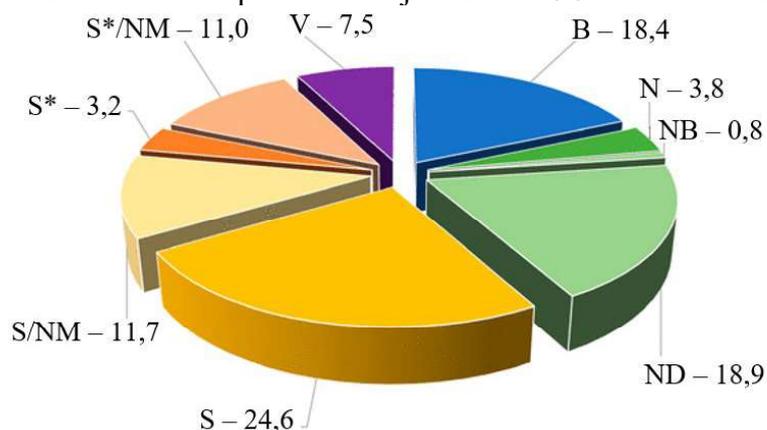
Figura 1 – Estrutura de alguns dos primeiros sucessos no desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais.



Fonte: o autor.

Com o surgimento de novas doenças e o com o aumento da resistência aos medicamentos que muitas vezes apresentam efeitos colaterais, surge a necessidade de descobrir novos compostos bioativos, sendo que aqueles de origem natural muitas vezes apresentam alvos específicos e menores efeitos colaterais. Os produtos naturais têm sido a fonte mais bem-sucedida de potenciais medicamentos. Um estudo realizado sobre todos os novos fármacos lançados entre 1981–2019, mostrou que cerca de 49% deles são inspirados em metabólitos especializados (Figura 2), sendo que o fármaco final não é necessariamente o composto químico isolado a partir da fonte natural, mas pode ser um derivado semissintético ou totalmente sintético, baseado em um produto natural ou no estudo de algum composto de origem natural (NEWMAN, CRAGG, 2020). O mesmo estudo mostrou que, da mesma forma mencionada anteriormente, cerca de 66,7% dos fármacos de pequenas moléculas lançados entre 1981–2019, isto é, excluindo-se vacinas e moléculas biológicas (proteínas, glicosídeos, peptídeos, etc), são inspirados em produtos naturais (Figura 3) (NEWMAN, CRAGG, 2020).

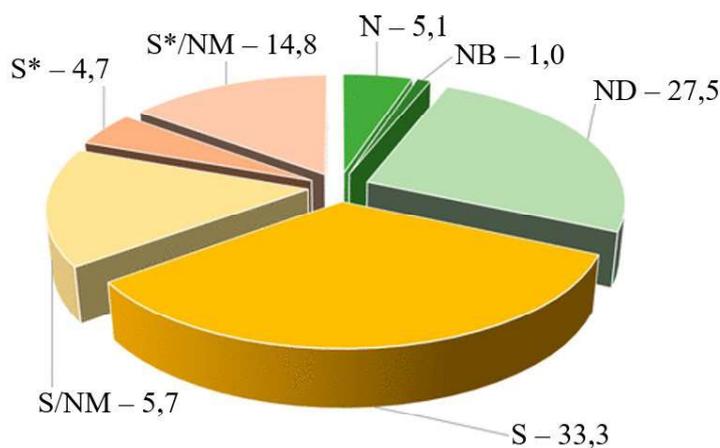
Figura 2 – Fármacos aprovados de janeiro de 1981 a setembro 2019.



Nota: B – moléculas biológica; N – totalmente de produto natural; NB – fármaco botânico; ND – produto natural semissintético; S – sintético; S* – sintético, mas seu grupo farmacofórico é baseado em produto natural; NM – compostos concebidos a partir do conhecimento adquirido do estudo de determinado produto natural, V – vacina.

Fonte: adaptado de Newman, Cragg (2020).

Figura 3 – Fármacos de pequenas moléculas aprovados de janeiro de 1981 a setembro 2019.



Nota: N – totalmente de produto natural; NB – fármaco botânico; ND – produto natural semissintético; S – sintético; S* – sintético, mas seu grupo farmacofórico é baseado em produto natural; NM – compostos concebidos a partir do conhecimento adquirido do estudo de determinado produto natural.

Fonte: adaptado de Newman, Cragg (2020).

Desta forma, os produtos naturais continuam a fornecer uma vasta diversidade estrutural o que é muito importante para o desenvolvimento de novos compostos bioativos para o tratamento de doenças. Uma vez que menos de 10% da biodiversidade mundial foi avaliada quanto aos seus potenciais biológicos, e muitos compostos naturais aguardam a sua descoberta (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012). Assim, este trabalho teve como proposta realizar o estudo fitoquímico e atividades biológicas dos extratos hexânicos e metanólicos da *Endlicheria paniculata* (Lauraceae), uma espécie de planta que ainda não foi estudada até o momento.

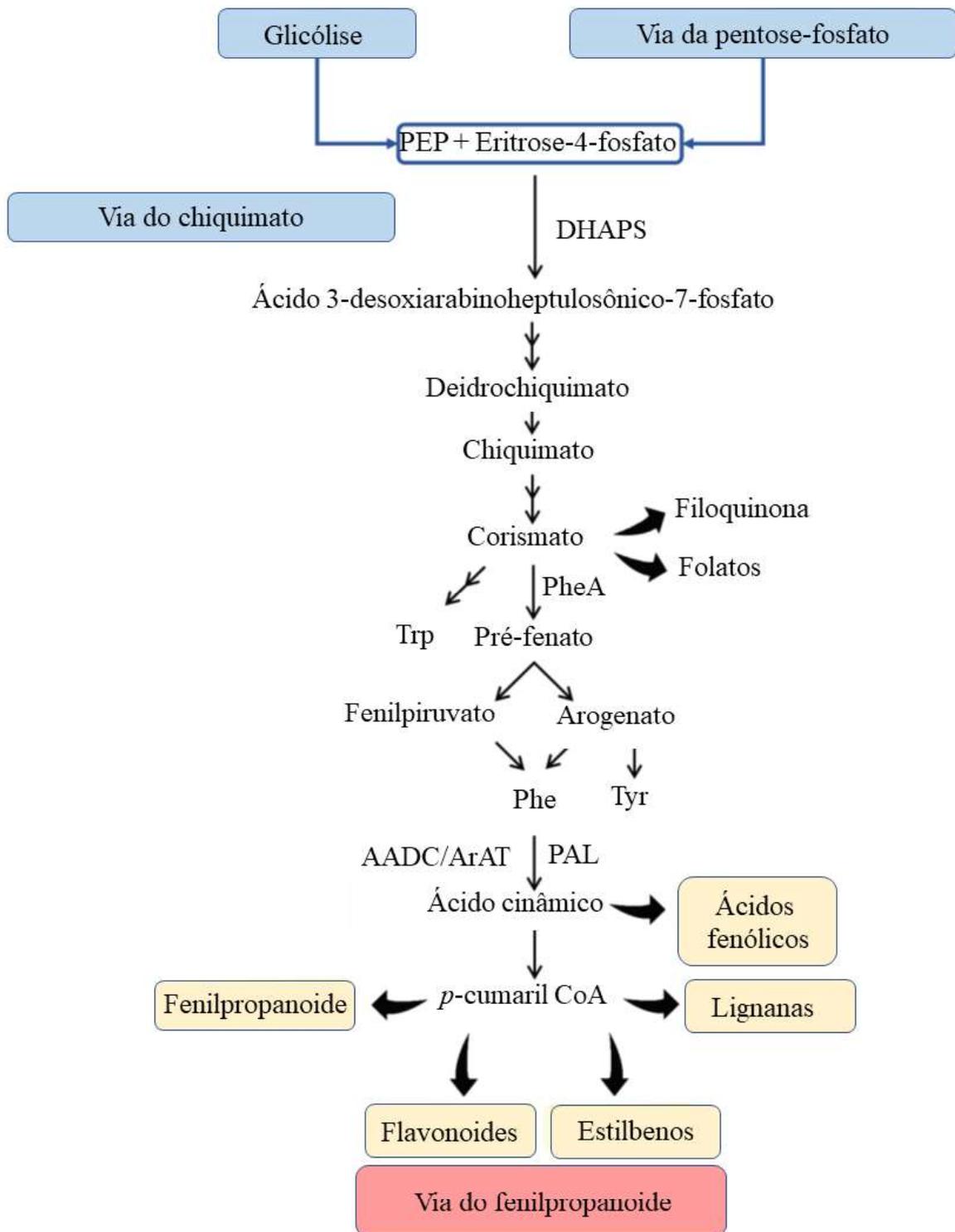
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Ao modificar os precursores do metabolismo primário, o metabolismo secundário é capaz de cumprir funções-chave envolvidas na interação da planta com seu ambiente, particularmente em relação ao seu entorno biótico, o que resulta em uma variedade de compostos orgânicos. Três classes principais de metabólitos especializados são produzidos pelas plantas: terpenoides/isoprenoides, compostos fenólicos e aqueles que contêm nitrogênio/enxofre, que são produzidos a partir do metabolismo central, como o ciclo do ácido tricarboxílico, glicólise, aminoácidos, pentose fosfato e via de chiquimato (AHARONI, GALILI, 2011). Os metabólitos destas três classes sofrem reações catalisadas por enzimas, tais como reações de ciclização, eliminação, rearranjo, redução, oxidação e metilação, dando origem a uma série de metabólitos com uma grande variedade e complexidade estrutural (GUNATILAKA, 2012).

A fenilalanina, tirosina e o triptofano são sintetizados através da via do chiquimato, sendo a primeira, o principal aminoácido aromático produzido. Na via do chiquimato (Figura 4) são produzidos fenilpropanoides, lignanas, ligninas, cumarinas e ácidos fenólicos. Segundo Rippert, Matringe (2002), aproximadamente 30% do carbono fixado pela fotossíntese é direcionado para produzir subunidades de fenilpropanoides. A partir da dimerização de fenilpropanoides, ocorre a formação de compostos pertencentes a classe das neolignanas (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019), principal classe de metabólitos especializados encontrados em *E. paniculata* objeto desse estudo e que será abordada com mais detalhes no tópico 2.1.1.

Figura 4 – Visão geral da via do chiquimato.



Nota: Principais classes de fenilpropanoides são mostrados em amarelo. As vias primárias são indicadas em azul, enquanto as vias secundárias estão em vermelho. PEP – fosfoenolpiruvato, DHAPS – 3-desoxiarabinoheptulosonato-7-fosfato sintase, PheA – pré-fenato desidratase, AADC – aminoácido aromático descarboxilase, ArAT – aminoácido aminotransferase aromático, PAL – fenilalanina amônia-liase, CoA – coenzima A.

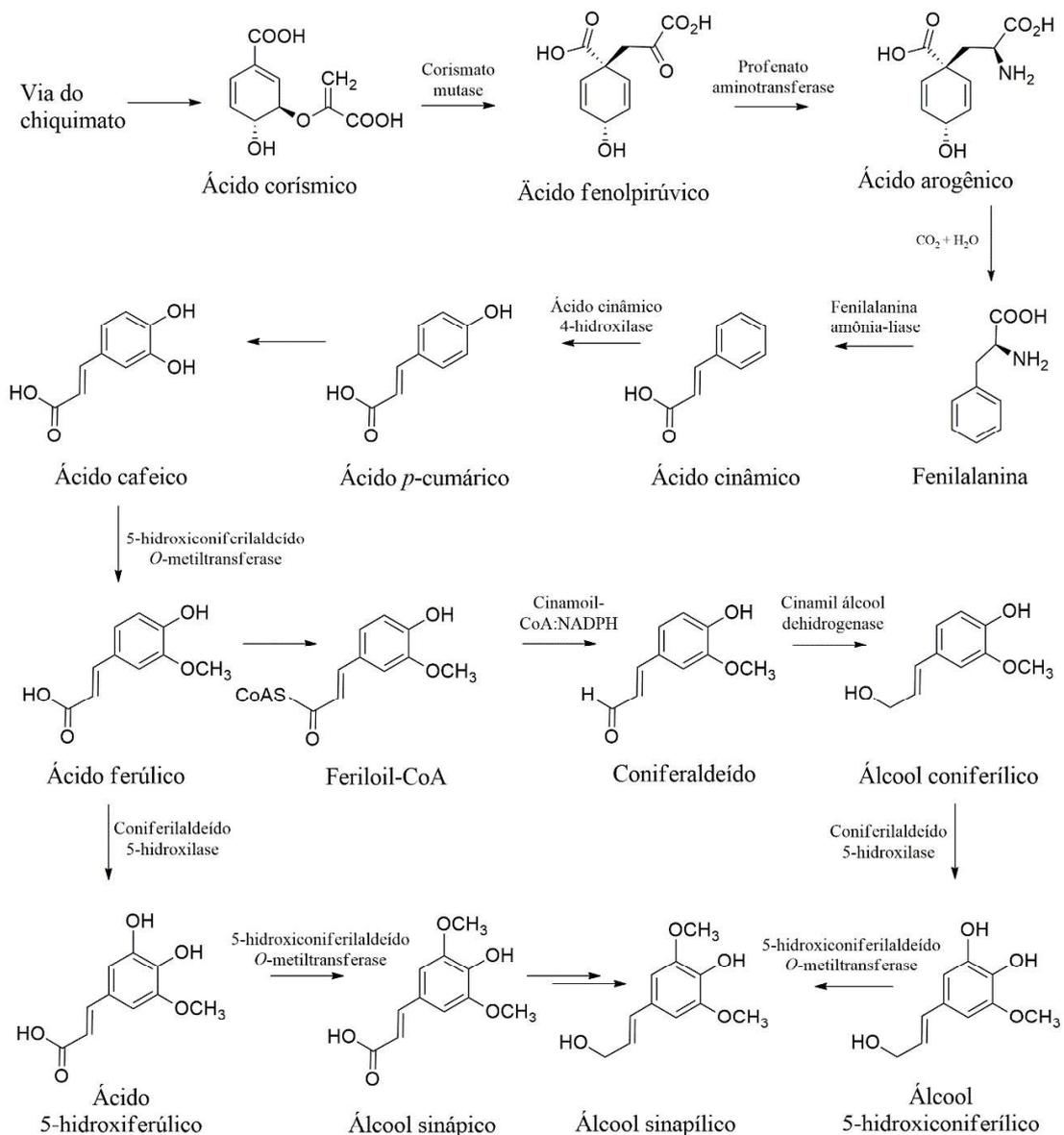
Fonte: adaptado de Pott, Osorio, Vallarino (2019).

2.1.1 Neolignanas

Os compostos da classe das neolignanas receberam um tópico especial nesse trabalho por ser a principal classe de metabólitos encontrada nas folhas e galhos de *E. paniculata*.

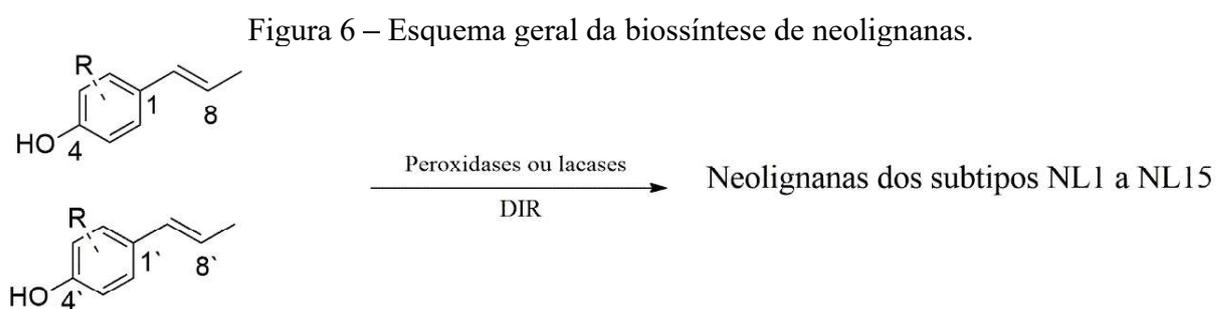
As neolignanas representam uma classe de metabólitos especializados farmacologicamente ativos, de ocorrência natural, que estão amplamente difundidos no reino vegetal e são derivados da via dos fenilpropanoides, e conseqüentemente da via biossintética do ácido chiquímico (Figura 5) (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019).

Figura 5 – Biossíntese de monômeros de fenilpropanoides.



Fonte: adaptado de Teponno, Kusari, Spiteller (2016) e Zálešák, Bon, Pospíšil (2019).

O termo neolignanas foi concebido por Gottlieb em 1972 (GOTTLIEB, 1972 apud SARTORELLI, 2000), para definir fenilpropanoides diméricos ligados por outras posições diferentes das β - β' (C8 e C8'), catalisada por reações enzimáticas (lacases e peroxidases) e com o auxílio de uma proteína dirigente (DIR) (Figura 6). Por outro lado, os compostos que contêm dois monômeros de fenilpropanoides ligados por uma ligação entre os carbonos β - β' (C8 e C8') são referidos como lignanas (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019). Essas duas unidades de fenilpropanoides podem diferir no grau de oxidação de suas cadeias laterais (C7-C9) e na substituição do anel aromático (C1-C6). Para fins de nomenclatura, os monômeros de fenilpropanoides são numerados de C1-C6 (anel aromático) e C7-C9 (cadeia propílica), onde os átomos C1 e C7 fazem a conexão das duas unidades. De forma idêntica, no segundo monômero de fenilpropanoide, a numeração é similar, porém com o uso de um sinal (') para diferenciar da primeira unidade (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019).



Nota: NL – neolignana.

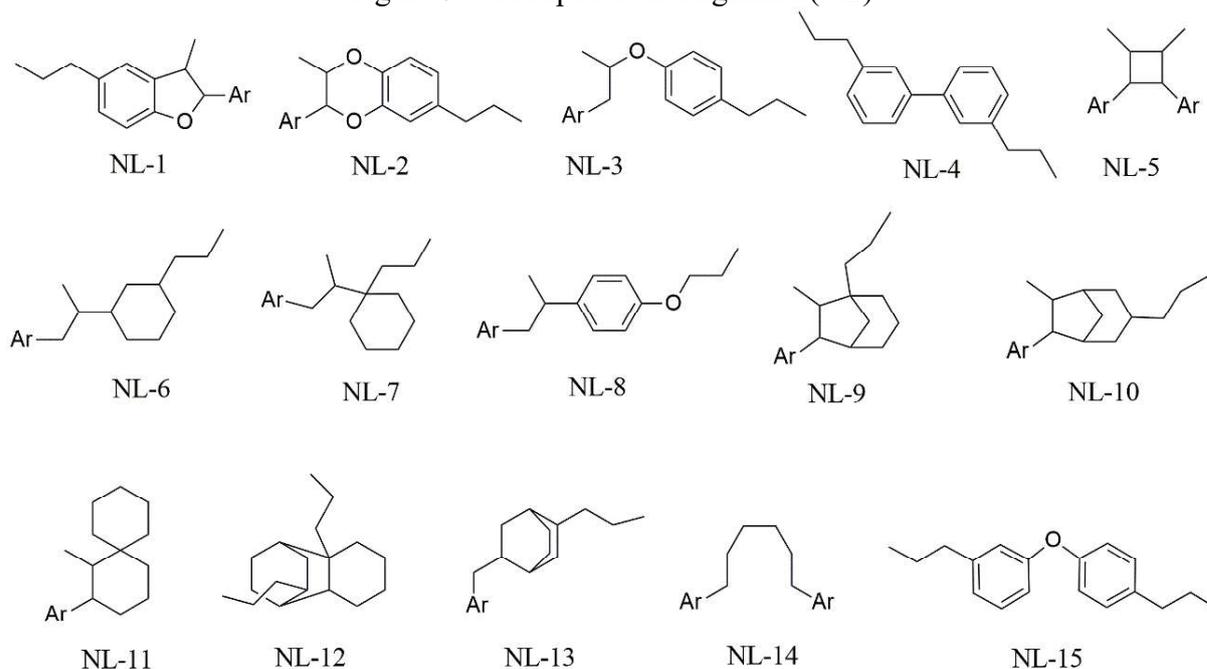
Fonte: o autor.

As neolignanas se originam de derivados do ácido cinâmico que estão bioquimicamente relacionados ao metabolismo da fenilalanina. O ácido corísmico é transformado em ácido fenolpirúvico por meio de um rearranjo de Claisen, que transfere a cadeia lateral derivada do fosfoenolpiruvato de modo que ela passa a ficar diretamente ligada ao carbociclo, e assim da origem ao esqueleto de carbono da fenilalanina. A descarboxilação do ácido pré-fênico produz o ácido fenolpirúvico, e a transaminação dependente de fosfato de piridoxal leva a *L*-fenilalanina. A biossíntese de álcoois coniferílicos é iniciada com a desaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase para formar o ácido cinâmico, que é então hidroxilado por uma enzima P450, o cinamato 4-hidroxilase, para formar o ácido *p*-cumárico. O álcool coniferílico é derivado da redução do ácido cumárico por meio do éster da coenzima A a um aldeído, que é posteriormente reduzido na presença de uma molécula de fosfato de

dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). A formação do éster de coenzima A (CoAS) facilita a primeira etapa de redução, introduzindo um grupo de saída melhor (CoAS) para a reação dependente de NADPH, levando a formação do coniferaldeído (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016).

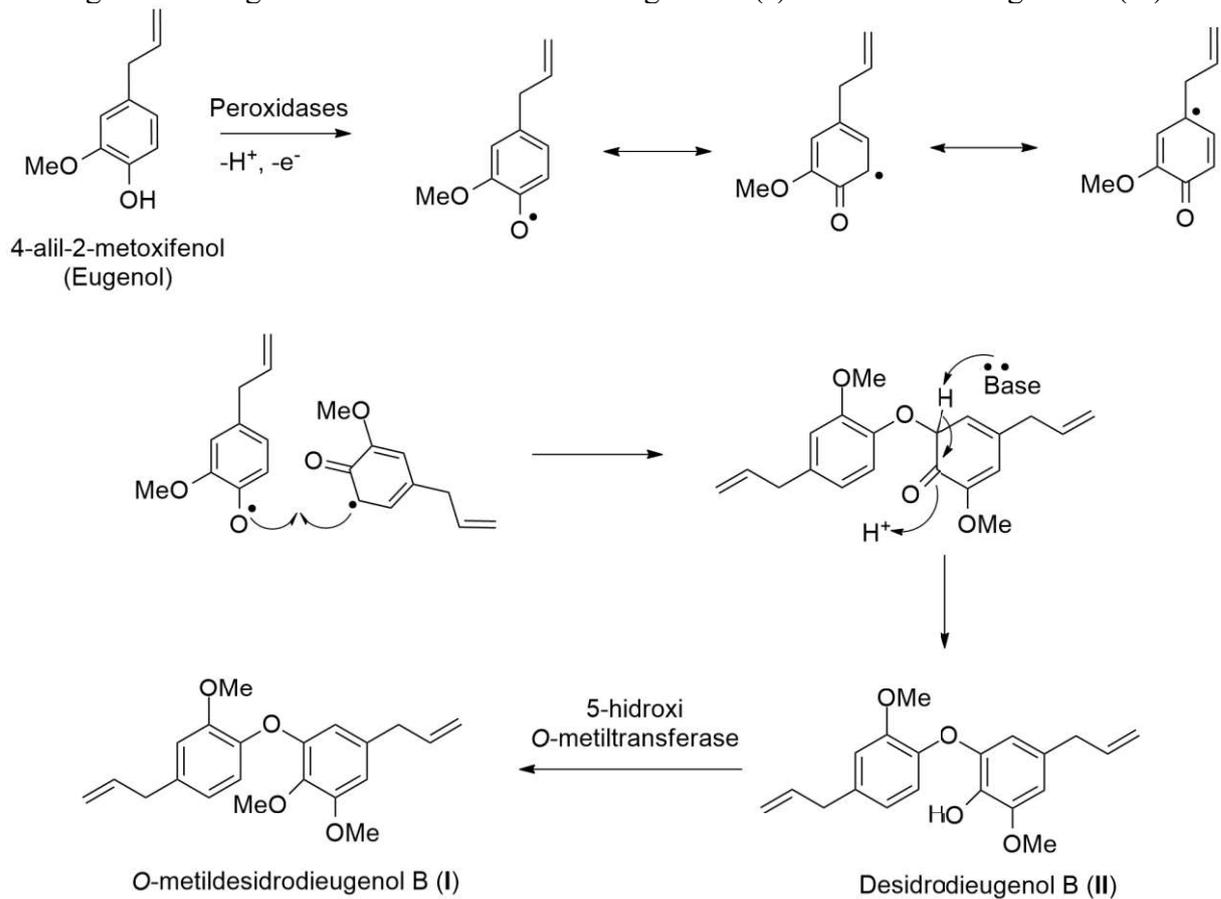
A partir de reações de biossíntese que envolvem o álcool coniferílico e/ou álcool sinapílico, podem ser formados 15 diferentes subtipos de neolignanas, designadas de NL-1 a NL-15 (Figura 7). A dimerização de monômeros (principalmente homodimerização) ocorre por meio de um mecanismo radicalar e é mediada por lacases e peroxidases, seguido de transformações pós-dimerização (metilação e/ou hidroxilação sucessivas) (ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019; YONEKURA-SAKAKIBARA et al., 2021). As neolignanas *O*-metildesidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II) encontradas neste trabalho pertencem ao subtipo NL-15 e suas propostas de biossínteses estão esquematizadas na Figura 8.

Figura 7 – Subtipos de neolignanas (NL).



Fonte: adaptado de Teponno, Kusari, Spiteller (2016).

Figura 8 – Biogêneses do *O*-metildesidrodieugenol B (I) e do desidrodieugenol B (II).



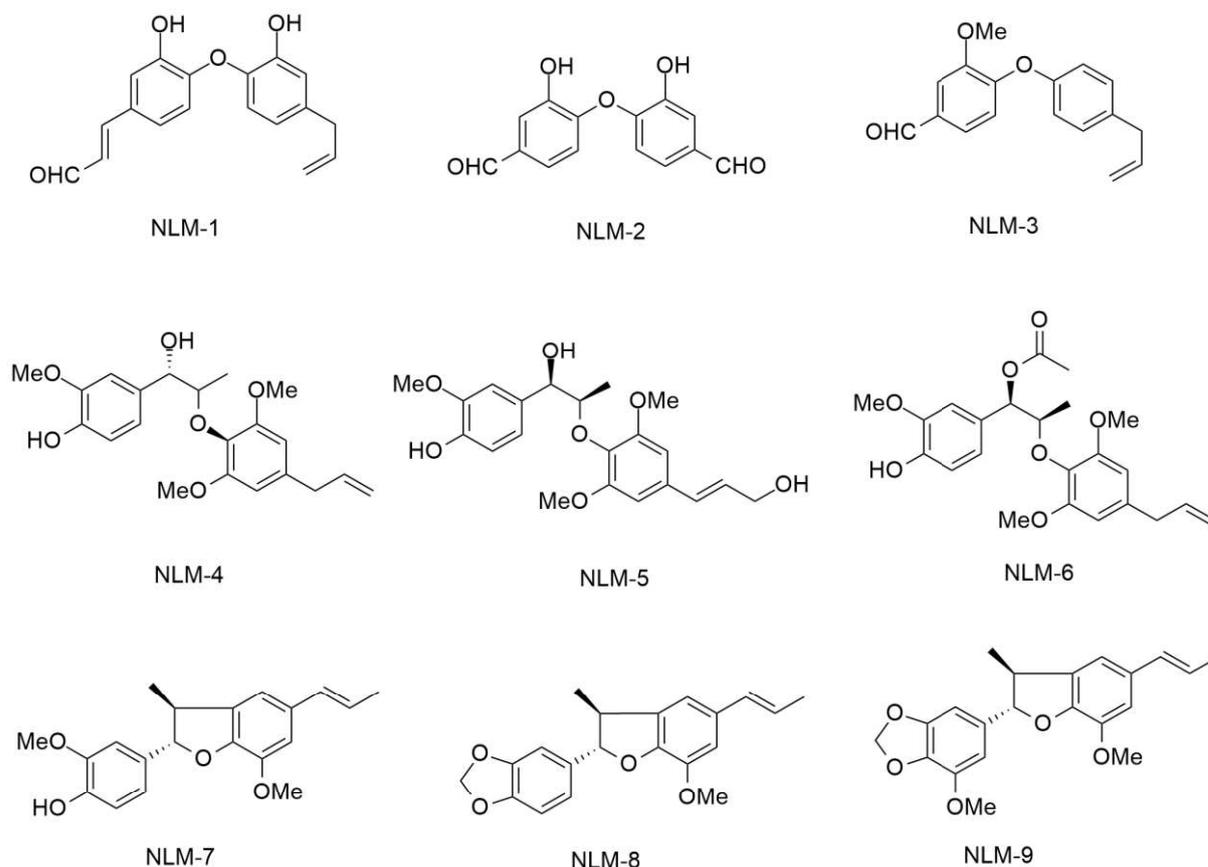
Fonte: o autor.

Dentro dos metabólitos secundários, a classe das neolignanas vem demonstrando importância biológica para diversas patologias, onde podemos destacar a bactericida, antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antialérgica, além de diversas outras no tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, osteoporose, obesidade, diabetes, cardiovasculares, entre outras (ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019). Antes da evolução da medicina e dos antibióticos e antimicrobianos, as mortes por doenças infecciosas eram comuns. Ao longo da história, doenças persistentes como a varíola (uma pandemia que se espalhou pelo Império Romano no século II d.C.), a peste bubônica (uma pandemia que atingiu a Europa, o norte da África e parte da Ásia, durante o século XIV, sendo responsável pela morte de cerca de 50 milhões de pessoas entre 1347 e 1353) (SILVA, 2021) e mais recentemente, o vírus da Covid-19 (uma pandemia que matou até o momento mais de 2,4 milhões de pessoas pelo mundo e ainda não há tratamento eficaz) levaram a morte de milhões de pessoas (OMS, 2021). Além disso, as cepas resistentes estão se tornando cada vez mais prevalentes e por isso a busca por novos compostos ativos é uma necessidade atual. Uma fonte promissora é a classe das neolignanas, algumas das quais

têm mostrado atividade potente até mesmo contra microrganismos resistentes (ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019).

Várias neolignanas são descritas na literatura com atividade microbiana, por exemplo, Nie e colaboradores (2016) mostraram que as três neolignanas NLM-1, NLM-2 e NLM-3 (Figura 9) isoladas das raízes de *Streblus asper* apresentaram boa atividade contra cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com valores de CIM (concentração inibitória mínima) variando de 0,0150 a 0,0940 μM . Park e colaboradores (2017) mostraram que as neolignanas mirislignano (NLM-4), mirislignanometina E (NLM-5), maceneolignano H (NLM-6), licarina A (NLM-7), licarina B (NLM-8) e 5'-metoxicarina B (NLM-9) isoladas das sementes de *Myristica fragrans* (Figura 9), apresentaram atividade contra *Streptococcus pneumoniae*, um agente importante de meningite e pneumonia, com valores de CI_{50} (concentração inibitória média) de 1,5 μM a 294,5 μM para a neuraminidase A (NanA), uma das isoformas da *Streptococcus pneumoniae*.

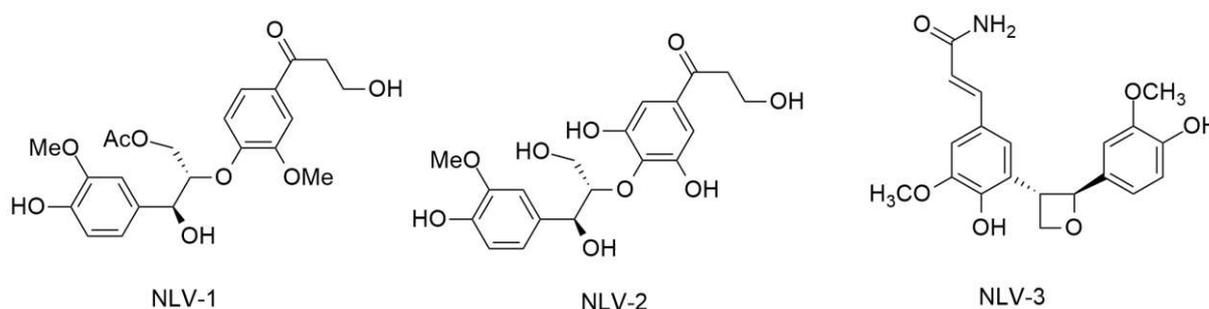
Figura 9 – Neolignanas com atividade microbiana (NLM).



Fonte: adaptado de Nie e colaboradores (2016) e Park e colaboradores (2017).

Foi descoberto que várias neolignananas possuem atividade antiviral, por exemplo, Yang e colaboradores (2016) mostraram que duas 8-*O*-4'-neolignananas (NLV-1 e NLV-2) isoladas das cascas de *Illicium difengpi* mostraram atividades promissoras anti-HIV-1, com valores de CE₅₀ (metade da concentração efetiva máxima ou ou concentração eficiente) de 2,26 e 2,16 mg mL⁻¹, respectivamente. Sulaiman e colaboradores (2018) mostraram que a neolignana pahangine A, (NLV-3) isolada das cascas de *Beilschmiedia glabra* Kosterm, apresentou baixa atividade antiviral contra o vírus da dengue, com inibição de 28,6% a uma concentração de 200 ppm.

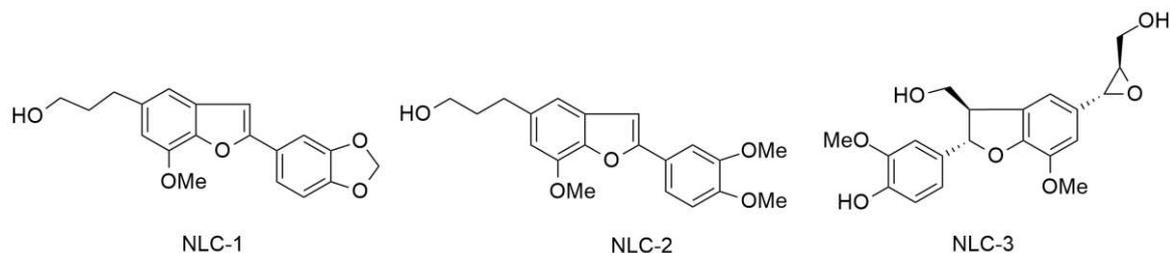
Figura 10 – Neolignananas com atividade antiviral (NLV).



Fonte: adaptado de Yang e colaboradores (2016).

Muitas neolignananas mostraram também atividade significativa contra vários tipos de células cancerígenas *in vitro* e/ou *in vivo*. Oliveira e colaboradores (2016) mostraram que as neolignananas egonol (NLC-1) e homoeгонol (NLC-2), isoladas do extrato hidroalcolico de *Styrax camporumforam*, foram testadas contra linhagens de células tumorais (B16F10, MCF-7, HeLa, HepG2 e MO59J) e os valores de CI₅₀ do egonol variaram de 11,2 ± 0,4 a 180,9 ± 1,9 μM com atividade mais forte contra linhagens de hepatocarcinoma humano (HepG2), enquanto o homoeгонol variou 40,6 ± 7,6 – 106,6 ± 16,2 μM com atividade contra a linhagem de células de câncer de mama MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7). Wang e colaboradores (2016) mostraram que a neolignana lyciumnan (NLC-3), isolada das folhas de *Lycium barbarum*, exibiu atividade citotóxica contra as linhagens celulares de câncer pulmonar, cervical e próstata – A549 (CI₅₀ = 37,1 ± 3,3 μM), HeLa (CI₅₀ = 54,1 ± 3,9 μM) e PC-3 (CI₅₀ = 51,7 ± 3,6 μM), respectivamente.

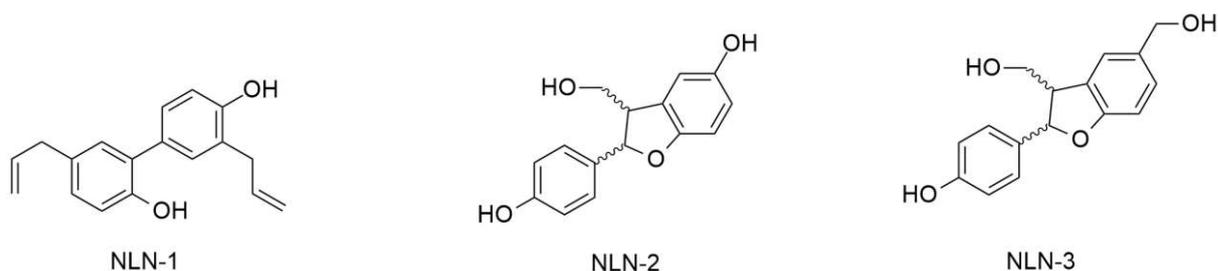
Figura 11 – Neolignananas com atividade anticâncer (NLC).



Fonte: adaptado de Oliveira e colaboradores (2016) e Wang e colaboradores (2016).

As doenças neurodegenerativas são um problema sério, especialmente no mundo desenvolvido, onde o aumento do consumo de alimentos, dos padrões de vida e da tecnologia médica estenderam a expectativa de vida. Prestar cuidados a pessoas vítimas de doenças neurodegenerativas é um esforço caro, sem mencionar as dificuldades para quem cuida. Portanto, o desenvolvimento de fármacos anti-neurodegenerativas é uma importante área de pesquisa e vários trabalhos têm isolado e descrito a atividade de neolignanas com tais propriedades. Kantham e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento com a neolignana honokiol (NLN-1) em *Caenorhabditis elegans* (espécie de nematódeo) revelou ter efeitos protetores e protegeu contra a toxicidade induzida pela proteína β -amiloide 42 ($A\beta_{42}$) (constituente das placas de amiloide observadas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer) e exibiu inibição modesta de colinesterases (acetilcolinesterase, $CI_{50} = 87,0 \pm 2,6 \mu\text{M}$ e butirilcolinesterase, $CI_{50} = 107,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Da mesma forma, Zhou e colaboradores (2018) mostraram que as neolignanas robussina A (NLN-2) e robussina B (NLN-3) (cada uma encontrada como par de enantiômeros), isoladas das frutas de *Rubus ideal*, apresentaram uma boa inibição da agregação da proteína $A\beta_{42}$. Os testes com os enantiômeros foram realizados a uma concentração de $20 \mu\text{M}$, onde a (7*S*,8*R*)-robussin A e (7*R*,8*S*)-robussin B foram mais ativas, com 81,6% e 83,4% de inibição, respectivamente, do que seus enantiômeros.

Figura 12 – Neolignanas com atividade antineurodegenerativas (NLN).



Fonte: adaptado de Kantham e colaboradores (2017) e Zhou e colaboradores (2018).

Os diversos estudos e atividades biológicas acima mencionados demonstram o enorme potencial biológico apresentado pela classe das neolignanais, além do uso de extratos ricos nestes compostos na medicina popular. Dessa forma, torna-se importante o estudo das folhas e galhos de *E. paniculata*, para o conhecimento da sua composição química e avaliação do seu potencial biológico.

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O nome antioxidante é aplicado a qualquer composto que atrasa ou impede significativamente a oxidação de um substrato quando presente em baixa concentração, incluindo todos os tipos de moléculas encontradas *in vivo* (HALLIWELL, 1990). Os antioxidantes naturais, tais como compostos de nitrogênio (alcaloides, aminoácidos/peptídeos e aminas), compostos fenólicos (flavonoides e demais compostos fenólicos), ácido ascórbico e derivados de carotenoides estão associados a diversos benefícios (LARSON, 1988; COOK, SAMMAN, 1996; SILVA, PORTARI, VANNUCCHI, 2016). Por exemplo, flavonoides podem prevenir lesões causadas pelos radicais livres de várias maneiras, como a eliminação direta de radicais livres ou oxidação, resultando em um radical mais estável e menos reativo. Em outras palavras, os flavonoides estabilizam as espécies reativas de oxigênio reagindo com o radical (PANCHE, DIWAN, CHANDRA, 2016).

Para se proteger de espécies reativas de oxigênio, os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos eficazes compostos por enzimas (como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e heme oxigenase), peptídeos (glutathione) e proteínas (tioredoxina), que funcionam juntamente com compostos nutricionais (carotenoides, flavonoides, vitamina C, vitamina E) fornecida por fontes alimentares. Juntos, esses sistemas protegem as estruturas celulares contra os danos induzidos pelos radicais livres (PANCHE, DIWAN, CHANDRA, 2016; SILVA, PORTARI, VANNUCCHI, 2016).

O consumo de bebidas alcoólicas, por exemplo, provoca uma elevação da síntese de EROs que pode comprometer o status antioxidante, resultando em estresse oxidativo celular. Conseqüentemente, a capacidade das EROs de modificar a estrutura dos componentes celulares, alterar a atividade da polimerase do ácido desoxirribonucleico (DNA) e modular a expressão gênica, além da síntese de proteínas resulta em uma variedade de condições patológicas, incluindo lesão hepática induzida pelo álcool (SILVA, PORTARI, VANNUCCHI, 2016).

Neste sentido, os compostos fenólicos são uma classe importante para os estudos relacionados às atividades antioxidantes. Estes compostos podem expressar sua atividade

antioxidante em três sistemas importantes: nas plantas, nos alimentos e nos seres humanos. As propriedades antioxidantes desses compostos são de particular interesse para os alimentos através da inibição da oxidação lipídica, enquanto a proteção contra o estresse oxidativo exerce papel central na fisiologia vegetal e humana. Tais atributos enfatizam as propriedades redutoras de compostos fenólicos e sua capacidade de interagir com íons e metaloproteínas (CHEYNIER, 2005).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes é interrompido pela produção excessiva de EROs e/ou defesas antioxidantes inadequadas (DELEO et al., 1998). Normalmente, existe um equilíbrio entre a quantidade de radicais livres gerada no corpo e os sistemas de defesa antioxidante, que eliminam/saciam esses radicais livres quando a quantidade não está dentro do nível fisiológico normal, impedindo-os de causar efeitos nocivos no corpo. Mas, quando esse equilíbrio é deslocado para mais radicais livres, leva-se ao estresse oxidativo (FINKEL, HOLBROOK, 2000; NOSE, 2000).

Segundo Alfadda, Sallam (2012), o primeiro artigo publicado no Pubmed sobre EROs é datado de 1945 e desde então, foram mais de 117.000 artigos escritos em inglês. A maioria dos estudos vinculou as EROs a danos oxidativos às biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (FARBER, 1994) e doenças como câncer, resistência à insulina, diabetes mellitus (DM), doenças cardiovasculares, aterosclerose e envelhecimento, entre inúmeras outras doenças degenerativas em humanos (HALLIWELL, 1994; POULSEN, PRIEME, LOFT, 1998). No entanto, vários artigos também vincularam a EROs a vários processos fisiológicos e mecanismos de proteção essenciais que os organismos vivos usam para sua sobrevivência, como seu papel na defesa imune, ação antibacteriana e tônus vascular. Além disso, a possibilidade de que as EROs e radicais livres possam estar envolvidos na reprodução humana foi sugerida há quase 60 anos (MACLEOD, 1943).

As EROs são geradas como resultado da redução parcial do oxigênio, o que leva à formação de espécies radicalares de oxigênio, como peroxil (ROO^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO^{\bullet}), radicais oxil (RO^{\bullet}) e radical hidroxila (HO^{\bullet}), que são gerados durante a peroxidação lipídica (QUIDEAU, DEFFIEUX, DOUAT-CASASSUS, POUYSÉGU, 2011; DANGLES, 2012). Outras espécies reativas, como ozônio (O_3), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ácido hipobromoso (HOBr), também são EROs que podem causar danos biológicos. Embora sejam espécies não-radicaais de oxigênio, são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (HALLIWELL, 2006). Por exemplo, o H_2O_2 é um precursor da formação de complexos

de hidroxila e complexos de ferro hipervalentes na presença de íons de metais de transição com baixo estado de oxidação ou proteínas (DANGLES, 2012).

Atualmente, inúmeros estudos vêm relacionando a atividade antioxidante ao estresse oxidativo. Uma delas está ligada ao envelhecimento, que causa perda progressiva da função de órgãos e tecidos ao longo do tempo. O termo “envelhecer” está associado à degeneração cognitiva e biológica, como fragilidade física, comprometimento psicológico e declínio cognitivo. O estresse oxidativo desempenha um papel crucial no desenvolvimento de doenças relacionadas à idade. Diversas pesquisas sugerem que compostos antioxidantes podem controlar a auto-oxidação interrompendo a propagação de radicais livres ou inibindo a formação de radicais livres e, subsequentemente reduzindo o estresse oxidativo, melhorando a função imunológica e aumentando a longevidade (TAN, NORHAIZAN, LIEW, SULAIMAN RAHMAN, 2018).

Doenças inflamatórias também estão relacionadas a produção de EROs. A ativação induzida por EROs de fatores de transcrição e genes pró-inflamatórios levam ao aparecimento de inflamação. A inflamação faz com que as células imunes secretem várias citocinas e quimiocinas, a fim de recrutar várias outras células imunes para o local do estresse oxidativo/infecção. Reflexivamente, uma produção aumentada de EROs pelas células imunes no local da inflamação causa estresse oxidativo e lesão tecidual (CHATTERJEE, 2016).

A progressão do diabetes tem sido associada ao estresse oxidativo através da produção de EROs, como causa subjacente ao desenvolvimento de resistência à insulina, disfunção das células β (responsáveis por sintetizar e secretar o hormônio insulina), intolerância à glicose e progressão de complicações prolongadas do diabetes, incluindo disfunção microvascular e macrovascular. O excesso de nutrição e um estilo de vida sedentário levam à sobrecarga de glicose e ácidos graxos, resultando na produção de EROs. Além disso, a reação da glicose com proteínas plasmáticas forma produtos finais avançados de glicação, desencadeando a produção de EROs, as quais iniciam uma reação em cadeia que leva à redução da disponibilidade de óxido nítrico, aumento de marcadores de inflamação e modificação química das lipoproteínas, as quais podem aumentar o risco de aterogênese (WRIGHT, SCISM-BACON, GLASS, 2006).

Para combater as EROs, o sistema de defesa inibe e/ou reduz os danos causados por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Esses mecanismos são divididos em enzimático (endógeno) e não-enzimático (exógeno). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Essas

enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos. Já o sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes provindos da alimentação, entre os quais se destacam os fitoquímicos (catequinas, quercetinas, etc.), vitaminas e compostos fenólicos tais como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno (precursores das vitaminas E e A, respectivamente) além de minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) (BARBOSA et al., 2010; DANGLES, 2012).

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados na maioria dos alimentos (ANWAR, HUSSAIN, MUSTAFA, 2018). Os flavonoides são uma subclasse de polifenóis presentes em abundância na maioria dos alimentos, como batatas, trigo, tomate, frutas vermelhas, pêssegos e amêndoas (URQUIAGA, LEIGHTON, 2000). As antocianinas (potentes antioxidantes), pertencem a classe dos flavonoides e estão presentes em frutas e vinhos tinto (CARR, ZHU, FREI, 2000). Os carotenoides são outra classe importante de antioxidantes encontrados principalmente em vegetais, como batatas, cenouras, mamão e damasco (URQUIAGA, LEIGHTON, 2000). A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é um antioxidante solúvel em água muito potente sendo comumente encontrado em frutas e vegetais cítricos, como laranjas, limões e tomates (URQUIAGA, LEIGHTON, 2000; MCGHIE, WALTON, 2007). Outra vitamina com propriedades antioxidantes é a vitamina E, que está relacionada à família de antioxidantes tocoferol, encontrada naturalmente em frutas e vegetais ricos em lipídios, como azeitonas, girassol e nozes (URQUIAGA, LEIGHTON, 2000).

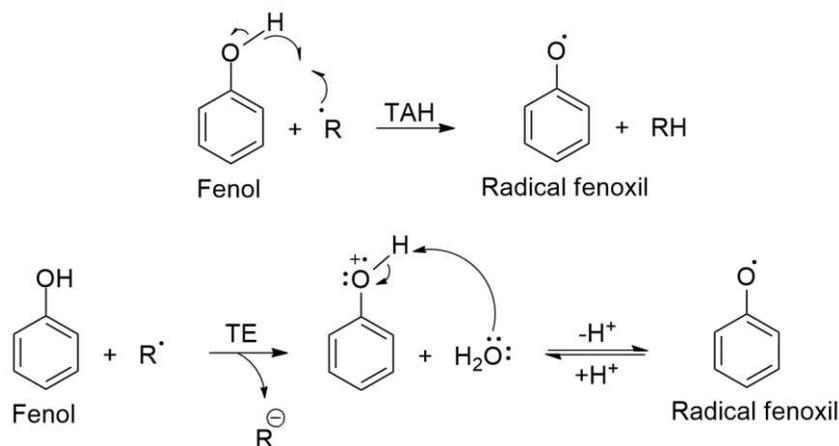
Embora as EROs sejam classicamente conhecidas por seus efeitos prejudiciais, acumulam-se evidências crescentes de seu uso na regulação e manutenção de processos normais em organismos vivos. Existem diversos estudos dos papéis desempenhados pelas EROs em vários processos fisiológicos, como a manutenção do diâmetro vascular e da função celular vascular normal, participando do FIH (fator induzível por hipóxia) na detecção da disponibilidade de oxigênio e iniciando respostas adequadas para a sobrevivência celular, montando assim uma resposta imune eficaz, agindo como possível sinalização de moléculas na regulação da captação de glicose no músculo esquelético e na regulação da estabilidade e transcrição de genes, afetando a estabilidade da cromatina (ALFADDA, SALLAM, 2012).

Quanto às reações de formação das EROs, podem ocorrer dois processos: o de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e a transferência de elétrons que são os principais

mecanismos pelos quais os fenóis expressam sua ação antioxidante baseada na eliminação de radicais livres.

No método TAH (Figura 13), um antioxidante do fenol doa um átomo de H a um radical livre instável (R^\cdot) com formação do radical fenoxila correspondente, que é estabilizado pela deslocalização do elétron não emparelhado em todo o anel aromático. Na transferência de elétrons, o radical fenoxila é produzido pela oxidação de um elétron do antioxidante fenol, seguida pela rápida desprotonação do cátion radical resultante (Figura 13) (QUIDEAU, DEFFIEUX, DOUAT-CASASSUS, POUYSÉGU, 2011).

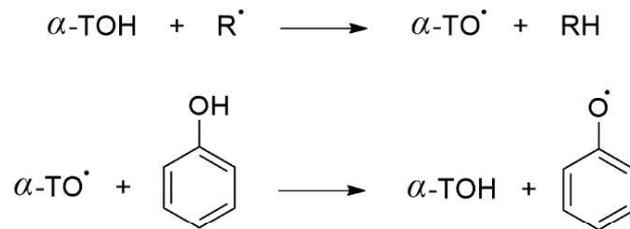
Figura 13 – Mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e de transferência de elétrons (TE) na atividade antioxidante de compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de Quideau e colaboradores (2011).

Os compostos fenólicos também manifestam atividade redutora na regeneração de outros antioxidantes. A interação entre eles e os tocoferóis é o exemplo mais relevante de sinergismo entre os antioxidantes. O α -tocoferol, único isômero relacionado às necessidades nutricionais da vitamina E, é considerado um dos melhores antioxidantes biológicos, devido à proteção oferecida à membrana plasmática e às lipoproteínas de baixa densidade contra reações de oxidação e peroxidação lipídica (SÁNCHEZ-PÉREZ, DELGADO-ZAMARREÑO, BUSTAMANTE-RANGEL, HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, 2000). Quando o α -tocoferol (α -TOH) doa hidrogênio aos radicais, esse mecanismo leva a formação do radical α -tocoferoxil. Por fim, os compostos fenólicos regeneram o α -tocoferol, reduzindo o radical α -tocoferoxil (Figura 14) (DANGLES, 2012).

Figura 14 – Reação do α -tocoferol para produção do radical fenoxila.



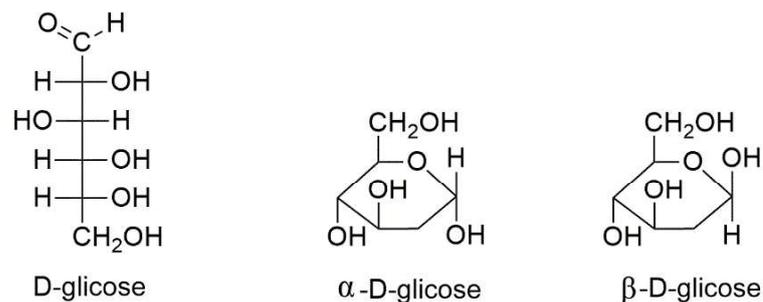
Fonte: o autor.

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.3.1 Atividades antidiabética

A glicose é um composto químico que consiste em seis carbonos e possui duas formas isoméricas, acíclica e cíclica (Figura 15). A glicose é a principal fonte de energia para o corpo humano e desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde. As moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) são um combustível para quase todos os processos celulares, que se formam como resultado do metabolismo das moléculas de glicose na maioria das células, sendo necessário um nível constante de glicose para que as células funcionem (OSUNDIJI, EVANS, 2011).

Figura 15 – Estruturas químicas da glicose.



Fonte: o autor.

A alta estabilidade da glicose está relacionada à sua estrutura em anel e isso a torna menos reativa aos resíduos de proteínas das aminas. Por outro lado, a presença de resíduos de carbonila livres na configuração aberta da glicose é responsável pela forma mais reativa. Além da glicose, existem outros açúcares redutores intracelulares, como galactose, glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose, ribose e seus derivados, que são mais reativos e contribuem mais para

a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) que a glicose. Além disso, a galactose, frutose, desoxiglicose e ribose são mais reativas com aminas que a glicose (5 vezes, 8 vezes, 25 vezes e 100 vezes, respectivamente). Por outro lado, o corpo regula os níveis de glicose no sangue em uma faixa baixa de concentrações (3–6 mM). No entanto, a concentração sanguínea de outros açúcares mais reativos, como frutose, ribose e metilglioxal são mantidas em concentrações muito mais baixas (μM) (NÈGRE-SALVAYRE et al., 2009). Portanto, a glicose é o tipo mais abundante de açúcar redutor no sangue e seu aumento pode levar a hiperglicemia e conseqüentemente, ao diabetes mellitus (DM), além da formação de AGEs.

A hiperglicemia é definida como um estado que ocorre quando o nível de glicose está acima do normal, devido à secreção inadequada ou insuficiência de insulina. A hiperglicemia leva a níveis aumentados de açúcares intracelulares, como glicose, frutose, frutose-3-fosfato (F-3-P), glicose-6-fosfato (G-6-P) e o acúmulo de moléculas de dicarbonil altamente reativas, por exemplo, metilglioxal e glioxal. Os AGEs se formam como resultado de reações não enzimáticas entre esses açúcares e seus derivados com outros tipos de moléculas (SINGH, BARDEN, MORI, BEILIN, 2001; COX et al., 2005) provocando complicações microvasculares e macrovasculares associadas ao DM, como neuropatia, nefropatia e retinopatia, que se desenvolvem em pacientes diabéticos por um período de 10 a 15 anos (NATHAN et al., 2005). Além disso, desenvolvem permeabilidade vascular elevada, condições pró-trombóticas, espessamento do membro basal, fluxo sanguíneo reduzido (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012), disfunção endotelial, rigidez elevada da parede arterial e diminuição da complacência do sistema vascular (VERZELLONI et al., 2011).

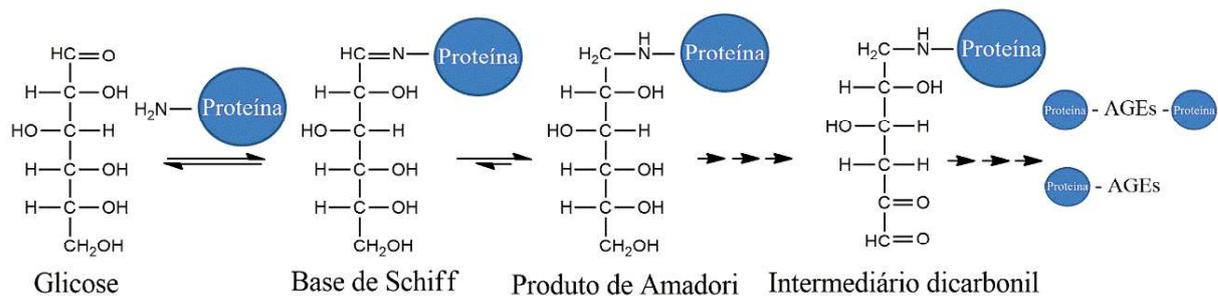
O DM é um dos distúrbios metabólicos causado pelo excesso de glicose caracterizado por hiperglicemia a longo prazo. Quando não tratada, pode causar condições médicas graves, como hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012). Nos últimos anos, a incidência de DM aumentou consideravelmente. Dados recentes estimam que 629 milhões de pessoas sofrerão de DM até o ano 2049 (ENGLISH, LENTERS-WESTRA, 2018). Geralmente, o DM pode ser classificado em três tipos: tipo I e tipo II que são baseados na dependência de insulina e tipo III, conhecido como DM gestacional, que ocorre durante a gravidez, onde a paciente apresenta qualquer grau de intolerância à glicose. Os tipos I e II do DM estão associados a complicações graves a longo prazo, como neuropatia, retinopatia, nefropatia, angiopatia (atraso na cicatrização), doenças vasculares e insuficiências digestivas (NAKATA et al., 2013; TAN et al., 2019).

O DM ocorre devido a uma falta na produção de insulina ou na sensibilidade à insulina. As células betas pancreáticas (células β) são responsáveis por produzir o hormônio insulina

(facilita a absorção de glicose nas células) a fim de fornecer energia, além de estar envolvido em várias outras funções. O DM tipo I está tipicamente associado à falha na produção de insulina, resultante da destruição das células β pancreáticas pela autoimunidade mediada por células T. Por outro lado, o DM tipo II é caracterizado pela resistência à insulina e redução da produção de insulina (TAN et al., 2019).

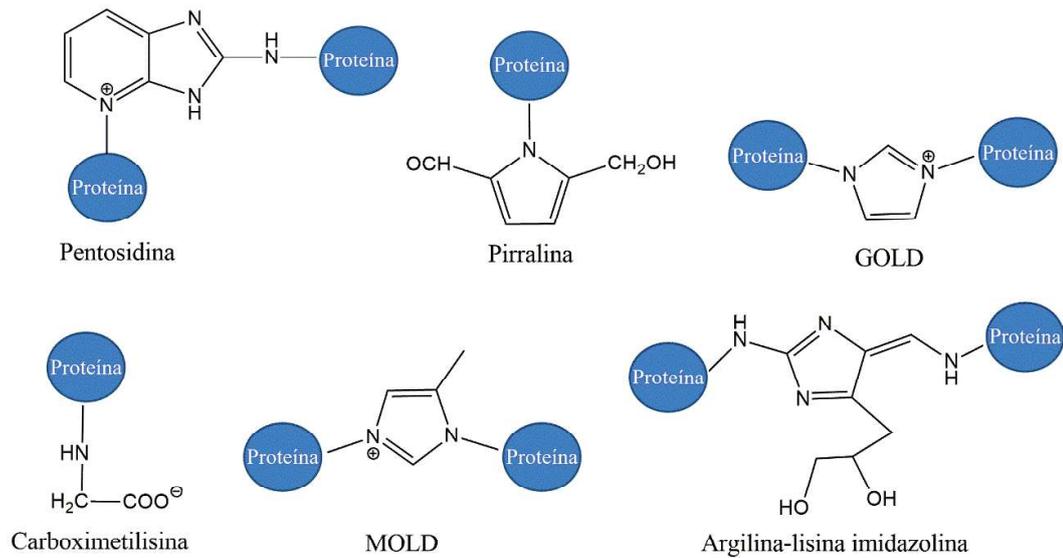
Em 1912, Louis Camille Maillard foi o primeiro cientista a descrever uma reação de escurecimento não enzimática que podia ser observada quando açúcares e aminoácidos eram aquecidos. Esta reação foi denominada reação de Maillard de acordo com seu descobridor e foi denominada como uma reação de glicosilação não enzimática (MAILLARD, 1912). Atualmente, essa reação é chamada glicação (Figura 16) e os produtos de escurecimento visíveis são chamados produtos finais de glicação avançada (AGEs). A Figura 17 apresenta uma lista de diferentes tipos de AGEs que podem ser formados a partir da glicose (SALAHUDDIN, RABBANI, KHAN, 2014). O DM foi uma das primeiras situações em que se observou a relevância do aumento da glicação. Esse processo teria uma taxa de produção mais alta na presença de hiperglicemia e estresse oxidativo. As moléculas modificadas pelos AGEs circulam por todo o corpo e exercem sua ação de duas maneiras principais: interagindo com os receptores e diretamente pela ligação covalente às proteínas, modificando sua estrutura e função, como ocorre no dano glomerular em pacientes diabéticos (TAN et al., 2019).

Figura 16 – Esquema de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicose.



Fonte: adaptado de Salahuddin, Rabbani, Khan (2014).

Figura 17 – Estruturas dos diferentes tipos de AGEs formados a partir da glicação.



Fonte: adaptado de Salahuddin, Rabbani, Khan (2014).

Na etapa inicial da glicação, o grupo carbonila da glicose se liga a proteína para formar um intermediário conhecido como base de Schiff (contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio), que são instáveis e reversíveis. A quantidade de bases de Schiff pode ser diretamente correlacionada com a concentração de glicose disponível no sistema de reação, logo, em situações hiperglicêmicas, ocorre um aumento na formação de bases de Schiff. Em seguida, a base de Schiff, é convertida em produtos de Amadori, mais estáveis. Finalmente, os produtos de Amadori formam um intermediário dicarbonil (1,4 desoxiglicose ligada a proteína) e produzem os AGEs, que são estáveis e irreversíveis (PEYROUX, STERNBERG, 2006; KHANGHOLI et al., 2016).

Além dos açúcares, compostos dicarbonílicos reativos como metilglioxal, glioxal ou 3-desoxiglicose também podem levar à glicação. Estes compostos são gerados durante o rearranjo do produto Amadori, à medida que as proteínas são glicadas pela glicose (THORNALLEY, LANGBORG, MINHAS, 1999). Uma visão geral esquemática da reação de glicação é mostrada na Figura 16.

Como consequência do estado hiperglicêmico e consequente formação dos AGEs, há o surgimento de várias doenças. Os AGEs levam à formação de doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) (SRIKANTH et al., 2011; SHARMA et al., 2020), doença cardiovascular (SIMM et al., 2007), acidente vascular cerebral (ZIMMERMAN et al., 1995), obesidade, DM (YAN, D'AGATI, SCHMIDT, RAMASAMY, 2007), cataratas (GUL, RAHMAN, HASNAIN, 2009), entre outras.

Um dos mecanismos pelo qual os AGEs induzem danos é através de um processo chamado reticulação, que causa danos intracelulares e apoptose (SHAIKH, NICHOLSON, 2008). Nesse processo formam-se fotossensibilizadores na lente cristalina, que tem implicações no desenvolvimento de cataratas (SHAIKH, NICHOLSON, 2008; GUL, RAHMAN, HASNAIN, 2009). Pesquisas recentes associam AGEs a formas familiares, de início precoce e esporádicas da doença de Parkinson e a proteínas ligadas à doença de Alzheimer. Em um estudo, as placas extraídas (pós-morte) dos cérebros de pacientes com Alzheimer, mostram um aumento de 3 vezes no conteúdo de AGEs, em comparação com indivíduos da mesma idade que morreram por outras causas (SRIKANTH et al., 2011).

Atualmente existem três abordagens terapêuticas para o tratamento dos AGEs: impedir a formação de AGEs, interromper as ligações cruzadas depois que elas são formadas e impedir seus efeitos negativos (MOHMMAD ABDUL, BUTTERFIELD, 2007; ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012; CHAUDHURI et al., 2016).

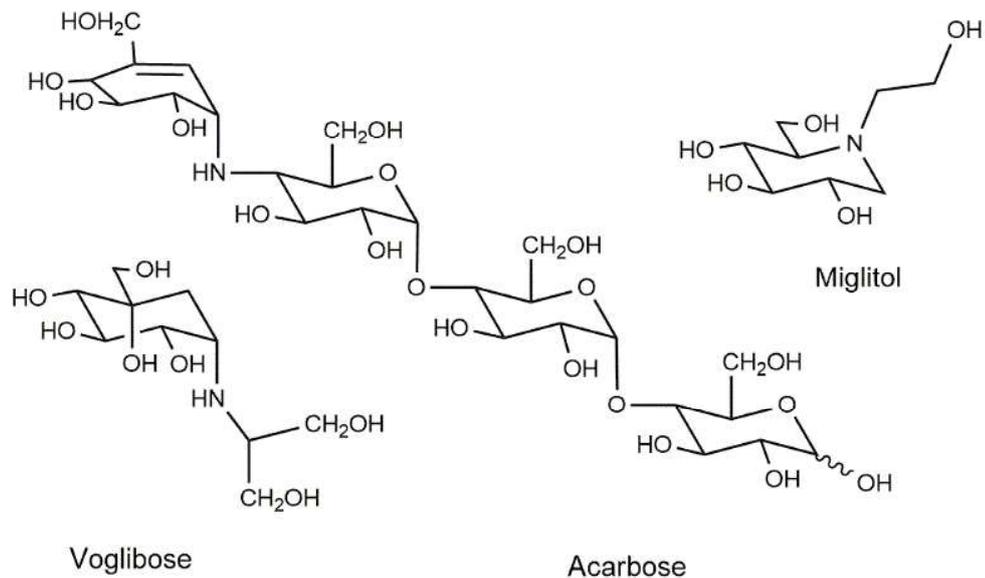
Estudos demonstram que vários compostos, muitos deles provenientes de fontes naturais, inibem a formação de AGE, como a vitamina C, piridoxamina (uma das formas da vitamina B6) (MOHMMAD ABDUL, BUTTERFIELD, 2007; CHAUDHURI et al., 2016), aspirina (URIOS, GRIGOROVA-BORSOS, STERNBERG, 2007), alcaloides isolados de *Ocotea paranapiacabensis* (FREITAS et al., 2020), a quercetina isolada do tomilho (MORIMITSU, YOSHIDA, ESAKI, HIROTA, 1995) e a curcumina isolada da *Curcuma longa* (açafraão) (HEWLINGS, KALMAN, 2017). Fortes efeitos inibitórios da glicação por compostos solúveis em água da pasta de tomate também foram relatados. Extratos de cravo, pimenta da Jamaica moída e canela, entre outras especiarias, foram inibidores eficazes da glicação. Há também estudos do efeito de compostos como o resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno), um fitoesterogênio natural encontrado nas uvas, como inibidores potentes da formação de AGEs (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012).

Outra abordagem para o tratamento dos AGEs é interromper as ligações cruzadas depois que elas são formadas. Foi demonstrado que a ativação do receptor TRPA-1 (receptor potencial transiente ankiryne 1) pelo ácido lipoico ou pelo ácido podocarpico, reduz os níveis de AGEs, melhorando a desintoxicação do metilglioxal, um precursor principal de várias AGEs (CHAUDHURI et al., 2016). Por fim, estudos em ratos e camundongos evidenciaram que fenóis naturais, como resveratrol e curcumina, podem impedir os efeitos negativos dos AGEs (MIZUTANI, IKEDA, YAMORI, 2000; TANG, CHEN, 2014).

Uma outra via de tratamento do DM é o controle da hiperglicemia através da utilização de inibidores da α -glicosidase, presente na mucosa do intestino delgado, responsável pela

clivagem da ligação glicosídica de oligossacarídeos produzindo unidades monossacarídeos de glicose. Os inibidores da α -glicosidase agem predominantemente atrasando a absorção pós-prandial de carboidratos do trato gastrointestinal, inibindo assim, os picos de glicemia e conseqüentemente reduzindo os níveis de glicose no sangue e insulina. Atualmente, três tipos de inibidores da α -glicosidase (acarbose, miglitol e voglibose) estão disponíveis para o tratamento de DM tipo II (Figura 18) (JOSHI et al., 2015).

Figura 18 – Estrutura molecular dos inibidores de α -glicosidase.



Fonte: adaptado de Joshi e colaboradores (2015).

A acarbose é o AGI mais utilizado no tratamento da hiperglicemia há mais de 20 anos. A acarbose é um pseudotetrassacarídeo com nitrogênio ligado entre a primeira e a segunda molécula de glicose, derivadas do processo de fermentação de *Actinoplanes utahensis*. Esta modificação confere à sua estrutura, estabilidade e alta afinidade pelos centros ativos da α -glicosidase, enzima responsável pela decomposição de carboidratos complexos. O miglitol é um derivado da 1-desoxinojirimicina e a voglibose é produzido por alquilação redutiva da valiolumina, um composto derivado do antibiótico validamicina C (JOSHI et al., 2015).

Por mais que a acarbose seja o fármaco mais utilizado como AGI, ela apresenta efeitos colaterais como flatulência (em 78% dos pacientes) e diarreia (em 14% dos pacientes) (DINICOLANTONIO, BHUTANI, O'KEEFE, 2015). Assim, inúmeros estudos com compostos de diversas classes inibidores da α -glicosidase isolados de plantas medicinais, têm sido realizados ao longo dos anos. Por exemplo, sessenta e um terpenoides isolados de plantas, como *Fagara tessmannii* (Rutaceae) e *Luculia pinceana* Hook, apresentaram atividade

inibidora da α -glicosidase. A investigação fitoquímica do extrato dos rizomas de *Hedychium spicatum* levou ao isolamento de diterpenos com atividade AGI. Duas novas fenilpropanoílamidas, as chaplupirrolidonas A e B, isoladas do extrato das folhas de *Piper sarmentosum*, apresentaram forte atividade inibidora da α -glicosidase. Seis alcaloides obtidos a partir da polpa das frutas de *Murraya koenigii* apresentaram atividade inibidora da α -glicosidase moderada (YIN et al., 2014).

Tendo em vista essa perspectiva, este trabalho teve como uma das vertentes avaliar o efeito inibitório de compostos isolados de *E. paniculata* frente aos produtos finais de glicação avançada e a enzima α -glicosidase.

2.3.2 Lipase pancreática

Outra vertente de estudo deste trabalho é a obesidade. A obesidade é agora reconhecida como a principal desordem do estilo de vida, especialmente nos países desenvolvidos, aumentando a uma velocidade alarmante no mundo como um todo, devido à ingestão de *fast food*, industrialização e redução da atividade física (CAIRNS, 2005). A OMS define obesidade como acúmulo excessivo de gordura, que pode prejudicar saúde e é diagnosticado com Índice de Massa Corpórea $IMC \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$ (WHITLOCK et al., 2009).

Segundo a OMS, 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso, entre os quais quase 375 milhões de mulheres e mais de 275 milhões de homens eram obesos. Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de um terço da população adulta é obesa, sendo considerada uma causa significativa de mortes (MOKDAD, MARKS, STROUP, GERBERDING, 2004). Na Malásia, cerca de 44% dos homens adultos com 20 anos ou mais estavam acima do peso e, cerca de 12% eram obesos (NG et al., 2014). De modo geral, a obesidade é considerada um problema de saúde extremamente oneroso, que nos países desenvolvidos, é responsável por 2 a 6% do total dos custos com saúde (SEYEDAN et al., 2015).

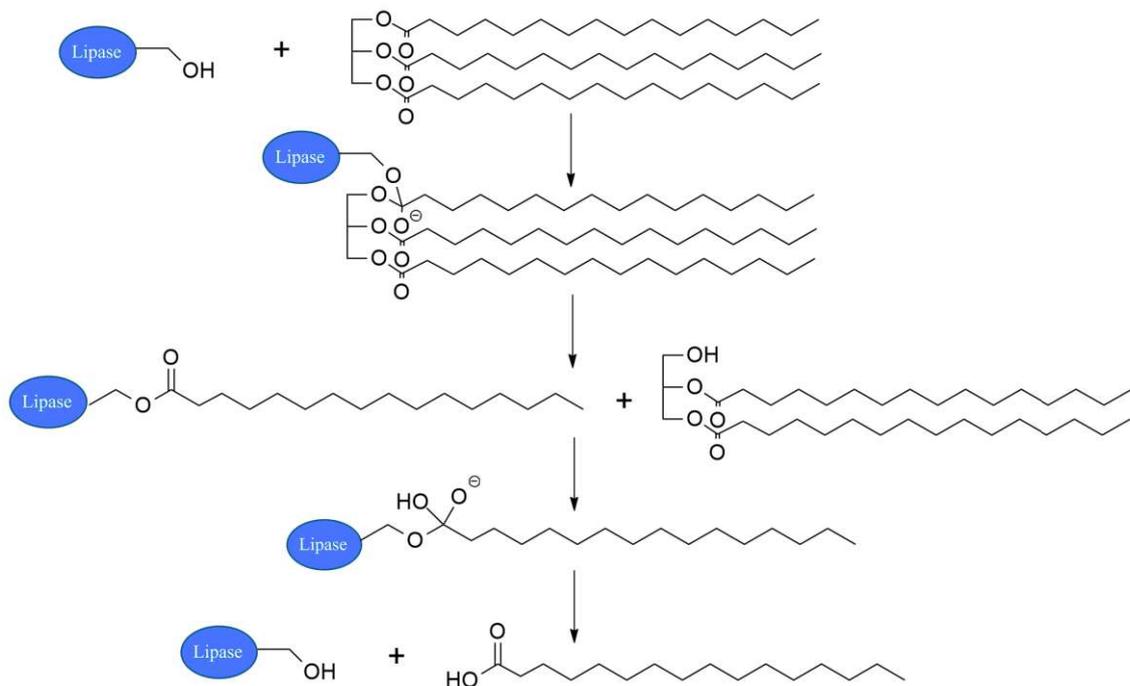
Várias estratégias foram aplicadas para o desenvolvimento de agentes antiobesidade, incluindo aumento do gasto energético (bloqueando a adipogênese ou induzindo a lipólise seguida pela oxidação da gordura) e redução do consumo de energia (suprimindo o apetite e retardando ou inibindo a absorção da nutrição). No entanto, apesar da progressão aparentemente inevitável dessa doença e dos resultados promissores de alguns medicamentos para redução do peso corporal e alteração de vários fatores cardiometabólicos, nos últimos anos, a maioria dos

medicamentos antiobesidade aprovados e comercializados foram retirados do mercado devido a efeitos colaterais graves (SEYEDAN et al., 2015).

Um das vias de tratamento da obesidade, é através da inibição da absorção de gordura. Como a gordura contribui mais do que proteínas ou carboidratos para a deposição indesejada de calorias, a inibição da absorção de gordura pode ser considerada o alvo mais comum para diminuir a ingestão de energia. Entre os tratamentos existentes para a obesidade, o desenvolvimento de inibidores da digestão e absorção de nutrientes é considerado uma estratégia importante no esforço de diminuir a ingestão de energia por mecanismos gastrointestinais (BIRARI, BHUTANI, 2007).

A inibição da digestão e absorção de lipídios da dieta, por meio de uma ação inibidora da lipase pancreática, pode ser direcionada para o desenvolvimento de agentes antiobesidade. A lipase pancreática (triacilglicerol acil-hidrolase) é uma enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas que desempenha um papel significativo na absorção dietética de triacilglicerol, hidrolisando triacilgliceróis em monoacilgliceróis e ácidos graxos (LOWE, 2002) (Figura 19), sendo responsável pela hidrólise de 50 a 70% do total de gorduras alimentares (BIRARI, BHUTANI, 2007). Assim, a interferência na hidrólise de gordura leva à diminuição da utilização de lipídios ingeridos, e portanto, a inibição da lipase reduz a absorção de gordura (SEYEDAN et al., 2015).

Figura 19 – Esquema de reação da clivagem de triglicerídeos pela lipase pancreática.



Fonte: adaptado de Eck (2013).

Ao longo dos anos, vários medicamentos foram testados como agentes inibidores da lipase pancreática, porém muitos deles foram retirados do mercado devido aos graves efeitos colaterais. Por exemplo, o rimonabanto, um medicamento supressor do apetite que estava disponível em 56 países a partir de 2006, teve seu uso suspenso em 2008 pela EMA (Agência Europeia de Medicamentos), devido a um risco aumentado de efeitos colaterais psiquiátricos, como ansiedade, ideação suicida, distúrbios do sono e depressão (CHRISTENSEN et al., 2007). Em 1997, a sibutramina, que é um inibidor anorético ou do apetite, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina/serotonina, foi amplamente utilizada após a aprovação da Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA). Em outubro de 2010, a FDA retirou-o do mercado devido à associação com maior risco de eventos cardiovasculares não fatais graves, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Posteriormente, em 2010, a EMA também sugeriu a suspensão do uso de sibutramina. Os efeitos colaterais comuns da sibutramina são devidos à ativação do sistema nervoso, como insônia, boca seca, constipação, anorexia, dor de cabeça, palpitações e hipertensão (NISOLI, CARRUBA, 2003; JAMES et al., 2010).

Atualmente, apenas o orlistat está disponível para o tratamento a longo prazo da obesidade. O orlistat é um inibidor das lipases gastrointestinais e pancreáticas, capaz de impedir a absorção de aproximadamente 30% da gordura da dieta (ΓΥΕΡΧΙΟΛΙΝΙ, 1997). Apesar do orlistat ser utilizado no tratamento da obesidade, ele está associado a certos efeitos colaterais gastrointestinais como flatulência, fezes líquidas, diarreia, manchas oleosas, incontinência ou urgência fecal e cólicas abdominais (CHAPUT, ST-PIERRE, TREMBLAY, 2007). Devido aos efeitos adversos do orlistat, ele pode não ser bem tolerado. Por isso, é crucial descobrir novos inibidores, derivados de fontes naturais, particularmente plantas que não estão associadas a esses efeitos colaterais graves.

Uma variedade de produtos naturais, incluindo extratos brutos e compostos isolados de plantas, têm sido amplamente utilizados tradicionalmente no tratamento da obesidade. Neste sentido, o potencial de produtos naturais para o tratamento da obesidade pode ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de fármacos antiobesidade seguros e eficazes (BIRARI, BHUTANI, 2007; SOUZA, PEREIRA, SOUZA, SANTOS, 2011). Por exemplo, o extrato da semente de uva foi utilizado como tratamento para limitar absorção de gordura e acúmulo de gordura no tecido adiposo (MORENO et al., 2003). Um estudo realizado por Moreno e colaboradores (2006) mostrou que o extrato etanólico de casca de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) inibiu a atividade da lipase. Além disso, as folhas de *Baccharis trimera* são usadas popularmente na redução de peso (SOUZA, PEREIRA, SOUZA, SANTOS, 2011) e os frutos

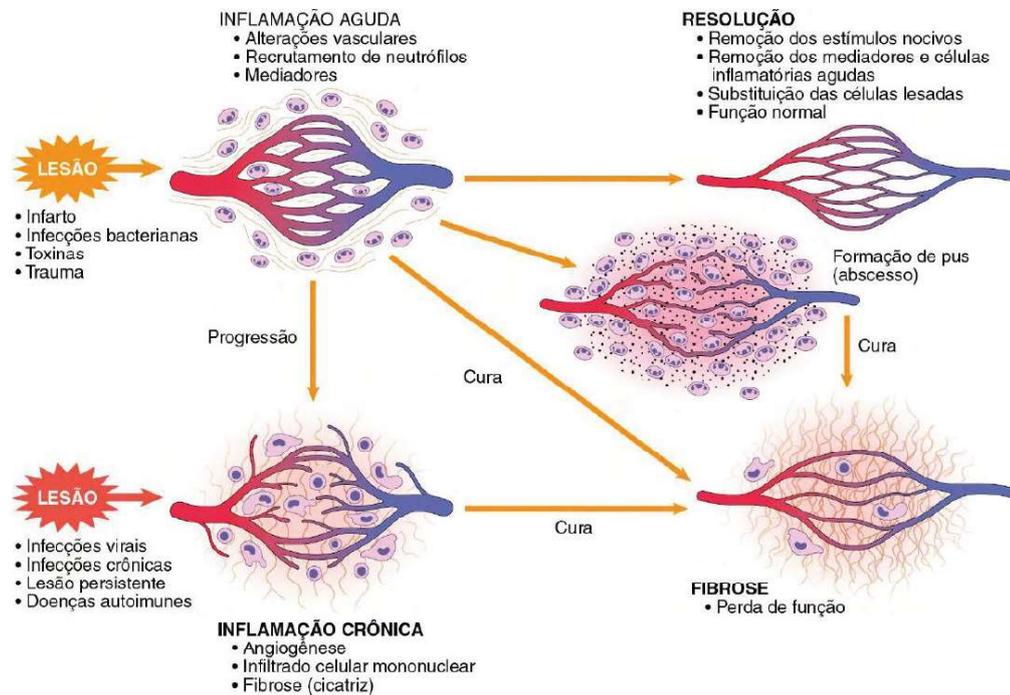
de *Garcinia cambogia*, fonte de ácido hidroxítrico, demonstrou ser eficaz como inibidor do apetite (Shara et al., 2004).

Tendo em vista essa perspectiva, este trabalho teve como uma das vertentes avaliar o efeito inibitório de compostos isolados de *E. paniculata* frente a enzima lipase pancreática.

2.3.3 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é o mecanismo de defesa natural do corpo para remover agentes agressores, patogênicos, irritantes e células danificadas, e em seguida, iniciar o processo de cura. Em geral, a inflamação é classificada como inflamação aguda ou crônica (Figura 20). A inflamação aguda é um processo benéfico que ajuda a imobilizar a região lesada e permite que o resto do sistema imunológico promova a cura da lesão (WARD, 2003). Já a inflamação crônica, por outro lado, se transforma em um problema e não em uma solução aos ferimentos. Os tecidos cronicamente inflamados normalmente evocam células imunológicas da corrente sanguínea para amplificar a resposta inflamatória, e assim, podem destruir tecidos saudáveis em uma tentativa mal direcionada de iniciar o processo de cura (LEE, WALSER, DUBINETT, 2009). Estímulos inflamatórios persistentes ou desregulação dos mecanismos da fase de resolução, resultam em inflamação crônica, reconhecida como um fator fundamental subjacente na progressão de uma série de doenças, incluindo aterosclerose, artrite e doenças neurodegenerativas crônicas, como Alzheimer (LIBBY, 2007).

Figura 20 – Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica.



Fonte: KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013.

De modo geral, quando um micro-organismo penetra no tecido ou o tecido é lesado, a presença de infecção ou lesão é percebida por células residentes, principalmente macrófagos, mas também por células dendríticas, mastócitos e outros tipos celulares. Essas células secretam moléculas (citocinas e outros mediadores) que induzem e regulam a resposta inflamatória. Os mediadores inflamatórios também são produzidos a partir das proteínas plasmáticas que reagem com os micro-organismos ou com os tecidos lesados. Alguns desses mediadores agem nos pequenos vasos sanguíneos nas vizinhanças e promovem a saída do plasma e o recrutamento dos leucócitos circulantes para o local onde o agente lesivo está localizado. Assim, os leucócitos recrutados são ativados e tentam remover o agente lesivo, por fagocitose. Porém, um efeito colateral da ativação dos leucócitos pode ser a lesão a tecidos normais do hospedeiro (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a responder frente um estímulo nocivo, chegando rapidamente ao local da injúria. Possui um período de vida relativamente curto, entre 24-48 horas em sua forma ativa. Sob condições fisiológicas, os neutrófilos agem por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, levam a destruição dos patógenos invasores. A formação de EROs é catalisada por meio da enzima mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade neste tipo celular. Após desempenharem o seu papel,

os neutrófilos entram em processo de apoptose, secretando mediadores que inibem o recrutamento de novos neutrófilos, como a anexina-1 (Anx-A1) e a lactoferrina (FERREIRA, 2016).

Os macrófagos, as células dominantes da inflamação crônica, são células teciduais derivadas dos monócitos do sangue circulante, após sua emigração da corrente sanguínea (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). São agrupados nas subpopulações M1 e M2, segundo o conjunto de ações que estas comumente desempenham. Os macrófagos M1, atuam principalmente nos processos de defesa, eliminando agentes lesivos através da síntese em altas concentrações da enzima lisossomal *N*-Acetil- β -D-glucosaminidase (NAG). Já os macrófagos M2, estão mais envolvidos com a fase resolutive da inflamação, fagocitando os neutrófilos apoptóticos, diminuindo a síntese e liberação de citocinas inflamatórias e aumentando a síntese de mediadores importantes no remodelamento tecidual, na angiogênese, e no reparo tecidual (FERREIRA, 2016).

A angiogênese (processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura preexistente) é um processo chave em algumas condições fisiológicas, como a cicatrização de feridas em processos inflamatórios. A resposta angiogênica é capaz de estimular e intensificar o processo inflamatório, fornecendo nutrientes e oxigênio para os sítios da inflamação. Além disso, a perturbação dos mecanismos da angiogênese fisiológica, tem um papel na patogênese de algumas doenças na forma de superproliferação de vasos sanguíneos, como câncer, psoríase, artrite, retinopatias, obesidade, asma e aterosclerose, ou a não angiogênese, que participa de doenças como isquemia cerebral, neurodegeneração, hipertensão, osteoporose, dificuldade respiratória, entre outras (TAHERGORABI, KHAZAEI, 2012; FERREIRA, 2016).

Por fim, no último estágio do processo inflamatório, na matriz extracelular da cicatriz (composta por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas presentes no tecido conjuntivo) ocorre a deposição do colágeno, essencial para o desenvolvimento da resistência no local da cura da ferida (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013; MAQUART, MONBOISSE, 2014). Com a maturação da cicatriz, ocorre uma regressão vascular progressiva que, finalmente, transforma o tecido de granulação, altamente vascularizado, em uma cicatriz amplamente avascular e pálida (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

O não tratamento de uma inflamação pode levar a progressão de uma série de doenças, como aterosclerose, artrite e doenças neurodegenerativas crônicas, como Alzheimer, tendinites, lesões musculoesqueléticas, neuralgia pós-herpética, periodontite, úlceras aftosas e ceratoses actínicas (LIBBY, 2007; JOSÉ, 2014). As ciclo-oxigenases (Coxs) tem papel fundamental no

processo inflamatório. A ação dos medicamentos consiste na inibição destas enzimas, com consequente diminuição da produção de prostaglandinas (HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). As prostaglandinas estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, hipotensão, ovulação, metabolismo ósseo, aumento do fluxo sanguíneo renal (resultando em diurese, natriurese, caliurese e estímulo de secreção de renina), inibição da secreção gástrica de ácido, resposta imunológica, hiperalgesia, regulação da atividade quimiotática celular, resposta endócrina e angiogênese, entre outros. Quando sua produção é aumentada, ocorre maior sensibilidade à dor e à febre e incremento da resposta inflamatória. Portanto, para o tratamento da inflamação é necessária a diminuição da produção de prostaglandinas, que passa pela inibição das Coxs, responsáveis por sua produção (HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006).

A Cox-1 e a Cox-2 são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica de fosfolipídios da membrana (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004). A Cox 1 está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins) e é, por isso, denominada de enzima constitutiva. A Cox 1 está associada à produção de prostaglandinas e resulta em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. A Cox-2, em contraste, está presente nos locais de inflamação, mas está ausente da maioria dos tecidos normais, sendo por isso, denominada de enzima indutiva, e tem papel essencial na mediação central da dor e da febre. Ela é expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos (HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). Diversos efeitos adversos gastrointestinais estão associados à supressão da expressão constitutiva da Cox-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004). Portanto, os inibidores da Cox-2 foram desenvolvidos com a expectativa de que eles inibissem a inflamação prejudicial, mas não bloqueassem os efeitos protetores das prostaglandinas produzidas constitutivamente (HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). Entretanto, essa seletividade pode desencadear uma série de complicações cardiovasculares, como o infarto (MENDES et al., 2012).

Atualmente, os principais medicamentos usados em doenças inflamatórias são os anti-inflamatórios esteroides (por exemplo, betametasona, prednisolona e dexametasona) e os não esteroides (por exemplo, aspirina, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, nimesulida e celecoxibe) (Tabela 1). No entanto, o uso prolongado está associado a vários

efeitos colaterais, como por exemplo, esteroides podem causar atrofia adrenal, osteoporose, supressão da resposta à infecção ou lesão, euforia, entre outras. Já medicamentos não esteroides podem causar úlceras e broncoespasmo devido ao bloqueio das prostaglandinas fisiológicas e inflamatórias, e produção simultânea de leucotrienos. Assim, levando em consideração os efeitos adversos e o alto custo de medicamentos esteroidais ou não esteroidais, a busca por novos agentes anti-inflamatórios de origem vegetal está se tornando popular, com o objetivo de obter maior segurança, melhor eficácia e uma forma mais econômica de tratar a inflamação (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004; HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; ABDULKHALEQ et al., 2018).

Tabela 1 – Especificidade dos anti-inflamatórios não-esteroidais utilizados no tratamento de doenças inflamatórias.

Inibidores não Específicos da Cox-2	Inibidores Específicos da Cox-2
Aspirina	Celecoxibe
Ácido mefenâmico	Cetorolaco
Cetoprofeno	Etodalaco
Diclofenaco sódico	Etoricoxibe
Flurbiprofeno	Meloxicam
Ibuprofeno	Nimesulide
Indometacina	Parecoxibe
Naproxeno	Rofecoxibe
Piroxicam	Valdecoxibe

Fonte: CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004; ABDULKHALEQ e colaboradores (2018).

Em virtude dos problemas que os anti-inflamatórios disponíveis atualmente no mercado podem causar, a busca de novos medicamentos com menos efeitos colaterais é uma alternativa. Deste modo, a busca por novos metabólitos especializados oriundos de plantas se torna um alternativa muito viável, visto que cerca de 66,7% dos fármacos de pequenas moléculas são inspirados em produtos naturais (Figura 3) (NEWMAN, CRAGG, 2020) e conforme relatado pela OMS, aproximadamente 75% da população mundial depende de medicamentos de origem natural (LI et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória de vários extratos de plantas e compostos isolados já foi cientificamente demonstrada. Por exemplo, o extrato de gengibre (*Zingiber zerumbet*) e seu

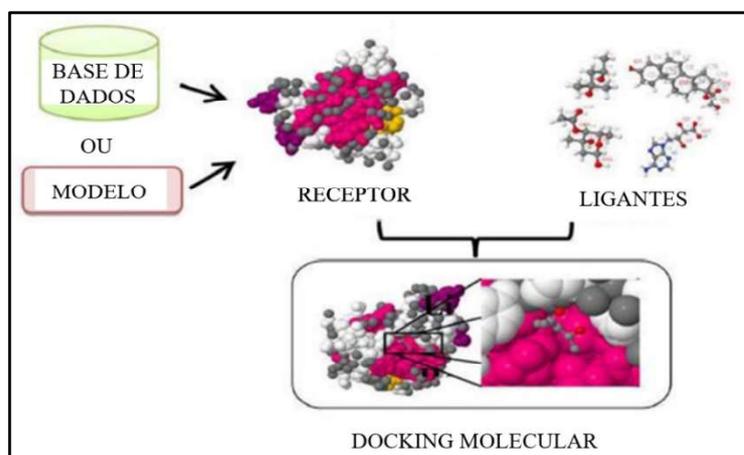
principal composto ativo, o 3-*O*-metilcanferol, apresentam atividade anti-inflamatória (CHIEN et al., 2008). A *Curcuma longa* e seu principal composto ativo, a curcumina, tem sido tradicionalmente utilizada nos países asiáticos como erva medicinal devido a sua propriedade anti-inflamatória (HEWLINGS, KALMAN, 2017). A espécie *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae), encontrada no nordeste e sudeste do Brasil, é utilizada largamente na medicina popular e indígena para o tratamento de desordens inflamatórias. A glaucina, um alcaloide isolado de *Glaucium flavum*, a triptantrina, outro alcaloide extraído da espécie *Isatis tinctori*, os flavonoides genisteína, canferol, quercetina e daidzeína encontrados em diversas plantas, também apresentam atividade anti-inflamatória (GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; HÄMÄLÄINEN et al., 2007; CORRÊA, MELO, COSTA, 2008).

Tendo em vista essa perspectiva, este trabalho teve como uma das vertentes avaliar o efeito inflamatório dos extratos em hexano das folhas e galhos e de compostos isolados de *E. paniculata*.

2.4 DOCKING MOLECULAR

O Docking Molecular é um método computacional que busca, por meio das energias livres de ligações, avaliar as orientações do ligante no sítio ativo do receptor para tornar o complexo estável. O receptor pode ser o DNA, o ácido ribonucleico (RNA), proteínas, enzimas, entre outros. A orientação preferida é determinada para prever a força da ligação ou afinidade de ligação entre o ligante e receptor utilizando sistemas de pontuação, *scoring*. A Figura 21 ilustra um fluxograma do processo de docking molecular (CHAUDHARY, MISHRA, 2016).

Figura 21 – Fluxograma de docking molecular.

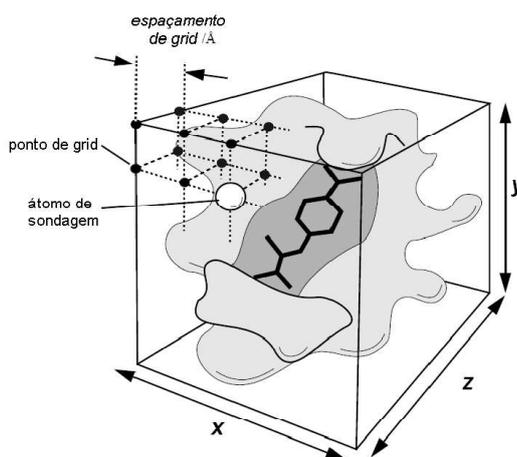


Fonte: adaptado de Chaudhary, Mishra (2016).

Após o acoplamento molecular ter sido realizado, o software executa uma pesquisa sistemática no algoritmo, na qual a conformação do ligante é abordada de forma recorrente, até que a conformação de menor energia seja identificada. O *scoring* fornece um modo para classificar o posicionamento de ligantes proporcionais aos outros. Idealmente, o *scoring* deve corresponder diretamente à afinidade de ligação do ligante com o receptor, ou seja, o melhor *scoring* é o melhor ligante. Assim, o resultado final terá um valor negativo de variação de energia livre de Gibbs (em kcal mol⁻¹).

Para executar os cálculos de docking, inicialmente é definido o sítio ativo do receptor, a parte rígida da molécula, a qual permanece imóvel durante os cálculos, e a parte flexível, que se movimenta juntamente com o ligante para determinar a melhor conformação do sistema. Em seguida, o ligante é colocado em uma grade tridimensional para restringir as interações com o alvo específico do receptor (Figura 22).

Figura 22 – Esquema de um mapa de grid.



Fonte: adaptado de Chaudhary, Mishra (2016).

O docking é frequentemente aplicado para antecipar a orientação de candidatos a medicamentos contra alvos específicos, a fim de prever a afinidade e atividade do fármaco. Portanto, o docking desempenha um papel central no processo de concepção e descoberta de medicamentos. O principal objetivo do docking é simular computacionalmente o processo de identificação e, realizar uma conformação otimizada para que a energia livre do sistema geral seja minimizada. Algumas das principais vantagens de se utilizar uma simulação computacional incluem (CHAUDHARY, MISHRA, 2016):

- a) Identificar informações químicas e biológicas sobre ligantes e/ou alvos para descobrir e otimizar novos medicamentos;

- b) Selecionar os candidatos mais promissores;
- c) Predizer a constante de inibição (K_i);
- d) Identificar novos alvos de medicamentos já disponíveis.

Assim, o docking permite que diversos compostos sejam testados a fim de obter um *screening* virtual, no qual aqueles que se apresentarem como mais promissoras, passam para as etapas de síntese e avaliação de suas atividades biológicas, para o desenvolvimento de um novo fármaco e, como consequência, os compostos que não são promissores, não são sintetizados, evitando assim, gastos e trabalho desnecessário de síntese e avaliação biológica.

Um estudo realizado por Kawano e colaboradores (2006) mostrou que de cada 30.000 moléculas estudadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) passam para a fase I de estudos clínicos, 40 (0,13%) entram na fase II, 12 (0,04%) seguem para a fase III, 09 (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios, e apenas 1 (0,003%) satisfaz o mercado, trazendo retorno para a indústria que a desenvolveu. Esses dados demonstram o quanto é importante a realização de estudos prévios, como o docking molecular, que minimizem escolhas que podem não ter resultados promissores e elevar cada vez mais os gastos na busca de medicamentos.

2.5 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DA FAMÍLIA DAS LAURACEAE

A família Lauraceae é composta por 52 gêneros e aproximadamente 2850 espécies de árvores e arbustos que são amplamente distribuídos em regiões temperadas e tropicais, e principalmente distribuídos no Sudeste Asiático e na América do Sul. No Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros, sendo que a maioria das espécies apresenta um odor semelhante ao de terpenos, e muitas têm sido usadas para tratar doenças do aparelho circulatório (SILVA, DA TRINDADE, MAIA, SETZER, 2016; JO et al., 2019).

Os 25 gêneros encontrados no Brasil são: *Aiouea*, *Anaueria*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocaria*, *Dicypellium*, *Endlicheria*, *Kubitzkia*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Misanteca*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Paraia*, *Persea*, *Phoebe*, *Phyllostemonodaphne*, *Pleurothyrium*, *Rhodostemonodaphne*, *Sextonia*, *Systemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamdendron* (SOUZA, LORENZI, 2019).

A quimiosistemática da família Lauraceae destaca a ocorrência de alcaloides, fenilpropanoides, lignanas, cumarinas, esteroides, nitro derivados, ésteres benzoicos, 2-pironas, flavonoides, benzofenonas, ácidos graxos e pares terminais alceno-alcino, além de mono e

sesquiterpenos (GOTTLIEB, 1972; BATISTA, YOSHIDA, GARCEZ, GARCEZ, 2015; FILHO, FERNANDES, ASSIS, 2015; WANG et al., 2020).

Diversos estudos mostraram que algumas espécies da família Lauraceae exibiram uma vasta gama de atividades biológicas, como atividades antiespasmódica, antipirética, antitumoral, anticonvulsivante, antibacteriana, fungicida, citotóxica e inibitória da cruzaína e antiviral (FILHO, FERNANDES, ASSIS, 2015). Além disso, as espécies de Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies são utilizadas na culinária, na marcenaria, na construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria, na indústria química e medicina popular, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais, que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas. Por exemplo, *Ocotea porosa* e *Ocotea odorifera* são utilizadas na fabricação de diversos produtos com grande valor econômico na indústria de alimentos e madeira. O óleo essencial rico em linalool encontrados na espécie *Aniba rosaeodor*, é usado como perfume e possui alto valor econômico no mercado internacional (CUSTÓDIO, JUNIOR, 2014; JO et al., 2019).

Estudos envolvendo o gênero *Beilschmiedia* Nees da família Lauraceae, mostrou que este gênero produz alcaloides, derivados do ácido endiandríco, ácidos graxos, lignanas, epoxifuranoides, flavanoides e terpenoides, onde muitos destes compostos apresentam atividades antioxidantes, antibacterianas, antimaláricas e antituberculose (CHEN et al., 2007; CHOUNA et al., 2010). Comumente, algumas espécies deste gênero são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças. Como por exemplo a *Beilschmiedia anacardioides*, que é usada no continente africano, mais especificamente em Camarões, no tratamento de tumores uterinos, rubéola, reumatismos, infecções de origem bacteriana e fúngica (PÉPIN, 2012). No caso da *Beilschmiedia madang*, encontrada na Malásia e Indonésia, foi isolado um alcaloide o qual apresentou atividade antimalárica (KITAGAWA et al., 1993). Estudos recentes mostraram as composições químicas e atividades biológicas provindas dos óleos das folhas e cascas da *B. madang*. O óleo obtido das cascas apresentou atividades antioxidante, usando os sistemas ácido β -caroteno/ácido linoléico e o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e forte propriedade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. O óleo obtido a partir das folhas, também apresentou inibição significativa das atividades de acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e antitirosinase (SALLEH, FAREDAH, KHONG, 2015).

A *Persea americana*, popularmente conhecida como abacate, é uma árvore frutífera nativa tropical, originária da América. O abacate é um alimento popular e uma boa fonte de potássio, vitamina D, ácidos graxos, vitaminas, carotenoides e outros fitoquímicos. Os frutos,

folhas e sementes são usados para formular remédios. Por exemplo, para reduzir os níveis de colesterol e aumentar o desejo sexual, além de despertar o fluxo menstrual. Além disso, os óleos de abacate são usados para tratar a osteoartrite e podem ser usados como um suplemento dietético alternativo. Os abacates são fontes de gorduras monoinsaturadas saudáveis e têm níveis naturalmente baixos de açúcar e sódio, sendo uma importante fonte alimentar do grupo da vitamina B. De modo geral, o abacate pode ajudar a controlar o colesterol alto, baixos níveis de LDL, controle de peso, saúde ocular, diminuir o nível de glicose no sangue e ser usado no tratamento da DM tipo 2 (HASAN et al., 2016).

As cascas de *Cinnamomum zeylanicum*, popularmente conhecida como canela, é uma árvore nativa do Sri Lanka e do sul da Índia. A casca é removida e seca para formar lascas ou moída para fazer pó. Milhares de toneladas são produzidas anualmente, principalmente do Sri Lanka, Madagascar e Seychelles. As atividades biológicas dos seus principais compostos, tais como cinamaldeído, acetato de cinamila, eugenol, linalol e cânfora, entre outros, permitem a sua aplicação na indústria alimentar como antioxidante, bactericida, antifúngico e intensificador de sabor e aroma. Além de seus usos culinários e na medicina popular, a canela é considerada um remédio para doenças respiratórias, digestivas e ginecológicas (RANASINGHE et al., 2013; CARDOSO-UGARTE, LÓPEZ-MALO, SOSA-MORALES, 2016; DORRI, HASHEMITABAR, HOSSEINZADEH, 2018).

A cânfora é derivada de *Cinnamomum camphora*, originária da China, Taiwan e Japão. A cânfora é obtida por destilação a vapor de aparas de madeira. O óleo pode ser redestilado para produzir outros compostos, como o safrol, que é usado em perfumes e aromatizantes. Além disso, existem muitas aplicações farmacêuticas para a cânfora, como analgésico tópico, antisséptico, antiespasmódico, anti-inflamatório, anti-infeccioso, contraceptivo, expectorante leve, descongestionante nasal, supressor de tosse, etc. (HAMIDPOUR, HAMIDPOUR, HAMIDPOUR, SHAHLARI, 2013). Na Tabela 2 estão descritas algumas espécies de Lauraceae e seus respectivos usos medicinais.

Tabela 2 – Espécies de Lauraceae e seu o uso na medicina popular. (continua)

Espécies de Lauraceae	Uso na medicina popular	Referência
	Tratamento de feridas causadas por	
<i>Acacia edgeworthii</i>	vermes que penetram na pele e impotência sexual.	SAMUELSSON et al., 1992.
<i>Acroclidium elaeophorum</i>	Dermatoses ou parasitoses do couro cabeludo.	FENNER, BETTI, MENTZ, RATES, 2006.
<i>Aniba canelilla</i>	Ação antiespasmódica e estimulante digestivo.	FILHO, FERNANDES, ASSIS, 2015.
<i>Aniba puchuryminor</i>	Leucorreia.	FENNER, BETTI, MENTZ, RATES, 2006.
<i>Aniba riparia</i>	Antibacteriano.	MARQUES, 2001.
<i>Cassytha filiformis</i>	Vermicida, conjuntivite, gonorreia, diurético, malária, ancilostomíase, queimaduras de terceiro grau.	SAMUELSSON et al., 1992; FILHO, FERNANDES, ASSIS, 2015.
<i>Lawsonia inermis</i>	Abortivo, dismenorreia, icterícia, dor de cabeça, doenças pós-parto e hepatite.	SAMUELSSON et al., 1992.
<i>Licaria puchurymajor</i>	Leucorreia.	FENNER, BETTI, MENTZ, RATES, 2006.
<i>Mespilodaphne pretiosa</i>	Debilidade do sistema nervoso, diminuição de memória, edema dos pés por causa de resfriamento, catarro crônico, hidropisia, gota, sífilis.	OLIVEIRA, 1854.
<i>Nectandra pichurin</i>	Cólicas e problemas gástricos.	MARQUES, 2001.
<i>Nectandra rodiaei</i>	Anticéptico e tônico.	MARQUES, 2001.
<i>Ocotea aciphylla</i>	Antirreumático e depurativo.	ALMEIDA et al., 2018.
<i>Ocotea quixos</i>	Desinfetante, anestésico local e antidiarreico.	BALLABENI et al., 2007.
<i>Ocotea lancifolia</i>	Antiparasitário.	FOURNET et al., 2007.

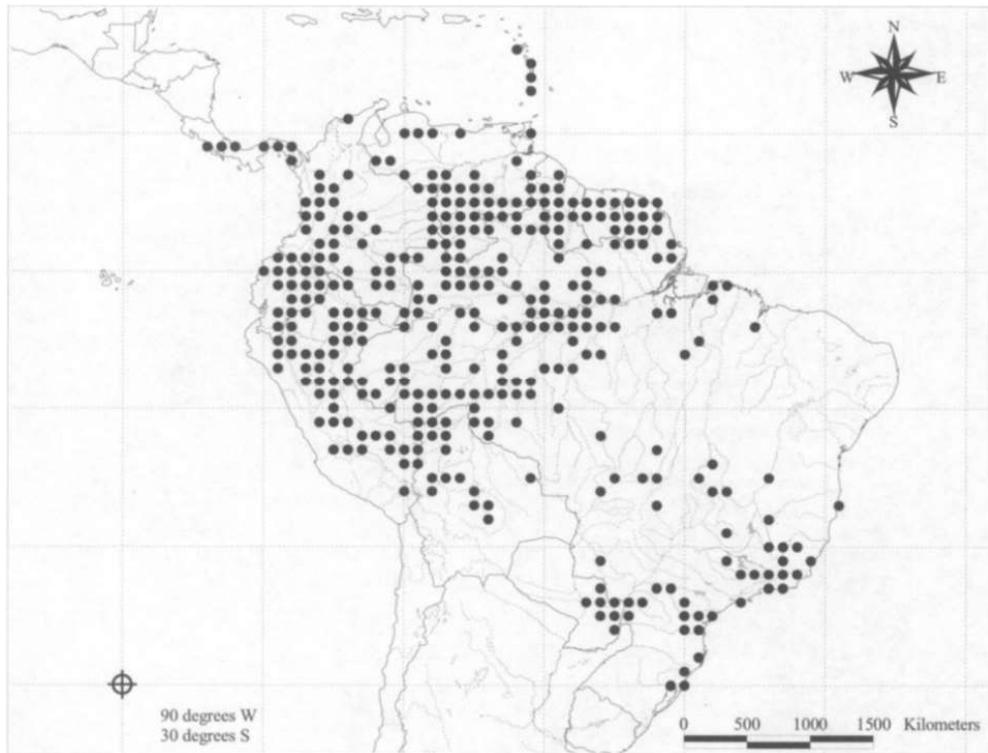
Tabela 2 – Espécies de Lauraceae e seu o uso na medicina popular. (conclusão)

Espécies de Lauraceae	Uso na medicina popular	Referência
<i>Persea americana</i>	Colesterol alto, baixo nível de LDL, controle de peso, saúde ocular, diminui o nível de glicose no sangue, diabetes tipo 2.	HASAN et al., 2016.
<i>Persea cordata</i>	Antibacteriano.	MARQUES, 2001.
<i>Persea gratissima</i>	Ação antitumoral.	MARQUES, 2001.
<i>Psoralea corylifolia</i>	Tratamento de furúnculo, sarna na cabeça, salivação abundante em animais, sangramento ao redor dos dentes (em humanos), feridas, rigidez de membros na epilepsia e perda de memória.	SAMUELSSON et al., 1992.

Dentre os vários gêneros da família das lauráceas, *Endlicheria* é um gênero neotropical centrado na América do Sul, encontrado desde a Costa Rica na América Central, Guadalupe nas ilhas do Caribe até o extremo sul nas florestas costeiras do Atlântico Sudeste do Brasil (Figura 23). Este gênero é composto por aproximadamente 60 espécies, sendo a maioria constituída por árvores de tamanho médio, às vezes até 40 metros de altura, mas algumas espécies são arbustos (CHANDERBALI, 2004).

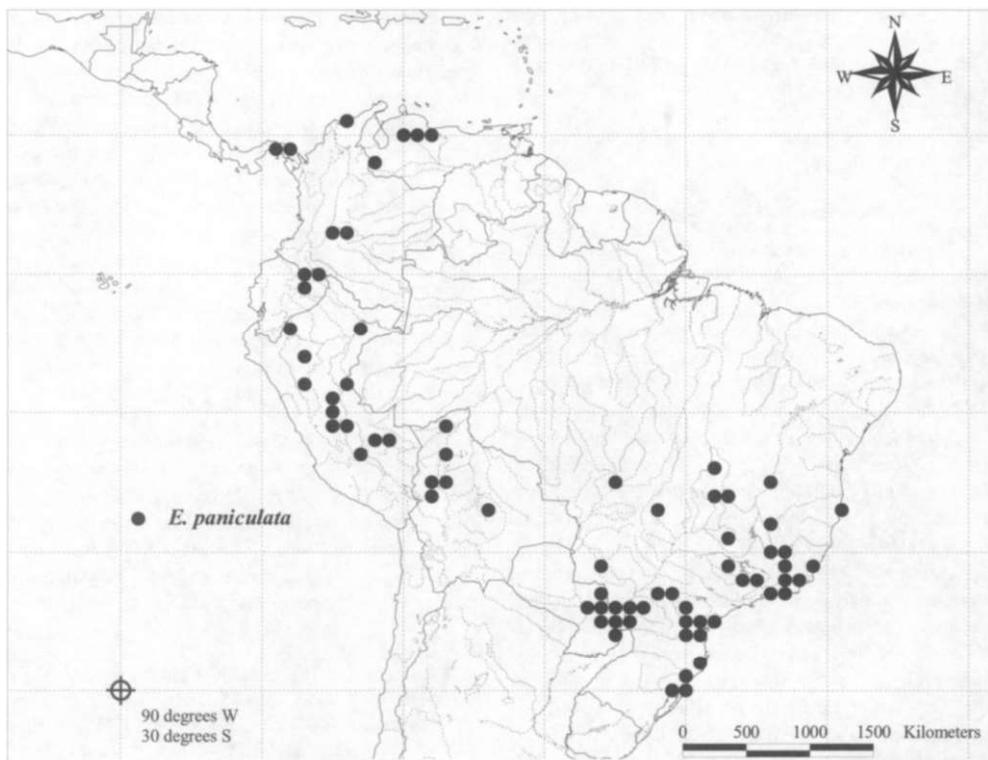
As espécies de *Endlicheria* ocorrem em habitats de floresta úmida em elevações em torno do nível do mar até 2500 m nas terras altas dos Andes e das Guianas. As limitações impostas pela baixa disponibilidade hídrica são evidentes na ausência de *Endlicheria* na vegetação de caatinga do leste do Brasil e da região do Chaco no sul da América do Sul. A diversidade de espécies é maior no sopé dos Andes orientais, onde as terras baixas e os elementos montanhosos inferiores se misturam. A Amazônia Central e as Guianas não são tão ricas em diversidade, e nas florestas costeiras atlânticas do sudeste do Brasil, apenas duas espécies são encontradas, a *E. glomerata* e *E. paniculata*. A *E. paniculata* é umas das espécies mais abundantes do gênero e sua distribuição no continente é quase igual à distribuição do gênero (faltando apenas no nordeste da América do Sul e nas ilhas do Caribe), mas todas as outras espécies são encontradas em poucos lugares (CHANDERBALI, 2004).

Figura 23 – Distribuição geográfica do gênero *Endlicheria*.



Fonte: CHANDERBALI, 2004.

Figura 24 – Distribuição geográfica de *E. paniculata*.



Fonte: CHANDERBALI, 2004.

Na literatura existem poucos estudos sobre a composição química e atividades biológicas das espécies de *Endlicheria* (SILVA, DA TRINDADE, MAIA, SETZER, 2016). JIN, LEE, KWON, KIM, 2013 relataram as atividades anti-oxidativa, anti-inflamatórias e antimelanogênicas do extrato metanólico da *Endlicheria anomala*, e os resultados foram promissores para todas estas atividades. Em um outro estudo com esta mesma espécie, os autores prepararam os extratos aquosos e etanólicos de doze espécies de diferentes gêneros e famílias. Os resultados das atividades antidiabética e antirradicalar apresentados pela espécie *E. anomala* em todos os testes foram piores do que os dos controles positivos utilizados (RODRÍGUEZ e colaboradores, 2008).

Ma, Kozlowski, Mclaughlin (1991) relataram o isolamento e identificação de quatro neolignanas presentes no extrato etanólico da espécie *Endlicheria dysodantha*. Neste estudo, todas as quatro neolignanas mostraram atividades no teste de letalidade de artêmia; três delas também inibiram o crescimento de tumores de galha em discos de batata e foram citotóxicos para células tumorais humanas em cultura.

No estudo realizado por Yamaguchi e colaboradores (2013) foram avaliadas as atividades hemolítica e citotóxica dos óleos essenciais obtidos das folhas e galhos de *Endlicheria citriodora*. Neste estudo, o óleo essencial dos galhos apresentou uma boa inibição da enzima tirosinase e foi observado baixa citotoxicidade dos óleos essenciais das folhas e galhos em todas as linhagens celulares estudadas (NHI3T3 - linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongo, B16F10 - linhagem celular de melanoma murino e ACP02 - adenocarcinoma gástrico humano). Além disso, o óleo essencial dos galhos apresentou capacidade antioxidante frente ao radical livre DPPH. A Tabela 3 apresenta alguns dos testes de atividades encontradas na literatura para os extratos das folhas, galhos e óleos essenciais das folhas de espécies de *Endlicheria*.

No que concerne a fitoquímica do gênero *Endlicheria*, foi descrita a ocorrência de diterpenos, esteroides, lignanas, neolignanas, alcaloides, além de diversos derivados fenólicos (SUAREZ, BONILLA, DE DIAZ, ACHENBACH, 1983; MA, KOZLOWSKI, MCLAUGHLIN, 1991; YAMAGUCHI et al., 2013). A Tabela 4 apresenta alguns compostos isolados dos extratos das folhas, galhos e de óleos essenciais das folhas de espécies de *Endlicheria*.

Tabela 3 – Espécies de *Endlicheria* e as respectivas atividades biológicas investigadas dos extratos e/ou compostos isolados.

Espécie de <i>Endlicheria</i>	Atividade biológica	Referência
<i>E. anomala</i>	Atividades anti-oxidativa, anti-inflamatórias, antimelanogênicas, antidiabética e antirradicalar	RODRÍGUEZ et al., 2008; JIN, LEE, KWON, KIM, 2013.
<i>E. arenosa</i>	Atividades antioxidantes e antimicrobianas	SILVA, DA TRINDADE, MAIA, SETZER, 2016.
<i>E. bracteolata</i>	Atividade antileishmania	ROTTINI et al., 2019.
<i>E. citriodora</i>	Atividade hemolítica, inibição da enzima tirosinase e citotoxicidade	YAMAGUCHI et al., 2013.
<i>E. dysodantha</i>	Atividades de letalidade de artêmia, inibição do crescimento de tumores e citotoxicidade para células tumorais	MA, KOZLOWSKI, MCLAUGHLIN, 1991.
<i>E. paniculata</i>	Atividades antifúngica, danos ao DNA, anticolinesterásica e anti-inflamatória	LOPES et al., 2008; SOUZA et al., 2020.

Tabela 4 – Compostos isolados das folhas, galhos e/ou raízes de espécies de *Endlicheria*.
(continua)

Espécie de <i>Endlicheria</i>	Compostos isolados	Referência
<i>E. oreocola</i>	Óxido de cariofileno; 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno; 4(15)-eudesmene-1b,6a-diol; <i>O</i> -metilmoschatolina; ácido palmítico; β -sitosterol; 22,23-desidrobrassicasterol; estigmasterol	ALBARRACIN, DELGADO, CUCA, ÁVILA, 2017.
<i>E. citriodora</i>	Linalol; geranato de metila; ácido gerânico; β -cariofileno	YAMAGUCHI et al., 2013.

Tabela 4 – Compostos isolados das folhas, galhos e/ou raízes de espécies de *Endlicheria*.
(conclusão)

Espécie de <i>Endlicheria</i>	Compostos isolados	Referência
<i>E. arenosa</i>	α -pineno; β -pineno; mirceno; α -terpineno; <i>p</i> -cimeno; limoneno; γ -terpineol; terpinoleno; linalool; terpinen-4-ol; α -terpineol; δ -elemeno; α -copaeno; β -cubebeno; β -elemeno; β -cariofileno; 2,5-dimetoxi- <i>p</i> -cymeno; α -umuleno; trans-cadina-1(6),4-dieno; germacreno D; cloveno; tridecan-2-ono; biciclogermacreno; α -muuroleno; β -bisaboleno; γ -cadineno; 7-epi- α -selineno; δ -cadineno, α -calacoreno; 1-epicubenol; murola-4,10(14)-dien-1- β -ol; epi- α -cadinol (τ -cadinol); epi- α -murolol (τ -murolol); α -murolol (torreiol); cubenol; α -cadinol; selin-11-en-4 α -ol; germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	SILVA, DA TRINDADE, MAIA, SETZER, 2016.
<i>E. dysodantha</i>	Disodantina A; disodantina B; acetato de megafone; [(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i>)-3 <i>a</i> -alil-metoxi-2-(3-metoxi-4,5-metilenodioxifenil)-3-metil-2,3,3 <i>a</i> ,6-tetrahidro-6-oxobenzofurano]	MA, KOZLOWSKI, MCLAUGHLIN, 1991.
<i>E. bracteolata</i>	γ -eudesmol; α -eudesmol; α -cadinol; bulnesol, α -tujeno; α -pineno; β -pineno; mirceno; α -felandreno; <i>p</i> -cimeno; limoneno; α -copaeno; β -elemeno; (<i>E</i>)-cariofileno; β -gurjuneno; γ -elemeno; α -guaieno; aromadendreno; α -bulneseno; δ -cadineno; selina-3,7(11)-dieno; rosifoliol; elemol; occidentalol; germacreno B; guaiol; 10-epi- γ -eudesmol	ROTTINI et al., 2019.

Dentre as várias espécies do gênero *Endlicheria*, a espécie *Endlicheria paniculata* (Figura 25) foi escolhida para ser estudada neste trabalho, sendo que a mesma possui 19 sinônimos encontrados na literatura (Tabela 5). Popularmente é conhecida como canela frade e canela garuva, é nativa no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, que possuem climas tropical

úmido e invernos mais rigorosos, sujeitos a geadas. Também é encontrada na Mata Atlântica e na Floresta amazônica e em boa parte da América tropical, em restinga, mata ciliar, cerrado e manguezal (Figura 26). *E. paniculata* é uma árvore coberta de folhas podendo atingir de 5-7 m de altura com tronco robusto. As folhas possuem forma peninervadas elíptica com tamanho de 8,5–27 × 3,5–8 cm. Os frutos possuem coloração externa arroxeada, tamanho de 18 × 10 mm, elípticos, parcialmente envolvido pela cúpula de 8 × 6 mm (CHANDERBALI, 2004; ELTINK, TORRES, RAMOS, 2008; BROTTTO, SANTOS, BAITELLO, 2009; GIEHL, 2020).

Figura 25 – *Endlicheria paniculata*.



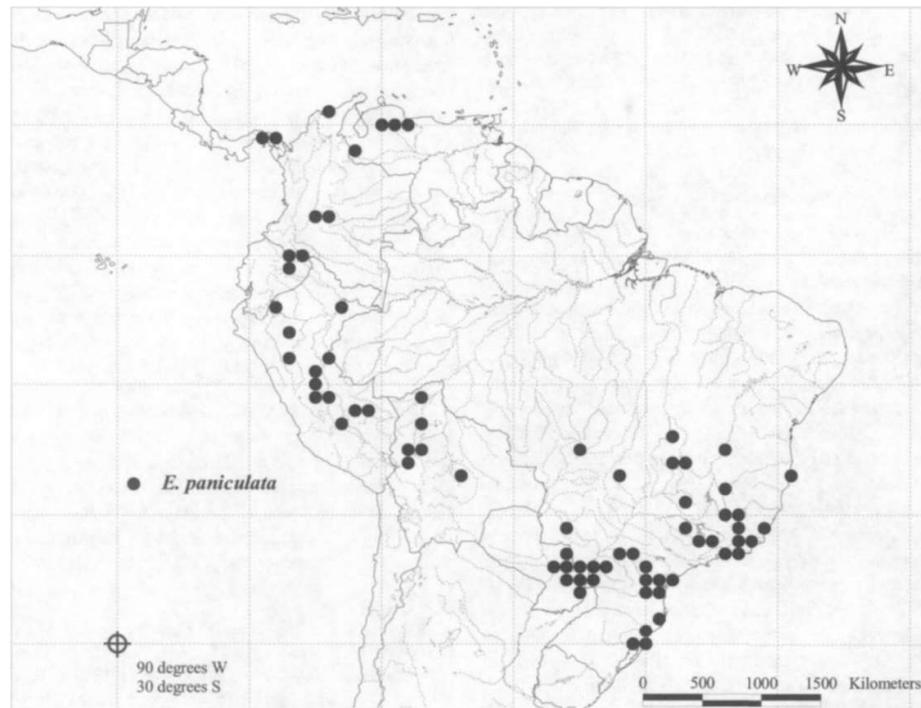
Fonte: GIEHL, 2020.

Tabela 5 – Sinônimos de *E. paniculata* encontrados na literatura.

<i>Aniba hirsuta</i> (Schott) Pax ex Sampaio	<i>Goeppertia cantagallana</i> Meisn
<i>Citrosma dimidiata</i> Sello ex A. DC.	<i>Goeppertia hirsuta</i> (Schott) Nees
<i>Citrosma paniculata</i> Spreng	<i>Goeppertia hirsuta</i> var. <i>hirsutior</i> Meisn
<i>Cryptocarya hirsuta</i> Schott	<i>Goeppertia longifolia</i> Nees
<i>Endlicheria boliviensis</i> Kosterm	<i>Goeppertia panicularis</i> Nees
<i>Endlicheria hirsuta</i> (Schott) Nees	<i>Nectandra lucida</i> (Schott) Nees
<i>Endlicheria longifolia</i> Mez	<i>Ocotea lucida</i> Mart. ex Nees
<i>Endlicheria panicularis</i> (Nees) Mez	<i>Ocotea turbacensis</i> Poepp. ex Nees
<i>Endlicheria poeppigii</i> Kosterm	<i>Siparuna paniculata</i> (Spreng.) A. DC.
<i>Endlicheria racemosa</i> Lasser	

Fonte: HASSLER, 2020.

Figura 26 – Distribuição geográfica da espécie *E. paniculata*.



Fonte: CHANDERBALI, 2004.

Em relação aos estudos químicos e biológicos de *E. paniculata*, consta na literatura um estudo realizado por Lopes e colaboradores (2008), em que foi avaliada a atividade antifúngica com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*, a atividade da acetilcolinesterase e ensaio de danos ao DNA do extrato etanólico das folhas e galhos. Todos os resultados foram negativos para essas atividades, com exceção a atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum*, que só foi observada nos galhos. Com relação a atividade da acetilcolinesterase, foi relatado um efeito inibitório de 37% e 41% para as folhas e galhos, respectivamente.

Neste sentido, torna-se importante os estudos químicos das folhas e galhos de *E. paniculata*, uma vez que não existem estudos da sua composição química na literatura e poucas espécies do gênero foram estudadas. Além disso, o gênero também é muito promissor devido as diversas classes de compostos que já foram isoladas e identificadas em espécies de *Endlicheria*.

O arsenal terapêutico atual para o tratamento de várias doenças, como diabetes e patologias inflamatórias, é bem limitado e em muitos casos, longe do satisfatório devido à elevada toxicidade. Desta forma, é importante a busca por novos compostos que possam ser utilizados na terapêutica dessas doenças, sendo que estes podem ser obtidos através de extratos e/ou compostos isolados das plantas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo

realizar a identificação dos constituintes químicos dos extratos hexânico e metanólico das folhas (EHF e EMF) e galhos (EHG e EMG) da *E. paniculata*, bem como explorar potenciais atividades dos extratos e de compostos isolados dos mesmos, tais como testes de atividade anti-inflamatória (realizadas *in vivo*, em camundongos da linhagem C57), análises de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e avaliação dos teores de fenóis, flavonoides e proantocianidinas, além de ensaios de inibições da α -glicosidase, glicação e lipase pancreática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico dos extratos obtidos da extração em hexano e metanol das folhas e galhos da espécie *Endlicheria paniculata* (Lauraceae) e avaliar as atividades anti-inflamatória, antioxidante, inibição enzimática e antiglicação dos extratos e compostos isolados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os extratos em hexano e metanol das folhas (EHF e EMF, respectivamente) e galhos (EHG e EMG, respectivamente) da planta;
- Identificar a composição química dos EHF e EHG;
- Fracionar por cromatografia os EHF, EMF, EHG e EMG;
- Isolar e purificar compostos químicos presentes nos EHF, EMF, EHG e EMG;
- Determinar a estrutura dos compostos isolados;
- Avaliar os teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas dos EHF, EMF, EHG e EMG;
- Avaliar a atividade antioxidante dos EHF, EMF, EHG e EMG;
- Avaliar a atividade inibitória das enzimas α -glicosidase e lipase pancreática;
- Avaliar a atividade inibitória dos produtos de glicação;
- Realizar estudos de docking molecular, bem como analisar as interações intermoleculares formadas e avaliar as energias de interações de compostos isolados com as enzimas Cox-1 e Cox-2;

- Avaliar a atividade anti-inflamatória (*in vivo*) em camundongos da linhagem C57 dos EHF e EHG e compostos isolados;
- Analisar *in silico* os parâmetros farmacocinéticos dos compostos isolados.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550;
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600;
- Evaporador rotatório IKA modelo RV 10;
- Lavadora ultrassônica modelo USC-750 Unique;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu[®], modelo LC-6AD, composto por: bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5R, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, autoinjeter SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD – Detector de espalhamento de luz evaporativo) LT II;
 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend[™] 400 Avance III HD (9,4 Tesla);
 - Cromatógrafo a gás Shimadzu 210 plus acoplado a espectrômetro de massas (GC-EM) Shimadzu QP 210 SE;
 - Espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis) modelo Genesys 10S.

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes utilizados foram de grau PA (para análise). Os solventes utilizados para a extração, prospecção fitoquímica e cromatografia: hexano, acetato de etila, diclorometano, metanol, ácidos acético e fórmico foram de marcas diversas: Synth, Vetec, Merck, Neon. Hexano e acetato de etila foram destilados para maior grau de pureza. Os reagentes *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glicosaminidase, Sirius Red e os solventes deuterado como dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio deuterado (CDCl₃) foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co.

Sílica gel 60 e sílica gel 60 *flash* para cromatografia foram adquiridos da Fluka Analytica. Esponjas de poliéter-poliuretano foram adquiridas da Vitafoam. O reagente Drabkin foi adquirido da Labtest. O reagente Triton X-100 foi adquirido da Promega. O padrão de gelatina foi adquirido da Merck. Metanol CLAE foi da Sigma Aldrich e J. T. Baker.

4.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

4.3.1 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

A triagem fitoquímica qualitativa com os extratos e frações de *E. paniculata* foi realizada por CCD utilizando cromatoplasmas comerciais de sílica gel 60 (Macherey-Nagel), com 0,20 mm de espessura e indicador de fluorescência (UV 254 nm). As cromatoplasmas foram reveladas por irradiação ultravioleta (254 ou 365 nm) e reveladores químicos NP/PEG, AlCl₃, iodocloro platinado, iodo sublimado, Dragendorff, Liebermann-Burchard, vanilina sulfúrica e sulfato cérico.

4.3.2 *Cromatografia em coluna (CC)*

Os fracionamentos cromatográficos dos extratos e frações foram realizados utilizando como fases estacionárias sílica gel 60, 63–200 µm com diâmetro de poro 60 Å (Fluka Analytica) para cromatografia comum e sílica gel 60, 40–63 µm com diâmetro de poro 60 Å (Fluka Analytica) para cromatografia *flash*.

4.3.3 *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizadas utilizando cromatógrafo à líquido de alta eficiência Shimadzu[®], modelo LC-6AD, utilizando o software LC Solutions.

Para as análises por CLAE foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex[®], 250 × 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi MeOH e água milli-Q, com um fluxo de 1 mL min⁻¹. O sistema gradiente de fase móvel utilizado foi: 30–100% MeOH (0–40 min), 100% MeOH (45 min), 100–30% MeOH (50 min).

Os extratos foram submetidos a análises por CLAE para obtenção do perfil cromatográfico e futuras comparações com as frações obtidas do fracionamento

cromatográfico. Os extratos foram solubilizados em MeOH em uma concentração de 2 mg mL^{-1} e em seguida filtradas com filtros para seringa PTFE hidrofóbico (diâmetro do filtro 13 mm, diâmetro do poro $0,22 \text{ }\mu\text{m}$) para a remoção de material particulado. As soluções dos EHF e EHG foram eluídas em um cartucho Sep-Pak de sílica C18 (Waters Corporation – USA, 360 mg, 55–105 μm , 125 Å), para separação de compostos muito apolares que possam ficar retidos na coluna. Foram injetados 50 μL das amostras. Os compostos **1** e **2** também foram submetidos a análise por CLAE seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.3.4 Cromatografia gasosa

Os EHF, EHG e as frações EHGC3F2, EHGC4F4, EHGC4F1, EMFC2F3 e EFHC1F1 obtidas dos fracionamentos foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG–EM) para a identificação de seus constituintes químicos. As análises foram realizadas em equipamento CG–EM equipado com coluna capilar OV-5 (5% de difenil, 95% de dimetilpolisiloxano), serial 121345 com diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme de $0,25 \text{ }\mu\text{m}$ e comprimento de 30 m. Foi usado gás hélio como carreador a fluxo constante de $1,02 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura do injetor de $246 \text{ }^\circ\text{C}$ (modo Split 1:20 para as frações e 1:5 para os extratos em hexano), temperatura do detector de $220 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura inicial em $60 \text{ }^\circ\text{C}$, crescente a cada minuto em $3 \text{ }^\circ\text{C}$ até $246 \text{ }^\circ\text{C}$, mantendo-se nessa temperatura por 38 min. O tempo total de análise foi de 100 min (ADAMS, 2007). O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de razão massa/carga (m/z) de 40 a 650. Os extratos foram solubilizados em metanol, filtrados em cartucho Sep-Pak de sílica C18. A solução remanescente foi evaporada e ressolubilizada com diclorometano a uma concentração de 5 mg mL^{-1} . As frações foram dissolvidas com diclorometano a uma concentração de 2 mg mL^{-1} . De cada solução dos extratos e frações foi retirado 1 μL , a qual foi injetado no CG–EM.

Os espectros de massas foram analisados pelo índice de similaridade resultante da comparação entre os espectros de massas mostrados pelas bibliotecas do software (NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, SHIMATSU e WILEY) e o espectro de massas do composto analisado. Nessa análise, para a identificação dos compostos foi considerado apenas aqueles índices de similaridade com valores superiores à 85%.

Em seguida, foi realizado o cálculo do índice aritmético (IA) (VANDENDOOL, KRATZ, 1963), que correlaciona o tempo de retenção (t_r) dos compostos analisados aos de alcanos. Este cálculo é feito por meio da Equação 1, onde são considerados os tempos de

retenção do alcano anterior ($T_R(P_z)$) e posterior ($T_R(P_{z+1})$) ao t_R dos compostos analisados ($T_R(x)$) e o número de carbonos do alcano ($C(P_z)$) com t_R anterior ao analisado.

$$IA = 100C(P_z) + 100 \left[\frac{T_R(x) - T_R(P_z)}{T_R(P_z + 1) - T_R(P_z)} \right] \quad \text{Equação 1}$$

O IA foi calculado utilizando o t_R do composto analisado e dos padrões de alcanos (C8–C30) previamente injetados utilizando a metodologia descrita no início da secção 4.3.4. O IA calculado é comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007). Além disso, o IA calculado também foi comparado com a NIST – Livro de Química na Web (LINSTROM, MALLARD, 2021), nas mesmas condições descrita no início da secção 4.3.4.

4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

A primeira parte do trabalho consistiu em coletar as folhas e galhos de *E. paniculata*. A coleta foi realizada pelo botânico Prof. Euder G. A. Martins, no parque ecológico do Pereque na cidade de Cubatão em SP, Brasil, em novembro de 2014, nas coordenadas 23°51'0,07”S e 46°25'0,02”W e depositado no Herbário SPF (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo) (MELLO-SILVA et al., 2020) com números (EM 335 e EM 355). Esta planta foi registrada no Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e em Conhecimento Tradicional Associado à Pesquisa (SisGen) do Brasil, com o código AD99BA0.

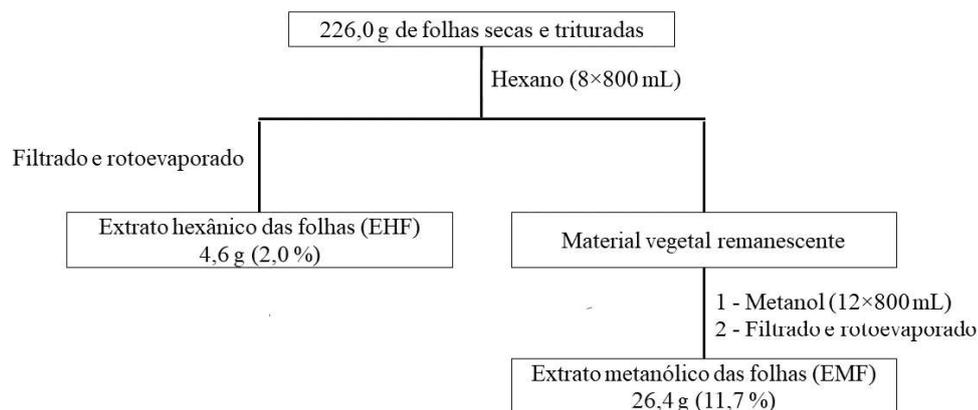
As folhas (226 g) e galhos (116 g) coletados foram secos a temperatura de 35–40 °C em estufa e a umidade foi constantemente monitorada até se encontrar entre 8–14%. A umidade do material vegetal foi determinada pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de 105 ± 5 °C, até que o teor de umidade permanecesse constante. Na sequência, o material vegetal seco foi triturado para o preparo dos extratos.

4.5 PREPARO DOS EXTRATOS

As folhas foram secas em estufa e reduzidas a pó através de moinho de facas, sendo obtidos 226,0 g de material vegetal. Em seguida, os extratos brutos foram preparados, submetendo o pó previamente obtido à extração por maceração em hexano (8×800 mL). A solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em um evaporador rotatório sob

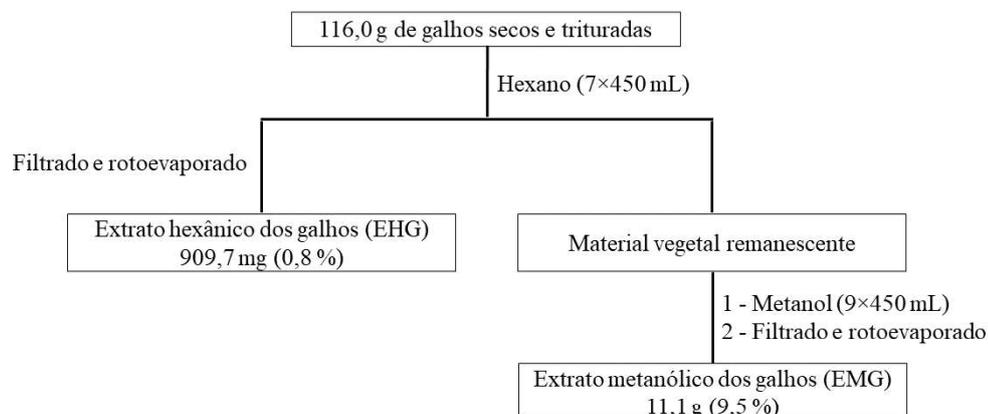
pressão reduzida a 40 °C. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido 8 vezes. O sólido restante foi submetido à extração por maceração em MeOH (12×800 mL), e ao final deste procedimento o solvente do extrato foi evaporado no evaporador rotatório a pressão reduzida a 40 °C. Após a remoção dos solventes, os extratos foram congelados e liofilizados para remoção de água. Por fim, os extratos foram armazenados em frascos de vidro a -18 ± 5 °C. Ao final do procedimento descrito acima, foi obtido 4,6 g de extrato hexânico (EHF) e 26,4 g de extrato metanólico (EMF). Para obtenção dos extratos dos galhos (EHG e EMG, respectivamente), foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima partindo de 116,0 g de material vegetal seco que foi submetido a extração com hexano (7×450 mL) e metanol (9×450 mL). Assim, foram obtidos 909,7 mg de extrato hexânico (EHG) e 11,1 g de extrato metanólico (EMG). Os fluxogramas nas Figura 27 e Figura 28 ilustram os procedimentos da preparação dos extratos.

Figura 27 – Procedimento de preparação dos extratos das folhas.



Fonte: o autor.

Figura 28 – Procedimento de preparação dos extratos dos galhos.



Fonte: o autor.

4.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para a análise das classes de compostos químicos presentes nos extratos e frações, foram preparadas soluções dos extratos em uma mistura de diclorometano/metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . As soluções foram aplicadas em cromatoplasmas de CCD utilizando um tubo capilar e desenvolvidas utilizando como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etila (9:1) para os extratos em hexano e diclorometano/metanol/ácido fórmico (8:1:0,25) para os extratos em metanol. Em seguida as cromatoplasmas foram visualizadas sob radiação ultravioleta (254 nm e 365 nm) e reveladas utilizando reagentes químicos como anisaldeído sulfúrico, Liebermann-Burchard, sulfato cérico, vanilina sulfúrica, dragendorff, iodocloroplatinado, iodo sublimado, NP/PEG e cloreto de alumínio.

Abaixo estão descritas as metodologias, de acordo com Wagner e Bladt (1996), para o preparo dos reveladores utilizados nas análises de prospecção fitoquímica.

a) Detecção de terpenos, esteroides, fenóis e açúcares

- Anisaldeído sulfúrico: solução contendo anisaldeído 5% ($v v^{-1}$) em ácido acético glacial. A esta solução foi adicionado 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. A cromatoplasma foi borrifada com o revelador e aquecida a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 a 10 min. Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

b) Detecção de terpenos e esteroides

- Liebermann-Burchard: 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A cromatoplasma foi pulverizada com a solução e aquecida a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 a 10 min. A cromatoplasma foi observada em câmara com luz UV (365 nm). Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

- Sulfato cérico: 2,1 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em 15 mL de H_2SO_4 concentrado e adicionado a 800 mL de água (CHAVES, 1997). A cromatoplasma CCD foi borrifada com a solução e aquecida a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 a 10 min. Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

c) Detecção de terpenos, taninos, flavonoides e saponinas

- Vanilina sulfúrica: 15 g de vanilina são dissolvidas em 250 mL de etanol. Em seguida são adicionados lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A cromatoplaça CCD foi borrifada com a solução e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

d) Detecção de alcaloides

- Dragendorf. Solução A: a 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial foram adicionados 40,0 mL de água destilada sob aquecimento. Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. Foi preparada uma solução estoque misturando a solução A e B (1:1). A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução estoque; 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada com a solução reveladora e observada a coloração alaranjada na presença de alcaloides.

- Iodocloroplatinado. Solução A: ácido hexacloroplatínico (IV) 5% em água ($m v^{-1}$). Solução B: iodeto de potássio 10% em água ($m v^{-1}$). A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução A, 9,0 mL da solução B e 10,0 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada com a solução reveladora e observada a coloração marrom na presença de alcaloides.

- Iodo sublimado: a cromatoplaça foi colocada em uma cuba saturada com iodo e observada a coloração marrom na presença de alcaloides.

e) Detecção de flavonoides

- NP/PEG. Solução A: difenilboriloxietilamina (NP) 1% ($m v^{-1}$) em metanol. Solução B: polietileno glicol-4000 (PEG4000) 5% ($m v^{-1}$) em etanol. A solução reveladora foi preparada com 10,0 mL da solução A e 8 mL da solução B. Após a borrifação, a cromatoplaça CCD foi observada em câmara de luz UV (365 nm). Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

- Cloreto de alumínio: AlCl_3 1% (m v^{-1}) em metanol. A cromatoplaça CCD foi borrifada com o revelador e observada em luz visível. Os compostos revelados apresentaram diversas colorações.

4.7 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA

O extrato hexânico dos galhos (EHG) (400 mg) foi submetido à CC utilizando sílica gel 60 (50,0 g de sílica, altura de 33,0 cm, diâmetro de 1,8 cm). A coluna foi eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/acetato de etila (AcOEt) 9:1 seguido de 7:1, 5:1, 3:1, 1:1 até 100% de AcOEt e de forma semelhante com AcOEt/MeOH, seguido de 100% de MeOH, o que resultou em 162 frações. Em cada uma das etapas foram utilizadas 100 mL da mistura de solventes. As frações foram monitoradas por CCD, utilizando sulfato cério como revelador e reunidas com base no perfil cromatográfico, o que resultou em 11 frações. A fração EHGC1F2 (76,1 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (25,0 g de sílica, altura de 30,0 cm, diâmetro de 1,5 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 4:1 (100 mL) seguido de 2:1 (90 mL), 1:2 (90 mL), 100% de AcOEt (50 mL), AcOEt/MeOH 3:2 (84 mL), 1:1 (70 mL), 2:3 (84 mL) e 100% de MeOH (80 mL), o que resultou em 145 frações, que foram reagrupadas em 3 frações. A fração EHGC2F2 (52,4 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (35,0 g de sílica, altura de 42,0 cm, diâmetro de 2,0 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em 100 % hexano (80 mL) seguido de hexano/AcOEt 6:0,25 (87 mL), 6:0,5 (85 mL), 6:0,75 (100 mL), 6:1 (83 mL) e 100% AcOEt (80 mL), o que resultou em 80 frações, que foram reagrupadas em 4 frações. A fração EHGC3F2 apresentou aspecto de um óleo amarelado (26,8 mg), que posteriormente foi identificada como o composto **(I)** (Figura 29). A fração EHGC1F5 (74,3 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (32,0 g de sílica, altura de 39,0 cm, diâmetro de 1,5 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 4:1 (500 mL) seguido de 3:1 (100 mL), 2:1 (75 mL), 1:1 (60 mL), 1:3 (135 mL), 100% de AcOEt (280 mL), AcOEt/MeOH 3:2 (84 mL), 1:1 (80 mL) e 100% de MeOH (80 mL), o que resultou em 69 frações, que foram reagrupadas em 4 frações, onde a fração EHGC4F1 apresentou aspecto de um pó esbranquiçado (6,2 mg), que posteriormente foi identificada como o composto **(III)** (Figura 29) e a fração

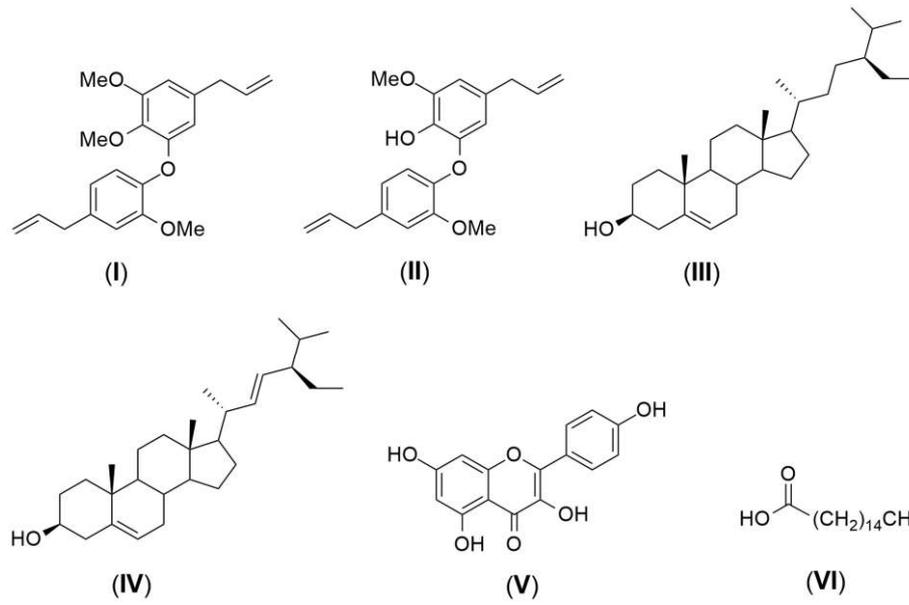
EHGC4F4 apresentou aspecto de um óleo amarelado (28,7 mg), que posteriormente foi identificada como o composto (II) (Figura 29). O fluxograma destas etapas está ilustrado na Figura 30.

O extrato hexânico das folhas (EHF) (3,6 g) foi submetido à CC utilizando sílica gel 60 (350,0 g de sílica, altura de 45,0 cm, diâmetro de 4,5 cm) e foi eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 9:1 seguido de 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, e de forma semelhante com AcOEt/MeOH, e 100% de MeOH, o que resultou em 126 frações. Em cada uma das etapas foram utilizadas 650 mL da mistura de solventes. As frações foram monitoradas por CCD utilizando sulfato cérico como revelador e reunidas com base no perfil cromatográfico, o que resultou em 11 frações. A fração EHFC1F2 (39,2 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (28,0 g de sílica, altura de 33,0 cm, diâmetro de 1,5 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 9:1 (150 mL) seguido de 8:1 (100 mL), 7:1 (90 mL) 6:1 (84 mL), o que resultou em 45 frações, que foram reagrupadas em 4 frações. A fração EHFC2F1 apresentou aspecto de um pó esbranquiçado (17,5 mg), que posteriormente foi identificada como o composto (IV) (Figura 29). A fração EHFC1F8 (170,3 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (32,0 g de sílica, altura de 21,0 cm, diâmetro de 2,0 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em CH₂Cl₂/AcOEt 1:0,5 (180 mL) seguido de 1:1 (90 mL) e 100% AcOEt (80 mL), o que resultou em 65 frações, que foram reagrupadas em 4 frações. Na fração EHFC3F3 (55 mg) foi identificada por CLAE a presença do composto II. O fluxograma destas etapas está ilustrado na Figura 31. A fração EHFC1F4 (884,3 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (50,0 g de sílica, altura de 34,0 cm, diâmetro de 1,8 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em 100% de hexano (100 mL) seguido de hexano/AcOEt 6:0,25 (245 mL), 6:0,5 (250 mL), 6:0,75 (250 mL), 6:1 (140 mL) 1:1 (120) e 100% de AcOEt (120 mL), o que resultou em 141 frações, que foram reagrupadas em 8 frações. A fração EHFC4F2 (465,8 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (32,0 g de sílica, altura de 21,0 cm, diâmetro de 2,0 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt/CH₂Cl₂ 6:1:0,5 (150 mL), 5:1:0,5 (260 mL), 4:1:0,5 110 mL), 3:1:0,5 (135 mL), 2:1:0,5 (125 mL), 1:1:0,5 (120 mL), AcOEt/CH₂Cl₂ 1:0,5 (100 mL), 1:1 (100 mL) e 100% de AcOEt (100 mL), o que resultou em 130 frações, que foram reagrupadas em 6 frações. Na fração EHFC5F2

(107,2 mg) foi identificada por RMN de ^1H e ^{13}C a presença do composto **I**. O fluxograma destas etapas está ilustrado na Figura 32.

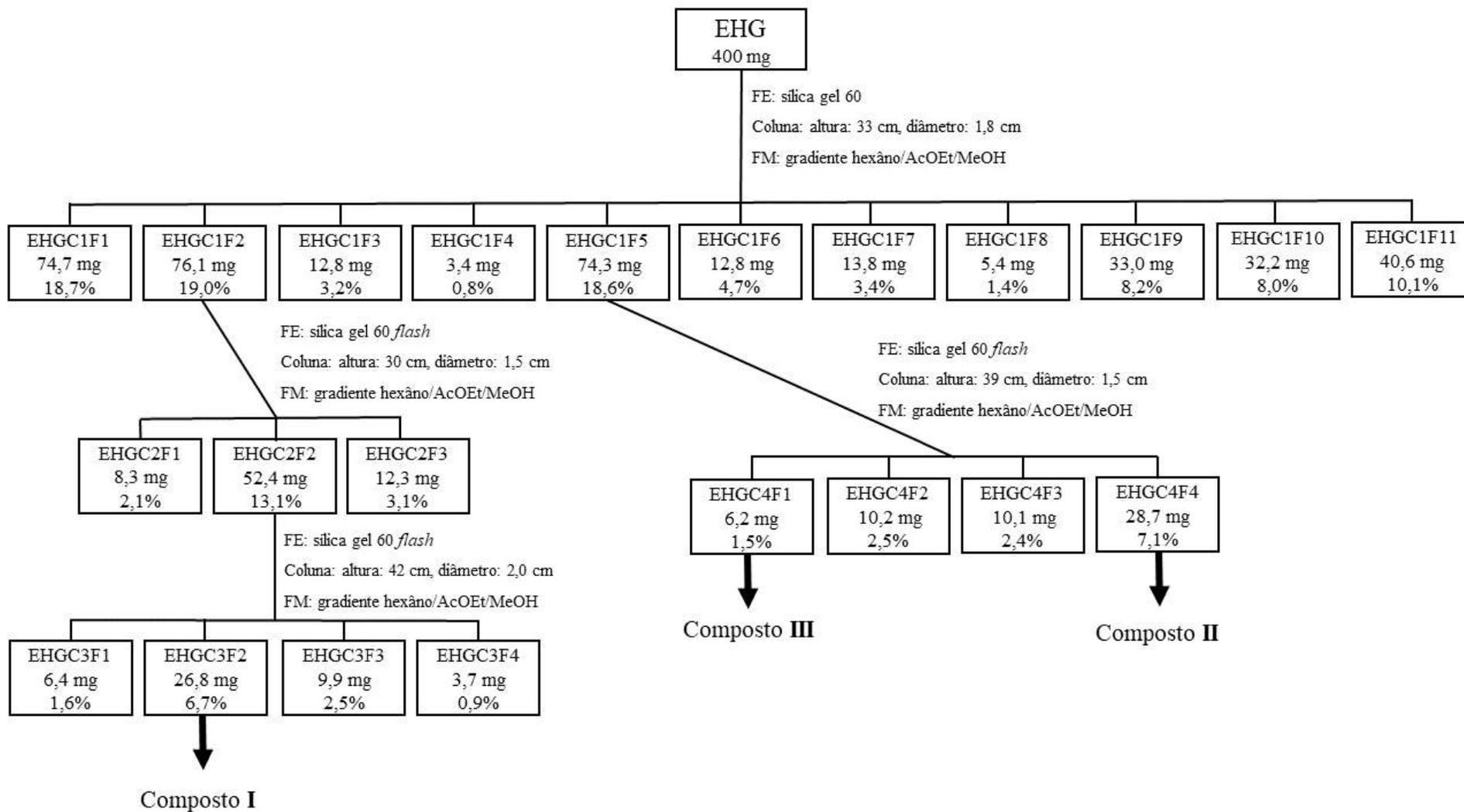
O extrato metanólico dos galhos (EMG) (2,5 g) foi submetido à CC utilizando sílica gel 60 (150,0 g de sílica, altura de 20,0 cm, diâmetro de 3,5 cm) e foi eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 9:1 (200 mL) seguido de 8:1 (600 mL), 7:3 (200 mL), 6:4 (300 mL), 1:1 (600 mL), 2:1 (300 mL), 3:1 (240 mL), 4:1 (240 mL), 100% de AcOEt (200 mL), AcOEt/MeOH 20:1 (210 mL), 10:1 (200 mL), 5:1 (240 mL), 4:1 (200 mL), 3:1 (200 mL), 2:1 (210 mL), 1:1 (200 mL) e 100% de MeOH, o que resultou em 433 frações. As frações foram monitoradas por CCD utilizando vanilina sulfúrica como revelador e reunidas com base no perfil cromatográfico, o que resultou em 6 frações. A fração EMGC1F6 (107,7 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (25,0 g de sílica, altura de 22 cm, diâmetro de 1,3 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 (80 mL) seguido de 8:1 (70 mL), 7:3 (70 mL), 6:4 (90 mL), 1:1 (80 mL), 2:1 (80 mL), 3:1 (80 mL), 4:1 (80 mL) e 100% de AcOEt (100 mL), o que resultou em 114 frações, que foram reagrupadas em 6 frações. A fração EHGC3F6 apresentou aspecto de um pó amarelado (6,3 mg), que posteriormente foi identificada como o composto (**V**) (Figura 29). O fluxograma destas etapas está ilustrado na Figura 33.

O extrato metanólico das folhas (EMF) (4,1 g) foi submetido à CC utilizando sílica gel 60 (252,0 g de sílica, altura de 30,0 cm, diâmetro de 4,5 cm) e foi eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente de CH_2Cl_2 (100–0%) e MeOH (0–100%) utilizando 150 mL em cada fase, o que resultou em 312 frações. As frações foram monitoradas por CCD utilizando vanilina sulfúrica como revelador e reunidas com base no perfil cromatográfico, o que resultou em 3 frações. A fração EMFC1F1 (361,7 mg) foi submetida novamente à CC utilizando sílica gel 60 *flash* para cromatografia (25,0 g de sílica, altura de 22,0 cm, diâmetro de 1,3 cm) e eluída com misturas de solventes em sistema gradiente de polaridade crescente iniciando em hexano/AcOEt 5:1 (200 mL) seguido de 5:3 (150 mL), 5:4 (180 mL) e 100% de AcOEt (100 mL), o que resultou em 84 frações, que foram reagrupadas em 6 frações. A fração EMFC2F3 apresentou aspecto de um pó esbranquiçado (16,7 mg), que posteriormente foi identificada como o composto (**VI**) (Figura 29). O fluxograma destas etapas está ilustrado na Figura 34.

Figura 29 – Compostos isolados dos extratos de *E. paniculata*.

Fonte: o autor.

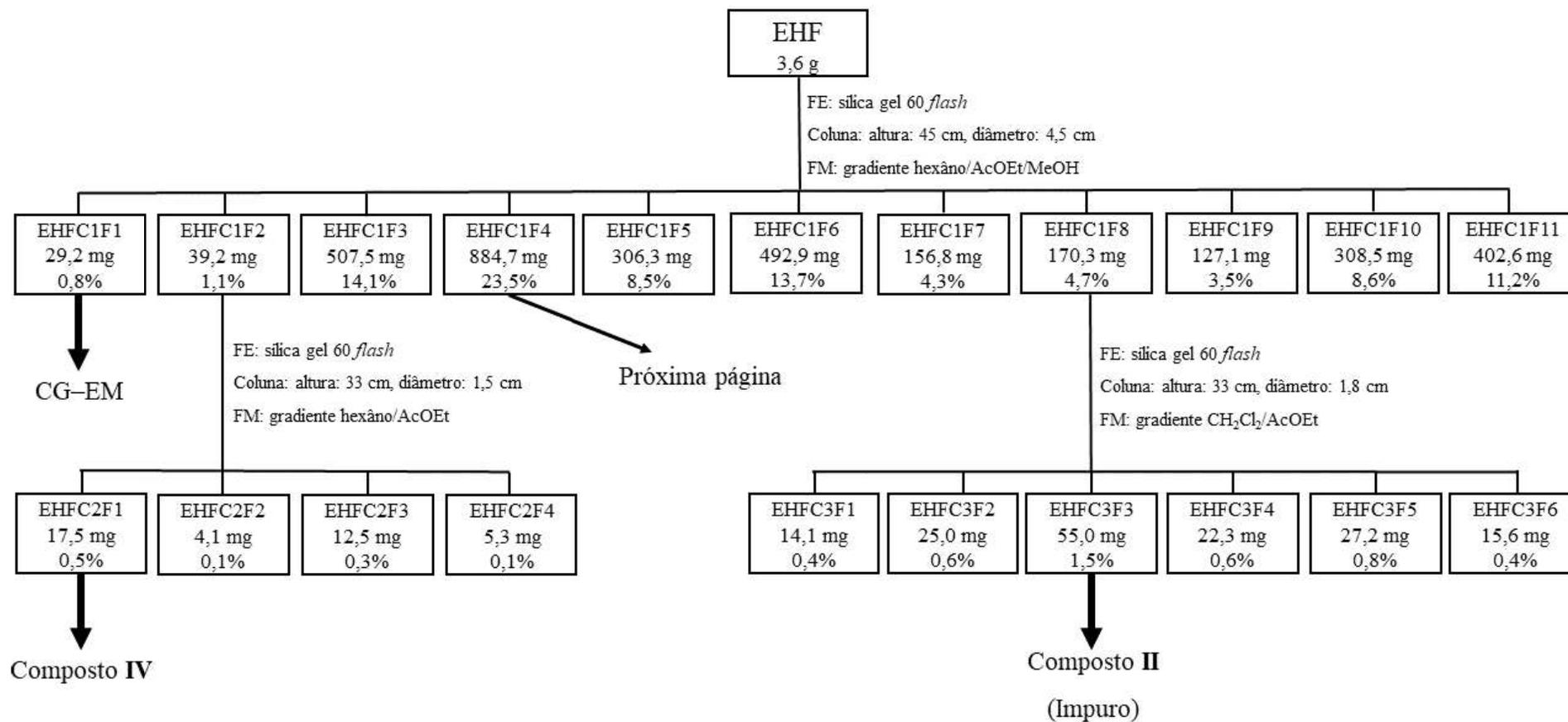
Figura 30 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHG.



Nota: FE: fase estacionária, FM: fase móvel.

Fonte: o autor.

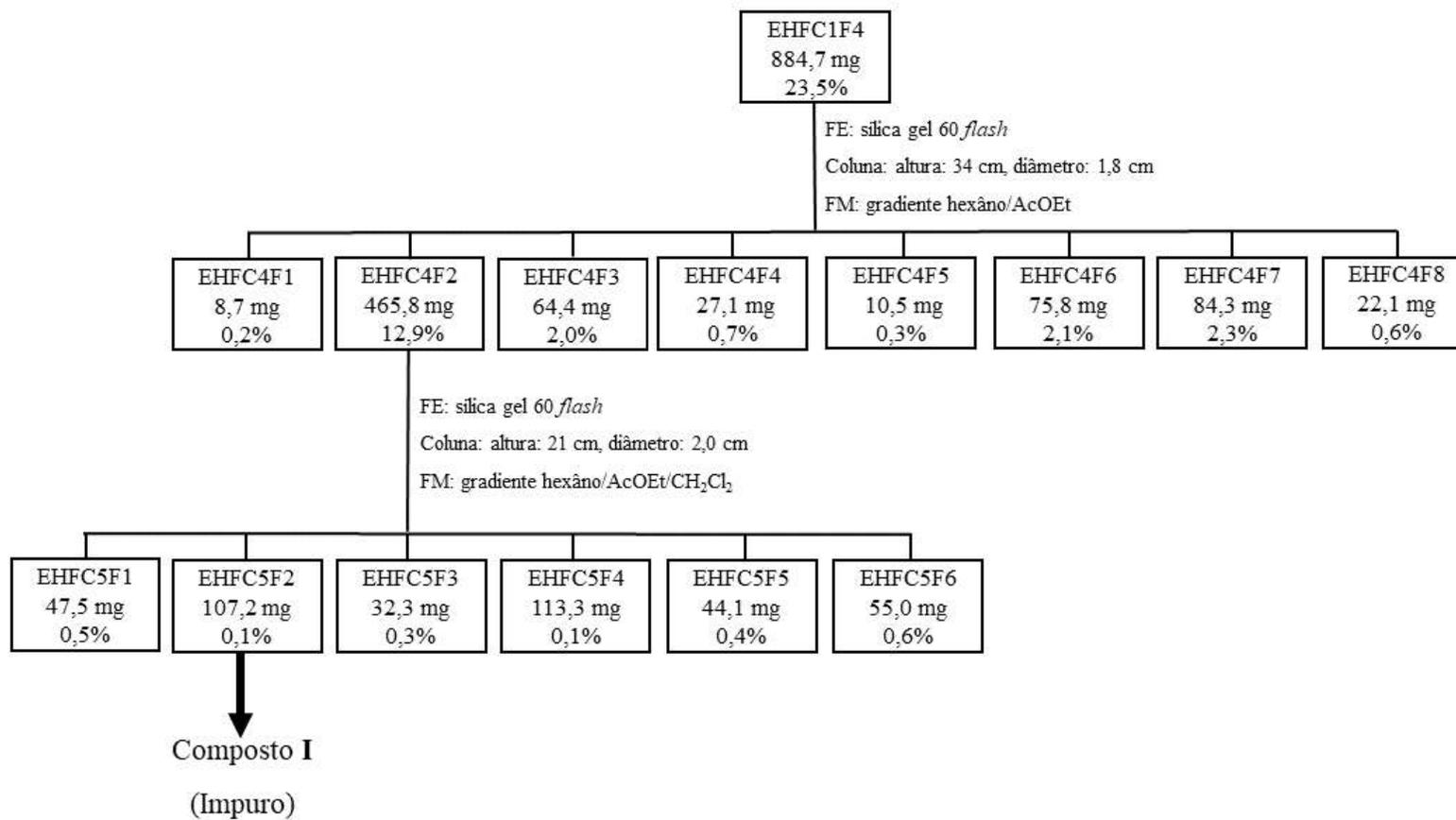
Figura 31 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHF parte 1.



Nota: FE: fase estacionária, FM: fase móvel.

Fonte: o autor.

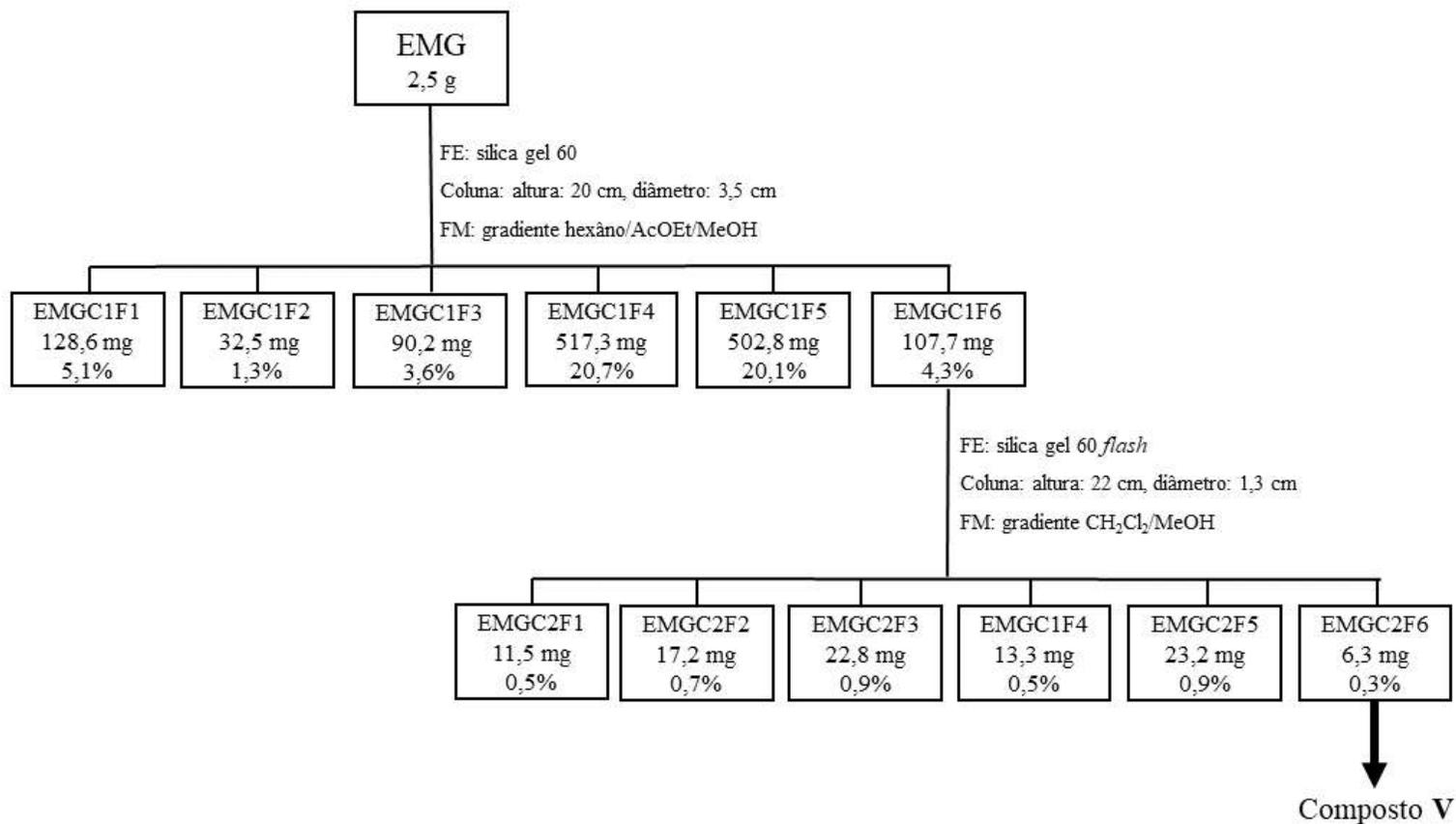
Figura 32 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EHF parte 2.



Nota: FE: fase estacionária, FM: fase móvel.

Fonte: o autor.

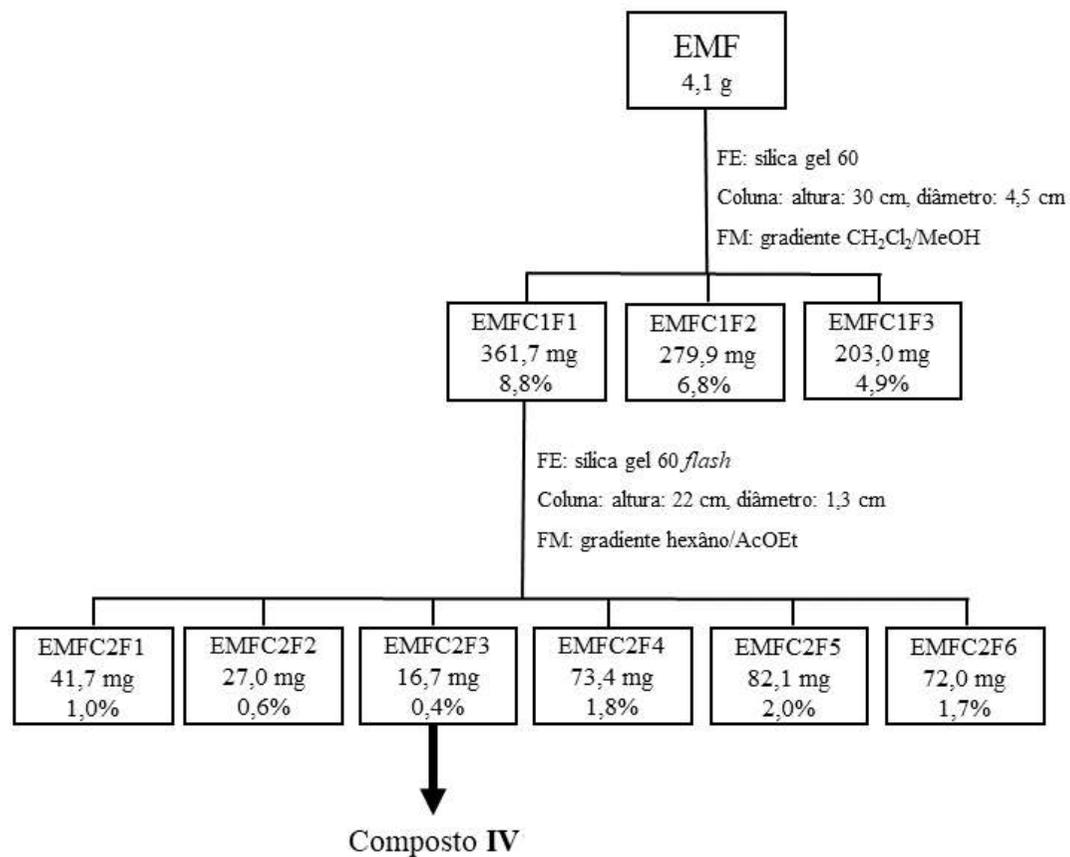
Figura 33 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EMG.



Nota: FE: fase estacionária, FM: fase móvel.

Fonte: o autor.

Figura 34 – Procedimentos cromatográficos realizados com o EMF.



Nota: FE: fase estacionária, FM: fase móvel.

Fonte: o autor.

4.8 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Os compostos **I**, **II**, **III**, **IV** e **VI** foram solubilizados em CDCl_3 e o composto **V** foi solubilizado em DMSO e analisados por RMN. Os experimentos foram realizados a 30 °C, utilizando TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$) como padrão interno. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando o espectrômetro da Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C). Foram realizadas análises em uma dimensão de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e as bidimensionais por correlação COSY (*homonuclear correlation spectroscopy*, $^1\text{H} \times ^1\text{H}$), HSQC *heteronuclear single quantum coherence*, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) e HMBC (*heteronuclear multiplebond coherence*, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$).

4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E PROANTOCIANIDINAS

4.9.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada utilizando-se a metodologia proposta por Marcos e colaboradores (2007). Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ (apresentando absorvância 0,973 em 517 nm). Em um tubo de ensaio, protegido da luz, foram adicionados 0,2 mL de solução dos extratos e 2,8 mL DPPH'. As soluções dos extratos e/ou compostos foram preparadas em metanol nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 6 (concentração calculada na cubeta). A mistura contendo os extratos e/ou compostos e DPPH' foram deixadas em repouso, à temperatura ambiente, durante 1 hora e lidas as absorvâncias ($\text{Abs}_{\text{amostra}}$). O controle ($\text{Abs}_{\text{controle}}$) foi realizado substituindo 0,2 mL de extrato e/ou composto por metanol (0,2 mL de metanol e 2,8 mL de DPPH'). O branco ($\text{Abs}_{\text{branco}}$) foi realizado substituindo 2,8 mL de DPPH' por metanol (0,2 mL de solução dos extratos e/ou compostos e 2,8 mL de metanol). O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Todas as absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro em 517 nm e o experimento foi realizado em triplicata. Os cálculos da porcentagem de atividade antioxidante (AA) dos extratos e/ou compostos, que corresponde à porcentagem de DPPH' sequestrado, foram determinadas pela Equação 2.

$$AA = \text{DPPH}_{\text{sequestrado}} (\%) = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O resultado da análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH foi expresso em concentração eficiente, CE_{50} , que é a concentração de extrato/e ou composto necessário para reagir com 50% do radical DPPH. Portanto, quanto menor esse valor, melhor é a atividade antioxidante. As medidas de CE_{50} foram calculadas através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH* sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações de extratos e/ou compostos.

Tabela 6 – Faixa de concentração dos extratos das folhas e galhos utilizados na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.

Amostra	Concentração de amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EHF	50–1750
EMF	25–500
EHG	50–1750
EMG	25–500
I	35–1000
II	300–4000

Fonte: o autor.

4.9.2 Determinação do teor de fenóis totais

Os teores de fenóis totais para os extratos das folhas e galhos foi determinado utilizando-se a metodologia proposta por Marcos e colaboradores (2007). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução metanólica do extrato ($125,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) 10% ($v v^{-1}$) e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio 7,5% ($m v^{-1}$). A mistura foi mantida por 5 min em banho a 50 °C. Para obtenção do branco, foi utilizado 0,5 mL de metanol, 2,5 mL da solução aquosa do RFC e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio. O resultado, expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato foi obtido pela Equação 3.

$$\text{EAG} = \frac{\text{CAG}}{\text{CA}} \times 10^3 \quad \text{Equação 3}$$

Sendo,

- CAG – a concentração em equivalentes de ácido gálico em $\mu\text{g mL}^{-1}$,
- CA – a concentração da amostra.

Para obtenção da concentração da amostra em função do ácido gálico, uma solução metanólica de ácido gálico foi reagido com RFC em variadas concentrações (5,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo 0,5 mL da solução metanólica de ácido gálico, 2,5 mL da solução aquosa do RFC e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio e assim, construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de ácido gálico utilizada (Tabela 7), obtendo-se coeficiente de determinação $R^2 = 0,995$. A partir da equação da reta obtida (y é absorbância medida), foi obtido o valor da concentração (x) em equivalentes de ácido gálico (CAG) expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro em 760 nm e o experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 7 – Curva de calibração do ácido gálico.

Ácido gálico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância
5,0	0,151
10,0	0,252
15,0	0,319
20,0	0,397
25,0	0,467
30,0	0,556
35,0	0,671
40,0	0,749
45,0	0,777
50,0	0,874

Fonte: o autor.

4.9.3 Determinação do teor de flavonoides

Os teores de flavonoides para os extratos das folhas e galhos foi determinado utilizando-se a metodologia proposta por Marcucci, Woisky, Salatino (1998). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução em metanol dos extratos (250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v^{-1}) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada

em repouso por 30 min a temperatura ambiente. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O resultado, expresso em mg de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato foi obtido pela Equação 4.

$$EQ = \frac{CQ}{CA} \times 10^3 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo,

- CQ – a concentração em equivalentes de quercetina em $\mu\text{g mL}^{-1}$,
- CA – a concentração da amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para obtenção da concentração da amostra em função da quercetina, a quercetina foi reagida com a solução de AlCl_3 em variadas concentrações (1,0 a 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo 2,0 mL da solução metanólica de quercetina, 2,0 mL de metanol e 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v^{-1}) e assim, construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de quercetina utilizada (Tabela 8), obtendo-se coeficiente de determinação $R^2 = 0,980$. A partir da equação da reta obtida (y é absorbância medida), foi obtido o valor da concentração (x) em equivalentes de quercetina expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro em 425 nm e o experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 8 – Curva de calibração da quercetina em solução de AlCl_3 .

Quercetina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância
1,0	0,040
5,0	0,207
10,0	0,321
15,0	0,416
20,0	0,631
25,0	0,801
30,0	0,827

Fonte: o autor.

4.9.4 Determinação do teor de proantocianidinas

Os teores de proantocianidinas para os extratos das folhas e galhos foi determinado utilizando-se a metodologia proposta por Morais e colaboradores (2008). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução metanólica do extrato (500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e

3,0 mL de solução de vanilina (5,0 mg mL⁻¹) em ácido sulfúrico 70% (m m⁻¹). A mistura foi mantida por 15 min em banho a 50 °C. Para obtenção do branco, foi utilizado 2,0 mL de metanol e 3,0 mL da solução de vanilina. O resultado, expresso em mg de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato foi obtido pela Equação 5.

$$EC = \frac{CEC}{CA} \times 10^3 \quad \text{Equação 5}$$

Sendo,

- CEC – a concentração em equivalentes de catequina em ug mL⁻¹,
- CA – a concentração da amostra em µg mL⁻¹.

Para obtenção da concentração da amostra em função da catequina, uma solução metanólica de catequina foi reagida com a vanilina em variadas concentrações (1,0 a 20,0 µg mL⁻¹), sendo 2,0 mL da solução metanólica de catequina e 3,0 mL da solução de vanilina e assim, construída uma curva analítica da absorbância obtida *versus* concentração de catequina utilizada (Tabela 9), obtendo-se coeficiente de determinação R² = 0,998. A partir da equação da reta obtida (y é absorbância medida), foi obtido o valor da concentração (x) em equivalentes de catequina expresso em ug mL⁻¹. Todas as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro em 500 nm e o experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 9 – Curva de calibração da catequina.

Catequina (ug mL ⁻¹)	Absorbância
1,0	0,135
5,0	0,283
10,0	0,464
15,0	0,650
20,0	0,800

Fonte: o autor.

4.9.5 *Análise estatística entre a atividade antioxidante, teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas*

Os dados obtidos foram avaliados pelo coeficiente de correlação realizado pelo método de Pearson (Equação 6) (MUKAKA, 2012), utilizando o programa GraphPad Prism (2016), versão 7.00, versão de avaliação. Valores de p < 0,01 foram considerados significativos.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\text{cov}(X, Y)}{\sqrt{\text{var}(X) \times \text{var}(Y)}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde,

- cov é a covariância,
- var é a variância,
- x_1, x_2, \dots, x_n e y_1, y_2, \dots, y_n são os valores medidos de ambas as variáveis,
- $r = \pm 1$ indica uma correlação perfeita entre as duas variáveis,
- $|r| > 0,9$ indica uma correlação muito forte,
- $|r| > 0,7$ a $0,9$ indica uma correlação forte,
- $|r| > 0,5$ a $0,7$ indica uma correlação moderada,
- $|r| > 0,3$ a $0,5$ indica uma correlação fraca,
- $|r| > 0$ a $0,3$ indica uma correlação desprezível,
- $r = 0$ indica uma correlação nula.

De maneira geral, valores positivos significam correlação positiva e valores negativos significam correlação negativa, isto é, se uma aumenta, a outra sempre diminui.

4.10 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIDIABÉTICA E ANTI-OBESIDADE *IN VITRO*

Os experimentos foram realizados pelo doutorando Allisson Benatti Justino no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI-UFU) sob a orientação do Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola.

4.10.1 Determinação do potencial de inibição de glicação

Os ensaios de inibição da glicação foram realizados com os compostos *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e desidrodieugenol B (**II**). Para isso foram adicionados em tubos de ensaio 50,0 mg mL⁻¹ de albumina sérica bovina previamente diluída em tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4), 1,25 mol L⁻¹ de frutose diluída em tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4) e os compostos diluídos em DMSO (62,5 µg/mL). Os tubos foram incubados à 37 °C por 72 horas, na ausência de luz. Após esse período, 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% (m v⁻¹) foi adicionado em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 10 min e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,6 mL de tampão fosfato (200,0 mmol L⁻¹, pH 7,4). A

redução da fluorescência da albumina sérica bovina quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm (SRI HARSHA, LAVELLI, SCARAFONI, 2014). O controle foi realizado substituindo o composto por DMSO. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato (200,0 mmol L⁻¹, pH 7,4), e o composto por DMSO. A quercetina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição de glicação (IG) é calculada por meio da Equação 7. Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando as seguintes concentrações dos compostos: 30,0; 10,0; 5,5; 3,0; 1,0; 0,55; 0,33; 0,1 mg mL⁻¹.

$$IG (\%) = 100 - \left(\frac{(IF_{\text{amostra}} - IF_{\text{branco}})}{(IF_{\text{controle}} - IF_{\text{branco}})} \times 100 \right) \quad \text{Equação 7}$$

Sendo,

- IF_{amostra} – a intensidade de fluorescência na presença do composto,
- IF_{branco} – a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e dos compostos,
- IF_{controle} – a intensidade de fluorescência na ausência dos compostos.

4.10.2 Inibição da atividade da α -glicosidase

Os ensaios de inibição da atividade da α -glicosidase foram realizados com os compostos *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e desidrodieugenol B (**II**). Para isso foi utilizado o substrato *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NFG) (SHAN et al., 2016) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (Sigma-Aldrich I-1630) (TOMA et al., 2014). Para o preparo da f-AG, 200,0 mg de pó cetônico de intestino de rato foi homogeneizado em 3,0 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m v⁻¹). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 xg por 30 min e o sobrenadante (f-AG) foi utilizado no ensaio. Os compostos foram dissolvidos em DMSO (25 μ g/mL) e foram incubadas com a f-AG e 1,5 mmol L⁻¹ de glutathiona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50,0 mmol L⁻¹, pH 6,8) durante 20 min a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição do substrato *p*-NFG (4,0 mmol L⁻¹, em tampão fosfato de sódio a 50,0 mmol L⁻¹, pH 6,8) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 30 min, com intervalo de 5 min, a 37 °C. O controle foi realizado substituindo o composto por tampão fosfato. A acarbose foi utilizada como controle positivo. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase (I α G), calculado por meio da Equação 8. Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando as mesmas concentrações do ensaio da inibição de glicação.

$$I\alpha G = \frac{(ASC_{\text{controle}} - ASC_{\text{amostra}})}{ASC_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Sendo,

- ASC_{controle} – a área sob a curva na ausência dos compostos;
- ASC_{amostra} – a área sob a curva na presença dos compostos.

4.10.3 Inibição da atividade da lipase pancreática

Os ensaios de inibição da atividade da lipase pancreática foram realizados com os compostos *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e desidrodieugenol B (**II**), utilizando o método modificado com palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NFP) como substrato e lipase pancreática suína (tipo II, Sigma Aldrich) (GUPTA, GUPTA, 2003). Os compostos foram solubilizados em DMSO:água (1:1) (100 µg/mL) e incubados com 10,0 g L⁻¹ de lipase pancreática diluídos em tampão contendo Tris-HCl (50,0 mmol L⁻¹, pH 8,0), 10,0 mmol L⁻¹ de CaCl₂ e 25,0 mmol L⁻¹ de NaCl por 20 min a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mmol L⁻¹ substrato de *p*-NFP diluído em 10% de isopropanol e 50,0 mmol L⁻¹ do tampão Tris-HCl, contendo 10,0 mmol L⁻¹ CaCl₂, 25,0 mmol L⁻¹ NaCl, 0,5% triton X-100. Os valores de absorbância foram medidos a 410 nm por 30 min a 30 °C. Orlistat (pureza > 98%) foi utilizado como controle positivo. DMSO 5% foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição da lipase (IL), calculada de acordo com a Equação 9. Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando as mesmas concentrações do ensaio da inibição de glicação. Os valores de CI₅₀ foram determinandos a partir da equação da reta da curva analítica do gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras.

$$IL (\%) = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Sendo,

- A_{controle} – a área sob a curva na ausência dos compostos,
- A_{amostra} – a área sob a curva na presença dos compostos.

4.11 DOCKING MOLECULAR

Os estudos de docking molecular foram realizados com o objetivo de avaliar a energia de interação e as interações formadas entre os ligantes (compostos **I** e **II**) e as enzimas Cox-1 e Cox-2. Para comparação dos resultados, foram utilizados três medicamentos anti-inflamatórios disponíveis comercialmente (ibuprofeno, diclofenaco e celecoxibe). As estruturas cristalinas dos complexos foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) – Cox-1/diclofenaco (código PDB: 3N8Y) e Cox-2/celecoxibe (código PDB: 3LN1). Estes sistemas foram considerados ideais para validar o protocolo de docking molecular e utilizados para descrever as interações intermoleculares dos compostos **I** e **II** com as enzimas Coxs.

Os procedimentos de re-docking foram realizados usando a interface AutoDockTools 1.5.6, juntamente com autogrid4 e autodock4 (MORRIS et al., 2009). Para preparar os ligantes ibuprofeno, celecoxibe e diclofenaco e as enzimas para os cálculos de docking molecular, foram adicionadas cargas parciais Gasteiger (SANNER, 1999) (que utiliza o princípio da equalização da eletronegatividade através do procedimento PEOE – *Partial Equalization of Orbital Electronegative*) no programa AutoDockTools 1.5.6 e convertidas nas estruturas cristalinas necessárias para os cálculos no autodock4. Para realizar os estudos de docking molecular, foram considerados como parte flexível os ligantes, já os resíduos de aminoácidos que interagem com as enzimas Coxs e o resto da enzima foram considerados como rígida.

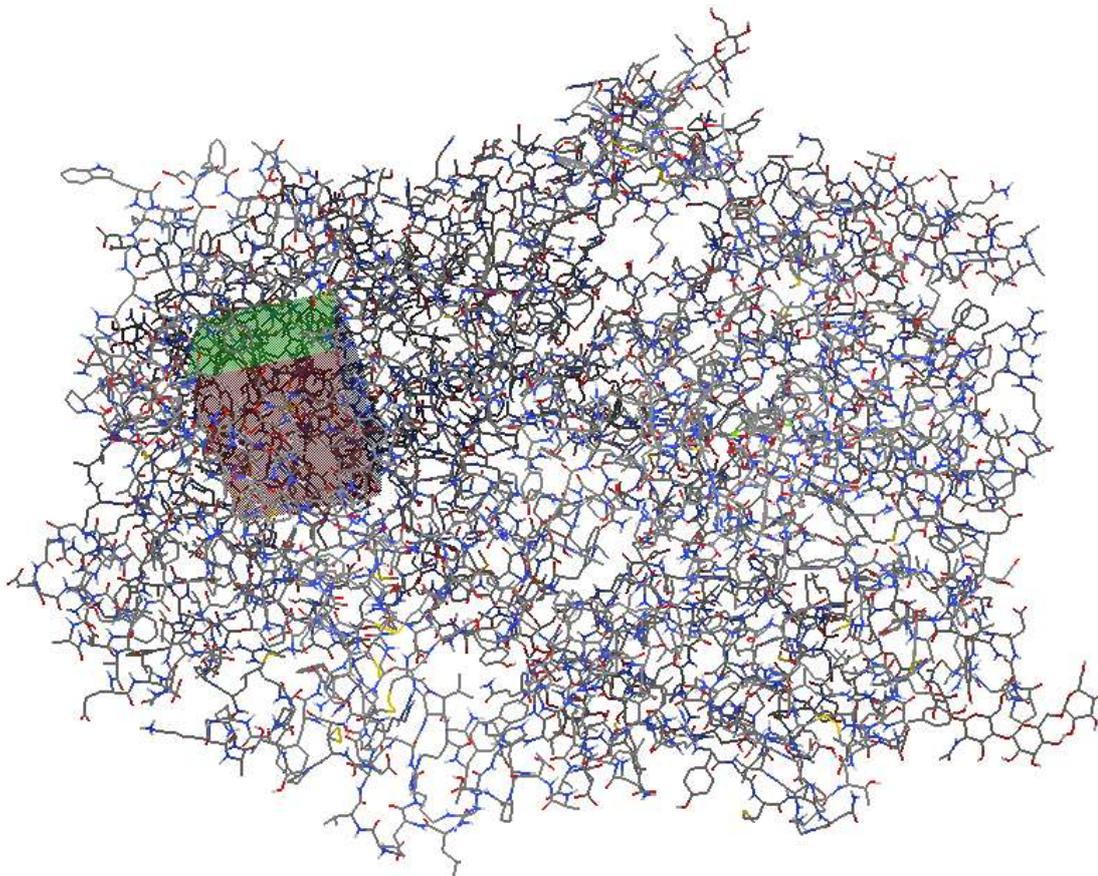
O algoritmo genético lamarckiano usado no programa autodock4 foi:

- população (150 indivíduos);
- número máximo de avaliações (25.000.000);
- número máximo de gerações (27.000);
- um indivíduo sobrevivendo até a próxima geração;
- execuções de docking de algoritmos genéticos (150);

caixa de grade de $28 \times 44 \times 36$ pontos centrada em: $x = 33,375$; $y = -7,204$; $z = -4,307$ com espaço de grade de $0,375 \text{ \AA}$ para a enzima Cox-1 (Figura 35);

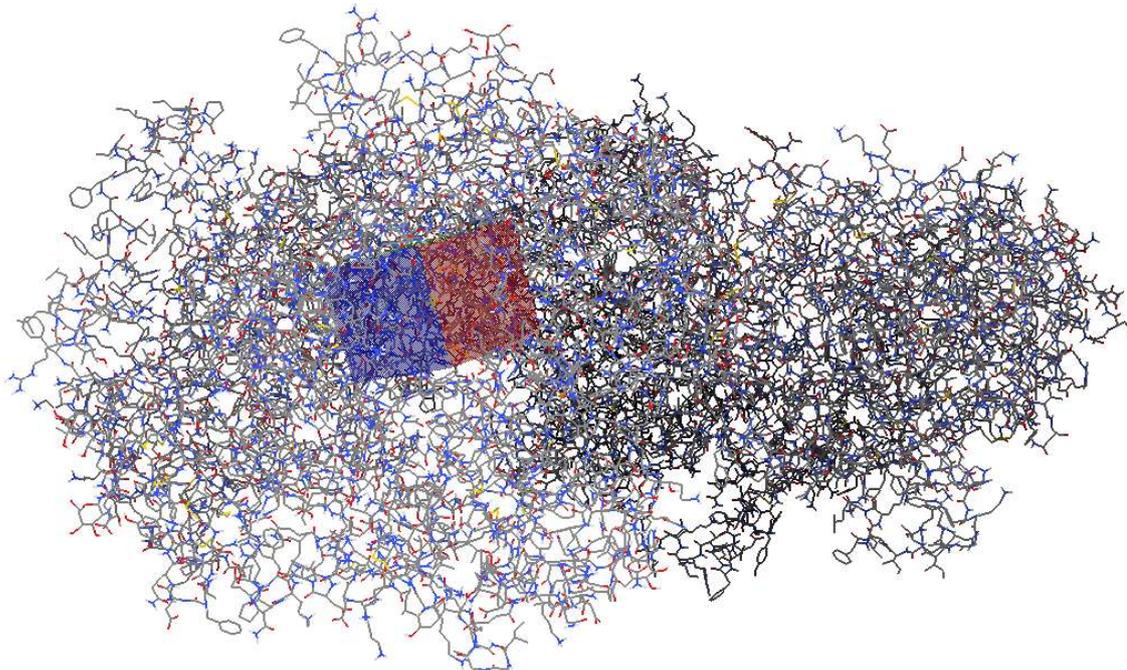
- caixa de grade de $40 \times 34 \times 38$ pontos centrada em: $x = 30,733$; $y = -1,965$; $z = -16,243$ com espaço de grade de $0,375 \text{ \AA}$ para a enzima Cox-2 (Figura 36).

Figura 35 – Caixa de grade de $28 \times 44 \times 36$, localizada no sítio ativo da Cox-1.



Fonte: o autor.

Figura 36 – Caixa de grade de $40 \times 34 \times 38$, localizada no sítio ativo da Cox-2.



Fonte: o autor.

Os ligantes (compostos **I** e **II**) foram desenhados no programa GABEDIT (ALLOUCHE, 2011) e otimizados com métodos semiempíricos PM7, utilizando o programa MOPAC2016 (STEWART, 2007). As interações formadas entre os ligantes e as enzimas foram geradas usando o programa Discovery Studio Visualizer (2017).

4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para determinar a atividade anti-inflamatória, implantes colocados nos camundongos foram utilizados para avaliar marcadores inflamatórios, tais como a atividades da enzima mieloperoxidase (MPO), *N*-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), número de mastócitos em cortes histológicos, vascularização do implante (número de novos vasos sanguíneos e conteúdo de hemoglobina) e marcadores de fibrogênese (tais como colágeno total, fibras de colágeno do tipo I e fibras de colágenos do tipo III). Os experimentos foram realizados juntamente com os doutorandos Bruno Antônio Ferreira e Francielle Borges Rosa de Moura no Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM–UFU) sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Fernanda de Assis Araújo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia, processo número: CEUA083/17.

4.12.1 *Animais*

Neste estudo, camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (7 a 8 semanas de idade, pesando cerca de 25 g) foram fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR/UFU), alojados individualmente sob condições padrão (ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura (22 °C), umidade relativa do ar a 60–65%, *ad libitum* (com livre acesso a alimentos e água)) e anestesiados de acordo com as regras do Comitê Institucional de Bem-Estar Animal.

4.12.2 *Procedimento cirúrgico e técnica de implantação*

Esponjas de poliéster-poliuretano de 8 mm de diâmetro \times 4 mm de espessura foram utilizadas como plataforma implantada para avaliar a resposta inflamatória nas costas dos camundongos. Antes da implantação, as esponjas foram embebidas em etanol durante a noite (70% v v⁻¹) e esterilizadas (30 min) em água destilada por ebulição. Uma injeção intraperitoneal

de mistura de cetamina (100 mg kg^{-1}) e xilazina (10 mg kg^{-1}) foi usada para anestésiar os animais. A pele das costas foi raspada e limpa com etanol (70%). Em cada animal, um disco de esponja foi implantado assepticamente (a 4 cm de distância do local do implante) em uma bolsa subcutânea através de uma incisão dorsal na linha média (1 cm de comprimento).

4.12.3 *Regime de tratamento com extratos e compostos*

Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle (CT), tratado com solução salina de tampão fosfato-salino (PBS), composto por 10 indivíduos, e três grupos tratados com EHF, EHG, *O*-metildesidrodieugenol B (I) ou desidrodieugenol B (II) nas doses de 10 ng, 100 ng e 1000 ng em 10 μL de solução salina, composto por 10 animais cada grupo. Os animais receberam o tratamento intrainplante logo após o procedimento cirúrgico, durante todos os dias, no mesmo horário até o 8º dia pós-implantação.

4.12.4 *Remoção dos implantes*

Após nove dias, os implantes foram removidos cirurgicamente e utilizados para as análises histológicas e bioquímicas. Para realizar o procedimento, os animais dos quatro grupos foram sacrificados por uma overdose de anestésico (mistura de cetamina (100 mg kg^{-1}) e xilazina (10 mg kg^{-1})).

4.12.5 *Dosagem de hemoglobina (avaliação indireta da neovascularização)*

O método Drabkin (MARQUES et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2015) foi utilizado para avaliar o conteúdo de hemoglobina, onde foram adicionados 2,0 mL do reagente Drabkin (Labtest) para homogeneizar cada implante. O material produzido foi centrifugado por 40 min ($12.000 \times g$, 4 °C) e o sobrenadante filtrado (filtro Millipore de 0,22 μm). O resultado (μg de Hb mg^{-1} de tecido úmido) foi quantificado (absorbância a 540 nm) e comparado com uma curva de hemoglobina padrão com concentrações conhecidas de hemoglobina (TEIXEIRA et al., 2015).

4.12.6 Avaliação da atividade da MPO

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi usada para medir o número de neutrófilos nos implantes (CASSINI-VIEIRA et al., 2017). Inicialmente, os implantes foram pesados, homogeneizados (Na-EDTA 0,015 M, Na₃PO₄ 0,02 M, NaCl 0,1 M – em solução tampão pH 4,7, Sigma-Aldrich) e centrifugados (10 min, 12.000 × g, 4 °C). Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos (pH 5,4, tampão Na₃PO₄ 0,05 M, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (HTAB), Sigma-Aldrich) e submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento (três vezes) usando nitrogênio líquido. Uma solução de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e H₂O₂ (0,3 mM) em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (concentração final de 1,6 mM). Esta solução foi utilizada para avaliar a atividade do MPO nas amostras de sobrenadante, onde foi medida a variação na absorbância (450 nm), expressa como variação na densidade óptica g⁻¹ do tecido úmido. Para finalizar a reação, foram adicionados 50,0 µL de H₂SO₄ (4 M).

4.12.7 Avaliação da atividade de NAG

Os níveis de *N*-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) foram medidos para quantificar o infiltrado de células mononucleares (CASSINI-VIEIRA et al., 2017). Uma solução de NaCl (0,9% m v⁻¹) contendo 0,1% v v⁻¹ de Triton X-100 (Promega) foi usada para homogeneizar os implantes, que foram então centrifugados por 10 min (3000 xg a 4 °C). A uma solução de 100,0 µL de *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich) preparada em tampão fosfato/citrato (pH 4,5, Na₂HPO₄ 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M), foram adicionadas amostras (100,0 µL) do sobrenadante resultante por 10 min (concentração final de 2,24 mM). Para finalizar a reação, foram adicionados 100, µL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). A absorção da solução foi medida a 400 nm e os resultados da hidrólise do substrato expressos em nmol mg⁻¹ de tecido úmido.

4.12.8 Avaliação da deposição de colágeno solúvel

A deposição de colágeno foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total foi quantificada pelo método químico de colorimetria baseada na reação do *Picrosirius Red*. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006).

Para isso, as amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0,1% Triton X-100) e depois da homogeneização, os debris foram removidos pela centrifugação e, em seguida, foram adicionados 50,0 μ L do reagente *Picrosírius Red* em 50,0 μ L da amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrosírius red foi separado por centrifugação a $10.000 \times g$ durante 15 min, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1,0 mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva de padrão de colágeno (Merck) e os resultados expressos em μ g de colágeno por mg de implante.

4.12.9 *Análise histológica das matrizes esponjosas*

Após a retirada dos implantes (6 de cada grupo), os implantes foram cuidadosamente fixados em solução de methacarn (60% de MeOH, 30% de CHCl_3 , 10% de ácido acético, $v v^{-1}$) a 4 °C por 24 h. Os implantes foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo (secções de 5 μ m) e as lâminas foram coradas com:

- Hematoxilina-eosina, para visualização do infiltrado tecidual e quantificação de vasos. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X) em microscópio LEICA ICC50,
- Picrosírius red para avaliação da deposição de colágeno (objetiva de 20X, ocular de 10X) microscópio Nikon TS 100. Cada corte teve o registro fotográfico na área total de tecido fibrovascular formado no implante, exceto na região central onde houve as injeções de tratamento.

Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Histologia da UFU.

4.12.10 *Análises estatísticas*

As análises de variância (ANOVA) seguida pelo fator de correção de Newman-Keuls foram feitas para as comparações entre os grupos múltiplos como um pós-teste. Todos os dados foram expressos como médias \pm e.p.m. O programa GraphPad Prism (2016), versão 7.00, foi utilizado para realizar a análise estatística. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias para valores de $p < 0,05$.

4.13 ANÁLISE *IN SILICO* DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

As propriedades físico-químicas, lipofilicidade e solubilidade em água foram avaliadas usando o software online gratuito SwissADME do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB, 2021). Tais resultados foram analisados utilizando as regras de Lipinski (LIPINSKI, LOMBARDO, DOMINY, FEENEY, 1997), Ghose (GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999), Veber (VEBER et al., 2002) e Egan (EGAN, MERZ, BALDWIN, 2000), que auxiliam na avaliação das características farmacocinéticas de candidatos a fármacos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A Tabela 10 apresenta o rendimento da extração por maceração das folhas e dos galhos de *E. paniculata* utilizando hexano e metanol. A extração foi iniciada com hexano, para a extração e remoção de compostos menos polares, como graxas e óleos e outros compostos de baixa polaridade como esteroides, fenilpropanoides e terpenos, possibilitando a avaliação da atividade de compostos com polaridade menor. A utilização de um solvente mais polar (metanol) na extração, foi visando extrair os compostos de polaridades maiores e com isto uma maior quantidade de compostos com atividade antioxidante. A escolha foi baseada em trabalhos prévios realizado por Líbero, Oliveira, Truiti (2016) com o extrato etanólico das folhas de *E. paniculata* e em trabalhos realizados no NUPPEN (OLIVEIRA, 2008; SOUSA, 2015; COSTA SILVA et al., 2019), onde foi observado que os extratos/frações mais polares, foram aqueles que apresentam os maiores teores de fenóis totais, e como consequência, maior atividade antioxidante.

Tabela 10 – Rendimento da extração por maceração das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostras	Material vegetal após secagem (g)	Umidade após secagem (%)	Extrato (g)	Rendimento (%)
EHF	226,0	8,3	4,6	2,0
EMF			26,4	11,7
EHG	116,0	7,6	0,9	0,8
EMG			11,1	9,5

Fonte: o autor.

Através dos resultados apresentados na Tabela 10 é possível verificar que as folhas apresentaram maior rendimento que os galhos. Um estudo apresentado por Martins (2012) mostrou que os galhos apresentam elevada quantidade de compostos macromoleculares, como celulose, hemicelulose e lignina que compõem a parede celular e são responsáveis principalmente pela sustentação do vegetal, não sendo extraídos através de maceração com solventes orgânicos. Em madeiras, por exemplo, a quantidade de celulose varia entre 65–70% da sua composição (MARTINS, 2012). Como consequência, os teores de compostos extraídos por solventes orgânicos em galhos foram menores que nas folhas, justificando o menor rendimento obtido.

Na prospecção fitoquímica (Tabela 11) foi verificado que os extratos não apresentaram alcaloides em sua composição (negativo para iodocloro platinado, dragendorff e iodo sublimado). Além disso, através da análise da prospecção fitoquímica foi sugerido que os extratos hexânicos e metanólicos apresentam flavonoides (positivo para NP/PEG e $AlCl_3$), terpenos, esteroides, açúcares e fenóis (positivo para Liebermann-Burchard, sulfato cérico e vanilina sulfúrica) em sua composição. O melhor revelador para os extratos hexânicos foi o sulfato cérico e para os extratos metanólicos foi a vanilina sulfúrica. Assim, estes reveladores foram escolhidos para o monitoramento das colunas no processo de fracionamento.

A baixa intensidade de flavonoides na prospecção fitoquímica está diretamente relacionada com os baixos valores encontrados para os teores de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante, que serão discutidos nos Itens 5.7.1, 5.7.2 e 5.7.3. Portanto, os resultados da prospecção fitoquímica se encontram de acordo com os resultados mostrados na análise dos teores de fenóis totais e flavonoides. Outra observação é o fato dos extratos em hexano apresentarem alta intensidade para todos os reveladores gerais (Liebermann-Burchard, sulfato cérico, vanilina sulfúrica). Assim, os extratos em hexano se mostraram promissores para o isolamento de compostos da classe dos terpenos, esteroides e fenóis.

Tabela 11 – Prospecção fitoquímica dos extratos das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostras	NP/PEG	AlCl ₃	Ip	Dg	Is	Lb	Sc	Vs
EHF	+	+	–	–	–	+++	+++	+++
EMF	+	+	–	–	–	++	+	+++
EHG	+	+	–	–	–	+++	+++	+++
EMG	++	++	–	–	–	+++	+	+++

Nota: – : não identificado, +: pouco intenso, ++: intenso, +++: muito intenso. Ip - iodocloro platinado, Dg - dragendorff, Is - iodo sublimado, LB - Liebermann-Burchard, Sc - sulfato cérico, Vs - vanilina sulfúrica.

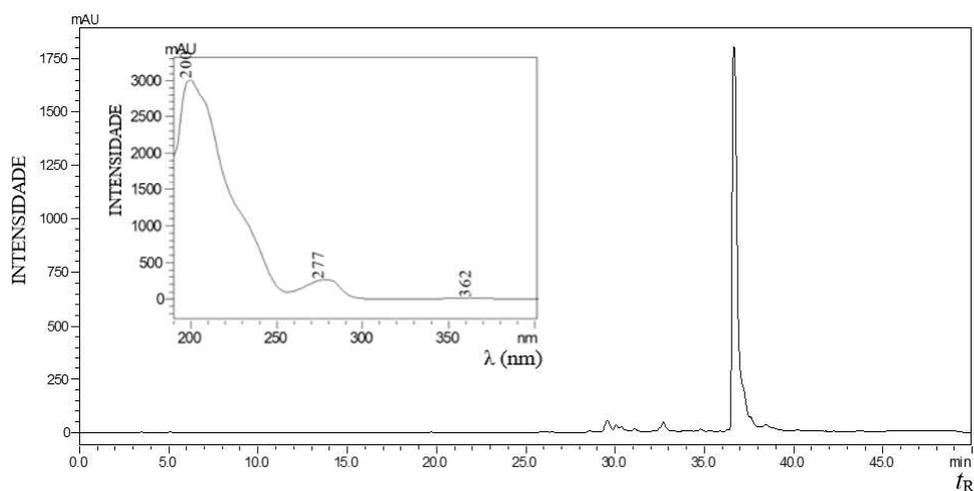
Fonte: o autor.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE *E. paniculata*

5.2.1 Identificação do *O*-metildesidroieugenol B (I)

A fração EHGC3F2 foi analisada por CLAE–DAD–ELSD (Figura 37 e Figura 38), sendo possível observar um único sinal com t_R 36,6 min, cujo espectro de DAD–UV apresentou máximos de absorção em 200 e 277 nm (Figura 106). Estes dados quando comparados com aqueles da literatura, foram similares aos reportados por Costa-Silva e colaboradores (2015).

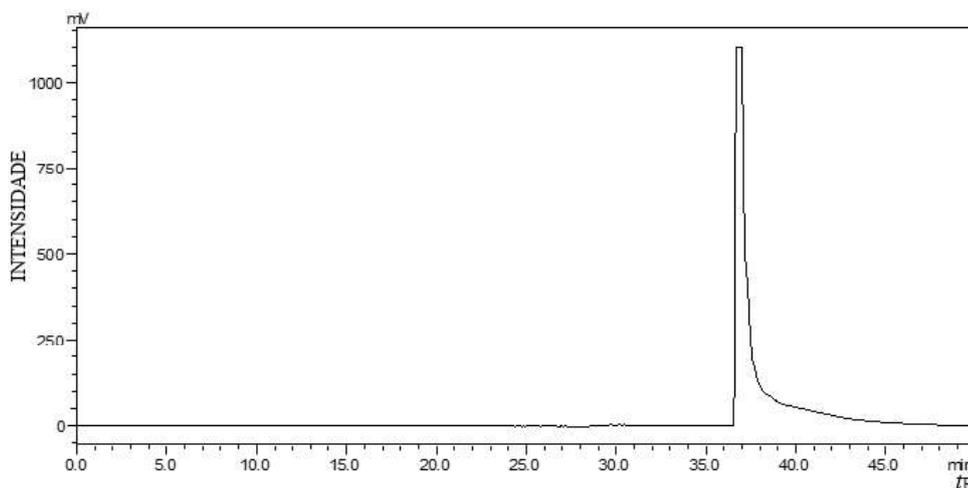
Figura 37 – Cromatograma da neolignana I obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 38 – Cromatograma do composto I obtido por CLAE–ELSD.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

A fração EHGC3F2 apresentou apenas um composto e foi submetida as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 40 e Figura 41) mostrou sinais de dupletos de δ_{H} 6,2 a 6,8 de hidrogênios aromáticos (H-2' , H-5', H-6', H-2, H-6), com integral para um hidrogênio (1H) para cada duplete, gerados a partir dos acoplamentos em *meta* de H-2' com H-6' e H-2 com H-6, todos com constante de acoplamento próximo a $J = 2,0$ Hz. Um duplo duplete em δ_{H} 6,71 (1H, H-6'), gerado a partir dos acoplamentos em *orto* (H-5', $J = 7,8$ Hz) e *meta* (H-2', $J = 2,0$ Hz). Um multiplete em δ_{H} 5,9 dos hidrogênios vinílicos (2H, H-8' e H-8); um multiplete em δ_{H} 5,06 de hidrogênios vinílicos terminais (4H, H-9' e H-9); dois simpletos em δ_{H} 3,84 (OCH₃-10) e 3,88 (OCH₃-10' e OCH₃-11), dois dupletos metilênicos em δ_{H} 3,37 (2H, H-7') e 3,24 (2H, H-7), gerados a partir dos acoplamentos vicinais de H-7 com H-8 e H-7' com H-8', todos com constante de acoplamento próximo a $J = 6,4$ Hz (Tabela 12).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 42) mostrou sinais de carbono em: δ_{C} 153,7; 150,8; 150,8; 144,3; 138,2; 136,2 e 135,7 que confirmam a presença do anel aromático (C1 a C6 e C1' a C6'); δ_{C} 137,3; 137,6; 116,1 e 116,1 de carbonos vicinais (C-8', C-8, C-9' e C-9), que confirmam a presença da ligação dupla; δ_{C} 56,2; 56,3 e 61,2 que confirmam a presença de três metoxilas (C-10, C-10' e C-11'); e por último a presença de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 40,2 e 40,3 (C-7' e C-7) (Tabela 12).

O espectro de RMN DEPT135 (Figura 43) mostrou sinais de sete carbonos metínicos (CH), quatro sinais de carbonos metilênicos (CH₂) e três sinais de metilas (CH₃) (Tabela 12).

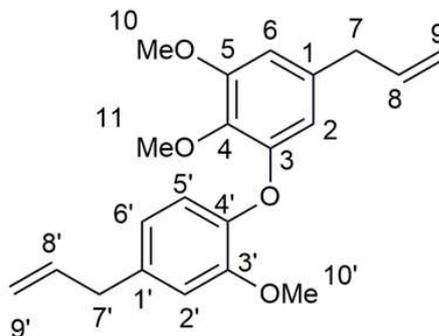
O mapa de contorno COSY (Figura 44) mostrou que os sinais de hidrogênio: δ_{H} 3,37 (H-7) está correlacionado com o δ_{H} 5,90 (H-8); o δ_{H} 5,90 (H-8) está correlacionado com o δ_{H} 3,37 (H-7) e 5,06 (H-9); o δ_{H} 5,06 (H-9) está correlacionado com o δ_{H} 5,90 (H-8); o δ_{H} 6,83 (H-5') está correlacionado com o δ_{H} 6,70 (H-6'); o δ_{H} 6,70 (H-6') está correlacionado com o δ_{H} 6,83 (H-5'); o δ_{H} 3,24 (H-7') está correlacionado com o δ_{H} 5,90 (H-8'); o δ_{H} 5,90 (H-8') está correlacionado com o δ_{H} 3,24 (H-7') e 5,06 (H-9'); o δ_{H} 5,06 (H-9') está correlacionado com o δ_{H} 5,90 (H-8') (Tabela 12).

O mapa de correlação HSQC (Figura 45) confirmou que os δ_{H} 6,28 (H-2), 6,49 (H-6), 3,37 (H-7), 5,90 (H-8), 5,06 (H-9), 3,84 (H-10), 3,88 (H-11), 6,82 (H-2'), 6,70 (H-6'), 3,24 (H-7'), 5,90 (H-8'), 5,06 (H-9') e 3,84 (H-10') estão correlacionados com os sinais em δ_{C} 107,5 (C-2), 111,5 (C-6), 40,2 (C-7), 137,6 (C-8), 116,1 (C-9), 56,3 (C-10), 61,2 (C-11), 113,2 (C-2'), 119,6 (C-5'), 120,9 (C-6'), 40,3 (C-7'), 137,3 (C-8'), 116,1 (C-9') e 56,2 (C-10'), respectivamente (Tabela 12).

Por fim, os valores de δ_{H} e δ_{C} foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos neste trabalho (Tabela 42 – Apêndice B).

Assim, os dados acima confirmam a presença dos dois anéis aromáticos unidos por um heteroátomo (oxigênio), substituídos com grupos propenilas e metoxilas, que foram suportados pelas principais correlações nos mapas de contorno COSY e HSQC. Portanto, através da análise por RMN foi possível identificar que o composto isolado na fração EHGC3F2 se tratava da neolignana *O*-metildesidrodieugenol B (**I**).

Figura 39 – Estrutura da neolignana **I** isolado de *E. paniculata*.



Fonte: o autor.

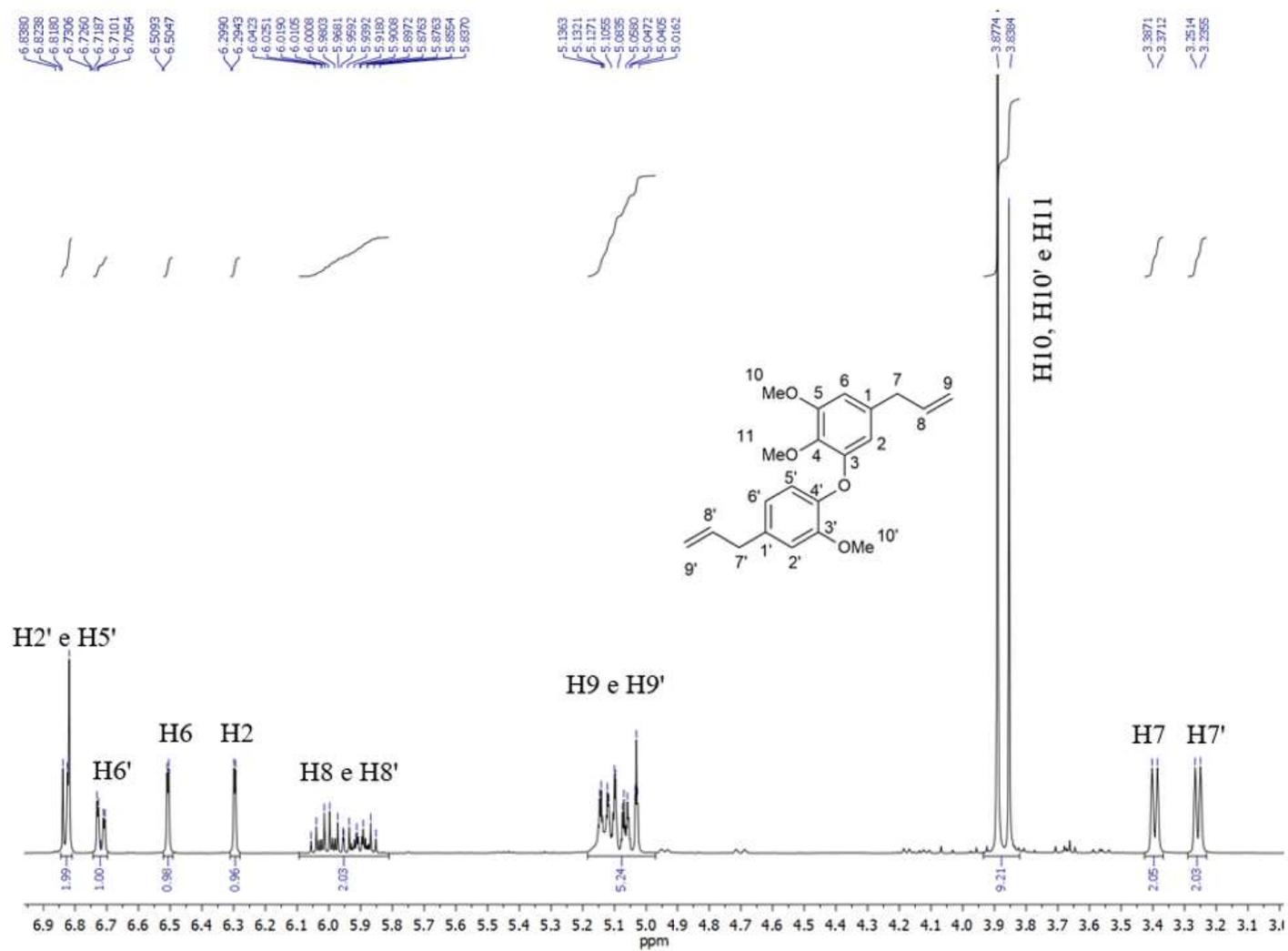
Tabela 12 – Dados de RMN do composto I em CDCl₃.

Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , J em Hz)	DEPT135	¹³ C δ _C ^a	COSY	HSQC
1	–	C	135,7	–	–
2	6,29 (d; 2,0; 1H)	CH	107,5	–	C-2
3	–	C	144,3	–	–
4	–	C	138,2	–	–
5	–	C	150,8	–	–
6	6,50 (d; 2,0; 1H)	CH	111,5	–	C-6
7	3,37 (d; 6,4; 2H)	CH ₂	40,2	H-8	C-7
8	5,90 (m; 1H)	CH	137,6	H-7, H-9	C-8
9	5,06 (m; 2H)	CH ₂	116,1	H-7, H-8	C-9
10	3,84 (s; 3H)	CH ₃	56,3	–	C-10
11	3,88 (s; 3H)	CH ₃	61,2	–	C-11
1'	–	C	136,2	–	–
2'	6,82 (sl; 2,1; 1H)	CH	113,2	–	C-2'
3'	–	C	153,7	–	–
4'	–	C	150,8	–	–
5'	6,83 (d; 7,1; 1H)	CH	119,6	–	C-5'
6'	6,71 (dd; 7,8 e 2,0; 1H)	CH	120,9	–	C-6'
7'	3,24 (d; 6,1; 2H)	CH ₂	40,3	H-8'	C-7'
8'	5,90 (m; 1H)	CH	137,3	H-7', H-9'	C-8'
9'	5,06 (m; 2H)	CH ₂	116,1	H-7', H-8'	C-9'
10'	3,88 (s; 3H)	CH ₃	56,2	–	C-10'

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, m = multipleteo.

Fonte: o autor.

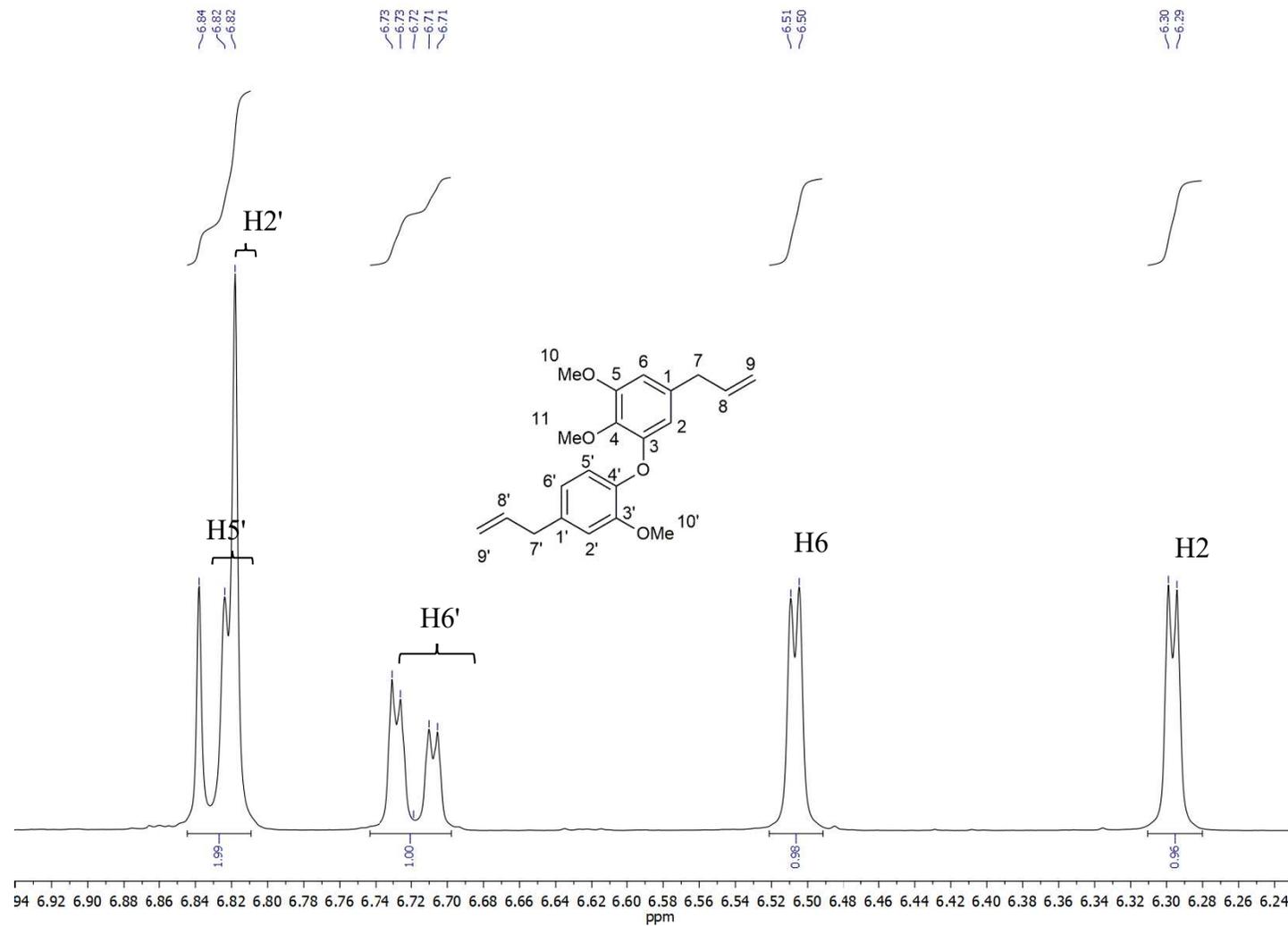
Figura 40 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,1–6,9) do composto I (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

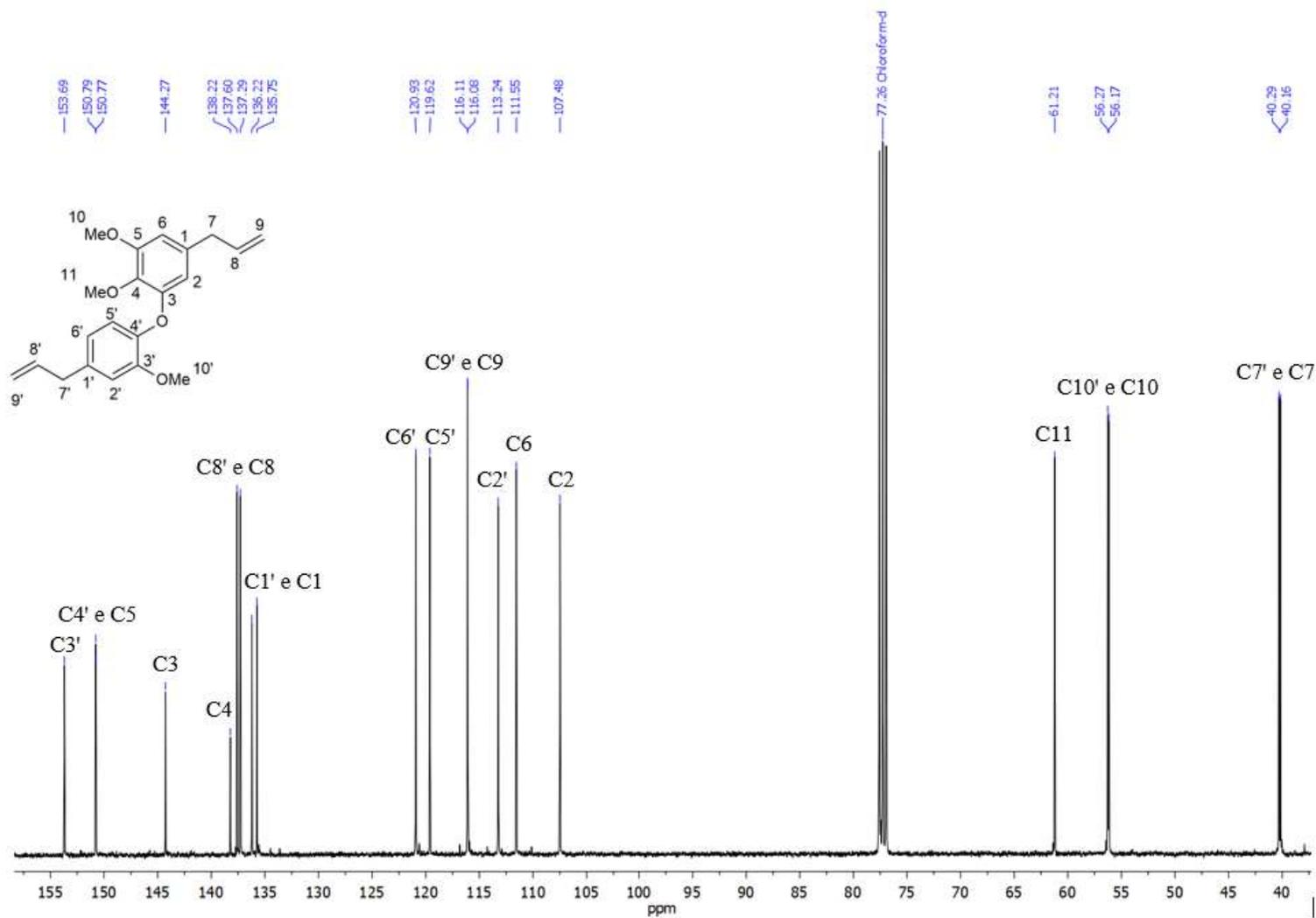
Figura 41 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,2–6,9) do composto I (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

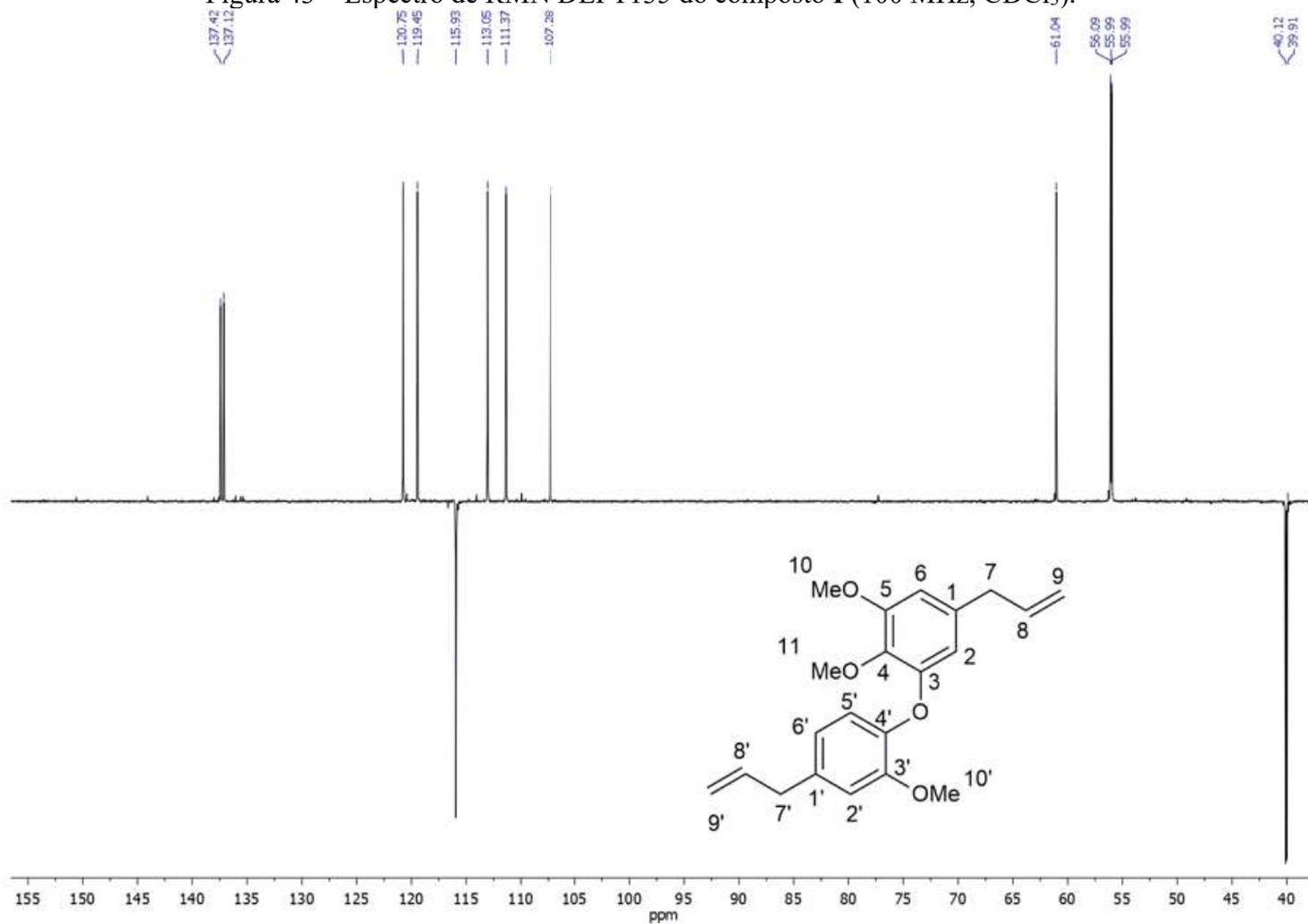
Fonte: o autor.

Figura 42 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 40–150) do composto I (100 MHz, CDCl_3).



Nota: O sinal em δ_{C} 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

Fonte: o autor

Figura 43 – Espectro de RMN DEPT135 do composto I (100 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

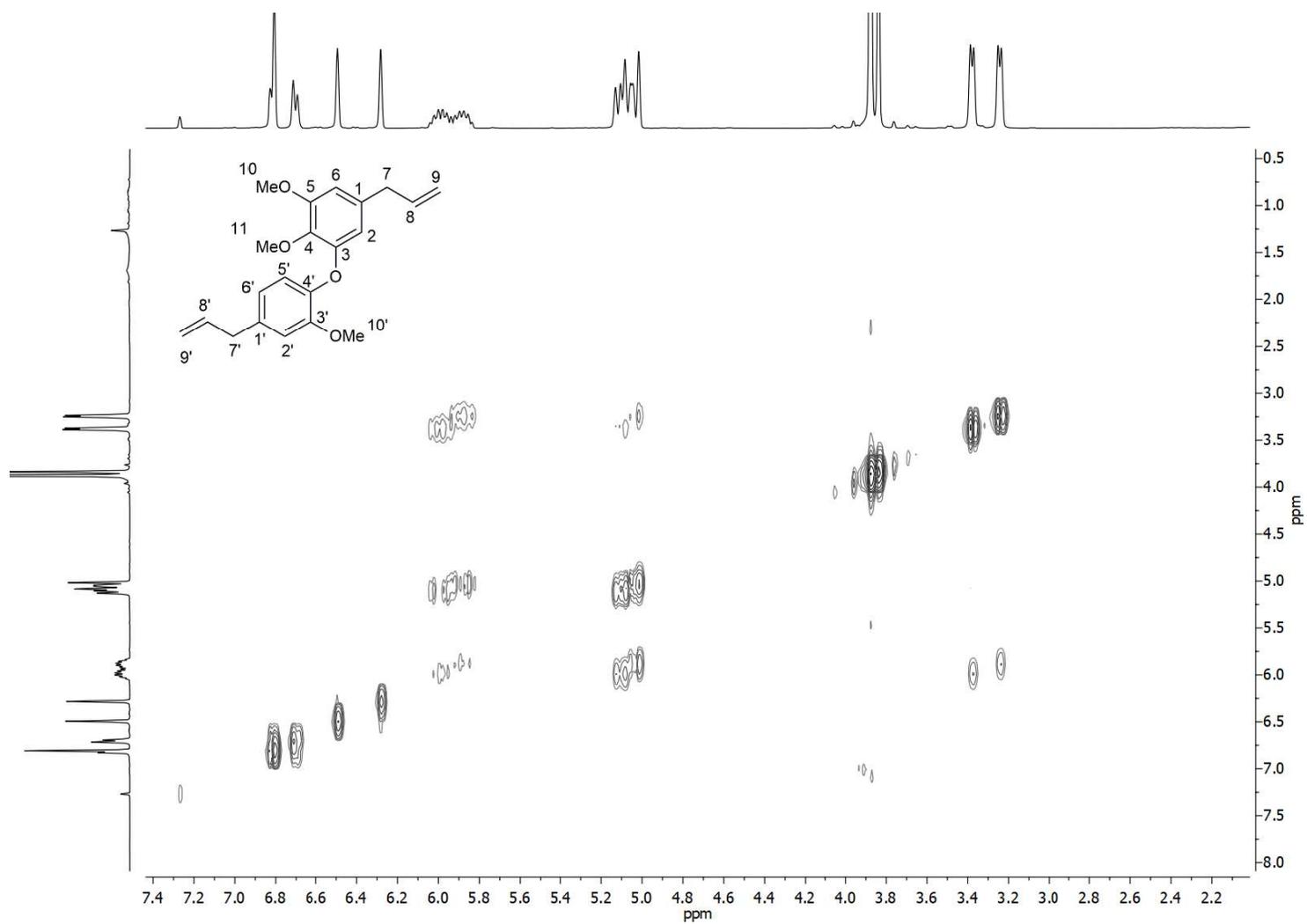
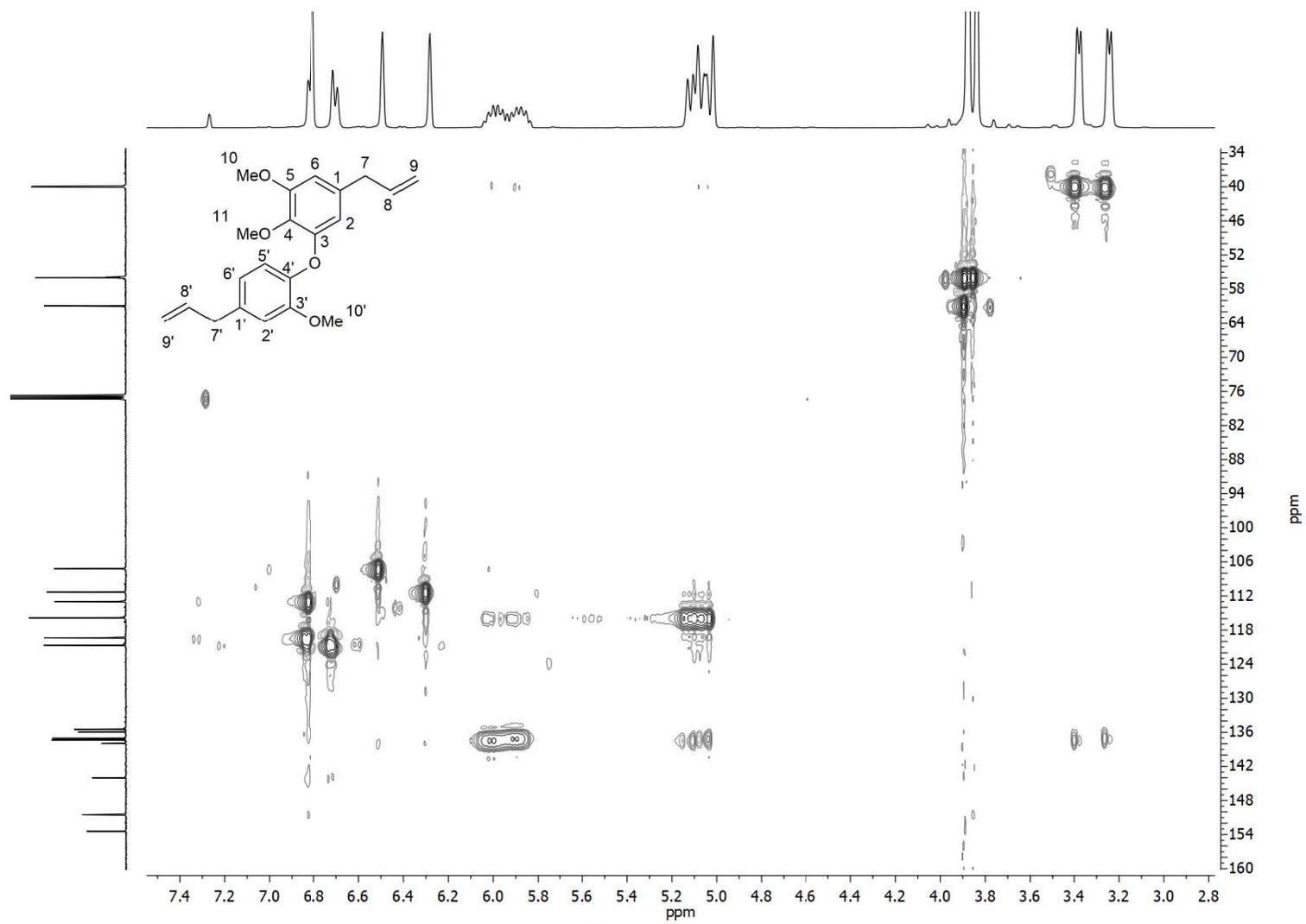
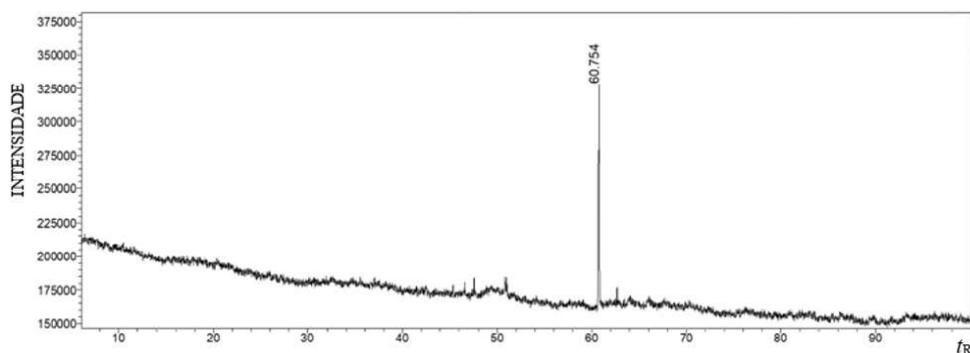
Figura 44 – Mapa de contorno COSY do composto I (400 MHz, CDCl₃).

Figura 45 – Mapa de contorno HSQC do composto I (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

A fração EHGC3F2 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de apenas um pico majoritário com t_R de 63,2 min (Figura 46). O índice aritmético (IA) calculado para este composto foi de 2428. O EM-IE do composto **I** (Figura 47) apresentou um sinal de m/z 340 (100%, pico base) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de m/z 284 (43%), 294 (35%) e 176 (18%). A proposta de mecanismo de fragmentação do *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) é ilustrado na Figura 48.

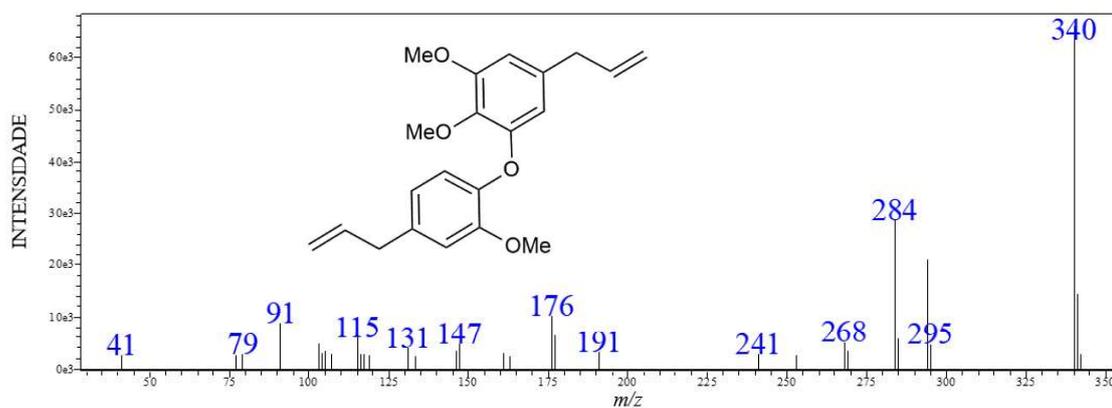
Figura 46 – Cromatograma da fração EMFC2F3 obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 47 – EM-IE do *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) obtido por CG-EM.

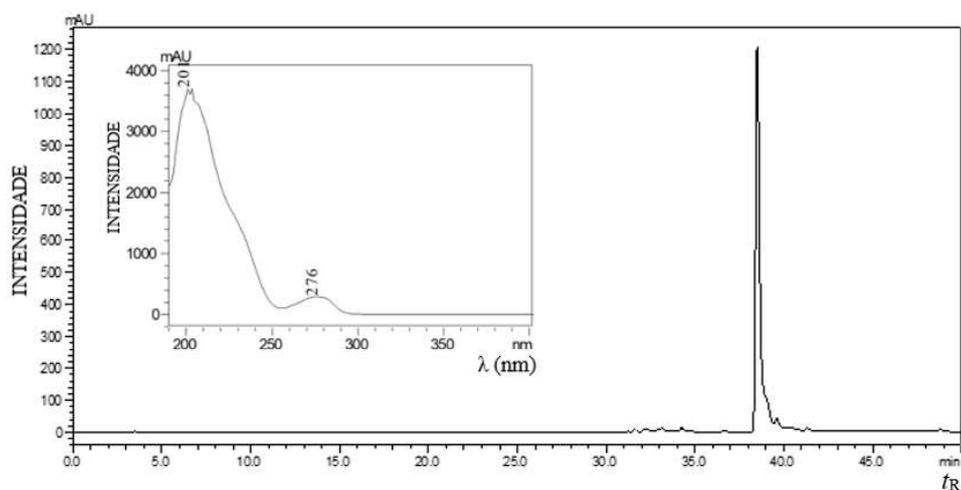


Fonte: o autor.

5.2.2 Identificação do desidrodieugenol B (II)

A fração EHGC4F4 foi analisada por CLAE–DAD–ELSD (Figura 49 e Figura 50), sendo possível observar um único sinal com t_R em 38,5 min, cujo espectro de DAD–UV apresentou máximos de absorção em 200 e 276 nm (Figura 106). Estes dados quando comparados aos da literatura, foram similares aos reportados por Costa-Silva e colaboradores (2015).

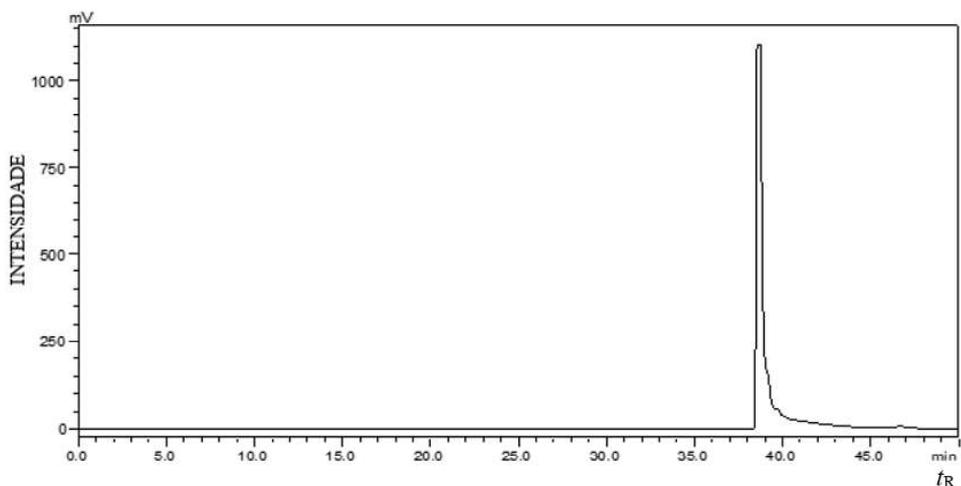
Figura 49 – Cromatograma do composto II obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 50 – Cromatograma do composto II obtido por CLAE–ELSD.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

A fração EHGC4F4 apresentou apenas um composto e foi submetida as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O composto **II** mostrou dados de RMN virtualmente idênticos aos espectros de **I**, mas exibiram um pico a menos em δ_{H} 3,8 e δ_{C} 61,2 atribuídos a um grupo metoxi em C-4 de **I**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 52 e Figura 53) mostrou sinais de dupletos de δ_{H} 6,4 a 6,9 de hidrogênios aromáticos (H-2', H-5', H-6', H-2 e H-6), com integral para um hidrogênio (1H), cada duplete, gerados a partir dos acoplamentos em meta de H-2' com H-6' e H-2 com H-6, todos com constante de acoplamento próximo a $J = 2,0$ Hz. Um duplo duplete em δ_{H} 6,71 (1H, H-6'), gerado a partir dos acoplamentos em *orto* (H-5', $J = 8,1$ Hz) e *meta* (H-2', $J = 2,1$ Hz). Um multiplete em δ_{H} 5,98 de hidrogênios vinílicos (2H, H-8' e H-8); um multiplete em δ_{H} 5,06 de hidrogênios vinílicos terminais (4H, H-9' e H-9); dois simpletos em δ_{H} 3,86 (10'-OCH₃) e 3,87 (10-OCH₃); dois dupletos metilênicos em δ_{H} 3,36 (2H, H-7') e 3,24 (2H, H-7), gerados a partir dos acoplamentos vicinais de H-7 com H-8 e H-7' com H-8', todos com constante de acoplamento próximo a $J = 6,4$ Hz (Tabela 13).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54) mostrou sinais de carbono em: δ_{C} 150,4; 147,8; 144,2; 136,4 e 135,4 que confirmam a presença do anel aromático (C1 a C6 e C1' a C6'); δ_{C} 137,5 e 137,3 de carbonos vinílicos (C-8', C-8, C-9' e C-9) que confirmam a presença da ligação dupla; δ_{C} 55,9 e 56,2 que confirmam a presença de duas metoxilas (C-10 e C-10'); e por último a presença de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 40,0 e 39,9 (C-7' e C-7) (Tabela 13).

O espectro de RMN DEPT135 (Figura 55) mostrou sinais de sete carbonos metínicos (CH), quatro sinais de carbonos metilênicos (CH₂) e dois sinais de metilas (CH₃) (Tabela 13).

O mapa de contorno COSY (Figura 56) mostrou que os sinais de hidrogênio: δ_{H} 3,24 (H-7) está correlacionado com o δ_{H} 5,98 (H-8); o δ_{H} 5,98 (H-8) está correlacionado com o δ_{H} 3,24 (H-7) e 5,06 (H-9); o δ_{H} 5,06 (H-9) está correlacionado com o δ_{H} 5,98 (H-8); o δ_{H} 6,89 (H-5') está correlacionado com o δ_{H} 6,71 (H-6'); o δ_{H} 6,71 (H-6') está correlacionado com o δ_{H} 6,89 (H-5'); o δ_{H} 3,36 (H-7') está correlacionado com o δ_{H} 5,98 (H-8'); o δ_{H} 5,98 (H-8') está correlacionado com o δ_{H} 3,36 (H-7') e 5,06 (H-9'); o δ_{H} 5,06 (H-9') está correlacionado com o δ_{H} 5,98 (H-8') (Tabela 13).

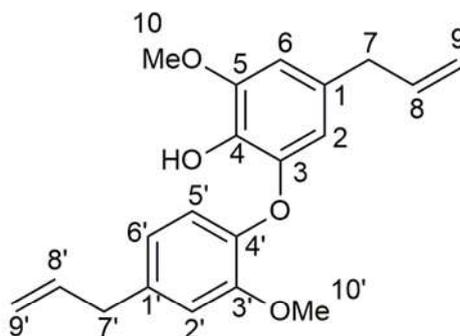
O mapa de correlação HSQC (Figura 57) confirmou que os δ_{H} 6,50 (H-2), 6,40 (H-6), 3,24 (H-7), 5,98 (H-8), 5,06 (H-9), 3,87 (H-10), 6,80 (H-2'), 6,89 (H-5'), 6,71 (H-5'), 3,36 (H-7'), 5,98 (H-8'), 5,06 (H-9') e 3,86 (H-10') estão correlacionados com os δ_{C} 107,5 (C-2), 112,1 (C-6), 40,1 (C-7), 137,5 (C-8), 115,9 (C-9), 56,5 (C-10), 113,1 (C-2'), 119,7 (C-5'), 121,1 (C-6'), 40,2 (C-7'), 137,6 (C-8'), 116,2 (C-9'), 56,2 (C-10'), respectivamente (Tabela 13).

O mapa de correlação HMBC (Figura 58) confirmou que: o δ_H 6,40 (H-2) está correlacionado com os δ_C 144,6 (C-3, $^2J_{CH}$), 135,4 (C-4, $^3J_{CH}$), 148,1 (C-5, $^4J_{CH}$) e 112,1 (C-6, $^3J_{CH}$); o δ_H 6,50 (H-6) está correlacionado com os δ_C 107,5 (C-2, $^3J_{CH}$), 135,4 (C-4, $^3J_{CH}$), 148,1 (C-5, $^2J_{CH}$) e 40,1 (C-7, $^3J_{CH}$); o δ_H 6,80 (H-2') está correlacionado com os δ_C 150,6 (C-3', $^2J_{CH}$), 144,4 (C-4', $^3J_{CH}$), 121,1 (C-6', $^3J_{CH}$) e 40,2 (C-7', $^3J_{CH}$); o δ_H 6,89 (H-5') está correlacionado com os δ_C 136,6 (C-1', $^3J_{CH}$), 150,6 (C-3', $^3J_{CH}$), 144,4 (C-4', $^2J_{CH}$) e 121,1 (C-6', $^2J_{CH}$); o δ_H 6,71 (H-6') está correlacionado com os δ_C 113,1 (C-2', $^3J_{CH}$), 144,4 (C-4', $^3J_{CH}$), 119,7 (C-5', $^2J_{CH}$) e 40,2 (C-7', $^3J_{CH}$) (Tabela 13).

Por fim, os valores de δ_H e δ_C foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos neste trabalho (Tabela 43 – Apendice B).

Assim, os dados acima confirmam a presença dos dois anéis aromáticos unidos por um heteroátomo (oxigênio), substituídos com grupos propenilas, metoxilas e uma hidroxila, que foram suportados pelas principais correlações nos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC. Portanto, através da análise por RMN foi possível identificar que o composto isolado na fração EHGC4F4 se tratava da neolignana desidrodieugenol B (II).

Figura 51 – Estrutura da neolignana II isolado de *E. paniculata*.



Fonte: o autor.

Tabela 13 – Dados de RMN do composto **II** em CDCl₃^a.

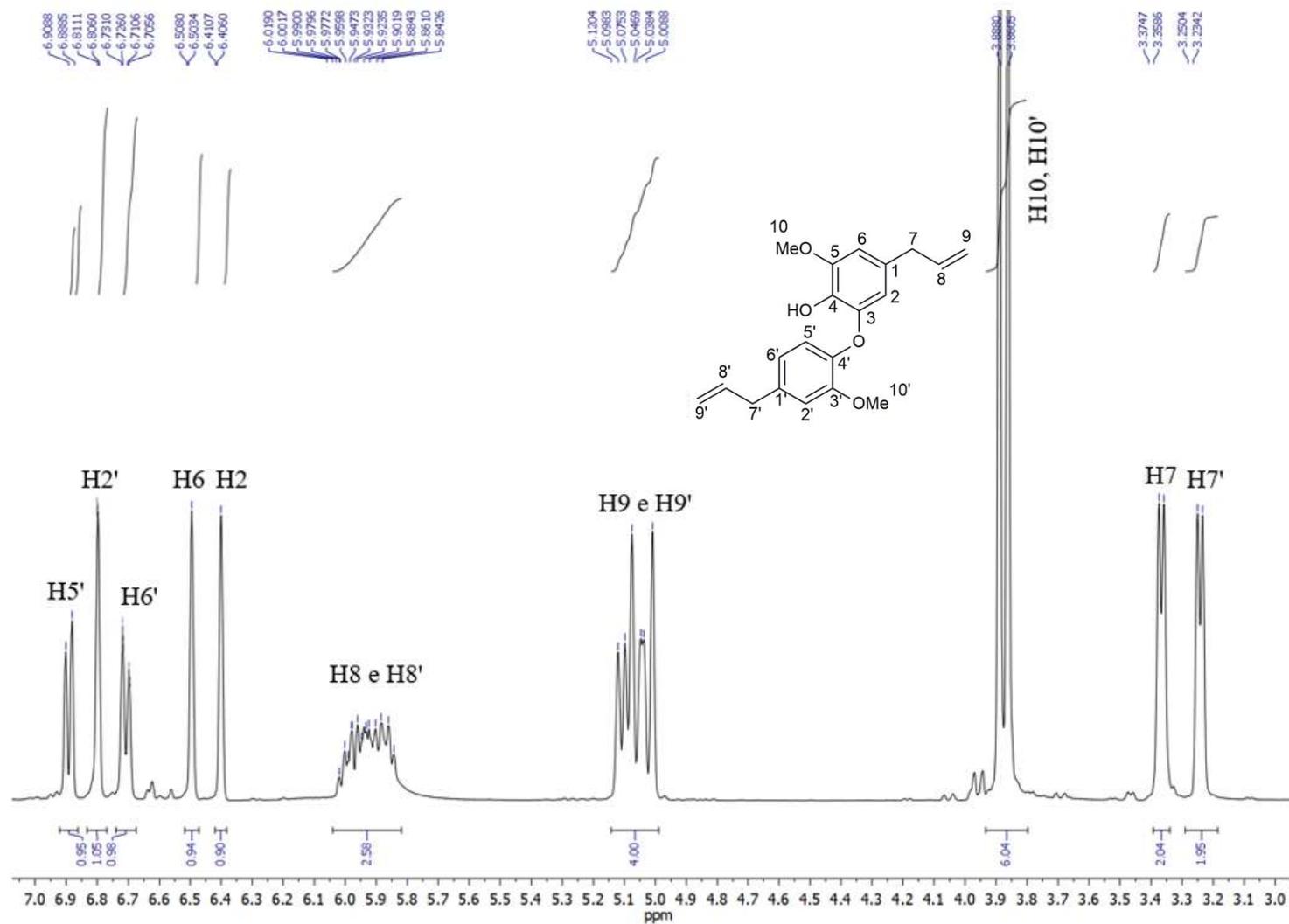
Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , <i>J</i> em Hz)	DEPT135	¹³ C δ _C ^a	COSY	HSQC	HMBC
1	–	C	131,28	–	–	–
2	6,40 (d; 1,9; 1H)	CH	107,48	–	C-2	C-3, C-4, C-5, C-6
3	–	C	144,64	–	–	–
4	–	C	135,41	–	–	–
5	–	C	148,06	–	–	–
6	6,50 (d; 2,0; 1H)	CH	112,07	–	C-6	C-2, C-4, C-5, C-7
7	3,24 (d; 6,4; 2H)	CH ₂	40,13	H-8	C-7	–
8	5,98 (m; 1H)	CH	137,50	H-7, H-9	C-8	–
9	5,06 (m; 2H)	CH ₂	115,94	H-8	C-9	–
10	3,87 (s; 3H)	CH ₃	56,46	–	C-10	–
1'	–	C	136,64	–	–	–
2'	6,80 (d; 1,9; 1H)	CH	113,14	–	C-2'	C-3', C-4', C-6', C-7'
3'	–	C	150,62	–	–	–
4'	–	C	144,44	–	–	–
5'	6,89 (d; 8,0; 1H)	CH	119,72	H-6'	C-6'	C-1', C-3', C-4', C-6'
6'	6,71 (dd; 8,1 e 2,1; 1H)	CH	121,06	H-5'	C-5'	C-2', C-4', C-6', C-7'
7'	3,36 (d; 6,4; 2H)	CH ₂	40,18	H-8'	C-8'	–
8'	5,98 (m; 1H)	CH	137,65	H-7', H-9'	C-8'	–
9'	5,06 (m; 2H)	CH ₂	116,20	H-8'	C-9'	–
10'	3,86 (s; 3H)	CH ₃	56,21	–	C-10'	–

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

^bMultiplicidade: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, m = multiplete.

Fonte: o autor.

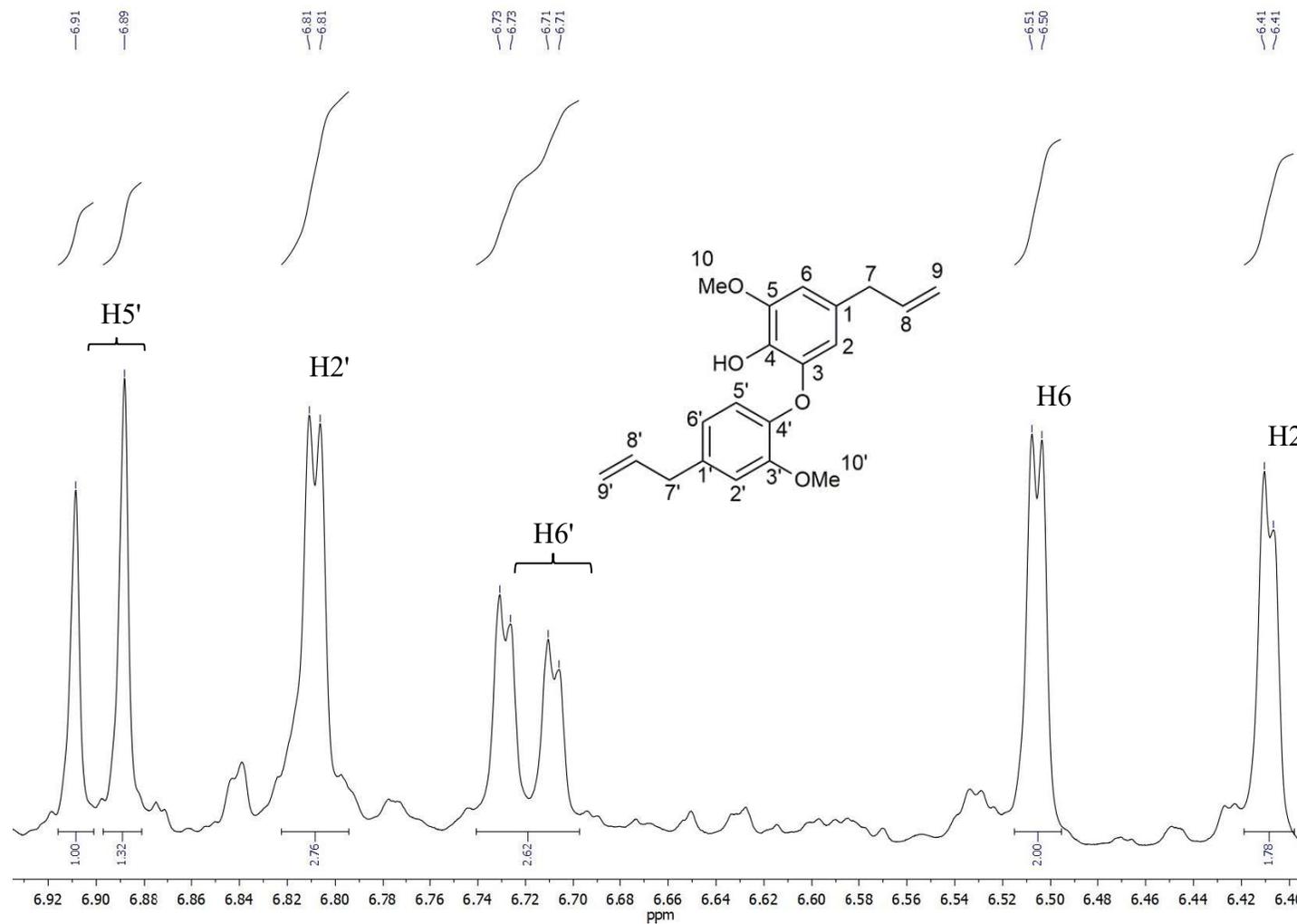
Figura 52 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,0–7,0) do composto **II** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

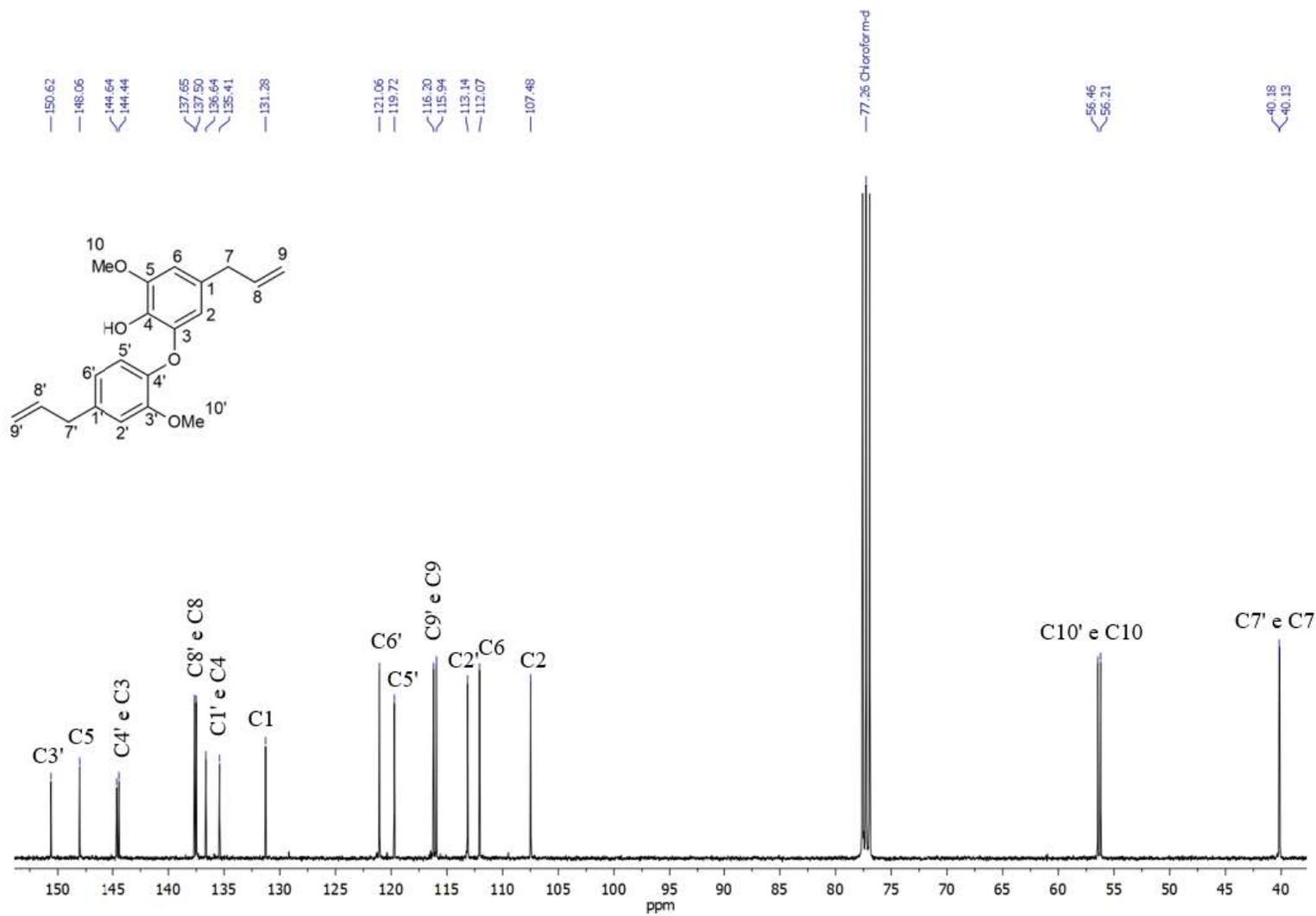
Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,4–7,0) do composto **II** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

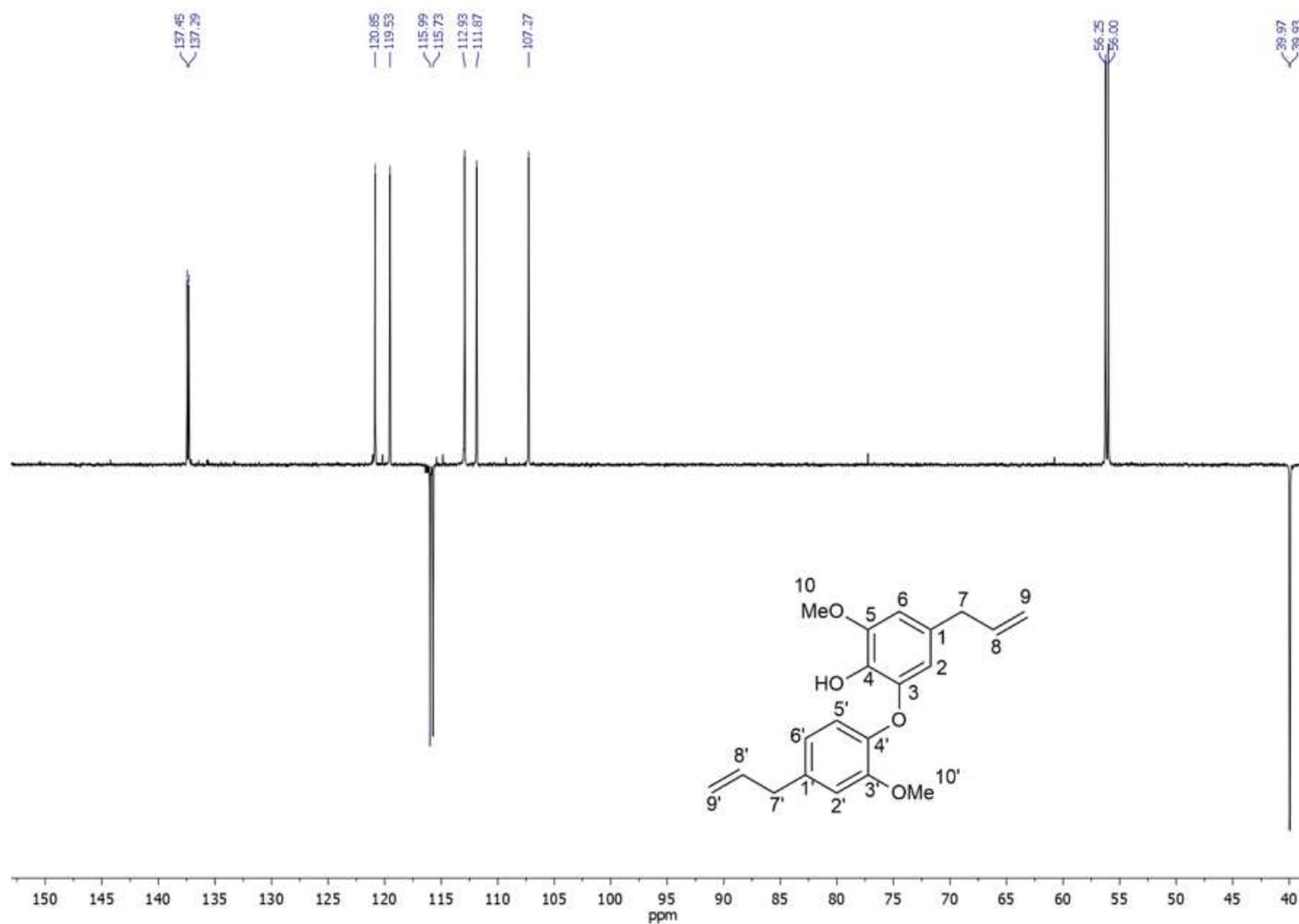
Fonte: o autor.

Figura 54 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 40–150) do composto **II** (100 MHz, CDCl_3).

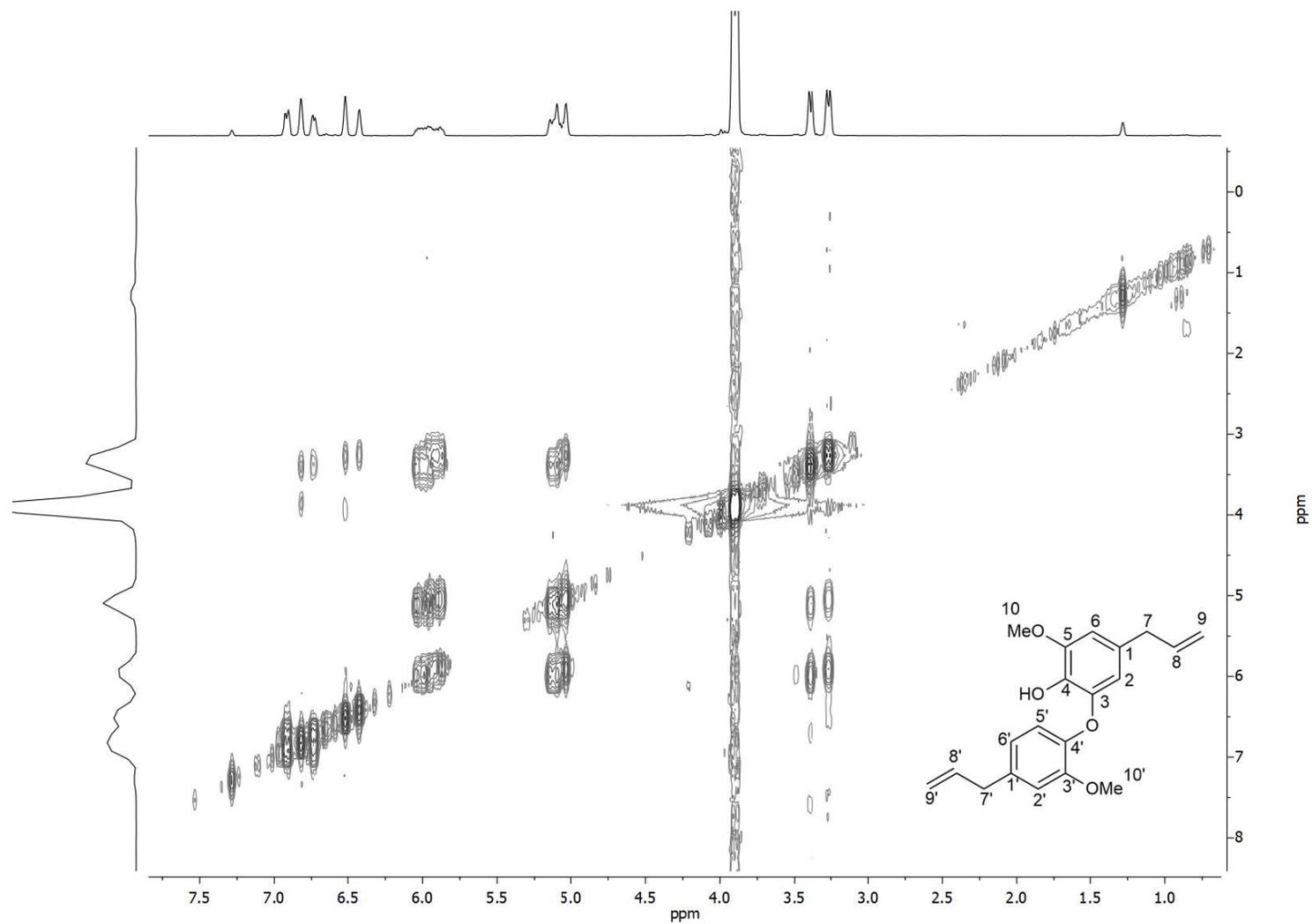


Nota: O sinal em δ_{C} 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

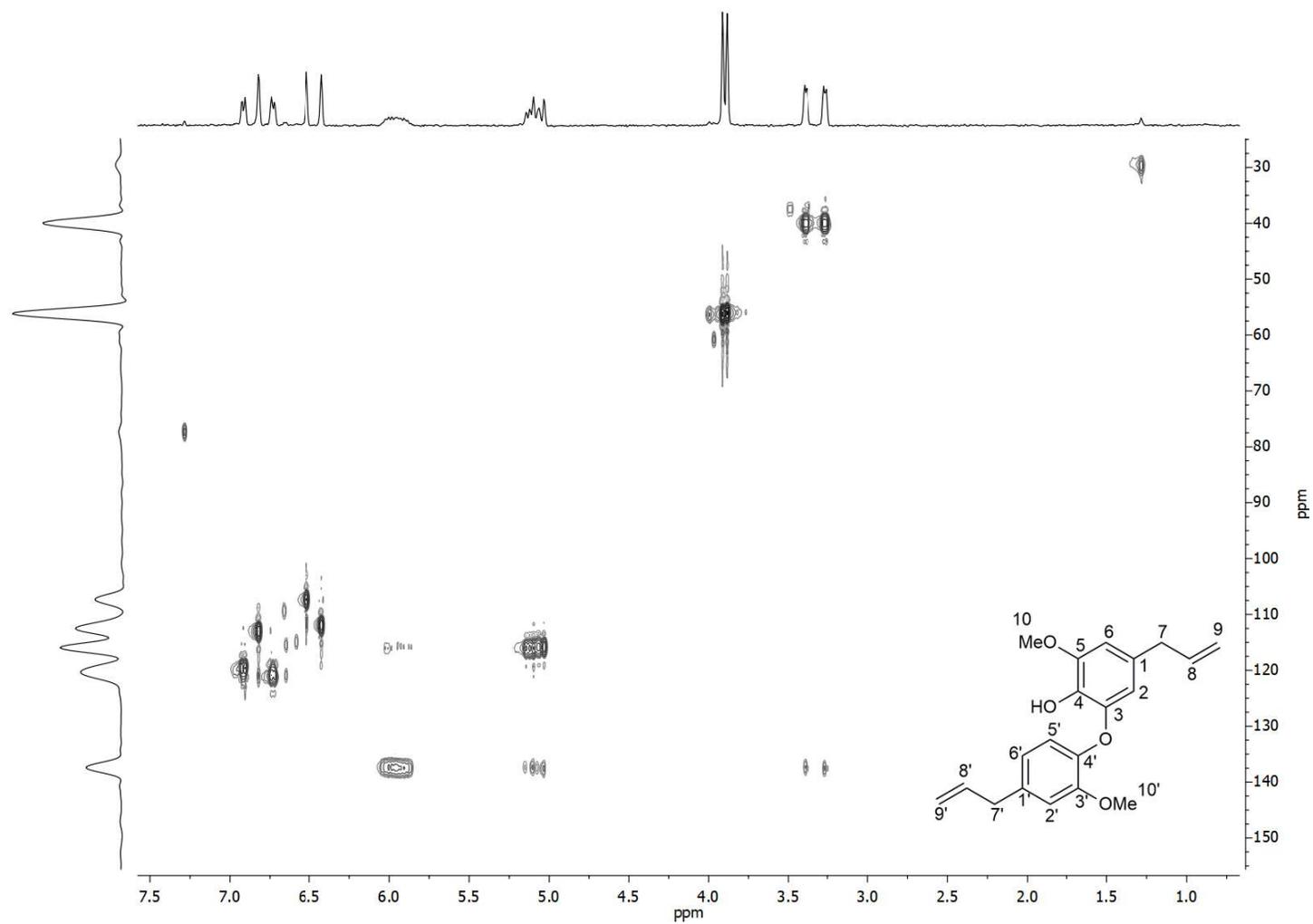
Fonte: o autor

Figura 55 – Espectro de RMN DEPT135 do composto **II** (100 MHz, CDCl₃).

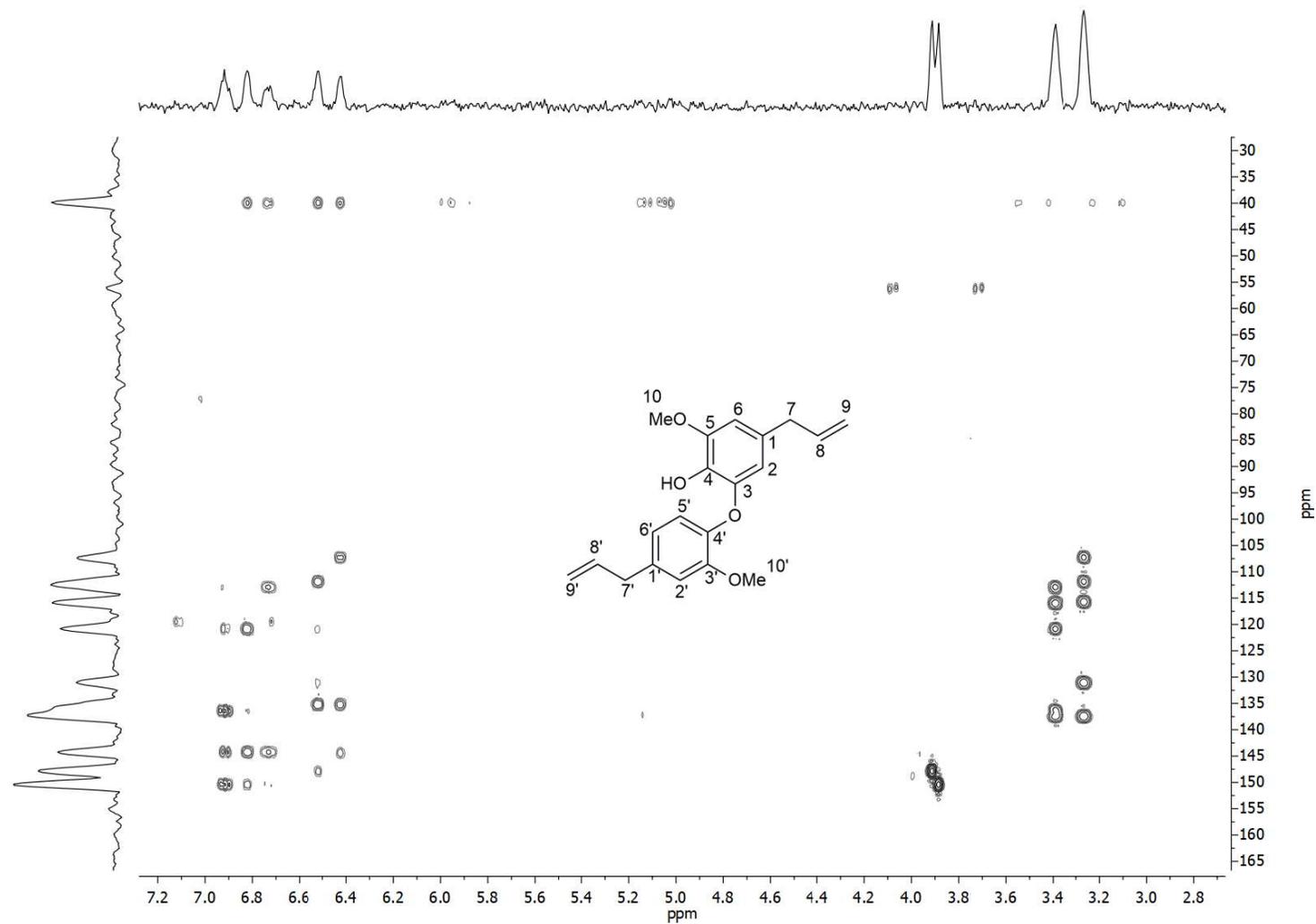
Fonte: o autor.

Figura 56 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

Figura 57 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

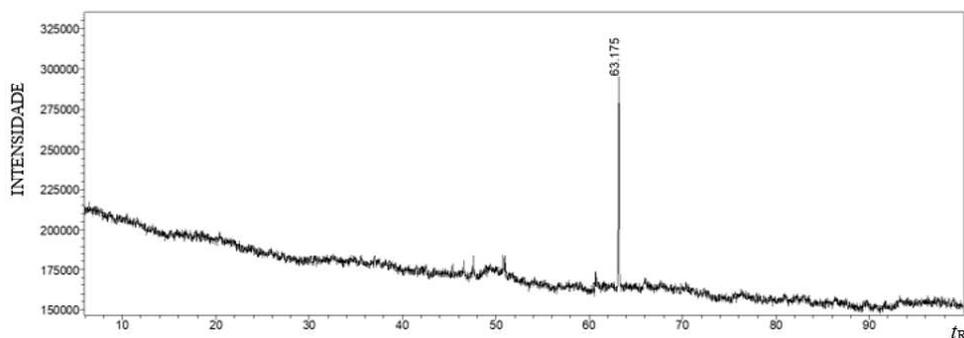
Fonte: o autor.

Figura 58 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

A fração EHGC4F4 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de apenas um pico majoritário com t_R de 63,17 min (Figura 59). O índice aritmético (IA) calculado para este composto foi de 2533. O EM-IE do composto **II** (Figura 60) apresentou um sinal de m/z 326 (100%) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de m/z 148 (75%), 117 (37%) e 91 (23%). A proposta de mecanismo de fragmentação do desidrodieugenol B (**II**) é ilustrado na Figura 61.

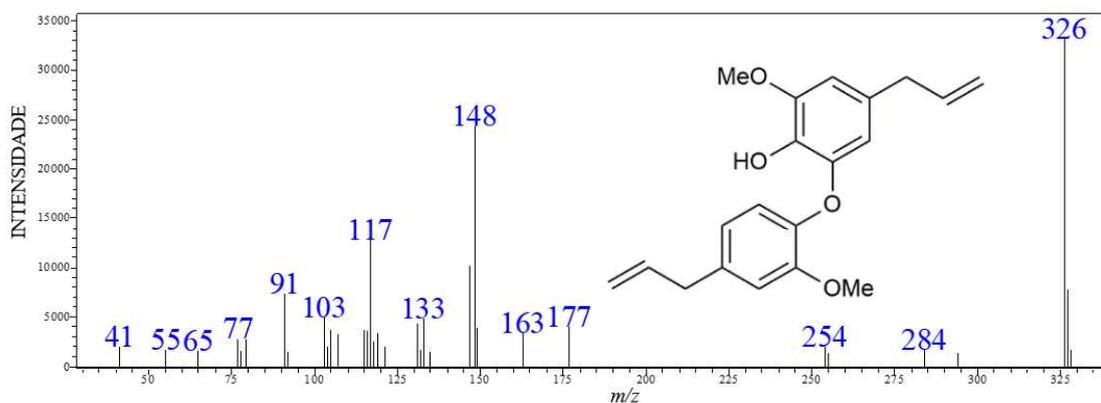
Figura 59 – Cromatograma da fração EHGC4F4 obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

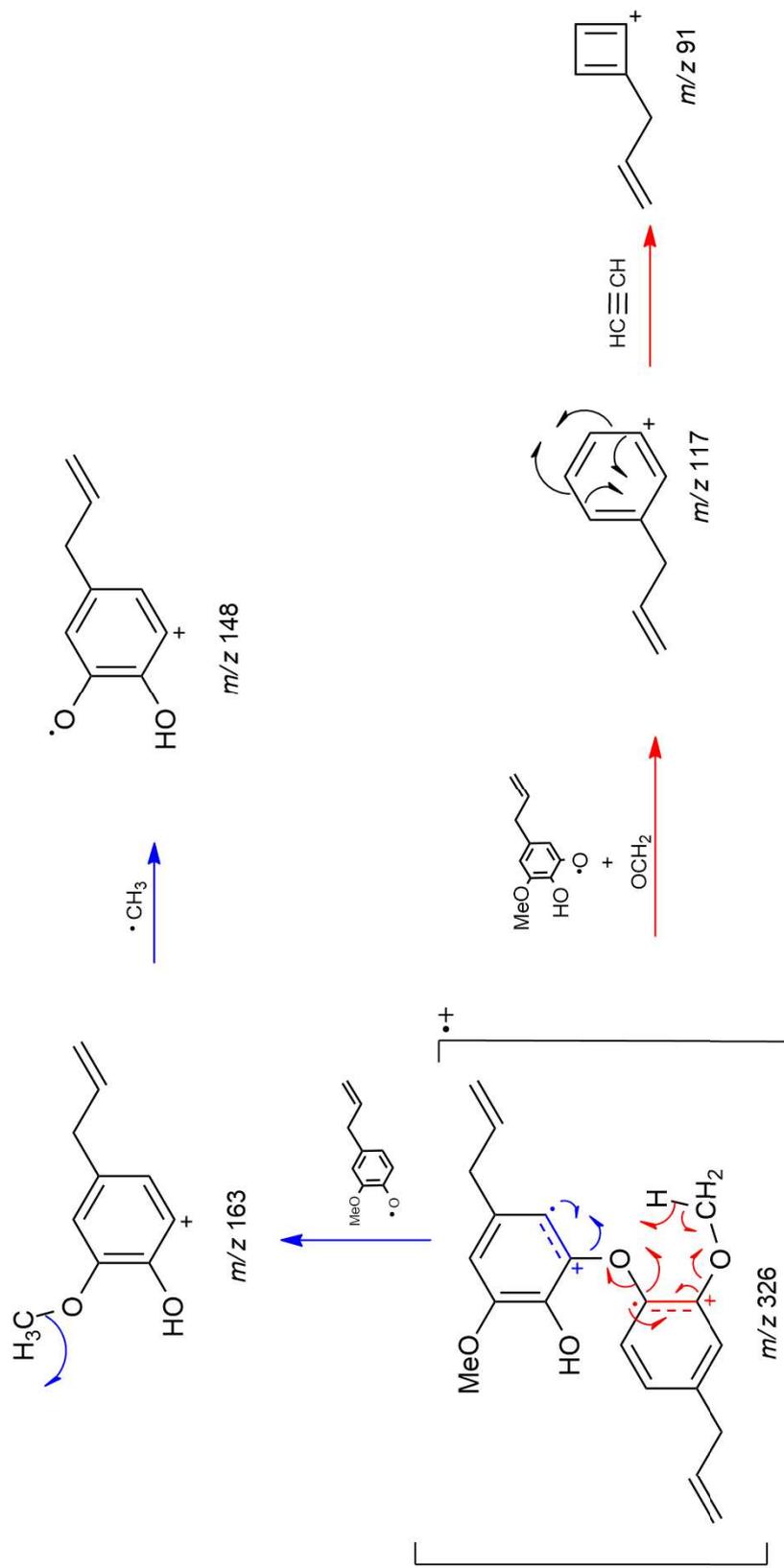
Fonte: o autor.

Figura 60 – EM-IE do desidrodieugenol B (**II**) obtido por CG-EM.



Fonte: o autor.

Figura 61 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o desidrodieugenol B (II).



Fonte: o autor.

5.2.3 Identificação do β -sitosterol (III)

A fração EHGC4F1 apresentou apenas um composto e foi submetida as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 63) mostrou sinais de hidrogênios em: δ_{H} 0,67 a 2,3 correspondentes aos hidrogênios das metilas e metilenas presentes no composto; dois simpletos de metilas em δ_{H} 0,71 (3H, H-29) e 1,01 (3H, H-28); três multipletos de metilas em δ_{H} 0,81 (3H, H-27), 0,83 (3H, H-26) e 0,84 (3H, H-24), gerado a partir dos acoplamentos com H-23 e H-25; um duplete de uma metila em δ_{H} 0,92 (3H, $J = 6,0$ Hz, H-19), gerado a partir do acoplamento com H-18; um multiplete em δ_{H} 3,5 (H-3) sendo este sinal correspondente ao hidrogênio carbinólico, com integral para um hidrogênio (1H), gerado a partir dos acoplamentos com H-2 e H-4; um tripleto em δ_{H} 5,35 (1H, $J = 5,1$ Hz, H-6), gerado a partir do acoplamento com H-7 (Tabela 14).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64) mostrou sinais de carbonos em: δ_{C} 12,1 e 12,2 referentes aos carbonos C-19 e C-29 das metilas; δ_{C} 141,1 e 121,8 referentes a insaturação em C-5/C-6; δ_{C} 72,1 referente ao carbono carbinólico (Tabela 14).

O espectro de RMN DEPT135 (Figura 65) mostrou sinais de quinze carbonos ligados a hidrogênios (CH ou CH_3) e onze sinais de carbonos ligado a dois hidrogênios (CH_2) (Tabela 14).

O mapa de contorno COSY (Figura 66) mostrou que os sinais de hidrogênio: δ_{H} 5,36 (H-6) está correlacionado com hidrogênios com δ_{H} 1,45 a 2,31, que é o H-7; o δ_{H} 3,53 (H-3) está correlacionado com hidrogênios com δ_{H} 1,43 a 2,44, que são os H-2 e H-3; o δ_{H} 0,92 (H-19) está correlacionado com δ_{H} 1,25 a 1,92, que é o H-18; o δ_{H} 0,84 (H-24) está correlacionado com δ_{H} 1,40, que é o H-23; os δ_{H} 0,83 (H-26) e 0,81 (H-27) estão correlacionados com δ_{H} 1,40, que é o H-25 (Tabela 14).

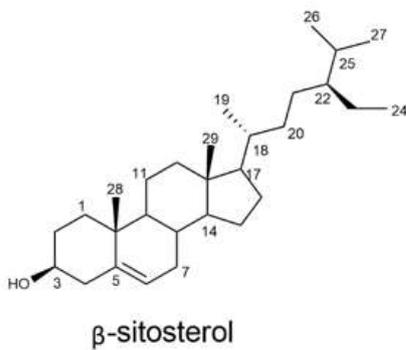
O mapa de correlação HSQC (Figura 67) confirmou que os δ_{H} 3,53 (H-3), 5,36 (H-6), 0,92 (H-19), 0,84 (H-24), 0,70 a 1,01 (H-26-28) estão correlacionados aos δ_{C} 72,1 (C-3), 122,0 (C-6), 19,3 (C-19), 12,2 (C-24), 12,1 a 20,1 (C-26-28), respectivamente (Tabela 14).

Por fim, os valores de δ_{H} e δ_{C} foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos neste trabalho (Tabela 44 – Apêndice B).

Assim, os dados acima confirmam a presença de um núcleo esteroidal com uma hidroxila no C-3, uma ligação dupla em C-5/C-6 e seis grupos metílicos, suportados pelas principais correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HSQC, que estão de acordo com a estrutura do β -sitosterol (III) (Figura 62). A estereoquímica deste composto foi atribuída

levando-se em consideração o fato de que o β -sitosterol é um dos fitoesteróis mais comuns encontrados em plantas (Moreau, Whitaker, Hicks, 2002).

Figura 62 – Estrutura do esteroide **III** isolado de *E. paniculata*.



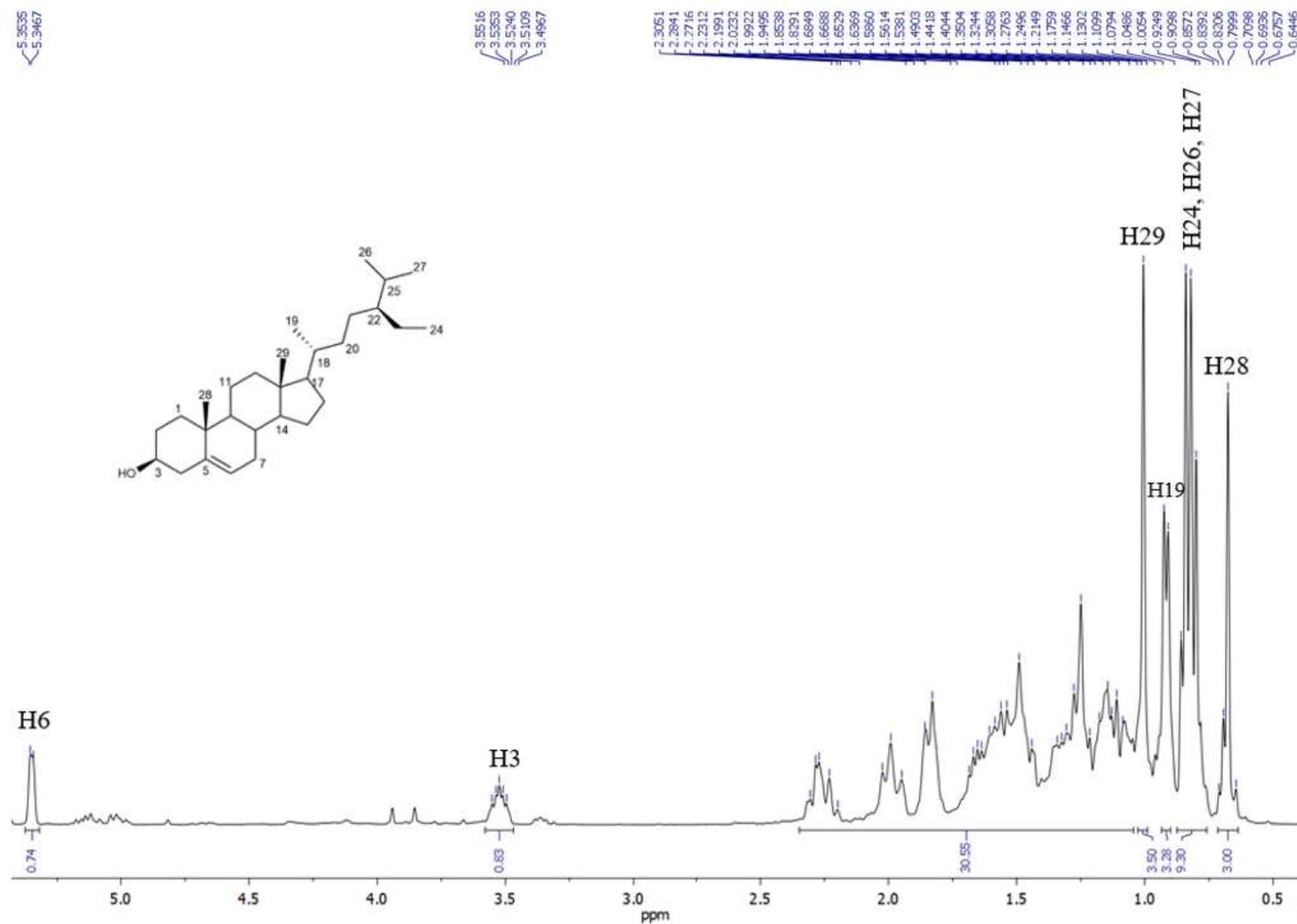
Fonte: o autor.

Tabela 14 – Dados de RMN do composto **III** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , <i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^a	DEPT135	COSY	HSQC
1	–	37,5	CH ₂	–	–
2	–	31,9	CH ₂	–	–
3	3,53 (tdd; 5,1 e 4,9 e 4,7; 1H)	72,1	CH	H-2, H-3	C-3
4	–	42,5	CH ₂	–	–
5	–	141,0	C	–	–
6	5,36 (t; 5,1; 1H)	122,0	CH	H-7	C-6
7	–	32,1	CH ₂	–	–
8	–	32,2	CH	–	–
9	–	50,4	CH	–	–
10	–	36,7	C	–	–
11	–	21,3	CH ₂	–	–
12	–	40,0	CH ₂	–	–
13	–	42,6	C	–	–
14	–	57,0	CH	–	–
15	–	24,5	CH ₂	–	–
16	–	28,5	CH ₂	–	–
17	–	56,3	CH	–	–
18	–	36,4	CH	–	–
19	0,92 (d; 6,0; 3H)	19,3	CH ₃	H-18	C-19
20	–	34,2	CH ₂	–	–
21	–	26,3	CH ₂	–	–
22	–	46,1	CH	–	–
23	–	23,3	CH ₂	–	–
24	0,84 (m; 3H)	12,2	CH ₃	H-23	C-24
25	–	29,4	CH	–	–
26	0,83 (m; 3H)	20,1	CH ₃	H-25	C-26
27	0,81 (m; 3H)	19,6	CH ₃	H-25	C-27
28	1,01 (s; 3H)	19,0	CH ₃	–	C-28
29	0,70 (s; 3H)	12,1	CH ₃	–	C-29

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s = simpleto, d = dupletto, t = tripleto, tdd = triplo duplo dupletto, m = multipletto. Fonte: o autor.

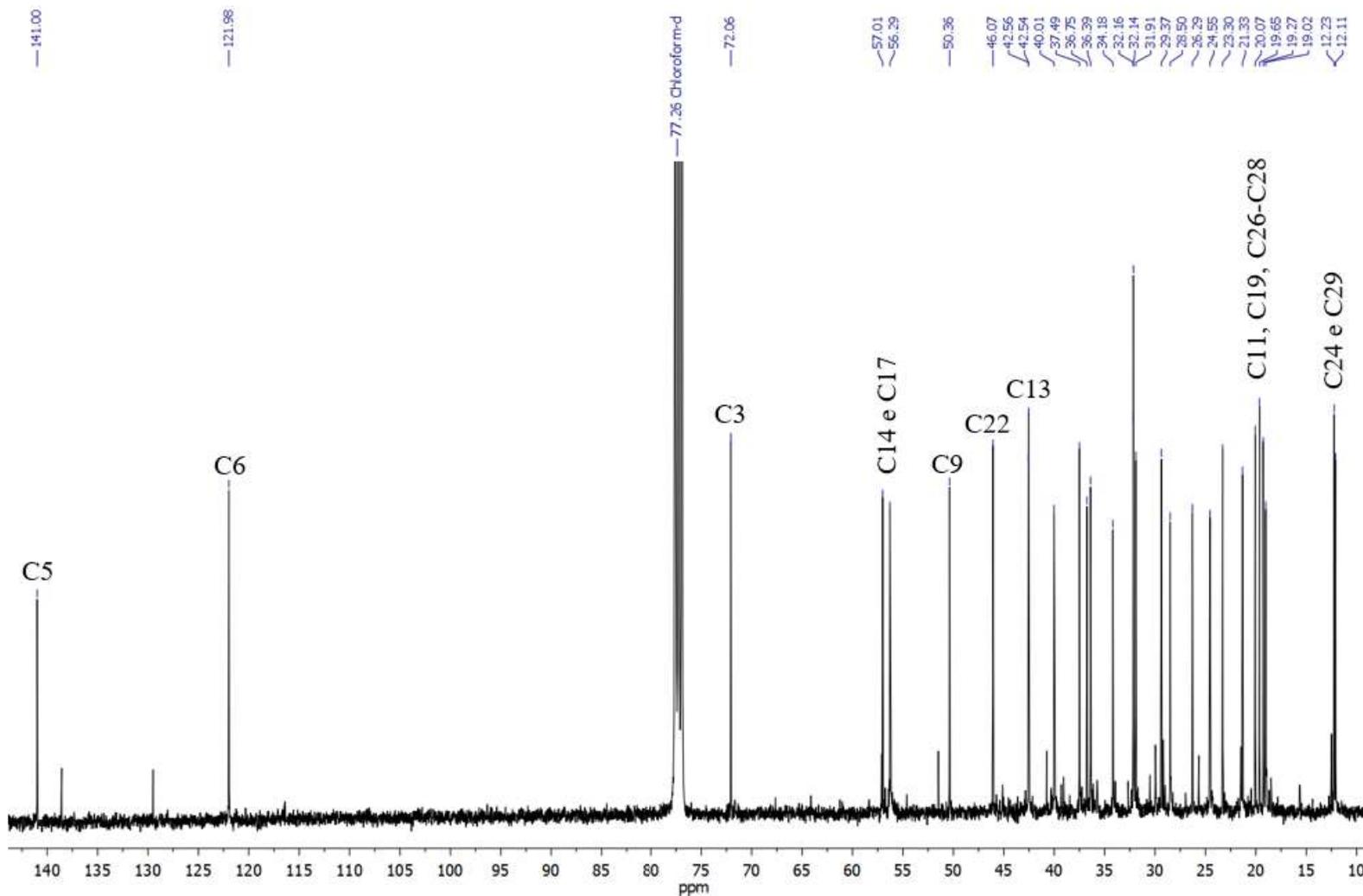
Figura 63 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,5–5,0) do composto **III** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

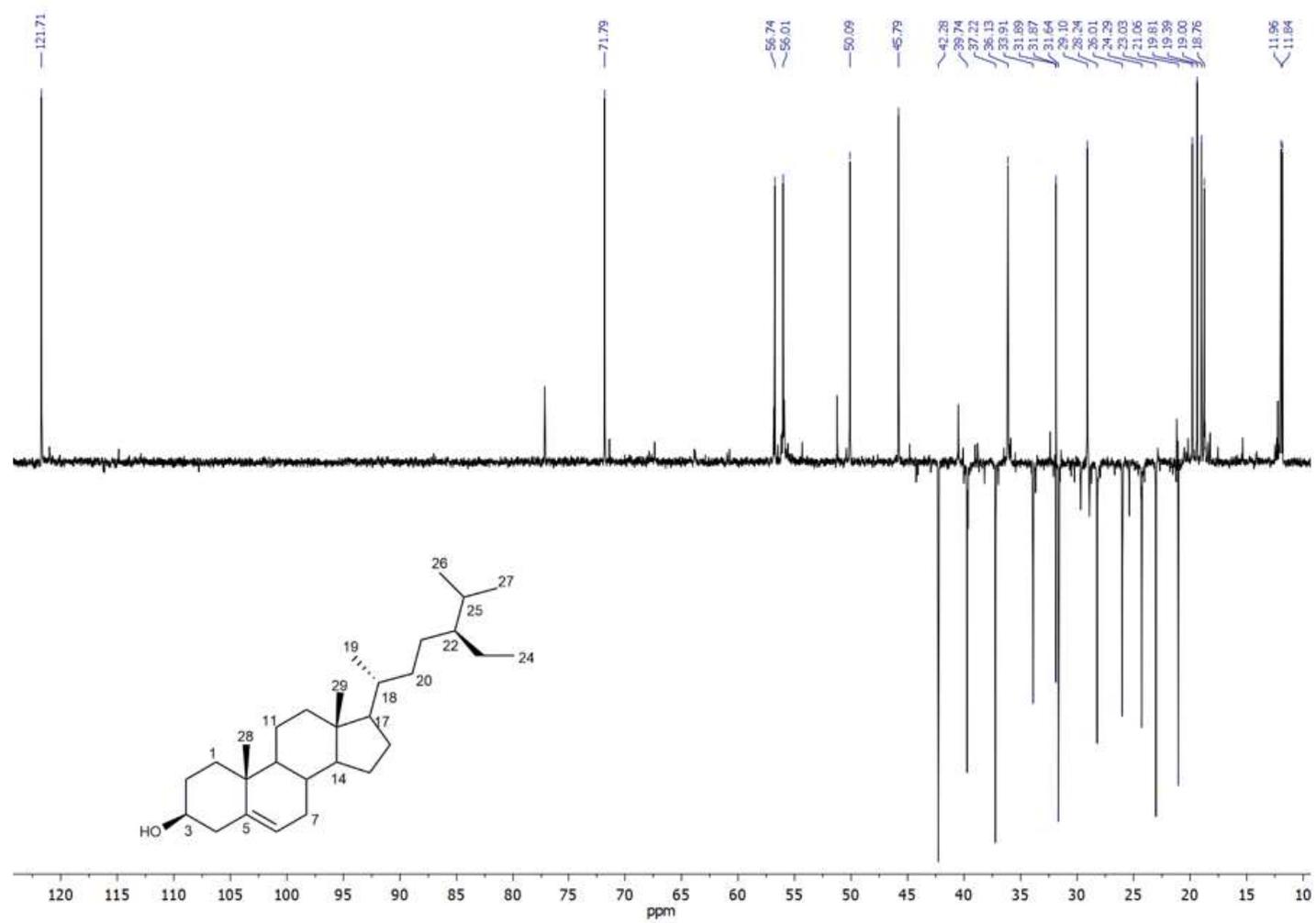
Figura 64 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 10–140) do composto **III** (100 MHz, CDCl_3).



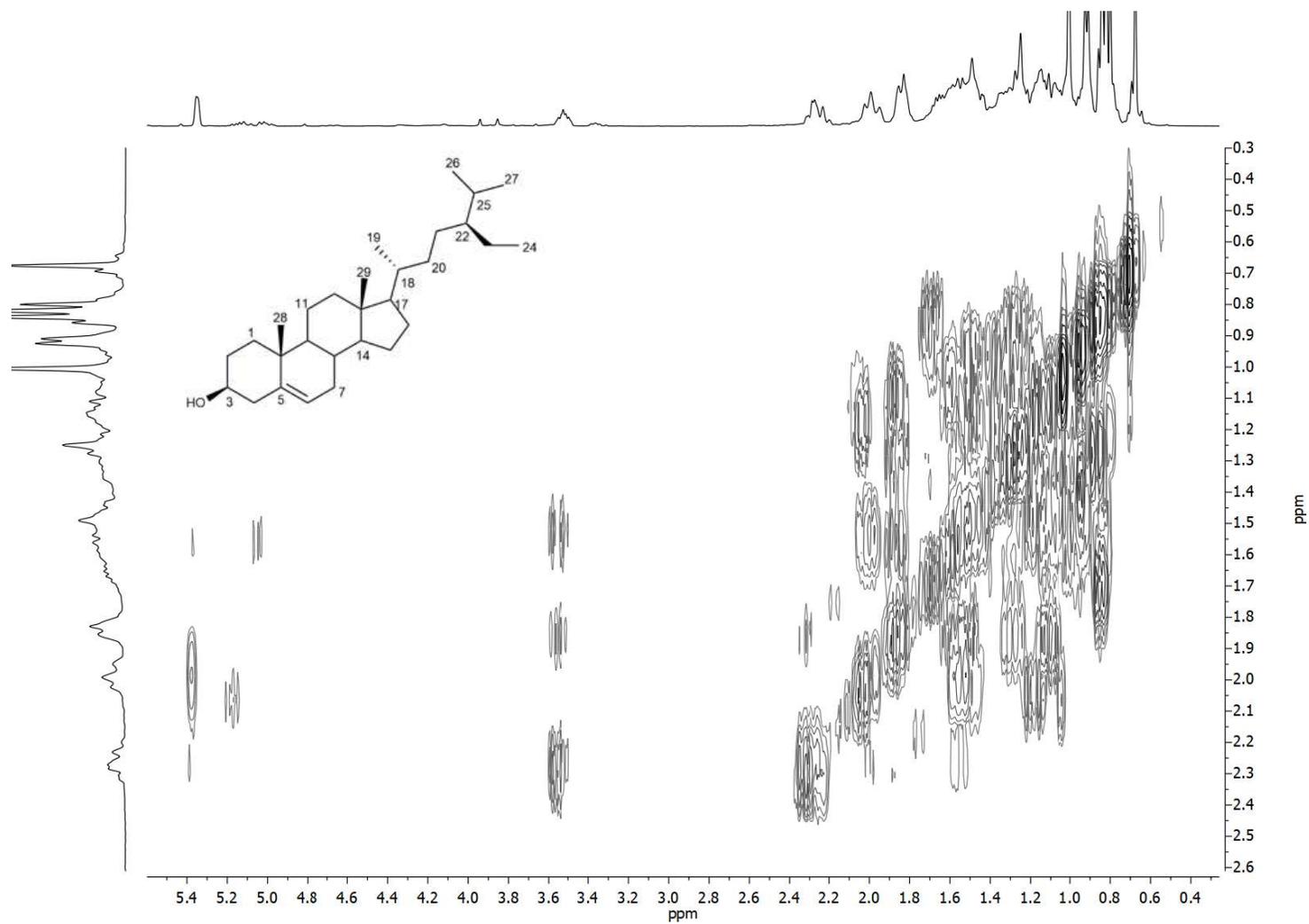
Nota: O sinal em δ_{C} 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

Fonte: o autor

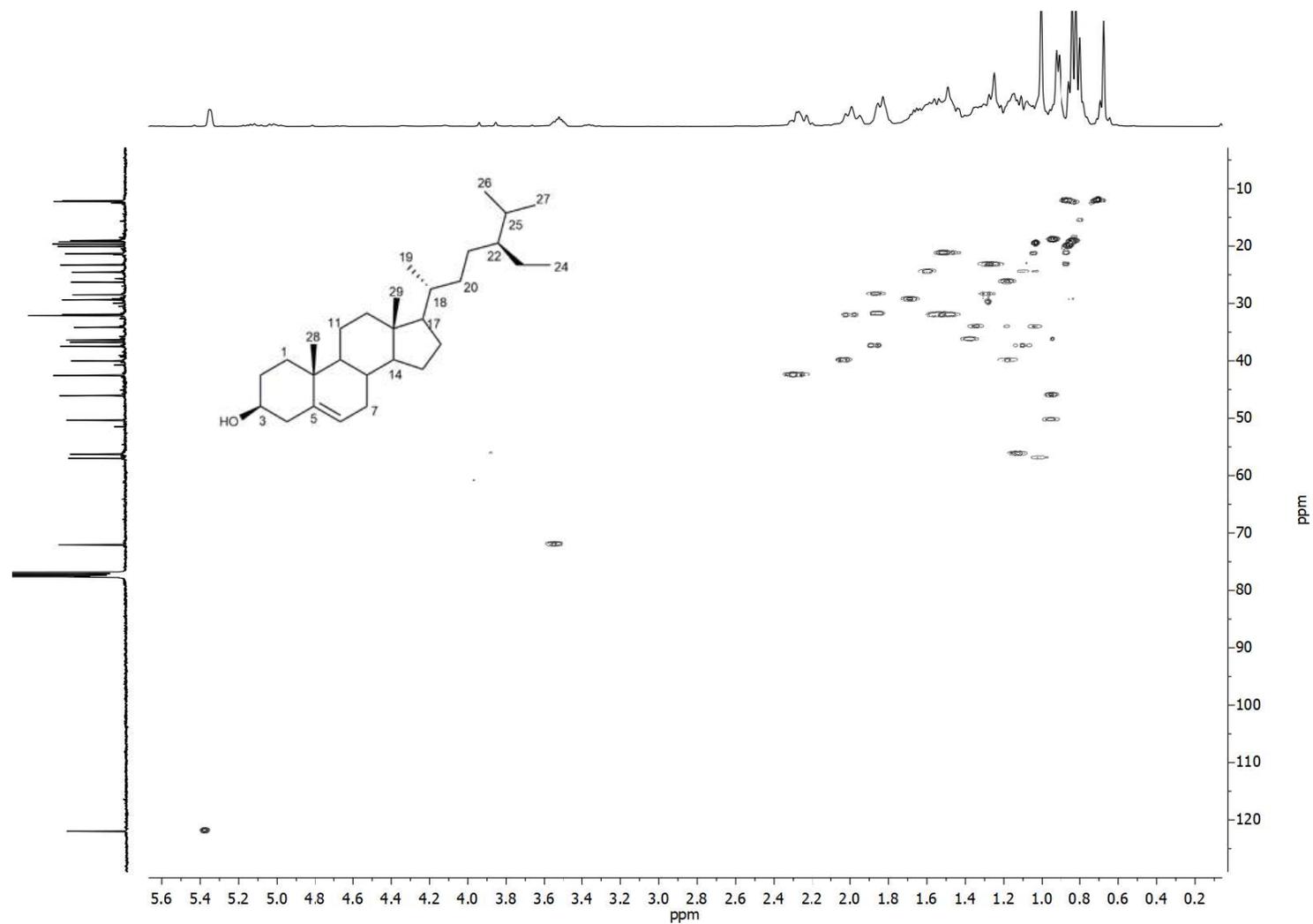
Figura 65 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto **III** (100 MHz, CDCl_3).



Fonte: o autor.

Figura 66 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto **III** (400 MHz, CDCl_3).

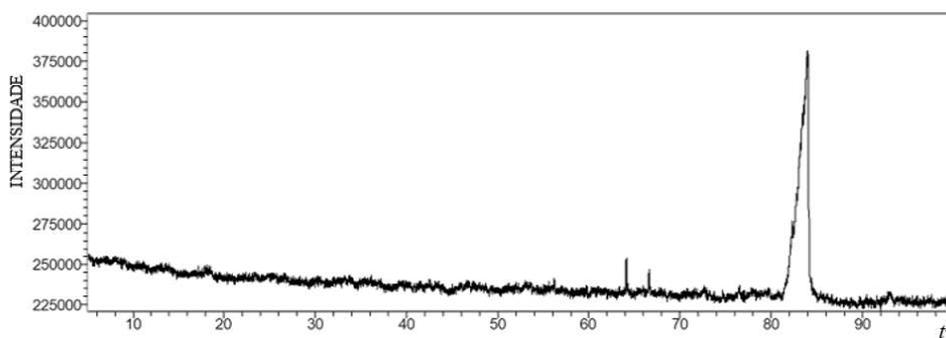
Fonte: o autor.

Figura 67 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **III** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

A fração EHGC4F1 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de apenas um pico majoritário com t_R de 84,3 min (Figura 68). O índice aritmético (IA) calculado para este composto foi de 3443. O EM-IE do composto **III** (Figura 69) apresentou um sinal em m/z 414 (25%) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de m/z 43 (100%), 81 (82%) e 145 (74%). As propostas de mecanismos de fragmentação do β -sitosterol (**III**) são ilustradas nas Figura 70 e Figura 71.

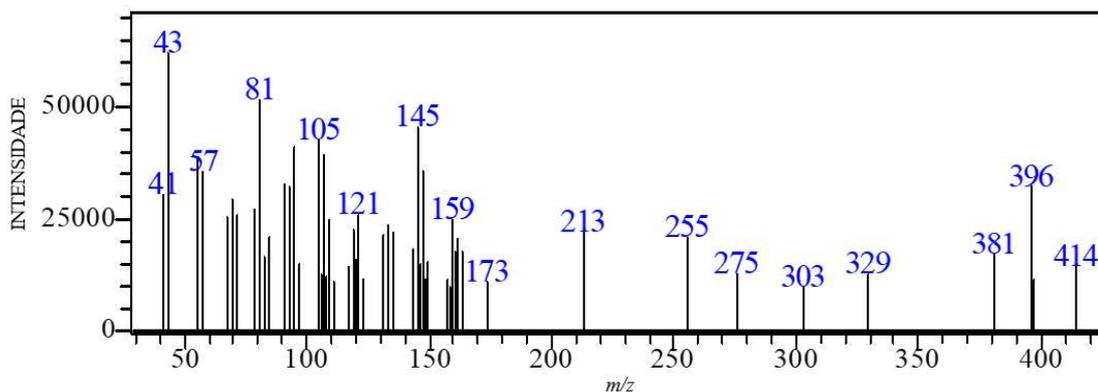
Figura 68 – Cromatograma da fração EHGC4F1 obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

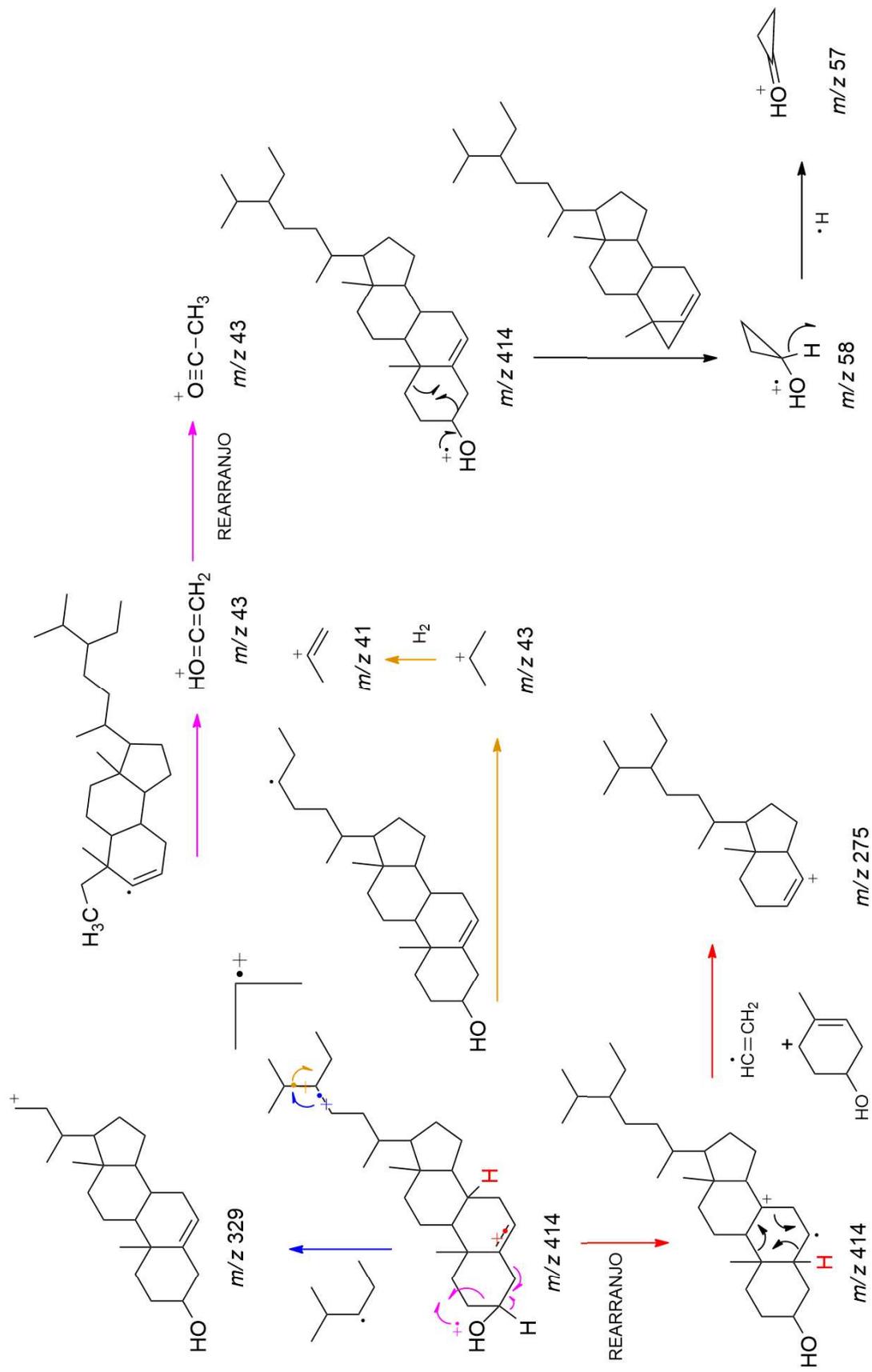
Fonte: o autor.

Figura 69 – EM-IE do β -sitosterol (**III**) obtido por CG-EM.



Fonte: o autor.

Figura 71 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o β -sitosterol (III) parte 2.



Fonte: o autor.

5.2.4 Identificação do estigmasterol (IV)

A fração EHFC2F1 apresentou apenas um composto e foi submetida as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 73) mostrou sinais de hidrogênios em: δ_{H} 0,71 a 2,3 correspondentes a metilas e metilenos presentes no composto. Estavam presentes dois simpletos de metilas em δ_{H} 0,71 (3H, H-29) e 1,02 (3H, H-28), três dupletos de metila em δ_{H} 0,81 (3H, $J = 6,8$ Hz, H-26), 0,86 (3H, $J = 6,6$ Hz, H-27) e 1,01 (3H, $J = 8,0$ Hz, H-19), gerados a partir dos acoplamentos com H-23, H-25 e H-18, respectivamente; um triplo de metila em δ_{H} 0,82 (1H, $J = 7,6$ Hz, H-24), gerado a partir do acoplamento com H-23; um multiplo em δ_{H} 5,36 (1H, H-6), gerado a partir do acoplamento com H-7; um multiplo em δ_{H} 3,36 (1H, H-3) correspondente ao hidrogênio carbinólico, gerado a partir dos acoplamentos com H-2 e H-4; dois duplo dupletos em δ_{H} 5,02 (1H, $J = 15,0$ e 8,5 Hz, H-21) e 5,16 (1H, $J = 15,1$ e 8,6 Hz, H-20), gerados a partir dos acoplamentos com H-20/H-22 e H-19/H-21, respectivamente (Tabela 15). A constante de acoplamento $J = 16$ Hz confirma a posição (*trans*) dos hidrogênios H-20 e H-21 da ligação C20=C21.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 74) mostrou sinais de carbono em: δ_{C} 12,3 e 12,5 referentes aos carbonos C-29 e C-24 das metilas; δ_{C} 141,1 e 121,8 referentes a insaturação em C-5/C-6; δ_{C} 138,5 e 129,5 referentes a insaturação em C-20/C-21; δ_{C} 72,1 referente ao carbono carbinólico (Tabela 15).

O espectro de RMN DEPT135 (Figura 75) mostrou sinais de quinze carbonos metílicos e/ou metínicos e oito sinais de carbonos metilênicos (Tabela 15).

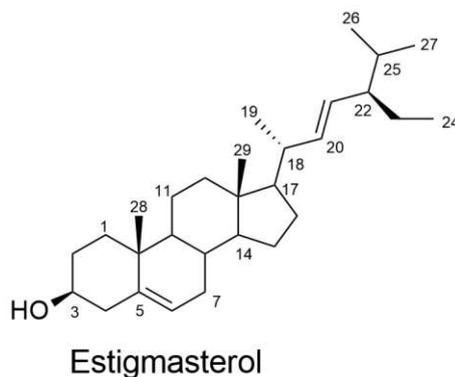
O mapa de contorno COSY (Figura 76) mostrou que os sinais de hidrogênio: δ_{H} 5,36 (H-6) está correlacionado com δ_{H} 1,40 a 2,40, que são os H-7; o δ_{H} 5,16 (H-20) está correlacionado com δ_{H} 1,70–2,30 e 5,04, que são os H-18 e H-21, respectivamente; o δ_{H} 5,02 (H-21) está correlacionado com δ_{H} 1,30–1,80 e 5,16, que são os H-22 e H-20, respectivamente; o δ_{H} 3,53 (H-3) está correlacionado com δ_{H} 1,40–2,40, que são os H-2 e H-4; o δ_{H} 1,01 (H-19) está correlacionados com δ_{H} 1,00– 2,20, que é o H-18; os δ_{H} 0,82 (H-24), 0,81 (H-26) e 0,86 (H-27) estão correlacionados com δ_{H} 0,80–1,80, que são os H-23, H-25 e H-25, respectivamente (Tabela 15).

O mapa de correlação HSQC (Figura 77) confirmou que os δ_{H} 3,53 (H-3), 5,36 (H-6), 1,01 (H-19), 5,16 (H-20), 5,02 (H-21), 0,82 (H-24), 0,71–1,02 (H-26–29) estão correlacionados aos carbonos δ_{C} 72,0 (C-3), 122,0 (C-6), 21,5 (C-19), 138,6 (C-20), 129,5 (C-21), 12,5 (C-24), 12,3–21,3 (C-26–29), respectivamente (Tabela 15).

Por fim, os valores de δ_H e δ_C foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos neste trabalho (Tabela 45 – Apendice B).

Assim, os dados acima confirmam a presença de um núcleo esteroidal com uma hidroxila no C-3, duas ligações duplas em C-5/C-6 e C-20/C-21 e seis grupos metílicos, suportados pelas principais correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HSQC, que estão de acordo com a estrutura do estigmasterol (**IV**) (Figura 72). A estereoquímica deste composto foi atribuída levando-se em consideração o fato do estigmasterol e o β -sitosterol serem alguns dos fitoesteróis mais comuns encontrados em plantas (Moreau, Whitaker, Hicks, 2002), sendo este último precursor biossintético para o composto IV (Griebel, Zeier, 2010).

Figura 72 – Estrutura do esteroide **IV** isolado de *E. paniculata*.



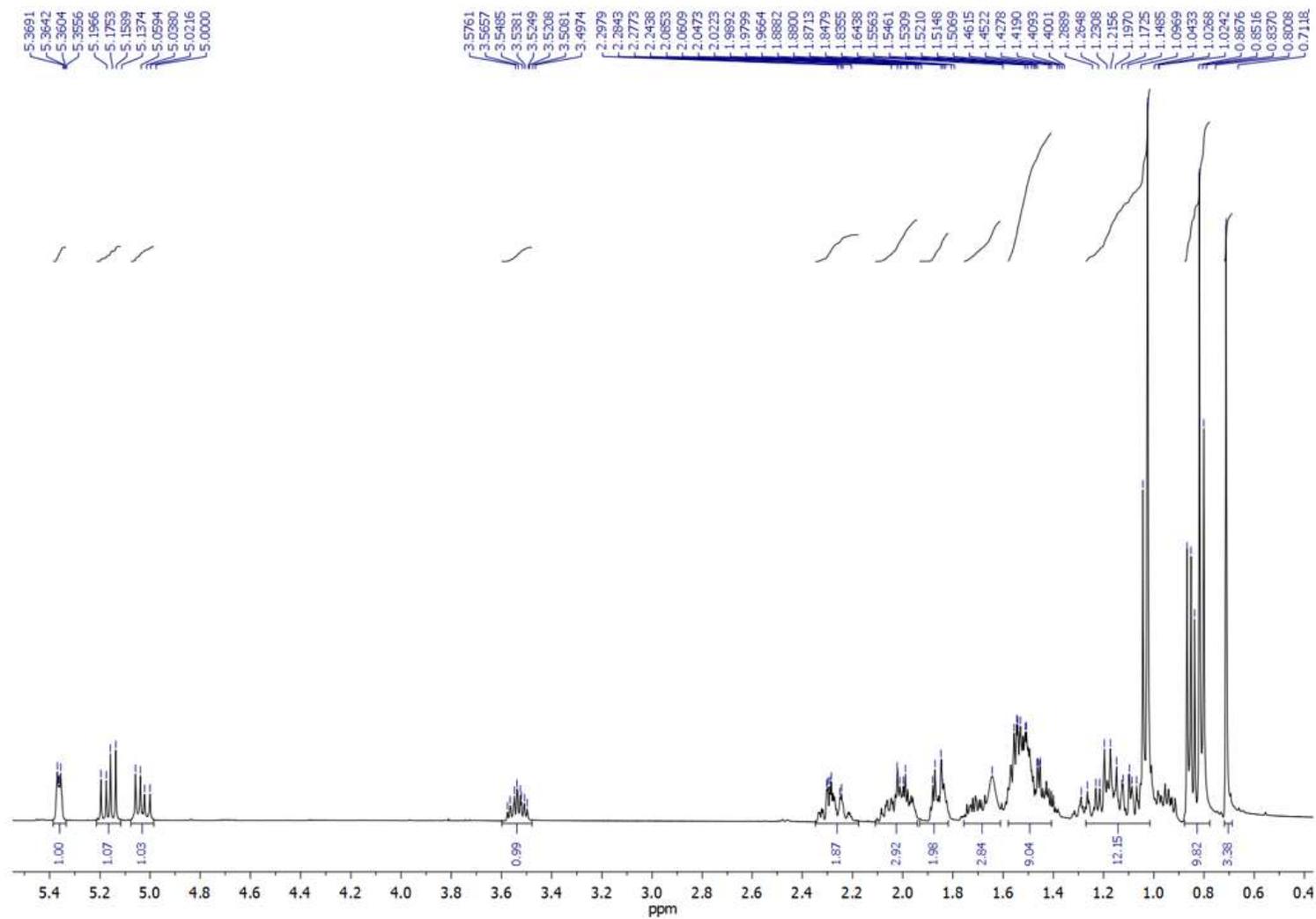
Fonte: o autor.

Tabela 15 – Dados de RMN do composto **IV** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , <i>J</i> em Hz)	¹³ C δ _C ^a	DEPT135	COSY	HSQC
1	–	37,5	CH ₂	–	–
2	–	32,1	CH ₂	–	–
3	3,53 (m; 1H)	72,0	CH	H-2, H-4	C-3
4	–	42,5	CH ₂	–	–
5	–	141,0	C	–	–
6	5,36 (m; 1H)	122,0	CH	H-7	C-6
7	–	31,9	CH ₂	–	–
8	–	32,1	CH	–	–
9	–	50,4	CH	–	–
10	–	36,8	C	–	–
11	–	21,3	CH ₂	–	–
12	–	39,9	CH ₂	–	–
13	–	42,5	C	–	–
14	–	57,1	CH	–	–
15	–	24,6	CH ₂	–	–
16	–	29,2	CH ₂	–	–
17	–	56,2	CH	–	–
18	–	40,7	CH	–	–
19	1,01 (d; 8,0; 3H)	21,5	CH ₃	H-18	C-19
20	5,16 (dd; 15,1 e 8,6; 1H)	138,6	CH	H-18, H-21	C-20
21	5,02 (dd; 15,0 e 8,5; 1H)	129,5	CH	H-22, H-20	C-21
22	–	51,5	CH	–	–
23	–	25,7	CH ₂	–	–
24	0,82 (t; 7,6; 1H)	12,5	CH ₃	H-23	C-24
25	–	32,1	CH	–	–
26	0,81 (d; 6,8; 3H)	19,2	CH ₃	H-25	C-26
27	0,86 (d; 6,3; 3H)	19,6	CH ₃	H-25	C-27
28	1,02 (s; 3H)	21,3	CH ₃	–	C-28
29	0,71 (s; 3H)	12,3	CH ₃	–	C-29

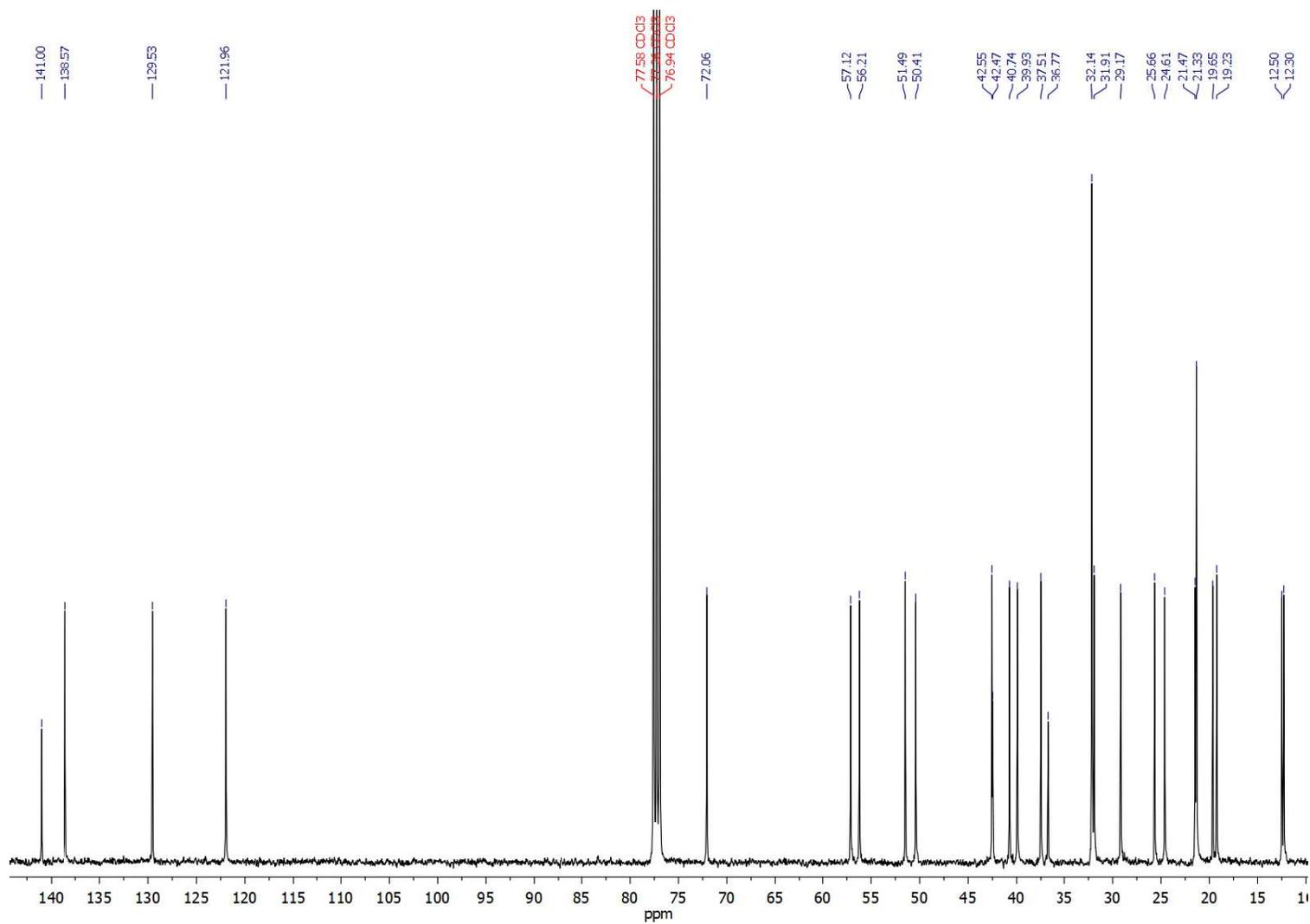
Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s = simpleto, d = duplete, t = triplete, dd = duplo duplete, m = multiplete. Fonte: o autor.

Figura 73 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,1–8,1) do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).



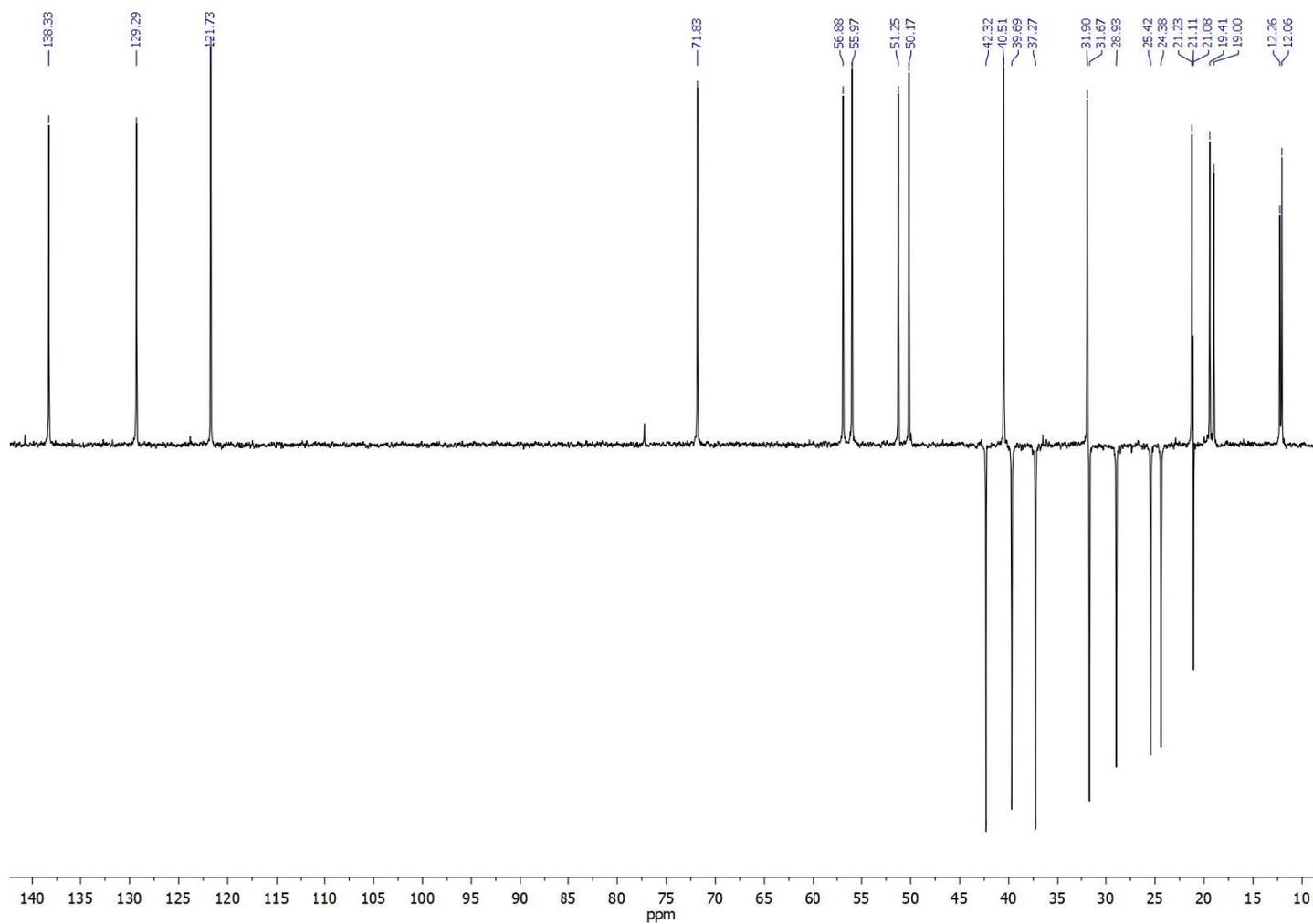
Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

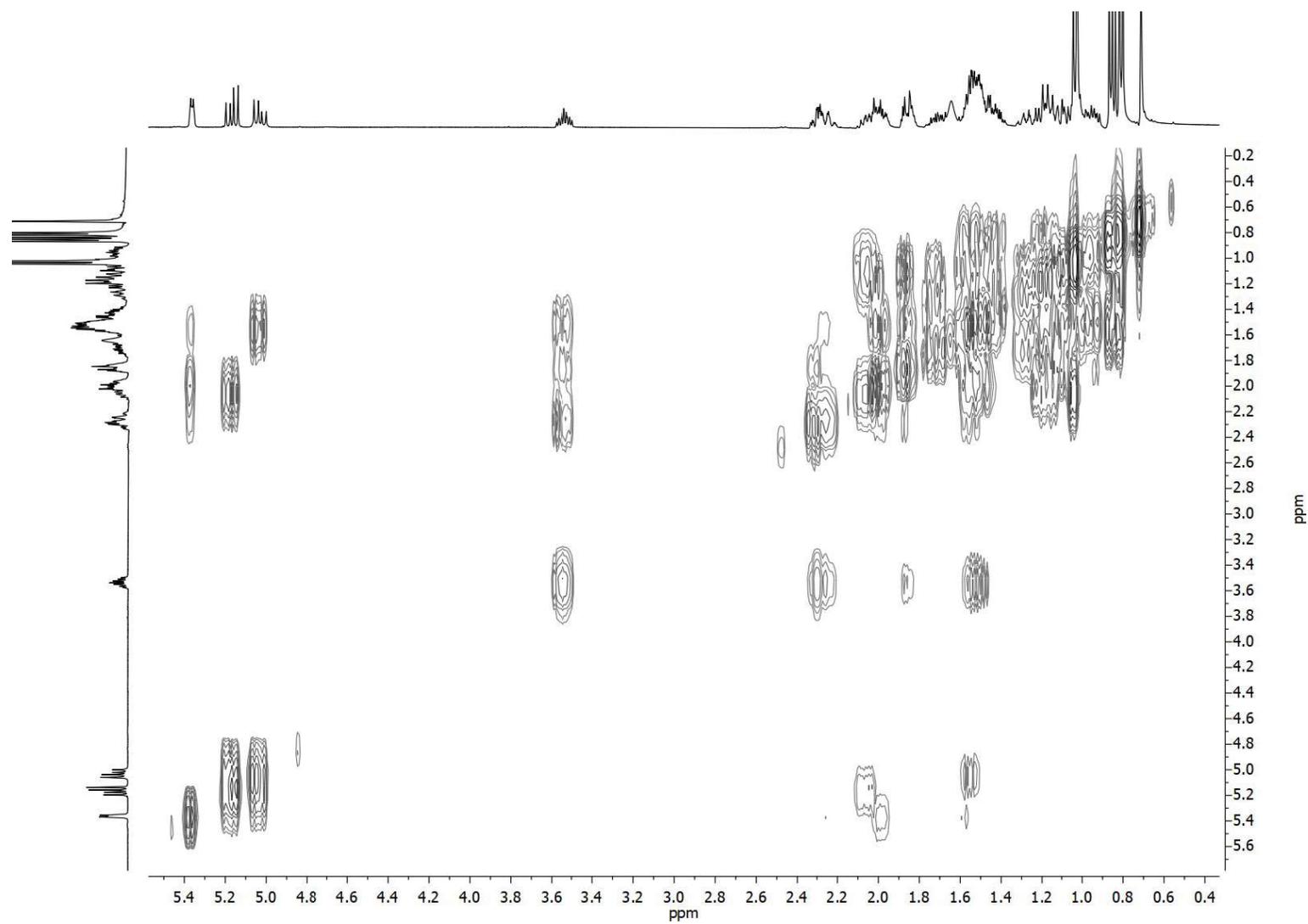
Figura 74 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 10–140) do composto **IV** (100 MHz, CDCl_3).

Nota: O sinal em δ_{C} 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

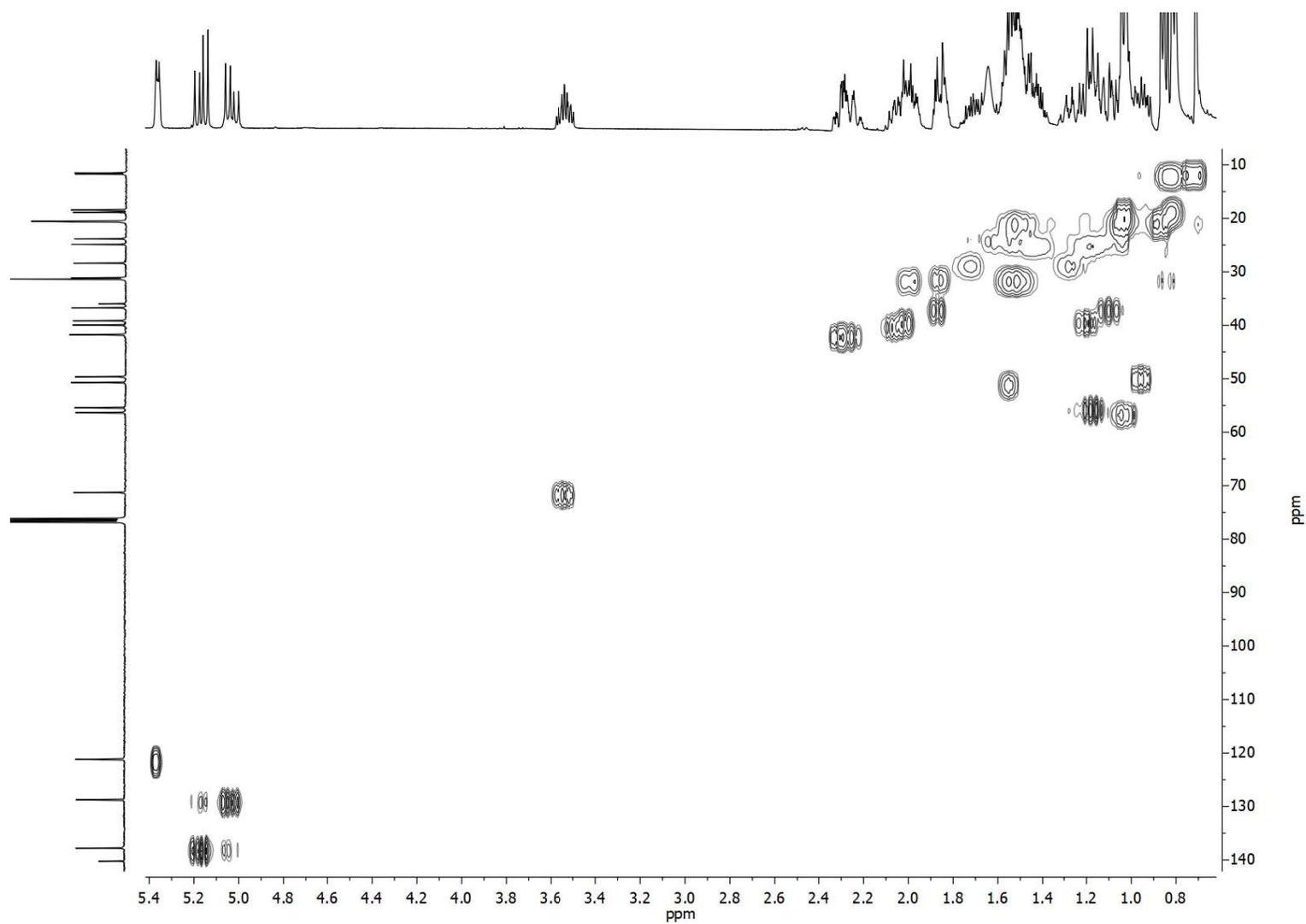
Fonte: o autor

Figura 75 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto **IV** (100 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

Figura 76 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).

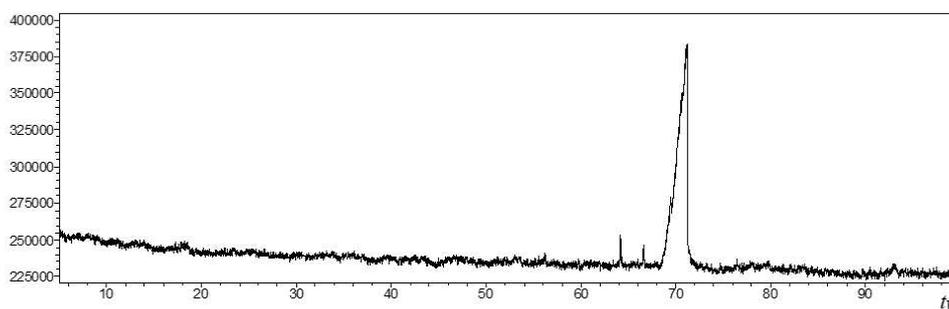
Fonte: o autor.

Figura 77 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).

Fonte: o autor.

A fração EHFC2F1 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de um pico majoritário com t_R de 70,3 min (Figura 78). O índice aritmético (IA) calculado para este composto foi de 2813. O EM-IE do composto **IV** (Figura 79) apresentou um sinal em m/z 414 (25%) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de m/z 55 (100%), 83 (82%) e 84 (74%). As propostas de mecanismos de fragmentação do estigmasterol (**IV**) são ilustradas na Figura 80 e Figura 81.

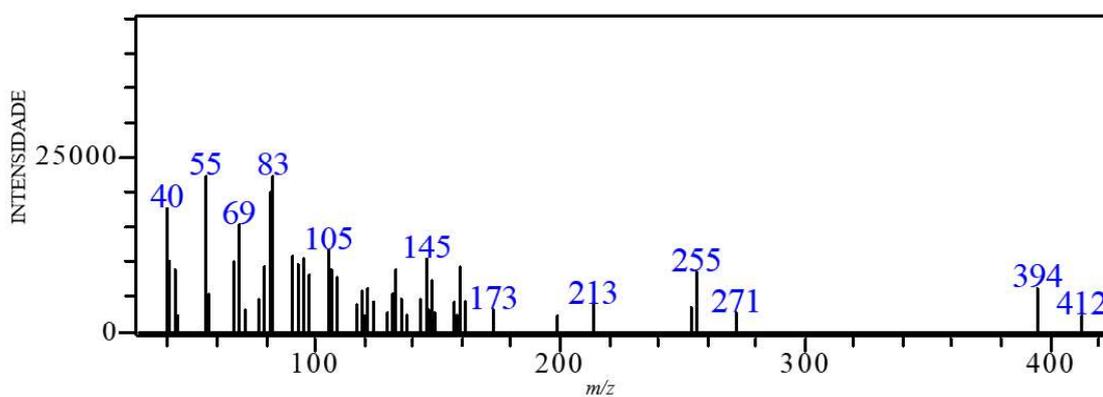
Figura 78 – Cromatograma da fração EHFC2F1 obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

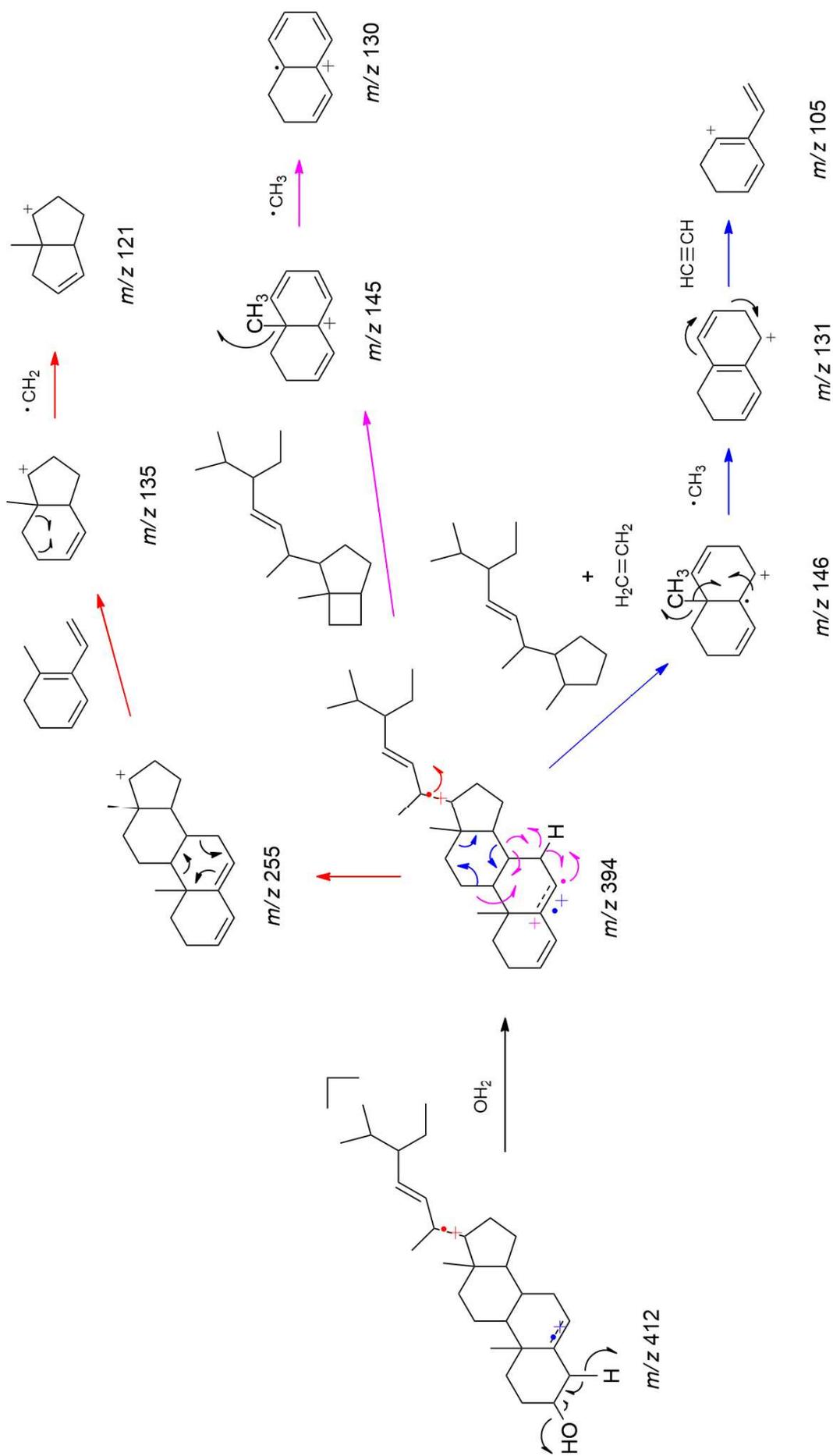
Fonte: o autor.

Figura 79 – EM-IE do estigmasterol (**IV**) obtido por CG-EM.



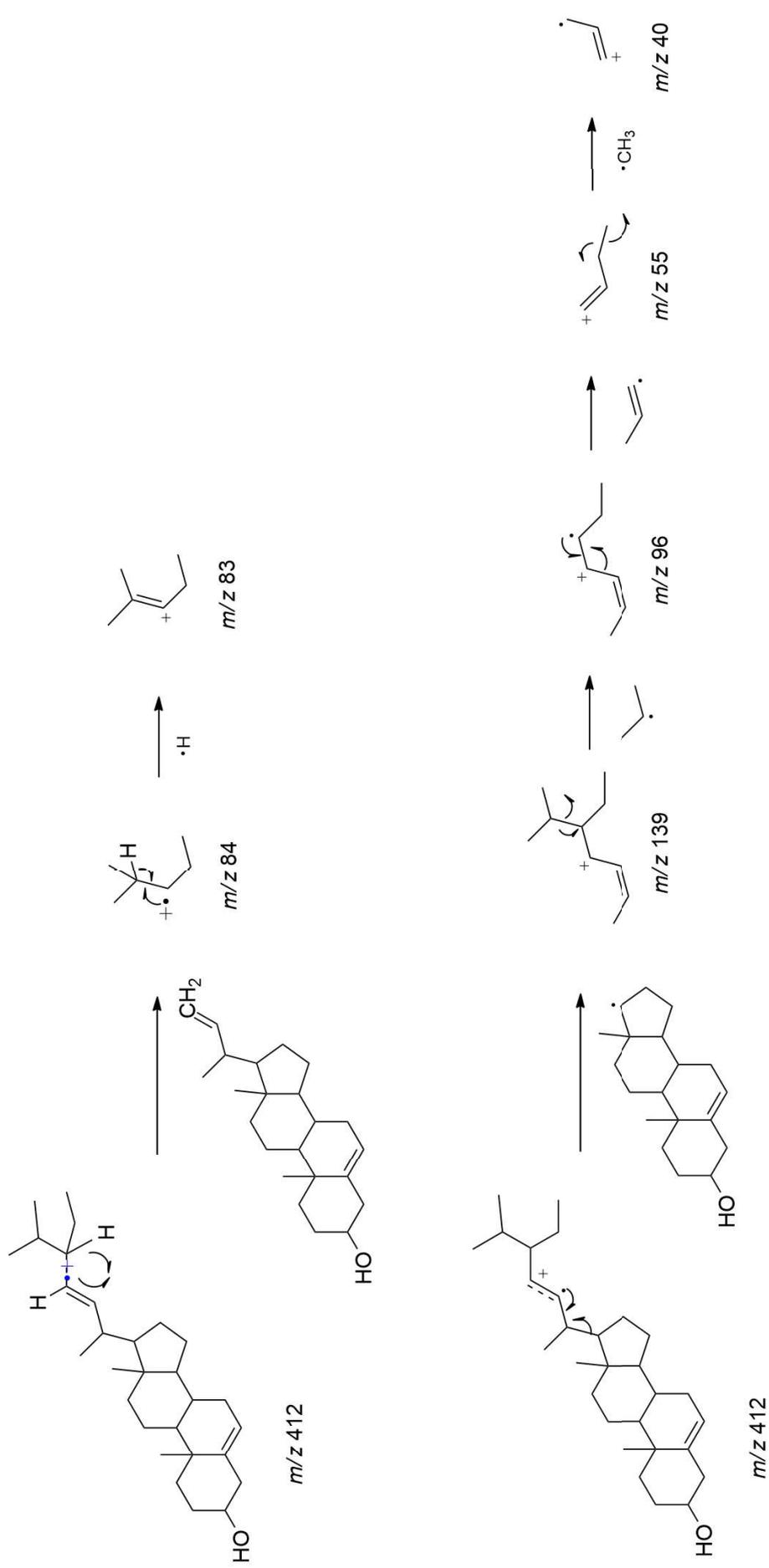
Fonte: o autor.

Figura 80 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o estigmasterol (IV) parte 1.



Fonte: o autor.

Figura 81— Propostas de mecanismos de fragmentação para o estigmasterol (IV) parte 2.



Fonte: o autor.

5.2.5 Identificação do canferol (V)

A fração EMGC2F6 apresentou apenas um composto e foi submetida a análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 83) mostrou sinais de hidrogênios de anéis aromáticos com sinais de duplo dupletos típicos de acoplamentos *orto* e *meta* em δ_{H} 8,04 (2H, $J = 9,2$ e $2,0$ Hz, H-2' e H-6') e 6,92 (2H, $J = 8,8$ e $2,0$ Hz, H-3' e H-5'), atribuídos a um anel aromático *para* substituído. Foi observado dois outros dupletos com constante de acoplamento característicos de Hs *meta* em δ_{H} 6,19 (1H, $J = 2,0$ Hz, H-6) e 6,43 (1H, $J = 2,0$ Hz, H-8) e também um simpleto em δ_{H} 12,47 (6-OH) (Figura 185), característico de hidrogênios de hidroxilas na posição C-6, desprotegido devido ao hidrogênio fazer ligação intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4, além de três outros sinais alargados e de baixa intensidade em δ_{H} 9,4; 10,08 e 10,7, característicos de hidrogênios das hidroxilas em C-3, C-8 e C-4'.

O espectro de RMN de ^{13}C em 100 MHz (Figura 84) mostrou 12 sinais de dois anéis aromáticos em δ_{C} 93,42 (C-8), 98,15 (C-6), 102,98 (C-10), 115,38 (C-3' e C-5'), 121,61 (C-1'), 129,43 (C-2' e C-6'), 135,58 (C-3), 146,78 (C-2), 156,13 (C-9), 159,13 (C-4'), 160,65 (C-5) e 163,84 (C-7), e um sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 175,84 (C-4) (Tabela 16).

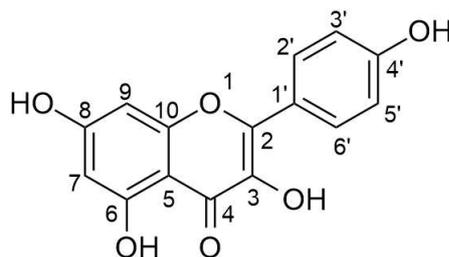
O espectro de RMN DEPT135 (Figura 85) mostrou sinais de 4 carbonos metínicos (CH) (Tabela 16) e o mapa de contorno COSY (Figura 86) mostrou que os sinais de hidrogênios em δ_{H} 8,04 (H-2' e H-6') e em δ_{H} 6,92 (H-3' e H-5') estão correlacionados.

O mapa de contorno HSQC (Figura 87) confirmou que o δ_{H} 8,04 (H-2' e H-6') está correlacionado com δ_{C} 129,43 (C-2' e C-6'); δ_{H} 6,92 (H-3' e H-5') está correlacionado com δ_{C} 115,38 (C-3' e C-5'); δ_{H} 6,43 (H-8) está correlacionado com δ_{C} 93,42 (C-8); δ_{H} 6,19 (H-6) está correlacionado com δ_{C} 98,15 (C-6).

O mapa de correlações HMBC (Figura 88) confirmou que: o δ_{H} 8,04 (H-2' e H-6') está correlacionado com os δ_{C} 115,38 (C-3' e C-5') ($^2J_{\text{CH}}$), 129,43 (C-6' e C-2') ($^3J_{\text{CH}}$), 146,78 (C-2) ($^3J_{\text{CH}}$) e 159,13 (C-4') ($^3J_{\text{CH}}$); o δ_{H} 6,92 (H-3' e H-5') está correlacionado com os δ_{C} 115,38 (C-5' e C-3') ($^3J_{\text{CH}}$), 121,61 (C-1') ($^3J_{\text{CH}}$), 129,43 (C-2' e C-6') ($^2J_{\text{CH}}$), 146,78 (C-2) ($^4J_{\text{CH}}$) e 159,13 (C-4') ($^2J_{\text{CH}}$); o δ_{H} 6,43 (H-8) está correlacionado com os δ_{C} 98,15 (C-6) ($^3J_{\text{CH}}$), 102,98 (C-10) ($^3J_{\text{CH}}$), 156,13 (C-9) ($^3J_{\text{CH}}$), 163,84 (C-7) ($^2J_{\text{CH}}$) e 175,84 (C-4) ($^4J_{\text{CH}}$); o δ_{H} 6,19 (H-6) está correlacionado com os δ_{C} 93,42 (C-8) ($^3J_{\text{CH}}$), 102,98 (C-10) ($^3J_{\text{CH}}$), 160,65 (C-5) ($^2J_{\text{CH}}$), 163,84 (C-7) ($^2J_{\text{CH}}$) e 175,84 (C-4) ($^4J_{\text{CH}}$) (Tabela 16 – Apêndice B).

Os valores de δ_H e δ_C foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos neste trabalho (Tabela 16), confirmando a presença dos dois anéis aromáticos, substituídos com grupos hidroxilas, unidas por um heterociclo contendo oxigênio e uma carbonila, que foram suportados pelas principais correlações nos mapas de contorno COSY e HSQC. Portanto, através da análise por RMN foi possível identificar que o composto isolado na fração EMGC2F6 se tratava do flavonoide canferol (**V**).

Figura 82 – Estrutura do flavonoide **V** isolado de *E. paniculata*.



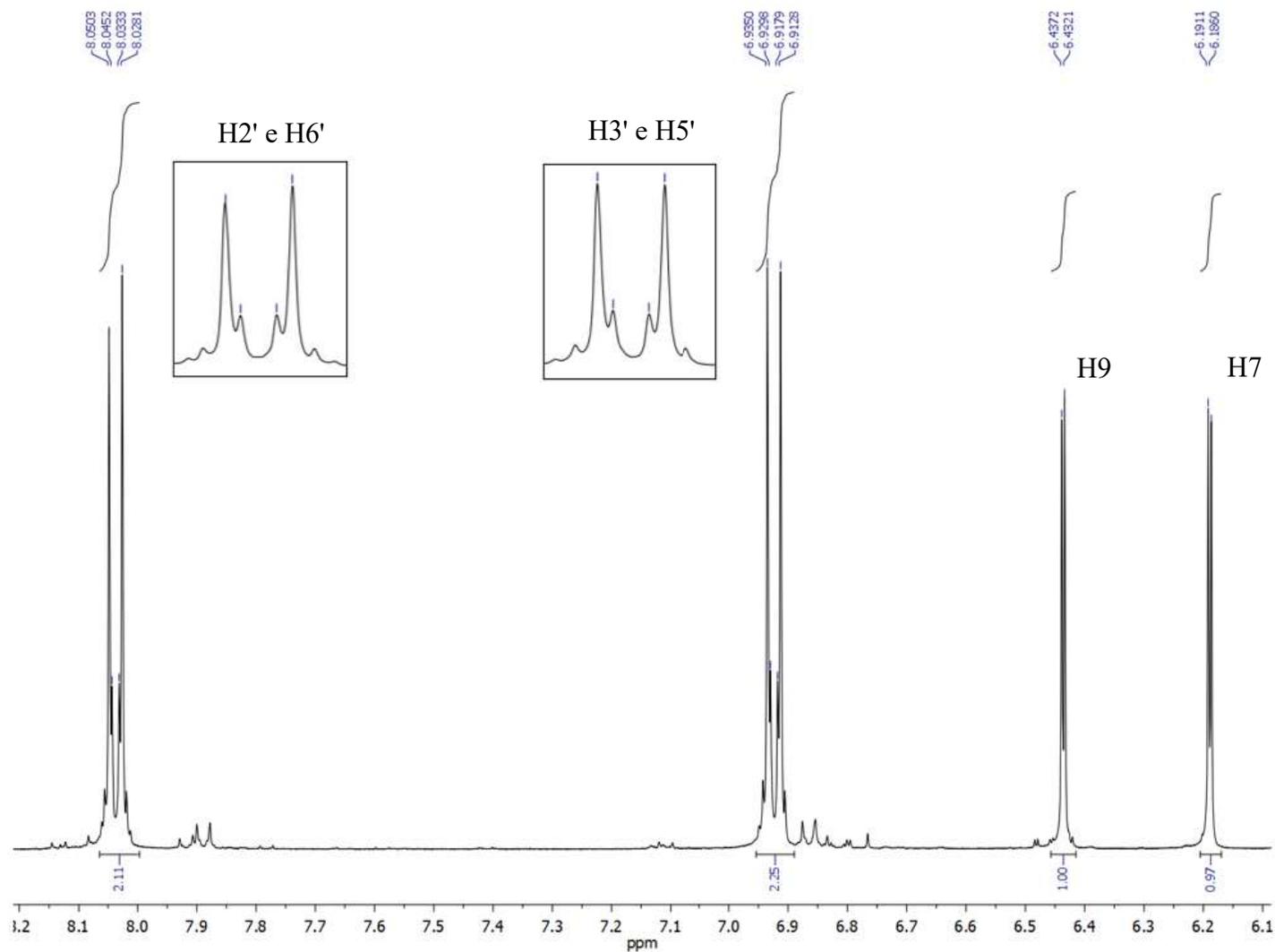
Fonte: o autor.

Tabela 16 – Dados de RMN do composto V em DMSO^a.

Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , <i>J</i> em Hz)	DEPT135	¹³ C δ _C ^a	COSY	HSQC	HMBC
2	–	C	146,78	–	–	–
3	–	C	135,58	–	–	–
4	–	C	175,84	–	–	–
5	–	C	160,65	–	–	–
6	–	C	163,84	–	–	–
7	6,19 (1H; d; 2,0)	CH	98,15	–	C-7	C-9, C-10, C-5, C-6, C-4
8	–	C	156,13	–	–	–
9	6,43 (1H; d; 2,0)	CH	93,42	–	C-9	C-7, C-10, C-8, C-6, C-4
10	–	C	102,98	–	–	–
1'	–	C	121,61	–	–	–
2'	8,04 (1H; dd; 8,8 e 2,0)	CH	129,43	H-3'	C-2'	C-3', C-6', C-2, C-4'
3'	6,92 (1H; dd; 9,2 e 2,0)	CH	115,38	H-2'	C-3'	C-5', C-1', C-2', C-2, C-4'
4'	–	C	159,13	–	–	–
5'	6,92 (1H; dd; 9,2 e 2,0)	CH	115,38	H-6'	C-5'	C-3', C-1', C-6', C-2, C-4'
6'	8,04 (1H; dd; 8,8 e 2,0)	CH	129,43	H-5'	C-6'	C-5', C-2', C-2, C-4'
4'-OH	9,35 (1H; s)	–	–	–	–	–
8-OH	10,08 (1H; s)	–	–	–	–	–
3-OH	10,75 (1H; s)	–	–	–	–	–
6-OH	12,47 (1H; s)	–	–	–	–	–

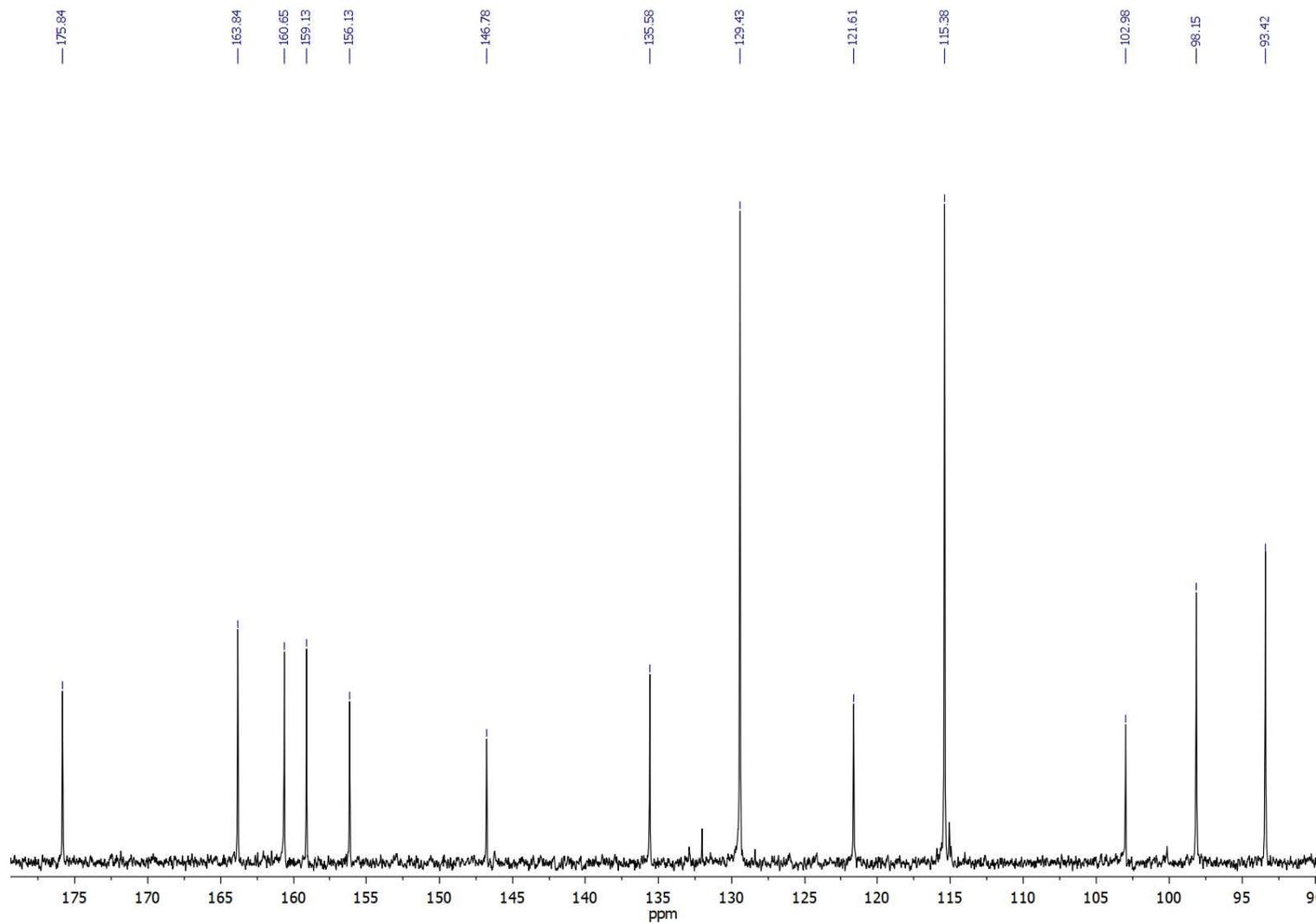
Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

^bMultiplicidade: d = duplete, dd = duplo duplete. Fonte: o autor.

Figura 83 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,1–8,1) do composto V (400 MHz, DMSO).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

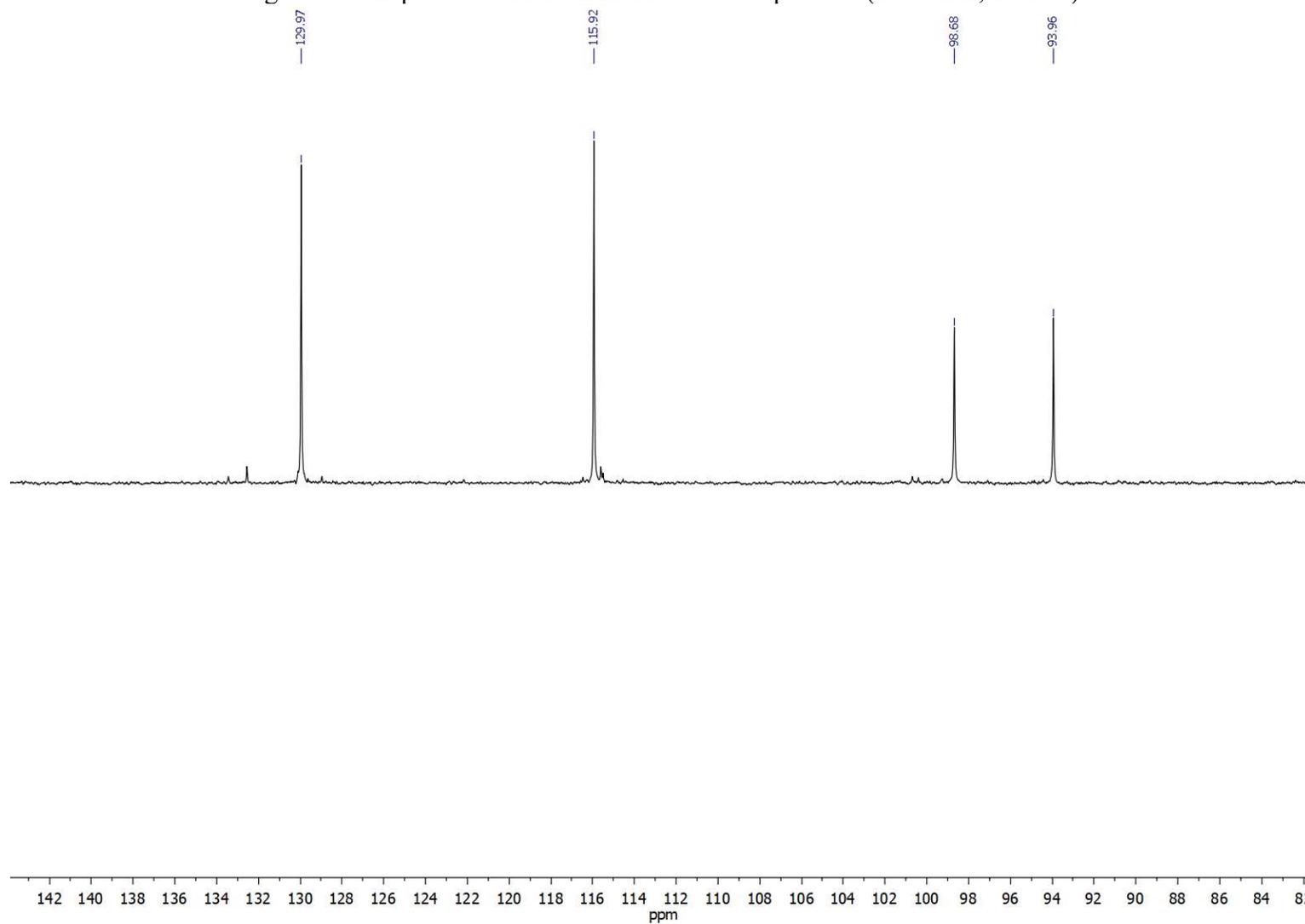
Fonte: o autor.

Figura 84 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 40–150) do composto V (100 MHz, DMSO).

Nota: O sinal em δ_{C} 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

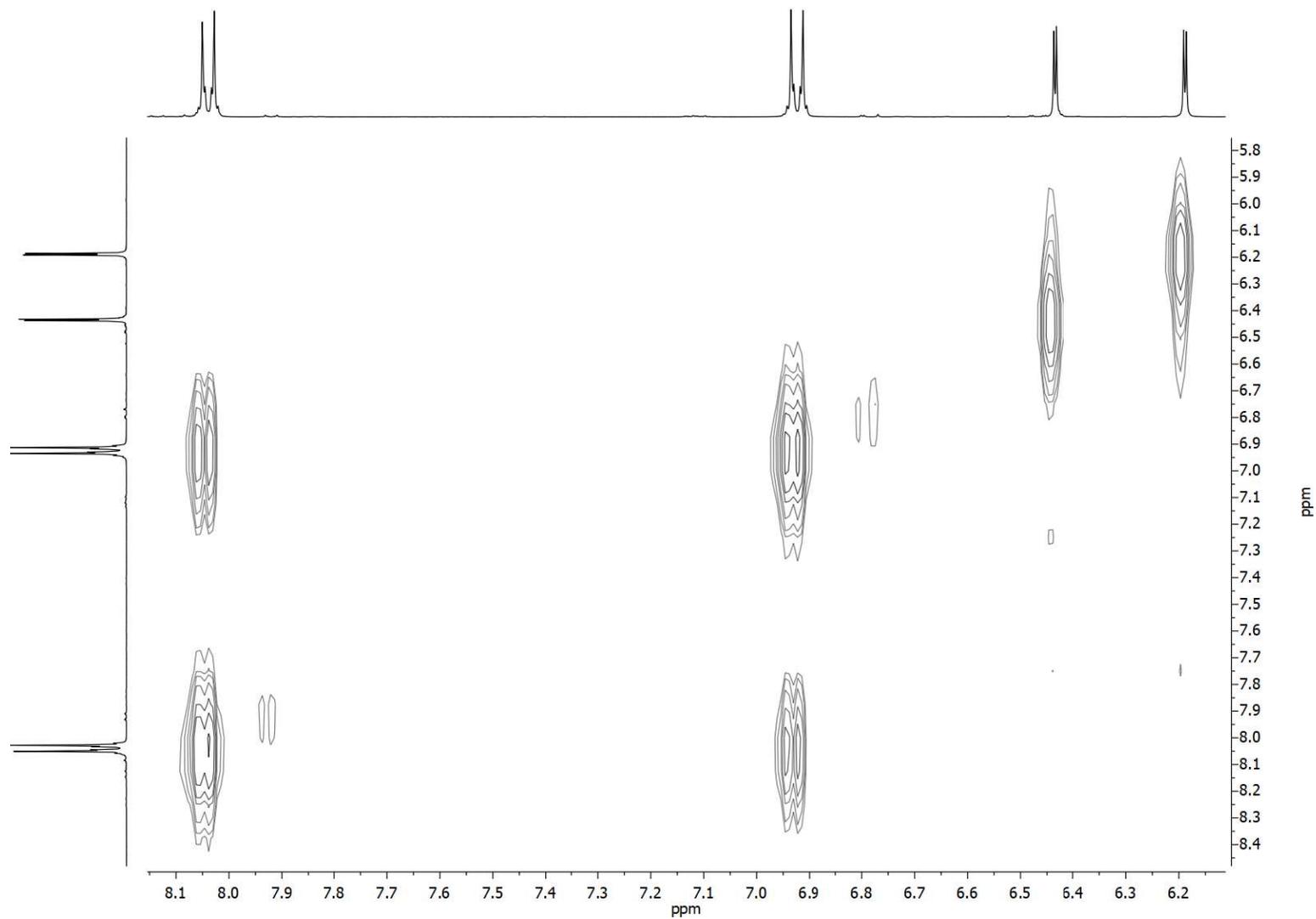
Fonte: o autor

Figura 85 – Espectro de RMN DEPT135 do composto V (100 MHz, DMSO).



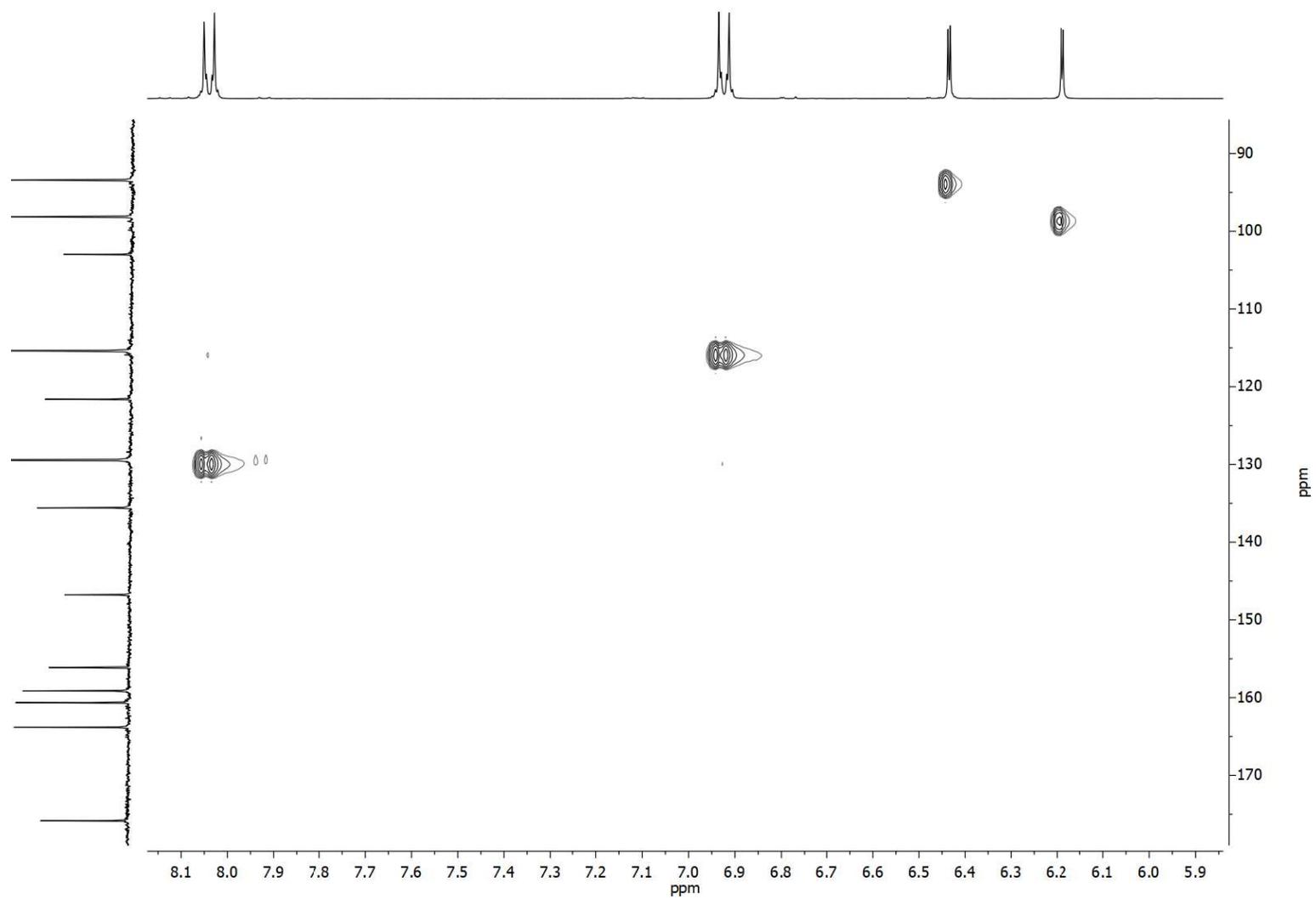
Fonte: o autor.

Figura 86 – Mapa de contorno COSY do composto V (400 MHz, DMSO).



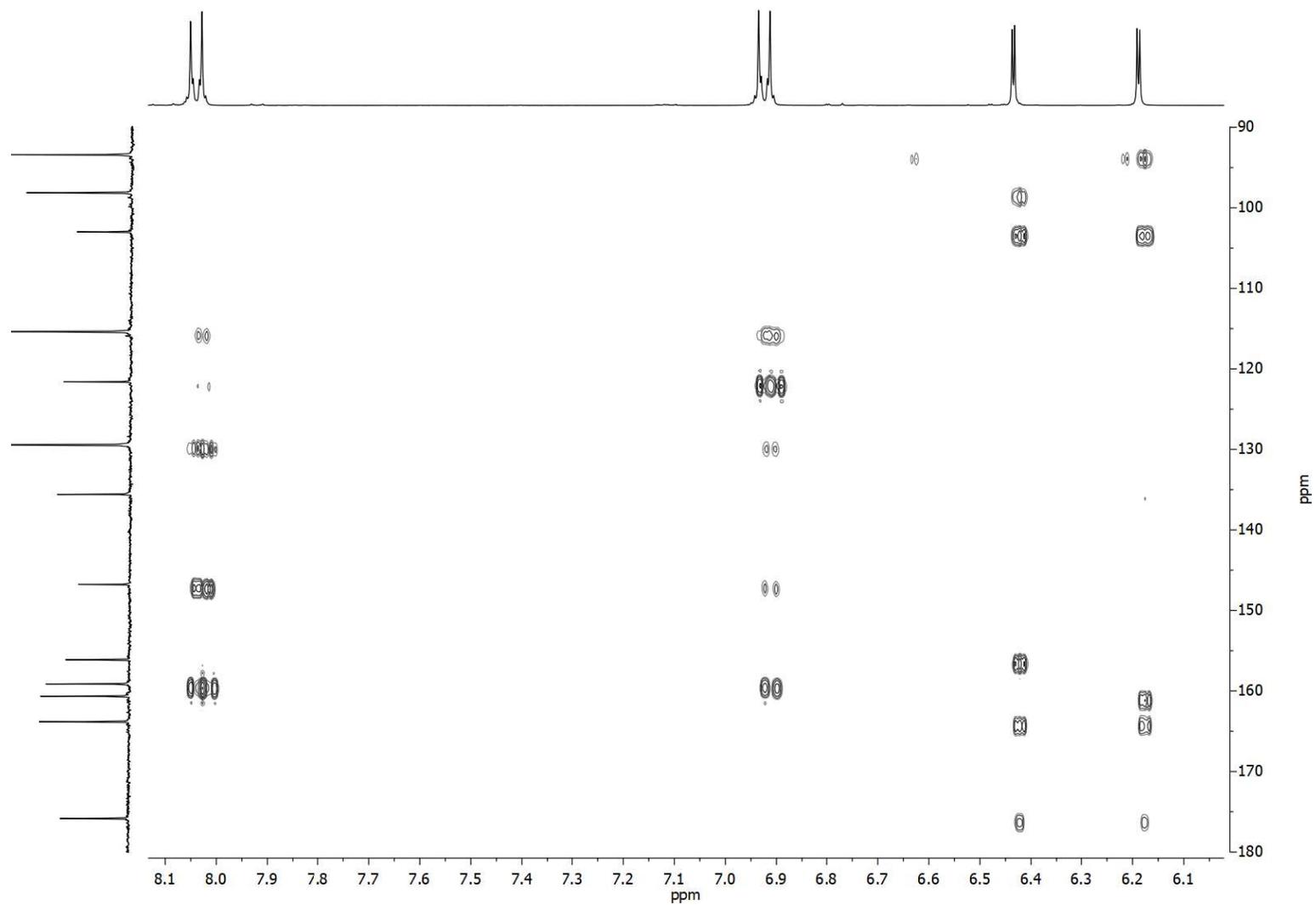
Fonte: o autor.

Figura 87 – Mapa de contorno HSQC do composto V (400 MHz, DMSO).



Fonte: o autor.

Figura 88 – Mapa de contorno HMBC do composto V (400 MHz, DMSO).



Fonte: o autor.

5.2.6 Identificação do ácido palmítico (VI)

A fração EMFC2F3 apresentou apenas um composto e foi submetida as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação estrutural.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 90) mostrou sinais de um tripleto em $\delta_{\text{H}} 2,3$ (2H, $J = 7,5$ Hz, H-2), gerados a partir do acoplamento com H-3; um quintupletto em $\delta_{\text{H}} 1,65$ (2H, $J = 7,5$ Hz, H-3), gerado a partir dos acoplamentos com H-2 e H-4; vários sinais em $\delta_{\text{H}} 1,27$, vistos como um simpleto largo característicos de CH_2 de cadeias longas; um tripleto em $\delta_{\text{H}} 0,9$ (3H, $J = 6,6$ Hz, H-16), gerado a partir do acoplamento com H-15 (Tabela 17).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 91) mostrou sinais de carbono em: $\delta_{\text{C}} 180,33$ característico de carbonila de ácidos carboxílicos; $\delta_{\text{C}} 34,31$ e $22,94$ característicos de carbonos metilênicos; $\delta_{\text{C}} 14,36$ característico de metila terminal de alcanos de cadeia longa (Tabela 17).

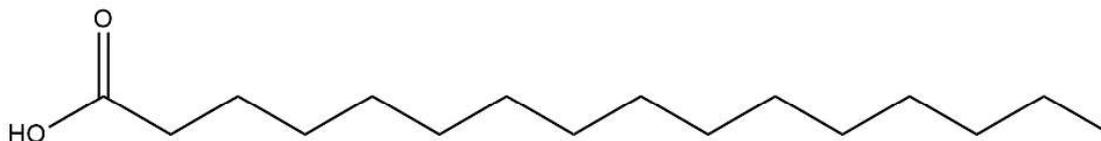
O espectro de RMN DEPT135 (Figura 92) mostrou quatorze sinais de carbonos metilênicos e um sinal de carbono metílico (Tabela 17).

O mapa de contorno COSY (Figura 93) mostrou as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio: $\delta_{\text{H}} 0,89$ (H-16) com $\delta_{\text{H}} 1,27$ (H-4 a H-15); $\delta_{\text{H}} 1,27$ (H-4 a H-15) com $\delta_{\text{H}} 1,65$ (H-3) e $0,89$ (H-16); $\delta_{\text{H}} 1,65$ (H-3) com $\delta_{\text{H}} 2,36$ (H-2) e $1,27$ (H-4 a H-15); $\delta_{\text{H}} 2,36$ (H-2) com $\delta_{\text{H}} 1,65$ (H-3) (Tabela 17).

O mapa de contorno HSQC (Figura 94) permitiu correlacionar os sinais em: $\delta_{\text{H}} 0,89$ (H-16) com $\delta_{\text{C}} 14,36$ (C-16); $\delta_{\text{H}} 1,27$ (H-4 a H-15) com $\delta_{\text{C}} 22,94$ (C-15) e $28,31$ a $32,18$ (C-4 a C-14); $\delta_{\text{H}} 1,65$ (H-3) com $\delta_{\text{C}} 24,93$ (C-3); $\delta_{\text{H}} 2,36$ (H-2) com $\delta_{\text{C}} 34,31$ (C-2) (Tabela 17).

O mapa de contorno HMBC (Figura 95) permitiu correlacionar os sinais: $\delta_{\text{H}} 2,36$ com $\delta_{\text{C}} 180,33$ (C-1, $^2J_{\text{CH}}$), $24,93$ (C-3, $^2J_{\text{CH}}$) e 29 (C-4, $^3J_{\text{CH}}$); $\delta_{\text{H}} 1,65$ (H-3) com $\delta_{\text{C}} 180,33$ (C-1, $^2J_{\text{CH}}$), $34,31$ (C-2, $^2J_{\text{CH}}$) e $29,84$ (C-4, $^3J_{\text{CH}}$); $\delta_{\text{H}} 1,27$ com $\delta_{\text{C}} 24,93$ (C-3, $^2J_{\text{CH}}$), $29,68$ (C-5, $^2J_{\text{CH}}$), $22,94$ (C-15, $^2J_{\text{CH}}$) e $14,36$ (C-16, $^3J_{\text{CH}}$); $\delta_{\text{H}} 0,89$ com $\delta_{\text{C}} 22,94$ (C-15, $^2J_{\text{CH}}$) e $32,18$ (C-14, $^3J_{\text{CH}}$) (Tabela 17).

Por fim, os valores de δ_{H} e δ_{C} foram comparados com os deslocamentos químicos reportados na literatura e foram similares aos obtidos experimentalmente (Tabela 47 – Apêndice B). Portanto, através da análise por RMN foi possível identificar que o composto isolado na fração EMFC2F3 se tratava do ácido palmítico (VI) (Figura 89).

Figura 89 – Estrutura do ácido graxo **VI** isolado de *E. paniculata*.

Fonte: o autor.

Tabela 17 – Dados de RMN do composto VI em CDCl₃^a.

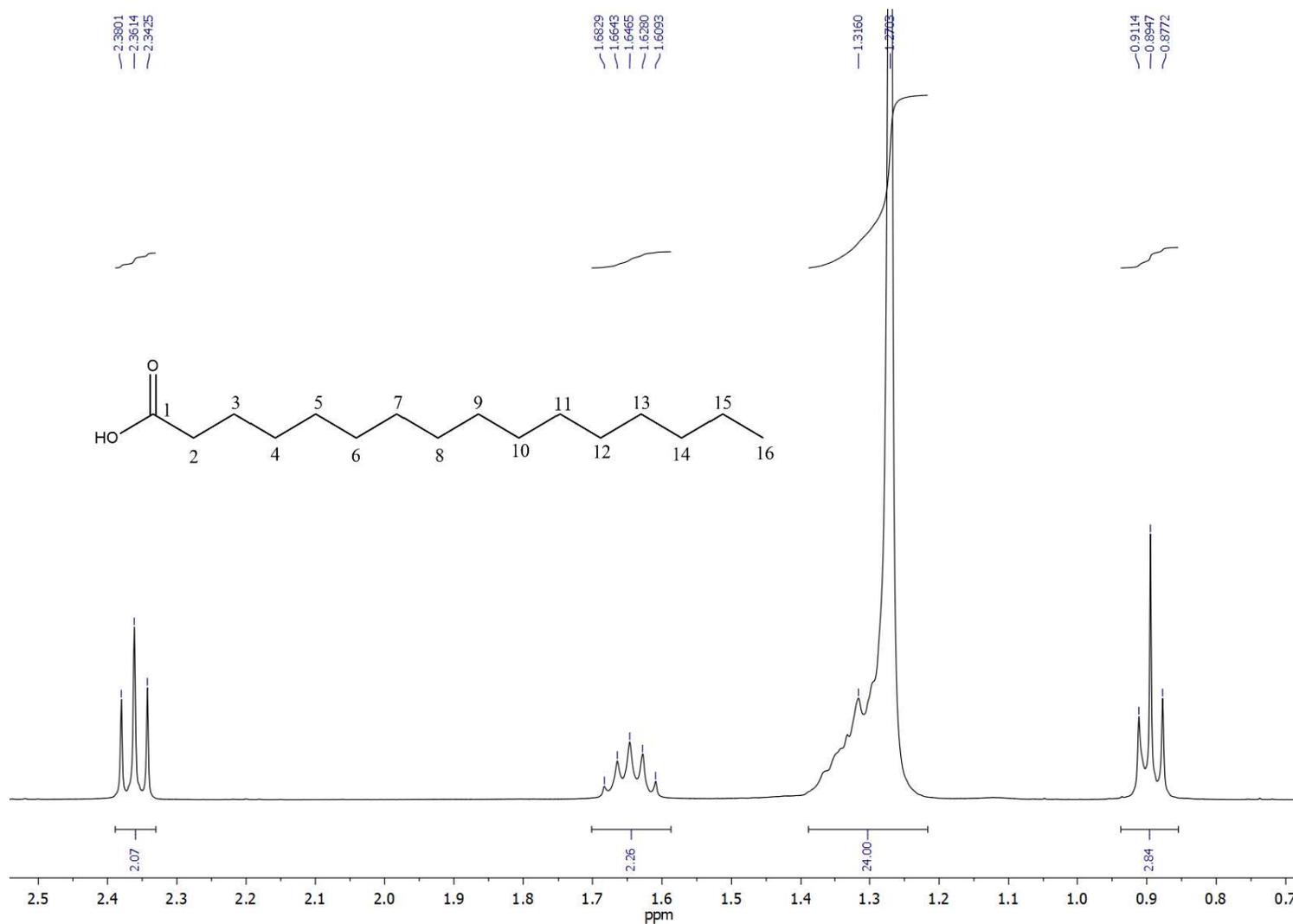
Posição	¹ H δ _H ^a (mult ^b , <i>J</i> em Hz)	DEPT135	¹³ C δ _C ^a	COSY	HSQC	HMBC
1	–	C	180,33	–	–	–
2	2,36 (t; 7,5; 2H)	CH ₂	34,31	H-3	C-2	C-1, C-3, C-4
3	1,65 (q; 7,5; 2H)	CH ₂	24,93	H-2, H-4	C-3	C-1, C-2, C-5
4-13	1,27 (sl; 22H)	CH ₂	28,31–29,84	–	–	–
14	1,27 (sl; 2H)	CH ₂	32,18	H-13, H-15	C-14	C-13, C-15
15	1,27 (sl; 2H)	CH ₂	22,94	H-14, H-16	C-15	C-14, C-16
16	0,89 (t; 6,6; 3H)	CH ₃	14,36	H-15	C-16	C-15, C-14

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

^bMultiplicidade: sl = simpleto largo; t = tripleto, q = quintupeto.

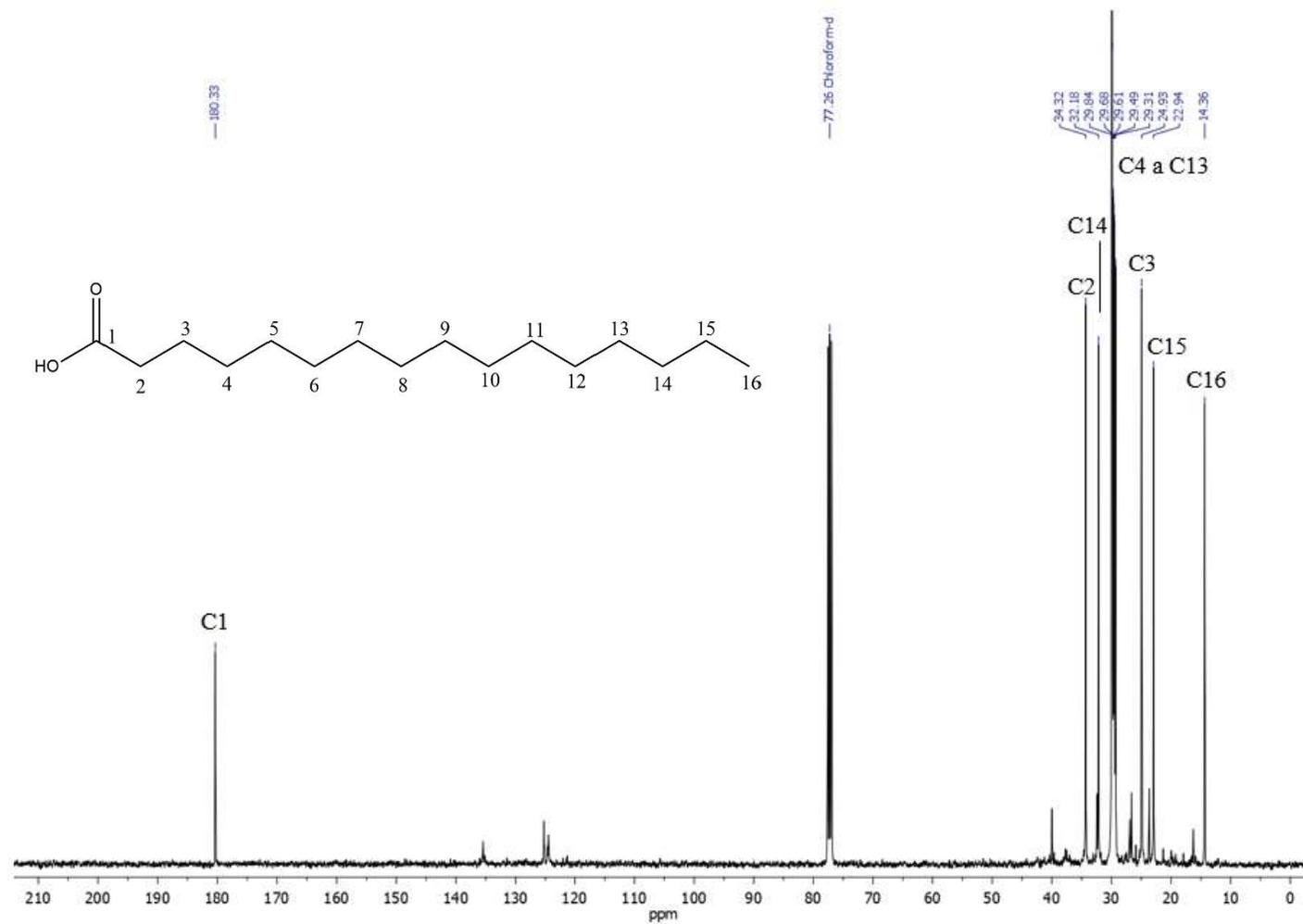
Fonte: o autor.

Figura 90 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,7–2,5) do composto VI (400 MHz, CDCl_3).



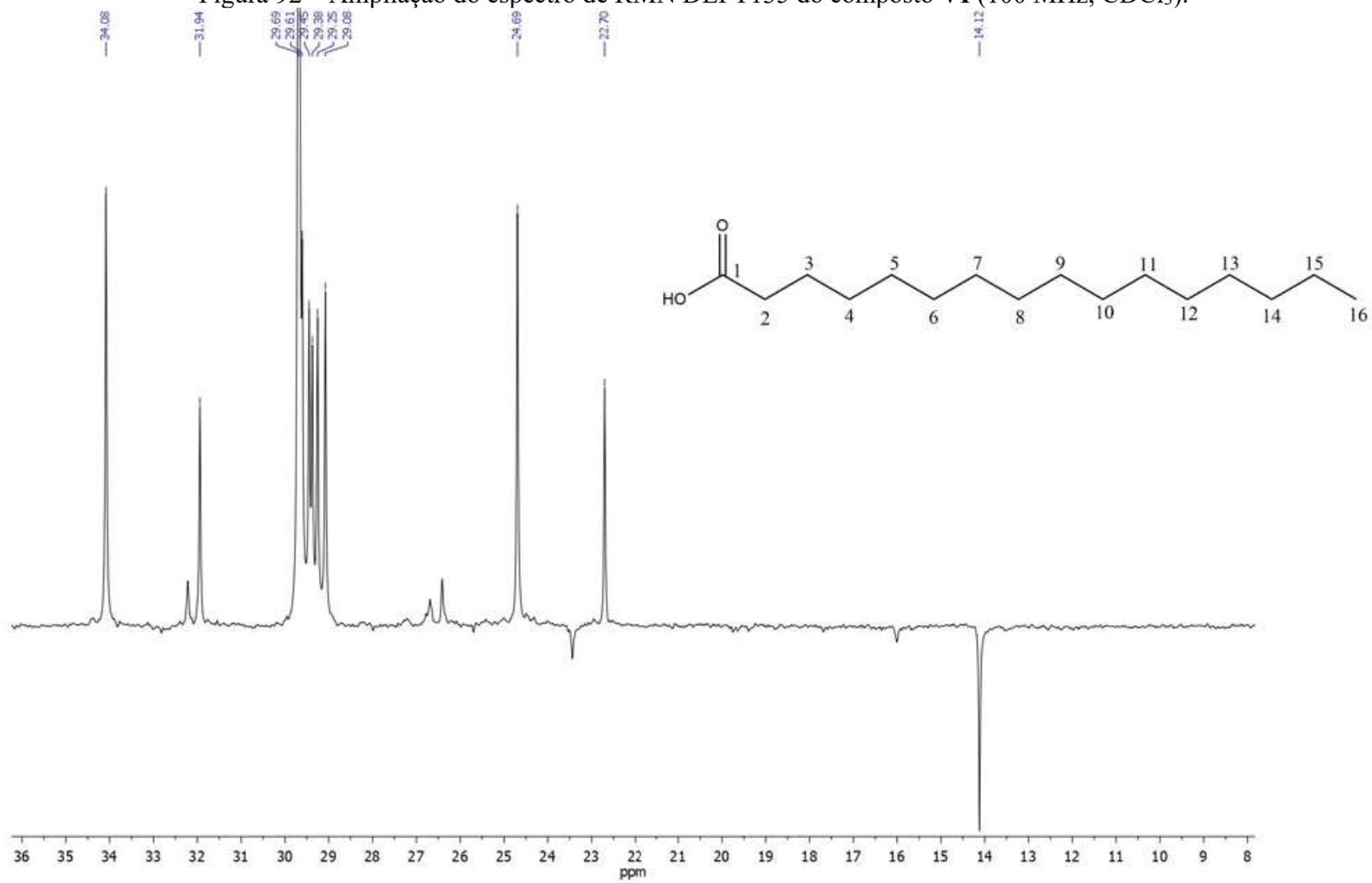
Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

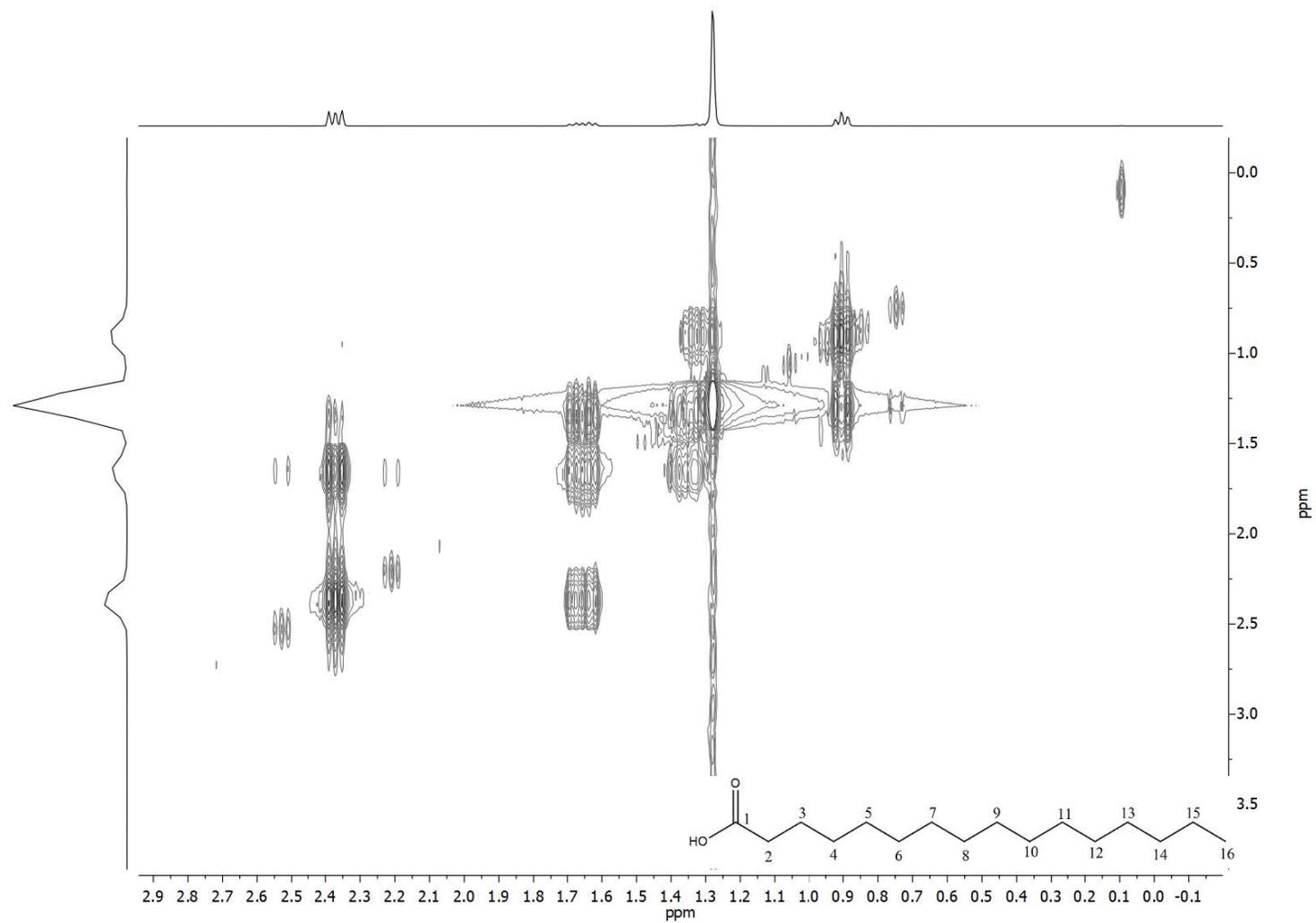
Figura 91 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto VI (100 MHz, CDCl_3).

Nota: O sinal em 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

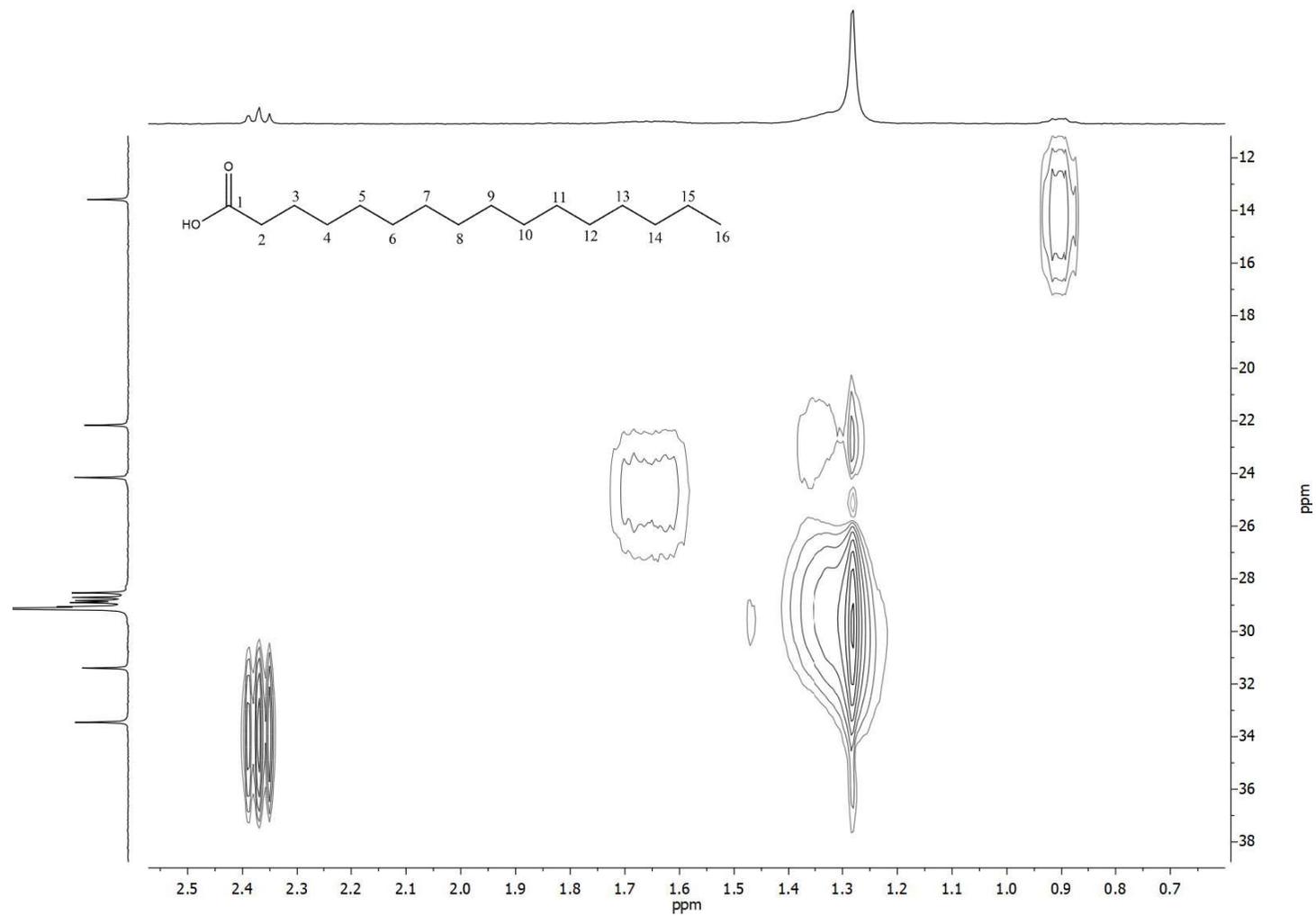
Fonte: o autor

Figura 92 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 do composto VI (100 MHz, CDCl₃).

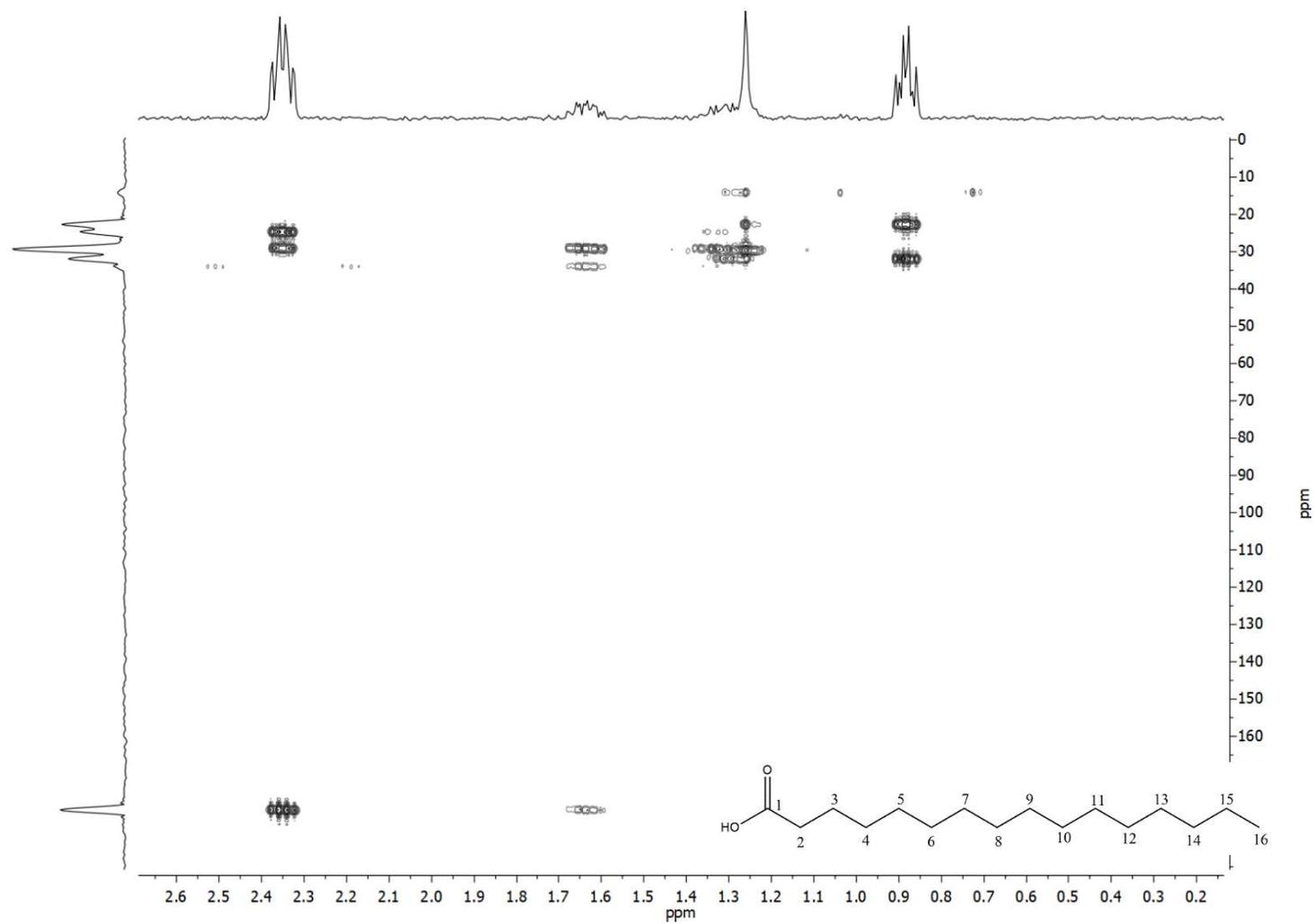
Fonte: o autor.

Figura 93 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto VI (400 MHz, CDCl_3).

Fonte: o autor.

Figura 94 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto VI (400 MHz, CDCl_3).

Fonte: o autor.

Figura 95 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto VI (400 MHz, CDCl₃).

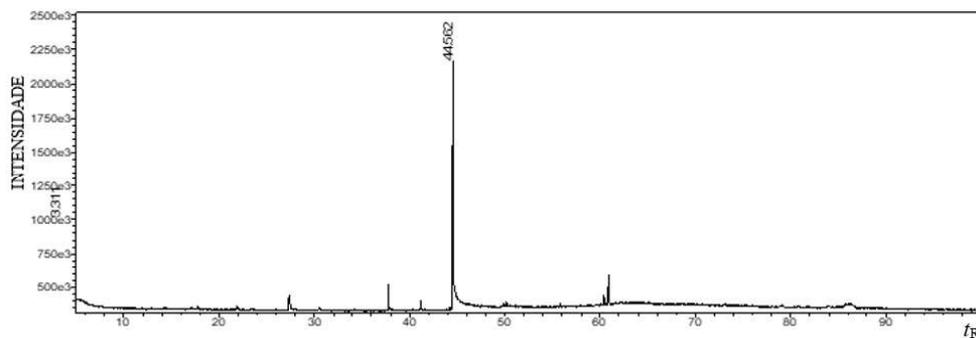
Fonte: o autor.

A fração EMFC2F3 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de apenas um pico majoritário com t_R de 44,56 min (Figura 96). O índice de similaridade obtido foi de 93%, confirmando o isolamento do composto **VI** e corroborando com os dados de RMN. O EM-IE do composto **IV** apresentou um sinal de m/z 256 (17%) que foi atribuído ao íon molecular do ácido palmítico (**VI**), além de três íons fragmentos intensos de m/z 43 (91%), 60 (83%) e 73 (100%, pico base) (Figura 100 e Figura 101) que são justificados abaixo:

- m/z 73 [M-183u] – formado após a captura de H^\bullet do carbono $C\alpha$ pelo átomo O^{+} , deixando o átomo de carbono com um elétron desemparelhado. Em seguida, ocorre uma clivagem homolítica da ligação entre o $C\alpha$ - $C\beta$ e ocorre uma nova ligação com o elétron desemparelhado, formando uma ligação dupla conjugadas. Assim, ocorre uma alta estabilidade do fragmento, o que justifica a intensidade do pico base (Figura 101);
- m/z 43 [M-213u] – formado quando a carga inicial está sobre a ligação C13-C14 e ocorre a clivagem heterolítica da ligação entre estes carbonos, formando um carbocátion terciário. Um segundo mecanismo é quando ocorre um rearranjo de McLafferty, no qual ocorre transferência de $H\gamma$ para a hidroxila através de um estado de transição cíclico, e quebra da ligação C2-C3 para gerar o íon radical de m/z 43, em ressonância, o que confere estabilidade ao fragmento, justificando a intensidade do sinal;
- m/z 60 [M-196u] – formado por rearranjo de McLafferty, no qual o par de elétrons da carbonila ataca o $H4$, o par de elétrons da ligação C4-H4 forma uma ligação dupla ($C3=C4$) e quebra a ligação C2-C3, para formar uma outra ligação dupla ($C1=C2$) e formar o radical de m/z 43, em ressonância, o que confere estabilidade ao fragmento, justificando a intensidade do sinal. O íon m/z 60 pode ser formado também a partir dos fragmentos de m/z 115, 129, 157 e 213 (o que justifica a alta intensidade do fragmento – o terceiro mais intenso) a partir de uma clivagem homolítica da ligação entre o $C\beta$ - $C\gamma$, deixando um elétron desemparelhado que fica em ressonância com os átomos de oxigênio, conferindo estabilidade ao fragmento (Figura 100).

As propostas de mecanismos de fragmentação do ácido palmítico (**VI**) são ilustradas nas Figura 98 e Figura 99.

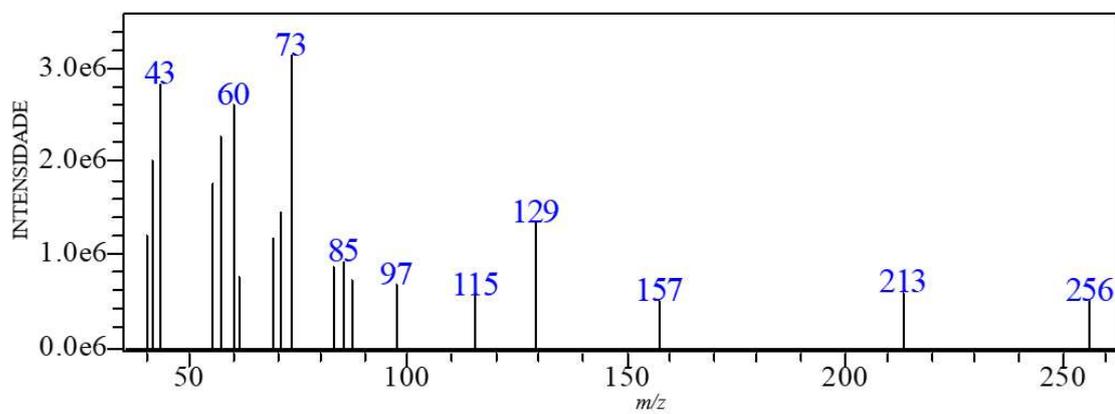
Figura 96 – Cromatograma da fração EMFC2F3 obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

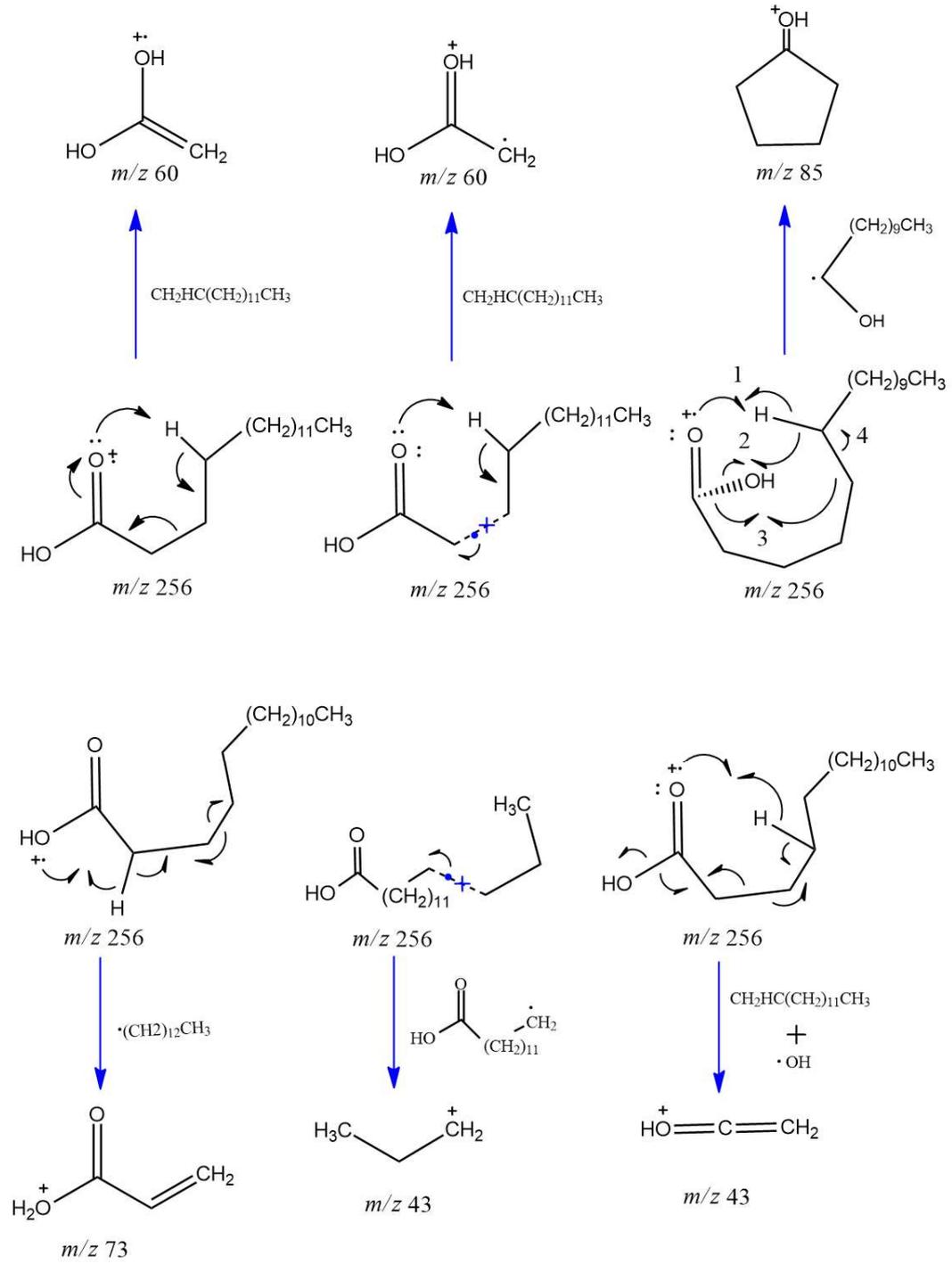
Fonte: o autor.

Figura 97 – EM-IE do ácido palmítico (VI) obtido por CG-EM.



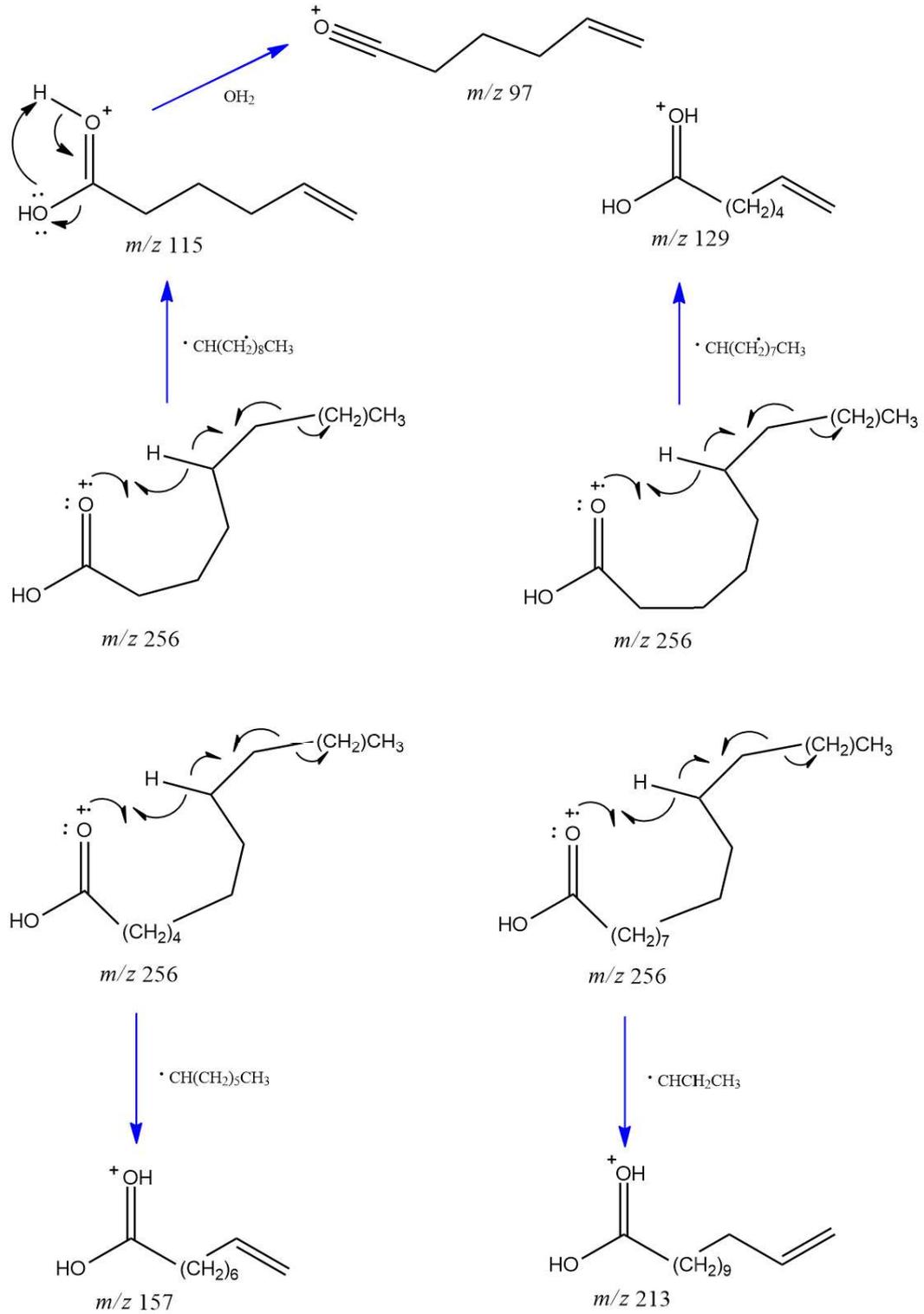
Fonte: o autor.

Figura 98 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o ácido palmítico (VI) parte 1.



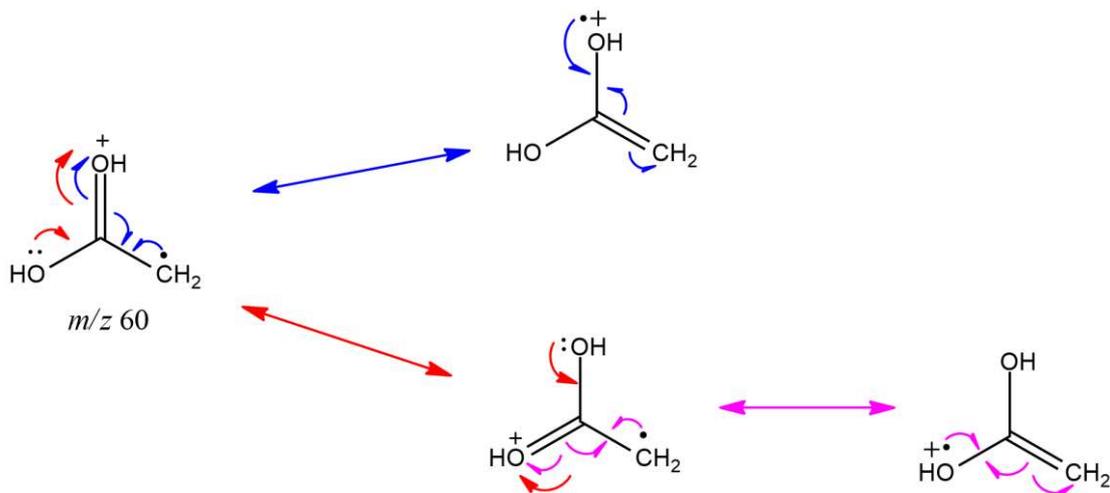
Fonte: o autor.

Figura 99 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o ácido palmítico (VI) parte 2.



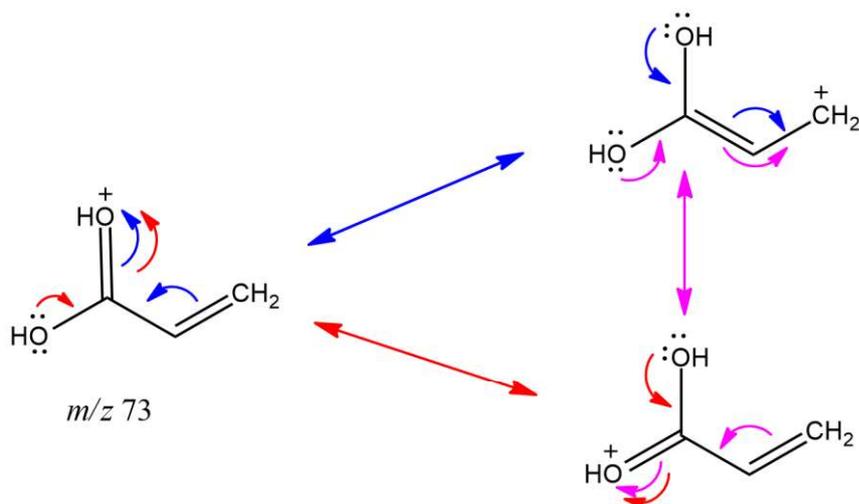
Fonte: o autor.

Figura 100 – Mecanismos de seta curva das estruturas de ressonância do íon de m/z 60 u.



Fonte: o autor.

Figura 101 – Mecanismos de seta curva das estruturas de ressonância do íon de m/z 73 u.



Fonte: o autor.

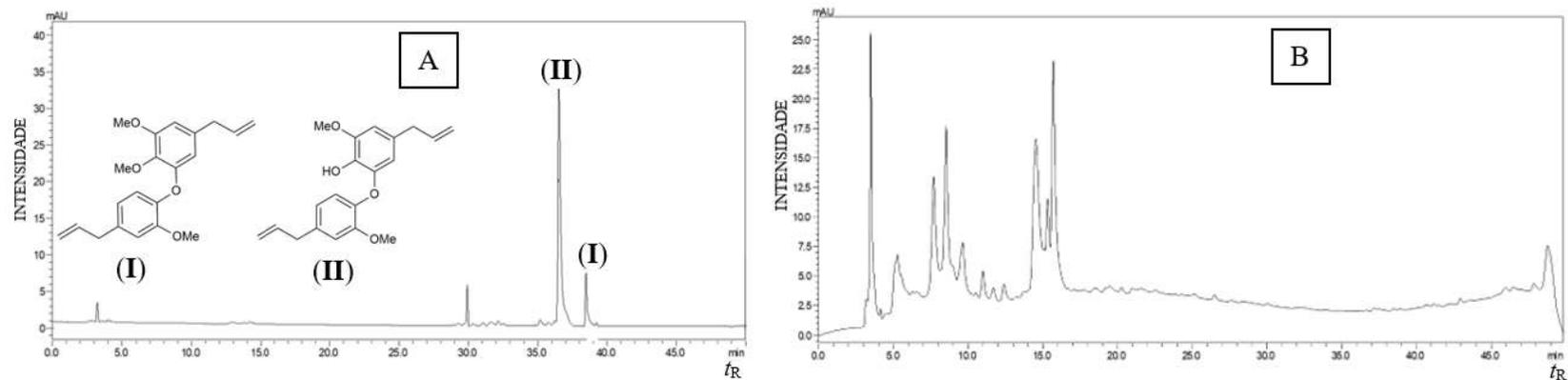
5.3 ANÁLISE POR CLAE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E GALHOS DE *E. paniculata*

Foi realizada a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE–DAD–ELSD) para a obtenção do perfil cromatográfico dos EHF, EMF, EHG e EMG. Após uma varredura do cromatograma do espectro UV de 190–800 nm, o comprimento de onda que mostrou maiores informações do perfil cromatográfico foi em 254 nm. Na análise do cromatograma CLAE–DAD do EHF (Figura 102) foi possível verificar um sinal mais intenso em 36,6 e dois outros menores em 30,0 e 38,5 min. No cromatograma do EHF obtido por ELSD (Figura 103) foi observado que estes sinais também aparecem, mas há a presença de outro sinal

em 3,5 min que agora é o de maior intensidade. A análise do cromatograma CLAE–DAD (Figura 102) do EMF mostrou um padrão bem diferente em relação ao EHF. Há a presença de sinais mais intensos entre 3,5 a 17,5 min, que antes não foram observados no EHF, e além disso, os dois sinais em 30,0; 36,6 e 38,5 min já não aparecem mais. Já na análise do cromatograma do EMF obtido por ELSD (Figura 103) foi possível verificar a presença de apenas um sinal em 4 min, provavelmente de possíveis açúcares ou compostos bem polares presente neste extrato. Por fim, foi verificado após o fracionamento, purificação, isolamento e análises por CLAE–DAD–ELSD que os sinais em 36,6 e 38,5 referem-se aos compostos **II** e **I** isolados do EHG, respectivamente.

As diferenças observadas nos cromatogramas DAD e ELSD do EMF se deve ao fato das análises de DAD serem dependentes da presença de grupos cromóforos nos compostos (ligações duplas conjugadas) (VERVOORT, DAEMEN, TÖRÖK, 2008), e como consequência, esta análise não é quantitativa, a menos de utilização de padrões internos e/ou curvas de calibração (DOBROWOLSKA-IWANIEK et al., 2020). Já as análises de ELSD são quantitativas e capazes de detectar quase todas as classes de compostos, independentemente de suas propriedades físicas ou químicas (MARKUS, HERMANN, 2005), ou seja, os sinais observados nos cromatogramas indicam a proporção destes compostos na amostra, e isto indica que os compostos com tempos de retenção entre 5 e 17 min observados no EMF estão presentes em baixas concentrações, visto que não aparecem no cromatograma de ELSD.

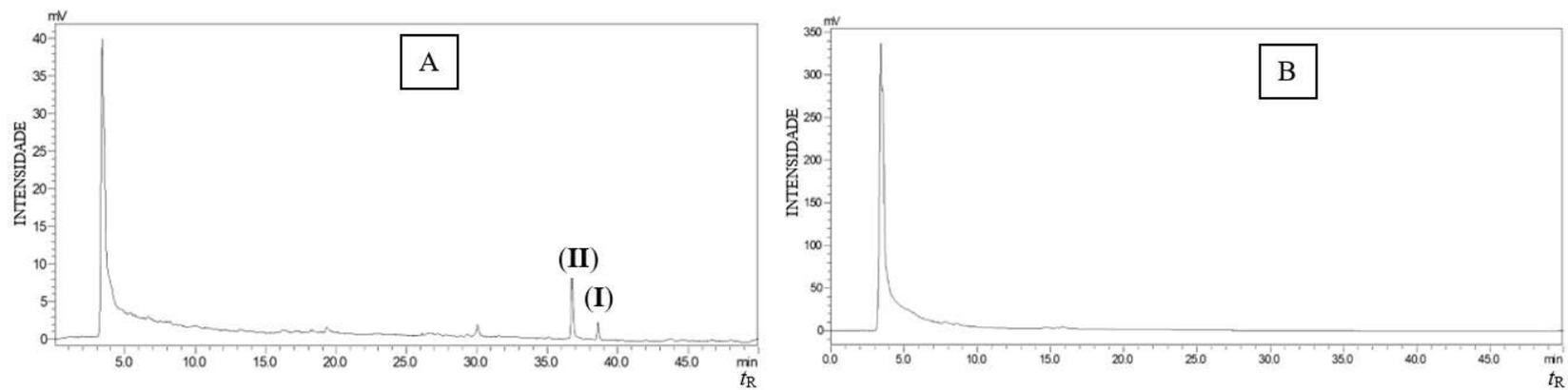
Figura 102 – Cromatograma do EHF (A) e EMF (B) obtido por CLAE–DAD (UV 254 nm).



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 103 – Cromatograma do EHF (A) e EMF (B) obtido por CLAE–ELSD.

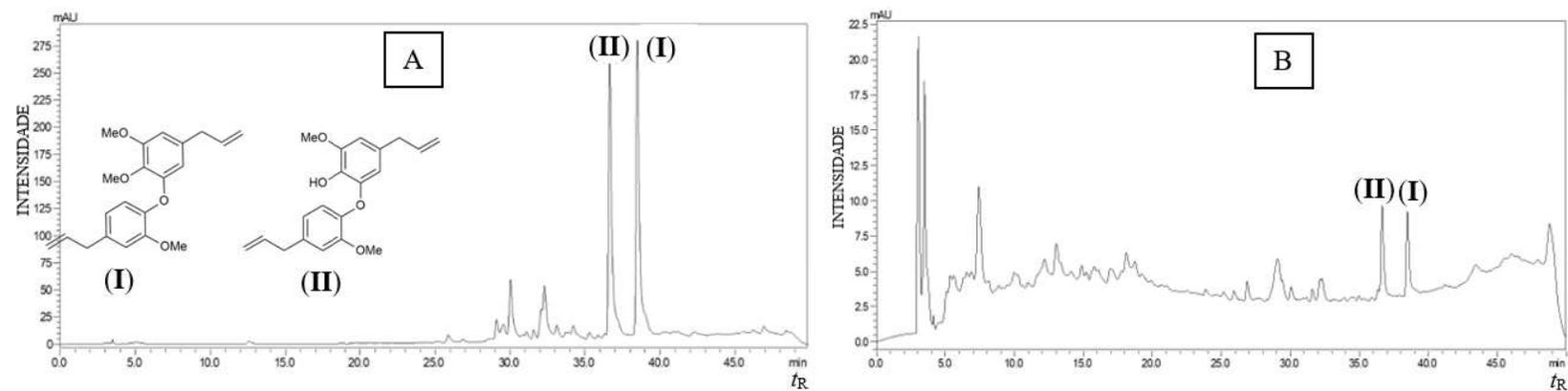


Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Na análise do cromatograma CLAE–DAD do EHG (Figura 104) foram observados dois sinais mais intensos em 36,6 e 38,5 min, mas há a presença de outros sinais de baixa a média intensidade de 28 a 35 min. No cromatograma do EHG obtido por ELSD (Figura 105) foi observado quase que apenas a presença dos sinais em 36,6 e 38,5 min, além de um pequeno sinal em 32,5 min. Na análise do cromatograma CLAE–DAD do EMG (Figura 104) foi verificado há presença dos sinais em 36,6 e 38,5 min, mas em uma intensidade bem inferior, onde agora, dois sinais de 3,5 a 4,0 min são os mais intensos. Também foi observado nesta figura um padrão bem diferente em relação ao EHG e EMF (CLAE–DAD). Foi observado um maior número de sinais, todos de intensidades bem parecidas, porém foi observado dois sinais mais intensos próximos a 3 min. Na análise do cromatograma do EMG obtido por ELSD (Figura 105) foi observado um único sinal em 4, sendo que este apresentou um perfil cromatográfico muito similar ao que foi observado no EMF. Este sinal provavelmente é devido a possíveis açúcares e compostos bem polares presente neste extrato, visto que a metodologia foi iniciada com 65% de água e a coluna utilizada foi de fase reversa, ou seja, compostos muito polares tendem a sair no início da corrida quando esta metodologia é aplicada. Por fim, foi verificado após o fracionamento, purificação, isolamento e análises por CLAE–DAD–ELSD que os sinais em 36,6 e 38,5 são os compostos **II** e **I** isolados do EHG, respectivamente.

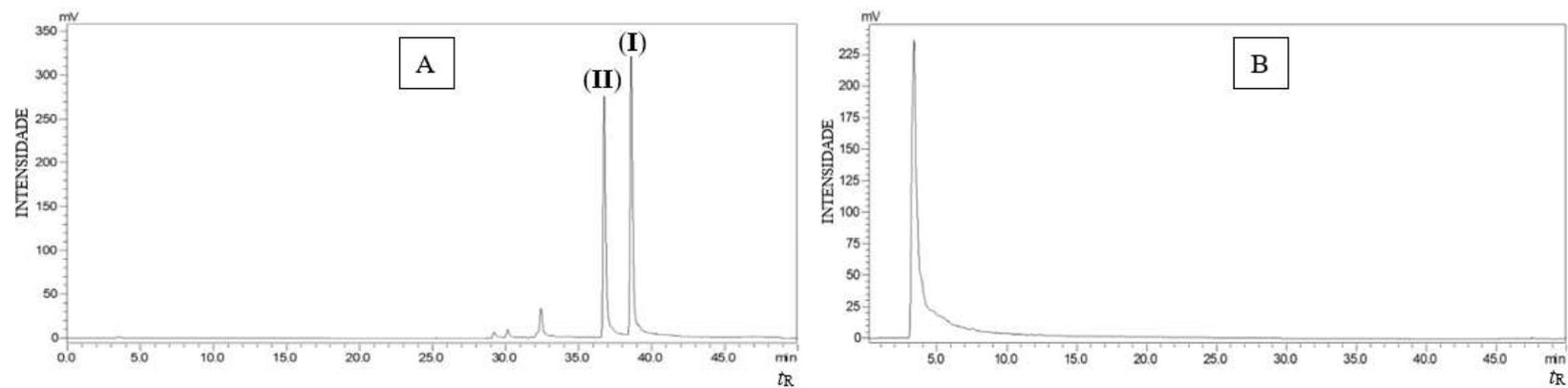
Figura 104 – Cromatograma do EHG obtido por CLAE-DAD (UV 254 nm).



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 105 – Cromatograma do EHG obtido por CLAE-ELSD.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

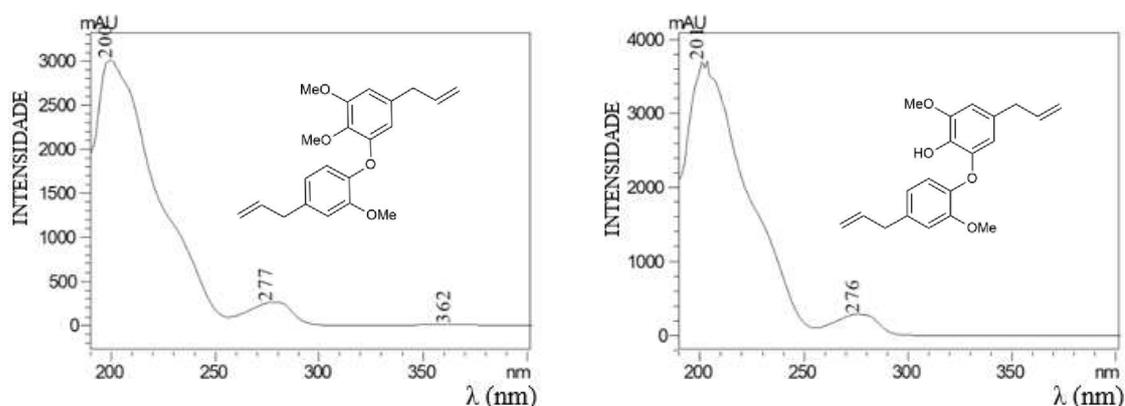
Fonte: o autor.

5.4 ANÁLISES DE DAD–UV DOS EXTRATOS E DOS COMPOSTOS I E II ISOLADOS DE *E. paniculata*

Foi realizada uma análise dos espectros de DAD–UV obtido das análises por CLAE de todos os sinais dos extratos com tempos de retenção próximos a 36,6 e 38,5 min (Figura 106) para o EHG e EHF. Foi observado tanto para o sinal em 36,6 quanto em 38,5 min, duas bandas de absorção, sendo uma em 200 nm e outra em aproximadamente 277 nm. Dessa forma, foi sugerido que os compostos referentes aos sinais em 36,6 e 38,5 min correspondem aos mesmos compostos nos diferentes extratos da *E. paniculata*. As análises de UV–Vis destes compostos já foram realizadas em um estudo reportado por Costa-Silva e colaboradores (2015). As análises foram realizadas em MeOH em um espectrofotômetro da Shimadzu (modelo 1650–PC) e foram obtidas bandas de absorção em 220 nm e 280 nm para o composto **I** e bandas de absorção em 215 nm e 280 nm para o composto **II**. Nas amostras analisadas neste trabalho, os dois compostos apresentaram bandas de absorção em comprimentos de onda menor (200 nm e 277 nm), o que pode ser referente a um deslocamento hipsocrômico provocado pela composição do solvente MeOH/H₂O (o aumento da polaridade do solvente pode provocar deslocamentos batocrômico ou hipsocrômico dos compostos (MOREIRA, SCHEEL, HATUMURA, SCARMINIO, 2014)).

Em geral, compostos aromáticos apresentam transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que geram duas bandas de absorção, uma banda primária intensa em 184 e 202 nm e uma banda secundária de baixa intensidade em 255 nm. Entretanto, a presença de substituintes com elétrons não ligantes (elétrons *n*), como as hidroxilas e metoxilas presentes nos compostos **I** e **II**, podem causar deslocamentos nestas bandas de absorção para comprimentos de ondas maiores, pois esses elétrons aumentam a extensão do sistema π possibilitando transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$, deslocando assim essas bandas para valores típicos de 210 e 270 nm na presença de OH e 217 e 269 nm na presença de OMe. Nos compostos **I** e **II**, a banda primária observada em comprimento de onda menor (200 nm) deve-se ao deslocamento hipsocrômico, enquanto que a banda secundária observada em comprimento de onda maior (276 nm) deve-se ao deslocamento batocrômico, que podem ter sido provocados pelo aumento da polaridade do solvente MeOH/H₂O na análise de CLAE.

Figura 106 – Espectros de DAD–UV da análise por CLAE dos compostos **I** e **II**, respectivamente.



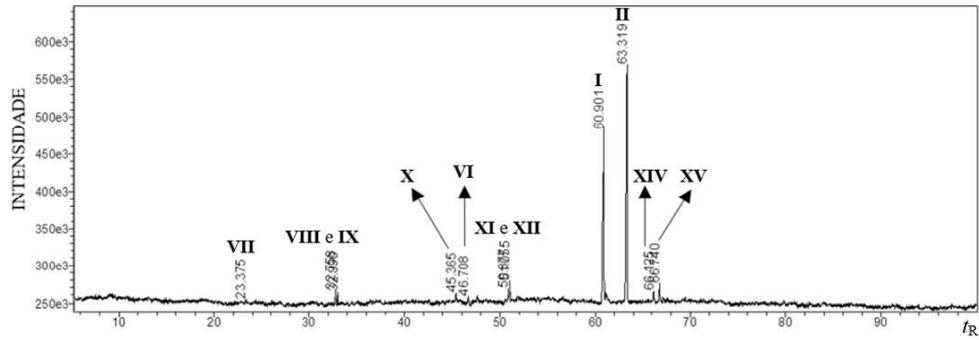
Fonte: o autor.

5.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EHF E EHG POR CG–EM

Uma das vias utilizadas neste trabalho para identificar os compostos presentes nos EHF e EHG, foi através de análises de CG–EM. A identificação dos compostos foi baseada nos espectros de massas obtidos nas análises e com a comparação dos dados de bibliotecas presentes no software LabSolution-GCMS Solution (Nist08, Wiley139, Wiley229 e Shim2205), sendo a comparação realizada entre os padrões de fragmentação mostrados pela biblioteca e a fragmentação do composto analisado. A identificação dos compostos foi baseada também no índice de similaridade (dado fornecido pelo software) e pelo índice aritmético (Equação 1). Em relação aos índices de similaridade para a identificação dos compostos foi considerado apenas valores superiores à 85%. Já os índices aritméticos (IA) calculados (Equação 1) foram comparados aos IA de compostos padrões, que se encontram tabelados por Adams (2007).

No cromatograma do EHF obtido por CG–EM (Figura 107), é possível verificar que os componentes apresentam t_R entre 23,37 e 66,74 min, enquanto que no cromatograma do EHG (Figura 108) os componentes apresentam t_R entre 45,35 e 77,28 min. Na análise do EHF foram identificados um total de 11 compostos, sendo 3 ésteres (**X**, **XI**, **XII**), 1 ácido graxo (**VI**), 4 neolignan (**I**, **II**, **XIV** e **XV**), 1 fenilpropanoide (**I**) e 2 sesquiterpenos (**VIII** e **IX**), enquanto no EHG foram identificados 8 compostos, sendo 4 ésteres (**X**, **XI**, **XII** e **XIII**), 1 ácido graxo (**VI**), 2 neolignan (**I** e **II**) e 1 esteroide (**III**). Os espectros de massa (EM–IE) dos compostos identificados por CG–EM estão disponíveis no Apêndice C.

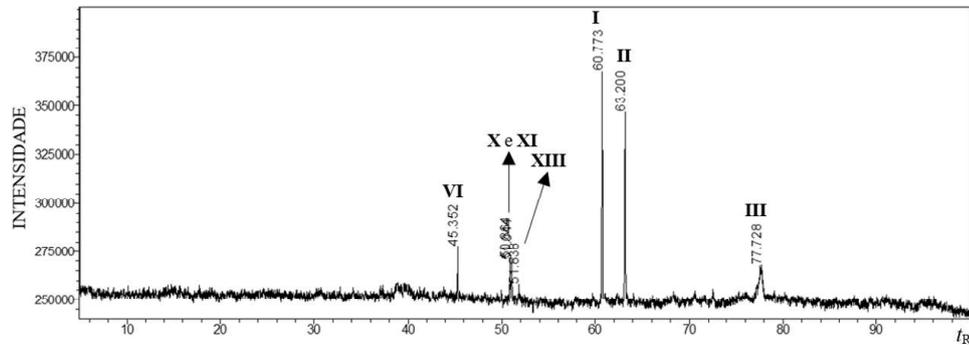
Figura 107 – Cromatograma do EHF obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

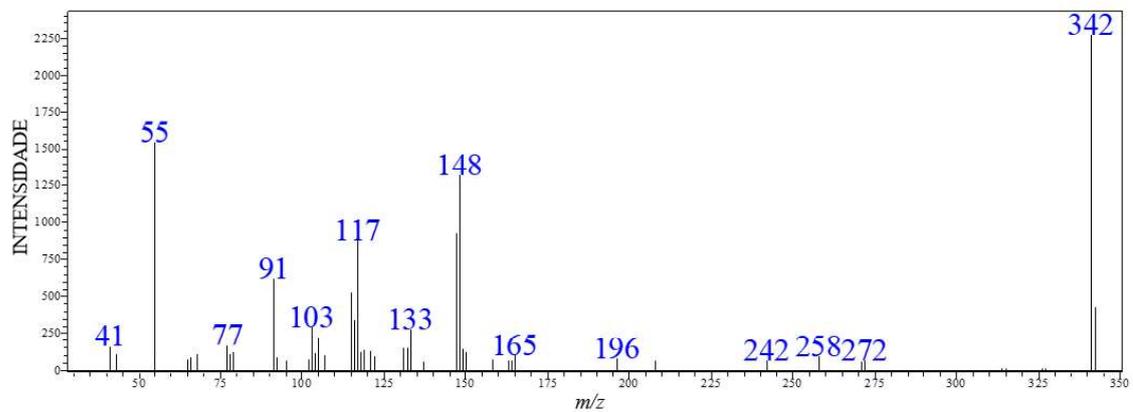
Figura 108 – Cromatograma do EHG obtido por CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

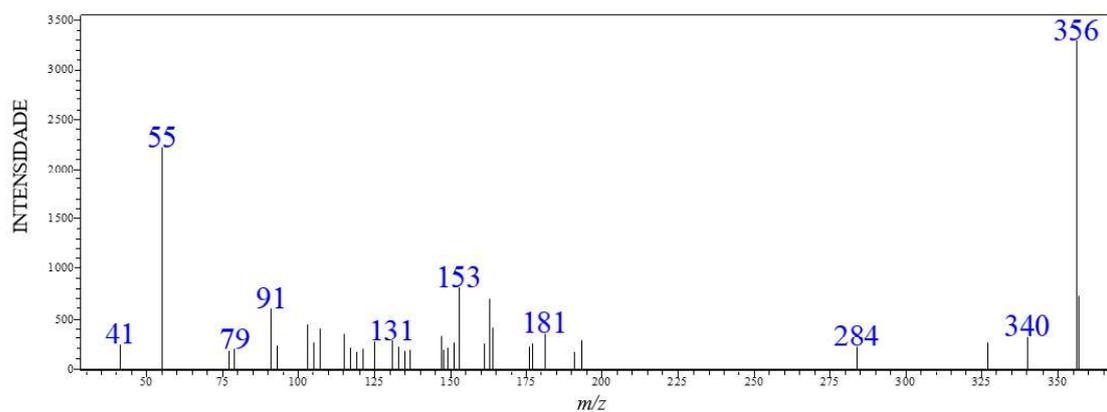
Fonte: o autor.

Figura 109 – EM-IE do 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-hidroxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4-hidroxi-5-hidroxibenzeno (XIV) obtido por CG-EM.



Fonte: o autor.

Figura 110 – EM–IE do 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno (**XV**) obtido por CG–EM.



Fonte: o autor.

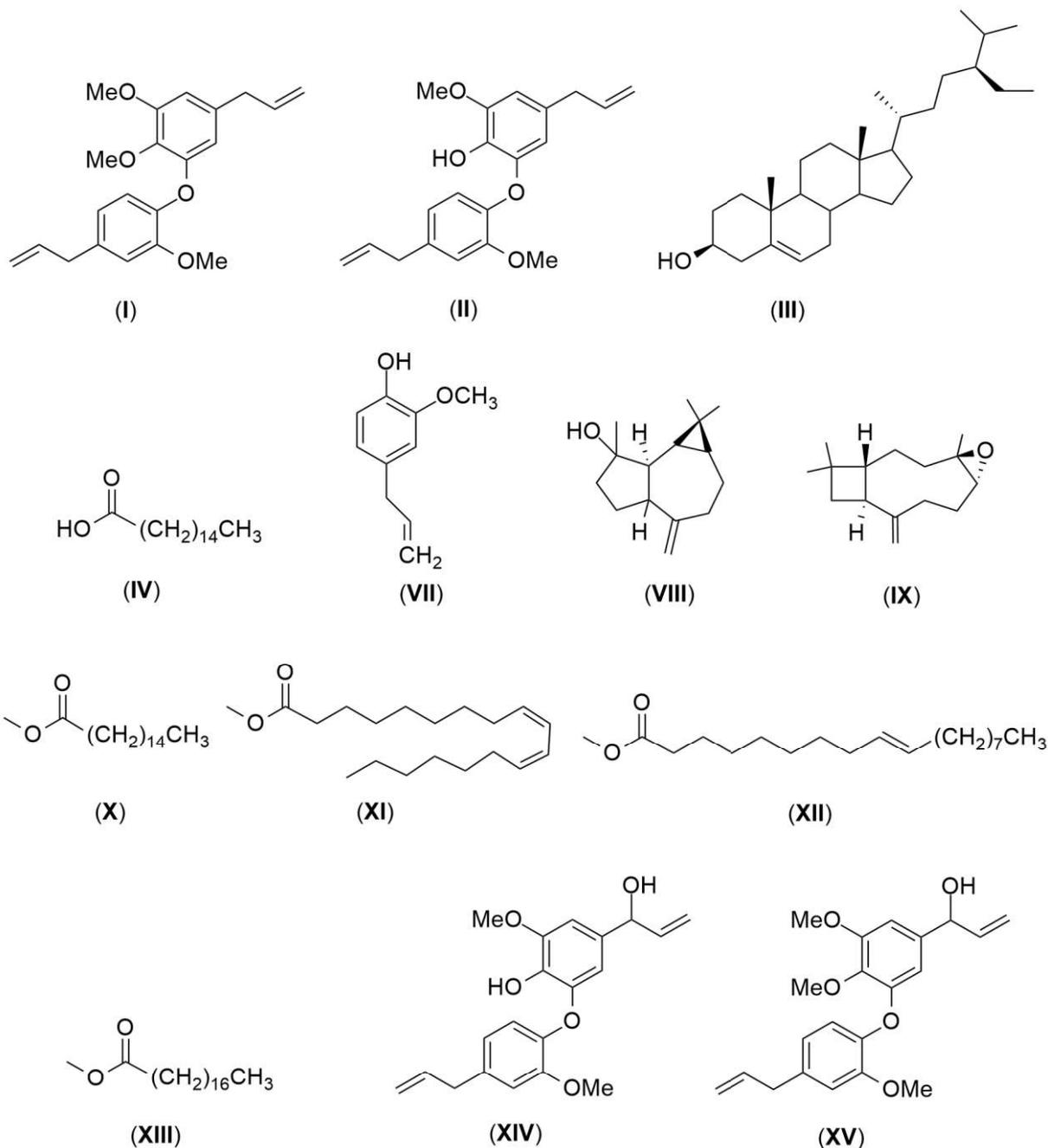
Tabela 18 – Compostos presentes nos EHF e EHG identificados por CG–EM.

t_R (min)	Composto	EHF	EHG	IS (%)	IA _{cal}	IA _{teo}
23,37	Eugenol ^{1,2,4} (VII)	Sim	–	85	1360	1356
32,75	Espatuleno ^{1,2,4} (VIII)	Sim	–	89	1582	1577
32,99	Óxido de cariofileno ^{1,2,4} (XI)	Sim	–	89	1589	1582
45,35	Hexadecanoato de metila ^{1,2} (X)	Sim	Sim	89	1927	1921
46,71	Ácido palmítico ^{1,2,4} (VI)	Sim	Sim	86	1967	1959
50,86	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila ^{1,2,3} (XI)	Sim	Sim	90	2098	2095
51,04	(9E)-octadec-9-enoato de metila ^{1,2,4} (XII)	Sim	Sim	90	2104	2110
51,83	Octadecanoato de metila ^{1,2} (XIII)	–	Sim	92	2131	2124
60,77	O-metildesidrodieugenol B (I)*	Sim	Sim	–	2428	–
63,20	Desidrodieugenol B (II)*	Sim	Sim	–	2533	–
66,12	1-[(7R)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)fenoxi]-4-hidroxi-5-metoxibenzeno**(XIV)	Sim	–	–	2637	–
66,74	1-[(7R)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno**(XV)	Sim	–	–	2658	–
77,57	β -Sitosterol (III) ^{1,2}	–	Sim	85	3164	3197

Nota: –: não obtido, t_R : tempo de retenção; IS: índice de similaridade; IA: índice aritmético; ¹ wiley7; ² wiley229; ³ Nist08; ⁴ Nist27; ⁵ Shim2205; * com base na massa e fragmentos e RMN dos compostos isolados. ** com base na massa, literatura, fragmentação e espectro de CG–EM dos compostos I e II (SOUSA et al., 2017).

Fonte: o autor.

Figura 111 – Estrutura química dos compostos identificados por CG–EM.



Fonte: o autor.

Os compostos **VII** ao **XIII** identificados por CG–EM não serão discutidos, pois suas estruturas foram confirmadas pelo IS, IA e pelo padrão de fragmentação. Os compostos **I**, **II**, **III** e **VI** foram isolados dos extratos de *E. paniculata* e foram abordados com mais detalhes nos tópicos 5.2.1 ao 5.2.6 (RMN e CG–EM). Os compostos **XIV** e **XV** não foram isolados e nem identificados pelas bibliotecas Nist08, Wiley139, Wiley229, Shim2205 e em bibliotecas disponíveis na internet. Entretanto, os espectros de massas das neolignanas **I** e **II** possuem os

mesmos padrões de fragmentação dos compostos **XV** e **XIV**, sendo possível sugerir que eles são respectivamente as neolignananas 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno e 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-hidroxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4-hidroxi-5-hidroxibenzeno (DIAZ, GOTTLIEB, GOTTLIEB, 1980; COSTA-SILVA et al., 2015; SOUSA et al., 2017). Além disso, na literatura não há registros de análises de CG-EM das neolignananas **XIV** e **XV**, visto que foram isolados pela primeira vez em 2015 e 2017, respectivamente. O índice aritmético (IA) calculado para **XIV** e **XV** foi de 2637 e 2658, respectivamente. A proposta de mecanismos de fragmentação para os principais íons fragmentos de **XIV** e **XV** são mostrados na Figura 112 e Figura 113.

A comparação de **XIV** e **XV** mostrou um aumento de 14 u, o que indica que houve uma troca de hidrogênio por CH₃. Além disso, os espectros de massas das duas neolignananas apresentam alguns sinais de mesmo *m/z*, como por exemplo 41, 77, 55, 91, 103 e 133 em diferentes intensidades.

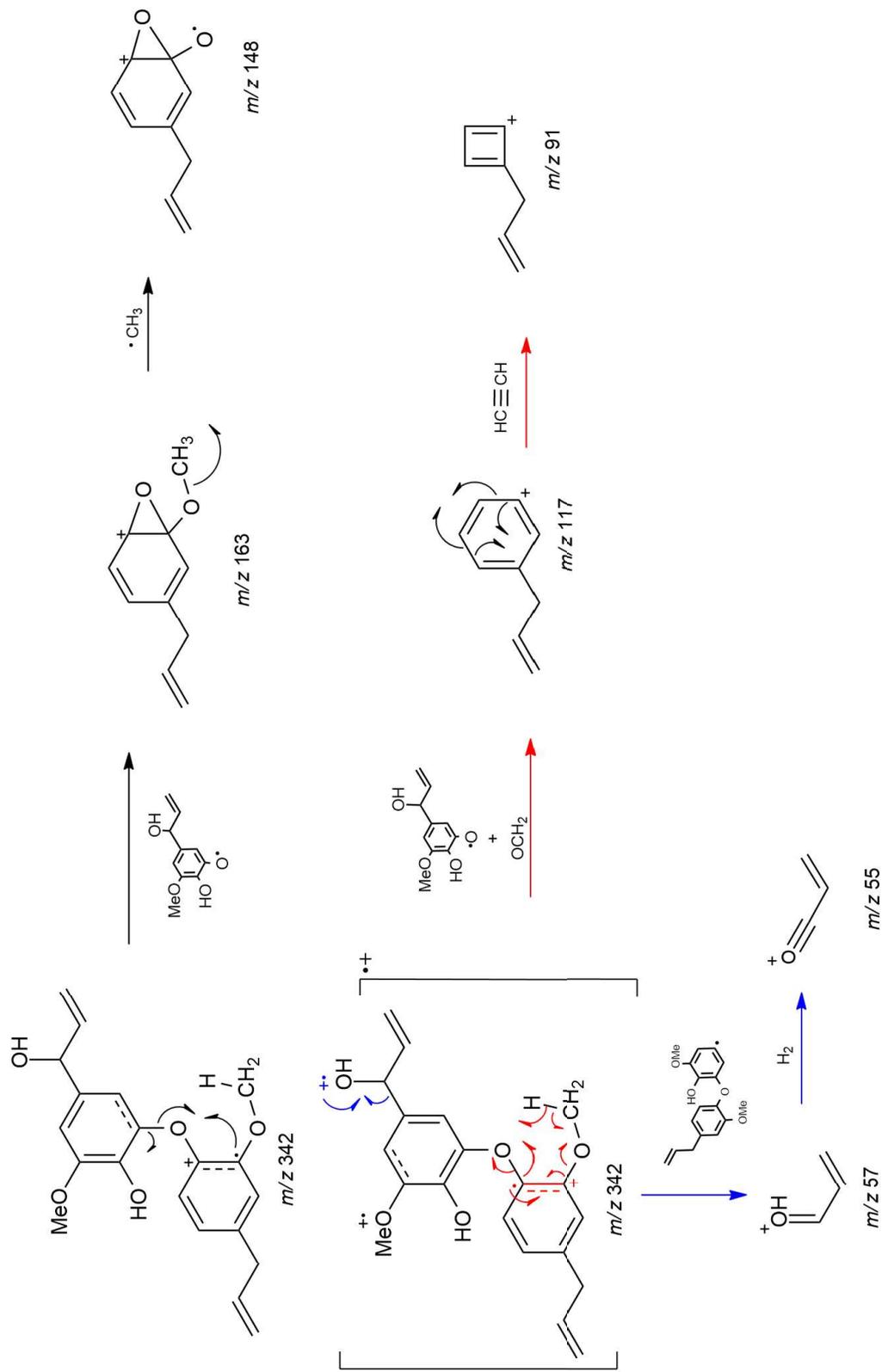
A neolignana **XIV** possui massa molar de 342 g mol⁻¹ enquanto a **II** possui massa molar de 326 g mol⁻¹, o que indica a troca de um hidrogênio por uma hidroxila (aumento de 16 u em relação a **II**). Além disso, a maioria dos sinais dos espectros de massas das duas neolignananas são equivalentes, sendo que o pico base é a massa molar do composto e outros 7 sinais (41, 77, 91, 103, 117, 133, 148) aparecem nos dois espectros. Além disso, ambos são metabólitos especializados derivados do eugenol (TEPONNO, KUSARI, SPITELLER, 2016; ZÁLEŠÁK, BON, POSPÍŠIL, 2019).

O EM-IE de **XIV** apresentou um sinal de *m/z* 342 (100%) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de *m/z* 55 (74%), 148 (54%) e 117 (38%) (Figura 109). A Figura 112 ilustra as propostas de mecanismos de fragmentação dos principais íons fragmentos que aparecem no espectro de massas de **XIV**.

A neolignana **XV** possui massa molar de 356 g mol⁻¹, enquanto a **I** possui massa molar de 340 g mol⁻¹, o que indica a troca de um hidrogênio por uma hidroxila (aumento de 16 u em relação a **I**). Além disso, a maioria dos sinais dos espectros de massas das duas neolignananas são equivalentes, sendo que o pico base é a massa molar do composto e outros 10 sinais (41, 79, 91, 103, 115, 131, 147, 161, 176, 284) aparecem nos dois espectros. Os sinais mais intensos no cromatograma da neolignana **XV** (55, 153, 163) se deve a presença da hidroxila no grupo propenil, que está ausente na **I** (Figura 113).

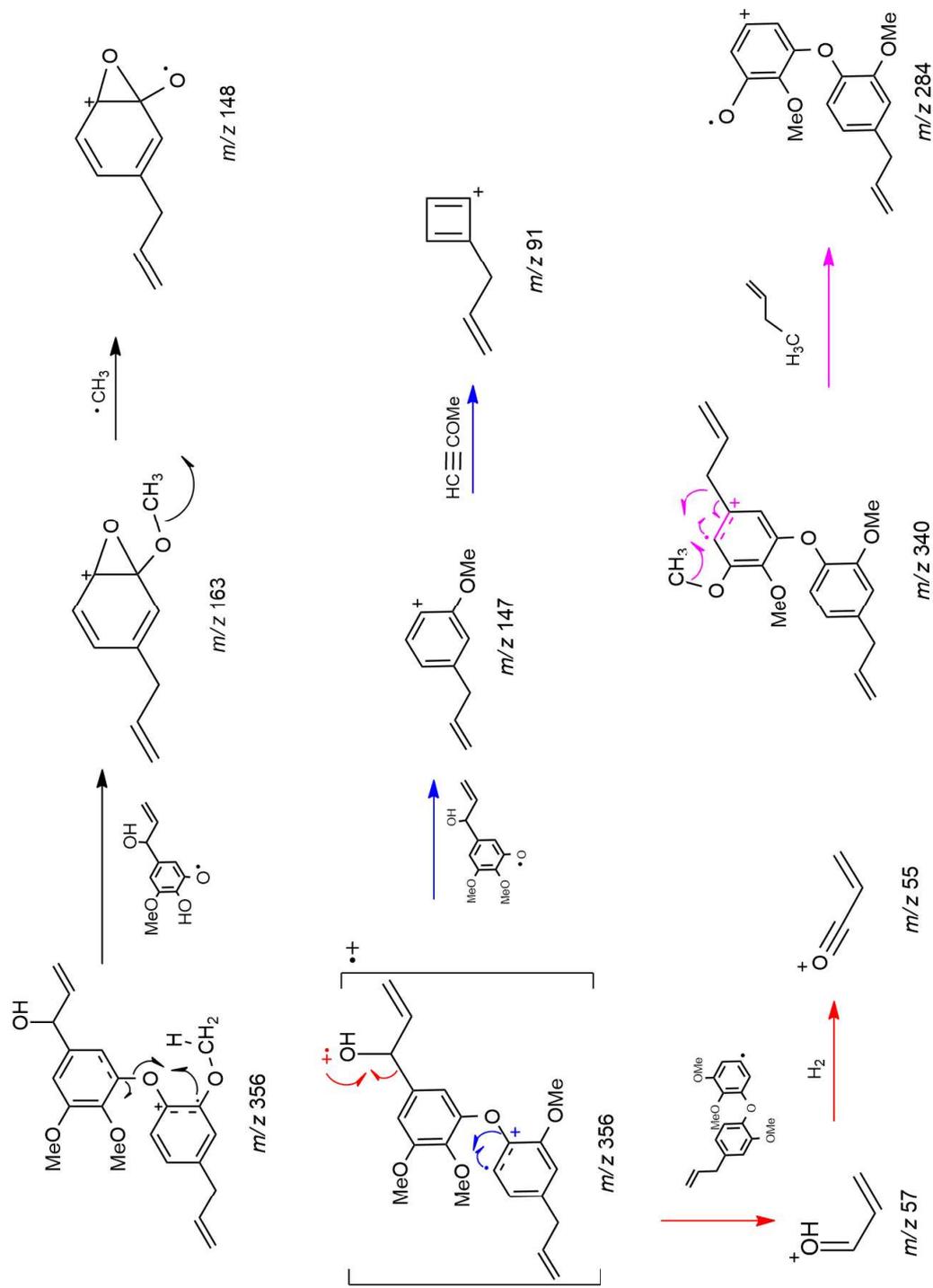
O EM-IE de **XV** apresentou um sinal de *m/z* 356 (100%, pico base) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de *m/z* 55 (69%), 153 (24%) e 163 (21%) (Figura 110). A Figura 113 ilustra as propostas de mecanismos de fragmentação dos principais íons fragmentos que aparecem no espectro de massas de **XV**.

Figura 112 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-hidroxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4-hidroxi-5-hidroxibenzeno (**XIV**).



Fonte: o autor.

Figura 113 – Propostas de mecanismos de fragmentação para o 1-[(7*R*)-hidroxi-8-propenil]-3-[3'-metoxi-1'-(8'-propenil)-fenoxi]-4,5-dimetoxibenzeno (**XV**).



Fonte: o autor.

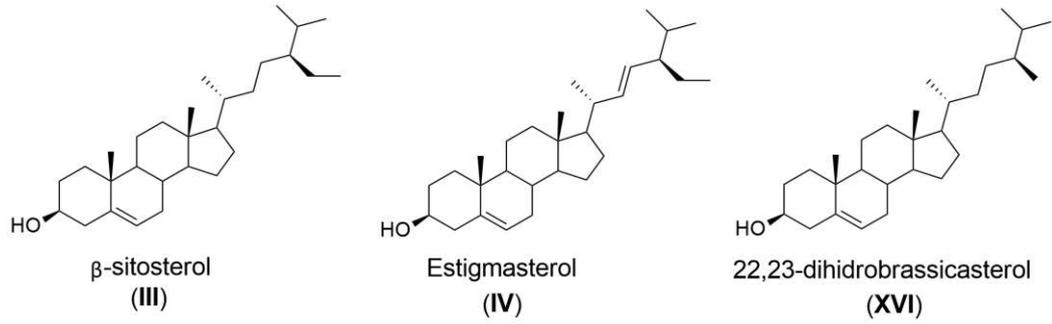
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ESTEROIDES POR CG-EM

A fração EFHC1F1 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível verificar a presença de 3 picos com tempos de retenções em 82,7 min, 84,2 min e 94,9 min (Figura 115) referentes aos compostos 22,23-dihidrobrassicasterol (**XVI**), β -sitosterol (**III**) e estigmasterol (**IV**), respectivamente (Figura 114). Os índices aritméticos (IA) calculado para estes compostos foram de 3385, 3443 e 3547, respectivamente. O isolamento, identificação e caracterização por RMN dos compostos **III** e **IV** já foram discutidos anteriormente. As diferenças nos tempos de retenções dos compostos **III** e **IV** em relação as análises anteriores se deve a calibragem do equipamento, já que a análise da fração EFHC1F1 foi realizada em data diferente e em equipamentos diferentes em relação as análises realizadas na secção de isolamento destes compostos. Entretanto, os espectros foram comparados e apresentam a mesma fragmentação, confirmando que os picos em 83,3 e 84,2 se referem ao composto **III**.

O índice de similaridade obtido para os compostos **III**, **IV** e **XVI** foram de 96%, 91% e 86% respectivamente e os espectros de massas dos compostos foram comparados com os espectros de massas disponíveis na literatura, e com os de bibliotecas presentes no software LabSolution-GCMS Solution (Nist27, Wiley7, Wiley139, Wiley229 e SHIM2205). Assim, foi confirmada a presença do β -sitosterol (**III**), do 22,23-dihidrobrassicasterol (**XVI**) e do estigmasterol (**IV**) na fração EFHC1F1.

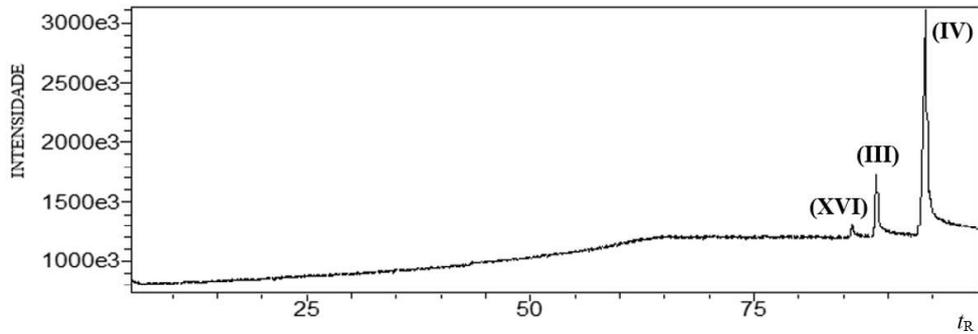
O espectro de massas do β -sitosterol (**III**) e do estigmasterol (**IV**) já foram discutidos anteriormente. O espectro de massas do 22,23-dihidrobrassicasterol (**XVI**) (Figura 116) apresentou um sinal de m/z 400 (14%) que foi atribuído ao íon molecular, além de três íons fragmentos intensos de m/z 43 (100%), 81 (74%) e 105 (67%). O mecanismo de fragmentação do esteroide 22,23-dihidrobrassicasterol (**XVI**) é similar aos já apresentados anteriormente para o β -sitosterol (**III**) e do estigmasterol e não será discutido. A estereoquímica destes compostos foram atribuídas levando-se em consideração o fato deles serem alguns dos fitoesteróis mais comuns encontrados em plantas (Moreau, Whitaker, Hicks, 2002).

Figura 114 – Esteroides identificados por CG-EM.



Fonte: o autor.

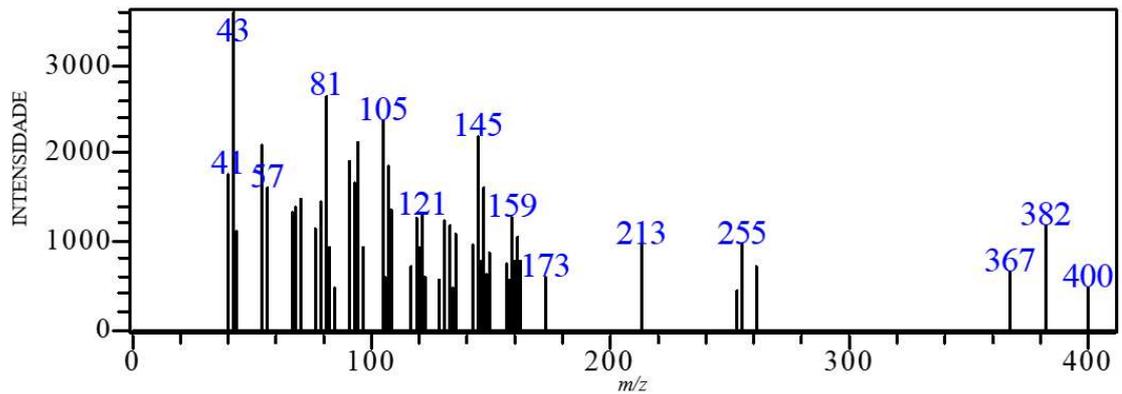
Figura 115 – Cromatograma da fração EFHC1F1 obtido CG-EM.



Nota: t_R – tempo de retenção em minutos.

Fonte: o autor.

Figura 116 – EM-IE do 22,23-dihidrobrassicasterol (XVI) obtido por CG-EM.



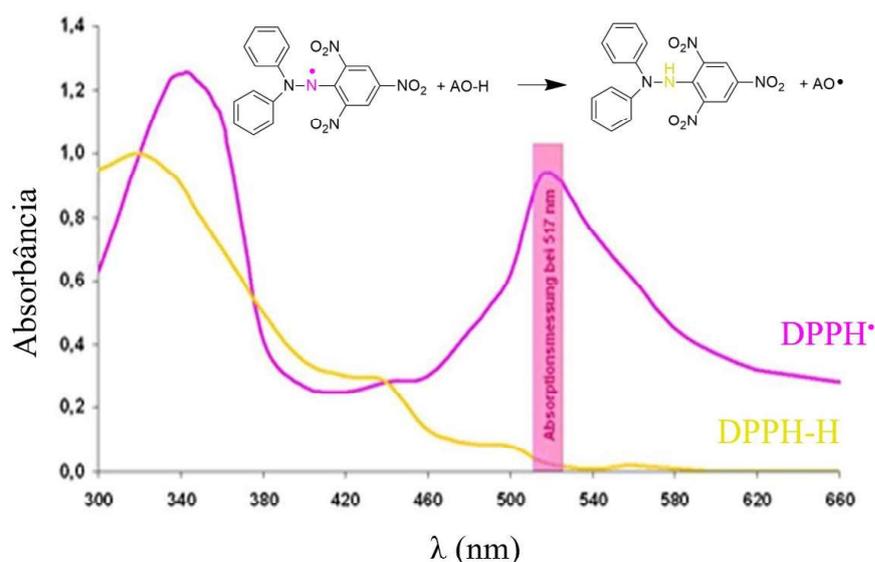
Fonte: o autor.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEORES DE FENÓIS TOTAIS, FLAVONOIDES E PROANTOCIANIDINAS

5.7.1 Análise da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]). Esse método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical DPPH[•] de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm. Na presença de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando o 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção (Figura 117) (PÉREZ, AGUILAR, 2013).

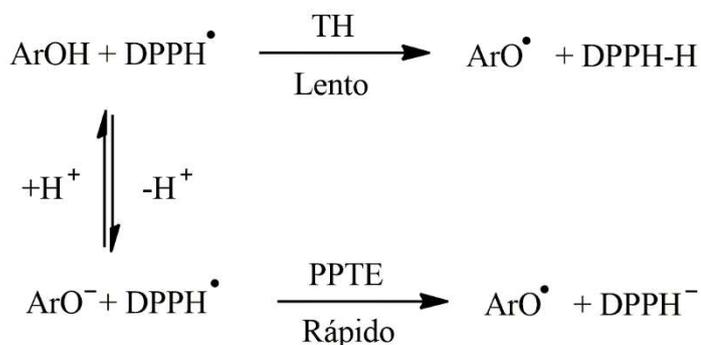
Figura 117 – Espectro de absorção UV–Vis do radical DPPH e do DPPH exposto a uma substancia oxidante (DPPH-H).



A reação de um composto fenólico (ArOH) com DPPH pode ocorrer de dois mecanismos distintos, o de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e o transferência de elétrons (TE). No mecanismo TAH, o átomo de hidrogênio (H[•]) do O-H transfere-se diretamente do ArOH para o DPPH, formando DPPH-H. No mecanismo TE, o ArOH primeiro perde um elétron para o DPPH, que aceita um elétron do ArOH para formar DPPH⁻ e em seguida, o ArOH[•] desprotona para formar o radical fenoxil (ArO[•]). A Figura 118 ilustra a comparação entre os mecanismos de TE e TAH (LIU, 2010). Essas reações são favorecidas devido a estabilidade das estruturas de ressonância do radical fenoxila (Figura 119). Assim, a

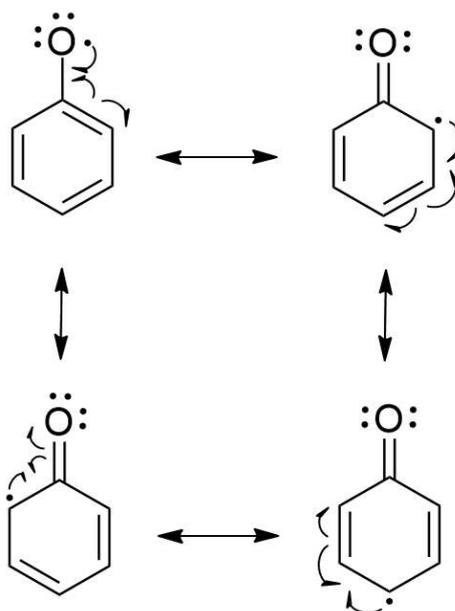
partir dos resultados obtidos, foi determinado a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 118 – Mecanismo de reação dos compostos fenólicos com DPPH[•].



Fonte: adaptado de Liu (2010).

Figura 119 – Estruturas de ressonância do radical fenoxila.



Fonte: o autor.

Com os dados de porcentagem de atividade antioxidante, para cada concentração, as medidas de CE_{50} , que representam a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, são calculadas através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH[•] sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações dos extratos. A Tabela 19 apresenta os valores de CE_{50} da análise de sequestro do radical DPPH para os extratos das folhas e galhos. Cabe ressaltar que quanto menor os valores de CE_{50} , melhor

a atividade antioxidante, pois é necessária uma concentração menor de amostra para sequestrar 50% do radical DPPH.

Tabela 19 – Valores de CE_{50} da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostra (125 mg mL ⁻¹)	DPPH* (CE_{50} , µg mL ⁻¹)
EHF	833,88 ± 21,03
EMF	352,05 ± 6,56
EHG	715,01 ± 25,13
EMG	257,23 ± 5,09
Ác. Ascórbico	4,22 ± 0,53

Fonte: o autor.

Com base nos dados obtidos foi possível verificar que todos os extratos apresentaram valores de CE_{50} que variam de 257,23 a 833,88 µg mL⁻¹ para a atividade antioxidante pelo método DPPH, sendo maior que o que o controle positivo (ácido ascórbico) e o menor valor obtido para o EMG. De modo geral, foi observado que os extratos em hexano apresentam valores cerca de 2,5x maiores que os obtidos para os extratos em metanol. Além disso, os extratos dos galhos apresentaram valores de CE_{50} menores que os extratos das folhas.

As análises de CLAE e CG-EM mostraram que os extratos em hexano, tanto das folhas quanto dos galhos, apresentam em sua composição os compostos **I** e **II**. A análise da estrutura do composto **I** mostrou que este composto não tem hidroxilas e sendo assim, não possui atividade antioxidante (CE_{50} = 2088 µg mL⁻¹). Já o composto **II** possui uma hidroxila aromática e a atividade antioxidante deste composto apresentou um CE_{50} de 773 µg mL⁻¹. As análises de CLAE-DAD mostraram que os extratos em metanol apresentaram diversos sinais com tempos de retenção menores, indicando a presença de compostos de maior polaridade (incluindo compostos fenólicos) que as neolignananas dos extratos hexânicos. Assim, esses dados podem justificar, em parte, os melhores resultados encontrados para a atividade antioxidante dos extratos em metanol aos obtidos para os extratos em hexano.

Na literatura encontram-se outros extratos da mesma família já avaliadas quanto a atividade antioxidante, as quais apresentaram valores de CE_{50} maiores que os obtidos para os extratos metanólicos de *E. paniculata*. Por exemplo, os valores de CE_{50} de extratos etanólicos das folhas de outras espécies da família das Lauraceae, como a *Cinnamomum triplinerve* (447,56 ± 50,22 µg mL⁻¹) (SILVA, PEZENTI, ABEL, YUNES, 2019) e *Ocotea* sp.

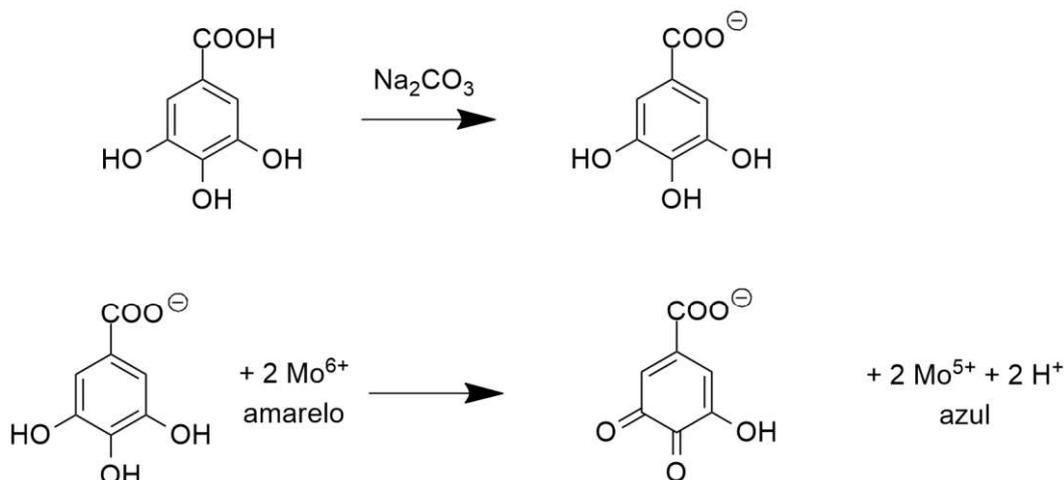
($480 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (TAFURT-GARCÍA, JIMÉNEZ-VIDAL, CALVO-SALAMANCA, 2015), mostraram que os valores determinados neste trabalho para os EMF e EMG são melhores que os obtidos por esses trabalhos, o que indica que os extratos metanólicos de *E. paniculata* apresentam maiores atividades antioxidantes. Mesmo quando os valores de CE_{50} obtidos para os extratos metanólicos de *E. paniculata* são comparados ao extrato metanólico da *Litsea glaucescens* (Lauraceae) ($556,2 \pm 7,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) (TAPIA-TORRES et al., 2014) e ao extrato aquoso da *Persea americana* (Lauraceae) ($271\text{--}1618 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CASTRO-LÓPEZ et al., 2019), os valores da atividade antioxidante obtidos neste trabalho também são menores, o que indica que os extratos metanólicos de *E. paniculata* apresentam maiores atividades antioxidantes. Já para análises dos EHF e EHG, na literatura não é muito comum encontrar atividade antioxidante para extratos hexânicos, vistos que o procedimento experimental da atividade antioxidante é realizado em metanol, o que leva a baixa solubilidade do extrato e isso implica em resultados mais elevados de CE_{50} , como observado nas análises deste trabalho.

5.7.2 Análise do teor de fenóis totais

Os compostos fenólicos geralmente estão relacionados a diversas funções, tais como às respostas de defesa na planta, a substâncias atraentes para acelerar a polinização, coloração para camuflagem e defesa contra herbívoros, atividades antibacterianas e antifúngicas, além de inúmeros benefícios para a saúde. Muitos estudos relataram as vantagens de compostos fenólicos como agentes antienvhecimento, anti-inflamatório, antioxidante e antiproliferativo. Os polifenóis, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, têm a importante propriedade de inibir a α -glicosidase e a α -amilase, que são enzimas-chave e responsáveis pela digestão dos carboidratos da dieta em glicose e estão associadas a diabetes (LIN et al., 2016).

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada por meio do RFC, que consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdico [$\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$] e fosfotúngstico [$\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$], na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se complexos de molibdênio-tungstênio azuis [$(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}$], em que a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração dos compostos redutores. A Figura 120 apresenta a desprotonação do ácido gálico em meio básico, gerando os ânions benzoatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion benzoato e o RFC, na qual, o molibdênio sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

Figura 120 – Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do RFC.



Fonte: o autor.

Os teores de fenóis totais (Tabela 20) para os extratos das folhas e galhos de *E. paniculata* foram calculados através da Equação 10, construída a partir dos dados do gráfico da absorbância da reação entre o ácido gálico e o RFC *versus* concentração de ácido gálico, sendo o resultado expresso em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato ($\text{mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

$$y = 0,0161x + 0,0799 \quad \text{Equação 10}$$

Onde y é absorbância e x a concentração de ácido gálico ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 20 – Teores de fenóis totais dos extratos das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostra (125 mg mL^{-1})	Fenóis totais ($\text{mg EAG g}_{\text{extract}}^{-1}$)
EHF	$122,12 \pm 1,74$
EMF	$275,00 \pm 1,55$
EHG	$148,95 \pm 2,43$
EMG	$185,39 \pm 2,65$

Fonte: o autor.

Com base nos dados obtidos é possível verificar que todos os extratos apresentam valores que variam de 122 a 275 $\text{mg EAG g}_{\text{extract}}^{-1}$ para os teores de fenóis totais. Foi observado que os extratos em hexano apresentam valores menores que os obtidos para os extratos em metanol, o que era esperado pelo fato de compostos fenólicos serem extraídos melhores em solventes mais polares por apresentam grupos polares, como a hidroxila. Além disso, o EHG

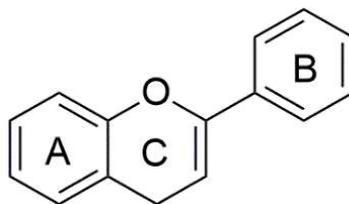
apresentou teor de fenóis totais maior do que o EHF, enquanto que o EMF apresentou teor de fenóis totais maior do que o EMG.

Na literatura encontramos outros extratos da mesma família já avaliadas quanto aos teores de fenóis totais. Por exemplo, no trabalho realizado por Líbero, Oliveira, Truiti (2016) com o extrato etanólico das folhas de *E. paniculata*, também foi observado que os extratos/partições mais polares foram aqueles que apresentaram os maiores teores de fenóis totais. Além disso, o extrato etanólico obtido por Líbero, Oliveira, Truiti (2016) apresentou $280,42 \pm 9,59$ mg EAG $\text{g}_{\text{extract}}^{-1}$, similar ao EMF deste trabalho. Em comparação com extratos etanólicos das folhas de outras espécies da família das Lauraceae, como a *Cinnamomum triplinerve* ($8,08 \pm 1,83$ mg EAG $\text{g}_{\text{extract}}^{-1}$) (SILVA, PEZENTI, ABEL, YUNES, 2019) e *Ocotea* sp. (85 ± 2 mg EAG $\text{g}_{\text{extract}}^{-1}$) (TAFURT-GARCÍA, JIMÉNEZ-VIDAL, CALVO-SALAMANCA, 2015), os valores apresentados tanto pelo extrato hexânico quanto metanólico das folhas e galhos da espécie *E. paniculata* foram maiores aos apresentados por essas outras espécies. Os valores de teores de fenóis totais apresentados pelos extratos da *E. paniculata* também foram maiores que os obtidos para os extratos aquosos da *Laurus nobilis* (Lauraceae) ($59,85 \pm 0,23$ mg EAG $\text{g}_{\text{extract}}^{-1}$) (DUDONNÉ et al., 2009) e metanólico da *Litsea glaucescens* (Lauraceae) ($142,3 \pm 0,7$ mg EAG $\text{g}_{\text{extract}}^{-1}$) (TAPIA-TORRES et al., 2014).

5.7.3 Análise do teor de flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos que apresentam um papel importante tanto no mundo animal quanto vegetal, tais como defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar (absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível), fornecendo uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros, relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos (atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização) e na saúde humana (foi demonstrado que indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonoides, apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares como infarto do miocárdio, trombose, derrame etc...) (MARCUCCI, WOISKY, SALATINO, 1998). Os flavonoides são caracterizados por apresentar em sua estrutura básica um anel aromático C6 (anel A) acoplado a um anel heterocíclico benzopirano (anel C) e um anel aromático C6 (anel B) ligado ao anel benzopirano (Figura 121).

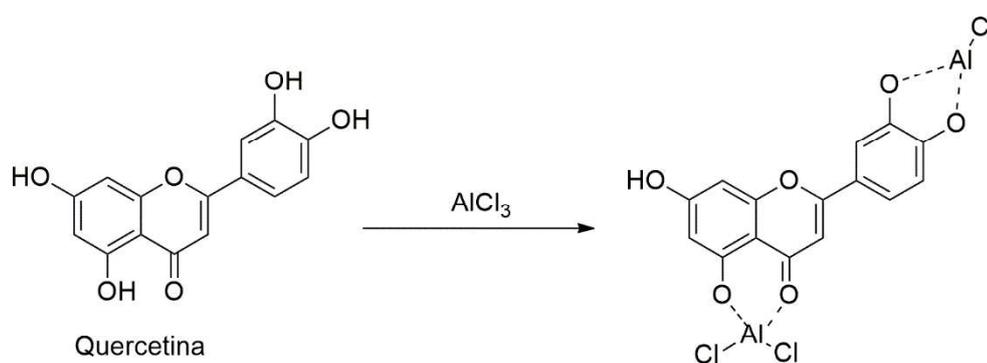
Figura 121 – Estrutura básica de um flavonoide.



Fonte: o autor.

A quantificação dos teores de flavonoides dos extratos foi realizada por meio do reagente AlCl_3 . Nessa metodologia, o cloreto de alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol. Nessas condições, o complexo flavonoide–Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante. A Figura 122 ilustra a formação do complexo flavonoide–Al com a quercetina (MARCUCCI, WOISKY, SALATINO, 1998).

Figura 122 – Formação do complexo quercetina–Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.



Fonte: adaptado de Marcucci, Woisky, Salatino (1998).

Os teores de flavonoides (Tabela 21) para os extratos das folhas e galhos de *E. paniculata* foram calculados através da Equação 11, construída a partir dos dados do gráfico da absorbância da reação entre a quercetina e o AlCl_3 versus a concentração de quercetina, sendo o resultado expresso em mg de equivalente de quercetina por g de extrato ($\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

$$y = 0,0281x + 0,0373$$

Equação 11

Onde y é absorvância e x a concentração de quercetina ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 21 – Teores de flavonoides dos extratos das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostra (250 mg mL^{-1})	Teor de flavonoides ($\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$)
EHF	$7,12 \pm 0,63$
EMF	$7,79 \pm 0,38$
EHG	$6,36 \pm 0,57$
EMG	$6,65 \pm 0,38$

Fonte: o autor.

Com base nos dados obtidos é possível verificar que todos os extratos apresentam valores que variam de 6,3 a 7,8 $\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$ para os teores de flavonoides. Foi observado que os extratos das folhas apresentam valores relativamente maiores do que os obtidos para os extratos dos galhos, sendo que o EMF apresentou o maior teor de flavonoides. Além disso, os extratos em metanol apresentaram os maiores valores para os teores de flavonoides, o que era esperado, visto que a classe de compostos dos flavonoides, apresentam em suas estruturas diversos grupos polares e são extraídos melhor em solventes mais polares.

Na literatura encontramos outros extratos da mesma família já avaliadas quanto aos teores de flavonoides. Por exemplo, os extratos hexânicos e metanólicos das folhas e galhos da *E. paniculata* apresentaram valores maiores que o extrato etanólico das folhas da *Cinnamomum triplinerve* ($2,55 \pm 0,17 \text{ mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$) (SILVA, PEZENTI, ABEL, YUNES, 2019).

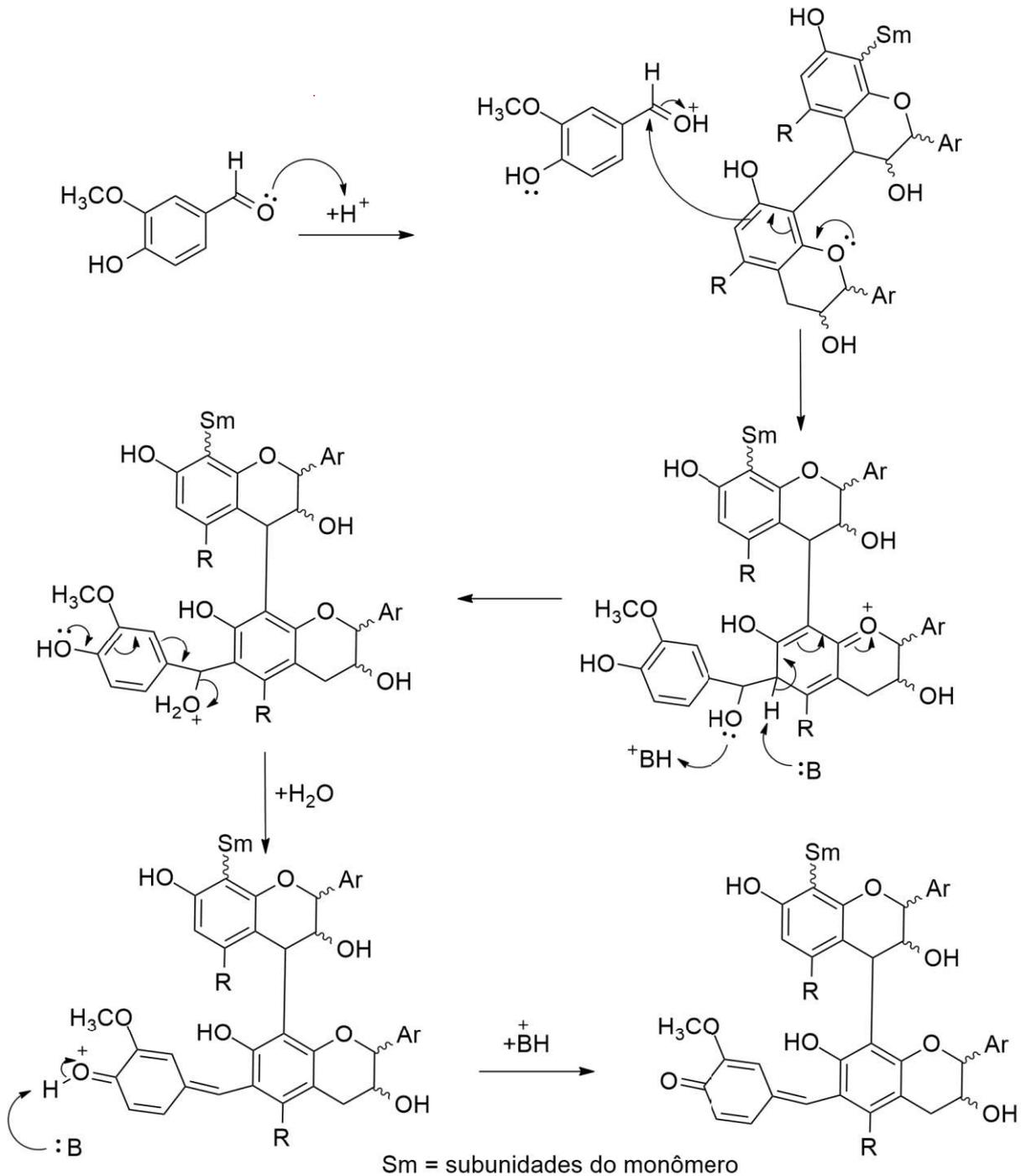
5.7.4 Análise do teor de proantocianidinas (taninos condensados)

As proantocianidinas (taninos condensados) desempenham um papel importante e têm amplas aplicações, tais como diminuições no consumo de ração, taxa de crescimento, eficiência alimentar, energia metabolizável líquida e digestibilidade proteica em animais experimentais, além de possuir propriedade antioxidante, atividades antimicrobianas, acelerar a coagulação sanguínea, reduzir a pressão sanguínea, diminui o nível lipídico sérico e modular respostas imunológicas, entre outras (BELE, JADHAV, KADAM, 2010).

As proantocianidinas são um grupo de oligômeros de polifenolfravan-3-ol e polímeros conectados por ligações carbono-carbono entre subunidades de flavanol (SCHOFIELD, MBUGUA, PELL, 2001).

A quantificação do teor de proantocianidinas foi realizada em meio ácido por meio do reagente vanilina. Nessa metodologia, a vanilina em meio ácido reage com um monômero do tanino através de uma reação de substituição eletrofílica aromática (Figura 123).

Figura 123 – Mecanismo de reação entre a vanilina e um tanino condensado em meio ácido.



Fonte: adaptado de Schofield, Mbugua, Pell (2001).

Os teores de proantocianidinas (Tabela 22) para os extratos das folhas e galhos de *E. paniculata* foram calculados através da Equação 12, construída a partir dos dados do gráfico da absorbância da reação entre catequina e a vanilina *versus* a concentração de catequina, sendo o resultado expresso em mg de equivalente de catequina por g de extrato ($\text{mg EC g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

$$y = 0,0353x + 0,1061 \quad \text{Equação 12}$$

Onde y é absorbância e x a concentração de catequina ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 22 – Teores de proantocianidinas dos extratos das folhas e galhos de *E. paniculata*.

Amostra (500 mg mL^{-1})	Teor de proantocianidinas ($\text{mg EC g}_{\text{extract}}^{-1}$)
EHF	$19,67 \pm 0,10$
EMF	$10,00 \pm 0,40$
EHG	$16,58 \pm 0,40$
EMG	$9,93 \pm 0,20$

Fonte: o autor.

Com base nos dados obtidos é possível verificar que todos os extratos apresentaram valores que variam de 9,9 a 19,8 $\text{mg EC g}_{\text{extract}}^{-1}$ para o teor de proantocianidinas. Foi observado um comportamento oposto aos resultados obtidos para os fenóis e flavonoides. Aqui, os extratos em hexano apresentaram maiores teores de proantocianidinas do que os extratos em metanol. Provavelmente, isto pode ser devido ao fato dos extratos possuírem proantocianidinas menos polares e, assim, foram extraídos já na fase hexânica. Além disso, os extratos das folhas apresentaram valores maiores para os teores de proantocianidinas do que os extratos dos galhos, sendo que o EHF apresentou o maior valor entre os extratos.

Na literatura encontramos outros extratos já avaliadas quanto aos teores de proantocianidinas. Por exemplo, o extrato etanólico das folhas de *Cinnamomum triplinerve* ($4,60 \pm 0,89 \text{ mg EC g}_{\text{extract}}^{-1}$) (SILVA, PEZENTI, ABEL, YUNES, 2019), apresentou valores menores de teores de proantocianidinas do que os extratos hexânicos e metanólicos das folhas e galhos da *E. paniculata*.

5.7.5 Análise estatística

A comparação entre os resultados obtidos das análises de atividade antioxidante (AA), proantocianidinas (TP), teores de fenóis (TPC) e flavonoides (TF), foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação pelo método de Pearson usando o programa GraphPad Prism. A

Tabela 25 mostra esses dados agrupados para melhor comparação. A Figura 124 apresenta esses dados agrupados para melhor comparação.

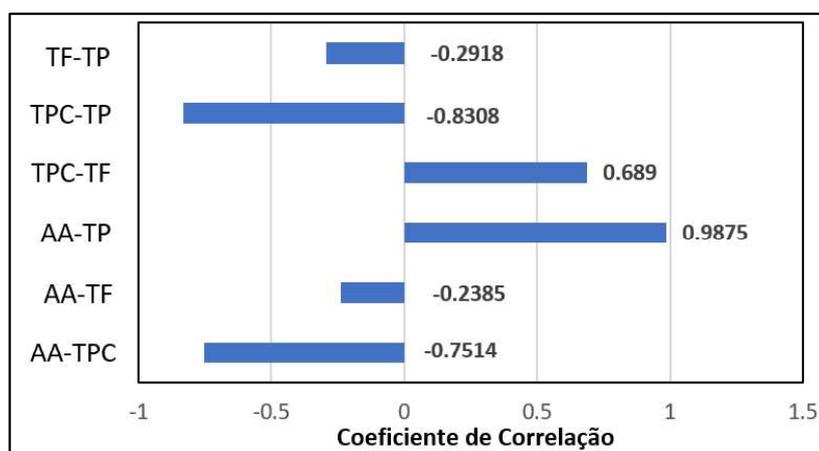
Tabela 23 – Resultados de atividade antioxidante, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides agrupados.

Amostra	AA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TP ($\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	TPC ($\text{mg EAG g}_{\text{extract}}^{-1}$)	TF ($\text{mg EC g}_{\text{extract}}^{-1}$)
EHF	833,88 \pm 21,03	19,67 \pm 0,10	122,12 \pm 1,74	7,12 \pm 0,63
EMF	352,05 \pm 6,56	10,00 \pm 0,40	275,00 \pm 1,55	7,79 \pm 0,38
EHG	715,01 \pm 25,13	16,58 \pm 0,40	148,95 \pm 2,43	6,36 \pm 0,57
EMG	257,23 \pm 5,09	9,93 \pm 0,20	185,39 \pm 2,65	6,65 \pm 0,38

Nota: AA: atividade antioxidante; TPC: fenóis totais; TF: flavonoides; TP: proantocianidinas.

Fonte: o autor.

Figura 124 – Coeficiente de correlação entre os AA, fenóis totais (TPC), flavonoides (TF) e proantocianidinas (TP) dos extratos de *E. paniculata*.



Nota: AA: atividade antioxidante; TPC: fenóis totais; TF: flavonoides; TP: proantocianidinas.

Fonte: o autor.

Foi observada uma correlação positiva entre as análises de TPC-TF, ou seja, o extrato que apresentou maior teor de fenóis totais também apresentou o maior teor de flavonoides. Também foi observado correlação positiva entre as análises de AA-TP, isso significa que os extratos que tiveram os maiores valores de CE_{50} para a atividade antioxidante, também apresentaram os maiores teores de proantocianidinas. Assim, quanto menor a atividade antioxidante, maior o teor de proantocianidinas, visto que quanto maior o CE_{50} , menor a atividade antioxidante.

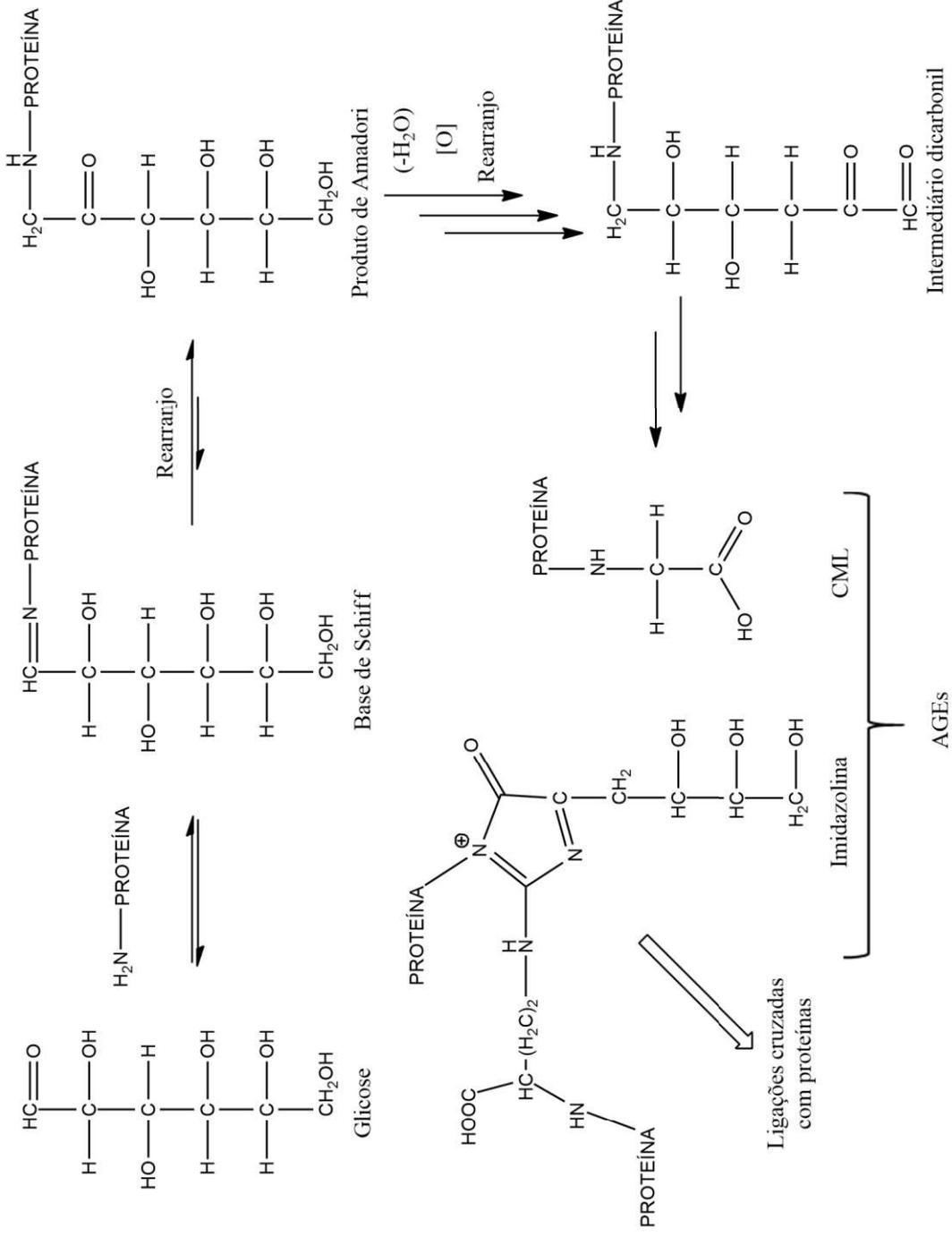
Foi observada uma correlação negativa entre as análises de TPC-TP, ou seja, o extrato que apresentou maior teor de fenóis totais apresentou o menor teor de proantocianidinas. Também foi observado correlação negativa entre as análises de AA-TPC, isso significa que os extratos que tiveram os menores valores de CE_{50} para a atividade antioxidante apresentaram os maiores teores de fenóis totais, ou seja, quanto maior a atividade antioxidante maior o teor de fenóis totais.

5.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIDIABÉTICA

5.8.1 *Atividade inibitória da glicação*

Os ensaios de inibição da atividade de glicação foram realizados com as neolignanas *O*-metildesidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II). Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) constituem grande variedade de compostos formados a partir de interações amino-carbonila, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003). Neste teste, a glicose reage com a proteína da albumina sérica bovina para formar um AGE, como ilustrado na Figura 125. Na etapa inicial da glicação, o grupo carbonila da glicose se liga a proteína para formar um intermediário conhecido como base de Schiff (imina, ou seja, uma ligação dupla carbono-nitrogênio), que são instáveis e reversíveis. Em seguida, a base de Schiff, após desidratação e rearranjo de Amadori, é convertida em produto de Amadori, mais estáveis. Finalmente, após desidratação, oxidação e rearranjo, os produtos de Amadori formam um intermediário dicarbonil (1,4-desoxiglucosona ligada a proteína) e produzem os AGEs, compostos estáveis e irreversíveis, como carboximetilisina (CML) e imidazolina com ligações cruzadas com proteínas (PEYROUX, STERNBERG, 2006; KHANGHOLI et al., 2016).

Figura 125 – Mecanismo de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicose.



Fonte: adaptado de Peyroux, Sternberg (2006).

Desse modo, os compostos foram avaliados frente a esta atividade inibitória, devido a necessidade de encontrar compostos que inibem a formação de AGEs, visto que na glicação, a ligação não enzimática da glicose aos grupos amino livres de um aminoácido, produz compostos heterogêneos irreversíveis (AGEs) e esses produtos desempenham um papel significativo nas complicações da diabetes, como aterosclerose, retinopatia diabética, nefropatia, neuropatia e cicatrização de feridas (CHINCHANSURE, KORWAR, KULKARNI, JOSHI, 2015; KHANGHOLI et al., 2016). Na Tabela 24 encontram-se os resultados do percentual de inibição dos compostos juntamente com o controle positivo (quercetina).

Tabela 24 – Percentual de inibição da atividade de glicação dos compostos **I** e **II** isolados dos galhos de *E. paniculata*.

Composto (25 µg mL ⁻¹)	% de inibição
I	34,54 ± 1,11
II	25,75 ± 1,36
Quercetina	97,50 ± 0,71

Nota: – : não obtido.

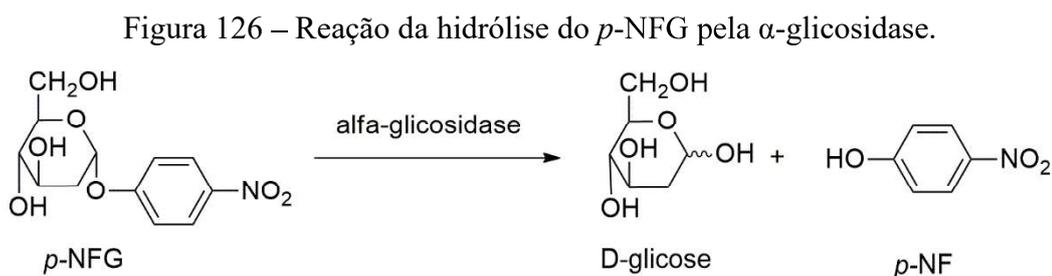
Fonte: o autor.

Os resultados apresentados na Tabela 24 mostram que o composto **I** apresentou melhor valor de percentual de inibição da glicação (34,54%) quando comparado ao composto **II**, porém inferior ao apresentado pela quercetina (97,50%), composto usado como controle. Como a porcentagem de inibição foi inferior a 50%, não foi realizado ensaios para a determinação do CI₅₀, que corresponde a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática. Assim, os resultados demonstram que os compostos não apresentam atividade inibitória de glicação promissora frente a atividade de glicação.

Na literatura encontramos outras neolignananas e fenilpropanoides já avaliadas quanto ao potencial de inibição de formação de AGEs, as quais também apresentam baixos percentuais de inibição. Por exemplo, o composto pomegralignan, uma neolignana isolada das sementes de romã (*Punica granatum* L., Lythraceae) apresentou baixos valores de inibição da atividade de glicação (CI₅₀ > 20) (ITO et al., 2014). O composto eugenol, um fenilpropanoide com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardiovasculares, analgésica e anestésica apresentou 58% de inibição da atividade de glicação (PRAMOD, ANSARI, ALI, 2010; SINGH et al., 2016), abaixo do padrão de quercetina (97%).

5.8.2 Atividade inibitória da α -glicosidase

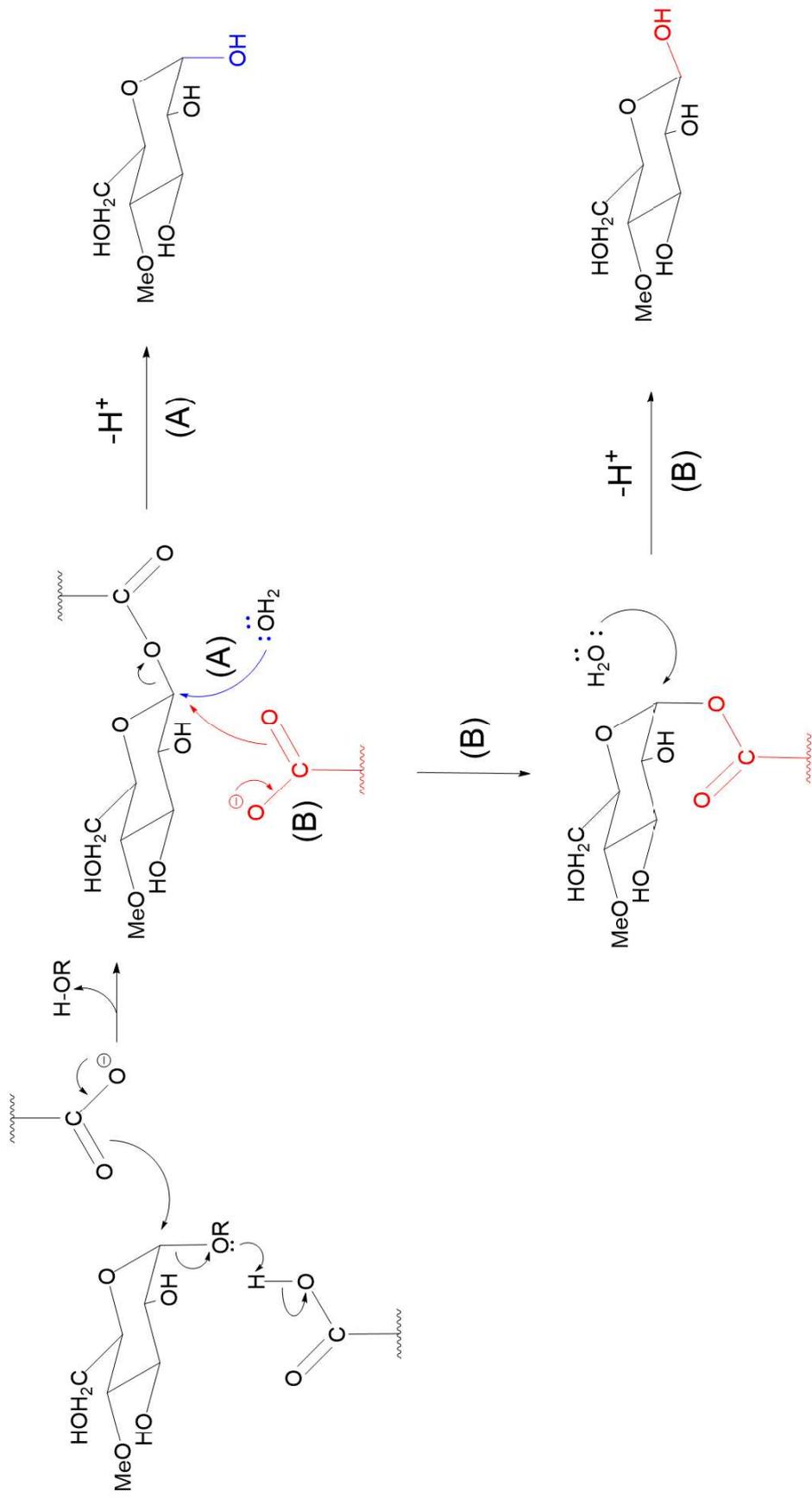
Os ensaios *in vitro* de inibição da atividade da α -glicosidase foram realizados com **I** e **II**. Neste teste, o substrato *p*-NFG é hidrolisado a D-glicose e *p*-nitrofenol (*p*-NF), de acordo com a Figura 126 (AIN et al., 2017).



Fonte: adaptado de Ain e colaboradores (2017).

Os mecanismos desta reação podem ser essencialmente diferentes um do outro, com ou sem retenção de configuração. No primeiro, como mostrado na Figura 127A, os dois grupos ionizáveis catalíticos de um carboxil ($-\text{COOH}$) e um carboxilato ($-\text{COO}^-$), clivam a ligação glicosídica cooperativamente, por ataques eletrofílicos e nucleofílicos diretos contra átomos de oxigênio glicosil e carbono anomérico, respectivamente, resultando em um complexo covalente de β -glicosil-enzima, envolvendo inversão de configuração. Posteriormente, a ligação β -carboxilacetal é substituída pelo íon hidroxila da água para interromper a hidrólise, retendo a configuração inicial do anômero. No segundo mecanismo, como mostrado na Figura 127B, um carboxil novamente cliva a ligação β -carboxilacetal, voltando a configuração inicial do anômero. Posteriormente, a ligação α -carboxilacetal é substituída pelo íon hidroxila, resultando em uma inversão de configuração (CHIBA, 1997).

Figura 127 – Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica com (A) retenção da configuração e (B) inversão da configuração.



Fonte: adaptado de Chiba (1997).

Desse modo, os compostos foram avaliados frente a esta atividade inibitória, devida à necessidade de encontrar compostos que inibem a α -glicosidase para auxiliar no tratamento da diabetes, levando à uma diminuição da glicemia após a ingestão de uma dieta rica em glicose. Na Tabela 25 encontram-se os resultados do percentual de inibição dos compostos, juntamente com o controle positivo (Acarbose).

Tabela 25 – Percentual de inibição da α -glicosidase dos compostos **I** e **II** isolados dos galhos de *E. paniculata*.

Composto (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de inibição
I	14,85 \pm 7,99
II	17,45 \pm 1,34
Acarbose	74,40 \pm 0,85

Fonte: o autor.

Os resultados apresentados na Tabela 25 mostram que o composto **II** apresentou melhor valor de percentual de inibição da α -glicosidase (17,45%) quando comparado ao composto **I**, porém inferior ao apresentado pela Acarbose (74,45%), composto usado como controle. Como a porcentagem de inibição foi inferior a 50%, não foi realizado testes para a determinação do CI_{50} . Assim, os resultados demonstram que os compostos não apresentam atividade inibitória promissora frente a enzima α -glicosidase.

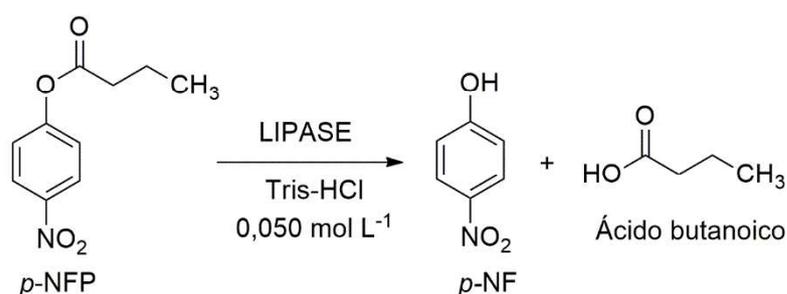
Na literatura outras neolignanas já avaliadas quanto ao potencial de inibição da α -glicosidase, apresentaram resultados promissores. Os compostos rebaneolignano A e rebaneolignano B isolados dos extratos do caule de *Mangifera reba* (Anacardiaceae), por exemplo, possuem atividade inibidora potente, com valores de CI_{50} variando de 28,5 a 162,8 μM , menores do que a acarbose ($\text{CI}_{50} = 214,5 \mu\text{M}$) (DUONG et al., 2017).

Em um outro estudo, uma série de 12 compostos inspirados em neolignanas também foram avaliados e apresentaram resultados muito promissores ($\text{CI}_{50} = 0,15$ a $4,1 \mu\text{M}$), onde os compostos utilizados como controle positivo foram a acarbose ($\text{CI}_{50} = 269,9 \mu\text{M}$) e a quercetina ($\text{CI}_{50} = 14,2 \mu\text{M}$) (PULVIRENTI et al., 2017). No entanto, a baccalignana, uma neolignana isolada da *Taxus baccata* não apresentou atividade inibitória satisfatória para a enzima α -glicosidase (LEI et al., 2018), assim como **I** e **II**. Importante observar que os valores de CI_{50} variam de acordo com a metodologia utilizada, por isso é importante a comparação dos CI_{50} dos compostos e controles utilizando a mesma metodologia.

5.8.3 Atividade inibitória da lipase pancreática

Os ensaios de inibição da atividade da lipase pancreática foram realizados com os compostos *O*-metildesidroieugenol B (**I**) e desidroieugenol B (**II**). Nesse método, a atividade de lipase é determinada pela medição da formação do substrato *p*-nitrofenol (*p*-NF, de coloração amarela), como resultado da hidrólise enzimática do *p*-NFP. O mecanismo desta reação está ilustrado na Figura 128 (SILVA, CARMONA-RIBEIRO, PETRI, 2014).

Figura 128 – Mecanismo da reação enzimática do *p*-NFP catalisada pela lipase.



Fonte: adaptado de Silva, Carmona-Ribeiro, Petri (2014).

Desse modo, os compostos foram avaliados frente a esta atividade inibitória, devida a necessidade de encontrar compostos que atuem como agentes antiobesidade, sendo que a prevalência da obesidade está aumentando a um ritmo alarmante e poucos medicamentos para o tratamento estão atualmente disponíveis no mercado (SOUZA, PEREIRA, SOUZA, SANTOS, 2012). Na Tabela 26 encontram-se os resultados do percentual de inibição e dos compostos juntamente com o controle positivo (Orlistat), além do CI₅₀ de **I** e do Orlistat.

Tabela 26 – Percentual de inibição e CI₅₀ da lipase pancreática dos compostos **I** e **II** isolados dos galhos de *E. paniculata*.

Composto (25 µg mL ⁻¹)	% de inibição	CI ₅₀ (µM)
I	55,45 ± 1,91	201,67 ± 21,39
II	39,40 ± 0,70	–
Orlistat	97,00 ± 4,24	0,34 ± 0,10

Nota: – não obtido.

Fonte: o autor.

Os resultados apresentados na Tabela 26 mostram que o composto **I** apresentou melhor valor de percentual de inibição da lipase pancreática (55,45%) quando comparado ao composto

II, porém inferior ao apresentado pelo orlistat, composto usado como controle (97,00%). Como o composto **II** apresentou porcentagem de inibição inferior a 50%, não foi realizado testes para a determinação do CI_{50} . Assim, os resultados demonstram que os compostos não apresentam atividade inibitória promissora frente a enzima da lipase pancreática.

Na literatura encontramos outras neolignananas que não apresentaram atividade promissora quanto ao potencial de inibição da lipase pancreática. Por exemplo, os compostos magnotriol A e magnaldeído B isolados das cascas de *Magnoliae officinalis* L. (Magnoliaceae) apresentaram valores de CI_{50} de 213,03 e 96,96 μ M, respectivamente (WANG et al., 2015), sendo obtido resultados melhores neste trabalho para as neolignananas **I** e **II**. Já alguns fenilpropanoides, como o acteosídeo, lipedosídeo A-I e osmanthusídeo B (CI_{50} = 2 a 20 μ M) isolados do extrato etanólico das folhas de *Ligustrum purpurascens* (Oleaceae), apresentaram inibição moderada da lipase pancreática (WU et al., 2014; FAN et al., 2015).

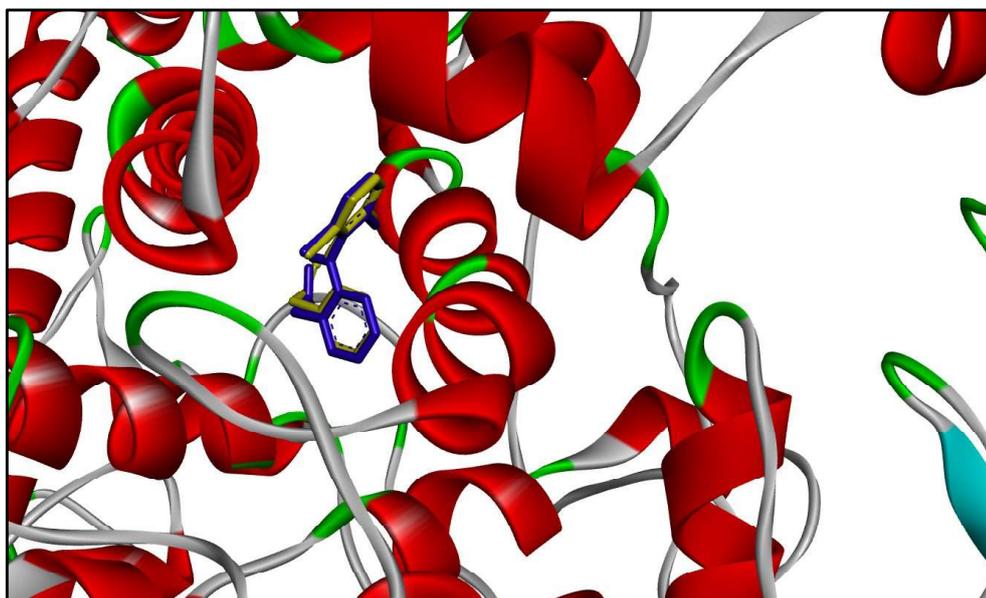
5.9 DOCKING MOLECULAR

5.9.1 Análise da inibição da enzima Cox-1

Nesta etapa do trabalho foram realizados cálculos de docking molecular para avaliar a inibição da enzima Cox-1 pelos compostos **I** e **II**. Assim foi selecionado um modelo cocrystalizado de diclofenaco (código PDB: 3N8Y), para validar e comparar os resultados obtidos com as neolignananas **I** e **II**, ibuprofeno e celecoxibe.

Para a validação do protocolo realizado no docking molecular, o re-docking do diclofenaco foi realizado usando o software AutoDock4 para validar as relações estruturais e usando o valor do RMSD (desvio quadrático médio) para analisar a precisão dos resultados. Para ser considerado um docking válido, os valores RMSD devem permanecer na faixa de 0–2 Å (THOMSEN, CHRISTENSEN, 2006). Como observado, o valor de RMSD foi de 0,35 Å. Este resultado foi confirmado pela sobreposição do diclofenaco cocrystalizado com a melhor conformação após o re-docking (Figura 129).

Figura 129 – Sobreposição do diclofenaco cocristalizado com a melhor conformação após o re-docking.



Nota: Amarelo: diclofenaco cocristalizado, Azul: melhor conformação do diclofenaco após o re-docking.

Fonte: o autor.

Para realizar as comparações dos resultados, foram considerados como resíduos essenciais (Val349, Tyr385, Trp387, Ile523, Ser530), aqueles que fazem interações com o composto cocristalizado de diclofenaco, os quais podem ser visualizados nos diagramas disponíveis no PDB. Em particular, foi verificado que **I** possui energia de interação maior que a de **II**, mas ambos valores são comparáveis aos calculados para o diclofenaco e bem superiores ao calculado para o ibuprofeno, mostrando que as neolignanas possuem alta afinidade com a enzima. Além disso, o celecoxibe mostrou ser o ligante com a energia de interação mais favorável.

A Tabela 27 resume os valores das energias livres calculadas dos fármacos e dos compostos **I** e **II**, o número de interações essenciais, o número total de interações com o sítio ativo, a constante de inibição calculada e o CI_{50} dos fármacos. Foi observado que os valores da constante de inibição calculados seguem a sequência ibuprofeno > diclofenaco > celecoxibe, enquanto os CI_{50} seguem a sequência celecoxibe > ibuprofeno > diclofenaco. Além disso, os resultados mostraram que todos os compostos apresentam interações intermoleculares de hidrogênio (verde) e interações hidrofóbicas (rosa), as quais podem ser visualizadas nos diagramas de interações 2D.

Tabela 27 – Resultados do docking molecular entre os compostos **I** e **II** e a enzima Cox-1.

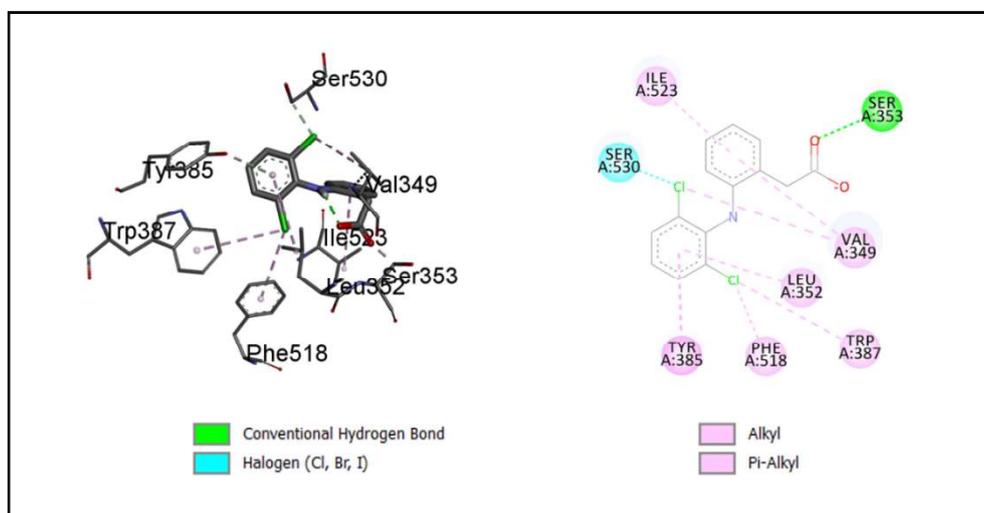
Compostos	Score do docking (kcal mol ⁻¹)	Ki ^a (uM)	Interações com o sitio ativo	CI ₅₀ ^b (uM)
I	-8,36	0,739	10	–
II	-8,17	1,03	12	–
Celecoxibe	-9,23	0,172	7	15
Diclofenaco	-8,29	0,837	8	1,57
Ibuprofeno	-6,99	7,54	7	4,88

Nota: ^aConstante de inibição estimada, ^bvalores experimentais (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004).

Fonte: o autor.

A conformação de energia mais favorável do diclofenaco (Figura 130) mostrou que ocorrem interações com todos os cinco resíduos essenciais além de interações com outros três resíduos não essenciais (Ser353, Leu352, Phe518), evidenciando que o modelo foi válido.

Figura 130 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o diclofenaco.



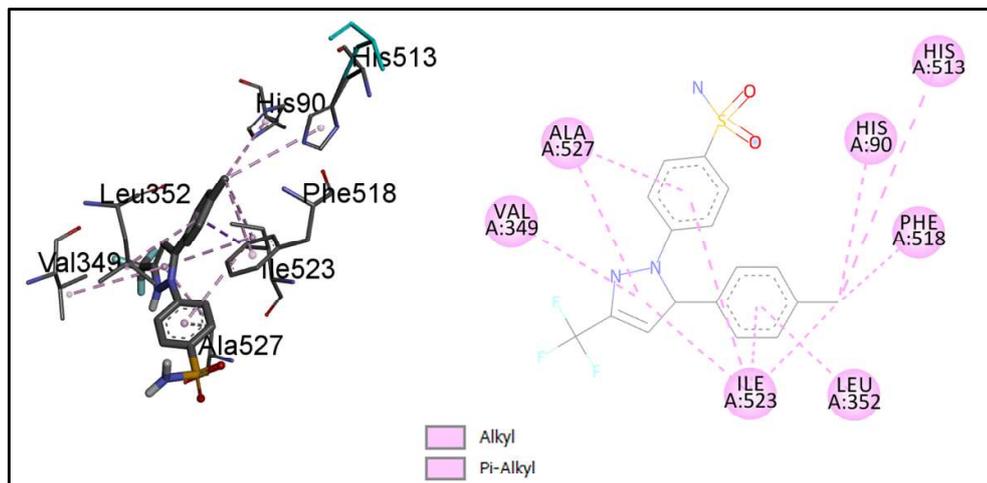
Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

A conformação de energia mais favorável do celecoxibe (Figura 131) mostrou que ocorrem interações com dois resíduos essenciais, além de interações com outros cinco resíduos não essenciais (His90, Leu352, His513, Phe518, Ala527) do sítio ativo da Cox-1. A conformação de energia mais favorável do ibuprofeno (Figura 132) mostrou que ocorre uma

interação com um resíduo essencial além de outras seis interações com resíduos não essenciais (Met113, Val116, Tyr355, Leu359, Leu531, Val349).

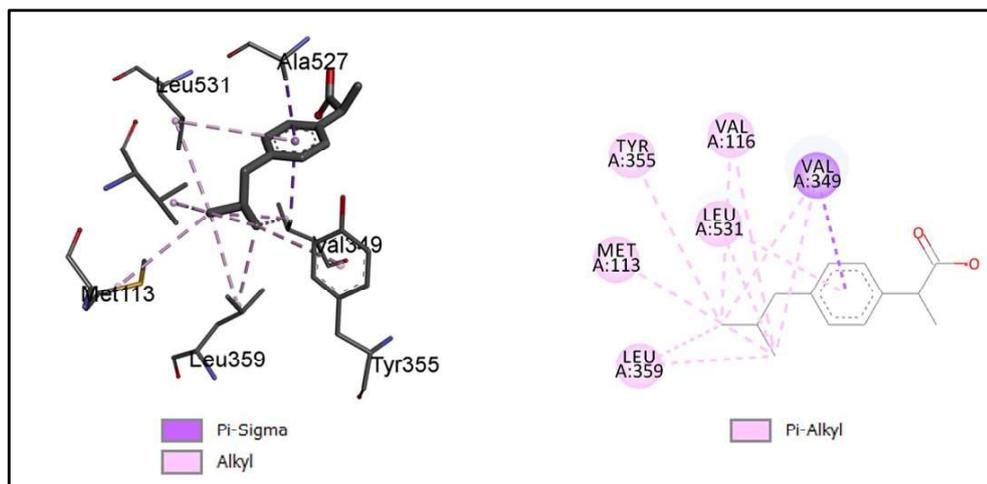
Figura 131 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o celecoxibe.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

Figura 132 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-1 e o ibuprofeno.



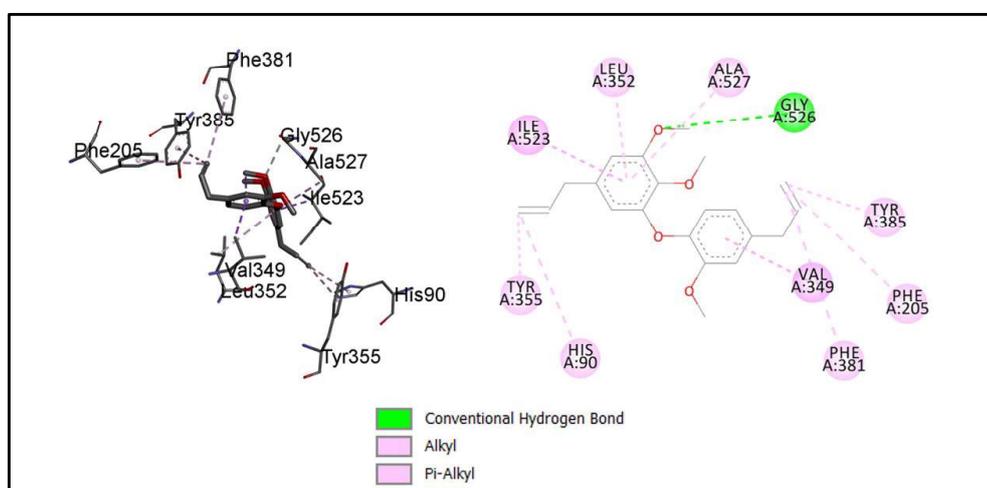
Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

A conformação de energia mais favorável do composto **I** (Figura 133) mostrou que ocorrem interações com três resíduos essenciais (Val349, Tyr385 e Ile523) além de outras sete interações com resíduos não essenciais (His90, Phe205, Leu352, Tyr355, Phe381, Gly526,

Ala527). A conformação de energia mais favorável do composto **II** (Figura 134) mostrou que ocorrem interações com três resíduos essenciais (Val349, Trp387 e Ser530) além de outras nove interações com resíduos não essenciais. O resíduo Gly526 faz ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do grupo metoxi do composto **I**. Essa interação adicional pode justificar a maior inibição da enzima Cox-1 em relação ao composto **II**, visto que ocorrem mais interações hidrofóbicas neste composto em relação ao composto **I**.

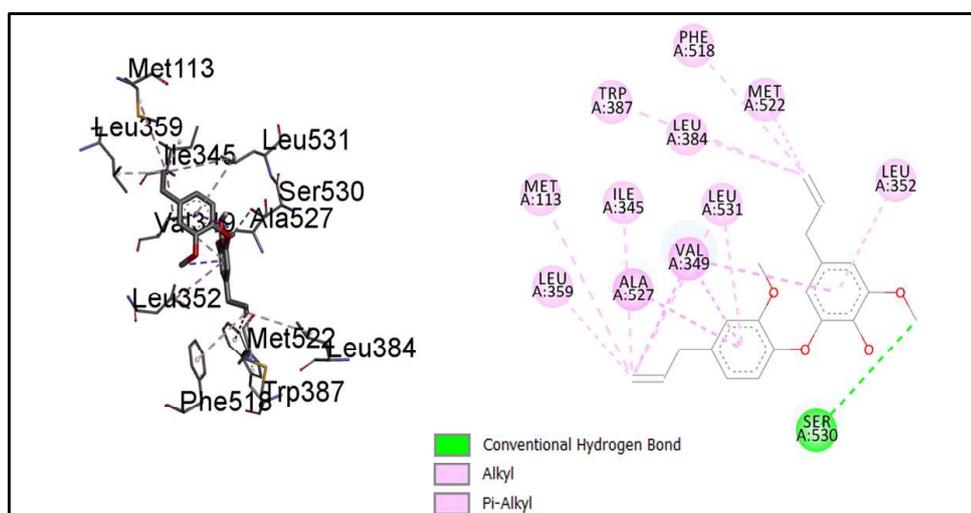
Figura 133 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-1 e o composto **I**.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

Figura 134 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-1 e o composto **II**.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

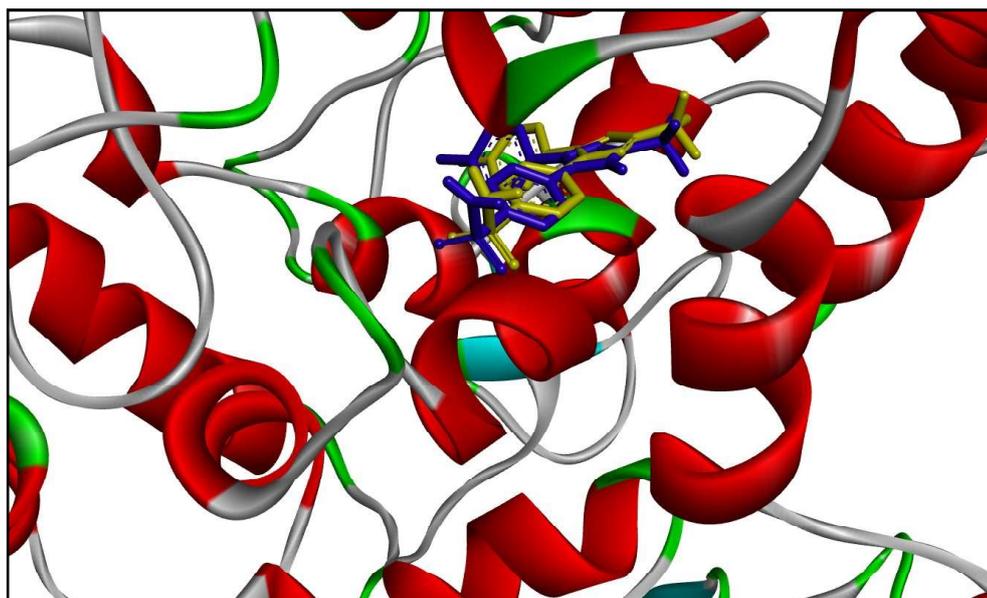
Portanto, os resultados de docking molecular sugerem que os compostos **I** e **II** são capazes de inibir a enzima Cox-1, além de ocorrer padrões de interações promissoras comparáveis aos medicamentos estudados.

5.9.2 Análise da inibição da enzima Cox-2

Nesta etapa do trabalho foram realizados cálculos de docking molecular para avaliar a inibição da enzima Cox-2 pelos compostos **I** e **II**. Assim foi selecionado um modelo cocrystalizado de celecoxibe (código PDB: 3NL1) para validar e comparar os resultados obtidos com os dos compostos **I**, **II**, ibuprofeno e diclofenaco.

Para a validação do protocolo realizado no docking molecular, o re-docking do diclofenaco foi realizado usando o software AutoDock4 para validar as relações estruturais e usando o valor do RMSD (desvio quadrático médio) para analisar a precisão dos resultados. Para ser considerado um docking válido, os valores RMSD devem permanecer na faixa de 0–2 Å (THOMSEN, CHRISTENSEN, 2006). Como observado, o valor de RMSD foi de 0,31 Å. Este resultado foi confirmado pela sobreposição do diclofenaco cocrystalizado com a melhor conformação após o re-docking (Figura 129).

Figura 135 – Sobreposição do diclofenaco cocrystalizado com a melhor conformação após o re-docking.



Nota: Amarelo: diclofenaco cocrystalizado, Azul: melhor conformação do diclofenaco após o re-docking.

Fonte: o autor.

Para realizar as comparações dos resultados, foram considerados como resíduos essenciais (Leu338, Ser339, Val509, Gly512, Ala513) aqueles que fazem interações com o composto cocristalizado de celecoxibe, os quais podem ser visualizados nos diagramas disponíveis no PDB. Em particular, foi verificado que os compostos **I** e **II** possuem energias de interações praticamente iguais, mas apresentam valores superiores aos dos medicamentos ibuprofeno e diclofenaco, mostrando que os mesmos possuem alta afinidade com a enzima Cox-2.

A Tabela 28 resume os valores das energias livres calculadas dos fármacos e dos compostos **I** e **II**, o número de interações essenciais, o número total de interações com o sítio ativo, a constante de inibição calculada e o CI_{50} dos fármacos. Foi observado que os valores da constante de inibição calculados e o CI_{50} dos fármacos seguem o mesmo padrão (ibuprofeno > diclofenaco > celecoxibe). Além disso, o celecoxibe mostrou ser o ligante com a energia de interação mais favorável, enquanto o ibuprofeno apresentou a energia menos favorável em comparação com os outros compostos. Nos diagramas de interações 2D, é possível observar interações de hidrogênio (verde), dipolo-dipolo (azul), hidrofóbicas (rosa) e eletrostáticas (laranja).

Tabela 28 – Resultados do docking molecular entre os compostos **I** e **II** e a enzima Cox-2.

Compostos	Score do docking (kcal mol ⁻¹)	Ki ^a (uM)	Interações com o sítio ativo	CI ₅₀ ^b (uM)
I	-8,47	0,613	10	–
II	-8,48	0,611	10	–
Celecoxibe	-10,44	0,022	12	0,04
Diclofenaco	-7,60	2,68	7	1,1
Ibuprofeno	-6,99	7,53	5	22,4

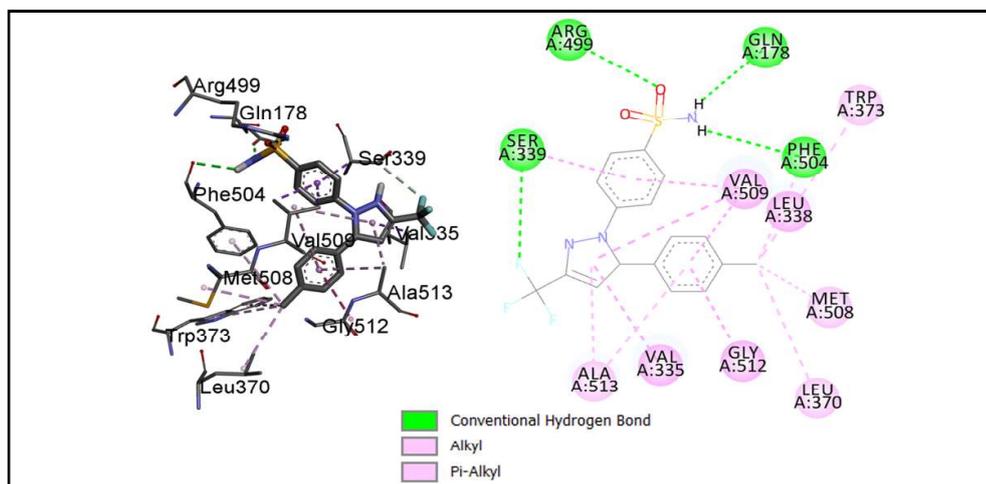
Nota: ^aConstante de inibição calculada, ^bvalores experimentais (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004).

Fonte: o autor.

Os estudos de docking mostraram que todos os compostos apresentam diferentes interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, mas em todos foi verificado a presença de interações de hidrogênio e hidrofóbicas. A Figura 136 apresenta a conformação de energia mais favorável do celecoxibe com os resíduos de aminoácidos. Foi observado que ocorrem interações com todos os cinco resíduos essenciais, além de interações com outros sete resíduos não essenciais (Gln178, Val335, Leu370, Trp373, Arg499, Met508, Phe504). Em

particular, os resíduos Gln178, Phe504, Ser339 e Arg499 fazem ligações de hidrogênio com o celecoxibe.

Figura 136 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o celecoxibe.

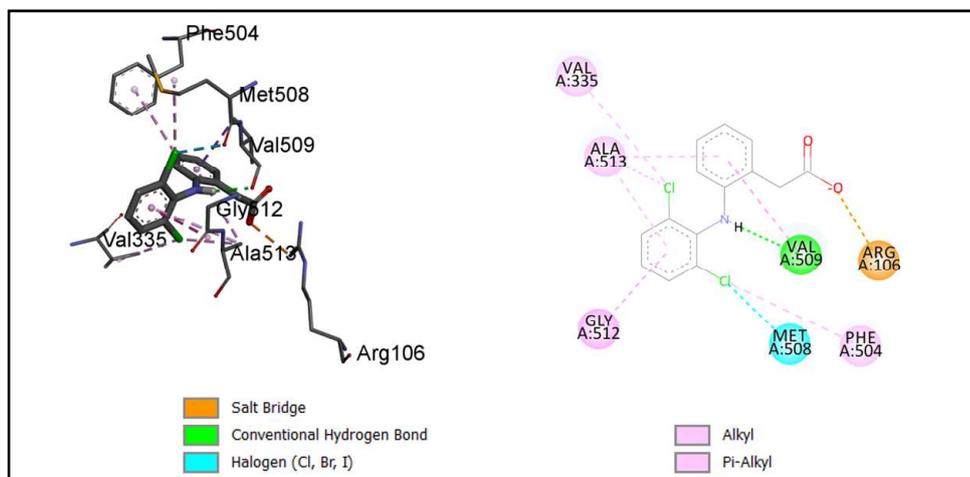


Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

As conformações de energia mais favoráveis do diclofenaco e do ibuprofeno (Figura 137 e Figura 138) mostraram que esses medicamentos realizam poucas interações com resíduos essenciais (Val509, Gly512, Ala513 para o diclofenaco e Leu338, Val509 para o ibuprofeno), no entanto ocorrem outras interações entre o diclofenaco e ibuprofeno com resíduos não essenciais (Arg106, Val335, Phe504, Met508 e His75, Val335, Arg499, respectivamente). Foi observado que mesmo estes compostos fazendo interações eletrostáticas com resíduos do sítio ativo, essas interações não contribuem suficientemente para compensar a falta das outras interações essenciais e, deste modo, as energias de interações são relativamente menores em comparação com a do celecoxibe e dos compostos **I** e **II**.

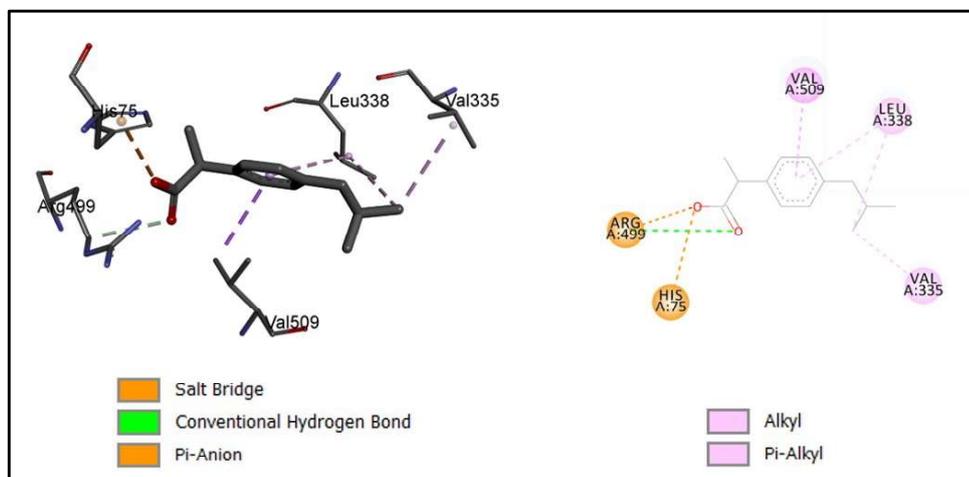
Figura 137 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o diclofenaco.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

Figura 138 – Diagramas de interações 3D e 2D entre os resíduos do sítio ativo da enzima Cox-2 e o Ibuprofeno.



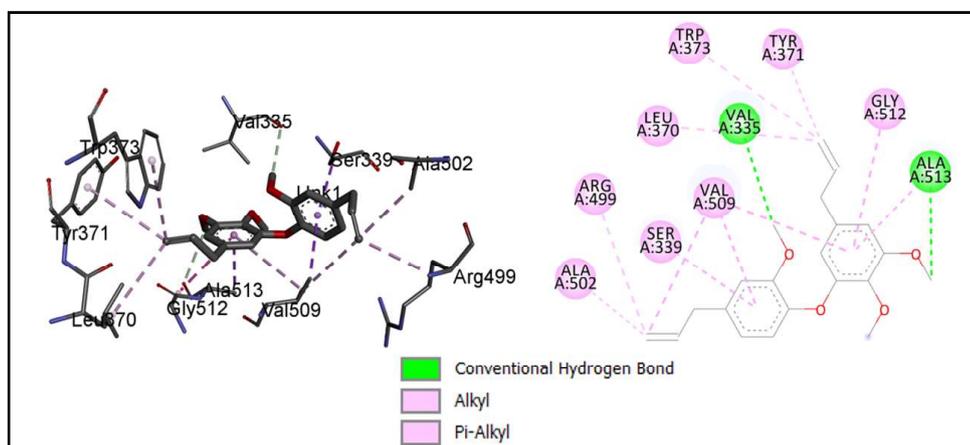
Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

A conformação de energia mais favorável do composto **I** (Figura 139) mostrou quatro interações com resíduos essenciais (Ser339, Val509, Gly512 e Ala513). Além disso, ocorrem interações com outros seis resíduos não essenciais (Val335, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Ala502). A conformação de energia mais favorável do composto **II** (Figura 140) mostrou que ocorrem interações com dois resíduos essenciais (Val509 e Ala513) e outras oito interações com resíduos não essenciais (Tyr341, Phe367, Tyr371, Arg499, Ala502, Ile503, Phe504,

Glu510). O número menor de interações essenciais presentes no composto **II** pode ser a causa de este apresentar energia de interação relativamente inferior ao composto **I**. Além disso, os resíduos Tyr341, Arg499 e Glu510 fazem interações intermoleculares de hidrogênio (C–H···O e O–H···O) com os grupos metoxi e hidroxí do composto **II** enquanto os resíduos Val335 e Ala513 fazem interação intermoleculares de hidrogênio (C–H···O) com os grupos metoxi do composto **I**. Essas interações mais fortes podem justificar a maior afinidade da enzima Cox-2 pelos compostos **I** e **II**, em relação ao diclofenaco e o ibuprofeno.

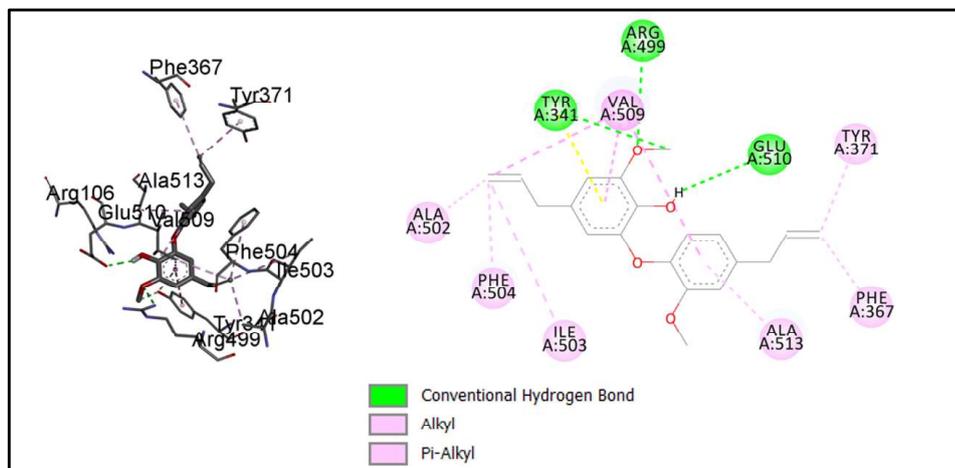
Figura 139 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-2 e o composto **I**.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

Figura 140 – Diagramas de interações 3D e 2D entre resíduos do sítio ativo do receptor Cox-2 e o composto **II**.



Nota: Os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza.

Fonte: o autor.

Assim, os resultados de docking molecular mostraram que as neolignanas **I** e **II** inibem o sítio ativo da Cox-2 de forma mais eficiente que o diclofenaco e o ibuprofeno, além de apresentar valores de K_i inferiores. Portanto, os resultados deste estudo indicam que os compostos **I** e **II** apresentam alta afinidade pela enzima Cox-2, além de padrões de interações promissores comparáveis aos medicamentos estudados.

Por fim, os resultados dos estudos de docking molecular sugerem que os compostos **I** e **II** possam apresentar atividade anti-inflamatória e serem bons candidatos a estudos *in vivo* devido aos resultados promissores aqui apresentados.

5.10 ANÁLISE *IN SILICO* DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO *O*-METILDESIDRODIEUGENOL B (**I**) E DESIDRODIEUGENOL B (**II**)

A predição *in silico* dos parâmetros moleculares físico-químicos, biodisponibilidade e farmacocinética, são etapas importantes do ponto de vista da descoberta de fármacos (KRÄMER, WUNDERLI-ALLENSPACH, 2001; NEERVANNAN, 2006). Nesse sentido, as propriedades do ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) que determinam o acesso do medicamento potencial ao alvo ou sua eliminação pelo organismo, são necessários na fase inicial do processo de descoberta do medicamento, e têm um papel fundamental neste processo (DOOGUE, POLASEK, 2013). Assim, neste trabalho, foi realizado um estudo *in silico* para verificar na teoria a biodisponibilidade oral, solubilidade, absorção e distribuição *in vivo* do *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e do desidrodieugenol B (**II**). De acordo com os valores dos parâmetros físico-químicos apresentados na Tabela 29, calculados por meio do programa online SwissADME, foi possível prever se estes compostos poderiam ser desenvolvidos como medicamentos, com base nas regras de Lipinski, Ghose, Veber e Egan. Para Lipinski, os fármacos devem ter massa molar ≤ 500 , coeficiente de partição entre *n*-octanol/água ≤ 5 , número de doadores de ligação ≤ 5 e número de aceitadores de ligação ≤ 10 . Para Ghose, o fármaco deve apresentar massa molar entre 180 e 480, número de átomos entre 20 e 70; refratividade molar entre 40 e 130 e coeficiente de partição entre *n*-octanol/água entre $-0,4$ e $5,6$. Para Veber, o fármaco deve apresentar número de ligações giratórias ≤ 10 e área de superfície polar topológica $\leq 140 \text{ \AA}^2$. Para Egan o fármaco deve apresentar coeficiente de partição entre *n*-octanol/água $\leq 5,88$ e área de superfície polar topológica $\leq 131,6 \text{ \AA}^2$.

Tabela 29 – Estudos *in silico* dos parâmetros de Lipinski, Ghose, Veber e Egan.

Parâmetros	<i>O</i> -metildesidrodieugenol B (I)	Desidrodieugenol B (II)
Propriedades físico-químicas		
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₄ O ₄	C ₂₀ H ₂₂ O ₄
Massa molecular	340,41 g mol ⁻¹	326,39 g mol ⁻¹
Num. Átomos pesados	25	24
Fração de C _{sp} ³	0,24	0,20
Num. de ligações giratórias	9	8
Num. Lig. H doadores	4	4
Num. De H aceptores	0	1
Refratividade molar	100,65	96,18
TPSA ¹	36,92 Å ²	47,92 Å ²
Lipofilicidade		
Consenso ² Log P _{o/w} ³	4,75	4,44
Solubilidade em água		
Log S (Ali)	-6,04	-5,93
Classe ⁴	Pouco	Moderado
Regras		
Lipinski ⁵	Sim	Sim
Ghose ⁶	Sim	Sim
Veber ⁷	Sim	Sim
Egan ⁸	Sim	Sim
Pontuação de biodisponibilidade ⁹	0,55	0,55

Nota: ¹ TPSA: Área de superfície polar topológica; ² Log de consenso P_{o/w} = média de todas as cinco previsões; ³

Log P_{o/w} = coeficiente de partição entre *n*-octanol/água; ⁴ Classe = Todas as classes: insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < moderadamente solúvel < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente; ⁵ Lipinski = MM ≤ 500; Log P_{o/w} ≤ 5; Doadores de ligação H ≤ 5; Aceitadores de ligação H ≤ 10; ⁶ Ghose = 180 ≤ MM ≤ 480; 20 ≤ No. de átomos ≤ 70; 40 ≤ Refratividade molar ≤ 130; -0,4 ≤ Log P_{o/w} ≤ 5,6; ⁷ Veber = Num. ligações giratórias ≤ 10; TPSA ≤ 140 Å²; ⁸ Egan = Log P_{o/w} ≤ 5,88; TPSA ≤ 131,6 Å²; ⁹ Pontuação de biodisponibilidade: 0,55 se for aprovado a regra de cinco e 0,17 se falhar (MARTIN, 2005).

Fonte: o autor.

A massa molecular de um composto é um parâmetro importante, pois quanto maior a massa molecular, maior o volume do composto e mais difícil a passagem da molécula para o meio intracelular. A massa molecular de **I** é 340,41 g mol⁻¹ e está de acordo com a regra de Lipinski e Ghose. Outro parâmetro importante é o Log P, relacionado à hidrofobicidade de um determinado composto e à capacidade de atravessar as membranas plasmáticas. O Log P obtido para o composto foi 4,75 e atendeu às regras de Lipinski (Log P_{o/w} ≤ 5), Ghose (Log P_{o/w} ≤ 5,6) e Egan (Log P_{o/w} ≤ 5,8). Os resultados apresentados na Tabela 29 mostra que o número de aceptores e doadores de hidrogênio estão de acordo com a regra de Lipinski, com valores para aceptores de 0 e para doadores de 4. Assim, de acordo com a regra de cinco de Lipinski, **I** tem uma excelente biodisponibilidade oral teórica. Porém, Veber considera dois parâmetros essenciais para as moléculas a serem administradas por via oral, que são a área de superfície polar topológica (TPSA) ≤ 140 Å² e o número de ligações giratórias. A molécula em estudo tem TPSA de 36,92 Å², e número de ligações giratórias são 9 e, portanto, a molécula tem grandes chances de ser usada por via oral. Além disso, a solubilidade em água é uma característica importante para a absorção e distribuição de um medicamento no organismo. O Log S = -6,04 (determinado pelo método de Ali e colaboradores (2012)) de **I** indica que o composto é pouco solúvel, mas no limite de ser considerado moderadamente solúvel.

A massa molecular de **II** é 326,39 g mol⁻¹ e está de acordo com a regra de Lipinski e Ghose. O Log P obtido para o composto foi de 4,44 e atendeu às regras de Lipinski, Ghose e Egan. Os resultados apresentados na Tabela 29 para o número de aceptores e doadores de hidrogênio, obedecem à regra de Lipinski, com valores para aceptores de **I** e para doadores de 4. A molécula possui um TPSA de 47,92 Å², e está de acordo com Ghose e Veber. O Log S = -5,93 indica que o composto é moderadamente solúvel.

Os parâmetros farmacocinéticos são fundamentais para um medicamento, visto que um dos principais fatores relacionados ao insucesso dos tratamentos se deve à ação inadequada no local da infecção. O medicamento ativa deve atingir o local apropriado em concentrações necessárias para matar ou suprimir o crescimento de patógenos. Mesmo para compostos com boa atividade *in vitro*, os parâmetros farmacocinéticos são decisivos para seu uso clínico (PANKEY, SABATH, 2004). Assim, os resultados desta análise preliminar *in silico*, suportam o potencial dos dois compostos como candidatos a fármacos, pois além de possuírem atividades anti-inflamatória, apresentaram parâmetros farmacocinéticos que sugerem boa absorção e biodistribuição *in vivo*. Embora se trate de um estudo preliminar, esses resultados servem de base para estudos futuros que avaliem a absorção e biodistribuição desse composto no organismo humano.

Com base em todos os resultados obtidos, este estudo mostrou que ambos compostos possuem um perfil farmacocinético indicando boa biodisponibilidade oral teórica, boa solubilidade, absorção e distribuição adequada da molécula *in vivo*, pois seguem todas as regras propostas por Lipinski, Ghose, Veber e Egan. Assim, os dois compostos possuem características que sugerem serem bons candidatos como medicamentos para o tratamento de inflamações. Assim, este trabalho incentiva futuros estudos farmacológicos destes compostos, visando suas aplicações terapêuticas.

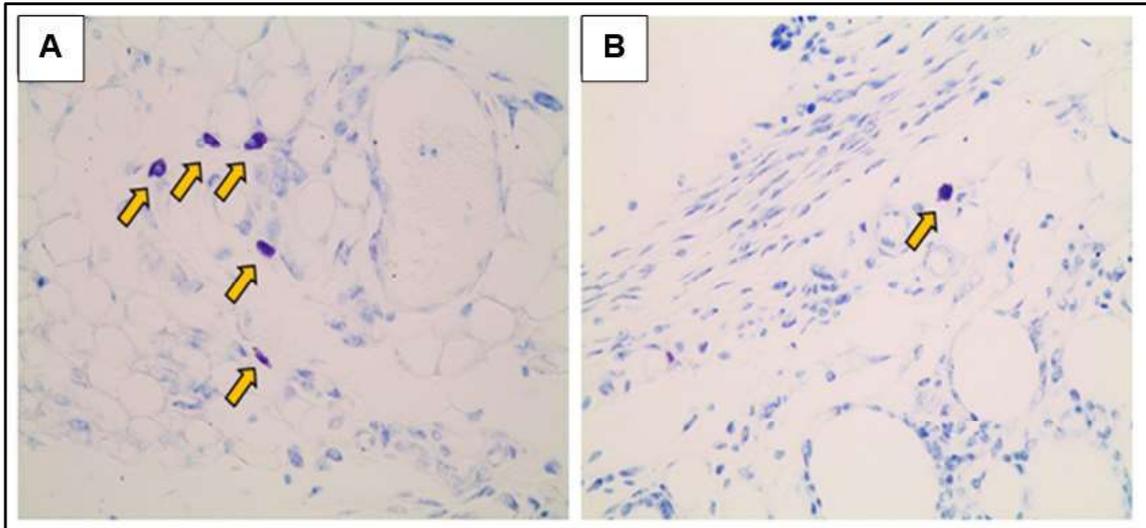
5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EHF E EHG E DAS NEOLIGANANS *O*-METILDESIDRODIEUGENOL B (I) E DESIDRODIEUGENOL B (II)

5.11.1 *Efeitos dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado inflamatório*

Esse trabalho é o primeiro a mostrar os efeitos dos tratamentos com EHF, EHG, *O*-metil-desidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II), em um modelo que possibilitou avaliar componentes importantes e que ocorrem concomitantemente durante o desenvolvimento de uma série de patologias que acometem a população mundial, como as doenças inflamatórias crônicas.

A avaliação do efeito anti-inflamatório associado aos tratamentos com os EHF, EHG, I e II foi avaliado indiretamente pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e da *N*-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), além da quantificação dos mastócitos presentes no tecido fibrovascular (Figura 141). O tecido de granulação, induzido pela implantação subcutânea dos discos esponjosos, é caracterizado pela presença de intenso infiltrado de células inflamatórias, por processo de neovascularização e pela migração e proliferação de fibroblastos, responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular (Figura 142).

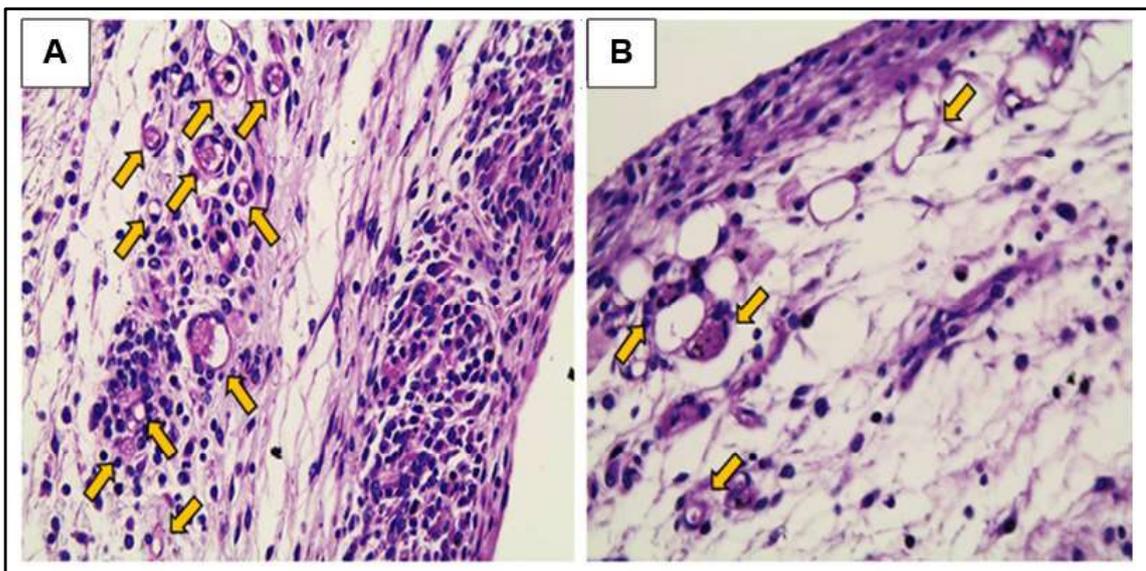
Figura 141 – Análise histológica de mastócitos de implantes com 9 dias de idade.



Nota: Fotomicrografias representativas de seções coradas com azul de toluidina (5 μ m), com ampliação de 400 \times , em (a) grupo controle e (b) II (10 ng). Setas amarelas indicam mastócitos.

Fonte: o autor.

Figura 142 – Análise histológica de implantes de 9 dias em cortes corados com hematoxilina-eosina, com aumento de 400x.



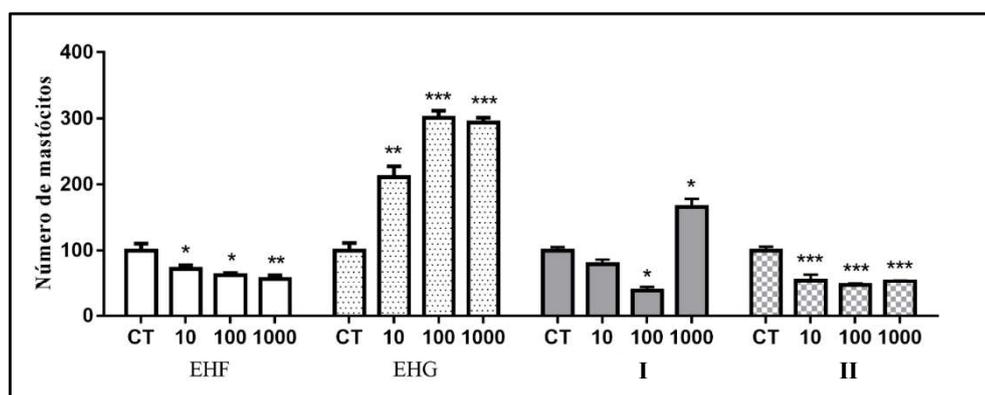
Nota: Seções de implante representativas de (a) animais tratados com o controle e (b) tratados com II (10 ng) mostrando o tecido de granulação recém-formado, composto por uma mistura de células inflamatórias, fibroblastos e numerosos vasos sanguíneos (setas amarelas).

Fonte: o autor.

O tratamento com EHF e II mostraram reduções na quantidade média de mastócitos em todas as doses, quando comparados ao grupo controle (CT), enquanto o I mostrou redução

apenas na dose de 100 ng, porém foi observado um aumento considerável de 63% na dose de 1000 ng. Entretanto, o EHG apresentou um aumento na quantidade média de mastócitos em todas as doses, quando comparados ao grupo CT (Figura 143). A dose de 10 ng no tratamento com I não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo CT. A Tabela 30 resume a quantificação de mastócitos (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT. A redução do número de mastócitos, após o tratamento com EHF, I (na dose de 100 ng) e II, pode ter contribuído para o menor acúmulo de células inflamatórias próximas ao tecido fibrovascular formado. Além disso, a redução desse tipo de célula nos grupos tratados sustenta o potencial uso terapêutico do EHF e destes compostos no tratamento de alergias (AMIN, 2012; CHOI et al., 2014) e hiperlipidemia (CHENG et al., 2017), doenças relacionadas a um aumento muito grande na quantidade de mastócitos.

Figura 143 – Representação gráfica da quantificação de mastócitos dos EHF, EHG, I e II.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 30 – Quantificação de mastócitos (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	72,22 \pm 5,63	211,24 \pm 16,44	79,70 \pm 7,35	54,62 \pm 9,19
100	63,29 \pm 2,98	301,24 \pm 10,60	38,09 \pm 5,18	46,64 \pm 3,70
1000	57,22 \pm 5,61	293,84 \pm 7,20	166,07 \pm 12,43	52,81 \pm 2,28

Fonte: o autor.

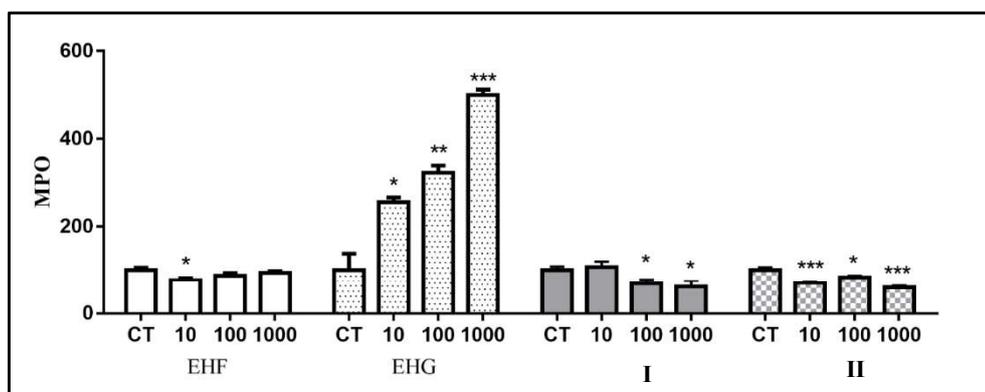
O neutrófilo é o primeiro tipo celular a responder frente a um estímulo nocivo, migrando em direção ao sítio inflamatório. Assim, quando ocorre aumento da atividade de MPO, ocorre um

aumento no conteúdo de neutrófilos no local da inflamação. Da mesma forma, quando ocorre diminuição da atividade de MPO, ocorre uma diminuição no conteúdo de neutrófilos no local da inflamação (FERREIRA, 2016).

Neste trabalho, o conteúdo de neutrófilos nos implantes foi medido indiretamente pela avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que está presente em grandes quantidades no interior dos grânulos dessas células. O tratamento com EHF, com 10 ng mostrou redução da atividade da MPO quando comparado ao grupo CT. Quando os animais foram tratados com **I** e **II**, houve reduções da atividade da MPO nas doses de 100 ng e 1000 ng para **I** e em todas as doses testadas para **II**, quando comparada ao grupo CT. Entretanto, quando os animais foram tratados com EHG, em todas as doses testadas houve um aumento da atividade da MPO quando comparada ao grupo CT, chegando a 400% de aumento na dose de 1000 ng. As doses de 100 ng e 1000 ng no tratamento com EHF e a dose de 10 ng no tratamento com o **I** não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao grupo CT.

A Tabela 31 resume a atividade da enzima MPO (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT. Esses resultados mostram que as neolignananas **I** e **II** diminuem a atividade da enzima MPO, mas mesmo os EHF e EHG tendo os compostos **I** e **II**, a ação conjunta dos dois compostos não foi capaz de diminuir a atividade da enzima MPO, visto que o EHG tem um aumento desta atividade. Outros estudos também demonstraram efeitos semelhantes do tratamento com fenilpropanoides por modelos *in vivo* (DOMICIANO et al., 2013; KANG et al., 2013; FILHO et al., 2019).

Figura 144 – Efeito do tratamento com EHF, EHG, **I** e **II** na avaliação da atividade da enzima MPO.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 31 – Atividade da enzima MPO (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%).

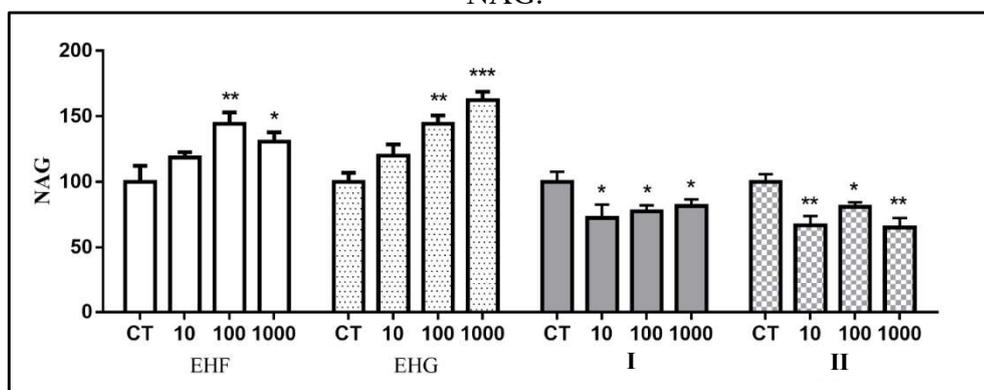
Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	77,51 ± 4,29	255,85 ± 10,58	107,91 ± 12,56	70,33 ± 3,95
100	87,53 ± 6,71	323,28 ± 15,91	68,36 ± 9,66	83,12 ± 4,39
1000	94,27 ± 4,09	500,49 ± 11,94	61,38 ± 13,46	59,35 ± 4,54

Fonte: o autor.

Durante a fase crônica da resposta inflamatória, o infiltrado celular passa a ser substituído por monócitos recrutados da corrente sanguínea que ao chegarem ao sítio da inflamação se diferenciam em macrófagos, células de defesa (M1), resolução e reparo (M2) (FERREIRA, 2016).

Neste trabalho, a avaliação do conteúdo de macrófagos, foi feita com base na dosagem da atividade da enzima NAG e mostrou em animais tratados com EHF e EHG (nas doses de 100 ng e 1000 ng), um aumento da atividade da NAG observado nestas doses quando comparadas ao grupo CT. Entretanto, quando os animais foram tratados com I e II foi observada uma redução da atividade do NAG após o tratamento em todas as doses, quando comparados ao grupo CT (Figura 145). A dose de 10 ng nos tratamentos com EHF e EHG não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao grupo CT. A Tabela 32 resume a atividade da enzima NAG (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT. Esses resultados mostram que as neolignanas I e II diminuem a atividade da enzima NAG, mas mesmo os EHF e EHG tendo os compostos I e II, a ação conjunta dos dois compostos não é a diminuição da atividade da enzima NAG, visto que no EHG ocorre aumento desta atividade.

Figura 145 – Efeito do tratamento com EHF, EHG, I e II na avaliação da atividade da enzima NAG.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 32 – Atividade da enzima NAG (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	118,71 ± 3,92	120,05 ± 8,61	72,42 ± 10,37	66,68 ± 7,21
100	144,27 ± 8,62	144,48 ± 6,04	77,54 ± 4,64	80,86 ± 3,61
1000	130,82 ± 6,97	162,49 ± 6,37	81,66 ± 4,92	65,18 ± 7,29

Fonte: o autor.

Os resultados obtidos na avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado celular mostram que os tratamentos com o EHF, **I** e **II** diminuem a quantidade de mastócitos e a atividade da enzima MPO enquanto no tratamento com o EHG foi observado um aumento. Os tratamentos com os EHF e EHG aumentam a atividade da enzima NAG enquanto no tratamento com **I** e **II** foi observado uma diminuição. A Tabela 33 apresenta os resultados gerais dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado celular. Assim, através da quantificação do número de mastócitos foi possível observar que o tratamento dos camundongos com EHF teve efeitos anti-inflamatórios, enquanto o tratamento com o EHG teve efeitos pró-inflamatórios. Já o tratamento com **I** teve efeitos anti-inflamatórios (na dose de 100 ng) e pró-inflamatórios (na dose de 1000 ng), enquanto o tratamento com **II** teve efeitos anti-inflamatórios, antifibrogênico e antiangiogênicos em todas as doses avaliadas.

Tabela 33 – Resultados gerais dos efeitos dos tratamentos sobre os componentes do infiltrado inflamatório.

Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
Mastócitos	↓	↑	↓ ↑	↓
MPO	↓	↑	↓	↓
NAG	↑	↑	↓	↓

Nota: ↓ diminui; ↑ aumenta.

Fonte: o autor.

As diferenças vistas no EHG principalmente nas atividades das enzimas MPO e NAG em relação aos EHF, **I** e **II** podem estar associadas as interações farmacodinâmicas. Tais interações podem ocorrer quando dois ou mais compostos atuam sobre um mesmo receptor, sobre um mesmo órgão ou sobre um mesmo sistema fisiológico. Esse tipo de interação pode

aumentar um efeito farmacológico, como também, diminuir, suprimir ou promover um efeito tóxico. Elas podem ocorrer devido a competições enzimáticas pelo substrato, grau de absorção pelo organismo, formação de complexos, etc. Por exemplo, a ação conjunta dos fármacos ácido acetilsalicílico e ibuprofeno acarreta na diminuição dos seus efeitos terapêuticos, quando comparados aos seus efeitos isolados. O omeprazol causa uma influência significativa na biodisponibilidade do atazanavir, inibidor de protease do HIV, não mediada pelo citocromo P450, mas como consequência do aumento do pH no estômago (CASCORBI, 2012).

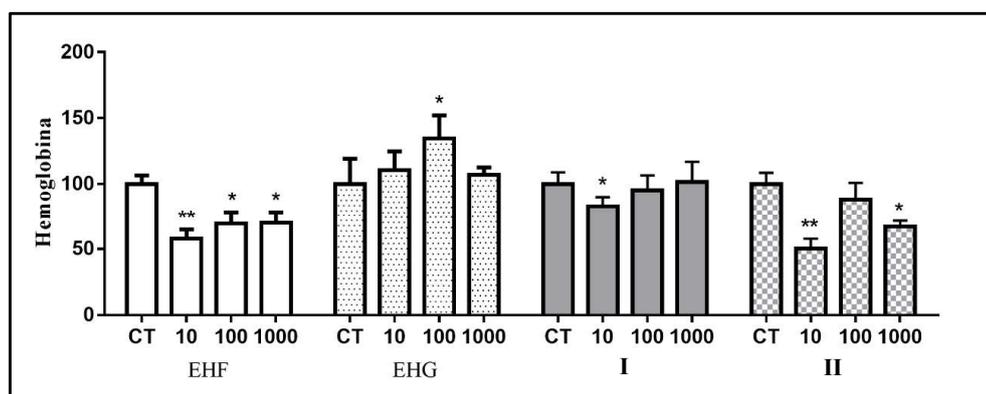
A inibição das enzimas Cox-1 e Cox-2 nos efeitos anti-inflamatórios associados à classe dos fenilpropanoides são semelhantes aos observados pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (MOMIN, DE WITT, NAIR, 2003; LEE et al., 2005; GUO et al., 2006; BALLABENI et al., 2010). Além disso, os mecanismos anti-inflamatórios de alguns fenilpropanoides significam mudanças na expressão de genes pró-inflamatórios, atividade antioxidante e inibição de importantes vias de sinalização, incluindo a inibição da via NF- κ B (factor nuclear kappa B) (AGGARWAL, SHISHODIA, 2006; RAHMAN, BISWAS, KIRKHAM, 2006). A consequência disso é uma inibição da transcrição do gene de citocinas associada ao recrutamento e ativação de leucócitos (por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6)) e uma redução na expressão de moléculas de adesão celular, necessárias para a transmigração dessas células da corrente sanguínea.

5.11.2 *Efeitos dos tratamentos sobre a angiogênese*

A formação de novos vasos sanguíneos é um processo comum às respostas fisiológicas e patológicas dos organismos (COSTA, INCIO, SOARES, 2007; VIALARD, LARRIVÉE, 2017; BADIMON, BORRELL, 2018). Nesse processo, a liberação de citocinas pró-angiogênicas pelas células de cada microambiente é responsável pela ativação, proliferação e migração das células endoteliais de vasos pré-existentes, em direção a um gradiente quimiotático (COSTA, INCIO, SOARES, 2007). Assim, para avaliar a formação de novos vasos sanguíneos nos implantes, foi avaliado os efeitos dos EHF, EHG, *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e desidrodieugenol B (**II**) sobre a angiogênese, segundo parâmetros bioquímicos e morfológicos. A angiogênese foi avaliada indiretamente pelo conteúdo de hemoglobina nos implantes e, diretamente pela contagem de vasos sanguíneos nos cortes histológicos. O teor de hemoglobina (mg/peso úmido) nos animais tratados com EHF em todas as doses, e **II** nas doses de 10 ng e 1000 ng foi menor quando comparados ao grupo CT, enquanto **I** reduziu o teor de hemoglobina apenas na dose de 10 ng quando comparado ao grupo

CT. Entretanto, nos animais tratados com EHG, o teor de hemoglobina foi maior na dose de 100 ng quando comparado ao grupo CT (Figura 146). As doses de 10 ng e 1000 ng no tratamento com EHG, as doses de 100 ng e 1000 ng no tratamento com **I** e 100 ng no tratamento com **II**, não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas ao grupo CT. A Tabela 34 resume o teor de hemoglobina (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT.

Figura 146 – Efeitos dos tratamentos com EHF, EHG, **I** e **II** no conteúdo de hemoglobina.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. CT.

Fonte: o autor.

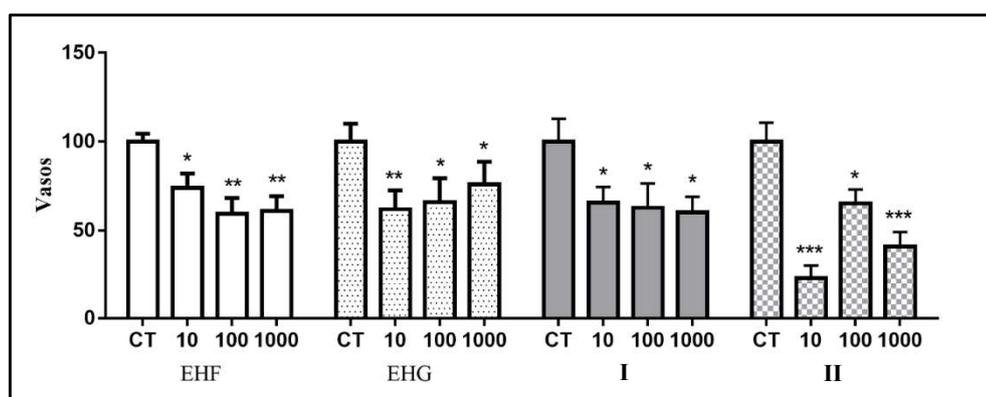
Tabela 34 – Teor de hemoglobina (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	57,86 \pm 6,95	110,62 \pm 14,16	83,04 \pm 7,01	50,15 \pm 7,57
100	69,01 \pm 9,36	134,76 \pm 17,32	95,19 \pm 11,42	88,21 \pm 12,73
1000	69,74 \pm 8,71	107,02 \pm 5,61	101,3 \pm 15,28	66,75 \pm 4,74

Fonte: o autor.

O número de vasos sanguíneos formados nos implantes tratados com o EHF, EHG, **I** e **II** foi menor quando comparados ao grupo CT (Figura 147). Esses resultados mostram que **II** causa maior redução do conteúdo de hemoglobina e do tecido fibrovascular nas doses de 10 e 1000 ng, em comparação aos tratamentos com EHF, EHG e **I**, enquanto o EHF causa uma maior redução na dose de 100 ng em comparação aos tratamentos com EHG e **I** em todas as doses e **II** na dose de 100 ng. A Tabela 35 resume o número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT.

Figura 147 – Número de vasos sanguíneos/área total quantificados nos cortes histológicos dos tratamentos com EHF, EHG, I e II.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 35 – Número de vasos formados (em %) nos diferentes tratamentos em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	73,87 \pm 8,15	62,11 \pm 10,46	65,71 \pm 8,69	23,00 \pm 7,36
100	59,32 \pm 8,97	65,98 \pm 13,44	62,85 \pm 13,63	65,22 \pm 7,85
1000	60,85 \pm 8,50	76,09 \pm 12,62	60,00 \pm 8,90	40,86 \pm 8,16

Fonte: o autor.

Os resultados obtidos na avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a angiogênese mostram que os tratamentos com o EHF, I e II causam efeitos antiangiogênicos (diminuição da formação de vasos sanguíneos) com consequente diminuição do conteúdo de hemoglobina. Já o tratamento com o EHG apesar de também apresentar efeito antiangiogênico, apresenta aumento do conteúdo de hemoglobina, o que indica a presença de vasos sanguíneos maiores. A Tabela 36 apresenta os resultados gerais dos tratamentos sobre a angiogênese.

Tabela 36 – Resultados gerais dos efeitos dos tratamentos sobre a angiogênese.

Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
Teor de hemoglobina	↓	↑	↓	↓
Número de vasos	↓	↓	↓	↓

Nota: ↓ diminui; ↑ aumenta.

Fonte: o autor.

Na literatura, a ação antiangiogênica dos fenilpropanoides está relacionada à inibição da secreção de citocinas pró-angiogênicas (LIU et al., 2014; YANG et al., 2016). Além disso, sabe-se que em diferentes condições patológicas associadas à resposta inflamatória, eventos como inflamação e angiogênese ocorrem concomitantemente e sinergicamente, de modo que uma série de mediadores são capazes de promover a formação de novos vasos sanguíneos (COSTA, INCIO, SOARES, 2007). Por exemplo, em muitos tumores, a elevação dos níveis de Cox-2 resulta em uma maior vascularização da massa tumoral, devido a um aumento na secreção de citocinas pró-angiogênicas (TOOMEY, MURPHY, CONLON, 2009; KIM et al., 2018). Assim, conforme observado nos resultados apresentados neste trabalho, a inibição da resposta inflamatória, poderia explicar, pelo menos em partes, a redução da angiogênese observada em implantes tratados com o EHF, EHF, I e II.

A angiogênese excessiva ou insuficiente está associada às principais classes de doenças crônicas. A angiogênese excessiva está associada a câncer, degeneração macular relacionada à idade e artrite (CARMELIET, 2003; FOLKMAN, 2007). Assim, medicamentos com efeitos antiangiogênicos, conforme observado nos EHF, I e II, são consideradas como um alvo potencial para terapia antitumoral (RAJABI, MOUSA, 2017). No entanto, os medicamentos com efeitos pró-angiogênicos, conforme observado no EHG, têm o potencial de auxiliar no tratamento de doenças e condições onde a formação de novos vasos sanguíneos é necessária, como na cicatrização de feridas (TONNESEN, FENG, CLARK, 2000; CARMELIET, 2003; BAO et al., 2009), doenças cardiovasculares (PANDYA, DHALLA, SANTANI, 2006; SILVESTRE, 2012) e derrame cerebral (BECK, PLATE, 2009; FONT, ARBOIX, KRUPINSKI, 2010; ALHUSBAN et al., 2015).

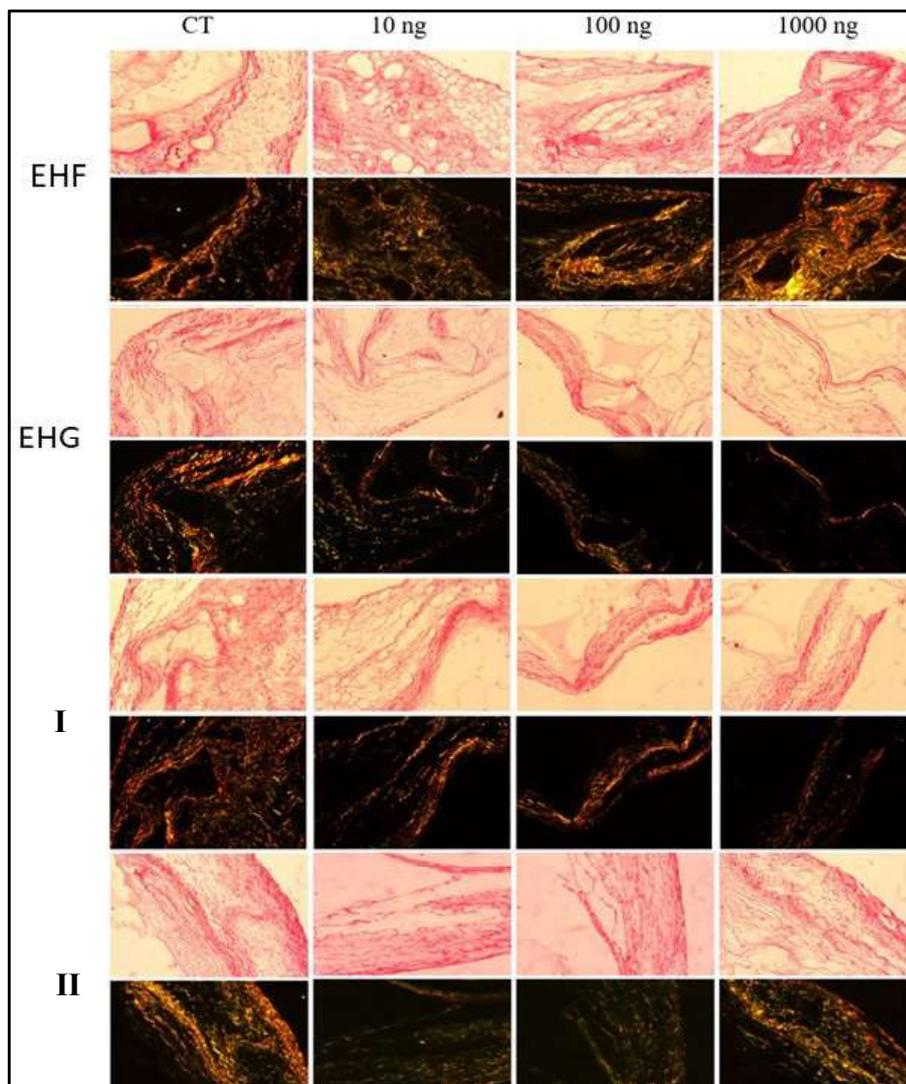
5.11.3 Avaliação dos tratamentos sobre a deposição de colágeno

O colágeno é o mais abundante dos constituintes da matriz extracelular, sendo de suma importância para o reparo tecidual, que é o estágio final do processo inflamatório. O colágeno do tipo I é o colágeno mais abundante do corpo humano. Está presente no tecido cicatricial, isto é, o produto final quando o tecido cicatriza por reparo podendo de ser encontrado nos tendões, pele, paredes das artérias, córnea, fibrocartilagem e na parte orgânica dos ossos e dentes. O colágeno do tipo III é o colágeno do tecido de granulação e é produzido rapidamente por fibroblastos jovens antes que o colágeno tipo I mais resistente seja sintetizado (HANCE, CRYSTAL, 1977; BUCKLEY et al., 2013).

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos dos tratamentos com EHF, EHG, **I** e **II** sobre o processo de remodelamento tecidual, foi avaliado a concentração de colágeno solúvel e deposição de colágeno total e fibras de colágeno dos tipos I e III. A concentração de colágeno no tecido fibrovascular induzido por implantes foi avaliada pela dosagem bioquímica do colágeno solúvel e pela técnica histológica de coloração por *picrossírius red*. Os cortes histológicos foram utilizados para observar a deposição de colágeno total, examinados com e sem a aplicação de filtro de luz polarizada, para avaliar a deposição total desse constituinte (Figura 149 e Figura 152), e também para analisar a deposição de fibras de colágeno do tipo I e III (Figura 148, Figura 150 e Figura 151).

Nos implantes tratados com o EHF em todas as doses, houve aumento da deposição de colágeno solúvel total, quando comparada ao grupo CT (10,02%, 14,74% e 18,71% para 10; 100 e 1000 ng, respectivamente). Nos implantes tratados com EHG em todas as doses, houve redução da deposição de colágeno solúvel total, quando comparada ao grupo CT (20,31%, 15,25% e 21,31% para 10, 100 e 1000 ng, respectivamente). Quando os implantes foram tratados com o *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) houve redução na deposição de colágeno solúvel total em todas as doses (32,59%, 24,04% e 37,04% para 10, 100 e 1000 ng, respectivamente) quando comparadas ao grupo CT. Quando os implantes foram tratados com desidrodieugenol B (**II**) houve redução na deposição de colágeno solúvel total nas doses de 10 e 100 ng (33,87 e 31,29%, respectivamente) quando comparadas aos grupo CT e a dose de 1000 ng (4,31%). O mesmo comportamento foi observado nas intensidades do colágeno do tipo I e III em todos os tratamentos quando comparados ao grupo CT.

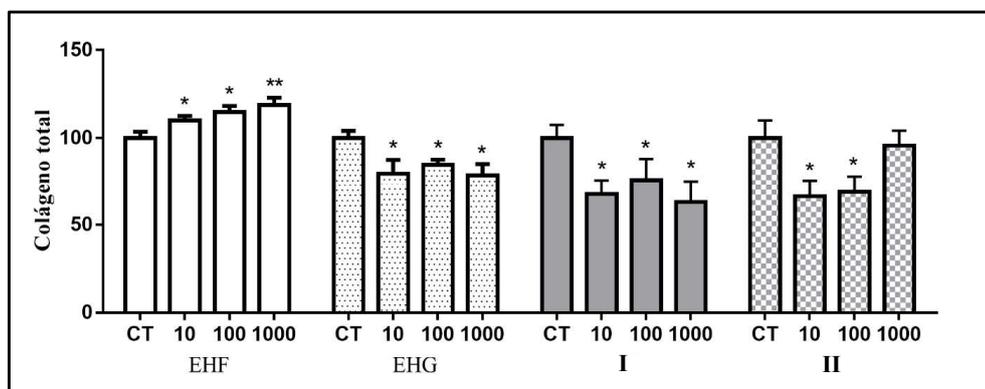
Figura 148 – Análise histológica da deposição de colágeno de seções coradas com picrossírius red (ampliação de 100 ×) em animais tratados com EHF, EHG, I e II, sem e com um filtro polarizador.



Nota: Sob luz polarizada, as fibras de colágeno do tipo I são marcadas em vermelho, o tipo III em verde e a sobreposição dessas duas fibras de colágeno em amarelo/laranja.

Fonte: o autor.

Figura 149 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno total nos implantes subcutâneos.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. CT.

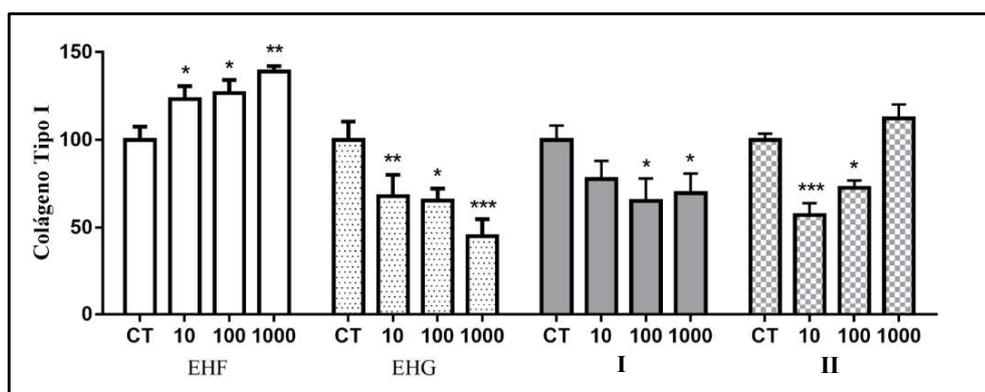
Fonte: o autor.

Tabela 37 – Concentração (em %) de colágeno total nos implantes em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	110,02 \pm 2,27	79,69 \pm 2,30	67,58 \pm 9,61	66,13 \pm 9,61
100	114,74 \pm 2,98	84,75 \pm 2,95	75,29 \pm 9,36	68,70 \pm 9,36
1000	118,71 \pm 3,52	78,69 \pm 3,89	63,83 \pm 8,54	95,68 \pm 8,54

Fonte: o autor.

Figura 150 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno do tipo I nos implantes subcutâneos.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CT.

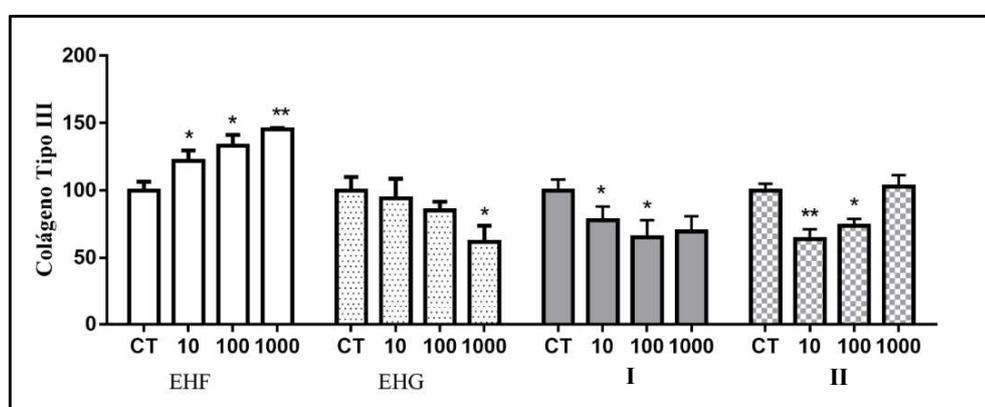
Fonte: o autor.

Tabela 38 – Concentração (em %) de colágeno do tipo I nos implantes em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	123,16 ± 6,10	67,92 ± 12,24	74,51 ± 11,82	57,19 ± 11,82
100	126,80 ± 5,82	65,33 ± 6,91	67,61 ± 5,69	72,75 ± 5,69
1000	138,87 ± 2,27	45,15 ± 9,62	70,38 ± 7,84	112,30 ± 7,84

Fonte: o autor.

Figura 151 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na concentração de colágeno do tipo III nos implantes subcutâneos.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 39 – Concentração (em %) de colágeno do tipo III nos implantes em relação ao grupo CT (100%).

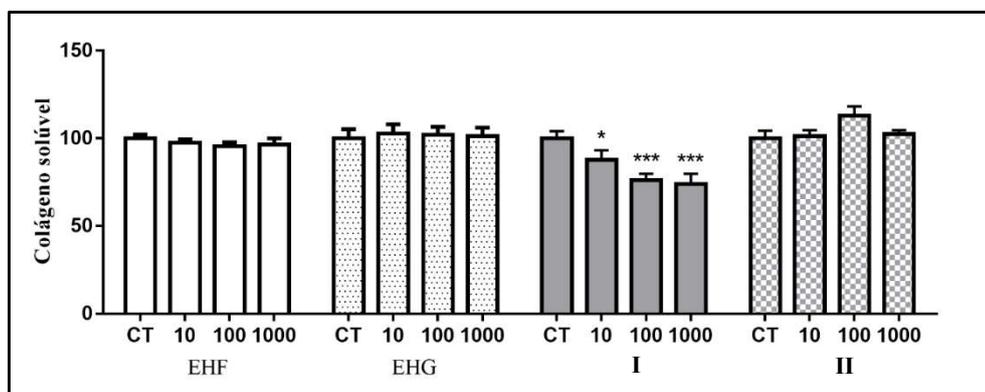
Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	122,07 ± 6,30	94,27 ± 14,50	75,27 ± 11,68	63,77 ± 11,68
100	133,33 ± 5,88	85,25 ± 6,45	64,18 ± 6,86	73,88 ± 6,86
1000	145,33 ± 0,70	61,90 ± 12,06	68,09 ± 8,25	102,96 ± 8,25

Fonte: o autor.

Nos implantes tratados com o EHF, EHG e II em todas as doses, não houve diferenças significativas da concentração de colágeno solúvel (colágeno que ainda não foi depositado na matriz extracelular), quando comparada ao grupo CT (Figura 152). Já nos implantes tratados com I, houve reduções em todas as doses testadas quando comparada ao grupo CT. A Tabela

40 resume a concentração do colágeno solúvel (em %) nos diferentes tratamentos em comparação ao grupo CT.

Figura 152 – Efeito dos EHF, EHG, I e II na quantidade de colágeno solúvel nos implantes subcutâneos.



Nota: Os valores representam as médias (\pm e.p.m) dos grupos. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. CT.

Fonte: o autor.

Tabela 40 – Concentração (em %) de colágeno solúvel nos implantes em relação ao grupo CT (100%).

Dose (ng)/ Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
10	97,47 \pm 1,95	102,86 \pm 5,13	87,78 \pm 5,40	101,36 \pm 3,31
100	95,39 \pm 2,32	101,96 \pm 4,62	76,10 \pm 3,57	112,94 \pm 5,27
1000	96,57 \pm 3,40	101,29 \pm 4,80	74,09 \pm 5,67	102,55 \pm 2,08

Fonte: o autor.

Os resultados obtidos na avaliação sobre a deposição de colágeno (observados como colágeno total e fibras do tipo I e III) mostram que os tratamentos com o EHG, I e II causam um efeito antifibrótico (diminuição da deposição de colágeno) enquanto o tratamento com EHF causa um efeito fibrótico (aumento da deposição de colágeno), o que pode ser o resultado de interações farmacocinéticas de outros compostos químicos presentes no extrato. Já a avaliação da concentração de colágeno solúvel mostra que os tratamentos com o EHF e I diminuem a concentração deste colágeno enquanto o tratamento com o EHG e II aumentam este colágeno. Estes resultados indicam que o tratamento com o EHF favorece a deposição de colágeno total, pois há aumento deste colágeno na matriz extracelular enquanto que o tratamento com I não favorece a produção de colágeno, pois há diminuição do colágeno solúvel

bem como da deposição de colágeno total. Os tratamentos com o EHF e **II** indicam que eles não favorecem a deposição de colágeno na matriz extracelular, pois há uma diminuição da deposição de colágeno e aumento da concentração de colágeno solúvel. A Tabela 41 apresenta os resultados gerais dos tratamentos sobre a deposição de colágeno na matriz extracelular.

Tabela 41 – Resultados gerais dos tratamentos sobre a deposição de colágeno.

Tratamento	EHF	EHG	(I)	(II)
Colágeno solúvel	↓	↑	↓	↑
Colágeno total	↑	↓	↓	↓
Colágeno tipo I	↑	↓	↓	↓
Colágeno tipo III	↑	↓	↓	↓

Nota: ↓ diminui; ↑ aumenta.

Fonte: o autor.

Em estudos da literatura com fenilpropanoides, ou extratos ricos destes compostos, também demonstraram efeitos antifibrogênico, como os observados nos resultados do EHF, **I** e **II**. Nestes trabalhos, a ação anti-inflamatória e o efeito antioxidante dos compostos testados, bem como a diminuição na síntese de citocinas pró-fibrogênicas, foram listados como fatores que desencadeiam a menor deposição de colágeno nos modelos avaliados (MOURA et al., 2011; SHIN et al., 2013; ZHANG et al., 2017; PULIVENDALA, BALE, GODUGU, 2020), estreitando ainda mais a relação entre a resposta inflamatória excessiva e a deposição exacerbada de matriz extracelular. A síntese e o processo de deposição do colágeno são influenciados pelo equilíbrio da liberação dos fatores fibrogênicos, pela ação de proteases capazes de degradar essas fibras (como as metaloproteases) e pela liberação de inibidores dessas enzimas (BAINBRIDGE, 2013). No entanto, em certas condições patológicas, a deposição exacerbada da matriz extracelular pode resultar em processos de cicatrização/fibrose aberrantes. Isso poderia levar a mudanças estruturais e funcionais em diferentes órgãos, resultando em danos à saúde do indivíduo (WICK et al., 2013; WEISKIRCHEN, WEISKIRCHEN, TACKE, 2019), como visto na cirrose hepática, doença renal crônica e doença pulmonar (SAFFIOTI, PINZANI, 2016; HUMPHREYS, 2018; GEORGE, WELLS, 2020).

Por outro lado, o aumento da produção de colágeno como observado no EHF pode ser uma via de tratamento para algumas doenças em humanos. Por exemplo, a osteogênese imperfeita é causada por uma mutação no colágeno tipo I, distúrbio autossômico dominante, que resulta em ossos fracos e tecido conjuntivo irregular, sendo que alguns casos podem ser

leves, enquanto outros podem ser letais. Os casos leves têm níveis reduzidos de colágeno tipo I, enquanto os casos graves têm defeitos estruturais no colágeno (GAJKO-GALICKA, 2002). O envelhecimento da pele é outro problema relacionado a diminuição do colágeno, sendo causado pela redução do colágeno dos tipos I e III, e intensificada no fotodano (exposição a luz) (VARANI et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

Os extratos das folhas e galhos de *E. paniculata* foram avaliados pela primeira vez em relação a composição química e o potencial biológico. A prospecção fitoquímica apresentou resultados positivos para uma diversidade de metabólitos especializados (secundários), tais como fenólicos, terpenos, esteroides.

Através da análise de CG-EM foi possível identificar 11 compostos presentes nos EHF e 8 compostos presentes no EHG. Foram identificados ácidos graxos, ésteres, neolignanais, fenilpropanoides, sesquiterpenos e esteroides. Através desta técnica, também foi possível confirmar a partir dos espectros de massas e das fragmentações, as estruturas dos compostos **I**, **II**, **III**, **IV** e **VI** isolados a partir dos extratos hexânicos.

Através de análises de CLAE, foram identificados dois sinais mais intensos presentes nos EHF e EHG, que foram posteriormente isolados por cromatografia em coluna e identificados como as neolignanais *O*-metildesidrodieugenol B (**I**) e desidrodieugenol B (**II**). O fracionamento do EHG, além do isolamento e identificação de **I** e **II**, também conduziu ao isolamento e identificação do β -sitosterol (**III**), o fracionamento do EHF levou ao isolamento do estigmasterol (**IV**) e frações ricas de **I** e **II**, o fracionamento do EMG levou ao isolamento do canferol (**V**) e o fracionamento do EMF ao isolamento do ácido palmítico (**VI**). Todos os compostos tiveram suas estruturas confirmadas por CG-EM e/ou RMN de ^1H e ^{13}C .

Todos os extratos foram submetidos a análises de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e avaliação dos teores fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Os extratos apresentaram CE_{50} entre 257 a 833 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a atividade antioxidante, sendo os melhores resultados para os extratos metanólicos. Já a análise dos teores de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, os melhores resultados foram: EMF para o teor de fenóis totais ($274,9 \pm 1,5 \text{ mg GAE g}^{-1}$) e EHF para os teores de proantocianidinas ($19,7 \pm 0,1 \text{ mg CE g}^{-1}$) e flavonoides ($7,7 \pm 0,4 \text{ mg QE g}^{-1}$).

As neolignanais **I** e **II** também foram submetidos a ensaios de inibições da α -glicosidase, glicação e lipase pancreática e ambos apresentaram inibições menores para todas as atividades

quando comparados aos respectivos compostos utilizados como controle. Os resultados mostram que **I** apresentou melhor valor de percentual de inibição da glicação (34,54%) e inibição da lipase pancreática (55,45%) quando comparado ao **II** (25,75% e 39,40%, respectivamente). Entretanto, os resultados mostram que o **II** apresentou melhor valor de percentual de inibição da α -glicosidase (17,45%) quando comparado ao **I** (14,85%).

As neolignanas **I** e **II** foram submetidos a cálculos de docking molecular com as enzimas Cox-1 e Cox-2 para estudo do potencial frente a atividade anti-inflamatória. Os resultados obtidos para as neolignanas foram comparados aos obtidos para os fármacos comerciais celecoxibe, diclofenaco e ibuprofeno. Os resultados mostraram que **I** e **II** possuem energias de interação com Cox-1 comparáveis ao fármaco diclofenaco e maiores que ibuprofeno, enquanto as energias de interação com a enzima Cox-2 foram maiores do que para os fármacos diclofenaco e ibuprofeno.

Em vista dos resultados promissores de docking molecular, os EHF, EHG, **I** e **II** foram submetidos a testes de atividade anti-inflamatória realizadas *in vivo* nas dosagens de 10, 100 e 1000 ng, em camundongos da linhagem C57. O tratamento dos camundongos com EHF teve efeitos anti-inflamatórios, fibrogênicos e antiangiogênicos, enquanto o tratamento com o EHG teve efeitos pró-inflamatórios, antiangiogênicos e antifibrogênico em todas as doses avaliadas. O tratamento com **I** teve efeitos antifibrogênico e antiangiogênico em todas as doses, anti-inflamatório na dose de 100 ng e pró-inflamatório na dose de 1000 ng, enquanto o tratamento com **II** teve efeitos anti-inflamatórios, antifibrogênico e antiangiogênicos em todas as doses avaliadas.

A análise *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos mostrou que a massa molecular de **I** e **II** estão de acordo com a regra de Lipinski e Ghose. O Log P de **I** e **II** atendeu às regras de Lipinski ($\text{Log } P_{o/w} \leq 5$), Ghose ($\text{Log } P_{o/w} \leq 5,6$) e Egan ($\text{Log } P_{o/w} \leq 5,8$). **I** e **II** apresentam número de aceptores e doadores de hidrogênio de acordo com a regra de Lipinski. Assim, de acordo com a regra de cinco de Lipinski, **I** e **II** tem uma excelente biodisponibilidade oral teórica. **I** e **II** apresentam a área de superfície polar topológica (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e o número de ligações giratórias ≤ 10 e, portanto, seguem as regras de Veber e tem grandes chances de ser usada por via oral. O Log S de **I** e **II** indicam que os compostos estão na faixa de transição entre moderadamente solúvel e pouco solúvel. Assim, a análise *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos de **I** e **II** suportam o potencial de ambos como candidatos a fármacos, pois apresentam parâmetros farmacocinéticos que sugerem boa absorção e biodistribuição *in vivo* e boa solubilidade, além de estarem de acordo com todas as regras propostas por Lipinski, Ghose, Veber e Egan.

Através dos compostos identificados, foi verificado que a planta acumula preferencialmente neolignanais e esteroides nos extratos em hexano. Tais informações constituem-se em importantes subsídios para estudos quimiosistemáticos e de atividade biológica. Além disso, com base nos resultados obtidos, os extratos das folhas e galhos, ricos em compostos da classe das neolignanais, fazem desta espécie uma fonte natural promissora para o estudo de outras atividades, como fúngica e bacteriana. As neolignanais **I** e **II** são compostos capazes de modular o processo inflamatório, alterando, inclusive, alguns componentes chave da angiogênese e do reparo tecidual, de modo a favorecer a resposta inflamatória.

REFERÊNCIAS

ABDULKHALEQ, L. A., ASSI, M. A., ABDULLAH, R., ZAMRI-SAAD, M., TAUFIQ-YAP, Y. H., HEZMEE, M. N. M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n°. 5, p. 627-635, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publ., 2007, Ed. 4°, p. 807.

AGGARWAL, B. B., SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n°. 10, p. 1397-1421, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.009>.

AGRAWAL, K. Doxorubicin in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Enna, S. J., Bylund, D. B. (Eds.). New York: Elsevier, 2007, ed., p. 1-5.

AHARONI, A., GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n°. 2, p. 239-244, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>.

AIN, Q., ASHIQ, U., JAMAL, R., SALEEM, M., MAHROOF-TAHIR, M. Alpha-Glucosidase and Carbonic Anhydrase Inhibition Studies of Pd(II)-Hydrazide Complexes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 488-499, 2017.

ALBARRACIN, L. T., DELGADO, W., CUCA, L., ÁVILA, M. Chemical constituents of the bark of *Endlicheria oreocola* (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 74, p. 60-62, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.09.003>.

ALFADDA, A. A., SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/936486>.

ALHUSBAN, A., FOUADA, A. Y., BINDU, P., ISHRAT, T., SOLIMAN, S., FAGAN, S. C. Compound 21 is pro-angiogenic in the brain and results in sustained recovery after ischemic stroke. **Journal of Hypertension**, v. 33, n°. 1, p. 170-180, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000000364>.

ALI, J., CAMILLERI, P., BROWN, M. B., HUTT, A. J., KIRTON, S. B. *In silico* prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: The importance of phenol and phenol-like moieties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n°. 11, p. 2950-2957, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/ci300447c>.

ALLOUCHE, A. R. Gabedit-a graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n°. 1, p. 174-182, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21600>.

ALMEIDA, M. M., CONCEICAO, R., REIS, I., SILVA, A., OLIVEIRA, J., BRANCO, A., COSTA, S., BOTURA, M. *In vitro* anticholinesterase and neurotoxicity activities of *Ocotea aciphylla* fractions. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, p. 448-452, 2018. DOI: https://doi.org/10.4103/pm.pm_366_17.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n°. 1, p. 9-14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.09.007>.

ANWAR, H., HUSSAIN, G., MUSTAFA, I. Antioxidants from natural sources in Antioxidants in Foods and Its Applications. SHALABY, E. (Eds.). London: IntechOpen, 2018, ed., p. 1-28.

ASRES, K., BUCAR, F. Anti-HIV activity against immunodeficiency virus type 1 (HIV-I) and type II (HIV-II) of compounds isolated from the stem bark of *Combretum molle*. **Ethiopian Medical Journal**, v. 43, n°. 1, p. 15-20, 2005.

- BADIMON, L., BORRELL, M. Microvasculature recovery by angiogenesis after myocardial infarction. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n°. 25, p. 2967-2973, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612824666180629162726>.
- BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of Wound Care**, v. 22, n°. 8, p. 407-408, 410-412, 2013. DOI: <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.8.407>.
- BALLABENI, V., TOGNOLINI, M., BERTONI, S., BRUNI, R., GUERRINI, A., RUEDA, G. M., BAROCELLI, E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, n°. 1, p. 23-30, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.09.009>.
- BALLABENI, V., TOGNOLINI, M., GIORGIO, C., BERTONI, S., BRUNI, R., BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *in vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, n°. 4, p. 289-295, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.002>.
- BAO, P., KODRA, A., TOMIC-CANIC, M., GOLINKO, M. S., EHRLICH, H. P., BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, n°. 2, p. 347-358, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- BATISTA, A. L., YOSHIDA, N. C., GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S. Chemical constituents from *Nectandra cuspidata* Nees – Lauraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 229-231, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.007>.
- BECK, H., PLATE, K. H. Angiogenesis after cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, v. 117, n°. 5, p. 481-496, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0483-6>.
- BELE, A. A., JADHAV, V. M., KADAM, V. J. Potential of tannins: A review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 209-214, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.209.214>.

- BIRARI, R. B., BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n°. 19-20, p. 879-889, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>.
- BROOK, K., BENNETT, J., DESAI, S. P. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. **Journal of Anesthesia History**, v. 3, n°. 2, p. 50-55, 2017. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.janh.2017.02.001>.
- BROTTO, M., SANTOS, E., BAITELLO, J. Lauraceae no Morro dos Perdidos (Floresta Atlântica), Paraná, Brasil. **Rodriguesia**, v. 60, p. 445-459, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860200960215>.
- BUCKLEY, M. R., EVANS, E. B., MATUSZEWSKI, P. E., CHEN, Y.-L., SATCHEL, L. N., ELLIOTT, D. M., SOSLOWSKY, L. J., DODGE, G. R. Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. **Connective Tissue Research**, v. 54, n°. 6, p. 374-379, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.847096>.
- CAIRNS, E. Obesity: The fat lady sings? **Drug Discovery Today**, v. 10, n°. 5, p. 305-307, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(05\)03375-1](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(05)03375-1).
- CAMPOS, P. P., ANDRADE, S. P., MORO, L., FERREIRA, M. A., VASCONCELOS, A. C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, v. 21, n°. 12, p. 1263-1270, 2006. DOI: <https://doi.org/10.14670/hh-21.1263>.
- CARDOSO-UGARTE, G. A., LÓPEZ-MALO, A., SOSA-MORALES, M. E. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils in Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. PREEDY, V. R. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2016, ed., p. 339-347.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n°. 6, p. 653-660, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>.
- CARR, A. C., ZHU, B. Z., FREI, B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). **Circulation research**, v. 87, n°. 5, p. 349-354, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.349>.
- CARVALHO, W. A., CARVALHO, R. D. S., RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxygenase-2: Avanços terapêuticos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 54, p. 448-464, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942004000300017>.

CASCORBI, I. Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, p. 546-556, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0546>.

CASSINI-VIEIRA, P., FELIPETTO, M., PRADO, L. B., VERANO-BRAGA, T., ANDRADE, S. P., SANTOS, R. A. S., TEIXEIRA, M. M., DE LIMA, M. E., PIMENTA, A. M. C., BARCELOS, L. S. Ts14 from *Tityus serrulatus* boosts angiogenesis and attenuates inflammation and collagen deposition in sponge-induced granulation tissue in mice. **Peptides**, v. 98, p. 63-69, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.10.002>.

CASTRO-LÓPEZ, C., BAUTISTA-HERNÁNDEZ, I., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D., MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G., ROJAS, R., GUTIÉRREZ-DÍEZ, A., MEDINA-HERRERA, N., AGUIRRE-ARZOLA, V. E. Polyphenolic profile and antioxidant activity of leaf purified hydroalcoholic extracts from seven Mexican *Persea americana* Cultivars. **Molecules**, v. 24, n°. 1, p. 1-18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24010173>.

CHANDERBALI, A. S. Endlicheria (Lauraceae). **Flora Neotropica**, v. 91, p. 1-141, 2004.

CHAPUT, J. P., ST-PIERRE, S., TREMBLAY, A. Currently available drugs for the treatment of obesity: Sibutramine and orlistat. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n°. 1, p. 3-10, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/138955707779317849>.

CHATTERJEE, S. Oxidative stress, inflammation, and disease in Oxidative stress and biomaterials. DZIUBLA, T., BUTTERFIELD, D. A. (Eds.). Cambridge: Academic Press, 2016, ed., p. 35-58.

CHATURVEDULA, V., PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, p. 239-242, 2012. DOI: 10.3329/icpj.v1i9.11613.

CHAUDHARY, K., MISHRA, N. A review on molecular docking: Novel tool for drug discovery. **JSM Chemistry**, v. 4, p. 1-4, 2016.

CHAUDHURI, J., BOSE, N., GONG, J., HALL, D., RIFKIND, A., BHAUMIK, D., PEIRIS, T. H., CHAMOLI, M., LE, C. H., LIU, J., LITHGOW, G. J., RAMANATHAN, A., XU, X. Z. S., KAPAHI, P. A caenorhabditis elegans model elucidates a conserved role for TRPA1-Nrf signaling in reactive α -dicarbonyl detoxification. **Current Biology**, v. 26, n°. 22, p. 3014-3025, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.024>.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: Uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Química Nova**, v. 20, p. 560-562, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500019>

CHEN, J. J., CHOU, E. T., PENG, C. F., CHEN, I. S., YANG, S. Z., HUANG, H. Y. Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. **Planta Medica**, v. 73, n°. 6, p. 567-571, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-967195>.

CHENG, Y., ZHU, Y., ZHANG, J., DUAN, X., ZHANG, Y. Large accumulation of collagen and increased activation of mast cells in hearts of mice with hyperlipidemia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, p. 404-409, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20170143>.

CHEYNIER, V. Polyphenols in food are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 223S-229S, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>.

CHIBA, S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n°. 8, p. 1233-1239, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>.

CHIEN, T. Y., CHEN, L. G., LEE, C. J., LEE, F. Y., WANG, C. C. Anti-inflammatory constituents of *Zingiber zerumbet*. **Food Chemistry**, v. 110, n°. 3, p. 584-589, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.038>.

CHINCHANSURE, A. A., KORWAR, A. M., KULKARNI, M. J., JOSHI, S. P. Recent development of plant products with anti-glycation activity: A review. **RSC Advances**, v. 5, n°. 39, p. 31113-31138, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA14211J>.

CHOI, H. G., CHOI, Y. H., KIM, J. H., KIM, H. H., KIM, S. H., KIM, J. A., LEE, S. M., NA, M., LEE, S. H. A new neolignan and lignans from the stems of *Lindera obtusiloba* Blume and their anti-allergic inflammatory effects. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n°. 4, p. 467-472, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0239-7>.

CHOUNA, J. R., NKENG-EFOUET, P. A., LENTA, B. N., WANSI, J. D., KIMBU, S. F., SEWALD, N. Endiandric acid derivatives from the stem bark of *Beilschmiedia anacardioides*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n°. 1, p. 13-16, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.10.005>.

CHRISTENSEN, R., KRISTENSEN, P. K., BARTELS, E. M., BLIDDAL, H., ASTRUP, A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: A meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 370, n°. 9600, p. 1706-1713, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61721-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61721-8).

CLISSOLD, S. P. Aspirin and related derivatives of salicylic acid. **Drugs**, v. 32 Suppl 4, p. 8-26, 1986. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-198600324-00003>.

COOK, N. C., SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n°. 2, p. 66-76, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9).

CORRÊA, M. F. P., MELO, G. O. D., COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785-797, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500025>.

COSTA-SILVA, T. A. D., GRECCO, S. S., DE SOUSA, F. S., LAGO, J. H., MARTINS, E. G., TERRAZAS, C. A., VARIKUTI, S., OWENS, K. L., BEVERLEY, S. M., SATOSKAR, A. R., TEMPONE, A. G. Immunomodulatory and antileishmanial activity of phenylpropanoid dimers isolated from *Nectandra leucantha*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n°. 4, p. 653-657, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/np500809a>.

COSTA, C., INCIO, J., SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: Cause or consequence? **Angiogenesis**, v. 10, n°. 3, p. 149-166, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9074-0>.

COSTA SILVA, T. D., JUSTINO, A. B., PRADO, D. G., KOCH, G. A., MARTINS, M. M., SANTOS, P. D. S., MORAIS, S. A. L. D., GOULART, L. R., CUNHA, L. C. S., SOUSA, R. M. F. D., ESPINDOLA, F. S., DE OLIVEIRA, A. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111641, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>.

COX, D. J., KOVATCHEV, B. P., GONDER-FREDERICK, L. A., SUMMERS, K. H., MCCALL, A., GRIMM, K. J., CLARKE, W. L. Relationships between hyperglycemia and cognitive performance among adults with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n°. 1, p. 71-77, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.71>.

CUSTÓDIO, D. L., JUNIOR, V. F. D. V. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, n°. 42, p. 21864-21890, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA01904K>.

DANGLES, O. Antioxidant activity of plant phenols: Chemical mechanisms and biological significance. **Current Organic Chemistry**, v. 16, p. 692-714, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/138527212799957995>.

DELEO, F. R., RENEE, J., MCCORMICK, S., NAKAMURA, M., APICELLA, M., WEISS, J. P., NAUSEEF, W. M. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n°. 2, p. 455-463, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI949>.

DESBOROUGH, M. J. R., KEELING, D. M. The aspirin story - from willow to wonder drug. **British Journal of Haematology**, v. 177, n°. 5, p. 674-683, 2017. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1111/bjh.14520>.

DIAS, D. A., URBAN, S., ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n°. 2, p. 303-336, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.

DIAZ, A. M. P. D., GOTTLIEB, H. E., GOTTLIEB, O. R. Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**, v. 19, n°. 4, p. 681-682, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87038-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87038-5).

DINICOLANTONIO, J. J., BHUTANI, J., O'KEEFE, J. H. Acarbose: Safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. **Open Heart**, v. 2, n°. 1, p. e000327-e000327, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000327>.

DISCOVERY (2017). STUDIO VISUALIZER. Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego. San Diego.

DOBROWOLSKA-IWANIEK, J., LAUTERBACH, R., HURAS, H., PAŠKO, P., PROCHOWNIK, E., WOŹNIAKIEWICZ, M., CHRZĄSZCZ, S., ZAGRODZKI, P. HPLC-DAD method for the quantitative determination of short-chain fatty acids in meconium samples. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104671, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104671>.

DOMICIANO, T. P., DALALIO, M. M., SILVA, E. L., RITTER, A. M., ESTEVÃO-SILVA, C. F., RAMOS, F. S., CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAN, R. K., BERSANI-AMADO, C.

- A. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n°. 4, p. 331-338, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0820-5>.
- DOOGUE, M. P., POLASEK, T. M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 4, n°. 1, p. 5-7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1177/2042098612469335>.
- DORRI, M., HASHEMITABAR, S., HOSSEINZADEH, H. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: A review. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n°. 3, p. 338-351, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1417995>.
- DUDONNÉ, S., VITRAC, X., COUTIÈRE, P., WOILLEZ, M., MÉRILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n°. 5, p. 1768-1774, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf803011r>.
- DUONG, T. T. T., DO, T. N. V., NGUYEN, H. X., LE, T. H., DANG, P. H., NGUYEN, N. T., NGUYEN, T. N. T., NGUYEN, T. D., NGUYEN, M. T. T. α -Glucosidase inhibitors from the stem of *Mangifera reba*. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n°. 23, p. 2280-2283, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.092>.
- ECK, P. Chapter 13 - Recombinant DNA Technologies in Food in *Biochemistry of Foods* (Third Edition). Eskin, N. A. M., Shahidi, F. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2013, ed., p. 503-556.
- EGAN, W. J., MERZ, K. M., JR., BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n°. 21, p. 3867-3877, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
- ELOSTA, A., GHOUS, T., AHMED, N. Natural products as anti-glycation agents: Possible therapeutic potential for diabetic complications. **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n°. 2, p. 92-108, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/157339912799424528>.
- ELTINK, M., TORRES, R. B., RAMOS, E. *Endlicheria paniculata* (Spreng.) J.F. Macbr. Guia de Árvores da Mata Atlântica, 2008. Disponível em:

<http://www.bdc.unicamp.com.br/gama/visualizarMaterial.php?idMaterial=555>. Acesso em: 20/11/2020.

ENGLISH, E., LENTERS-WESTRA, E. HbA1c method performance: The great success story of global standardization. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, n.º 6, p. 408-419, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1480591>.

FAN, L., LIAO, C.-H., LI, S.-G., HUANG, X.-J., HU, X.-P., SONG, X., FAN, C.-L., WANG, Y., YE, W.-C., KANG, Q.-R., ZHENG, K., LIU, L.-P., JIANG, Y.-C., FAN, X.-M., ZHANG, J., LI, Y., ZENG, Y., HE, Z.-D. Phenylethanoid and secoiridoid glycosides from the leaves of *Ligustrum purpurascens*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 177-181, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.06.011>.

FARBER, J. L. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 17-24, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1017>.

FENNER, R., BETTI, A. H., MENTZ, L. A., RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300007>

FERREIRA, B. A. (2016). Avaliação da atividade da Jararagina-C na resposta inflamatória induzida por implantes de esponja em camundongos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia.

FERREIRA, R. O. (2011). Contribuição ao estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola* (Clusiaceae). Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

FILHO, A. A., FERNANDES, H. M. B., ASSIS, T. J. C. F. Lauraceae's family: A brief review of cardiovascular effects. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, p. 22-26, 2015.

FILHO, A. C. M. L., SILVA, I. S., SOUSA, F. B. M., DE SOUZA, L. K. M., GOMES, B. D. S., GONÇALVES, R. L. G., DE REZENDE, D. C., CUNHA, F. V. M., WONG, D. V. T., JÚNIOR, R. C. P. L., MEDEIROS, J. V.-R., DE SOUSA, D. P., OLIVEIRA, F. D. A. Inhibition of neutrophil migration and reduction of oxidative stress by ethyl *p*-coumarate in acute and chronic inflammatory models. **Phytomedicine**, v. 57, p. 9-17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.034>.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n°. 6809, p. 239-247, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35041687>.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n°. 4, p. 273-286, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2115>.

FONT, M. A., ARBOIX, A., KRUPINSKI, J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. **Current Cardiology Reviews**, v. 6, n°. 3, p. 238-244, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340310791658802>.

FOURNET, A., FERREIRA, M. E., ROJAS DE ARIAS, A., GUY, I., GUINAUDEAU, H., HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, n°. 5, p. 382-384, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.003>.

FREITAS, L. D., VALLI, M., DAMETTO, A. C., PENNACCHI, P. C., ANDRICOPULO, A. D., MARIA-ENGLER, S. S., BOLZANI, V. S. Advanced glycation end product inhibition by alkaloids from *Ocotea paranapiacabensis* for the prevention of skin aging. **Journal of Natural Products**, v. 83, n°. 3, p. 649-656, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01083>.

GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, p. 433-441, 2002.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V., CRESPO, I., COLLADO, P. S., ESTELLER, A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN, M. J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in *Chang Liver* cells. **European journal of pharmacology**, v. 557, n°. 2-3, p. 221-229, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.014>.

GEORGE, P. M., WELLS, A. U. Contemporary concise review 2019: Interstitial lung disease. **Respirology**, v. 25, n°. 7, p. 756-763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/resp.13803>.

GHOSE, A. K., VISWANADHAN, V. N., WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. A

qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n^o. 1, p. 55-68, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.

GIEHL, E. L. H. Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, 2020. Disponível em: <http://floradigital.ufsc.br>. Acesso em: 20/11/2020.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n^o. 5, p. 1537-1570, 1972. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(72\)85001-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(72)85001-5).

GRAPHPAD (2016). PRISMA, Versão 7.00, La Jolla, California.

Griebel, T., Zeier, J. A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 63, n^o. 2, p. 254-268, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>.

GUERCIOLINI, R. Mode of action of orlistat. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 21, p. S12-S23, 1997.

GUL, A., RAHMAN, M. A., HASNAIN, S. N. Role of fructose concentration on cataractogenesis in senile diabetic and non-diabetic patients. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 247, n^o. 6, p. 809-814, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00417-008-1027-9>.

GUNATILAKA, A. L. Plant natural products in Natural products in chemical biology. CIVJAN, N. (Eds.). Hoboken: Wiley, 2012, ed., p. 3-29.

GUO, J.-Y., HUO, H.-R., ZHAO, B.-S., LIU, H.-B., LI, L.-F., MA, Y.-Y., GUO, S.-Y., JIANG, T.-L. Cinnamaldehyde reduces IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 537, n^o. 1, p. 174-180, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.002>.

GUPTA, N., GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00379-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00379-2).

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, n^o. 1, p. 1-32, 1990. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n°. 8924, p. 721-724, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92211-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92211-x).

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, n°. 2, p. 312-322, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>.

HÄMÄLÄINEN, M., NIEMINEN, R., VUORELA, P., HEINONEN, M., MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 2007, p. 45673, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1155/2007/45673>.

HAMIDPOUR, R., HAMIDPOUR, S., HAMIDPOUR, M., SHAHLARI, M. Camphor (*Cinnamomum camphora*), a traditional remedy with the history of treating several diseases. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 4, p. 1-4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5348/ijcri-2013-02-267-RA-1>.

HANCE, A. J., CRYSTAL, R. G. Rigid control of synthesis of collagen types I and III by cells in culture. **Nature**, v. 268, n°. 5616, p. 152-154, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1038/268152a0>.

HASAN, N., AHMAD, N., KHAN, Z., KHALID, M., AHMAD, Z., VARTIKA, S. Health benefits and pharmacology of *Persea americana* mill. (Avocado). **International Journal of Research in Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 5, p. 132-141, 2016.

HASSLER, M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World, 2020. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/733208033fd7da547464873ec3ac91cc>. Acesso em: 22/11/2020.

HEWLINGS, S. J., KALMAN, D. S. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n°. 10, p. 92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods6100092>.

HEWLINGS, S. J., KALMAN, D. S. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 6, n°. 10, p. 92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods6100092>.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T., LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. S206-S212, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572006000700011>.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

HUMPHREYS, B. D. Mechanisms of renal fibrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 80, p. 309-326, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034227>.

ITO, H., LI, P., KOREISHI, M., NAGATOMO, A., NISHIDA, N., YOSHIDA, T. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. **Food Chemistry**, v. 152, p. 323-330, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.160>.

JAMES, W. P., CATERSON, I. D., COUTINHO, W., FINER, N., VAN GAAL, L. F., MAGGIONI, A. P., TORP-PEDERSEN, C., SHARMA, A. M., SHEPHERD, G. M., RODE, R. A., RENZ, C. L. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n°. 10, p. 905-917, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003114>.

JIN, K.-S., LEE, J., KWON, H., KIM, B. Anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities of *Endlicheria Anomala* extract. **Korean Journal of Microbiology**, v. 41, p. 433-441, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4014/kjmb.1309.09005>.

JO, S., KIM, Y.-K., CHEON, S.-H., FAN, Q., KIM, K.-J. Characterization of 20 complete plastomes from the tribe Laureae (Lauraceae) and distribution of small inversions. **PLOS ONE**, v. 14, n°. 11, p. e0224622, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224622>.

JOSÉ, F. F. O papel dos anti-inflamatórios não hormonais no tratamento da dor musculoesquelética. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n°. 5, p. 24-26, 2014.

JOSHI, S. R., STANDL, E., TONG, N., SHAH, P., KALRA, S., RATHOD, R. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n°. 13, p. 1959-1981, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1070827>.

KANG, P., KIM, K., LEE, H., MIN, S. S., SEOL, G. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Life Sciences**, v. 93, p. 955–961, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.014>.

KANTHAM, S., CHAN, S., MCCOLL, G., MILES, J. A., VELIYATH, S. K., DEORA, G. S., DIGHE, S. N., KHABBAZI, S., PARAT, M.-O., ROSS, B. P. Effect of the Biphenyl Neolignan Honokiol on A β 42-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*, A β 42 Fibrillation, Cholinesterase Activity, DPPH Radicals, and Iron(II) Chelation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n $^{\circ}$. 9, p. 1901-1912, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00071>.

KAWANO, D. F., PEREIRA, L. R. L., UETA, J. M., FREITAS, O. D. Acidentes com os medicamentos: Como minimizá-los? **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 487-495, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000400003>.

KHANGHOLI, S., MAJID, F. A., BERWARY, N. J., AHMAD, F., AZIZ, R. B. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. **Planta Medica**, v. 82, n $^{\circ}$. 1-2, p. 32-45, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558086>.

KHANNA, C., ROSENBERG, M., VAIL, D. M. A Review of Paclitaxel and Novel Formulations Including Those Suitable for Use in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n $^{\circ}$. 4, p. 1006-1012, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.12596>.

KIM, H. S., SHARMA, A., REN, W. X., HAN, J., KIM, J. S. COX-2 Inhibition mediated anti-angiogenic activatable prodrug potentiates cancer therapy in preclinical models. **Biomaterials**, v. 185, p. 63-72, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.006>.

KRÄMER, S. D., WUNDERLI-ALLENSPACH, H. Physicochemical properties in pharmacokinetic lead optimization. **Farmaco**, v. 56, n $^{\circ}$. 1-2, p. 145-148, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01028-x](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01028-x).

KUMAR, V., ABBAS, A. K., ASTER, J. C. Robbins Patologia Básica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, Ed. 9 $^{\circ}$, p. 927.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n $^{\circ}$. 4, p. 969-978, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1).

LEE, G., WALSER, T. C., DUBINETT, S. M. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 15, n°. 4, p. 303-307, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32832c975a>.

LEE, S. H., LEE, S. Y., SON, D. J., LEE, H., YOO, H. S., SONG, S., OH, K. W., HAN, D. C., KWON, B. M., HONG, J. T. Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF-kappa B activation in RAW 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n°. 5, p. 791-799, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.11.013>.

LEI, X., HUANG, S., XIAO, H. U., GAO, F., ZHOU, X. A new taxane diterpenoid and a new neolignan from *Taxus baccata*. **Natural Product Communications**, v. 13, p. 1425 - 1428, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301103>.

LI, W., WEI, H., LI, H., GAO, J., FENG, S. S., GUO, Y. Cancer nanoimmunotherapy using advanced pharmaceutical nanotechnology. **Nanomedicine**, v. 9, n°. 16, p. 2587-2605, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm.14.127>.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition Reviews**, v. 65, n°. 12 Pt 2, p. S140-146, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>.

LÍBERO, I. C., OLIVEIRA, M. M. D., TRUITI, M. D. C. T. Investigação preliminar da capacidade antioxidante de *Endlicheria paniculata* (Spreng) J.F. Macbr. **XXV Encontro Anual de Inicia Científica e V Encontro Anual de Inicia Científica Júnior**, p. 1-4, 2016.

LIN, D., XIAO, M., ZHAO, J., LI, Z., XING, B., LI, X., KONG, M., LI, L., ZHANG, Q., LIU, Y., CHEN, H., QIN, W., WU, H., CHEN, S. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n°. 10, p. 1-19, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>.

LINSTROM, P. J., MALLARD, W. G. National Institute of Standards and Technology (NIST), 2021. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 07/08/2020.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n°. 1, p. 3-25, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).

- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n°. 3 Suppl, p. 517s-520s, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.517S>.
- LIU, Z., LU, H., LIU, R., CHEN, B., WANG, S., MA, J., FU, J. The dineolignan from *Saururus chinensis*, manassantin B, inhibits tumor-induced angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinases 9 in human endothelial cells. **Oncology Reports**, v. 32, n°. 2, p. 659-667, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2014.3244>.
- LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n°. 10, p. 5675-5691, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900302x>.
- LOPES, E. M. C., CARREIRA, R. C., AGRIPINO, D. G., TORRES, L. M. B., CORDEIRO, I., BOLZANI, V. D. S., DIETRICH, S. M. D. C., YOUNG, M. C. M. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest: Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 655-660, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500002>
- LOWE, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n°. 12, p. 2007-2016, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.r200012-jlr200>.
- MA, W. W., KOZLOWSKI, J. F., MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive neolignans from *Endlicheria dysodantha*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n°. 4, p. 1153-1158, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/np50076a045>.
- MACLEOD, J. The rôle of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v. 138, n°. 3, p. 512-518, 1943. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1943.138.3.512>.
- MAILLARD, L. C. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoides par voie méthodique. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 154, p. 66-68, 1912.
- MAQUART, F. X., MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie**, v. 62, n°. 2, p. 91-95, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.02.007>.
- Marcos, C., Sousa, M., Rocha, H., Vieira Júnior, G. M., Cruz, M., Ayres, C., Costa, C., Costa, D., Araújo, L., Carlos, D., Cavalcante, L., Elcio, D., Barros, P., Breitner, De Araújo, M., Brandão, M., Helena, C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.

Química Nova, v. 30, p. 351-355, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G., SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-9, 1998.

MARKUS, G., HERMANN, S. Evaporative Light Scattering Detection (ELSD) for the Analysis of Natural Products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n.º. 2, p. 135-144, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1573412054022699>.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.º. 1, p. 195-206, 2001.

MARQUES, S. M., CAMPOS, P. P., CASTRO, P. R., CARDOSO, C. C., FERREIRA, M. A., ANDRADE, S. P. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 82, n.º. 3, p. 246-252, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.08.011>.

MARTIN, Y. C. A bioavailability score. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n.º. 9, p. 3164-3170, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm0492002>.

MARTINS, C. M. (2012). Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau-santo) do Cerrado. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia.

MCGHIE, T. K., WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n.º. 6, p. 702-713, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700092>.

MELLO-SILVA, R., CASSANO, V., PIRANI, J. R., JONO, V., LOHMANN, L. G., FIGUEIREDO, R. R. D. SPF herbarium, 2020. Disponível em: http://ipt.jbrj.gov.br/reflora/resource?r=spf_herbarium&v=1.188. Acesso em: 23 de Julho de 2020.

MENDES, R. T., STANCZYK, C. P., SORDI, R., OTUKI, M. F., SANTOS, F. A. D., FERNANDES, D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n.º. 5, p. 774-782, 2012.

MINER, J., HOFFHINES, A. The discovery of aspirin's antithrombotic effects. **Texas Heart Institute journal**, v. 34, n.º. 2, p. 179-186, 2007.

MIZUTANI, K., IKEDA, K., YAMORI, Y. Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n° 1, p. 61-67, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3097>.

MOHMMAD ABDUL, H., BUTTERFIELD, D. A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and α -lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n° 3, p. 371-384, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.006>.

MOKDAD, A. H., MARKS, J. S., STROUP, D. F., GERBERDING, J. L. Actual causes of death in the United States, 2000. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, n° 10, p. 1238-1245, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.291.10.1238>.

MOMIN, R. A., DE WITT, D. L., NAIR, M. G. Inhibition of cyclooxygenase (COX) enzymes by compounds from *Daucus carota* L. Seeds. **Phytotherapy Research**, v. 17, n° 8, p. 976-979, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1296>.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n° 1, p. 1-15, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.014>.

MORAIS, S. A. L. D., AQUINO, F. J. T. D., NASCIMENTO, E. A. D., OLIVEIRA, G. S. D., CHANG, R., SANTOS, N. C. D., ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Journal of Food Science and Technology**, v. 28, p. 198-207, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500031>.

Moreau, R. A., Whitaker, B. D., Hicks, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in lipid research**, v. 41, n° 6, p. 457-500, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00006-1).

MOREIRA, I., SCHEEL, G. L., HATUMURA, P. H., SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. **Química Nova**, v. 37, p. 39-43, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100008>

- MORENO, D. A., ILIC, N., POULEV, A., BRASAEMLE, D. L., FRIED, S. K., RASKIN, I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. **Nutrition**, v. 19, n°. 10, p. 876-879, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(03\)00167-9](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(03)00167-9).
- MORENO, D. A., ILIC, N., POULEV, A., RASKIN, I. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. **Life Sciences**, v. 78, n°. 24, p. 2797-2803, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.012>.
- MORIMITSU, Y., YOSHIDA, K., ESAKI, S., HIROTA, A. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n°. 11, p. 2018-2021, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.59.2018>.
- MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S., OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n°. 16, p. 2785-2791, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- MOURA, A., VILEGA, W., SANTOS, L. Identification of some chemical constituents of *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) by HPLC-ESI-MS (TOF) and evaluation of the antiradical activity. **Química Nova**, v. 34, p. 1136-1140, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700006>.
- MOURA, S. A. L. D., NEGRI, G., SALATINO, A., LIMA, L. D. D. C., DOURADO, L. P. A., MENDES, J. B., ANDRADE, S. P., FERREIRA, M. A. N. D., CARA, D. C. Aqueous extract of *Brazilian Green* propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep112>.
- MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi**, v. 24, n°. 3, p. 69-71, 2012.
- NAKATA, B., ISHIKAWA, T., AMANO, R., KIMURA, K., HIRAKAWA, K. Impact of preoperative diabetes mellitus on clinical outcome after pancreatectomy. **International Journal of Surgery**, v. 11, n°. 9, p. 757-761, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2013.07.008>.
- NATHAN, D. M., CLEARY, P. A., BACKLUND, J. Y., GENUTH, S. M., LACHIN, J. M., ORCHARD, T. J., RASKIN, P., ZINMAN, B. Intensive diabetes treatment and

cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n°. 25, p. 2643-2653, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052187>.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n°. 5, p. 715-731, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1517/17425255.2.5.715>.

NÈGRE-SALVAYRE, A., SALVAYRE, R., AUGÉ, N., PAMPLONA, R., PORTERO-OTIN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 3071-3109, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2484>.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n°. 3, p. 770-803, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NG, M., FLEMING, T., ROBINSON, M., THOMSON, B., GRAETZ, N., MARGONO, C., MULLANY, E. C., BIRYUKOV, S., ABBAFATI, C., ABERA, S. F., ABRAHAM, J. P., ABU-RMEILEH, N. M., ACHOKI, T., ALBUHAIRAN, F. S., ALEMU, Z. A., ALFONSO, R., ALI, M. K., ALI, R., GUZMAN, N. A., AMMAR, W., ANWARI, P., BANERJEE, A., BARQUERA, S., BASU, S., BENNETT, D. A., BHUTTA, Z., BLORE, J., CABRAL, N., NONATO, I. C., CHANG, J. C., CHOWDHURY, R., COURVILLE, K. J., CRIQUI, M. H., CUNDIFF, D. K., DABHADKAR, K. C., DANDONA, L., DAVIS, A., DAYAMA, A., DHARMARATNE, S. D., DING, E. L., DURRANI, A. M., ESTEGHAMATI, A., FARZADFAR, F., FAY, D. F., FEIGIN, V. L., FLAXMAN, A., FOROUZANFAR, M. H., GOTO, A., GREEN, M. A., GUPTA, R., HAFEZI-NEJAD, N., HANKEY, G. J., HAREWOOD, H. C., HAVMOELLER, R., HAY, S., HERNANDEZ, L., HUSSEINI, A., IDRISOV, B. T., IKEDA, N., ISLAMI, F., JAHANGIR, E., JASSAL, S. K., JEE, S. H., JEFFREYS, M., JONAS, J. B., KABAGAMBE, E. K., KHALIFA, S. E., KENGNE, A. P., KHADER, Y. S., KHANG, Y. H., KIM, D., KIMOKOTI, R. W., KINGE, J. M., KOKUBO, Y., KOSEN, S., KWAN, G., LAI, T., LEINSALU, M., LI, Y., LIANG, X., LIU, S., LOGROSCINO, G., LOTUFO, P. A., LU, Y., MA, J., MAINOO, N. K., MENSAH, G. A., MERRIMAN, T. R., MOKDAD, A. H., MOSCHANDREAS, J., NAGHAVI, M., NAHEED, A., NAND, D., NARAYAN, K. M., NELSON, E. L., NEUHOUSER, M. L., NISAR, M. I., OHKUBO, T., OTI, S. O., PEDROZA, A., PRABHAKARAN, D., ROY, N., SAMPSON, U., SEO, H., SEPANLOU, S. G., SHIBUYA, K., SHIRI, R., SHIUE, I., SINGH, G. M., SINGH, J. A., SKIRBEKK, V., STAPELBERG, N. J., STURUA, L., SYKES, B. L., TOBIAS, M.,

TRAN, B. X., TRASANDE, L., TOYOSHIMA, H., VAN DE VIJVER, S., VASANKARI, T. J., VEERMAN, J. L., VELASQUEZ-MELENDZ, G., VLASSOV, V. V., VOLLSET, S. E., VOS, T., WANG, C., WANG, X., WEIDERPASS, E., WERDECKER, A., WRIGHT, J. L., YANG, Y. C., YATSUYA, H., YOON, J., YOON, S. J., ZHAO, Y., ZHOU, M., ZHU, S., LOPEZ, A. D., MURRAY, C. J., GAKIDOU, E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n°. 9945, p. 766-781, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60460-8).

NIE, H., GUAN, X.-L., LI, J., ZHANG, Y.-J., HE, R.-J., HUANG, Y., LIU, B.-M., ZHOU, D.-X., DENG, S.-P., CHEN, H.-C., YANG, R.-Y., LI, J. Antimicrobial lignans derived from the roots of *Streblus asper*. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 226-231, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.10.022>.

NISOLI, E., CARRUBA, M. O. A benefit-risk assessment of sibutramine in the management of obesity. **Drug Safety**, v. 26, n°. 14, p. 1027-1048, 2003. DOI: <https://doi.org/10.2165/00002018-200326140-00004>.

NOSE, K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n°. 8, p. 897-903, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.23.897>.

NYIGO, V., PETER, X., MABIKI, F., MALEBO, H., MDEGELA, R., FOCHE, G. Isolation and identification of euphol and β -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 5, p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, A. (2008). Avaliação do potencial biológico de piperolídeos naturais de *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. e de análogos sintéticos. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Uberlândia.

OLIVEIRA, A. C. D., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, A. R. M. D., SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, p. 1971-1974, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700048>.

OLIVEIRA, H. V. *Systema de materia medica vegetal*. Rio de Janeiro: Eduardo e Henrique Laemmert, 1854, p. 284.

OLIVEIRA, P. F. D., DAMASCENO, J. L., BERTANHA, C. S., ARAÚJO, A. R. B., PAULETTI, P. M., TAVARES, D. C. Study of the cytotoxic activity of *Styrax camporum* extract and its chemical markers, egonol and homoegonol. **Cytotechnology**, v. 68, n°. 4, p. 1597-1602, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9864-y>.

OMS. Obesity and overweight, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 24/07/2020.

OMS. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2021. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 09/05/2021.

OSUNDIJI, M. A., EVANS, M. L. Hypothalamic glucose sensing and glycaemic disease. **Current diabetes reviews**, v. 7, n°. 2, p. 84-98, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/157339911794940701>.

PAGARE, S., BHATIA, M., TRIPATHI, N., BANSAL, Y. K. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, p. 293-304, 2015.

PANCHE, A. N., DIWAN, A. D., CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47-e47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

PANDYA, N. M., DHALLA, N. S., SANTANI, D. D. Angiogenesis - A new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**, v. 44, n°. 5, p. 265-274, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.01.005>.

PANKEY, G. A., SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n°. 6, p. 864-870, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1086/381972>.

PARK, J.-Y., HWAN LIM, S., RAM KIM, B., JAE JEONG, H., KWON, H.-J., SONG, G.-Y., BAE RYU, Y., SONG LEE, W. Sialidase inhibitory activity of diarylnonanoid and neolignan compounds extracted from the seeds of *Myristica fragrans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n°. 14, p. 3060-3064, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.055>.

PÉPIN, N.-E.-A. Phytochemicals from *Beilschmiedia anacardioides* and their biological significance in Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health RAO, V. (Eds.). Rijeka, Croatia: InTech, 2012, ed., p. 538.

PÉREZ, J. A. M., AGUILAR, T. A. F. Chemistry of natural antioxidants and studies performed with different plants collected in Mexico in Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants. MORALES-GONZÁLEZ, J. A. (Eds.). Rijeka: InTech, 2013, ed., p. 59-85.

PEYROUX, J., STERNBERG, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. **Pathologie Biologie**, v. 54, n°. 7, p. 405-419, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.006>.

PHILLIPS, C. L., PFEIFFER, B. J., LUGER, A. M., FRANKLIN, C. L. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney International**, v. 62, n°. 2, p. 383-391, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00451.x>.

POTT, D. M., OSORIO, S., VALLARINO, J. G. From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 835-835, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>.

POULSEN, H. E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n°. 1, p. 9-16, 1998.

PRAMOD, K., ANSARI, S. H., ALI, J. Eugenol: A natural compound with versatile pharmacological actions. **Natural Product Communications**, v. 5, n°. 12, p. 1999-2006, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501236>.

PULIVENDALA, G., BALE, S., GODUGU, C. Honokiol: A polyphenol neolignan ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling, matrix proteins and IL-6/CD44/STAT3 axis both *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 391, p. 1-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114913>.

PULVIRENTI, L., MUCCILLI, V., CARDULLO, N., SPATAFORA, C., TRINGALI, C. Chemoenzymatic synthesis and α -Glucosidase inhibitory activity of dimeric neolignans inspired by magnolol. **Journal of Natural Products**, v. 80, n°. 5, p. 1648-1657, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00250>.

- QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n°. 3, p. 586-621, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
- RAHMAN, I., BISWAS, S. K., KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n°. 11, p. 1439-1452, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.004>.
- RAJABI, M., MOUSA, S. A. The role of angiogenesis in cancer treatment. **Biomedicines**, v. 5, n°. 2, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020034>.
- RANASINGHE, P., PIGERA, S., PREMAKUMARA, G. A. S., GALAPPATHTHY, P., CONSTANTINE, G. R., KATULANDA, P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 13, p. 275-275, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-275>.
- RIPPERT, P., MATRINGE, M. Molecular and biochemical characterization of an *Arabidopsis thaliana* arogenate dehydrogenase with two highly similar and active protein domains. **Plant molecular biology**, v. 48, n°. 4, p. 361-368, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1014018926676>.
- RODRÍGUEZ, M., HASEGAWA, M., GONZÁLEZ-MÚJICA, F., MOTTA, N., CASTILLO, A., CASTILLO, J., ZEA, E., MORA, K., SOUSA, L., GONZÁLEZ, A., CAMEJO, D. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 331-338, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300004>.
- ROTTINI, M. M., AMARAL, A. C. F., FERREIRA, J. L. P., OLIVEIRA, E. S. C., SILVA, J. R. A., TANIWAKI, N. N., DOS SANTOS, A. R., ALMEIDA-SOUZA, F., DE SOUZA, C., CALABRESE, K. D. S. *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) Essential oil as a weapon against *Leishmania amazonensis*: *In vitro* assay. **Molecules**, v. 24, n°. 14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24142525>.
- SAFFIOTI, F., PINZANI, M. Development and regression of cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 34, n°. 4, p. 374-381, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000444550>.
- SALAHUDDIN, P., RABBANI, G., KHAN, R. H. The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: A therapeutic approach. **Cellular &**

Molecular Biology Letters, v. 19, n°. 3, p. 407-437, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.2478/s11658-014-0205-5>.

SALLEH, W. M. N. H. W., FAREDAH, A., KHONG, H. Y. Chemical compositions and biological activities of the essential oils of *Beilschmiedia madang* Blume (Lauraceae).

Archives of Pharmacal Research, v. 38, p. 485-493, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s12272-014-0460-z>

SAMUELSSON, G., FARAH, M. H., CLAESON, P., HAGOS, M., THULIN, M., HEDBERG, O., WARFA, A. M., HASSAN, A. O., ELMI, A. H., ABDURAHMAN, A. D., ELMI, A. S., ABDI, Y. A., ALIN, M. H. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia. III. Plants of the families Lauraceae-Papilionaceae. **Journal of**

ethnopharmacology, v. 37, n°. 2, p. 93-112, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90068-3).

SÁNCHEZ-PÉREZ, A., DELGADO-ZAMARREÑO, M. M., BUSTAMANTE-RANGEL, M., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection.

Journal of chromatography. A, v. 881, n°. 1-2, p. 229-241, 2000. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00314-9).

SANNER, M. F. Python: A programming language for software integration and development.

Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 17, n°. 1, p. 57-61, 1999.

SARTORELLI, P. (2000). Biossíntese de neolignanas benzofurânicas em *Piper regnellii* (Piperaceae). Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: A review.

Animal Feed Science and Technology, v. 91, n°. 1, p. 21-40, 2001. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0).

SCOTTI, L., BALLERINI FERNANDES, M., MURAMATSU, E., EMERECIANO, V., TAVARES, J., SILVA, M., SCOTTI, M. ¹³C NMR spectral data and molecular descriptors to predict the antioxidant activity of flavonoids. **Brazilian Journal of Pharmaceutical**

Sciences, v. 47, p. 241-249, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000200005>.

SEYEDAN, A., ALSHAWSH, M. A., ALSHAGGA, M. A., KOOSHA, S., MOHAMED, Z.

Medicinal plants and their inhibitory activities against pancreatic lipase: A review. **Evidence-**

based Complementary and Alternative Medicine, v. 2015, p. 1-13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/973143>.

SHAIKH, S., NICHOLSON, L. F. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n°. 9, p. 2071-2082, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.21644>.

SHAN, X., LIU, X., HAO, J., CAI, C., FAN, F., DUN, Y., ZHAO, X., LIU, X., LI, C., YU, G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249-255, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>.

Shara, M., Ohia, S. E., Schmidt, R. E., Yasmin, T., Zardetto-Smith, A., Kincaid, A., Bagchi, M., Chatterjee, A., Bagchi, D., Stohs, S. J. Physico-chemical properties of a novel (-)-hydroxycitric acid extract and its effect on body weight, selected organ weights, hepatic lipid peroxidation and DNA fragmentation, hematology and clinical chemistry, and histopathological changes over a period of 90 days. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n°. 1-2, p. 171-186, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000026069.53960.75>.

SHARMA, A., WEBER, D., RAUPBACH, J., DAKAL, T. C., FLIEBBACH, K., RAMIREZ, A., GRUNE, T., WÜLLNER, U. Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. **Redox Biology**, v. 34, p. 1-6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101546>.

SHARMA, H. S., PATNAIK, R., RAY, A. K., DEY, P. K. 16 - Blood-Central Nervous System Barriers in Morphine Dependence and Withdrawal in Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease. Sharma, H. S., Westman, J. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2004, ed., p. 299-328.

SHIN, D.-S., KIM, K., CHUNG, H.-Y., YOON, S., MOON, J.-O. Effect of sinapic acid against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 608-618, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0033-6>.

SIB, S. I. o. B. SwissADME, 2021. Disponível em: <http://www.swissadme.ch/>. Acesso em: 14/03/2020.

SILVA, A., PEZENTI, L., ABEL, M., YUNES, R. Antioxidant activity and quantification of phenols, flavonoids and total tannins of *Cinnamomum triplinerve* (Lauraceae). **Ciência e Natura**, v. 41, p. e34, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5902/2179460X35292>.

SILVA, C. S., PORTARI, G. V., VANNUCCHI, H. Antioxidant treatment and alcoholism in Molecular aspects of alcohol and nutrition. PATEL, V. B. (Eds.). San Diego: Academic Press, 2016, ed., p. 119-131.

SILVA, D. N. Cinco doenças que marcaram a história da humanidade, 2021. Disponível em: <https://www.historiadomundo.com.br/curiosidades/cinco-doencas-que-marcaram-a-historia-da-humanidade.htm>. Acesso em: 03/03/2021.

SILVA, J. K. D., DA TRINDADE, R. C., MAIA, J. G., SETZER, W. N. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oils of *Endlicheria arenosa* (Lauraceae) from the Amazon. **Natural Product Communications**, v. 11, n°. 5, p. 695-698, 2016.

SILVA, R. A., CARMONA-RIBEIRO, A. M., PETRI, D. F. S. Catalytic behavior of lipase immobilized onto congo red and PEG-decorated particles. **Molecules**, v. 19, n°. 6, p. 8610-8628, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19068610>.

SILVESTRE, J. S. Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases. **Thrombosis Research**, v. 130 Suppl 1, p. S90-94, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.08.287>.

SIMM, A., WAGNER, J., GURSINSKY, T., NASS, N., FRIEDRICH, I., SCHINZEL, R., CZESLIK, E., SILBER, R. E., SCHEUBEL, R. J. Advanced glycation endproducts: A biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? **Experimental Gerontology**, v. 42, n°. 7, p. 668-675, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.03.006>.

SIMOES, C. M. O. S., E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, Ed. 2°, p. 486.

SIMPSON, D., NOBLE, S. Tacrolimus ointment: a review of its use in atopic dermatitis and its clinical potential in other inflammatory skin conditions. **Drugs**, v. 65, n°. 6, p. 827-858, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-200565060-00011>.

SINGH, P., JAYARAMAIAH, R. H., AGAWANE, S. B., VANNURUSWAMY, G., KORWAR, A. M., ANAND, A., DHAYGUDE, V. S., SHAIKH, M. L., JOSHI, R. S., BOPANA, R., KULKARNI, M. J., THULASIRAM, H. V., GIRI, A. P. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. **Scientific Reports**, v. 6, n°. 1, p. 1-13, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1038/srep18798>.

SINGH, R., BARDEN, A., MORI, T., BEILIN, L. Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, p. 129-146, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001250051591>.

SKYTTE, D. M., FRYDENVANG, K., HANSEN, L., NIELSEN, P. G., JAROSZEWSKI, J. W. Synthesis and characterization of an epimer of tacrolimus, an immunosuppressive drug. **Journal of Natural Products**, v. 73, n°. 4, p. 776-779, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1021/np9007975>.

SNEADER, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. **British Medical Journal**, v. 321, n°. 7276, p. 1591-1594, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7276.1591>.

SOLECKI, R. S. Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, v. 190, n°. 4217, p. 880, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.190.4217.880>.

SOUSA, F. S. D., GRECCO, S. S., GIROLA, N., AZEVEDO, R. A., FIGUEIREDO, C. R., LAGO, J. H. G. Neolignans isolated from *Nectandra leucantha* induce apoptosis in melanoma cells by disturbance in mitochondrial integrity and redox homeostasis. **Phytochemistry**, v. 140, p. 108-117, 2017. DOI: [10.1016/j.phytochem.2017.04.024](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.024).

SOUSA, R. M. F. D. (2015). Estudo químico de *Eugenia calycina* cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfaamilase. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Uberlândia.

SOUZA, R. A. C., FERREIRA, B. A., MOURA, F. B. R. D., COSTA SILVA, T. D., CAVALCANTI, F., FRANCA, E. D. F., SOUSA, R. M. F. D., FEBRONIO, J. D. L., LAGO, J. H. G., ARAÚJO, F. D. A., DE OLIVEIRA, A. Dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104767, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104767>.

- SOUZA, S. P., PEREIRA, L. L. S., SOUZA, A. A., SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 643-648, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400011>.
- SOUZA, S. P. D., PEREIRA, L. L. S., SOUZA, A. A., SANTOS, C. D. D. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae: Evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 450-455, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000049>
- SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: EDITORA PLANTARUM, 2019, 1, Ed. 4º, p.
- SRI HARSHA, P. S. C., LAVELLI, V., SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chemistry**, v. 156, p. 220-226, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.104>.
- SRIGHT, J. L. C., MCINNES, A. G., SHIMIZU, S., SMITH, D. G., WALTER, J. A., IDLER, D., KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 56, nº. 14, p. 1898-1903, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1139/v78-308>.
- SRIKANTH, V., MACZUREK, A., PHAN, T., STEELE, M., WESTCOTT, B., JUSKIW, D., MÜNCH, G. Advanced glycation end products and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 32, nº. 5, p. 763-777, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016>.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, nº. 12, p. 1173-1213, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>.
- SUAREZ, M., BONILLA, J., DE DIAZ, A. M. P., ACHENBACH, H. Dehydrodieugenols from *Nectandra polita*. **Phytochemistry**, v. 22, nº. 2, p. 609-610, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)83066-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83066-0).
- SULAIMAN, S. N., ZAHARI, A., LIEW, S. Y., LITAUDON, M., ISSAM, A. M., WAHAB, H. A., AWANG, K. Pahangine A and B, two new oxetane containing neolignans from the

barks of *Beilschmiedia glabra* Kosterm (Lauraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 25, p. 22-26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.03.008>.

TAFURT-GARCÍA, G., JIMÉNEZ-VIDAL, L. F., CALVO-SALAMANCA, A. M. Antioxidant capacity and total phenol content of *Hyptis spp.*, *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia* and *Ocotea sp.* **Revista Colombiana de Química**, v. 44, p. 28-33, 2015. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n2.55217>.

TAHERGORABI, Z., KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n°. 6, p. 1110-1126, 2012.

TAN, B. L., NORHAIZAN, M. E., LIEW, W.-P.-P., SULAIMAN RAHMAN, H. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in Age-related diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1162-1162, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>.

TAN, S. Y., MEI WONG, J. L., SIM, Y. J., WONG, S. S., MOHAMED ELHASSAN, S. A., TAN, S. H., LING LIM, G. P., RONG TAY, N. W., ANNAN, N. C., BHATTAMISRA, S. K., CANDASAMY, M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 13, n°. 1, p. 364-372, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>.

TANG, Y., CHEN, A. Curcumin eliminates the effect of advanced glycation end products (AGEs) on the divergent regulation of gene expression of receptors of AGEs by interrupting leptin signaling. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 94, n°. 5, p. 503-516, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.42>.

TAPIA-TORRES, N. A., PAZ-PÉREZ-OLVERA, C. D. L., ROMÁN-GUERRERO, A., QUINTANAR-ISAIÁS, A., GARCÍA-MÁRQUEZ, E., CRUZ-SOSA, F. Histochemistry, total phenolic content and antioxidant activity in leaf and wood of *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). **Madera bosques**, v. 20, p. 125-137, 2014.

TEDESCO, D., HARAGSIM, L. Cyclosporine: A Review. **Journal of Transplantation**, v. 2012, p. 230386, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/230386>.

TEIXEIRA, T. L., MACHADO, F. C., ALVES DA SILVA, A., TEIXEIRA, S. C., BORGES, B. C., DOS SANTOS, M. A., MARTINS, F. A., BRÍGIDO, P. C., RODRIGUES, A. A., NOTÁRIO, A. F., FERREIRA, B. A., SERVATO, J. P., DECONTE, S. R., LOPES, D. S., ÁVILA, V. M., ARAÚJO FDE, A., TOMIOSSO, T. C., SILVA, M. J., DA SILVA, C. V.

Trypanosoma cruzi P21: A potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy.

Scientific Reports, v. 5, p. 1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep16877>.

TEPONNO, R. B., KUSARI, S., SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v. 33, n°. 9, p. 1044-1092, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1039/c6np00021e>.

THOMSEN, R., CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n°. 11, p. 3315-3321, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1021/jm051197e>.

THORNALLEY, P. J., LANGBORG, A., MINHAS, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochemical Journal**, v. 344 Pt 1, n°. Pt 1, p. 109-116, 1999.

TOMA, A., MAKONNEN, E., MEKONNEN, Y., DEBELLA, A., ADISKWAATTANA, S. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>.

TONNESEN, M. G., FENG, X., CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings** v. 5, n°. 1, p. 40-46, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x>.

TOOMEY, D. P., MURPHY, J. F., CONLON, K. C. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. **The Surgeon**, v. 7, n°. 3, p. 174-180, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1479-666X\(09\)80042-5](https://doi.org/10.1016/S1479-666X(09)80042-5).

TORSSELL, K. B. G. Natural product chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach. Apotekarsocieteten, 1997, Ed. 2°, p. 480.

UNASUS. Fitoterapia e plantas medicinais, 2021. Disponível em:

http://production.latec.ufms.br/modulos/pcfa201802/u1_3.html#:~:text=Os%20primeiros%20registros%20de%20fitoter%C3%A1picos,FRAN%C3%87A%20et%20al%2C%202008).

Acesso em: 17 de janeiro de 2021.

URIOS, P., GRIGOROVA-BORSOS, A. M., STERNBERG, M. Aspirin inhibits the formation of pentosidine, a cross-linking advanced glycation end product, in collagen.

Diabetes Research and Clinical Practice, v. 77, n°. 2, p. 337-340, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.12.024>.

URQUIAGA, I., LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological research**, v. 33, n°. 2, p. 55-64, 2000. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0716-97602000000200004>.

VALENTOVIC, M. Lovastatin in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Enna, S. J., Bylund, D. B. (Eds.). New York: Elsevier, 2007, ed., p. 1-5.

VANDENDOOL, H., KRATZ, P. D. A GENERALIZATION OF THE RETENTION INDEX SYSTEM INCLUDING LINEAR TEMPERATURE PROGRAMMED GAS-LIQUID PARTITION CHROMATOGRAPHY. **Journal of chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x).

VARANI, J., DAME, M. K., RITTIE, L., FLIGIEL, S. E. G., KANG, S., FISHER, G. J., VOORHEES, J. J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n°. 6, p. 1861-1868, 2006. DOI: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051302>.

VEBER, D. F., JOHNSON, S. R., CHENG, H.-Y., SMITH, B. R., WARD, K. W., KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n°. 12, p. 2615-2623, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.

VERVOORT, N., DAEMEN, D., TÖRÖK, G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n°. 1, p. 92-100, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.111>.

VERZELLONI, E., TAGLIAZUCCHI, D., DEL RIO, D., CALANI, L., CONTE, A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1430-1435, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.103>.

VIALARD, C., LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n°. 4, p. 409-426, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.

WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer, 1996, Ed. 2^o, p. 384.

WANG, H., ZHAO, X., WANG, S., TAO, S., AI, N., WANG, Y. Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1392, p. 20-27, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.002>.

WANG, J., SU, B., JIANG, H., CUI, N., YU, Z., YANG, Y., SUN, Y. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104675, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104675>.

WANG, Y., LI, J., MA, H. R., NUMONOV, S. R., AISA, H. A. New Neolignan from *Lycium barbarum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n^o. 3, p. 396-398, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1657-9>.

WARD, P. A. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. **he European respiratory journal. Supplement**, v. 44, p. 22s-23s, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00000703a>.

WEISKIRCHEN, R., WEISKIRCHEN, S., TACKE, F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, p. 2-15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.003>.

WHITLOCK, G., LEWINGTON, S., SHERLIKER, P., CLARKE, R., EMBERSON, J., HALSEY, J., QIZILBASH, N., COLLINS, R., PETO, R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet**, v. 373, n^o. 9669, p. 1083-1096, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)60318-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60318-4).

WICK, G., GRUNDTMAN, C., MAYERL, C., WIMPISSINGER, T. F., FEICHTINGER, J., ZELGER, B., SGONC, R., WOLFRAM, D. The immunology of fibrosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 107-135, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095937>.

WISHART, D. S., KNOX, C., GUO, A. C., EISNER, R., YOUNG, N., GAUTAM, B., HAU, D. D., PSYCHOGIOS, N., DONG, E., BOUATRA, S., MANDAL, R., SINELNIKOV, I., XIA, J., JIA, L., CRUZ, J. A., LIM, E., SOBSEY, C. A., SHRIVASTAVA, S., HUANG, P., LIU, P., FANG, L., PENG, J., FRADETTE, R., CHENG, D., TZUR, D., CLEMENTS, M.,

- LEWIS, A., DE SOUZA, A., ZUNIGA, A., DAWE, M., XIONG, Y., CLIVE, D., GREINER, R., NAZYROVA, A., SHAYKHUTDINOV, R., LI, L., VOGEL, H. J., FORSYTHE, I. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n°. Database issue, p. D603-D610, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn810>.
- WRIGHT, E., JR., SCISM-BACON, J. L., GLASS, L. C. Oxidative stress in type 2 diabetes: The role of fasting and postprandial glycaemia. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n°. 3, p. 308-314, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2006.00825.x>.
- WU, X., HE, W., ZHANG, H., LI, Y., LIU, Z., HE, Z. Acteoside: a lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. **Food chemistry**, v. 142, p. 306-310, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.071>.
- YAMAGUCHI, K. K. L., VEIGA-JUNIOR, V. F., PEDROSA, T. D. N., VASCONCELLOS, M. C. D., LIMA, E. S. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v. 36, p. 826-830, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600015>
- YAN, S. F., D'AGATI, V., SCHMIDT, A. M., RAMASAMY, R. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): A formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n°. 8, p. 699-710, 2007.
- YANG, B., XU, Y., YU, S., HUANG, Y., LU, L., LIANG, X. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effect of magnolol in the oxygen-induced retinopathy model. **Journal of Inflammation Research**, v. 65, n°. 1, p. 81-93, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0894-x>.
- YANG, Y., QIN, Y., MENG, Y., XIA, C., GAO, X., HU, Q. 8-O-4'-Neolignans from the Stem Bark of *Illicium difengpi* and their ANTI-HIV-1 Activities. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n°. 1, p. 43-47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1543-5>.
- YIN, Z., ZHANG, W., FENG, F., ZHANG, Y., KANG, W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n°. 3, p. 136-174, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>.
- YONEKURA-SAKAKIBARA, K., YAMAMURA, M., MATSUDA, F., ONO, E., NAKABAYASHI, R., SUGAWARA, S., MORI, T., TOBIMATSU, Y., UMEZAWA, T., SAITO, K. Seed-coat protective neolignans are produced by the dirigent protein AtDP1 and

the laccase AtLAC5 in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 33, n^o. 1, p. 129-152, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa014>.

YUAN, H., MA, Q., YE, L., PIAO, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n^o. 5, p. 559, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.

ZÁLEŠÁK, F., BON, D. J. D., POSPÍŠIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104284, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.

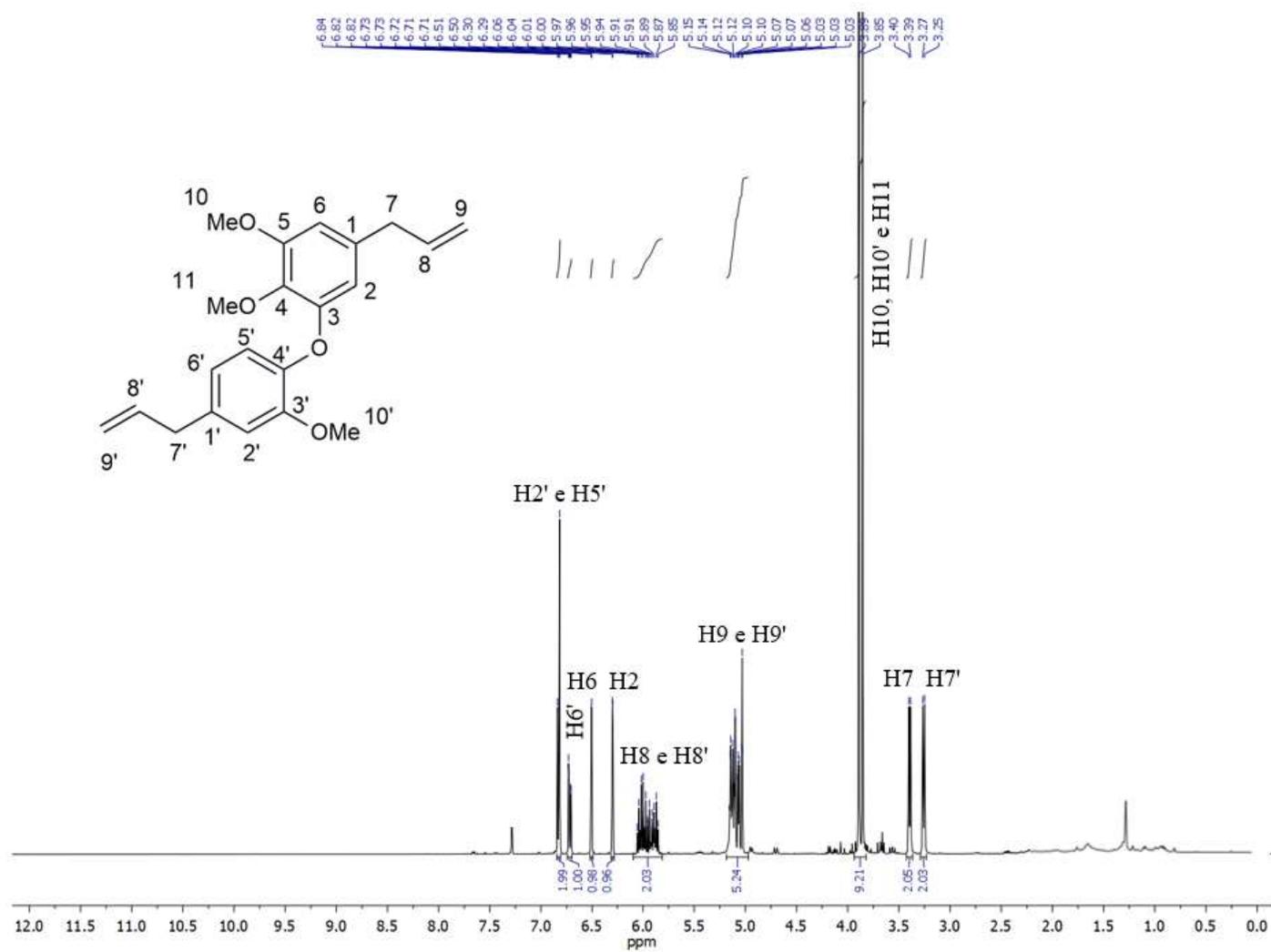
ZHANG, D., LIU, B., CAO, B., WEI, F., YU, X., LI, G. F., CHEN, H., WEI, L. Q., WANG, P. L. Synergistic protection of Schizandrin B and Glycyrrhizic acid against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad2 pathways and overexpression of NOX4. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 67-75, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.04.024>.

ZHOU, L., WANG, J., GUO, R., LIN, B., WANG, X.-B., HUANG, X.-X., SONG, S.-J. Discovery of dihydrobenzofuran neolignans from *Rubus ideaus* L. with enantioselective anti-A β 1–42 aggregation activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 64-69, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.05.016>.

ZIMMERMAN, G. A., MEISTRELL, M., 3RD, BLOOM, O., COCKROFT, K. M., BIANCHI, M., RISUCCI, D., BROOME, J., FARMER, P., CERAMI, A., VLASSARA, H. Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 92, n^o. 9, p. 3744-3748, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3744>.

**APÊNDICE A – AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE
RMN**

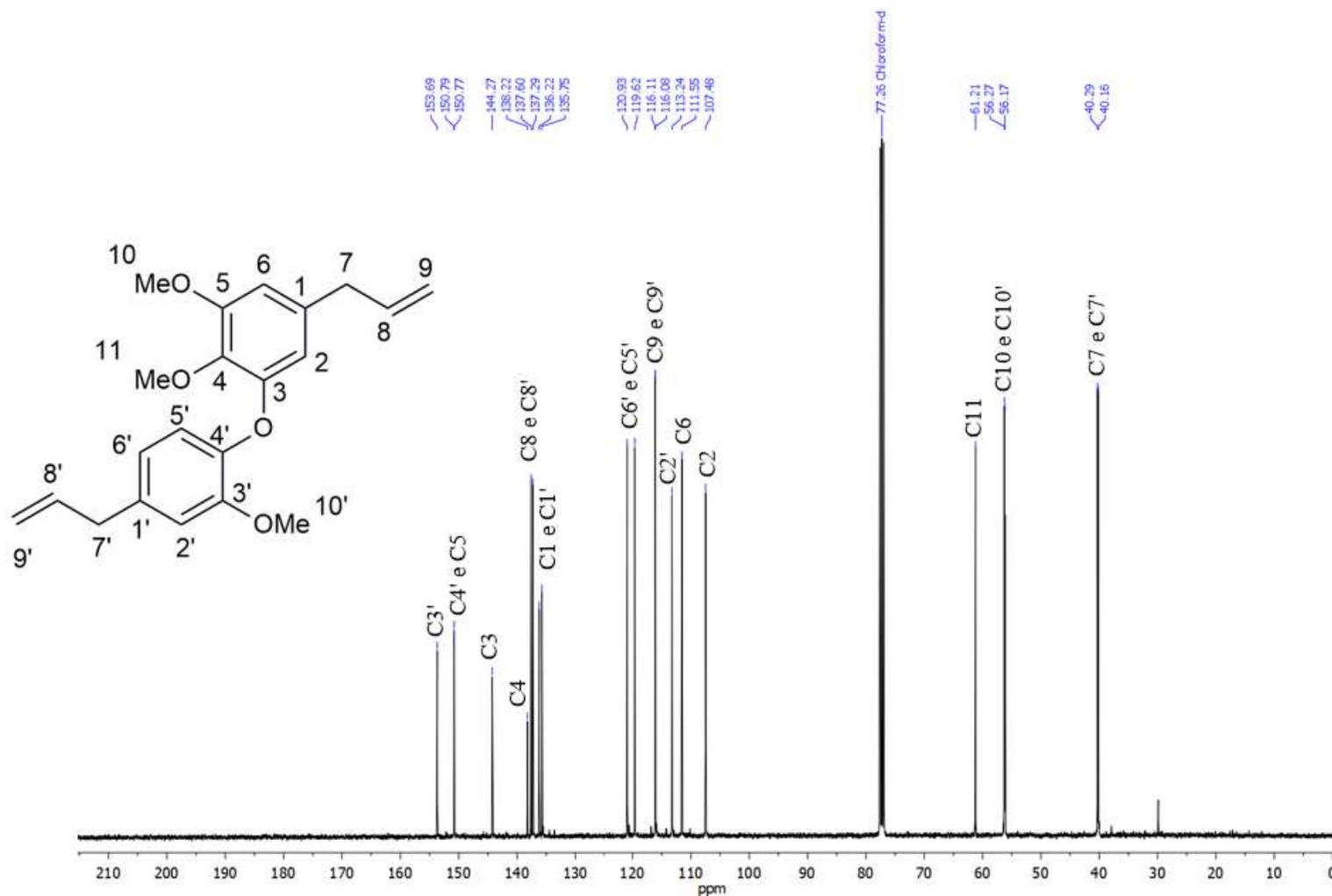
Figura 153 – Espectro de RMN de ^1H do composto I (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

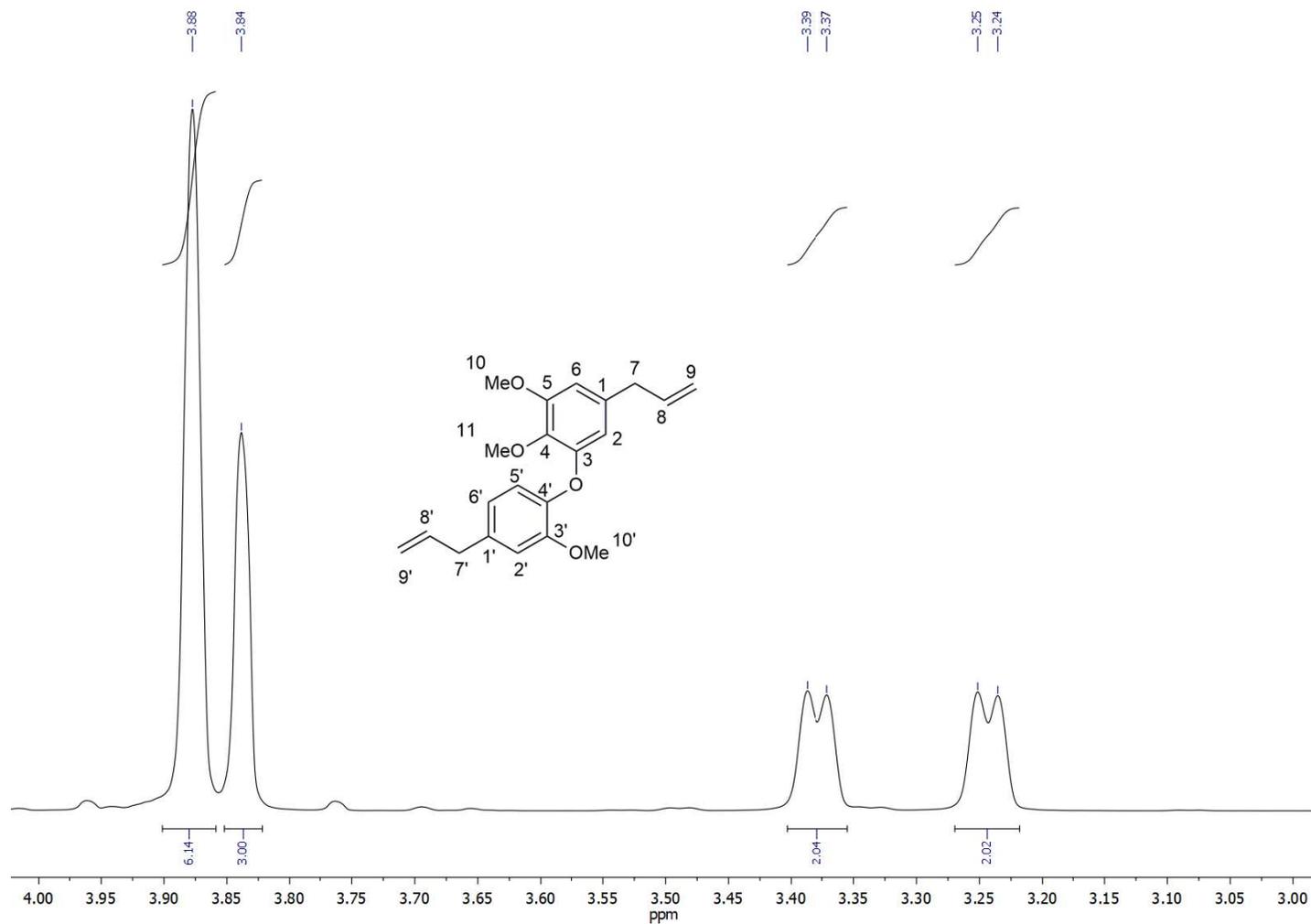
Figura 154 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto I (100 MHz, CDCl_3).



Nota: O sinal em 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

Fonte: o autor

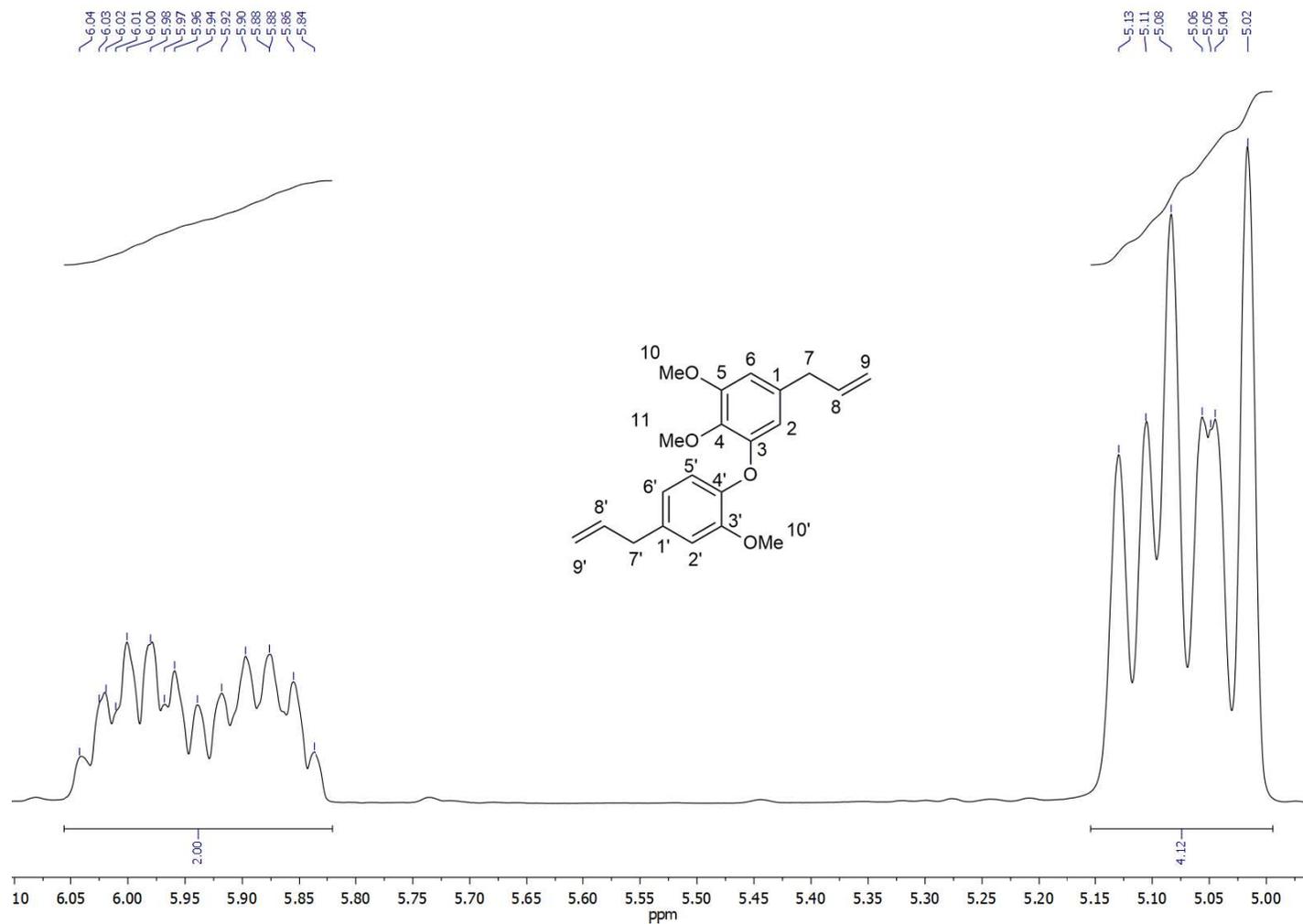
Figura 155 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,0–4,0) do composto **I** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

Figura 156 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 5,0–6,1) do composto **I** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

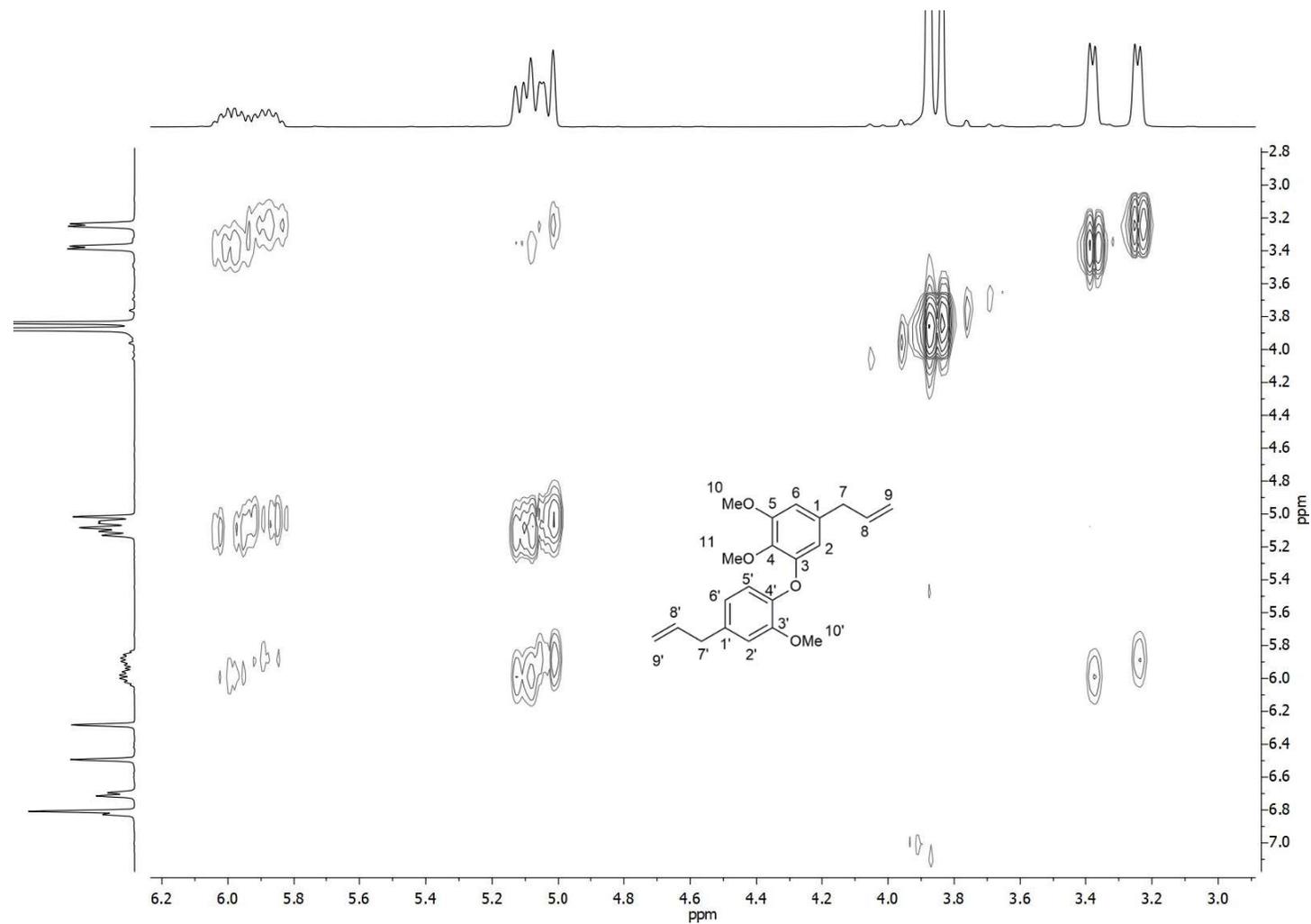
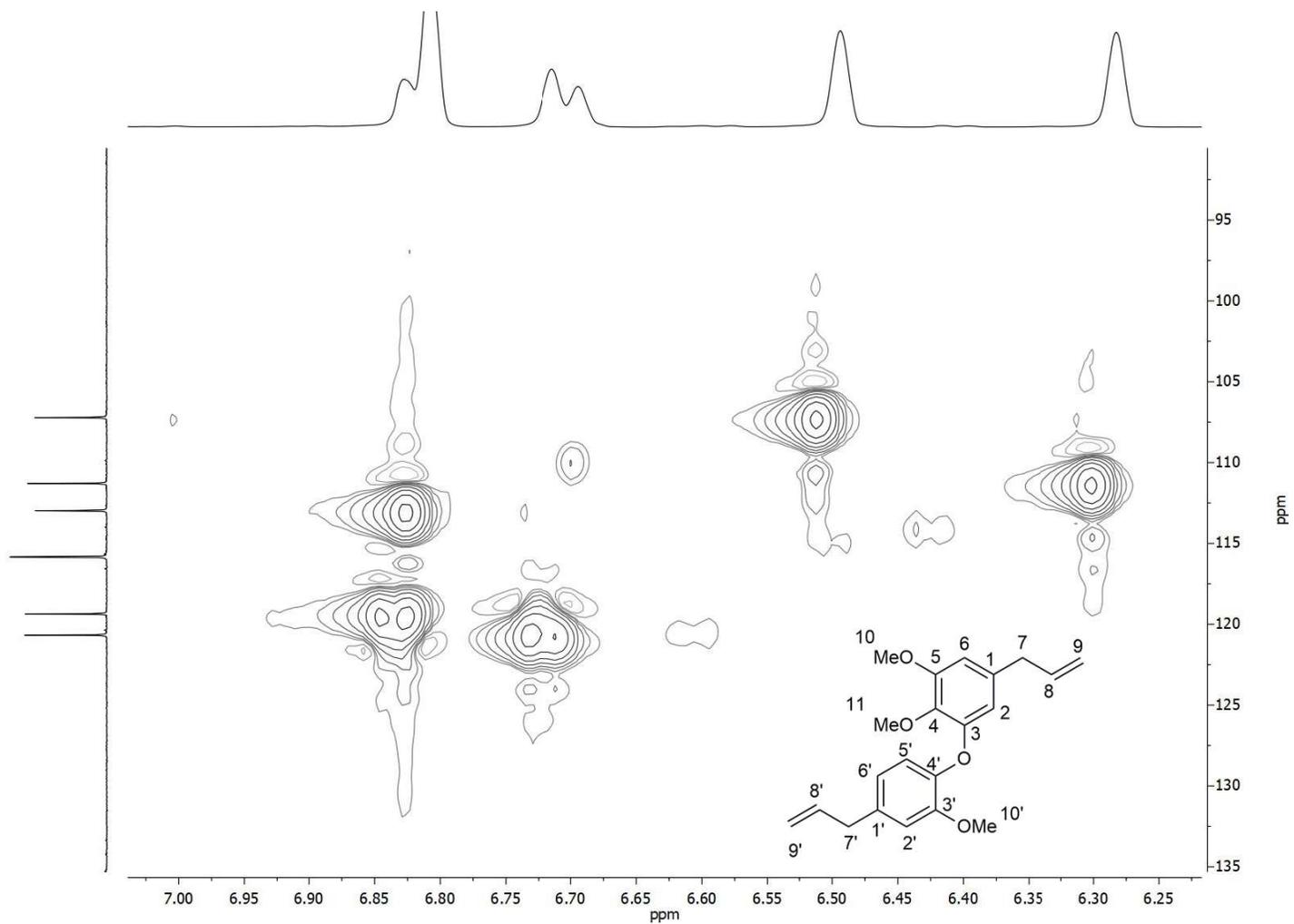
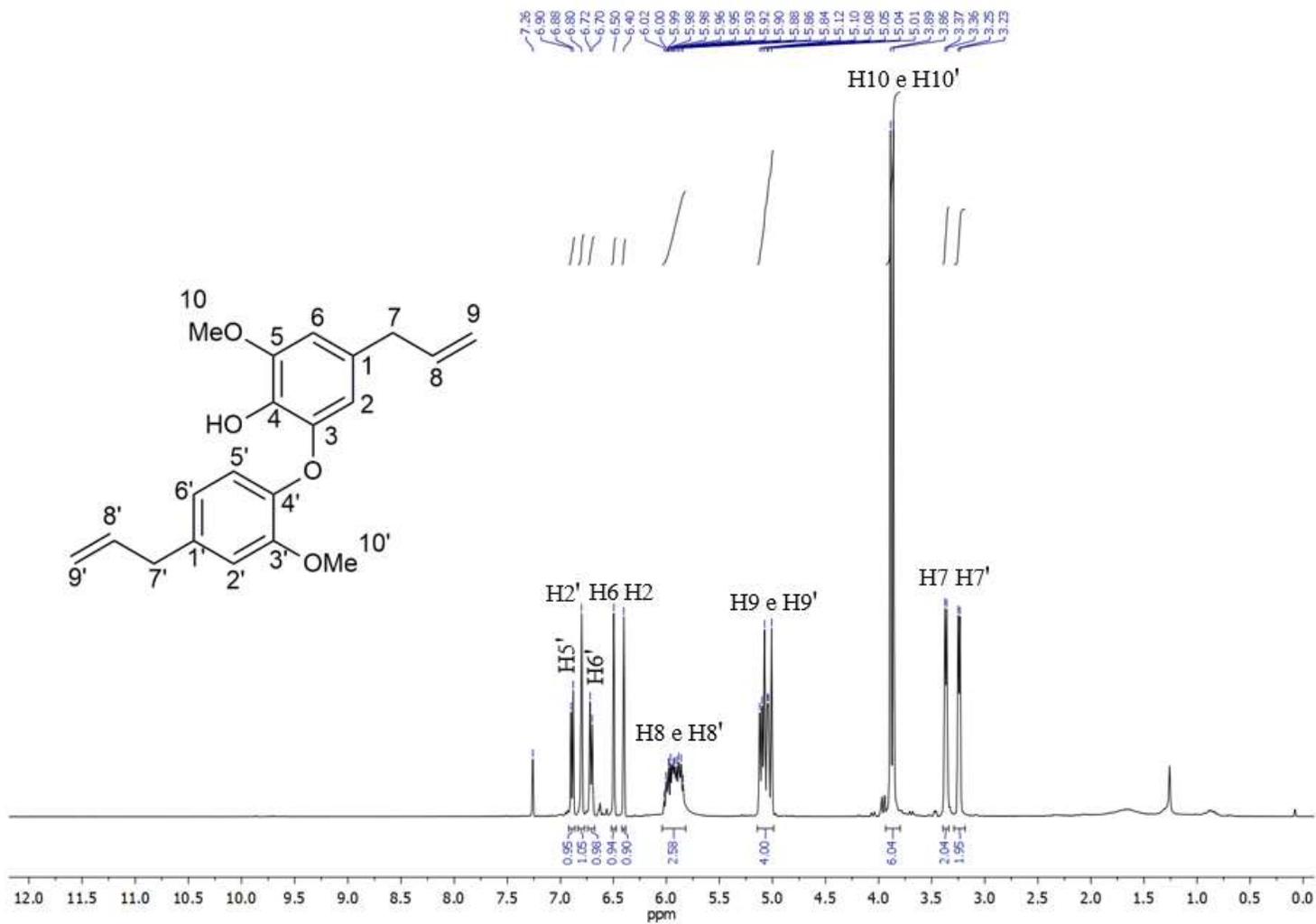
Figura 157 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto I (400 MHz, CDCl₃).

Figura 158 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto I (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

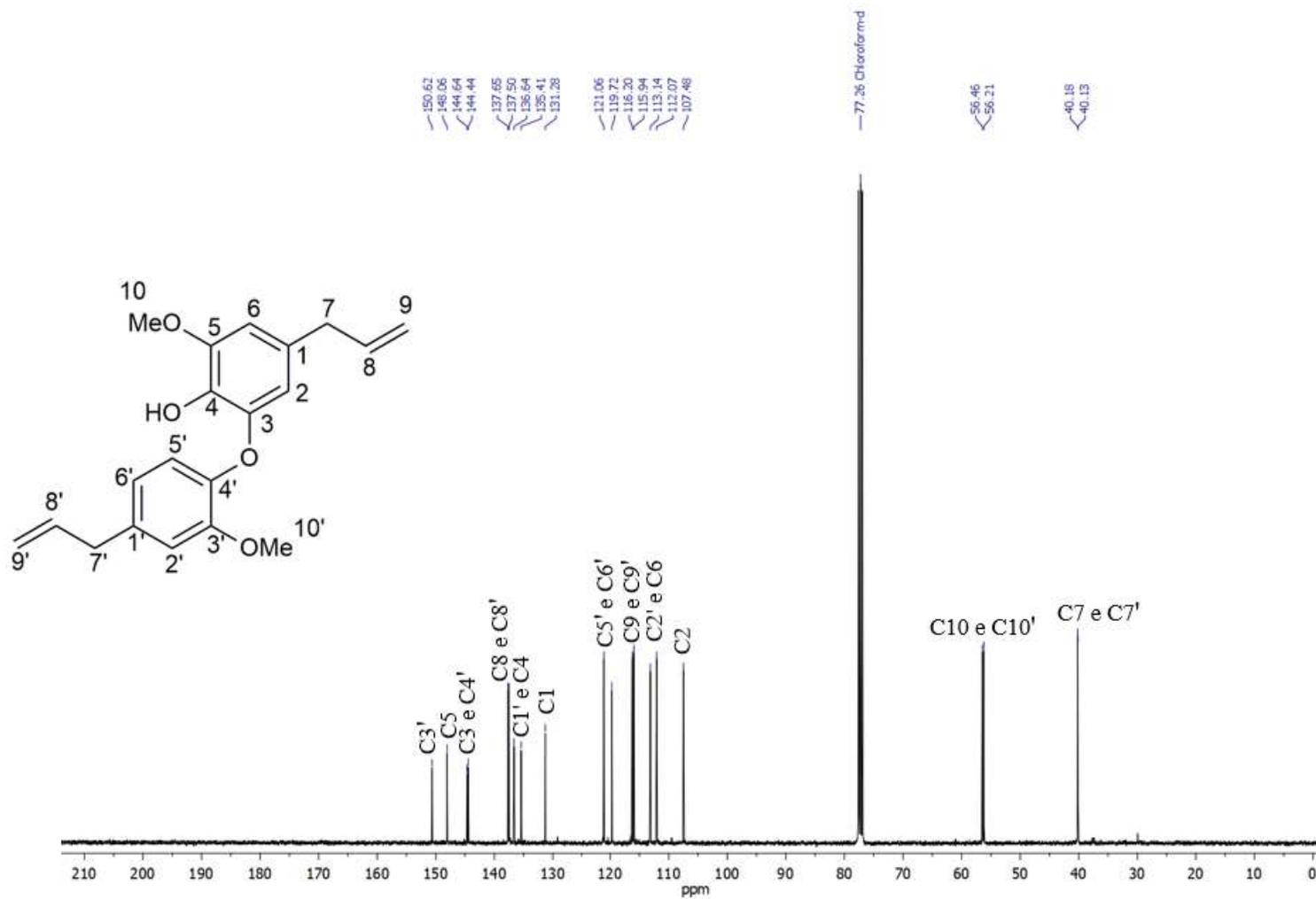
Figura 159 – Espectro de RMN de ^1H do composto **II** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

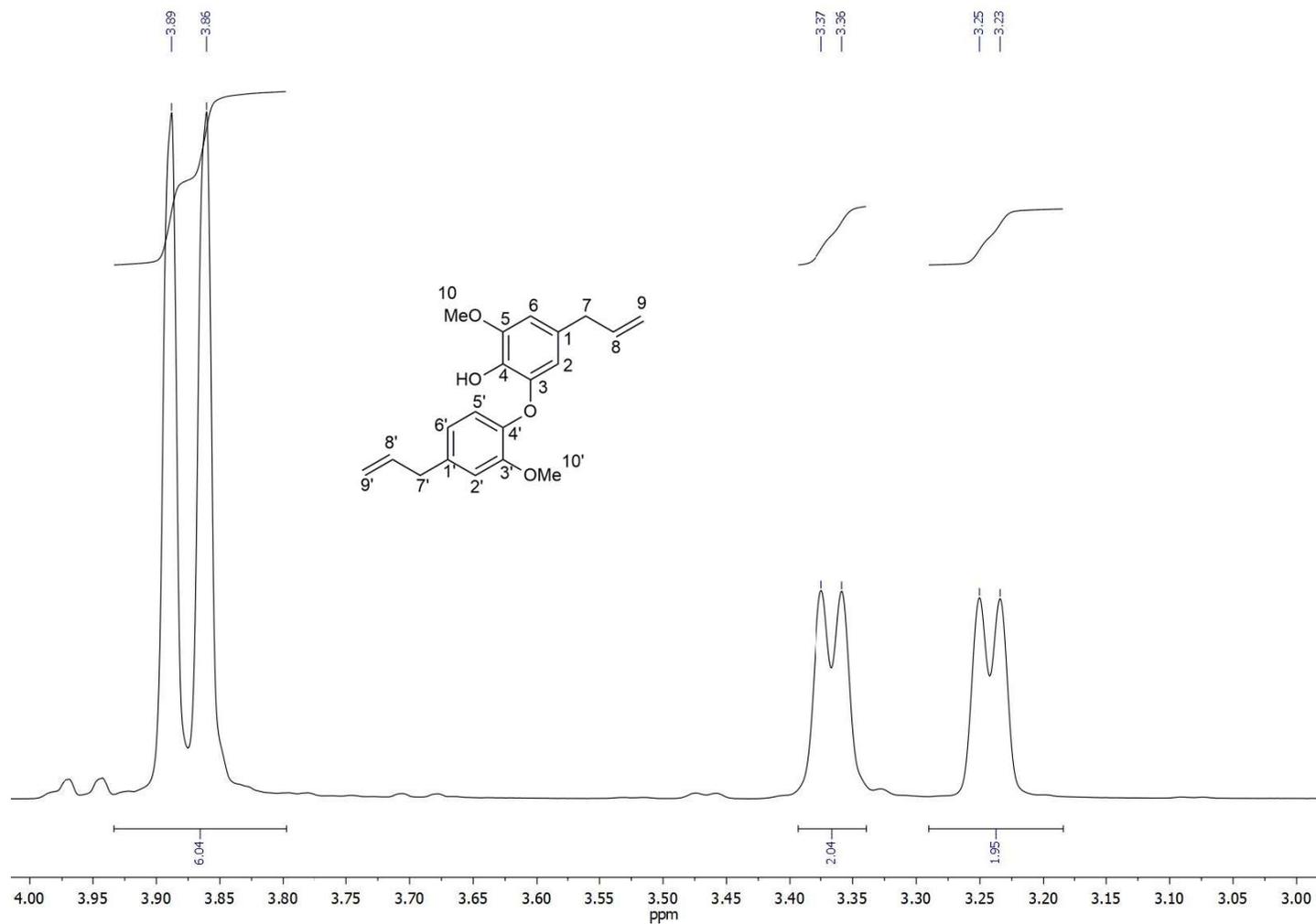
Fonte: o autor.

Figura 160 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **II** (100 MHz, CDCl_3).



Nota: O sinal em 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

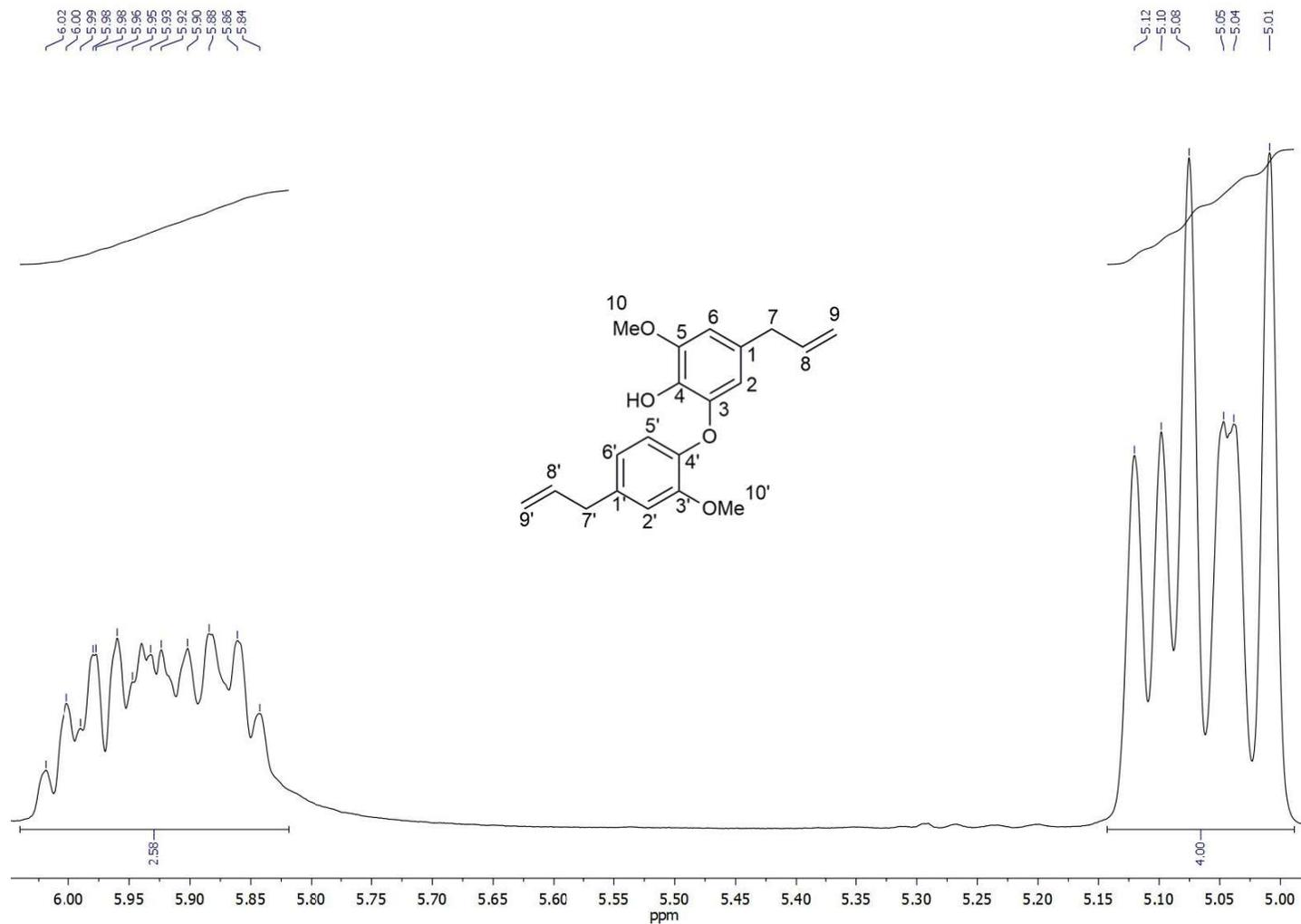
Fonte: o autor

Figura 161 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,0–4,0) do composto **II** (400 MHz, CDCl_3).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

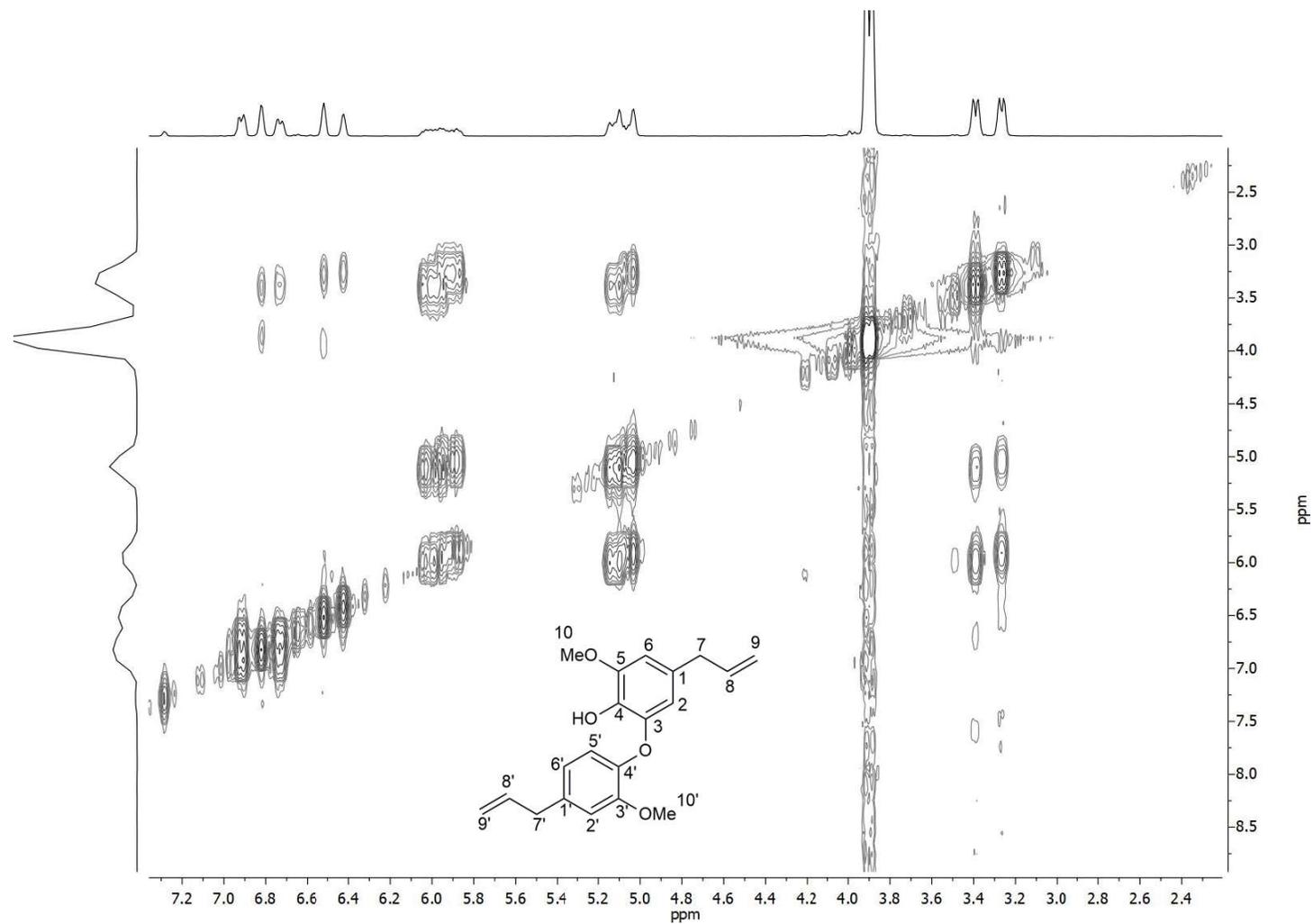
Fonte: o autor.

Figura 162 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 5,0–6,0) do composto **II** (400 MHz, CDCl_3).

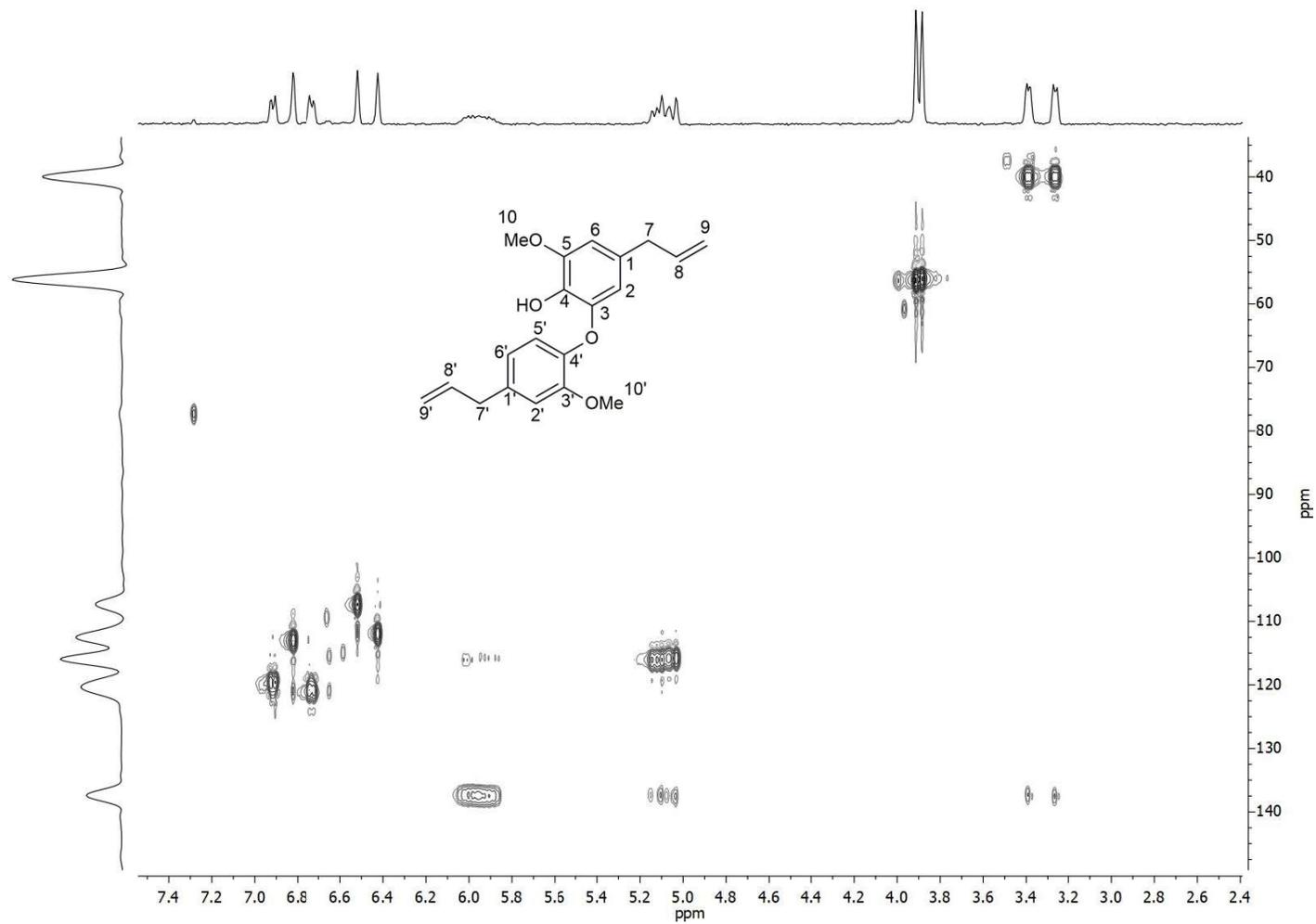


Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

Figura 163 – Ampliação do mapa de contorno COSY do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

Figura 164 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

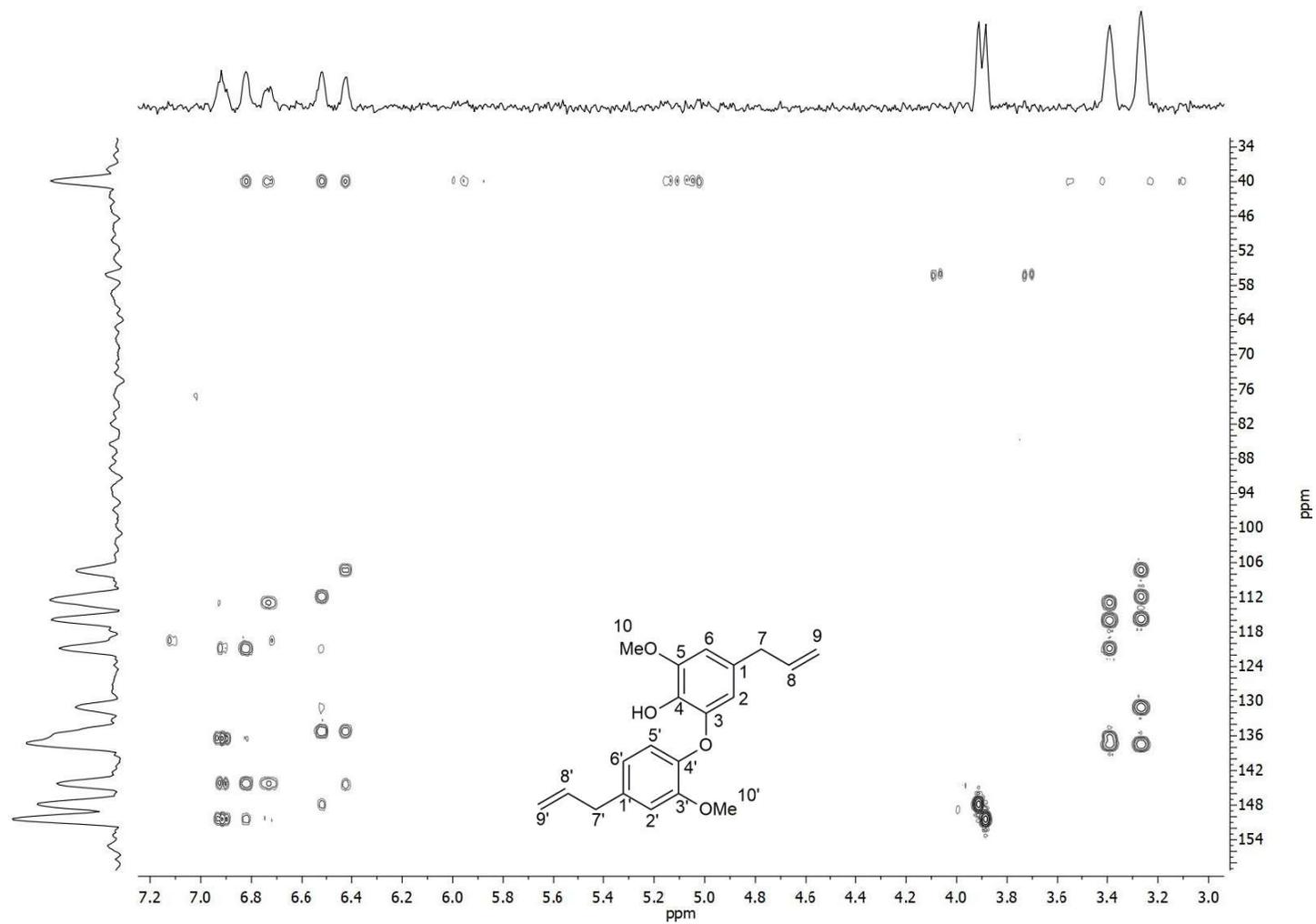
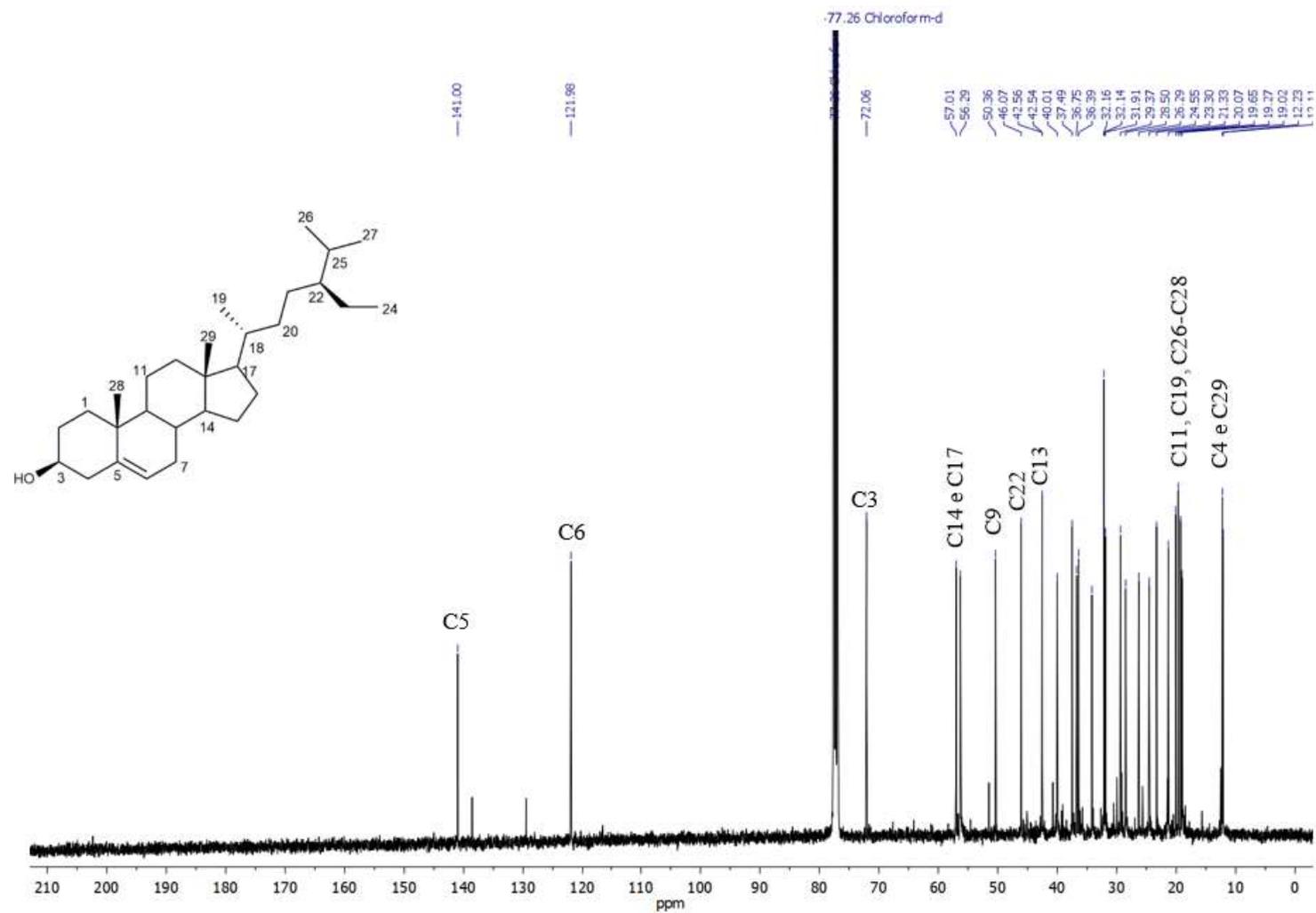
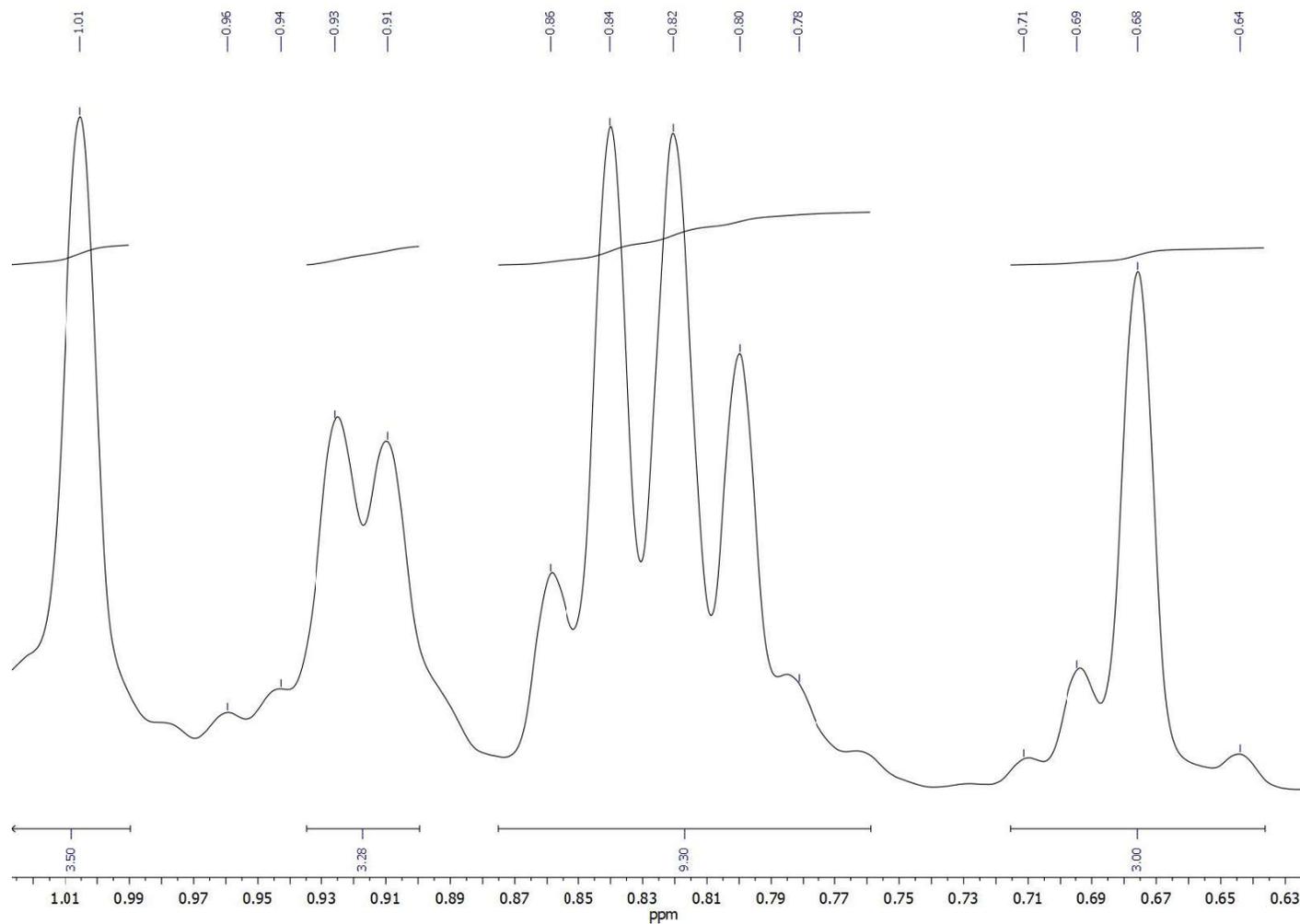
Figura 165 – Ampliação do mapa de contorno HMBC do composto **II** (400 MHz, CDCl₃).

Figura 167 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **III** (100 MHz, CDCl_3).



Nota: O sinal em 77,26 é referente ao solvente CDCl_3 .

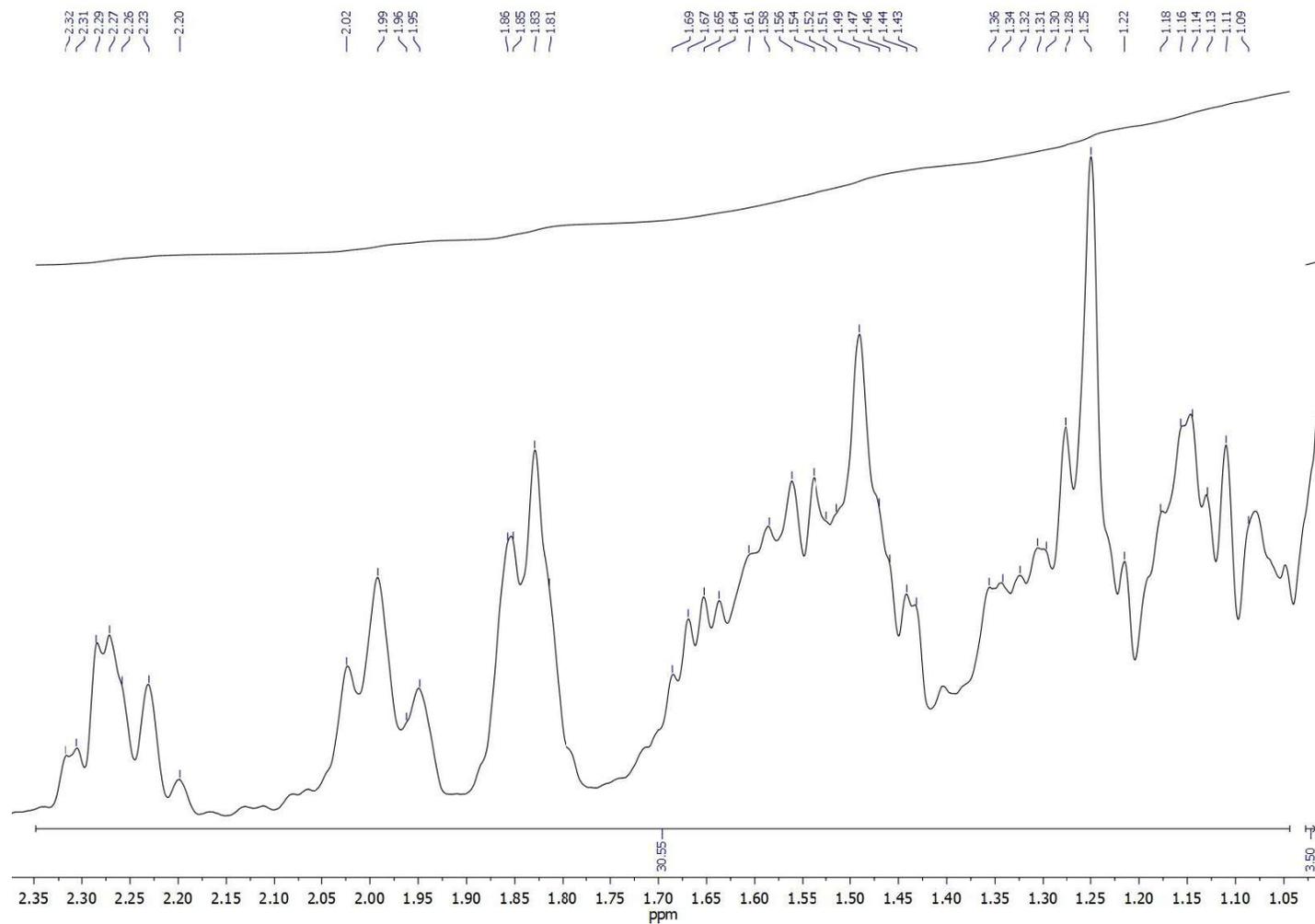
Fonte: o autor

Figura 168 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,6–1,1) do composto **III** (400 MHz, CDCl_3).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

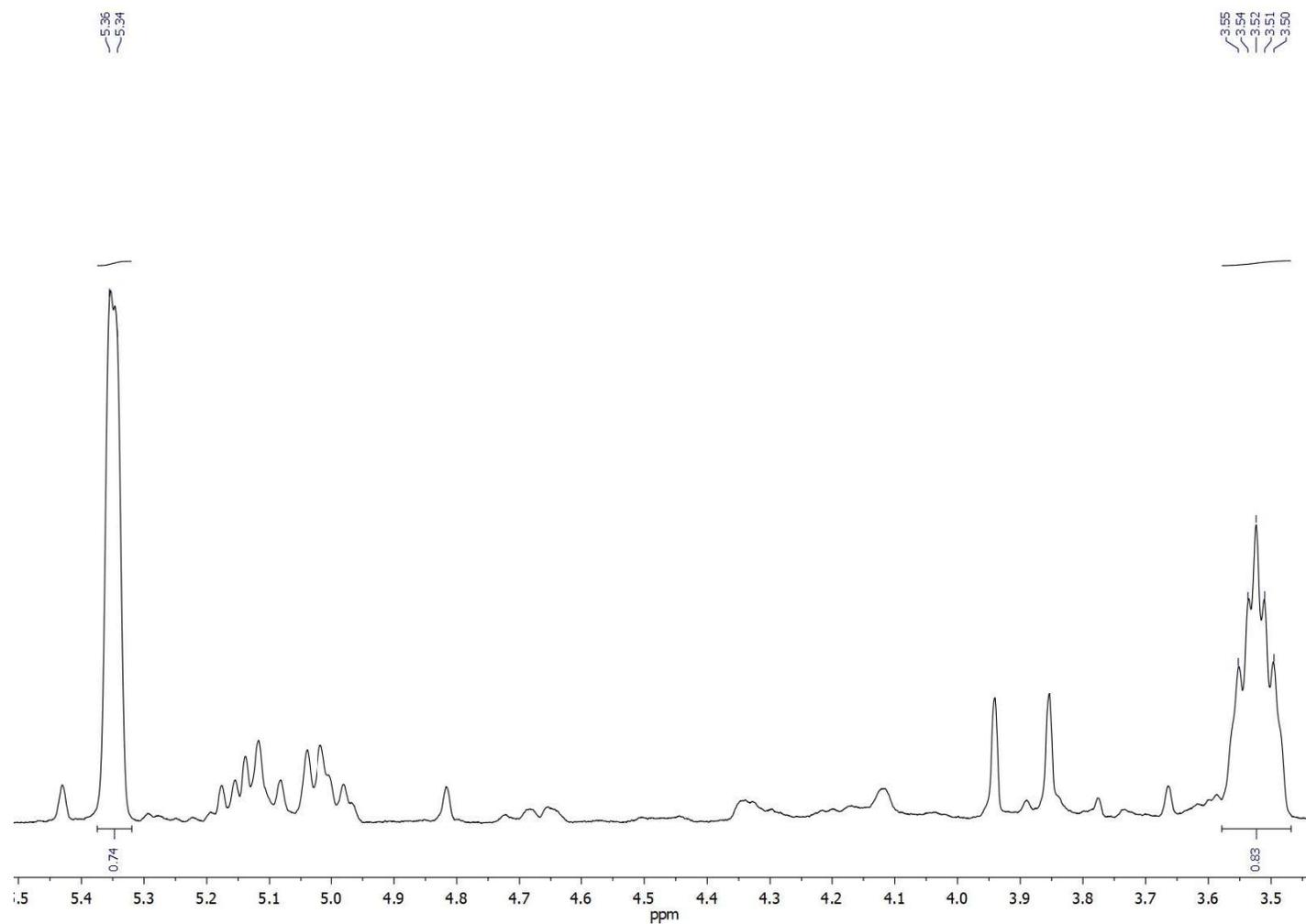
Figura 169 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,0–2,4) do composto **III** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

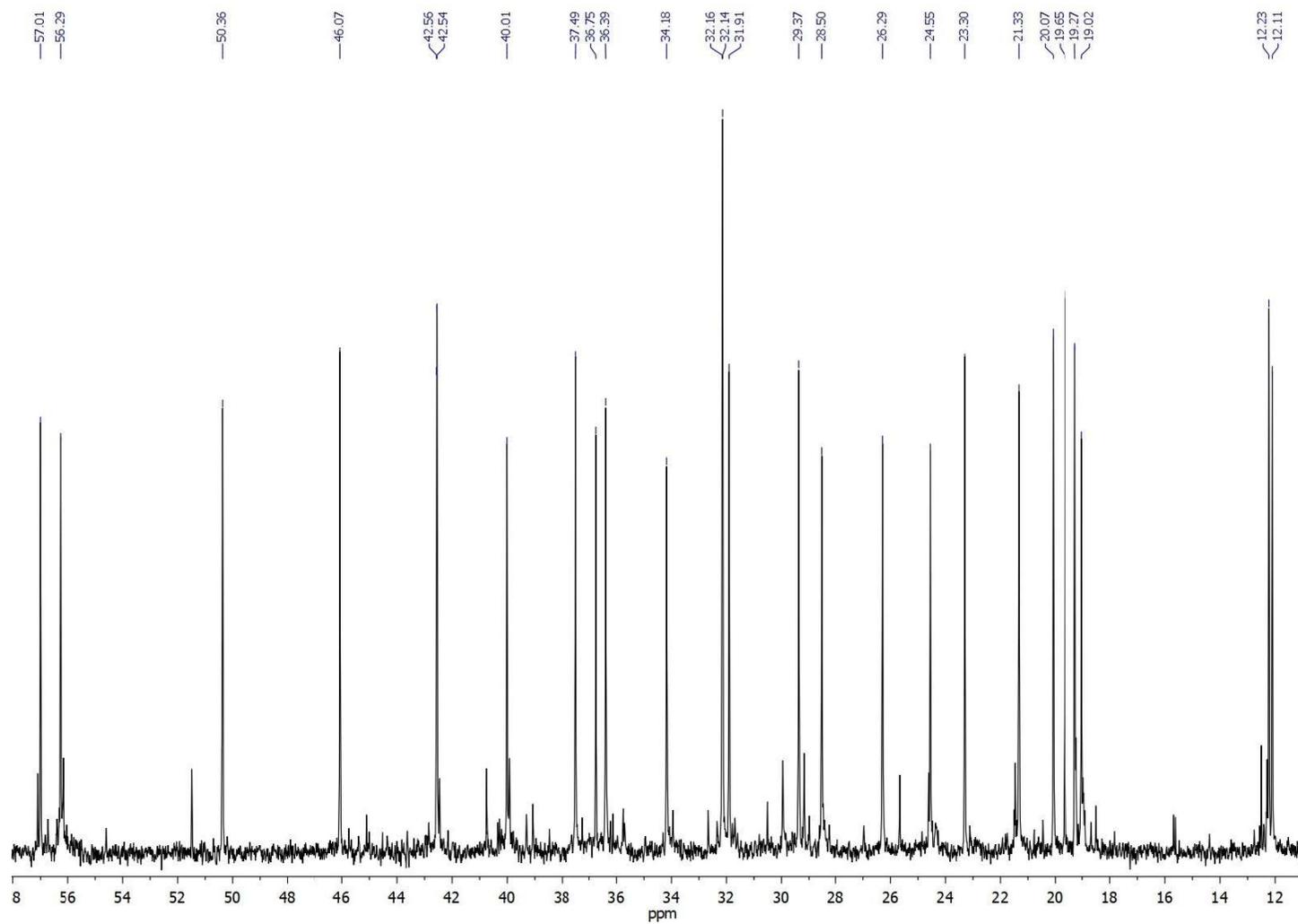
Fonte: o autor.

Figura 170 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 3,5–5,4) do composto **III** (400 MHz, CDCl_3).



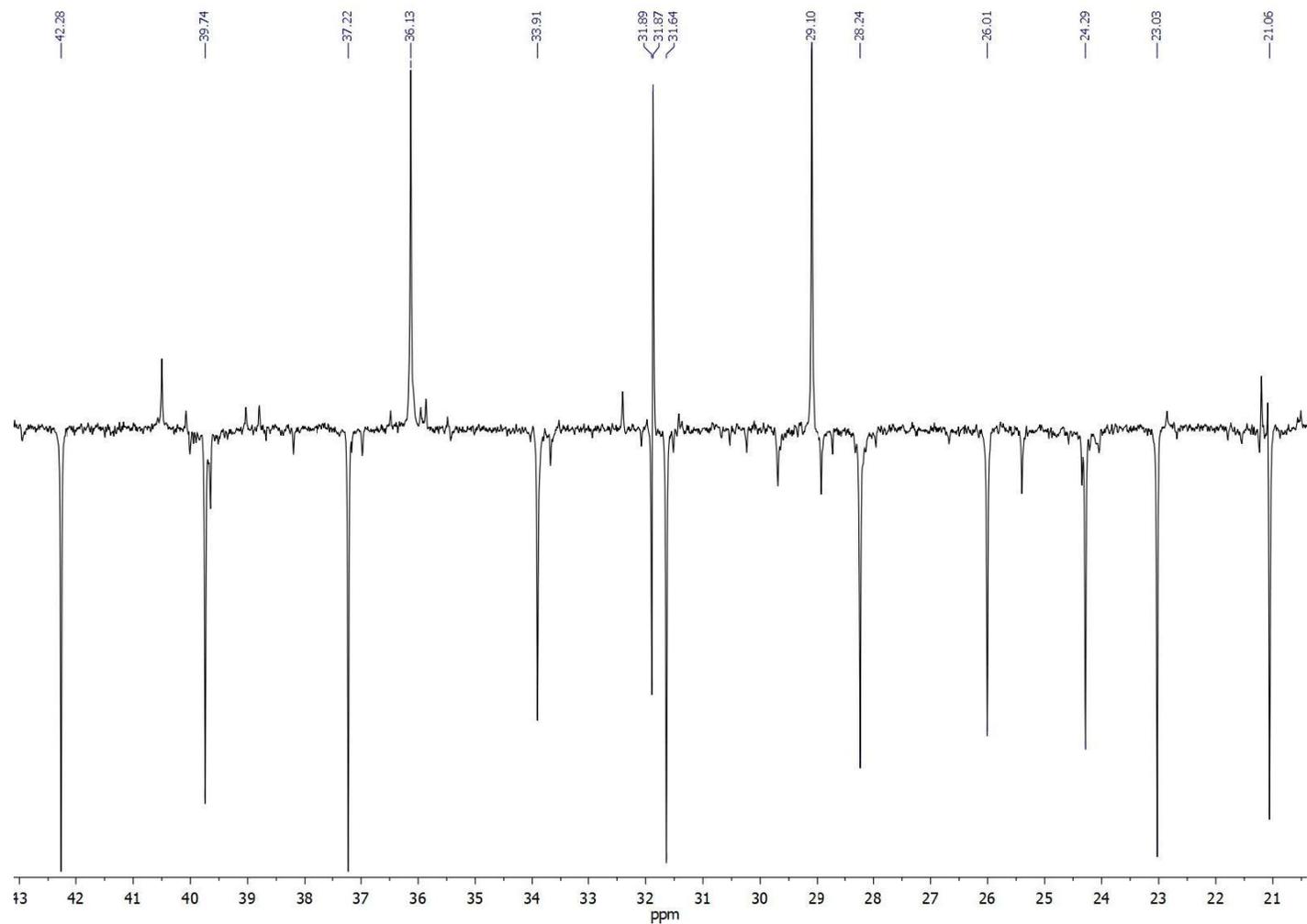
Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

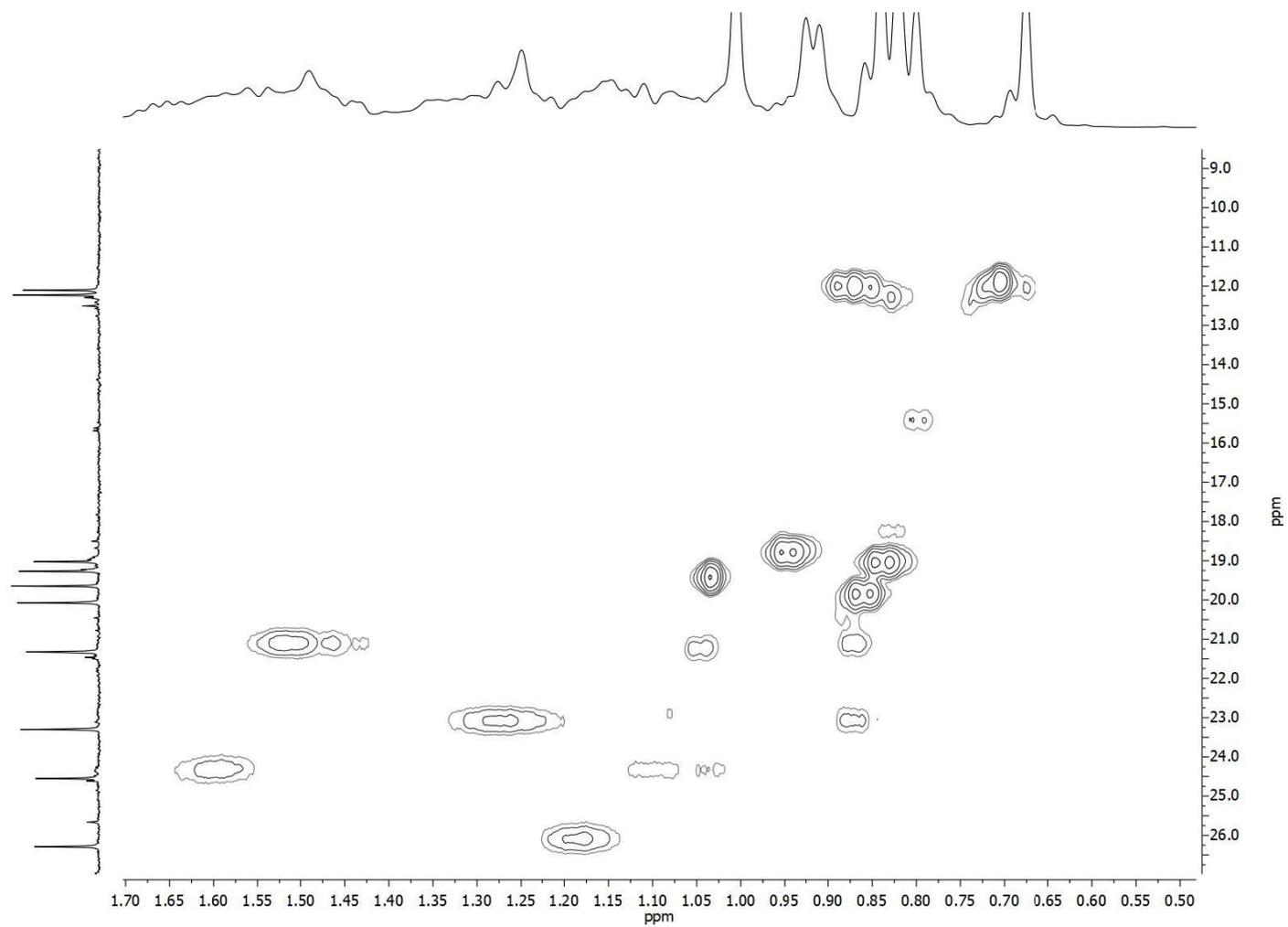
Figura 171 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 12,0–58,0) do composto **III** (100 MHz, CDCl_3).

Fonte: o autor.

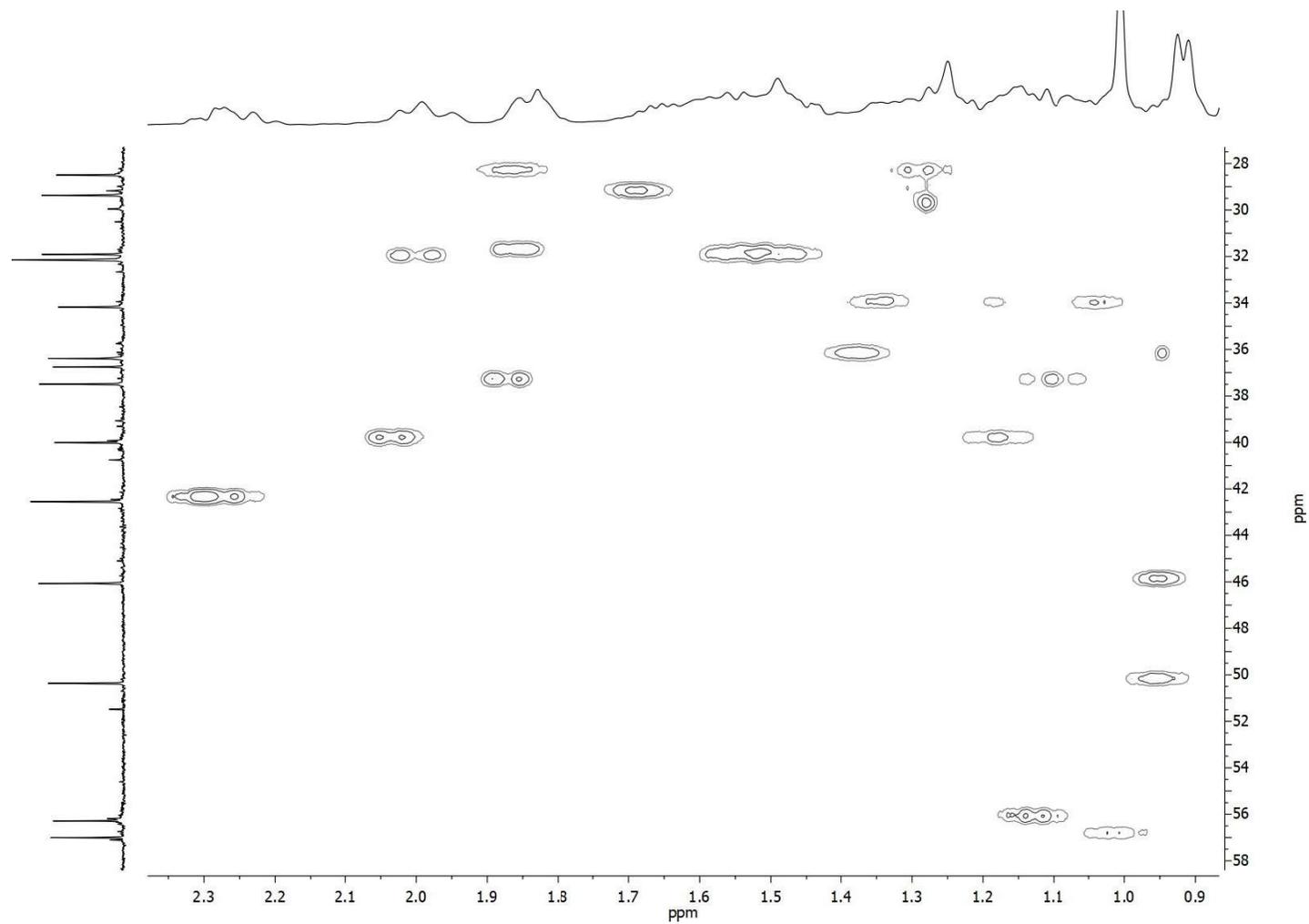
Figura 172 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 (δ_c 21,0–43,0) do composto **III** (100 MHz, CDCl_3).



Fonte: o autor.

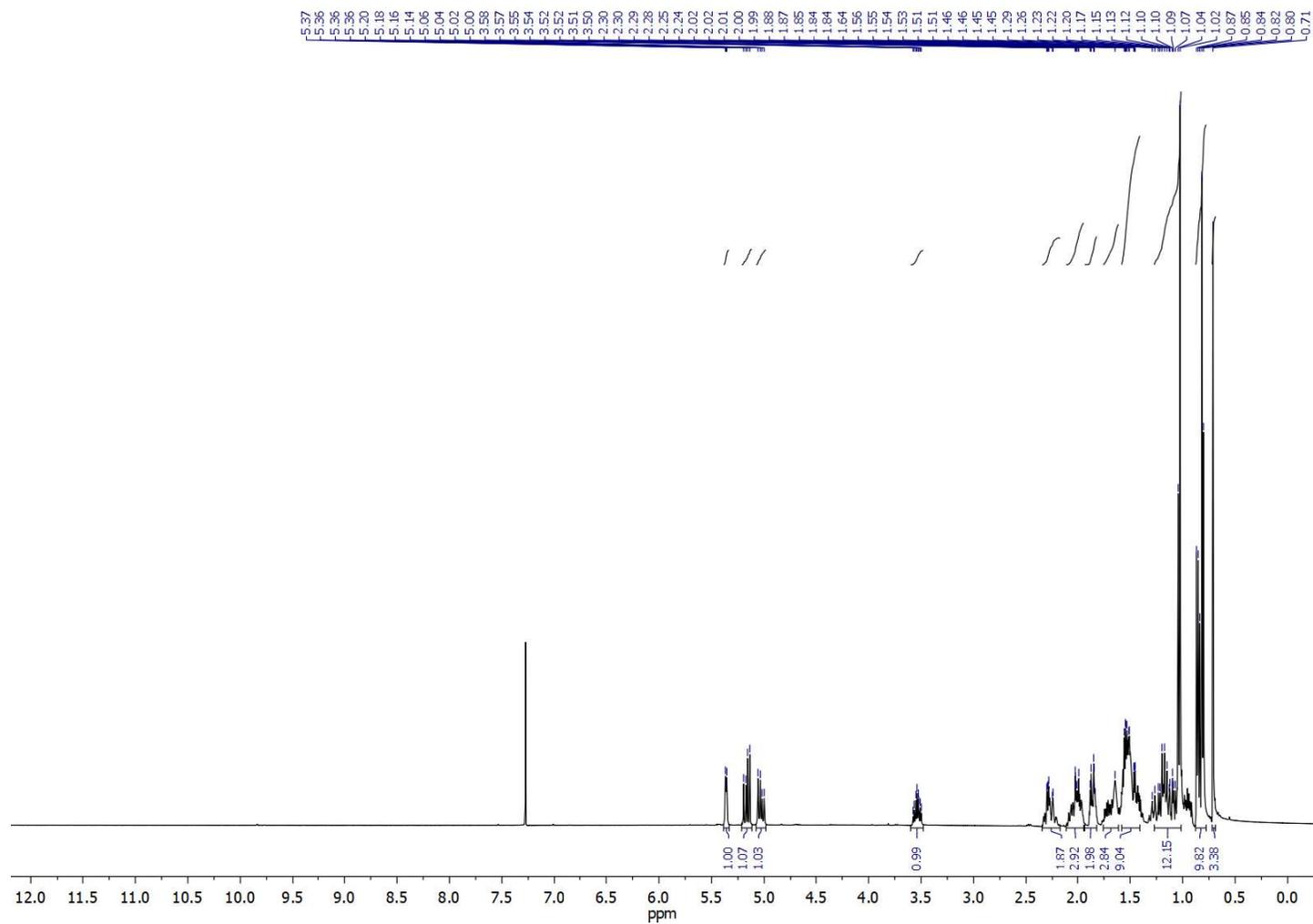
Figura 173 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **III** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

Figura 174 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **III** (400 MHz, CDCl₃).

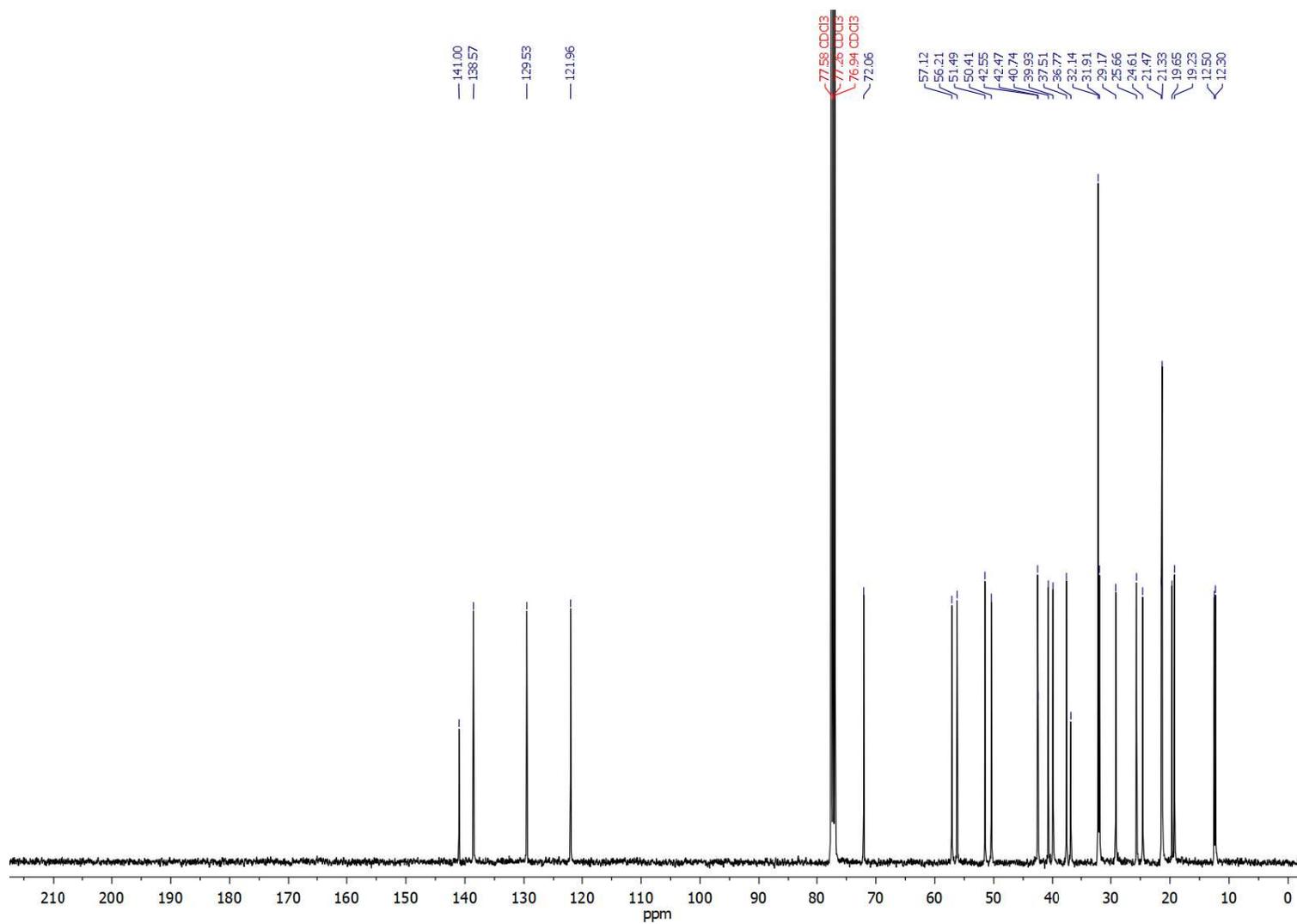
Fonte: o autor.

Figura 175 – Espectro de RMN de ^1H do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

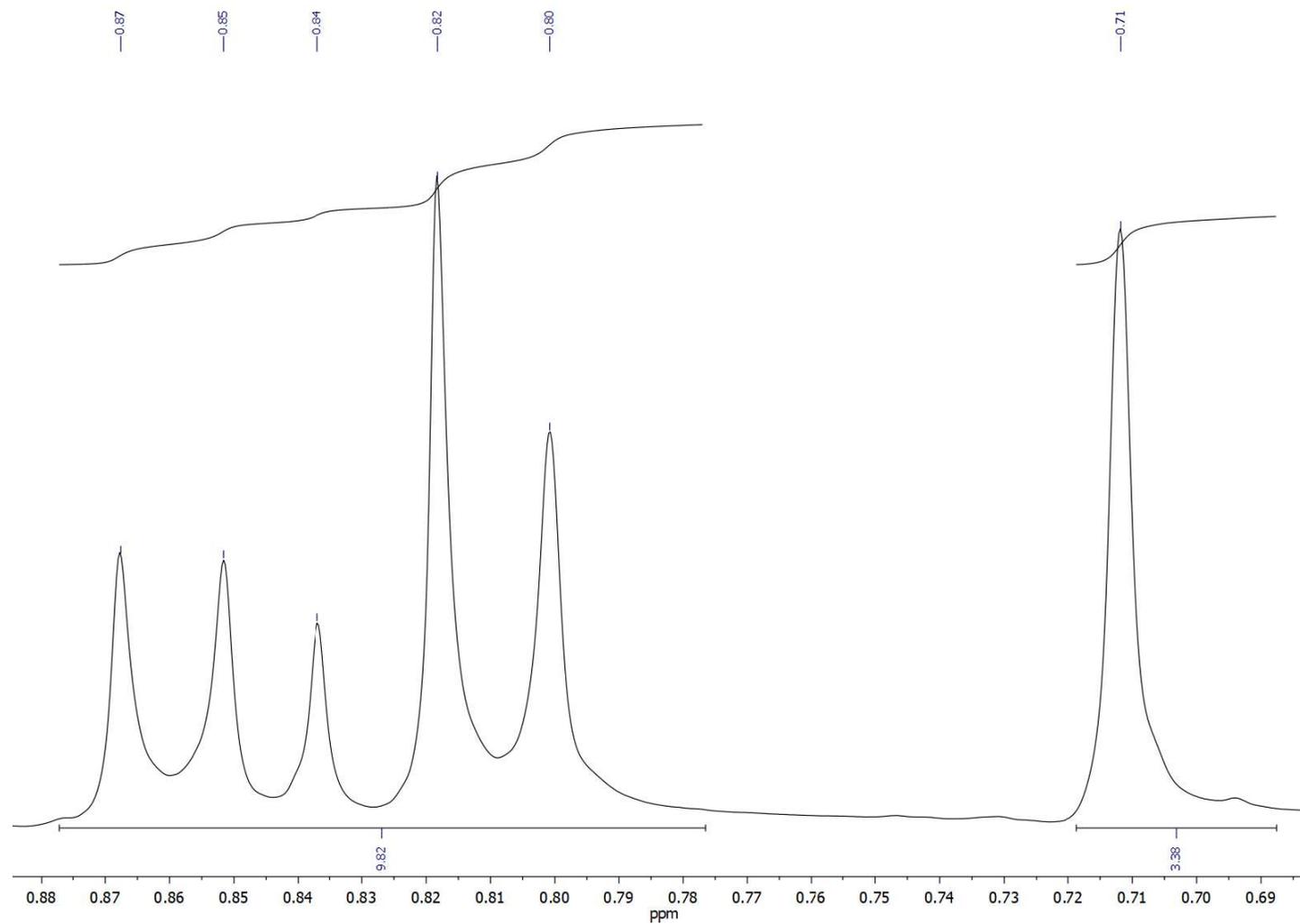
Fonte: o autor.

Figura 176 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **IV** (100 MHz, CDCl_3).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

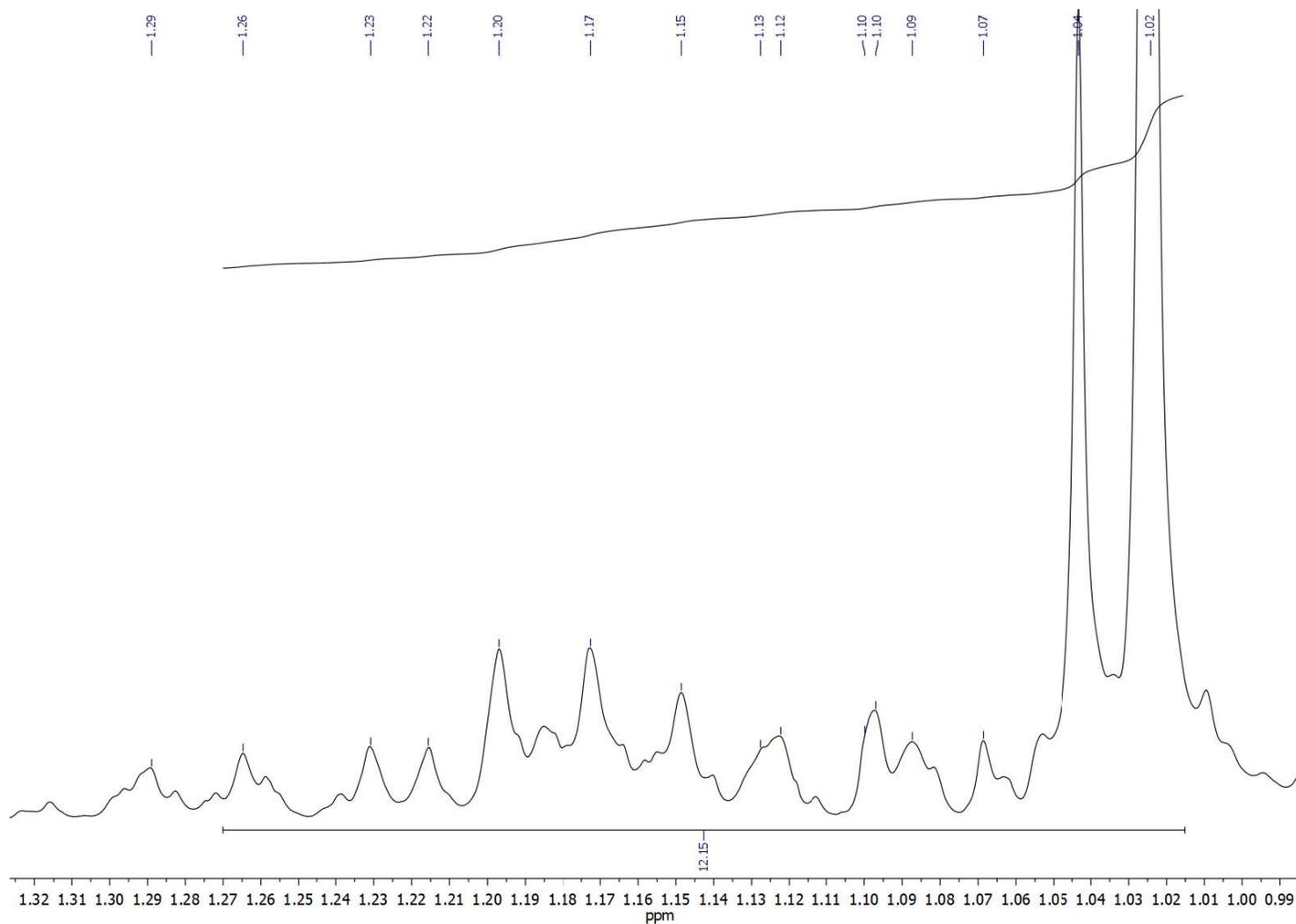
Fonte: o autor.

Figura 177 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 0,7–0,9) do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).



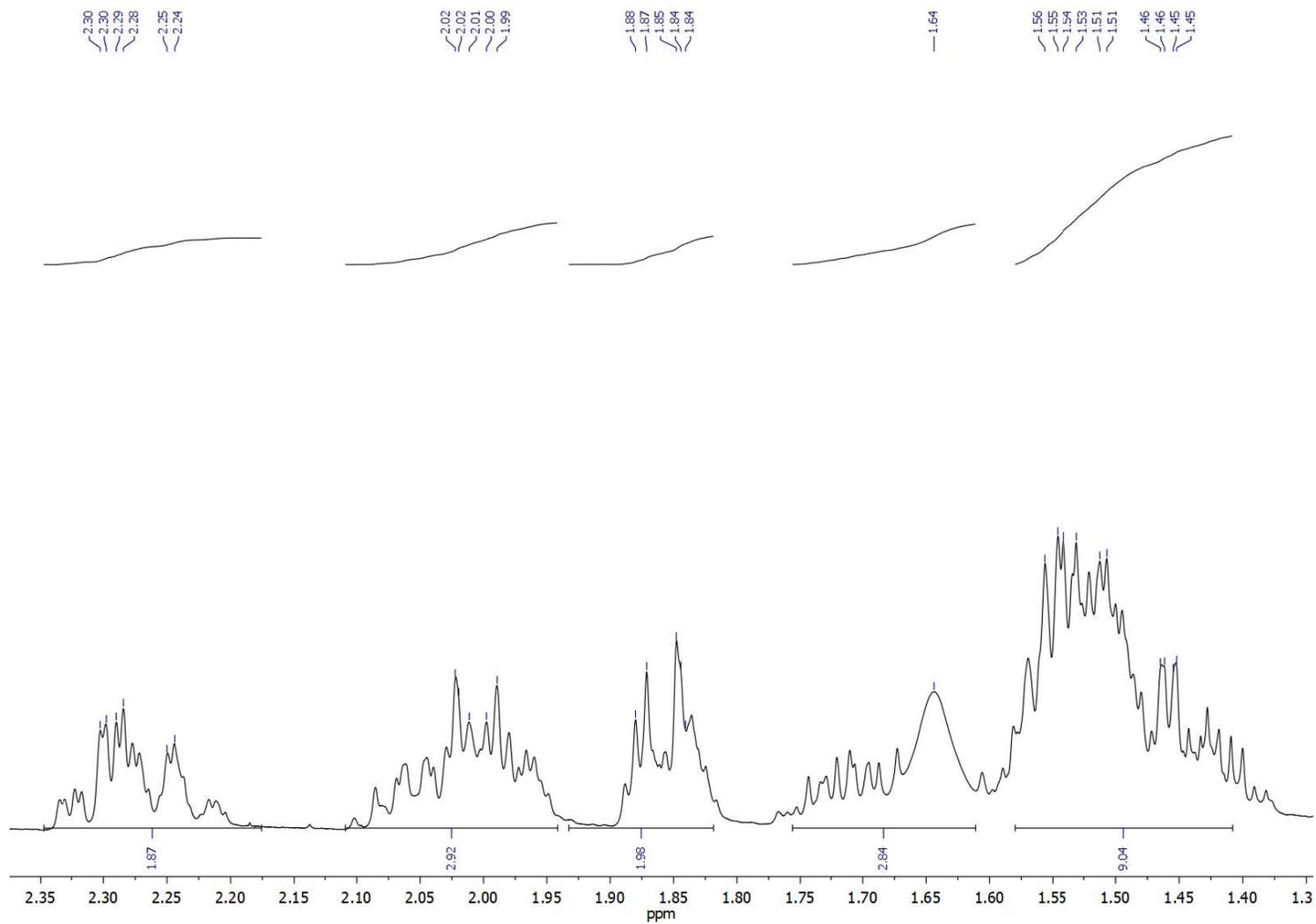
Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

Figura 178 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,0–1,3) do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

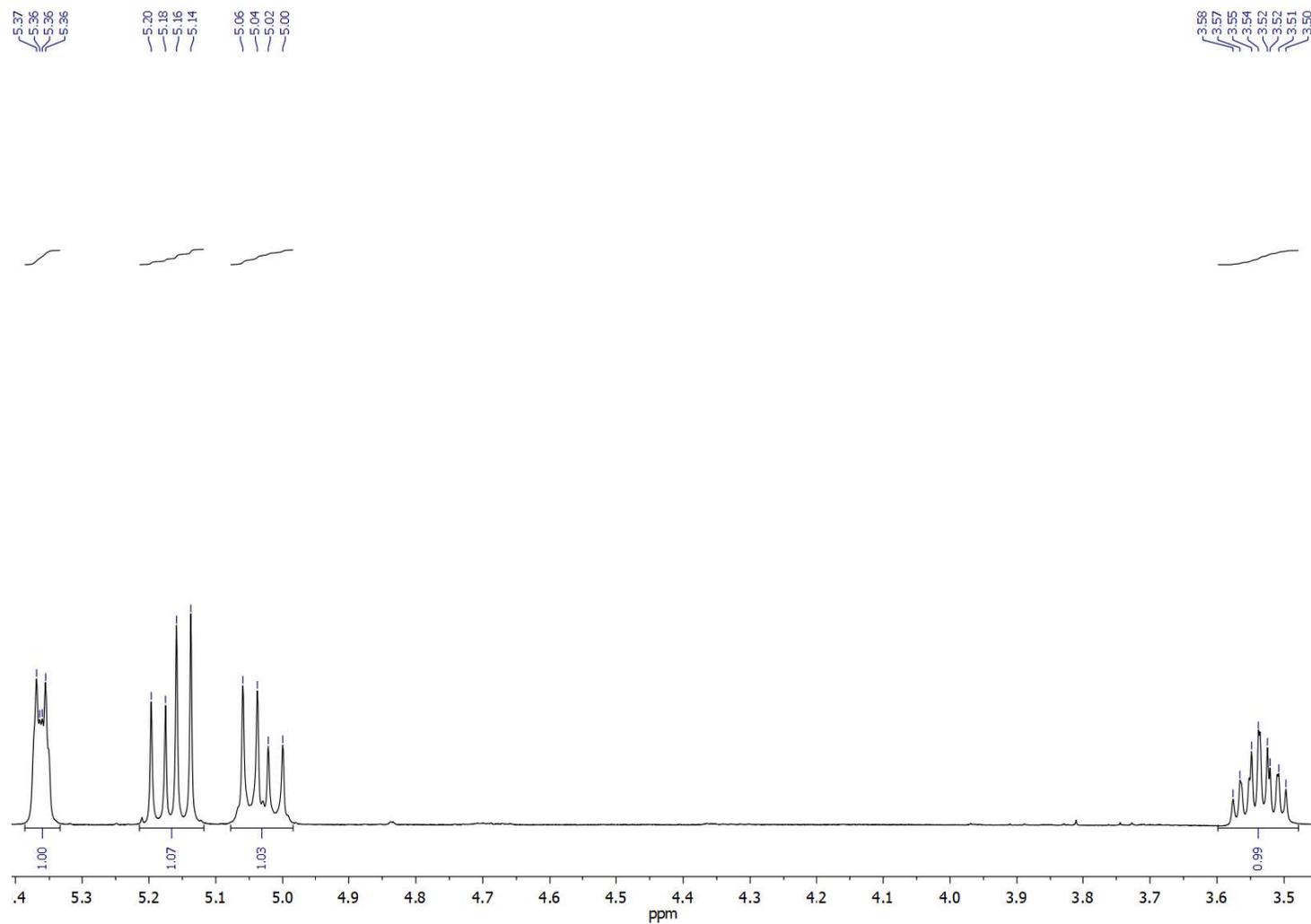
Fonte: o autor.

Figura 179 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,3–2,3) do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

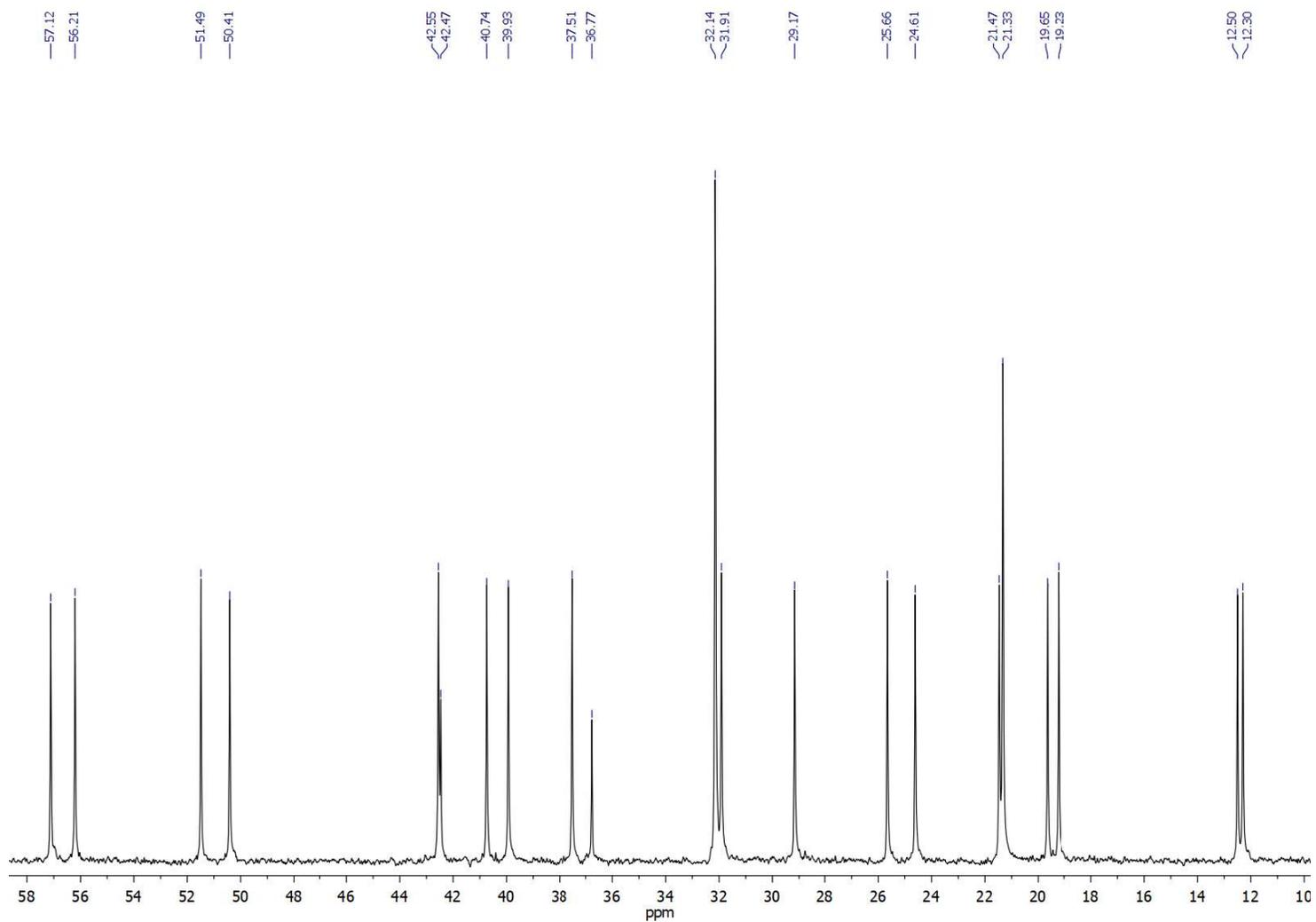
Fonte: o autor.

Figura 180 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 1,3–2,3) do composto **IV** (400 MHz, CDCl_3).



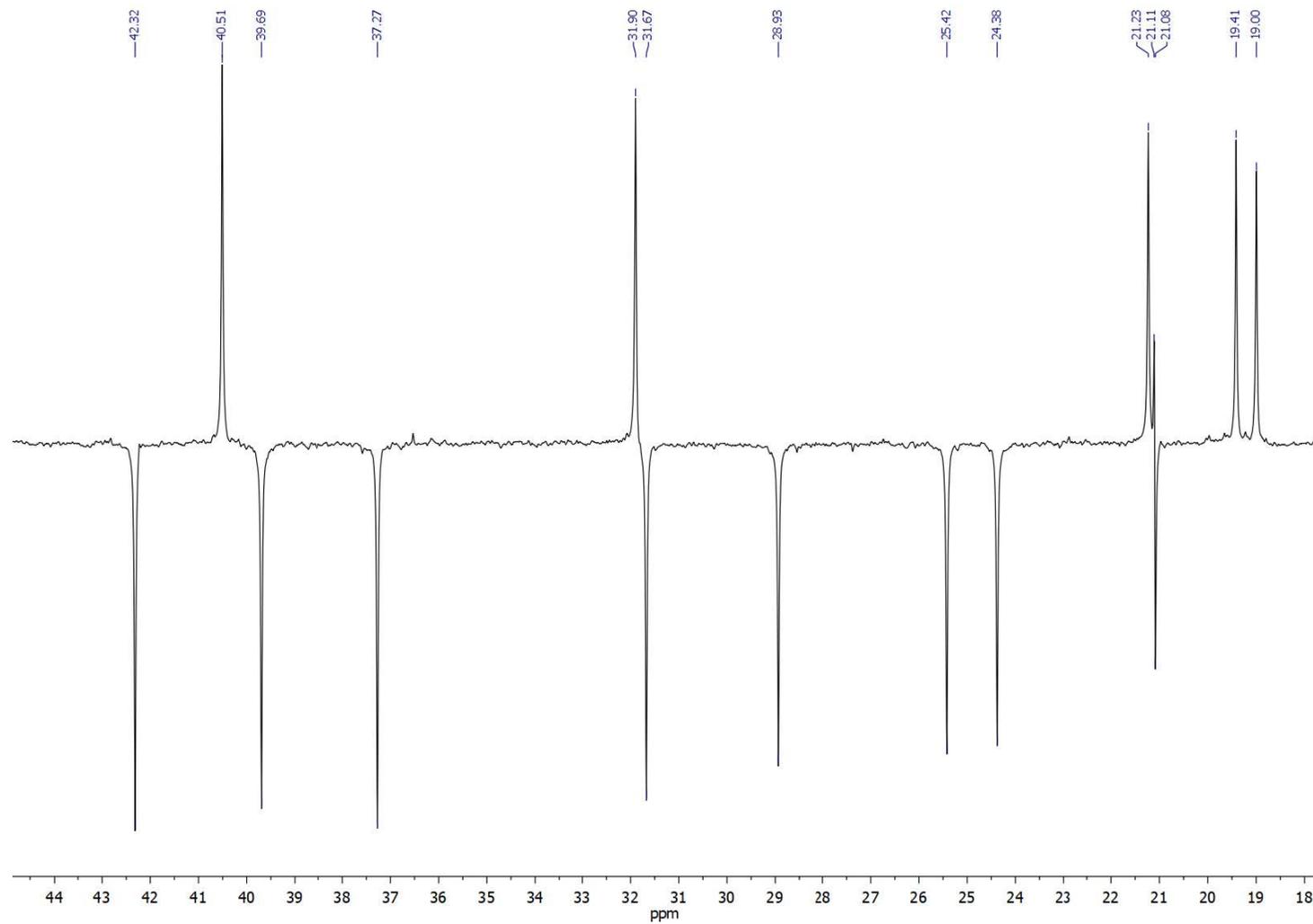
Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

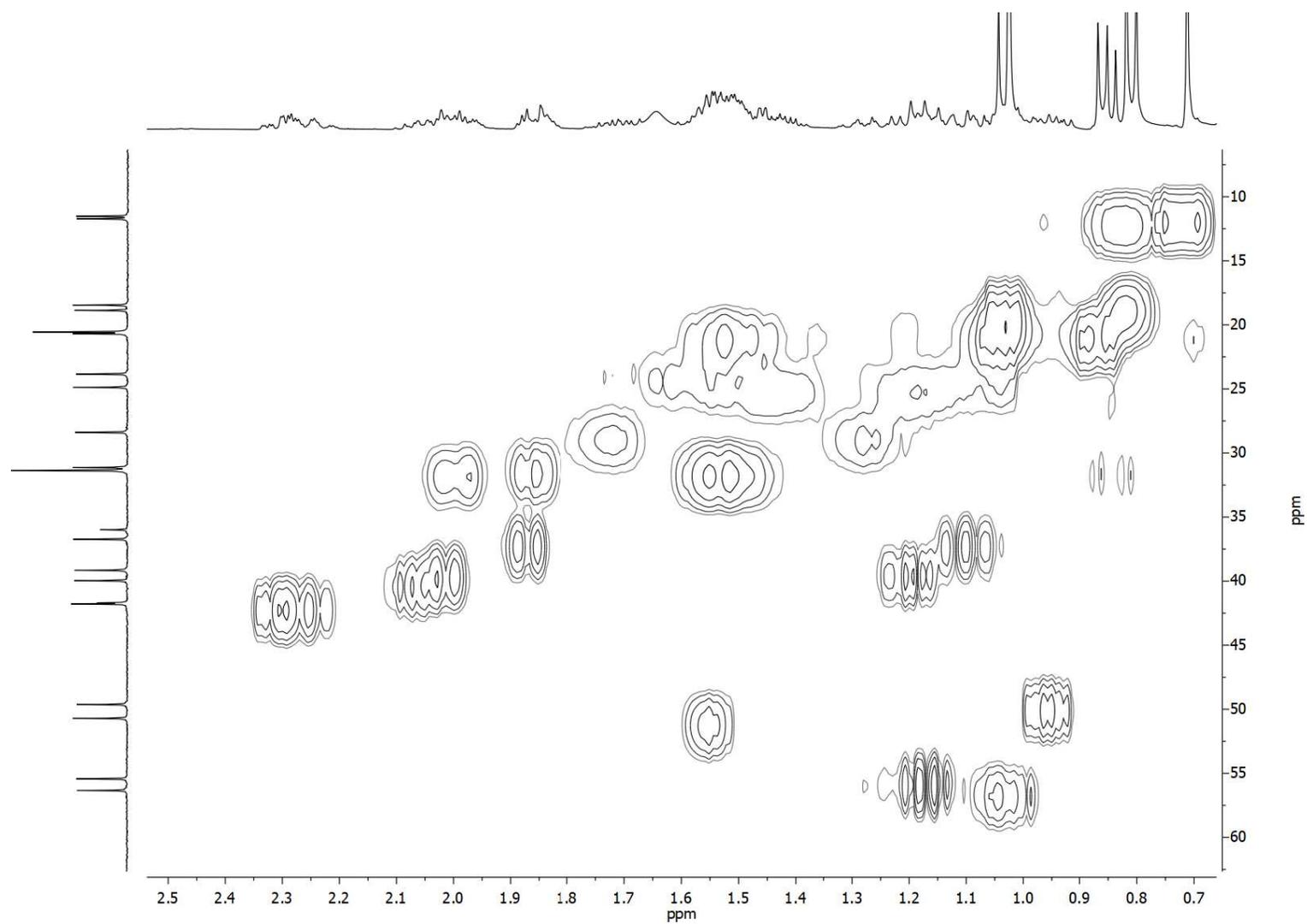
Figura 181 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ_{C} 12,0–58,0) do composto **IV** (100 MHz, CDCl_3).

Fonte: o autor.

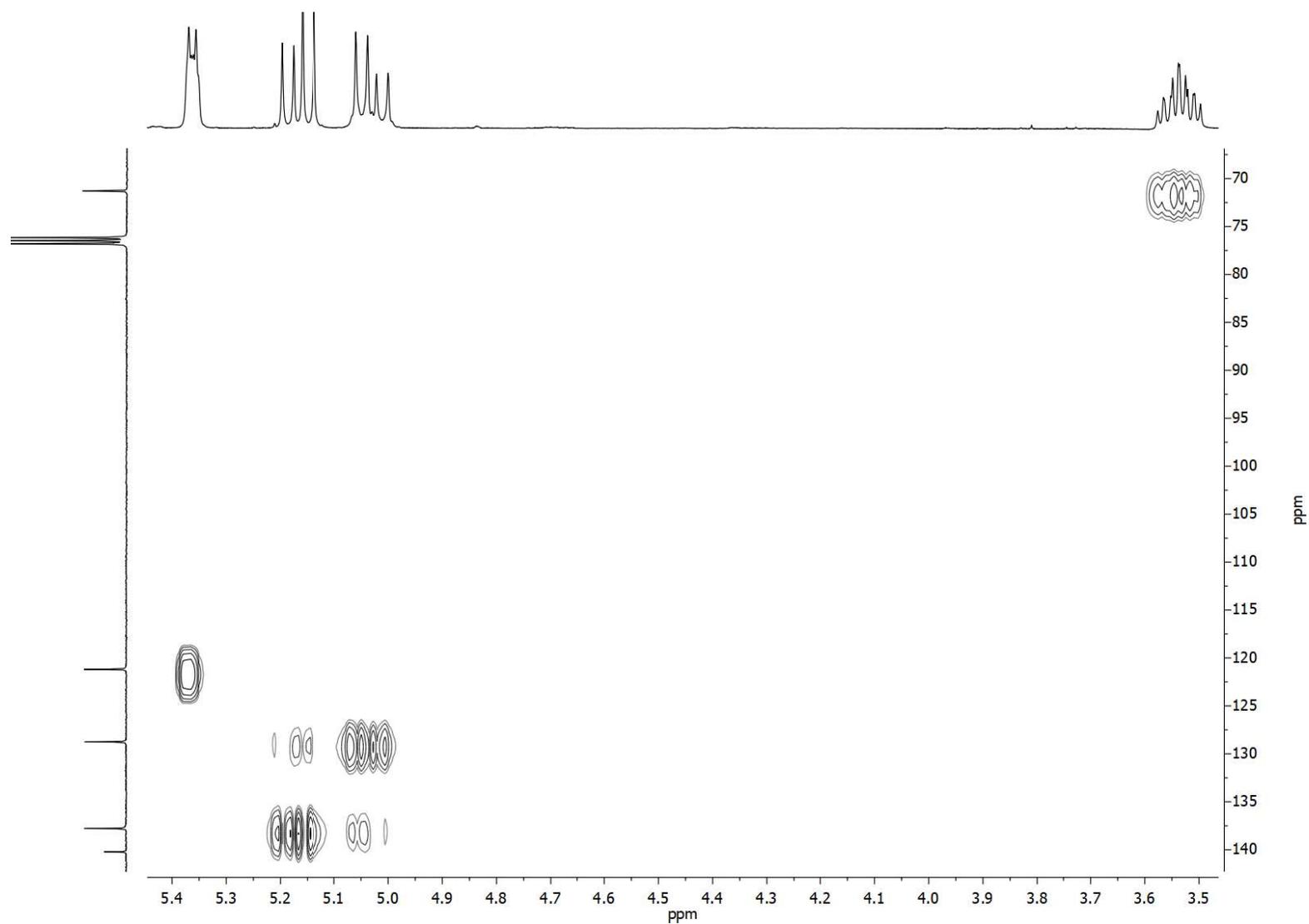
Figura 182 – Ampliação do espectro de RMN DEPT135 (δ_c 21,0–43,0) do composto **IV** (100 MHz, CDCl_3).



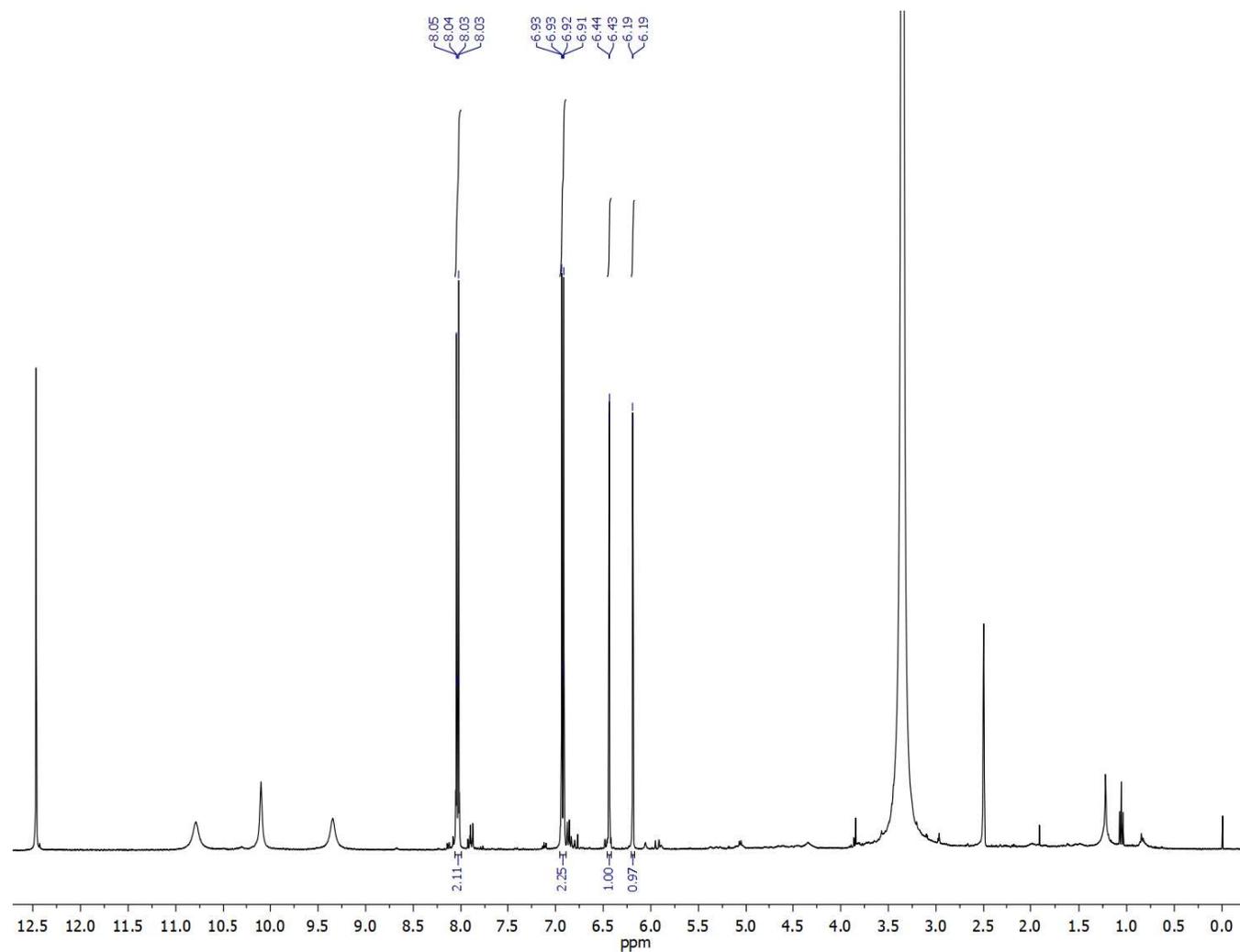
Fonte: o autor.

Figura 183 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **IV** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

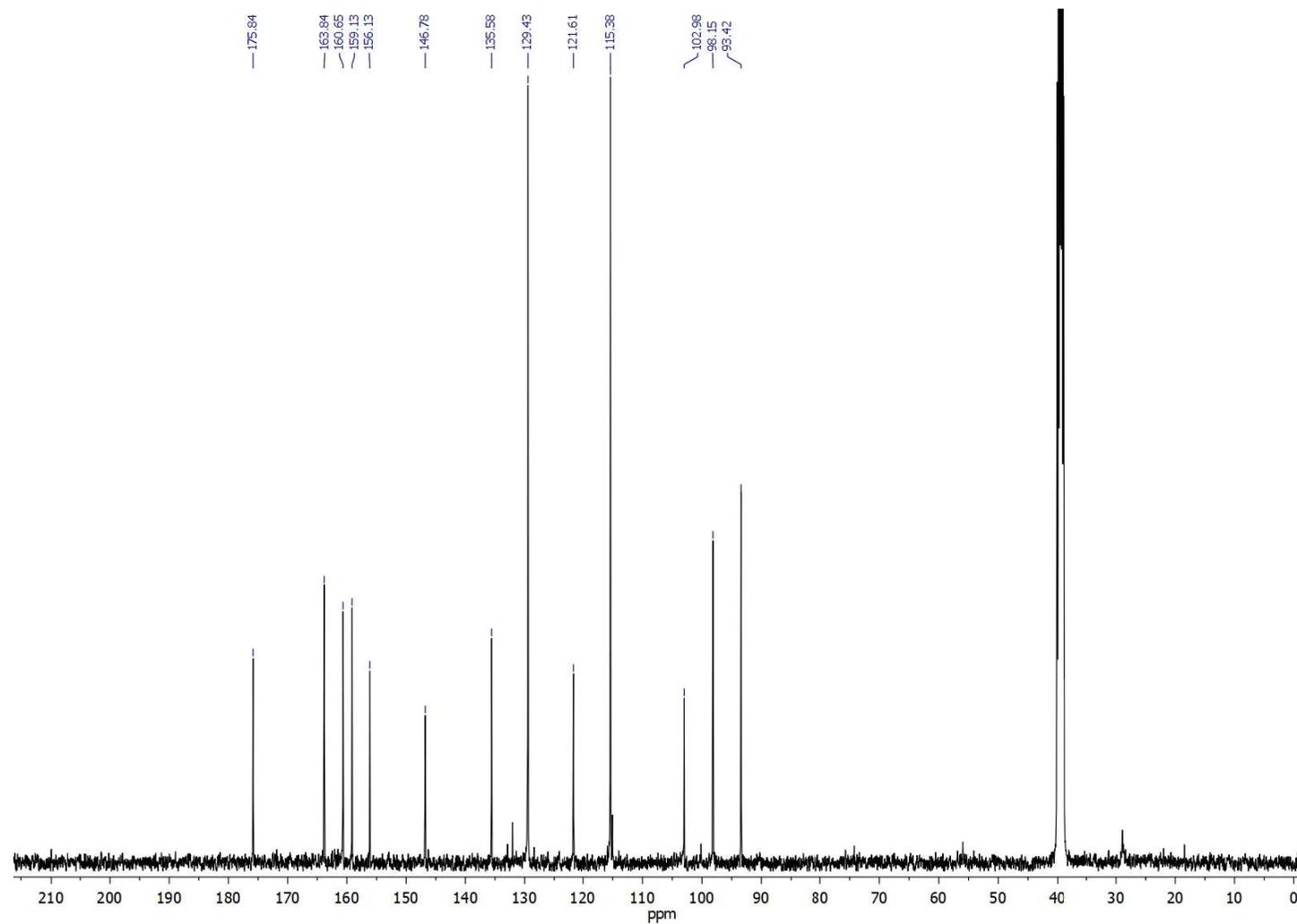
Figura 184 – Ampliação do mapa de contorno HSQC do composto **IV** (400 MHz, CDCl₃).

Fonte: o autor.

Figura 185 – Espectro de RMN de ^1H do composto V (400 MHz, DMSO).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

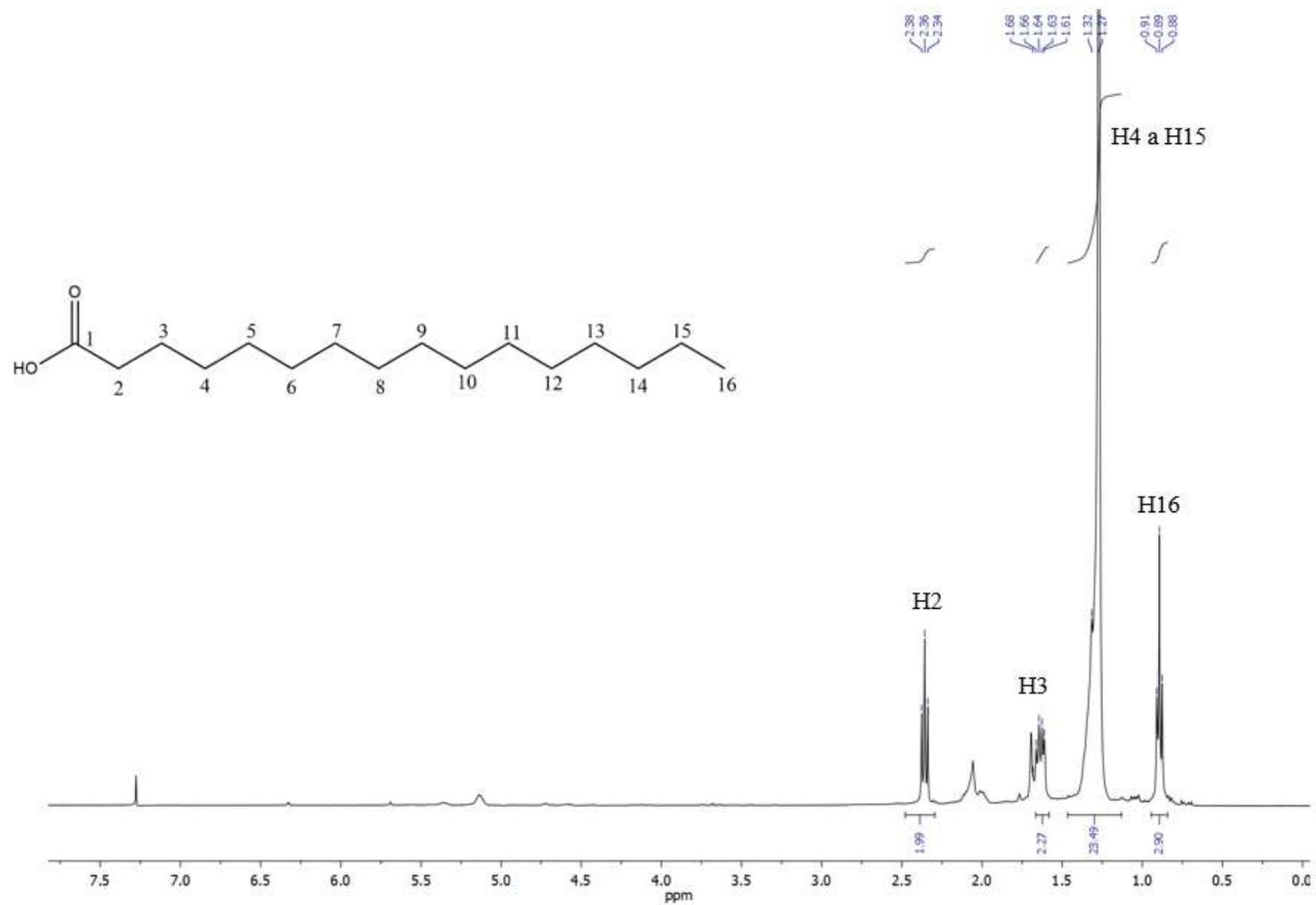
Fonte: o autor.

Figura 186 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto V (100 MHz, DMSO).

Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

Figura 187 – Espectro de RMN de ^1H do composto VI (400 MHz, CDCl_3).



Nota: Deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00).

Fonte: o autor.

**APÊNDICE B – DADOS DE RMN DOS
COMPOSTOS ISOLADOS COMPARADOS AOS DA
LITERATURA**

Tabela 42 – Dados de RMN do composto **I** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
1	–	–	135,75	135,5
2	6,28	6,27	107,48	107,3
3	–	–	144,27	144,1
4	–	–	138,22	138,1
5	–	–	150,77	150,6
6	6,50	6,48	111,55	111,4
7	3,24	3,24	40,16	40,0
8	5,90	5,93	137,60	137,4
9	5,06	5,06	116,11	115,9
10	3,84	3,83	56,27	56,1
11	3,88	3,87	61,21	61,0
1'	–	–	136,22	136,0
2'	6,79	6,79	113,24	113,1
3'	–	–	153,69	153,5
4'	–	–	150,79	150,6
5'	6,82	6,81	119,62	119,4
6'	6,71	6,69	120,93	120,7
7'	3,37	3,37	40,29	40,1
8'	5,90	5,93	137,29	137,1
9'	5,06	5,06	116,08	115,9
10'	3,88	3,87	56,17	56,0

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (COSTA-SILVA et al., 2015).

Fonte: o autor.

Tabela 43 – Dados de RMN do composto **II** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
1	–	–	131,28	131,0
2	6,50	6,49	107,48	107,3
3	–	–	144,64	144,4
4	–	–	135,41	135,4
5	–	–	148,06	147,8
6	6,40	6,40	112,07	111,8
7	3,24	3,24	40,13	40,0
8	5,98	5,92	137,50	137,2
9	5,06	5,06	115,94	115,7
10	3,87	3,89	56,46	56,2
1'	–	–	136,64	136,4
2'	6,80	6,79	113,14	112,9
3'	–	–	150,62	150,4
4'	–	–	144,44	144,2
5'	6,89	6,89	119,72	119,5
6'	6,71	6,70	121,06	119,5
7'	3,36	3,36	40,18	39,9
8'	5,98	5,93	137,65	137,4
9'	5,06	5,06	116,20	116,0
10'	3,86	3,86	56,21	55,9

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (COSTA-SILVA et al., 2015).

Fonte: o autor.

Tabela 44 – Dados de RMN do composto **III** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
1	–	–	37,49	37,5
2	–	–	31,91	31,9
3	3,53	3,53	72,06	72,0
4	–	–	42,54	42,5
5	–	–	141,00	140,9
6	5,36	5,36	121,98	121,9
7	–	–	32,14	32,1
8	–	–	32,16	32,1
9	–	–	50,36	50,3
10	–	–	36,75	36,7
11	–	–	21,33	21,3
12	–	–	40,01	39,9
13	–	–	42,56	42,6
14	–	–	57,01	56,9
15	–	–	24,55	26,3
16	–	–	28,50	28,5
17	–	–	56,29	56,3
18	–	–	36,39	36,3
19	0,92	0,93	19,27	19,2
20	–	–	34,18	34,2
21	–	–	26,29	26,3
22	–	–	46,07	46,1
23	–	–	23,30	23,3
24	0,84	0,84	12,23	12,2
25	–	–	29,37	29,4
26	0,83	0,83	20,07	20,1
27	0,81	0,81	19,65	19,6
28	0,70	0,68	19,02	19,0
29	1,01	1,01	12,11	12,0

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (CHATURVEDULA, PRAKASH, 2012; NYIGO et al., 2016). Fonte: o autor.

Tabela 45 – Dados de RMN do composto **IV** em CDCl₃^a.

Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
1	–	–	37,51	37,31
2	–	–	32,14	31,69
3	3,53	3,52	72,06	71,81
4	–	–	42,55	42,35
5	–	–	141,00	140,80
6	5,36	5,35	121,96	121,69
7	–	–	31,91	31,94
8	–	–	32,14	31,94
9	–	–	50,41	50,20
10	–	–	36,77	36,56
11	–	–	21,33	21,11
12	–	–	39,93	39,74
13	–	–	42,47	42,35
14	–	–	57,12	56,91
15	–	–	24,61	24,39
16	–	–	29,17	28,96
17	–	–	56,21	56,06
18	–	–	40,74	40,54
19	0,92	1,02	21,47	21,11
20	–	5,16	138,57	138,37
21	–	5,02	129,53	129,32
22	–	–	51,49	51,29
23	–	–	25,66	25,44
24	–	–	12,50	12,27
25	–	–	32,14	31,94
26	–	–	19,23	21,26
27	–	–	19,65	19,02
28	0,70	1,01	21,33	19,42
29	1,01	0,68	12,30	12,07

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (SRIGHT et al., 1978;

FERREIRA, 2011). Fonte: o autor.

Tabela 46 – Dados de RMN do composto V em DMSO^a.

Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
2	–	–	146,78	146,1
3	–	–	135,58	135,5
4	–	–	175,84	175,7
5	–	–	160,65	156,0
6	6,19	6,2	98,15	98,2
7	–	–	163,84	163,8
8	6,43	6,44	93,42	93,4
9	–	–	156,13	160,5
10	–	–	102,98	102,9
1'	–	–	121,61	121,6
2'	8,04	8,05	129,43	129,3
3'	6,92	6,94	115,38	115,3
4'	–	–	159,13	159,0
5'	6,92	6,94	115,38	115,3
6'	8,04	8,05	129,43	129,3

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (MOURA, VILEGA, SANTOS, 2010; SCOTTI et al., 2011).

Fonte: o autor.

Tabela 47 – Dados de RMN do composto VI em CDCl₃^a.

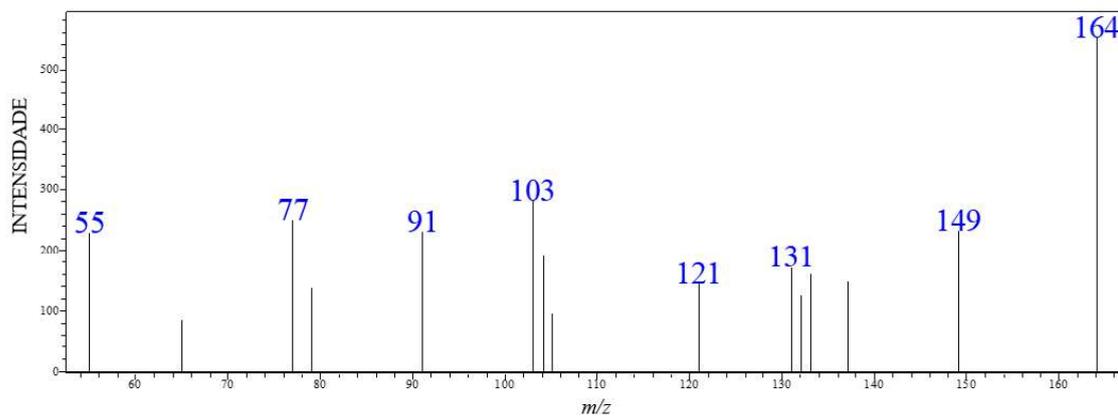
Posição	¹ H δ _H ^a	¹ H δ _H ^b	¹³ C δ _C ^a	¹³ C δ _C ^b
1	–	–	180,33	182,61
2	2,36	2,34	34,31	36,68
3	1,65	1,64	24,93	25,35
4	1,27	1,26	29,84	27,33
5	1,27	1,26	29,84	32,09
6	1,27	1,26	29,84	32,24
7	1,27	1,26	29,84	32,32
8	1,27	1,26	29,84	34,58
9	1,27	1,26	29,84	31,71
10	1,27	1,26	29,68	31,89
11	1,27	1,26	29,61	32,02
12	1,27	1,26	28,49	32,95
13	1,27	1,26	28,31	32,24
14	1,27	1,26	32,18	32,32
15	1,27	1,26	22,94	24,48
16	0,89	0,88	14,36	16,78

Nota: ^aExperimentos de RMN realizados a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz e deslocamentos químicos (δ) em ppm estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bDados da literatura (WISHART et al., 2009).

Fonte: o autor.

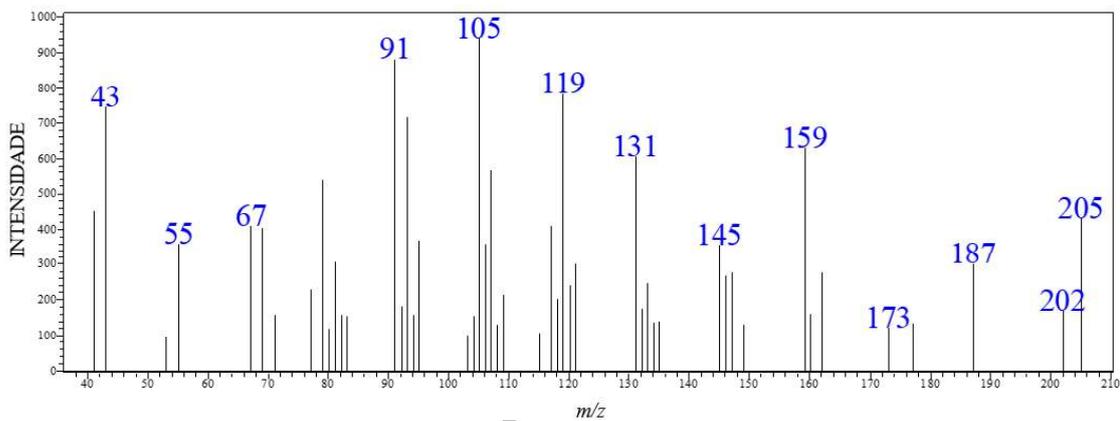
APÊNDICE C – EM-IE por CG-EM dos EHF e EHG

Figura 188 – EM-IE do eugenol (VII) obtido por CG-EM.



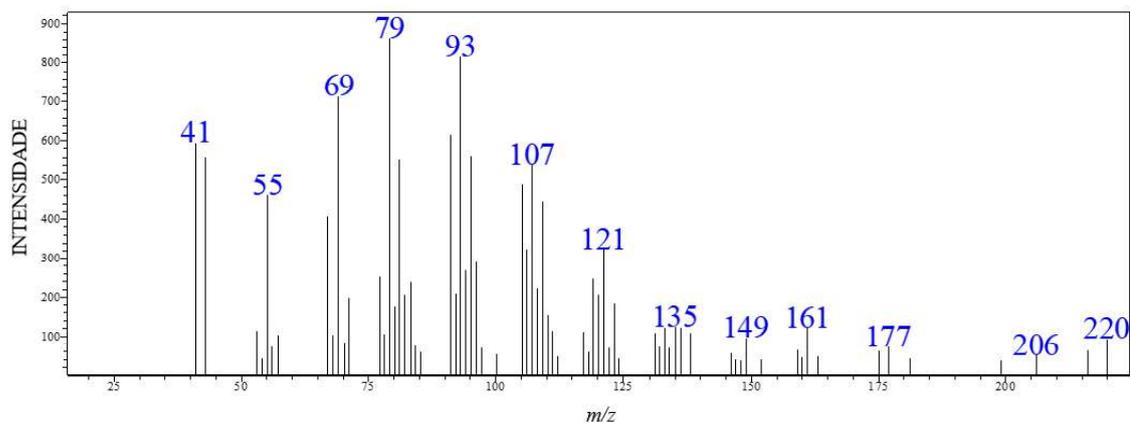
Fonte: o autor.

Figura 189 – EM-IE do espatulenol (VIII) obtido por CG-EM.



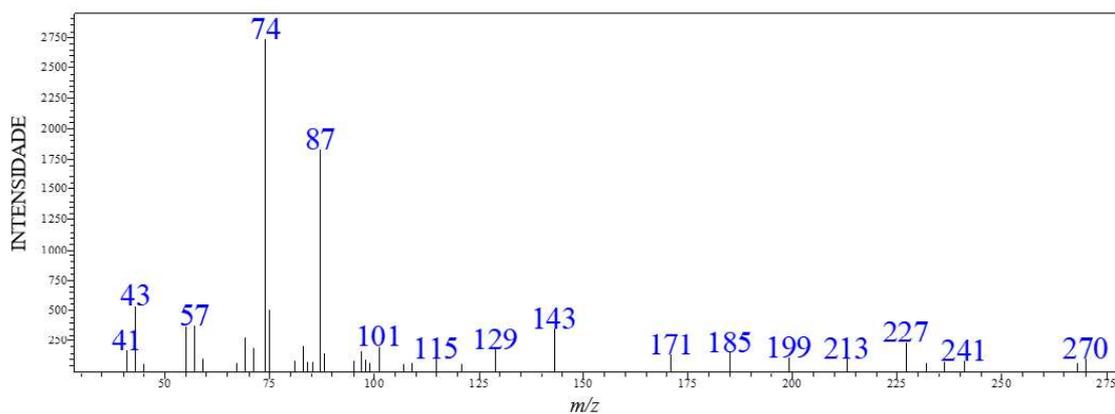
Fonte: o autor.

Figura 190 – EM-IE do óxido de cariofileno (IX) obtido por CG-EM.



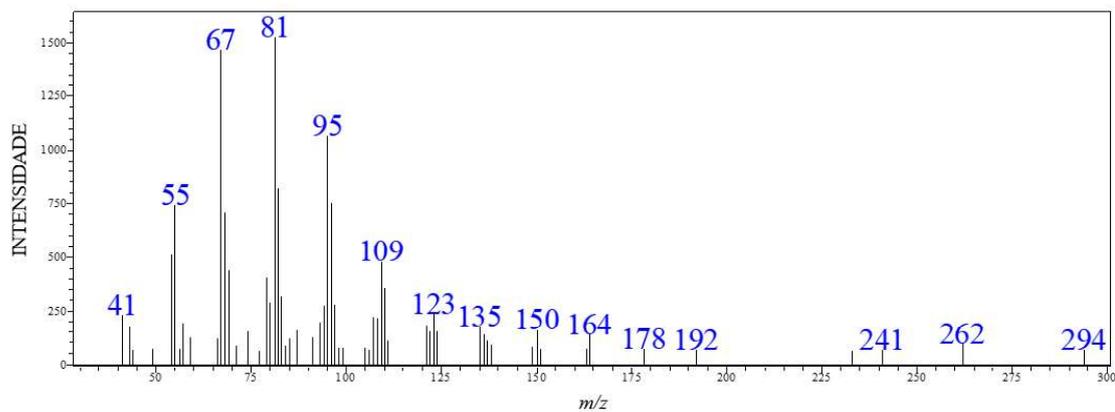
Fonte: o autor.

Figura 191 – EM-IE do hexadecanoato de metila (X) obtido por CG-EM.



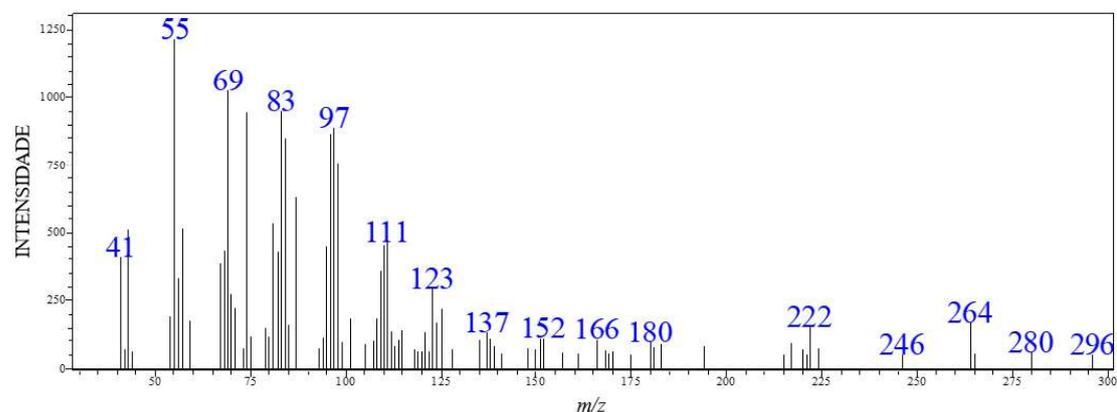
Fonte: o autor.

Figura 192 – EM-IE do (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila (XI) obtido por CG-EM.



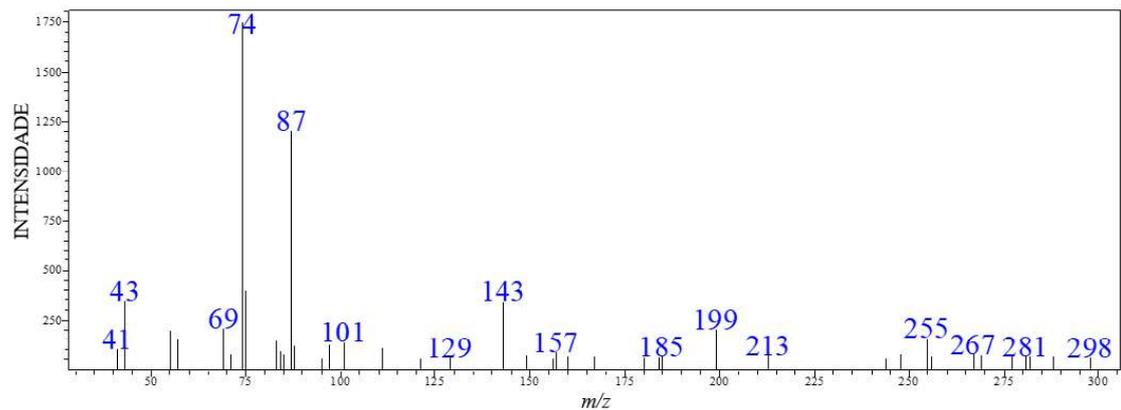
Fonte: o autor.

Figura 193 – EM-IE do (9E)-octadec-9-enoato de metila (XII) por CG-EM.



Fonte: o autor.

Figura 194 – EM-IE do octadecanoato de metila (XIII) obtido por CG-EM.



Fonte: o autor.

APÊNDICE D – PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos publicados

1. **Rafael A. C. Souza**, Waleska R. P. Costa, Eduardo de Franca Faria, Meliza A. de S. Bessa, Ralciane de P. Menezes, Carlos H. G. Martins, Pedro I. S. Maia, Victor M. Deflon, Carolina G. Oliveira. *Copper(II) complexes based on thiosemicarbazone ligand: preparation, crystal structure, Hirshfeld surface, energy framework, antiMycobacterium activity, in silico and molecular docking studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111543>.

2. Anderson da Silva Rabello, Mayura Marques Magalhães Rubinger, **Rafael Aparecido Carvalho Souza**, Silvana Guilardi, Guilherme Ferreira de Lima, Éder do Couto Tavares, Édipo da Penha Zanon, Giovanna Rodrigues Nobile da Silva, Laércio Zambolim, Javier Ellena. *Syntheses, characterization, crystal structure, hirshfeld surface analysis and antifungal activity of sulfonamides derived from a Morita-Baylis-Hillman adduct*. Journal of Brazilian Chemical Society, 2021.

3. **Rafael Aparecido Carvalho Souza**, Bruno Antonio Ferreira, Francielle Borges Rosa de Moura, Tiara da Costa Silva, Felipe Cavalcanti, Eduardo de Faria Franca, Raquel Maria Ferreira de Sousa, Jenifer de Lima Febronio, João Henrique Ghilardi Lago, Fernanda de Assis Araújo, Alberto de Oliveira. *Dehydrodieugenol B and hexane extract from Endlicheria paniculata regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model*. Fitoterapia, 147, 104767, 1–11, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104767>.

4. Laísa de P. Fernandes, Júlia M. B. Silva, Daniel O. S. Martins, Mariana B. Santiago, Carlos H. G. Martins, Ana C. G. Jardim, Guedmiller S. Oliveira, Marcos Pivatto, **Rafael A. C. Souza**, Eduardo de F. Franca, Victor M. Deflon, Antonio E. H. Machado, Carolina G. Oliveira. *Fragmentation Study, Computational Data, Dual Anti-bactericidal and Anti-viral effects and Molecular Docking of Schiff Base Cobalt(III) Complexes*. International Journal of Molecular Sciences, 21(21), 8355, 1–17, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21218355>.

5. Nathalia M. Albuini-Oliveira, Mayura M. M. Rubinger, Silvana Guilardi, **Rafael A. C. Souza**, Javier Ellena, Natalia Alvarez, Eder C. Tavares, Carlos H. C. Zacchi, Antonio E. C. Vidigal, Marcelo S. Lima, Laercio Zambolim. *New allyldithiocarbimate salts: Synthesis,*

structure and antifungal activity. Journal of Molecular Structure, 1214, 128149, 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128149>.

6. Waleska R. P. Costa, **Rafael A. C. Souza**, Victor M. Deflon, Carolina G. Oliveira. *Preparation, structural characterization, voltammetry and Hirshfeld Surfaces Analysis of homoleptic Iron(III) thiosemicarbazone complexes*. Transition Metal Chemistry 45, 511–521, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11243-020-00404-w>.

7. Vidigal, A. E. C.; Rubinger, Mayura M. M.; Lucas F. Da Silva; Zambolim, L.; Arthur B. D. Pereira; Silvana Guilardi; **Rafael A. C. Souza**; Javier Ellena. *New allyldithiocarbimates: synthesis, structure and antifungal activity against Phakopsora pachyrhizi and Hemileia vastatrix*. Journal of Brazilian Chemical Society, 31, 703–715, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190234>.

8. Vidigal, Antonio E. C.; Rubinger, Mayura M. M.; De Queiroz, Luan F.; Da Silva, Lucas F.; Zambolim, Laércio; Guilardi, Silvana; **Souza, Rafael A. C.**; Ellena, Javier; Wetler, Emiliana B.; Oliveira, Marcelo R. L. *Nickel complexes with phosphines and N-R-sulfonyldithiocarbimato ligands: New antifungals for the control of Hemileia vastatrix and Phakopsora pachyrhizi*. Inorganica Chimica Acta, 486, 724–732, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.11.037>.

9. **Souza, R. A. C.**; S. Guilardi; Rubinger, M. M. M.; Terra, L. R.; Tavares, E. C.; Ellena, J. A. *Crystal structure of N-(2-cyano-1-phenylprop-2-en-1-yl)-4-methylbenzenesulfonamide*. Journal of Structural Chemistry, 59, 1232, 2018. <https://doi.org/10.1134/S0022476618050244>.

10. Bomfim Filho, Lucius F. O.; Oliveira, Marcelo R. L.; Miranda, Liany D.L.; Vidigal, Antonio E. C.; Guilardi, Silvana; **Souza, Rafael A. C.**; Ellena, Javier; Ardisson, José D.; Zambolim, Laércio; Rubinger, Mayura M. M. *Syntheses, characterization and antifungal activity of novel dimethylbis(N-R-sulfonyldithiocarbimato)stannate(IV) complexes*. Journal of Molecular Structure, 1129, 60–67, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.08.084>.

Capítulos de livros publicados

1. Carolina Gonçalves Oliveira, Laísa de P. Fernandes, Júlia M. B. Silva, Daniel O. S. Martins, Mariana B. Santiago, Carlos H. G. Martins, Ana C. G. Jardim, Marcos Pivatto, Rafael A. C. Souza, Victor M. Deflon. Fragmentation study, dual anti-bactericidal and anti-viral effects and molecular docking of cobalt (III) complexes. In: Rossano Sartori Dal Molin, Anderson Nunes Lopes. *Infectologia bases epidemiológicas e clínicas*. 1. ed. São Paulo: Editora Científica, 2021. cap. 2, p. 33–55. <https://doi.org/10.37885/210303625>.

Artigos em andamento

1. Ritielly Maria Guimarães Guerino, Junilson Augusto de Paula Silva, Débora de Jesus Pires, **Rafael Aparecido Carvalho Souza**, Raquel Maria Ferreira de Sousa, Alberto de Oliveira, Isa Lucia de Moraes. *Evaluation of the toxic activity of decomposition water of leaves of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake (Myrtaceae) using *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) as a test organism and analysis of its chemical composition by CGMS*. **Submetido**.

2. David Jackson Vieira Borges, Jean Carlos Santos, **Rafael Aparecido Carvalho Souza**, Alberto De Oliveira, Raquel Maria Ferreira De Sousa. *Responses of the predator *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) to volatile organic compounds in leaves of *Eucalyptus urograndis* (Myrtaceae) and identification of the chemical composition of its essential oil*. *Journal Of Chemical Ecology*. **Submetido**.

3. **Rafael Aparecido Carvalho Souza**, Bruno Antonio Ferreira, Francielle Borges Rosa de Moura, Tiara da Costa Silva, Felipe Cavalcanti, Eduardo de Faria Franca, Raquel Maria Ferreira de Sousa, Jenifer de Lima Febronio, João Henrique Ghilardi Lago, Fernanda de Assis Araújo, Alberto de Oliveira. *Methyl dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model*.

4. Carolina G. Oliveira, **Rafael A. C. Souza**, Eduardo de Franca Faria, Victor M. Deflon. *Nickel(II) complex of novel thiosemicarbazone compound: Synthesis, molecular docking study, voltammetry, structural characterization, hirshfeld surfaces analysis and energy framework calculation*.

5. **Rafael A. C. Souza**, Silvana Guilardi, Angélica F. Maia, Róbson R. Teixeira, Javier A. Ellena. *Crystal structure, hirshfeld surface analysis and energy framework calculation of a chiral isobenzofuranone 3-[2(4-methylphenyl)-2-oxoethyl]isobenzofuran-1(3H)-one.*

Colaborações em andamento

1. Frank Silva – Dissertação de mestrado em orgânica de produtos naturais.
2. Aline Gomes – Dissertação de mestrado em orgânica de produtos naturais.
3. Daiane Oliveira – Tese de doutorado em orgânica de produtos naturais.

Resumos apresentados em congressos

1. **Rafael A. C. Souza**; Raquel M. F. Sousa; Frank S. da Silva; João Henrique G. Lago; Tiara C. Silva; Felipe Cavalcanti; Francisco J. T. Aquino; Alberto de Oliveira. *Antioxidant studies of extract and isolated compounds from leaves of Endlicheria paniculata*, In: XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba.
2. Taís S. Adriano; Daiane M. Oliveira; **Rafael A. C. Souza**; Francisco J. T. Aquino; Hans G. Garces; Marcos Pivatto; Fabiana B. Furtado; Alberto de Oliveira. *Atividade antifúngica e prospecção fitoquímica dos extratos e das frações das raízes externas da Solanum subumbellatum*, In: XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba.
3. Francisco José Torres de Aquino; Frank Silva; Alberto de Oliveira; Raquel Sousa; Sérgio Antônio Lemos de Moraes; **Rafael Aparecido Carvalho Souza**. *Chemical prospecting and antioxidant activity of ethanol extract from flowers' peduncules from Cassia bakeriana Craib.*, In: 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, 2019, Rio de Janeiro.
4. **Rafael A. C. Souza**; S. Guilardi; N. M. Albuini; M. M. M. Rubinger; E. C. Tavares; C. H. C. Zacchi; L. Zambolim; M. R. L. Oliveira; A. E. C. Vidigal; J. A. Ellena. *Estrutura cristalina de dois novos sais de alilditiocarbimatos de tetrafenilfosfônio*, In: 24th ABCr Meeting, 2019, Curitiba.

5. David Borges; **Rafael Aparecido Carvalho Souza**; Jean Santos; Alberto de Oliveira; Raquel Sousa. *Identification of volatile compounds by simulated herbivory of young and mature leaves from Eucalyptus grandis (Myrtaceae)*, In: 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, 2019, Rio de Janeiro.

6. **Rafael A. C. Souza**; Silvana Guilardi; Antonio E. C. Vidigal; Mayura M. M. Rubinger; Marcelo R. L. Oliveira; Javier Ellena. *Novos Complexos Heterolépticos de Paládio com 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno e Ditiocarbimatos: Síntese e Estrutura Cristalina*, In: XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba.

7. **Rafael Aparecido Carvalho Souza**; Bruno Antônio Ferreira; Francielle Moura; Tiara da Costa Silva; Raquel Sousa; Joao Lago; Fernanda de Assis Araújo; Alberto de Oliveira. *Phytochemistry characterization of hexane extracts from branches and leaves of Endlicheria paniculata and inflammatory studies by sponge implants*, In: 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, 2019, Rio de Janeiro.

8. Frank S. da Silva; Bianka Gomes Costa; **Rafael A. C. Souza**; Alberto de Oliveira; Morais, S. A.; Francisco J. T Aquino. *Prospecção fitoquímica e análise por CG-EM do extrato hexânico das flores Cassia Bakeriana Craib*, In: XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba.

9. Kamila N. Maia; Daiane M. Oliveira; **Rafael A. C. Souza**; Francisco J. T. Aquino; Hans G. Garces; Marcos Pivatto; Fabiana B. Furtado; Alberto de Oliveira. *Prospecção fitoquímica e atividade antifúngica dos extratos dos galhos de Solanum subumbellatum (SOLANACEAE)*, In: XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Uberaba.

10. **Rafael A. C. Souza**; Bruno Antônio Ferreira; Francielle Borges Rosa de Moura; Raquel Maria Ferreira de Sousa; Simone dos Santos Greco; Joao Henrique Ghilardi Lago; Fernanda de Assis Araújo; Alberto de Oliveira. *Anti-inflammatory effect of a phenylpropanoid dimer, isolated from Endlicheria paniculata, in a inflammatory response induced by sponge implants*, In: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018, São Paulo.

11. **Rafael A. C. Souza**; Raquel M. F. Sousa; João Henrique G. Lago; Simone S. Grecco; Tiara da C. Silva; Alberto de Oliveira. *Neolignans isolated from leaves of Endlicheria paniculata (Lauraceae)*, In: Brazilian Conference on Natural Products and XXXII RESEM, 2017, Vitoria.
12. Antônio Eustáquio Carneiro Vidigal; Mayura Marques Magalhaes Rubinger; Marcelo Ribeiro Leite Oliveira; Silvana Guilardi; **Rafael Aparecido Carvalho Souza**; Javier Ellena. *Syntheses and crystal structure of heteroleptic platinum(ii) complexes with dithiocarbimates and 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene*, In: 46th World Chemistry Congress, 40a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo.
13. **Rafael A. C. Souza**; S. Guilardi, A. E. C.; A. E. C. Vidigal; M. M. M. Rubinger; M. R. L. Oliveira; J. A. Ellena. *Synthesis and crystalline structure of (Z)-2-(methoxycarbonyl)-3-(4-nitrophenyl)allyl (methylsulfonyl) dithiocarbimate of tetraphenylphosphonium compound*, In: 23rd Brazilian Crystallographic Association (ABCr), 2017, Vitoria.

Apresentação de trabalhos em congressos

1. **Souza, R. A. C.**; Guilardi, S.; Vidigal, A. E. C.; Rubinger, M. M. M.; Oliveira, M. R. L.; Ellena, J. A. *Síntese e estrutura cristalina de dois novos complexos heterolépticos de níquel(II) com 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno e ditiocarbimatos*, 2019.
2. **Rafael A. C. Souza**; Raquel Sousa; Joao Lago; Leticia A. Corrêa; Maria L. R. Souza; Tiara Da Costa Silva; Felipe Cavalcanti; Alberto De Oliveira. *Isolation and characterization by NMR and HRMS of β -sitosterol from hexane extract of branches of Endlicheria paniculata*, 2018.
3. **Rafael Aparecido Carvalho Souza**; Conrado, J. A. M.; Barbosa, B. L. C.; Dias, M. F.; Lima, V. A. *Ponto de Impacto: prova da existência de vida extraterrestre por meio da literatura*, 2018.
4. Josiele A. Magalhaes Conrado; Bruna L. C. Barbosa; Jeanderson M De Alcantra Barbosa; Maurilio R. Da Silva Jr; Maria F. Dias; **Rafael A. C. Souza**; Viviani A. De Lima. *O uso de*

materiais de baixo custo e fácil obtenção para a realização de uma experimentação alternativa problematizadora e em espaços não convencionais, 2017.