



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

EVELISE COSTA MESQUITA

PERFIL QUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum* E ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. deciduum* (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:

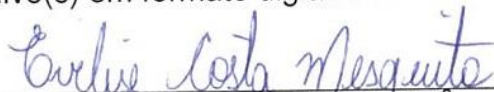
Nome completo do autor: Evelise Costa Mesquita

Título do trabalho: Perfil químico de espécies do gênero *Erythroxylum* e estudo químico das folhas de *E. deciduum* (Erythroxylaceae).

3. Informações de acesso ao documento:

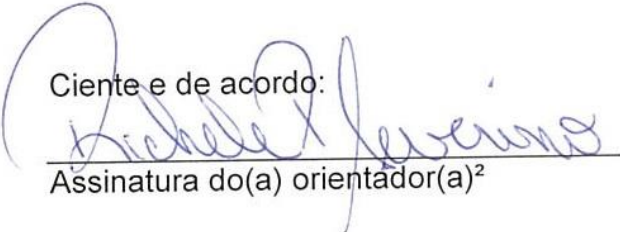
Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 06 / 03 / 2019

¹ 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.

² A assinatura deve ser escaneada.

EVELISE COSTA MESQUITA

PERFIL QUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum* E ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *E. deciduum* (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 de Freitas Souza

CATALÃO - GO

2018

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

Costa Mesquita, Evelise

Perfil químico de espécies do gênero *Erythroxylum* e estudo químico das folhas de *E. deciduum* (ERYTHROXYLACEAE) [manuscrito] / Evelise Costa Mesquita. - 2018.

xvi, 102 f.: il.

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

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

Bibliografia. Anexos.

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

1. *Erythroxylum*, . 2. VOCs, . 3. dereplication, . 4. flavonoids, . 5. cytotoxicity.. I. Priscila Severino, Richele , 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: **Evelise Costa Mesquita**

Aos 22/02/18 às 14:00 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 de Espécies do Gênero *Erythroxylum* e Estudo Químico das folhas de *E. deciduum* (ERYTHROXYLACEAE)**” apresentada pela candidata: **Evelise Costa Mesquita**. 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
Prof. Dr. Marcos Pivatto	Titular	UFU – Uberlândia
Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero	Titular	UFG – Catalão

Resultado Final: Aprovada.

Parecer da Comissão Julgadora:

A aluna foi aprovada após apresentação do trabalho e arguições da banca.

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 Jainer Diogo Vieira Matos, representante do Programa de Pós-Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Richele Priscila Severino
Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Marcos Pivatto
Prof. Dr. Marcos Pivatto

Elaine Rosechrer Carbonero
Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Jainer Diogo Vieira Matos
Representante do PPG Jainer Diogo Vieira Matos
Assistente em Administração

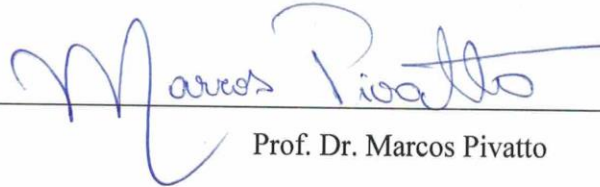
Não houve alteração no título.

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 **Evelise Costa Mesquita**, realizada em 22 de fevereiro de 2018.*



Profa. Dra. Richele Priscila Severino



Prof. Dr. Marcos Pivatto



Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Dedico este trabalho a todos aqueles que se mantiveram ao meu lado, com manifestos de amor, compreensão e orações.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa concedida, ao CNPq e a FAPEG pelo suporte financeiro à pesquisa.

A Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão e ao Programa de Pós-Graduação em Química por todo amparo concedido na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Richele P. Severino pela orientação, paciência e disposição. Além dos ensinamentos, sou muito grata pela confiança depositada e pelos incentivos.

A Profa. Dra. Lorena R. de Freitas Souza pela co-orientação, ensinamentos transmitidos e por ser exemplo de humildade na vida acadêmica.

A Profa. Dra. Elaine Carbonero pelos ensinamentos e trocas de experiências nos dias de laboratório.

A professora Dra. Rosy I. M. A. Ribeiro da Universidade Federal de São João *Del-Rei*, *Campus* Centro-Oeste Dona Lindu pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Helder N. Consolaro da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão pela identificação das espécies de *Erythroxylum* e ao Msc. Raphael M. da Silva pela prontidão às idas ao campo em todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira da Universidade Federal de São Carlos e ao Laboratório de Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

A Profa. Dra. Quézia B. Cass da Universidade Federal de São Carlos pela parceria na realização dos experimentos de desreplicação.

A doutoranda Michelle Nauara G. do Nascimento pelos conhecimentos transmitidos desde o início do desenvolvimento deste trabalho. Exemplo de perseverança e dedicação!

Ao Romário e Andreia Pereira pela amizade e inúmeras contribuições para realização deste trabalho. Torcerei sempre pelo sucesso de vocês!

Aos colegas da UFG – Regional Catalão e do LABIOrg, pela boa convivência e conhecimentos compartilhados, e aos amigos que pude conhecer nessa jornada.

Aos amigos pelas orações e por todo apoio e afeto. Em especial aqueles que me deram suporte em todos sentidos, para a realização do mestrado.

A minha família que sempre apoiou todas as minhas decisões.

A Deus, por me fazer compreender a partir de todos os momentos, que fé, persistência e esforço são catalisadores para o êxito.

Cada um tem a idade do seu
coração, da sua experiência, da sua fé.

George Sand

RESUMO

O gênero *Erythroxyllum* pertence à família Erythroxylaceae e é amplamente utilizado na medicina popular. Estudos mostraram que neste gênero foram encontrados metabólitos secundários das classes dos alcaloides, flavonoides, esteroides e terpenos. O presente trabalho foi subdividido em três etapas, sendo: (i) estudo dos compostos orgânicos voláteis (COVS) presentes nas folhas de *E. deciduum*; (ii) estudo do perfil químico das folhas de quatro espécies do gênero *Erythroxyllum* (*E. deciduum*, *E. suberosum*, *E. campestre* e *E. tortuosum*) e avaliação citotóxica dos extratos frente a células HeLA; (iii) estudo químico e desreplicação do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum*, e avaliação citotóxica frente a células tumorais 4T1. Para o estudo dos COVS utilizou as técnicas hidrodestilação e *HSPE*, apresentando como constituição química principal, hidrocarbonetos alifáticos além de cetonas, aldeídos, alcoóis, ésteres e esteroides. O perfil químico das quatro espécies foi realizado utilizando técnicas qualitativas como CCD, CLAE-DAD, CG-EM e RMN de ^1H , evidenciando a predominância de flavonoides, alcaloides e esteroides. Os extratos diclorometano e metanol de *E. campestre* e *E. suberosum*; acetato de etila de *E. deciduum* e metanol de *E. tortuosum* apresentaram potencial citotóxico significativo frente a células HeLA (*in vitro*). O estudo fitoquímico da fração acetato de etila de *E. deciduum* levou ao isolamento de dois flavonóis glicosilados: 4',7-di-*O*-metilquercetina-3-*O*- β -rutinosídeo (**I**) e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (**II**), ambos confirmados pela fragmentação em análise de espectrometria de massas sequencial e por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. A desreplicação por CLUE-EM do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum* levou a identificação de quatro flavonoides, sendo estes **I** e **II**, além da rutina (**III**) e catequina ou epicatequina (**IV**), todos já relatados para o gênero. Este mesmo extrato foi avaliado por ensaios *in vitro* frente a células tumorais do tipo 4T1, apresentando inibição semelhante ao controle cisplatina. Os resultados obtidos são importantes para o conhecimento das espécies estudadas, uma vez que a literatura apresenta dados bastante restritos.

Palavras-chave: *Erythroxyllum*, COVs, desreplicação, flavonoides, citotoxicidade.

ABSTRACT

The genus *Erythroxylum* belongs to the Erythroxylaceae family and is widely used in folk medicine. Studies show that secondary metabolites of the alkaloid, flavonoid, steroid and terpene classes were found in the genus. The present work was subdivided in three stages, being: (i) study of volatile organic compounds (VOCs) present in leaves of *E. deciduum*; (ii) chemical profile of leaves of four species of the genus *Erythroxylum* (*E. deciduum*, *E. suberosum*, *E. campestre* e *E. tortuosum*) and cytotoxic evaluation of the extracts against HeLA cells; (iii) chemical study and dereplication of the ethanolic extract of *E. deciduum* leaves, and cytotoxic evaluation against 4T1 cells. The hydrodistillation and HSPE techniques were used for the study of VOCs and it were present the main chemical composition aliphatic hydrocarbons in addition to ketones, aldehydes, alcohols, esters and steroids. The chemical profile of the four species was performed using qualitative techniques such as TLC, HPLC-DAD, GC-MS and ¹H NMR, evidencing the predominance of flavonoids, alkaloids and steroids. The extracts from *E. campestre* and *E. suberosum* (Dichloromethane and Methanol); *E. deciduum* (Ethyl acetate) and *E. tortuosum* (Methanol) showed significant cytotoxicity activity against HeLA cells (*in vitro*). The phytochemical investigation of ethyl acetate fraction of *E. deciduum* led to the isolation of two known flavonoid glycosides: 4',7-di-*O*-methyl quercetin-3-*O*- β -rutinoside (**I**) and Kaempferol-3-*O*-rutinoside (**II**), both were confirmed by the fragmentation in analysis of Sequential Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance. The ethanolic extracts of leaves of *E. deciduum* was explored through the technique of dereplication using UPLC-MS and the following compounds were identified: **I**, **II**, rutin (**III**) and catechin or epicatechin (**IV**), all reported in this genus. This extract was evaluated by *in vitro* assays against 4T1 tumor cells, exhibiting inhibition similar to the cisplatin control. The results obtained are important for the knowledge of the species, since the literature presents very restricted data.

Keywords: *Erythroxylum*, VOCs, dereplication, flavonoids, cytotoxicity.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 - Fracionamento da fração acetato de etila (FA).....	26
FLUXOGRAMA 3.2 - Fracionamento da subfração acetato de etila 4 (FA4).....	27
FLUXOGRAMA 3.3 - Fracionamento da subfração acetato de etila 5 (FA5).....	28
FLUXOGRAMA 3.4 - Fracionamento da fração acetato de etila (FA).....	28

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Novas substâncias ativas aprovadas pelo FDA no período de 1981 a 2014 (total = 1562)	2
FIGURA 1.2 - Algumas das novas substâncias ativas aprovadas entre 1981 e 2014.	3
FIGURA 1.3 - Novas substâncias ativas anticâncer aprovadas pelo FDA no período de 1981 a 2014 (total = 175).	5
FIGURA 1.4 - Comparação entre a área de distribuição original do Cerrado e área após desmatamento.	6
FIGURA 1.5 - Estrutura básica da cocaína.	8
FIGURA 1.6 - Estrutura básica do esqueleto de um alcaloide do tipo tropano.	9
FIGURA 1.7 - Alcaloides isolados de folhas de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	11
FIGURA 1.8 - Flavonoides isolados de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	12
FIGURA 1.9 - Terpenoides isolados de folhas de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	13
FIGURA 1.10 - Espécies de <i>Erythroxylum</i> de estudo em (a) <i>E. deciduum</i> (b) <i>E. campestre</i> , (c) <i>E. tortuosum</i> e (d) <i>E. suberosum</i> coletadas na fazenda da UFG - Regional Catalão.	14
FIGURA 4.1 - Cromatograma do óleo essencial de <i>E. deciduum</i> obtido na hidrodestilação 2.....	33
FIGURA 4.2 - Cromatogramas de hidrocarbonetos utilizados como padrões (C ₈ -C ₃₆). 33	
FIGURA 4.3 - Cromatogramas obtidos das análises com diferentes fibras via HS-SPME	36
FIGURA 4.4 - CCD das quatro espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> eluidas em diclorometano/acetato de etila (4:6) e reveladas em soluções de ácido de vanilina, Dragendorff e cloreto férrico.....	42
FIGURA 4.5 - Cromatogramas obtidos de análises por CG-EM dos extratos em diclorometano (azul) e acetato de etila (vermelho) das espécies de <i>Erythroxylum</i>	42
FIGURA 4.6 - Espectros de RMN de ¹ H (500 MHz) dos extratos em hexano das espécies de <i>Erythroxylum</i>	44
FIGURA 4.7 - Espectros de RMN de ¹ H (500 MHz) dos extratos em diclorometano das espécies de <i>Erythroxylum</i>	45
FIGURA 4.8 - Espectros de RMN de ¹ H (500 MHz) dos extratos em acetato de etila das espécies de <i>Erythroxylum</i>	46

FIGURA 4.9 - Espetros de RMN de ^1H (500 MHz) dos extratos em metanol das espécies de <i>Erythroxylum</i>	47
FIGURA 4.10 - Cromatogramas dos extratos da espécie <i>E. tortuosum</i>	50
FIGURA 4.11- Cromatogramas dos extratos da espécie <i>E. suberosum</i>	51
FIGURA 4.12 - Cromatogramas dos extratos da espécie <i>E. campestre</i>	52
FIGURA 4.13 - Cromatogramas dos extratos da espécie <i>E. deciduum</i>	53
FIGURA 4.14 - Perfil dos extratos etanólicos de <i>E. deciduum</i> obtidos por RMN ^1H (DMSO- <i>d</i> ₆ - 500 MHz e CLAE-DAD	57
FIGURA 4.15 - Cromatogramas do extrato etanólico <i>E. deciduum</i> por percolação, apresentando como <i>full scan</i> dos íons detectados	69
FIGURA 4.16 Cromatograma do íon extraído e espectros ESI(-) QqToF MS/MS (35eV) do composto I de <i>m/z</i> 637,1822.....	62
FIGURA 4.17 - Cromatograma do íon extraído e espectros ESI(-) QqToF MS/MS (35eV) do composto II de <i>m/z</i> 593,1542.....	63
FIGURA 4.18 - Cromatograma do íon extraído e espectros ESI(-) QqToF MS/MS (38 eV) do composto III de <i>m/z</i> 609,0079.....	65
FIGURA 4.19 - Cromatograma do íon extraído e espectro ESI(-) QqToF MS/MS (35 eV) do composto IV de <i>m/z</i> 289,0715.....	66
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN de ^1H da substância I (CD ₃ OD, 400 Hz).....	71
FIGURA 4.21- Espectro de RMN de ^1H da substância I (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	72
FIGURA 4.22- Mapa de contorno de HSQC da substância I (CD ₃ OD, 400/150 MHz).73	
FIGURA 4.23- Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância I (CD ₃ OD, 400/150 MHz)	74
FIGURA 4.24 - Mapa de contorno de COSY da substância I (CD ₃ OD, 400 MHz).....	76
FIGURA 4.25 - Cromatograma do íon extraído em <i>m/z</i> 637,1800 referente a identificação da substância I	77
FIGURA 4.26 - Espectros de primeira e segunda ordem ESI(-) QqToF MS/MS (35eV) da substância I de <i>m/z</i> 637,1800	78
FIGURA 4.27 - Propostas de fragmentações da substância I , segundo adaptações de Frabe <i>et al.</i> , (2001), a partir do espectro de massas de segunda ordem extraído de <i>m/z</i> 637,1800	79
FIGURA 4.28 - Espectro de RMN de ^1H da substância II (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 Hz).....	83
FIGURA 4.29 - Mapa de contorno de HSQC da substância II (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400/150 MHz).....	84

FIGURA 4.30 - Mapa de contorno de COSY da substância II (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	85
FIGURA 4.31 - Mapa de contorno de HMBC da substância II (CD ₃ OD, 400/150 MHz)	86
FIGURA 4.32 - Cromatograma do íon extraído com <i>m/z</i> 593,1512 referente a identificação da substância II	87
FIGURA 4.33 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 593,10 e espectro ESI (-) QqToF MS/MS (35eV) de <i>m/z</i> 593,10 (substância II).....	88
FIGURA 4.34 - Propostas de fragmentações da substância II , segundo adaptações de Frabe <i>et al.</i> (2001), a partir do espectro de massas de segunda ordem, extraído de <i>m/z</i> 593,10	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Informações quanto a utilizações e algumas atividades biológicas de espécies de <i>Erythroxyllum</i>	8
TABELA 1.2 - Bandas de absorção no UV de subclasses de flavonoides.....	10
TABELA 1.3 - Utilização de óleos essenciais, extraídos de espécies comuns e suas aplicações terapêuticas	99
TABELA 1.4 - Especificações das fibras utilizadas, segundo o fabricante Supleco, Bellefonte, (PA).....	20
TABELA 4.1 - Massas e rendimentos dos óleos essenciais obtidos a partir das hidrodestilações realizadas em triplicata.	31
TABELA 4.2 - Compostos identificados a partir dos OEs das folhas frescas de <i>E. deciduum</i>	34
TABELA 4.3 - Compostos identificados a partir da extração dos COVs por <i>MEFS in vitro</i> das folhas frescas de <i>E. deciduum</i>	38
TABELA 4.4 - Massa do material vegetal seco e dos extratos obtidos de espécies do gênero <i>Erythroxyllum</i>	41
TABELA 4.5 - Bandas de absorção no UV extraídos dos tempos de retenção (tr) dos extratos de <i>Erythroxyllum</i>	47
TABELA 4.6 - Valores de IC ₅₀ de extratos de espécies do gênero <i>Erythroxyllum</i> frente a células HeLA	54
TABELA 4.7 - Dados da preparação dos extratos das folhas de <i>E. deciduum</i> e das frações obtidas após extração líquido-líquido	56
TABELA 4.8 - Análise dos resultados de citotoxicidade do extrato etanólico <i>E. deciduum</i>	58
TABELA 4.9 - Substâncias identificadas por CLUE-EM no modo negativo (ESI) do extrato etanólico de <i>Erythroxyllum decidum</i>	66
TABELA 4.10 - Dados de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância I , em comparação com dados da literatura de GONZÁLEZ-GUEVARA <i>et al.</i> (2006) δ _H (400 MHz) e δ _C (125 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆	69
TABELA 4.11 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (400/100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para a substância II , em comparação com dados da literatura de Ferreira <i>et al.</i> (2014) (500/125 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆)	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AcOEt	acetato de etila
AV	arraste a vapor
C ₃ D ₆ O	acetona deuterada
CA	cromatografia por adsorção
CC	cromatografia em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CE	cromatografia por exclusão
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
COVs	compostos orgânicos voláteis
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DMEM	dulbecco MEM
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>electrospray ionization</i>
eV	elétron-volt
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
h	altura da fase estacionária
HD	hidrodestilação
Hex	hexano
Hz	hertz

IC ₅₀	concentração mínima da amostra, necessária para inibir 50% da atividade celular
IE	impacto de elétrons
<i>J</i>	constante de acoplamento
LABIOrg	Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica
kV	medida de tensão elétrica em quilovolt
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	mega-Hertz
mL	mililitro
MEFS	microextração em fase sólida
MTT	(3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
PB	pico base
PIM	pico do íon molecular
ppm	parte por milhão
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SFB	soro fetal bovino
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	triplete
<i>t_r</i>	tempo de retenção
UV-Vís	região do ultravioleta e visível
v/v	volume por volume
δ _C	deslocamento químico de carbono
δ _H	deslocamento químico de hidrogênio
φ	diâmetro da coluna cromatográfica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância do estudo de Produtos Naturais	1
1.2. Cerrado.....	5
1.3. Família Erythroxylaceae	7
1.4. O gênero <i>Erythroxylum</i> e as espécies de estudo	7
1.5. Perfil metabolômico.....	16
1.6. Identificação dos compostos orgânicos voláteis (COVs)	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1. Materiais utilizados	21
3.1.1. Reagentes	21
3.1.2. Solventes.....	21
3.1.3. Fases estacionárias	21
3.1.4. Equipamentos.....	22
3.1.5. Micro extração em fase sólida (MEFS)	23
3.2. Metodologia	23
3.2.1. Coleta do material vegetal	23
3.2.2. Estudo dos compostos voláteis (COVs).....	23
3.2.2.1. Extração do óleo essencial de <i>E. deciduum</i> por hidrodestilação (HD).....	23
3.2.2.2. Extração dos compostos voláteis das folhas de <i>E. deciduum</i> por micro extração em fase sólida (MEFS).....	24
3.2.2.3. Identificação dos COVs	24
3.2.3. Estudo dos constituintes químicos não-voláteis	25
3.2.3.1. Preparação dos extratos etanólicos de <i>Erythroxylum</i>	25
3.2.3.2. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (FA).....	26

3.2.3.2.1 - Refracionamento cromatográfico da subfração FA4.....	26
3.2.3.2.2 - Refracionamento cromatográfico da subfração FA5.....	27
3.2.3.3. Perfil químico dos extratos de <i>Erythroxyllum</i>	28
3.2.4. Análises por CLUE-EM do extrato etanólico de <i>E. deciduum</i> obtido por percolação e das substâncias I e II	29
3.2.5. Ensaios de citotoxicidade.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Estudo dos constituintes voláteis de <i>E. deciduum</i>	32
4.1.1. Perfil do óleo essencial de <i>E. deciduum</i> e identificação dos compostos químicos	32
4.1.2. Identificação dos compostos químicos obtidos a partir de MEFS para <i>E. deciduum</i>	35
4.2 - Estudo dos constituintes não voláteis de espécies do gênero <i>Erythroxyllum</i> ...	43
4.2.1. Análise dos perfis químicos ou metabólitos dos extratos	43
4.2.1.1. Extratos obtidos a partir do homogeneizador dispersor ultra turrax....	43
4.2.1.1.1 – Avaliação do potencial citotóxico dos extratos brutos de <i>Erythroxyllum</i>	57
4.2.1.2. Extratos etanólicos de <i>E. deciduum</i>	58
4.2.1.2.1 - Avaliação citotóxica do extrato etanólico de <i>E. deciduum</i> obtido por percolação.....	61
4.2.1.2.2 - Análise por desreplicação do extrato etanólico obtido por percolação	62
4.2.2. Identificação estrutural dos flavonoides isolados de <i>E. deciduum</i>	70
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO	102
FLUXOGRAMA GERAL.....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 - IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS

O Brasil é o país que abriga maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas. A utilização das espécies vegetais está relacionada aos aspectos culturais e hereditários da sociedade desde os primórdios da história, com relatos descendentes de gerações quanto a utilização da química medicinal como fonte inspiradora na descoberta de novas substâncias químicas, o que tem contribuído para os avanços científicos decorrentes da investigação dos produtos extraídos de espécies vegetais (CALIXTO, 2005; COSTA *et al.*, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2015).

Os produtos naturais (PNs) podem ser classificados como compostos químicos que são extraídos da natureza, sendo obtidos de organismos vivos ou por sínteses reproduzidas por rotas biossintéticas. Alguns PNs são metabólitos ativos biologicamente e corroboram para a descoberta de novos medicamentos (COSTA *et al.*, 2009; BUTTLER *et al.*, 2014).

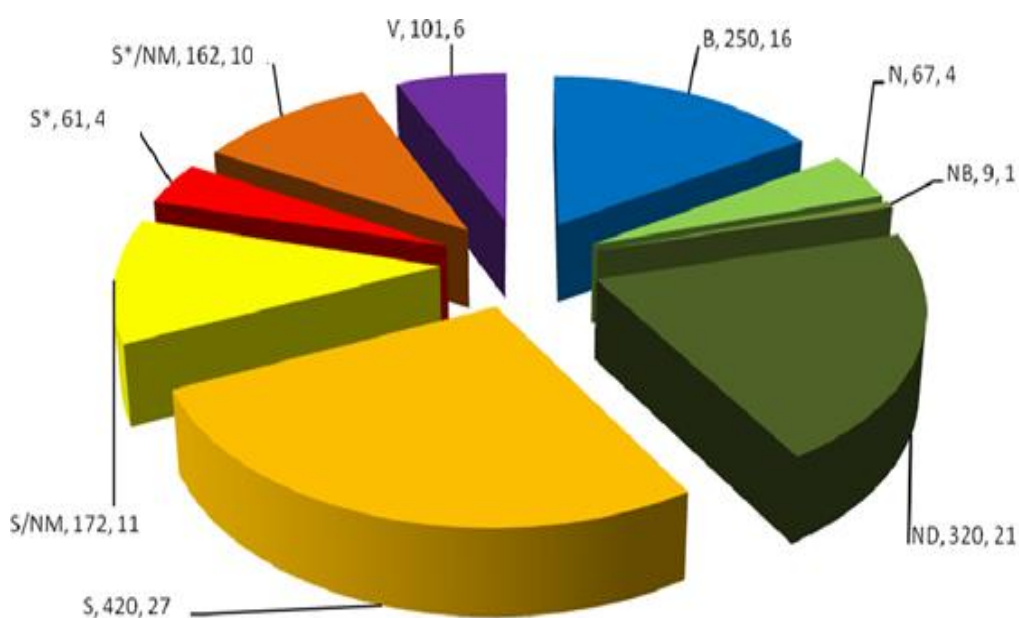
O destaque da atividade biológica reportada para a química dos produtos naturais deriva especialmente dos metabólitos secundários. Esses metabólitos despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas nas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também porque podem ser utilizados para diversas patologias, como doenças infecciosas (bacteriana, fúngica, parasitária e viral), imunológicas, cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias, oncológicas, entre outras (MISHRA & TIWARI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; CRAGG & NEWMAN, 2013).

Desta forma, o reino vegetal abriga uma diversidade estrutural de substâncias químicas que têm sido uma importante alternativa de obtenção de novos fármacos, fitoterápicos e medicamentos (JOHN, 2010). Ao serem descobertas, são reconhecidas como novas entidades químicas (NCEs, *new chemical entity*), que engloba todas as substâncias químicas, com potencial biológico, que podem ser utilizadas para o tratamento de alguma doença (BARREIRO & BOLZANI, 2009; KINGSTON, 2011; BUTTLER *et al.*, 2014). Após serem conhecidas como NCEs, as substâncias químicas devem ser aprovadas pelo órgão responsável em liberar o medicamento para a comercialização, o FDA (*Food and Drug Administration*), e este processo entre a

descoberta até a utilização do medicamento pode ser extenso e demorado (NEWMAN & CRAGG, 2015).

Segundo dados do FDA, mais de 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 a 2014 deriva de produtos naturais, podendo estes serem produtos naturais ("N"), derivados semissintéticos de produtos naturais ("NB"), derivados de produtos naturais ("ND") e produtos sintéticos com grupos farmacofóricos, baseados em produtos naturais ("S/NM"). Além destes, os produtos biológicos ("B") e as vacinas ("V") representam atualmente 37% dos medicamentos, e 30% são produtos totalmente sintéticos (FIGURA 1.1) (NEWMAN & CRAGG, 2016).

FIGURA 1.1 - Novas substâncias ativas aprovadas pelo FDA no período de 1981 a 2014 (total = 1562).



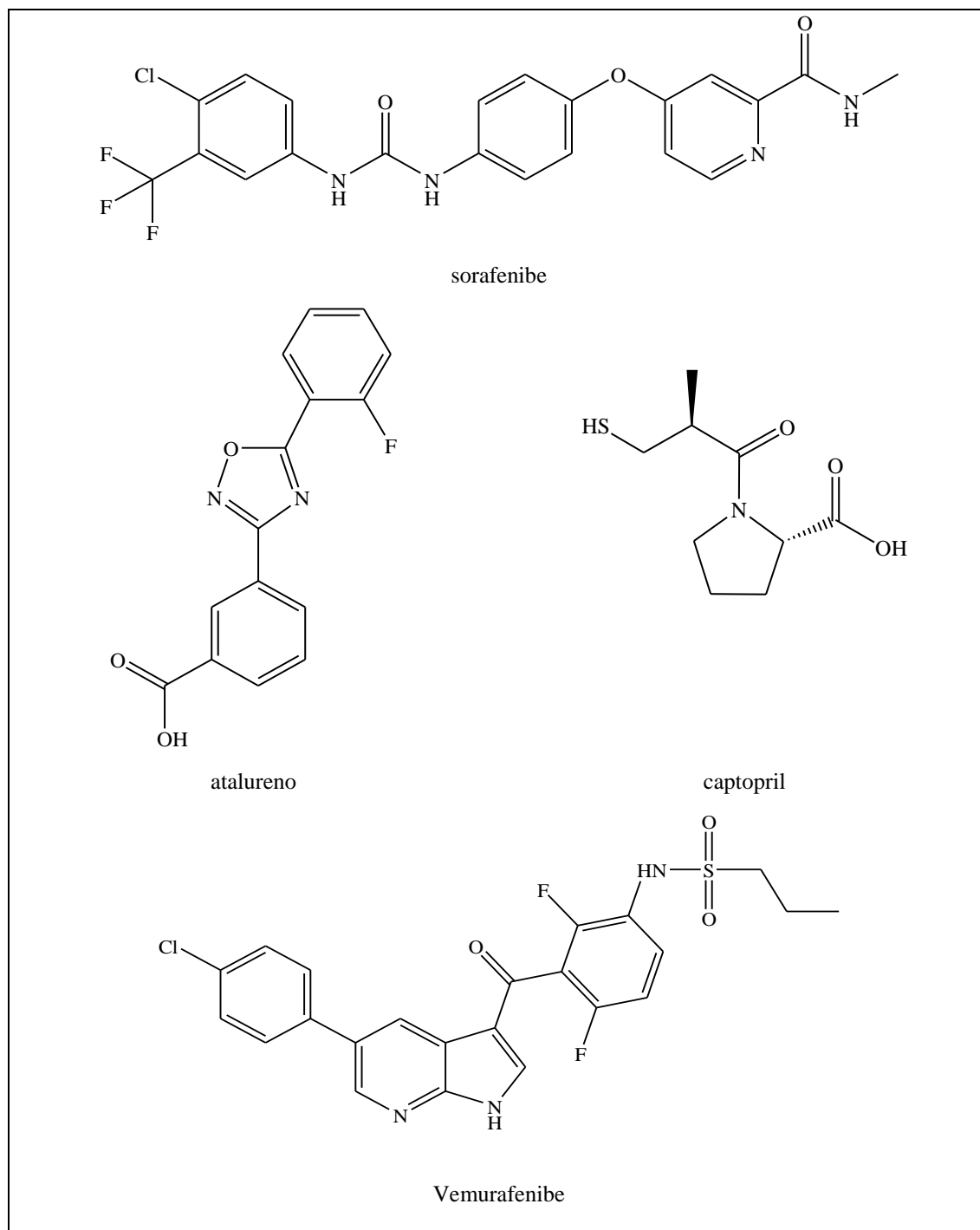
"B": produtos biológicos; "N": produto natural; "NB": derivado semissintéticos de um produto natural; "ND": derivado de um produto natural; "S": totalmente sintético; "S/NM": sintético baseado em um produto natural; "S*/NM": síntese total, mas o farmacóforo assemelha ao produto natural "S*": Feito por síntese total, mas deriva de um produto natural; "V": Vacina.

Fonte: NEWMAN & CRAGG, 2016 (Modificado pela autora)

Na FIGURA 1.2 (p. 3), estão apresentados alguns medicamentos que foram aprovados pelo FDA para serem comercializados entre o ano de 2005 a 2014, com suas respectivas indicações: sorafenibe (Nexavar®) para carcinomas de células renais, epiteliais e câncer de tireoide; vemurafenibe (Zelboraf®) para tratamento de melanoma; atalurenio (Translarna®) para tratamento da distrofia muscular de Duchene e captopril

(Captopril®) anti-hipertensivo (NEWMAN & CRAGG, 2016). Dentre estes, Captopril® é derivado de veneno de cobras, ou seja, seu farmacóforo é um produto natural.

FIGURA 1.2 - Algumas das novas substâncias ativas aprovadas pelo FDA entre 1981 e 2014.



(FONTE: NEWMAN & CRAGG, 2016).

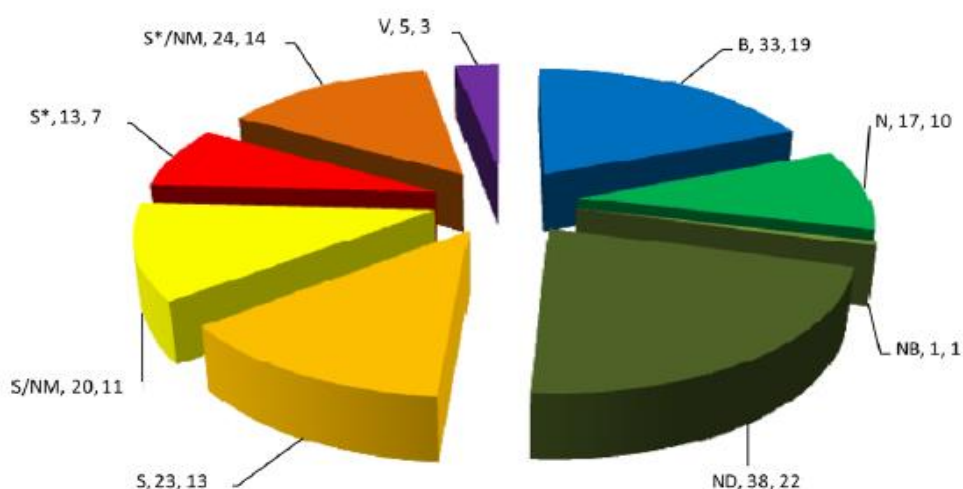
A busca dos compostos bioativos de plantas compreende a obtenção de compostos puros para identificação das estruturas químicas presentes (QUEIROZ *et al.*, 2014). Algumas técnicas analíticas são comumente utilizadas para separação dos constituintes químicos, como: cromatografia em coluna (CC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de Ultravioleta por arranjo de diodos (CLAE:UV-DAD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de Espectrometria de Massas (CLAE-EM), Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de Espectrometria de Massas (CG-EM), e são precedidas por etapas de pré-purificação da amostra (COLLINS *et al.*, 2006; MISHRA & TIWARI, 2011; HIMMELSBACH, 2012).

Além disso, há exigências da legislação brasileira para o registro de um fitoterápico, como dados referentes a padronização das análises realizadas com os extratos. A fim de atender às exigências atuais, as técnicas cromatográficas hífenadas, (CLAE-EM e espectrometria de massas *tandem* (EM/EM), são utilizadas, para identificar a composição química presente na espécie vegetal estudada e identificar substâncias denominadas marcadores da espécie (HIMMELSBACH, 2012). Também conta com técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear - RMN) e (Espectrometria de Massas – EM) para elucidação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários.

Além destas técnicas que buscam compreender a constituição química presente nas espécies de plantas, tem-se o estudo dos compostos orgânicos voláteis (COVs), que são compostos extraídos a partir de técnicas analíticas, como por exemplo Micro-Extração em Fase Sólida (MEFS) e obtenção de óleos essenciais, por hidrodestilação (HD) e arraste a vapor (AV); em que são captados devido capacidade de comunicação entre as espécies via sua aromatização, de algum órgão da planta, (BAKKALI *et al.*, 2008; MOHAMMADHOSSEINI *et al.*, 2016).

Diante a diversidade de compostos químicos que podem ser extraídos das espécies vegetais, o estudo químico de substâncias naturais têm se acentuado ao longo dos anos (NEWMAN & CRAGG, 2015; CRAGG & NEWMAN, 2016). Por exemplo, para o tratamento do câncer, entre 1940 até o final de 2014, de 175 moléculas aprovadas pelo FDA, 85 são produtos naturais ou derivados (FIGURA 1.3).

FIGURA 1.3 - Novas substâncias ativas anticâncer aprovadas pelo FDA no período de 1981 a 2014 (total = 175 substâncias).



"B": agente biológico, isolada de um organismo ou por meios biotecnológicos; "N": produto natural não modificado, sendo semi-/ou totalmente sintético; "NB": produto natural (recentemente aprovado); "ND": derivado de um produto natural; "S": totalmente sintético; "S/NM": sintético baseado em um produto natural; "S*/NM": síntese total, mas o farmacóforo imita produto natural "S*": Feito por síntese total, mas deriva de um produto natural; "V": Vacina.

Fonte: NEWMAN & CRAGG, 2016 (Modificado pela autora)

1.2. CERRADO

O Brasil possui maior biodiversidade do mundo, com 10% do número total de espécies terrestre (COSTA *et al.*, 2012). A biodiversidade é referida diante das categorias biológicas existentes, considerando a abundância e variabilidade de espécies da fauna e flora brasileira, dispersas em seus diferentes habitats (VIEGAS, 2006).

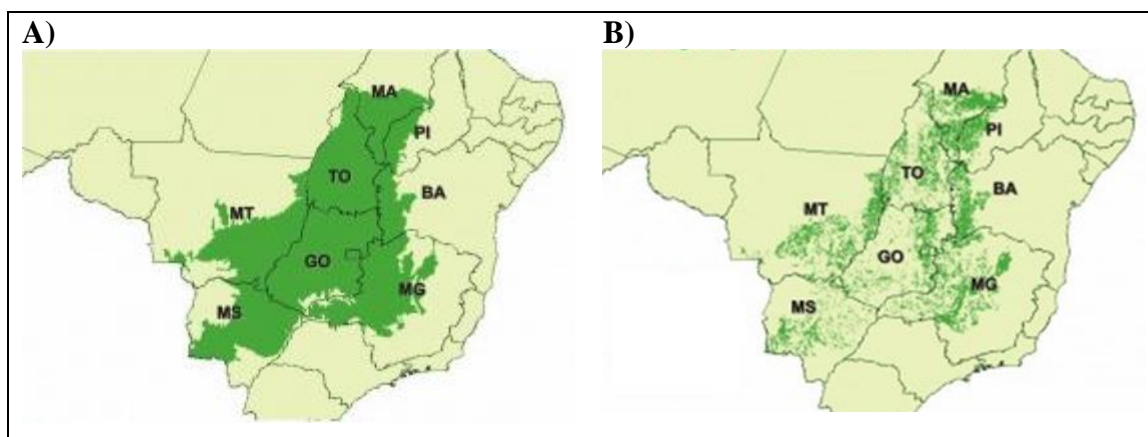
O Bioma é compreendido por escala regional e pelas similaridades de condições de vida, em que espécies faunísticas e florísticas apresentam. O Brasil abriga seis biomas continentais: Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Pampa e Caatinga, sendo o Cerrado caracterizado como o segundo maior bioma na América do Sul, depois da floresta Amazônica (CALIXTO, 2005).

COLLINSON (1988) define o Cerrado, sendo “uma formação tropical com domínio de gramíneas, contendo uma proporção maior ou menor de vegetação lenhosa e árvores associadas”, e caracteriza-se como a maior biodiversidade do mundo, abrangendo espécies diversificadas de flora e fauna (MESQUITA *et al.*, 2009). O

Cerrado situa-se, principalmente, na região Centro-Oeste do Brasil, abrangendo Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Brasília e Tocantins, encontrando-se também nas regiões oeste de Minas Gerais e sul do Maranhão e Piauí, e em áreas isoladas do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas ilhas no Paraná (SANO *et al.*, 2008).

Embora abranja grande parte do território brasileiro e apresente expressiva quantidade de espécies endêmicas, sofre elevada perda de habitat decorrentes do desmatamento para o processo de ocupação de áreas de pastagem ou cultivos, e ocasionando o risco de extinção de diferentes espécies da fauna e flora (FIGURA 1.4). Dentre as espécies da flora deste bioma, muitas são fontes de substâncias químicas importantes para o descobrimento de novos fármacos (CALIXTO, 2005; MIATTO, 2016).

FIGURA 1.4 - Comparação entre a área de distribuição original do Cerrado e área após desmatamento. A) Área de distribuição original do Cerrado; B) Principais áreas remanescentes de vegetação nativa do Cerrado em 2002.



Fonte: ISPN - Instituto Sociedade, População e Natureza

(Disponível em: <http://www.ispn.org.br/arquivos/mapa-desmatamento-cerrado>)

Considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, o Cerrado ocupa 24% do território brasileiro, com aproximadamente 12.000 espécies de plantas, das quais 35% são de áreas savânicas, 30% de florestas, 25% de áreas campestres e 10% ainda possuem poucas publicações sobre a sua origem, pois podem ocorrer em mais de um ambiente (MIATO *et al.*, 2016).

Além dos aspectos ambientais, esse bioma tem grande importância social. Algumas espécies de plantas encontradas no Cerrado possuem metabólitos secundários

com atividade biológica relevantes, entretanto, ainda pouco exploradas do ponto de vista químico e farmacológico (MESQUITA *et al.*, 2009).

1.3. FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE

A família Erythroxylaceae compreende cerca de 250 espécies e abrange 4 gêneros. Têm seus principais centros de diversidade na Venezuela, Madagascar e Brasil, sendo que neste país, foram listadas 25 espécies nativas, cujos habitats variam de floresta a Cerrado e são compostos por árvores, arbustos ou subarbustos (ZANOLARI *et al.*, 2005). Dos quatro gêneros pertencentes a esta família (*Aneulophus* Benth. *Nectaropetalum* Engl., *Pinacopodium* Exell, *Erythroxylum* P. Browne), apenas o *Erythroxylum* tem ocorrência no Brasil (PLOWMAN & HENSOLD, 2004).

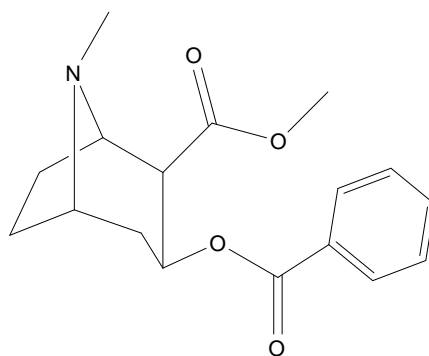
Dentre essa variedade de espécies, muitas ainda não possuem estudo químico, ou possui poucas informações sobre sua bioatividade (BROCK *et al.* (2005). Conforme proposto por AL-Said (1989), o alcaloide tropânico cocaína não é marcador do gênero, encontrado como composto majoritário nas espécies *E. coca* Lam. e *E. novogranatense*.

1.4. O gênero *Erythroxylum* e as espécies estudadas

O gênero *Erythroxylum* é o maior entre os quatro gêneros pertencente da família Erythroxylaceae, que corresponde a 97% das espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo que no Brasil há a ocorrência de 130 espécies em ambientes florestais e de Cerrado (PLOWMAN & HENSOLD, 2004; BIERI *et al.*, 2006). Na TABELA 1.1 (p. 8), estão dispostas informações sobre atividade biológica de algumas espécies do gênero.

O interesse por estudos de espécies do gênero *Erythroxylum* se acentuou no século XIX, pois em 1855 ocorreu isolamento de uma substância alcaloídica do tipo tropano, derivado das folhas da espécie *E. coca* Lam e que ficou conhecida como cocaína (FIGURA 1.5) (JOHNSON, 1996; MI *et al.*, 2002).

FIGURA 1.5 - Estrutura química da cocaína.



As folhas da espécie *E. coca* eram utilizadas como anestésico local em pequenas cirurgias, por grupos indígenas na América do Sul, assim como outras espécies deste gênero são conhecidas pelo seu uso medicinal (BOHN *et al.*, 1982; ZUANAZZI *et al.*, 2001). Entretanto, a cocaína ganhou notoriedade, tornando um problema de saúde pública e atualmente é conhecida como droga ilícita, causando dependência aos seus usuários (ALAGILE *et al.*, 2005).

TABELA 1.1 - Informações quanto a utilização e algumas atividades biológicas de espécies do gênero *Erythroxylum*.

ESPÉCIES	UTILIZAÇÃO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS	REFERÊNCIAS
<i>E. suberosum</i>	abortivo	antibacteriana, antifúngica, anti-hipertensivo citotóxico	BARBOSA & AMARAL, 2001; FILHO, 2010; LEITE <i>et al.</i> , 2014; MACEDO <i>et al.</i> , 2016
<i>E. vacciniifolium</i>	afrodisíaca, conhecida como catuaba	anti-HIV, analgésico, anti-inflamatório	MANABE <i>et al.</i> , 1992; ZANOLARI <i>et al.</i> , 2003; CHAVEZ <i>et al.</i> , 1988;
<i>E. pervillei</i>	folclórica (veneno de peixe), dores abdominais e tumores	citotóxica frente às células KB-V1	SILVIA <i>et al.</i> , 2001; MI <i>et al.</i> , 2002;
<i>E. moonii</i>	supuração de furúnculos e abscessos	antimicrobiana (bactérias, fungos e leveduras)	RAHMAN <i>et al.</i> , 1998;
<i>E. argentinum</i>	tratamento de sinusite, estômago e gripe	analgésico; anti-inflamatória	CHAVEZ <i>et al.</i> , 1996.

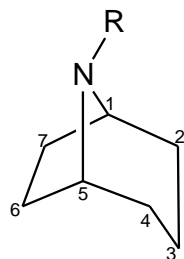
O gênero é conhecido pela ocorrência de metabólitos secundários das classes dos alcaloides (do tipo tropano), flavonoides, esteroides e terpenos (diterpenos, triterpenos),

variando as subclasses e a presença das substâncias químicas majoritárias (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2013)

Alcaloides do tipo tropano (FIGURA 1.6) são considerados metabólitos secundários de grande interesse, uma vez que apresentam propriedades farmacológicas relevantes, como: anti-hipertensivo, antimalárico, antitumoral, hipnoanalgésico, antioxidante, entre outros (CHAVEZ *et al.*, 1988; AGUIAR *et al.*, 2012). Já são conhecidos mais de 200 representantes desta classe, sendo alguns isolados de espécies das famílias Convolvulaceae, Dioscoreaceae, Erythroxylaceae, Solanaceae, Proteaceae e Rhizophoraceae (BROCK, 2005). Entretanto, ainda há poucos relatos de substâncias alcaloídicas do gênero *Erythroxylum* quando comparados aos de outras classes (BIERI *et al.*, 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2010) e os que são encontrados são baseados em extrações ácido-base (ZUANNAZZI, *et al.* 2001) (FIGURA 1.8).

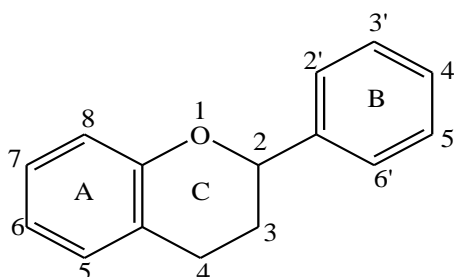
B

FIGURA 1.6 - Estrutura do esqueleto de um alcaloide tropano.



Os flavonoides são compostos encontrados em diversas espécies vegetais, possuindo 15 átomos de carbono em sua estrutura química geral, dois anéis aromáticos, (anel A e B) ligados por um anel heterocíclico (anel C) (FIGURA 1.7).

FIGURA 1.7 - Estrutura do esqueleto de um flavonoide.



Suas subclasses são definidas como flavonas, flavonois, isoflavonas, flavanonas, xalconas, diidroflavonois, e podem conter unidades glicosídeas ligadas aos anéis

(DEWICK, 2002). Esta classe é conhecida pelas atividades biológicas, sendo também considerada marcador de diversas espécies do gênero *Erythroxylum* (FIGURA 1.9, p. 12). Dentre suas diferentes classificações, há relatos da presença da classe flavonas e flavonois para o gênero, com ou sem a presença de unidades glicosídeas (BOHN *et al.*, 1982; INIGO & POMILIO, 1985; BONEFELD *et al.*, 1986; BOHN *et al.*, 1988; JOHNSON *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006; CÓRDOVA *et al.*, 2012). Além destas características mencionadas, na classe dos flavonoides são observadas absorções na região do ultravioleta-visível, com transições $\pi \rightarrow \pi^*$, que ocorrem a partir da ressonância entre as ligações duplas dos anéis e a conjugação entre a carbonila e os anéis aromáticos, formando duas bandas e que podem variar de acordo com as subclasses, assim conforme apresentado na TABELA 1.2 (MABRY; MARKHAM & THOMAS, 1970).

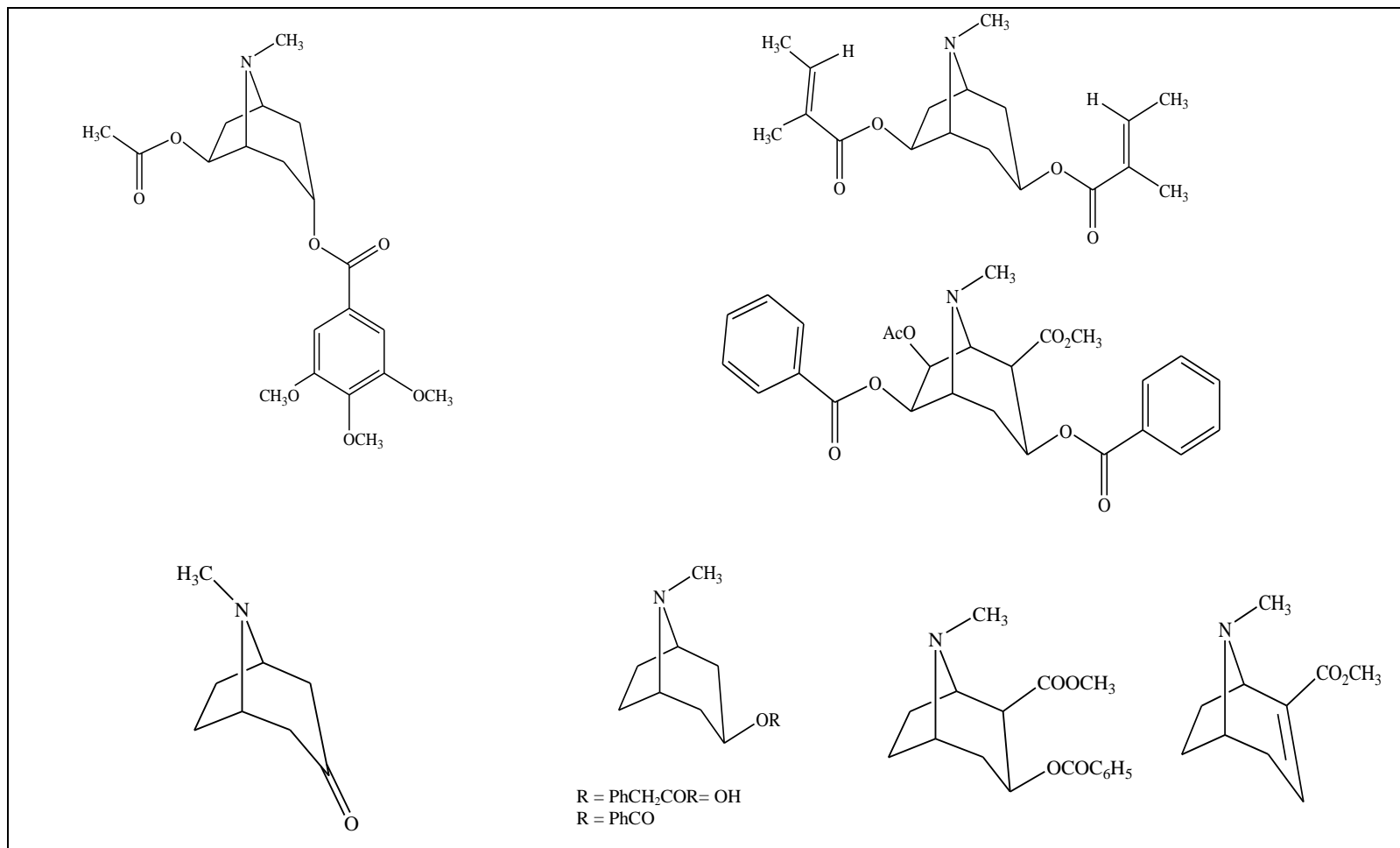
TABELA 1.2 - Bandas de absorção no UV de subclasses de flavonoides.

BANDA II (nm)	BANDA I (nm)	TIPO DE FLAVONÓIDE
250-280	310-350	Flavona
250-280	330-360	Flavonois (3-OH substituído)
250-280	350-385	Flavonois (3-OH livre)
245-275	310-330	Isoflavonas
275-295	300-330	Flavanonas e dihidroflavonois

(Fonte: MABRY; MARKHAM & THOMAS, 1970).

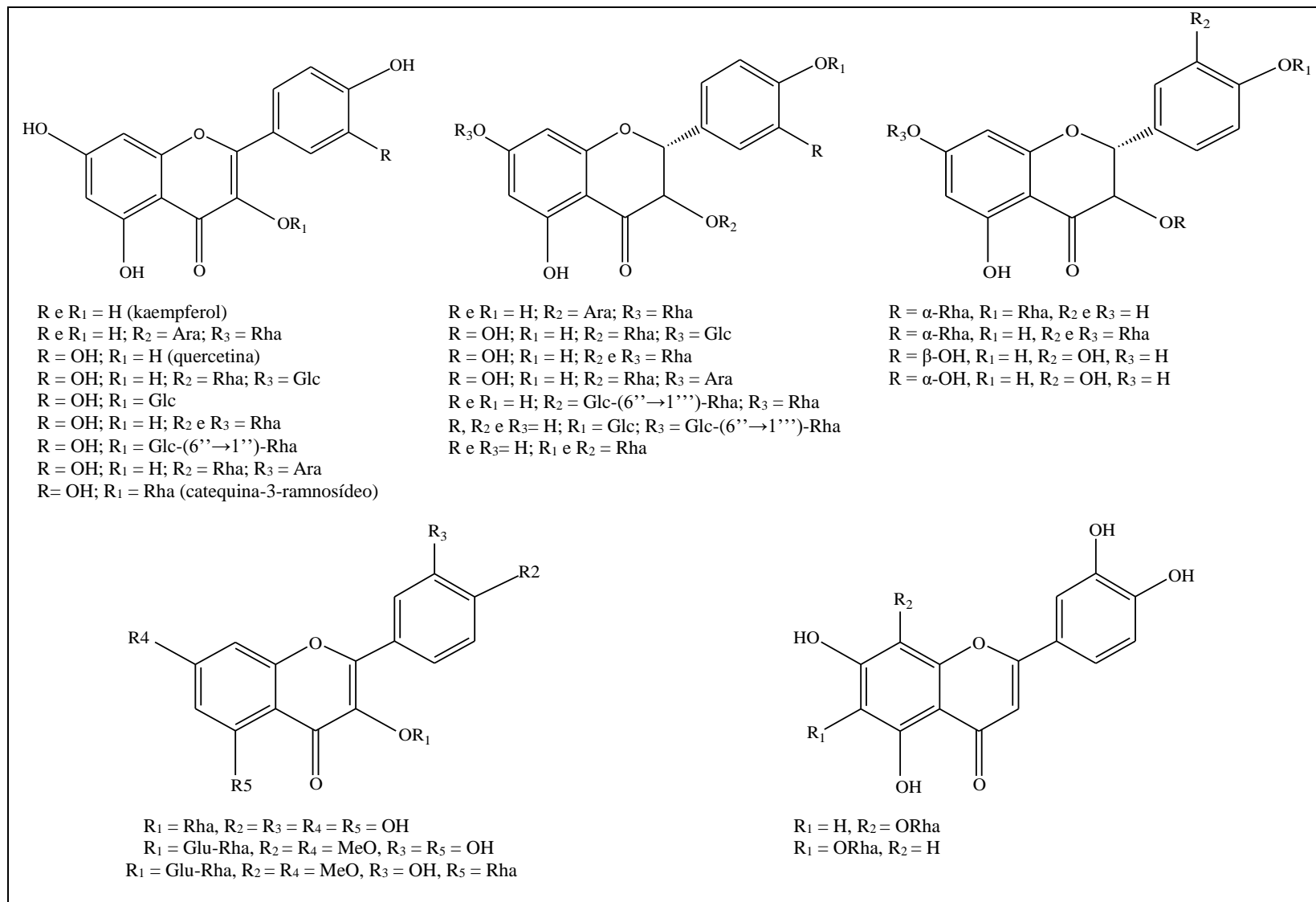
Os terpenoides estão presentes na maioria das famílias, sendo caracterizados como um grupo abrangente de metabólitos secundários e com diferentes subclasses (DEWICK, 2002). Dentre estas, os triterpenoides possuem 30 átomos de carbono, sendo uma subclasse comum isolada de espécies de *Erythroxylum* (FIGURA 1.10, p. 13) (BARREIROS *et al.*, 2002; BARREIROS *et al.*, 2005; CHAVEZ *et al.*, 1995).

FIGURA 1.8 - Alcaloides isolados de folhas de espécies do gênero *Erythroxylum*.



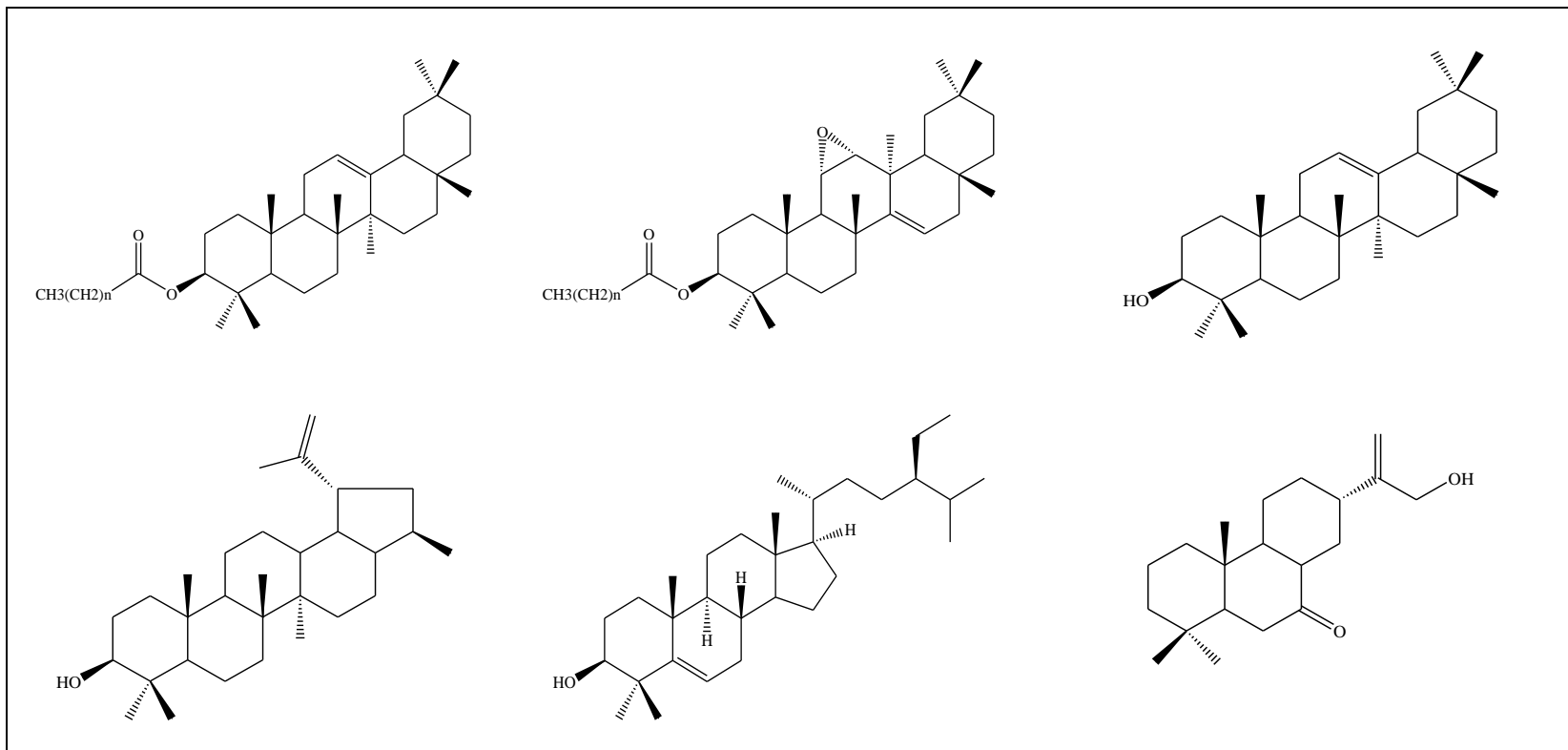
REFERÊNCIAS: RIVIER, 1981; PLOWMAN & RIVIER, 1983; BRACHET *et al.* 1986; AL-SAID *et al.* 1989; JOHNSON, 1996; SILVIA *et al.*, 2001; ZUANAZZI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013.

FIGURA 1.9 - Flavonoides isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*.



REFERÊNCIAS: HEGNAUER, 1981; INIGO, 1985; BOHN, 1988; JOHNSON, 1998; CHÁVEZ, 1996; JOHNSON, 2002; SANTOS, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2013.

FIGURA 1.10- Terpenoides isolados de folhas de espécies do gênero *Erythroxylum*.



REFERÊNCIAS: BARREIROS *et al.*, 2002; BARREIROS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013.

O interesse pelas espécies de *Erythroxylum* se acentuaram a partir dos relatos do uso medicinal e da atividade biológica relatada para o gênero (NASCIMENTO *et al.*, 2012; WET *et al.*, 2012). Além das atividades biológicas citadas na TABELA 1.1 (p. 8), há relatos de investigações com potenciais antimicrobiano, antiproliferativo para *E. caatingae* (AGUIAR *et al.*, 2012); anti-inflamatório para *E. argentinum*: (CHAVEZ *et al.*, 1988), antioxidante para as espécies *E. deciduum* (NASCIMENTO, MENEZES & LACERDA, 2013), *E. alaternifolium* (AGUIAR *et al.*, 2012) e *E. suberosum* (CÓRDOVA, 2012); antitumoral e citotóxico para *E. deciduum* (NASCIMENTO, MENEZES & LACERDA, 2013) e *E. suberosum* (MACEDO *et al.* 2016); inibição da enzima conversora de angiotensina para *E. gonocladum* (FILHO *et al.*, 2010); modulador do fenótipo de resistência múltipla para os extratos de *E. pervillei* (SILVA *et al.*, 2001); além de efeito frente a infecção microbiana e de HIV dos extratos de *E. catuaba* (MANABE *et al.*, 1992).

Foram selecionadas para o estudo químico as espécies *E. deciduum*, *E. suberosum*, *E. campestre* e *E. tortuosum* (FIGURA 1.11), podendo as mesmas serem encontradas em todos os gradientes de cerrado, desde cerradão até campo limpo, sendo mais comum em cerrado aberto nos estados da região centro-oeste (HEGNAUER, 1981).

FIGURA 1.11 - Espécies estudadas do gênero *Erythroxylum* (A) *E. deciduum* (B) *E. campestre*, (C) *E. tortuosum* e (D) *E. suberosum* coletadas na fazenda da UFG - Regional Catalão.



(Fonte: Própria da autora)

E. deciduum A. St.-Hil. Pl, popularmente conhecida como ata-de-cobra, guajujura, baga de pompa, fruta de pomba, cocão e concon, exibe distribuição nos países Peru, Paraguai, Bolívia, Argentina e Brasil. Sua ocorrência vai desde a região Nordeste (Piauí, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), em matas, matas ciliares, capões e capoeiras próximas aos cursos d'água, cerradões e áreas

descaracterizadas (MENDONÇA & AMARAL-JÚNIOR, 2002). Como aspecto físico pode ser destacado árvore de grande porte, que pode atingir a altura de até 8 metros com casca do caule grossa, ou ser subarbusciva, o que varia de sua regionalidade (BARBOSA & AMARAL, 2001). Exibe poucos relatos na literatura sobre isolamento de metabólitos secundários, entretanto a ingestão de frutos desta espécie ocasionou a toxicidade em ovinos (COLODEL *et al.*, 2004).

E. suberosum A. St.-Hil. Pl, é conhecida como azogue-do-campo, cabelo-de-negro, fruta-de-pomba, galinha-choca, jacaré-do-campo, mercúrio-do-campo, sessenta-e-dois e pode ser encontrada nos países Guiana Francesa, Venezuela, Bolívia, Paraguai e no Brasil, nas regiões Norte (Acre, Amazonas e Amapá), Nordeste (Maranhão, Ceará, Pernambuco, Alagoas, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná), com as espécies dispostas em áreas abertas no cerrado. Sua casca é utilizada para curtume; fornece matéria tintorial castanho-avermelhada e seus frutos são conhecidos por evitar o choco das galinhas (MENDONÇA & AMARAL, 2002).

E. campestre A. St.-Hil. Pl, conhecida como cabelo-de-negro, fruta-de-tucano. Encontrada no Nordeste (Bahia, Ceará e Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná), sendo mais encontrada em campo cerrado (LOIOLA, 2001). Espécie subarbusciva, frequentemente forma agrupamentos densos, sendo a raiz e casca utilizadas como purgativas (MENDONÇA & AMARAL, 2002).

E. tortuosum Mart. Beitr é conhecida popularmente por ruta-de-pombo, moxiba-comprida, e mercúrio-do-campo, tanto pelo aspecto ferrugíneo do caule quando descascado como pela coloração avermelhada de seus frutos, é uma planta arbustiva-arbórea típica dos cerrados, com pouca informação na literatura sobre os organismos ocorrentes e também sobre as substâncias que podem ser encontradas a partir de sua espécie. Encontrada nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, em regiões de cerrado. A casca adstringente tem aplicações na indústria pois fornece matéria tintorial vermelha (MENDONÇA & AMARAL, 2002).

Como exemplos de uso popular de infusos, das raízes de *E. campestre* e *E. tortuosum* vêm sendo utilizado como laxante e da casca do caule de *E. tortuosum* como adstringente no caso de hemorragias (MENDONÇA & AMARAL-JÚNIOR, 2002).

1.5. PERFIL METABOLÔMICO

O perfil metabolômico é caracterizado por realizar análise química rápida de várias amostras, permitindo a classificação ou comparação de análises de substâncias que podem ter sido responsáveis por contaminação de um alimento ou medicamento. É conhecido por utilizar técnicas hífenadas, como Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência (CLUE-EM), CG-EM, além de técnicas como RMN e infusão direta por EM. A análise por *fingerprinting* em produtos naturais, auxilia na identificação das classes de compostos que são considerados minoritários, facilitando a classificação dos compostos presentes (KATJA-DETTMER, ARONOV & HAMMOCK, 2007).

1.6. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs)

A maioria das plantas, são conhecidas por serem fontes de metabólitos e compostos orgânicos voláteis (COVs), sendo reconhecidos por seus diferentes benefícios para a sociedade (MOHAMMADHOSSEINI *et al.*, 2017). Os COVs são acumulados biossintetizados por vários órgãos das plantas, como caules, flores, folhas, frutos, raízes e sementes, e são emitidos como agentes de partir da comunicação com outras espécies, sendo estas vegetais, animais ou com outros organismos (CÁCERES *et al.*, 2015).

A notoriedade do crescente interesse nos COVs deve a sua ampla utilização em indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, perfumaria, aromaterapia, pesticidas, repelentes, produtos de uso doméstico, e também ao destaque da atividade farmacológica das substâncias químicas lábeis que os representam (BAKKALI *et al.*, 2008).

A composição dos COVs é derivada de substâncias que são originadas de vias biossintéticas dos metabólitos secundários das plantas, os quais se caracterizam por possuir estruturas complexas, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e, diferente dos metabólitos primários, se apresentam em baixas concentrações. É válido considerar a influência de fatores externos na sua composição química como: genéticos, ambientais (umidade, exposição ao sol, temperatura), disponibilidade de água e nutrientes e as interações que as espécies vegetais possuem com animais e microrganismos, conforme proposto por GOBBO-NETO & LOPES (2007).

Para separação e identificação dos COVs é comumente utilizada a técnica hífenada CG-EM, sendo precedidas pela extração, além da comparação de espectros (ADAMS, 2001). Os COVs podem ser extraídos através de diferentes métodos, entre eles: *Soxhlet*, maceração com

solvente, com fluido supercrítico (EFSC), microextração em fase sólida (MEFS, SPME, sigla em inglês), micro-ondas (MD) e métodos de destilação, como: hidrodestilação (HD), destilação a vapor (DV) e destilação à vácuo (ZHU *et al.*, 2013).

A HD vem sendo utilizada há anos, considerada como referência para extração de OE em uso laboratorial e industrial. Em extrações em escalas laboratoriais, é comumente utilizado aparelho do tipo Clevenger modificado (MOHAMMADHOSSEINI, SARKER & AKBARZADEH, 2017). O funcionamento da HD ocorre pela imersão do material vegetal em água, dispostos em um balão, que possui temperatura controlada por uma manta aquecedora, e conectado ao aparelho de Clevenger. Ao entrar em ebulição, os vapores de água e os voláteis são extraídos em direção a outro recipiente, e os OE ficam concentrados sobre a camada de água, sendo separados por extração líquido-líquido com o uso de um solvente orgânico (AUGUSTO, LOPES & ZINI, 2003).

Constituídos por uma mistura de hidrocarbonetos saturados e insaturados, álcool, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, óxidos, fenóis e terpenos, os OE vêm sendo destacados devido sua ampla utilização, em processos espirituais e terapêuticos, indústrias alimentícias e de cosméticos, além das propriedades medicinais que alguns apresentam, como: bactericida, fungicida, antimicrobiana, analgésica, sedativa, anti-inflamatória e anestésica; são usados também na preservação de alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008). Na TABELA 1.3 (p. 19), encontram-se apresentados COVs isolados, de diferentes espécies vegetais e suas aplicações biológicas segundo adaptações de Armola *et al.* (2009).

Em consonância a reportada atividade biológica para os OEs de plantas, a utilização de técnicas rápidas para identificação química dos COVs, assim como a técnica MEFS, em que é realizada o preparo de amostra para extração dos compostos voláteis, não utilizando solvente e consistindo em extrair e concentrar (em uma etapa) por um sistema composto de *headspace* (espaço em que acondiciona a amostra em sistema fechado) e uma fibra (sílica fundida recoberta por polímero e/ou outro material) (ALPENDURA, 2000).

A fibra de SPME possui extremidade (10-20 mm), sendo conectada a uma agulha oca e recoberta por um filme (7-100 µm), o qual possui especificação relacionada à coloração da fibra (TABELA 1.4, p. 20). Além disso, é necessário o condicionamento da mesma, antes da sua utilização. O filme é exposto sobre a amostra, aguardando o equilíbrio de extração, e após adsorver os analitos orgânicos na sua superfície é recolhida, conectando a fibra ao amostrador (*holder*). As substâncias adsorvidas são analisadas no CG-EM inserindo a fibra no injetor, ocorrendo a dessorção (PAWLISZYN *et al.*, 1999).

TABELA 1.3 - Utilização de óleos essenciais, extraídos de espécies comuns e suas aplicações terapêuticas.

ESPÉCIE (nome popular)	PARTE DA PLANTA	CLASSE DE COMPOSTOS QUÍMICOS	APLICAÇÃO TERAPÊUTICA*
<i>Lavandula angustifolia</i> (flor de lavanda)	Flores	linalol, acetato de linalilo, lavandulol, acetato de lavandulilo, cânfora	analgésico, antibacteriano, antifúngico, antidepressivo
<i>Citrus sinensis</i> (laranja selvagem)	frutos (cascas)	tetraterpenos, aldeídos, cetonas, monoterpenos, álcool	antisséptico, antimicrobiano, antiplasmídeo
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	tronco (cascas)	aldeídos, fenois, álcoois, sesquiterpenos, ácido carboxílico	adstringente, germicida, antibacteriano, antifúngico, antimicrobiano
<i>Eugenia caryophyllata</i> (óleo de cravo)	broto (fruto)	fenois, ésteres, sesquiterpenos, óxidos	antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatório
<i>Eucalyptus radiata</i> (eucalipto)	Folhas	monoterpenos, aldeídos óxidos, álcoois	anestésico, antisséptico
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	flores e folhas	óxidos, monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, cetonas	antimicrobiano, antifúngico

*NOTA: Adaptação extraída do artigo “Essential Oils Following Traumatic Burn Injury: A Case Study”, de JOPKE, SANDERS & WHITE-TRAUT, publicado em *Journal of Pediatric Nursing*, v. 34, 72-77, 2017. Foi apresentada por ARMOLA, BOURGAULT, HALM *et al.* em “AACN levels of evidence: What's new?”, *Critical Care Nurse*, n. 29, v. 4, p. 70-73, 2009, onde estão dispostas as referências utilizadas.

TABELA 1.4 - Especificações das fibras utilizadas, segundo o fabricante Supleco, Bellefonte, PA.

NOME DA FIBRA	SIGLA	Df/ μm	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)*	CONDICIONAMENTO	COR	APLICAÇÃO TÍPICA
polidimetilsiloxano	PDMS	100	200-270	250 $^{\circ}\text{C}$ por 0,5 h	vermelha	apolar, volátil
poliacrilato	PA	85	220-310	280 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h	branca	polar, uso geral
carboxen/ polidimetilsiloxano**	CAR/PDMS	75	240-300	300 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h	preta	semipolar, volátil, gasosos, análise de traços
polidimetilsiloxano / divinilbenzeno**	PDMS/ DVB	65	200-270	270 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h	azul	polar
divinilbenzeno/ carboxen/ polidimetilsiloxano	DVB/CAR/ PDMS	50/30	----	250 $^{\circ}\text{C}$ por 0,5 h	cinza	ampla faixa de polaridade (C_3 a C_{20})

* ΔT : faixa e temperatura indicada para dessorção; ** mecanismo de extração predominante: adsorção.

Em relação a outras metodologias, a SPME exhibe vantagens em relação aos métodos convencionais, tratando-se de uma técnica de extração rápida, sensível e de baixo custo (PAWLISZYN, 2000; KARAMI-OSBOO, MIRI & JASSIB, 2015; SPIETELUN *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o perfil químico de quatro espécies do gênero *Erythroxylum* (Erythroxylaceae), assim como realizar o estudo químico do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum*.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o perfil químico dos extratos das folhas de *E. tortuosum*, *E. campestre*, *E. suberosum*, *E. deciduum*, a fim de traçar a identidade dos metabólitos secundários presentes nas espécies;
- Realizar o estudo químico do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum*, identificação e caracterização de metabólitos secundários;
- Realizar o estudo da composição química dos voláteis das folhas, de *E. deciduum* através das técnicas de hidrodestilação e SPME;
- Submeter os extratos obtidos à avaliação do potencial biológico frente a teste citotóxico com células tumorais 4T1 e HeLA (saudáveis humanas).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS

3.1.1 - Reagentes

- Reveladores:
 - Solução ácida de vanilina, preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvida em solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado;
 - Solução de Dragendorff, preparada a partir de 1 mL de solução estoque do reagente subnitrato de bismuto (BiONO_3) com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada;
 - Solução de cloreto férrico (FeCl_3), preparada a partir da dissolução de 1 g de cloreto férrico em 100 mL de água destilada;
 - Solução de iodocloroplatinado preparado a partir da mistura da solução A, B e água destilada, na proporção 1:9:10. Solução A: solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV); Solução B: solução aquosa a 10% (m/m), de iodeto de potássio.

3.1.2 - Solventes

- Solventes grau P.A. (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol, etanol,), de diversas marcas;
- Solventes grau CLAE (ácido fórmico, hexano, acetona, metanol, diclorometano, água e acetonitrila), marcas Panreac, Tedia J. T. Baker e Sigma-Aldrich;
- Solventes deuterados para a obtenção dos espectros de RMN: clorofórmio, metanol, acetona, água e DMSO, marcas Sigma-Aldrich, Merck, Across e Deutero.

3.1.3 - Fases Estacionárias

- Cromatografia em coluna aberta (CC): *Sephadex* LH-20 (Amershan Pharmacia Biotech); Sílica gel 60 (230-400 *mesh*) e Sílica gel 60 (70-230 *mesh*), ambas da marca Macherey-Nagel;

- Cromatografia em camada delgada (CCD): Sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F254 nm) ($\Phi = 0,2$ mm), em folhas de alumínio da Marca Fluka e Macherey-Nagel;
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP): Cromatoplaça DC-Fertigplatten ADAMANT UV₂₅₄, sílica gel 60 - 0,25mm (20×10 cm) com fluorescência em UV₂₅₄, marca Macherey-Nagel;
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): colunas Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 150×4,6 mm); Coluna empacotada no laboratório SEPARARE - UFSCar com fase Phenomenex Fenil-Hexil - Luna (10 μ m, 250×70 cm);
- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM): coluna HP-5 MS - Agilent (5% fenil - 95% metilpolisiloxano (30 m×0,250 μ m×0,25 μ m)).

3.1.4 - Equipamentos

- Balança analítica: OHAUS AR2140;
- Estufa de secagem: Nova Ética 220W;
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm, marca Spectroline, modelo CM-26 UV;
- Evaporador rotativo: Marca Fisatom, modelo 801, com banho de aquecimento redondo Fisatom, modelo 550 e bomba de hidrovácuo da marca VACUUBRAND + GO KG, modelo ME-1C.
- SpeedVac; Marca Thermo Scientific, com centrífuga modelo SC110/SC110A/SC210A acoplada a refrigerador modelo RVT5105;
- Homogeneizador dispersor Ultra-turrax: IKA ULTRA-TURRAX, modelo T18 digital;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE): sistema analítico da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor manual e software *EZChrom Edition*;
- Cromatógrafo à Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) com ionização por elétrons (70 eV) marca Agilent, modelo 7820 A - Series MSD 5975, e amostrador automático;
- Espectrômetro de massas: MicroTOF III (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Brucker Daltonics,

Bremen, Germany). Experimentos realizados em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP;

- Ressonância Magnética Nuclear (RMN):
 - Equipamento da marca Bruker, modelo Avance III HD (9,2 TESLA) operando em frequência de 400 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C . Experimentos realizados em colaboração com o Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG;
 - Equipamento da marca Bruker, modelo Avance III - 11,7 Tesla (500 MHz para ^1H). Experimentos realizados em colaboração com o Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

3.1.5 - Micro extração em fase sólida (SPME)

- Fibras PDMS (100 μm), PA (85 μm), CAR/PDMS (75 μm), DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) e PDMS/ DVB (65 μm) da marca Supelco;
- Holder (suporte manual de fibra SPME) da marca Supelco;
- Vials para *headspace* (20 mL) da marca Agilent;
- Padrões: mistura de hidrocarbonetos alifáticos, com n-alcenos de C₅-C₃₆ da marca Supelco.

3.2 - METODOLOGIA

3.2.1 - Coleta do material vegetal

As coletas foram realizadas nas dependências da fazenda da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, sob a Autorização CNPq nº 010698/2013-2, armazenando os 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. Foram realizadas duas coletas, sendo estas nos dias 05 de dezembro de 2016 e 25 de março de 2017.

3.2.2 - Estudo dos compostos voláteis (COVs)

3.2.2.1 - Extração do óleo essencial de *E. deciduum* por hidrodestilação (HD)

Após coleta das folhas frescas de *E. deciduum* (25 de março de 2017), o material vegetal foi cortado em pequenas partes e submetido à hidrodestilação por 4 horas, utilizando um aparelho de Clevenger adaptado. O procedimento foi efetuado em triplicata, empregando alíquotas de 80 g de folhas fresca em cada uma das extrações. Posteriormente foi feita a extração líquido-líquido dos hidrolatos utilizando diclorometano (3×40 mL) e o solvente foi evaporado em capela sob temperatura ambiente. Os óleos essenciais (OE) obtidos foram armazenados em congelador (-20 °C) até análise em CG-EM.

3.2.2.2 - Extração dos compostos voláteis das folhas de *E. deciduum* por micro extração em fase sólida (MEFS)

As folhas de *E. deciduum* foram coletadas às 09h (25 de março de 2017) na fazenda da UFG – Regional Catalão, armazenadas em caixa de isopor para transporte e submetidas rapidamente às extrações dos COVs no LABIOrg da UFG/RC. Foi inserida uma folha intacta dentro de cada *vial* (tipo *headspace*) que foi lacrado imediatamente, permanecendo em repouso por 15 minutos para conceber equilíbrio dentro dos *vials*. Posteriormente, as fibras foram expostas ao *headspace* (sem encostar nas folhas) sob temperatura ambiente, variando de 27,5 a 29,0 °C, durante 60 minutos. Após a exposição, as fibras foram recolhidas e reservadas em tubos de ensaio vedados e mantidos sob resfriamento até a análise por CG-EM. Foram utilizadas fibras PA, PDMS, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB, sendo todos os experimentos foram realizados em triplicata a fim de obter diferentes condições de extrações e assim identificar COVs distintos.

3.2.2.3 - Identificação dos COVs

Os COVs obtidos por hidrodestilação e por HS-MEFS, foram analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrometria de Massas utilizando os seguintes parâmetros: gradiente de temperatura: 60 °C/4 min, 5 °C/min até 300 °C, com tempo total de análise 57 minutos. Foi utilizado hélio como gás de arraste (1 mL/min), no modo *split* (razão 1:10), volume de injeção de 1 µL e no modo *scan* (45-450 u.m.a.). Os parâmetros de

temperaturas foram: 250 °C para o injetor, 280 °C para a interface, 230 °C para a fonte de ionização e 150 °C para o quadrupolo. A análise dos dados foi realizada a partir do *software* Origin versão 8.6.

A identificação dos compostos presentes no OE e nas fibras foi realizada através do cálculo do índice de retenção de *Kovats* (*IK*), e comparação dos seus respectivos espectros de massas da literatura, dos padrões comerciais e com os dados da biblioteca *NIST/EPA/NIH*, *software* disponível no equipamento CG-EM. O *IK* foi calculado por meio da relação dos tempos de retenção (t_R) de uma série de *n*-alcanos (C₈-C₃₆) com os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas, utilizando o *software RetenSoft*, desenvolvido por Péricles Alves Barreto e Rubens de Souza Matos Júnior, em 2008, baseado na fórmula desenvolvida para este tipo de relação matemática (ADAMS, 2007).

3.2.3 - Estudo dos constituintes químicos não-voláteis

3.2.3.1 - Preparação dos extratos etanólicos de *Erythroxylum*

As espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. campestre*, *E. deciduum*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*) foram coletadas no dia 6 de outubro de 2015 conforme detalhamento descrito anteriormente (item 3.2.1). As folhas coletadas foram secas na estufa (T = 50 °C), moídas, pesadas e submetidas à extrações com: homogeneizador dispersor ultra turrax e maceração.

Os extratos das folhas das quatro espécies de *Erythroxylum* foram preparados utilizando homogeneizador dispersor do tipo ultra turrax, nas condições 8 RPM por 5 minutos, a partir de alíquotas de 10 g do material vegetal (seco e moído) e 150 mL de solvente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, sucessivamente). As extrações foram realizadas três vezes e após cada extração, o material foi filtrado e o solvente foi destilado em evaporador rotativo à baixa pressão, obtendo 16 extratos (quatro extratos para cada espécie). Além disso, também foi preparado o extrato etanólico de *E. deciduum* utilizando as mesmas condições.

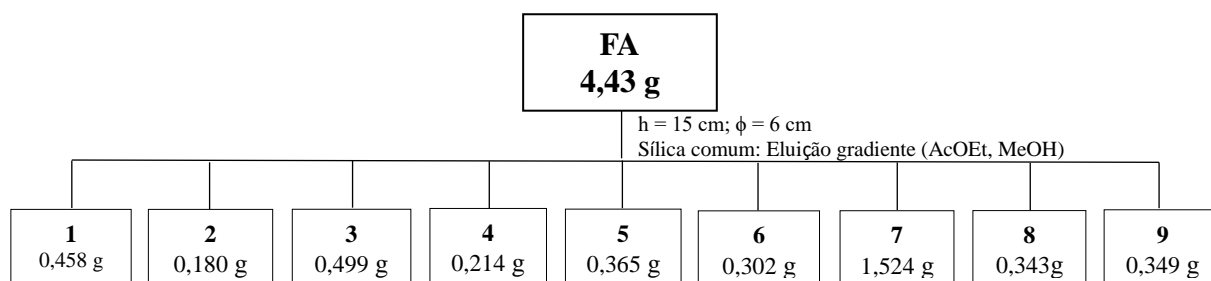
O extrato etanólico das folhas *E. deciduum* (EEF) foi preparado utilizando 200 g de folhas e 450 mL de solvente, realizando extrações a cada três dias, a temperatura ambiente, sendo o procedimento repetido por três vezes. Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à baixa pressão. Em seguida, 15 g do EEF foi solubilizado em 300 mL de MeOH/H₂O (3:7) e submetido a extração líquido-líquido, utilizando 200 mL de solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano e acetato de

etila, sucessivamente), em triplicata. Os solventes foram destilados, obtendo as frações: hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e metanol/água (FM), as quais foram analisadas por CCD e CLAE-DAD, de onde foi possível selecionar FA para o fracionamento cromatográfico (ANEXO I).

3.2.3.2 - Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (FA)

A fração FA (4,43 g) foi submetida a cromatografia em coluna (CC) ($\phi = 6,0$ cm, $h = 15$ cm), utilizando sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e eluição gradiente em ordem crescente de polaridade utilizando AcOEt até 100 % de MeOH. O AcOEt utilizado foi saturado com água destilada via extração líquido-líquido. Foram obtidas 9 frações (FLUXOGRAMA 3.1), que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), reveladas sob inspeção em câmara de UV (254 e 365 nm), solução ácida de vanilina ou revelador de *Dragendorff*.

FLUXOGRAMA 3.1 - Fracionamento da fração acetato de etila (FA).

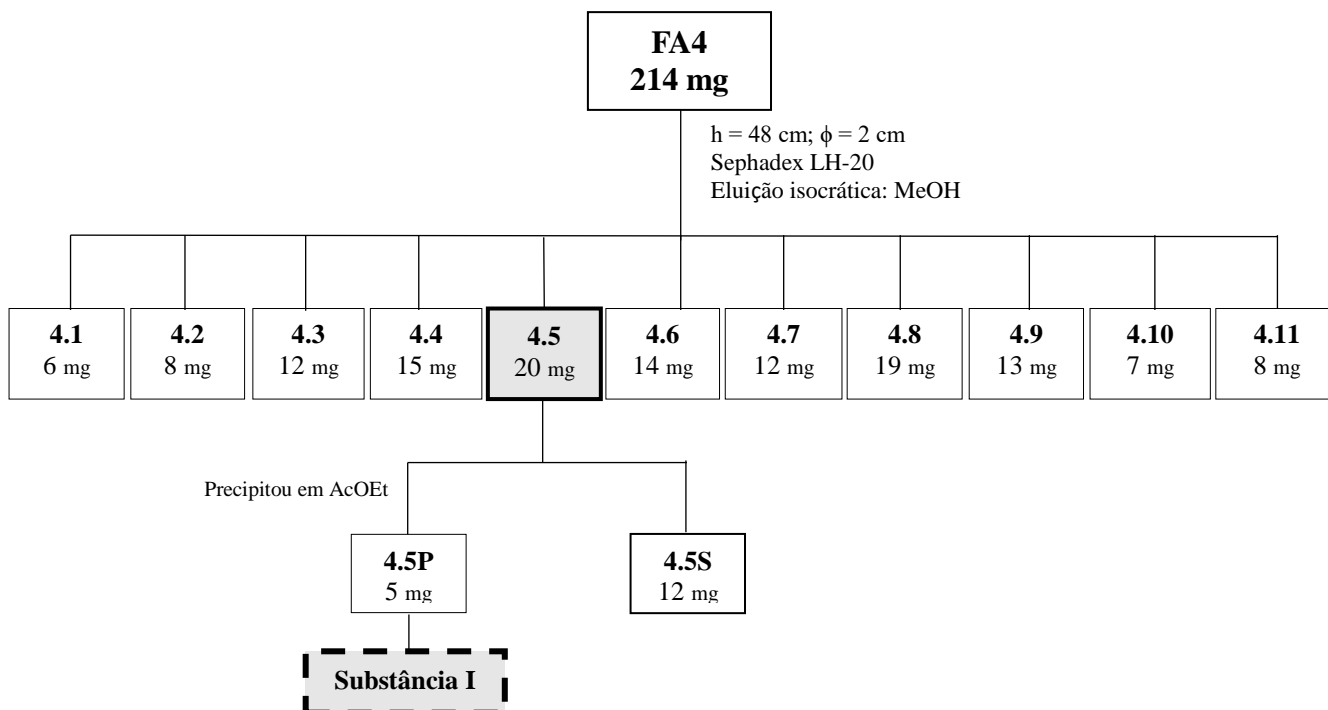


3.2.3.2.1 - Refracionamento cromatográfico da subfração FA4

A subfração FA4 (0,214 g) foi submetida a CC utilizando fase estacionária de permeação em gel (*Sephadex* LH-20) utilizando metanol como fase móvel, em eluição isocrática. As frações resultantes foram analisadas por CCD, em diferentes sistemas de eluentes (Hex/AcOEt/ MeOH) e selecionou a fração 4.5 (FA4.5) para cromatografia em camada delgada preparativa de fase reversa (CCDP). Ao solubilizar a subfração 4.5 em acetato de etila, formou duas frações: o precipitado (FA4.5P) e o sobrenadante (FA4.5S).

O fracionamento da FA4, resultou no isolamento da substância **I**, (FLUXOGRAMA 3.2, p. 27), sendo a mesma caracterizada por análise dos espectros de CLUE-EM, RMN de ^1H e ^{13}C , assim como experimentos bidimensionais, em comparações com dados da literatura.

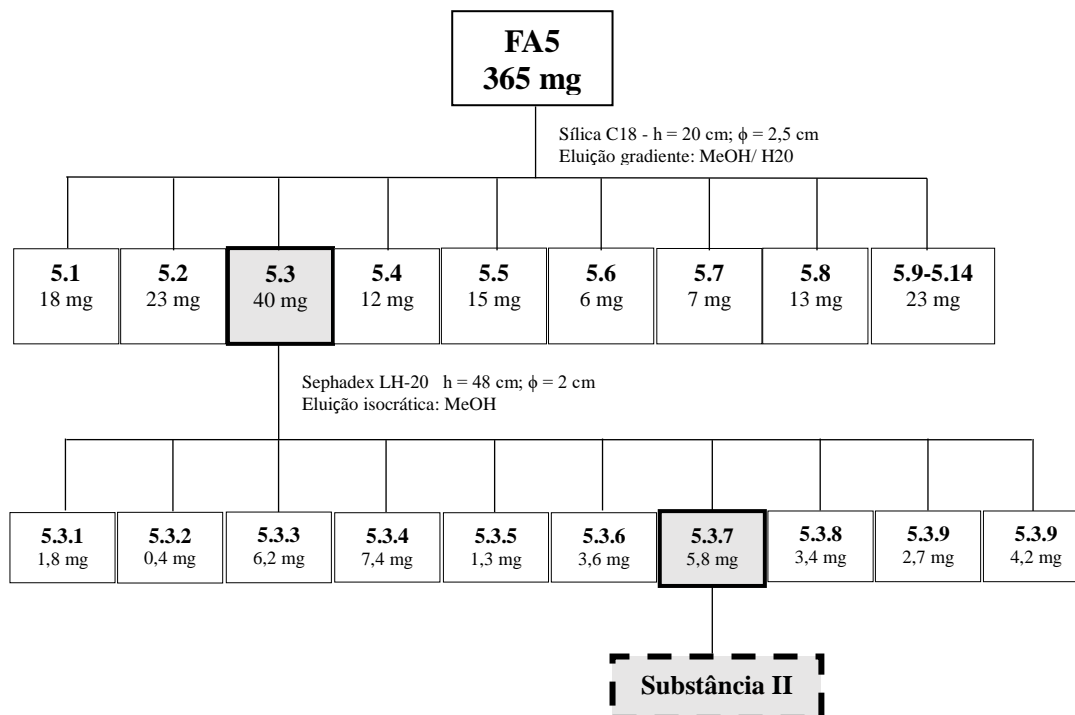
FLUXOGRAMA 3.2- Fracionamento da subfração FA4.



3.2.3.2.2 - Refracionamento cromatográfico da subfração FA5

A subfração FA5 (365 mg) foi submetida a CC utilizando como fase estacionária sílica modificada do tipo C18 e eluição em modo gradiente de 10 % H₂O a 100 % MeOH. Após análise por CCD, a subfração FA5.3 foi refracionada por CC, utilizando *Sephadex* LH-20 em modo isocrático de eluição (MeOH). As 9 subfrações obtidas foram analisadas por CCD, resultando no isolamento da substância **II** (FLUXOGRAMA 3.3, p. 28), que foi identificada a partir da análise dos dados de RMN de ¹H, DEPT-135 e experimentos bidimensionais COSY ¹H, HSQC e HMBC, CLUE-EM e comparações com dados da literatura.

FLUXOGRAMA 3.3 - Fracionamento da subfração acetato de etila 5 (FA5).



3.2.3.3 - Perfil químico dos extratos de *Erythroxylum*

O perfil metabolômico dos constituintes químicos presentes nas folhas foi traçado a partir da análise dos 16 extratos obtidos por homogeneizador ultra turrax (*E. campestre*, *E. deciduum*, *E. tortuosum* e *E. suberosum*) e dos 3 extratos etanólicos das folhas de *E. deciduum*, obtidos por maceração e homogeneizador ultra turrax. As análises foram realizadas utilizando CLAE-UV-DAD, CG-EM e RMN de ¹H.

Para as análises em CLAE-UV-DAD, as amostras foram filtradas em membrana 0,22 μ m PFE (Millex) e posteriormente injetadas manualmente 30 μ L (mg/mL) de cada amostra, preparadas em metanol/água (1:1), em 2 condições de coluna e eluição, sendo que ambas mantiveram fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ detecção nos comprimentos de onda 217, 220, 240, 254 e 365 nm, durante 60 minutos.

- Condição 1: coluna XDB-C18 (5 μ m), com fase móvel metanol/água em gradiente exploratório de 10-90% de metanol;
- Condição 2: coluna feni-hexil – Luna (10 μ m), com fase móvel: Solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e B – acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v),

Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B); 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 µL (mg/mL) das amostras preparadas em metanol/água (1:1, v/v).

Nas análises em CG-EM as amostras foram solubilizadas em hexano ou acetona, e utilizou como condições cromatográficas fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, hélio como gás de arraste e duas rampas de aquecimento, sendo:

- Método 1: com programação de temperatura de 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, modo de injeção *split* (20:1), operando a 250 °C.

- Método 2: com programação de temperatura de 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 modo de injeção *splitless*, operando a 280 °C.

3.2.4 – Análises por CLUE-EM do extrato etanólico de *E. deciduum* obtido por percolação e das substâncias **I e II**

As análises por CLUE-EM foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos, para a substância **I e II** e o extrato etanólico de *E. deciduum*.

Utilizou um sistema de CLUE (Agilent 1290 Infinity II Kioto, Japão) que possui duas bombas LC-20AD, sendo uma equipada com válvula solenoide de quatro linhas, autoinjeter SIL-20A com alça de amostragem de 500 µL, degaseificador DGU-20A5, forno CTO-20A e controladora CBM 20A. As análises foram realizadas utilizando coluna Sulpelco® Ascentis Express C18 de núcleo fundido (2,7; 10×0,21 cm), com detector de UV, 254 e 365 nm, fases móveis utilizadas: solvente A - água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e B - acetonitrila. O gradiente utilizado foi: 0-15 min, 90-50% B; 15-16 min, 50-50%; 16-20 min 100 % B. A coluna foi submetida a limpeza com 100% B por 5 minutos e recondicionada nas condições iniciais por 5 minutos. Foram injetados 5 µL de extrato a 1 mg.mL⁻¹, solubilizados em água/metanol (70:30, v/v). O sistema de cromatografia líquida encontra-se acoplado ao espectrômetro de massas QqToF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI. Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos (auto - MS/MS) nos dois modos de ionização em uma faixa de massas de 80 a 1300. As condições da fonte de ionização foram: nebulizador 1,7 bar, vazão do gás de secagem 9,3 L.min⁻¹, temperatura de secagem 200 °C, tensão do End Plate e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente.

Foram 5 experimentos de íons produtos em ambos os modos de ionização variando a energia de fragmentação. As energias foram 20, 30, 40, 50 e 60 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*.

3.2.5 - Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro da Universidade Federal de São João *del-Rei*. Para a avaliação citotóxica dos extratos utilizou linhagens de células *HeLA* para os extratos obtidos por homogeneizador ultraturrax e 4T1 para o extrato etanólico das folhas de *E. deciduum* obtido por maceração.

As células foram semeadas em placas de 96 poços com 5×10^3 células por poço e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ (5%), à 37 °C. Para preparar os tratamentos, as amostras foram diluídas em DMSO (1%) e meio DMEM (Dulbecco MEM) suplementado com 0,5% de SFB (soro fetal bovino). Após 24 horas de incubação as células receberam os tratamentos com as amostras, em diferentes concentrações, por 48 horas. Para a obtenção das curvas analíticas e avaliação da citotoxicidade, o extrato etanólico de *E. deciduum*, obtido por maceração, foi diluído nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e avaliados no ensaio utilizando a linhagem de células murina 4T1 (carcinoma mamário murino). Os extratos obtidos utilizando o equipamento homogeneizador ultra turrax foram diluídos a 50; 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e avaliados no ensaio utilizando a linhagem de células HeLa (testados na linhagem humana).

A viabilidade celular foi quantificada usando o reagente colorimétrico MTT. Este composto ao ser colocado em contato com as células viáveis é reduzido a um composto colorido, o formazan, através da enzima mitocondrial desidrogenase. A metabolização do composto é diretamente proporcional ao número de células viáveis e pode ser lido a um comprimento de onda de 570 nm.

A absorbância foi medida utilizando o leitor de placa de ELISA, após 2 horas de incubação com 10 μL de MTT diluído em 90 μL de DMEM. Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em média de porcentagem \pm desvio padrão de viabilidade celular e normalizados na presença do veículo DMSO, utilizando o *software* Excel 2010. Em seguida, os dados normalizados foram analisados utilizando o *software*

GraphPad PRISM version 5, por regressão não linear, obtendo os valores da IC₅₀.
Ainda não foram realizadas análises com controles positivos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudo dos constituintes voláteis de *E. deciduum*

4.1.1 - Perfil do óleo essencial de *E. deciduum* e identificação dos compostos químicos

Os óleos essenciais (OE) obtidos a partir das folhas frescas da espécie *E. deciduum*, apresentaram aspecto incolor. A utilização de folhas frescas, em todas as extrações, deve-se à perda de constituintes voláteis, quando se utiliza folhas secas. A comparação dos cromatogramas obtidos nas duas hidrodestilações sugere similaridade de perfil dos COVs mesmo em épocas diferentes do ano, apresentando tempos de retenção aproximados na maioria dos compostos. Entretanto, o cromatograma referente a extração do dia 25 de março de 2017 apresentou maior concentração de compostos, em relação a porcentagem da área normalizada, sendo utilizada para identificação dos compostos presentes nos COVs. Na TABELA 4.1 estão apresentados os valores das massas utilizadas nas hidrodestilações, realizados em triplicata, e seus respectivos rendimentos.

TABELA 4.1 - Massas e rendimentos dos óleos essenciais obtidos a partir das hidrodestilações

	Hidrodestilação	Massa (g) das folhas frescas	Massa (mg) dos OE	Rendimento (%)
Coleta 05/12/2016	1 ^a	81,5	5,1	0,00625
	2 ^a	80,0	5,2	0,00637
	3 ^a	82,0	5,3	0,00646
Coleta 25/03/2017	1 ^a	80,1	4,1	0,00328
	2 ^a	80,0	3,8	0,00304
	3 ^a	81,5	4,3	0,00344

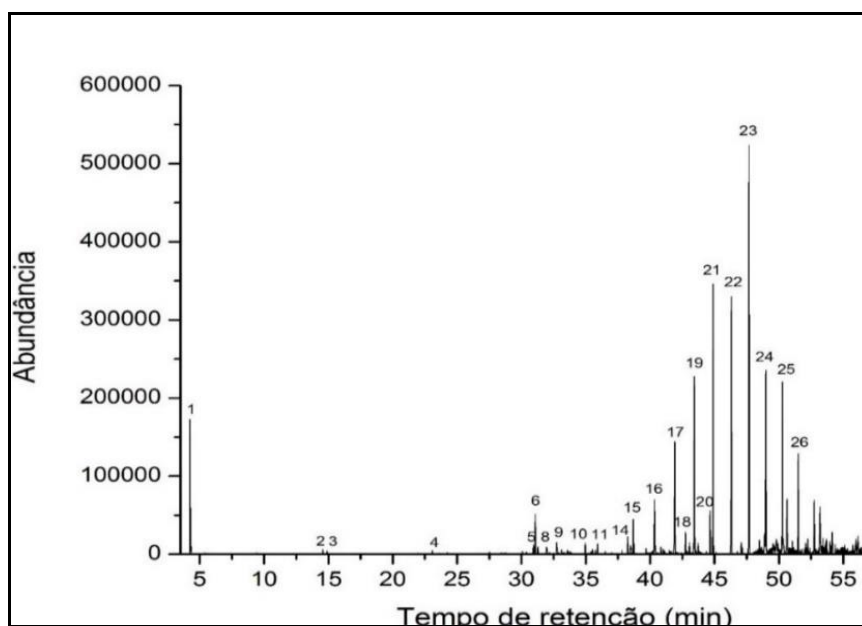
Foi encontrado apenas um estudo dos constituintes voláteis de *E. deciduum*, realizado por Verde *et al.* (2016) a partir das folhas secas desta espécie, o que apresentou perfil químico distinto, fenômeno justificado devido as diferentes condições de extração, como: folhas secas, tempo, temperatura e solvente utilizado na extração

líquido-líquido, e também as influências do ambiente de coleta, que interferem no rendimento e na composição dos COVs (BIERI *et al.*, 2006, ASBAHANI *et al.*, 2015; KILLINY & JONES, 2017).

A separação dos constituintes químicos foi realizada via CG-EM, sendo possível realizar a identificação de 26 compostos orgânicos voláteis (FIGURA 4.1). Dos compostos extraídos e caracterizados, 87,82% correspondendo a compostos voláteis comumente encontrados em plantas (MOHAMMADHOSSEINI *et al.*, 2017).

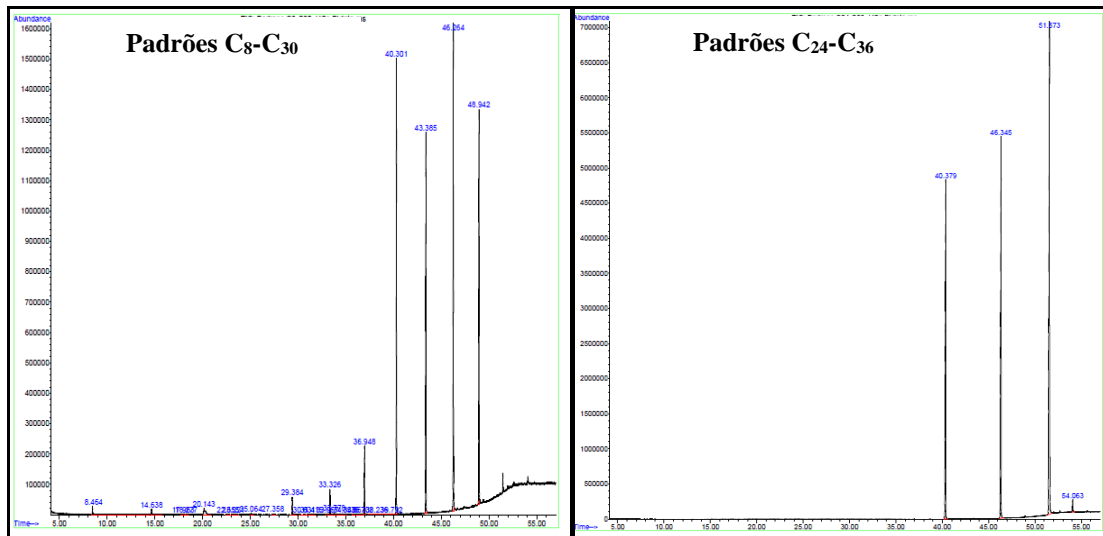
A espécie *E. deciduum* apresentou como constituição química principal, hidrocarbonetos alifáticos, correspondendo 75,38% do total de compostos identificados, sendo o composto majoritário o triacontano ($C_{30}H_{62}$ - O16,95%). Além destes, também foram identificados, cetonas (6,25%), aldeídos (0,19 %), álcoois (2,1%), ésteres (1,62%), esteroides (0,81%) e outros (1,46%).

FIGURA 4.1 - Cromatograma do óleo essencial de *E. deciduum* obtido na hidrodestilação 2 (coleta do dia 25/03)



Na TABELA 4.2, estão dispostos os compostos que foram extraídos e identificados a partir do óleo essencial.

FIGURA 4.2 - Cromatogramas de hidrocarbonetos utilizados como padrões (C_8 - C_{36}), em ordem crescente de t_R .



A análise do perfil cromatográfico do óleo essencial levou a identificação de hidrocarbonetos que apresentaram tempos de retenção (t_R) similares aos hidrocarbonetos utilizados como padrões (C_8 - C_{36}) (FIGURA 4.2).

TABELA 4.2 - Compostos identificados a partir dos OEs das folhas frescas de *E. deciduum*.

N°	t _R (min)	Compostos	%	Identificação		
				IK _{cal}	IK _{ADAMS}	EM
1	4,24	4-hidroxi,4-metil-2-pentanona	5,51	-	-	x
2	14,55	1-(2-butoxi)2-propanol	0,29	1198	-	x
3	14,91	decanal	0,19	1209	1202	x
4	23,06	2,5-bis(1,1-dimetil)fenol	0,19	1518	-	-
5	31,07	<i>n</i> -hexadecanol	1,62	1785	1875	x
6	31,28	epi- α acetato de bisabolol	0,31	1796	1802	-
7	31,94	octadecano	0,72	1830	1800	x
8	32,73	nonadecano	0,74	1870	1900	-
9	34,96	eicosano	0,60	2017	2000	x
10	37,00	heneicosano	0,30	2104	2100	x
11	37,57	abienol	0,81	2155	2149	-
12	37,81	butil-metil-hexadecanoato	0,80	2177	-	x
13	38,25	tributil-acetilcitrato	0,82	2216	-	x
14	38,68	tricosano	1,58	2255	2300	x
15	40,33	tetracosano	2,25	2444	2400	x
16	41,90	pentacosano	4,80	2577	2500	x
17	43,43	heptacosano	7,69	2655	2700	x
18	44,66	octocileno	2,16	2718	-	x
19	44,89	octacosano	11,65	2729	2800	x
20	46,30	nonacosano	10,48	2901	2900	x
21	47,67	triacontano	16,95	2903	3000	x
22	48,98	dotriacontano	7,47	3203	3200	x
23	50,26	tritriacontano	7,99	3300	3300	x
24	51,50	tetratriacontano	4,66	3394	-	x

IK_{cal}: índice de retenção de Kovats calculado utilizando o software *RetenSoft*. **IK_{ADAMS}**: índice de retenção de Kovats descrito por ADAMS, 2007. **EM**: identificado pela biblioteca *NIST*.

4.1.2 - Identificação dos compostos químicos obtidos a partir de MEFS para *E. deciduum*

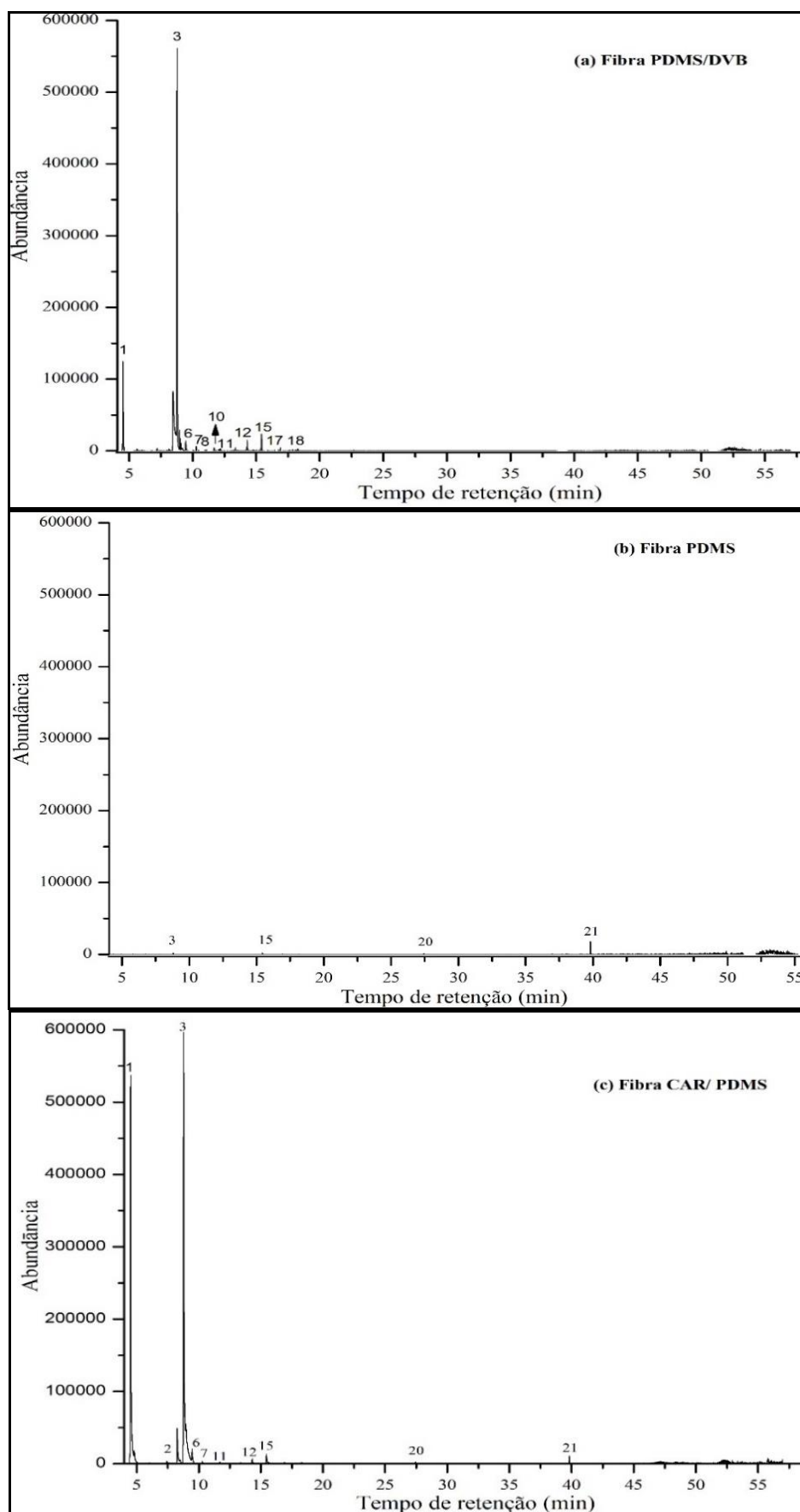
Para a obtenção do perfil químico dos voláteis das folhas frescas de *E. deciduum*, foram realizadas análises via MEFS, utilizando as fibras PA, PDMS, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB, e as folhas frescas coletadas no dia 25 de março de 2017, para comparação com os compostos voláteis extraídos por hidrodestilação.

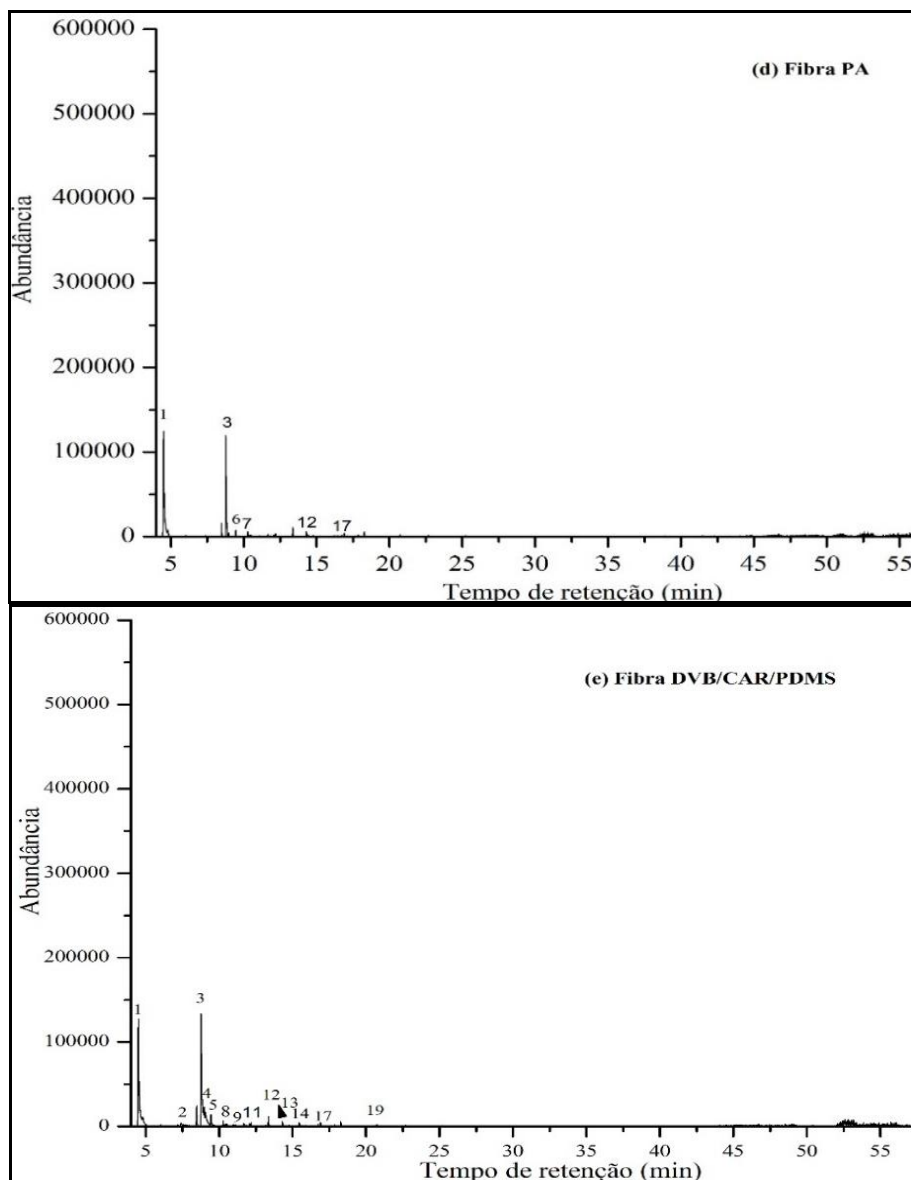
Foram utilizadas diferentes fibras visando identificar o maior número de constituintes químicos, já que as mesmas são caracterizadas por apresentarem diferentes polaridades na constituição do seu revestimento, e a partir das suas interações com o material a ser adsorvido, possibilita a identificação de diferentes classes de COVs (BICCHI, DRIGO & RUBIOLO, 2000; CASTRO-VÁRQUEZ *et al.*, 2006). Nesse contexto, as fibras utilizadas foram: PA para compostos polares, PDMS para os de polaridade intermediária; e CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB para os compostos de média polaridade, devido sua constituição mista.

Cáceres e colaboradores (2015) e Dawidowicz & Dybowski (2016) avaliaram a eficiência de extração utilizando fibras diferentes polaridades. Mesquita *et al.* (2017) destacam a importância da seletividade da fibra e a influência direta de alguns fatores na extração e eficiência da análise, tais como: polaridade, revestimento, tempo, temperatura, quantidade e estado físico da amostra.

Dentre as fibras utilizadas neste trabalho, as fibras DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS e PDMS/DVB possibilitaram a identificação de um maior número de substâncias (FIGURA 4.3a, 4.4c e 4.4e, p. 37 e 38), uma vez que as fibras mistas apresentam uma maior faixa de polaridade. Já a fibra com revestimento PDMS foi a que apresentou menor retenção em porcentagem a área normalizada, justificada pela retenção de compostos menos polares, como os compostos **3**, **15** e **20**. Dentre estes, os compostos **3** e **15** foram adsorvidos por todas as fibras utilizadas, assim como disposto na FIGURA 4.3a-e. Os cromatogramas foram otimizados utilizando o Origin 8.6, e os compostos identificados estão apresentados na TABELA 4.3.

FIGURA 4.3 - Cromatogramas obtidos das análises com diferentes fibras via MEFS das folhas de *E deciduum*.





Os compostos identificados como **1**, **3**, **4** e **12**, são COVs agentes de defesa, emitidos quando a planta se encontra em situações de ameaça, contra insetos ou outros riscos (SMITH & BECK, 2015).

O composto **1**, apresentou maior adsorção para a fibra CAR/PDMS, enquanto que para as fibras PDMS/DVB, PA e DVB/CAR/PDMS, os compostos tiveram menor porcentagem em relação a área normalizada, sendo notório a seletividade e sensibilidade para este tipo de revestimento. Nesse contexto, Silva & Câmara (2013) destacam a eficiência da utilização de fases mistas de fibras empregadas na análise MEFS para folhas de espécies vegetais.

TABELA 4.3 - Compostos identificados a partir da extração dos COVs por MEFS *in vitro* das folhas frescas de *E. deciduum*.

N°	t _R (min)	Compostos	Fibras					Identificação		
			a	b	c	d	e	IK _{cal}	IK _{ADAMS}	EM
1	4,55	(Z)-3-hexenol	x	-	x	x	x	-	-	x
2	7,40	ciclohexil-dodecil-éster	-	-	x	-	x	1011	-	x
3	8,80	(3Z)-acetato de hexenila	x	x	x	x	x	1105	1005	x
4	8,97	(3Z)-hexenil-metil-carbonato	-	-	-	x	x	1108	1091	x
5	9,08	(5Z)-octenol	-	-	-	x	x	1110	1099	-
6	9,47	(2E, 4E)-octadienol	x	-	x	x	x	1116	1116	-
7	10,28	formiato de octila	x	-	x	x	x	1129	1130	-
8	10,45	α-metil-metanol-ciclobutano	-	-	-	x	x	1132	-	x
9	10,97	2-metil-1-undecanol	-	-	-	-	x	1140	-	x
10	11,11	(<i>trans-p</i>) ment-2-en-1-ol	-	-	-	x	x	1142	1140	-
11	11,68	3,3-dimetil-2-butenil-butanoato	-	-	x	x	x	1152	1151	-
12	14,30	(3Z)-hexenil butanoato	x	-	x	x	x	1194	1186	x
13	14,75	dodecano	-	-	-	x	x	1204	1200	-

14	15,25	2,3,4-trimetil-hexano	-	-	-	x	x	1222	-	x
15	15,40	benzotiazol	x	x	x	x	x	1228	-	x
16	15,90	3,3-dimetil-hexano	-	-	-	x	-	1245	-	x
17	16,91	tridecano	x	-	-	x	x	1282	1300	-
18	17,86	acetato de diidro-citronelol	-	-	-	x	-	1317	1320	-
19	20,73	α -copaeno	-	-	-	-	x	1424	1376	-
20	27,45	éster dietílico do ácido fumárico	-	x	x	-	x	1655	-	x
21	39,77	não identificado*	-	x	x	-	-	-	-	x

a: fibra PA; **b:** fibra PDMS; **c:** fibra CAR/PDMS; **d:** fibra PDMS/ DVB; **e:** fibra VB/CAR/PDMS. **IK_{cal}**: índice de retenção de Kovats calculado utilizando o software *RetenSoft*. **IK_{ADAMS}**: índice de retenção de Kovats descrito por ADAMS, 2007. **EM:** identificado pela biblioteca *NIST*. *Composto derivado de grupos silanóis, o que sugere "sangramento de coluna".

A partir da utilização das técnicas de hidrodestilação e MEFS para extração dos COVs das folhas frescas de *E. deciduum*, foi possível traçar um perfil da classe de compostos orgânicos voláteis presentes nesta espécie. Destaca-se que até a realização das análises, não foram encontrados estudos semelhantes para espécies do gênero *Erythroxylum* utilizando a técnica MEFS. Em comparação com as duas técnicas de extração utilizadas, na hidrodestilação foi possível identificar majoritariamente compostos *n*-alcanos, enquanto que a partir da técnica de MEFS foram também identificados compostos mais oxigenados. Além disso, também deve ser mencionado a vantagem da utilização da técnica de MEFS, segundo princípios da Química Verde, devido a não utilização de solventes orgânicos e a facilidade de realização das análises por não envolver pré-tratamento da amostra (SMITH & BECK, 2015).

4.2 - Estudo dos constituintes não voláteis de espécies do gênero *Erythroxylum*

4.2.1 - Análise dos perfis químicos ou metabólicos dos extratos

Os perfis químicos são amplamente utilizados no estudo de plantas, permitindo comparar e sugerir classes de compostos presentes em extratos e frações quando se utiliza detectores de arranjo de diodos ou espectrometria de massas. As análises do perfil metabólico das quatro espécies do gênero *Erythroxylum* foram realizadas utilizando técnicas qualitativas como CCD, CLAE-DAD, CG-EM e RMN de ¹H, submetendo os extratos às análises mencionadas conforme a polaridade de cada amostra.

4.2.1.1 - Extratos obtidos a partir do homogeneizador dispersor ultra turrax

A partir dos 16 extratos obtidos das folhas das quatro espécies do gênero *Erythroxylum*, foi possível sugerir a composição majoritária das espécies estudadas, sendo a maioria compostos polares evidenciados pelo maior rendimento dos extratos metanólicos (TABELA 4.4). A preparação dos extratos via ultra turrax objetivou uma extração rápida e mais sustentável para realização do perfil químico das espécies estudadas, com utilização de pouca massa de material vegetal e menor quantidade solvente, compreendendo assim uma metodologia mais focada na Química Verde.

Segundo Dhanani & colaboradores (2017), a utilização de novas técnicas de extração de compostos bioativos de plantas tem sido amplamente investigada, com fins comparativos em relação aos rendimentos obtidos e as análises fitoquímicas dos métodos

tradicionais. Portanto, é necessário compreender, os conceitos relacionados a Química Verde, considerando a seletividade de cada método de extração.

TABELA 4.4 - Massa do material vegetal seco e dos extratos obtidos de espécies do gênero *Erythroxylum*.

Espécies	Vegetal seco (g)	Extratos							
		Hexano		Diclorometano		Acetato de etila		Metanol	
		M ^a (g)	R ^b (%)	M ^a (g)	R ^b (%)	M ^a (g)	R ^b (%)	M ^a (g)	^b R (%)
<i>E. campestre</i>	12,1	0,19	1,6	0,09	0,7	0,08	0,7	1,82	15,4
<i>E. deciduum</i>	8,0	0,08	1,0	0,03	0,4	0,04	0,5	1,04	13,0
<i>E. tortuosum</i>	10,1	0,09	0,9	0,06	0,6	0,07	0,7	2,41	23,8
<i>E. suberosum</i>	12,6	0,24	1,9	0,16	1,3	0,12	0,9	1,88	14,9

^aM: massa; ^bR: rendimento

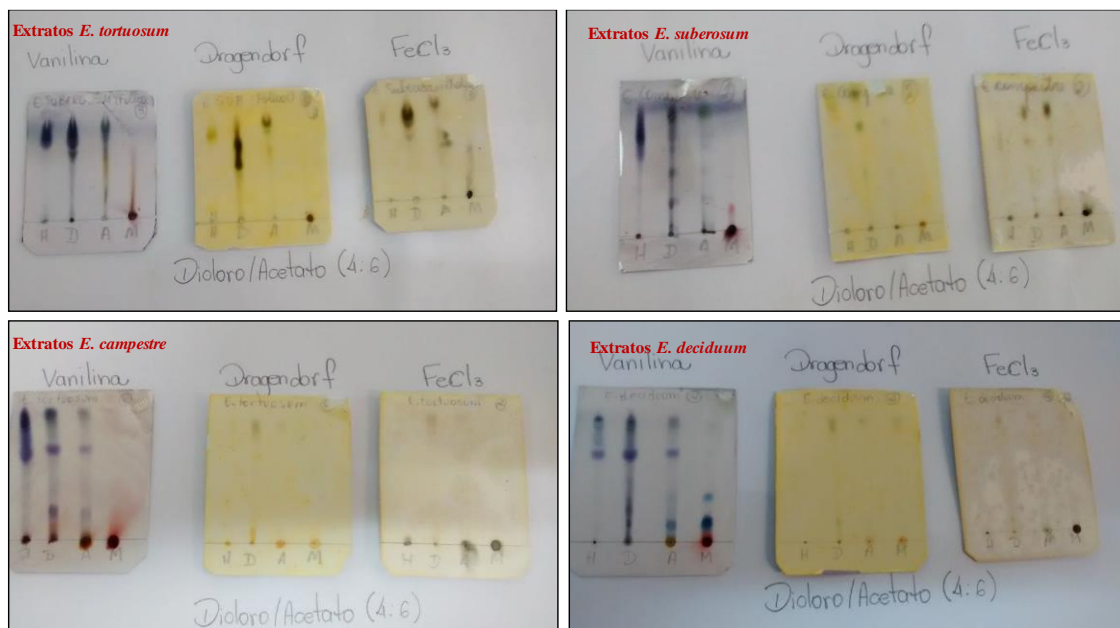
Após submeter os extratos às análises por CCD utilizando sistemas de solventes com diferentes polaridades, selecionou o sistema com melhor desenvolvimento (diclorometano/acetato de etila - 4:6) e revelou as cromatoplasmas com: irradiação de luz ultravioleta, solução ácida de vanilina, solução ácida de *Dragendorff* e solução de cloreto férrico, observando as manchas apresentadas na FIGURA 4.4. As quatro espécies mostraram teste positivo frente ao revelador de *Dragendorff* e solução de cloreto férrico, que sugere respectivamente a presença de alcaloides e compostos fenólicos, quando apresentado manchas escuras (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Em presença da luz UV, notou-se absorções nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, faixas que abrangem diferentes classes de metabólitos secundários que possuem cromóforos. Ao reagir com vanilina, foi possível observar uma mistura complexa de substâncias com diferentes polaridades, sugerindo a presença de: esteroides e terpenoides - manchas azuis e roxas; flavonoides e glicosídeos - manchas amareladas; taninos e clorofila - manchas vermelhas (STAHL, 1969).

Devido à baixa solubilidade dos extratos preparados em metanol e hexano, as análises via CG-EM foram realizadas apenas com os extratos diclorometano e acetato de etila. A partir da análise dos cromatogramas (FIGURA 4.5), foi evidenciada a presença de alguns compostos comuns nos extratos e também variação tanto na proporção quanto na composição química entre as diferentes espécies. Baseado no método utilizado e no tempo de retenção dos

compostos detectados, foi possível sugerir a existência majoritária de compostos de média polaridade.

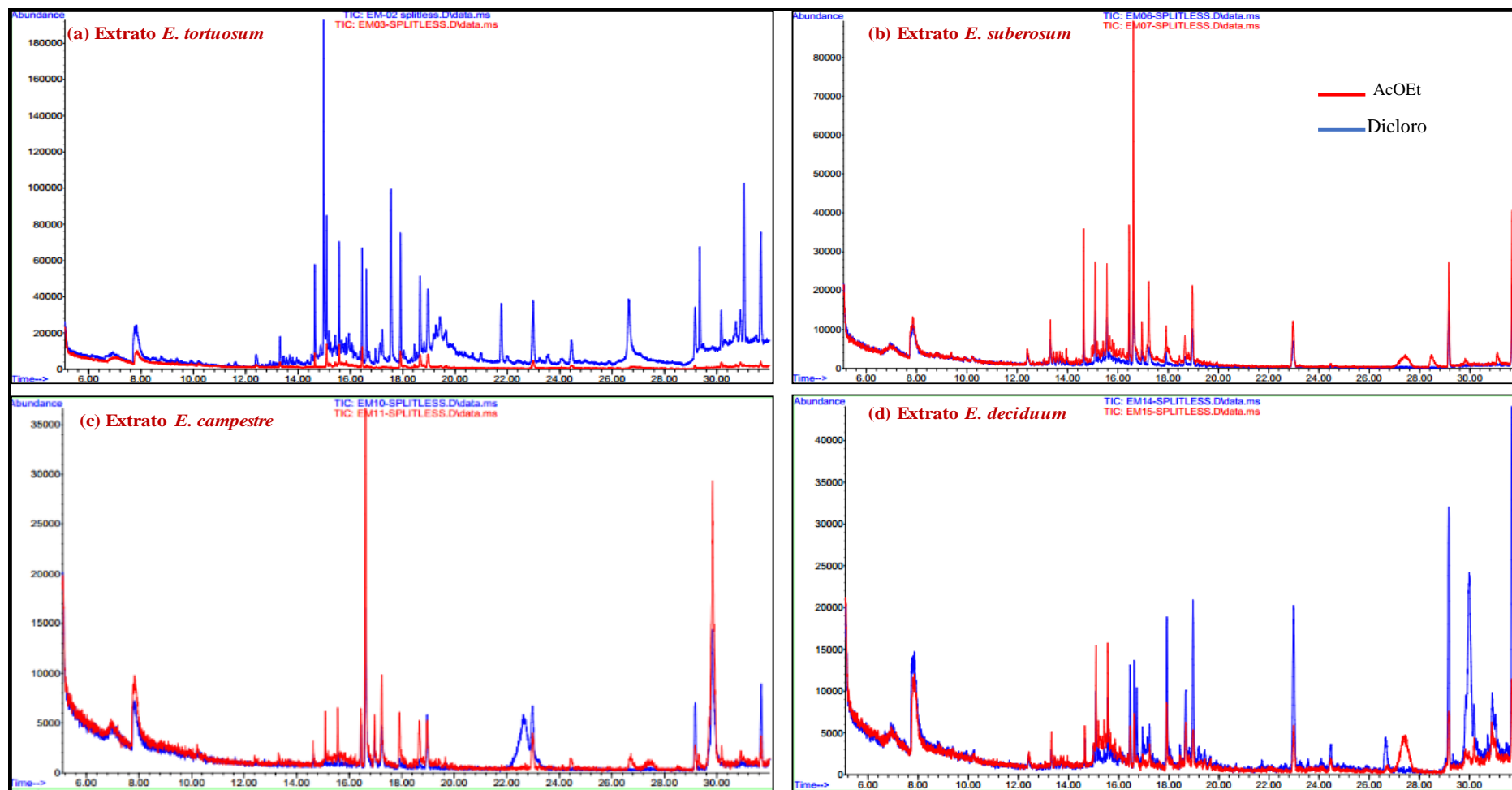
FIGURA 4.4 - CCD das quatro espécies do gênero *Erythroxylum* eluídas em diclorometano/acetato de etila (4:6) e reveladas em soluções de ácido de vanilina, Dragendorff e cloreto férrico, respectivamente.



Nota: Em cada cromatoplaça, possui em sequência os extratos hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

Todos os extratos foram submetidos a análise por RMN de ¹H (500 MHz) e a partir dos resultados, juntamente com dados da literatura sobre o gênero *Erythroxylum* (BARREIROS, 2005; RIBEIRO, 2013), foi possível aferir informações sobre a composição química das espécies. Analisando os espectros, foram observadas algumas semelhanças entre os perfis das quatro espécies estudadas. Observa-se nos espectros de RMN a presença de sinais característicos de hidrogênios: metílicos, metilênicos e metínicos (δ_H 0,7 – 3,0); hidrogênios pertencentes às unidades glicosídicas (δ_H 3,0 – 5,4); hidrogênios carbinólicos (δ_H 3,0 - 4,0); hidrogênios olefínicos (δ_H 4,5 – 6,5); e hidrogênios aromáticos (δ_H 6,5 – 9,0).

FIGURA 4.5 - Cromatogramas obtidos de análises por CG-EM dos extratos em diclorometano (azul) e acetato de etila (vermelho) das espécies de *Erythroxylum*.



Condições cromatográficas: coluna HP-5 MS (30 m x 250 μm e filme 0,25 μm), hélio (gás de arraste), fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, método com programação de T = 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), injeção *splitless*, operando o injetor a 250 °C.

Na FIGURA 4.6 é possível observar que os espectros referentes aos extratos em hexano apresentam sinais bastante intensos na região de δ 0,7 a 2,1 ppm, com multiplicidades não resolvidas e que podem ser característicos de metilas. Também apresentam sinais característico de hidrogênios metilênicos e metínicos, além da ausência de sinais na região desblindada do espectro, evidenciando a presença de substâncias terpenoídicas. O espectro do extrato de *E. deciduum* apresentou composição um pouco diferente dos demais extratos, com menor intensidade de sinais na região blindada do espectro. Nos extratos em diclorometano (FIGURA 4.7), acetato de etila (FIGURA 4.8) e metanol (FIGURA 4.9), há presença de sinais na região de δ 3,0 a 5,4 ppm, que podem indiciar hidrogênios característicos de substâncias glicosiladas, e sinal próximo a δ 4,0 ppm, caracterizando a presença metoxilas. Nos extratos em metanol, além dos deslocamentos mencionados, há também sinais característicos de hidrogênios aromáticos (δ_H 6,5 – 9,0) e sinais característicos de hidrogênios nitrogenados (δ_H 2,0 – 5,0), sugerindo a presença de alcaloides característicos do gênero. Os extratos metanólicos de *E. campestre* e *E. tortuosum* parecem possuir majoritariamente flavonoides glicosilados. Já os extratos metanólicos de *E. deciduum* e *E. suberosum* apresentaram espectros bastante heterogêneos, sendo possível observar sinais característicos de compostos aromáticos, terpenoides e hidrogênios desblindados (evidenciados por multipletos), podendo sugerir a presença de alcaloides aromáticos. Embora os deslocamentos apresentados indicam que a maioria são sinais complexos, provenientes de extratos brutos, pode-se fazer algumas proposições baseadas em dados da literatura (BARREIROS *et al.*, 2005).

FIGURA 4.6 - Espetros de RMN de ^1H (acetona- d_6 e CDCl_3 , 500 MHz) dos extratos em hexano das espécies de *Erythroxylum*.

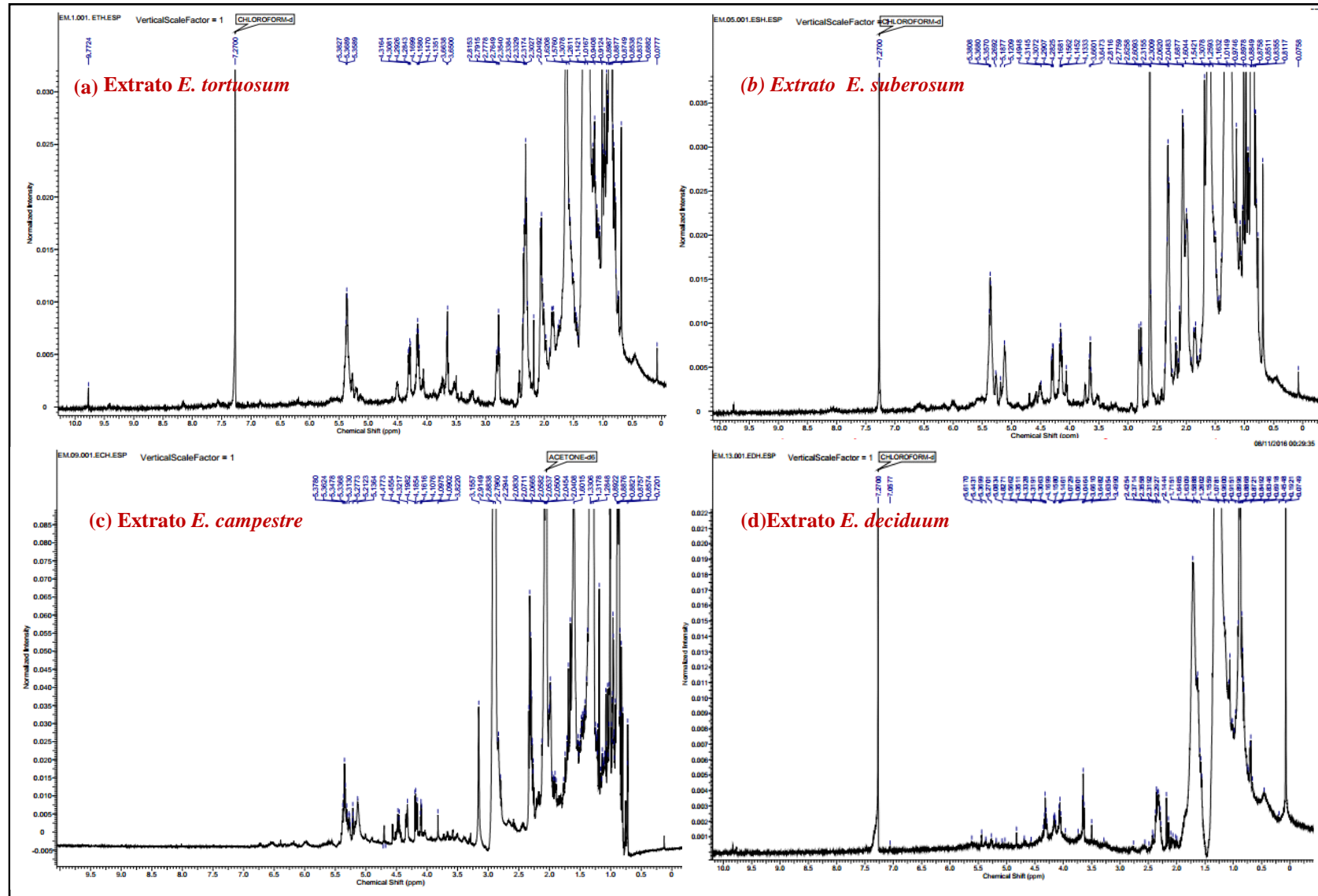
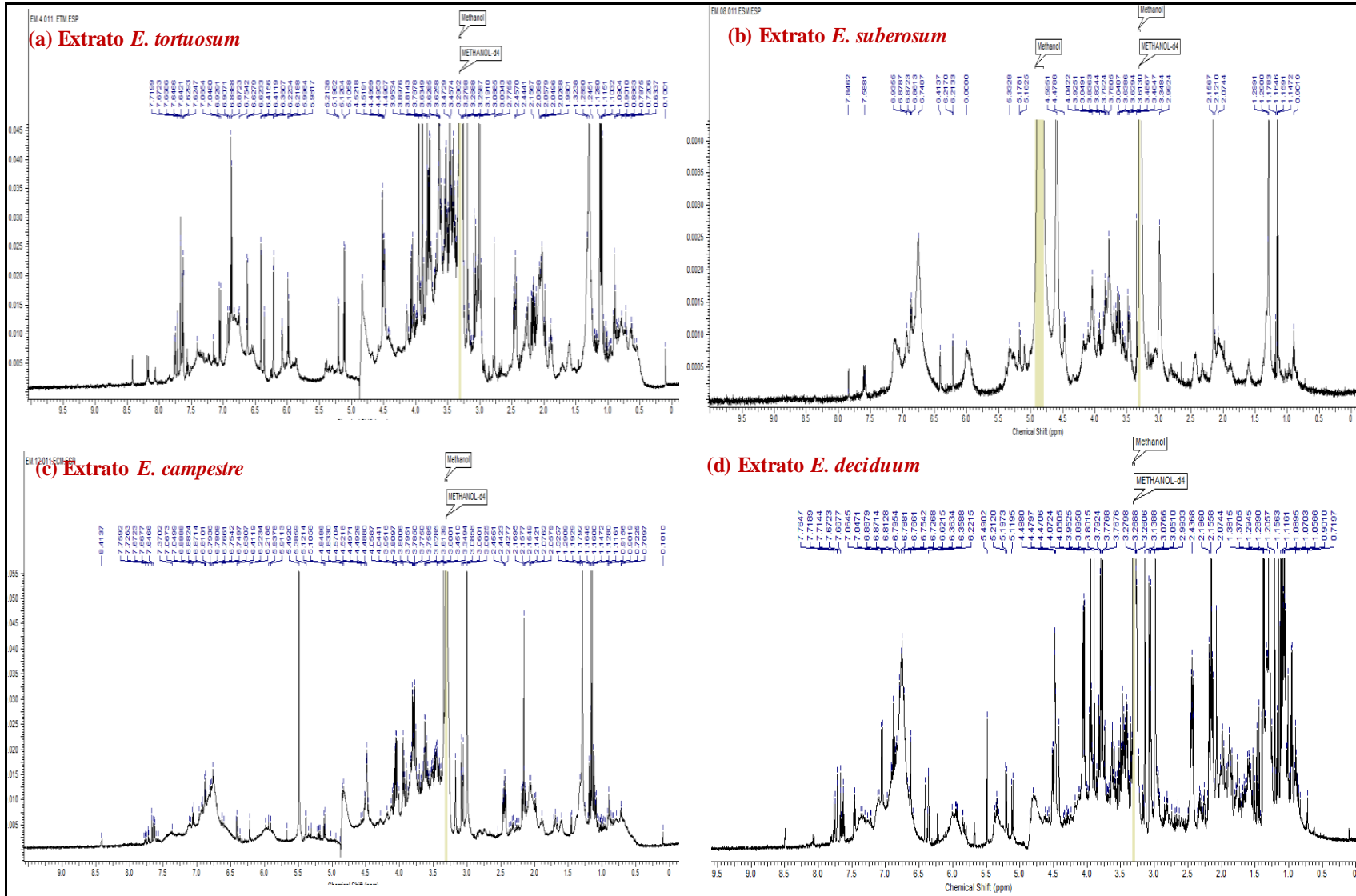


FIGURA 4.9 - Espetros de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) dos extratos em metanol das espécies de *Erythroxylum*.



A fim de se obter os perfis cromatográficos dos extratos, foi realizado um gradiente exploratório em CLAE-DAD, permitindo a detecção e visualização dos metabólitos presentes em uma ampla faixa de polaridade. As FIGURAS 4.10 a 4.13 (p. 52-55) mostram os cromatogramas dos extratos das espécies estudadas, com bandas de diferentes intensidades, sendo detectado em geral compostos de média a alta polaridade. A otimização das condições cromatográficas foi realizada selecionando o conjunto de parâmetros que proporcionou melhor resolução nos cromatogramas, e conseqüentemente absorção dos cromóforos. Dentre os comprimentos de onda utilizados para a análise (217, 220, 240, 254 e 365 nm), observou-se que a maioria das classes de substâncias detectadas apresentaram maiores absorções nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

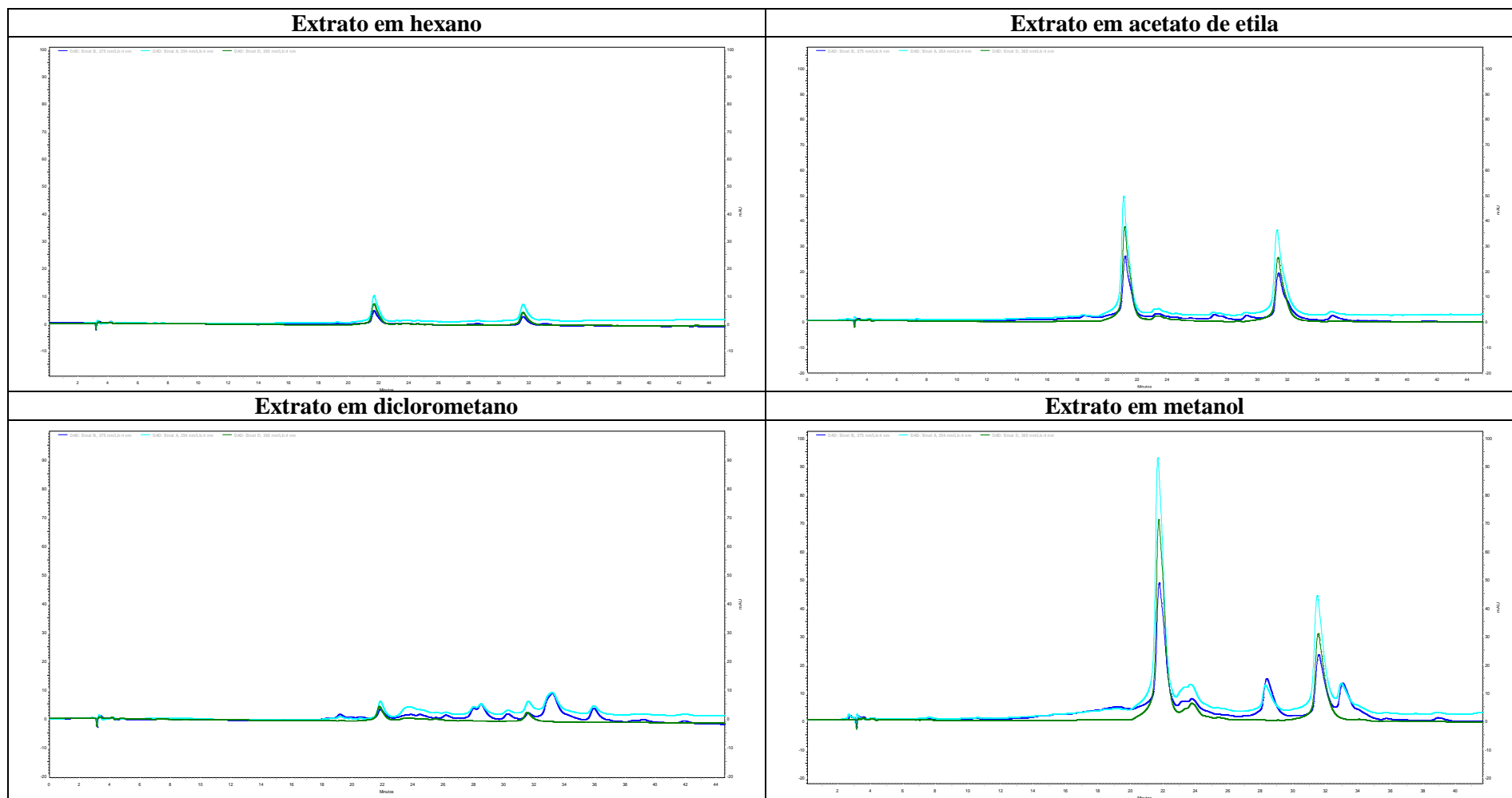
Analisando os cromatogramas de todos os extratos, foram selecionadas as bandas cromatográficas de maior intensidade que apresentaram tempos de retenção entre 19 e 29 minutos. Os extratos das diferentes espécies apresentaram composição química similar, destacando que os extratos em acetato de etila e metanol ainda apresentaram uma banda adicional com tempo de retenção em torno de 21 minutos (TABELA 4.5). A partir das bandas cromatográficas selecionadas, verificou-se que a variação dos máximos de absorção ocorreram entre 254-368 nm. Os dados observados em comparação com os valores de UV apresentados na TABELA 1.2 (p. 10), sugerem a presença de metabólitos secundários do tipo flavonoides. Essas absorções ocorrem na região do ultravioleta-visível, detectadas a partir da presença dos cromóforos do anel benzênico, com deslocamentos batocrômico e hipsocrômico variando conforme o substituinte ligado ao anel (MABRY *et al.*, 2012). Flavonoides, em especial, os flavonois são comumente encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum* (BOHN *et al.*, 1988; CHAVEZ *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 2003).

Os extratos de *E. tortuosum* (extratos em hexano e diclorometano) e *E. campestre* (extrato em diclorometano) não apresentaram absorção significativa, evidenciando a ausência de cromóforos. Esses dados em conjunto com os dados de RMN ¹H sugerem que estes extratos contém majoritariamente terpenoides e esteroides.

TABELA 4.5 - Bandas de absorção no UV extraídos dos tempos de retenção (t_R) dos extratos de *Erythroxylum*.

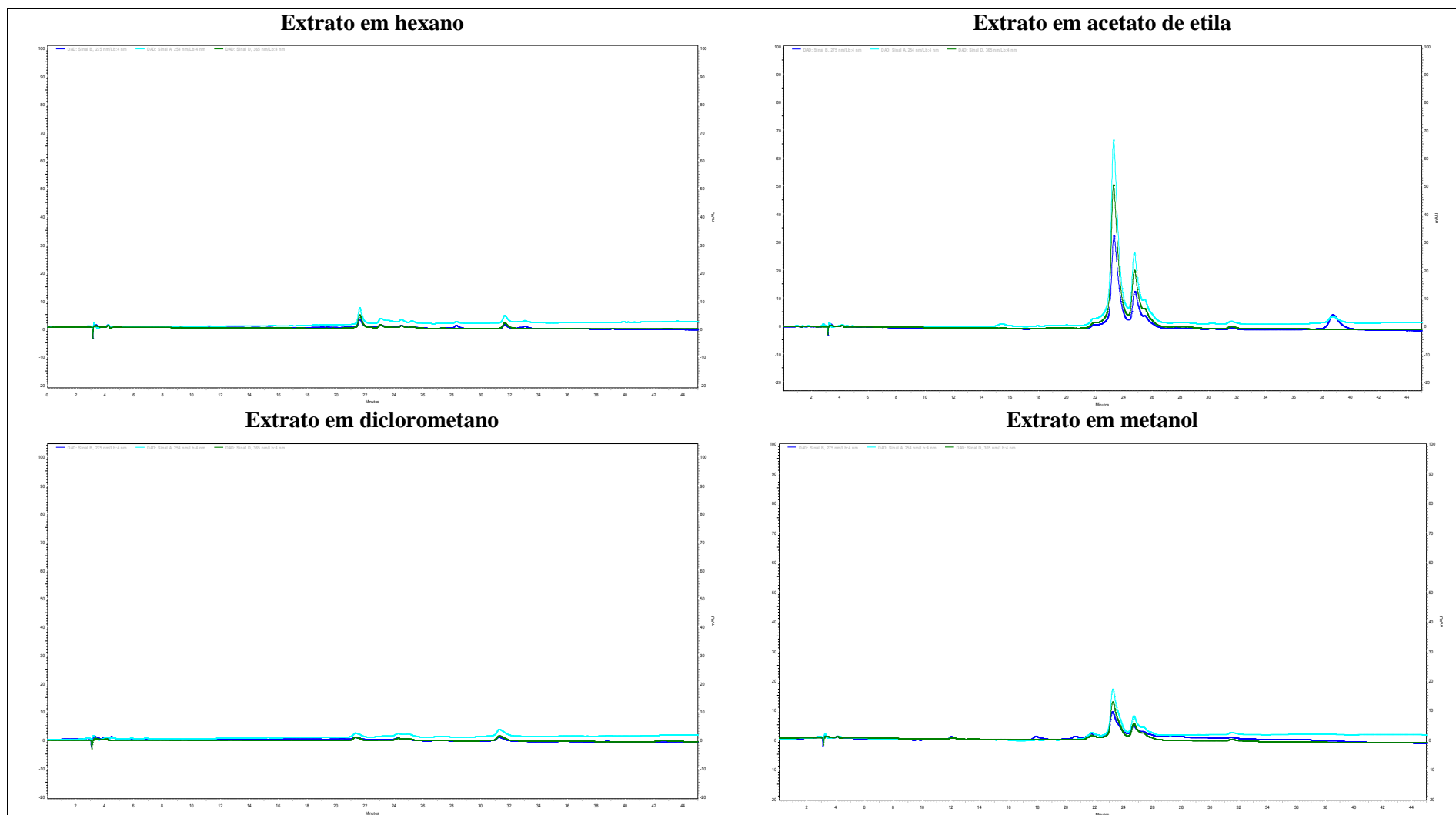
ESPÉCIES	EXTRATOS	t_R (min)	BANDAS (nm)	
<i>E. campestre</i>	hexano	19,4	280, 304, 366	
		29,5	280, 304, 368	
	diclorometano	19,8	280, 304, 368	
		29,4	280, 306, 366	
	acetato de etila	19,0	282, 306, 368	
		21,1	312, 358	
	metanol	29,3	280, 308, 368	
		19,6	280, 306, 368	
		21,3	358, 380, 388	
	<i>E. deciduum</i>	hexano	19,2	280, 304, 366
			29,4	280, 304, 368
		diclorometano	19,4	310, 360, 398
29,1			310, 360, 398	
acetato de etila		19,3	310, 360, 398	
		21,6	310, 360, 398	
metanol		29,2	310, 360, 398	
		19,1	282, 308, 368	
		21,7	310, 358, 380	
<i>E. tortuosum</i>		hexano	29,1	282, 306, 368
			19,2	310, 358, 380
		diclorometano	29,3	310, 358, 380
	19,2		282, 306, 368	
	acetato de etila	29,3	282, 308, 368	
		19,6	280, 304, 368	
	metanol	21,4	306, 358	
		29,3	280, 304, 368	
		19,6	280, 304, 368	
	<i>E. suberosum</i>	hexano	21,4	306, 356
			29,4	280, 304, 368
		diclorometano	19,3	280, 306, 368
29,4			280, 306, 368	
acetato de etila		19,1	310, 360, 398	
		29,9	310, 360, 398	
metanol		21,0	280, 304, 368	
		22,5	280, 304, 368	
		19,6	280, 304, 368	
metanol		21,0	280, 304, 368	
		29,3	280, 304, 368	

FIGURA 4.10 - Cromatogramas dos extratos da espécie *E. tortuosum*.



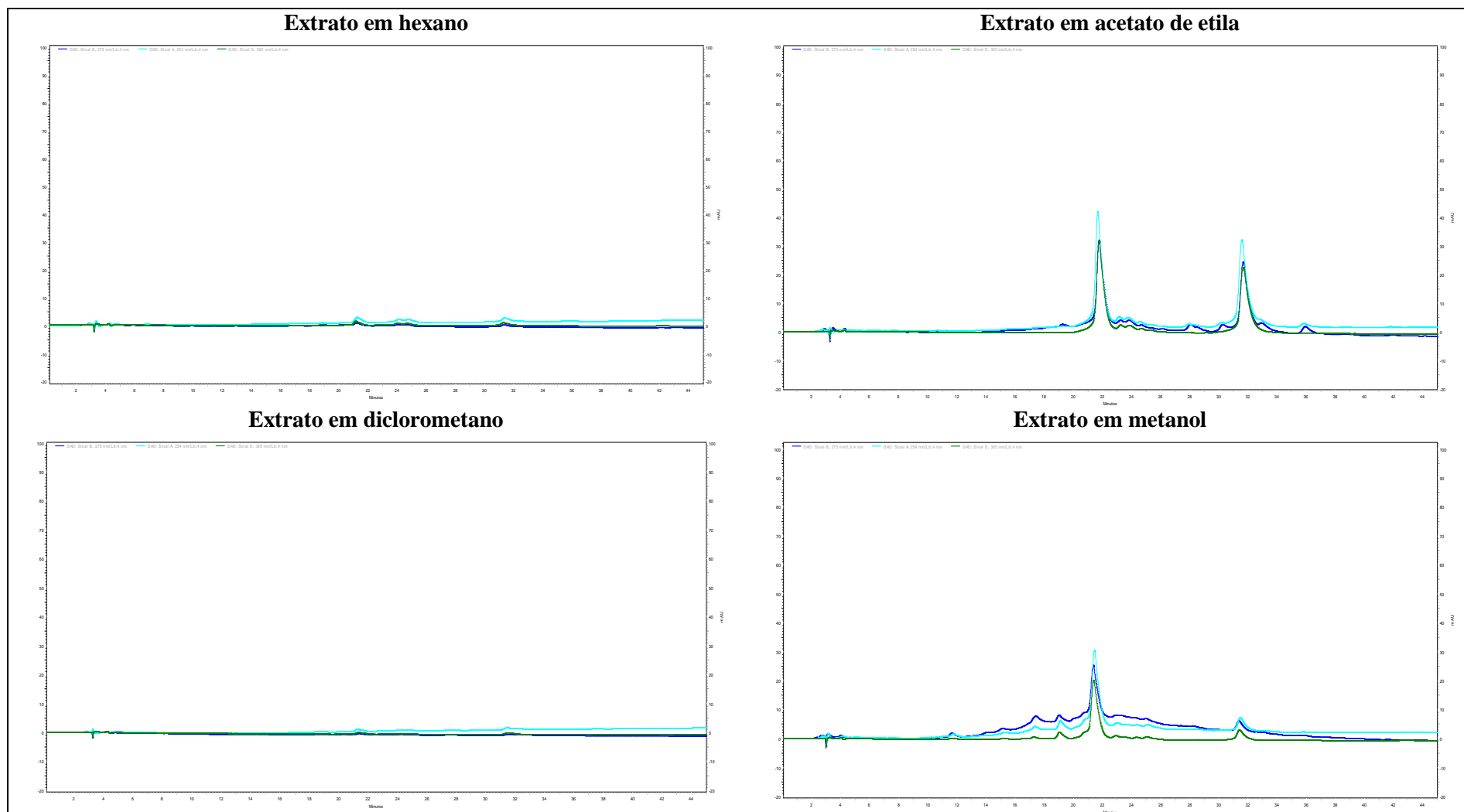
Condições: coluna fenil-hexil Luna (150 x 4,6 mm d.i., 10 μ m). Vazão 1,0 mL.min⁻¹; Fase móvel: Solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e B – acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v), Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B); 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 μ L (1 mg.mL⁻¹ de amostra preparada em metanol/água - 1:1). Tempo de detecção em DAD: 50 min em 254, 275 e 365 nm.

FIGURA 4. 11 - Cromatogramas dos extratos da espécie *E. suberosum*.



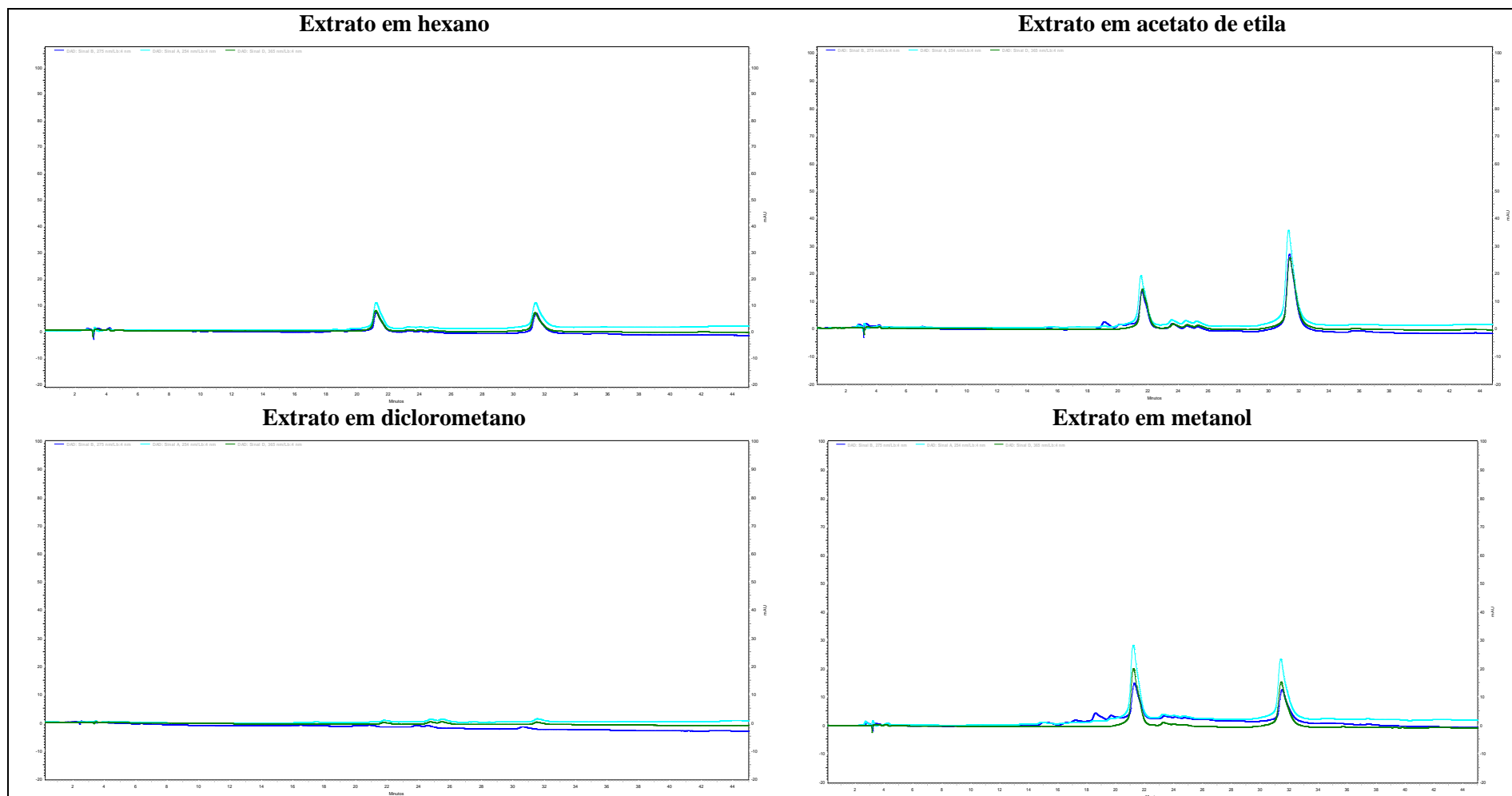
Condições: coluna phenyl-hexyl Luna (150 x 4,6 mm d.i., 10 μ m). Vazão 1,0 mL.min⁻¹; Fase móvel: Solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e B – acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v). Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B); 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 μ L (1 mg.mL⁻¹ de amostra preparada em metanol/água - 1:1). Tempo de detecção em DAD: 50 min em 254, 275 e 365 nm.

FIGURA 4.12 - Cromatogramas dos extratos da espécie *E. campestre*.



Condições: coluna phenyl-hexyl Luna (150 x 4,6 mm d.i., 10 μ m). Vazão 1,0 mL.min⁻¹; Fase móvel: Solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e B – acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v), Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B); 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 μ L (1 mg.mL⁻¹ de amostra preparada em metanol/água - 1:1). Tempo de detecção em DAD: 50 min em 254, 275 e 365 nm.

FIGURA 4.13 - Cromatogramas dos extratos da espécie *E. deciduum*.



Condições: coluna phenyl-hexyl Luna (150 x 4,6 mm d.i., 10 μ m). Vazão 1,0 mL.min⁻¹; Fase móvel: Solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e B – acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,01, v/v), Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B); 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 μ L (1 mg.mL⁻¹ de amostra preparada em metanol/água - 1:1). Tempo de detecção em DAD: 50 min em 254, 275 e 365 nm.

4.2.1.1.1 - Avaliação do potencial citotóxico dos extratos de *Erythroxylum*

A avaliação da atividade citotóxica dos 16 extratos (quatro espécies de *Erythroxylum*), obtidos por extração com homogeneizador ultra turrax, foi investigada usando linhagem celular de carcinoma cervical humano (HeLa). O tempo de incubação das amostras foi de 8 h e os resultados foram expressos como média das repetições utilizando dados da triplicata. As amostras foram testadas nas concentrações 50, 75, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para controle foi utilizado DMSO 1%. Para algumas amostras não foi possível alcançar os valores de IC_{50} , sendo estes estimados pelo programa utilizando o software *GraphPad PRISM version 5* (TABELA 4.6).

TABELA 4.6 - Valores de IC_{50} de extratos de espécies do gênero *Erythroxylum* frente a células HeLa.

Espécies	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Hex	CH_2Cl_2	AcOEt	MeOH
<i>E. campestre</i>	241,3*	28,8	322,8*	36,6
<i>E. deciduum</i>	224,0*	561,3*	52,9	207,0*
<i>E. tortuosum</i>	458,7*	195,6*	386,7*	67,7
<i>E. suberosum</i>	508,0*	38,5	490,*2	92,3

*Valores de IC_{50} estimados pelo programa software *GraphPad PRISM version 5*.

A linhagem HeLa foi sensível aos extratos que apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo estes: diclorometano (28,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e metanol (36,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *E. campestre*; acetato de etila (52,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *E. deciduum*; metanol (67,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *E. tortuosum* e diclorometano (38,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e metanol (92,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *E. suberosum*. Os demais extratos não apresentaram sensibilidade nas concentrações testadas. O potencial citotóxico verificado para estas espécies sugere a presença de substâncias ativas frente as células HeLa, sendo evidenciado pelo perfil químico a presença de flavonoides, classe essa reconhecida como marcadora taxonômica do gênero *Erythroxylum*. González-Guevara *et al.*, (2006) e Mori *et al.*, (1988) avaliaram a citotoxicidade de flavonoides extraídos de plantas frente a células HeLa, e observaram que os valores de IC_{50} variaram conforme as subclasses das substâncias, sendo: flavonas (2,6-54,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); flavonol (6,3-60,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), flavanona (7,9-15,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), flavanonol (23,3-49,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e catequinas (18,4-100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Segundo MONEIM *et al.* (2016), várias classes de produtos naturais são utilizadas como agentes anticancerígenos, como: alcaloides, flavonoides, polissacarídeos, taninos, terpenoides e saponinas, os quais podem estar presentes nas espécies em estudo, variando a majoritariedade entre as espécies. A atividade citotóxica do gênero *Erythroxylum* foi descrita em células de carcinoma e adenocarcinoma. O estudo com *E. pervillei* mostrou que o extrato metanólico e os alcaloides tropânicos isolados inibiram o crescimento de células KB-V1 (carcinoma de cérvix humana resistente a multidrogas) na presença de vimblastina, sendo esta espécie muito citotóxica para células KB (carcinoma epidermóide oral). Os alcaloides isolados, pervillene B e C, apresentaram citotoxicidade em adenocarcinoma do ovário (SKOV3) e adenocarcinoma do ovário resistente a multidrogas (SKVLB), incubadas com adriamicina (SILVIA *et al.*, 2001; MI *et al.*, 2002).

4.2.1.2 - Extratos etanólicos de *E. deciduum*

A partir dos resultados obtidos com os extratos obtidos por ultra turrax, a espécie *E. deciduum* foi selecionada para o estudo químico, pois *E. suberosum* e *E. tortuosum*, estão sendo estudadas por outros integrantes do grupo de pesquisa. Considerando aspectos relacionados a Química Verde, foram preparados extratos utilizando apenas etanol como solvente extrator. Um dos extratos foi preparado utilizando extrator homogeneizador do tipo ultra turrax, para ser analisado comparativamente com os demais extratos utilizando solventes de diferentes polaridades, e outro extrato foi preparado pela técnica de maceração, a fim de obter maior quantidade de material para realizar o isolamento de substâncias (TABELA 4.7).

TABELA 4.7 - Dados da preparação dos extratos das folhas de *E. deciduum* e das frações obtidas após extração líquido-líquido.

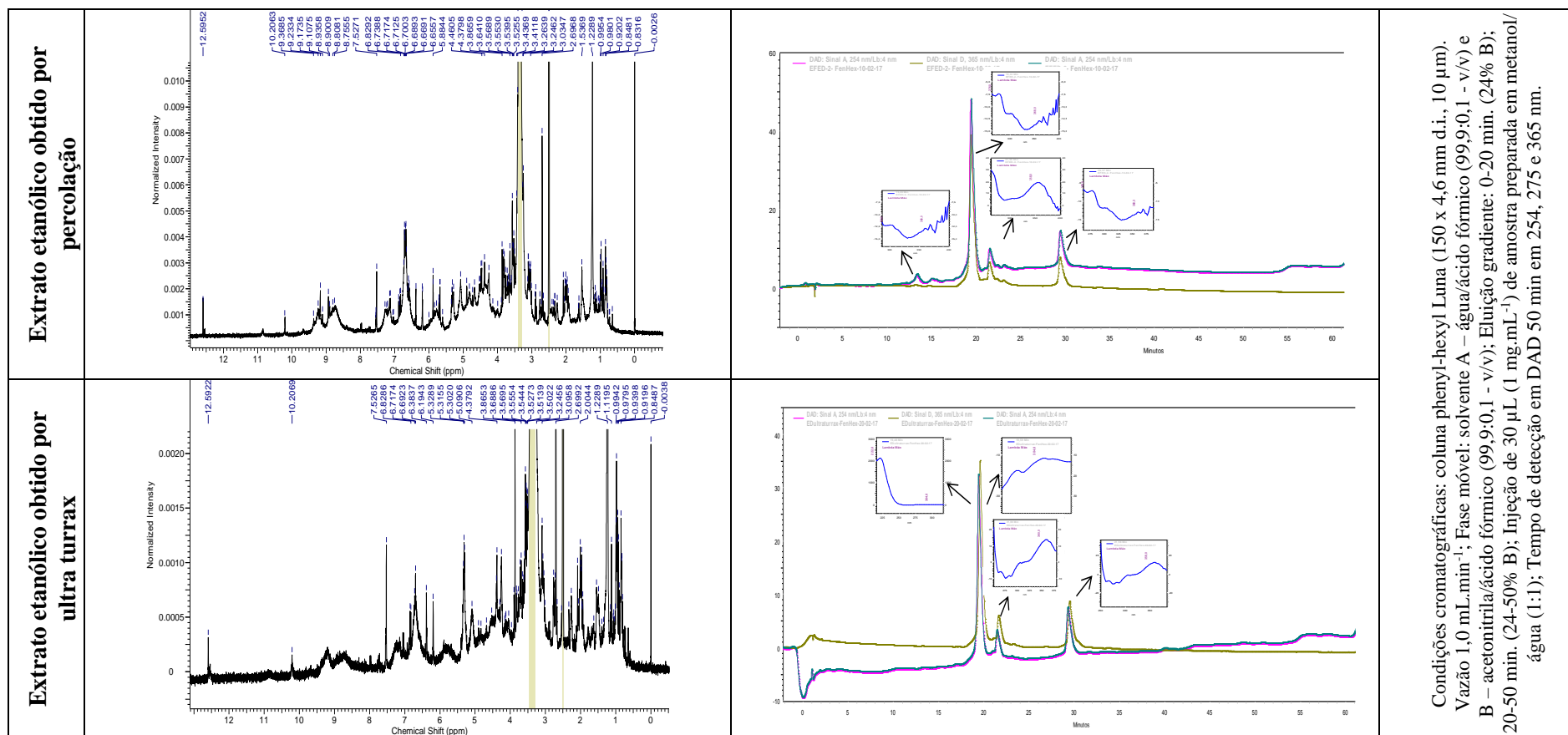
Método de extração	Material vegetal (g)	Extrato etanólico (g)	Rendimento (%)	Massa utilizada (g)	Frações Obtidas (g)			
					FH	FD	FAE	FHM
Percolação	453,0	25,0	5,5	15,0	0,2	0,4	5,1	6,6
Ultra turrax	10,0	1,9	19,2	-	-	-	-	-

Código das frações obtidas por extração líquido-líquido. FH: fração em hexano; FD: fração em diclorometano; FAE: fração em acetato de etila; FHM: fração hidro-metanol.

O perfil químico dos extratos etanólicos de *E. deciduum* foram realizados utilizando as técnicas de CLAE-DAD e RMN ¹H. A composição química mostrou-se bastante heterogênea, mas foi possível observar que o método de extração não interferiu na obtenção dos compostos majoritários (FIGURA 4.14).

A partir das faixas de absorções entre 280-368 nm e as características espectrais observadas por RMN ¹H, evidenciou a presença de classes de compostos com cromóforos, em tempos de retenção intermediários, que sugere um aspecto como a somatória das absorções dos quatro extratos de *E. deciduum* (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), analisados anteriormente. Em ambos os extratos, destaca-se a presença de flavonoides, sendo estes do tipo flavona, flavanonas e flavonois com diferentes substituintes, constatados em comparação com dados da literatura (TABELA 1.2, p. 10) - MABRY *et al.*, 1970). Entretanto, a presença de outros metabólitos secundários não pode ser excluída, pois não pode ser diagnosticado os compostos minoritários.

FIGURA 4.14 - Perfil dos extratos etanólicos de *E. deciduum* obtidos por RMN ¹H (DMSO-*d*₆ - 500 MHz) e CLAE-DAD.



Condições cromatográficas: coluna phenyl-hexyl Luna (150 x 4,6 mm d.i., 10 µm).
 Vazão 1,0 mL.min⁻¹; Fase móvel: solvente A – água/ácido fórmico (99,9:0,1 - v/v) e
 B – acetomirtila/ácido fórmico (99,9:0,1 - v/v); Eluição gradiente: 0-20 min. (24% B);
 20-50 min. (24-50% B); Injeção de 30 µL (1 mg.mL⁻¹) de amostra preparada em metanol/
 água (1:1); Tempo de detecção em DAD 50 min em 254, 275 e 365 nm.

4.2.1.2.1 - Avaliação citotóxica do extrato etanólico de *E. deciduum* obtido por percolação

A avaliação da atividade citotóxica do extrato etanólico de *E. deciduum* (obtido por percolação) foi realizada por ensaios *in vitro* frente a células tumorais de câncer de mama, linhagem 4T1 (TABELA 4.8). O extrato etanólico impediu significativamente o crescimento das células cancerígenas, quando comparado a cisplatina que foi utilizada como controle positivo. Os resultados de sensibilidade da linhagem celular foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento). Nas concentrações de 5 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorreu expressiva inibição do crescimento celular, potência semelhante a observada para o controle cisplatina, o que sugere capacidade citotóxica do extrato e a necessidade de caracterização da composição química do extrato, conjuntamente com a realização de ensaios *in vivo* (PLUIM *et al.*, 2004).

TABELA 4.8 - Análise dos resultados de citotoxicidade do extrato etanólico *E. deciduum*.

Concentração das amostras ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Crescimento celular Média (%)	DP (\pm)
30 (cisplatina)	11	7
0 (controle negativo)	100	14
5	78	11
10	18	4
25	11	1
50	10	1
75	15	4
100	11	0

Assim, como abordado por Souza (2013), a investigação de novos fármacos antitumorais de origem vegetal, compreende associação de técnicas fitoquímicas a testes biológicos. Portanto, neste caso, essa associação de estudos se torna importante, pois não há relatos do isolamento de metabólitos secundários desta espécie com atividade citotóxica.

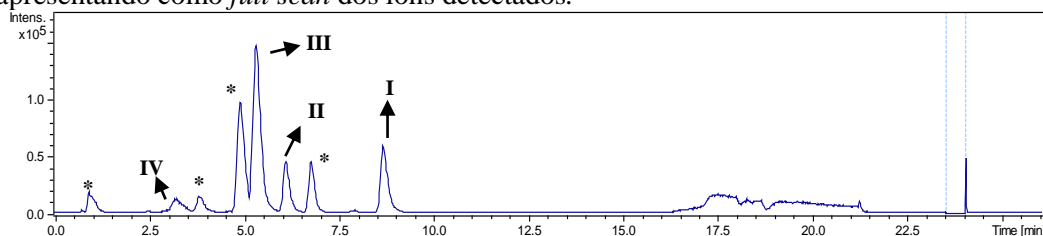
4.2.1.2.2 - Análise por desreplicação do extrato etanólico de *E. deciduum* obtido por percolação

O extrato etanólico da espécie *E. deciduum*, obtido por percolação, foi selecionado para realização da desreplicação (FIGURA 4.15), visto que o mesmo foi estudado quimicamente. A técnica de desreplicação consiste na associação de técnicas analíticas para análise de marcadores químicos da espécie, por comparação com informações presentes na literatura.

A busca resultou no levantamento de íons importantes, sendo as estruturas químicas dos compostos inferidas com base nos dados obtidos por CLUE-QqTOF em análises de espectrometria de massas sequencial no modo negativo de ionização (FIGURA 4.16). As substâncias foram sugeridas considerando a comparação entre fórmulas propostas pelo software *Data Analysis* com menor erro, em conjunto com as buscas nas bases de dados sugeridas pelo *Compound Crowler*, em comparação com dados da literatura para metabólitos secundários presentes no gênero e em outras espécies vegetais (TABELA 4.9). Entretanto, diante da escassez de dados, há íons que ainda necessitam de estudos mais aprofundados, que não foram possíveis de serem identificados.

Em estudos realizados com extratos polares de outras espécies do gênero *Erythroxylum*, *E. coca* var. *ipadu* e *E. novogranatense* var. *truxillense*, foram observados a predominância de flavonoides glicosilados, considerando estes como uma classe marcadora taxonômica para o gênero (JOHNSON *et al.* (2002).

FIGURA 4.15 - Cromatograma do extrato etanólico de *E. deciduum* obtido por percolação, apresentando como *full scan* dos íons detectados.



I-IV: íons extraídos e identificados.

A substância **I**, 4',7-di-*O*-metilquercetina-3-*O*- β -rutinosídeo, foi identificada a partir da extração do íon do cromatograma no t_R 8,6 minutos. O íon precursor m/z 637,1822 gerou um espectro de massas de segunda ordem com íon mais abundante m/z 329,0688, atribuindo a eliminação neutra perda das unidades glicosídicas $[M-(\text{Glu-Rha})-H]^-$, sugerindo a formação da aglicona 4'-7-di-*O*-metilquercetina. O espectro de massas de segunda ordem também apresentou um sinal de m/z 314,0451 que foi correlacionada a perda de $[M-C_{12}H_{21}O_4-CH_3]^-$, indicando a perda de uma metila que de alguma forma estava ligada ao flavonoide (FIGURA 4.16, p. 63). A fórmula molecular proposta ($C_{29}H_{34}O_{16}$) com suas respectivas perdas foram sugeridas pelo software *Data Analysis* com menor erro, comparado as bases de dados contidas no *Compound Crowler* e METLIN, e em comparação com dados da literatura que mostram a presença desta substância em algumas espécies do gênero *Erythroxylum*, como *E. rufum* (BOHN *et al.*, 1982; BOHN *et al.*, 1988), *E. argentinum* (INIGO *et al.*, 1985), *E. minutiolium* (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006), *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014), mas ainda não relatada para *E. deciduum*.

A substância **II** foi identificada como sendo o flavonol kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, proposto a partir da extração do íon do cromatograma no t_R 6,2 minutos. O íon precursor m/z 593,1509 gerou um espectro de massas de segunda ordem com íon mais abundante m/z 285,0422, atribuindo este fragmento a eliminação neutra das unidades glicosídicas $[M-(\text{Gli-Rha})-H]^-$, sugerido a formação do kaempferol (FIGURA 4.17). A fórmula molecular proposta ($C_{27}H_{30}O_{15}$) e a principal perda apresentada no espectro foram sugeridas a partir do software *Data Analysis* com menor erro, comparando com as bases de dados contidas no *Compound Crowler* e METLIN. A literatura reporta a presença desta substância no gênero *Erythroxylum*, em espécies como *E. rufum* e *E. ulei* (BOHM *et al.*, 1982), *E. argentinum* (INIGO *et al.*, 1985), *E. minutiolium* (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006), *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

FIGURA 4.16 – (A) Cromatograma do íon extraído e (B) EM – IES(—) em alta resolução, EM/EM - IES(—) íon m/z 637,1822 (35eV).

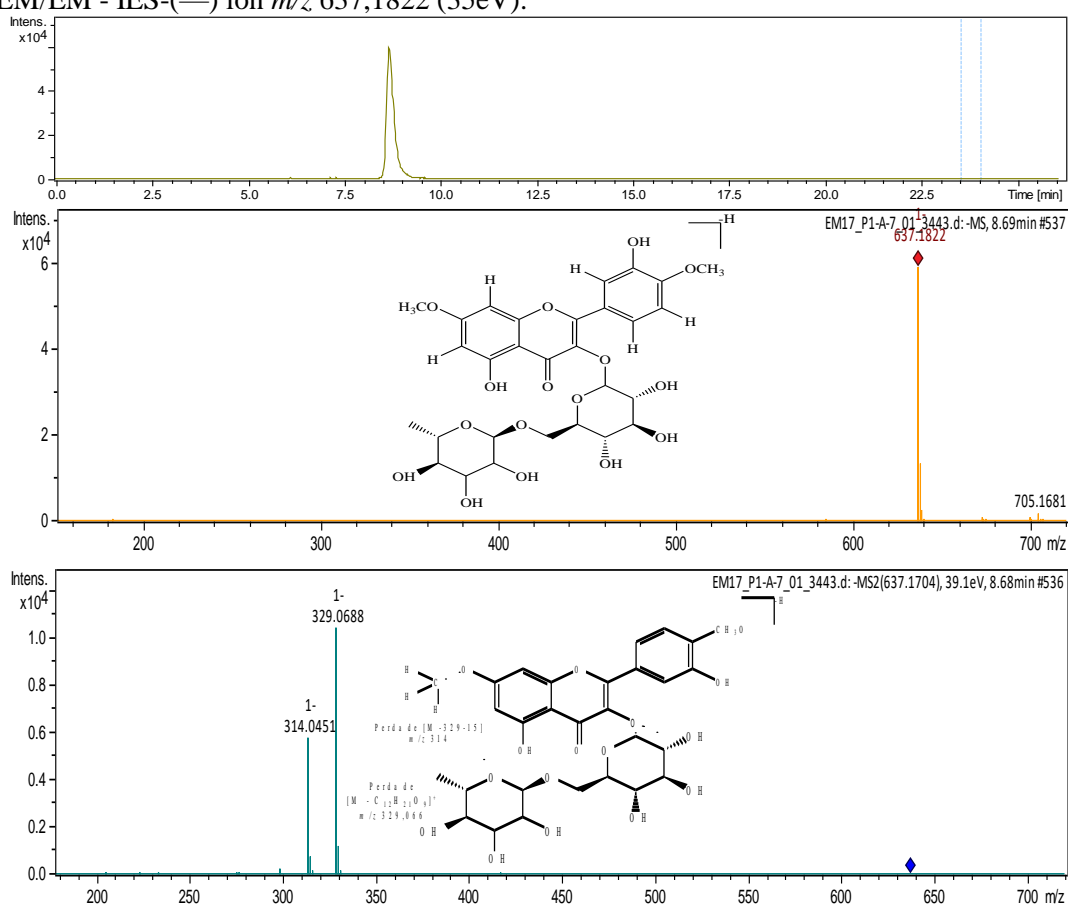
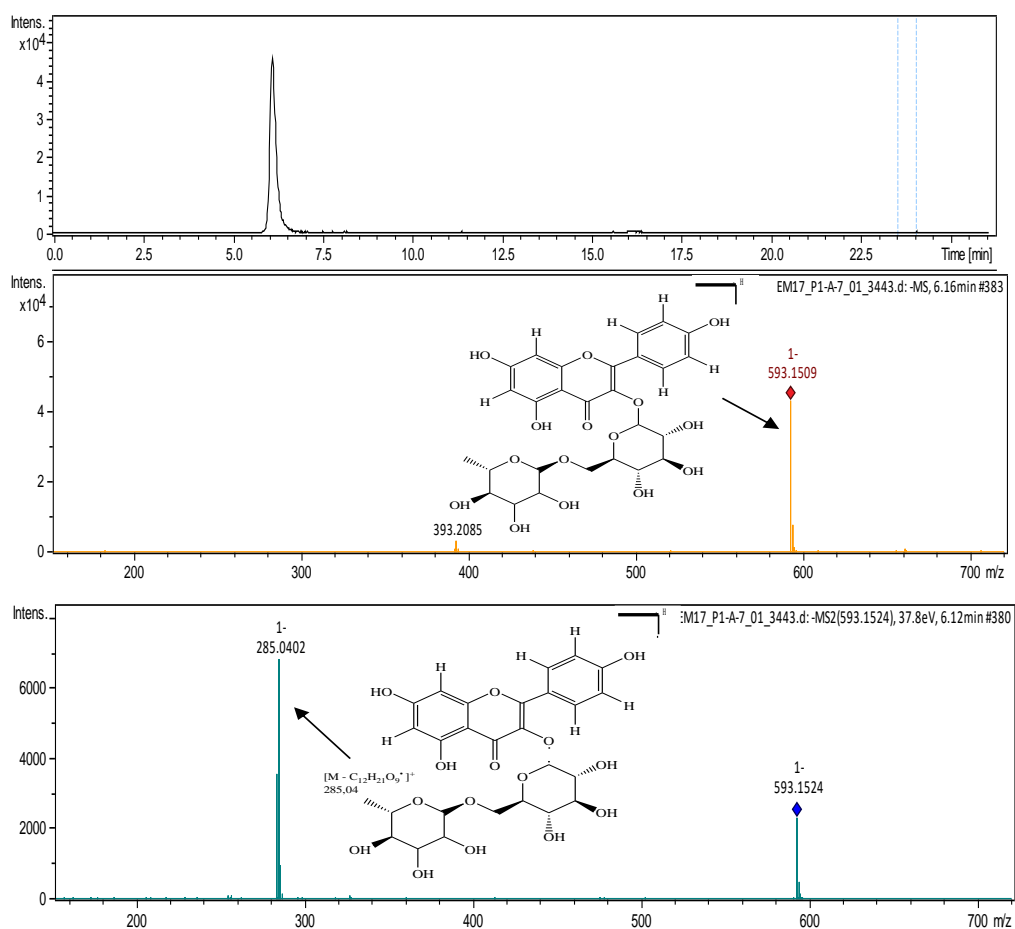


FIGURA 4.17 - (A) Cromatograma do íon extraído e (B) EM – IES(—) em alta resolução, EM/EM - IES(—) íon m/z 593,1509 (35eV).



A substância **III** foi identificada como sendo o flavonol rutina, proposto a partir da extração do íon do cromatograma no t_R 5,4 minutos. O íon precursor m/z 609,0079 gerou um espectro de massas de segunda ordem com íon mais abundante m/z 299,0287, atribuído ao fragmento $[M-H-308,1206]^-$ que foi proveniente da clivagem homolítica ocorrida entre as unidades glicosídicas e a glucona $[M-C_{12}H_{21}O_9]^-$, levando a formação do kaempferol (FIGURA 4.18). A fórmula molecular proposta ($C_{27}H_{30}O_{16}$) e a fragmentação principal foram sugeridas pelo software *Data Analysis*, comparando com informações das bases de dados contidas no *Compound Crowler* e METLIN. Leite *et al.* (2014) relatou essa substância para a espécie *E. suberosum*, sendo sua presença também reportada em outros gêneros, (FARIAS *et al.*, 2014, FERREIRA *et al.*, 2014; JANG *et al.*, 2016; PARDEDE *et al.*, 2017).

A substância **IV**, catequina ou epicatequina, foi extraída do íon do cromatograma no t_R 3,2 minutos, sendo o íon precursor m/z 289,0715. A sugestão da fórmula molecular ($C_{15}H_{14}O_6$) foi realizada assim como os demais, sugeridos pelo software *Data Analysis* com menor erro, comparado com informações contidas nas bases de dados do *Compound Crowler* e METLIN (FIGURA 4.19). Embora não tenham sido realizadas as análises de massa sequencial, substâncias como estas foram comumente identificadas em outras espécies do gênero *Erythroxylum*, como *E. rufum* (BOHN *et al.*, 1982), *E. argentinum* (INIGO *et al.*, 1985), *E. novogranatense* (BONEFELD *et al.*, 1986), além da sua presença em outras famílias (FERREIRA *et al.*, 2014; JANG *et al.*, 2016; PARDEDE *et al.*, 2017).

Considerando que as substâncias **I**, **II** e **III** apresentaram como pico base a perda de 308 Da ($[M-308]$), e as comparações que foram realizadas nas bases de dados, sugeriu-se que estes metabólitos possuem unidades glicosídicas glucose-raminose $[M-C_{12}H_{21}O_9]^+$. Entretanto, através dos dados obtidos não pode ser confirmado a identidade destas unidades, devido a existência de monossacarídeos com mesma massa molecular. A posição da glicosilação não pode ser determinada somente com os dados obtidos por EM/EM, o que ressalta a importância de hifenação de técnicas para identificação estrutural, amparado pela revisão bibliográfica do gênero/espécie. As propostas de fragmentação das substâncias **I** e **II** encontram-se na seção 4.2.2, uma vez que estas foram isoladas nos fracionamentos da fração em acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum*, obtido por percolação.

FIGURA 4.18 - (A) Cromatograma do íon extraído e (B) EM – IES(—) em alta resolução, EM/EM - IES(—) íon m/z 609,0079 (35eV).

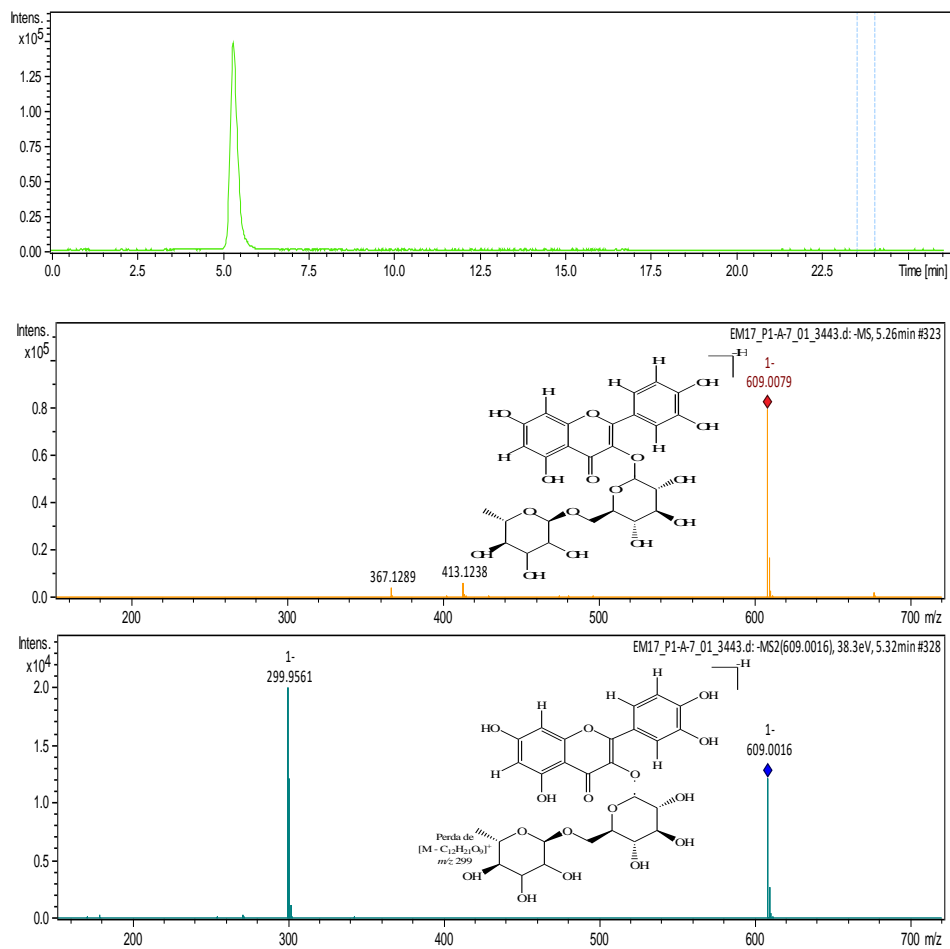


FIGURA 4.19 - Cromatograma do íon extraído e espectro ESI(-) QqToF MS/MS (35 eV) da substância **IV** de m/z 289,0715.

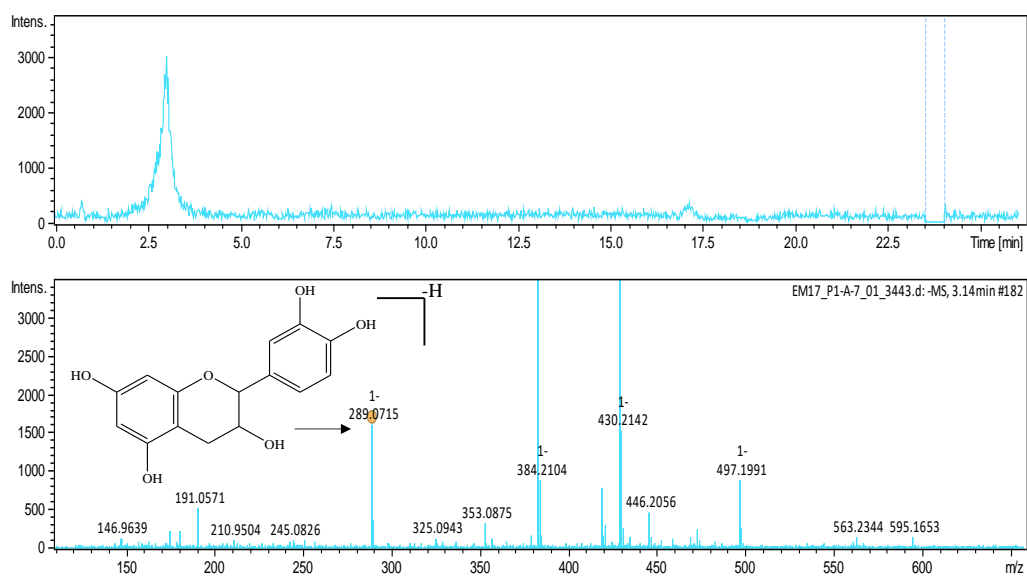


TABELA 4.9 - Substâncias identificadas por CLUE-EM no modo negativo de ionização (ESI) do extrato etanólico de *E. decidum* (obtido por percolação).

Nº	Substância	t _r * (min)	m/z observada [M - H] ⁻	m/z teórica	Fragmentos MS/MS (m/z)	Erro experimental (ppm)	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Referência
I	4',7-di- <i>O</i> -metilquercetina-3- <i>O</i> -β-rutinosídeo	8,7	637,1822	637,1774	329,0688 314,0451	-0,3	7,5	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2014
II	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	6,1	593,1509	593,1512	285,0402	0,3	1,0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	BOHN <i>et al.</i> , 1982
III	rutina	5,4	609,0079	609,1461	299,0287	-0,5	-2,0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	GONZÁLEZ- GUEVARA <i>et al.</i> , 2014
IV	catequina ou epicatequina	3,2	289,0715	290,0795	-	0,8	1,0	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2013

* t_r:Tempo de retenção.

4.2.2. Identificação estrutural dos flavonoides isolados de *E. deciduum*

Os dois flavonoides identificados foram isolados das folhas de *E. deciduum*, provenientes da fração FAC do extrato etanólico obtido por percolação. Estes compostos foram caracterizados através de análises por CLUE-EM e experimentos uni e bidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C , em comparação com dados da literatura.

A substância **I** (5 mg) foi caracterizada como sendo o flavonol 7,4'-di-*O*-metilquercetina-3-*O*- β -rutinosídeo, também conhecido como ombuina-3-rutinosídeo. Este composto foi relatado anteriormente para quatorze espécies do gênero *Erythroxylum* (NASCIMENTO, 2014), entre elas *E. rufum* (BOHN *et al.*, 1982), *E. novoratanense* (BOHN *et al.*, 1988), *E. argentinum* (INIGO *et al.*, 1985), *E. minutiolum* (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006), *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Os trabalhos sugerem que ombuinas glicosiladas são marcadores taxonômicos característicos para este gênero.

A partir do espectro de RMN ^1H , foi observado que a substância **I** não estava pura, mas que os principais sinais são suficientes para realizar a elucidação estrutural (TABELA 4.10; FIGURA 4.20). O espectro apresentou sinais característicos de flavonol glicosilado, sendo dois dubletos em δ_{H} 6,36 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H) e 6,62 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H), característicos dos hidrogênios H-8 e H-6 de flavonoide substituído nas posições 5 e 7; um duplo dubleto em δ_{H} 7,76 (*dd*, $J = 2,2$ e 8,6 Hz, 1H), um dubleto em δ_{H} 7,05 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 1H) e outro dubleto em δ_{H} 7,71 (*d*, $J = 2,2$ Hz, 1H), atribuídos aos H-6', H-5' e H-2', respectivamente, típico de um sistema ABX do anel B. A ausência de outros sinais desblindados sugeriram a existência de um flavonol.

O fato de existir dois singletos em δ_{H} 3,89 (*s*, 3H) e δ_{H} 3,95 (*s*, 3H), integrando para três hidrogênios cada sinal, sugere a presença de duas metoxilas em ambientes químicos diferentes. Alguns sinais foram observados apenas a partir da análise dos espectros realizados em DMSO- d_6 (FIGURA 4.21), como singletos desblindados em δ_{H} 12,54 (*s*, 1H) e 9,22 (*s*, 1H), sugerindo a presença de hidroxilas na posição 5 do anel A e nas posições 3' ou 5' do anel B, evidenciados pelo ambiente químico e comparados com dados da literatura.

Foi observada a existência de duas unidades glicosídicas a partir de sinais compatíveis a hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,39 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 1H) e 4,38 (*sl*, 1H). Os tipos de unidades monossacarídicas puderam ser evidenciados pela presença de um dubleto em δ_{H} 3,83 (*d*, $J = 10,0$ Hz, 2H) e outro em δ_{H} 0,97 (*d*, $J = 6,1$ Hz, 3H),

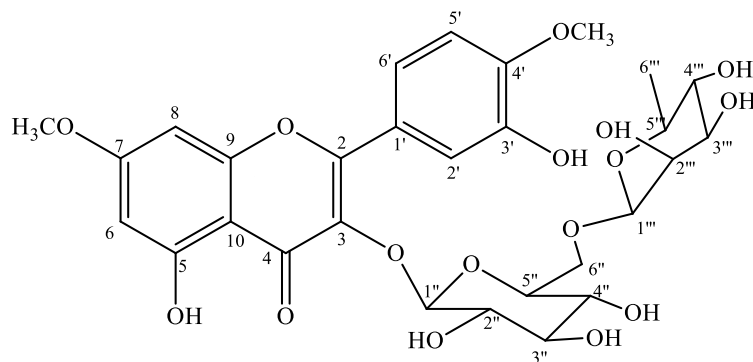
referentes aos hidrogênios metilênicos e metílicos, respectivamente, sugerindo a presença de uma glucose ligada a uma ramnose terminal. Também foram observados multipletos entre δ_H 3-4, correspondentes a acoplamentos vicinais e geminais entre os hidrogênios das unidades glicosídicas. Os sinais dos carbonos anoméricos em δ_C 104,2 e 102,9, reforçam a presença das unidades glucose e raminose, respectivamente, além da presença do sinal em δ_C 18,0 referentes à metila da raminose.

Pela análise do mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.22) foram observadas correlações entre hidrogênios e carbonos a J^I . Na região característica dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 4.23) observou correlação dos sinais de H-6 com C-6 (δ_C 99,4) e H-8 com C-8 (δ_C 93,5), típico do anel A de flavonoides; H-2' com C-2' (δ_C 117,5) e H-6' com C-6' (δ_C 123,2), característico do anel B. Além destes, as duas metoxilas, com sinais em δ_H 3,89 e 3,95, se correlacionam em δ 56,5 e δ 56,3, respectivamente (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006). Para as unidades glicosídicas foi possível observar as correlações de H-1'' com C-1'' (δ_C 104,2) e H-6'' com C-6'' (δ_C 68,5) para a glucose; H-1''' com C-1''' (δ_C 102,9) e H-6''' com C-6''' (δ_C 18,0) da raminose.

Através da análise do mapa de contorno do COSY foi verificado o acoplamento dos sinais de hidrogênios dos anéis aromáticos do flavonoide. No anel A o H-8 (δ_H 6,62) acoplando com o H-6 (δ_H 6,37) e no B H-6' (δ_H 7,76) acoplando com o H-5' (δ_H 7,05), o que confirma os substituintes propostos para os anéis aromáticos (OH e OCH₃) (FIGURA 4.24).

De modo geral, a configuração da unidade glicosídica pode ser determinada a partir do valor da constante de acoplamento $^3J_{1'',2''}$ pois possui dependência direta como o ângulo de diedro (Φ). De acordo com Karplus, hidrogênios que apresentam configuração β (*trans*-diaxiais), com $\Phi = 180^\circ$ têm uma constante de acoplamento elevada entre 7-8 Hz, enquanto os que possuem configuração α (orientações axial-equatorial e equatorial-equatorial), com $\Phi = 60^\circ$, têm constantes de acoplamento entre 1-2 Hz (SINNOTT, 2007). Diante deste contexto, determinou-se a configuração β para o oxigênio ligado ao carbono anomérico C-1'', com valor de $J = 7,6$ Hz. Assim, a configuração β para o oxigênio da unidade rutinosídeo foi evidenciada pelo valor da constante de acoplamento de H-1'' com $J = 7,6$ Hz, e por comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

TABELA 4.10 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) e ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **I**, em comparação com dados da literatura de GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.* (2006) δ_{H} (400 MHz) e δ_{C} (125 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.



H/ C	(400/100 MHz, CD_3OD) $J = \text{Hz}$		GONZÁLEZ-GUEVARA <i>et al.</i> , 2006 (600/150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $J = \text{Hz}$	
	δ_{H} (ppm) $J = \text{Hz}$	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) $J = \text{Hz}$	δ_{C} (ppm)
6	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,0$, 1H)	99,4	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,2$, 1H)	97,7
8	6,62 (<i>d</i> , $J = 2,0$, 1H)	93,5	6,67 (<i>d</i> , $J = 2,2$, 1H)	92,1
OCH_3	3,89 (<i>s</i> , 3H)	56,5	3,87 (<i>s</i> , 3H)	55,5
OCH_3	3,95 (<i>s</i> , 3H)	56,3	3,88 (<i>s</i> , 3H)	55,9
2'	7,71 (<i>d</i> , $J = 2,2$, 1H)	117,5	7,55 (<i>d</i> , $J = 2,3$, 1H)	115,7
5'	7,05 (<i>d</i> , $J = 8,6$, 1H)	-	7,05 (<i>d</i> , $J = 8,7$, 1H)	111,3
6'	7,76 (<i>dd</i> , $J = 2,2$ e 8,6, 1H)	123,2	7,72 (<i>dd</i> , $J = 2,3$ e 8,7, 1H)	121,3
UNIDADES GLICOSÍDICAS				
1''	5,39 (<i>d</i> , $J = 7,6$, 1H)	104,2	5,39 (<i>d</i> , $J = 7,3$, 1H)	101,1
2''	3,60 (<i>m</i>)	72,0	3,60 (<i>m</i>)	73,9
3''	3,63 (<i>m</i>)	-	-	76,3
4''	3,40 (<i>m</i>)	71,5	3,63 (<i>d</i> , $J = 6,4$, 3H)	69,8
5''	3,25 (<i>m</i>)	-	-	75,7
6''	3,83 (<i>d</i> , $J = 10,0$, 2H)	68,5	3,84 (<i>d</i> , $J = 10$, 2H)	66,7
1'''	4,38 (<i>sl</i>)	102,9	4,50 (<i>sl</i>)	100,6
2'''	3,27(<i>m</i>)	-	-	70,2
3'''	3,17 (<i>m</i>)	-	-	70,5
4'''	3,12 (<i>m</i>)	-	-	71,7
5'''	3,25 (<i>m</i>)	-	-	68
6'''	δ_{H} 0,97 (<i>d</i> , $J = 6,1$, 3H)	18,0	0,99 (<i>d</i> , $J = 6,3$, 3H)	17,5

FIGURA 4.20- Espectro de RMN de ^1H da substância I (CD_3OD , 400 MHz).

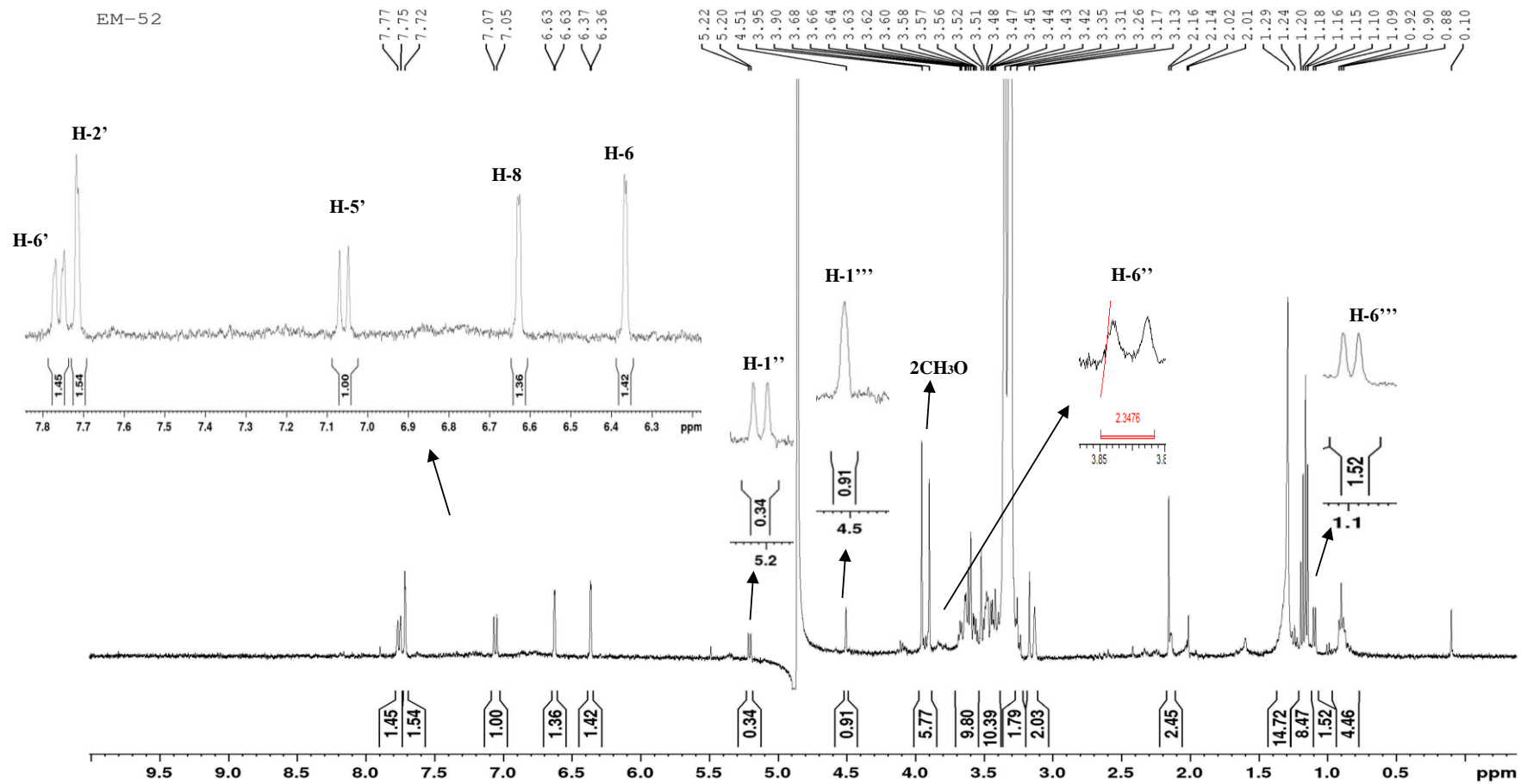


FIGURA 4.21 - Espectro de RMN de ^1H da substância I (DMSO- d_6 , 400 MHz).

EM-31A (20161021).001.ESP

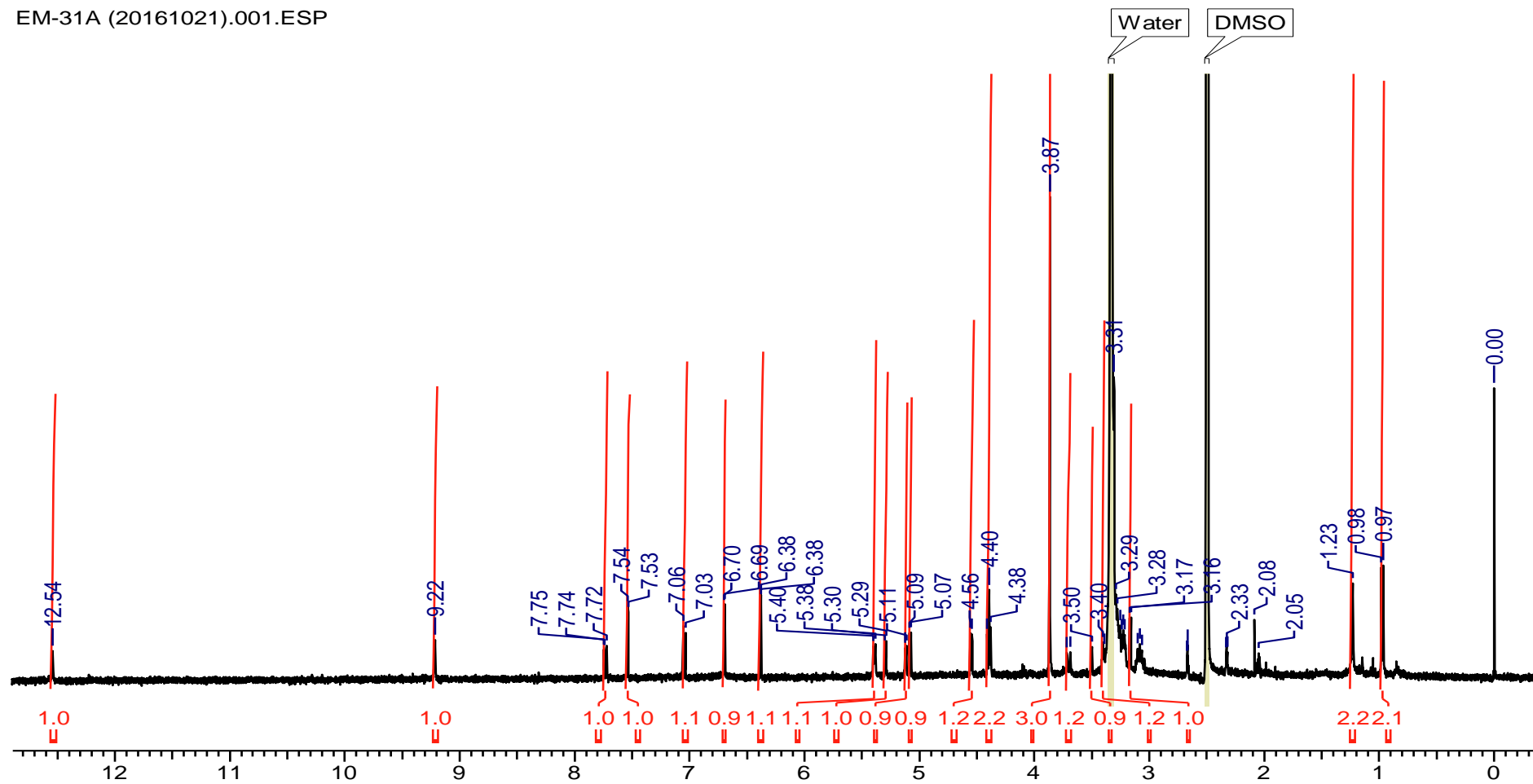


FIGURA 4.22 - Mapa de contorno de HSQC da substância I (CD₃OD, 400/150 MHz)

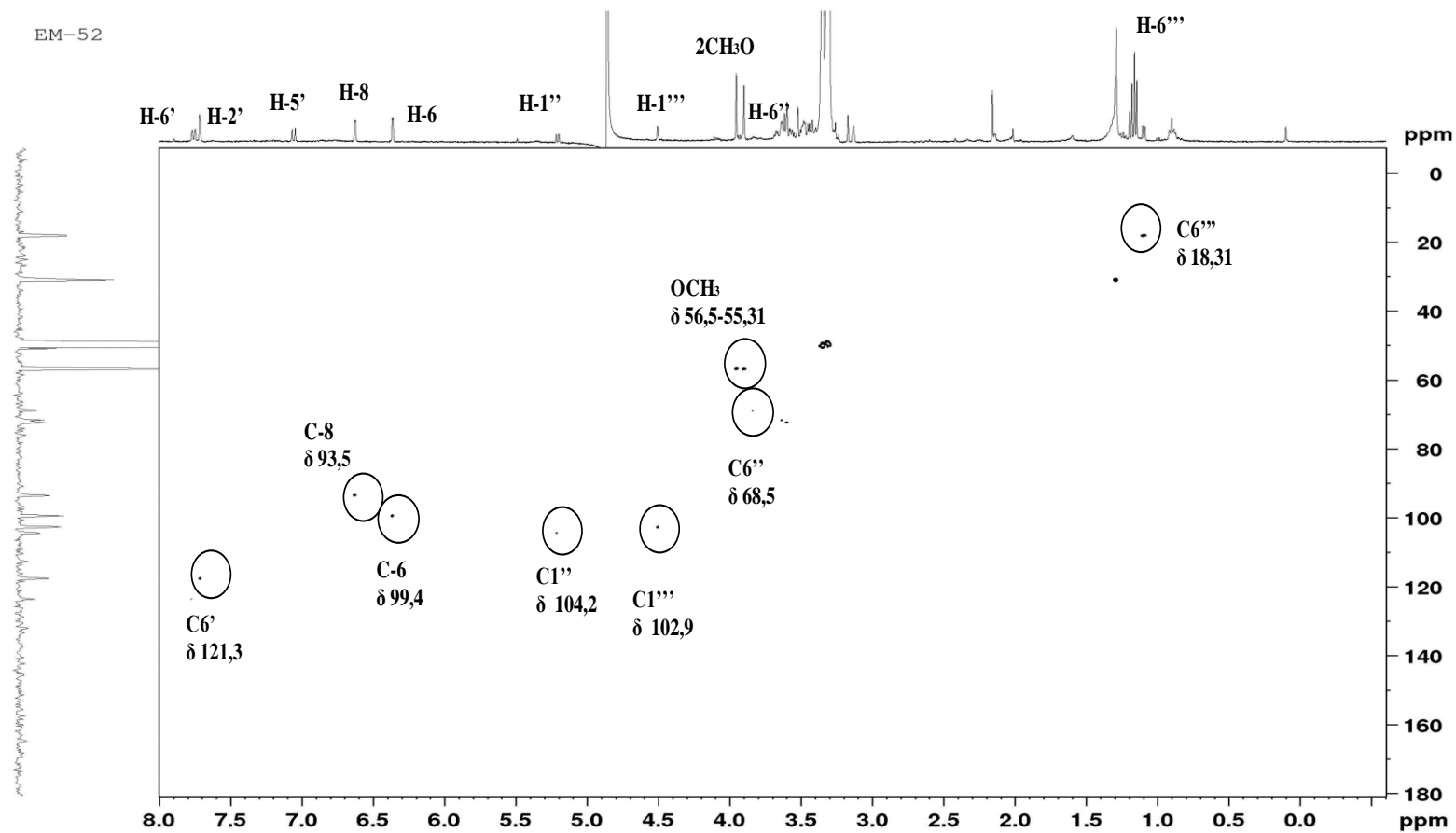
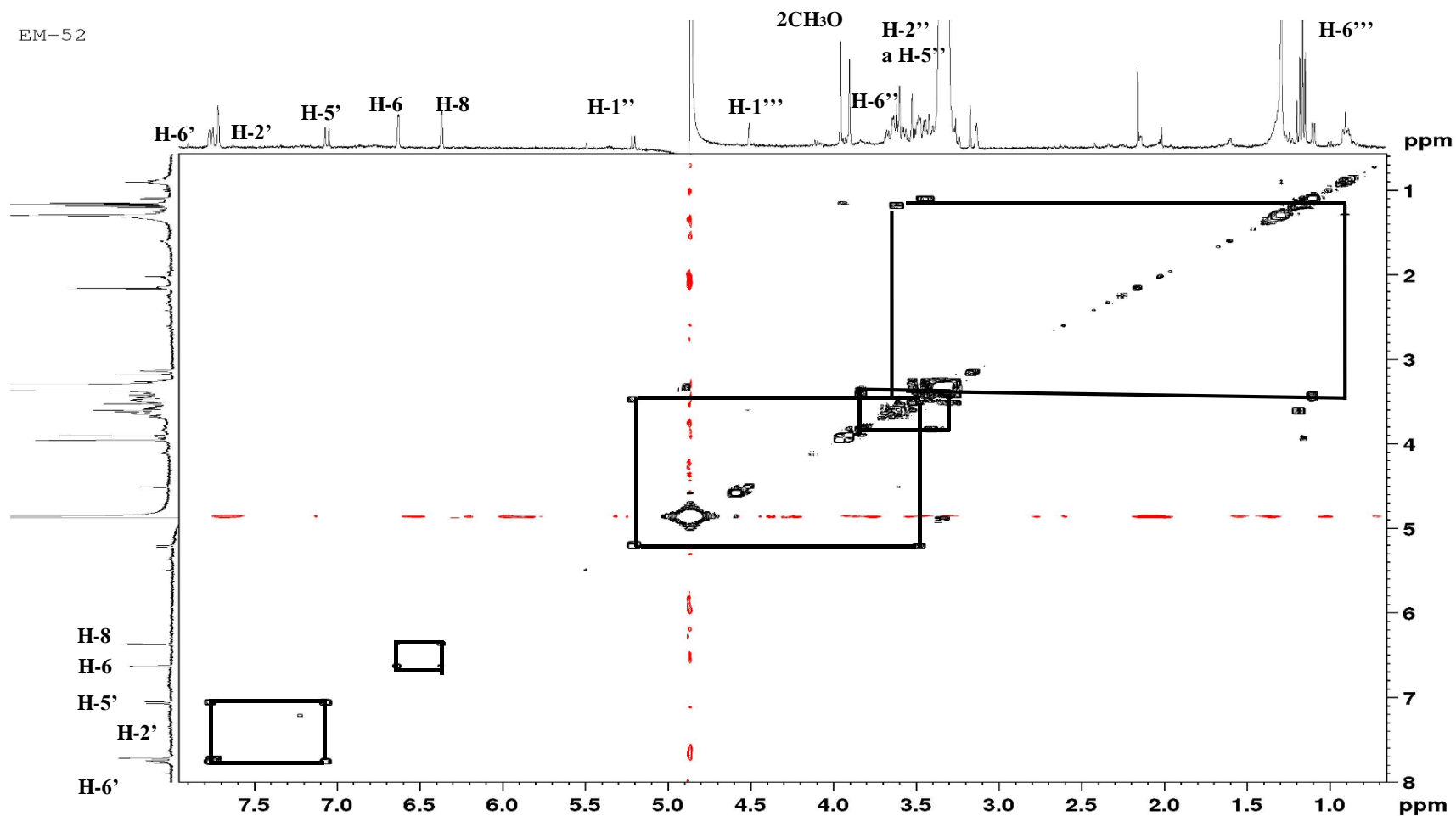
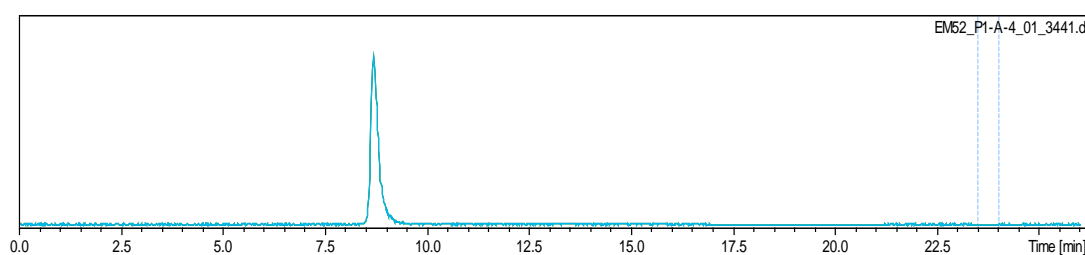


FIGURA 4.24 - Mapa de contorno de COSY da substância I (CD₃OD, 400 MHz).



O flavonol 4',7-di-*O*-metilquercetina-3-*O*- β -rutinosídeo foi submetido a CLUE-EM no modo de ionização negativo $[M-H]^-$ a fim de confirmar a identidade da amostra. No t_R 8,6 minutos foram detectados dois íons totais, sendo a substância **I** confirmada pelo íon precursor m/z 637,1800 (FIGURA 4.25), em comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006).

FIGURA 4.25 - Cromatograma do íon extraído em m/z 637,1800 referente a identificação da substância **I**.



A partir da m/z 637,1809 observada no espectro de primeira ordem (FIGURA 4.26), foi possível comparar com a base de dados realizada pelo *Compound Crawler*, confirmando a fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{16}$. Nos espectros de segunda ordem o pico mais abundante em m/z 329,0676 foi atribuído ao fragmento $[M-H-308,1206]^-$, sugerindo a perda das unidades glicosídicas glicose-raminose $[M-(Glc-Rham)-H]^-$ formando a aglicona 4'-7-di-*O*-metilquercetina. Para os flavonoides *O*-glicosilados podem ocorrer dois tipos de clivagens, homolítica e heterolítica. No espectro de massas da substância **I** foi observado a ocorrência de uma clivagem homolítica, originando um íon radicalar referente ao radical aglicona desprotonado (HVATTUM & EKERBERG, 2003).

Os picos com m/z 314,0451 $[M-(Gli-Rham)-H]^-$ e 299,0235 $[M-(Gli-Rham)-CH_3-H]^-$, foram correlacionados a eliminação neutra das unidades glicosídicas e clivagem homolítica para eliminação de uma metila, respectivamente (FIGURA 4.25, p. 78). Na FIGURA 4.27, é apresentado o mecanismo geral de fragmentação dos flavonoides identificados neste trabalho (FABRE *et al.*, 2001; TIBERTI *et al.*, 2007).

FIGURA 4.26 - Espectros de primeira e segunda ordem ESI(-) QqToF MS/MS (35eV) da substância I de m/z 637,1800.

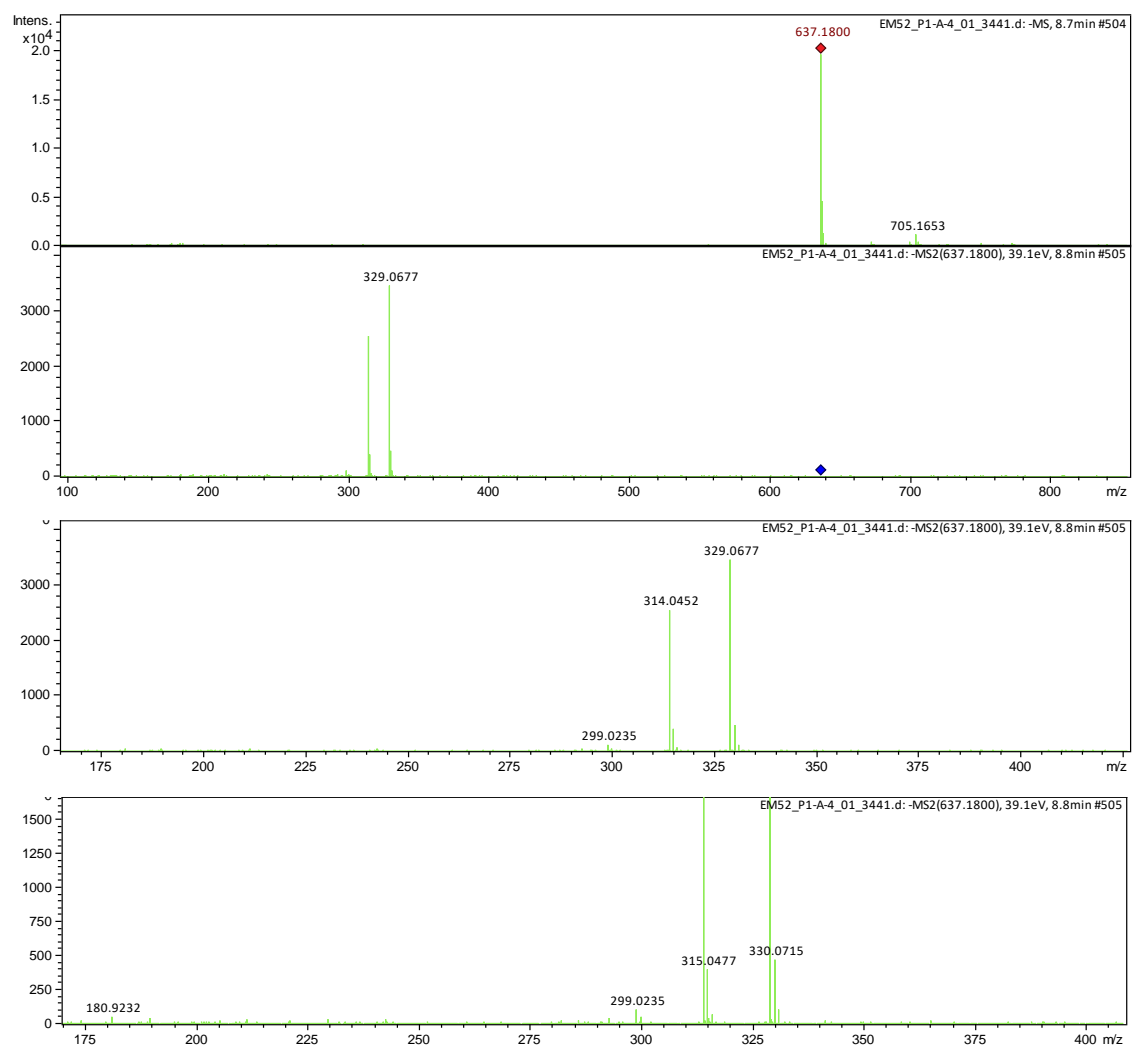
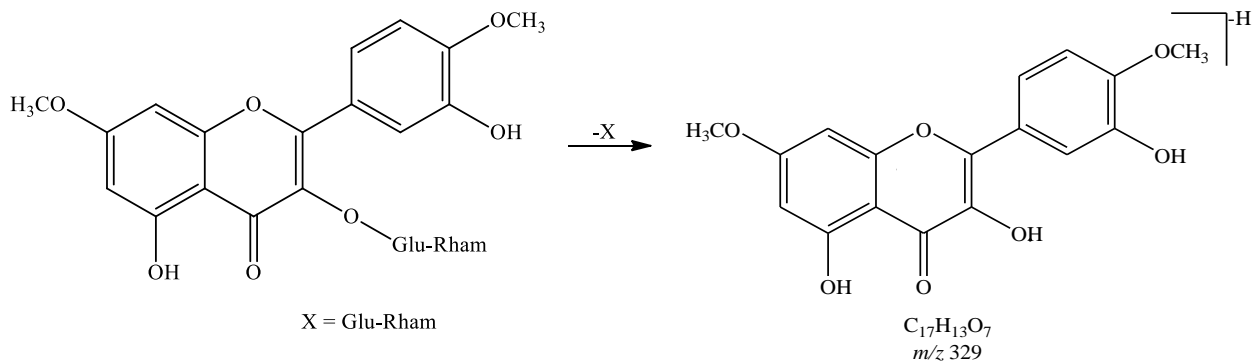
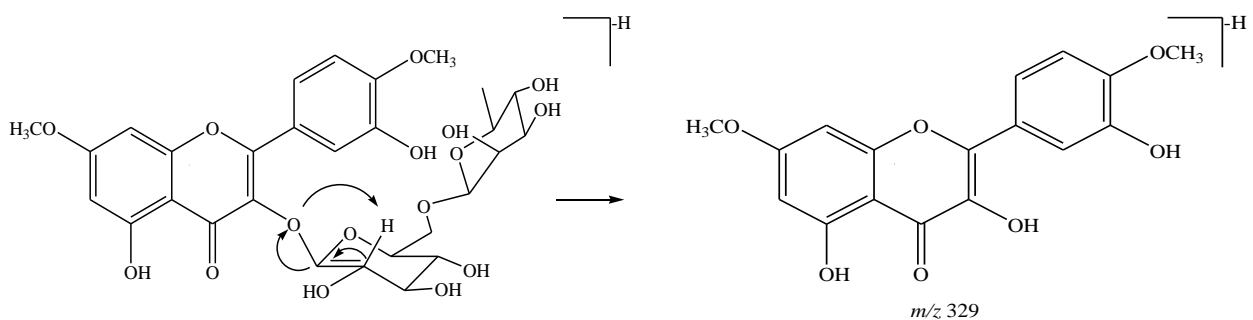


FIGURA 4.27 - Propostas de fragmentações da substância I, segundo adaptações de Frabe *et al.*, (2001), a partir do espectro de massas de segunda ordem extraído de m/z 637,1800.

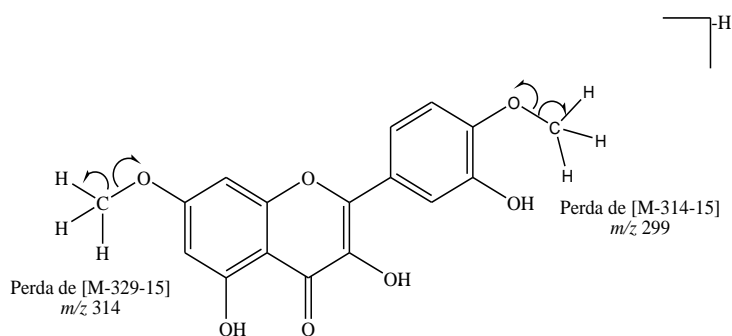
a) Proposta de cisão heterolítica



b) Proposta de fragmentação de rearranjo de hidrogênio



c) Proposta de perda das metilas por cisão homolítica, observados no espectro de segunda ordem em m/z 314,0451 e 299,0235.



A substância **II** foi caracterizada como sendo o flavonol kaempferol-3-rutinosídeo, também conhecido como nicotilorin, também já relatado em espécies do gênero *Erythroxylum* (BOHN *et al.*, 1988). A elucidação estrutural ocorreu a partir de análises de CLUE-EM e experimentos uni e bidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 4.11; FIGURA 4.28), em comparação com dados da literatura Ferreira *et al.* (2014).

A partir do espectro de RMN ^1H , foram observados que a substância **II** não estava pura, mas que seus principais são suficientes para realizar a elucidação estrutural (TABELA 4.11; FIGURA 4.28). O espectro apresentou sinais característicos de flavonol glicosilado, sendo dois singletos largos δ_{H} 6,19 (*sl*, 1H) e 6,40 (*sl*, 1H), característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 de flavonoides substituídos nas posições 5 e 7; e dois dubletos dispostos em ambientes químico diferentes, integrando para dois hidrogênios cada, sendo um em δ_{H} 7,96 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H) referente aos H-2', H-6' (que são hidrogênios equivalentes) e outro em δ_{H} 6,86 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H) atribuídos aos H-3' e H-5' (que são hidrogênios equivalentes), sinais típicos de um sistema AA'BB' do anel B. O sinal δ_{H} 12,56 (*s*, 1H) foi observado como singlete desblindado, integrados para 1H, sugerindo a presença de hidroxila na posição 5, evidenciado pelo ambiente químico e comparado com dados da literatura.

A presença de duas unidades glicosídicas foi evidenciada a partir de sinais característicos de hidrogênios anoméricos, sendo dois dubletos em δ_{H} 5,30 (*d*, $J = 7,3$ Hz) e 4,37 (*d*, $J = 1,0$ Hz), referentes ao H-1'' e H-1'''', sendo estes das unidades glucose e raminose, respectivamente. A sugestão dos tipos de unidades monossacarídicas foi embasada pela presença de um dubleto em δ_{H} 0,97 (*d*, $J = 5,87$ Hz, 3H) referente aos hidrogênios metílicos (H-6'''), sugerindo então a presença de uma ramnose terminal. Também foram observados multipletos entre δ_{H} 3-4, correspondentes a acoplamentos vicinais e geminais entre os hidrogênios das unidades glicosídicas, além da sobreposição de sinais na região característica de hidrogênios metilênicos, respectivamente. Os sinais de carbonos anoméricos em δ_{C} 101,7 e 109,1, reforçam a presença das unidades glucose e raminose, respectivamente, além da presença do sinal em δ_{C} 18,0 referentes à metila da raminose.

Pela análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.29, p. 84) foi possível observar as correlações entre hidrogênios e carbonos a J^1 . Na região desblindada do espectro, observou-se a correlação dos hidrogênios H-6 com C-6 (δ_{C} 99,2) e H-8 com C-8 (δ_{C} 94,2), típicos de anel A de flavonoides. Também foi possível verificar as

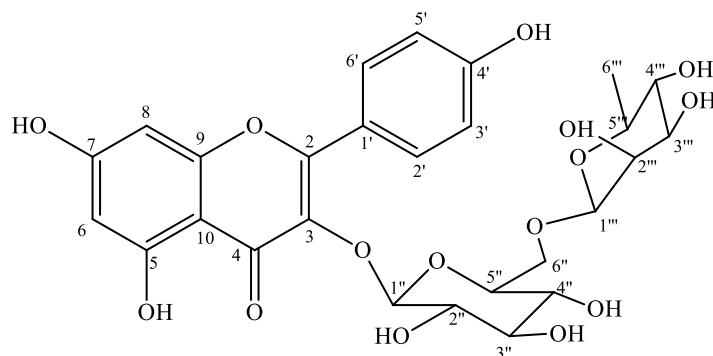
correlações características do anel B, os hidrogênios H-2' e 6' correlacionando com δ_C 131,2 e H-3' e 5' com δ_C 115,43. Estes dados evidenciam que H-2' e 6' e H-3' e 5' são quimicamente e magneticamente equivalentes. Os sinais característicos dos hidrogênios anoméricos, H-1'' e H-1''', apresentaram correlação com δ_C 101,7 e 100,1, respectivamente, assim como H-6''' com δ_C 18,0.

Através da análise do mapa de contorno do COSY foi verificado o acoplamento dos sinais de hidrogênios dos anéis aromáticos do flavonoide, e também entre os hidrogênios das unidades glicosídicas. No anel B, H-2' e 6' (δ_H 7,96) acoplado com o H-5' e H-3' (δ_H 6,86), o que confirma a presença dos substituintes propostos para os anéis aromáticos. Além destes, também foram observados acoplamentos entre os hidrogênios das unidades glicosídicas entre δ 3-3,90 (FIGURA 4.30).

As disposições das unidades glicosídicas foram confirmadas a partir da análise do mapa de contorno de HMBC em que foi observado correlação entre os sinais de H-1''' com C-6'' (δ 68,5), evidenciando que as unidades encontram-se ligadas a partir de uma ligação glicosídica (1''' \rightarrow 6''). A proposta do anel A hidroxilado na posição *para* foi evidenciada por correlações entre os sinais de C-4' (δ 160,3) com OH, H-2' e H-6'; também C-1' apresentou correlação com H-3' e H-5' e com o sinal em 131,2 (C-6') (FIGURA 4.31).

A configuração da unidade glicosídica foi determinada baseados nos conceitos propostos por SINNOTT (2007), em que na configuração β a constante de acoplamento de H-1'' tem valor entre 7-8 Hz, enquanto que o possui configuração α possui constante entre 1-2 Hz. Diante deste contexto, determinou-se a configuração β para o oxigênio ligado ao carbono anomérico C-1'', com valor de $J = 7,3$ Hz. Assim, a configuração β para o oxigênio da unidade rutinosídeo foi evidenciada pelo valor da constante de acoplamento e por comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

TABELA 4.11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para a substância **II**, em comparação com dados da literatura de Ferreira *et al.* (2014) (500/125 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$.



H/C	(400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $J = \text{Hz}$		FERREIRA <i>et al.</i> , 2014 (500/125 MHz) $J = \text{Hz}$	
	δ_{H} (ppm) $J = \text{Hz}$	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) $J = \text{Hz}$	δ_{C} (ppm)
2	-	-	-	155,7
3	-	-	-	133,3
4	-	-	-	177,9
5	-	-	-	161,5
6	6,19 (<i>sl</i> , 1H)	99,2	6,18 (<i>d</i> , $J = 2$)	99,3
7	-	-	-	164,7
8	6,40 (<i>sl</i> , 1H)	94,2	6,41 (<i>d</i> , $J = 2$)	94,1
9	-	-	-	157,7
10	-	-	-	104,1
1'	-	-	-	121,3
2'	7,96 (<i>d</i> , $J = 8,6$, 1H)	131,2	7,98 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	131,4
3'	6,86 (<i>d</i> , $J = 8,6$, 1H)	115,4	6,88 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	115,7
4'	-	160,3	-	160,3
5'	6,86 (<i>d</i> , $J = 8,6$, 1H)	115,4	6,88 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	115,7
6'	7,96 (<i>d</i> , $J = 8,6$, 1H)	131,2	7,98 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	131,4
C5-OH	12,56		12,8	
UNIDADES GLICOSÍDICAS				
1''	5,30 (<i>d</i> , $J = 7,3$, 1H)	101,7	5,30 (<i>d</i> , $J = 7,5$)	101,6
2''	*	74,5	**	74,5
3''	*	76,8	**	76,8
4''	*	70,7	**	70,7
5''	*	76,2	**	76,2
6''	*	68,5	**	68,5
1'''	4,37 (<i>d</i> , $J = 1,0$, 1H)	100,1	4,38 (<i>d</i> , $J = 1,0$)	100,9
2'''	*	70,8	**	70,8
3'''	*	71,2	**	70,9
4'''	*	71,9	**	71,9
5'''	*	68,5	**	68,5
6'''	0,97 (<i>d</i> , $J = 5,87$, 3H)	18,0	0,98 (<i>d</i> , $J = 6,0$)	18,0

* Foram observados sinais entre δ_{H} 3-3,9, como multipletos;

** Segundo os autores, os sinais entre δ_{H} 3-3,9 são referentes aos H2'', H6'', H2''' e H5'''.

FIGURA 4.28 - Espectro de ^1H da substância II (DMSO- d_6 , 400 MHz).

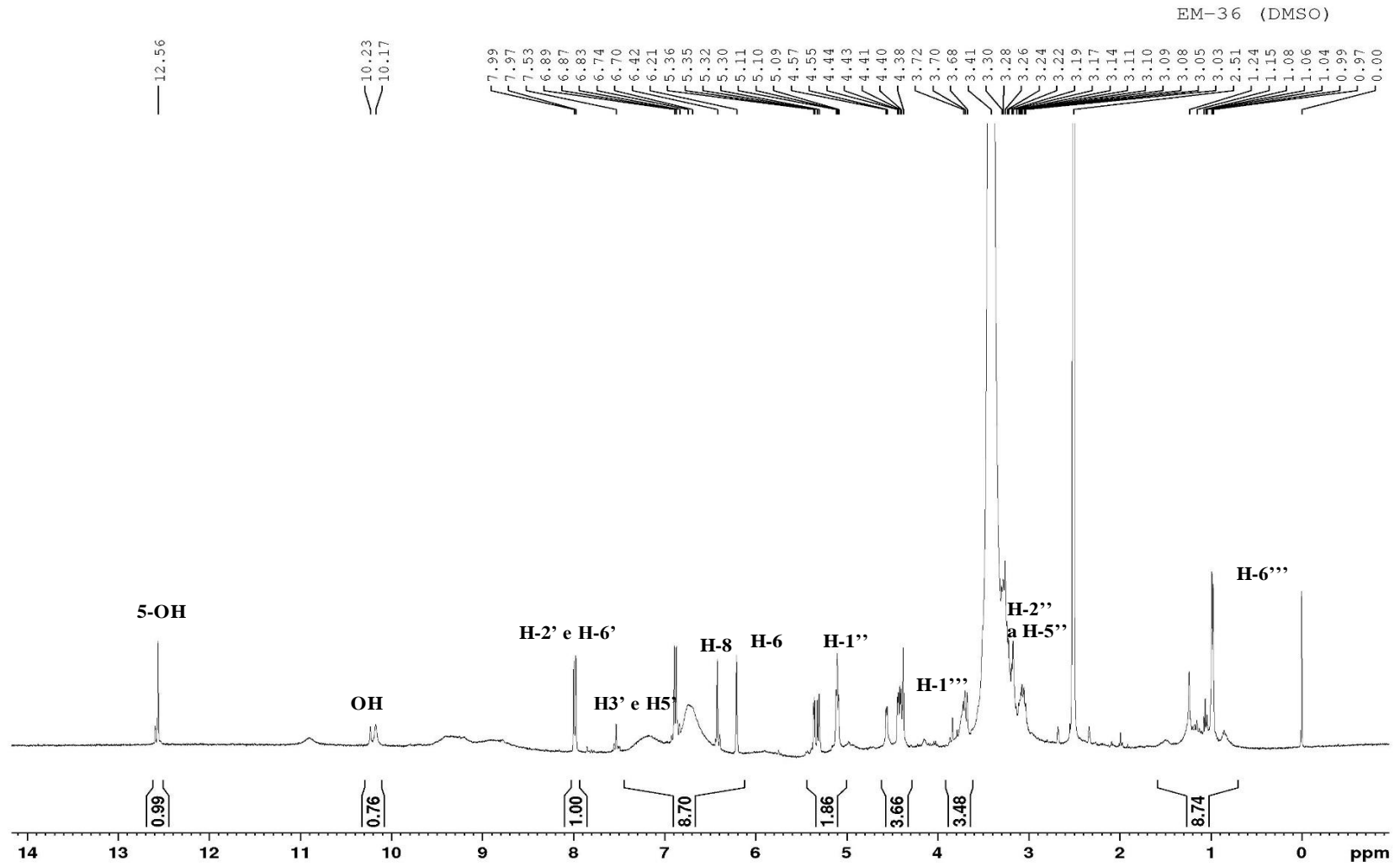


FIGURA 4.29 - Mapa de contorno de HSQC da substância II (DMSO-*d*₆, 400/125 MHz).

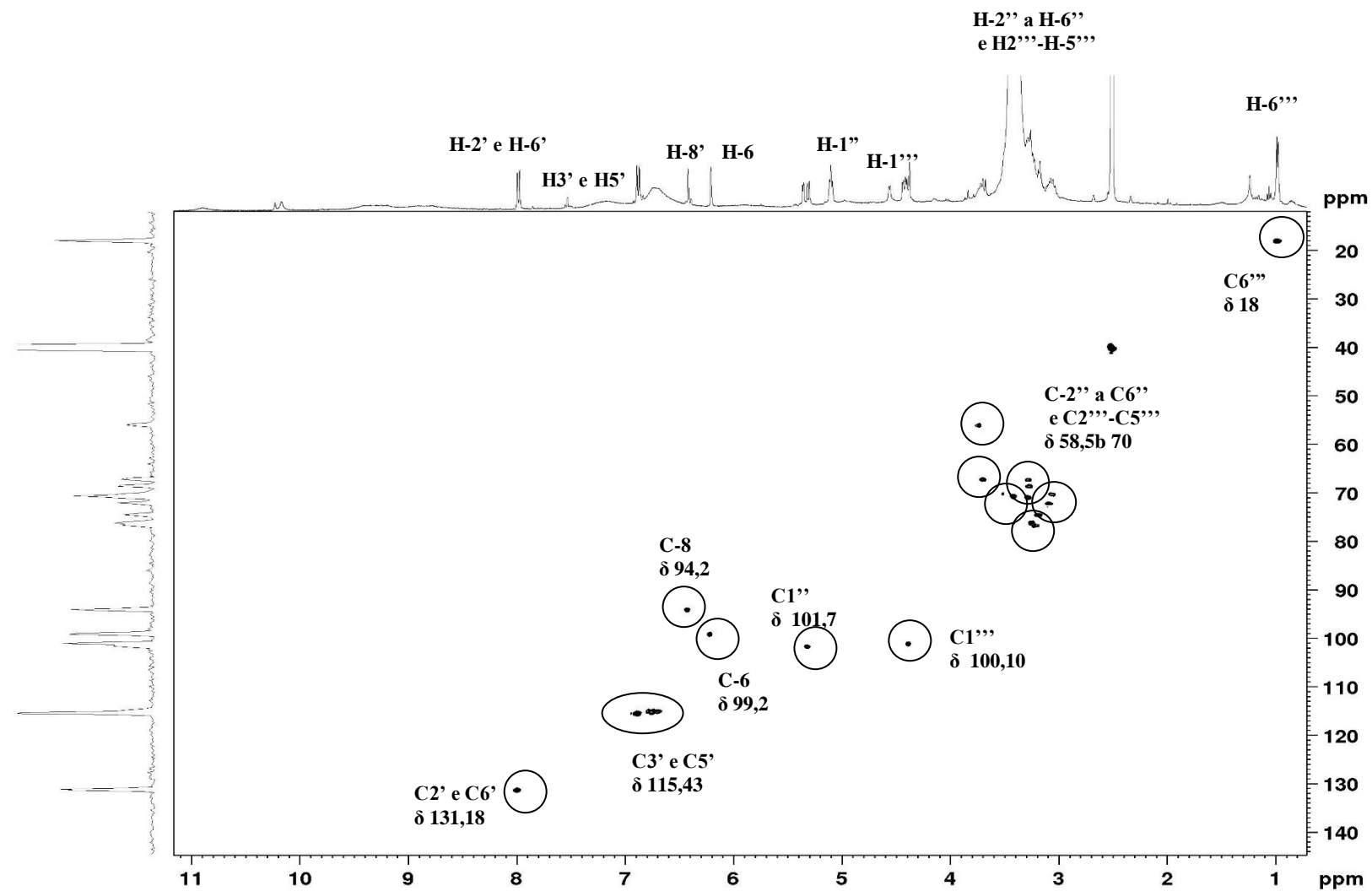


FIGURA 4.30 - Mapa de contorno de COSY da substância **II** (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

EM-36 (DMSO)

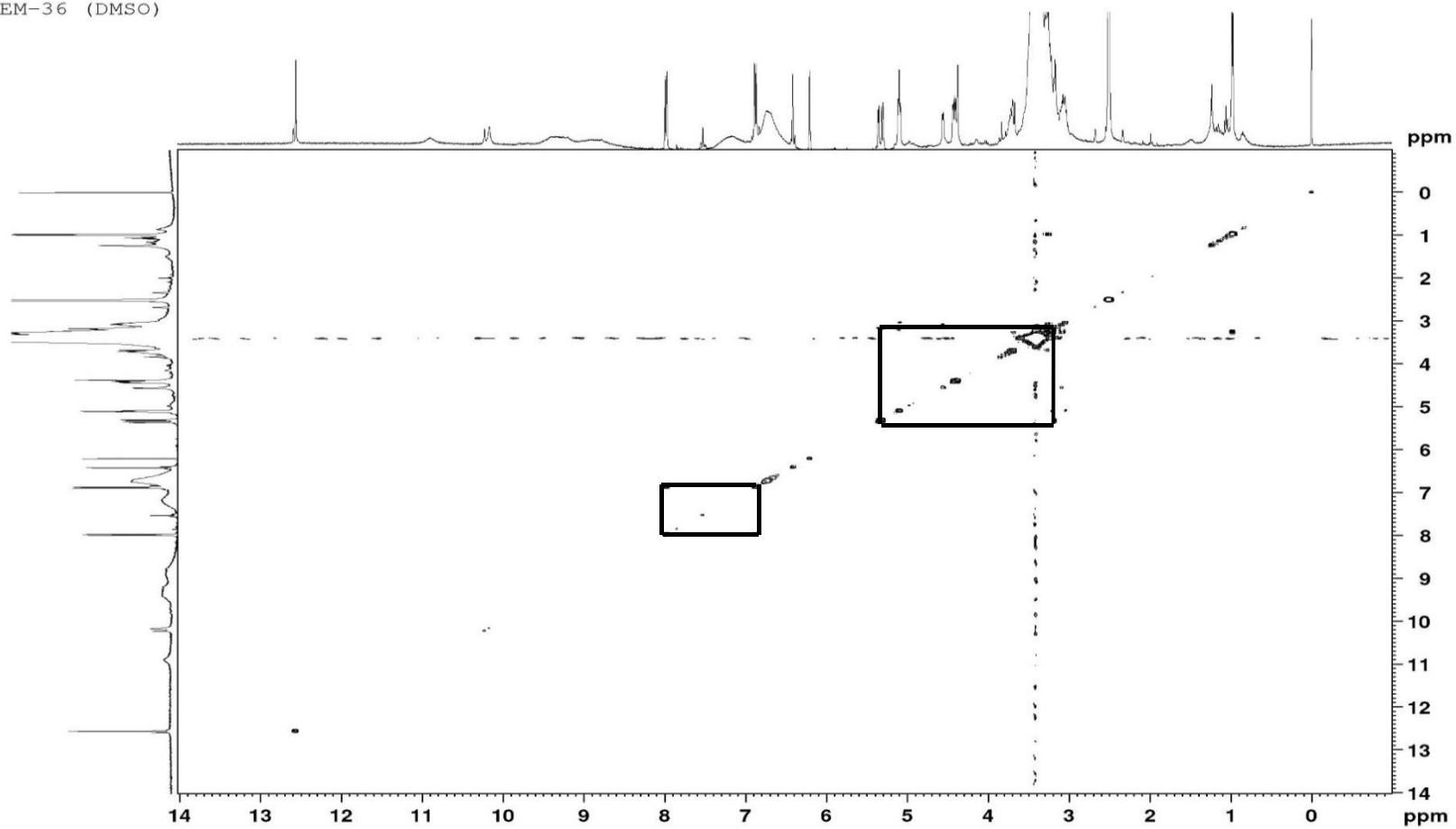
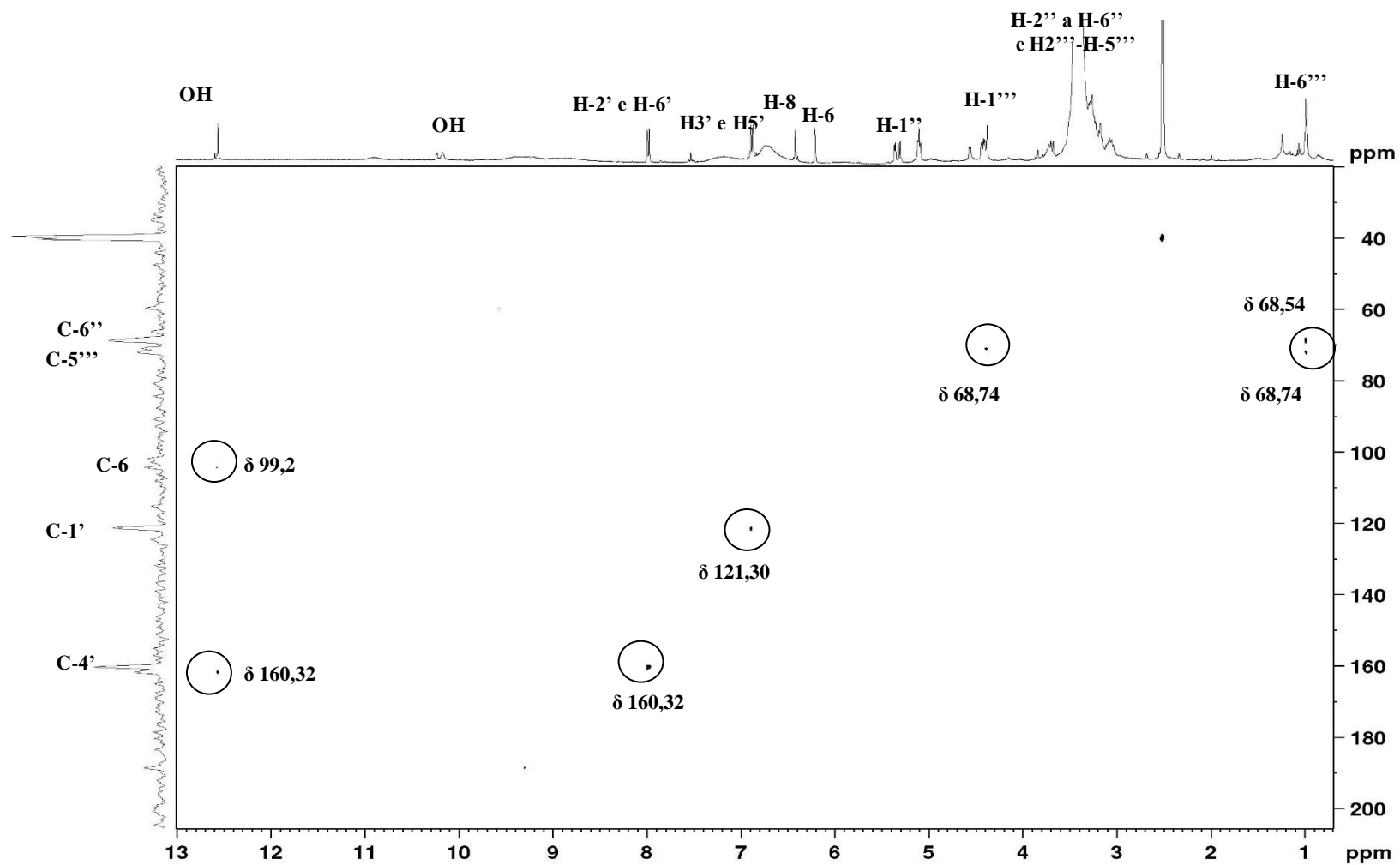
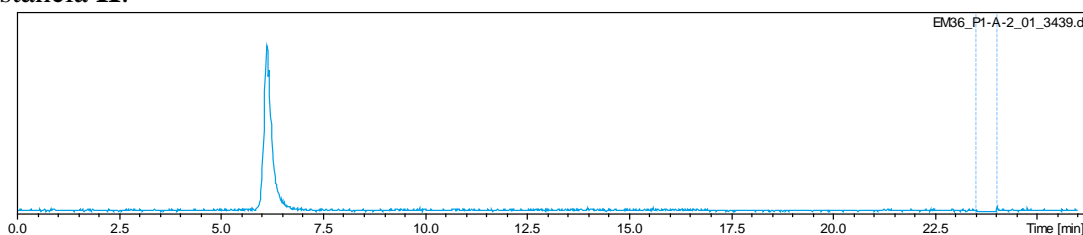


FIGURA 4.31 - Mapa de contorno de HMBC da substância II (DMSO-*d*₆, 400/125 MHz).



O flavonol kaempferol-*O*-rutinosídeo foi submetido à análise por CLUE-EM no modo negativo de ionização $[M-H]^-$ a fim de confirmar a estrutura proposta. Com t_R 6,13 minutos foi detectado o íon total, sendo o kaempferol-*O*-rutinosídeo confirmado pelo íon precursor m/z 593,1512 (FIGURA 4.32).

FIGURA 4.32 - Cromatograma do íon extraído com m/z 593,1512 referente a identificação da substância **II**.



O espectro de primeira ordem forneceu um pico com m/z 593,1512 (FIGURA 4.32), confirmando a sua fórmula molecular proposta $C_{27}H_{30}O_{15}$ a partir das buscas nas bases de dados contidas no *Compound Crowler*, e também por comparação com dados da literatura (FARIAS & MENDES, 2014; FERREIRA *et al.*, 2014; JANG *et al.*, 2016; PARDEDE *et al.*, 2017).

Nos espectros de segunda ordem (FIGURA 4.33), foram apresentados dois picos com maior abundância, representado por duas perdas características de flavonoides *O*-glicosilados. O fragmento $[M-H-308,1206]^-$ apresentou-se como o pico mais abundante em m/z 284,0408, sugerindo perda das unidades glicosídicas glucose-raminose $[M-(Glu-Rham)-H]^-$, conhecida como rutinosídica. Por meio de uma clivagem homolítica formou-se a aglicona kaempferol e foi originado um íon radicalar da aglicona desprotonada com m/z 285,0447 (HVATTUM; EKERBERG, 2003).

Na FIGURA 4.34, estão dispostas propostas gerais de fragmentação para a substância **II** (FABRE *et al.*, 2001; TIBERTI *et al.*, 2007). Vale ressaltar que algumas fragmentações que forneceriam informações sobre a posição das unidades glicosídicas, foram observadas apenas como ruídos e devido baixa intensidade no espectro de massas de segunda ordem não foram propostas.

FIGURA 4.33 - Espectros de primeira e segunda ordem ESI(-) QqToF MS/MS (35eV) da substância II de m/z 593,10.

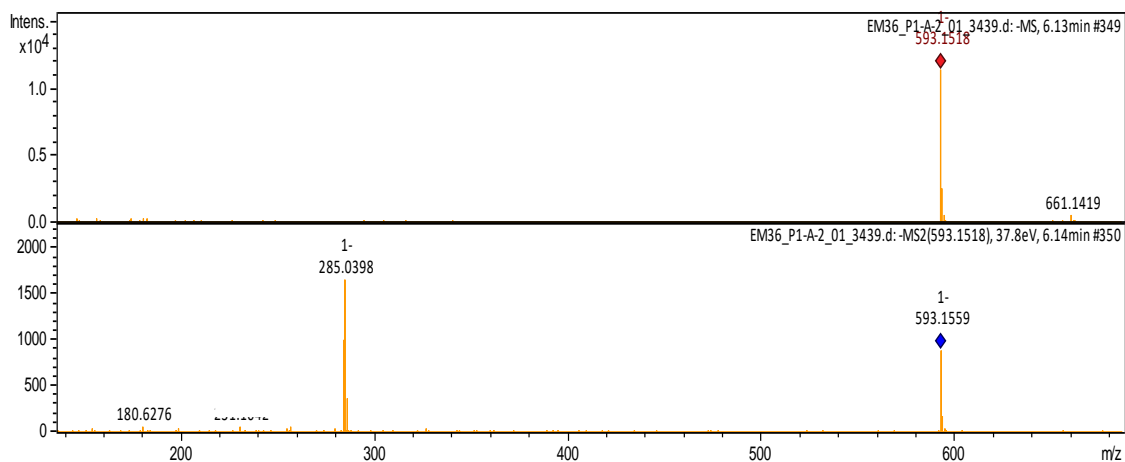
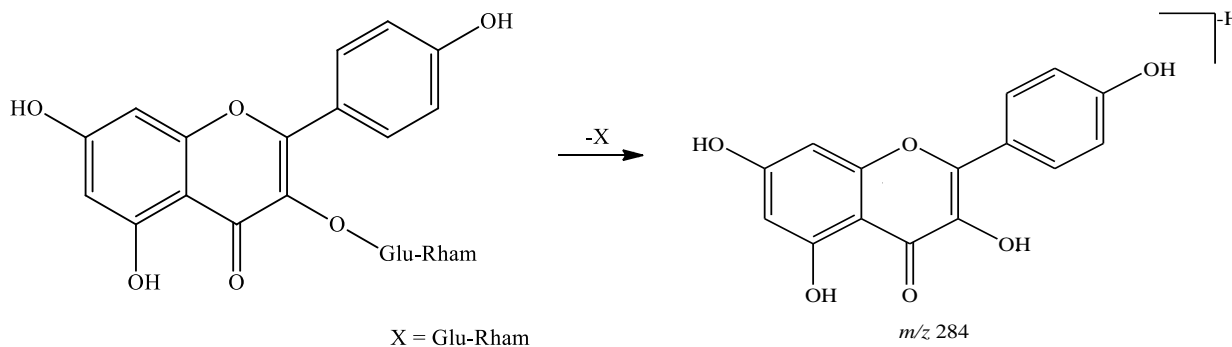
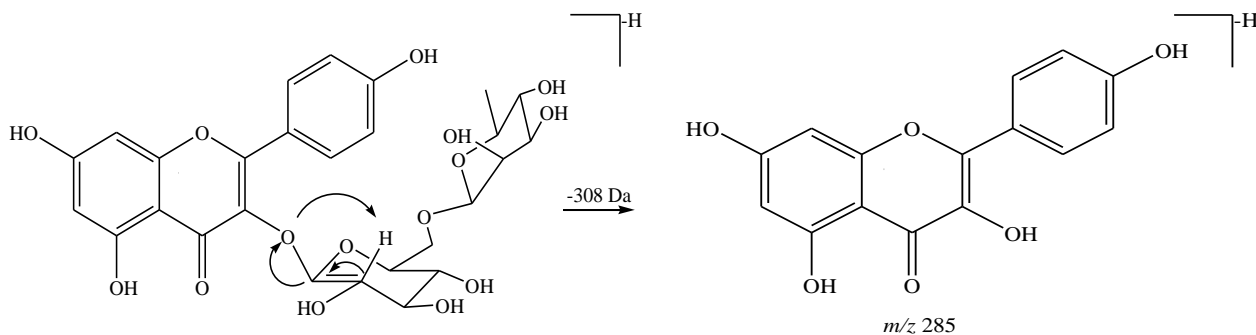


FIGURA 4.34 - Propostas de fragmentações da substância II, segundo adaptações de Frabe *et al.* (2001), a partir do espectro de massas de segunda ordem, extraído de m/z 593,10.

a) Proposta de fragmentação homolítica



b) Proposta de fragmentação de rearranjo de hidrogênio



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo químico das folhas das espécies de *Erythroxylum*, foi possível traçar a presença de alguns metabólitos secundários, contribuindo para o conhecimento químico e biológico das espécies estudadas, uma vez que são bastante restritas as informações sobre essas espécies. No entanto, a partir dos experimentos realizados neste estudo, não mostraram abundância de alcaloides tropânicos, como é amplamente conhecido pelo gênero.

O estudo dos compostos voláteis das folhas de *E. deciduum* utilizando as técnicas de extração *HS-SPME* e hidrodestilação, em comparação dos dados da literatura, levou a caracterização majoritária de hidrocarbonetos alifáticos, além de cetonas, aldeídos, alcoóis, ésteres e esteróides, independente da técnica de extração utilizada. A investigação do perfil dos COVs permitiu a identificação de 26 substâncias obtidas a partir da técnica de hidrodestilação e 21 a partir da extração *MEFS*, sendo pouco relatadas para o gênero.

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos obtidos das folhas de *E. tortuosum*, *E. campestre*, *E. suberosum* e *E. deciduum* por CLAE-DAD, CG-EM e RMN ¹H sugeriram a presença de metabólitos secundários como, flavonoides, alcaloides e esteróides, sendo essas classes já reportadas para este gênero. O estudo do perfil químico dos extratos etanólicos de *E. deciduum*, obtidos por percolação ou por extração com dispersor homogeneizador por ultraturrax, indicou a presença de flavonoides, sendo estes do tipo flavona, flavanonas e flavonois com diferentes substituintes.

A avaliação do potencial citotóxico dos extratos enfatiza a importância do estudo de espécies do gênero *Erythroxylum*, os quais obtiveram resultados significativos para os extratos obtidos por ultra turrax frente a células HeLA (diclorometano e metanol de *E. campestre*; diclorometano e metanol de *E. suberosum*; acetato de etila de *E. deciduum* e metanol de *E. tortuosum*). O extrato etanólico de *E. deciduum* (obtido por percolação) apresentou expressiva atividade citotóxica frente à linhagem 4T1, evidenciando a necessidade de caracterização da composição química do extrato e realização de ensaios *in vivo*.

O estudo químico do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum* levou ao isolamento e identificação estrutural de dois metabólitos secundários. A partir do extrato etanólico das folhas de *E. deciduum* foi possível isolar substâncias pertencentes a classe dos flavonois: 4',7-di-O-metilquercetina-3-O-β-rutinosídeo (**I**) e kaempferol-3-O-rutinosídeo (**II**). Essas mesmas substâncias foram confirmadas por desreplicação, em análises realizadas por CLUE-QqTOF e espectrometria de massas sequencial, assim como também foram identificadas as substâncias rutina (**III**) e catequina ou epicatequina (**IV**).

Desta forma, as contribuições deste trabalho, referente às espécies do gênero *Erythroxylum*, em especial *E. deciduum*, se fizeram importantes para o conhecimento químico e biológico das espécies estudadas. O estudo também possui sua importância ao fornecer dados inéditos à literatura no que se refere ao melhor conhecimento da biodiversidade brasileira e das possíveis contribuições para a terapia do câncer.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A.; RAGAB, A. R.; MAGDY, A; MOHAMED, A. E.; AMGAD, R. *Cancer Metabolism and Natural Management*. 1ª ed. Lambert Academic Publishing, 2016. 268p.

ADAMS, R. P. “Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry”. 4ª ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804p.

AGUIAR, J. S., ARAÚJO, R. O., DO DESTERRO; R. M, SENA, K.X, BATISTA AM, GUERRA M. M. “Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman”. *Int Journal Mol Science*. 13 (4): 4124-4140, 2012.

ALAGILE, D.; BALDWIN, R. M; ROTH, B. L.; WROBLEWSKI, J.T.; GRAJKOWSKA, E.; TAMAGNAN, G. D. “Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 945-949, 2005.

ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARESA, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S. GONÇALVES; G. F., COSTA, V. C. O., AGRAC, M. F.; PESSOA, H. L. F.; SILVA, M. S. “Flavonoides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae)”. *Química Nova*, 37 (4): 663-666, 2014.

ALPENDURA, M. F. “Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis - A review” *Journal of Chromatography A*, 3: 889, 2000.

AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. “Alkaloids of *Erythroxylum hypericifolium* Stem Bark”. *Phytochemistry*, 28 (2): 671-673, 1989.

ARMOLA, R. R., BOURGAULT, A.M., HALM, M. A., BOARD, R. M., BUCHER, L., HARRINGTON, L., MEDINA, J. “AACN levels of evidence: What's new?” *Critical Care Nurse*, 29 (4): 70–73, 2009.

ASBAHANI, A. E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H., MOUSADIK, A. E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. “Essential oils: From extraction to encapsulation”. *International Journal of Pharmaceutics*, 483: 220-243, 2015.

AUGUSTO, F.; LOPES, A.L. & ZINI, C.A. “Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances”. *Trend.Anal. Chem.*, 22: 160, 2003.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D., IDAOMAR, M. “Biological effects of essential oils”. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446, 2008.

BARBOSA, A. V. G. & AMARAL Jr., A. Flora dos estados de Goiás e Tocantins: Erythroxylaceae. Editora da UFG. Goiânia. 2001. 73p.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. “Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos”. *Química Nova*, 3 (32): 679-688, 2009.

BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; PEREIRA, P. A. P.; GUEDES, M. L.; DAVID, J. P. “Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*”. *J Braz Chem Soc.*, 13: 42, 2002.

BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; P.; DAVID, J. P. “Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*”. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 537-540, 2005.

BICCHI, C.; DRIGO, S. & RUBIOLO, P. “Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants”. *J. Chromatography, A*, 892: 469, 2000.

BIERI, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J. L; CHRISTEN, P. “Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species”. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 439-447, 2006.

BIERI, S.; ILIAS, Y.; BICCHI, C.; VEUTHEY, J.-L.; CHRISTEN, P. “Focused microwave-assisted extraction combined with solid-phase microextraction and gas chromatography–mass

spectrometry for the selective analysis of cocaine from coca leaves” *J. Chromatography A*, 1112: 127-132, 2006.

BOHN, B. A LOO, T., NICHOLLS, K. W. PLOWMAN, T. “Flanovoid or *Erythroxyllum rufum* and *E. ulei*”. *Natural Products*, 44 (6): 676-679, 1982.

BOHN, B. A.; LOO, T.; NICHOLLS, K. W.; PLOWMAN, T. “Flanovoid variation in *Erythroxyllum*”. *Phytochemistry*, 27 (3): 833-837, 1988.

BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H. & KOLODZIEJ, H. “(+)-catechin 3- rhamnoside from *Erythroxyllum novogranatense*”. *Phytochemistry*, 25: 1205, 1986.

BRACHET, A.; MUÑOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J.; CHRISTEN, P. “Alkaloids of *Erythroxyllum luciduum stem-bark*”. *Phytochemistry* 25 (5): 1205-1207, 1986.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRAEGER, B. “Calystegines in wild cultivated *Erythroxyllum* species”. *Phytochemistry*, 66 (11): 1231-1240, 2005.

BUTTLER, M.S.; ROBERTSON, A. A. B. & COOPER, M. A. “Natural product and natural product derived drugs in clinical trials”. *Nat. Prod. Rep.*, 25: 475, 2014.

CÁCERES, L.A.; MCDOWELL, T.W.; SCOTT, I.M. HANNOUFA, A.; MCGARVEY, B.D.; TIAN, L.; YENUNG, K.K.-C. & SUMARAH, M.W. “*In vivo* extraction of volatile organic compounds (VOCs) from micro-tom tomato flowers with multiple solid phase microextraction (SPME) fibers”. *Can. J. Chem.*, 93: 8, 2015.

CALIXTO, J.B. “Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view”. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134, 2005.

CASTRO-VÁRQUEZ, L. M.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GUCHU, E.; PÉREZ-COELLO, M. S. “Analysis of volatile compounds of eucalypt honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry”. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 27–31, 2006.

CHAVEZ, C. G.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ZUANAZZI, J. A.; DIEHL, E.; DE SIQUEIRA, N. C. S.; HENRIQUE, A. T. “*Erythroxyllum argentinum*: Assays for anti-inflammatory activity”. *Journal of Ethnopharmacology*. 22, 117-120, 1988.

CHAVEZ, J. P.; SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G. & DAVID, J. M. "Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*". *Phytochemistry*, 41: 941-943, 1996.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

COLLINSON, A. S. Introduction to world vegetation. London: Unwin Hyman Ltd. 2^a ed., 1988. 325 p.

COLODEL, E. M. et al. 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.; DO MMES, J. "In vitro characterization of antioxidant properties of cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich.: Isolation of two flavonol glycosides". *J. Chil. Chem. Soc.*, 57: 1340-1343, 2012.

COSTA, D. A.; MATIAS, W. N.; LIMA, I. O.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. B. M.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F.; BATISTA, L. M.; SOUZA, M. F. V. "First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L (*Brizicky*) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach.". *Química Nova*, 32: 48-50, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. "Natural products: a continuing source of novel drug leads." *Biochim. Biophys. Acta*, 1830: 3670-3695, 2013.

DAWIDOWICZ, A. L.; DYBOWSKI, J. S. M. P. "Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials". *Talanta*, 146: 195–202, 2016.

DEWICK, P. M. "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". 2a ed. John Wiley & Sons. England. 2002. p. 232.

DHANANI, T.; SHAH, S.; SATYA, G.; KUMAR, S. "Effect o extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Whithania somnifera*". *Arabian Journal Chemistry*, 2013.

FARIAS, L. S.; MENDEZ, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*. *Quim. Nova*, 37 (3): 483-486, 2014.

FRABE, N. *et al.* Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal American Society for Mass Spectrometry*, 12: 707-715, 2001.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. “Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb”. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8 (8): 353-360, 2014.

FILHO, M. D. L.; SILVA, G. C.; CÔRTEZ, S. F.; GUIA, T. R. M.; FERRAZ, V. P.; SERRA, C.P. “ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) OE Schulz”. *Phytomedicine*. 17 (5): 383-387, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários”. *Química Nova*, 30: 374-381, 2007.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. “Género *Erythroxylum*: Análisis de la Información Científica”. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (2): 284-90, 2005.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L., PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J. “Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species”. *Biochem Syst Ecol*, 34 (6):539-42, 2006.

HEGNAUER, R. “Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (ing some ethnobotanical notes on old word species)”. *J. Ethnopharmacol*, 3: 282, 1981.

HIMMELSBACH, M. “10 years of MS instrumental developments – Impact on LC-MS/MS in clinical chemistry”, *Journal of Chromatography B*, 3: 883-884, 2012.

HVATTUM, E. & EKERBERG, D. “Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative *electrospray* ionization tandem quadrupole mass spectrometry”. *Journal of Mass Spectrometry*, 38: 43-49, 2003.

IBAMA - PMDBBS (Projeto de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite) <http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/> Acesso em: 20 julho, 2017.

INIGO, R. P. A.; POMILIO, A. B. “Flavonoids from *Erythroxyllum argentinum*”. *Phytochemistry*, 24: 347-349, 1985.

ISPN - Instituto Sociedade, População e Natureza. <<http://www.ispn.org.br/arquivos/mapa-desmatamento-cerrado>>. Acesso em: 20 julho, 2017.

JANG, G. H.; KIM, H. W.; LEE, M. K.; JEONG, S. Y.; BAK, A. R.; LEE, D. J.; KIM, J. B. “Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the Prunus genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25 (8): 1622-1631, 2016.

JOHN, J. E. “Natural products as lead structures: a role for biotechnology”. *Drug Discovery Today*, 15: 11-12, 2010.

JOHNSON, E. L. “Alcaloid content in *Erythroxyllum coca* tissue during reproductive development”. *Phytochemistry*, 35-38, 1996.

JOHNSON E. L., SCHMIDT W.F. & NORMAN, H. A. “Flavonoids as markers for *Erythroxyllum Taxa: E. coca var. ipadu and E. novogranatense var. truxillense*”. *Biochem Syst Ecol*, 26 (7): 743-59, 1998.

JONHSON, E. L., SCHMIDT, W. F. & COOPER, D. “Flavonoids as chemotaxonomic markers for cultivated Amazonian coca”. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (1): 89-95, 2002.

JOHNSON E. L & SCHMIDT W. F. “Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxyllum australe*”. *Z Naturforsch C A J Biosci*, 59: 769-776, 2004.

JOPKE, K.; SANDERS, H. & TRAUT, R. “Use of Essential Oils Following Traumatic Burn Injury: A Case Study”. *Journal of Pediatric Nursing*, 34: 72-77, 2017.

KARAMI-OSBOO, R.; MIRI, R. & JASSBI, A. R. “Comparative study of the volatiles in the essential oils of *Achillea wilhelmsii*, *A. vermicularis* and *A. eriophora* by hydrodistillation and head space-solid phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) analyses”. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. 18 (6), 1433-1440, 2015.

KATJA-DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B.D. “Mass spectrometry based Metabolomics”. *Mass Spectrom. Rev.*, 26: 51-78, 2007.

KILLINY, N. & JONES, S. E. "Profiling of volatile organic compounds released from individual intact juvenile and mature citrus leaves". *Journal of Plant Physiology*, 208: 47-51, 2017.

KINGSTON, D. G. I. "Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation". *J. Nat. Prod.*, 74: 496-511, 2011.

LEITE, C. F. M.; LEITE, B. H. M.; DE CARVALHO, BARROS, I. M.; GOMES, S. M.; FAGG, C. W.; SIMEONI, L. A. "Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies". *Bol Lat Caribe Plant Med y Aromáticas*, 13 (5), 2014.

LIU, Q.; SUN, G.; WANG, S.; LIN, Q.; ZHANG, J. & LI, X. "Analysis of the variation in scent components of *Hosta* flowers by HS-SPME and GC-MS". *Sci. Hortic*, 175: 57, 2014.

LOIOLA, M. I. B. "Revisão taxonômica de *Erythroxylum* P. Browne sect. *Rhabdophyllum* O. E. Schulz (Erythroxylaceae Kunth)". Programa de Pós-Graduação em Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001. Tese de doutorado, 238 p.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: _____. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer, 1970. Chap. 5, p. 41-61.

MACEDO, T.B.; ELIAS, S. T.; TORRES, H. M.; SILVA, F. P. Y.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. "Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines". *Braz Dental J*, 27 (1):108-12, 2016.

MANABE, H., SAKAGAMI, H., ISHIZONE, H., KUSANO, H., FUJIMAKI, M., WADA, C., KOMATSU, N., NAKASHIMA, H., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, N. "Effects of catuaba extracts on microbial and HIV infection *In Vivo*". 6: 161-165, 1992.

MENDONÇA, J. O.; AMARAL-JR., "A. Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, vol. 2. "Erythroxylaceae" Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, 2: 107-120, 2002.

MESQUITA, M. L. DE; PAULA, J. E. DE.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. DE.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S.

“Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines”. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 439–445, 2009.

MESQUITA, P. R. R.; NUNES, E. C.; SANTOS, F. N.; BASTOS, L. P.; COSTA, M. A.P.C.; RODRIGUES, F. DE M.; ANDRADE, J. B. “Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis”. *Microchemical Journal*, 130: 79-87, 2017.

MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. “Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay” *Cancer Lett*, 184: 13, 2002.

MIATTO, R. C., WRIGHT, I. J. W., BATALHA, M. A. “Relationships between soil nutrient status and nutrient-related leaf traits in Brazilian cerrado and seasonal forest communities”. *Plant soil*, DOI 10.1007/s11104-016-2796-2, 2016.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. “Natural products: an evolving role in future drug discovery”. *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 4769-4807, 2011.

MOHAMMADHOSSEINI, M. “The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties and medicinal applications of essential oils and extracts of different *Ziziphora* species”. *Industrial Crops & Products*, 105: 164–192, 2017.

MOHAMMADHOSSEINI, M.; AKBARZADEH, A., HASHEMI-MOGHADDAM, H. “Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by HS-SPME/GC-MS technique from *Stachys lavandulifolia* and evaluation for biological activity: a review”. *J. Essent. Oil-Bear. Plants* 19 (6), 1300–1327. 2016.

MOHAMMADHOSSEINI, M.; SARKER, S. D.; AKBARZADEH, A. “Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review”. *Journal of Ethnopharmacology*, 199: 257–315, 2017.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells. *Phytochemistry*, 27 (4): 1017-1020, 1988.

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(2):401-406, 2012.

NASCIMENTO, G. C.; MENEZES, A. C. S.; LACERDA, E.P. “Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antitumoral e Citotoxicidade in vitro de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae)”. *Revista Processos Químicos*, 10: 44-55, 2013.

NASCIMENTO, M. N. G. Estudo Químico de *Erythroxylum soberosum* (Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Departamento de Química, Goiás, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. “In The Practice of Medicinal Chemistry”, 4^a ed., Elsevier: *Amsterdam*, 2015; p. 101–139.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. “Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014”. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661, 2016.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; SENA-FILHO, J. G., LUCENA, H. F.; ROMERO, M. A. “Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C NMR Spectral Data”. *Chem Biodivers*, 7 (2): 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; BRANCO, M. V.; LUCENA, H. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F. “Tropane alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman”. *Chem Biodivers*, 8 (1):155-65, 35, 2011.

OLIVEIRA, A. M. F.; PINHEIRO, L. S.; PEREIRA, C. K. S.; MATIAS, W. N.; GOMES, R. A.; CHAVES, O. S.; SOUZA, M. F. V; ALMEIDA, R. N.; ASSIS, T. S. "Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species". *Antioxidants*, 1: 33–43, 2012.

PAWLISZYN, J. “Applications of Solid Phase Microextraction”. IN: MANI, V. Properties of commercial SPME coatings”. *The Royal Society of Chemistry*, 57-72p, 1999.

PAWLISZYN, J. “Theory of solid-phase microextraction”. *J. Chromatogr. Sci.*, 38: 270, 2000.

- PARDEDE, A.; ADFA, M.; KUSNANDA, A. J.; NINOMIYA, M.; KOKETSU, M. "Flavonoid rutinosides from *Cinnamomum parthenoxylon* leaves and their hepatoprotective and antioxidant activity". *Med Chemistry Research*, 26:2074-2079, 2017.
- PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R. C.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. "Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines". *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 54, n. 1, p. 71-78, 2004
- PLOWMAN T. & HENSOLD N. "Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae)". *Brittonia*. 56(1): 1-53, 2004.
- PLOWMAN, T. & RIVIER, L. Cocaine and Cinnamoylcocaine Content of *Erythroxylum* Species. *Ann. Bot.* 51 (5), 641-659, 1983.
- QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; VIEIRA, P. C. "Princípios ativos de plantas superiores". 2ª ed. São Paulo: EdUFSCAR, 232 p., 2014.
- RAHMAN, A. U.; KHATTAK, K. F.; NIGHAT, F.; SHABBIR, M.; HEMALAL, K.D.; & TILLEKERATNE, L. M. "Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*". *Phytochemistry*, 48: 377-383, 1998.
- 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 *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae)". *Phytochemistry Letters*, 6 (2): 232-5, 2013.
- RIVIER, L. Analysis of alkaloids in leaves of cultivated *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances used during coca chewing. *J. of Ethnopharmacology*, 3: 313–335, 1981.
- SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. "Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados" – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 1: 71-72, 2008.
- SANTOS, C. C., LIMA, M. A. S., FILHO, R. B., SILVEIRA, E. R. "Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*". *J. Braz. Chem. Soc.*, 17: 1304-1308, 2006.
- SILVIA, G.L., CUI, B., CHÁVEZ, D., YOU, M., CHAI, H.B., RASOANAIVO, P., LYNN, S.M., O'NEILL, M.J., LEWIS, J.A., BESTERMAN, J.M., MONKS, A., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, D. "Modulation of the multidrug-

resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*". *Journal of Natural Products*, 64: 1514-1520, 2001.

SILVA, C. L. & CÂMARA, J. S. "Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry". *Food Research International*, 51: 378–387, 2013.

SINNOTT, M.L. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Structure and Mechanism. 3a ed. Ed. WILEY-VCH, *Weinheim*. 2007. 51p.

SMITH, L. & BECK, J.J. "Duration of emission of volatile organic compounds from mechanically damaged plant leaves". *Journal of Plant Physiology*, 188: 19–28, 2015.

SOUZA, S. M. Estudo fitoquímico e atividade antitumoral de extrato de folhas de *Austroplenckia populnea* Reissek, 2013. Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UFOP. Dissertação de Mestrado, 96 p.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, Ł.; GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. "Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry". *J. Chromatogr. A*, 13: 1321, 2013.

STAHL, E. Apparatus and general techniques. In: Stahl, E., Ed., *TLC in thin layer chromatography: A Laboratory Handbook*, 2 Ed, Springer-Verlag, New York. 1969.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. "On-Line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18 (1): 100-105, 2007.

VERDE, G. M. V.; COUTO, E. A. P.; CUNHA, M. G.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; AQUINO, G. L. B.; PAULA, J. R. "Perfil Químico do óleo volátil das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae), coletadas em Goiânia, Goiás". *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, v.5, 1: 213-225, 2016.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. "Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna". *Química Nova*, 29: 326-337, 2006.

WET, H. D. "Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species". *J. Biotechnol*, 10 (55):1151-1154, 2011.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F., DE Q. PAULO M, HOSTETTMANN K. “Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*” *Journal Natural Products*. 66 (4): 497-502, 2003.

ZANOLARI B, GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. Q; HOSTETTMANN, K. “Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*”. *Journal Natural Products*, 68 (8): 1153-1158, 2005.

ZHU, F.; XU, J.; KE, Y.; HUANG, S.; ZENG, F. LUAN, T. & OUYANG, G. “Applications of *in vivo* and *in vitro* solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review”. *Anal. Chim. Acta*, 1: 794, 2013.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. “Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil”. *Biochem Syst Ecol.*, 29 (8): 819-825, 2001.

ANEXO I - Fluxograma geral para identificação das substâncias I e II.

