

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nathalia dos Santos Rezende

**Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Cecropia pachystachya* Trecúl
(URTICACEAE)**

Juiz de Fora
2019

Nathalia dos Santos Rezende

**Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Cecropia pachystachya* Trecúl
(URTICACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Dra. Elita Scio Fontes

Coorientadora: Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rezende, Nathalia dos Santos.

Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Cecropia pachystachya* Trecúl (URTICACEAE) / Nathalia dos Santos Rezende. -- 2019.

105 p.

Orientadora: Elita Scio Fontes

Coorientadora: Juliana de Carvalho da Costa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. produtos naturais. 2. antioxidante. 3. antiglicante. 4. espectrometria de massa. I. Fontes, Elita Scio, orient. II. Costa, Juliana de Carvalho da, coorient. III. Título.

Nathalia dos Santos Rezende

**Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Cecropia pachystachya* Trecúl
(URTICACEAE)**

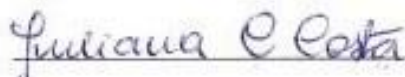
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Aprovada em 26 de julho de 2019.

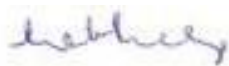
BANCA EXAMINADORA



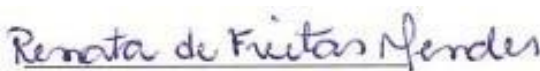
Dra. Elita Scio Fontes - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Juliana de Carvalho da Costa - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Luciana Moreira Chedier
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Renata de Freitas Mendes

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus pelo dom da vida e por me conceder saúde, fé e força na minha caminhada.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e à Faculdade de Farmácia pelo seu empenho e por proporcionar essa oportunidade, e também às agências de fomento FAPEMIG, CNPq, em especial CAPES pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Dra. Elita Scio Fontes, por me receber no grupo abrindo portas para esse novo aprendizado e por todo apoio científico e profissional.

À minha coorientadora Dra. Juliana de Carvalho da Costa por toda sua solicitude e paciência em ensinar, ajudar sem medir esforços e agregar conhecimento.

A toda minha família, especialmente meus pais José Alair e Raquel e minha irmã Lizandra, por serem a minha base e por sempre acreditarem em mim. A minha anjinha de quatro patas, Dilinha por ter alegrado a vida. Aos meus tios, tias, primas, primos que torcem por mim e a meu querido avô Carlos, sempre demonstrando seu imenso orgulho pelos netos.

Ao meu namorado João Victor, pelo incentivo, companheirismo e parceria de todos os dias e momentos, mesmo que longe.

A todos do LPNB pela cooperação e pelos ótimos momentos de distração. Aqui não poderia deixar de enfatizar o agradecimento a Mariana e Ari, pelos risos, o companheirismo de trabalho e por deixar mais leves as obrigações e dificuldades. À MSc.. Jéssica, por toda ajuda no trabalho e na rotina do dia a dia, sempre disposta a compartilhar o conhecimento. Ao técnico Delfino, pela dedicação em colaborar em nossos experimentos e “nossos” laboratórios.

A todos demais amigos e colaboradores que contribuem de certa forma, para que esse trabalho enriqueça e prospere.

Meu muito obrigado!

RESUMO

A espécie *Cecropia pachystachya* Trécul pertence ao gênero *Cecropia* Loebl, conhecida no Brasil como embaúba, apresenta ampla distribuição, estendendo-se do sul ao norte do país. A espécie é utilizada popularmente como antitussígeno, antiasmático, diurético, hipoglicemiante, anti-inflamatório e cardiotônico. No presente trabalho, *C. pachystachya* foi avaliada com relação ao seu potencial antioxidante e antiglicante, uma vez que o acúmulo de espécies reativas (ER) e os produtos finais de glicação avançada (AGEs) estão associados ao envelhecimento cutâneo, doenças crônicas e neurodegenerativas. Elevadas concentrações de ER provocam o estresse oxidativo. Já os AGEs, são responsáveis por formar ligações entre açúcares redutores ou derivados com proteínas, aminoácidos ou lipídeos, gerando moléculas capazes de modificar irreversivelmente estruturas biológicas. Além disso, o presente estudo teve como objetivo identificar e isolar os principais constituintes do extrato hidroetanólico (EBHE) das folhas de *C. pachystachya*. Assim, o EBHE foi particionado obtendo-se a partição hexânica (PHEX), em acetato de etila (PACT), hidrometanólica (PHM) e dois precipitados (ppt¹HM e ppt²ACT). O perfil químico das amostras foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de absorção em ultravioleta (CLAE-UV-DAD) e espectrometria de massas (MS). O doseamento de fenólicos e flavonoides foi realizado, bem como a atividade antioxidante foi mensurada por diferentes metodologias: sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, redução do molibdênio, descoramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, poder de redução do ferro e inibição da produção de óxido nítrico. O potencial antiglicante foi avaliado pelo teste de glicação com os açúcares frutose e glicose. Por fim, avaliou-se a viabilidade celular frente às linhagens celulares HaCat e L929. Com relação aos resultados, verificou-se a presença de substâncias fenólicas nas amostras, com exceção da PHEX. Ácido clorogênico, ácido quínico, cinchona, isorientina, orientina, rutina, vitexina/isovitexina e procinidinas (B2, B3 e B5) foram encontradas no extrato. Por cromatografia em coluna Sephadex LH-20 da PACT obteve-se 12 frações (F1 a F12), posteriormente por CLAE-UV-DAD semi preparativa duas substâncias foram isoladas, das frações F6 e F7, sendo possivelmente isorientina e orientina. Com exceção da PHEX, as amostras demonstram significativo potencial antioxidante e antiglicante, de forma semelhante entre elas. As atividades podem ser correlacionadas aos constituintes fenólicos presentes na espécie. EBHE não apresentou citotoxicidade frente as linhagens celulares L929 e HaCat.

Palavras-chave: produtos naturais, antioxidante, antiglicante, espectrometria de massa

ABSTRACT

The species *Cecropia pachystachya* Trecú belongs to the genus *Cecropia* Loebl, known as *embaúba* in Brazil and presents a wide distribution, extending from the south to the north of the country. The species is popularly used as antitussive, antiasmatic, diuretic, hypoglycemic, anti-inflammatory and cardiogenic. In the present work *C. pachystachya* will be evaluated in relation to its antioxidant and antiglycation potential, since the accumulation of reactive species (ER) and advanced glycation end products (AGEs) are associated with skin aging, chronic and neurodegenerative diseases. High ER concentrations cause oxidative stress. AGEs are responsible for forming bonds between reducing sugars or derivatives and proteins, amino acids or lipids, generating molecules that are capable of irreversibly modifying the most diverse biological structures. In addition, the present study aimed to identify the main constituents of the hydroethanolic extract (EBHE) of the leaves *C. pachystachya*. Thus, the EBHE was partitioned to obtain hexane partition (PHEX), ethyl acetate partition (PACT), hydromethanolic partition (PHM) and two precipitates (ppt¹HM and ppt²ACT). The chemical profile of the samples was obtained by high performance liquid chromatography with ultraviolet absorption detector (performed, as well as the antioxidant activity measured by different methodologies: sequestration of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical, reduction of molybdenum, discoloration by the β -carotene / linoleic acid system, reduction of iron and inhibition of nitric oxide production. The antiglycation potential was evaluated by the glycation test with BSA fructose and glucose sugars. Finally, cell viability was evaluated against HaCat and L929 cell lines. Regarding the results, it was verified the presence of phenolic substances by HPLC-UV, with the exception of PHEX. Chlorogenic acid, quinic acid, cinchona, isorientin, orientin, rutin, vitexin / isovitexin and procinidines (B2, B3 and B5) were found in the extract. By column chromatography Sephadex LH-20 PACTO obtained 12 fractions (F1 to F12), later by HPLC-UV-DAD semi preparative for the phases were isolated from fractions F6 and F7, possibly isorientin and orientin. With the exception of PHEX, the samples demonstrate a significant antioxidant and antiglycation potential, similarly between them. The activities can be correlated to the phenolic constituents present in the species. EBHE showed no cytotoxicity against L929 and HaCat cell lines.

Keywords: natural products, antioxidant. antiglycation, mass spectrometric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema simplificado da formação de metabólitos especiais (secundários) envolvendo os precursores e as vias biossintéticas.....	18
Figura 2 -	Distribuição geográfica da espécie <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl no território brasileiro.....	20
Figura 3 -	Folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl.....	21
Figura 4 -	Rotas de formação e produtos finais de glicação avançada.....	28
Figura 5 -	Fluxograma da obtenção do extrato bruto hidroetanólico de folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul pela extração do material vegetal e obtenção de partições e precipitados pelo particionamento do extrato hidroetanólico.....	33
Figura 6 -	Fluxograma da obtenção do extrato bruto hidroetanólico, partições e precipitados com suas respectivas massas.....	43
Figura 7 -	Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	45
Figura 8 -	Perfil cromatográfico da partição em acetato de etila, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
Figura 9 -	Perfil cromatográfico da partição hidrometanólica, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
Figura 10 -	Perfil cromatográfico do precipitado em metanol, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos cromatografia líquida de alta eficiência.....	47
Figura 11 -	Perfil cromatográfico do precipitado em acetato de etila, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	47
Figura 12 -	Eluição dos padrões isoorientina e orientina, espectro de absorção UV do sinal e tempo de retenção em cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
Figura 13 -	Eluição do extrato bruto hidroetanólico e coeluição do extrato bruto hidroetanólico com rutina, espectro de absorção UV do sinal e tempo de retenção por cromatografia líquida de alta eficiência.....	49
Figura 14 -	Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico de folhas da <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência	

	acoplado a espectrômetro de massas em modo negativo (A) e positivo (B)	50
Figura 15 -	Íon molecular do ácido quínico e espectro obtido por espectrometria de massa em modo negativo da substância #1.....	53
Figura 16 -	Sugestão da fragmentação do ácido clorogênico e espectro obtido por espectrometria de massa em modo negativo da substância #2.....	55
Figura 17 -	Íon molecular da procianidina B2 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #3.....	55
Figura 18 -	Íon molecular das procianidina B3 e B5 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo das substâncias #4 e #5 respectivamente.....	56
Figura 19-	Sugestão da fragmentação da procianidina C1 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #6.....	57
Figura 20 -	Íon molecular da catequina e epicatequina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #7.....	58
Figura 21 -	Íon molecular da cinchona Ia e chinchona Ib e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #9.....	59
Figura 22 -	Íon molecular da orientina e isoorientina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo das substâncias #11 e #13.....	60
Figura 23 -	Íon molecular da vitexina e isovitexina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #15.....	61
Figura 24 -	Sugestão da fragmentação da rutina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #16.....	62
Figura 25 -	Etapas da eluição da partição em acetato de etila do extrato hidroetanólico de folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul durante o processo de fracionamento em coluna cromatográfica em gel Sephadex LH-20.....	64
Figura 26 -	Fluoxograma da obtenção das frações e isolados o com suas respectivas massas.....	65
Figura 27 -	Perfis cromatográficos das frações F6 e F7, respectivamente, obtidas pelo fracionamento da partição em acetato de etila em coluna cromatográfica de gel Sephadex LH-20.....	66
Figura 28 -	Atividade antioxidante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul obtida pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.....	69

Figura 29 - Atividade antioxidante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico.....	70
Figura 30 - Atividade antioxidante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl obtida pelo método do poder de redução do ferro.....	71
Figura 31 - Atividade antioxidante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl obtida pelo método de inibição da produção de óxido nítrico.....	72
Figura 32 - Atividade antiglicante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl obtida pelo método de glicação BSA:frutose (A) e BSA:glicose (B)	75
Figura 33 - Viabilidade celular das linhagens HaCat e L929 tratadas com extrato bruto hidroetanólico das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl e com DMSO 5% pelo método do MTT.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições cromatográficas utilizadas nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroetanólico, partições e precipitados.....	35
Tabela 2 -	Condições cromatográficas utilizadas na análise de cromatografia líquida de ultra eficiência do extrato bruto hidroetanólico.....	36
Tabela 3 -	Condições cromatográficas utilizadas no isolamento de substâncias das frações F6 e F7 por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa.....	37
Tabela 4 -	Resultados de teores de fenóis e de flavonoides do extrato bruto, partições e precipitados.....	44
Tabela 5 -	Resultado da quantificação da rutina no extrato bruto hidroetanólico.....	49
Tabela 6 -	Tempo de retenção, relação massa/carga, fórmula molecular, fragmentos e classe metabólica apresentados pelas substâncias presentes no extrato bruto hidroetanólico de folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul após análise de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas em modo negativo.....	52
Tabela 7 -	Substâncias, suas atividades biológicas estudadas para <i>Cecropia pachystachya</i> , tipo de extrato encontradas e referências.....	63
Tabela 8 -	Atividade antioxidante das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> pelo método do sequestro do radical livre DPPH.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µl	Microlitros
µg	Microgramas
AA	Ácido Ascórbico
a.C	Antes de Cristo
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
cm	Centímetros
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila
EAT	Equivalente à Ácido Tânico
EBHE	Extrato Bruto Hidroetanólico
e.p.m	Erro Padrão da Média
EQ	Equivalente à Quercetina
ER	Espécies Reativas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
Et	Etanol
Fe ²⁺	Ferro

FRAP	Poder de Redução do Ferro
g	Gramas
g/L	Gramas/litro
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
kg	Quilogramas
MeOH	Metanol
min	Minutos
µL	Microlitros
mg	Miligramas
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NP/PEG	Ácido difenilbórico β-etilanimóéster /Polietilenoglicol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACT	Partição em Acetato de Etila
PHEX	Partição Hexânica
PHM	Partição Hidrometanólica
ppt	Precipitado
ppt ¹ HM	Precipitado Hidrometanólico
ppt ² ACT	Precipitado em Acetato de Etila
rpm	Rotações por minutos
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
UFLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	PRODUTOS NATURAIS.....	15
2.1.1	Metabólitos especiais.....	17
2.2	GÊNERO <i>Cecropia</i>	19
2.2.1	<i>Cecropia pachystachya</i> Trecúl.....	20
2.3	ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
2.4	PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs).....	26
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	32
4.2	PREPARO DO EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES.....	32
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	33
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES.....	34
4.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	34
4.5.1	Cromatografia de camada delgada.....	34
4.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	34
4.5.3	Quantificação por CLAE.....	35
4.5.4	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas.....	35
4.5.5	Cromatografia em coluna por permeação em gel.....	36
4.5.6	Isolamento de substâncias por CLAE semi-preparativa.....	37

4.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	37
4.6.1	Atividade antioxidante	37
4.6.1.1	<i>Método do sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i>	37
4.6.1.2	<i>Modelo de redução do complexo fosfomolibdênio</i>	38
4.6.1.3	<i>Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico</i>	38
4.6.1.4	<i>Poder de redução do Fe^{3+} (FRAP)</i>	39
4.6.1.5	<i>Inibição da produção de óxido nítrico</i>	40
4.6.2	Atividade antiglicante	40
4.7	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	41
4.7.1	Cultura das linhagens celulares	41
4.7.2	Ensaio da viabilidade celular	42
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	RENDIMENTOS DAS AMOSTRAS	43
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	44
5.2.1	Teores fenólicos e flavonoides	44
5.2.2	Identificação de substâncias por CLAE-UV	45
5.2.3	Quantificação por CLAE	49
5.2.4	Identificação de substâncias por UFLC-MS/MS	50
5.2.5	Isolamento de substâncias por CLAE-UV semi-preparativa	64
5.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VIVO</i>	66
5.3.1	Atividade antioxidante	66
5.3.1.1	<i>Método do sequestro de radicais livres (DPPH)</i>	67
5.3.1.2	<i>Redução do complexo fosfomolibdênio</i>	68

5.3.1.3	<i>Método β-caroteno/ácido linoleico.....</i>	69
5.3.1.4	<i>Poder de redução do ferro (FRAP).....</i>	71
5.3.1.5	<i>Inibição da produção de Óxido Nítrico (NO).....</i>	72
5.3.2	Atividade antigicante.....	74
5.4	VIABILIDADE CELULAR.....	77
6	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE	
	ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais (PNs) têm sido por milênios uma fonte infinita de medicamentos e muitos daqueles que são atualmente descritos e úteis na terapêutica foram desenvolvidos a partir de espécies vegetais (MENDONÇA et al., 2016). Das novas moléculas químicas registradas nos últimos 30 anos, estima-se que cerca de 27% derivam direta ou indiretamente de PNs (PIMENTEL et al., 2015). Especificamente, de 2008 a 2013 um total de 25 novos fármacos, consideradas PNs ou derivados, foram aprovadas (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). Além disso, segundo estimativas, de todos os medicamentos usualmente prescritos, 20% são originados de PNs (UCHÔA et al., 2010).

O advento da química dos PNs, principalmente a combinação da utilização de técnicas hifenadas e de ferramentas de biologia molecular permitiu obter um amplo conhecimento sobre o metabolismo secundário vegetal e sobre as substâncias bioativas, tornando os PNs excelente fonte para a descoberta de novos candidatos a medicamentos (AMIRKIA; HEINRICH, 2015; BERLINCK et al., 2017).

A fim de garantir a eficácia e segurança terapêutica dos PNs, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera fundamental a realização de estudos experimentais de validação acerca das plantas e de suas substâncias bioativas utilizadas para fins medicinais (BRASIL, 2016).

Produtos finais de glicação avançada (AGEs) (do inglês, *Advanced Glycation End Products*) são formados por reações entre açúcares redutores ou seus derivados e proteínas, aminoácidos ou lipídios (VERMA; MANNA, 2017). O acúmulo de AGEs pode causar modificações estruturais e funcionais em proteínas teciduais provocando danos irreversíveis, e como consequências fisiopatológicas pode ser citado uma série de doenças crônicas e neurodegenerativas, principalmente relacionadas ao envelhecimento, como: inflamação, artrite reumatoide, aterosclerose, câncer, diabetes e nefropatia diabética, neuropatias, Mal de Alzheimer, distúrbios respiratórios e hepáticos (ASADI et al., 2011; VERMA; MANNA, 2017).

Quanto ao estresse oxidativo, o mesmo ocorre devido quantidades excessivas de espécies reativas (ERs) que podem sobrecarregar as defesas antioxidantes naturais e promover danos ao DNA, lipídios e proteínas e, consequentemente levar a lesão e morte celular. O estresse oxidativo a longo prazo também está associado a inúmeras doenças e distúrbios, principalmente crônicos, como: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, inflamatórias e

neurodegenerativas (LUSHCHAK, 2014; PEREZ GUTIERREZ; FLORES COTERA; NEIRA GONZALEZ, 2012).

O processo de glicação está associado ao dano oxidativo, pois o acúmulo de AGE pode induzir o estresse oxidativo e vice e versa (TORRES et al., 2018). Devido essa correlação, estudos recentes têm sido focados nos benefícios de novos produtos que apresentam propriedades antiglicantes e antioxidantes, principalmente na prevenção de danos causados na pele, uma vez que ambos processos estão relacionados a sintomas do envelhecimento cutâneo, como aumento de rugas e perda de elasticidade (ASADI et al., 2011; LEE et al., 2017).

No intuito de estudar os PNs e engrandecer o conhecimento da área, o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), atua na pesquisa de diferentes extratos vegetais e derivados, buscando investigar atividades biológicas relevantes, caracterização química dessas amostras, prospecção de novas moléculas e obtenção de produtos finais acabados (fitoterápicos e fitocosméticos).

Dada a importância dos efeitos fisiológicos e patológicos decorrentes do estresse oxidativo e do acúmulo de AGES, este trabalho traz uma abordagem avaliativa do potencial antioxidante e antiglicante de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae), além da caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico. Objetiva-se contribuir cientificamente com os estudos já descritos da espécie e dar continuidade ao estudo realizado por FERNANDES et al. (2019), em que o extrato hidroetanólico apresentou potencial para ser utilizado em formulações dermocosméticas que buscam minimizar o processo de envelhecimento cutâneo e manter a integridade da pele.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

Segundo Pye et al. (2017), os PNs podem ser amplamente definidos como: “Conjunto de pequenas moléculas derivadas do ambiente que não envolvidos no metabolismo primário. Esses compostos são principalmente codificados geneticamente e produzidos por vias metabólicas secundárias”. E no que diz respeito aos PNs estão incluídas moléculas obtidas a partir de plantas medicinais, derivados e preparações destas.

Apesar dos notórios avanços na medicina moderna, a OMS estima que aproximadamente 80% da população, particularmente de países em desenvolvimento, utilizam práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde e 85% fazem uso de plantas ou preparações medicinais (ALVES et al., 2014; BRASIL, 2006). Dessa forma, o conhecimento e desenvolvimento de PNs é uma área de grande interesse para comunidades científicas, médicas e comerciais em todo mundo (AMIRKIA; HEINRICH, 2015).

Historicamente, a maioria das preparações medicinais com fins terapêuticos utilizadas pelos seres humanos tinham origem de PNs derivados de plantas e animais (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). A inter-relação e coevolução, ocorrida durante milênios até tempos atuais, entre populações nativas de todo mundo e o suprimento das suas necessidades medicinais, além de alimentícias, industriais, e mesmo ritualísticas através da natureza, contribuíram para o conhecimento e os diversos usos das plantas (ALVES et al., 2014).

Os primeiros registros descritos com usos de plantas medicinais datam de 600 a.C na Mesopotâmia e relatam cerca de 1000 substâncias derivadas de plantas. Na medicina egípcia de 2900 a.C, o registro mais importante é o "*Papiro Ebers*" de cerca de 1550 a.C, contendo mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal. Apenas no século XVIII, iniciou-se as bases racionais para a investigação clínica do uso de plantas, que até então eram usadas de forma empírica, sem conhecimento prévio sobre as atividades farmacológicas ou seus constituintes químicos (ATANASOV et al., 2015).

Anton Von Störck investigou plantas como *Aconito* e *Colchicum* e, William Withering estudou *Digitalis* para o tratamento de edema (ATANASOV et al., 2015). No século XIX, Friedrich Sertürner isolou do ópio a "*Morphium*" (morfina), tendo realizado e publicado estudos sobre o seu isolamento, cristalização, estrutura e propriedades farmacológicas. A partir daí outras plantas medicinais foram também estudadas e substâncias bioativas puderam então

ser isoladas de suas fontes naturais. Mais tarde, a fim de minimizar custos e facilitar a produção, as substâncias derivadas de PN começaram a ser produzidas por meio de síntese química, sendo o ácido salicílico a primeira a ser sintetizada em 1853 (ATANASOV et al., 2015; PATRIDGE et al., 2016).

No decorrer dos anos, a evolução e o aumento da eficiência e qualidade das técnicas analíticas, além do desenvolvimento de melhores instrumentações, como exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de RMN, espectrometria de massas e modelagem computacional, induziram a um considerável aumento no processo de caracterização de estruturas e isolamento de substâncias derivadas de PNs (PYE et al., 2017).

Em relação às vantagens atribuídas aos PNs, devido sua diversidade e complexidade estereoquímica desenvolvidas durante a biossíntese metabólica, eles apresentam alto número de centros quirais e de grupos farmacofóricos, que frequentemente possuem alta afinidade de ligação com proteínas específicas (ATANASOV et al., 2015; BERLINCK et al., 2017). Outro fato é que PNs podem ser substratos para um ou mais sistemas de transportadores e atingem o meio intracelular facilmente (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Por essas características, PNs podem apresentar vantagens sobre os produtos sintéticos e ainda serem considerados como potenciais modelos de fármacos. Cerca de 80% de quase 160.000 substâncias de origem natural, que já foram catalogados no *Dictionary of Natural Products*, possuem características físico-químicas favoráveis para se tornarem fármacos (BERLINCK et al., 2017).

Devido ao processo de síntese ser também dispendioso, pois muitas moléculas não avançam para as etapas clínicas e/ou pré-clínicas, as indústrias farmacêuticas passaram a investir mais intensamente em métodos de pesquisa de substâncias bioativas com efetiva ação terapêutica. Assim, os PNs vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, como fonte para novos medicamentos (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Além disso, o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano (MARTINAZZO et al., 2013).

As fontes para estudos de PNs ainda são inúmeras, acredita-se que apenas 6% de aproximadamente 300.000 espécies (algumas estimativas chegam a 500.000 espécies) de plantas foram investigadas farmacologicamente, e 15% fitoquimicamente (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), o Brasil é o país que apresenta maior parcela de biodiversidade biológica, ocupando cerca de 15 a 20% do total mundial. As plantas são constituintes dessa biodiversidade, utilizadas como matéria-prima e substrato para a obtenção

de medicamentos e na prática da medicina tradicional. O processo de utilização de PNs no território brasileiro foi resultado de vários fatores históricos, culturais e étnicos, trazidos pelos colonizadores europeus, tribos indígenas e africanos.

Apesar de toda diversidade, apenas 8% das 60.000 espécies vegetais superiores, que estão catalogadas, foram estudadas para pesquisas de biocompostos e 1.100 espécies avaliadas quanto suas propriedades medicinais. Nesse contexto, se faz necessário o fortalecimento de pesquisas científicas envolvendo espécies vegetais no âmbito nacional (BRASIL, 2006).

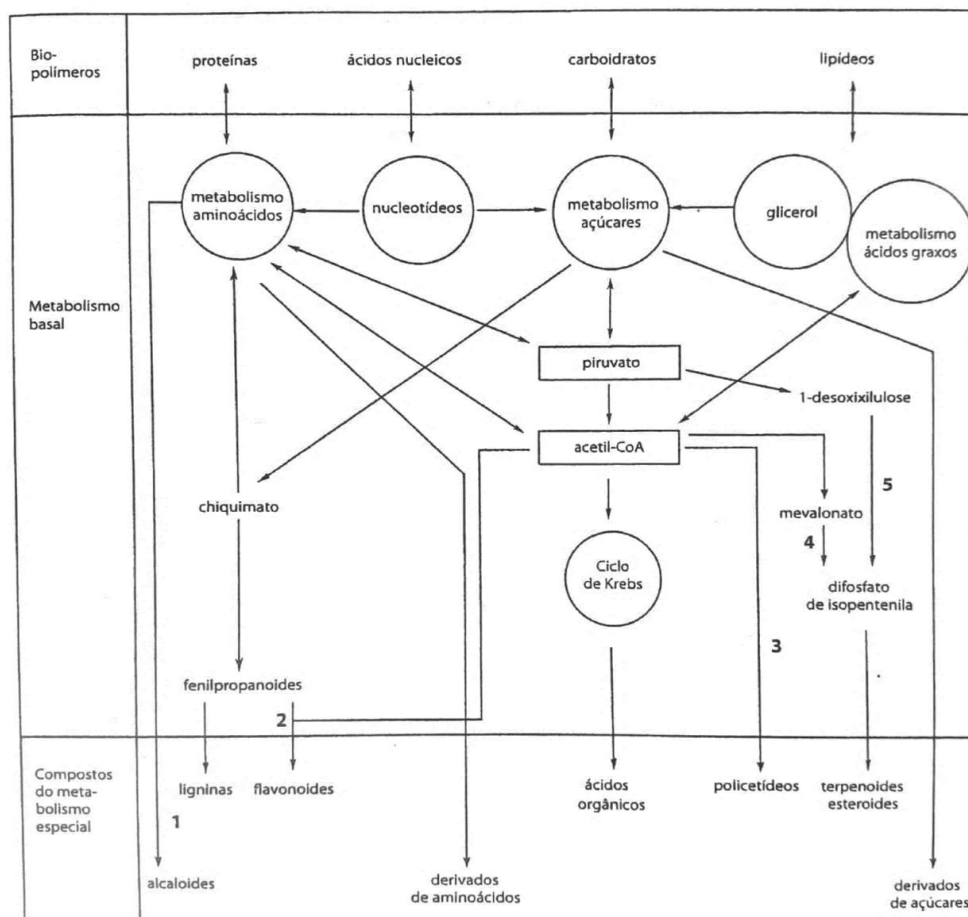
Dentre as diversas espécies já estudadas, *Cecropia pachystachya* é relatada nesse estudo e em outros diferentes estudos científicos publicados, que buscam identificar e elucidar seus principais metabólitos especiais derivados de partes da planta, bem como avaliar atividades biológicas para potencial uso terapêutico.

2.1.1 Metabólitos especiais

Segundo Ramakrishna; Ravishankar (2011), os metabólitos especiais ou também chamados de metabólitos secundários das plantas são substâncias fitoquímicas importantes para interação da planta com o ambiente e sua produção é induzida em condições de estresse, incluindo alta e baixa temperatura, seca, alcalinidade e salinidade do solo, radiação UV, infecção por patógenos e por particularidades da espécie. O estágio fisiológico e o desenvolvimento da planta são fatores de dependência dessa produção (NCUBE; VAN STADEN, 2015).

A variedade dos metabólitos especiais é sintetizada indiretamente a partir de metabólitos primários, por exemplo, hidratos de carbono, lípidios e aminoácidos, onde é produzida a glicose pela fotossíntese. A glicose por sua vez, dá origem ao ácido chiquímico e a acetil coenzima A, que através de reações e vias específicas dão origem aos mais diversos metabólitos especiais, como os terpenos, fenólicos (ligninas, flavonoides, cumarinas e taninos) e os substâncias nitrogenadas (alcaloides e glicosídeos cianogênicos) (NCUBE; VAN STADEN, 2015; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1: Esquema simplificado da formação de metabólitos secundários envolvendo os precursores e rotas biossintéticas.



1: via dos aminoácidos; 2: via do chiquimato; 3: via dos policetídeos; 4: via do ácido mevalônico e 5: via do metileritritol fosfato (MEP).

Fonte: SIMÕES et al. (2017).

Além de desempenhar papéis nas interações planta-ambiente, como proteção contra patógenos; proteção contra estresses abióticos, como a radiação; atrativos para polinizadores e moléculas sinalizadoras, esses metabólitos especiais constituem uma classe de fitoquímicos que exibem imensa diversidade química. São utilizados como agentes aromatizantes, fragrâncias, inseticidas, corantes e fármacos, despertando grande interesse por suas diferentes atividades biológicas exercidas (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015).

As propriedades terapêuticas observadas no gênero *Cecropia* têm sido correlacionadas com a presença dos metabólitos secundários: terpenos, esteroides, proantocianidinas, flavonoides, ácido clorogênico e ácido cafeico, dentre outros fenólicos já identificados e relatados (BRANGO-VANEGAS et al., 2014; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017).

2.2 GÊNERO *Cecropia*

O gênero *Cecropia* Loebl. possui cerca de 70 espécies distribuídas nas floresta tropical e subtropical do México até a América Central e do Sul (MATHIAS; OLIVEIRA, 2018; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017). Descrito por Pedro Loebling em 1758, e inicialmente incluído como parte da família Moraceae, *Cecropia* foi incluída em uma nova família nos anos 70, a Cecropiaceae. Porém, posteriores estudos taxonômicos, morfológicos e filogenéticos classificaram-na na família Urticaceae (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

Este gênero é constituído por árvores dioicas que geralmente medem de 5 a 15 metros de altura e apresentam crescimento rápido e ciclo de vida curto (25 a 50 anos). Possuem grande produção de sementes, galhos em forma de candelabro, inflorescências carnudas, folhas dispostas em espiral e divididas em 8 lóbulos com a parte inferior acinzentada e tronco oco de madeira enfraquecida (AGUIAR; GAGLIOTI, 2019; JOSÉ-CHAGAS et al., 2014; ALMEIDA et al., 2016).

Popularmente são conhecidas no Brasil por embaúba, umbaúba, imbaúba, e embaúva, denominações que podem ter variações conforme a coloração das inflorescências, como por exemplo, embaúba vermelha (*C. glaziovii*), embaúba branca (*C. palmata*) e embaúba prateada (*C. pachystachya*). Em outros países da América Latina são conhecidas *guarumbo*, *yarumo*, *torém*, *ambaí*, e na língua inglesa, são descritas principalmente como *ambay* e *trump-tree* (BRANGO-VANEGAS et al., 2014; COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017). As espécies de *Cecropia* têm importância ecológica, uma vez que são consideradas pioneiras típicas de áreas desmatadas e atuam como espécies invasoras em regiões não nativas (ALMEIDA et al., 2016; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017).

No território brasileiro são encontradas 26 espécies de embaúbas, com ocorrências confirmadas desde o litoral do Nordeste, passando pela região Sudeste e Centro-Oeste, chegando até Santa Catarina, tanto em áreas de influência dos cerrados quanto de florestas variadas e formação do complexo atlântico (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; JOSÉ-CHAGAS et al., 2014).

De modo geral, a importância biológica da *Cecropia* está associada ao seu amplo uso na medicina tradicional, sendo utilizado como analgésico, hipoglicemiante, antimicrobiano, diurético, antioxidante, antitussígeno e expectorante, tratamento de asma, hipertensão, diabetes, inflamação e distúrbios do sistema nervoso central (ansiedade e depressão), além do uso para

cicatrização de feridas (DUQUE et al., 2016; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017). As espécies também são popularmente usadas para tratar febre, principalmente na região amazônica do território brasileiro (UCHÔA et al., 2010). O fato de apresentar comportamento pioneiro, devido ao rápido crescimento e fácil dispersão de sementes, também contribui para o uso das plantas desse gênero (MATHIAS; OLIVEIRA, 2018).

As espécies *C. glaziovii*, *C. pachystachya* são as mais estudadas no gênero, em relação às propriedades biológicas e composição química de seus extratos (ALMEIDA et al., 2016). Como dito, a espécie estudada neste trabalho foi a *C. pachystachya*.

2.2.1 *Cecropia pachystachya* Trecúl

C. pachystachya possui como sinônimo *C. adenopus* Mart, *C. lyratiloba* Miq e *C. catarinensis* Trec e é conhecida popularmente como árvore-da-preguiça, embaubeira, pau-de-lixa e embaúba prateada. A espécie *C. pachystachya* distribui-se do México até a Argentina. No território brasileiro não é endêmica, mas tem ocorrência abundante e confirmada, principalmente às margens de florestas nativas ou em recomposição. Pode ser encontrada em todas as regiões nacionais: norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, com exceção dos seguintes estados: Acre, Amapá, Rondônia e Roraima (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017; GAGLIOTI; AGUIAR, 2019) (Figura 2).

Figura 2: Distribuição geográfica da espécie *Cecropia pachystachya* Trecúl no território brasileiro.



Fonte: GAGLIOTI; AGUIAR. (2019)

As árvores podem atingir cerca de 10 metros de altura, possuem folhas grandes e largas, normalmente de coloração verde-escura na parte superior e cinza prateado na parte inferior. A inflorescência ocorre entre os meses de agosto a fevereiro, com maior intensidade em dezembro (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005) (Figura 3).

Figura 3: Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul.



Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina / Autor: CHAVES, M. (2012)

Estudos etnofarmacológicos revelam que o chá das folhas e cascas desta planta são popularmente usadas como agente antitussígeno, expectorante, antiasmático (GAZAL et al., 2014), diurético, anti-hipertensivo (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011), hipoglicemiante (ARAGÃO et al., 2013) e anti-inflamatório (PACHECO et al., 2014a), além do uso em doenças renais e analgesia para dor renal (MAQUIAVELI et al., 2014) e também como cardiotônico (CONSOLINI et al., 2006).

O extrato aquoso das folhas de *C. pachystachya* foi incorporado junto à Farmacopeia Nacional da Argentina (VI edição. 1978), na dosagem de três xícaras (200 mL cada) por dia. É recomendado o uso medicinal em uma decocção de 5% (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017).

A fim de justificar o uso tradicional da espécie, algumas atividades biológicas já foram comprovadas por estudos farmacológicos realizados com diferentes extratos e algumas dessas atividades foram correlacionadas com a presença de determinadas substâncias encontradas nos estudos de caracterização química. A seguir, um breve compilado desses estudos relatados sobre a espécie *C. pachystachya*.

A atividade anti-inflamatória do extrato hexânico das folhas apresentou-se significativa em um ensaio *in vivo*, sendo que o estudo atribuiu tal atividade ao β -sitosterol isolado (HIKAWCZUK et al., 1998). Em outro estudo, o ácido pomólico foi isolado do extrato de diclorometano das folhas e também exibiu capacidade de limitar a resposta inflamatória *in vivo*, reduzir a produção de IL-1b e inibir a viabilidade de neutrófilos por apoptose. Neste trabalho foi relatado que transfitol, α -amirina e o ácido ursólico, identificados nesse extrato, exibiram efeitos anti-inflamatórios (SCHINELLA et al., 2008).

O extrato aquoso das folhas apresentou atividade hipotensiva, pelo bloqueio central dos nervos simpáticos dos vasos, e cardiotônica, pela inibição colinérgica central, em ratos. Além desses efeitos, a atividade sedativa foi comparável ao diazepam, este efeito pode contribuir para seu uso terapêutico na tosse e na asma. Porém, a atividade diurética não foi observada neste estudo (CONSOLINI et al., 2006; CONSOLINI; MIGLIORI, 2005). O extrato metanólico e uma fração de flavonoides proveniente de partição em acetato de etila produziram vasodilatação na aorta, evidenciando ainda mais o uso como hipotensivo. Segundo o estudo, esse efeito é possivelmente explicado pela estimulação da produção de óxido nítrico. Orientina, isoorientina, isovitexina e apigenina-6-galactosil-6''-O-galactopiranosídeo, foram isolados porém não apresentaram atividade quando testados isoladamente (RAMOS ALMEIDA et al., 2006).

O estudo de Aragão et al. (2010), evidenciou a capacidade hipoglicemiante *in vivo* e antioxidante *in vitro* do extrato metanólico das folhas. Os efeitos foram atribuídos à presença de ácido clorogênico, isoorientina e orientina. Posteriormente, também para o extrato metanólico foi relatado atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica frente às linhagens cancerígenas, HL-60, Bcl-2 e Jurkat (ARAGAO et al., 2013), além de redução de edema induzido, após tratamento tópico com o extrato (PACHECO et al., 2014a).

Além disso, os metabólitos: ácido clorogênico, isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina e rutina foram identificados no extrato metanólico das folhas e relatados pela primeira vez como inibidores de “Quorum Sensing” para cepas *Cromobacterium violaceum* e *Escherichia coli* (BRANGO-VANEGAS et al., 2014). O extrato etanólico apresentou pequena atividade frente à *Staphylococcus aureus*, que foi associada aos fenólicos totais encontrados, além da presença de saponinas (COSTA; HOSCHEID, 2018).

O uso da espécie demonstrou redução da inflamação e das lesões renais em ratos. Ocorreu à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), redução da infiltração de macrófagos, angiotensina II e c-Jan quinase e atividade de arginase no córtex renal. Ácido clorogênico e orientina foram os principais identificados, no extrato aquoso e etanólico das

folhas, sendo seus efeitos anti-inflamatórios previamente demonstrados, o que explica o potencial da espécie frente ao tratamento das doenças renais (MAQUIAVELI et al., 2014).

Gazal et al. (2014) e Ortmann et al. (2016) investigaram os efeitos antidepressivos e antioxidantes do extrato aquoso e de fração enriquecida de flavonoides C-glicosilados, respectivamente, em modelo *in vivo* de estresse crônico. Como resultado, ambos reduziram o comportamento depressivo e o dano oxidativo (diminuição de marcadores oxidativos, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e disfunção mitocondrial), evidenciando seu potencial neuroprotetor. Em outro estudo, verificou-se a atividade frente ao modelo comportamental de mania depressiva, e conforme foi observado, o extrato pode ser útil na prevenção do transtorno bipolar. Além disso, foi correlacionada a atividade antioxidante do ácido clorogênico e dos flavonoides: orientina, isoorientina, isovitexina e isoquercitrina com os efeitos antidepressivos (GAZAL et al., 2015).

Atividades antiparasitárias também foram estudadas, para malária e *Leishmania*. Extratos etanólicos de folha, raiz e caule foram testados contra *Plasmodium falciparum* e/ou *Plasmodium berghei* em camundongos. Todos os extratos conseguiram reduzir a parasitemia, o extrato das raízes apresentou melhor índice terapêutico e o ácido tormêntico isolado foi associado a atividade (UCHÔA et al., 2010). Em outro estudo, a fração em acetato de etila do extrato etanólico das folhas, foi capaz de reduzir o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* alterando o arranjo de K-DNA mitocondrial e inibindo a arginase. Foram identificados flavonoides glicosídicos, ácido clorogênico, catequina, epicatequina e isoquercitrina que exibiram inibição da arginase, sendo a orientina o composto mais ativo (CRUZ et al., 2013).

Quanto à cicatrização de feridas, a formulação de gel contendo extrato em acetato de etila das folhas foi capaz de promover o processo de cicatrização *in vivo* e as propriedades curativas foram atribuídas à presença de ácido clorogênico, orientina e isoorientina (DUQUE et al., 2016).

Fernandes et al. (2019) avaliou o potencial antienvelhecimento dos extratos hidroetanólico e etanólico mensurado pela atividade antioxidante e antiglicante, capacidade de inibir metaloproteinases como collagenase e elastase, proliferação celular e viabilidade de linhagem de fibroblasto BALBc/3T3 e linhagem renal humano HEK293. Ambos apresentaram atividade antioxidante e antiglicante significativas e induziram a proliferação de fibroblastos, o extrato hidroetanólico reduziu significativamente a atividade da collagenase e inibiu a enzima elastase. Isoorientina e orientina foram identificados e quantificados nesses extratos.

Alguns triterpenos foram isolados das raízes, como: ácido tormêntico, β -sitosterol, ácido euscáfico, 2 α -acetil ácido tormêntico, 3 β -acetil ácido tormêntico, ácido ursólico, 2-O-acetil euscáfico, 2 α -acetil-3 β ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxi-ursan-28,13 β -olide, 3 β -O-6'-O-n-acil- β -D-glucopiranosil sitosterol e 3 β -acetoxi-2 α ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxi-ursan-28,13 β -olídeo (MACHADO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2005; ROCHA et al., 2007). Os quatro primeiros terpenos apresentaram citotoxidez *in vitro* em linhagens celulares de leucemia sensíveis e multirresistentes (ROCHA et al., 2007, 2012).

2.3 ESPÉCIES REATIVAS E ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas (ERs) são definidas como átomos ou moléculas que apresentam formas radicalares, ou seja, que possuem elétrons livres em sua camada de valência, o que explica sua alta instabilidade e reatividade. Também apresentam-se na forma não radicalar, que embora não possuam elétrons desemparelhados em sua última camada, também são altamente reativos e participam das reações de oxirredução devido sua instabilidade (BIRBEN et al., 2012).

Em sistemas biológicos, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são as principais responsáveis por reagir com outras moléculas a fim de alcançar sua estabilidade, causando a oxidação de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos (GULCIN; BEYDEMIR, 2013). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Já as ERNs incluem o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), peroxinitritos (ONOO^-), óxido nitroso (N_2O_3), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (BURTON; JAUNIAUX, 2011; FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; VALKO et al., 2007).

Nos organismos aeróbios, a produção de EROs e ERNs ocorre devido a fatores exógenos ou endógenos. Dentre os fatores exógenos destacam-se: infecção microbiana, exposição prolongada a patógenos e/ou poluentes e toxinas (álcool, tabaco, pesticidas, radiação ultravioleta (UV) e ionizante), além da realização de exercícios físicos intensos. As fontes endógenas mais importantes são as mitocondriais, incluindo as reações da cadeia de transporte de elétrons e a reação de síntese de $\text{NO}\cdot$ (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). As fontes não-mitocondriais são: enzimas microsossomiais do citocromo P450, a beta-oxidação peroxisomal e a explosão respiratória das células fagocíticas VALKO et al., 2007).

Nos eventos de fosforilação oxidativa para formação de trifosfato de adenosina (ATP) da cadeia respiratória, a transferência de elétrons não é totalmente eficiente, permitindo

que elétrons sejam direcionados ao oxigênio molecular gerando formas parcialmente reduzidas de O_2 , o radical aniônico $O_2^{\cdot-}$, o qual pode ser espontaneamente ou enzimaticamente convertido em H_2O_2 ou no radical $HO^{\cdot}$ (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013; RAHAL et al., 2014; VALKO et al., 2007).

Nos níveis homeostáticos as ERs são essenciais, pois desempenham diversas funções sobre as ações celulares, incluindo regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, ativação de fatores de transcrição sensíveis a potencial de óxido redução, ativação de proteínas quinases, abertura de canais iônicos, modificação de proteínas, além de desempenhar funções em vias de sinalização pró-inflamatórias, morte e defesa celular (ABUELO et al., 2015; BURTON; JAUNIAUX, 2011). Entretanto, quando produzidos em excesso, as ERs podem prejudicar as células, levando à perda de função celular e danos teciduais (GULCIN; BEYDEMIR, 2013).

Para manter os níveis de substâncias oxidantes baixos, permitindo papéis úteis de ERs e limitando os seus efeitos prejudiciais, as células apresentam sistemas antioxidantes, produzidos pelo corpo ou absorvidos pela dieta, que são capazes de controlar a produção das ERs e inibir ou minimizar a oxidação de um substrato (LUSHCHAK, 2014). Segundo Halliwell et al., (2000) “Antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Esses sistemas incluem enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), capaz de converter $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), responsáveis pela conversão de H_2O_2 em água (H_2O), além dos sistemas não enzimáticos compostos por proteínas de baixo peso molecular como ácido úrico, hemoglobina, coenzima Q_{10} , ubiquinol, ácido lipoico, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides e polifenóis (BURTON; JAUNIAUX, 2011; RAHAL et al., 2014).

De acordo com Birben et al. (2012) quando há um estado de desequilíbrio entre antioxidantes e ERs em favor destes, seja por depleção ou mutação dos sistemas de defesa, diminuição de antioxidantes exógenos, eventos patológicos ou por acúmulo dos oxidantes, ocorre o chamado “estresse oxidativo”. Este por sua vez, contribui com a patogênese de diversas doenças crônicas incluindo câncer, distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, diabetes e complicações, bem como processos inflamatórios. O envelhecimento cutâneo também pode ser um processo afetado pelo estresse oxidativo, uma vez que o mesmo pode aumentar os estímulos nocivos do tecido conjuntivo da pele e alterar a regulação de mediadores celulares envolvidos na degradação da matriz extracelular (FERNANDES et al., 2019; PISOSCHI; POP, 2015).

Estudos comprovam que há uma relação benéfica entre a ingestão dietética rica em compostos oxidantes e o estresse oxidativo, uma vez que, suplementos antioxidantes podem reduzir o aumento dos níveis de estresse oxidativo, podendo atuar como inibidores da reação em cadeia radical, quelantes de metais, inibidores de enzimas oxidativas e cofatores enzimáticos (ABUELO et al., 2015; POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013).

Dentre os antioxidantes sintéticos mais empregados na indústria de alimento e aplicações farmacêuticas destacam-se as substâncias fenólicas, como o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato, sendo os dois primeiros associados a efeitos carcinogênicos e dano hepático (GULCIN; BEYDEMIR, 2013).

Neste contexto, existe um forte interesse na busca por produtos antioxidantes provenientes de fontes naturais e mais seguros, além de uma tendência crescente desses produtos nas preferências dos consumidores. Dentre as diversas substâncias bioativas com propriedades antioxidantes já descritas, pode-se destacar o ácido ascórbico, os tocoferóis, carotenoides e os polifenóis, como os derivados do ácido cinâmico, e em especial os flavonoides (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; PISOSCHI; POP, 2015).

2.4 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

Os AGEs constituem uma variedade de compostos altamente reativos formados por reações de glicação, de origem não enzimática, entre açúcares redutores livres ou lipídios oxidados com grupo aminocarbonilo de proteínas, ácidos nucleicos ou lipídeos (AHMAD et al., 2013).

A formação de AGEs ocorre em condições fisiológicas normais e de maneira lenta, ou podem ser introduzidos no organismo de forma exógena, via dieta, poluição ou fumo. O acúmulo de AGEs se encontra acelerado em condições de estresse oxidativo e patologias crônicas, como no diabetes e em suas complicações cardiovasculares, renais, nervosas e oculares, doenças neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer, aterosclerose, doença renal e também nas doenças autoimunes (JAISSON; GILLERY, 2010; KONTOGIANNI et al., 2013).

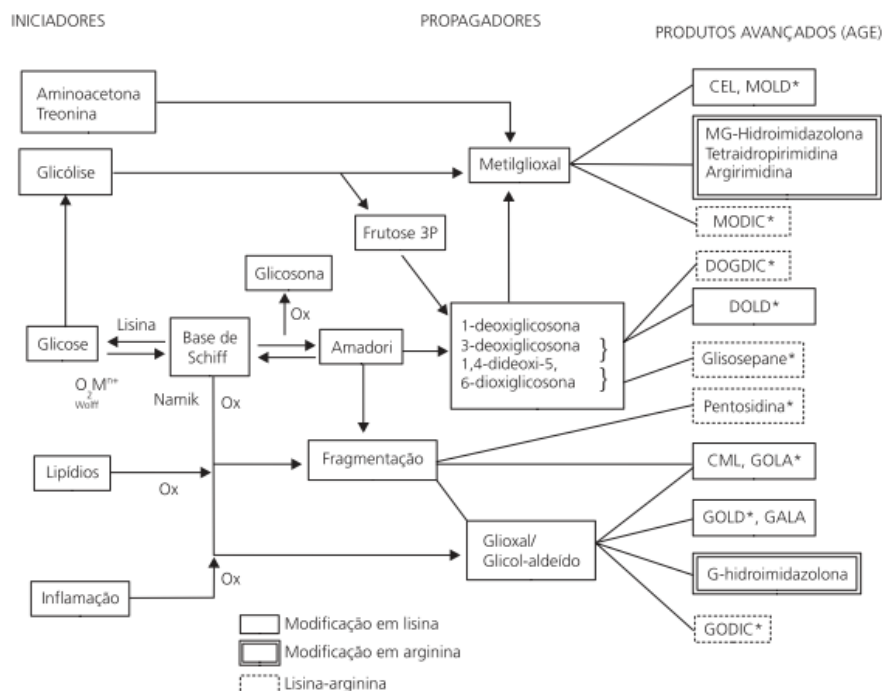
Os efeitos do acúmulo de AGEs é diretamente relacionado ao envelhecimento, comprometendo proteínas de meia-vida longa, como: hemoglobina, lisozima e cristalino ocular (FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005; OTT et al., 2014; TORRES et al., 2018). Na pele, estes complexos químicos afetam principalmente proteínas da matriz extracelular dérmica, como: colágeno, elastina e fibronectina, agravando assim o envelhecimento cutâneo, além de acelerar o processo de apoptose de fibroblastos, que são células constituintes do tecido

conjuntivo que dentre outras funções sintetizam colágeno e elastina (FERNANDES et al., 2019; GKOGKOLOU; BÖHM, 2017).

A via clássica de formação dos AGEs começa com a reação de Maillard ou glicação, que pode ser dividida em três etapas: inicial, avançada e final. Na fase inicial ocorre a condensação de um grupo carbonila de um açúcar redutor (frutose, glicose, xilose, manose e/ou galactose) com um grupamento amina de uma proteína, formando uma carbonila intermediária. Esta por sua vez, sofre desidratação, produzindo a base de Schiff. Para tornar a estrutura mais estável, essa base sofre, por meio de catálise ácido-base, rearranjos estruturais formando os chamados produtos de Amadori, como a hemoglobina glicada e frutossamina (RICHARDSON et al., 2015; SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2016; TORRES et al., 2018). No estágio avançado e reversível, tanto a base de Schiff quanto o produto Amadori podem sofrer reações adicionais (oxidação, desidratação, hidrólise e fragmentação) com resíduos de aminoácidos das proteínas (sendo lisina e arginina os mais reativos), originando compostos secundários extremamente reativos denominados α -dicarbonílicos ou α -oxaldeídos (glioxal, metilglioxal e deoxiglicosonas). As reações dos compostos carbonílicos formados a partir da base de Schiff são conhecidas como reação de Namiki enquanto que a reação de Hodge origina os compostos carbonílicos a partir da auto-oxidação de produtos de Amadori. Alternativamente, a formação desses produtos reativos pode ocorrer a partir da auto-oxidação direta dos açúcares redutores na ausência de grupos amino livres, conhecida como "via de Wolff" (KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014). No estágio final e irreversível da glicação os compostos carbonílicos e os oxaldeídos reagem com os grupos amino para a formação dos AGEs (TORRES et al., 2018).

Devido aos diferentes precursores e a complexidade das reações, os AGEs são um grupo de compostos heterogêneos dos quais muitos não são ainda conhecidos, porém, existem AGEs bem caracterizadas nos seres humanos (OTT et al., 2014). Os mais estudados são: N-carboximetil-lisina (CML), resultante da reação entre o glioxal e a lisina ou da quebra oxidativa da frutossamina; a pirralina, formado através da reação da lisina e da glicose e a pentosidina, formado a partir de um resíduo de lisina e um resíduo de arginina que se ligam ao carbono cinco do açúcar redutor. E também os AGEs: GOLD, MOLD e DOLD que são obtidos a partir de interações de dímeros de lisina com glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona, respectivamente (LEE et al., 2017; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010). A Figura 4 representa a via clássica de reações de glicação até a formação de AGEs.

Figura 4: Rotas de formação e produtos finais de glicação avançada.



CML: carboximetilisina; CEL: carboxietilisina; DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicosona; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicosona; GOLA: glioxal lisina amida; GOLD: dímero de glioxal-lisina, GALA: ácido glioxílico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina.

Fonte: PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA (2009)

Uma via alternativa capaz de formar AGEs é a via do polioliol, onde a glicose é reduzida em sorbitol pela enzima aldose redutase e depois convertida em frutose pela sorbitol desidrogenase. Por reações de desidratação a frutose pode ser convertida em 3-desoxiglicosona ou os metabólitos de frutose como, frutose 3-fosfato, perdem uma molécula de ácido fosfórico sendo convertidos 3-desoxiglicosona, esse intermediário reativo é capaz de interagir com aminoácidos e formar AGEs (LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOWSKI, 2010; SEMCHYSHYN, 2014). A peroxidação lipídica é outra via que pode originar compostos dicarbonílicos. Quando ácidos graxos polinsaturados estão em contato com EROs, são formadas espécies reativas de carbonil, como o malonaldeído, 4-hidroxi-trans-2-nonenal e os α -oxoaldeídos (HUEBSCHMANN et al., 2006). E ainda, algumas células de defesa, como neutrófilos, macrófagos e monócitos após estímulo inflamatório liberam mieloperoxidases e ativam a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, enzimas que podem

oxidar aminoácidos e consequentemente formar intermediários reativos (URIBARRI; TUTTLE, 2006).

Três mecanismos são descritos pelos quais os AGEs podem danificar matriz e células extracelulares: (1) acúmulo de AGEs na matriz extracelular causando extrema reticulação, o que diminui a elasticidade do tecido conjuntivo; (2) glicação de proteínas intracelulares, que podem alterar o funcionamento celular e (3) ligação de AGEs circulantes a receptores de superfície que modificam as vias de sinalização celular com subsequente modulação da expressão gênica (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2016).

O primeiro receptor identificado e melhor caracterizado atualmente é o RAGE (acrônimo em inglês para *Receptor for Advanced Glycation End-products*) (SINGH et al., 2014). A interação AGE-RAGE, induz diretamente o estresse oxidativo, ativando a NADPH e óxido nítrico sintase, diminuindo a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase e outras vias que reduzem as defesas antioxidantes celulares (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012). Em células endoteliais por exemplo, essa interação ativa a transcrição do NF- κ B levando a expressão de fatores pró-inflamatórios como a endotelina-1, selectina E, fator tecidual, trombomodulina, IL-1 α , IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (GKOGKOLOU; BÖHM, 2017; TORRES et al., 2018).

A diminuição dos níveis de AGEs celular pode ocorrer de duas formas: catálise proteolítica, envolvendo enzimas como glioxalase I, aldose redutase e oxaldeído redutase ou endocitose pelos receptores AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 e receptores *scavengers* (macrófagos classe A tipos I e II). Após a degradação, os AGE-peptídeos, que são moléculas solúveis e de baixo peso molecular, são liberados na corrente sanguínea para eliminação via renal (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012; KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014).

Neste contexto, inibidores da formação de AGE ganham atenção como potenciais agentes terapêuticos. Aminoguanidina (AG) é um agente antiglicante sintético, que contém hidrazina a qual reage com glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona, neutralizando-o. Porém, em fases de estudos clínicos (Fase III) seu uso foi cancelado devido a preocupações de segurança, pois AG também foi capaz de inibir a óxido nítrico sintase. Outro agente investigado foi o ALT-711 (Alagebrium), uma pequena molécula descoberta capaz de quebrar os AGEs pré-formados. Apesar de mostrar-se promissor nos estudos iniciais (avanço para a Fase II), o desenvolvimento da ALT-711 foi interrompido devido a complicações financeiras (FARSI et al., 2008; RICHARDSON et al., 2015).

Fármacos já comercializados como ácido acetilsalicílico, hidralazina, metformina e derivados de 1,3-tiazol apresentam atividade antiglicante via diferentes mecanismos (SINGH et al., 2016). Os estudos têm se concentrado nos benefícios das plantas medicinais com propriedades antiglicantes, e uma variedade de fenólicos demonstraram alta atividade antiglicante (FARSI et al., 2008; TSUJI-NAITO; SAEKI; HAMANO, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e isolar os principais metabólitos secundários do extrato hidroetanólico das folhas de *C. pachystachya* e avaliar, juntamente com suas partições, o potencial biológico frente às atividades antioxidante e antiglicante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extrato bruto hidroetanólico (EBHE) das folhas da espécie;
- Particionar o extrato com solventes de diferentes polaridades para purificação do extrato bruto e biomonitoramento das partições obtidas;
- Analisar o perfil químico por métodos cromatográficos e espectrométricos:
 - Caracterizar as classes e/ou identificar os principais metabólitos secundários presentes no extrato bruto e suas partições;
 - Determinar o teor de fenóis totais e flavonoides (extrato bruto, partições e precipitados);
 - Quantificar a rutina no EBHE;
 - Fracionar por cromatografia em gel a partição em acetato de etila (PACT);
 - Caracterizar, isolar e identificar substâncias provenientes do fracionamento.
- Atividades biológicas *in vitro* (extrato bruto e partições):
 - Avaliar o potencial antioxidante por meio dos seguintes modelos: 2,2 difenil–1–picril–hidrazila (DPPH), fosfomolibidênio, β -caroteno/ácido linoleico, poder de redução do ferro (FRAP) e inibição da produção de óxido nítrico;
 - Determinar atividade antiglicante.
- Avaliar a viabilidade celular do EBHE frente as linhagens HaCat e L929

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *C. pachystachya* foram coletas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, no mês de outubro de 2017 no período da manhã. Uma exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger CESJ da UFJF, sob o número 46591.

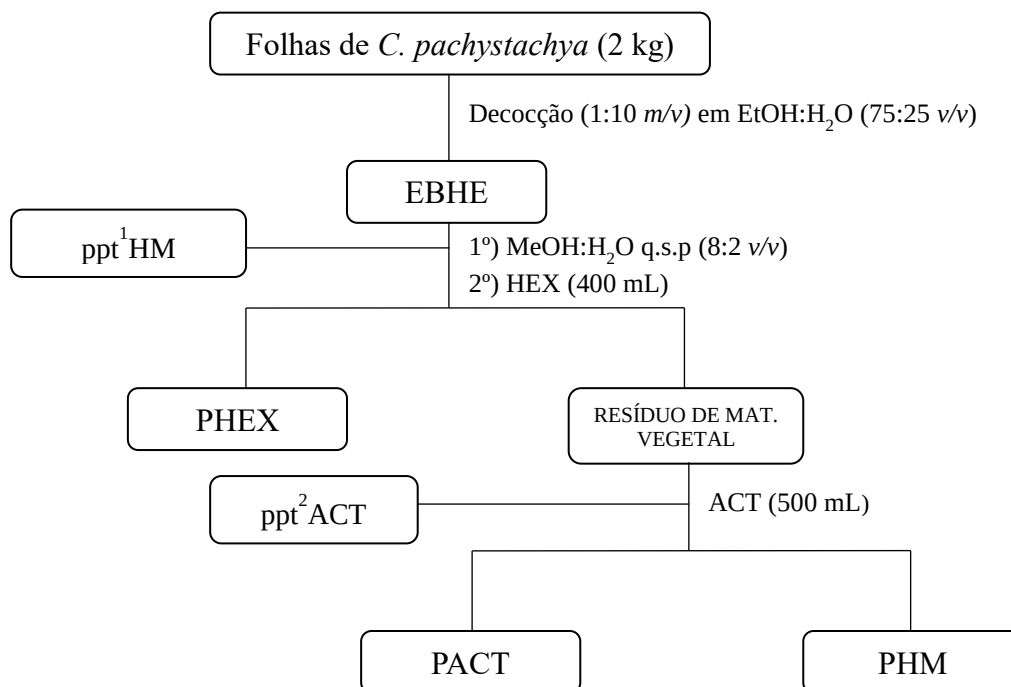
4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E PARTIÇÕES

As folhas coletadas foram secas à sombra e em local com temperatura ambiente (25 °C) e submetidas, aproximadamente 2 kg, à moagem em moinho de facas. O extrato bruto hidroetanólico (EBHE) foi obtido por decocção (1:10 *m/v*) em solução extratora etanol:água (EtOH:H₂O) (75:25 *v/v*) à temperatura de 60 °C durante 30 minutos, seguido de filtração (FERNANDES et al., 2019). O solvente etanólico foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, e posteriormente, a amostra foi liofilizada para remoção do solvente aquoso.

Após completa remoção do solvente, 150 g do EBHE foram ressuspensos em quantidade suficiente (q.s.p) de metanol:água (MeOH:H₂O) (8:2 *v/v*) e particionados com solventes hexano (4x100mL), seguido de acetato de etila (5x100mL).

Todas as partições obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, e a partição hidrometanólica, após a rotaevaporação, foi liofilizada para completa eliminação da água. Todas as amostras: EBHE, partições e precipitados, foram devidamente armazenadas e mantidas sob refrigeração para posterior utilização em análises fitoquímicas e bioensaios.

Figura 5: Fluxograma da obtenção do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul pela extração do material vegetal e obtenção de partições e precipitados pelo particionamento do extrato.



MeOH: metanol; H₂O: água; HEX: hexano; ACT: acetato de etila; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; ppt¹HM: precipitado hidrometanólico; ppt²ACT: precipitado em acetato de etila; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Fonte: AUTORA (2019)

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais do EBHE, partições e precipitados foi determinado pelo método espectrofotômetro de FOLIN e CIOCALTEAU (1927), com modificações. Foram adicionados em microplacas de 96 poços, 120 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 20%, 30 µL de amostra (0,5 mg/mL) e 100 µL de solução carbonato de sódio 4%. Poços com os mesmos volumes dos reagentes e MeOH correspondente ao volume da amostra foram preparados como branco do teste. Uma curva analítica do padrão ácido tânico foi realizada nas mesmas condições das amostras, com concentrações de 0,9 a 60 µL/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-vis em 750 nm. Os resultados foram expressos em µg/mg de amostra em equivalente ao ácido tânico (EAT) ± erro padrão, utilizando regressão linear no Excel.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

Para avaliação do teor de flavonoides do EBHE, partições e precipitados utilizou-se o método de complexação com o cloreto de alumínio, com adaptações (DOWD; THORSTEIN; DAVIS, 2015). Em tubos de ensaios foram adicionados 250 µL da amostra (0,5 mg/mL), 250 µL de cloreto de alumínio 2%, 1 gota de ácido acético glacial e 500 µL de MeOH. No branco utilizou-se os mesmos reagentes e volumes, com exceção da amostra, à qual foi substituída por MeOH. Uma curva padrão de quercetina foi feita nas mesmas condições, com concentrações de 1,25 a 125 µg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os tubos foram mantidos em repouso ao abrigo da luz por 30 min em temperatura ambiente. Uma alíquota de 250 µL foi transferida para placa de 96 poços e a absorvância medida em espectrofotômetro UV-vis em 415 nm. Os resultados foram expressos em µg/mg de amostra em equivalente à quercetina (EQ) $\pm$ erro padrão, utilizando regressão linear no Excel.

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.5.1 Cromatografia em camada delgada

Foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) tanto das partições, precipitados e extrato bruto, a fim de verificar a presença das principais classes de metabólitos secundários, quanto para reunir as amostras obtidas no fracionamento com perfis químicos semelhantes. Para isso, foram utilizadas cromatoplasacas revestidas de sílica sobre alumínio e os eluentes foram utilizados em diferentes proporções e polaridades. A revelação foi obtida por meio de revelador físico (UV 254 e 365) e/ou pela utilização de reagentes químicos, como solução de vanilina/ácido sulfúrico em etanol 1% e ácido difenilbórico β -etilaminoéster (NP) 1% em MeOH e uma solução de polietilenoglicol 5% (PEG).

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O EBHE, as partições (PACT, PHEX e PHM) e os precipitados (ppt¹HM e ppt²ACT), foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada no equipamento Agilent Technologies® Série 1200, constituído por bomba quaternária, detector de arranjos de diodo-ultravioleta (DAD-UV) e injetor e coletor automáticos. A coluna empregada foi do tipo fase reversa, Zorbax SB-C18 (25 cm X 4,6 cm X 5 µm). O espectro UV foi determinado utilizando varredura de comprimento de onda de 190 a 400 nm e o utilizado na detecção foi de 330 nm. As amostras foram preparadas a 1 mg/mL e solubilizadas em

acetonitrila (ACN) grau HPLC. As condições utilizadas para a eluição estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto hidroetanólico, partições e precipitados.

Volume de injeção (μ L)	Fluxo (ml/min)	Tempo de eluição (min)	Solventes	
			ACN	H ₂ O
0,50	0,80	0	5%	95%
		3,00	5%	95%
		3,01	15%	75%
		30,00	15%	75%

ACN: acetonitrila; H₂O: água.

4.5.3 Quantificação por CLAE

Realizou-se a quantificação do flavonoide rutina no EBHE a partir da equação da curva de calibração, construída pela área do sinal desse padrão externo no comprimento de onda 350 nm. EBHE e padrão foi preparado na concentração de 1 mg/ml, solubilizados em ACN:H₂O (2:8) grau HPLC. Para construção da curva utilizou-se as seguintes concentrações do padrão: 6 μ g/mL; 12,5 μ g/mL; 25 μ g/mL; 50 μ g/mL e 100 μ g/mL. Utilizou-se coluna do tipo fase reversa Kromasil C-18. As condições cromatográficas para as amostras foram as mesmas descritas na Tabela 1. As eluições cromatográficas foram feitas em triplicatas e a concentração de rutina foi determinada em mg por grama de extrato (mg/g).

4.5.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência-espectrometria de massas

A amostra do EBHE foi enviada para a Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), para que análises fossem realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UFLC) em aparelho modelo Nexera, marca Shimadzu®. A coluna cromatográfica utilizada foi Kinetex C18 (100 mm X 3.0 mm x 2.6 μ m). As condições da eluição estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições cromatográficas utilizadas na análise de cromatografia líquida de ultra eficiência do extrato bruto hidroetanólico.

Volume de injeção (μL)	Fluxo (ml/min)	Tempo de eluição (min)	Solventes	
			MeOH	H ₂ O
2	0,4	0,01	5%	95%
		2	33%	63%
		10,5	37%	63%
		11,5	37%	63%
		13	5%	95%
		15	5%	95%

MeOH: metanol; H₂O: água.

Como analisador foi utilizado o espectrômetro de massas de alta resolução Compact (Bruker®) em tandem, quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF). As análises foram realizadas no modo positivo e negativo com ionização por *eletrospray* (ESI) com faixa de massas de 100 a 1000 *m/z*. A otimização dos parâmetros foi alcançada por rampeamento manual para se obter maior intensidade dos sinais, mantendo-se as seguintes condições: *nebulizer gas* (N₂) em 5,0 bar; *dry gas* (N₂) em 10,0 L/min; *dry heater* em 220 °C e *capillary voltage* em 4,5 KV.

4.5.5 Cromatografia em coluna por permeação em gel

Para separação de constituintes químicos da PACT foi realizado o método cromatográfico por filtração em gel Sephadex LH-20. Para montagem da coluna, 100 g de gel Sephadex LH-20 foram misturados em 1900 mL de MeOH e essa mistura foi adicionada à coluna. O empacotamento foi realizado de forma simples pela ação da gravidade e a coluna preenchida apresentava 60 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro. Um total de 500 mg da amostra foram solubilizadas em quantidade suficiente de MeOH (aproximadamente 10 mL) seguida de centrifugação e filtração do sobrenadante. A solução com a amostra foi aplicada no topo da coluna, e após a total penetração no gel, foi eluída com MeOH. A vazão da coluna foi mantida em 30 gotas por minuto. Após coletar 180 frações (5 mL cada), as mesmas foram analisadas por CCD conforme item 4.5.1 e reunidas em 12 frações por similaridade do perfil fitoquímico. Todo processo foi repetido por mais uma vez a fim de obter rendimento suficiente para o isolamento.

4.5.6 Isolamento de substâncias por CLAE semi-preparativa

As frações F6 e F7 foram repurificadas em CLAE semi preparativa. Para isso, utilizou-se o equipamento Agilent Technologies® Série 1200, constituído por bomba quaternária, detector de arranjos de diodo-ultravioleta (DAD-UV) e injetor e coletor automáticos. Empregou-se coluna do tipo fase reversa, Zorbax SB-C18 (25 cm X 4,6 cm X 5 µm) semi preparativa. As amostras foram preparadas a 5 mg/mL e solubilizadas em ACN grau HPLC e água (2:8 v/v). As amostras coletadas contendo as substâncias isoladas foram evaporadas em rotavapor rotatório e centrífuga evaporadora SpeedVac. As condições utilizadas para a eluição estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas no isolamento de substâncias das frações F6 e F7 por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa.

Volume de injeção (µL)	Fluxo (ml/min)	Tempo de eluição (min)	Solventes	
			ACN	H ₂ O
300	3	30	15%	85%

ACN: acetonitrila; H₂O: água.

4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

4.6.1 Atividade antioxidante

4.6.1.1 Método do sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Uma triagem quantitativa para atividade antioxidante do EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM) foi mensurada pela capacidade em sequestrar o DPPH (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997). Amostras e os controles positivos (quercetina e ácido ascórbico) foram solubilizados em MeOH (1 mg/mL) e 100 µL de cada solução foi transferido para uma placa de 96 poços e 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol foram realizadas, obtendo concentrações de 0,98 a 250 µg/mL. O branco do teste apresentava todos os reagentes exceto a amostra, a qual foi substituída por metanol. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução de DPPH (20 µg/mL) em metanol em todo os poços. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, tendo a absorvância determinada em 517 nm. Todo o

experimento foi realizado em triplicata e calculado o percentual de inibição (%I) e a concentração inibitória média (CI₅₀), com auxílio do programa Graphit7.

$$\%I = \frac{abs\ BT - abs\ AM}{abs\ BT} \times 100$$

Sendo:

abs BT = absorvância do branco do teste

abs AM = absorvância da amostra

4.6.1.2 Modelo de redução do complexo fosfomolibdênio

Nesse modelo, a capacidade antioxidante das amostras, EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM), foram determinadas através do método de Prieto et al., (1999). A solução reagente utilizada foi o complexo fosfomolibdênio, formado pela reação da solução de fosfato de sódio (Na₃PO₄) (42 mL, 0,1 mol/L) com solução de molibdato de amônio ([(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O]) (18 mL, 0,03 mol/L) e solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (30 mL, 3 mol/L) em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 150 mL.

Em tubos de ensaio foram adicionados 300 µL das amostras (0,2 mg/mL) e dos controles positivo (quercetina e ácido ascórbico) na mesma concentração e 2 mL de solução reagente. O branco da técnica foi feito substituindo a amostra por H₂O:MeOH (1:1). Os tubos foram fechados e incubados em estufa a 95°C por 90 min. Após resfriamento, uma alíquota de 200 µL foi transferida para placa de 96 poços procedendo-se à leitura a 695 nm em leitor de microplacas. O ensaio foi realizado em triplicata. Para efeito de cálculo da porcentagem de inibição do complexo fosfomolibdênio (%I), o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%I = \frac{abs\ AA - abs\ AM}{abs\ AA} \times 100$$

Sendo:

abs AM = absorvância da amostra

abs AA = absorvância do ácido ascórbico

4.6.1.3 Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

Neste método descrito por MARCO (1968) foi preparado uma mistura reativa, em que adicionaram-se 30 µL de ácido linoleico, 200 µL de Tween 40, 50 µL de solução de β-caroteno (10 mg/mL) em clorofórmio e 500 µL de diclorometano. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do diclorometano com auxílio de nitrogênio gasoso. A esta mistura adicionaram-se cerca de 40 mL de água previamente saturada com oxigênio. A absorvância da emulsão foi ajustada para obter uma solução emulsionada com densidade óptica na faixa de 0,6 - 0,7 nm. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 250 µL da emulsão e 10 µL das amostras, EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM), ou o mesmo volume para a substância referência (quercetina) em concentrações variando de 38,46 a 1,20 µg/mL em metanol. O ensaio foi realizado em triplicata e a emulsão considerada como controle negativo (100% de oxidação). As placas foram incubadas a 45°C em leitor de microplacas, sendo que ao todo foram realizadas nove leituras das absorvâncias em 470 nm, durante 120 min com intervalos de 15 min. O decaimento da absorvância das amostras (AM) pode ser correlacionado com o decaimento da absorvância do controle (C), obtendo-se a porcentagem de inibição da oxidação do β-caroteno (%I) por meio da seguinte fórmula:

$$(\%I) = \frac{abs\ C - abs\ AM}{abs\ C} \times 100$$

Sendo:

abs C = absorvância inicial (T₀) – absorvância final (T₉)

abs AM = absorvância inicial (T₀) – absorvância final (T₉)

4.6.1.4 Poder de redução do ferro (Fe³⁺) (FRAP)

A atividade antioxidante avaliada quanto ao poder de redução do ferro, (FRAP - do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi medida pelo método descrito por Oyaizu, (1986). Em tubos de ensaio foram adicionadas amostras EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM), incluindo os controles positivos (quercetina e ácido ascórbico) em três concentrações diferentes (26,82 µg/mL; 13,41 µg/mL e 6,7 µg/mL) diluídas em H₂O destilada, 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (200 µM, pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio [K₃Fe (CN)₆] 1%. Os tubos foram fechados e incubados em estufa a 50°C por 20 minutos. Após resfriamento, uma alíquota de 2,5 mL de tricloroacético (TCA) 10% foi adicionada à mistura, sendo posteriormente centrifugada por 8 min a 3000 rpm. Em seguida, 2,5 mL foi retirado do sobrenadante e misturado com H₂O destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl₃) 0,1%.

Também foi feito o branco do teste da mesma forma, sendo a amostra substituída por H₂O. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para uma placa de 96 poços e a leitura em leitor de microplacas foi realizada (700 nm). Os resultados foram expressos em percentual de redução do Fe³⁺ (%R) em relação ao ácido ascórbico.

$$\%R = \frac{abs AA - abs AM}{abs AA} \times 100$$

Sendo:

abs AA = absorvância do branco do teste

abs AM = absorvância da amostra

4.6.1.5 Inibição da produção de óxido nítrico

A dosagem da capacidade de inibição das amostras em relação ao radical NO (do inglês *Nitric Oxide*) produzido *in vitro* é feita através de dosagem indireta pelo Método de Griess (GREEN et al., 1982), com modificações. Para produção do NO foi utilizado nitroprussiato de sódio (NPS) (10 mM) em tampão fosfato (TF) (10 mM, pH 7,4). Os controles positivos, quercetina e ácido gálico, e as amostras foram solubilizados em 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO), 900 µL TF e testadas na concentração de 100 µg/mL.

Em uma placa de 96 poços foram preparados em triplicata o controle negativo (62,5 µL NPS + 62,5 µL TF:DMSO 90:10); controles positivos (62,5 µL NPS + 62,5 µL Quercetina/ácido gálico); e as amostras (EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM)) (62,5 µL NPS + 62,5 µL amostra). Posteriormente, procedeu-se à incubação à luz e temperatura ambiente durante 60 minutos, seguido da adição 125 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% + N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) 0,1% em H₃PO₄ 2,5%). Por fim, após 10 min a leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 540 nm.

4.6.2 Atividade antiglicante

Avaliação da atividade antiglicante de EBHE e partições (PHEX, PACT e PHM) foi realizada baseada na metodologia descrita por Farsi et al. (2008), com modificações. A uma microplaca estéril de 96 poços foram adicionados 60 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4), 50 µL de solução de BSA (10 mg/mL), 25 µL de solução de frutose ou glicose (1,6 M), 50 µL da amostra e 15 µL de ázida sódica (8 g/L). Todas as soluções foram previamente esterilizadas utilizando-se membranas filtrantes de nitrato de celulose. As amostras e os

controles positivos (quercetina e a aminoguanidina) foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1 M e testadas em diferentes concentrações (1,5; 1,0; 0,5; 0,15; 0,01 e 0,05 µg/ml). Foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes exceto a amostra, que foi substituída por tampão fosfato de sódio. Toda técnica foi realizada em triplicata, em ambiente asséptico e em capela de fluxo laminar. Após incubação ao abrigo da luz a 37 °C, a quantidade de produtos finais de glicação avançada (AGEs) fluorescentes formados foi determinada utilizando um fluorímetro, em comprimento de onda de excitação de 330 nm e emissão de 410 nm. A leitura foi realizada nos tempos 0, 24, 48 e 96 horas e 7 dias. A porcentagem de inibição (%I) da formação de AGEs para cada amostra foi calculada pela seguinte equação:

$$\%I = \frac{\text{fluorescência da solução sem inibidores} - \text{fluorescência da solução com inibidores}}{\text{fluorescência da solução sem inibidores}} \times 100\%$$

4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

4.7.1 Cultura das linhagens celulares

A linhagem de fibroblastos L929 (ATCC®CRL-1658™) e de queratinócitos HaCaT foram cedidas pelo Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da UFJF. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) e meio DMEM/Ham's F-12 (1:1) respectivamente, ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de solução Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL), em garrafas de cultura de 75 cm³ e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência. Em seguida o meio foi removido, as células lavadas com *Phosphate buffered saline* (PBS) e adicionados 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5% às garrafas de cultura dos fibroblastos e queratinócitos, às quais foram incubadas por 4 e 10 minutos, respectivamente, à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% da solução de antibióticos. Recolheu-se o meio contendo as células e transferiu-o para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL, procedendo a centrifugação à 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. As suspensões de células foram diluídas (10x) diretamente no corante Azul de Trypan para a contagem em câmara de Neubauer para iniciar o ensaio de viabilidade celular.

4.7.2 Ensaio da viabilidade celular

As células previamente cultivadas e tratadas foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5×10^3 células/poço e 1×10^4 células/poço para NIH/3T3 e HaCaT, respectivamente, e incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, removeu-se o meio e adicionou-se 150 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham' F-12 suplementado (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) em cada poço. Em seguida, foi adicionado 10 µL da amostra EBHE previamente diluída em solução de DMSO (0,5% v/v), de modo a obter-se concentrações variando 6,25 a 100 µg/mL (em quadruplicata). Utilizou-se como controle negativo meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 e meio DMEM acrescido do solvente [solução de DMSO a 0,5% (v/v)] e solução de DMSO (5% v/v) como controle positivo. As placas foram incubadas por 24 à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 suplementado e acrescido de 10 µL de solução de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetilazol-2-i]) à 5 mg/mL, sendo incubada por 2h30min à 37 °C com 5%. Após, o precipitado de formazan formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis foi dissolvido em 10 µL de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para o cálculo do percentual de viabilidade (%V), seguiu-se a fórmula:

$$\%V = \frac{abs\ CA \times 100\%}{abs\ CN}$$

Sendo:

abs CA = absorvância da célula tratada com amostra

abs CN = absorvância do controle negativo

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos ensaios, antioxidantes e antiglicante, os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e foi utilizada análise estatística dos dados obtidos pelo teste de ANOVA *one way* ou *two way* seguida do teste de Bonferroni, para análise de significância. Os testes foram realizados no Software estatístico GraphPad Prism 5.0 e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

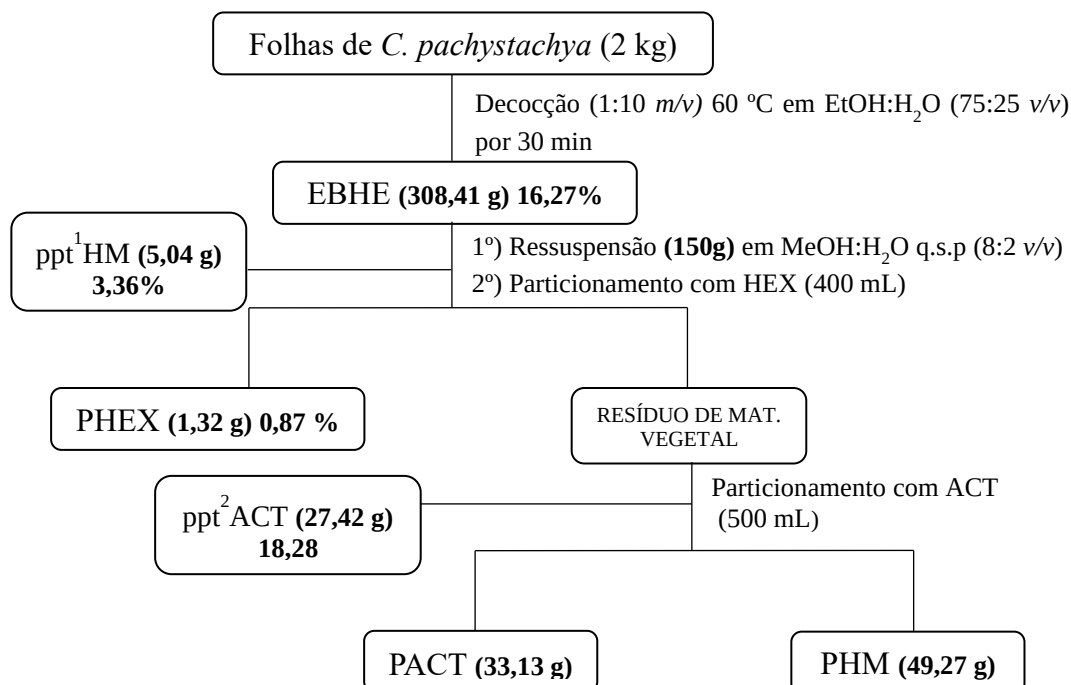
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTOS DAS AMOSTRAS

A escolha da metodologia do processo extrativo foi baseada no trabalho anterior do mesmo grupo de estudo realizado para espécie, descrito por Fernandes et al., 2019 , onde o método se mostrou eficaz para obtenção de metabolitos secundários.

O processo extrativo das folhas de *C. pachystachya* resultou no EBHE obtendo-se 308,41 g de massa e rendimento de 16,27%. No particionamento líquido-líquido foram obtidas as seguintes amostras com suas respectivas massas: PHEX (1,32 g); PACT (33,13 g); PHM (49,27 g); ppt¹HM (5,04 g) obtido na ressuspensão do extrato bruto e ppt²ACT (27,42 g) obtido no particionamento com acetato de etila. Os rendimentos para PHEX, PACT, PHM, ppt¹HM, ppt²ACT foram, respectivamente, 0,87%; 16,27%; 22,08%; 32,84%; 3,36% e 18,28% (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma da obtenção do extrato bruto hidroetanólico, partições e precipitados com suas respectivas massas.



MeOH: metanol; H₂O: água; HEX: hexano; ACT: acetato de etila; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; ppt¹HM: precipitado hidrometanólico; ppt²ACT: precipitado em acetato de etila; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Fonte: AUTORA (2019)

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.2.1 Teores fenólicos e flavonoides

Os valores referentes ao teor de fenólicos e flavonoides estão apresentados na Tabela 4. A equação da reta obtida para a dosagem do teor de fenólicos por regressão linear dos dados da curva foi $y=0,0539x-0,0431$ com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9994$, sendo os resultados expressos em μg de fenóis por mg de amostra equivalente a ácido tânico (EAT).

Para dosagem do teor de flavonoides a equação da reta obtida foi $y=0,0249x-0,0409$ e o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9993$, sendo os resultados expressos em μg de flavonoides por mg de amostra equivalente a quercetina (EQ).

Tabela 4: Resultados de teores de fenóis e de flavonoides do extrato bruto, partições e precipitados.

<i>Amostra</i>	<i>EAT (μg de fenóis/mg de amostra)</i>	<i>EQ (μg de flavonoides/mg de amostra)</i>
EBHE	$281,56 \pm 2,21$	$16,92 \pm 0,37$
PHEX	$24,80 \pm 1,48$	ND
PACT	$302,46 \pm 2,07$	$31,71 \pm 0,17$
PHM	$253,78 \pm 1,44$	$18,16 \pm 0,88$
ppt¹HM	$228,44 \pm 10,86$	$31,32 \pm 1,53$
ppt²ACT	$161,62 \pm 1,55$	$0,3 \pm 0,01$

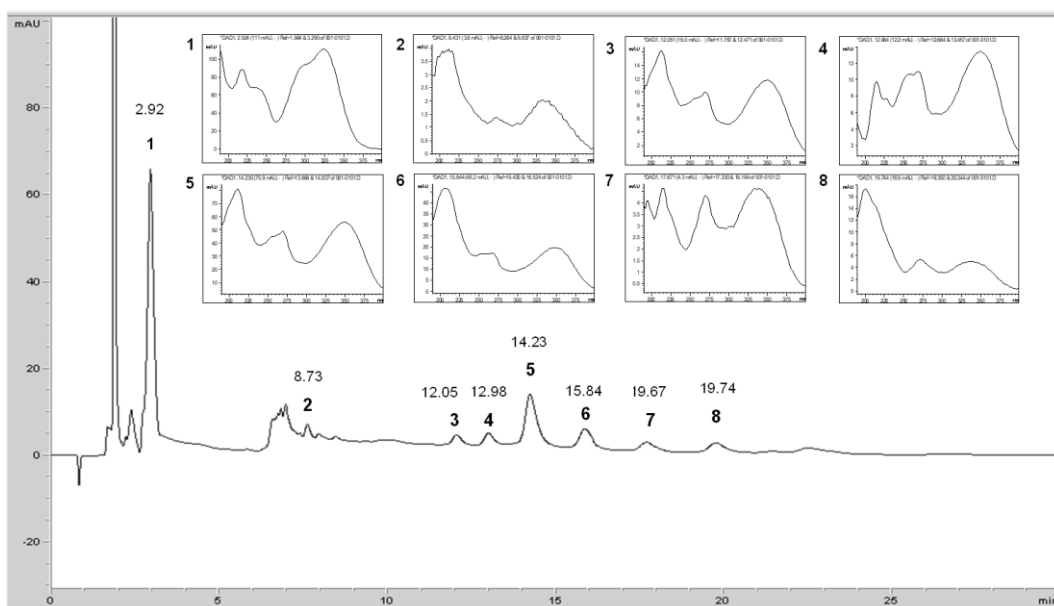
Média das concentrações $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para as amostras descritas. EAT: equivalente ao ácido tânico; EQ: equivalente à quercetina; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica; ppt¹HM: precipitado hidrometanólico e ppt²ACT precipitado de acetato ND = não detectável.

De acordo com o observado nos resultados (Tabela 4), a PACT concentrou maior teores de fenólicos e flavonoides dentre as amostras, enquanto a PHEX apresentou valores baixos para fenólicos e indetectáveis para flavonoides.

5.2.2 Identificação de substâncias por CLAE-UV

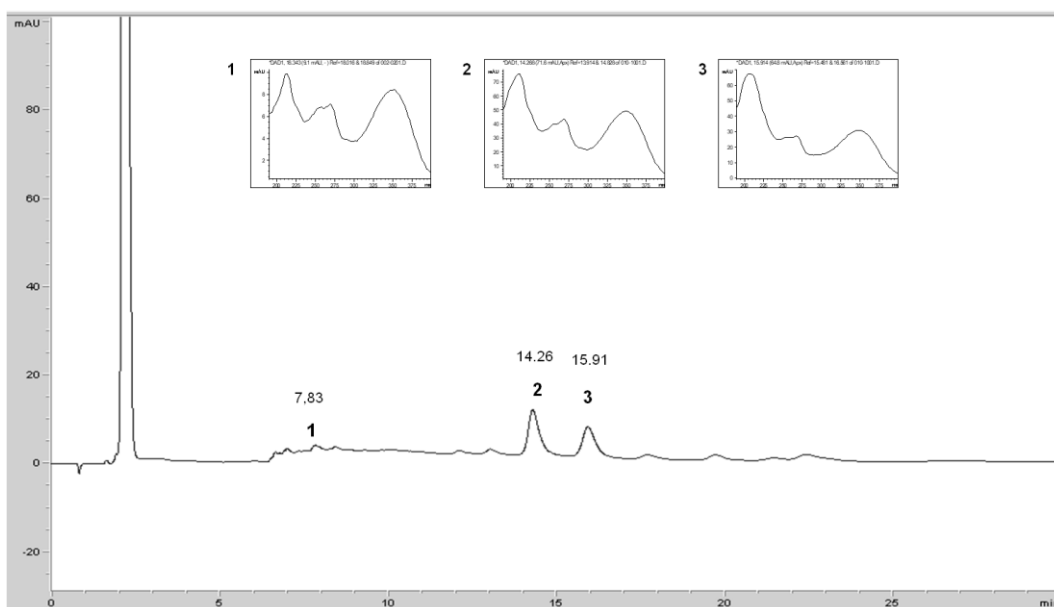
Os perfis cromatográficos de EBHE, PACT, PHM, ppt¹HM e ppt²ACT obtidos por CLAE em detecção de 330 nm e os espectros de absorção UV dos sinais correspondentes às substâncias detectadas estão apresentados nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11, respectivamente. Os cromatogramas indicaram a presença de substâncias com tempo de retenção (TR) variando entre 2 a 20 minutos e máximos de absorção em comprimentos de onda (λ) de 200 a 350 nm. A PHEX quando analisada nas mesmas condições, não apresentou nenhum sinal por CLAE-UV

Figura 7: Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.



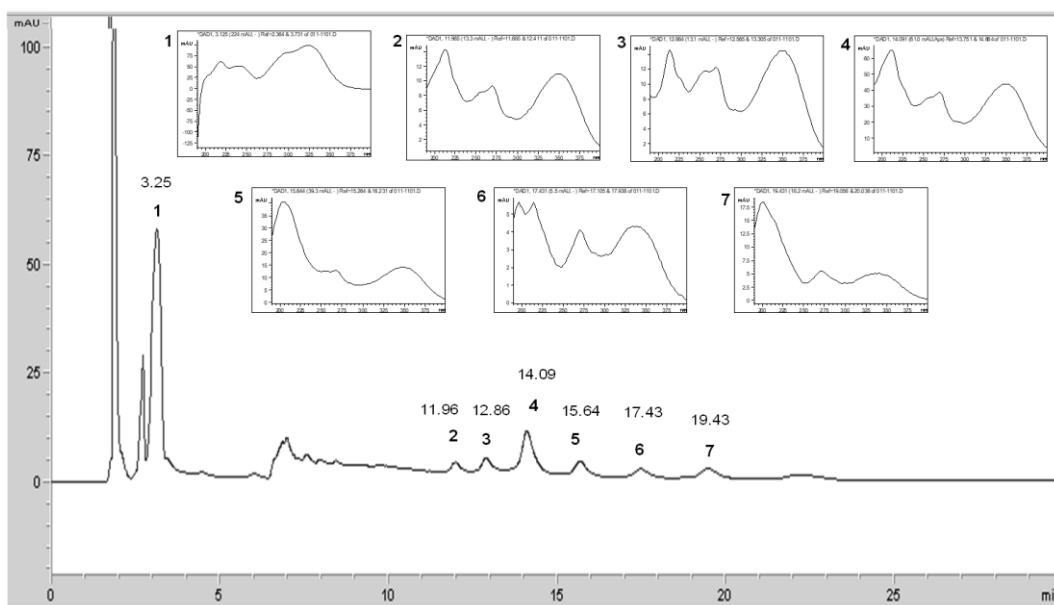
Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 μ L; detecção λ 330 nm.

Figura 8: Perfil cromatográfico da partição em acetato de etila, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.



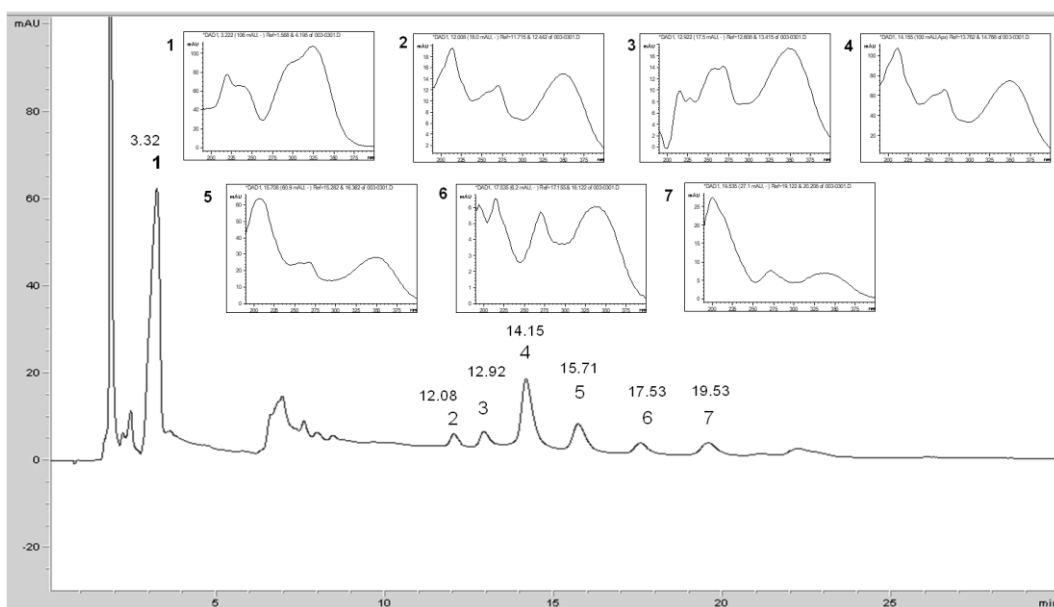
Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 µL; detecção λ 330 nm.

Figura 9: Perfil cromatográfico da partição hidrometanólica, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.



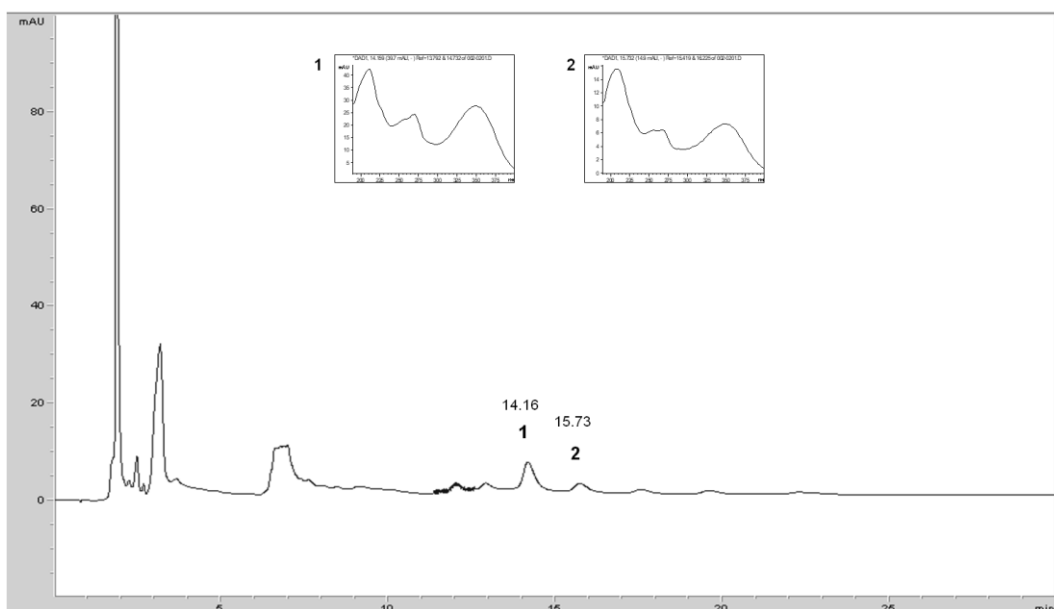
Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 µL; detecção λ 330 nm.

Figura 10: Perfil cromatográfico do precipitado hidrometanólico, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção por cromatografia líquida de alta eficiência.



Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 µL; detecção λ 330 nm.

Figura 11: Perfil cromatográfico do precipitado em acetato de etila, espectros de absorção UV dos sinais e tempos de retenção por cromatografia líquida de alta eficiência.

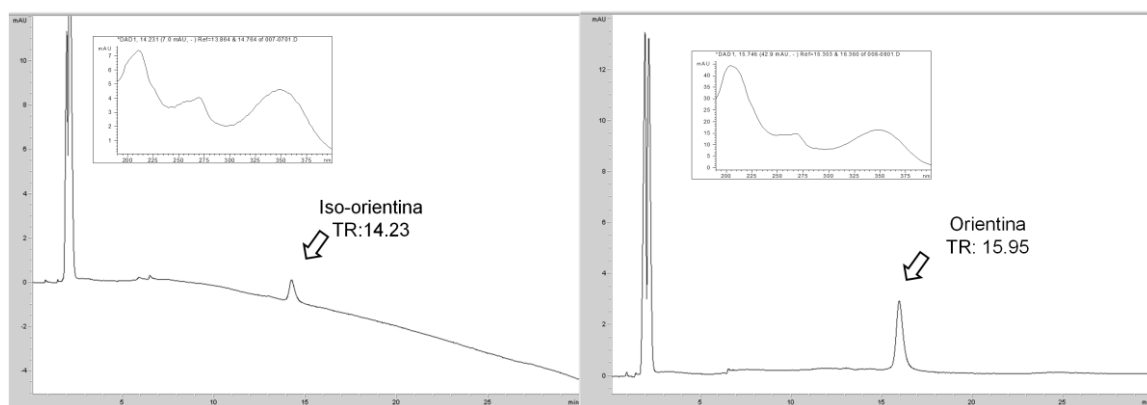


Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 µL; detecção λ 330 nm.

Os relatos da literatura identificam a presença de ácidos fenólicos e uma série de flavonoides na maioria das amostras estudadas provenientes de *C. pachystachya* (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017). De acordo com o perfil UV, máximos de absorção em aproximadamente λ 220 e λ 330 nm, a substância 1 presente nos cromatogramas do EBHE, PHM e ppt¹HM (Figuras 7, 9 e 10), pôde ser sugerida como sendo o ácido clorogênico. As demais substâncias apresentadas em todas as amostras, segundo o perfil de absorção UV, são pertencentes à classe dos flavonoides. Todas as amostras, quando analisadas por CCD, apresentaram bandas fluorescentes em λ 254 nm após revelação com reagente NP/PEG (para identificação de flavonoides), confirmando a presença dessa classe.

Os sinais 5 e 6 (Figura 7) observados no EBHE foram confirmados como sendo os flavonoides isoorientina e orientina respectivamente, através da eluição de padrões externos nas mesmas condições cromatográficas da amostra (Figura 12) e coeluição dos mesmos, podendo-se então comparar os tempos de retenção e os espectros de absorção UV. Esses flavonoides também correspondem aos sinais 2 e 3 da PAC, 4 e 5 da PHM, 4 e 5 do ppt¹HM e os dois únicos sinais, 1 e 2 do ppt²ACT.

Figura 12: Eluição dos padrões isoorientina e orientina, espectro de absorção UV do sinal e tempo de retenção por cromatografia líquida de alta eficiência.



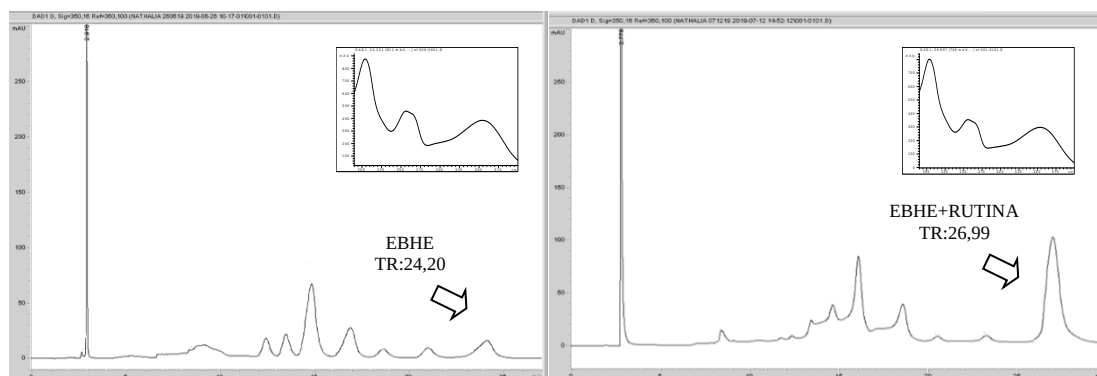
Condições: coluna SB-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 μ L; detecção λ 330 nm.

De acordo com os cromatogramas da Figura 10 e Figura 11, em detecção λ 210, λ 320 e λ 350 nm, os precipitados apresentaram perfis iguais as partições que foram originados, ppt²ACT com PACT e ppt¹HM com PHM, portanto não foram estudados quanto as atividades biológicas avaliadas aqui neste trabalho.

5.2.3 Quantificação por CLAE analítica

De acordo com a coeluição do EBHE com padrão externo rutina (Figura 13) foi possível identificar essa substância no extrato e quantificá-lo. A equação da reta obtida por regressão linear dos dados da curva foi $y=3395,8x-79,803$ com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9993$. O resultado está apresentado na Tabela 5 em μg de rutina por mg de extrato.

Figura 13: Eluição do extrato bruto hidroetanólico e coeluição do extrato bruto hidroetanólico com rutina, espectro de absorção UV do sinal e tempo de retenção por cromatografia líquida de alta eficiência.



Condições: coluna Kromasil; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 μL ; detecção λ 350 nm.

Tabela 5: Resultado da quantificação da rutina no extrato bruto hidroetanólico.

<i>Amostra</i>	*Rutina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
EBHE	$6,40 \pm 0,007$

*Valor médio da concentração de rutina $\pm$ desvio padrão para eluições realizados em triplicata. EBHE: extrato bruto hidroetanólico.

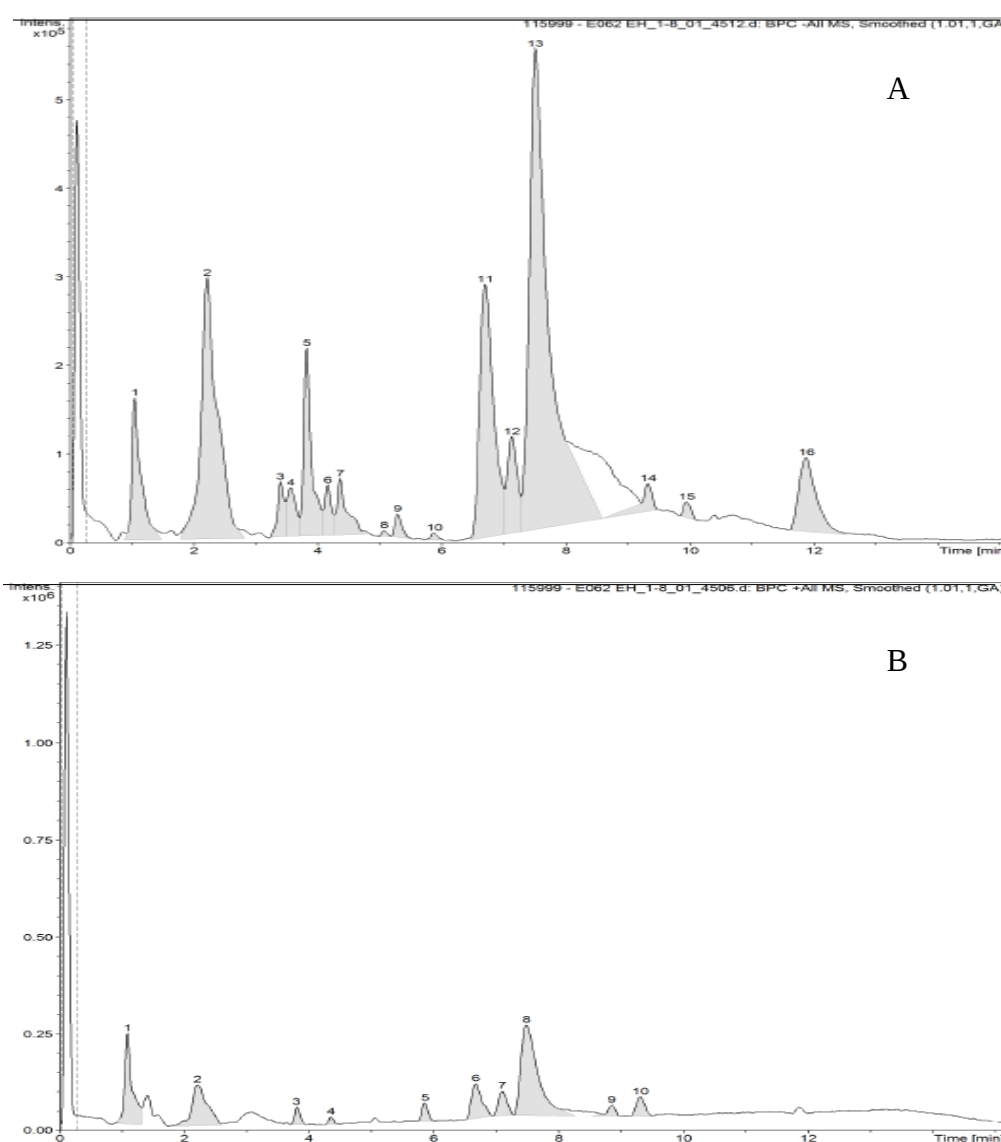
Extratos padronizados correspondem àqueles com conteúdo definido de um ou mais biomarcadores responsáveis pela atividade terapêutica, afim de garantir o controle de qualidade e segurança da matéria prima vegetal até a produção de um fitoterápico (LI et al., 2015).

Segundo Rivera-Mondragón et al. (2017) as substâncias mais importantes para monitoramento dos extratos de *C. pachystachya*, são: ácido clorogênico, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, rutina, b-sitosterol, α -amirina, ácido pomólico, ácido ursólico e ácido tormêntico, devido às suas atividades farmacológicas, às concentrações relativamente elevadas nas amostras, estabilidade química e disponibilidade comercial de padrões analíticos.

5.2.4 Identificação de substâncias por espectrometria de massas

Após análise em espectrômetro de massas Q-TOF nos modos de ionização negativo e positivo, foram observados os seguintes cromatogramas (Figura 14 e Apêndice 1).

Figura 14: Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico de folhas da *Cecropia pachystachya* Trecúl obtido por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas em modo negativo (A) e positivo (B).



Condições: Coluna kinetex- C18; Solventes A: MeOH B: H₂O (0,01' - 5% A; 2' - 33% A; 10,5' - 37% A; 11,5' - 37% A; 13' - 5% A; 15' - 5% A); tempo de eluição: 15 min; fluxo 0,4 mL/min; volume de injeção, 2 µL. Análises realizadas no modo positivo e negativo com ionização por *eletrospray* (ESI) com faixa de massas de 100 a 1000 *m/z* e analisador Q-TOF.

No modo de ionização negativo $[MH]^-$ foram observados 16 sinais com TR variando de 1,0 a 11,9 min. Os perfis de fragmentação referente a cada substância estão apresentados no Apêndice 2.

Uma vez que se tem conhecimento da presença de uma enorme variedade de fenólicos na espécie de *C. pachystachya* (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011), fato constatado pelos perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV, foi dada maior atenção à análise realizada no modo negativo devido à facilidade de ionização dessas substâncias nesse modo.

De acordo com o estudo feito dos metabólitos secundários já descritos na literatura para a espécie *C. pachystachya* e seus perfis de fragmentação, bem como com o auxílio da base de dados *Metlin*, foi possível sugerir a presença dos principais metabólitos presentes no EBHE. A Tabela 6 resume essas substâncias encontradas, incluindo tempo de retenção (*tr*), razão massa carga experimental (*m/z*) em modo negativo $[MH]^-$, fórmula molecular, fragmentos (*MS/MS*) e classe metabólica.

Tabela 6: Tempo de retenção, relação massa/carga, fórmula molecular, fragmentos e classe metabólica apresentados pelas substâncias presentes no extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul após análise de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas em modo negativo.

#	<i>tr</i> (min)	<i>m/z</i> [MH] ⁻	Fórmula molecular	MS/MS [MH] ⁻	Substância
1	1,0	191.0572	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	Ácido Quínico
2	2,2	353.0887	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191	Ácido clorogênico
3	3,4	577.1366	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	339, 425	Procianidina B2
4	3,6	577.1367	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	221, 341, 393	Procianidina B3 ou B5*
5	3,8	577.1373	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	342, 445	Procianidina B3 ou B5*
6	4,2	865.2003	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	287, 432, 490, 576, 739	Procianidina C1
7	4,4	289.0722	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	163, 245	Epicatequina ou Catequina*
8	5,1	387.2031	-	187, 341	-
9	5,3	451.1037	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	289	Cinchona Ib ou Ia*
10	5,9	399.1294	-	195, 289	-
11	6,7	447.0935	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	349	Isoorientina*
12	7,1	579.1365	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	206, 429	Isoorientina-2-O-xilosídeo ou Orientina-2-O-xilosídeo*
13	7,5	447.0938	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	349	Orientina*
14	9,3	563.1411	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	206, 400	Vitexina-2-O-xilosídeo ou Isovitexina-2-O-xilosídeo*
15	10,0	431.0977	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	224, 401	Vitexina ou Isovitexina*
16	11,9	609.1466	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	463	Rutina

#: substância *tr*: tempo de retenção; *m/z*: razão massa carga experimental; MS/MS: Espectrometria de Massas em Tandem; [M-H]⁻ modo de ionização negativo. *Amostras que apresentam isomeria.

Alguns sinais cromatográficos apresentados são de substâncias que possuem isômeros, o que dificulta a identificação/diferenciação das mesmas apenas por espectrometria de massas.

Dois ácidos fenólicos da classe dos hidroxicinâmicos foram possivelmente encontrados. A substância #1 (Tabela 6) foi atribuída ao ácido quínico, m/z 191,06 (Figura 15) e a substância #2 (Tabela 6) ao ácido clorogênico, m/z 353, que apresentou apenas um fragmento sendo este característico do ácido quínico m/z 191,06, portanto a diferença do íon molecular e este fragmento corresponde a perda do grupo cafeoil m/z 162,03 (Figura 16).

Figura 15: Íon molecular do ácido quínico e espectro obtido por espectrometria de massa em modo negativo da substância #1.

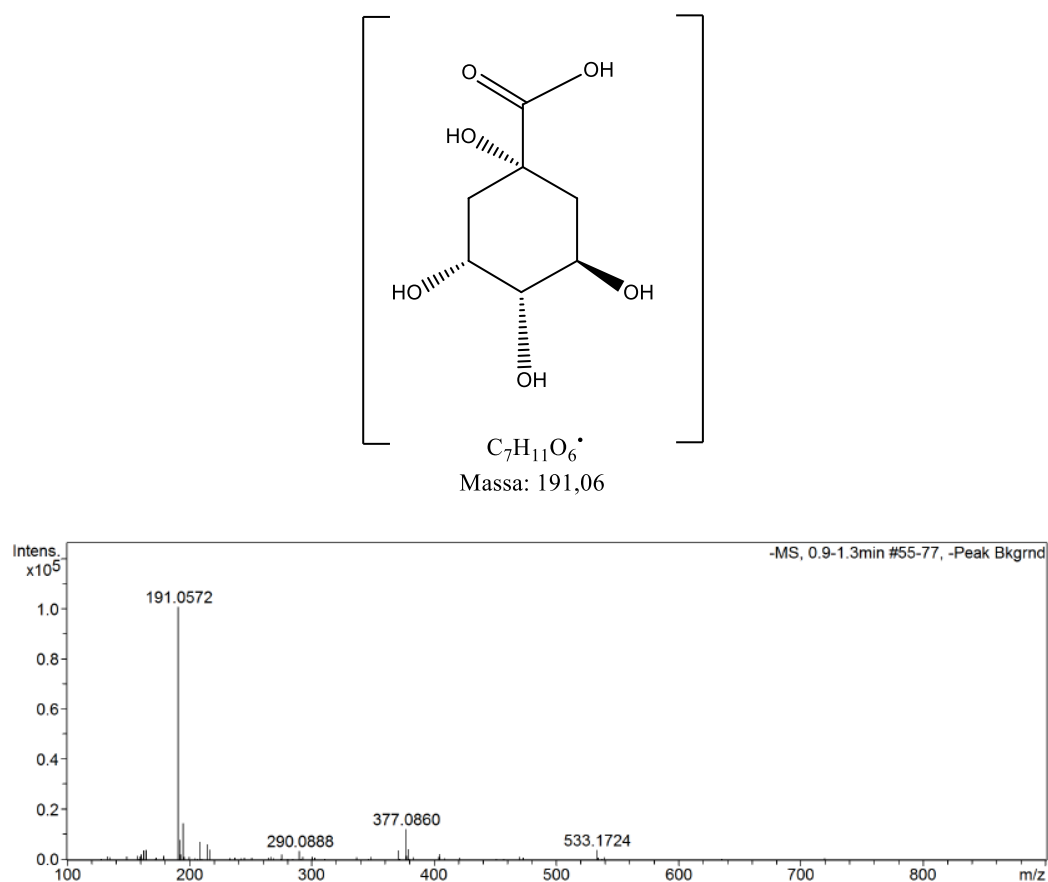
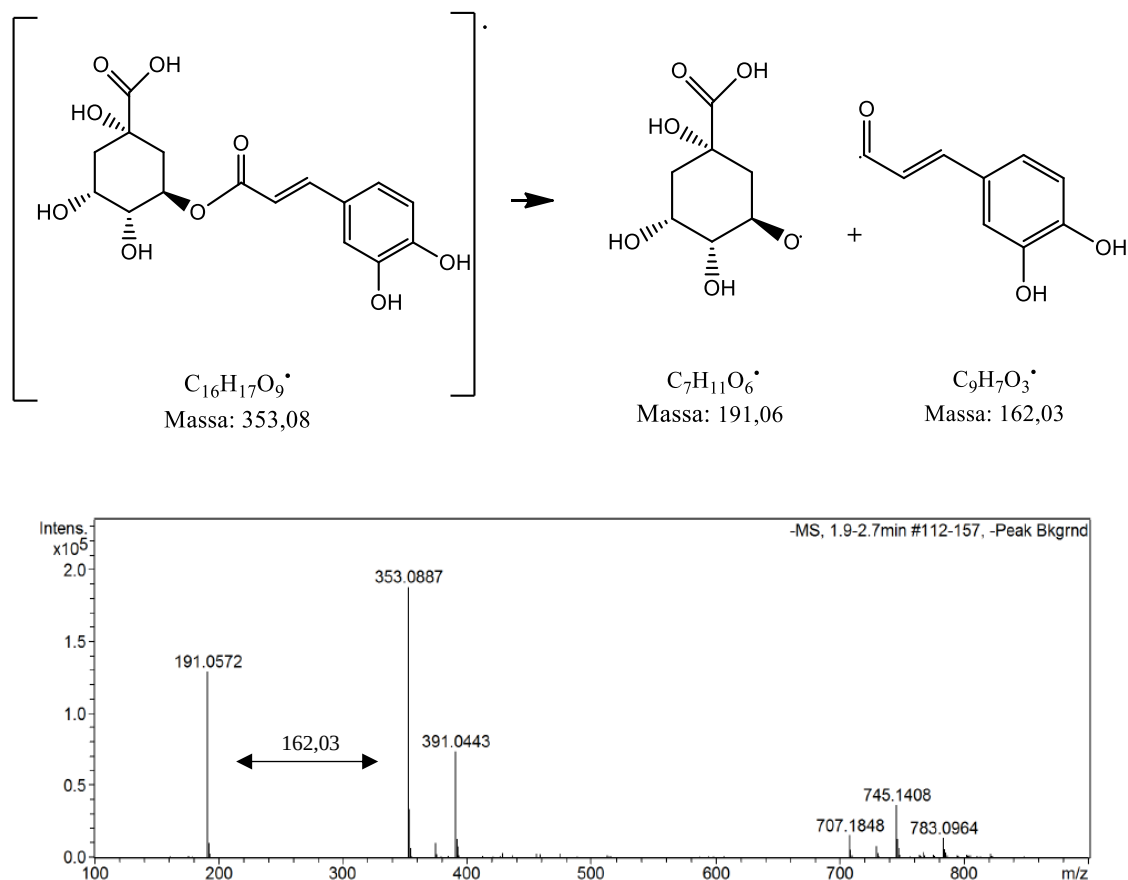


Figura 16: Sugestão da fragmentação do ácido clorogênico e espectro obtido por espectrometria de massa em modo negativo da substância #2.



As substâncias #3, #4, #5 e #6 (Tabela 6) foram identificadas como procianidinas, substâncias que pertencem ao grupo dos taninos condensados derivados de catequinas e/ou epicatequinas (MASUMOTO et al., 2018). De acordo com o íon molecular m/z 577,13 observado em #3, #4, #5 (Tabela 6), pode-se classificá-las como procianidinas do tipo B (B2, B3 ou B5). Segundo estudo de Mathias, Oliveira. (2018) também com *C. pachystachya* e em condições espectrométricas semelhantes, fragmentos m/z 451 e m/z 425 derivados do íon molecular m/z 577,13 são característicos do arranjo B formado por duas moléculas de epicatequinas (ligação C-C entre os monômeros), esse fragmento m/z 425 é observado no presente estudo no sinal #3, portanto ela pode ser diferenciada como a procianidina B2 (Figura 17).

A substância #6 possivelmente refere-se a uma forma trimérica de epicatequina, a procianidina C1, devido ao valor do íon molecular m/z 865,20 e a diferença deste com o fragmento m/z 576, que representa a epicatequina m/z 289 (Figura 19). E o flavonol epicatequina ou catequina, foi atribuído a substância #7, m/z 289,07 (Figura 20).

Figura 17: Íon molecular da procianidina B2 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #3.

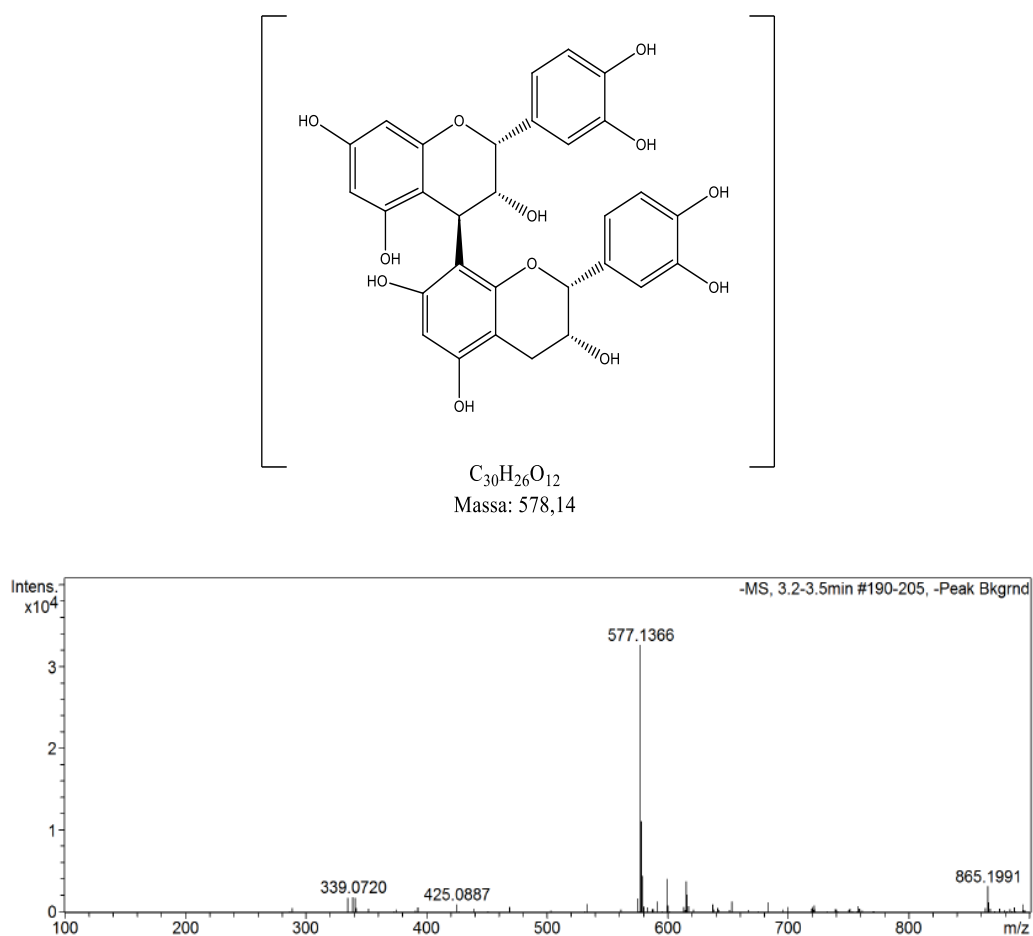


Figura 18: Íon molecular das procianidina B3 e B5 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo das substâncias #4 e #5 respectivamente.

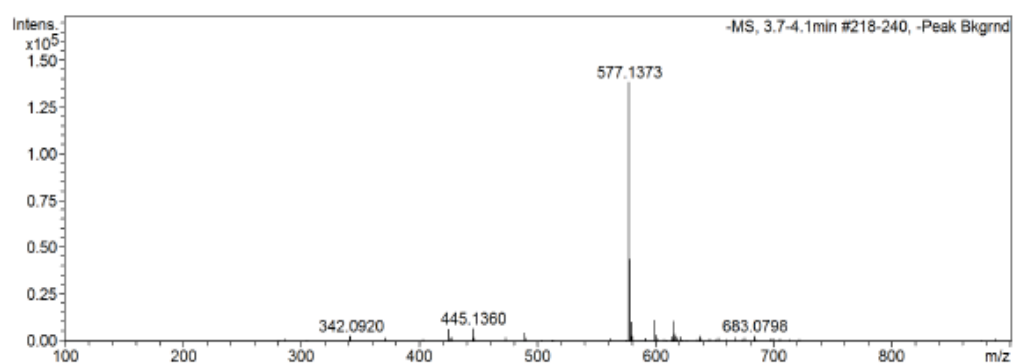
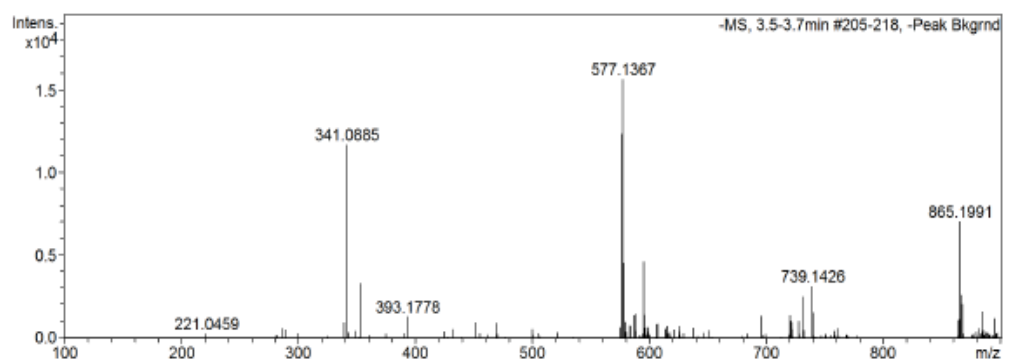
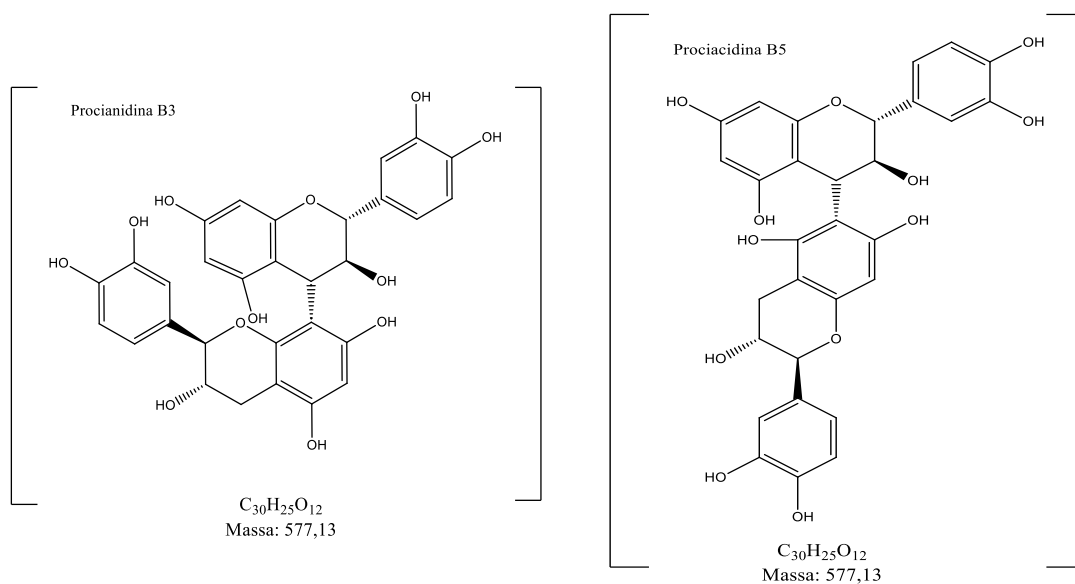


Figura 19: Sugestão da fragmentação da procianidina C1 e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #6.

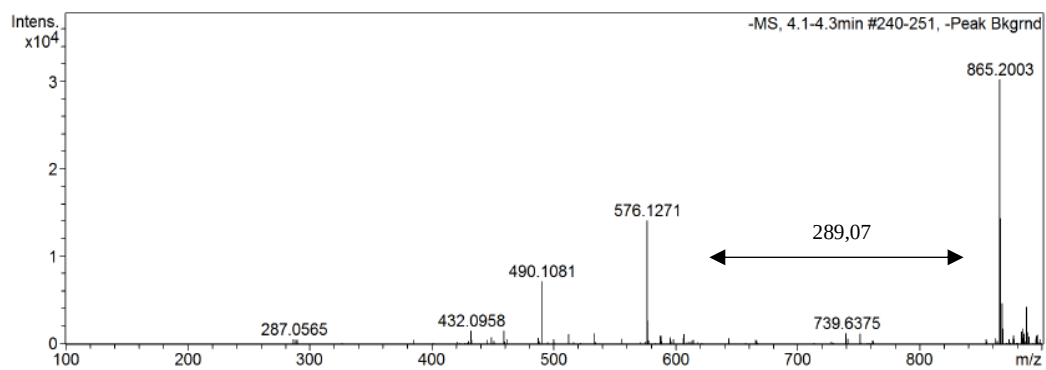
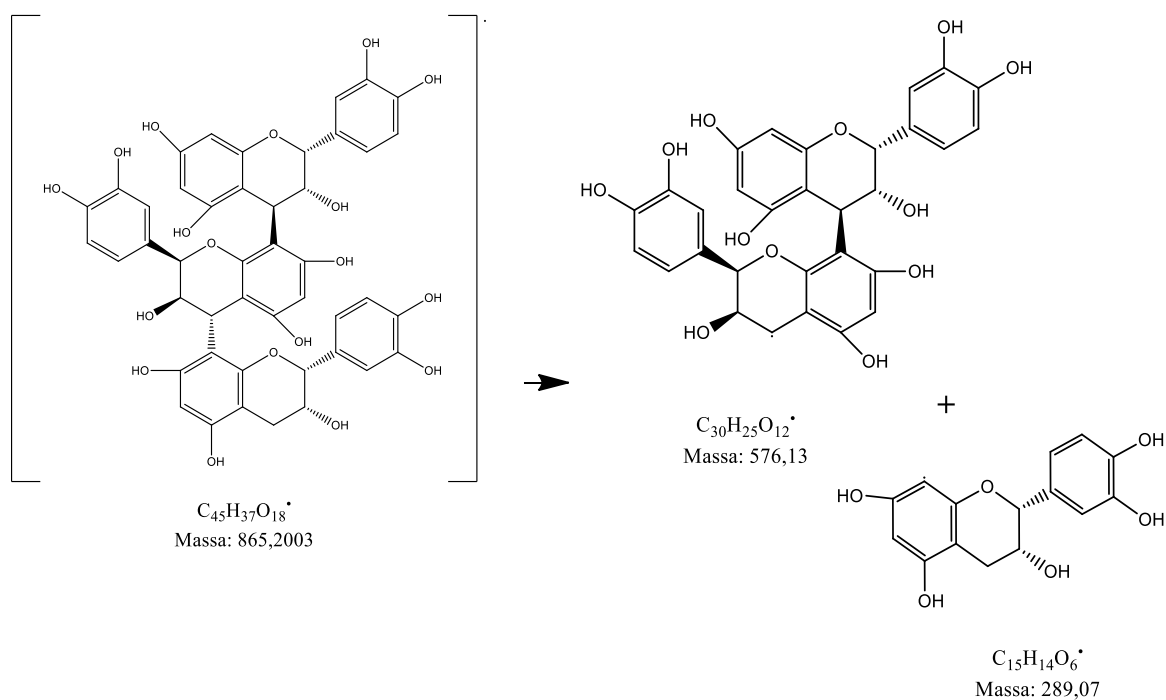
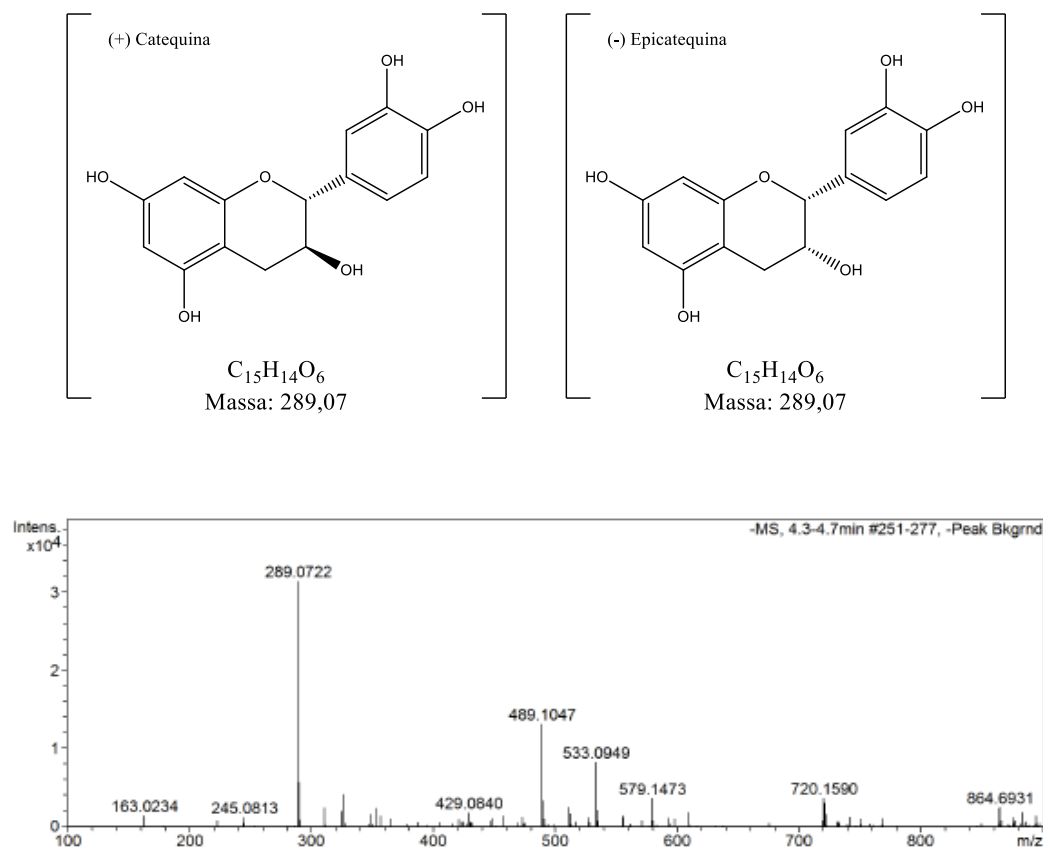
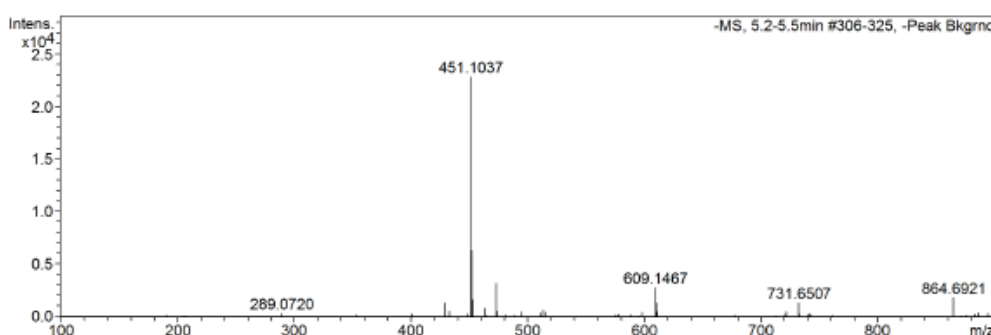
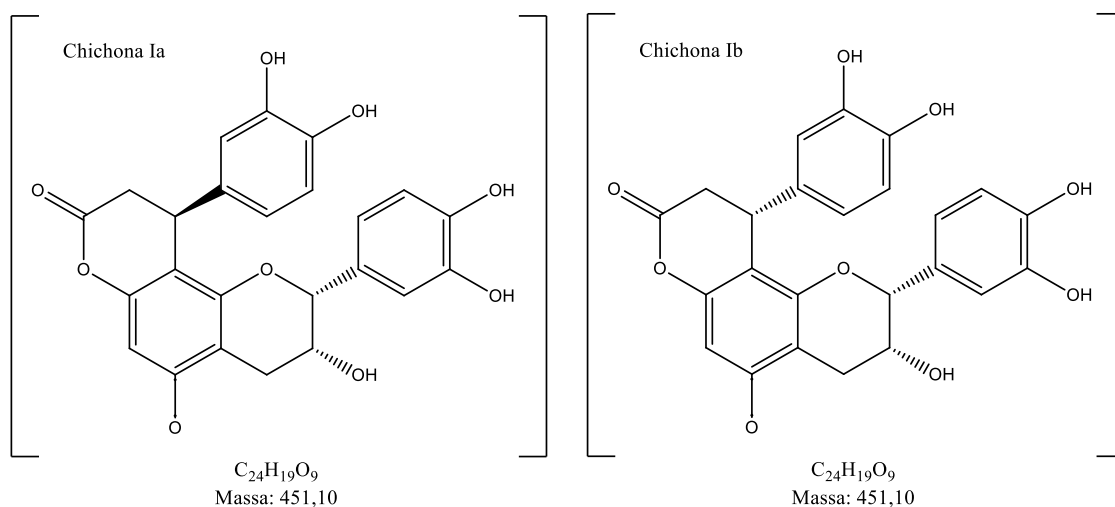


Figura 20: Íon molecular da catequina e epicatequina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #7.



A substância #9 (Tabela 6) foi atribuída a uma flavolignana, cinchona Ia ou Ib, ela apresenta íon molecular m/z 451,10 (Figura 21).

Figura 21: Íon molecular da cinchona Ia e chinchona Ib e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #9.



Isoorientina (luteolina-6-C-glicosídeo) e orientina (luteolina-8-C-glicosídeo), correspondem as substâncias #11 e #13 (Tabela 6), ambas apresentando íon molecular m/z 447,09 (Figura 21). Já a vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) ou a isovitexina (apigenina-6-C-glicosídeo) corresponde a substância #15 apresentando íon molecular m/z 431,09 (Figura 22). Essas substâncias bem relacionadas na espécie, são flavonoides da subclasse flavonas, derivados das agliconas luteína e apigenina, sob a forma de glicosídeos (MATHIAS; OLIVEIRA, 2018).

Também foi observada a presença de isoorientina/orientina-2-O-xilosídeo (m/z 579,13) e vitexina/isovitexina-2-O-xilosídeo (m/z 563,14), nas substâncias #12 e #14 (Tabela 6), respectivamente. O valor m/z 132 adicionado ao íon molecular dessas substâncias refere-se a uma unidade de pentose. A diferença do íon molecular da #12, m/z 579,13, com fragmento m/z 429 corresponde à perda do grupo xilose (m/z 150).

Figura 22: Íon molecular da orientina e isoorientina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #11 e #13.

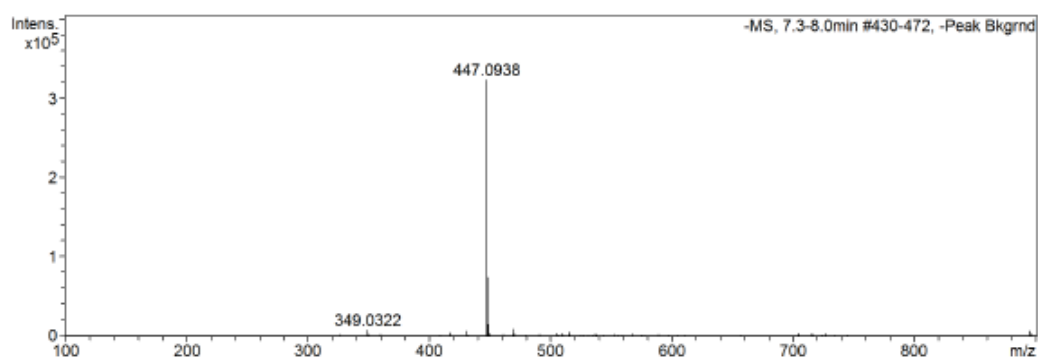
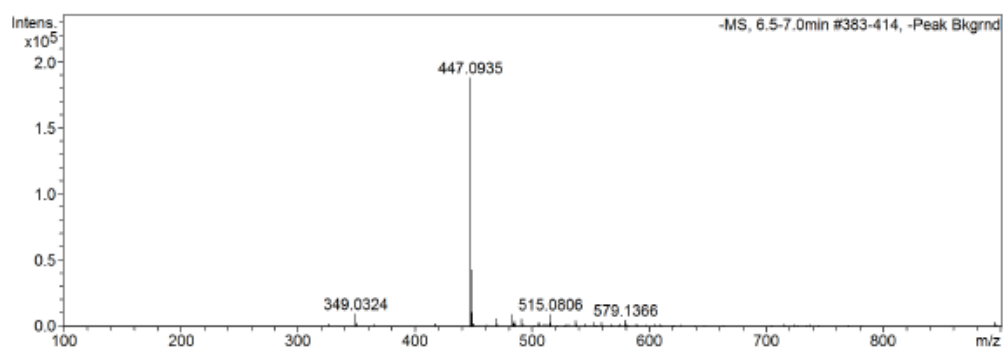
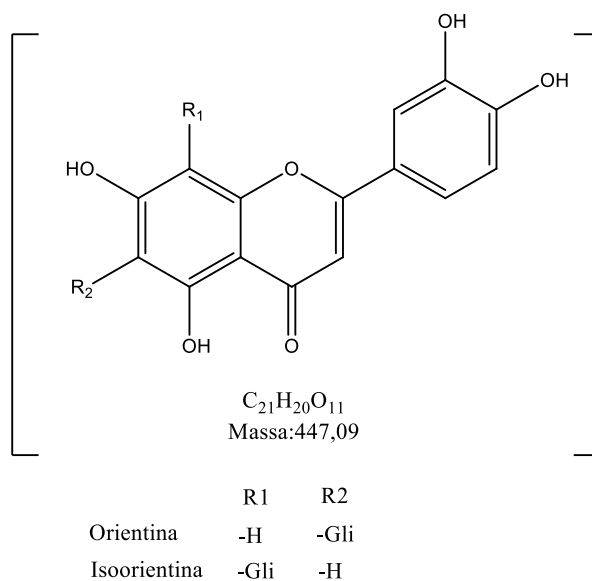
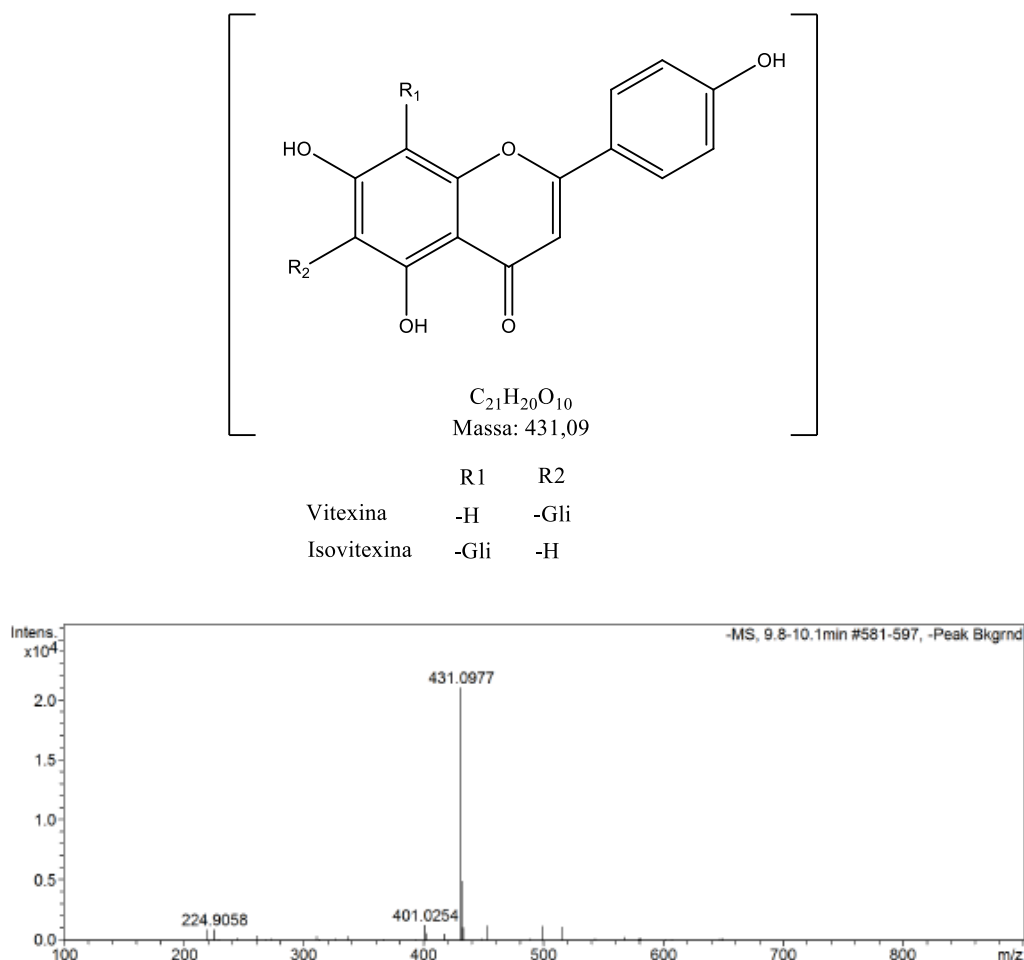
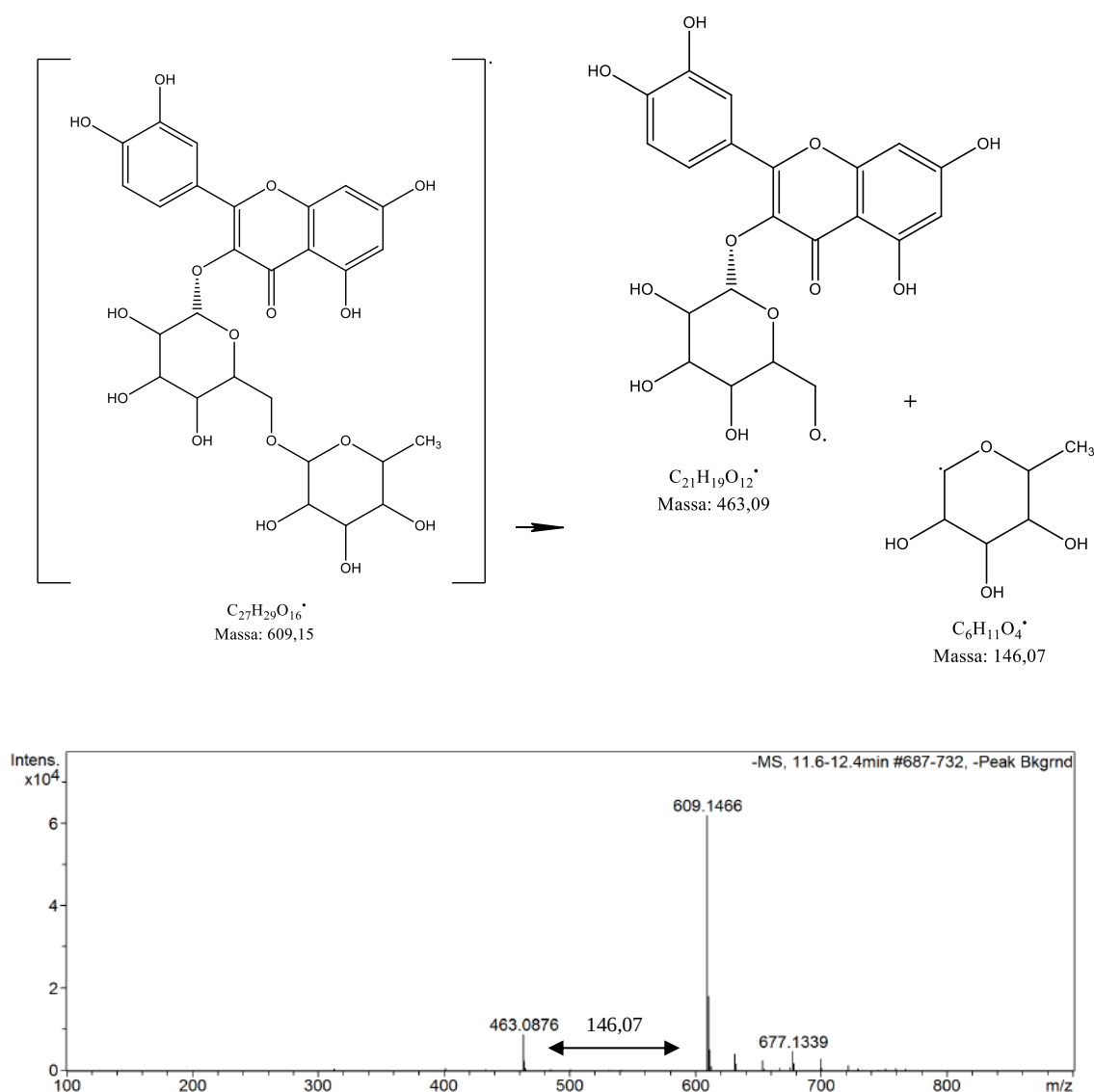


Figura 23: Íon molecular da vitexina e isovitexina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #15.



Por fim a substância #16 (Tabela 6) foi atribuída a rutina, um flavonol do tipo O-diglicosídeo (ramnose + glicose) (MATHIAS; OLIVEIRA, 2018). A diferença do íon molecular da rutina m/z 609,14 com o fragmento m/z 463 obtido, corresponde a m/z 146, que é a massa molecular da ramnose, portanto, podemos sugerir a perda desse grupo na fragmentação (Figura 24).

Figura 24: Sugestão da fragmentação da rutina e espectro obtido por espectrometria de massas em modo negativo da substância #16.



Ácido clorogênico, procianidinas (B2, B3, B5 e C1), catequina, epicatequina, isoorientina e orientina são substâncias comumente encontradas nos extratos de *C. pachystachya*, inclusive em extratos hidroetanólicos. Ácido quinico, vitexina, isovitexina e rutina foram encontrados apenas em extratos metanólicos. Enquanto cinchona Ia/Ib são substâncias inéditas em *C. pachystachya*, foram até então descritas apenas na espécie *C. schreberiana*.

A Tabela 7 resume essas substâncias com suas atividades estudadas na espécie, o extrato onde foram encontradas e com suas as referências.

Tabela 7: Substâncias, suas atividades biológicas estudadas para *Cecropia pachystachya*, tipo de extrato encontradas e referências.

Substância	Atividade biológica estudadas para <i>C. pachystachya</i>	Extrato	Referências
Ácido quínico	-	EM	(MATHIAS; OLIVEIRA, 2018)
Ácido clorogênico	Anti-diabético, antiinflamatório, leishmanicida, neuroprotetor, antioxidante, cicatrizante, inibidor QS	EM, EACT, EA, F. C-GLICOSIL, EE	(ARAGÃO et al., 2010; COSTA; ORTMANN; SCHENKEL, 2011; CRUZ et al., 2013; DUQUE et al., 2016; GAZAL et al., 2014, 2015; MAQUIAVELI et al., 2014; MATHIAS; OLIVEIRA, 2018; MENDONÇA et al., 2016; PACHECO et al., 2014)
Procianidinas B2, B3, B5, C1 Catequina Epicatequina	Antioxidante, antihipertensivo, leishmanicida	EM, EE	(CRUZ et al., 2013; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; MATHIAS; OLIVEIRA, 2018)
*Cinchona Ia/Ib	-	EAC	(LI et al., 2013)
Isoorientina Orientina	Anti-diabético, antioxidante, anti-inflamatório, antidepressivo, neuroprotetor, cicatrizante, leishmanicida, inibidor QS	EM, EACT, EA, F. C-GLICOSIL, EE, EH	(ARAGÃO et al., 2010; BRANGO-VANEGAS et al., 2014; COSTA; ORTMANN; SCHENKEL, 2011; DUQUE et al., 2016; FERNANDES et al., 2019; GAZAL et al., 2014, 2015; MATHIAS; OLIVEIRA, 2018; OLIVEIRA et al., 2003; ORTMANN et al., 2016; PACHECO et al., 2014a)
Vitexina Isovitexina	Anti-inflamatório, antioxidante, anti-hipertensivo, antidiabético, antidepressivo, leishmanicida, neuroprotetor, cicatrizante, inibidor QS	EM	(BRANGO-VANEGAS et al., 2014; COSTA; ORTMANN; SCHENKEL, 2011; GAZAL et al., 2014; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; MATHIAS; OLIVEIRA, 2018; MENDONÇA et al., 2016)
Rutina	Anti-inflamatório, antioxidante, inibidor QS	EM	(BRANGO-VANEGAS et al., 2014; LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001)

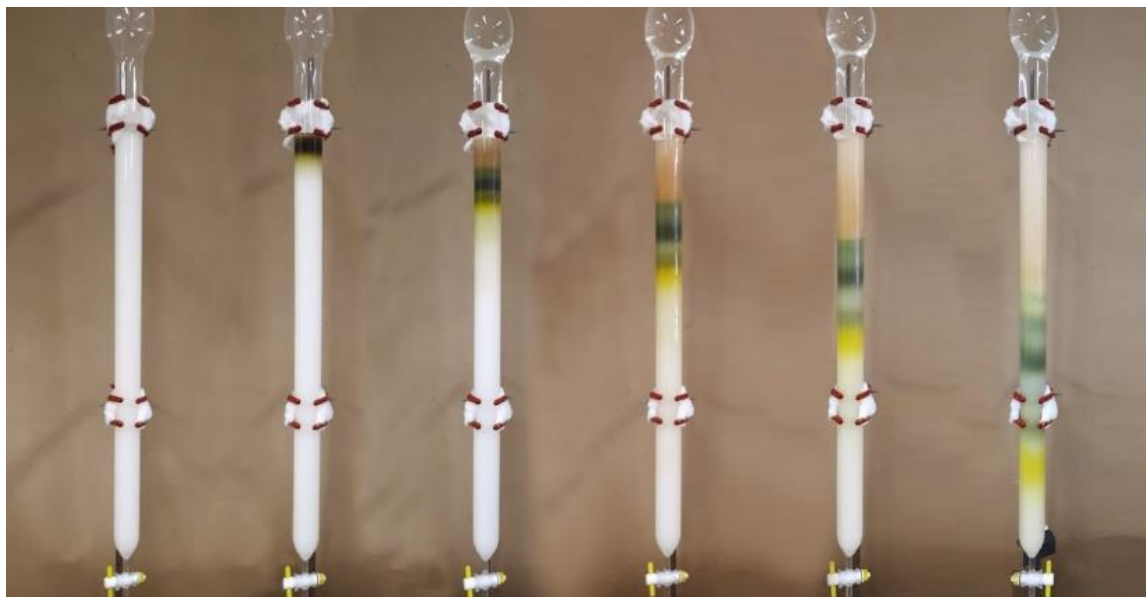
*Encontradas apenas na espécie *Cecropia schreberiana*. EM: extrato metanólico; EACT: extrato em acetato de etila; F.: fração; EA: extrato aquoso; EE: extrato etanólico; EH: extrato hidroetanólico; EAC extrato em acetona. QS: *quorum sensing*.

FONTE: AUTORA (2019)

5.2.5 Isolamento de substâncias presentes no extrato de *C. pachystachya*

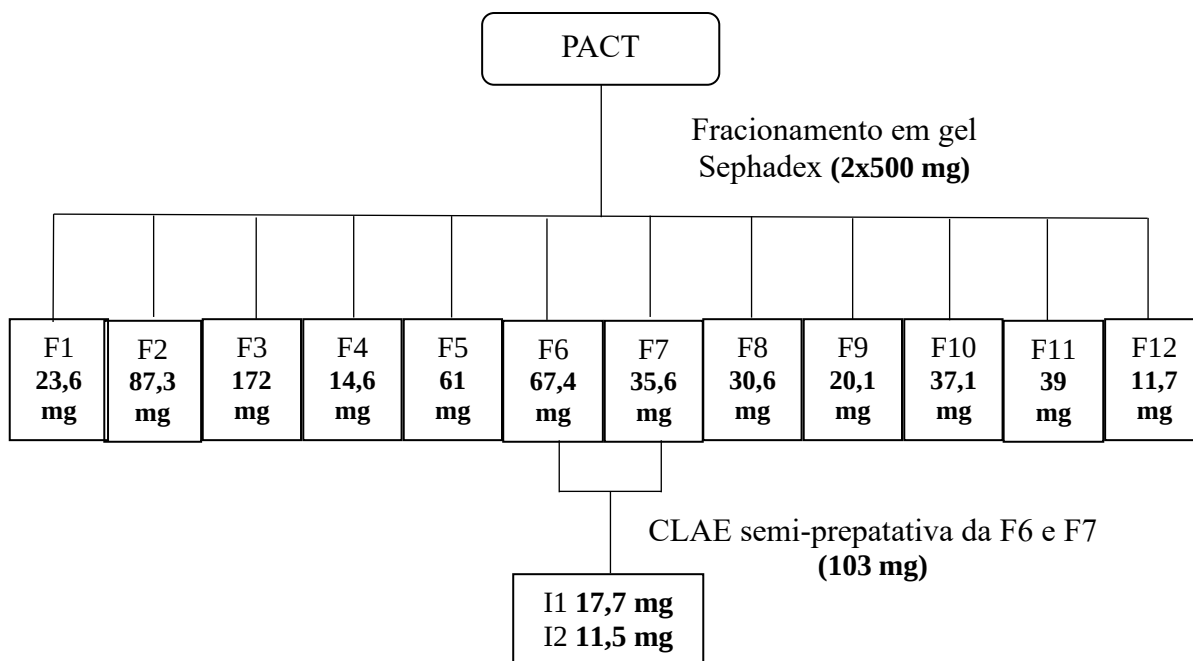
Realizou-se o fracionamento da PACT em coluna cromatográfica em gel Sephadex LH-20 (Figura 25) com intuito de se obter amostras semi-purificadas. O fracionamento forneceu 12 frações (F1 a F12). O rendimento obtido do processo foi 60% e a massa de cada fração se encontra no fluxograma da Figura 26.

Figura 25: Etapas da eluição da partição em acetato de etila do extrato hidroetanólico de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul durante o processo de fracionamento em coluna cromatográfica em gel Sephadex LH-20.



Fonte: AUTORA (2018).

Figura 26: Fluoxograma da obtenção das frações e isolados o com suas respectivas massas.



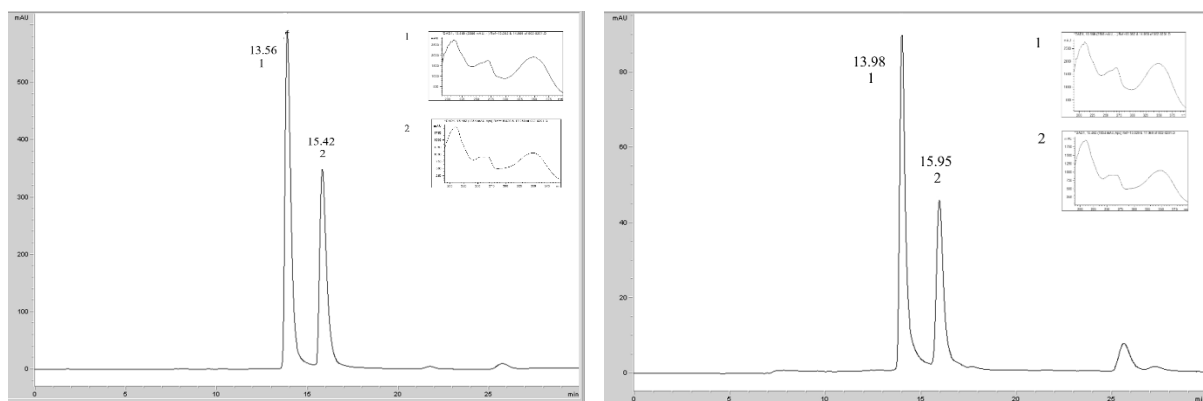
PACT: partição em acetato de etila; F: frações; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; I1: isolado 1; I2: isolado 2.

FONTE: AUTORA (2019)

Após verificar o perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD analítico conforme item 4.5.2 e CCD revelada com NP-PEG conforme item 4.5.1, duas frações de interesse, F6 e F7, foram utilizadas para próxima etapa do isolamento.

Essas frações apresentaram fluorescência na CDD, confirmando a presença de flavonoides. De acordo com o perfil cromatográfico apresentado por CLAE UV-DAD, mostraram-se semipurificadas e semelhantes entre si (Figura 27). A massa dessas frações foram, respectivamente: 67,7 mg e 35,6 mg, que representam 9,49% e 5% do rendimento total.

Figura 27: Perfis cromatográficos das frações F6 e F7, respectivamente, obtidas pelo fracionamento da partição em acetato de etila em coluna cromatográfica de gel Sephadex LH-20.



Condições: coluna Kromasil C-18; isocrática de solventes acetonitrila:H₂O (0' - 5:95%; 3.01' 15:75%); tempo de eluição: 30 min; fluxo 0,8 mL/min; volume de injeção, 50 µL; detecção λ 350 nm.

Na CLAE-UV-DAD semi preparativa foi possível isolar duas substâncias: isolado 1 (I1), com massa 17,7 mg e rendimento 17,13% e isolado 2 (I2) com massa 11,5 mg e 11,13% de rendimento (Figura 26). A Figura 27 mostra a presença de dois sinais em F6 e F7, que de acordo com o tempo de retenção e o espectro de absorvância são os flavonoides Isoorientina e Orientina, conforme a coeluição na PACT (Figura 12). Portanto I1 e I2 possivelmente são esses flavonoides, respectivamente.

5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

5.3.1 Atividade antioxidante

Considerando a diversidade dos constituintes dos extratos vegetais e a complexidade do processo oxidativo, é necessária a utilização de mais de uma técnica para traçar o perfil antioxidante de uma amostra (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). Dessa forma, foram empregadas cinco diferentes metodologias que têm por base a redução de radicais livres e íons metálicos (método do DPPH, fósfolípidênio, NO, FRAP) e inibição do processo de peroxidação lipídica (método do β -caroteno/ácido linoleico).

A quercetina, um flavonoides natural e abundante em espécies vegetais é capaz de prevenir a lesão oxidativa e a morte celular por neutralização de radicais livres, evitar a peroxidação lipídica e a quelação de íon metálicos (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014; PISOSCHI; POP, 2015; RAHAL et al., 2014). Assim, a quercetina foi utilizada como padrão

de comparação em todos os testes para avaliação da atividade antioxidante. Também foi utilizado o ácido ascórbico (vitamina C), exceto no teste de peroxidação lipídica e do NO (por motivos de mecanismo de ação diferente do proposto pelo método e/ou incompatibilidade da metodologia padronizada). Uma série de benefícios do ácido ascórbico, incluindo seus efeitos antioxidantes já foi relatada, sendo capaz de reagir com oxigênio singlete ($O_2^{\cdot-}$) e outros radicais livres neutralizando-os (REKHA et al., 2012). No método do NO, o ácido ascórbico foi substituído pelo ácido gálico, um ácido benzoico presente na maioria das plantas com atividade antioxidante também descrita (FERNANDES; SALGADO, 2016).

Os resultados da atividade antioxidante determinada para EBHE, PHEX, PACT e PHM, e controles positivos, pelos métodos sequestro do radical livre DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio, descoramento do sistema β -caroteno/ácido linoleico, FRAP, e inibição da produção de NO estão apresentados na Tabela 8 e Figuras 28, 29, 30 e 31 respectivamente.

5.3.1.1 Método do sequestro de radicais livres (DPPH)

Tabela 8: Atividade antioxidante das amostras de *Cecropia pachystachya* pelo método do sequestro do radical livre DPPH.

<i>Amostra</i>	¹ DPPH CI ₍₅₀₎
Q	1,02 ± 0,03
AA	0,24 ± 0,05
EBHE	1,04 ± 0,12 ^{# a}
PHEX	61,52 ± 2,65 [#]
PACT	1,50 ± 0,20 ^{*# a}
PHM	1,21 ± 0,07 ^{*# a}

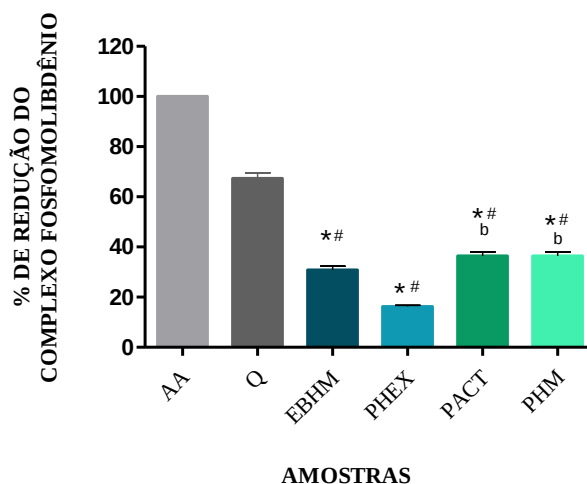
¹ Valores expressos com média ± desvio padrão. CI₍₅₀₎: concentração inibitória média; Q: quercetina; AA: ácido ascórbico; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila. Análise estatística realizadas por teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.*Valores significativamente diferentes da quercetina (p<0,05). [#] Valores significativamente diferentes do ácido ascórbico (p<0,05). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras (p>0,05).

O método do DPPH é um dos ensaios antioxidantes mais utilizados por ser uma metodologia simples, rápida e eficiente na triagem de extratos obtidos a partir de solventes com

diferentes polaridades (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). O DPPH é um radical livre, nitrogenado e estável que reage com substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio. Portanto, o método baseia-se na inibição do DPPH através da adição de um antioxidante que é capaz de reduzi-lo. Essa reação é caracterizada pela mudança da cor purpúra (cor própria do radical) para amarelo (cor característica da forma reduzida) (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SILVA et al., 2013). Dentre as amostras, o EBHE foi o que apresentou maior número de substâncias fenólicas por CLAE-UV. Também apresentou teor de fenólicos e flavonoides expressivos, o que correlaciona a sua atividade antioxidante ser significativamente igual à quercetina, já que ambos conseguiram inibir 50% do radical DPPH em concentrações significativamente iguais ($1,02 \pm 0,03$ e $1,04 \pm 0,12$, respectivamente). Apesar dos resultados para as demais amostras terem sido significativamente diferente dos controles, podem ser caracterizadas como amostras promissoras e com potencial antioxidante, uma vez que a quercetina e o ácido ascórbico são substâncias puras e com alta atividade antioxidante já reconhecida. Fernandes et al. (2019) apresentou um resultado comparável para o mesmo extrato ($1,07 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$). Duque et al. (2016) e Pacheco et al. (2014) também encontraram uma atividade mais baixa para os extratos em acetato de etila ($3,1 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$) e metanólico ($1,93 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) das folhas de *C. pachystachya*.

5.3.1.2 Modelo de redução do complexo fosfomolibdênio

Figura 28: Atividade antioxidante das amostras de *Cecropia pachystachya* Trécul obtida pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio.

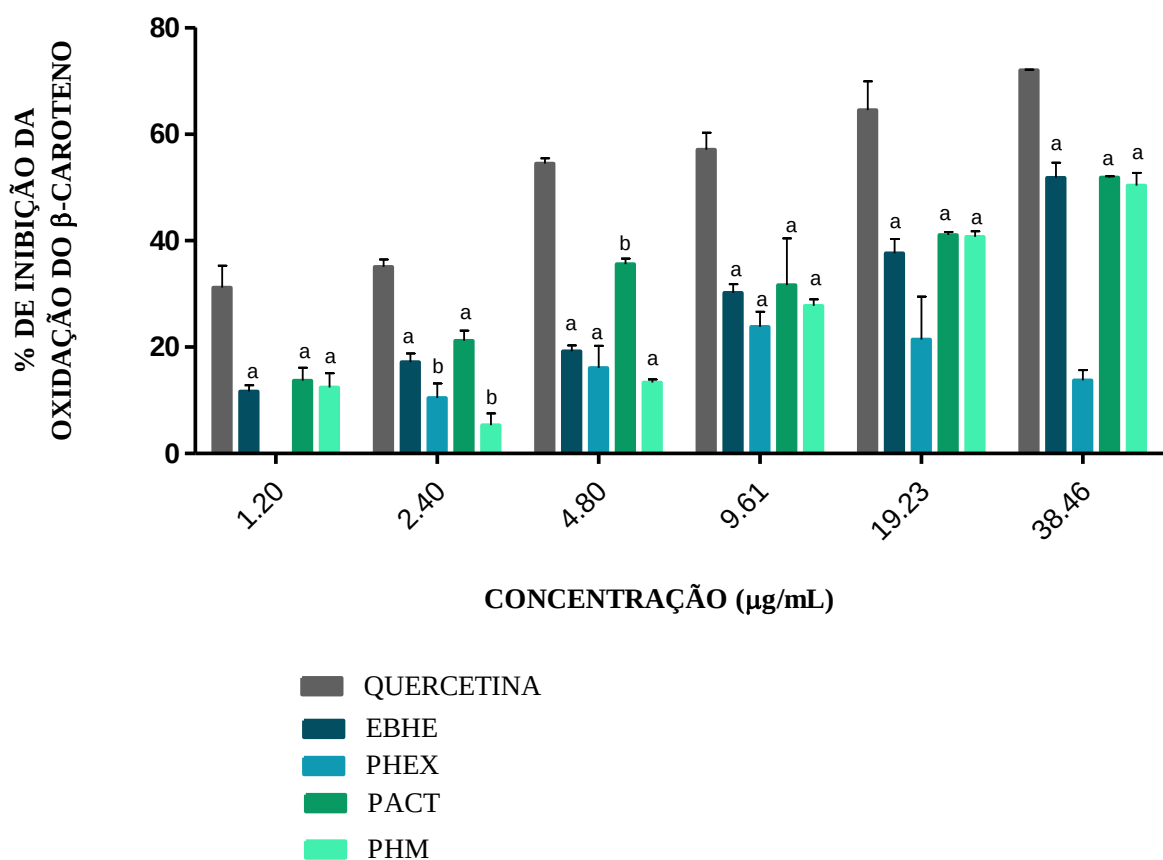


Média de percentual de inibição $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para os controles e amostras descritas. Análise estatística realizadas por teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. AA: ácido ascórbico; Q: quercetina; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica. *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,05$). #Valores significativamente diferentes do ácido ascórbico ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p > 0,05$).

De acordo com Merino et al., (2015) o método fosfomolibdênio possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante total de componentes lipofílicos e hidrofílicos em misturas complexas de maneira simples e com baixo custo. O ensaio baseia-se na redução da molécula de molibdênio (IV) a molibdênio (V) por substâncias antioxidantes, e subsequente formação de um complexo fosfato/Mo (V) de coloração esverdeada em pH ácido. Fazendo uma comparação dos percentuais de redução de molibdênio, com exceção da PHEX, elas apresentaram valores próximos e foram relevantes considerando que representam o percentual de redução em relação a atividade antioxidante do ácido ascórbico, considerada 100%.

5.3.1.3 Método β -caroteno/ácido linoleico

Figura 29: Atividade antioxidante das amostras de *Cecropia pachystachya* obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico.



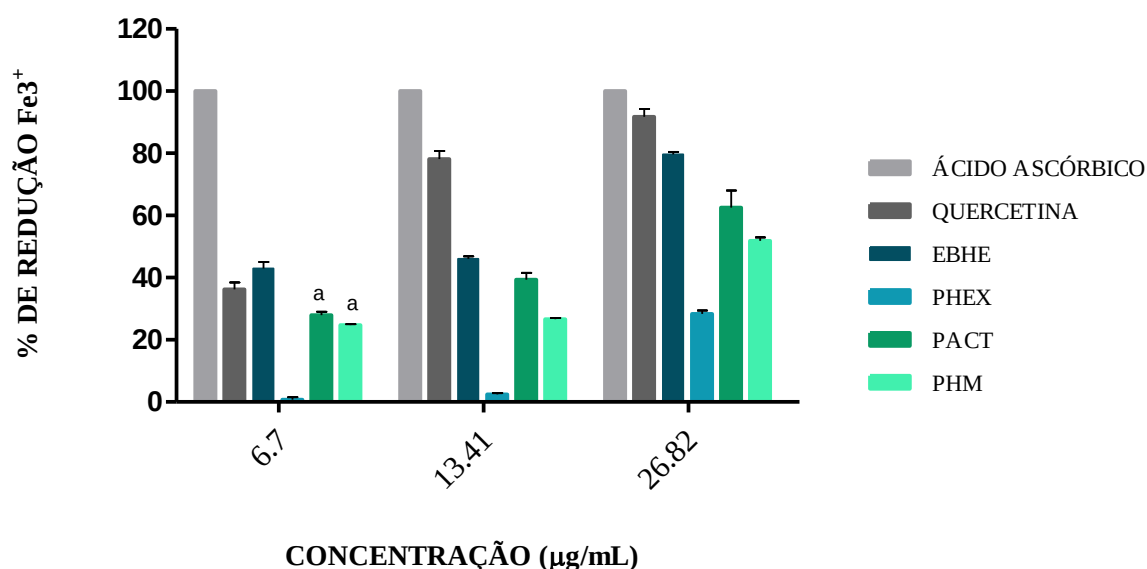
Média de percentual de inibição $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para os controles e amostras descritas. Análise estatística realizadas por teste ANOVA two way, seguido pelo teste de Bonferroni. Q: quercetina; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica. Todos os valores são significativamente diferentes da quercetina comparando-se em todas as concentrações ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras em cada concentração ($p < 0,001$).

Os lipídios são componentes essenciais das membranas celulares mantendo a estrutura e controlando a função das células. Pode ser relacionado ao estresse oxidativo e é associado à várias doenças, como: aterosclerose, câncer, diabetes, lesões pulmonares agudas, bem como os transtornos neurodegenerativos que incluem a doença de Alzheimer e Doença de Parkinson. A reação de lipídios com o oxigênio molecular (peroxidação lipídica), tem sido uma área de importantes pesquisas há décadas (YIN; XU; PORTER, 2011). O método do β -caroteno/ácido linoleico permite avaliar a degradação oxidativa da molécula de ácido linoleico, e os produtos de peroxidação formados proporcionam a oxidação do β -caroteno e consequentemente seu descolorimento. Dessa maneira, a presença de substâncias antioxidantes nas amostras minimizam o descolorimento do β -caroteno, pois o radical livre linoleato e outros

radicais são neutralizados (ATIQA, 2014; SANG et al., 2014). Os resultados apresentados na Figura 26 mostram, com exceção da PHEX, que os percentuais de inibição para as amostras foram próximos em cada concentração avaliada. Os resultados foram significativos, visto que em praticamente todas as concentrações, incluindo as mais baixas, as amostras conseguiram, em sua maioria, inibir 50% ou mais quando comparadas com os percentuais de inibição da quercetina, e como já mencionado esta é um potente inibidor da peroxidação lipídica.

5.3.1.4 Poder de redução do ferro (FRAP)

Figura 30: Atividade antioxidante das amostras de *Cecropia pachystachya* Trécul obtida pelo método do poder de redução do ferro.



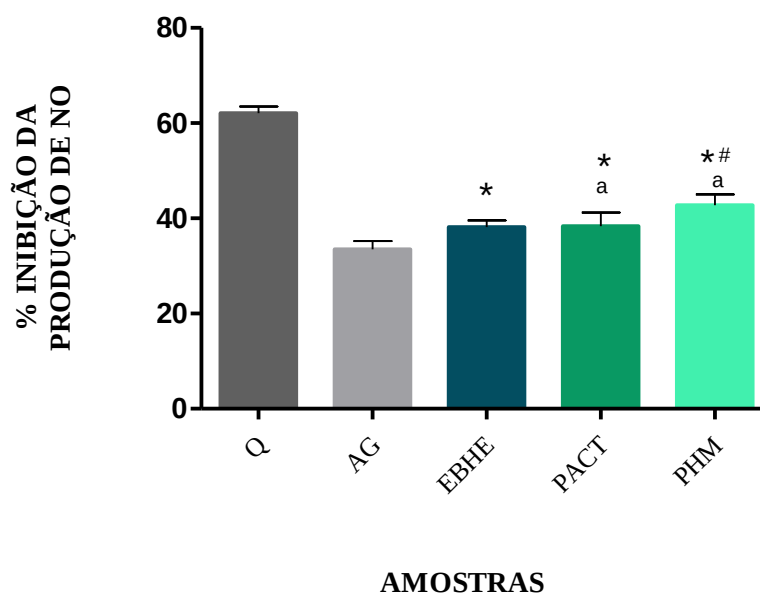
Média de percentual de inibição $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para os controles e amostras descritas. Análise estatística realizada por teste ANOVA “two way”, seguido pelo teste de Bonferroni. EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica. Todos os valores são significativamente diferentes do ácido ascórbico comparando-se em todas as concentrações ($p < 0,001$). Todos os valores são significativamente diferentes da quercetina comparando-se em todas as concentrações ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,001$).

O ensaio FRAP mede o potencial de redução de um antioxidante que irá reagir com o complexo tripiridiltiazina férrico ($\text{Fe}^{3+}\text{TPTZ}$), formado na reação, sendo capaz de reduzi-lo para o complexo corado tripiridiltiazina ferroso ($\text{Fe}^{2+}\text{TPTZ}$) em pH baixo (ATIQA, 2014). Portanto esse teste envolve os mecanismos de transferência de elétrons (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012). Da mesma forma que o método de redução do fosfomolibdênio, a capacidade de redução das amostras foi avaliada em relação ao ácido ascórbico, considerado 100% de redução do Fe^{3+} . Todas as amostras demonstraram uma relação dependente da dose, portanto

quanto maior a concentração maior o percentual de redução do Fe^{3+} (Figura 30). O EBHE apresentou resultados significativos de percentuais de redução do Fe^{3+} , na menor concentração o percentual foi superior ao da quercetina. Com exceção à PHEX, os resultados foram próximos e promissores quando comparamos a quercetina e consideramos o potencial antioxidante do ácido ascórbico.

5.3.1.4 Inibição da produção de NO

Figura 31: Atividade antioxidante das amostras de *Cecropia pachystachya* obtida pelo método de inibição da produção de óxido nítrico.



Média de percentual de inibição $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para os controles e amostras descritas. Análise estatística realizadas por teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Q: quercetina; AG: ácido gálico; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica. *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,05$). #Valores significativamente diferentes do ácido gálico ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$).

Embora o NO tenha um papel endógeno essencial, diversos estudos demonstram que o excesso desse radical pode estar envolvido na alteração de estrutura e função de muitos componentes celulares, dessa forma inúmeras patologias estão associadas a este excesso, como, por exemplo, as desordens neurodegenerativas e crônicas. Dessa forma, é importante avaliar amostras que podem ser capazes de sequestrá-lo (ABU; UCHENDU, 2010; MAIA et al., 2010). No teste de inibição da produção de NO, o radical é gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato em tampão fosfato, e uma vez gerado ele interage com o oxigênio para

produzir íons nitrito, que por sua vez, são quantificados pela reação de Griess (CITÓ et al., 2013). De acordo com os resultados obtidos no teste (Figura 31), PHEX apresentou um resultado questionável comparado com os outros métodos que avaliaram a capacidade antioxidante das amostras. Seu percentual de inibição da produção de NO ficou acima das demais amostras, possivelmente há uma interferência da cor dessa partição na leitura espectrométrica. A PHM foi a amostra com o melhor resultado e significativamente maior que o ácido gálico. As demais amostras foram significativamente iguais ao ácido gálico e iguais entre si, demonstrando assim, seu potencial em inibir a produção de NO, visto que ácido gálico, uma substância isolada e pura, tem seu potencial antioxidante relatado, como já mencionado.

Com os resultados apresentados pelos métodos, pode-se concluir que as amostras apresentaram significativo potencial antioxidante demonstrado em todas as metodologias, tanto para os testes de inibição de redução de radicais quanto no teste de peroxidação lipídica. E os resultados para EBHE foram na maioria dos testes semelhantes as partições. Em exceção à PHEX, não foram encontradas diferenças relevantes quando se compara as respostas das amostras em cada teste.

Várias plantas são reconhecidas por possuírem significativa atividade antioxidante quando comparadas aos antioxidantes sintéticos (Krishnaiah; Sarbatly; Nithyanandam, 2011). Segundo Gulcin; Beydemir, (2013) os principais metabólitos com ação antioxidante, derivados de espécies vegetais, são os fenólicos e seus derivados, principalmente os tocoferóis, os ácidos fenólicos, os flavonoides e seus glicosídeos e, como observado por espectrometria de massas, ácidos fenólicos (ácido quínico e ácido clorogênico) e alguns flavonoides (epicatequina/catequina e procianidinas) e derivados glicosilados (isoorientina, orientina vitexina/isovitexina e rutina) estão presentes no EHBH.

Os ácidos fenólicos, derivados do ácido e os derivados do ácido cinâmico são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm demonstrado seu potencial protetor dos danos oxidativos. O mecanismo principal da ação é a transferência do átomo de hidrogênio das hidroxilas fenólicas (OH) para os radicais peroxil (GULCIN; BEYDEMIR, 2013; PISOSCHI; POP, 2015).

Em relação aos flavonoides, o mecanismo de ação antioxidante melhor descrito deriva da capacidade em eliminar diretamente as ERs, sendo capazes de estabilizar os radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio das hidroxilas fenólicas presentes em sua estrutura ou pela transferência simples de elétrons. Outro possível mecanismo é por quelação de metais de transição, evitando que esses íons sejam propensos à oxidação, como os íons Fe^{2+} e Cu^+ que desempenham papel vital no metabolismo do oxigênio e na formação de radicais

livres. Por fim, flavonoides também podem inibir enzimas geradoras de radicais livres como xantina oxidase, lipoxigenase, proteína quinase C, cicloxygenase, monooxygenase microsomal, e NADPH oxidase (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014).

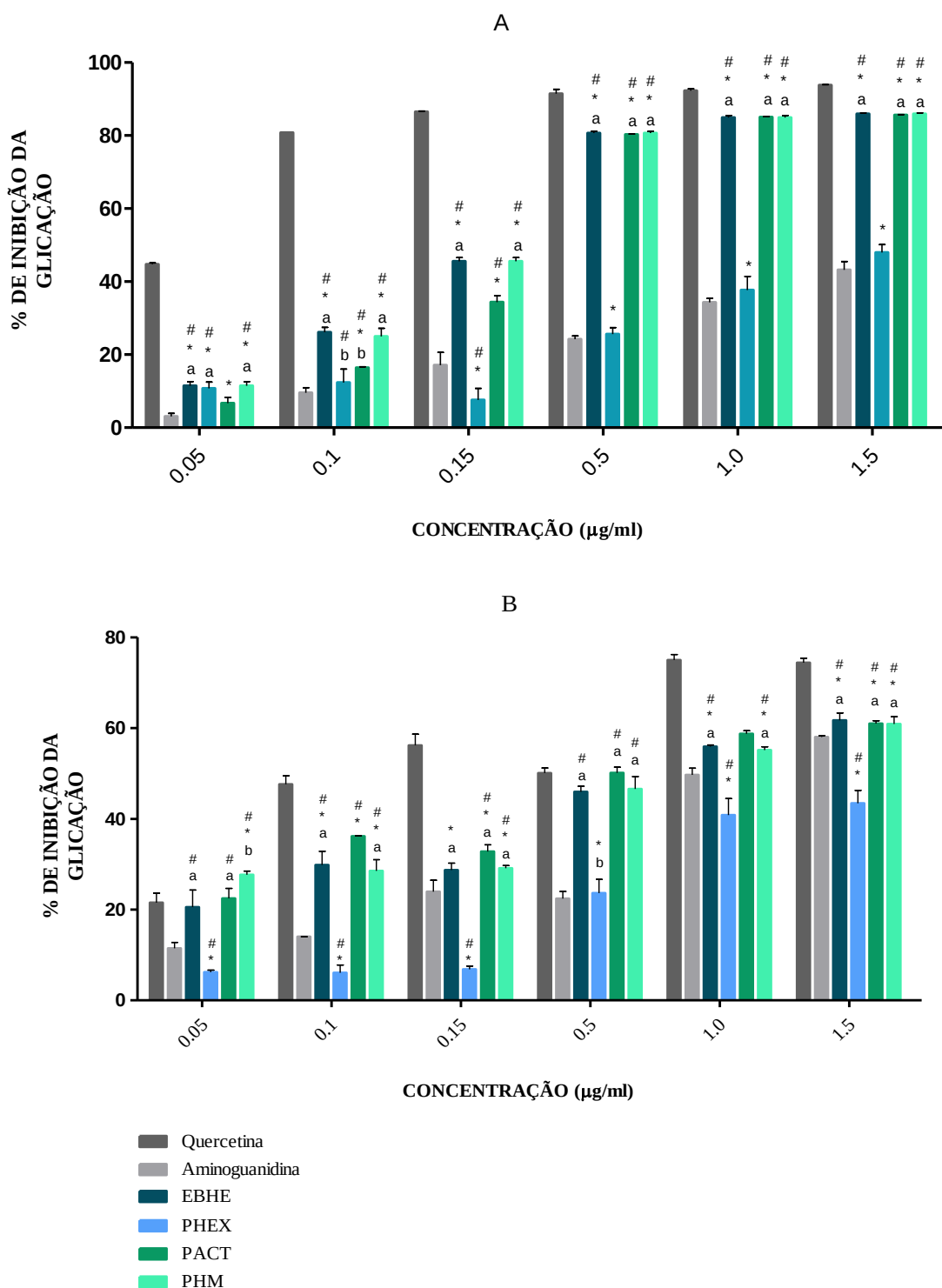
Dessa forma é possível correlacionar a presença de fenólicos e de flavonoides aos resultados observados. PHEX apresentou resultados baixos em todos os testes antioxidantes, e seus teores fenólicos foram inferiores, sendo indetectáveis para flavonoides. Além disso, não apresentou presença de sinais característicos dessas classes de substâncias por CLAE. Esse resultado já era esperado, pois a presença de grupos -OH na estrutura dos compostos fenólicos permite concentrá-lo em fases mais polares e fases aquosas de extratos biológicos (GULCIN; BEYDEMIR, 2013).

Pacheco et al. (2014) e Fernandes et al. (2019) correlacionaram o potencial antioxidante de *C. pachystachya* encontrado no método DPPH, FRAP, fosfomolibdênio, e β -caroteno/ácido linoleico, à alta concentração de orientina, isoorientina e ácido clorogênico.

5.3.2 Atividade antiglicante

Os valores referentes à atividade antiglicante da aminoguanidina, quercetina, EBHE, PHEX, PACT e PHM em diferentes concentrações pelo método de glicação de BSA e frutose/glicose estão representados na Figura 32 (A) e (B), respectivamente.

Figura 32: Atividade antiglicante das amostras de *Cecropia pachystachya* obtida pelo método de glicação de BSA:frutose (A) e BSA:glicose (B).



Média de percentual de inibição $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para os controles e amostras descritas. Análise estatística realizadas por teste ANOVA two way, seguido pelo teste de Bonferroni. EBHE: extrato bruto hidroetanólico; PHEX: partição hexânica; PACT: partição em acetato de etila e PHM: partição hidrometanólica. *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,001$). #Valores significativamente diferentes da aminoguanidina ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p > 0,001$).

No método realizado para avaliar o potencial antiglicante das amostras, BSA (soroalbumina) é incubada com a frutose e/ou glicose. Essa mistura reacional permite a formação de AGEs, que mede um subconjunto de produtos fluorescentes, como a pentosidina e a argipiridina. Portanto, é avaliado a inibição da fluorescência específica gerada durante o curso da glicação e consequente formação de AGEs (FARSI et al., 2008). Utilizou-se como controle positivo a aminoguanidina, que tem por mecanismo limitar a formação de AGEs iniciais, como compostos intermediários de carbonila (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012) e a quercetina, que tem sua ação antiglicante documentada, inibindo a produtos de amadori (hemoglobina glicada e frutosamina) (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2016).

A estrutura da cadeia do açúcar influencia a susceptibilidade da reação de glicação, variando 0,0002% para a glicose a 0,7% para a frutose, sendo esta e seus derivados mais reativos. Além disso, a frutose é um açúcar de ocorrência comum na dieta humana, portanto pode-se explicar o papel crítico desse açúcar para o processo de glicação, principalmente em alimentos como uma fonte exógena de AGEs. A glicose é o açúcar mais comum que ocorre em sistemas biológicos, e seus metabólitos são altamente reativos e são considerados, juntamente com derivados da frutose, os principais precursores da glicação *in vivo* (PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA, 2009). Dado a importância desses dois açúcares na formação de AGEs, ambos foram avaliados (Figuras 32A e 29B).

Como visto nos resultados da Figura 32, os percentuais de inibição da glicação para as amostras e até mesmo dos controles positivos foram superiores utilizando a frutose, mostrando que a amostra tem maior potencial de inibir a glicação quando o precursor é este açúcar. Na frutose, suas maiores concentrações, com exceção da PHEX e da aminoguanidina, os valores ultrapassaram 80% de inibição para as amostras e 90% para quercetina. No teste utilizando a glicose, as inibições nessas mesmas concentrações mantiveram-se entre 50% a 65%, para as amostras e aminoguanidina, e 70% para quercetina. Na glicação utilizando a glicose, os resultados de inibição para as amostras foram maiores que aminoguanidina em todas as concentrações avaliadas. E em ambos os testes (glicose e frutose), os resultados foram superiores a aminoguanidina em todas as concentrações e próximos a quercetina nas três maiores concentrações, demonstrando o potencial antiglicante das amostras nesta metodologia.

Como mencionado, a oxidação e o estresse oxidativo estão criticamente envolvidos na formação de AGEs, uma vez que a taxa de conversão da base Schiff e dos produtos Amadori em AGEs pode ser acelerada sob condições de estresse oxidativo. Também foi relatado que a interação AGE-RAGE (receptor) provoca o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que os antioxidantes naturais têm

demonstrado inibir a glicação. Dessa forma, a eliminação de radicais livres é também um mecanismo proposto para atividade antiglicante (FARSI et al., 2008; KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; M. P. DE O. TORRES et al., 2018). A atenção tem sido especialmente focada em plantas ricas fenólicos que geralmente apresentam propriedades antioxidantes e efeito antiglicante (RAM et al., 2017).

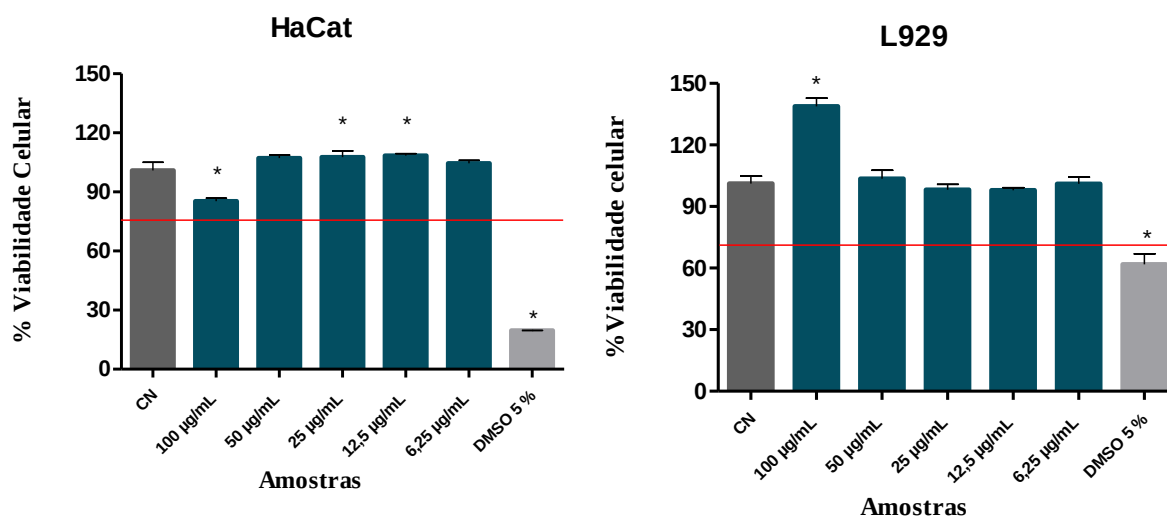
Portanto, de acordo com a correlação observada na literatura e com os resultados verificados no presente trabalho, pode-se associar o potencial da atividade antiglicante, encontrada para as amostras, com o potencial antioxidante verificado nos resultados dos testes descritos. Como mencionado, as substâncias que possivelmente estão presentes no EBHE possuem atividades antioxidantes bem descritas. Com baixos teores fenólicos e baixa atividade antioxidante, a PHEX também apresentou baixa inibição da glicação, corroborando ainda mais essa correlação.

Dentre os metabólitos identificados nas amostras, o ácido clorogênico foi estudado por Kim et al. (2011). Segundo o estudo *in vitro* para glicação de albumina de soro bovino por alta glicose, o ácido clorogênico inibiu a formação de AGEs de forma mais eficaz que o controle positivo, aminoguanidina. Em outro ensaio indireto por AGE-ELISA, a atividade inibitória da ligação cruzada de AGEs ao colágeno também se mostrou mais potente que aminoguanidina. A vitexina e isovitexina também foram testadas frente ensaios antiglicação *in vitro* e demonstraram significativa atividade inibitória contra a formação de AGEs, induzida por glicose e por metilglioxal, com resultados próximos aos controles, aminoguanidina e rutina, tendo esta última resultados semelhantes a quercetina, sendo considerada controle positivo em alguns testes (HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2014; PENG et al., 2008). No estudo de Chen et al. (2018) avaliou-se o inibição de AGEs e CML no modelo *in vitro* maltose/glicose-lisina para (+)catequina e (-)epicatequina e ambos apresentaram resultados superiores ao controle, aminoguanidina.

5.4 VIABILIDADE CELULAR

A fim de avaliar a citotoxicidade tópica *in vitro* do EBHE e contribuir com estudos já descritos para o mesmo ou para a espécie *C. pachystachya*, realizou-se o teste da viabilidade celular com linhagens celulares: queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos de camundongo (L929). A Figura 33 apresenta os gráficos referentes aos resultados de percentuais de viabilidade celular para ambas as células, quando não tratadas (controle negativo), tratadas com EBHE em diferentes concentrações e com DMSO 5%.

Figura 33: Viabilidade celular das linhagens HaCat e L929 tratadas com extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* e com DMSO 5% pelo método MTT.



Média de percentual de viabilidade celular $\pm$ desvio padrão em ensaios realizados em quadruplicata para os controles e amostras descritas. Barras em azul representam as diferentes concentrações do extrato bruto hidroetanólico. CN: controle negativo. Análise estatística realizadas por teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. * Valores significativamente diferentes do CN ($p < 0,05$).

A viabilidade foi mensurada pelo ensaio de MTT que se baseia na redução do MTT (cor amarelo) em cristais de formazam (cor purpúrea) por células metabolicamente ativas, devido a presença de enzimas celulares óxidoreductase dependente de NAD(P)H. O formazam pode ser dissolvido em DMSO para ser quantificado, assim, a intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O método é comumente aplicado para triagem de citotoxicidade *in vitro* de drogas em células (BAHUGUNA et al., 2017).

Conforme o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993/2009, amostras que reduzem a viabilidade celular para valores inferiores a 70% devem ser consideradas citotóxicas. Assim, avaliando os resultados obtidos (Figura 29) EBHE não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração avaliadas para as queratinócitos e fibroblastos, já que os resultados foram superiores a 70% e comparáveis ao controle negativo em ambas as linhagens celulares. O EBHE além de não ser citotóxico apresentou resultado significativamente superior ao controle negativo, na concentração 100 µg/mL para os fibroblastos L929. Pode-se presumir que nessa concentração a amostra também foi capaz de ser proliferativa para esta célula.

EBHE de *C. pachystachya* foi investigado por Fernandes et al. (2019) nas concentrações de 16,75 a 300 µg/mL, para viabilidade celular de fibroblastos BALBC e o extrato não apresentou citotoxicidade celular em nenhuma concentração, sendo capaz de

estimular expressivamente a proliferação celular nas altas concentrações testadas. Estes dados corroboram com os resultados observados no experimento *in vivo* com extrato em acetato de etila da mesma espécie, realizado por Duque et al. (2016), em que o uso tópico de géis contendo 2 ou 5% do extrato foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos e consequente aumento da síntese de colágeno no tecido dos animais tratados.

Em outro estudo *in vivo*, o EBHE foi incorporado em uma formulação com 5% do extrato e outra com 2% do extrato em associação a outro extrato, e ambas modularam a resposta inflamatória, aumentaram a angiogênese e irrigação vascular, estimularam a produção de colágeno e melhoraram as cicatrizes em feridas, principalmente de animais hiperglicêmicos (DUQUE, 2019 - dados protegidos).

Considerando que queratinócitos e fibroblastos são células importantes no processo de cicatrização de feridas, pois restabelecem a composição normal da matriz celular e extracelular da pele e estimulam o crescimento de células endoteliais vasculares para formar novos vasos sanguíneos afim de suprir as necessidades nutritivas das células epidérmicas e com base nos estudos citados acima, EBHE tem importante potencial cicatrizante, não sendo citotóxico para essas células. Outro fato é que EBHE teve nesse estudo e nos estudos citados importante potencial antioxidante e em processos de cicatrização de feridas níveis endógenos estão diminuídos o que prejudica a cicatrização principalmente em peles de pacientes idosos e diabéticos (CHIGURUPATI et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

A caracterização fitoquímica por CDD e CLAE, revelou presença de substâncias fenólicas, em especial flavonoides no EBHE e partições da espécie *C. pachystachya*.

Ácidos fenólicos: ácido quinico e ácido clorogênico; taninos condensados: procianidinas (B2, B3, B5 e C1), epicatequina/catequina e os flavonoides: cinchonas (Ib ou Ia), orientina, isoorientina, rutina, vitexina/isovitexina foram identificados no EBHE por espectrometria de massas. Vitexina/isovitexina e rutina não foram relatadas em extrato etanólico ou aquoso e as cinchonas (Ib e Ia) não haviam sido identificadas, até então, nessa espécie. Por métodos cromatográficos foi possível isolamento de 2 substâncias, sendo eles os flavonoides isoorientina e orientina. Foi possível a quantificação da substância rutina, que apresenta atividade antioxidante e antiglicante já descrita.

Com exceção da PHEX, todas as amostras demonstraram significativo potencial antioxidante e antiglicante, de forma semelhante entre elas. As atividades podem ser correlacionadas aos teores e presença de constituintes fenólicos identificados, cuja atividade antioxidante e antiglicante foram relatadas.

Não foi observado efeito citotóxico para EBHE frente às linhagens celulares de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (L929).

REFERÊNCIAS

- ABU, A. H.; UCHENDU, C. N. Antispermatic effects of aqueous ethanolic extract of *Hymenocardia acida* stem bark in Wistar rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 23, p. 2495–2502, 2010.
- ABUELO, A. et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: Revisiting antioxidant supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1003–1016, 2015.
- AGUIAR, D. P. P.; GAGLIOTI, A. L. **Urticaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15041>>. Acesso em: 6 dec. 2019.
- AHMAD, S. et al. Inhibitory Effect of Metformin and Pyridoxamine in the Formation of Early, Intermediate and Advanced Glycation End-Products. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.
- ALMEIDA, A. P. et al. The cytotoxic effect of extracts obtained from *Cecropia catharinensis* cuatrec (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 27–34, 2016.
- ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 593–606, 2014.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: A survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 2015.
- ARAGÃO, D. M. D. O. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *cecropia pachystachya* trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 926–930, 2013.
- ARAGAO, D. M. DE O. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trecul. **Phytotherapy research : PTR**, v. 27, n. 6, p. 926–930, 2013.

ARAGÃO, D. M. O. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629–633, 2010.

ASADI, S. et al. Chemical Composition Analysis, Antioxidant, Antiglycating Activities and Neuroprotective Effects of *S. choloroleuca*, *S. mirzayanii* and *S. santolinifolia* from Iran. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, n. 03, p. 615–638, 2011.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

ATIQA, N. Comparison of antioxidant properties of tamarillo (*Cyphomandra betacea*), cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var . *cerasiform*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). v. 21, n. 6, p. 2355–2362, 2014.

BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. p. 115–118, 2017.

BANJARNAHOR, S. D. S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p. 239–244, 2014.

BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Quimica Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH•free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609–615, 1997.

BRANGO-VANEGAS, J. et al. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670–675, 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.** 1.^a edição ed. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** MINISTÉRIO ed. Brasília: [s.n.].

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.

CHEN, Y. et al. Structure-activity relationship of procyanidins on advanced glycation end products formation and corresponding mechanisms. **Food Chemistry**, 2018.

CHIGURUPATI, S. et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes , fi broblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. **Biomaterials**, p. 1–8, 2012.

CITÓ, L. et al. Avaliação do potencial antioxidante , atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de Mikania glomerata Sprengel. **Revista Brasileira de**, v. 94, n. 2, p. 120–129, 2013.

CONSOLINI, A. E. et al. Cardiotonic and sedative effects of Cecropia pachystachya Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 90–96, 2006.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant Cecropia pachystachya (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417–422, 2005.

COSTA, J. C. F. DA; HOSCHEID, J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de Cecropia pachystachya. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 175–185, 2018.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of. v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913–20, 2011.

CRUZ, E. D. M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p. 71–77, 2013.

DOWD, D. F.; THORSTEIN, E.; DAVIS, A. K. Professor of Anthropology be applied to Latin America , New Zealand , Writing of History : Essays and Letters. p. 2015, 2015.

DUQUE, A. P. D. N. et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128–138, 2016.

FARSI, D. A. et al. Inhibition of Non-enzymatic Glycation by Silk Extracts from a Mexican Land Race and Modern Inbred Lines of Maize (*Zea mays*). **Phytother. Res**, v. 22, p. 108–112, 2008.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257–265, 2016.

FERNANDES, M. F. et al. *Cecropia pachystachya* Leaves Present Potential to Be Used as New Ingredient for Antiaging Dermocosmetics. v. 2019, 2019.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the radar: advanced glycation end products that detour “around the side”. Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 26, n. 4, p. 123–134, 2005.

GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303–317, 2015.

GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 10–17, 2014.

GAZAL, M. et al. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 7, p. 1421–1430, 2015.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259–270, 2012.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced Glycation End Products (AGEs): Emerging Mediators of Skin Aging. In: **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. Berlin: [s.n.].

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GULCIN, I.; BEYDEMIR, S. Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. January, p. 408–430, 2013.

HALLIWELL, B.; VERONIQUE, M.; HUA, L. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, p. 14–17, 2000.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G. et al. Allelopathic Action of *Cecropia pachystachya* Extracts on the Growth of Guinea Grass (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 763–769, 2007.

HIKAWCZUK, V. J. et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **ANALES- ASOCIACION QUIMICA ARGENTINA**, v. 86, n. 3/6, p. 167–170, 1998.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **J Endocrinol Invest**, 2014.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420–1432, 2006.

JAISSON, S.; GILLERY, P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 1401–1412, 2010.

JOSÉ-CHAGAS, F. N. et al. Aspectos Químicos e Ecológicos de Espécimes Masculinos e Femininos de *Cecropia* Loeft. (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 432–452, 2014.

KIM, J. et al. Chlorogenic acid inhibits the formation of advanced glycation end products and associated protein cross-linking. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 3, p. 495–500, 2011.

KONTOGIANNI, V. G. et al. Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 817–822, 2013.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

KUMAR PASUPULATI, A.; CHITRA, P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 5–6, p. 293–299, 2016.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 47–52, 2001.

LEE, K. H. et al. Molecular characterization of glycation-associated skin ageing: an alternative skin model to study in vitro antiglycation activity of topical cosmeceutical and pharmaceutical formulations. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 1, p. 159–167, 2017.

LI, C. F. et al. Global transcriptome and gene regulation network for secondary metabolite biosynthesis of tea plant (*Camellia sinensis*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–21, 2015.

LI, J. et al. Triterpenoids and flavonoids from *Cecropia schreberiana* Miq. (Urticaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 96–99, 2013.

LUEVANO-CONTRERAS, C.; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, K. Dietary advanced glycation end products and aging. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1247–1265, 2010.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, n. October, p. 164–175, 2014.

M. P. DE O. TORRES, N. et al. The Chemistry of Advanced Glycation End-products. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

MACHADO, E. C. et al. Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. n. June 2013, p. 37–41, 2008.

MAIA, R. M. et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 489–493, 2010.

MAQUIAVELI, C. C. et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. PART A, p. 49–57, 2014.

MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. **The journal of the american oil chemist's society**, v. 45, n. 9, p. 594–598, 1968.

MARTINAZZO, A. P. et al. Profile for use of herbal medicines in the municipalities of Volta Redonda and Barra Mansa/RJ. **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, p. 103–112, 2013.

MASUMOTO, S. et al. Flavan-3-ol/procyanidin metabolomics in rat urine using HPLC-quadrupole TOF/MS. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 1–26, 2018.

MATHIAS, S.; OLIVEIRA, R. R. DE. Differentiation of the phenolic chemical profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*. n. October 2017, p. 1–10, 2018.

MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 214–220, 2016.

MERINO, F. J. Z. et al. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1031–1040, 2015.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12698–12731, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA, R. R. et al. High-speed countercurrent chromatography as valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. **Phytochemical Analysis**, v. 14, n. 2, p. 96–99, 2003.

OLIVEIRA, R. R. et al. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 12–13, p. 1985–1992, 2005.

ORTMANN, C. F. et al. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 4, p. 469–483, 2016.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: A species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PENG, X. et al. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 475–481, 2008.

PEREZ GUTIERREZ, R. M.; FLORES COTERA, L. B.; NEIRA GONZALEZ, A. M. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from piper auritum leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11897–11919, 2012.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, p. 41–89, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

PORTO BARBOSA, J. H.; DE OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutricao**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. **Anal Biochem**, v. 269, p. 337–341, 1999.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RAM, C. et al. Computational study of leading edge jet impingement cooling with a conical converging hole for blade cooling. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 12, n. 22, p. 6397–6406, 2017.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

RAMOS ALMEIDA, R. et al. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1–2, p. 109–113, 2006.

REKHA, C. et al. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. **Chemical Science Transactions**, v. 1, n. 2, p. 303–310, 2012.

RICHARDSON, M. A. et al. Inhibition and breaking of advanced glycation end-products (AGEs) with bis-2-aminoimidazole derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 23, p. 3406–3409, 2015.

RIVERA-MONDRAGÓN, A. et al. Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1500–1512, 2017.

ROCHA, G. DA G. et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 23, p. 7355–7360, 2007.

ROCHA, G. DA G. et al. Effects of 3 β -acetyl TORMENTIC acid (3ATA) on ABCC proteins activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6757–6771, 2012.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 160, p. 1–18, 2016.

SANG, S. Y. et al. Influence of drying treatments on antioxidant capacity of forage legume leaves. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 988–993, 2014.

SCHINELLA, G. et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, v. 74, n. 3, p. 215–220, 2008.

SEMCHYSHYN, H. M. Reactive carbonyl species in vivo: Generation and dual biological effects. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 27–31, 2014.

SILVA, C. E. DE L. DA et al. Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da *Commiphora Myrrha*. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 1, p. 117–124, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed ed. Porto Alegre: [s.n.].

SINGH, P. et al. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: Proteomic and mechanistic insights. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–13, 2016.

SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Expert Opin. Investig. Drugs (2002)**, v. 18, n. 9, p. 1205–1223, 2014.

TORRES, N. M. P. DE O. et al. The Chemistry of Advanced Glycation End-products. **Revista Virtual de Química**, n. January, p. 375–392, 2018.

TSUJI-NAITO, K.; SAEKI, H.; HAMANO, M. Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extracts on formation of advanced glycation end products. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 854–859, 2009.

UCHÔA, V. T. et al. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82–91, 2010.

URIBARRI, J.; TUTTLE, K. R. Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 1, n. 6, p. 1293–1299, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VERMA, N.; MANNA, S. K. Advanced glycation end products (AGE) potentiates cell death in p53 negative cells via upregulation of NF-kappa B and impairment of autophagy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 12, p. 3598–3610, 2017.

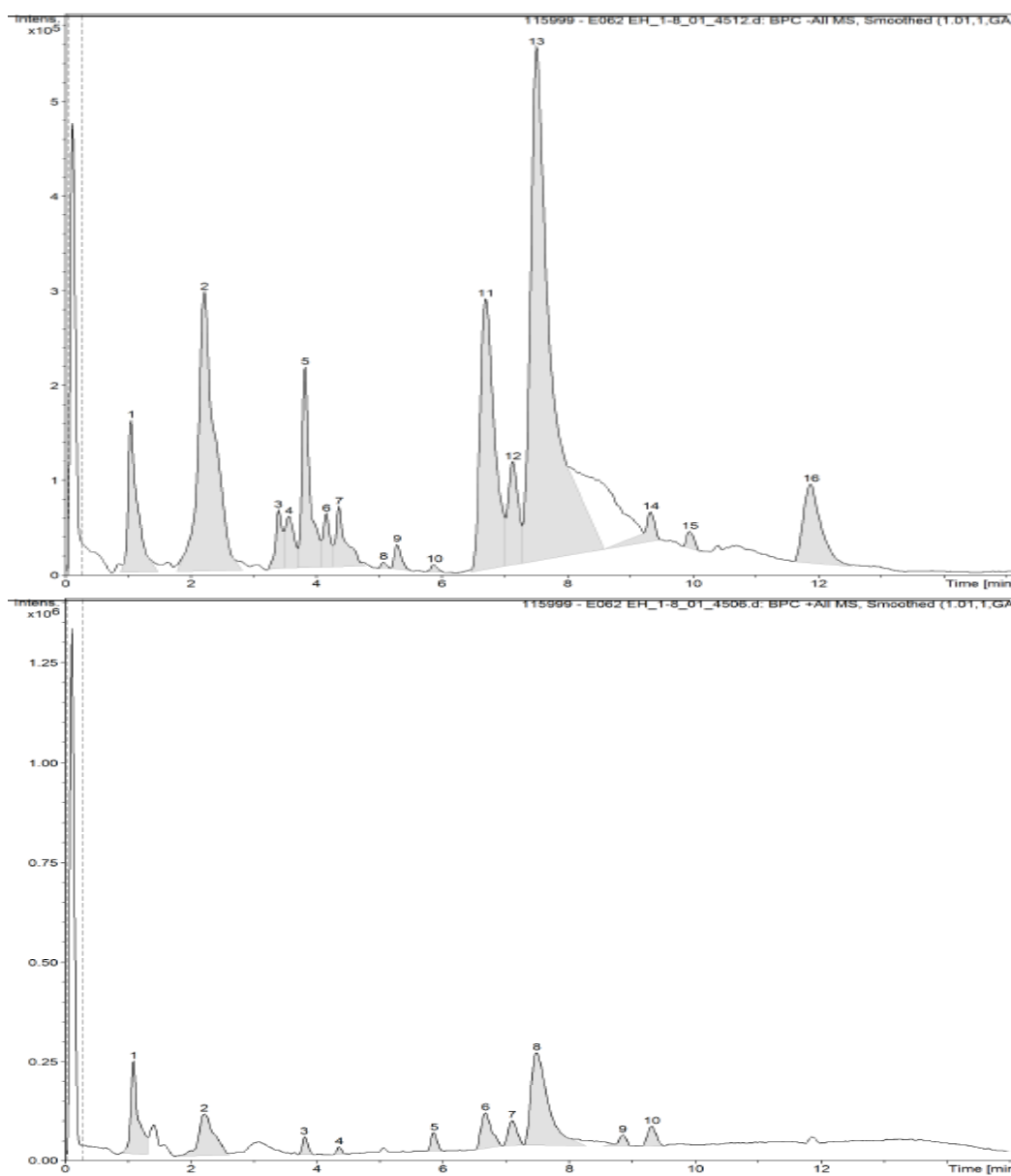
VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. DE T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: Padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 68–75, 2012.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011.

APÊNDICE

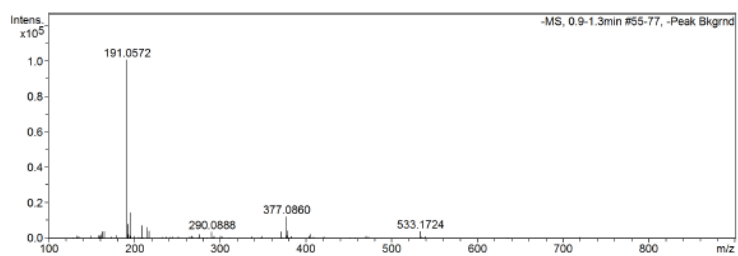
Cromatograma obtido por LC-MS referentes ao EBHE em polaridade iônica negativa e positiva.



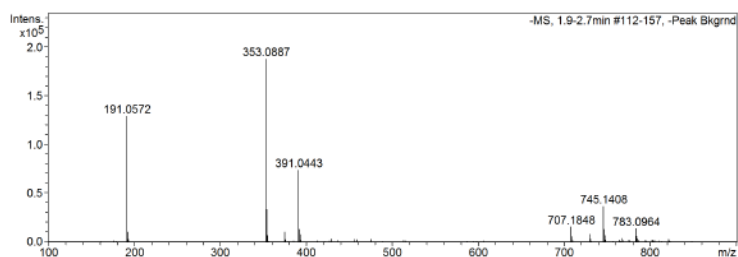
Condições: Coluna kinetex- C18; Solventes A: MeOH B: H₂O: (0,01' - 5% A; 2' - 33% A; 10,5' - 37% A; 11,5' - 37% A; 13' - 5% A; 15' - 5% A); tempo de eluição: 15 min; fluxo 0,4 mL/min; volume de injeção, 2 µL. Análises realizadas no modo positivo e negativo com ionização por *eletrospray* (ESI) com faixa de massas de 100 a 1000 *m/z* e analisador Q-TOF.

Perfil dos fragmentos das substâncias do EBHE obtido por UFLC-MS em polaridade iônica negativa. Os números representam o sinal no cromatograma (figura 13) seguido dos tempos de retenção (RT) em minutos.

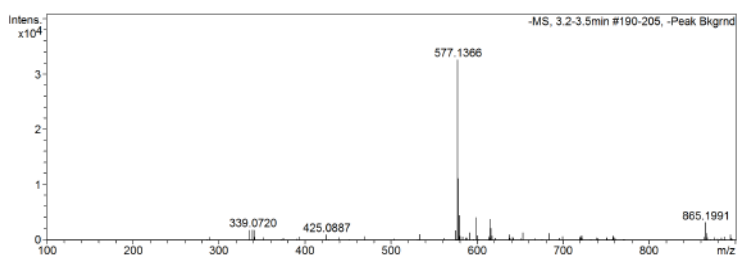
1 – TR: 1.0



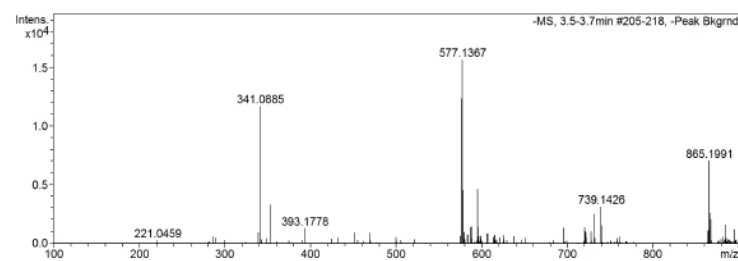
2 – TR: 2.2



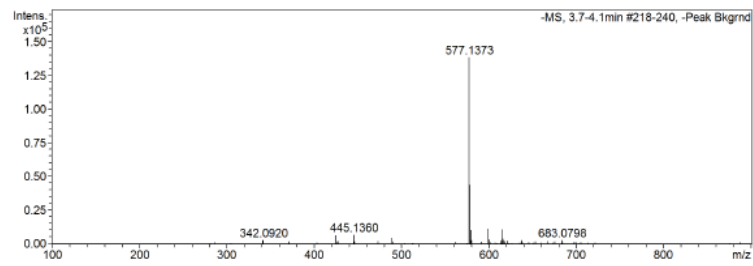
3 – TR: 3.4



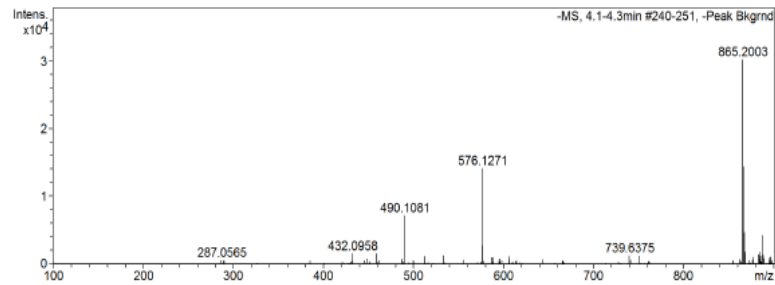
4 – TR: 3.6



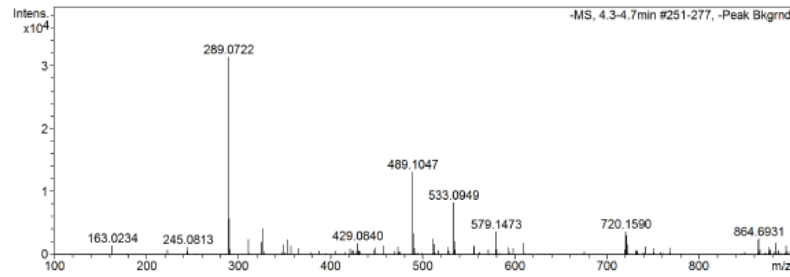
5 – TR: 3.8



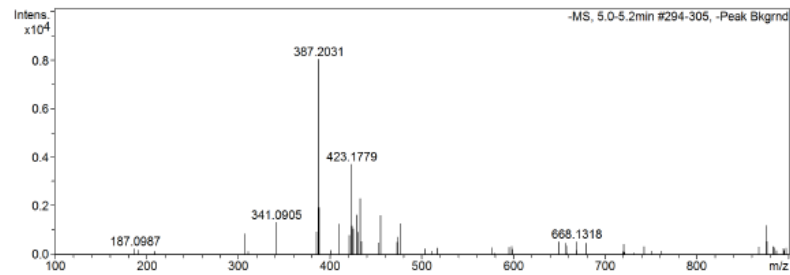
6 – TR: 4.2



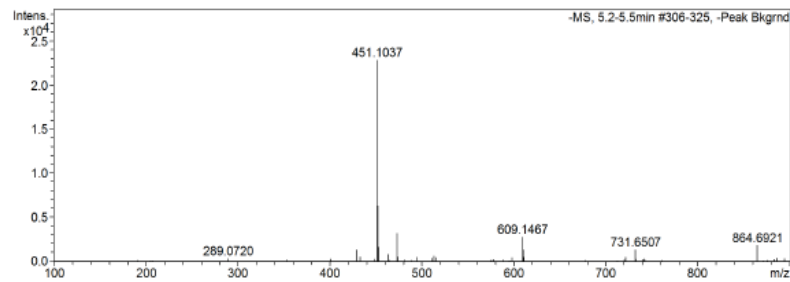
7 – TR: 4.4



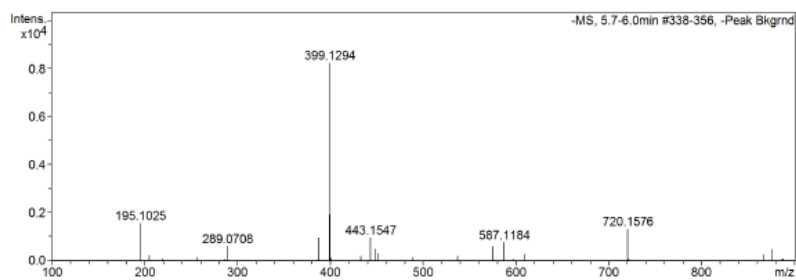
8 – TR: 5.1



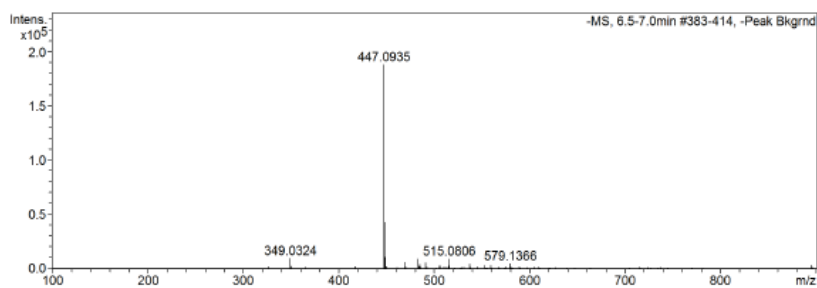
9 – TR: 5.3



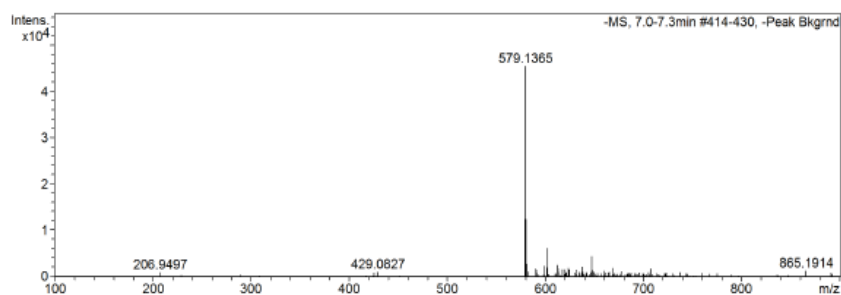
10 – TR: 5.9



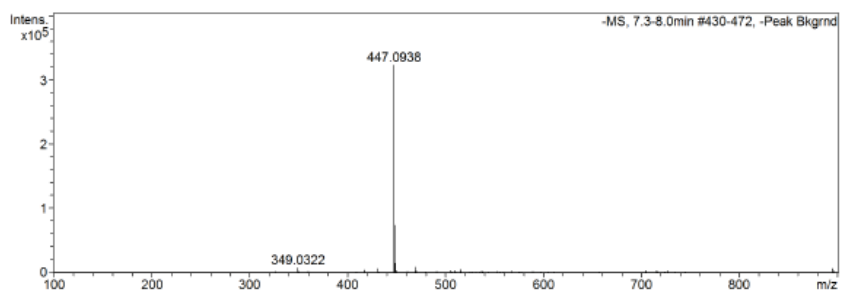
11 – TR: 6.7



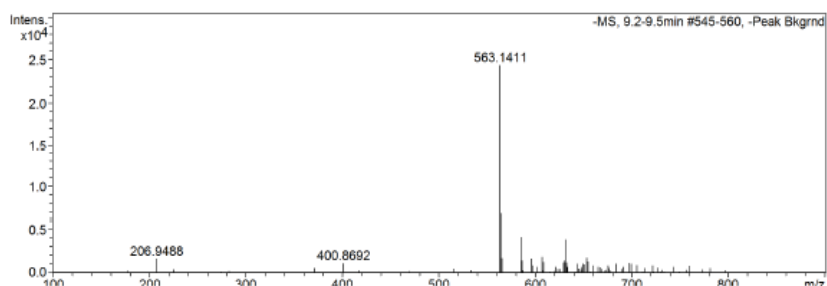
12 – TR: 7.1



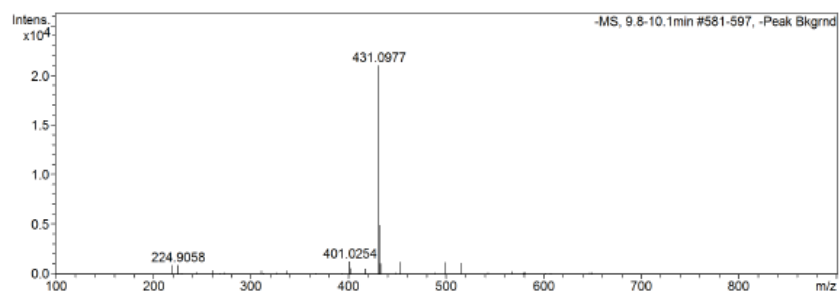
13 – TR: 7.5



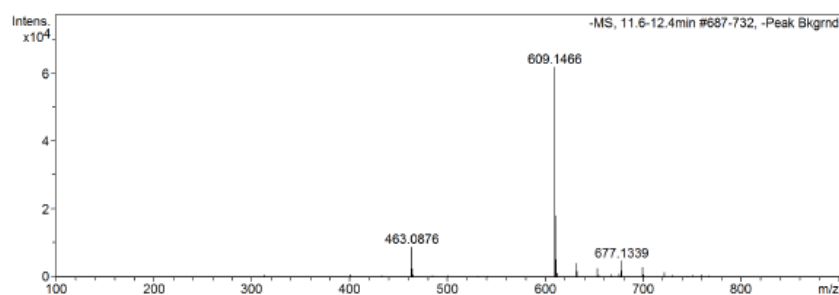
14 – TR: 9.3



15 – TR: 10.0

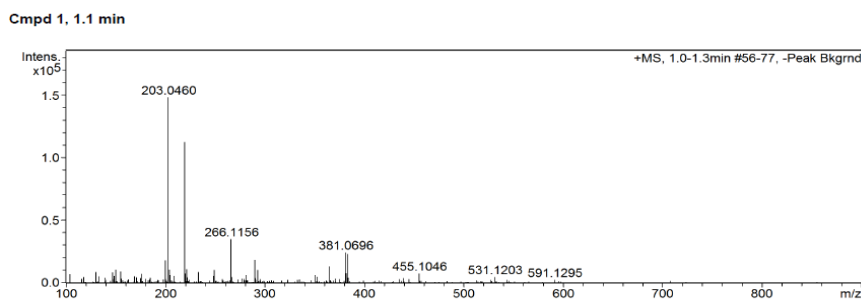


16 – TR: 11.9

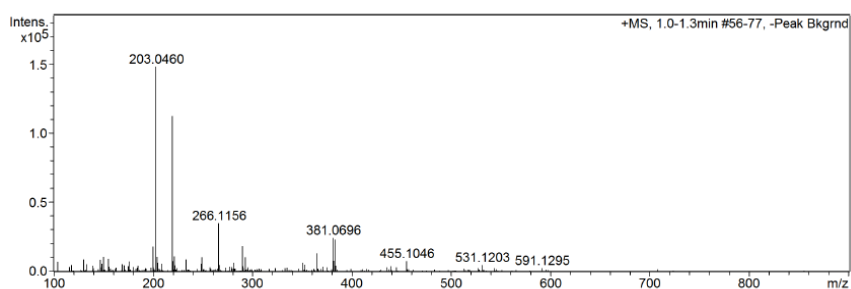


Perfil da quebra dos compostos do EBHE obtido por UFLC-MS em polaridade iônica positiva. Os números representam o sinal no cromatograma (figura 13) seguido dos tempos de retenção (RT) em minutos.

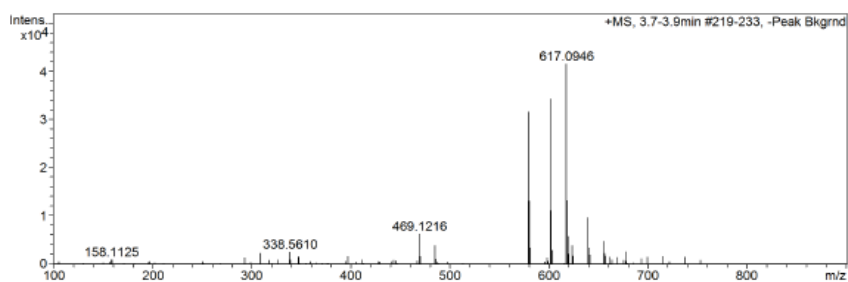
1 – TR: 1.1



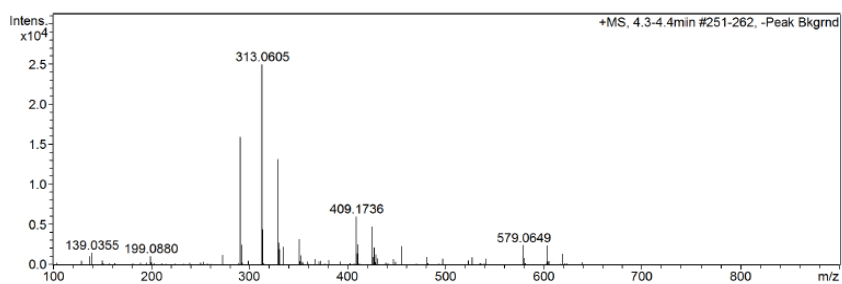
2 – TR: 2.2



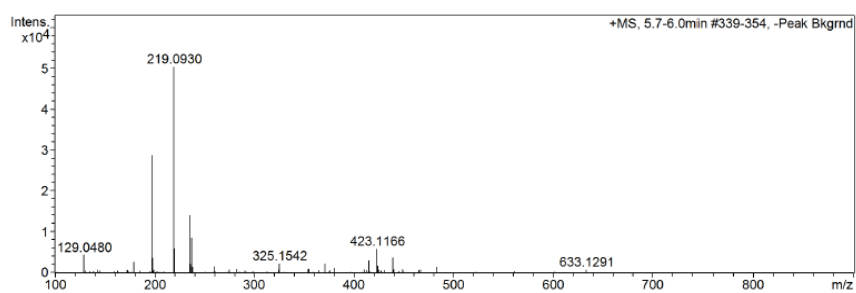
3 – TR: 3.8



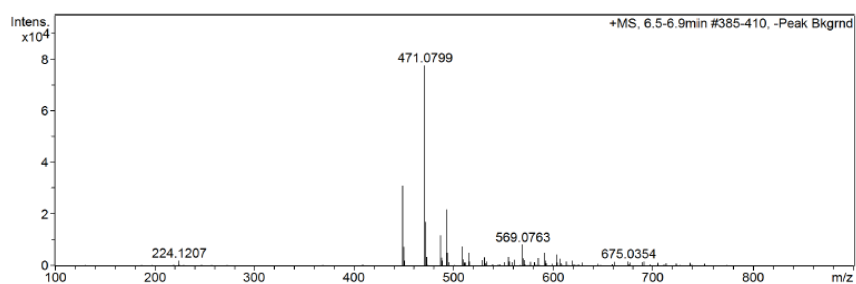
4 – TR: 4.4



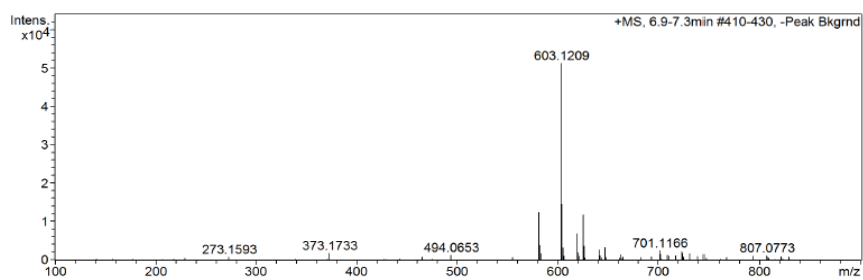
5 – TR: 5.9



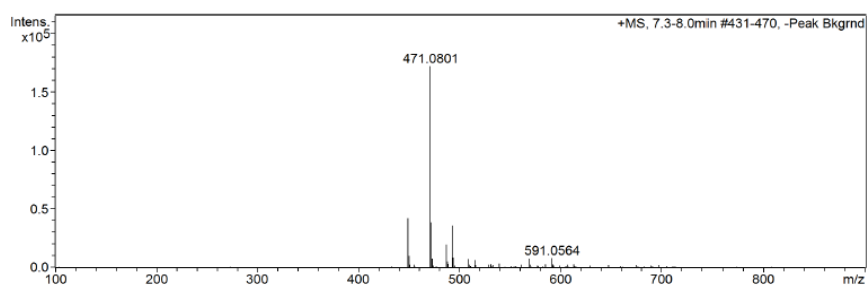
6 – TR: 6.7



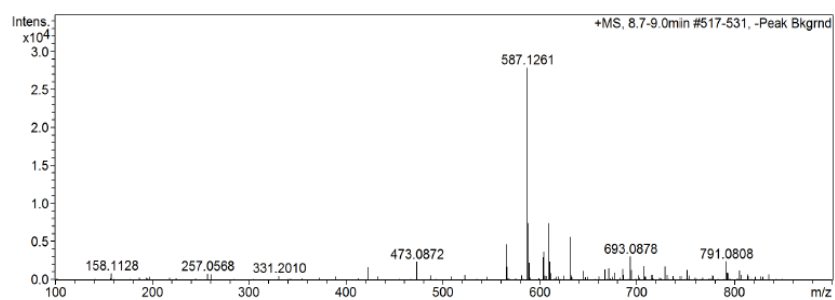
7 – TR: 7.1



8 – TR: 7.5



9 – TR: 8.9



10 – TR: 9.3

