



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**HIDNA NASCIMENTO DA CUNHA**

**COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Erythroxylum paufferense* Plowman:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**JOÃO PESSOA – PB  
2019**

**HIDNA NASCIMENTO DA CUNHA**

**COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Erythroxylum paufferense* Plowman:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.  
Orientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

**JOÃO PESSOA – PB  
2019**

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

C972c Cunha, Hidna Nascimento da.

Compostos fenólicos de *Erythroxyllum paufferense*  
Plowman: Isolamento e caracterização por cromatografia  
líquida acoplada a espectrometria de massas / Hidna  
Nascimento da Cunha. - João Pessoa, 2019.  
93 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Erythroxyllum paufferense*. 2. Erythroxyllaceae. 3.  
Flavonoides. 4. Citotoxicidade. I. Tavares, Josean  
Fachine. II. Título.

UFPB/BC

**HIDNA NASCIMENTO DA CUNHA**


**COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Erythroxylum paufferense* Plowman:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação aprovada em 22/02/2019


**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Josean Fachine Tavares**  
Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba – Campus I  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**  
Doutor em Química Orgânica  
Universidade Federal da Paraíba – Campus I  
(Examinador Interno)

  
\_\_\_\_\_

**Prof. Dr<sup>a</sup> Renata Mendonça Araújo**  
Doutora em Química Orgânica  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Campus I  
(Examinador Externo)

## DEDICATORIA

A minha mãe, pelo exemplo de perseverança.  
Ao meu pai (*in memoriam*), pelo exemplo de coragem.  
A eles, por sempre acreditarem em mim.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter sido escolhida por Ele para estar aqui, por sempre estar comigo me guiando e me dando forças, por ser bom o tempo todo! Obrigada, Deus, o teu amor me explicou tudo!

Ao meu orientador, Josean Fachine Tavares, um profissional exemplar e completamente dedicado a pesquisa, que me deu a oportunidade para que todo esse trabalho se concretizasse. Lhe admiro muito! Obrigada, pela compreensão, ensinamentos, dedicação e grande amizade durante todo o processo!

Aos professores Dr. José Maria Barbosa Filho, o qual admiro tanto e sou grata pela oportunidade na Iniciação científica, e Dra. Renata Mendonça Araújo, pelas contribuições bastantes relevantes neste trabalho e por participarem desta importante etapa da minha formação.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral da Silva por todo o apoio, ensinamentos e por nos inspirar constantemente com o seu amor e dedicação a pesquisa.

Ao professor Dr. Vicente Carlos Oliveira Costa, por ter me ajudado muito na Iniciação científica e me incentivado. Obrigada, pelo carinho e amizade!

A professora Dra. Marianna Vieira Sobral por disponibilizar o laboratório Oncofarm para a realização da atividade citotóxica, e pela amizade Topíssima!

Ao técnico Raimundo Nonato (Noninha), que não sei o que seria do lab de fitoquímica sem ele, por ter me ajudado tanto, por sempre dar um jeito para tudo, por todos os abraços, carinho e incentivo. Obrigada, Noninha!

Ao meu amigo Yuri Mangueira, que sempre que precisei me ajudou muito nas pesquisas, sem medir esforços. Sempre me motivando e me ensinando com toda sua paciência. Você é exemplo de aluno! Obrigada, pela sua amizade, por se preocupar comigo, por todas as risadas, pelas longas conversas (rsrs), pelas saidinhas das sextas e quartas onde nos divertíamos muito! Meu carinho é enorme por ti! Te desejo todo sucesso do mundo!

Ao amigo Lucas Abreu, sempre disposto a me ajudar e a me ensinar. Obrigada, por toda a ajuda nessa pesquisa, pelas conversas e por todas as farrinhas (rsrs).

A todos os alunos do LMCA, pela ajuda nas dificuldades encontradas no dia a dia do lab, pelos momentos alegres compartilhados, pelos cafés, pelas conversas diárias, pelo incentivo. Meu muito obrigada!

A Júnior, por todos os cafés, assistência e pelas palavras que tanto me motivou.

A amiga Lyvina, pela sua grande amizade. Minha companheira de tudo aqui em JP, que sempre estar comigo para o que der e vier. Minha parceira, obrigada pela lealdade, por me escutar nas minhas conversas intermináveis, por todas as nossas saídas, farras, estudos, conselhos, brincadeiras, enfim, por tudo! Te amo!

Aos Topíssimos (Rê, Ly, Lu, Jéss, Fifi, Lipe, Fefa, Mari), irmãos que a Farmácia me deu, por todo amor, companheirismo, irmandade, apoio, por não medir esforços para ajudar um ao outro! Levarei vocês pra vida! Eu amo muito vocês!

Ao bloco e grupo de vôlei (rsrs) por toda ajuda prestada e pelo laço que formamos em tão pouco tempo. Obrigada pela amizade e tanto carinho!

Aos meu pais, por tanto amor e dedicação a mim, por não medir esforços para me ajudar, por sempre terem me apoiado e feito tudo por nossa família, por toda a educação e grandes ensinamentos, por vibrarem e se emocionarem junto comigo. Obrigada, simplesmente, por tudo! Eu amo tanto vocês!

Aos meus irmãos, por todo amor e cuidado com a pequena aqui (rsrs). E em especial, para minha irmã Hyale, que é minha mãe também, e que fez e faz tudo por mim aqui em JP e em qualquer lugar que eu esteja! Eu amo demais vocês!

Ao meu namorado, Emerson, por todo amor, companheirismo, por sempre acreditar em mim, por me incentivar desde sempre, por não medir esforços para me ajudar, e sempre se fazer presente! Obrigada, por tudo! Eu te amo!

Ao programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos (PGNSB).

A Universidade Federal da Paraíba.

## RESUMO

CUNHA, H. N. **Compostos fenólicos de *Erythroxylum paufferense* Plowman: Isolamento e caracterização por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.** 2019. N<sup>o</sup>93. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

A população humana sempre buscou nas espécies vegetais importantes propriedades terapêuticas e, com isso, passou a utilizá-las no tratamento de diversas doenças, a partir da observação de que nas plantas existem substâncias que atuam na recuperação da saúde humana. *Erythroxylum paufferense* Plowman, conhecida popularmente como “Guarda Orvalho” é uma espécie da família Erythroxylaceae endêmica da região Nordeste do Brasil com ocorrência confirmada apenas no estado da Paraíba. Devido à ausência de estudos químicos e farmacológicos, este trabalho tem como objetivo efetuar uma abordagem fitoquímica e avaliar o potencial de citotoxicidade da fase acetato de etila de *E. paufferense*. As partes aéreas da espécie foram coletadas no município de Aréia – PB, após secagem e pulverização foi realizada uma extração do material vegetal, e posterior partição do extrato resultando nas fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica. Na busca de constituintes químicos fenólicos, a fase acetato de etila foi então analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, apresentando 14 picos principais, que foram identificados putativamente como sendo flavonoides glicosídeos e flavonoides oligoméricos. Essa mesma fase foi submetida a cromatografia em coluna, e uma das suas frações foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos em escala analítica e fracionamento em escala preparativa, levando ao isolamento de três substâncias majoritárias: Quercetina-3-sambubiosídeo, Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo e Ombuin-3-rutinosídeo. Estes foram identificados por espectroscopia por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais. Para a avaliação da citotoxicidade da fase acetato de etila da *E. Paufferense* foi realizada uma triagem utilizando as linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal) mantidas em meio de cultura RPMI-1640. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT. Essa triagem mostrou um resultado de pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%) para a linhagem HCT-116, uma atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) para a linhagem MCF-7 e muita atividade para a linhagem HL-60 promovendo uma inibição de crescimento variando de 70 a 100%. Logo, essa triagem tem um resultado bastante promissor para a linhagem HL-60. Os resultados obtidos deste trabalho, contribuirão para o conhecimento fitoquímico e farmacológico do gênero *Erythroxylum* e da espécie *Erythroxylum paufferense*.

**Palavras-chaves:** *Erythroxylum paufferense*, Erythroxylaceae, flavonoides, citotoxicidade.

## ABSTRACT

CUNHA, H. N. **Compostos fenólicos de *Erythroxyllum paufferense* Plowman: Isolamento e caracterização por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.** 2019. N<sup>o</sup>93. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

The human population has always sought important therapeutic properties in the vegetable species and, as a result, it began to use them in the treatment of various diseases, from the observation that in plants there are substances that act in the recovery of human health. *Erythroxyllum paufferense* Plowman, popularly known as "Guarda Dew" is a species of the Erythroxyllaceae family endemic to the Northeast region of Brazil with occurrence confirmed only in the state of Paraíba. Due to the absence of chemical and pharmacological studies, this work aims to make a phytochemical approach and to evaluate the cytotoxicity potential of the ethyl acetate phase of *E. paufferense*. The aerial parts of the species were collected in the municipality of Aréia - PB, after drying and spraying, extraction of the vegetal material and subsequent partition of the extract resulted in hexane, chloroform, ethyl acetate and n - butanolic phases. The ethyl acetate phase was analyzed by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer, presenting 14 main peaks, which were putatively identified as flavonoids glycosides and oligomeric flavonoids. The same phase was subjected to column chromatography, and one of its fractions was analyzed by high performance liquid chromatography with diode arrangement detector on analytical scale and preparative scale fractionation, leading to the isolation of three major substances: Quercetin-3- sambubioside, Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-raminoside, and Ombuin-3-rutinoside. These were identified by uni and bidimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. For the evaluation of the cytotoxicity of the ethyl acetate phase of *E. Paufferense*, a selection was made using the human tumor cell lines HL-60 (acute promyelocytic leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma) and HCT-116 (colorectal carcinoma) in RPMI-1640 medium. Cytotoxicity was assessed by the MTT reduction assay. This screening showed a low activity (inhibition of cell growth ranging from 20 to 50%) for the HCT-116 lineage, a moderate activity (inhibition of cell growth ranging from 50 to 70%) for the MCF-7 lineage and much activity for the HL-60 line promoting a growth inhibition ranging from 70 to 100%. Therefore, this screening has a very promising result for the HL-60 lineage. The results obtained from this work contributed to the phytochemical and pharmacological knowledge of the genus *Erythroxyllum* and the species *Erythroxyllum paufferense*.

Keywords: *Erythroxyllum paufferense*, Erythroxyllaceae, flavonoids, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica mundial da família <i>Erythroxylaceae</i> . .....	22
<b>Figura 2</b> - Principais constituintes do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	23
<b>Figura 3</b> - -Cromatograma da fração EPFA-12 por CLAE no modo analítico.....	39
<b>Figura 4</b> - Cromatograma da fração EPFA-12 por CLAE no modo preparativo.....	40
<b>Figura 5</b> - Cromatograma de íons totais da fase acetato EPF por CLAE-EM.....	45
<b>Figura 6</b> - Fragmentação de perdas neutras sequenciais de unidades osídicas dos compostos fenólicos analisadas em CLAE-EM <sup>2</sup> .....	46
<b>Figura 7</b> - Fragmentação de perdas neutras sequenciais de unidades osídicas dos compostos fenólicos analisadas em CLAE-EM <sup>3</sup> .....	47
<b>Figura 8</b> - Fragmentação das proantocianidinas .....	48
<b>Figura 9</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 1.....	49
<b>Figura 10</b> - Via de fragmentação da proantocianidina B.....	49
<b>Figura 11</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 2.....	50
<b>Figura 12</b> - Via de fragmentação da proantocianidina C.....	50
<b>Figura 13</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 3.....	51
<b>Figura 14</b> – Via de fragmentação da catequina.....	51
<b>Figura 15</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 4...	52
<b>Figura 16</b> - Via de fragmentação da Quercetina-3-O-dihexosideo.....	52
<b>Figura 17</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 5.....	53
<b>Figura 18</b> - Via de fragmentação da Quercetina-3-O-sambubiosideo.....	53
<b>Figura 19</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 6.....	54
<b>Figura 20</b> - Via de fragmentação do Canferol-3-O-sambubiodiseo.....	54
<b>Figura 21</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 7.....	55
<b>Figura 22</b> - Via de fragmentação da Quercetina 3-O-rutinosideo (Rutina).....	55
<b>Figura 23</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do pico 8.....	56
<b>Figura 24</b> - Via de fragmentação da quercetina-3-O-hexosideo.....	56

<b>Figura 25</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 9.....	57
<b>Figura 26</b> - Via de fragmentação da quercetina-3-O-ramnosideo.....	57
<b>Figura 27</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 10.....	58
<b>Figura 28</b> - Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-dihexosideo.....	58
<b>Figura 29</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 11.....	59
<b>Figura 30</b> - Via de fragmentação da Isorhaminetin-3-O-rutinosideo.....	59
<b>Figura 31</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 12.....	60
<b>Figura 32</b> - Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-rutnosideo.....	60
<b>Figura 33</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 13.....	61
<b>Figura 34</b> - Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-hexosideo.....	61
<b>Figura 35</b> - Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 14.....	62
<b>Figura 36</b> - Via de fragmentação da Isoramnetina-3-O-ramnose. ....	62
<b>Figura 37</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1. ....	66
<b>Figura 38</b> - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de 60 – 108 ppm.....	66
<b>Figura 39</b> - Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de 110 – 185 ppm .....	67
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1. ....	67
<b>Figura 41</b> - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de 2,95 – 4,25 ppm.....	68
<b>Figura 42</b> - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de 4,70 – 6,50 ppm .....	68
<b>Figura 43</b> - Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de 6,65 – 7,95 ppm.....	69
<b>Figura 44</b> - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 .....	69
<b>Figura 45</b> - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de (3,00 – 5,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm) .....	70
<b>Figura 46</b> - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de EPF-1 na região de (5,90– 8,50 ppm) x (80,0 – 190,0 ppm).....	70
<b>Figura 47</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, DMSO) de EPF-2. ....	74

<b>Figura 48</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 66 – 110 ppm. ....	74
<b>Figura 49</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 110 – 180 ppm.....	75
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) de EPF-2.....	75
<b>Figura 51</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 0,0 – 9,0 ppm.....	76
<b>Figura 52</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 0,0 – 2,6 ppm.. ....	76
<b>Figura 53</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 3,0 – 5,5 ppm. ....	77
<b>Figura 54</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 6,15 – 7,45 ppm.....	77
<b>Figura 55</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3.....	81
<b>Figura 56</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 54 – 82 ppm. ....	81
<b>Figura 57</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 91 – 121 ppm.....	82
<b>Figura 58</b> - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 120 – 176 ppm. ....	82
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3. ....	83
<b>Figura 60</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 0,5 – 2,8 ppm. ....	83
<b>Figura 61</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 2,8 – 4,2 ppm ....	84
<b>Figura 62</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 3,7 – 4,7 ppm. ....	84
<b>Figura 63</b> - Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) de EPF-3 na região de 3,7 – 4,7 ppm. ....	85

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Elaboração e partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Erythroxylum paufferense</i> .....	36
<b>Esquema 2</b> – Fracionamento da fase acetato de etila.....	37

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Estruturas de alguns alcaloides tropânicos encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	24
<b>Quadro 2</b> – Estruturas de alguns flavonoides encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	26
<b>Quadro 3</b> – Estrutura de alguns terpenóides encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	27
<b>Quadro 4</b> – Dados das reuniões das frações após monitoramento por CCDA.....	38
<b>Quadro 5</b> – Dados das frações coletadas no cromatógrafo preparativo.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Compostos fenólicos presentes na fase acetato da <i>Erythroxyllum paufferrense</i> . .....	44
<b>Tabela 2</b> - Dados de RMN de EPF-1 (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	65
<b>Tabela 3</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, DMSO) de EPF-1 .....	73
<b>Tabela 4</b> - Dados de RMN de EPF-3 (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	80
<b>Tabela 5</b> - Efeito de <i>Erythroxyllum paufferrense</i> na viabilidade das células MCF-7, HCT-116 e HL-60 após 72 h de tratamento.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	“Attached Proton Test”
AcOEt	Acetato de etila
BB	Broad Band
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dddd	Duplo duplo duplo dubleto
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
ESI	“Electrospray ionization”
EtOH	Etanol
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRESI-MS	“High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra”
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
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
s	Singlete

sl	Singleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
$\delta$	Deslocamento químico

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	22
2.1 Considerações sobre a família Erythroxyaceae .....	22
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Erythroxyllum</i> .....	22
2.3. Considerações sobre <i>Erythroxyllum paufferrense</i> Plowman.....	28
2.4. Considerações sobre técnicas hífenadas.....	28
2.5. Considerações sobre Citotoxicidade.....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1. Geral .....	32
3.2. Específicos.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 Material e equipamentos utilizados .....	34
4.2 Material Vegetal .....	35
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal .....	35
4.2.2 Processamento do material vegetal.....	35
4.3 Obtenção do extrato etanólico bruto .....	35
4.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto.....	35
4.5 Espectrometria de massas da fase acetato de etila.....	37
4.6 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila .....	37
4.7. Processamento cromatográfico da fração EPFA 11-12 por CLAE.....	39
4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados.....	41
4.9 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas ...	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1. Identificação de compostos fenólicos por CLAE-EM .....	44
5.2 Determinação estrutural de EPF-1.....	63
5.3 Determinação estrutural de EPF-2.....	71
5.4 Determinação Estrutural de EPF-3 .....	78
5.5 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas ...	86
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	88
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89

# *INTRODUÇÃO*

# 1 INTRODUÇÃO

A população humana sempre buscou nas espécies vegetais importantes propriedades terapêuticas e, com isso, passou a utilizá-las no tratamento de diversas doenças, a partir da observação de que nas plantas existem substâncias que atuam na recuperação da saúde humana. O conhecimento das propriedades curativas destas plantas foi adquirido ao longo do tempo sendo transmitido de geração em geração como a única forma de conhecimento disponível sobre as suas propriedades medicinais (SILVEIRA et al., 2009; SALVAGNINI et al., 2008).

Os vegetais além de fornecerem complexas bibliotecas de componentes bioativos únicos, devido à grande diversidade estrutural, eles também apresentam uma importante característica adicional, a de muitas vezes possuir atividades biológicas altamente seletivas e específicas (CRAGG et al., 2013). Essa variabilidade estrutural encontrada nas plantas se dá através da grande versatilidade do metabolismo e faz com que um único indivíduo possa produzir centenas de substâncias. Para sobrevivência, são produzidos os metabólitos primários, tais como clorofila, açúcares, e etc., mas esses não são os únicos, há também substâncias que não possuem funções tão essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, e que não são produzidas por todos os organismos, designados de metabólitos secundários (GOTTILIEB et al., 2012) Como consequência prática, esses compostos são utilizados em estudos in vivo e in vitro, e eles tem validado sua segurança de uso e eficácia farmacológica, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e agroindustriais (SIMÕES, et al., 2017).

Entre os metabólitos secundários destacam-se os flavonoides, uma classe amplamente distribuída no reino vegetal, que representa um dos mais diversificados grupos fenólicos entre os produtos de origem natural. Compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático apresentando um ou mais grupos hidroxila, incluindo os seus derivados. A busca por esses compostos vem crescendo substancialmente devido à presença de inúmeras atividades farmacológicas (SIMÕES, 2004).

Diversos estudos têm atribuído diferentes atividades farmacológicas aos flavonóides, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (YAO, et al., 2004; HARBONE, 1994; MANTHEY, 1998; MARKHAM, 1982). Uma das ações de destaque é a capacidade de alguns flavonoides tem de atuar controlando a proliferação celular e desempenhando o bloqueio da oncogênese. Isso

se dá por apresentarem características farmacológicas conhecidas como antioxidantes. Dessa forma a atividade antitumoral de flavonoides e polifenóis passou a ser alvo de estudos com intuito de esclarecer sua interação no mecanismo de inibição do crescimento celular por meio da apoptose em linhagens de células carcinogênicas (JADVAR; ALAVI; GAMBHIR, 2009).

A química de produtos naturais busca proporcionar o embasamento científico para o uso das plantas medicinais, por se dedicar principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biosintéticas de substâncias naturais produzidas por organismos vivos (BRAZ-FILHO, 2010). Atualmente, o avanço e aperfeiçoamento tecnológico dos métodos cromatográficos e espectroscópicos, em especial das técnicas hífenadas, é de suma importância para acelerar o isolamento e identificação de novas substâncias bioativas em uma mistura complexa, como, por exemplo, extratos vegetais, que devem passar por uma triagem química e biológica.

Neste sentido, os perfis cromatográficos proporcionam uma visão mais ampla sobre a composição química de organismos vivos, através dos quais é observado um grande número de metabólitos e compostos bioativos. Esses estudos utilizam, na maior parte, técnicas combinadas, que se baseiam na separação cromatográfica de substâncias utilizando cromatografia em fase gasosa (CG) ou líquida (LC), acoplada a técnicas espectrométrica para detecção, como, espectrofotômetro de UV-Vis (DAD) e espectrometria de massas (EM) (FARAGA et al., 2012).

Diante do exposto, percebendo todo o potencial químico e farmacológico da nossa flora, em especial da família Erythroxylaceae, e reconhecendo a importância do gênero *Erythroxylum* pela sua diversidade no estado da Paraíba e pelos seus raros estudos, observou-se que o estudo fitoquímico inédito da espécie *Erythroxylum paufferense* torna-se relevante e bastante promissor para o conhecimento desta espécie e seus constituintes químicos.

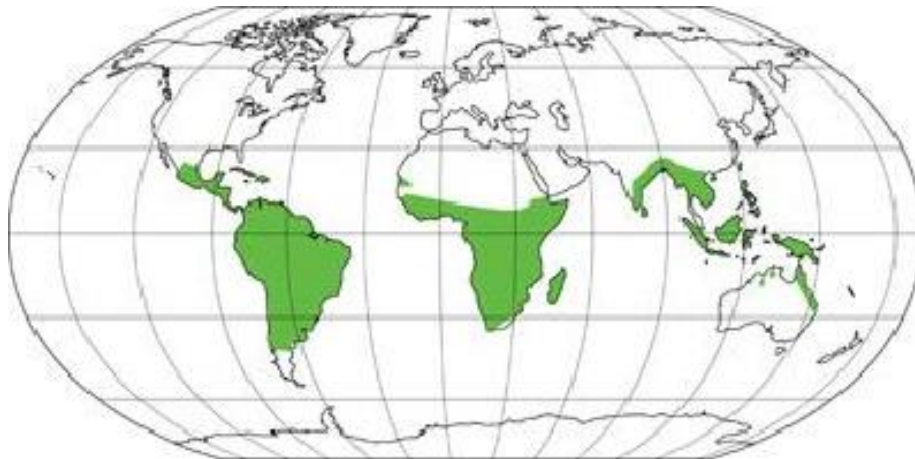
# *FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA*

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Considerações sobre a família Erythroxylaceae

Erythroxylaceae é uma família pertencente à divisão das Angiospermas e está incluída na ordem Malgiphiales, à classe Magnoliopsida das dicotiledôneas. É constituída por quatro gêneros (*Pinacopodium*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Aneulophus*) que reúnem cerca de 240 espécies com distribuição pantropical, tendo seus principais centros de diversidade e endemismo no Brasil, Madagascar e Venezuela (BIERI et al., 2006 e DALY, 2004). A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum*, sendo encontradas nos quatro continentes, principalmente na América tropical. Os demais gêneros possuem poucas espécies com distribuição apenas na África (Figura 1, pág 22) (DALY 2004 e LOIOLA et al., 2006).

**Figura 1** – Distribuição geográfica mundial da família Erythroxylaceae.



Fonte: Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares da Faculdade de Ciências do Instituto de Ecologia e Ciências Ambientais (LSPV-FC-IECA)

### 2.2 Considerações sobre o gênero *Erythroxylum*

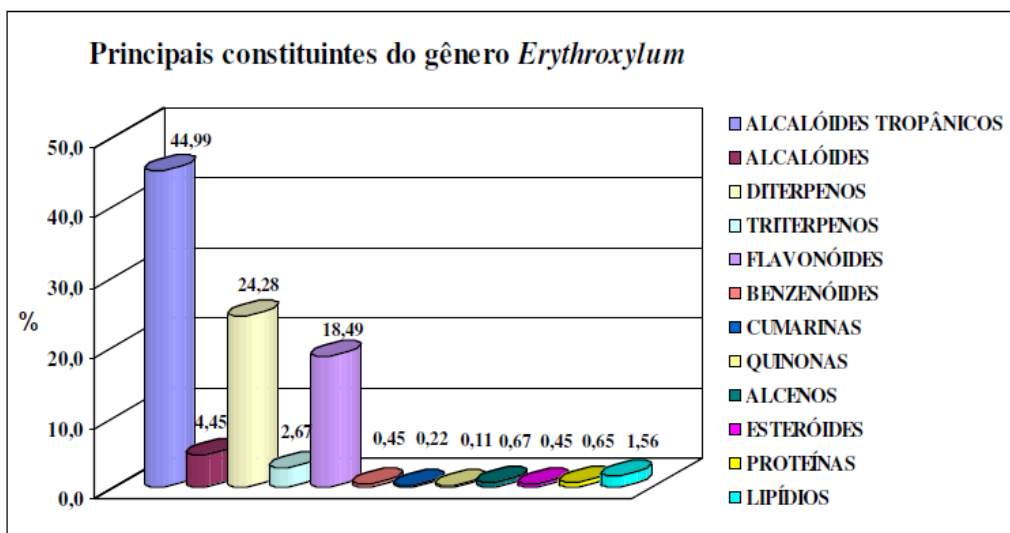
É o maior gênero da família Erythroxylaceae com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, reunindo cerca de 230 espécies, e o único encontrado na região neotropical (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). Apresenta uma grande versatilidade ecológica por possuir espécies em ambientes úmidos como a Floresta

Atlântida e Floresta Amazônica, em regiões semi-áridas, em altitudes elevadas ou ao nível do mar (DALY, 2004).

A biodiversidade de *Erythroxylum* no Brasil desperta interesse, pois das 187 espécies descritas na América tropical 116 são encontradas no país, principalmente no nordeste brasileiro (PLOWMAN & HENSOLD, 2004; RIBEIRO et al., 2013), no qual foram listadas 66 espécies, dentre as quais 25 foram registradas apenas para essa região. No entanto para o estado da Paraíba foram catalogadas 13 espécies, sendo elas: *E. caatingae* Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil, *E. nummularia* Peyr, *E. pauferrense* Plowman, *E. passerinum* Mart, *E. pulchrum* A. St.Hil, *E. pungens* O.E. Schulz, *E. revolutum* Mart, *E. rimosum* O.E. Schulz, *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O.E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil, e *E. squamatum* Sw, encontradas do brejo ao sertão. A maioria destas espécies tem distribuição restrita ao Nordeste do Brasil (*E. caatingae* Plowman, *E. nummularia* Peyer, *E. pauferrense* Plowman, *E. pungens* O.E. Schulz, *E. revolutum* Mart, *E. rimosum* O.E. Schulz e *E. simonis* Plowman). É importante destacar que a *E. pauferrense* é endêmica do Estado da Paraíba no município de Areia (LOIOLA, et al., 2007).

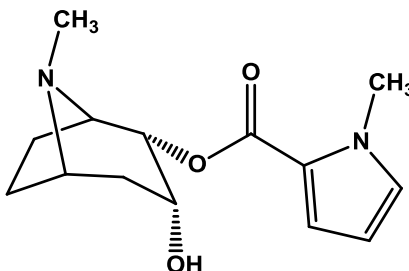
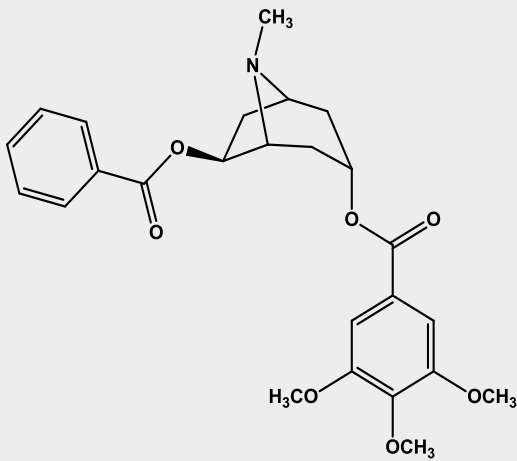
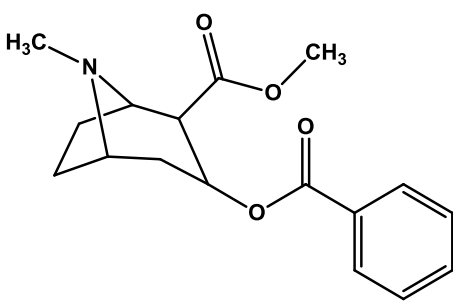
As classes de maior ocorrência no gênero são: alcaloides tropânicos (Quadro 1, pág. 24), encontrados em todas as partes das espécies; terpenos, encontrado nas cascas do caule e nas folhas; flavonoides, encontrados somente nas folhas (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 2005) (Figura 2, pág 23).

**Figura 2 -** Principais constituintes do gênero *Erythroxylum*



Fonte: NAPRALERT (Natural PProducts ALERT).

**Quadro 1** - Estruturas de alguns alcaloides tropânicos encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*

Espécie	Alcaloide	Referência
<p><i>E. vacciniifolium</i> (Casca do caule)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>vaccinina A</b></p>	<p>Zanolari et al. (2005)</p>
<p><i>E. caatingae</i> (Caule)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>catuabina B</b></p>	<p>Oliveira et al. (2011)</p>
<p><i>E. coca</i> (Folhas)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>cocaína</b></p>	<p>Torre et al. (2013)</p>

O gênero caracteriza-se pela presença de plantas lenhosas, arbustos ou pequenas árvores, com catafilos, algumas possuindo madeira dura e durável. As folhas são alternas e inteiras, com estípulas intrapeciolares. As flores apresentam 10 estames de filetes unidos na base. O ovário é súpero, tricarpelar, trilobular, mas geralmente com um único óvulo desenvolvido. O fruto é uma drupa, vermelha a púrpura (LOIOLA et al., 2007).

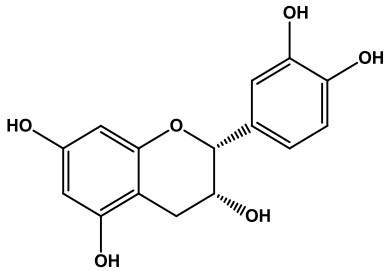
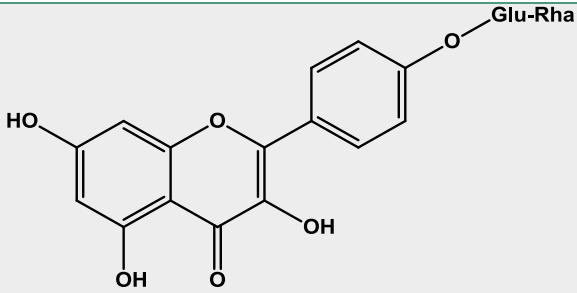
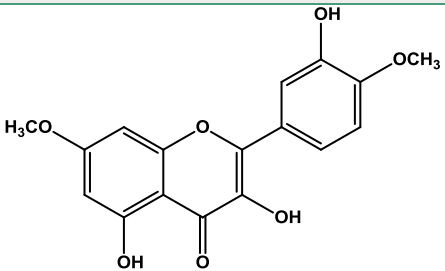
O interesse por *Erythroxylum* se intensificou a partir da descoberta das atividades farmacológicas apresentada pela *Erythroxylum coca* Lam, que tem uma longa tradição de uso, sendo utilizadas pelos indígenas por séculos. (ZUANAZZI et al., 2001) O gênero caracteriza-se pela presença do alcaloide tropânico, a cocaína, responsável por efeitos alucinógenos dando sensação de bem-estar e provocando também euforia. Ela foi empregada como anestésico local em pequenas cirurgias, e quando usada excessivamente a cocaína pode causar dependência química, um dos principais problemas de saúde do mundo (SIMÕES, et al., 2017).

Os flavonoides (Quadro 2, pág. 26), assim como os terpenoides (Quadro 3, pág.27), também estão presentes neste gênero. Especialmente flavonóis como a quercetina e campferol, bem como seus 3-O-glicosídeos. Sendo que tanto a quercetina quanto o campferol são característicos do gênero *Erythroxylum* tornando-os potencialmente importantes como marcadores quimiotaxômicos de espécies pertencentes a este gênero (GRIFFIN E LIN, 2000; ZUANAZZI et al., 2001; JONHSON 1998; CHAVEZ et al., 1996). E também sendo comum a presença de triterpenos principalmente de esqueleto oleanano (BARREIROS, 2005 e CHAVEZ, et al.,1996).

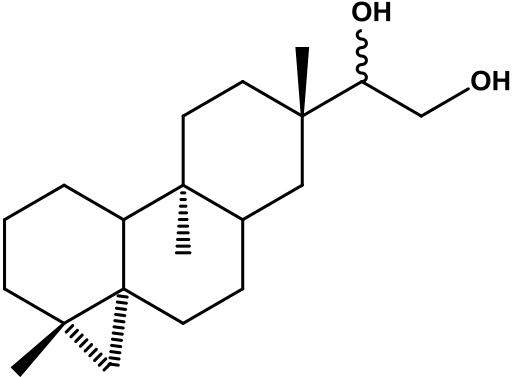
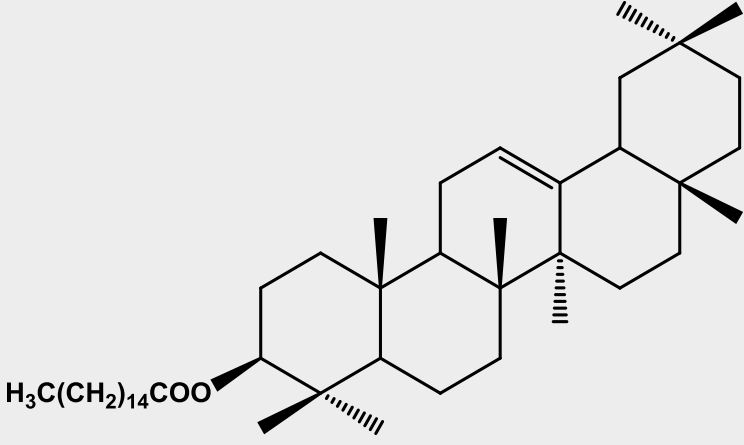
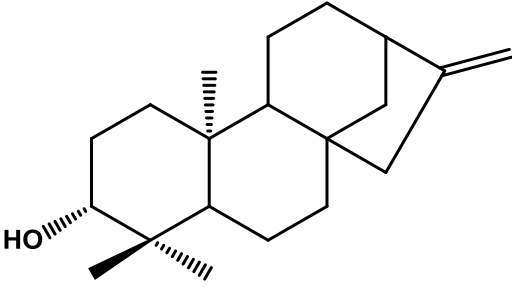
As folhas são as partes mais utilizadas das espécies do gênero *Erythroxylum*, na medicina popular. E os principais usos buscam uma ação estimulante, anti-inflamatória, promotora de saciedade, anestésica local e para o alívio de dores de cabeça e no estômago (GARCÍA et al., 2005). As raízes e as cascas do caule também são usadas com a finalidade de cessar hemorragias e como laxantes, a exemplo da *E. tortuosum* e *E. campestre* (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

A *Erythroxylum vacciniifolium*, conhecida popularmente como catuaba-verdadeira, reconhecida pelo seu potencial farmacológico, forneceu alcaloides tropânicos da série catuabina, e apresentou propriedades afrodisíacas, sendo usada como estimulante do sistema nervoso central, apresentou efeito contra infecções oportunas em pacientes com HIV (ZANOLARI et al., 2003), como também mostrou atividade contra infecções provocadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ADAMS et al., 2007). A *E. suberosum* é utilizada na indústria de curtume. *E. moonii* apresentou atividade antimicrobiana frente as cepas de leveduras, fungos e bactérias. *E. Pelleterianum* é usada para o tratamento de dores no estômago (LOIOLA, et. al., 2007).

**Quadro 2** - Estruturas de alguns flavonoides encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*

Espécie	Flavonoide	Referência
<p><i>E. barbatum</i> (Folhas)</p>	 <p>epicatequina</p>	<p>Barreiros et al. (2005)</p>
<p><i>E. coca</i> (Folhas)</p>	 <p>Canferol-4'-O-(ramnosil)-glicosídeo</p>	<p>Johnson et al. (2003)</p>
<p><i>E. nummularia</i> (Folhas)</p>	 <p>4',7-dimetil-quercetina</p>	<p>Barreiros et al. (2005)</p>

**Quadro 3** - Estruturas de alguns terpenoides encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*

Espécie	Terpenóide	Referência
<p><i>E. barbatum</i> (caule)</p>	 <p>erythroxiol X</p>	<p>Santos et al. (2006)</p>
<p><i>E. leal costae</i> (Folhas)</p>	 <p><math>\beta</math>-amirina palmitato</p>	<p>Chávez et al. (1996)</p>
<p><i>E. revolutum</i> (Folhas)</p>	 <p>ent-caur-16-en-3<math>\beta</math>-ol</p>	<p>Oliveira et al. (2012)</p>

Estudos realizados com espécies de *Erythroxylum* na Paraíba, mostraram a presença de substâncias isoladas e de atividades farmacológicas. O estudo fitoquímico do caule de *E. caatingae*, exclusiva da região nordeste, levou ao isolamento e identificação estrutural de três alcaloides tropânicos (OLIVEIRA, 2008), e o seu extrato apresentou atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias Gram positivas, e antitumoral contra as linhagens de célula NCI-H292, HEP-2 E K562 (AGUIAR, et al., 2011). Já no estudo fitoquímico da *E. revolutum* foi isolado e identificado seis diterpenos, e no da *E. subrotundum* dois flavonoides-O-glicosilados. A *E. pulgens* rica em alcaloides tropânicos apresentou atividade anti-hipertensiva (OLIVEIRA, 2012). No estudo da *E. Pulchrum* foi isolado e identificado quatro flavonoides e um terpenoide, e o seu extrato metanólico apresentou atividade antibacteriana inibindo o crescimento de dez linhagens (ALBUQUERQUE, 2013). Outros flavonoides (quatro) foram isolados e identificados, dessa vez da *E. Simonis*, como também três ácidos fenólicos. Dois dos flavonoides, quanto a atividade moduladora, não interferiram nos níveis de óxido nítrico, assim como não promoveram uma redução da viabilidade celular (DANTAS, 2018).

### **2.3 Considerações sobre a espécie *Erythroxylum pauferrense* Plowman**

*Erythroxylum pauferrense*, conhecida popularmente como guarda-ovalho ou pau-ferro (Plowman 1986), é uma espécie de arbusto ou arvoreta que pode variar de 1,5 a 4 metros de altura, endêmica da região Nordeste do Brasil com ocorrência confirmada apenas no estado da Paraíba, no município de Areia, área de Brejos de Altitude, em elevações de 500 a 660m, sendo encontrada no interior da floresta na Mata do Pau-Ferro. A espécie possui grande afinidade com *E. simonis*, também encontrada na Paraíba (Loiola et al., 2007). Não há relato de estudos químicos e farmacológicos desta espécie.

### **2.4 Considerações sobre técnicas hifenadas**

A cromatografia líquida com o detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) é uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que, o analito apresente grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-visível. É uma técnica muito aplicada no controle de qualidade de produtos de origem

vegetal; porém, sua utilização na identificação de compostos bioativos é limitada, pois o CLAE-DAD fornece apenas o espectro UV-Vis de cada substância como informação estrutural, o que não é suficiente para a caracterização, pois vários compostos de um mesmo grupo químico apresentam espectros similares, impossibilitando sua distinção (Rodrigues et al., 2006).

Assim, a busca por mais informações sobre a estrutura de compostos levou ao desenvolvimento de novas técnicas hífenadas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM). Na última década, esta técnica tem sido uma das mais utilizadas para determinação da “impressão digital” ou *fingerprint* de plantas, devido à facilidade de manuseio e por não estar limitada à volatilidade ou estabilidade dos compostos da amostra (Gomes, 2009).

A cromatografia gasosa foi a primeira técnica a ser interfaceada com o detector de massas (CG-EM), pela facilidade de manuseio do eluente gasoso no cromatógrafo. É uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal, graças à disponibilidade de bibliotecas espectrais com detector de massas operando sob condições de impacto de elétrons. É uma técnica que permite separar gases ou substâncias volatilizáveis, baseando-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre duas fases. É o método mais utilizado para análise de compostos voláteis e termicamente estáveis como os terpenoides e de alcaloides tropanicos (Rodrigues et al., 2006).

O uso do CG-EM na determinação de alcaloides em métodos de perfil químico é predominante nas publicações científicas da área de química forense (Botelho, 2011). Bem como, no estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas e identificação de terpenoides (Branco et al., 2002). Esta técnica pode ser empregada na separação de flavonoides, entretanto, devido ao fato dos flavonoides não apresentarem volatilidade, existe a necessidade de derivatização, processo que dificulta o uso desta técnica (Março et al, 2008).

## **2.5 Considerações sobre Citotoxicidade**

O câncer é a principal causa de morte no mundo, por isso uma das razões para a busca de novos agentes anticancerígenos, destacando-se os de origem nos produtos naturais, o que torna a pesquisa com esses produtos relevante (WEN TAN et al., 2011).

As investigações *in vitro* sobre a leucemia mielóide (LMA) utilizando linhagens de células cultivadas contribuíram para a caracterização deste tipo de leucemia, aumentando os conhecimentos sobre a diferenciação e morte celular por apoptose e, principalmente, para a compreensão dos efeitos da quimioterapia (BRUSERUD e WENDELBOE, 2001). As linhagens de células humanas derivadas de leucemias mielóides têm sido utilizadas como modelos para estudar o controle molecular da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas. Assim, a realização de triagens *in vitro*, para descobrir agentes citotóxicos contra células tumorais ainda é um dos objetivos da pesquisa contra o câncer.

A cultura de células tem importância na investigação das características toxicológicas no que concerne aos estudos farmacológicos, propiciando uma ferramenta fundamental na avaliação dos parâmetros biológicos e/ou terapêuticos versus os efeitos toxicológicos (MELO et al., 2004).

O estudo de citotoxicidade é um procedimento que avalia o quanto um produto pode ser tóxico para uma célula, contudo, podem ser utilizados diversos métodos para isso. O método de avaliação da toxicidade pelo uso do MTT demonstra o número de células em uma amostra e o nível de sua atividade metabólica (MOSSAN, 1983). Esse autor afirmou que o teste de citotoxicidade, pelo MTT, é um método confiável, que se reproduz fácil e rapidamente em laboratório, por meio da aplicação do corante brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio, conhecido na literatura unicamente por MTT. A reação ocorre em um sítio específico – nas mitocôndrias – de células viáveis, sob ação das enzimas desidrogenases mitocondriais que degradam o anel tetrazólio do MTT produzindo cristais insolúveis de formazina. O método de MTT tem sido frequentemente utilizado para analisar os efeitos citotóxicos anel tetrazólio formazina desidrogenase mitocondrial de diversos produtos, incluindo fitoterápicos (GUERRERO et al., 2011).

Vários estudos têm demonstrado a atividade citotóxica de flavonoides. Sonoda e colaboradores (2004) testaram 17 flavonoides em células HL-60, dentre eles 10 inibiram a proliferação celular *in vitro*. Galvez e colaboradores (2013) demonstraram a citotoxicidade da luteolina em melanoma com uma CI50 de 10µg/mL. A apigenina demonstrou inibição celular em células HL-60.

## *OBJETIVOS*

## 3 OBJETIVOS

### 3.1. Geral

Contribuir para a ampliação do conhecimento químico e biológico de espécies vegetais da família Erythroxilaceae, em especial *Erythroxylum paufferense*, uma planta endêmica da Paraíba, com estudo fitoquímico relatado pela primeira vez.

### 3.2. Específicos

- Identificar os constituintes químicos fenólicos da fase acetato de etila das folhas de *Erythroxylum paufferense* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM);
- Isolar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector por arranjo de diodos em escala analítica e fracionamento em escala preparativa e caracterizar por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e HMBC inequivocamente os componentes detectados na CLAE/EM/EM em maior concentração e que tenham importância quimiotaxonomica;
- Avaliar a citotoxicidade da fase acetato de etila das folhas de *Erythroxylum paufferense*, em células MCF-7, HL60 e HCT-116.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material e equipamentos utilizados

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos utilizando espectrômetros de massas de baixa resolução da marca Bruker modelo Ion-Trap AmazonX. As amostras foram preparadas com metanol grau HPLC da Merck.

A cromatografia por exclusão em coluna foi realizada utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), e metanol p.a. da Sigma-Aldrich como fase móvel.

A Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi realizada em cromatofolhas de alumínio - sílica gel 60 PF254 artigo 7749, Merck. Para a eluição, foram utilizados solventes orgânicos comerciais (hexano, acetato de etila e metanol) puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade.

A revelação física das cromatoplasmas foi realizada através da exposição à radiação ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 e 366 nm, utilizando o aparelho Mineralight modelo UVGL-58.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo analítico da marca Shimadzu, equipado com uma coluna da marca Kromasil, bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A HT e detector UV-VIS SPD-M20A. E em um cromatógrafo preparativo da marca Shimadzu, equipado com uma coluna da marca Kromasil, bombas LC-6AD, injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizado água milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merck. Este também foi empregado no preparo da amostra.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de  $^{13}\text{C}$  (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais (HMBC) foram obtidos em um espectrômetro Bruker operando a 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), como também no espectrômetro Varian system operando a 500MHz, localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Para o preparo das amostras a serem analisadas, foram utilizados solventes deuterados ( $\text{CD}_3\text{OD}$  e DMSO) da Cambridge Isotope Laboratories.

## **4.2 Material Vegetal**

### **4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal**

As partes aéreas de *Erythroxylum pauferrense* foram coletadas em junho de 2016 no município brasileiro de Areia, estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Fátima Agra do setor de botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma excicata dessa espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob código *Agra 4958* (JPB) e sob cadastro AE11D71 no SISGEN.

### **4.2.2 Processamento do material vegetal**

As partes aéreas de *Erythroxylum pauferrense* foram dessecadas em uma estufa de ar circulante à uma temperatura de 40°C durante 72 horas. O material seco foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico fornecendo 3000 g do pó da planta.

## **4.3 Obtenção do extrato etanólico bruto**

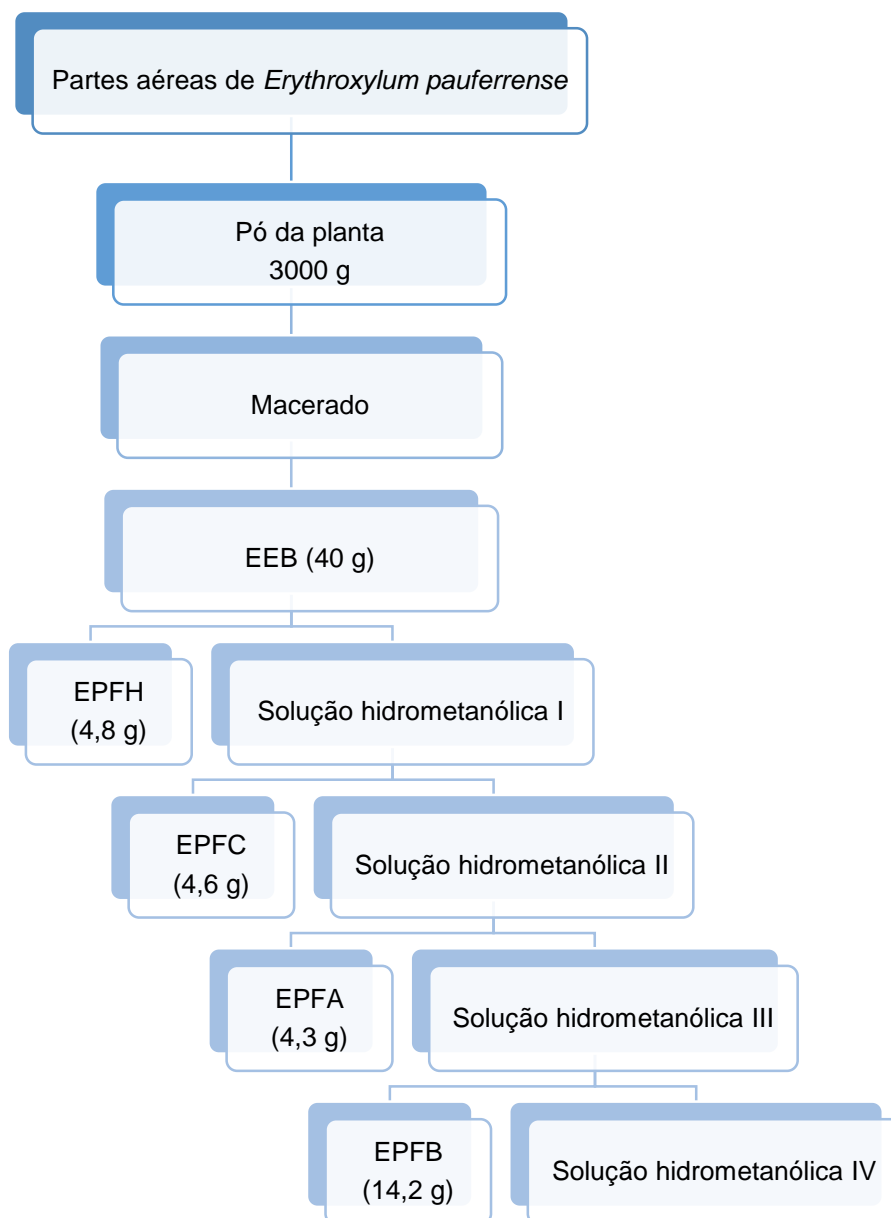
O material vegetal seco e pulverizado (3000 g) foi macerado com etanol (EtOH) a 95 %, em recipiente de aço inoxidável, durante 72 horas, sendo esse processo repetido por três vezes. A solução extrativa foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C, desta forma obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB).

## **4.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto**

Parte do extrato etanólico bruto (40g) das partes aéreas de *Erythroxylum pauferrense* foi diluída em 500 mL de uma solução metanol/água (7:3 v/v) e submetido a agitação por 60 minutos para homogeneização. Em seguida, foi realizada uma partição líquido/líquido em uma ampola de separação, utilizando os seguintes

solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções obtidas foram concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em um rotaevaporador, obtendo-se ao fim as fases: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica (Esquema 1, pág. 36).

**Esquema 1** – Elaboração e partição do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas de *Erythroxylum paufferense*.



Legenda: EPFH – Fase hexânica de *Erythroxylum paufferense*; EPFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum paufferense*; EPFA – Fase acetato de *Erythroxylum paufferense*; EPFB – Fase butanólica de *Erythroxylum paufferense*.

#### 4.5 Espectrometria de massas da fase acetato de etila

Na preparação da amostra da fase acetato de etila, foi solubilizado 0,001 g desta em 1 mL de metanol grau HPLC, seguidas de 30 segundos de banho de ultrassom, no aparelho USC-1600 da marca Unique, para favorecer a solubilização, e filtradas em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro. Posteriormente, uma alíquota de 200 µL desta solução foi adicionada em 800 µL de metanol grau HPLC e, por fim, 20 µL desta última solução foi adicionada em 980 µL de CH<sub>3</sub>OH: H<sub>2</sub>O (1:1). Em seguida a amostra foi injetada no espectrômetro de massas, sendo utilizada a técnica de ionização por Eletrospray (modo negativo).

A identificação dos constituintes químicos fenólicos foi efetuada de acordo com a comparação dos seus espectros de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com espectros e padrões de fragmentação existentes na literatura.

#### 4.6 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila

A fase acetato de etila (3,0g) foi submetida a cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sephadex LH-20, e metanol (MeOH) como fase móvel. Foram coletadas 41 frações (EPFr 01 – 41). Após secagem a temperatura ambiente, as frações foram reunidas por análise de seus fatores de retenção em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando como sistema de eluição AcOEt:MeOH (9:1 v/v) com 2 gotas de ácido fórmico para as frações EPFr11 – 32, e como sistema de eluição AcOEt:MeOH (5:5 v/v) com 2 gotas de ácido fórmico para as frações EPFr1 – 10 e EPFr 33 – 41. Como revelador físico foi utilizada a luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366nm) (Esquema 2, pág. 37). Desta reunião foram obtidas 21 frações (Quadro 4, pág. 38).

**Esquema 2** – Fracionamento da fase acetato de etila.



**Quadro 4** – Dados das reuniões das frações após monitoramento por CCDA.

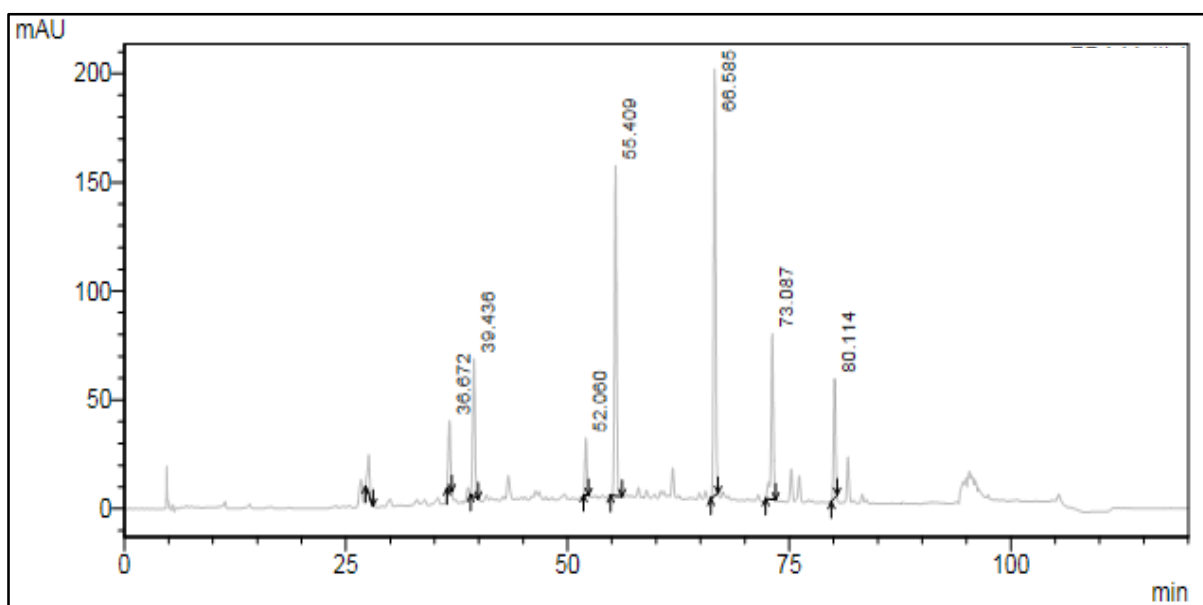
Fração	Peso
EPFA 1-2	0,0280 g
EPFA 3-4	0,0183 g
EPFA 5	0,0320 g
EPFA 6	0,0270 g
EPFA 7	0,0726 g
EPFA 8-10	0,0922 g
EPFA 11-12	0,2300 g
EPFA 13	0,1059 g
EPFA 14	0,1248 g
EPFA 15	0,0941 g
EPFA 16-18	0,1404 g
EPFA 19-20	0,0639 g
EPFA 21-25	0,0624 g
EPFA 26-27	0,0575 g
EPFA 28	0,0197 g
EPFA 29-30	0,0234 g
EPFA 31-32	0,0147 g
EPFA 33-35	0,0156 g
EPFA 36	0,0108 g
EPFA 37-38	0,0160 g
EPFA 39-41	0,0173 g

#### 4.7. Processamento cromatográfico da fração EPFA 11-12 por CLAE

A fração EPFA 11-12 (230 mg) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Inicialmente foi preparada uma solução com 1mg da amostra em metanol grau HPLC, na concentração de  $1\text{mg/mL}^{-1}$ . Utilizou-se como fase móvel água ultrapura (Tipo I) purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> acidificada com ácido fórmico (0,1%) e metanol grau HPLC. A análise no cromatógrafo analítico permitiu desenvolver um método eficiente para o isolamento das substâncias presentes na fração. No método mais eficaz, a concentração de metanol variou de 5 a 75% em um tempo de 90 minutos com um fluxo de 0,6 mL/min. No cromatograma (figura 3, pág. 39) foi possível observar 7 picos principais.

Na transposição para o cromatógrafo preparativo (figura 4, pág. 40), foi preparada uma solução com 200 mg da amostra em 2000  $\mu\text{L}$  de metanol grau HPLC. Foram realizadas 9 injeções de 100  $\mu\text{L}$  desta solução. Foi utilizado o método desenvolvido na fase analítica, no entanto foi empregado um fluxo de 8 mL/min. As frações obtidas foram então concentradas sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C em um rotaevaporador. Deste processo foram coletadas 8 frações (Quadro 5, pág. 40), correspondentes aos 8 picos visualizados no cromatograma analítico. Estando as substâncias, presentes nas frações EpFr-12.4, EpFr-12.5 e EpFr-12.6, isoladas. Estas foram codificadas, nesta ordem, em EPF-1, EPF-2 e EPF-3.

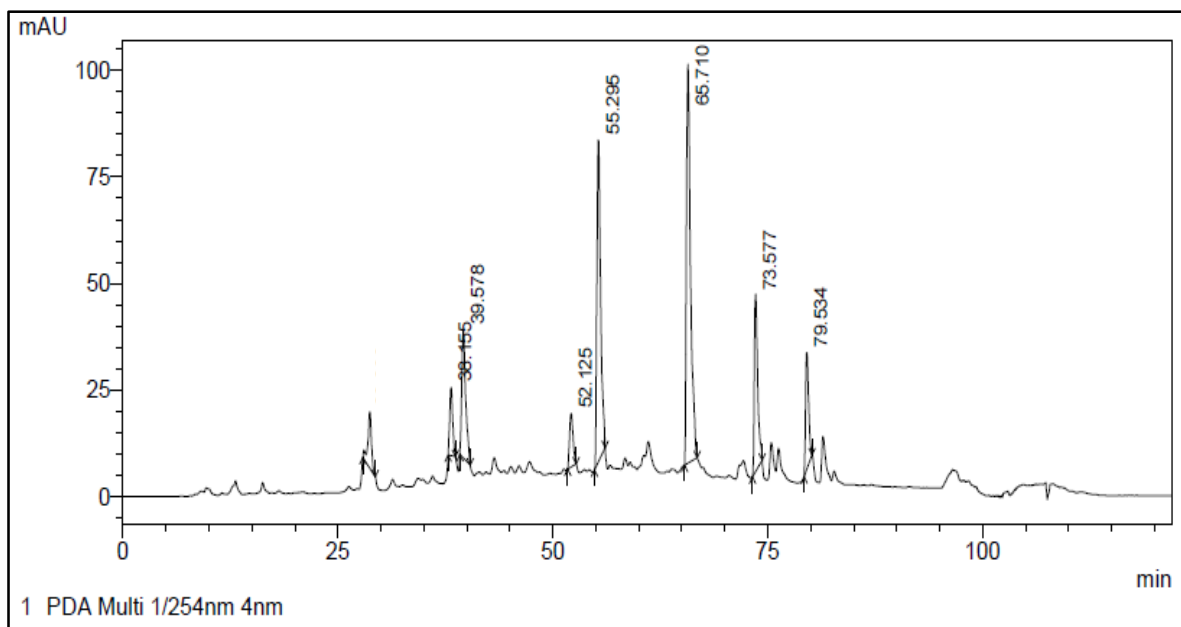
**Figura 3** -Cromatograma da fração EPFA-12 por CLAE no modo analítico.



**Quadro 5** – Dados das frações coletadas no cromatógrafo preparativo

Fração	v/v	peso
EPFr 12.1	120 mL	0,003
EPFr 12.2	150 mL	0,003
EPFr 12.3	140 mL	0,002
EPFr 12.4	150 mL	0,015g
EPFr 12.5	300 mL	0,013g
EPFr 12.6	280 mL	0,010g
EPFr 12.7	260 mL	0,004

**Figura 4** -Cromatograma da fração EPFA-12 por CLAE no modo preparativo



#### 4.8. Caracterização estrutural dos compostos isolados

As determinações estruturais dos constituintes químicos isolados, foram efetuadas a partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (HMBC), e pela comparação destes com dados descritos na literatura. Para a obtenção dos espectros foi utilizado metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) na solubilização das substâncias EPF-1 e EPF-3, e dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ) para a substância EPF-2.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e como padrão interno foram utilizados os sinais característicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos solventes utilizados. Para RMN  $^1\text{H}$  os sinais característicos são em  $\delta_{\text{H}}$  3,30 para o metanol e em  $\delta_{\text{H}}$  2,49 para o DMSO. Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os sinais característicos são em  $\delta_{\text{H}}$  49,0 para o metanol e em  $\delta_{\text{C}}$  39,5 para o DMSO. As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram dadas em Hz e as multiplicidades no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: s (singleto), sl (singleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), dl (duplete largo), t (tripleto), q (quadruplete) e m (multiplete).

#### 4.9 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas

Para a avaliação da citotoxicidade da fase acetato de etila da *E. Pauferrense* foi realizada uma triagem utilizando as linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal) mantidas em meio de cultura RPMI-1640. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida enriquecida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL para células aderentes (MCF7 e HCT116) e  $5 \times 10^5$  cél/mL para células não aderentes (HL60). Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 4 mg/mL das amostras, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foi produzida a solução de trabalho na concentração de teste (200  $\mu\text{g/mL}$ ), diluída em meio RPMI-1640, não

ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 µL do sobrenadante, sendo adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). As placas foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS; 10% HCL 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram cobertas com um papel alumínio e deixadas *overnight* em um agitador. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

O experimento foi realizado em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico da amostra testada: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação de compostos fenólicos por CLAE-EM

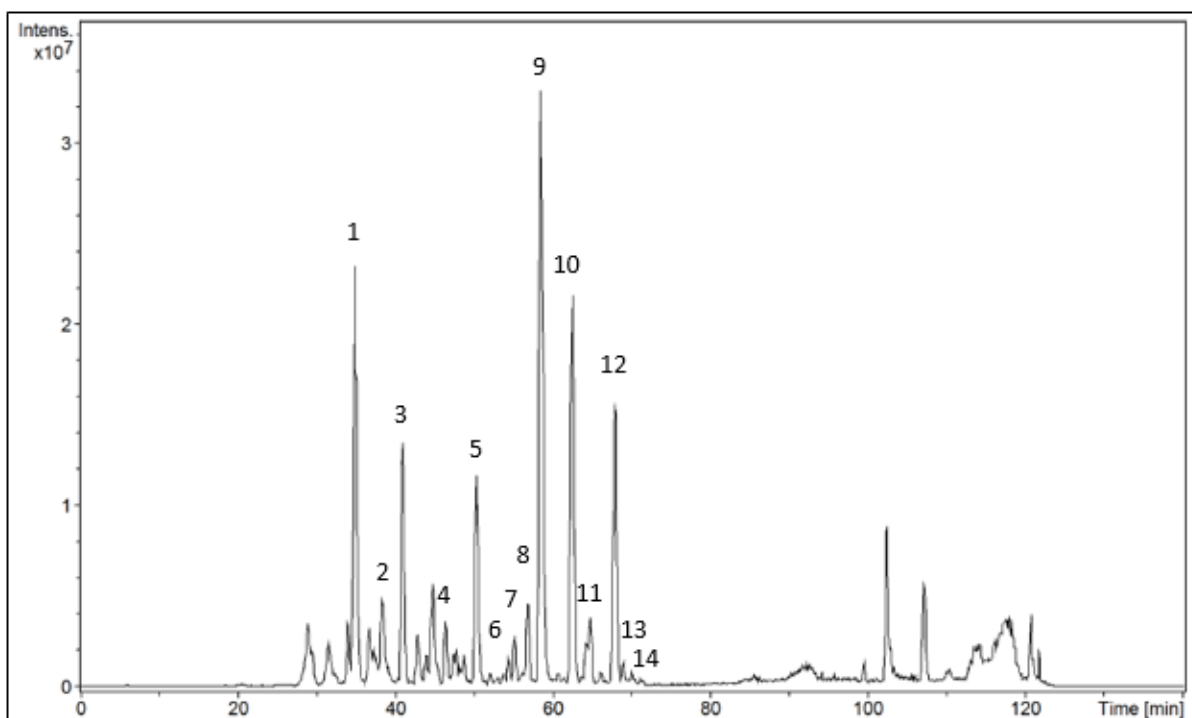
A fase acetato de etila da *Erythroxylum paufferense* foi analisada por CLAE-EM com vista à identificação dos compostos bioativos, a fim de contribuir para a quimiotaxonomia da espécie. No cromatograma da fase, verifica-se a existência de quinze compostos, após a zona do sinal de injeção (tempo de retenção entre 1-2 min).

**Tabela 1:** Compostos fenólicos presentes na fase acetato da *Erythroxylum paufferense*

Pico	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Tr (min)	Formula Molecular	MS <sup>n</sup> (m/z)	Composto	Referência
1	577,0	34,9	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	451, 425, 407, 289, 245	procianidina tipo B	SANTOS et al., 2013
2	865,1	37,6	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	739, 713, 695, 577, 288	proantocianidina tipo C	RODRIGUES et al., 2007
3	289,0	41,0	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	245	epicatequina	RODRIGUES et al., 2007
4	625,0	47,9	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	301, 271, 255, 179, 151	quercetina-di-hexosideo	SANTOS et al., 2013
5	595,0	50,3	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub>	301, 271, 255, 179, 151	quercetina-3-sambubiosideo	SANTOS et al., 2013
6	579,0	54,5	C <sub>26</sub> H <sub>17</sub> O <sub>15</sub>	285, 255	canferol-3-O-sambubiodiseo	SANTOS et al., 2013
7	609,0	55,1	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	301, 271, 255, 179, 151	rutina	SANTOS et al., 2013
8	463,0	55,1	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	301, 271, 255, 179, 151	quercetina-3-O-hexosideo	- SANTOS et al., 2013
9	447,0	58,5	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	301, 271, 255, 151	quercetina-3-O-alfa-L-rhamnopiranosideo	SANTOS et al., 2013
10	653,1	62,5	C <sub>29</sub> H <sub>18</sub> O <sub>18</sub>	315, 301, 271	dimetilquercetina-di-hexosideo	- SANTOS et al., 2013
11	623,1	64,6	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	315, 271	isorhaminetin-3-O-rutinosideo	CHEN et al., 2015
12	637,1	67,9	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	329, 315, 301, 271	dimetilquercetina-rutnosideo	RODRIGUES et al., 2007
13	491,0	69,0	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	329, 315, 301, 271	dimetilquercetina-hexoside	RODRIGUES et al., 2007
14	461,0	70,1	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	315, 300, 271	isoramnetin-3-O-ramnosideo	CHEN et al., 2015

As estruturas dos compostos identificados na Tabela 1 foram propostas com base no padrão de fragmentação obtido por CLAE/EM<sup>n</sup> do cromatograma de íons totais da fase acetato por (Figura 5, pág 45). Para facilitar a interpretação dos espectros de massas e a identificação dos compostos, é necessário conhecer à priori alguns padrões de fragmentação destes.

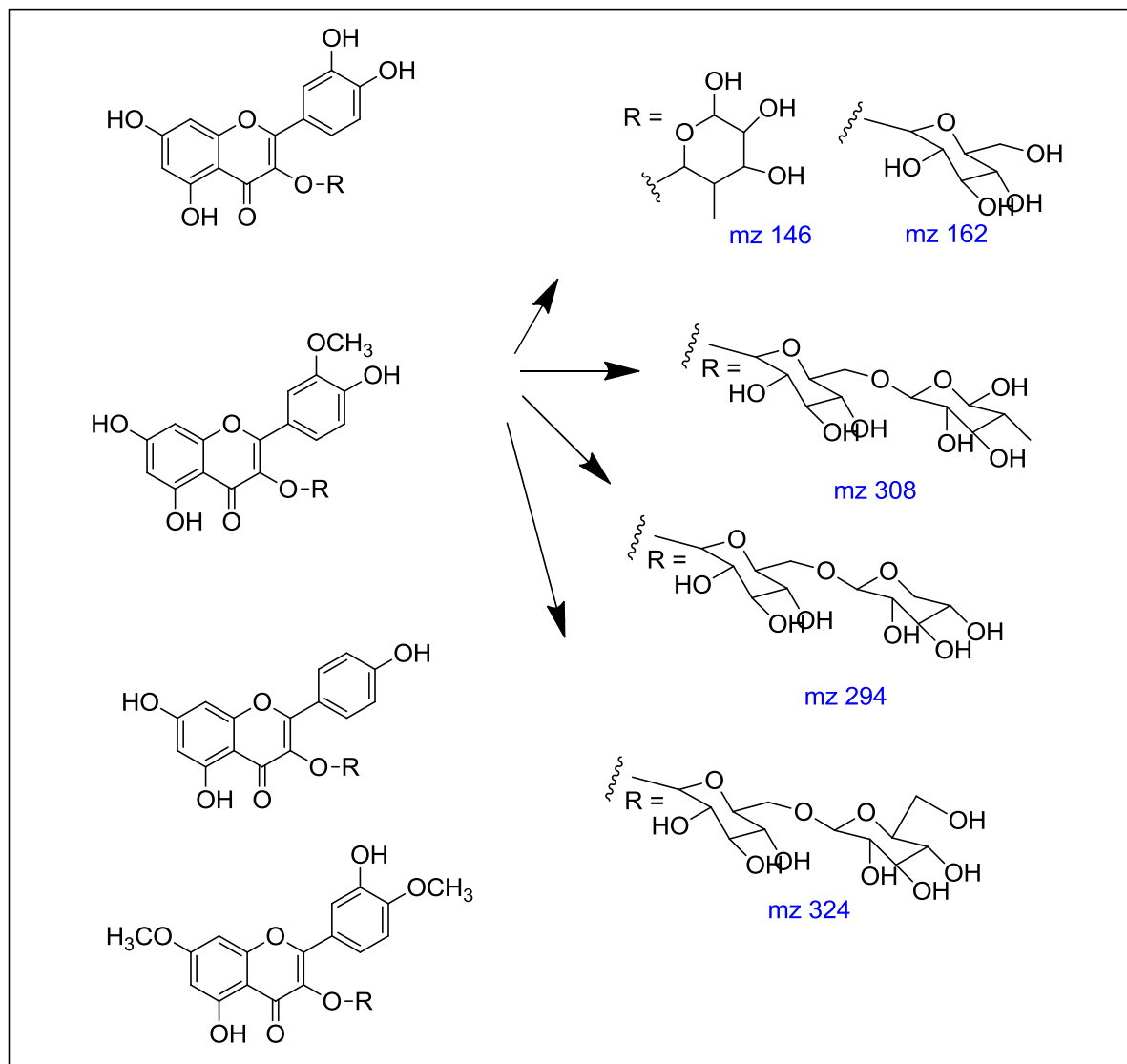
**Figura 5 :** Cromatograma de íons totais da fase acetato EPF por CLAE-EM



Para identificação dos flavon-O- glicosídicos foi observado um mecanismo de fragmentação de perdas neutras sequenciais de unidades osídicas dos compostos fenólicos. No espectro de CLAE-EM<sup>2</sup>, por exemplo, a perda de 162 Dalton é indicativa da presença de hexose (glicose ou galactose), a perda de 133 Da sugere a presença de pentoses (xilose ou arabinose), a perda de 146 Da pode ser resultado de uma perda de ramnose, e a perda de 308, 284 e 324 Da aponta para a presença de compostos que possuem uma estrutura dissacarídica, respectivamente, do tipo rutinósideo, sambubiosídeo e dihexose, gerando agliconas com  $m/z$  301 e 300;  $m/z$  329 e 328;  $m/z$  315 e 314;  $m/z$  285 e 284 característicos, respectivamente, de quercetina, dimetilquercetina, isoramnetina e canferol (BRITO, et al., 2014) (Figura 6,

pág. 46). Os pares de íons gerados são característicos de clivagem homolíticas e heterolíticas. [

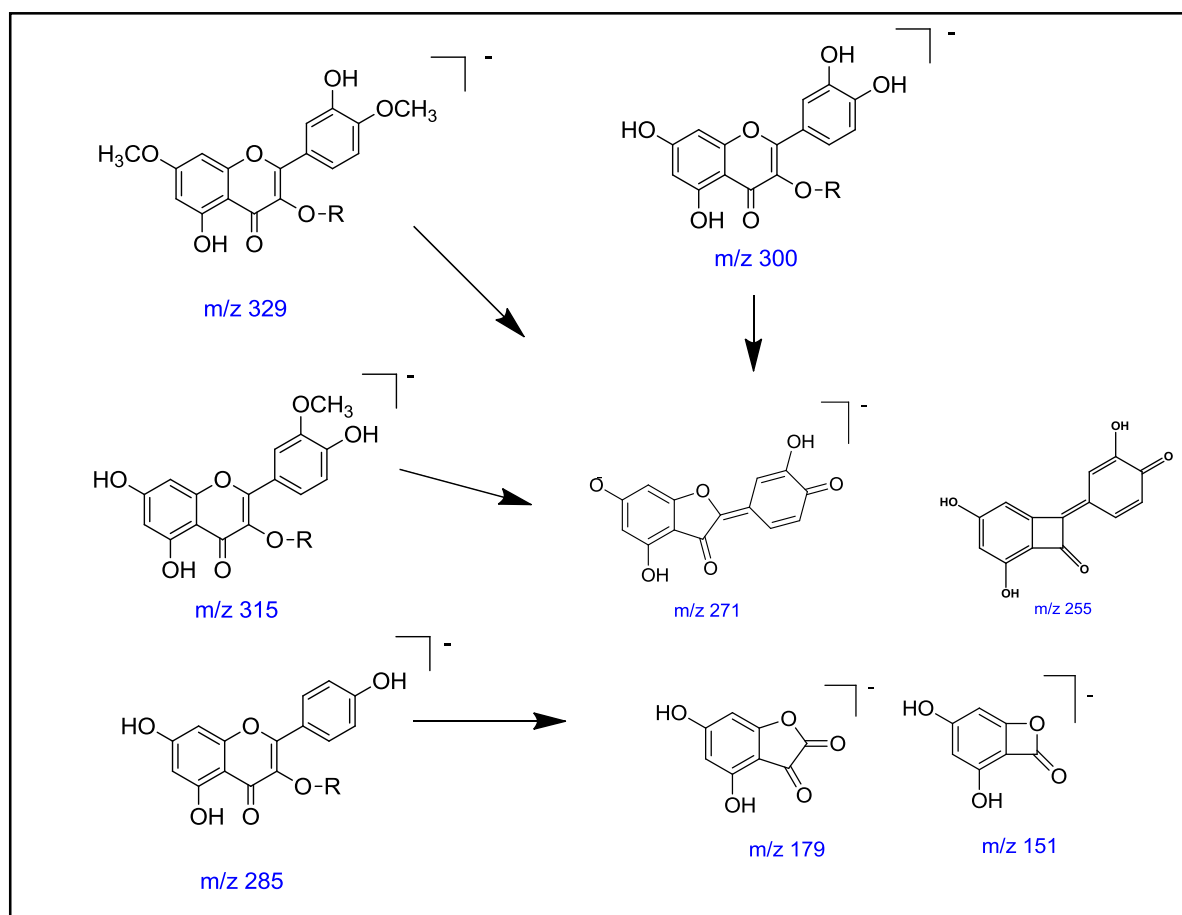
**Figura 6 :** Fragmentação de perdas neutras sequenciais de unidades osídicas dos compostos fenólicos analisadas em CLAE-EM<sup>2</sup>



Para além da análise CLAE-EM<sup>2</sup> foi também analisado o espectro CLAE-EM<sup>3</sup> dos compostos, de modo a confirmar que estes corresponderiam realmente a moléculas de flavonoides glicosilados. Logo, foi observado alguns padrões de fragmentação e perdas características, tais como, a perda de 30Da correspondente a CH<sub>2</sub>O, a perda de 46Da, referindo-se a CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o íon *m/z* 179 que resulta de uma fissão de *retro* Diels-Alder (RDA) com perda C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, entre as posições O-C2 e C2-C3 e o

íon  $m/z$  151 que resulta também de uma fissão RDA entre as posições O-C2 e C3-C4 com perda de  $C_8H_6O_4$ . O mecanismo subjacente a estas fissões compreende a clivagem do anel heterocíclico (anel C) (CELLI, et al., 2011; DAVIS, 2007) (Figura 7,pág 47).

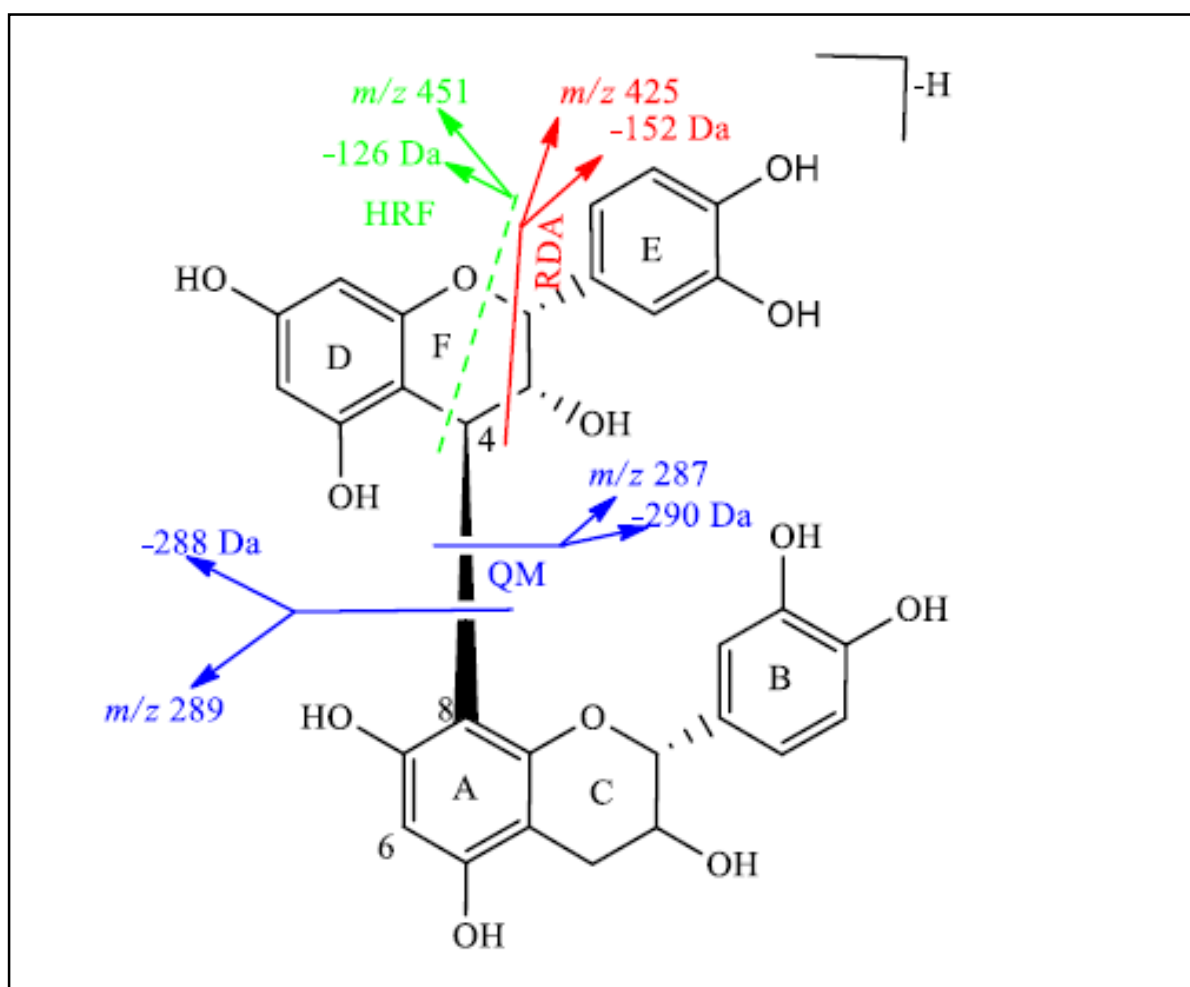
**Figura 7 :** Fragmentação de perdas neutras sequenciais de unidades osídicas dos compostos fenólicos analisadas em CLAE-EM<sup>3</sup>



As proantocianidinas também apresentam padrões de fragmentações, que se rege principalmente pela ocorrência da fissão do anel heterocíclico (HRF), de fissão *retro* Diels-Alder (RDA) e clivagem da ligação interflavanoídica por quinona metídeo. (POUPARD, et. al., 2011; LIN, et al., 2014). Sendo assim, foi observada a perda de 152Da ( $C_8H_8O_3$ ) a qual refere-se a uma fissão de RDA entre as posições O-C2 e C3-C4 com clivagem do anel heterocíclico (anel C) e eliminação do anel B. A perda de 126Da ( $C_6H_6O_3$ ) que resulta da fissão do anel heterocíclico (HRF), entre as posições O-C2 e C4-C5, com conseqüente perda do anel A. (CALLEMIEN e COLIN, 2008;

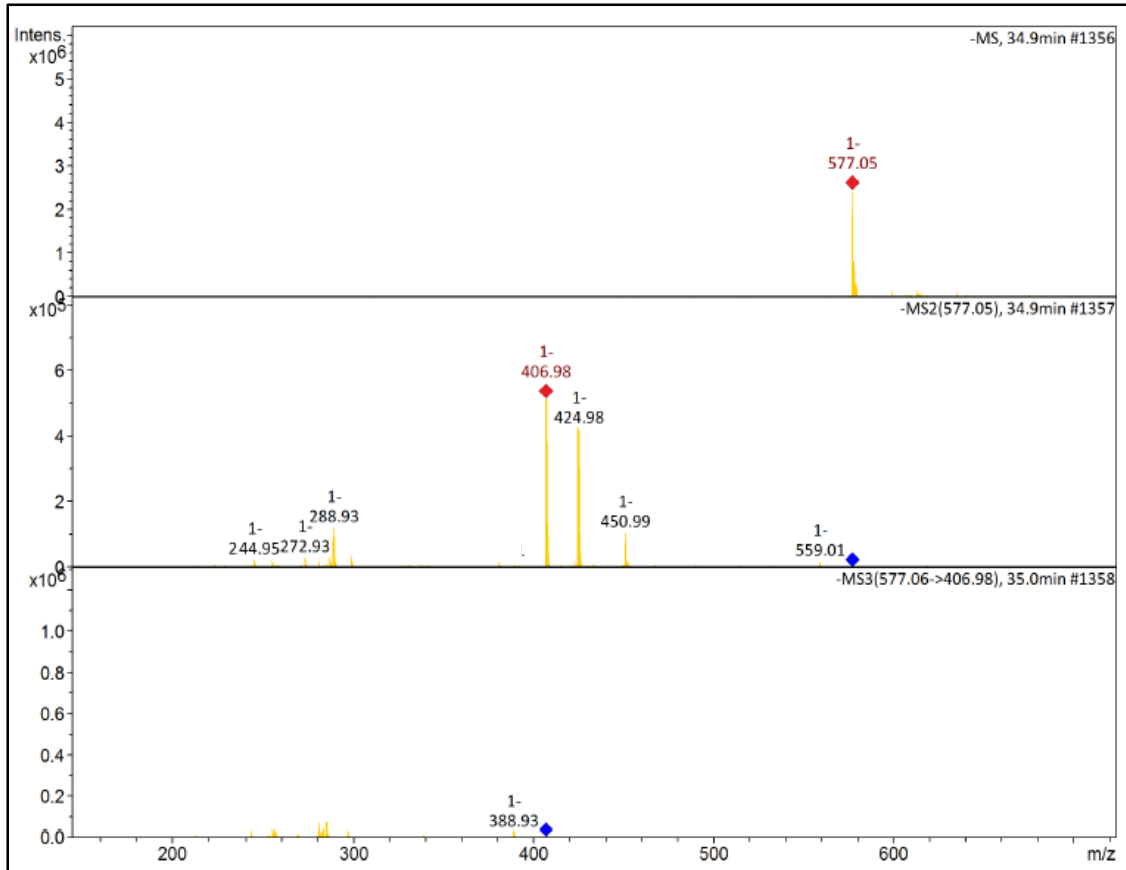
RODRIGUES et al., 2007; CREN-OLIVÉ et al., 2000). A perda de 170Da [ $M-H-C_8H_8O_3-H_2O$ ] por uma clivagem de RDA e a formação do íon  $m/z$  289, característico da catequina, ocorre por QM onde a clivagem da ligação C-C leva a perda de uma unidade do oligômero. (GE et al., 2017; MAGRINI, 2016; Jaiswal, et al., 2012) (Figura 8, pág 48)

**Figura 8 :** Fragmentação das proantocianidinas

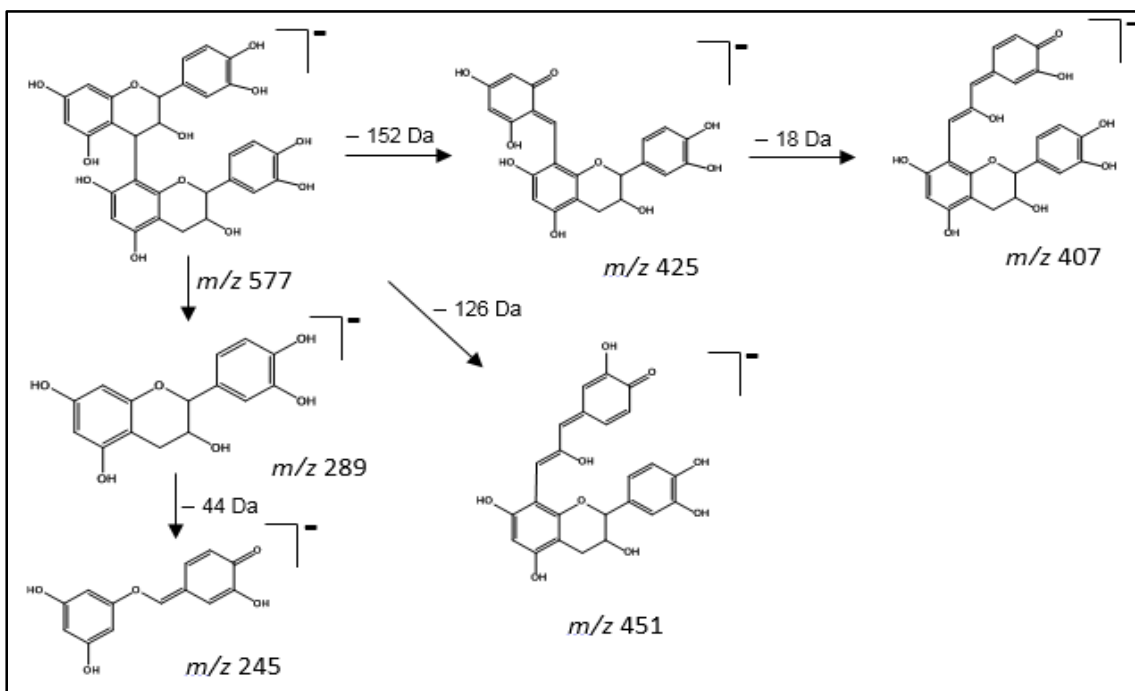


Através do espectro de CLAE/ $EM^n$ , correspondente à molécula desprotonada  $[M-H]^-$ , podemos analisar os íons resultantes das suas fragmentações, assim como identificar os 14 compostos. Os espectros de CLAE/ $EM^n$  da cada substância e as suas vias de fragmentação estão dispostos abaixo (Figura 6 – Figura 33, pág. 47 – 60).

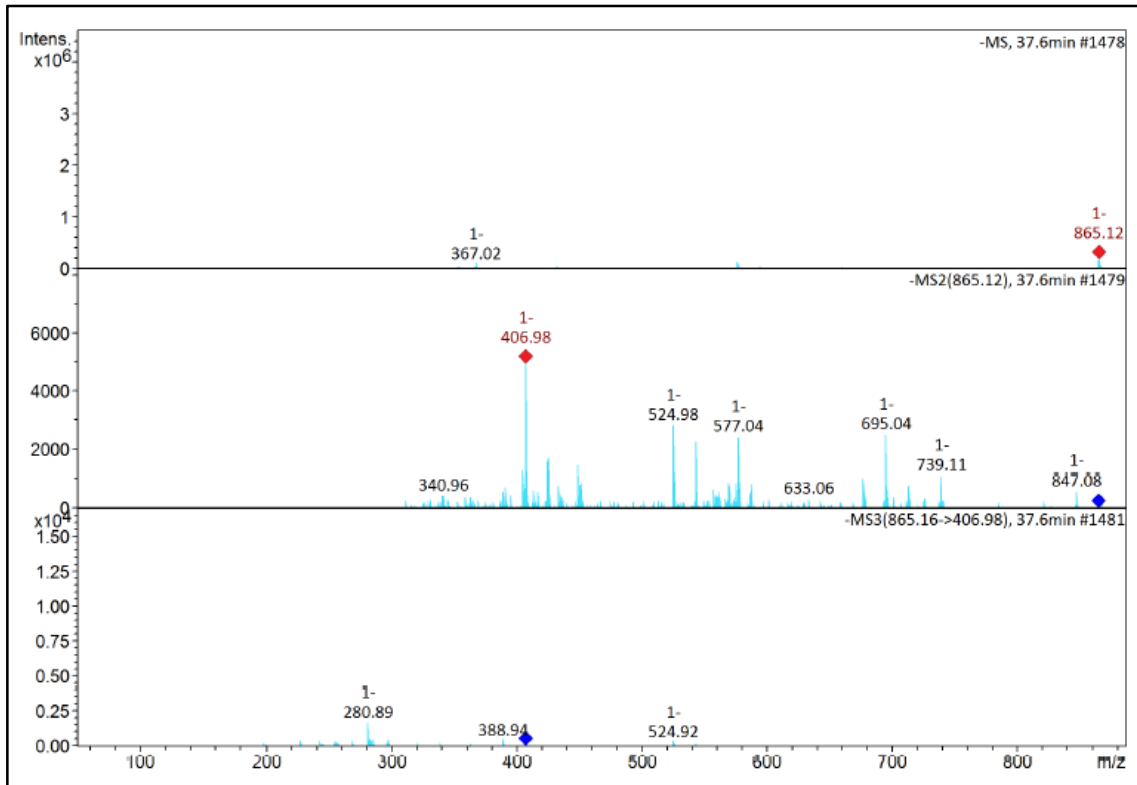
**Figura 9:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 1



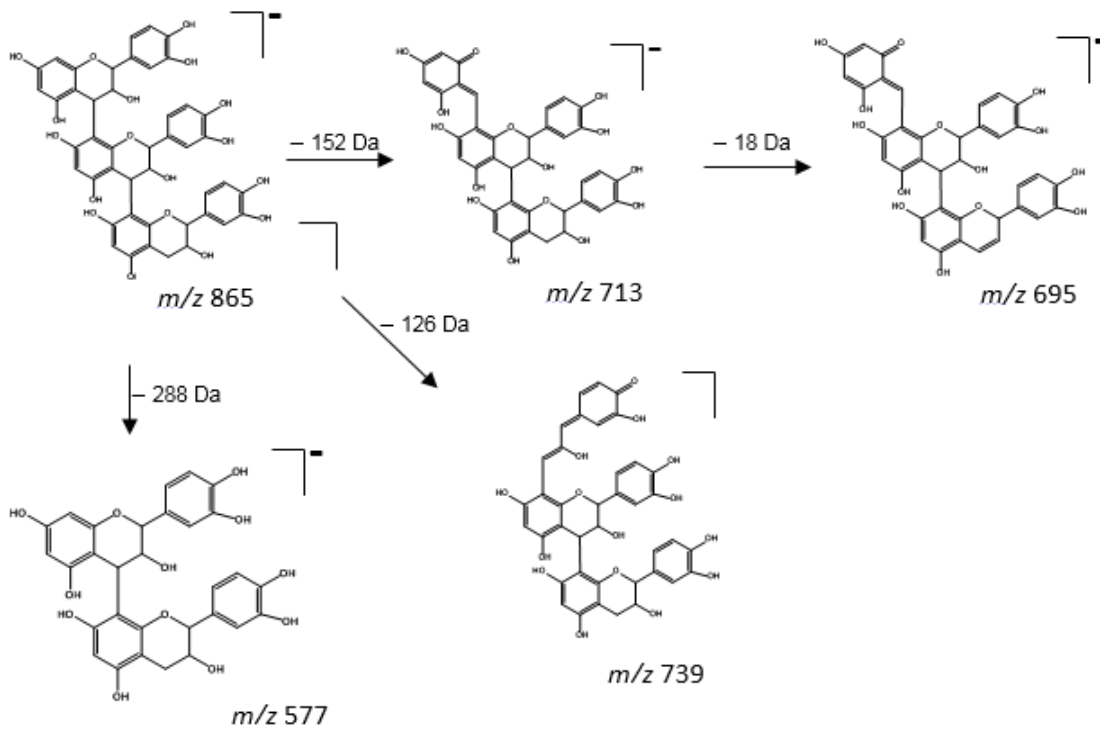
**Figura 10:** Via de fragmentação da proantocianidina B



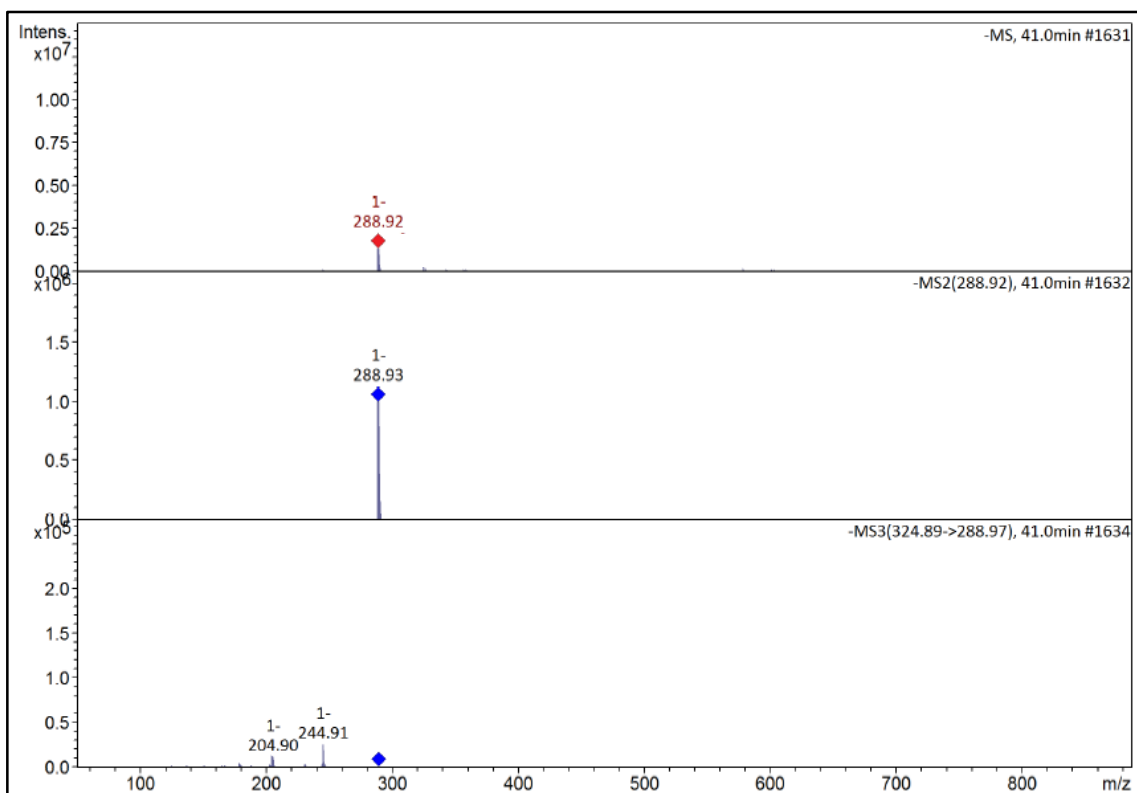
**Figura 11:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 2



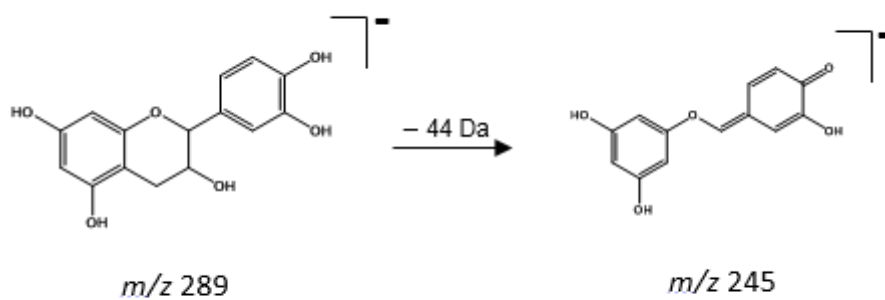
**Figura 12:** Via de fragmentação da proantocianidina C



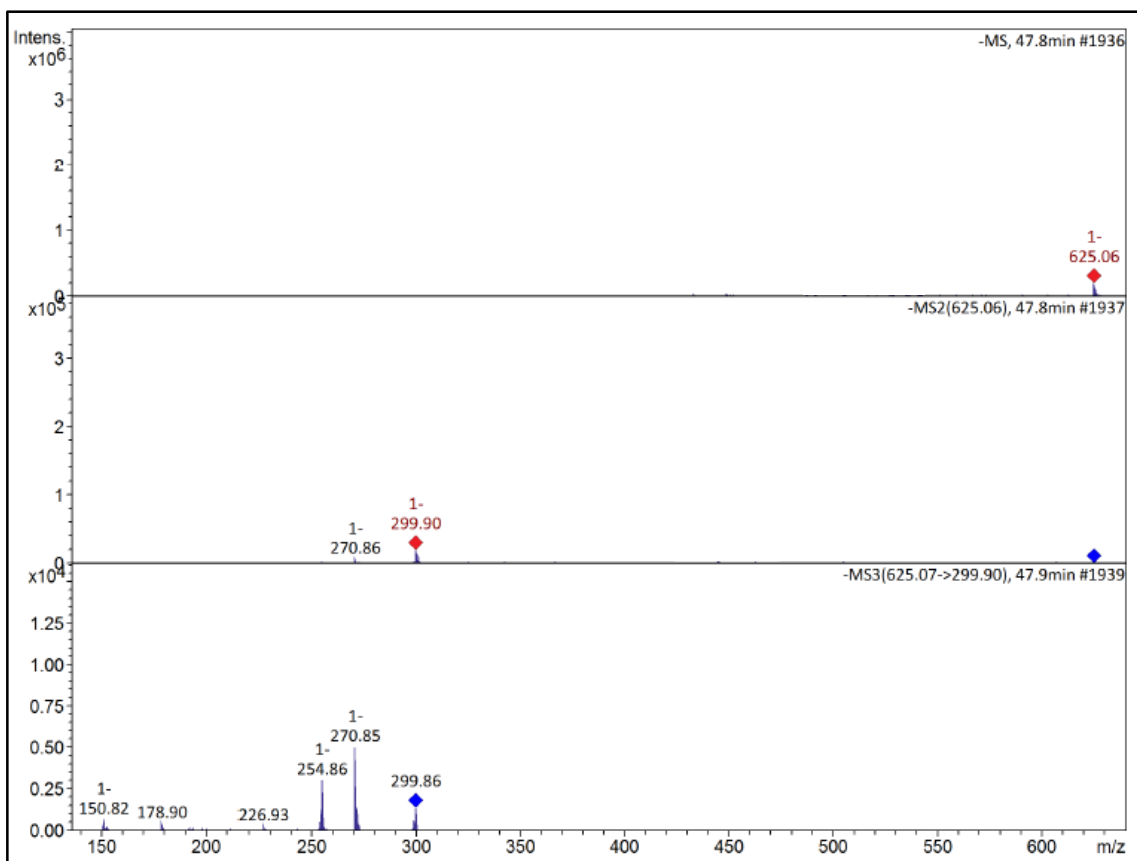
**Figura 13:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 3



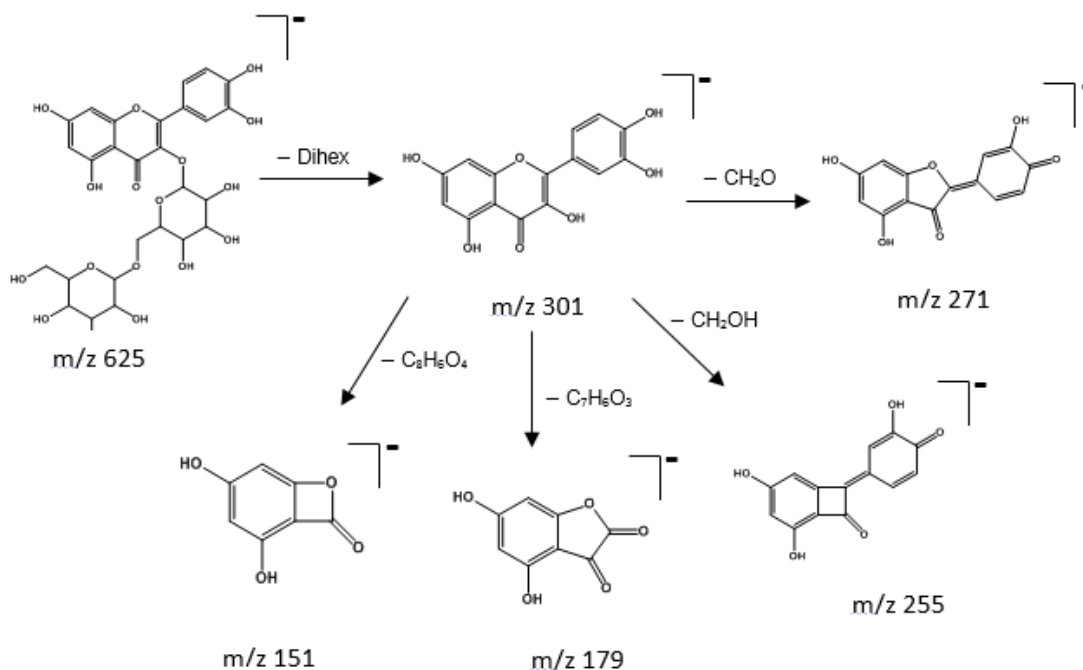
**Figura 14:** Via de fragmentação da catequina



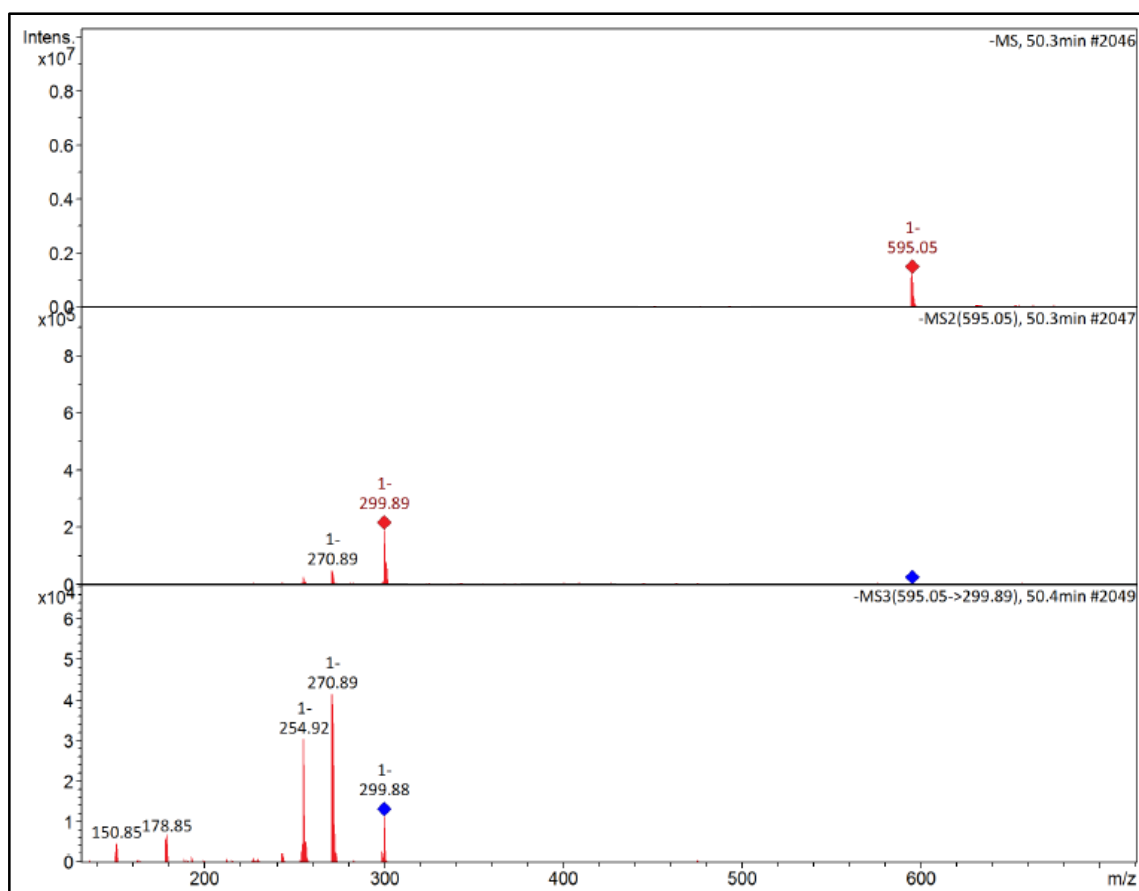
**Figura 15:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 4



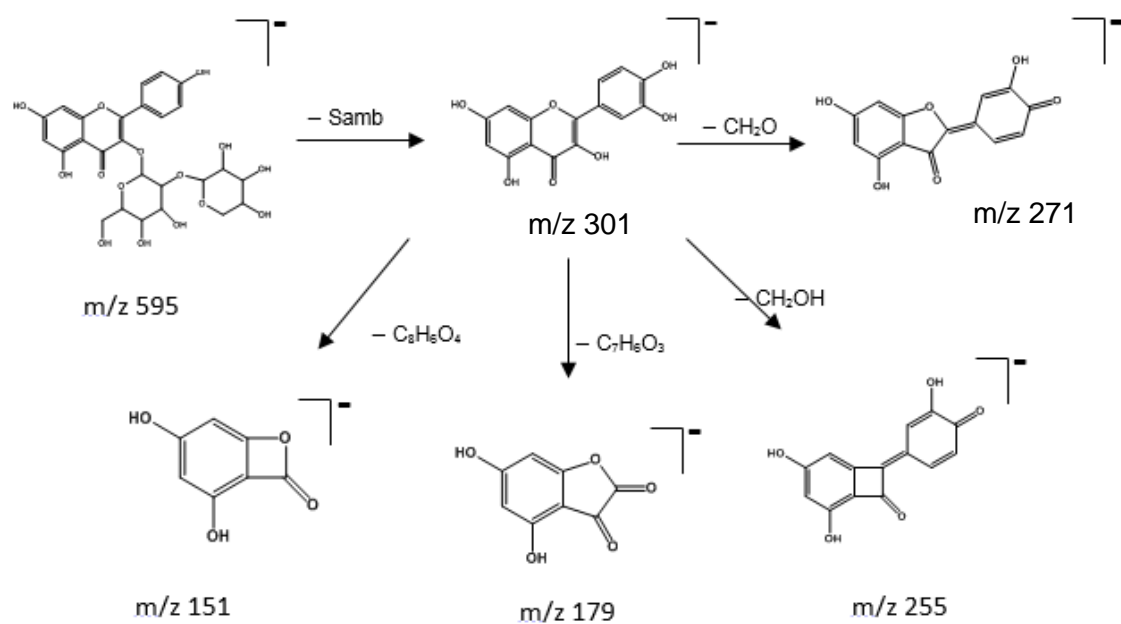
**Figura 16:** Via de fragmentação da Quercetina-3-O-dihexosideo



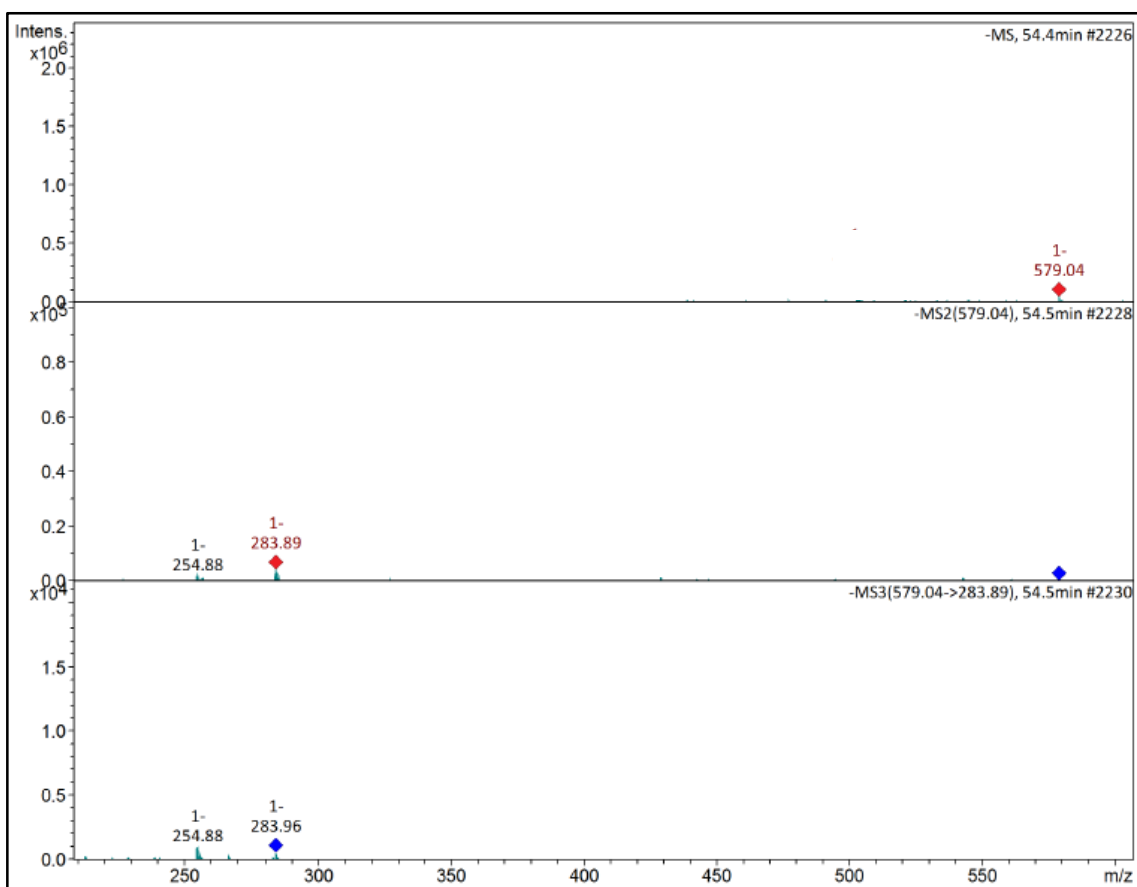
**Figura 17:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 5



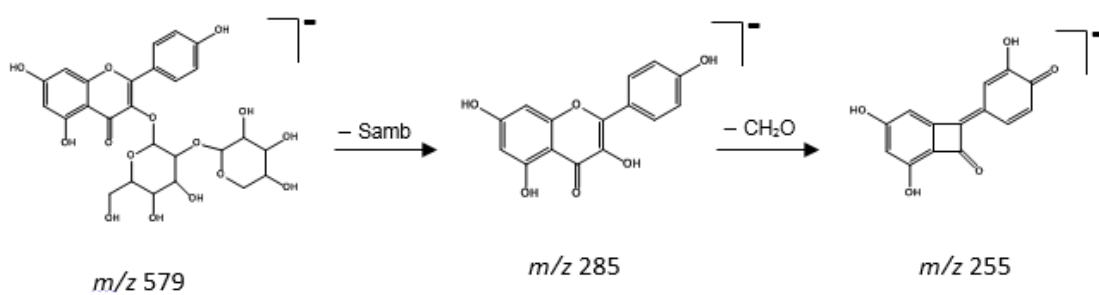
**Figura 18:** Via de fragmentação da Quercetina-3-O-sambubiosídeo



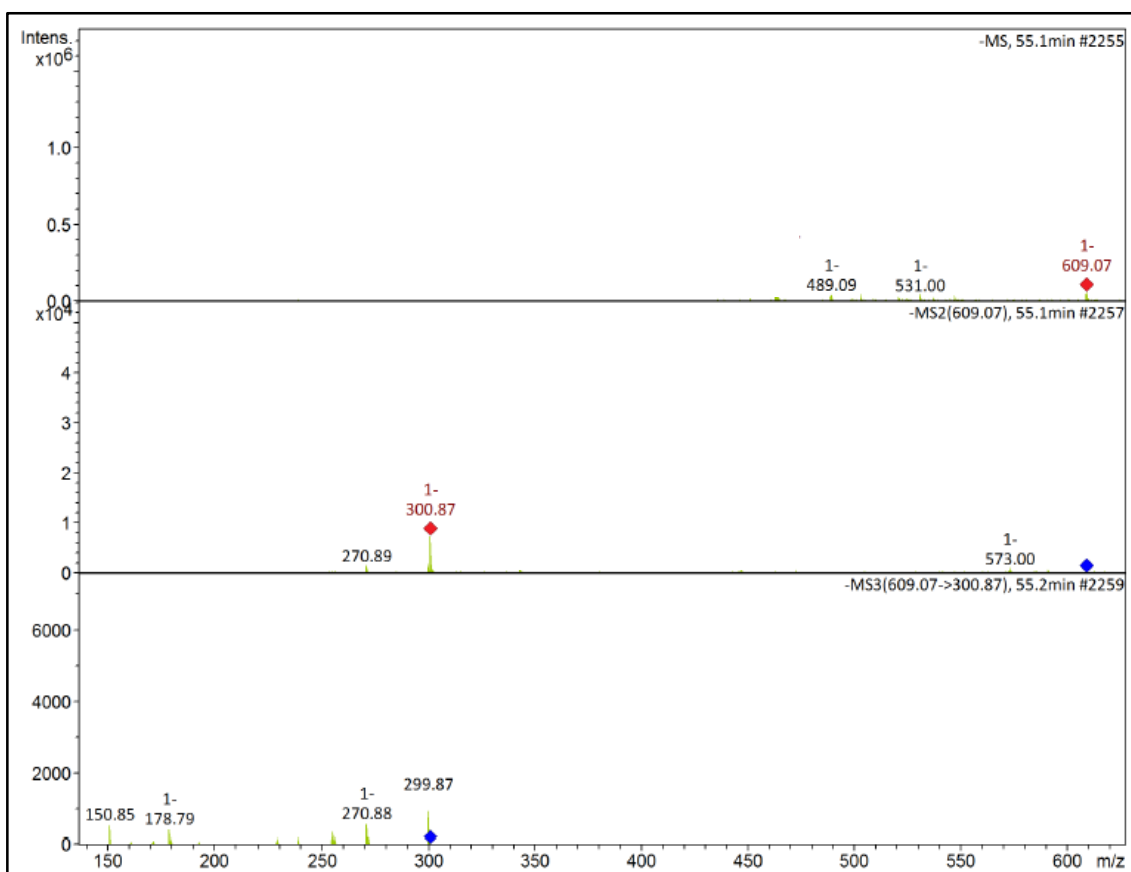
**Figura 19:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 6



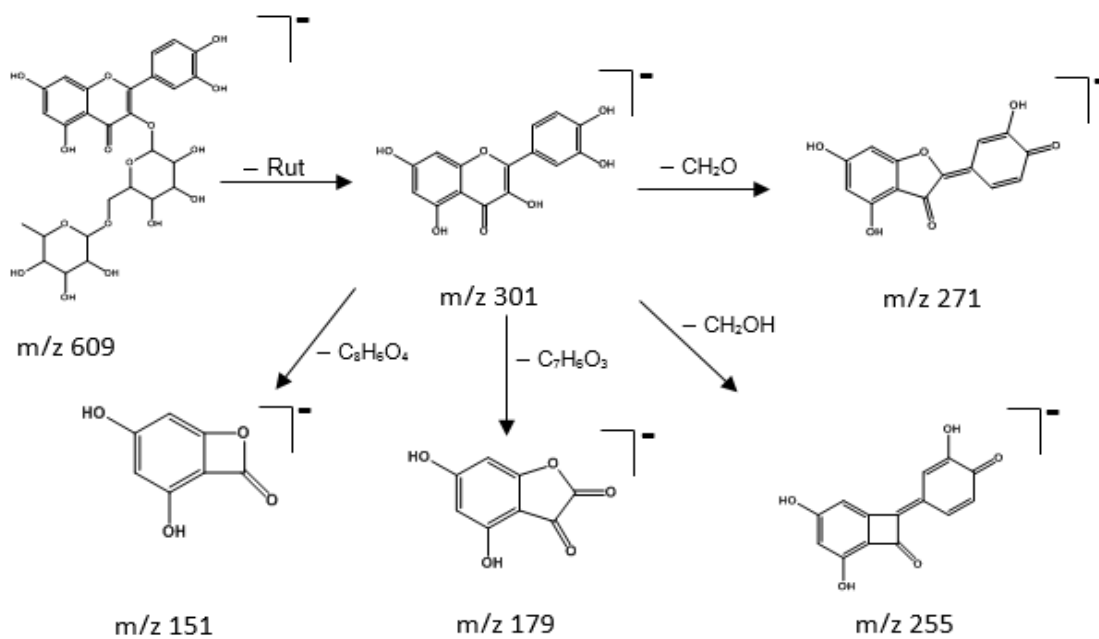
**Figura 20:** Via de fragmentação do Canferol-3-O-sambubiodiseo



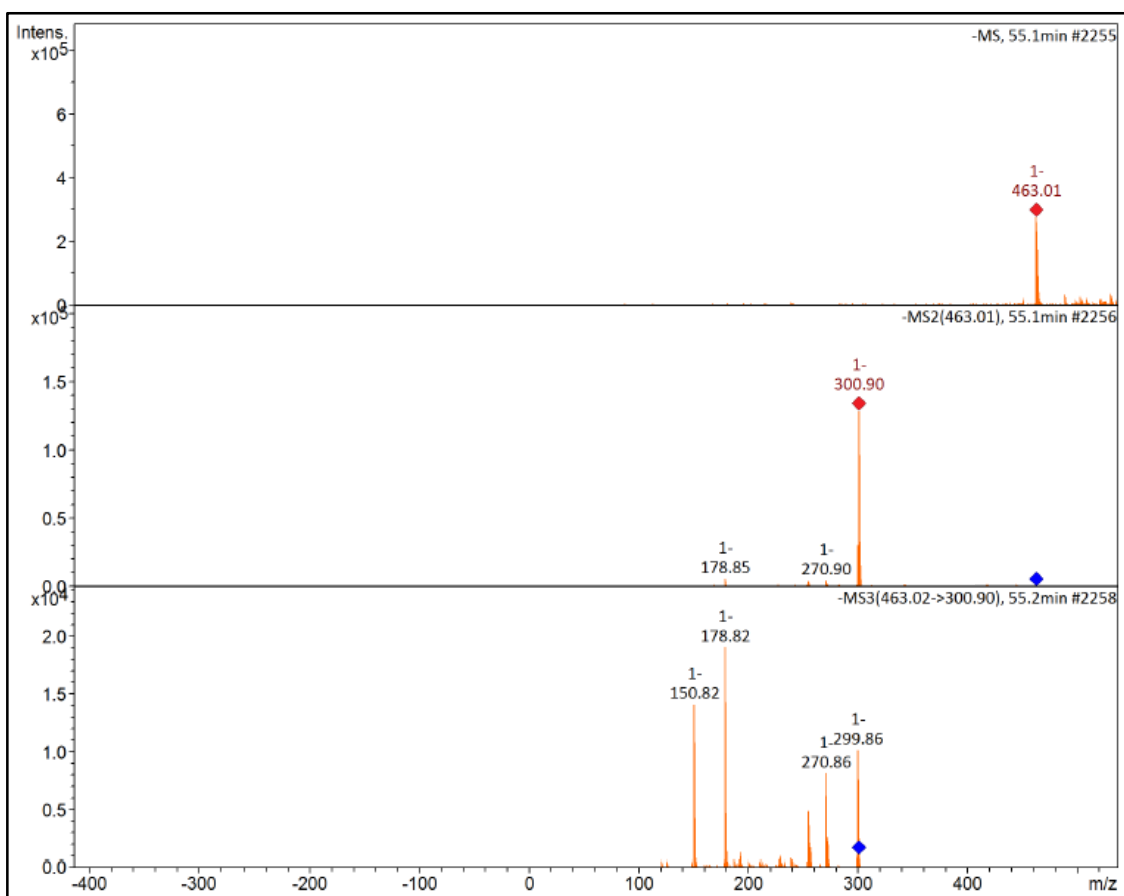
**Figura 21:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 7



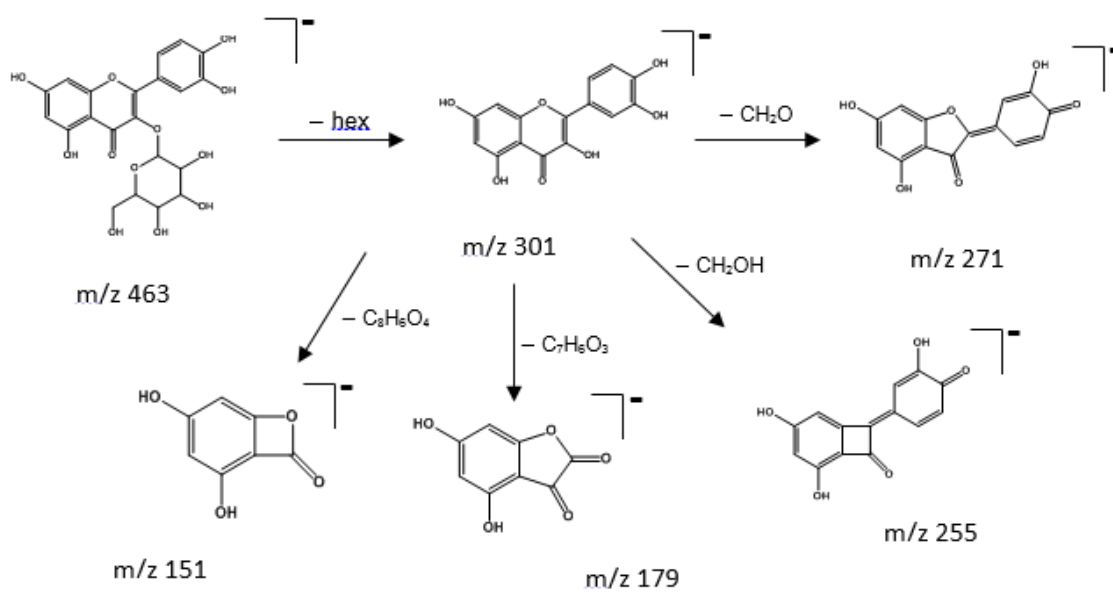
**Figura 22:** Via de fragmentação da Quercetina 3-O-rutinosideo (Rutina).



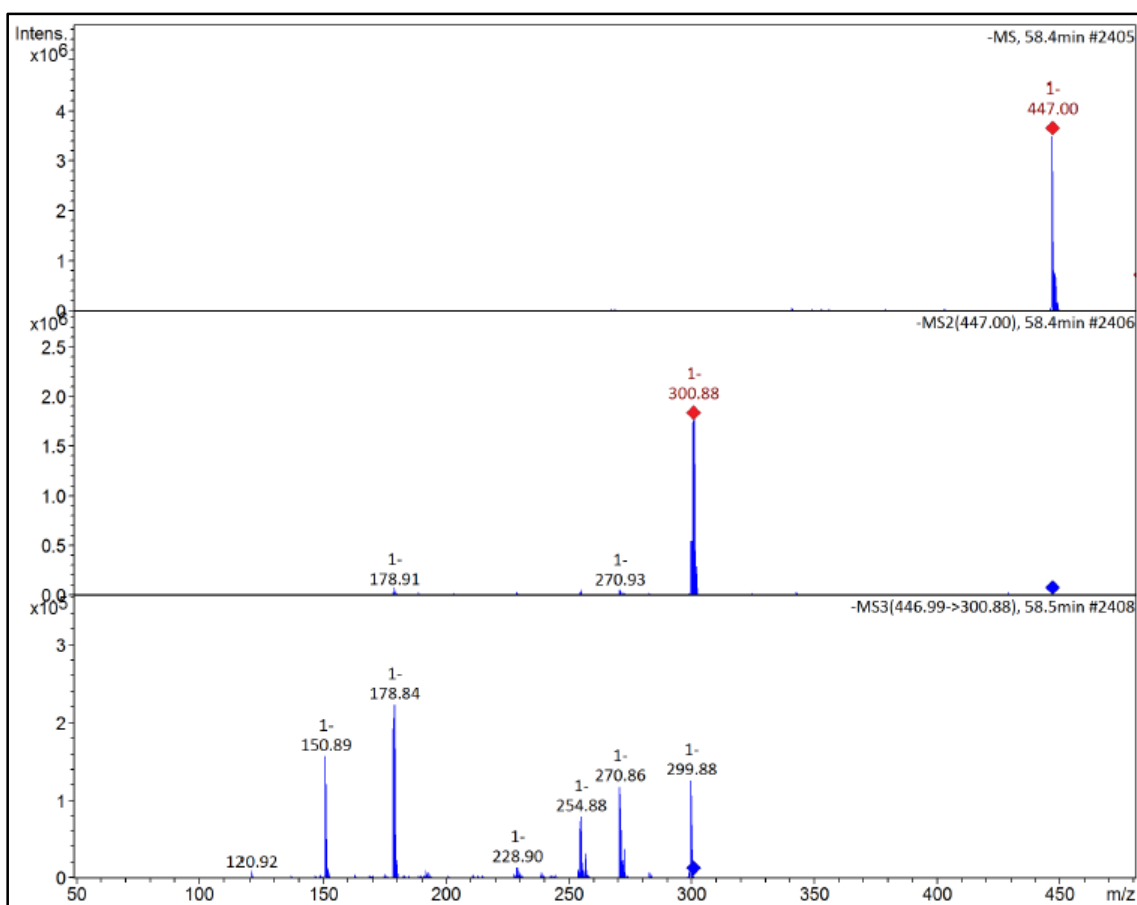
**Figura 23:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 8



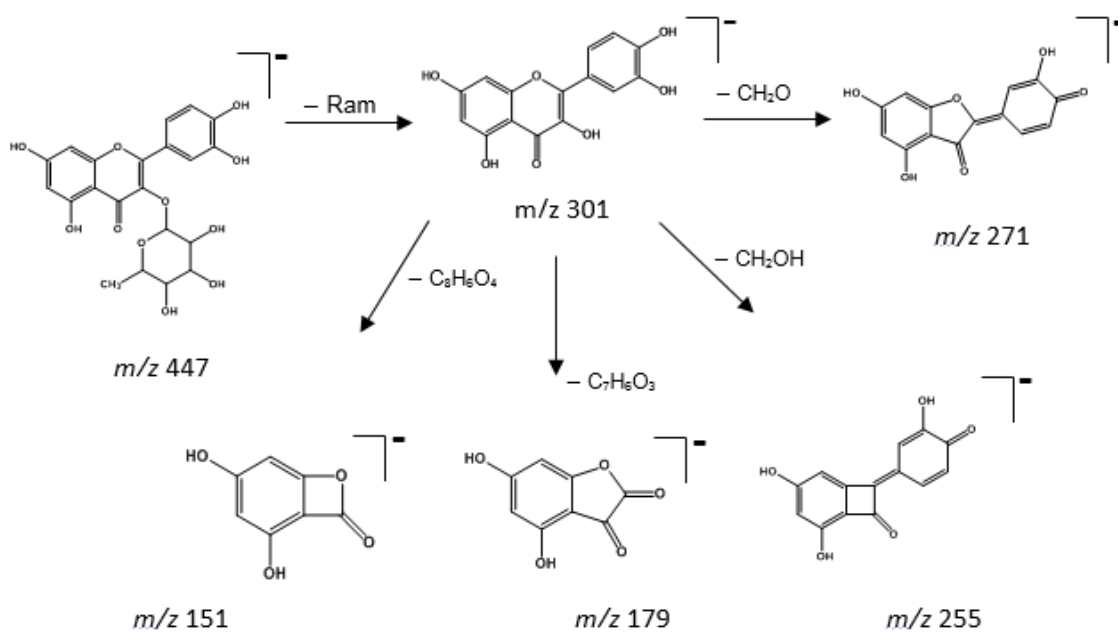
**Figura 24:** Via de fragmentação da quercetina-3-O-hexosídeo



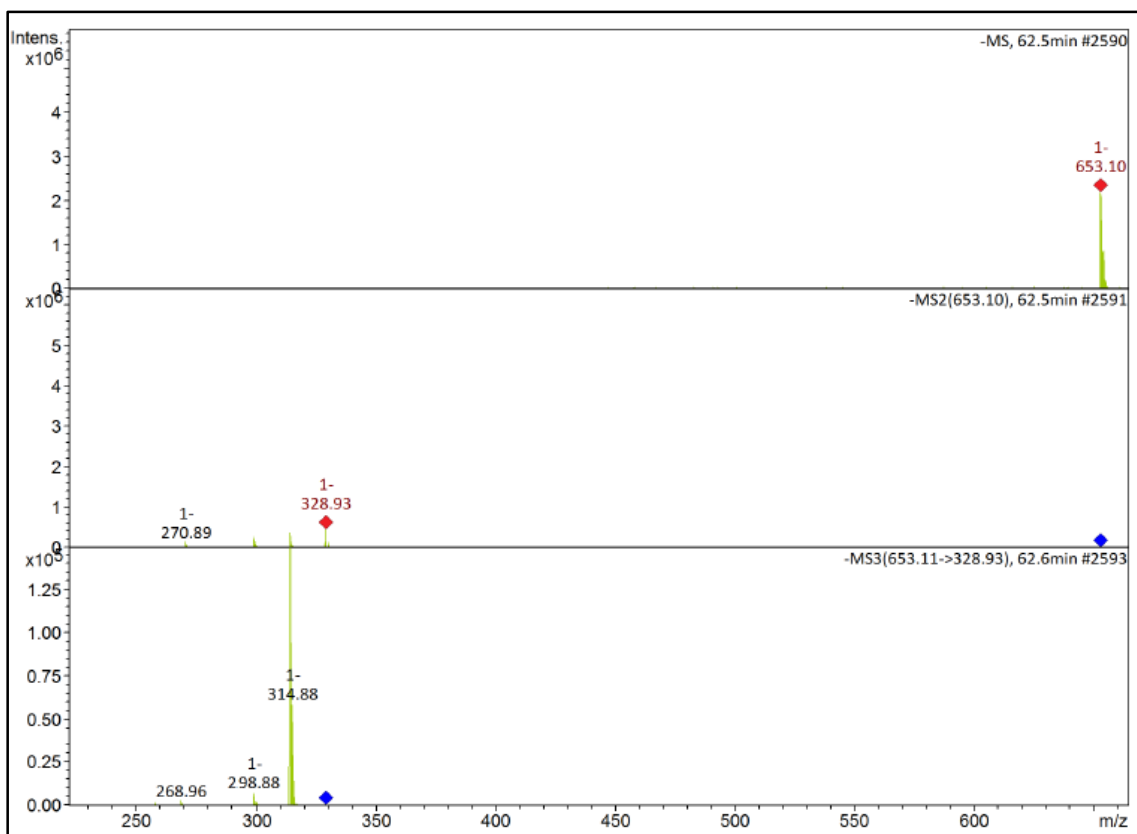
**Figura 25:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 9



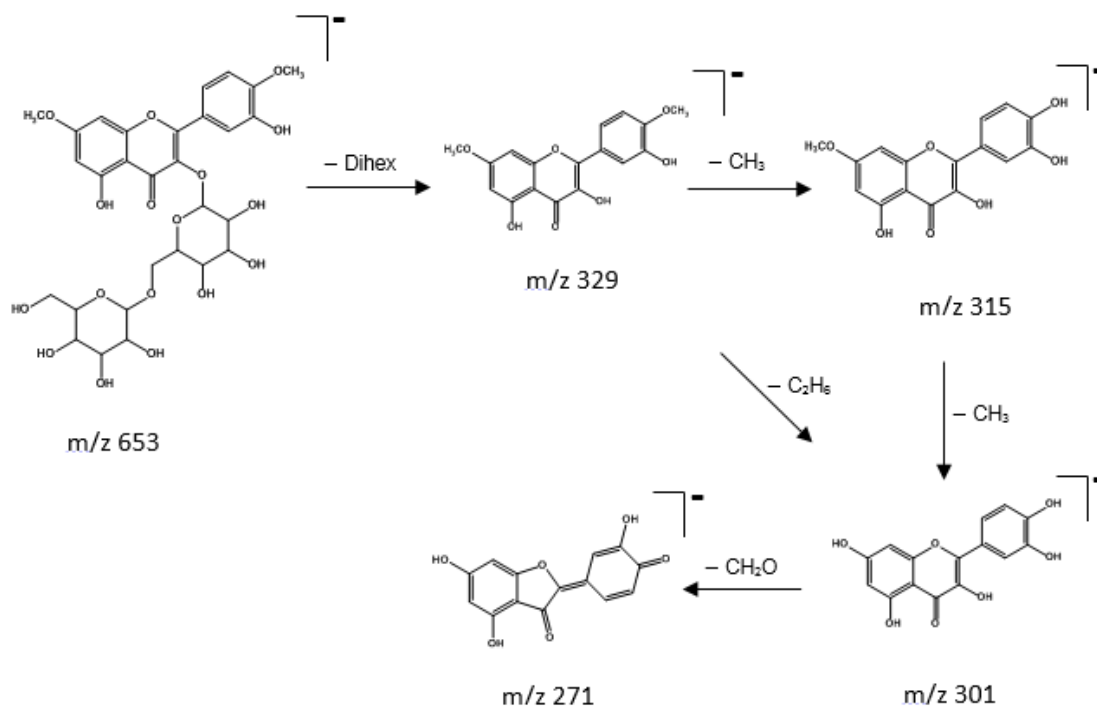
**Figura 26:** Via de fragmentação da quercetina-3-O-ramnosideo



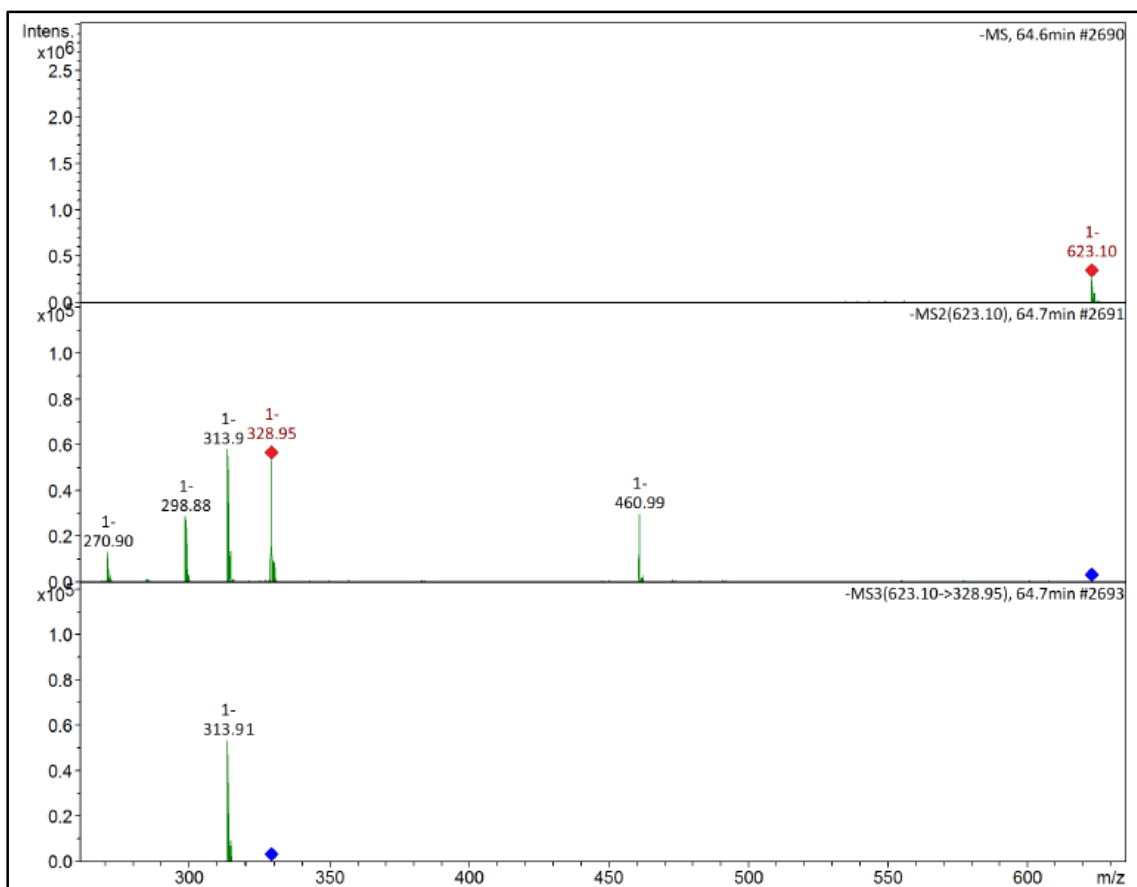
**Figura 27:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 10



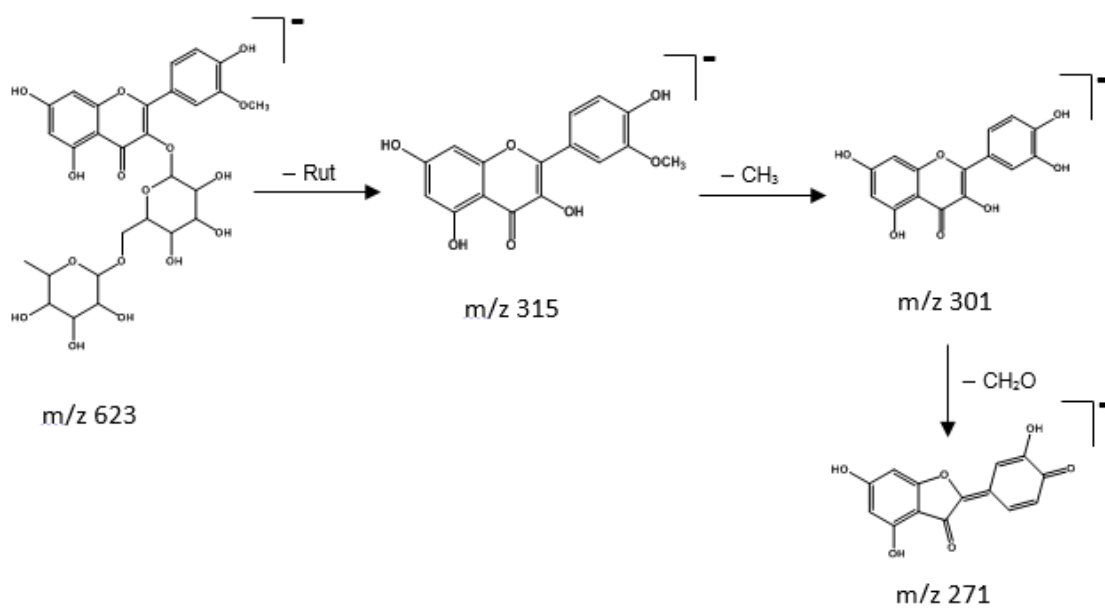
**Figura 28:** Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-dihexosideo



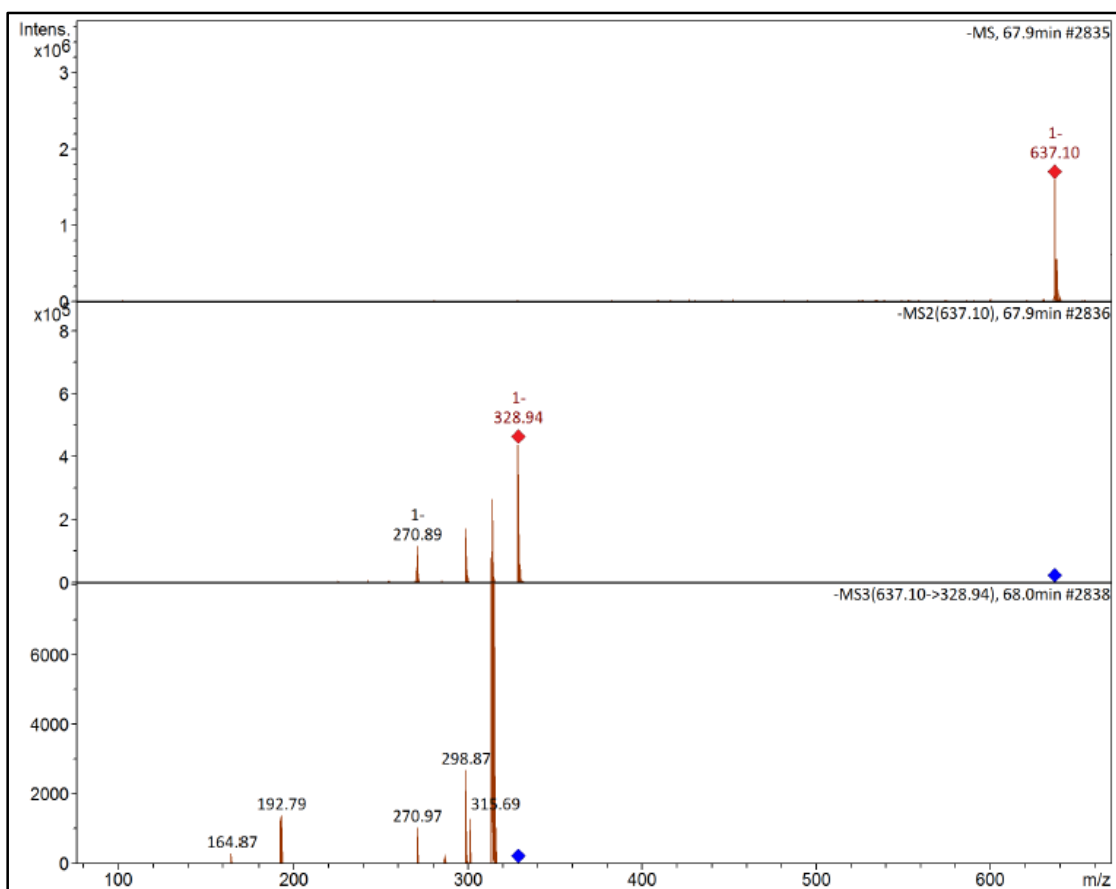
**Figura 29:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 11



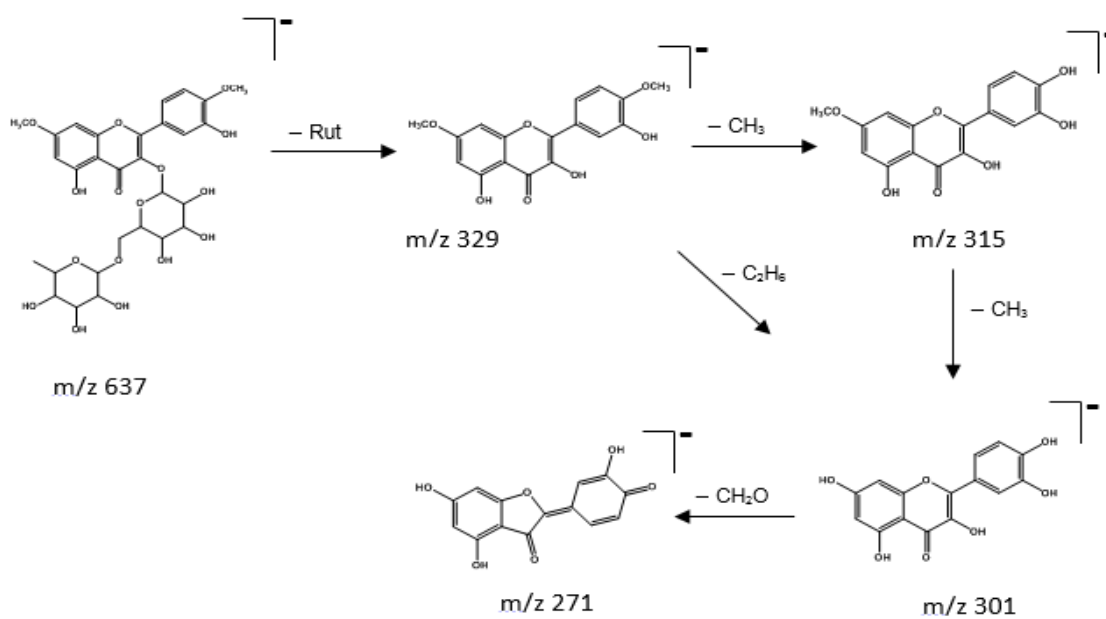
**Figura 30:** Via de fragmentação da Isorhaminetin-3-O-rutinosídeo



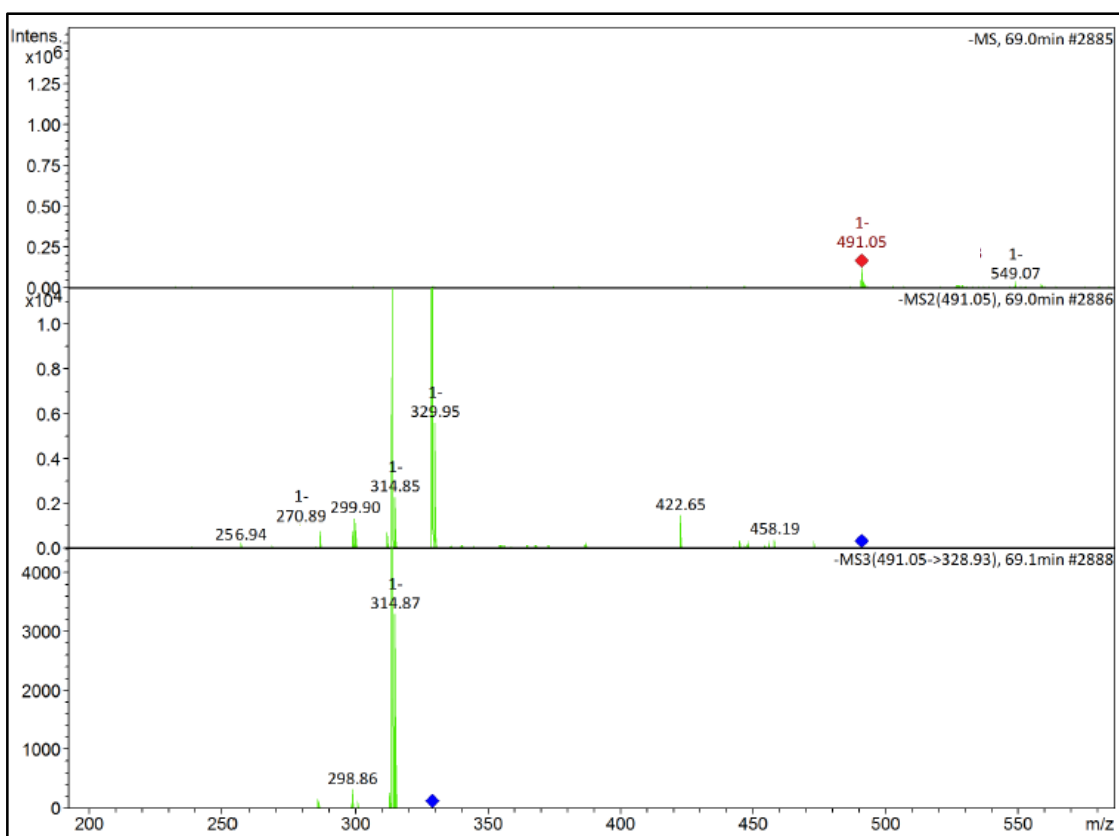
**Figura 31:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 12



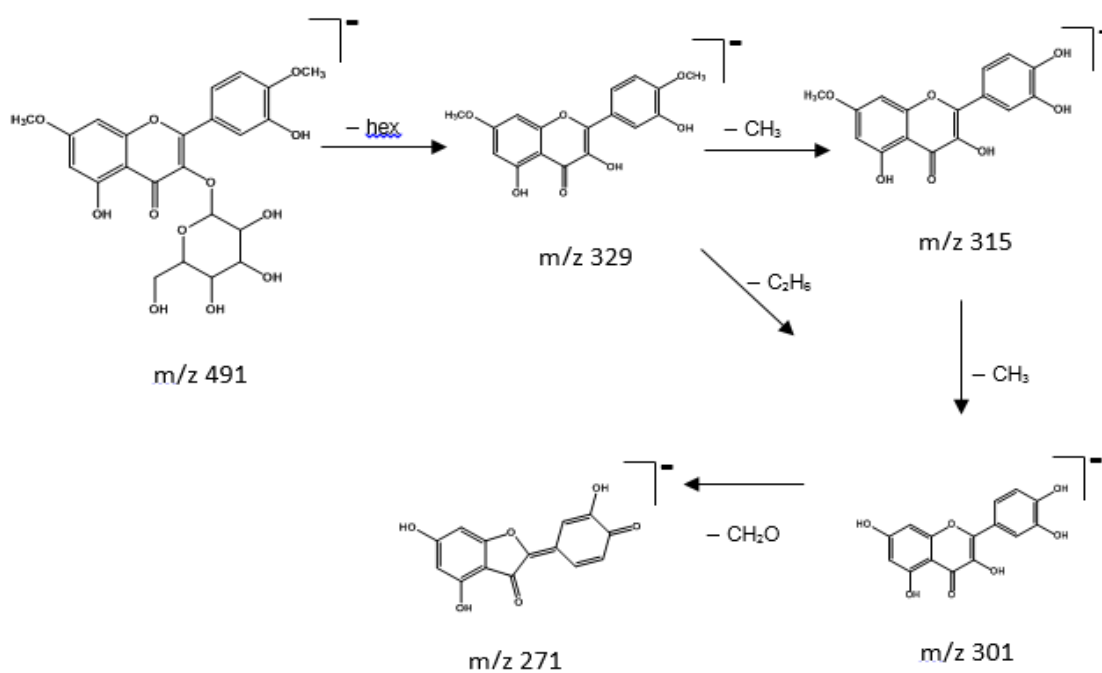
**Figura 32:** Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-rutnósido



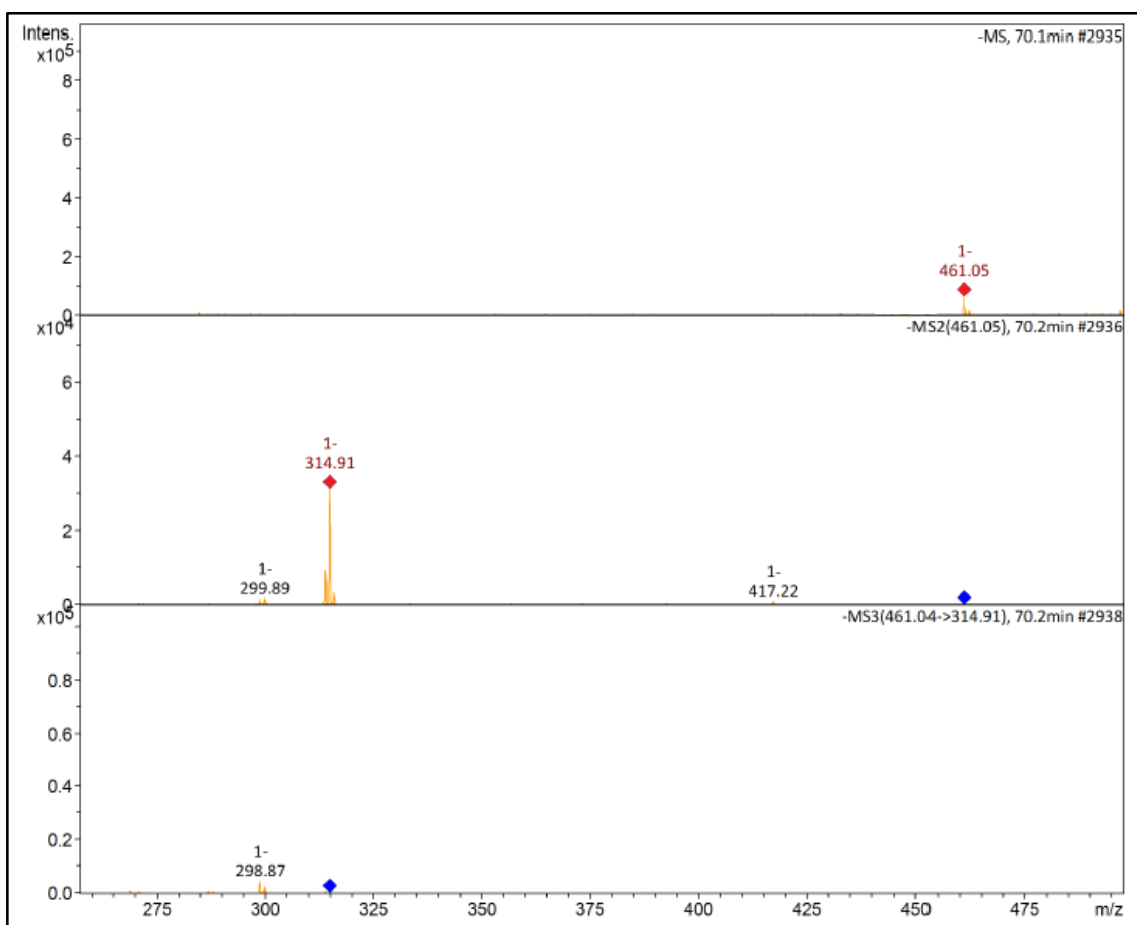
**Figura 33:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 13



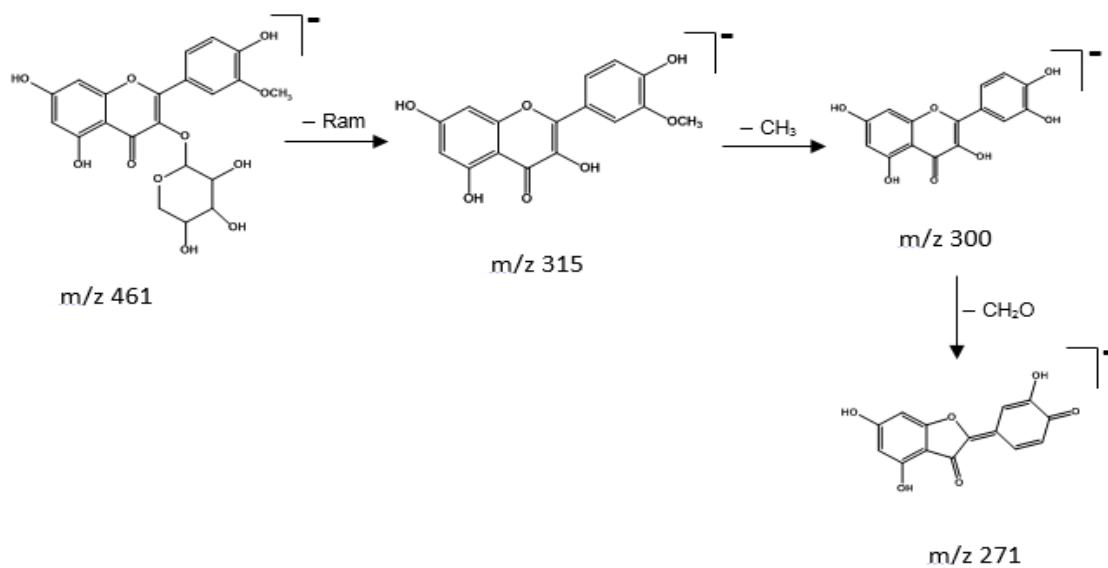
**Figura 34:** Via de fragmentação da Dimetilquercetina-3-O-hexosídeo



**Figura 35:** Espectro de massas com fragmentos em MS2 e MS3 do pico 14



**Figura 36:** Via de fragmentação da Isoramnetina-3-O-ramnose



## 5.2 Determinação estrutural de EPF-1

A substância codificada como EPF-1 foi isolada na forma de um pó amorfo alaranjado com 0,015g.

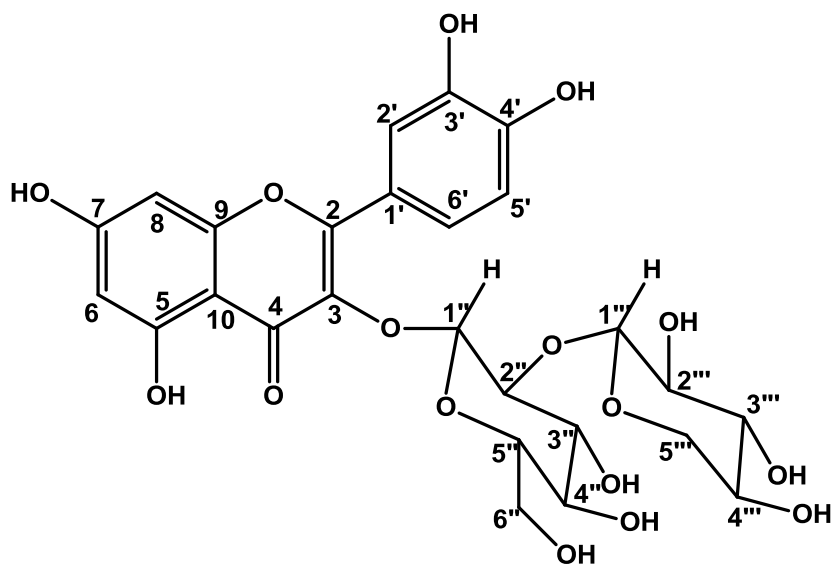
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 37, pág.66), em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , e suas expansões (Fig. 38, pág.66, Figura 39, pág. 67) apresentaram vinte e cinco sinais, referentes a vinte e seis átomos de carbono. Foram atribuídos nove sinais a carbonos não hidrogenados, dois a carbonos metilênicos  $sp^3$ , cinco sinais a carbonos metínicos  $sp^2$  e nove a carbonos metínicos  $sp^3$ . Sinais em  $\delta_c$  163,0,  $\delta_c$  165,6,  $\delta_c$  145,9 e  $\delta_c$  149,6 em comparação com os dados da literatura, sugeriram que EPF-2 se tratava de um derivado da quercetina (BELTRAME, 2001). A ausência do sinal na faixa de  $\delta_c$  104,7 – 111,8 ppm, assim como a presença do deslocamento químico em 135,0 permitiu inferir uma substituição no carbono C-3. Este sinal, em conjunto com os visualizados em  $\delta_c$  158,2 e  $\delta_c$  179,5, atribuídos respectivamente aos carbonos C-2 e C-4, evidenciaram um esqueleto do tipo flavonol. O conjunto de sinais em  $\delta_c$  82,1,  $\delta_c$  78,2,  $\delta_c$  78,1,  $\delta_c$  76,9,  $\delta_c$  74,8,  $\delta_c$  70,9,  $\delta_c$  70,9,  $\delta_c$  66,5 e  $\delta_c$  62,3 sugeriram a presença da sambubiose (WEI et al. 2011). Os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  100,8 e  $\delta_c$  62,3 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1'') e ao carbono metilênico (C-6'') da glicose, enquanto que o deslocamento em  $\delta_c$  82,1 foi atribuído ao carbono C-2, corroborando com a inserção da xilose nesta posição. Os sinais em  $\delta_c$  105,2 e  $\delta_c$  66,5, foram condizentes respectivamente com o carbono anomérico (C-1''') e ao carbono metilênico (C-5''') da xilose.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40, pág. 67), obtido a 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , e em suas expansões (Figura 41, pág. 68, Figura 42, pág. 68, Figura 43, pág. 69) foram observados dois singletos largos, um em  $\delta_H$  6,16 e outro em  $\delta_H$  6,35, correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Um duplo dubleto em  $\delta_H$  7,61 ( $J = 1,6$  e  $8,4$  Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6', estando acoplado em *orto* com H-5', com sinal em  $\delta_H$  6,86 (d,  $J = 8,4$  Hz), estes sinais em conjunto com o deslocamento em  $\delta_H$  7,63 (sl) (H-2'), permitiram inferir um sistema ABX no anel B (BELTRAME, 2001). Dois dubletos, um em  $\delta_H$  5,47 ( $J = 7,6$  Hz) e outro em  $\delta_H$  4,76 ( $J = 6,8$  Hz), foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' da glicose e H-1''' da xilose, respectivamente.

No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 44, pág. 69), e suas expansões (Figura 45, pág. 70, Figura 46, pág. 70) foi possível observar a correlação

entre o sinal do hidrogênio anomérico da glicose em  $\delta_H$  5,47 (H-1'') com o sinal em  $\delta_C$  135,0 (C-3), confirmando a ligação da glicose em C-3. A correlação entre o sinal do H-1''' em  $\delta_H$  4,76 com o sinal em  $\delta_C$  82,1 (C-2'') inferiu a inserção da xilose no carbono 2 da glicose. Estas e outras correlações estão reunidas na Tabela 2.

Após análise dos dados de RMN em comparação com os descritos na literatura, pode determinar que a substancia EPF-1 se trata da quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosideo ou quercetina-3-sambubiosideo, e está sendo relatado pela primeira vez em *Erythroxyllum pauferrense*.



Estrutura da Quercetin-3-sambubiosideo.

**Tabela 2** - Dados de RMN de EPF-1 (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Posição	EPF-1		HMBC	SHENGGUO et al., 2009.	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_C \times \delta_H$	$\delta_H$	$\delta_C$
<b>2</b>	-	158,2	H-2', H-6'	-	156,8
<b>3</b>	-	135,0	H-1'''	-	133,4
<b>4</b>	-	179,5	-	-	177,5
<b>5</b>	-	163,0	H-6	-	161,4
<b>6</b>	6,16 ( <i>s</i> ; 1 H)	99,7	H-8	6,20 ( <i>d</i> ; $J = 2$ Hz)	99,2
<b>7</b>	-	165,6	H-6, H-8	-	165,2
<b>8</b>	6,35 ( <i>s</i> ; 1 H)	94,5	H-6	6,38 ( <i>d</i> ; $J = 2$ Hz)	94,2
<b>9</b>	-	158,2	H-8	-	156,2
<b>10</b>	-	105,7	H-6, H-8	-	105,1
<b>1'</b>	-	123,1	H-2', H-5', H-6'	-	122,2
<b>2'</b>	7,63 ( <i>s</i> ; 1 H)	117,3	H-6'	7,60 ( <i>s</i> )	115,9
<b>3'</b>	-	145,9	H-2', H-5', H-6'	-	145,3
<b>4'</b>	-	149,6	H-2', H-5', H-6'	-	149,4
<b>5'</b>	6,86 ( <i>d</i> ; 1 H; $J = 8,4$ Hz)	116,0	H-6'	6,86 ( <i>d</i> ; $J = 8,3$ Hz)	116,2
<b>6'</b>	7,61 ( <i>dd</i> ; 1 H; $J = 1,6$ e 8,4 Hz)	123,3	H-2', H-5'	7,66 ( <i>d</i> ; $J = 8,3$ Hz)	121,6
<b>1''</b>	5,47 ( <i>d</i> ; 1 H; $J = 7,6$ Hz)	100,8	-	5,54 ( <i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	98,7
<b>2''</b>	3,69 – 3,74 ( <i>m</i> )	82,1	H-1'''	3,76 ( <i>t</i> , $J = 8,5$ Hz)	82,5
<b>3''</b>	3,48 – 3,63 ( <i>m</i> )	78,1	-	3,63 ( <i>t</i> , $J = 9$ Hz)	77,9
<b>4''</b>	3,48 – 3,63 ( <i>m</i> )	70,9	-	3,45 ( <i>dd</i> , $J = 9,3$ e 9,3 Hz)	70,3
<b>5''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	76,9	-	3,23 ( <i>m</i> )	76,5
<b>6''</b>	3,48 – 3,63 ( <i>m</i> ) 3,69 – 3,74 ( <i>m</i> )	62,3	-	3,65 ( <i>dd</i> ; $J = 3$ e 12 Hz) 3,80 ( <i>m</i> )	61,2
<b>1'''</b>	4,76 ( <i>d</i> ; 1H; $J = 6,8$ Hz)	105,2	-	4,66 ( <i>d</i> ; $J = 8$ Hz)	104,2
<b>2'''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	74,8	-	3,31 ( <i>dd</i> ; $J = 7,5$ e 8,9 Hz)	74,2
<b>3'''</b>	3,20 – 3,25 ( <i>m</i> )	78,2	-	3,35 ( <i>m</i> )	77,6
<b>4'''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	70,9	-	3,46 ( <i>m</i> )	70,2
<b>5'''</b>	3,93 ( <i>dd</i> ; $J = 4,8$ e 11,6 Hz) 3,20 – 3,25 ( <i>m</i> )	66,5	-	3,81 ( <i>dd</i> ; $J = 5,5$ e 11,2 Hz) 3,13 ( <i>dd</i> ; $J = 9,5$ e 11,2 Hz)	66,1

Figura 37 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1.

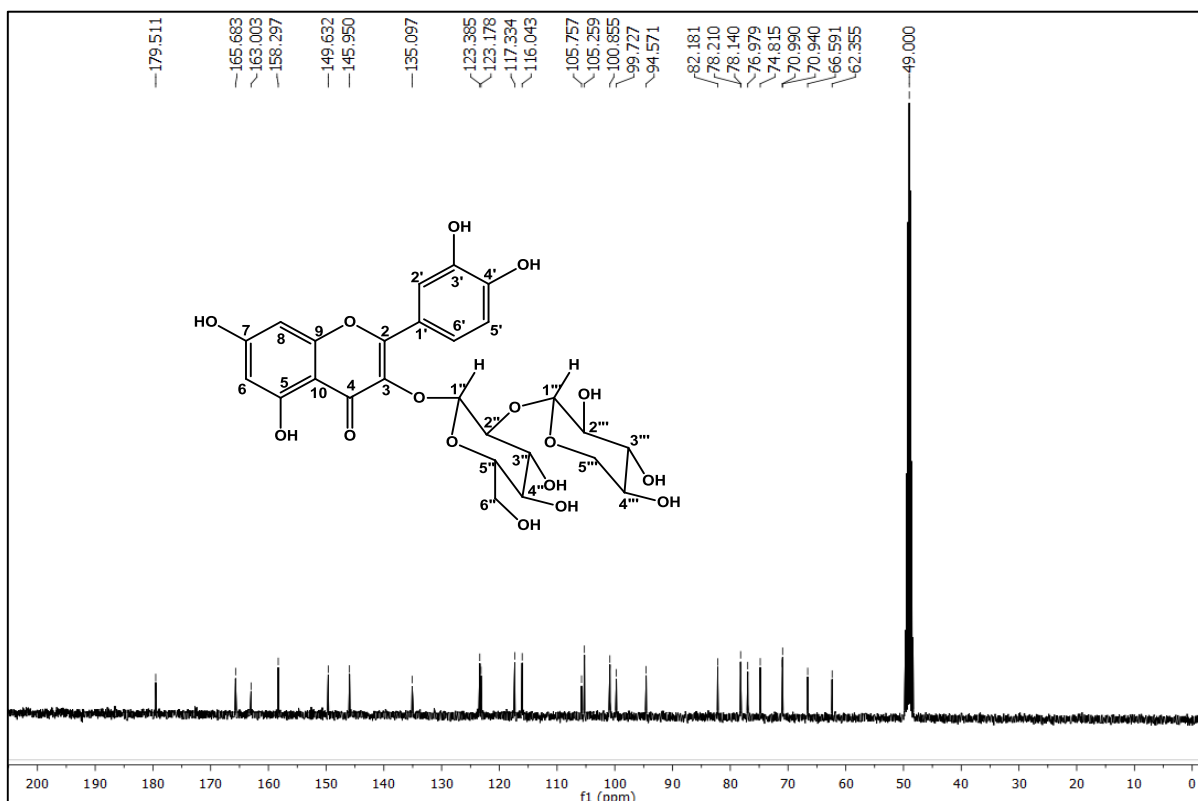
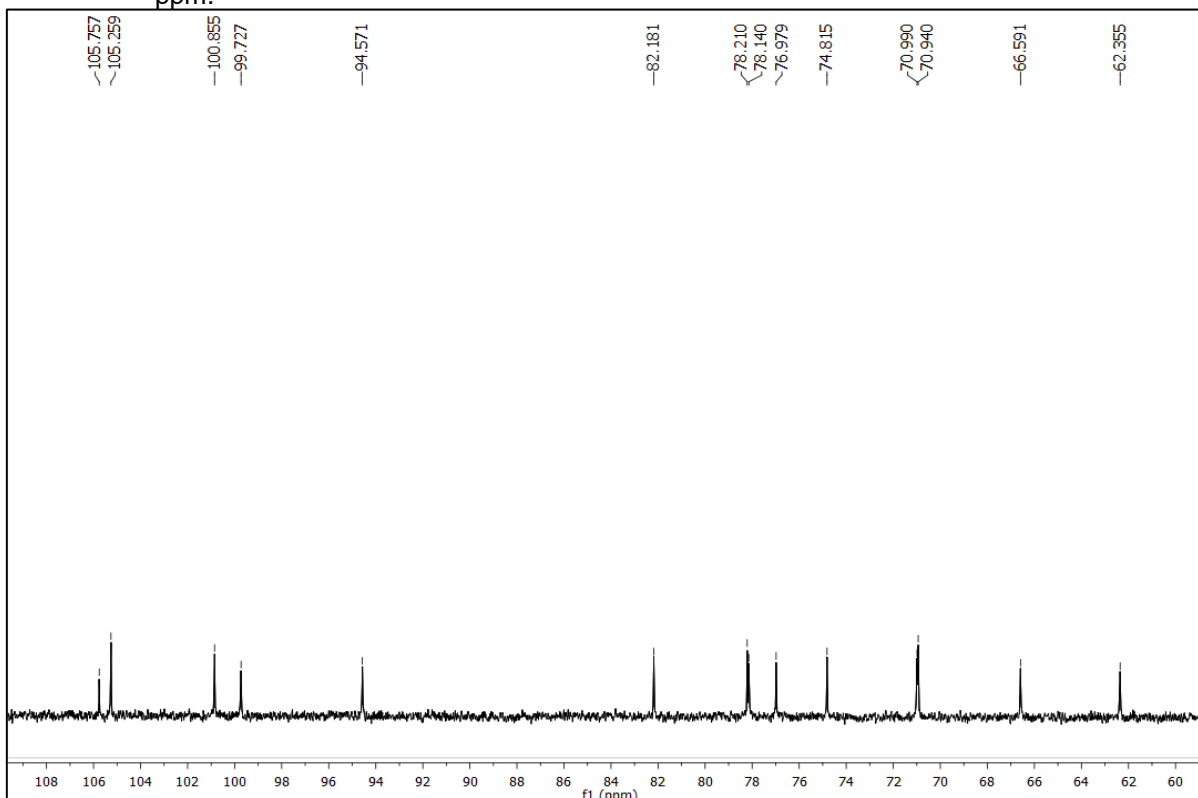
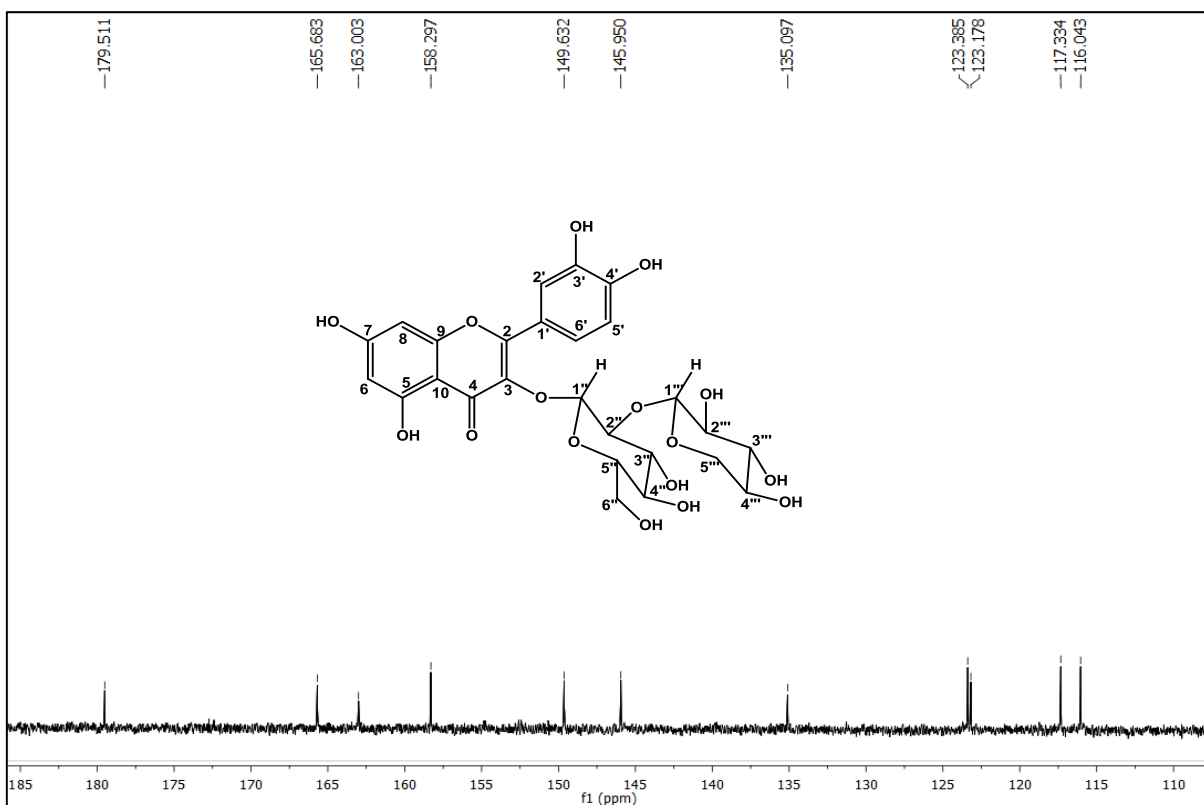


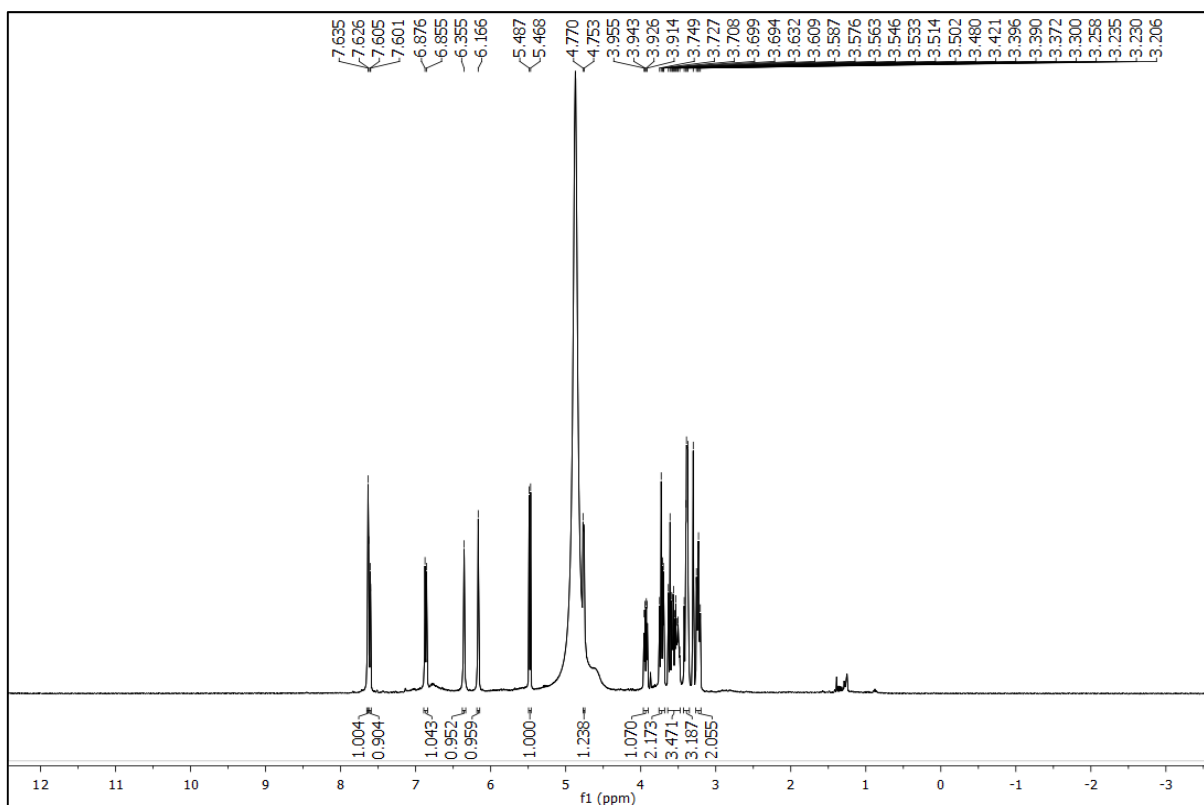
Figura 38 - Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1 na região de 60 – 108 ppm.



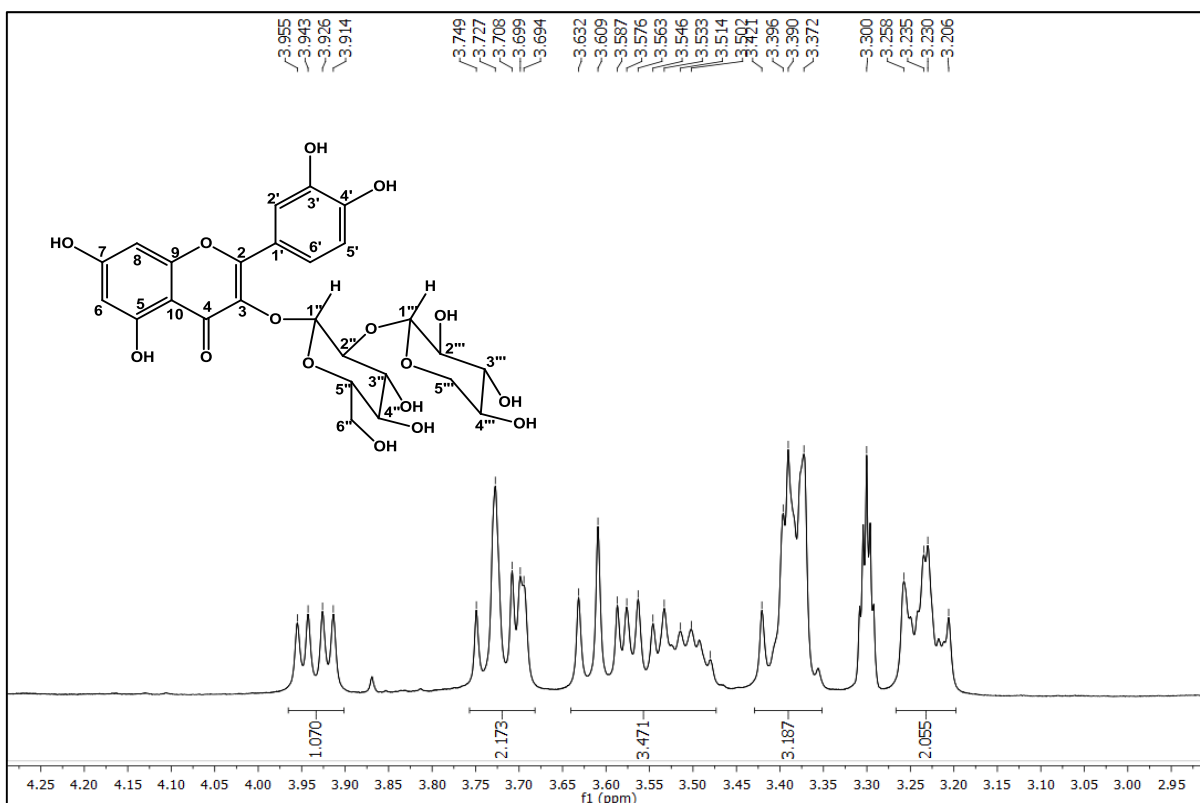
**Figura 39** - Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1 na região de 110 – 185 ppm.



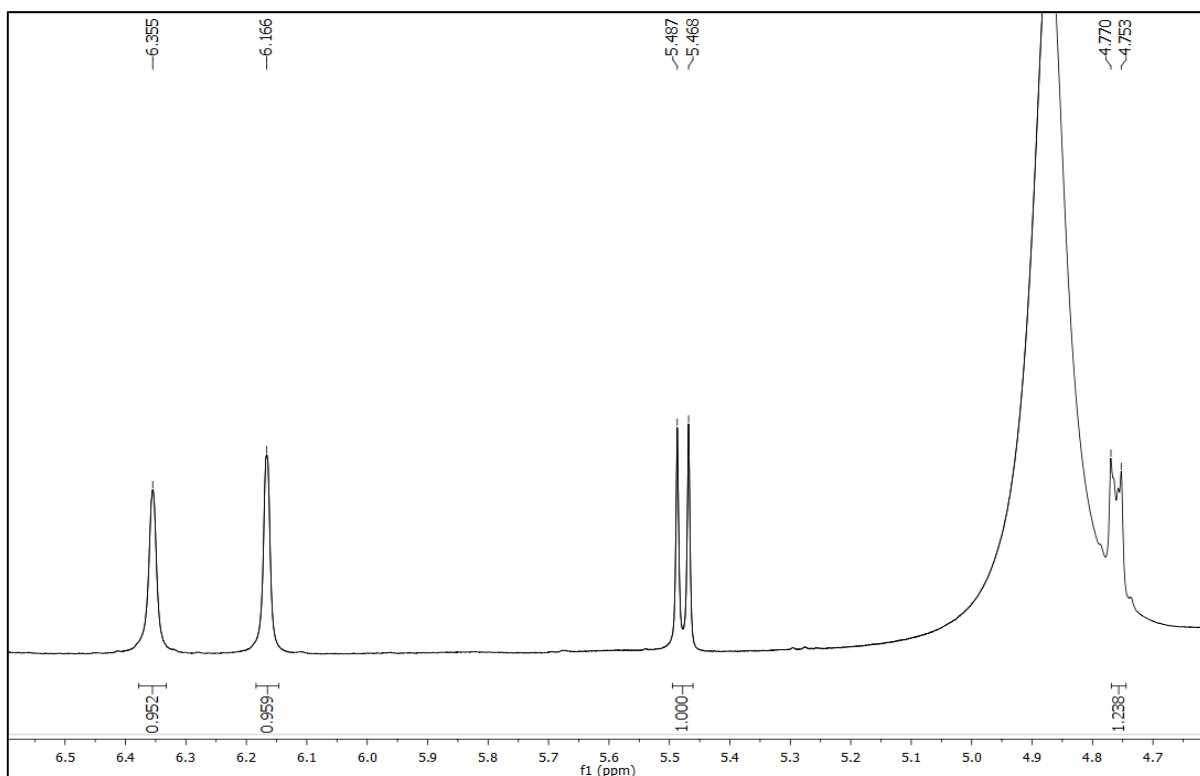
**Figura 40** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1.



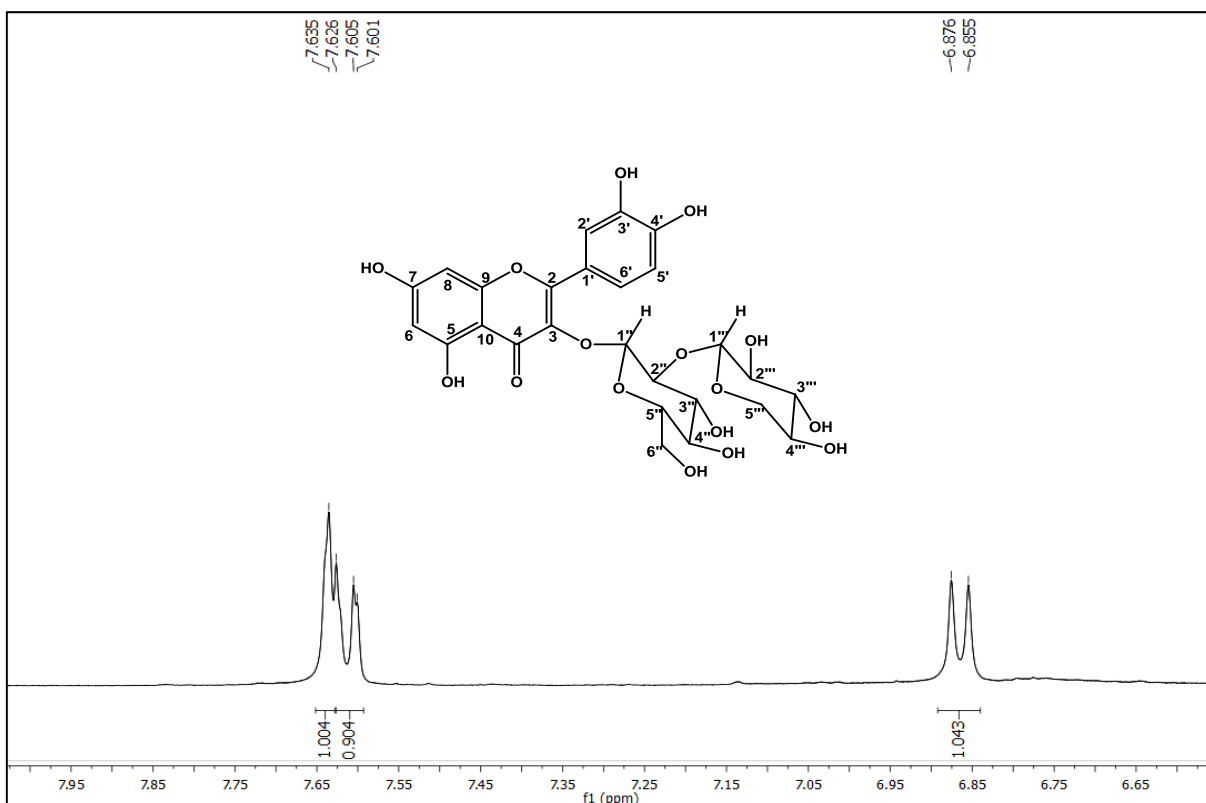
**Figura 41** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1 na região de 2,95 – 4,25 ppm.



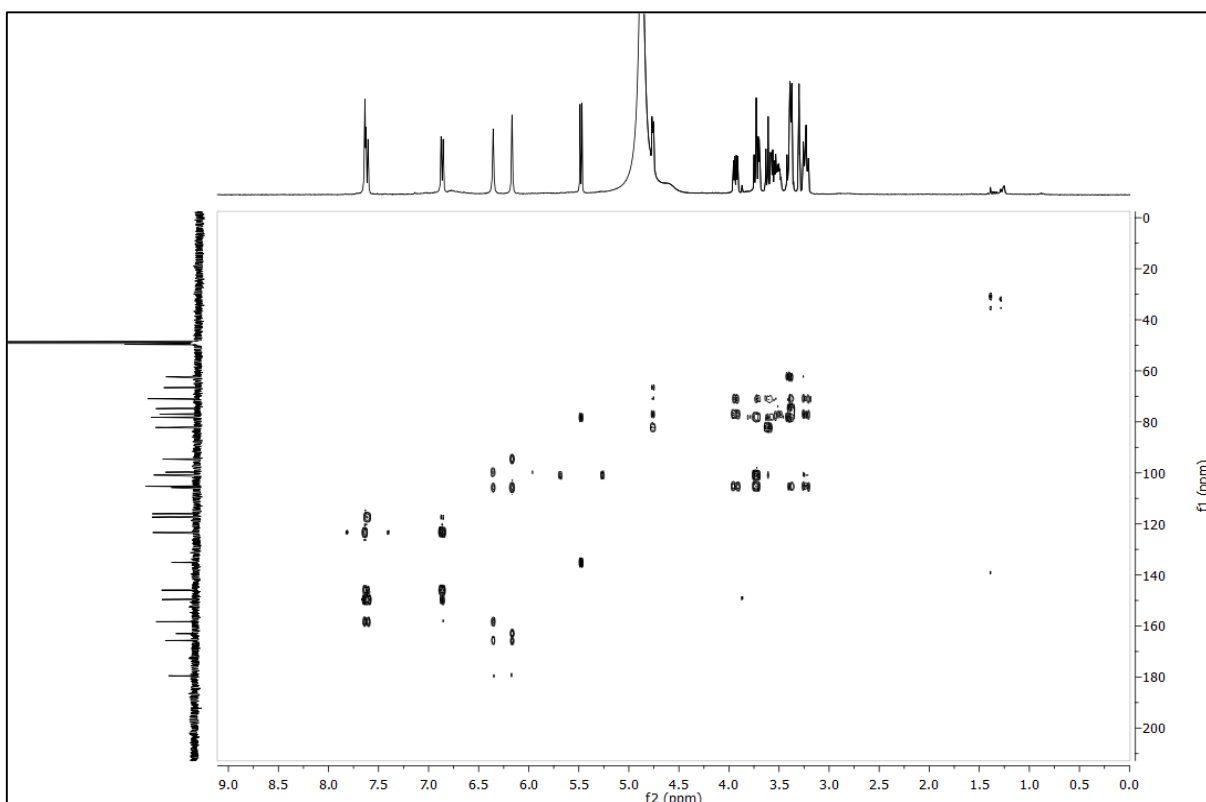
**Figura 42** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1 na região de 4,70 – 6,50 ppm.



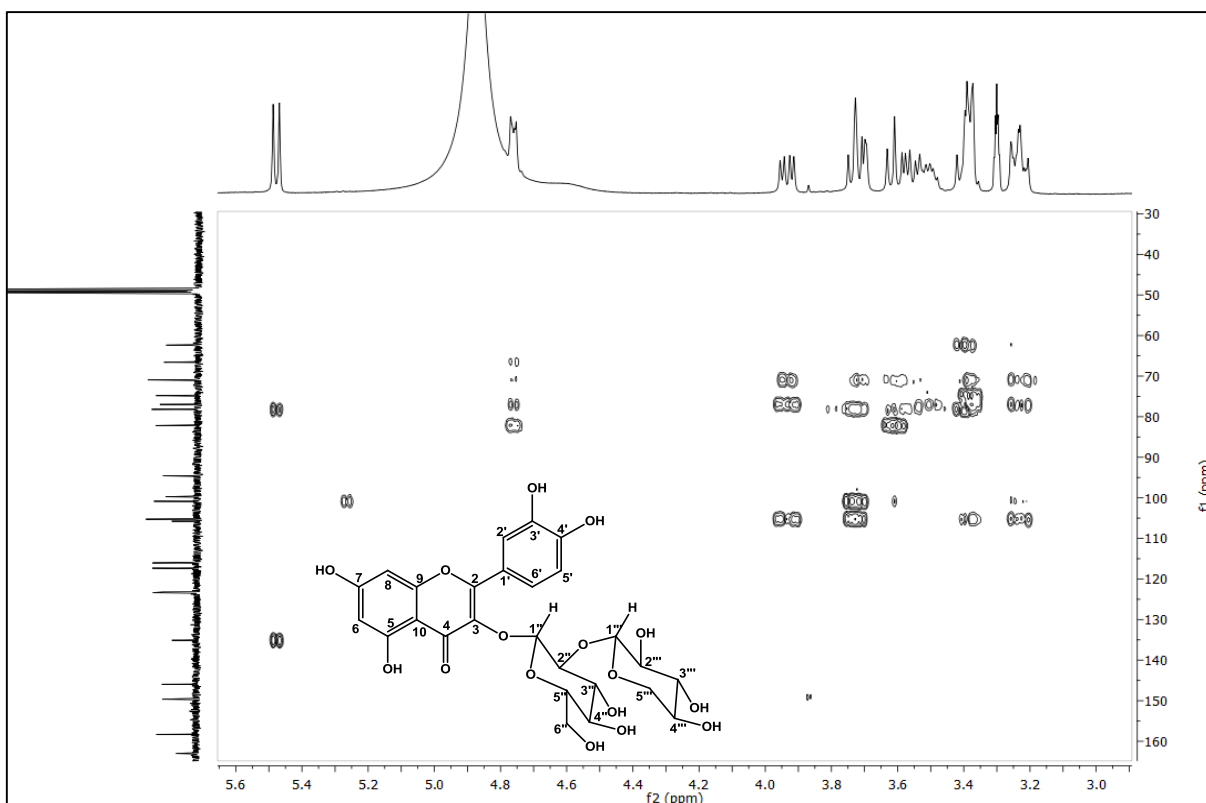
**Figura 43** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1 na região de 6,65 – 7,95 ppm.



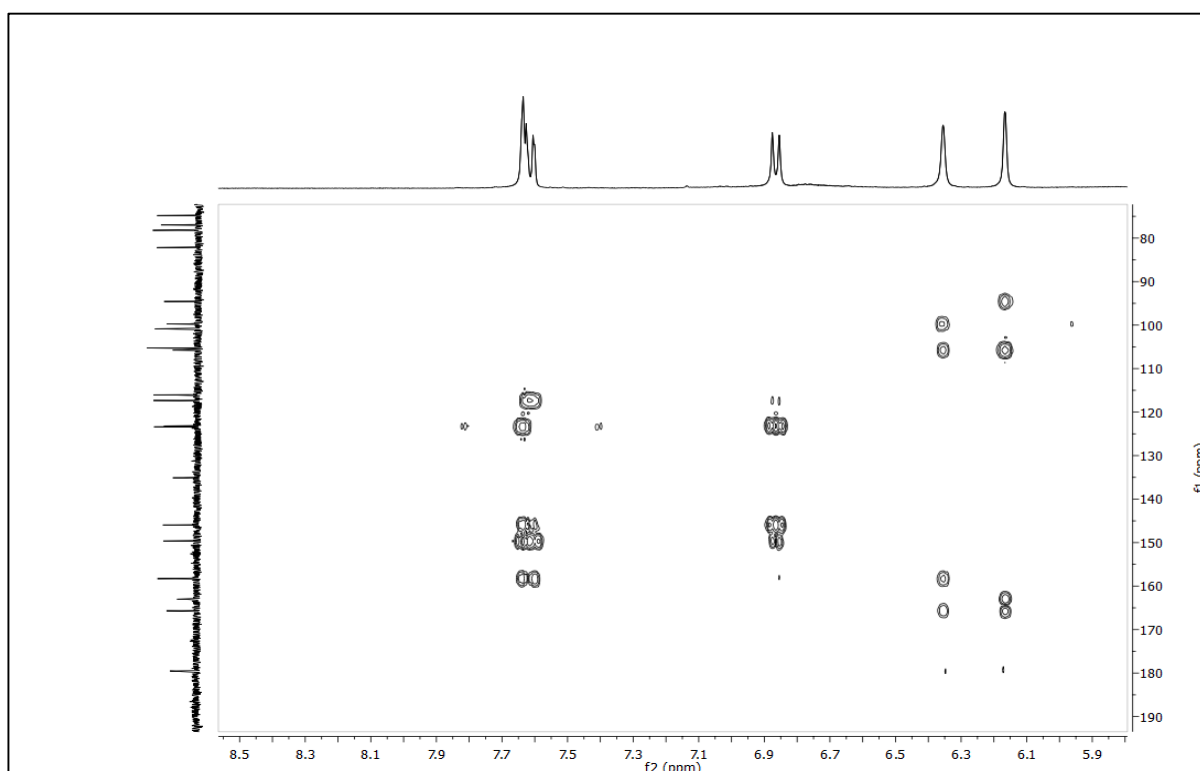
**Figura 44** - Espectro HMBC (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-1.



**Figura 45-** Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPF-1 na região de (3,00 – 5,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm).



**Figura 46 -** Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPF-1 na região de (5,90– 8,50 ppm) x (80,0 – 190,0 ppm).



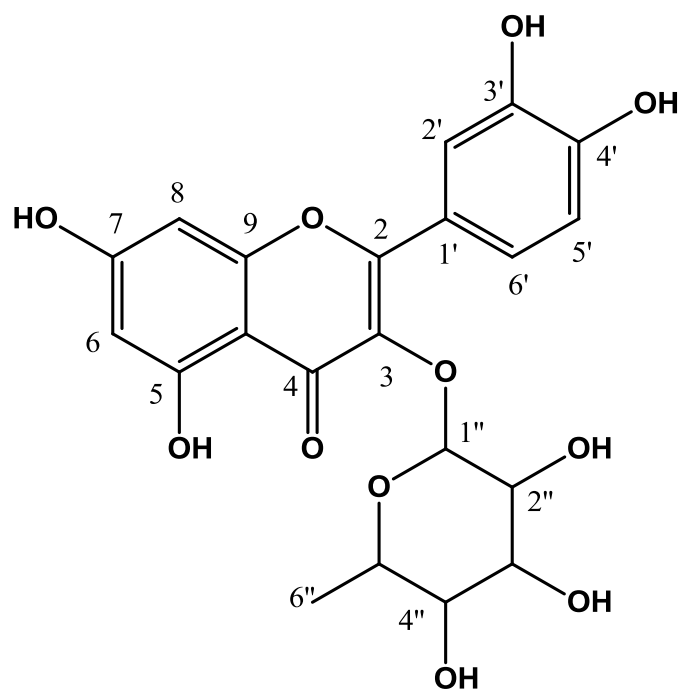
### 5.3 Determinação estrutural de EPF-2

A substância codificada como EPF-2 foi isolada na forma de um pó amorfo alaranjado com 0,013g.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB (Fig. 47, pág. 74) obtido a 100 MHz em DMSO e em suas expansões (Figura 48, pág. 74, Figura 49, pág. 75), foi possível observar a presença de 21 sinais. Destes, dez foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos  $\text{sp}^2$  e seis a carbonos metínicos  $\text{sp}^3$ . Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  177,5, 165,8, 161,2, 157,0, 156,5, 145,3 e 148,6 foram condizentes com esqueleto carbono de uma flavona sendo atribuídos aos carbonos C-4, C-7, C-5, C-2, C-9, C-3' e C-4', respectivamente. Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  98,9 e 93,7 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 corroborando com o padrão de flavonas com oxigenação em C-5 e C-7. Observou-se ainda os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  115,6, 115,4 e 121,0 que foram atribuídos aos carbonos C-2', C-5' e C-6', respectivamente. A ausência de sinal em  $\delta_{\text{C}}$  ~107,5 sugeriu a presença de substituinte no carbono 3. Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  101,8; 71,9; 70,5; 70,3; 70,0 e 18,3 indicou a presença da unidade osídica ramnose. O deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  134,1 foi atribuído ao C-3 e esse valor de acordo com a literatura corrobora para a inserção da unidade osídica nesse carbono.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) (Fig. 50, pág. 75) e em suas expansões (Figura 51, pág. 76, Figura 52, pág., 76, Figura 53, pág. 77, Figura 54, pág. 77) foi possível observar a presença de dois singletos largos na região de hidrogênios aromáticos com deslocamentos de  $\delta_{\text{H}}$  6,36 e 6,17 característicos de hidrogênios H-8 e H-6 de flavonas oxigenadas na posição 5. Um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,25 (H-6') ( $J = 8,0$  e  $2,0$  Hz) acoplado orto ( $J = 8,0$ ) com o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (H-5') e acoplado meta com o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,29 (H-2'), possibilitou, dessa maneira, atribuir um sistema ABX ao anel B da flavona. A ausência do singlete com absorção entre  $\delta_{\text{H}}$  6,39 e 6,94, o qual seria característico do hidrogênio 3, reforçou a proposta da existência de um substituinte nesta posição, sugerindo uma flavona 3, 5, 7, 3', 4' pentasubstituída. Ainda observou-se absorções que permitiram inferir a presença de uma unidade osídica em 5,25 (d,  $J = 1,2$ ) correspondente ao hidrogênio anomérico da alfa-ramnose., um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,51 e os multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,25 e 3,10 além de um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,82, referente ao hidrogênio da metila de ramnose. Estas e outras relações estão reunidas na Tabela 3.

Após análise dos dados e a comparação com a literatura, foi possível identificar EPF-1 como sendo quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo. Esse composto tem ampla distribuição no gênero *Erythroxylum* e está sendo relatado pela primeira vez em *E. paufferense*.

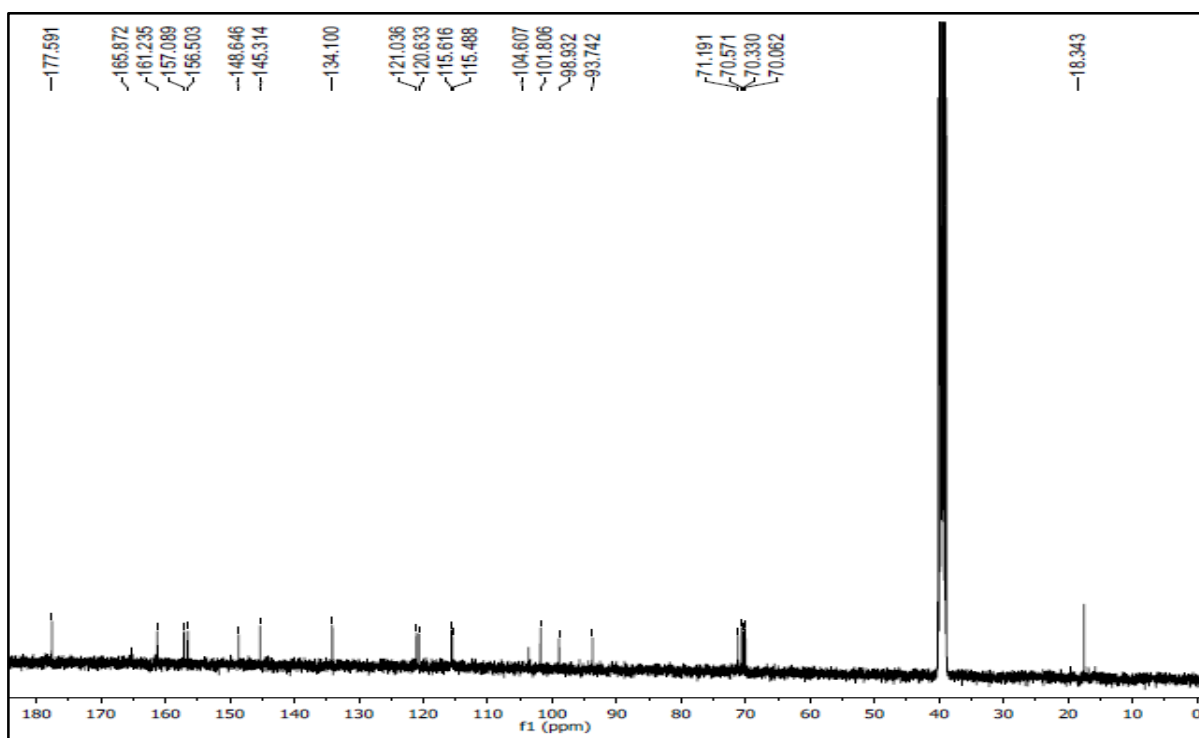


Estrutura da Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo.

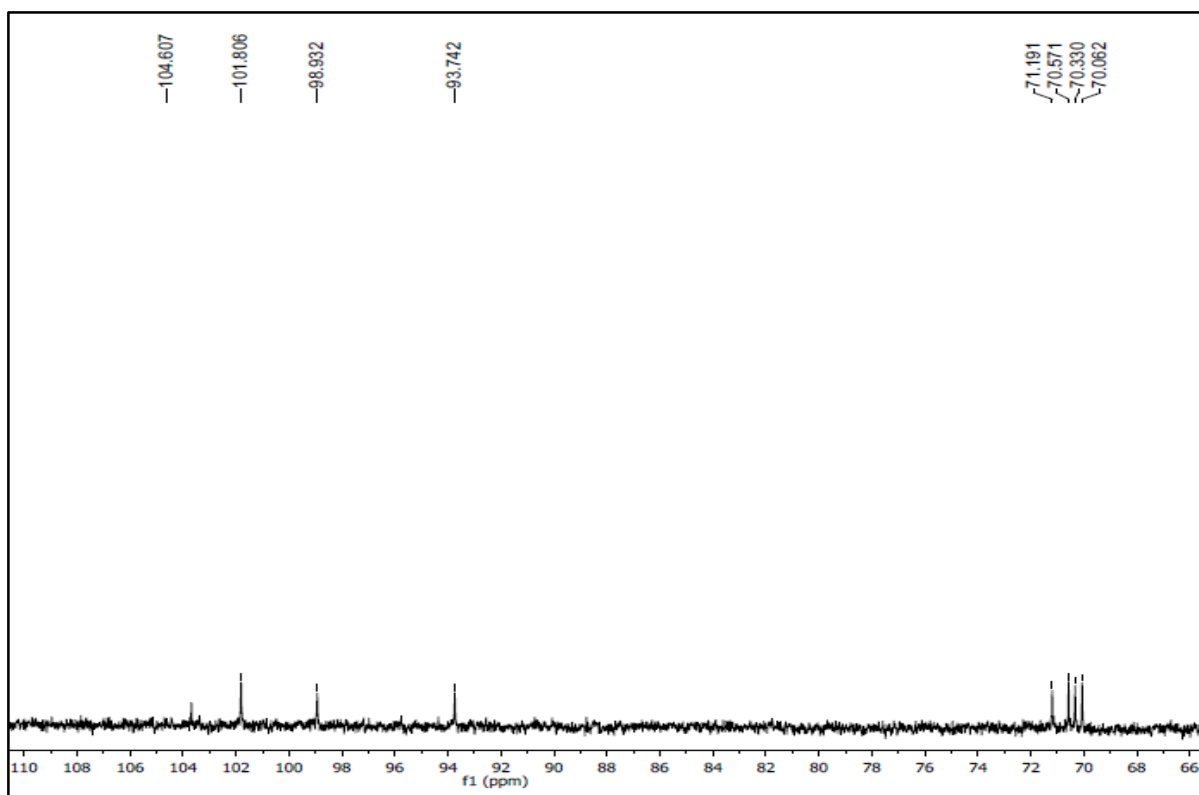
**Tabela 3** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz, DMSO) de EPF-1

C	EPF-2		CHANG et al., 2009	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	---	157,0	---	158,0
3	---	134,1	---	134,9
4	---	177,5	---	178,2
5	---	161,2	---	162,0
6	6,17 (1H, <i>sl</i> )	98,9	6,20 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )	99,4
7	---	165,8	---	165,0
8	6,36 (1H, <i>dd</i> , <i>sl</i> )	93,7	6,40 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )	94,2
9	---	156,5	---	157,2
10	---	104,6	---	104,8
1'	---	120,6	---	123,1
2'	7,29 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )	115,6	7,31 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ )	117,0
3'	---	145,3	---	145,9
4'	---	148,6	---	149,2
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$ )	115,4	6,90 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$ )	116,2
6'	7,25 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,5$ e $J = 8,5$ )	121,0	7,30 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $J = 2,0$ )	121,8
1''	5,25 (1H, <i>d</i> , $J = 1,5$ )	101,8	5,21 (1H, <i>d</i> , $J = 1,5$ )	102,6
2''	4,0 <i>m</i>	70,3	4,21 (1H, <i>dd</i> , $J = 1,5$ e $3,0$ )	71,3
3''	3,51 (1H, <i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,5$ )	70,5	3,75 (1H, <i>dd</i> , $J = 9,5$ e $3,5$ )	71,1
4''	3,15 (1H, <i>m</i> )	71,9	3,32 (1H, <i>m</i> )	71,9
5''	3,25 (1H, <i>m</i> )	70,0	3,42 (1H, <i>m</i> )	70,8
6''	0,82 (3H, <i>d</i> , $J = 6,0$ )	18,3	0,80 (3H, <i>d</i> , $J = 6,0$ )	18,2

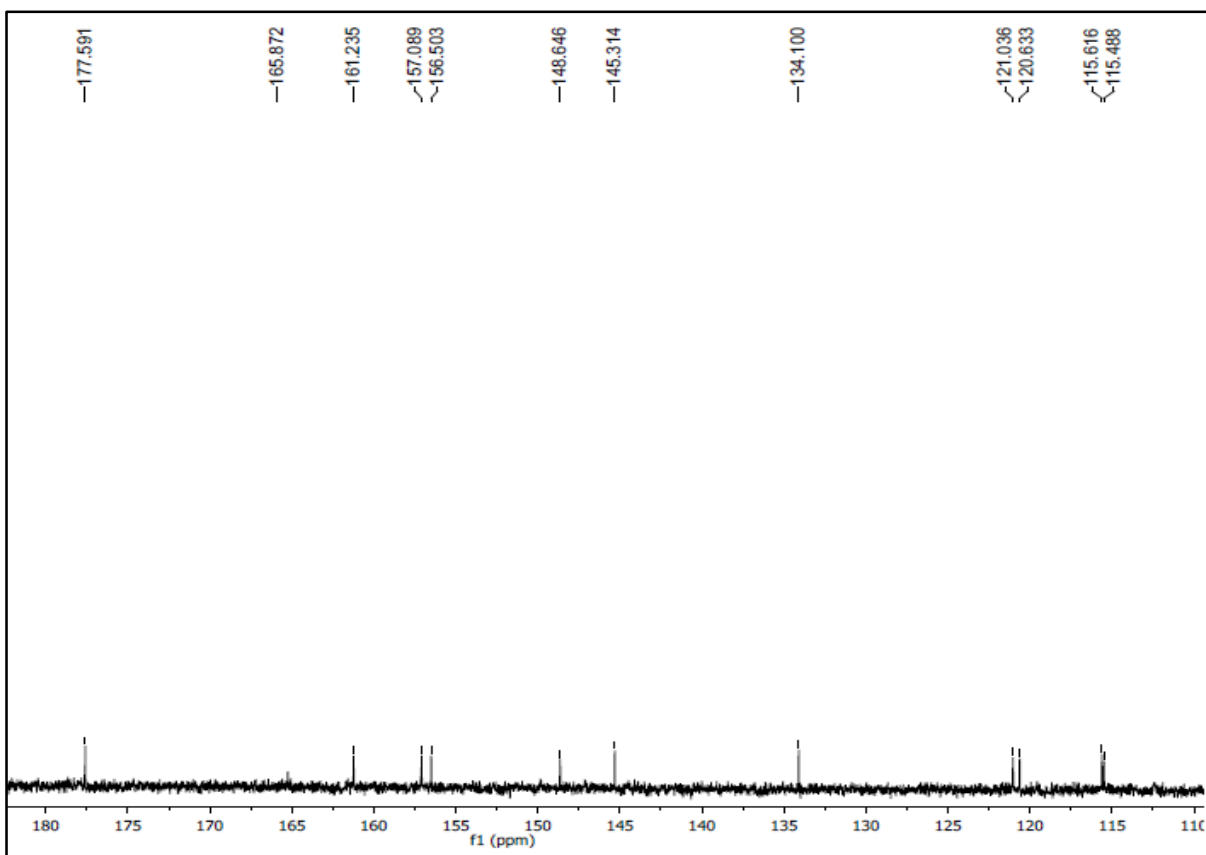
**Figura 47-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO) de EPF-2



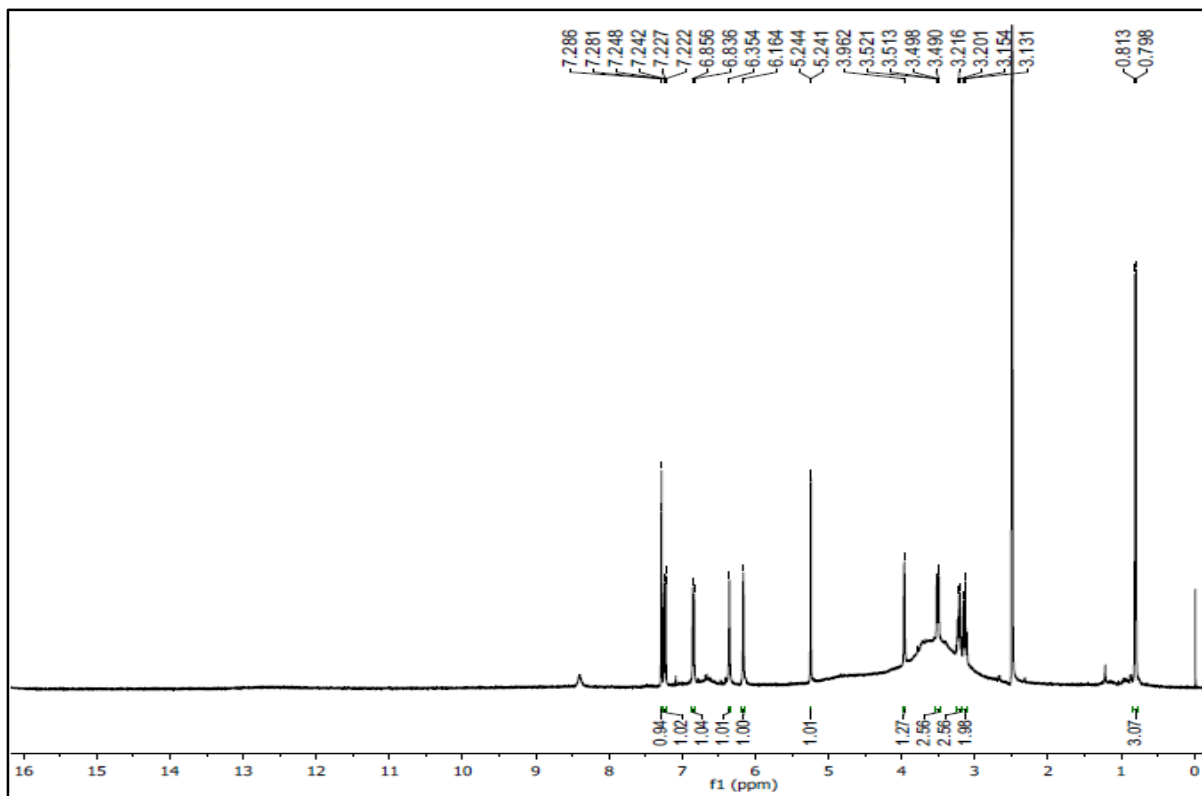
**Figura 48 -**Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 66 – 110 ppm.



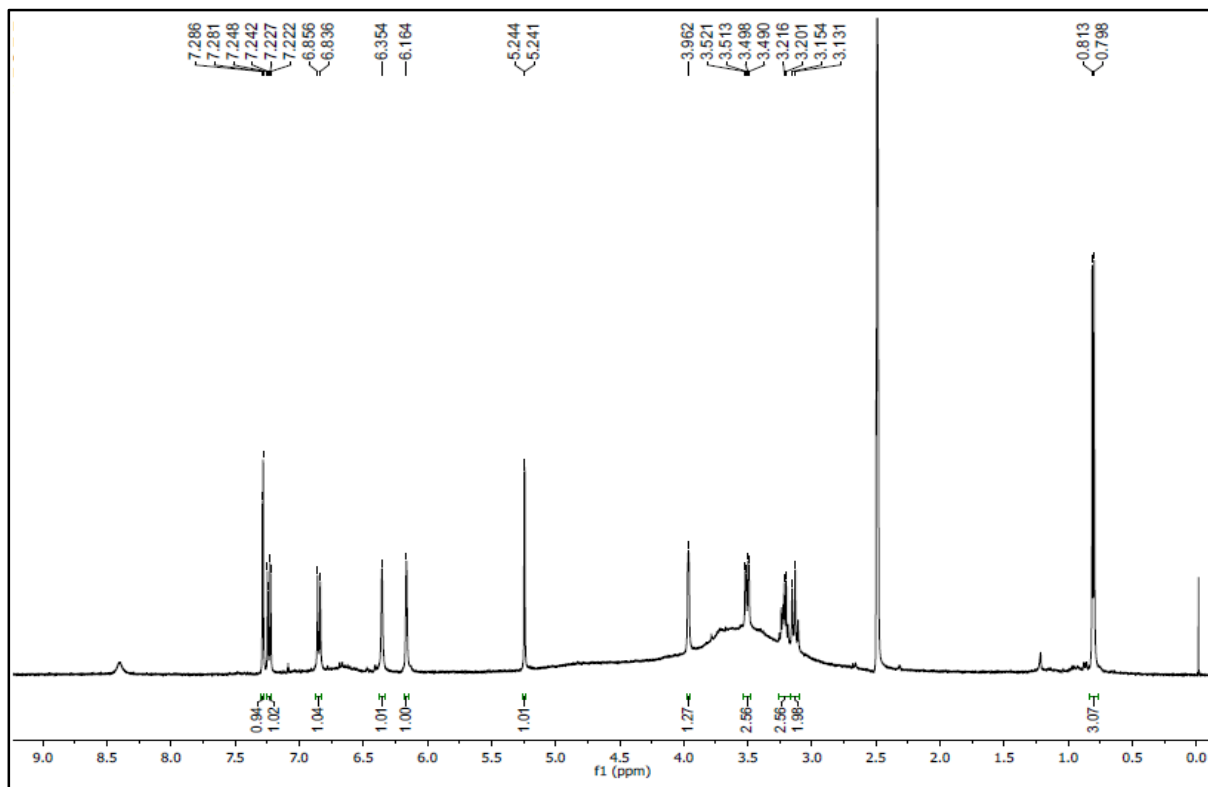
**Figura 49** -Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 110 – 180 ppm.



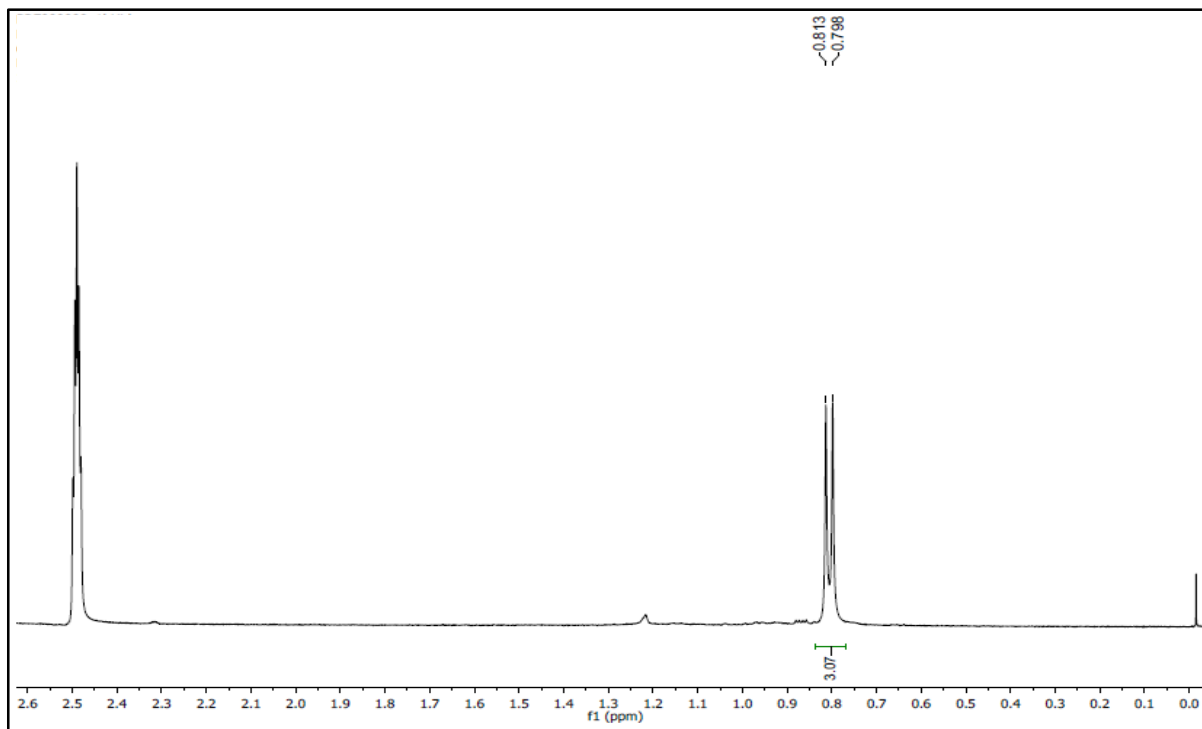
**Figura 50** -Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) de EPF-2.



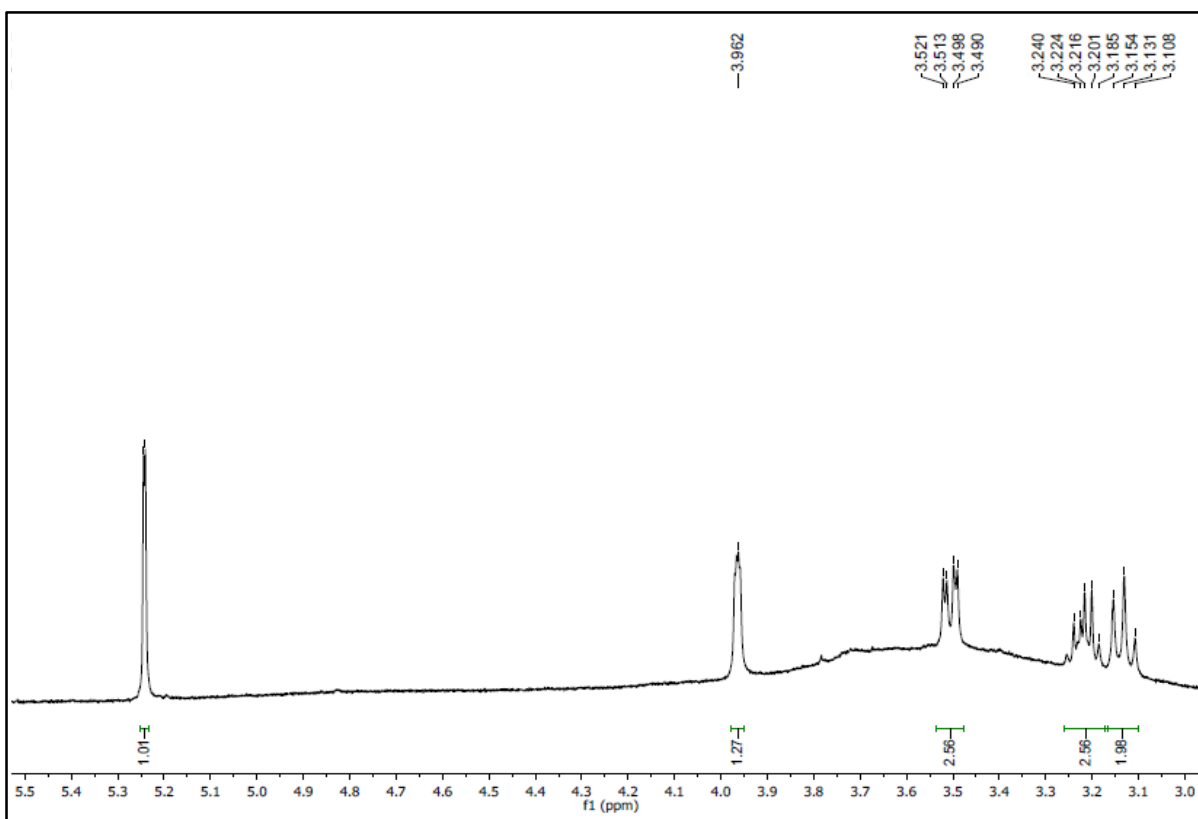
**Figura 51** -Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 0,0 – 9,0 ppm.



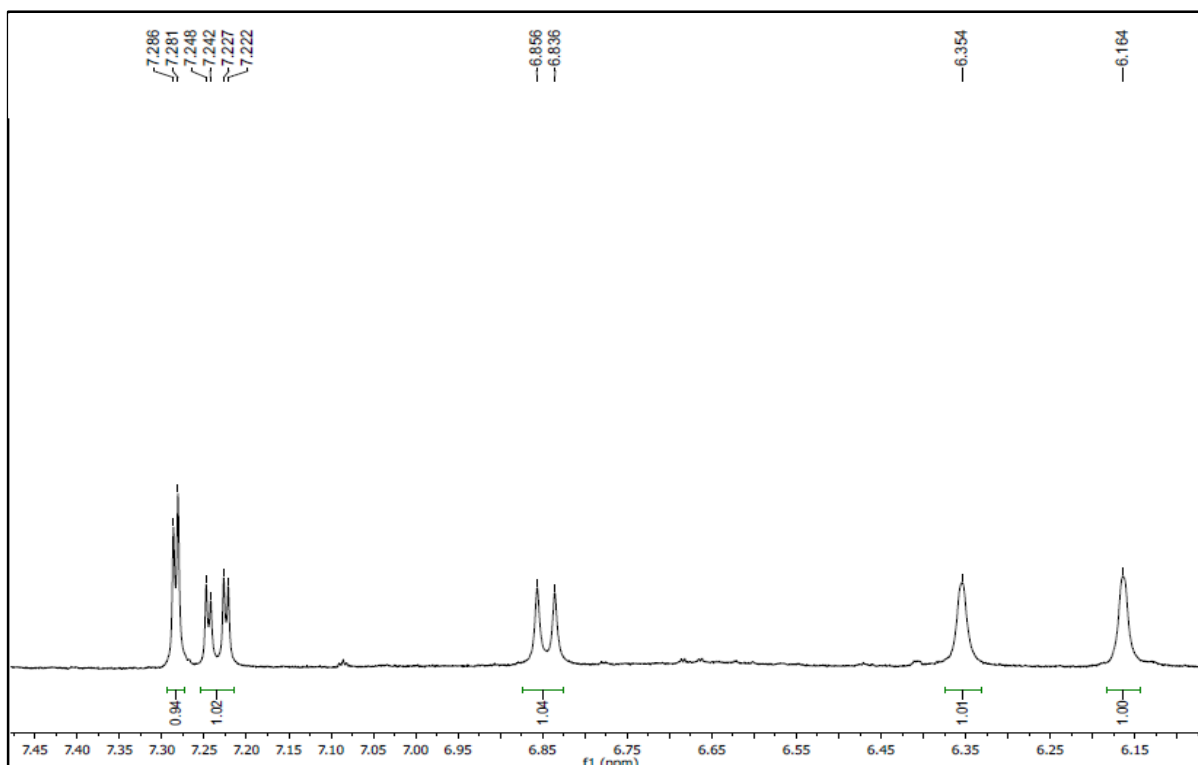
**Figura 52** -Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 0,0 – 2,6 ppm.



**Figura 53** -Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 3,0 – 5,5 ppm.



**Figura 54** -Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO) de EPF-2 na região de 6,15 – 7,45 ppm.



## 5.4 Determinação Estrutural de EPF-3

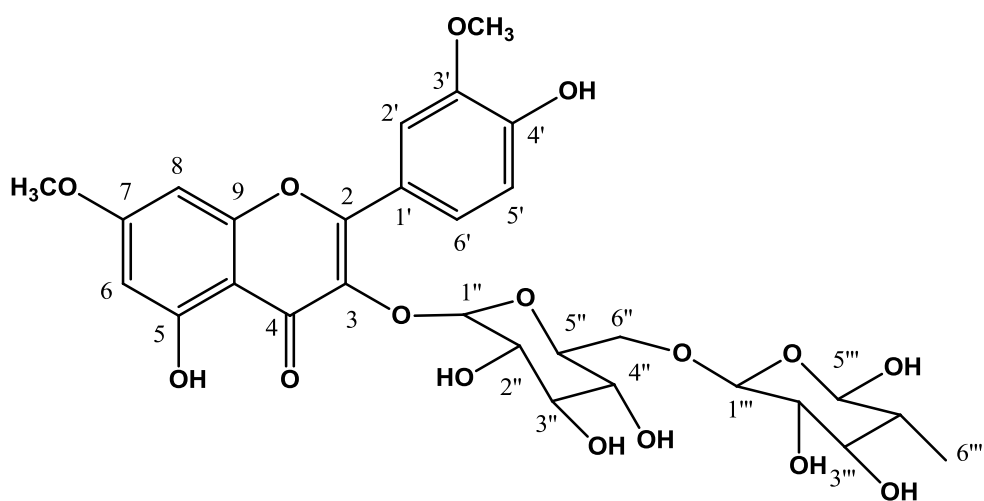
A substância codificada como EPF-3 foi isolada na forma de um pó alaranjado com 0,010g.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Fig. 55, pág. 81) obtido a 125 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  e em suas expansões (Figura 56, pág.81 , Figura 57, pág.82 ), foi possível observar a presença de 29. Destes, dez foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos  $\text{sp}^2$  e quatorze a carbonos  $\text{sp}^3$ . Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  177,4, 167,4, 162,7, 159,2, 158,4, 145,7 e 151,7 foram condizentes com esqueleto carbono de uma flavona sendo atribuídos aos carbonos C-4, C-7, C-5, C-2, C-9, C-3' e C-4', respectivamente. Os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  99,2 e 93,2 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 corroborando com o padrão de flavonas com oxigenação em C-5 e C-7. Observou-se ainda os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  111,9, 117,4 e 123,2 que foram atribuídos aos carbonos C-5', C-2', e C-6', respectivamente. A ausência de sinal em  $\delta_{\text{C}}$   $\sim$ 107,5 sugeriu a presença de substituinte no carbono 3. Observou-se ainda dois sinais para metoxilas em  $\delta_{\text{C}}$  56,5 e 56,4. Como esses deslocamentos correspondem a metoxilas inseridas em anel aromático e não estão impedidas estericamente foram inseridas nos carbonos C-7 e C-4'. O conjunto de sinais em  $\delta_{\text{C}}$  78,1; 77,2; 75,7; 73,8; 72,2; 72,0; 71,4; 69,7 e 68,5 sugeriram a presença da rutinose. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  102,3 e 68,5, foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1'') e ao carbono metilênico respectivamente, sinais estes característicos da presença de glicose. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  101,4 e 17,6 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1''') e ao carbono metílico (C-6'''), característicos da presença de ramnose (GONZÁLEZ-GUEVARA, et al., 2006).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 58 pág. 82) e em suas expansões (Figura 59, pág. 83, Figura 60, pág. 83, Figura 61, pág.84, Figura 62, pág. 84, Figura 63, pág. 85) observou-se na região de hidrogênios em sistema aromático, dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (1H,  $J = 2,0$  Hz) e 6,31 (1H,  $J = 2,0$ Hz) acoplado em meta características dos hidrogênios H-6 e H-8 de flavonoides. Foi observado um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,77 (1H,  $J = 2,5$  e 8,0 Hz) referente ao hidrogênio H-6', um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,71 (1H,  $J = 2,0$  Hz) referente ao hidrogênio H-2' e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (1H,  $J = 8,0$  Hz) referente ao hidrogênio H-5'. Esse padrão de hidrogenação corrobora para um sistema ABX no anel B do flavonoide. Ainda se observou, os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 e 3,70, o singleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,39 e o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,97, bem como, os multipletos entre

$\delta_H$  3,39; 3,22; 3,34; 3,70; 3,29; 3,07 e 3,26 inferindo as duas unidades osídicas. Estas e outras relações estão reunidas na Tabela 4.

Após análise dos dados de RMN foi concluído que a substância se tratava do 7,4'-Di-O-metilquercetin-3-O- $\beta$ -rutinosídeo (Ombuin-3-rutinosídeo), relatado pela primeira vez em *E. paufferense*.

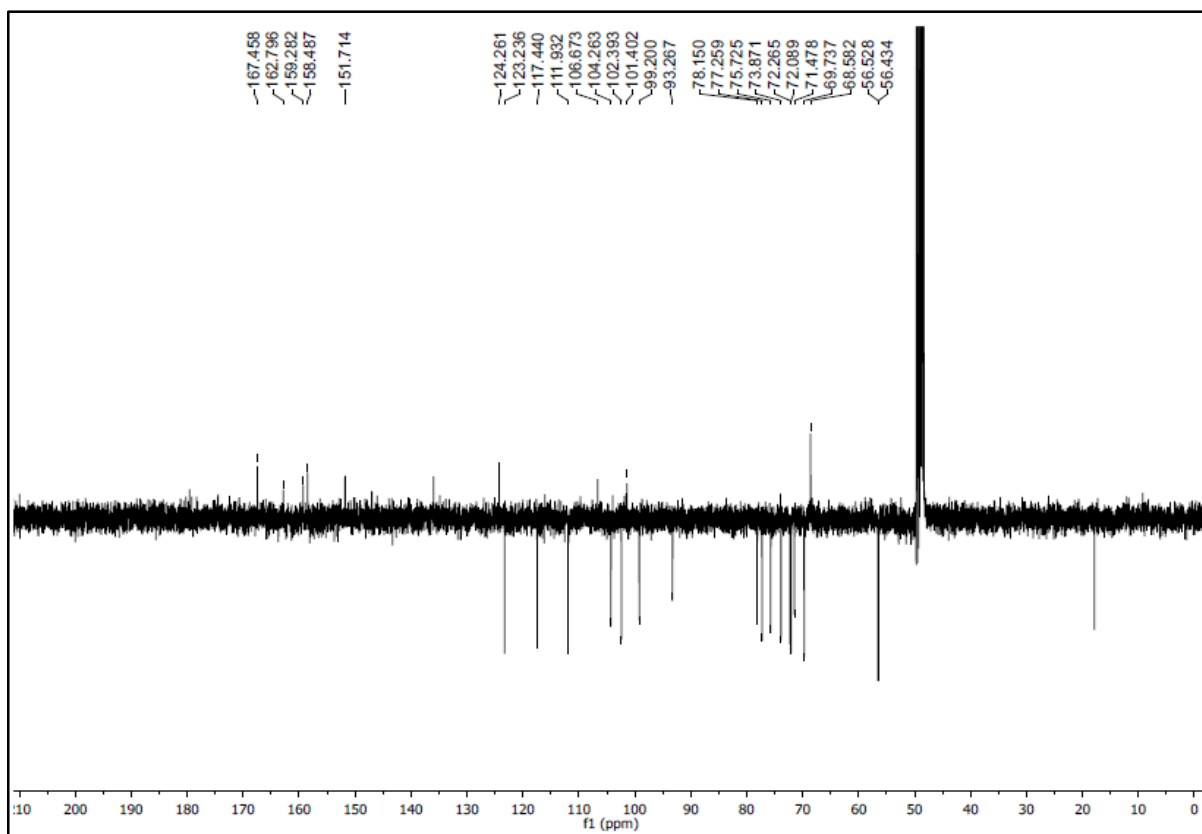


Estrutura da Ombuin-3-rutinosídeo.

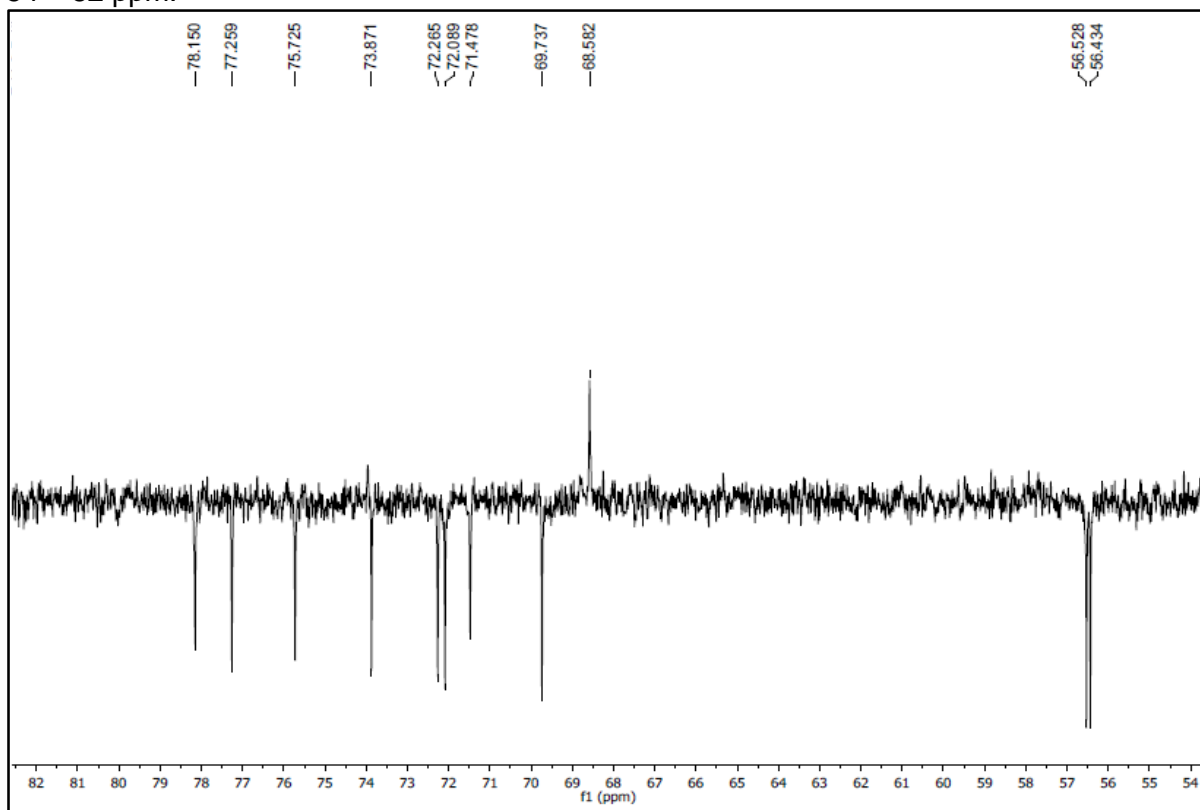
Tabela 4 - Dados de RMN de EPF-3 (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Posição	HMQC		(GONZÁLEZ-GUEVARA, et al., 2006)	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
<b>2</b>	-	159,2	-	156,2
<b>3</b>	-	135,0	-	135,7
<b>4</b>	-	179,5	-	177,3
<b>5</b>	-	162,7	-	160,7
<b>6</b>	6,36 ( <i>d</i> ; 1 H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	99,2	6,36 ( <i>d</i> ; <i>J</i> = 2 Hz)	97,7
<b>7</b>	-	167,4	-	165,0
<b>8</b>	6,62 ( <i>d</i> ; 1 H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	93,2	6,38 ( <i>d</i> ; <i>J</i> = 2 Hz)	92,1
<b>9</b>	-	158,4	-	156,5
<b>10</b>	-	106,6	-	104,8
<b>1'</b>	-	124,2	-	122,7
<b>2'</b>	7,71 ( <i>d</i> ; 1 H, <i>J</i> = 2,0 Hz)	117,4	7,55 ( <i>d</i> ; <i>J</i> = 2 Hz)	115,7
<b>3'</b>	-	145,9	-	145,7
<b>4'</b>	-	151,7	-	150,0
<b>5'</b>	7,06 ( <i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 8,0 Hz)	111,9	7,04 ( <i>d</i> ; <i>J</i> = 8,0 Hz)	111,2
<b>6'</b>	7,77 ( <i>dd</i> ; 1 H; <i>J</i> = 2,0 e 8,0)	123,2	7,72 ( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 8,0 e 2,0 Hz)	121,3
<b>1''</b>	5,21 ( <i>d</i> ; 1 H; <i>J</i> = 7,5 Hz)	102,3	5,38 ( <i>d</i> ; <i>J</i> = 7,5 Hz)	101,7
<b>2''</b>	3,69 – 3,74 ( <i>m</i> )	75,7	3,22	73,9
<b>3''</b>	3,48 – 3,63 ( <i>m</i> )	78,1	3,25 ( <i>t</i> ; <i>J</i> = 9 Hz)	76,3
<b>4''</b>	3,48 – 3,63 ( <i>m</i> )	71,4	3,39 ( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 9,3 e 9,3 Hz)	69,7
<b>5''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	77,2	3,24 ( <i>m</i> )	75,7
<b>1'''</b>	4,50 ( <i>d</i> ; 1H; <i>J</i> = 1,2 Hz)	101,4	4,39 ( <i>sl</i> )	100,5
<b>2'''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	72,2	3,29 ( <i>m</i> )	70,2
<b>3'''</b>	3,20 – 3,25 ( <i>m</i> )	72,0	3,08 ( <i>m</i> )	70,4
<b>4'''</b>	3,37 – 3,42 ( <i>m</i> )	73,8	3,07 ( <i>m</i> )	71,7
<b>5'''</b>	3,93 ( <i>m</i> )	69,7	3,26( <i>m</i> )	68,0
<b>6'''</b>	1,10 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	18,2	0,97 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	17,4
<b>OMe-7</b>	3,95 ( <i>s</i> )	56,5	3,88 ( <i>s</i> )	55,6
<b>OMe-3'</b>	3,89 ( <i>s</i> )	56,4	3,88 ( <i>s</i> )	56,1

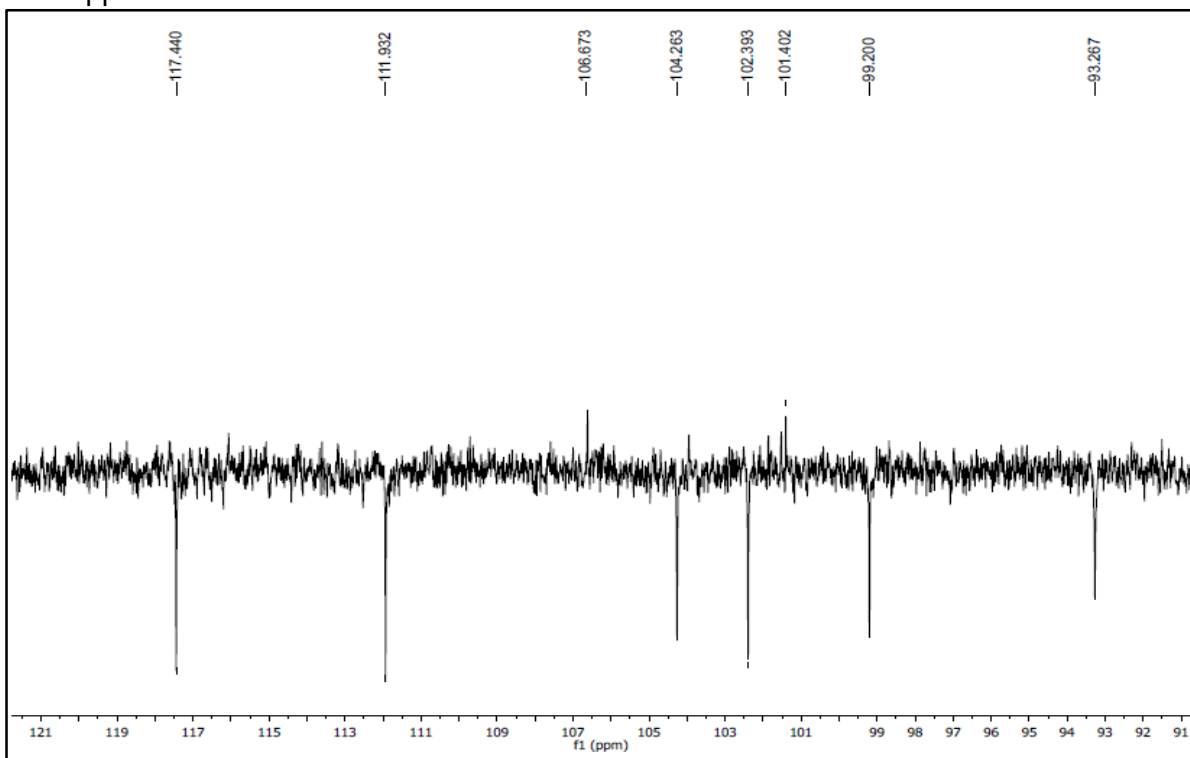
**Figura 55-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3



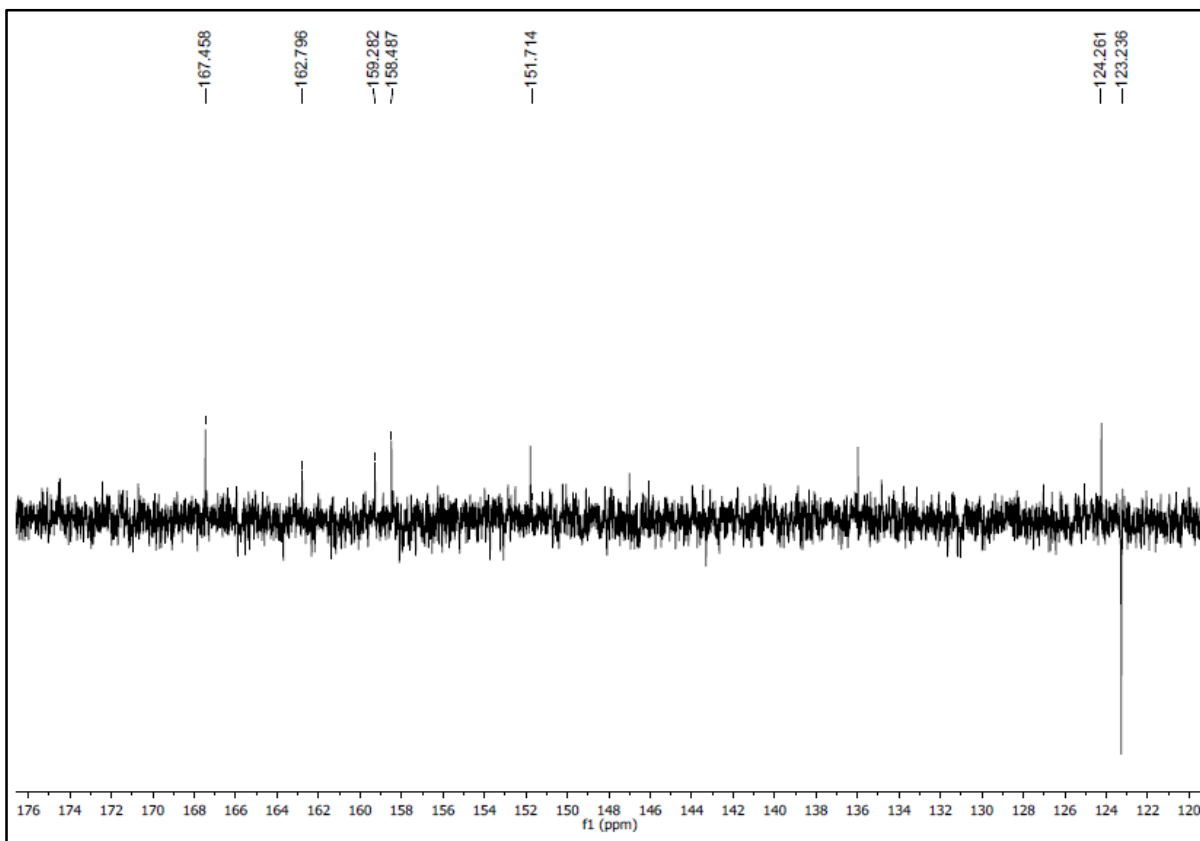
**Figura 56 -**Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 54 – 82 ppm.



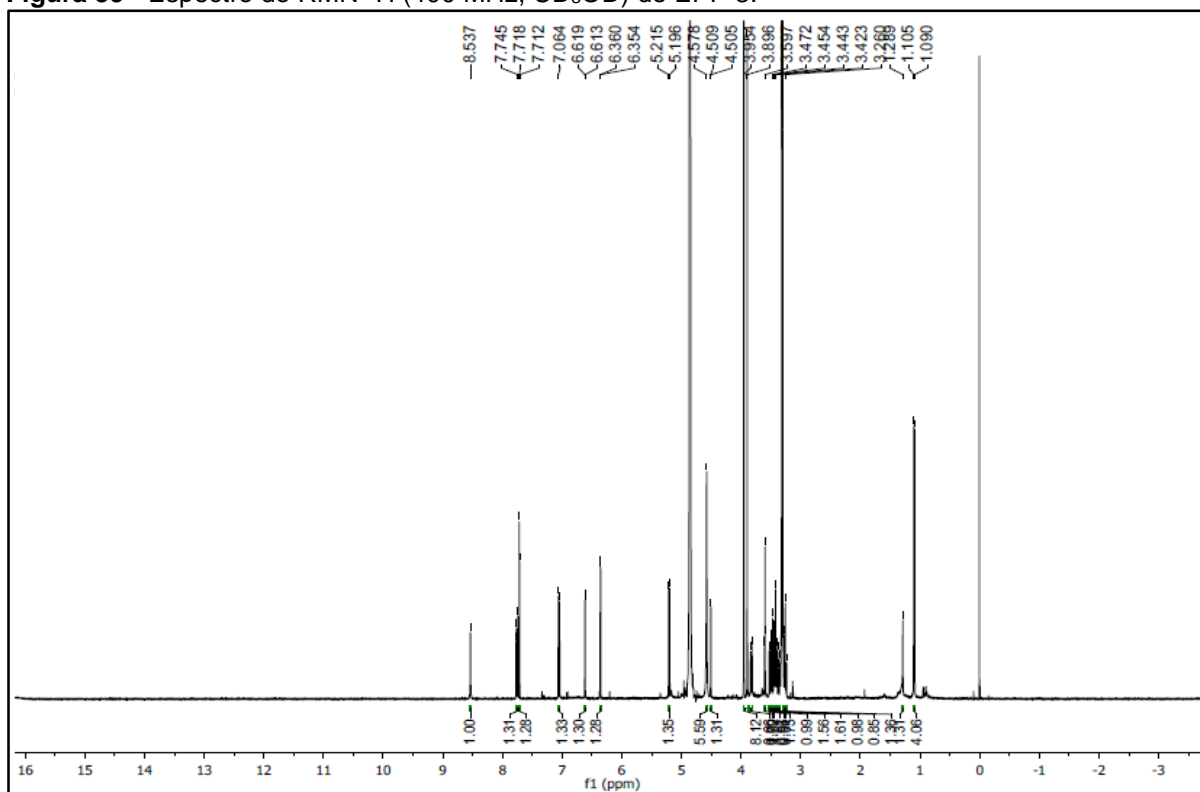
**Figura 57** -Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 91 – 121 ppm.



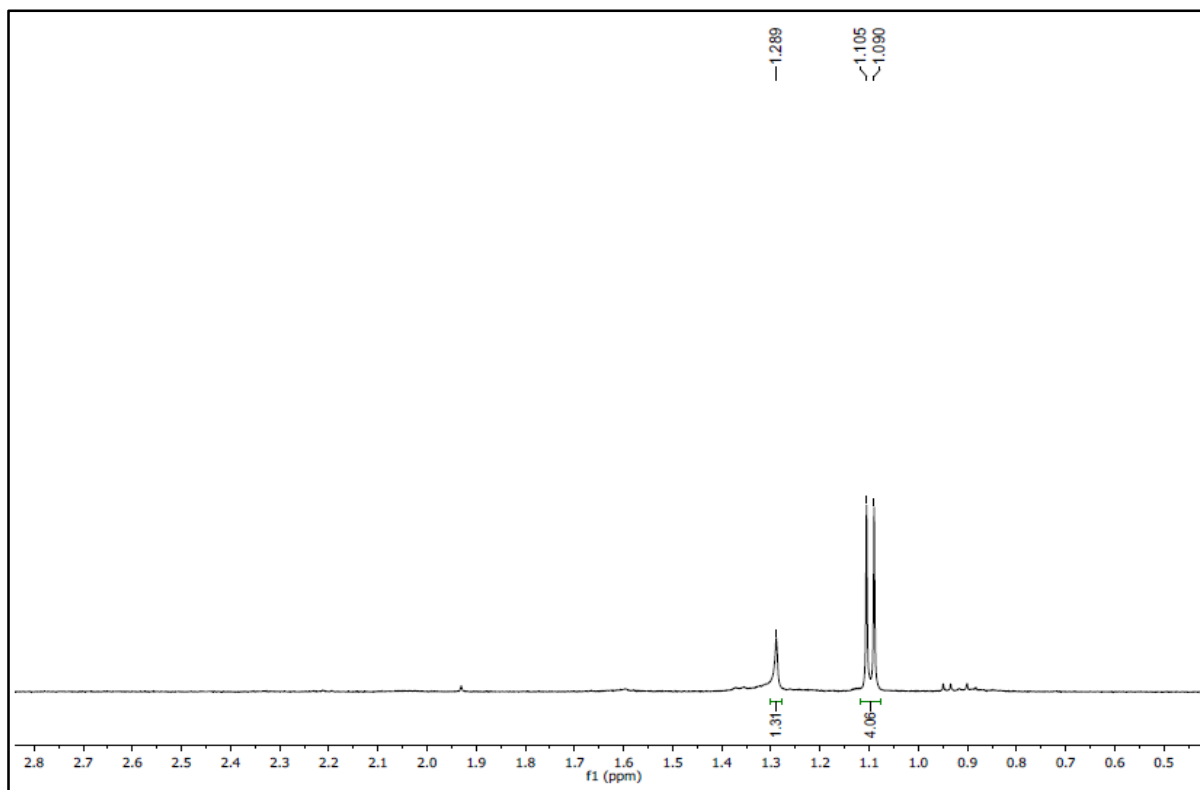
**Figura 58** -Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 120 – 176 ppm.



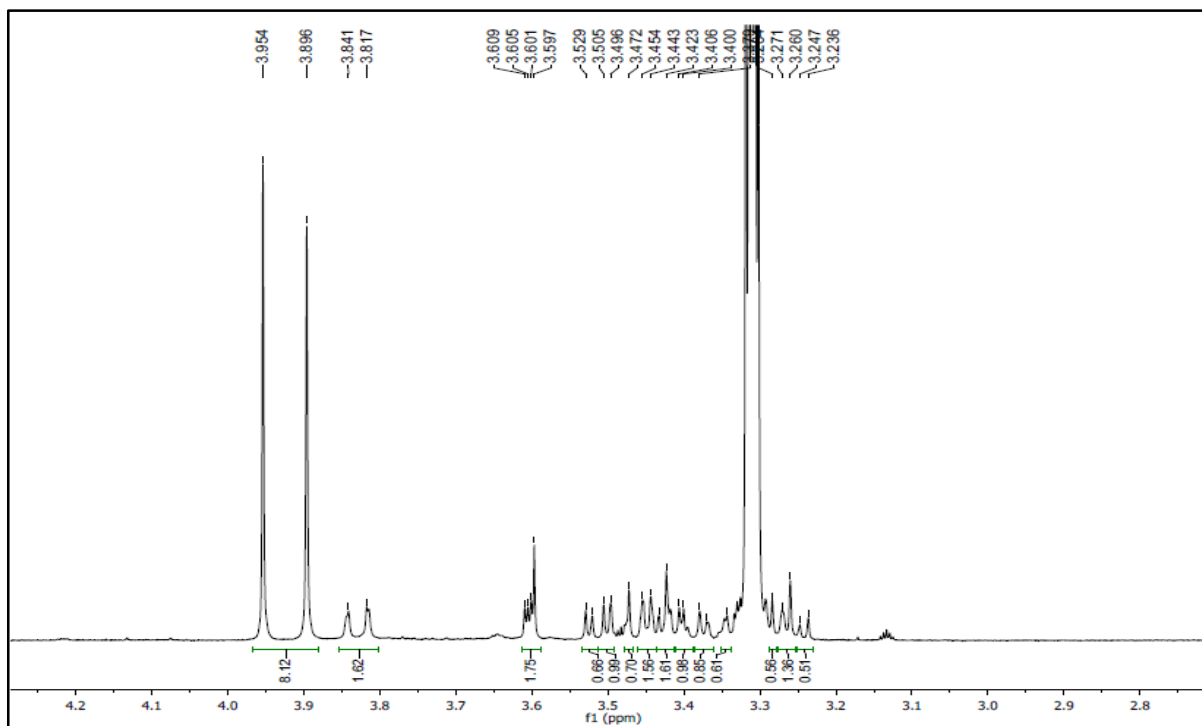
**Figura 59** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3.



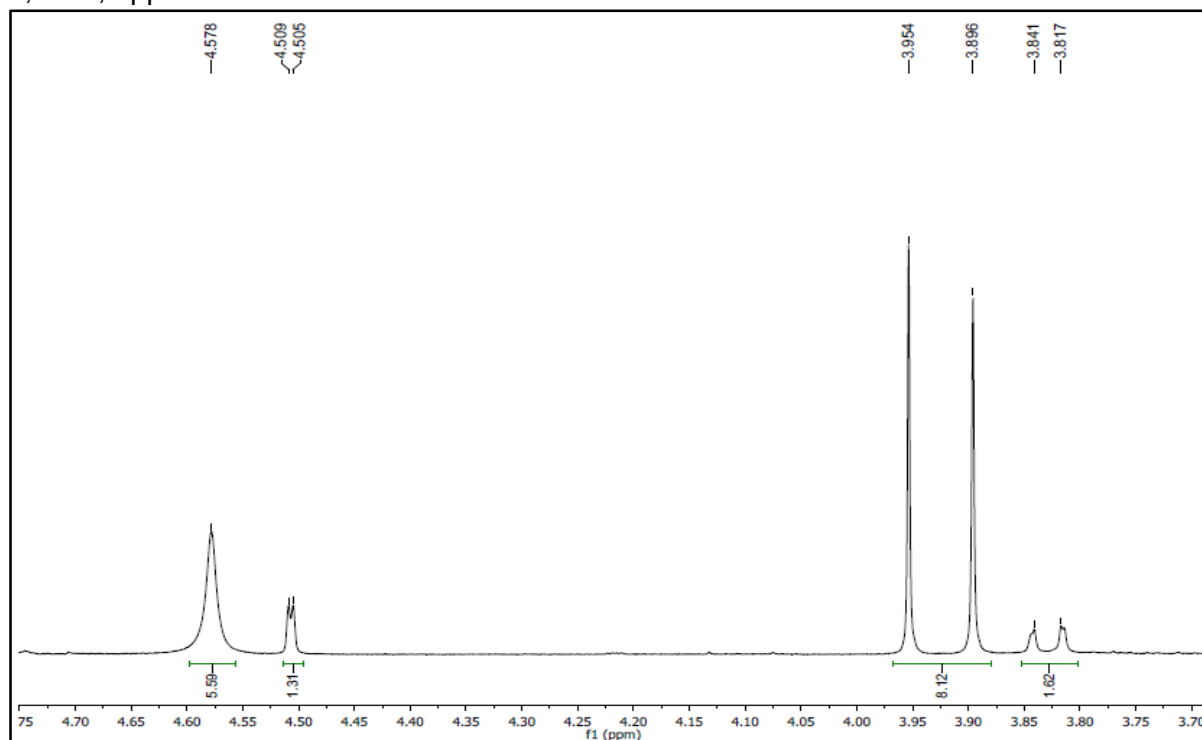
**Figura 60** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 0,5 – 2,8 ppm



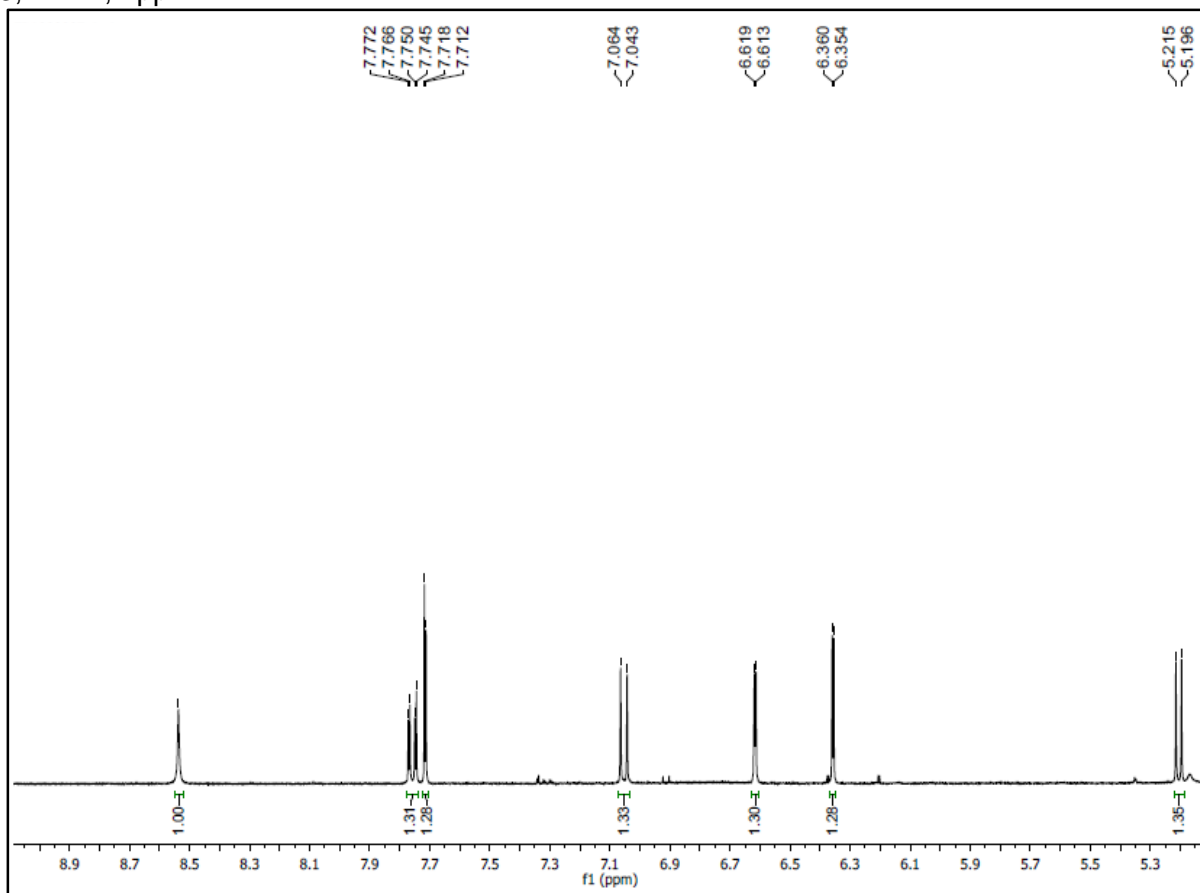
**Figura 61** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 2,8 – 4,2 ppm.



**Figura 62** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 3,7 – 4,7 ppm.



**Figura 63** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPF-3 na região de 3,7 – 4,7 ppm



## 5.5 Estudo da citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas

As amostras foram testadas na concentração de **200 µg/mL** apresentando citotoxicidade conforme a Tabela 5:

**Tabela 5:** Efeito de *Erythroxylum paufferense* na viabilidade das células MCF-7, HCT-116 e HL-60 após 72 h de tratamento.

Fases do Extrato	Porcentagem de inibição		
	MCF-7	HCT-116	HL-60
<i>Erythroxylum paufferense</i>	53,3 ± 1,47%	41,89 ± 2,90%	73,82 ± 0,68%

Os resultados são expressos como média ± erro padrão de um experimento independente em triplicata, testado na concentração de 200 µg/mL.

Dentre os resultados obtidos para a citotoxicidade, pode-se observar que a fase acetato de etila apresentou pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%) para a linhagem HCT-116, uma atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) para a linhagem MCF-7 e muita atividade para a linhagem HL-60 promovendo uma inibição de crescimento variando de 70 a 100%.

Logo, essa triagem tem um resultado bastante promissor para a linhagem HL-60, uma vez que promoveu uma alta inibição do seu crescimento celular. Sendo assim, é de grande relevância para a farmacologia os estudos posteriores destes.

## *CONCLUSÃO*

## 6. CONCLUSÕES

Pela primeira vez, foi relatado o estudo fitoquímico da espécie *Erythroxylum paufferense* (Erythroxylaceae).

A partir dos estudos das partes áreas da planta utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas pode-se evidenciar uma alta concentração de compostos fenólicos em sua fase acetato de etila, sendo possível identificar três flavonoides glicosilados, duas proantocianidinas e uma catequina. Esses dados corroboram com a química de Erythroxylaceae que tem flavonoides como um de seus marcadores.

Os picos com m/z 595, 447 e 637, foram isolados e identificados como Quercetina-3-sambubiosídeo, Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo e Ombuin-3-rutinosídeo, respectivamente. Esses compostos possuem ampla distribuição em espécies de *Erythroxylum* e possuem importância quimiotaxonomica. Os mesmos tiveram suas estruturas completamente elucidadas e estão sendo relatados pela primeira vez em *Erythroxylum paufferense*.

A fase acetato de etila rica em flavonoides e compostos fenólicos, apresentou no estudo preliminar de citotoxicidade com células MCF-7, HL60 e HCT-116 dados promissores, destacando o percentual de inibição acima de 70% na linhagem HL-60.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M; GMÜNDER, F; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 363-381, 2007.
- AGUIAR, S. J; OLIVEIRA, S. L; TAVARES, J. F; BRANCO M.V; LUCENA, H. F; BARBOSA-FILHO, J. M; AGRA, M. F; NASCIMENTO, S. C; SILVA, T. G; SIMONE, C. A; ARAÚJO, J. X. J; SILVA, M. S. Tropane alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 155-165, 2011.
- ALBUQUERQUE, C. H. Constituintes químicos e atividade farmacológica de *Erythroxulum pulchrum* A. St. Hil. (Erythroxylaceae). **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**, João Pessoa, 2013.
- BARREIROS, M. L. Flavonóides e terpenóides de três espécies do gênero *Erythroxylum* e suas atividades biológicas. **Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química**, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- BELTRAME, F. L; SARTORETTO, J. L; BAZOTTE, R. B; CUMAN, R. N; CORTEZ, D. A. G; FERNANDES, L. C; TCHAIKOVSKI, O. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.
- BIERI, S; BRACHET, A; VEUTHEY, J. L; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 439-447, 2006.
- BOTELHO, E. D. Desenvolvimento para nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada á espectroscopia de massas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade federal de Brasília, Brasília, 2011.
- BRANCO, A; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 25, p. 15-19, 2002.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BRITO, A; RAMIREZ, J. E; ARECHE, C. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400-17421, 2014.
- BRUSERUD, O; WENDELBOE, O. Biological treatment in acute myelogenous leukaemia: how should T-cell targeting immunotherapy be combined with intensive chemotherapy? **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 1, p. 1005-1116, 2001.

CELLI, G. B; PEREIRA-NETTO, A. B; BETA, T. Comparative Analysis of Total Neotropics Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Flavonoids Profile of Fruits from two Varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) Throughout the Fruit Developmental Stages. **Food Research International**, v. 44, p. 2442-2451, 2011.

CHANG, S. W; KIM, K. H; LEE, I. K; CHOI, S. U; RYU, S. Y; LEE, K. R. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. **Natural Products Sciences**, v. 15, n. 4, p. 234-240, 2009.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, v. 6, p. 670-3695, 2013.

DALY, D. Flowering Plants of -Erythroxylaceae. **The New York Botanical Garden**, p. 143-145, 2004.

DANTAS, C. A. G. Estudo Fitoquímico e investigação de uma provável atividade imunomoduladora de metabólitos secundários de *Erthroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae). **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**, João Pessoa, 2008.

DAVIS, B. D. Structural Characterization of Isomeric Flavonoid Glycosides and Metabolites by Metal Complexation and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Dissertation**, The University of Texas at Austin, 2007.

FARAGA, M. A; PORZELA, A; WESSJOHANNA, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D-NMR techniques. **Phytochemistry**, v. 76, p. 60-72, 2012.

FERREIRA, N. R. F. Estudo fitoquímico de *Waltheria ferrugínea*. **Dissertação (Mestrado em química)**, 2014.

GALVEZ, M; MARTIN-CORDERO, C; LOPEZ-LÁZARO, M; CORTES, F; AYUSO, M. J. Cytotoxic effects of *Plantago* ssp. on câncer cell lines. **Journal of Ethnopharmacological**, v 88, p. 125-130, 2003.

GIULIETTI, A. M; CONCEIÇÃO, A; QUEIROZ, L. P. Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro. **Associação Plantas do Nordeste**, Recife, 2006.

GOMES, S. V. F. Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer. **Dissertação de Mestrado**. São Cristovão, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K; GONZALEZ-LAVAUT, J. A; GONZÁLEZ-GUEVARA, J; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: análisis de la información científica. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 284-290, 2005.

GONZALEZ-GUEVARA J. L; CASTRO, V. H; GONZALEZ-GARCIA, K. L; PAYOHILL, A. L; GONZALEZ-LAVAUT, J. A; TORRES, J. M; PRIETO-GONZALEZ, S. Flavonoid glycosides from *Cuban Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 539-542, 2006.

GOTTLIEB, B; BEITEL, L; NADARAJAH, A; PALIOURAS, M; TRIFIRO, M. The androgen receptor gene mutations database. **Journal Human Mutation**, 2012.

GRIFFIN, W. J; LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, n 8, p. 623-637, 2000.

GUERRERO, J. L. G; BUENO, R. R; GARCIA, I. R; SANCHEZ, C. L. Cytotoxicity Screening of Several Tomato Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 40-45, 2011.

JADVAR, H; ALAVI, A; GAMBHIR, S. S. 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon can-cers: molecular biology correlates and dis-ease characterization. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1820-7, 2009.

JAISWAL, R; JAYASINGHE, L; KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 502-515, 2012.

JOHNSON, E; SCHMIDT, W. F; NORMAN, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, 7, 743-759, 1998.

LIN, L.-Z; SUN, J; CHEN, P; MONAGAS, M. J; HARMY, J. M. UHPLC-PDA ESI/HRMSn Profiling Method To Identify and Quantify Oligomeric Proanthocyanidins in Plant Products. **Jornal Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, p. 9387-9400, 2014.

LOIOLA, M. I. B; AGRA, M. D. F; BARACHO, G. S; QUEIROZ, R. T. D. Flora of Paraíba, Brazil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 473-487, 2007.

MARÇO, P. H; POPPI, J. R. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

MELO, P. S; JUSTO, G. Z; DURÁN, N; HAUN, M. Natural killer cell activity and antitumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivative. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, S. L. Alcaloides tropânicos de *Erythroxylum caatingae*. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**, João Pessoa, 2008.

OLIVEIRA, S. L. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos. **Dissertação (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**, João Pessoa, 2012.

PLOWMAN, T. C; HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia** v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.

POUPARD, P; SANOREN, P; BARON, A; RENARD, C. M. G. C; GUYOT. S. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass spectrometry**, v. 46, p. 1186-1197, 2011.

RIBEIRO, E. M. O; LIMA, L. S; DAVID, J. M; VALE, A. E; LOPES, L. M.X; DAVID, J.P. "A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae)". **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 232-235, 2013.

RODRIGUES, M. V. N; REHDER, V. L. G; SARTORATTO, A; BOAVENTURA, S. J. A. S.O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência**, 2006.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

SALVAGNINI, L. E; OLIVEIRA, J. R. S; SANTOS, L. E; MOREIRA, R. R; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.

SILVEIRA, L. M. S; OLEA, R. S. G; MESQUITA, J. S; CRUZ, A. L. N; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O; SCBENKEL, E. P; GOSMANN G; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed Editora, 2017.

SONODA, M; NISHIYAMA, T; MATSUKAWA, Y; MORRIYASU, M. Cytotoxic activities from two *Scutellaria* plants in chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacological**, v. 91, p. 65-68, 2004.

WEI, Y; SARDAR, M. R; SUTHERLAND, I. A; FISHER, D. Separation of delphinidin-3-*O*-sambubioside, cyanidin-3-*O*-sambubioside and p-coumaric acid from cranberry by CCC followed by prep-HPLC using robotic CCC solvent system selection. **Chromatographia**, v. 74, p. 367-373, 2011.

WEN, T; JINJIAN, L; MINGQING, H; YINGBO, L; MEIWAN, C; GUOSHENG, W; JIAN, G; ZHANGFENG, Z; ZENGTAO, X; YUANYE, D; JIAJIE, G; XIUPING, C; YITAO, W. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese Medical Journal**, v. 6, p. 27-42, 2011.

ZANOLARI, B; WOLFENDER J. L; GUILLET D; MARSTON A; QUEIROZ E.F; PAULO, M.Q; HOSTETTMANN K. 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.

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**, v. 29, n. 8, p. 819-825, 2001.