



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

Estudo fitoquímico e investigação da atividade imunomoduladora de
metabólitos secundários de *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae)

João Pessoa – PB

2018

CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

Estudo fitoquímico e investigação da atividade imunomoduladora de metabólitos secundários de *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de Concentração: **FARMACOQUÍMICA**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares
COORIENTADORA: Profa. Dra. Ivana Maria Fachine

JOÃO PESSOA – PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192e Dantas, César Augusto Gonçalves.

Estudo fitoquímico e investigação da atividade
imunomoduladora de metabólitos secundários de
Erythroxylum simonis Plowman (Erythroxylaceae) / César
Augusto Gonçalves Dantas. - João Pessoa, 2018.
135 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.

Coorientação: Ivana Maria Fachine.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Guarda-Orvalho. 2. Erythroxylaceae. 3. Flavonoides.
4. Inflamação. 5. Plantas medicinais. I. Tavares,
Josean Fachine. II. Fachine, Ivana Maria. III. Título.

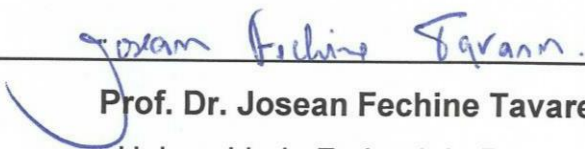
UFPB/BC

CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

**Estudo fitoquímico e investigação da atividade imunomoduladora de
metabólitos secundários de *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae)**

Dissertação aprovada em 19/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Universidade Federal da Paraíba

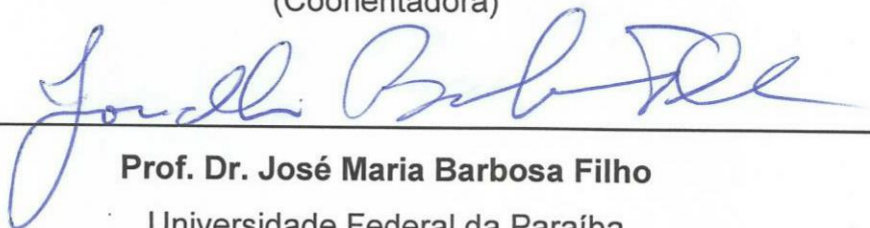
(Orientador)



Profa. Dra. Ivana Maria Fachine

Universidade Estadual da Paraíba

(Coorientadora)



Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Universidade Federal da Paraíba

(Examinador Interno)



Prof. Dr. Harley da Silva Alves

Universidade Estadual da Paraíba

(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cuidar de mim todos os dias e me conduzir pelos melhores cominhos.

Aos meus pais, Rilvaneide e João Teodoro (*In memoriam*), por todo amor, carinho, educação e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus tios, Renilda e Nelson, pelos cuidados e acolhimento durante toda a minha vida.

Aos meus tio, Suderley e Tathiana, e aos meus primos, Téo e Vinicius, pela confiança, incentivos, amizade e apoio quando vim morar aqui em João Pessoa.

Ao meu orientador, Professor Doutor Josean Fachine Taveres, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, confiança, ensinamentos e por toda ajuda e disponibilidade durante o mestrado.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ivana Maria Fachine, pela amizade, conhecimentos e por me apresentar à fitoquímica.

Ao Doutor Vicente Carlos Oliveira Costa e ao Professor Doutor Marcelo Sobral da Silva, pelos ensinamentos e contribuições na parte espectroscópica.

Ao doutorando e amigo Lucas Abreu, pelos conhecimentos e por toda sua disponibilidade em me ajudar durante as etapas de isolamento e identificação das substâncias.

À Professora Doutora Sandra Rodrigues Mascarenha e sua equipe, pelo auxílio na realização dos testes biológicos.

À Professora Doutora Maria de Fátima Agra, pela identificação da espécie.

À Professora Doutora Mariana Sobral e sua equipe, por disponibilizar o laboratório e o espectrômetro de ultravioleta.

Às Professora Doutoras Bagnólia e Fabiana, pelos ensinamentos e ajuda durante o meu mestrado.

Aos técnicos Evandro Ferreira, Raimundo Nonato e Alexsandro Marinho, pelo auxílio nos laboratórios da farmacoquímica.

Aos meus amigos da graduação, Arthur, Fernanda e Amanda, pela amizade, apoio e por sempre estarem comigo.

Aos meus amigos de mestrado, Sarah Dantas, Danilo Duarte e Luiz Agra, por toda amizade, conversas diárias e companhia durante esses dois anos.

À minha amiga Juliana de Medeiros, pelo carinho, paciência, disponibilidade e por toda ajuda nos experimentos.

Aos amigos da comissão organizadora do III e IV Curso de Verão de Farmacologia do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Aos amigos de laboratório, Ana Rita, André, Laiane, Sabrina, Joanda, Diego, Yuri, Roseane, Kaio, Márcio, Rodrigo, Fiama, Hídna, Anderson, Ramon, Jociano, Pedro, Jordana, Ranna e todos da equipe SFCB.

Aos professores da pós-graduação por seus ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Estudo fitoquímico e investigação da atividade imunomoduladora de metabólitos secundários de *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae).

Dantas, C. A. G.

**Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2018).**

RESUMO

Durante séculos a sociedade humana faz uso de plantas com fins medicinais, sendo provavelmente um dos primeiros meios que a humanidade buscou para aliviar suas dores e enfermidades. *Erythroxylum simonis* Plowman, conhecida popularmente como “Guarda-Orvalho” é uma espécie da família Erythroxylaceae com distribuição em alguns estados da região Nordeste do Brasil. Este trabalho tem como objetivo efetuar uma abordagem fitoquímica e avaliar o potencial imunomodulador de metabólitos secundários isolados de *Erythroxylum simonis*. As partes aéreas da espécie foram coletadas na Mata Pau-Ferro no município de Areia – PB. Após secagem e pulverização foi realizada uma extração do material vegetal e posterior partição do extrato resultando nas fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica. O teor de fenólicos totais no extrato etanólico bruto foi determinado por espectrofotometria utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu*. A partir de técnicas cromatográficas realizadas com a fase acetato de etila foi possível isolar 6 compostos: ácido protocatecuico, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, quercetina-3-sambubiosídeo, canferol-3-sambubiosídeo e canferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo. Estes foram identificados por espectroscopia de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais. Para avaliação da atividade imunomoduladora dos flavonoides quercetina-3-sambubiosídeo e canferol-3-sambubiosídeo, camudongos fêmeas foram estimulados com tioglicolato (4%) na cavidade peritoneal para obtenção dos macrófagos. A determinação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT. Foi estudado, *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações das amostras (10 μM , 50 μM e 100 μM) na produção de óxido nítrico (NO) pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess. O efeito modulador desses flavonóis em diferentes concentrações, sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL-6 foram analisadas por ELISA. Nenhuma das concentrações dos flavonóis testados foi capaz de reduzir a viabilidade celular e de interferir na produção do NO e das citocinas TNF- α e IL-6 produzidas por macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Os resultados obtidos deste trabalho, contribuíram para o conhecimento fitoquímico e farmacológico do gênero *Erythroxylum* e da espécie *Erythroxylum simonis*.

Palavras-chaves: Guarda-Orvalho, Erythroxylaceae, flavonoides, inflamação, plantas medicinais.

**Phytochemical study and investigation of the immunomodulatory activity of secondary metabolites from *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae).
Dantas, C. A. G.**

**Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2018).**

ABSTRACT

For centuries human society has made use of medicinal plants, and is probably one of the first means humanity has sought to alleviate its pains and infirmities. *Erythroxylum simonis* Plowman, commonly known as "Guarda Orvalho" is a species of the Erythroxylaceae family with distribution in some states of the Northeast region of Brazil. This work aims to make a phytochemical approach and evaluate the immunomodulatory potential of secondary metabolites isolated from *Erythroxylum simonis*. The aerial parts of the species were collected at Mata Pau-Ferro in the city of Areia - PB, after dried and pulverized, the extraction of the vegetal material and subsequent partitioning of the extract resulted in hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanolic phases. The total phenolic content in the ethanolic crude extract was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. It was possible to isolate 6 compounds: protocatechuic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, quercetin-3-sambubioside, kaempferol-3-sambubioside and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside. These were identified by mass and NMR ^1H and ^{13}C spectroscopy, using uni and bidimensional techniques. In order to evaluate the immunomodulatory activity of flavonoids quercetin-3-sambubioside and kaempferol-3-sambubioside, female mice were stimulated with thioglycollate (4%) in the peritoneal cavity to obtain the macrophages. Determination of cell viability was performed by the MTT assay. The effect of different concentrations of the samples (10 μM , 50 μM and 100 μM) on nitric oxide (NO) production was studied in vitro by the indirect colorimetric method known as Griess reaction. The modulating effect of these flavonols at different concentrations on the levels of TNF- α and IL-6 cytokines was analyzed by ELISA. None of the flavonol concentrations tested were able to reduce cell viability and to interfere in the production of NO and TNF- α and IL-6 cytokines produced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulated macrophages. The results obtained from this work contributed to the phytochemical and pharmacological knowledge of the genus *Erythroxylum* and the species *Erythroxylum simonis*.

Keywords: Guarda-Orvalho, Erythroxylaceae, flavonoids, inflammation, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial da família Erythroxylaceae.	25
Figura 2 - Espécie <i>Erythroxylum coca</i>	27
Figura 3 - Espécie <i>Erythroxylum simonis</i> Plowman	35
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.....	36
Figura 5 - Esqueletos básicos de flavonoides.....	38
Figura 6 - Cromatograma da fração ESFA-15.	48
Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) de Es-1.....	58
Figura 8 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) de Es-1 na região de 115 – 170 ppm.	59
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de Es-1.	59
Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de Es-1 na região de 6,72 – 7,36 ppm.	60
Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2.....	65
Figura 12 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 0 – 105 ppm	65
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 90 – 200 ppm.	66
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2.	66
Figura 15 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 6,65 – 7,70 ppm.	67
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 5,30 – 6,35 ppm.	67
Figura 17 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 1,80 – 4,30 ppm.	68
Figura 18 - Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2.....	68
Figura 19 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de (1,80– 5,40 ppm) x (30,0 – 95,0 ppm).....	69
Figura 20 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de (5,90– 8,00 ppm) x (100,0 – 155,0 ppm).....	69
Figura 21 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2.	70
Figura 22 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de (5,20– 8,20 ppm) x (100,0 – 190,0 ppm).....	70

Figura 23 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-2 na região de (3,45– 4,45 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).....	71
Figura 24 - Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-2 na região de (3,50 – 5,60 ppm) x (3,00 – 5,60 ppm).	71
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3.....	75
Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 34 – 84 ppm.	75
Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 112 – 132 ppm.	76
Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 144 – 182 ppm.	76
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-3.....	77
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 4,10 – 5,10 ppm.	77
Figura 31 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 1,60 – 2,60 ppm.	78
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de 6,30 – 7,70 ppm.	78
Figura 33 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3.....	79
Figura 34 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de (1,60– 5,00 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).....	79
Figura 35 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de (5,80– 8,10 ppm) x (100,0 – 165,0 ppm).....	80
Figura 36 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3.	80
Figura 37 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3 na região de (1,00– 4,80 ppm) x (10,0 – 100,0 ppm).....	81
Figura 38 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-2 na região de (4,50– 8,00 ppm) x (100,0 – 180,0 ppm).....	81
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-4.....	88
Figura 40 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-4 na região de 60 – 108 ppm.	88
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-4 na região de 110 – 185 ppm.	89
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-4.....	89

Figura 43 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 2,95 – 4,25 ppm.	90
Figura 44 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 4,70 – 6,50 ppm.	90
Figura 45 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 6,65 – 7,95 ppm.	91
Figura 46 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4.....	91
Figura 47 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de (2,80– 4,20 ppm) x (40,0 – 95,0 ppm).....	92
Figura 48 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de (4,40– 7,80 ppm) x (70,0 – 150,0 ppm).....	92
Figura 49 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4.	93
Figura 50 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de (3,00 – 5,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm).....	93
Figura 51 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de (5,90– 8,50 ppm) x (80,0 – 190,0 ppm).....	94
Figura 52 - Fragmentação da substância Es-4.	94
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	99
Figura 54 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 62 – 83 ppm.	99
Figura 55 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 90 – 180 ppm.	100
Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	100
Figura 57 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 2,90 – 4,15 ppm.	101
Figura 58 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 4,55 – 5,60 ppm.	101
Figura 59 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 5,80 – 6,65 ppm.	102
Figura 60 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 6,50 – 8,50 ppm.	102
Figura 61 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5.	103
Figura 62 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (2,80– 4,40 ppm) x (35,0 – 100,0 ppm).....	103

Figura 63 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-5 na região de (4,60– 8,20 ppm) x (80,0 – 150,0 ppm).....	104
Figura 64 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-5.	104
Figura 65 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-5 na região de (2,60– 5,60 ppm) x (50,0 – 140,0 ppm).....	105
Figura 66 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-5 na região de (6,10– 8,10 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).....	105
Figura 67 - Fragmentação da substância Es-5.	106
Figura 68 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6.....	110
Figura 69 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de 60 – 106 ppm.	110
Figura 70 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de 115 – 180 ppm.	111
Figura 71 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-6.....	111
Figura 72 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de 2,85 – 4,05 ppm.	112
Figura 73 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de 6,60 – 8,40 ppm.	112
Figura 74 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de 5,20 – 6,50 ppm.	113
Figura 75 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6.....	113
Figura 76 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de (2,50– 4,40 ppm) x (35,0 – 95,0 ppm).....	114
Figura 77 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de (5,30– 8,10 ppm) x (35,0 – 95,0 ppm).....	114
Figura 78 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6.	115
Figura 79 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de (2,80 – 5,60 ppm) x (40 – 150,0 ppm).....	115
Figura 80 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6 na região de (5,70– 8,50 ppm) x (80 – 180,0 ppm).....	116
Figura 81 - Fragmentação da substância Es-6.	116

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Elaboração e partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Erythroxylum simonis</i>	45
Esquema 2 – Fracionamento da fase acetato de etila.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Metabólitos secundários evidenciados em diferentes órgãos de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	28
Quadro 2 – Estruturas de alguns alcaloides tropânicos encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	29
Quadro 3 – Estrutura de alguns terpenoides encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	31
Quadro 4 – Estrutura de alguns flavonoides encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	33
Quadro 5 – Classificação botânica da espécie <i>Erythroxylum simonis</i>	35
Quadro 6 – Dados das reuniões das frações após monitoramento por CCDA.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de fenóis totais nas amostras (n=9), na concentração de 1 mg mL ⁻¹ . Dados expressos como média ± desvio padrão.	54
Tabela 2 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz, DMSO) de Es-1, ácido 3,4-dihidroxibenzóico (Ácido protocatecuico), em comparação aos dados obtidos por OU et al., 2012.	58
Tabela 3 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C, utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-2, ácido 3-O-cafeoilquínico, em comparação aos dados obtidos por NAKATANI et al., 2000.	64
Tabela 4 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C, utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-3, ácido 4-O-cafeoilquínico, em comparação aos dados obtidos por NAKATANI et al., 2000.	74
Tabela 5 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C, utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-4, quercetin-3-sambubiosídeo, em comparação aos dados obtidos por DENG et al., 2009.	87
Tabela 6 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, em comparação aos dados obtidos por LEE et al., 2016.	98
Tabela 7 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C, utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) de Es-6, canferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo, em comparação aos dados obtidos por DEMIREZER et al., 2006.	109

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido gálico como substância de referência. Absorbância 765 nm.....	54
Gráfico 2 - Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, na viabilidade de macrófagos peritoneais.....	117
Gráfico 3 - Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, na viabilidade de macrófagos peritoneais.....	118
Gráfico 4 – Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais.....	119
Gráfico 5 – Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais.....	120
Gráfico 6 – Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de TNF- α	121
Gráfico 7 – Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de TNF- α	122
Gráfico 8 – Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de IL-6.....	122
Gráfico 9 – Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de IL-6.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	“Attached Proton Test”
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dddd	Duplo duplo duplo dubleto
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato etanólico bruto
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESFA	Fase acetate de etila de <i>Erythroxylum simonis</i>
ESFB	Fase butanólica de <i>Erythroxylum simonis</i>
ESFC	Fase clorofórmica de <i>Erythroxylum simonis</i>
ESFH	Fase hexânica de <i>Erythroxylum simonis</i>
ESI	“Electrospray ionization”
EtOH	Etanol
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRESI-MS	“High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra”
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
J	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Múltiplo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
NO	Óxido nítrico

NOESY	“Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy”
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
R _f s	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
SBF	Soro fetal bovino
sl	Singleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Geral.....	23
2.2. Específicos	23
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
3.1. Considerações sobre a família Erythroxylaceae.....	25
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Erythroxylum</i>	25
3.3. Considerações sobre a espécie <i>Erythroxylum simonis</i> Plowman.....	34
3.4. Considerações sobre flavonoides.....	36
3.5. Considerações sobre inflamação	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Material e equipamentos utilizados.....	42
4.2. Material Vegetal.....	43
4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal	43
4.2.2. Processamento do material vegetal.....	43
4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto.....	43
4.4. Determinação do teor de fenólicos totais.....	43
4.5. Fracionamento do extrato etanólico bruto.....	44
4.6. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila	46
4.7. Processamento cromatográfico da fração ESFA 15 por CLAE....	47
4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados	48
4.9. Espectrometria de massas.....	49
4.10. Atividade imunomoduladora.....	49
4.10.1. Animais	49
4.10.2. Cultura de macrófagos peritoneais	50
4.10.3. Determinação da viabilidade celular	50
4.10.4. Determinação dos níveis de NO	51
4.10.5. Ensaio imunoenzimático para a detecção de citocinas.....	51
4.10.6. Análise Estatística.....	52

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Determinação do teor de fenólicos	54
5.2. Identificação estrutural de Es-1	56
5.3. Identificação estrutural de Es-2.....	61
5.4. Identificação estrutural de Es-3.....	72
5.5. Identificação estrutural de Es-4.....	82
5.6. Identificação estrutural de Es-5.....	95
5.7. Identificação estrutural de Es-6.....	107
5.8. Estudo da citotoxicidade dos compostos Es-4 e Es-5 em macrófagos peritoneais	117
5.9. Efeitos dos compostos Es-4 e Es-5 na produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais	118
5.10. Efeito dos compostos Es-4 e Es-5 sobre os níveis de citocinas.....	120
6. CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	127



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A população humana dispõe de numerosas informações sobre o ambiente onde vive, no qual, o conhecimento popular sobre as espécies vegetais é uma importante ferramenta para a busca de novas fórmulas terapêuticas. Durante séculos a sociedade vem recorrendo as plantas para tratar diferentes doenças. Todas as civilizações e culturas empregam ou já empregaram plantas com intuito medicinal. E esse conhecimento tradicional foi fundamental, como base, para a Farmacologia moderna (FERREIRA et al., 2014; BREITBACH et al., 2013).

O Brasil possui uma expressiva diversidade de espécies vegetais, uma vez que é detentor de diferentes ecossistemas, climas e solos, dada a sua grande área física (FILHO, 1987). Muitas comunidades brasileiras fazem uso de plantas medicinais para o tratamento ou prevenção de doenças, e muitas das espécies são carentes de estudos químicos e farmacológicos, possuindo pouca ou nenhuma confirmação científica de suas propriedades biológicas. Muitas espécies medicinais da flora nativa são comercializadas em feiras livres, mercados populares, lojas de produtos naturais e cultivadas nos quintais de algumas residências. A falta de estudos toxicológicos e de informações sobre estas plantas, pode acarretar em diversos prejuízos aos indivíduos que lhes fazem uso, como reações adversas ou promover um efeito sinérgico com outras drogas. Atualmente a toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública no Brasil, tornando a pesquisa na área de produtos naturais essencial (MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias, dentre elas, os metabólitos secundários. Estes compostos desempenham um importante papel na adaptabilidade às condições ambientais as quais estão expostas. Inúmeros estudos, *in vivo* e *in vitro*, tem validado alguns metabólitos secundários quanto a sua segurança de uso e eficácia farmacológica, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e agroindustriais (SIMÕES et al., 2017).

Os flavonoides constituem uma das classes de metabólitos secundários mais amplamente distribuída no reino vegetal e presente na dieta humana. Diversos estudos têm atribuído diferentes atividades aos flavonoides, a exemplo: ação antioxidante, cardioprotetora, anticancerígena entre outras (WANG, et al., 2018). Uma das ações de destaque é a capacidade que alguns flavonoides tem de atuar sobre o

sistema imunológico e sobre a resposta inflamatória. Dessa forma, os flavonoides representam uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios (COUTINHO et al., 2009). As drogas vegetais que mais se destacam nesta classe são: citrus, ginkgo e maracujá. Pesquisas com plantas medicinais da caatinga tem demonstrado a presença de flavonoides em diversas espécies, sendo os possíveis agentes responsáveis pelas propriedades atribuídas a estas plantas (SIMÕES et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2011).

Nos últimos anos tem-se evidenciado uma evolução nas pesquisas químicas e farmacológicas de plantas medicinais. Diversas moléculas novas, com suas estruturas elucidadas e relatadas na literatura a cada momento, algumas possuindo significantes propriedades farmacológicas. O crescimento dessa área de pesquisa veio com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Estes avanços aliados ao fato de que o Brasil possui uma das biotas mais ricas do mundo, se tornam uma fonte de oportunidade para o crescimento científico e tecnológico do país na área de produtos naturais, além de contribuir na formação de recursos humanos qualificados (CECHINEL FILHO, 1998).

Devido a importância do gênero *Erythroxylum* para a família Erythroxylaceae, pela diversidade do gênero no estado da Paraíba e pelos raros estudos, tanto do ponto de vista químico quanto do ponto de vista farmacológico, de algumas espécies, este trabalho tem grande relevância para o desenvolvimento dos conhecimentos deste gênero, especificamente sobre a espécie *Erythroxylum simonis* Plowman e seus metabólitos.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Contribuir para os conhecimentos fitoquímicos e biológicos do gênero *Erythroxylum* e da família Erythroxylaceae, através do estudo das partes aéreas da espécie *Erythroxylum simonis* Plowman. E avaliar uma possível atividade imunomoduladora de compostos isolados desta espécie.

2.2. Específicos

- Determinar o teor de fenólicos totais do extrato etanólico bruto das partes aéreas da espécie *Erythroxylum simonis*;
- Extrair, isolar e purificar os metabólitos secundários da espécie *Erythroxylum simonis*, utilizando técnicas extrativas com solventes orgânicos e métodos cromatográficos;
- Elucidar ou identificar as estruturas químicas dos constituintes de *Erythroxylum simonis* através de métodos espectroscópicos, tais como espectroscopia de massas e RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de metabólitos secundários isolados de *Erythroxylum simonis* na produção de NO (óxido nítrico) e na citotoxicidade em cultura celular de macrófagos peritoneais.
- Analisar o efeito modulador de metabólitos secundários isolados de *Erythroxylum simonis* na produção de citocinas por macrófagos peritoneais.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

em florestas, em áreas semiáridas, em altitudes elevadas ou ao nível do mar (DALY, 2004).

De acordo com Loiola et al. (2007) o gênero morfologicamente é caracterizado pela presença de plantas lenhosas, arbustos ou árvores, glabras, com catafilos geralmente semelhantes às estípulas. As folhas são alternas e inteiras, com estípulas intrapeciolares. As flores são monoclinas, diclamídeas, pentâmeras e heterostílicas, com 10 estames de filetes unidos na base, formando um tubo que circunda o pistilo. O ovário é súpero, tricarpelar, trilocular, mas geralmente com apenas um único óvulo desenvolvido. O fruto é uma drupa, vermelha a púrpura.

No Brasil foram encontradas 115 espécies, e cerca de 74 possui distribuição restrita, com ocorrência no cerrado, caatinga, floresta amazônica e mata atlântica (DALY 2004; LOIOLA et al., 2007). O estado brasileiro com maior número de espécies de *Erythroxylum* é a Bahia, são 56 registros de um total de 70 espécies da região Nordeste. No estado da Paraíba 13 espécies foram catalogadas, são elas: *E. caatingae* Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil, *E. nummularia* Peyr., *E. pauferrense* Plowman, *E. passerinum* Mart., *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O.E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil. e *E. squamatum* Sw, encontradas do brejo ao sertão. Grande parte destas espécies tem distribuição restrita ao Nordeste do Brasil (*E. caatingae*, *E. nummularia*, *E. pauferrense*, *E. pungens*, *E. revolutum*, *E. rimosum* e *E. simonis*). É importante ressaltar que a espécie *E. pauferrense* foi registrada apenas no estado da Paraíba, no município de Areia (LOIOLA et al., 2007).

As espécies que se destacam pelo seu valor comercial são a *E. coca*, *E. novogranatense* e suas variedades, por produzirem o alcaloide tropânico cocaína, que pode chegar a 2% da massa total das folhas secas, e foi por causa deste alcaloide que o interesse pelo gênero *Erythroxylum* teve início (PLOWMAN; RIVIER, 1983). A espécie *E. coca* (Figura 2, pág. 27) tem uma longa tradição de uso, sendo inicialmente utilizada pelos indígenas e Incas em rituais religiosos. Sua disseminação veio com a chegada dos espanhóis, que após aprender sobre as propriedades da espécie, difundiram o uso entre os trabalhadores indígenas da Bolívia, Equador e Peru. Por possuir ação estimulante, dar sensação de bem-estar e provocar euforia, o uso abusivo de cocaína pode levar a dependência química, que é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (SIMÕES et al., 2017).

Figura 2 - Espécie *Erythroxylum coca*.



(Fonte: Mário Franco, 2012)

As partes mais utilizadas das espécies do gênero *Erythroxylum*, na medicina popular, são as folhas secas, sendo a infusão e decocção os métodos de extração mais empregados. Os principais usos na medicina popular buscam uma ação estimulante, indutora de euforia, anti-inflamatória, promotora de saciedade, anestésica local e para o alívio de dores no estômago e cabeça (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005). Outras partes das plantas também têm registros de uso, a exemplo das raízes de *E. campestre* e das cascas do caule da *E. tortuosum*, em que os infusos destes órgãos são empregados, respectivamente, como laxante e adstringente no caso de hemorragias (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Outra espécie utilizada na medicina tradicional é a *Erythroxylum vacciniifolium*, conhecida popularmente como catuaba-verdadeira, cujo chá ou decocto de suas cascas é um dos remédios mais populares do Brasil, ao qual é atribuído propriedades estimulantes do sistema nervoso central e afrodisíacas. Ensaio farmacológicos em modelos animais, realizados com o extrato desta espécie, evidenciaram atividade contra infecções provocadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de atividade antiviral (KLETTER et al., 2004; ADAMS et al., 2007).

Ensaio realizados com o extrato metanólico das folhas de *E. monogynum* demonstraram que o mesmo possui propriedade hepatoprotetora contra hepatotoxicidade induzida por paracetamol (SYED; NAMDEO, 2013). Em ensaios de atividade antimicrobiana com o extrato metanólico de *E. pulchrum*, foi evidenciado uma inibição do crescimento das linhagens das seguintes bactérias: *Bacillus subtilis*

CCT 0516, *Escherichia coli* ATCC 2536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Streptococcus sanguíneos*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus* ATCC (ALBUQUERQUE, 2013). Estudos recentes com o extrato etanólico de *Erythroxylum caatingae*, em ovelhas, evidenciaram uma ação na diminuição das contrações cervicais (SANTOS et al., 2016).

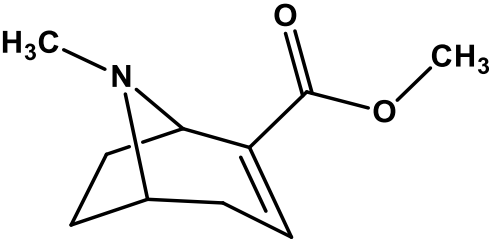
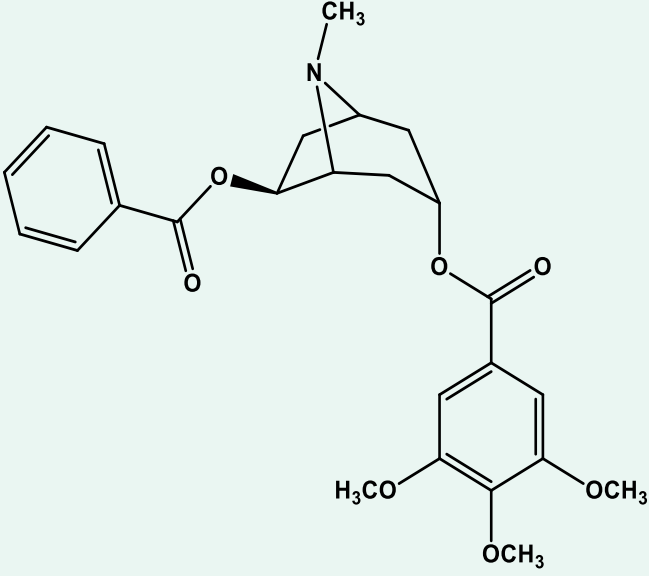
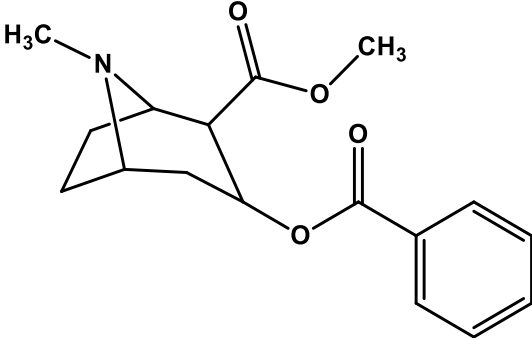
Do ponto de vista fitoquímico, os metabolitos secundários mais evidenciados nas espécies desse gênero são alcaloides tropânicos, presentes em quase todos os órgãos das plantas que os contém, seguido dos terpenos e flavonoides. As espécies com maior número de estudos fitoquímicos são *E. coca*, *E. novogranatense*, *E. zambesiacum*, *E. hypericifolium*, *E. monogynum*, *E. pictum*, *E. argentinum*, *E. rotundifolium* e *E. rufum* (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005). No Quadro 1 estão agrupadas as principais classes de metabólitos secundários encontradas nas diferentes partes das espécies do gênero *Erythroxylum*.

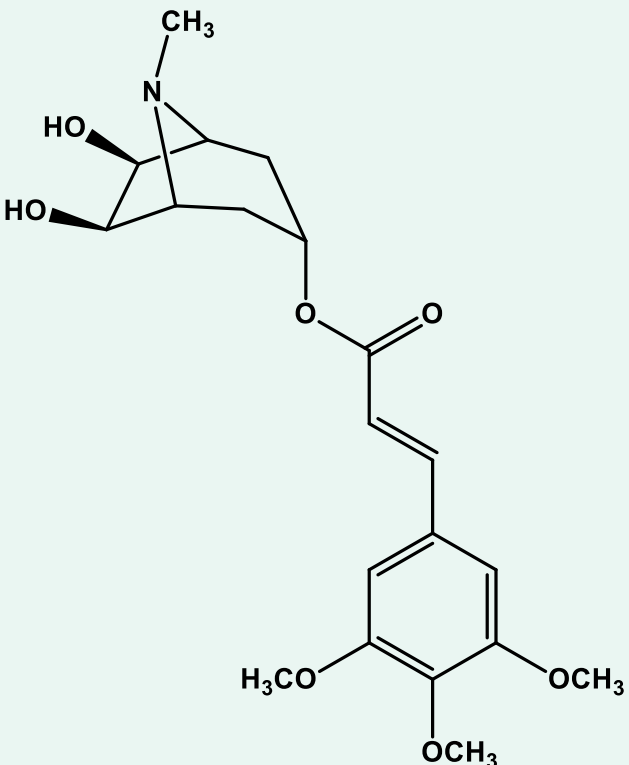
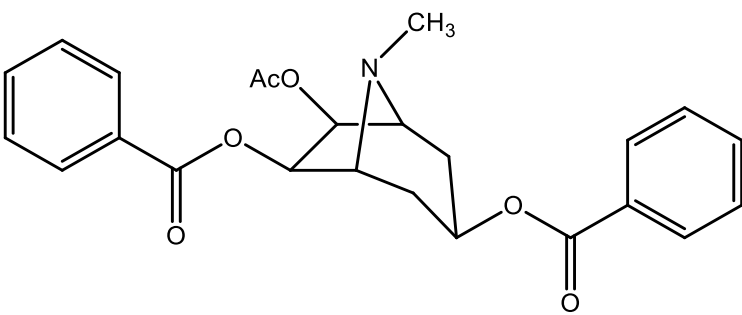
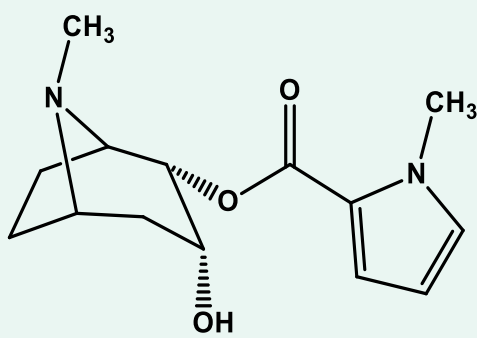
Quadro 1 – Metabólitos secundários evidenciados em diferentes órgãos de espécies do gênero *Erythroxylum*, de acordo com GONZÁLEZ-GARCÍA et al. (2005).

Partes da planta	Metabólitos secundários
Cascas do caule	Alcaloides e terpenos
Cascas da raiz	Alcaloides
Folhas	Alcaloides, terpenos e flavonoides
Raiz	Alcaloides

O alcaloide tropânico que mais se destaca neste gênero é a cocaína, por sua ação psicoativa no sistema nervoso central, sendo a droga psicoestimulante mais utilizada em todo o mundo (ALAGILLE et al., 2005). Um levantamento bibliográfico realizado por Oliveira et al. (2010) com 230 espécies de *Erythroxylum*, indicou que apenas 35 apresentaram registros de alcaloides, com um total de 186 alcaloides tropânicos. Desta forma, este tipo de metabólito é um dos mais encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum* (SIMÕES et al., 2017). No Quadro 2 foram reunidos alguns alcaloides registrados em espécies deste gênero.

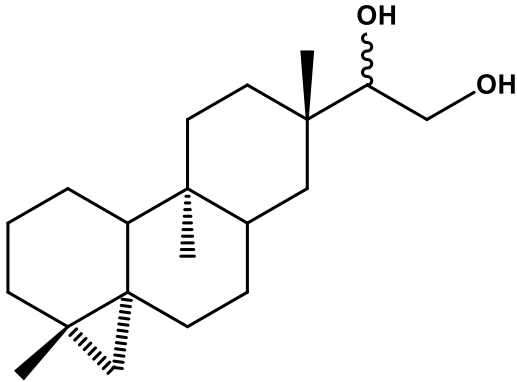
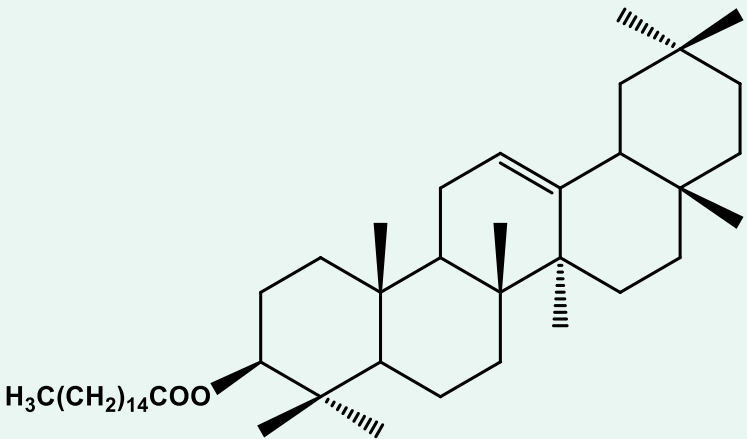
Quadro 2 – Estruturas de alguns alcaloides tropânicos encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*.

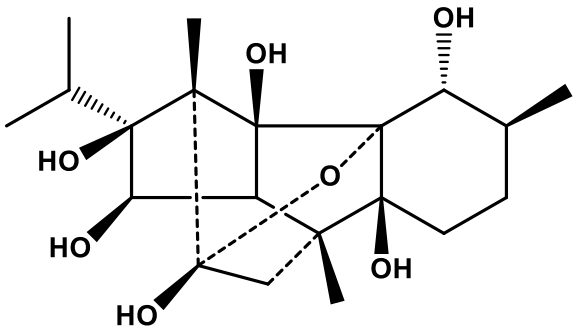
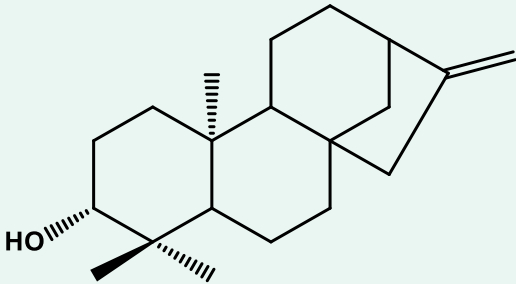
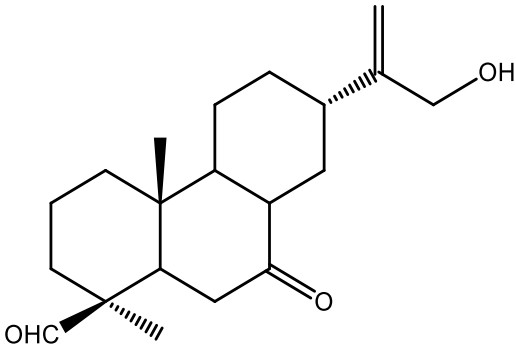
Espécie	Alcaloide	Referência
<i>E. argentinum</i> (Folhas)	 metilecgonidina	Zuanazzi et al. (2001)
<i>E. caatingae</i> (Caule)	 catuabina B	Oliveira et al. (2011)
<i>E. coca</i> (Folhas)	 cocaína	Torre et al. (2013)

<i>E. pervillei</i> (Cascas do caule)	 pervilleina H	Chin et al. (2006)
<i>E. rimosum</i> (Folhas)	 7β-acetoxi-3β,6β-dibenzoiloxitropano	Ribeiro et al. (2013)
<i>E. vacciniifolium</i> (Cascas do caule)	 vaccinina A	Zanolari et al. (2005)

Estudos realizados por Ansell et al. (1993) com o caule de 20 espécies de *Erythroxylum*, levaram ao isolamento de 43 diterpenos em 10 das espécies analisadas. Pesquisas com a fase hexânica de *Erythroxylum revolutum* promoveram o isolamento de 6 diterpenos (OLIVEIRA, 2012). Além destes metabólitos algumas espécies ainda apresentam triterpenos, como a *Erythroxylum leal costae*, na qual estudos com seu extrato metanólico levaram ao isolamento de 3 triterpenoides (CHAVEZ et al., 1996). Alguns terpenoides registrados em espécies do gênero *Erythroxylum* foram agrupados no Quadro 3.

Quadro 3 – Estrutura de alguns terpenoides encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*.

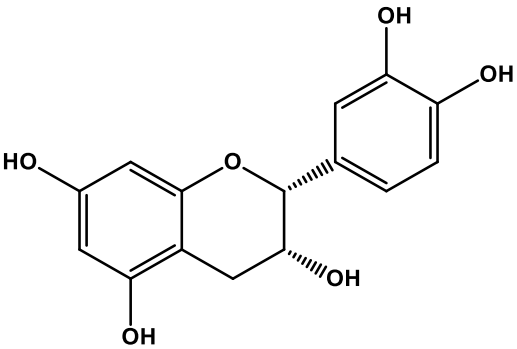
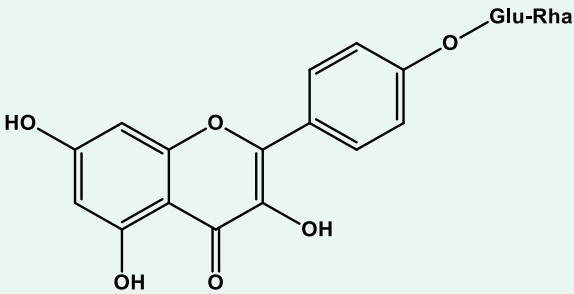
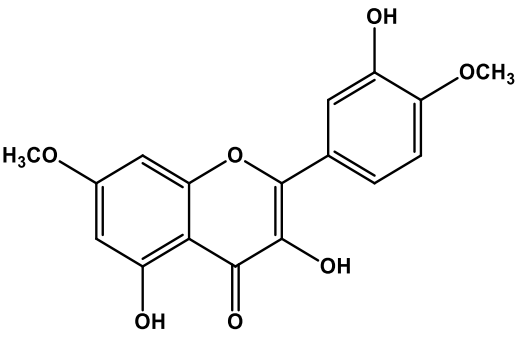
Espécie	Terpenoide	Referência
<i>E. barbatum</i> (Raízes)	 erythroxiol X	Santos et al. (2006)
<i>E. leal costae</i> (Folhas)	 palmitato de β-amirina	Chávez et al. (1996)

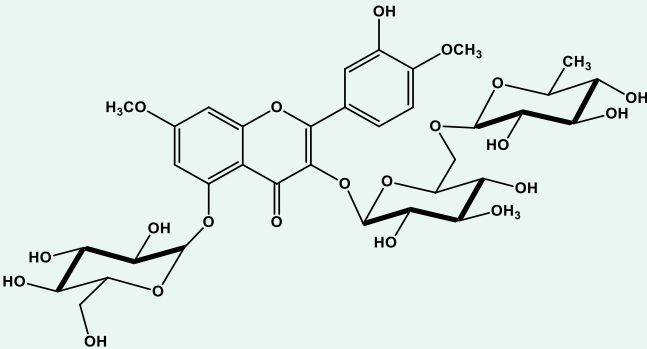
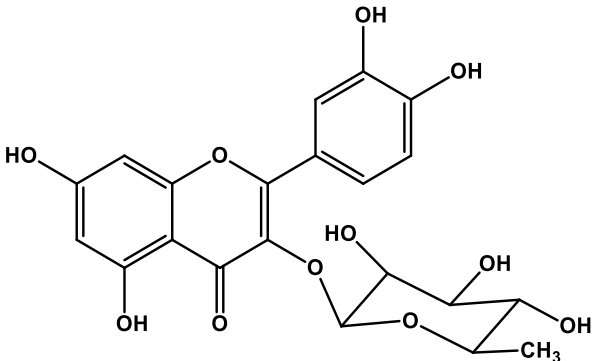
<i>E. passerinum</i> (Frutas maduras)	 rianodanol	Barreiros et al. (2007)
<i>E. revolutum</i> (Folhas)	 ent-caur-16-en-3β-ol	Oliveira et al. (2012)
<i>E. suberosum</i>	 7-oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al	Nascimento et al. (2012)

Apesar da ocorrência de flavonoides em várias famílias, estes metabólitos e seus derivados triglicosilados são considerados marcadores de *Erythroxylum* (RIBEIRO et al. 2013). Estudos realizados por González-Guevara et al. (2004) com quatro espécies de *Erythroxylum* (*E. confusum*, *E. areolatum*, *E. havanense* e *E. alaternifolium*) detectaram baixa quantidade de alcaloides e altas concentrações de flavonoides. A presença de flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavonas e chalconas já foi registrada em algumas espécies. Porém, os flavonóis correspondem a maior parte dos registros (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005). Estes metabólitos no gênero *Erythroxylum* ocorre na maioria das vezes como 3-O-monoglicosídeos com glicose,

ramnose, xilose, galactose ou arabinose e como 3-O-diglicosídeos com diferentes combinações destes açúcares (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006). No Quadro 4 foram reunidos alguns flavonoides de *Erythroxylum*.

Quadro 4 – Estrutura de alguns flavonoides encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*.

Espécie	Flavonoide	Referência
<i>E. barbatum</i> (Folhas)	 epicatequina	Barreiros et al. (2005)
<i>E. coca</i> (Folhas)	 Canferol-4'-O-(ramnosil)-glicosídeo	Johnson et al. (2003)
<i>E. nummularia</i> (Folhas)	 4',7-dimetil-quercetina	Barreiros et al. (2005)

<i>E. pulchrum</i> (Folhas)	 ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	Albuquerque et al. (2014)
<i>E. subrotundum</i> (Folhas)	 quercetina-3-O-α-L-raminosídeo	Oliveira et al. (2012)

3.3. Considerações sobre a espécie *Erythroxylum simonis* Plowman

A espécie *Erythroxylum simonis* Plowman (Figura 3, pág. 35), popularmente conhecida como “Guarda-Orvalho” tem sua distribuição limitada a região Nordeste do Brasil, podendo ser encontrada nas florestas úmidas do litoral e nas matas do interior conhecidas como “brejos de altitude”. Existem registros de sua presença nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Rio Grande do Norte (PLOWMAN, 1986; LOIOLA et al., 2007; COSTA-LIMA et al., 2014)

Figura 3 - Espécie *Erythroxylum simonis* Plowman



(Fonte: M.I.B. Loiola, 2009)

Esta espécie homenageia Simon J. Mayo, botânico no Royal Botanic Gardens, Kew, por suas contribuições nos estudos botânicos no Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, que é uma reserva ambiental localizada na cidade de Areia no estado da Paraíba, e também local de primeiro registro de *E. simonis* Plowman (PLOWMAN, 1986). Estudos químicos de *Erythroxylum simonis* são raros. A classificação botânica desta espécie pode ser visualizada no Quadro 5.

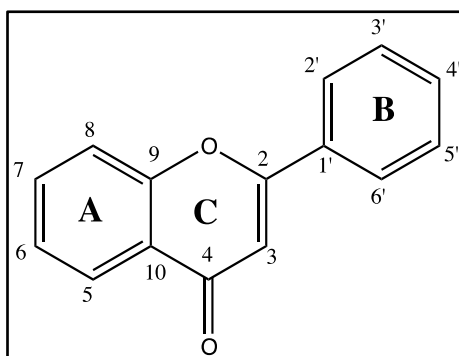
Quadro 5 – Classificação botânica da espécie *Erythroxylum simonis*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malpighiales
Família	Erythroxylaceae
Gênero	<i>Erythroxylum</i>
Espécie	<i>Erythroxylum simonis</i> Plowman

3.4. Considerações sobre flavonoides

Os flavonoides compõem uma classe de metabólitos secundários largamente distribuída no reino vegetal (LOPES et al., 2000). Podem ser encontrados nas folhas, sementes, cascas e flores de diversas espécies vegetais. Mais de 4.000 flavonoides, nas formas naturais ou de seus glicosídeos, foram identificados até o momento (HEIM et al., 2002). Estes metabólitos têm biossíntese mista, proveniente das vias do chiquimato e acetato, que formam o núcleo fundamental dos flavonoides (Figura 4), fenil-benzopirano (C6-C3-C6), que consiste em quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (A, B e C) (DORNAS et al., 2007). O anel benzeno A é condensado com um anel de seis membros (C), que na posição 2 carrega um anel fenil benzeno (B). O anel C pode ser um pirano heterocíclico, que produz catequinas e antocianidinas, ou pirona, que produz flavonóis, flavonas e flavanonas (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



(Fonte: SIMÕES et al., 2017)

A palavra flavonoide deriva do latim “flavus” que significa amarelo, por estes compostos participarem da coloração de flores, onde são responsáveis pelos tons de amarelo, laranja e vermelho (TIMBERLAKE; HENRY, 1986). Os flavonoides também exercem importantes funções para o crescimento, desenvolvimento e defesa da planta, tais como proteção contra os raios ultravioleta e visível, ação antioxidante, inibição enzimática, controle hormonal e proteção contra fungos, vírus e bactérias (DI CARLO et al., 1999; SIMÕES et al., 2017).

Os flavonoides também são constituintes importantes na dieta humana, podendo ser encontrados em frutas, vegetais e bebidas como o chá e vinho tinto, em média, a dieta diária contém aproximadamente 1 g de flavonoides (AHERNE;

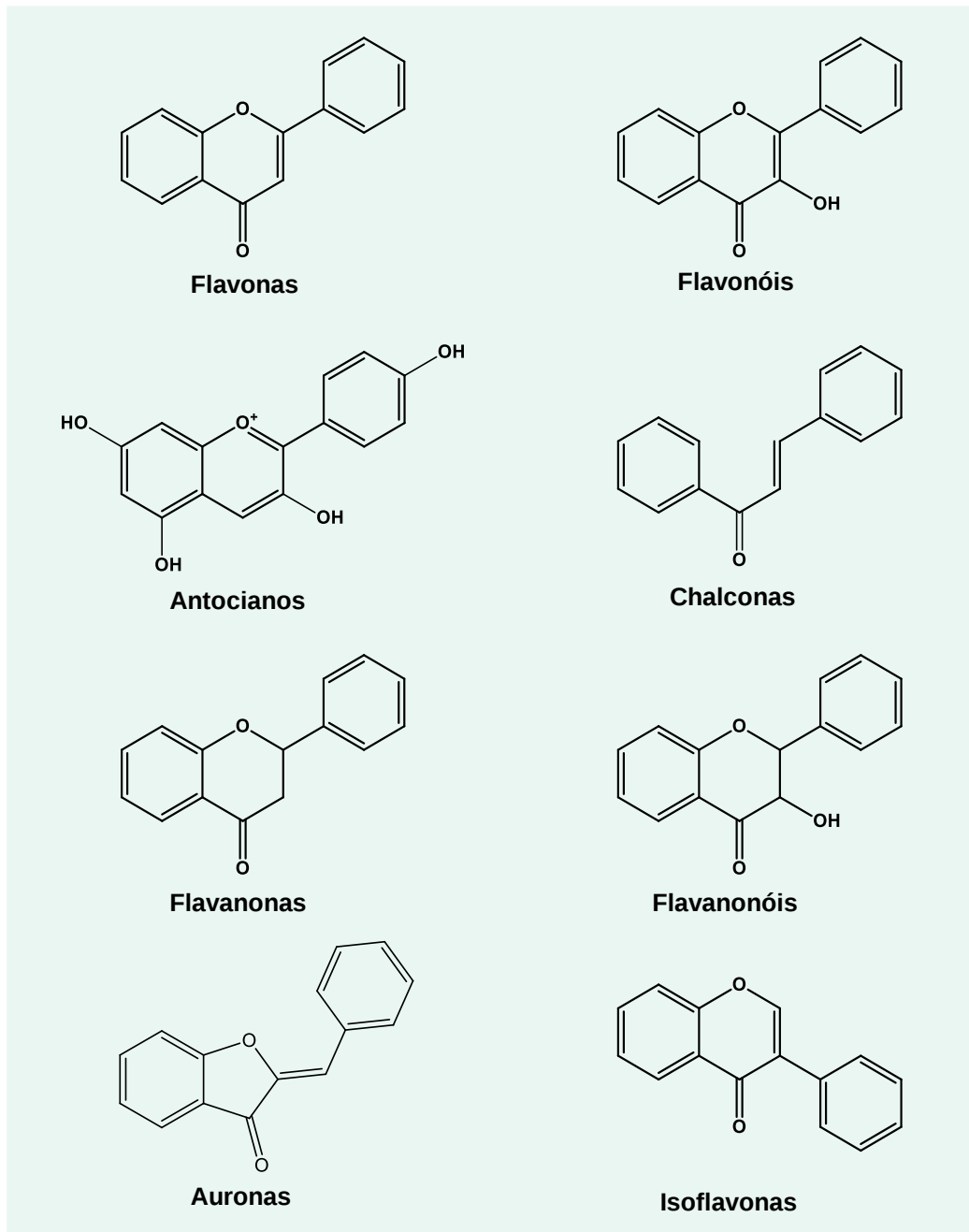
O'BRIEN, 2002). Também são encontrados em várias plantas utilizadas na medicina popular em todo o mundo, sendo assim compostos importantes não apenas para as plantas, mas também para os humanos (DI CARLO et al., 1999).

Os compostos flavonoídicos podem ocorrer nas plantas em suas formas livres (aglicona), como O-heterosídeos, C-heterosídeo e/ou derivados metilados e/ou acilados (KUMAR; PANDEY, 2013). A classificação dos flavonoides depende do nível de oxidação e das mudanças no núcleo carbônico básico, acarretadas por diferentes tipos de reações, tais como: oligomerização, alquilação ou glicosilação (TAHARA, 2007). Alterações no anel central (C) proporcionam a formação de diferentes subclasses de flavonoides (Figura 5, pág. 38), tais como: flavonas, flavonóis, chalconas, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas e antocianidinas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; BOOTS et al., 2008; COUTINHO et al., 2009). Quando os glicosídeos são formados, a ligação ocorre geralmente nas posições 3 ou 7, na maioria das vezes a unidade osídica é uma glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose ou diferentes combinações destes açúcares (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; KUMAR; PANDEY, 2013).

É ampla a utilização de plantas medicinais contendo flavonoides em todo o mundo, o que torna essencial os estudos desses metabólitos. Alguns medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares são elaborados a partir de flavonoides (SIMÕES et al., 2017). Vários ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm atribuindo diversas ações biológicas a estes compostos, tendo destaque as atividades antioxidante, antiulcerogênica, antitumoral, anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, anti-hemorrágica e antiviral (LOPES et al., 2000; SIMÕES et al., 2017).

Alguns estudos têm evidenciado significativa atividade anti-inflamatória para os flavonoides do tipo flavonol, com destaque para quercetina e canferol, amplamente distribuídos no reino vegetal. Esta ação pode ser atribuída a um efeito inibitório das enzimas: ciclo-oxigenase, lipo-oxigenase, fosfolipase A2 e ação moduladora sobre a enzima iNOS, promovendo uma inibição da produção de óxido nítrico (LOPES et al., 2000; SANTANGELO et al., 2007; YOON; BAEK et al. 2005).

Figura 5 - Esqueletos básicos de flavonoides.



3.5 Considerações sobre inflamação

A inflamação consiste em uma resposta fisiológica do organismo desencadeada por uma lesão tecidual ou pela exposição a um patógeno, normalmente restaurando o tecido lesionado. Logo, as principais funções da resposta inflamatória são a defesa e o reparo, habitualmente restituindo a homeostase. Este processo é fundamental para a segurança e sobrevivência do organismo, de forma

que, se esta resposta falhar, seja por razões genéticas, como a deficiência de adesão leucocitária, seja por motivos de tratamentos imunossupressores ou por infecções que escapem de sua ação, como a ocasionada pelo vírus da imunodeficiência humana, os danos são graves ou fatais (MEDZHITOV, 2008; RANG et al., 2011).

A resposta inflamatória envolve diversos tipos de células e mediadores, que estão divididos em dois componentes: a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adaptativa. A resposta imunológica inata ocorre imediatamente após a lesão tecidual ou infecção, envolvendo componentes vasculares e celulares, como os mastócitos, células dendríticas e macrófagos, que reconhecem o patógeno e liberam citocinas e outros mediadores como prostaglandinas e histamina. A interleucina IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral TNF- α agem na parede do endotélio vascular induzindo a expressão de moléculas de adesão nas superfícies celulares, além de promover um aumento da permeabilidade vascular. As citocinas também estimulam a síntese de óxido nítrico, que é um vasodilator, o que contribui com o aumento da permeabilidade vascular. Todos estes eventos ocorrem com o objetivo de direcionar os leucócitos para o local do patógeno. Na resposta imunológica adaptativa as principais células envolvidas são os linfócitos. Esta resposta é específica e especializada para o patógeno invasor (RANG et al., 2011; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A resposta inflamatória é classificada em: aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda tem curta duração e envolve mediadores que promovem os sinais clássicos da inflamação (dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não da perda da função tecidual), que estão relacionados com o processo de vasodilatação, como por exemplo os prostanoídes e o óxido nítrico. A inflamação crônica ocorre quando o patógeno promotor da inflamação aguda persistir no organismo. Este evento é caracterizado pela presença dominante de macrófagos e linfócitos no tecido afetado, podendo durar muitos dias, meses ou anos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; GILROY et al., 2004).

Em geral, a inflamação constitui um mecanismo de defesa do organismo, e não uma doença. No entanto, a inflamação também está associada com a fisiopatologia de diversas doenças. Nestes casos, se faz necessário o uso de agentes farmacológicos com o objetivo de inibir ou abolir com o processo inflamatório, minimizando os danos e proporcionando maior conforto. Os anti-inflamatórios e imunossupressores são os fármacos capazes de interferir nesta resposta fisiológica

(COUTINHO et al., 2009). A grande ocorrência de efeitos colaterais decorrentes do uso destes medicamentos é um estímulo para a busca de novos agentes terapêuticos, e uma alternativa para isso são metabólitos secundários de algumas plantas, como os flavonoides.



MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e equipamentos utilizados

Para a determinação de fenólicos totais, foram utilizados os reagentes de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu modelo UV-2550. Para obtenção da curva de calibração foi empregado o ácido gálico como padrão.

A cromatografia por exclusão em coluna foi realizada utilizando como fase fixa o Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), e como fase móvel o metanol p.a. da Sigma-Aldrich.

A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada em cromatofolhas de alumínio - sílica gel 60 PF₂₅₄ artigo 7749, Merck. Para a eluição, foram utilizados solventes orgânicos comerciais (hexano, acetato de etila e metanol) puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade.

A revelação física das cromatoplasmas foi realizada através da exposição à radiação ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 e 366 nm, utilizando o aparelho Mineralight modelo UVGL-58.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo analítico da marca Shimadzu, equipado com uma coluna de fase reversa C-18 da marca Kromasil, bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A HT e detector UV-VIS SPD-M20A, como fase móvel foi utilizado água milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merk. E em um cromatógrafo preparativo da marca Shimadzu, equipado com uma coluna de fase reversa C-18 da marca ACE, bombas LC-6AD, injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizado água milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merk. Este também foi empregado no preparo da amostra.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e de ^{13}C (RMN de ^{13}C), utilizando técnicas uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY) foram obtidos em um espectrômetro Bruker operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Para o preparo das amostras a serem analisadas, foram utilizados solventes deuterados (CD_3OD e DMSO) da Cambridge Isotope Laboratories.

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos utilizando espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo micro TOF II e Ion-Trap AmazonX, respectivamente. As amostras foram preparadas com metanol grau HPLC da Merk.

4.2. Material Vegetal

4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas de *Erythroxylum simonis* foram coletadas no Parque Estadual Mata do Pau-Ferro, localizado no município brasileiro de Areia, estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra. Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro *Lourenço & Carneiro 232* Herbário JPB/UFPB.

4.2.2. Processamento do material vegetal

Em uma estufa com ar circulante, foi realizada a dessecação das partes aéreas de *Erythroxylum simonis* à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Em seguida, o material já seco, foi pulverizado em moinho mecânico fornecendo 3000 g do pó da planta.

4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto

Após secagem e pulverização, o material vegetal foi submetido à extração exaustiva por maceração em etanol (EtOH) a 95 %. Este procedimento foi realizado 3 vezes com intervalos de 72 horas entre cada extração. A solução extrativa foi, em seguida, filtrada e evaporada por meio de um rotaevaporador, a uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se ao fim, o extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1).

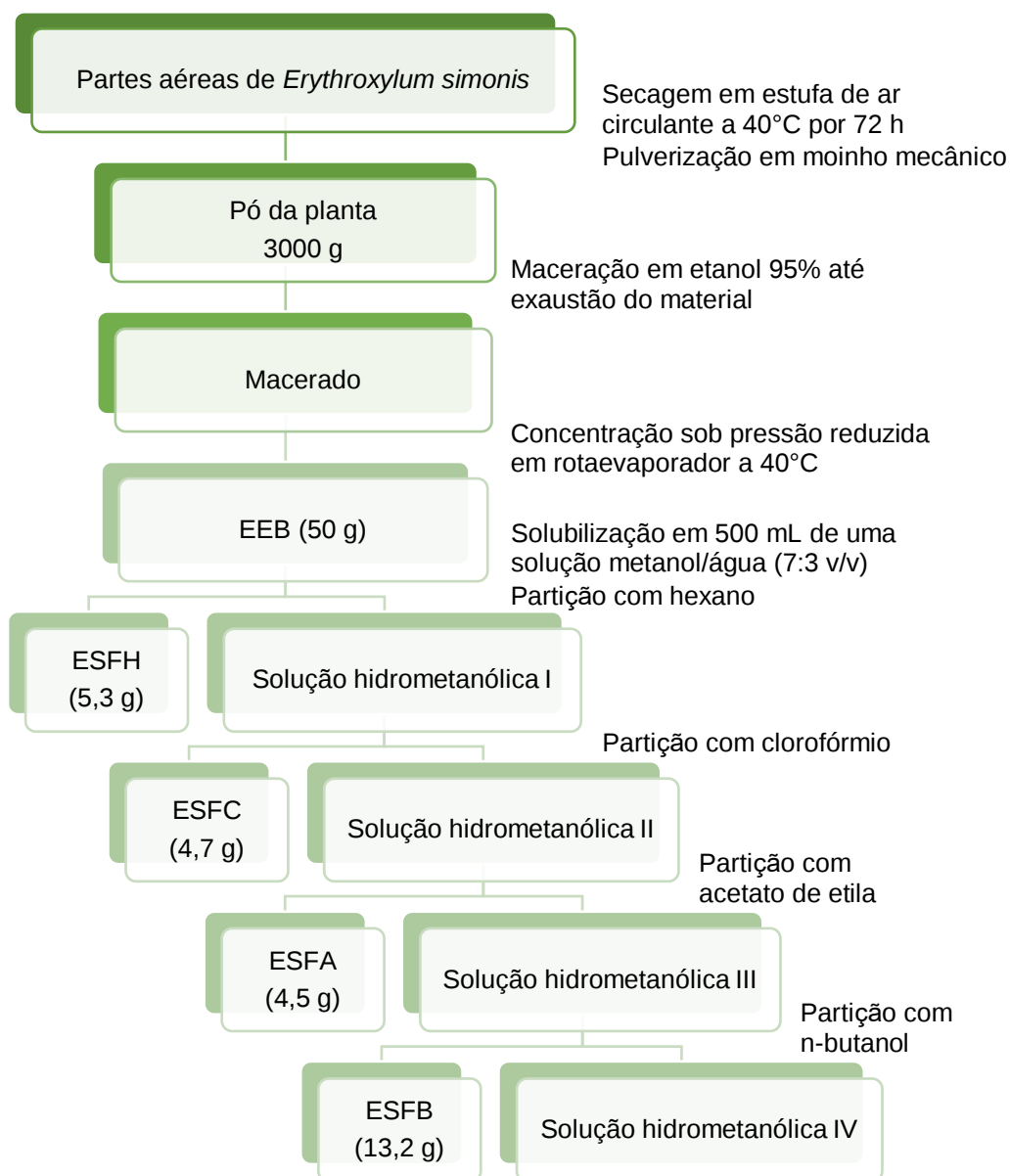
4.4. Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria, sendo utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, e como padrão fenólico foi empregado o ácido gálico (GULCI et al., 2004). Inicialmente, uma solução com concentração de 1 mg mL⁻¹ foi preparada a partir da solubilização de 1 mg do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Erythroxylum simonis* em 1 mL de MeOH. Posteriormente, uma alíquota de 120 µL desta solução foi mantida em contato, por 8 minutos, com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% em água. Com o objetivo de neutralizar a mistura, adicionou-se 400 µL de solução de carbonato de sódio a 7,5 % em água. Após 120 min, sobre o abrigo da luz e a temperatura ambiente, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços (200 µL/poço) e foi realizada a leitura em um espectrofotômetro UV/Vis calibrado a 765 nm. Como branco foi utilizada uma mistura de 120 µL da solução inicial do EEB com 900 µL de água destilada. Esta análise foi realizada em triplicatas e repetida por três dias. A partir da equação de regressão linear da curva de calibração, obtida a partir de soluções de ácido gálico em diversas concentrações (75; 100; 150; 200 e 300 µg mL⁻¹), foi possível determinar o teor de fenólicos totais, o qual é expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de amostra).

4.5. Fracionamento do extrato etanólico bruto

Parte do Extrato Etanólico Bruto (50 g) das partes aéreas de *Erythroxylum simonis* foi diluída em 500 ml de uma solução de metanol/água (7:3 v/v) e submetido a agitação por 60 minutos para homogeneização. Em seguida, foi realizada uma partição líquido/líquido em uma ampola de separação, utilizando os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em um rotaevaporador, obtendo-se ao fim as fases: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica (Esquema 1, pág. 45).

Esquema 1 – Elaboração e partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de *Erythroxylum simonis*.

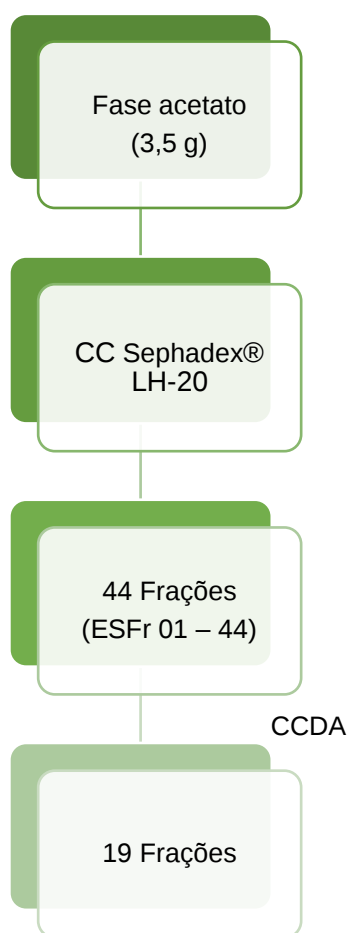


Legenda: ESFH – Fase hexânica de *Erythroxylum simonis*; ESFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum simonis*; ESFA – Fase acetato de etila de *Erythroxylum simonis*; ESFB – Fase butanólica de *Erythroxylum simonis*.

4.6. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila

A fase acetato de etila (3,5 g) foi submetida a cromatografia em coluna utilizando como fase fixa Sephadex LH-20, e metanol (MeOH) como fase móvel. Foram coletadas 44 frações (ESFr-01 – 44). Após secagem a temperatura ambiente, as frações foram reunidas por análise de seus fatores de retenção em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando diferentes sistemas de eluição, em ordem crescente de polaridade. Como revelador físico foi utilizada a luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) (Esquema 2). Desta reunião foram obtidas 19 frações (Quadro 6, pág 47).

Esquema 2 – Fracionamento da fase acetato de etila.



Quadro 6 – Dados das reuniões das frações após monitoramento por CCDA.

Fração	Peso
ESFA 1-2	0,0321 g
ESFA 3	0,0166 g
ESFA 4-5	0,0302 g
ESFA 6	0,0249 g
ESFA 7	0,0863 g
ESFA 8-10	0,8000 g
ESFA 11-14	1,0760 g
ESFA 15	0,2049 g
ESFA 16-20	0,6000 g
ESFA 21-23	0,1118 g
ESFA 24-25	0,0704 g
ESFA 26-29	0,2000 g
ESFA 30-32	0,0224 g
ESFA 33-36	0,0375 g
ESFA 37-40	0,0197 g
ESFA 41	0,0234 g
ESFA 42	0,0144 g
ESFA 43	0,0216 g
ESFA 44	0,0108 g

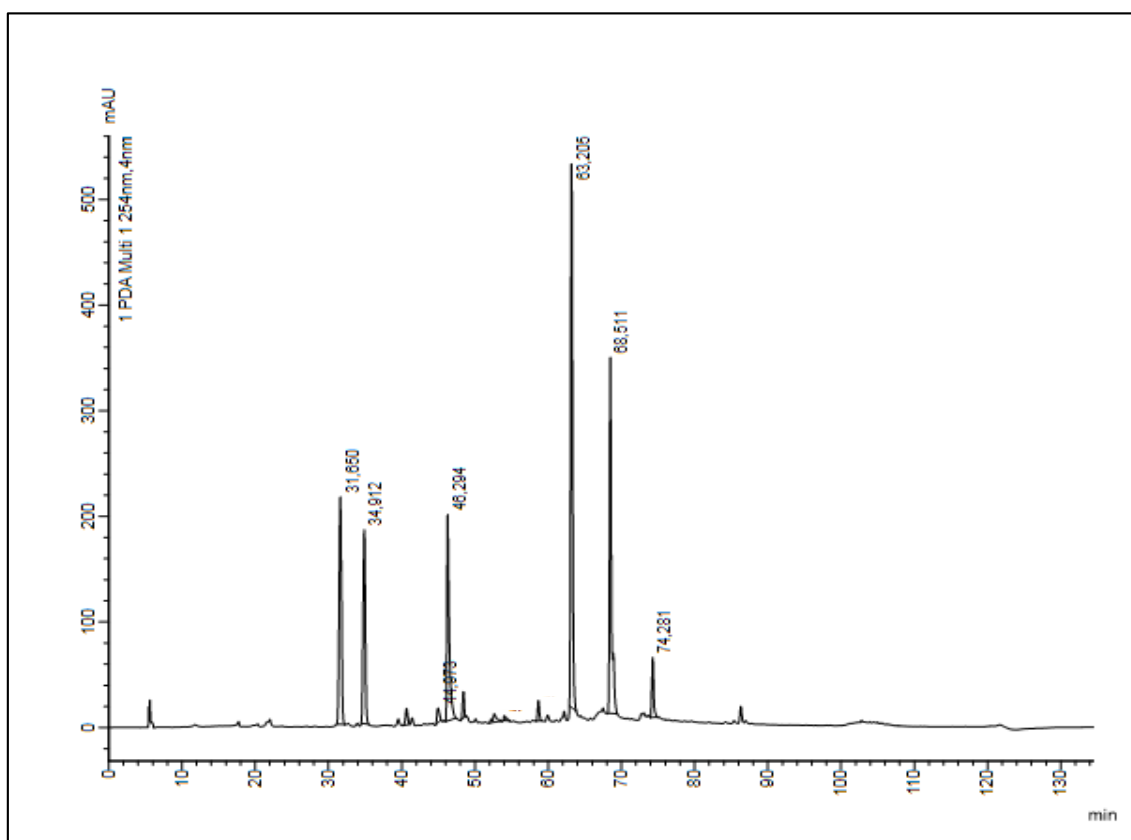
4.7. Processamento cromatográfico da fração ESFA 15 por CLAE

A fração ESFA 15 (170 mg) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Inicialmente foi preparada uma solução, com 1mg da amostra em metanol grau HPLC, na concentração de 1 mg ml⁻¹. Empregou-se como fase móvel água milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol. A análise no cromatógrafo analítico permitiu desenvolver um método eficiente para o isolamento das substâncias presentes na fração. No método mais eficaz, a concentração de metanol variou de 0 a 70% em um tempo de 90 minutos com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. No cromatograma (Figura 6, pág. 48) foi possível observar 6 picos principais principais.

Na transposição para o cromatógrafo preparativo, foi preparada uma solução com 150 mg da amostra em 600 µL de metanol grau HPLC. Foram realizadas 6 injeções de 100 µL desta solução. Foi utilizado o método desenvolvido na fase analítica, no entanto foi empregado um fluxo de 8 ml/min. As frações obtidas foram

então concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em um rotaevaporador. Deste processo foram coletadas 6 frações (ESFA-15.1 – 15.6) correspondentes aos 6 principais picos visualizados no cromatograma analítico. Estando as substâncias presentes nestas frações, isoladas. Estas foram codificadas em Es-1, Es-2, Es-3, Es-4, Es-5 e Es-6.

Figura 6 - Cromatograma da fração ESFA-15.



4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados

As determinações estruturais dos constituintes químicos isolados, foram efetuadas a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY), e pela comparação destes com dados descritos na literatura. Para a obtenção dos espectros foi utilizado o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) na solubilização da substância Es-1 e metanol deuterado (CD_3OD) para as substâncias Es-2, Es-3, Es-4, Es-5 e Es-6.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e como padrão interno foram utilizados os sinais característicos de ^1H e ^{13}C dos

solventes utilizados. Para RMN ^1H os sinais característicos são em δ_{H} 2,49 ppm para o DMSO- d_6 e em δ_{H} 3,30 ppm para o CD_3OD . Para os espectros de RMN de ^{13}C , os sinais característicos são em δ_{C} 39,5 ppm para o DMSO- d_6 e em δ_{H} 49,0 ppm para o CD_3OD . As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hz e as multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *s/* (singleto largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *dl* (dubleto largo), *t* (triplete), *q* (quadruplete) e *m* (multiplete).

4.9. Espectrometria de massas

Na preparação das amostras, foi realizada inicialmente a solubilização de 0,001 g destas em 1 mL de metanol grau HPLC. Posteriormente uma alíquota de 200 μL desta solução foi adicionada em 800 μL de metanol grau HPLC e, por fim, 20 μL desta última solução foi adicionada em 980 μL de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Em seguida, as amostras foram injetadas no espectrômetro de massa, sendo utilizada a técnica de ionização por Eletrospray (modo negativo).

4.10. Atividade imunomoduladora

4.10.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas com 8 semanas de idade, pesando entre 25 - 30 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos/UFPB. Os animais foram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (25 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Todos os animais foram manipulados seguindo os princípios de cuidados com animais e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB Nº 125/2016.

4.10.2. Cultura de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos fêmeas com 8 semanas de idade. Inicialmente, os animais foram estimulados com 2 mL de tioglicolato (4%) na cavidade peritoneal. Após 4 dias, os animais foram eutanasiados e em suas cavidades peritoneais foram injetados 5 mL de solução PBS estéril enriquecida com 3 % de soro fetal bovino (SBF). Posteriormente, foi realizada uma massagem por 30 segundos e o lavado foi coletado.

As células foram centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (RPMI + 10% SBF, 100 U.I. de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) e a viabilidade determinada utilizando o corante azul de *trypan*. As células foram ressuspensas na concentração de 2 x 10⁵ células mL⁻¹ de meio RPMI completo e distribuídas em poços de placa de 96 poços (200 µL/poço). Posteriormente, as células foram cultivadas por um período de 24 horas, na presença ou ausência de 1 µg mL⁻¹ lipopolissacarídeo (LPS), seguida da adição ou não das amostras em diferentes concentrações (10 µM, 50 µM e 100 µM). Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para análise da viabilidade celular e doseamento de óxido nítrico (NO) e citocinas.

4.10.3. Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). Como descrito acima, o sobrenadante foi coletado para o doseamento de NO após 24 horas de cultura celular.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Neste método, o MTT é reduzido por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO (REILLY et al., 1998). Foram adicionados 90 µL de meio RPMI completo e 10 µL de uma suspensão de MTT a 5 mg mL⁻¹ nas células que permaneceram nos poços da placa. Após incubação por 4 horas à temperatura de 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 100 µL de DMSO com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan produzidos. A quantificação da viabilidade celular foi realizada em um espectrofotômetro UV – VIS Spectramax 190 – Molecular Device,

com comprimento de onda de 570 nm. A média dos valores das absorbâncias obtida nas células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade.

4.10.4. Determinação dos níveis de NO

Os níveis de NO foram determinados *in vitro* pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess (GREEN et al., 1982). Primeiramente, foi preparado o reagente Griess através da mistura de duas soluções na proporção 1:1, a primeira composta por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a segunda por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Em seguida, 50 µL do reagente de Griess foi adicionado a 50 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura com macrófagos peritoneais. Após um período de 10 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro UV – VIS Spectramax 190 – Molecular Device, com comprimento de onda de 540 nm. Os resultados em µM foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.576 µM).

4.10.5. Ensaio imunoenzimático para a detecção de citocinas

A quantificação das citocinas, TNF- α e IL-6 presentes na cultura de células foi realizada por ELISA, seguindo o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Inicialmente as placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF- α e anti-IL-6 e incubadas por 18 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por uma hora. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBST e adicionou-se as amostras a serem analisadas e diferentes concentrações das citocinas recombinantes TNF- α e IL-6 para a realização da curva. Após 18 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Em seguida, foram lavadas novamente e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidina-HRP) foi adicionado. Após meia hora de incubação à

temperatura ambiente e lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta reação foi interrompida após 15 minutos pela adição de ácido fosfórico 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

4.10.6. Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e a diferença entre os diferentes grupos foi avaliada por teste t e análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância mínimo considerado foi 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism© versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do teor de fenólicos

O teor de fenólicos totais no extrato etanólico bruto foi determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*. Este reagente é formado por uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, em que o molibdênio e o tungstênio se encontram no estado oxidado. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, ocorre a formação do molibdênio azul e tungstênio azul, permitindo a quantificação das substâncias redutoras devido a coloração (IKAWA et al., 2003).

O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência para a construção da curva de calibração, nas seguintes concentrações: 75; 100; 150; 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação linear R^2 podem ser visualizados no Gráfico 1. Esta equação é essencial para interpolação dos dados e desta forma calcular o teor de fenóis em mg EAG/g de EEB de *Erythroxylum simonis* na concentração de 1 mg mL^{-1} (Tabela 1).

Gráfico 1 - Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido gálico como substância de referência. Absorbância 765 nm.

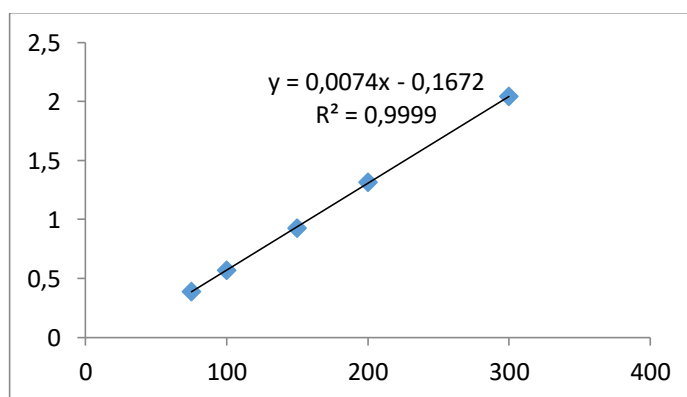


Tabela 1 - Teor de fenóis totais nas amostras (n=9), na concentração de 1 mg mL^{-1} . Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Amostra	Teor de Fenólicos (mg EAG / g)			CV (%)	Valor de p
	1º dia	2º dia	3º dia		
EEB	188,98 $\pm$ 0,29	185,54 $\pm$ 1,53	186,30 $\pm$ 3,36	1,30	0,20

Legenda: CV – Coeficiente de variação.

Após análise dos dados presentes na Tabela 1, foi possível observar que a concentração de fenólicos no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *E. simonis* é de $186,94 \pm 2,42$ mg EAG/g (18,7 %). Esta concentração foi próxima a de outras espécies de *Erythroxylum*, como por exemplo a espécie *Erythroxylum daphnites*, em que estudos de sazonalidade com o extrato etanólico bruto de suas folhas, evidenciaram um teor de fenólicos de 22,4 % à 27,4 % (MARTINS, 2015). Ainda foi possível observar que o método é estatisticamente reprodutível na concentração de 1 mg mL^{-1} , visto que, não há diferença entre os dias de teste no nível de 0,05 de significância.

Devido a presença de quantidade significativa de compostos fenólicos, o EEB das partes aéreas de *E. simonis* possivelmente tem atividade antioxidante, uma vez que, estas substâncias são reconhecidas por possuir ação antioxidante, capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade LDL e prevenir doenças trombóticas (RAUHA et al., 2000).

5.2. Identificação estrutural de Es-1

A substância Es-1 foi isolada na forma de um pó amorfo de coloração branca com 0,006 g.

O espectro de RMN de ^{13}C na técnica BB (Figura 7, pág. 58), obtidos a 100 MHz em DMSO, e sua expansão (Figura 8, pág. 59) apresentaram sete deslocamentos químicos. Destes, três sinais foram atribuídos a carbonos metínicos sp^2 e quatro a carbonos não hidrogenados.

Foi possível observar sinais característicos de carbonos ligados a elementos eletronegativos, pois estes substituintes reduzem a densidade eletrônica do átomo de carbono. Os elétrons têm a função de blindar o núcleo do campo magnético aplicado, logo, sua remoção promove uma desblindagem. Quanto maior a eletronegatividade do substituinte, maior a desproteção do carbono e, conseqüentemente, maior é o seu deslocamento químico. Desta forma, os deslocamentos em δ_c 167,4, δ_c 150,0 e em δ_c 144,9 evidenciaram três oxigenações na molécula (MOURA et al., 2011). Estes sinais, em comparação com dados da literatura, permitiram sugerir que a substância Es-1 corresponde ao ácido protocatecuico, e foram atribuídos, nesta ordem, ao carbono carbonílico C-7, e aos carbonos C-4 e C-3 do anel aromático (MOURA et al., 2011). Os carbonos de carbonilas apresentam os maiores deslocamentos químicos, uma vez que sofrem efeitos de desproteção devido a hibridação sp^2 e por estar ligado diretamente ao elemento eletronegativo oxigênio (SILVERSTEIN et al., 2000). Os sinais em δ_c 121,9, δ_c 121,7; δ_c 116,6 e δ_c 115,2, foram atribuídos aos outros carbonos do sistema aromático, C-6, C-1, C-2 e C-5, respectivamente, (COLOMBO et al., 2010). Estas e outras atribuições encontram-se compilados na Tabela 2.

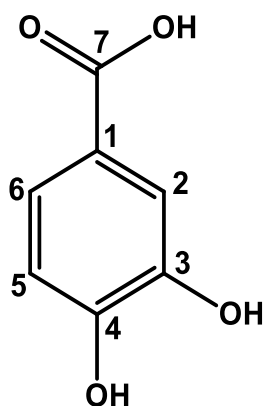
O espectro de RMN de ^1H (Figura 9, pág. 59), obtido a 400 MHz em DMSO, e suas expansão (Figura 10, pág. 60), apresentaram deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos. Estes sinais aparecem em uma região de δ_H 6,5 - 8,0 ppm, devido ao efeito conhecido como anisotropia magnética, no qual os hidrogênios do anel sofrem uma maior desblindagem, absorvendo uma frequência relativamente alta devido a formação de um campo magnético induzido, provocado pelo movimento circular dos elétrons π , quando as moléculas são colocadas em um campo magnético (SILVERSTEIN et al., 2000).

Foram observados três sinais característicos de um sistema aromático ABX, sendo dois dupletos (*d*), um em δ_H 7,31 ($J = 2$ Hz) e outro em δ_H 6,76 ($J = 8,4$ Hz),

ambos com integral para um hidrogênio. Foi observado ainda, o acoplamento desses sinais com um duplo duplete (*dd*) em δ_H 7,27 ($J = 2$ e 8,4 Hz), estando este, acoplado em *orto* com o segundo próton citado, uma vez que, neste acoplamento a constante varia na faixa de 7 a 10 Hz. Quando o acoplamento ocorre na posição *meta* a constante varia de 2 a 3 Hz, este foi o caso observado com o primeiro próton descrito. Esses sinais reforçaram a evidência de que a substância Es-1 se trata do ácido protocatecuico (PAVIA et al., 2015).

Além do efeito de ressonância, os prótons de um sistema aromático sofrem influência da hibridação sp^2 e da presença ou ausência de grupos doadores ou retiradores de elétrons. Os grupos doadores proporcionam proteção nas posições *orto* e *para* e os grupos retiradores levam a uma desproteção nestas posições. Logo, o sinal em δ_H 6,76 é o mais protegido por estar *orto* a um grupo doador de elétrons, sendo atribuído ao hidrogênio H-5. Os hidrogênios H-2 e H-6 estão *orto* e *para*, respectivamente, a um grupo doador, porém por ambos estarem *orto* com relação ao grupo retirador de elétrons, sofrem um maior efeito de desproteção, tendo um deslocamento químico maior. Assim, os sinais em δ_H 7,31 e δ_H 7,27 foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-6, respectivamente (MOURA et al., 2011). Estas e outras atribuições foram agrupadas na Tabela 2.

A partir da análise destes dados espectrais e em comparação com dados encontrados na literatura, foi possível identificar a substância Es-1 como sendo o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (Figura 10), também conhecido como ácido protocatecuico (OU et al., 2012).



Estrutura do ácido protocatecuico

Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, DMSO) de Es-1, ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Ácido protocatecuico), em comparação aos dados obtidos por OU et al., 2012.

Posição	δ_{H} Es-1	δ_{H} Referência	δ_{C} Es-1	δ_{C} Referência
1	-	-	121,7	121,7
2	7,31 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	7,33 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	116,6	116,7
3	-	-	144,9	144,8
4	-	-	150,0	149,8
5	6,76 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 8,4 Hz)	6,76 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 8,2 Hz)	115,2	115,1
6	7,27 (<i>dd</i> ; 1 H; <i>J</i> = 8,4 e 2 Hz)	7,27 (<i>dd</i> ; 1 H; <i>J</i> = 8,2 e 2 Hz)	121,9	122,5
7	-	-	167,4	167,7

Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) de Es-1.

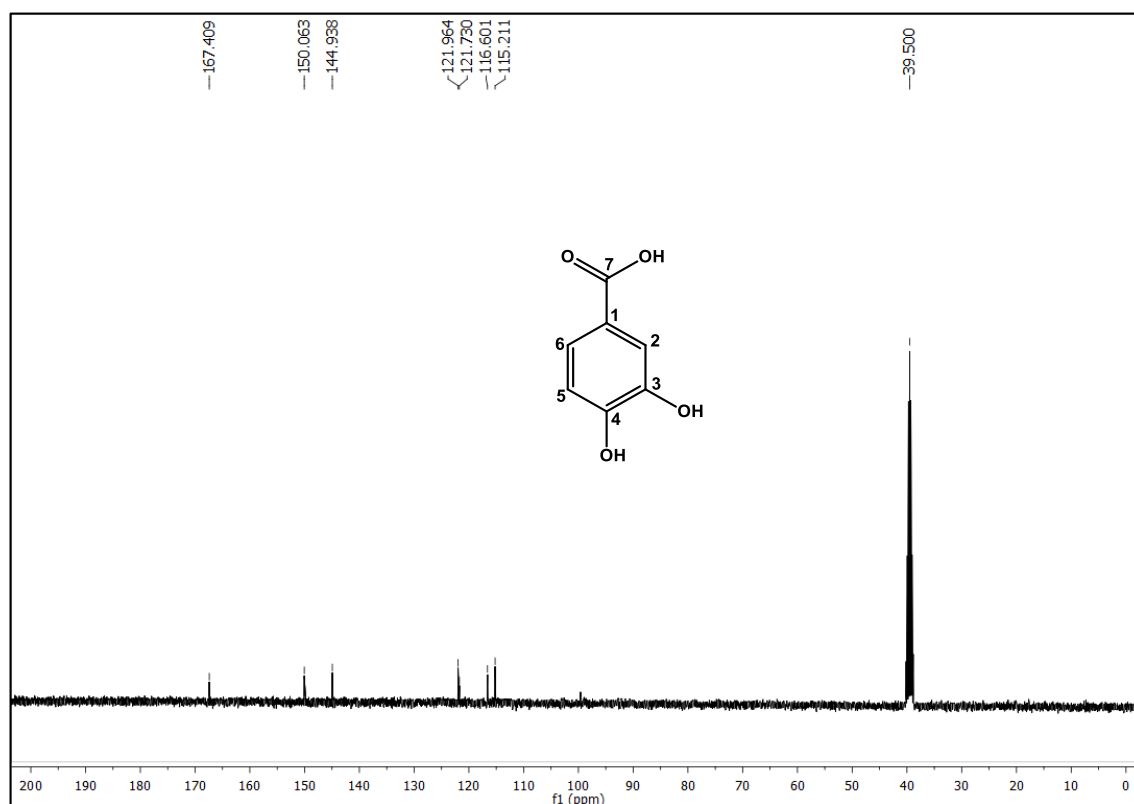


Figura 8 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) de Es-1 na região de 115 – 170 ppm.

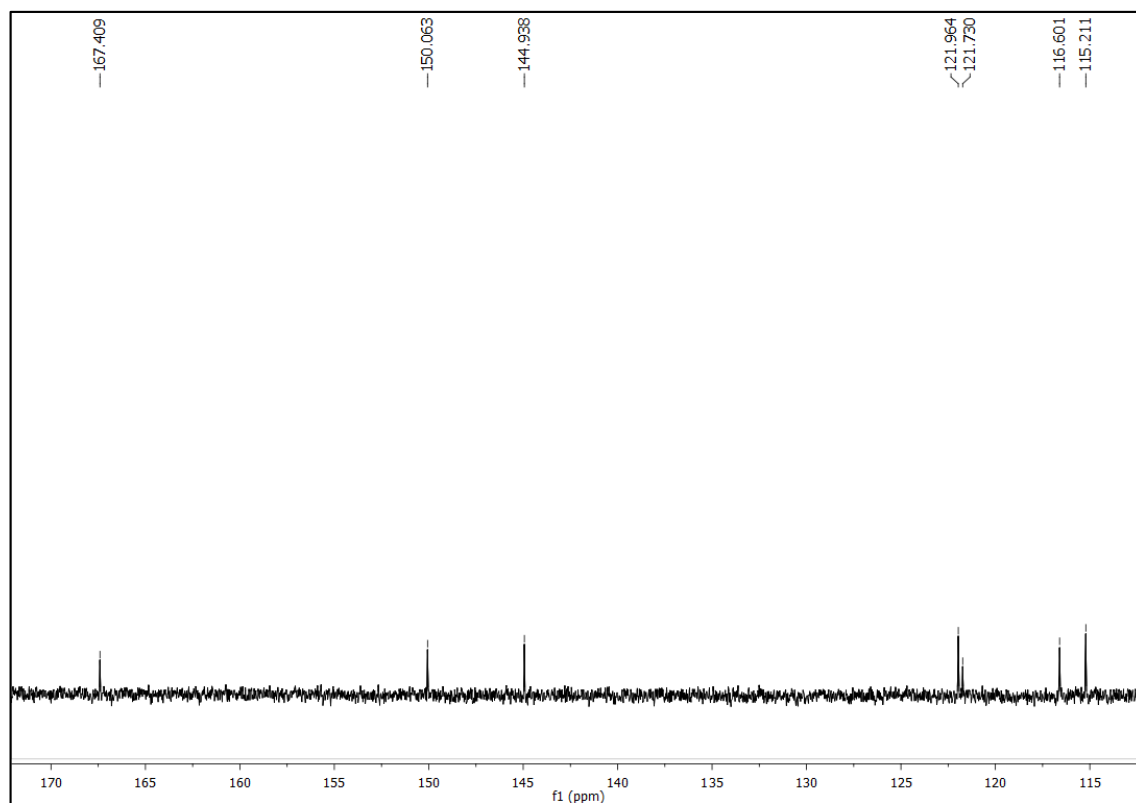


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de Es-1.

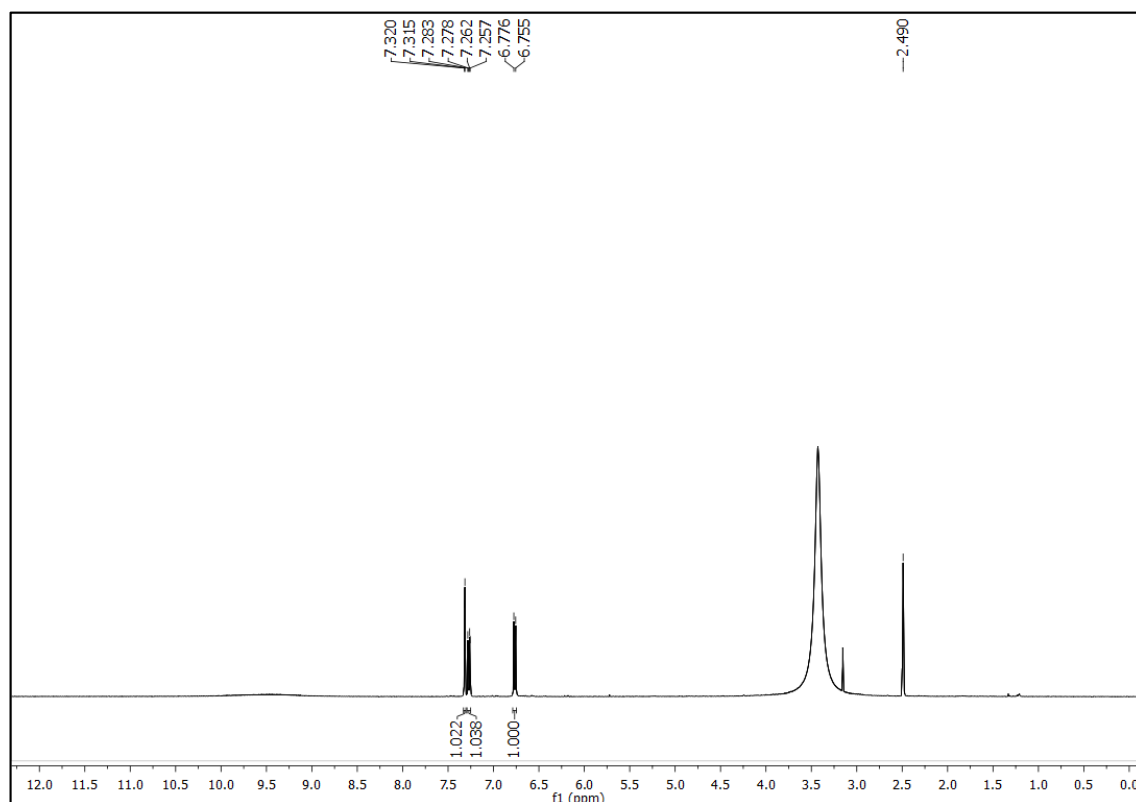
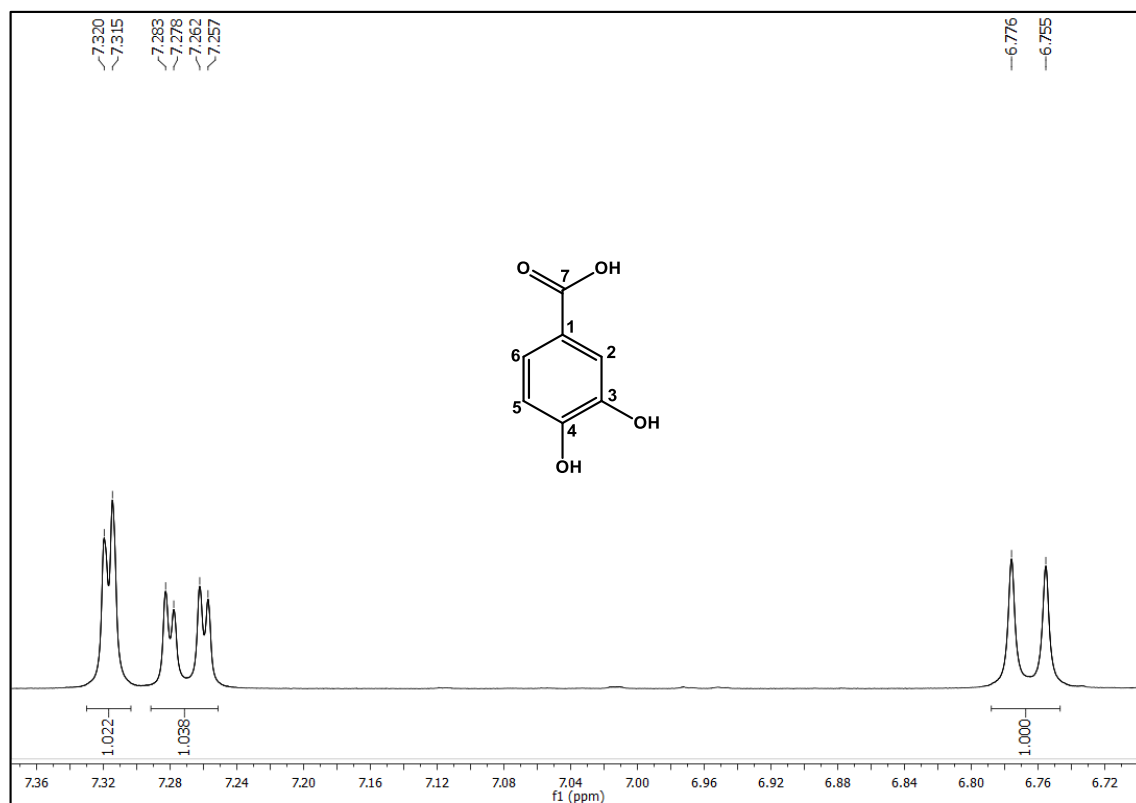


Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de Es-1 na região de 6,72 – 7,36 ppm.



5.3. Identificação estrutural de Es-2

A substância Es-2 foi isolada na forma de um pó amorfo de coloração branca com 0,008 g.

O espectro de RMN de ^{13}C na técnica APT da substância Es-2 (Figura 11, pág. 65), obtido a 100 MHz em CD_3OD , e suas expansões (Figura 12, pág. 65, Figura 13, pág. 66) apresentaram dezesseis deslocamentos químicos, dos quais dois foram atribuídos a carbonos metilênicos sp^3 , três a carbonos metínicos sp^3 , cinco a carbonos metínicos sp^2 e seis a carbonos não hydrogenados. Os sinais em δ_c 75,3, δ_c 74,7, δ_c 73,0, δ_c 68,2, δ_c 41,4 e δ_c 36,6 evidenciaram a presença de um derivado do ácido quínico. Estes sinais foram equivalentes, nesta ordem, aos carbonos C-1, C-4, C-3, C-5, C-6 e C-2, estando C-2 e C-6 mais protegidos por serem carbonos metilênicos e por não estarem ligados diretamente a um elemento eletronegativo. Foi observado ainda, um sinal de carbonila de ácido em δ_c 178,3, atribuído ao carbono C-7, após comparação com dados descritos na literatura (KUCZKOWIAK et al., 2014).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 14, pág. 66), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e suas expansões (Figura 15, pág. 67, Figura 16, pág. 67, Figura 17, pág. 68), revelaram a presença de três hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenados, com sinais em δ_H 5,34 (1H; *m*), δ_H 4,15 (1 H; *m*) e δ_H 3,64 (*dd*, 1 H, *J* = 3,2 e 8,4). Apresentaram também um conjunto de sinais de hidrogênios de carbonos metilênicos sp^3 não equivalentes em δ_H 1,92 – 2,22 (*m*). Vale ressaltar que prótons de carbonos sp^3 apresentam uma faixa de ressonância menor em comparação aos hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , uma vez que estes apresentam maior caráter s (33%), os tornando mais eletronegativos. Isto ocorre porque o orbital s mantém seus elétrons mais próximos do núcleo, resultando assim, em menor blindagem do próton (PAVIA et al., 2015). Estes sinais reforçaram a evidência que a substância Es-2 se tratava de um derivado do ácido quínico, no qual os sinais em δ_H 5,34, δ_H 4,15 δ_H e 3,64 corresponderam de modo respectivo aos hidrogênios H-3, H-5 e H-4 do ácido quínico, e o conjunto de sinais em δ_H 1,92 – 2,22 (*m*) foram condizentes com os hidrogênios de carbonos metilênicos H-2 e H-6 (KUCZKOWIAK et al., 2014). Essas atribuições foram reunidas na Tabela 3.

A análise de outros sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de Es-2, com auxílio de dados da literatura, evidenciaram a presença de uma unidade do ácido caféico (JEONG et al., 2011). No espectro de RMN de ^1H , três sinais na região

de hidrogênios aromáticos indicaram a presença de um sistema ABX 1', 3' e 4' trissubstituído, que foram um duplo duplete em δ_H 6,93 (1 H, $J = 2$ e 8 Hz), acoplado em *orto* ao próton com sinal em δ_H 6,76 (*d*, 1 H, $J = 8$ Hz) e em *meta* ao hidrogênio com deslocamento químico em 7,04 (*d*, 1 H, $J = 2$ Hz). Estes sinais foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-6', H-5' e H-2' da unidade cafeoíla.

Dois dupletos, ambos com integral para um hidrogênio, um em δ_H 7,57 ($J = 16$ Hz) e outro em δ_H 6,30 ($J = 15,6$ Hz), foram equivalentes ao par de hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos da unidade cafeoíla. Suas constantes de acoplamento, indicaram que os mesmos estão *trans*-acoplados, devido ao fato de que em uma ligação dupla prótons substituídos *trans* se acoplam com maior intensidade, com um valor característico de 3J por volta de 16 Hz. Com relação a constante de acoplamento *cis*, esta tem um valor típico de 3J de aproximadamente 10 Hz (Pavia et al., 2015). Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-7' e H-8' da unidade cafeoíla, respectivamente (WAN et al., 2017). Estas e outras atribuições podem ser visualizadas na Tabela 3.

Foram observados deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C e em suas expansões, que reforçaram a evidência da unidade cafeoíla. Os sinais em δ_C 149,3 e δ_C 146,7 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-4' e C-3' desta unidade, por serem mais desprotegidos dos demais carbonos aromáticos, pois sofrem um efeito eletronegativo direto. Outros sinais em δ_C 127,9, δ_C 122,9, δ_C 116,4 e δ_C 115,1 foram atribuídos aos carbonos C-1', C-6', C-5' e C-2', respectivamente, do sistema aromático ABX (LIU et al., 2013).

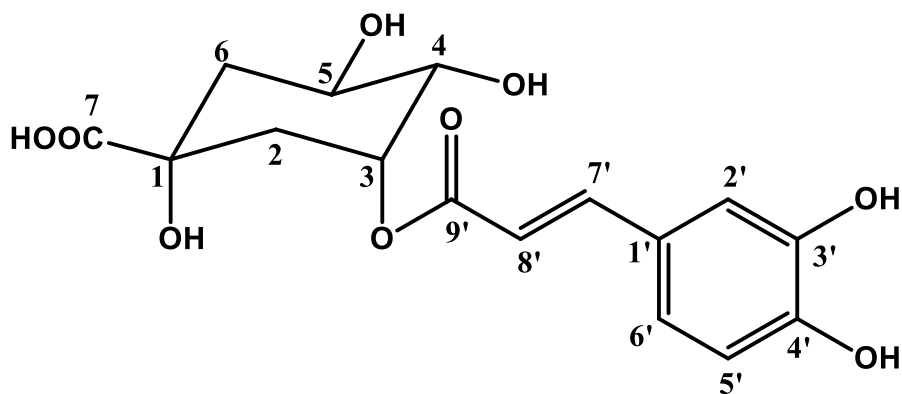
Um deslocamento em δ_C 169,0 indicou a presença da carboníla da unidade cafeoíla, sendo atribuído ao carbono C-9'. Os sinais em δ_C 146,8 e δ_C 115,7 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-7' e C-8', estando a posição C-8' mais protegida por estar α a carbonila em um sistema carbonílico α,β insaturado, uma vez que, a deslocalização eletrônica provoca desproteção na posição β . Estas e outras atribuições foram compiladas na Tabela 3.

Essas atribuições puderam ser confirmadas por análise das correlações no mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura 18, pág. 68), e em suas expansões (Figura 19, pág. 69, Figura 20, pág. 69), onde se observou-se correlações entre os sinais em δ_H 5,34 (H-3) com δ_C 73,0 (C-3), de δ_H 4,15 (H-5) com δ_C 68,2 (C-5) e de δ_H 3,64 (H-4) com δ_C 74,7 (C-4) do ácido quínico. Outras correlações entre os sinais em δ_H 7,57 (H-7') com δ_C 146,8 (C-7'), de δ_H 7,04 (H-2') com δ_C 115,1 (C-2'), de δ_H 6,93

(H-6') com δ_c 122,9 (C-6'), de δ_H 6,76 (H-5') com δ_c 116,4 (H-5') e de δ_H 6,30 (H-8') com δ_c 115,7 (C-8') confirmaram as atribuições aos carbonos da unidade cafeoíla.

No mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura 21, pág. 70) e em suas expansões (Figura 22, pág. 70, Figura 23, pág. 71), a esterificação da unidade cafeoíla no carbono C-3 do ácido quínico, foi confirmada através da correlação a três ligações do sinal em δ_H 5,34 (H-3) com δ_c 169,0, correspondente ao carbono carbonílico da unidade cafeoíla. Pode-se ainda confirmar esta posição de esterificação pela análise do mapa de contornos homonuclear NOESY (Figura 24, pág. 71), no qual foi evidenciada a correlação entre os sinais em δ_H 5,34 e δ_H 3,64, referentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente.

Após análise desses dados espectrais e com auxílio da literatura, foi possível sugerir que a substância Es-2 trata-se do ácido 3-O-cafeoilquínico.



Estrutura do ácido 3-O-cafeoilquínico

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2, ácido 3-O-cafeoilquínico, em comparação aos dados obtidos por NAKATANI et al., 2000.

Posição	HMQC		HMBC		Referência	
	δ_{H} Es-2	δ_{C} Es-2	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}	
1	-	75,3	H-2, H-3, H-5, H-6	-	75,4	
2	1,92 – 2,22 (<i>m</i> ; 4 H)	36,6	H-3, H-4	1,95 – 2,20 (<i>m</i>)	36,7	
3	5,34 (<i>m</i> ; 1H)	73,0	H-2, H-4, H-5	5,34 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 3, 3 e 4 Hz)	73,0	
4	3,64 (<i>dd</i> ; 1 H; <i>J</i> = 3,2 e 8,4 Hz)	74,7	H-2, H-3, H-5, H-6	3,63 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3 e 9 Hz)	74,8	
5	4,15 (<i>m</i> ; 1 H)	68,2	H-2, H-3, H-4, H-6	4,14 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> = 3, 9, e 9 Hz)	68,3	
6	1,92 – 2,22 (<i>m</i> ; 4 H)	41,4	H-2, H-4, H-5	1,95 – 2,20 (<i>m</i>)	41,5	
7	-	178,3	-	-	178,3	
1'	-	127,9	H-2', H-5', H-6', H-7', H-8'	-	127,9	
2'	7,04 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	115,1	H-6', H-5', H-7'	7,04 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 2 Hz)	115,1	
3'	-	146,7	H-2', H-5'	-	146,7	
4'	-	149,3	H-2', H-5', H-6'	-	149,4	
5'	6,76 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 8 Hz)	116,4	H-2', H-6', H-7'	6,76 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 8 Hz)	116,4	
6'	6,93 (<i>dd</i> ; 1H; <i>J</i> = 2 e 8 Hz)	122,9	H-2', H-5', H-7', H-8'	6,93 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 2 e 8 Hz)	122,9	
7'	7,57 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 16 Hz)	146,8	H-2', H-5', H-6', H-8'	7,58 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 16 Hz)	146,8	
8'	6,30 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 15,6 Hz)	115,7	H-7'	6,30 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 16 Hz)	115,8	
9'	-	169,0	H-3, H-7', H-8'	-	169,0	

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2.

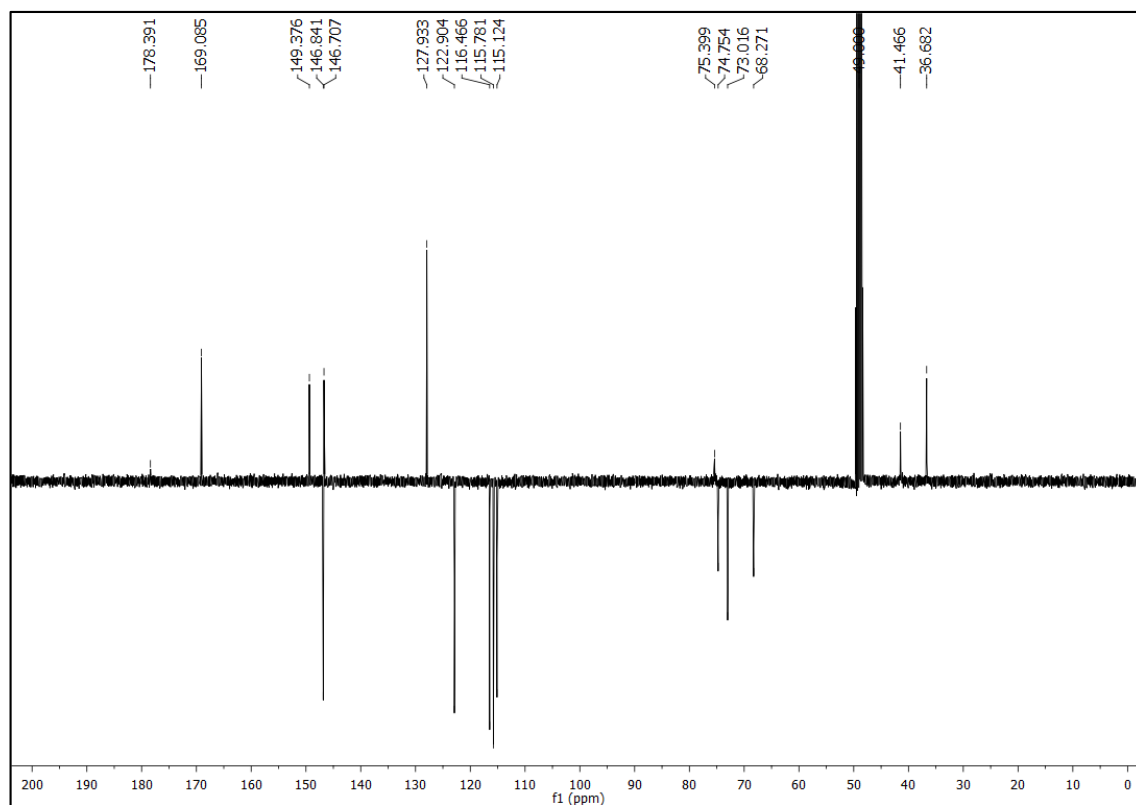


Figura 12 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 0 – 105 ppm

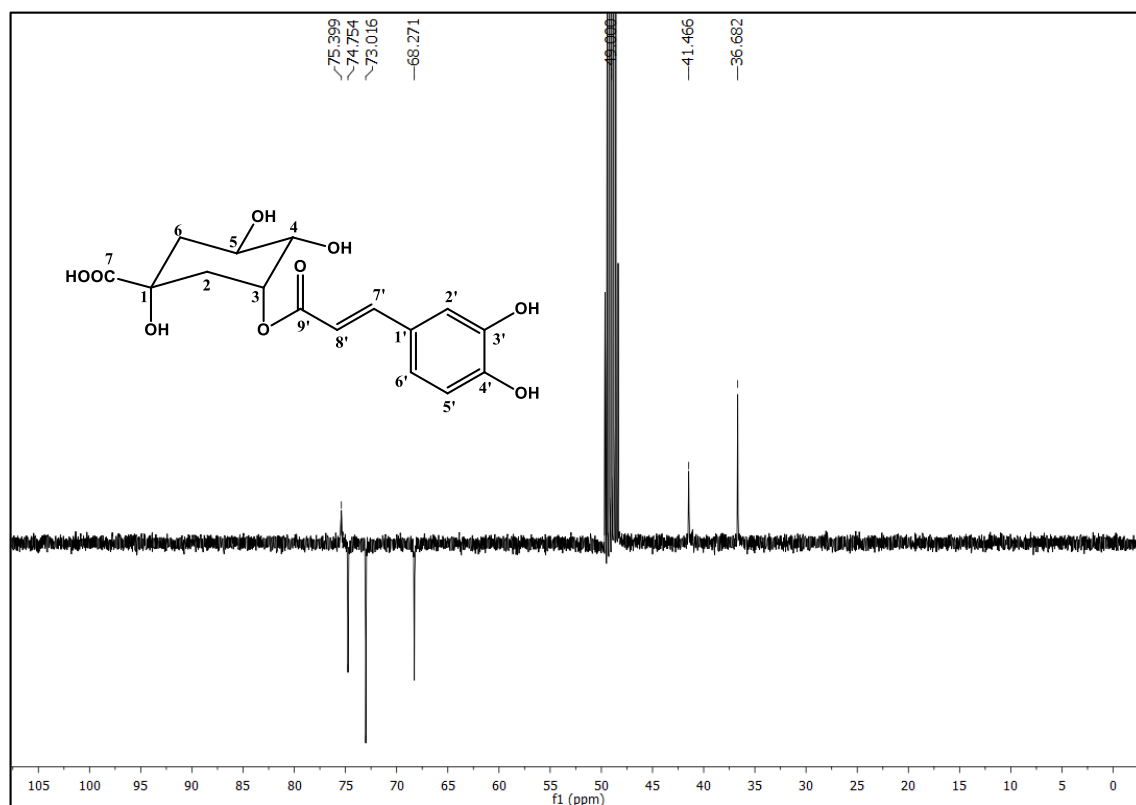


Figura 13 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 90 – 200 ppm.

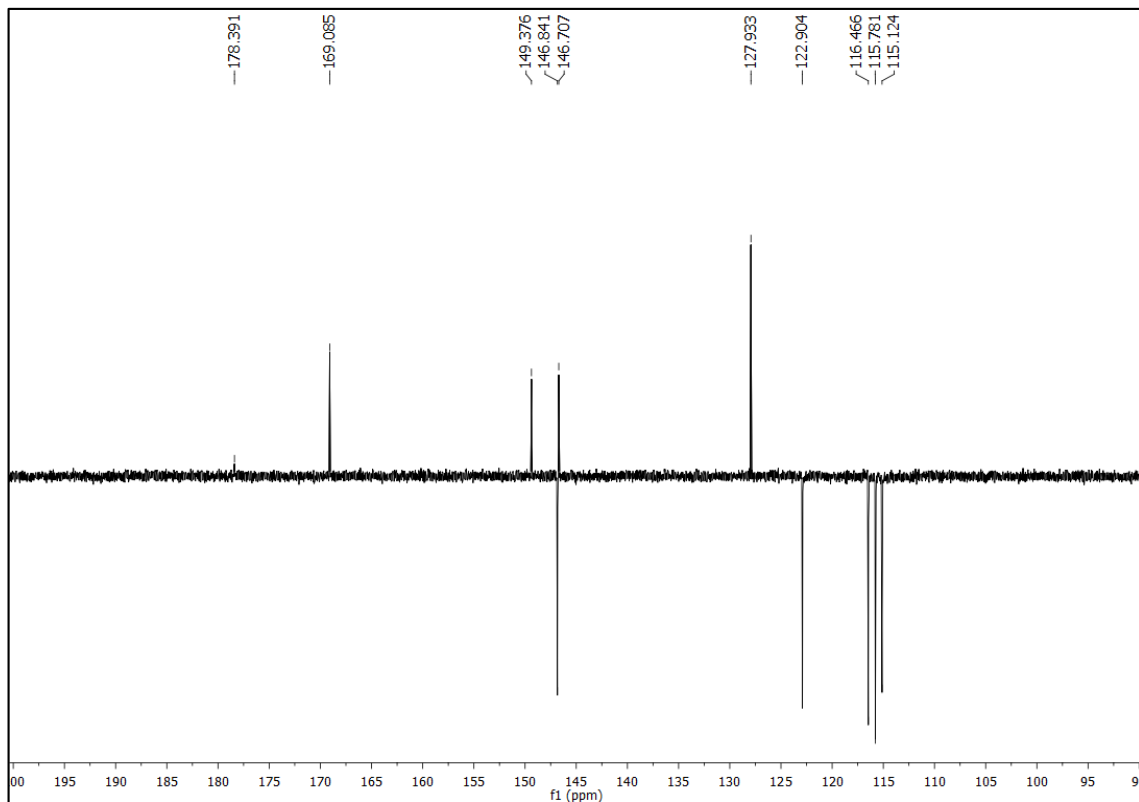


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2.

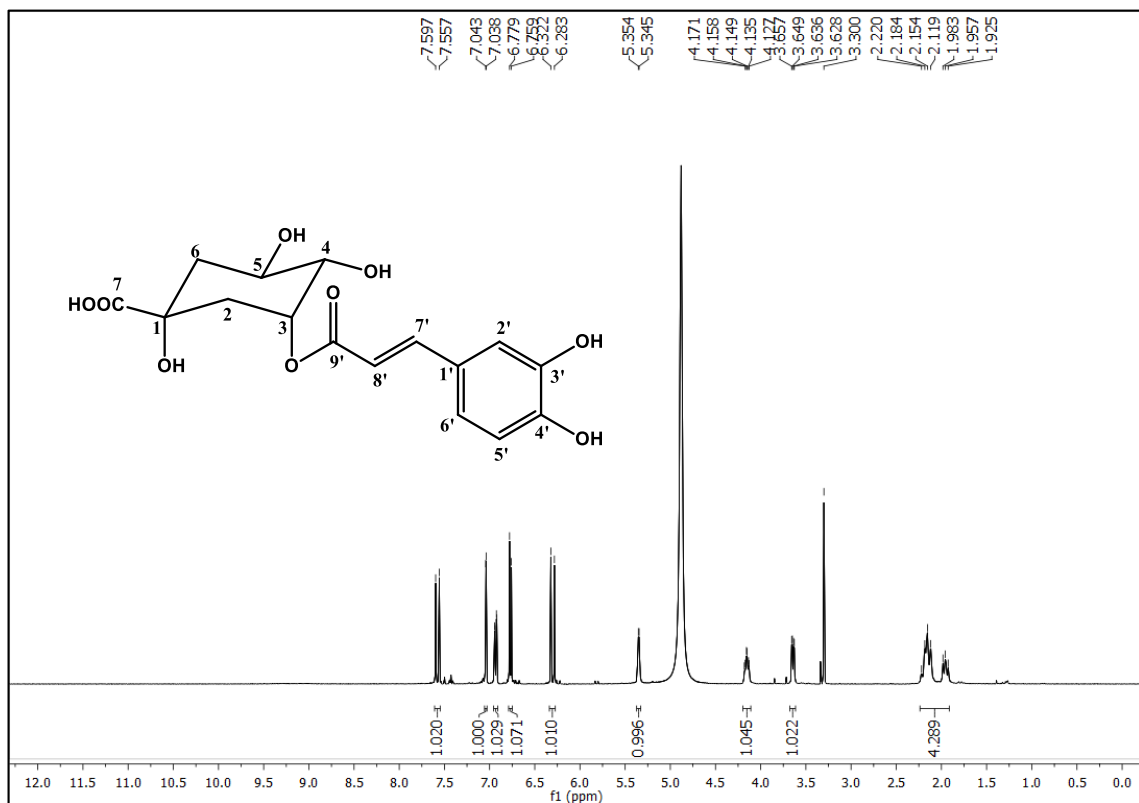


Figura 15 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 6,65 – 7,70 ppm.

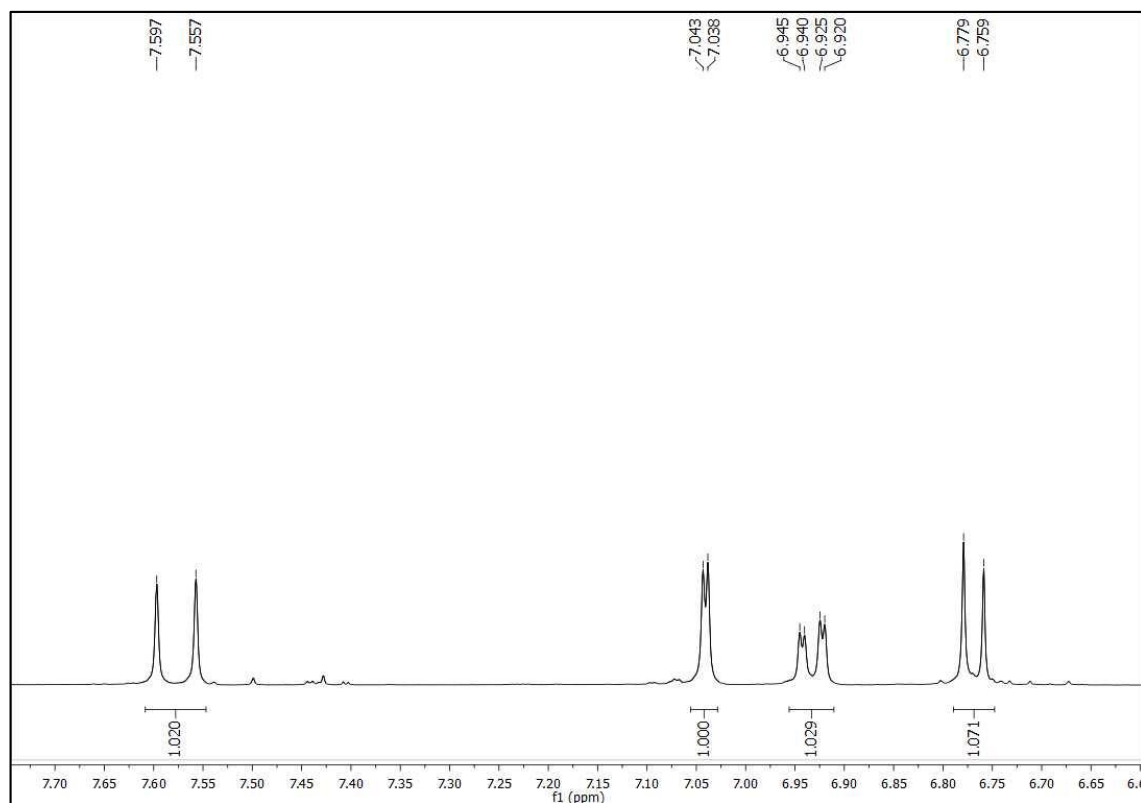


Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 5,30 – 6,35 ppm.

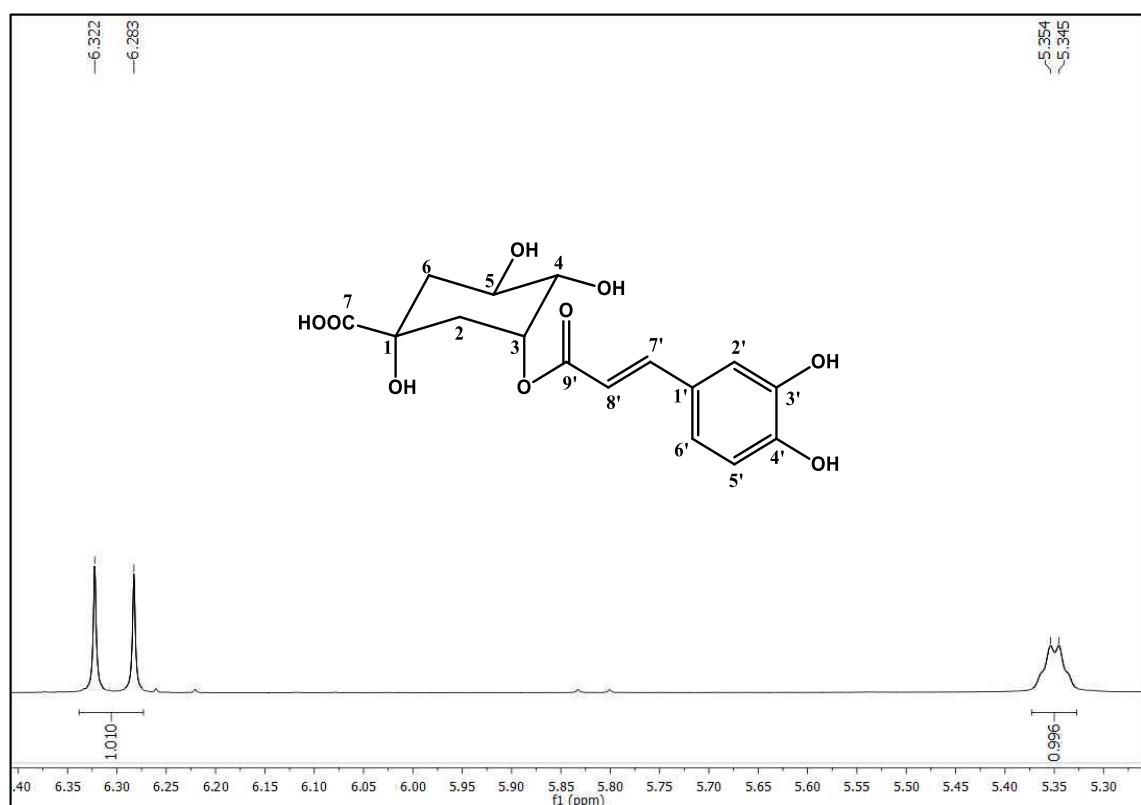


Figura 17 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 1,80 – 4,30 ppm.

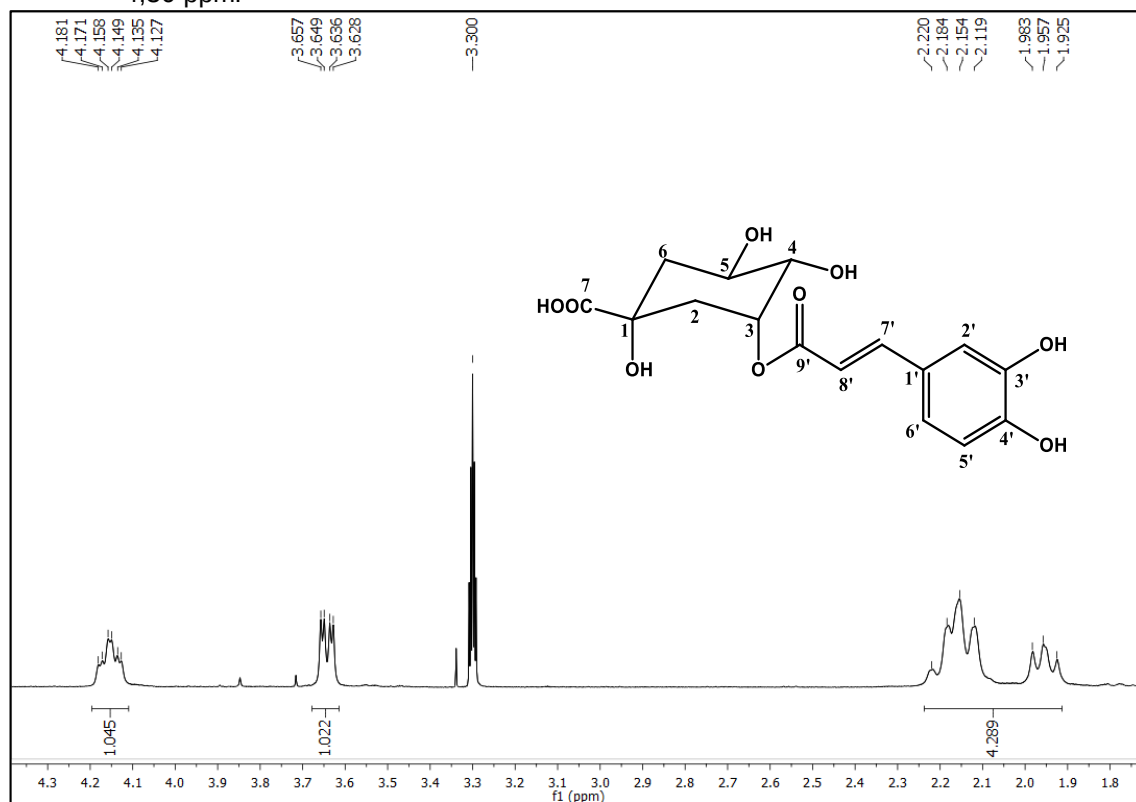


Figura 18 - Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2.

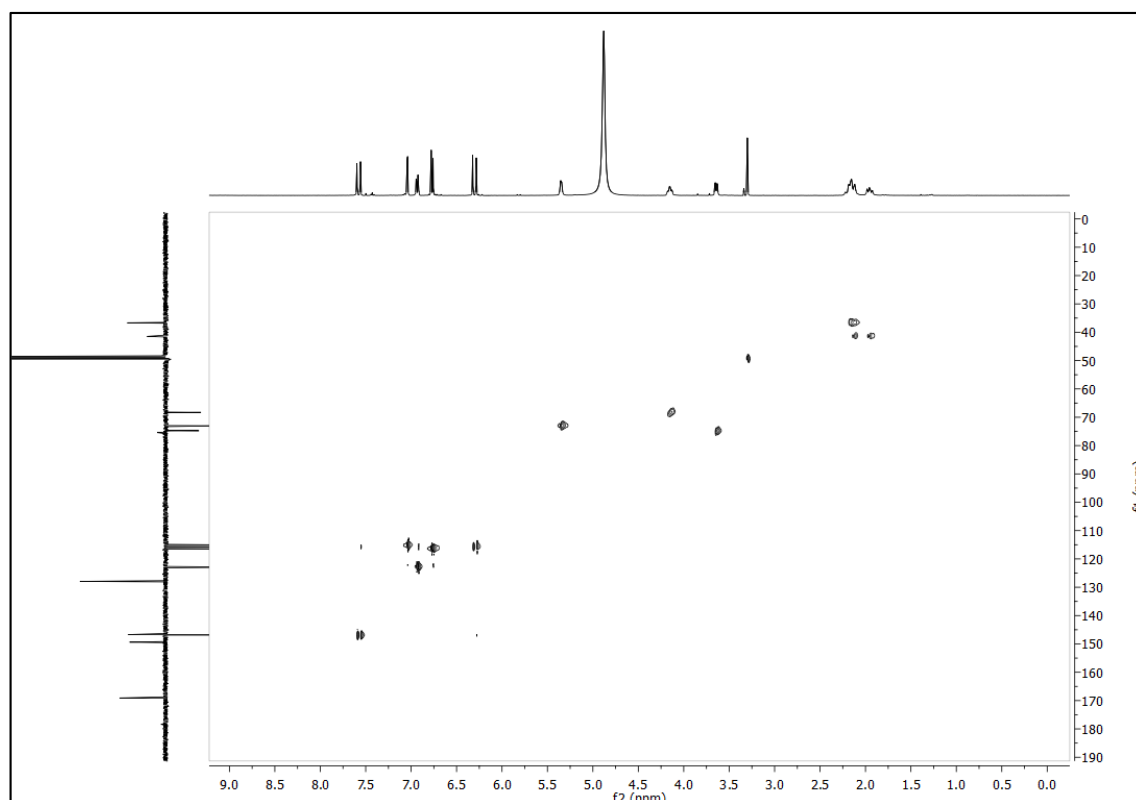


Figura 19 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (1,80– 5,40 ppm) x (30,0 – 95,0 ppm).

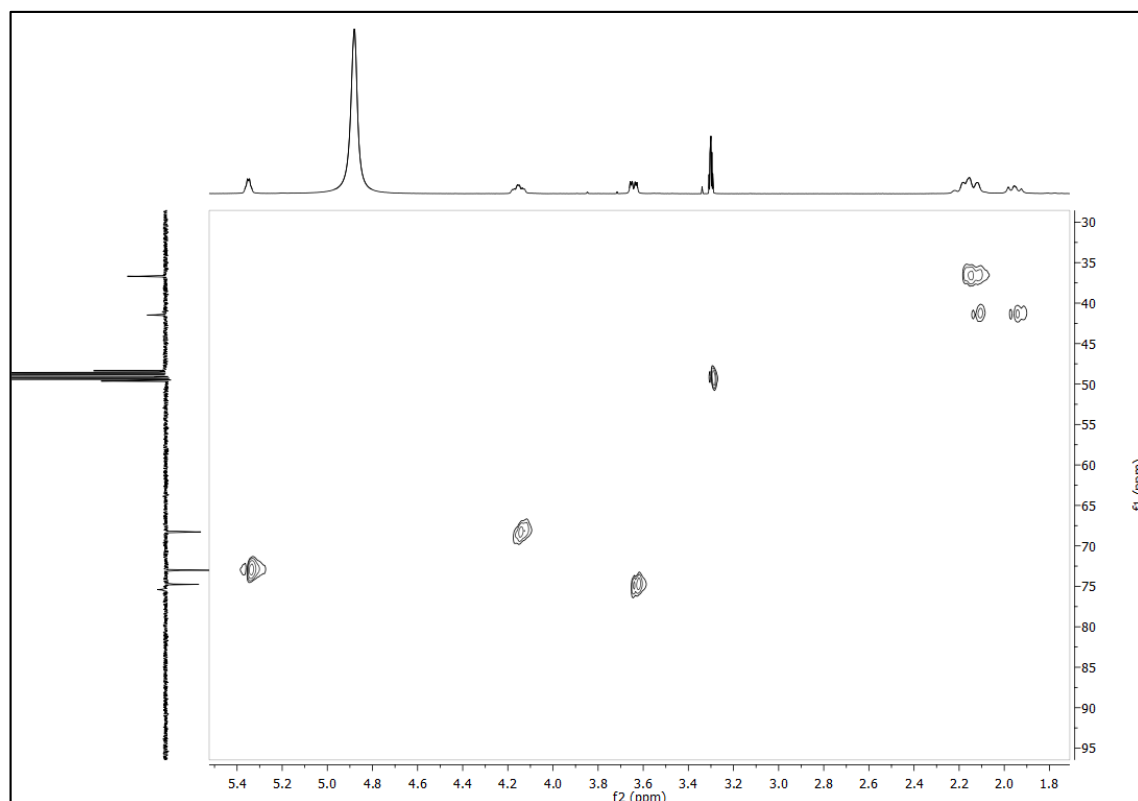


Figura 20 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (5,90– 8,00 ppm) x (100,0 – 155,0 ppm).

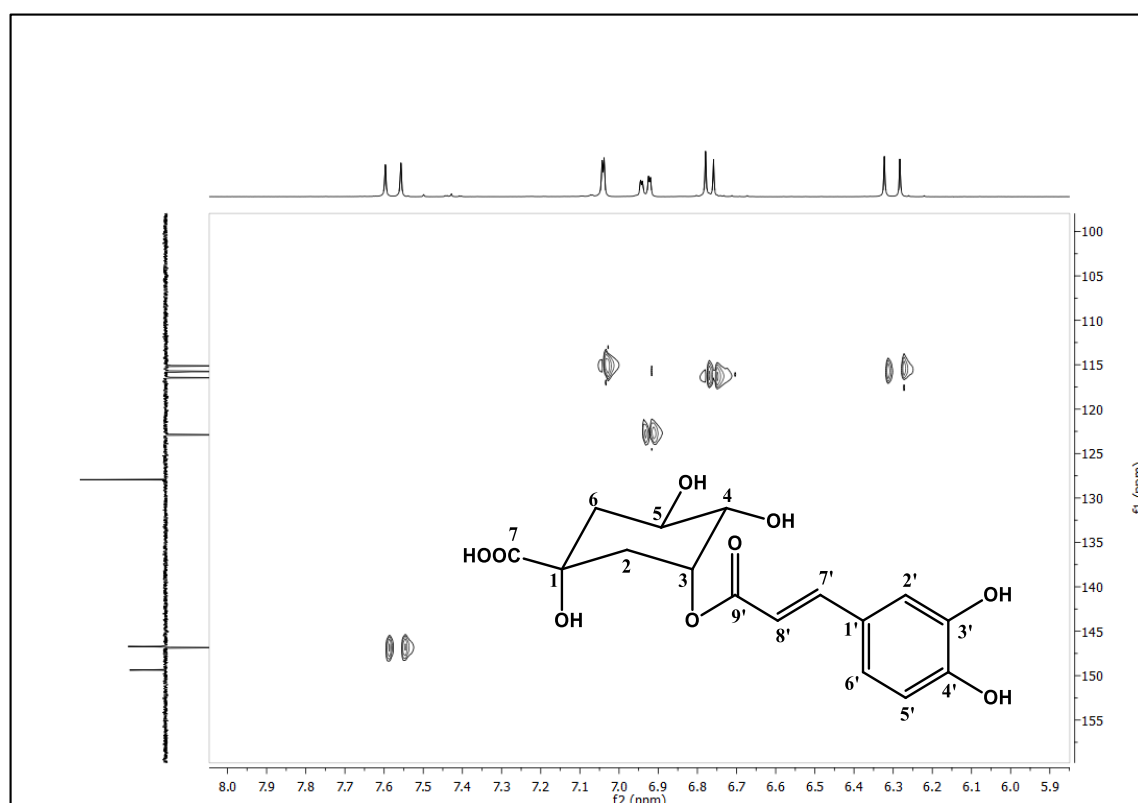


Figura 21 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2.

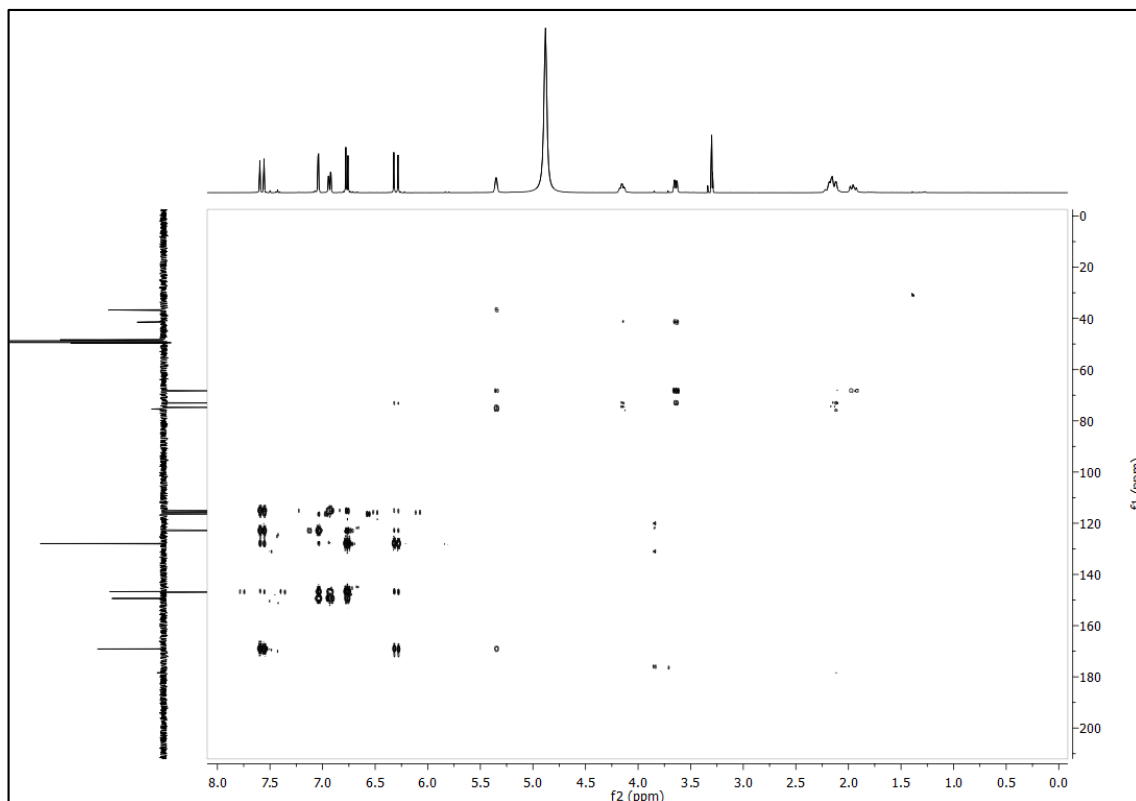


Figura 22 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (5,20– 8,20 ppm) x (100,0 – 190,0 ppm).

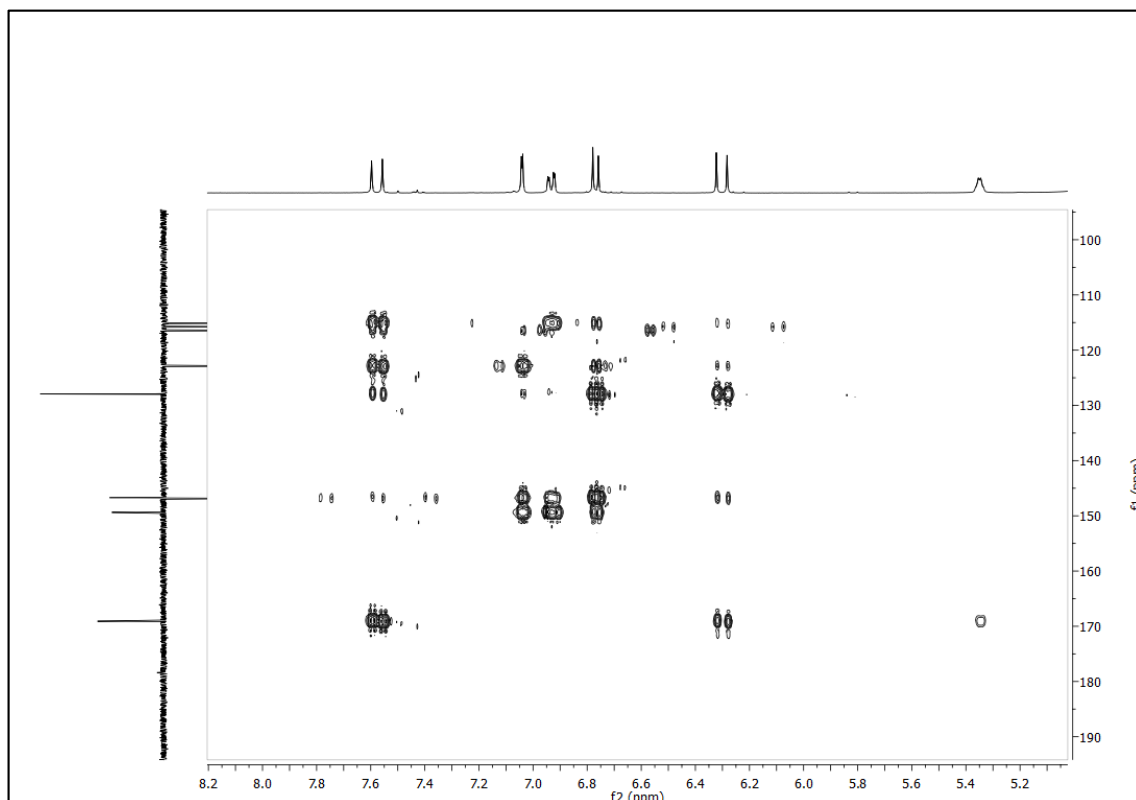


Figura 23 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (3,45– 4,45 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).

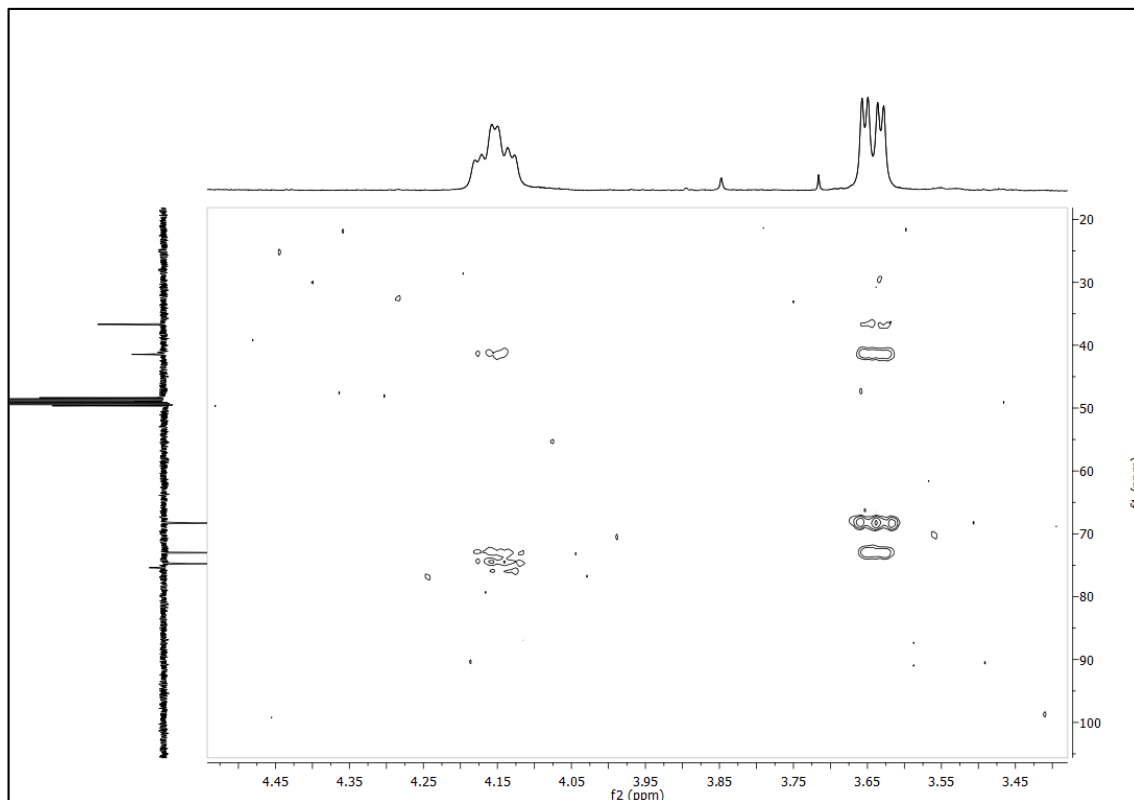
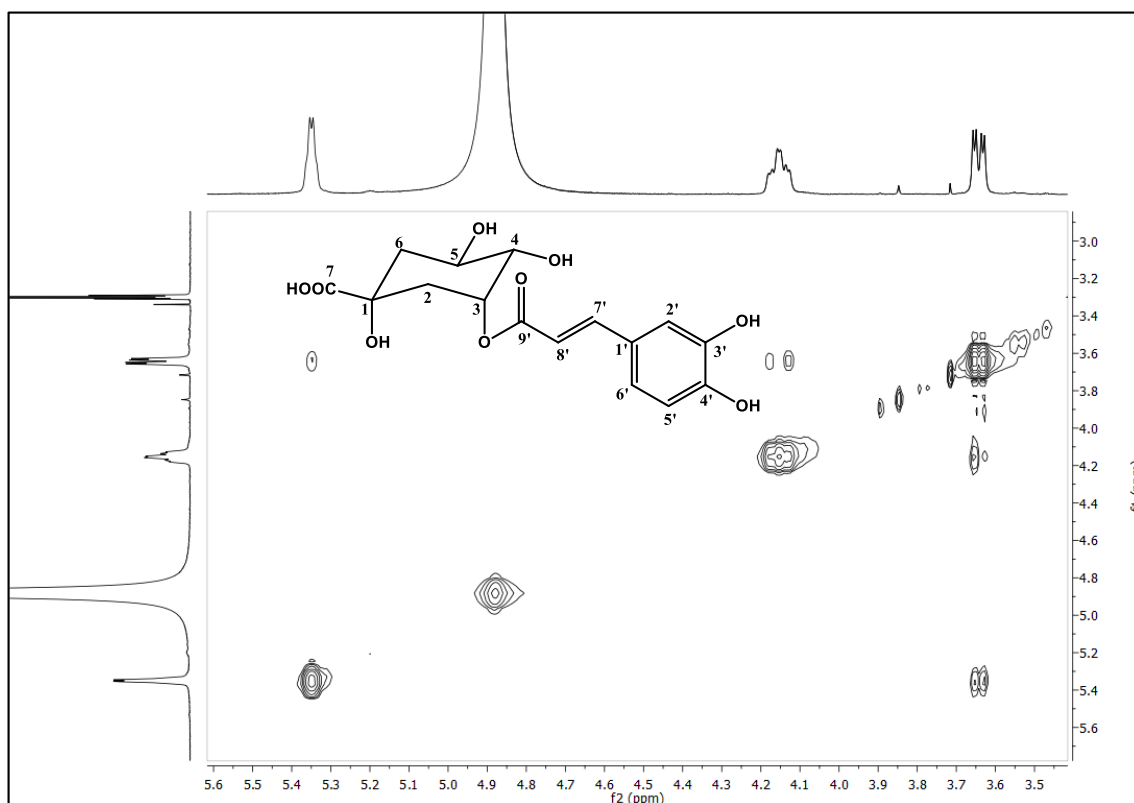


Figura 24 - Expansão do mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (3,50 – 5,60 ppm) x (3,00 – 5,60 ppm).



5.4. Identificação estrutural de Es-3

A substância codificada como Es-3 foi isolada na forma de um pó amorfo amarelo com 0,010 g.

Os espectros de RMN de ^1H , obtido a 400 MHz em CD_3OD e de ^{13}C – APT, obtido a 100 MHz em CD_3OD , apresentaram sinais com multiplicidade e deslocamentos químicos semelhantes aos da substância Es-2. Após esta análise, foi possível sugerir que a substância Es-3 também corresponde a um derivado do ácido quínico monossustituído por uma unidade cafeoíla.

Observou-se no espectro de RMN de ^{13}C – APT (Figura 25, pág. 75), e em suas expansões (Figura 26, pág. 75, Figura 27, pág. 76, Figura 28, pág. 76), dezesseis deslocamentos químicos. Destes, dois foram atribuídos a carbonos metilênicos sp^3 , três a carbonos metínicos sp^3 , cinco a carbonos metínicos sp^2 e seis a carbonos não hidrogenados. Os sinais com deslocamentos químicos em δ_{C} 169,0, δ_{C} 149,5, δ_{C} 147,0, δ_{C} 146,7, δ_{C} 127,8, δ_{C} 122,9, δ_{C} 116,4, δ_{C} 115,3 e δ_{C} 115,1 foram condizentes com a unidade cafeoíla, quando comparados com dados da literatura (LIU et al., 2013). Os demais deslocamentos podem ser visualizados na Tabela 4.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 29, pág. 77), e em suas expansões (Figura 30, pág. 77, Figura 31, pág. 78, Figura 32, pág. 78), um par de dupletos com integrais para um hidrogênio em δ_{H} 7,63 e δ_{H} 6,36 revelaram a presença de dois prótons olefínicos em configuração *trans*, uma vez que a constante de acoplamento foi de 16 Hz. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-7' e H-8', respectivamente. Também foram observados sinais, integrando para um hidrogênio, com multiplicidades equivalentes ao sistema aromático ABX 1', 3', 4' trissustituído da unidade cafeoíla, que foram os sinais em δ_{H} 7,05 (*d*, $J = 2$ Hz), δ_{H} 6,95 (*dd*, $J = 2$ e 8,4 Hz) e δ_{H} 6,77 (*d*, $J = 8$ Hz), correspondentes nesta ordem aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' (JEONG et al., 2011).

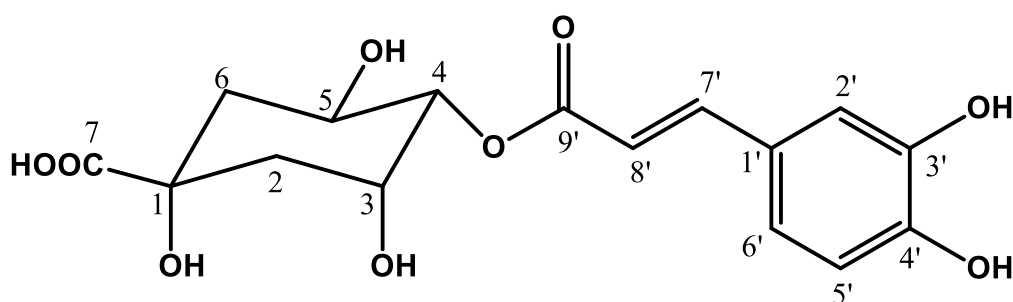
Um multipletto em δ_{H} 1,97 – 2,23, com integral para 4 hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios dos carbonos metilênicos do ácido quínico, H-2 e H-6. Um conjunto de deslocamentos químicos formado pela sobreposição de sinais dos prótons ligados a carbonos oxigenados, com integral para dois hidrogênios, em δ_{H} 4,29 foi condizente com uma substituição no carbono C-4 do ácido quínico pela unidade cafeoíla, em comparação com dados da literatura. Este conjunto de sinais foi atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5. Um duplo dupletto mais desprotegido, integrando para um

hidrogênio, em δ_H 4,80 ($J = 3,2$ e $9,2$ Hz) corroborou com a possível esterificação no carbono C-4, este sinal foi então atribuído ao hidrogênio H-4 (WAN et al., 2017). Estas e outras atribuições foram reunidas na Tabela 4.

As atribuições dos sinais aos carbonos foram confirmadas na análise do mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura 33, pág. 79), e em suas expansões (Figura 34, pág. 79, Figura 35, pág. 80), onde se observou-se correlações entre os sinais em δ_H 4,80 (H-4) com δ_C 79,2 (C-4) e de δ_H 4,29 (H-3 e H-5) com δ_C 69,6 (C-3) e δ_C 65,5 (C-5) do ácido quínico. Outras correlações entre os sinais em δ_H 7,63 (H-7') com δ_C 147,0 (C-7'), de δ_H 7,05 (H-2') com δ_C 115,1 (C-2'), de δ_H 6,95 (H-6') com δ_C 122,9 (C-6'), de δ_H 6,77 (H-5') com δ_C 116,4 (H-5') e de δ_H 6,36 (H-8') com δ_C 115,3 (C-8') assinalaram os carbonos da unidade cafeoíla.

A posição de esterificação no ácido quínico pode ser confirmada no mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura 36, pág. 80), e em suas expansões (Figura 37, pág. 81, Figura 38, pág. 81), no qual foi observada a correlação entre o sinal do hidrogênio H-4 (δ_H 4,80) com o carbono carbonílico C-9' (δ_C 169,0). Neste espectro foi possível ainda observar correlações que permitiram confirmar e assinalar todos os carbonos do anel aromático da unidade cafeoíla. Estes dados podem ser encontrados na Tabela 4.

Ao analisar e confrontar os dados dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais, de Es-3 com os descritos na literatura, pode-se identificar esta substância como sendo o ácido 4-O-cafeoilquínico (NAKATANI et al., 2000).



Estrutura do ácido 4-O-cafeoilquínico.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3, ácido 4-O-cafeoilquínico, em comparação aos dados obtidos por NAKATANI et al., 2000.

Posição	HMQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Es-3	δ_{C} Es-3	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	76,5	H-2, H-3, H-5, H-6	-	76,6
2	1,97 – 2,23 (<i>m</i> ; 4 H)	38,4	H-3, H-4, H-6	2,00 – 2,20 (<i>m</i>)	38,4
3	4,29 (<i>m</i> ; 2H)	69,6	H-2, H-4, H-5	4,28 (<i>ddd</i> ; $J = 3, 3$ e 4 Hz)	69,6
4	4,80 (<i>dd</i> ; 1 H; $J = 3,2$ e 9,2 Hz)	79,2	H-2, H-3, H-5, H-6	4,79 (<i>dd</i> ; $J = 3$ e 9 Hz)	79,3
5	4,29 (<i>m</i> ; 2 H)	65,5	H-3, H-4, H-6	4,27 (<i>ddd</i> ; $J = 4, 9$, e 11 Hz)	65,5
6	1,97 – 2,23 (<i>m</i> ; 4 H)	42,6	H-2, H-4, H-5	2,00 – 2,20 (<i>m</i>)	42,7
7	-	177,3	H-2, H-6	-	177,3
1'	-	127,8	H-2', H-5', H-6', H-7', H-8'	-	127,8
2'	7,05 (<i>d</i> ; 1 H; $J = 2$ Hz)	115,1	H-5', H-6', H-7'	7,06 (<i>d</i> ; $J = 2$ Hz)	115,1
3'	-	146,7	H-2', H-5', H-6'	-	146,8
4'	-	149,5	H-2', H-5', H-6'	-	149,6
5'	6,77 (<i>d</i> ; 1 H; $J = 8$ Hz)	116,4	H-2', H-6'	6,77 (<i>d</i> ; $J = 8$ Hz)	116,5
6'	6,95 (<i>dd</i> ; 1H; $J = 2$ e 8,4 Hz)	122,9	H-2', H-5', H-7', H-8'	6,96 (<i>dd</i> ; $J = 2$ e 8 Hz)	123,0
7'	7,63 (<i>d</i> ; 1H; $J = 16$ Hz)	147,0	H-2', H-6', H-8'	7,65 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	147,1
8'	6,36 (<i>d</i> ; 1 H; $J = 15,6$ Hz)	115,3	H-7'	6,37 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	115,4
9'	-	169,0	H-4, H-7', H-8'	-	169,0

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3.

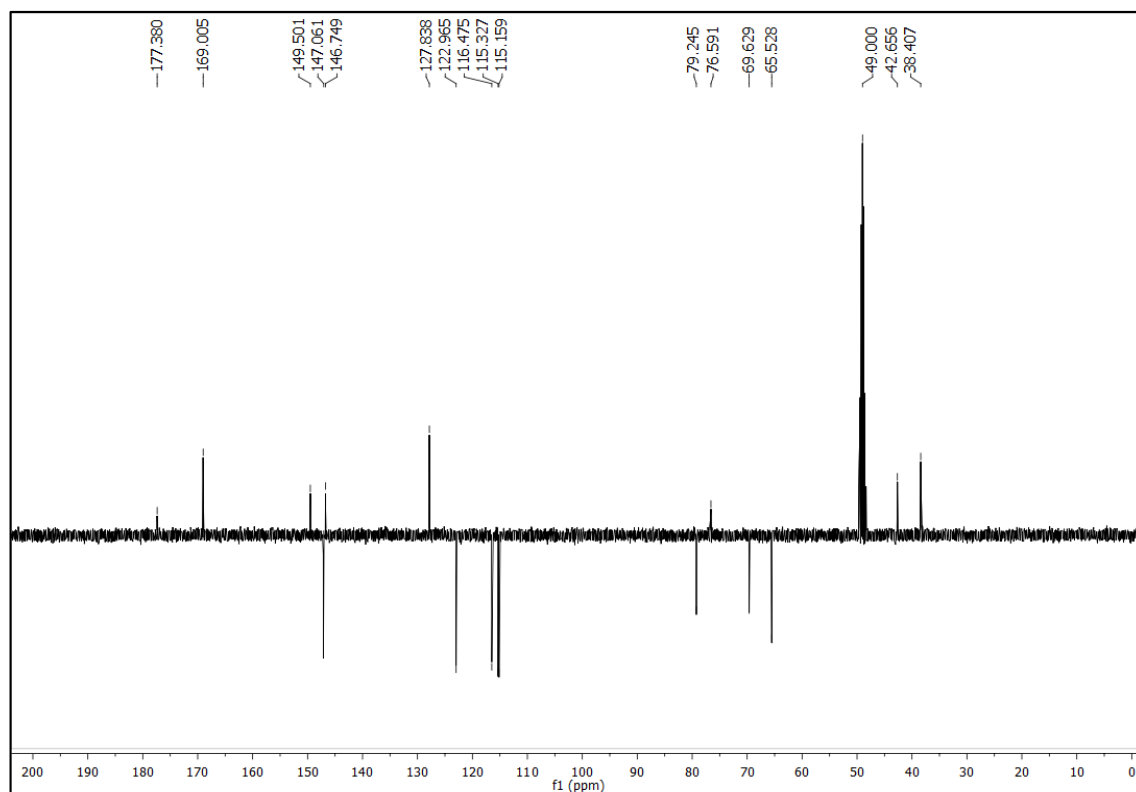


Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 34 – 84 ppm.

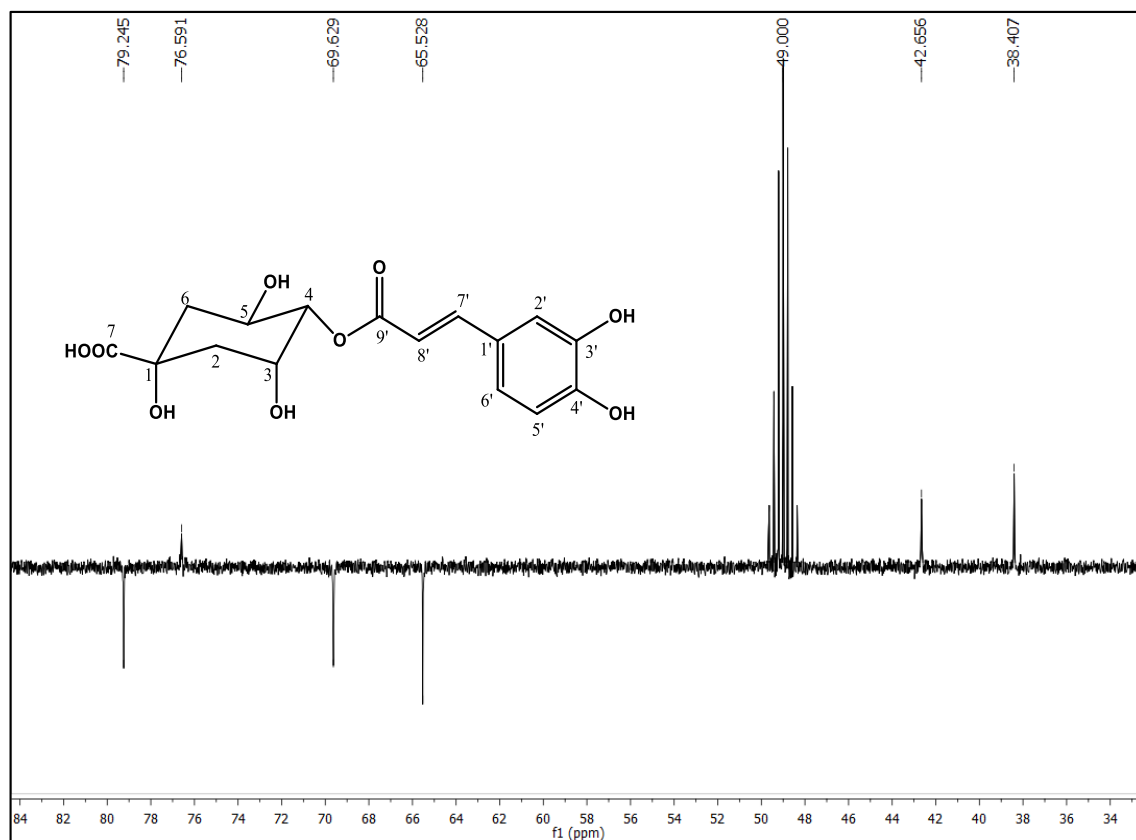


Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 112 – 132 ppm.

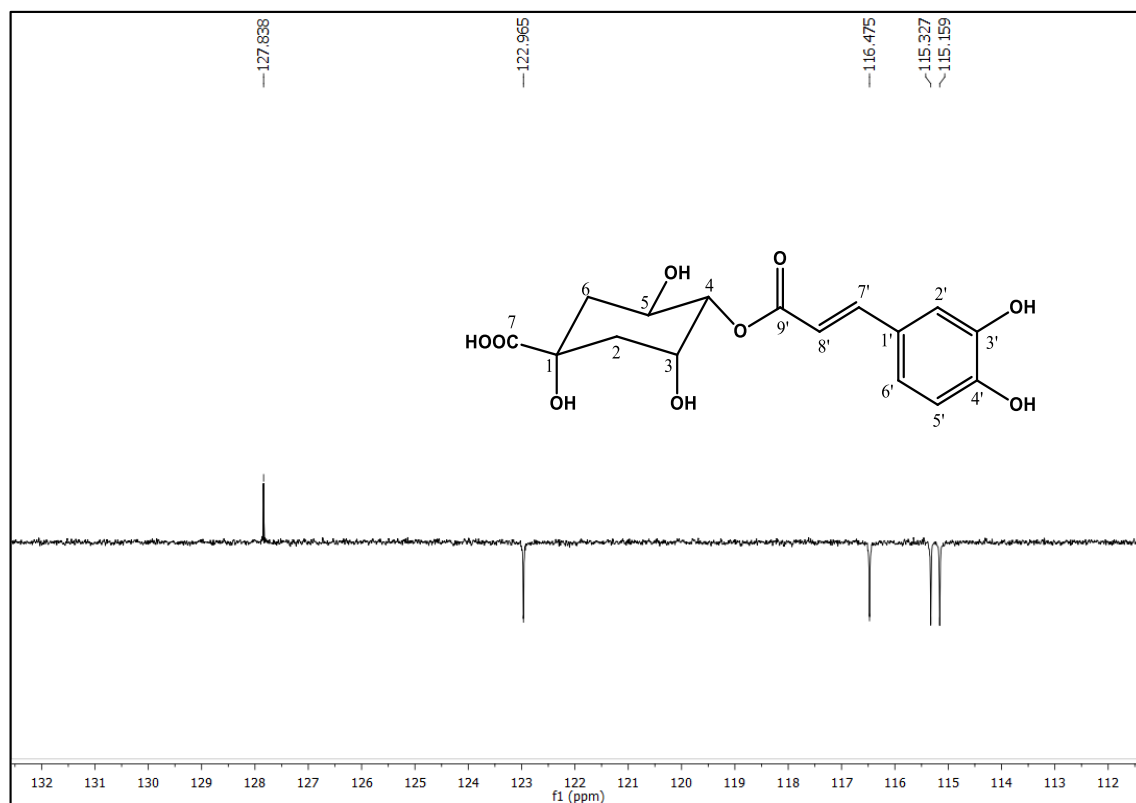


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 144 – 182 ppm.

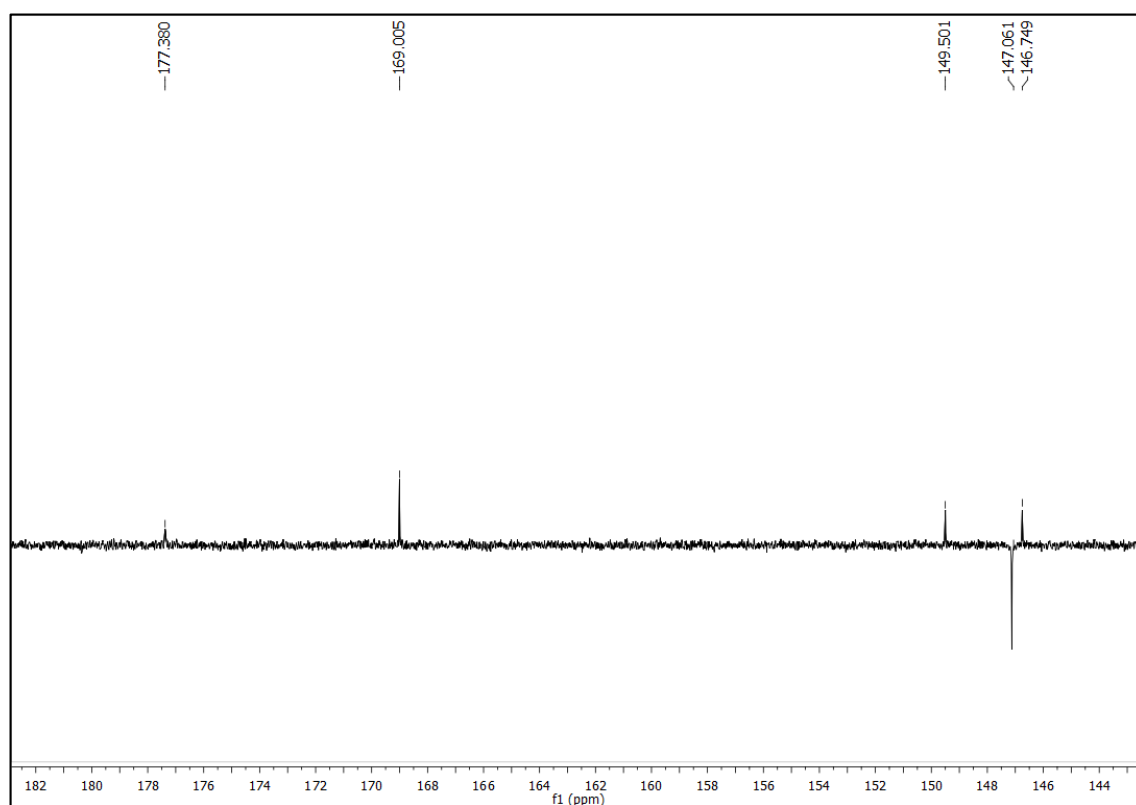


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3.

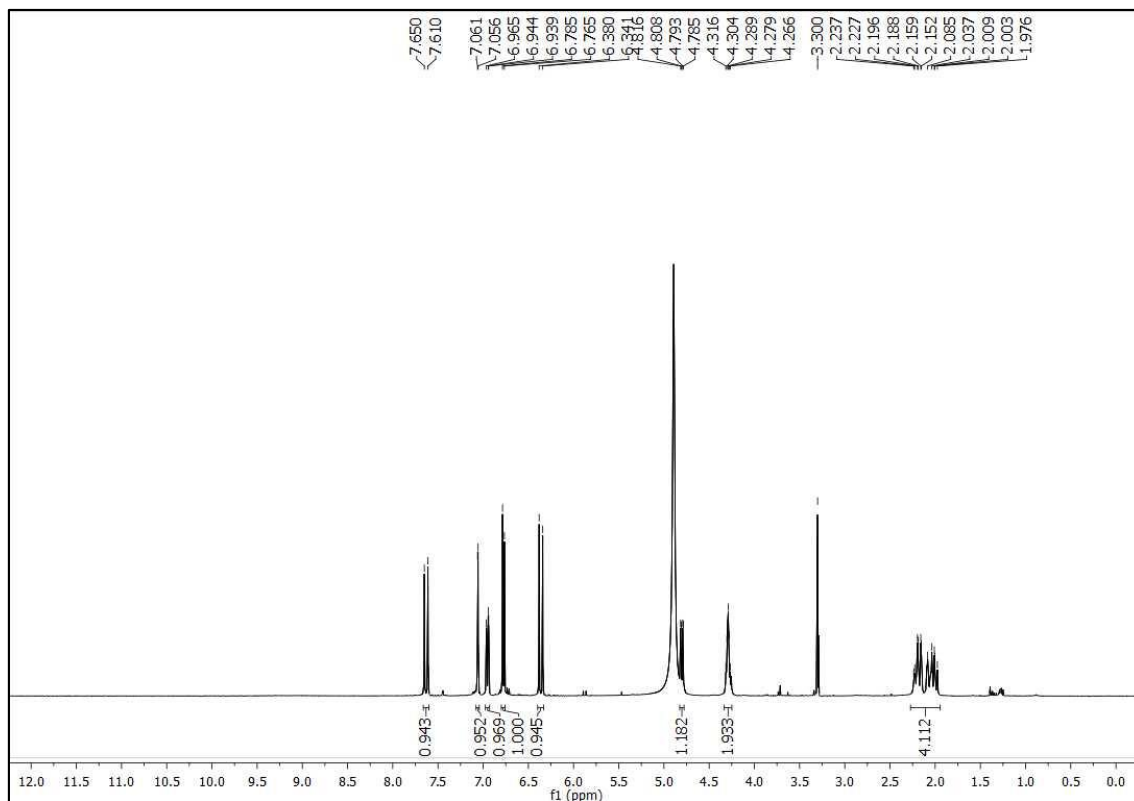


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 4,10 – 5,10 ppm.

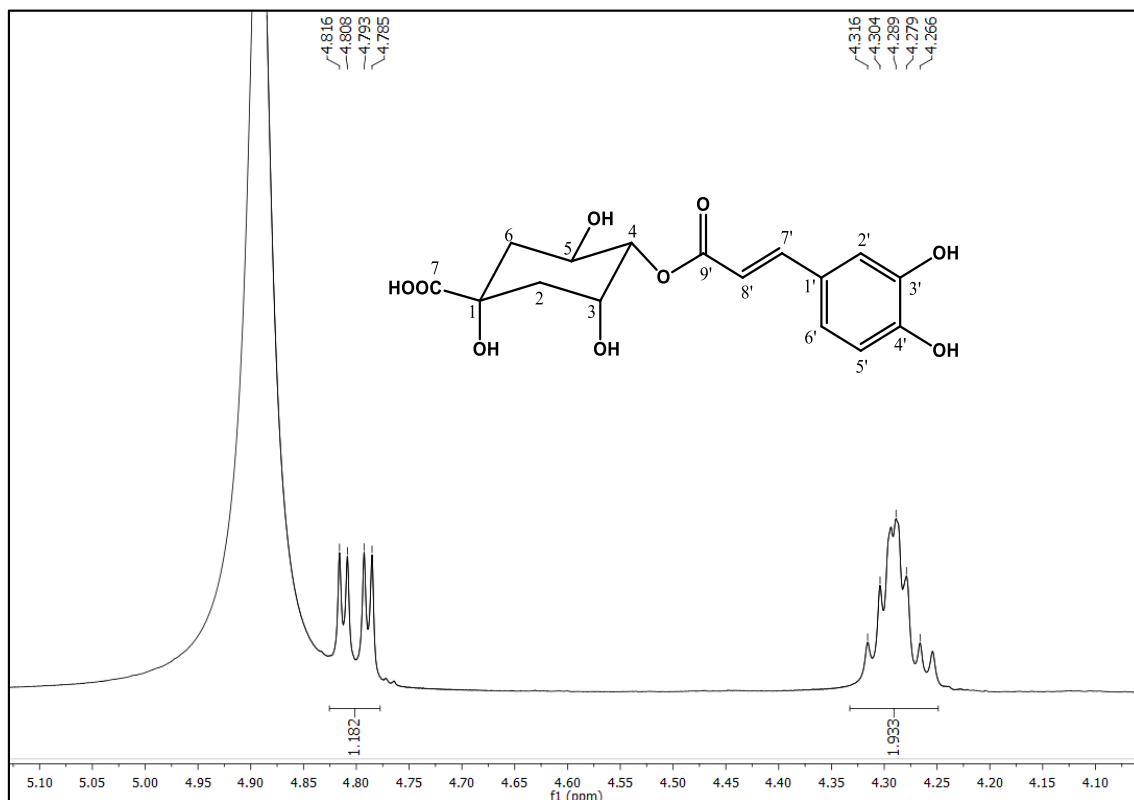


Figura 31 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 1,60 – 2,60 ppm.

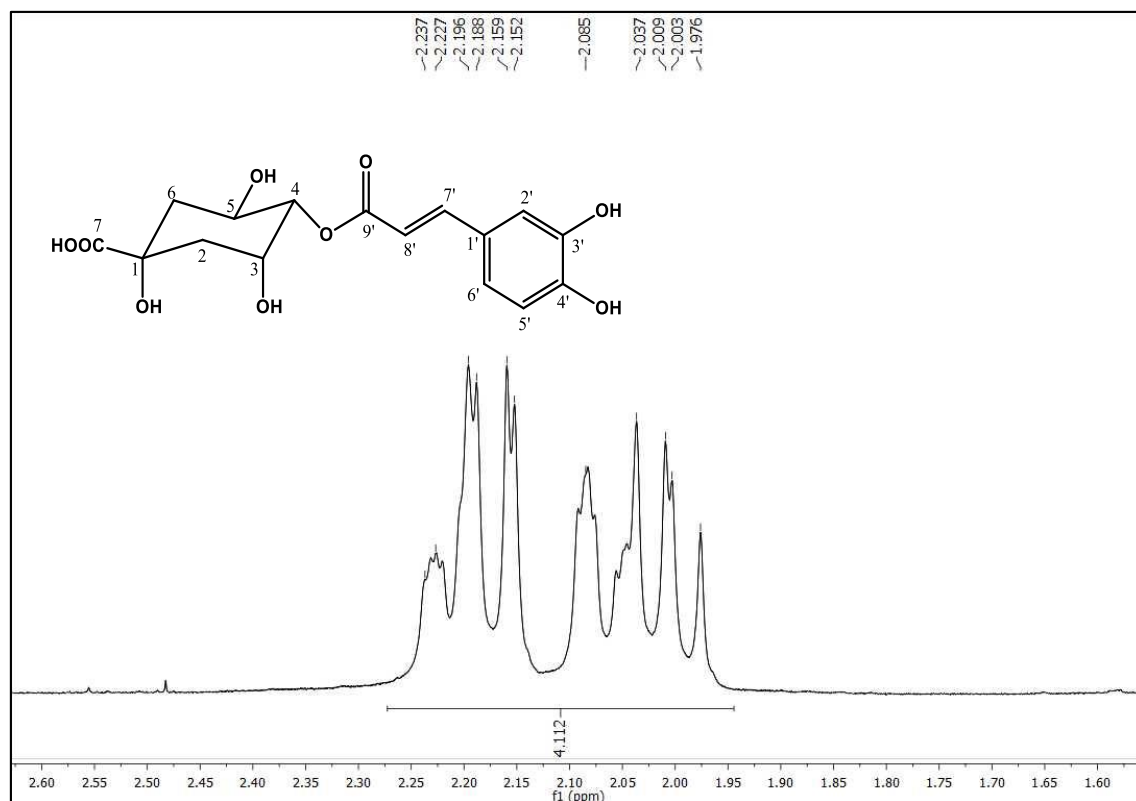


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 6,30 – 7,70 ppm.

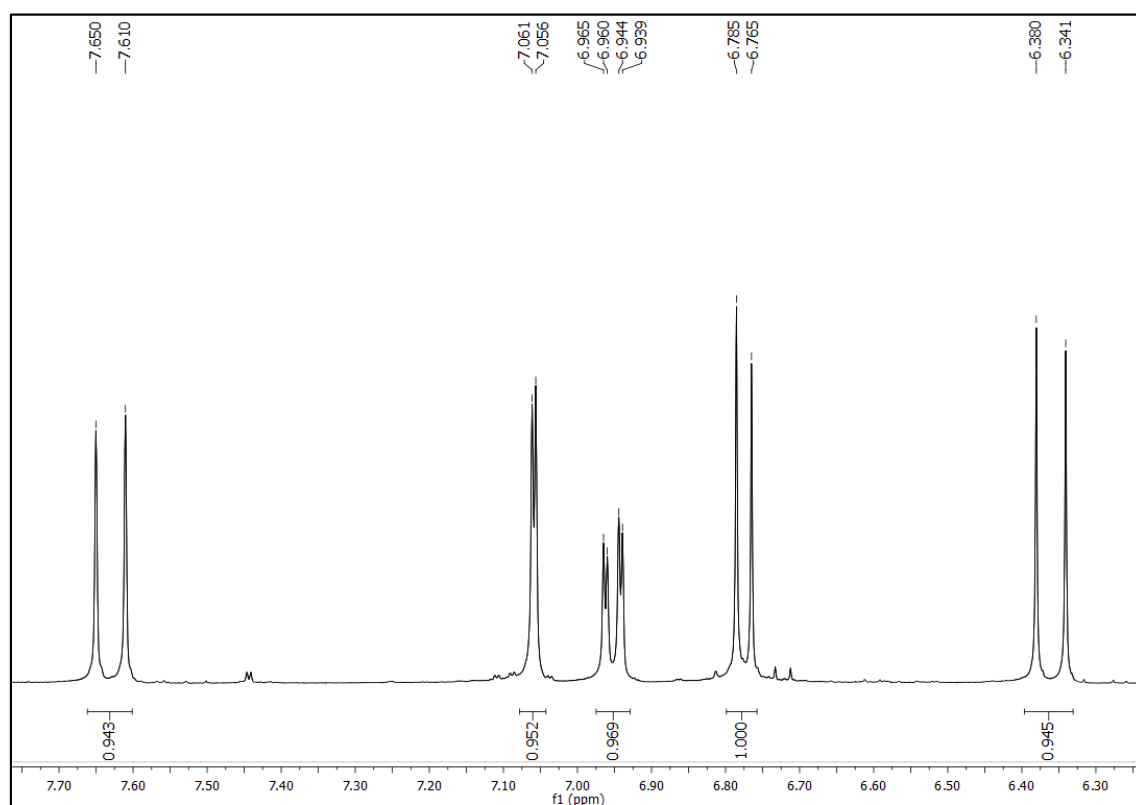


Figura 33 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3.

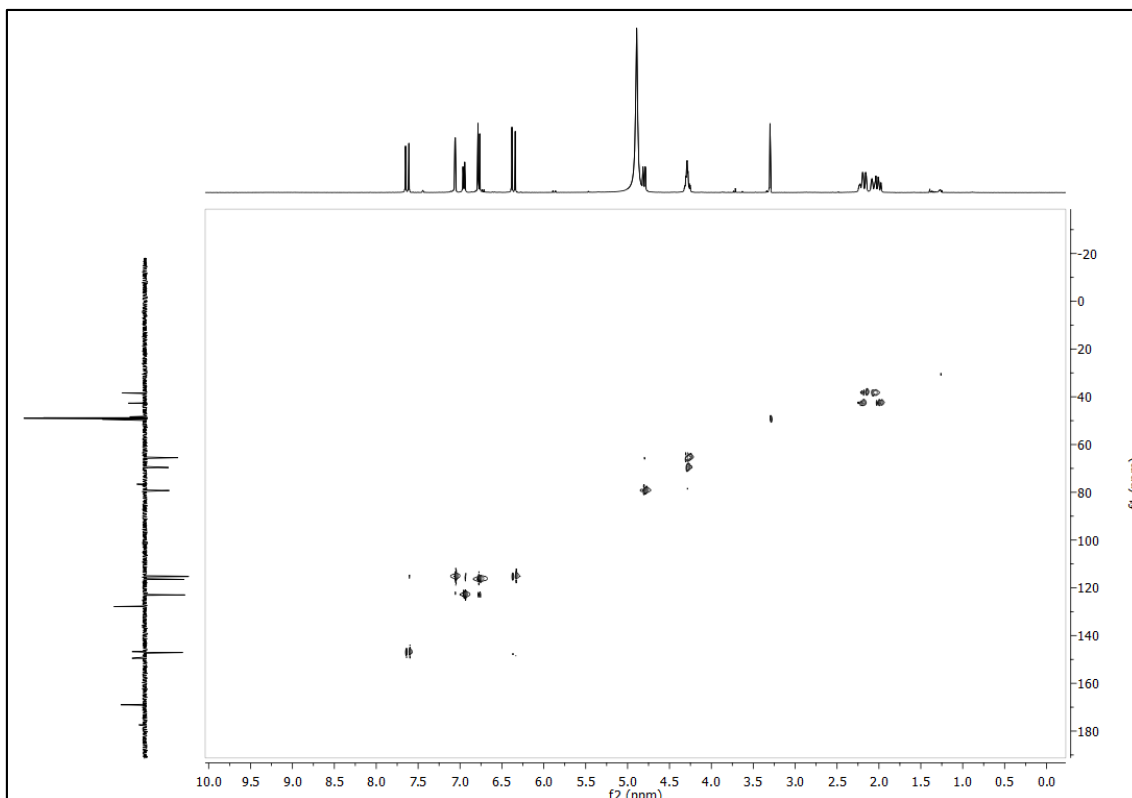


Figura 34 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (1,60– 5,00 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).

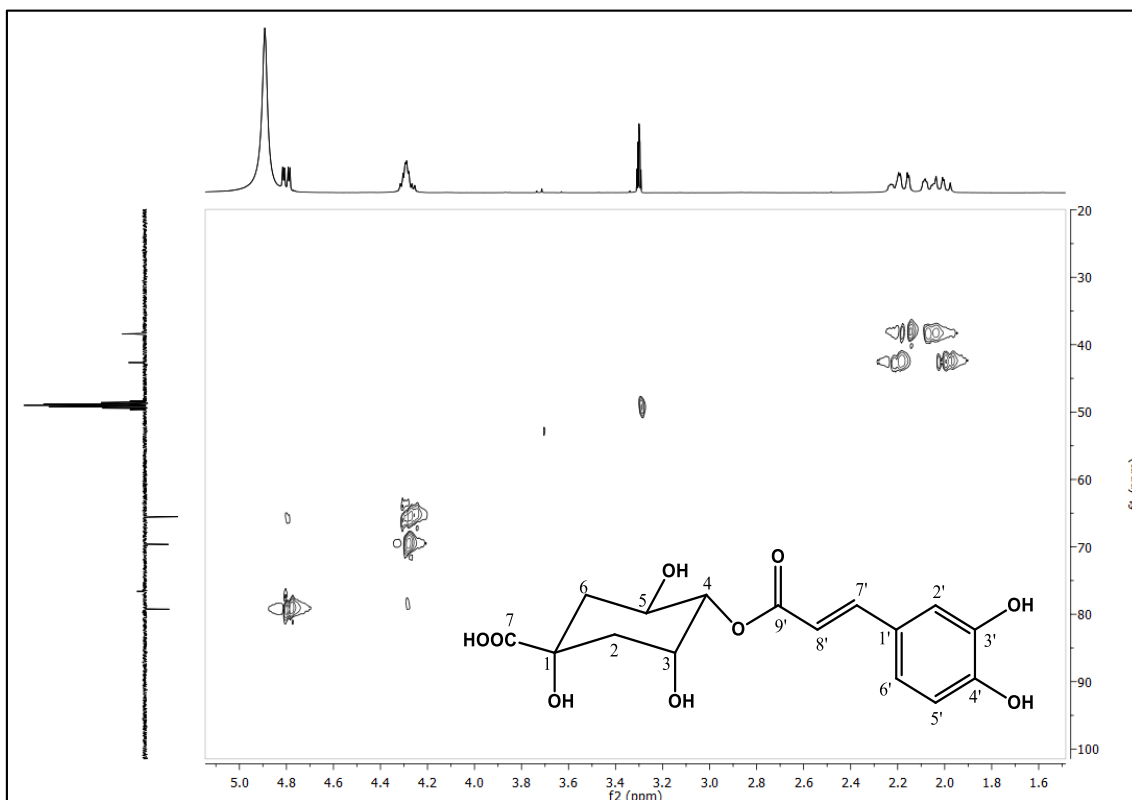


Figura 35 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (5,80– 8,10 ppm) x (100,0 – 165,0 ppm).

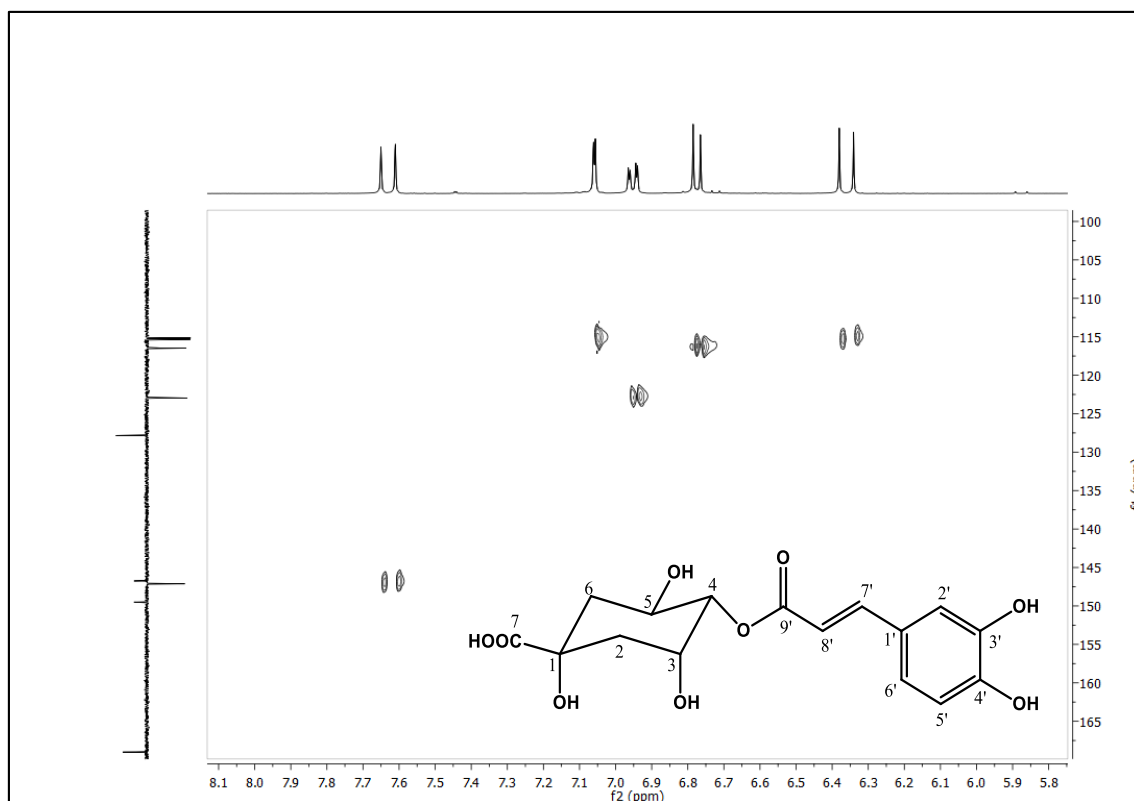


Figura 36 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3.

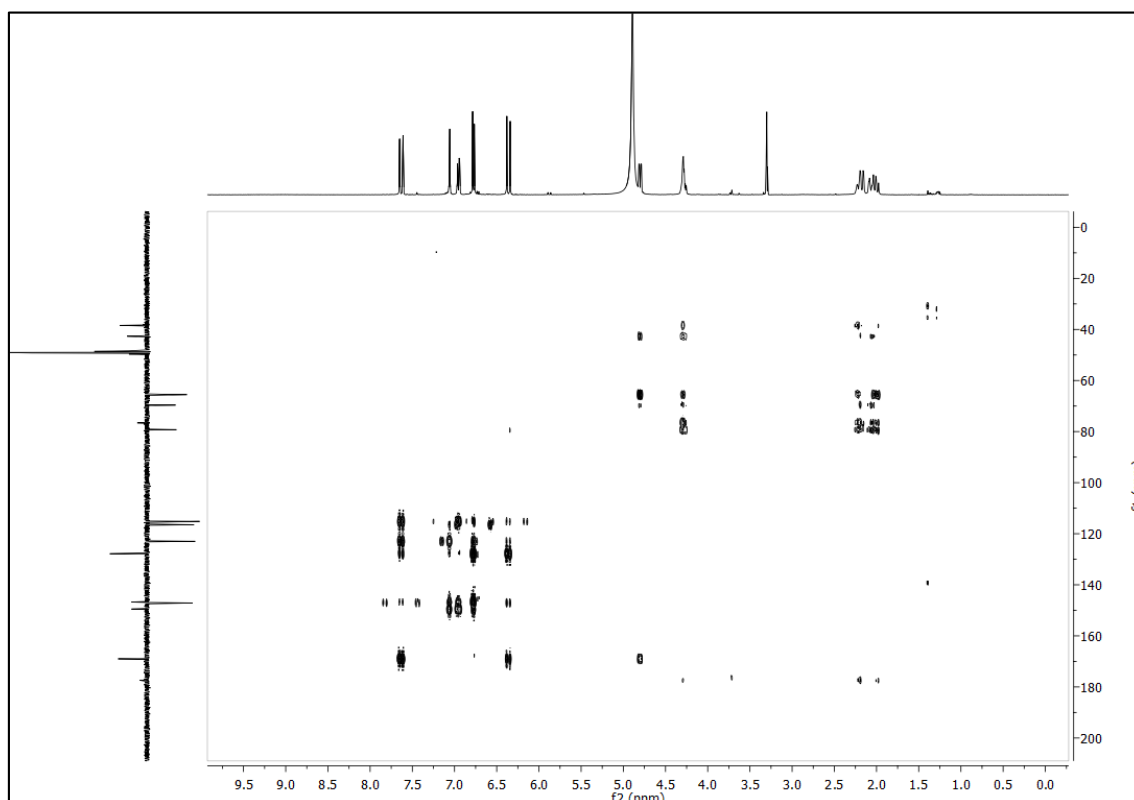


Figura 37 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (1,00– 4,80 ppm) x (10,0 – 100,0 ppm).

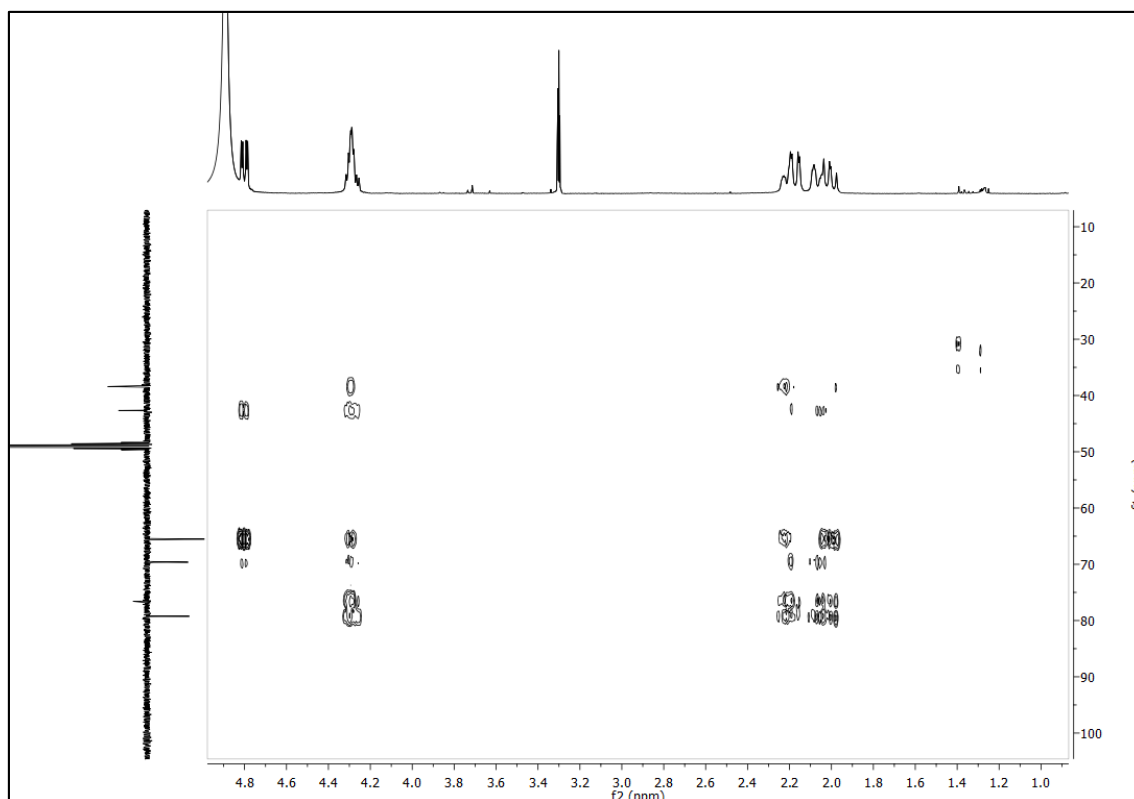
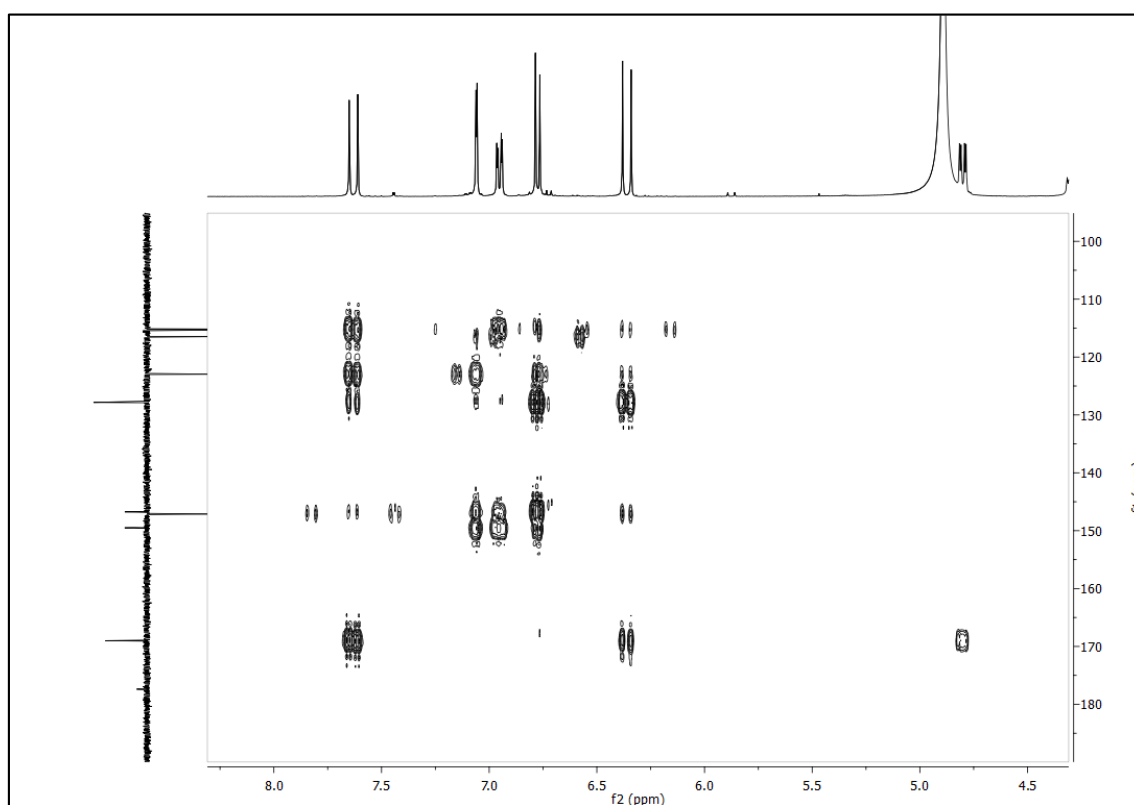


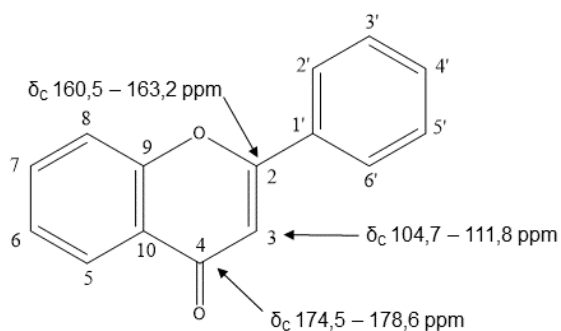
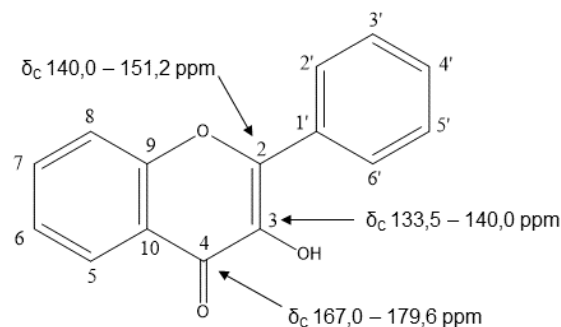
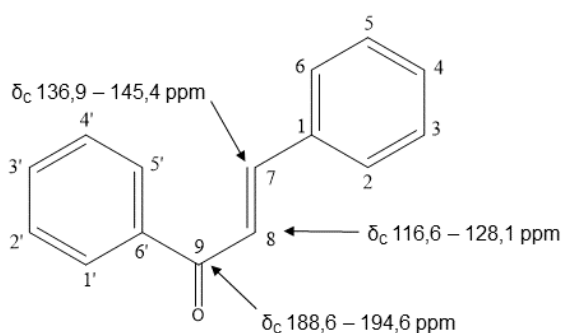
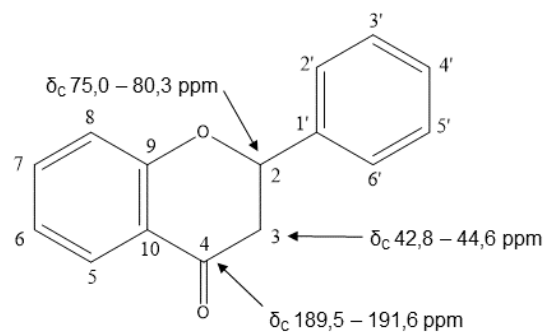
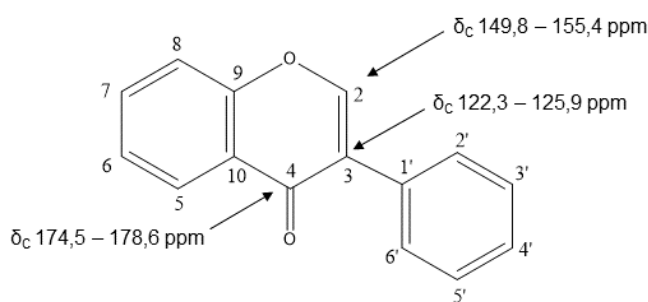
Figura 38 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (4,50– 8,00 ppm) x (100,0 – 180,0 ppm).



5.5. Identificação estrutural de Es-4

O composto codificado com Es-4 foi isolado na forma de um pó amorfo alaranjado com 0,013 g. O espectro de massas mostrou um pico do íon molecular em m/z 595.17 $[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{16}$.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39, pág. 88), obtido a 100 MHz em CD_3OD , e suas expansões (Figura 40, pág. 88, Figura 41, pág. 89) apresentaram vinte e cinco deslocamentos químicos, referentes a vinte e seis átomos de carbono, estando o sinal em δ_C 158,2 correspondendo a dois carbonos. Foram atribuídos nove sinais a carbonos não hidrogenados, dois a carbonos metilênicos sp^3 , cinco sinais a carbonos metínicos sp^2 e nove a carbonos metínicos sp^3 . Um esqueleto flavonoídico ($C_6C_3C_6$) foi evidenciado pela presença de quatorze sinais característicos, referentes aos 15 átomos de carbonos presentes nesta unidade. A ausência do sinal na faixa de δ_C 104,7 – 111,8 ppm, assim como a presença do deslocamento químico em 135,0 permitiu inferir uma substituição no carbono C-3. Este sinal, em conjunto com os visualizados em δ_C 158,2 e δ_C 179,5, atribuídos respectivamente aos carbonos C-2 e C-4, evidenciaram um esqueleto do tipo flavonol. As faixas características de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C de alguns tipos de flavonoides podem ser visualizadas abaixo (PELTER et al. 1976).

**Flavona****Flavonol****Chalcona****Flavanona****Isoflavona**

Faixas de deslocamentos químicos característicos de alguns carbonos em núcleos de flavonoides.

Oxigenações nos carbonos C-5 e C-7 do anel A e em C-3' e C4' do anel B foram deduzidas, de forma respectiva, pela presença dos sinais em δ_c 163,0, δ_c 165,6, δ_c 145,9 e δ_c 149,6. Esses sinais, em comparação com os dados da literatura, sugeriram que o composto Es-6 trata-se de um derivado da quercetina (BELTRAME, 2011). Estas e outras atribuições encontram-se agrupadas na Tabela 5.

O conjunto de sinais em δ_c 82,1, δ_c 78,2, δ_c 78,1, δ_c 76,9, δ_c 74,8, δ_c 70,9, δ_c 70,9, δ_c 66,5 e δ_c 62,3 sugeriram a presença da sambubiose (WEI et al. 2011). Este é um dissacarídeo, presente em alguns pigmentos glicosídicos, em que a pentose xilose encontra-se inserida no carbono 2 da glicose (β -D-xilosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicose)

(FRANCIS & MARKAKIS, 1989). Os deslocamentos químicos em δ_c 100,8 e δ_c 62,3 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1'') e ao carbono metilênico (C-6'') da glicose, enquanto que o deslocamento em δ_c 82,1 foi atribuído ao carbono C-2'', corroborando com a inserção da xilose nesta posição. Os sinais em δ_c 105,2 e δ_c 66,5, foram condizentes respectivamente com o carbono anomérico (C-1''') e ao carbono metilênico (C-5''') da xilose, quando comparados com a literatura (DENG et al., 2009).

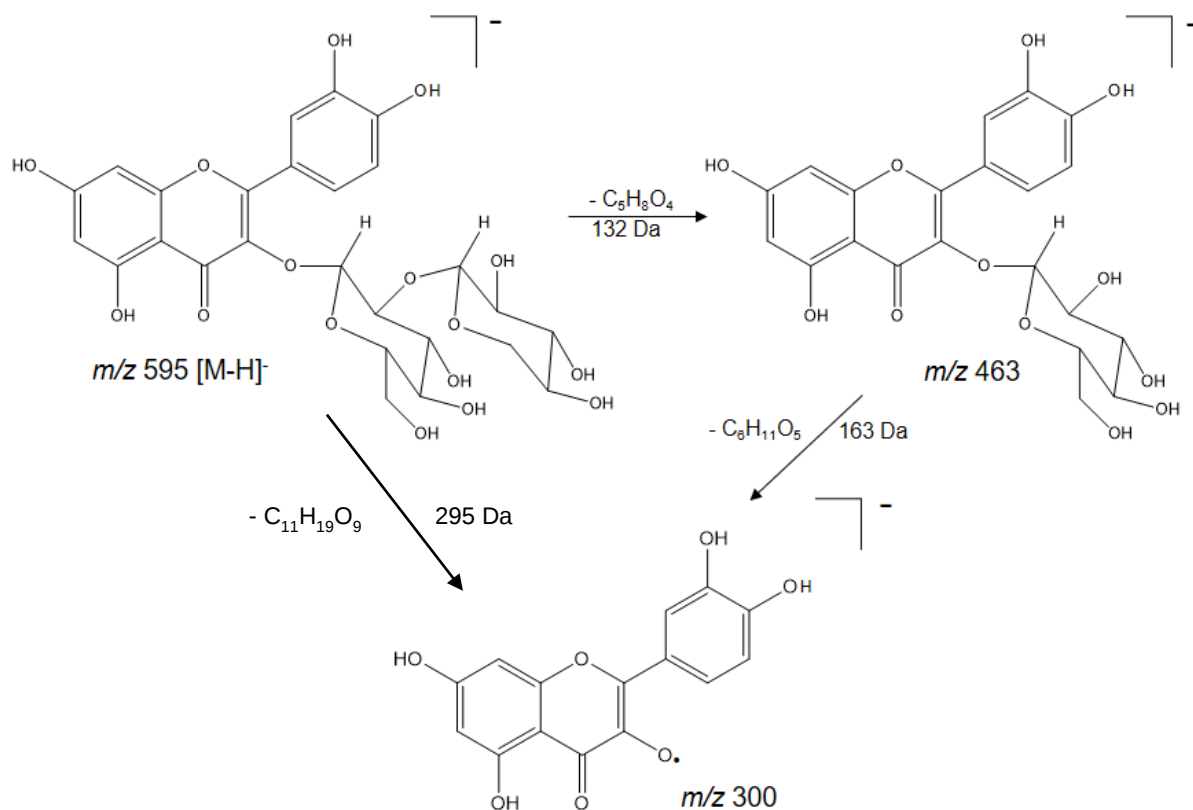
No espectro de RMN de 1H (Figura 42, pág. 89), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 43, pág. 90, Figura 44, pág. 90, Figura 45, pág. 91) foram observados dois singletos largos, um em δ_H 6,16 e outro em δ_H 6,35, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Um duplo duplete em δ_H 7,61 ($J = 1,6$ e $8,4$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6', estando acoplado em *orto* com H-5', com sinal em δ_H 6,86 (d , $J = 8,4$ Hz). Estes sinais em conjunto com o deslocamento em δ_H 7,63 (*s*), atribuído ao hidrogênio H-2', corroboraram com os hidrogênios do sistema aromático ABX, correspondente ao anel B da aglicona (BELTRAME, 2011). Dois dupletos, um em δ_H 5,47 ($J = 7,6$ Hz) e outro em δ_H 4,76 ($J = 6,8$ Hz) com integrais para um hidrogênio, foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' da glicose e H-1''' da xilose, de forma respectiva. Estas e outras atribuições foram agrupadas na Tabela 5.

O mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura 46, pág. 91) e em suas expansões (Figura 47, pág. 92, Figura 48, pág. 92), apontaram correlações entre os sinais em δ_H 6,16 (H-6) com δ_c 99,7 (C-6) e em δ_H 6,35 (H-8) com δ_c 94,5 (C-8), confirmando as atribuições sugeridas aos carbonos C-6 e C-8 do anel A da aglicona. Correlações entre os sinais em δ_H 7,63 (H-2') com δ_c 117,3 (C-2'), de δ_H 6,86 (H-5') com δ_c 116,0 (C-5') e de δ_H 7,61 (H-6') com δ_c 123,3 (C-6') confirmaram as atribuições aos carbonos do anel B. As demais correlações estão compiladas na Tabela 5.

No mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura 49, pág. 93) e em suas expansões (Figura 50, pág. 93, Figura 51, pág. 94) foi possível observar correlações a longa distância entre os sinais em δ_H 6,16 (H-6) e δ_H 6,35 (H-8) com o carbono em δ_c 165,6 (C-7), em 6,16 (H-6) com δ_c 163,0 (C-5) e em δ_H 6,35 (H-8) com δ_c 158,2 (C-9), confirmando as atribuições sugeridas para o anel A. As correlações entre os sinais em δ_H 7,63 (H-2') e δ_H 6,86 (H-5') com δ_c 123,3 (C-6'), de δ_H 7,61 (H-6') com δ_c 116,0 (C-5'), de δ_H 7,63 (H-2'), 6,86 (H-5') e δ_H 7,61 (H-6') com δ_c 149,6 (C-4'), δ_c 145,9 (C-3') e δ_c 123,1 (C-1') e de δ_H 7,61 (H-6') com δ_c 117,3 (C-2'), permitiram

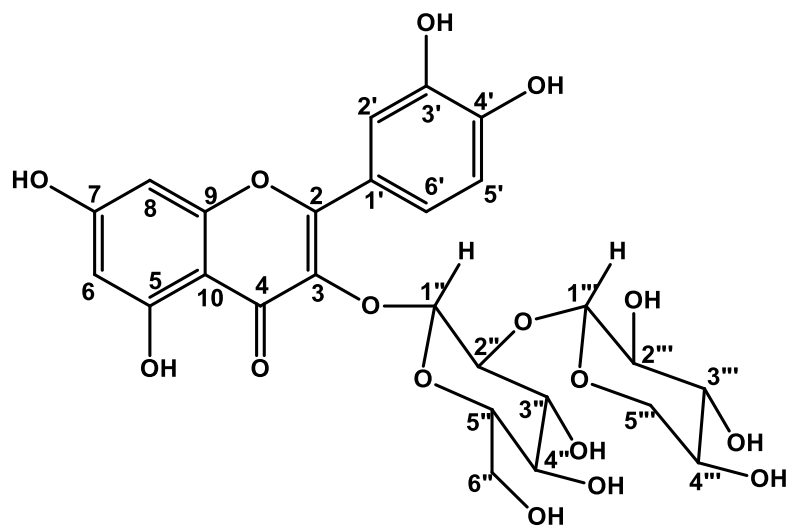
assinalar todos os carbonos do anel B do flavonol. Ainda foi possível observar a correlação entre o sinal do hidrogênio anomérico da glicose em δ_H 5,47 (H-1'') com o sinal em δ_C 135,0 (C-3), confirmando a ligação da glicose neste carbono da aglicona. A inserção da xilose no carbono 2 da glicose foi confirmada através da correlação entre o sinal do próton anomérico da xilose em δ_H 4,76 (H-1''') com o sinal em δ_C 82,1 (C-2''). Estas e outras correlações estão reunidas na Tabela 5.

A fragmentação (Figura 52, pág. 94) do íon da molécula desprotonada, m/z 595.17 $[M-H]^-$, correspondente a substância Es-4, gerou um íon base com m/z 299,74, condizente com uma quebra homolítica da ligação entre a aglicona e a unidade osídica, formando um radical desprotonado da quercetina (m/z 300) (HVATTUM et al., 2002). De acordo com a literatura, a presença dos fragmentos com m/z 462,98 e m/z 444,95 são condizentes, respectivamente, com a perda da pentose e posterior perda de uma molécula de água (FERRERES et al., 2009).



Fragmentação de Es-4.

A partir desse conjunto de dados espectrais, e em comparação com os descritos na literatura, pode-se sugerir que o composto Es-4 se trata da quercetina-3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo, também conhecida como quercetina-3-sambubiosídeo (DENG et al., 2009). Esta substância já encontra-se reportada na literatura para algumas espécies, como a *Nelumbo nucifera* (DENG et al., 2009), porém está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Erythroxylum*.



Estrutura da Quercetina-3-sambubiosídeo.

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4, quercetin-3-sambubiosídeo, em comparação aos dados obtidos por DENG et al., 2009.

Posição	HMQC	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	Referência
	δ_{H} Es-4		$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$		δ_{C}
		Es-4			
2	-	158,2	H-2', H-6'	-	156,8
3	-	135,0	H-1''	-	133,4
4	-	179,5	-	-	177,5
5	-	163,0	H-6	-	161,4
6	6,16 (<i>sl</i> ; 1 H)	99,7	H-8	6,20 (<i>d</i> ; $J = 2$ Hz)	99,2
7	-	165,6	H-6, H-8	-	165,2
8	6,35 (<i>sl</i> ; 1 H)	94,5	H-6	6,38 (<i>d</i> ; $J = 2$ Hz)	94,2
9	-	158,2	H-8	-	156,2
10	-	105,7	H-6, H-8	-	105,1
1'	-	123,1	H-2', H-5', H-6'	-	122,2
2'	7,63 (<i>sl</i> ; 1 H)	117,3	H-6'	7,60 (<i>s</i>)	115,9
3'	-	145,9	H-2', H-5', H-6'	-	145,3
4'	-	149,6	H-2', H-5', H-6'	-	149,4
5'	6,86 (<i>d</i> ; 1 H; $J = 8,4$ Hz)	116,0	H-6'	6,86 (<i>d</i> ; $J = 8,3$ Hz)	116,2
6'	7,61 (<i>dd</i> ; 1 H; $J = 1,6$ e 8,4 Hz)	123,3	H-2', H-5'	7,66 (<i>d</i> ; $J = 8,3$ Hz)	121,6
1''	5,47 (<i>d</i> ; 1 H; $J = 7,6$ Hz)	100,8	-	5,54 (<i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	98,7
2''	3,69 – 3,74 (<i>m</i>)	82,1	H-1'''	3,76 (<i>t</i> ; $J = 8,5$ Hz)	82,5
3''	3,48 – 3,63 (<i>m</i>)	78,1	-	3,63 (<i>t</i> ; $J = 9$ Hz)	77,9
4''	3,37 – 3,42 (<i>m</i>)	70,9	-	3,45 (<i>dd</i> , $J = 9,3$ e 9,3 Hz)	70,3
5''	3,37 – 3,42 (<i>m</i>)	76,9	-	3,23 (<i>m</i>)	76,5
6''	3,48 – 3,63 (<i>m</i>)	62,3	-	3,65 (<i>dd</i> ; $J = 3$ e 12 Hz)	61,2
	3,69 – 3,74 (<i>m</i>)			3,80 (<i>m</i>)	
1'''	4,76 (<i>d</i> ; 1H; $J = 6,8$ Hz)	105,2	-	4,66 (<i>d</i> ; $J = 8$ Hz)	104,2
2'''	3,37 – 3,42 (<i>m</i>)	74,8	-	3,31 (<i>dd</i> ; $J = 7,5$ e 8,9 Hz)	74,2
3'''	3,20 – 3,25 (<i>m</i>)	78,2	-	3,35 (<i>m</i>)	77,6
4'''	3,48 – 3,63 (<i>m</i>)	70,9	-	3,46 (<i>m</i>)	70,2
5'''	3,93 (<i>dd</i> ; $J = 4,8$ e 11,6 Hz)	66,5	-	3,81 (<i>dd</i> ; $J = 5,5$ e 11,2 Hz)	66,1
	3,20 – 3,25 (<i>m</i>)			3,13 (<i>dd</i> ; $J = 9,5$ e 11,2 Hz)	

Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-4.

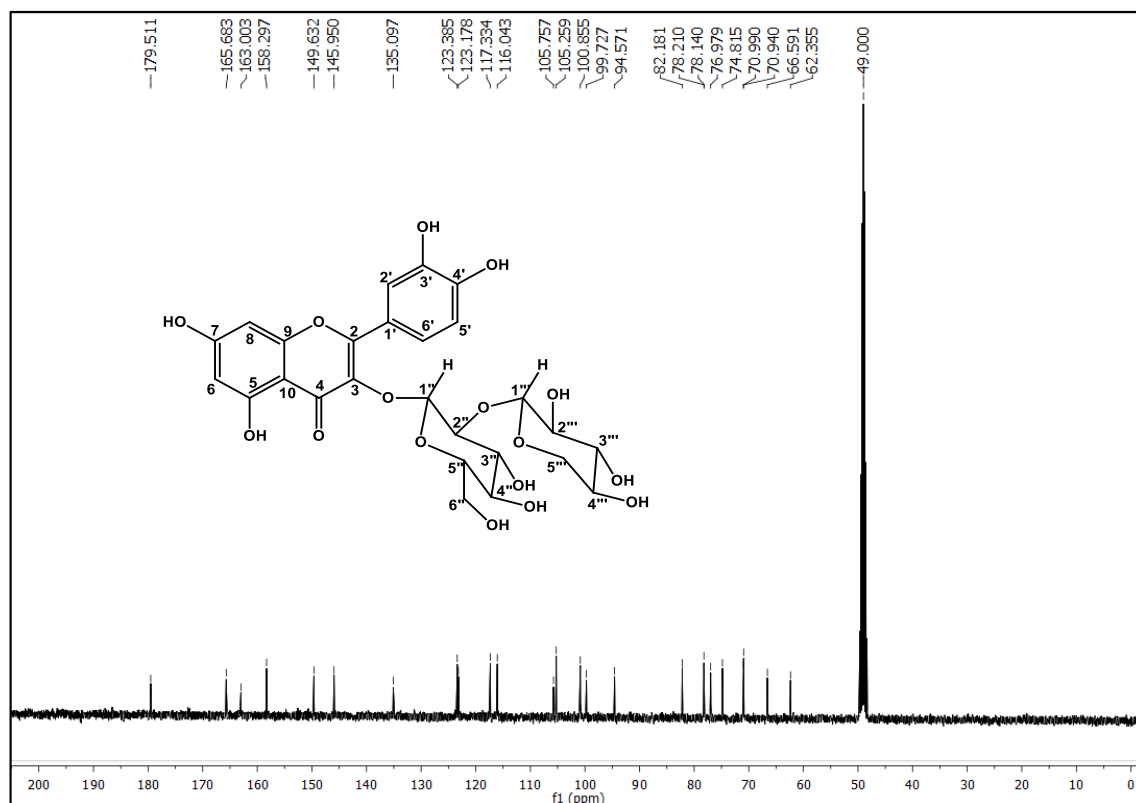


Figura 40 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 60 – 108 ppm.

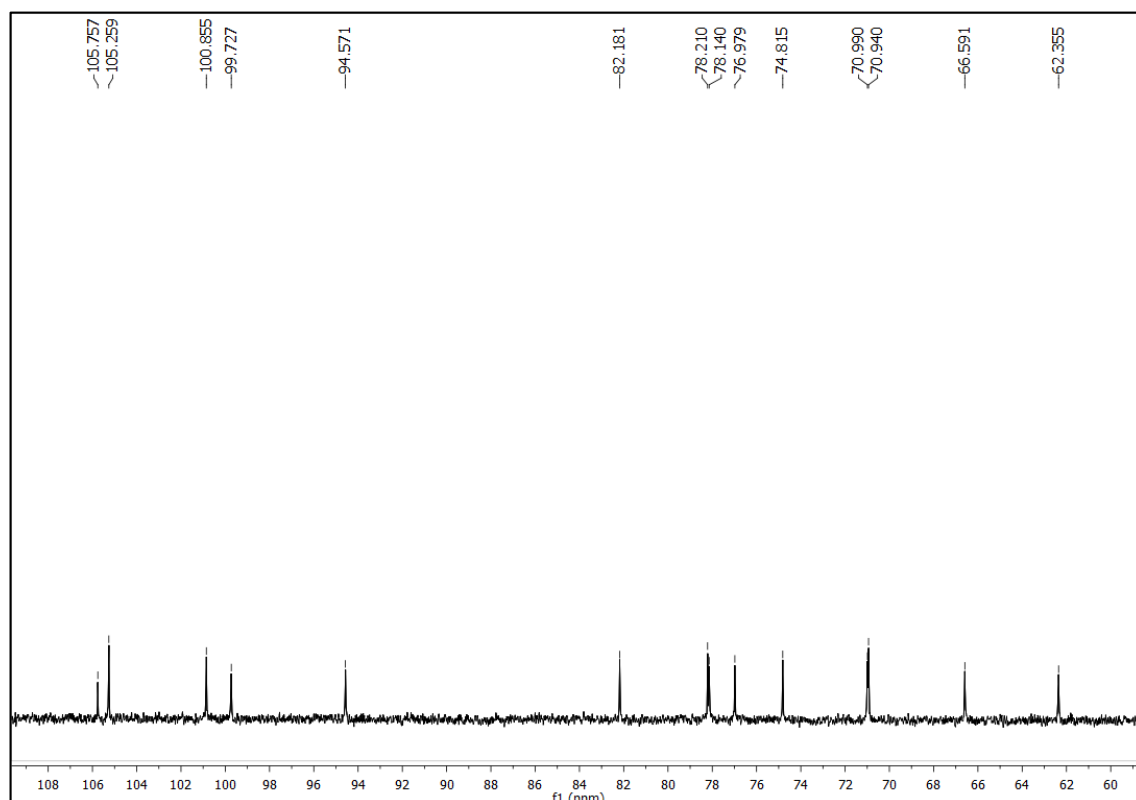


Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 110 – 185 ppm.

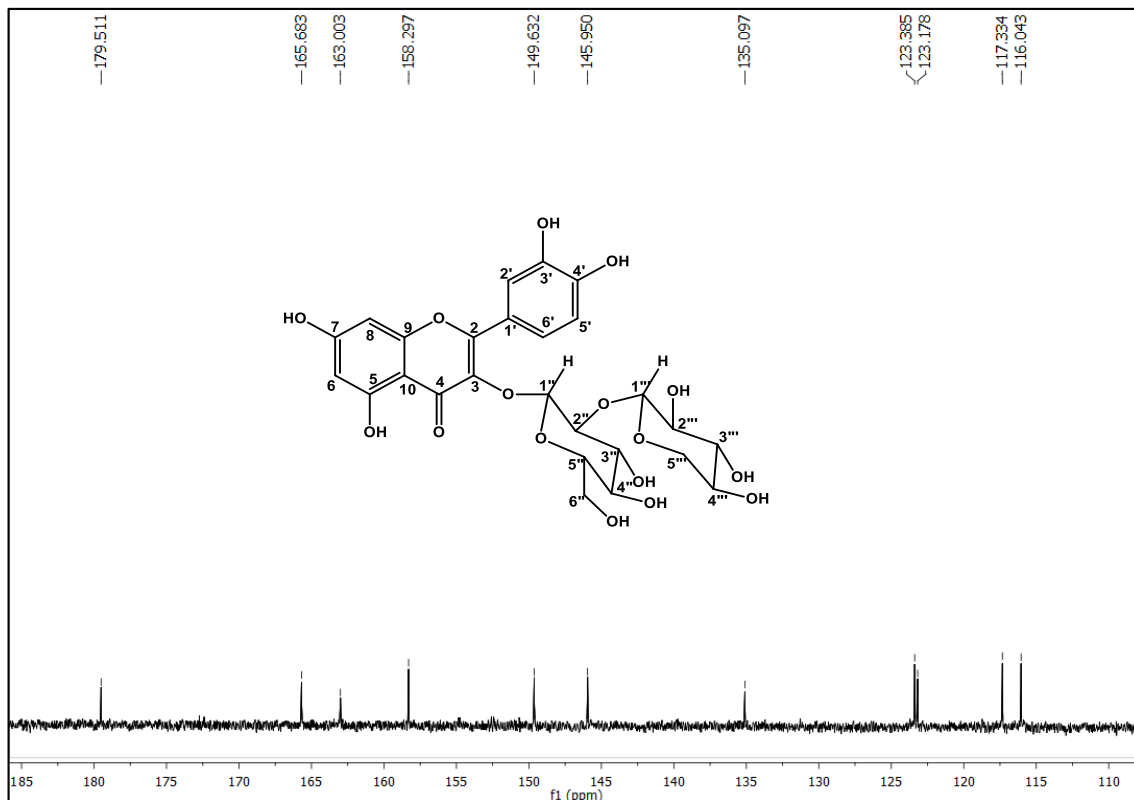


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4.

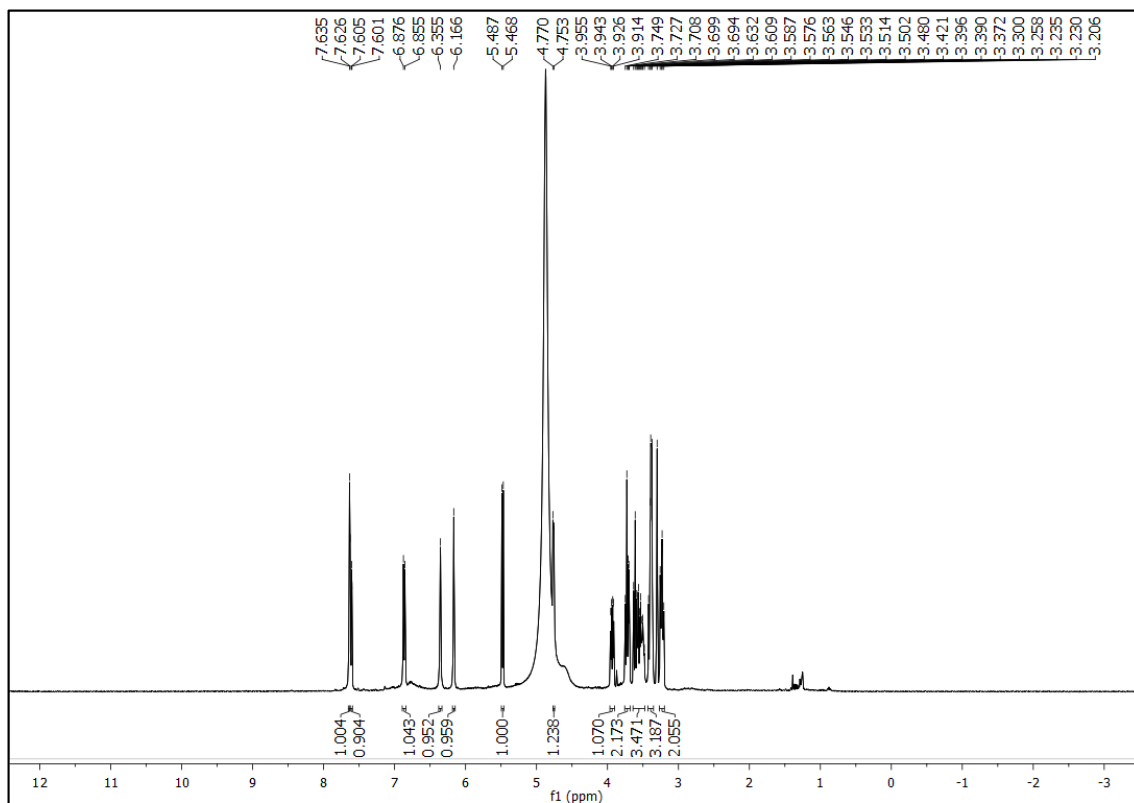


Figura 43 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 2,95 – 4,25 ppm.

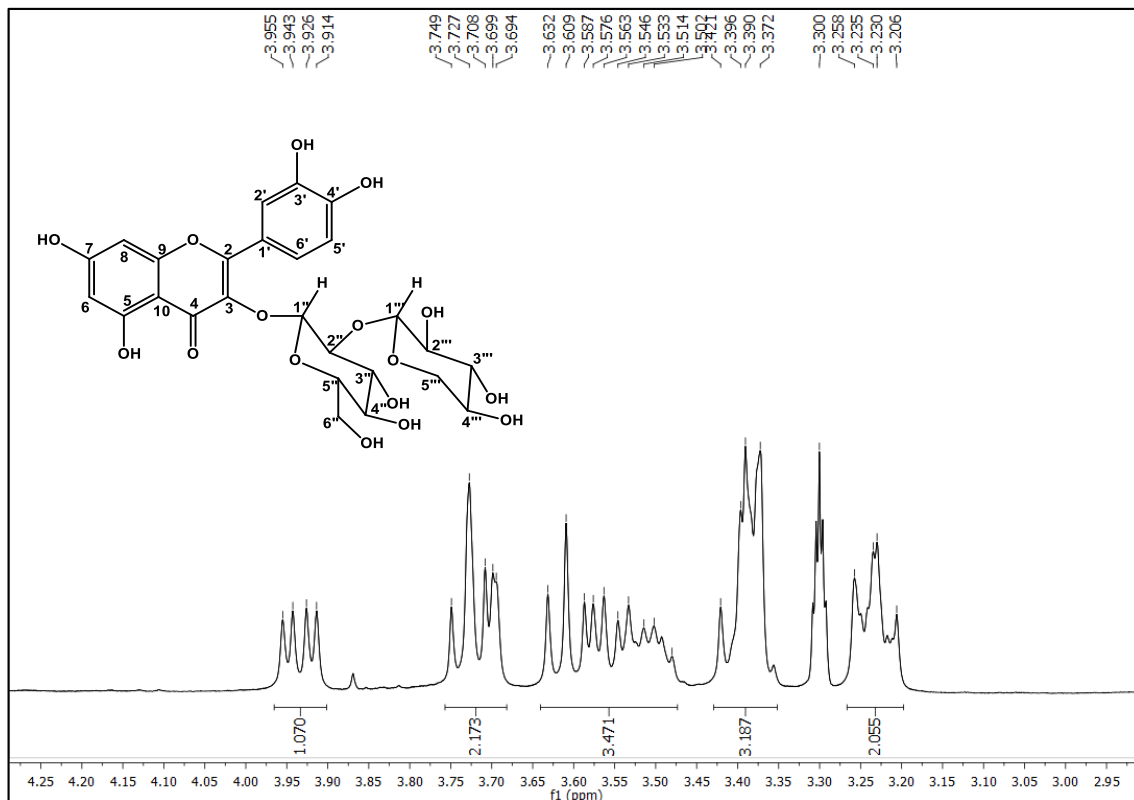


Figura 44 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 4,70 – 6,50 ppm.

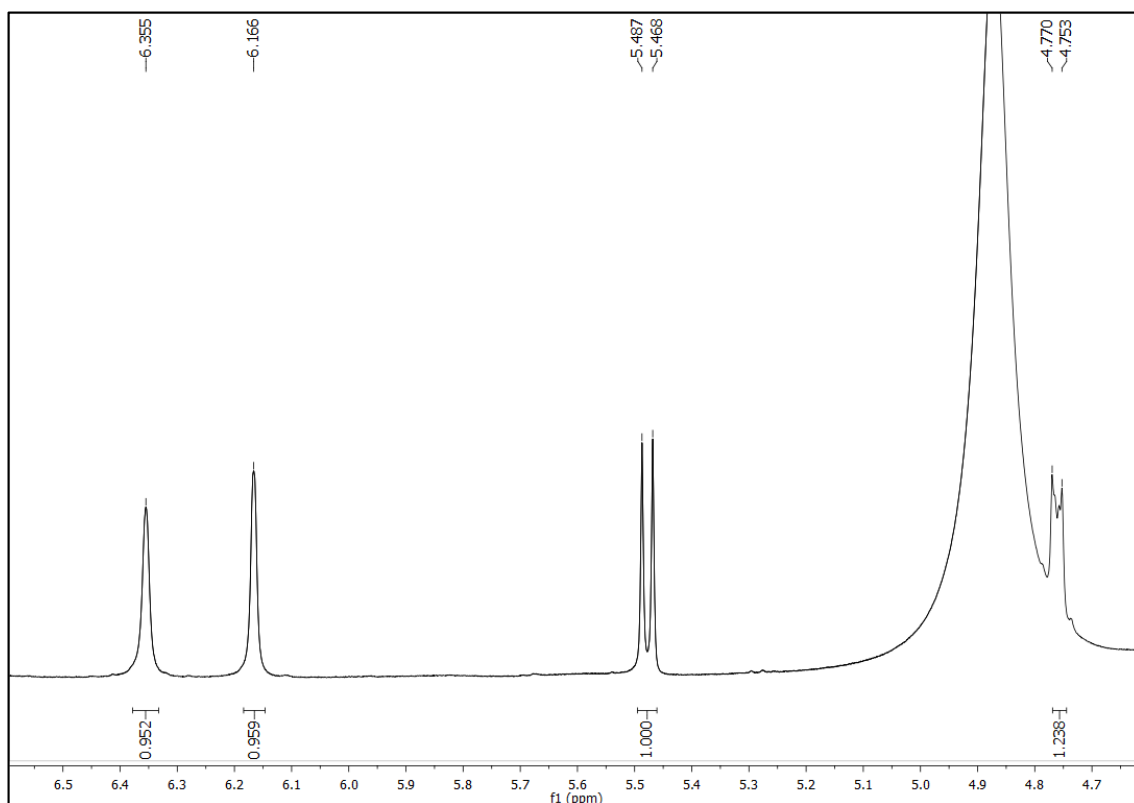


Figura 45 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 6,65 – 7,95 ppm.

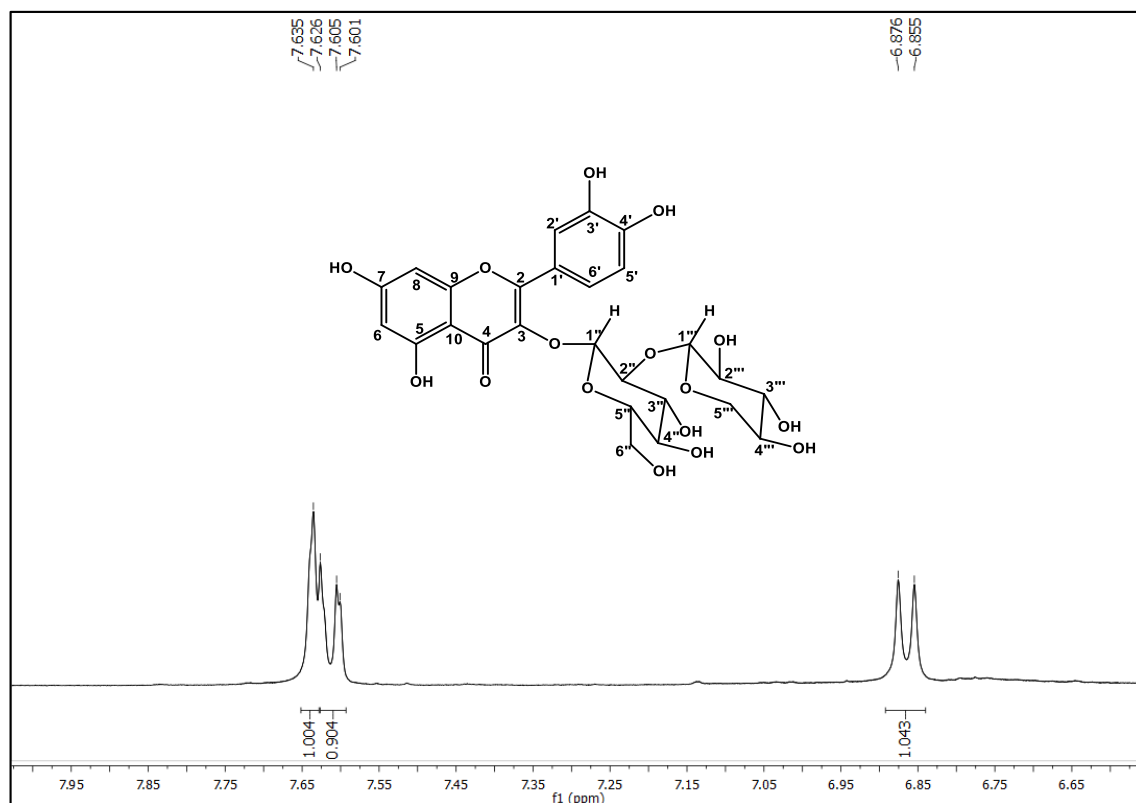


Figura 46 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-4.

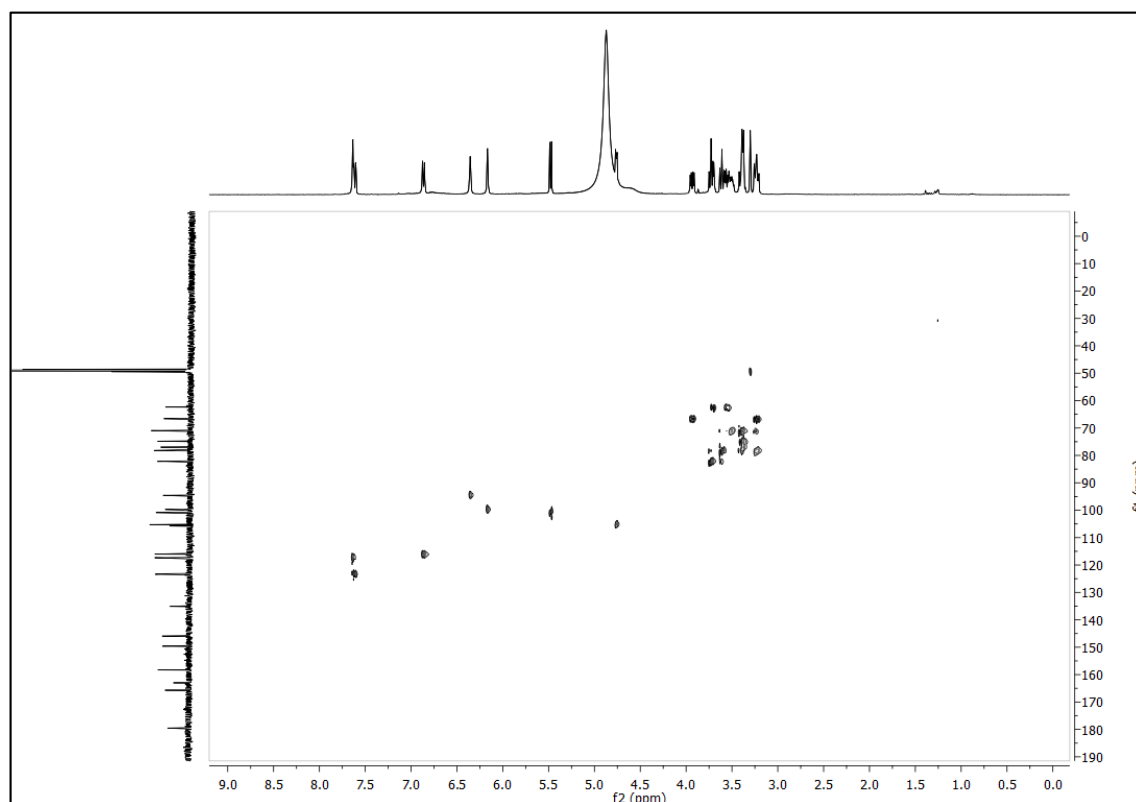


Figura 47 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-4 na região de (2,80– 4,20 ppm) x (40,0 – 95,0 ppm).

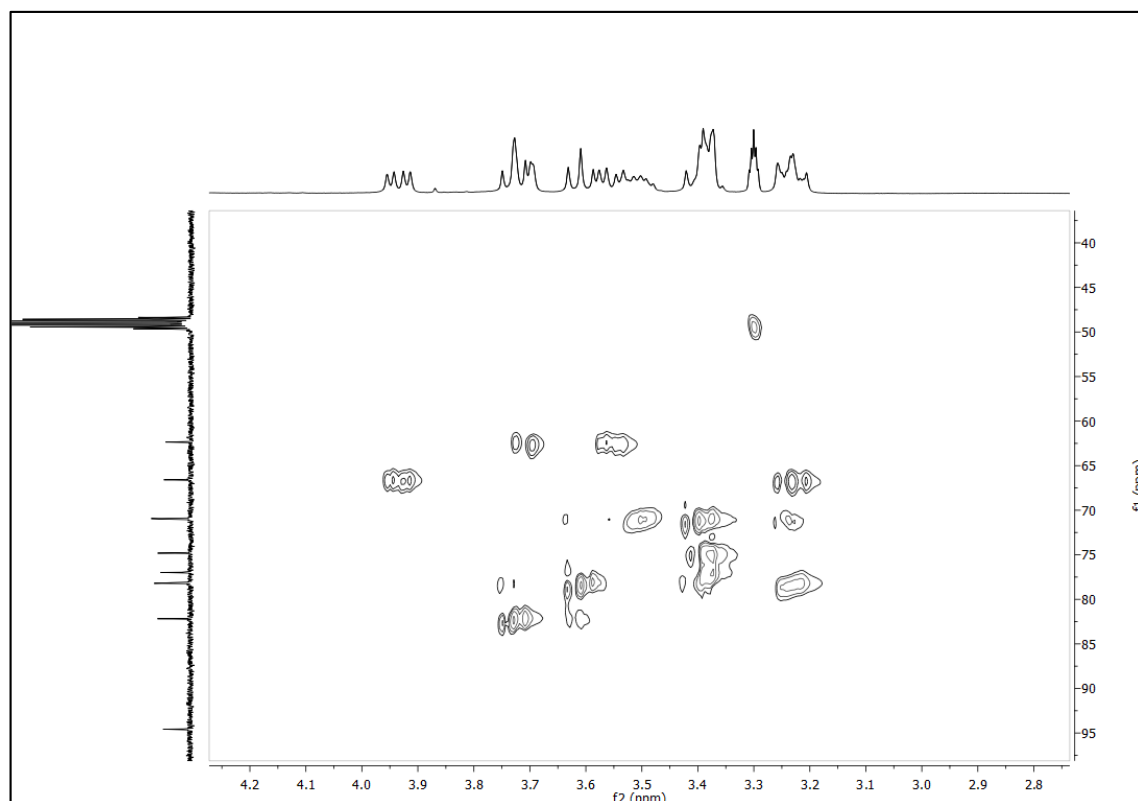


Figura 48 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-4 na região de (4,40– 7,80 ppm) x (70,0 – 150,0 ppm).

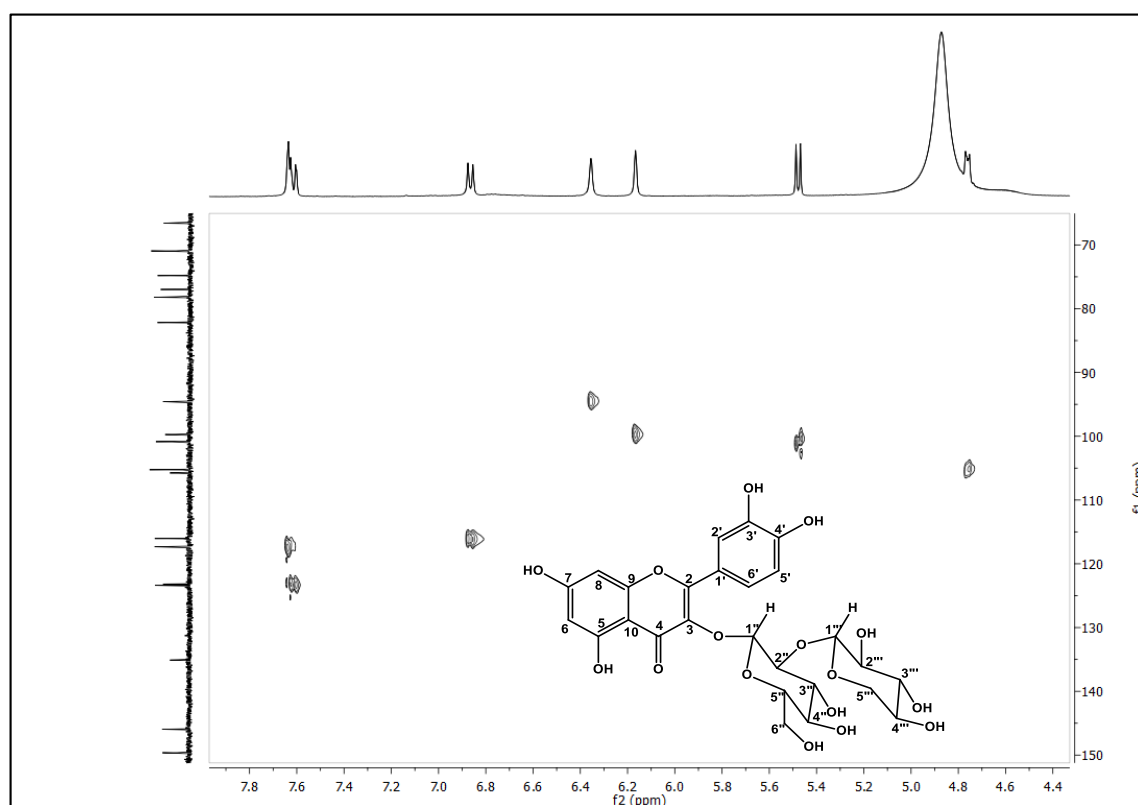


Figura 49 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-4.

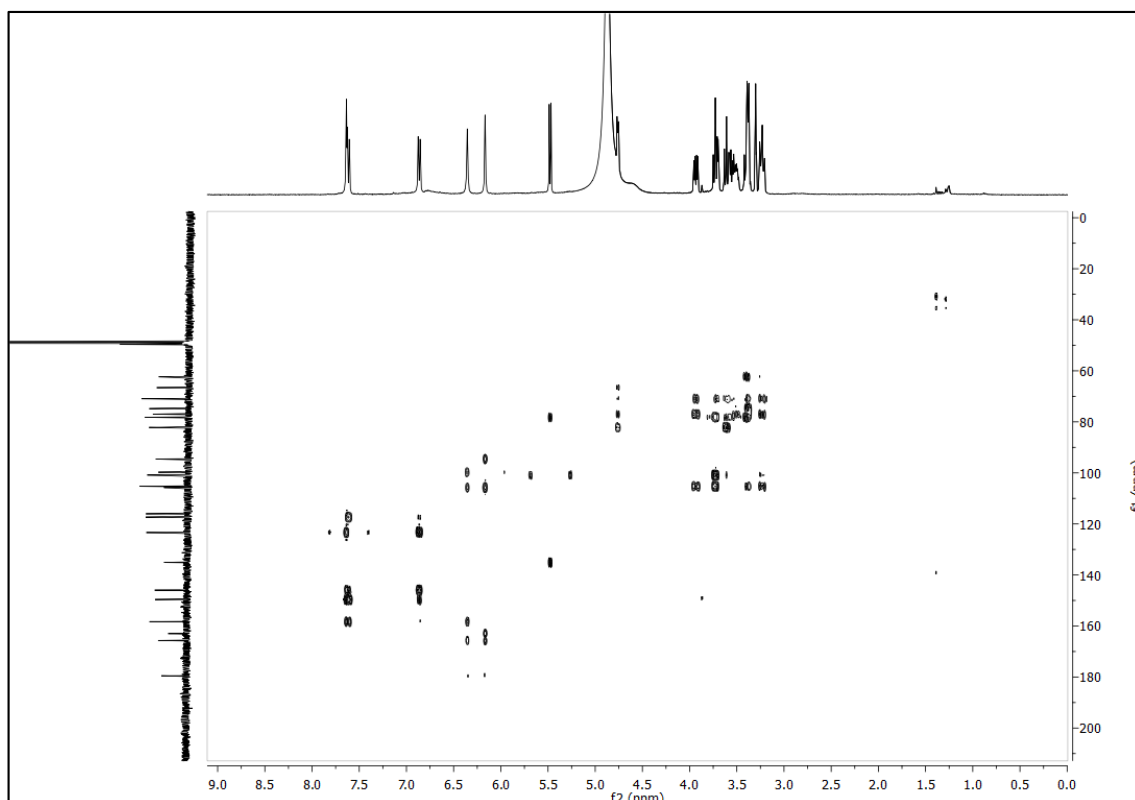


Figura 50 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-4 na região de (3,00 – 5,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm).

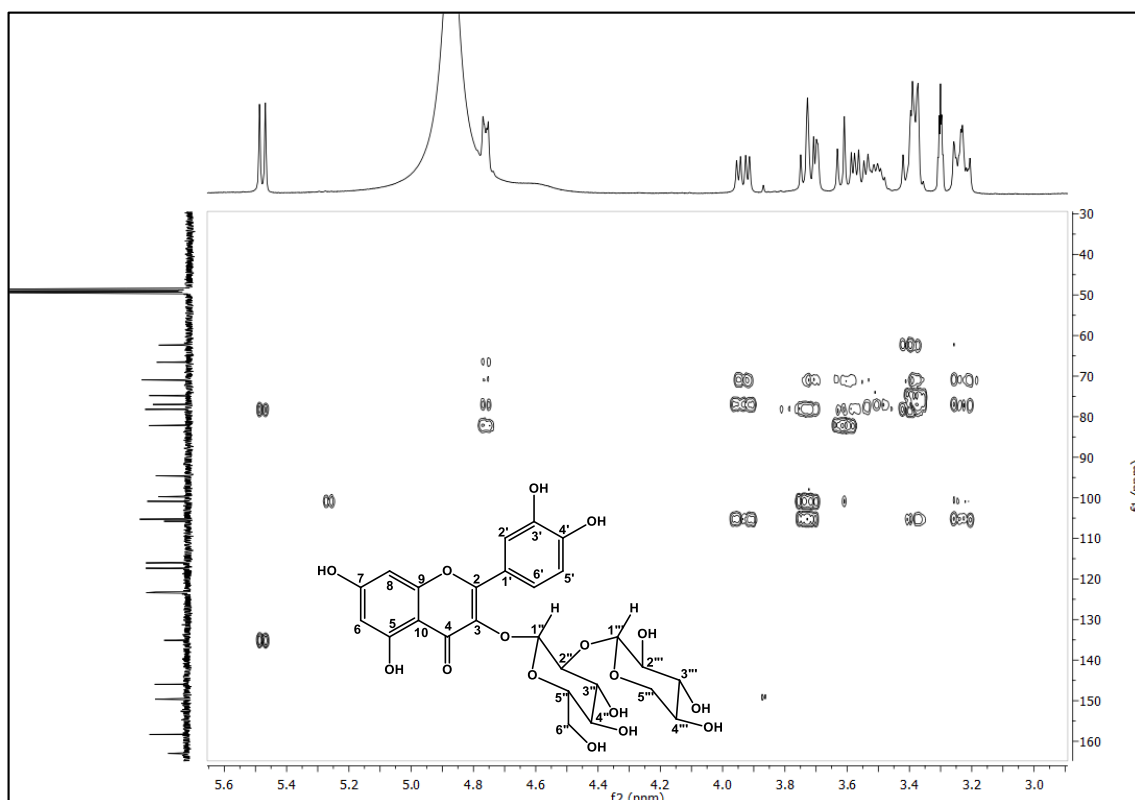


Figura 51 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-4 na região de (5,90– 8,50 ppm) x (80,0 – 190,0 ppm).

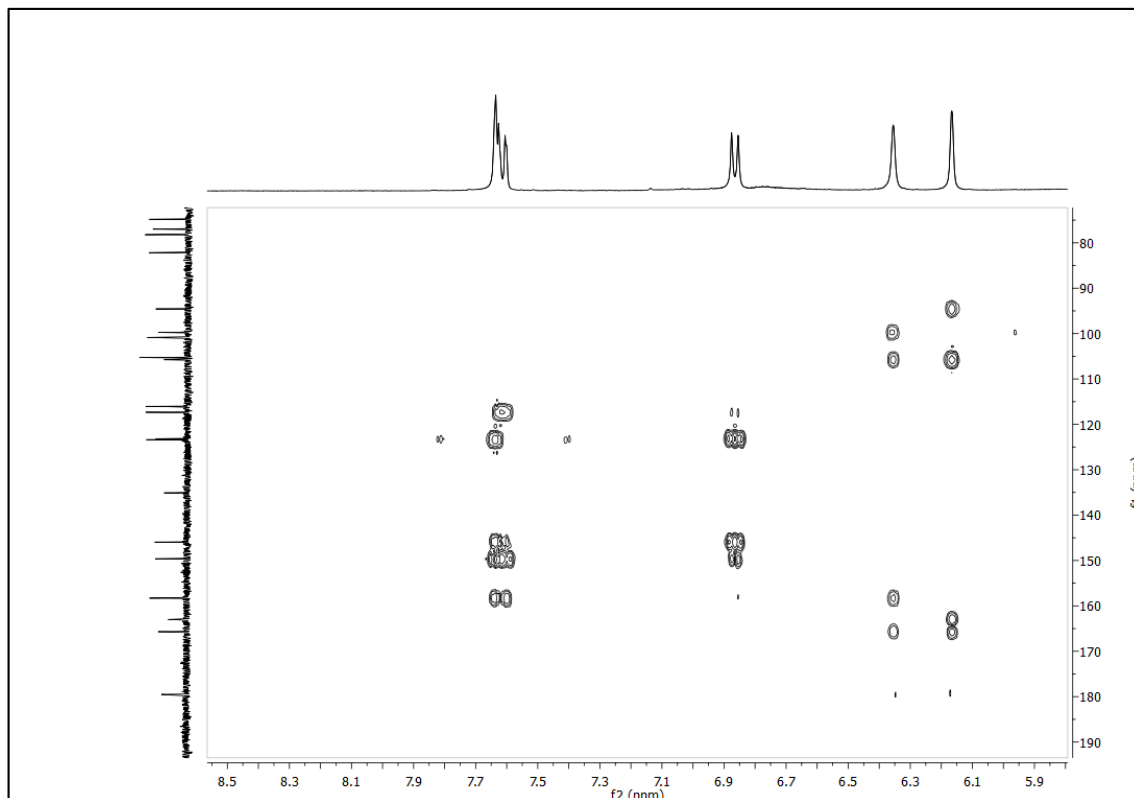
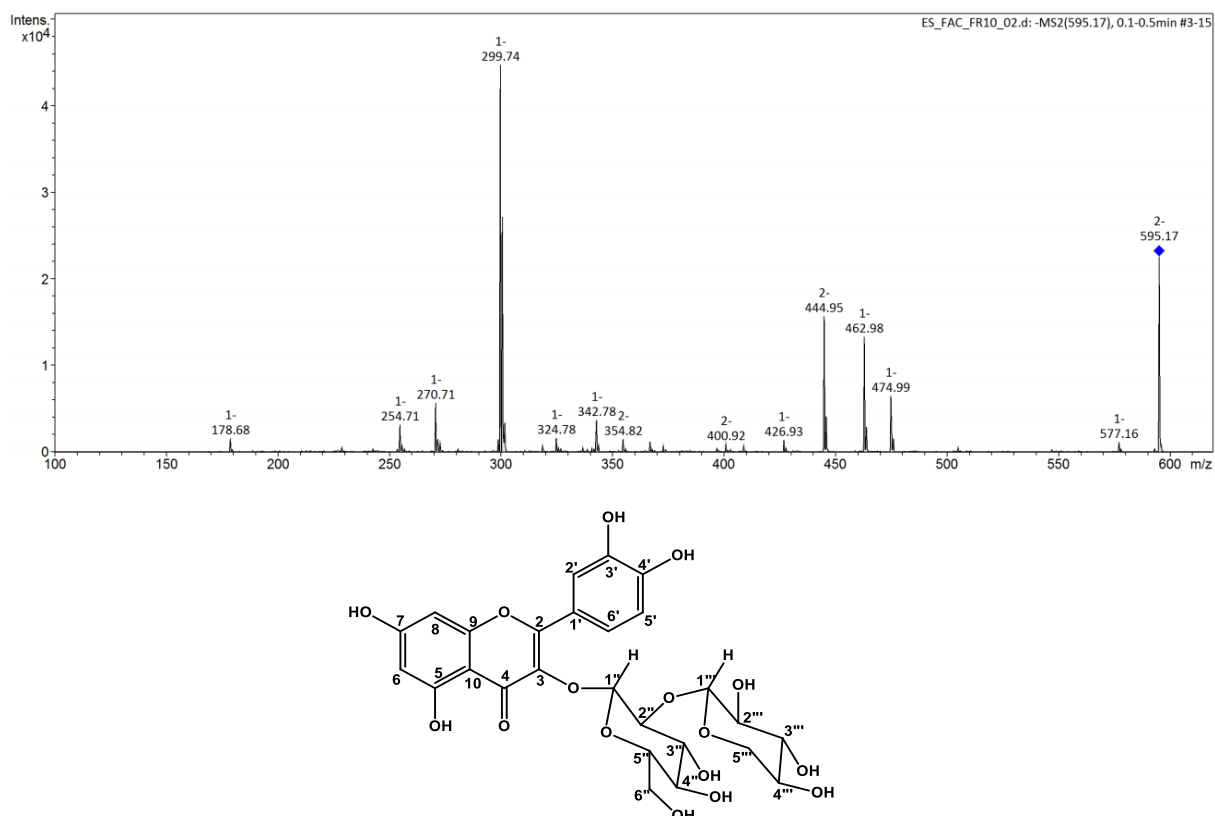


Figura 52 - Fragmentação da substância Es-4.



5.6. Identificação estrutural de Es-5

A substância Es-5 foi isolada na forma de um pó amorfo laranja, com 0,011 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 579.15 $[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{15}$.

No espectro de RMN de ^{13}C – BB (Figura 53, pág. 99), obtido a 100 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 54, pág. 99, Figura 55, pág. 100) foram observados vinte e três sinais, correspondentes a vinte e seis átomos de carbonos, sendo dois carbonos metilênicos sp^3 , seis carbonos metínicos sp^2 , nove carbonos metínicos sp^3 e nove carbonos não hidrogenados. Estes sinais evidenciaram um esqueleto flavonoídico, e os deslocamentos em δ_C 179,5, δ_C 158,3 e δ_C 134,9 referentes, nesta ordem, aos carbonos C-4, C-2 e C-3, foram condizentes para um esqueleto de flavonol. Uma substituição na posição C-3 (134,9) foi deduzida pela ausência do sinal em aproximadamente δ_C 107,0.

Os sinais em δ_C 82,3, δ_C 78,2, δ_C 78,1, δ_C 77,0, δ_C 74,9, δ_C 71,0, δ_C 71,0, δ_C 66,6 e δ_C 62,3, sugeriram a presença de duas unidades osídicas, sendo uma pentose ligada a uma hexose. Após análise e comparação com dados da literatura foi sugerida a presença da sambubiose (β -D-xilosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicose), assim como na substância Es-4. Os deslocamentos em 100,7 e 62,3 foram atribuídos, nesta ordem, ao carbono anomérico (C-1'') e ao metilênico (C-6'') da glicose. Enquanto que, os sinais em δ_C 105,3 e δ_C 66,6 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1''') e ao metilênico (C-5''') da xilose, respectivamente (GIANG et al., 2007). Essas e outras atribuições podem ser visualizadas na Tabela 6.

No espectro de RMN de 1H (Figura 56, pág. 100), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 57, pág. 101, Figura 58, pág. 101, Figura 59, pág. 102, Figura 60, pág. 102) foi evidenciado um sistema aromático AA'BB', correspondente ao anel B da aglicona. No qual, dois dupletos com integrais para dois hidrogênios cada, em δ_H 8,05 ($J = 9,2$ Hz) e em δ_H 6,88 ($J = 8,8$ Hz) foram atribuídos aos conjuntos de hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente. Os dupletos em δ_H 6,36 ($J = 2$ Hz) e δ_H 6,17 ($J = 1,6$ Hz), ambos com integral para um hidrogênio, foram condizentes com os hidrogênios H-8 e H-6 do anel A do flavanol, respectivamente. Esses sinais foram condizentes com o esqueleto do canferol (KIM et al. 1994).

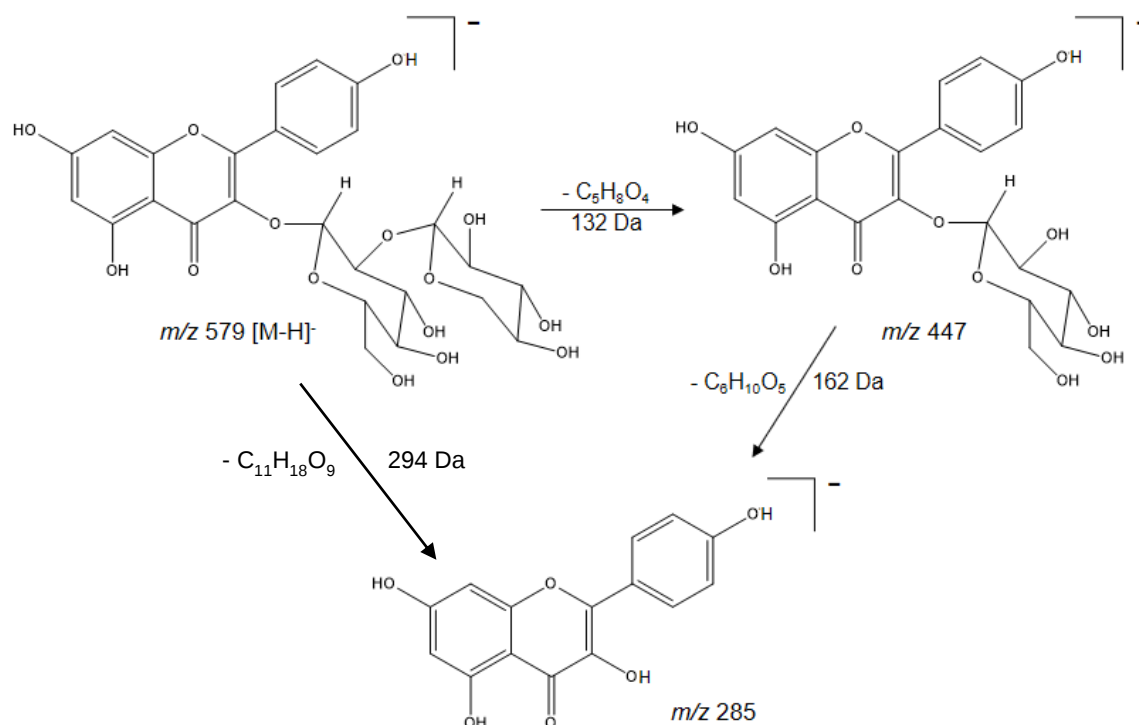
Os conjunto de sinais na região de 3 – 4 ppm e a ausência de um singlete em aproximadamente δ_H 6,70 (H-3), reforçaram a evidência da presença de uma unidade

osídica no carbono C-3. O duplete com integral para um hidrogênio em δ_H 5,46 ($J = 7,6$ Hz), foi atribuído ao hidrogênio anomérico da glicose, enquanto que o duplete em δ_H 4,74 ($J = 6,8$ Hz), também com integral para um hidrogênio, foi condizente com o próton anomérico da xilose da unidade sambubiose (GIANG et al., 2007).

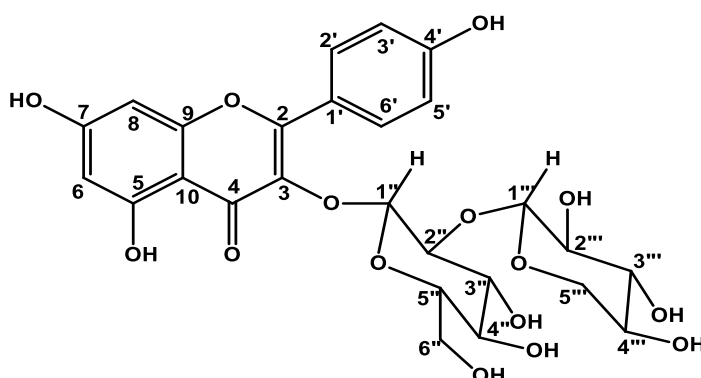
No mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura 61, pág. 103), e em suas expansões (Figura 62, pág. 103, Figura 63, pág. 104), foram observadas correlações que confirmaram as atribuições aos carbonos do anel A, estas foram entre o sinal em δ_H 6,17 (H-6) com δ_C 99,7 (C-6) e de δ_H 6,36 (H-8) com δ_C 94,6 (C-8). Correlações entre os sinais em δ_H 8,05 (H-2' e H-6') com 132,3 (C-2' e C-6') e de δ_H 6,88 (H-3' e H-5') com δ_C 116,1 (C-3' e C-5') confirmaram as atribuições aos carbonos do anel B do flavonol. Na unidade sambubiose foram observadas correlações entre o sinal em δ_H 5,46 (H-1'') com δ_C 100,7 (C-1'') e entre δ_H 4,74 (H-1''') com 105,3 (C-1'''), que confirmaram as atribuições dos carbonos anoméricos da glicose e xilose, nesta ordem.

No mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura 64, pág. 104) e em suas expansões (Figura 65, pág. 105, Figura 66, pág. 105), as correlações entre os sinais em δ_H 6,17 (H-6) e δ_H 6,36 (H-8) com δ_C 165,6 (C-7), em δ_H 6,17 (H-6) com δ_C 163,0 (C-5) e em δ_H 6,36 (H-8) com δ_C 158,3 (C-9), foram condizentes com as atribuições dos carbonos do anel A da aglicona. Foram observadas ainda, correlações entre o sinal em δ_H 5,46 (H-1'') com δ_C 134,9, (C-3) confirmando a inserção da sambubiose nesta posição, e entre o sinal em δ_H 4,74 (H-1''') com δ_C 82,3 (C-2''), o que corroborou com a inserção da xilose na posição 2 da glicose. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensional, da substância Es-5 estão compilados na Tabela 6.

A fragmentação (Figura 67, pág. 106) do íon da molécula desprotonada, m/z 579,15 $[M-H]^-$, correspondente a substância Es-5, gerou um íon base com m/z 284,71, condizente com uma quebra heterolítica da ligação entre a aglicona e a unidade osídica, formando o canferol desprotonado (m/z 285). De acordo com a literatura, a presença dos fragmentos com m/z 446,96 e m/z 428,94 foram condizentes, respectivamente, com a perda da pentose e posterior perda de uma molécula de água (FERRERES et al., 2009).



Após análise dos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensionais, e do espectro de massas, além de comparação com dados descritos na literatura, foi possível propor que a substância Es-5 se trata do flavanol canferol-3-O-D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-D-glicopiranosídeo, também conhecido por canferol-3-sambubiosídeo (GIANG et al., 2007). Esta substância já encontra-se reportada na literatura para algumas espécies, como a *Papaver rhoeas* Bee (LEE et al., 2016), porém está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Erythroxylum*.



Estrutura da canferol-3-sambubiosídeo.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, em comparação aos dados obtidos por LEE et al., 2016.

Posição	HMQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Es-5	δ_{C} Es-5	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}
2	-	158,3	H-2', H-6'	-	158,4
3	-	134,9	H-1''	-	135,3
4	-	179,5	-	-	178,6
5	-	163,0	H-6	-	163,0
6	6,17 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	99,7	H-8	6,19 (<i>s</i> /; 1H)	99,8
7	-	165,6	H-6, H-8	-	165,7
8	6,36 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 1,6 Hz)	94,6	H-6	6,39 (<i>s</i> /; 1 H)	94,6
9	-	158,3	H-8	-	159,4
10	-	105,7	H-6, H-8	-	105,8
1'	-	122,8	H-5', H-3'	-	123,0
2'	8,05 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 9,2 Hz)	132,3	H-6'	8,07 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,2 Hz)	132,3
3'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	116,1	H-2', H-5'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,2 Hz)	116,2
4'	-	161,4	H-2', H-3', H-5', H-6'	-	161,5
5'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	116,1	H-3', H-6'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,2 Hz)	116,2
6'	8,05 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 9,2 Hz)	132,3	H-2'	8,07 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,2 Hz)	132,3
1''	5,46 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 7,6 Hz)	100,7	-	5,47 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 7,6 Hz)	100,7
2''	3,64 – 3,71 (<i>m</i>)	82,3	H-1'''	3,65 (<i>m</i> ; 1 H)	82,4
3''	3,50 – 3,61 (<i>m</i>)	78,1	-	3,55 (<i>m</i> ; 1 H)	78,2
4''	3,33 – 3,38 (<i>m</i>)	71,0	-	3,35 (<i>m</i> ; 1 H)	71,1
5''	3,19 – 3,25 (<i>m</i>)	78,2	-	3,21 (<i>m</i> ; 1H)	78,4
6''	3,64 – 3,71 (<i>m</i>)	62,3	-	3,71 (<i>m</i> ; 1 H)	62,4
	3,50 – 3,61 (<i>m</i>)			3,52 (<i>m</i> ; 1H)	
1'''	4,74 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 6,8 Hz)	105,3	-	4,74 (<i>s</i> ; 1H)	105,5
2'''	3,33 – 3,38 (<i>m</i>)	74,9	-	3,38 (<i>m</i> ; 1 H)	75,0
3'''	3,33 – 3,38 (<i>m</i>)	77,0	-	3,39 (<i>m</i> ; 1 H)	77,9
4'''	3,50 – 3,61 (<i>m</i>)	71,0	-	3,50 (<i>m</i> ; 1 H)	71,0
5'''	3,94 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 4,8 e 11,6)	66,6	-	3,93 (<i>m</i> ; 1 H)	66,7
	3,19 – 3,25 (<i>m</i>)			3,22 (<i>m</i> ; 1 H)	

Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5.

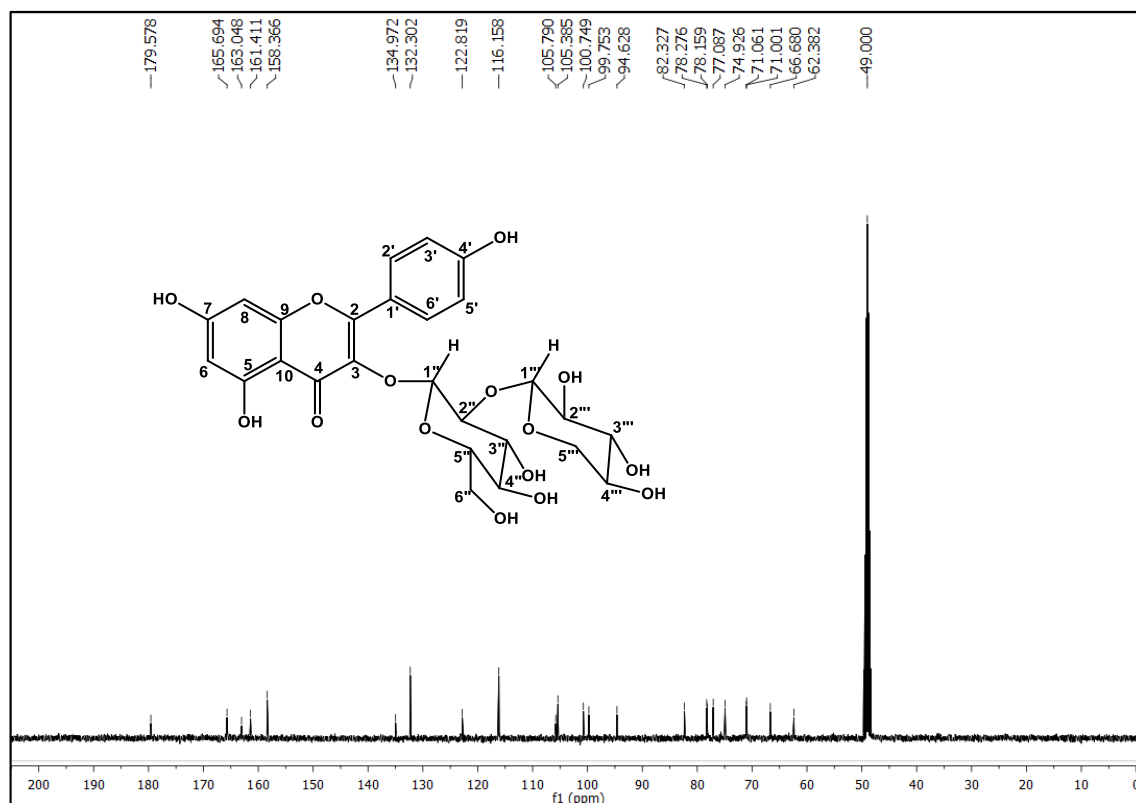


Figura 54 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 62 – 83 ppm.

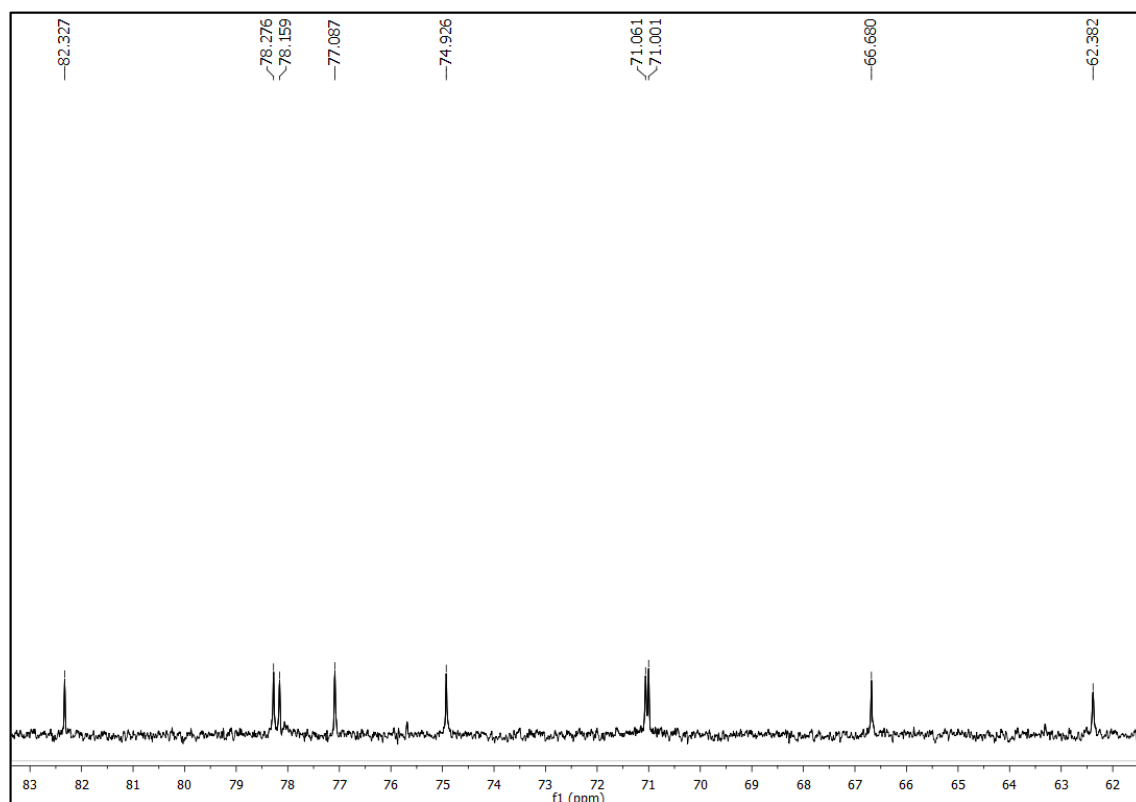


Figura 55 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 90 – 180 ppm.

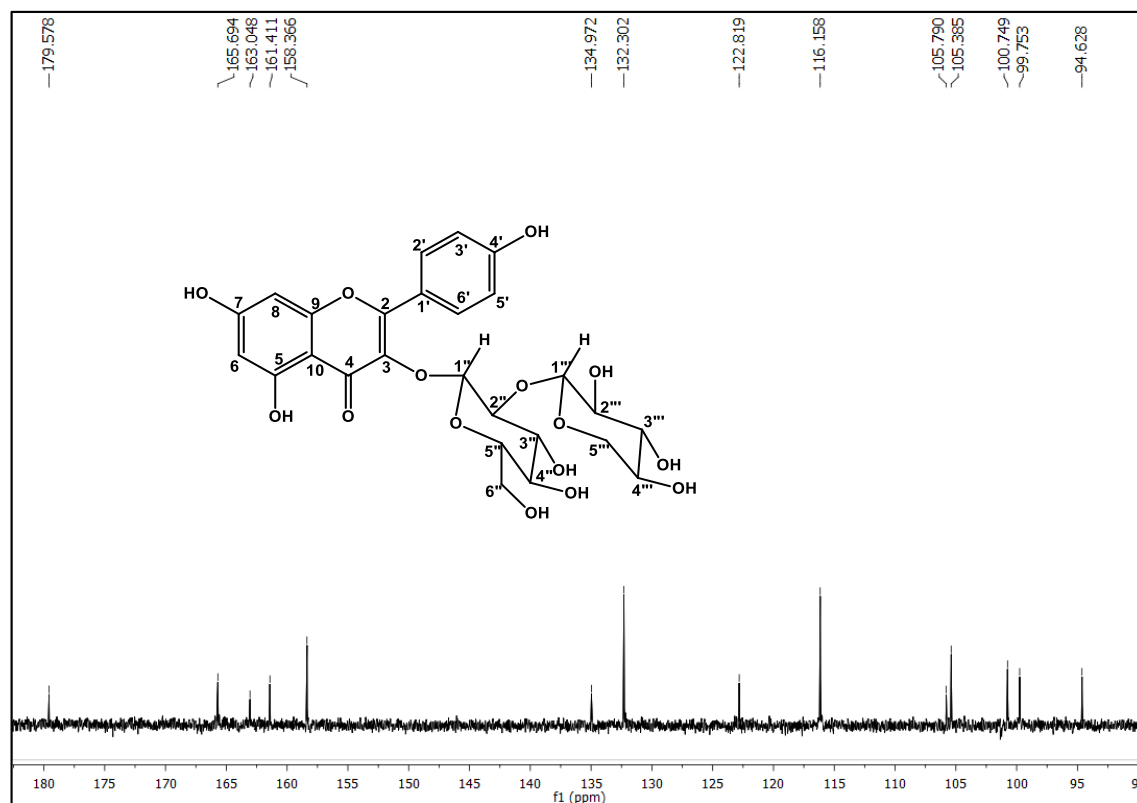


Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5.

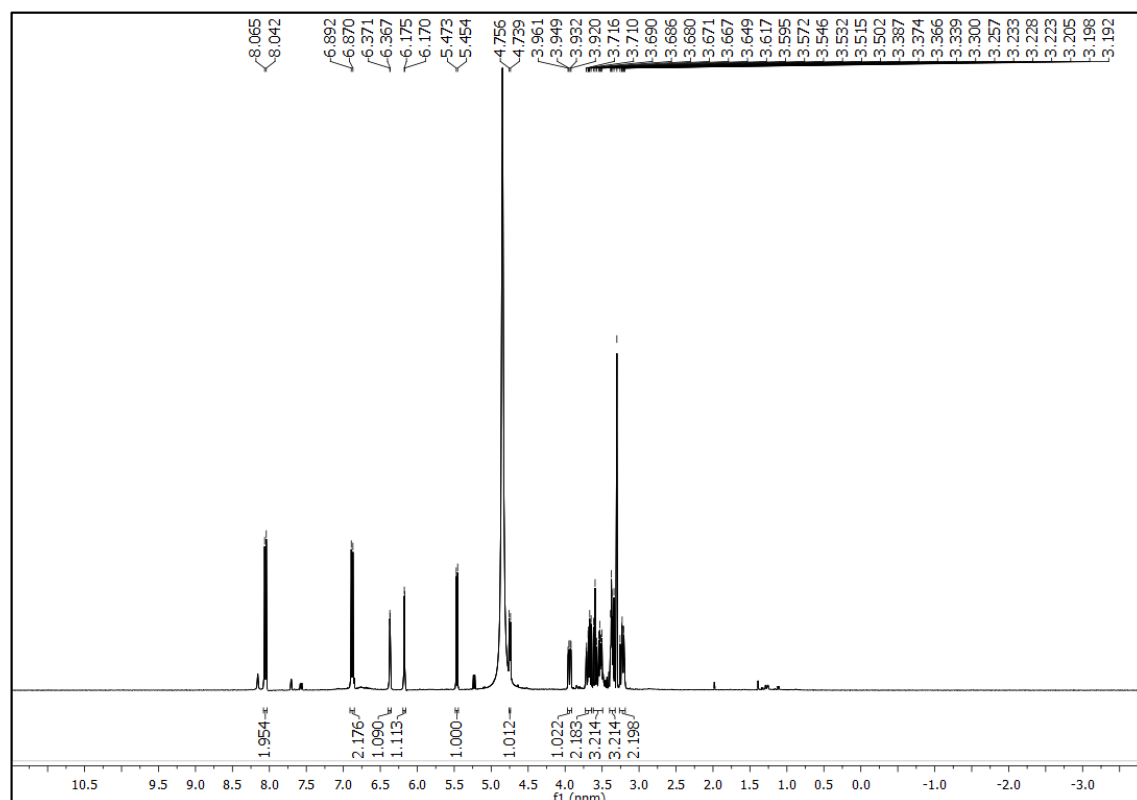


Figura 57 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 2,90 – 4,15 ppm.

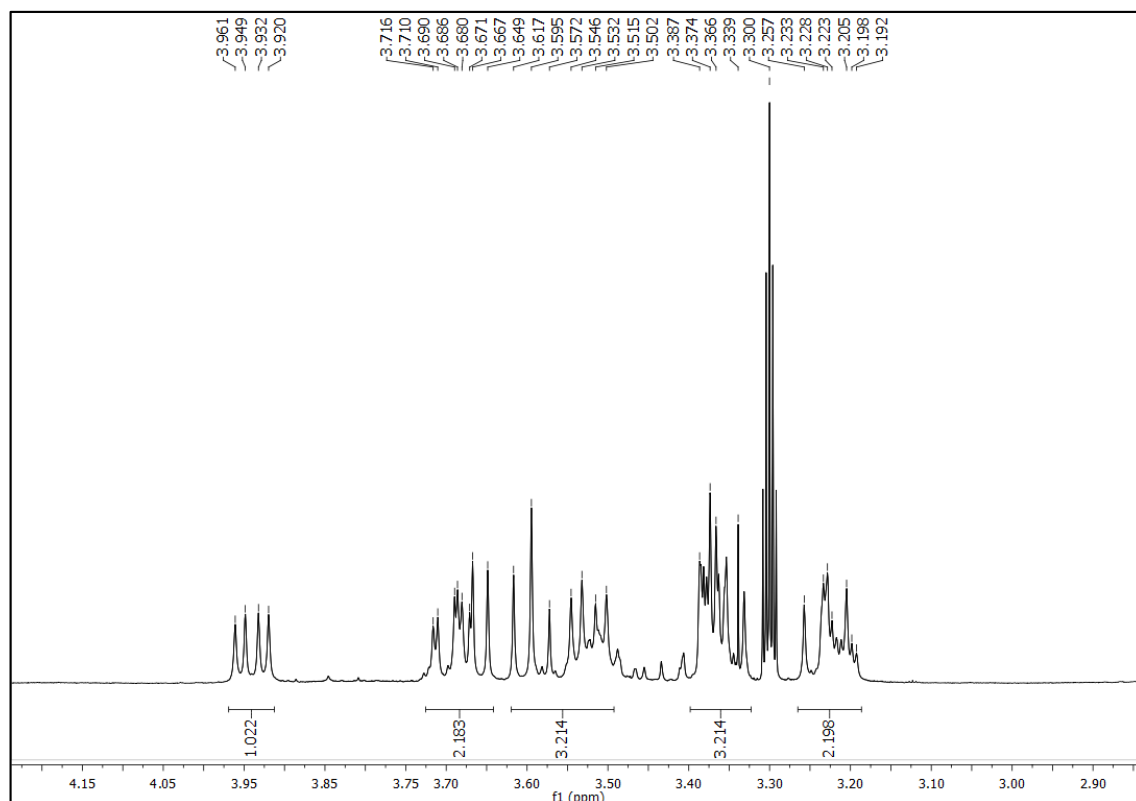


Figura 58 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 4,55 – 5,60 ppm.

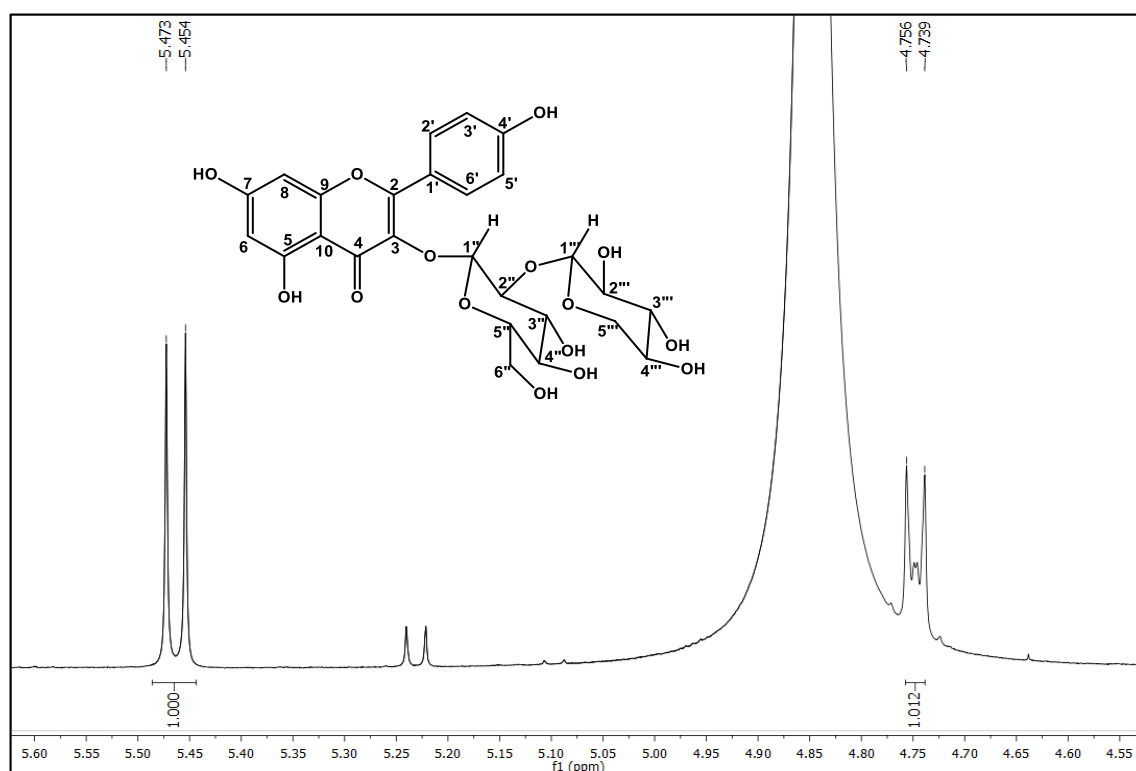


Figura 59 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 5,80 – 6,65 ppm.

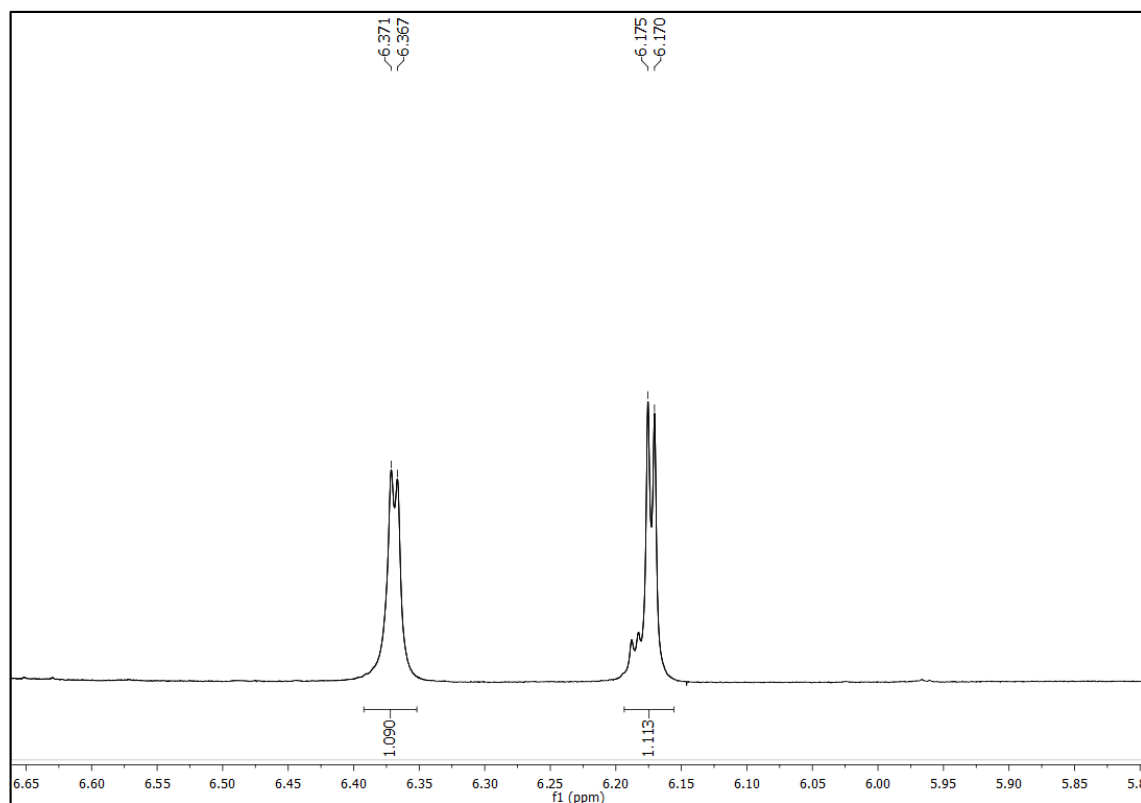


Figura 60 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 6,50 – 8,50 ppm.

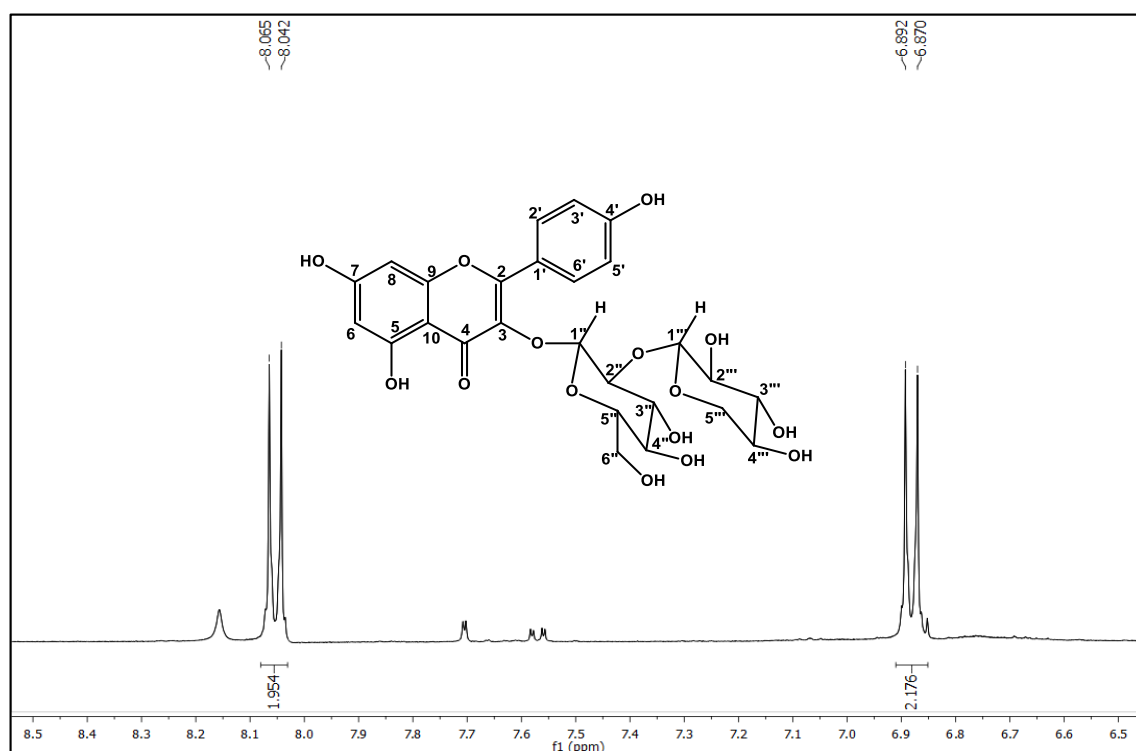


Figura 61 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5.

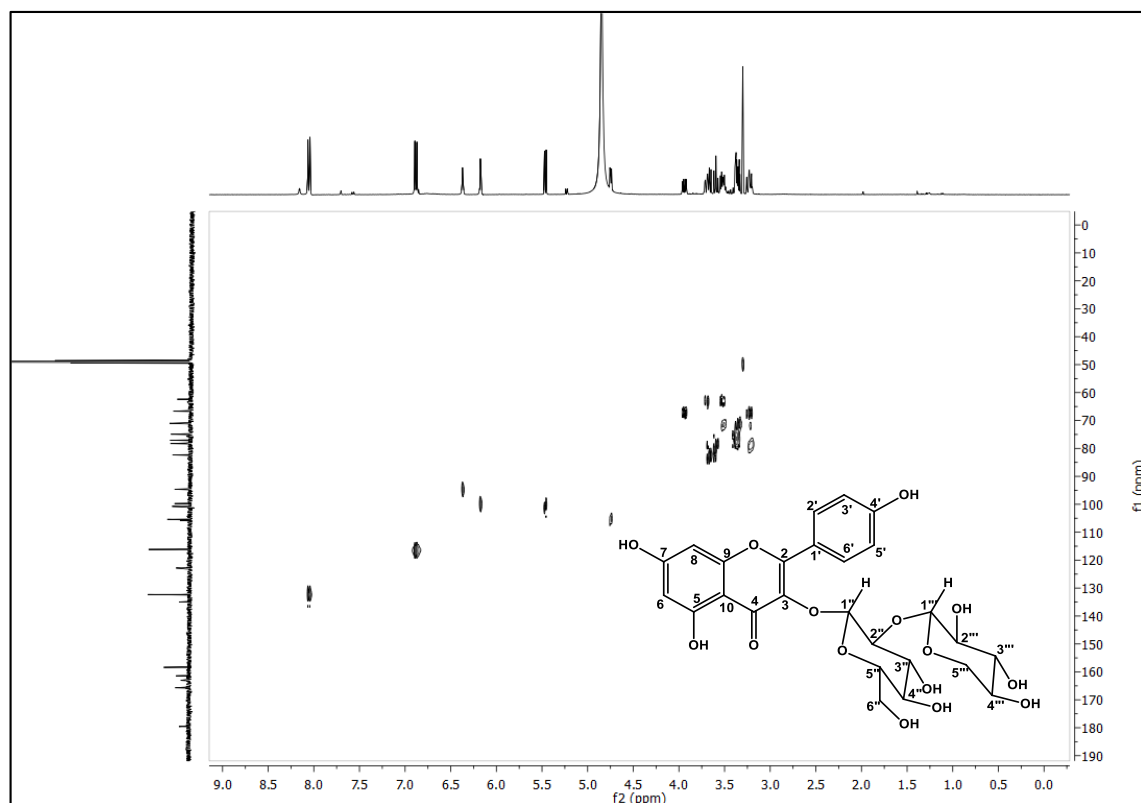


Figura 62 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (2,80– 4,40 ppm) x (35,0 – 100,0 ppm).

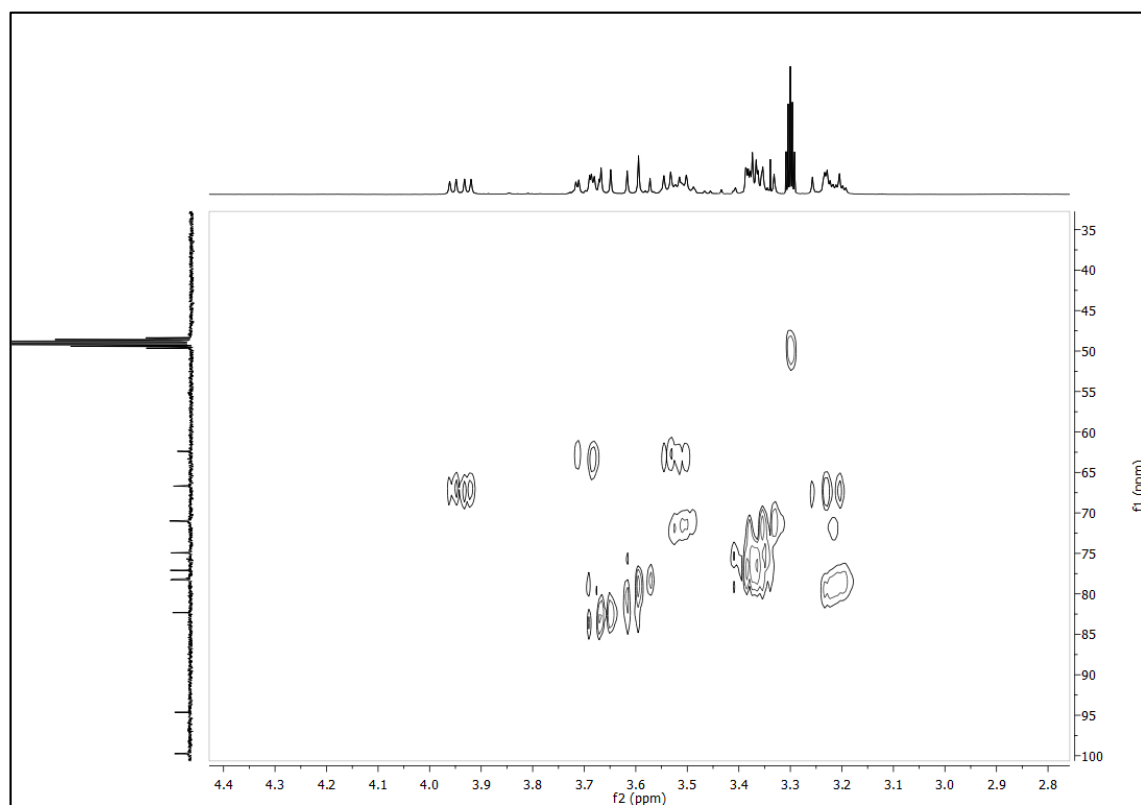


Figura 63 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (4,60– 8,20 ppm) x (80,0 – 150,0 ppm).

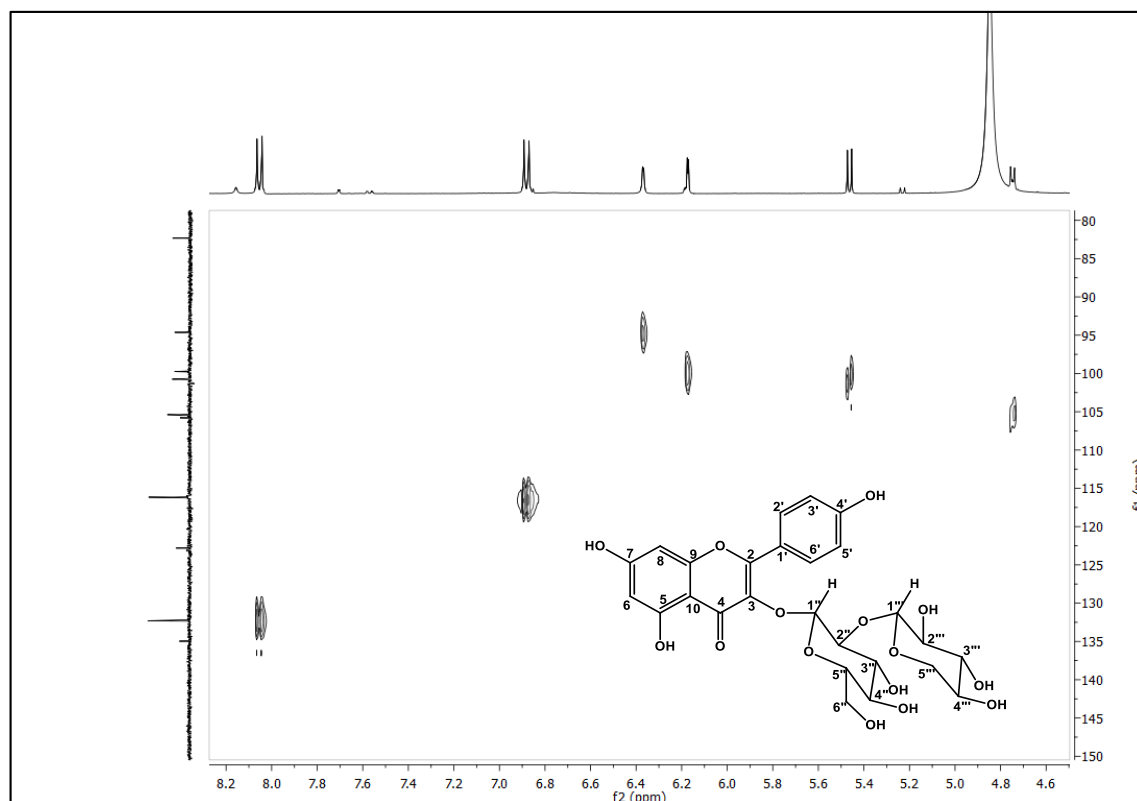


Figura 64 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5.

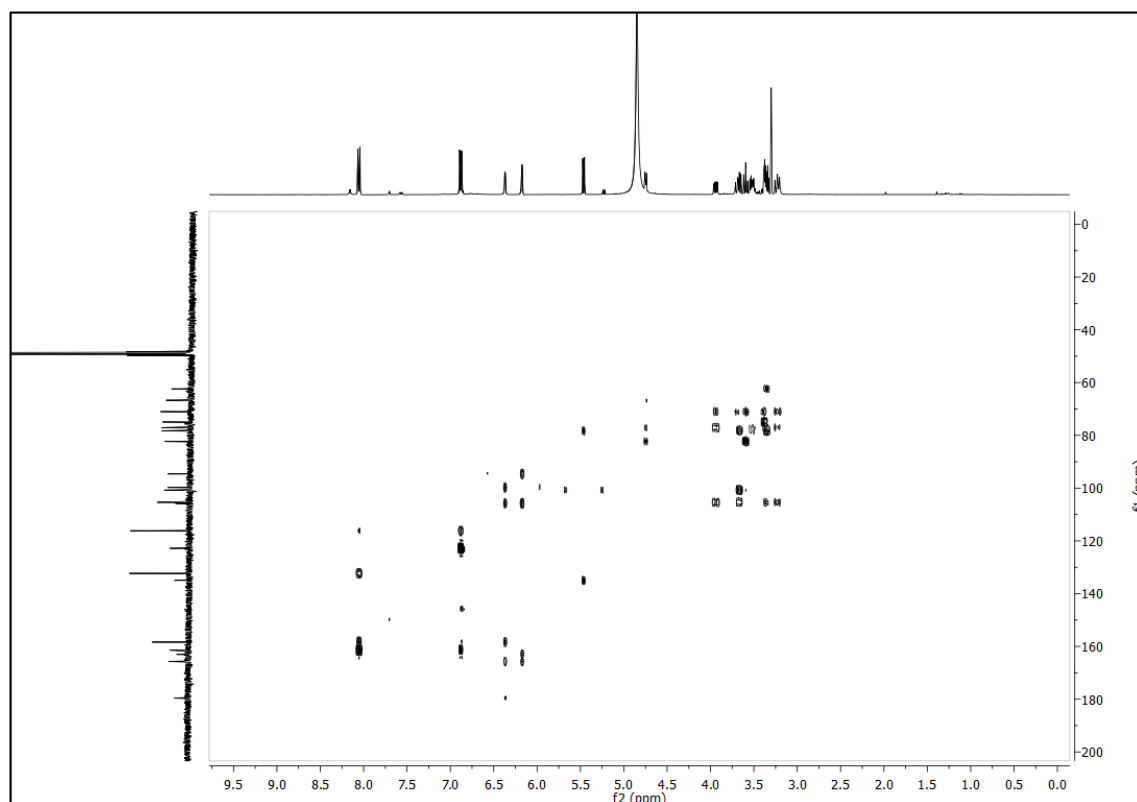


Figura 65 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (2,60– 5,60 ppm) x (50,0 – 140,0 ppm).

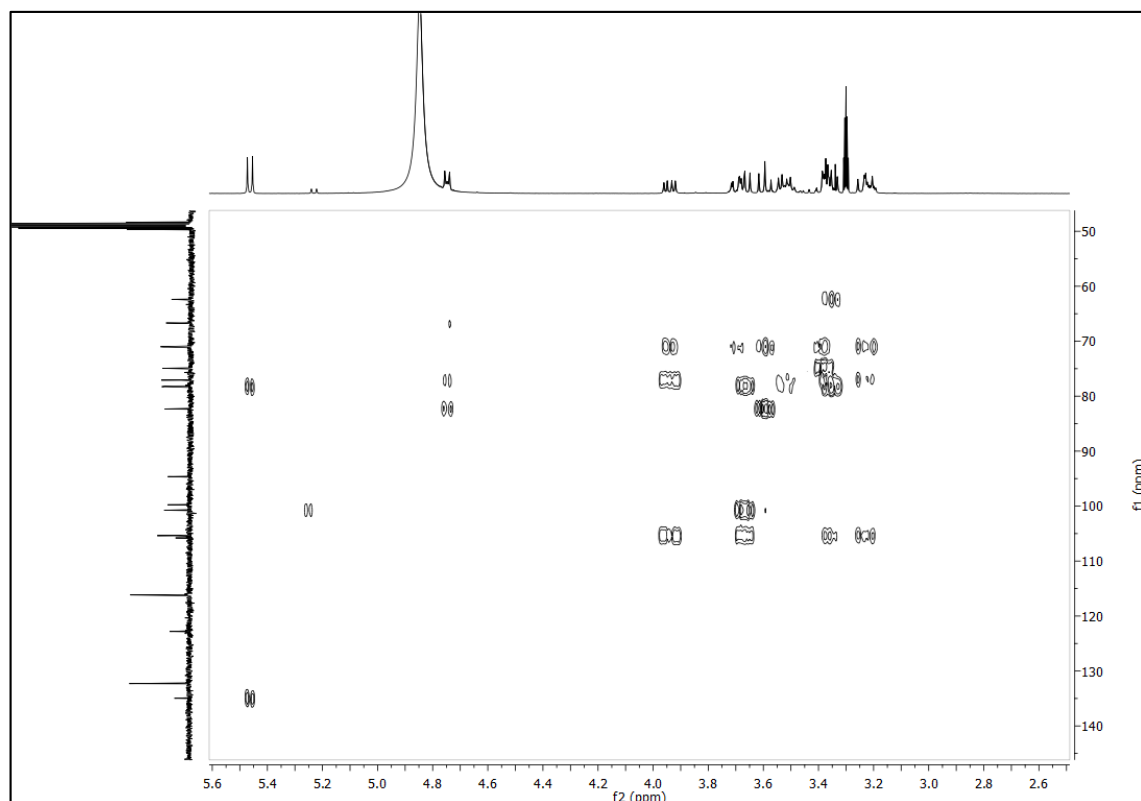


Figura 66 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (6,10– 8,10 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).

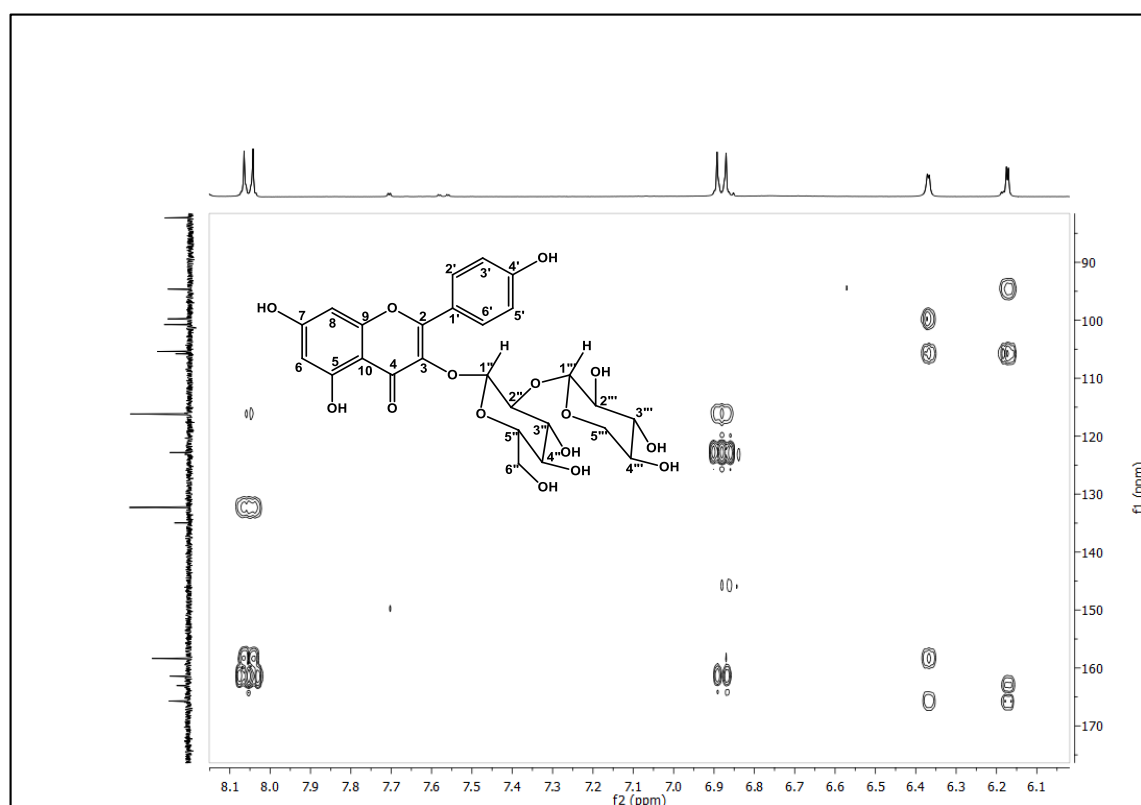
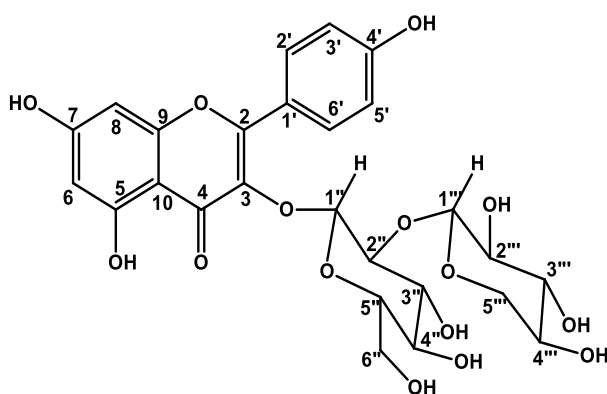
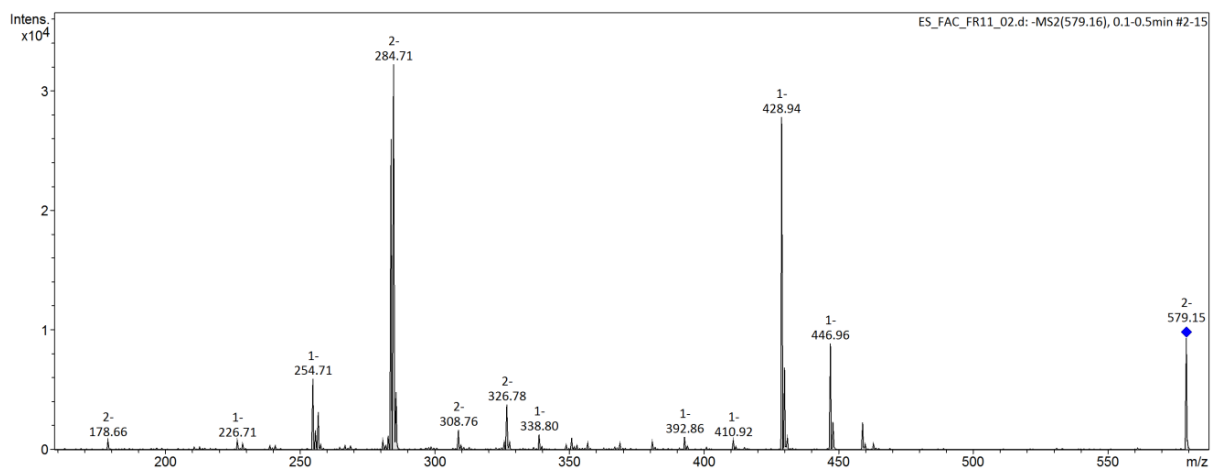


Figura 67 - Fragmentação da substância Es-5.

5.7. Identificação estrutural de Es-6

A substância Es-6 apresentou-se como um pó amorfo de cor alaranjada com 0,009 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 447.16 $[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$.

O espectro de RMN de ^{13}C na técnica BB (Figura 68, pág. 110), obtido a 100 MHz em CD_3OD , e suas expansões (Figura 69, pág. 110, Figura 70, pág. 111) apresentaram dezenove sinais correspondentes a vinte e um átomos de carbono, dos quais, um foi atribuído a carbono metilênico sp^3 , quatro a carbonos metínicos sp^2 , cinco a carbonos metínicos sp^3 e nove a carbonos não hidrogenados. O número de sinais observados, assim como a presença dos sinais em δ_c 179,5, δ_c 158,5 e δ_c 135,4, quando comparados com a literatura (KHALIL; KAMEL, 2015), evidenciou que a substância Es-6 possuía um esqueleto flavonoídico do tipo flavonol. Estes sinais foram equivalentes aos carbonos C-4 (carbonílico), C-2 (β -carbonila) e C-3 (α -carbonila), respectivamente. Oxigenações nos carbonos C-7, C-5 e C-4' foram evidenciadas, respectivamente, com os deslocamentos químicos em δ_c 165,9, δ_c 163,0 e δ_c 161,5, corroborando com a estrutura do canferol.

A ausência do sinal aproximadamente de δ_c 107,0, indicou uma substituição no carbono C-3. Deslocamentos químicos em δ_c 104,0, δ_c 78,4, δ_c 78,0, δ_c 75,7, δ_c 71,3 e δ_c 62,6 foram sugestivos da presença de uma unidade osídica. Após análise dos dados, e comparando-os com a literatura, foi possível identificar esta unidade como sendo a glicose (KIM et al. 1994). Esses e os demais deslocamentos encontram-se compilados na Tabela 7.

No espectro de RMN de 1H (Figura 71, pág. 111), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 72, pág. 112, Figura 73, pág. 112, Figura 74, pág. 113) foram observados deslocamentos químicos sugestivos de um sistema aromático AA'BB', correspondente ao anel B, que foi um dubleto em δ_H 8,04 ($J = 8,8$ Hz), integrando para dois hidrogênios, acoplado em *orto* a outro dubleto, também com integral para dois hidrogênios, em δ_H 6,88 ($J = 8,8$ Hz). Esses sinais foram atribuídos aos conjuntos de hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', estando estes mais protegidos por estarem *orto* ao grupo doador de elétrons (hidroxila). Os dubletos acoplados em meta, com sinais em δ_c 6,40 ($J = 2$ Hz) e δ_c 6,20 ($J = 2$ Hz) foram condizentes, respectivamente, com os hidrogênios H-8 e H-6 do anel A em comparação com dados da literatura, reforçando que o composto Es-6 é um derivado do canferol (KHALIL;

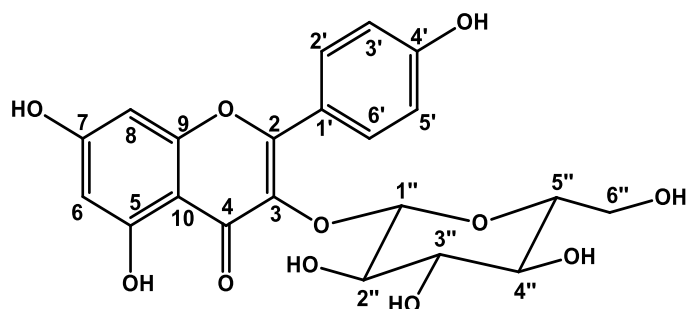
KAMEL et al., 2015). A ausência do singlete em aproximadamente δ_H 6,70, e a presença de deslocamentos característicos de açúcar na região de δ_H 3 – 4 ppm, correspondentes a unidade osídica, sugerem a inserção desta unidade no carbono C-3. Essas atribuições podem ser visualizadas na Tabela 7.

O mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura 75, pág. 113) e em suas expansões (Figura 76, pág. 114, Figura 77, pág. 114), apontou correlações entre os sinais em δ_H 6,20 (H-6) com δ_C 99,9 (C-6) e em δ_H 6,40 (H-8) com δ_C 94,7 (C-8), confirmando as atribuições sugeridas aos carbonos C-6 e C-8 do anel A do flavonol. Correlações entre os sinais em δ_H 8,04 (H-2' e H-6') com δ_C 132,2 (C-2' e C-6') e em δ_H 6,88 (H-3' e H-5') com δ_C 116,0 (C-3' e C-5') confirmaram as atribuições aos carbonos do anel B.

No mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura 78, pág. 115) e em suas expansões (Figura 79, pág. 115, Figura 80, pág. 116), as correlações entre os sinais em δ_H 6,20 (H-6) e δ_H 6,40 (H-8) com δ_C 165,9 (C-7), de δ_H 6,28 (H-6) com δ_C 163,0 (C-5) e de δ_H 6,40 (H-8) com δ_C 159,1 (C-9), confirmaram as atribuições aos carbonos do anel A do flavonol. A correlação entre o sinal em δ_H 5,23, correspondente ao hidrogênio do carbono anomérico da unidade osídica, com δ_C 135,4 (C-3) confirmou a eterificação no carbono C-3 da aglicona. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C , usando técnicas uni e bidimensional estão compilados na Tabela 7.

A fragmentação (Figura 81, pág. 116) do íon da molécula desprotonada, m/z 447.16 $[M-H]^-$, correspondente a substância Es-5, gerou um íon base com m/z 284,13, condizente com uma quebra homolítica da ligação entre a aglicona e a unidade osídica, formando um radical desprotonado do canferol (m/z 284).

Após comparação destes dados com os descritos na literatura, foi possível identificar a substância Es-6 como sendo o flavonoide canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, também conhecido como astragalina (DEMIREZER et al., 2006). Tal composto é comum no gênero *Erythroxylum*, já relatada na espécie *Erythroxylum coca* var. *coca* (BOHM et al., 1982) e pela primeira vez na espécie *Erythroxylum simonis*.



Estrutura do canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-6, canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, em comparação aos dados obtidos por DEMIREZER et al., 2006.

Posição	HMQC		HMBC		Referência	
	δ_{H} Es-6	δ_{C} Es-6	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}	
2	-	158,5	H-2', H-6'	-	158,6	
3	-	135,4	H-1''	-	135,4	
4	-	179,5	-	-	179,4	
5	-	163,0	H-6	-	163,0	
6	6,20 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	99,9	H-8	6,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1 Hz)	100,3	
7	-	165,9	H-6, H-8	-	167,3	
8	6,40 (<i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2 Hz)	94,7	H-6	6,37 (<i>sl</i>)	95,1	
9	-	159,1	H-8	-	158,9	
10	-	105,7	H-6; H-8	-	105,4	
1'	-	122,7	H-3', H-5'	-	122,8	
2'	8,04 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	132,2	H-3', H-6'	8,04 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 9 Hz)	132,3	
3'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	116,0	H-2', H-5'	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz)	116,1	
4'	-	161,5	H-2', H-3', H-5', H-6'	-	161,6	
5'	6,88 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	116,0	H-3', H-6'	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz)	116,1	
6'	8,04 (<i>d</i> ; 2 H; <i>J</i> = 8,8 Hz)	132,2	H-2', H-5'	8,04 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 9 Hz)	132,3	
1''	5,23 (<i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 7,6 Hz)	104,0	-	5,22 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 7,5 Hz)	104,2	
2''	3,17 - 3,21 (<i>m</i>)	75,7	-	3,19 (<i>m</i>)	75,7	
3''	3,27 - 3,45 (<i>m</i>)	78,0	-	3,42 (<i>m</i>)	78,1	
4''	3,27 - 3,45 (<i>m</i>)	71,3	-	3,42 (<i>m</i>)	71,3	
5''	3,27 - 3,45 (<i>m</i>)	78,4	-	3,42 (<i>m</i>)	78,4	
6''	3,51 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,6 e 12 Hz) 3,68 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 2,4 e 12 Hz)	62,6	-	3,52 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,5 e 12 Hz) 3,68 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 2 e 12 Hz)	62,6	

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-6.

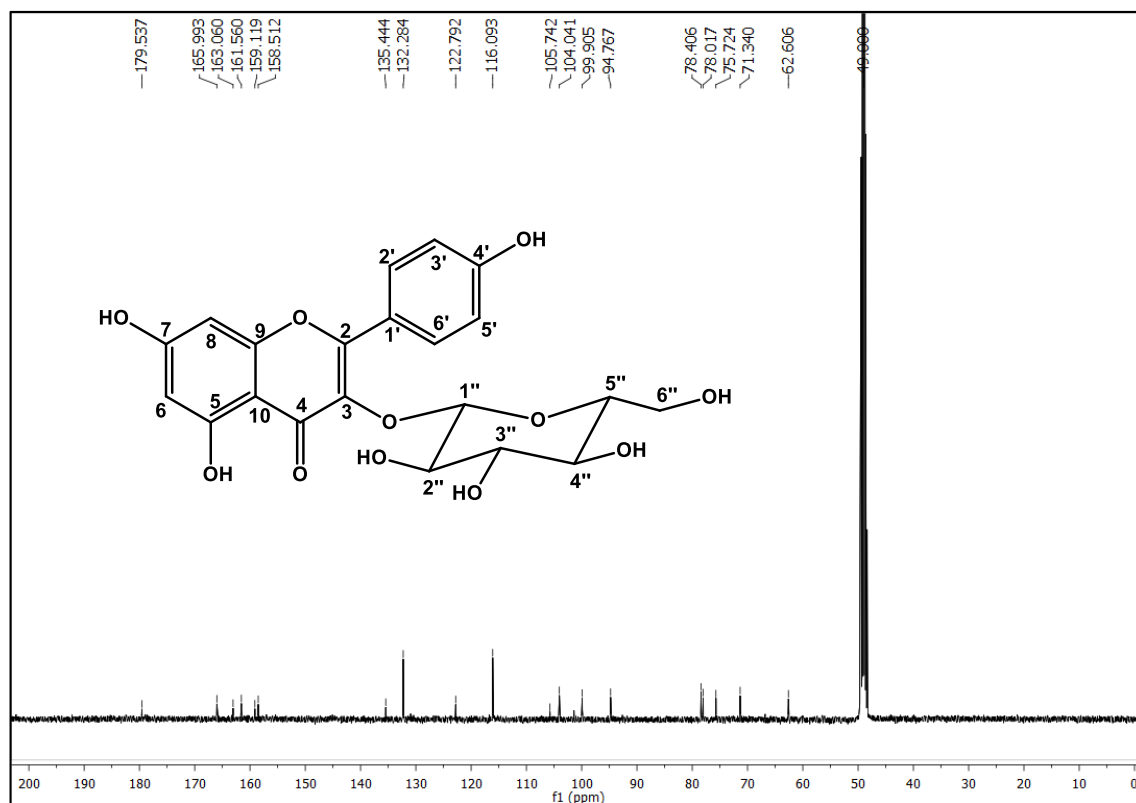


Figura 69 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-6 na região de 60 – 106 ppm.

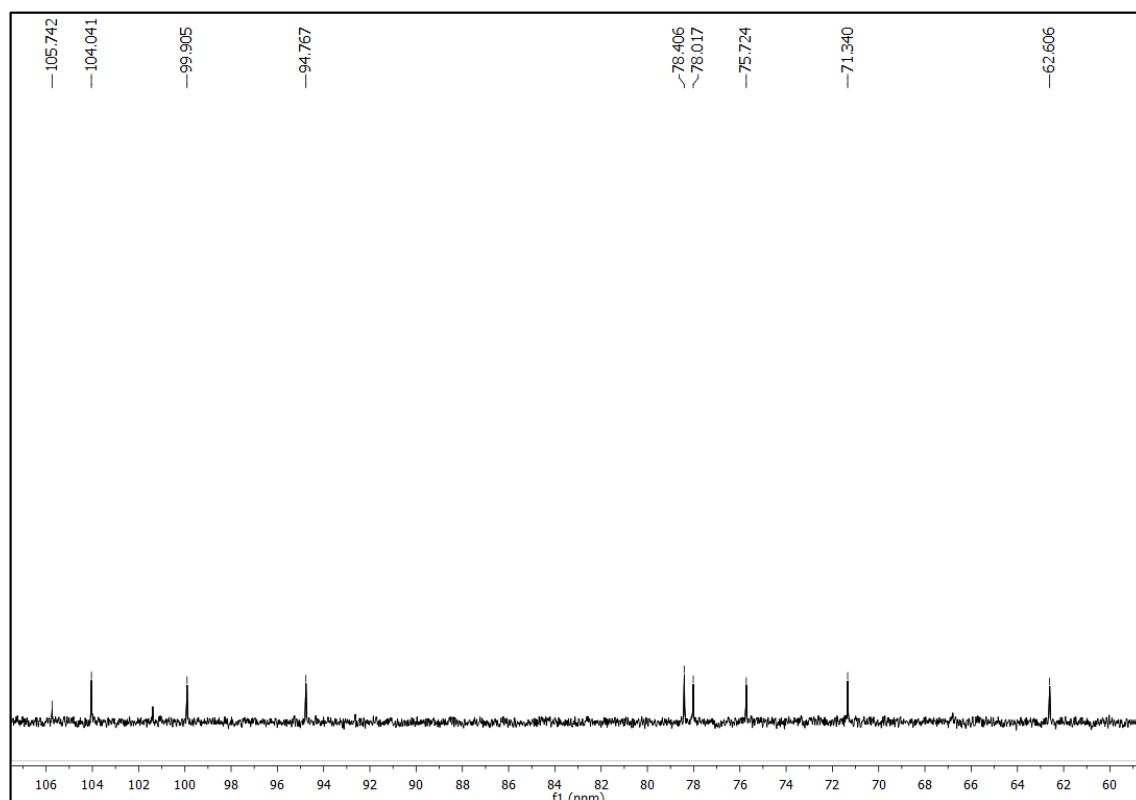


Figura 70 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-6 na região de 115 – 180 ppm.

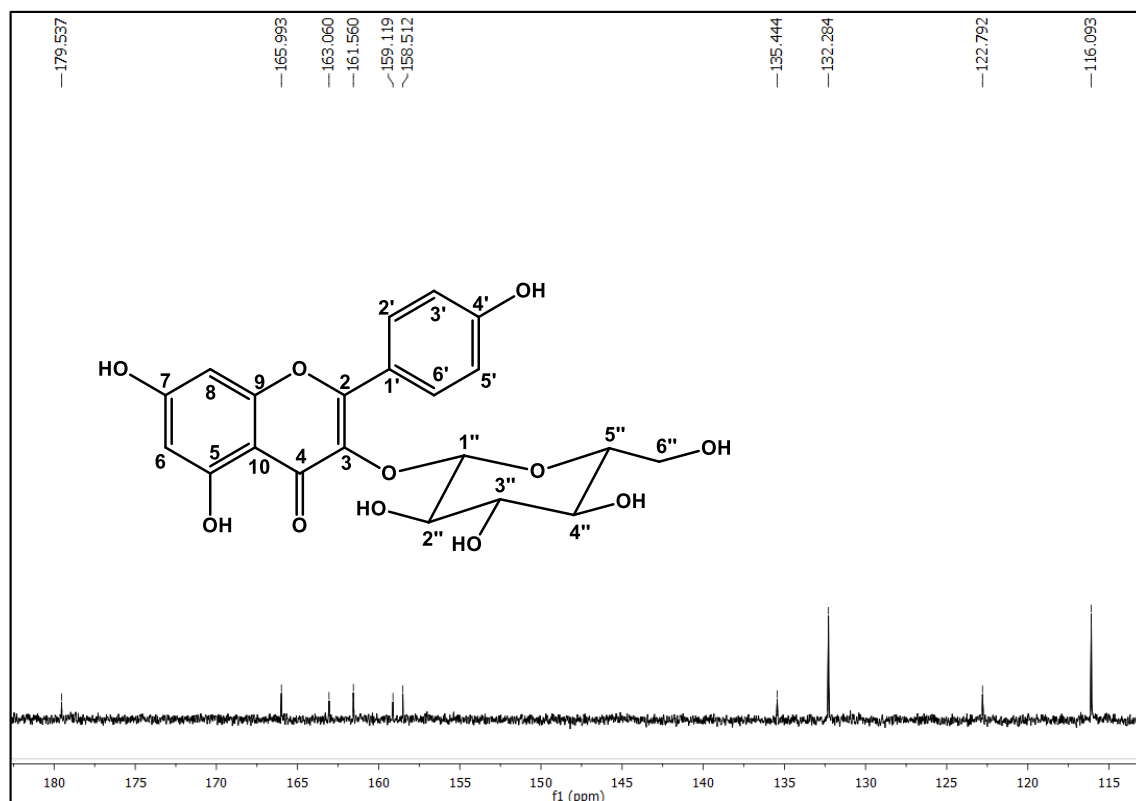


Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-6.

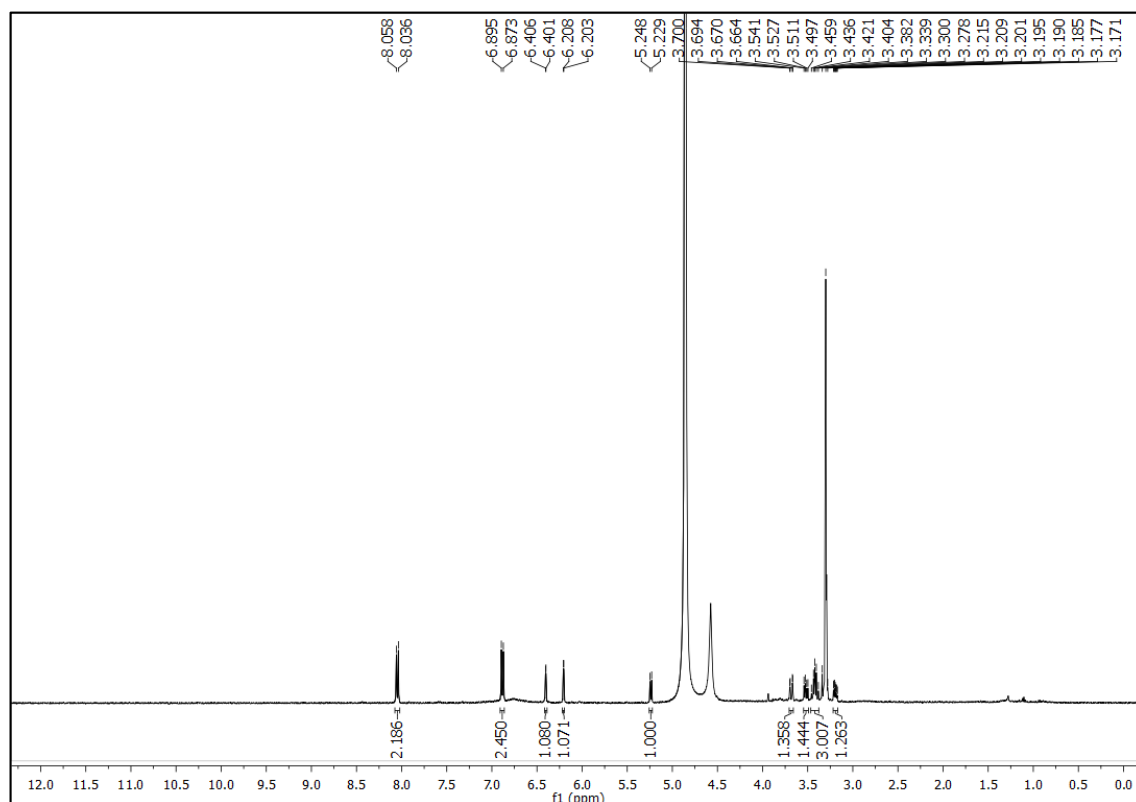


Figura 72 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-6 na região de 2,85 – 4,05 ppm.

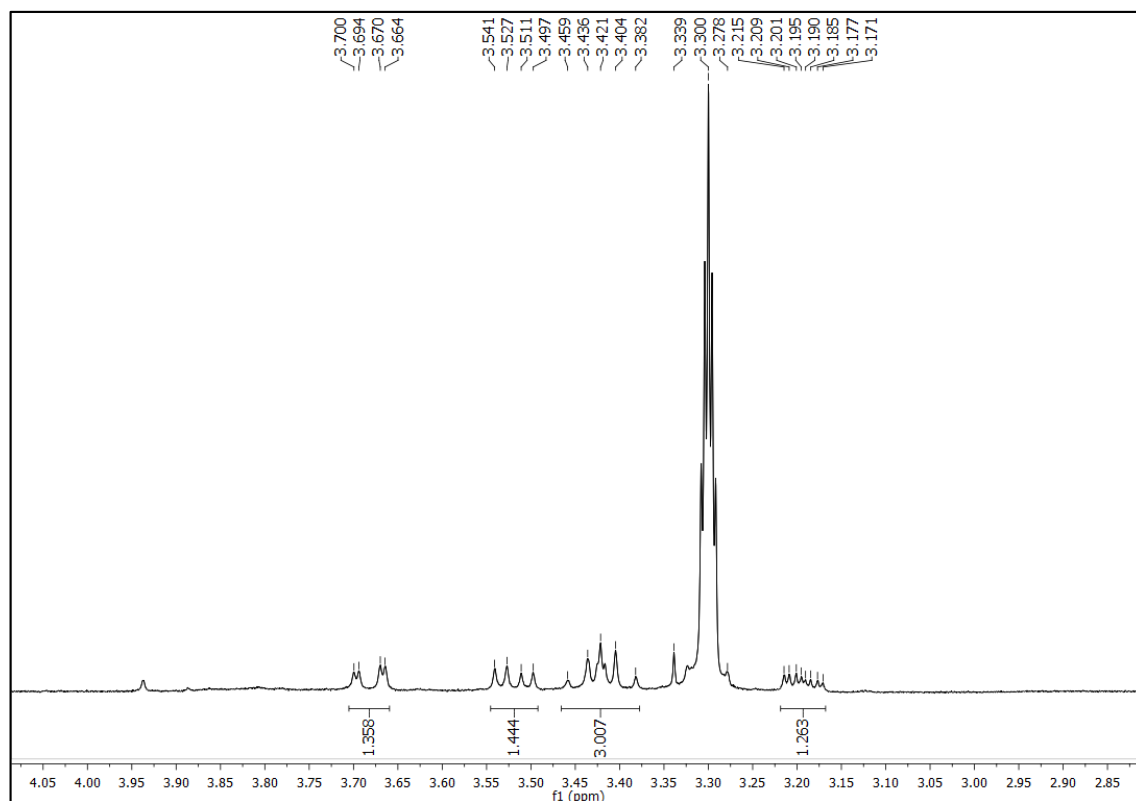


Figura 73 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-6 na região de 6,60 – 8,40 ppm.

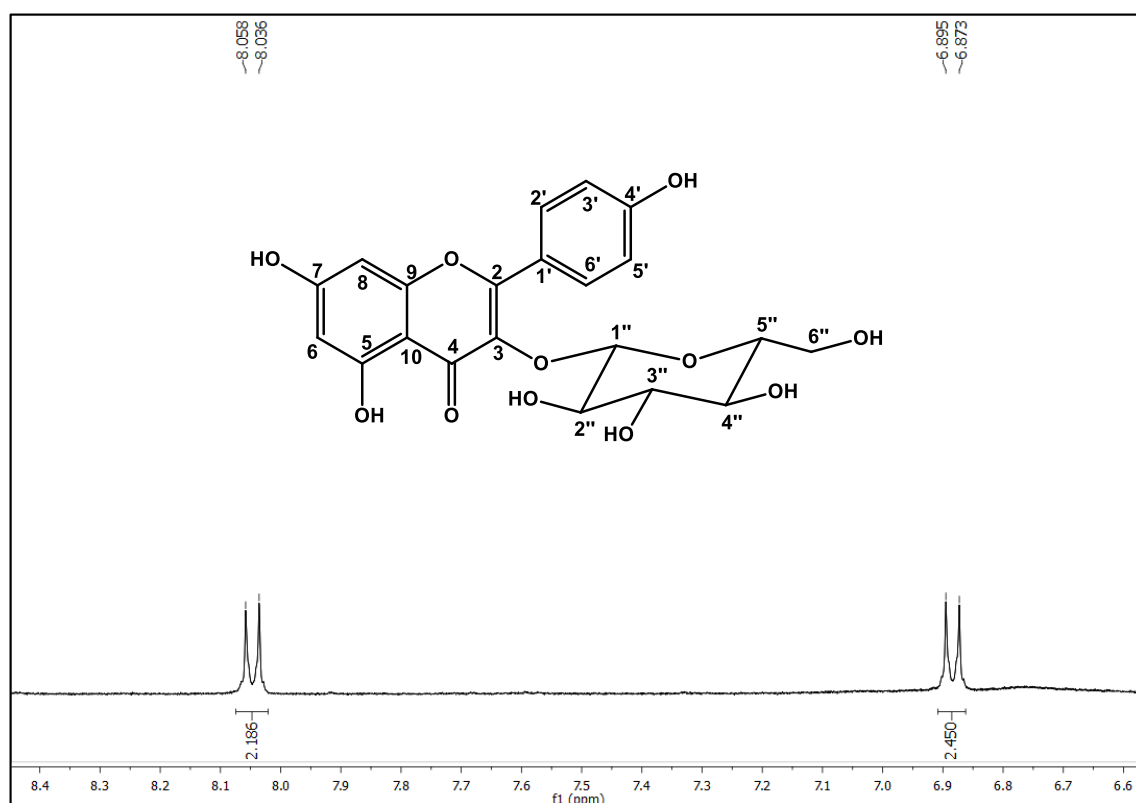


Figura 74 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-6 na região de 5,20 – 6,50 ppm.

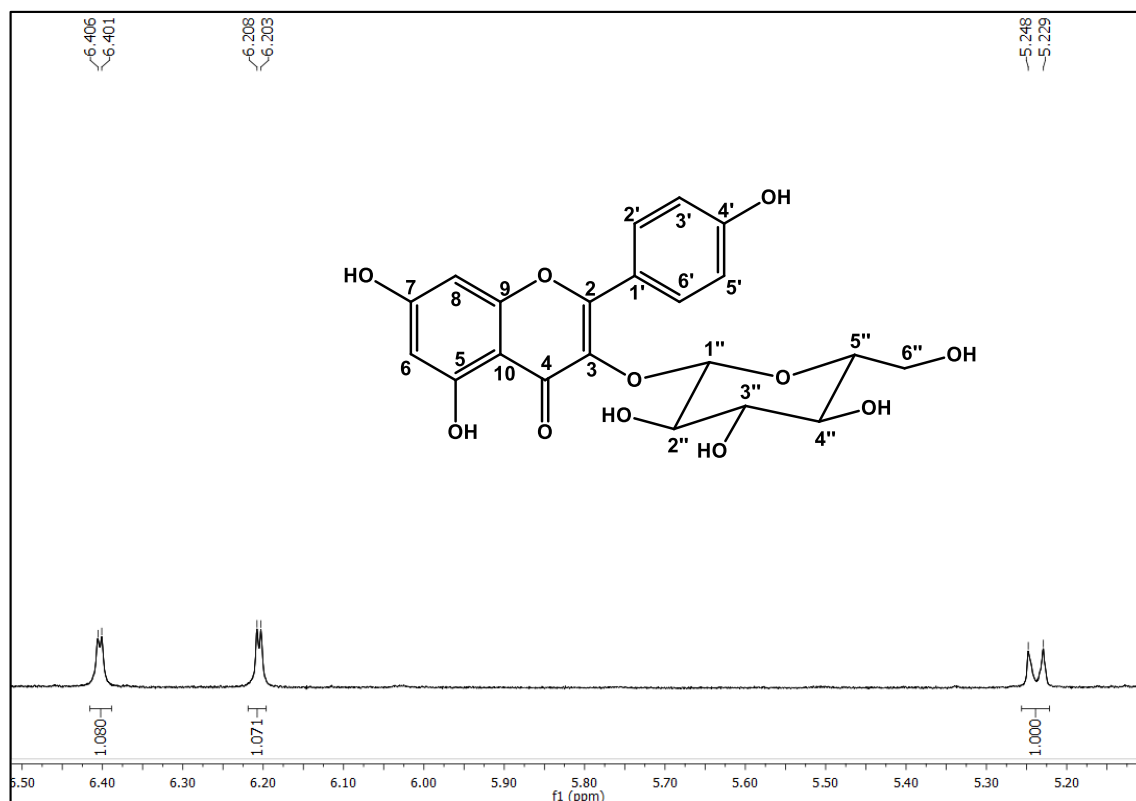


Figura 75 – Mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-6.

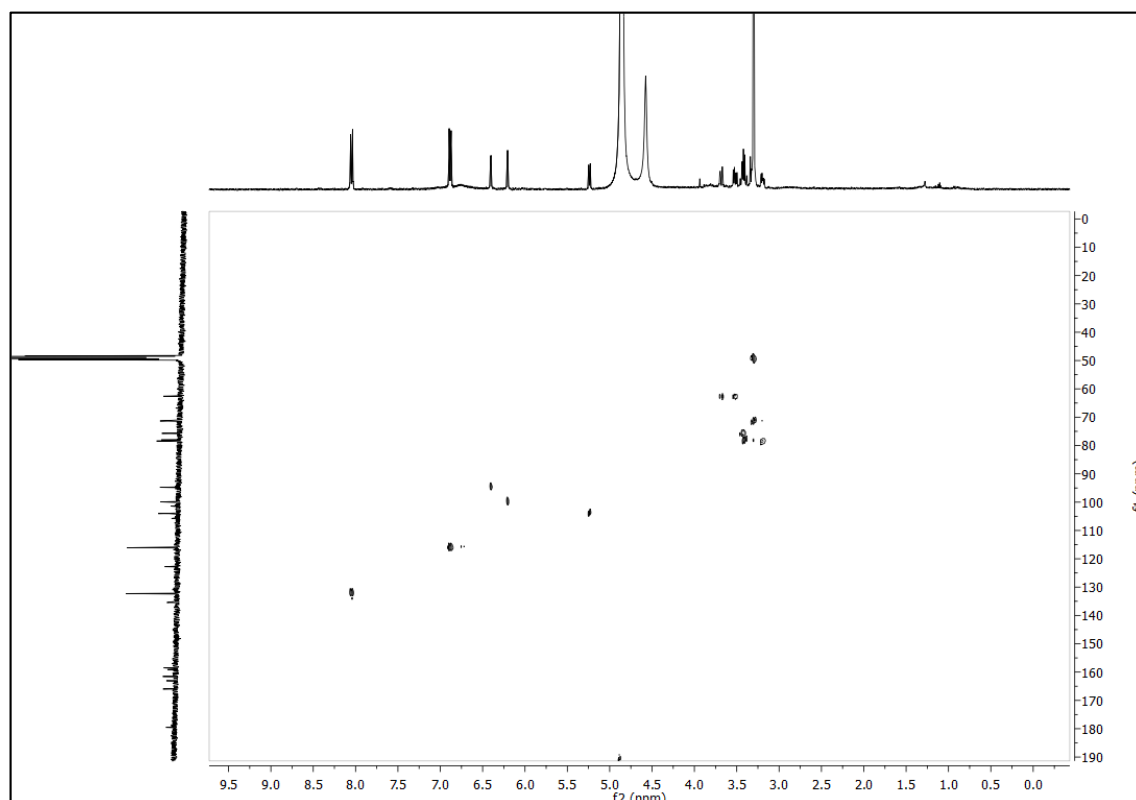


Figura 76 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-6 na região de (2,50– 4,40 ppm) x (35,0 – 95,0 ppm).

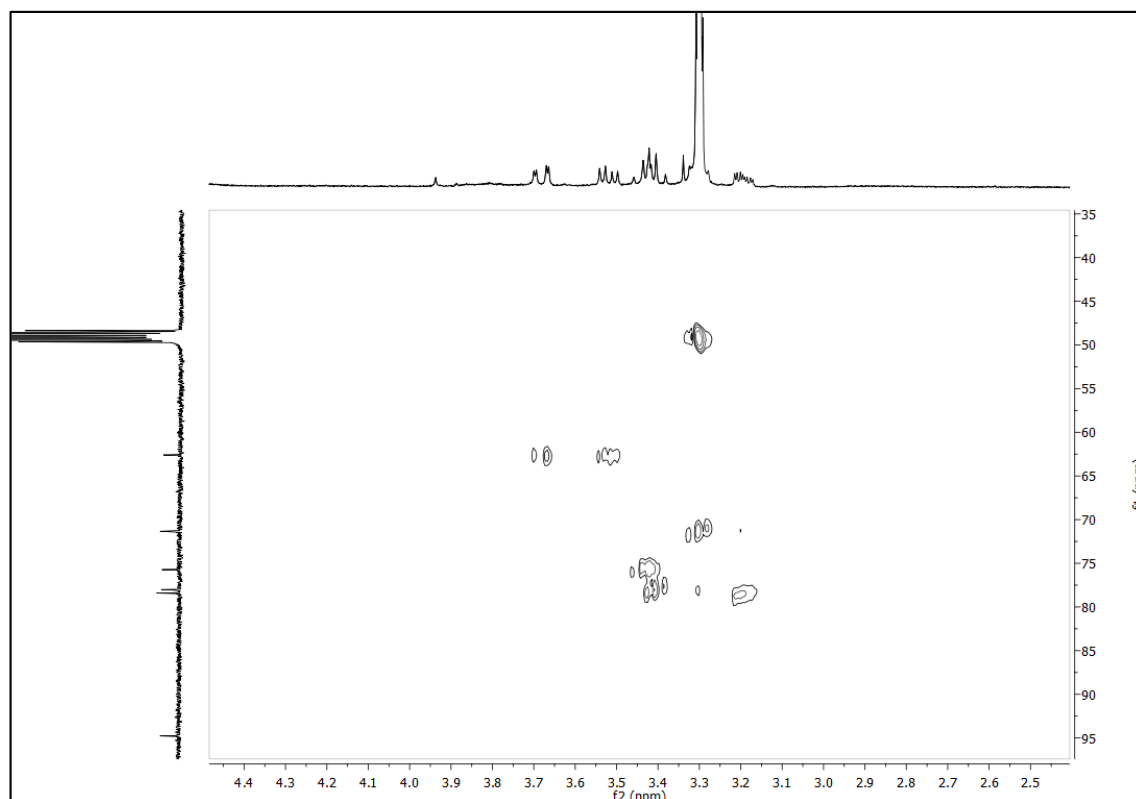


Figura 77 - Expansão do mapa de contornos HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-6 na região de (5,30– 8,10 ppm) x (35,0 – 95,0 ppm).

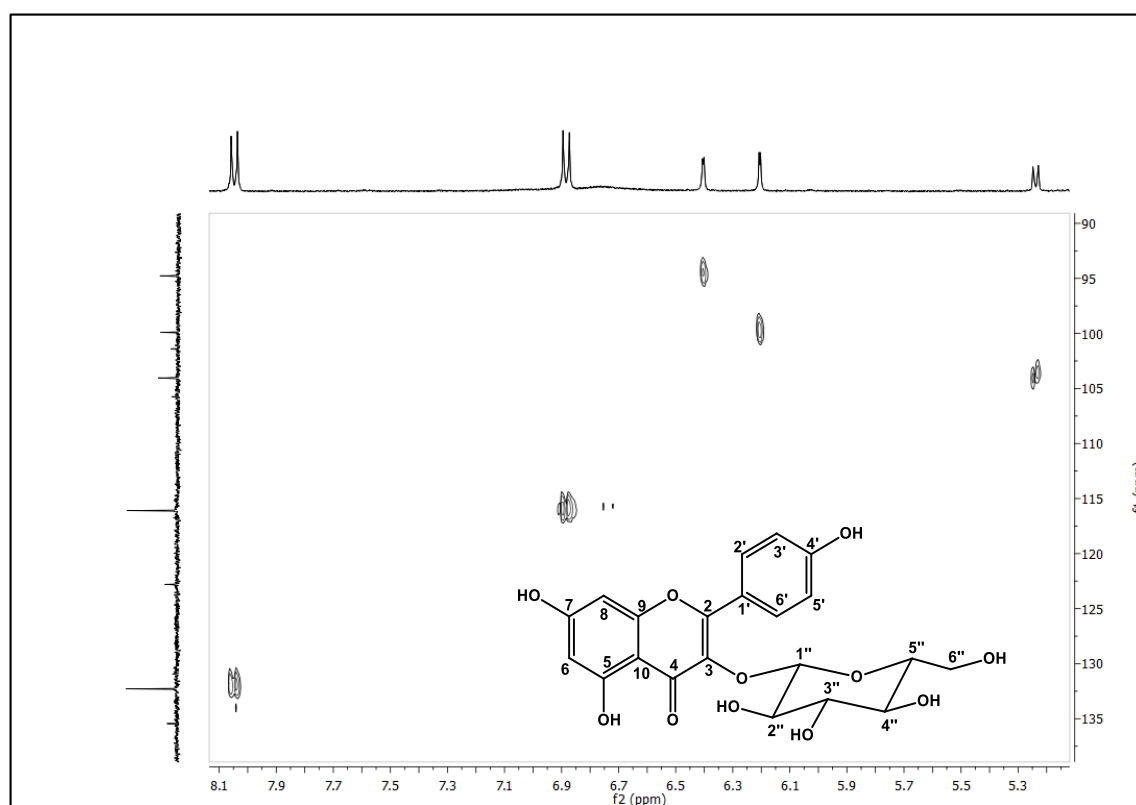


Figura 78 – Mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-6.

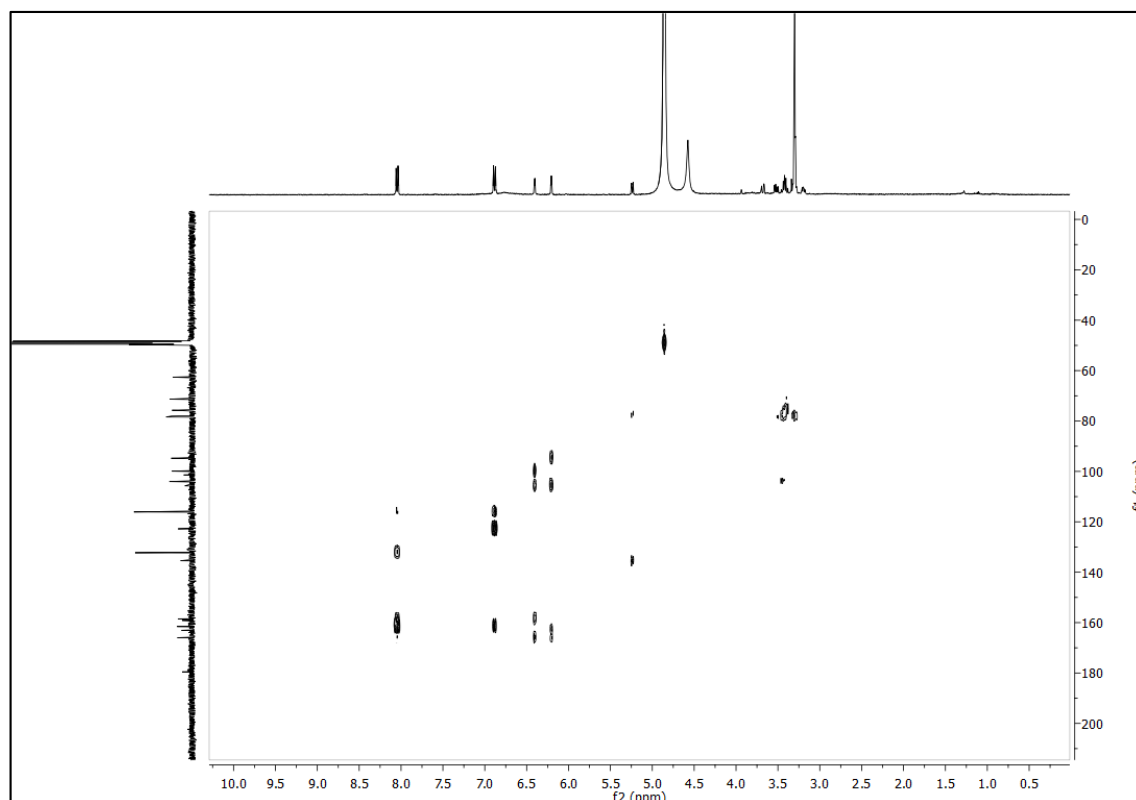


Figura 79 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-6 na região de (2,80 – 5,60 ppm) x (40 – 150,0 ppm).

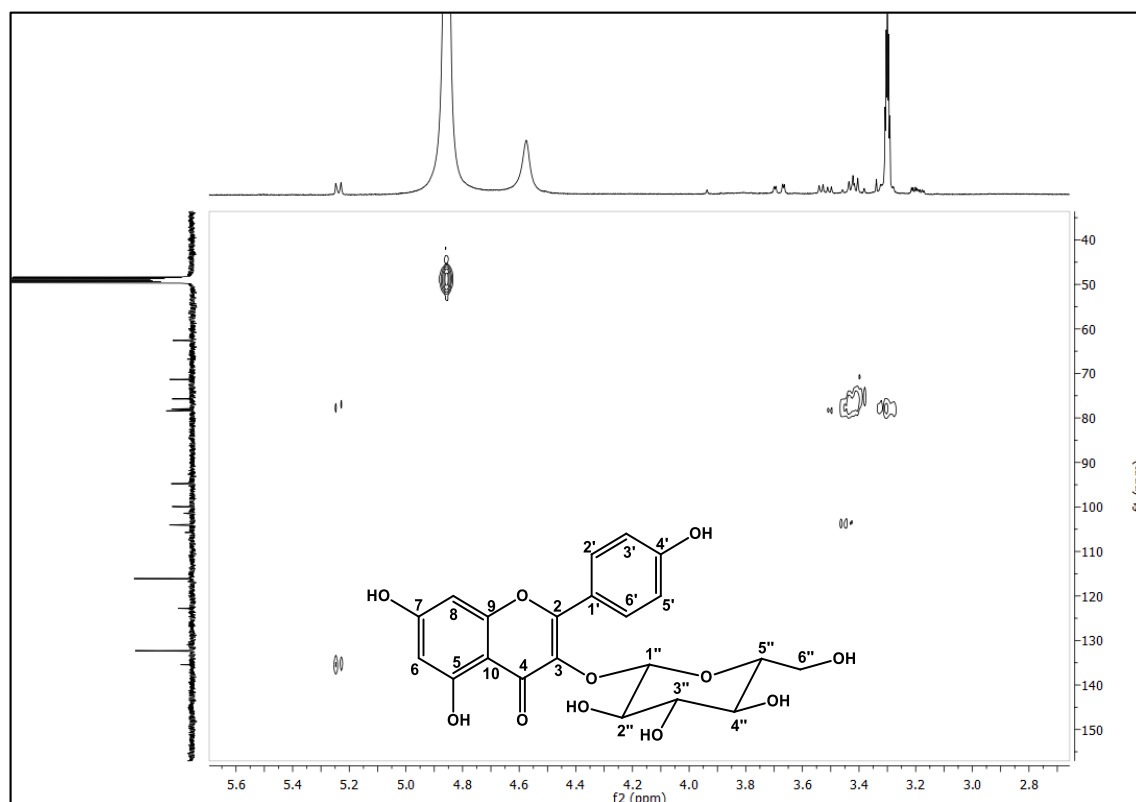


Figura 80 - Expansão do mapa de contornos HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-6 na região de (5,70– 8,50 ppm) x (80 – 180,0 ppm).

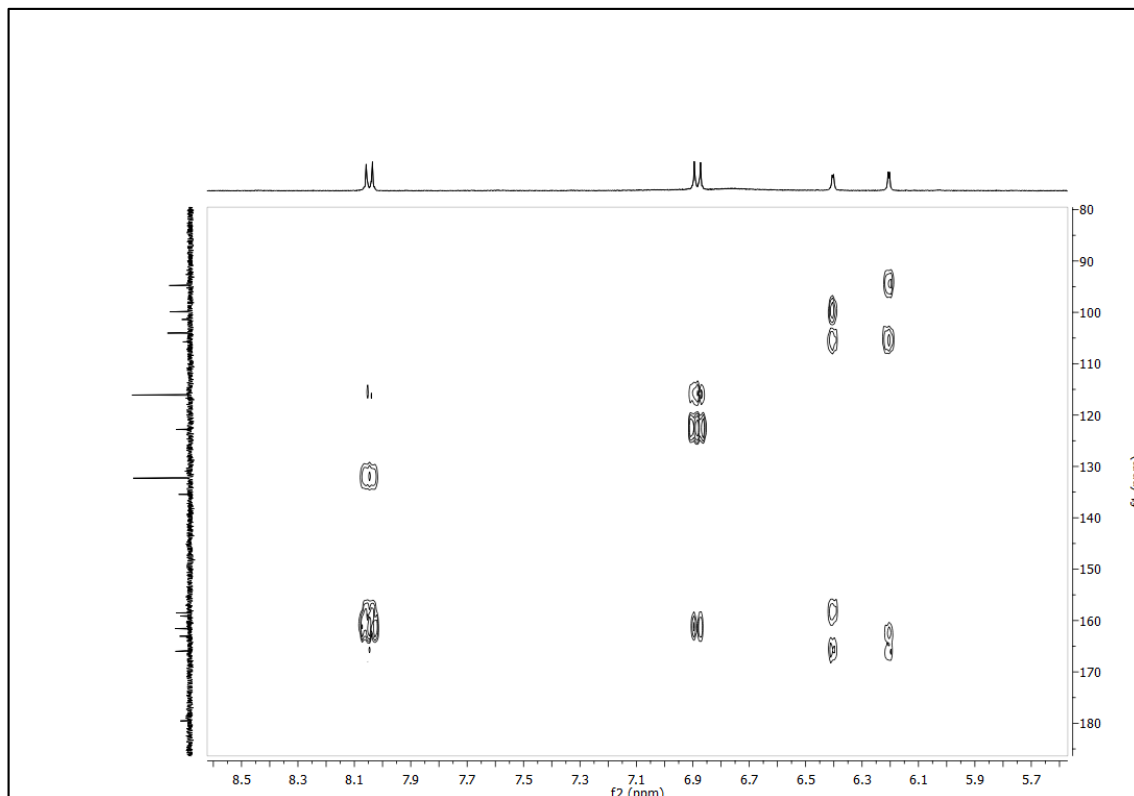
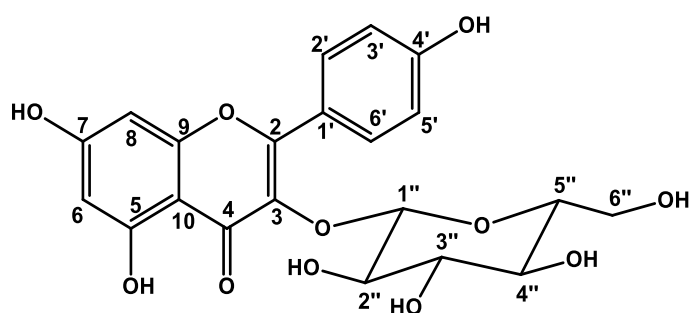
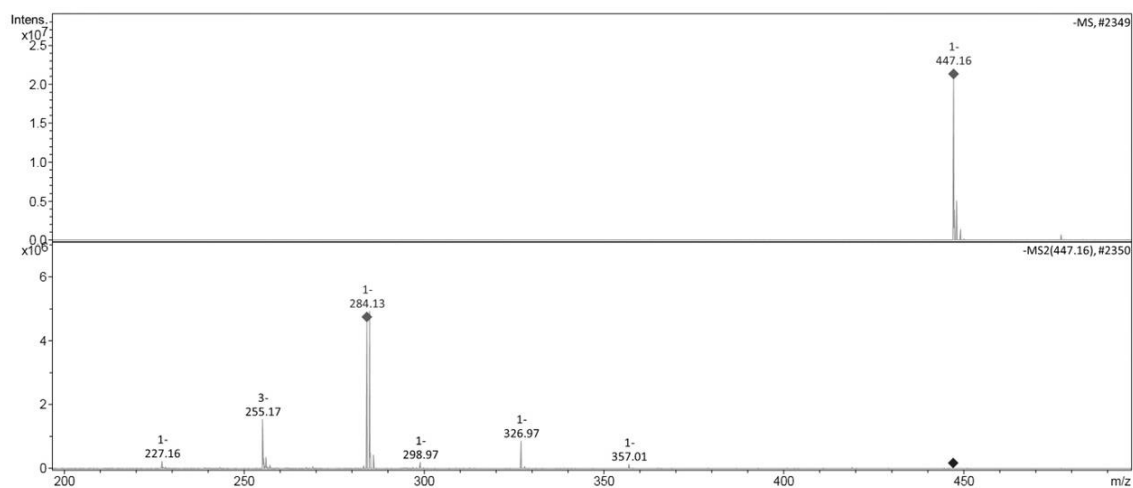


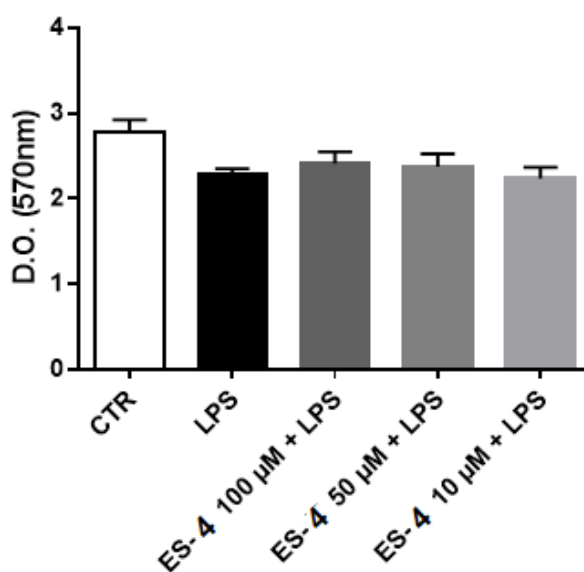
Figura 81 - Fragmentação da substância Es-6.



5.8. Estudo da citotoxicidade dos compostos Es-4 e Es-5 em macrófagos peritoneais

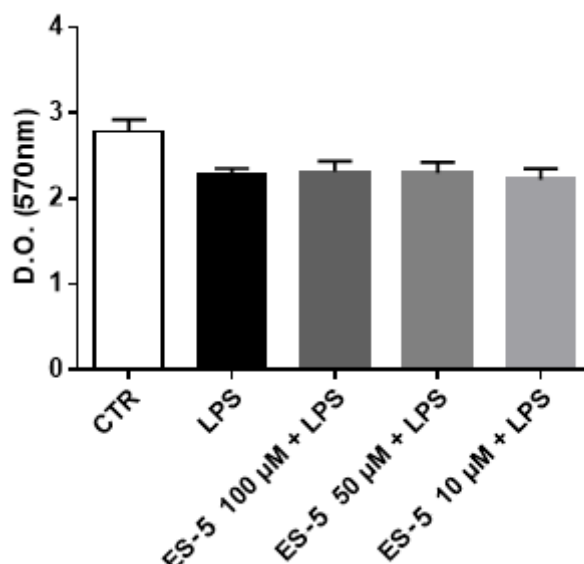
A citotoxicidade dos compostos Es-4 (quercetina-3-sambubiosídeo) e Es-5 (canferol-3-sambubiosídeo) foi avaliada em cultura de macrófagos peritoneais pelo ensaio do MTT. A partir da análise dos dados expressos no Gráfico 2 e Gráfico 3, pode-se concluir que as diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM) de ambos os flavonóis testados não reduziram a viabilidade celular quando comparados com o grupo controle, constituído por células tratadas apenas com meio de cultura RPMI.

Gráfico 2 - Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, na viabilidade de macrófagos peritoneais.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-4: quercetina-3-sambubiosídeo.

Gráfico 3 - Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, na viabilidade de macrófagos peritoneais.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-5: canferol-3-sambubiosídeo.

5.9. Efeitos dos compostos Es-4 e Es-5 na produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais

O óxido nítrico (NO) é um mediador da resposta inflamatória produzido por diferentes células do sistema imunológicos, como os macrófagos, por ação da enzima iNOS. O NO possui um efeito vasodilatador e uma ação regulatória no recrutamento de leucócitos, além de efeito citotóxico contra microrganismos (SAUTEBIN, 2000).

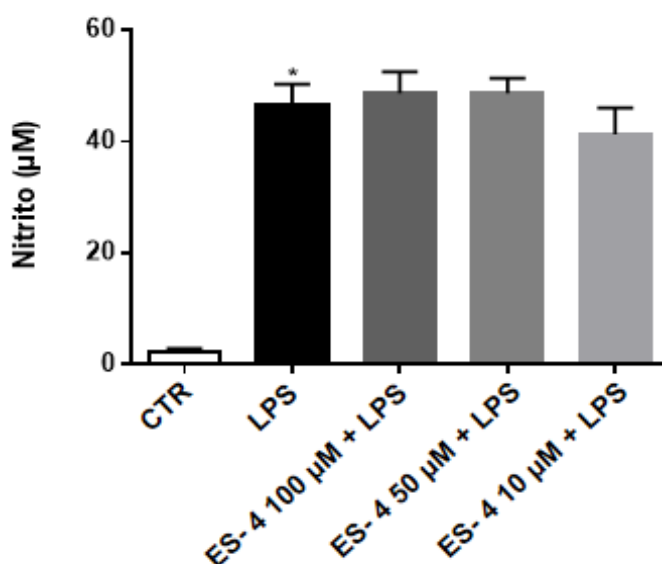
O efeito dos flavonóis Es-4 (quercetina-3-sambubiosídeo) e Es-5 (canferol-3-sambubiosídeo) na produção de NO em sobrenadantes obtidos por cultura de macrófagos peritoneais foi determinado pela reação de Griess. Neste método o nitrito, produto de degradação do NO, reage em meio ácido com sulfanilamida, formando o sal de diazônio. Este reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto estável de coloração púrpura, permitindo a análise em um espectrofotômetro.

Os dados obtidos para as substâncias Es-4 e Es-5 foram expressos no Gráfico 4 e Gráfico 5, respectivamente. Observou-se que o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano estimulou os macrófagos, promovendo um aumento na produção de NO, quando comparado com o grupo controle. No entanto, verificou-se que o tratamento

com os compostos Es-4 e Es-5 (10, 50 e 100 μM) não modulou a produção de NO pelas células estimuladas com LPS. Além disso, o tratamento apenas com os flavonóis não interferiu nos níveis de NO quando comparado com o grupo controle (dados não mostrados).

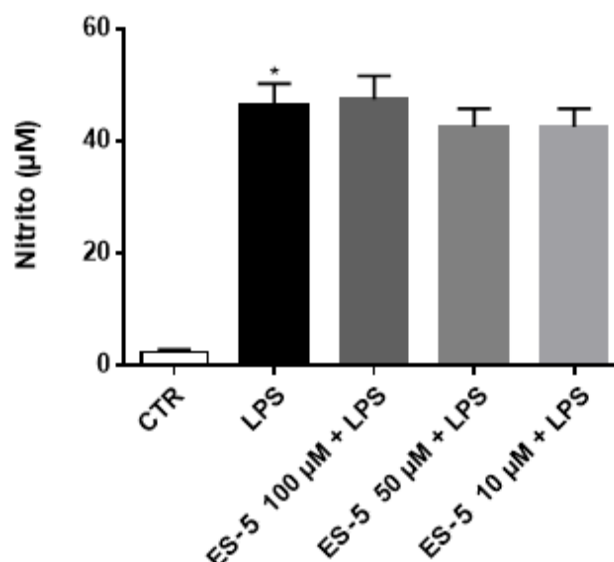
Em contrapartida, estudos mostram que a quercetina livre inibe a expressão de iNOS induzida por LPS e a produção de nitrito (LEE et al., 2008), portanto, participa da atividade anti-inflamatória das plantas que são utilizadas para este fim e que possuem este metabólito. Desta forma, a inserção da unidade osídica sambubiose na posição 3 da aglicona, promove a perda do efeito inibidor sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos estimulados por LPS.

Gráfico 4 – Efeito da substância Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-4: quercetina-3-sambubiosídeo.

Gráfico 5 – Efeito da substância Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-5: canferol-3-sambubiosídeo.

5.10. Efeito dos compostos Es-4 e Es-5 sobre os níveis de citocinas

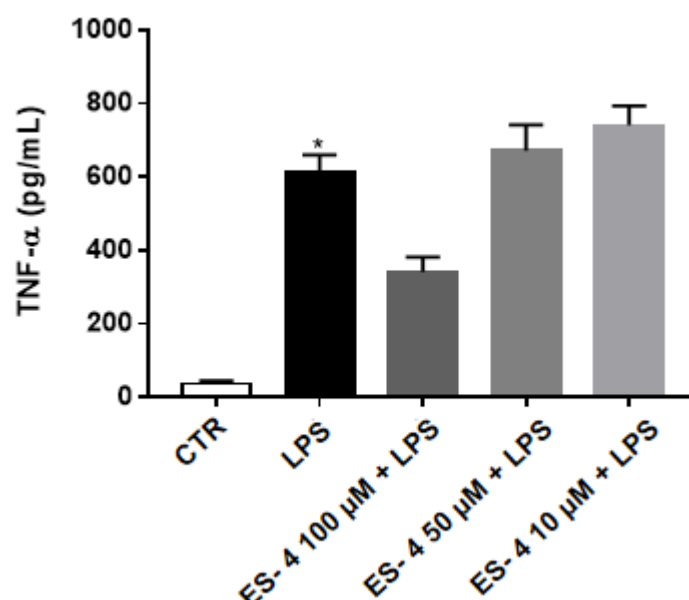
As citocinas são polipeptídeos que são liberados durante a resposta inflamatória, regulando a ação das células envolvidas neste processo. Como por exemplo as citocinas TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-6 (interleucina-6) que estão envolvidas no processo de migração e ativação de leucócitos durante a inflamação. Estas citocinas são produzidas pelos macrófagos e outros tipos celulares e atuam como alvos farmacológicos para fármacos anti-inflamatórios (RANG et al., 2011).

O efeito das substâncias Es-4 (quercetina-3-sambubiosídeo) e Es-5 (canferol-3-sambubiosídeo) sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL-6 presentes na cultura de macrófagos foi realizada por ELISA. Os resultados deste ensaio estão expressos no Gráfico 6, Gráfico 7, Gráfico 8 e Gráfico 9. Os dois primeiros são referentes aos efeitos de Es-4 e Es-5 sobre a liberação de TNF- α e os dois últimos referem-se aos efeitos destes compostos na liberação de IL-6.

Observou-se, por comparação com o grupo controle, que o LPS estimulou os macrófagos, promovendo um aumento na liberação das citocinas TNF- α e IL-6. Entretanto, nenhum dos flavonóis testados interferiu nos níveis destes mediadores,

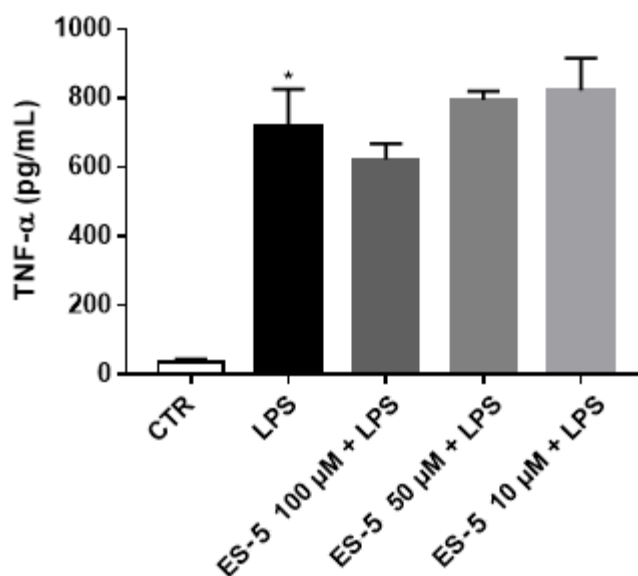
quando comparados com as culturas de macrófagos que receberam apenas o LPS. Por outro lado, Boesch-Saadatmandi et al. (2011) demonstraram que a quercetina livre possui ação inibitória sobre a liberação de TNF- α e IL-6 em macrófagos. Logo, a adição da sambubiose na posição 3 da quercetina promove a perda de sua ação moduladora sobre a liberação das citocinas TNF- α e IL-6 pelos macrófagos estimulados por LPS.

Gráfico 6 – Efeito de Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de TNF- α .



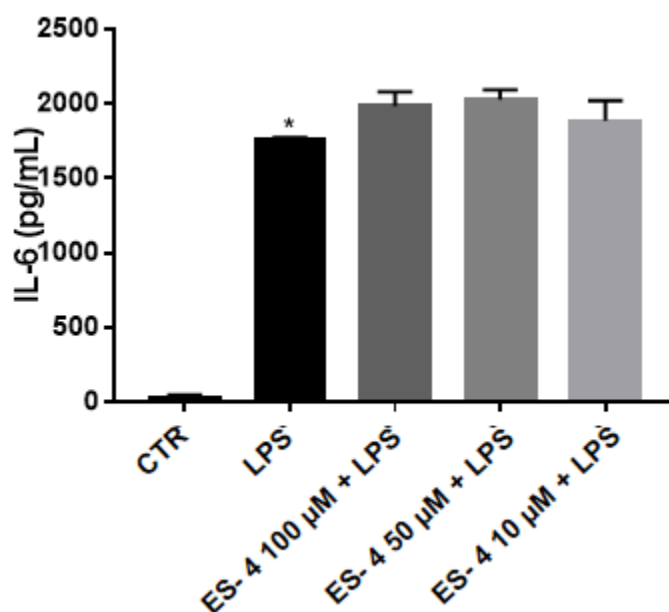
Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-4: quercetina-3-sambubiosídeo.

Gráfico 7 – Efeito de Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de TNF- α .



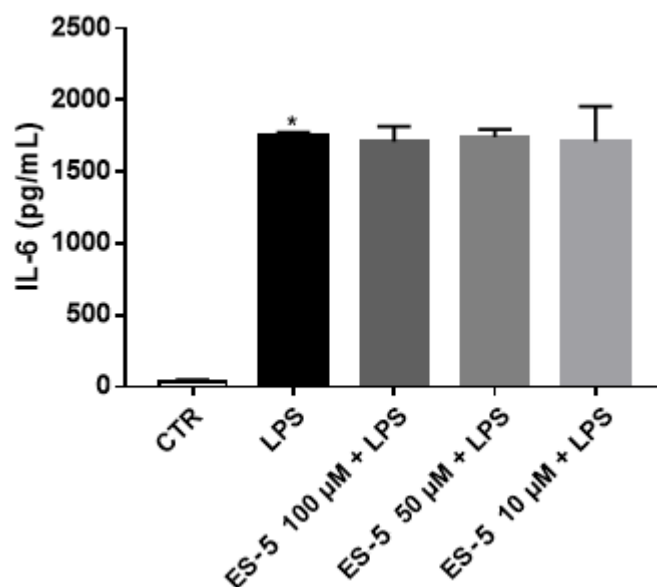
Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-5: canferol-3-sambubiosídeo.

Gráfico 8 – Efeito de Es-4, quercetina-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de IL-6.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-4: quercetina-3-sambubiosídeo.

Gráfico 9 – Efeito de Es-5, canferol-3-sambubiosídeo, sobre os níveis de IL-6.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ e. p. m. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido do pós teste de Turkey, considerando o nível de significância mínimo $p < 0,05$. Os dados foram realizados em triplicata. Sendo, CTR: controle; LPS: lipopolissacarídeo e Es-5: canferol-3-sambubiosídeo.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos estudos fitoquímicos das partes aéreas da espécie *Erythroxylum simonis*, pode-se evidenciar uma alta concentração de compostos fenólicos em seu Extrato Etanólico Bruto. Através da partição deste, foi obtida a fase acetato de etila que por técnicas cromatográficas, resultou no isolamento de seis compostos, os quais puderam ser identificados por meio de métodos espectroscópicos, sendo:

- Três ácidos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido-3-O-cafeoilquínico e ácido-4-O-cafeoilquínico.
- Três flavonoides: quercetina-3-sambubiosídeo, canferol-3-sambubiosídeo e canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo.

Estes compostos estão sendo relatados pela primeira vez para esta espécie, e os flavonóis quercetina-3-sambubiosídeo e canferol-3-sambubiosídeo relatados pela primeira vez no gênero *Erythroxylum*, contribuindo desta forma, para a ampliação dos conhecimentos fitoquímicos deste gênero e da espécie *Erythroxylum simonis*.

Com base nos estudos da atividade imunomoduladora dos flavonóis quercetina-3-sambubiosídeo e canferol-3-sambubiosídeo, pode-se observar que nas concentrações testadas estes metabólitos não interferem nos níveis do óxido nítrico e das citocinas TNF- α e IL-6 produzidas por culturas de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), assim como, não promoveram uma redução da viabilidade celular. Em comparação com estudos realizados com a quercetina, pode-se concluir que a adição da sambubiose na posição 3 deste flavonol promove uma perda de sua ação moduladora sobre o NO, TNF- α e IL-6 produzidos por macrófagos peritoneais.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; GMÜNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders — A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 363-381, 2007.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALAGILLE, D.; BALDWIN, R. M.; ROTH, B. L.; WROBLEWSKI, J. T.; GRAJKOWSKA, E.; TAMAGNAN, G. D. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 945-949, 2005.
- ALBUQUERQUE, C. H. (2013). **Constituintes químicos e atividade farmacológica de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil.(Erythroxylaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João pessoa, 2013.
- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, M. S. Flavonoid glycosides from *Erythroxylum pulchrum* a. st.-hil. (Erythroxylaceae). **Quimica Nova**, v. 37, n.4, p. 663-666, 2014.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 953-959, 1993.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIRÓZ, L. P.; SANT'ANA, A. E. G. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, n. 13, p.1735-1739, 2007.
- BARREIROS, M. L. **Flavonóides e terpenóides de três espécies do gênero *Erythroxylum* e suas atividades biológicas**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, L. C.; TCHAIKOVSKI, O. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Quimica Nova**, v. 24, , n. 6, p. 783-785, 2001.
- BIERI, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J. L.; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 439-447, 2006.
- BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOBODA, A.; WAGNER, A. E.; STACHURSKA, A.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J.; DORING, F; WOLFFRAM, S.; RIMBACH, G. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 293-299, 2011.

BOHM, B. A.; GANDERS, F. R.; PLOWMAN, T. Biosystematics and evolution of cultivated coca (*Erythroxylaceae*). **Systematic Botany**, v. 7, n. 2, p.121-133, 1982.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2, p. 325-337, 2008.

BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by CFP von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, 2013.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRÄGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 66, n. 11, p. 1231-1240, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHÁVEZ, J. P.; DOS SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 941-943, 1996.

CHIN, Y. W.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; MCCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 414-417, 2006.

COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J. G. Erythroxylaceae of Rio Grande do Norte, Brazil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 659-671, 2014.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COLOMBO, R.; BATISTA, A. N. L.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REIMBERG, M. C. H. Validated high-performance liquid chromatographic method for the standardisation of *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, commercial extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 781-788, 2010.

DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. Flowering plants of the neotropics. Princeton University Press, 2004.

DEMİREZER, L. Ö.; GÜRBÜZ, F.; GÜVENALP, Z.; STRÖCH, K.; ZEECK, A. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 30, p. 525-534, 2006.

DENG, S.; DENG, Z.; FAN, Y.; LI, J.; LIU, R.; XIONG, D. Application of high-speed counter-current chromatography coupled with high performance liquid

chromatography for the separation and purification of quercetin-3-O-sambubioside from the leaves of *Nelumbo nucifera*. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 3, n. 4, p. 375-382, 2009.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n.4, p. 337-353, 1999.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA J. W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FERRERES, F.; GOMES, D.; VALENTÃO, P.; GONÇALVES, R.; PIO, R.; CHAGAS, E. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1019-1027, 2009.

FILHO, H. F. L. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **IPEF**, v. 35, p. 41-46, 1987.

FRANCIS, F. J.; MARKAKIS, P. C. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

GIANG, P. M.; HA, T. T.; ANH, N. T. H.; SON, P. T. Contribution to the study on polar constituents from the buds of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. (Myrtaceae), **Journal of Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 749 - 750, 2007.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZALEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: análisis de la información científica. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 284-290, 2005.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PINO-RODRÍGUEZ, S.; GARCÍA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEZ, M. T.; ECHEMENDIA-ARANA, O. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZALEZ, S. Phytochemical screening and in vitro antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farm Bonaerense**, v. 23, n. 4, 2004.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 6, p. 539-542, 2006.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

GULCI, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. İ. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 393-400, 2004.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.38, n. 1, p. 43-49, 2003.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, 2003.

JEONG, C. H.; JEONG, H. R.; CHOI, G. N.; KIM, D. O.; LEE, U. K.; HEO, H. J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, v. 6, p. 25, 2011.

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F.; EMCHE, S. D.; MOSSOBA, M. M.; MUSSER, S. M. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. var. ipadu. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 59-67, 2003.

KHALIL, H. E.; KAMEL, M. S. Phytochemical and biological studies of *Cichorium endivia* L. leaves. **J Pharm Sci Res**, v. 7, n. 8, p. 509-513, 2015.

KIM, H. J.; WOO, E. R.; PARK, H. A novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 581-586, 1994.

KLETTER, C.; GLASL, S.; PRESSER, A.; WERNER, I.; REZNICEK, G.; NARANTUYA, S.; CELLEK, S.; HASLINGER, E.; JURENITSCH, J. Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. **Planta Medica**, v. 70, n. 10, p. 993-1000, 2004.

KUCZKOWIAK, U.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Hydroxycinnamic acid derivatives obtained from a commercial *Crataegus* extract and from authentic *Crataegus* spp. **Scientia Pharmaceutica**, v. 82, p. 835-846, 2014.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 2013.

LEE, I. K., HWANG, B. S., KIM, D. W., KIM, J. Y., WOO, E. E., LEE, Y. J.; CHOI, H. J.; YUN, B. S. Characterization of neuraminidase inhibitors in *Korean papaver rhoeas*

bee pollen contributing to anti-influenza activities in vitro. **Planta Medica**, v. 82, n. 6, p. 524-529, 2016.

LEE, S.; PARK, H. S.; NOTSU, Y.; BAN, H. S.; KIM, Y. P.; ISHIHARA, K.; HIRASAWA, N.; JUNG, S. H.; LEE, Y. S.; LIM, S. S.; PARK, E. H.; SHIN, K. H.; SEYAMA, T.; HONG, J.; OHUCHI, K. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1552-1556, 2008.

LIU, H.; ZHANG, X.; WU, C.; WU, H.; GUO, P.; XU, X. Anti-hyperlipidemic caffeoylquinic acids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p.16-19, 2013.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. D. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. D. Flora of Paraíba, Brazil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 473-487, 2007.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR. V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, D. H. N. **Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart.** Dissertação (Mestrado em Ciencias da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435. 2008.

MENDONÇA, J. D. O.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. O gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 3, 0-0, 1998.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NAKATANI, N.; KAYANO, S. I.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5512-5516, 2000.

NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 401-406, 2012.

OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; BRANCO, M. V. S. C.; LUCENA, H. F. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. D. F.; NASCIMENTO, S. C.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JÚNIOR J. X.; SILVA, M. S. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 155-165, 2011.

OLIVEIRA, S. L.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; SENA-FILHO, J. G.; LUCENA, H. F.; ROMERO, M. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of ^{13}C -NMR spectral data. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 2, p. 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L. D. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos.** Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

OU, C. B.; PANG, Q.; CHEN, X.; HOU, N.; HE, C. Protocatechuic acid, a new active substance against the challenge of avian infectious bursal disease virus. **Poultry Science**, v. 91, n. 7, p. 1604-1609, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia.** Cengage Learning, 2015.

PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 2475-2483, 1976.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, n. 20, v. 4, p. 751-762, 2006.

PLOWMAN, T. Four new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from northeastern Brazil. **Brittonia**, v. 38, n. 3, p. 189-200, 1986.

PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, n. 1, p. 1-53, 2004

PLOWMAN, T.; RIVIER, L. Cocaine and cinnamoylcocaine content of *Erythroxylum* species. **Annals of Botany**, v. 51, n. 5, p. 641-659, 1983.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia.** 7. ed. Elsevier Brasil, 2011.

RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-10, 1998.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RIBEIRO, E. M. D. O.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S.; LOPES, L. M. X.; KRŠKOVÁ, Z.; DUŠEK, J. Ent-labdane and beyerane diterpenes from *Erythroxylum betulaceum* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 90-92, 2013.

RIBEIRO E. M. D. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; DO VALE, A. E.; LOPES, L. M.; DAVID, J. P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, v. 2, p. 232-235, 2013.

SANTANGELO, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESÌ, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali-Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; BRAZ FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1304-1308, 2006.

SANTOS, K. C.; MONTE, A. P. O.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A.; JUNIOR, R. P. Role of NO–cGMP pathway in ovine cervical relaxation induced by *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 23-30, 2016.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, v. 71, p. S48-S57, 2000.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, s. 8, 2073S-2085S, 2000.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIQUEIRA, C. F. Q. **Teores de taninos e flavonóides em plantas medicinais da caatinga: avaliando estratégias de bioprospecção**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. LTC, 2000.

SYED, S. H.; NAMDEO, A. G. Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. on paracetamol induced toxicity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 877-881, 2013.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.

TIMBERLAKE, C. F.; HENRY, B. S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**, v. 10, n. 1, p. 31-36, 1986.

TORRE, J. C. P.; SCHMIDT, G. W.; PAETZ, C.; REICHELT, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J. C. The biosynthesis of hydroxycinnamoyl quinate esters and their role in the storage of cocaine in *Erythroxylum coca*. **Phytochemistry**, v. 91, p. 177-186, 2013.

VEIGA JR. V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WAN, C.; LI, S.; LIU, L.; CHEN, C.; FAN, S. Caffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L. **Plants**, v. 6, n. 1, p. 10, 2017.

WANG, T. Y.; LI, Q.; BI, K. S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

WEI, Y.; SARDAR, M. R.; SUTHERLAND, I. A.; FISHER, D. Separation of delphinidin-3-O-sambubioside, cyanidin-3-O-sambubioside and *p*-coumaric acid from cranberry by CCC followed by prep-HPLC using robotic CCC solvent system selection. **Chromatographia**, v. 74, p. 367-373, 2011.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. Q.; HOSTETTMANN, K. Methylpyrrole Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1153-1158, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 8, p. 819-825, 2001.