



**PgPNSB**

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL UFPB/UFCG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS  
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**NATASHA LORENN FERREIRA DA SILVA LEAL**

**ALCALÓIDES DE *Erythrina velutina* Willd: CARACTERIZAÇÃO POR  
CROMATOGRÁFIA GASOSA E LÍQUIDA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**SUMÉ – PB  
2018**

**NATASHA LORENNNA FERREIRA DA SILVA LEAL**

**ALCALÓIDES DE *Erythrina velutina* Willd: CARACTERIZAÇÃO POR  
CROMATOGRAFIA GASOSA E LÍQUIDA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Josean Fechinne Tavares**

**Co-orientadora: Alecksandra Vieira de Lacerda**

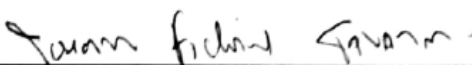
**SUMÉ – PB  
2018**

**NATASHA LORENN FERREIRA DA SILVA LEAL**

**ALCALÓIDES DE *Erythrina velutina* Willd: CARACTERIZAÇÃO POR  
CROMATOGRAFIA GASOSA E LÍQUIDA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**Defendida e aprovada em: 31 de agosto de 2018**

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Josean Fachine Tavares**

Universidade Federal da Paraíba – Campus I

(Orientador)

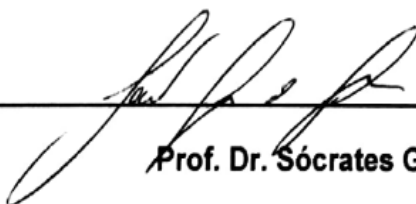


---

**Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa**

Universidade Federal da Paraíba – Campus I

(Examinador interno)



---

**Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos**

Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba

(Examinador externo)

**SUMÉ – PB  
2018**

*Ao meu avô Severino (Seu Maguinho) (in memoriam) que foi meu exemplo de vida, um homem analfabeto que sempre me incentivou a estudar e correr atrás dos meus sonhos, a ele que dedicou sua vida desde o dia em que nasci para ajudar na minha educação e criação. Não há palavras que expressem o amor e a importância que este homem tem em minha vida!*

**DEDICO!**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, protegendo, abençoando e guiando os meus passos e os daqueles que amo, por me dar forças e coragem para não desistir;

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pela orientação, atenção, confiança e oportunidade para a elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva pela convivência no laboratório, por todos os ensinamentos que conseqüentemente contribuem de maneira significativa para minha formação;

Ao programa de Pós Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos (PgPNSB);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos professores da pós-graduação por seus ensinamentos fundamentais para minha carreira profissional;

Aos meus colegas de turma Amilton, Pollyana, João, Lécia e em especial Dayse e Analu que sempre estiveram junto comigo desde as disciplinas até na rotina de laboratório principalmente nas longas e divertidas viagens semanais de João Pessoa – Sumé. Vocês fazem parte dessa conquista de maneira primordial;

Aos meus colegas da equipe SFBC pela ajuda nos momentos de maiores dificuldades encontrados, no dia a dia do laboratório, pelos momentos alegres compartilhados, pelas conversas diárias, sem vocês tudo seria mais difícil, toda contribuição de vocês foi essencial;

Ao meu colega Lucas Abreu por toda ajuda e paciência, o meu agradecimento especial a este que esteve comigo durante toda a jornada do laboratório, desde

os experimentos até a análise e interpretação dos mesmos, você foi fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui;

Ao técnico Raimundo Nonato por toda ajuda e ensinamentos necessários no laboratório de fitoquímica;

Ao técnico Sócrates que sempre esteve disponível para ajudar;

À todos os funcionários em geral do LMCA por todo apoio;

Aos meus amados e queridos pais Natanael e Malba pelos ensinamentos, valores, carinho, atenção, proteção, incentivo, amor, paciência e por sempre alimentar meus sonhos a cada vez que me dizem e mostram o tamanho do potencial que existe em mim. Vocês não imaginam o tamanho da gratidão e importância que exercem em minha vida;

Ao meu amado esposo Oristácio Jr que em todos os melhores e piores momentos ao longo desses dez anos de convivência esteve presente sem medir esforços para me ajudar, só tenho a agradecer por todo companheirismo, amizade, fidelidade, carinho, paciência, cuidado, presença, compreensão, e todas as vezes que você pensou na minha felicidade como prioridade, você foi e sempre será fundamental e insubstituível em todas as conquistas da minha vida, eu amo você;

Ao meu irmão que me deu os melhores presentes que já recebi até hoje, meus sobrinhos Miguel e Alice, fundamentais para a minha vida sem eles nossa casa não teria a mesma graça, meu amor por esses pequenos é imenso;

À minha família materna por toda alegria que me proporcionam em especial meus avós Marta e Sebastião, sei que torceram e torcem por mim;

À minha querida e tão especial tia Fátima por todo carinho, amor, incentivo que a senhora tem por mim, sei que é uma das pessoas que mais acredita nos meus sonhos e torce verdadeiramente pelo meu sucesso minha eterna gratidão;

Aos meus sogros Arislêda e Tata toda sua família, por todo carinho, sei que sempre acreditaram em mim e torcem pelo meu sucesso;

À minha querida amiga Mayara Amorim que foi fundamental para a realização deste trabalho sem seu apoio com certeza tudo teria sido mais árduo, obrigada pelas conversas, risadas e todo carinho nesse ano que passamos juntas. Você foi muito importante nessa caminhada.

Às minhas companheiras do 307 (Mayara, Debora, Júlia, Dani e Mel), pois foi ao lado de vocês que a maior parte deste trabalho foi escrito, sem a alegria de vocês teria sido bem mais difícil;

A Universidade Federal da Paraíba;

À todos que direto ou indiretamente contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho;

À todos os que torcem por mim!

**Meus sinceros agradecimentos, muito obrigada!!!**

*“Não é um destino que se cumpre, mas uma escolha que se desdobra. Não acho justo creditar os resultados da vida a movimentos ocultos, forças que não aceitam nossa intervenção.*

*A mim soa mais sensato compreender a vida como um exercício de semeadura. O plantio de hoje já nos indica a colheita de amanhã.*

*E se não florescer, se não for como esperávamos, seguiremos plantando tudo de novo. Cercados de mistério, mas guiados pela sensatez. ”*

*Pe. Fábio de Melo*

## RESUMO

Leal, N. L. F. S. Alcalóides de *Erythrina velutina* Willd: Estudo e Identificação por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas. 2018. 106 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturas e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

O gênero *Erythrina* apresenta cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas das Américas com disseminação principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Este gênero pertence à família Fabaceae. A espécie estudada *Erythrina velutina* popularmente conhecida como suína, mulungu, canivete, corticeira, eritrina-mulungu e bico-de-papagaio. Encontra-se distribuída no Brasil do Nordeste até Minas Gerais. Na medicina popular é utilizada como calmante e para outras desordens no sistema nervoso central como insônia e depressão. Espécies do gênero são muito importantes na indústria farmacêutica para produção de fitoterápicos ansiolíticos. Os marcadores químicos do gênero *Erythrina* são os alcalóides eritrínicos, a estes é atribuída a atividade ansiolítica. Diante disto, este trabalho objetiva contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero, por meio da caracterização de alcalóides das cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd. por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Para a realização do estudo o material vegetal seco e triturado foi submetido a extração por maceração com etanol 95% e concentrado em evaporador rotativo, posteriormente por meio de extração ácido-base foi obtido a fração de alcalóides totais e em seguida a mesma foi analisada por espectrometria de massas com ionização por elétrons e espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Com os resultados foi possível observar a presença de alcalóides eritrínicos no extrato etanólico das cascas do caule da espécie em estudo, sendo eles: erisodina ou erisovina, eritrascina, eritralina, eritraditina ou seu epímero, erimelantina, erisotina ou erisosalvina, Hidroxierisosalvina/hidroxierisotina, eritratina, erisotrina, eritrinina, eritroculina e eritratina N- óxido. Com exceção de eritralina, erisotrina, erisodina, eritratina e erisovina as demais substâncias são relatadas pela primeira vez para *Erythrina velutina*.

**Palavras-chave:** *Erythrina velutina*, alcalóides, mulungu, espectrometria de massas, cromatografia.

## ABSTRACT

Leal, N. L F. S. Alcalóides de *Erythrina Velutina* Willd: Study and Identification by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. 2018. 106 pág. Dissertation (Master in Pharmacochemistry of Natural and Synthetic Bioactive Products) - Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

The genus *Erythrina* presents about 110 species, of which 70 are native to the Americas with dissemination mainly in the tropical and subtropical regions. This genus belongs to the Fabaceae family. The species studied *Erythrina velutina* popularly known as swine, mulungu, pocket knife, corticeira, eritrina-mulungu and parrot beak. It is distributed in Brazil from the Northeast to Minas Gerais. In folk medicine it is used as a tranquilizer and for other disorders in the central nervous system such as insomnia and depression. Species of the genus are very important in the pharmaceutical industry for the production of anxiolytic herbal medicines. The chemical markers of the genus *Erythrina* are the erythrin alkaloids, which are attributed to anxiolytic activity. In view of this, this work aims to contribute to the expansion of chemical knowledge of the genus, through the characterization of alkaloids from the stem bark of *E. velutina* Willd. by gas chromatography coupled to mass spectrometry and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. For the study, the dry and crushed plant material was subjected to extraction by exhaustive maceration and concentrated in a rotary evaporator, posteriorly by means of acid-base extraction the fraction of total alkaloids was obtained and then the same was analyzed by mass spectrometry with electron ionization and electrospray ionization mass spectrometry. With the results it was possible to observe the presence of erythrin alkaloids in the fraction of total alkaloids of the ethanolic extract of the stem bark of the species in study, being them: erysodyne or erysovine, erythrascline, erythraline, erytraditine or its epimer, erymelanthine, erysotina or erysosalvine, Hidroxerisosalvina/ hidroxierisotina, erythratine, erysothrine, erythrinine, eritroculin and erythratine N- oxide. With the exception of erythraline, erysothrine, erysodyne, erysovine e erythratine the other substances are first reported for *E. velutina*.

**Keywords:** *Erythrina velutina*, alkaloids, mulungu, mass spectrometry, chromatography.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
DAP	Diamêtro a Altura do Peito
DCM	Diclorometano
EAB	Extração Ácido-Base
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
FAT	Fração de Alcalóides Totais
HCl	Ácido Clorídrico
HEX	Hexano
EM-IE	Espectrometria de Massas com ionização por impacto de elétrons
EM-IES	Espectrometria de Massas com ionização por Eletrospray
IV	Infravermelho
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
MeOH	Metanol
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amônio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDA	Retro Diels-Alder
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
Tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do Gênero <i>Erythrina</i> pelo mundo .....	26
Figura 2. Número de publicações com <i>Erythrina</i> na base de dados SciFinder®.....	28
Figura 3. <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	32
Figura 4. Locais identificados com a presença de <i>Erythrina</i> no Brasil .....	34
Figura 5 - Estrutura básica de alcaloides eritrínicos.....	40
Figura 6. Estrutura dos alcaloides eritrínicos das subclasses dienoide (B), alcenoide (C) e lactônica (D).....	41
Figura 7. Formação do DOPA através da hidroxilação da tirosina e formação da dopamina (3) e do 3,4-diidroxifenil-acetadeído (4).....	44
Figura 8. Formação da base de Schiff, seguida de uma reação de Mannich intramolecular para formação da (S)-(+)-Norprotosinomenina.....	45
Figura 9. Cromatograma obtido para fração de alcalóides totais.....	56
Figura 10. Região do perfil cromatográfico (janela) da fração de alcaloides totais no qual foram identificados os alcalóides eritrínicos).....	57
Figura 11. Padrão de fragmentação IE-EM para alcalóides eritrínicos das subclasses dienoides A e alcenoides B.....	58
Figura 12. Alcalóides eritrínicos identificados na fração de alcaloides do extrato de <i>E. velutina</i> .....	61
Figura 13. Espectro de massa da substância A no tempo de retenção 31,92 min.....	62
Figura 14. Espectro de massa da substância D no tempo de retenção 34,63 min.....	63
Figura 15. Espectro de massa da substância B no tempo de retenção 33,29 min.....	63
Figura 16. Espectro de massa da substância C no tempo de retenção 33,77 min.....	64
Figura 17. Espectro de massa da substância E no tempo de retenção 35,70 min.....	64

Figura 18. Espectro de massa da substância F no tempo de retenção 36,33 min.....	65
Figura 19. Espectro de massa da substância G no tempo de retenção 36,72 min.....	65
Figura 20. Espectro de massa da substância H no tempo de retenção 37,58 min.....	66
Figura 21. Espectro de massa da substância I no tempo de retenção 37,88 min.....	67
Figura 22. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2. Iniciado pela reação RDA.....	70
Figura 23. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2. Iniciado pela reação clivagem $\alpha$ .....	71
Figura 24. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos dienoides.....	73
Figura 25 A. Cromatograma de íons totais obtido por IES no modo positivo.....	74
Figura 25 B. Região do perfil cromatográfico onde foram identificados os alcalóides eritrínicos por CLAE-EM-ESI .....	74
Figura 26. Espectro de massas correspondente ao íon 318 no Tr de 17,8 min no modo IES positivo.....	75
Figura 27. Espectro de massas correspondente ao íon 334 no Tr de 19,5 min no modo IES positivo.....	76
Figura 28. Espectro de massas correspondente ao íon 316 no Tr de 23,8 min no modo IES positivo.....	77
Figura 29. Espectro de massas correspondente ao íon 298 no Tr de 24,3 min no modo IES positivo .....	78
Figura 30. Espectro de massas correspondente ao íon 300 no Tr de 27,3 min no modo IES positivo.....	79
Figura 31. Espectro de massas correspondente ao íon 372 no Tr de 33,7 min no modo IES positivo .....	80

Figura 32. Espectro de massas correspondente ao íon 314 no Tr de 33,7 min no modo IES positivo.....	81
Figura 33. Espectro de massas correspondente ao íon 296 no Tr de 36,5 min no modo IES positivo .....	82
Figura 34. Espectro de massas correspondente ao íon 344 no Tr de 38,3 min no modo IES positivo .....	83
Figura 35. Espectro de massas correspondente ao íon 346 no Tr de 39,1 min no modo IES positivo .....	84
Figura 36. Alcalóides eritrínicos identificados na FAT de E. velutina por CLAE-EM-IES.....	85
Figura 37. Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico erisodina .....	90
Figura 38. Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico hidrosierisosalvina .....	91

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Padrão de fragmentação alcalóides de <i>Erythrina velutina</i> .....	67
Tabela 2. Caracterização dos alcalóides identificados na FAT de E. velutina por CLAE-IES-EM-EM.....	87

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais constituintes químicos do gênero <i>Erythrina</i> .....	28
Quadro 2. Algumas substâncias isoladas do gênero <i>Erythrina</i> .....	29
Quadro 3. Algumas substâncias isoladas de <i>E. velutina</i> .....	37
Quadro 4. Alcaloides eritrínicos de maior ocorrência no gênero <i>Erythrina</i> ...	41
Quadro 5. Padrões de fragmentação de alcalóides eritrínicos em IE-EM, subclasse dienoide.....	59
Quadro 6. Padrões de fragmentação de alcalóides eritrínicos em IE – EM, subclasse alcenoide.....	59

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção do extrato etanólico bruto das cascas do caule de <i>Erythrina velutina</i> Willd .....	52
Esquema 2. Extração ácido – base (EAB).....	53

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivos Gerais.....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3. REFERENCIAL TEORICO .....	20
3.1 Bioma Caatinga.....	20
3.2 Produtos Naturais .....	21
3.3 Família Fabaceae .....	23
3.4 Gênero <i>Erythrina</i> .....	26
3.5 <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	32
3.6 Alcaloides eritrínicos .....	39
3.6.1 Biossíntese de alcalóides eritrínicos .....	43
3.7 Técnicas Hifenadas para Identificação de Substâncias .....	46
3.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas .....	46
3.7.2 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas.....	48
4. METODOLOGIA.....	51
4.2 Coleta e desinfestação das cascas do caule .....	51
4.3 Obtenção do extrato etanólico bruto .....	51
4.4 Extração ácido - base .....	53
4.5 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação dos alcaloides de <i>Erythrina velutina</i> Willd.....	54
4.5.1 Análise em CG-EM .....	54
4.5.2 Análise em CLAE-IES-EM/EM.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Identificação dos alcalóides eritrínicos por CG-IE-EM .....	56
5.1.1 Padrão de fragmentação dos alcalóides eritrínicos em IE-EM .....	57
5.1.2 Identificação dos alcalóides eritrínicos e análise do perfil alcaloídico no extrato de <i>Erythrina velutina</i> por IE-EM .....	60
5.1.3 Identificação dos alcalóides eritrínicos e análise dos padrões de fragmentação no extrato de <i>Erythrina velutina</i> por IE-EM .....	61
5.1.4 Mecanismo de fragmentação proposto em IE-EM para alcalóides eritrínicos das subclasses alcenoide e dienoide .....	68
5.1.5 Mecanismo de fragmentação de alcalóides alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2 .....	68

5.1.6 Mecanismo de fragmentação de alcalóides dienoides.....	72
5.2 Identificação dos alcalóides eritrínicos por CLAE-IES-EM.....	74
5.2.1 Mecanismo de fragmentação de alcalóides eritrínicos por IES-EM .....	89
5.2.1.1 Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico erisodina .....	89
5.2.1.2 Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico hidroxierisosalvina .....	90
6. CONCLUSÕES .....	92
REFERÊNCIAS.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos vai desde a identificação da espécie vegetal, a avaliação, análise das atividades farmacológicas, toxicológicas, microbiológicas e biológicas e determinação de critérios de qualidade até chegar a sua produção farmacêutica em maiores escalas (CARVALHO, 2016).

No Brasil esse tipo de medicamento tem uma ampla importância na economia e no ponto de vista cultural, o país tem uma estimativa de mais de 22% das espécies vegetais do planeta (NEWMAN; CRAGG, 2016), e em função da grande diversidade o potencial exploratório do país para obtenção de medicamentos à base de produtos naturais vegetais é tão elevada. A medicina popular já confirma esse direcionamento tendo em vista a grande utilização de espécies vegetais na cultura popular com eficiência considerável em seus resultados (FEITOSA, 2014).

Apesar dos avanços e instigação a pesquisa com medicamentos oriundos de produtos naturais vegetais, ainda existe diversas dificuldades com relação à matéria prima de origem, pois muitas espécies utilizadas como fitoterápicos direto ou indiretamente ainda não possuem dados oficiais que comprovem a sua autenticidade, onde muitas vezes inúmeras espécies são confundidas ou adulteradas pelo fato de que em regiões distintas sejam denominadas e conhecidas de formas diferentes, ou seja, há a falta de padronização (FEITOSA, 2014). O comércio de plantas nativas medicinais que são encontradas em feiras livres e mercados também apresentam riscos aos consumidores no que diz respeito à comprovação da toxicidade e seus reais efeitos farmacológicos (SCHENKEL et al, 2007b). O aumento no consumo de diferentes produtos à base de plantas medicinais, fatores como a precariedade na fiscalização da produção e da venda têm comprometido a qualidade dos mesmos (SILVA, 2012).

O estudo dos componentes químicos vegetais denomina-se fitoquímica, que com auxílio da purificação por métodos cromatográficos e identificação por técnicas espectrais, tais como: ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia nas regiões do ultravioleta (UV), juntamente com técnicas como cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) bem como, acoplamento

da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com EM e RMN facilitou a melhoria e otimização das análises visto que as informações e resultados obtidos sobre a estrutura dos componentes da matriz vegetal são altamente confiáveis (FEITOSA, 2014). Para isso, a utilização de técnicas hífenadas é de grande valia, pois fornece numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento.

Dentre espécies com grande potencial para produção de drogas de origem vegetal, destacam-se as plantas do gênero *Erythrina*, estas são extensivamente conhecidas pelo seu potencial farmacológico com base na cultura popular que utiliza a mesma para diversos fins medicinais desde muito tempo (ANHESINE, 2018). O gênero *Erythrina* é bastante notado devido à produção de alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides que apresentam uma elevada utilidade farmacológica, plantas desse gênero são as principais fontes de alcaloides tetracíclicos. Essa espécie apresenta atividade sedativa, anticonvulsivante e anestésica (VIRTUOSO, 2005).

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, que apresentam constituintes químicos conhecidos como metabólitos que exercem atividades sobre o metabolismo de outros organismos (MERLUGO, 2015). Estes podem ser primários ou secundários. Metabólitos primários são descritos como compostos necessariamente ligados à sobrevivência da planta, como por exemplo: DNA, RNA, açúcares, proteínas e aminoácidos (KERBAUY, 2004); os metabólitos secundários são importantes com relação a sobrevivência e propagação das plantas, tanto pela defesa contra herbívoros ou competidores, patógenos como proteção à radiação solar; ou ainda como fator de contribuição para a dispersão de pólen e sementes (MARTINS, 2012). Muitas vezes, as substâncias sintetizadas em um ou vários órgãos da planta podem atuar como fitoterápicos, ou seja, expressar potencialidades terapêuticas.

O nordeste é uma área onde são encontradas árvores da espécie *Erythrina velutina*, objeto de estudo desse trabalho. Por ser uma área de escassez hídrica e temperaturas elevadas os organismos que nesta região habita apresentam potencial excepcional de sobrevivência a adversidades climáticas favorecendo a investigação e estudo de espécies e metabólitos que

estes produzem gerando um grande interesse para a descoberta de novas substancias com atividade farmacológica.

Devido às poucas informações na literatura especializada sobre a presença, interferência ou alterações das características, principalmente *in natura* das plantas medicinais comumente utilizadas, tem se por justificativa neste trabalho identificar os alcaloides da espécie medicinal *Erythrina velutina* Wild. com sinonímia popular de mulungu a fim de se conhecer a abundância e a diversidade dos metabolitos secundários presentes na espécie para fins de interesse farmacológico/biotecnológico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar alcaloides das cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método extrativo para caracterização dos alcaloides das cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd;
- Desenvolver o método analítico para caracterização e identificação da fração de alcaloides totais (FAT) desta espécie através dos dados de CG-IE-EM;
- Desenvolver o método analítico para caracterização e identificação da fração de alcaloides totais (FAT) desta espécie através dos dados de CLAE-IES-EM- Ion trap;
- Propor as fragmentações dos alcalóides encontrados na FAT do extrato de *E. velutina*.

### 3. REFERENCIAL TEORICO

#### 3.1 Bioma Caatinga

O bioma Caatinga (termo originário do tupi - guarani que significa mata branca) é o principal ecossistema da Região Nordeste que apresenta características peculiares devido ao seu clima quente e seco, típico do semiárido. O semiárido brasileiro apresenta uma área de extensão de cerca de 900.000 Km<sup>2</sup>, correspondente a 54% da região nordeste, e cerca de 10% do território nacional (IBGE, 2016). Nesta região o clima tem os mais elevados valores de temperatura, taxa de evaporação escassa e irregulares precipitações pluviais, com baixas percentagens de umidade relativa (SILVA JUNIOR, 2005).

A Caatinga é o principal ecossistema existente na Região Nordeste, estendendo - se pelo domínio de climas semiáridos, que compreende os estados do Ceará, mais da metade da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte, quase metade de Alagoas e Sergipe, além de pequenas áreas de Minas Gerais e do Maranhão, com um bioma, caracterizado por grande variedade de paisagens, riqueza biológica e endemismo (IBAMA, 2016). Esse bioma possui espécies que apresentam adaptações à deficiência hídrica e as elevadas temperaturas, entretanto existem poucos estudos sobre o potencial biotecnológico de microrganismos desta região de condições extremas, havendo a hipótese de que os microrganismos também desenvolvem mecanismos de adaptação para sobrevivência às condições adversas, assim como as plantas dessa região (FERREIRA, 2015).

A vegetação da Caatinga apresenta diferenças anatômicas e/ou fisiológicas comparadas a vegetação de outros biomas relacionada ao clima, para adaptar-se às restritas condições de aridez, as espécies vegetais que habitam a Caatinga desenvolveram mecanismos de sobrevivência os quais permitem conviver com a condições que o meio oferece (SILVA JUNIOR, 2005).

Entre as principais adaptações, podemos destacar órgãos de armazenamento de água, ausência de folhas, presença de espinhos, caule suculento nas cactáceas, túberas aquíferas de *Spondias tuberosa* Arruda e a perda de folhas de quase todas as espécies lenhosas da Caatinga (SILVA, 2002). Esta vegetação apresenta árvores e arbustos decíduais, constituindo-se ainda do domínio das plantas suculentas espinhosas e das herbáceas temporárias que se desenvolvem no período chuvoso caracterizando-a (SILVA,

JUNIOR, 2005). A classificação da vegetação Caatinga não é homogênea do ponto de vista fisionômico.

A heterogeneidade da vegetação é decorrente de variações do clima, solo, relevo e altitude, que proporcionam diferentes formações vegetacionais. A sobreposição de espécies nas diferentes fisionomias de Caatinga é grande, comparada a preservação e fisionomias de outros biomas (SCHISTEK; SEYFFARTH et al.; 2012).

Visto a diversidade de formações fisionômicas e a vasta concentração de espécies endêmicas encontradas neste bioma, é de grande valia um estudo bem como ações e planos de manejo que sejam implementados para garantir a existência de espécies ainda não estudadas que apresentam potencial elevado para diversas pesquisas e fins. Vale salientar que o uso e a potencialidade da vegetação são bastante variados, dependendo da região onde ocorre.

### **3.2 Produtos Naturais**

Muitos estudos com plantas têm objetivado a prospecção de princípios ativos para as indústrias cosmética, agrícola e farmacêutica devido às promissoras comercializações de seus produtos. Atualmente, a fitoterapia é reconhecida, pela Organização Mundial de Saúde, como alternativa importante e viável, principalmente, para as populações de países em desenvolvimento devido aos custos de seus produtos serem mais acessíveis.

No Brasil apenas 2% das espécies catalogadas possuem uso medicinal comprovado cientificamente (SÁ, 2013). Nesse contexto, estudos com as plantas nativas devem ser priorizados, uma vez que o Brasil possui a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, mas pouco se conhece dos seus respectivos potenciais bioativos.

Antigamente o uso de produtos naturais era frequentemente empregado pelas populações carentes, tanto da área rural quanto na área urbana, em função da sua alta disponibilidade e baixos custos (DUARTE, 2006). No entanto, nos dias atuais, o uso de plantas com fins medicamentosos é abundante e tem sido considerada uma solução alternativa para problemas de saúde, além de estar bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (MERLUGO, 2015).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde a sua origem, visto a procura da cura e do alívio de doenças, imagina-se que o consumo de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas da utilização dos produtos naturais (YUNES, 2001). No entanto não só para tratamento e prevenção de doenças estes produtos são utilizados, a uma grande utilização desde os primórdios também no controle de pragas e em mecanismos de defesa.

Muitos medicamentos até hoje usados foram descobertos por químicos que estudavam plantas consagradas pelo uso na medicina popular, porém limitavam-se apenas ao isolamento e determinação estrutural de substâncias ativas. As civilizações Oriental e Ocidental são ricas em exemplos de uso de recursos naturais na medicina, e a cada dia novas tecnologias são empregadas para o uso, descoberta e entendimento do mecanismo de ação quando se consegue isolar um metabólito que apresente princípio ativo de interesse.

Mesmo com grandes avanços alcançados pela medicina moderna os produtos naturais ainda são abundantemente utilizados, estima-se que aproximadamente 30% das drogas avaliadas como agentes terapêuticos são oriundos de metabólitos secundários (CALIXTO, 2005; VEIGA JUNIOR, 2008).

Entre os anos de 1981 a 2006, 1.184 (um mil cento e oitenta e quatro) novas espécies químicas foram aprovadas como fármacos, onde 47% destes são produtos naturais ou derivados semissintéticos, 30% produtos totalmente sintéticos, 18% produtos biológicos e vacinas, todos são planejados a partir conhecimentos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Porém não é tão simples o caminho para o desenvolvimento de um fármaco, no que compete a produtos naturais existe o envolvimento de diversos campos e diversas técnicas (LORENZI & MATOS, 2002). Normalmente os estudos tem início com técnicas botânicas devido à coleta e identificação da planta, que geralmente já tem um histórico de alguma atividade farmacológica usada popularmente, em seguida testes fitoquímicos preparam extratos e submetem o material a análises farmacológicas, a ausência ou presença de algum efeito farmacológico direciona o estudo para processos de isolamento do princípio ativo através dos testes de atividades destinados para tal. Portanto o envolvimento de diferentes áreas e diferentes conhecimentos é fundamental para o inesgotável conhecimento e fonte medicinal de produtos naturais podendo ser citados: botânica, farmacologia e fitoquímica (YUNES, 2001).

### 3.3 Família Fabaceae

A família Fabaceae (Leguminosae) representa uma das maiores famílias botânicas existentes, classificada como angiospermas dicotiledôneas, estão presentes nas regiões temperadas, frias e também nas tropicais (CABRAL, 2009), distribuídos em 770 gêneros e 19.500 espécies (LEWIS et al., 2005). Subdividida em três subfamílias sendo elas: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (GOMES, 2017). Dentre os gêneros nativos mais frequentes, destacam-se: *Phaseolus*, *Crotalaria*, *Erythrina*, *Andira*, *Sophora*, *Indigofera*, *Mucuna*, entre outros (CARVALHO, 2008).

O subgrupo Faboideae mostra-se como o maior apresentando cerca de 429 gêneros e 12.615 espécies. A subfamília Caesalpinioideae com aproximadamente 150 gêneros e 2.700 espécies e Mimosoideae com 40 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies. Nas regiões temperadas a única subfamília encontrada é a Faboideae (CABRAL, 2009). Das três subfamílias as estruturas morfológicas em comum são ovário súpero, unicarpelar, legume e a capacidade de apresentar nodosidades nas raízes (LUCKOW, 2003).

As subfamílias Mimosoideae e Faboideae apresentam pequenas alterações em relação à circunscrição tradicional, ambas são monofiléticas, enquanto que a Caesalpinioideae é parafilética (SOUZA; LORENZI, 2008). No entanto estudos filogenéticos ainda não foram suficientes para a concepção de uma classificação considerável para as subfamílias de Fabaceae.

Os representantes de Fabaceae geralmente associam-se a bactérias fixadoras de Nitrogênio, que fazem a conversão de Nitrogênio em Nitrato e com fungos (micorrizas) que tem a capacidade de auxiliar na absorção de nutrientes e água (SPRENT, J. I.; JAMES, 2007), devido a essas associações simbióticas tem-se a grande adaptação de organismos desta família em diferentes ambientes.

Tradicionalmente denominada como Leguminosae a família Fabaceae era tratada como uma única família contendo três subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Em um outro momento Cronquist 1981 e Hutchinson 1964 sugeriram que estas subfamílias fossem reclassificadas como famílias distintas (GOMES, 2017). Em conformidade com APG IV (2016), atualmente as subfamílias são consideradas integrantes de uma única família (Fabaceae). Na filogenia mais recente proposta para Fabaceae a subfamília

Mimosoideae por meio de estudos moleculares e taxonômicos, apresentou o mesmo ancestral de diversificação da subfamília Caesalpinioideae, em função disso, agrupou-se a subfamília como uma linhagem irmã, passando a formar o clado mimosoide aninhado em Caesalpinioideae (LPWG, 2017).

Apresenta uma variada morfologia floral, as espécies da família Fabaceae possuem um amplo conjunto de polinizadores dentre eles abelhas, morcegos, aves e insetos (MATEUS, 2013). A maioria das espécies apresentam frutos tipo legumes composto por duas válvulas e quando alcançam a maturidade lançam suas sementes no ambiente, as cores contrastantes das sementes de algumas espécies facilitam a visualização bem como identificação de alguns animais dispersores (LEWIS et al., 2005; QUEIROZ, 2009).

Loiola et al. (2010) ressaltam o uso de Fabaceae como recurso medicinal, rituais religiosos e importante influência desse grupo de plantas na cultura sertaneja principalmente na região da caatinga. Espécies desta família são comumente utilizadas no tratamento de doenças por apresentarem propriedades terapêuticas e curativas, muitas espécies desta família são utilizadas na medicina popular e na farmacologia, são exemplos: *L. ferrea* (pau-ferro), *Anadenanthera peregrina* (angico), *Bauhinia forficata* (mororó), *Poincianella pyramidalys* (catingueira), *Leucaena leucocephala* (leucena) entre outras (GOMES, 2008).

Espécies de Fabaceae são muito utilizadas na alimentação humana, apresentando um elevado potencial econômico sendo elas: *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Vicia faba* L. (fava), *Glycine max* (soja), *Cicer arietinum* (grão-de-bico) e *Pisum sativum* L. (ervilha) (MATEUS, 2013). Outras espécies também são usadas na fabricação de óleos combustíveis, tintas, indústria de madeira, resina, ornamentação, reflorestamento de áreas degradadas, recuperação de solos, produção de fármacos e arborização de vias públicas (LEWIS et al., 2005).

Dentro da família Fabaceae são encontrados árvores, arbustos, ervas perenes ou anuais e trepadeiras. O fruto típico desta família é do tipo legume ou vagem, podendo ocorrer outros tipos como folículo, lomento, sâmara, e aquênio (LEWIS et al., 2005), normalmente é reconhecida com folhas compostas com estípula, muitas vezes adaptadas em formas de espinhos, comumente apresentam nectários extraflorais, ocasionalmente com pontuações translúcidas (CABRAL, 2009). Seu sistema radicular tem predominância de raiz pivotante

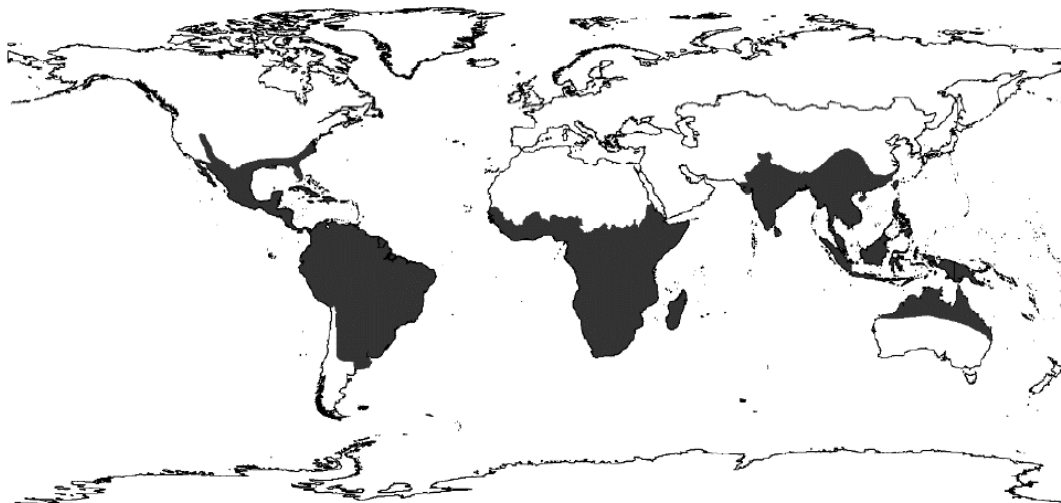
podendo penetrar vários metros de profundidade no solo, as espécies herbáceas por sua vez possuem raízes adventícias (LEWIS et al., 2005). As flores dessa família geralmente apresentam sépalas fundidas e cinco pétalas livres. As flores podem ser zigomorfas ou actinomorfas (SOUZA; LORENZI, 2008). São majoritariamente diclamídeas (raramente monoclamídeas), bissexuadas (hermafroditas); apresentam um único pistilo e um hipanto curto, que normalmente apresenta um formato de taça. Fabaceae são em geral entomófilas (polinizadas por insetos), portanto, as flores são chamativas para a atração dos polinizadores. O cálice é gamossépalo ou raramente dialissépalo, com prefloração aberta, valvar ou imbricada. Já a corola apresenta pétalas livres ou conatas, valvadas ou imbricadas. Além disso, o androceu conta tipicamente com 10 estames, alguns gêneros apresentem essas estruturas maior ou menor número. Por fim, o gineceu apresenta ovário súpero, unicarpelar, unilocular, às vezes dividido por falsos septos, e em geral multiovulado (em geral apresenta 10 óvulos) com placentação parietal (JUDD, 2009).

Com relação à química de metabólitos secundários a família Fabaceae é tradicionalmente lembrada pelo número de ocorrências de flavonoides com destaque aos isoflavonoides antimicrobianos, alcaloides, taninos, alguns glicosídeos cianogênicos, cristais de proteínas e também grão de amido (CABRAL, 2009). Por meio de estudos, nas décadas de 70 e 80 Harborne (1999) apud Cabral (2009) listou 500 diferentes tipos de fitoalexinas, estas são produzidas pelo organismo vegetal em resposta a patógenos desta família, este estudo contribuiu para o conhecimento quimiotaxonômico da Fabaceae, em função disso foram confirmados que apenas essa família botânica possui essa grande variedade de metabólitos de defesa com uma vasta gama de variedade estrutural, que sejam empregados como marcadores filogenéticos (SOUZA; LORENZI, 2008).

### 3.4 Gênero *Erythrina*

Entre os diversos gêneros da família Fabaceae, encontra-se, *Erythrina* que possui cerca de 115 espécies, das quais 70 são nativas das Américas (SOBARZO-SÁNCHEZ, 2015) com disseminação principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Na América do Sul ocorrem no Brasil (11 espécies), Argentina, Bolívia, Guianas, Paraguai, Peru, Panamá e Colômbia (MELO, 2011). Além das américas pode ser encontrado no sul da Ásia, norte da Oceania e África, (Figura 1) (SOBARZO-SÁNCHEZ, 2015). No Brasil essa espécie ocorre em vários biomas sendo eles Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (NEILL, 1993), sendo as duas principais *E. velutina* no Nordeste e *E. verna* no Sudeste (MELO, 2011).

Figura1. Distribuição do Gênero *Erythrina* pelo mundo representado na cor preto



Fonte: ANHESINE, 2018.

Informações botânicas como aspectos morfológicos e anatômicos são de extrema importância na caracterização de espécies do gênero *Erythrina*, visto a semelhança destas, bem como, a denominação popular que apresenta variação de acordo com a região de origem, cultura ou uso, podendo ocasionar equívocos que comprometam estudos e/ou produção de drogas vegetais (MARTINS-DASILVA, 2002). Outra espécie do gênero *Erythrina*, a *E. verna*, apresenta mesma indicação popular e grande semelhança a *E. velutina* (objeto de estudo deste

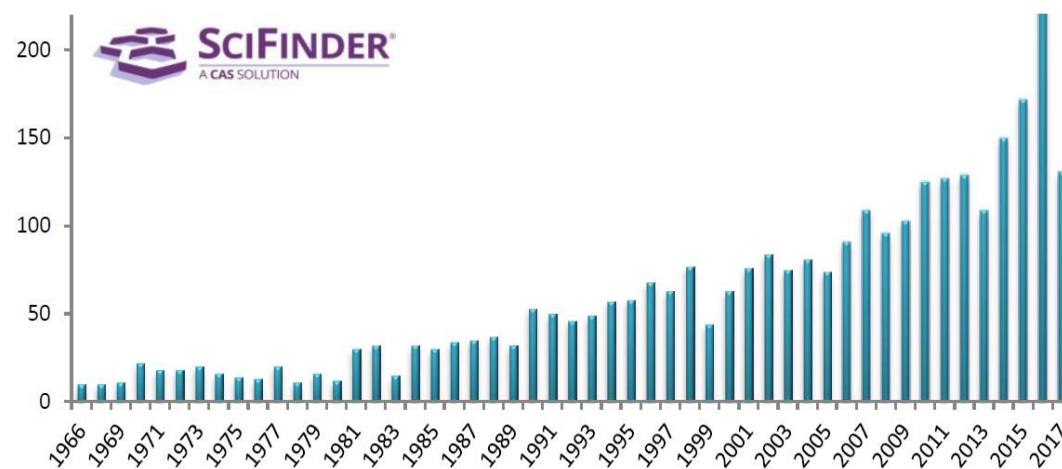
trabalho), porém ocorre em diferentes regiões brasileiras. A *E. verna* está presente na relação Nacional de plantas de interesse do SUS (RENISUS) e é empregada em associação a outros gêneros durante a produção de três medicamentos fitoterápicos ansiolíticos pela indústria brasileira são eles: Maracugina Composta® (Hypermarcas), Calmapax® (Delta) e Passaneuro® (Bunker). Os fitoterápicos hipnóticos sedativos representam 63,73% das vendas totais de medicamentos fitoterápicos no Brasil, desses 21,67% são os medicamentos acima citados (FEITOSA, 2014).

É característico de todas as espécies deste gênero possuir flores vistosas de cor laranja ou vermelho que são polinizadas por animais e ocorrem em uma ampla variedade de habitats, desde bosques tropicais chuvosos de terras baixas a desertos subtropicais muito áridos e até em bosques montanhosos de coníferas acima de 3.000 m (NEILL, 1993; VASCONCELOS et al., 2003).

No Brasil, encontram-se 11 espécies: *E. amazônica*, *E. crista-galli*, *E. dominguezzi*, *E. falcata*, *E. fusca*, *E. poeppigiana*, *E. similis*, *E. speciosa*, *E. ueli*, *E. velutina* e *E. verna* (REFLORA, 2018), estas são muito utilizadas no paisagismo, em função das suas flores vermelho alaranjadas, visto que, são atraentes, vistosas e de longa duração (FEITOSA et al., 2012; GRATIERI-SOSSELLA; PETRY; NIENOW, 2008; CARVALHO, 2003). Essas flores são uma referência alusiva à denominação deste gênero, que vem do grego *erythros*, e significa vermelho (NEILL, 1993; CARVALHO, 2008).

Estudos relacionados ao gênero *Erythrina* foram aumentando com o passar dos anos, em função disso, tem-se mais de 3281 publicações (Figura 2), nas quais 787 são patentes. Na sua maioria oriundas da China, estas publicações trazem aplicações na medicina tradicional da China (existente há mais de 2000 anos) e vem sendo reconhecida no mundo todo por meio da confirmação de suas propriedades (AHNSINE, 2018).

Figura 2. Número de publicações com Erythrina na base de dados SciFinder®



Fonte: ANHESINE, 2018

Diversos estudos fitoquímicos de espécies do gênero demonstraram a presença de alcaloides, flavonoides, pterocarpano, cumarinas, isoflavonóides, triterpenoides (Quadro 1) e outras substâncias, algumas substâncias do gênero são exemplificadas no quadro 2. (VIRTUOSO et al., 2005), sendo que muitos destes apresentaram diferentes atividades como antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória (VIRTUOSO et al., 2005; QUEIROZ et al, 2002).

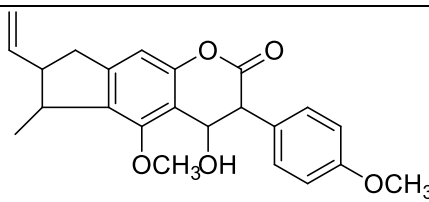
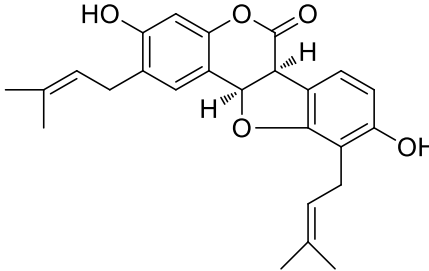
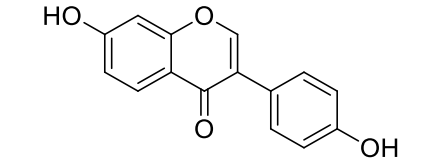
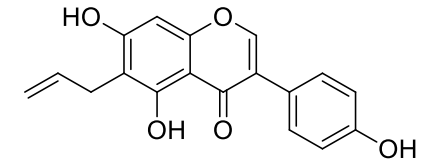
Quadro 1. Principais constituintes químicos do gênero *Erythrina*

Principais constituintes químicos presentes no gênero <i>Erythrina</i>	Local na planta
Alcalóides	Folhas, caule e flores
Saponina espumídica	Folhas
Açúcares redutores	Folhas e flores
Fenóis e taninos	Folhas, caule e flores
Proteínas e aminoácidos	Folhas, caule e flores
Flavonoides	Folhas, caule e flores
Depsideos e depsidonas	Folhas
Derivados de cumarina	Folhas, caule e flores
Esteroides triterpenoides	Folhas e caule
Glicosídeos cardiotônicos	Flores

Glicosídeos antraquinônicos	Flores
Terpenoides	Caule

Fonte: PALUMBO; GARDIN; NAKAMURA, 2016

Quadro 2. Algumas substâncias isoladas do gênero *Erythrina*

Sustâncias isoladas do gênero <i>Erythrina</i>	Estrutura química
Indicanina A	
Ericristagalina	
Daidzeina	
Eritrinina B	

Fonte: CABRAL, 2009

De acordo com a família que este gênero pertence é comum a presença de flavonoides, visto que, indicações quimiotaxonômicas são correspondentes para Fabaceae na qual é conhecida pela abundância de substâncias dessa classe (CABRAL, 2009).

O gênero é conhecido devido a sua grande produção de alcaloides eritrínicos, sendo que é a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo *Erythrina* (Figura 5). O gênero *Erythrina* tem destaque entre as plantas medicinais, pelas respostas no sistema nervoso central e o uso como sedativo.

Estudos farmacológicos realizados em diferentes laboratórios brasileiros têm mostrado atividades antinociceptiva, ansiolítica/sedativa, relaxante muscular e antibacteriana de extratos de *Erythrina velutina* (VIRTUOSO et al., 2005) e (DANTAS, 2004).

VASCONCELOS et al., 2003 demonstraram que *E. velutina* e *E. mulungu* apresentam efeitos antinociceptivos relevantes em modelos experimentais distintos e, que os efeitos analgésicos desta planta são independentes do sistema opióide.

Os efeitos do tratamento oral utilizando o extrato hidroalcoólico das inflorescências de *E. mulungu* em diversos padrões para ansiedade foram comparados com padrão benzodiazepínico e comprovaram que o extrato exerce efeitos ansiolíticos em tipos específicos de comportamento de defesa, especialmente naqueles sensíveis ao tratamento com doses baixas de benzodiazepínicos (CABRAL, 2009).

Os flavonoides também estão muito presentes em espécies do gênero *Erythrina*, essa classe apresenta diversas atividades biológicas. O estudo sobre os compostos flavonoídicos de *Erythrina* é mais atual, Deshpande e colaboradores (1977) reportaram três novas isoflavonas: eritrininas A, B e C (SILVA, 2012). Até janeiro de 2001, de um total de 350 ocorrências no gênero *Erythrina*, foram isoladas e identificadas 177 substâncias flavonoídicas diferentes. Foi observado que a classe mais abundante é formada pelos isoflavonóides. Também se reporta o isolamento das seguintes isoflavonas: osajina, alpinum isoflavona, oxiresveratrol estireno e diidroestilbeno diidroxiresveratrol, warangalona, 5,7,4"-triidroxi-6,8-diprenilisoflavona, quatro pterocarpanos já conhecidos (ericristagalina, eritrabissina II, faseolina e faseolidina), uma flavanona (isobavaquina) e um cinamilfenol (erivariestireno) isolados das cascas de *E. variegata* (VIRTUOSO, 2005).

Kumar et al. 2013 isolaram três flavonoides das cascas do caule de *E. suberosa*, sendo eles, 4'-Metoxilicoflavanone, Alpinumisoflavone e Wighteone, e confirmaram que os mesmos possuem resposta a atividade anti-cancerígena. Por meio de estudos realizados por Yenesew et al. (2003) e Yenesew et al. (2012), demonstraram que a casca da raiz de *E. abyssinica* e *E. burttii* apresenta flavonoides com atividade antiespasmódica.

Yenesew et al. (2005), por meio de trabalhos demonstraram atividades distintas de flavonoides eritrínicos isolados das cascas do caule de *E. burttii* apresenta resposta as atividades antimicrobianas frente a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Flavonoides *E. latíssima* isolados das cascas do caule apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida mycoderma* (CHACHA et al., 2005).

Além de alcaloides e flavonoides, outras classes metabólitos secundários também já foram identificadas no gênero, tais como, diversos pterocarpanos isolados de *E. crista-galli* e *E. fusca* (INNOK et al., 2010), triterpenóides isolados de *E. sigmoidea* e *E. eriotriocha* (KOUAM et al., 2008, KOUAM et al. 2007) e cumarinas isoladas de *E. indica* (NKENGFACK et al., 2000).

Os extratos metanólico e diclorometano de *Erythrina vogelii* mostraram propriedades antifúngicas contra *Cladosporium cucumerinum* (SILVA, 2012). A sigmoidina B e o calopocarpano isolados das cascas do caule de *Erythrina burttii* demonstraram atividade contra fungos e *Staphylococcus aureus* (YENESEW et al., 2005).

Com base nos estudos acima citados tem-se evidencias dos efeitos exercidos por as classes de metabólitos existentes no gênero *Erythrina*, em função disso, é gerado o interesse e a necessidade de investigações que mostrem a confirmação de atividades biológicas distintas que possam ser desempenhadas.

O gênero *Erythrina* também apresenta aspectos toxicológicos visto que, são leguminosas que normalmente contém substancias tóxicas aos seres humanos. Ocorre a presença de lectinas que levam a gastroenterites, diarreias e náuseas. Alguns aminoácidos que ocorrem livremente em leguminosas também trazem efeitos tóxicos a seres humanos, são encontrados concentrados nas sementes, podendo ocorrer em toda planta (CABRAL, 2009) causando a limitação desse tipo de vegetal no uso como alimento. Dessas substâncias tóxicas as mais relevantes são os compostos latirogênicos, que estão presentes em sementes de algumas espécies de leguminosas, estes acarretam condições patológicas (latirismo) que podem ocorrer de três formas diferentes, sendo elas: neurolatirismo (paralisia de membros inferiores, fraqueza, dificuldades

respiratórias e tremores dos músculos), angiolarirismo (ruptura da aorta) e osteolarirismo (caracterizado por deformações esqueléticas que são relacionadas a desordens no crescimento em ossos e cartilagens devido ao distúrbio na síntese de compostos elásticos em tecidos mesenquimais e no sistema esquelético) (GRELA et al., 2001).

Fatores anutricionais como inibidores de proteases e inibidores de tripsina também se fazem presentes no gênero *Erythrina* sendo estes a principal causa de animais em experimentos alimentados com ração crua. Homólogos do inibidor de tripsina soja foram isolados em sementes de eritrinas, estes compostos são capazes de causar depressão do crescimento em animais em estudo, redução na absorção de enxofre e nitrogênio quando utilizado em rações cruas, interferir na digestibilidade de proteínas de soja em roedores, impulsionar hiperplasia e hipertrofia do pâncreas (excessiva secreção de enzimas), bem como impulsionar a síntese de tripsina e quimiotripsina no pâncreas aumentando a demanda de metionina e cisteína (CABRAL, 2009).

*Erythrina cristgalli* é considerada tóxica devido os alcaloides pela via administração parenteral, podendo levar a um quadro neurológico de astenia, paresia ou paralisia musculares. Essa paralisia é resposta dos alcalóides sobre a acetilcolina obedecendo à sequência seguinte: músculos enervados pelos nervos cranianos, músculos do tronco, e das extremidades e musculatura respiratória (MERGLUGO, 2015). Porém quando os alcaloides de *Erythrina cristgalli* são absorvidos pelo tubo gastrointestinal, são excretados pelos rins de maneira rápida, de modo que, por essa via não ocorre intoxicação (CABRAL, 2009).

### **3.5 *Erythrina velutina* Willd.**

A espécie *Erythrina velutina* Willd (Figura 3) do gênero *Erythrina* (Fabaceae) é uma Leguminosae (Papilionoideae), de porte arbóreo, aculeada ou espinhenta normalmente apresenta de 10 m - 15 m de altura e 80 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo) na idade adulta, tronco reto, levemente tortuoso, apresenta ramificação dicotômica com copa aberta e arredondada, tem comportamento decídua, heliófila, ramos e troncos de 40-70 cm de diâmetro, a casca mede até 25 mm de espessura, folhas compostas trifolioladas, flores vermelhas ou laranjas ocorrem em fascículos axilares

medindo de 12 cm a 20 cm de comprimento e com três flores, fruto tipo legume um tanto curvo, de ápices e bases agudas, internamente não-septado, com 1 a 3 sementes de coloração vermelha, que tem sua dispersão anemocórica (pelo vento) e zoocórica (por animais), plântulas do tipo fanerocotiledonar-epigeal-de-reserva(CARVALHO, 2008; SILVA JUNIOR, 2005).

Figura 3. *Erythrina velutina* Willd



Fonte: APNE/CNIP

Presente na América Central e do Sul, no Brasil do Nordeste até Minas Gerais, possui ampla ocorrência em áreas semi-áridas e secas (SILVA, 2012), ocorre de forma natural nos seguintes estados: Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio grande do Norte, Sergipe e Piauí (Figura 4) representados por pontos verdes. A *E. velutina* é a única espécie do gênero *Erythrina* que está presente no Bioma Caatinga (QUEIROZ, 2009).

A etimologia do nome científico *E. velutina*, tem origem do grego erythros, devido sua coloração avermelhada das inflorescências, e velutina, do latim, devido à textura aveludada para o epíteto específico oriundo dos indumentos delicados e pelos macios das folhas. O nome vulgar mulungu tem origem africana, que apresenta como significando pandeiro, acredita-se que é devido ao som produzido pela batida do seu tronco oco (CARVALHO, 2008).

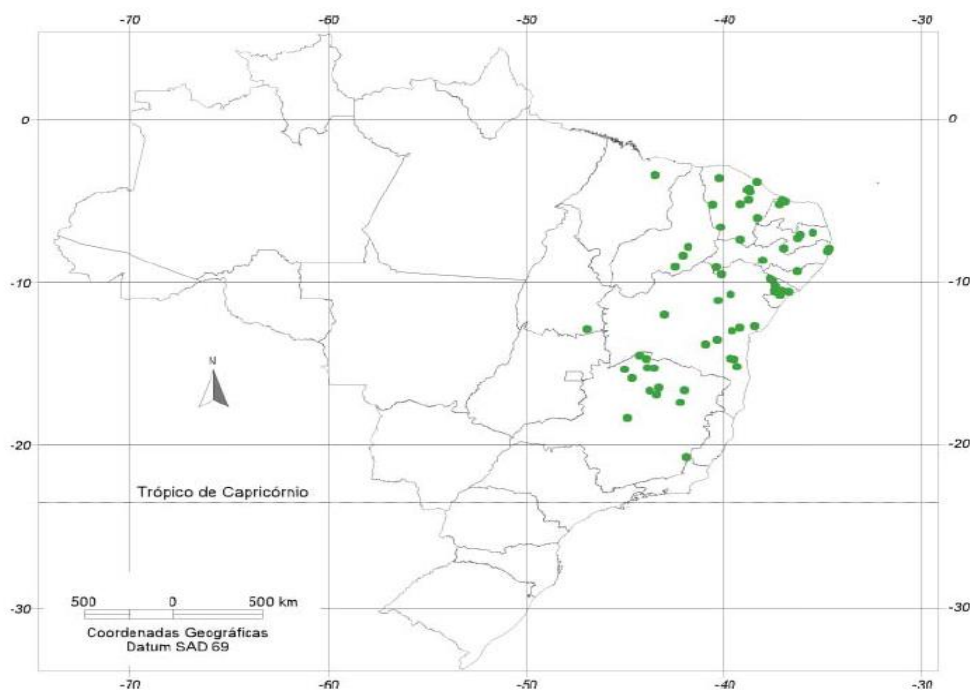
Popularmente denominada, suína, mulungu, canivete, corticeira, eritrina-mulungu e bico-de-papagaio (LOREZI e MATOS, 2002). Apresenta sinonímia

botânica com *Chirocalyx velutinus* Walp., *Coraliodendron velutinum* (Willd.) Kuntze, *Erythrina aculeatissima* Desf., *Erythrina splendida* Diels.

São utilizadas economicamente na construção de caibros, ripas e cercas vivas, na ornamentação de praças e ruas e por apresentarem madeira leve também é utilizado na fabricação de tamancos, jangadas e palitos de fósforo. (SCHISTEK, 2012) A madeira é leve e macia pouco resistente a agentes decompositores (CABRAL, 2009).

O período de floração tem variação de julho até fevereiro e os frutos maduros são encontrados entre os meses de setembro a março, independente da região onde encontra-se. (CARVALHO, 2008).

Figura 4. Locais identificados com a presença do gênero *Erythrina* no Brasil, representado em verde.



Fonte: Embrapa, circulat técnica, 2008.

Na medicina popular a *Erythrina velutina* tem destaque pelo uso de suas folhas, cascas e frutos. A infusão das cascas é utilizada como calmante natural sedativo indicado para problemas no sistema nervoso como depressão, ansiedade, insônia, epilepsia, estresse (VASCONCELOS, 2003) tosse, bronquite, tratamento de verminoses e hemorroidas (CARVALHO, 2008)

também possuem efeito hipotônico além de estabilizar altos níveis de enzimas do fígado, o efeito calmante da planta pode ser benéfico a pessoas que sofrem pela abstinência de nicotina ou drogas, (LOREZI; MATOS, 2002), bem como, a decocção das cascas é usada para precipitar a maturação de abscessos gengivais (MELO, 2011) embora a eficácia e segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas cientificamente (LORENZI; MATOS, 2002). As folhas são utilizadas em infusos ou através de decocção como tranquilizantes, também indicado no tratamento de sonolência e convulsões (VASCONCELOS et al., 2003). Ao fruto seco é atribuída a capacidade de ação anestésica local utilizado na forma de cigarro (MELO, 2011).

Algumas espécies do gênero *Erythrina* são utilizadas popularmente no tratamento da hipertensão arterial desde os primórdios até os dias atuais, possuindo relatos em estudos etnobotânicos (SILVA, 2012; CABRAL; MACIEL, 2011). A espécie *E. falcata* é usada popularmente por possuir atividade hipotensiva (MERLUGO, 2015). Um estudo realizado por Silva (2012), onde foram entrevistados raizeiros do município de Campina Grande-PB, descreveu a utilização da espécie *E. mulungu*, muito encontrada no Brasil, para o tratamento de distúrbios cardíacos. Já Albuquerque, Figueredo e Cerqueira (2011) e Cabral e Maciel (2011) atribuem essa atividade hipotensiva a espécie *E. velutina*.

Estudos farmacológicos realizados em animais de laboratório mostram que o extrato de *E. velutina* apresenta atividades espasmolítica, curarizante, antimuscarínica e depressora do sistema nervoso central, de modo, ocorre compatibilidade com a utilização na medicina popular (LORENZI; MATOS 2008).

Os extratos das hidroalcoólicos das cascas do caule de *E. velutina* e *E. mulungu* apresentaram atividade anticonvulsivante como resposta a um aumento considerável na latência da convulsão no modelo induzido por estriçnina, sendo *Erythrina velutina* mais potente que *E. mulungu* neste aspecto (VASCONCELOS et. al., 2007).

O extrato aquoso das folhas de *E. velutina* ampliou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital, não havendo distinção entre as doses utilizadas, de maneira dose-dependente, levando a um efeito sedativo e hipnótico, porém doses elevadas reduziram a atividade motora no campo aberto (DANTAS et al., 2004). Esses resultados em geral são análogos ao Diazepam, que em doses

baixas atua como ansiolítico e em doses mais elevadas age como relaxante muscular e sedativo.

Na avaliação do alcalóide hipaporfina proveniente de *E. velutina* diante atividade indutora do sono foi evidenciado este alcalóide aumentou significativamente os movimentos oculares não rápidos (NREM) na primeira hora de tempo de sono após a sua administração. O tempo de sono foi aumentado em 33% em camundongo experimentais em comparação com o do controle (OZAWA et al., 2008). Este estudo confirmou a propriedade que esta espécie vegetal tem em promover o sono.

No teste de formalina caracterizado por duas fases, onde a primeira é resultado da atividade química direta de fibras aferentes nociceptivas, mielinizadas ou não, e a segunda é resultado de mudanças de longa duração provocadas por estímulos danosos nos neurônios do colo dorsal da medula, com isso foi possível constatar que a inibição foi superior na segunda fase (resposta inflamatória), portanto os autores sugeriram que o extrato pode produzir uma atuação modulatória no nível espinhas, que por sua vez possui efeitos antinociceptivos (VASCONCELOS et al., 2003).

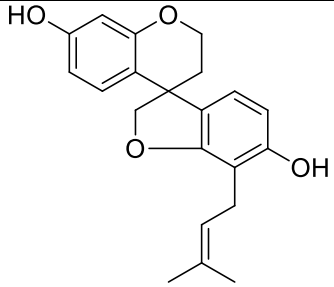
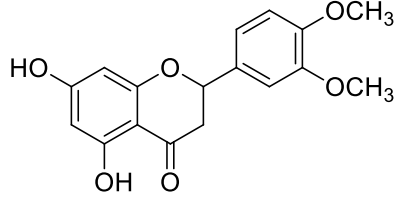
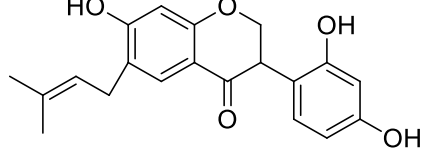
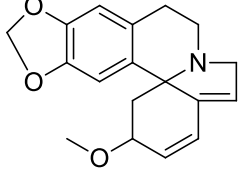
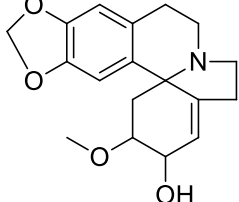
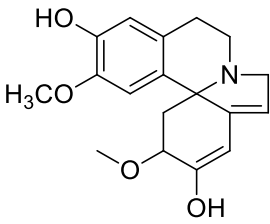
*Erythrina velutina* apresentou atividade anestésica no extrato aquoso das folhas em que foi demonstrado efeito analgésico, no qual, a eficácia foi correspondente à morfina em um dos modelos de indução de dor (MARCHIORO et al., 2005). Santos e colaboradores (2007) demonstraram a ação relaxante em ducto deferente de ratos do extrato aquoso de folhas de *E. velutina*.

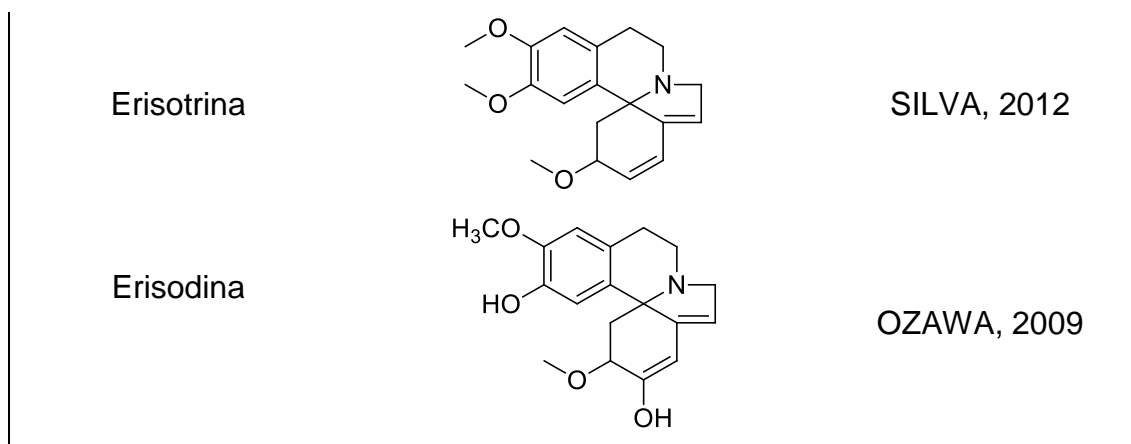
Das sementes de *E. velutina* foi extraído uma lectina que incentivou a migração de neutrófilos no peritônio e bolsa de ar dorsal em ratos, levando a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios com base na estrutura de lectinas desse tipo (CABRAL, 2009). Também das sementes vários alcalóides, como hipaforina, um alcalóide indólico (OZAWA et al., 2008), além de eritralina, 8-oxoeritralina, erisotrina, erisodina, erisovina e glicoerisodina (OZAWA et al., 2009) (Quadro 3).

De *Erythrina velutina* foram isolados os alcaloides (+)-eritralina e a (+)-eritratina (AMER et al., 1991) e a segmentação química das cascas de *Erythrina velutina* apresentou aos flavonóides faseolidina e homoesperetina, sendo que a última ainda não havia sido relatada para espécies de Fabaceae (RABELO et al., 2001), também a erivelutinona (2',4'-dihydroxy-6-prenyl-7-

methoxyisoflavanone) como uma goma marrom-amarelada e a 3'- O-etilsigmoidina (DA-CUNHA et al., 1996) (Quadro 3).

Quadro 3. Algumas substâncias isoladas de *E. velutina*

Substâncias isoladas de <i>E. velutina</i>	Estrutura química	Referência
Faseolidina		SILVA, 2012
Homoesperetina		SILVA, 2012
Erivelutinona		DA-CUNHA, 1996
Eritralina		AMER et al., 1991; SILVA, 2012
Eritratina		AMER et al., 1991; SILVA, 2012
Erisovina		OZAWA, 2009



Utilizando o método de difusão em disco e concentração inibitória mínima para o extrato etanólico bruto e difusão em disco para a fração hexânica utilizando as cascas do caule de *Erythrina velutina*, demonstraram resposta a atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. (VIRTUOSO, et al., 2005)

O objeto de estudo, a *Erythrina velutina* Wild. tem mostrado que o interesse farmacológico de pesquisadores pela mesma não é em vão, visto que esta já é muito utilizada e apresenta resultados benéficos e eficazes na medicina popular, com este embasamento da cultura popular a ciência alia suas tecnologias para que novos fármacos possam ser desenvolvidos a partir da utilização dessa matéria prima rica e abundante em nossa região. Com bases nos estudos acima citados pode-se considerar a *E. velutina* como uma espécie vegetal que tem relevância farmacológica, visto que, é provável que está tenha efeito tanto sobre a ansiedade quanto sobre a dor. O interesse torna-se ainda maior quando é levado em consideração que os tratamentos atuais para estas patologias apresentam efeitos colaterais como dependência e crise de abstinência (benzodiazepínicos) para as drogas ansiolíticas. Enquanto que, os analgésicos e antiinflamatórios podem ocasionar úlceras gástricas, intolerância gastrointestinal, bloqueio da agregação plaquetária e reações de hipersensibilidade (CABRAL, 2009). Em função desses efeitos indesejados acima citados que há a necessidade da investigação e produção de drogas novas que possam reduzir esses efeitos adversos e tratar as enfermidades de forma mais efetiva e segura.

### 3.6 Alcaloides eritrínicos

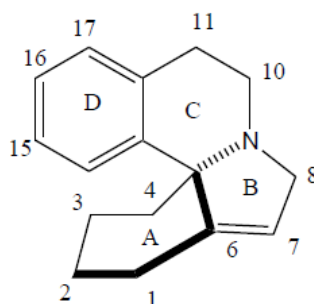
Os alcaloides são uma classe de metabólitos secundários nitrogenados com grande diversidade estrutural. Tal característica permite a estes compostos uma vasta aplicação farmacológica podendo ser utilizados no tratamento de câncer, do mal Alzheimer, hipertensão, gota, malária, depressor/estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) entre outras (SIMÕES et al., 2007).

Os alcalóides eritrínicos são os marcadores químicos do gênero *Erythrina*, estes ocorrem amplamente nas espécies do gênero. No entanto também são encontrados em algumas espécies do gênero *Cocculus* (*Menispermaceae*) (AMER, et al., 1991).

Os estudos fitoquímicos das espécies do gênero *Erythrina* foram iniciados por Folkers e Major 1973 quando ocorreu o isolamento do alcaloide Eritroidina de sementes de *E. americana* (SOTO-HERNÁNDEZ et a., 2012) que demonstrou por sua vez bloqueio neuromuscular semelhante a curare (um poderoso veneno) (DANTAS, 2004). Vários estudos sobre os mesmos foram realizados devido a uma importante diferença que os alcaloides eritrínicos apresentam, pois estes são de base terciária, enquanto que, outros alcaloides com atividades semelhantes são sais quaternários (SOTO-HERNANDEZ; JACKSON, 1994),

A estrutura básica dos alcaloides eritrínicos é formada por uma espiroamina tetracíclica, podendo está livre ou conjugada com carboidrato (FEITOSA, 2012). A estrutura também apresenta um espirocentro C-5. A nomenclatura dos tipos de alcaloides eritrínicos se deve ao prefixo “eryso-” que denota a presença de uma função fenólica, ao prefixo “erythroi-” que indica que o anel D do esqueleto é lactônico, e ao prefixo “erythra-” que demonstra que o anel D do esqueleto é o clássico (Figura 5) (AMER et al.,1991).

Figura 5 - Estrutura básica de alcaloides eritrínicos

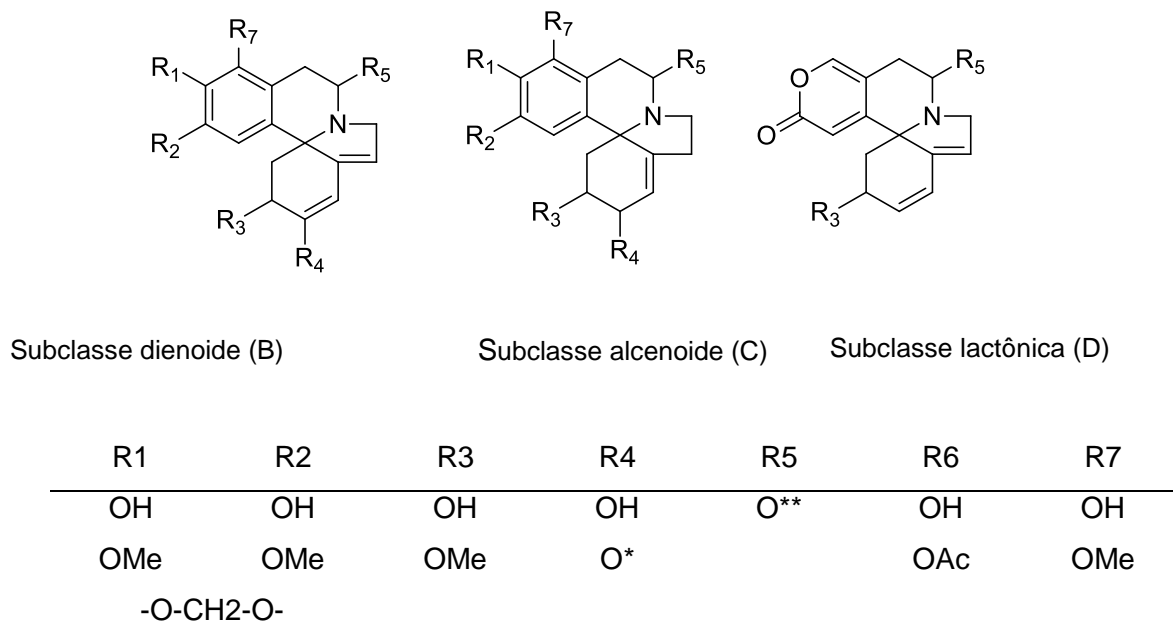


Fonte: MELO, 2011

Alguns alcaloides do gênero *Erythrina* são: erisovina, erisotrina, erisodina, erisonina, eritralina, erisopina, erisonina, erisopitina, eritratina e hipaforina, estes foram isolados de *Erythrina verigata* (CABRAL, 2009).

Os derivados de *Erythrina* são geralmente classificados em três grupos distintos: dienoides (Figura 6 B), alcenoides (Figura 6 C) e lactônicos (Figura 6 D). Os alcaloides dienoides apresentam dupla ligação entre os carbonos 1-2 e 6-7 respectivamente. Enquanto que a subclasse alcenoide possuem dupla ligação entre os carbonos 1 e 6. Os alcaloides pertencentes às classes dienoides e alcenoides em função, do anel D na sua estrutura são classificados como aromáticos. Os alcaloides da subclasse lactônica apresentam o anel D lactônico. Presentes em maior quantidade no gênero *Erythrina* estão às subclasses dienoide e alcenoide, enquanto que a subclasse lactônica está em menor ocorrência, no entanto, as estruturas da subclasse lactônica normalmente apresentam o sistema dienoide (AMER, et al., 1991). Os alcaloides eritrínicos apresentam substituintes oxigenados diversos, porém a maioria destes possuem a presença de grupo metoxila na posição 3.

Figura 6. Estrutura dos alcaloides eritrínicos das subclasses dienoide (B), alcenoide (C) e lactônica (D)

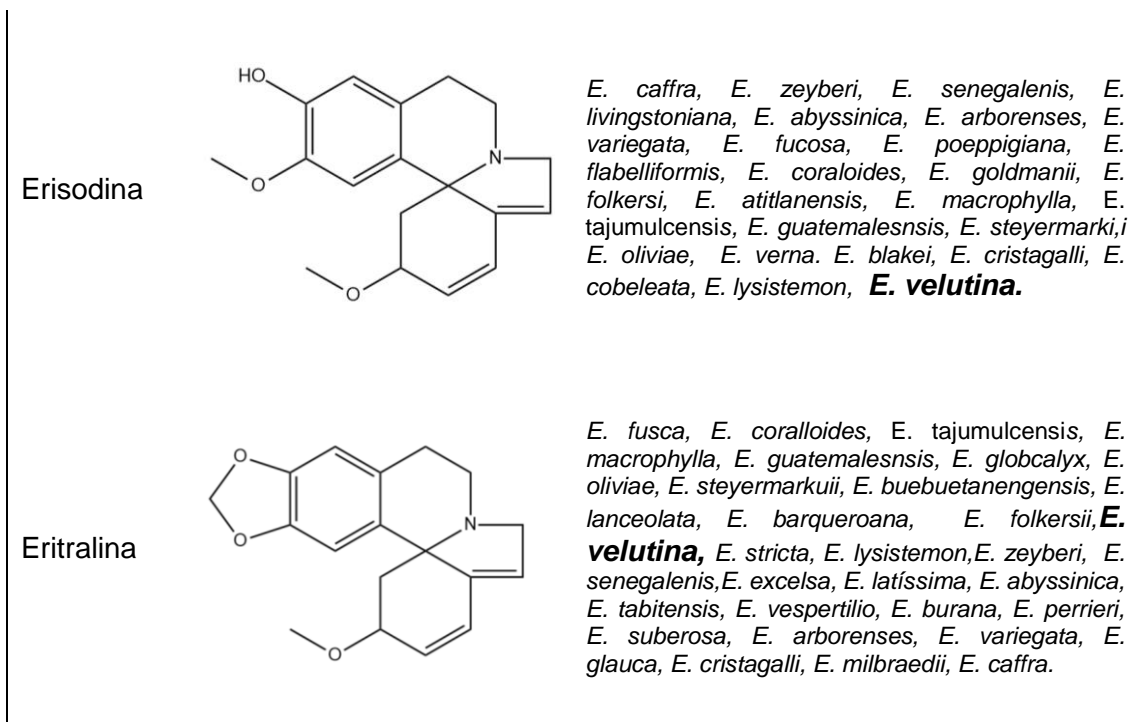


Fonte: FEITOSA, 2014

Dentre a composição alcaloídica de espécies do gênero *Erythrina* os alcaloides de maior ocorrência estão os dienoides erisovina, erisotrina, eritralina, e erisodina, como mostra a quadro 4.

Quadro 4. Alcaloides eritrínicos de maior ocorrência no gênero *Erythrina*

Alcaloide	Estrutura	Espécies
Erisotrina		<i>E. caffra</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalenis</i> , <i>E. livingstoniana</i> , <i>E. suberosa</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. fucosa</i> , <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. flabelliformis</i> , <i>E. coraloides</i> , <i>E. goldmanii</i> , <i>E. folkersi</i> , <i>E. atitlanensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. verna</i> . <i>E. blakei</i> , <i>E. cristagalli</i> , <i>E. cobeleata</i> , <i>E. lysistemom</i> , <b><i>E. velutina</i></b>
Erisovina		<i>E. caffra</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalenis</i> , <i>E. livingstoniana</i> , <i>E. abyssinica</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. fucosa</i> , <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. flabelliformis</i> , <i>E. coraloides</i> , <i>E. goldmanii</i> , <i>E. folkersi</i> , <i>E. atitlanensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. tajumulcensis</i> , <i>E. guatemalensis</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. verna</i> . <i>E. blakei</i> , <i>E. cristagalli</i> , <i>E. cobeleata</i> , <i>E. lysistemom</i> , <b><i>E. velutina</i></b>



FONTE: FEITOSA, 2014

Estudos sobre a estrutura dos alcaloides erisodina, erisovina e erisopina tem explicado os grupos funcionais e o número de anéis de cada um destes alcaloides e mostrado que ambos têm o mesmo sistema de anéis. Esses alcaloides citados apresentam uma interessante ação farmacológica. Erisovina e Erisodina apresentam a mesma fórmula molecular ( $C_{18}H_{21}NO_3$ ), ambos apresentam dois grupos metoxil e um grupo hidroxil fenólico. De modo que, os grupos funcionais que contém os átomos de oxigênio de erisovina e erisodina são conhecidos. Erisopina apresenta a fórmula molecular  $C_{17}H_{19}NO_3$ , com um grupo metoxila e dois grupos hidroxil fenólicos em posição "orto" como são indicados por coloração na reação com cloreto de ferro. Ambos os três alcaloides não apresentaram nenhum grupo *N*-metil ou *C*-metil. A presença de grupos metoxilicos, e particularmente os grupos de hidroxilas fenólicas, leva a presença de pelo menos um núcleo benzênico em todos os três alcalóides (CABRAL, 2009).

Alguns alcaloides que não apresentam o esqueleto típico de derivados eritrínicos também foram isolados sendo eles: *N*-noorientalina, orientalina, coreximina, protosinomenina, isoboldina, norprotosinomenina, hipaforina, eribidina e colina (FLAUSINO-JUNIOR, 2007).

A investigação para o uso medicinal de espécies do gênero *Erythrina* sobre os efeitos dos alcaloides eritrínicos envolvendo o sistema nervoso central

tem sido amplamente estudado. Estudos mostraram que os alcaloides (+)-eritravinae (+)-11- $\alpha$ -hidroxieritravina isolados nas flores de *E. verna* apresentaram efeito anticonvulsivante, da mesma forma que o extrato hidroalcoólico das cascas de *Erythrina verna* (VASCONCELOS et al., 2007).

Erisodina, um alcaloide do gênero *Erythrina* foi estudado e demonstrou uma maior seletividade do que diidro- $\beta$ -eritroidina para os receptores neuronais em relação aos receptores musculares (CABRAL, 2009).

Estudos atuais confirmaram a eficácia farmacológica de alcaloides isolados de espécies de *Erythrina*. Rosa et al. (2012) isolaram o erisotrina derivadas das flores de *E. mulungu* e mostraram que o mesmo possui um grande potencial ansiolítico e anticonvulsivante. Esse potencial ansiolítico também foi atestado por Serrano et al. (2011) através da análise de alcaloides de *E. suberosa*. Juma e Majinda (2004) isolaram alcaloides de *E. lysistemon* e Estrada et al. (2011) de *E. americana*, e certificaram que os mesmos possuem atividade antioxidante.

O alcaloide Erisovina, também apresentou resultados como agente microbiano. Estrada et al, (2011) verificaram que o alcaloide erisovina isolado de sementes de *E. americana* mostrou atividade inibitória para o crescimento dos fungos *A. solani*, *B. cinérea*, *F. oxysporum*, *Penicillium sp* e *T. harzianum*. Porém em *Penicillium sp* o efeito de erisovina foi o menor. Os autores sugerem mais estudos na utilização de erisovina contra outros tipos de microrganismos como parasitas de seres humanos (MELO, 2011). Cornelius et al., (2009) recomenda estudos para efeito inseticida dos alcaloides eritrínicos isolado de sementes e flores de *E. latíssima*.

Alcaloides glucodienóides estão sendo isolados das espécies de *Erythrina*, a exemplo, (+)-16 $\beta$ -D-glucoerisopina e (+)-15 $\beta$ -D-glucoerisopina das sementes de *E. latíssima* (WANJALA & MAJINDA, 2000).

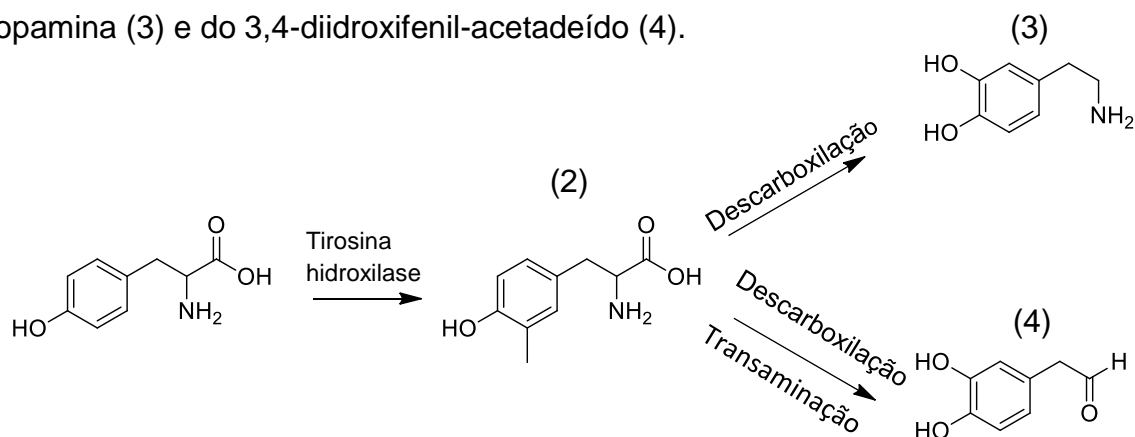
### 3.6.1 Biossíntese de alcalóides eritrínicos

De acordo com a biossíntese, os *building blocks* responsáveis pela construção/formação dos alcaloides, são os aminoácidos, estes por sua vez são metabólitos primários envolvidos principalmente na biossíntese de proteínas (DEWICK, 2002).

Basicamente, a biossíntese de alcaloides é a combinação de duas reações: a formação de uma imina (base de *Schiff*) e uma condensação de Mannich (DEWICK, 2002).

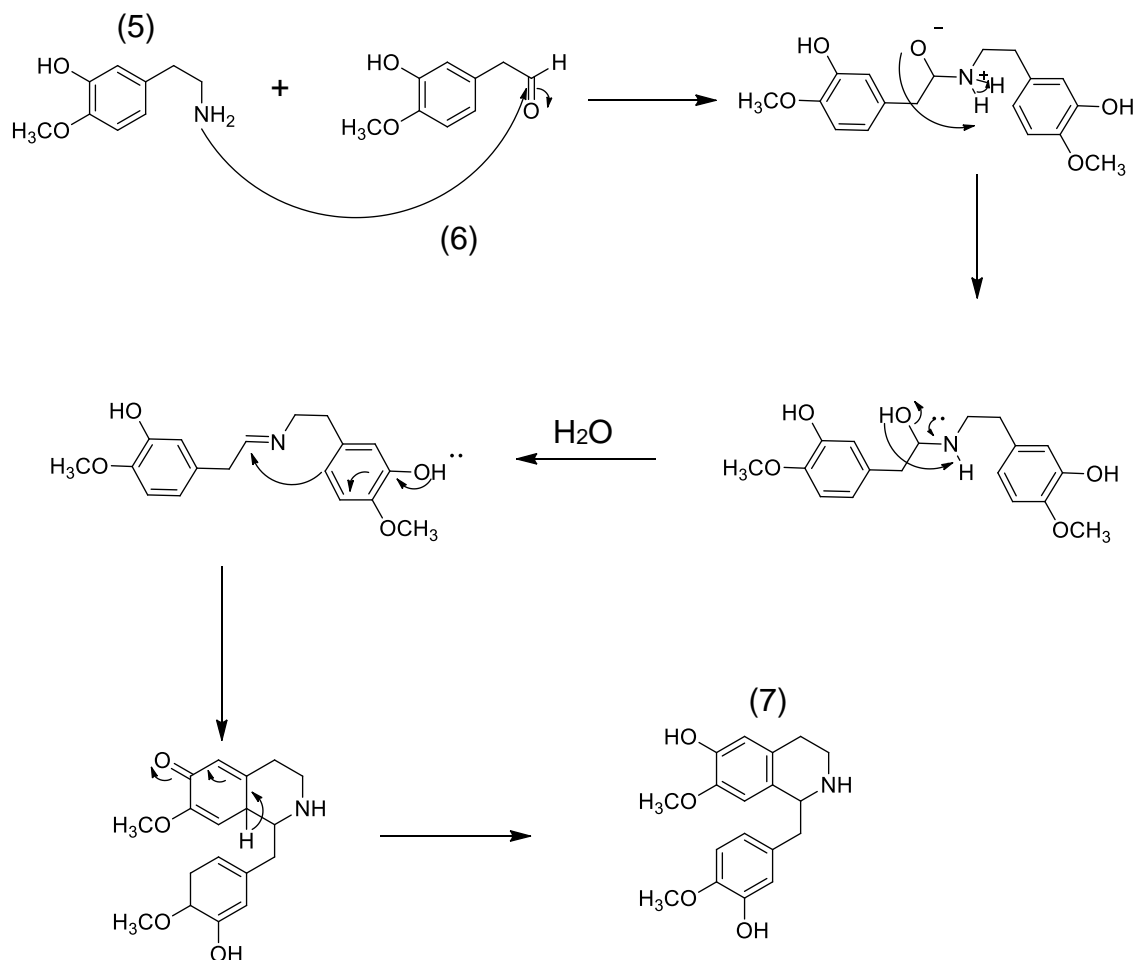
Na geração da base de *Schiff*, duas moléculas de aminoácidos sofrerão descarboxilação, no entanto apenas uma delas sofrerá transaminação (Figura 7). Como resultado obtêm-se uma amina e um aldeído, respectivamente, os quais irão reagir entre si formando a base de *Schiff* com a eliminação de uma molécula de água. Posteriormente, o alcaloide é formado por meio de uma reação de Mannich intra ou inter-molecular na qual o íon imínio (base de *Schiff* protonada) pode reagir com um nucleófilo, como um enolato, por exemplo (ANHESINE, 2018) (Figura 8).

Figura 7. Formação do DOPA através da hidroxilação da tirosina e formação da dopamina (3) e do 3,4-diidroxifenil-acetadeído (4).



Fonte: ANHESINE, 2018

Figura 8. Formação da base de Schiff, seguida de uma reação de Mannich intramolecular para formação da (S)-(+)-Norprotosinomenina.



Fonte: ANHESINE, 2018

O esqueleto básico dos alcalóides eritrínicos é proveniente da rota biossintética do aminoácido tirosina (1). Como a maior parte dos alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos apresenta dois anéis aromáticos *orto* di-oxigenados, propõe-se que este padrão evidencia de que duas moléculas de 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) (2) foram utilizadas na rota biossintética. As moléculas de DOPA, resultantes da hidroxilação da tirosina pela enzima *tirosina hidroxilase*, podem sofrer descarboxilação e transaminação resultando na dopamina (amina) (3) e no 3,4-diidroxifenil-acetaldeído (aldeído) (4) (Figura 7). Estas podem sofrer O-alquilação com o auxílio da S-adenosilmetionina (SAM) (DEWICK, 2002) para formar 4-metoxitiramina (5) e homoisovanilina (6). Finalmente, pode ocorrer uma reação entre estas para formar uma base de *Schiff*

a qual, em uma condensação de Mannich intramolecular, pode resultar na benzilisoquinolina (S)-(+)-norprotosinomenina (7) (Figura 8), o alcaloide precursor dos eritrínicos (ANHESINE, 2018).

Outros estudos afirmam que os alcalóides são biossintetizados em regiões crescentes da planta, como por exemplo o caule.

### 3.7 Técnicas Hifenadas para Identificação de Substâncias

O progresso de técnicas analíticas, sobretudo técnicas hifenadas têm favorecido o esclarecimento de composições químicas complexas dos produtos oriundos de vegetais, com elevada seletividade e sensibilidade (MELO, 2011).

A combinação de tais técnicas permite a análise do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, podem levar a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas hifenadas (OLIVEIRA et al., 2015).

#### 3.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

Muito utilizada para caracterização de produtos naturais a cromatografia gasosa é uma técnica analítica, qualitativa e quantitativa, que possibilita a separação de componentes de uma amostra por meio da partição dos compostos da mesma entre uma fase líquida (estacionária) e uma fase gasosa (móvel). Ocorre uma partição gás-líquido entre os componentes da amostra e as duas fases, onde a fase estacionária é um líquido não-volátil ligado à parede interna de um tubo capilar de sílica fundida, e a fase móvel é um gás inerte, chamado gás carreador, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ou He (SOUZA, 2007).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica fundamentado na determinação da massa atômica ou molecular de uma substancia numa amostra. Foi a partir da década de 70 que essa técnica foi amplamente desenvolvida e aplicada, devido ao acoplamento às técnicas cromatográficas, ao surgimento de novas formas de ionização, bem como o desenvolvimento de softwares. A relevância do seu acoplamento com técnicas cromatográficas é em função do tipo de informação que se obtém, como identificação de compostos, quantificação de compostos conhecidos e elucidação estrutura e de propriedades químicas de moléculas (SÁ, 2013).

FEITOSA (2012) analisou a fração de alcalóide (FAT) da casca de *Erythrina verna* por CG-EM e HRESI-EM onde cinco alcalóides eritrínicos foram identificados: erisotrina, eritriadina, eritramidona, epero e 11-hidroxiertitridinona. No trabalho 11-hidroxiertitridinone foi relatado pela primeira vez como um produto natural.

TELES (2016) analisou a FAT do extrato etanólico de *Ocotea duckei* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e realizou a identificação dos alcaloides metilreticulina e metilcoclaurina.

Valentim (2016) identificou cinco compostos do alburno de *Hymenaeae stigonocarpa* através da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) sendo eles: N-N dietil-decanamida, Hexadecanoato de metila, Ácido hexadecanóico, Ácido 9-octadecenóico e Ácido octadecanóico.

Peixoto Filho (2015) por meio de análises em CG-EM do óleo essencial de *Adenocalymma imperatoris-maximiliani*, elucidou trinta e nove (39) compostos, sendo o fitol identificado como composto majoritário.

Através das análises por cromatografia gasosa, acoplada com espectrômetro de massas (CG/EM) OLIVEIRA et al., (2015), obtiveram um perfil químico dos óleos extraídos, encontrando os compostos  $\alpha$  – terpineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\rho$  – cimeno, terpinen - 4-ol, 1,8 – cineol como majoritários.

Para o trabalho de Xavier et al. (2016) também foi utilizado CG/EM durante análise química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum*, e foram identificados 23 compostos no óleo essencial das folhas, sendo que o composto majoritário foi o sesquiterpeno oxigenado espatulenol (28,78%); nas flores, foram identificados 31 compostos com abundância dos sesquiterpenos hidrocarbonados germacreno-D (37,03%) e germacreno-B (13,72%); e, nos frutos, 17 compostos com predominância dos sesquiterpenos hidrocarbonados germacreno-D (28,19%), germacreno-B (20,90%) e do sesquiterpeno oxigenado espatulenol (11,53%). Sendo que para folhas e flores foi a primeira vez relatado a composição química do óleo essencial.

Em pesquisa Sá (2013) com o objetivo de conhecer a composição química do óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. utilizou a técnica de CG-EM. Como resultado obteve como componentes majoritários  $\alpha$ -terpineno (42,14%),  $\alpha$ -terpinenil-acetato (31,57%) e timol (7,90%). Concluindo também que

a diferença na composição química do óleo essencial desta espécie depende do local onde o vegetal está inserido.

As espécies *Ricinus communis*, *Citrus limonum* e *Senna occidentalis*, tiveram seus extratos submetidas a CG-EM, sendo identificado a presença dos compostos, derivados de terpenoides e cumarinas, que em estudos anteriores são citados com a atividade anticolinesterásica (CASTRO, 2016).

A cromatografia gasosa em especial acoplada a um espectrômetro de massas é atualmente, uma das técnicas de análise de maior uso que produz dados quantitativos, bem como a identificação de compostos de uma amostra sem a necessidade de isola-los. Os recentes e grandes avanços nessa área fazem da cromatografia gasosa uma técnica altamente estimulante, empregada nas mais diversas áreas, como a análise ambiental, nas indústrias químicas, farmacêuticas, de alimentos, de produtos petroquímicos e outras.

### 3.7.2 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

De acordo com Niero et al., (2003), em termos de caracterização, detecção, separação e controle final de pureza de compostos umas das técnicas que apresenta mais vantagens é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou High Performance Liquid Chromatography (HPLC), essa técnica possibilita a separação de substâncias que estão em baixas quantidades no vegetal e em tempo reduzido de análise.

A hifenção de um método eficaz de separação com detector espectrométrico é uma ferramenta essencial utilizada no estudo de plantas medicinais, de modo que, a cromatografia líquida ocupa um lugar de destaque entre os métodos de separação.

Yang et al., (2012) analisaram por CLAE-EM com fonte de ionização por eletrospray os extratos brutos e frações cromatográficas de frutos e flores de *Phyllanthus emblica* L. Nos extratos brutos dos frutos, foram identificados como compostos mais abundantes: Galato de ácido muco, lactona galato de ácido mucílico, monogoloylglucose, ácido gálico, digalloylglucose, putranjivain A, galloyl-HHDP-glicose, elaeocarpusin, e o ácido chebulágico. Nas frações foram tentativamente identificados principalmente elagitaninos, flavonóides e ácido

gálico simples. Enquanto que nas frutas os resultados indicaram a presença de ácido neocobulóico, isômeros de neo-estrobóyl galloylglucose, ruminolilo, neocarboilgluilglucose, glicosídeos do ácido elágico, glicosídeos da quercetina e eriodictilol glicosídeos de coumaroíla.

Peixoto Filho (2015) por meio de análises foi capaz de evidenciar quatorze (14) compostos derivados flavonoídicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com modo de ionização por eletrospray, presentes nos extratos aquoso, metanólico e acetônico.

De acordo com TELES (2016) por meio de CLAE – EM foi realizado a identificação de alcaloides: reticulina, discretamina, tetrahydrocolumbamina, coclaurina e N-óxido de reticulina. Dentre os alcaloides citados, apenas a reticulina foi identificada na FAT das folhas em estudos anteriores.

Leite (2010), apresentou resultados na caracterização dos compostos orgânicos existentes em efluentes brutos e tratados de sistemas combinados de tratamento de esgoto, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electro spray, possibilitou a discriminação dos íons mais abundantes sendo estes: homólogos do surfactante alquilbenzeno sulfonado de cadeia linear e de ácidos graxos de cadeia longa presentes nas amostras.

A fim de elucidar funções biológicas a nível molecular dos compostos presentes no arroz colorido como estratégia dietética para melhoria na saúde, Minatel et al., (2014), com auxílio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas identificou a abundância de tocoferóis e carotenóis no arroz negro, tocotrienóis no arroz vermelho e  $\gamma$ -orizanol no arroz integral açucarado. Em ambas amostras de arroz integral colorido por meio de CLAE-EM foram encontrados ácidos graxos: palmítico, oleico e linoleico. A análise dos componentes de  $\gamma$ -orizanol por espectrometria de massa permitiu identificar 3, 10, 8, e 8 álcoois triterpenóides ou esteril ferulatos nas amostras integral, integral açucarado, vermelho e negro, respectivamente.

*Orostachys japonicus* cultivado na República da Coréia foi analisado em função do conteúdo de flavonóides pela técnica CLAE-MS / MS. Foram caracterizados 16 compostos, oito flavonóides e um alcalóide foram caracterizados pela primeira vez: dois isômeros de galato de procianidina, epigallocatequina-3-galato, dois isômeros digalato de procianidina, quercetina 3-

O-ramnosil-7-O-glucósido, miricetina 3-O-glucósido, kaempferol e N<sup>1</sup>, N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-tri-p- (E, E, E) –coumaroilspermidina (LEE et al., 2011).

O *Petasites japonicus* é uma planta coreana perene utilizada na medicina popular como remédio para várias doenças. Dez polifenóis foram caracterizados das folhas, caules e raízes desta planta por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massa (CHOI, 2017).

No estudo de produtos naturais, quase que predominantemente, há a necessidade do uso de técnicas complementares para a identificação dos componentes ativos, como o caso da associação entre CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas) e CL-EM (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas), devido à complexidade do trabalho com esse tipo de substância. Com os recentes avanços da tecnologia, os pesquisadores podem contar com ferramentas poderosas na busca de novos compostos bioativos.

## 4. METODOLOGIA

O material botânico utilizado no presente estudo foi coletado no estado da Paraíba, região do Cariri que está situado na superfície do planalto da Borborema, de clima semiárido acentuado, onde contempla 29 municípios, ocupa uma área de 11.233 km<sup>2</sup> (ALVES, 2009). As cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd foram coletadas, em maio de 2017 na zona rural do município de Serra Branca, estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada e uma exsicata foi depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza - UFPB apresentando-se como código AGRA et al. 2554.

A pesquisa ocorreu em duas etapas, na primeira etapa foram realizadas a coleta, desinfestação, secagem e trituração do material coletado. A fase inicial ocorreu nos laboratórios do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA/UFCG). Laboratórios de Ecologia e Botânica I (Laebinho) e II (LaeBi).

Enquanto que no segundo momento da pesquisa ocorreu a obtenção do extrato etanólico, concentração e análises CG-IE-EM e CLAE-IES-EM, estas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) campus João Pessoa (Laboratório de fitoquímica e LMCA).

### 4.2 Coleta e desinfestação das cascas do caule

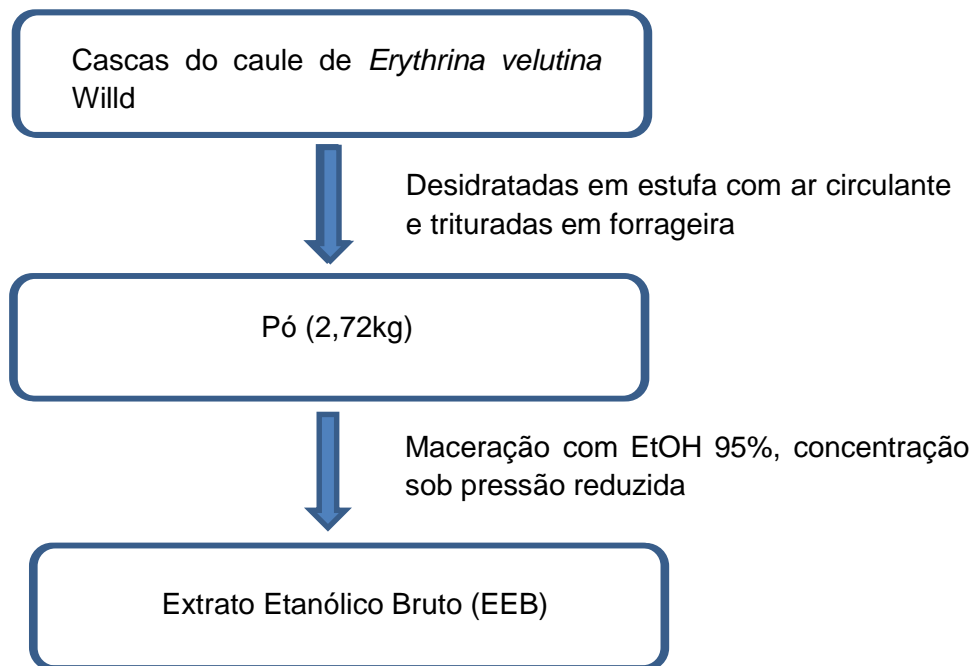
As cascas coletadas na região do Cariri foram higienizadas para que microrganismos que vivem nas superfícies (epífitos) sejam eliminados de modo que não haja nenhuma contaminação por estes. A lavagem das cascas do caule foi realizada com álcool 70% por 1 minuto, seguida de banho com hipoclorito de sódio 3% por 2 minutos, álcool 70% novamente por 1 minuto e para finalizar foi realizado um banho com água destilada estéril para remover resquícios dos agentes de desinfestação (ARAÚJO, 2005).

### 4.3 Obtenção do extrato etanólico bruto

O material botânico foi desidratado em estufa com ar circulante a temperatura média de 45° C durante 72 h. Em seguida o material foi triturado em forrageira obtendo-se 2,72 kg de pó. Posteriormente o pó foi submetido à

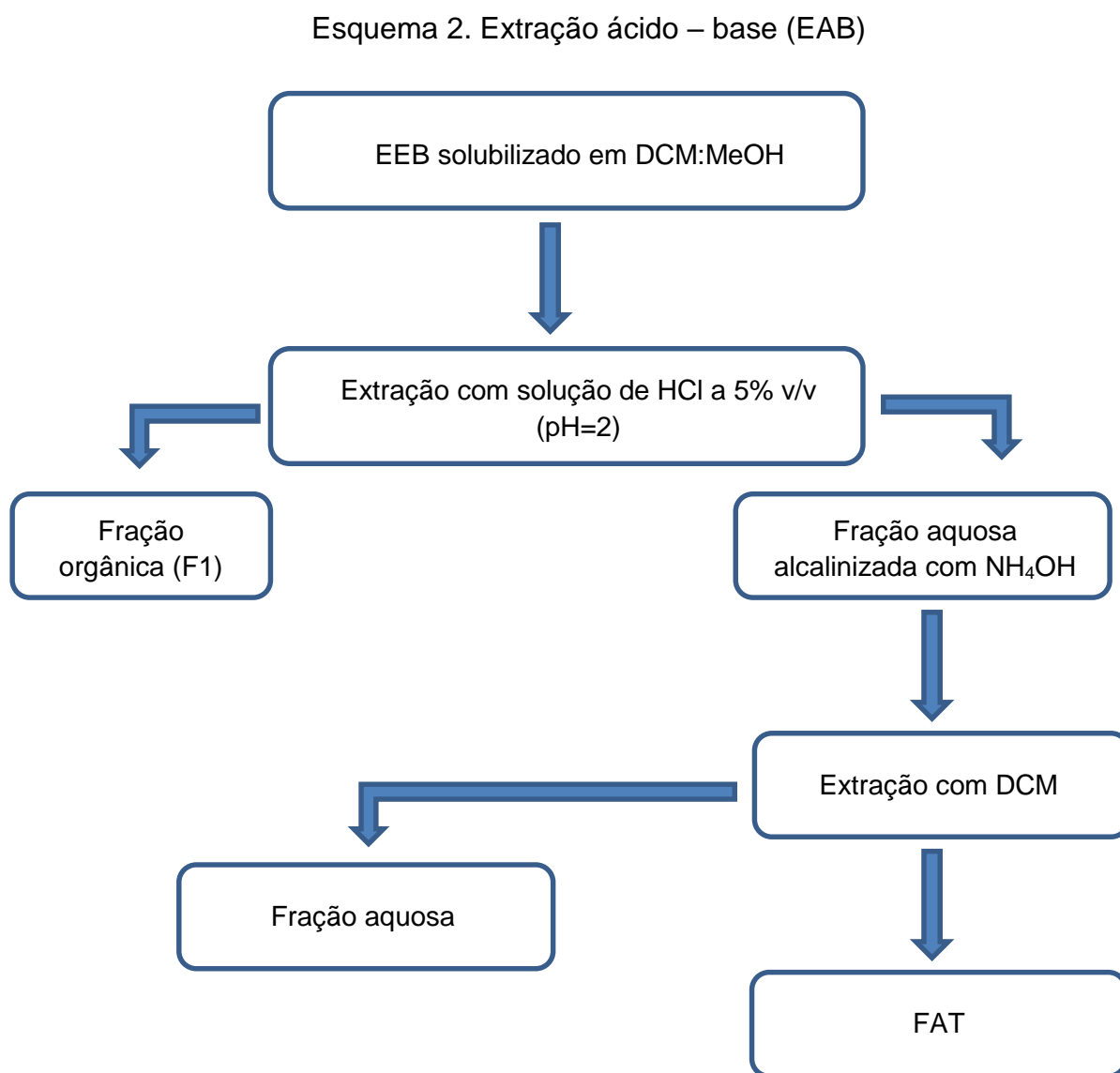
maceração com etanol (EtOH) a 95%, em percolador de aço inoxidável por 72 h, sendo este processo repetido por três vezes. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 40°C com objetivo de eliminação do solvente para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1).

Esquema 1. Obtenção do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *Erythrina velutina* Willd.



#### 4.4 Extração ácido - base

A extração ácido-base (EAB) foi utilizada para obtenção de frações enriquecidas com alcaloides do extrato etanólico de *Erythrina velutina* conforme ilustrado no esquema 2. Em solução DCM:MeOH (8:2) foi realizada a solubilização do extrato etanólico com auxílio de banho de ultrassom por 20 min. Posteriormente, a fração orgânica (F1) foi extraída com solução de HCL 5% (v/v). Em seguida, a fração aquosa ácida foi alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  em volume suficiente para atingir  $\text{pH} = 10$ . Por fim, a fração aquosa foi extraída com DCM (F2). Após essa marcha química a fração diclorometânica enriquecida com alcaloides obtidas foi utilizada nos testes (FEITOSA, 2014).



## 4.5 Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação dos alcaloides de *Erythrina velutina* Willd

### 4.5.1 Análise em CG-EM

As frações obtidas foram analisadas em CG-EM (Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas) em sistema Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, operando em energia de ionização de 70 eV. Equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i.) com fase estacionária RT-SMS (0,25µm de espessura do filme). O método cromatográfico em fase gasosa empregado foi desenvolvido utilizando injeção no modo *Split* (1/10), temperatura de injeção 250 °C, o gás carreador usado foi o hélio ao fluxo de 1,1 mL/min e o gradiente de temperatura empregado foi o seguinte: de 100 a 200 °C a 6°C/min, 220 °C por 10 min, de 220 a 290 °C a 6 °C/min e, por fim, 290 °C por 11 min (FEITOSA,2014). O filtro quadrupolo com varredura de  $m/z$  de 40 a 400 Da. Com volume de injeção de 1µL.

As amostras foram preparadas diluindo-as em MeOH (3mg /mL), seguidas de banho de ultrassom, no aparelho USC-1600 da marca Unique, para favorecer a solubilização, e por fim filtradas em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro.

A identificação das substancias foi efetuada de acordo com a comparação dos espectros de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 2008) e com espectros e padrões de fragmentação existentes na literatura (FEITOSA, 2014; AMER et al., 1991).

### 4.5.2 Análise em CLAE-IES-EM/EM

Para as análises na CLAE foram utilizados água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q®) acidificada com ácido fórmico (0,1%) (solvente A) e Metanol grau de pureza CLAE (Tedia®) (Solvente B). As amostras foram solubilizadas em MeOH (1mg/mL) com auxílio de banho de ultrassom (USC-1600 Unique). Por fim a amostra foi filtrada em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro.

O equipamento utilizado para as análises de CLAE-IES-EM/EM foi da marca Shimadzu®, composto por duas bombas de solvente LC20AD, auto-injetor SIL-20A HT, detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A, degaseificador DGU-20A 5R e controlador sistema CBM20A acoplado a um

espectrômetro de massas com analisador tipo Ion-Trap modelo AmazonX-Bruker® em modo positivo. A coluna utilizada na separação cromatográfica foi uma C18 de fase reversa (Kromasil; 250 mm x 4,6 mm x 5 micrómetros).

O método analítico desenvolvido para FAT consistiu em um sistema gradiente com os eluentes água acidificada (0,1% ácido fórmico) (A) e MeOH (B) com detecção em 245 nm. Assim, o gradiente foi iniciado 0 – 35 min (5-35%B); 35 – 75 min (35-50%B); 75-140 min (50-90%B); 140 – 141 min (90-100% B) finalizando a corrida com uma eluição isocrática de 100% de B a 100% de B de 141 até 160 min. O volume de injeção foi de 20 µL com fluxo de 0,6 mL/min.

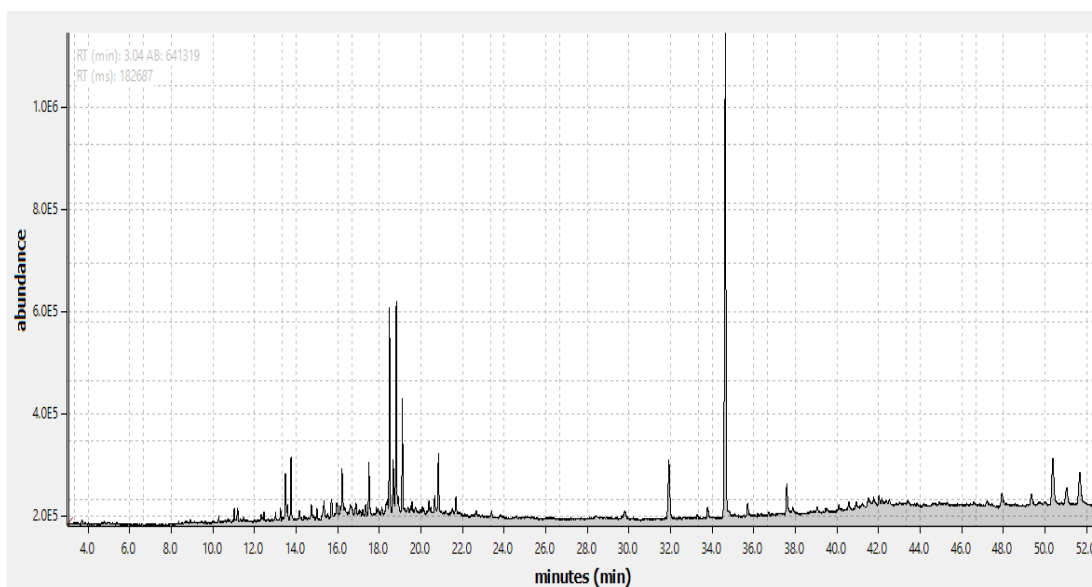
Os parâmetros de aquisição de Ion Trap foram: voltagem do capilar - 4,5 kV, voltagem da placa offset - 500V, pressão do gás nebulizador - 20 psi, vazão e temperatura do gás de secagem - 8 L/min e 300°C, respectivamente e modo de ionização positivo. A fragmentação na célula de colisão (CID) foi obtida no modo auto-EM/EM com resolução aprimorada para obtenção dos espectros EM e EM/EM. Os espectros foram registrados com um intervalo entre m/z 100-1000 a cada 2 segundos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação dos alcalóides eritrínicos por CG-IE-EM

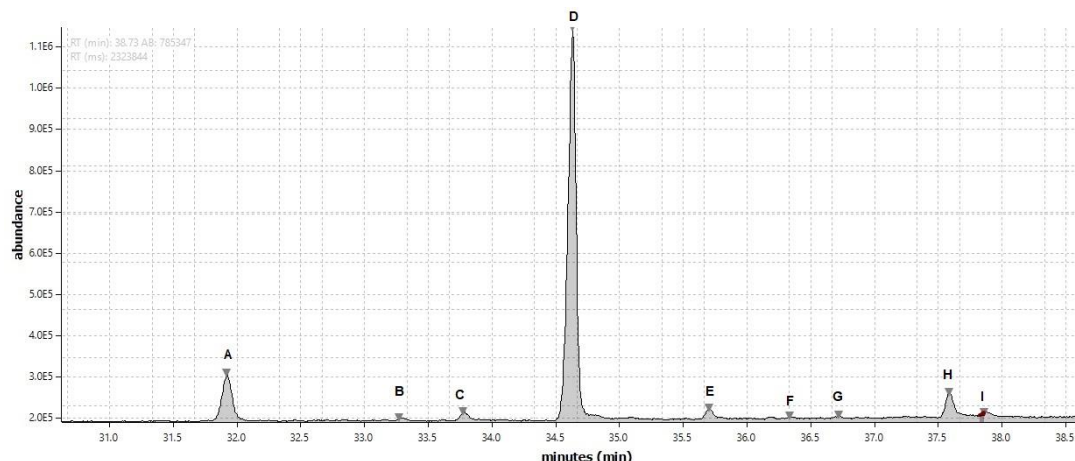
Na análise do Cromatograma da FAT de *E. velutina* foi observado a presença de 48 picos (Figura 9), dos quais 9 (Figura 10) são putativos alcalóides eritrínicos no intervalo de tempo de 31 a 38 min, também observado por FEITOSA, 2014 por CG-EM utilizando a mesma metodologia. Sendo os possíveis alcalóides erisodina ou erisovina e seu isômero, eritrascina, eritralina, eritratidina ou epiertatidina e seu isômero, erisotina ou erisolavina e seu isômero e erimelantina.

Figura 9. Cromatograma obtido para fração de alcalóides totais.



Com base no tempo de retenção dos constituintes químicos do gênero, esse estudo foi realizado em uma janela do Cromatograma da fração de alcalóides totais (Figura 10), e de acordo com dados do padrão de fragmentação bem como a intensidade destes fragmentos foi possível sugerir a caracterização dos alcalóides presentes na FAT e o padrão de fragmentação dos mesmos.

Figura 10. Perfil cromatográfico (janela) da fração de alcalóides totais no qual foram identificados os alcalóides eritrínicos. Erisodina ou erisovina (A), eritrascina (B), dienoide ou eritralina (C), erisodina ou erisovina (D), eritraditina ou seu epímero (E), eritratidina ou seu epímero (F), erimelantina (G), erisotina ou erisosalvina (H) e erisotina ou erisosalvina (I).



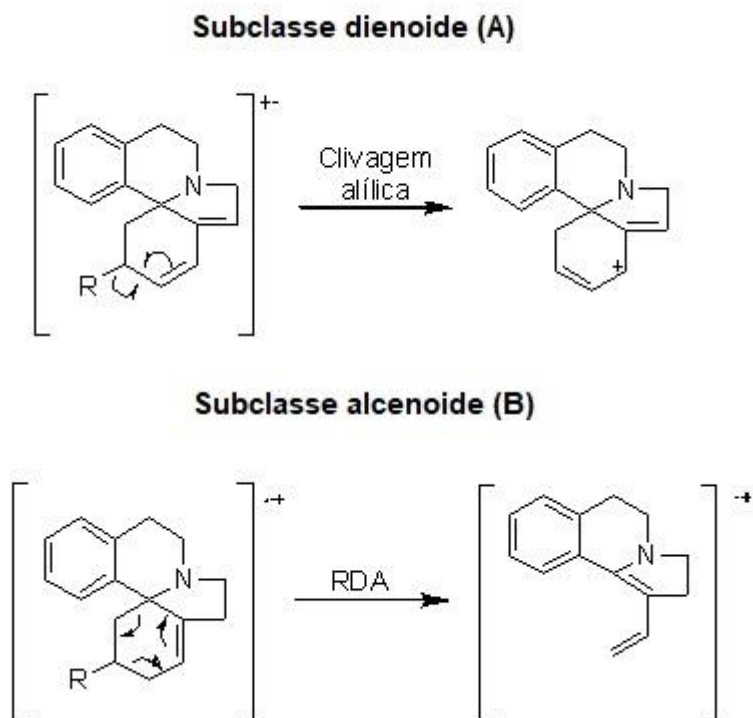
### 5.1.1 Padrão de fragmentação dos alcalóides eritrínicos em IE-EM

De acordo com os fundamentos da espectrometria de massas é possível prevê padrões de fragmentação de substâncias de acordo com seus análogos, com base nisso foi possível propor a análise dos perfis de fragmentação dos possíveis alcalóides encontrados na fração de alcalóides totais de acordo com os padrões de fragmentação para as subclasses dienoides e alcenoides reportados por Amer et al. (1991).

Deste modo, foi possível perceber que em sistemas dienoides (ligações duplas entre os carbonos 1 e 2, 6 e 7 respectivamente) há uma facilidade para ejeção de um elétron, sendo assim a fragmentação para este tipo de subclasse ocorre por clivagem  $\alpha$ -alílica (Figura 11 A) dando origem a um íon di-alílico estável, normalmente este é o fragmento majoritário do espectro (FEITOSA, 2014; MILLINGTON et al., 1974). Assim para ocorrer a formação do pico base em um espectro de alcalóides eritrínicos da subclasse dienoide que apresentam metoxila na posição 3 ( $R_3 = OCH_3$ ) ocorre uma clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{\bullet+} - 31$ ] do íon molecular com perda do radical metóxi nesta posição, isso pode ser observado na figura 11 A, que mostram o padrão de fragmentação de derivados eritrínicos da subclasse dienoide de acordo com Amer et al., 1991. Enquanto que para alcalóides eritrínicos da subclasse dienoide que apresentam hidroxila na

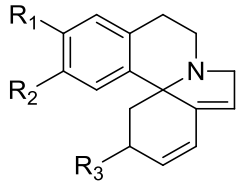
posição 3 ( $R_3=OH$ ), o pico base do espectro de massas se dá devido a fragmentação do íon molecular a partir de clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{\bullet+} - 17$ ] perdendo o radical hidróxi, isto pode ser observado na figura 11 B (FEITOSA, 2014).

Figura 11. Padrão de fragmentação IE-EM para alcalóides eritrínicos das subclasses dienoide A e alcenoide B



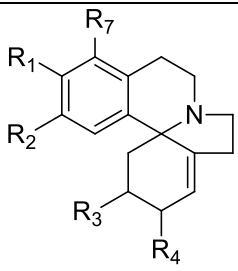
Para a subclasse alcenoide (ligação dupla entre os carbonos 1 e 6) a ocorrência da reação retro Diels-Alder (RDA) [ $M^{\bullet+} - 58$ ] é característica para esses derivados eritrínicos (figura 11 B). Barton et al., (1968) e Millington et al., (1974) também apresentaram a proposta de fragmentação por reação de RDA em alcalóides eritrínicos alcenoide. Alguns derivados eritrínicos alcenoide por meio da reação de RDA geram o pico base do espectro (Quadro 6), são exemplos: dihidroerisotrina, eritroculina, eritroculinol e eritraulina, enquanto que outros geram íons de elevada intensidade, porém não o pico base do espectro como por exemplo erisotina, erisosalvina e eritatidina. O padrão de fragmentação é essencial para distinção das subclasses dos alcalóides eritrínicos, visto que ocorre de forma diferente para ambas as classes.

Quadro 5. Padrões de fragmentação de alcalóides eritrínicos em IE-EM, subclasse dienoide

				
Alcaloide eritrínico	R1	R2	R3	m/z (intensidade)
Erisotrina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	313 (84), 298 (81), 282 (100)
Eritravina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	299 (94), 282 (100), 280 (17), 266 (23)
Erisovina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	299 (39), 284 (41), 268 (100)
Eritralina	-O-CH <sub>2</sub> -O-		OCH <sub>3</sub>	29, 282, 266 (100), 264, 239, 225, 212
Erisonina	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	285 (100), 268 (89), 266 (21), 254 (11)
Erisolina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	285 (100), 268 (89), 266 (21), 254 (11)

Fonte: AMER et al., 1991

Quadro 6. Padrões de fragmentação de alcalóides eritrínicos em IE – EM, subclasse alcenoide

						
Alcaloide eritrínico	R1	R2	R3	R4	R7	m/z (intensidade)
Eritratidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	331, 300, 257 (100), 244
Erisosalvina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	317 (8), 286 (14), 259 (93), 258
Erisotina	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	317 (8), 286 (14), 259 (93), 258 (23), 243 (100), 242 (26)
Dihidroerisotrina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	315, 284, 257 (100), 256 (30)

Eritroculina	OCH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	343 (7), 328 (0,5), 312 (13), 285 (100)
Eritramina		-O-CH <sub>2</sub> -O-	OCH <sub>3</sub>	H	H	299 (20), 268 (15), 241 (74), 240 (100)
Eritlaurina	OCH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	359, 328, 301 (100)
Eritroculinol	OCH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	315 (3), 284, 257 (100), 238, 226
Eritratina		-O-CH <sub>2</sub> -O-	OCH <sub>3</sub>	H	H	331, 300, 273, 257 (100), 256 (30)
Erisotinona	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	315 (3), 257 (75), 256 (11), 229 (70), 228 (100), 242 (15)
Eritratidinona	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	O	H	329, 301, 298, 286, 272, 271 (100), 243, 242, 228, 215, 214, 197

Fonte: AMER et al., 1991

De acordo com dados da literatura e com as informações obtidas nos padrões de fragmentação dos constituintes da fração de alcalóides totais na análise em CG- IE- EM juntamente com os dados resultantes da CLAE- ESI – EM, foi possível sugerir a caracterização dos alcalóides eritrínicos presentes no extrato de *Erythrina velutina*.

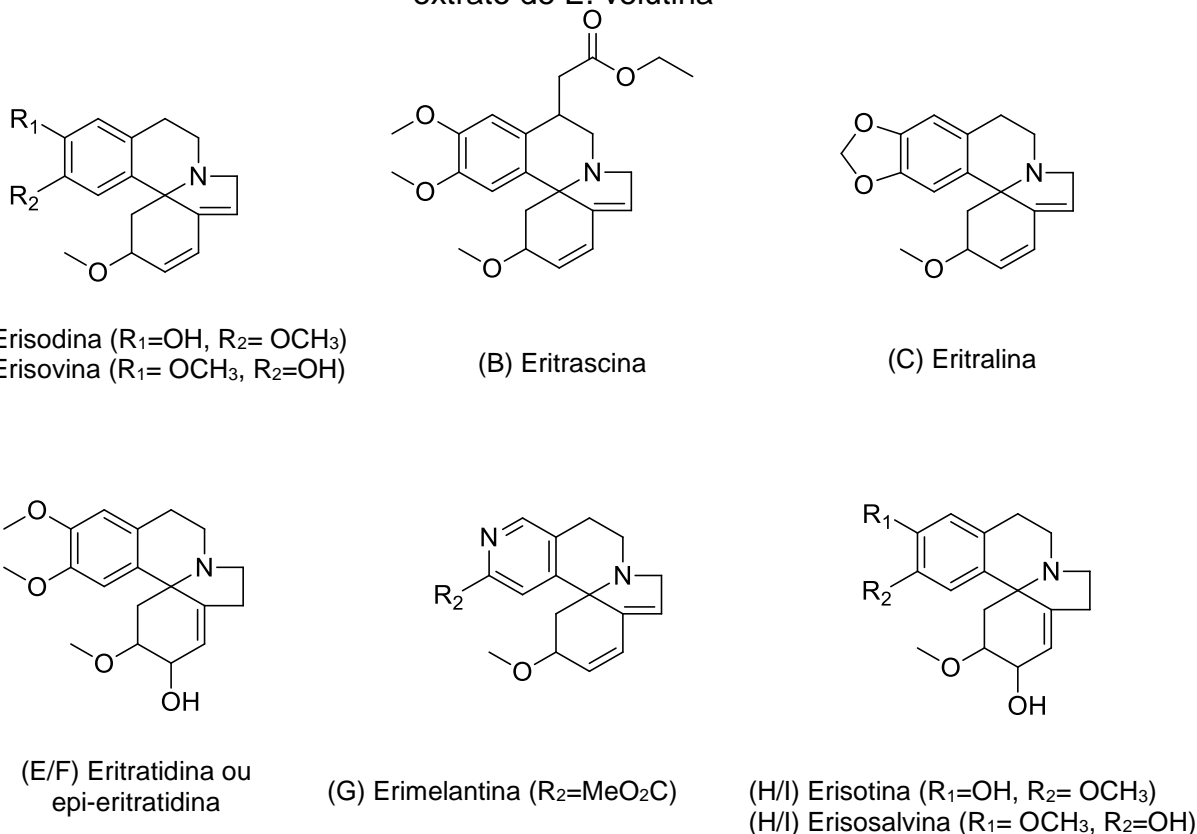
### 5.1.2 Identificação dos alcalóides eritrínicos e análise do perfil alcaloídico no extrato de *Erythrina velutina* por IE-EM

A análise dos dados de CG-EM da fração de alcalóides de *Erythrina velutina*, por meio de comparação dos padrões de fragmentação da fração de alcalóides juntamente com os padrões de fragmentação descritos para este gênero na literatura sugerem a presença de nove alcalóides no extrato das cascas do caule do mulungu: erisodina ou erisovina (A), eritrascina (B), eritralina (C), erisodina ou erisovina (D), eritraditina ou seu epímero (E), eritratidina ou seu epímero (F), erimelantina (G), erisotina ou erisolavina (H) e erisotina ou erisolavina (I) (Figura 10). De modo que, os picos (A) e (D), (E) e (F) e (G) e (H) são isômeros. O constituinte que se apresenta de forma majoritária pode ser

erisodina ou erisovina representado no pico D, com tempo de retenção de 34, 63 minutos. As estruturas desses alcalóides estão expressas na figura 12.

Em estudo Feitosa (2014) por meio de IE-EM e IES-EM em alta resolução, caracterizou alcalóides eritrínicos das cascas de *Erythrina verna* de origens diferentes (nativa e produtores comerciais) e identificou treze possíveis alcalóides eritrínicos nos extratos de *E. verna*, onde erisodina, erisovina, eritratidina e seu epímero, também estão presentes na análise da fração de alcalóides do extrato de *E. velutina*. Sendo possível destacar que a erisovina também foi o constituinte majoritário no extrato de *E. verna*, bem como em *E. velutina*.

Figura 12. Alcalóides eritrínicos identificados na fração de alcaloides do extrato de *E. velutina*



### 5.1.3 Identificação dos alcalóides eritrínicos e análise dos padrões de fragmentação no extrato de *Erythrina velutina* por IE-EM

O pico da substância A presente no tempo de retenção 31,92 min (Figura 10. Após análise do espectro de massa do constituinte A (Figura 13) foi possível perceber que o íon molecular de  $m/z$  299 fragmenta-se por clivagem  $\alpha$ -alílica

[M<sup>•+</sup> - 31] dando origem ao pico base do espectro m/z 268 (Quadro 5). Essa fragmentação com perda de 31 u é característico para alcalóides dienoides com grupo metoxila na posição 3. Isômeros de erisodina e erisovina, diferem entre si apenas com alteração na posição do grupo metoxila e hidroxila em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> (Figura 12), isso foi comprovado por Singh et al (1981) por meio de dados de IES-EM, IV e RMN <sup>1</sup>H. Também foi possível observar que o pico D apresentou fragmentações idênticas as presentes no perfil de fragmentação da substância A (Figura 14), bem como a intensidade dos íons nos perfis das substancias A e D também são semelhantes (Quadro 5), diferindo apenas no tempo de retenção destes constituintes. Logo, esses dados sugerem a presença dos isômeros erisovina e erisodina na fração de alcaloides do extrato de *E. velutina*. Para ambas as substâncias os íons majoritários dos espectros de massas ocorrem em m/z 299, 284, 269, 268 (100) e estão em conformidade com os padrões de fragmentação descritos para estes isômeros (FEITOSA, 2014; AMER et al., 1991). Porém os dados referentes a espectrometria de massas não são suficientes para distinção dos isômeros.

Figura 13. Espectro de massa da substância A no tempo de retenção 31, 92 min.

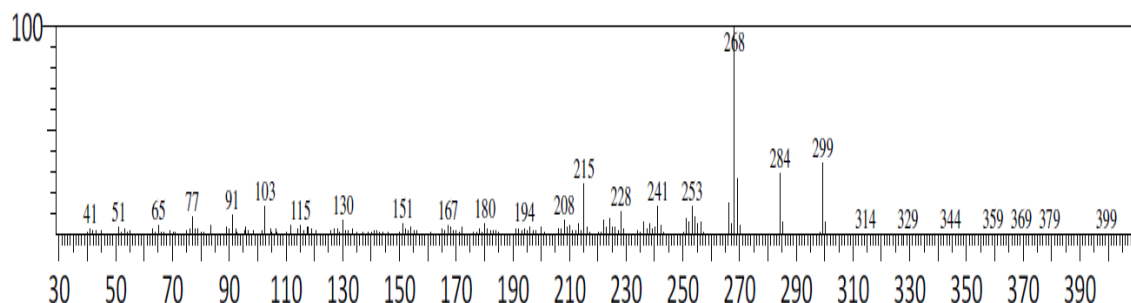
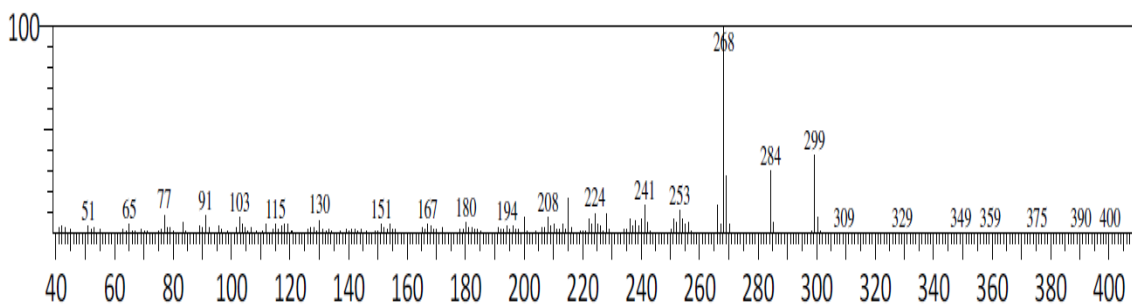
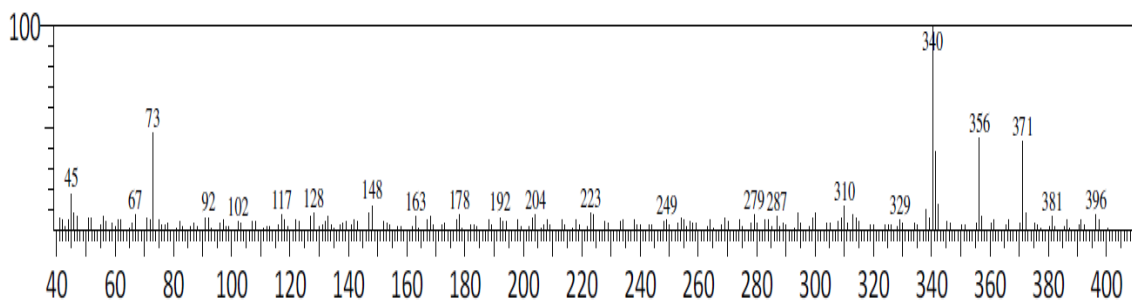


Figura 14. Espectro de massa da substância D no tempo de retenção 34,63 min.



Na análise do perfil de fragmentação da substância B com tempo de retenção 33,29 min, observou-se a fragmentação do íon molecular de  $m/z$  371 por meio de clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{*+} - 31$ ] dando origem ao íon majoritário no espectro em  $m/z$  340 e classifica essa substância como dienoide com grupo metoxila na posição 3. É ainda possível sugerir com base no perfil de fragmentação deste constituinte que o mesmo seja o alcalóide eritrínico eritrascina (Figura 12) de acordo com a semelhança dos fragmentos e intensidade destes, bem como os íons majoritários do espectro de massas em  $m/z$  371, 356 e 340 (100) (Figura 15) descritos por AMER et al., 1991.

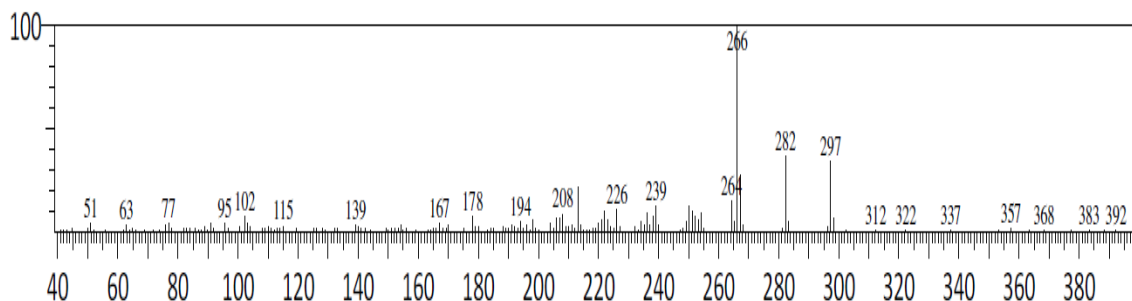
Figura 15. Espectro de massa da substância B no tempo de retenção 33,29 min.



A substância presente no pico C (Figura 10) com tempo de retenção de 33,77 min também apresentou clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{*+} - 31$ ] do íon molecular em  $m/z$  297 para formar o pico base do espectro em  $m/z$  266 (Quadro 5) o que sugere a presença de metoxila na posição do carbono 3, com estrutura de alcalóide eritrínico dienoide. Os íons majoritários do espectro de massas  $m/z$  297, 282, 266 e 264 (Figura 16) estão em concordância com a fragmentação da eritralina (AMER et al., 1991; FEITOSA 2014), sugerindo que a substância

anteriormente descrita seja a eritralina. A estrutura desse alcalóide está presente na figura 12.

Figura 16. Espectro de massa da substância C no tempo de retenção 33,77 min.



As substâncias E e F apresentaram as mesmas fragmentações em  $m/z$  331, 300, 273, 257 (100) e 244 (Figura 17 e 18), entretanto é possível perceber a diferença na intensidade dos íons em seus espectros de massas, bem como o diferente tempo de retenção que estas foram detectadas 35,70 min e 36,33 minutos respectivamente, o que sugere a presença de isômeros no extrato. Além do que, essas substâncias, mostraram em comum reação de RDA [ $M^{*+} - 58$ ] no íon molecular  $m/z$  331 para originar o íon em  $m/z$  273 (Quadro 6), o que sugere um alcalóide do tipo alcenoide com metoxila na posição 3. Os dados de IE-EM das substâncias E e F estão de acordo com o perfil de fragmentação e a baixa intensidade do sinal do íon molecular reportado nos trabalhos de MILLINGTON et al., 1974 e FEITOSA, 2014 para a eritratidina um alcalóide alcenoide com hidroxila na posição 2, o que sugere que esses dois constituintes sejam a eritratidina. Sua estrutura está presente na figura 12.

Figura 17. Espectro de massa da substância E no tempo de retenção 35,70 min.

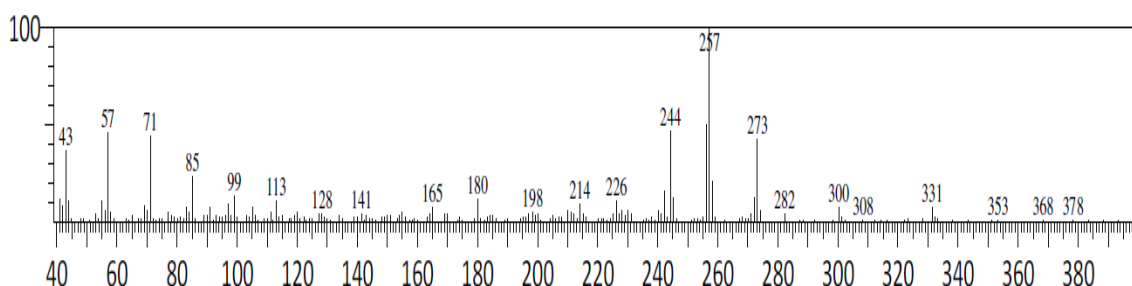
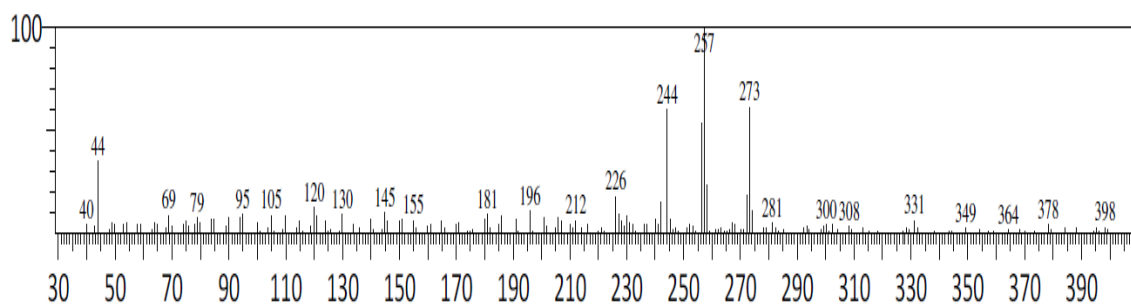
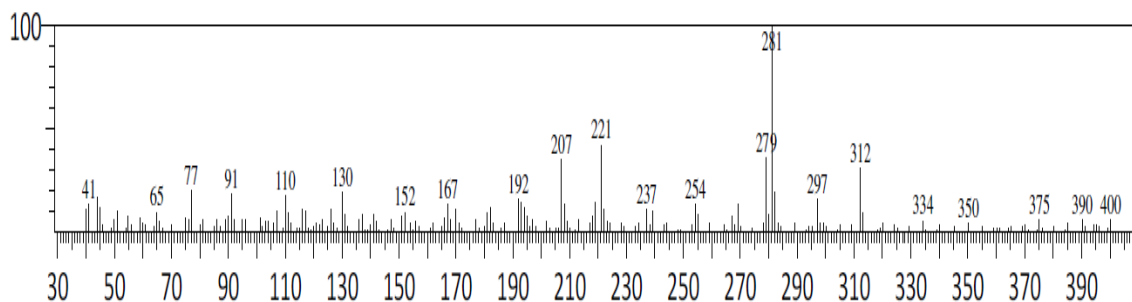


Figura 18. Espectro de massa da substância F no tempo de retenção 36,33 min.



A substância referente ao pico G (Figura 10) com tempo de retenção de 36,72 min também apresentou clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{+} - 31$ ] do íon molecular em  $m/z$  312 para formar o pico base do espectro em  $m/z$  281 o que sugere a presença de metoxila ligada ao carbono 3, com estrutura de alcalóide eritrínico dienoide. Os íons majoritários do espectro de massas  $m/z$  312, 297, 281, 279 (Figura 19) estão em concordância com a fragmentação da erimelantina (AMER et al., 1991), apresentando apenas diferenças na intensidade dos picos, sendo que o majoritário é o mesmo, dessa forma propõe-se que o constituinte G seja a eritralina. A estrutura da eritralina está presente na figura 12.

Figura 19. Espectro de massa da substância G no tempo de retenção 36,72 min.



Para as substâncias H e I que foram detectadas no tempo de retenção 37,58 min e 37,88min respectivamente, a fragmentação do íon molecular de  $m/z$  317 não gera o pico base do espectro por reação RDA. Logo, foi realizado um levantamento para que fosse possível um estudo mais detalhado destes alcaloides alcenoides. De modo, foi observado que nas fragmentações descritas na literatura para alcalóides eritrínicos alcenoides com hidroxila na posição 2, como por exemplo eritratidina, erisosalvina e erisotina (BARTON et al., 1973; MILLINGTON et al., 1974, FEITOSA 2014) que a reação de RDA não dá origem

ao pico base do espectro de massas. Verificou-se também que no perfil de fragmentação dessas substâncias a intensidade do pico do íon molecular foi reduzida, MILLINGTON et al., 1974 e FEITOSA, 2014 também observaram a redução nas intensidades dos íons moleculares de alcalóides eritrínicos da subclasse alcenoide com substituinte oxigenado na posição 2. Feitosa, 2014 sugere que a presença da hidroxila ligada ao carbono 2 seja um outro ponto para início de fragmentação dos alcalóides eritrínicos alcenoides, visto que, essa clivagem origina uma via de fragmentação distinta da fragmentação iniciada pela reação de RDA. Essa hidroxila no Carbono 2 também pode estar ligada as fragmentações seguintes ao íon formado pela RDA para a formação do pico base do espectro. Mecanismo de fragmentação mais elucidado no próximo item deste trabalho.

No perfil de fragmentação das substâncias H e I através de reação de RDA o íon molecular de  $m/z$  317 perde 58  $u$  para a formação o íon em  $m/z$  259 um dos majoritários no espectro de massas (Tabela 1) (Figuras 20 e 21), fato, que é característico para eritrínicos alcenoides com metoxila ligada ao carbono 3. As substâncias H e I apresentam perfil de fragmentação correspondente as fragmentações descritas por Feitosa, 2014 e Millington et al., 1974 para isômeros alcenoides com hidroxila na posição C-2 erisotina e erisosalvina, com ênfase para a baixa intensidade dos íons moleculares nesses alcalóides, é possível que os constituintes H e I sejam os isômeros erisotina e erisosalvina. As estruturas de erisotina e erisosalvina são mostradas na figura 12. Entretanto só os dados espectrométricos não são suficientes para distinção dos isômeros presentes na FAT do extrato de *E. velutina*.

Figura 20. Espectro de massa da substância H no tempo de retenção 37,58 min.

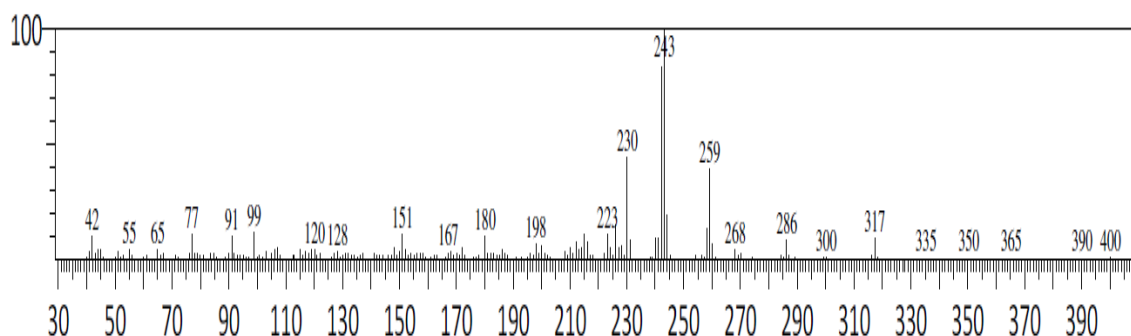
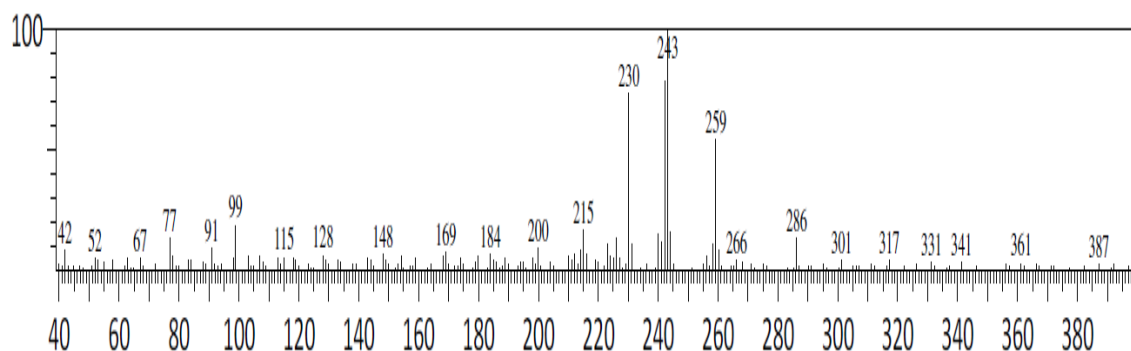


Figura 21. Espectro de massa da substância I no tempo de retenção 37,88 min.

Tabela 1. Padrão de fragmentação alcalóides de *Erythrina velutina*

Pico	Alcalóide	Tr (min)	m/z (IE-EM) (intensidade)
A	Erisodina/Erisovina (C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> )	31,92	299 (37), 284 (36), 269 (27), 268 (100), 266 (19), 253 (12), 241 (11), 228 (13), 215 (23)
B	Eritrascina (C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub> N)	33,29	371 (42), 356 (42), 340 (100), 329 (12)
C	Eritralina (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> )	33,77	297 (31), 282 (32), 266 (100), 264 (24), 239 (10), 226 (16)
D	Erisovina ou Erisodina (C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> )	34,63	299 (37), 284 (36), 268 (100), 253 (12), 241 (11), 228 (13), 215 (23)
E	Eritratidina ou epieritratidina (C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> )	35,70	331 (2), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)
F	Eritratidina ou epieritratidina (C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> )	36,33	331 (2), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)
G	Erimelantina (C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ) Erisotina ou	36,72	312 (50), 297 (36), 281 (100), 279 (28), 221 (49)
H	Erisosalvina (C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> )	37,58	317 (10), 286 (11), 259 (46), 258 (10), 243 (100), 242 (40)

	Erisotina ou		
I	Erisosalvina (C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> )	37,88	317 (7), 286 (11), 259 (66), 258 (10), 243 (100), 242 (40)

#### 5.1.4 Mecanismo de fragmentação proposto em IE-EM para alcalóides eritrínicos das subclasses alcenoide e dienoide

Baseado nos estudos de fragmentação de FEITOSA (2014), MILLINGTON et al., (1974) e BOAR et al.,(1970) em IE-EM para alcaloides eritrínicos e nos padrões de fragmentação com ionização por elétrons discutidas anteriormente neste estudo foram propostos os mecanismos de fragmentação de alguns íons das vias que envolvem reação de RDA e clivagem  $\alpha$  nas subclasses alcenoides e dienoides de acordo com os substituintes ligados ao carbono 2 (para alcenoides), o que contribuiu para identificação destes alcalóides na fração alcaloídica do extrato etanólico de *Erythrina velutina*.

#### 5.1.5 Mecanismo de fragmentação de alcalóides alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2

Para falar sobre esse mecanismo de fragmentação foram selecionados os alcalóides alcenoides encontrados no extrato de *E. velutina*, ambos apresentam hidroxila ligada ao carbono 2, os íons formados da fragmentação de eritratidina e seu possível epímero (E e F) e os isômeros erisotina e erisosalvina (H e I).

Os íons moleculares das substâncias E, F, H e I fragmentam-se por reação de RDA [ $M^{*+} - 58$ ] perdendo uma molécula neutra (- 58 u), originando o cátion radical em m/z 273 (E e F) e m/z 259 (H e I) (Figura 22). Posteriormente o cátion radical resultante da fragmentação do íon molecular fragmenta-se por meio de clivagem guiada pelo radical com perda de um íon hidrogênio radicalar originando os íons em m/z 272 (E e F) e m/z 258 (H e I) (Figura 22). Esses íons ainda sofrem fragmentação por meio da perda de uma metila radicalar em função do aumento do comprimento da ligação de C-O (FEITOSA, 2014). Essa fragmentação dá origem aos íons majoritários nos espectros de massas dos alcalóides encontrados em m/z 257 (E e F) e m/z 243 (H e I).

Outra proposta de fragmentação ocorre com os íons originados pela reação de RDA em m/z 273 (E e F) e m/z 259 (H e I), estes também podem perder uma metila radicalar originando os íons de m/z 258 (E e F) e m/z 244 (H

e I) (Figura 22). Para os isômeros erisotina e erisosalvina, a perda da metila radicalar é a da metoxila,  $R_1$  (erisosalvina) ou  $R_2$  (erisotina).

Para a clivagem  $\alpha$  a fragmentação das substâncias E e F ou H e I tem início com a ejeção de um elétron do oxigênio da hidroxila que está ligada ao carbono 2, caracterizando uma outra via de fragmentação (Figura 23). A baixa intensidade dos íons moleculares de eritratidina e seu epímero, erisosalvina e erisotina podem ser justificados pela presença dessa via de fragmentação. A clivagem  $\alpha$  dos íons moleculares de  $m/z$  331 (E e F) e  $m/z$  317 (H e I) da origem os cátion radicais em  $m/z$  273 (E e F) e 259 (H e I) por meio da perda de uma molécula neutra de 58  $u$ . Posteriormente esses íons radicais podem fragmentar-se por clivagem guiada pelo radical com a perda de um hidrogênio radicalar, em função disso tem-se a formação dos íons de  $m/z$  272 (E e F) e  $m/z$  258 (H e I), ou fragmentar-se pela perda uma metila radicalar (-15  $u$ ) e formar os íons majoritários dos espectros em  $m/z$  257 (E e F) e  $m/z$  243 (H e I). Ambos os mecanismos citados anteriormente sugerem que tanto na via iniciada por reação de RDA quando por clivagem  $\alpha$  originam os mesmos íons do espectro de massas dessas substâncias.

Figura 22. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2. Iniciado pela reação RDA

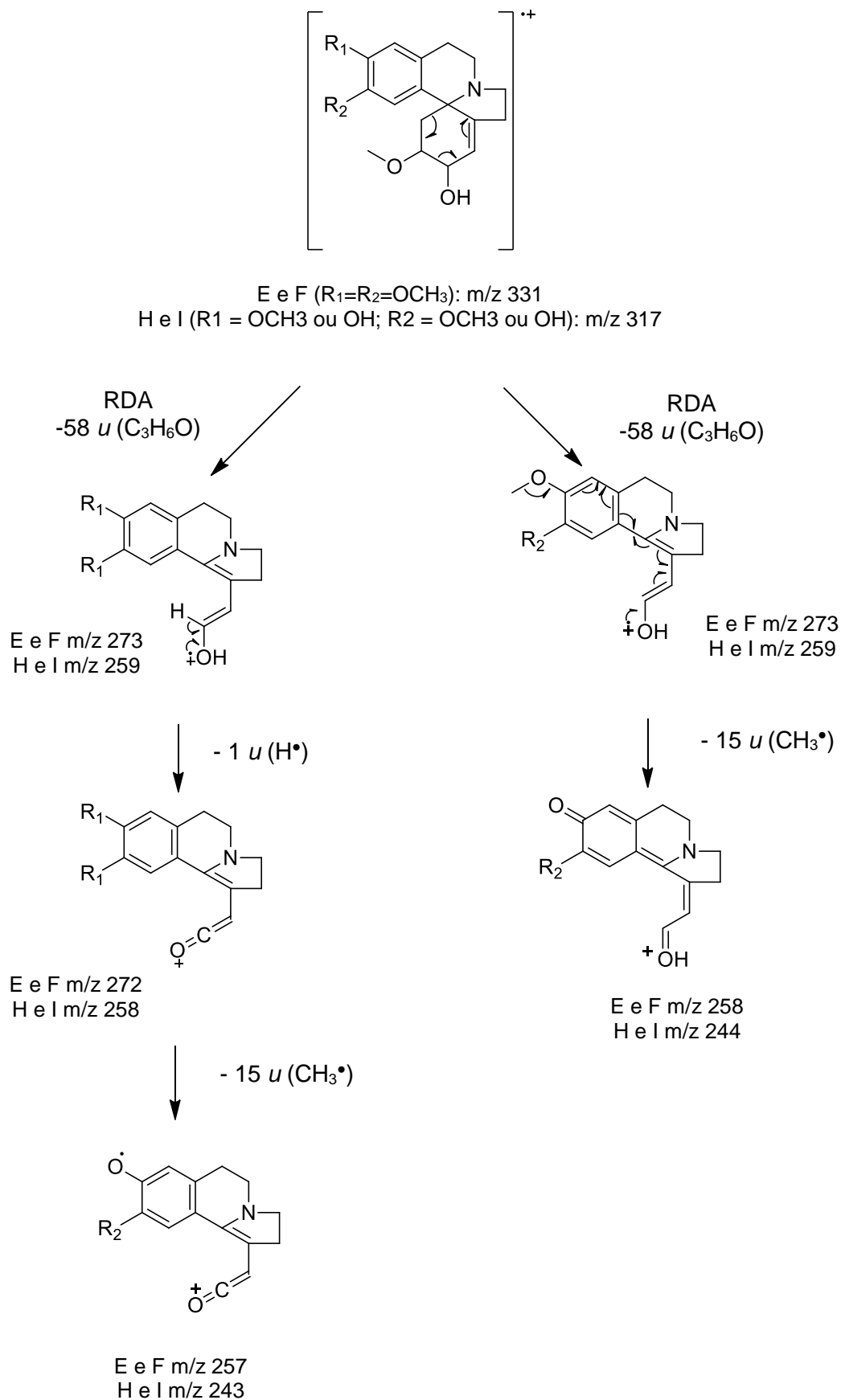
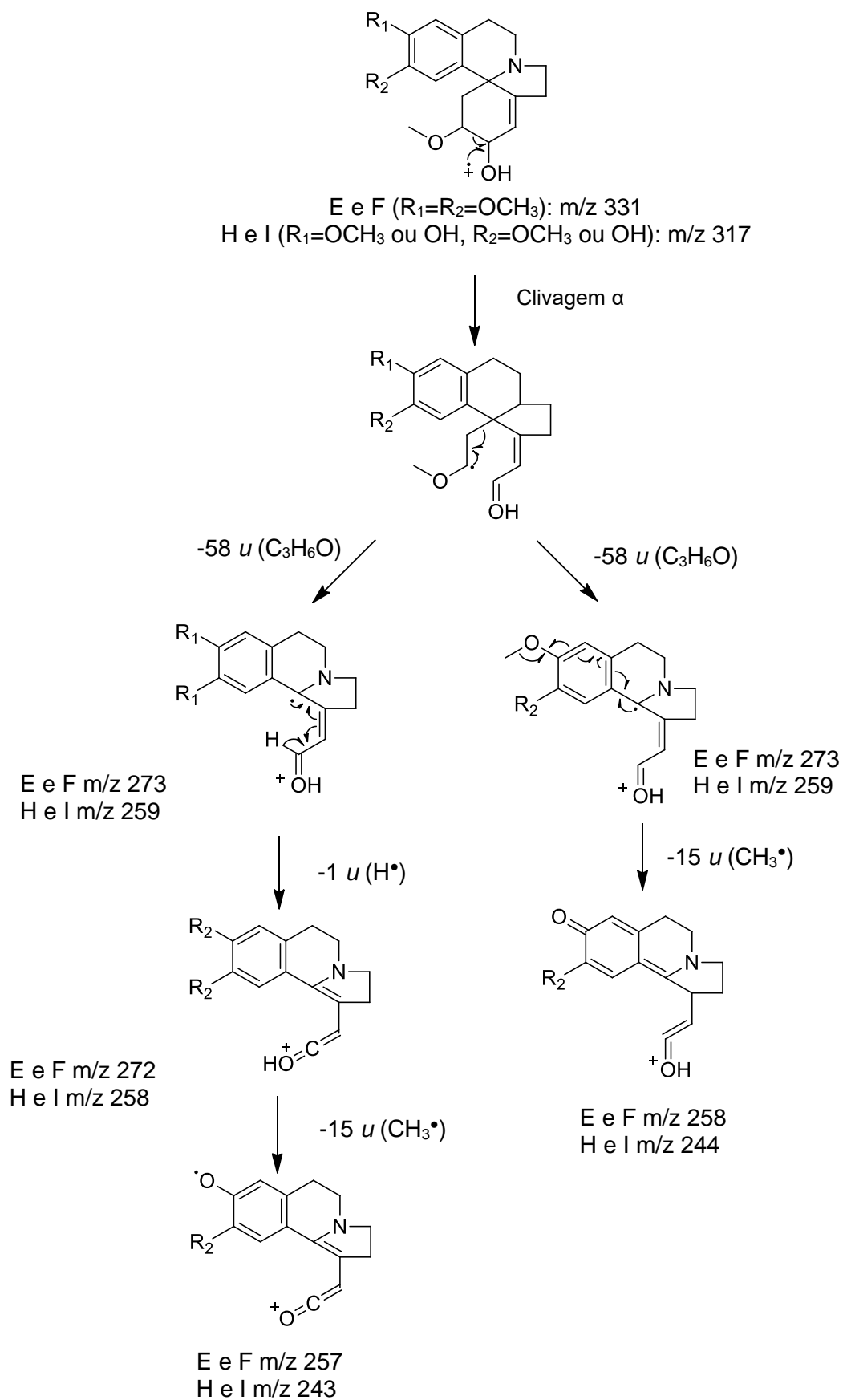


Figura 23. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila ligada ao carbono 2. Iniciado pela reação clivagem  $\alpha$

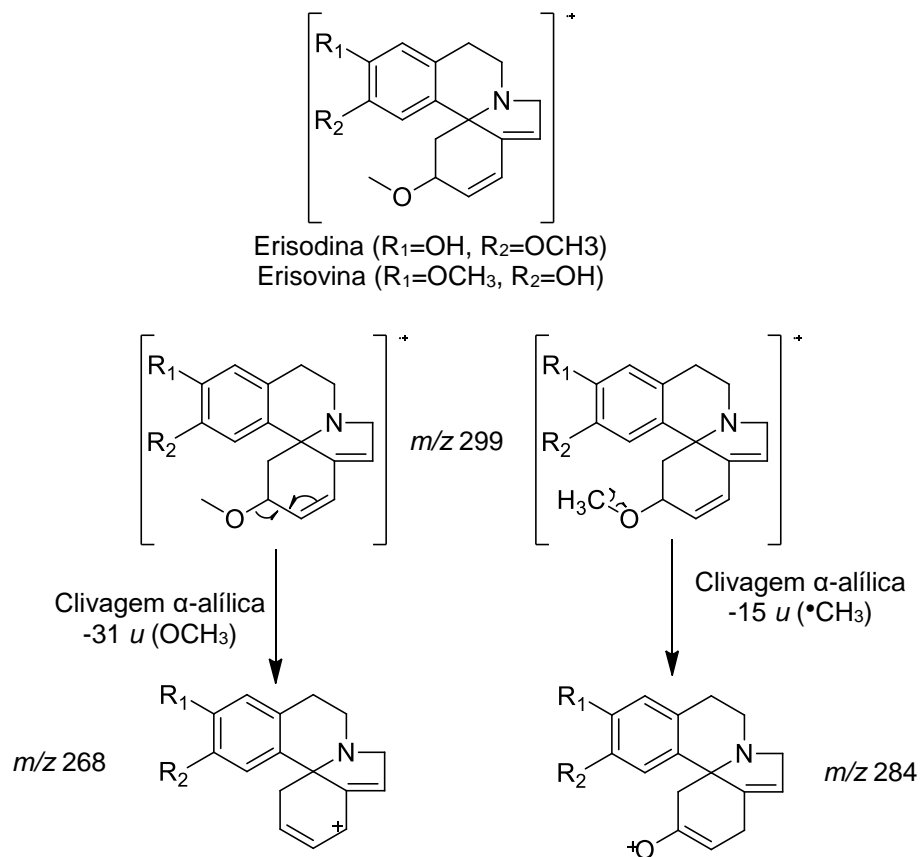


### 5.1.6 Mecanismo de fragmentação de alcalóides dienoides

Para falar dos alcalóides dienoides utilizamos um dos alcalóides encontrados na fração de alcaloídica de *E. velutina* no pico majoritário do Cromatograma, referente a substancia presente no pico D, sugerido como sendo erisodina ou erisovina de acordo com o padrão de fragmentação destas substancias neste trabalho bem como Feitosa 2014 e Amer 1991. Os alcalóides dienoides deste estudo possuem metoxila ligada ao carbono 3, em função disso sugere-se que os mesmos sofrem fragmentação via clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{\bullet+} - 31$ ], visto que estes tendem a ejetar elétrons, gerando o pico base do espectro de massas (BOAR et al., 1970; PELLETIER, 1983; PHILLIPSON, 1985) (Figura 7A).

Para o derivado eritrínico referente ao pico base do Cromatograma (D) e também ao pico A (Figura 10) foi sugerido que o íon molecular em  $m/z$  299 fragmenta-se por clivagem  $\alpha$ -alílica [ $M^{\bullet+} - 31$ ] com perda do radical metóxi gerando o íon di-alílico estável em  $m/z$  268 referente ao pico majoritário do espectro de massas. O íon molecular também sofre fragmentação de [ $M^{\bullet+} - 15$ ] com perda de metila radicalar para formar o íon em  $m/z$  284 com elevada intensidade no espectro de massas (Figura 24).

Figura 24. Mecanismo de fragmentação de derivados eritrínicos dienoides



## 5.2 Identificação dos alcalóides eritrínicos por CLAE-IES-EM

A caracterização dos possíveis alcalóides encontrados na fração de alcalóides totais do extrato etanólico de *E. velutina* realizada por CLAE-IES-EM é apresentada na figura 25 A onde tem-se o Cromatograma de íons totais no modo de ionização por eletrospray positivo (IES<sup>+</sup>). Os constituintes da FAT foram identificados com base no padrão de fragmentação dos mesmos comparados com os obtidos na literatura, assim foi possível sugerir a presença de vinte e três possíveis alcalóides eritrínicos, estes foram encontrados num intervalo de tempo de 17 a 39 minutos (Figura 25 B).

Figura 25 A. Cromatograma de íons totais obtido por IES no modo positivo

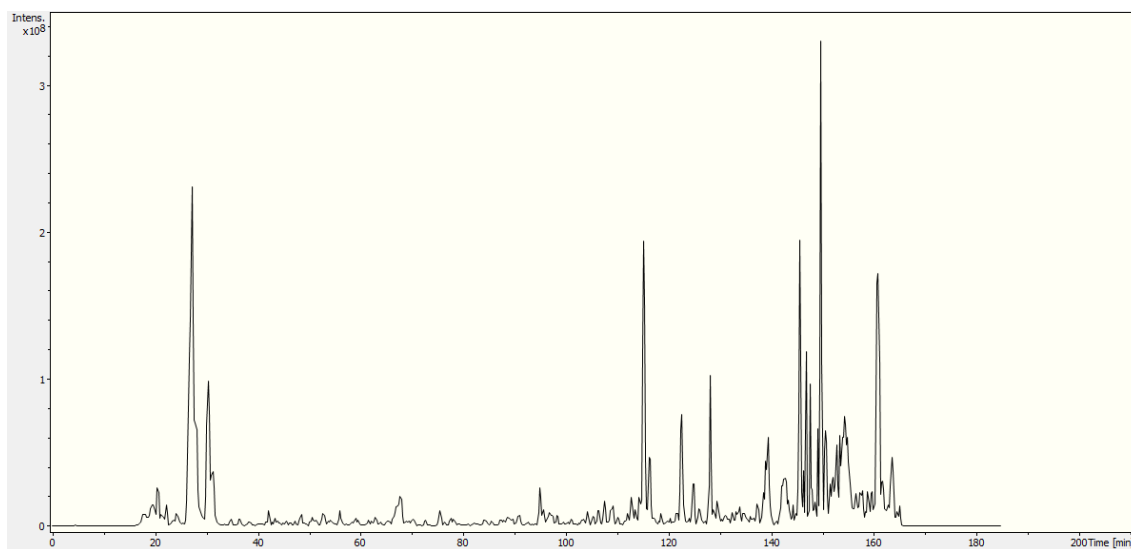
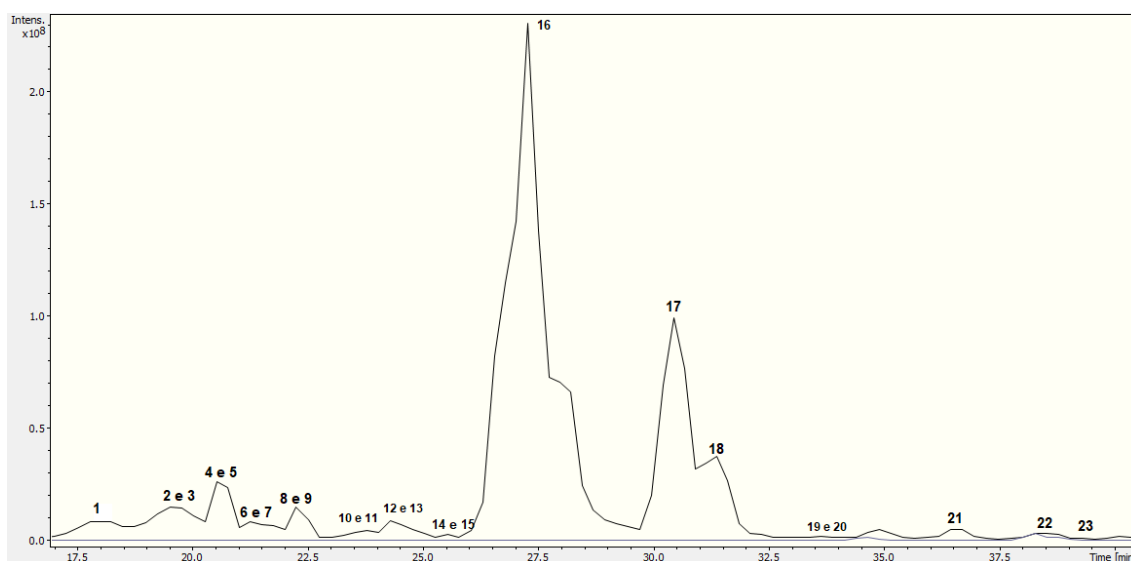
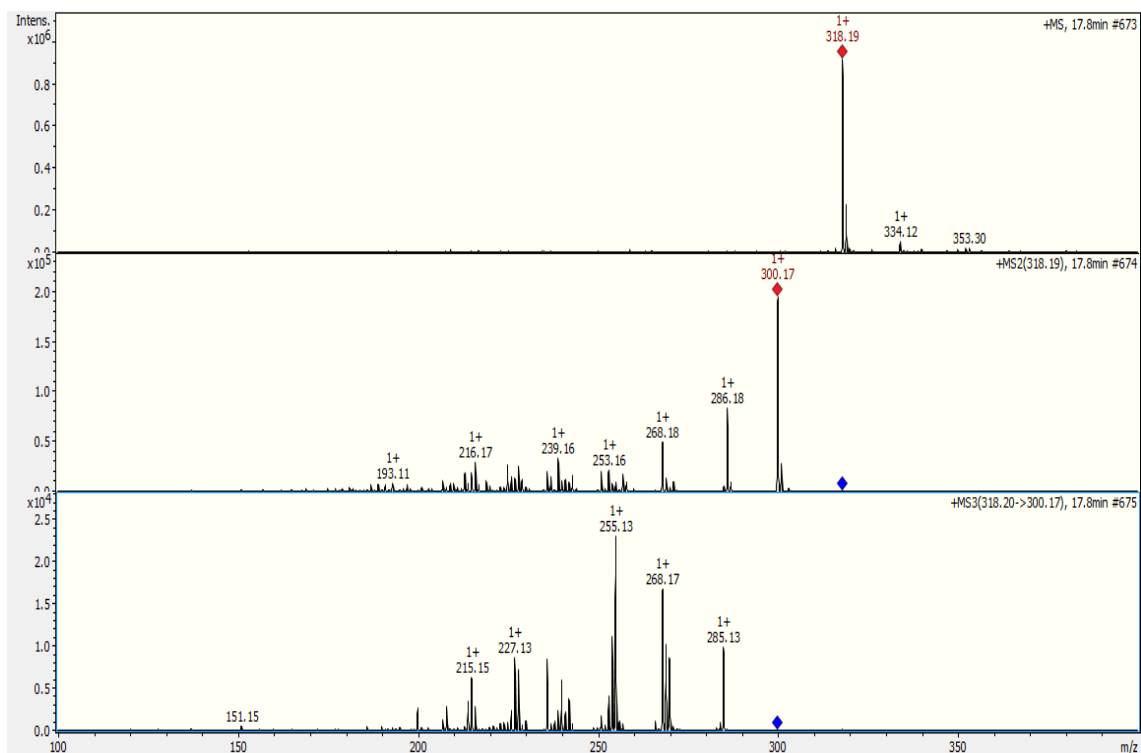


Figura 25 B. Região do perfil cromatográfico onde foram identificados os alcalóides eritrínicos por CLAE-EM-IES



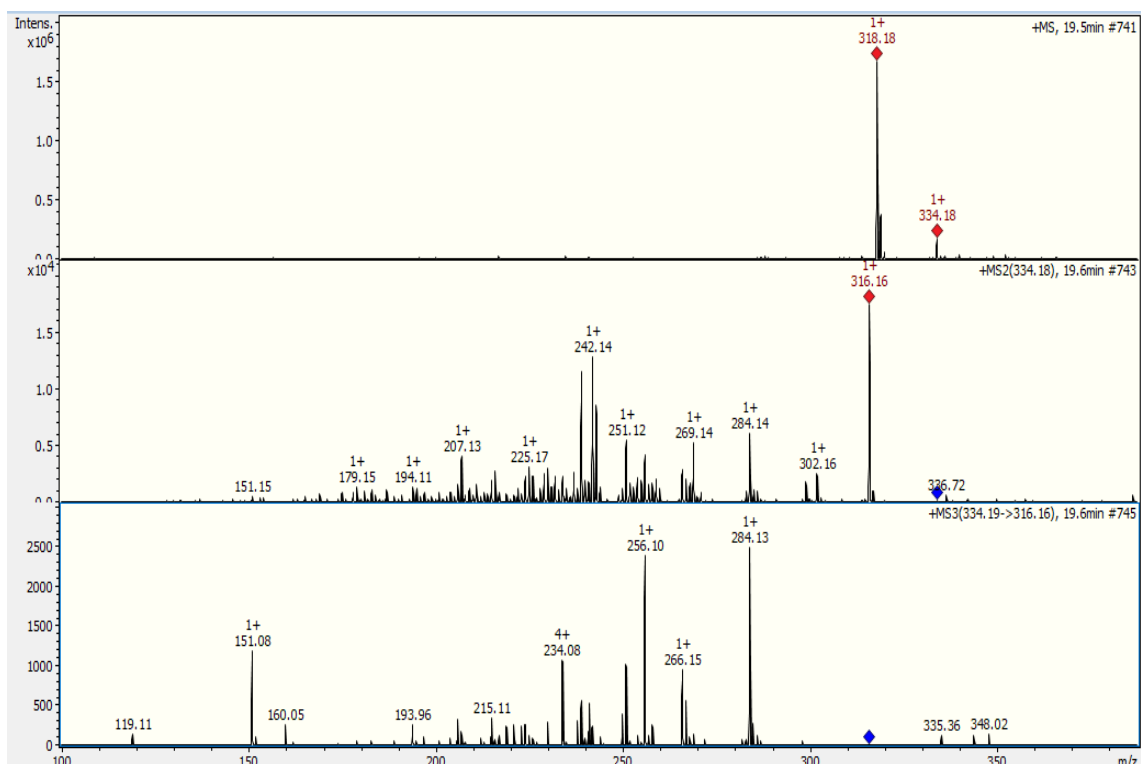
O composto 1 localizado no pico 1 em Tr de 17,8 min foi caracterizado de acordo com o íon obtido em  $[M+H]^+$  em  $m/z$  318 (Figura 26). Dados da literatura baseados em Amer et al., (1991) e Feitosa (2014) sugerem que este composto seja erisolavina/erisotina (Figura 36) (diferem entre si nos seus substituintes para  $R_1$  e  $R_2$ , figura 36) de acordo com  $m/z$  317 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. Os principais fragmentos gerados a partir do íon molecular em  $m/z$  318 foram  $m/z$  300, 286 e 268 que correspondem a perda de uma molécula de água por meio de rearranjo de hidrogênio (DEMARQUE et al., 2016), uma molécula de metanol que segundo Stévigny et al., (2004) compostos que contém hidroxila e metoxila vicinais no anel aromático tendem a perder uma molécula de metanol correspondente a 32  $u$  e para formar o fragmento em  $m/z$  268 outra molécula de água é perdida. Isômeros deste composto estão presentes na FAT de *E. velutina* nos seguintes tempos de retenção 19,5 min (pico 2), 20,5 min (pico 3), 21,3 min (pico 4), 22,3 min (pico 5) (Tabela 2). O composto é relatado pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 26. Espectro de massas correspondente ao íon 318 no Tr de 17,8 min no modo IES positivo



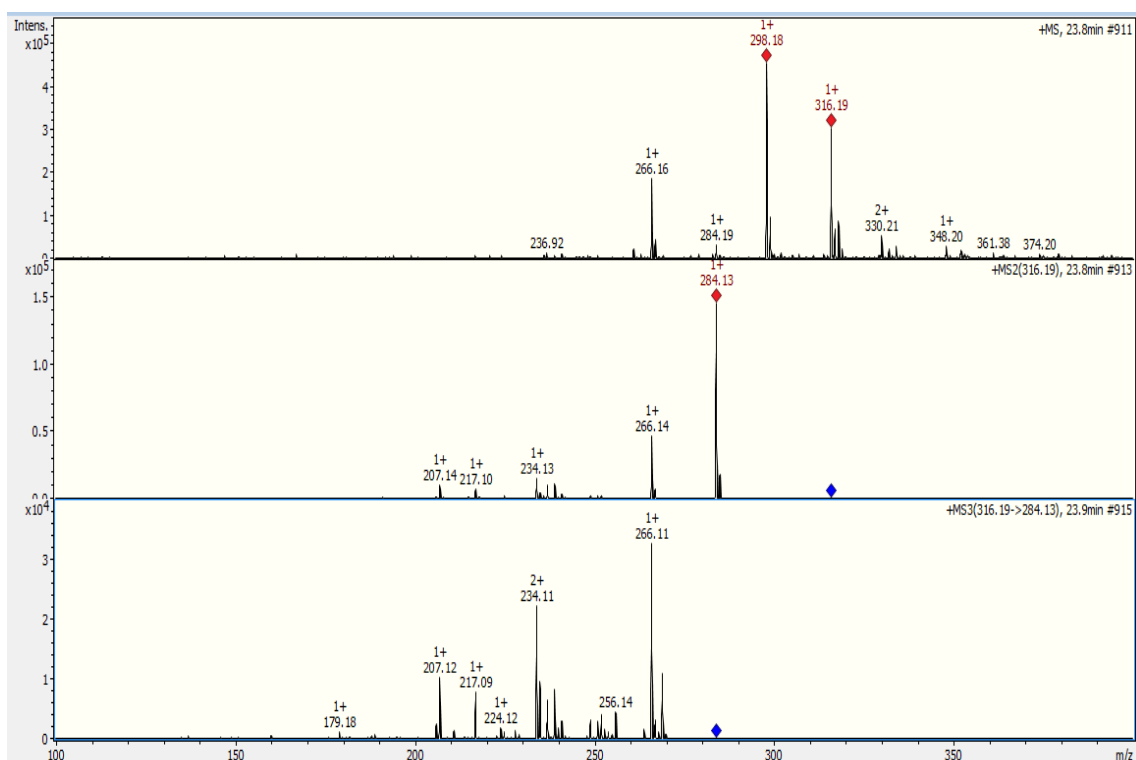
O composto 2 localizado no pico 2 no Tr de 19,5 min apresentou um pico em  $m/z$  334 no espectro de massas (Figura 27) baseado na literatura de Amer et al., (1991) é possível propor que seja o alcalóide eritrínico hidroxierisosalvina/ hidroxierisotina diferem entre si nos seus substituintes para  $R_1$  e  $R_2$ , figura 36) de acordo com  $m/z$  333 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. Os principais fragmentos gerados a partir do íon molecular  $m/z$  334 foram  $m/z$  316, 284, 256 e 302 esses são resultantes da perda de  $H_2O$  (18  $u$ ) por rearranjo de hidrogênio de acordo com Demarque et al., (2016),  $CH_3OH$  (32  $u$ ) que segundo Stévigny et al., (2004) compostos que contém hidroxila e metoxila vicinais no anel aromático tendem a perder uma molécula de metanol seguido de  $CO$  (28  $u$ ) durante o processo de fragmentação. Isômeros deste composto estão presentes na FAT de *E. velutina* nos seguintes tempos de retenção 20,5 min (pico 3), 21,3 min (pico 4), 22,3 min (pico 5). O composto é descrito pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 27. Espectro de massas do íon 334 no Tr de 19,5 min no modo IES positivo.



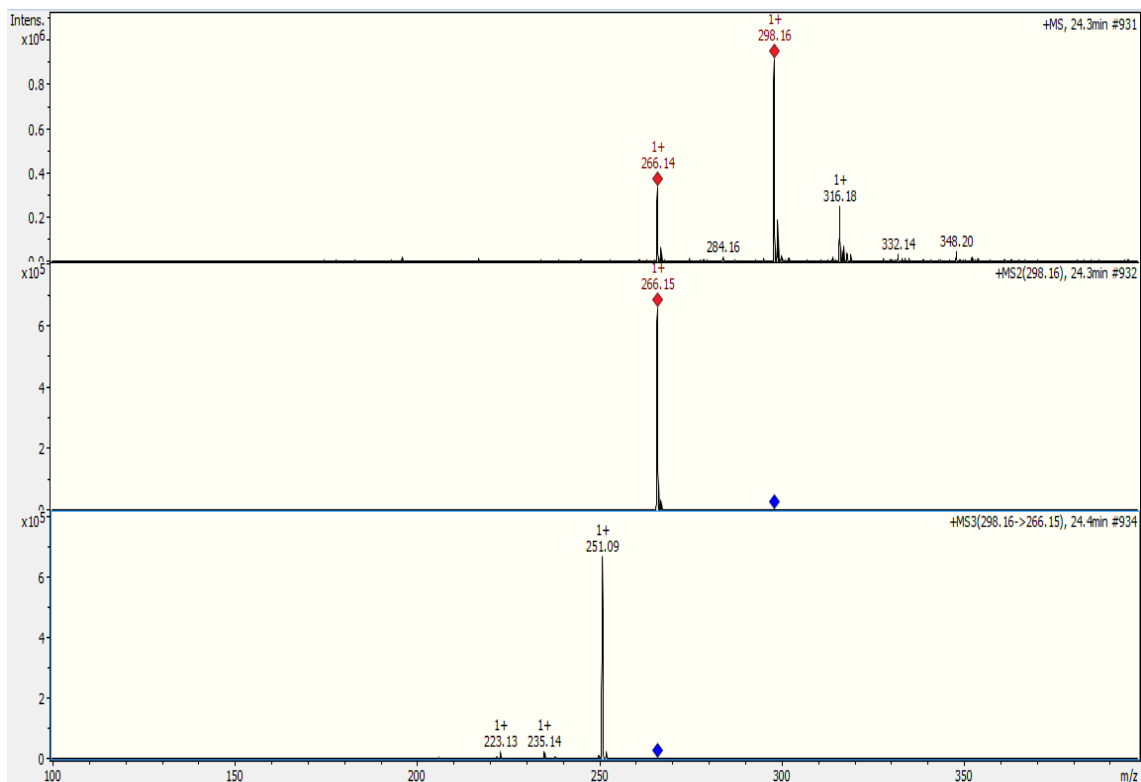
O composto 10 presente no pico 6 em Tr 23,8 min apresentou um espectro de massas com pico do íon molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  316 (Figura 28), onde essa relação massa carga obtida sugere que a substancia encontrada sejam um dos alcalóides eritrínicos a seguir: erisotinona, erisolalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  315 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES baseado em Feitosa (2014). Os principais fragmentos gerados para  $m/z$  316 fora  $m/z$  298, 284, 266 e são formados a partir da perda de uma molécula de água, uma molécula de metanol e outra molécula de água respectivamente. A perda de  $CH_3OH$  é descrita no trabalho de Stévigny et al., (2004) e a perda de água ocorre por rearranjo de hidrogênio. Isômeros deste composto estão presentes na FAT de *E. velutina* nos seguintes tempos de retenção 24,3 min (pico 7), 25,5 min (pico 8), 30,5 min (pico 10) e 31,4 min (pico 11) (Tabela 2), com mesma massa e padrão de fragmentação.

Figura 28. Espectro de massas correspondente ao íon 316 no Tr de 23,8 min no modo IES positivo



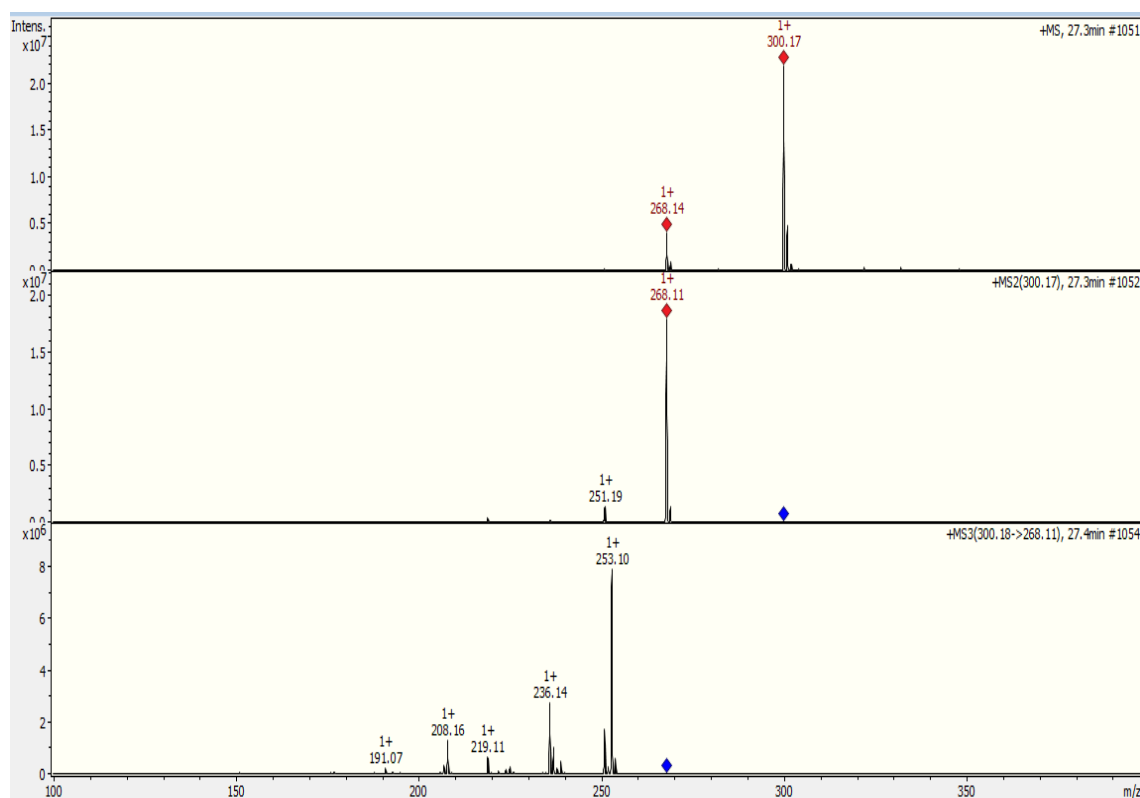
O composto 12 presente no pico 7 em Tr 24,3 min apresentou um espectro de massas com pico do íon molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  298 (Figura 29), onde essa relação massa carga obtida sugere que a substancia encontrada seja o alcalóide eritrínico eritralina (Figura 36)  $m/z$  297 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES de acordo com Feitosa (2014). Os principais fragmentos gerados para  $m/z$  298 fora  $m/z$  266, 251 e são formados a partir da perda de uma molécula de metanol e uma metila. A perda de  $CH_3OH$  é descrita no trabalho de Guaratini et al., (2017). Isômeros deste composto estão presentes na FAT de *E. velutina* nos seguintes tempos de retenção 23,8 min (pico 7), 25,5 min (pico 8) (Tabela 2), com mesma massa e padrão de fragmentação.

Figura 29. Espectro de massas correspondente ao íon 298 no Tr de 24,3 min no modo IES positivo



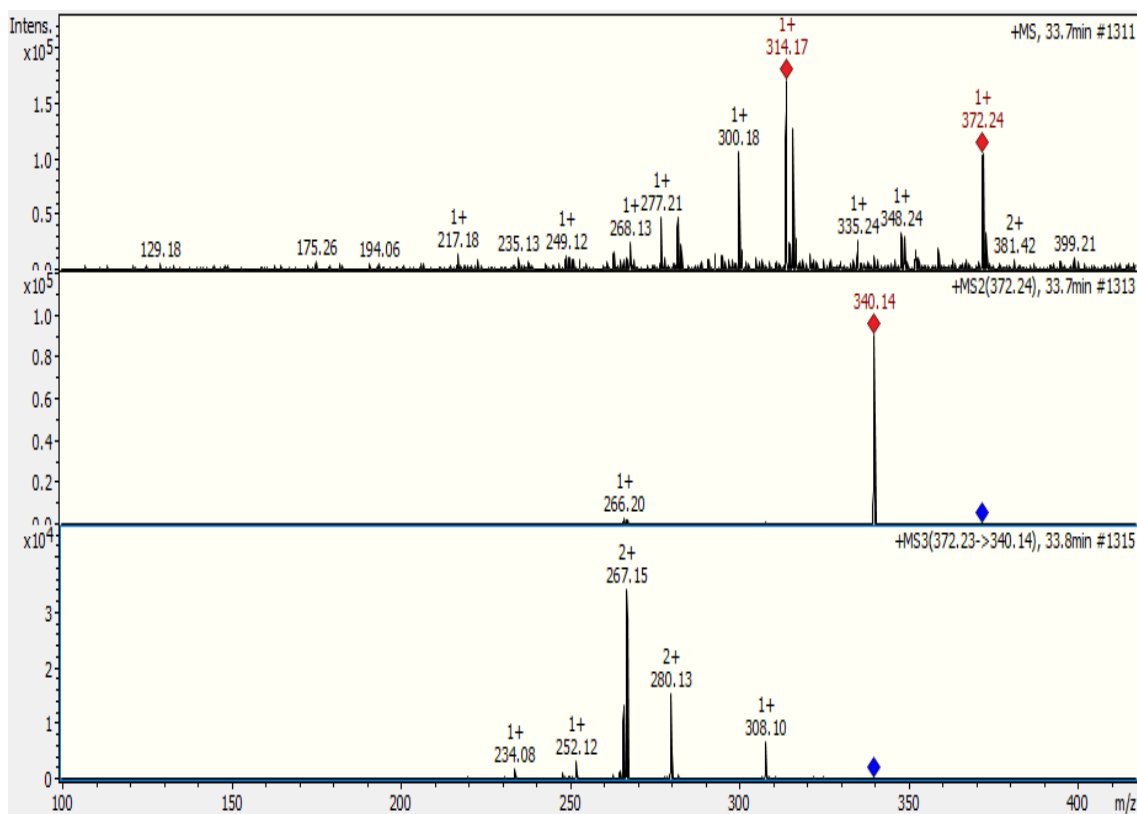
O composto 16 em presente no pico 9 em Tr de 27,3 min foi caracterizado de acordo com o íon obtido em  $[M+H]^+$  em  $m/z$  300 (Figura 30). Dados da literatura baseados em Amer et al., (1991) e Feitosa (2014) sugerem que este composto seja erisovina ou erisodina ou eritramina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  299 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. Os principais fragmentos gerados a partir do íon molecular em  $m/z$  300 foram  $m/z$  268, 253, 225 que correspondem a perda de uma de  $CH_3OH$  (32 u) de acordo com Stévigny et al., (2004) pela presença de hidroxila e metoxila vicinais no anel aromático resultando na perda de uma molécula de metanol para formar o íon em  $m/z$  268, seguido de uma metila radicalar (SILVA et al., 2017) para formar o íon em 253, e uma molécula de CO (28 u) baseado em Stévigny et al., (2004) formando o íon em  $m/z$  225.

Figura 30. Espectro de massas correspondente ao íon 300 no Tr de 27,3 min no modo IES positivo



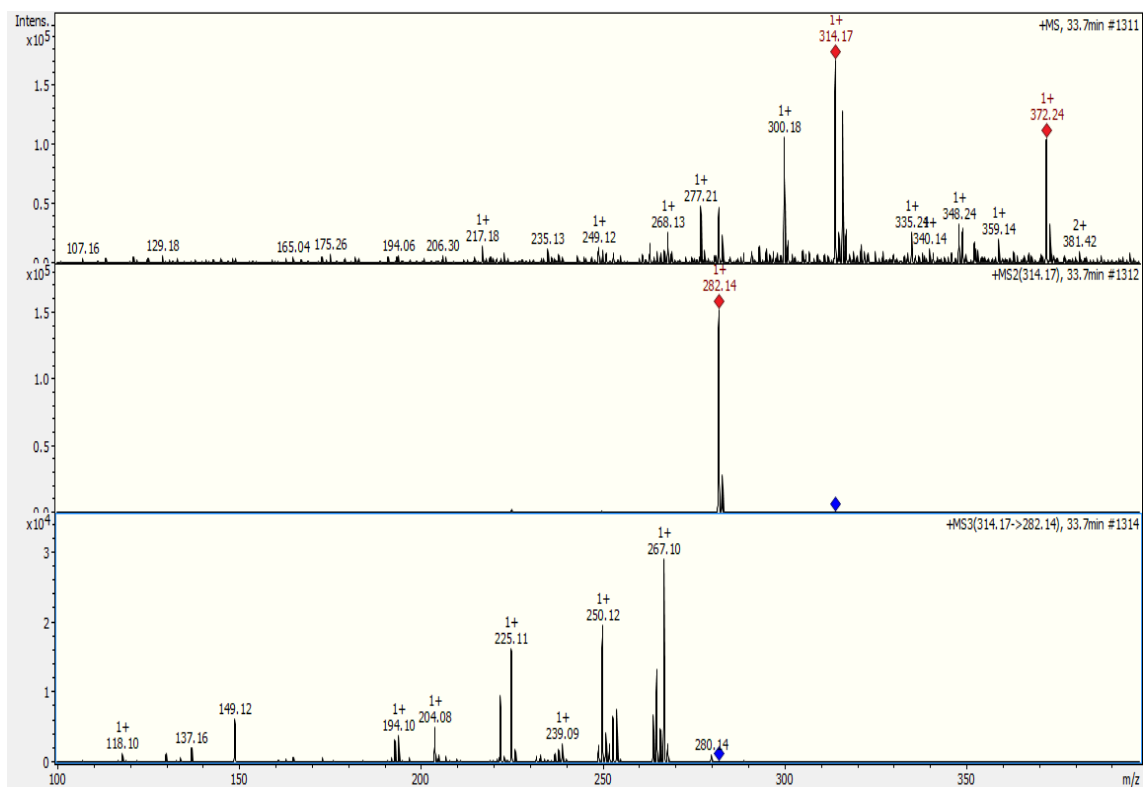
O composto 19 no Tr de 33,7 min e pico 12 apresentou pico do íon molecular em  $m/z$  372 no espectro de massas (Figura 31) de acordo com a literatura de Amer et al., (1991) é possível propor que seja o alcalóide eritrínico eritrascina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  371 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. O principal fragmento gerado a partir do íon molecular  $m/z$  372 foi  $m/z$  340 esse é resultantes da perda de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (32 u) pelo mecanismo de eliminação com carga remota baseado em Guaratini et al., (2017), onde a presença de metoxila no anel A sugere a eliminação neutra de  $\text{CH}_3\text{OH}$  durante o processo de fragmentação. O composto é descrito pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 31. Espectro de massas correspondente ao íon 372 no Tr de 33,7 min no modo IES positivo



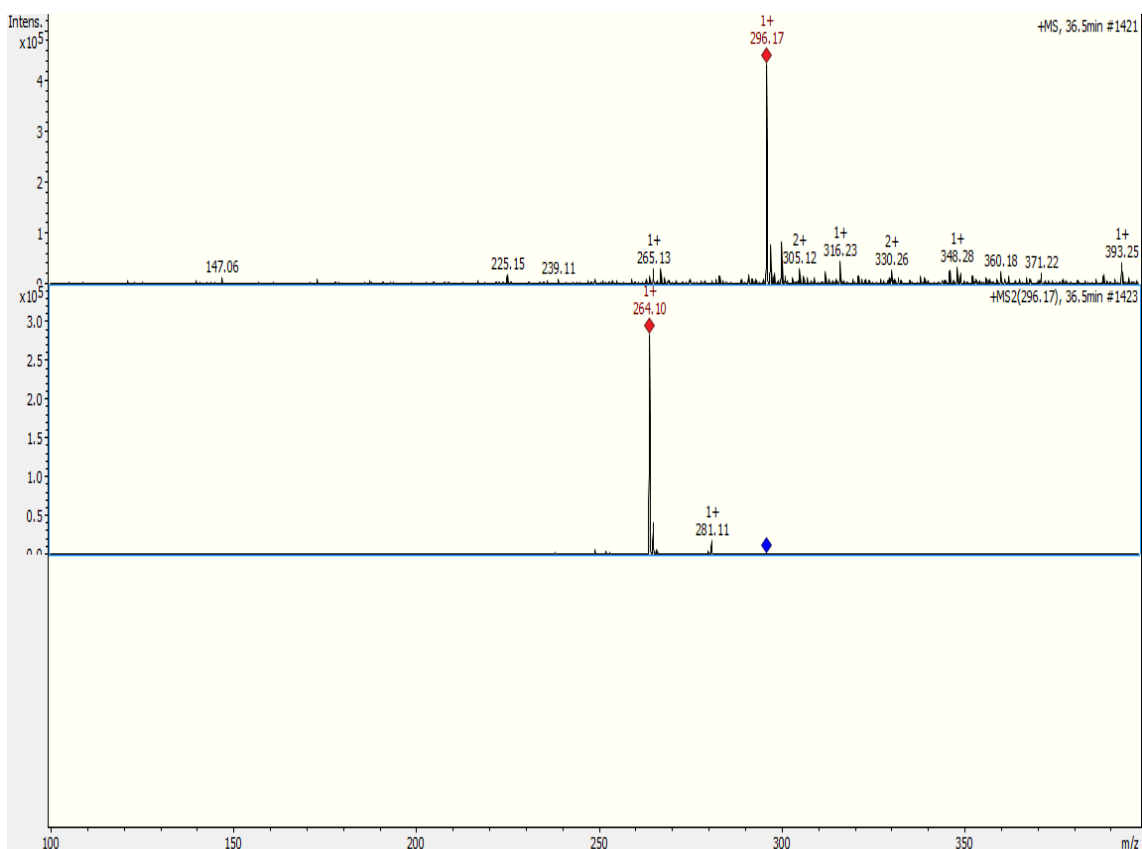
A substância 20 presente no pico 12 em tempo de retenção 33,7 min apresentou um espectro de massas com pico do íon molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  314 (Figura 32), onde essa relação massa carga obtida sugere que a substância encontrada seja o alcalóide eritrínico erisotrina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  313 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES baseado em Feitosa (2014). Os principais fragmentos gerados para  $m/z$  314 fora  $m/z$  282, 267 e são formados a partir da perda de uma molécula de metanol (32 u) gerando o fragmento em  $m/z$  282 e uma metila radicalar (SILVA et al., 2017) eliminando 15 u gerando o íon em  $m/z$  267. A perda de  $CH_3OH$  é descrita no trabalho de Guaratini et al., (2017) pelo mecanismo de eliminação com carga remota.

Figura 32. Espectro de massas correspondente ao íon 2314 no Tr de 33,7 min no modo IES positivo



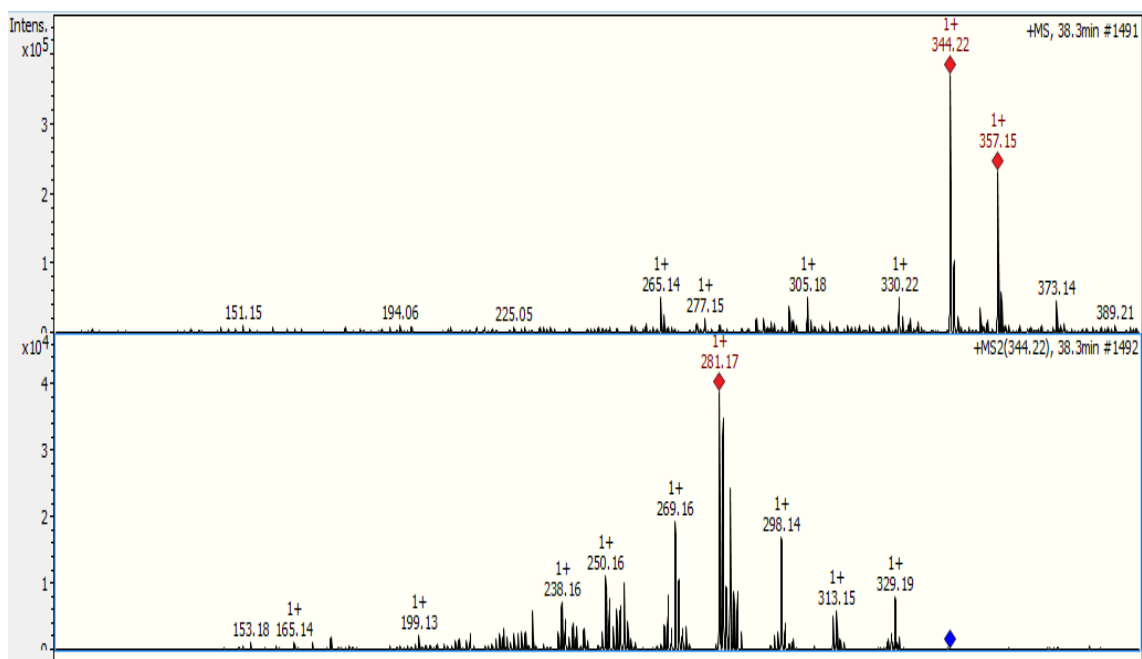
A substância 21 em Tr de 36,5 min e pico 13 foi caracterizado de acordo com o íon obtido em  $[M+H]^+$  em  $m/z$  296 (Figura 33). Dados da literatura baseados em Amer et al., (1991) e Feitosa (2014) sugerem que este composto seja eritrinina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  295 + 1 resultante da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. Os principais fragmentos gerados a partir do íon molecular em  $m/z$  295 foram  $m/z$  281 e 264, que correspondem a perda de uma molécula de metanol (32  $u$ ) pela presença de hidroxila e metoxila vicinais no anel aromático resultando na formação de um epóxido baseado em Stévigny et al., (2004) formando o fragmento em  $m/z$  264, ocorrendo também a perda de uma metila radicalar (15 $u$ ) (SILVA et al., 2017) formando o fragmento em  $m/z$  281. Esta substância é descrita pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 33. Espectro de massas correspondente ao íon 296 no Tr de 36,5 min no modo IES positivo



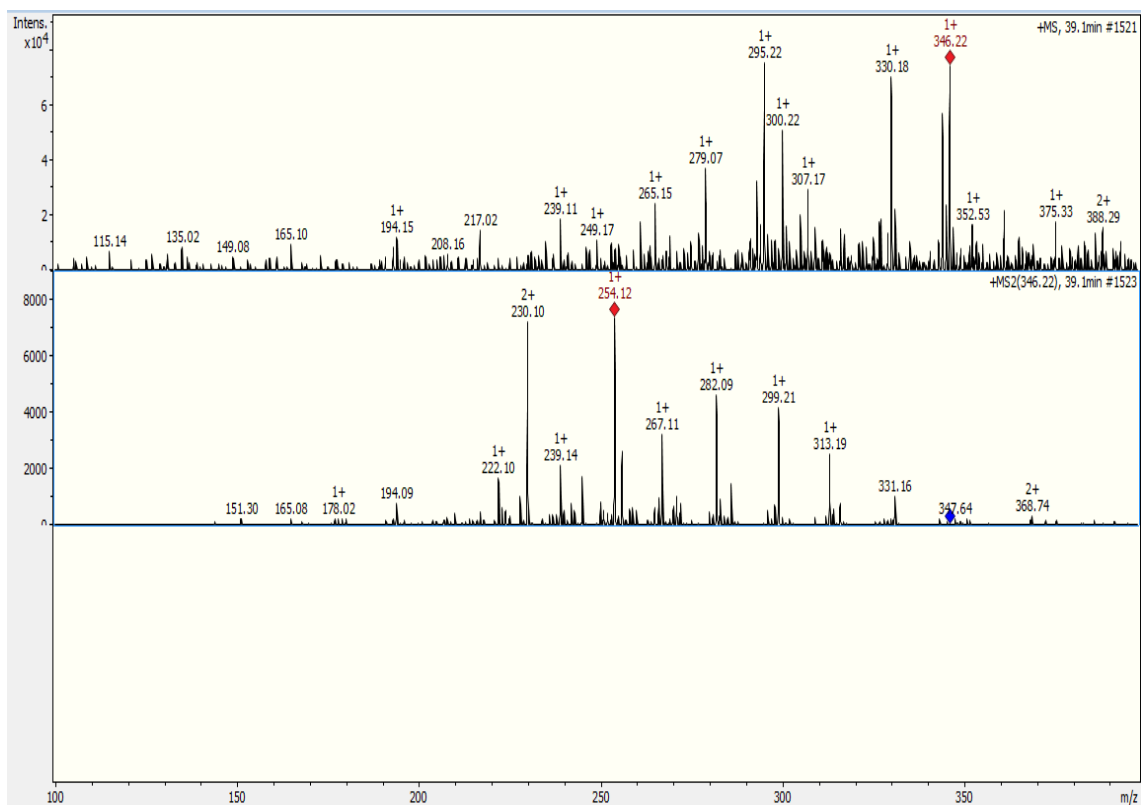
A substância 22 presente no pico 14 em Tr de 38,3 min foi caracterizado de acordo com o íon obtido em  $[M+H]^+$  em  $m/z$  344 (Figura 34). Dados da literatura baseados em Amer et al., (1991) e Feitosa (2014) propõem que este composto seja eritroculina ou eritristemina (Figura 36) de acordo com  $m/z$  343 + 1 em função da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. Os principais fragmentos gerados a partir do íon molecular em  $m/z$  344 foram  $m/z$  329 e 312, que correspondem a perda de uma molécula de metanol que corresponde a 32 u pelo mecanismo de eliminação com carga remota baseado em Guaratini et al., (2017), para formar o fragmento em  $m/z$  312 e também ocorre a perda de uma metila radical (SILVA et al., 2017) para formar o íon em  $m/z$  329. O composto é descrito pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 34. Espectro de massas correspondente ao íon 344 no Tr de 38,3 min no modo IES positivo.



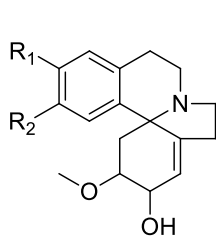
O composto 23 presente no pico 15 em Tr de 39,1 min foi caracterizado de acordo com o íon obtido em  $[M+H]^+$  em  $m/z$  346 (Figura 35). Dados da literatura baseados em Amer et al., (1991) propõe que este composto seja Eritratina N-Oxido (Figura 36) de acordo com  $m/z$  345 + 1 em função da ionização no modo positivo pela fonte iônica IES. O principal fragmento gerado a partir do íon molecular em  $m/z$  346 foram  $m/z$  331, que correspondem a perda de uma metila (15  $u$ ) de acordo com trabalho de Silva et al., (2017), para formar o fragmento em  $m/z$  331. O composto é descrito pela primeira vez em *E. velutina*.

Figura 35. Espectro de massas correspondente ao íon 346 no Tr de 39,1 min no modo IES positivo



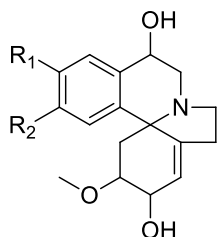
Os alcalóides eritrínicos da FAT do extrato etanólico caracterizados por meio de CLAE-IES-EM deste estudo estão em resumo, na figura 36 e tabela 2 respectivamente.

Figura 36. Alcalóides eritrínicos identificados na FAT de *E. velutina* por CLAE-IES-EM.

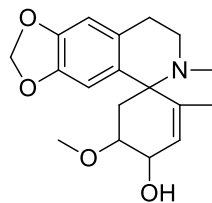


(1) Erisosolvina (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>)

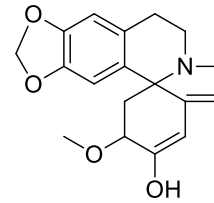
(1) Erisotina (R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= OH)



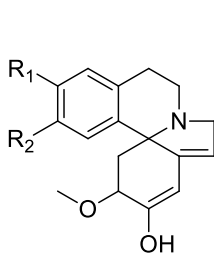
(2) Hidroxierisosolvina/  
Hidroxierisotina



(10) Eritratina

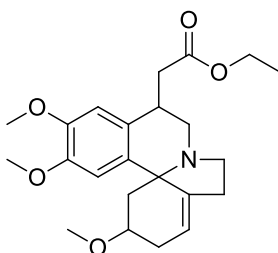


(12) Eritralina

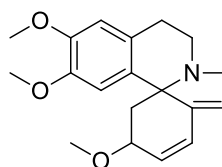


(16) Erisovina (R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>)

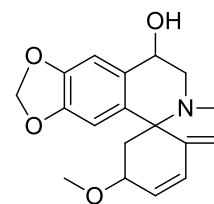
(16) Erisodina (R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= OH)



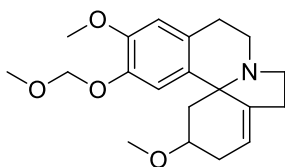
(19) Eritratina



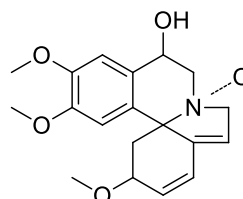
(20) Erisotrina



(21) Eritrina



(22) Eritroculina



(23) Eritratina N- Óxido

Tabela 2. Caracterização dos alcalóides identificados na FAT de *E. velutina* por CLAE-IES-EM-EM

Quant. De substâncias	Tr(min)/(Pico)	Fórmula molecular+	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>n</sup> (m/z)	Substância putativa	Referência
1	17, 8 (1)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	FEITOSA, 2014
2	19,5 (2)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	FEITOSA, 2014
3	19,5 (2)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub>	334	316, 284, 256, 302	Hidroxierisosalvina ou hidroxierisotina	AMER et al., 1991
4	20,5 (3)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	FEITOSA, 2014
5	20,5 (3)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub>	334	316, 284, 256, 302	Hidroxierisosalvina ou hidroxierisotina	AMER et al., 1991
6	21,3 (4)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	FEITOSA, 2014
7	21,3 (4)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub>	334	316, 284, 256, 302	Hidroxierisosalvina ou hidroxierisotina	AMER et al., 1991
8	22,3 (5)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	318	300, 286, 268	Erisotina ou Erisosalvina	FEITOSA, 2014
9	22,3 (5)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>5</sub>	334	316, 284, 256, 302	Hidroxierisosalvina ou hidroxierisotina	AMER et al., 1991

10	23,8 (6)	$C_{18}H_{22}NO_4$	316	298, 284, 266	erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	FEITOSA, 2014
11	23,8 (6)	$C_{18}H_{20}NO_3$	298	266, 251	Eritralina	FEITOSA, 2014
12	24,3 (7)	$C_{18}H_{20}NO_3$	298	266, 251	Eritralina	FEITOSA, 2014
13	24,3 (7)	$C_{18}H_{22}NO_4$	316	298, 284, 266	erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	FEITOSA, 2014
14	25,5(8)	$C_{18}H_{20}NO_3$	298	266, 251	Eritralina	FEITOSA, 2014
15	25,5 (8)	$C_{18}H_{22}NO_4$	316	298, 284, 266	erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	FEITOSA, 2014
16	27,3 (9)	$C_{18}H_{22}NO_3$	300	268, 253, 225	Erisovina ou erisodina ou eritramina	FEITOSA, 2014

17	30,5 (10)	$C_{18}H_{22}NO_4$	316	298, 284, 266	erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	FEITOSA, 2014
18	31,4 (11)	$C_{18}H_{22}NO_4$	316	298, 284, 266	erisotinona, erisosalvinona, eritroculinol, eritratina e epieritratina	FEITOSA, 2014
19	33,7 (12)	$C_{21}H_{26}NO_5$	372	340	Eritrascina	AMER et al., 1991
20	33,7 (12)	$C_{18}H_{20}NO_4$	314	282, 267	Erisotrina ou 8- oxoerisodina	FEITOSA, 2014
21	36,5 (13)	$C_{18}H_{19}NO_4$	296	281, 264	Eritrinina	FEITOSA, 2014
22	38,3 (14)	$C_{20}H_{26}NO_4$	344	329, 312	Eritroculina ou eristemina	FEITOSA, 2014
23	39,1 (15)	$C_{19}H_{24}NO_5$	346**	331	Eritratina N-Oxido	AMER et al., 1991

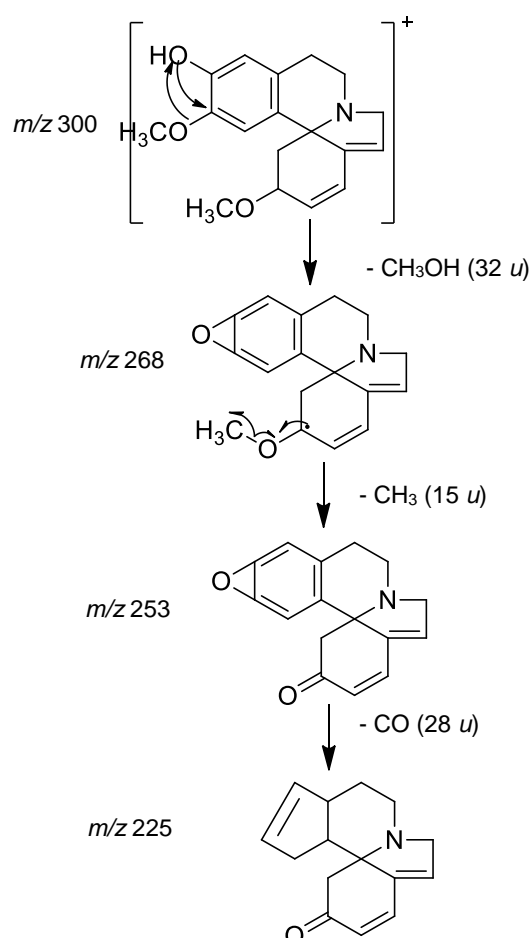
### 5.2.1 Mecanismo de fragmentação de alcalóides eritrínicos por IES-EM

Como proposta para as fragmentações sofridas pelos alcalóides eritrínicos presentes na FAT de *E. velutina* tem-se um padrão de mecanismos que ocorre de forma intensa para estas substâncias, visto que as perdas de H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>• e CO acontecem em todos alcalóides estudados, não necessariamente na ordem citada. Com base nos estudos de fragmentação de Guaratini et al., (2017), Stévigny et al., (2004), Feitosa (2014) e Demarque et al., (2016) foi possível propor as fragmentações mais comuns para as substâncias estudadas. Para isso serão utilizados como exemplos a fragmentação dos alcalóides hidroxierisosalvina e erisodina estes foram selecionados pois em suas fragmentações é possível demonstrar as perdas mais frequentes em alcalóides do gênero *Erythrina*.

#### 5.2.1.1 Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico erisodina

Para o alcalóide erisodina ocorre a perda de uma molécula de CH<sub>3</sub>OH (32 u) de acordo com o mecanismo proposto por Stévigny et al., (2004) com a formação de um epóxido formando o íon em  $m/z$  268, seguido da de perda de metila radicalar proposto por Silva et al., (2017) para formação do íon em  $m/z$  253 e por fim ocorre a perda de um CO também proposto por Stévigny et al., (2004) gerando o íon em  $m/z$  225. Estes são mecanismos comuns para alcalóides aporfínicos. Essas etapas da fragmentação da erisodina estão descritas na figura 37.

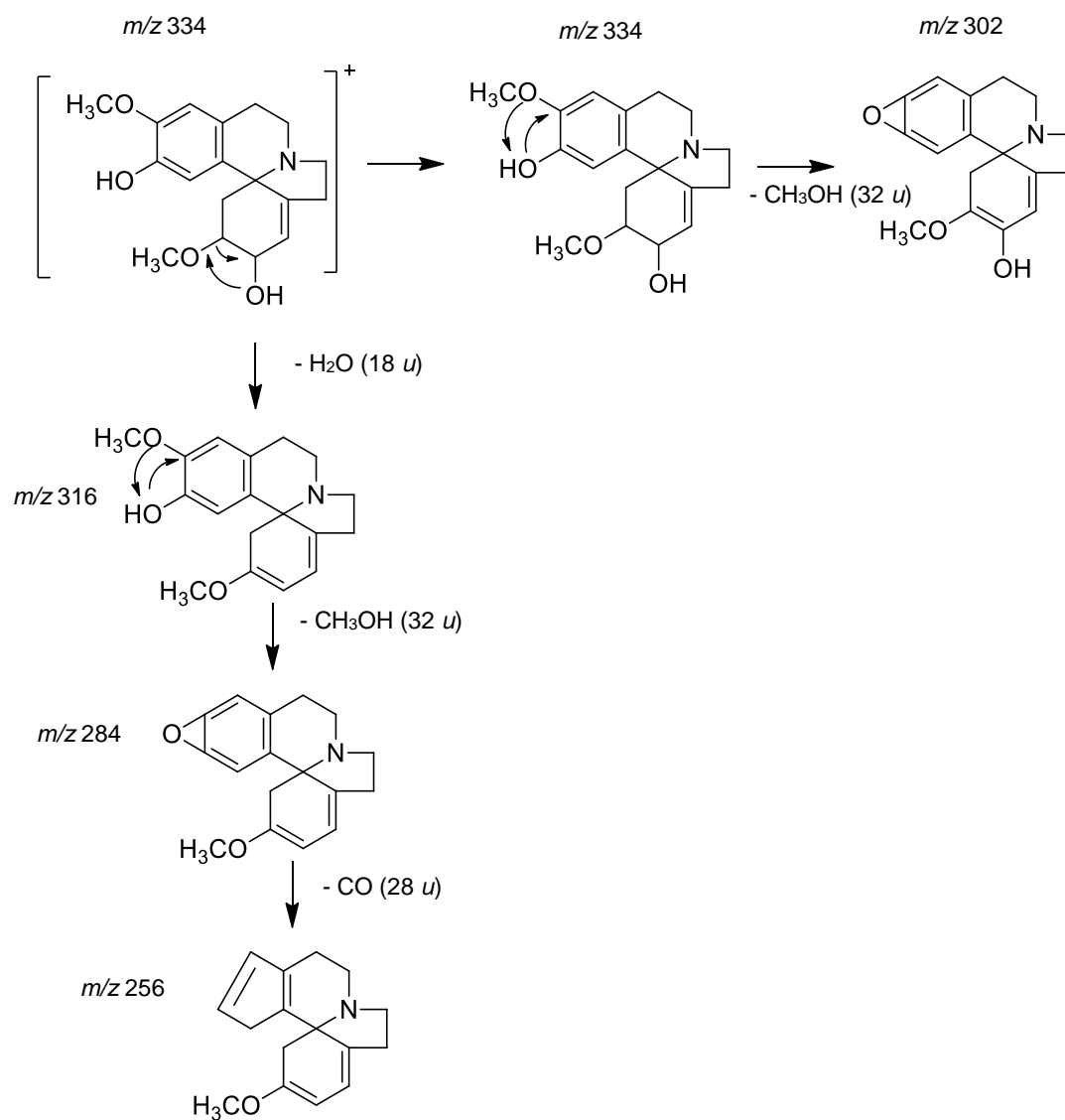
Figura 37. Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico erisodina



### 5.2.1.2 Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico hidroxierisosalvina

A fragmentação proposta para o alcalóide hidroxierisosalvina tem início com a perda de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $18 u$ ) gerando o íon em  $m/z$  316 por meio de rearranjo remoto de hidrogênio (DEMARQUE et al., 2016), seguido da perda de uma molécula de  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $32 u$ ) de acordo com estudos de Stévigny et al., (2004), formando o íon em  $m/z$  284, seguido da perda de  $\text{CO}$  também proposto por Stévigny et al., (2004) com a formação do íon em  $m/z$  256. Outra via de fragmentação do íon molecular em  $m/z$  334 ocorre para geração do fragmento em  $m/z$  302 a partir da perda de uma molécula de  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $32 u$ ). Estes são mecanismos comuns para alcalóides aporfínicos. As etapas da fragmentação descritas para o alcalóide hidroxierisosalvina estão ilustradas na figura 38.

Figura 38. Proposta de fragmentação do alcalóide eritrínico hidrosierisosalvina



## 6. CONCLUSÕES

A combinação da ionização por impacto de elétrons e a ionização por eletrospray juntamente com os dados de espectrometria de massas permitiu a identificação de nove possíveis alcalóides eritrínicos por meio CG-IE-EM e vinte três possíveis alcalóides nas análises por CLAE-IES-EM presentes na fração de alcalóides totais do extrato das cascas do caule de *E. velutina*. Os resultados obtidos pela combinação dos dados cromatográficos unidos a espectrometria de massas permitiram a identificação das substâncias citadas neste trabalho sem a necessidade do isolamento das mesmas, de acordo com os padrões de fragmentações previamente descritos na literatura, bem como o mecanismo de fragmentação sofrido pelos alcalóides eritrínicos.

Dentre os alcalóides identificados nas análises de CG-EM estão: erisodina ou erisovina e um isômero, eritrascina, eritralina, eritraditina ou seu epímero e um isômero, erimelantina, erisotina ou erisosalvina e um isômero.

A caracterização da FAT de *E. velutina* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas forneceu como resultado a identificação de vinte e três substâncias putativas derivadas de *E. velutina* sendo elas erisosalvina ou erisotina e quatro isômeros, Hidroxierisosalvina/ hidroxierisotina e três isômeros, eritratina e quatro isômeros, eritralina e dois isômeros, erisovina/erisodina, eritrascina, eritratina, erisotrina, erittrinina, eritroculina N- óxido. Com exceção de eritralina, erisotrina, erisodina, eritratina e erisovina as demais substâncias são relatadas pela primeira vez para *Erythrina velutina*.

Dessa forma o presente estudo foi de grande valia para o conhecimento do arsenal de constituintes desta espécie e obtenção de dados químicos de marcadores do gênero *Erythrina* uma espécie muito utilizada na medicina popular pelas suas atividades no SNC porém pouco estudada. Apesar das substâncias mencionadas neste trabalho já serem descritas na literatura este estudo contribuiu evidenciando que esta espécie apresenta alcalóides com potencial ansiolítico, antinociceptivo e anticonvulsivante, visando estudos mais detalhados para trabalhos posteriores.

Diante disso, este estudo cumpriu com o objetivo que fundamentou na ampliação sobre o conhecimento químico do gênero *Erythrina*, por meio de estudo fitoquímico de *Erythrina velutina*.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, H. N.; FIGUÊREDO, D. J. C.; CERQUEIRA, J. S. Os vegetais com potencial fitoterápico do complexo Aluízio Campos, Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, v. 3, n. 2, p. 17-26, 2011.

ALVES, J. J. A. CAATINGA DO CARIRI PARAIBANO. **Geonomos**, v. 17, p. 19-25, 2009.

AMER, M. E.; SHAMMA, M.; FREYER, A. J. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. **Journal of Natural Products**. V. 54 (2). P. 329-363. 1991.

ANHESINE, NAIRA BUZZO. **Perfil cromatográfico (fingerprinting) por LC-DAD-MS de espécies do gênero Erythrina: desenvolvimento e validação de método para controle de qualidade de drogas vegetais**. 176f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Estadual Paulista , Araraquara, 2018.

Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**, v.76, p. 637-642. 2005.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.181, p. 1–20, 2016.

APNE/CNIP. Disponível em: <  
[http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Mulungu/erythrinavelutinawilld3.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Mulungu/erythrinavelutinawilld3.html)>. Acesso em: 09/11/18.

ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, 86 p, 2005.

BARTON, D. H.R. et al. Phenol Oxidation and biosynthesis. The structure and biosynthesis of Erythrina Alkaloids. **Journal of the chemical society C: Organic**, p. 1529 - 1537, 1968.

BHUSHAN, S. The anticancer potential of flavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina suberosa* through induction of apoptosis and inhibition of STAT signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, p. 128–137, 2013.

BOAR, R. B.; WIDDOWSON, D. Mass spectra of the Erythrina Alkaloids: a novel fragmentation of the spiran system. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p. 1591-1595, 1970. Brasil”, **Agrarian Academy**, v.4, n.8; p. 153. 2017.

CABRAL, ANA LUCIA GUEDES SILVEIRA. **Constituintes químicos de Erythrina velutina Willd.(FABACEAE)**. 2009. 179 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

CABRAL, G. A. L.; MACIEL, J. R. Levantamento etnobotânico da coleção de plantas medicinais do jardim botânico do Recife, PE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 2, p.121 – 129, 2011.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal Ethnofarmacol**, 100, 131-134, 2005.

CARVALHO, J.E. **Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde**. 2004. Disponível em: <[www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf](http://www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf)>. Acesso em: 6 out. 2016.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Mulungu (*Erythrina velutina*)**. Circular técnico, 160. Embrapa Florestas: Colombo –PR, ISSN 1517-5278. 2008.

CASTRO, V. T. N. de A. **Atividade anticolinesterásica de plantas da Caatinga com indicação popular para distúrbios do Sistema nervoso**. 2016. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CHACHA, M.; MOLETA, G. B.; MAJINDA, R. R.T. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 99–104, 2005.

CHOI, J. Y.; DESTA, K. T.; SARALAMMA, V. V. G. et al. LC-MS/MS characterization, anti-inflammatory effects, and antioxidant activities of polyphenols from different tissues of Korean *Petasites japonicus* (Meowi). **Biomedical Chromatography**, p. 4033. V. 31, n 12. Ed. 12. 2017.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, p. 126, 1981.

D. P. Demarque, A. E. Crotti, R. Vessecchi, et al., Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, **Nat. Prod. Rep.**, 2016, 33(3), 432–455.

DA-CUNHA, E. V. L.; DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n.6, p. 1371-1373. 1996.

DANTAS, M.C. et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.129-33, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, Inc. 507p. 2002

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo\\_Microrganismos\\_endofiticos\\_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismos_endofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf)>. Acesso em: 12 de out. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Erythrina velutina* – Mulungu; Circular técnica nº 160. Carvalho, P. E. Colombo, PR. 2008.

ESTRADA, E. I.; SÁNCHEZ, M. P.; MATEOS, R. G.; CHÁVEZ, R. S. M.; VALVERDE, G. R.; SOTO HERNÁNDEZ, R. M. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 34, n. 4, p. 241 - 246, 2011.

FEITOSA, L. G. P. **Caracterização dos alcaloides eritrínicos de *Erythrina verna***. 2014. 124f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

FEITOSA, L. G. P.; GUARATINI, T.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; BIZARRO, A. C.; SILVA, D. B. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2177-2180, 2012.

FERREIRA, C. **Descoberta metagenômica da dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga**. Biblioteca Virtual. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/131539/descoberta-metagenomica> >. Acesso em: 19 out de 2015.

FLAUSINI-JÚNIOR, O; SANTOS, L. A; VERLI, H; PEREIRA, A, M; BOLZANI, V. S; NUNES-SOUZA, R. L. Anxiolytic effects of Erythrinian from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, 70: 48-53. 2007

FOLKERS, K; MAJOR, R. T. Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina Americana* Mill. **Journal of the American Chemical Society**, v 59. P. 1580. 1937.

Fuscacarpans A–C, new pterocarpanes from the stems of *Erythrina fusca*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 518–523, 2010.

GOMES, E.C.S. **Plantas da Caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico**. Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal, v.5, n.2, 2008.

GRATIERI-SOSSELLA, A.; PETRY, C.; NIENOW A. A. Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (Fabaceae) pelo processo de estaquia. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p.163-171, 2008.

GRELA E.R., STUDZIOSKI T. E MATRAS J. Antinutritional factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. **Lathyrus Lathyrism Newsletter**, 2: 101-104. 2001.

GUARATINI, T. Gas-phase dissociation study of erythrinian alkaloids by electrospray ionization mass spectrometry and computational methods. **Journal of mass spectrometry**, 52, 571-579, 2017.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants**. Oxford: Clarendon Press, v. 1, p. 516, 1964.

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ecossistemas. Caatinga. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/Caatinga.htm>>. Acesso em: 07 out. 2016.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de imprensa. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169)>. Acesso em: 07 out. 2016

INNOK, P.; RUKACHAISIRIKUL, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUKSAMRARN, A. JUDD, WALTER S. et al. Sistemática vegetal : um enfoque filogenético.3. ed. Porto Alegre : **Artmed**, 2009.

JUMA, B. F.; MAJINDA, R. R.T.; Erythraline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. **Phytochemistry**, v. 65,p. 1397–1404, 2004 .  
KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOUAM J., NOUNDOU, X. S.; MABEKU, L.B. K.; MELI LANNANG, A., M.; CHOUDHARY, M. I.; FOMUM, Z.T. Sigmoiside e: a new antibacterial triterpenoid saponin from *Erythrina sigmoidea* (HUA). **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 21, n 3,p. 373-378, 2007.

KOUAM, J.; MELI, A. L.; CHOUDHARY, M. I.; FOMUM, Z. T. Sigmoiside F and KUMAR, S.; PATHANIA, A.S.; SAXENA, A.K.; VISHWAKARMA, R.A.; ALI, A.; LEE, J. H.; LEE, S. J.; PARK, S.; KIM, H. K.; JEONG, W. Y. et al. Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicas* A. Berger using HPLC-MS/MS Contribution to the overall antioxidant effect. **Food Chemistry**, 124 (2011).p. 1627-1633.

LEITE, GUSTAVO DE SOUSA; AFONSO, ROBSON JOSÉ DE CÁSSIA FRANCO e AQUINO, SÉRGIO FRANCISCO DE. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Quím. Nova** [online]. 2010, vol.33, n.3. pp.734-738.

- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens**, Kew. p. 577, 2005.
- LOIOLA, M.I.B.; PATERNO, G.B.C.; DINIZ, J.A.; CALADO, J.F.; OLIVEIRA, A. C.P. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. **Revista Caatinga**, Mossoró v. 23,n 3, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512 p. 2002.
- LPWG. Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**. v. 66, n.1, p. 44–77, 2017.
- LUCKOW L., A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based an chlooplast DNA sequence data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) **Advances in Legume Systematics 10, High Level Systematics**. Royal Botanic Gardens, UK, pp 197- 220, 2003.
- MARCHIORO, M.; BLANK, M. F.; MOURÃO, R. H.; ANTONIOLLI, A. R. MARTINS., F. M. de M. **Estudo da influência de fatores ambientais na composição química e atividades biológicas de Xylopia sericea**. 2012.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C.V.Coleta e Identificação de espécimes botânicos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Belém – PA, 2002.
- MATEUS, Wallace Messias Barbosa São. **Taxonomia de Papilionoidae (Leguminosae) da Mata Atlântica do Rio Grande do Norte**. 151p. Dissertação (Mestrado em sistemática e evolução) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2013.
- MELO, I. C. A. R. **Contribuição ao conhecimento de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae-Faboideae): Uma abordagem Farmacobotânica, Química e Farmacológica**. 99p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof Delby Fernandes Medeiros”. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2011.
- MERLUGO,L. **Análise cromatográfica, constituição química em alcaloides e avaliação do potencial hipotensor de extratos vegetais obtidos de espécies de erythrina**. 12 de março de 2015. 69f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Pampa. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Uruguiana 2015.
- MILLINGTON, D.S ., STEINMAN, D. H.; RINEHART, JR., K. L. Isolation gas-chromatography-mass spectrometry and, structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* and *Erythrina salviiflora*. **Journal of de American Chemical Society** , v. 96, p. 1909-1917, 1974.
- MINATEL, I. O; HAN, S.I; AIDINI G.; COLZANI M; N. R MATTHAN; CORREA, C. R; FECCHIO, D; YEUM K.J. Fat-Soluble Bioactive Components in Colored Rice Varieties. **Journal of Medicinal Food**. **October**, 1134-1141. 2014.

NEILL, D. A. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation. In: WESTLEY, S. B.; POWELL, M. H. (Ed.). *Erythrina in the New and Old Worlds*. Paia: Nitrogen Fixing Tree Association. p. 15-27.

NEWMAN, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, 629-661, 2016.

NKENGFAK A. E. et al. Indicanine A, a new 3- phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 6, p. 855-856. 2000.

OLIVEIRA, MARCIELLI INDIARA et al. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 5, n. 1, jun. 2015. ISSN 2237-048X. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/5806/4048>>. Acesso em: 10 maio 2018.

OZAWA, M.; HONDA, K.; NAKAI, I.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indolealkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3992–3994, 2008.

OZAWA, M.; ETOH, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. TRAIL – enhancing activity of *Erythrinan* alkaloids from *Erythrina velutina*. *Bioorg. Med.Chem. Lett.*, v. 19. P. 234-236, 2009

PALUMBO, CARLA FERNANDA GOMES; GARDIN, NILO E; NAKAMURA, MARY UCHIYAMA. *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth e *Erythrina velutina* Willd: Aspectos farmacológicos e perspectiva antropológica de plantas brasileiras / *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth and *Erythrina velutina* Willd: Pharmacological aspects and anthroposophic view of these Brazilian plants **Arte med. ampl**; 36(4): 152-161, 2016.

PEIXOTO FILHO, R. C. S. **Caracterização físico-química e atividades biológicas das folhas de *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* (WAWRA) L.G. LOHMANN (BIGNONEACEAE)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. 2015.

PELLETIER, S. W. (1983) *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Wiley, New York. Vol 9.

PHILLIPSON, J. D., M. F. Roberts & M. H. Zenk (eds.). 1985. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin. 304 pp.

Propyloxyamyrin, Two New Triterpenoid Derivatives from *Erythrina sigmoidea* (Fabaceae). **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 101 – 104, 2008.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDERA, J. L.; ATINDEHOUA, K. K.; TRAOREB D.; HOSTETTMANNA, K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry,

ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 123–134, 2002.

QUEIROZ, L. P. de. Leguminosas da caatinga. Feira de Santana: Editora Universitária . UEFS. 443p. 2009.

RABELO, L.A.; AGRA, M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA FILHO, J.M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.5, p.543-544. 2001.

REFLORA – Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22965>. Acesso em: 10 de abril de 2018.

RODRIGUES, M. V.N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, pag. 2-14.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI R.O. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, p. 205–212, 2012.

SÁ, R. D. **Estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Relaxant effects of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves on rat vas deferens. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 343-348. 2007.

SCHENKEL, E. P. et al. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia – Da planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007b. cap. 37, p. 959-993.

SCHISTEK, H.; SEYFFARTH, J. A.; KIILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A.; PIMENTEL, R.M. M.; CASTRO, R.; SALES, M. T. B. F.; ALBUQUERQUE, U. P. Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro. **Revista do Instituto Humanistas Unisinos**. 389 ed. São Leopoldo, 2012.

SERRANO, M. A. R.; BATISTA, A. N. L.; BOLZARI, V. S.; SANTOS, L. Á.; NOGUEIRA, P. J. C.; SOUZA, R. L. N.; LATIF, A.; ARFAN, M. Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 808-811, 2011.

SILVA JÚNIOR, VALTER TAVARES DA. **Biometria, germinação e crescimento inicial de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae - Papilionoideae) ocorrente em caatinga e brejo de altitude (PE)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

SILVA, A. HOLANDA. **Desenvolvimento e caracterização do extrato de *Erythrina velutina* para o tratamento de doença neurodegenerativa**. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SILVA, ATALGINA da. **Riqueza e diversidade de espécies vegetais lenhosas da Caatinga na região de Xingó, Alagoas/** Roselit a Atalgina da Silva. – Recife, 2002.

SILVA, M. M. Barbosa da. **Estudo farmacognóstico de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae)** Recife, 2012.

SILVA, M.A.FELIPE et al., Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and abinitio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **Journal of mass spectrometry**. 418, 30–36. 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 1096 p. 2007.

SINGH, H. et al. Investigation *Erythrina spp.* IX. chemical constituents *Erythrina stricta* bark. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 526-529, 1981.

SOBARZO-SÁNCHEZ, E. **Alkaloids: biosynthesis, biological roles and health benefits**. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2015. 275p.

SOTO-HERNÁNDEZ, R. M.; GARCÍA-MATEOS, R.; MIGUEL-CHÁVEZ R. S.; KITE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; RAMOS-VALDIVIA A. C. *Erythrina*, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. **Bioactive Compounds. Phytomedicine**, p. 163 – 185, 2012.

SOUZA, J. B. PEREIRA. **Tecnologia analítica baseada na pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa para caracterização de extratos de *Erythrina mulungu* Linné, *Matricaria chamomilla* Linné, E *Passiflora alata* Curtis**. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

SOUZA, V. C.; HARRI LORENZI. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2º ed. **Nova Odessa**, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas. **Plant Physiology**, v. 144, p. 575-581, 2007.

STÉVIGNY, C. JIWAN, H, JEAN LOUIS. R. ROZENBERG, E. DE HOFFMANN, AND J. QUETIN-LECLERCQ, "Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 18, no. 5, pp. 523–528, 2004.

TELES, M. M. R. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Ocotea gardnei* (Meisa) Mez e *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae)**. 2016. 115p. Tese (Doutora) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016.

TSUDA. S. Hosoi, T. SANO, and M. NAGÃO, *Chem. Pharm. Bull* 44, 2342 (1996).

VALENTIM, A. P de T. **Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá)**. 2006. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

VASCONCELOS, S.M. et al. Anticonvulsivant activity of hidroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110(2),p 271-274,2007.

VASCONCELOS, S.M. et al. Antinociceptive activities of the hidroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p.946-9, 2003.

VEIGA- JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,18: 308 - 313. 2008.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; Mello. J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 464-471, 2008.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.137-42, 2005.

WANJALA, C. C. W.; MAJINDA, R. R. T. Two novel glucodienoid alkaloids from *Erythrina latissima* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.6, p. 871-873. 2000.

XAVIER, MN; et al. Chemical composition of the volatile oil of *Cardiopetalum calophyllum* collected in the Cerrado area. : Composição química do óleo volátil de *Cardiopetalum calophyllum* coletada em área de Cerrado. **Ciência Rural**. 46, 5, 937-942, May 2016.

YANG, B.; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; et al. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass. **Journal of Agricultural and food chemistry**, 2012, 60, 8672 – 8683.

YENESEW, A.; AKALA, H. M.; TWINOMUHWEZI, H.; CHEPKIRUI, C.; IRUNGU, B.N.; EYASE, F. L.; KAMATENESI-MUGISHA, M.; KIREMIRE, B. T.; JOHNSON, J. D.; WATERS, N. C. The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina Burtii*. **Acta Tropica**, v. 123, p. 123– 127, 2012.

YENESEW, A.; DERESE, S.; IRUNGU, B.; MIDIWO, J. O.; WATERS, N. C.; LIYALA, P.; AKALA, H.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Flavonoids and isoflavonoids with antiplasmodial activities from the root bark of *Erythrina abyssinica*. **Planta Medica** v. 69, p.658 – 661, 2003.

YENESEW, A.; DERESE, S.; MIDIWO, J. O.; BII, C. C.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*. **Fitoterapia**, v. 76, p.469– 472, 2005.

YUNES, R. A.; Cechinel Filho, V.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Quim. Nova**, 24, 147. 2001.