

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE FARMÁCIA**

**JOCIANO DA SILVA LINS**

**BUSCA POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA  
ESPÉCIE *Erythroxylum rimosum* O. E. SCHULZ**

JOÃO PESSOA – PB

Junho- 2018

**JOCIANO DA SILVA LINS**

**BUSCA POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA ESPÉCIE**  
***Erythroxylum rimosum* O. E. SCHULZ**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do  
Curso de Graduação em Farmácia,  
do Centro de Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal da Paraíba,  
como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Farmácia.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares**  
**COORIENTADOR: Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa**

**JOÃO PESSOA – PB**

**Junho –2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L759b Lins, Jociano da Silva.

Busca por metabólitos secundários na espécie  
*Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz / Jociano da Silva  
Lins. - João Pessoa, 2018.  
68 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.  
Coorientação: Vicente Carlos de Oliveira Costa.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Erythroxyllaceae. 2. Flavonoide. 3. Alcaloide. 4.  
Cromatografia. I. Tavares, Josean Fachine. II. Costa,  
Vicente Carlos de Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

JOCIANO DA SILVA LINS

**BUSCA POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA ESPÉCIE  
*Erythroxylum rimosum* O. E. SCHULZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

João Pessoa, 04 de JUNHO de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

*Josean Fchine Tavares*

**Prof. Dr. Josean Fchine Tavares**  
Universidade Federal da Paraíba-UFPB  
(Orientador)

*Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa*

**Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa**  
Universidade Federal da Paraíba-UFPB  
(Coorientador)

*Elisana Afonso de Moura Pires*

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisana Afonso de Moura Pires**  
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança-FACENE  
(Examinadora)

*Barbara Viviana de Oliveira Santos*

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Barbara Viviana de Oliveira Santos**  
Universidade Federal da Paraíba-UFPB  
(Examinadora)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, João Teotônio Lins (in memoriam) e Luciene Angelo da Silva, por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos, vocês são os meus maiores exemplos.*

*Aos meus queridos irmãos, por todo companheirismo, apoio e amizade. Vocês são os meus melhores amigos.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por está comigo em todos os momentos, sempre me dando forças para vencer todos os desafios, obrigado, porque todos os dias me dáis mais do que peço e muito mais do que mereço.

Ao meu pai, **João Teotônio Lins** (*in memoriam*), pelo amor, amizade, carinho e companheirismo, por ter sido o melhor pai que eu podia-te, sempre me ensinando a seguir o caminho correto. Muito da pessoa que sou hoje devo ao senhor e sei que junto de Deus sente orgulho de mim, saudades de ti.

A minha mãe, **Luciene Angelo da Silva**, pelo amor incondicional, colocando seus filhos sempre em primeiro lugar. Por toda dedicação em buscar o melhor para nós, ÉS uma guerreira.

Aos meus irmãos, **Jociene, Jocieno, Jocileno e Jocilano**, pelo companheirismo e amizade, por todos os momentos bons e ruins que passamos juntos sempre um pensando no outro. A vida com vocês se torna mais leve e agradável.

Ao meu orientador **Vicente Carlos de Oliveira Costa**, por toda orientação e ensinamentos durante esses quatro anos de Iniciação Científica. Por todo o convívio e conselhos que me passou durante esse tempo, me fazendo crescer como pessoa e profissional. Por ser como um pai e grande amigo que a vida me deu, sendo um dos melhores exemplos de pessoa e profissional para mim. E por toda orientação para que este trabalho fosse possível.

Ao **Prof. Josean Fechine Tavares**, pela orientação, confiança e por todo o ensinamento.

Ao **Prof. Marcelo Sobral da Silva**, por todo ensinamento, contribuição e disponibilidade para a realização deste trabalho.

A professora e amiga **Elisana**, por todo ensinamento, paciência e amizade. Pelo conhecimento transmitido durante todo nosso convívio no laboratório sempre com muito bom humor e alegria. Por ter a oportunidade de tê-la como minha professora na graduação, aprendendo tanto na área profissional quanto para a vida. ÉS uma pessoa de coração enorme.

A minha professora e amiga **Andreza Barbosa**, obrigado por ter me mostrado de maneira tão especial o melhor curso que eu poderia escolher, você foi a responsável por despertar em mim a paixão pelo curso de Farmácia, me ensinando no tempo do curso profissionalizante (atendente de Farmácia). Obrigado também pela confiança em ter me indicado para o laboratório de

fitoquímica, graças a você estou seguindo uma área da farmácia que me traz tanta alegria e realização. E por todo o convívio e ensinamento no laboratório.

A Professora **Bagnólia Costa**, por todos os ensinamentos e conselhos que me deu durante a graduação.

Aos doutorandos **Yuri Manguiera e Anderson Vieira**, por toda a disponibilidade na realização dos experimentos e pelos conhecimentos transmitidos. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

A todos os **estudantes de Iniciação Científica, técnicos e pós-graduandos** que fazem parte do grupo SFCB (Sobral, Fachine, Costa e Barbosa) por todo convívio, apoio e ensinamentos. Aprendo muito com vocês todos os dias!

A todos os **professores da graduação de Farmácia**, por todos os ensinamentos tanto profissionais quanto para a vida, levo um pouco de cada um de vocês comigo para a minha vida.

A minha turma de **Farmácia 2013.2**, vocês foram muito importantes durante todo o curso, aprendi bastante com vocês. Aprendemos a aceitar as diferenças de cada um e crescer juntos durante esse tempo, nos tornando uma turma mais unida. Obrigado por toda a ajuda, convívio e companheirismo.

Aos meus amigos **Ada Vivianny e Camyla Andrade (“Tritop”)**, vocês foram fundamentais na minha vida acadêmica, passamos por tantas coisas juntos. Vocês tornaram o dia a dia na universidade muito mais leve e divertida, obrigado por todo apoio, amizade, paciência e companheirismo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

**Jociano da Silva Lins**

## RESUMO

*Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz é uma espécie restrita à região Nordeste do Brasil, encontrada nos estados do Ceará, Piauí, Sergipe e Bahia, ocorrendo respectivamente em vegetação de Restinga, Cerrado e Carrasco. O estudo do extrato etanólico bruto das folhas de *E. rimosum* reportou a identificação de triterpenos pentacíclicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina), esteróide ( $\beta$ -sitosterol), alcaloide tropânico e flavonoides. Sendo assim, foi realizado um estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas e ramos de *E. rimosum*. O material botânico das partes aéreas foi coletado no município de Pirambu, estado de Sergipe e identificado pela Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Em seguida, foi seco em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C, triturado em moinho mecânico e submetido à maceração com EtOH a 95%. O extrato etanólico bruto (105 g) foi dissolvido em uma solução de metanol:água (7:3 v/v) e submetido a um processo de partição com os seguintes solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila. A fase acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60, (70-230 mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária e como fase móvel, os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se 30 frações que após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram reunidas de acordo com os seus respectivos fatores de retenção (R<sub>f</sub>s). A reunião das frações de 23 a 25 obteve-se a substância codificada como Er-1. A fase diclorometano foi submetida ao mesmo processo cromatográfico descrito anteriormente. Obtendo-se 55 frações que após análise por CCDA foram reunidas de acordo com seus R<sub>f</sub>s. A reunião das frações de 53 a 55 obteve-se a substância codificada como Er-2. Estas tiveram suas estruturas identificadas através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-APT, técnicas bidimensionais e em comparação com os dados da literatura, sendo denominadas: 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo e 4-hidroxi-1-metil-2-pirrolidina ácido carboxílico. Foram realizadas as determinações do perfil cromatográfico de Er-1 e Er-2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) e separação em CLAE preparativo e semi-preparativo respectivamente, obtendo-se as substâncias Er-1 e Er-2 com índices de pureza de 99%. A partir do estudo fitoquímico do EEB de *E. rimosum*, foram isolados: um flavonoide glicosilado (Er-1) e um alcaloide pirrolidínico (Er-2), sendo estes relatados pela primeira vez na espécie em estudo.

**Palavras-chave:** Erythroxylaceae; Flavonoide; Alcaloide; cromatografia.

## ABSTRACT

*Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz is a species restricted to the northeastern region of Brazil, found in the states of Ceará, Piauí, Sergipe and Bahia, occurring respectively in Restinga, Cerrado and Carrasco vegetation. The study of the crude ethanolic extract (CEE) from leaves of *E. rimosum* reported the identification of pentacyclic triterpenes ( $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amirine), steroid ( $\beta$ -sitosterol), tropane alkaloid and flavonoids. Thus, a phytochemical study of the crude ethanolic extract of leaves and branches of *E. rimosum* was carried out. The botanical material of the aerial parts was collected in the municipality of Pirambu, state of Sergipe and identified by Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, from Department of Biology at the Federal University of Sergipe (UFS). It was then oven dried with circulating air at an average temperature of 40 ° C, ground in a mechanical mill and submitted to maceration with 95% EtOH. The crude ethanolic extract (105 g) was dissolved in a methanol: water (7:3 v/v) solution and partitioned with the following solvents: hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The ethyl acetate phase was subjected to column chromatography using silica gel 60, (70-230 mesh-ASTM, Merck) as the stationary phase and as the mobile phase the hexane, ethyl acetate and methanol solvents, pure and in binary mixtures in increasing order of polarity. This yielded 30 fractions which, after analytical thin layer chromatography (TLC), were pooled according to their respective retention factors (Rf). The reunion of the fractions from 23 to 25 provided the substance encoded as Er-1. The dichloromethane phase was subjected to the same chromatographic procedure described above. There were obtained 55 fractions which after TLC analysis were pooled according to their Rf. Fractions from 53 to 55 were reunited and provided the substance encoded as Er-2. These substances had their structures identified by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT Nuclear Magnetic Resonance (NMR), two-dimensional techniques and in comparison with the literature data, being named: 4', 7-di-O-methylquercetin-3-O- $\beta$ -rutinoside and 4-hydroxy-1 methyl-2-pyrrolidine carboxylic acid. The Er-1 and Er-2 chromatographic profile determinations were carried out by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) and separation in preparative and semi-preparative HPLC respectively, obtaining the Er-1 and Er-2 with purity indexes of 99%. From the phytochemical study of CEE of *E. rimosum*, a glycosylated flavonoid (Er-1) and a pyrrolidine alkaloid (Er-2) were isolated, and these were reported for the first time in the study species.

**Keywords:** Erythroxylaceae; Flavonoid; Alkaloid; Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa de distribuição do gênero <i>Erythroxylum</i> no mundo, área representada em vermelho.....	22
<b>Figura 2</b> - Foto da espécie <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	27
<b>Figura 3</b> - Esqueleto básico dos flavonoides.....	28
<b>Figura 4</b> - Formação do esqueleto básico dos alcaloides tropanicos.....	31
<b>Figura 5</b> - Principais alcaloides das famílias Solonaceae e Erythroxylaceae.....	32
<b>Figura 6</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de Er-1.....	48
<b>Figura 7</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de Er-1.....	48
<b>Figura 8</b> - Mapa de contorno HMBC da substância Er-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 x 125 MHz).....	49
<b>Figura 9</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de Er-2.....	53
<b>Figura 10</b> - Expansão do Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de Er-2 na região de 36-78 ppm.....	53
<b>Figura 11</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de Er-2.....	54
<b>Figura 12</b> - Expansão do espectro de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de Er-2 na região de 2,0-4,5 ppm.....	54
<b>Figura 13</b> - Mapa de contorno HMBC da substância Er-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 x 125 MHz).....	55
<b>Figura 14</b> – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância Er-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 x 125 MHz) na região de 1,5-9,5 ppm x 10-200 ppm.....	55
<b>Figura 15</b> - Mapa de contorno HSQC da substância Er-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 x 125 MHz).....	56

<b>Figura 16</b> - Mapa de contorno COSY da substância Er-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	56
<b>Figura 17</b> – Expansão do mapa de contorno COSY da substância Er-2 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) na região de 1,5-6,0 ppm x 2,0-5,2 ppm.....	57
<b>Figura 18</b> - Possíveis configurações espaciais dos grupos hidroxila e ácido carboxílico.....	58
<b>Figura 19</b> - Conformação envelope e os principais acoplamentos entre os hidrogênios de Er-2.....	59
<b>Figura 20</b> -Cromatograma da fração Er-2 da fase diclorometano de <i>E. rimosum</i> .....	60
<b>Figura 21</b> - Expansão do cromatograma de 0 a 13 min da fração Er-2 da fase diclorometano de <i>E. rimosum</i> .....	61
<b>Figura 22</b> - Cromatograma da fração 23 a 25 da fase acetato de etila da espécie <i>E. rimosum</i> .....	61

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1</b> - Rota biossintética para a formação dos flavonoides da série Quercetina e Canferol.....	29
<b>Esquema 2</b> - Rota biossintética para a formação dos alcaloides pirrolidínicos....	34
<b>Esquema 3</b> - Rota biossintética para a formação dos alcaloides tropânicos.....	35
<b>Esquema 4</b> - Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	42
<b>Esquema 5</b> -Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	42
<b>Esquema 6</b> - Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano das folhas de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Erythroxyllum rimosum</i> O. E. Schulz.....	44
<b>Tabela 2</b> - Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>Erythroxyllum rimosum</i> O. E. Schulz.....	44
<b>Tabela 3</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C-APT de Er-1 e da literatura (500 MHz x 125 MHz em CD <sub>3</sub> OD).....	47
<b>Tabela 4</b> - Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C-APT de Er-2 e da literatura (500 MHz x 125 MHz em CD <sub>3</sub> OD).....	52

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Alcaloides isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*.....24
- Quadro 2** - Flavonoides e triterpenos isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*.....25
- Quadro 3** - Série de diterpenos isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*...25
- Quadro 4** - Alcaloides isolados de espécies de *Erythroxylum*.....26

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
APT	“Attached Proton Test”
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	“Correlation Spectroscopy”
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dupleto
<i>ddt</i>	Duplo duplo tripleto
EEB	Extrato etanólico bruto
Er	<i>Erythroxylum rimosum</i>
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
Hz	Hertz

<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
MHz	Megahertz
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PLP	Piridoxal fosfato
ppm	Partes por milhão
R <sub>f</sub> s	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
s	Singleto
sl	Singleto largo
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFS	Universidade Federal de Sergipe
δ	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. Considerações sobre a família Erithroxylaceae.....	20
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Erythroxylum</i> .....	21
2.3. Considerações sobre a espécie <i>Erythroxylum rimosum</i> .....	27
2.4. Considerações sobre os flavonoides.....	27
2.5. Biogênese dos flavonoides quercetina e canferol.....	28
2.6. Considerações sobre os alcaloides.....	30
2.7. Biogênese dos alcaloides pirrolidínicos e tropânicos.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	37
4.2. Processamento do material vegetal de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	38
4.3. Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	38
4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.....	38

4.4.1. Fracionamento cromatográfico das fases acetato de etila e diclorometano das folhas de <i>Erythroxyllum rimosum</i> O. E. Schulz.....	39
4.5. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Semi-preparativo de Er-2 da fase diclorometano .....	40
4.6. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo de Er-1 da fase acetato de etila.....	41
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	45
5.1. Estudo Fitoquímico das partes aéreas de <i>Erythroxyllum rimosum</i> O. E. Schulz.....	45
5.1.1. Identificação estrutural de Er-1.....	45
5.1.2. Identificação estrutural de Er-2.....	50
5.2. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Semi-preparativo de Er-2 da fase diclorometano.....	59
5.2.1. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo de Er-1 da fase acetato de etila.....	60
6. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A ligação do homem com o reino vegetal foi se tornando ao longo da história uma relação mais íntima, isso ocorreu através das observações dos fenômenos naturais e experiências com os meios disponíveis, o que resultou em um amplo conhecimento empírico sobre a utilização das plantas (TORRES, RIBEIRO e MORAES, 2010; SILVA, 2014).

Através dos milênios, o homem buscou a superação dos seus males através das plantas medicinais, utilizando seus instintos, percebia a diferença entre as plantas comestíveis daquelas que poderiam proporcionar a curar, a cicatrização ou o alívio (BEZERRA, 2014). A humanidade convive com uma grande variedade de espécies vegetais, desenvolvendo diversas maneiras de explorá-las para diferentes finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Dentre estas, podemos destacar o conhecimento sobre o uso das plantas para fins terapêuticos (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010).

A utilização de plantas medicinais é a principal alternativa terapêutica para aproximadamente 80% da população mundial de acordo com a organização mundial da saúde (ALVES & SILVA, 2002; WHO, 2008). O extenso uso terapêutico de plantas, principalmente nos países em desenvolvimento, está relacionado ao alto custo à assistência médica e os medicamentos alopáticos (OLIVEIRA & GONÇALVES, 2006). Assim como os medicamentos alopáticos, as plantas também possuem substâncias ativas que, muitas vezes, o efeito tóxico sobre o organismo é desconhecido ou ignorado pelos usuários. Mostrando assim a importância sobre o conhecimento do consumo de plantas para uso seguro, consciente e eficaz na terapêutica (FARIA et al., 2004; BAKKE et al., 2008).

De fato, as plantas possuem a capacidade de produzir substâncias químicas que podem colaborar com a sua sobrevivência, tendo como exemplo disto o desenvolvimento de mecanismos de defesa. Essas substâncias são metabólitos bioativos oriundos de seu metabolismo secundário. Esses componentes químicos que as plantas produzem e estocam, apresentam funções biológicas, desempenhando um papel ecológico que pode ser utilizado para diversos fins, tais como medicamentos, alimentos funcionais, inseticidas, herbicidas, perfumes, entre outros, podendo também, receber, a denominação de

produtos naturais (GARCÍA; CARRIL, 2009). COZZOLINO (2009) referiu que esses metabólitos podem ser encontrados em vários vegetais que fazem parte da alimentação humana. O autor ressalta, também, a importância dos benefícios que os metabólitos secundários podem trazer à saúde humana, tais como a redução na incidência de certos tipos de câncer, estimulação do sistema imunológico, dentre outros.

O Brasil possui uma extensa biodiversidade, comportando aproximadamente 55 mil espécies de plantas, sendo que muitas dessas são endêmicas e desconhecidas. Entre os componentes que formam essa biodiversidade, estas plantas medicinais, que são bastante utilizadas pelas comunidades tradicionais, como remédios caseiros, sendo considerada a matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Entretanto, dados mostram que em torno de 5% destas plantas, tem sido estudada fitoquimicamente e ainda uma menor porcentagem são avaliadas sob os aspectos biológicos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FUMAGALI et al., 2008).

## 2. REFERENCIALTEÓRICO

### 2.1. Considerações sobre a família Erythroxyceae

Na flora brasileira, várias plantas se destacam, entre elas, as da família Erythroxlaceae, reconhecendo a riqueza de metabólitos secundários presentes em espécies da família, e que no levantamento bibliográfico realizado foram encontrados poucos relatos de estudos fitoquímicos e farmacológicos para a espécie *Erythroxylum rimosum*. Diante disto se faz necessário um estudo mais profundo da referida espécie.

A família Erythroxlaceae é composta por aproximadamente quatro gêneros e cerca de 240 espécies com distribuição pantropical, tendo seus principais centros de diversidade e endemismo na Venezuela, Madagascar e Brasil (ALBUQUERQUE, 2014). A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum* P. Browne, que apresenta distribuição ampla, sendo encontrado em quatro continentes, principalmente na América tropical (PLOWMAN, 2001). Os demais gêneros, *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl. E *Pinacopodium* Exell & Mendonça, são compostas por poucas espécies e possuem distribuição restrita na África (PLOWMAN; BERRY, 1999; DALY 2004). É uma família de plantas angiospérmicas, apresentando controvérsias em relação a sua afinidade e posição sistemática. Estudos moleculares recentes (SALOVAINEN et al., 2000; SCHWARZBACH E RICKLEFS, 2000; SOLTIS et al., 2000), baseado em vários caracteres morfológicos e anatômicos listados por DAHLGREN, (1998), observaram a grande afinidade entre Erythroxlaceae e Rhizophoraceae propõem seu posicionamento na ordem Malpighiales, sensu APG (1998). Na classificação sugerida pelo APG (2003), a enorme afinidade e o grupo de caracteres compartilhados pelas duas famílias fizeram com que Erythroxlaceae e Rhizophoraceae fossem consideradas, como uma só família, Rhizophoraceae. Segundo os autores JUDD e OLMSTEAD (2004), os principais caracteres partilhados pelas duas famílias são a presença de alcaloides dos grupos tropanos e pirrolidínicos.

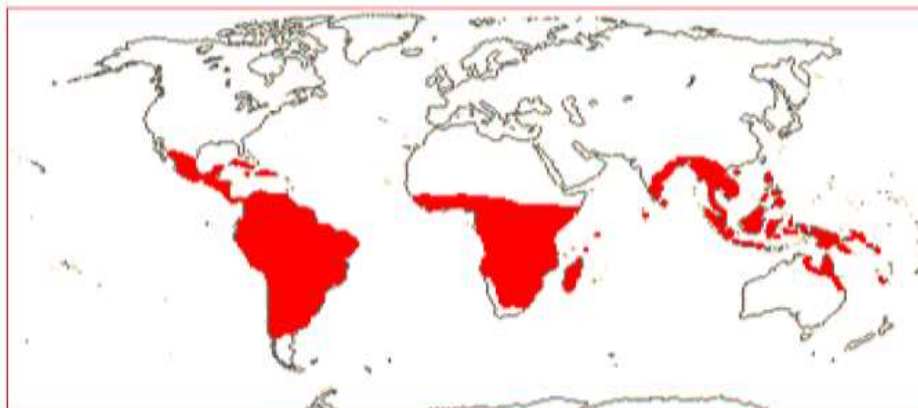
## 2.2. Considerações sobre o gênero *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum*, possui aproximadamente 230 espécies, sendo o único gênero encontrado na região Neotropical, onde cerca, de 187 espécies são exclusivas desta região (PLOWMAN; HENSOLD, 2004), tendo como principal centro de diversidade e endemismo a América do Sul, especialmente o Brasil e a Venezuela (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

No Brasil, o gênero é composto por aproximadamente 74 espécies com distribuição restrita, correspondendo a 40% de todas as espécies da região tropical, encontradas nos mais diversos tipos de vegetação do país, possuindo ocorrência que se estende desde as florestas da Amazônia e Atlântica, até as matas do cerrado e caatinga (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

De acordo com ZUANAZZI et al., (2001), o interesse pelo gênero acentuou-se no século XIX, devido a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam, que secularmente eram utilizadas pelos indígenas da região andina da América do Sul. Quimicamente, o gênero se configura pela presença de alcaloides do grupo tropano, nas quais se sobressai a cocaína, um alcaloide natural produzido por *Erythroxylum coca* Lam, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (BOHM et al., 1982; GRIFFIN & LIN, 2000). No entanto a cocaína ganhou destaque por sua atividade psicoativa no Sistema Nervoso Central- SNC, sendo um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade (ALAGILLE et al., 2005). Este gênero é o maior da família Erythroxylaceae, com vasta distribuição, nas regiões tropicais da Ásia, Austrália, África e Américas (Figura 1, p. 22), (LOIOLA, 2007).

**Figura 1** – Mapa de distribuição do gênero *Erythroxylum* no mundo, área representada em vermelho.



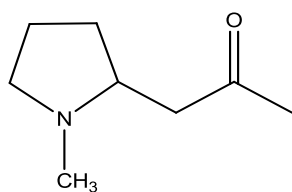
**Fonte:** <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>. Acesso em: 15 de dezembro de 2017.

Várias espécies de *Erythroxylum* são utilizadas pela medicina popular para diferentes fins terapêuticos, sendo usadas como tônicos, vermífugos, diuréticos, antitérmicos, antidiarreicos e inalantes nos casos de asma (HEGNAUER, 1981; RAHMAN, 1998). Algumas espécies são ainda usadas para o tratamento de hemorragia, amenorreia, sinusite, gripe, desordens dos rins, estimulantes e desarranjo do estômago para combater cansaço e a sensação de fome (PLOWMAN, 1984; AL-SAID et al., 1986; CHAVES et al., 1988). Sendo assim, extratos de várias espécies do gênero *Erythroxylum*, vem sido testado separadamente quanto ao seu potencial farmacológico. Foi observado em relatos da literatura que espécies deste gênero são caracterizados por possuírem substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, principalmente atividades antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana, citotóxica e anti-HIV (SILVA et al., 2001; PLOWMAN, 1984; AL-SAID et al., 1986; MANABE et al., 1992; CHAVES et al., 1988).

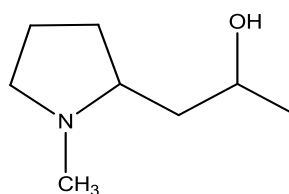
Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Erythroxylum*, igualmente as espécies da família Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Papavaraceae e outras, apresentam alcaloides em sua composição. Alcaloides como Deidrohigrina, Higrina, Cuscohigrina, Higrina, DeidroCUSCOHigrina e nicotina foram isolados em espécies de *Erythroxylum* (Quadro 1, p. 24) (HEGNAUER, 1981; MOORE, 1994; GRIFFIN, 2000; BRACHET, 1997; EL-IMAN, 1988). Entretanto, estudos

fitoquímicos indicam que o gênero *Erythroxylum* é rico em alcaloides tropânicos, e, os mesmos, são encontrados nas folhas, frutos, caule e raízes. Os flavonoides também estão presentes neste gênero, especialmente Canferol e Quercetina, bem como seus 3-O-glicosídeos. Presumisse que estes dois compostos são característicos do gênero *Erythroxylum*, portanto podem se tornar possíveis marcadores quimiotaxonômicos de espécies pertencentes a esse gênero (GRIFFIN E LIN, 2000; ZUANAZZI et al., 2001; JOHNSON et al., 1998; BARREIROS et al., 2005; CHÁVEZ et al., 1996; INIGO, 1985). Também é bastante comum a ocorrência de triterpenos principalmente de esqueleto oleanano (Quadro 2, p. 25) (BARREIROS, 2005; CHAVEZ, 1996; INIGO, 1985). Na madeira de algumas espécies do gênero também foram isolados diterpenos dos tipos Ent-labdano, Ent-devadarano, Ent-kaurano e Ent-beyerano (Quadro3, p. 25) (ANSELL, 1993; KAPADI, 1964; MARTIN, 1968; McCRINDLE, 1968; SOMAN, 1964).

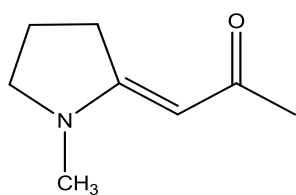
Espécies do gênero *Erythroxylum* estão sendo investigadas quanto às atividades farmacológicas, *E. vacciniifolium* apresentou efeito anti-HIV e contra infecções oportunistas em pacientes com HIV, e produziu alcaloides tropano da série catuabine (A, B e C) (ZANOLARI et al., 2003 a); Pervilleines A e B, isolados de *E. perville*, inibiram o crescimento de carcinoma de pele em células KB-VI (MI et al., 2002), e outros tipos de alcaloides extraídos de *E. rotundifolium* também que possui esta mesma atividade (CHÁVEZ et al., 2002); *E. moonii* mostrou atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias, fungos e leveduras, além de fornecer os alcaloides tropânicos mooniine A e B (Quadro 4, p. 26 ) (RAHMAN et al., 1998). Outras classes de metabolitos secundários foram, isolados de espécies de *Eythroxylum* como diterpenos do tipo labdano, kaurano, atisano, e flavonoides glicosilados (Quadro 3, p. 25).

Quadro 1 – Alcaloides isolados de espécies do gênero *Erythroxylum*.

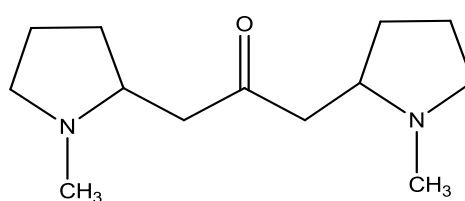
Higrina



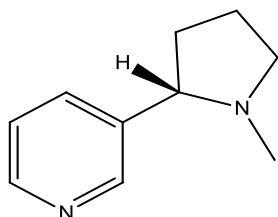
Higrolina



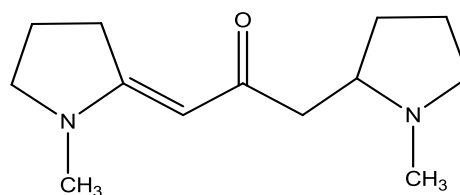
Deidrohigrina



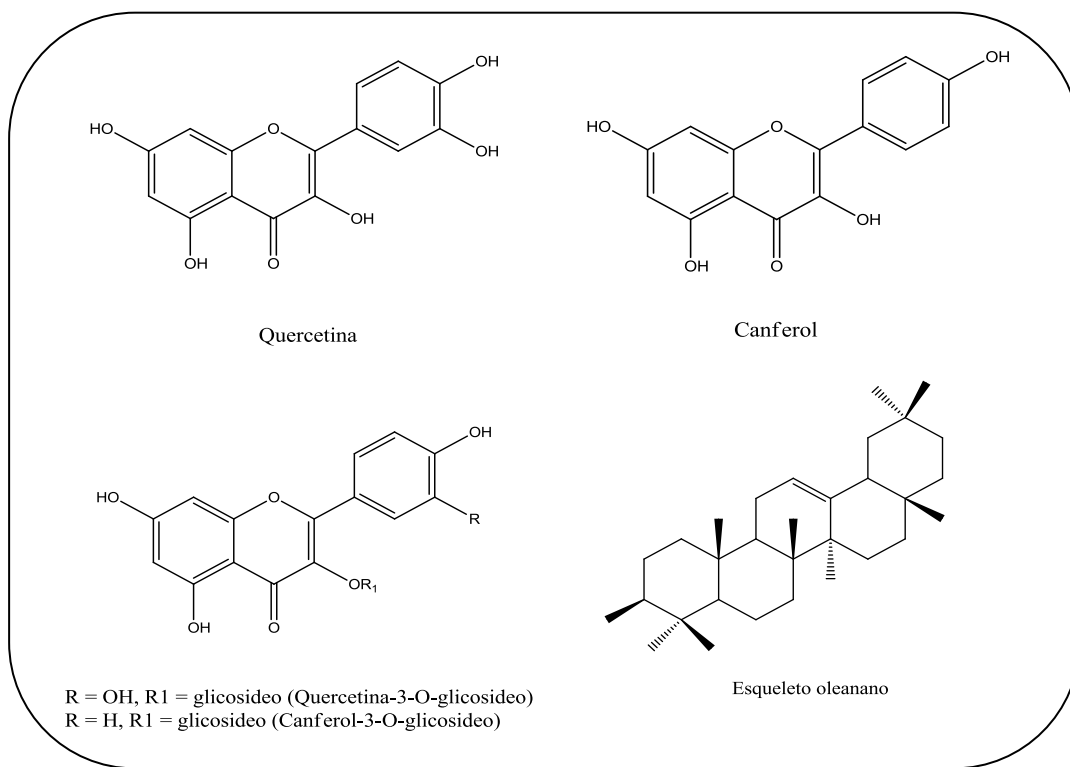
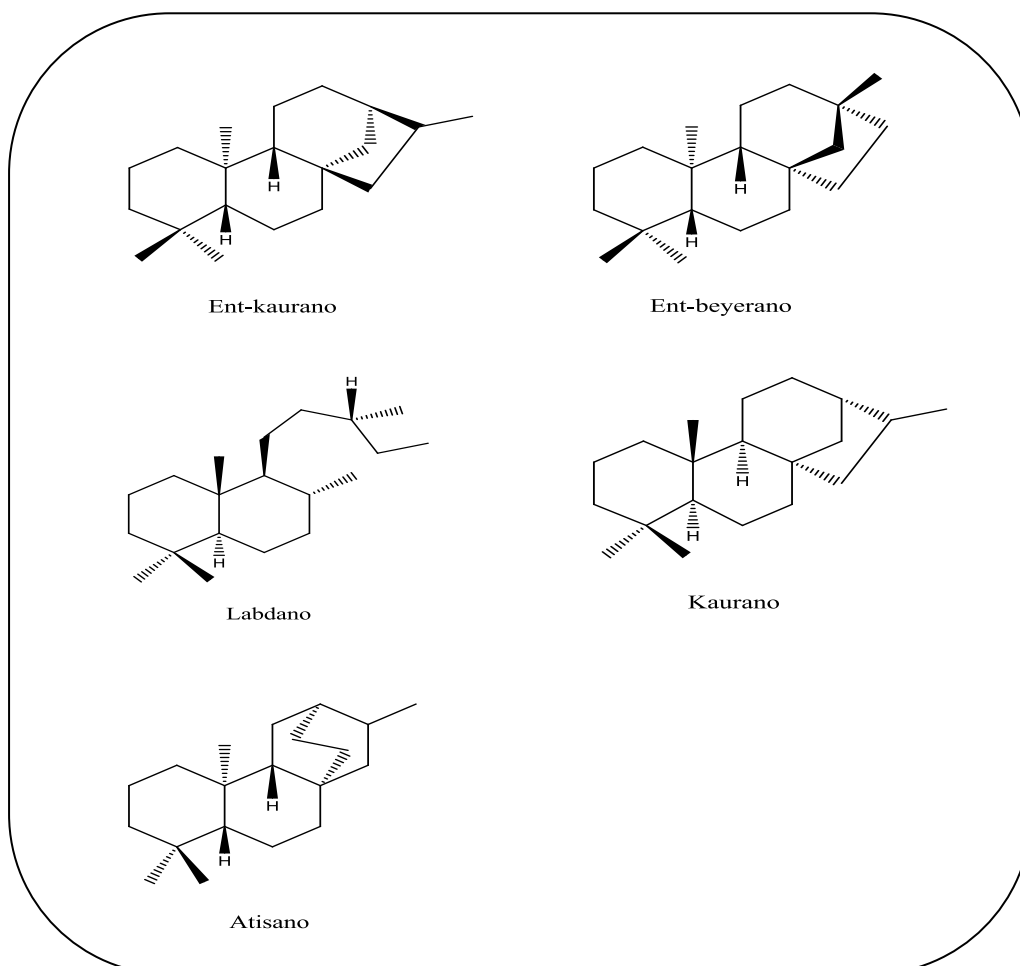
Cuscohigrina

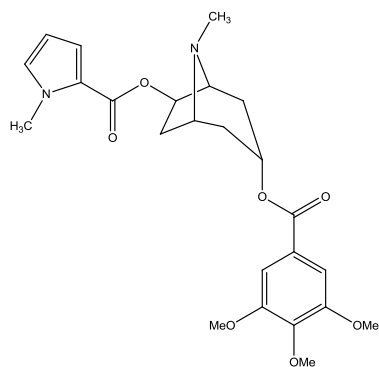


Nicotina

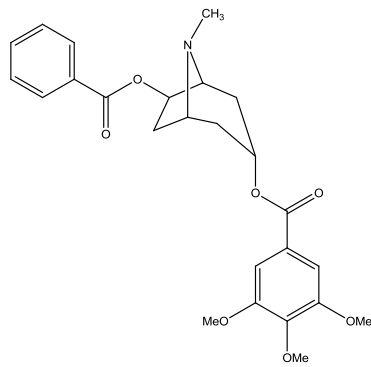


DeidroCUSCOhigrina

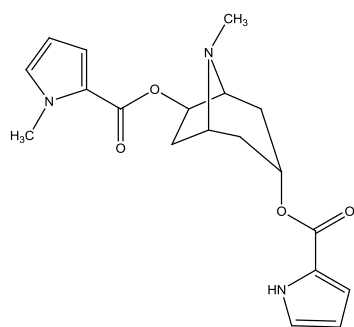
**Quadro 2** – Flavonoides e triterpenos isolados de espécies do gênero *Erythroxyllum*.**Quadro 3** – Série de diterpenos isolados de espécies do gênero *Erythroxyllum*.

Quadro 4 – Alcaloides isolados de espécies de *Erythroxylum*.

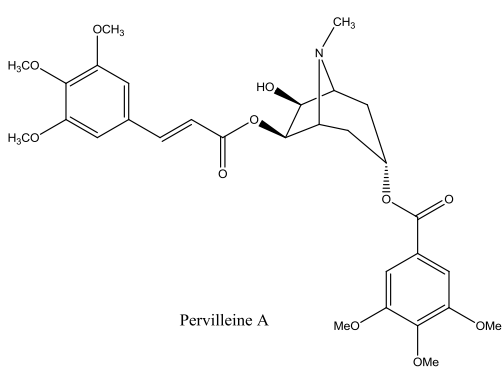
Catuabine A



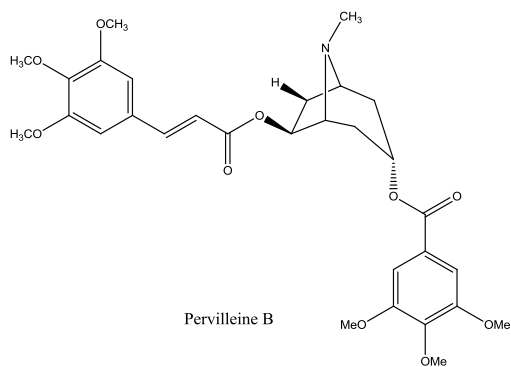
Catuabine B



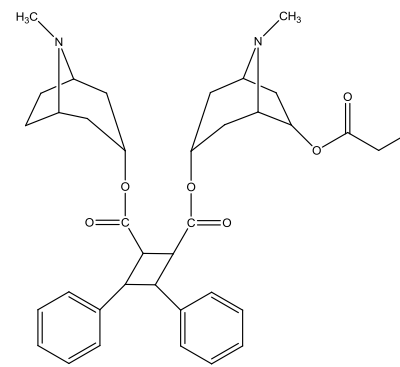
Catuabine C



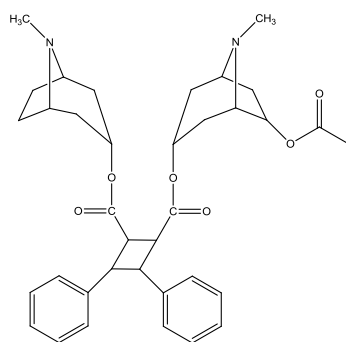
Pervilleine A



Pervilleine B



Mooniine A



Mooniine B

### 2.3. Considerações sobre a espécie *Erythroxylum rimosum*

*E. rimosum* O. E. Schulz é uma espécie restrita à região Nordeste do Brasil, encontrada nos estados do Ceará, Piauí, Sergipe e Bahia, ocorrendo respectivamente em vegetação de Restinga, Cerrado e Carrasco (Figura 2, p.27) (LOIOLA, 2007).

O estudo do extrato etanólico bruto das folhas de *Erythroxylum rimosum* realizado por RIBEIRO, (2011), reportou a identificação de triterpenos pentacíclicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina), esteróide ( $\beta$ -sitosterol), alcaloide tropânico e flavonoides.

**Figura 2** - Foto da espécie *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.



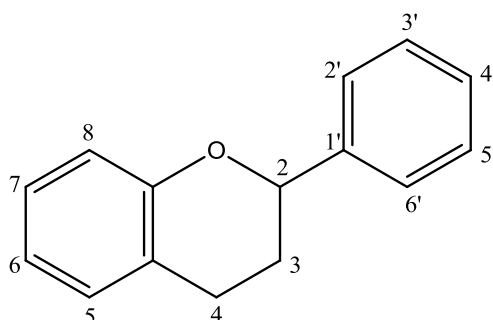
Fonte: Marcelo cavalcante, 2012.

### 2.4. Considerações sobre os flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos, encontradas principalmente em plantas, sendo derivados da benzo- $\gamma$ -pirona. Consistem de um esqueleto de difenil propano (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 3, p. 28). Os flavonoides podem se apresentar na forma de agliconas, glicosídeos ou ligados a outras classes de metabólitos secundários, como por exemplo, as flavolignananas, entretanto, apresentam-se com

mais frequência na forma de glicosídeos. Eles podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos. As subclasses dos flavonoides são: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas (luteolina, diosmetina), flavonois (quercetina, canferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina), flavanol, flavandiol, antocianidina, isoflavonoides (genisteína), bioflavonoides e proantocianinas (BEHLING, 2004).

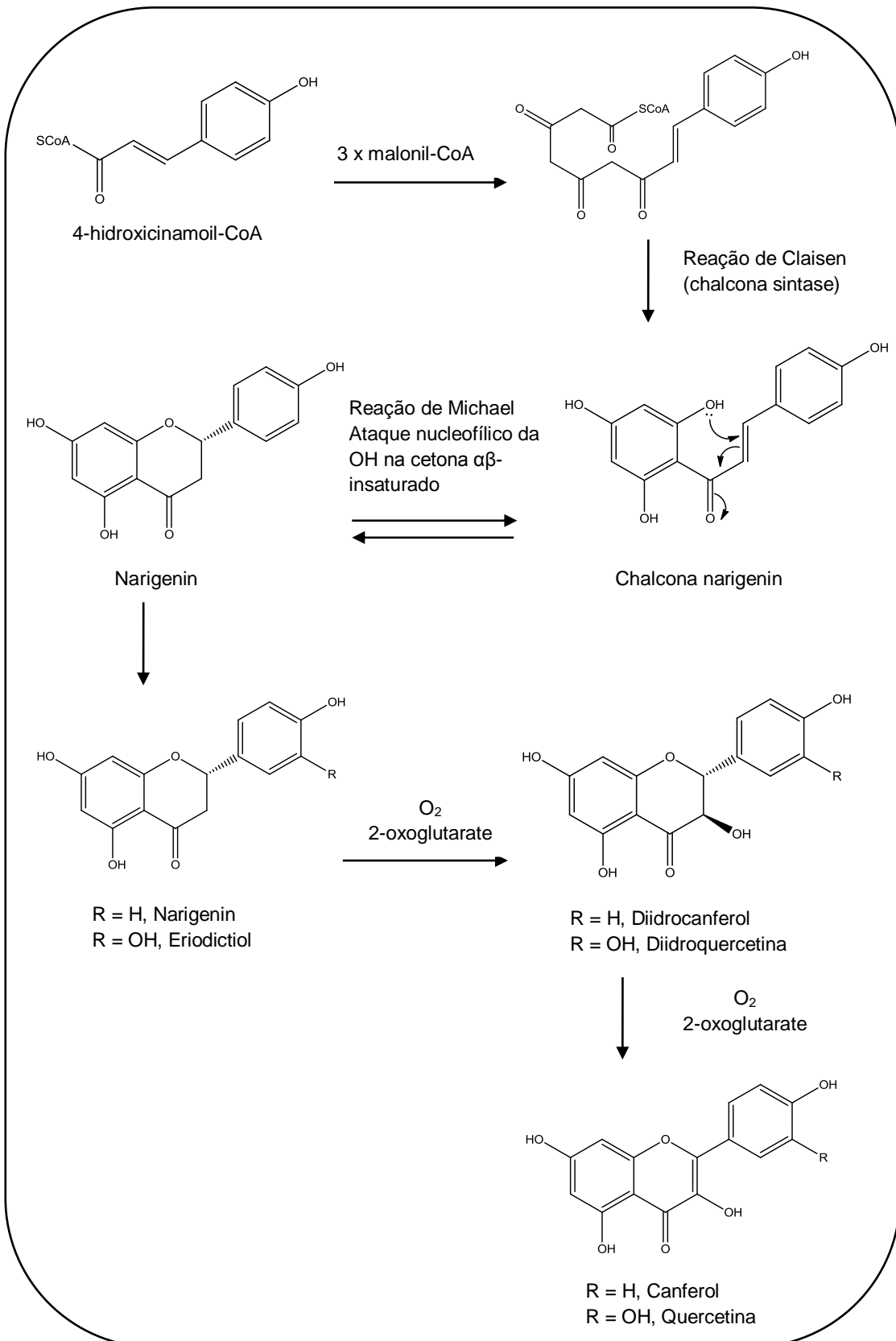
**Figura 3** - Esqueleto básico dos flavonoides.



## 2.5. Biogênese dos flavonoides Quercetina e Canferol

Os flavonoides são inicialmente formados pela união de uma molécula de cinamoil-CoA com três unidades de malonil-CoA, produzindo um policetídeo. Em seguida após a ação da enzima chalcona sintase promovendo uma reação do tipo Claisen que une uma unidade cinamoil-CoA com três unidades de malonil-CoA, produzindo a naringenina chalcona, que sofre uma reação do tipo Michael com o ataque nucleofílico da hidroxila (ligada ao carbono 9) a cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada dando origem a naringenina. Esta reação de isomerização ocorre em meio ácido, favorecendo a formação da flavanona, ou em meio básico favorecendo a formação da chalcona, entretanto, na natureza esta reação é catalisada por uma enzima estereoespecífica, produzindo assim um único enantiômero da flavanona. A partir da flavanona ou diidroflavonol, iram ocorrer modificações nos padrões de hidroxilação nos dois anéis aromáticos gerando flavonoides da série quercetina e canferol. Reações de metilação, dimetilação e glicosilação também são comuns de acontecer, gerando uma gama de compostos (Esquema 1, p. 29)(DEWICK, 2012).

Esquema 1- Rota biossintética para a formação dos flavonoides da série quercetina e canferol.



## 2.6. Considerações sobre os alcaloides

Os alcaloides constituem um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas, geralmente de origem vegetal, de caráter básico e que possuem intensa ação farmacológica em animais.

Esses compostos são encontrados nos vegetais mais prevalentemente na forma combinada, com ácidos orgânicos, e em concentração menor, na forma livre. Na forma de sal, são solúveis em meio aquoso e insolúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, éter e benzeno na forma livre, a solubilidade é inversa. O grau de alcalinidade que apresentam é variável, dependendo da disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio, podendo apresentar caráter ácido quando este é quaternário (SIMEÕES et al., 2007).

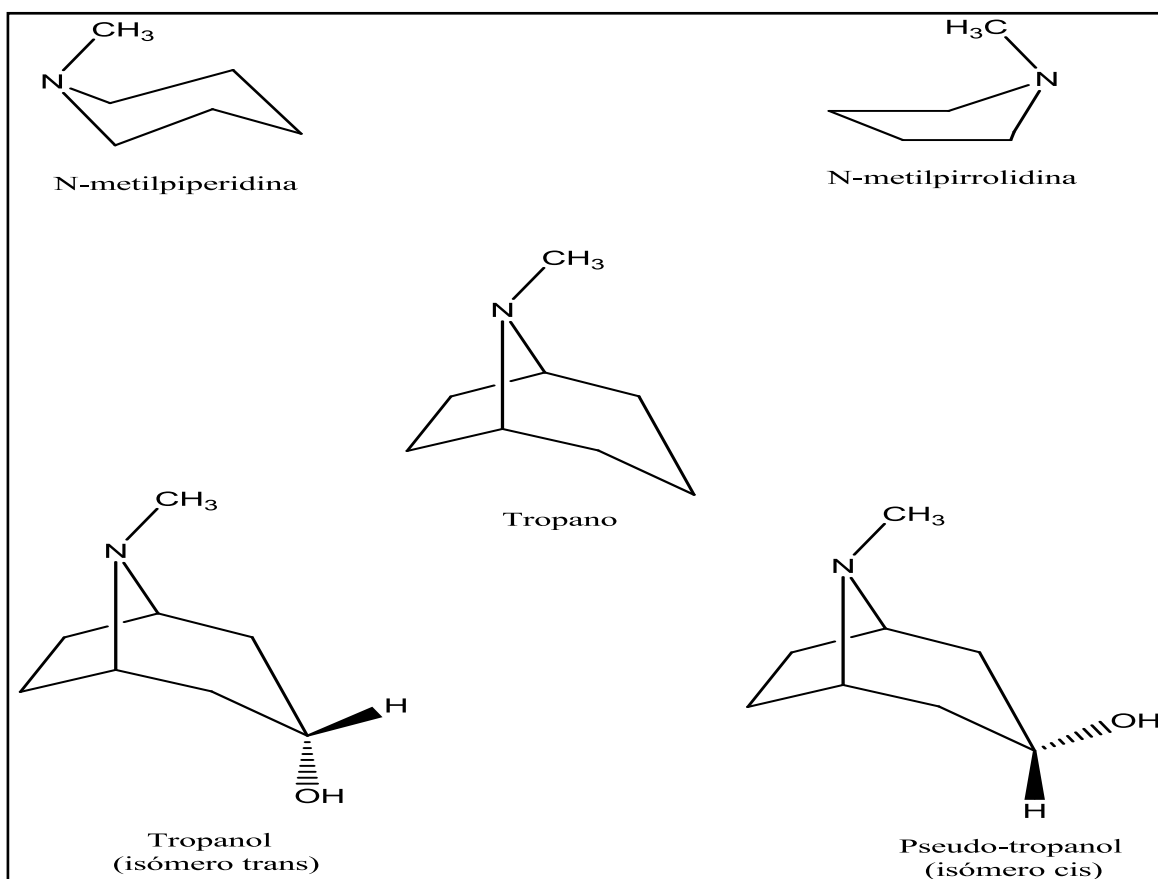
De acordo com Pelletier, alcaloides são compostos orgânicos cíclicos contendo nitrogênio em um estado de oxidação negativo e de distribuição limitada entre os seres vivos. Estima-se que esta classe contenha mais de 4000 compostos, que correspondem a aproximadamente 15% a 20% dos produtos naturais conhecidos e que está dividida em diferentes grupos, tropânico, quinolínic, piperidínico, entre outros (BRANDÃO HN. J.P. DAVID, et al., 2010; QIU S, H. SUN, et al. 2014; PELLETIER SW., 2001; VERPOORTE R., 1986; CORDELL GA, M. L. QUINN-BEATTIE, et al., 2001).

Os alcaloides apresentam um amplo espectro de atividades biológicas mencionadas que pode estar relacionado com sua estrutura química. A existência de alcaloides pode ser assinalada em diversos tipos de atividades biológicas investigadas. Assim podemos citar atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgico), emetina (amebicida e emético), castanospermina (antiviral), cafeína (estimulante do SNC), colchicina (tratamento da gota), codeína e noscapina (antitussígenos), efedrina (simpatomimético), camptotecina, vinblastina e vincristina (antitumorais), morfina (hipnoanalgésico), reserpina e protoveratrina A (antipertensivo), quinina (antimalárico), quinidina (depressor cardíaco), teobromina e teofilina (diuréticos), tubocurarina (miorreaxante), entre muitos outros (HENRIQUES et al., 1999).

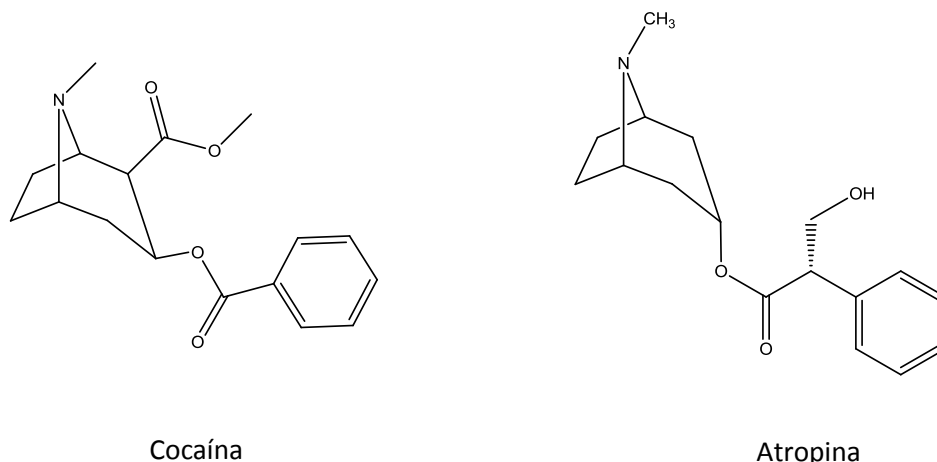
Alcaloides tropânicos possuem em comum uma estrutura bicíclica, denominada tropano 8-metil-8-azabicyclo (2,3,1)octano). O anel tropano é

propriamente constituído pelos anéis piperidina e pirrolidina. Dependendo da orientação alfa e beta de um grupamento hidroxila na posição C-3, este fornece dois isômeros geométricos: tropanol (tropina) e pseudotropanol (pseudotropina) (Figura 4, p.31) (SIMÕES et al., 1999; BRUCE, 2007).

**Figura 4 -** Formação do esqueleto básico dos alcaloides tropânicos



A esterificação do grupo hidroxila com ácidos aromáticos produz os alcaloides de maior importância farmacêutica e podem ser encontrados nas famílias Solonaceae (tipo atropina) e Erythroxylaceae (tipo cocaína) (Figura 5, p. 32). Estes dois alcaloides possuem grande importância na terapêutica atual e consagradamente se tornaram os protótipos no qual posteriormente a partir destes foram desenvolvidos análogos sintéticos, principalmente das classes de fármacos anticolinérgicos e anestésicos locais (SIMÕES et al., 1999; BRUCE, 2007).

**Figura 5** - Principais alcaloides das famílias Solonaceae e Erythroxylaceae.

## 2.7. Biogênese dos alcaloides pirrolidínicos e tropânicos

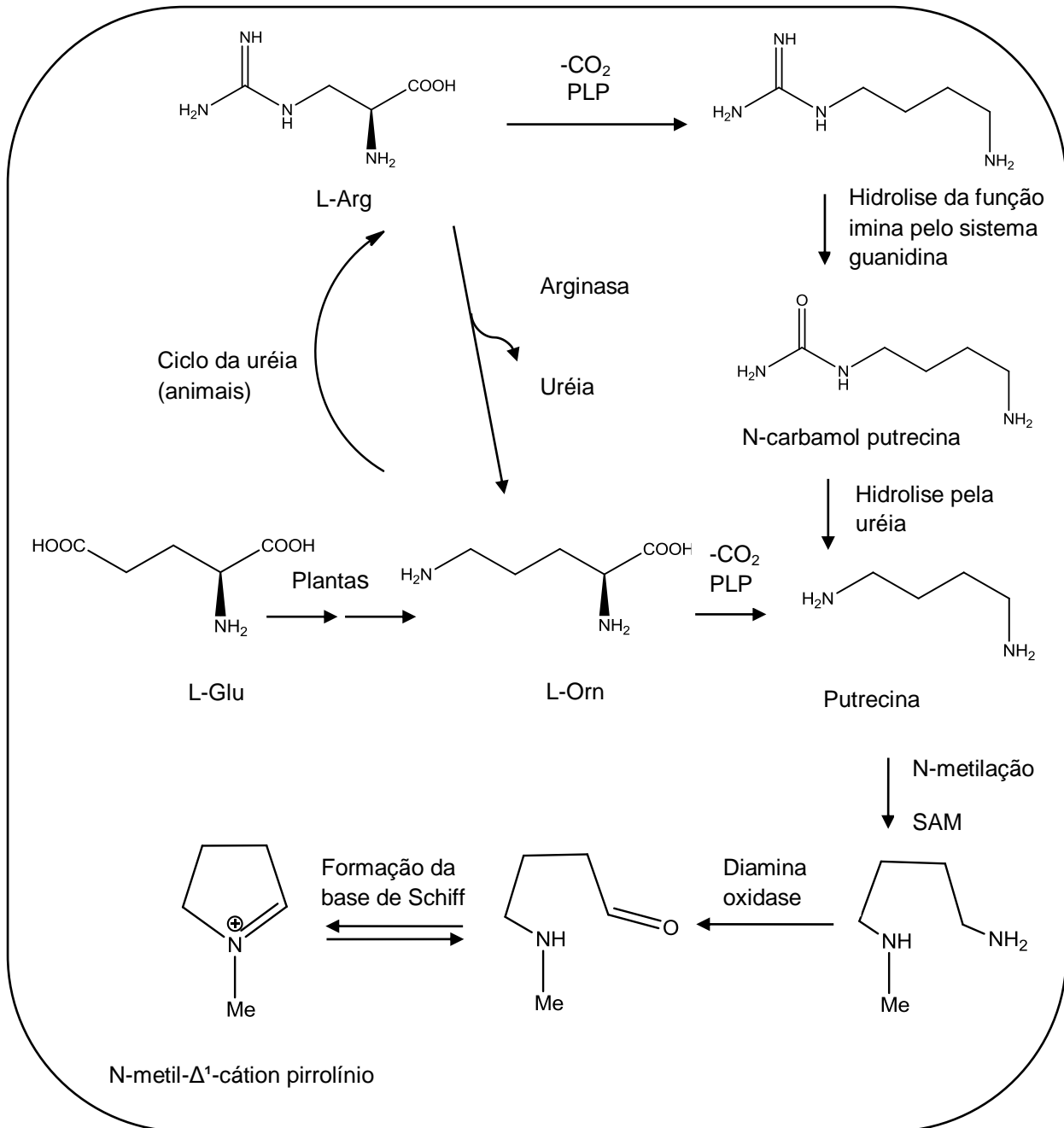
A formação do anel pirrolidínico ocorre através dos aminoácidos arginina ou ornitina. A L-ornitina é um aminoácido não protéico que faz parte do ciclo da uréia em animais, onde é produzido a partir da L-arginina, pela ação da enzima arginase. Nas plantas é formado principalmente de L-glutamato. A ornitina contém ambos os grupos  $\alpha$  e  $\delta$ -amino, sendo o nitrogênio do grupo  $\delta$ -amino incorporado nas estruturas dos alcaloides, juntamente com a cadeia de carbono (formada por 4 carbonos), exceto para o grupo carboxila. Assim, a ornitina fornece um bloco de construção  $C_4N$  ao alcaloide, principalmente na forma de um anel de pirrolidina, mas também como parte dos alcaloides tropânicos. Entretanto, a maioria dos outros precursores (aminoácidos) de alcaloides tipicamente fornece nitrogênio do seu grupo  $\alpha$ -amino.

O sistema de anéis pirrolidina é formado inicialmente como um cátion  $\Delta^1$ -pirrolíno. A biossíntese dos alcaloides pirrolidínicos se inicia com a descarboxilação do aminoácido ornitina pela enzima PLP-dependente produzindo a putrescina, a qual é então metilada pela enzima SAM para formar a N-metilputrescina. A desaminação da N-metilputrescina pela ação da enzima diamina oxidase produz um aldeído, como consequência disto, ocorre a formação de uma base de Schiff (imina) produzindo o cátion N-metil- $\Delta^1$ -pirrolíno. De fato, o aminoaldeído em solução aquosa é conhecido como uma mistura em equilíbrio

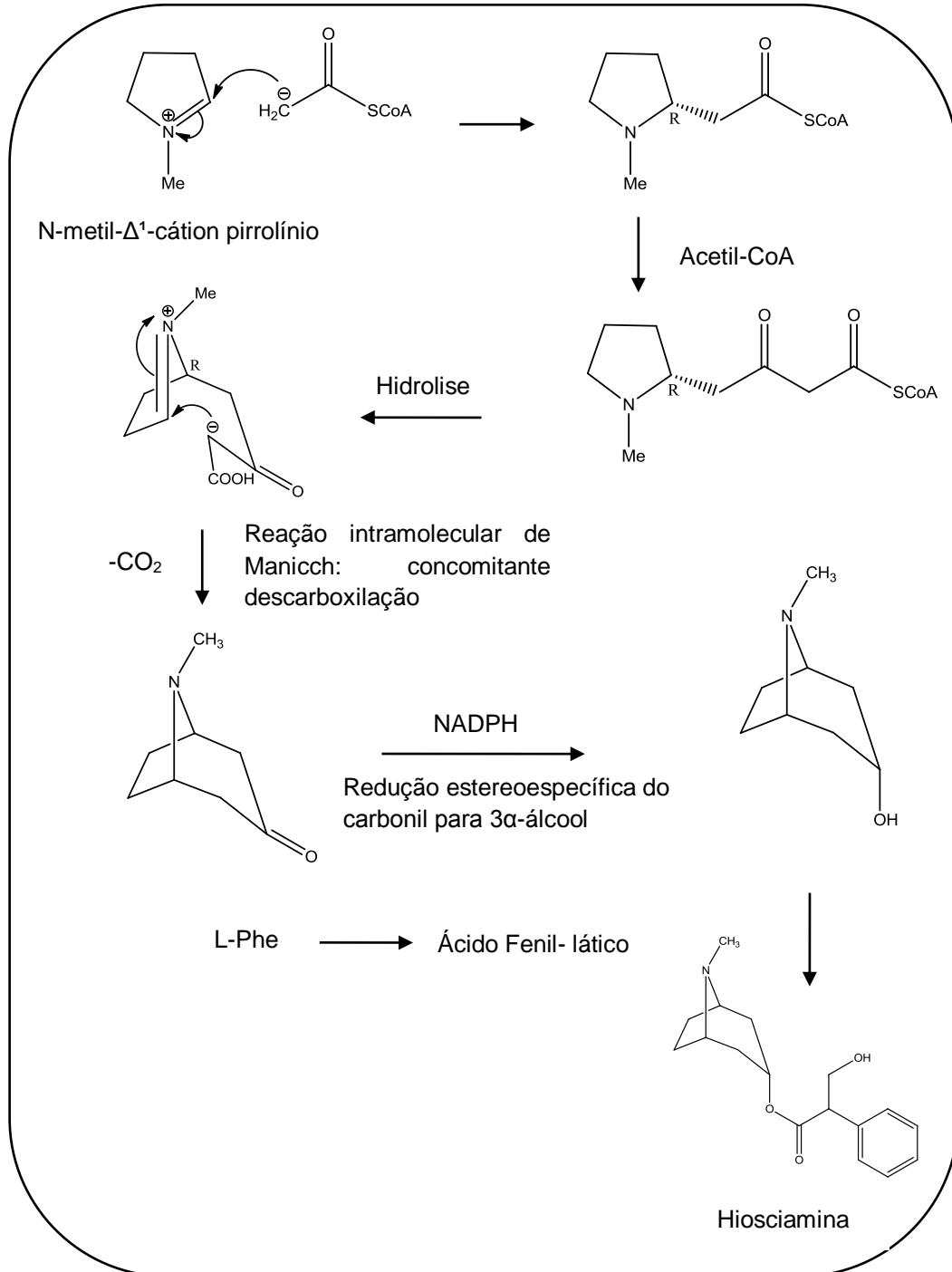
com a base de Schiff. Outra rota biossintética para a formação de um anel pirrolidínico se dá a partir da L-arginina, envolvendo inicialmente uma reação de descarboxilação, formando a agmatina, que após duas reações de hidrólise, cliva a porção de guanidina, produzindo assim a putrescina. Esta substância vai seguir a mesma rota biossintética, descrita anteriormente, até a formação do cátion N-metil- $\Delta^1$ -pirrolínio (Esquema 2, p. 34).

A rota biossintética para a formação dos alcaloides tropânicos se inicia com o ataque nucleofílico do ânion enolato do acetil-CoA em direção ao íon pirrólico, denominada de reação de Mannich. Esta reação pode formar produtos com estereoquímica R ou S. A segunda adição do ânion enolato do acetil-CoA se dá pela reação de condensação de Claisen, promovendo um aumento da cadeia lateral, e o produto formado é um anel pirrolidínico ligado a duas moléculas de acetil-CoA, retendo o grupo tioéster na segunda porção de acetil-CoA. Como na maioria dos alcaloides tropânicos, o carbono da carbonila que está presente na segunda porção de acetil-CoA é perdido pela reação de hidrólise, reação intramolecular de Mannich e descarboxilação, produzindo a tropinona que após uma reação de redução estereoespecífica da carbonila pela ação da coenzima NADPH produz a tropina. Em seguida a fenilalanina se converte no ácido fenil-lático que se esterifica com a tropina para formar a hiosciamina (Esquema 3, p. 35) (DEWICK, 2012).

Esquema 2 - Rota biossintética para a formação dos alcaloides pirrolidínicos.



Esquema 3 - Rota biossintética para a formação dos alcaloides tropânicos.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Contribuir com o estudo fitoquímico de plantas do Nordeste Brasileiro através do isolamento e identificação dos constituintes químicos das partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz da família Erythroxylaceae.

#### 3.2. Específicos

Isolar, purificar e identificar/determinar através de Cromatografia Clássica e Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear os constituintes químicos fixos das partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.

Caracterizar o derivado vegetal das partes aéreas de *Erythroxylum rimosum*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta e identificação do material vegetal

As cromatografias de adsorção em colunas foram realizadas em colunas de vidro cilíndricas, com variações nas dimensões, de acordo com a quantidade de amostra a ser aplicada, utilizando como fase estacionária, sílica gel da Merck, 7734, com partículas de 0,063-0,200 mm de diâmetro.

Também foram empregadas, cromatografias por exclusão molecular em colunas de vidro cilíndricas, cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada, utilizando como fase estacionária, Sephadex da Merck, com partículas de 0,063-0,200 de mm de diâmetro.

As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas cromatográficas da Merck, contendo sílica gel70com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, diâmetro de 20 x 20 cm e espessura de 0,25 mm.

Para a realização das técnicas cromatográficas foram utilizados os solventes orgânicos: Hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e metanol (MeOH), puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade, este ultimo (MeOH), não foi utilizado na forma pura, mas em mistura binária com o solvente acetato de etila até a proporção de 7:3 (AcOEt:MeOH), (Tabelas 1 e 2,p. 47).

As substâncias nas CCDA foram reveladas através da exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e em câmara saturada com vapores de iodo.

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN SYSTEM, operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e 125 MHz para carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C). As amostras a serem analisadas foram preparadas dissolvendo-as em solventes deuterados. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. As multiplicidades da RMN <sup>1</sup>H foram indicadas segundo a convenção: *s* (sinpleto), *sl* (sinpleto largo), *d* (dupleto), *dd* (duplo dupleto), *ddd* (duplo duplo dupleto), *dddd*

(duplo duplo duplo duplete), *t* (triplete), *tl* (triplete largo), *q* (quadruplete) e *m* (multiplete).

Para a caracterização do perfil cromatográfico das frações foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Tédia<sup>®</sup>, Brasil) e água ultra-pura obtida por sistema de purificação Milli-Q Millipore<sup>®</sup>. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de desgaseificação DGU-20A5, detector SPD-M20A arranjo de diodo (DAD). A coluna utilizada foi Kromasil<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna Security Guard Gemini<sup>®</sup> C18 (4 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm).

As partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* foram coletadas no município de Pirambu, estado de Sergipe no ano de 2016. E em seguida foi identificado pela Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da botânica do centro de ciências Biológicas da saúde da UFS sob identificação AS 37756.

#### **4.2. Obtenção da droga vegetal de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz**

As partes aéreas (1 Kg) foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de trituração em moinho mecânico, obtendo-se 480 g de pó seco (Esquema 4, p. 42).

#### **4.3. Procedimento para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz**

O material vegetal seco e triturado foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95%, em um recipiente de aço inoxidável denominado percolador. Foram feitos quatro processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução

etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador a uma temperatura média de 40°C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que pesou 105 g (Esquema 4, p. 42).

#### **4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) do material vegetal de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz**

Para obtenção das fases, foram utilizadas (70 g) do extrato etanólico bruto, este foi dissolvido numa mistura de metanol:água (7:3 v/v) e homogeneizado, obtendo-se uma solução aquosa. Esta solução foi submetida a um processo de partição em ampola de separação, utilizando os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. As respectivas fases foram tratadas com sulfato de sódio anidro para secagem, posteriormente foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40°C. Fornecendo as fases, hexânica (4,0 g), diclorometano (2,6 g) e acetato de etila (4,6 g), (Esquema 4, p. 42).

##### **4.4.1. Fracionamento cromatográfico das fases acetato de etila e diclorometano das folhas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz**

A fase acetato de etila foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel, e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias (Tabela 1, p. 44), em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se assim um total de 30 frações. Essas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (R<sub>f</sub>), após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas em grupos. A reunião das frações de 23 a 25 foi submetida à análise de Ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-APT resultando na substância codificada como Er-1 (Esquema 5, p. 46). A fase diclorometano foi submetida à mesma condição cromatográfica descrita anteriormente (Tabela 2, p. 44). Obtendo-se assim um total de 55 frações. Essas frações foram monitoradas

por CCDA e reunidas de acordo com seus Rfs, após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas em grupos. A reunião das frações de 53 a 55 foi submetida à análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -APT resultando na substância codificada como Er-2 (Esquema 6, p. 43).

#### **4.5. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Semi-preparativo de Er-2 da fase diclorometano.**

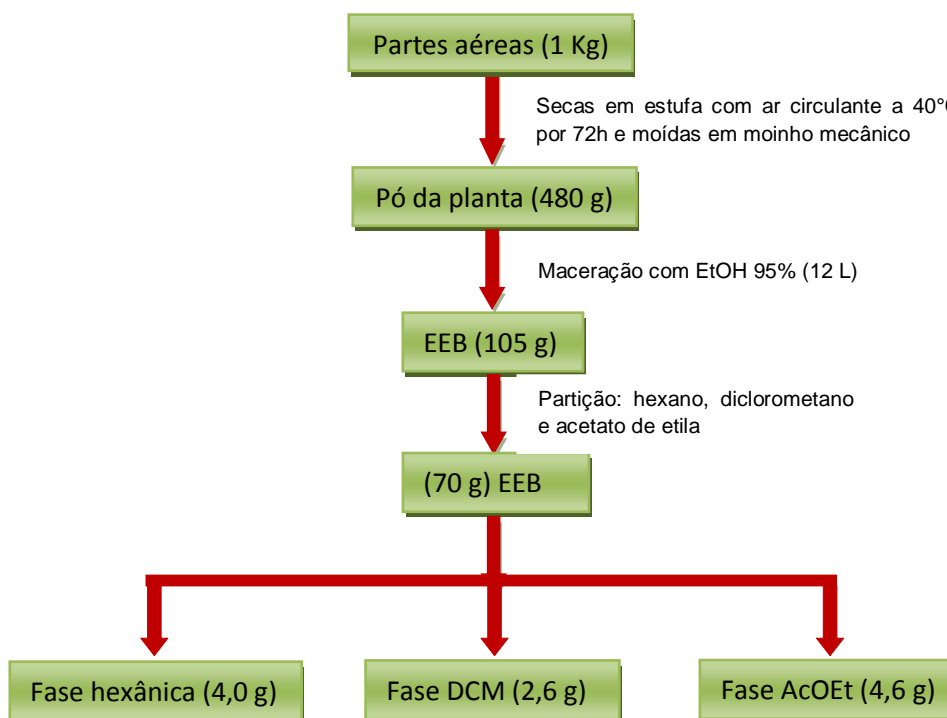
Para a preparação da amostra, pesou-se em um tubo de eppendorf, 1 mg de Er-2, em seguida foi adicionado no eppendorf 500  $\mu\text{L}$  de água e 500  $\mu\text{L}$  de metanol e posteriormente sonicado por 20 minutos para a completa dissolução. A fase móvel foi composta por 500 ml de água Milli-QMillipore<sup>®</sup> acidificada com 500  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico com concentração de 0,1 %. Em seguida foi desenvolvido o método analítico com o objetivo de obter o melhor perfil cromatográfico. A eluição foi realizada em modo gradiente, sendo o método composto por MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  acidificada (0,1% de ácido fórmico) na proporção de 20 a 60% MeOH em 60 min, 60 a 75 % em 10 min, 75 a 100% em 20 min, 100 a 20% em 5 min, permanecendo em modo isocrático até 120 min. O fluxo da fase móvel foi de 0,6 ml/min. Posteriormente foi realizado a transposição do método analítico para o CLAE semi-preparativo com o objetivo de separar e coletar os analitos da amostra.

Preparação da amostra para a separação na CLAE semi-preparativa: a fração Er-2 com 17,8 mg foi transferida para um tubo de eppendorf e em seguida foi adicionado 1 ml de metanol, sonicado por 40 min e centrifugado por 5 min em 15000 RPM. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e realizados as injeções. O fluxo utilizado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) semi-preparativa foi de 2,8 ml/min, sendo realizado ao todo 10 injeções de 100  $\mu\text{L}$  cada. Ao final da décima corrida cromatográfica foram coletados 3 picos (Figuras 21 e 22, p. ), que foram concentrados em rotaevaporador e submetidos a análise em Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT.

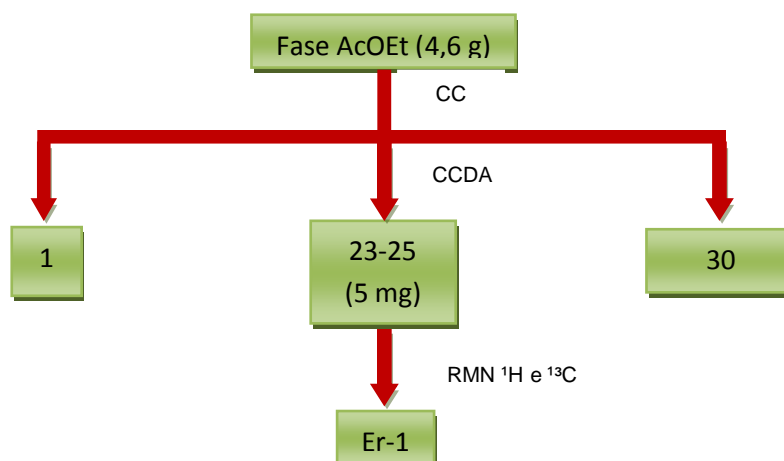
#### **4.6. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo de Er-1 da fase acetato de etila.**

Para a preparação das amostras, pesou-se em tubos de eppendorf 1 mg da reunião das frações de 14 a 16 (Amostra 1), 17 a 19 (Amostra 2) e 23 a 25 (Amostra 3), sendo estas frações selecionadas para a separação na CLAE por terem as maiores massas. Em seguida, foram adicionados 1 ml de MeOH nas três amostras separadamente e solubilizado por 20 minutos no sonificador, após esse tempo o conteúdo de cada eppendorf foi filtrado em um filtro com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . Após a preparação das amostras, as mesmas foram injetadas no equipamento de CLAE-DAD analítico. Sendo a fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (ac. fórmico 0,1 %) com fluxo da fase móvel de 0,6 ml/min e um volume de injeção de 20  $\mu\text{l}$ . A primeira injeção foi realizada no método exploratório composto por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (0,1% de ácido fórmico) em modo gradiente de 5 a 95% de MeOH. Após análise do cromatograma foi proposto que o método descrito anteriormente deveria passar por modificações para se obter um melhor perfil cromatográfico. Sendo assim, o novo método foi composto por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (0,1% de ácido fórmico) na proporção de 40 a 80% de MeOH em 60 min, 80 a 100 % em 10 min, permanecendo em modo isocrático 100% em 20 min, 100 a 40% em 5 min, permanecendo em modo isocrático por 20 min, totalizando 115 min de corrida cromatográfica. Após o desenvolvimento do método analítico a fração escolhida para a separação na CLAE preparativo foi 23 a 25 por ter a melhor separação e resolução dos picos na fase de desenvolvimento do método. Para a preparação da amostra, pesou-se 600 mg da fração 23 a 25 que foi dividida igualmente em 4 eppendorfs, sendo assim cada eppendorf comportou 150 mg. Em seguida foi adicionado em cada tubo 1000  $\mu\text{l}$  de MeOH, ficando na concentração de 150 mg/ml. Foi sonificado por 40 min, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para outros eppendorfs. O volume de injeção feito no HPLC preparativo foi de 200  $\mu\text{l}$  com fluxo da fase móvel de 8 ml/min. Foram realizadas 12 injeções de 200  $\mu\text{l}$ . Ao final foram coletados 9 picos (Figura 22, p. 61). Posteriormente foram concentradas em rota evaporador e submetidas á análises de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-APT para identificação/determinação estrutural.

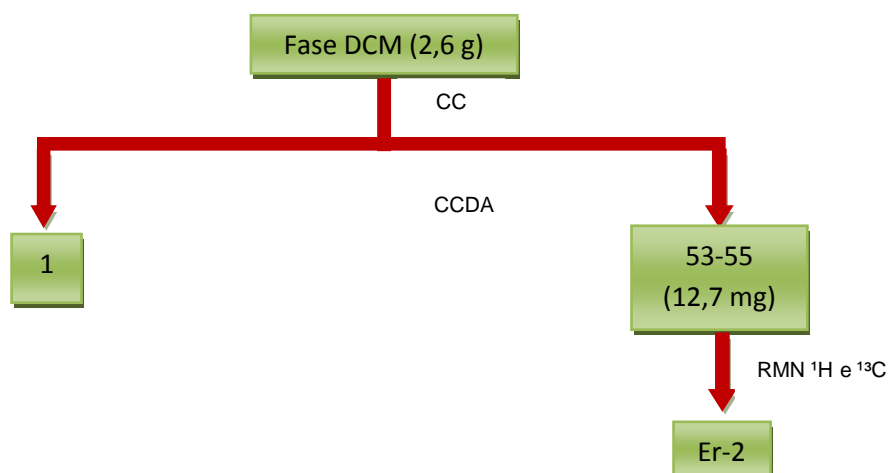
**Esquema 4** - Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.



**Esquema 5** - Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.



**Esquema 6** - Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano das folhas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.



**Tabela 1** - Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz.

Frações	Solventes	Proporção (%)
Desengordurar	Hexano	100
1	Hexano:CHCl <sub>3</sub>	50:50
2	CHCl <sub>3</sub>	100
3-4	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50
5-13	AcOEt	100
14-16	AcOEt:MeOH	95:5
17-20	AcOEt:MeOH	90:10
21-22	AcOEt:MeOH	85:15
23-24	AcOEt:MeOH	80:20
25-30	AcOEt:MeOH	70:30

**Tabela 2** - Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz.

Frações	Solventes	Proporção (%)
Desengordurar	Hexano	100
1	Hexano:AcOEt	90:10
2-13	Hexano: AcOEt	80:20
14-16	Hexano: AcOEt	70:30
17-20	Hexano: AcOEt	60:40
21-28	Hexano: AcOEt	50:50
29	Hexano: AcOEt	40:60
30-33	AcOEt	100
34-35	AcOEt:MeOH	95:5
36-41	AcOEt:MeOH	90:10
42-43	AcOEt:MeOH	80:20
44-45	AcOEt:MeOH	75:25
46-49	AcOEt:MeOH	65:35
50-51	AcOEt:MeOH	60:40
52-55	AcOEt:MeOH	50:50

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo Fitoquímico das partes aéreas de *Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz.

#### 5.1.1. Identificação estrutural de Er-1

A substância codificada como Er-1 foi isolada como um sólido marrom com 5 mg. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT obtido a 125 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Figura 6, p. 48) mostrou a presença de 29 sinais. Destes 10 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 15 a carbonos metínicos, 1 a carbono metilênico, 1 carbono metílico e 2 carbonos metoxílicos. Os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  162,8; 99,2; 167,5 e 93,3 foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-5; C-6; C-7 e C-8 respectivamente, sugerindo-se tratar do padrão de substituição do anel A de flavonas oxigenada sem C-5 e C-7. Os sinais em  $\delta_c$  117,4; 111,9 e 123,3 correspondentes aos carbonos C-2'; C-5' e C-6' respectivamente, são característicos do anel B de flavonas. Os sinais em  $\delta_c$  158,4; 136,0 e 179,5 foram atribuídos aos carbonos C-2; C-3 e C-4 respectivamente, sendo condizente com uma flavona oxigenada em C-3. De acordo com os dados de  $^{13}\text{C}$  foi possível também sugerir a presença de duas unidades osídicas, sendo uma glicose e uma ramnose, isto foi devido aos sinais dos carbonos anoméricos em  $\delta_c$  102,4 e 101,4 e ainda para o carbono metilênico em 68,6 e carbono metílico em  $\delta_c$  17,9, e, além do conjunto de sinais entre  $\delta_c$  69,7 e 78,2 sugeriram a presença da rutinose. Os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  56,5 e 54,4 foram atribuídos a duas metoxilas (Tabela 3, p. 47).

No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 7, p. 48) observou-se dois dupletos em  $\delta_H$  6,60 e 6,35 ( $J = 2,0$  Hz), característicos de hidrogênios H-8 e H-6 de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7, além de um duplo duplete em  $\delta_H$  7,78 ( $J = 8,0$  e  $2,0$  Hz), um duplete em  $\delta_H$  7,03 ( $J = 9,6$  Hz) e um duplete em  $\delta_H$  7,70 ( $J = 2,0$  Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-6'; H-5' e H-2', respectivamente do anel B de flavona sem um sistema ABX. Complementarmente, foi observado no espectro um duplete em  $\delta_H$  5,19 ( $J = 7,5$  Hz) e um sinpleto largo em  $\delta_H$

4,57, correspondente aos hidrogênios anoméricos da glicose e rhamnose respectivamente. A presença de um duplete em  $\delta_H$  3,80 (d,  $J = 9,6$  Hz) e outro em 1,09 (d,  $J = 6,0$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos e metílicos respectivamente. Esses dados corroboram com uma unidade osídica glicose ligada a rhamnose. A constante de acoplamento  $J = 7,5$  Hz foi condizente com uma unidade  $\beta$ -rutinosídeo (Tabela 3, p. 47).

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC de Er-1 (Figura 8, p. 49) dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,35 (H-6), 6,60 (H-8) e o sinal dos hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,94 com o carbono em  $\delta_C$  167,5 confirmou a posição de uma Metoxila em C-7. As correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  7,77 (H-6');  $\delta_H$  7,70 (H-2');  $\delta_H$  7,04 (H-5') e os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  3,88 com o carbono em  $\delta_C$  151,8 confirmaram a posição de outra Metoxila em C-4'. Foi possível também observar no espectro uma correlação dos hidrogênios em  $\delta_H$  3,80 (H-6'') com o carbono em  $\delta_C$  101,4 (C-1'''), corroborou com a ligação do carbono C-1''' da rhamnose com o carbono C-6'' da glicose. A correlação do hidrogênio  $\delta_H$  5,19 (H-1'') com o carbono C-3 em  $\delta_C$  136,0 a três ligações confirmou a inserção da unidade glicosídica em C-3. Após estas análises, foi possível concluir que Er-1 trata-se da 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo, um flavonoide glicosilado que está sendo relatado pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 3 - Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-APT de Er-1 e da literatura (500 x 125 MHz em CD<sub>3</sub>OD).

Er-1			Albuquerque et al., 2014	
C	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$
2	158,44	-	156,30	-
3	136,00	-	134,00	-
4	179,53	-	177,40	-
5	162,80	-	160,80	-
6	99,20	6,35 (d, $J = 2,0$ Hz)	97,90	6,36 (d, $J = 2,0$ Hz)
7	167,46	-	165,10	-
8	93,27	6,60 (d, $J = 2,0$ Hz)	92,20	6,67 (d, $J = 2,0$ Hz)
9	159,28	-	156,50	-
10	104,26	-	104,80	-
1'	124,24	-	122,30	-
2'	117,44	7,70 (d, $J = 2,0$ Hz)	115,70	7,55 (d, $J = 2,0$ Hz)
3'	146,27	-	145,70	-
4'	151,78	-	150,00	-
5'	111,93	7,04 (d, $J = 8,5$ Hz)	111,10	7,04 (d, $J = 8,5$ Hz)
6'	123,27	7,77 (dd, $J = 2,5; 8,5$ Hz)	121,50	7,72 (dd, $J = 2,5; 8,5$ Hz)
1''	102,39	5,19 (d, $J = 7,5$ Hz)	101,10	5,38 (d, $J = 7,5$ Hz)
2''	75,73	3,40 (m)	74,00	3,22m
3''	77,26	3,45 (m)	75,70	3,25 m
4''	72,09	3,59 (m)	70,30	3,39 (m)
5''	78,15	3,42 (m)	76,40	3,24 (m)
6''	68,58	3,80 (d, $J = 9,6$ Hz)	66,80	3,70 (d, $J = 11,0$ Hz)
1'''	101,40	4,57 sl	100,70	4,39sl
2'''	72,27	3,51 (m)	70,50	3,29m
3'''	71,48	3,70 (m)	69,80	3,08m
4'''	73,87	3,26 (m)	71,80	3,07 (m)
5'''	69,73	3,47 (m)	68,10	3,26 (m)
6'''	17,88	1,09 (d, $J = 6,0$ Hz)	17,60	0,97 (d, $J = 6,0$ Hz)
O-CH <sub>3</sub>	54,40	3,89 s	55,60	3,88 s
O-CH <sub>3</sub>	56,50	3,95 s	56,10	3,88 s

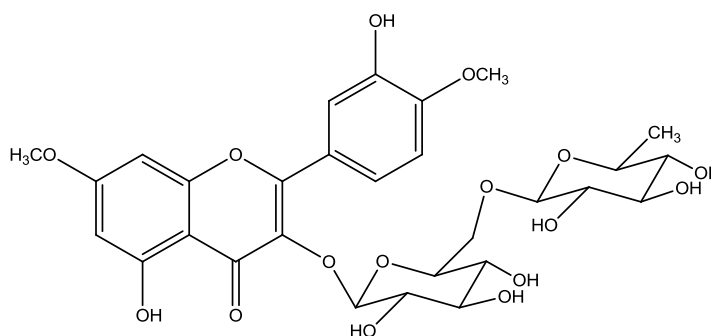
4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo

Figura 6 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de Er-1.

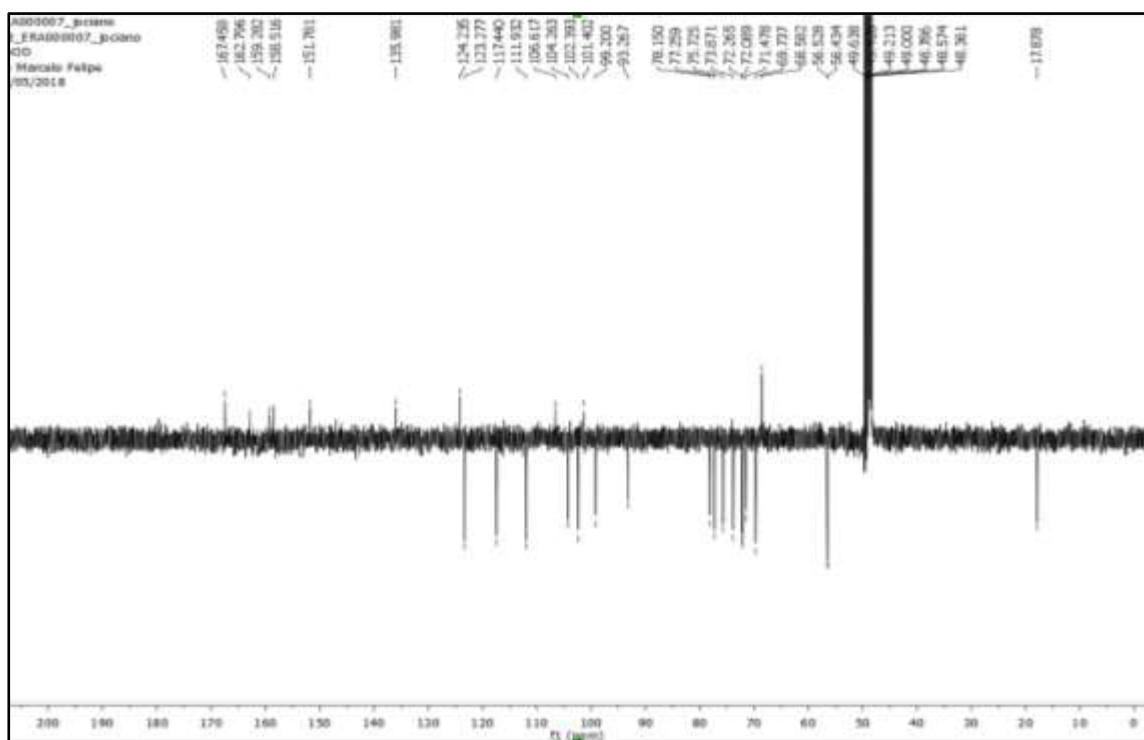


Figura 7 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Er-1.

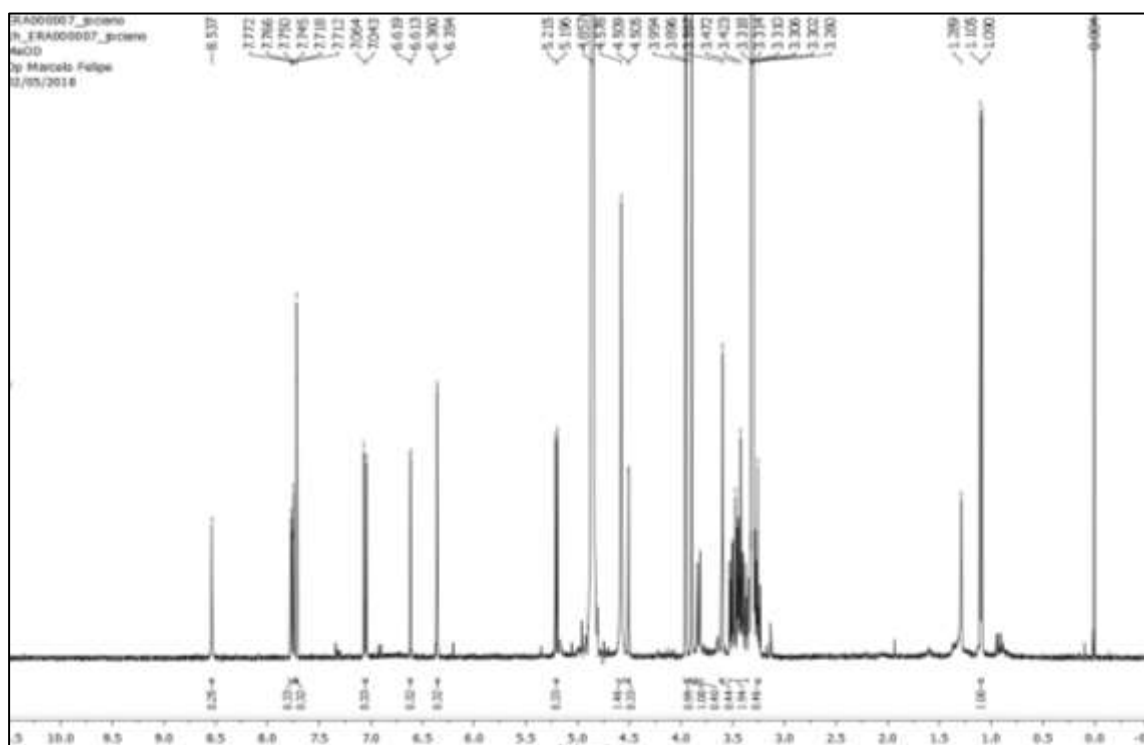
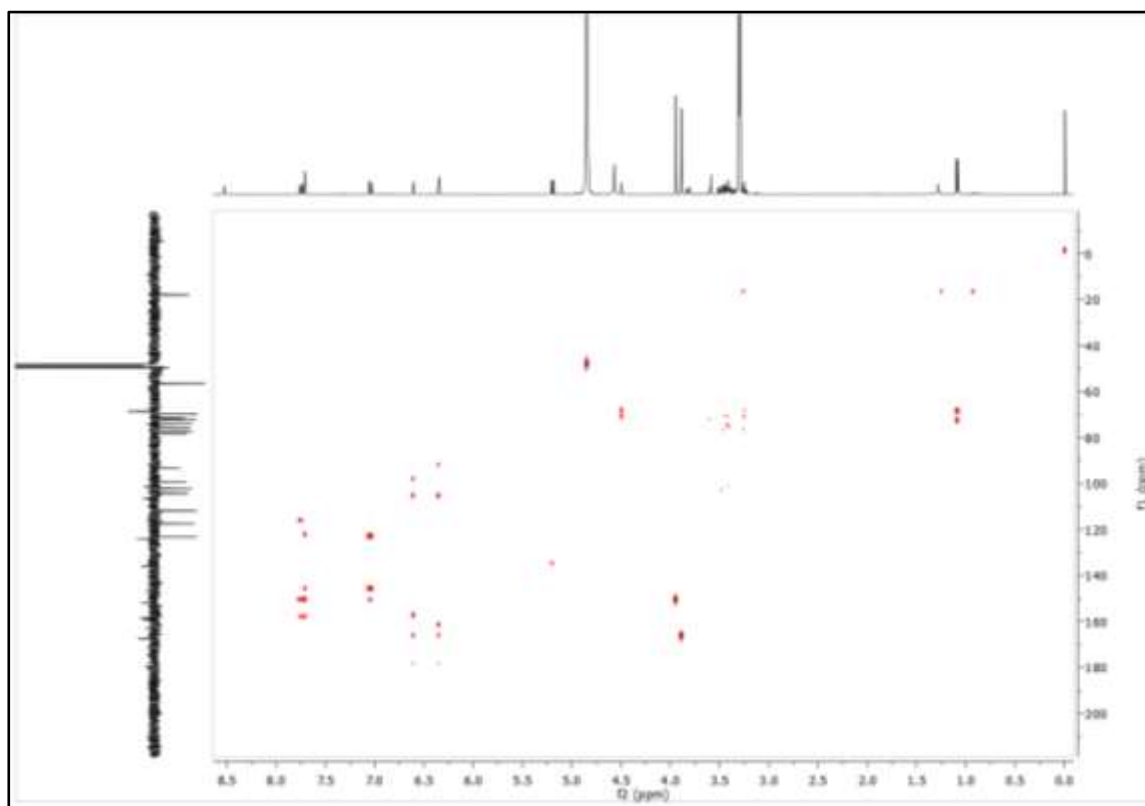


Figura 8 - Mapa de contorno HMBC da substância Er-1 (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz).



### 5.1.2. Identificação estrutural de Er-2

A substância codificada como Er-2 foi isolada como um sólido marrom com 12,7 mg. O espectro de RMN<sup>13</sup>C-APT (Figura 9, p. 53) mostrou a presença de 6 sinais. Destes 2 foram atribuídos a carbonos metínicos, 2 a carbonos metilênicos, 1 a carbono metílico e 1 carbono não hidrogenado. Os sinais em  $\delta_C$  71,9 e 70,9 foram atribuídos aos carbonos metínicos 2 e 4 respectivamente. Também foi observado os sinais em  $\delta_C$  40,3 e 64,2 que foram atribuídos aos carbonos metilênicos 3 e 5, e um sinal em  $\delta_C$  44,0 que foi atribuído a metila ligada ao nitrogênio. Todos esses deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C foram comparados com a literatura (Winkler T., 2006) sugerindo-se tratar de um esqueleto pirrolidínico (Tabela 4, p. 55).

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 11, p. 54) foi possível observar um sinpleto em  $\delta_H$  2,98 (3H) e sinais de prótons alifáticos acoplados geminalmente em  $\delta_H$  2,43, 2,19, 3,06 e 3,80, atribuídos aos hidrogênios 3a, 3b, 5a e 5b respectivamente, sugerindo-se tratar de um grupo N-metil e dois metilenos alifáticos. Observou-se também os sinais em  $\delta_H$  4,04 (H-2) e 4,48 (H-4) atribuídos aos hidrogênios metínicos, estes deslocamentos químicos foram devidos à ligação do H-2 ao nitrogênio e H-4 ao oxigênio (Tabela 4, p. 52).

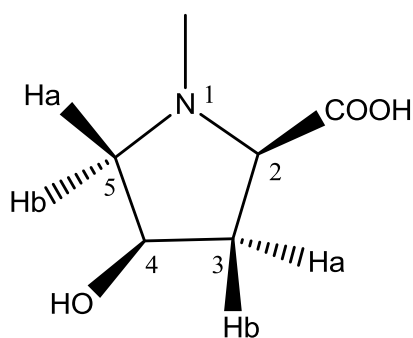
No espectro de HMBC (Figura 13, p. 55) foi possível observar no mapa de contorno correlações do H-2 ( $\delta_H$  4,04) e Hb-3 ( $\delta_H$  2,19) com o carbono do ácido (COOH) confirmando que a substância contém um grupamento ácido carboxílico. A correlação do Hb-3 com o C-2 ( $\delta_C$  71,9), juntamente com a correlação direta no HSQC do H-2 com o C-2, corroborou com a inserção do grupo ácido no carbono dois (Figura 15, p. 56). As correlações do Ha-3 (2,43) e Ha-5 (3,06) com C-4 (70,9) e o H-2 e Hb-5 (3,80) com o N-metil (44,0) confirmaram a inserção da hidroxila no carbono 4 e do grupo N-metil ligado aos carbonos 2 e 5, respectivamente.

No cosy (Figura 16, p. 56) foram observados correlações vicinais do H-2 com Ha-3 e Hb-3, e H-4 com Ha-3, Hb-3, Ha-5 e Hb-5, podendo-se inferir que C-2 e C-4 são carbonos metínicos. As correlações geminais do Ha-3 com Hb-3 e Ha-5 com Hb-5, foram compatíveis com os carbonos metilênicos (C-3 e C-5).

A estereoquímica de Er-2 foi definida pelo valor das constantes de acoplamento. A configuração espacial do grupo ácido foi confirmada pelos acoplamentos do, Ha-3 com H-2 (Equatorial-Axial,  $J = 7,6$  Hz) e Hb-3 com H-2 (Axial-Axial,  $J = 10,5$  Hz), assim, foi definido que o grupamento ácido se encontra na configuração Beta. Os acoplamentos entre Ha-5 com H-4 (Equatorial-Equatorial,  $J = 2,0$  Hz) e Hb-5 com H-4 (Axial-Equatorial,  $J = 4,5$  Hz) definiu a configuração da hidroxila em beta (Tabela 4, p. 52 e Figura 19, p. 59). Esta estereoquímica foi corroborada pela comparação dos valores da constante de acoplamento com os dados da literatura, (SCIUTO et al., 1983; HARAGUCHI et al., 2003; NAKAYAMA et al., 2003) onde pode se observar que a configuração espacial dos grupos ácido carboxílico e hidroxila são beta (Figura 18, p. 58). Após estas análises, foi possível concluir que Er-2 trata-se da 4-hidroxi-1-metil-2-pirrolidina ácido carboxílico, um alcaloide pirrolidínico que está sendo relatado pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 4 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -APT de Er-2 e da literatura (500 x 125 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Er-2			Winkler., 2006	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. ( <i>J</i> em Hz)
COOH		-	170,2	-
NCH <sub>3</sub>	44,0	2,98 (s)	43,4	2,96 (s)
2	71,9	4,04 (dd, <i>J</i> = 7,5; 10,5 Hz)	69,7	4,05 (dd, <i>J</i> = 7,5; 10,5)
3	40,3	-	38,7	-
4	70,9	4,48 (m)	69,1	4,48 (dddd, <i>J</i> = 1,8; 2,1; 4,8; 4,8;)
5	64,2	-	62,4	-
Ha-3	-	2,43 (ddt, <i>J</i> = 2,0; 7,6; 14 Hz)	-	2,43 (ddt, <i>J</i> = 1,8; 7,5; 13,5 Hz)
Hb-3	-	2,19 (ddd, <i>J</i> = 4,8; 10,8; 14 Hz)	-	2,20 (ddd, <i>J</i> = 4,8; 10,5; 13,5 Hz)
Ha-5	-	3,06 (dt, <i>J</i> = 2,0; 12,5 Hz)	-	3,10 (dd, <i>J</i> = 2,1; 12,6 Hz)
Hb-5	-	3,80 (dd, <i>J</i> = 4,5; 12,5 Hz)	-	3,82 (dd, <i>J</i> = 4,8; 12,6 Hz)



4-hidroxi-1-metil-2-pirrolidina ácido carboxílico

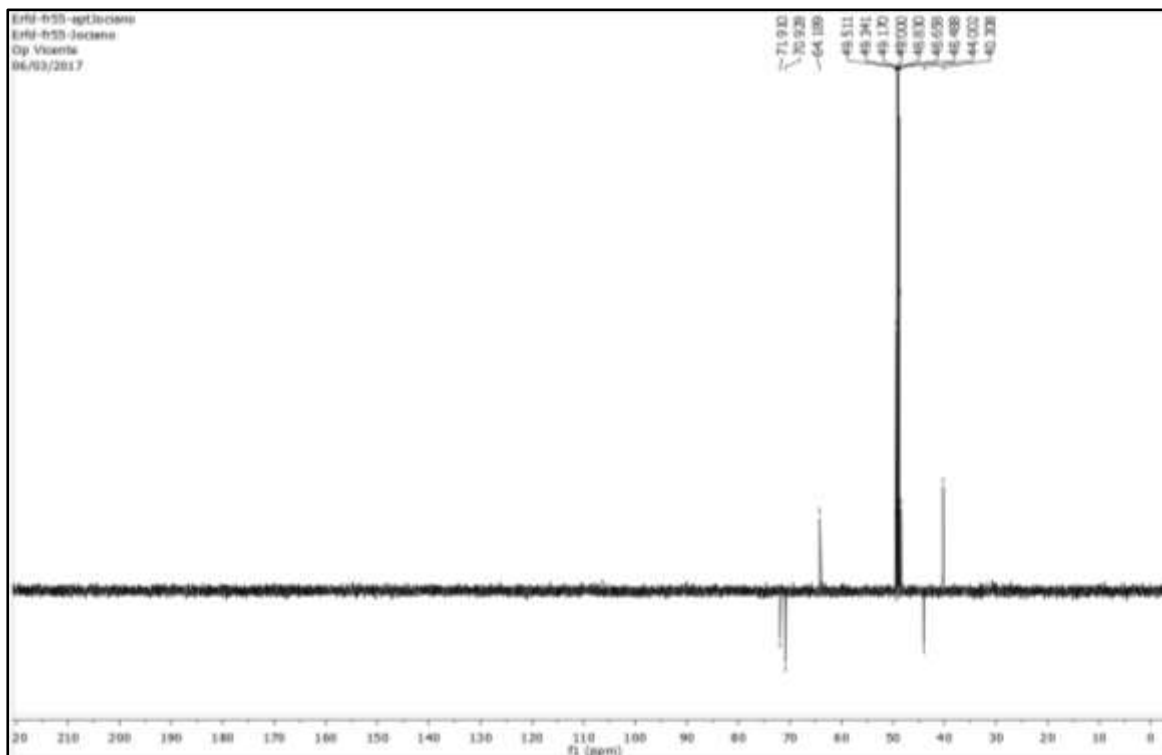
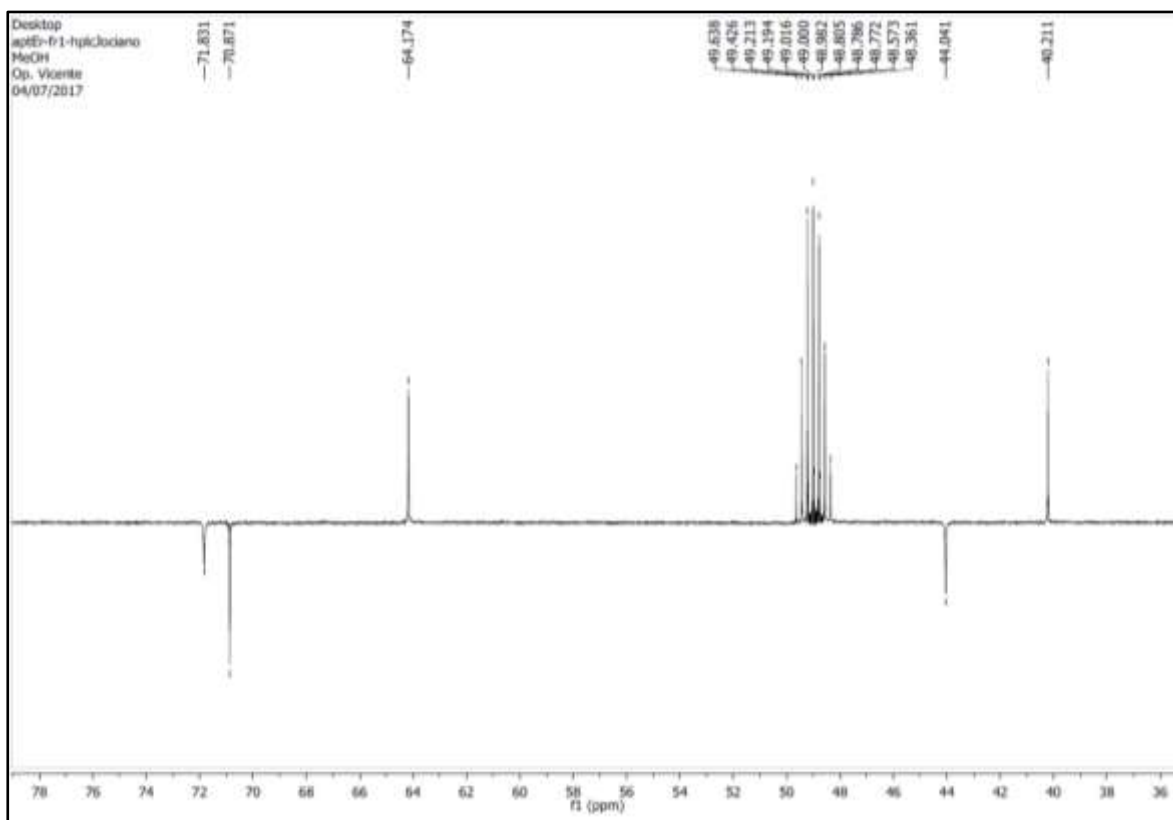
Figura 9 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de **Er-2**.Figura 10 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de **Er-2** na região de 36-78 ppm.

Figura 11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Er-2.

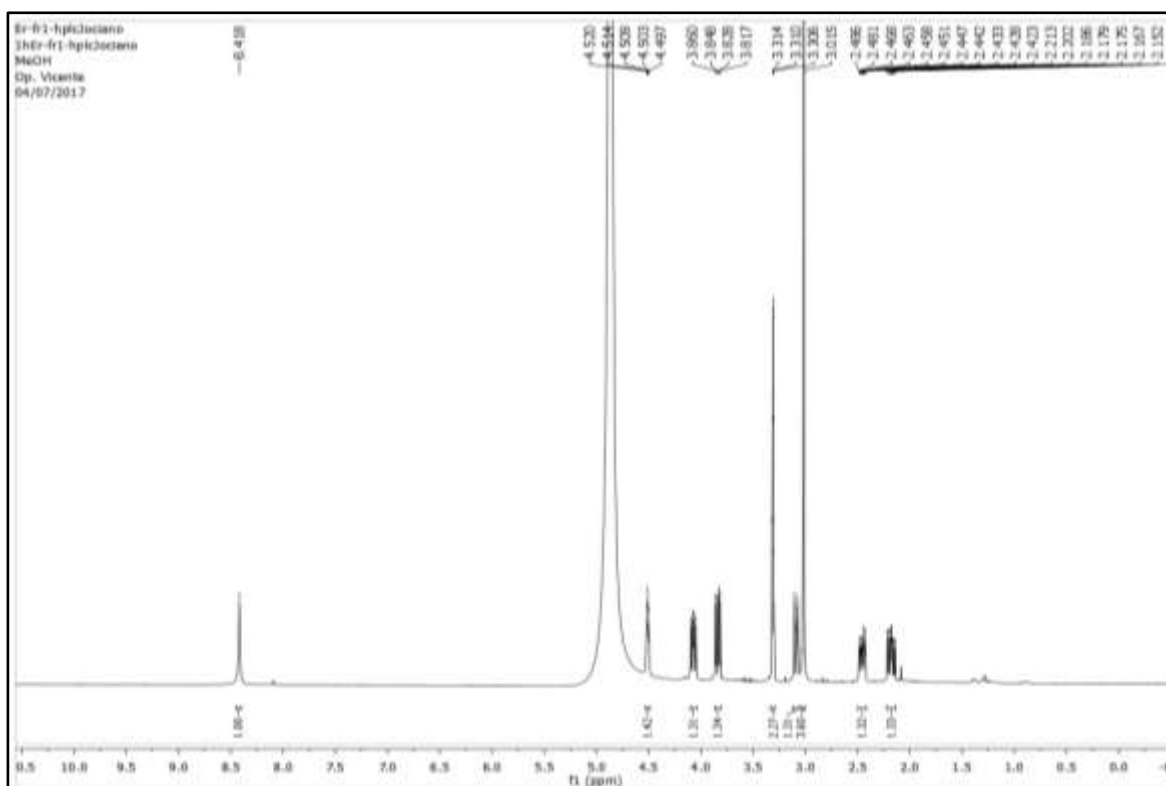


Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Er-2 na região de 2,0-4,5 ppm.

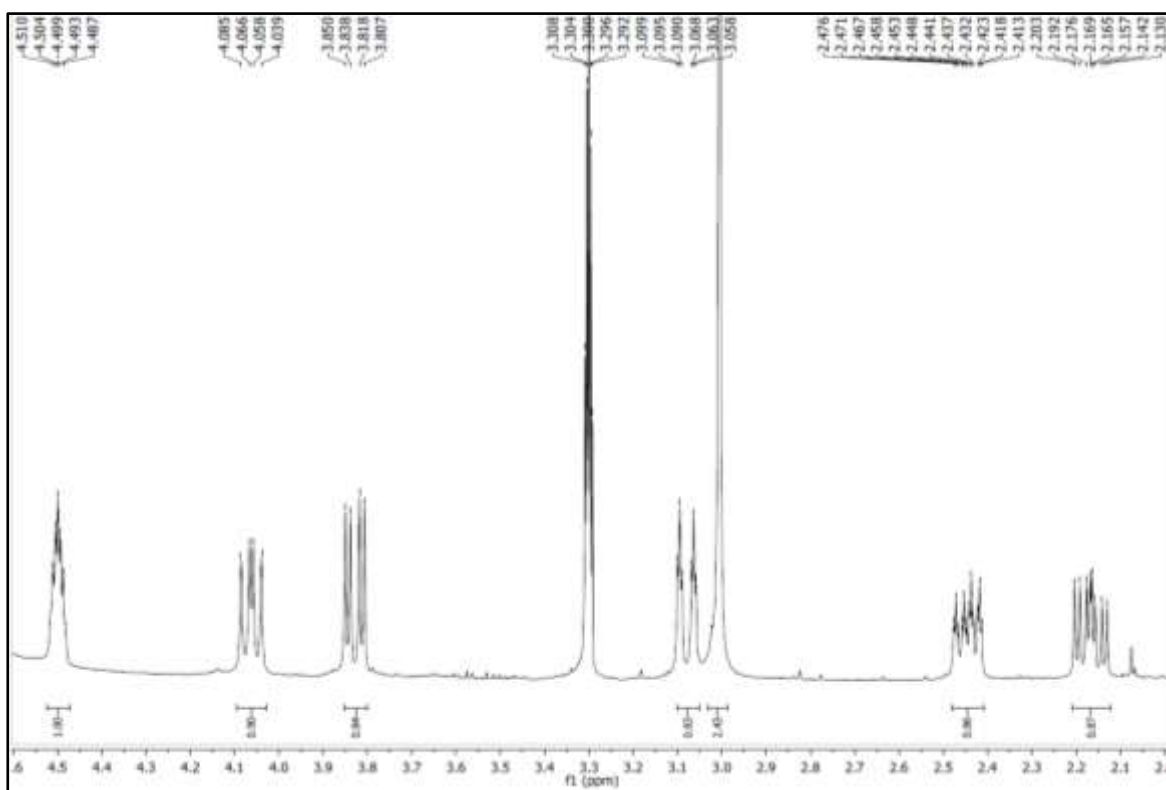


Figura 13 – Mapa de contorno HMBC da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz).

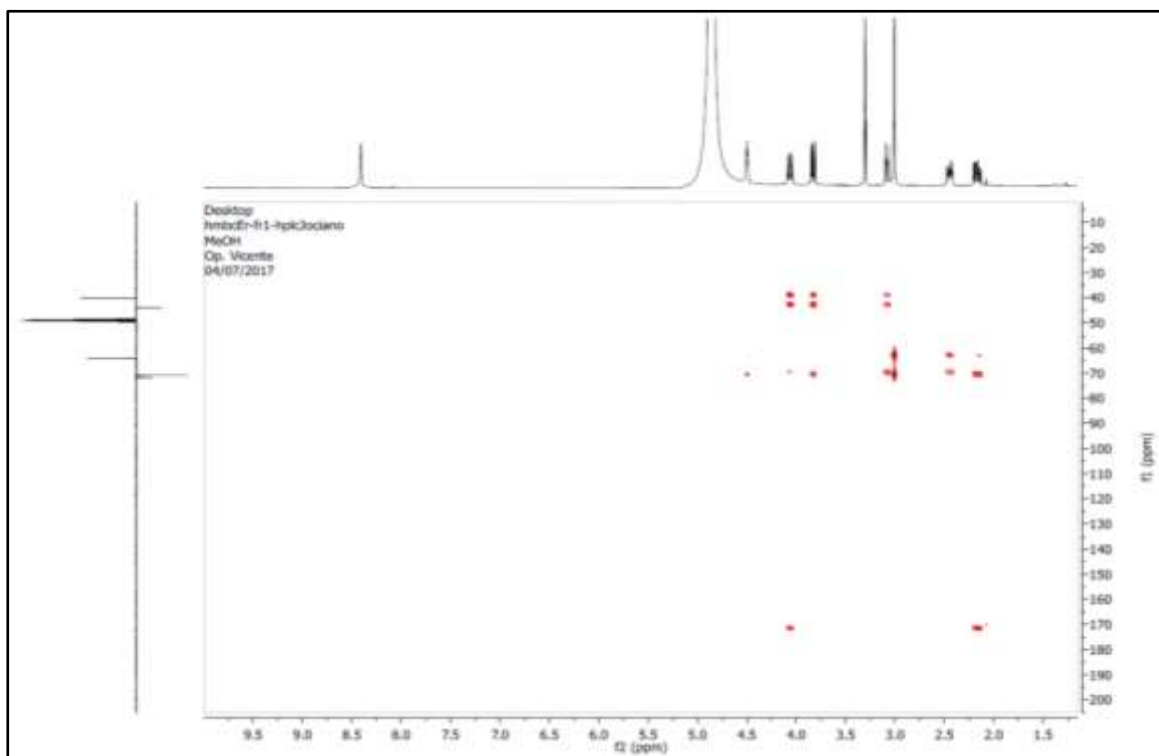


Figura 14 – Expansão do Mapa de contorno HMBC da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz) na região de 1,5-9,5 ppm x 10-200 ppm.

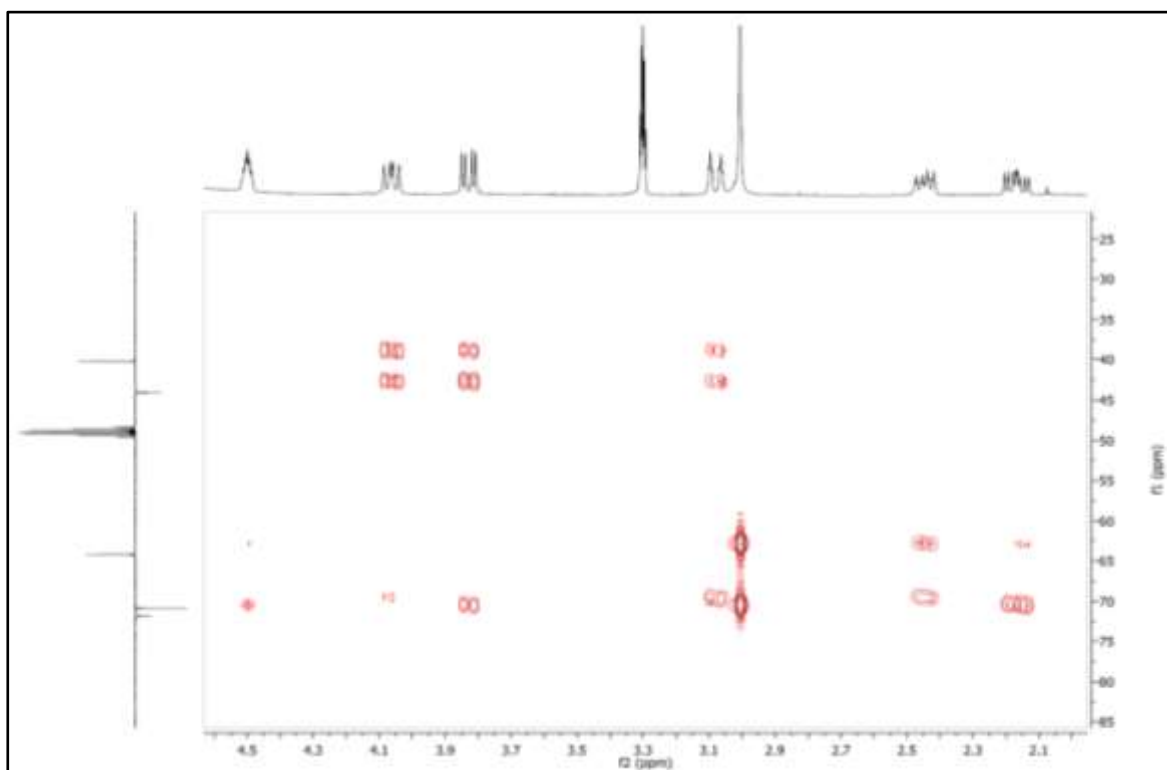


Figura 15 - Mapa de contorno HSQC da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz).

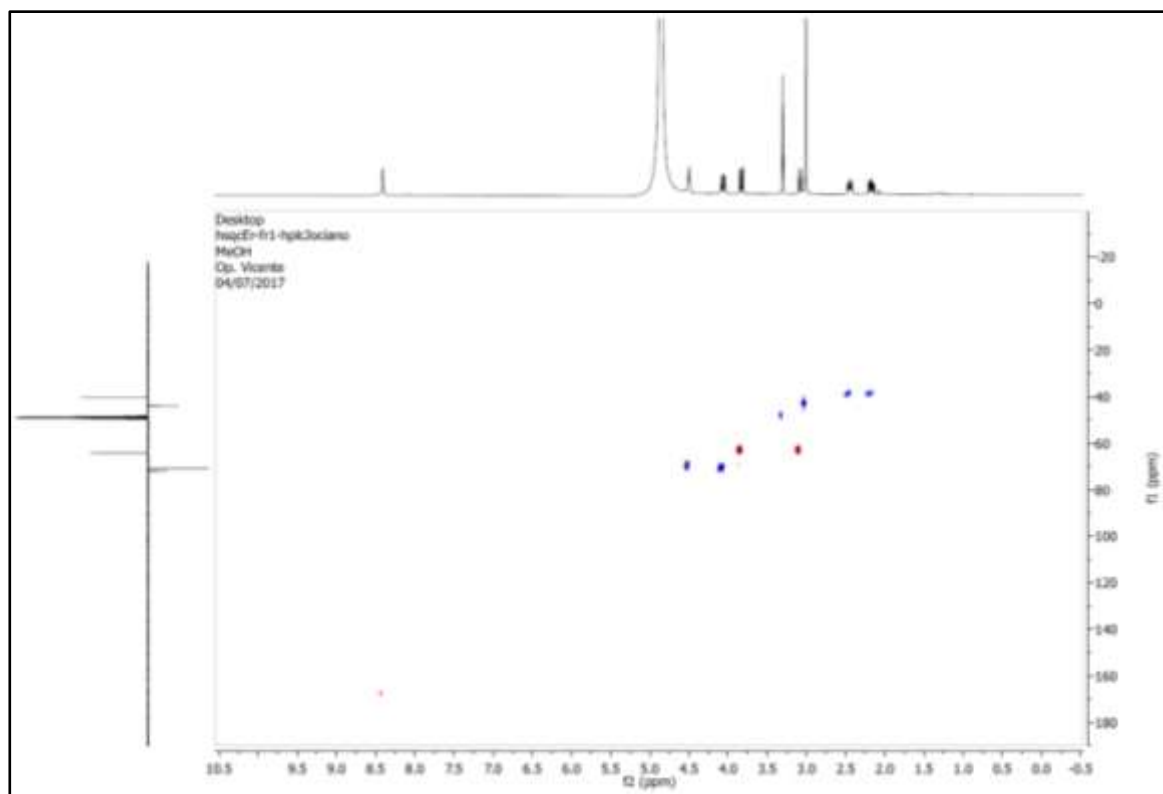
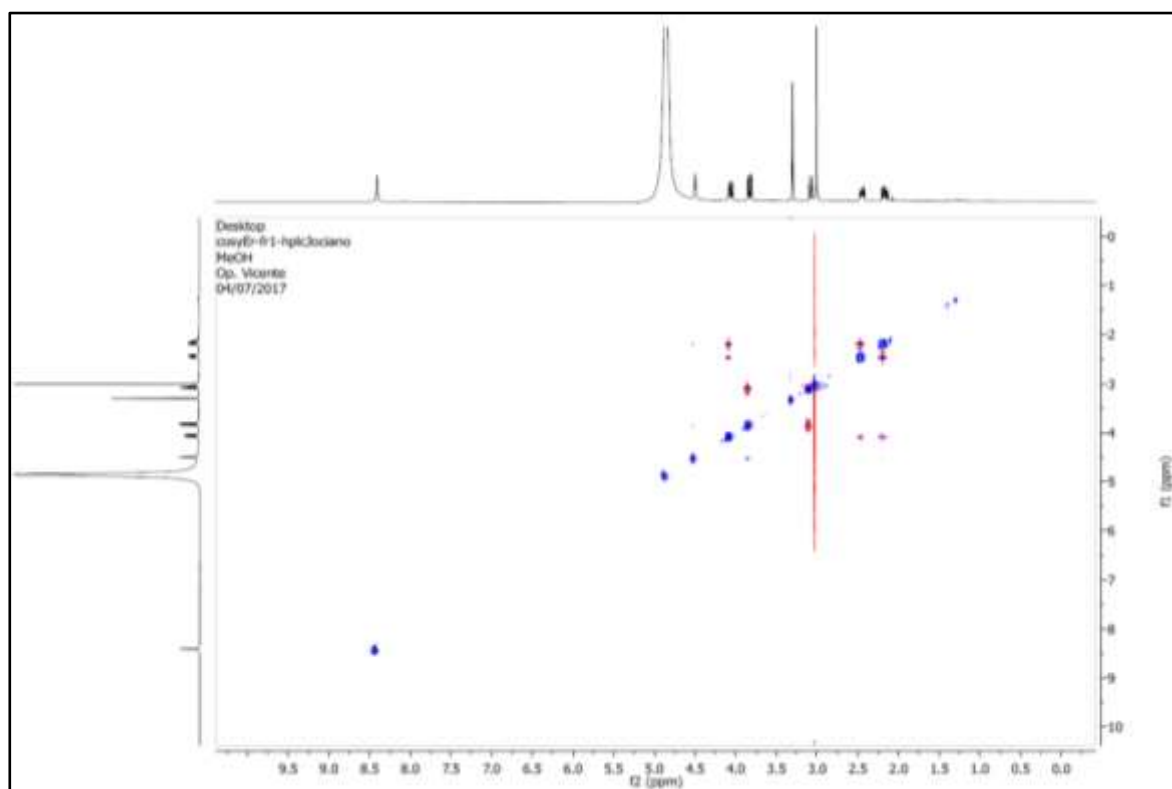
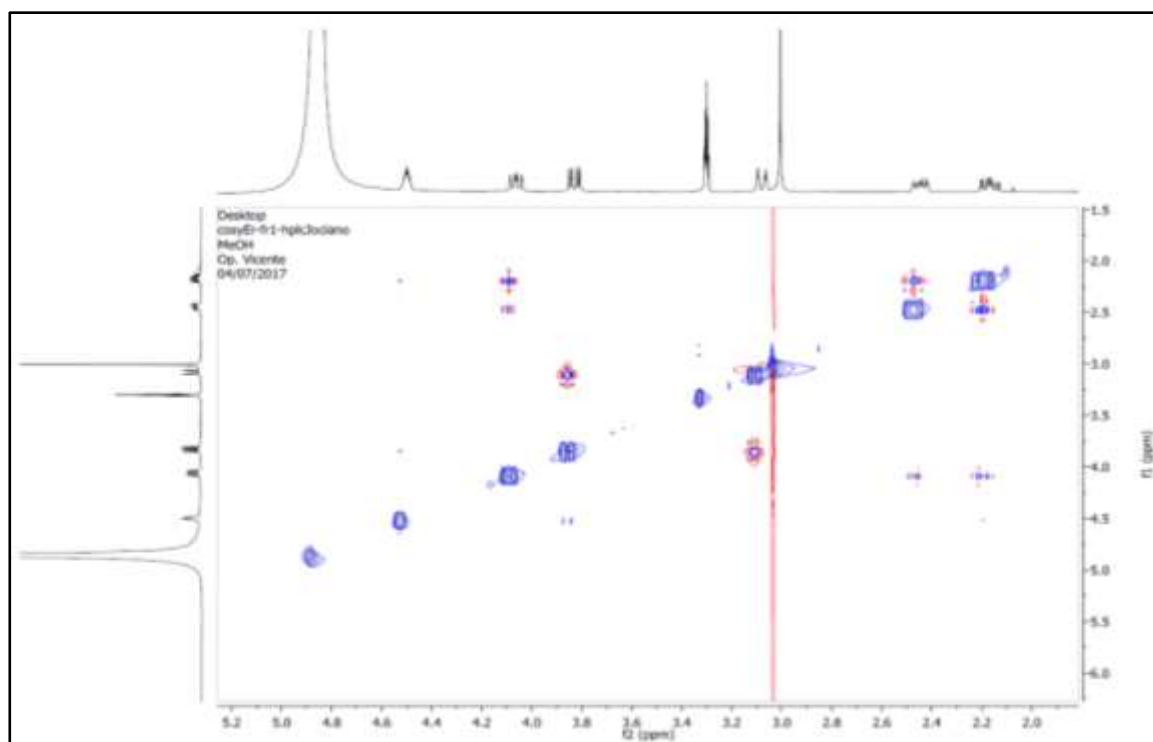


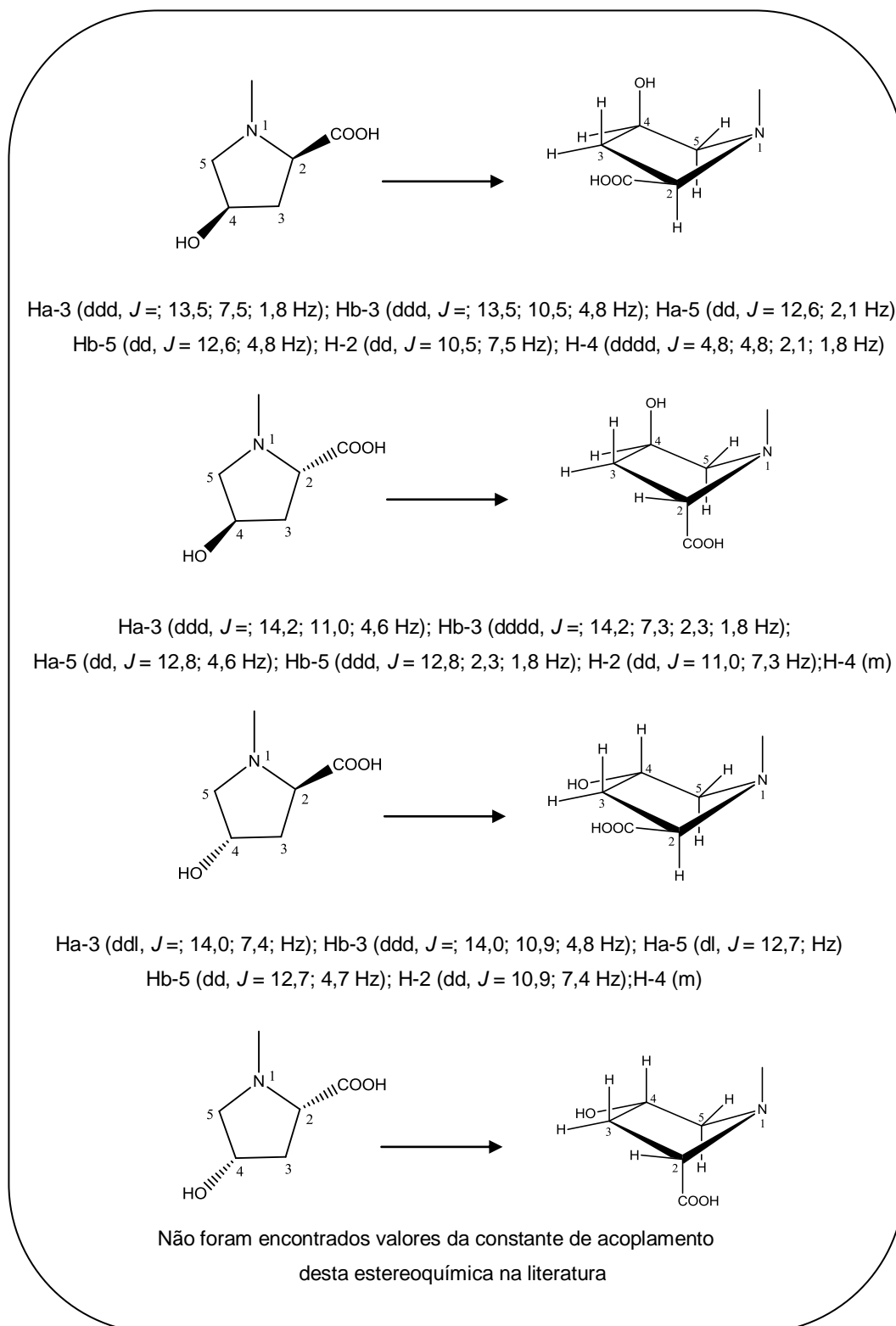
Figura 16 - Mapa de contorno COSY da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

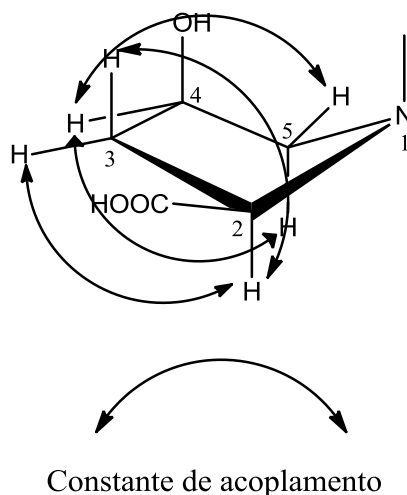


**Figura 17** – Expansão do mapa de contorno COSY da substância **Er-2** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) na região de 1,5-6,0 ppm x 2,0-5,2 ppm.



**Figura 18** - Possíveis configurações espaciais dos grupos hidroxila e ácido carboxílico.



**Figura 19** - Conformação envelope e os principais acoplamentos entre os hidrogênios de Er-2.

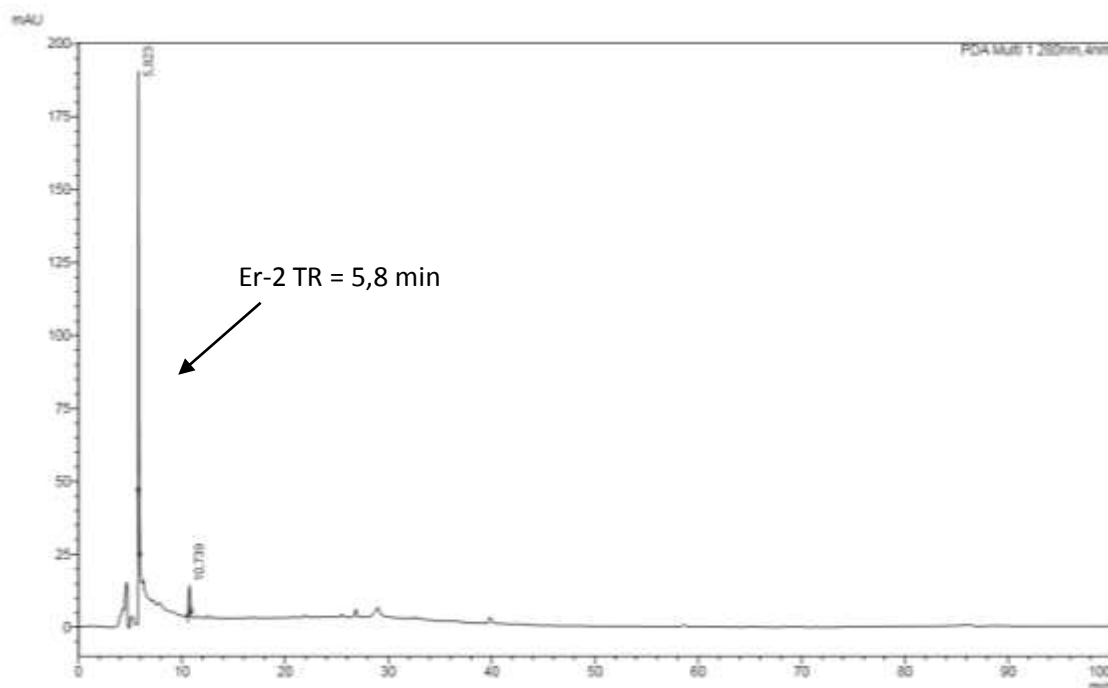
## 5.2. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Semi-preparativo de Er-2 da fase diclorometano.

Após a análise da fração Er-2 em CLAE-DAD, foi obtido o perfil cromatográfico (Figura 20 e 21, p. 60 e 61) que possibilitou observar dois picos com tempos de retenção em 5 min 08 s e 10 min 07 s, com índices de purezas: 99 %. O método analítico em CLAE-DAD foi transposto para a CLAE semi-preparativo, sendo injetado 17,8 mg de Er-2 dividido em 10 injeções de 100  $\mu$ l cada. Os dois picos foram coletados, concentrados em rotaevaporador e analisados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , sendo possível identificar o pico com tempo de retenção em 5 min 08 s como sendo a substância Er-2. O pico com tempo de retenção de 10min 07s ainda está em fase de elucidação estrutural.

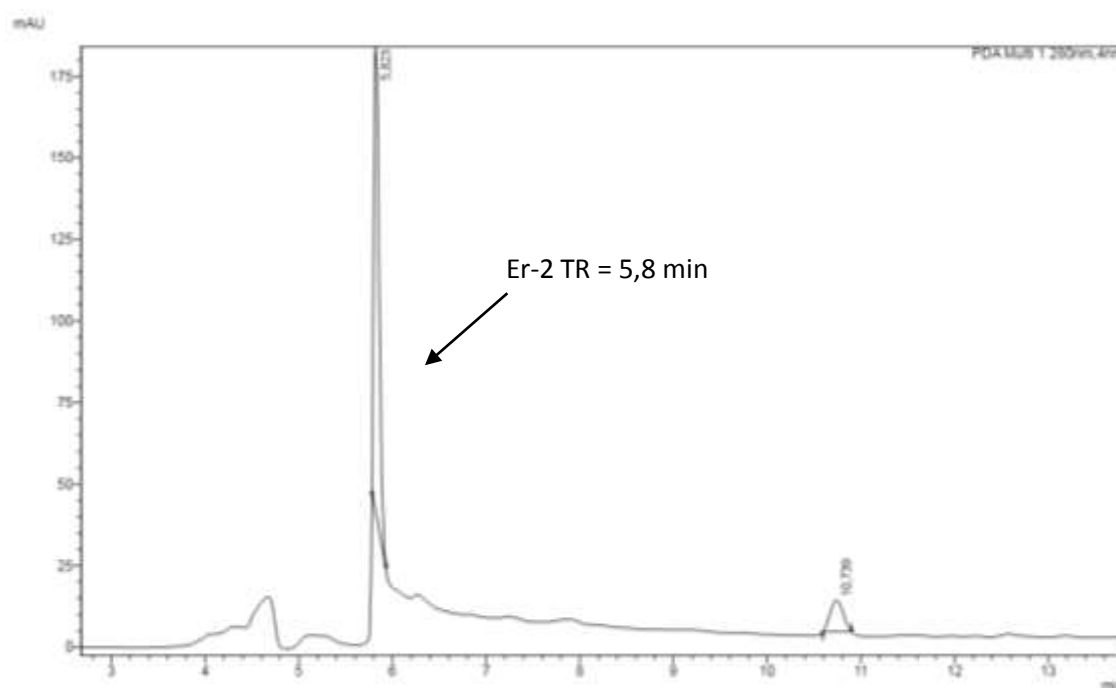
### 5.2.1. Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo de Er-1 da fase acetato de etila.

Após à análise da fração Er-1 em CLAE-DAD, foi obtido o perfil cromatográfico (Figura 22, p. 62) que possibilitou observar oito picos com tempos de retenção entre 7 min 04 s e 59 min 02 s, com índices de purezas: 99 %. O método analítico em CLAE-DAD foi transposto para a CLAE preparativo, sendo injetado 600 mg de Er-1 dividido em 12 injeções de 200 µl cada. Os oito picos foram coletados, concentrados em rotaevaporador e analisados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , sendo possível identificar o pico com tempo de retenção em 53 min 57 s como sendo a substância Er-1. Os sete picos restantes estão em fase de elucidação estrutural.

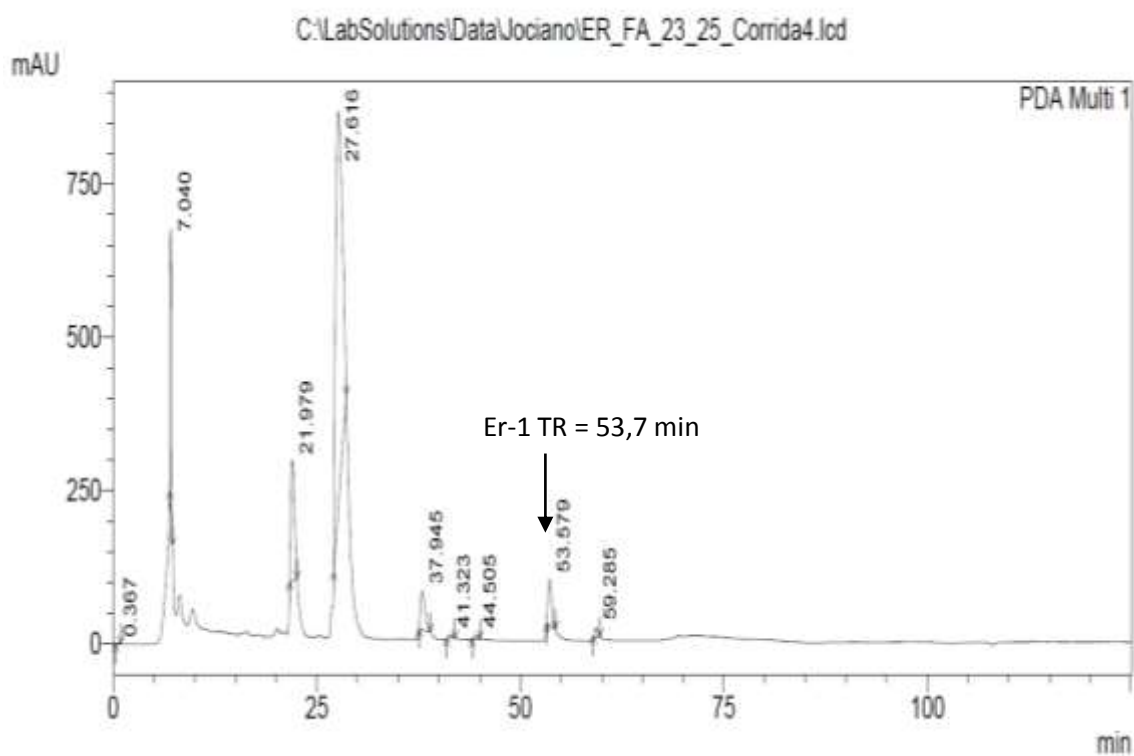
**Figura 20** – Cromatogramada fração Er-2 da fase diclorometano de *E. rimosum*.



**Figura 21** - Expansão do cromatograma de 0 a 13 min da fração **Er-2** da fase diclorometano de *E. rimosum*.



**Figura 22** - Cromatograma da fração 23 a 25 da fase acetato de etila da espécie *E. rimosum*



## 6. CONCLUSÕES

A partir do estudo fitoquímico dos constituintes do extrato etanólico bruto de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz. Foram isoladas duas substâncias. Estas tiveram suas estruturas identificadas através de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , técnicas bidimensionais e em comparação com os dados da literatura, sendo denominadas: 4',7-di-O-metilquercetina-3-O- $\beta$ -rutinosídeo e 4-hidroxi-1-metil-2-pirrolidina ácido carboxílico, sendo estes relatados pela primeira vez na espécie em estudo, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico desta espécie. A fase hexânica não foi estudada, ficando para estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS

- ALAGILE, D. et al. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 15. P. 945-949. 2005.
- ALBUQUERQUE, C. H., et al. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). **Química nova**, Vol. 37, No. 4, 2014, 663-666.
- AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*. *Phytochemistry*, 25, p. 851-853, 1986.
- ALVES, D.L.; SILVA, R.C. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal**. São Paulo: Atheneu, 2002, 105p.
- ANSELL, S. M.; Pegel, K. H.; Taylor, D. A. H. Diterpenes from the Timber of *Erythroxylum pictum*. **Phytochemistry**, 32, p. 937-943, 1993.
- APG. Na ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85, p. 531-553, 1998.
- APG. An update of, APG classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical journal of the Linnean Society** 141, p. 399-436, 2003.
- BAKKE, L.A. et al. Estudo comparativo sobre o conhecimento do uso de plantas abortivas entre alunas da área de saúde e da área de humanas da Universidade Federal da Paraíba. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.1, p.8-15, 2008.
- BARREIROS, M. L. Flavonoides e terpenóides de três espécies do gênero *Erythroxylum* suas atividades biológicas. 2005. 162 f. **Tese** (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2005.
- BRACHET, A., Munoz, O., Gupta, M., Veuthey, J. L., Christen, P. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. **Phytochemistry** 46, p. 1439-1442, 1997.
- BRACJET, A.; MATEUS, L., CHERKAOUI, S.; CHRISTEN, P.; GAUVRIT, J.-Y.; LANTÉRI, P.; VEUTHEY, J.-L. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. **Analysis**, v. 27, p. 772-778, 1999
- BRANDÃO HN, J. P. David, et al. (2010). "Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas." *Química Nova* 33: 1359-1369.
- BEHLING, E. B., Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BEZERRA, W. K. T et al. O uso de fitoterapia com ação anti-inflamatória que atuam no sistema gênito-urinário. **Intesa**, Pombal, v.8, n.1, p.24-36, jan./dez.2014.

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

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

CHAVES, D. et al., Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 606-610, 2002.

CHÁVEZ, J. P.; DOS SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene Ester derivatives from *Erythroxylum lealcostae*. **Phytochemistry**, 41, p. 941-943, 1996.

CORDELL GA, M. L. Quinn-Beattie, et al. (2001). "The potential of alkaloids in drug discovery." *Phytother Res* 15(3): 183-205.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009. 1200 p.

CUSIDO, R.M.; PALAZÓN, J.; PIÑOL, M.T.; BONFILL, M.; MORALES, C. Daturametel: in vitro production of tropane alkaloids. **Planta Medica**, v.65, p. 144-148, 1999

DAHLGREN, r. M. T. Rhizophoraceae and Anisophylleaceae: summary statement, relationships. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 75, 1259-1277, 1988.

DEWICK. P. M. Medicinal Natural Products. **A biosynthetic approach**. Second edition. Copyright, 2002.

DURAN-PATRON, R.; O' HAGAN, D.; HAMILTON, J.T.G.; WONG, C. W. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 777- 784, 2000.

EL-IMAM, Y. M. A., EVANS, W. C., GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum cumeatum*, *E. ecarinatum* and *E. austral*. **Phytochemistry**, 27, p. 2181-2184, 1988.

EVANS, W.C. Trease and evans' pharmacognosy. **14.ed London: W. B Saunders**, 1996. p. 340- 408.

FARIA, P.G. et al. O diálogo com gestantes sobre plantas medicinais: contribuições para os cuidados básicos de saúde. **Acta Scientiarum Health Sciences Maringá**, v.26, n.2, p.287-294, 2004.

- GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GRIFFIN, W. J., LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, 53: 623-637, 2000.
- HARAGUCHI et al., Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J. Agric. Chem.* v. 51. p. 4995-5000, 2003.
- HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some Ethnobotanical notes on old World Species). **Journal of Ethnopharmacology**, 3, p. 279-292, 1981.
- HENRIQUES, A. T. et al. Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, cap.29, p 641, 1999.
- INIGO, R. P. A.; POMILIO, A. B. Flavonoids from *Erythroxylum argentinum*. **Phytochemistry**, 24, p. 346-349, 1985.
- JOHNSON, E., SCHMIDT, W. F. NORMAN, H. A., Flavonoids as markers for *Erythroxylum*. Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxilense*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 26, 7, 743-759, 1998.
- JUDD, W. S. & OLMSTEAD, R. G. A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic relationships. **American Journal of Botany**. 91, 10, 1627-1644, 2004.
- KAPADI, A. H.; DEV. S. The Diterpenoids of *Erythroxylum monogynum*-III further constituents, the absolute stereochemistry and hydroxy monogynol. **Tetrahedron Letters**, 38, p. 2751-2757, 1964.
- KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1059-1070, 1995.
- LOIOLA, M. I. B; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. de flora paraibana, Brasil: Erythroxylaceae. **Acta Botanica Brasilica**. V. 21, p. 473-487, 2007.
- MANABE, H., SAKAGAMI, H., ISHIZONE, H., KUSANO, H., FUJIMAKI, M., WADA, C., KOMATSU, N., NAKASHIMA, H., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, N. Effect of catuaba extract on microbial and HIV infection. **In Vivo**, 6, 161-165, 1992.
- MARTIN, A.; MURRAY, R. D. H. Constituents of *Erythroxylum monogynum* Roxb. Part IV. Two Nor-diterpenoids Tertiary Alcohols and Three Diterpenoid Epoxides. **Journal of Chemical Society (C)**, p. 2529-2533, 1968.
- MCCRINDLE, R.; MARTIN, A.; MURRAY, R. D. H. Constituents of *Erythroxylum monogynum* Roxb. Part I. (+)-Hibaene, [(+)-Stachene], Erythroxylol A (Monogynol), Erythroxylol B and Erythroxydiol A. **Journal of Chemical Society (C)**, p. 2349-2354, 1968.

- MOORE, J. M., HAYS, P. A., COOPER, D. A., CASALE, J. F., LYNDON, J. Hydroxytropacocaine: An abundant alkaloid of *E. novogranatense* Var. *Novogranatense* and Var. *Truxillense*. **Phytochemistry**, 36, p. 357-360, 1994.
- NAKAYAMA et al., Oviposition stimulants for the tropical swallowtail butterfly, *Papiliopolytes*, feeding on a rutaceous plant, *Toddaliaasiatica*. **Journal of Chemical Ecology**, Vol. 29, No. 7, July 2003.
- OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 3, 2010.
- OLIVEIRA, F.Q.; GONÇALVES, L.A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.36-41, 2006.
- MI et al., Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Letters**. V. 184, p. 13-20. 2002.
- PELLETIER SW. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Volume 15, New York: USA, Willey. Pages 1-635, 2001.
- PLOWMAN, T. C. & BERRY, P. E. Erythroxyloaceae. In: J. Steyermark, PÁG. Berry, B. Holst & K. Yatskievych (Eds.). **Flora of the Venezuelan Guayana**, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, v. p. 59-71. 1999.
- PLOWMAN, T. C. & HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae). **Brittonia** v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.
- PLOWMAN, T. C. Erythroxyloaceae Kunth. In: W. D. Stevens. C. Ulloa, A. Pool & O. M. Montiel (Eds.). **Flora de Nicaragua. Monographs Systematic Botany Missouri Botanical Garden**, v. 85, p. 834-838, 2001.
- PLOWMAN, T.C. New taxa of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae) from the Amazon basin. **Acta Amazonica**, 14(1/2) Supl.: 117-143, 1984.
- QIU S, H. SUN, et al. (2014). "Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives." *Chin J Nat Med* 12(6): 401-406.
- RAHMAN, A-V. et al. Dimerictropane alkaloids from *Erythroxyllum moonii*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 2, p. 377-383, 1998.
- RAHMAN, A. U., KHATTAK, K. F., NIGHAT, F., SHABBIR, M., HEMALAL, K. D., TILLEKERATNE, L. M. Dimerictropane alkaloids from *Erythroxyllum monogynum*. **Phytochemistry**, 48, p. 377-383, 1998.
- RIBEIRO, E. M. O. Estudo fitoquímico de *Erythroxyllum rimosum* O.E. Schulz e *Erythroxyllum betulaceum* Mart. (erythroxyloaceae). **Tese** (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2011.

SAVOLAINEN, V.; CHASE, M.W.; HOOT, S.B.; MORTON, C.M.; SOLTIS, D.E.; BAYER, C.; FAY, M.F.; DE BRUIJN, A.Y.; SULLIVAN, S. & QIU, Y.-L. Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. **Systematic Biology** 49, 306-362, 2000.

SCHWARZBACH, A.E. & RICKLEFS, R.E. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on Chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. **American Journal of Botany** 87, 4, 547-564, 2000.

SCIUTO et al., Identification of 4-hidroxy-N-methylproline in the red alga *Chondriacoerulescens*-spectral information. **Phytochemistry**, v.22, No. 10, pp. 2311-2312, 1983.

SILVA, G.L., CUI, B., CHÁVEZ, D., YOU, M., CHAI, H.B., RASOANAIVO, P., LYNN, S.M., O'NEILL, M.J., LEWIS, J.A., BESTERMAN, J.M., MONKS, A., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, D. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. **Journal of Natural Products**. 64, p. 1514-1520, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al, **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; CHASE, M.W.; MORT, M.E.; ALBACH, D.C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W.H.; HOOT, S.B.; FAY, M.F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S.M.; PRINCE, L.M.; KRESS, W.J.; NIXON, C.K. & FARRIS, J.S. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 133, 381-461, 2000.

SOMAN, R.; DEV, S. The diterpenoids of *Erythroxylum monogynum*-II. Devadarool, a new type in Tetracyclic Diterpenoids. **Tetrahedron Letters**, 19, p. 1181-1185, 1964.

SILVA, C. L. F. Uso terapêutico e religioso das ervas. **Caminhos**. v.12, p.79-92, 2014. ISSN 1983-778X.

SIMEÕES, CM.; SCHENKEL, EP.; GOSMANN, G.; MELO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed da UFRGS/ Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2007.1104p.

TORRES, E. C.; RIBEIRO, A.; MORAES, M. A. Abordagem fitoquímica e prospecção do potencial antimicrobiano in vitro das partes aéreas de três espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae. **Educadores dia a dia**. Curitiba. 2010

WHO, World Health Organization. **Fact sheet N°134: traditional medicine.** December 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html> Acesso em: 05 jan. 2011.

WINKLER, T. Comments on 'Piperidone derivative from *Dalbergia sympathetica*'. **Magn. Reson. Chem.** 2006; 44: 571–572

VERPOORTE R. (1986). "Methods for the Structure Elucidation of Alkaloids." *Journal of Natural Products* 49(1): 1-25.

ZANOLARI, B. et al., On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, V. 1020, P. 75-89, 2003 a.

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