



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
REGIONAL CATALÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA MAYRENNE DE FREITAS ALCHAAR

Perfil Químico das Flores de *Erythroxylum* e Caracterização Química das Folhas de *E. Tortuosum* (Erythroxylaceae)

CATALÃO-GO

2018

---

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor:

Maria Mayrenne de Freitas Alchaar

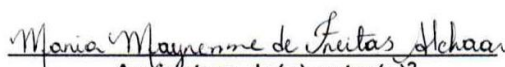
Título do trabalho:

Perfil Químico das Flores de *Erythroxylum* e Caracterização Química das Folhas de *E. Tortuosum* (Erythroxylaceae)

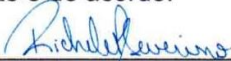
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 18 / 05 / 2018

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

MARIA MAYRENNE DE FREITAS ALCHAAR

Perfil Químico das Flores de *Erythroxylum* e Caracterização Química das Folhas de *E. Tortuosum* (Erythroxylaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, para obtenção do título de Mestra em Química.

**Orientadora:** Profa. Dra. Richele Priscila Severino

**Coorientadora:** Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa

CATALÃO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alchaar, Maria Mayrenne de Freitas

Perfil Químico das Flores de *Erythroxylum*  
e Caracterização Química das Folhas de *E.*  
*Tortuosum* (Erythroxylaceae) [manuscrito] /  
Maria Mayrenne de Freitas Alchaar. - 2018.

vii, 83 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Richele Priscila  
Severino; co-orientadora Dra. Lorena Ramos  
Freitas de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial  
de Física e Química, Programa de Pós-  
Graduação em Química, Catalão, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas,  
símbolos, tabelas, algoritmos, lista de figuras,  
lista de tabelas.

1. *Erythroxylum*. 2. Metabólitos  
secundários. 3. Cerrado. I. Severino, Richele  
Priscila, orient. II. Título.

CDU 54

Serviço Público Federal  
 Ministério da Educação  
 Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Relatório de Defesa de Dissertação  
 Candidata: **María Mayrenne de Freitas Alchaar**

Aos 19/04/2018 às 09:00 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **“Perfil Químico das flores de Erythroxylum e caracterização química das folhas de E. tortuosum (Erythroxyllaceae)”**. apresentada pela candidata: **María Mayrenne de Freitas Alchaar**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

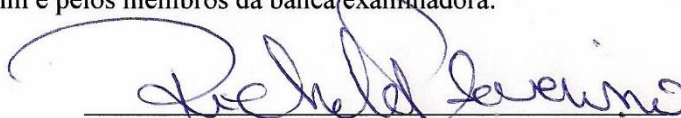
Participantes da Banca:	Função	Instituição
Profa. Dra. Richele Priscila Severino	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Elaine R. Carbonero	Titular	UFG – Catalão
Prof. Dr. Thiago André Moura	Titular	UNIFESP


Resultado Final: Aprovada.

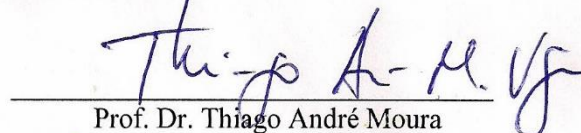
**Parecer da Comissão Julgadora:**

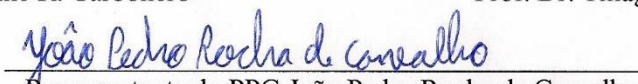
*A banca arguiu a candidata que respondeu satisfatoriamente aos questionamentos e foi considerada aprovada.*

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu João Pedro Rocha de Carvalho, representante do Programa de Pós-Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

  
 Prof. Dra. Richele Priscila Severino

  
 Prof. Dra. Elaine R. Carbonero

  
 Prof. Dr. Thiago André Moura


  
 Representante do PPG João Pedro Rocha de Carvalho  
 Assistente em Administração

Não houve alteração no título.

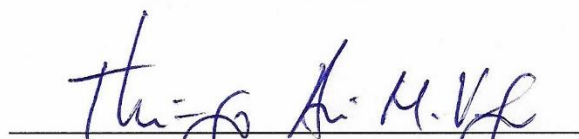
Houve. O novo título passa a ser:

---

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado da candidata **Maria Mayrenne de Freitas Alchaar** realizada em 19 de Abril de 2018.*

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Richele Priscila Severino

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elaine R. Carbonero

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago André Moura

Aos meus pais, Maria Marina de Freitas Alchaar e Antônio Miguel Alchaar (*in memoriam*), e aos meus irmãos e sobrinhos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás pela concessão de espaço e pela oportunidade de ter realizado o mestrado.

À Capes pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Richele P. Severino pela orientação deste trabalho, confiança e por todo apoio dado antes mesmo do início do mestrado.

À Profa. Dra. Lorena R. F. de Sousa pela coorientação e por ser transmissora de conhecimento com muito profissionalismo.

À Profa. Dra. Elaine R. Carbonero por todas as contribuições diárias e por ser um exemplo de excelente pesquisadora.

À Profa. Dra. Quézia B. Cass da Universidade Federal de São Carlos pela parceria na realização dos experimentos de CLAE-EM.

Ao Romário Pereira pela disposição em ajudar no que fosse preciso e pela realização dos experimentos de CLAE-EM.

Ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química Universidade Federal de Uberlândia pela realização dos experimentos de RMN, em especial à Msc. Michele N. G. do Nascimento pelo auxílio em transportar as amostras para Uberlândia.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica, em especial à Msc. Evelise C. Mesquita por muitas vezes ter contribuído diretamente na realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e que estiveram comigo no decorrer do mestrado.

## RESUMO

O Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, porém pouco explorado do ponto de vista químico. Dentre os gêneros de plantas existentes neste bioma, encontra-se *Erythroxylum* (família Erythroxylaceae) que é conhecido principalmente pela produção de alcaloides tropânicos. Este trabalho descreve o estudo comparativo do perfil químico das flores das espécies *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*, assim como o estudo químico das folhas de *E. tortuosum*. Para o perfil químico das flores foram obtidos extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, que foram analisados por RMN <sup>1</sup>H, CLAE UV/DAD e CG-EM. Os dados mostraram semelhança de perfil químico entre as espécies estudadas, sugerindo a presença de terpenos, flavonoides e alcaloides. A partir das análises por CG-EM foi possível identificar hidrocarbonetos, aldeídos e um derivado fenólico. Os extratos das folhas de *E. tortuosum* foram preparados de modo semelhante ao procedimento utilizado para as flores, além de realizar extração ácido-base no extrato metanólico para obtenção de alcaloides. Dos extratos acetato de etila e metanólico das folhas foram identificadas seis substâncias:  $\alpha$ -amirina (I),  $\beta$ -amirina (II), campesterol (III), estigmastan-3,5-dieno (IV),  $\beta$ -sitosterol (V) e 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo (IX), sendo o flavonoide o composto majoritário dos extratos. Através da extração alcaloídica foi possível identificar três alcaloides tropânicos: tropacocaína (VI), cocaína (VII) e 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (VIII), sendo o último relatado pela primeira vez no gênero *Erythroxylum*. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento químico da biodiversidade do Cerrado devido à escassez de estudos relacionados à constituição química das espécies estudadas.

Palavras-chave: *Erythroxylum*, metabólitos secundários, Cerrado.

## ABSTRACT

The Cerrado is known as the world's richest savanna in biodiversity, but still little explored from the chemical view. Among the genus of plants found in this biome, there is *Erythroxylum* (Erythroxylaceae), which is known mostly for the tropane alkaloids metabolites. This work describes a comparative study of flowers chemical profile from *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*, as well as the chemical study of *E. tortuosum* leaves. To obtain the chemical profile of flowers for the different species, the extracts were prepared in hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol, which were analyzed by <sup>1</sup>H NMR, HPLC UV/DAD and GC-MS. The data showed similar phytochemical composition in the species investigated, suggesting attendance of terpenes, flavonoids and alkaloids. The GC-MS analysis afforded to identify hydrocarbons, aldehydes and a phenolic derivative. The extracts of the leaves of *E. tortuosum* were prepared likewise the flowers extracts, but to obtain alkaloids it was performed an acid-base extraction of the methanolic extract of the leaves. From the ethyl acetate and methanolic extracts of leaves, were identified six substances:  $\alpha$ -amyrin (I),  $\beta$ -amyrin (II), campesterol (III), stigmastan-3,5-diene (IV),  $\beta$ -sitosterol (V) and 7,4'-di-O-methylquercetin-3-O- $\beta$ -rutinoside (IX), which flavonoid was found as the major compound of extracts. Through the alkaloid extraction it was possible to identify three tropane alkaloids: tropacocaine (VI), cocaine (VII) and 6-methoxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (VIII), and among them, compound (VIII) was described for the first time in *Erythroxylum* genus. The results obtained are important for the chemical knowledge of the Cerrado biodiversity, since there are not much data in the literature about the species studied in this work.

Keywords: *Erythroxylum*, secondary metabolites, Cerrado.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do alcaloide tropano cocaína .....	3
Figura 2 - Exemplos de metabólitos secundários identificados no gênero <i>Erythroxylum</i> .....	3
Figura 3 - Foto de <i>Erythroxylum</i> spp. ( <b>A</b> = <i>E. suberosum</i> , <b>B</b> = <i>E. campestre</i> e <b>C</b> = <i>E. tortuosum</i> ) .....	4
Figura 4 - Fluxograma Obtenção dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por turbo extração.....	18
Figura 5 – Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	20
Figura 6 – Esquema de fracionamento da amostra ETA.....	22
Figura 7 – Fluxograma da extração alcaloídica das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	24
Figura 8 – Fluxograma da partição líquido-líquido da fase aquosa .....	26
Figura 9 – Fluxograma do fracionamento da amostra ETAA.....	26
Figura 10 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos hexânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp.....	30
Figura 11 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos diclorometânico das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	31
Figura 12 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos acetato de etila das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	32
Figura 13 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos metanólicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	33
Figura 14 - Cromatogramas dos extratos metanólicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por CLAE em 254 nm (bandas cromatográficas com intervalo de tempo: A = 1,20-1,44 min; B = 8,62-8,68 min e C = 14,03-14,47 min).....	35
Figura 15 - Cromatogramas dos extratos acetato de etila das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por CLAE em 254 nm (bandas cromatográficas com intervalo de tempo: D = 8,16-9,32 min e E = 13,23-14,12 min).....	35
Figura 16 - Espectros de absorção no ultravioleta-visível das bandas cromatográficas com tempo de retenção análogos dos extratos metanólico das flores de <i>Erythroxylum</i> spp (bandas cromatográficas com tempo de retenção: A = 1,20-1,44 min; B = 8,62-8,68 min e C = 14,03-14,47 min).....	36
Figura 17 - Espectros de absorção no ultravioleta-visível das bandas cromatográficas com tempo de retenção análogos dos extratos acetato de etila das flores <i>Erythroxylum</i> spp. (bandas cromatográficas com tempo de retenção: D = 8,16-9,32 min e E = 13,23-14,12 min).....	37
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM para os extratos hexânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp.....	39
Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM para os extratos diclorometânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	40
Figura 20 - Estruturas químicas dos compostos identificados via GC-EM nos extratos hexânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	42

Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos identificados via GC-EM nos extratos diclorometânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	43
Figura 22 - Compostos identificados das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	45
Figura 23 - Cromatograma da fração ETA9 obtido por CG-EM ( $T_R = 22,2$ min = $\alpha$ -amirina <b>I</b> ; $T_R = 21,0$ min = $\beta$ -amirina <b>II</b> ; $T_R = 19,6$ min = campesterol <b>III</b> ; $T_R = 16,5$ min = estigmastan-3,5-dieno <b>IV</b> ; $T_R = 21,8$ min sitosterol <b>V</b> ) .....	47
Figura 24 - Espectro de massa do esteroide $\alpha$ -amirina ( <b>I</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	48
Figura 25 - Espectro de massa do esteroide $\beta$ -amirina ( <b>II</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	48
Figura 26 - Proposta de fragmentação para os esteroides $\alpha$ e $\beta$ -amirina .....	49
Figura 27 - Espectro de massa do esteroide campesterol ( <b>III</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	50
Figura 28 - Proposta de fragmentação para o esteroide campesterol ( <b>III</b> ).....	50
Figura 29 - Espectro de massa do esteroide estigmastan-3,5-dieno ( <b>IV</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV) .....	51
Figura 30 - Proposta de fragmentação para o esteroide estigmastan-3,5-dieno ( <b>IV</b> )...	51
Figura 31 - Espectro de massa do esteroide $\beta$ -sitosterol ( <b>V</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	52
Figura 32 - Proposta de fragmentação para o esteroide $\beta$ -sitosterol ( <b>V</b> ) .....	52
Figura 33 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração alcalóidica (ETDN) das folhas de <i>E. tortuosum</i> (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ , $25^\circ\text{C}$ .....	54
Figura 34 - Cromatograma de íons totais por CG-EM da mistura das substâncias VI, VII e VIII ( $T_R = 9,8$ min = tropacocaína <b>VI</b> ; $T_R = 10,3$ min = cocaína <b>VII</b> ; $T_R = 10,4$ min = 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol <b>VIII</b> ).....	55
Figura 35 - Espectros de massas do alcaloide tropacocaína ( <b>VI</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	57
Figura 36 - Proposta de fragmentação para o alcaloide tropacocaína ( <b>VI</b> ).....	57
Figura 37 - Espectros de massas do alcaloide cocaína ( <b>VII</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV).....	58
Figura 38 - Proposta de fragmentação para o alcaloide cocaína ( <b>VII</b> ).....	58
Figura 39 - Espectros de massas do alcaloide 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol ( <b>VIII</b> ) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV) .....	59
Figura 40 - Proposta de fragmentação para o alcaloide 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol ( <b>VIII</b> ).....	59
Figura 41 - Precipitado amarelo presente em diferentes amostras das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	60
Figura 42 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>IX</b> ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz), $50^\circ\text{C}$ ....	64
Figura 43 - Mapa de contorno de HSQC da substância <b>IX</b> ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400/100 MHz) 65	

Figura 44 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância <b>IX</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 400/150 MHz) .....	66
Figura 45 - Cromatograma do íon extraído em <i>m/z</i> 637,18 referente à identificação da substância <b>IX</b> .....	67
Figura 46 - Espectros de primeira e segunda ordem ESI (-) QqToF MS/MS (35 eV) da substância <b>IX</b> de <i>m/z</i> 637,1783.....	68
Figura 47 - Proposta de fragmentação para a substância <b>IX</b> .....	68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	6
Quadro 2 - Estudos relatados na literatura de <i>Erythroxylum</i> spp. objetos de estudo desse trabalho .....	14
Quadro 3 - Condições cromatográficas para análise dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. ....	19
Quadro 4 - Condições cromatográficas para análise em CG-EM das substâncias <b>I, II, III, IV e V</b> .....	21
Quadro 5 - Condições cromatográficas para análise da fração alcaloídica em CG-EM .....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento, solubilidade e experimento utilizado para a realização do perfil químico das flores de <i>Erythroxylum</i> spp.....	27
Tabela 2 - Compostos identificados nos extratos hexânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. obtidos via GC-EM.....	41
Tabela 3 - Compostos identificados nos extratos diclorometânicos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. obtidos via GC-EM .....	41
Tabela 4 - Rendimento dos extratos orgânicos das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	44
Tabela 5 - Esteroides identificados a partir do extrato acetato de etila das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	46
Tabela 6 - Alcaloides identificados a partir da extração ácido-base do extrato metanólico das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	55
Tabela 8 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C obtidos para a substância <b>IX</b> em comparação com dados da literatura .....	63

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

AcOEt	acetato de etila
CA	cromatografia por adsorção
CC	cromatografia em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CD <sub>3</sub> OD	metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
Dic	diclorometano
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>electrospray ionization</i>
eV	elétron-volt
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
g	grama
h	altura da fase estacionária
Ø	largura da coluna de vidro
Hex	hexano
Hz	hertz
HCl	ácido clorídrico
IE	impacto eletrônico
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MeOH	metanol

MeCN	acetona
nm	nanometro
mg	miligrama
MHz	mega-Hertz
mL	mililitro
NH <sub>4</sub> OH	hidróxido de Amônio
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	singleto
s/	singleto largo
t <sub>r</sub>	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vís	região do ultravioleta e visível
v/v	volume por volume
δ	deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
δ <sub>c</sub>	deslocamento químico de carbono
δ <sub>H</sub>	deslocamento químico de hidrogênio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 PRODUTOS NATURAIS .....	1
1.2 FAMÍLIA ERYTHOXYLACEAE .....	2
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
3.1 MATERIAIS.....	16
<b>3.1.1 Reagentes</b> .....	16
<b>3.1.2 Solventes</b> .....	16
<b>3.1.3 Fases Estacionárias</b> .....	16
<b>3.1.4 Equipamentos</b> .....	16
3.2 MÉTODOS.....	17
<b>3.2.1 Coleta do material vegetal</b> .....	17
<b>3.2.2 Perfil Químico das Flores</b> .....	17
3.2.2.1 Preparação dos extratos.....	18
3.2.2.2 Análise cromatográfica dos extratos por CLAE-DAD.....	19
3.2.2.3 Análise cromatográfica dos extratos por CG-EM.....	19
3.2.2.4 Análise dos extratos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup> H).....	20
<b>3.2.3 Estudo químico das folhas de <i>E. tortuosum</i></b> .....	20
3.2.3.1 Obtenção dos extratos das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	20
3.2.3.2 Fracionamento cromatográfico da amostra ETA .....	21
3.2.3.3 Análise por CLAE-EM da substância IX .....	23
3.2.3.4 Extração alcaloídica das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	23
3.2.3.5 Partição líquido-líquido da fase aquosa .....	25
3.2.3.6 Extração em fase sólida da amostra ETAA .....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
4.1 PERFIL QUÍMICO DAS FLORES DE <i>Erythroxylum</i> spp.....	27
<b>4.1.2 Rendimento e solubilidade dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp.</b> ..	27
<b>4.1.3 Perfil químico dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por RMN de <sup>1</sup>H</b> .....	28
<b>4.1.4 Perfil químico dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por CLAE-UV/DAD</b> .....	34
<b>4.1.5 Perfil químico dos extratos das flores de <i>Erythroxylum</i> spp. por CG-EM</b> ....	37

4.2 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE <i>E. tortuosum</i> .....	44
4.2.1 Rendimento dos extratos orgânicos das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	44
4.2.2 Constituintes químicos caracterizados a partir das folhas <i>E. tortuosum</i> ...	44
4.2.3 Identificação estrutural dos estereoides isolados de <i>E. tortuosum</i> .....	46
4.2.4 Identificação de alcaloides nas folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	53
4.2.5 Identificação de flavonoide das folhas de <i>E. tortuosum</i> .....	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	69
REFERÊNCIAS .....	70
ANEXO.....	79

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

Dentro do campo da química orgânica a definição de produtos naturais é geralmente limitada aos compostos orgânicos obtidos a partir de fontes naturais que são produzidos pelas vias do metabolismo primário ou secundário de plantas, micro-organismos e animais marinhos. Muitos desses compostos possuem atividades farmacológicas ou biológicas que podem ser de benefício terapêutico no tratamento de doenças, prova disso é o fato desses serem os componentes ativos não só da maioria dos medicamentos tradicionais, mas também de muitos medicamentos modernos. (KHALIL et al., 2016).

A importância farmacológica de produtos naturais é enfatizada quando são usados como materiais de partida para medicamentos, independentemente se eles são produzidos por processos de extração ou sintéticos (PENTO-ARIAS & HAINES 2016). As plantas são uma valiosa fonte desses produtos e seus efeitos terapêuticos são diversos, como antibacteriano (DZOTAM; TOUANI & KUETE, 2016), antifúngico (MEDEIROS et al, 2016), antiparasitário (CALIXTO JUNIOR et al., 2016), citotóxico (TOLEDO et al., 2016), antiviral (CECÍLIO et al., 2012) e antioxidante (STANKOVIC et al., 2016).

O Brasil possui uma flora vasta e pouco explorada, do ponto de vista químico, o que faz dela uma importante fonte de produtos naturais, pois as plantas produzem metabólitos diferentes dependendo da região terrestre que se encontram. A biodiversidade brasileira é dividida em biomas, sendo Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, além do Bioma Marinho Costeiro. Cada um deles possui um conjunto de espécies vegetais adaptada às condições ambientais da região (MMA, 2018). Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade; sua flora tem 4.400 espécies exclusivas e é considerado como *hotspot* mundial de biodiversidade, pois apresenta mais de 1.500 espécies endêmicas (IBGE, 2016; SCHIASSI et al., 2018).

Dentre as famílias de plantas presentes no Cerrado encontra-se a Erythroxylaceae constituída por arbustos e árvores, é subdividida em quatro gêneros: *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl. *Pinacopodium* Exell & Mendonça e *Erythroxylum* P. Browne (ALBERTS et al., 2017).

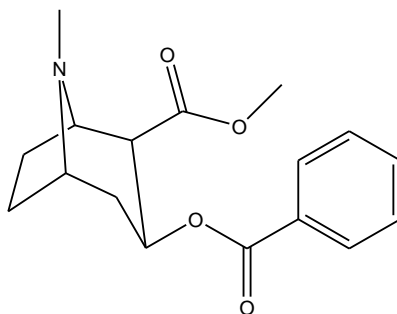
## 1.2 FAMÍLIA ERYTHOXYLACEAE

A família Erythroxylaceae possui cerca de 260 espécies pantropicais, sendo que, o maior membro da família é o gênero *Erythroxylum* (ALBERTS et al., 2018).

O desenvolvimento e a biodiversidade das espécies de *Erythroxylum* no Brasil chamam atenção, pois das 187 espécies descrita na América tropical 116 são encontradas no país, principalmente no nordeste brasileiro (HEGNAUER, 1981; PLOWMAN & HENSOLD, 2004; RIBEIRO et al., 2013-a). Algumas espécies desse gênero têm sido usadas pela medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano, problemas renais, hepáticos e vesiculares, doenças venéreas e respiratórias (pneumonia, bronquite, asma), diurético e no tratamento de reumatismo e artroses (CANO & VOLPATO, 2004; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; LUCAS-FILHO et al., 2010).

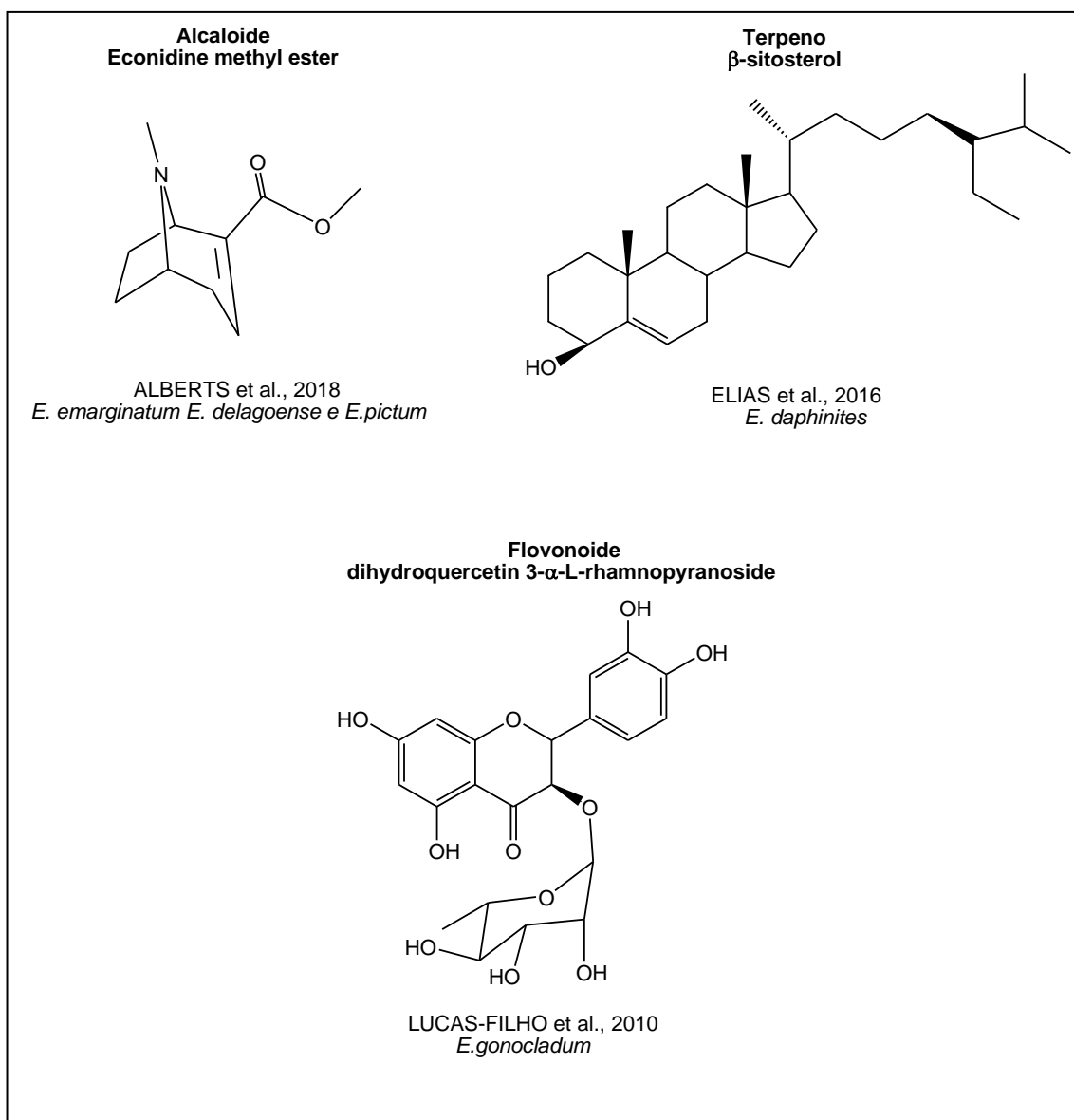
O gênero *Erythroxylum* destaca-se principalmente pela produção de alcaloides do tipo tropano (SENA-FILHO et al., 2010; ZUANAZZI et al., 2001). Dentre essas substâncias, a cocaína (Figura 1, p.3,) é a principal representante dos alcaloides tropânicos isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*, sendo mais abundante nas espécies *E. coca* e *E. novogranatense* (CASALE, et al., 2014; DOCIMO et al.,2012; JOHNSON, 1996;). Além dos alcaloides tropanos, outras classes de metabólitos têm sido relatadas no gênero, como flavonoides glicosilados e terpenos. ALBUQUERQUE et al., 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2013-b). Apesar da grande variedade de substâncias relatada no gênero, algumas classes de metabólitos são mais frequentemente identificadas no gênero, como alcaloide tropânico, flavonoide e terpeno. Alguns exemplos de substâncias isoladas no gênero são mostrados na Figura 2, p. 3, e no Quadro 1, p.6, é mostrado estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero a partir do ano de 2000.

Figura 1 - Estrutura química do alcaloide tropano cocaína



KUDLACEK et al., 2017

Figura 2 - Exemplos de metabólitos secundários identificados no gênero *Erythroxylum*



Dentre as *Erythroxylum* spp. Encontradas no Cerrado estão *E. campestre*, *E. tortuosum* e *E. suberosum* objetos de estudos dessa pesquisa (BARROS, 1998). Na Figura 3 estão apresentadas fotos registradas no momento da coleta.

Para essas espécies, há poucos relatos de estudo químico, principalmente em se tratando da *E. tortuosum*, o que está descrito nas plataformas de acesso é mostrado no Quadro 2, p.14.

Figura 3 - Foto de *Erythroxylum* spp. (A = *E. suberosum*, B = *E. campestre* e C = *E. tortuosum*)



*E. suberosum* é um arbusto conhecido popularmente como "cabelo-de-negro" seus frutos e flores são fonte alimentícia para a fauna silvestre (AQUINO et al., 2007). Floresce de agosto a dezembro, frutifica de setembro a janeiro. É encontrado no Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Maranhão, Amapá, Amazonas, Acre, Paraguai, Bolívia e Venezuela (MENDONÇA et al., 1998).

*E. campestre* é uma espécie subarbustiva, mais comum em cerrado aberto (BARROS, 1998), conhecida como "cabelo-de-negro", "fruta-de-tucano". Floresce de julho a novembro, frutifica de agosto a dezembro. É encontrado no Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal. No Estado do Paraná, somente foi encontrada em áreas de cerrado, mais propriamente em campo cerrado (MENDONÇA et al., 1998).

*E. tortuosum* é uma espécie arbórea, floresce de maio a outubro (BARROS, 1998), conhecida como “cabelo-de-negro”, “galinha-choca”, “mercureiro”. Encontrado na Bolívia e no Brasil nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e São Paulo. (MENDONÇA et al., 2002).

Existem estudos realizados com as espécies *E. deciduum* e *E. suberosum*, coletadas na região de Catalão e objetos de estudos do grupo de pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, das quais foram isolados e identificados compostos pertencentes a classe dos flavonoides, terpenoides e alcaloides (MESQUITA, 2018; NASCIMENTO, 2014).

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero *Erythroxylum*

<b>Espécie/ parte da planta</b>	<b>Substâncias identificadas/ discutidas</b>	<b>Classe de metabólito/ técnica de caracterização</b>	<b>Efeito biológico</b>	<b>Referência</b>
<i>E. delagoense</i> (folhas)	Benzoic acid methyl estera; 2-Carbomethoxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene; Ecgonidine methyl ester; Ecgonine methyl ester e Pseudoecgonine methyl ester.	alcaloide /espectrometria de massas	não avaliado	ALBERTS et al., 2018
<i>E. emarginatum</i> (folhas)	Tropinone; 2-Carbomethoxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene; Econidine methyl ester; Ecgonine methyl ester e Pseudoecgonine methyl ester.			
<i>E. pictum</i> (folhas)	Benzoic acid methyl ester; 2-Carbomethoxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene; Ecgonidine methyl ester; Ecgonine methyl ester ; Pseudoecgonine methyl ester.			
<i>E. monogynum</i> (folhas)	não houve identificação	alcaloide, glicosídeo, carboidrato, flavonoide, tanino, saponina, esterol, fenol e proteína / <i>screening</i> fitoquímico	antidiabético e antihiperlipidêmico	KAUSAR & KONDE, 2017
<i>E. ovalifolium</i> (folhas)	$\beta$ -sitosterol; lupeol; quercetin e rutin	terpeno e flavonoide / espectrometria de massas e RMN	Efeito protetor contra os efeitos tóxicos do veneno cobra	OLIVEIRA et al., 2016
<i>E. subsessile</i> (folhas)	$\beta$ -sitosterol; friedelin; quercetrin e kaempferol-3-O-rhaminósido			

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero *Erythroxylum*

(Continuação)

<i>E. daphnites</i> (folhas)	$\beta$ – Sitosterol; Lupenone; Friedelanol; Friedelan-3-one; Methyl palmitate; Methyl sterate; Methyl linoleate; Methyl 18-methylnonadecanoate; Methyl docosanoate; Methyl linocerate e Methyl hexacosanoate	terpenos e ésteres metílicos / espectrometria de massas e RMN	citotóxico	ELIAS et al., 2016
<i>E. subsessile</i> (folhas)	6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dibenzoyloxytropan-3 $\alpha$ -ol; 3 $\alpha$ -benzoyloxynortropan-6 $\beta$ -ol e 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibenzoyloxtropane.	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	CRUZ et al., 2016
<i>E. caatingae</i> (folhas)	não houve identificação	não houve identificação	relaxativo	SANTOS et al., 2016
<i>E. pulchrum</i> (folhas)	quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo; ombuina-3-rutinosídeo e ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	flavonoides / espectrometria de massas e RMN	antibacteriano	ALBUQUERQUE et al., 2014
<i>E. coca</i> e <i>E. novogranatense</i> (folhas)	Hygrine; Tropinone; Ecgonine methyl ester; (EME) Acetoxy-EME; Cuscohygrine; Butyroyl- EME; Isovaleroyl-EME; Tigloyl-EME; Benzoyltropine; Tropacocaine; Hexanoyl-EME; trans-3-Hexenoyl-EME; Furoyl-EME; 2,4-Hexadienoyl-EME; o-Hydroxytropacocaine; 1-Hydroxytropacocaine 16 cis-Cinnamoyltropacocaine; Norcocaine; Cocaine; Phenylacetoxymethyl-EME; Nicotinoyl-EME; trans-Cinnamoyltropacocaine; cis trans-Cinnamoyltropacocaine; Trimethoxybenzoyltropine; Trimethoxytropacocaine; Trimethoxycocaine e Trimethoxy-cis- Trimethoxy-trans-cinnamoyltropacocaine	alcaloides / espectrometria de massas	não avaliado	CASALE et al., 2014
<i>E. passerinum</i> (frutos)	14-O-Methyl-ryanodanol	terpeno / RMN	citotóxico	MENEZES-FILHO, et al., 2014

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero *Erythroxylum*

(Continuação)

<i>E. vacciniifolium</i> (cascas) e <i>E. hipericifolium</i> (folhas)	3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Dicinnamoyloxytropane e 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Di(1-ethyl-1H-pyrrol-2-ylcarbonyloxy) tropane	alcaloides / dicroísmo circular e RMN	não avaliado	MUNOZ, ARRIAGADA & JOSEPH-NATHAN, 2013
<i>E. monogynum</i> (folhas)	não houve identificação	carboidratos flavonoides, terpenos e saponinas / <i>screening</i> fitoquímico	hepatoprotetor	SYED & NAMDEO, 2013
<i>E. betulaceum</i> (madeira)	vanillin, 3-oxo (-)-manool, 3 $\beta$ -hydroxy (-)-manool e ent-2 $\beta$ ,19-dihydroxybeyer-15-en-1-one	terpenos / RMN	não avaliado	RIBEIRO et al., 2013-a
<i>E. rimosum</i> (folhas)	2 $\beta$ -acetoxy-3v, 6 $\alpha$ -dibenzoyloxytropane; quercetin; kaempferol-3-O- $\alpha$ -L- arabinofuranoside; Catechin; epicatechin; quercetin-3-O- $\alpha$ arabinofuranoside; quercetin-3- O- $\alpha$ arabinopyranoside; quercetin-3-O- $\beta$ - arabinopyranoside; quercetin-3- $\beta$ - lucopyranoside; kaempferol; quercetin-3-O- $\beta$ - galactopyranoside, $\alpha$ amyrrin; b-amyrrin e $\beta$ - sitosterol.	alcaloide, terpeno e flavonoide / espectrometria de massas e RMN	anticolinesterase	RIBEIRO et al., 2013-b
<i>E. rosuliferum</i> ; <i>E. stipulosum</i> ; <i>E. cuneifolium</i> ; <i>E. vacciniifolium</i> ; <i>E. barbatum</i> (folhas)	não houve identificação	não houve identificação	alelopático	TAVEIRA; SILVA & LOIOLA, 2013
<i>E. cuneatum</i> (folhas)	não houve identificação	não houve identificação	citotóxico e genotóxico	WESAM et al., 2013
<i>E. caatingae</i> (caule)	6 $\beta$ -Benzoyloxy-3 $\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy) tropane	Alcaloide / espectrometria de massas e RMN	antibiótico e citotóxico	AGUIAR et al., 2012
<i>E. alaternifolium</i> (folhas)	Quercetin-3-O-rutinoside e ombuin-3-O-rutinoside	flavonoide / UV e RMN	antioxidante	CÓRDOVA et al., 2012

Quadro 1 – Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero *Erythroxylum*

(Continuação)

<i>E. pungens</i> (raízes)	pungencine	Alcaloide / não é discutido a caracterização	vasorelaxante	OLIVEIRA et al., 2012
<i>E. caatingae</i> (folhas)	6 $\beta$ -benzoyloxy-3 $\alpha$ -[(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl)oxy]tropane; 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibenzoyloxytropane e 6 $\beta$ -benzoyloxy-3 $\alpha$ -[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxy]tropane	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	citotóxico	OLIVEIRA et al., 2011
<i>E. gonocladum</i> (folhas)	astilbin e $\beta$ -sitosterol	flavonoide e terpeno / RMN e CLAE	enzimático	LUCAS-FILHO et al., 2010
<i>E. pungens</i> (raízes)	(3-endo,8-anti)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	citotóxico	SENA-FILHO et al., 2010
<i>E. vacciniifolium</i> (casca)	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -[(1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)carbonyloxy] tropane <i>N</i> -oxide e 6 $\beta$ -hydroxy-4 $\alpha$ -[(1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane <i>N</i> -oxide	alcaloide / RMN, UV e espectrometria de massas	não avaliado	QUEIROZ et al., 2009
<i>E. confusum</i> (folhas)	$\beta$ -amyirin palmitate	esteroide / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	GONZÁLEZ-LAVAUT et al., 2008
<i>E. passerimum</i> (folhas)	14-O-methyl-ryanodanol; ryanodanol; quercetin; epicatechin e quercetin-3-O-D-glucopyranosyl	terpenos e flavonoides / espectrometria de massas e RMN	inseticida e larvicida	BARREIROS et al., 2007
<i>E. passerimum</i> (frutos)	14-O-methyl-ryanodanol e ryanodanol			
<i>E. nummularia</i> (folhas)	40,7-Dimethyl-quercetin; 14-methoxy ryanodanol; quercetin, epicatechin e quercetin-3-O-D-glucopyranosyl			

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de algumas espécies do gênero *Erythroxylum*

(Continuação)

<i>E. pervillei</i> (raízes)	3 $\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -( <i>E</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)-7 $\beta$ -tropane	alcaloide / não é discutido a caracterização	enzimático e adrenergico	CHIN; KINGHORN & PATIL, 2007
<i>E. pervillei</i> (casca)	3 $\alpha$ -( <i>E</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxytropane			
<i>E. emarginatum</i> (casca)	Anhydroecgonine methyl ester e anhydroecgonine methyl ester N-oxide	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	NISHIYAMA et al., 2007
<i>E. emarginatum</i> (galhos)	Anhydroecgonine methyl ester			
<i>E. pervillei</i> (casca)	3 $\alpha$ -( <i>E</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)-6 $\beta$ -hidroxytropane; 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -7 $\beta$ dyhydroxytropane; 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -( <i>Z</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)tropane e 3 $\alpha$ -phenylacetoxy-6 $\beta$ -( <i>Z</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)tropane.	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	CHIN et al., 2006
<i>E. minutifolium</i> (folha)	ombuin-3-rutinoside-5-glucoside e ombuin-3-rutinoside.	flavonoide / RMN	não avaliado	GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006
<i>E. barbatum</i> (raízes)	ent-rosan-1-one-5 $\alpha$ ,15 $\xi$ ,16-triol e ent-11 $\alpha$ -acetoxy-devadarane-15 $\xi$ ,16-diol e ent-devadarane-7 $\beta$ ,15 $\xi$ ,16-triol.	terpenos / RMN	não avaliado	SANTOS et al., 2006
<i>E. barbatum</i> (caule)	ent-devadaran-11 $\alpha$ ,15 $\xi$ ,16-triol; ent-devadarane-7 $\beta$ ,15 $\xi$ ,16-triol e $\beta$ -sitosterol			

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de *Erythroxylum* spp.

(Continuação)

<i>E. cambodianum</i> (folhas)	2,4-dihydroxi-6-methoxyacetophenone 4-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside; 2,4-dihydroxy-6-methoxy-acetophenone 4-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-glucopyranoside; (+)-catechin; (-)-epicatechin; quercetin-3-O-rutinoside; 3S,5R,6R,7E,9S-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3-O-β-D-glucopyranoside e citroside A	flavonoides, terpeno e acetofenona / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	KANCHANAPOOM et al., 2005
<i>E. vacciniifolium</i> (casca)	3α-hidroxy-6β-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane; 3 β -hydroxy-6β-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane]; [3α, 7β-dihydroxy-6 β -[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane]; 3α,7α -dihydroxy-6β-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]- tropane]; 6β-hydroxy-3α-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane]; 6β,7β-dihydroxy-3α-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyloxy]tropane] e 3α-hidroxy-4α-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-carbonyloxy]tropane]	alcaloides / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	ZANOLARI et al., 2005
<i>E. deciduum</i> (folhas)	não houve identificação	não houve identificação	intoxicante	COLODEL et al., 2004
<i>E. areolatum</i> <i>E. suave</i> <i>E. havanense</i> (ramos)	não houve identificação	flavonoides, alcaloides e taninos / screening fitoquímico	não avaliado	CAZANA-MARTINEZ et al., 2004
<i>E. australe</i> (folhas)	2-Methyl-3'-O-rhamnosyl-dihydro-orobol; 3-O-Rhamnosyl-7-O-glucosyl-quercetin; 4-O-Dihydro-orobol; 5-O-Rhamnosyl-7-methoxy-dihydro-orobol; 7-O-Rhamnosyl-5,3',4'-OH-eriodictyol; 5-Dehydroxy-7,3-O-glucosyl-dihydro-orobol; 3'-O-Rhamnosyl-7-O-glucosyl-dihydro-orobol e 5-OH-6-Methoxy-dihydro-pseudobaptisin.	flavonoides / espectrometria de massas, RMN e UV	não avaliado	JOHNSON & SCHMIDT et al., 2004

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de *Erythroxylum* spp.

(Continuação)

<i>E. barbatum</i> (tronco)	erythroxydiol; derricin; lonchocarpin; procesterol; $\beta$ -sitosterol; scoparon; medicarpin e homopterocarpin	flavonoide, terpeno e chalcona / RMN	não avaliado	SANTOS, LIMA & SILVEIRA, 2003
<i>E. vacciniifolium</i> (folhas)	3 $\alpha$ -(1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)-6 $\beta$ - (1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)-tropane; 3 $\alpha$ -(1- methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)-6 $\beta$ -(1 <i>H</i> -pyrrol- 2-ylcarbonyloxy)-7 $\beta$ -hydroxytropane; 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ - di(1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)tropane; 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di(1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)-7 $\beta$ - hydroxytropane; 7 $\beta$ -acetoxy-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di(1-methyl- 1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)tropane; 3 $\alpha$ -(4- hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -(1-methyl- 1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)tropane; 3 $\alpha$ -(4- hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -(1-methyl- 1 <i>H</i> -pyrrol-2-ylcarbonyloxy)-7 $\beta$ -hydroxytropane e 3 $\alpha$ -(3-hydroxyphenylacetoxy)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ - dihydroxytropane	alcaloides / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	ZANOLARI et al., 2003
<i>E. pervillei</i> (folhas)	tropane-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol 3-phenylacetate; 1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H- tropan-3 $\alpha$ -yl-3,4,5-trimethoxybenzoate; Pervilleine A [3 $\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -( <i>E</i> )-(3,4,5- trimethoxycinnamoyloxy)-7 $\alpha$ -hidroxytropane]; Pervilleine A <i>N</i> -oxide [3 $\alpha$ -(3,4,5- trimethoxybenzoyloxy)- 6 $\beta$ -( <i>E</i> )-(3,4,5- trimetoxycinnamoyloxy)-7 $\beta$ -hidroxytropane <i>N</i> - oxide]; Pervilleine B [3 $\alpha$ -(3,4,5- trimethoxybenzoyloxy)-6 $\beta$ -( <i>E</i> )-(3,4,5- trimethoxycinnamoyloxy)tropane]; Pervilleine C {3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di-[( <i>E</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)] tropane}; Pervilleine D {3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di-[( <i>E</i> )-(3,4,5- trimetoxicinnamoiloxi)]-7 $\beta$ -hidroxytropane}; Pervilleine E [3 $\alpha$ -(3-hidroxyphenilacetoxy)-6 $\beta$ - ( <i>E</i> )-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)tropane] e Pervilleine F [3- $\alpha$ phenilacetoxy-6 $\beta$ -( <i>E</i> )-(3,4,5- trimethoxycinnamoyloxy)tropane]	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	citotóxico	SILVA et al., 2001

Quadro 1 - Estudos relatados na literatura de *Erythroxylum* spp.

(Conclusão)

<i>E. zeylanicum</i> (raiz)	erythrozeylanine [1 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> -6-acetoxy-3-(3', 4', 5'-trimethoxybenzoyloxy) tropane]; 3 $\alpha$ -(3',4',5'-trimethoxybenzoyloxy)tropane; erythrozeylanine B [ <i>cis</i> -3 $\beta$ -(cinamoyloxy) tropane]; <i>trans</i> -3 $\beta$ -(cinamoyloxy) tropane; erythrozeylanine C [ <i>cis</i> -6 $\beta$ -acetoxy-3 $\alpha$ -(cinamoyloxy) tropane] e <i>trans</i> -6 $\beta$ -acetoxy-3 $\alpha$ -(cinamoyloxy) tropane.	alcaloide / espectrometria de massas e RMN	não avaliado	BRINGMANN et al., 2000
--------------------------------	---	--	--------------	------------------------

Quadro 2 - Estudos relatados na literatura de *Erythroxylum* spp. objetos de estudo desse trabalho

<b>Espécie/ parte da planta</b>	<b>Substâncias identificada/ discutida</b>	<b>Classe de metabólito/ técnica de caracterização</b>	<b>Efeito biológico</b>	<b>Referência</b>
<i>E. suberosum</i> (folhas)	não houve identificação	não houve isolamento ou caracterização	citotóxico	MACEDO et al., 2016
<i>E. suberosum</i> (folhas)	rutin	flavonoide / espectrometria de massas	não avaliado	LEITE et al., 2014
<i>E. suberosum</i> (ramos)	7-oxo-16-hydroxy-abiet-15(17)-en-19-al; 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol; 7 $\alpha$ ,16-dihydroxy-abiet-15(17)-en-19-al; <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-kaur-16-en-19-al; methyl- <i>ent</i> -7 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihydroxy-kaur-16-en-19-oate	terpenos e flavonoides / espectrometria de massas e RMN	larvicida	NASCIMENTO et al., 2012
<i>E. suberosum</i> (folhas)	quercetin-3-rutinoside e ombuin-3-rutinoside			
<i>E. campestre</i> (folhas)	cocaine	alcaloide / espectrometria de massas	não avaliado	NOVAK et al., 1984

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico das folhas de *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae) e conhecer o perfil químico das flores de três espécies de *Erythroxylum*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos: hexânico, diclorometânico, acetato de etila e metanólico das folhas e flores de espécies de *Erythroxylum*
- Explorar o perfil químico das flores de *E. tortuosum*, *E. campestre* e *E. suberosum* por meio de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas de análises;
- Caracterizar os constituintes químicos presentes nos extratos das folhas de *E. tortuosum*;
- Extrair e identificar os alcaloides das folhas de *E. tortuosum*;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Reagentes

- Solução ácida de vanilina, preparada solubilizando 3,0 g de vanilina em 135 mL de metanol, 135 mL de água destilada e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L<sup>-1</sup>
- Hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 25%.

##### 3.1.2 Solventes

- Solventes grau PA: hexano (Hex), diclorometano (Dic), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), de diversas marcas;
- Solventes grau CLAE: água, acetonitrila, acetona e metanol (Panreac, JTBaker);
- Solventes deuterados: clorofórmio (Sigma-Aldrich e Deutero), acetona (Sigma-Aldrich), água e dimetilsulfóxido (Deutero).

##### 3.1.3 Fases Estacionárias

- Cromatografia em coluna aberta (CC): sílica gel 60 (70-230 *mesh* e 230-400 *mesh*) (Macherey-Nagel);
- Cromatografia em camada delgada (CCD): sílica gel 60 com F254 (0,2 mm), em folhas de alumínio (Whatman e Fluka);

##### 3.1.4 Equipamentos

- Câmara de luz ultravioleta, 254 e 365 nm (Spetroline, modelo ENF-260C/ FE);
- Dispersor ultra-turrax (IKA, modelo T18 digital);

- Centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810R)
- Evaporador rotativo (IKA, modelo RV 05 Basic), banho de aquecimento (IKA HB 05.06 CN) e bomba de vácuo (Vacuubrand, modelo ME-1C);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE): sistema analítico (Agilent, modelo 1260 Infinity) bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), coluna Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm - 5 µm), injetor manual e software *EZChrom Edition* - Universidade Federal de Catalão
- Cromatógrafo gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM): (Agilent, modelo 7820 A – Series MSD 5975), coluna HP-5 MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm) e ionização por elétrons (70 eV) - Universidade Federal de Catalão
- Espectrômetro de massa: MicroTOF III (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de íons comercial ESI (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) - Universidade Federal de São Carlos
- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Bruker, modelo Ascend 400 MHz - Universidade Federal de Uberlândia

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta do material vegetal

As flores foram coletadas no dia 06 de outubro de 2015 e as folhas em 11 de novembro de 2016 no Cerrado do centro-oeste brasileiro, na fazenda da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Catalão - GO, sob a Autorização CNPq nº 010698/2013-2, com armazenamento dos dados e coordenadas (GPS: S18°09'16.4"; W47°55'43.2") para coletas futuras. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia - UFG/RC), que realizou a identificação do material vegetal.

### 3.2.2 Perfil Químico das Flores

O perfil químico das flores de *Erythroxylum* spp. (*E. campestre*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*) foi realizado a partir da análise de 12 extratos

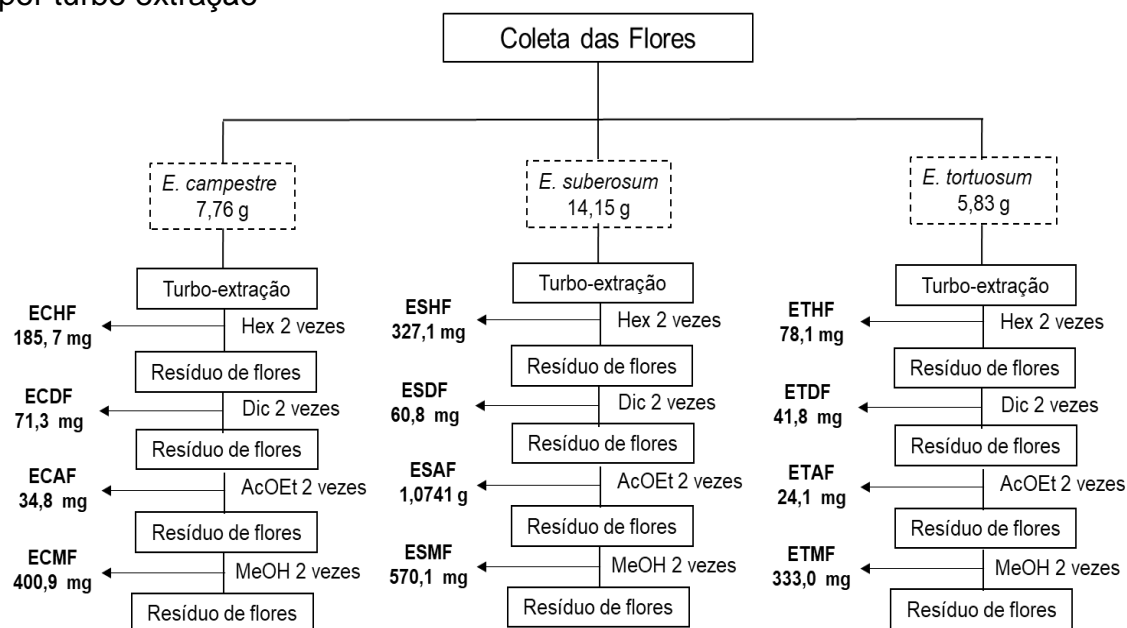
brutos obtidos por turbo extração. As análises foram realizadas utilizando CLAE-UV-DAD, CG-EM e RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.2.2.1 Preparação dos extratos

As flores frescas foram submetidas a turbo extrações (15 minutos cada) utilizando dispersor ultra-turrax e solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. No total foram feitas duas extrações com cada solvente, sendo posteriormente filtrado o material obtido e o solvente eliminado em evaporador rotativo.

A partir das espécies de *E. suberosum*, *E. campestre* e *E. tortuosum* foram obtidos doze extratos, ou seja, quatro para cada espécie, sendo esses denominados da seguinte forma: para *E. suberosum* extrato hexânico (**ESHF**), extrato diclorometano (**ESDF**), extrato acetato de etila (**ESAF**), extrato metanólico (**ESMF**); para *E. campestre* extrato hexânico (**ECHF**), extrato diclorometânico (**ECDF**), extrato acetato de etila (**ECAF**), extrato metanólico (**ECMF**); para *E. tortuosum* extrato hexânico (**ETHF**), extrato diclorometânico (**ETDF**), extrato acetato de etila (**ETAF**) e extrato metanólico (**ETMF**) (Na Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma Obtenção dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp. por turbo extração



Os extratos obtidos foram testados quanto a sua solubilidade e a partir do observado pode-se decidir qual tipo de análise cromatográfica seria realizada. Se a amostra fosse solúvel em hexano ou acetona seria então analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), mas se fossem solúveis em água ou metanol, seriam analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essa seleção foi assim feita devido as diferentes características das colunas cromatográficas dos equipamentos

### 3.2.2.2 Análise cromatográfica dos extratos por CLAE-DAD

Uma alíquota de 1 mg de cada amostra foi solubilizada em metanol:água (1:1 v/v), filtradas em membranas 0,22 µm PFE e posteriormente injetadas em um equipamento de CLAE equipado com uma coluna de C18. A fase móvel utilizada para as análises por gradiente exploratório foi acetonitrila/água de 10-90% de acetonitrila durante 60 min.

### 3.2.2.3 Análise cromatográfica dos extratos por CG-EM

As amostras analisadas foram filtradas em membranas 0,22 µm PFE e injetadas em um equipamento de CG-EM equipado com uma coluna HP - 5MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm) (Quadro 3).

Quadro 3 - Condições cromatográficas para análise dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp.

<b>Gás de arraste</b>	Hélio de alta pureza
<b>Fluxo</b>	1,0 mL min <sup>-1</sup>
<b>Injeção</b>	<i>splitless</i>
<b>Temperatura de operação</b>	250 °C
<b>Gradiente de temperatura</b>	75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/ min até 150 °C (5 min), 55 °C/ min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 240 °C (2 min), com injetor operando a 250 °C.

### 3.2.2.4 Análise dos extratos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de $^1\text{H}$ )

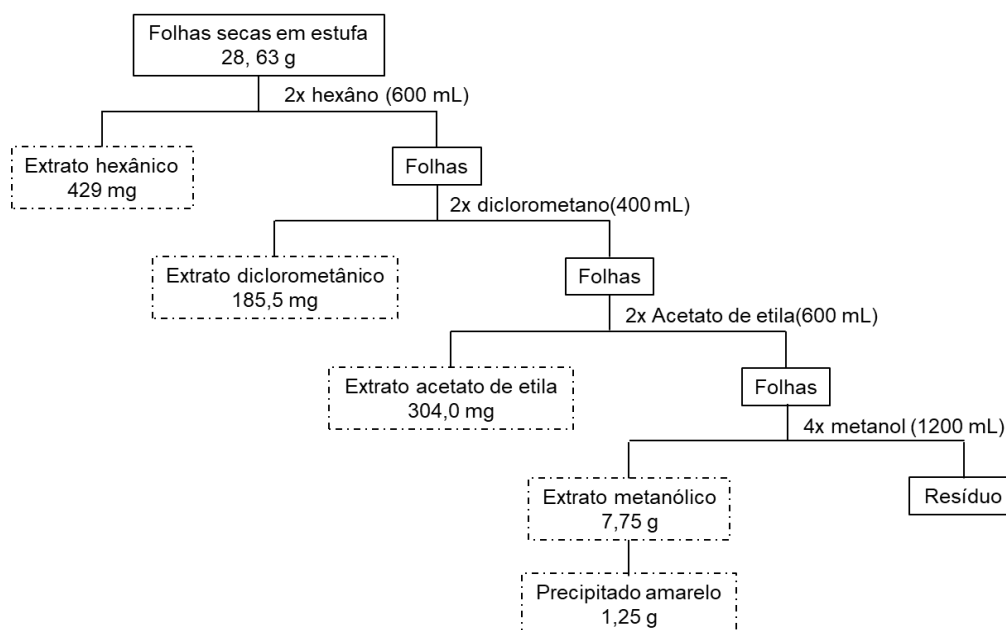
Todos os extratos das flores foram analisados por RMN $^1\text{H}$ . Os experimentos foram realizados com a colaboração do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG. Os espectros de RMN $^1\text{H}$  foram adquiridos em um equipamento com a potência de 400 MHz. Para as análises foram utilizadas de 6,0 a 8,0 mg de cada extrato e solubilizadas em solventes deuterados conforme a solubilidade.

### 3.2.3 Estudo químico das folhas de *E. tortuosum*

#### 3.2.3.1 Obtenção dos extratos das folhas de *E. tortuosum*

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa à 45° C e submetidas à turbo extrações utilizando dispersor ultra-turrax e solventes de diferentes polaridades: hexano (Hex), diclorometano (Dic), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). O material obtido de cada extração foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas de *E. tortuosum*



Após o processo de extração, foram obtidos 4 extratos das **folhas** de *E. tortuosum*: extrato hexânico (**ETH**), extrato diclorometânico (**ETD**), extrato acetato de etila (**ETA**) e extrato metanólico (**ETM**). O material obtido de cada extração foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo. Após a evaporação do solvente da amostra ETM, foi observado a formação de um precipitado amarelo que foi retirado e resuspenso com metanol. Esse precipitado foi codificado como **ETMP**.

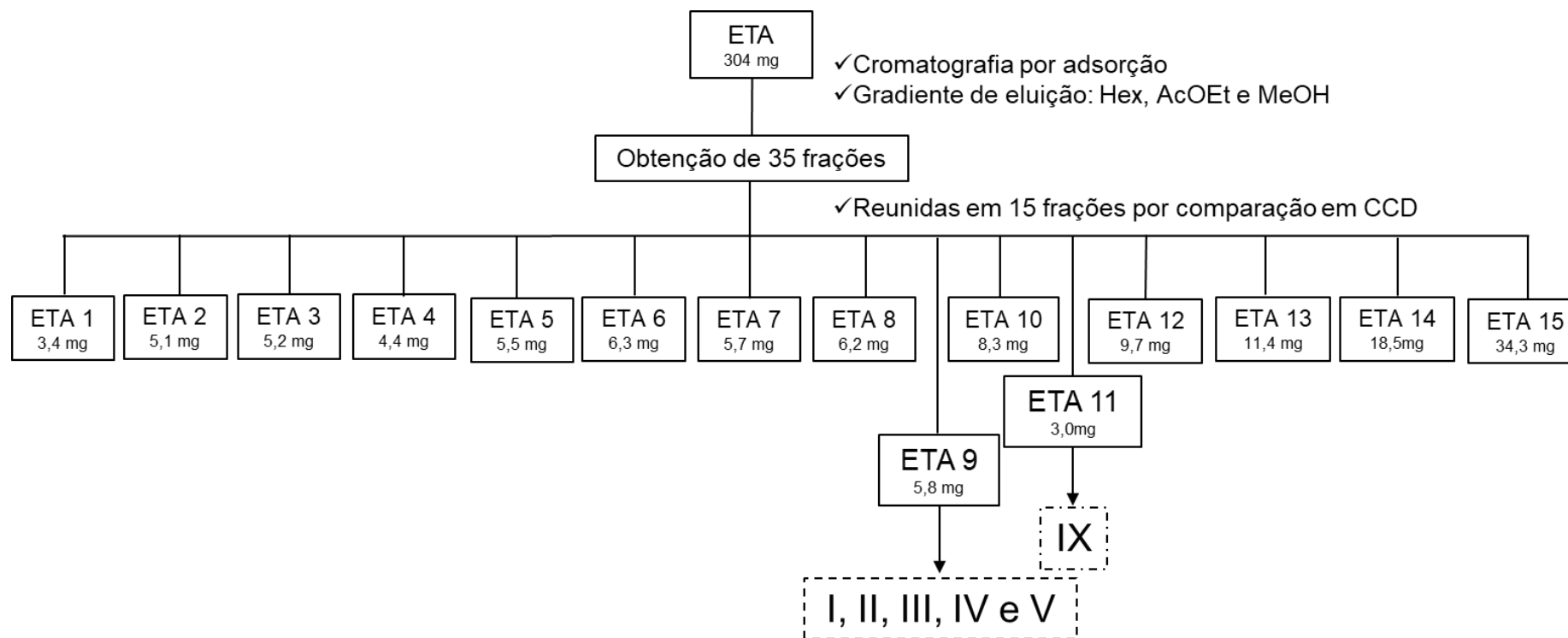
### 3.2.3.2 Fracionamento cromatográfico da amostra ETA

A amostra ETA (304 mg) foi submetida a cromatografia em coluna clássica (CC) utilizando uma coluna de vidro,  $h \times \varnothing = 17 \times 3,3$  cm, preenchida com sílica gel 60 - 200  $\mu\text{m}$  (70 - 230 *mesh*) como fase estacionária e eluição gradiente: Hex/AcOEt 9:1, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 50%, MeOH 100% (Figura 6, p.22). Após o fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD e reveladas em câmara de luz UV (254 e 365 nm) e em solução ácida de vanilina. As amostras que apresentaram  $R_{fs}$  semelhantes foram reunidas e ao final foram obtidas 15 subfrações. A amostra ETA 9 (substância **I**, **II**, **III**, **IV** e **V**) apresentou-se na forma de cristais brancos solúveis em acetona e foram analisados por CG-EM nas condições descritas no Quadro 4. A amostra ETA 11 (substância **IX**) depois de seca apresentou-se na forma de um pó amarelo amorfo e foi analisada por RMN uni e bidimensional, e também por CLAE-E.

Quadro 4 - Condições cromatográficas para análise em CG-EM das substâncias **I**, **II**, **III**, **IV** e **V**

<b>Gás de arraste</b>	Hélio de alta pureza
<b>Fluxo</b>	1,0 $\mu\text{L min}^{-1}$
<b>Injeção</b>	<i>split</i>
<b>Temperatura de operação</b>	250 °C
<b>Gradiente de temperatura</b>	150 °C (1 min); 150 a 250 °C (10 °C/min); 250 °C (4 min); 250 a 280 °C (10 °C/min); 280 °C por 20 min, com injetor operando a 250 °C.

Figura 6 – Esquema de fracionamento da amostra ETA



### 3.2.3.3 Análise por CLAE-EM da substância IX

A análise de CLAE-EM para a substância **IX** foi realizada em colaboração com a professora Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos. Foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida (coluna Sulpelco® Ascentis Express C18 de núcleo fundido com detector de UV 254 e 365 nm, fases móveis utilizadas foram: solvente A - água/ácido fórmico 0,1% e B - acetonitrila) acoplado a um espectrômetro de massas QqToF Impact HD equipado com fonte de ionização *electrospray*, sendo realizados experimentos de íons totais e de íons produtos (auto - MS/MS) no modo negativo. As condições da fonte de ionização foram: nebulizador 1,7 bar, vazão do gás de secagem 9,3 L.min<sup>-1</sup>, temperatura de secagem 200 °C, tensão do End Plate e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente. A energia de colisão foi 35 eV. O processamento dos dados foi realizado com o software *Data Analysis* (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) e as pesquisas nas bases de dados foram realizadas a partir do componente *Compound Crawler*.

### 3.2.3.4 Extração alcaloídica das folhas de *E. tortuosum*

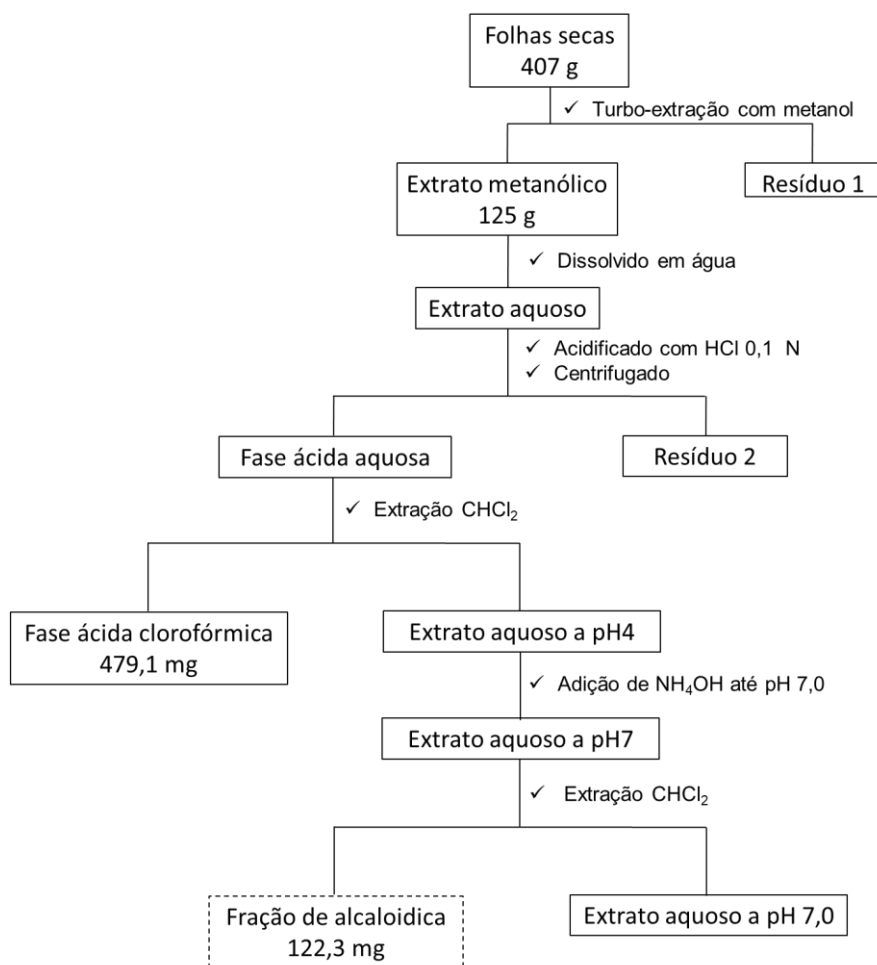
Uma nova coleta foi necessária para a realização da extração alcaloídica no dia 6 de fevereiro de 2017 no mesmo local que a espécie foi coletada anteriormente.

Para obtenção das frações enriquecidas em alcaloides, partiu-se do extrato metanólico das folhas de *E. tortuosum* para posteriormente fazer a extração alcaloídica. As folhas secas (407 g) em estufa a 45° C foram submetidas à extração com metanol por turbo extração em aparelho de ultraturrax até a exaustão. O material obtido foi filtrado e o solvente evaporado em rotaevaporador.

O extrato metanólico foi submetido à extração ácido-base, sendo 125 g do extrato solubilizado em 500 mL de água destilada e acidificado até pH 3 com uma solução de HCl 0,1 mol/L<sup>-1</sup>, sob agitação mecânica. Após adição do ácido foi observado a formação de um precipitado que foi separado por centrifugação e descartado. Prosseguiu-se para a partição líquido-líquido com

diclorometano (3 x 300 mL), obtendo-se a fase ácida clorofórmica e fase ácida aquosa. A fase ácida aquosa foi neutralizada com hidróxido de amônio 25 e prosseguiu-se para extração com diclorometano (3x 300 mL), obtendo-se a fase neutra aquosa e fração alcaloídica (ETDN). A fração alcaloídica foi resuspendida com água destilada e seca com sulfato de sódio anidro (Figura 7).

Figura 7 – Fluxograma da extração alcaloídica das folhas de *E. tortuosum*



A fração alcaloídica foi solubilizada em acetato de etila e analisada por CG-EM nas condições cromatográficas descritas no Quadro 5, p.25, para identificar e caracterizar possíveis alcaloides presentes nessa amostra.

Quadro 5 - Condições cromatográficas para análise da fração alcaloídica em CG-EM

<b>Gás de arraste</b>	Hélio de alta pureza
<b>Fluxo</b>	1,0 $\mu\text{L min}^{-1}$
<b>Injeção</b>	<i>split</i>
<b>Temperatura de operação</b>	250 °C
<b>Gradiente de temperatura</b>	150 °C (1 min); 150 a 250 °C (10 °C/min); 250 °C (4 min); 250 a 280 °C (10 °C/min); 280 °C por 20 min, com injetor operando a 250 °C.

### 3.2.3.5 Partição líquido-líquido da fase aquosa

O Resíduo 1 (resíduo obtido da extração metanólica para obtenção dos alcaloides) foi submetido à extração com água destilada quente (1x 700 mL) à 80 °C durante 20 minutos, utilizando chapa aquecedora e controlando a temperatura com um termômetro de mercúrio. Após o material atingir a temperatura ambiente, foi centrifugado e separado o resíduo das folhas do extrato aquoso. O extrato aquoso foi acidificado com ácido clorídrico 0,1 N até pH 4 e partiu-se para a extração líquido-líquido com acetato de etila (3 x 300 mL), obtendo-se a fase ácida aquosa e fase ácida acetato de etila (ETAA). A fase aquosa foi neutralizada com hidróxido de amônio 25% até pH 7 e prosseguiu-se para a extração com acetato de etila obtendo-se a fração aquosa neutra (Figura 8, p.26).

### 3.2.3.6 Extração em fase sólida da amostra ETAA

Uma alíquota de 50 mg da amostra ETAA foi purificada em cartucho de sílica modificada (SILICYCLE, C18, 500 mg/6 mL). Primeiramente o cartucho foi ativado com 30 mL de metanol e condicionada com 10 mL de água ultrapura (grau CLAE). Posteriormente a amostra foi solubilizada em 1 mL de metanol/água (1:4), introduzida no cartucho e submetida a cinco diferentes sistemas de eluição: H<sub>2</sub>O 100%; H<sub>2</sub>O/MeOH 50%; MeOH 100%; MeOH/MeCN

50%; MeCN 100% e ao final tinha-se 4 frações (Figura 9). A amostra ETAA 3 (substância **IX**), foi enviada para análise de RMN de  $^1\text{H}$ .

Figura 8 – Fluxograma da partição líquido-líquido da fase aquosa

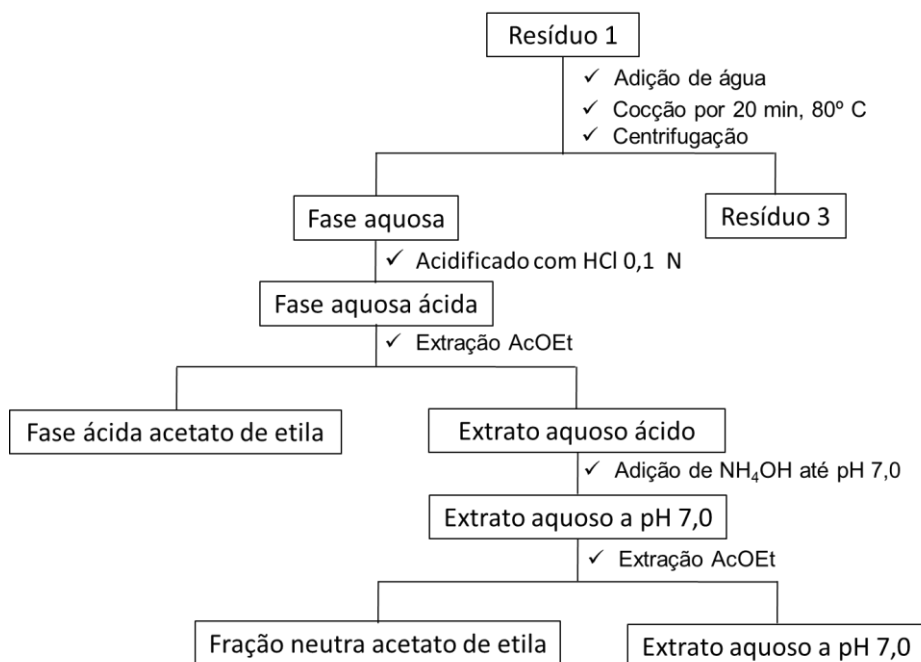
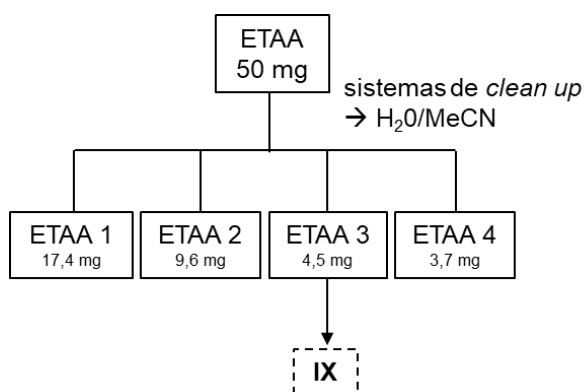


Figura 9 – Fluxograma do fracionamento da amostra ETAA



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PERFIL QUÍMICO DAS FLORES DE *Erythroxylum* spp.

O perfil químico das flores foi feito através das análises dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , CG-EM e CLAE-UV-DAD, em que foi possível verificar as similaridades e diferenças entre os extratos, sugerir a presença de algumas classes de compostos e de algumas substâncias.

#### 4.1.2 Rendimento e solubilidade dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp.

Depois de evaporado o solvente dos extratos, foi calculado o rendimento de extração e testada a solubilidade: se a amostra fosse solúvel em solventes mais polares, como metanol ou água, seria analisada por CLAE-UV/DAD; mas se solúvel em solventes mais apolares, como hexano e acetato de etila, então seria analisada por CG-EM (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento, solubilidade e experimento utilizado para a realização do perfil químico das flores de *Erythroxylum* spp

Extrato	Rendimento (%)	Solubilidade	Experimento
ESHF	2,3	Hex	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ESDF	0,4	Hex	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ESAF	7,6	MeOH/H <sub>2</sub> O	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$
ESMF	4,0	MeOH/H <sub>2</sub> O	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$
ECHF	2,4	Hex	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ECDF	1,0	Hex	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ECAF	0,6	MeOH	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$
ECMF	5,2	H <sub>2</sub> O	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$
ETHF	1,3	Hex	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ETDF	0,7	AcOEt	CG-EM e RMN de $^1\text{H}$
ETAF	0,4	H <sub>2</sub> O	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$
ETMF	5,7	H <sub>2</sub> O	CLAE-UV/DAD e RMN de $^1\text{H}$

#### 4.1.3 Perfil químico dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp. por RMN de $^1\text{H}$

A análise de amostras por ressonância magnética nuclear é bastante utilizada para determinação dos constituintes químicos principais presentes nas mesmas, nesse tipo de análise não se tem a intenção de elucidar substâncias isoladas, mas sim de analisar os constituintes principais dos extratos. Alguns trabalhos de determinação de perfil químico do extrato de plantas utilizando a RMN como técnica de análise principal, já foram descritos anteriormente (BRAHMI et al., 2015; DEBORDE et al., 2017; FOTAKIS et al., 2016), por isso, nesse trabalho, foram analisados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para complementar o perfil químico das flores.

Analisando os espectros dos extratos das flores (Figuras 10-13, p.30-33) observa-se, de modo geral, semelhança entre as três espécies estudadas. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  tem a presença de sinais no intervalo de  $\delta_{\text{H}}$  8,5-0,5 ppm, sendo característicos de hidrogênios alifáticos e aromáticos. Os hidrogênios da região mais desblindada do espectro, de  $\delta_{\text{H}}$  8,5-6,0 ppm, são referentes à substâncias com anéis aromáticos, como flavonoides, por exemplo, comumente encontrado no gênero *Erythroxylum* (ALBUQUERQUE et al., 2014; BARREIROS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2016); de  $\delta_{\text{H}}$  6,5-4,5 ppm hidrogênios olefínicos; de  $\delta_{\text{H}}$  3,0-0,5 ppm hidrogênios metílicos e metínicos, podendo ser referentes a triterpenos que são comuns em plantas (HAO et al., 2018; QIN et al., 2018; ELIAS et al., 2016). Observa-se também, sinais característicos de alcaloides tropânicos, sendo eles em  $\delta_{\text{H}}$  2,4 e 3,4 ppm, esses sinais são atribuídos a essa classe por ser o gênero conhecido pela produção de alcaloides (RIBEIRO et al., 2013-a; ZUANAZZI et al., 2001; BRACHET et al., 1997; CASALE & MALETTE, 2016). A presença de sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  5,0-3,0 ppm são referentes a hidrogênios de unidades glicosídicas, dando indícios de que nos extratos tem-se substâncias glicosiladas.

No caso dos extratos preparados com hexano, foi possível observar semelhança entre as três espécies estudadas (Figura 10, p.30). Os sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são característicos de metabólitos secundários do tipo terpenoides. Na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,5-1,5 ppm verificou-se sinais de hidrogênios metílicos ( $\text{CH}_3$ ), em  $\delta_{\text{H}}$  1,5-2,8 ppm de

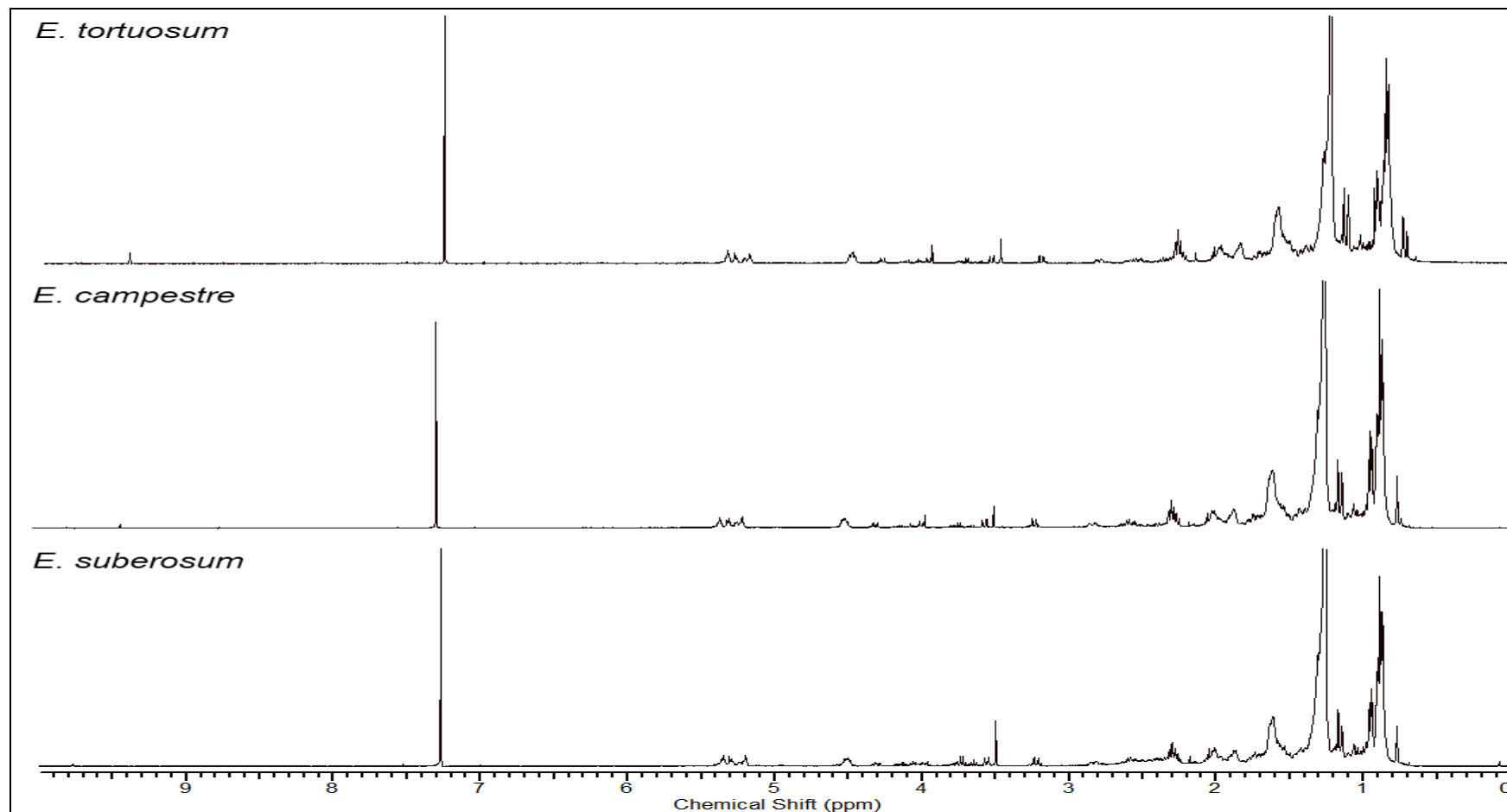
hidrogênios metilênicos (CH<sub>2</sub>) e metínicos (CH). Outros sinais entre  $\delta_H$  3,0-4,5 ppm corroboram com estruturas terpênicas.

Os espectros dos extratos preparados com diclorometano (Figura 11, p.31) mostraram composição semelhante aos extratos preparados com hexano. Já o extrato de *E. tortuosum*, além de apresentar a composição terpênica, apresentou sinais desblindados em  $\delta_H$  5,5-9,3 ppm, característicos de compostos aromáticos, mais especificamente flavonoides.

A extração realizada com acetato de etila levou a extratos com composição química diferente (Figura 12, p.32). O espectro do extrato de *E. tortuosum* apresentou majoritariamente sinais de hidrogênios bastante blindados, característicos de terpenos. O espectro de *E. campestre* não apresentou boa resolução, impossibilitando caracterizar sua composição. Para a *E. suberosum* observou-se espectro bastante heterogêneo com sinais característicos de compostos com hidrogênios aromáticos  $\delta_H$  6,0-8,0 ppm, o que leva a sugerir a presença de alguns compostos, como flavonoides e alcaloides com substituintes aromáticos, por ser observado sinais característicos de alcaloide tropânico em  $\delta_H$  3,2 - 3,5 ppm.

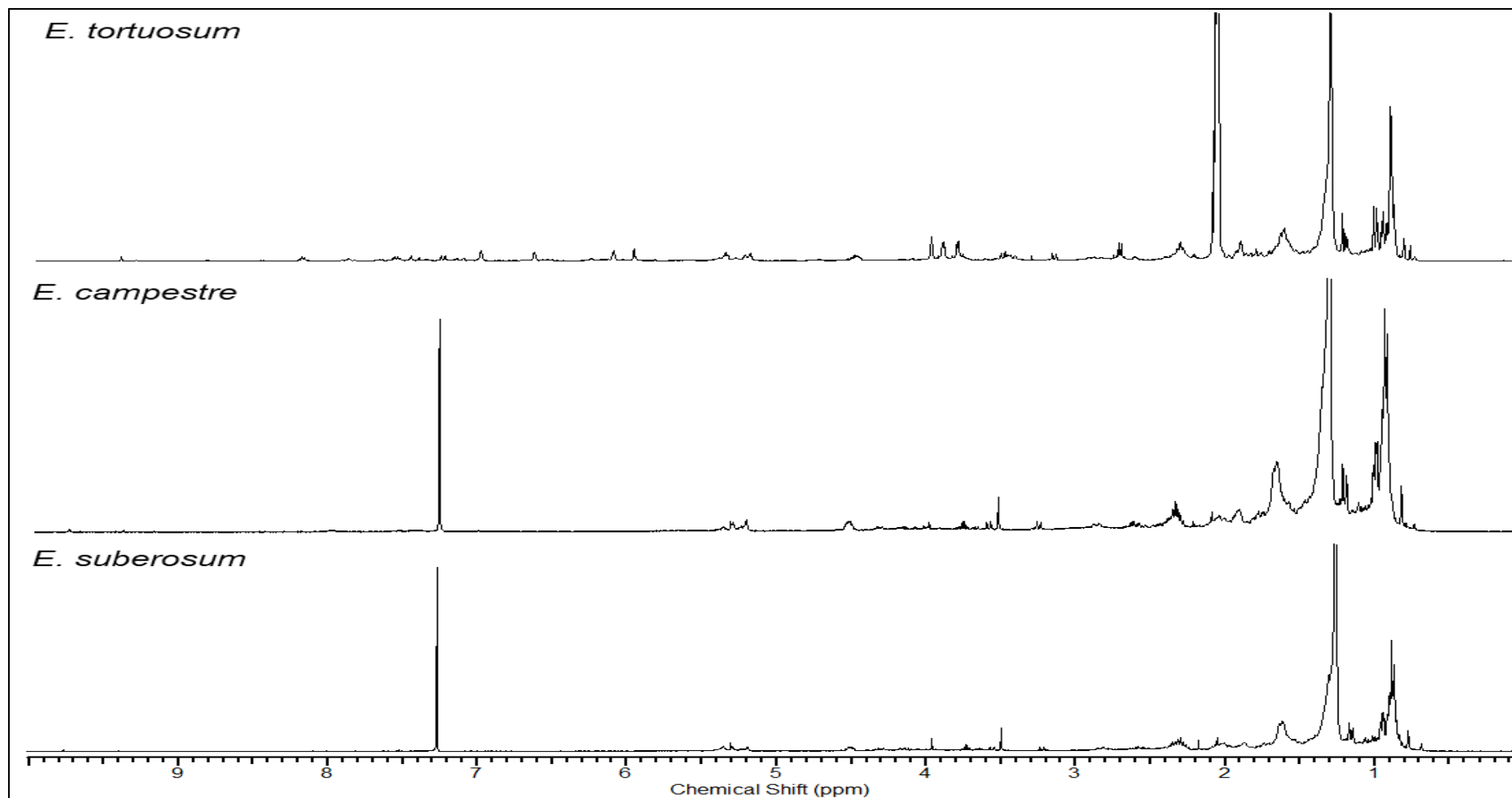
Os extratos preparados com metanol (Figura 13, p.33) são muito semelhantes para as três espécies, os sinais observados são de hidrogênios mais blindados em  $\delta_H$  0,5-1,5 ppm referente à hidrogênios metílicos (CH<sub>3</sub>), em  $\delta_H$  1,5-2,8 ppm de hidrogênios metilênicos (CH<sub>2</sub>) e metínicos (CH), além de sinais na região de  $\delta_H$  5,0-3,0 ppm que sugerem a presença de unidades glicosídicas.

Figura 10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos hexânicos das flores de *Erythroxylum* spp.



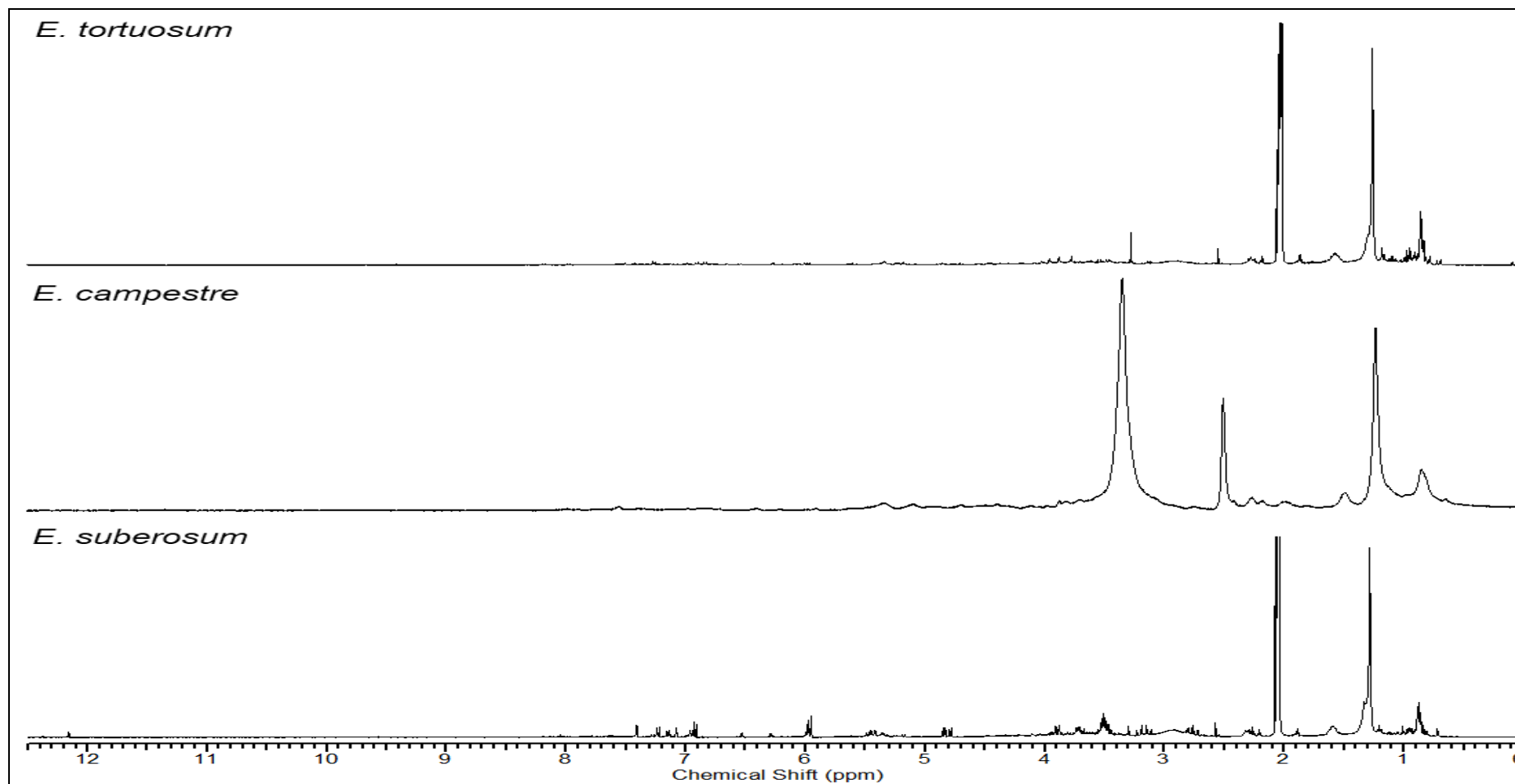
Experimentos realizados na UFU: 400 MHz; 6,0 a 8,0 mg; 25 °C;  $\text{CDCl}_3$  para as três espécies

Figura 11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos diclorometânico das flores de *Erythroxylum* spp.

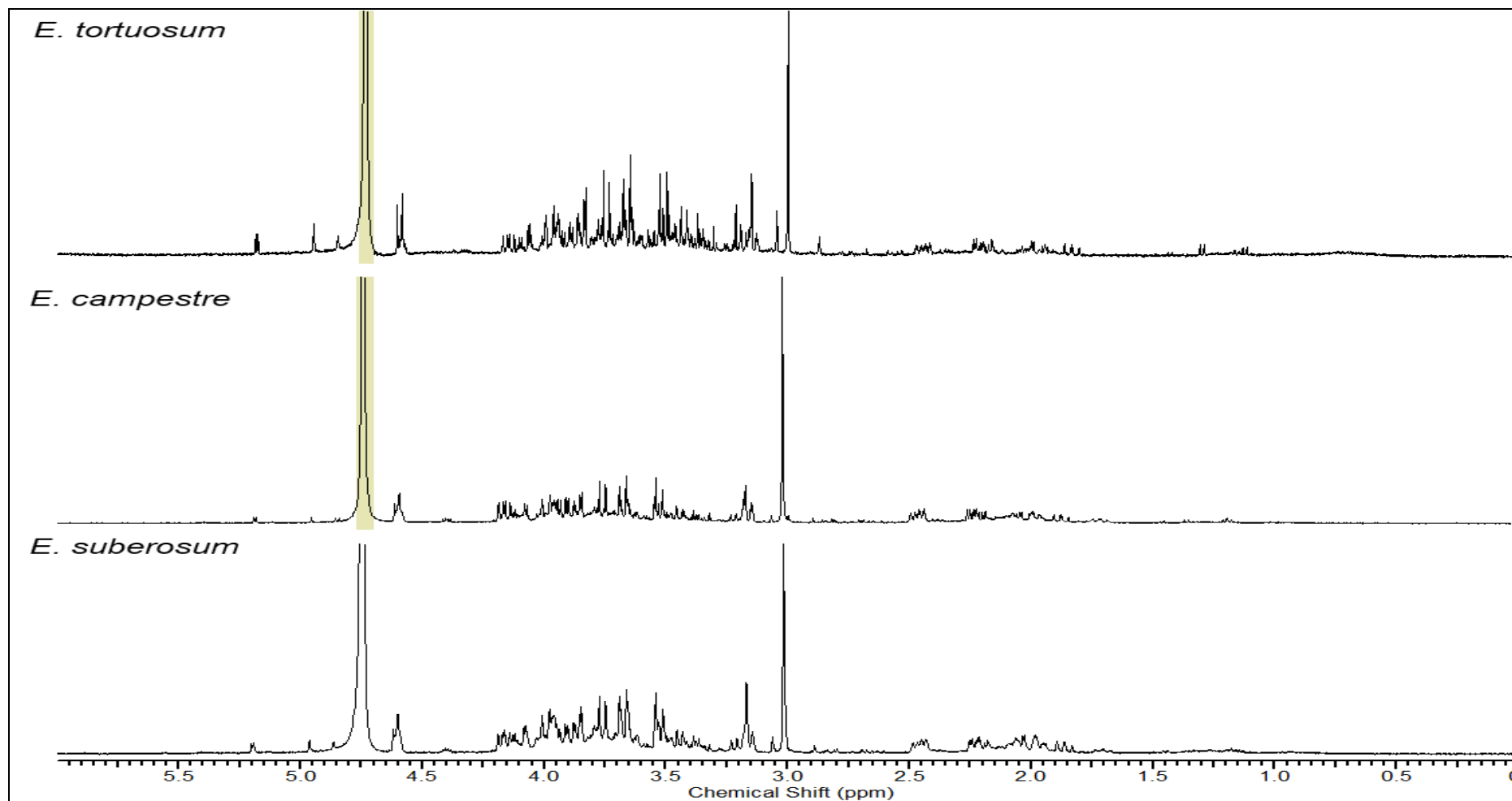


Experimentos realizados na UFU: 400 MHz; 6,0 a 8,0 mg; 25 °C;  $\text{CDCl}_3$  para *E. campestre* e *E. suberosum*,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  para *E. tortuosum*.

Figura 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos acetato de etila das flores de *Erythroxylum* spp.



Experimentos realizados na UFU: 400 MHz; 6,0 a 8,0 mg; 25 °C; DMSO-  $d_6$  para *E. campestre* e,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  para *E. suberosum* e *E. tortuosum*.

Figura 13 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos metanólicos das flores de *Erythroxylum* spp.

Experimentos realizados na UFU: 400 MHz; 6,0 a 8,0 mg; 25 °C;  $\text{D}_2\text{O}$  para as três espécies

#### 4.1.4 Perfil químico dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp. por CLAE-UV/DAD

Após a injeção dos extratos mais polares no equipamento de CLAE-UV/DAD (condições cromatográficas descritas no item 3.2.2.3, p.19), foram analisados os cromatogramas (Figuras 14 e 15, p.35) e os espectros de ultravioleta-visível (Figuras 16 e 17, p.36 e 37) gerados a partir das bandas cromatográficas detectadas. Os espectros de UV possibilitaram a diferenciação das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos estudados, além de observar a similaridade entre eles. Utilizando um sistema de gradiente exploratório foi possível detectar metabólitos com grande intervalo de polaridade e com diversidade de sensibilidade a detecção de luz UV. O perfil cromatográfico mostrou a presença de diversas bandas, o que leva a sugerir a presença de uma variedade de substâncias com cromóforos, sendo estas de média a alta polaridade.

Apesar da variedade de substâncias, os cromatogramas apresentam bandas cromatográficas análogas, tanto pelo tempo de retenção quanto pelos máximos de absorção em UV, o que sugere a presença de metabólitos semelhantes nas três espécies. Para tal avaliação foram analisados os espectros de ultravioleta-visível das bandas cromatográficas com tempo retenção semelhantes (Figuras 16 e 17, p.36 e 37).

Analisando cada um dos espectros de ultravioleta-visível, pode-se observar a presença de bandas características de alcaloides para os picos dos extratos metanólicos sendo a banda II entre 200-280 nm e a banda I entre 300-380 nm (SANGSTER & STUART,1964) (Figura 16, p.36). Esses mesmos intervalos de comprimentos de onda podem ser atribuídos a outras classes de metabólitos secundários, como a classe dos flavonoides (MABRY et al., 1970), porém a análise de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 13, p.33) juntamente com os estudos químicos do gênero já relatados na literatura (Quadro 1, p.6), corroboraram para que essas bandas fossem atribuídas a compostos da classe dos alcaloides. Para os extratos acetato de etila essas bandas poderiam ser designadas aos flavonoides (Figura 17, p.37). A principal contribuição das análises de RMN de  $^1\text{H}$  foi poder observar a presença dos sinais de

hidrogênios aromáticos, o que contribuiu para a atribuição das bandas dos espectros de UV a essa classe de metabólito.

Figura 14 - Cromatogramas dos extratos metanólicos das flores de *Erythroxylum* spp. por CLAE em 254 nm (bandas cromatográficas com intervalo de tempo: A = 1,20-1,44 min; B = 8,62-8,68 min e C = 14,03-14,47 min)

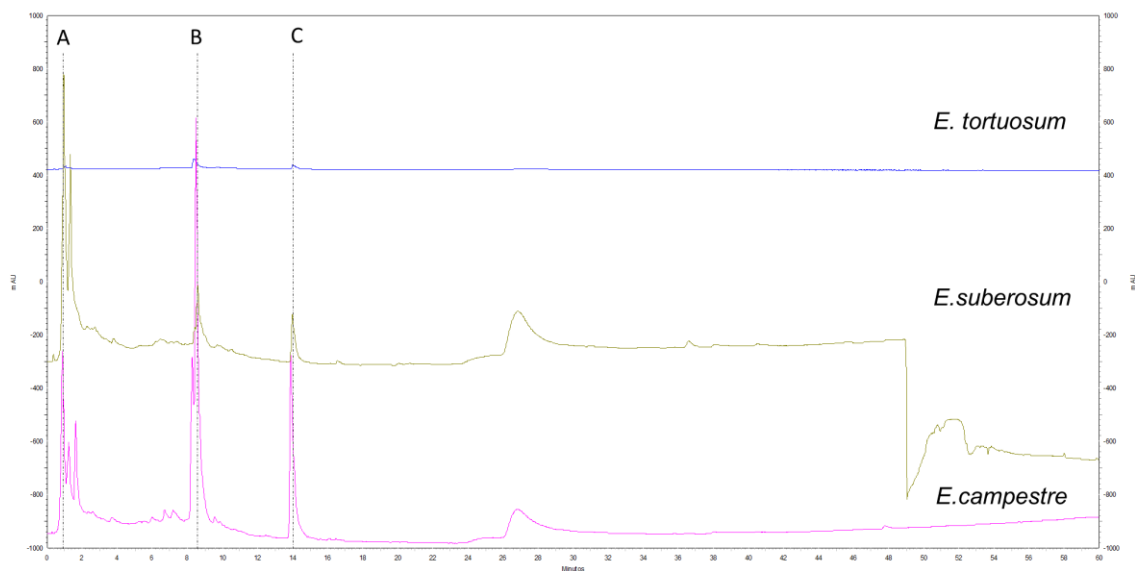


Figura 15 - Cromatogramas dos extratos acetato de etila das flores de *Erythroxylum* spp. por CLAE em 254 nm (bandas cromatográficas com intervalo de tempo: D = 8,16-9,32 min e E = 13,23-14,12 min)

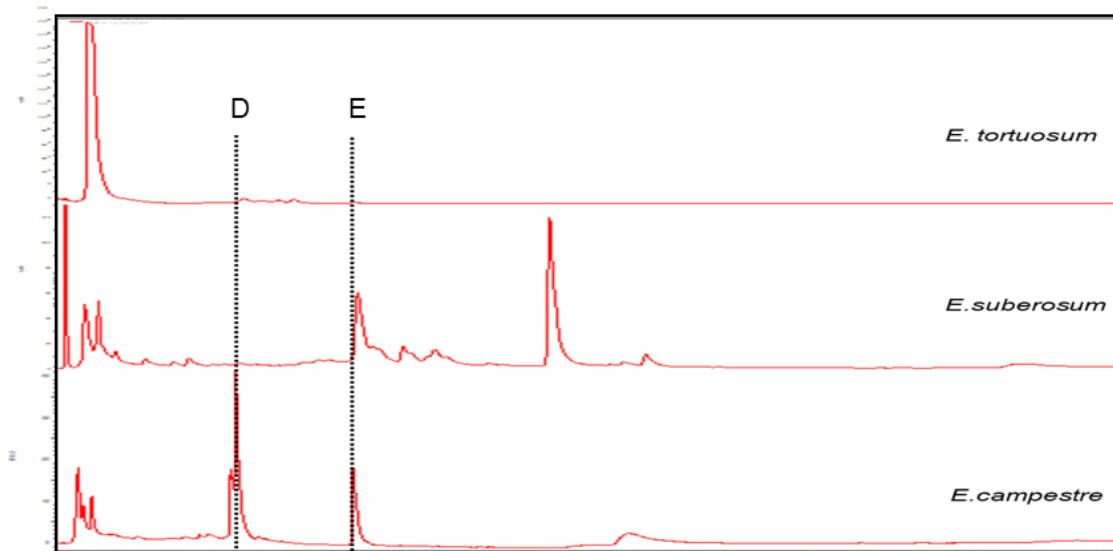


Figura 16 - Espectros de absorção no ultravioleta-visível das bandas cromatográficas com tempo de retenção análogos dos extratos metanólicos das flores de *Erythroxylum* spp (bandas cromatográficas com tempo de retenção: A = 1,20-1,44 min; B = 8,62-8,68 min e C = 14,03-14,47 min)

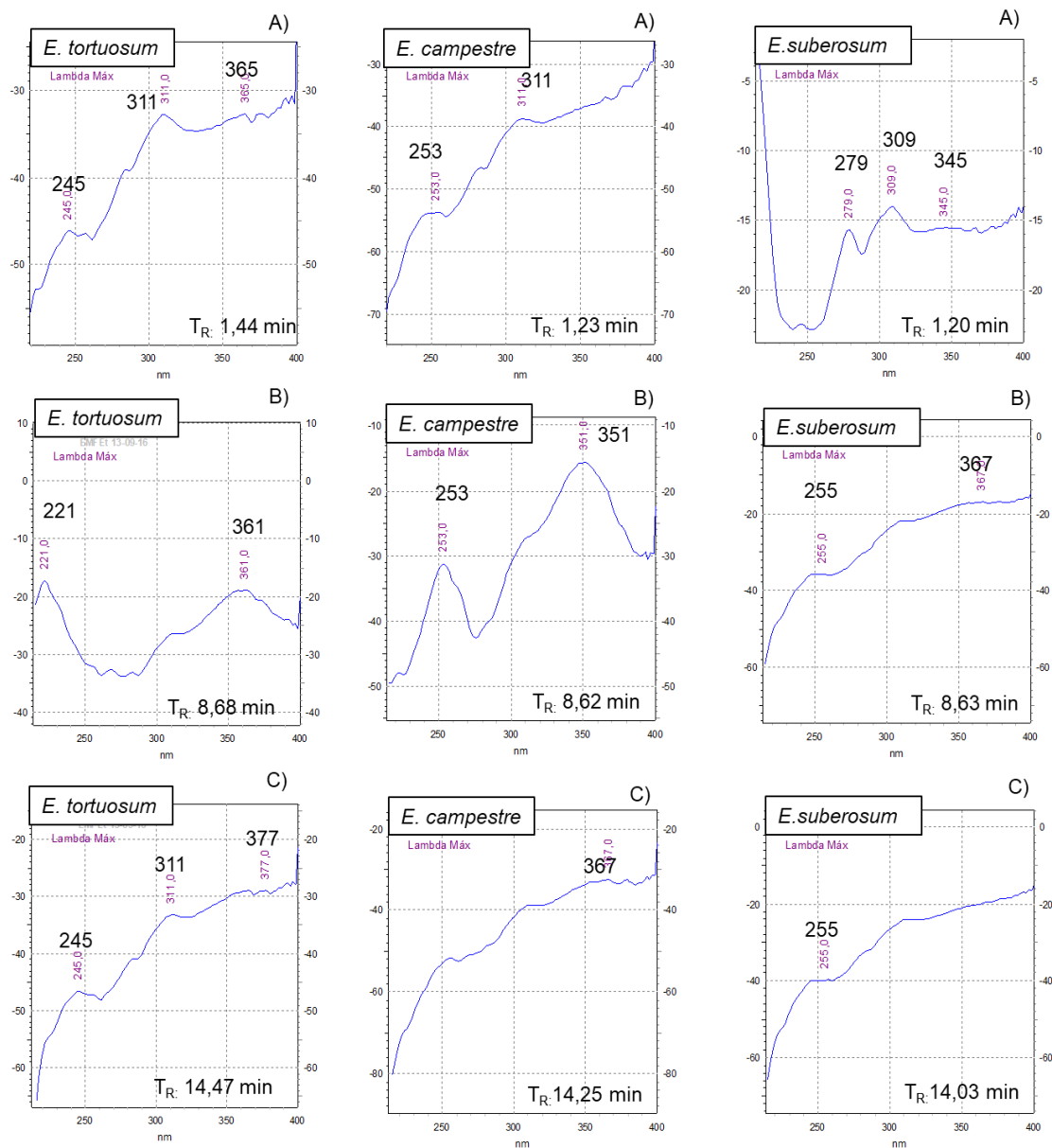
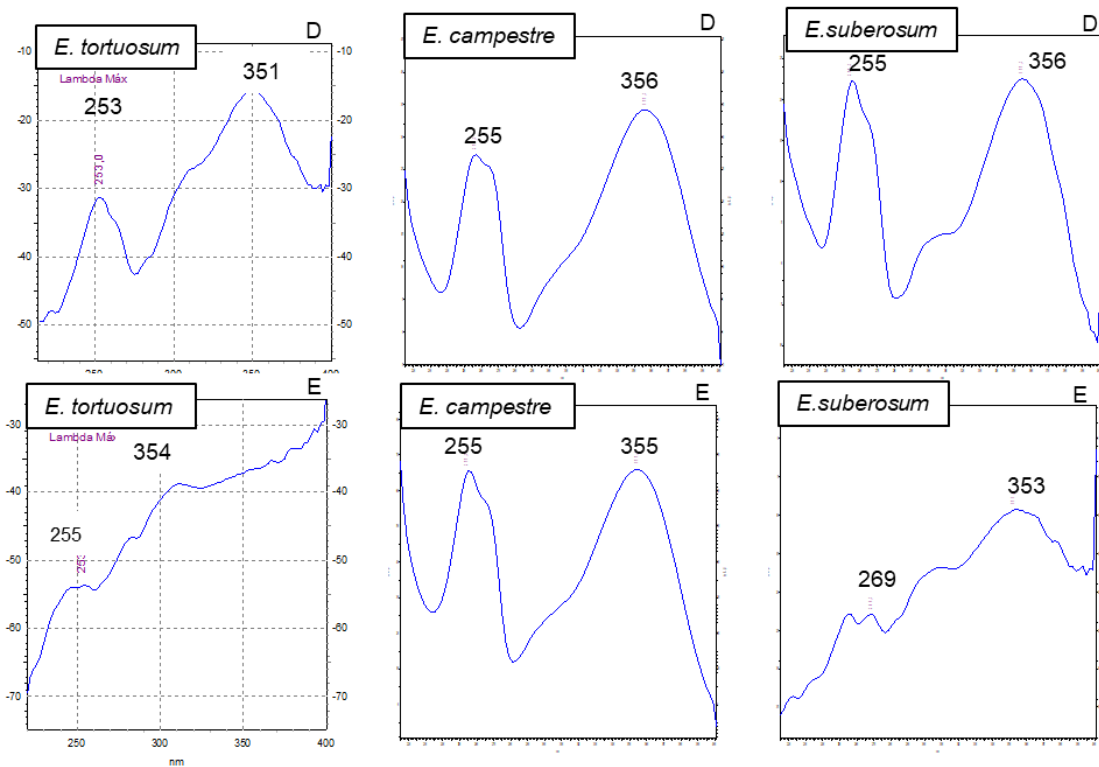


Figura 17 - Espectros de absorção no ultravioleta-visível das bandas cromatográficas com tempo de retenção análogos dos extratos acetato de etila das flores *Erythroxylum* spp. (bandas cromatográficas com tempo de retenção: D = 8,16-9,32 min e E = 13,23-14,12 min)



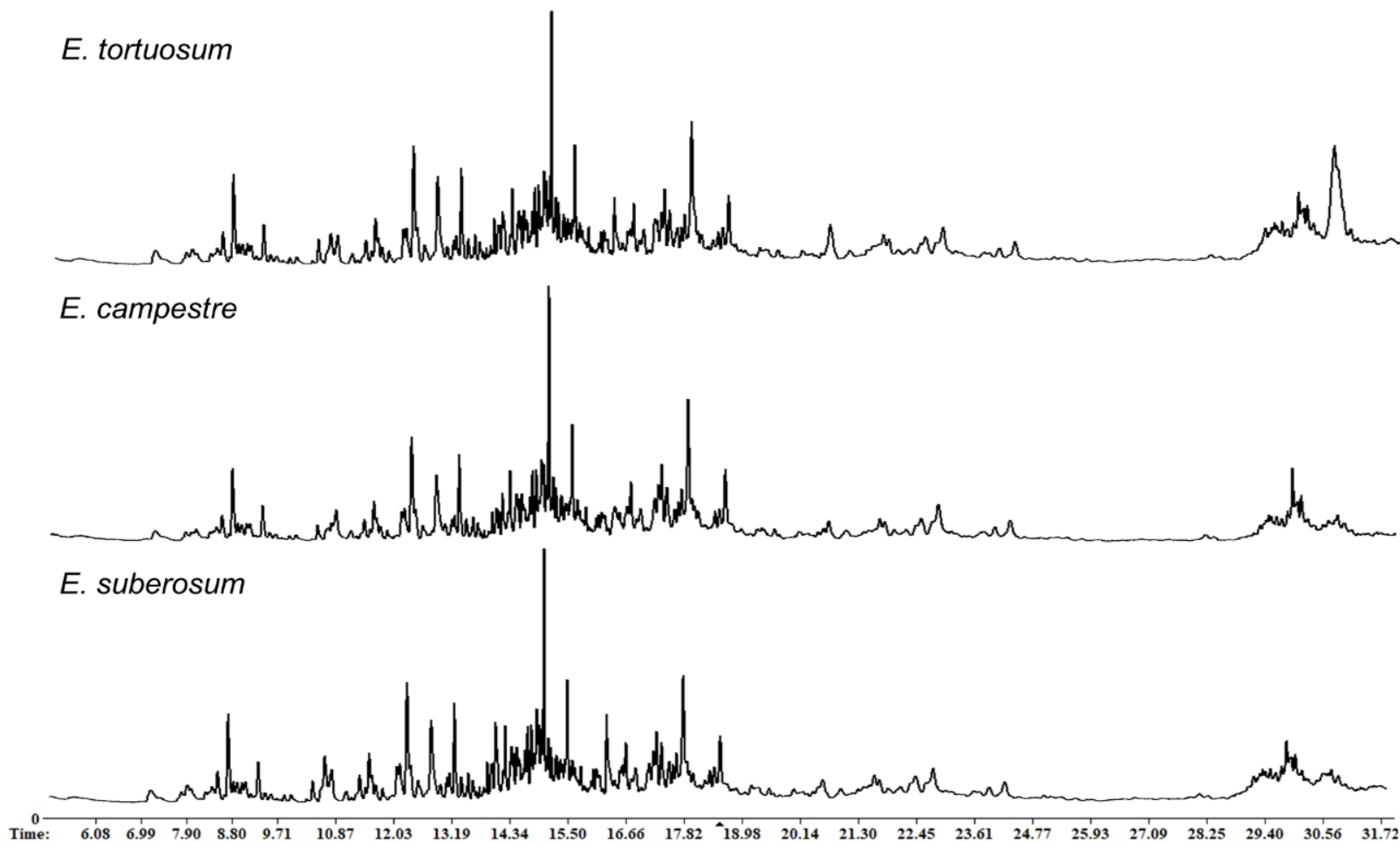
#### 4.1.5 Perfil químico dos extratos das flores de *Erythroxylum* spp. por CG-EM

Com a finalidade de analisar o perfil químico das espécies e avaliar a similaridade entre os extratos estudados, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (condições mostradas no Quadro 3, p.19). Através das análises dos cromatogramas (Figuras 18 e 19, p.39 e 40) e dos espectros de massas (Anexos 1 e 2, p. 80-83) foi possível confirmar que as espécies possuem perfil químico semelhante, pois os cromatogramas dos extratos hexânicos e diclorometânicos evidenciaram de um modo geral a presença das mesmas substâncias. Apenas o extrato diclorometânico de *E. tortuosum* apresentou menor variedade de metabólitos quando comparado aos demais extratos de mesma polaridade.

A partir dos cromatogramas foram gerados os espectros de massas de alguns picos que estavam presentes em todos os extratos e que apresentavam intensidades significativas. As substâncias foram identificadas

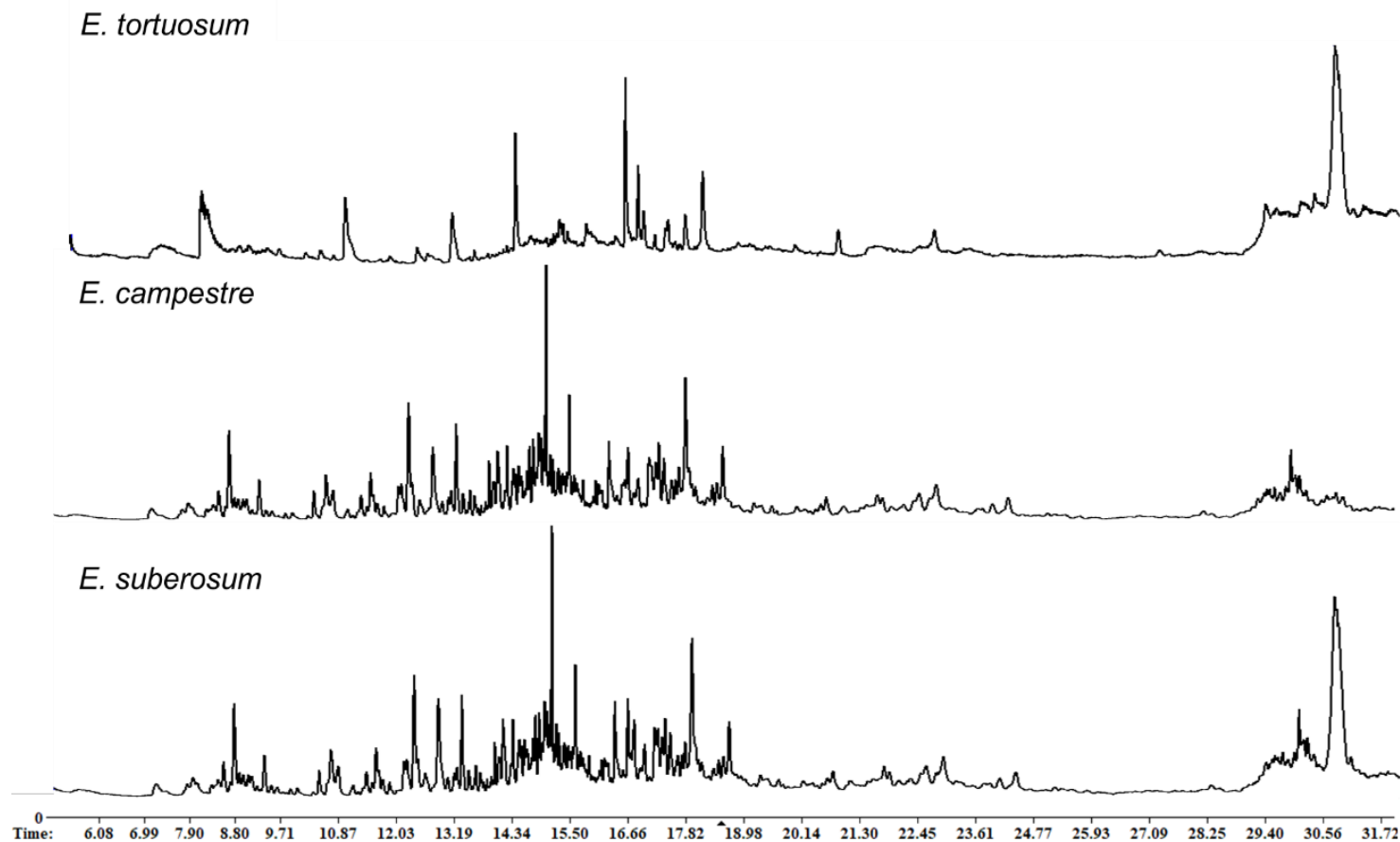
com base nos dados da biblioteca NIST/EPA/NIH, disponível no equipamento, em comparação com dados da literatura. Não há relato na literatura de estudos químicos sobre as flores das espécies aqui estudadas, mas as substâncias que foram identificadas nas flores já foram relatadas em outras plantas, principalmente em óleos essenciais (Tabelas 2 e 3, p.41 e Figuras 20 e 21, p. 42 e 43).

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM para os extratos hexânicos das flores de *Erythroxylum* spp.



**Condições cromatográficas:** coluna HP-5 MS (30 m x 250  $\mu\text{m}$  e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ), hélio (gás de arraste), fluxo de 1,0  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , método com programação de T = 75  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), 35  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 100  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 45  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 150  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 55  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 200  $^{\circ}\text{C}$  (15 min), 65  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 240  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), injeção *splitless*, operando o injetor a 250  $^{\circ}\text{C}$ , energia de ionização 70 ev.

Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM para os extratos diclorometânicos das flores de *Erythroxylum* spp.



**Condições cromatográficas:** coluna HP-5 MS (30 m x 250  $\mu\text{m}$  e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ), hélio (gás de arraste), fluxo de 1,0  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , método com programação de T = 75  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), 35  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 100  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 45  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 150  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 55  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 200  $^{\circ}\text{C}$  (15 min), 65  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até 240  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), injeção *splitless*, operando o injetor a 250  $^{\circ}\text{C}$ , energia de ionização 70 ev.

Tabela 2 - Compostos identificados nos extratos hexânicos das flores de *Erythroxylum* spp. obtidos via GC-EM

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>[M]<sup>+</sup></b>	<b>Nome da substância</b>	<b>Referência</b>
8,7	296	2,6,10,15-tetrametileptadecano	KARIMOV et al., 2015
9,3	212	2,6,11-trimetildodecano	WINNETT et al., 2017
11,5	281	2,6,10,15-tetrametileptadecano	LV et al., 2017
12,3	212	2,6,11-trimetildodecano	WINNETT et al., 2017
12,8	206	2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol	ADEOSU et al., 2013
13,3	267	2,6,11,15-tetrametilexadecano	GANIYAT et al., 2011
15,0	380	heptacosano	KARIMOV et al., 2015
15,5	268	2-metiloctadecano	RAHMAN et al., 2011
18,8	282	2,6,10,14-tetrametilexadecano	CAO et al., 2007

Tabela 3 - Compostos identificados nos extratos diclorometânicos das flores de *Erythroxylum* spp. obtidos via GC-EM

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>[M]<sup>+</sup></b>	<b>Nome da substância</b>	<b>Referência</b>
10,6	156	dodecanal	CAO et al., 2007
13,3	268	nonadecano	OMORUYI et al., 2014
14,1	212	tetradecanal	OGUNWADE et al., 2013
16,3	268	octadecanal	PRADHEESH et al., 2015
18,6	240	2,6,10-trimetiltetradecano	HONG et al., 2010

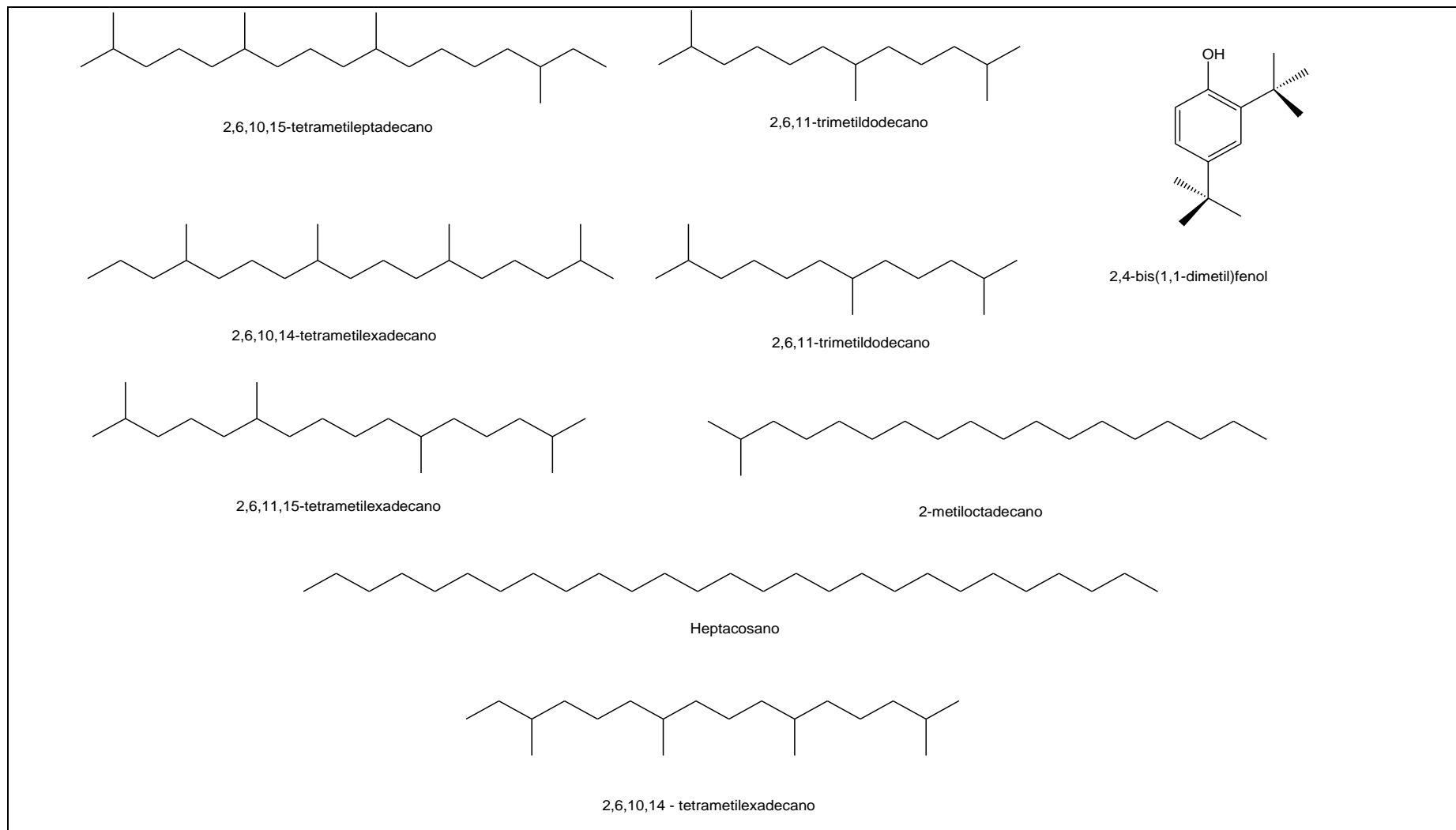
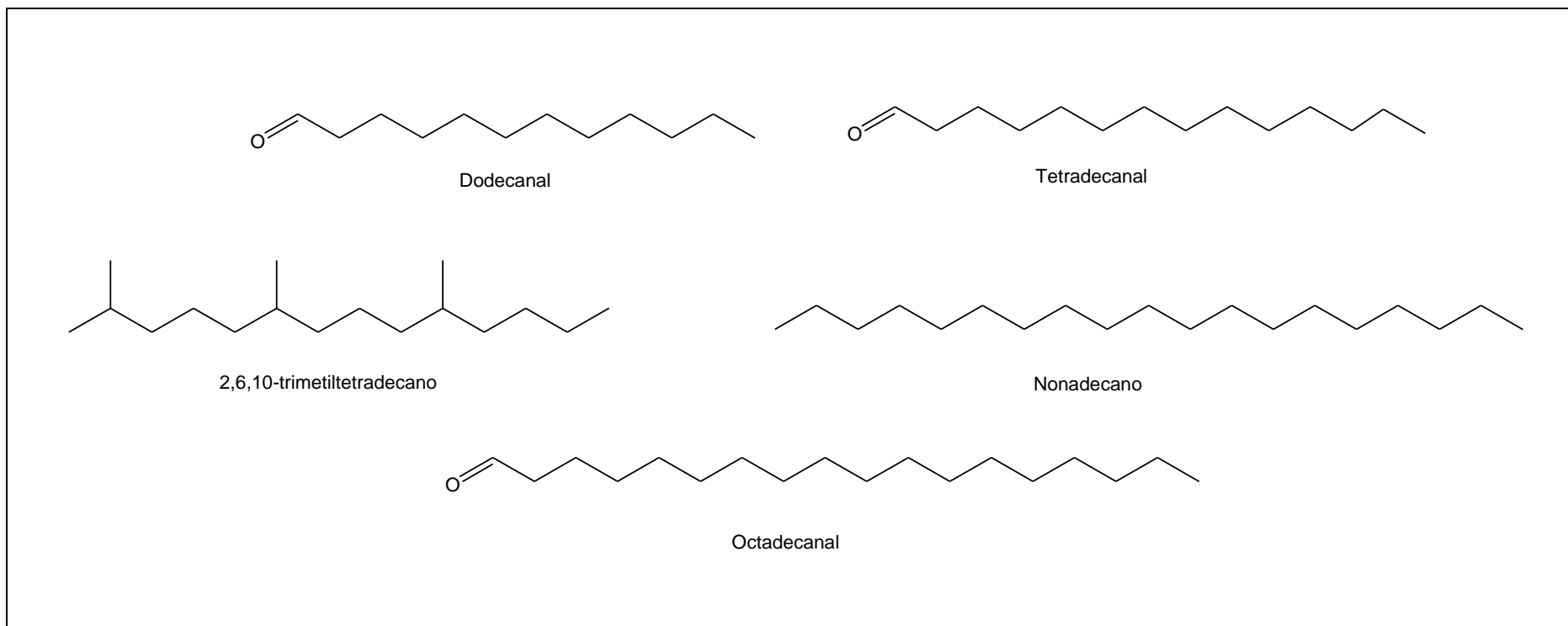
Figura 20 - Estruturas químicas dos compostos identificados via GC-EM nos extratos hexânicos das flores de *Erythroxylum* spp.

Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos identificados via GC-EM nos extratos diclorometânicos das flores de *Erythroxylum* spp.



## 4.2 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. tortuosum*

### 4.2.1 Rendimento dos extratos orgânicos das folhas de *E. tortuosum*

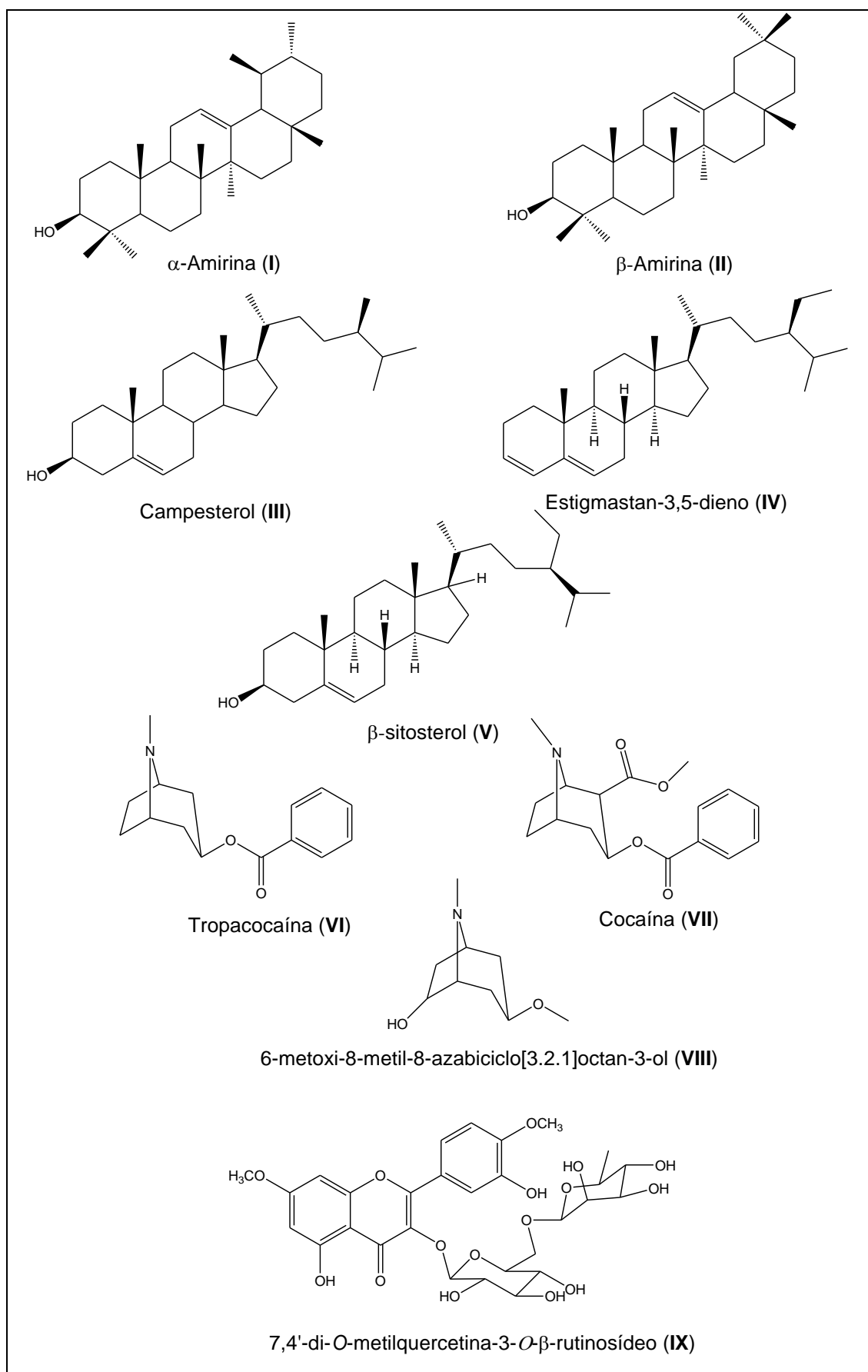
As folhas de *E. tortuosum* foram extraídas com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanólico. Os rendimentos dos extratos orgânicos são mostrados na Tabela 4 e o que pode ser observado é que a planta tem majoritariamente composto mais polares.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos orgânicos das folhas de *E. tortuosum*

Extrato	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Hexânico	0,429	1,5
Diclorometânico	0,185	0,6
Acetato de etila	0,304	1,1
Metanólico	7,755	27,1

### 4.2.2 Constituintes químicos caracterizados a partir das folhas *E. tortuosum*

Os metabólitos identificados nas folhas de *E. tortuosum* estão dispostos na Figura 22, p. 45, as classes desse composto são: terpeno, alcaloide e flavonoide, o que era de se esperar para essa planta, já que essas são as classes de substâncias isoladas mais relatadas na literatura (Quadro 1, p.6).

Figura 22 - Compostos identificados das folhas de *E. tortuosum*

### 4.2.3 Identificação estrutural dos estereoides isolados de *E. tortuosum*

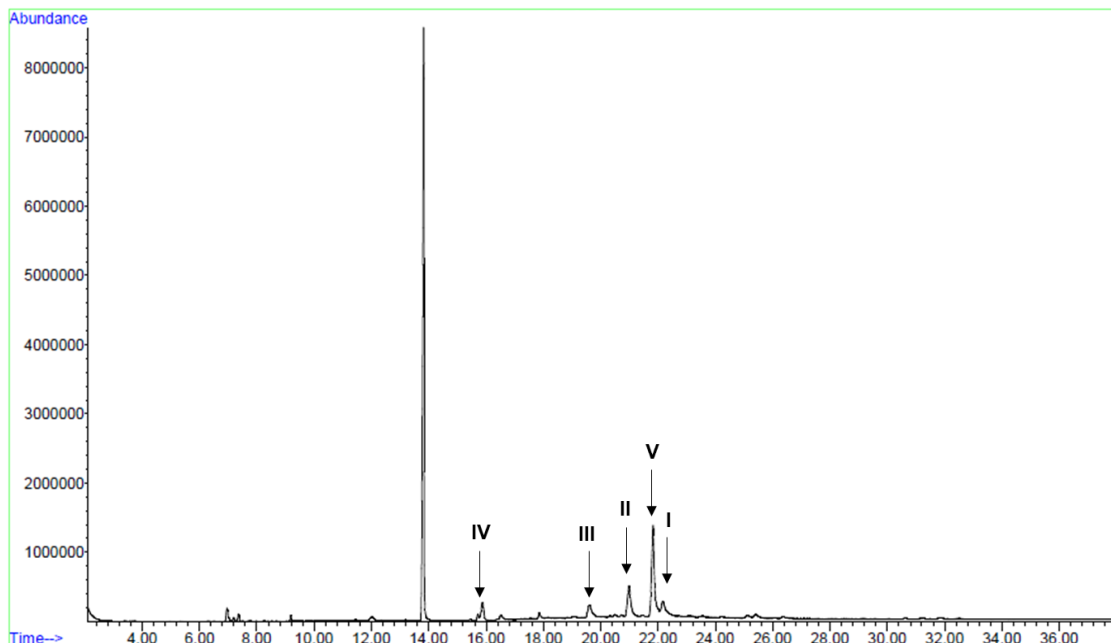
No estudo químico do extrato acetato de etila (ETA) das folhas de *E. tortuosum* foi identificada uma mistura de esteroides, sendo estes identificados através dos dados de CG-EM. O fracionamento deste extrato resultou em 15 frações, sendo que na fração ETA9 foram identificados os esteroides  $\alpha$ -amirina (I),  $\beta$ -amirina(II), campesterol (III) estigmastan-3,5-dieno (IV) e sitosterol (V) (Figura 23, p.47). A identificação destes compostos foi realizada através da análise dos espectros de massas obtidos para cada pico, em comparação com os dados da biblioteca NIST/EPA/NIH, disponível no equipamento, e com os dados da literatura (OGUNKOYA, 1981; ZANON et al., 2008) (Tabela 5). Os espectros de massas das substâncias I-V e suas respectivas propostas de fragmentação estão mostrados nas Figuras 24-32, p.48-52.

Os esteroides são muito comuns em organismos vegetais, por isso o isolamento e identificação desses metabólitos são muito relatado em plantas (KIYAMA, 2017; BALDÉ et al., 2000). No gênero *Erythroxylum* já foram descritos a presença desses metabólitos em algumas espécies, como *E. rimosum* (RIBEIRO et al., 2013b), *E. subsessile* (OLIVEIRA et al., 2016) e *E. daphines* (ELIAS et al.,2016).

Tabela 5 - Esteroides identificados a partir do extrato acetato de etila das folhas de *E. tortuosum*

$t_R$ (min)	Íon molecular ( $m/z$ )	Fórmula Molecular	Composto
22,2	426	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	$\alpha$ -amirina (I)
21,0	426	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	$\beta$ -amirina (II)
19,6	400	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	Campesterol (III)
16,5	396	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub>	estigmastan-3,5-dieno (IV)
21,8	414	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	$\beta$ -sitosterol (V)

Figura 23 - Cromatograma da fração ETA9 obtido por CG-EM ( $T_R = 22,2$  min =  $\alpha$ -amirina **I**;  $T_R = 21,0$  min =  $\beta$ -amirina **II**;  $T_R = 19,6$  min = campesterol **III**;  $T_R = 16,5$  min = estigmastan-3,5-dieno **IV**;  $T_R = 21,8$  min sitosterol **V**)



As propostas de fragmentações para as substâncias **I** e **II** (Figura 27, p.50) foram comparadas com OGUNKOYA,1981 e ZANON et al., 2008. Nos espectros de massas são observados os picos base com razão  $m/z$  218, referente ao fragmento gerado via reação Retro-Diels-Alder (RDA), fragmentação essa característica de triterpenos que possuem dupla ligação. Os demais fragmentos são gerados a partir de rearranjos da molécula.

Figura 24 - Espectro de massa do esteroide  $\alpha$ -amirina (I) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

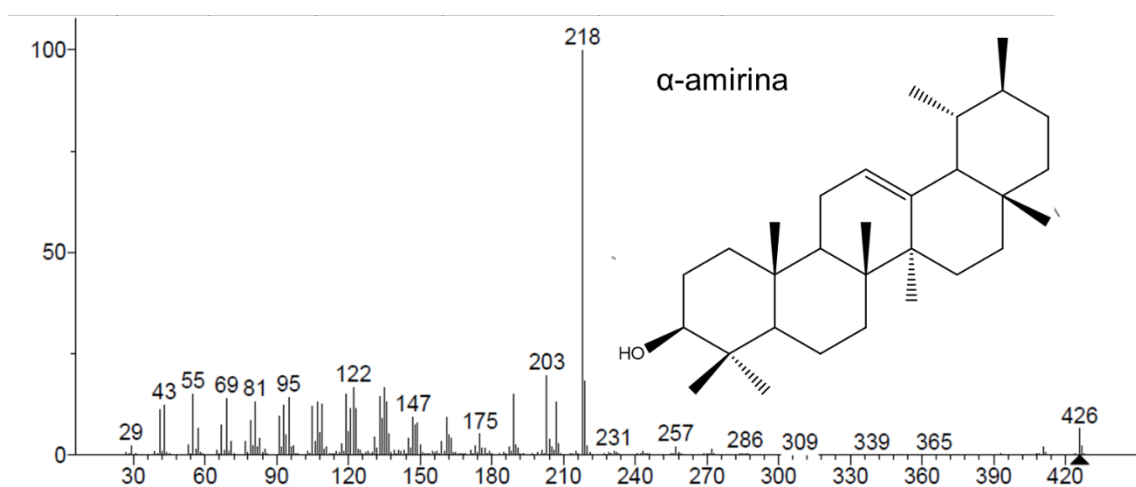


Figura 25 - Espectro de massa do esteroide  $\beta$ -amirina (II) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

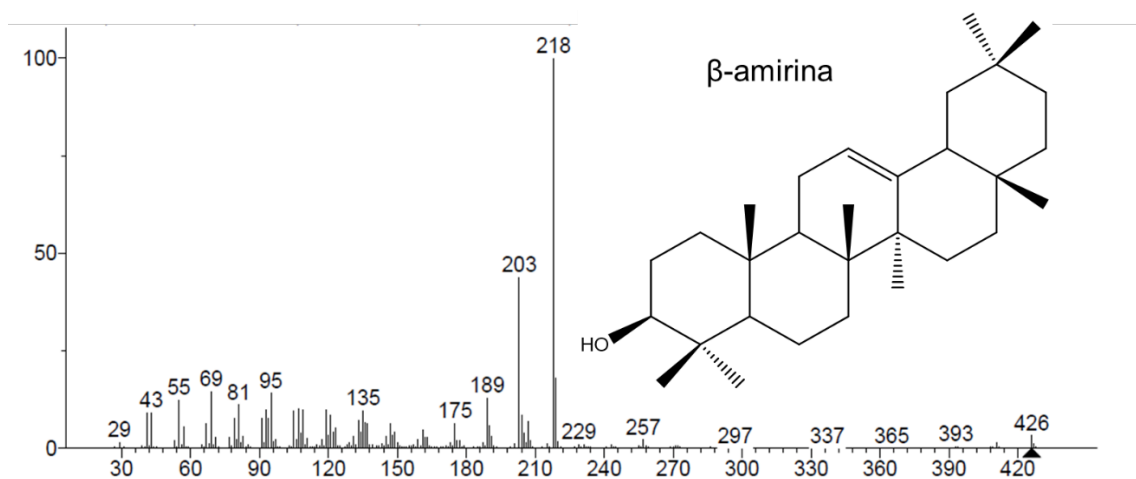


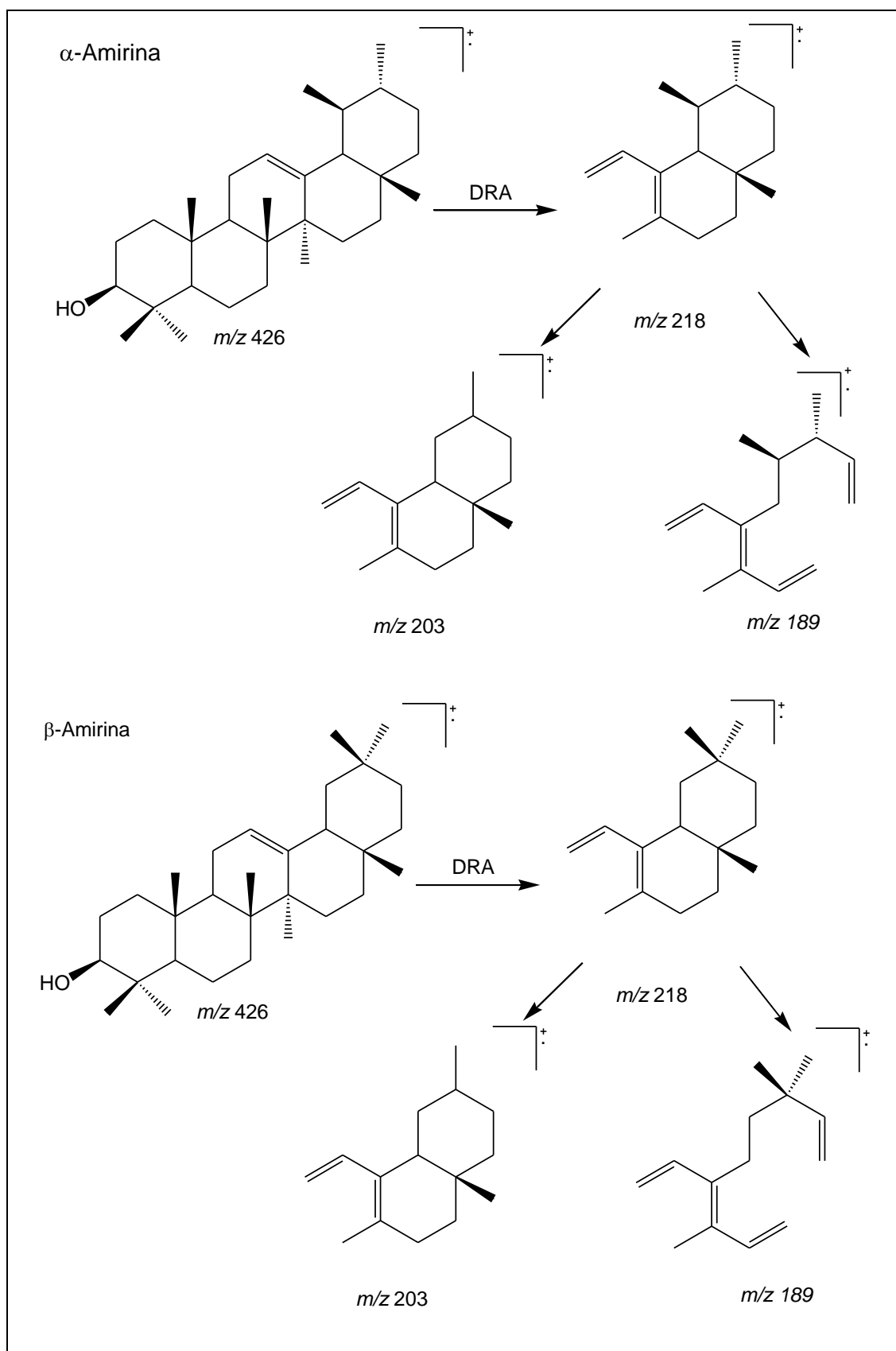
Figura 26 - Proposta de fragmentação para os esteroides  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina

Figura 27 - Espectro de massa do esteroide campesterol (III) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

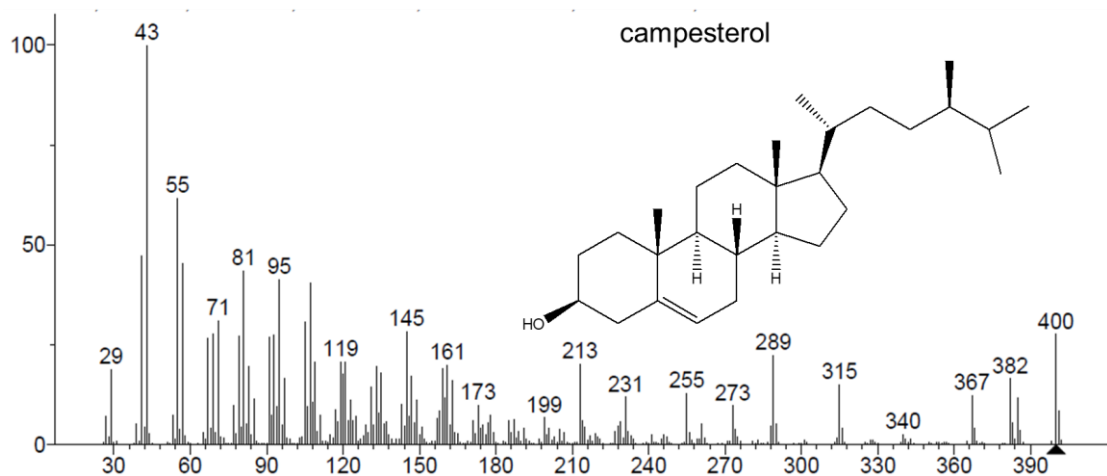


Figura 28 - Proposta de fragmentação para o esteroide campesterol (III)

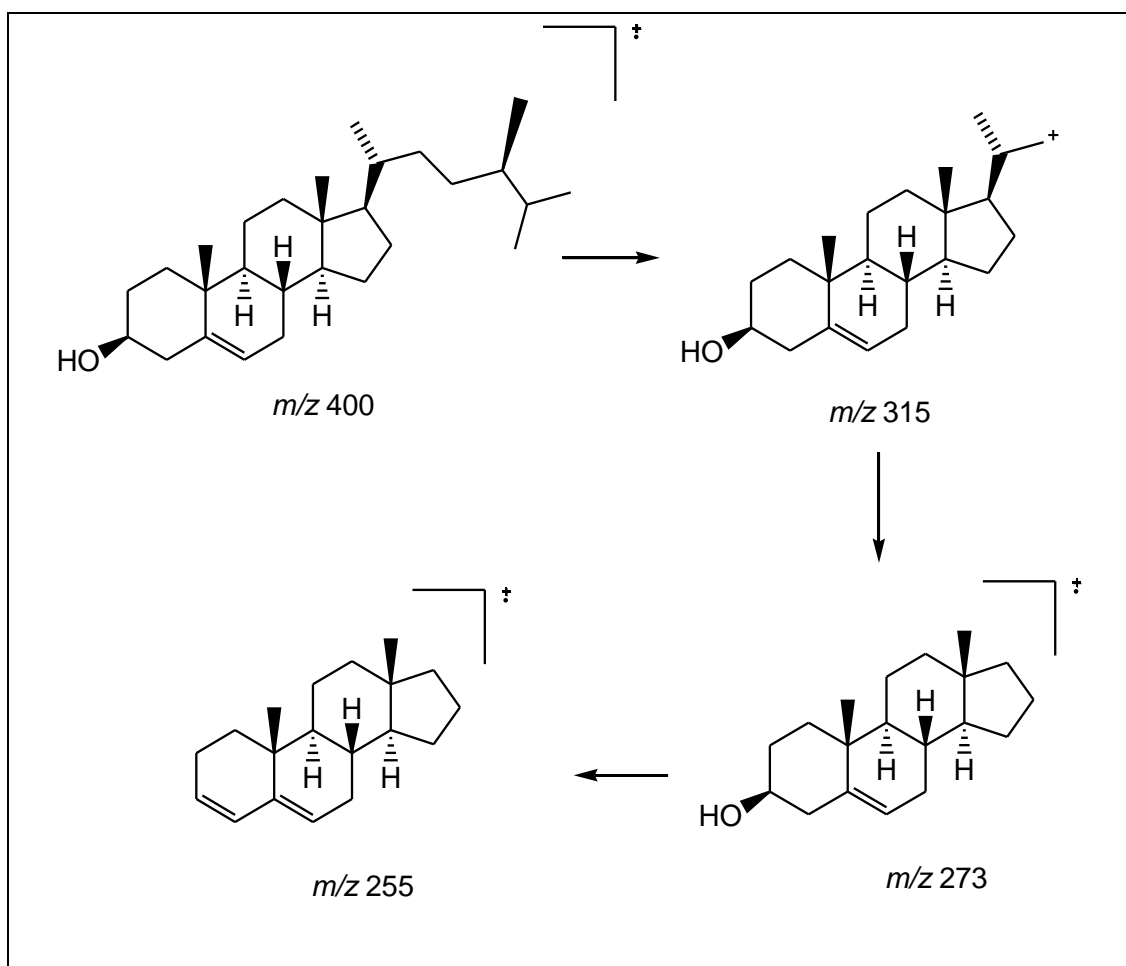


Figura 29 - Espectro de massa do esteroide estigmastan-3,5-dieno (**IV**) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

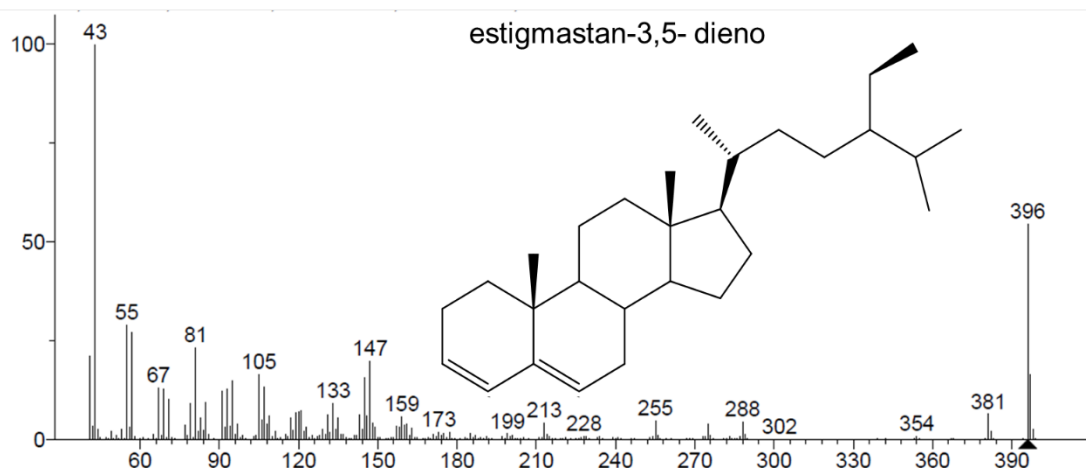


Figura 30 - Proposta de fragmentação para o esteroide estigmastan-3,5-dieno (**IV**)

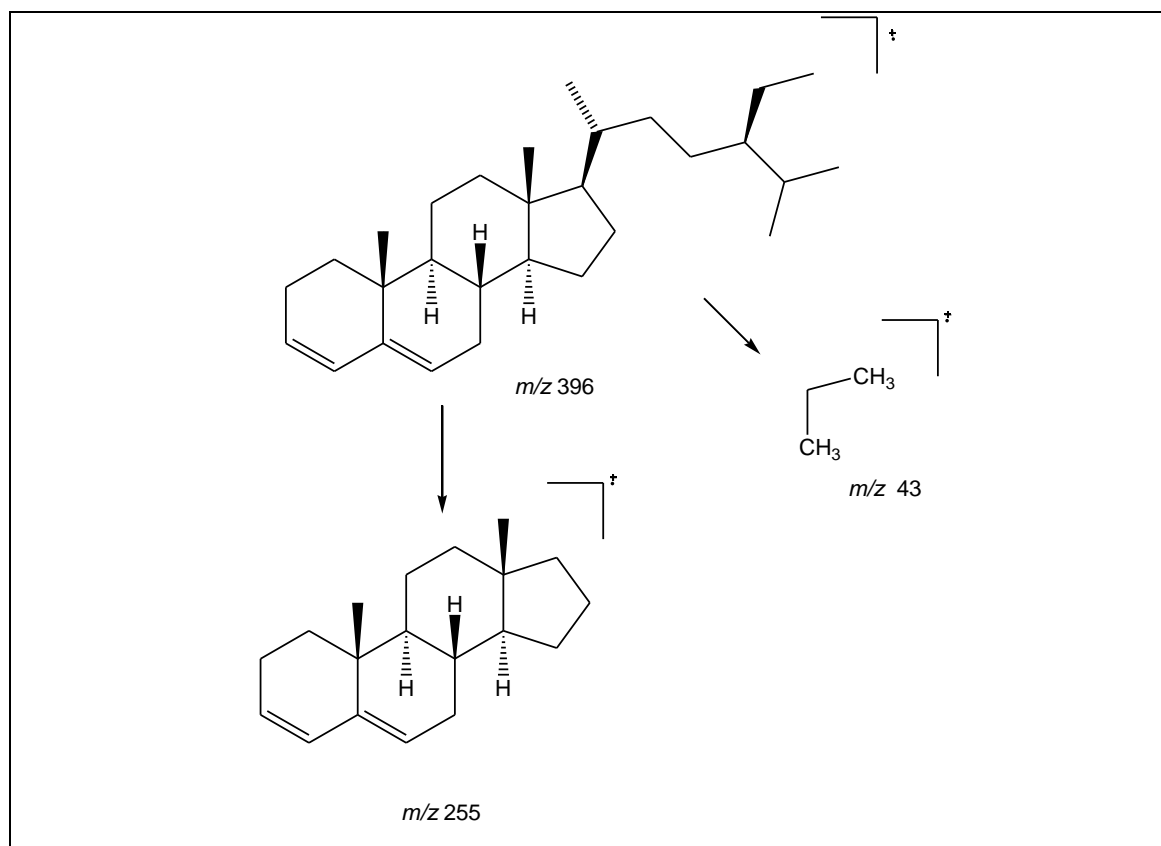


Figura 31 - Espectro de massa do esteroide  $\beta$ -sitosterol (**V**) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

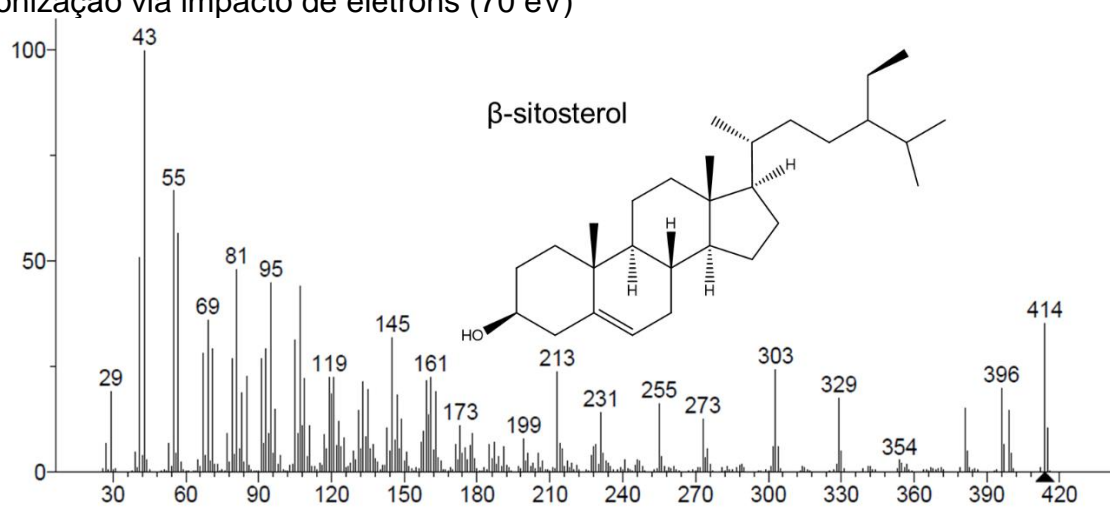
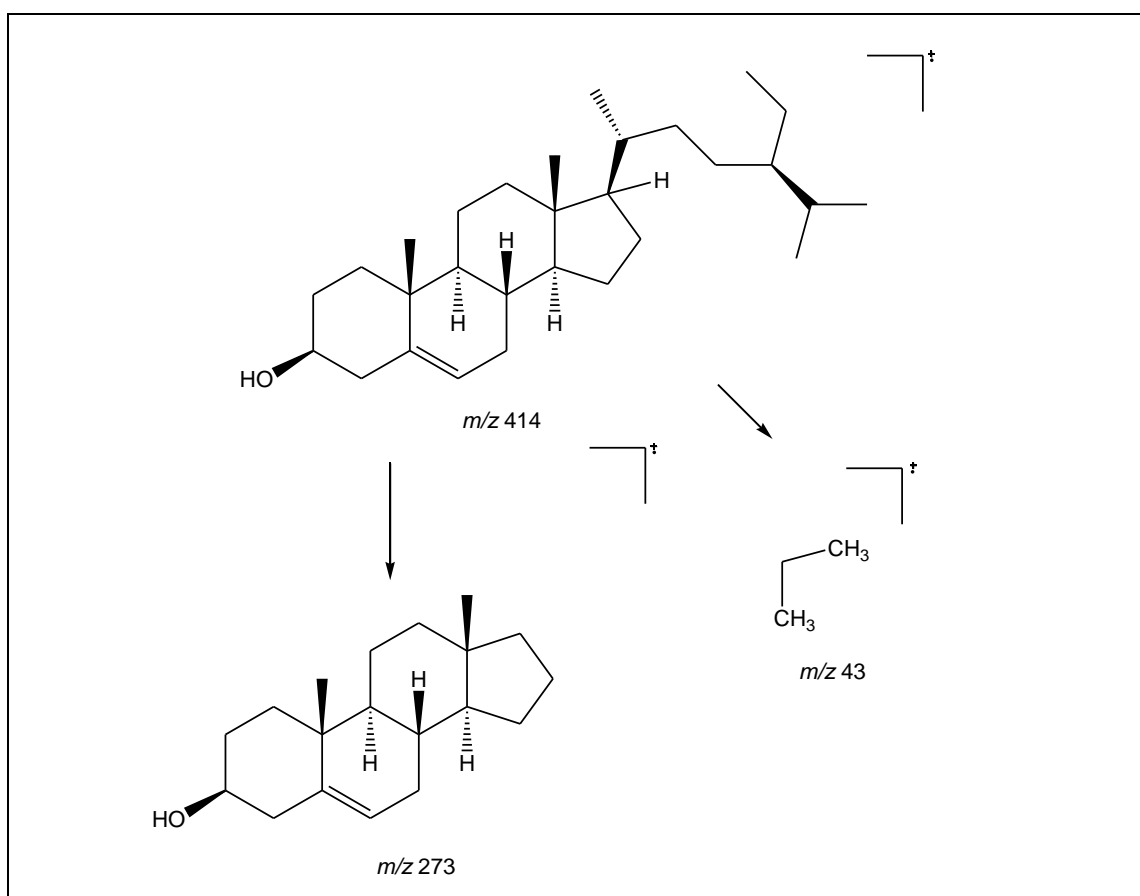


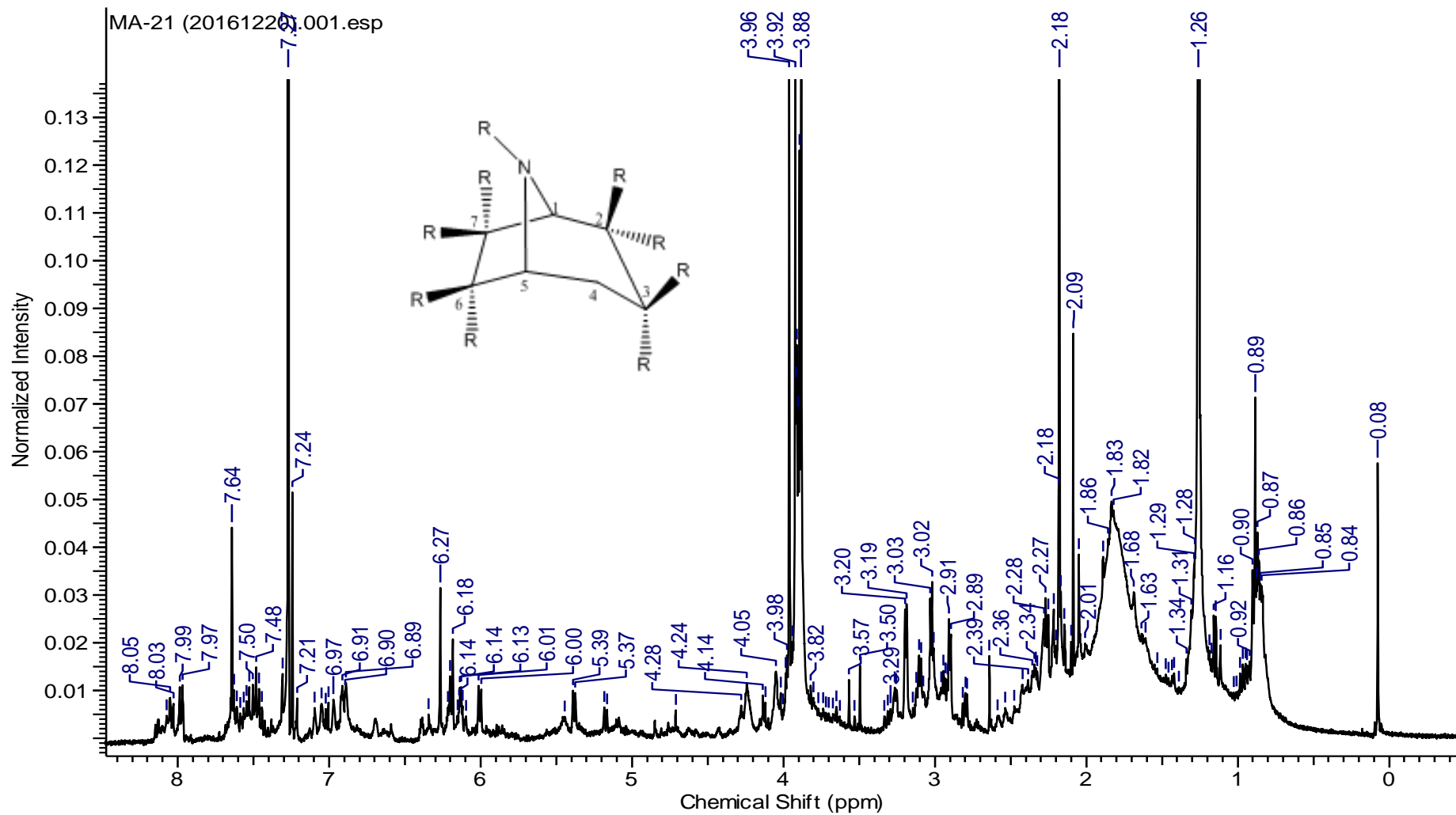
Figura 32 - Proposta de fragmentação para o esteroide  $\beta$ -sitosterol (**V**)



#### 4.2.4 Identificação de alcaloides nas folhas de *E. tortuosum*

Os alcaloides são abundantes em plantas e o gênero *Erythroxylum* se destaca por apresentar um grande número de relatos da presença desses metabólitos, especialmente do tipo tropânico. Nesse trabalho foram identificados alcaloides em mistura, oriundos da extração ácido-base do extrato metanólico das folhas de *E. tortuosum*. A fração alcaloídica foi denominada ETDN e sua constituição foi determinada utilizando técnicas de CG-EM e RMN de  $^1\text{H}$ . Na Figura 33, p.54, é mostrada a estrutura básica de um alcaloide tropânico, devidamente numerada, com os hidrogênios que se espera observar em espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Na análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração alcaloídica (Figura 33, p.54) foi observada a região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,5-3,5 ppm, característica de alcaloides do tipo tropânico. Para os hidrogênios do carbono **1** e **5** é comum encontrar multipletos em deslocamento químico que variam de  $\delta_{\text{H}}$  3,2-3,5 ppm. Esses deslocamentos e multiplicidades foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração ETDN e contribuíram para a confirmar a presença dos alcaloides. Analisando as demais regiões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram observados diversos sinais que se situam no intervalo de  $\delta_{\text{H}}$  8,5-0,8 ppm, sendo característicos de hidrogênios alifáticos e aromáticos. Os hidrogênios na região mais desblindada do espectro,  $\delta_{\text{H}}$  8,5-6,0 ppm, são característicos de substâncias com anéis aromáticos, o que pode ser atribuído a alcaloides tropânicos com substituintes aromáticos, como é o caso da cocaína, já relatada em diversas espécies de *Erythroxylum* (BIERI, et al., 2006). Sinais na região mais blindada do espectro  $\delta_{\text{H}}$  4,0-0,5 ppm são atribuídos a hidrogênios metílicos, metínico, metilênicos e oxidados, dando indícios da presença de mais de um tipo de alcaloide tropânico.

Figura 33 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração alcaloídica (ETDN) das folhas de *E. tortuosum* (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ 

A fração ETDN foi analisada por CG-EM (Figura 34) em que pode ser observado uma grande quantidade de picos, sugerindo a presença de diversos compostos. Cada pico do cromatograma foi avaliado, gerado o espectro de massas e comparado com os dados da biblioteca NIST/EPA/NIH, disponível no equipamento. Com os dados tratados, foi possível identificar que os picos com os tempos de retenção 9,85; 10,26 e 10,36 min são referentes a alcaloides do tipo tropânico, sendo estes tropococaína (**VI**), cocaína (**VII**) e 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**VIII**) (Tabela 6).

Figura 34 - Cromatograma de íons totais por CG-EM da mistura das substâncias VI, VII e VIII ( $T_R = 9,8$  min = tropococaína **VI**;  $T_R = 10,3$  min = cocaína **VII**;  $T_R = 10,4$  min = 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol **VIII**)

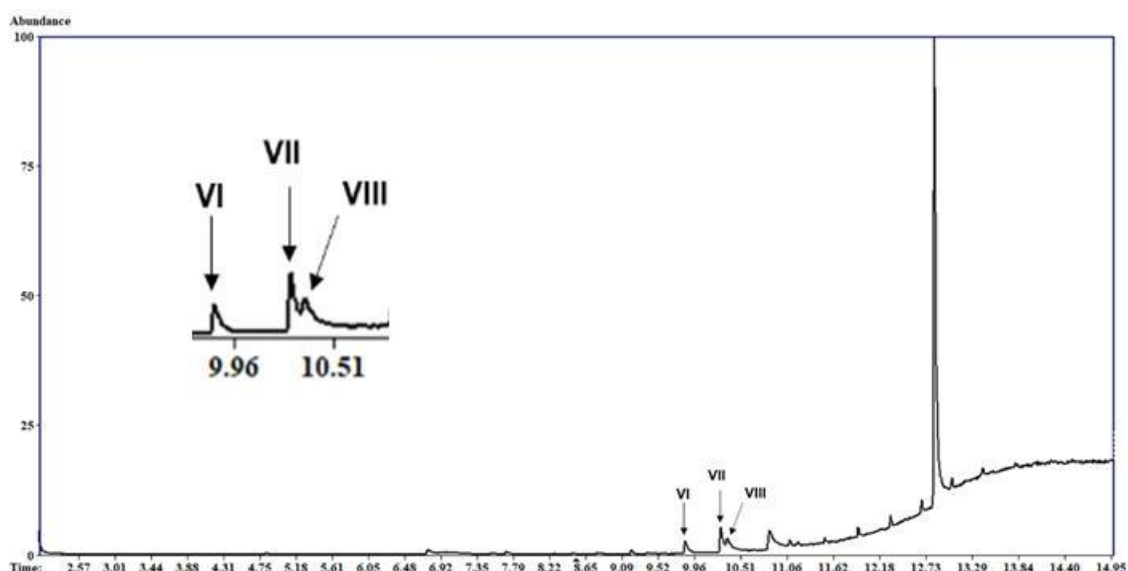


Tabela 6 - Alcaloides identificados a partir da extração ácido-base do extrato metanólico das folhas de *E. tortuosum*

$t_R$ (min)	Íon molecular ( $m/z$ )	Fórmula Molecular	Composto
9,8	245	$C_{15}H_{19}NO_2$	tropococaína
10,3	303	$C_{17}H_{21}NO_4$	cocaína
10,4	171	$C_9H_{17}NO_2$	6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol

O espectro de massas da tropacocaína (**VI**) (Figura 35, p.57) apresenta fragmentos característicos de anel tropano substituído em C-3, que para a tropacocaína o substituinte é o benzoato, o que gera um pico base  $m/z$  124 (Figura 36, p.57). Os fragmentos  $m/z$  140, 105, 94 e 82, também são característicos desse tipo de alcaloide (CHRISTEN et al., 1993; CHRISTEN et al., 1995; EL-IMAM et al., 1988). Essa substância já foi relatada em várias espécies de *Erythroxylum*, como *E. coca* (JOHNSON, 1996), *E. pelleterianum*, *E. microphyllum* (ZUANAZZI et al., 2001), *E. monogynum* (CHRISTEN et al., 1995), *E. ecarinatum* (EL-IMAM et al., 1988), e está sendo descrita pela primeira vez para *E. tortuosum*.

O espectro de massas da cocaína (**VII**) (Figura 37, p.58), apresenta fragmentos característicos de anel tropano, neste caso substituído em C-2 e C-3, o que gera um pico base de  $m/z$  82. Esta substância é amplamente distribuída no gênero *Erythroxylum* e foi isolada principalmente de *E. coca*, mas também já foi descrita nas espécies *E. amazonicum*, *E. citrifolium*, *E. laetevirens*, *E. argentinum*, *E. cumanense*, *E. densum*, *E. frangulifolium*, *E. subrotundum*, *E. cuneifolium*, *E. divaricatum*, *E. gonocladum*, *E. andreii*, *E. aturense* e *E. confusum* (BIERI et al., 2006). Uma proposta de fragmentação é mostrada na Figura 38, p.58, onde os fragmentos principais são formados principalmente por cisões homolíticas (SMITH & CASALE, 2010).

Para o composto 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**VIII**) não há relatos de isolamento e/ou caracterização desse composto em espécies de *Erythroxylum*, mas esse composto já foi identificado no extrato etanólico das folhas de uma espécie de planta da família Fabaceae, *Glycyrrhiza glabra* Linn, por CG-EM (VIJAYALAKSHMI & SHOURIE, 2013). Na Figura 39, p.59, é mostrado o espectro de massas desse composto e a proposta de fragmentação é mostrada na Figura 40, p.59.

Figura 35 - Espectros de massas do alcaloide tropacocaína (VI) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

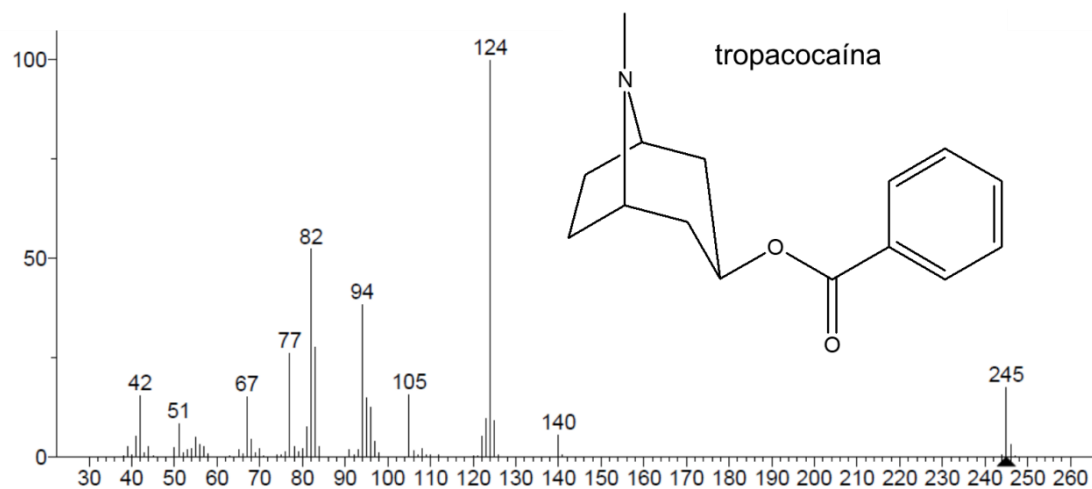


Figura 36 - Proposta de fragmentação para o alcaloide tropacocaína (VI)

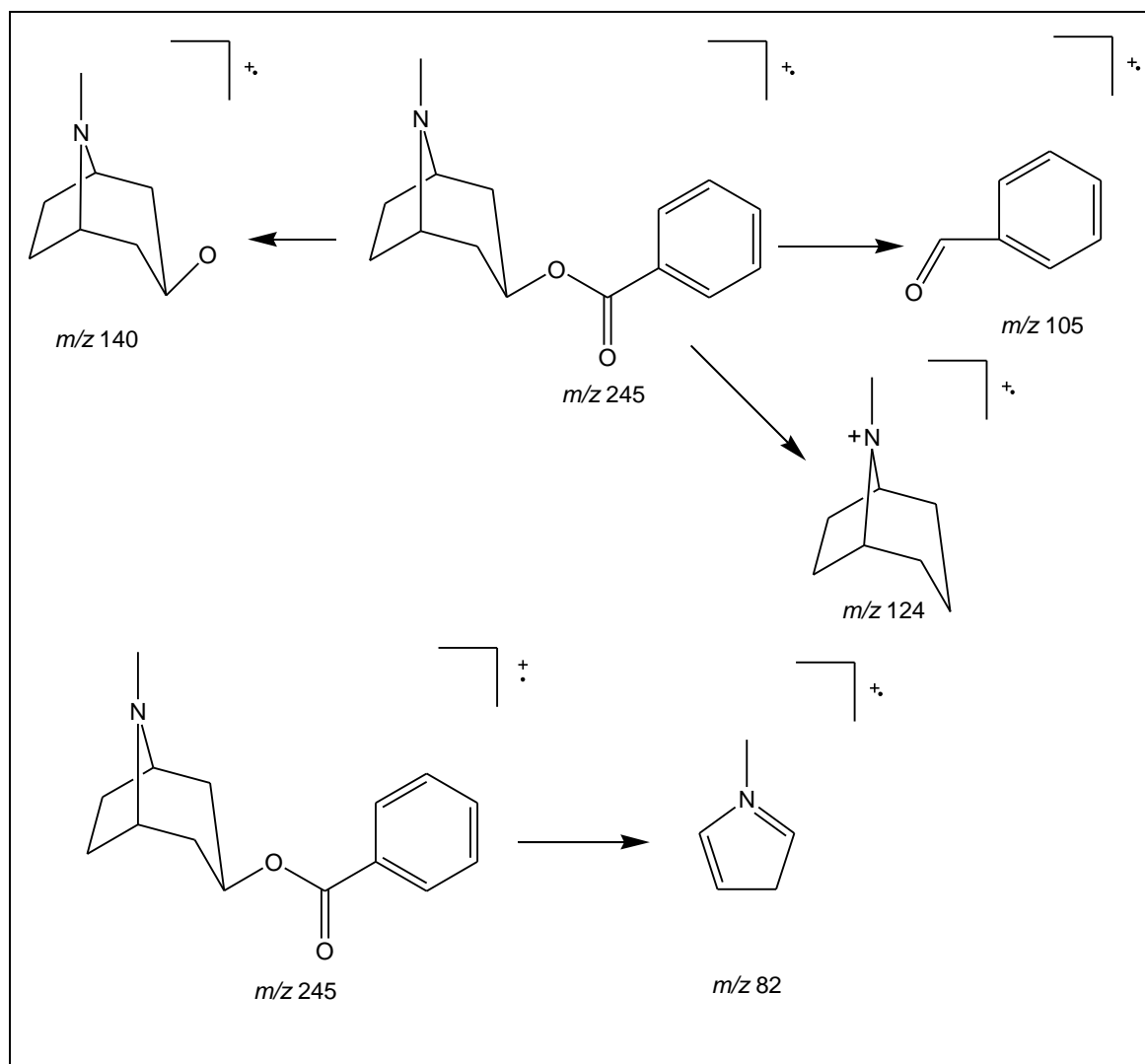


Figura 37 - Espectros de massas do alcaloide cocaína (**VII**) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

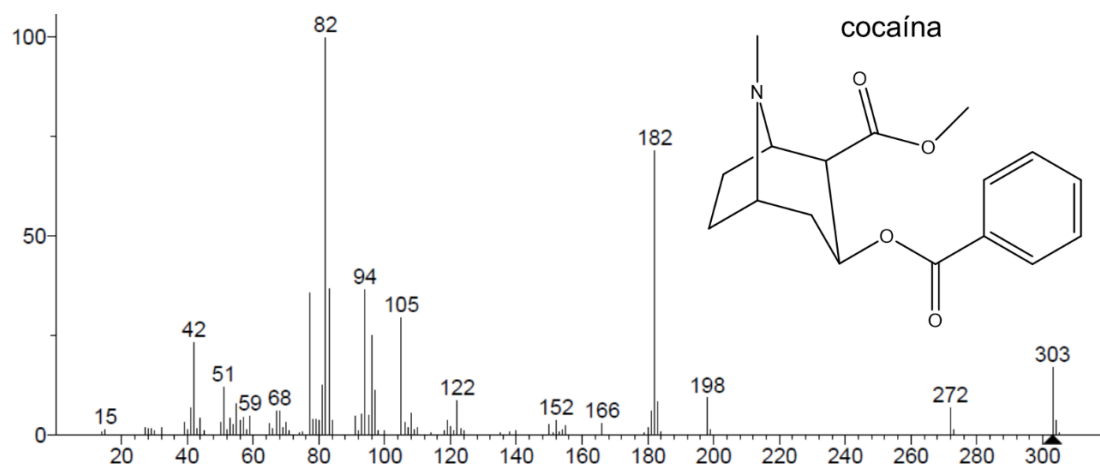


Figura 38 - Proposta de fragmentação para o alcaloide cocaína (**VII**)

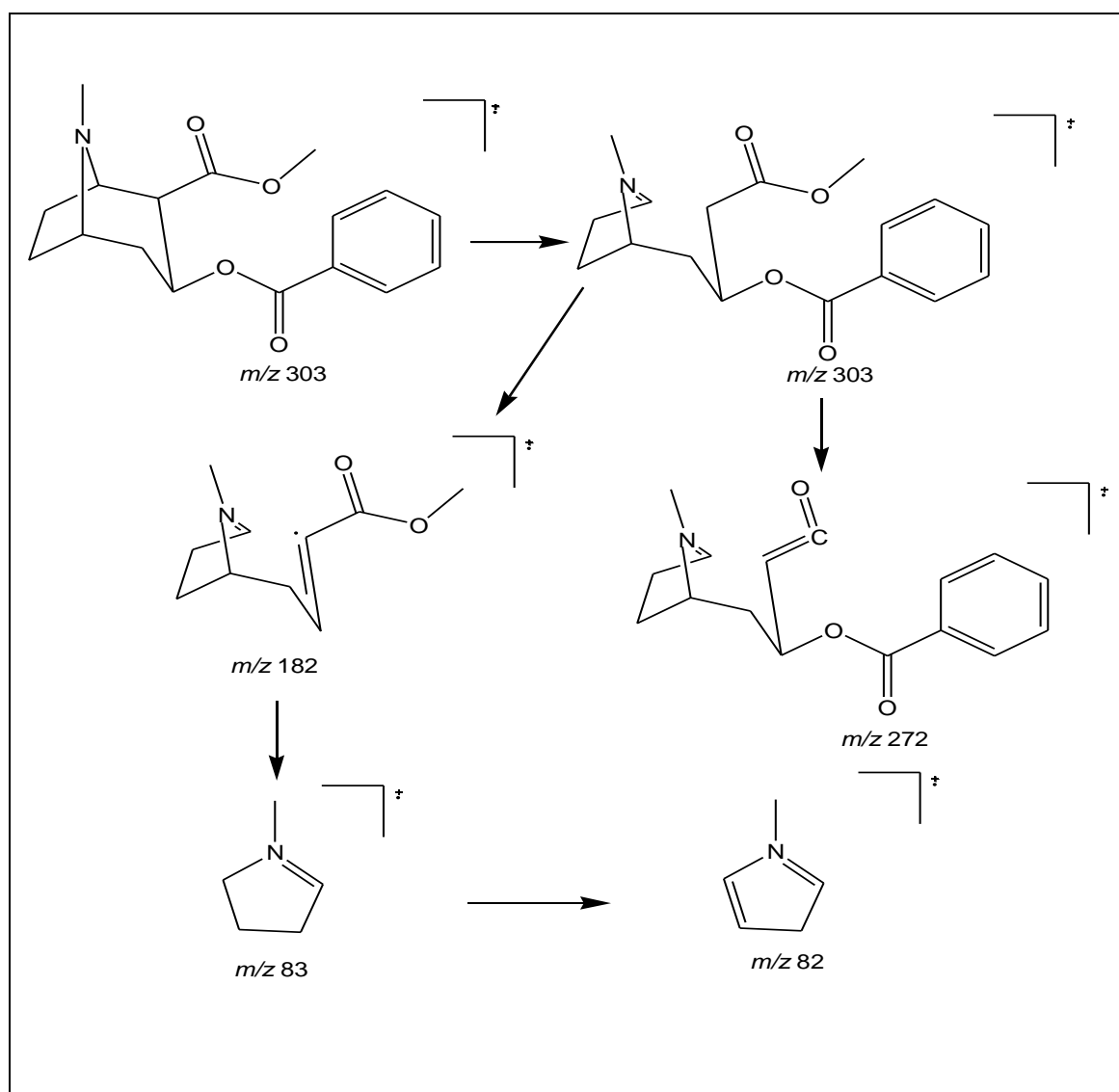


Figura 39 - Espectros de massas do alcaloide 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**VIII**) obtido por CG-EM e ionização via impacto de elétrons (70 eV)

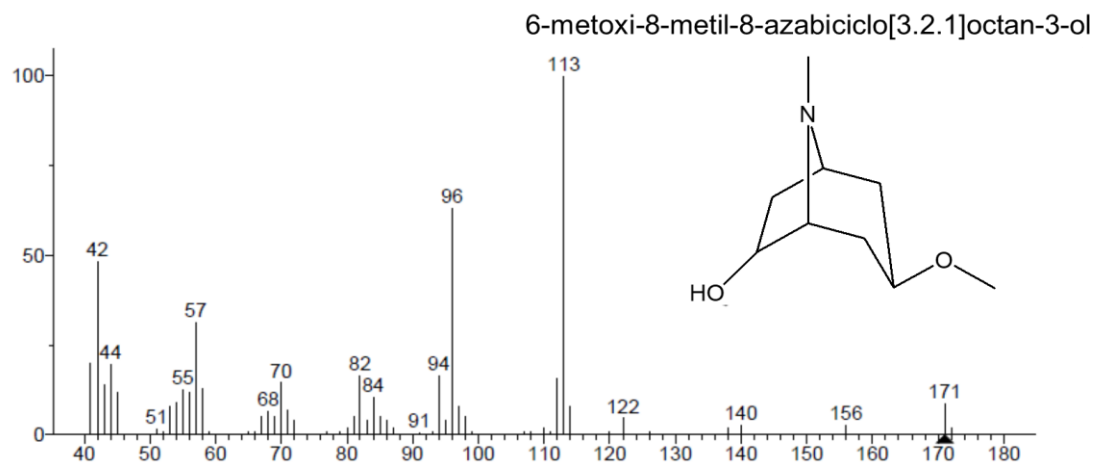
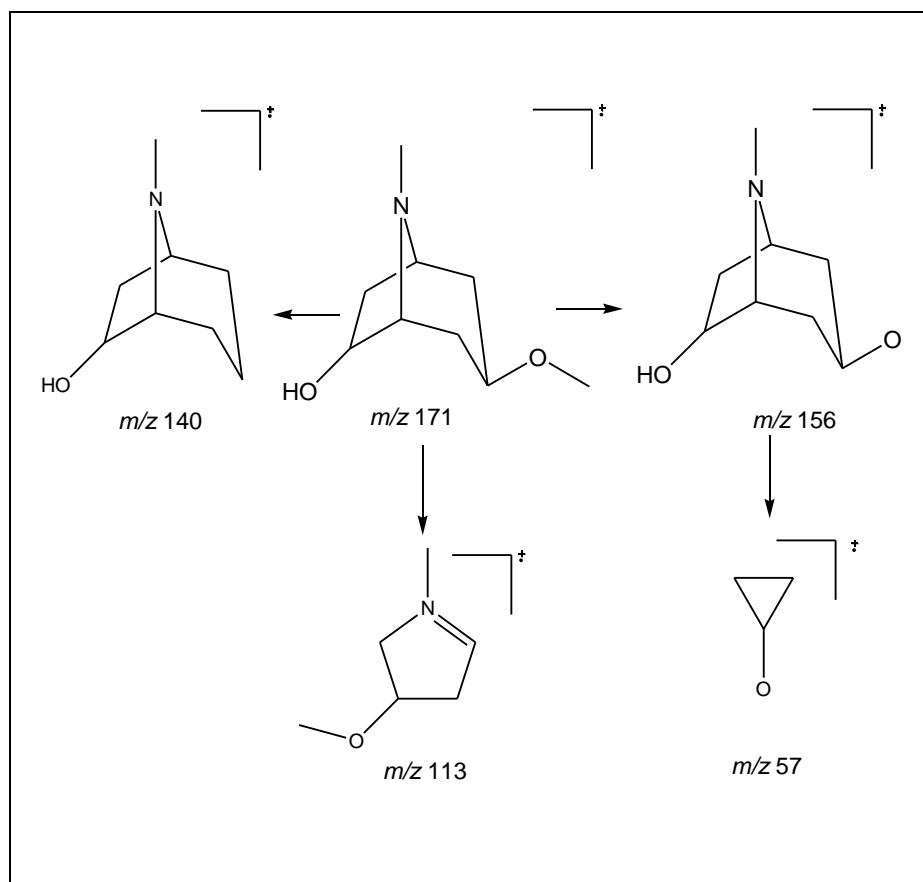


Figura 40 - Proposta de fragmentação para o alcaloide 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**VIII**)



#### 4.2.5 Identificação de flavonoide das folhas de *E. tortuosum*

A substância **IX** foi identificada a partir de um precipitado obtido do extrato acetato de etila das folhas de *E. tortuosum* (ETA), assim como da fração ETA11 (Figuras 6 e 9, p.22 e 26). Vale ressaltar que foram obtidos 1,25 g do precipitado, o que representa aproximadamente 16% do extrato metanólico. Essa substância estava presente não só nessas duas amostras como também em todas as frações mais polares, indicando mais uma vez que o composto é majoritário nas folhas desta espécie. O precipitado apresentava cor amarelada e solubilidade em água e dimetilsulfóxido (Figura 41).

Figura 41 - Precipitado amarelo presente em diferentes amostras das folhas de *E. tortuosum*



A substância **IX** foi isolada como pó amarelo amorfo e a identificação estrutural foi realizada utilizando experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC e Espectrometria de Massa de Alta Resolução, em comparação com os dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006). Os dados sugerem que esta substância seja um flavonoide do tipo flavona, denominada 7,4'-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo, também conhecida como ombuina-3-rutinosídeo (Tabela 7, p. 63). Este flavonoide já foi relatado em várias espécies

de *Erythroxylum*, como *E. minutifolium*, *E. areolatum*, *E. confusum* e *E. suave* (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

Como o isolamento e/ou caracterização da substância **IX** é muito recorrente no gênero, isso confirma os resultados anteriores de que os glicosídeos de ombuína são marcadores quimiosistemáticos característicos do gênero (ALBUQUERQUE et al., 2014; BOHM et al., 1981; CÓRDOVA et al., 2012 e GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

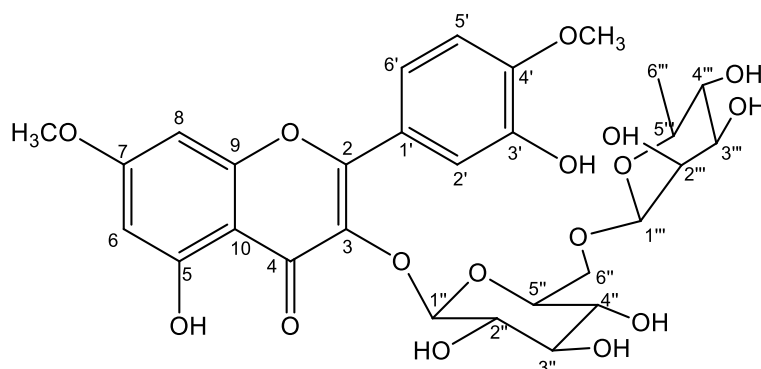
Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 42, p.64) da substância **IX** pode-se observar sinais característicos de hidrogênios desblindados, sendo: dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (*d*,  $J = 2,2$  Hz) e 6,67 (*d*,  $J = 2,2$  Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A de um esqueleto flavonoídico. Observou-se ainda um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,55 (*d*,  $J = 2,2$  Hz); um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (*d*,  $J = 8,6$  Hz) e duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,73 (*dd*,  $J = 8,6$  e  $2,2$  Hz), referentes aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente.

Além disso, também foi observado dois singletos um em  $\delta_{\text{H}}$  3,87 e outro em  $\delta_{\text{H}}$  3,88, cada um integrando para três hidrogênios, referente a duas metoxilas em ambientes químicos diferentes. A existência de um singlete desblindado em  $\delta_{\text{H}}$  12,52 sugeriu a presença de hidroxila quelada, o que corrobora para a sugestão de uma hidroxila na posição 5 do anel A do flavonoide e um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  9,06  $^1\text{H}$  sugere a presença de hidroxilas nas posições 3' ou 5' do anel B.

Também foram observados dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,40 (*d*,  $J = 7,2$  Hz) e 4,42 (*d*,  $J = 1,2$  Hz) que correspondem a hidrogênios anoméricos de unidades osídicas. Com a constante de acoplamento em  $J = 7,2$  Hz, pode-se inferir uma configuração  $\beta$  para o oxigênio ligado ao carbono anomérico C-1" (ALBUQUERQUE et al., 2014). Os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,73 (*d*,  $J = 10,2$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  0,99 (*d*,  $J = 6,1$ Hz), são referentes aos hidrogênios metilênicos e metílicos que sugerem uma glucose ligada a uma ramnose. No intervalo de  $\delta_{\text{H}}$  3-4 foi possível observar vários sinais de hidrogênios glicosídicos, porém com pouca definição pelo fato do sinal da água estar muito intenso. O fato de ter sinais nessa região, mesmo com multiplicidades não muito bem resolvidas, contribuem para a sugestão de unidades glicosídicas ligadas ao núcleo flavonoídicos, sendo esses sinais referentes aos acoplamentos entre os hidrogênios dos monossacarídeos.

O experimento de HSQC (Figura 43, p.65) também contribuiu para a caracterização da molécula, pois através dele foi possível observar a presença dos sinais de carbonos com os valores de  $\delta_c$  101,2 e 101,8, que são referentes a deslocamentos químicos de carbonos anoméricos. Também foi possível fazer a designação dos acoplamentos dos hidrogênios aromáticos, sendo observadas as correlações dos sinais de H-6 com C-6 ( $\delta_c$  98,4) e H-8 com C-8 ( $\delta_c$  92,8); H-2' com C-2' ( $\delta_c$  116,5) e H-6' com C-6' ( $\delta_c$  122,3), característicos de anéis A e B de flavonoides. As duas metoxilas, com sinais em  $\delta_H$  3,87 e 3,88, se correlacionam em  $\delta$  56,4 e  $\delta$  56,3, respectivamente. Para as unidades glicosídicas foi possível observar as correlações de H-1'' com C-1'' ( $\delta_c$  101,8) e H-6'' com C-6'' ( $\delta_c$  68,5) para a glucose; e H-1''' com C-1''' ( $\delta_c$  101,8) e H-6''' com C-6''' ( $\delta_c$  17,6) para a ramnose (Tabela 7, p.63)

Tabela 7 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância **IX** em comparação com dados da literatura



H/ C	(400/100 MHz, DMSO- $d_6$ ) $J = \text{Hz}$		GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006 (600/150 MHz, DMSO- $d_6$ ) $J = \text{Hz}$	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) $J = \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) $J = \text{Hz}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
6	6,37 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ , 1H)	98,2	6,36 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ , 1H)	97,7
8	6,67 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ , 1H)	92,7	6,67 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ , 1H)	92,1
OCH <sub>3</sub>	3,87 ( <i>s</i> , 3H)	56,5	3,87 ( <i>s</i> , 3H)	55,5
OCH <sub>3</sub>	3,88 ( <i>s</i> , 3H)	56,3	3,88 ( <i>s</i> , 3H)	55,9
2'	7,55 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ , 1H)	116,4	7,55 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ , 1H)	115,7
5'	7,04 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ , 1H)	112,1	7,05 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ , 1H)	111,3
6'	7,76 ( <i>dd</i> , $J = 8,6$ e $2,2$ , 1H)	122,4	7,72 ( <i>dd</i> , $J = 2,3$ e $8,7$ , 1H)	121,3
1''	5,40 ( <i>d</i> , $J = 7,2$ , 1H)	101,6	5,39 ( <i>d</i> , $J = 7,3$ , 1H)	101,1
2''	3,63	74,5	3,60 ( <i>m</i> )	73,9
3''	-	76,8	-	76,3
4''	3,40 ( <i>s</i> )	70,1	-	69,8
5''	-	76,1	-	75,7
6''	3,73 ( <i>d</i> , $J = 10,2$ , 2H)	67,1	3,72 ( <i>d</i> , 2H)	66,7
1'''	4,38 ( <i>s</i> )	101,2	4,50 ( <i>s</i> )	100,6
2'''	-	70,4	-	70,2
3'''	-	70,9	-	70,5
4'''	3,12	72,1	-	71,7
5'''	3,30 ( <i>m</i> )	68,8	-	68
6'''	0,99 ( <i>d</i> , $J = 6,1$ , 3H)	18,0	0,99 ( <i>d</i> , $J = 6,3$ , 3H)	17,5

Obs: valores de deslocamentos químicos de carbono atribuídos pelo HSQC.

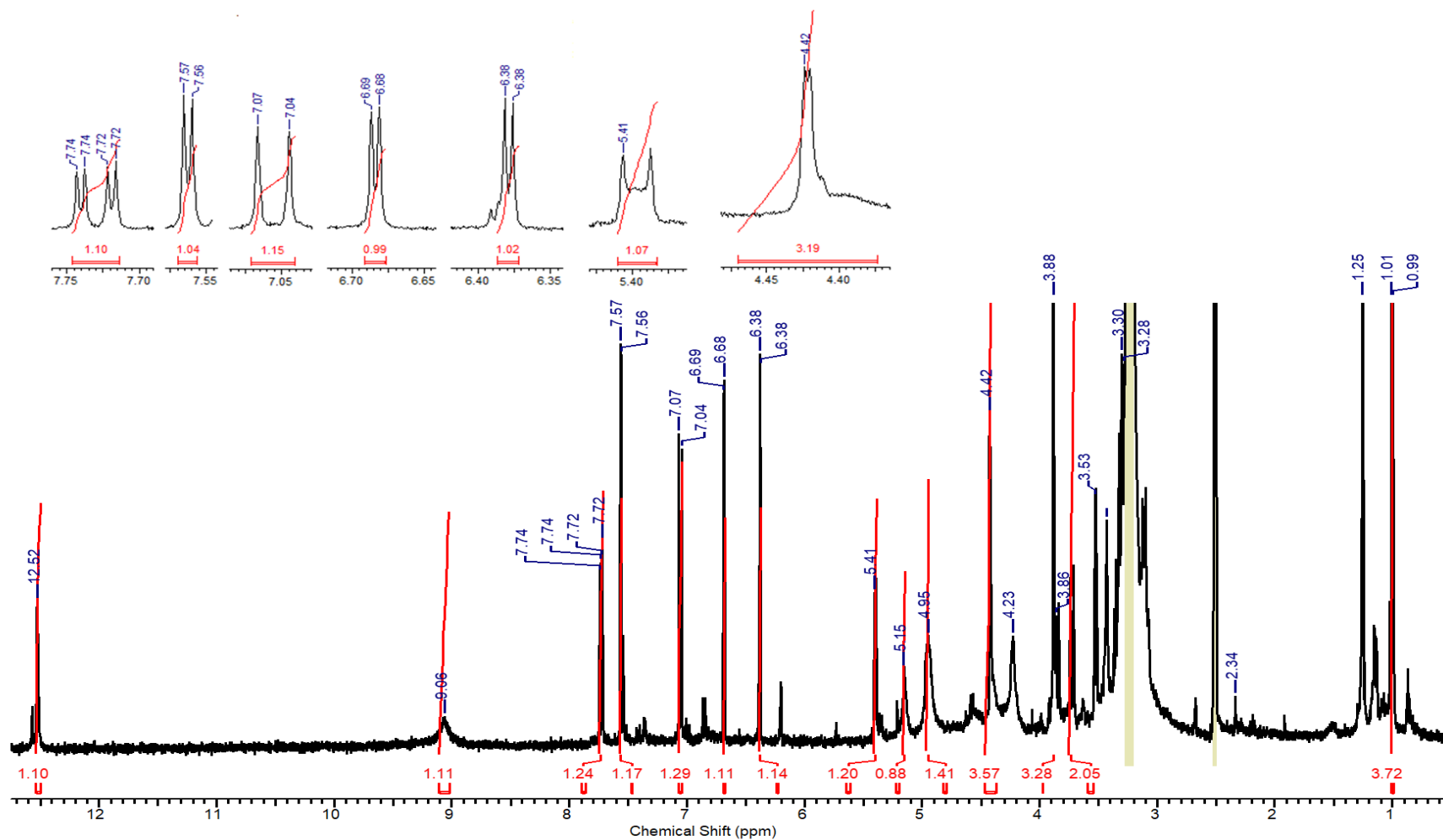
Figura 42 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IX (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), 50°C

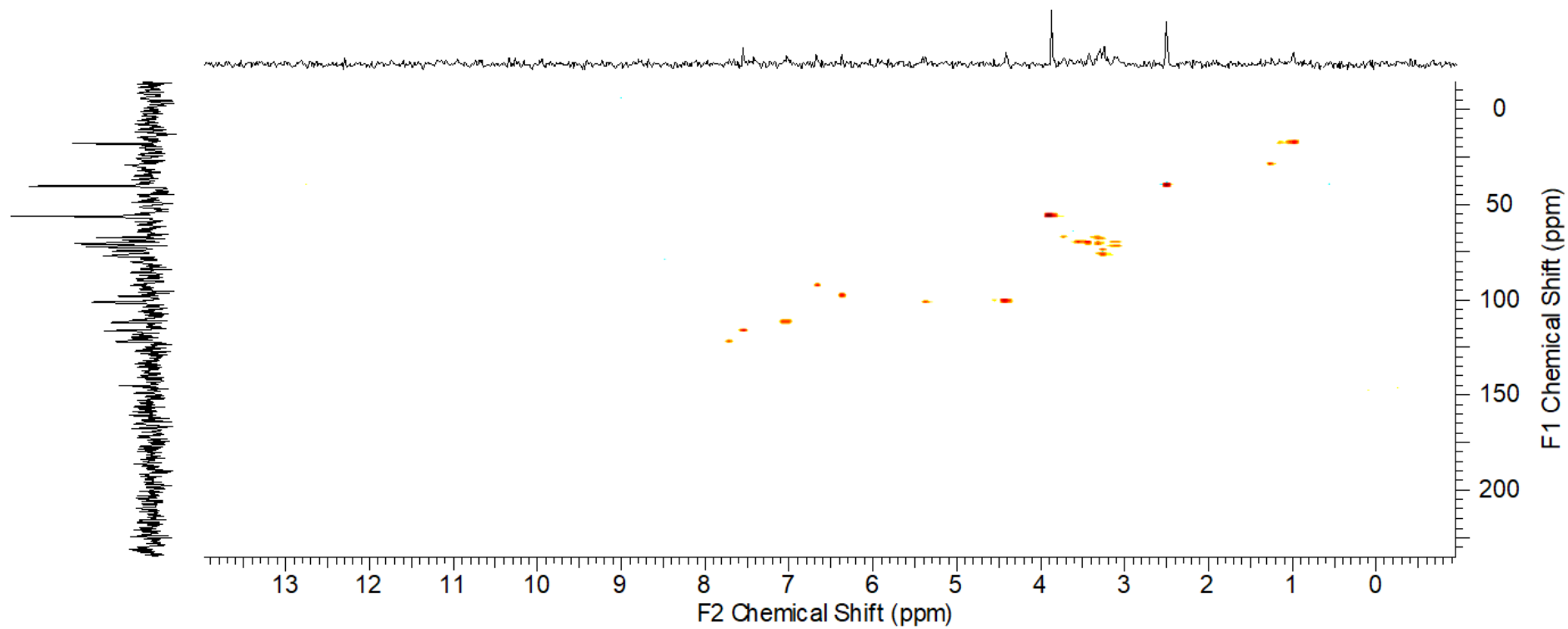
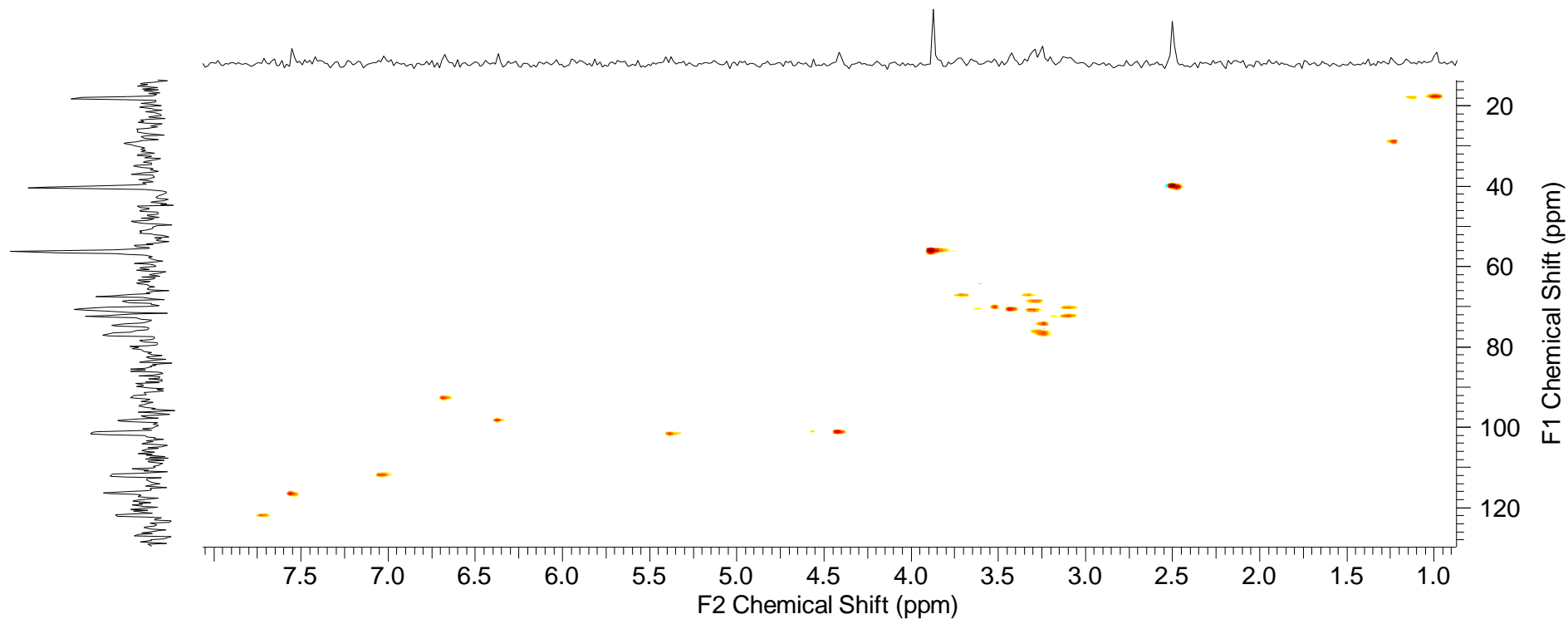
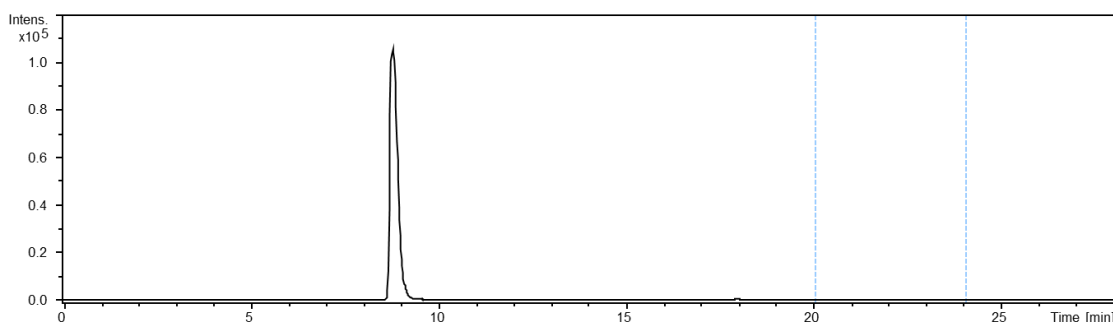
Figura 43 - Mapa de contorno de HSQC da substância **IX** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400/100 MHz)

Figura 44 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância IX (DMSO-d<sub>6</sub>, 400/150 MHz)

Através das análises por CLAE-EM no modo de ionização negativo  $[M-H]^-$  foi possível confirmar a identidade da substância **IX**. Na Figura 45 é apresentado o pico do íon total com  $t_R$  8,8 min e que apresenta o íon precursor  $m/z$  637,1783 que é condizente com o da substância 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

Figura 45 - Cromatograma do íon extraído em  $m/z$  637,18 referente à identificação da substância **IX**



O espectro de massas de primeira ordem (Figura 46, p.68) mostrou o pico do íon quase-molecular de  $m/z$  637,18  $[M-H]^-$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{29}H_{34}O_{16}$ , comparado com a base de dados *Compound Crawler*. Analisando o espectro de massas de segunda ordem são observados dois picos, sendo:  $m/z$  329  $[M-H]^-$  o mais abundante, podendo ser esse fragmento referente a perda das unidades glicosídicas glucose-ramnose  $[M-H-308,1206]$  formando assim a aglicona 4'-7-di-O-metilquercetina; e outro fragmento  $m/z$  329  $[M-H]^-$  característico de perda de radical metila.

Uma proposta de fragmentação para a molécula em questão está mostrada na Figura 47, p.68.

Figura 46 - Espectros de primeira e segunda ordem ESI (-) QqToF MS/MS (35 eV) da substância **IX** de  $m/z$  637,1783

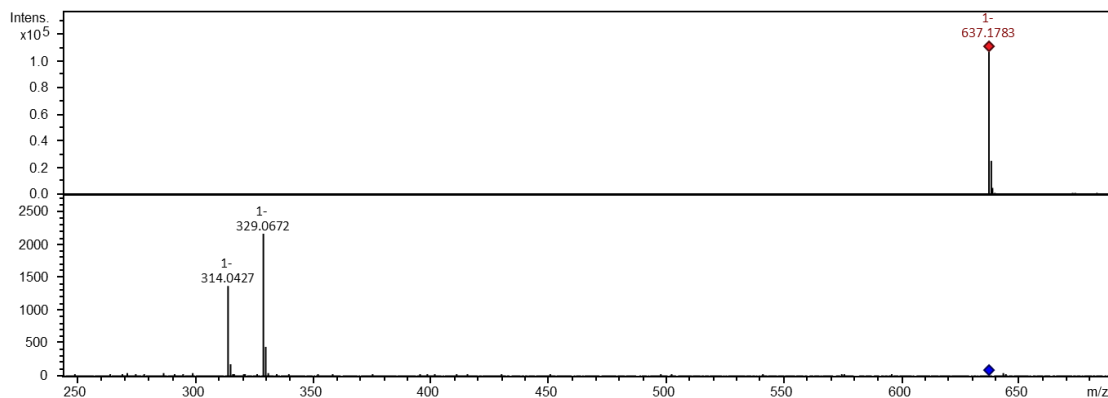
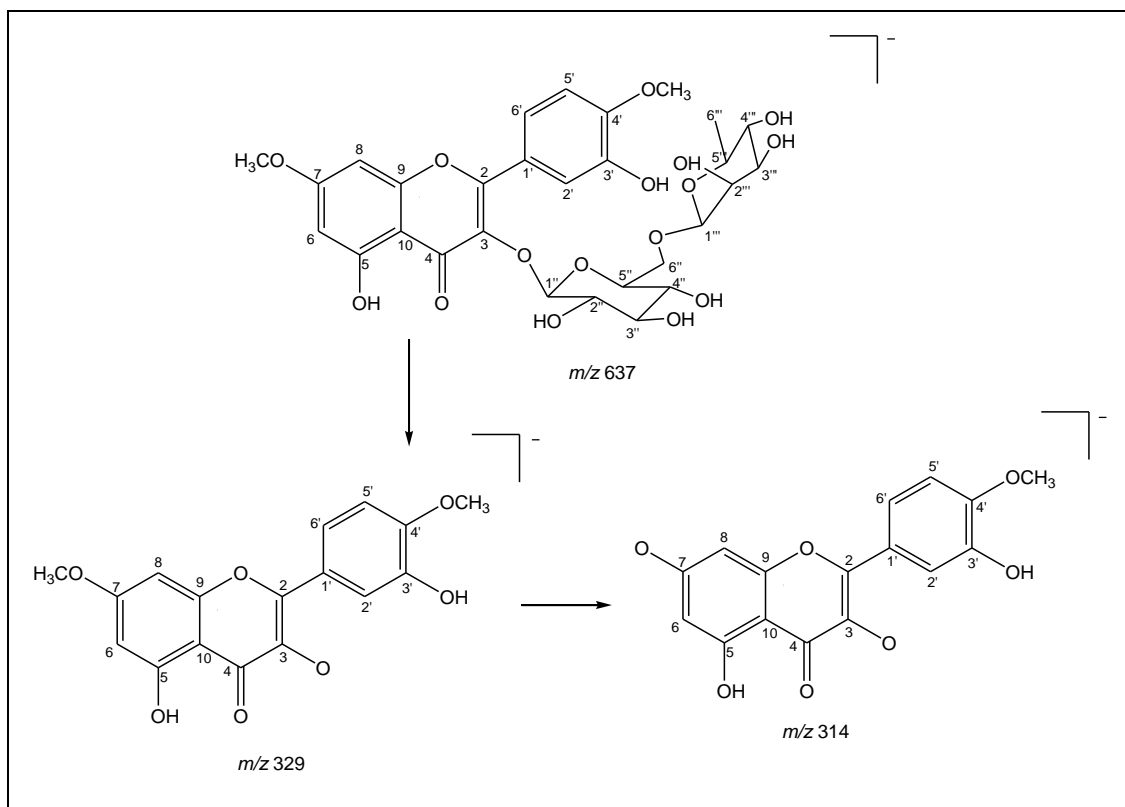


Figura 47 - Proposta de fragmentação para a substância **IX**



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir do perfil químico das flores, foi possível sugerir a presença de compostos orgânicos comum em organismos vegetais, como terpenos e flavonoide, além de alcaloides que são comumente encontradas em espécies de *Erythroxylum*.

Conforme os resultados as que as flores são quimicamente semelhantes. Traçar o perfil das flores foi importante para o conhecimento químico, mesmo que sugestivo, das espécies estudadas, já que na literatura os relatos sobre a composição química dos extratos das flores dessas plantas são escassos.

Por meio do estudo químico das folhas de *E. tortuosum* foi possível fazer a caracterização estrutural de nove substâncias utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional) e Espectrometria de Massas juntamente com comparação dos dados da literatura. O flavonoide identificado foi o 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosíde, um composto majoritário presente no extrato acetato de etila e metanólico. Esse fato faz dessa espécie uma planta com prováveis atividades biológicas, já que é relatado para os flavonoides atividades, como citotóxico, bacteriano e antioxidante. Também foi possível identificar os terpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, campesterol, estigmastan-3,5-dieno e  $\beta$ -sitosterol. É importante ressaltar que até o momento não há na literatura estudo químico sobre essa espécie, assim esse trabalho contribuiu para o conhecimento químico da mesma.

Através da extração alcaloídica foi possível identificar três alcaloides: tropacocaína, cocaína e 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo [3.2.1] octan-3-ol. Apesar de ser comum a presença de alcaloides em espécies de *Erythroxylum*, esse é o primeiro relato para *E. tortuosum*. A tropacocaína e a cocaína são substâncias muito relatadas em espécies deste gênero, mas o composto 6-metoxi-8-metil-8-azabicyclo [3.2.1] octan-3-ol ainda não foi relatado.

Tem-se como perspectiva futura para o grupo de pesquisa a realização de ensaios biológicos com extratos de *E. tortuosum* para avaliação do potencial biológico do mesmo.

## REFERÊNCIAS

- ADEOSUN, C. B.; OLASEINDE, S.; OPEIFA, A. O. & ATOLANI, O. "Essential oil from the stem bark of *Cordia sebestena* scavenges free radicals." *Journal of Acute Medicine*, 3: 138-141, 2013.
- AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; RODRIGUES, M. D.; SENA, K. X. F. R.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C. & SILVA T. G. "Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman." *International journal of molecular sciences*, 13: 4124-4140, 2012.
- ALBERTS, P. S. F.; DANEEL, M.; MARAIS, A. A.; BARANENKO, D. A. & MEYER, J. M. "Seasonal analysis of the tropane alkaloid ecgonine methyl ester and the occurrence of other highly-valued tropanes in the South African *Erythroxylum* trees." *Acta Physiologiae Plantarum*, 40: 24, 2018.
- ALBERTS, P. S. F.; MEYER, J. J. M. & DARU, B. H. "Molecular and chemical evaluation of selected species within the South African coca family (*Erythroxylaceae*)." *South African Journal of Botany*, 109: 325, 2017.
- ALBUQUERQUE, C. H. D.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T.S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; ANGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F. & SILVA, M. S. "Flavonoid glycosides from *Erythroxylum pulchrum* a. st.-hil.(*Erythroxylaceae*)." *Quimica Nova*, 37: 663-666, 2014.
- AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T. & RIBEIRO, J.F. "Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas, MA." *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 147-149, 2007.
- BALDÉ, A. M.; APERS, S.; BRUYNE, T. E.; HEUVEL, H. V. D.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. J. & PIETERS, L. A. "Steroids from *Harrisonia abyssinica*." *Planta medica*, 66: 67-69, 2000.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P. & DAVID, J. P. "Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. *Biochemical systematics and ecology*, 33: 537-540, 2005.
- BARREIROS, M. L., DAVID, J. P., DAVID, J. M., LOPES, L. M. X., DE SÁ, M. S., COSTA, J. O. F.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIRÓZ, L. P.; & SANT'ANA, A. E. G. "Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species." *Phytochemistry*, 68: 1735-1739, 2007.
- BARROS, M. G. "Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br.(*Erythroxylaceae*) do Brasil." *Brazilian Journal of Botany*, 21: 159-166, 1998.
- BIERI, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J. L. & CHRISTEN, P. "Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species." *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 439-447, 2006.

BOHM, B. A.; PHILLIPS, D. W. & GANDERS, F. R. "Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*." *Journal of Natural Products*, 44: 676-679, 1981.

BRACHET, A.; MUNOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J. & CHRISTEN, P. "Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark." *Pergamon*, 46: 1439-1442, 1997.

BRAHMI, N.; SCOGNAMIGLIO, M.; PACIFICO, S.; MEKHOUKHE, A.; MADANI, K.; FIORENTINO, A. & MONACO, P. "1H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties." *Food Research International*, 76: 334-341, 2015.

BRINGMANN, G.; GÜNTHER, C.; MÜHLBACHER, J.; GUNATHILAKE, M. L. P. & WICKRAMASINGHE, A. "Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* OE Schulz (Erythroxylaceae)." *Phytochemistry*, 53: 409-416, 2000.

CALIXTO, J. J. T.; MORAIS, S. M.; GOMEZ, C.V.; MOLAS, C. C.; ROLON, M.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M.L.; OLIVEIRA C. D. M.; TINTINO, S.R.; COUTINHO, H. D. M. "Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast Cerrado." *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 434-440, 2016.

CANO, J. H. & VOLPATO, G. "Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba." *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 293-316, 2004.

CAO, P.; LIU, C. & LIU, K. "Aromatic constituents in fresh leaves of Lingtuo Dancong tea induced by drought stress." *Frontiers of Agriculture in China*, 1: 81-84, 2007.

CASALE, J. F.; MALLETTE, J. R. & JONES, L. M. "Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production." *Forensic Science International*, 237: 30-39, 2014.

CASALE, J. F. & MALLETTE, J. R. "Illicit coca grown in Mexico: An alkaloid and isotope profile unlike coca grown in South America." *Forensic Chemistry*, 1: 1-5, 2016.

CAZANA-MARTÍNEZ, Y.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; MOLINA-TORRES, J.; GONZÁLEZ- GUEVARA, J. L. & URQUIOLA-CRUZ, A. "Preliminary phytochemical study of three Cuban species of *Erythroxylum*." *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23: 193-197, 2004.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. de C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G. & ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 975– 981, 2012.

CHIN, Y.; KINGHORN, A. D. & PATIL, P. N. "Evaluation of the Cholinergic and Adrenergic Effects of Two Tropane Alkaloids from *Erythroxylum pervillei*." *Phytotherapy research : PTR*, 21: 1002-1005, 2007.

- CHIN, Y.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; MCCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M & KINGHORN, A. D. "Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-collection of *Erythroxylum pervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar." *Journal of Natural Products*, 69: 414-417, 2006.
- CHRISTEN, P.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D. & EVANS, W. C. "Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* root-bark." *Phytochemistry*, 38: 1053-1056, 1995.
- CHRISTEN, P.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D. & EVANS, W. C. "Alkaloids of *Erythroxylum zambesiicum* stem-bark." *Phytochemistry*, 34: 1147-1511, 1993.
- COLODEL, E. M.; SEITZ, A. L.; SCHMITZ, M.; RAYMUNDO, D. L.; BORBA, M. R. & DRIEMEIER, D. "Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos." *Pesquisa veterinária brasileira*, 24: 165-168, 2004.
- CÓRDOVA, W. H. P; MATOS, M. G; TABART, J.; SIPEL, A.; KEVERS, C. & DOMMES, J. " In vitro characterization of antioxidant properties of cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* a. rich. isolation of two flavonol glycosides." *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57: 1340-1343, 2012.
- CRUZ, R. A. S; ALMEIDA, H.; FERNANDES, C. P.; JOSEPH-NATHAN, P.; ROCHA, L.; LEITÃO, G. G. "A new tropane alkaloid from the leaves of *Erythroxylum subsessile* isolated by pH-zone-refining counter-current chromatography." *Journal of Separation Science*, 39: 1273-1277, 2016.
- DEBORDE, C.; MOING, A.; ROCH, L.; JACOB, D.; ROLIN, D. & GIRAUDEAU, P. "Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy." *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 102: 61-97, 2017.
- DOCIMO, T.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; KAI, M.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. & D'AURIA, J. C. "The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases." *Plant molecular biology*, 78: 99-615, 2012.
- DZOTAM, J.K.; TOUANI, F.K. & KUETE, V. "Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria." *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 565–570, 2016.
- ELIAS, S. T.; MACEDO, C. S.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; COLETTA, R. D; NEVES, F. A.R & GUERRA, E. N. S. " Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma." *Cell Cycle*, 15:948-956, 2016.
- EL-IMAM, Y. M. A.; EVANS, W. C. & GROUT, R. J. "Alkaloids of *Erythroxylum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*." *Phytochemistry*, 27: 218-2184, 1988.

FOTAKIS, C.; TSIGRIMANI, D.; TSIACA, T.; LANTZOURAKI, D. Z.; STRATI, I. F.; MAKRIS, C.; TAGKOULI, D.; PROESTOS, C.; SINANOGLU, V. J.; & ZOUMPOULAKIS, P. "Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions." *Food chemistry*, 211: 963-971, 2016.

GANIYAT, K. O.; PATRICIA, A. O. & SUNDAY, F. A. "Chemical composition, toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of leaf and stem essential oils of *Dieffenbachia picta* (Araceae)." *European Journal of Scientific Research*, 49: 567-580, 2011.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J. & PRIETO-GONZÁLEZ, S. "Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species." *Biochemical systematics and ecology*, 34: 539-542, 2006.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PINO-RODRÍGUEZ, S.; GARCÍA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEZ, M. T.; ECHEMENDIA-ARANA, O. A.; MOLINA-TORRES, J. & PRIETO-GONZÁLEZ, S. "Phytochemical screening and in vitro antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species." *Acta farmacéutica bonaerense*, 23: 506-509, 2004.

GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GARCIA G. N.; ÁLVAREZ, O.G & VELEZ-CASTRO, H. "Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de beta-Amirina." *Latin American Journal of Pharmacy*, 27: 85-88, 2008.

HAO, S. J.; GAO, L. J.; XU, S. F.; YE, Y. P. & LI, X. Y. "Six new steroidal glycosides from roots of *Cynanchum bungei*." *Phytochemistry Letters*, 23: 26-32, 2018.

HEGNAUER, R. "Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on Old World species)." *Journal of Ethnopharmacology*, 3: 279-292, 1981.

HONG, Y. A. N. P. I. N. G.; HUANG, S., WU, J., & LIN, S. "Identification of essential oils from the Leaves of 11 species of *eriobotrya*." *Pakistan Journal of Botany*, 42: 4379-4386, 2010.

IBGE- "Vamos conhecer o Brasil" Disponível em: <<http://7a12.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 04 fev. 2018.

JOHNSON, E. L.; "Alkaloid content in *Erythroxylum coca* tissue during reproductive development." *Phytochemistry*, 42: 35-38, 1996.

JOHNSON, E. L. "Alkaloid content in *Erythroxylum coca* tissue during reproductive development." *Phytochemistry*, 42: 35-38, 1996.

JOHNSON, E. L. & SCHMIDT, W. F. "Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxylum australe*." *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59: p769-776, 2004.

KANCHANAPOOM, T.; NOIARSA, P.; TIENGTHAM, P.; OTSUKA, H., & RUCHIRAWAT, S. "Acetophenone diglycosides from *Erythroxylum cambodianum*." *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 53: 579-581, 2005.

KARIMOV, A. M.; DRENIN, A. A.; VASINA, N. A., & BOTIROV, E. K. "GC-MS Study of Nonpolar Constituents from *Scutellaria comosa*." *Chemistry of Natural Compounds*, 51: 1188-1190, 2015.

KAUSAR, F.; KONDE, A. "Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *chonemorpha fragrans* and *erythroxylum monogynum* combined ethanolic leaf extract in alloxan induced diabetic wistar rats." *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 7428 – 7436, 2017.

KHALIL, A.A.; DIAB, M.M.S. & MOUDGIL, K. D." The 4th Euro-Mediterranean Conference of Natural Products and Drug Discovery: Back to Mother Nature (BioNat-IV), Cairo/Sharm El-Sheikh, Egypt, March 3–7, 2015." *asian journal of pharmaceutical sciences*, 11: 297–300, 2016.

KIYAMA, R. "Estrogenic terpenes and terpenoids: pathways, functions and applications". *European journal of pharmacology*, 2017.

KUDLACEK, O; HOFMAIER, T.; LUF, A; MAYER, F, P.; STOCKNER, T.; NAGY, C.; HOLY, M.; FREISSMUTH, M.; SCHMID, R. & SITTE, H. H. "Cocaine adulteration". *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 83-84: 75-81, 2017.

LEITE, C. F. M.; LEITE, B. H. M.; BARROS, I. M. C.; GOMES, S. M.; FAGG, C. W.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. & FONSECA, Y. M. "Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13: 135-143, 2014.

LUCAS-FILHO, M. D.; SILVA, G. C. D.; CÔRTEZ, S. D. F.; MARES-GUIA, T. R. D.; FERRAZ, V. P.; SERRA, C. P. & BRAGA, F. C. "ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) OE Schulz". *Phytomedicine*, 17: 383-387, 2010.

LV, D.; GUO, K. W.; XU, C.; HUANG, M.; ZHENG, S. J.; MA, X. H.; PAN, L.; WANG, Q. & YANG, X. Z. "Essential oil from *Siegesbeckia pubescens* induces apoptosis through the mitochondrial pathway in human HepG2 cells". *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 37: 87-92, 2017.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. & THOMAS, M. B. "The ultraviolet spectra of isoflavones, flavanones and dihydroflavonols. In: (Ed.)". *The systematic identification of flavonoids: Springer*, 1970. p.165-226.

MACEDO, T. B. C.; ELIAS, S. T.; TORRES, H. M.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; GUERRA, E. N. S. & SILVA, M. A. G. "Cytotoxic effect of *Erythroxylum suberosum* combined with radiotherapy in head and neck cancer cell lines". *Brazilian dental journal*, 27: 108-112, 2016.

- MEDEIROS, F. C.M.; GOUVEIA, F.N.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. & MENEZZI, C.H.S.D. "Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114: 87-93, 2016.
- MENDONÇA, O.J.; CERVI, A.C. & GUIMARÃES, O.A. "O Gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Estado do Paraná, Brasil". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41, 1998.
- MENEZES-FILHO, N. J.; SOUZA, C. S.; COSTA, T. C. S.; SILVA, V. D. A.; RIBEIRO, C. S. O.; BARREIROS, M. L.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M; DAVID, J. P. L. & COSTA, S. L. "Cytotoxicity of the diterpene 14-O-methyl-ryanodanol from *Erythroxylum passerinum* in an astrocytic cells model". *Natural product communications*, 9: 1245-1248, 2014.
- MESQUITA, E. C. "PERFIL QUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum* E ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. deciduum* (ERYTHROXYLACEA." Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG, 2018, 120 p.
- MMA - "Flora é reconhecida como uma das mais importantes do mundo". Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2012/04/flora-brasileira>> Acesso em: 01 fev 2018.
- MUÑOZ, M.; ARRIAGADA, S. & JOSEPH-NATHAN, P. "Chiral resolution and absolute configuration of 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ - dicinnamoyloxytropene and 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di(1-ethyl-1H-pyrrol-2-ylcarbonyloxy) tropene, constituents of *Erythroxylum* species". *Natural product Communications*, 9: 27-30, 2014.
- NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; & GARCEZ, F. R. "Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*". *Phytochemistry Letters*, 5: 401-406, 2012.
- NASCIMENTO, M. N. G. "Estudo Químico de *Erythroxylum Suberosum* (Erythroxylaceae) Frente às Catepsinas K, L e V." Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG, 2014, 104 p.
- NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; SONODA, M.; IWASA, K.; KATO, A.; JUMA, F. D.; MATHENGE, S. G. & MUTISO, P. B. C. "Tropane alkaloids from *Erythroxylum emarginatum*". *Journal of Natural Medicines*, 61: 56-58, 2007.
- NOVAK, M.; SALEMINK, C. & KHAN, I. "Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*". *Journal of ethnopharmacology*, 10: 261-274, 1984.
- OGUNKOYA, L. "Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes". *Phytochemistry*, 20: 121-126, 1981.

OGUNWANDE, O. A.; AVOSEH, N. O.; FLAMINI, G. A.; HASSAN, A. O.; OGUNMOYE, A. O.; OGUNSANWO, A. O.; YUSUF, K. O.; KELECHI, A. O.; TIAMIYU, Z. A. & TABOWEI, O. G. "Essential oils from the leaves of six medicinal plants of Nigeria". *Natural Product Communications*, 8: 243-248, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; SENA-FILHO, J. G.; MENDES-JÚNIOR, L. G.; ANJOS, R. M.; RIBEIRO, T. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAGA, V. A. & MEDEIROS, I. A. "Erythroxyllum pungens elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 436-442, 2012.

OLIVEIRA, E. C.; CRUZ, R. A. S.; AMORIM, N. M.; SANTOS, M. G.; PEREIRA JUNIOR, L. C.; SANCHEZ, E. O. F.; FERNANDES, C. P.; GARRETT, R.; ROCHA, L. M. & FULY, A. L. "Protective effect of the plant extracts of erythroxyllum sp. against toxic effects induced by the venom of lachesis muta snake". *Molecules*, 21: 1350, 2016.

OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; BRANCO, M. V.; LUCENA, H. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, F. M.; NASCIMENTO, S. C.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. & SILVA, M. S. "Tropane Alkaloids from Erythroxyllum caatingae Plowman". *Chemistry & biodiversity*, 8: 155-165. 2011.

OMORUYI, B. E.; AFOLAYAN, A. J. & BRADLEY, G. "Chemical composition profiling and antifungal activity of the essential oil and plant extracts of Mesembryanthemum edule (L.) bolus leaves". *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11: 19-30, 2014.

PENTO-ARIAS, E. & HAINES, D.D. "Chapter 11 – Natural Products: Immuno-Rebalancing Therapeutic Approaches". *Immune Rebalancing The Future of Immunosuppression*. p. 229–249, 2016

PLOWMAN, T. & HENSOLD, N. "Names, types, and distribution of neotropical species of Erythroxyllum (Erythroxyllaceae)". *Brittonia*, 56: 1-53, 2004.

PRADHEESH, G.; SURESH, S. & ALEXRAMANI, V. "Phytochemical and GC-MS analysis of methanolic extract of Pisonia grandis R. Br". *International Journal of Chemical Sciences*, 13: 1295-1304, 2015.

QIN, J. J.; CHEN, X.; LIN, Z. M.; XU, Y. S.; LI, Y. M.; ZUO, J. P. & ZHAO, W. M. "C21-steroidal glycosides and sesquiterpenes from the roots of Cynanchum bungei and their inhibitory activities against the proliferation of B and T lymphocytes". *Fitoterapia*, 124: 193-199, 2018.

QUEIROZ, E. F.; ZANOLARI, B.; MARSTON, A.; GUILLET, D.; BURGNER, L.; PAULO, Q. M., & HOSTETTMANN, K. "Two new tropane alkaloids from the bark of Erythroxyllum vacciniifolium Mart.(Erythroxyllaceae)". *Natural product communications*, 4: 1337-1340, 2009.

- RAHMAN, M. M.; ROY, S. K.; HUSAIN, M. & SHAHJAHAN, M. "Chemical Constituents of Essential Oil of Petals and Corolla Tubes of *Nyctanthes Arbor-Tristis* Linn Flower". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14: 717-721, 2011.
- RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M.X. & DAVID, J.P. "A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxyllum rimosum* (Erythroxylaceae)". *Phytochemistry Letters*, 6: 232-235, 2013-a.
- RIBEIRO, E. M. O. ; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S. ; LOPES, L. M.X.; KRŠKOVÁ, Z. & DUŠEK, J. "Ent-labdane and beyerane diterpenes from *Erythroxyllum betulaceum* Mart." *Biochemical Systematics and Ecology*, 50: 90-92, 2013-b.
- SANGSTER, A. W. & STUART, K. L. "Ultraviolet spectra of alkaloids". *Chemical Reviews*, 65: 69-130, 1965.
- SANTOS, C. C. D.; LIMA, M. A. S.; BRAZ FILHO, R., & SILVEIRA, E. R. "Diterpenes from *Erythroxyllum barbatum*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17: 1304-1308. 2006.
- SANTOS, C.; LIMA, M. A. S. & SILVEIRA, E. R. "Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxyllum barbatum*". *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 661-664, 2003.
- SANTOS, K. C.; MONTE, A. P. O.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A. & JUNIOR, R. P. "Role of NO–cGMP pathway in ovine cervical relaxation induced by *Erythroxyllum caatingae* Plowman". *Animal reproduction science*, 164: 23-30. 2016.
- SCHIASSI, M. C. E. V.; DE SOUZA, V. R.; LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G., & QUEIROZ, F. "Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation". *Food chemistry*, 245: 305-311, 2018.
- SENA-FILHO, J. G.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; ROMERO, M. A.; XAVIER, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. & BRAZ-FILHO, R. "Cytotoxic evaluation of pungencine: a new tropane alkaloid from the Roots of *Erythroxyllum pungens* OE Schulz". *Helvetica Chimica Acta*, 93: 1742-1744, 2010.
- SILVA, G. L., CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H. B.; RASOANAIVO, P. & MONKS, A. "Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxyllum pervillei*". *Journal of natural products*, 64: 1514-1520, 2001.
- SMITH, R. M. & CASALE, J. F "The mass spectrum of cocaine: deuterium labeling and MS/MS studies". *Microgram J*, 7: 16-41, 2010.
- STANKOVIC, N.; MIHAJLOV- KRESTEV, T.; ZLATKOVIC, V.S.; MITIC, V.; JOVIC, V.; COMIC, L.; KOCIC, B. & BERNSTEIN, N. "Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula" *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 78: 21–28, 2016.

SYED, S. H. & NAMDEO, A. G. "Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. on paracetamol induced toxicity". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3: 877-881, 2013.

TAVEIRA, L. K. P. D.; SILVA, M. A. P. & LOIOLA, M. I. B. " Allelopathy in five species of *Erythroxylum*." *Acta Scientiarum, Agronomy*, 35: 325-331, 2013.

TOLEDO, C.E.M; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA E. R.; MELLO, J. C.P.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. & UEDA-NAKAMURA, T. "Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid". *Journal of Ethnopharmacology*, 133:420–425, 2011.

VIJAYALAKSHMI, U. & SHOURIE, A. "Gas Chromatography-Mass Spectrometric analysis of ethanolic extracts of *Glycyrrhiza glabra* Linn. Roots". *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4: 741-755, 2013.

WESAM, R. K.; GHANYA, A. N.; MIZATON, H. H.; ILHAM, M. & AISHAH, A. "Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of standardized aqueous extract from leaves of *Erythroxylum cuneatum* in human HepG2 and WRL68 cells line". *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6: 811-816, 2013.

WINNETT, V.; SIRDAARTA, J.; WHITE, A.; CLARKE, F. M. & COCK, I. E. "Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* growth by selected Australian plants: Natural approaches for the prevention and management of ankylosing spondylitis". *Inflammopharmacology*, 25: 223-235, 2017.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. Q. & HOSTETTMANN, K. "Methylpyrrole 'Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum v acciniifolium*". *Journal of natural products*, 68: 1153-1158, 2005.

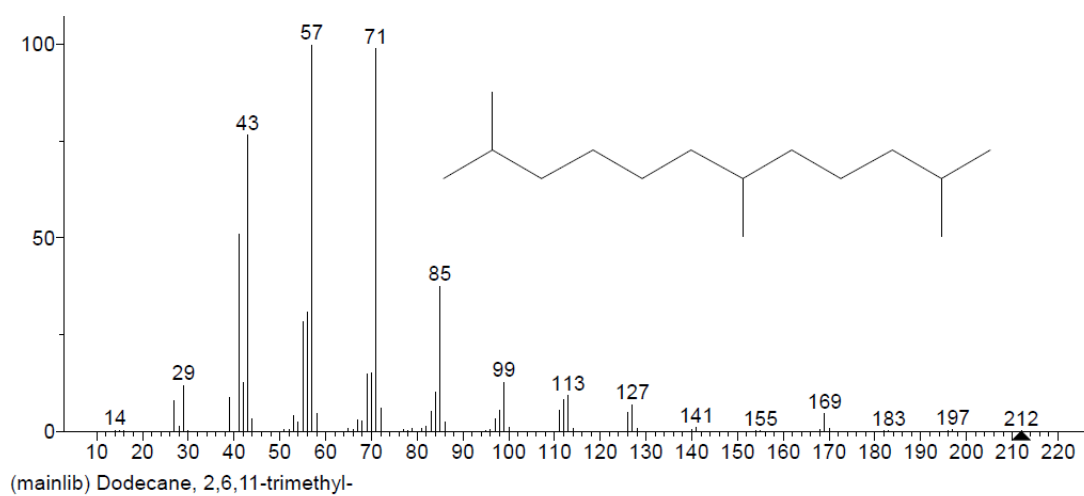
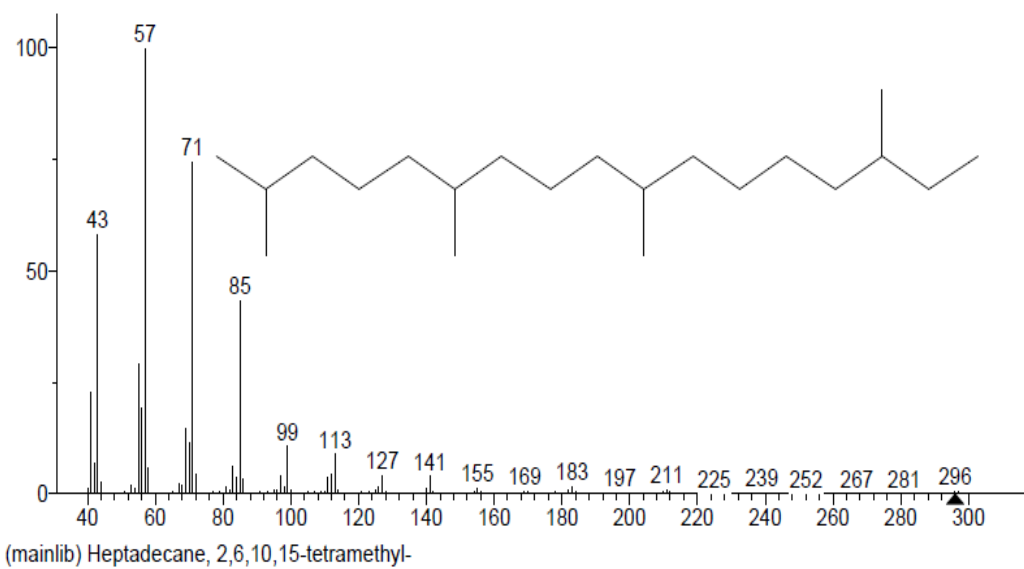
ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; DE Q. PAULO, M. & HOSTETTMANN, K. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *Journal of natural products*. 66: 497-502, 2003.

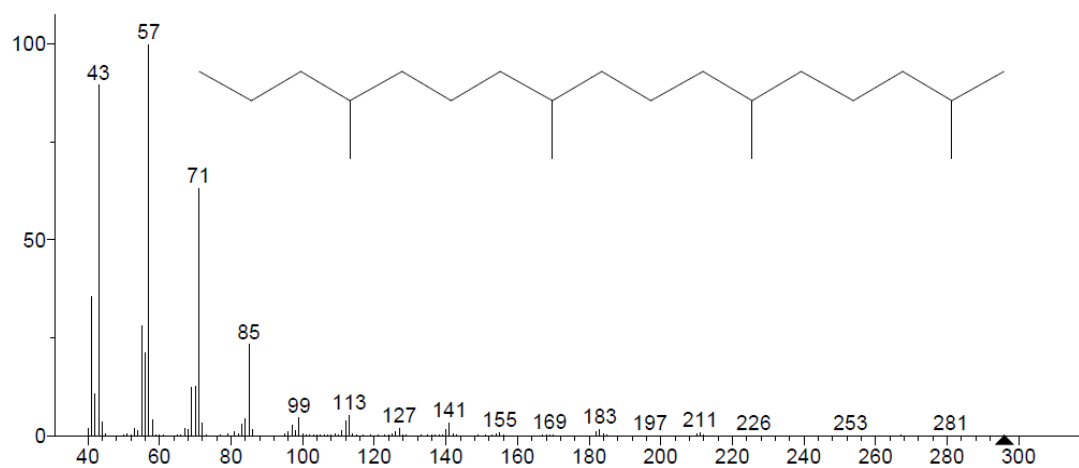
ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M. D. & ATHAYDE, M. L. "Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 226-229, 2008.

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

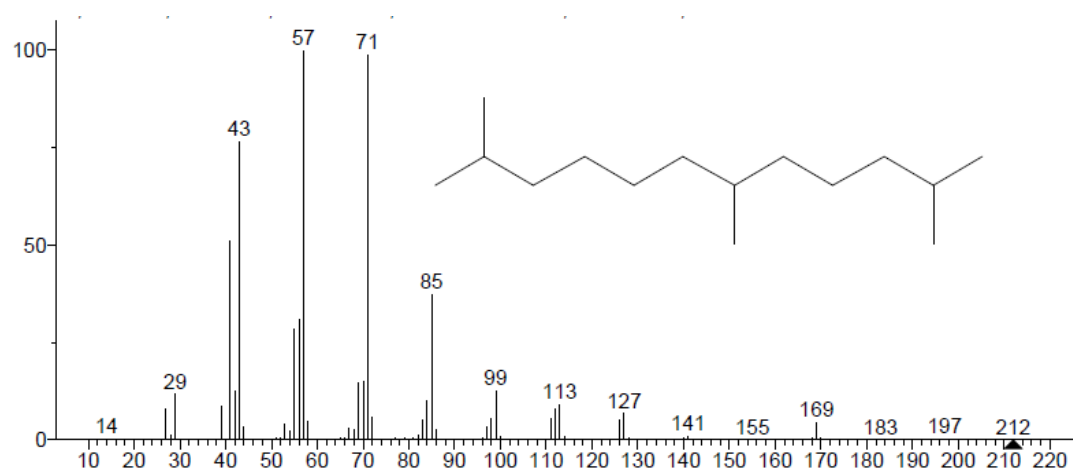
## ANEXO

## Anexo 1 – Espectros de massas das substâncias identificadas nos extratos hexânico das flores

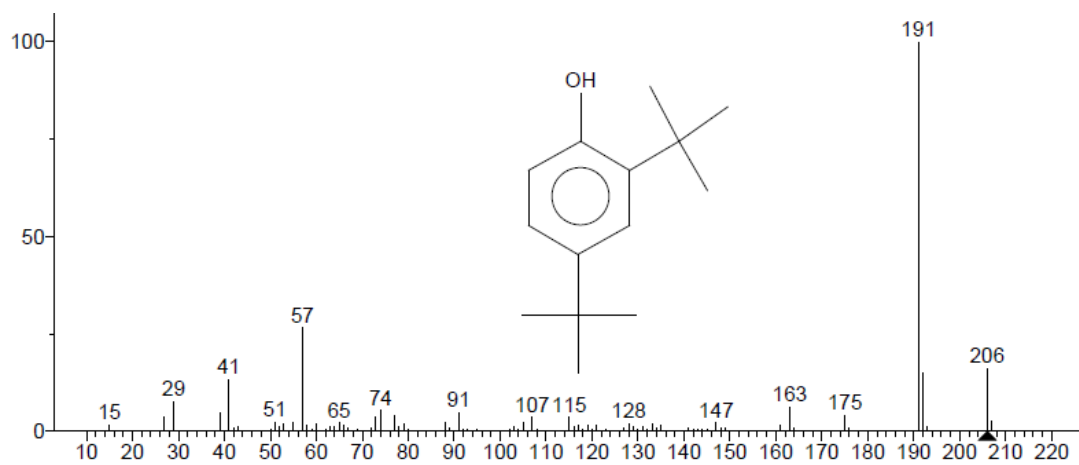




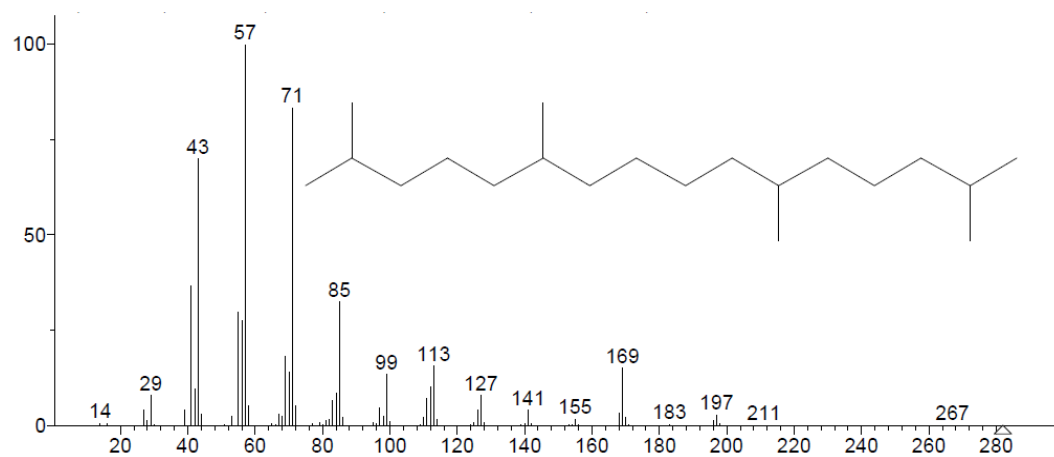
(mainlib) Heptadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-



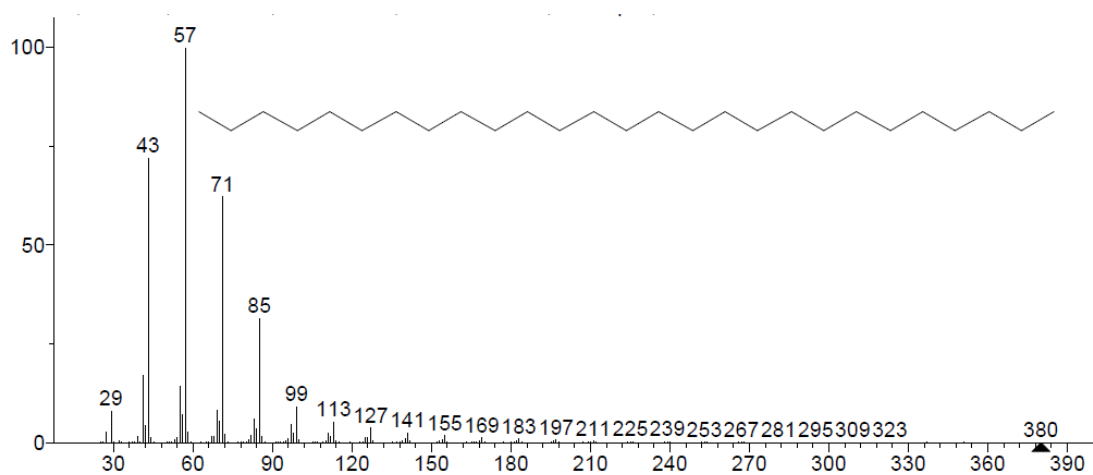
(mainlib) Dodecane, 2,6,11-trimethyl-



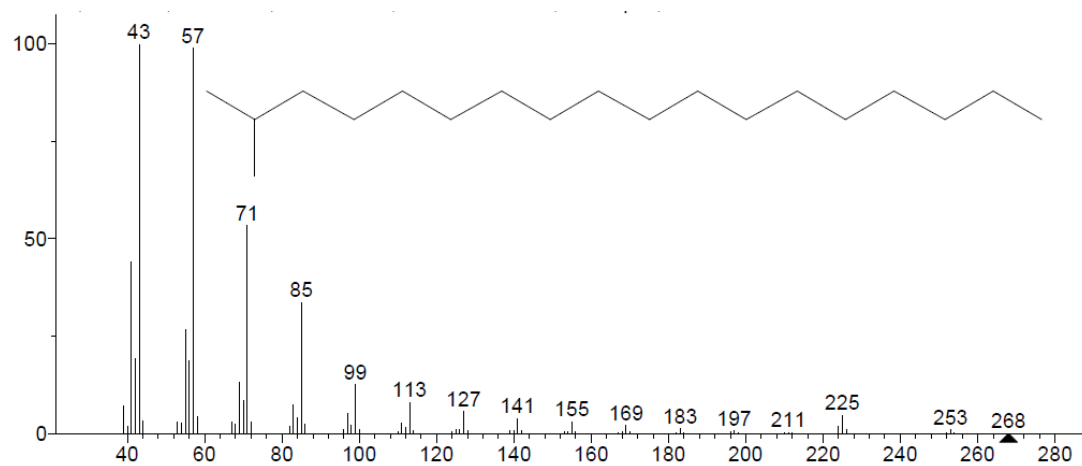
(replib) Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-



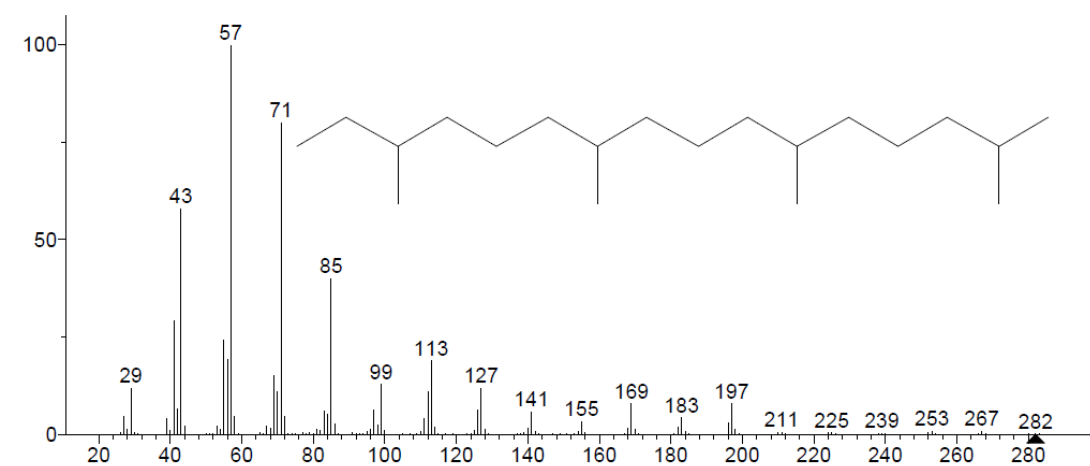
(mainlib) Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl-



(replib) Heptacosane

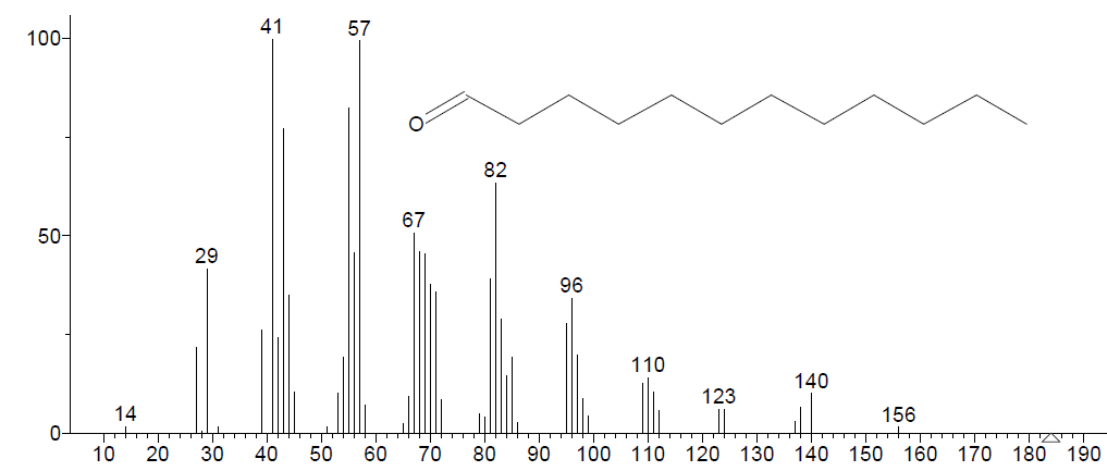


(replib) Octadecane, 2-methyl-

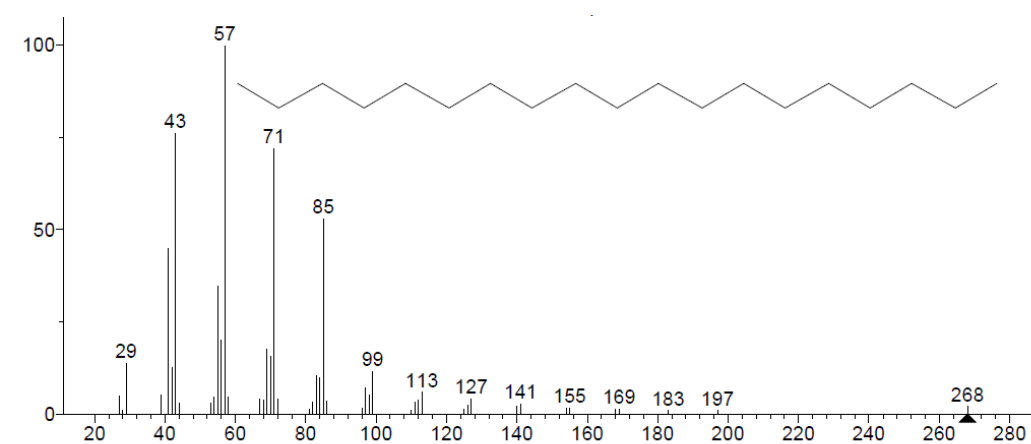


(replib) Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-

## Anexo 2 – Espectros de massas das substâncias identificadas nos extratos diclorometânicos das flores



(mainlib) Dodecanal



(replib) Nonadecane

