



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E
MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum*

CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

**João Pessoa – PB
2023**

CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum*

Tese 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 às exigências para obtenção do título de Doutor em **Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, área de concentração **Farmacocímica**.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

**João Pessoa – PB
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192i Dantas, César Augusto Gonçalves.
Investigação fitoquímica de espécies do gênero
Erythroxylum / César Augusto Gonçalves Dantas. - João
Pessoa, 2023.
185 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Fitoquímica. 2. Alcaloides tropânicos. 3.
Compostos fenólicos. 4. Espectroscopia. 5.
Cromatografia. I. Tavares, Josean Fachine. II. Título.

UFPB/BC

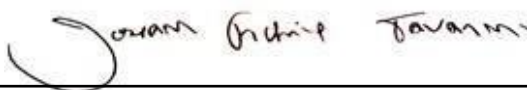
CDU 581.19(043)

CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS

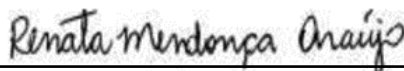
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxylum*

APROVADO EM: 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA



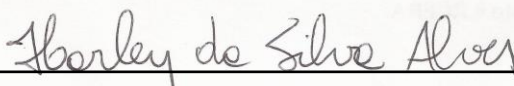
Prof. Dr. Josean Fachine Tavares
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador



Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte)
Examinadora Externa



Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte)
Examinadora Externa



Prof. Dr. Harley da Silva Alves
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno



Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cuidar de mim todos os dias e me conduzir pelos melhores cominhos.

Aos meus pais, Rilvaneide e João Teodoro (*In memoriam*), por todo amor, carinho, educação e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Professor Doutor Josean Fachine Tavares, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, confiança, ensinamentos e por toda ajuda e disponibilidade durante o mestrado e doutorado.

Ao Professor Doutor Marcelo Sobral da Silva, pelos ensinamentos e contribuições na parte espectroscópica.

Ao Professor Doutor Lucas Silva Abreu, pelos conhecimentos e por toda sua disponibilidade em ajudar durante as etapas de anotação e isolamento dos compostos.

À Professora Doutora Maria de Fátima Agra, pelas contribuições na identificação botânica das espécies de *Erythroxylum*.

Às Professoras Doutoras Renata Araujo e Silvana Zucolotto, e aos Professores Doutores Harley Alves e Sócrates Golzio, pela participação e colaborações na banca examinadora.

Aos técnicos Evandro, Marcelo e Raimundo Nonato, pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN e apoio nos laboratórios da farmacoquímica.

Às secretárias do PPgPNSB, Caroline Mangueira e Nilmar, pelas informações prestadas, auxílio e disponibilidade em ajudar.

Aos meus amigos da graduação, Arthur Gouveia, Fernanda Nobrega e Amanda Justino, pela amizade, apoio e por sempre estarem comigo.

Aos meus colegas e amigos do doutorado Luiz Agra, Sarah Dantas, Juliana Medeiros e Danilo Duarte, por toda amizade, conversas diárias e companhia durante esses anos.

Aos amigos do laboratório Vinicius Viana, Natan Teles, Gabriela, Ranna, e Ana Rita pela amizade, apoio e encontros sempre cheios de conversas e alegria.

A todos da equipe SFCB, pelo compartilhamento de conhecimentos e experiencias.

Aos professores do PPgPNSB, pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

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

RESUMO

Diversos metabólitos secundários de diferentes classes podem ser evidenciados em espécies do gênero *Erythroxylum*, com destaque para os flavonoides, terpenos e alcaloides do tipo tropânico, estes últimos sendo considerados marcadores do gênero. Por muitos desses compostos já se encontram descritos na literatura científica, metodologias modernas de triagem e identificação, como a desreplicação, se fazem necessárias para direcionar ao isolamento dos metabólitos de interesse, representando uma estratégia eficiente, rápida e segura. Este trabalho teve como objetivo traçar o perfil químico dos metabólitos secundários presentes nas fases clorofórmicas, acetato de etila e *n*-butanólicas das partes aéreas das espécies *Erythroxylum simonis* Plowman, *Erythroxylum pauferrense* Plowman, *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. e *Erythroxylum revolutum* Mart. por metodologias de desreplicação. Para tanto, as fases foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, em seguida os experimentos foram repetidos com o cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, também com fonte de ionização por *electrospray*, as fases acetato de etila e *n*-butanólicas foram analisadas no modo negativo e as fases clorofórmicas no modo positivo. A anotação dos compostos foi realizada com base nos íons de suas moléculas desprotonadas ou protonadas, fórmulas moleculares, padrões de fragmentação e por comparação dos dados obtidos com os presentes na literatura científica. Os compostos não anotados completamente foram isolados e caracterizados por espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C . Por meio das análises realizadas foi possível traçar e comparar o perfil químico dos metabólitos secundários das espécies de *Erythroxylum*. A desreplicação das fases acetato de etila e *n*-butanólicas promoveu a anotação de 55 compostos fenólicos, se destacando os flavonoides glicosilados, ácidos fenólicos, procianidinas, flavolignananas e lignoides, a maioria sendo descritos pela primeira vez nas espécies do estudo, e alguns inéditos para o gênero *Erythroxylum* e para a família Erythroxylaceae. A desreplicação das fases clorofórmicas promoveu a anotação de 29 alcaloides tropânicos, alguns também sendo descritos pela primeira vez no gênero e na família das espécies estudadas. Da fase acetato de etila de *E. simonis* foi realizado o isolamento das cinchoninas Ia e Ib, epicatequina, quercetina-O-hexosídeo, e do bifenil-3,3',4,4'-tetraol, descritos pela primeira vez na espécie. Da fase clorofórmica de *E. revolutum* foi realizado o isolamento de três compostos, o 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano protonado, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropano protonado e 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano protonado, relatados pela primeira vez na espécie *E. revolutum*. Este trabalho contribuiu para os conhecimentos fitoquímicos do gênero *Erythroxylum* e demonstra a eficiência e a importância da utilização de metodologias de isolamento guiado de metabólitos secundários na pesquisa em produtos naturais.

Palavras-chave: Erythroxylaceae. Alcaloides tropânicos. Compostos fenólicos. Espectroscopia. Cromatografia.

ABSTRACT

Several secondary metabolites of different classes can be evidenced in species of the genus *Erythroxylum*, with emphasis on flavonoids, terpenes and tropane alkaloids, the latter being considered markers of the genus. Because many of these compounds are already described in the scientific literature, modern screening and identification methodologies, such as dereplication, are necessary to direct the isolation of the metabolites of interest, representing an efficient, fast and safe strategy. This work aimed to trace the chemical profile of the secondary metabolites present in the chloroform, ethyl acetate and *n*-butanolic phases of the aerial parts of the species *Erythroxylum simonis* Plowman, *Erythroxylum pauferrense* Plowman, *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. and *Erythroxylum revolutum* Mart. by dereplication methodologies. For this purpose, the phases were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization, then the experiments were repeated with the chromatograph coupled to a high-resolution mass spectrometer, also with an electrospray ionization source, ethyl acetate and *n*-butanolic phases were analyzed in negative mode and chloroform phases in positive mode. The annotation of the compounds was carried out based on the ions of their deprotonated or protonated molecules, molecular formulas, fragmentation patterns and by comparing the data obtained with those present in the scientific literature. Compounds not fully annotated were isolated and characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Through the analyzes carried out, it was possible to trace and compare the chemical profile of the secondary metabolites of the *Erythroxylum* species. The dereplication of the ethyl acetate and *n*-butanolic phases led to the annotation of 55 phenolic compounds, highlighting glycosylated flavonoids, phenolic acids, procyanidins, flavolignans and lignoids, most being described for the first time in the studied species, and some unpublished for the genus *Erythroxylum* and for the family Erythroxylaceae. The dereplication of the chloroform phases led to the annotation of 29 tropane alkaloids, some also being described for the first time in the genus and family of the studied species. From the ethyl acetate phase of *E. simonis*, the isolation of cinchonaines 1a and 1b, epicatechin, quercetin-*O*-hexoside, and biphenyl-3,3',4,4'-tetraol, described for the first time in the species, was isolated. Three compounds were isolated from the chloroform phase of *E. revolutum*, the protonated 6-(benzoyloxy)-3-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoyloxy)tropane, protonated 6-(benzoyloxy)-3-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)tropane and protonated 6-(benzoyloxy)-3-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)tropane, reported for the first time in the species *E. revolutum*. This work contributed to the phytochemical knowledge of the genus *Erythroxylum* and demonstrates the efficiency and importance of using methodologies for guided isolation of secondary metabolites in research on natural products.

Keywords: Erythroxylaceae. Tropane alkaloids. Phenolic compounds. Spectroscopy. Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial da família Erythroxylaceae.....	23
Figura 2 - Espécie <i>Erythroxylum simonis</i> Plowman.....	24
Figura 3 - Espécie <i>Erythroxylum pauferrense</i> Plowman.....	25
Figura 4 - Espécie <i>Erythroxylum pulchrum</i> A. St.-Hil.....	26
Figura 5 - Espécie <i>Erythroxylum revolutum</i> Mart.....	27
Figura 6 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>E. simonis</i>	32
Figura 7 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>E. pauferrense</i>	33
Figura 8 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>E. pulchrum</i>	34
Figura 9 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>E. revolutum</i>	35
Figura 10 - Esquema do fracionamento da fase acetato de etila de <i>E. simonis</i>	37
Figura 11 - Cromatograma da fração ESFA 21-23.....	39
Figura 12 - Esquema do fracionamento da fase clorofórmica de <i>E. revolutum</i>	40
Figura 13 - Cromatograma da fração ERFC-45%.....	41
Figura 14 - Cromatogramas de pico base (BPC) das fases acetato de etila e <i>n</i> -butanólica de <i>E. pauferrense</i> , <i>E. simonis</i> e <i>E. pulchrum</i> . A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 1.....	44
Figura 15 - Via de fragmentação proposta para os dímeros de procianidinas do tipo B.....	54
Figura 16 - Via de fragmentação proposta para os trímeros de procianidinas do tipo B.....	56
Figura 17 - Via de fragmentação proposta para os dímeros de procianidinas do tipo A.....	57
Figura 18 - Via de fragmentação proposta para a catequina e epicatequina.....	58
Figura 19 - Via de fragmentação proposta para os ácidos cafeoilquínico.....	60
Figura 20 - Via de fragmentação proposta para o ácido di-cafeoilquínico.....	61
Figura 21 - Via de fragmentação proposta para o ácido cumaroilquínico.....	62
Figura 22 - Via de fragmentação proposta para o ácido feruloilquínico.....	63

Figura 23 - Via de fragmentação proposta para o 4- <i>O</i> -cafeoilchiquímico.....	65
Figura 24 - Via de fragmentação proposta para o ácido cafeico.....	65
Figura 25 - Via de fragmentação proposta para a cinchonaína II.....	67
Figura 26 - Via de fragmentação proposta para a cinchonaína I.....	68
Figura 27 - Via de fragmentação proposta para o ciclolariciresinol- <i>O</i> -deoxyhexoside.....	69
Figura 28 - Via de fragmentação proposta para a quercetina-3- <i>O</i> -deoxihexosídeo e quercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo.....	71
Figura 29 - Via de fragmentação proposta para a quercetina-3- <i>O</i> -sambubiosídeo.....	72
Figura 30 - Via de fragmentação proposta para a astragalina.....	74
Figura 31 - Via de fragmentação proposta para o canferol-3- <i>O</i> -sambubiosídeo.....	75
Figura 32 - Via de fragmentação proposta para a metilquercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo.....	76
Figura 33 - Via de fragmentação proposta para a dimetilquercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo.....	78
Figura 34 – Estrutura química dos compostos anotados nas fases acetato de etila e <i>n</i> -butanólica das espécies <i>E. simonis</i> , <i>E. pauferrense</i> e <i>E. pulchrum</i>	80
Figura 35 - Cromatogramas de pico base (BPC) das fases clorofórmicas de <i>E. pauferrense</i> , <i>E. simonis</i> , <i>E. pulchrum</i> e <i>E. revolutum</i> . A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 1.....	82
Figura 36 - Via de fragmentação proposta para a pungencina.....	88
Figura 37 - Via de fragmentação proposta para o 3-(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)tropan-6-ol.....	90
Figura 38 - Via de fragmentação proposta para a escopolamina.....	95
Figura 39 - Via de fragmentação proposta para o 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)nortropano.....	96
Figura 40 - Via de fragmentação proposta para o 3-(benzoiloxi)tropan-6,7-diol.....	97
Figura 41 – Estrutura química dos alcaloides tropânicos anotados nas fases clorofórmicas das espécies <i>E. simonis</i> , <i>E. pauferrense</i> , <i>E. pulchrum</i> e <i>E. revolutum</i>	99
Figura 42 - Espectro de massa de Es-1.....	102
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de Es-1.....	103

Figura 44 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Es-1 na região de 6,65 – 6,95 ppm.....	103
Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1.....	104
Figura 46 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1 na região de 110 – 150 ppm.....	104
Figura 47 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1.....	105
Figura 48 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1 na região de (6,30 – 7,30 ppm) x (85,0 – 145,0 ppm).....	105
Figura 49 - Estrutura do bifenil-3,3',4,4'-tetraol.....	106
Figura 50 - Espectro de massa de Es-2.....	109
Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2.....	110
Figura 52 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 6,70 – 7,05 ppm.....	110
Figura 53 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 5,66 – 6,12 ppm.....	111
Figura 54 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 4,10 – 5,00 ppm.....	111
Figura 55 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 2,67 – 2,95 ppm.....	112
Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2.....	112
Figura 57 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 95 – 160 ppm.....	113
Figura 58 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 28 – 82 ppm.....	113
Figura 59 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2.....	114
Figura 60 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de (4,70 – 7,30 ppm) x (80,0 – 160,0 ppm).....	114
Figura 61 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de (2,45 – 3,05 ppm) x (65,0 – 105,0 ppm).....	115
Figura 62 - Estrutura da epicatequina.....	115
Figura 63 - Espectro de massa de Es-3.....	120
Figura 64 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3.....	121
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 6,10 – 7,10 ppm.....	121

Figura 66 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz CD_3OD) de Es-3 na região de 3,70 – 5,30 ppm.....	122
Figura 67 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 2,78 – 3,16 ppm.....	122
Figura 68 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3.....	123
Figura 69 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 114 – 174 ppm.....	123
Figura 70 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 64 – 108 ppm.....	124
Figura 71 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 28,5 – 41,5 ppm.....	124
Figura 72 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3.....	125
Figura 73 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de (2,70 – 5,10 ppm) x (20,0 – 90,0 ppm).....	125
Figura 74 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de (5,90 – 7,20 ppm) x (90,0 – 130,0 ppm).....	126
Figura 75 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3.....	126
Figura 76 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de (2,80 – 5,20 ppm) x (40,0 – 180,0 ppm).....	127
Figura 77 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de (5,90 – 7,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm).....	127
Figura 78 – Estrutura da cinchonaína Ia.....	128
Figura 79 - Espectro de massa de Es-4.....	131
Figura 80 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4.....	131
Figura 81 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 6,80 – 7,85 ppm.....	132
Figura 82 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 5,15 – 6,45 ppm.....	132
Figura 83 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 3,15 – 3,75 ppm.....	133
Figura 84 - Estrutura da quercetina-3-O-hexosídeo.....	133
Figura 85 - Espectro de massa de Es-5.....	136
Figura 86 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	136
Figura 87 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 6,20 – 6,90 ppm.....	137

Figura 88 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 4,15 – 5,00 ppm.....	137
Figura 89 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 2,74 – 3,12 ppm.....	138
Figura 90 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	138
Figura 91 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 114 – 174 ppm.....	139
Figura 92 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 62 – 110 ppm.....	139
Figura 93 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 27,0 – 40,5 ppm.....	140
Figura 94 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	140
Figura 95 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (2,50 – 5,01 ppm) x (30,0 – 90,0 ppm).....	141
Figura 96 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (5,50 – 7,80 ppm) x (85,0 – 125,0 ppm).....	141
Figura 97 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5.....	142
Figura 98 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (2,60 – 5,00 ppm) x (30,0 – 110,0 ppm).....	142
Figura 99 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (2,30 – 5,10 ppm) x (100,0 – 180,0 ppm).....	143
Figura 100 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de (5,60 – 7,70 ppm) x (80,0 – 150,0 ppm).....	143
Figura 101 - Estrutura da cinchonaína Ib.....	144
Figura 102 - Espectro de massa de Er-1.....	147
Figura 103 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1.....	147
Figura 104 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 2,10 – 4,30 ppm.....	148
Figura 105 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 5,05 – 6,25 ppm.....	148
Figura 106 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 7,30 – 8,05 ppm.....	149
Figura 107 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1.....	149
Figura 108 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 30 – 80 ppm.....	150

Figura 109 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 107 – 168 ppm.....	150
Figura 110 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1.....	151
Figura 111 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (2,00 – 4,60 ppm) x (25,0 – 80,0 ppm).....	151
Figura 112 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (5,10 – 8,40 ppm) x (60,0 – 140,0 ppm).....	152
Figura 113 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1.....	152
Figura 114 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (1,90 – 4,50 ppm) x (20,0 – 90,0 ppm).....	153
Figura 115 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (3,10 – 4,15 ppm) x (105,0 – 180,0 ppm).....	153
Figura 116 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (4,80 – 6,30 ppm) x (30,0 – 170,0 ppm).....	154
Figura 117 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de (6,60 – 8,50 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).....	154
Figura 118 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropane protonado.....	155
Figura 119 - Espectro de massa de Er-2.....	157
Figura 120 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2.....	157
Figura 121 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 2,10 – 4,20 ppm.....	158
Figura 122 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 5,30 – 8,10 ppm.....	158
Figura 123 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2.....	159
Figura 124 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 30 – 78 ppm.....	159
Figura 125 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 104 – 170 ppm.....	160
Figura 126 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-2.....	160
Figura 127 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de (2,40 – 6,20 ppm) x (30,0 – 120,0 ppm).....	161
Figura 128 - Expansão do espectro HMBC (500 e 120 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de (3,00 – 9,50 ppm) x (90,0 – 180,0 ppm).....	161
Figura 129 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropane protonada.....	162

Figura 130 - Espectro de massa de Er-3.....	165
Figura 131 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3.....	165
Figura 132 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 1,80 – 4,30 ppm.....	166
Figura 133 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 5,20 – 8,10 ppm.....	166
Figura 134 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3.....	167
Figura 135 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 30 – 84 ppm.....	167
Figura 136 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 106 – 168 ppm.....	168
Figura 137 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3.....	168
Figura 138 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de (2,80 – 6,10 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).....	169
Figura 139 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de (5,80 – 8,30 ppm) x (80,0 – 170,0 ppm).....	169
Figura 140 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3.....	170
Figura 141 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de (2,80 – 6,20 ppm) x (30,0 – 120,0 ppm).....	170
Figura 142 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de (5,80 – 8,30 ppm) x (80,0 – 170,0 ppm).....	171
Figura 143 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropane protonado.....	171

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Dados das reuniões das frações da fase acetato de etila de <i>E. simonis</i> após monitoramento por CCDA.....	38
Quadro 2 - Dados das frações obtidas da fase clorofórmica de <i>E. revolutum</i> por CLMP.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos anotados nas fases acetato de etila e <i>n</i> -butanólica de <i>E. paufferense</i> , <i>E. simonis</i> e <i>E. pulchrum</i>	46
Tabela 2 - Compostos anotados nas fases clorofórmicas de <i>E. paufferense</i> , <i>E. pulchrum</i> , <i>E. simonis</i> e <i>E. revolutum</i>	84
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1, bifenil-3,3',4,4'-tetraol, em comparação aos dados obtidos por LIANG et al., 2016.....	102
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2, epicatequina, em comparação aos dados obtidos por SOUSA, 2015.....	109
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3, cinchonaína la, em comparação aos dados obtidos por XU et al., 2013.....	119
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (400, CD_3OD) de Es-4, quercetina-3-O-hexosídeo, em comparação aos dados obtidos por ATAY et al., 2015 para quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (A) e quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (B).....	130
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5, cinchonaína lb, em comparação aos dados obtidos por XU et al., 2013.....	135
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1, 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropane protonado, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA et al., 2011.....	146
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-2, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropane protonada, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA et al., 2011.....	156
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropane protonado, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA, 2012.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
AcOEt	Acetato de etila
BPC	Cromatograma do pico base
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C ₁₈	Octadecilsilano
<i>d</i>	Dubleto
DAD	<i>Detector Diode Array</i>
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
EM/EM ou EMn	Espectrômetro de massas em <i>tandem</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Etanol
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-ESI-MS	<i>High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	<i>Megahertz</i>
[M + H] ⁺	Molécula protonada

[M – H]-	Molécula desprotonada
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ppm	Partes por milhão
R _f s	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
s/	Singleto largo
t	Tripleto
tl	Tripleto largo
TOF	<i>Time-of-flight</i>
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVO.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Material e equipamentos utilizados.....	29
4.2. Material Vegetal.....	30
4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	30
4.2.2. Processamento do material vegetal.....	31
4.3. Obtenção dos extratos etanólicos brutos.....	31
4.4. Fracionamento dos extratos etanólicos brutos.....	31
4.5. Desreplicação das fases acetato de etila e butanólica.....	35
4.6. Desreplicação das fases clorofórmicas.....	36
4.7. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>E. simonis</i>	37
4.8. Processamento cromatográfico da fração ESFA 21-23 por CLAE.....	38
4.9. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>E. revolutum</i>	39
4.10. Processamento cromatográfico da fração ERFC-45%.....	40
4.11. Caracterização estrutural dos compostos isolados.....	41
4.12. Espectrometria de massas de alta resolução dos compostos isolados.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Análise das fases acetato de etila e <i>n</i> -butanólica por CLAE-ESI-MS ⁿ	43
5.2. Análise das fases clorofórmicas por CLAE-ESI-MS ⁿ	81
5.3. Identificação estrutural de Es-1.....	100
5.4. Identificação estrutural de Es-2.....	106
5.5. Identificação estrutural de Es-3.....	115
5.6. Identificação estrutural de Es-4.....	128
5.7. Identificação estrutural de Es-5.....	133
5.8. Identificação estrutural de Er-1.....	144
5.9. Identificação estrutural de Er-2.....	155
5.10. Identificação estrutural de Er-3.....	162
6. CONCLUSÃO.....	172

REFEÊNCIAS.....	173
ANEXOS.....	184
Anexo 1: Artigo publicado durante o doutorado na revista <i>Phytochemical Analysis</i> , em 2021.....	185

1. INTRODUÇÃO

Erythroxylum representa o maior dentre os quatro gêneros da família Erythroxylaceae, reunindo cerca de 250 espécies catalogadas, com ampla distribuição nas regiões tropicais da América do Sul e África, onde países como o Brasil, Venezuela e Madagascar se destacam como áreas de endemismo e diversidade em espécies do gênero (QUEIROZ et al., 2009; PEREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2012; BRACHET et al., 1997; DALY, 2004). São espécies com grande versatilidade ecológica, podendo ser observadas em diferentes ambientes, desde florestas tropicais como a Amazônica e a Mata Atlântica, a regiões semiáridas como no bioma Caatinga do nordeste do Brasil, região que agrupa 78 espécies de 128 táxons identificados no Brasil, sendo 34 endêmicas (DALY 2004; LOIOLA et al., 2007; CORDEIRO et al., 2018).

Uma maior atenção ao gênero foi dada no século XIX, com a espécie *Erythroxylum coca* Lam., devido a presença da cocaína, um alcalóides tropânicos que tem ação psicoativa no sistema nervoso central e que rapidamente desenvolve dependência. Em adição aos alcaloides, o gênero também é caracterizado quimicamente pela presença de flavonoides e terpenoides, além de apresentar outros metabólitos secundários farmacologicamente promissores. Os principais usos na medicina popular buscam uma ação estimulante, indutora de euforia, anti-inflamatória, promotora de saciedade, anestésica local e para o alívio de dores no estômago e cabeça (GOZALEZ-GARCIA et al., 2005). No Brasil a espécie *Erythroxylum catuaba* é amplamente empregada como afrodisíaco, e ensaios farmacológicos em modelos animais realizados com o extrato etanólico desta espécie evidenciaram atividade citotóxica contra células L1210 de leucemia, e esta propriedade foi atribuída as flavolignanas cinchonaina Ia e Ib, a espécie *E. argentinum* é utilizada popularmente no tratamento de sinusite e em aldeias indígenas a espécie *E. suberosum* é tradicionalmente indicada como anestésico e anti-reumático e *E. subracemosum* para tratar doenças respiratórias (SATO et al., 2000; CHAVES et al., 1988; BARBOSA et al., 2003). Diante do exposto, o gênero *Erythroxylum* constitui uma rica fonte para pesquisas com fins medicinais, e nos últimos anos tem-se evidenciado uma evolução nos estudos químicos e farmacológicos com essas espécies, na tentativa de desenvolver um futuro medicamento (RESTREPO et al., 2019).

Devido à grande variedade de metabólitos secundários produzidos por esse gênero e muitos já estarem descritos na literatura, metodologias modernas de triagem e identificação, como as técnicas de desreplicação de compostos presentes em matrizes biológicas, se fazem necessárias e vem ajudando a superar um dos maiores desafios na pesquisa em produtos naturais, que é a busca de novos metabólitos secundários (MOHIMANI et al, 2018). A partir delas os metabólitos são identificados na amostra analisada comparando-se as informações espectrais de sua estrutura química com as dos produtos naturais já descritos na literatura científica e nos bancos de dados, evitando-se desta forma a realização de todo o processo de isolamento para compostos indesejáveis (MOHIMANI et al, 2018; YANG et al 2013). Uma das técnicas indispensáveis no processo de desreplicação de produtos naturais conhecidos é a espectrometria de massas, em específico a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (MS^n) demonstrando uma maior confiabilidade por meio da análise e comparação dos padrões de fragmentação dos metabólitos (YANG et al, 2013; HUBERT et al, 2017; JOUANEH et al, 2022).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Contribuir para os conhecimentos fitoquímicos do gênero *Erythroxylum* e da família Erythroxylaceae, através do estudo das partes aéreas das espécies *Erythroxylum simonis* Plowman, *Erythroxylum pauferrense* Plowman, *Erythroxylum pulchrum* St. Hil. e *Erythroxylum revolutum* Mart.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de metabólitos secundários nas diferentes fases do EEB das espécies *E. simonis*, *E. pauferrense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum*, utilizando metodologias de desreplicação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas com fonte de Ionização por *electrospray* (ESI);
- Isolar, purificar e identificar os metabólitos secundários não anotados, na etapa de desreplicação, de *E. simonis*, *E. pauferrense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum* por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa e técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais;
- Contribuir para os conhecimentos fitoquímicos das espécies *E. simonis*, *E. pauferrense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum* e sobre a técnica de desreplicação de compostos em matrizes vegetais complexas por CLAE acoplada a espectrometria de massas com fonte de Ionização por *electrospray*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

A população humana dispõe de numerosas informações sobre o ambiente onde vive, no qual, o conhecimento popular sobre as espécies vegetais é uma importante ferramenta para a busca de novas fórmulas terapêuticas. Durante séculos a sociedade vem recorrendo as plantas para tratar diferentes doenças, de forma que todas as civilizações e culturas empregam ou já empregaram plantas com intuito medicinal, e esse conhecimento tradicional foi fundamental para o desenvolvimento da farmacologia moderna (FERREIRA et al., 2014; BREITBACH et al., 2013).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos, dentre eles se destacam os metabólitos secundários. Estes compostos desempenham um importante papel na adaptabilidade às condições ambientais as quais as plantas estão expostas. Inúmeros estudos, *in vivo* e *in vitro*, tem validado alguns metabólitos secundários quanto a sua segurança de uso e eficácia farmacológica, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e agroindustriais (SIMÕES et al., 2017).

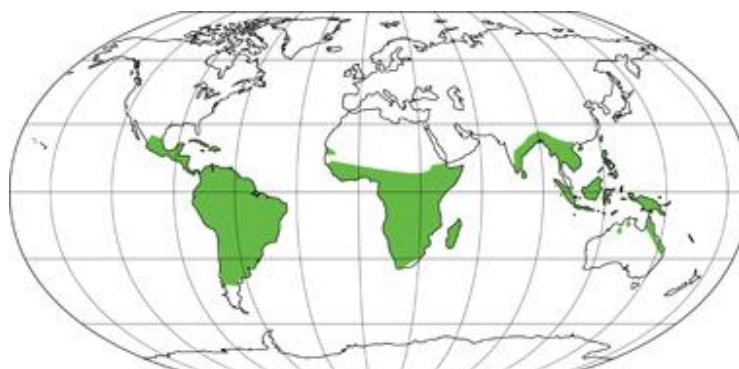
Nos últimos anos tem-se evidenciado uma evolução nas pesquisas químicas e farmacológicas de plantas medicinais. Diversas moléculas novas, tem suas estruturas elucidadas e relatadas na literatura a cada momento, algumas possuindo significantes propriedades farmacológicas. O crescimento dessa área de pesquisa veio com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Estes avanços aliados ao fato de que o Brasil possui uma das biotas mais ricas do mundo, se tornam uma fonte de oportunidade para o crescimento científico e tecnológico do país na área de produtos naturais, além de contribuir na formação de recursos humanos qualificados (RESTREPO et al., 2019).

Devido a importância do gênero *Erythroxylum* para a família Erythroxylaceae, pela diversidade de espécies do gênero no estado da Paraíba e pelos raros estudos, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico, de algumas espécies, este trabalho tem grande relevância para o desenvolvimento dos conhecimentos fitoquímicos deste gênero, especificamente sobre as espécies *Erythroxylum simonis* Plowman, *Erythroxylum pauferrense* Plowman, *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. e *Erythroxylum revolutum* Mart. e seus metabólitos.

Erythroxylaceae é uma família de plantas angiospermas pertencente à ordem Malpighiales, à classe Magnoliopsida das dicotiledôneas. É composta por quatro

gêneros: *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*, que reúnem cerca de 240 espécies (BIERI et al., 2006; RESTREPO et al., 2019). Compreendem árvores e arbustos com distribuição nas regiões subtropicais e tropicais da América do Sul, África e Sudeste Asiático (Figura 1) (BROCK et al., 2005). A maioria das espécies pertencem ao gênero *Erythroxylum* e são encontradas principalmente na América tropical, os demais gêneros apresentam poucas espécies com distribuição apenas no continente africano (DALY, 2004; MENDONÇA et al., 1998; LOIOLA et al., 2007, LV et al., 2022).

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).

O gênero *Erythroxylum* é o maior da família Erythroxylaceae, reunindo aproximadamente 230 espécies com ampla distribuição nos trópicos e subtropicais. É o único gênero da família encontrado na Região Neotropical, onde também se encontra a maior diversidade de *Erythroxylum*, em que cerca 187 espécies foram registradas (PLOWMAN; HENSOLD, 2004; RESTREPO et al., 2019; LV et al., 2023). A região nordeste do Brasil, a Venezuela e Madagascar são considerados centro de endemismo e diversidade deste gênero. Estas espécies apresentam grande variedade de habitats, podendo ser encontradas em florestas, em áreas semiáridas, em altitudes elevadas ou ao nível do mar (DALY, 2004).

No Brasil foram catalogadas 115 espécies, e cerca de 74 possui distribuição restrita, com ocorrência no cerrado, caatinga, floresta amazônica e mata atlântica (DALY 2004; LOIOLA et al., 2007). O estado brasileiro com maior número de espécies de *Erythroxylum* é a Bahia, são 56 registros de um total de 70 espécies da região Nordeste. No estado da Paraíba 13 espécies foram catalogadas, são elas: *E.*

caatingae Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil., *E. nummularia* Peyr., *E. paufferense* Plowman, *E. passerinum* Mart., *E. pungens* O.E. Schulz, *E. revolutum* Mart., *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O.E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil., *E. pulchrum* St.-Hil., *E. rimosum* O.E. Schulz e *E. squamatum* Sw, encontradas do brejo ao sertão. Grande parte destas espécies tem distribuição restrita ao Nordeste do Brasil (*E. caatingae*, *E. nummularia*, *E. paufferense*, *E. pungens*, *E. revolutum*, *E. rimosum* e *E. simonis*). É importante ressaltar que a espécie *E. paufferense* foi registrada apenas no estado da Paraíba, no município de Areia (LOIOLA et al., 2007).

Do ponto de vista fitoquímico, os metabolitos secundários mais evidenciados nas espécies desse gênero são os alcaloides tropânicos, presentes em quase todos os órgãos das plantas que os contém, seguido dos terpenos e flavonoides. As espécies com maior número de estudos fitoquímicos são a *E. coca*, *E. novogranatense*, *E. zambesiacum*, *E. hypericifolium*, *E. monogynum*, *E. pictum*, *E. argentinum*, *E. rotundifolium* e *E. Rufum* (RESTREPO et al., 2019; GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005; LV et al., 2022).

A espécie *Erythroxylum simonis* Plowman (Figura 2), popularmente conhecida como “Guarda Orvalho” tem sua distribuição limitada a região Nordeste do Brasil, podendo ser encontrada nas florestas úmidas do litoral e nas matas do interior conhecidas como “brejos de altitude”. Existem registros de sua presença nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Rio Grande do Norte (PLOWMAN, 1986; LOIOLA et al., 2007; COSTA-LIMA et al., 2014).

Figura 2 - Espécie *Erythroxylum simonis* Plowman.



Fonte: M.I.B. Loiola, 2009.

Estudos químicos realizados por Dantas em 2018 com as partes aéreas de *Erythroxylum simonis* evidenciaram uma alta concentração de compostos fenólicos em seu extrato etanólico bruto e levaram ao isolamento e identificação de seis compostos, sendo três ácidos fenólicos (ácido protocatecuico, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico) e três flavonoides (quercetina-3-sambubiosídeo, canferol-3-sambubiosídeo e canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo).

A espécie *Erythroxylum pauferrense* Plowman (Figura 3), conhecida popularmente como guarda-ovalho ou pau-ferro, é um arbusto ou arvoreta com 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 660 m, sendo encontrada no interior da floresta na Mata do Pau-Ferro (PLOWMAN, 1986; LOIOLA et al., 2007). Estudos realizados com as partes aéreas desta espécie promoveram o isolamento dos flavonoides quercetina-3-sambubiosídeo, quercetina-3-O- α -L-raminosídeo e ombuina-3-rutinosídeo (CUNHA et al., 2019).

Figura 3 - Espécie *Erythroxylum pauferrense* Plowman.

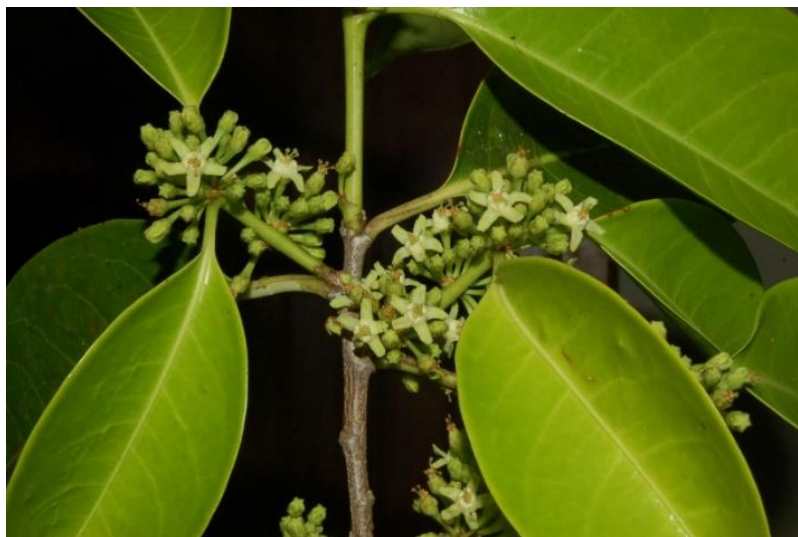


Fonte: Mata Atlântica da Paraíba: Conservação e Cidadania.

A espécie *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Figura 4), conhecida popularmente como arco-de-pipa, cocão, guareita e sobragil é uma árvore com 5 a 10 metros de altura, aplicada tradicionalmente para tratar distúrbios gástricos. É uma espécie exclusiva da flora brasileira, com distribuição no Nordeste e Sudeste do país, encontrada em Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

E. pulchrum só foi encontrada na Paraíba em uma área de Floresta Serrana, em elevações de 900 a 1.000 m de altitude. Foram isolados das partes aéreas de *E. pulchrum* os flavonoides glicosilados quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, ombuina-3-rutinosídeo e ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (LOIOLA et al., 2007; PLOWMAN & HENSOLD 2004; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Figura 4 - Espécie *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil.



Fonte: Plants of the world online.

A espécie *Erythroxylum revolutum* Mart. (Figura 5), conhecida popularmente com quebra-facão, é um arbusto ou arvoreta medindo de 0,8 a 3 metros de altura, e sua distribuição está restrita aos estados do nordeste brasileiro Ceará, Alagoas, Bahia, Piauí, Pernambuco, Sergipe e Paraíba (LOIOLA et al., 2007). Estudos realizados anteriormente com *E. revolutum* descreveram a presença dos diterpenos *ent*-cauran-16-eno, 13-hidroxi-8(17),14-labdadieno (Manool), *ent*-caur-16-en-3 β -ol, 3-oxo-13-hidroxi-8(17),14-labdadieno, 3,13,19-trihidroxi-8(17),14-labdadieno e *ent*-cauran-16 β ,17-diol, e dos alcaloides tropânicos 6-(2'-metilbutiriloxi)-3-hidroxitropano e 6-butiriloxi-3-hidroxitropano (OLIVEIRA, 2012; BARBOSA et al., 2021).

Figura 5 - Espécie *Erythroxylum revolutum* Mart.



Fonte: M.I.B. Loiola, 2014.

Alguns dos desafios enfrentados nos estudos de produtos naturais consiste em evitar o reisolamento de metabólitos secundários já descritos na literatura, longos períodos de tempo empregado nas análises e grandes volumes de solventes orgânicos utilizados na busca dos compostos de interesse. Na tentativa de solucionar esses obstáculos, a desreplicação de compostos pode ser uma alternativa inteligente, essa ferramenta configura-se como uma estratégia segura, rápida e eficaz às metodologias clássicas vinculadas aos estudos de produtos naturais (TRAPP, 2011).

Esta técnica é caracterizada por um prévio conhecimento químico da amostra, tornando possível o reconhecimento rápido e confiável de compostos já relatados e descritos na literatura científica, antes dos processos clássicos de isolamento e identificação. Desta forma essa metodologia permite que novas estruturas químicas sejam focalizadas em um estágio muito inicial do estudo evitando assim o isolamento de metabólitos conhecidos. Como resultado é realizada a análise de uma grande quantidade de compostos em um menor tempo e empregando baixos volumes de

solventes orgânicos em comparação com outras técnicas de *screening* (BITZER et al., 2007).

Atualmente a desreplicação de produtos naturais é geralmente obtida empregando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a equipamentos de detecção, e dentre as ferramentas espectroscópicas mais bem estabelecidas para este tipo de estudo, destacam-se a espectroscopia na região do UV-Vis e a espectrometria de massas (BITZER et al., 2007; JOUANEH et al, 2022). É importante ressaltar que as técnicas de ressonância magnética nuclear continuam sendo um instrumento bastante útil para essas análises devido às importantes informações estruturais que ela fornece (TRAPP, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e equipamentos utilizados

As soluções extrativas e as fases obtidas foram concentradas em um evaporador rotativo da marca BUCHI (Flawil, Suíça).

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

A Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi realizada em cromatoplas de alumínio - sílica gel 60 PF254 artigo 7749, Merck (Darmstadt, Alemanha). 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 cromatoplas foi realizada através da exposição à radiação ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 e 366 nm, utilizando o aparelho Mineralight modelo UVGL-58.

Para a dereplicação das fases foi utilizado um cromatógrafo analítico da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas Ion-Trap Amazon X ou micro TOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de ionização por *electrospray*, para análises de Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MSⁿ) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Electrospray (HR-ESI-MS), respectivamente. O cromatógrafo líquido utilizado foi equipado por um injetor automático SIL-20A HT uma bomba LC-20AD, um desgaseificador on-line DGU-20A₅, detector UV-VIS SPD-M20A e um sistema de controle CBM-20A. E a separação foi realizada em uma coluna analítica Kromasil (Bohus, Sweden) C-18 5 µm 100Å, 250 x 4,6 mm, e como fase móvel foi utilizado água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico da Merk.

Para o desenvolvimento do método de separação dos compostos presentes nas frações, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência, 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 C₁₈ ACE, para o isolamento dos compostos de *E. simonis* e *E. pauferrense*, e uma coluna C₁₈ YMC (Devens, MA, US), para o isolamento dos alcaloides tropânicos

de *E. revolutum*, bombas LC-6AD, injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizado água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico da Merk. Este também foi empregado no preparo da amostra.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetros Brucker operando a 400 ou 500 MHz (RMN de ^1H) e 100 ou 125 MHz (RMN de ^{13}C), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Para o preparo das amostras a serem analisadas, foram utilizados solventes deuterados (CD_3OD e DMSO-d_6) da Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA).

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos utilizando espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker modelo micro TOF II e Ion-Trap AmazonX, respectivamente. As amostras foram preparadas com metanol grau cromatográfico da Merk.

4.2. Material Vegetal

4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas de *E. simonis* e *E. pauferrense* foram coletadas no Parque Estadual Mata do Pau-Ferro ($6^\circ 59' 28''$ S, $35^\circ 45' 4''$ W), localizado no município brasileiro de Areia, estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra. Uma exsicata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro *Lourenço & Carneiro 232*, para *E. simonis*, e *Agra 4958* (JPB), para *E. pauferrense*.

As partes aéreas de *E. pulchrum* foram coletadas no município de Maturéia ($7^\circ 11' 10''$ S, $37^\circ 25' 53''$ W), estado da Paraíba. Sua identificação também foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, e uma exsicata desta espécie está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier sob o código *Agra 4947* (JPB).

As partes aéreas de *E. revolutum* foi coletada no município de Serra Branca ($7^\circ 29' 14''$ S, $36^\circ 39' 51''$ W). A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, e uma exsicata das espécies encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, sob registro *Agra 5695*.

Essas espécies estão sob o cadastro AE11D71, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen-Brasil).

4.2.2. Processamento do material vegetal

Em uma estufa com circulação de ar, foi realizada a dessecação das partes aéreas de *E. pauferrense*, *E. pulchrum*, *E. simonis* e *E. revolutum* à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Em seguida, o material já seco, foi pulverizado em moinho mecânico fornecendo o pó das plantas com peso de 3000 g para *E. simonis* e *E. pauferrense*, 800 g para *E. pulchrum* e 1900 g para *E. revolutum*.

4.3. Obtenção dos extratos etanólicos brutos

Após secagem e pulverização, os materiais vegetais foram submetidos a extrações por maceração em etanol (EtOH) a 95 %. Este procedimento foi realizado três vezes com intervalos de 72 horas entre cada extração. As soluções extrativas foram em seguida filtradas e evaporadas sob baixa pressão por meio de um rotaevaporador a uma temperatura média de 40 °C. Obtendo-se ao fim, os extratos etanólicos brutos de *E. simonis* (Esquema 1), *E. pauferrense* (Esquema 2) e *E. pulchrum* (Esquema 3) e *E. revolutum* (Esquema 4).

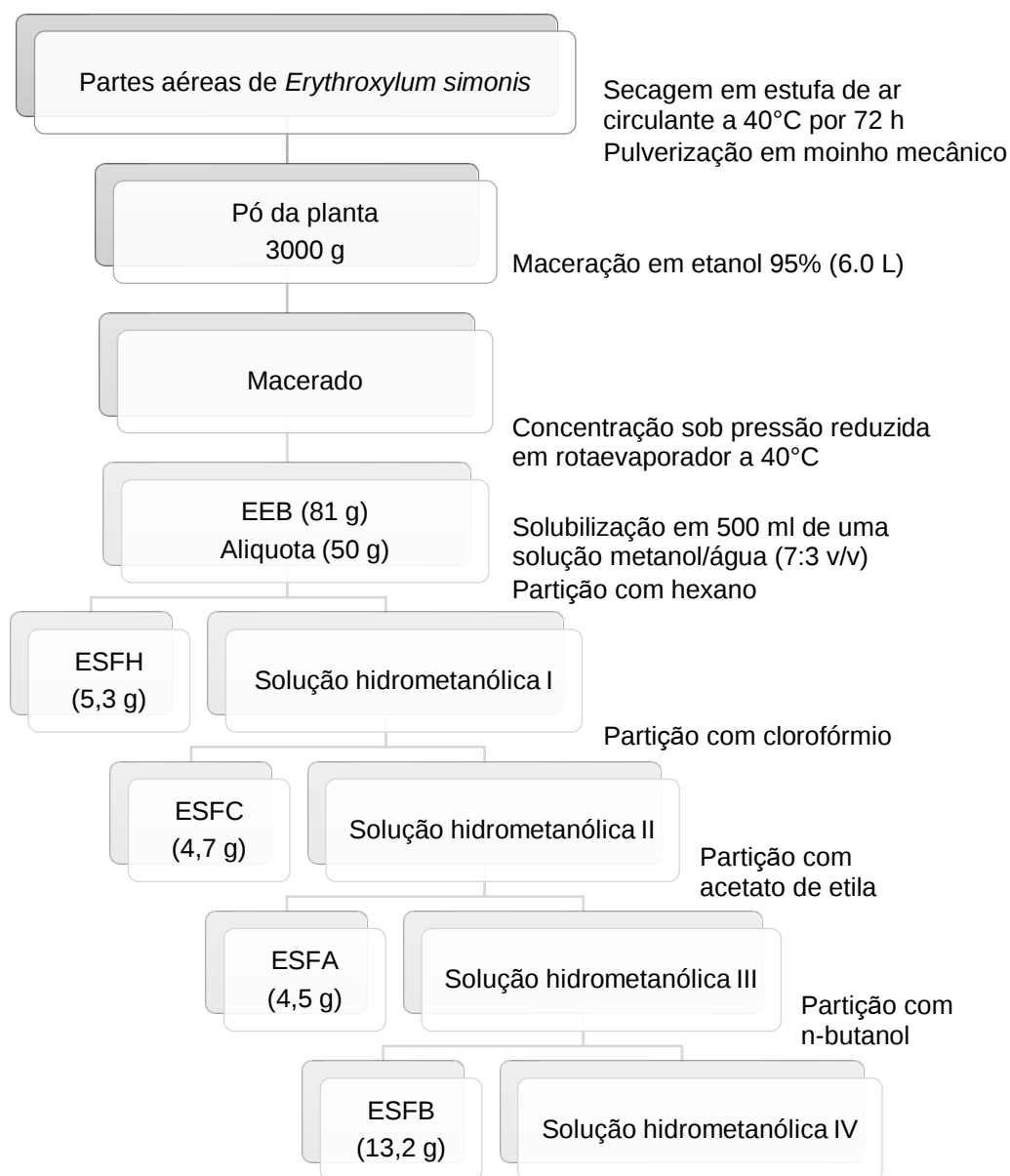
4.4. Fracionamento dos extratos etanólicos brutos

Parte do extrato etanólico bruto (50 g) das partes aéreas de *E. simonis* 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, utilizado os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções obtidas foram então 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 butanólica (Figura 6).

O mesmo procedimento foi realizado para os extratos das espécies *E. pauferrense* (alíquota de 40g), *E. puchrum* (alíquota de 10g) e *E. revolutum* (alíquota

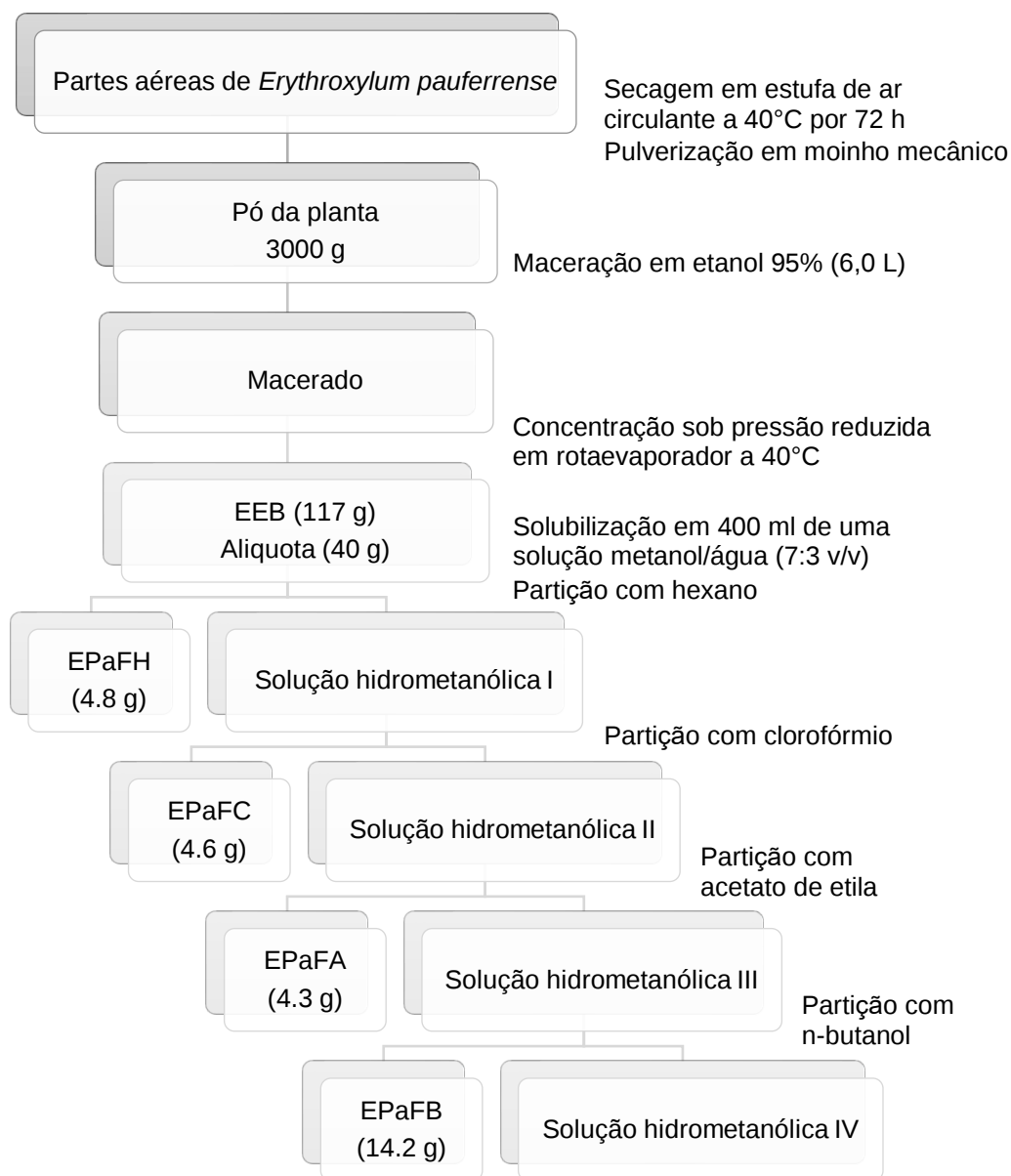
de 40g). Após solubilização na solução metanol/água (7:3 v/v), foram obtidas as quatro fases, hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica, de *E. paufferrense* (Figura 7) e *E. puchrum* (Figura 8) e *E. revolutum* (Figura 9).

Figura 6 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *E. simonis*.



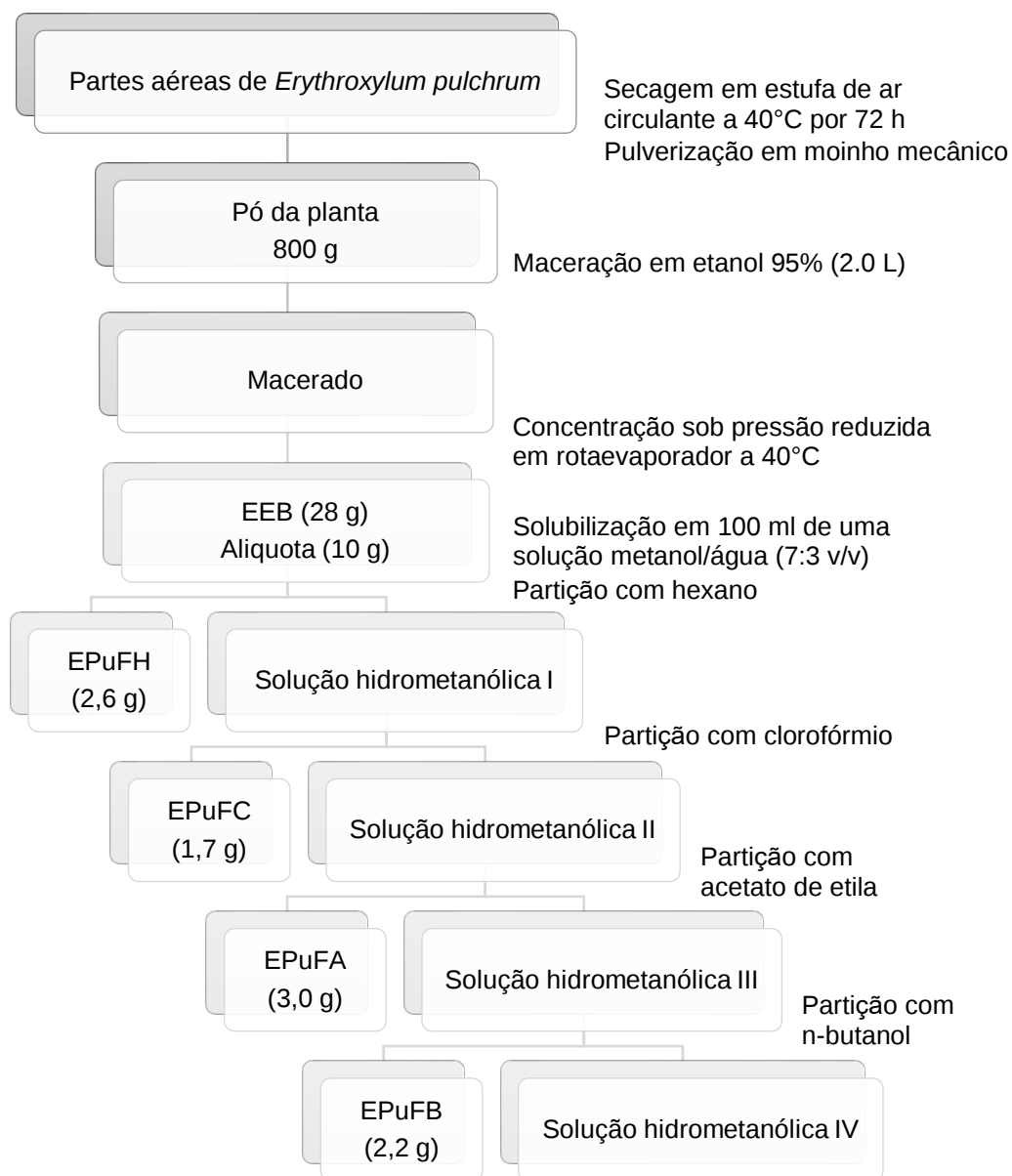
Legenda: ESFH – Fase hexânica de *Erythroxylum simonis*; ESFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum simonis*; ESFA – Fase acetato de etila de *Erythroxylum simonis*; ESFB – Fase butanólica de *Erythroxylum simonis*.

Figura 7 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *E. paufferense*.



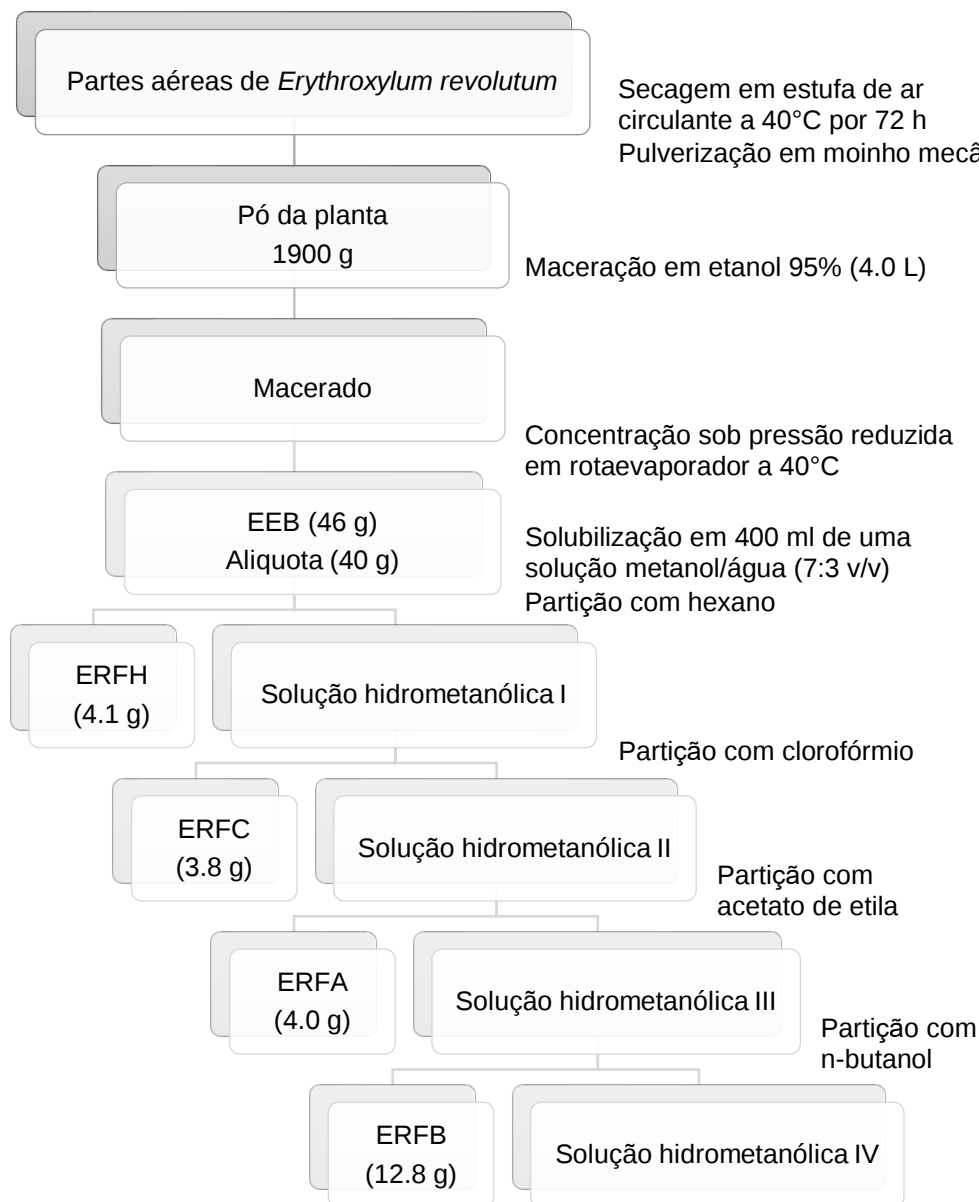
Legenda: EPaFH – Fase hexânica de *Erythroxylum paufferense*; EPaFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum paufferense*; EPaFA – Fase acetato de etila de *Erythroxylum paufferense*; EPaFB – Fase butanólica de *Erythroxylum paufferense*.

Figura 8 - Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *E. pulchrum*.



Legenda: EPuFH – Fase hexânica de *Erythroxylum pulchrum*; EPuFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum pulchrum*; EPuFA – Fase acetato de etila de *Erythroxylum pulchrum*; EPuFB – Fase butanólica de *Erythroxylum pulchrum*.

Figura 9 – Esquema de elaboração e partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *E. revolutum*.



Legenda: ERFH – Fase hexânica de *Erythroxylum revolutum*; ERFC – Fase clorofórmica de *Erythroxylum revolutum*; ERFA – Fase acetato de etila de *Erythroxylum revolutum*; ERFB – Fase butanólica de *Erythroxylum revolutum*.

4.5. Desrepliação das fases acetato de etila e butanólica

Para o estudo de derepliação das fases polares, acetato de etila e butanólica, de *E. simonis*, *E. paufferense* e *E. pulchrum*, foi preparado inicialmente uma amostra de cada uma das fases das três espécies, que consistia em 1 mg do material solubilizado em 1 mL de metanol grau cromatográfico. Essas amostras foram

injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Ion-Trap Amazon X empregando ionização por electrospray, para análise de ESI-MSⁿ no modo negativo. A voltagem do capilar foi de 4,5 kV, a temperatura empregada foi de 300 °C, o fluxo do gás de secagem (N₂) foi de 8 mL/min e a pressão do nebulizador de 40 psi. No sistema de cromatografia líquida foi utilizado como fase móvel água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico, e no método de eluição aplicado a concentração de metanol variou de 5 a 100% em um tempo de 90 minutos com um fluxo de 0,6 mL/min. Em seguida essas amostras foram novamente injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, empregando o mesmo método reportado anteriormente, estando este acoplado a um espectrômetro de massas micro TOF II, para as análises de HR-ESI-MS.

Os compostos foram anotados por meio da interpretação de seus padrões de fragmentação obtidos a partir de espectros de massas (MS² e MS³), fórmulas moleculares adquiridas por HR-ESI-MS e pela comparação dos dados adquiridos com os presentes na literatura. E para um conhecimento mais abrangente das substâncias presentes, alguns dos compostos foram isolados da espécie *E. simonis*, confirmando a identificação deles.

4.6. Desreplicação das fases clorofórmicas

Para a desreplicação dos alcaloides tropânicos das fases clorofórmicas de *E. simonis*, *E. pauferrense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum*, 1 mg desses materiais foi solubilizado em 1 mL de metanol grau cromatográfico, essas amostras foram injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Ion-Trap Amazon X empregando ionização por electrospray, operando no modo positivo, para análise de ESI-MSⁿ. A voltagem do capilar foi de 4,5 kV, a temperatura empregada foi de 300 °C, o fluxo do gás de secagem (N₂) foi de 8 mL/min e a pressão do nebulizador de 40 psi. No sistema de cromatografia líquida foi utilizado como fase móvel água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico, e no método de eluição aplicado a concentração de metanol variou de 5 a 100% em um tempo de 90 minutos com um fluxo de 0,6 mL/min. Em seguida essas amostras foram novamente injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, empregando o mesmo método reportado anteriormente, estando este

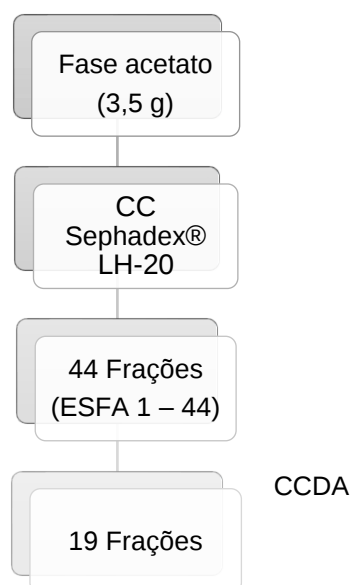
acoplado a um espectrômetro de massas micro TOF II, para as análises de HR-ESI-MS.

Os possíveis assinalamentos dos alcaloides tropânicos presentes nas fases clorofórmicas das espécies estudadas, foram realizados a partir da análise de seus padrões de fragmentação (MS^2 e MS^3), fórmulas moleculares (HR-ESI-MS) e por comparações com os dados presentes na literatura científica. A fase clorofórmica de *E. revolutum* foi fracionada posteriormente, com o objetivo de isolar os alcaloides tropânicos que não puderam ser totalmente anotados no estudo de desreplicação.

4.7. Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *E. simonis*

O fracionamento da fase acetato de etila da espécie *E. simonis* resultou em 19 frações (Quadro 1). Para isto, a fase acetato de etila (3,5 g) foi submetida a cromatografia em coluna de vidro utilizando como fase estacionária Sephadex® LH-20, e metanol (MeOH) como fase móvel. Foram coletadas 44 frações (ESFA1 – 44), após secagem a temperatura ambiente as frações foram reunidas por análise de seus fatores de retenção em cromatografia de camada delgada analítica. Como revelador foi utilizada a luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) (Figura 10). A fração ESFA 21-23 seguiu para posterior fracionamento após sua análise por CLAE-ESI-MSⁿ.

Figura 10 – Esquema do fracionamento da fase acetato de etila de *E. simonis*.



Quadro 1 - Dados das reuniões das frações da fase acetato de etila de *E. simonis* após monitoramento por CCDA.

Fração	Peso
ESFA 1-2	0,0321 g
ESFA 3	0,0166 g
ESFA 4-5	0,0302 g
ESFA 6	0,0249 g
ESFA 7	0,0863 g
ESFA 8-10	0,8000 g
ESFA 11-14	1,0760 g
ESFA 15	0,1700 g
ESFA 16-20	0,6000 g
ESFA 21-23	0,1118 g
ESFA 24-25	0,0704 g
ESFA 26-29	0,2000 g
ESFA 31-32	0,0224 g
ESFA 33-36	0,0375 g
ESFA 37-40	0,0197 g
ESFA 41	0,0234 g
ESFA 42	0,0144 g
ESFA 43	0,0216 g
ESFA 44	0,0108 g

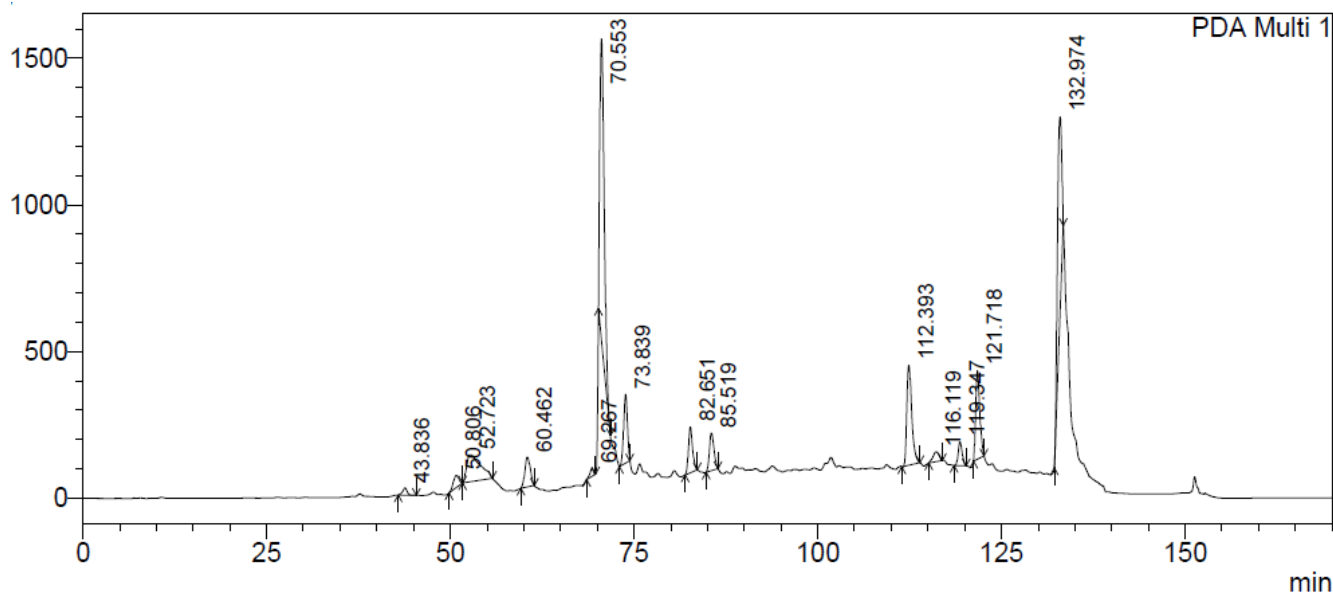
4.8. Processamento cromatográfico da fração ESFA 21-23 por CLAE

No fracionamento da fração ESFA 21-23 (111 mg) foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência preparativo da Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ACE (250 mm × 21.2 mm × 5 µm), bombas LC-6AD, injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Empregou-se como fase móvel água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico. No método mais eficiente para o isolamento dos compostos presentes na fração, a concentração de metanol variou de 5 a 50% em um tempo de 125 minutos com um fluxo de 8 mL/min.

Deste processo foram coletadas 14 frações (ESFA-212301 – 212314) correspondentes aos 14 picos principais como pode ser visualizado no cromatograma (λ = 254 nm) presente na Figura 11. Estando as substâncias, presentes nas frações ESFA-212305 (69,2 min.), ESFA-212307 (73,8 min), ESFA-212308 (82,6 min), ESFA-

212310 (112.3 min) e ESFA-212313 (121.7 min.), isoladas. Estas foram codificadas, nesta ordem, em Es-1, Es-2, Es-3, Es-4 e Es-5.

Figura 11 - Cromatograma da fração ESFA 21-23.

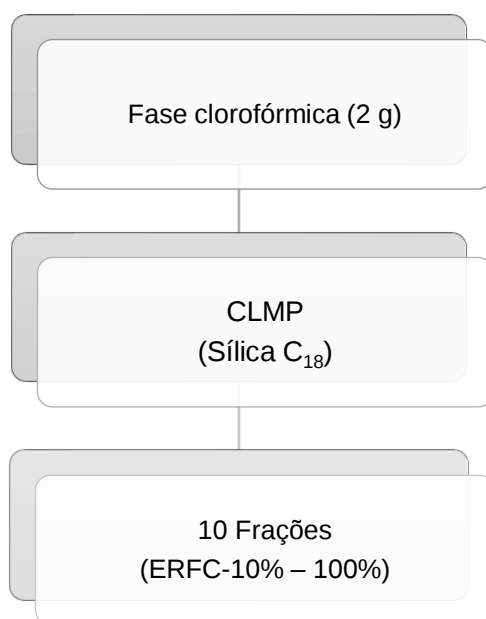


4.9. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *E. revolutum*

A fase clorofórmica (2 g) de *E. revolutum* foi fracionada por Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) empregando como fase estacionária sílica de fase reversa C₁₈ em uma coluna Buchi de código 19674, e como fase móvel foram utilizadas dez soluções de metanol em água tipo I acidificada (0,1% ácido fórmico) em ordem decrescente de polaridade (10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80 e 100%), cada uma com 150 mL, sob o fluxo de 10 mL/min, sendo obtido no final do processo 10 frações (ERFC-10% -ERFC-100%) como pode ser no quadro 2. O esquema desse fracionamento está representado na Figura 12.

O composto codificado como Er-1 foi obtido já isolado na fração ERFC-40% (13.3 mg).

Figura 12 – Esquema do fracionamento da fase clorofórmica de *E. revolutum*.



Quadro 2 - Dados das frações obtidas da fase clorofórmica de *E. revolutum* por CLMP.

Fração	Peso
ERFC-10%	0.0106 g
ERFC-20%	0.0231 g
ERFC-30%	0.0648 g
ERFC-35%	0.0967 g
ERFC-40%	0.1330 g
ERFC-45%	0.0831 g
ERFC-50%	0.0902 g
ERFC-60%	0.2771 g
ERFC-80%	0.4159 g
ERFC-100%	0.4843 g

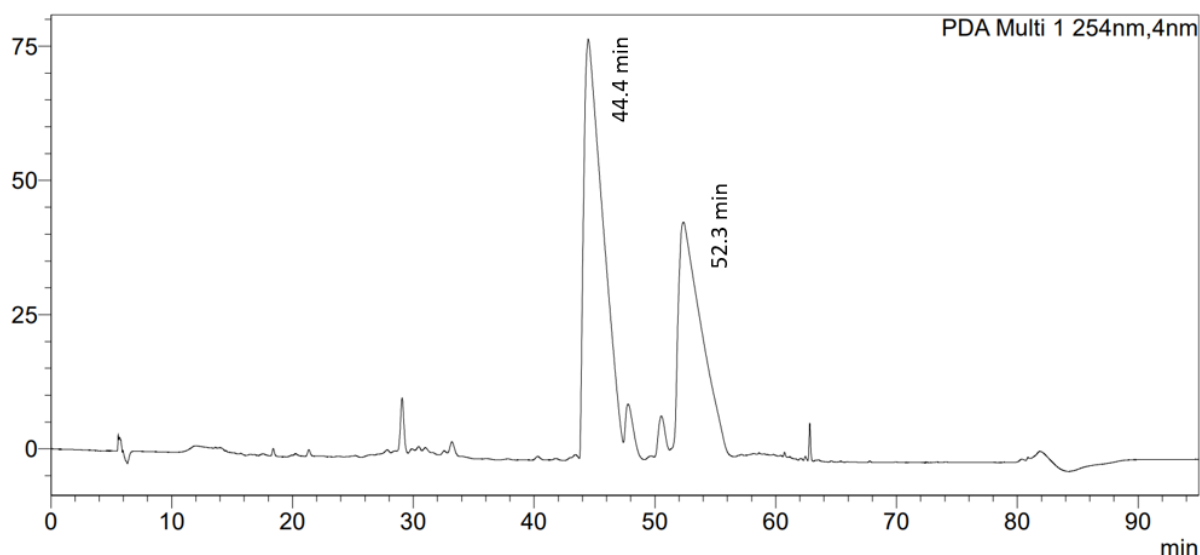
4.10. Processamento cromatográfico da fração ERFC-45%

A fração ERFC-45% (83 mg) exigiu um novo fracionamento para que seus compostos pudessem ser determinados. Com este objetivo, injetou-se a fração em um cromatógrafo líquido de alta eficiência preparativo da Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ YMC (250 mm × 20.0 mm × 5 µm), bombas LC-6AD,

injetor manual, e detector UV-VIS SPD-M10A. Para a separação dos compostos empregou-se como fase móvel água tipo 1 acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol grau cromatográfico, no método desenvolvido a concentração do solvente orgânico variou de 5 a 45% em 5 minutos, em seguida de 45 a 55% em 40 min, e de 55 a 100% em 5 min, permanecendo nesta condição por 20 min, sob o fluxo de 8 mL/min.

Este processo cromatográfico proporcionou o isolamento dos alcaloides tropânicos codificados como Er-2 (44.4 min.) e Er-3 (52.3 min). O cromatograma desse fracionamento pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Cromatograma da fração ERFC-45%.



4.11. Caracterização estrutural dos compostos isolados

As determinações estruturais dos constituintes químicos isolados, foram efetuadas a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMQC e HMBC), e pela comparação destes com dados descritos na literatura. Para a obtenção dos espectros foi utilizado o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) na solubilização da substância Es-1 e metanol deuterado (CD_3OD) para as substâncias Es-2, Es-3, Es-4, Es-5, Er-1, Er-2 e Er-3.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e como padrão interno foram utilizados os sinais característicos de ^1H e ^{13}C dos solventes utilizados. Para RMN ^1H os sinais característicos são em δ_{H} 2,50 para o DMSO e em δ_{H} 3,31 para o metanol. Para os espectros de RMN de ^{13}C , os sinais

característicos são em δ_c 39,5 para o DMSO e em δ_H 49,0 para o metanol. As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hz e as multiplicidades no espectro de RMN 1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *dl* (duplete largo), *t* (triplete), *tl* (triplete largo) *q* (quadruplete) e *m* (multiplete).

4.12. Espectrometria de massas de alta resolução dos compostos isolados

Na preparação das amostras, foram realizadas inicialmente as solubilizações de 1 mg dessas em 1 mL de metanol grau cromatográfico, posteriormente uma alíquota de 200 μ L dessas soluções foram adicionadas em 800 μ L de metanol grau cromatográfico, por fim 20 μ L dessas últimas soluções foram adicionadas em 980 μ L de MeOH:H₂O (1:1). Em seguida, as amostras foram injetadas no espectrômetro de massa de alta resolução por injeção direta, sendo utilizada uma fonte de ionização por electrospray no modo negativo para os compostos Es-1, Es-2, Es-3, Es-4 e Es-5, e no modo positivo para os compostos Er-1, Er-2 e Er-3.

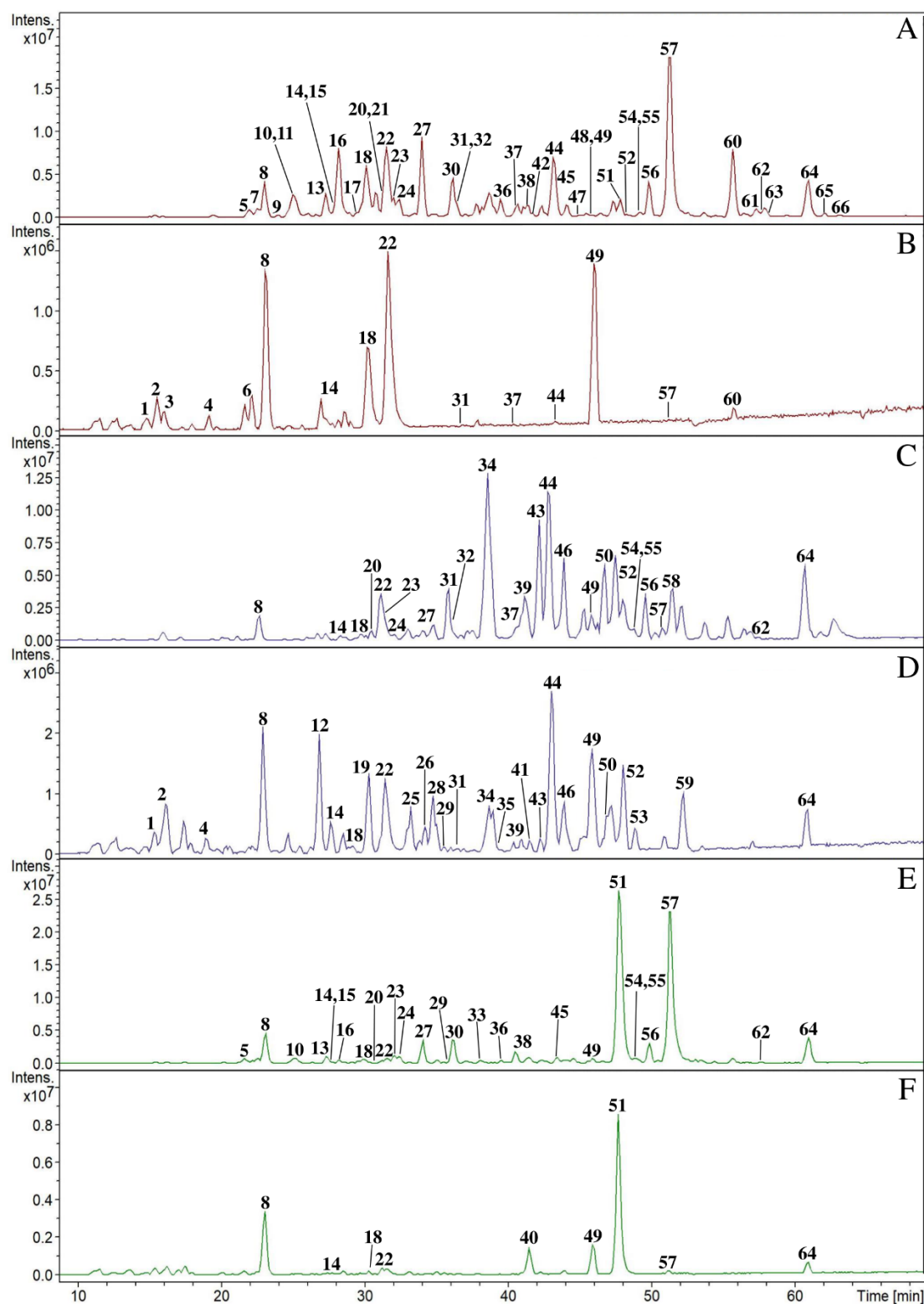
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise das fases acetato de etila e *n*-butanólica por CLAE-ESI-MSⁿ

As fases polares, acetato de etila e *n*-butanólica, das espécies *E. simonis*, *E. pauferrense* e *E. pulchrum* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, com o objetivo de anotar os compostos presentes nos materiais, contribuindo com a quimiotaxonomia do gênero *Erythroxylum*. O gradiente de eluição empregado nas análises cromatográficas foi capaz de separar uma vasta gama de compostos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, como os ácidos fenólicos, dímeros e trímeros de procianidinas, lignoides, catequina e epicatequina, flavonoides glicosilados derivados da quercetina, metilquercetina, dimetilquercetina e canferol, além de isômeros de flavolignanas do tipo cichonaina I e II.

O método cromatográfico empregado nas corridas proporcionou a comparação do perfil químico entres as seis fases das três espécies do estudo. A Figura 14 apresenta os cromatogramas de pico base (BPC) das fases acetato de etila e *n*-butanólica das espécies *E. pauferrense*, *E. simonis* e *E. pulchrum*, e os picos correspondentes aos metabólitos anotados por CLAE-ESI-MSⁿ.

Figura 14 - Cromatogramas de pico base (BPC) das fases acetato de etila e *n*-butanólica de *E. paufferense*, *E. simonis* e *E. pulchrum*. A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 1.



Legenda: (A) fase acetato de *E. paufferense*, (B) fase *n*-butanólica de *E. paufferense*, (C) fase acetato de *E. simonis*, (D) fase *n*-butanólica de *E. simonis*, (E) fase acetato de *E. pulchrum*, (B) fase *n*-butanólica de *E. pulchrum*.

No total foram anotados 55 compostos e a partir da comparação dos perfis das seis fases das três espécies de *Erythroxylum*, foi possível observar que alguns picos estavam presentes exclusivamente em uma ou outra espécie, enquanto alguns foram detectados em todas as espécies estudadas. As análises foram executadas no modo negativo e a identificação dos metabólitos foi realizada com base nas moléculas desprotonadas, padrões de fragmentação e dados da literatura.

A espécie *E. pauferrense*, apresentou a maior quantidade e variedade de metabólitos secundários, sendo anotados 43 compostos, todos presentes em sua fase acetato de etila, porém apenas 10 foram detectados na fase butanólica. Foram anotados 30 compostos em *E. simonis*, sendo 26 evidenciados na fase acetato de etila e 18 na fase *n*-butanólica. E na espécie *E. pulchrum* foram anotados 28 compostos, 27 observados na fase acetato de etila e 9 na fase *n*-butanólica.

Dos 55 compostos analisados, 15 foram detectados nas três espécies, foi observado ainda, uma maior similaridade de perfil químico entre as espécies *E. pauferrense* e *E. pulchrum*, com 10 picos em comum que não estavam presentes em *E. simonis*, esta apresentou em comum com *E. pauferrense* mais 8 compostos, e com *E. pulchrum* apenas uma substância, que não estava presente em *E. pauferrense*. Para todos os compostos assinalados, as reações clássicas para cada classe de metabólito secundário foram examinadas e os principais íons obtidos por ESI-MSⁿ estão apresentados na Tabela 1, onde também pode ser observado a anotação atribuída para cada pico e as respectivas espécies em que foram evidenciados.

Tabela 1 - Compostos anotados nas fases acetato de etila e *n*-butanólica de *E. pauferrense*, *E. simonis* e *E. pulchrum*.

Pico	T.R.	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	Fórmula Molecular	Calculada	Erro (ppm)	MS ² /MS ³	Compostos anotados	Espécies	Referencias
1	14.9	379.0315	C ₁₆ H ₁₂ O ₁₁	379.0307	-2.4	MS ² [379]: 241 (100); 299 (3.5); 223 (7.7)/ MS ³ [379 → 241]: 223 (63.8); 139 (100); 97 (27.2)	Desconhecido	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	
2	15.5	411.0666	C ₂₈ H ₁₂ O ₄	411.0663	-0.9	MS ² [411]: 357 (11); 327 (24.8); 295 (3.2); 241 (100); 223 (6); 165 (5.4)/ MS ³ [411 → 241]: 223 (32); 181 (19.6); 165 (19); 139 (40.9); 195 (13.4); 97 (100)	Desconhecido	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	
3	17.3	371.1001	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.0984	-4.7	MS ² [371]: 353 (52.6); 341 (39.8); 333 (7.4); 285 (9.1); 209 (7.3); 197 (4.1); 191 (100); 179 (9.1); 173 (35.3) /MS ³ [371 → 191]: 173 (55.6); 155 (26.3); 153 (100); 127 (19.7); 109 (39.8); 85 (84.3); 81 (24.8)	Desconhecido	<i>E. pauferrense</i>	
4	19.1	409.0420	C ₁₇ H ₁₄ O ₁₂	409.0412	-1.9	MS ² [409]: 241 (100); 223 (3.7)/ MS ³ [409 → 241]: 223 (100); 181 (39); 169 (7.4); 165 (20.2); 151 (8.8); 139 (89.5); 97 (53.9)	Desconhecido	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	
5	21.9	577.1344	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	1.4	MS ² [577]: 559 (5.8); 451 (21.4); 425 (100); 407 (83.9); 289 (21.5)/ MS ³ [577 → 425]: 407 (100)	Dímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	FRAIGE et al., 2018.
6	22.0	447.1149	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	447.1144	-0.8	MS ² [447]: 429 (100); 315 (20.2); 233 (41.6); 225 (52.6)/ MS ³ [447 → 429]: 357 (100); 339 (79.9); 181 (63.9)	Desconhecido	<i>E. pauferrense</i>	
7	22.5	577.1380	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	-4.9	MS ² [577]: 559 (6.2); 451 (25); 425 (100); 407 (71.8); 289 (26.2)/ MS ³ [577 → 425]: 407 (100)	Dímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i>	FRAIGE et al., 2018.
8	23.0	353.0876	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0.5	MS ² [353]: 191 (100); 179 (40.2); 135 (6.2)/ MS ³ [353 → 191]: 127 (100); 85 (65.4)	Ácido 3-O-cafeioiquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
9	23.9	865.1982	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1985	0.3	MS ² [865]: 847 (22.11); 739 (53.7); 713 (39.65); 695 (100); 577 (55.0); 575 (30.9); 451 (56.8); 425 (28.0);	Trímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i>	RUE et al., 2018.

						407 (55.4)/ MS ³ [865 → 695]: 543 (100); 451 (67.4)			
10	25.0	577.1349	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	0.4	MS ² [577]: 559 (8.0); 451 (29.1); 425 (100); 407 (90.6); 289 (30.3)/ MS ³ [577 → 425]: 407 (100)	Dímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	FRAIGE et al., 2018.
11	25.0	865.1971	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1985	1.6	MS ² [865]: 847 (19.3); 739 (8.3); 713 (36.7); 695 (100); 577 (42.8); 575 (31.1); 451 (36.6); 425 (45.1); 407 (41.3)/ MS ³ [865 → 695]: 677 (93.4); 543 (100); 407 (40.9);	Trímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i>	RUE et al., 2018.
12	25.4	425.0767	C ₁₁ H ₂₂ O ₁₇	425.0784	4.0	MS ² [425]: 389 (100); 375 (21.1); 357 (86.1); 311 (16.4); 243 (11.1); 179 (9.4)/ MS ³ [425 → 389]: 345 (100); 297 (22); 179 (8.1)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	
13	27.2	289.0720	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0718	-0.7	MS ² [289]: 271 (5.9); 245 (100); 205 (41.5); 203 (20.2); 179 (8.8)/ MS ³ [289 → 245]: 227 (23.5); 203 (100); 187 (22.9); 175 (11.7); 161 (17.6)	Catequina	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	YUZUAK et al., 2018.
14	27.6	337.0919	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0929	2.9	MS ² [337]: 191 (8.7); 173 (6.5); 163 (100)/ MS ³ [337 → 163]: 119 (100)	Ácido 3-O-cumaroilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
15	27.8	739.1662	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	739.1668	0.9	MS ² [739]: 629 (19.9); 587 (100); 569 (27.7); 451 (6.6); 435 (46.7); 417 (27.8); 339 (25.3); 289 (5.3)/ MS ³ [739 → 587]: 569 (10.5); 449 (26.9); 435 (100); 417 (78.5); 339 (26.9)	Isômero da cinchonaína II	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	SENDKER et al., 2013.
16	28.1	577.1350	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	0.3	MS ² [577]: 559 (5.6); 451 (22.1); 425 (100); 407 (80.6); 289 (19.6)/ MS ³ [577 → 425]: 407 (100)	Dímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	FRAIGE et al., 2018
17	29.4	739.1662	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	739.1668	-2.9	MS ² [739]: 629 (14.9); 587 (100); 569 (45.9); 451 (30.0); 435 (53.5); 417 (23.0); 339 (26.4); 325 (7.3); 289 (48.7)/ MS ³ [739 → 587]: 569 (100); 449 (34.9); 435 (55.8); 417 (32.6); 339 (81.9); 325 (21.6)	Isômero da cinchonaína II	<i>E. pauferrense</i>	SENDKER et al., 2013.
18	30.1	353.0876	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	0.5	MS ² [353]: 191 (100); 179 (2.0)/ MS ³ [353 → 191]: 173 990.9); 127 (100); 85 (62.5)	Ácido 5-O-cafeoilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.

19	30.3	583.2613	C ₂₅ H ₄₄ O ₁₅	583.2607	-0.9	MS ² [583]: 537 (100)/ MS ³ [583 → 537]: 519 (30.8); 405 (100); 387 (20.4)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	
20	30.7	367.1036	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1035	-0.4	MS ² [367]: 193 (17.1); 191 (1.4); 161 (100); 135 (5.2)/ MS ³ [367 → 161]: 133 (100)	Ácido 4-O-feruloilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
21	30.7	865.1989	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1985	-0.4	MS ² [865]: 847 (8.2); 739 (39.4); 713 (33.6); 695 (100); 577 (53.0); 575 (26.4); 543 (26.4); 451 (24.4); 425 (21.8); 407 (44.1)/ MS ³ [865 → 695]: 677 (86.8); 407 (53.8); 299 (100)	Trímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i>	RUE et al., 2018.
22	31.5	353.0879	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	-0.2	MS ² [353]: 191 (25.0); 179 (60.3); 173 (100); 135 (9.0)/ MS ³ [353 → 173]: 111 (50.2); 93 (100)	Ácido 4-O-cafeoilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
23	32.0	739.1681	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	739.1668	-1.7	MS ² [739]: 629 (14.9); 587 (100); 569 (39.9); 451 (16.1); 435 (47.7); 417 (23.8); 339 (19.9); 325 (4.0); 289 (20.8)/ MS ³ [739 → 587]: 569 (100); 449 (17.7); 435 (54.6); 417 (18.0); 339 (71.7)	Isômero da cinchonaína II	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	SENDKER et al., 2013.
24	32.4	739.1665	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	739.1668	0.5	MS ² [739]: 587 (100); 569 (37.8); 451 (11.1); 435 (47.3); 417 (25.5); 339 (22.8); 325 (4.4); 289 (6.3)/ MS ³ [739 → 587]: 569 (100); 435 (14.4); 417 (84.2); 339 (99.4)	Isômero da cinchonaína II	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	SENDKER et al., 2013.
25	33.3	179.0350	C ₉ H ₈ O ₄	179.0350	0.2	MS ² [179]: 135 (100)	Ácido cafeico	<i>E. simonis</i>	BASTOS et al., 2007.
26	34.0	491.1510	C ₃₁ H ₂₄ O ₆	491.1500	-1.9	MS ² [491]: 413 (10.3); 293 (100)/ MS ³ [491 → 293]: 233 (16.3); 149 (100); 131 (95.9); 125 (34.2); 113 (15.4)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	
27	34.0	289.0720	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0718	-0.9	MS ² [289]: 271 (6.7); 245 (100); 205 (43.5); 203 (20.2); 179 (8.6)/ MS ³ [289 → 245]: 227 (26.9); 203 (100); 187 (21.1); 161 (13.4)	Epicatequina	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	YUZUAK et al., 2018.
28	34.8	563.2355	C ₂₅ H ₄₀ O ₁₄	563.2345	-1.8	MS ² [563]: 517 (100); 473 (15); 399 (28.2); 293 (32.6); 205 (33.6)/ MS ³ [563 → 517]: 481 (100); 473 (41.2); 208 (62)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	

29	35.9	335.0785	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.0772	-3.9	MS ² [335]: 179 (20.9); 161 (100); 135 (30.9)/ MS ³ [335 → 161]: 133 (100)	Isômero do ácido 4-O-cafeoilchiquímico	<i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	SAID et al., 2017.
30	36.2	451.1032	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1035	0.5	MS ² [451]: 341 (100); 231 (1.6); 217 (6.63)/ MS ³ [451 → 341]: 323 (18.4); 231 (33.7); 217 (100); 189 (20.5); 177 (11.3)	Isômero da cinchonaina I	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	WU et al., 2017.
31	36.4	337.0917	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0929	3.7	MS ² [337]: 173 (100); 163 (5.1)/ MS ³ [337 → 173]: 111 (37.3); 93 (100)	Ácido 4-O-cumaroilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
32	36.4	367.1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1035	-0.2	MS ² [367]: 193 (7.1); 191 (1.4); 161 (100); 135 (12.6)/ MS ³ [367 → 161]: 133 (100)	Isômero do ácido feruloilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	JAISWAL et al., 2010.
33	37.9	335.0780	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.0772	-2.2	MS ² [335]: 179 (13.4); 161 (100); 135 (4.4)/ MS ³ [335 → 161]: 133 (100)	Isômero do ácido 4-O-cafeoilchiquímico	<i>E. pulchrum</i>	SAID et al., 2017.
34	38.6	565.2294	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₂	565.2291	-0.6	MS ² [565]: 535 (23.4); 519 (39.5); 550 (95.6); 419 (100); 405 (73.5); 371 (40.6); 233 (12.1)/ MS ³ [565 → 419]: 404 (100); 389 (10.7); 373 (38.1)	Dimetoxi-ciclolariciresinol-O-deoxihexosídeo	<i>E. simonis</i>	EKLUND et al., 2008
35	39.2	727.1750	C ₃₁ H ₃₆ O ₂₀	727.1727	-3.2	MS ² [727]: 595 (100); 463 (1.4); 300 (1.7)/ MS ³ [727 → 595]: 300 (100); 271 (33.8); 255 (19.5)	Quercetina-3-O-hexose-dipentosídeo	<i>E. simonis</i>	GHAREEB et al., 2018.
36	39.4	577.1356	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	-0.7	MS ² [577]: 559 (4.4); 451 (15.3); 425 (100); 407 (72.1); 289 (19.4)/ MS ³ [577 → 425]: 407 (100)	Dímero de procianidina do tipo B	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	FRAIGE et al., 2018
37	40.6	625.1409	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625.1410	0.2	MS ² [625]: 463 (13.7); 445 (34.7); 300 (100); 271 (17.3); 255 (12.4); 243 (2.9)/ MS ³ [625 → 300]: 271(100); 255 (65.3); 151 (14.1)	Quercetina-3-O-di-hexosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	WANG et al., 2020.
38	41.3	451.1039	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1035	-0.9	MS ² [451]: 341 (100); 299 (10.2); 231 (2.1); 217 (5.6); 177 (2.7)/ MS ³ [451 → 341]: 323 (12.5); 231 (28.0); 217 (100); 189 (33.6); 177 (19.6)	Isômero da cinchonaína I	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	WU et al., 2017.
39	41.3	505.2070	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₀	505.2079	1.9	MS ² [505]: 359 (100); 344 (29.3); 341 (23.2)/ MS ³ [505 → 359]: 344 (100); 329 (10.2); 313 (15.4)	Ciclolariciresinol-O-deoxihexosídeo	<i>E. simonis</i>	EKLUND et al., 2008

40	41.4	755.2053	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755.2040	-1.6	MS ² [755]: 609 (33.5); 591 (43.0); 489 (22.9); 300 (100); 271 (21.5)/ MS ³ [755 → 300]: 271 (100); 255 (87.5); 179 (19.4)	Quercetina-3-O-hexose-di-deoxihexosídeo	<i>E. pulchrum</i>	GHAREEB et al., 2018.
41	41.6	711.1792	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₉	711.1778	-2.0	MS ² [711]: 579 (100)/ MS ³ [711 → 579]: 447 (28.7); 284 (100); 255(42.0)	Canferol-3-O-hexose-dipentosídeo	<i>E. simonis</i>	
42	41.7	575.1204	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575.1195	-1.5	MS ² [575]: 557 (25.1); 539 (23.0); 451 (14.5); 449 (74.2); 423 (100); 407 (19.3); 289 (16.5); 285 (9.5)/ MS ³ [575 → 423]: 285 (100)	Dímero da procianidina do tipo A	<i>E. pauferrense</i>	POUPARD et al., 2011.
43	42.2	505.2093	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₀	505.2079	-2.8	MS ² [505]: 475 (6.9); 359 (100); 344 (25.0); 341 (26.6)/ MS ³ [505 → 359]: 344 (100); 329 (5.4); 313 (5.4); 189 (7.4); 159 (6)	Ciclolariciresinol-O-deoxihexosídeo	<i>E. simonis</i>	EKLUND et al., 2008
44	43.1	595.1305	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.1305	-1.0	MS ² [595]: 463(2.5); 445 (4.2); 300 (100); 271 (31.6); 255 (13.5)/ MS ³ [595 → 300]: 271 (100); 255 (58.3); 151 (6.5)	Quercetina-3-O-hexose-pentosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	DANTAS, 2018.
45	43.4	451.1035	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1035	-0.2	MS ² [451]: 341 (100); 289 (0.9); 231 (2.7); 217 (8.5); 189 (2.2); 177 (0.9)/ MS ³ [451 → 341]: 323 (13.3); 231 (26.8); 217 (100); 189 (27.4); 177 (17.6)	Isômero da cinchonaína I	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	WU et al., 2017.
46	43.9	537.2005	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂	537.1978	-4.8	MS ² [537]: 491 (100)/ MS ³ [537 → 491]: 359 (100), 344 (18)	Derivado do ciclolariciresinol	<i>E. simonis</i>	EKLUND et al., 2008.
47	45.0	639.1572	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	639.1567	-0.8	MS ² [639]: 477 (6.0); 315 (64.4); 300 (100); 271 (20.5); 255 (13.2)/ MS ³ [639 → 300]: 271 (100); 255 (94.2); 217 (9.0)	Metilquercetina-3-O-di-hexosídeo	<i>E. pauferrense</i>	BOUKHRIS et al., 2016.
48	45.7	575.1172	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575.1195	4.0	MS ² [575]: 557 (30.2); 539 (58.1); 451 (24.9); 449 (100); 407 (27.4); 289 (16.5); 287 (77.1); 285 (24.82)/ MS ³ [575 → 449]: 423 (100); 327 (81.1)	Dímero de procianidina do tipo A	<i>E. pauferrense</i>	POUPARD et al., 2011.
49	46.0	799.2309	C ₃₅ H ₄₄ O ₂₁	799.2302	-0.8	MS ² [799]: 637(100); 329 (6.4); 314 (3.1); 299 (1.3)/ MS ³ [799 → 637]: 329 (100); 314 (94.7); 299 (58.8); 271 (22.5)	Dimetilquercetina-3-O-di-hexose-deoxihexosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	DE TOMMASI et al., 1997

50	46.8	579.1371	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.1355	-2.6	MS ² [579]: 447 (14.7); 429 (61.0); 284 (100); 255 (26.5)/ MS ³ [579 → 284]: 255 (100); 227 (6.8)	Canferol-3-O-hexose-pentosídeo	<i>E. simonis</i>	DANTAS, 2018.
51	47.7	609.1449	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461	0.2	MS ² [609]: 463 (3.4); 301 (100); 271 (7.7); 255 (7.3)/ MS ³ [609 → 301]: 277 (100); 255 (54.1); 177 (55.1); 151 (48.5)	Quercetina-3-O-hexose-deoxihexosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i>	FRAIGE et al., 2018
52	48.2	515.1204	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1195	-1.8	MS ² [515]: 353 (100); 335 (5.7)/ MS ³ [515 → 353]: 191 (52.5); 179 (96.2); 173 (100); 135 (38.4)	Ácido di-cafeoilquínico	<i>E. pauferrense</i> <i>E. simonis</i>	ZHANG et al., 2018
53	48.8	549.2573	C ₂₅ H ₄₂ O ₁₃	549.2553	-3.6	MS ² [549]: 503 (100)/ MS ³ [549 → 503]: 371 (100)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	
54	48.9	451.1054	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1035	-4.4	MS ² [451]: 341 (100); 299 (7.8); 231 (2.0); 217 (1.1)/ MS ³ [451 → 341]: 281(100); 217 (54.9); 189 (41.1); 177 (19.0)	Isômero da cinchonaína I	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	WU et al., 2017.
55	48.9	463.0877	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0882	1.1	MS ² [463]: 301(100); 271 (3.5); 255 (3.2)/ MS ³ [463 → 301]: 271 (100); 255 (53.5); 179 (89.7); 151 (93.8)	Quercetina-3-O-hexosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	COSTA et al., 2016.
56	49.8	451.1031	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1035	0.5	MS ² [451]: 341 (100); 289 (0.9); 231 (2.0); 217 (6.3); 189 (2.0); 177 (1.2))/ MS ³ [451 → 341]: 323 (14.9); 231 (2.0); 217 (100); 189 (24.6); 177 (10.5)	Isômero da cinchonaína I	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	WU et al., 2017.
57	51.2	447.0932	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0933	0.2	MS ² [447]: 301 (100); 271 (1.5); 255 (1.4); 179 (2.4)/ MS ³ [447 → 301]: 271 (100); 255 (69.4); 179 (88.5); 151 (68.9)	Quercetin-O-3-deoxihexosídeo	<i>E. pauferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	CELLI et al., 2011.
58	51.5	447.0936	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0933	-0.7	MS ² [447]: 285 (100); 255 (53.4); 227 (7.9)/ MS ³ [447 → 285]: 255 (100); 227(12.9)	canferol-3-O-hexosídeo	<i>E. simonis</i>	DANTAS, 2018.
59	52.2	661.3464	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₄	661.3441	-3.6	MS ² [661]: 615 (100); 483 (4.1)/ MS ³ [661 → 615]: 483 (100)	Desconhecido	<i>E. simonis</i>	
60	55.7	653.1727	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	653.1723	-0.6	MS ² [653]: 491 (0.8); 329 (100); 314 (79.4); 299 (39.7); 271 (21.7)/ MS ³ [653 → 329]: 314 (100)	Dimetilquercetina-3-O-di-hexosídeo	<i>E. pauferrense</i>	CELLI et al., 2011.

61	57.3	623.1620	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1618	-0.4	MS ² [623]: 461 (100); 315 (6.3); 299 (2.0); 271 (0.7)/ MS ³ [623 → 461]: 315 (100); 299(2.0)	Metilquercetina-3-O-deoxihexose-hexosídeo	<i>E. paufferrense</i>	BARROS et al., 2011.
62	57,6	623.1628	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1618	-1.7	MS ² [623]: 315(100); 299 (14.5); 271 (10.4)/ MS ³ [623 → 315]: 299 (100); 165 (87.3)	Metilquercetina-3-O-deoxihexose-hexosídeo	<i>E. paufferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	BARROS et al., 2011.
63	58.6	477.1051	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1032	-2.6	MS ² [477]: 315 (100); 300 (4.4)/ MS ³ [477 → 315]: 299 (100); 165 (56.37)	Metilquercetina-3-O-hexosídeo	<i>E. paufferrense</i>	LEI et al., 2018.
64	60.9	637.1783	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	637.1774	-1.4	MS ² [637]: 329 (100); 314 (51.2); 299 (27.9); 271 (13.4)/ MS ³ [637 → 329]: 314 (100)	Dimetilquercetina-3-O-hexose-deoxihexosídeo	<i>E. paufferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	EL-ASKARY et al., 2019.
65	62.0	491.1199	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.1195	-0.7	MS ² [491]: 329 (100)/ MS ³ [491 → 329]: 314 (100); 271 (0.7)	Dimetilquercetina-3-O-hexosídeo	<i>E. paufferrense</i>	BRITO et al., 2014.
66	63.1	461.1090	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1089	-0.1	MS ² [461]: 315 (100); 299 (7.2)/ MS ³ [461 → 315]: 299 (100); 271 (10.8); 165 (82.4)	Metilquercetina-3-O-deoxihexosídeo	<i>E. paufferrense</i>	LEI et al., 2018.

*Identificados por RMN de ¹H e ¹³C.

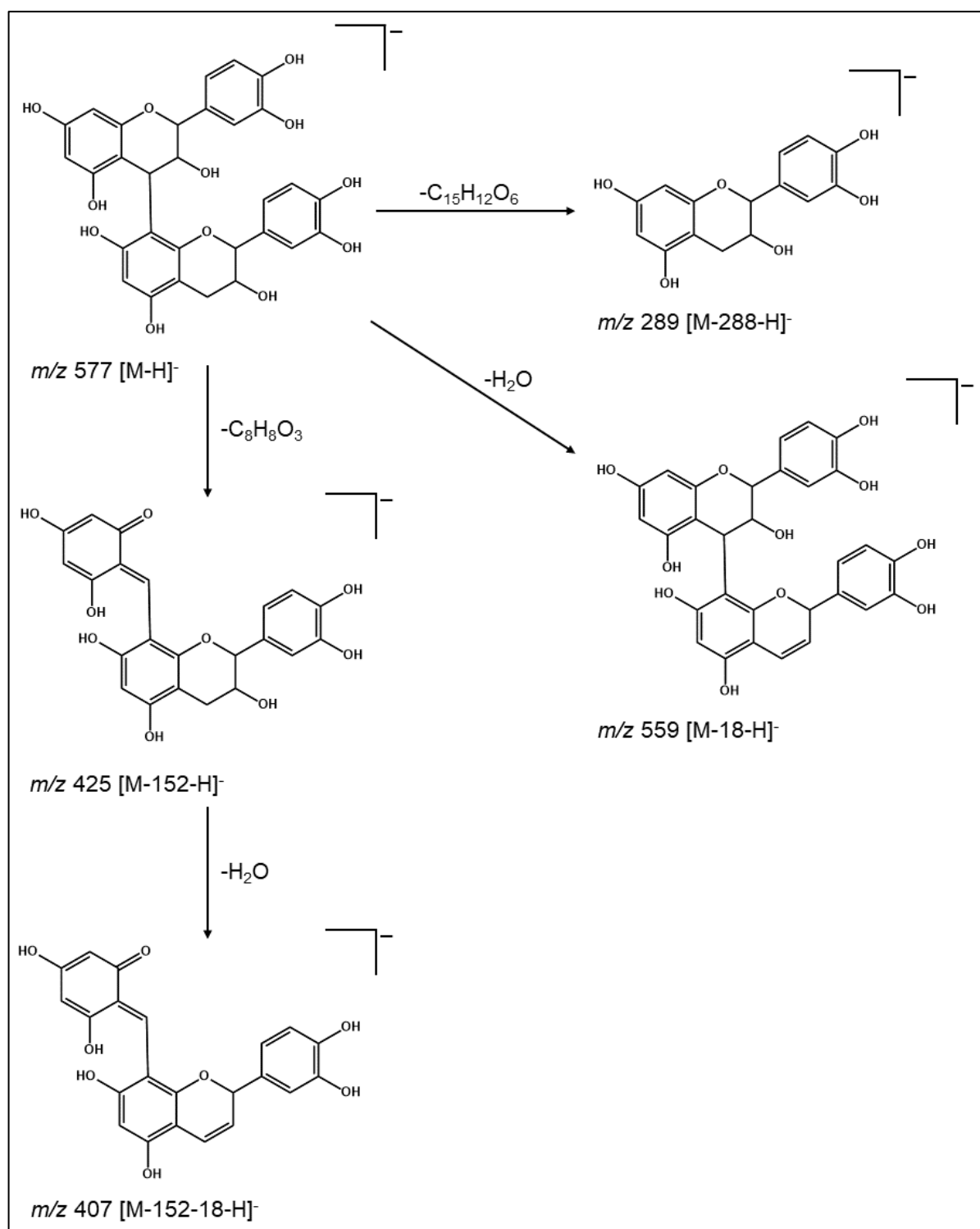
Sete dímeros de procianidina, sendo cinco do tipo B (m/z 577, picos **5**, **7**, **10**, **16** e **36**) e dois do tipo A (m/z 575, picos **42** e **48**), três trímeros de procianidina do tipo B (m/z 865, picos **9**, **11** e **21**) e dois monômeros (m/z 289, picos **13** e **27**), catequina e epicatequina, foram tentativamente identificados. Os cinco dímeros de procianidina do tipo B foram encontrados na espécie *E. pauferrense*, destes, quatro também estiveram presentes na espécie *E. pulchrum*, enquanto os trímeros se apresentaram apenas em *E. pauferrense*. A epicatequina esteve presente em todas as espécies, em contrapartida, a catequina não pode ser assinalada em *E. simonis*.

As proantocianidinas correspondem a uma classe de flavonoides, são metabólitos oligoméricos formados pelos monômeros de flavan-3-ol, e de acordo com o tipo desta unidade as proantocianidinas podem ser classificadas em propelargonidinas, prodelfinidinas e procianidinas, sendo esta última classe a mais comumente encontrada nas espécies vegetais. A estrutura das procianidinas é composta exclusivamente por catequina e epicatequina, e pode ser categorizada no tipo A ou B com relação a sua configuração e ligação entre os monômeros. As do tipo B são mais abundantes, e são definidas por possuir uma única ligação interflavanica entre o carbono C-4 do anel B e o carbono C-8 ou C-6 do anel C. As procianidinas do tipo A são caracterizadas por apresentar uma ligação adicional, do tipo éter, entre o carbono C-2 do anel A e a hidroxila ligada ao carbono C-7 do anel C (BITTNER et al., 2013; RUE et al., 2018).

Um padrão de fragmentação foi observado para os cinco dímeros de procianidina do tipo B (m/z 577; UV λ_{max} : 236, 278 nm), os principais fragmentos obtidos após a quebra da molécula foram o m/z 559 ($[M-18-H]^-$), formado após a perda de água, seguido de m/z 451 ($[M-108-18-H]^-$), obtido através de uma reação via retro-Diels-Alder (RDA) promovendo a perda de um fragmento $C_6H_4O_2$. Adicionalmente o íon da molécula desprotonada também pode sofrer uma clivagem via retro-Diels-Alder diretamente fornecendo o fragmento m/z 425 ($[M-152-H]^-$) após a perda de 152 Da correspondente a $C_8H_8O_3$, que sucessivamente forma o m/z 407 ($[M-152-18-H]^-$) após perda de uma molécula de água, por fim o fragmento m/z 289 ($[M-288-H]^-$) é gerado por meio da quebra da ligação interflavanica via clivagem QM (quinone methide), correspondendo a catequina ou epicatequina (FRAIGE et al., 2018; GORDON et al., 2011; SANNOMIYA et al., 2005). A fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{12}$ foi sugerida nas análises HR-ESI-MS reforçando a anotação realizada para esses metabólitos. A via comum de fragmentação dos dímeros de procianidinas do tipo B pode ser visualizada

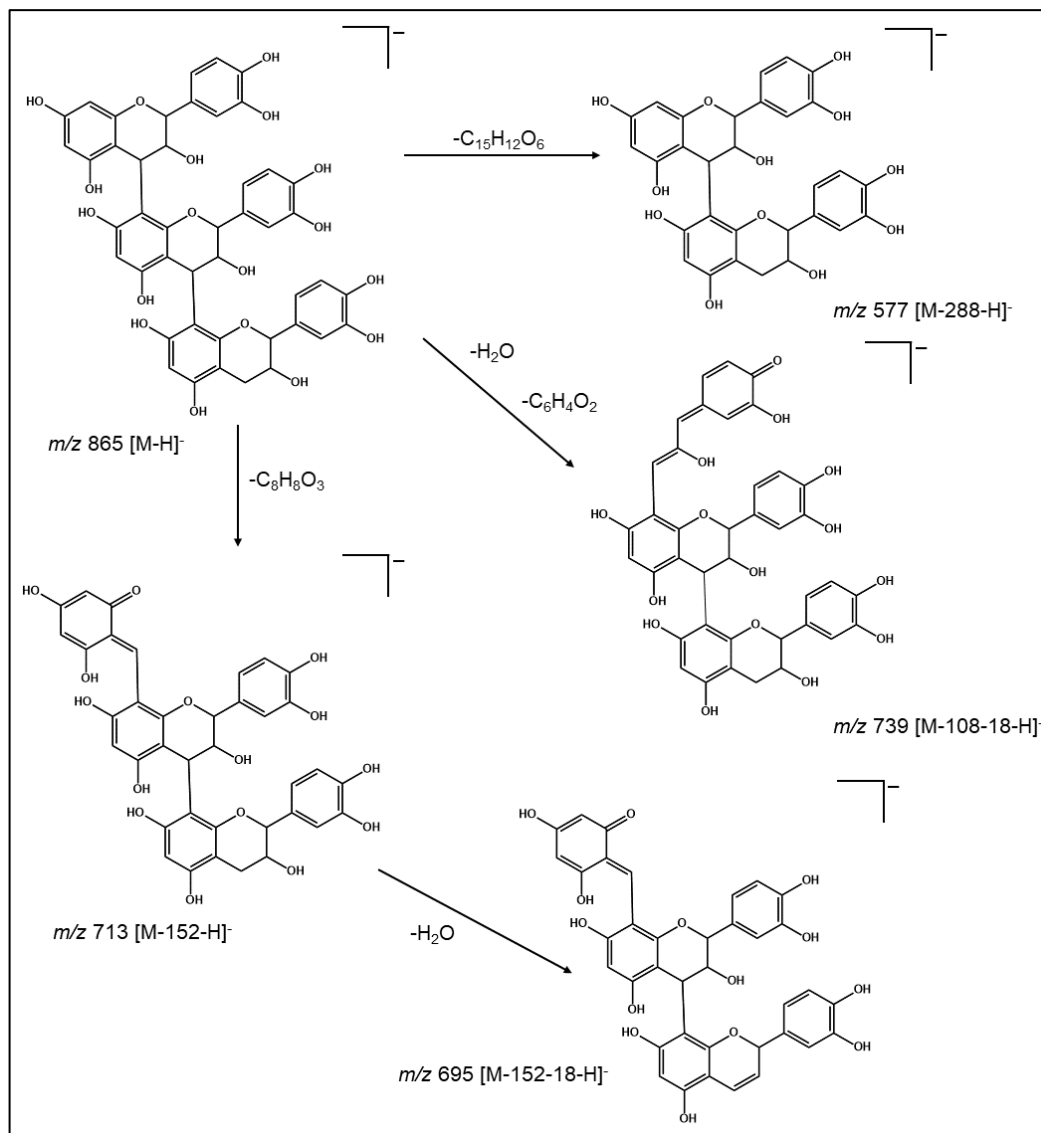
na Figura 15. Estudos já apontaram a presença de procianidinas do tipo B no gênero *Erythroxylum*, procianidina B₁ e B₃, porém este tipo de metabólito está sendo sendo descrito pela primeira vez na *E. paufferense*, *E. simonis* e *E. pulchrum* (BONEFELD et al., 1986).

Figura 15 - Via de fragmentação proposta para os dímeros de procianidinas do tipo B.



Os trímeros de procianidina do tipo B (m/z 865; UV λ_{max} : 240, 278 nm) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação dos dímeros do tipo B, com o adicional de fragmentos em m/z 847 ($[M-18-H]^-$), formado a partir da retirada de um molécula água, que em seguida sofre uma quebra via retro Diels-Alder formando m/z 739 ($[M-108-18-H]^-$), devido à perda de um fragmento correspondente a $C_6H_4O_2$. Foi observado ainda um fragmento em m/z 713 ($[M-152-H]^-$), correspondente a saída de 152 Da equivalente a $C_8H_8O_3$ por clivagem via retro Diels-Alder, que posteriormente perde uma molécula de água formando o fragmento m/z 695 ($[M-152-18-H]^-$). Para a formação do fragmento em m/z 577 ($[M-288-H]^-$), o íon da molécula desprotonada sofre uma quebra da ligação interflavanica via clivagem QM, que em seguida segue pela via comum de fragmentação dos dímeros da procianidina do tipo B. É importante salientar que a fragmentação de um trímero de procianidina do tipo A promove a formação de um fragmento em m/z 711 e não em m/z 713, como foi observado (RUE et al., 2018; FRAIGE et al., 2017; GU et al., 2003). A anotação foi compatível aos dados fornecidos pelos espectros HR-ESI-MS que apontou a fórmula molecular $C_{45}H_{38}O_{18}$. A via geral de fragmentação dos trímeros de procianidina do tipo B encontra-se representada na Figura 16.

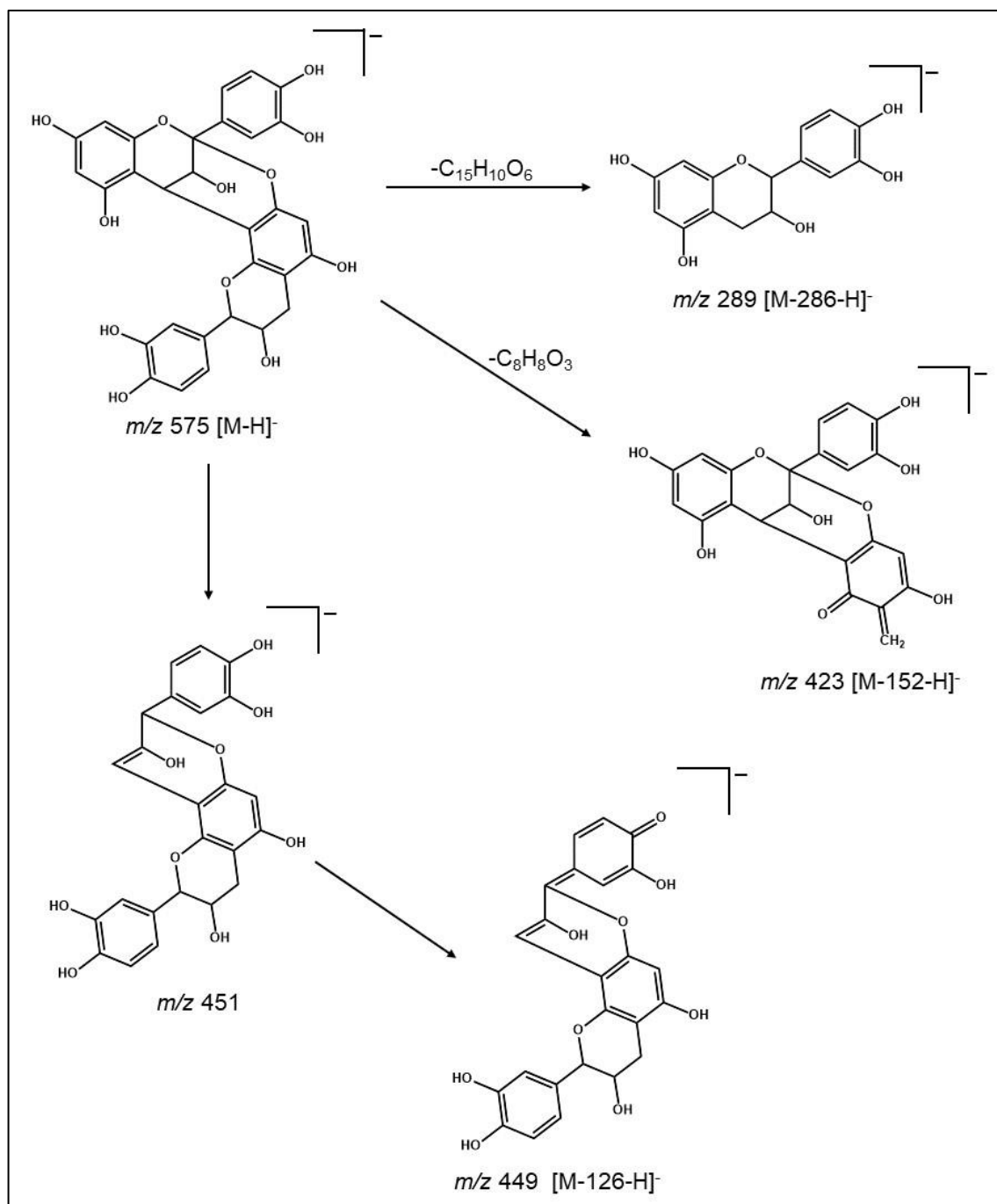
Figura 16 - Via de fragmentação proposta para os trimeros de procianidinas do tipo B.



Os dímeros de procianidina do tipo A (m/z 575; UV $\lambda_{\max}$: 245, 279 nm) estão sendo descritos pela primeira vez para o gênero *Erythroxylum*, os fragmentos padrões observados foram o íon em m/z 557 ($[M-18-H]^-$), produzindo a partir da saída de uma molécula de água, o fragmento em m/z 449 ($[M-126-H]^-$) possivelmente foi formado através da clivagem do íon da molécula desprotonada via fissão do anel heterocíclico. Foi observado ainda a perda de 152 Da devido a saída de um fragmento $C_8H_8O_3$ por clivagem via retro Diels-Alder diretamente no íon da molécula desprotonada formando m/z 423 ($[M-152-H]^-$). Os fragmentos m/z 289 e m/z 285 são gerados a partir da quebra da ligação interflavanica via clivagem QM, e esta diferença de 4 Da entre os produtos é característico das ligações do tipo A, sendo desta forma, útil na diferenciação dos tipos de dímeros de procianidina (POUPARD et al., 2011; LIN et al., 2014). As análises

HR-ESI-MS forneceram a fórmula molecular $C_{30}H_{24}O_{12}$ corroborando com a anotação atribuída. Na Figura 17 pode ser observado a via comum de fragmentação dos dímeros de procianidina do tipo A.

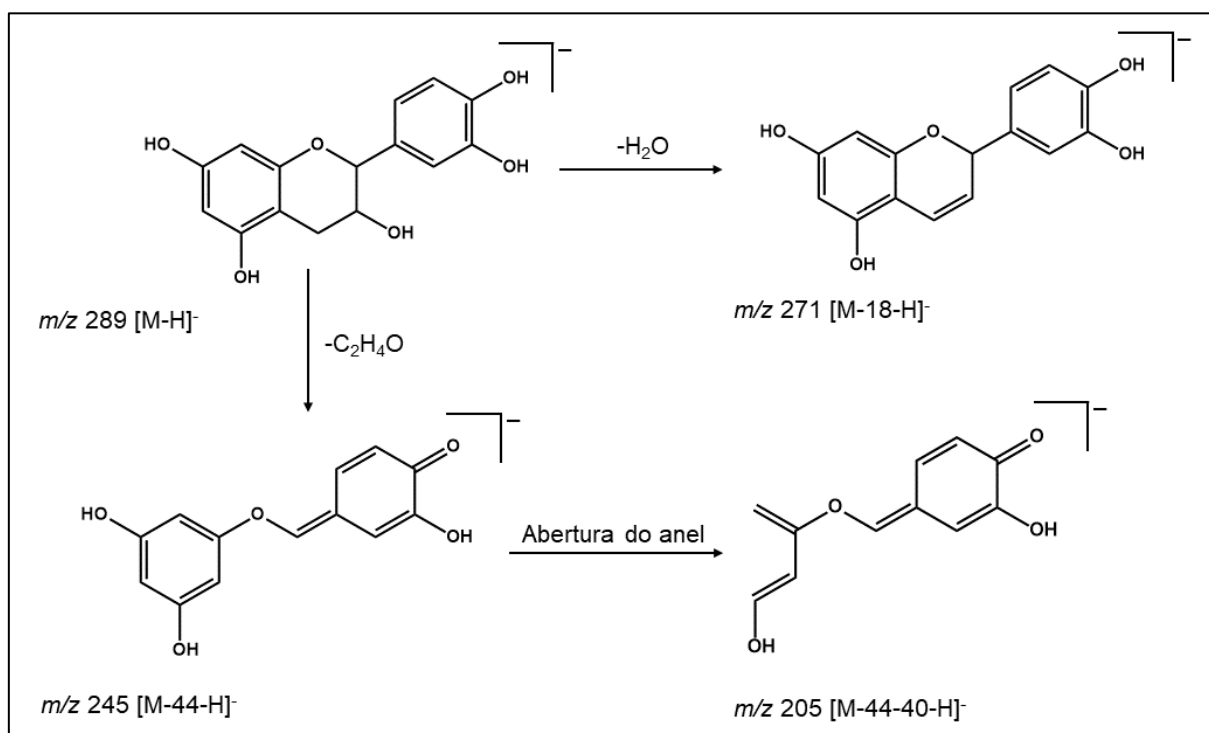
Figura 17 - Via de fragmentação proposta para os dímeros de procianidinas do tipo A.



A fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ obtida nos espectros HR-ESI-MS corroborou com a presença dos isômeros anotados como catequina (pico **13**; UV λ_{max} : 236, 278 nm) e epicatequina (pico **27**; UV λ_{max} : 234, 278 nm). O diferente tempo de retenção desses

picos foi o fator que permitiu sua diferenciação, uma vez que apresentaram o mesmo padrão de fragmentação, no qual o íon da molécula desprotonada (m/z 289) por mecanismos de clivagem via retro-Diels-Alder promove a formação dos fragmentos em m/z 245 ($[M-44-H]^-$), m/z 205 ($[M-84-H]^-$) e m/z 179 ($[M-110-H]^-$), além do fragmento em m/z 271 ($[M-18-H]^-$) relativo a perda de uma molécula de água (YUZUAK et al., 2018; CALLEMIEN; COLLIN, 2008; GALAVERNA et al., 2015). A proposta dessa via de fragmentação encontra-se representada na Figura 18. A presença da catequina está sendo relatada pela primeira vez nas três espécies, no entanto a epicatequina já foi descrita anteriormente nas partes aéreas *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE et al., 2014)

Figura 18 - Via de fragmentação proposta para a catequina e epicatequina.



Tradicionalmente os compostos fenólicos são classificados de acordo com suas características estruturais, uma dessas classes corresponde aos ácidos clorogênicos, que são moléculas formadas pela ligação entre o ácido quínico e ácidos trans-cinâmicos, como o ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico, através de uma ligação éster. Os ácidos trans-cinâmicos podem ser esterificados em uma ou mais hidroxilas do ácido quínico nas posições 1, 3, 4 e 5, originando séries de isômeros posicionais (TOCI et al., 2006).

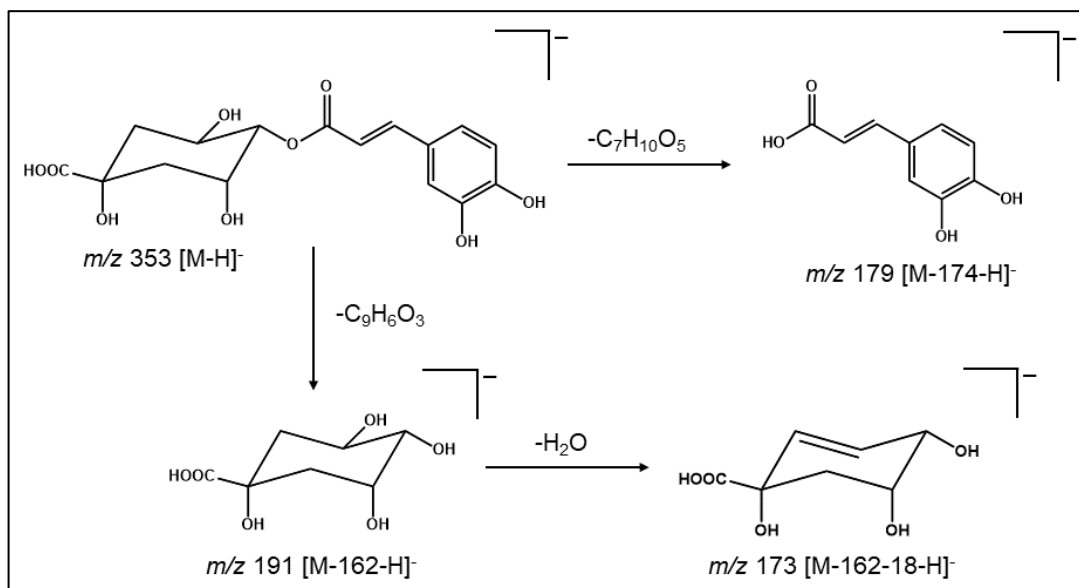
Os ácidos cafeoilquínicos que apresentam apenas uma unidade de ácido cafeico, frequentemente são os mais observados no reino vegetal, se destacando o ácido 5-*O*-cafeoilquinóico (ácido clorogênico), por sua abundância, no entanto os outros isômeros também são tipicamente encontrados nas plantas, como o ácido 3-*O*-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico) e o ácido 4-*O*-cafeoilquinico (ácido criptoclorogênico). Comumente também são encontrados os ácidos di-cafeoilquínicos, que apresentam duas unidades de ácido cafeico ligadas ao ácido quínico por meio de ligações éster. Os ácidos clorogênicos representam uma das classes de compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana, e são responsáveis por vários benefícios à saúde, além de apresentar propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (CLIFFORD, 2000; UPADHYAY; WILLEMS et al., 2016).

Quatro ácidos clorogênicos substituídos por unidades de ácido cafeico foram detectados nos materiais vegetais analisados, sendo três ácidos mono-cafeoilquínico, identificados como sendo o ácido 3-*O*-cafeoilquínico (m/z 353, pico **8**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (m/z 353, pico **22**) e ácido 5-*O*-cafeoilquínico (m/z 353, pico **18**), que se apresentaram nas três espécies, e um ácido di-cafeoilquínico (m/z 515, pico 39) que não foi observado apenas em *E. pulchrum*. A presença de ácidos clorogênicos no gênero *Erythroxylum* já foi relatada anteriormente, e alguns estudos apontam seu direto envolvimento no armazenamento de alcaloides tropânicos nos vacúolos da espécie *E. coca* (TORRE et al., 2013; DANTAS, 2018).

Os três isômeros de ácido mono-cafeoilquínico (m/z 353; UV λ_{max} : 241, 290, 323 nm) apresentam o mesmo peso molecular e desta forma também possuem o mesmo valor de m/z , logo esta medição não pode ser um parâmetro para a diferenciação deles. No entanto, é possível diferenciá-los mediante a análise dos principais fragmentos formados a partir do íon da molécula desprotonada. Estes íons foram observados em m/z 191 ($[M-162-H]^-$), que é formado pela clivagem da ligação éster entre a unidade de ácido quínico e ácido cafeico, m/z 179 ($[M-174-H]^-$) equivalente ao ácido cafeico e m/z 173 ($[M-162-18-H]^-$) gerado também por uma quebra da ligação ester entre as unidades, seguida de desidratação na unidade de ácido quínico. Para a diferenciação dos isômeros, é necessário verificar a abundância relativa destes três principais fragmentos, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico foi determinado por apresentar o íon base em m/z 191 com o fragmento em m/z 179 pouco intenso. Para o assinalamento do ácido 3-*O*-cafeoilquínico, quem também apresentou o íon base em m/z 191, foi observado um pico relativamente intenso referente ao fragmento

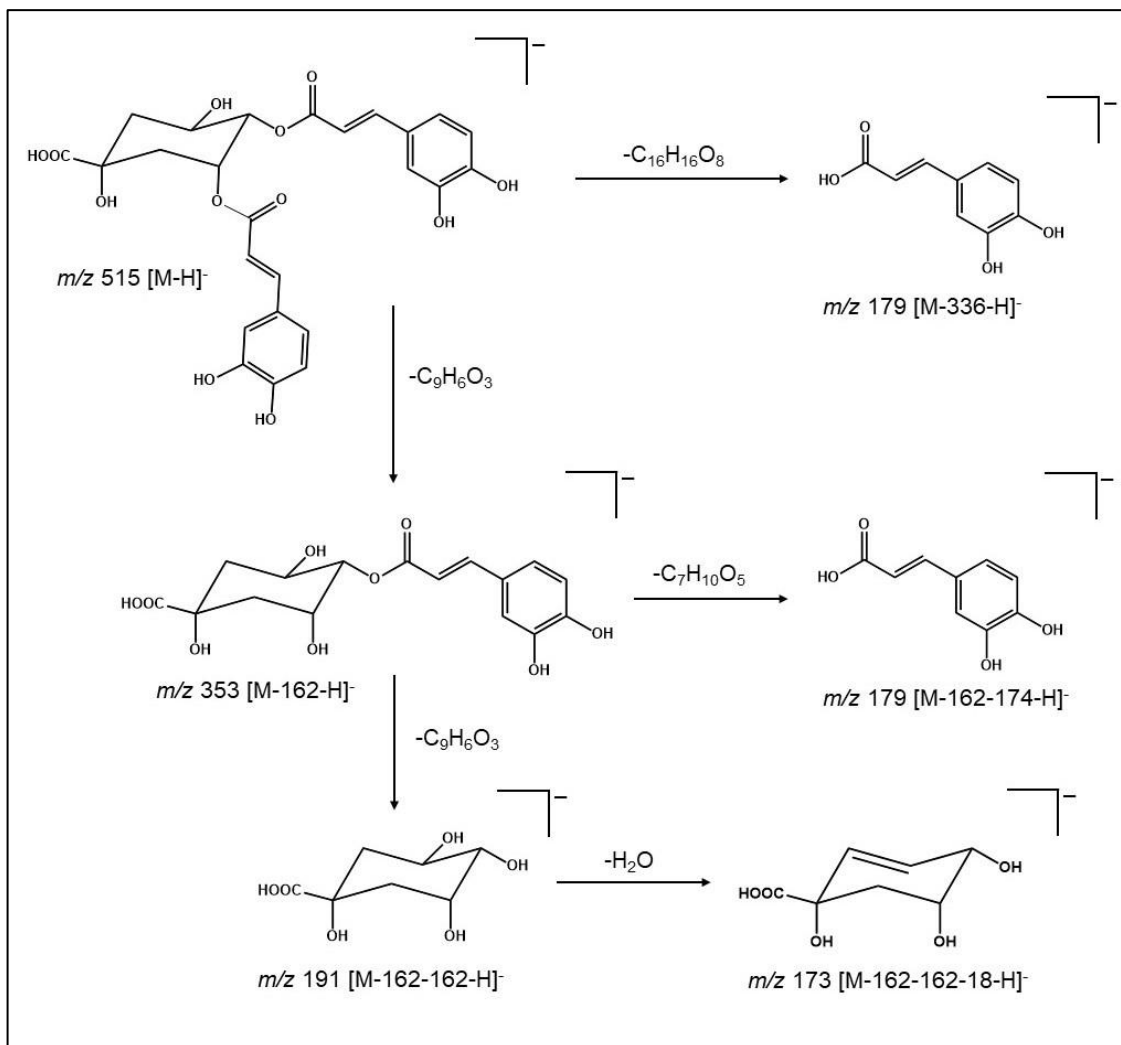
em m/z 179, e o ácido 4-*O*-cafeoilquínico foi diferenciado dos demais por apresentar o íon base em m/z 173 (JAISWAL et al., 2010). Para os três isômeros a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ foi fornecida a partir dos espectros HR-ESI-MS. A possível via de formação desses fragmentos pode ser observada na Figura 19.

Figura 19 - Via de fragmentação proposta para os ácidos cafeoilquínico.



O ácido di-cafeoilquínico (pico **52**, m/z 515; UV λ_{max} : 245, 327 nm), ausente apenas em *E. puchrum*, mostrou o mesmo padrão de fragmentação dos isômeros relatados anteriormente, com o adicional do fragmento em m/z 353 ($[M-162-H]^-$), produzido pela perda de uma porção $C_9H_6O_3$, de uma das unidades de ácido cafeico ligadas ao ácido quínico (ZHANG et al., 2018). A fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$, obtida nas análises HR-ESI-MS, corroborou com a anotação realizada. Na Figura 20, esta via de fragmentação pode ser visualizada.

Figura 20 - Via de fragmentação proposta para o ácido di-cafeoilquínico.

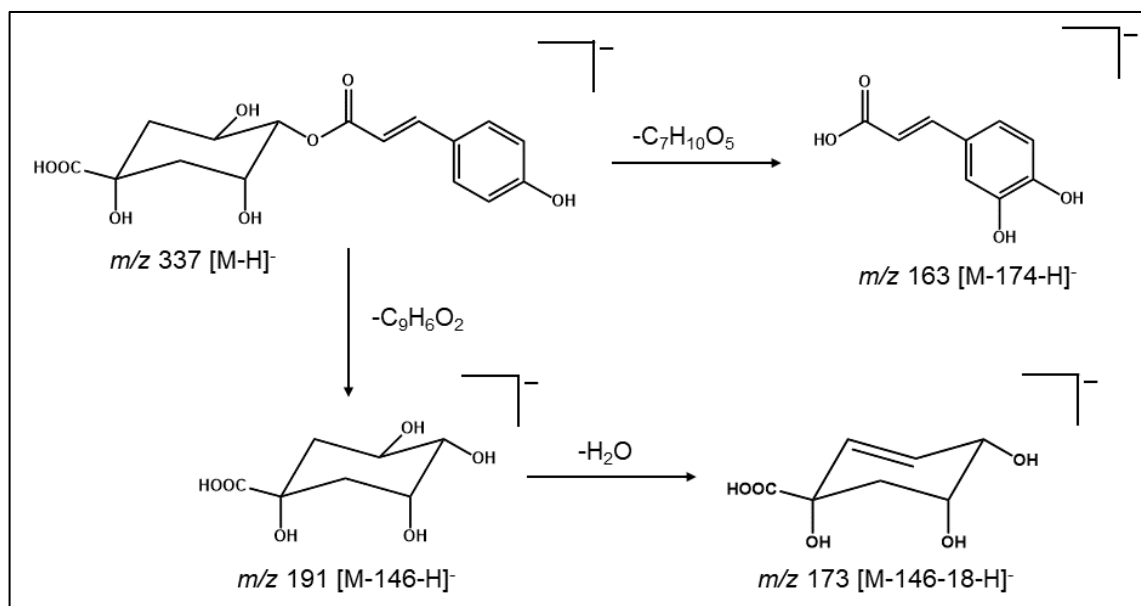


Uma outra classe de ácidos clorogênicos são aqueles formados através da ligação éster entre o ácido quínico com uma ou mais unidades de ácidos p-cumárico, que é um ácido trans-cinâmico assim como o ácido cafeico. E dependendo da posição de esterificação vários isômeros posicionais podem ser formados. Os ácidos clorogênicos substituídos com unidades de ácidos p-cumárico também já foram descritos para o gênero *Erythroxylum*, a exemplo a espécie *Erythroxylum Coca* (TORRE et al., 2013).

A presença de dois ácidos mono-cumaroilquínico (m/z 337, picos **14** e **31**; UV λ_{max} : 241, 320) foi evidenciada com base nos fragmentos produzidos a partir do íon da molécula desprotonada, suas respectivas identificações foram propiciadas por análise da abundância dos principais fragmentos gerados e pela fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_8$ obtida por HR-ESI-MS. O pico **14** forneceu um fragmento com íon base em m/z 163

([M-174-H]⁻), equivalente ao ácido p-cumárico, através da clivagem da ligação éster entre o ácido quínico e o ácido hidroxicinâmico. Em contrapartida, o pico **31** produziu um fragmento com íon base em m/z 173 ([M-146-18-H]⁻), condizente ao ácido quínico “desidratado”, obtido via quebra da ligação éster entre os ácidos, seguido da saída de uma molécula de água da fração de ácido quínico. Comparando os dados obtidos com as informações descritas na literatura, os compostos dos picos **14** e **31** foram anotados, respectivamente, como sendo o ácido 3-O-cumaroilquínico e o ácido 4-O-cumaroilquínico, compostos inéditos para as espécies de *Erythroxylum* desse estudo, o primeiro presente nas três espécies e o segundo não estando presente apenas em *E. pulchrum*. É importante salientar que a presença de um íon base em m/z 191, que corresponderia ao fragmento do ácido quínico, o composto se trataria do ácido 5-O-cumaroilquínico (JAISWAL et al., 2010). A via de formação desses fragmentos pode ser observada na Figura 21.

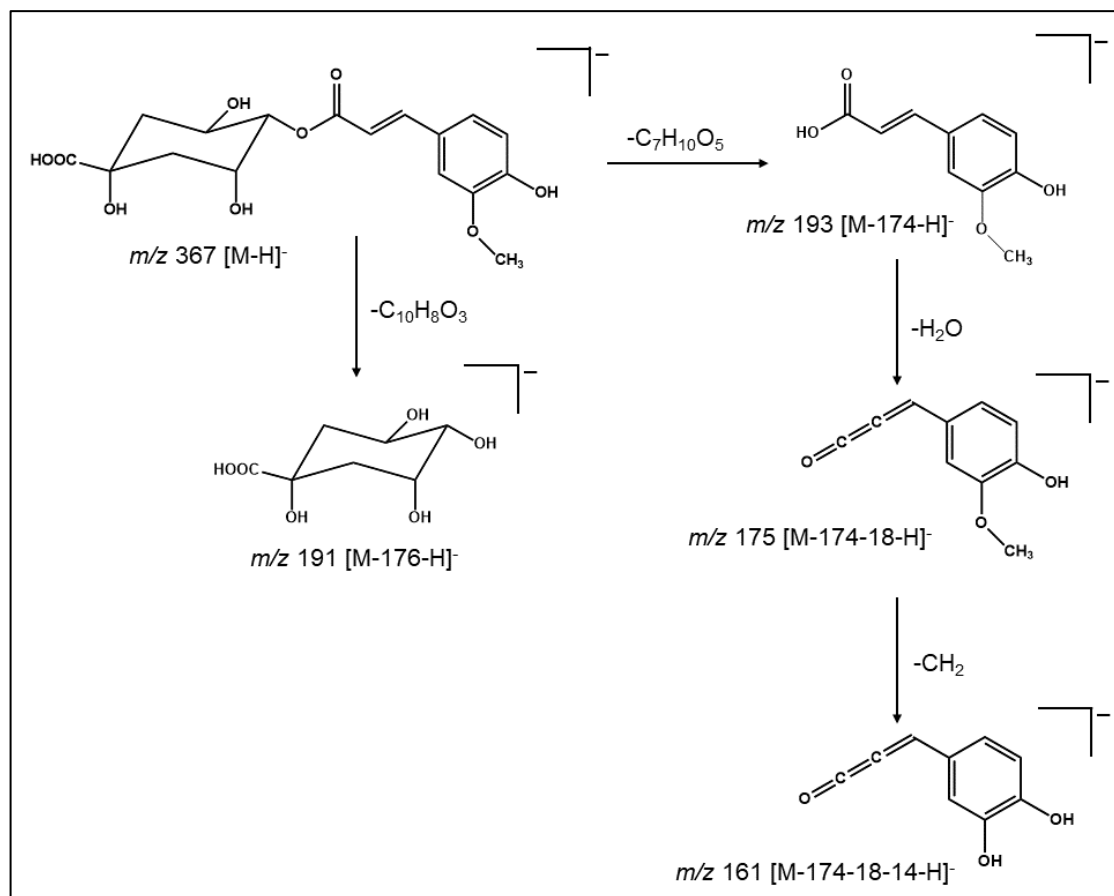
Figura 21 - Via de fragmentação proposta para o ácido cumaroilquínico.



A última classe de ácidos clorogênicos observada nos materiais vegetais estudados corresponde ao ácido quínico substituído por uma unidade de ácido ferúlico, sendo comum nas plantas os ácidos 3-O-feruloilquínico, 4-O-feruloilquínico e 5-O-feruloilquínico. Não foram encontrados relatos na literatura da presença desses ácidos no gênero *Erythroxylum*.

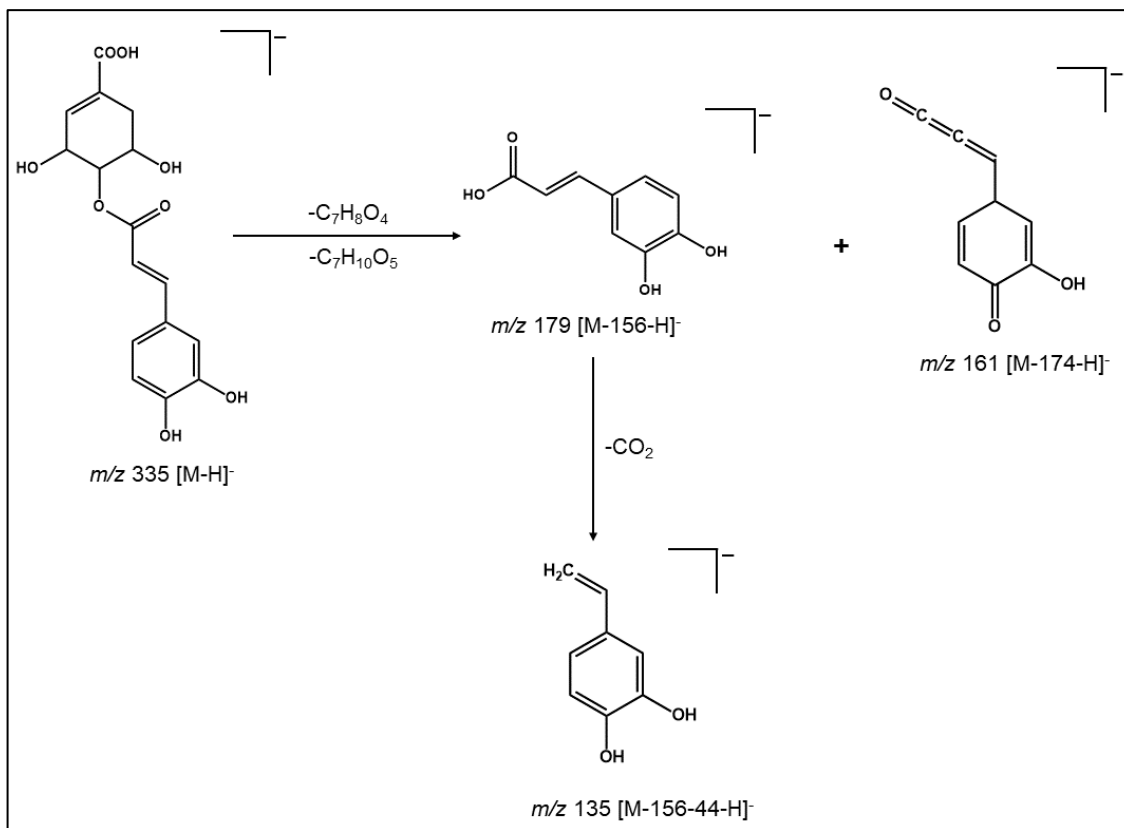
Suspeitou-se da presença de dois isômeros do ácido mono-feruloilquínico (m/z 367, picos **20** e **32**; UV λ_{max} : 241, 280, 325) após análise dos fragmentos gerados pelo íon da molécula desprotonada e pelos fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$ fornecida por HR-ESI-MS. Estes compostos foram evidenciados nas três espécies, no entanto, *E. pulchrum* apresentou apenas um isômero (pico **20**). Um importante fragmento formado é o m/z 193 ($[\text{M}-174-\text{H}]^-$), correspondente ao ácido ferúlico após clivagem da ligação éster entre o mesmo e o ácido quínico. Este fragmento pode ainda sofrer perda de uma molécula de água e saída de CH_2 , gerando assim, o íon em m/z 161 ($[\text{M}-174-18-14-\text{H}]^-$). Outro fragmento observado foi o m/z 191 ($[\text{M}-176-\text{H}]^-$), equivalente a porção do ácido quínico após quebra da ligação éster. Os dois isômeros exibiram o mesmo padrão de fragmentação, não possibilitando sua diferenciação a partir dos dados fornecidos, e estão sendo reportados pela primeira vez nas espécies desse estudo (JAISWAL et al., 2010). A via comum de fragmentação proposta para estes ácidos pode ser observada na Figura 22.

Figura 22 - Via de fragmentação proposta para o ácido feruloilquínico.

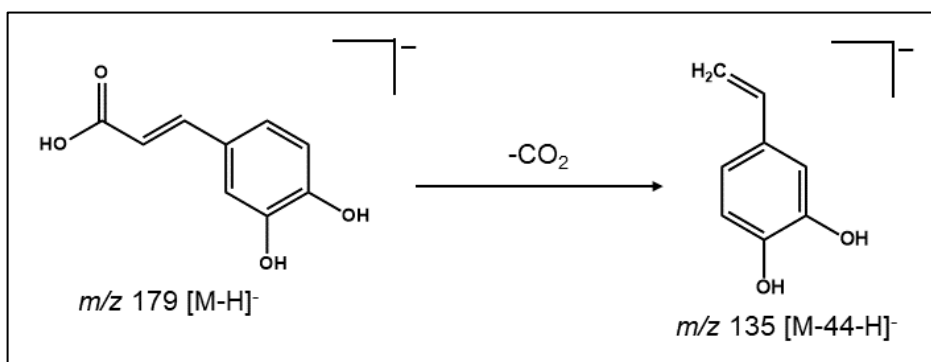


Os picos dos compostos **29** e **33** exibiram um íon quasi-molecular em m/z 335 (UV λ_{max} : 239, 280, 325 nm) e nos espectros HR-ESI-MS a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_8$, o que poderia corresponder a regioisômeros do ácido cafeoilchiquímico, que é um derivado do ácido hidroxicinâmico, formado pela esterificação de uma unidade de ácido cafeico na posição 3, 4 ou 5 do ácido chiquímico, que corresponde ao ácido quínico desidratado, podendo desta forma dar origem a três isômeros de posição (SAID et al., 2017). Os dois compostos foram anotados na espécie *E. pulchum*, o **29** também foi evidenciado em *E. simonis* e nenhum em *E. paufferense*. Não foram encontradas referências literárias da presença desses metabólitos no gênero *Erythroxylum*.

Os dois íons precursores não mostraram diferenças relativas em seus espectros de MS^n , e apresentaram os mesmos fragmentos principais, um em m/z 179 ($[\text{M}-156-\text{H}]^-$), referente a porção do ácido cafeico, produzido por meio da quebra da ligação éster entre as duas unidades de ácido, este íon promove ainda a formação do m/z 135 ($[\text{M}-156-44-\text{H}]^-$) por descarboxilação. Outro fragmento importante para a identificação dos compostos é o m/z 161 ($[\text{M}-174-\text{H}]^-$) gerado através da saída de $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$, após clivagem da ligação éster. Este íon é característico do ácido 4-*O*-cafeoilchiquímico, que o apresenta como íon base, e está ausente nos ácidos 3-*O*-cafeoilchiquímico e 5-*O*-cafeoilchiquímico. Estes dois últimos compostos, após a clivagem da ligação éster promove por perdas neutras a formação de um ciclohexadieno com a porção dieno conjugada, o que não ocorre no ácido 4-*O*-cafeoilchiquímico, pois ele não consegue formar um dieno conjugado, dando origem ao íon m/z 161 (JAISWAL et al., 2010; BASTOS et al., 2007; SAID et al., 2017). A Figura 23 apresenta a via de clivagem do ácido 4-*O*-cafeoilchiquímico.

Figura 23 - Via de fragmentação proposta para o 4-O-cafeoilchiquímico.

O ácido cafeico (m/z 179, pico **25**; UV λ_{max} : 239 nm) foi anotado na fase butanólica da espécie *E. simonis*, porém não foi detectado em *E. pulchrum* e *E. paufferense*. Como já relatado anteriormente, o ácido cafeico e seus derivados são comuns em espécies do gênero *Erythroxylum* (TORRE et al., 2013). O íon da molécula desprotonada de ácido cafeico promove a formação do íon base em m/z 135 ([M-44-H]⁻) decorrente de uma descarboxilação, como pode ser observado na Figura 24 (JAISWAL et al., 2010; BASTOS et al., 2007). A fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ foi adquirida a partir dos espectros HR-ESI-MS reforçando a anotação realizada.

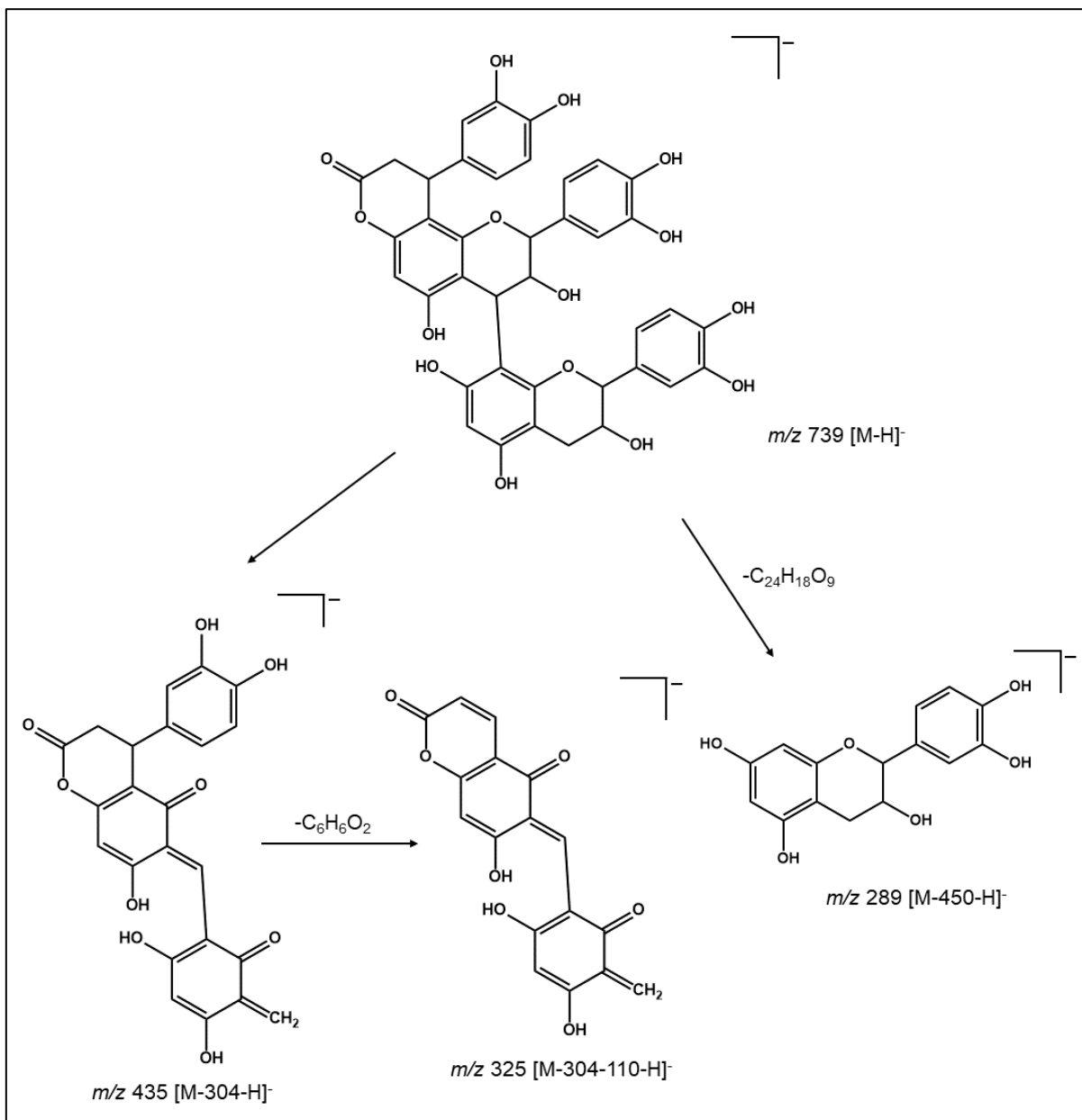
Figura 24 - Via de fragmentação proposta para o ácido cafeico.

Os compostos cinchonainas I e II foram anotados no material vegetal das três espécies do estudo, no total foram observadas quatro isômeros da cinchonaina II (m/z 739, picos **15**, **17**, **23** e **24**; UV λ_{max} : 241, 280 nm), todos presentes na espécie *E. paufferense*, três em *E. pulchrum* e dois em *E. simonis*. Com relação a cinchonaina I (m/z 451, picos **30**, **38**, **45**, **54** e **56**; UV λ_{max} : 244, 280 nm), foram anotados cinco isômeros na espécie *E. paufferense* e *E. pulchrum*, no entanto apenas dois se apresentaram em *E. simonis*. Cinchonainas já foram relatadas em estudos com espécies do gênero *Erythroxylum*, como as reportadas por Negri e colaboradores ao pesquisar metabólitos secundários no extrato etanólico das cascas do caule de *Erythroxylum vacciniifolium*, promovendo a determinação das cinchonainas Ia, Ib e IIa (NEGRI et al., 2016).

Quimicamente as cinchonainas são classificadas como flavolignanais, que correspondem a moléculas de flavan-3-ol com substituições fenilpropanoides do tipo cinchonaina. O estudo destes metabólitos foi iniciado a mais de trinta anos por Nonaka e colaboradores com a espécie *Cinchona succirubra*, e as cinchonainas Ia, Ib, Ic, Id, IIa e IIb representam a estereoquímica mais comum para estes compostos. As cinchonainas I são formados a partir da substituição fenilpropanoide em uma molécula de catequina ou epicatequina, enquanto as cinchonainas II são oriundas dessa substituição em dímeros de procianidinas (SENDKER et al., 2013; TANG et al., 2007; NONAKA; NISHIOKA, 1982).

Os fragmentos formados a partir da quebra do íon da molécula desprotonada necessários para a anotação das cinchonainas II (m/z 739) foram o fragmento em m/z 435 ($[M-304-H]^-$), gerado por meio de duas clivagens retro-Diels-Alder seguidas, indicando a ligação da porção $C_9H_6O_3$ ao anel A da subunidade superior de flavan-3-ol, caso estivesse ligado na subunidade inferior formaria um fragmento em m/z 449. Outro fragmento importante para o diagnóstico do íon é o m/z 325 ($[M-304-110-H]^-$), gerado a partir do m/z 435 por uma fenil clivagem na porção $C_9H_6O_3$, essa perda de 110 Da indica ainda a presença de um anel fenil-di-hidroxilado nesta porção. Por fim outro fragmento importante na identificação das cinchonainas II é o m/z 289 ($[M-450-H]^-$) que corresponde ao flavan-3-ol, catequina ou epicatequina desprotonada, gerado por quebra da ligação interflavanica (SENDKER et al., 2013). Na Figura 25 está representado a via proposta de fragmentação desses compostos. A fórmula molecular $C_{39}H_{32}O_{15}$ obtida a partir das análises HR-ESI-MS corroborou com a anotação realizada.

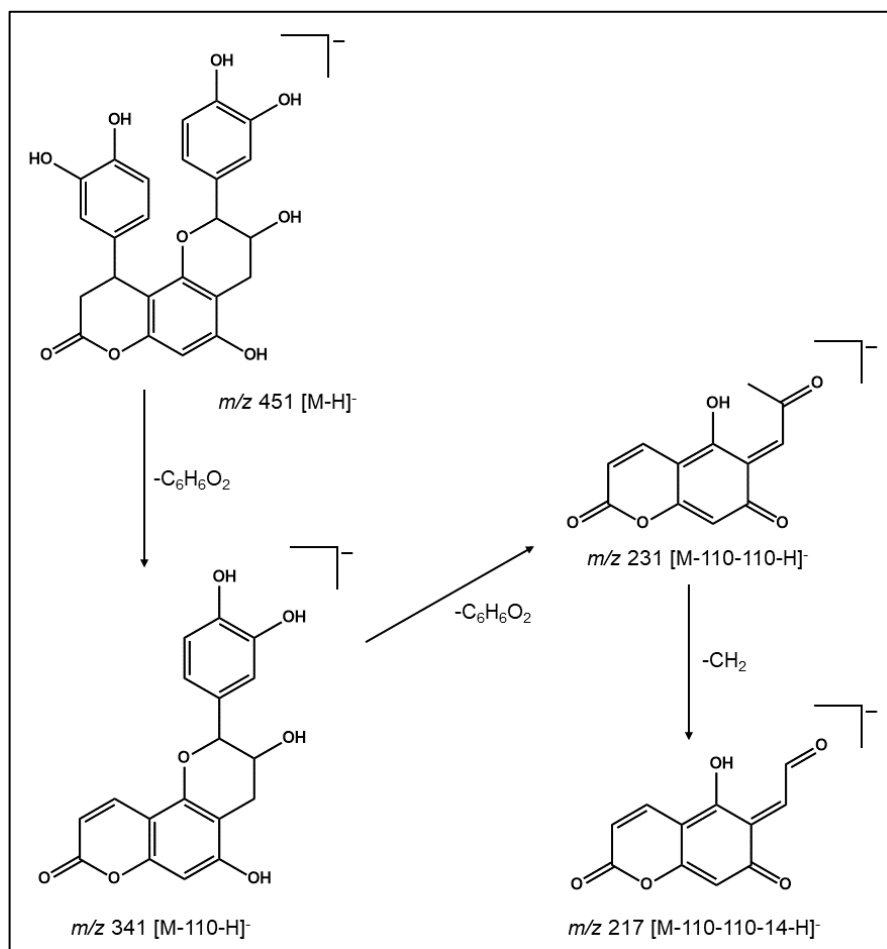
Figura 25 - Via de fragmentação proposta para a cinchonaína II.



As cinchonainas I (*m/z* 451) foram anotadas com base em fragmentos padrões descritos na literatura. Foram estes, o *m/z* 341 ([M-110-H]⁻), formado pela saída de uma unidade de catecol da porção C₉H₆O₃ via fenil clivagem, o *m/z* 231 ([M-110-110-H]⁻), gerado também por meio da retirada de uma segunda molécula de catecol, desta vez da unidade de flavan-3-ol, e o último fragmento importante na análise desses picos foi o *m/z* 217 ([M-110-110-14-H]⁻) fornecido provavelmente pela perda de um CH₂ (ZHANG et al., 2016; FASCIOTTI et al., 2015; WU et al., 2017; FIGUEROA et al., 2018). Esta via de fragmentação encontra-se representada na Figura 26. Os

experimentos HR-ESI-MS apontaram a fórmula molecular $C_{24}H_{20}O_9$ corroborando com a anotação para estes compostos.

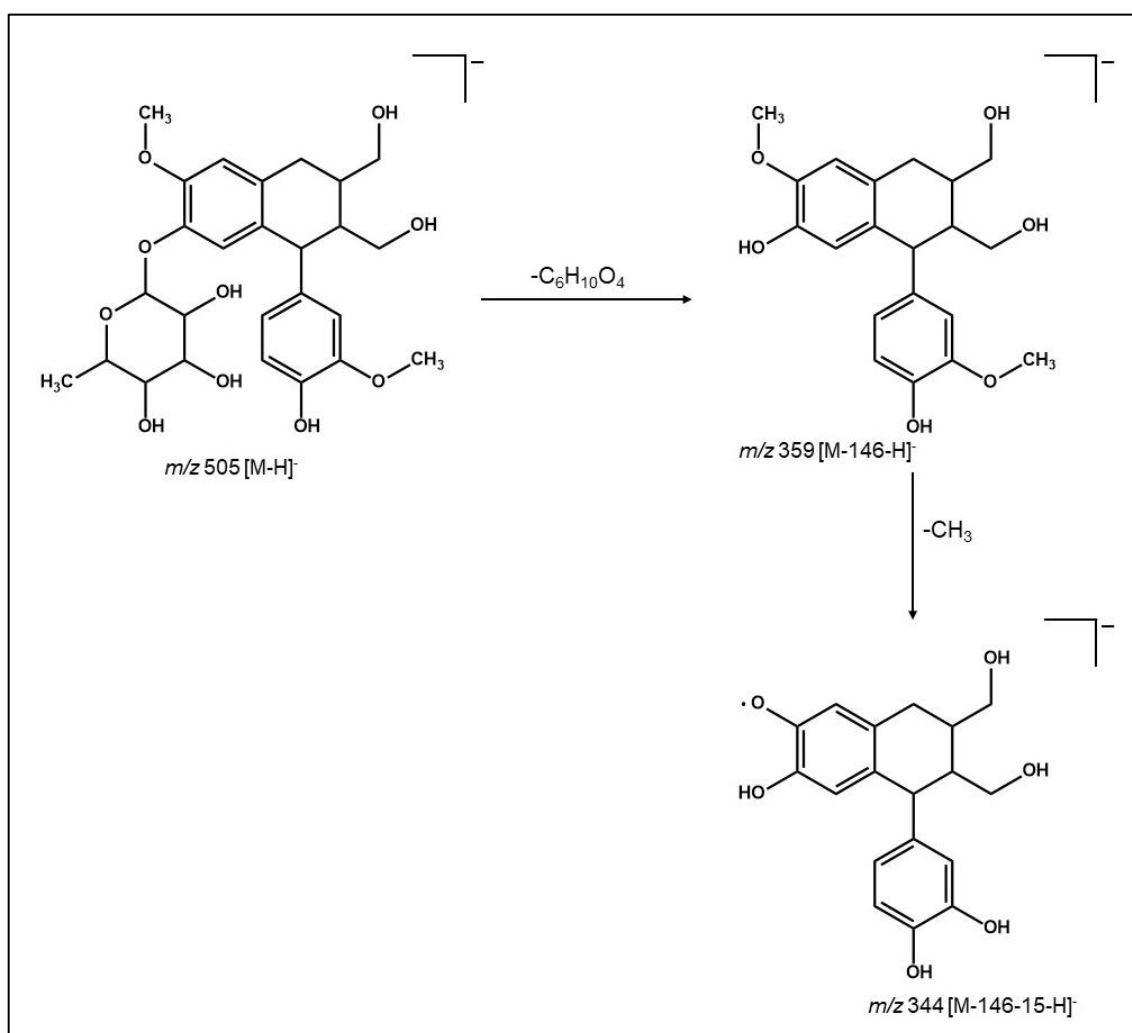
Figura 26 - Via de fragmentação proposta para a cinchonaína I.



Suspeitou-se da presença de quatro derivados da lignana ciclolariciresinol (m/z 359), todos presentes apenas na espécie *E. simonis*. Este diol de linana apresenta perdas características de 15 e 30 Da, correspondente a saídas sucessivas dos radicais metil e metoxil, produzindo os íons m/z 344 ($[M-15-H]^-$) e 313 ($[M-15-31-H]^-$), respectivamente. Os picos **39** e **43** foram identificados como sendo isômeros do ciclolariciresinol-*O*-deoxyhexoside (m/z 505; UV λ_{max} : 252, 280nm), uma vez que apresentaram os mesmos fragmentos do ciclolariciresinol com uma perda adicional de 146 Da, equivalente a saída da deoxyhexose, seus espectros HR-ESI-MS foram condizentes com as anotações ao exibir a fórmula molecular $C_{26}H_{34}O_{10}$, a via de fragmentação proposta para esses compostos está representada na Figura 27. O pico **34** (m/z 565; UV λ_{max} : 247, 278 nm) apresentou fragmentos correspondentes a adição de duas metoxilas ao núcleo do ciclolariciresinol-*O*-deoxyhexosideo e fórmula

molecular $C_{28}H_{38}O_{12}$ nos espectros HR-ESI-MS, sendo assim anotado como dimetoxi-ciclariciresinol-*O*-deoxihexosideo. Por fim o pico **46** (m/z 537; UV λ_{max} : 252, 280 nm) apresentou os fragmentos característicos do ciclariciresinol-*O*-deoxihexosideo, porém a análise de HR-ESI-MS apontou uma fórmula molecular $C_{26}H_{34}O_{12}$, ou seja, o íon do pico **46** apresenta dois átomos de oxigênio a mais em relação ao ciclariciresinol-*O*-deoxihexosideo, sendo identificado como um derivado do ciclariciresinol (EKLUND et al., 2008). Estes metabólitos estão sendo descritos pela primeira na família Erythroxylaceae.

Figura 27 - Via de fragmentação proposta para o ciclariciresinol-*O*-deoxihexosideo.



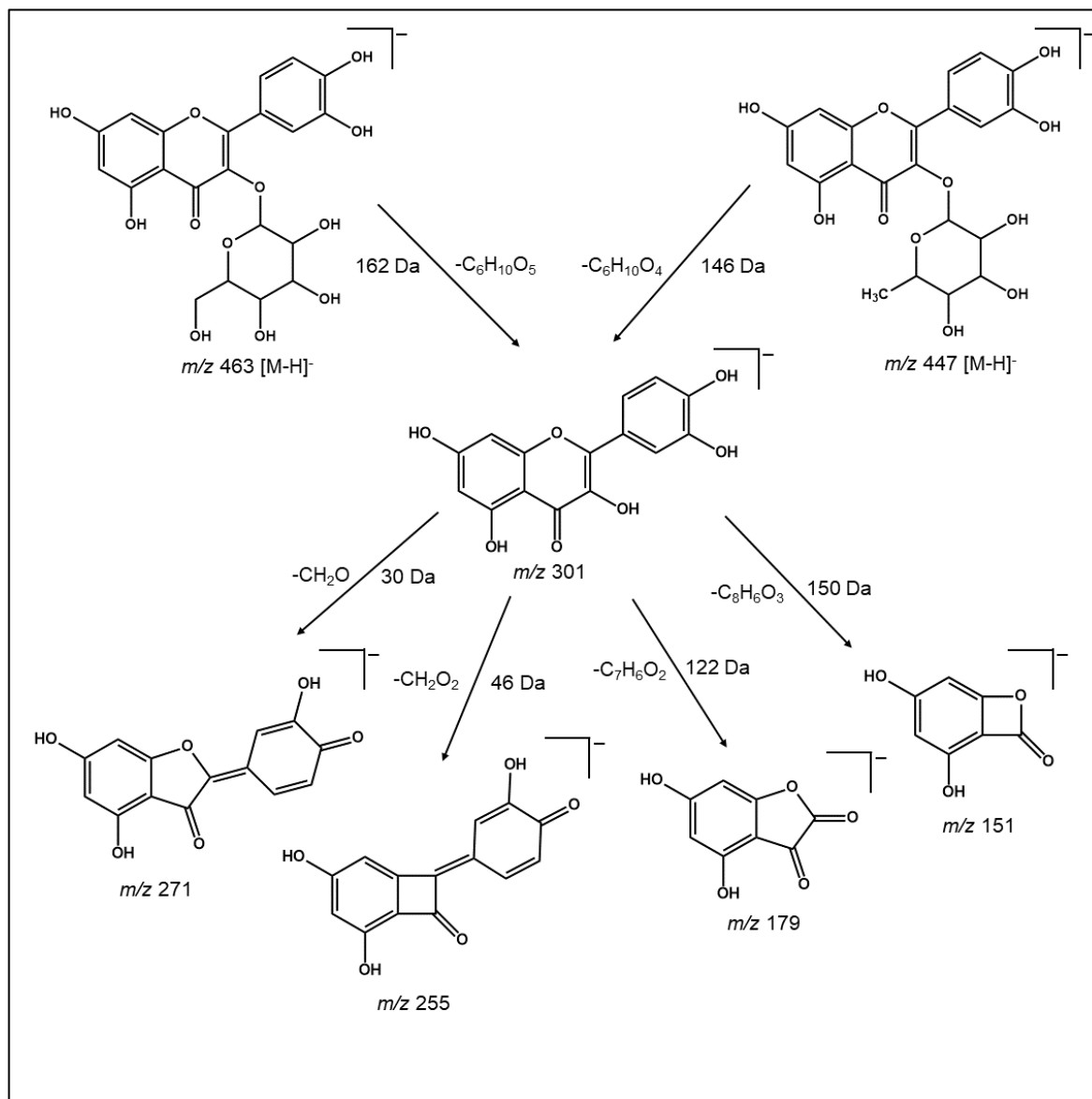
Sete glicosídeos flavanoídicos derivados do núcleo quercetina foram constatados em m/z 447, 463, 595, 609, 625, 755 e 727 por meio das perdas de 132, 162 e 146 Da, atribuídos a pentosídeos, hexosídeos e deoxihexosídeo, respectivamente, além do fragmento de massa em m/z 301 ou 300, devido à clivagem

heterolítica e homolítica da fração de açúcar, formando nessa ordem, a aglicona e o radical aglicona da quercetina (LI et al., 2018).

Nas três espécies do estudo estavam presentes os compostos em m/z 447 (pico **57**) e 463 (pico **55**), que foram anotados como sendo a quercetina-3-*O*-deoxihexosídeo e quercetina-3-*O*-hexosídeo, respectivamente, devido a perda de 146 Da referente a saída da deoxihexose e 162 Da correspondente a hexose, ambos produzindo o fragmento em m/z 301, equivalente a aglicona quercetina (CELLI et al., 2011; DA COSTA et al., 2016).

A aglicona quercetina (m/z 301) também teve seus fragmentos analisados no espectro de MS³, com o objetivo de confirmar seu núcleo. Os principais fragmentos gerados pela quercetina foram o m/z 271 ([M-30-H]⁻), correspondente a saída de CH₂O, m/z 255 ([M-46-H]⁻), formado a partir da perda de uma porção CH₂O₂, m/z 179 ([M-122-H]⁻), gerado por meio de uma clivagem retro-Diels-Alder entre as posições O-C2 e C2-C3, promovendo a saída de uma porção C₇H₆O₂, e o último fragmento importante na análise foi o m/z 151 ([M-150-H]⁻), que também resulta de uma clivagem retro-Diels-Alder, desta vez entre as posições O-C2 e C3-C4 com perda de C₈H₆O₃ (LI et al., 2018; CELLI et al., 2011). A fragmentação proposta para os compostos anotados e os fragmentos gerados pela quercetina, podem ser visualizadas na Figura 28. Os espectros HR-ESI-MS mostraram as fórmulas moleculares C₂₁H₂₀O₁₁ e C₂₁H₂₀O₁₂ para os compostos **57** e **55**, respectivamente, corroborando com as anotações realizadas.

Figura 28 - Via de fragmentação proposta para a quercetina-3-O-deoxihexosídeo e quercetina-3-O-hexosídeo

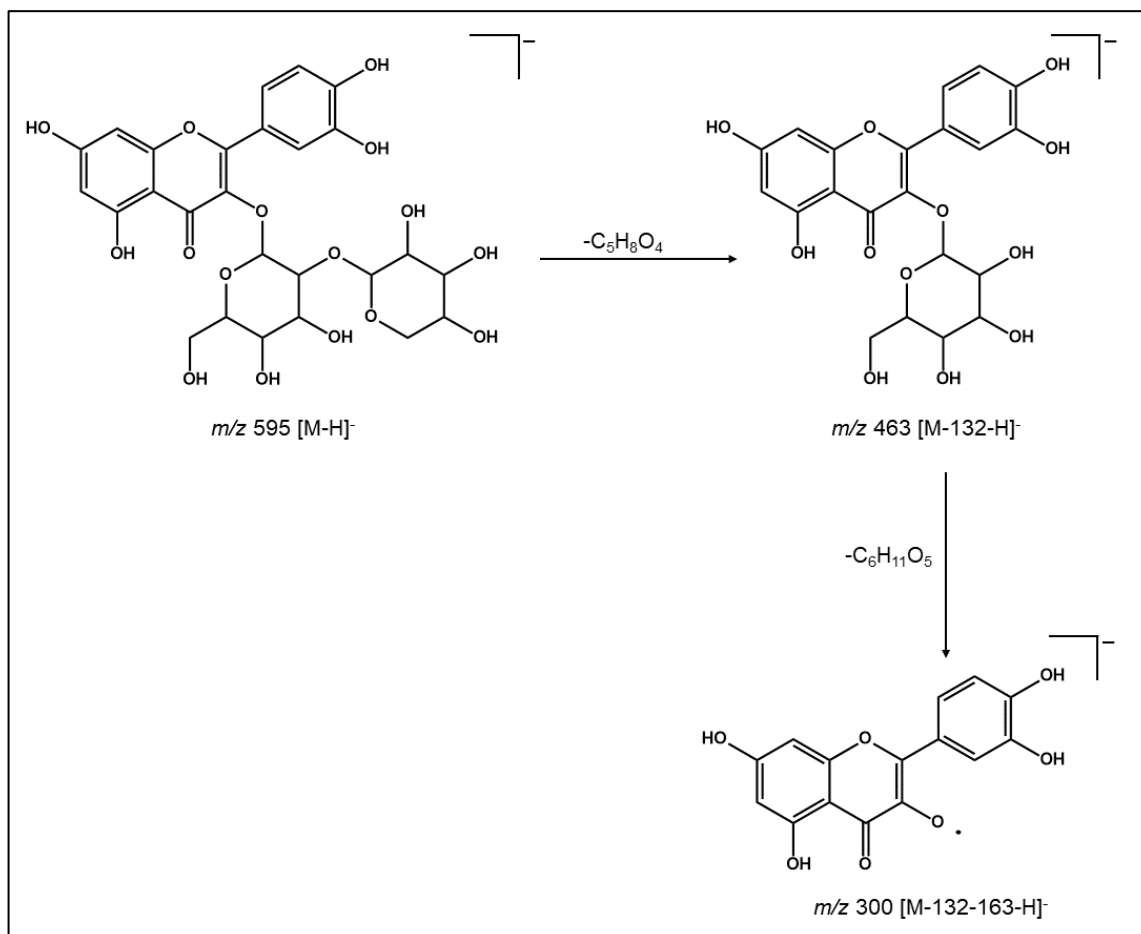


Os compostos em m/z 609 (pico **51**), presentes em *E. pauferrense* e *E. pulchrum*, e m/z 625 (pico **37**), presentes em *E. pauferrense* e *E. simonis*, foram anotados como quercetina-3-O-hexose-deoxihexosídeo e quercetina-3-O-di-hexosídeo, respectivamente. Estas substâncias apresentaram, nessa ordem, o mesmo padrão de fragmentação da quercetina-3-O-deoxihexosídeo e quercetina-3-O-hexosídeo, porém foi observado ainda, uma perda sequencial de 162 Da, referente a unidade adicional de hexose. A porção da aglicona apresentou os fragmentos clássicos da quercetina, relatados anteriormente, no espectro de MS^3 . Outro fator que contribuiu com as anotações realizadas foram as fórmulas moleculares obtidas nas

análises HR-ESI-MS, $C_{27}H_{30}O_{16}$ para o composto do pico **51** e $C_{27}H_{30}O_{17}$ para o composto do pico **37** (FRAIGE et al., 2017; WANG et al., 2020).

O pico **44**, em m/z 595, foi anotado como quercetina-3-O-hexose-pentosídeo, por apresentar uma perda sequencial de 132 Da e 162 Da, equivalentes às unidades de pentose e hexose, respectivamente, além de produzir o fragmento em m/z 300 da aglicona quercetina na forma de íon radical e apresentar a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{16}$ nos espectros HR-ESI-MS. Este composto foi evidenciado nas espécies *E. simonis* e *E. pauferrense*, e o mesmo já foi isolando em estudos anteriores destas espécies, e por apresentarem o mesmo padrão de fragmentação, pode-se determinar em conjunto com os dados espectrais de RMN de 1H e ^{13}C , e em comparação com os dados descritos na literatura, o tipo e a posição das unidades dos açúcares ligados na aglicona, sendo identificada com quercetina-3-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosídeo (quercetina-3-O-sambubiosídeo) (DANTAS, 2018; CUNHA 2019). A via de fragmentação deste composto pode ser observada na Figura 29.

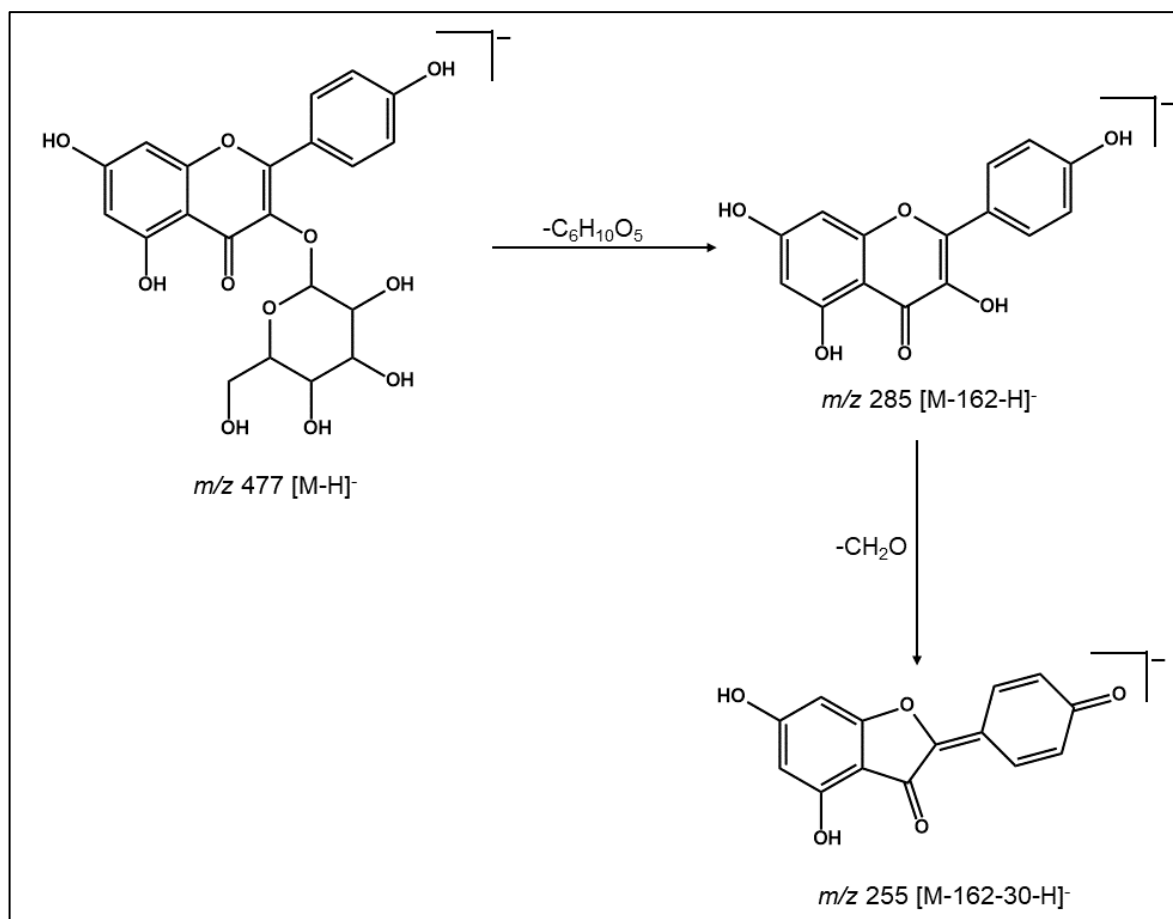
Figura 29 - Via de fragmentação proposta para a quercetina-3-O-sambubiosídeo.



O composto com m/z 727 (pico **35**), mostrou um fragmento em m/z 300, condizente com a aglicona quercetina na forma de íon radical, e perdas seriadas de 132 Da, 132 Da e 162 Da, além da fórmula molecular $C_{31}H_{36}O_{20}$ nos espectros HR-ESI-MS, sendo anotado como quercetina-3-O-hexose-di-pentosídeo, e foi evidenciado apenas na espécie *E. simonis*. Outro núcleo de quercetina substituído por três unidades osídicas foi identificado em m/z 755 (pico **40**), que também apresentou o fragmento em m/z 300 da aglicona quercetina na forma de íon radical, e mostrou perdas sucessivas de 146 Da, 146 Da e 162 Da, condizentes com a saída de duas deoxihexoses e uma hexose, além de mostrar os fragmentos clássicos da quercetina no espectro MS^3 , por meio desses dados e da fórmula moléculas $C_{33}H_{40}O_{20}$ adquirida a partir das análises HR-ESI-MS o composto foi anotado como quercetina-3-O-hexose-di-deoxihexosídeo, detectada apenas em *E. pulchrum* (GHAREEB et al., 2018).

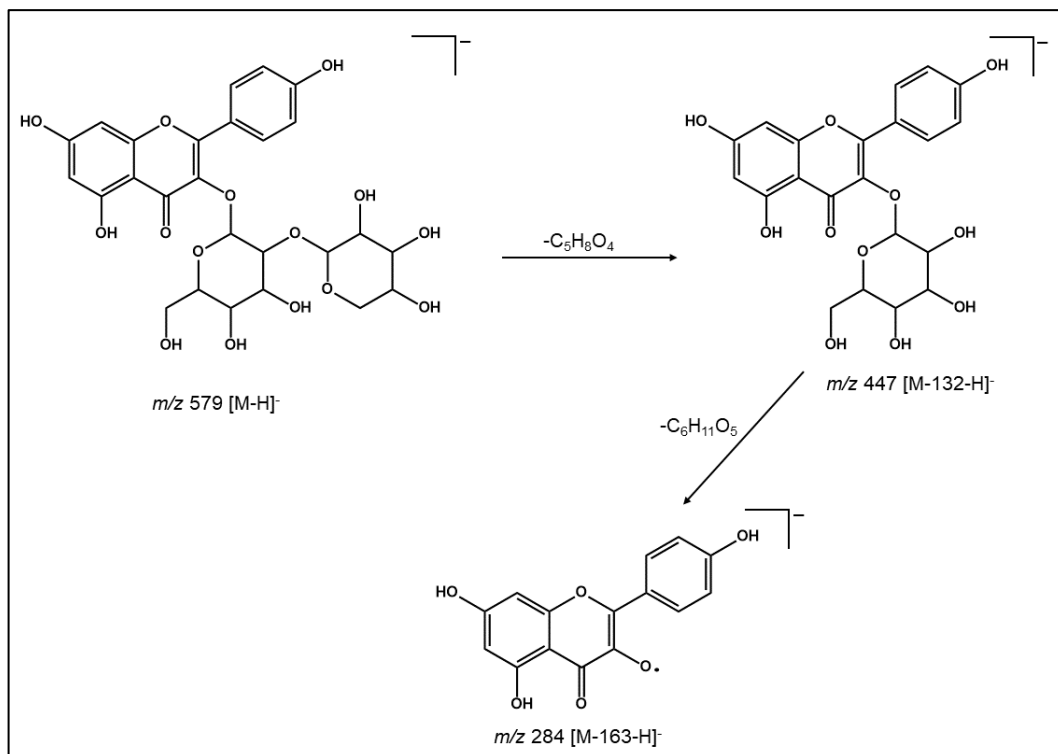
O composto em m/z 447 (pico **58**), apresentou nos espectros HR-ESI-MS a formula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$, e nos espectros MS^n foi observado uma perda de 162 Da equivalente a saída da hexose, por clivagem da ligação entre a aglicona e a unidade osídica, originando um íon base em m/z 285 ($[M-162-H]^-$) correspondente a aglicona, a partir desses dados espectrais o composto foi anotado como canferol-3-O-hexosídeo. A fragmentação da aglicona canferol foi analisada no espectro de MS^3 para confirmação do núcleo, e fragmentos característicos foram observados em m/z 255 ($[M-162-30-H]^-$), promovido por perda de CH_2O , e m/z 227 ($[M-162-30-28-H]^-$), por meio da saída de CO do íon anterior (LI et al., 2014; DELBUBBA et al., 2012; MARCH; MIAO, 2004). Em trabalhos anteriores com a espécie *E. simonis*, foi realizado o isolamento do canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (astragalina), que apresentou o mesmo padrão de fragmentação observado, desta forma foi atribuído a identificação de astragalina ao composto do pico **58**. A fragmentação da astragalina encontra-se representada na Figura 30.

Figura 30 - Via de fragmentação proposta para a astragalina.



Também foi observado a presença do canferol substituído por duas unidades osídicas, pentose e hexose, apresentando o íon quasi-molecular em m/z 579 (pico **50**) e fórmula molécula $C_{26}H_{28}O_{15}$, nos espectros HR-ESI-MS. Esse íon fragmentou-se em m/z 447 ($[M-132-H]^-$), provavelmente pela saída de uma pentose, m/z 284 ($[M-132-163-H]^-$), evidenciando a saída sequencial de uma hexose, gerando o fragmento correspondente ao núcleo do canferol na forma de íon radical (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2015). Da mesma forma que a astragalina, este composto também já foi isolado em trabalhos anteriores com a espécie *E. simonis*, o qual foi atribuída a identificação de canferol-3-O-D-xilopiranosil-(1→2)-O-D-glicopiranosídeo (canferol-3-O-sambubiosídeo) (DANTAS et al., 2018). Na Figura 31, a via de fragmentação do canferol-3-O-sambubiosídeo pode ser visualizada.

Figura 31 - Via de fragmentação proposta para o canferol-3-O-sambubiosídeo.



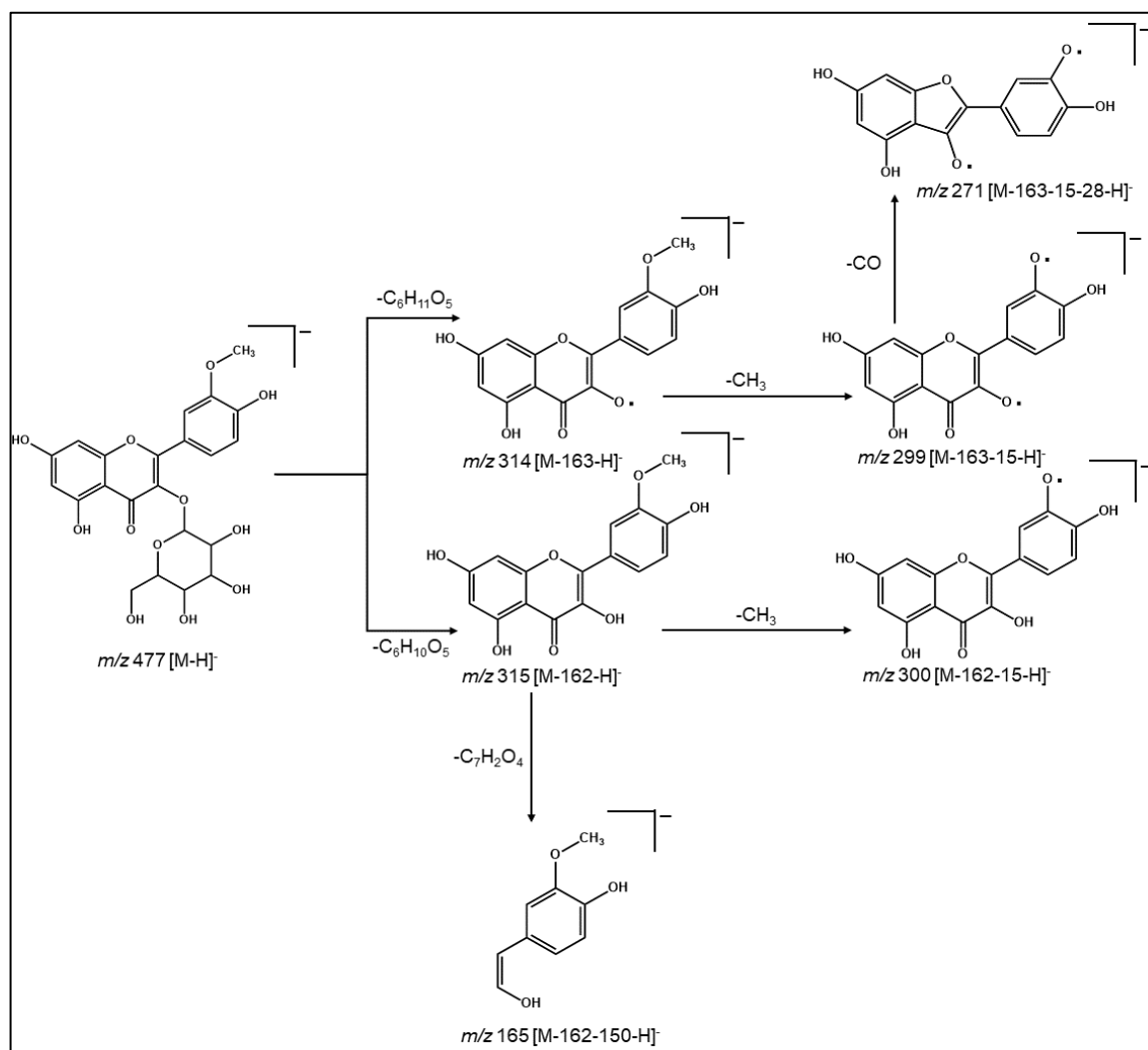
O pico **41** mostrou um íon precursor em m/z 711, e no seu espectro MS^n foram observados fragmentos característicos do canferol-3-O-hexose-di-pentosídeo. Este composto apresentou o mesmo padrão de fragmentação do canferol-3-O-sambubiosídeo, com uma perda sequencial a mais de 132 Da, referente a saída da unidade adicional de pentose, gerando o íon base em m/z 579 ($[M-132-H]^-$), que apresentou os mesmos fragmentos do canferol-3-O-sambubiosídeo no espectro de MS^3 . Além desses dados, a fórmula molecular $C_{31}H_{36}O_{19}$ foi evidenciada a partir das análises HR-ESI-MS, corroborando com a anotação realizada.

As anotações de cinco glicosídeos flavonoídicos derivados do núcleo da metilquercetina foram realizadas para os compostos presentes nos picos **47** (m/z 639), **63** (m/z 477), **66** (m/z 461) e para os isômeros dos picos **61** e **62** (m/z 623), por análise das perdas de 146 Da e/ou 162 Da, em seus espectros MS^n , atribuídas a saída de unidades de deoxihexosídeos e hexosídeos, respectivamente, além do íon fragmento em m/z 315 ou m/z 314, característico da aglicona metilquercetina.

Os picos **63** e **66** foram observados apenas em *E. pauferrense*, apresentando respectivamente os íons quasi-molecular em m/z 477 e 461, e fórmulas moleculares $C_{22}H_{22}O_{12}$ e $C_{22}H_{22}O_{11}$, nos espectros HR-ESI-MS. Após avaliação desses dados os compostos foram anotados, na referida ordem, como metilquercetina-3-O-hexosídeo

e metilquercetina-3-O-deoxihexosídeo. O primeiro metabólito mostrou uma perda de 162 Da, correspondente a hexose, já no segundo metabólito anotado foi observado a saída de uma porção com 146 Da, equivalente a unidade osídica deoxihexose, e em ambos os espectros MSⁿ a formação do fragmento íon base em m/z 315, característico da aglicona metilquercetina desprotonada, foi evidenciada. Nos espectros MS³ exibiram fragmentos em m/z 165, provavelmente formado por meio de clivagem retro-Diels-Alder no anel C, m/z 299 e m/z 271, que provavelmente são provenientes do íon m/z 314, devidamente gerado por fissão homolítica da ligação entre a aglicona metilquercetina e a unidade osídica. Por fim, o íon fragmento em m/z 299 se forma após a saída de um grupo metila, e em sequência ocorre a perda de CO gerando o fragmento em m/z 271 (LEI et al., 2018). A proposta da via de fragmentação da metilquercetina-3-O-hexosídeo está representada na Figura 32.

Figura 32 - Via de fragmentação proposta para a metilquercetina-3-O-hexosídeo.



O íon em m/z 639, presente no pico **47**, mostrou nos espectros HR-ESI-MS a fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{17}$ e nos MS^n exibiu uma fragmentação semelhante ao composto anotado como metilquercetina-3-*O*-hexosídeo, com o diferencial do fragmento suplementar em m/z 447 ($[M-162-H]^-$), provavelmente em decorrência da saída de uma unidade adicional de hexose. A perda em sequência de 162 Da indicou a saída de outra hexose, formando o fragmento da aglicona metilquercetina desprotonada em m/z 315 ($[M-162-162-H]^-$), a partir desses dados espectrais o composto foi anotado como metilquercetina-3-*O*-di-hexosídeo (BOUKHRIS et al., 2016).

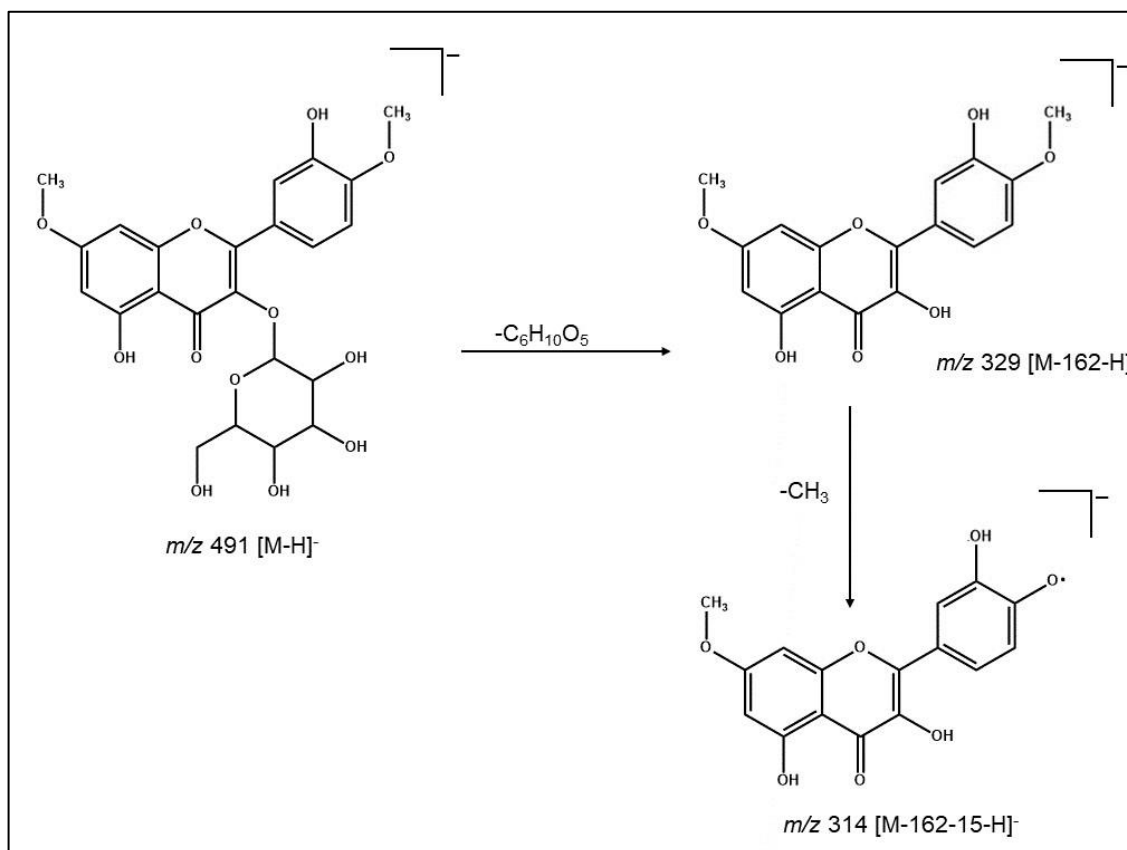
Os picos **61** e **62**, apresentaram o mesmo íon quasi-molecular (m/z 623) e fragmentos nos espectros MS^n , e foram anotados como sendo dois isômeros de metilquercetina-3-*O*-deoxihexose-hexosídeo. Para essa anotação foi analisada a fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{16}$ obtida nos experimentos HR-ESI-MS e os íons fragmentos em m/z 461 ($[M-162-H]^-$), após saída da hexose, m/z 315 ($[M-162-146-H]^-$), condizente com a aglicona metilquercetina desprotonada, gerada por meio da perda da deoxihexose (BARROS et al., 2011). Os dois isômeros foram assinalados em *E. pauferrense*, porém apenas o **62** foi evidenciado também nas espécies *E. simonis* e *E. pulchrum*.

Quatro picos em m/z 799 (pico **49**), m/z 653 (pico **60**), m/z 637 (pico **64**) e m/z 491 (pico **65**) foram anotados como sendo isômeros glicosilados derivado da dimetilquercetina, por apresentaram perdas características da saída de unidades osídicas e o fragmento em m/z 329 referente a aglicona dimetilquercetina desprotonada. Estudos já descreveram a presença de glicosídeos flavonoídicos derivados da dimetilquercetina, a exemplo da ombuína, composto relatado na espécie *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE et al., 2014).

O íon em m/z 491 (pico **65**), evidenciado somente em *E. pauferrense*, apresentou o fragmento íon base em m/z 329 ($[M-162-H]^-$), equivalente ao núcleo da dimetilquercetina desprotonado, gerado provavelmente após a saída da unidade osídica hexose. No espectro MS^3 do íon em m/z 329, foi observado o fragmento em m/z 314 ($[M-162-15-H]^-$), formado pela saída de uma metila, e o fragmento em m/z 271 ($[M-162-15-15-28-H]^-$), que provavelmente é originado do m/z 299 ($[M-162-15-15-H]^-$), gerado após a perda da segunda metila, seguido da saída de CO. Nos espectros HR-ESI-MS a fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_{12}$ obtida corroborou para a anotação do

composto como dimetilquercetina-3-O-hexosídeo (BRITO et al., 2014). A via de fragmentação sugerida pode ser observada na Figura 33.

Figura 33 - Via de fragmentação proposta para a dimetilquercetina-3-O-hexosídeo.



O íon do pico **64** (m/z 637), evidenciado nas três espécies, mostrou nos espectros MS^n uma perda de 308 Da, possivelmente gerado pela saída de uma hexose (162 Da) e um deoxihexose (146 Da). Foi observado ainda no espectro o fragmento íon base em m/z 329 ($[M-308-H]^-$), correspondendo a aglicona dimetilquercetina desprotonada, um fragmento em m/z 314 ($[M-308-15-H]^-$), provavelmente formado após perda de uma metila, m/z 299 ($[M-308-15-15-H]^-$), gerado pela saída de uma segunda metila e m/z 271 ($[M-308-15-15-28-H]^-$) após perda de CO. A partir desses dados espectrais esse composto foi anotado como dimetilquercetina-3-O-deoxihexose-hexosídeo (EL-ASKARY et al., 2019). A fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{16}$ observada nos espectros HR-ESI-MS corroborou com a anotação realizada.

O íon do pico **60** em m/z 653, exibido apenas por *E. paufferense*, apresentou fragmentação semelhante a dimetilquercetina-3-O-hexosídeo, porém mostrou uma

perda a mais de 162 Da, provavelmente pela saída de um unidade de hexose adicional, originando o fragmento em m/z 491 ($[M-162-H]^+$), que seguiu com o mesmo padrão de fragmentação da dimetilquercetina-3-O-hexosídeo, sendo assim, anotado como dimetilquercetina-3-O-di-hexosídeo. Os espectros HR-ESI-MS apontaram a fórmula molecular $C_{29}H_{34}O_{17}$, reforçando a anotação realizada.

O íon do pico **49** (m/z 799) mostrou em seus espectros HR-ESI-MS a fórmula molecular $C_{35}H_{44}O_{21}$, e em seus espectros MS^n foi observado a perda de 162 Da a mais em comparação com os espectro da dimetilquercetina-3-O-deoxihexose-hexosídeo, provavelmente devido a saída de uma unidade a mais de hexose, gerando o fragmento íon base em m/z 637 ($[M-162-H]^+$), que seguiu pela mesma via de fragmentação proposta para a dimetilquercetina-O-deoxihexose-hexosídeo. A partir das análises desses dados o composto foi anotado dimetilquercetina-3-O-di-hexose-deoxihexosídeo

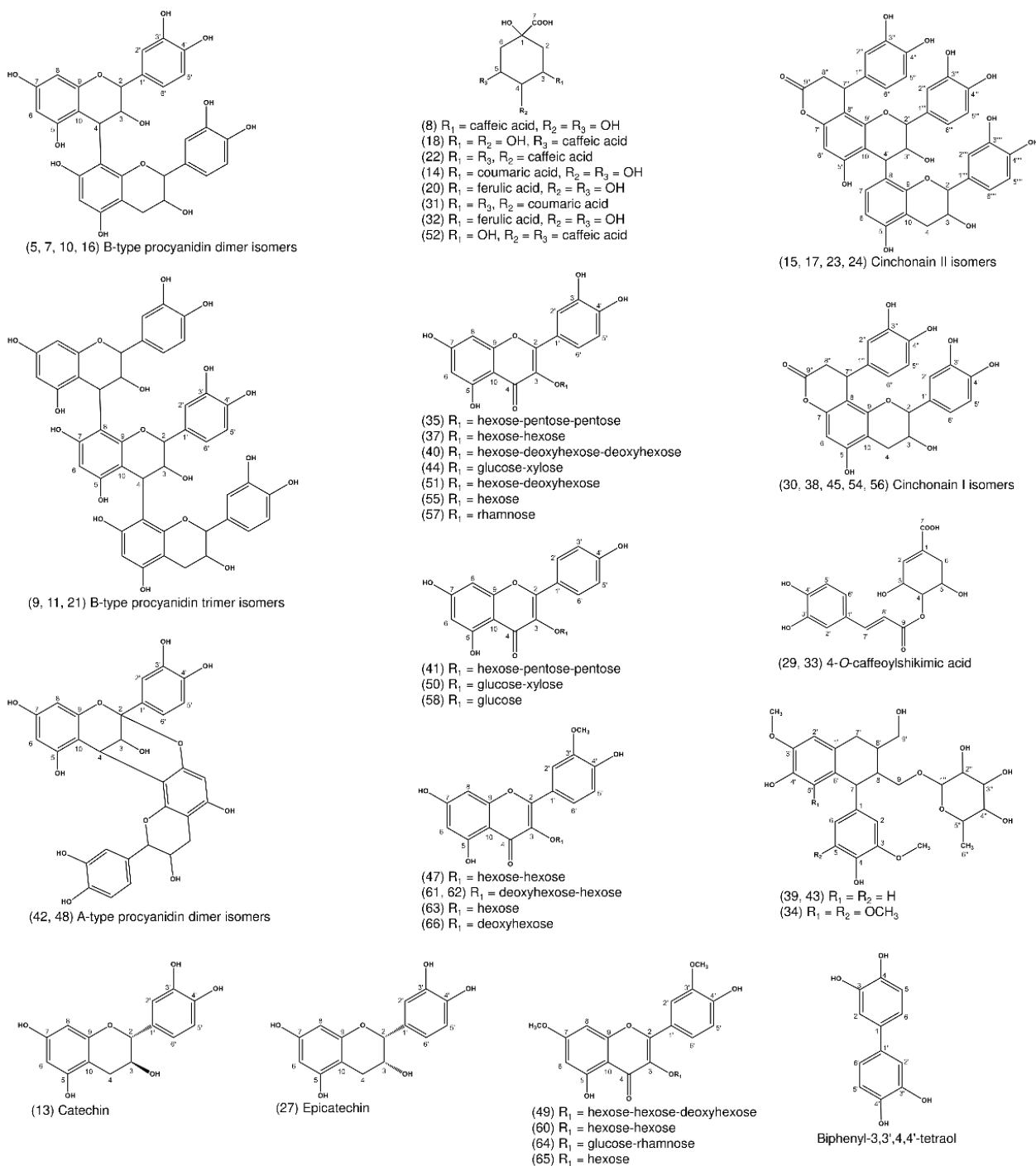
Os dados espectrais UV observados para os compostos anotados como O-glicosídeos de quercetina (UV λ_{max} : 253, 350 nm), canferol (UV λ_{max} : 243, 342 nm), metilquercetina (UV λ_{max} : 253, 340 nm) e dimetilquercetina (UV λ_{max} : 253, 352 nm) permitiu inferir que as unidades osídicas estariam inseridas na posição 3 da aglicona. Quando esta posição do flavonol se encontra substituída por unidades osídicas uma banda máxima em torno de 356 nm é observada, enquanto uma banda máxima em torno de 374 nm é evidenciada quando esta posição se encontra livre (FRACASSETTI et al., 2013). As estruturas químicas dos compostos anotados podem ser visualizadas na Figura 34.

Os 11 compostos que não puderam ser anotados provavelmente tratavam-se de metabólitos não fenólicos, uma vez que não foram evidenciadas absorções, nos espectros UV-Vis, nos comprimentos de onda de 220 e 254 nm. Também não foram observadas absorções em outros comprimentos de onda, podendo sugerir que esses compostos não apresentam grupos cromóforos, dificultando desta forma, o isolamento dos mesmos.

Diante dos dados obtidos no estudo de desreplicação, teve-se o interesse de isolar e determinar o composto que apresentou íon quasi-molecular em m/z 217 com tempo de retenção de 33.4 min. presente na fase acetato de etila de *E. simonis*, uma vez que os dados espectrais fornecidos não foram suficientes para seu assinalamento. E com o objetivo de definir quais os isômeros da cinchonaina I estavam presentes nas fases, estas substâncias também foram direcionadas para o isolamento, a caracterização

estrutural destes compostos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C está descrita a seguir.

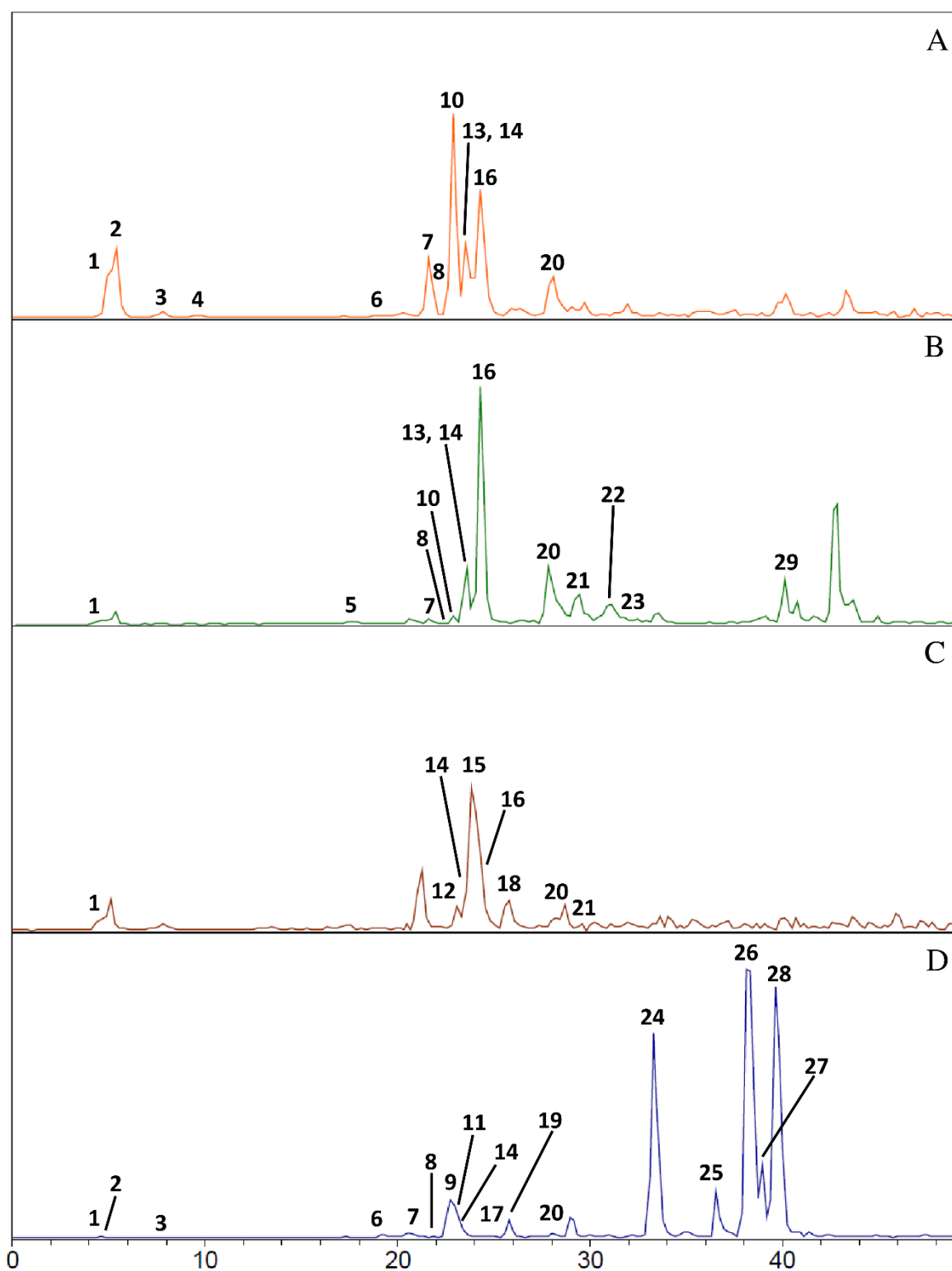
Figura 34 – Estrutura química dos compostos anotados nas fases acetato de etila e n-butanólica das espécies *E. simonis*, *E. paufferense* e *E. pulchrum*.



5.2. Análise das fases clorofórmicas por CLAE-ESI-MSⁿ

As fases clorofórmicas de *E. paufferense*, *E. pulchrum*, *E. simonis* e *E. revolutum* foram analisadas por HPLC-ESI-MSⁿ e HR-ESI-MS com o objetivo de traçar o perfil químico dos alcaloides tropânicos presentes. Foram anotados 29 compostos dessa classe a partir da investigação dos íons de suas moléculas protonadas, fórmulas moleculares, padrões de fragmentação e comparação dos dados obtidos com os presentes na literatura científica. Na Figura 35 estão representados os cromatogramas de pico de base das fases clorofórmicas das espécies de *Erythroxylum* e os picos correspondentes aos metabólitos anotados. As fórmulas moleculares, os principais íons fragmentos obtidos para esses compostos e suas anotações podem ser visualizados na Tabela 2.

Figura 35 - Cromatogramas de pico base (BPC) das fases clorofórmicas de *E. paufferense*, *E. simonis*, *E. pulchrum* e *E. revolutum*. A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 1.



Legenda: (A) Fase clorofórmica de *E. paufferense*. (B) Fase clorofórmica de *E. pulchrum*. (C) Fase clorofórmica de *E. simonis*. (D) Fase clorofórmica de *E. revolutum*.

Existe uma considerável variedade de alcaloides tropânicos distribuídos no reino vegetal, mais de 200 metabólitos dessa classe já foram descritos na literatura científica, a maioria apresentando substituições em seu núcleo central, azabíciclo[3.2.1]oct, nas posições C-2, C-3, C-6 ou C-7, frequentemente pela esterificação de ácidos carboxílicos. (REINA et al., 2010; DRAGER, 2002; ZHOU et al, 2017).

Foi observado a presença de alcaloides tropânicos com diferentes padrões de substituições em seu núcleo central, azabíciclo[3.2.1]oct, a exemplo dos monossustituídos na posição C-3, dissustituídos nas posições C-3 e C-6, trissustituídos nas posições C-3, C-6 e C-7, além de alcaloides tropânicos com o grupo epóxi no anel tropano e um do tipo nortropano. O maior número e variedade desses metabólitos foi anotado na fase clorofórmica de *E. revolutum*, com o total de 17 compostos, seguido de *E. pulchrum* com 13, *E. pauferrense* com 12 e por fim *E. simonis* com apenas 8 compostos anotados. As espécies que apresentaram maior semelhança entre seus perfis foram *E. pauferrense* e *E. revolutum* e entre *E. pauferrense* e *E. pulchrum*, com oito compostos em comum, já *E. simonis* apresentou cinco compostos em comum com *E. pulchrum*, sendo a espécie de maior similaridade com o seu perfil de alcaloides tropânicos. Na Tabela 2 também revela as respectivas espécies em que cada composto foi anotado.

Tabela 2. Compostos anotados nas fases clorofórmicas de *E. paufferrense*, *E. pulchrum*, *E. simonis* e *E. revolutum*.

Pico	R.T.	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Fórmula Molecular	Calculada	Erro (ppm)	MS ² /MS ³	Compostos anotados	Espécies	Referência
1	5.2	158.1176	C ₈ H ₁₅ NO ₂	158.1176	-0.5	MS ² [158]: 140 (100); 122 (18); 112 (53.8); 114 (36.5); 98 (98.8); 91 (23); 81 (88.3); 74 (82.7)/MS ³ [158→140]: 122 (77.4); 109 (100); 91 (30.2)	3,6-dihidroxitropano	<i>E. paufferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i> <i>E. revolutum</i>	CINELLI; JONES, 2021.
2	5.4	200.1272	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	200.1281	4.5	MS ² [200]: 182 (63.2); 140 (100); 122 (12.8); 109 (30.3); 91 (13); 79 (15.5)/MS ³ [200→140]: 122 (73.3); 110 (38.8); 109 (100); 94 (98.7); 91 (82.6); 79 (37.7)	Isômero 3-acetoxi-6-hidroxitropano	<i>E. paufferrense</i> <i>E. revolutum</i>	JOUSSE et al., 2009.
3	7.9	200.1286	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	200.1281	-2.5	MS ² [200]: 182 (48.2); 140 (100); 122 (11.7); 109 (31.5); 91 (11.45); 79 (15.5)/MS ³ [200→140]: 122 (33.9); 109 (47.6); 96 (100); 94 (48.6); 91 (38.7)	Isômero 3-acetoxi-6-hidroxitropano	<i>E. paufferrense</i> <i>E. revolutum</i>	JOUSSE et al., 2009.
4	9.6	200.1287	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	200.1281	-3.0	MS ² [200]: 182 (20.7); 140 (100); 122 (4.3); 96 (24.1); 91 (3.1)/MS ³ [200→140]: 122 (6.8); 109 (1.9); 96 (100); 91 (2.1)	Isômero 3-acetoxi-6-hidroxitropano	<i>E. paufferrense</i>	JOUSSE et al., 2009.
5	17.7	338.1598	C ₁₇ H ₂₃ NO ₆	338.1598	0.1	MS ² [338]: 320 (59.5); 181 (87.3); 140 (100)/MS ³ [338→140]: 122 (23.8); 96 (100); 91 (7); 82 (32)	Isômero 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropan-6-ol	<i>E. pulchrum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
6	19.3	292.1553	C ₁₆ H ₂₁ NO ₄	292.1543	-3.3	MS ² [292]: 274 (5.2); 140 (100); 122 (12.7)/MS ³ [292→140]: 122 (100); 109 (18.9); 91 (32.9)	3-mandeloiloxi-6-hidroxitropano	<i>E. paufferrense</i> <i>E. revolutum</i>	DU et al., 2019
7	21.6	338.1613	C ₁₇ H ₂₃ NO ₆	338.1598	-4.4	MS ² [338]: 181 (19); 140 (100); 122 (4.2)/MS ³ [338→140]: 122 (100); 109 (16.5); 91 (38.1)	Isômero 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropan-6-ol	<i>E. paufferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
8	21.9	278.1395	C ₁₅ H ₁₉ NO ₄	278.1387	-3.0	MS ² [278]: 260 (15.1); 156 (56.0); 120 (3); 138 (100); 110 (30.5)/MS ³ [278→138]: 120 (3.2); 110 (100); 94 (4)	3-(benzoiloxi)tropan-6,7-diol	<i>E. paufferrense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
9	22.8	276.1606	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	276.1594	-4.4	MS ² [276]: 140 (100); 122 (12.9)/MS ³ [276→140]: 122 (100); 109 (18.3); 91 (37.8)	Isômero 3-fenilacetoxi-6-hidroxitropano	<i>E. revolutum</i>	CHRISTEN et al., 1995.

10	22.9	338.1582	C ₁₇ H ₂₃ NO ₆	338.1598	4.8	MS ² [338]: 320 (62.1); 181 (78.9); 140 (100); 122 (1.4)/MS ³ [338→140]: 122 (8.1); 96 (100); 91 (2); 82 (22.4)	Isômero 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropan-6-ol	<i>E. paufferense</i> <i>E. pulchrum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
11	23.0	262.1446	C ₁₅ H ₁₉ NO ₃	262.1438	-3.3	MS ² [262]: 140 (100); 122 (20.8)/MS ³ [262→140]: 122 (100)	3-benzoiloxitropan-6-ol	<i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
12	23.1	240.1578	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	240.1592	6.6	MS ² [240]: 222 (33); 140 (100); 122 (3.1); 96 (18.9)/MS ³ [240→140]: 122 (4.7); 96 (100); 82 (21.8)	3-tigloiloxi-6-hidroxitropano	<i>E. simonis</i>	JOUSSE et al., 2009.
13	23.6	265.1535	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	265.1547	4.4	MS ² [265]: 247 (29.1); 203 (10.6); 140 (100); 122 (3.9); 108 (7.6); 96 (7.9)/MS ³ [265→140]: 122 (8.7); 96 (100); 82 (21.8)	6-hidroxi-3-(1-metil-1H-pirrol-2-il-carboniloxi)tropano	<i>E. paufferense</i> <i>E. pulchrum</i>	ZANOLARI et al., 2005
14	23.6	322.1661	C ₁₇ H ₂₃ NO ₅	322.1649	-3.8	MS ² [322]: 156 (10.5); 124 (100)/MS ³ [322→124]: 93 (100)	3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropano	<i>E. paufferense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i> <i>E. revolutum</i>	PEREIRA et al., 2018.
15	23.8	304.1537	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.1543	2.1	MS ² [304]: 286 (100); 156 (74.4); 138 (51.2) 110 (0.8)/MS ³ [304→286]: 156 (3.7); 138 (100)	Isômero escopolamina	<i>E. simonis</i>	CHEN et al., 2005.
16	24.3	308.1483	C ₁₆ H ₂₁ NO ₅	308.1492	3.1	MS ² [308]: 181 (100); 126 (12.5); 110 (70.9)/MS ³ [308→181]: 171 (98.9); 153 (100)	3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropano	<i>E. paufferense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	MOREIRA et al., 2021.
17	25.4	276.1603	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	276.1594	-3.3	MS ² [276]: 140 (100); 122 (20.8)/MS ³ [276→140]: 122 (100); 91 (34.8)	Isômero do 3-fenilacetoxi-6-hidroxitropano	<i>E. revolutum</i>	CHRISTEN et al., 1995.
18	25.8	304.1542	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.1543	0.5	MS ² [304]: 286 (100); 274 (0.7); 156 (37); 138 (30.6); 131 (2.3); 110 (1)/MS ³ [304→286]: 138 (100)	Isômero escopolamina	<i>E. simonis</i>	CHEN et al., 2005.
19	25.8	352.1769	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352.1755	-4.0	MS ² [352]: 195 (29.9); 140 (100)/MS ³ [352→140]: 122 (100); 109 (22.2); 91 (31)	3-(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)tropan-6-ol	<i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
20	28.1	246.1499	C ₁₅ H ₁₉ NO ₂	246.1489	-4.3	MS ² [246]: 124(100)/MS ³ [246→124]: 93 (100); 82 (66); 67 (26.8)	3-benzoiloxitropano	<i>E. paufferense</i> <i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i> <i>E. revolutum</i>	RUBIO et al., 2018.
21	29.5	322.2028	C ₁₈ H ₂₇ NO ₄	322.2013	-4.7	MS ² [322]: 222 (7); 140 (100); 122 (8.4)/MS ³ [322→140]: 122 (100); 96 (28.9); 91 (38.2)	Isômero 3,6-ditigloiloxitropano	<i>E. pulchrum</i> <i>E. simonis</i>	JOUSSE et al., 2009.

22	30.9	322.2026	C ₁₈ H ₂₇ NO ₄	322.2013	-4.2	MS ² [322]: 222 (2); 140 (100); 122 (4.9)/MS ³ [322→140]: 122 (100); 96 (20.4); 91 (35.3)	Isômero 3,6-ditigloiloxitropano	<i>E. pulchrum</i>	JOUSSE et al., 2009.
23	31.4	306.1696	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.1700	1.3	MS ² [306]: 142 (12.6); 124(100)/MS ³ [306→124]: 93 (100)	3-(3',4'-dimetoxi)benzoiloxitropano	<i>E. pulchrum</i>	CHRISTEN et al., 1993.
24	33.3	442.1861	C ₂₄ H ₂₇ NO ₇	442.1860	-0.1	MS ² [442]: 320 (9); 244 (100); 181 (70.3)/MS ³ [442→244]: 122 (100); 91 (61.3)	C-(benzoiloxi)-C-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano*	<i>E. revolutum</i>	
25	36.6	426.1922	C ₂₄ H ₂₇ NO ₆	426.1911	-2.6	MS ² [426]: 304 (8.6); 244 (100); 165 (45.4)/MS ³ [426→244]: 122 (100); 91 (50.8)	C-(benzoiloxi)-C-(3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	<i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
26	38.1	456.2019	C ₂₅ H ₂₉ NO ₇	456.2017	-0.5	MS ² [456]: 334 (11.7); 244 (100); 195 (95.7)/MS ³ [456→244]: 122 (100); 91 (48.7)	C-(benzoiloxi)-C-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropano 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropano*	<i>E. revolutum</i>	
27	39.0	366.1717	C ₂₂ H ₂₃ NO ₄	366.1700	-4.7	MS ² [366]: 244(100)/MS ³ [366→244]: 122 (100); 91 (40.4)	3,6-dibenzoiloxitropano	<i>E. revolutum</i>	OLIVEIRA et al., 2011.
28	39.6	482.2172	C ₂₇ H ₃₁ NO ₇	482.2173	0.2	MS ² [482]: 360 (13.7); 244 (93.5); 221 (100)/MS ³ [482→221]: 206 (44); 193 (100)	C-(benzoiloxi)-C-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano*	<i>E. revolutum</i>	
29	40.4	306.1686	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.1700	4.5	MS ² [306]: 288 (5); 140(100); 122 (10.1)/MS ³ [306→140]: 122 (100); 91 (41.2)	Anisodamina	<i>E. pulchrum</i>	CHEN et al., 2005.

*Identificado por RMN de ¹H and ¹³C.

A espectroscopia UV-Vis é uma ferramenta amplamente empregada na detecção de alcaloides tropânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, nessa técnica o monitoramento desses metabólitos é realizado no comprimento de onda de 210 nm, porém absorções em maiores comprimentos de onda também podem ocorrer, especialmente quando esses compostos possuem, em sua estrutura, um ou mais anel aromático. Por este motivo, outros metabólitos secundários contendo grupos cromóforos como flavonoides, lignoides e terpenoides, presentes na mesma matriz biológica, podem interferir e dificultar esse monitoramento (ZANOLARI et al, 2003; CINELLI, JONES, 2021). A maioria dos compostos anotados apresentaram nos espectros UV-Vis absorbâncias máximas variando entre 234 e 281 nm, a partir dessas análises pode-se concluir que suas estruturas químicas provavelmente apresentam grupos cromóforos semelhantes e que possivelmente compartilham um esqueleto básico central similar, apenas os compostos anotados para os picos **24** a **28** apresentaram maiores absorbâncias máximas que variaram de 210 a 308 nm.

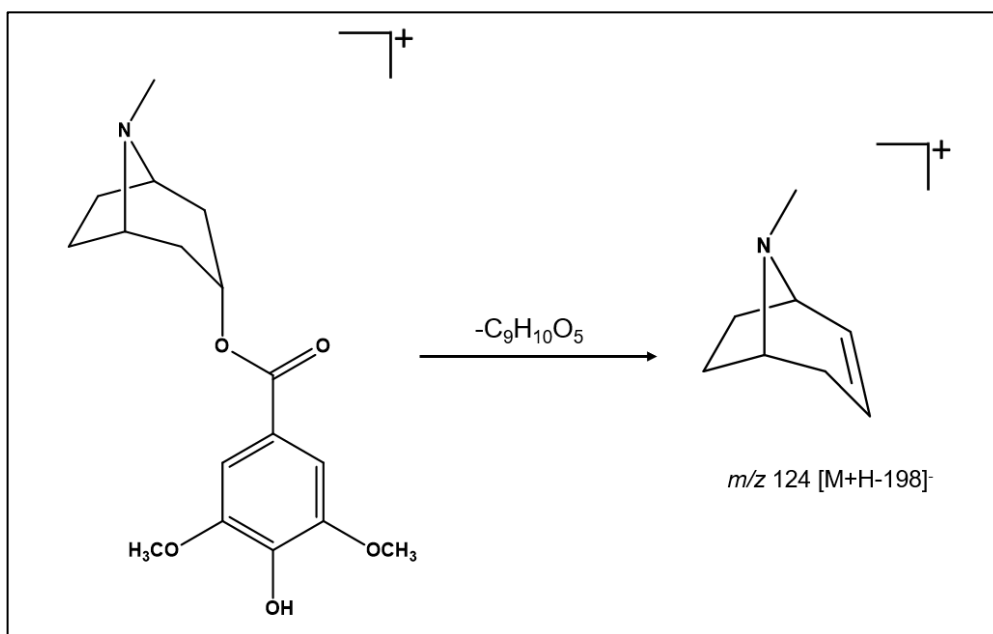
Estudos realizados por Zhou e colaboradores em 2016 avaliou por LC-ESI-MSⁿ, no modo positivo, os principais íons fragmentos gerados por alcaloides tropânicos com diferentes padrões de substituições em seu anel central. Esse trabalho auxiliou na determinação da classe de alcaloides tropânicos e posições de inserção dos grupos ácidos carboxílicos e hidroxilas no núcleo tropânico dos metabólitos anotados. Em suas observações, Zhou destaca os íons fragmentos em m/z 142 e m/z 124 para os compostos com anel tropânico monossustituído na posição C-3, para essa proposta a atropina foi empregada como composto padrão. A *D/L*-anisodamina, alcaloide substituído nas posições C-3 e C-6 pela esterificação de um ácido carboxílico e pela inserção de um grupo hidroxila, respectivamente, foi utilizada como o segundo composto padrão e gerou os íons fragmentos diagnóstico em m/z 158, m/z 140 e m/z 122. Por fim a escopolamina foi a molécula padrão para os metabólitos com o grupo epóxi no esqueleto central e uma substituição no carbono C-3, sendo obtidos os íons diagnósticos em m/z 156 e m/z 138 (ZHOU et al, 2016).

Um padrão de fragmentação característico de núcleo tropano monossustituído na posição C-3 foi evidenciado para o composto do pico **14**, presente nas quatro espécies do estudo e que exibiu o íon quasi-molecular em m/z 322. De acordo com Cinelli e Jones em 2021, os fragmentos típicos de alcaloides tropânicos esterificados apenas nesta posição correspondem a m/z 142, resultante da clivagem da ligação C-O entre o carbono carbonílico e o oxigênio da função éster, m/z 124, produzido a partir

da quebra da ponte entre o carbono C-3 e o oxigênio do substituinte promovendo a saída neutra de um ácido fenólico, m/z 93 e m/z 91, que são gerados após a perda da metilamina (NH_2CH_3) e subsequente desidrogenação (CINELLI E JONES, 2021; ZHOU et al 2016).

O íon diagnóstico em m/z 124 ($[\text{M}+\text{H}-198]^+$) produzido a partir do íon da molécula desprotonada em m/z 322 (pico **14**), indicou que o substituinte provavelmente se tratava do ácido sirínico cuja fórmula molecular é $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$, também foram visualizados os fragmentos em m/z 93 ($[\text{M}+\text{H}-198-31]^+$) e m/z 91($[\text{M}+\text{H}-198-31-2]^+$), correspondentes a saída da metilamina e desidrogenação do núcleo tropano, respectivamente. Essas informações em conjunto com os dados da literatura e com os experimentos HR-ESI-MS, que forneceram a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_5$, foram suficientes para presumir que o alcaloide em questão seria o 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropano (pungencina) (MOREIRA et al, 2021; PEREIRA 2018). A presença desse metabólito no gênero *Erythroxylum* já foi relatada anteriormente para a espécie *Erythroxylum pungens* O. E. Shulz, no entanto está sendo descrito pela primeira vez para as quatro espécies analisadas (SENA-FILHO et al, 2010; PEREIRA et al, 2018; MOREIRA et al, 2021). Foi constatado por meio de estudos em anéis da artéria mesentérica de ratos que a pungencina apresenta efeito vasorelaxante (OLIVEIRA et al, 2012). A via de fragmentação sugerida para esse alcaloide com núcleo tropano monossustituído pode ser observada na Figura 36.

Figura 36 - Via de fragmentação proposta para a pungencina.



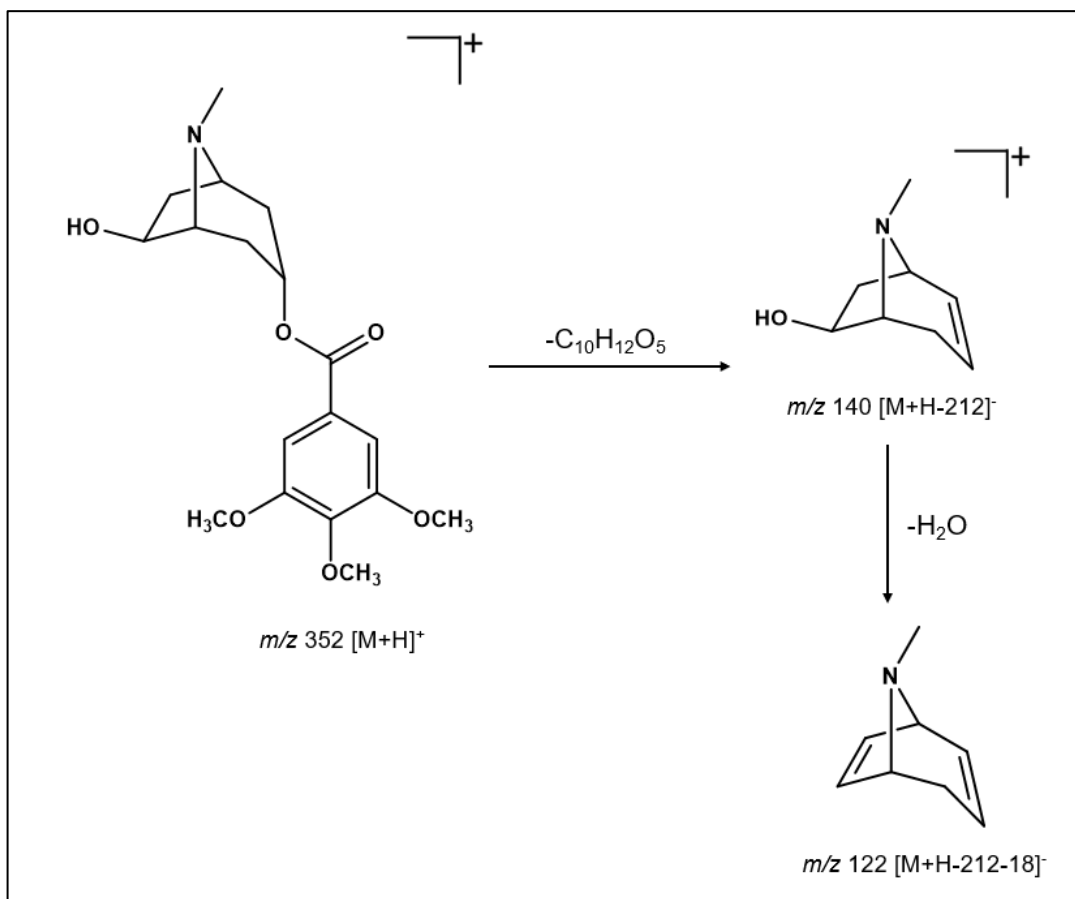
Para o pico **20** (m/z 246) a perda de 122 Da originando o íon base em m/z 124 ($[M+H-122]^+$) indicou que o substituinte provavelmente se tratava do ácido benzóico, também foi visualizado o fragmento em m/z 93 ($[M+H-122-31]^+$), correspondentes a saída da metilamina. De acordo com esses dados o composto foi anotado como 3-benzoiloxitropano (tropococaina), em adição a análise HR-ESI-MS apontou para uma fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO_2$, corroborando com o assinalamento proposto. A tropococaína está sendo relatada pela primeira vez para as quatro espécies desse estudo, no entanto é um fitoconstituente com larga distribuição no gênero *Erythroxylum*, e que exibe efeito anestésico local (LIU et al, 2016; RUBIO et al, 2019; OLIVEIRA et al, 2010; ZHOU et al, 2019).

O composto em m/z 306 (pico **23**), observado apenas em *E. pulchrum*, mostrou fragmentos semelhantes aos comentados anteriormente, m/z 124 ($[M+H-182]^+$), decorrente da saída neutra de uma porção $C_9H_{10}O_4$, equivalente ao ácido verátrico, subsequentemente ocorre a perda da metilamina do núcleo tropano gerando o fragmento em m/z 93 ($[M+H-182-31]^+$), e após desidrogenação é produzido o íon em m/z 91 ($[M+H-182-31-2]^+$). Diante dos dados exibidos suspeitou-se que o composto correspondia ao 3-(3',4'-dimetoxibenzoiloxi)tropano (convolamina), já descrito anteriormente na espécie *Erythroxylum zambeziacum* N. Robson, porém sendo mencionado pela primeira vez em *E. pulchrum* (CHRISTEN et al, 1993; OLIVEIRA et al, 2010). A fórmula molecular $C_{17}H_{23}NO_4$ obtida por meio dos espectros HR-ESI-MS deu suporte para sua previa identificação. A convolamina tem demonstrado efeito sedativo, agindo de forma semelhante aos agonistas GABA-A, além das atividades imunomoduladora e antiinflamatória (BALKRISHNA et al, 2020; SIDDIQUI et al, 2014; GAPPAROV et al, 2011).

A maioria dos metabólitos secundários anotados apresentaram o padrão de fragmentação de alcaloides tropanicos dissustituídos, teoricamente pela inserção de grupos nas posições C-3 e C-6. Os principais íons diagnósticos gerados são m/z 140 e m/z 122, respectivamente, decorrentes da saída neutra do substituinte esterificado seguido de desidratação. Outros fragmentos gerados por LC-ESI-MSⁿ para esses compostos são o m/z 91, obtido a partir da perda da metilamina do núcleo tropano, e algumas vezes quando ocorre a quebra da ligação C-O entre o carbono carbonílico e o oxigênio da função éster o íon em m/z 158 é adquirido, porém com intensidade baixa (CINELLI E JONES, 2021; ZHOU et al, 2016; ZANOLARI et al, 2003).

Por exemplo, o composto do pico **19**, visualizado apenas em *E. revolutum*, cujo íon da molécula protonada foi m/z 352 e a fórmula molecular obtida nos espectros HR-ESI-MS foi $C_{18}H_{25}NO_6$, apresentou fragmentação característica de alcaloides tropânicos dissustituídos, os íons em m/z 140 ($[M+H-212]^+$), produzido após saída neutra do ácido esterificado, em m/z 122 ($[M+H-212-18]^+$) resultante da subsequente desidratação e em m/z 91 ($[M+H-212-18-31]^+$), originado após saída da metilamina. Estes íons diagnóstico em conjunto com o fragmento em m/z 195, correspondente a porção do substituinte após quebra da ligação C-O entre o carbono carbonílico e o oxigênio da função éster, indicaram que o composto supostamente apresentava esterificação pelo ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (212 Da) na posição C-3 e a inserção de uma hidroxila no carbono C-6, se tratando do 3-(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)tropan-6-ol, relatado em estudo com a espécie *Erythroxylum caatingae* Plowman, no entanto, inédito para *E. revolutum* (OLIVEIRA et al, 2011). A via de fragmentação sugerida para esse alcaloide com núcleo tropânio dissustituído pode ser visualizada na Figura 37.

Figura 37 - Via de fragmentação proposta para o 3-(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)tropan-6-ol.



O composto do pico **1** (m/z 158), detectado nas quatro espécies, apresentou a fórmula molecular $C_8H_{15}NO_2$ nos espectros HR-ESI-MS e nos espectros MS^n reproduziu o modelo de fragmentação do núcleo tropano dissustituído, logo a inserção de dois grupos OH foi presumida e o composto foi anotado como sendo o 3,6-dihidroxitropane. Em seu espectro MS^2 foram observados os íons filhos em m/z 140 ($[M+H-18]^+$) e m/z 122 ($[M+H-18-18]^+$), derivados de seguidas desidratações, corroborando com a presença das hidroxilas no núcleo tropano, que posteriormente perde a metilamina formando o fragmento em m/z 91 ($[M+H-18-18-31]^+$) (CINELLI E JONES, 2021; CHEN et al, 2005). O 3,6-dihydroxytropano é um precursor para diversos alcaloides tropânicos e já foi descrito para espécies como *Erythroxylum coca* Lam., *Erythroxylum novogranatense* (D.Morris) Hieron e *Erythroxylum monogynum* Roxb. e agora está sendo retratado nas espécies aqui analisadas (EVANS et al, 1981; OLIVEIRA et al, 2010).

Três isômeros do alcaloide 3-acetoxi-6-hidroxitropano (m/z 200, picos **2**, **3** e **4**) foram evidenciados em *E. pauferrense*, e apenas dois em *E. revolutum*, os isômeros exibiram o mesmo padrão de fragmentação impossibilitando sua diferenciação com os dados espectrais adquiridos. A saída de 60 Da foi um indicador da presença do grupo acetoxi na molécula, promovendo a formação do íon em m/z 140 ($[M+H-60]^+$) que em seguida perde o radical hidroxil por desidratação originando o fragmento em m/z 122 ($[M+H-60-18]^+$) e por meio da retirada da metilamina do núcleo o íon m/z 91 ($[M+H-60-18-31]^+$) é gerado(JOUSSE et al, 2009). Em conformidade com sua previa identificação os espectros HR-ESI-MS apontaram para a fórmula molecular $C_{10}H_{17}NO_3$.

Foi evidenciada a presença de três derivados dissustituídos da pungencina (picos **5**, **7** e **10**; m/z 338), alcaloide anotado para o pico **14** (m/z 322), uma vez que foi observada a perda característica de 198 Da, equivalente a saída do ácido siríngico ($C_9H_{10}O_5$), formando o fragmento em m/z 140 ($[M+H-198]^+$), o íon em m/z 122 ($[M+H-198-18]^+$) também foi revelado, sendo adquirido por perda da hidroxila livre por desidratação. Outra evidência que reforçou esse prévio assinalamento foi obtida por meio das análises dos espectros HR-ESI-MS, que apontaram para a fórmula molecular $C_{17}H_{23}NO_6$, que detém apenas um oxigênio a mais quando comparada à fórmula molecular da pungencina (MOREIRA et al., 2021; PEREIRA et al., 2018). A partir dos dados espectrais obtidos para estes metabólitos sugeriu-se suas

identificações como isômeros I, II e III do composto 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzoiloxi)tropan-6-ol.

O composto em m/z 292 (pico **6**), evidenciado em *E. paufferense* e *E. revolutum*, foi tentativamente assinalado como 3-mandeloil-oxi-6-hidroxitropano, uma vez que mostrou uma perda de 152 Da, referente a saída neutra de uma porção $C_8H_8O_3$ condizente ao ácido mandélico, gerando o íon em m/z 140 ($[M+H-152]^+$), os fragmentos em m/z 122 ($[M+H-152-18]^+$) e m/z 91 ($[M+H-152-18-31]^+$) foram obtidos após perda do grupo hidroxil livre e saída da metilamina do núcleo tropano, respectivamente (DU et al, 2019). A fórmula molecular $C_{16}H_{21}NO_4$ foi revelada a partir dos espectros HR-ESI-MS, corroborando com a previa identificação estabelecida. Este metabólito já foi identificado na espécie *Scopolia tangutica*, no entanto não foram encontrados relatos na literatura sobre sua presença no gênero *Erythroxylum* (DU et al, 2019).

Foi observado a presença de dois isômeros do alcaloide 3-fenilacetoxi-6-hidroxitropano (m/z 276, picos **9** e **17**) após análise dos fragmentos gerados pelo íon da molécula protonada e dos espectros HR-ESI-MS, através do qual foi obtida a fórmula molecular $C_{16}H_{21}NO_3$. Estes compostos estão sendo evidenciados pela primeira vez em *E. revolutum*, no entanto estudos anteriores já relataram sua presença em outras espécies do gênero, como *Erythroxylum monogynum*, *Erythroxylum hypericifolium* Lam. e *Erythroxylum zambeziacum* (OLIVEIRA et al, 2010; CHRISTEN et al, 1995). O fragmento em m/z 140 ($[M+H-136]^+$) correspondeu a saída neutra do ácido fenilacético ($C_8H_8O_2$) e os íons em m/z 122 ($[M+H-136-18]^+$) e m/z 91 ($[M+H-136-18-31]^+$) foram produzidos pela subsequente desidratação e perda da metilamina do núcleo tropano, nessa ordem.

Os fragmentos formados a partir da quebra do íon da molécula protonada em m/z 262 (pico **11**), suficientes para sugerir sua identificação como sendo o 3-benzoiloxitropano-6-ol, foram o m/z 140 ($[M+H-122]^+$) e m/z 122 ($[M+H-122-18]^+$) decorrentes da perda neutra do ácido benzóico ($C_7H_6O_2$), com saída de 122 Da, seguido de desidratação. Os espectros HR-ESI-MS indicou a fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO_3$, reforçando seu assinalamento. Este metabólito está sendo apontado pela primeira vez em *E. revolutum*, única espécie do estudo em que sua presença foi evidenciada, porém outros trabalhos já apontaram sua existência em outras espécies do gênero, tais como *Erythroxylum sideroxyloides* Lam. e *Erythroxylum hypericifolium* (AL-SAID et al, 1986; AL-SAID et al, 1989).

O alcaloide do pico **13** (m/z 265) foi anotado como 6-hidroxi-3-(1-metil-1H-pirrol-2-il-carboniloxi)tropano (catuabina I), os espectros HR-ESI-MS apontaram para a fórmula molecular $C_{14}H_{20}N_2O_3$, condizente com a estrutura proposta, e os fragmentos obtidos a partir do íon da molécula protonada foram característicos de substituições nos carbonos C-3 e C-6, possivelmente com um grupo hidroxil livre nesta última (CINELLI E JONES, 2021; ZHOU et al, 2016; ZANOLARI et al, 2003). A saída de 125 Da gerou o íon base no espectro MS^2 em m/z 140 ($[M+H-125]^+$), referente a perda neutra do ácido 1-metil-1H-pirrol-2-carboxílico ($C_6H_7NO_2$), e a consecutiva desidratação do núcleo produziu o íon em m/z 122 ($[M+H-125-18]^+$), outro fragmento abundante no espectro MS^2 foi o m/z 247 ($[M+H-18]^+$), adquirido pela saída inicial de H_2O (ZANOLARI et al, 2003; ZANOLARI et al, 2005). A catuabina I já foi isolada e descrita na espécie *Erythroxylum vacciniifolium* Mart., porém está sendo apontada pela primeira vez em *E. paufferense* e *E. pulchrum* (ZANOLARI et al, 2005).

O alcaloide do pico **29** (m/z 306) forneceu através dos espectros HR-ESI-MS a mesma fórmula molecular do alcaloide do pico **14**, $C_{17}H_{23}NO_4$, porém diferiu em seus íons diagnósticos, originando fragmentos característicos de um núcleo tropano dissustituído. O composto foi anotado como 6-hidroxihiosciamina (anisodamina), este metabólito de acordo com a literatura apresenta os seguintes íons filhos, m/z 288 ($[M+H-18]^+$), originado após desidratação, m/z 140 ($[M+H-166]^+$), íon mais abundante adquirido com a saída neutra de uma porção $C_9H_{10}O_3$ (166 Da), equivalente ao ácido trópico, m/z 122 ($[M+H-166-18]^+$), obtido com a perda do radical hidroxil por desidratação, e por fim o íon em m/z 91 ($[M+H-166-18-31]^+$), gerado pela saída da metilamina (CHEN et al, 2005). A anisodamina é um derivado natural da atropina com ação anticolinérgica, no presente estudo este composto foi observado apenas em *E. pulchrum*, sendo inédito na espécie, é importante salientar que não foram encontrados relatos sobre este metabólito no gênero *Erythroxylum*, sendo necessário mais estudos para confirmar sua presença (POUPKO et al, 2006).

Derivados esterificados com grupos tigloil, também foram assinalados a partir das análises dos picos **12**, **21** e **22**. Esses derivados são reconhecidos por perdas neutras de 100 Da, condizente com a saída do substituinte tigloil na configuração de ácido 2-metil-2-butenóico ($C_5H_8O_2$) (CINELLI E JONES, 2021). Considerando essas informações, o composto do pico **12** apresentou íon quasi-molecular em m/z 240 e fragmento íon base em m/z 140 ($[M+H-100]^+$), uma vez a saída de 100 Da foi observada presumiu-se que a molécula em questão possuía uma unidade tigloil e o

fragmento em m/z 122 ($[M+H-100-18]^+$), originado por desidratação, evidenciou um segundo substituinte no núcleo tropano, sendo este o grupo hidroxila. Diante dos dados examinados o composto foi anotado como sendo o 3-tigloiloxi-6-hidroxitropano, constatado apenas em *E. simonis*, o espectro HR-ESI-MS foi compatível com o assinalamento realizado, uma vez que forneceu a fórmula molecular $C_{13}H_{21}NO_3$, este composto já foi observado para a espécie *Erythroxylum australe* (JOUSSE et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2010).

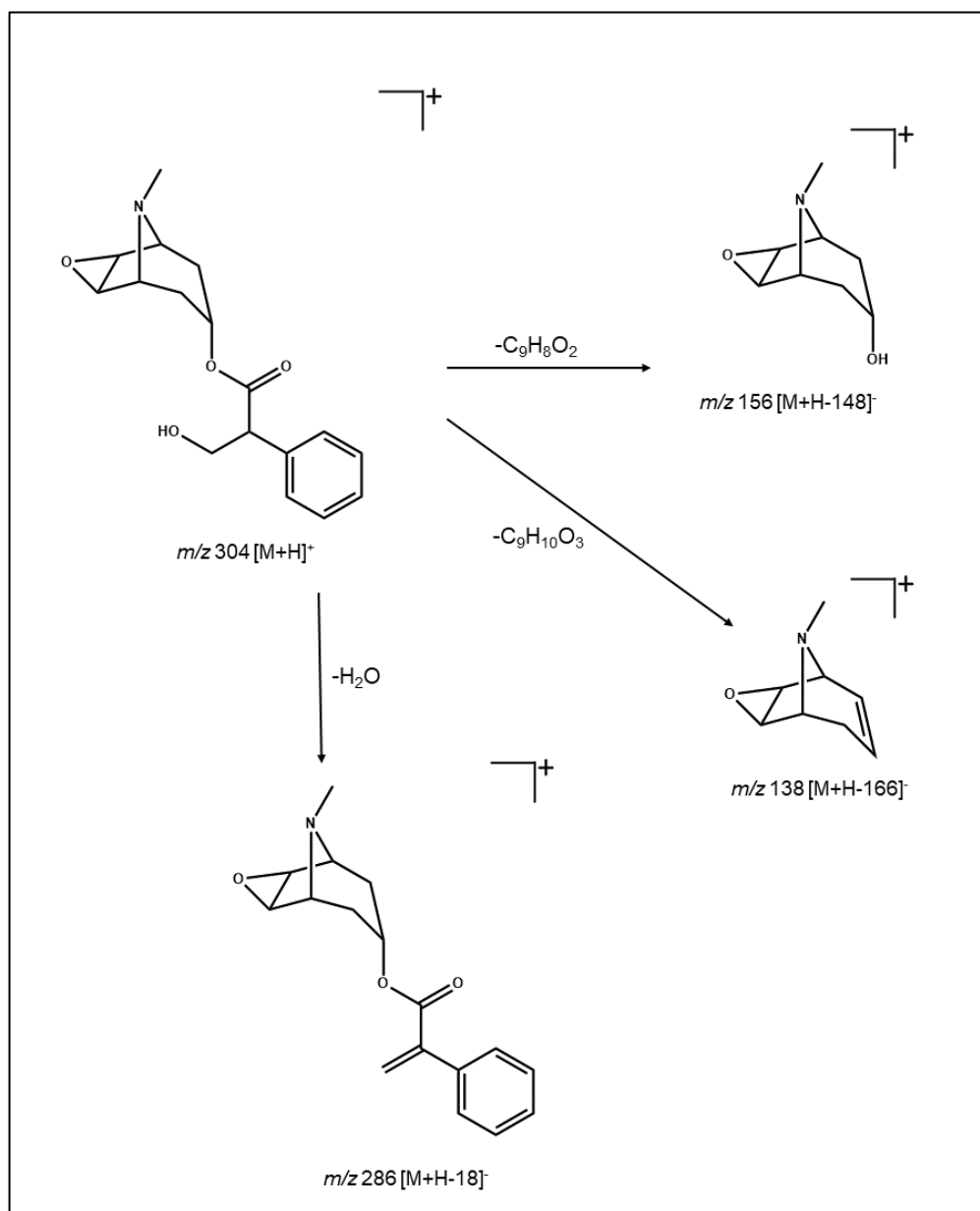
Os picos **21** e **22** exibiram o íon molecular protonado em m/z 322, o que poderia corresponder a regioisômeros do alcaloide 3,6-ditigloiloxitropano, inéditos para o gênero, os dois compostos foram evidenciados na espécie *E. pulchum*, porém apenas o **21** estava presente em *E. simonis*, e não foram visualizados nos espectros de *E. paufferense* e *E. revolutum*. Os dois íons precursores não mostraram diferenças relativas em seus espectros MS^n exibindo os mesmos íons filhos de um núcleo tropano dissustituído. Os fragmentos em m/z 222 ($[M+H-100]^+$) e em m/z 122 ($[M+H-100-100]^+$), foram condizentes com a perda de duas unidades tigloil, que em conjunto com a fórmula molecular $C_{18}H_{27}NO_4$ obtida através das análises HR-ESI-MS, justificaram o seu prévio assinalamento (JOUSSE et al, 2009).

Durante as análises dos espectros MS^n obtidos da espécie *E. simonis* levantou-se a hipótese da presença de dois isômeros da escopolamina, alcaloide que possui um grupo epóxi no anel tropano nas posições C-6 e C-7 (BAROS et al, 2010). Essa diferença estrutural garante um padrão de fragmentação distinto das moléculas comentadas anteriormente, os íons diagnósticos para esta classe de alcaloides tropânicos compreendem o m/z 156 e m/z 138, decorrentes da perda do grupo esterificado na posição C-3 e da saída de um oxigênio, respectivamente (ZHOU et al, 2016; CINELLI E JONES, 2021).

Os íons fragmentos relatados no parágrafo anterior foram observados para os compostos dos picos **15** e **18**, que apresentara o íon pseudomolecular em m/z 304, o fragmento em m/z 156 ($[M+H-148]^+$) foi formado após perda de uma porção $C_9H_8O_2$ (148 Da), devido a quebra da ligação C-O entre o carbono carbonílico e o oxigênio da função éster, e o íon em m/z 138 ($[M+H-166]^+$) foi adquirido após saída neutra do ácido trópico esterificado na posição C-3. Também foi visualizado outro fragmento descrito na literatura para a escopolamina, sendo ele em m/z 286 ($[M+H-18]^+$), obtido pela perda de H_2O (CHEN et al, 2005; WANG et al, 2012; GOMÉZ-CANELA et al, 2021). Em adição, os espectros HR-ESI-MS de ambos os picos apontaram a fórmula

molecular $C_{17}H_{21}NO_4$, compatível com a anotação realizada. A escopolamina tem diferentes atividades biológicas de interesse terapêutico como ação espasmolítica e anestésica, não foram encontrados relatos sobre este metabólito no gênero *Erythroxylum*, sendo necessário mais estudos para confirmar sua presença (CHEN et al, 2005). A via de fragmentação sugerida para a escopolamina pode ser visualizada na Figura 38.

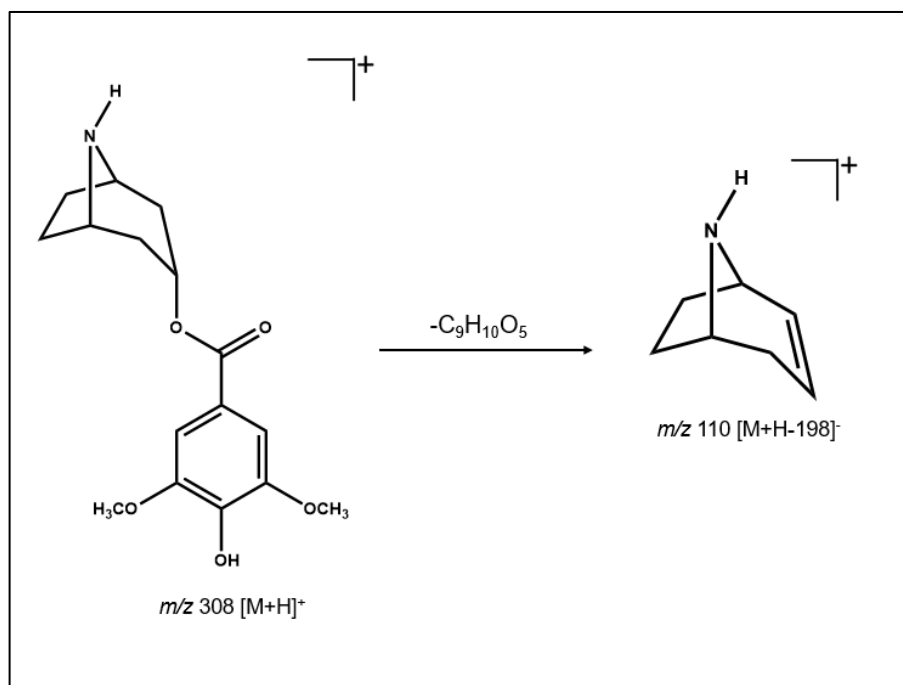
Figura 38 - Via de fragmentação proposta para a escopolamina.



Com exceção de *E. revolutum*, em todas as demais espécies do estudo foram constatados íons característicos de alcaloide tropânico do tipo nortropano, metabólito

secundário caracterizados pela ausência do grupo metil na amina terciária (NAJMI et al, 2020). Esses compostos quando analisados por LC-ESI-MSⁿ exibem um abundante fragmento em m/z 110, produzido após a saída neutra do ácido esterificado provavelmente na posição C-3 (CINELLI, JONES, 2021). Esse íon foi obtido a partir da fragmentação do íon quasi-molecular do composto presente no pico **16** (m/z 308), suspeitando-se da saída neutra de uma porção $C_9H_{10}O_5$ (198 Da), equivalente ao ácido siríngico, e em seus espectros HR-ESI-MS foi revelada a fórmula molécula $C_{16}H_{21}NO_5$. A partir das informações espectrais analisadas e em comparação aos dados encontrados na literatura o composto foi previamente assinalado como sendo o 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi)benzoiloxinortropano, composto já relatado na espécie *Erythroxylum pungens* mas que está sendo sugerido pela primeira vez nas espécies do estudo em que foi evidenciada (MOREIRA et al, 2021). A via de fragmentação sugerida pode ser observada na Figura 39.

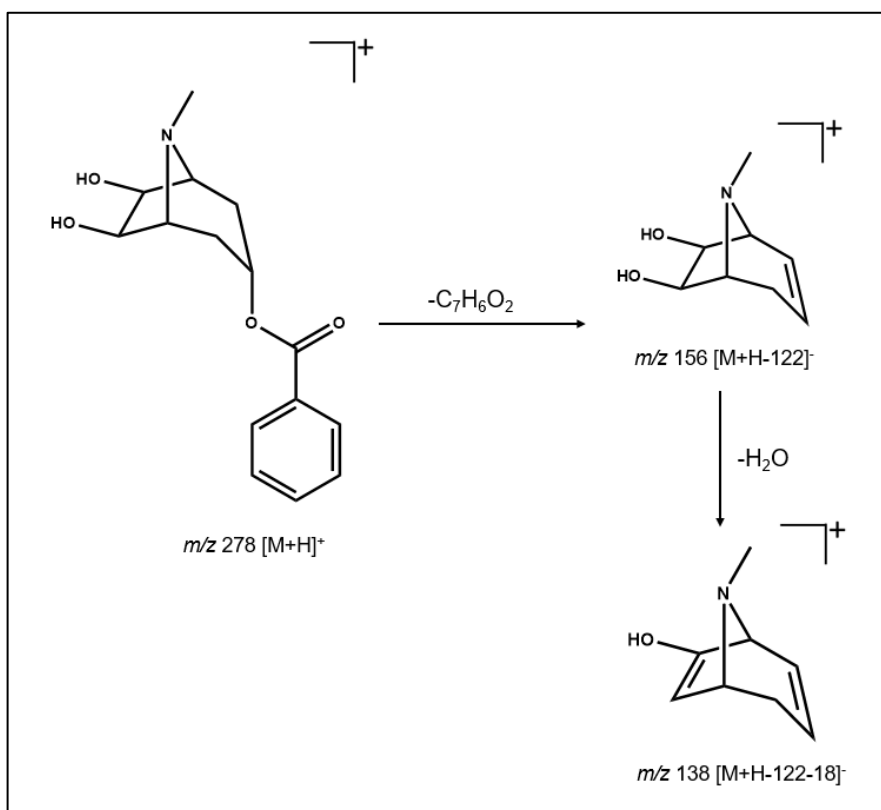
Figura 39 - Via de fragmentação proposta para o 3-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi)benzoiloxinortropano.



Íons diagnóstico de compostos possuindo anel tropano trissubstituído foram adquiridos a partir da fragmentação do íon da molécula protonada em m/z 278 (pico **8**), ausente apenas em *E. simonis*. Este tipo de fragmentação é definido por gerar os íons em m/z 156, m/z 138 e m/z 120, o primeiro foi formado com a perda de 122 Da, condizente a uma porção $C_7H_6O_2$, este dado foi suficiente para inferir a esterificação

do ácido benzóico no esqueleto tropano. Os demais fragmentos, em m/z 138 ($[M+H-122-18]^+$) e em m/z 120 ($[M+H-122-18-18]^+$), são obtidos por perdas consecutivas das duas hidroxilas por desidratação. Foi sugerida a identificação 3-(benzoiloxi)tropan-6,7-diol para este composto, já descrito em outros estudos para as espécies *Erythroxylum australe* F.Muell. e *Erythroxylum caatingae*, o assinalamento foi fortalecido com os dados dos espectros HR-ESI-MS que forneceram a fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO_4$ (OLIVEIRA et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). A via de fragmentação sugerida pode ser observada na Figura 40.

Figura 40 - Via de fragmentação proposta para o 3-(benzoiloxi)tropan-6,7-diol.



O composto do pico **24** (m/z 442) foi anotado como sendo o C-(benzoiloxi)-C-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano, devido as saídas neutras de 198 Da e 122 Da, equivalentes respectivamente aos ácidos 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico e benzoico, formando os íons em m/z 244 ($[M+H-198]^+$), m/z 320 ($[M+H-122]^+$) e m/z 122 ($[M+H-198-122]^+$), o prévio assinalamento foi reforçado por meio das análises HR-ESI-MS que apontaram para a fórmula molecular $C_{24}H_{27}NO_7$. O pico **25** (m/z 426) apresentou os fragmentos em m/z 304 ($[M+H-122]^+$), sendo um indicativo da inserção do ácido benzoico no núcleo tropano, em m/z 244 ($[M+H-182]^+$), formado

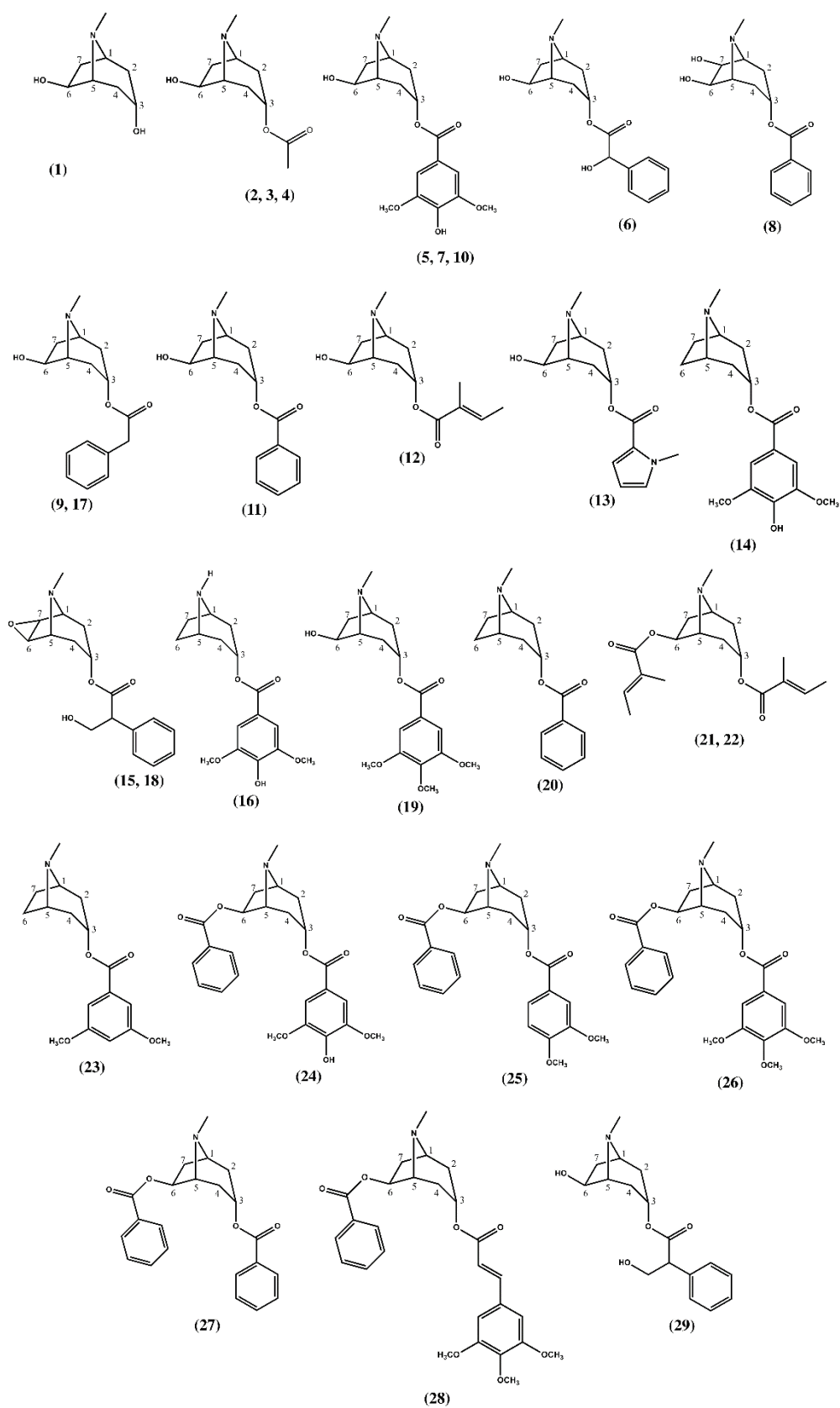
provavelmente pela saída neutra do ácido 3,4-dimetoxibenzoico, e m/z 122 ($[M+H-182-122]^+$). Seu espectro HR-ESI-MS forneceu a fórmula molecular $C_{24}H_{27}NO_6$, e após a análise desses dados o composto foi previamente assinalado como sendo C-(benzoyloxy)-C-(3,5-dimethoxybenzoyloxy)tropano (Oliveira et al, 2011).

Os íons fragmentos em m/z 244 ($[M+H-212]^+$) e m/z 334 ($[M+H-122]^+$) sugeriram que o alcaloide tropânico presente no pico **26** (m/z 456) apresentava como substituintes os ácidos 3,4,5-trimetoxibenzoico e benzoico, sendo anotado como sendo o C-(benzoiloxi)-C-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropano, e a fórmula molecular $C_{25}H_{29}NO_7$ adquirida nas análises HR-ESI-MS corroborou com o assinalamento proposto. Pode-se sugerir a identificação 3,6-dibenzoiloxitropano para o composto do pico **27** (m/z 366), devido a duas perdas de 122 Da, referentes a saídas neutras e sucessivas de duas moléculas de ácido benzoico, que geraram os fragmentos em m/z 244 ($[M+H-122]^+$) e m/z 122 ($[M+H-122-122]^+$), através dos espectros HR-ESI-MS foi obtida a fórmula molecular $C_{22}H_{23}NO_4$, equivalente a molécula anotada. Este composto já foi descrito em outras espécies de *Erythroxylum*, como *Erythroxylum subsessile* (Mart.) O.E. Schulz e *Erythroxylum cuneatum* (Miq.) Kurz (CRUZ et al, 2016; EL-IMAM et al, 1988).

O composto do pico **28** (m/z 482) apresentou os íons fragmentos em m/z 360 ($[M+H-122]^+$) e m/z 244 ($[M+H-238]^+$), revelando que supostamente o núcleo tropano estaria esterificado por uma unidade de ácido benzoico e uma unidade de ácido 3,4,5-trimetoxicinamico, a fórmula molecular $C_{27}H_{31}NO_7$ foi adquirida a partir dos espectros HR-ESI-MS, e de acordo com esses dados espectrais o composto foi putativamente assinalado como sendo o C-(benzoiloxi)-C-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano.

As estruturas químicas dos alcaloides tropânicos anotados podem ser visualizadas na Figura 41. Os compostos dos picos **24**, **26** e **28**, evidenciados somente na espécie *E. revolutum*, mostraram fragmentos que não possibilitaram sua total identificação apenas com os dados dos espectros de massas. De acordo com os íons fragmentos obtidos nos espectros MS^n e as perdas observadas, foi possível sugerir que essas moléculas possuem o anel tropano dissubstituído pela esterificação de dois ácidos fenólicos, também foi possível indicar quais seriam os prováveis substituintes, no entanto, apontar a posição em que estariam inseridas no núcleo tropano não foi possível. Com este objetivo a fase clorofórmica de *E. revolutum* foi direcionada para o isolamento dos metabólitos presentes nos respectivos picos.

Figura 41 – Estrutura química dos alcaloides tropânicos anotados nas fases clorofórmicas das espécies *E. simonis*, *E. paufferense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum*.



5.3. Identificação estrutural de Es-1

A substância Es-1 apresentou-se como um pó amorfo de cor alaranjada com 0,0031 g. O espectro de massas obtido mostrou um pico em m/z 217,0506 $[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_4$, esse espectro pode ser visualizado na Figura 42.

O espectro de RMN de 1H (Figura 43), obtido a 400 MHz em DMSO, e sua expansão (Figura 44), apresentaram deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos. Estes sinais aparecem em uma região de δ_H 6,5 - 8,0 ppm, devido ao efeito conhecido como anisotropia magnética. No qual os hidrogênios do anel sofrem uma maior desblindagem, absorvendo uma frequência relativamente alta devido a formação de um campo magnético induzido, provocado pelo movimento circular dos elétrons π , quando as moléculas são colocadas em um campo magnético (SILVERSTEIN et al., 2000).

Foram observados três sinais característicos de um sistema aromático ABX. Sendo dois dupletos (d), um em δ_H 6,72 ($J = 8,4$ Hz) e outro em δ_H 6,87 ($J = 2,0$ Hz), ambos com integral para um hidrogênio, foi observado ainda, o acoplamento desses sinais com um duplo duplete (dd) em δ_H 6,76 ($J = 2,0$ e 8,0 Hz). Estando este, acoplado em *orto* com o primeiro próton citado, uma vez que, neste acoplamento a constante varia na faixa de 7 a 10 Hz. Quando o acoplamento ocorre na posição *meta* a constante varia de 2 a 3 Hz, este foi o caso observado com o segundo próton descrito (PAVIA et al., 2015).

O espectro de RMN de ^{13}C – APT (Figura 45), obtidos a 100 MHz em DMSO, e sua expansão (Figura 46) apresentaram seis deslocamentos químicos. Destes, três sinais foram atribuídos a carbonos metínicos sp^2 e três a carbonos não hidrogenados.

Foi possível observar sinais característicos de carbonos ligados a elementos eletronegativos, estes substituintes reduzem a densidade eletrônica do átomo de carbono. Os elétrons têm a função de blindar o núcleo do campo magnético aplicado, logo, sua remoção promove uma desblindagem. Quanto maior a eletronegatividade do substituinte, maior a desproteção do carbono e consequentemente maior é o seu deslocamento químico. Desta forma, os deslocamentos em δ_C 145,4 e δ_C 144,2 evidenciaram duas oxigenações na molécula (MOURA et al., 2011).

Não foram evidenciados sinais característicos da presença de carbonila, uma vez que os carbonos de carbonilas apresentam maiores deslocamentos químicos,

pois sofrem efeitos de desproteção devido a hibridação sp^2 e por estarem ligados diretamente ao elemento eletronegativo oxigênio (SILVERSTEIN et al., 2000).

Estes dados em conjunto com o fato de que foi observado a presença de um sistema aromático ABX trissubstituído, entretanto apenas duas substituições por elementos eletronegativos foram indicadas, permitiu sugerir que a substância Es-1 poderia ser um dímero simétrico, e que os respectivos átomos das duas unidades estavam apresentando os mesmos sinais nos espectros de RMN. A partir da análise dessas informações suspeitou-se que o composto em questão se tratava de um bifenil, com cada uma de suas unidades substituídas por duas hidroxilas. Adicionalmente a presença do sinal em δ_c 132,1 reforçou essa evidência, sendo atribuído ao carbono C-1 das porções de fenil, posição de ligação entre as duas unidades (LAVOIE et al., 2019).

Os sinais em δ_c 145,4 e δ_c 144,2, foram atribuídos aos carbonos C-3 e C-4, respectivamente, correspondendo aos carbonos ligados diretamente ao grupo hidroxila. Os deslocamentos químicos em δ_c 113,4, δ_c 115,9 e δ_c 116,9 foram atribuídos nesta ordem aos outros carbonos do sistema aromático, C-2, C-5 e C-6 (LIANG et al., 2016). Estas e outras atribuições encontram-se compilados na Tabela 3.

Para o assinalamento dos hidrogênios na unidade de fenil foi levado em consideração o deslocamento químico, a multiplicidade do sinal e a constante de acoplamento, logo os sinais em δ_H 6,87, δ_H 6,72 e δ_H 6,76 foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-5 e H-6 (LIANG et al., 2016).

Essas atribuições puderam ser confirmadas por análise das correlações no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Figura 47), e em sua expansão (Figura 48). Onde se observou correlações entre os sinais em δ_H 6,87 (H-2) com δ_c 113,4 (C-2), de δ_H 6,72 (H-5) com δ_c 115,9 (C-5) e de δ_H 6,76 (H-6) com δ_c 116,9 (C-6).

A partir da análise destes dados espectrais e em comparação com dados encontrados na literatura, foi possível identificar a substância Es-1 como sendo o bifenil-3,3',4,4'-tetraol, sua estrutura está representada na figura 49 (LIANG et al., 2016).

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, DMSO-d_6) de Es-1, bifenil-3,3',4,4'-tetraol, em comparação aos dados obtidos por LIANG et al., 2016.

HMQC			
Posição	δ_{H} Es-05	δ_{C} Es-05	δ_{C} Referência
1	-	132,1	132,0
2	6,87 (1H, d, J = 2Hz)	113,4	113,4
3	-	145,4	145,3
4	-	144,2	144,2
5	6,72 (1H, d, J = 8.4 Hz)	115,9	115,9
6	6,76 (1H, dd, J = 8.0, 2 Hz)	116,9	116,8

Figura 42 - Espectro de massa de Es-1.

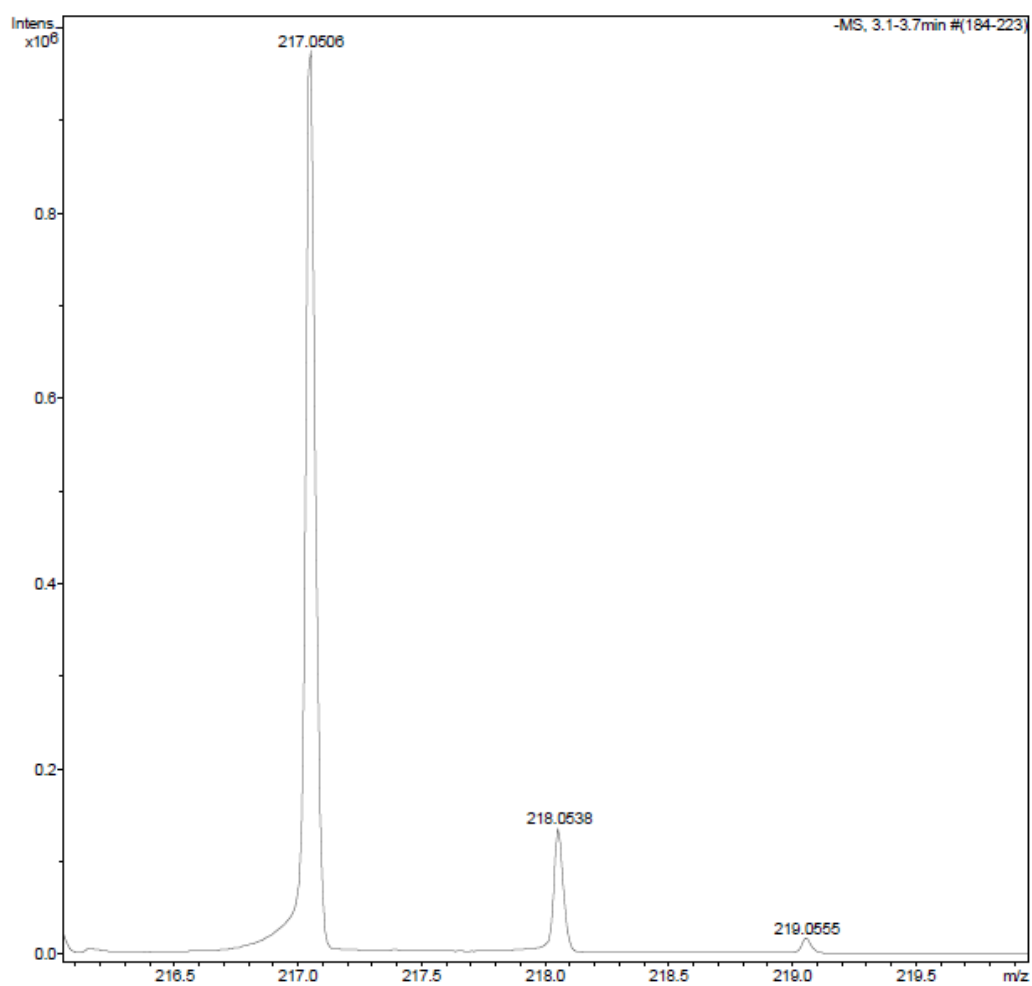


Figura 43 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Es-1.

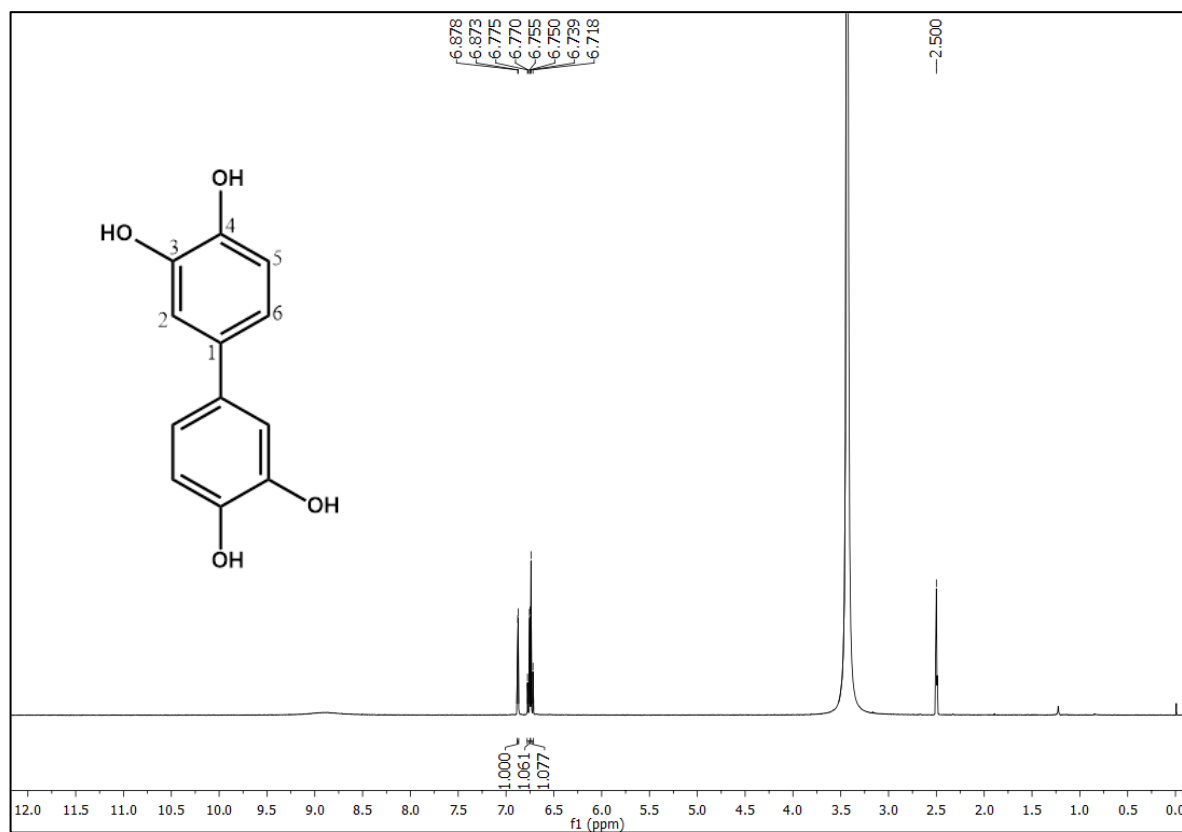


Figura 44 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de Es-1 na região de 6,65 – 6,95 ppm.

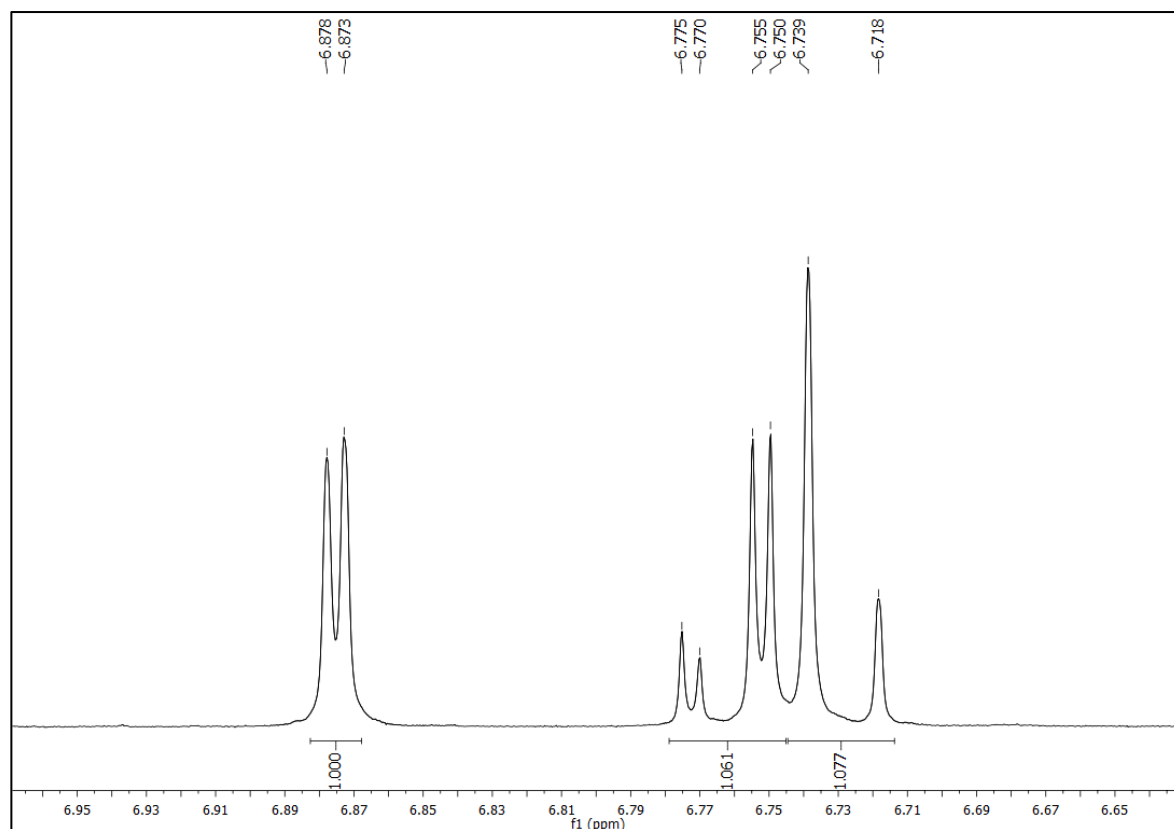


Figura 45 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1.

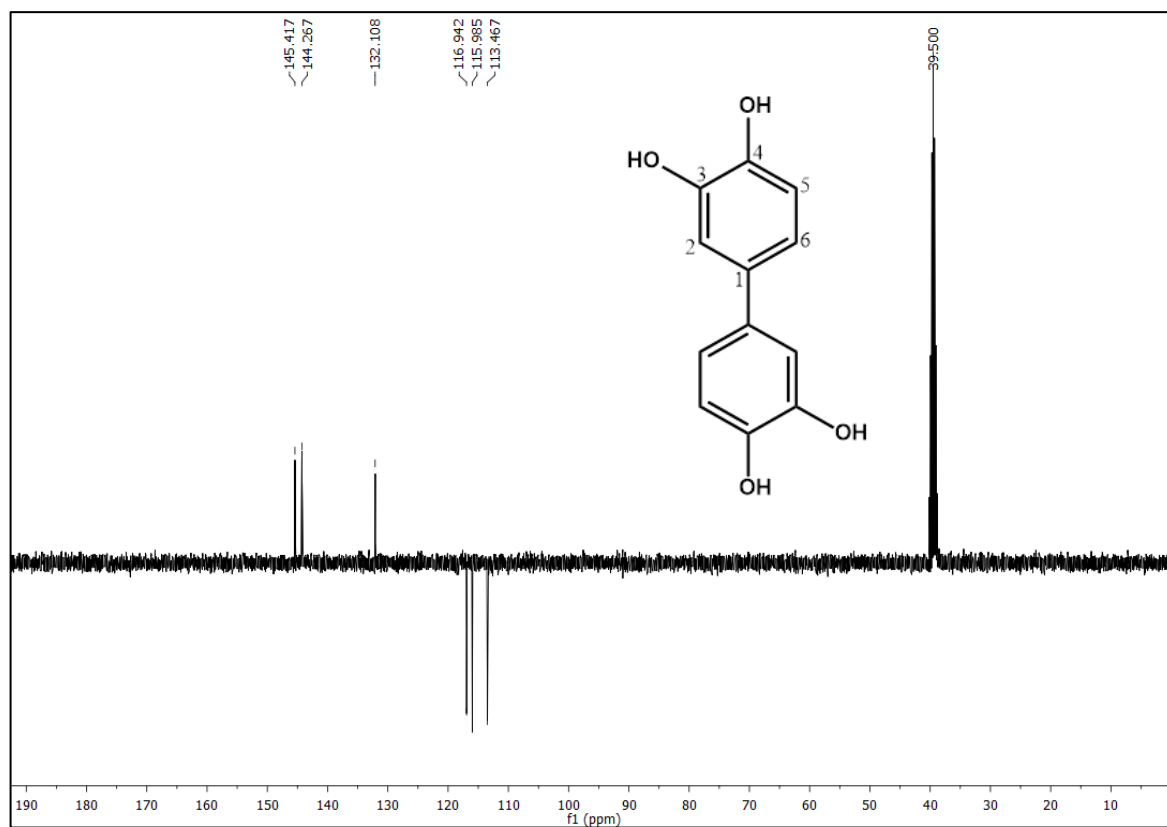


Figura 46 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de Es-1 na região de 110 – 150 ppm.

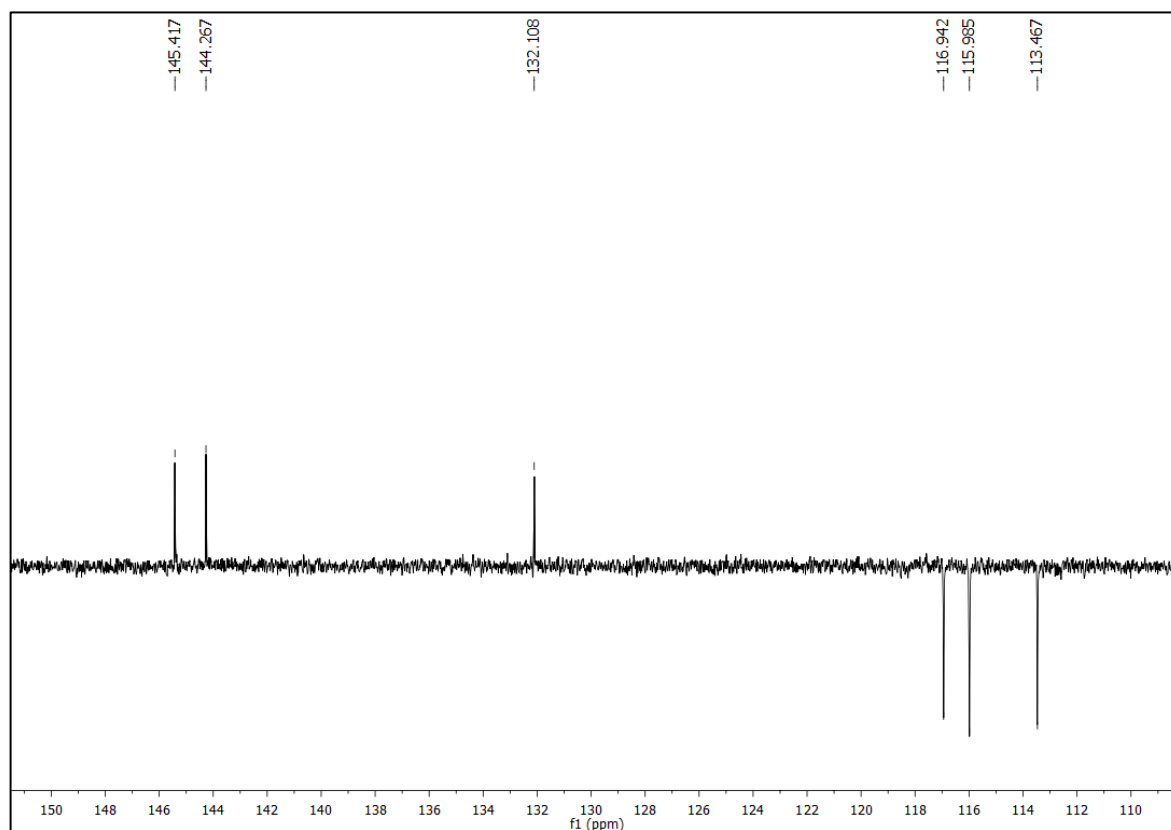


Figura 47 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-d₆) de Es-1.

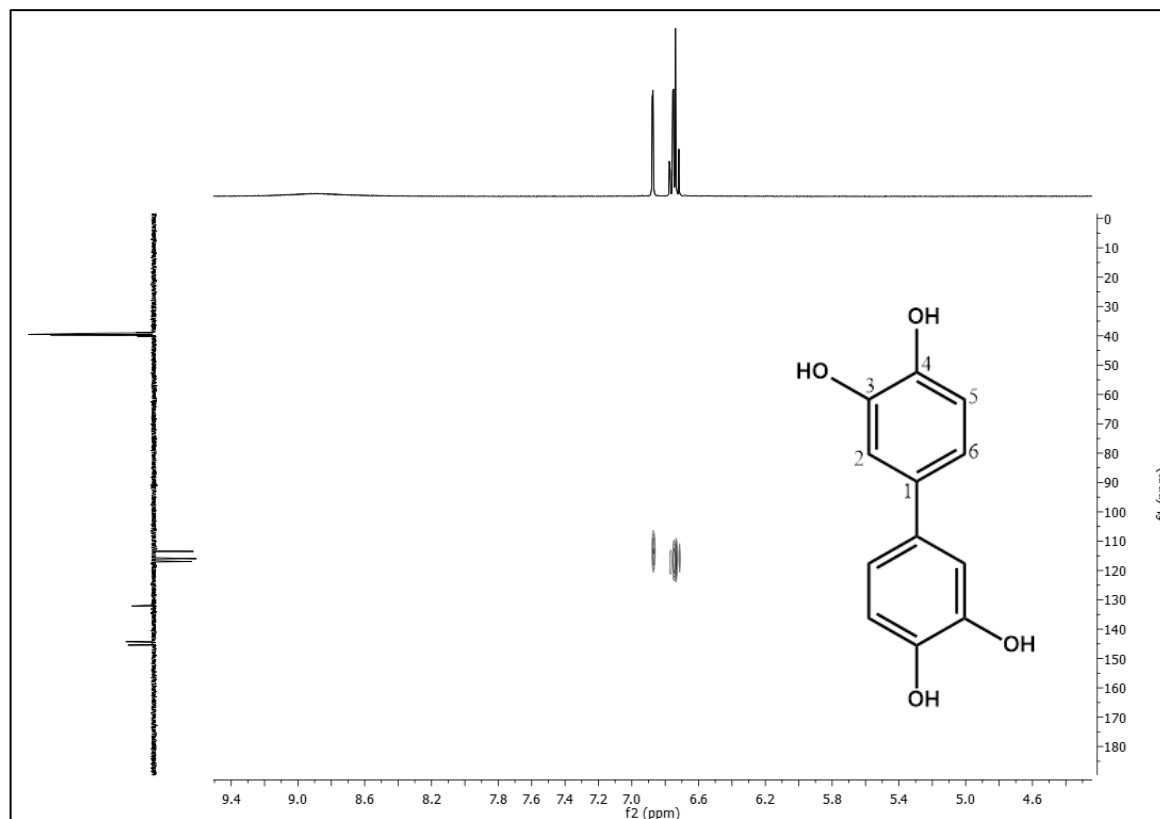


Figura 48 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-d₆) de Es-1 na região de (6,30 – 7,30 ppm) x (85,0 – 145,0 ppm).

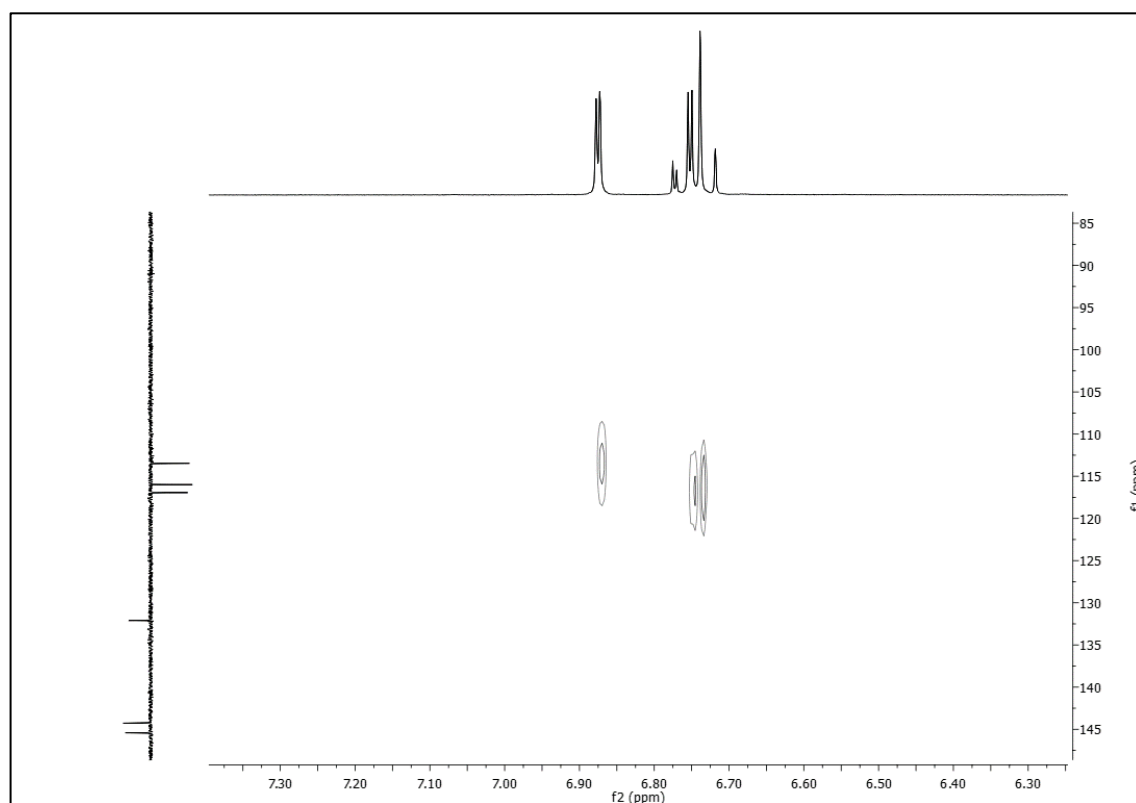
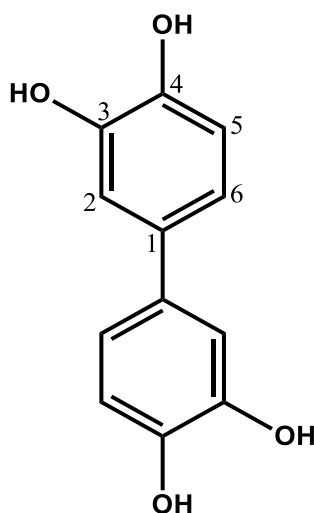


Figura 49 - Estrutura do bifênil-3,3',4,4'-tetraol.



5.4. Identificação estrutural de Es-2

O composto codificado com Es-2 foi isolado na forma de um pó amorfo alaranjado com 0,0030 g. Seu espectro de massas (Figura 50) mostrou um pico do íon molecular em m/z 289.0713 $[M-H]^-$ compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$. A partir das informações fornecidas pelo espectro de massas suspeitou-se que o composto Es-2 correspondia a epicatequina, uma vez que a catequina não foi evidenciada no estudo de desreplicação das fases polares de *E. simonis*.

No espectro de RMN de 1H (Figura 51), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 52, Figura 53, Figura 54, Figura 55) pode-se verificar a presença de nove sinais. Foram observados três sinais na região de hidrogênios aromáticos, um com deslocamento químico em δ_H 6,80 (dd, $J = 2,0$ e $8,0$ Hz), estando acoplado em *meta* com o hidrogênio com sinal em δ_H 6,97 (d, $J = 2,0$ Hz) e em *orto* com o hidrogênio em δ_H 6,75 (d, $J = 8,0$ Hz), todos integrando para um hidrogênio, estes sinais evidenciaram por meio de seus valores e constantes de acoplamento a presença de um sistema aromático ABX 1', 3' e 4' trissubstituído, e foram atribuídos aos hidrogênios H-6' , H-2' , e H-5' do anel B, respectivamente. Na mesma faixa espectral foram analisados os dupletos com deslocamentos em δ_H 5,94 e δ_H 5,91, cuja constante de acoplamento ($J = 2,4$ Hz) indicou uma correlação *meta* entre os prótons, e integraram para apenas um hidrogênio, sendo atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, na devida ordem (SOUSA et al., 2015). E a partir da análise preliminar

desses dados pode-se indicar a presença dos dois anéis aromáticos da molécula, sendo um trissubstituído e outro tetrasubstituído.

Em outra região do espectro foram evidenciados os sinais de prótons de um carbono metilênico, em δ_H 2,88 (dd, $J = 16,4$ e $4,4$ Hz) e δ_H 2,73 (dd, $J = 16,8$ e $3,2$ Hz), característico dos hidrogênios H-4a e H-4b da epicatequina. O multipletto em δ_H 4,18 sugeriu a presença do próton oximetínico, que também caracteriza a epicatequina, sendo atribuído ao hidrogênio H-3. Por fim, o simpleto (s) em δ_H 4,81, referente ao hidrogênio oxibenzílico, revelou que a hidroxila se encontrava em posição *cis* em relação ao grupo fenila, sendo mais um indicativo que a estrutura se tratava da epicatequina (SOUSA et al., 2015). Estas e outras atribuições foram agrupadas na Tabela 4.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 56), obtido a 100 MHz em CD_3OD , e suas expansões (Figura 57, Figura 58) apresentou quinze deslocamentos químicos. Foram atribuídos sete sinais a carbonos não hydrogenados, um a carbono metilênico sp^3 , cinco sinais a carbonos metínicos sp^2 e dois a carbonos metínicos sp^3 . Um esqueleto flavonoídico ($C_6C_3C_6$) foi evidenciado pela presença de quinze sinais característicos, referentes aos 15 átomos de carbonos presentes nesta unidade.

A inexistência de sinal na faixa de δ_C 170 – 190 ppm, revelou a ausência de carbonila na estrutura, assim como a presença do deslocamento químico em δ_C 29,2 permitiu inferir a presença de um carbono metilênico sp^3 (C-4). Estes dados, juntamente com os sinais em δ_C 67,4 e δ_C 79,8, correspondentes aos carbonos metínicos sp^3 oxigenado, C-3 e C-2, respectivamente, reforçaram a evidência que o composto Es-2 se tratava da epicatequina (LV et al., 2015).

Foram observados deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C e em suas expansões que reforçaram a evidência da presença de um anel aromático trissubstituído, estando dois sinais mais desprotegidos por estarem ligados diretamente ao elemento eletronegativo oxigênio, em δ_C 143,7 e δ_C 145,9, atribuídos nesta ordem, aos carbonos C-3' e C4'. Outros sinais em δ_C 132,2, δ_C 119,3, δ_C 115,8 e δ_C 115,3 foram atribuídos aos carbonos C-1', C-6', C-5' e C-2', respectivamente, do sistema aromático ABX (GARCEZ et al., 2009).

As oxigenações nos carbonos C-5, C-7 e C-9 do anel A foram deduzidas, respectivamente, pela presença dos sinais mais desprotegidos em δ_C 158,0, δ_C 157,6 e δ_C 157,3. E os deslocamentos químicos em δ_C 100,0, δ_C 96,3 e δ_C 95,8, foram condizentes com os demais carbonos desse sistema aromático, sendo atribuídos aos

carbonos C-10, C-6 e C-8, na referida ordem (LV et al., 2015). Estas e outras atribuições encontram-se agrupadas na Tabela 4.

No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 59) e em suas expansões (Figura 60, Figura 61) foi possível observar correlações entre os sinais em δ_H 5,94 (H-6) e δ_H 5,91 (H-8) com o carbono em δ_C 100,0 (C-10), e em δ_H 5,94 (H-6) com δ_C 95,8 (C-8), confirmando as atribuições sugeridas para o anel A. As correlações entre dos sinais em δ_H 4,81 (H-2') com δ_C 119,3 (C-6') e δ_C 145,9 (C-4') e de δ_H 6,86 (H-5') com δ_C 132,2 (C-1') e δ_C 145,9 (C-4'), permitiram confirmar os assinalamentos realizados no anel B. Ainda foi possível observar as correlações entre os hidrogênios H-4a (δ_H 2,88) e H-4b (δ_H 2,73) com o carbono C-10 (δ_C 100,0), e do H-4a (δ_H 2,88) com o carbono C-3 (δ_C 67,4), que em conjunto com as correlações do sinal do hidrogênio H-2 (δ_H 4,81) com os carbonos C-1' (δ_C 132,2), C-2' (δ_C 115,3) e C-6' (δ_C 119,3), permitiram confirmar as atribuições ao anel C. Estas e outras correlações estão reunidas na Tabela 4.

Ao analisar e confrontar os dados dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais de Es-2 com os descritos na literatura, pode-se identificar esta substância como sendo a epicatequina, sua estrutura pode ser visualizada na Figura 62 (SOUSA, 2015).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-2, epicatequina, em comparação aos dados obtidos por SOUSA, 2015.

Posição	δ_{H} Es-07	δ_{C} Es-07	HMBC $\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	δ_{H} Referência	δ_{C} Referência
2	4,81 (1H, s)	79,8		4,83 (1H, s)	79,8
3	4,18 (1H, m)	67,4	H-4a	4,17 (1H, m)	67,4
4a	2,88 (1H, dd, $J=16,4$ e $4,4$ Hz)	29,2		2,86 (1H, dd, $J=16,5$ e $4,5$ Hz)	29,2
4b	2,73 (1H, dd, $J=16,8$ e $3,2$ Hz)			2,73 (1H, dd, $J=16,8$ e $2,7$ Hz)	
5	-	158,0		-	157,9
6	5,94 (1H, d, $J=2,4$ Hz)	96,3		5,94 (1H, d, $J=2,1$ Hz)	96,3
7		157,6			157,6
8	5,91 (1H, d, $J=2,4$ Hz)	95,8	H-6	5,91 (1H, d, $J=2,1$ Hz)	95,8
9	-	157,3		-	157,3
10	-	100,0	H-4a, H-4b, H-6 e H-8	-	100,0
1'	-	132,2	H-2 e H-5	-	132,2
2'	6,97 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	115,3	H-2	6,97 (1H, d, $J=1,7$ Hz)	115,2
3'	-	143,7		-	143,7
4'	-	145,9	H-2' e H-5	-	145,9
5'	6,75 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	115,8		6,75 (1H, d, $J=7,9$ Hz)	115,8
6'	6,80 (1H, dd, $J=2,0$ e $8,0$ Hz)	119,3	H-2 e H-2'	6,79 (1H, dd, $J=1,7$ e $7,9$ Hz)	119,3

Figura 50 - Espectro de massa de Es-2.

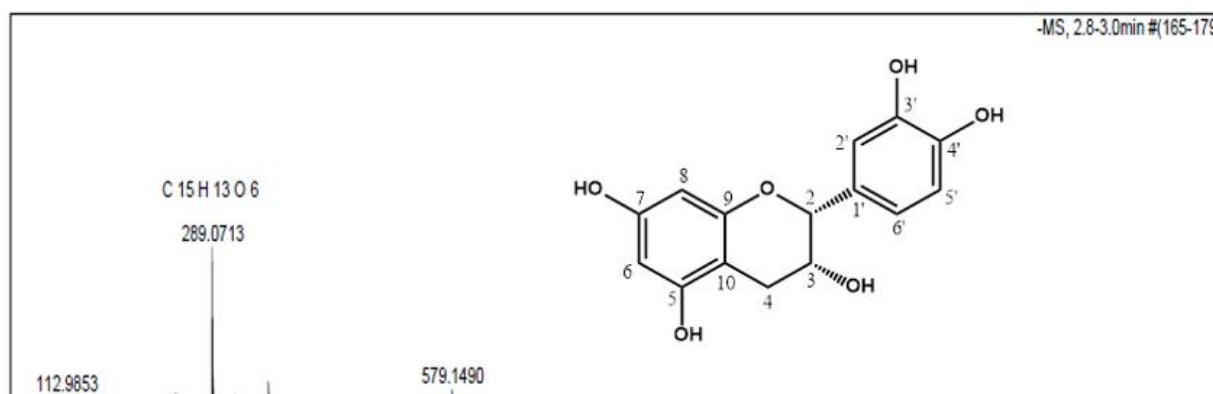


Figura 51 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2.

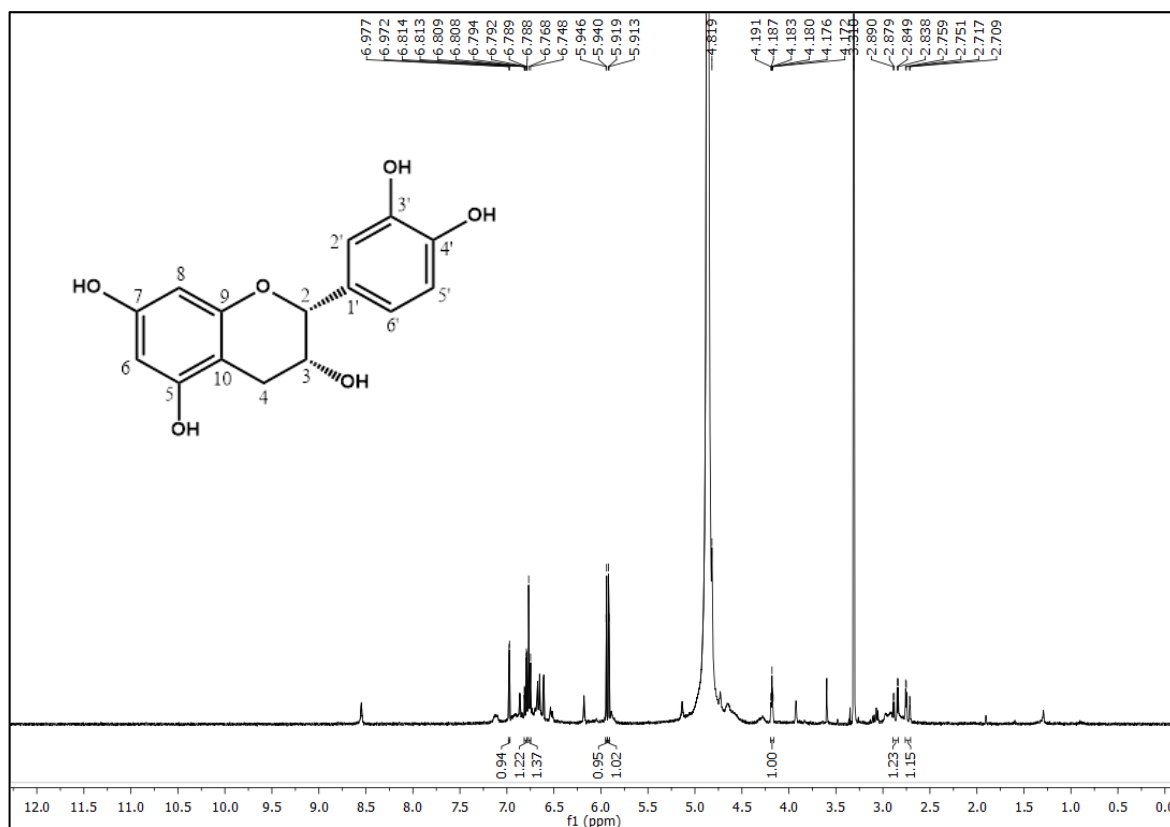


Figura 52 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 6,70 – 7,05 ppm.

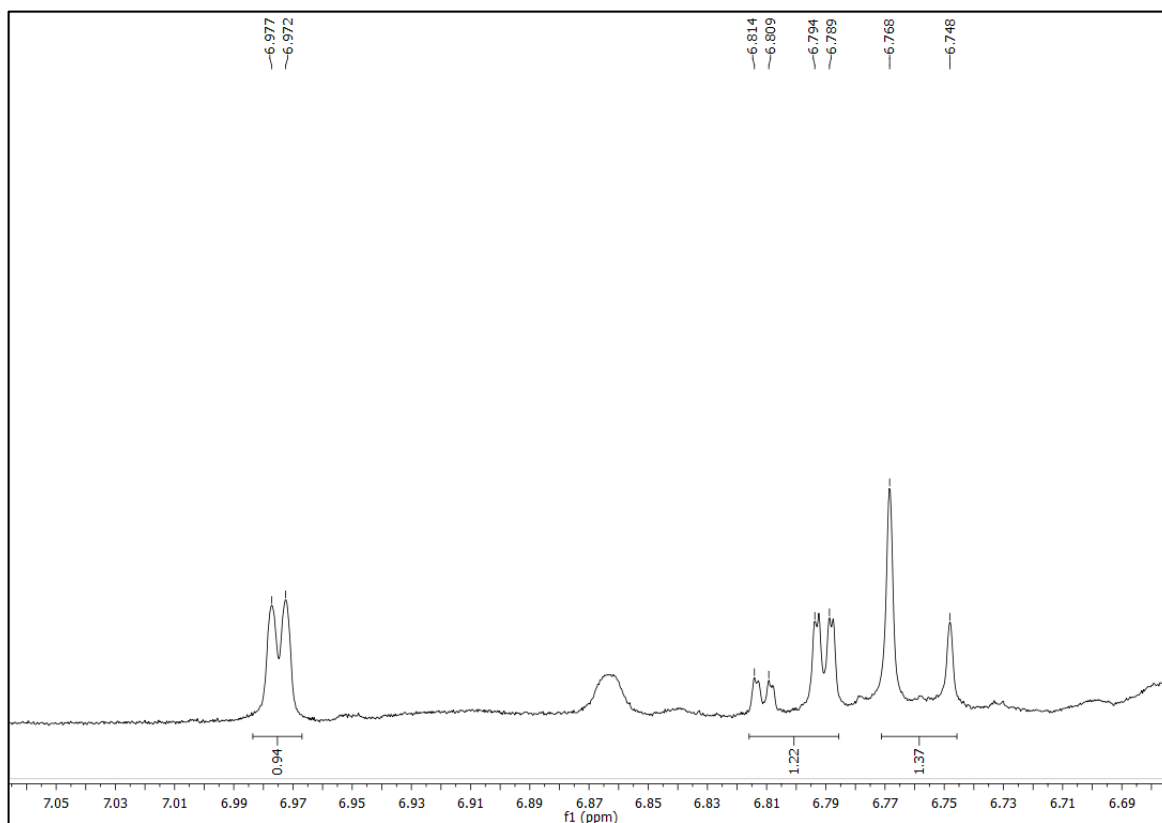


Figura 53 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 5,66 – 6,12 ppm.

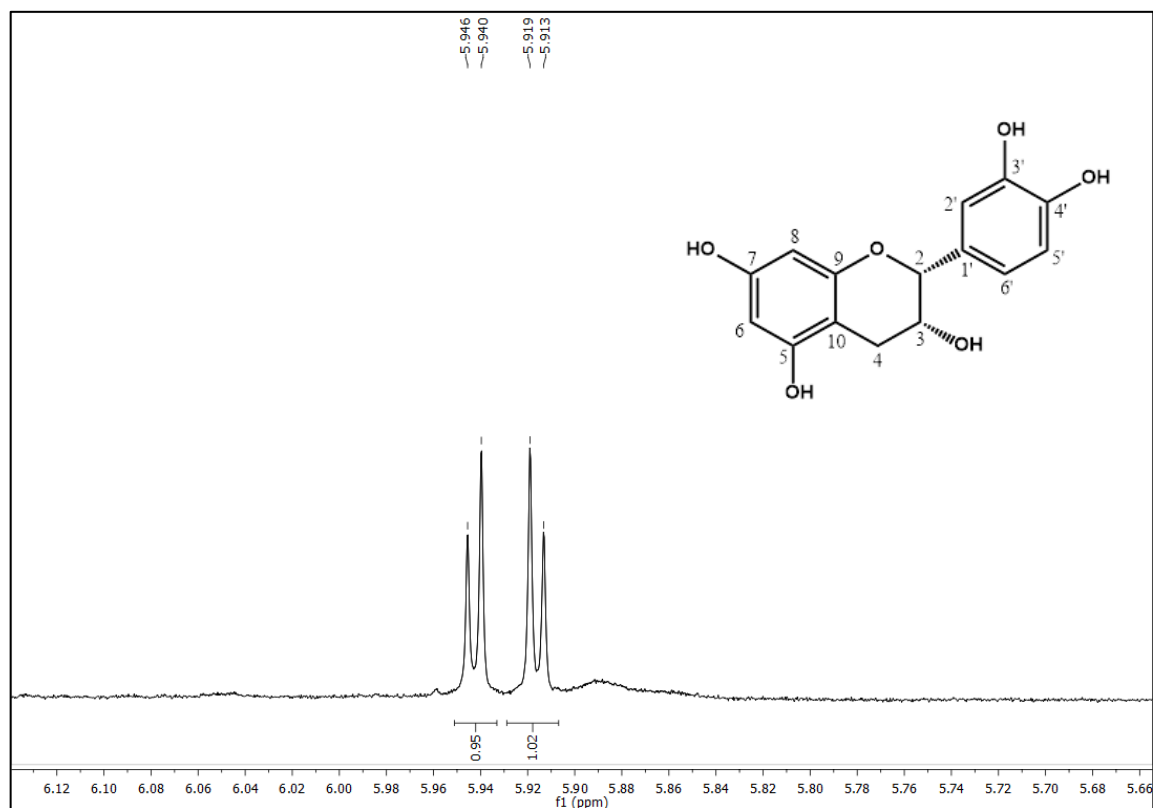


Figura 54 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 4,10 – 5,00 ppm.

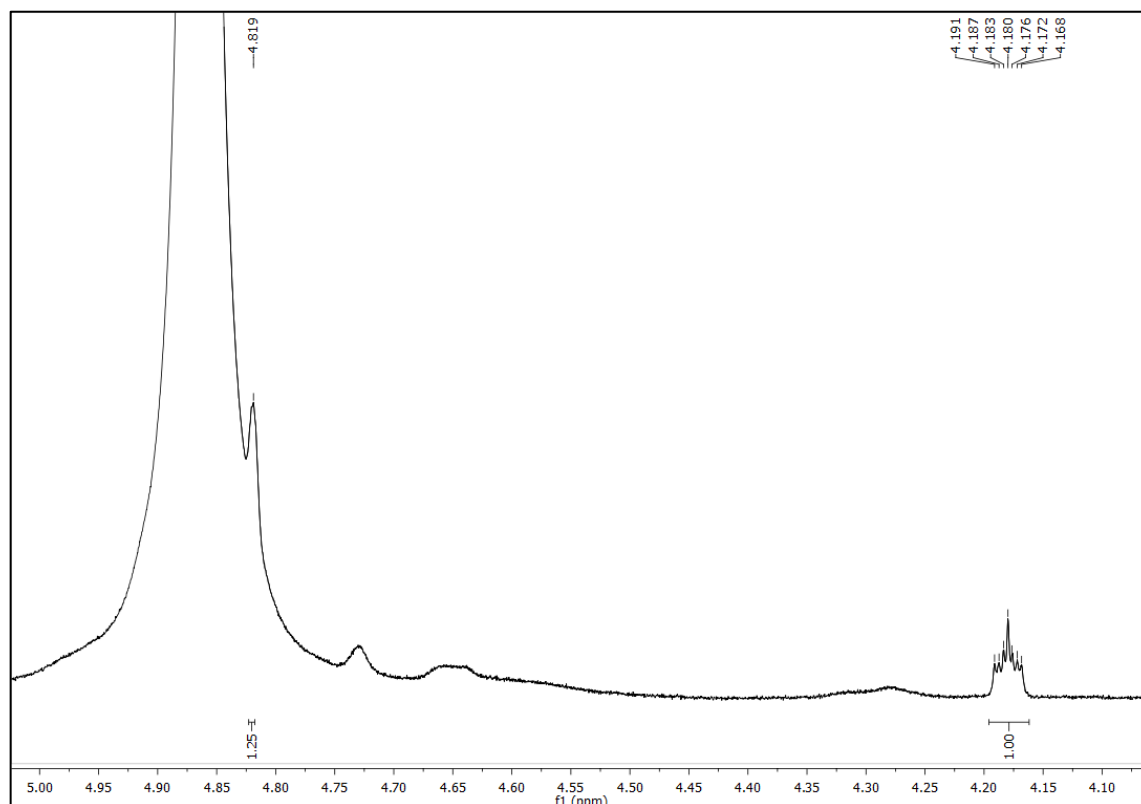


Figura 55 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 2,67 – 2,95 ppm.

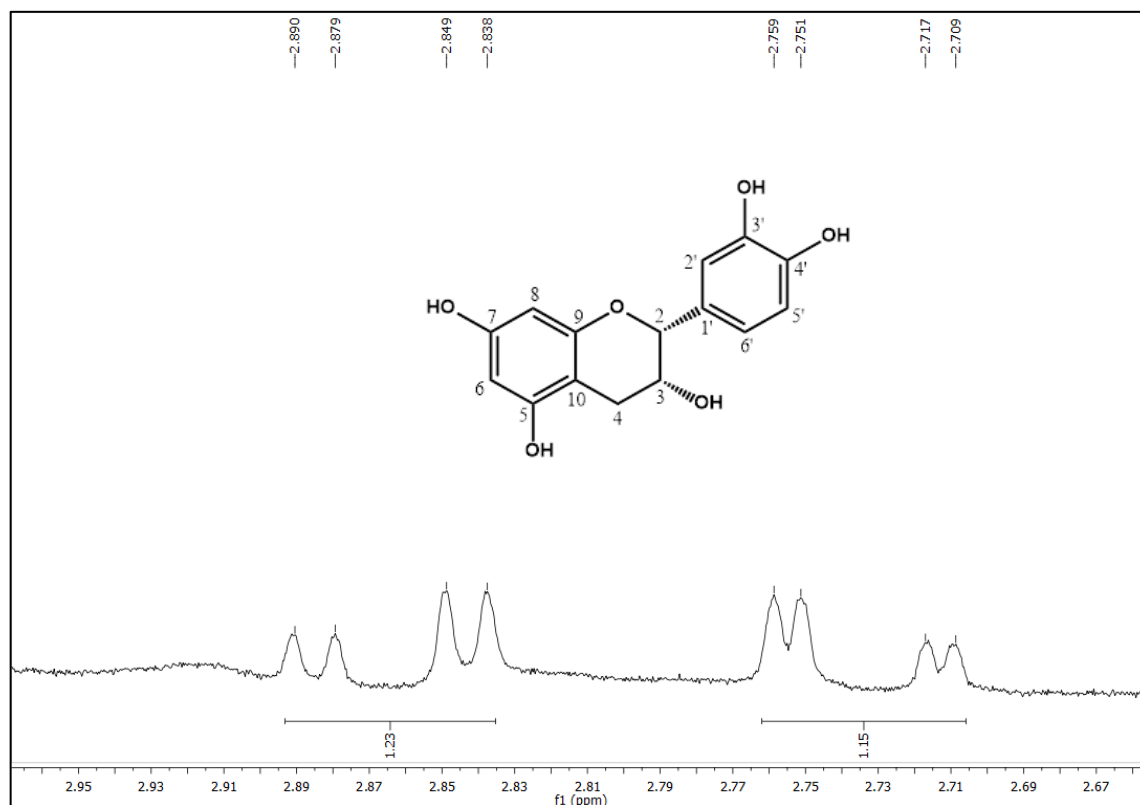


Figura 56 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2.

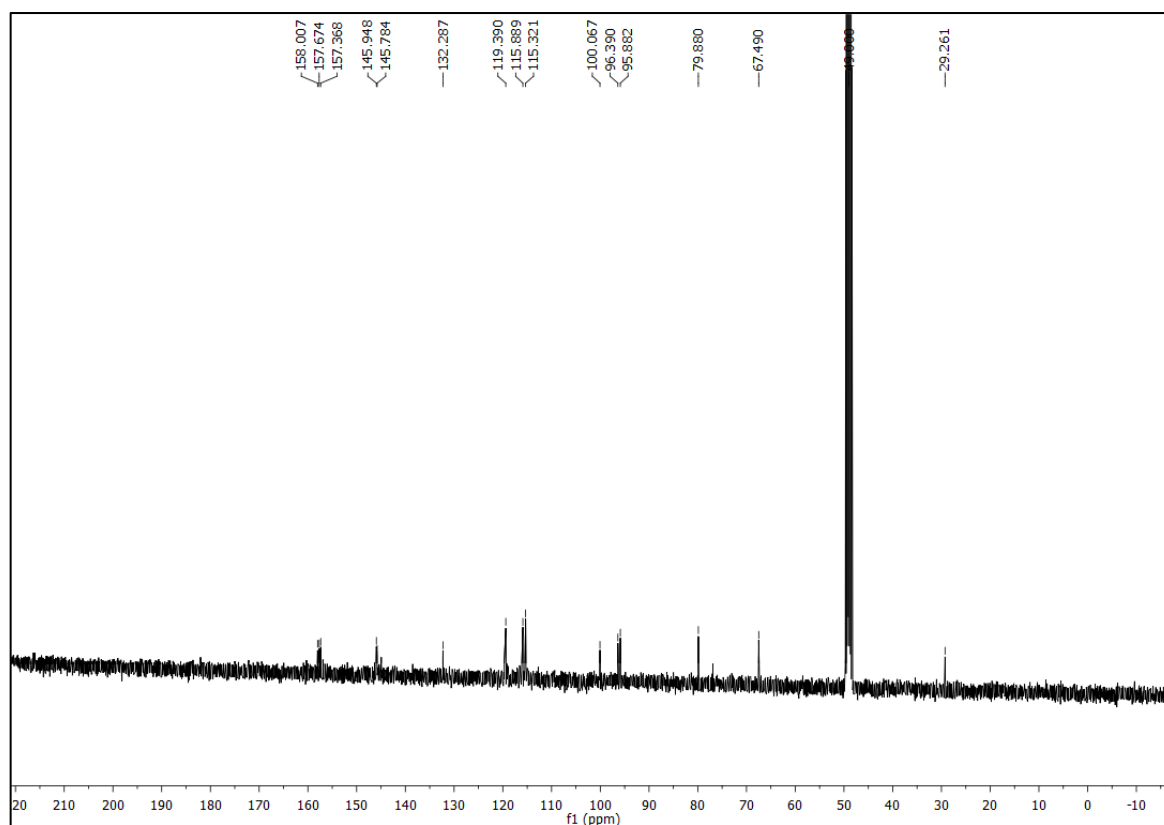


Figura 57 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 95 – 160 ppm.

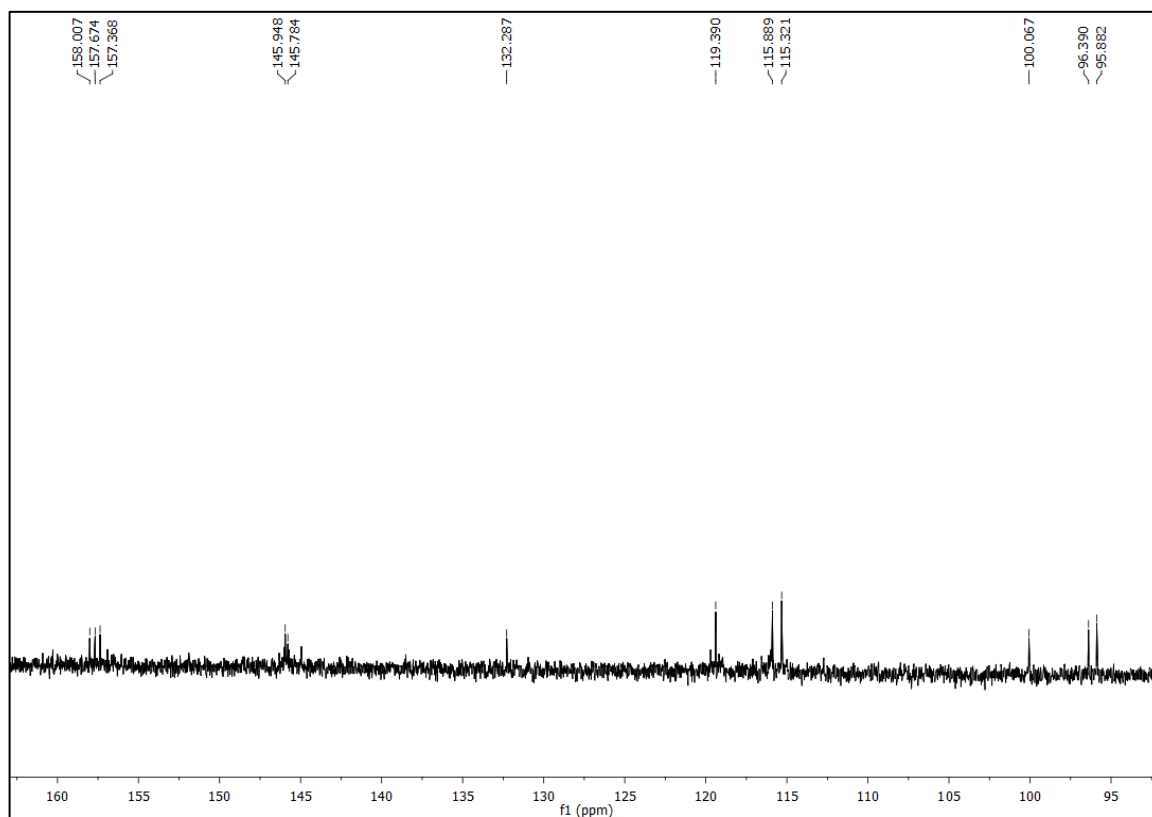


Figura 58 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-2 na região de 28 – 82 ppm.

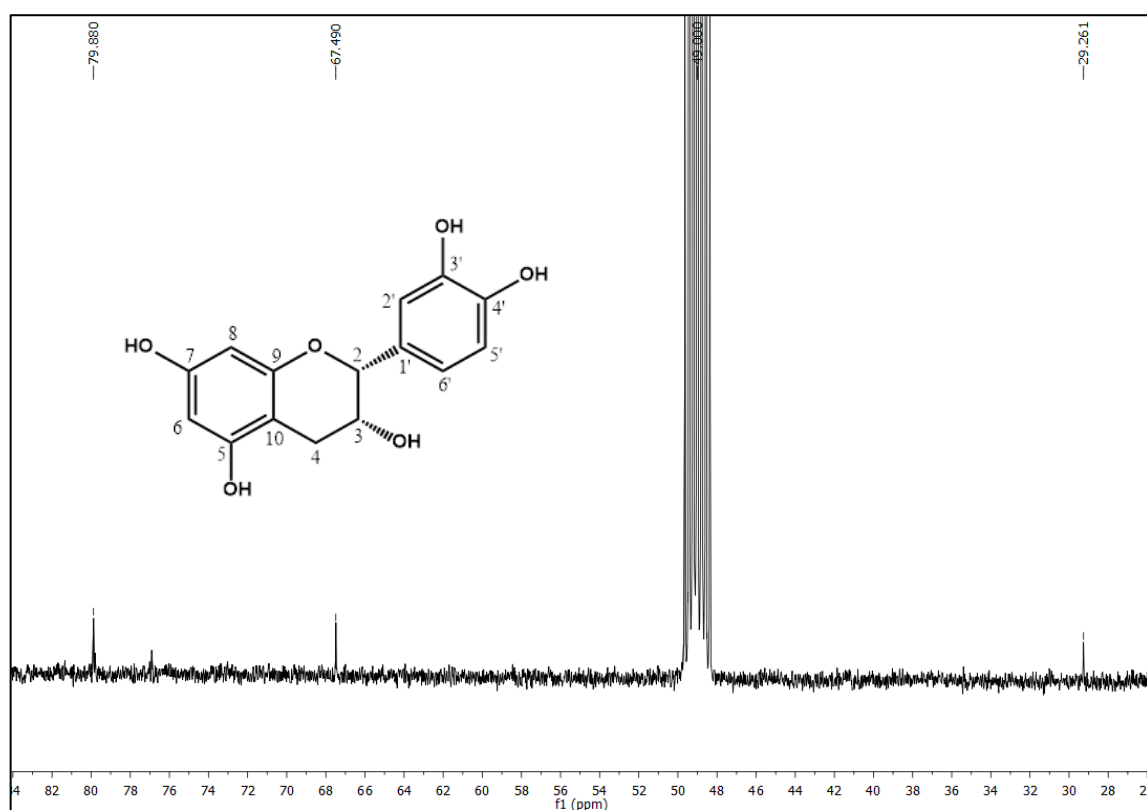


Figura 59 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2.

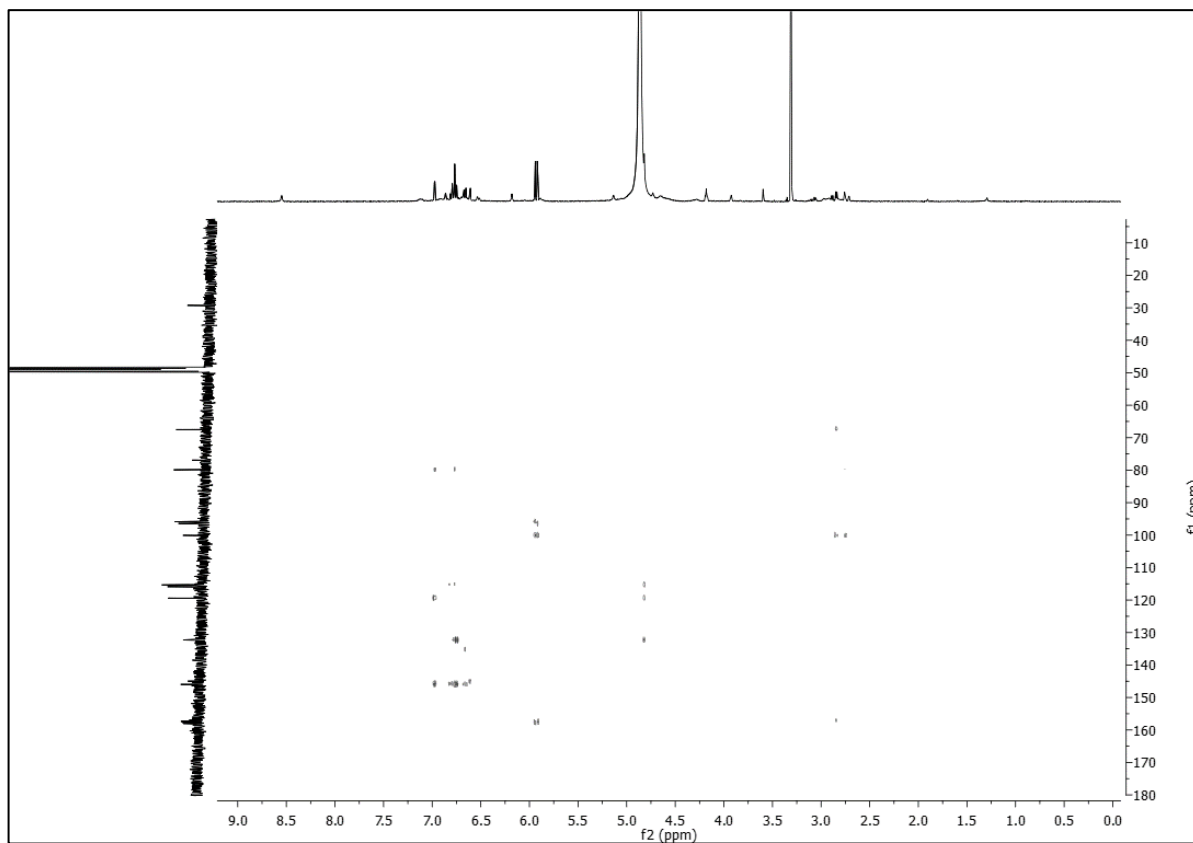


Figura 60 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (4,70 – 7,30 ppm) x (80,0 – 160,0 ppm).

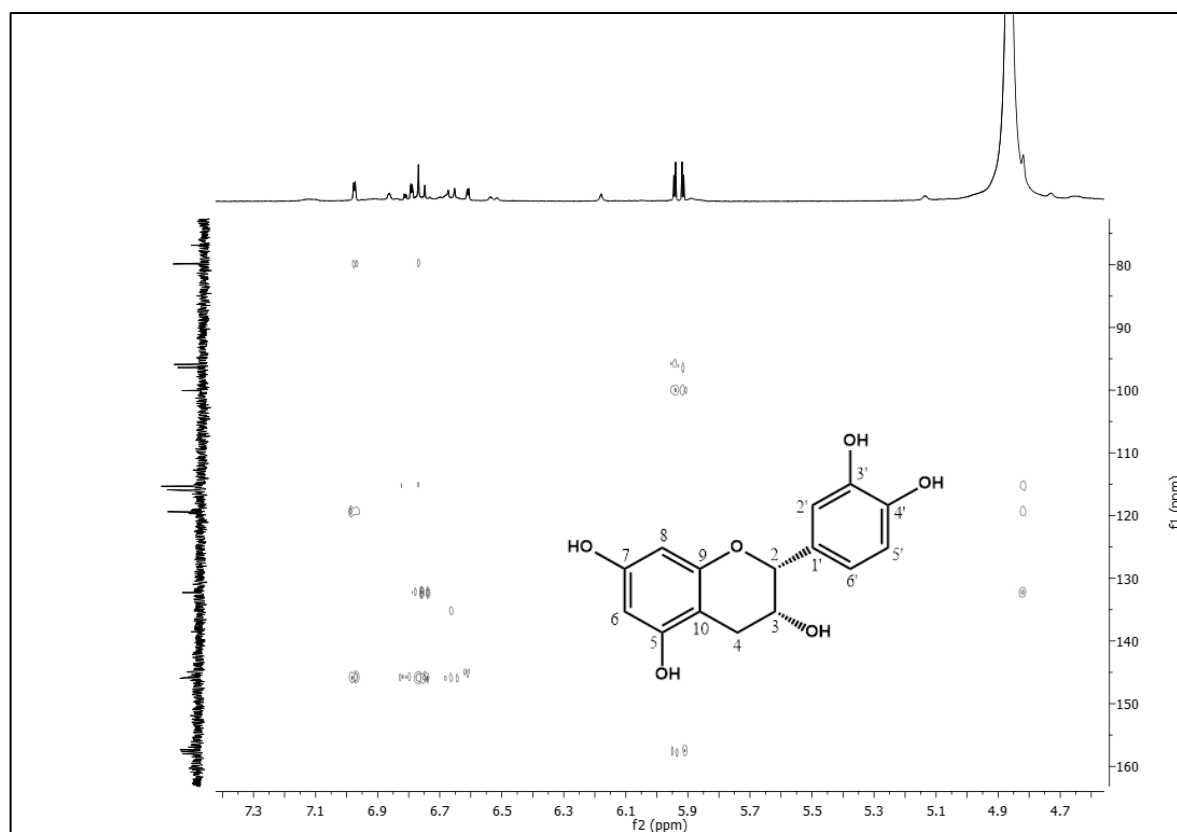


Figura 61 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-2 na região de (2,45 – 3,05 ppm) x (65,0 – 105,0 ppm).

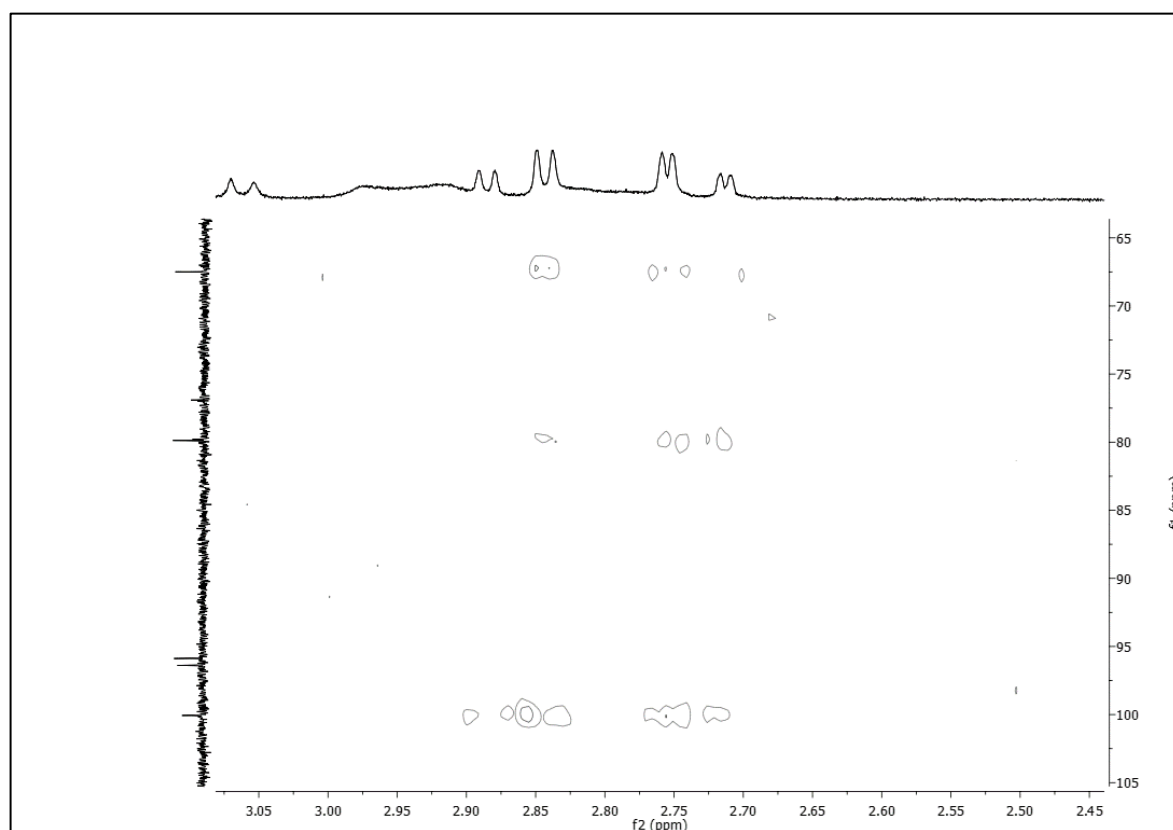
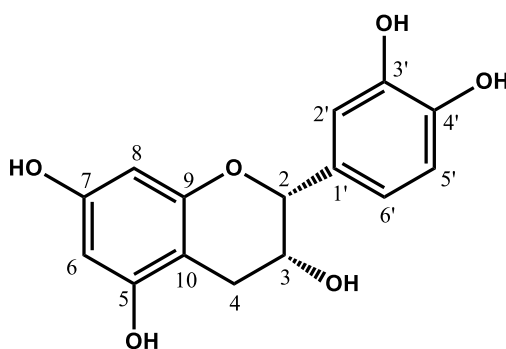


Figura 62 - Estrutura da epicatequina.



5.5. Identificação estrutural de Es-3

O composto Es-3 foi obtido como um sólido avermelhado. A fórmula molecular do composto ES-3, C₂₄H₂₀O₉, foi concluída a partir de seu HRESIMS, que mostrou um pico do íon quasi-molecular em *m/z* 451.1045 [M-H] como pode ser visualizado na Figura 63.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64) e em suas expansões (Figura 65, Figura 66, Figura 67), foram observados 23 deslocamentos químicos para 24 átomos de carbono, e a partir destes, foi evidenciado a presença de doze carbonos não hidrogenados, três carbonos metínicos sp^3 , sete carbonos metínicos sp^2 e dois carbonos metilênicos sp^3 . A presença de três sinais de carbonos alifáticos em δ_{C} 79,7, δ_{C} 66,5 e δ_{C} 29,4, corroboraram com a presença de uma unidade de epicatequina, cujos sinais característicos já foram discutidos anteriormente, desta forma, foram atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, na referida ordem.

Essa evidência foi reforçada no espectro de RMN de ^1H (Figura 68) e em suas expansões (Figura 69, Figura 70, Figura 71), onde foi possível verificar a presença de um conjunto de sinais referentes a hidrogênios de carbonos metilênicos sp^3 em δ_{H} 2,89 (1H, m) e δ_{H} 2,82 (1H, m), sendo atribuídos aos hidrogênios do carbono metilênico sp^3 (C-4) da unidade de epicatequina. Os hidrogênios oximetínico (H-3) e oxibenzílico (H-2) foram assinalados, respectivamente, pelos deslocamentos em δ_{H} 4,25 (1H, m) e δ_{H} 4,84 (1H, s), característicos da estrutura. Vale ressaltar que prótons de carbonos sp^3 apresentam uma faixa de ressonância menor em comparação aos hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Uma vez que estes apresentam maior caráter s (33%), os tornando mais eletronegativos. Isto ocorre porque o orbital s mantém seus elétrons mais próximos do núcleo, resultando assim, em menor blindagem do próton (PAVIA et al., 2015).

O sistema aromático de acoplamento do tipo ABX da fração de epicatequina foi determinado com base nos deslocamentos químicos em δ_{H} 6,97 (d, $J = 1,6$ Hz), δ_{H} 6,76 (d, $J = 3,2$ Hz) e δ_{H} 6,78 (dd, $J = 1,6$ e 8,4 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6'. Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 131,9, δ_{C} 115,0, δ_{C} 145,1, δ_{C} 145,9, δ_{C} 115,9 e δ_{C} 119,1, apoiaram essa evidência, equivalendo aos carbonos C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6' (XU et al., 2013).

No espectro de RMN de ^1H , foi observado um simpleto de prótons aromáticos em δ_{H} 6,21, que sugeriu uma substituição na posição 6 ou 8 do anel A. A presença de um grupo fenilpropanoide foi deduzida a partir de sinais condizentes com a presença de um segundo sistema aromático ABX substituído, dois sinais para carbonos alifáticos e um deslocamento químico característico de carbonila.

O grupo fenil trissubstituído da unidade fenilpropanoide mostrou no espectro de RMN de ^1H , um duplo duplete em δ_{H} 6,44 (1H, $J = 2,4$ e 8,0 Hz) e dois dupletos, um em δ_{H} 6,52 (1H, $J = 2,4$ Hz) e em δ_{H} 6,61 (1H, $J = 8,4$ Hz), sendo atribuídos aos

hidrogênios H-6'', H-2'' e H-5'', respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C os sinais em δ_{C} 135,3, δ_{C} 115,0, δ_{C} 146,2, δ_{C} 145,2, δ_{C} 116,4 e δ_{C} 119,1, foram condizentes com a presença desse segundo anel aromático trissubstituído, correspondendo nesta ordem aos carbonos C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' e C-6'' (BELTRAME et al., 2006).

A presença do duplete largo em δ_{H} 4,54 (1H, $J = 5,6$ Hz) associado ao conjunto de sinais característicos de hidrogênios ligados a um carbono metilênico sp^3 , em δ_{H} 3,06 (1H, dd, $J = 7,2$ e $16,0$) e em δ_{H} 2,88 (1H, br. d, $J = 1,6$ Hz), reforçou a evidência de que o substituinte se tratava de uma unidade fenilpropanóide, sendo atribuídos aos hidrogênios H-7'', H-8''a e H-8''b, respectivamente. Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C que corresponderam a essa porção alifática do fenilpropanoide, foram os deslocamentos químicos em δ_{C} 35,3, do carbono metínico sp^3 C-7'', δ_{C} 38,5 do carbono metilênico sp^3 C-8'' e δ_{C} 170,7 do carbono carbonílico C-9'' (XU et al., 2013). Estas e outras atribuições foram compiladas na Tabela 5.

Essas atribuições puderam ser confirmadas por análise das correlações no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Figura 72), e em suas expansões (Figura 73, Figura 74). Onde observou-se correlações entre os sinais em δ_{H} 4,84 (H-2) com δ_{C} 79,7 (C-2), de δ_{H} 4,25 (H-3) com δ_{C} 66,5 (C-3), de δ_{H} 2,89 (H-4a) e 2,82 (H-4b) com δ_{C} 29,4 (C-4), de δ_{H} 6,97 (H-2') com δ_{C} 115,0 (C-2'), de δ_{H} 6,76 (H-5') com δ_{C} 115,9 (C-5') e de δ_{H} 6,78 (H-6') com δ_{C} 119,1 (C-6') da porção de epicatequina. Outras correlações entre os sinais em δ_{H} 4,54 (H-7'') com δ_{C} 35,3 (C-7''), de δ_{H} 3,06 (H-8''a) e δ_{H} 2,88 (H-8''b) com δ_{C} 38,5 (C-8''), de δ_{H} 6,52 (H-2'') com δ_{C} 115,0 (C-2''), de δ_{H} 6,61 (H-5'') com δ_{C} 116,4 (C-5'') e de δ_{H} 6,44 (H-6'') com δ_{C} 119,1 (C-6'') confirmaram as atribuições aos carbonos da unidade fenilpropanóide. Estas correlações podem ser visualizadas na Tabela 5.

No espectro HMBC (Figura 75) e em suas expansões (Figura 76, Figura 77), pode-se confirmar os assinalamentos no sistema aromático ABX da porção de epicatequina a partir das correlações entre os sinais dos hidrogênios H-2 (δ_{H} 4,84) com os carbonos C-6' (δ_{C} 119,1) e C-1' (δ_{C} 131,9), de H-2' (δ_{H} 6,97) com C-2 (δ_{C} 79,7) e C-6' (δ_{C} 96,2), de H-5' (δ_{H} 6,76) com C-1' (δ_{C} 131,9) e de H-6' (δ_{H} 6,78) com C-2 (δ_{C} 79,7) e C1' (δ_{C} 131,9). Para a região alifática da epicatequina foram observadas correlações entre os sinais em δ_{H} 2,89 (H-4a) e em δ_{H} 2,82 (H-4b) com o sinal em δ_{C} 105,2 (C-10), confirmando as atribuições da posição 4. A posição de inserção do unidade fenilpropanoide na epicatequina foi confirmada através da ausência de correlação dos hidrogênios desta unidade com o carbono C-5 (δ_{H} 157,3) e pela

presença das correlações entre o hidrogênio H-7'' (δ_H 4,54) com os carbonos C-8 (106,0) e C-7 (δ_C 152,0), este hidrogênio ainda apresentou correlações com os carbonos C-9'' (δ_C 170,7), C-8'' (δ_C 38,5), C-1'' (δ_C 135,3) e C-2'' (δ_C 115,0), confirmando o assinalamento nesta posição. A correlação entre os hidrogênios H-8''a (3,06) e H-8''b (2,88) com os carbonos C-1'' (135,3) e C9'' (170,7) confirmaram as atribuições realizadas na posição 8''. Os assinalamentos no sistema aromático ABX foram confirmados pelas correlações entre os hidrogênios H-6'' (δ_H 6,44) com os carbonos C-2'' (δ_C 115,0) e C-7'' (δ_C 35,3), de H-2'' (δ_H 6,52) com C-6'' (δ_C 119,1) e C-7'' (δ_C 35,3) e de H-5'' (δ_H 6,61) com C-6'' (δ_C 119,1) e C-1'' (δ_C 135,3). Estes dados podem ser encontrados na Tabela 5.

A partir da análise destes dados espectrais e em comparação com dados encontrados na literatura, foi possível identificar a substância Es-3 como sendo um isômero da cinchonaína I, e a partir dos experimentos de rotação ótica foi determinada a estereoquímica absoluta da substância, obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -32$ (metanol, c. 0,001) que de acordo com os dados reportados na literatura se trata da cinchonaina Ia, sua estrutura pode ser visualizada na Figura 78 (XU et al., 2013; RESENDE et al., 2011; BELTRAME et al., 2006).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-3, cinchonaína Ia, em comparação aos dados obtidos por XU et al., 2013.

Posição	HMQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Es-08	δ_{C} Es-08	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	δ_{H}	δ_{C}
2	4,84 (1H, s)	79,7	H-2' e H-6'	4,87 (1H, s)	79,7
3	4,25 (1H, m)	66,5	-	4,25 (1H, m)	66,6
4a	2,89 (1H, m)	29,4	-	2,91 (1H, dd, $J=16,8$ e 4,2)	29,5
4b	2,82 (1H, m)			2,84 (1H, dd, $J=16,8$ e 2,0 Hz)	
5	-	157,3	-	-	157,3
6	6,21 (1H, s)	96,2	-	6,21 (1H, s)	96,2
7	-	152,0	H-7''	-	152,1
8	-	106,0	H-7''	-	106,0
9	-	153,4	-	-	153,4
10	-	105,2	H-4a e H-4b	-	105,2
1'	-	131,9	H-2, H-5' e H-6'	-	131,9
2'	6,97 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	115,0	-	6,97 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	115,1
3'	-	145,1	-	-	145,1
4'	-	145,9	-	-	146,0
5'	6,76 (1H, d, $J=3,2$ Hz)	115,9	-	6,77 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	116,0
6'	6,78 (1H, dd, $J=1,6$ e 8,4 Hz)	119,1	H-2 e H-2'	6,78 (1H, dd, $J=1,8$ e 8,0 Hz)	119,2
1''	-	135,3	H-5'', H-7'' e H-8''	-	135,4
2''	6,52 (1H, d, $J=2,4$ Hz)	115,0	H-6'' e H-7''	6,52 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	115,1
3''	-	146,2	-	-	146,3
4''	-	145,2	-	-	145,8
5''	6,61 (1H, d, $J=8,4$ Hz)	116,4	-	6,45 (1H, dd, $J=7,8$ e 1,8 Hz)	116,5
6''	6,44 (1H, dd, $J=8,0$ e 2,4 Hz)	119,1	H-2'' e H-5''	6,61 (1H, d, $J=8,2$ Hz)	119,2
7''	4,54 (1H, br. d, $J=5,6$ Hz)	35,3	H-2'' e H-6''	4,55 (1H, dl, $J=6,0$ Hz)	35,4
8''a	3,06 (1H, dd, $J=16,0$ e 7,2 Hz)	38,5	H-7''	3,07 (1H, dd, $J=15,6$ e 7,2 Hz)	38,6
8''b	2,88 (1H, br. d, $J=1,6$ Hz)			2,87 (1H, dd, $J=15,6$ e 2,0 Hz)	
9''	-	170,7	H-7'' e H-8''	-	170,7

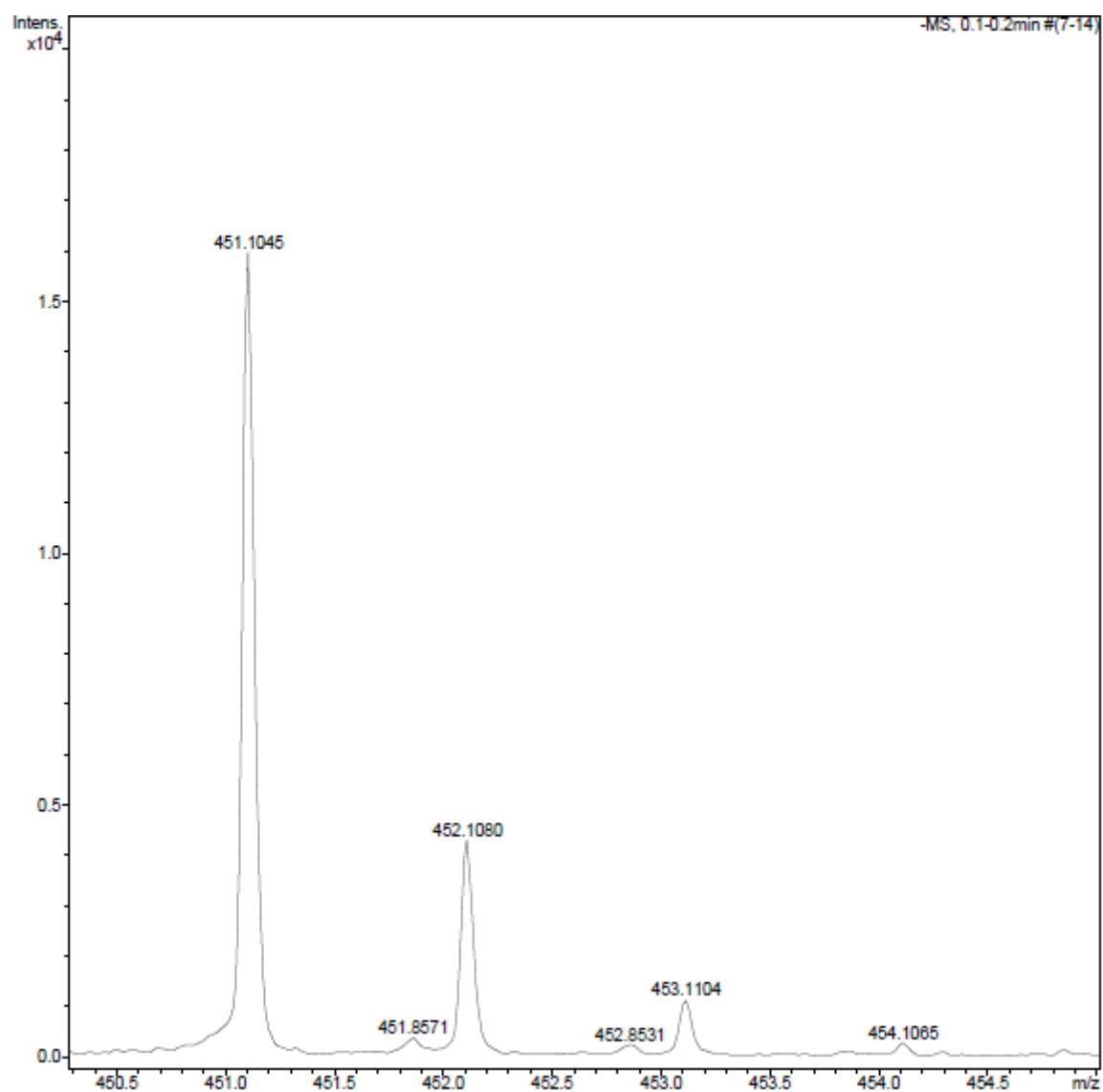
Figura 63 - Espectro de massa de Es-3.

Figura 64 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3.

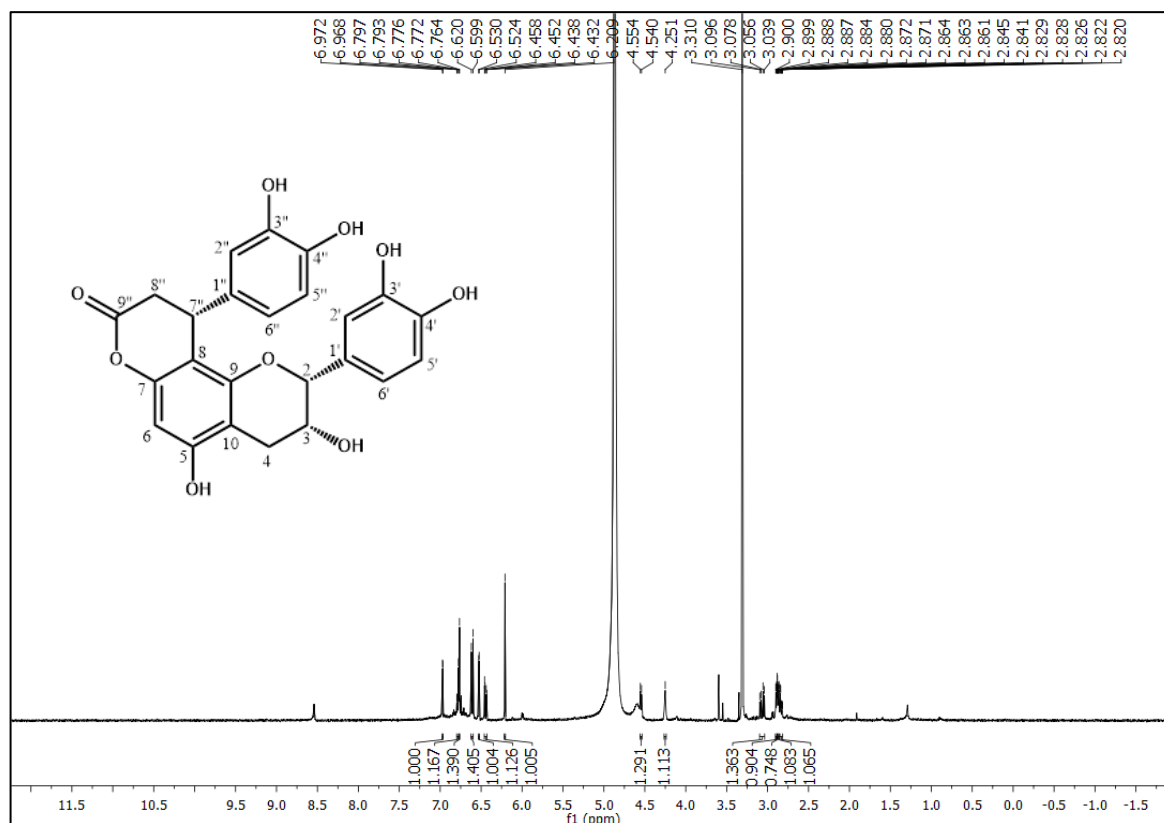


Figura 65 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 6,10 – 7,10 ppm.

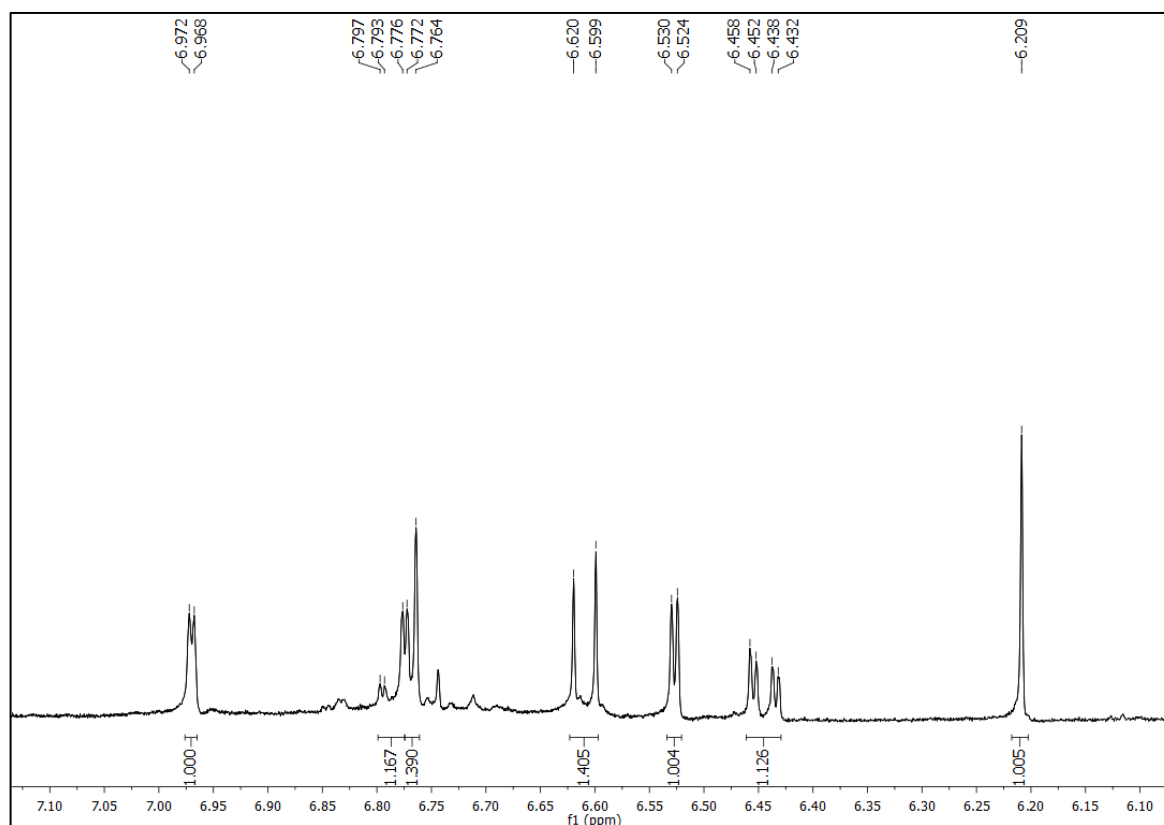


Figura 66 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz CD_3OD) de Es-3 na região de 3,70 – 5,30 ppm.

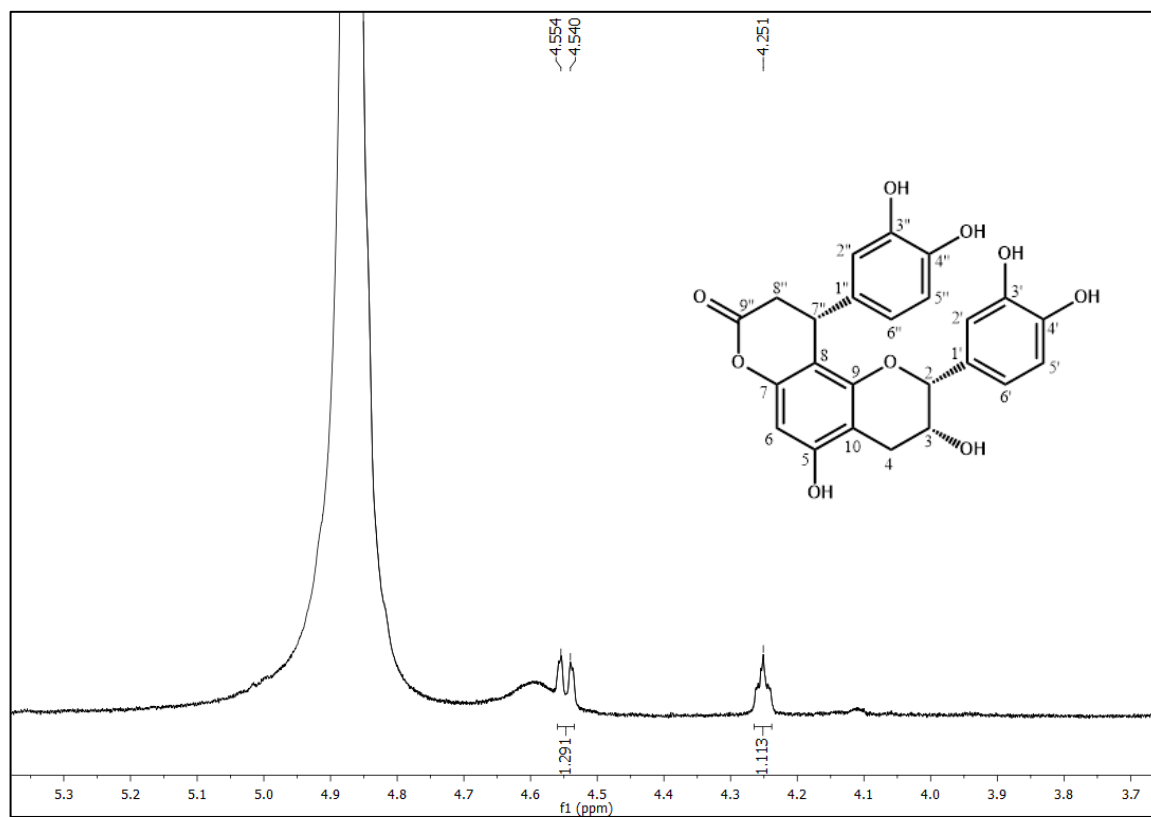


Figura 67 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 2,78 – 3,16 ppm.

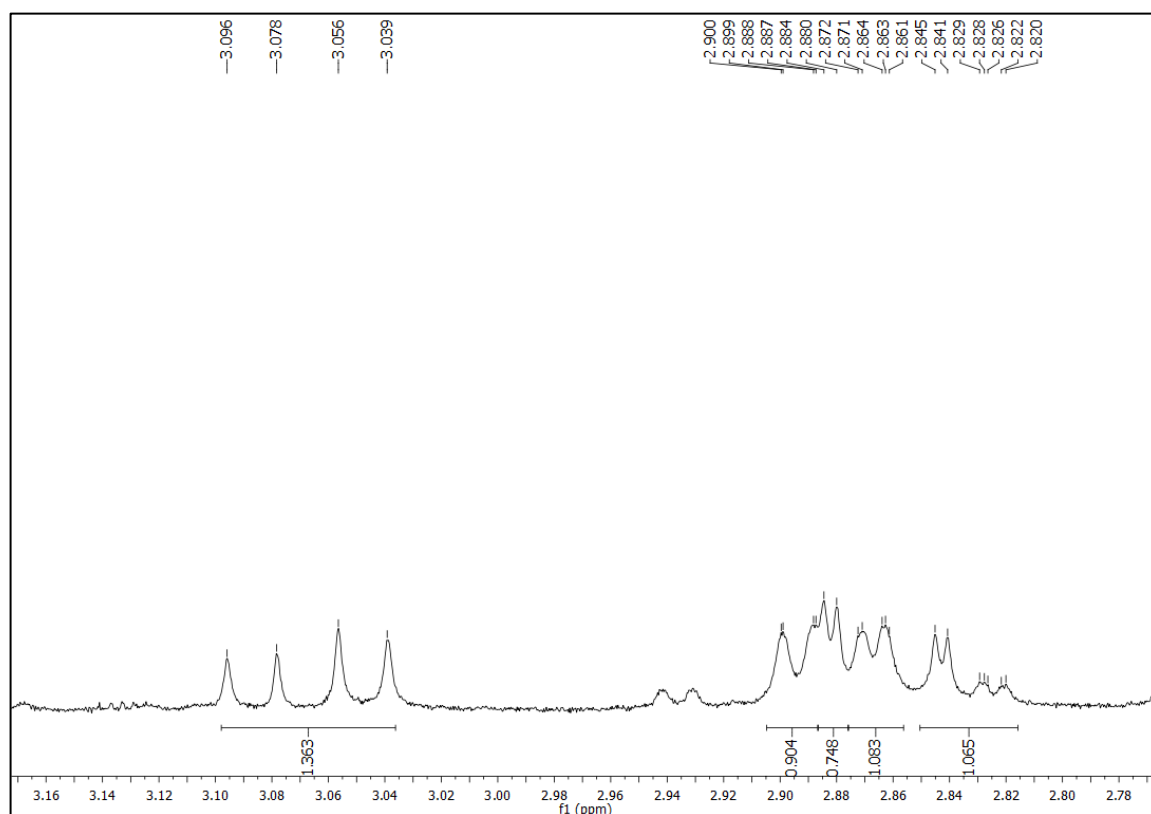


Figura 68 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3.

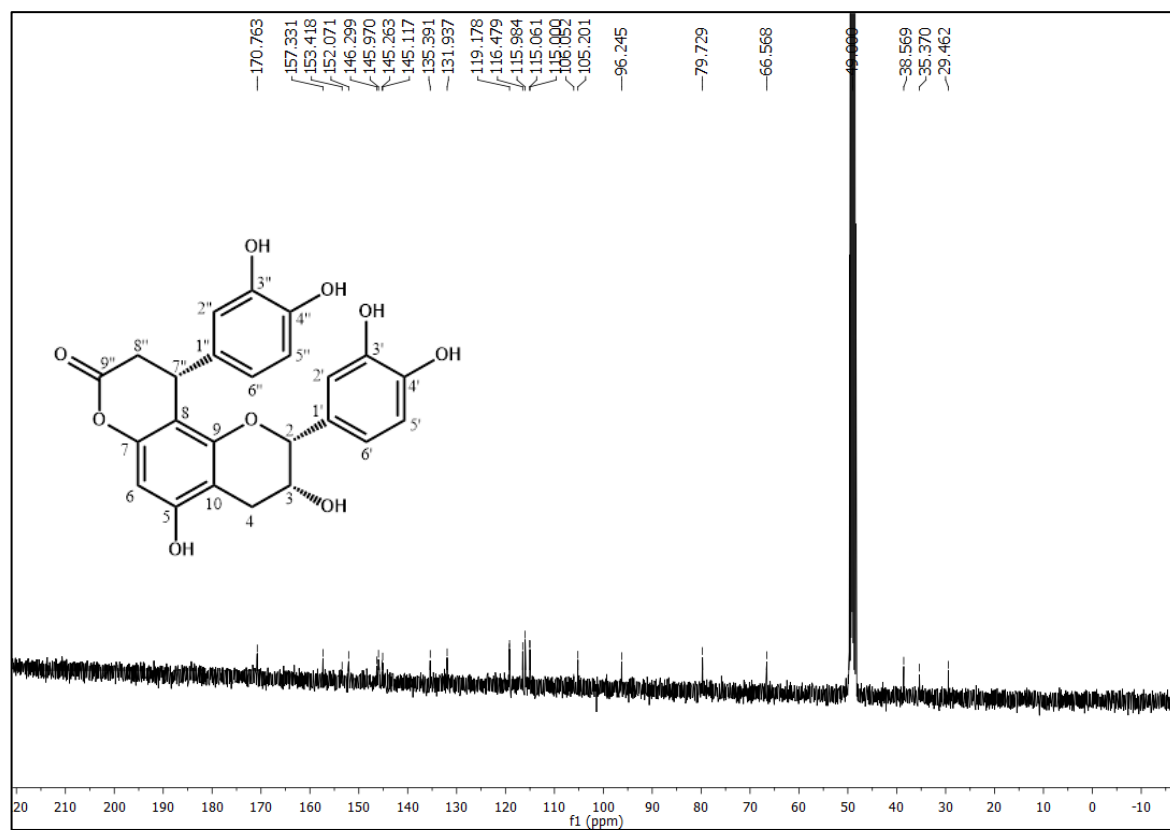


Figura 69 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 114 – 174 ppm.

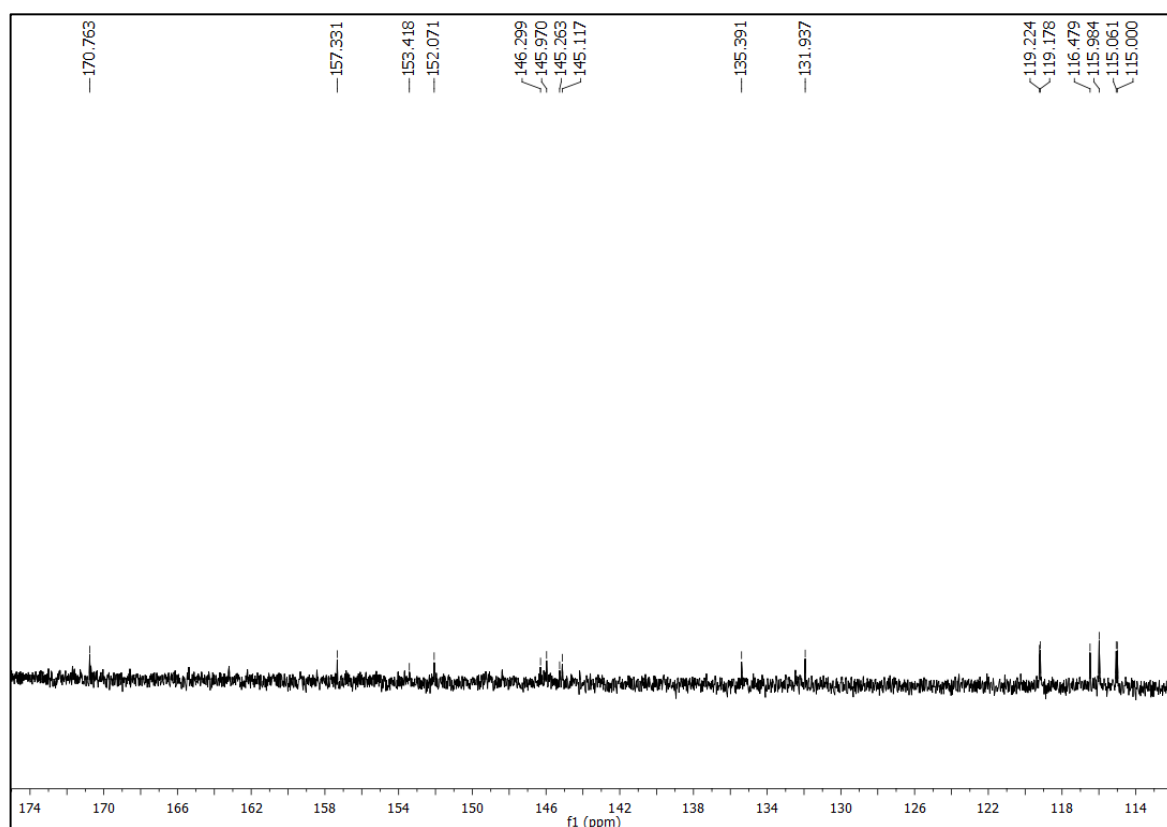


Figura 70 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 64 – 108 ppm.

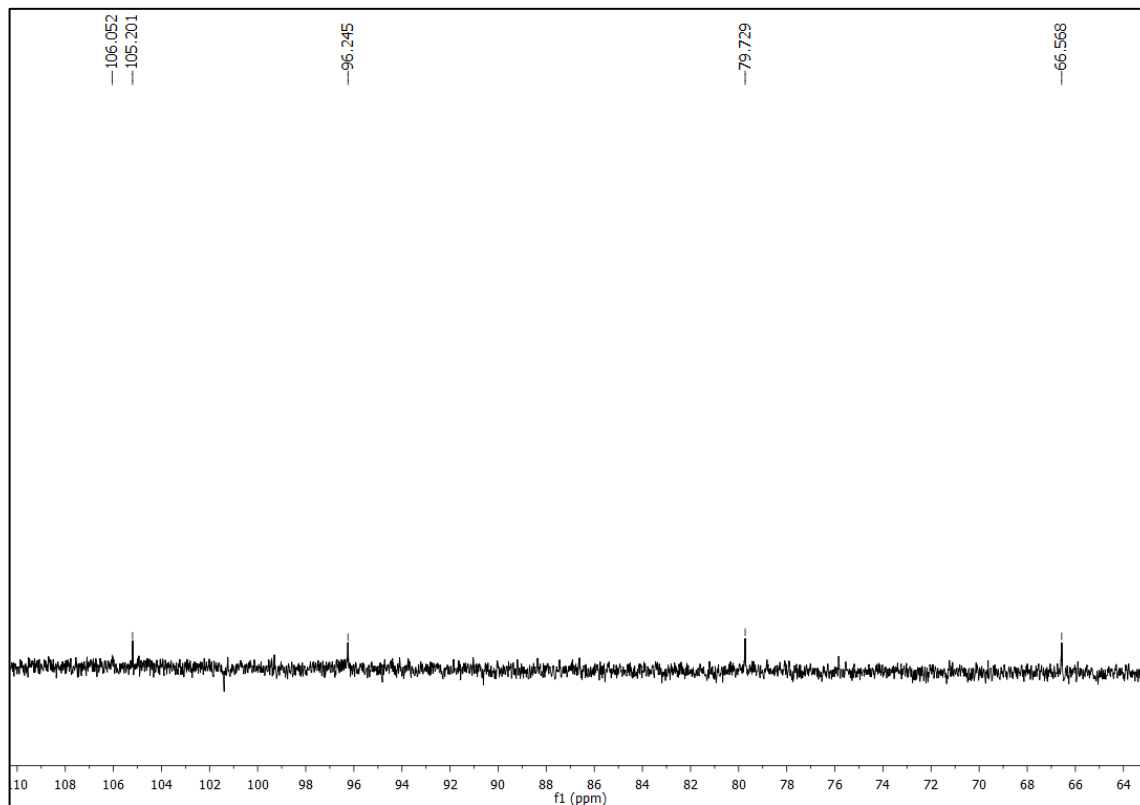


Figura 71 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-3 na região de 28,5 – 41,5 ppm.

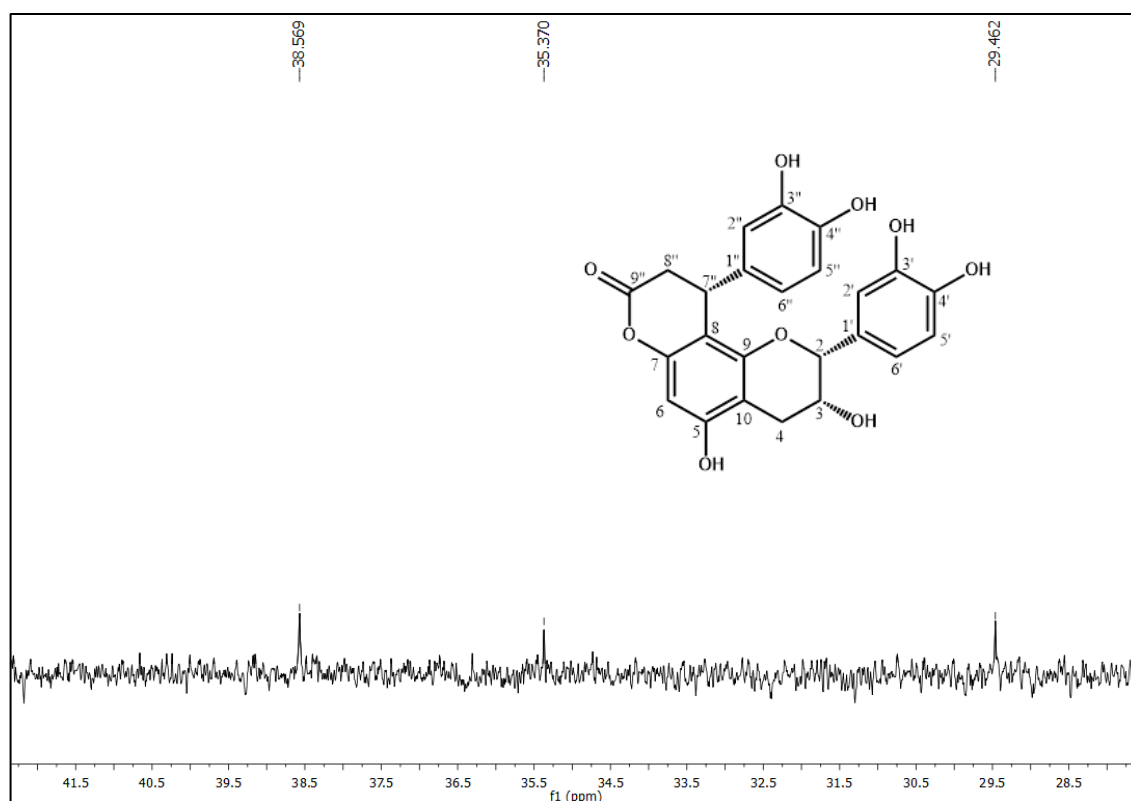


Figura 72 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3.

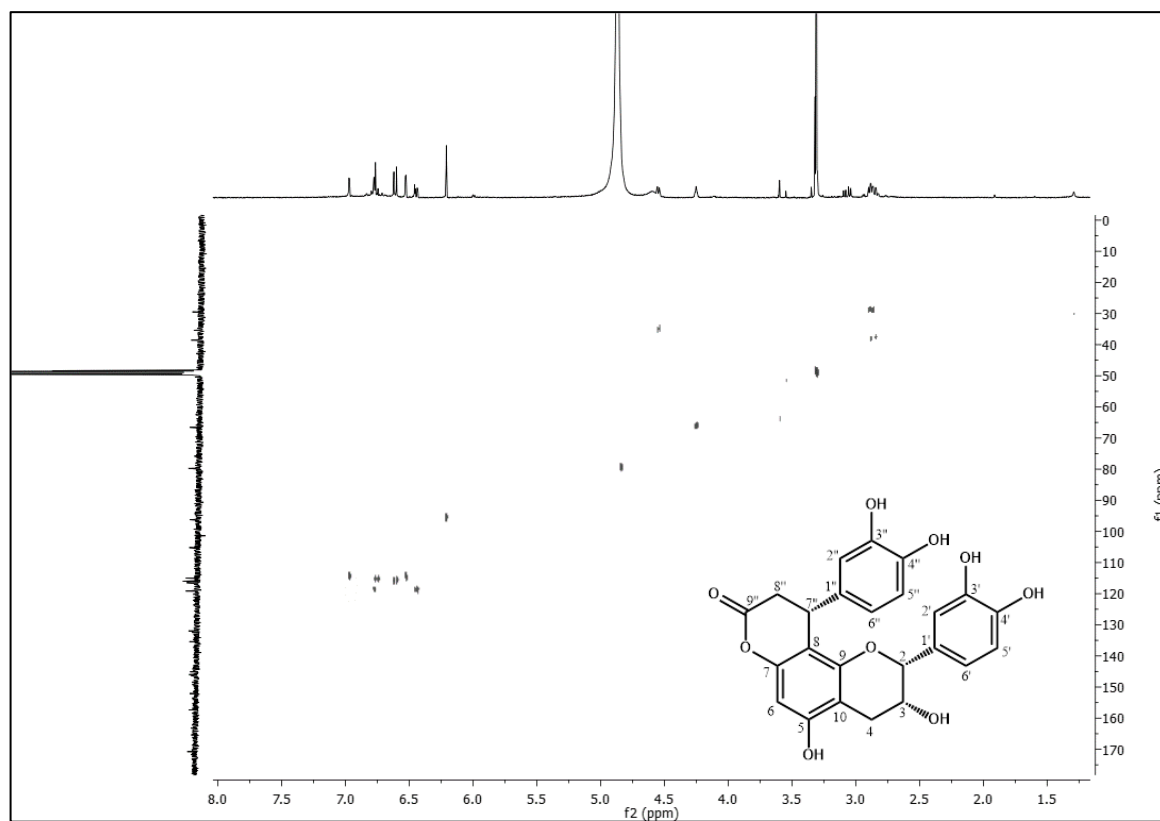


Figura 73 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (2,70 – 5,10 ppm) x (20,0 – 90,0 ppm).

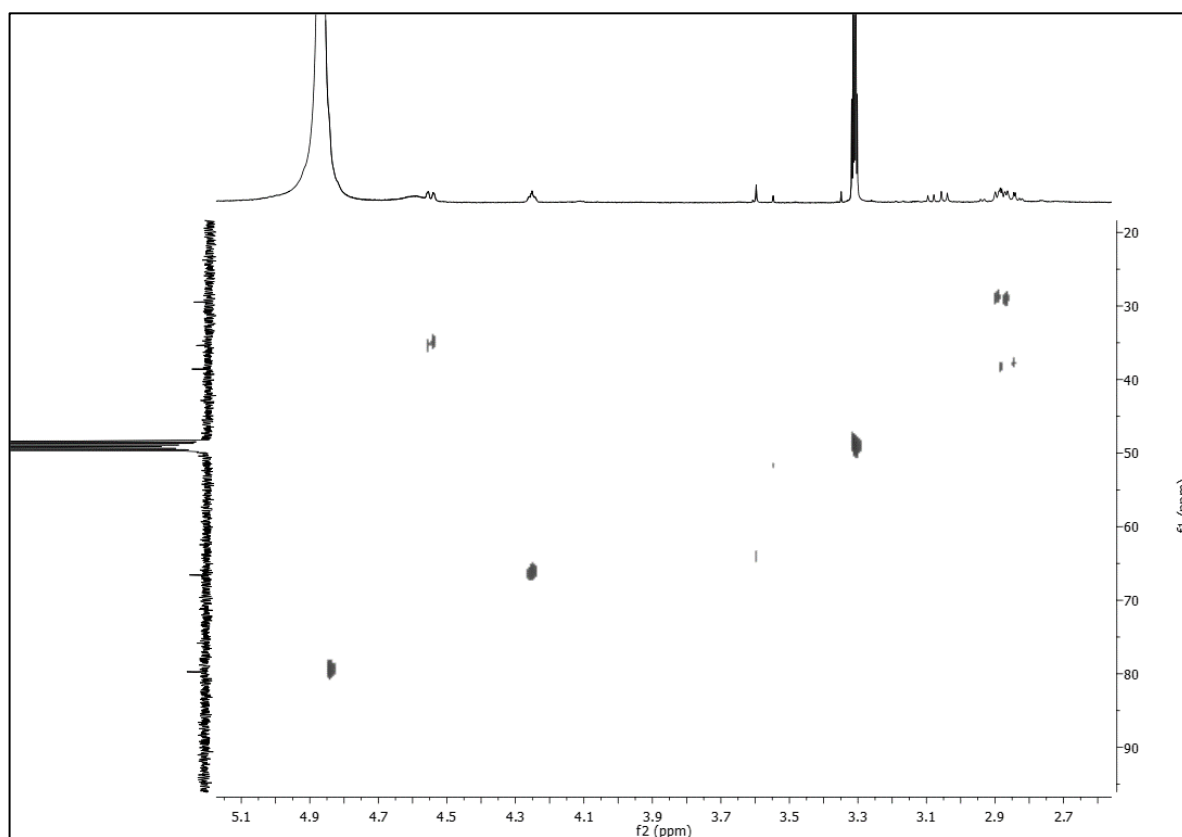


Figura 74 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (5,90 – 7,20 ppm) x (90,0 – 130,0 ppm).

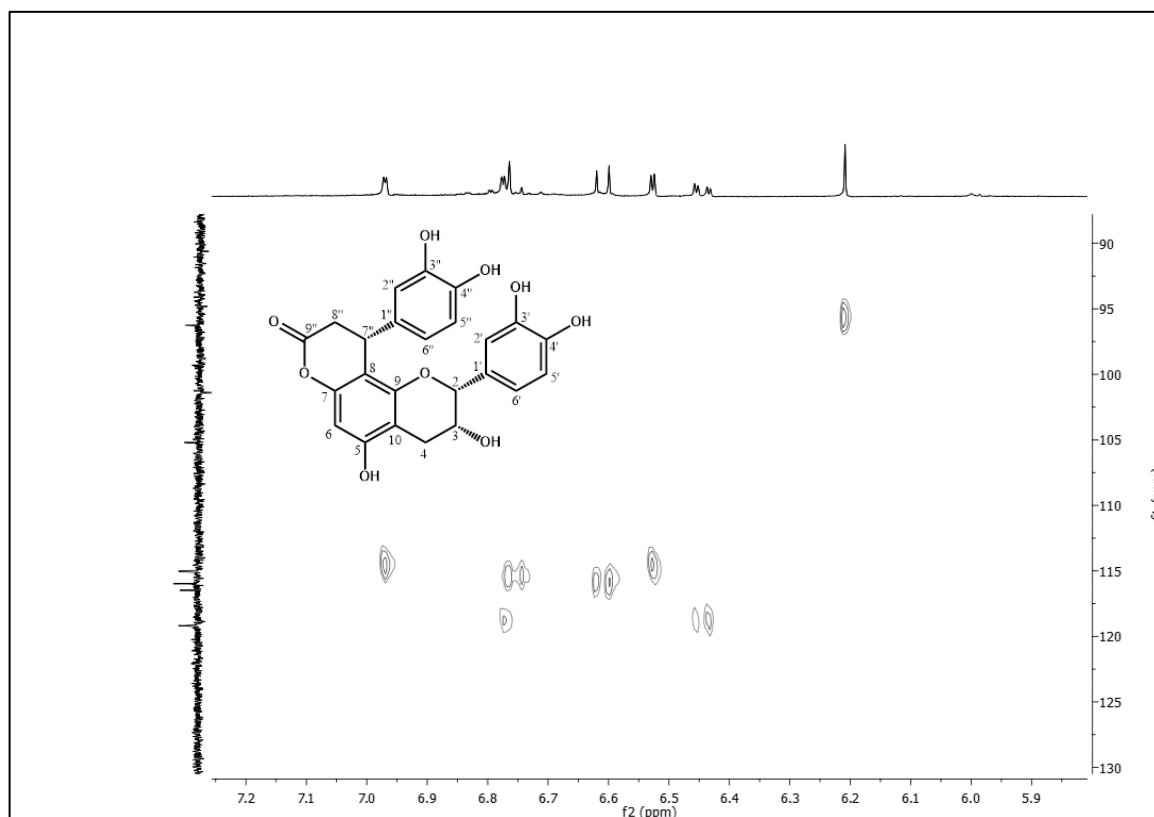


Figura 75 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3.

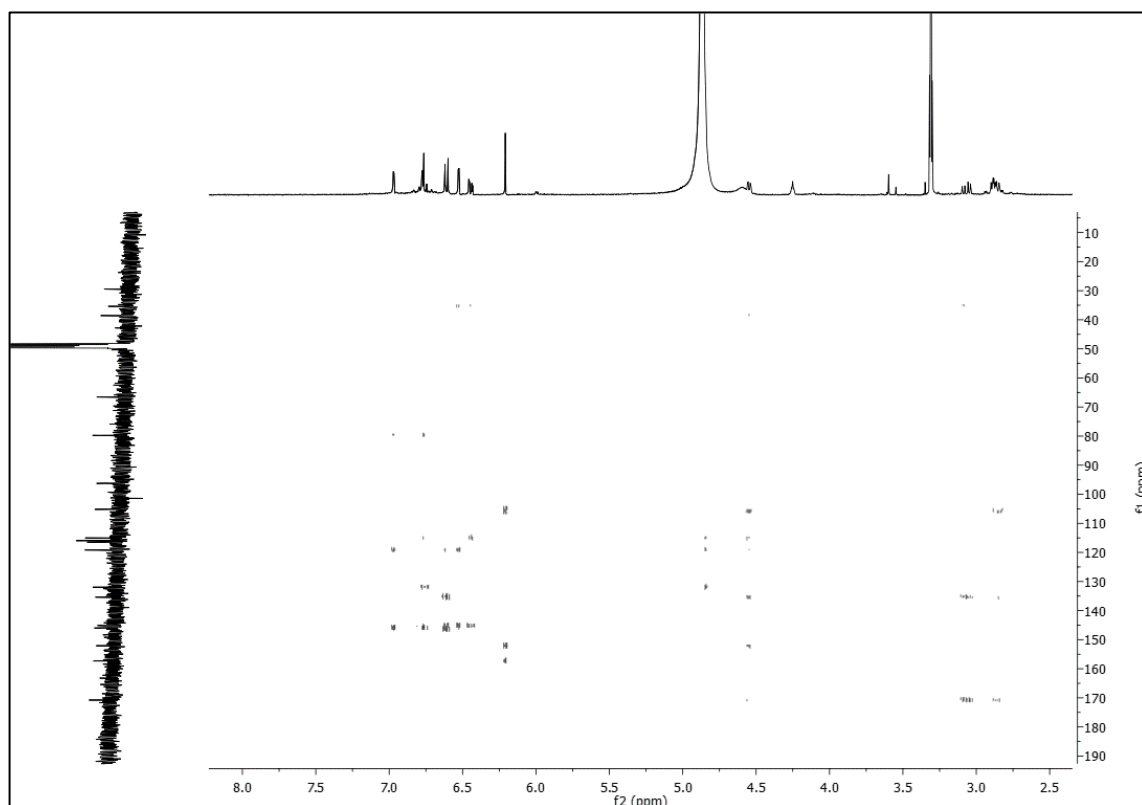


Figura 76 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (2,80 – 5,20 ppm) x (40,0 – 180,0 ppm).

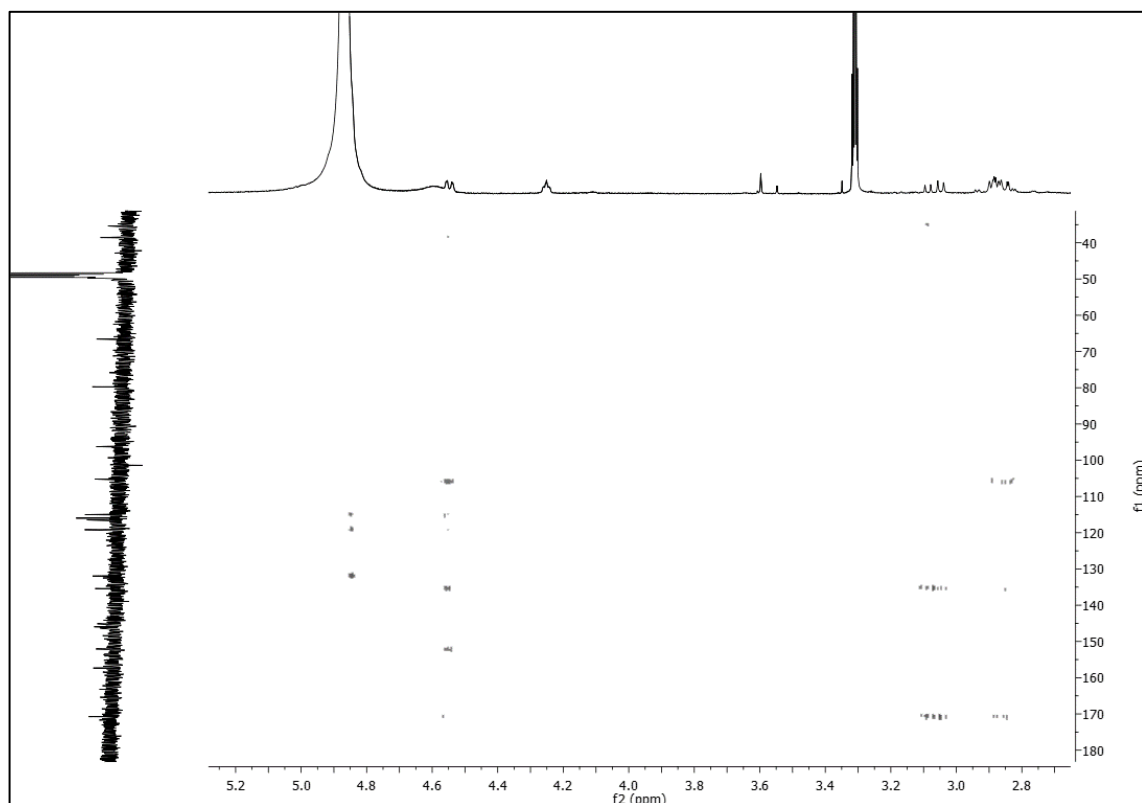


Figura 77 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-3 na região de (5,90 – 7,60 ppm) x (30,0 – 160,0 ppm).

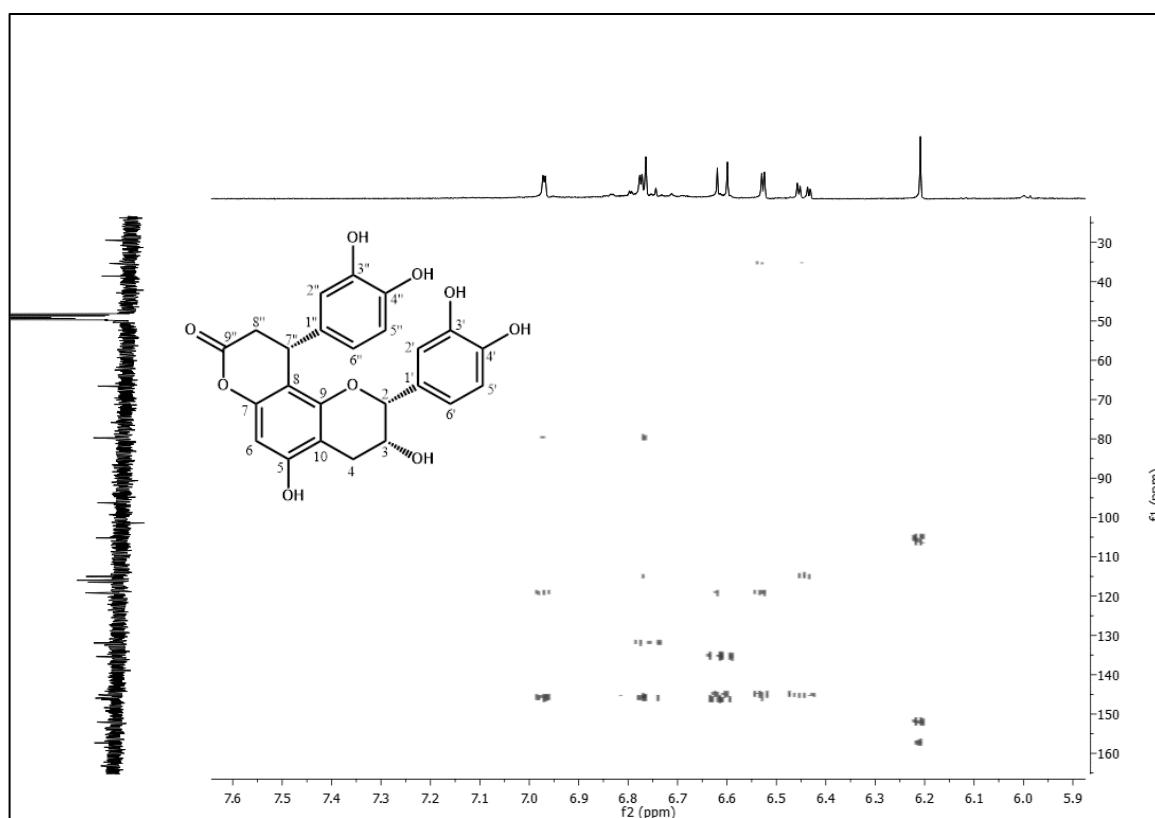
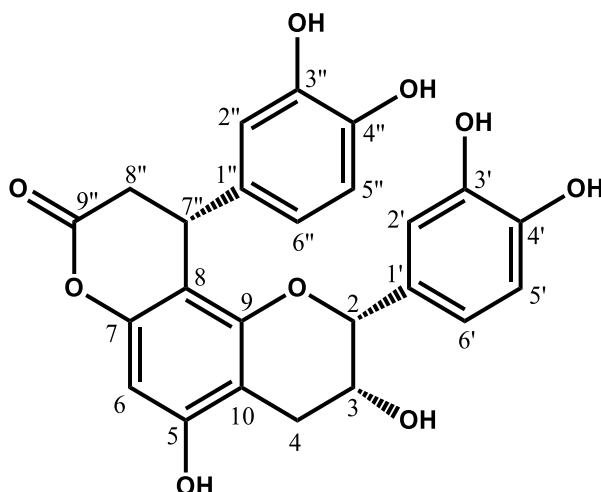


Figura 78 – Estrutura da cinchonaína la.



5.6. Identificação estrutural de Es-4

O composto Es-4 foi isolado na forma de um pó amorfo laranja, com 0,0025 g. O espectro de massas obtido (Figura 79) mostrou um pico em m/z 463,0882 $[M-H]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$. Com base nesses dados, e em comparação com os obtidos no estudo de desreplicação, levantou-se a hipótese que possivelmente o composto Es-4 se tratava da substância do pico 41, a quercetina-O-hexosídeo.

Não foi possível obter espectros de RMN de ^{13}C , uma vez que a quantidade de substância coletada e o elevado tempo de relaxamentos dos carbonos dificultaram a geração de sinais no espectro. O mesmo foi observado nos experimentos bidimensionais de RMN.

No espectro de RMN de 1H (Figura 80), obtido a 400 MHz em CD_3OD , e em suas expansões (Figura 81, Figura 82, Figura 83) foi evidenciado um sistema aromático do tipo ABX, correspondente ao anel B da aglicona. No qual, dois dupletos com integrais para um hidrogênio cada, em δ_H 6,87 ($J = 6,8$) e em δ_H 7,70 ($J = 1,6$), encontravam-se acoplados com um duplo duplete em δ_H 7,58 (1H, $J = 1,6$ e 6,8), e foram atribuídos ao conjuntos de hidrogênios do anel B, H-5', H-2' e H-6', respectivamente. Os dupletos em δ_H 6,37 ($J = 1,6$) e δ_H 6,19 ($J = 1,6$), ambos com integral para um hidrogênio, foram condizentes com os hidrogênios H-8 e H-6 do anel A do flavanol, respectivamente. Esses sinais são característicos do esqueleto da

Quercetina, reforçando assim, a hipótese levantada (ATAY et al., 2015; WUST et al., 2016).

A ausência do singlete em aproximadamente δ_H 6,70, característico do hidrogênio do carbono C-3 da quercetina, bem como a presença de deslocamentos característicos de açúcar na região de δ_H 3 – 4 ppm, correspondentes a unidade osídica, corroboraram com a inserção desta unidade no carbono C-3. Foram observados no total seis deslocamentos químicos condizentes com a presença de uma hexose, o duplete em δ_H 5,20 ($J = 6,0$), com integral para um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio anomérico do açúcar, e os multipletos em δ_H 3,42, δ_H 3,48, δ_H 3,35, δ_H 3,21 e o conjunto de sinais em δ_H 3,57 e δ_H 3,70, foram atribuídos nessa ordem, aos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''. A partir desses sinais e em comparação com os dados presentes na literatura, a suspeita da presença de uma hexose foi reforçada, no entanto, não foi possível identificar qual o açúcar presente apenas pelos sinais de RMN de 1H , podendo ser a glicose ou galactose em concordância com os sinais atribuídos (ATAY et al., 2015; WUST et al., 2016). Estas e outras atribuições estão reunidas na Tabela 6.

A partir desse conjunto de dados espectrais, e em comparação com os descritos na literatura, pode sugerir que o composto Es-4 se tratava de uma quercetina-3-O-hexosídeo, podendo ser a quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside ou a quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (Figura 84).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (400, CD_3OD) de Es-4, quercetina-3-O-hexosídeo, em comparação aos dados obtidos por ATAY et al., 2015 para quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (A) e quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (B).

Posição	δ_{H} Es-4	δ_{H} Referência A	δ_{H} Referência B
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	6,19 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	6,20 (1H, d, $J=1,7$ Hz)	6,20 (1H, d, $J=2,1$ Hz)
7	-	-	-
8	6,37 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	6,39 (1H, d, $J=1,7$ Hz)	6,39 (1H, d, $J=2,1$ Hz)
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,70 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	7,66 (1H, d, $J=2,2$ Hz)	7,84 (1H, d, $J=2,3$ Hz)
3'	-	-	-
4'	-	-	-
5'	6,87 (1H, d, $J=6,8$ Hz)	6,84 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	6,86 (1H, d, $J=8,8$ Hz)
6'	7,58 (1H, dd, $J=1,6$ e $6,8$ Hz)	7,63 (1H, dd, $J=2,2$ e $8,5$ Hz)	7,59 (1H, dd, $J=2,3$ e $8,8$ Hz)
1''	5,20 (1H, d, $J=6,0$ Hz)	5,25 (1H, d, $J=7,6$ Hz)	5,15 (1H, d, $J=8,2$ Hz)
2''	3,42 (m)	3,42 (1H, dd, $J=7,6$ e $9,0$ Hz)	3,53 (1H, dd, $J=8,2$ e $9,3$ Hz)
3''	3,48 (1H, m)	3,48 (1H, m)	3,22-3,34 (1H, m)
4''	3,35 (1H, m)	3,35 (1H, m)	3,61 (1H, d, $J=3,2$ Hz)
5''	3,21 (1H, m)	3,22 (1H, m)	3,22-3,34 (1H, m)
6''	3,57 (1H, m) 3,70 (1H, dd, $J=2,0$ e $9,6$ Hz)	3,58 (1H, dd, $J=12,0$ e $5,5$ Hz) 3,71 (1H, dd, $J=12,0$ e $2,5$ Hz)	3,60 3,71 (1H, dd, $J=12,0$ e $2,5$ Hz)

Figura 79 - Espectro de massa de Es-4.

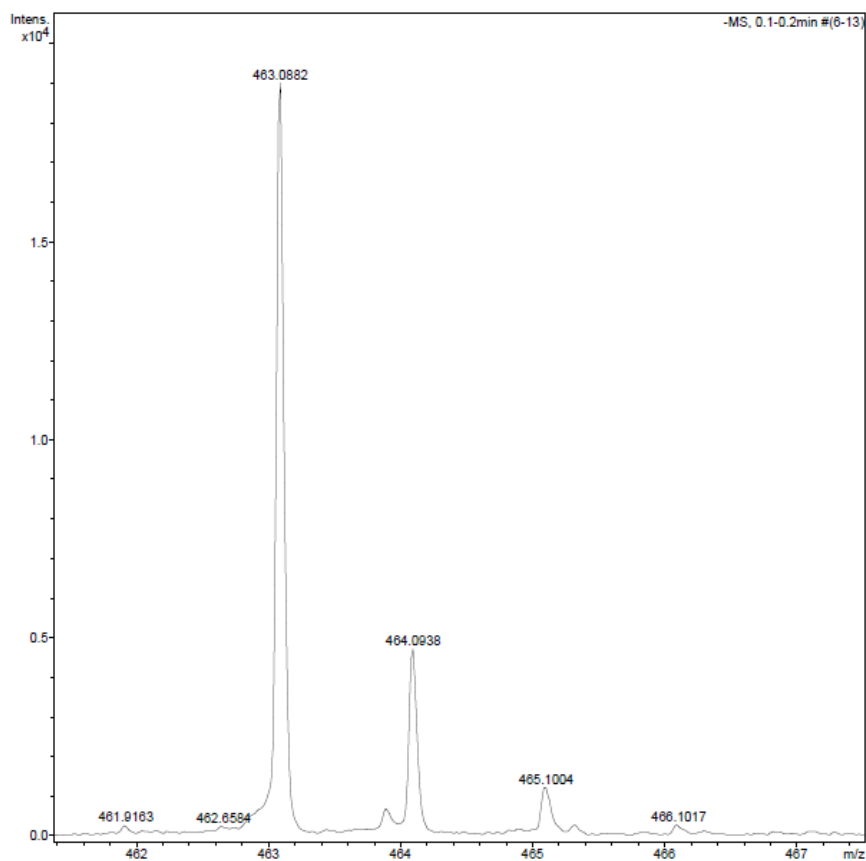


Figura 80 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4.

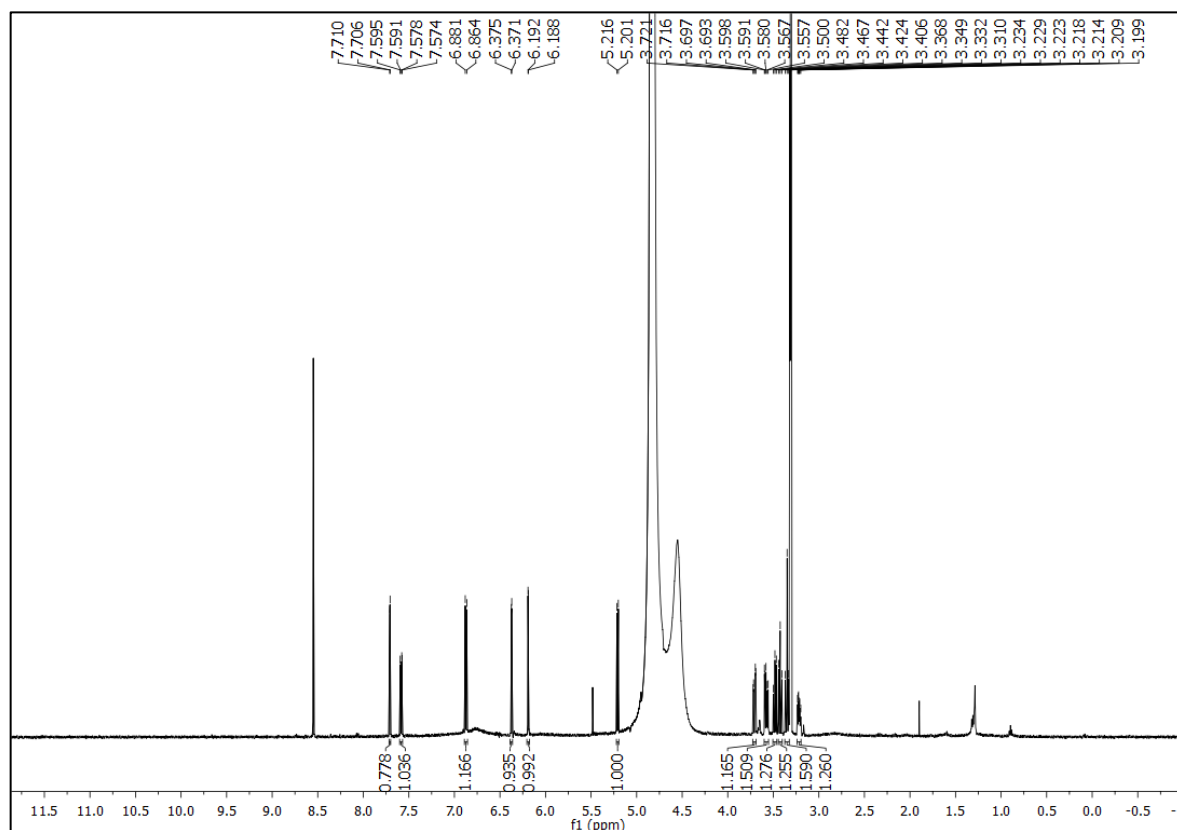


Figura 81 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 6,80 – 7,85 ppm.

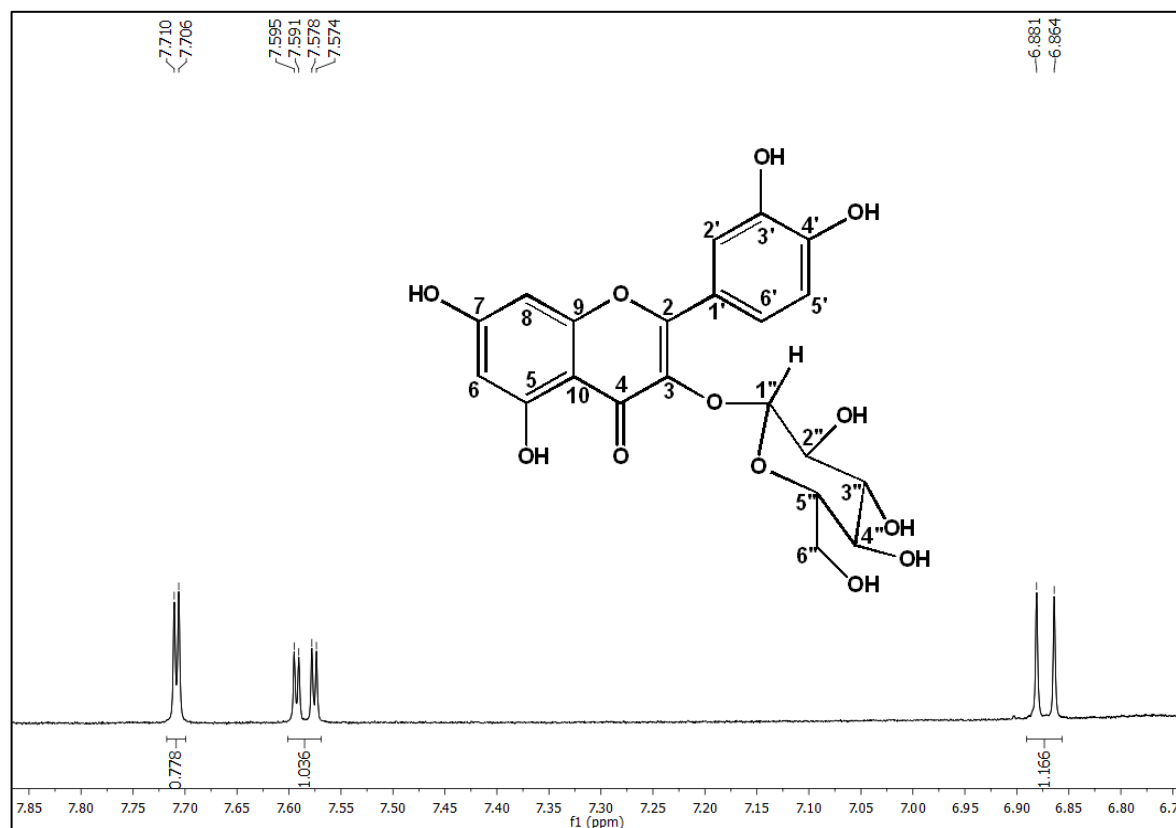


Figura 82 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 5,15 – 6,45 ppm.

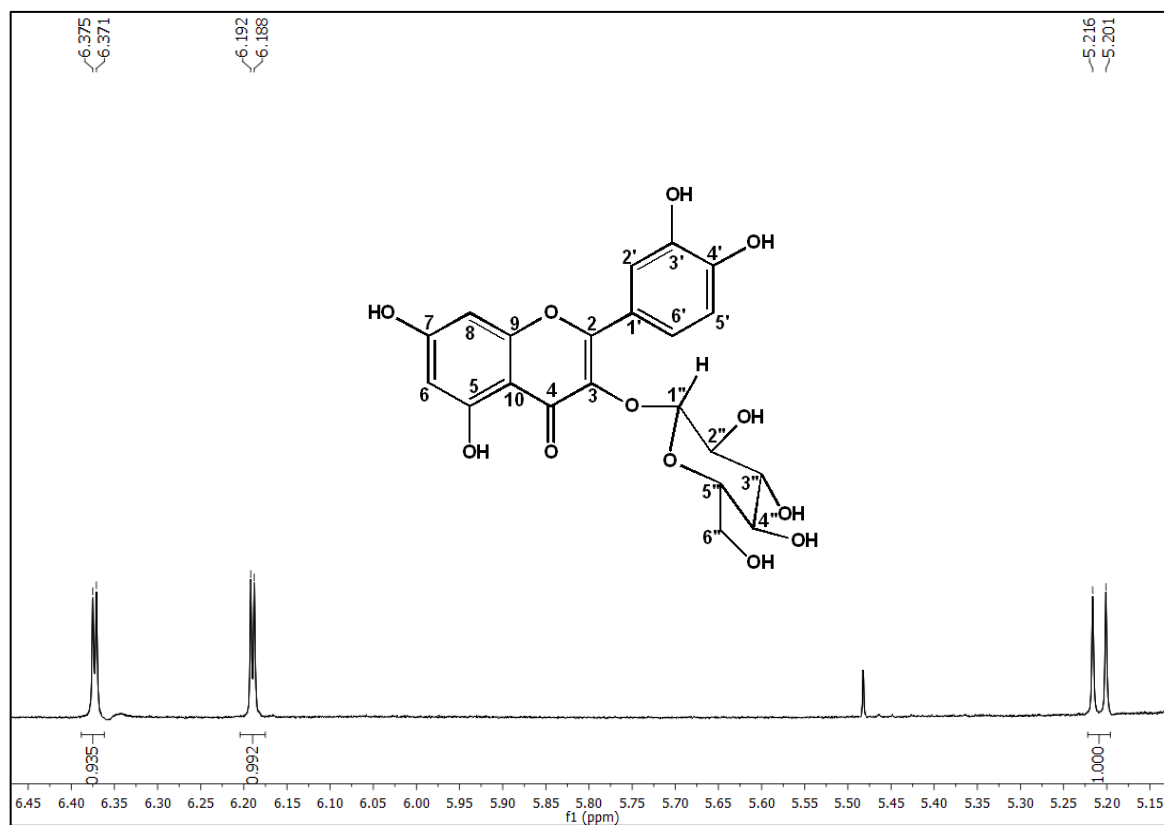


Figura 83 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-4 na região de 3,15 – 3,75 ppm.

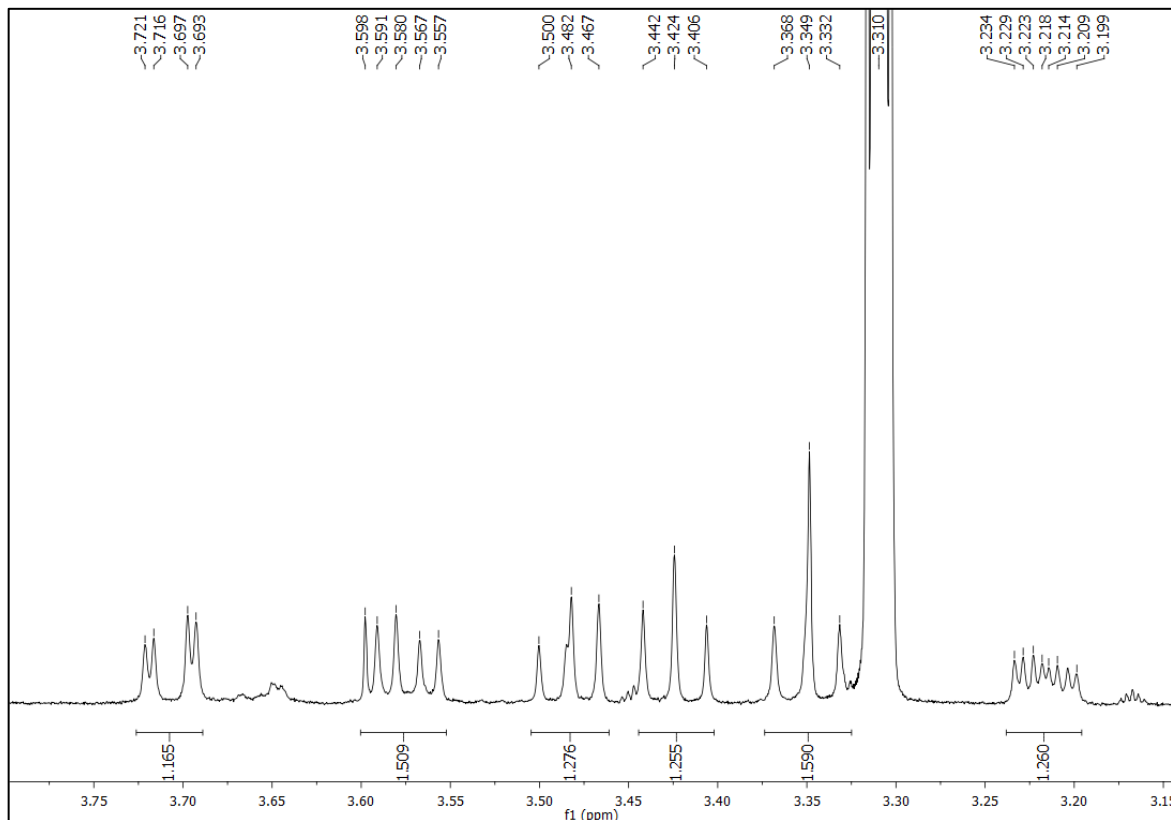
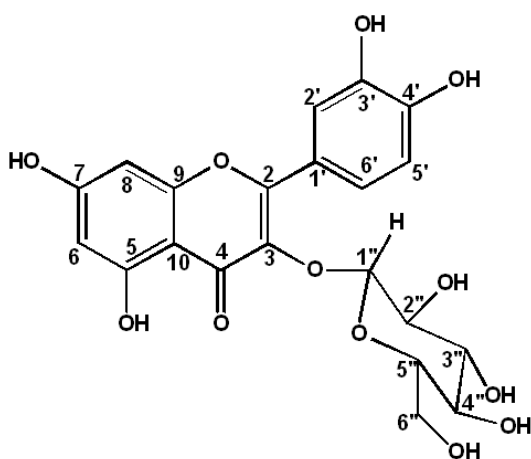


Figura 84 - Estrutura da quercetina-3-O-hexosídeo.



5.7. Identificação estrutural de Es-5

O composto codificado como Es-5 foi isolado na forma de um pó amorfo avermelhado com 0,0022 g. O espectro de massas mostrou um pico do íon molecular em m/z 451.1037 $[\text{M}-\text{H}]^-$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_9$ como pode ser observado na Figura 85.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostraram sinais semelhantes e equivalentes aos apresentados pela cinchonaina Ia (substância Es-3), a partir desses dados, e em conjunto com o estudo de massas, suspeitou-se que a substância Es-5 seria um isômero da cinchonaina Ia. Para a determinação da estereoquímica absoluta foram realizados experimentos de rotação ótica, obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +11$ (metanol, c. 0,001).

A partir da análise destes dados espectrais e em comparação com dados encontrados na literatura, foi possível identificar a substância Es-5 sendo a cinchonaína Ib (XU et al., 2013; RESENDE et al., 2011; BELTRAME et al., 2006).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, assim como suas expansões podem ser visualizados nas Figuras 86 a 100, e seus dados foram organizados na Tabela 7. A estrutura química da cinchonaína Ib pode ser observada na Figura 101.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5, cinchonaína lb, em comparação aos dados obtidos por XU et al., 2013.

Posição	HMQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Es-13	δ_{C} Es-13	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{C}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-	-
2	4,90 (1H, s)	80,2	H-4a, H-4b e H-2'	4,98 (1H, s)	79,9
3	4,20 (1H, m)	67,0	H-4a e H-4b	4,21 (1H, m)	67,0
4a	2,93 (1H, dd, $J=17,0$ e $4,5$ Hz)	29,2	-	2,94 (1H, dd, $J=16,8$ e $4,2$ Hz)	29,3
4b	2,83 (1H, dd, $J=17,5$ e $2,5$ Hz)			2,83 (1H, dd, $J=17,4$ e $2,4$ Hz)	
5	-	157,2	H-6	-	157,3
6	6,21 (1H, s)	96,3	-	6,21 (1H, s)	96,4
7	-	152,0	H-6 e H-7''	-	152,0
8	-	106,1	H-7''	-	106,2
9	-	153,5	-	-	153,5
10	-	105,2	H-6, H-4a e H-4b	-	105,3
1'	-	131,6	H-2 e H-6'	-	131,7
2'	6,83 (1H, d, $J=1,5$ Hz)	114,9	H-2	6,83 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	115,0
3'	-	145,1	-	-	145,3
4'	-	145,9	H-2' e H-6'	-	145,9
5'	6,62 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	115,9	-	6,63 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	115,9
6'	6,68 (1H, d, $J=5,5$ Hz)	119,3	H-2 e H-2'	6,67 (1H, dd, $J=8,0$ e $2,0$ Hz)	119,4
1''	-	135,2	H-5'', H-7'', H-8''a e H-8''b	-	135,3
2''	6,61 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	115,3	H-6'' e H-7''	6,61 (1H, d, $J=1,8$ Hz)	115,3
3''	-	146,3	-	-	146,4
4''	-	145,8	H-2'' e H-6''	-	145,8
5''	6,69 (1H, d, $J=5,0$ Hz)	116,5	-	6,69 (1H, d, $J=7,8$ Hz)	116,5
6''	6,53 (1H, dd, $J=8,0$ e $2,0$ Hz)	119,3	H-2'', H-5'' e H-6''	6,54 (1H, dd, $J=8,2$ e $2,0$ Hz)	119,3
7''	4,46 (1H, dl, $J=6,0$ Hz)	35,1	H-2'', H-6'', H-8''a e H-8''b	4,46 (1H, br. d, $J=5,4$ Hz)	35,2
8''a	3,00 (1H, m)			3,01 (1H, dd, $J=15,6$ e $7,2$ Hz)	
8''b	2,87 (1H, br. dd)	38,3	H-7''	2,87 (1H, dd, $J=16,2$ e $1,8$ Hz)	38,3
9''	-	170,7	H-7'', H-8''a e H-8''b	-	170,7

Figura 85 - Espectro de massa de Es-5.

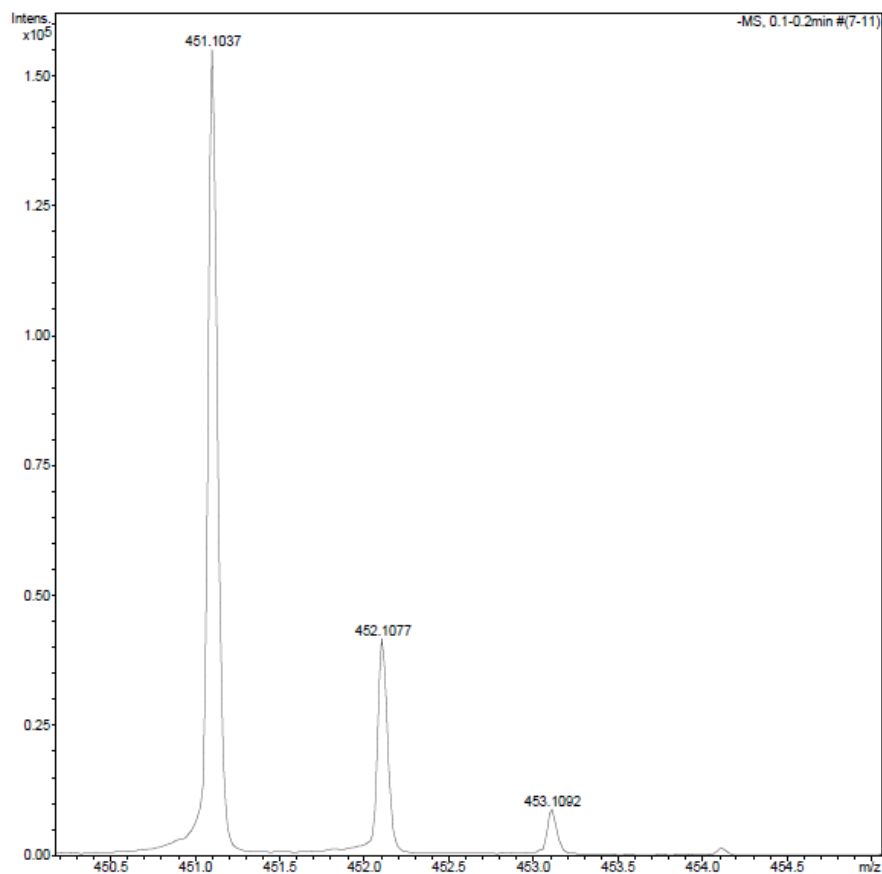


Figura 86 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) de Es-5.

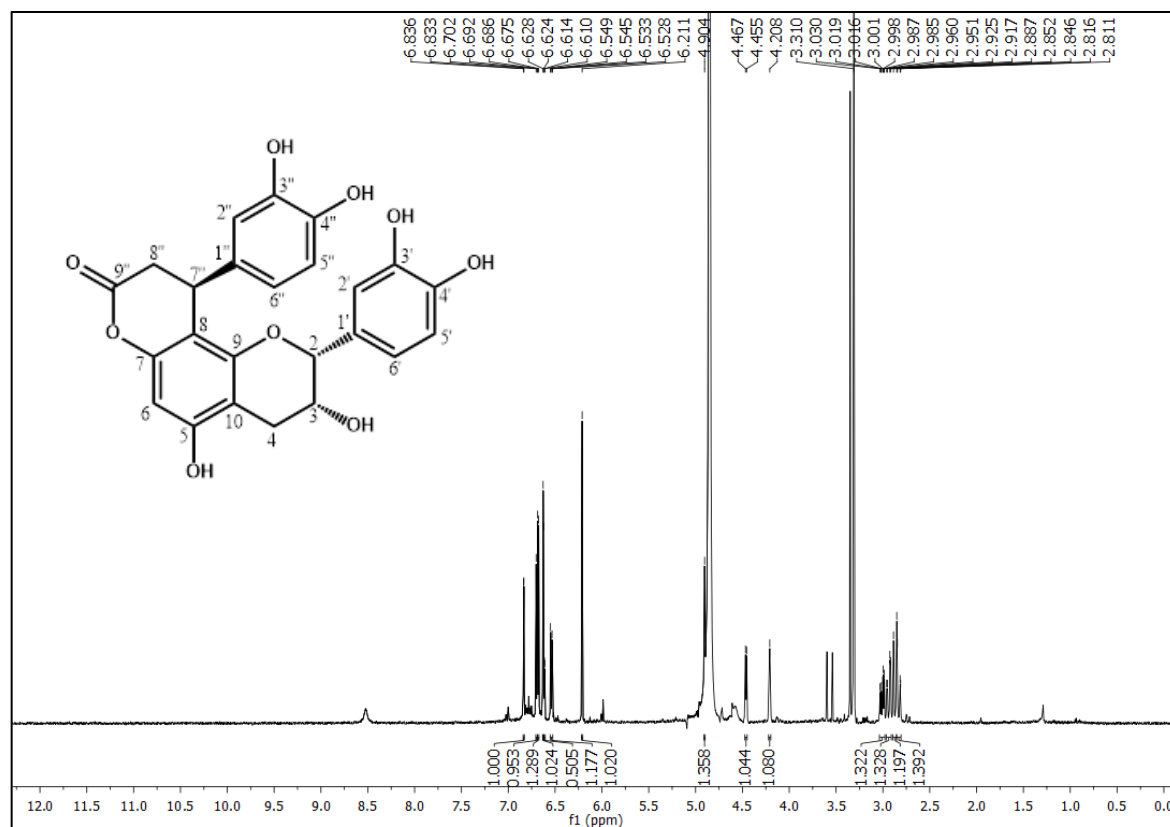


Figura 87 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 6,20 – 6,90 ppm.

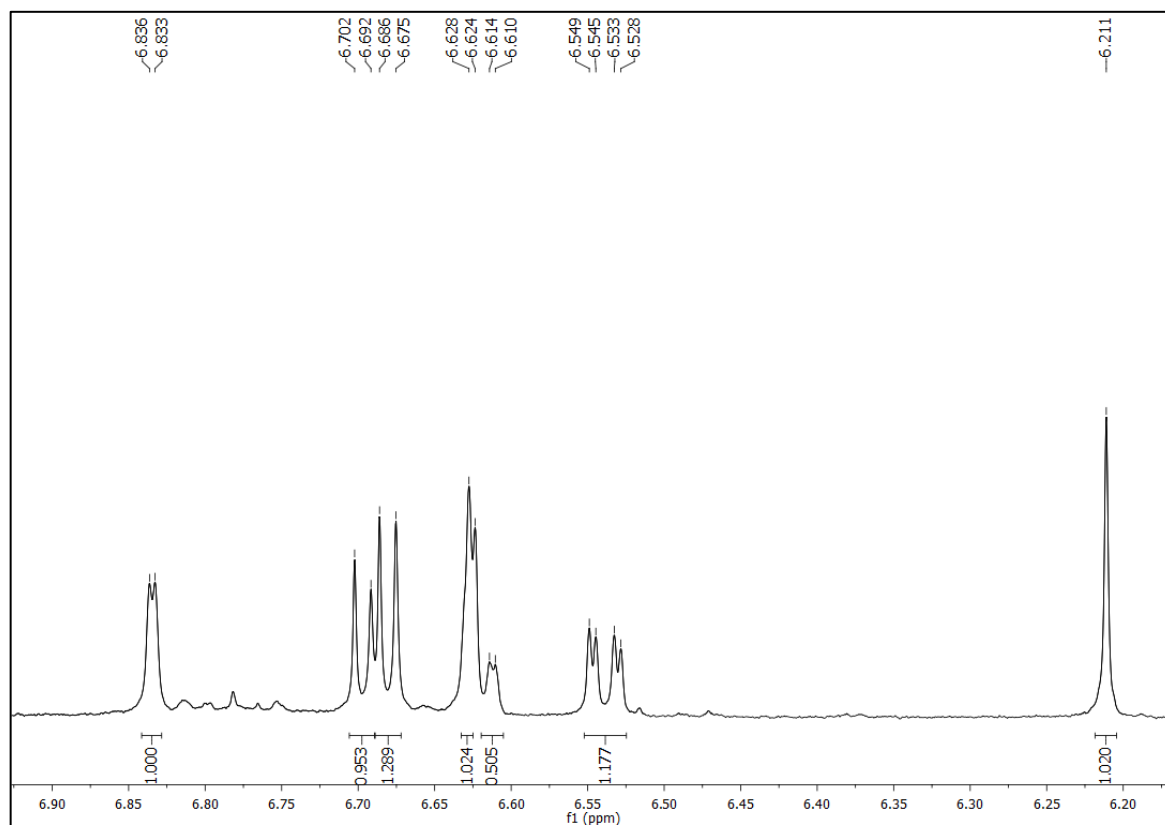


Figura 88 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 4,15 – 5,00 ppm.

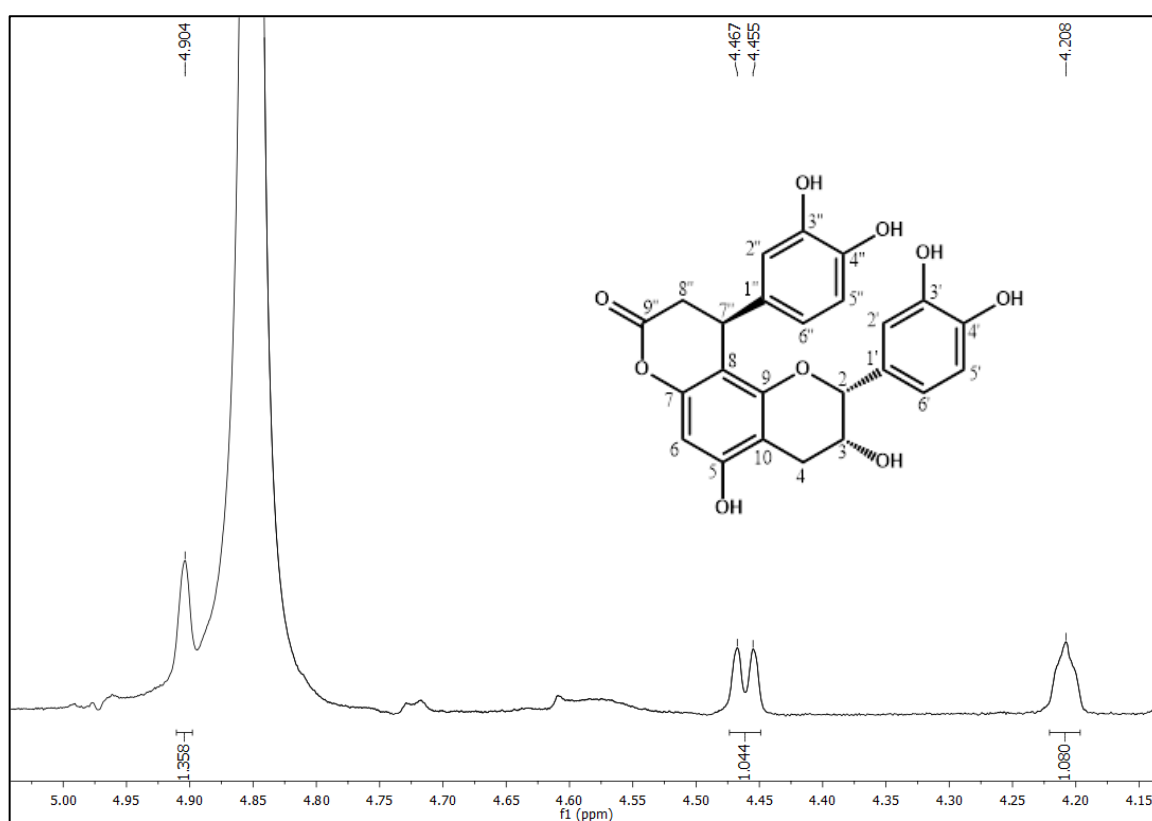


Figura 89 - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 2,74 – 3,12 ppm.

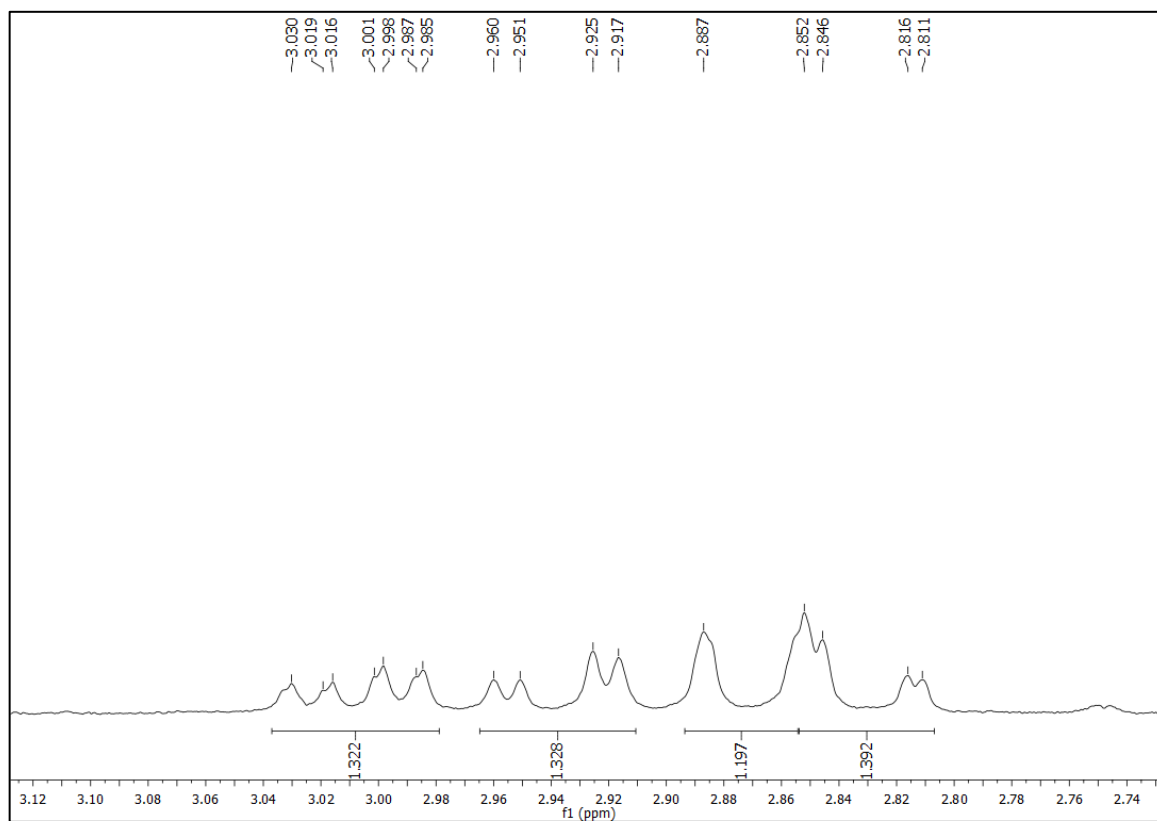


Figura 90 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5.

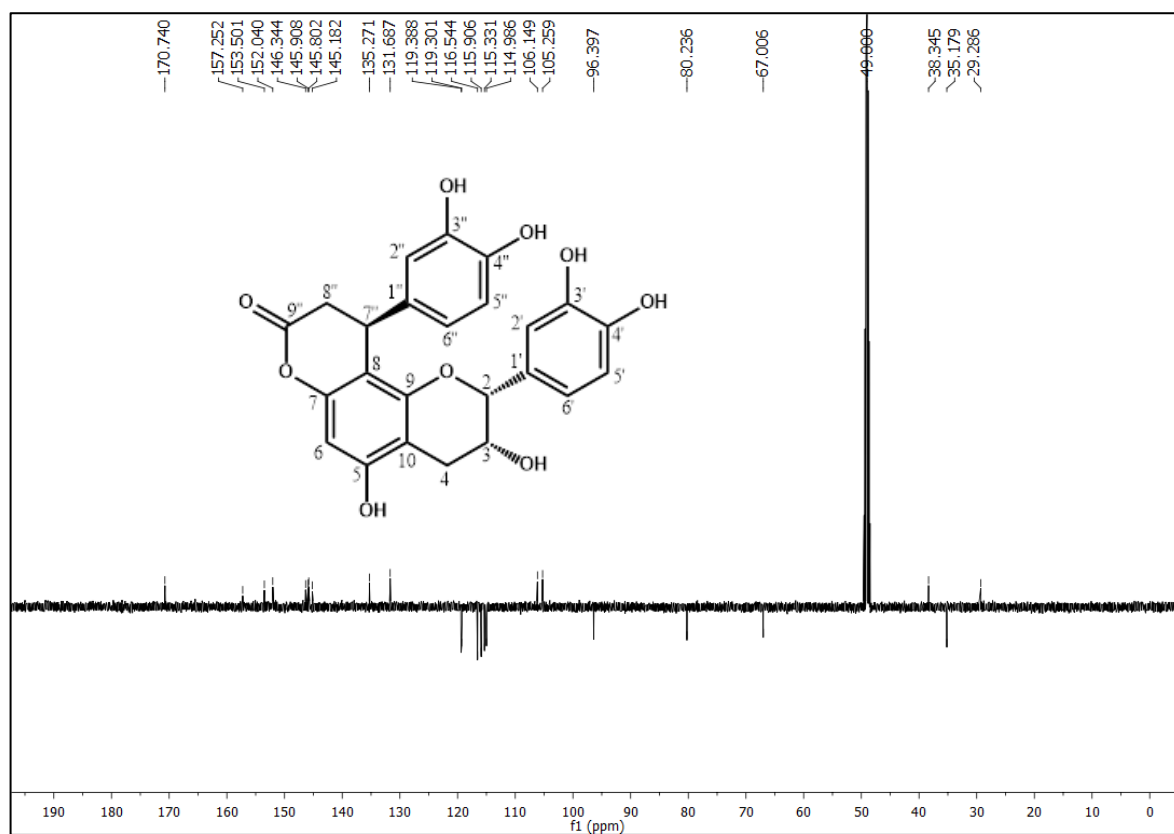


Figura 91 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 114 – 174 ppm.

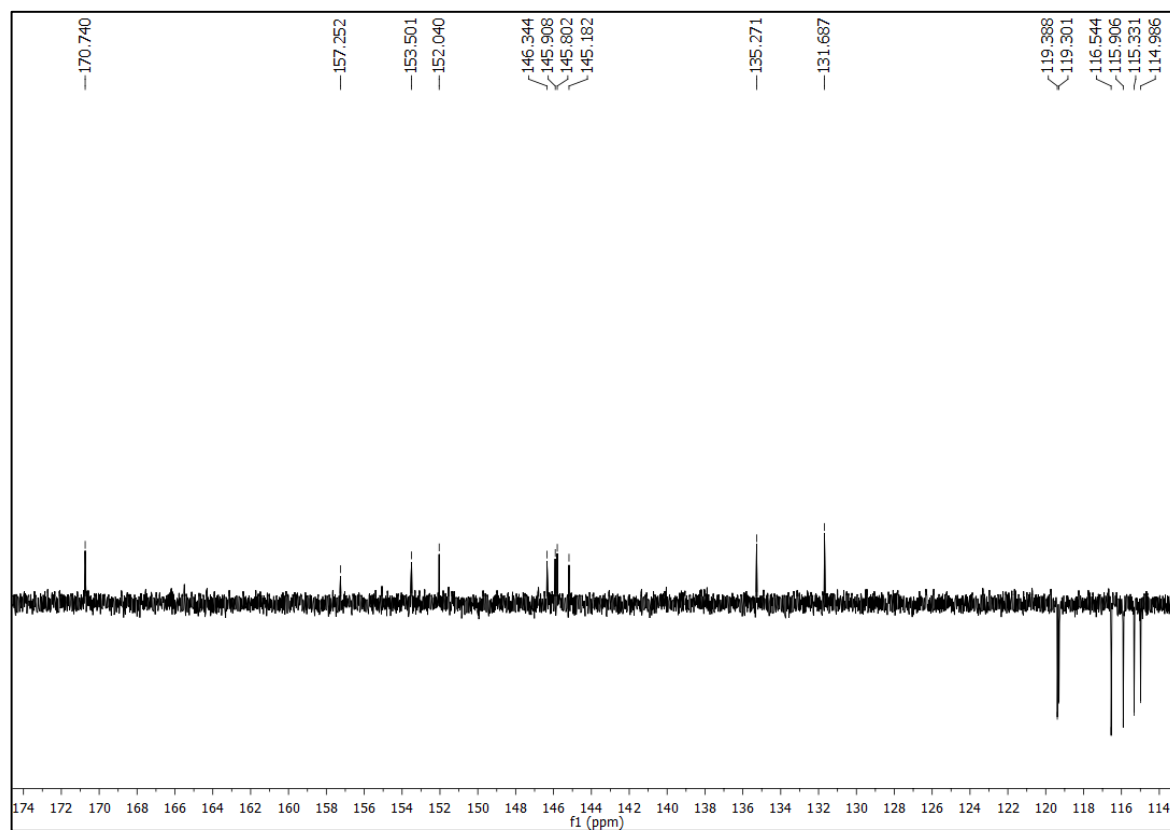


Figura 92 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 62 – 110 ppm.

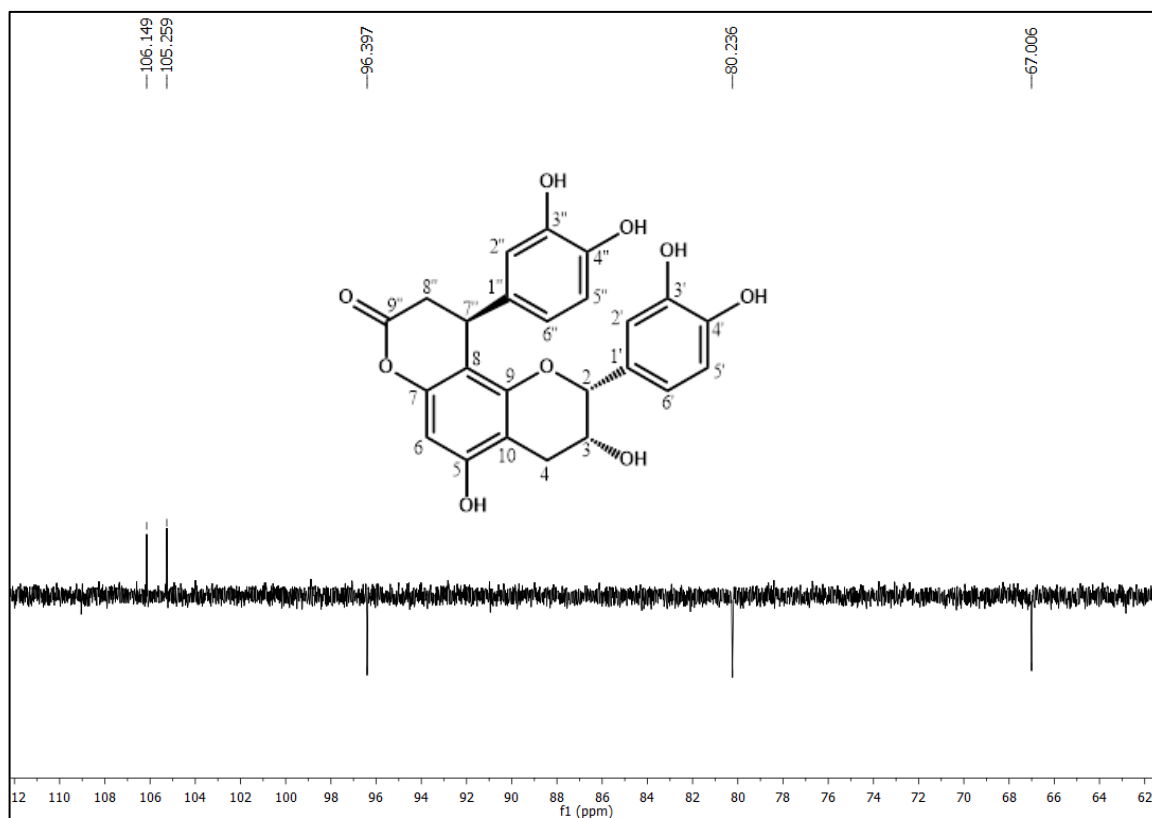


Figura 93 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de Es-5 na região de 27,0 – 40,5 ppm.

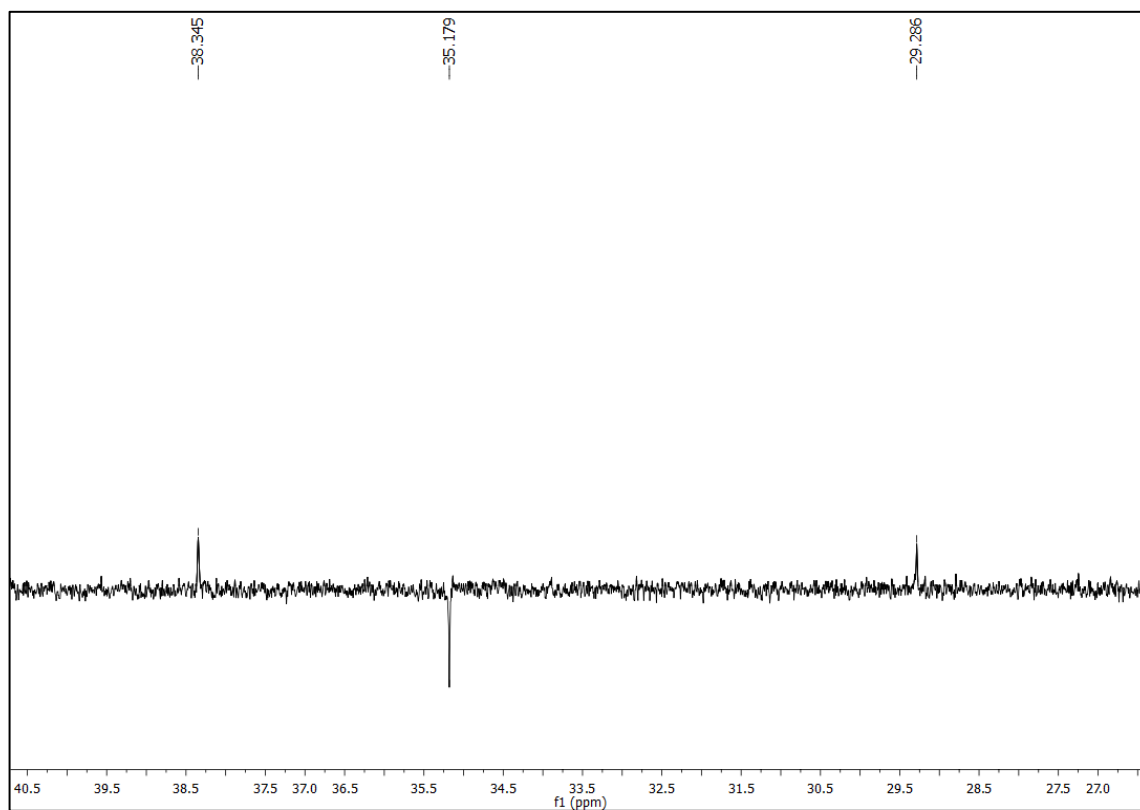


Figura 94 - Espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Es-5.

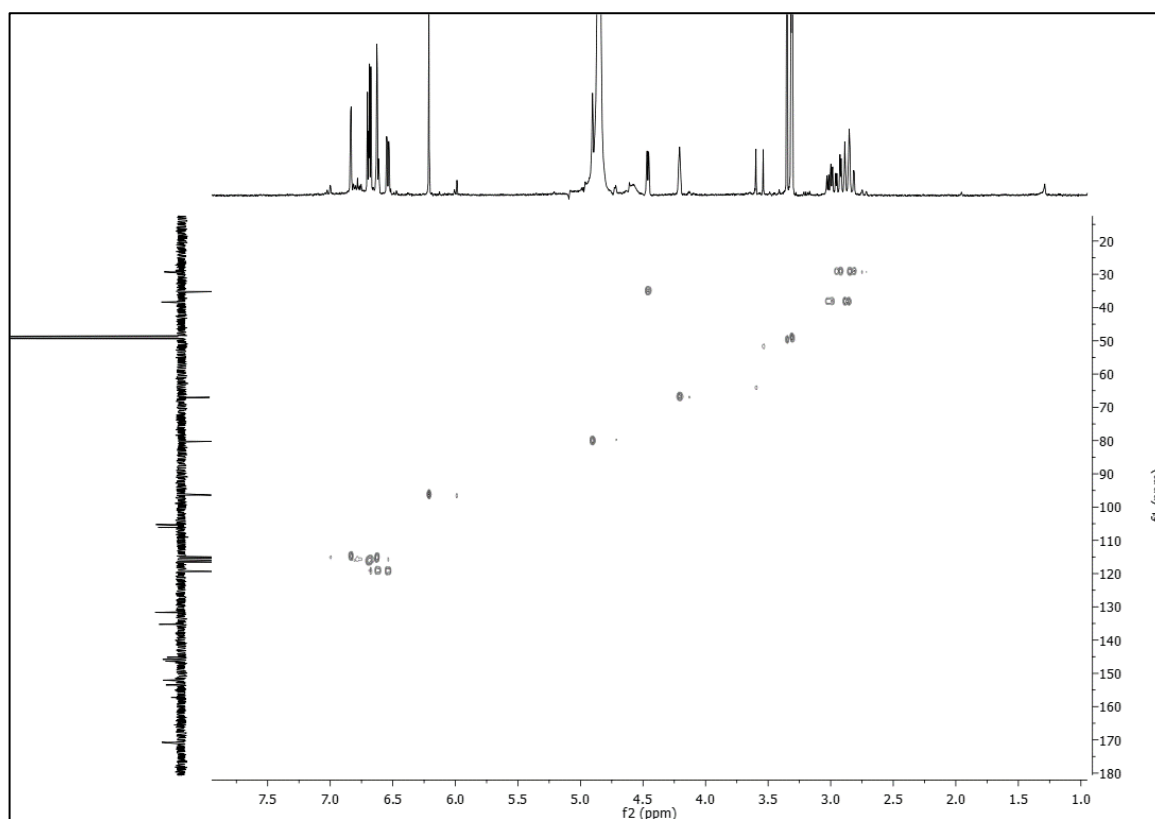


Figura 95 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (2,50 – 5,01 ppm) x (30,0 – 90,0 ppm).

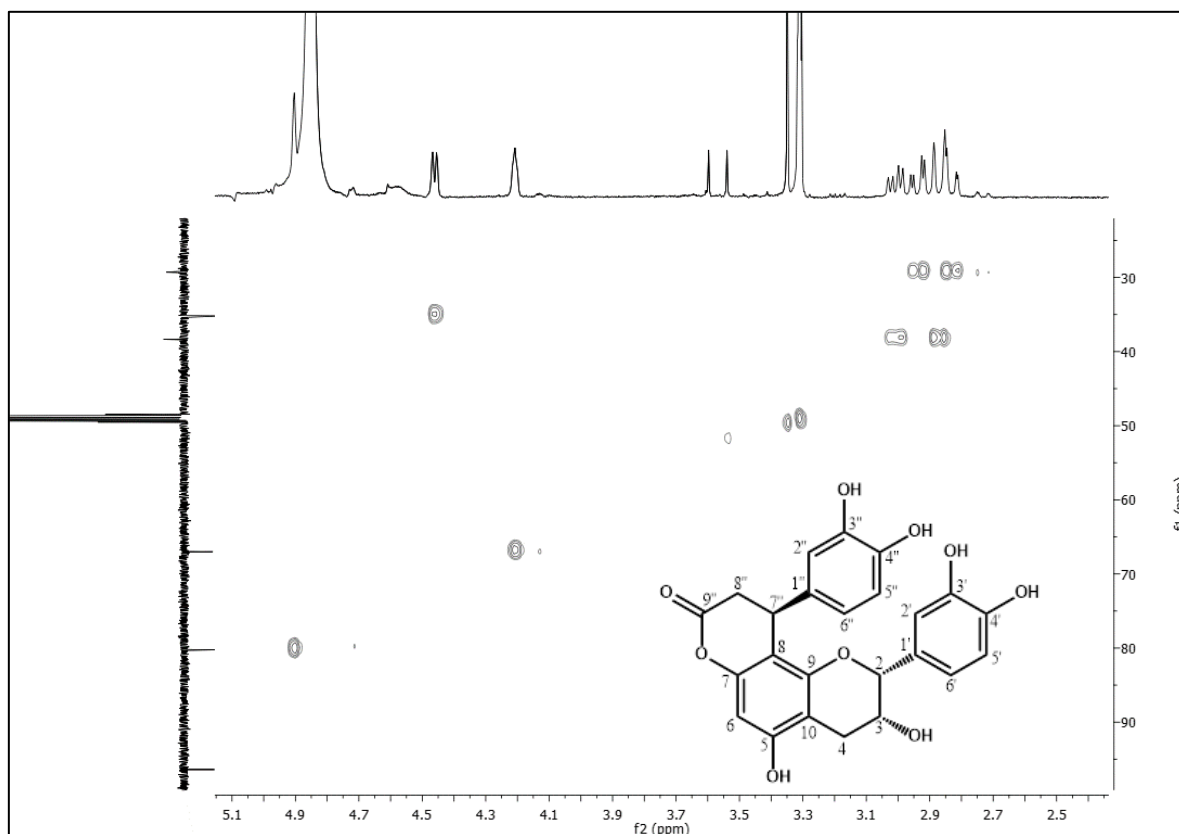


Figura 96 - Expansão do espectro HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (5,50 – 7,80 ppm) x (85,0 – 125,0 ppm).

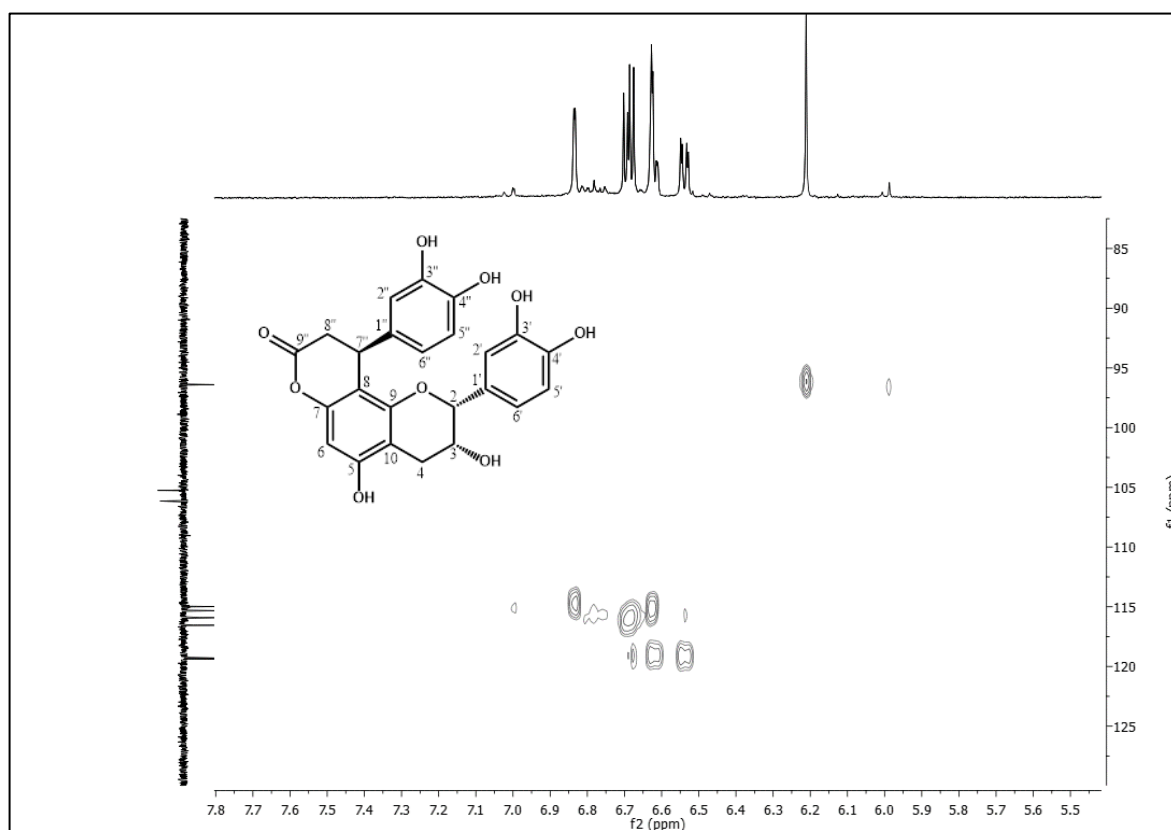


Figura 97 - Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5.

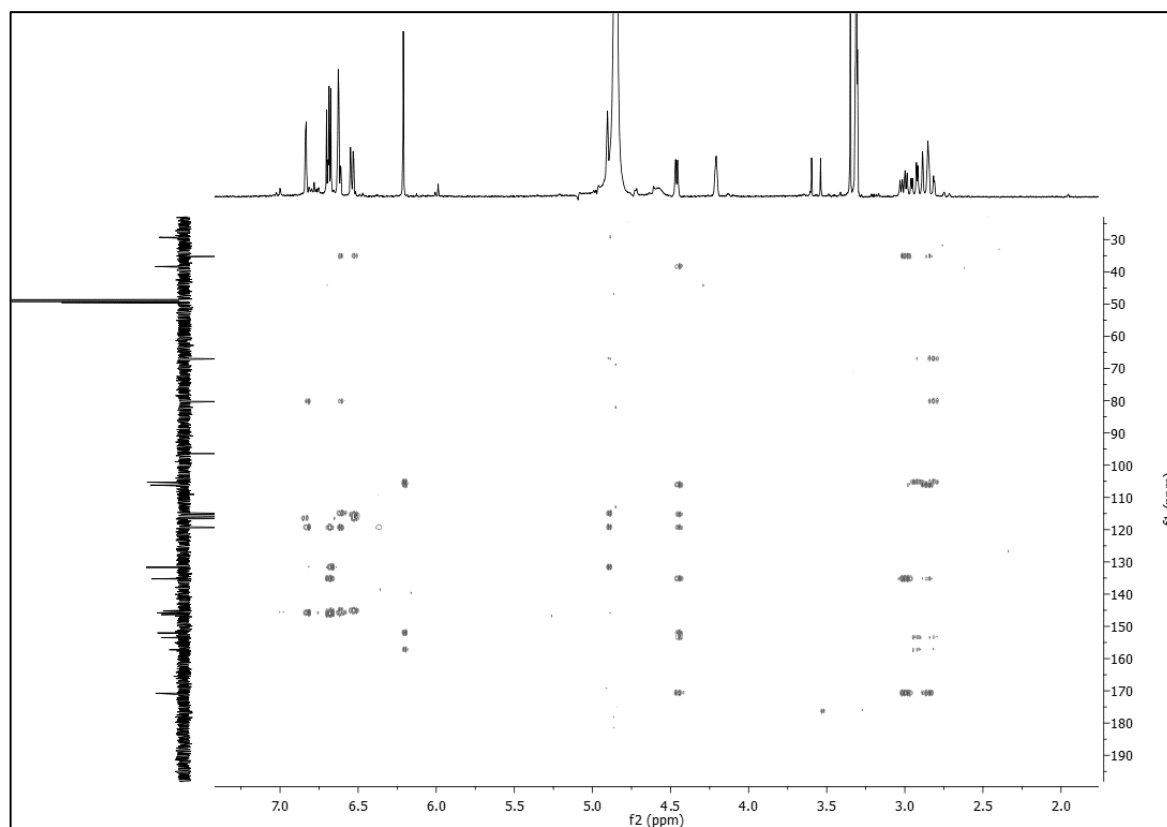


Figura 98 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (2,60 – 5,00 ppm) x (30,0 – 110,0 ppm).

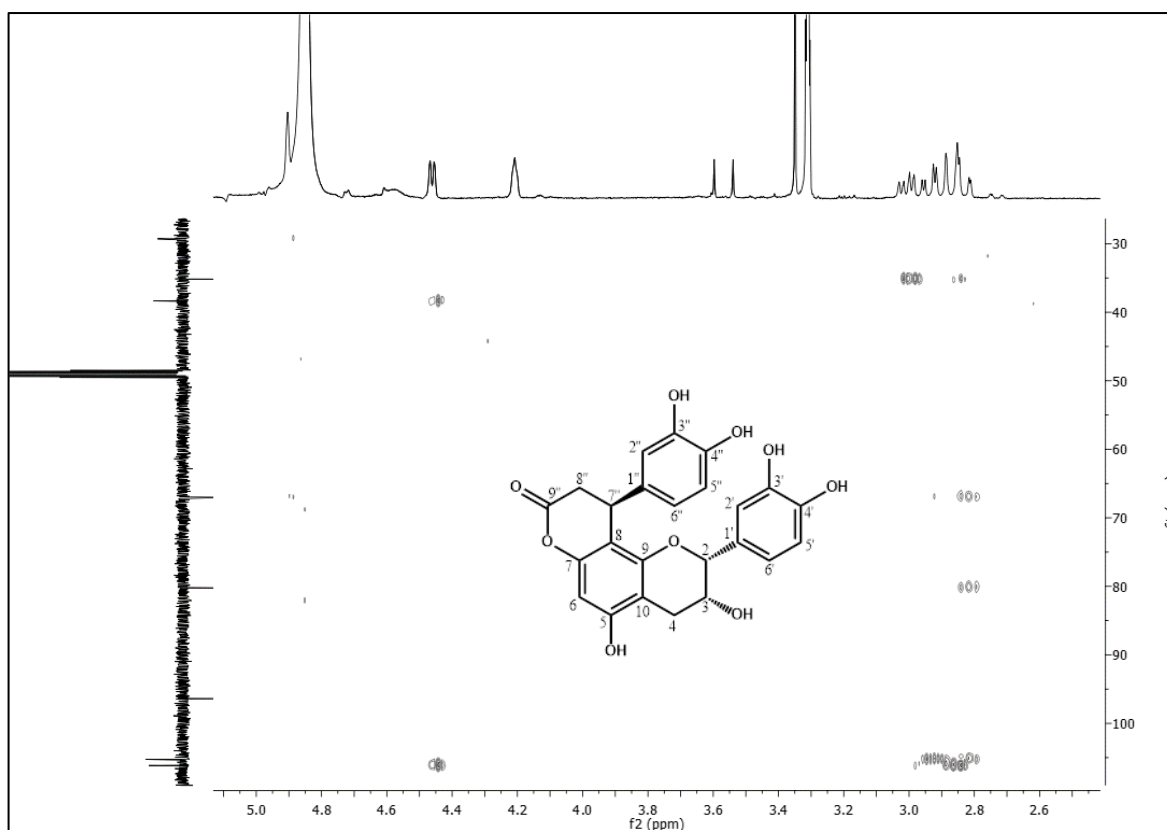


Figura 99 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (2,30 – 5,10 ppm) x (100,0 – 180,0 ppm).

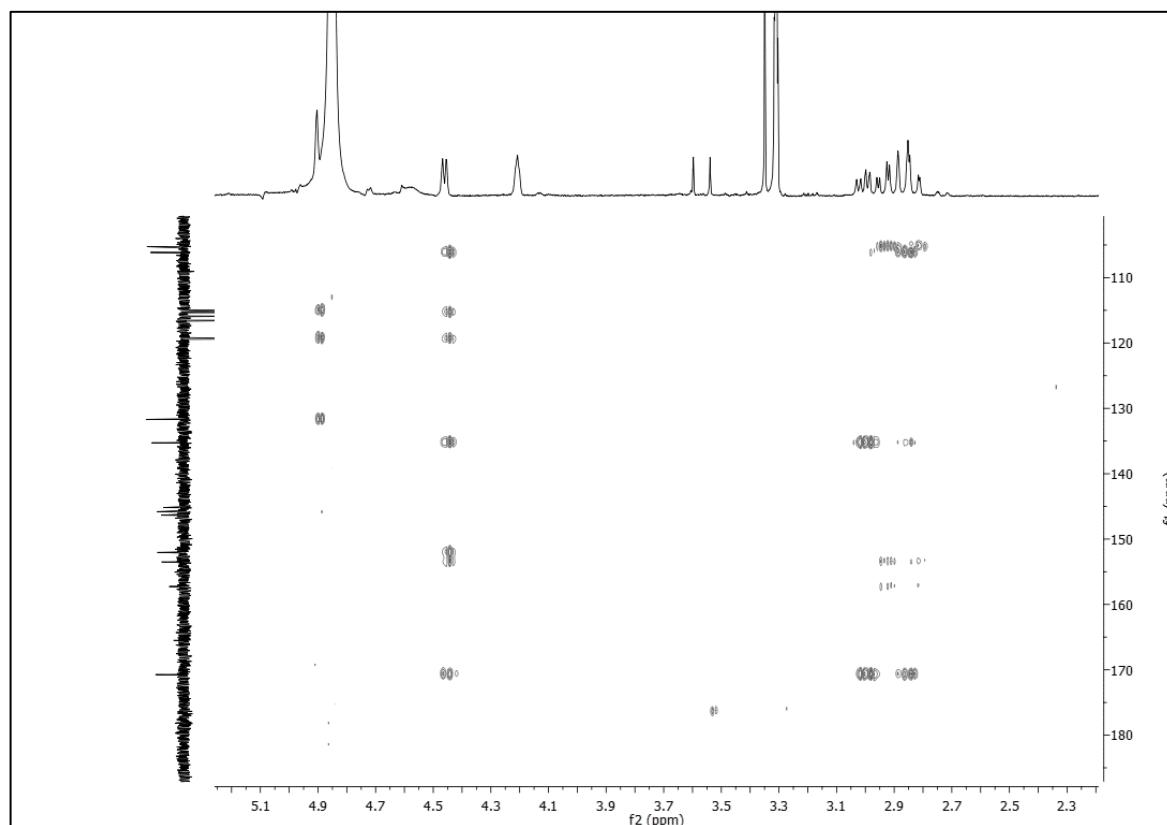
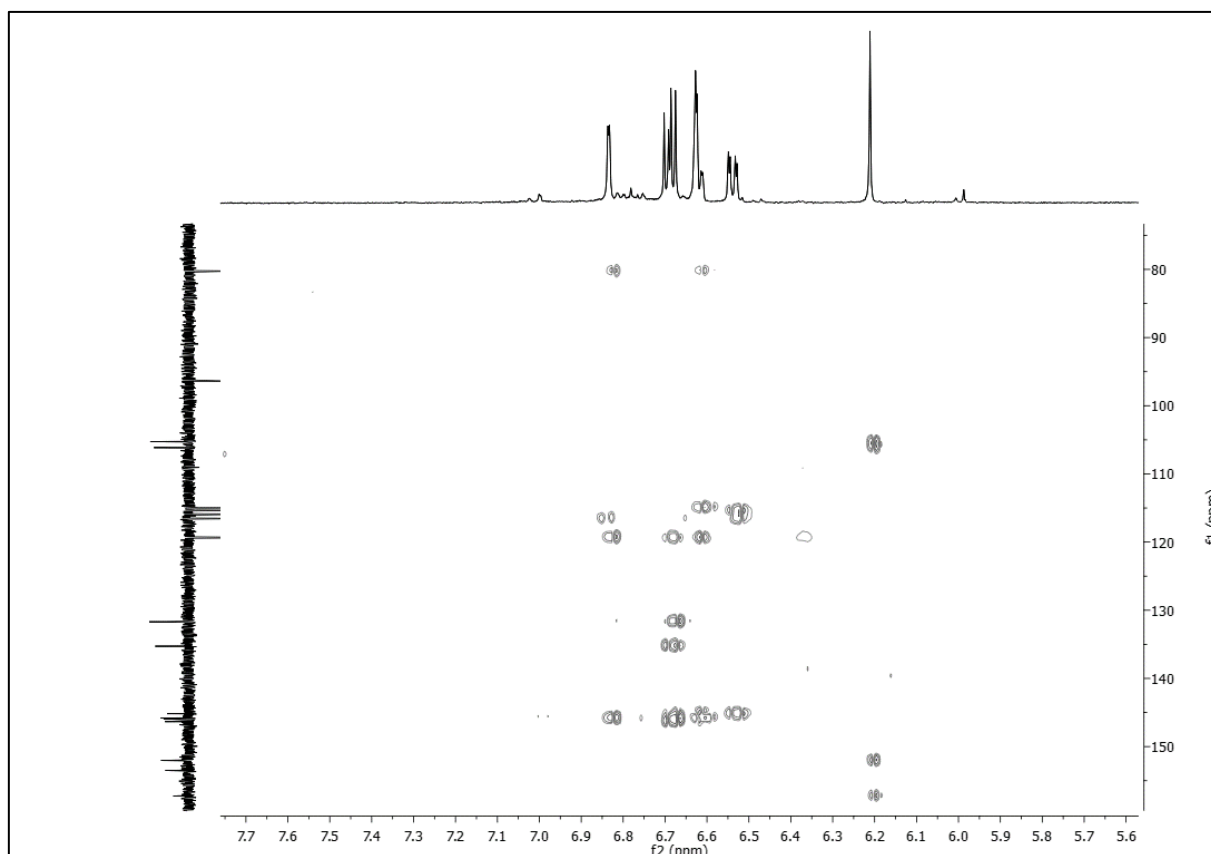


Figura 100 - Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Es-5 na região de (5,60 – 7,70 ppm) x (80,0 – 150,0 ppm).



foram evidenciados em δ_H 2,18 (d; $J = 16$ Hz), δ_H 2,38 (d; $J = 16$ Hz) e δ_H 3,12 (dd; $J = 8$ e $15,5$ Hz) e foram correlacionados aos hidrogênios H-4, H-2 e H-7. Os dois singletos largos em δ_H 4,08 e δ_H 4,14 foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-1, respectivamente, uma vez que estão inseridos nos carbonos ligados ao nitrogênio do anel tropânico, por fim o singlete em δ_H 3,06 com integral para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio, este valor de deslocamento maior sugeriu que a molécula durante seu processo de isolamento sofreu ionização devido provavelmente a utilização de ácido fórmico (OLIVEIRA et al, 2011).

Para os substituintes do composto Er-1, os deslocamentos químicos condizentes aos hidrogênios do grupo benzoiloxi foram assinalados em δ_H 8,01 (d; $J = 7.5$ Hz), δ_H 7,47 (t; $J = 7.5$ Hz) e δ_H 7,61 (t; $J = 7.5$ Hz), os dois primeiros sinais apresentaram integral para dois átomos de hidrogênio cada, e foram atribuídos nesta ordem aos pares de hidrogênios H-2''/H-6'' e H-3''/H-5'', e o terceiro sinal foi atribuído ao hidrogênio H-4''. Para o grupo 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi, foi observado um sinal em δ_H 7,32 com integral para dois átomos de hidrogênios e um singlete em δ_H 3,91 com integral para seis átomos de hidrogênios, e foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H6' e aos hidrogênios das metoxilas inseridas nos carbonos C-3' e C-5'. No mapa de contorno HMBC (Figuras 113 a 117) foi evidenciada uma correlação entre o hidrogênio H-3 do núcleo tropano com o carbono C-7' do grupo 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi, confirmando sua esterificação nesta posição, e a correlação entre o hidrogênio H-6 com o carbono C-7'' da unidade benzoiloxi confirmou sua inserção na posição 6 do anel tropano. De acordo com as análises do conjunto de dados espectrais obtidos, o composto foi identificado como 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropane protonado (Figura 118), alcaloide já conhecido e isolado pela primeira vez da espécie *E. caatingae*, porém inédito para *E. revolutum* (OLIVEIRA et al, 2011).

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-1, 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropane protonado, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA et al., 2011.

Posição	HSQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Er-1	δ_{C} Er-1	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	4,14 (1H; s)	68,3	H-3, H-6, H-7 e H-MeN	4,11 (sl)	67,1
2	2,38 (1H; d; $J = 16$ Hz)	33,3	H-6	2,40 (dl; $J = 15,5$ Hz)	33,0
3	5,31 (tl; 1H)	65,9	H-2 e H-4	5,46 (tl; $J = 4,5$ Hz)	64,4
4	2,18 (1H; d; $J = 16$ Hz)	34,5	H-3, H-7 _{ax} e H-7 _{eq}	2,20 (br. d; $J = 16$ Hz)	34,1
5	4,08 (1H; br. s)	63,6	H-3, H-6, H-7 e H-MeN	4,12 (br. s)	63,1
6	6,02 (1H; dd; $J = 3,5$ e 8 Hz)	76,9	H-7 _{ax} e H-7 _{eq}	6,09 (dd; $J = 3$ e 8 Hz)	35,4
7	3,12 (1H; dd; $J = 8$ e 15,5 Hz)	36,5	-	3,16 (dd; $J = 8$ e 15 Hz)	74,8
1'	2,55 (1H; m)	120,8	H-2' e H-6'	2,51 (m)	119,7
2', 6'	-	107,9	H-6'/ H-2'	-	106,5
3', 5'	7,32 (2H; m)	149,0	H-2', H-6' e H-MeO	7,35 (s)	147,1
4'	-	142,2	H-2' e H-6'	-	140,2
7'	-	166,5	H-2', H-6', H-3	-	164,9
1''	-	130,5	H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	-	128,5
2'' 6''	8,01 (2H; d; $J = 7,5$ Hz)	130,7	H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''	7,98 (dl; $J = 7,5$ Hz)	129,4
3'', 5''	7,47 (2H; t; $J = 7,5$ Hz)	129,7	H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''	7,49 (t; $J = 7,5$ Hz)	128,6
4''	7,61 (1H; t; $J = 7,5$ Hz)	134,7	H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	7,63 (t; $J = 7$ Hz)	133,9
7''	-	166,8	H-2'', H-3'', H-5'', H-6'' e H-6	-	165,1
MeN	3,06 (3H; s)	39,8	-	3,10 (s)	40,3
MeO	3,91 (6H; s)	56,9	-	4,00 (s)	56,4

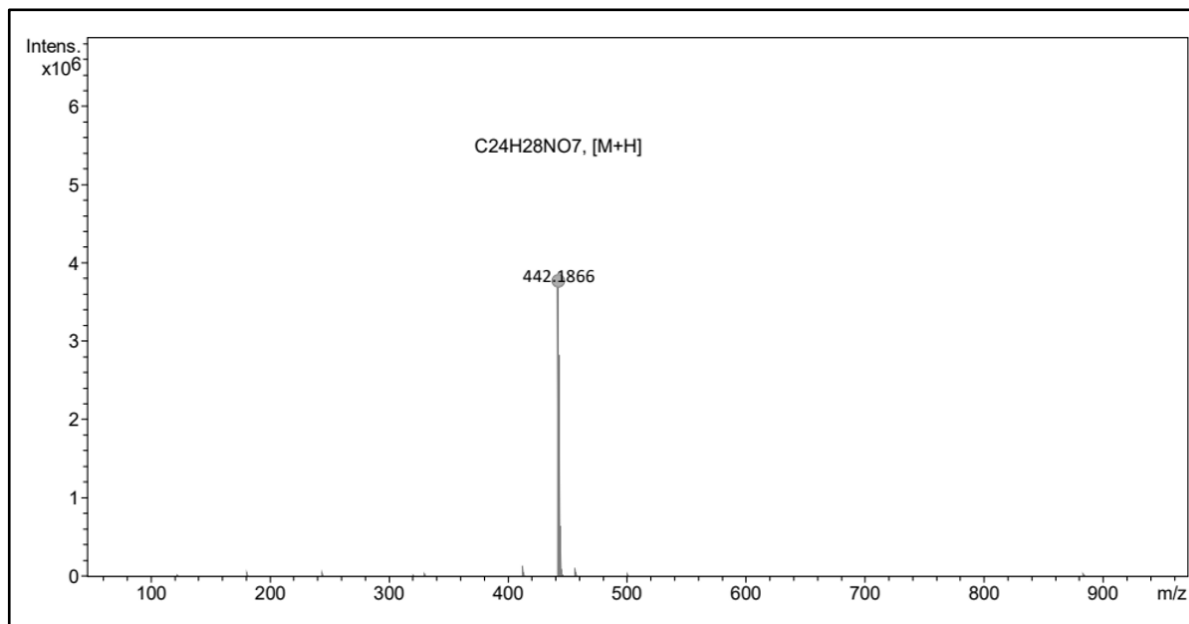
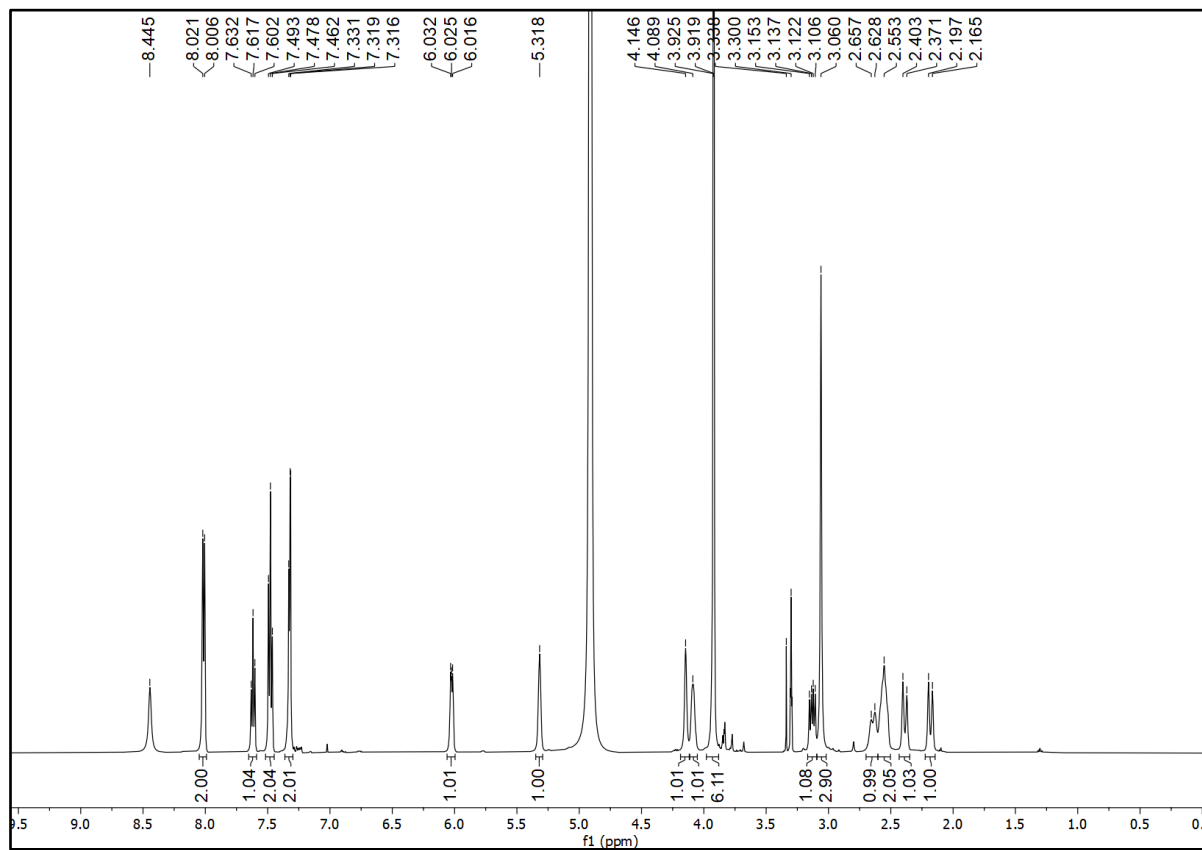
Figura 102 - Espectro de massa de Er-1.**Figura 103** - Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1.

Figura 104 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 2,10 – 4,30 ppm.

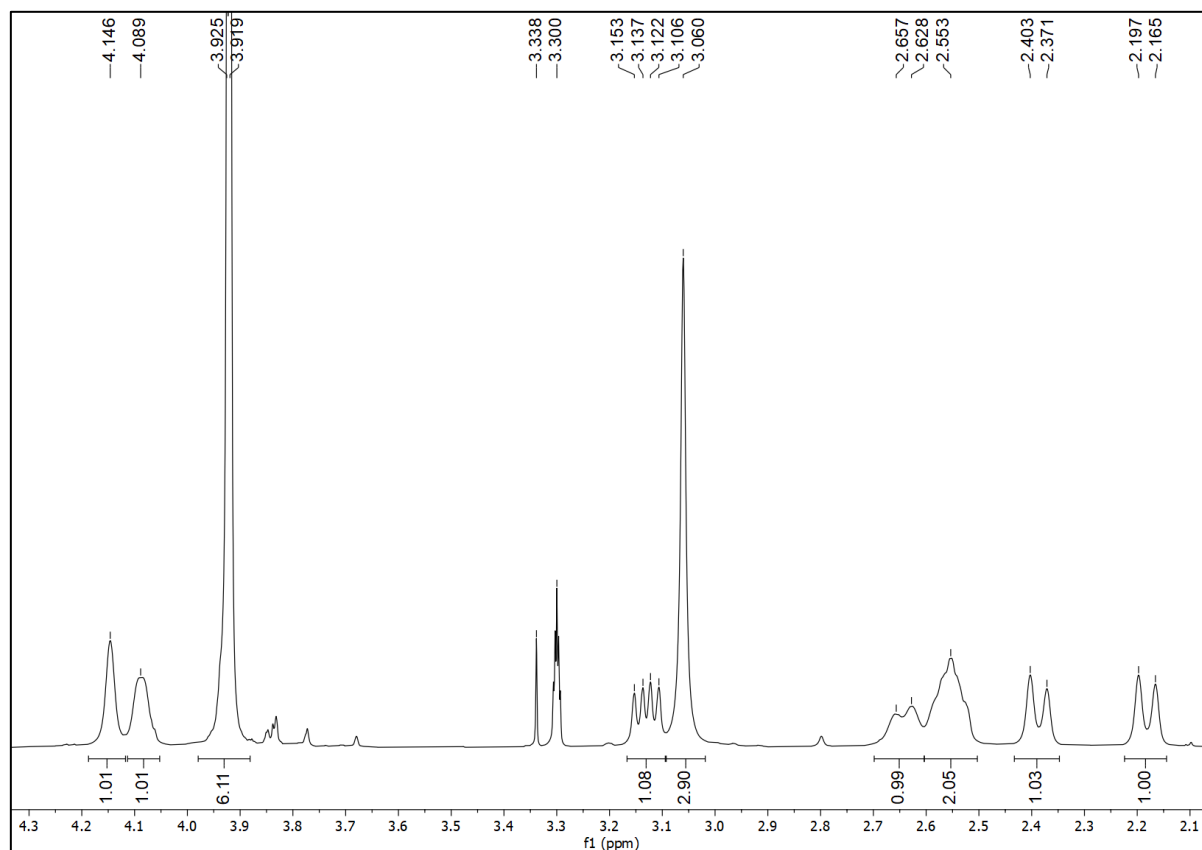


Figura 105 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 5,05 – 6,25 ppm.

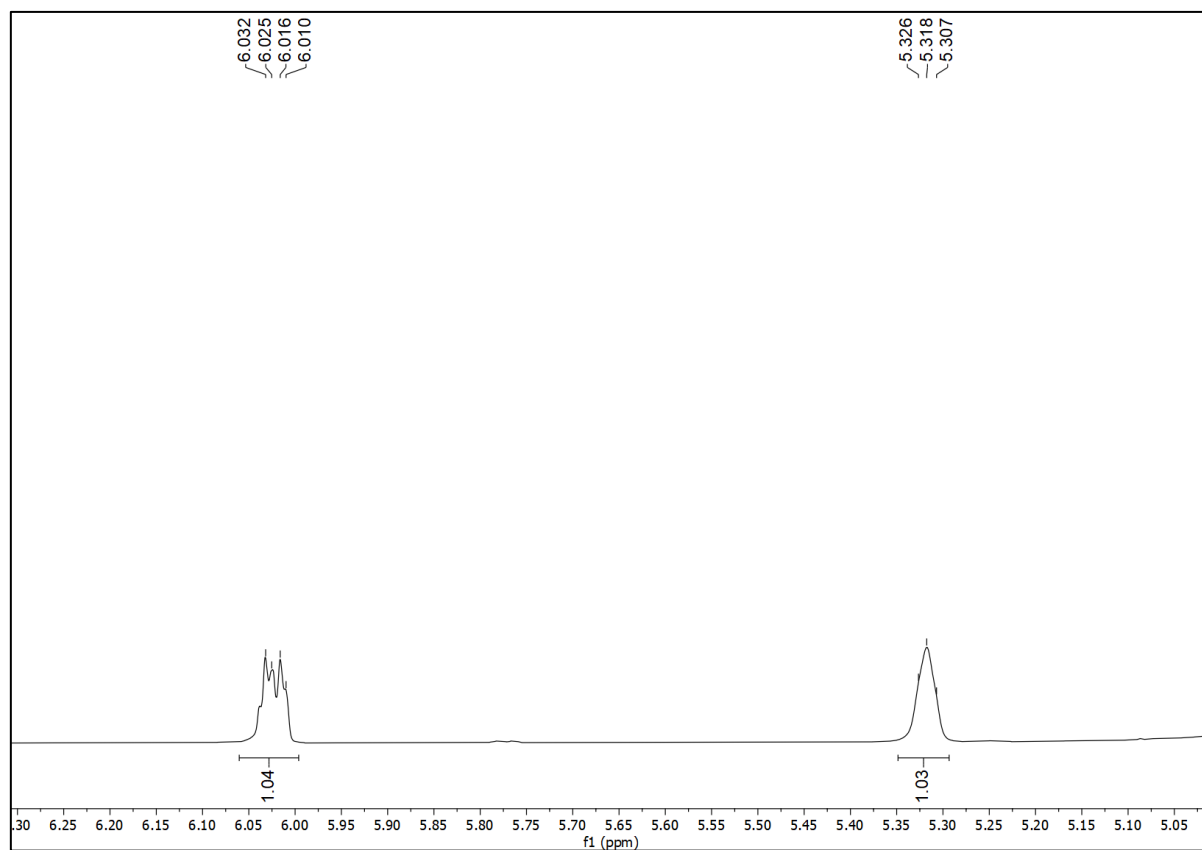


Figura 106 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 7,30 – 8,05 ppm.

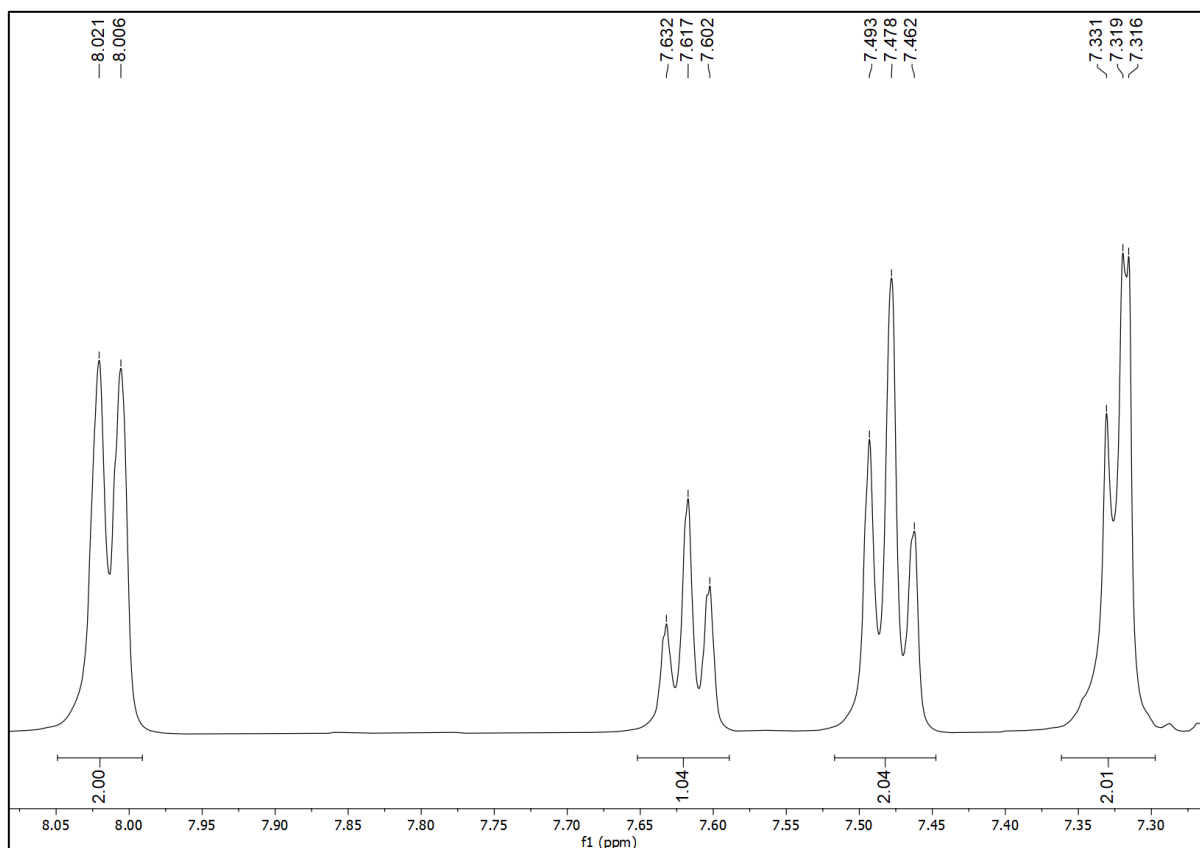


Figura 107 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1.

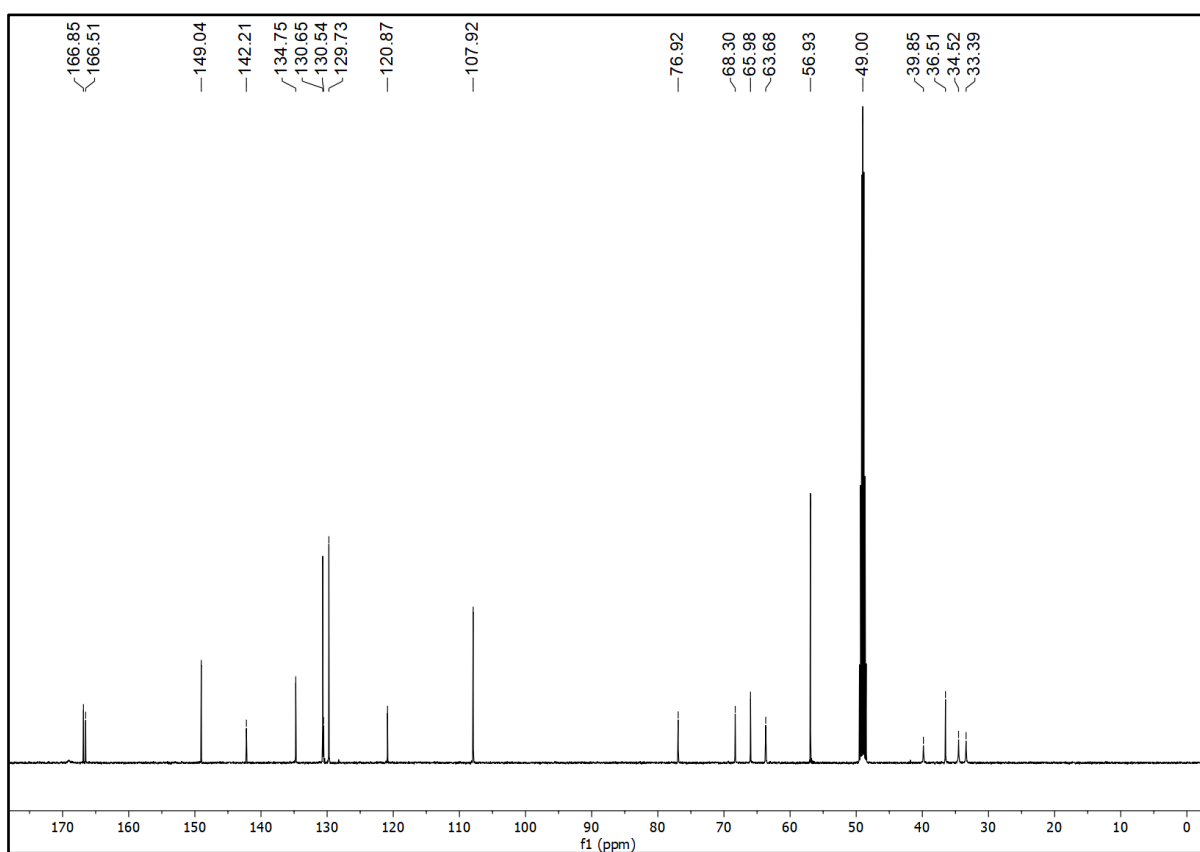


Figura 108 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 30 – 80 ppm.

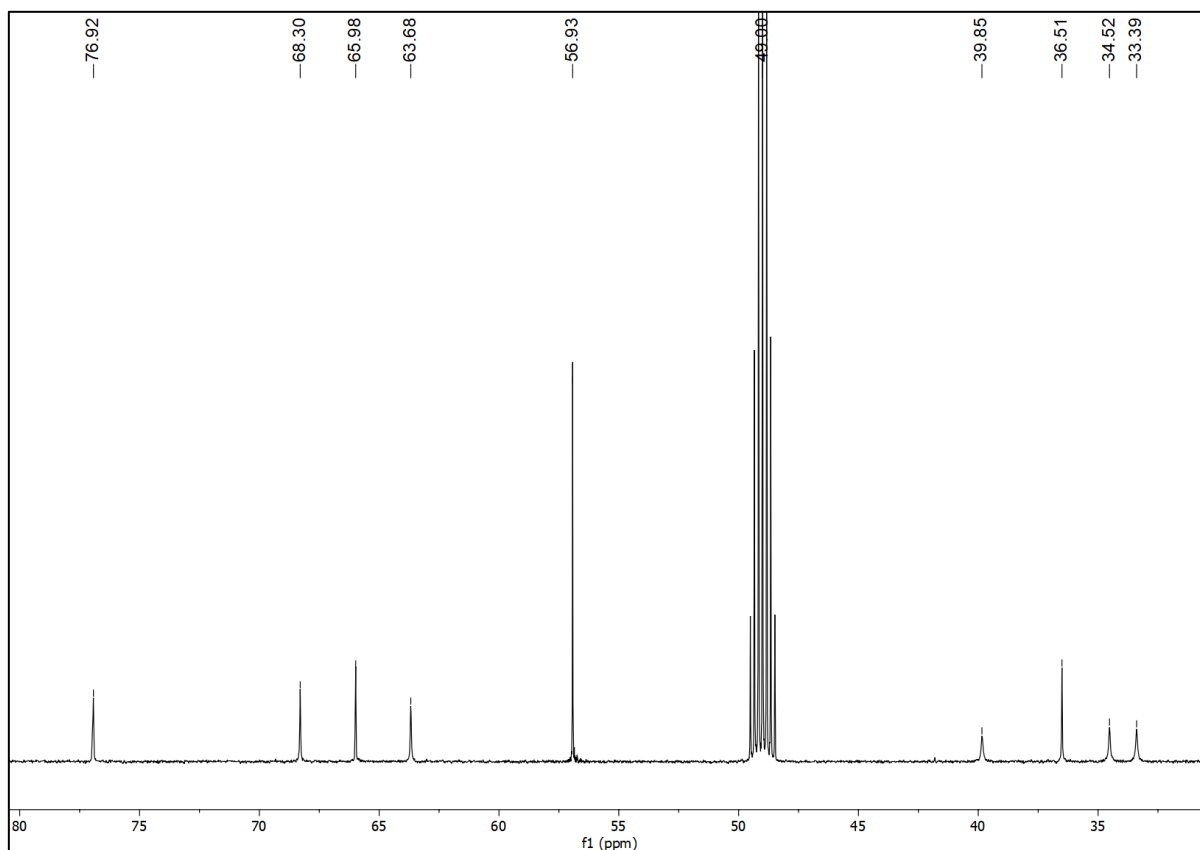


Figura 109 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-1 na região de 107 – 168 ppm.

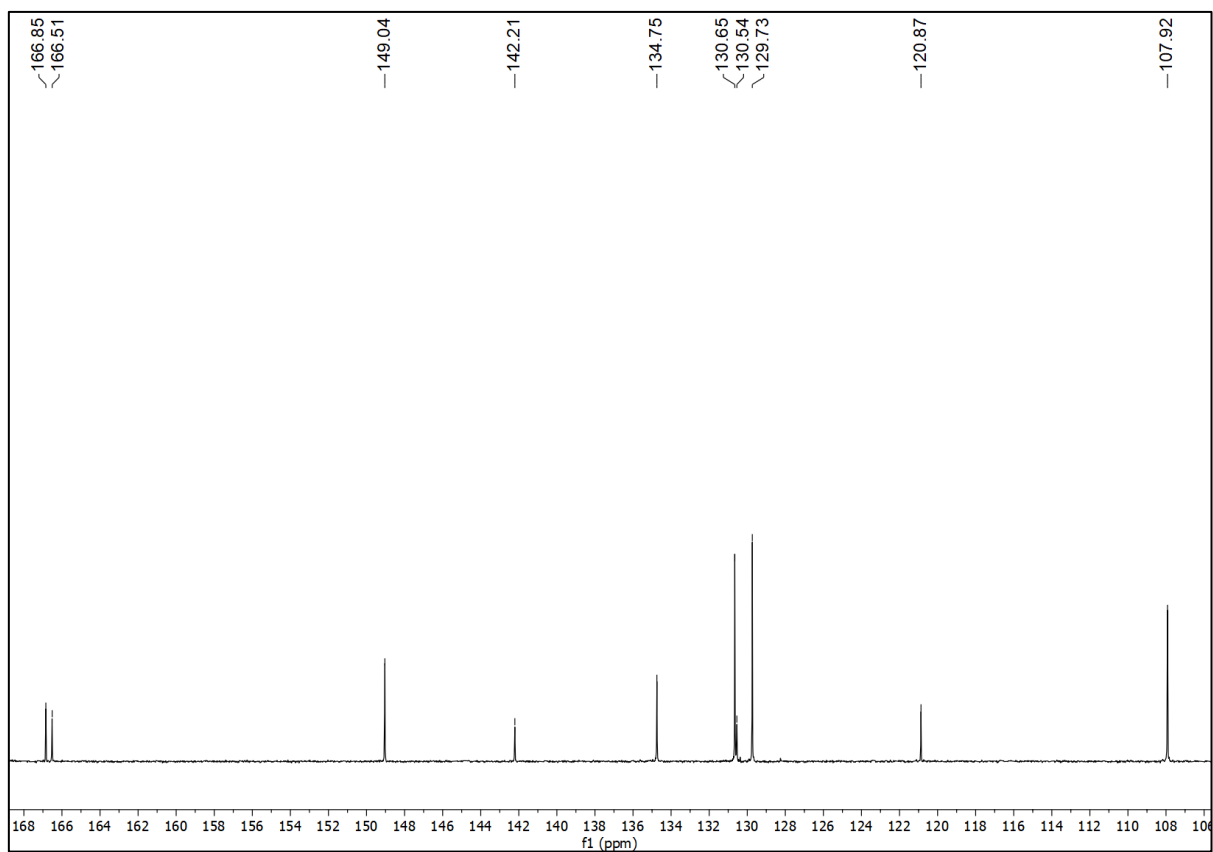


Figura 110 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1.

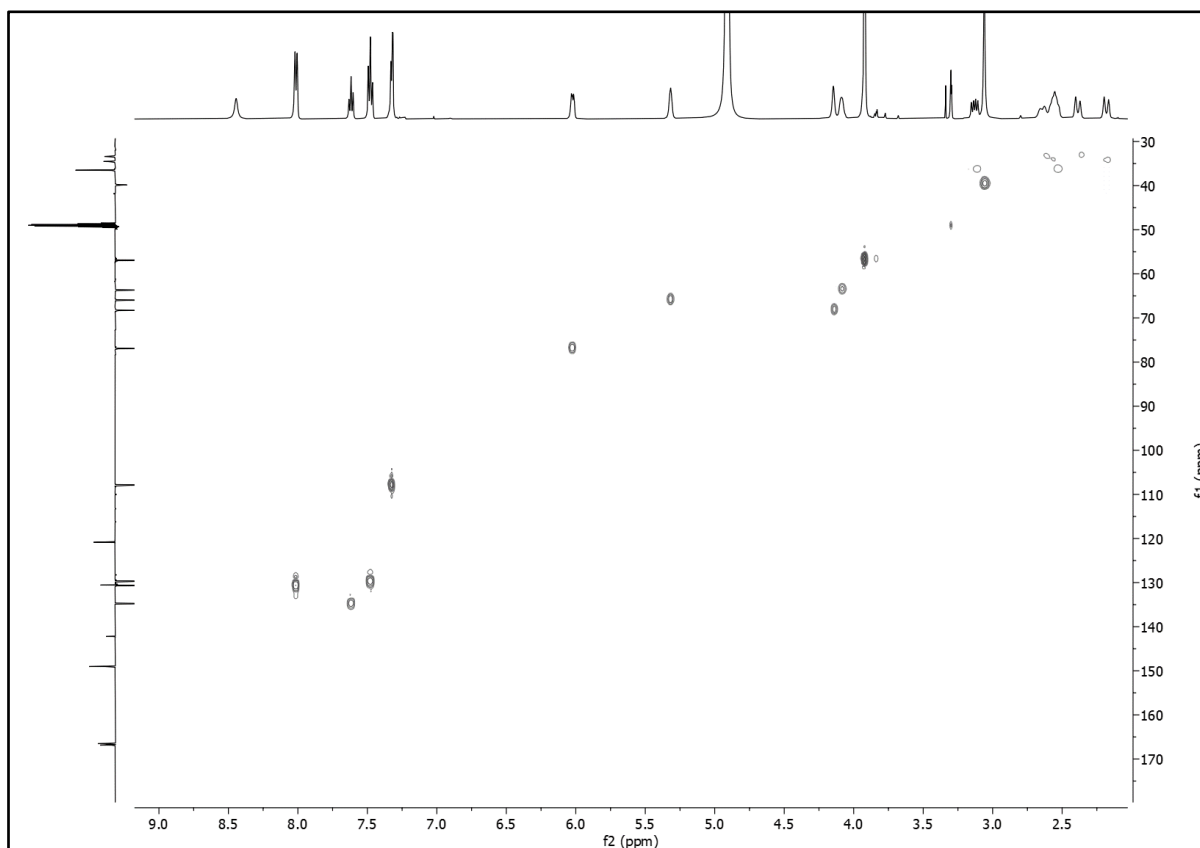


Figura 111 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (2,00 – 4,60 ppm) x (25,0 – 80,0 ppm).

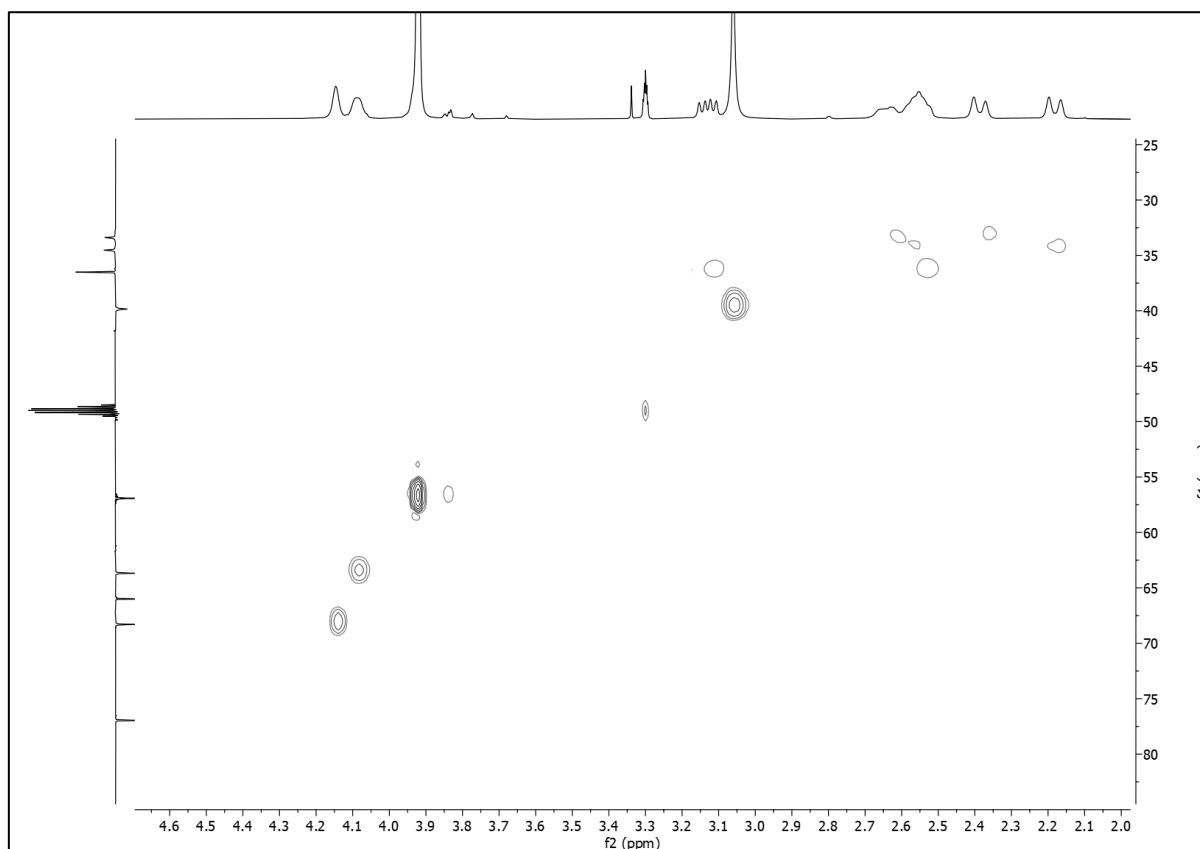


Figura 112 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (5,10 – 8,40 ppm) x (60,0 – 140,0 ppm).

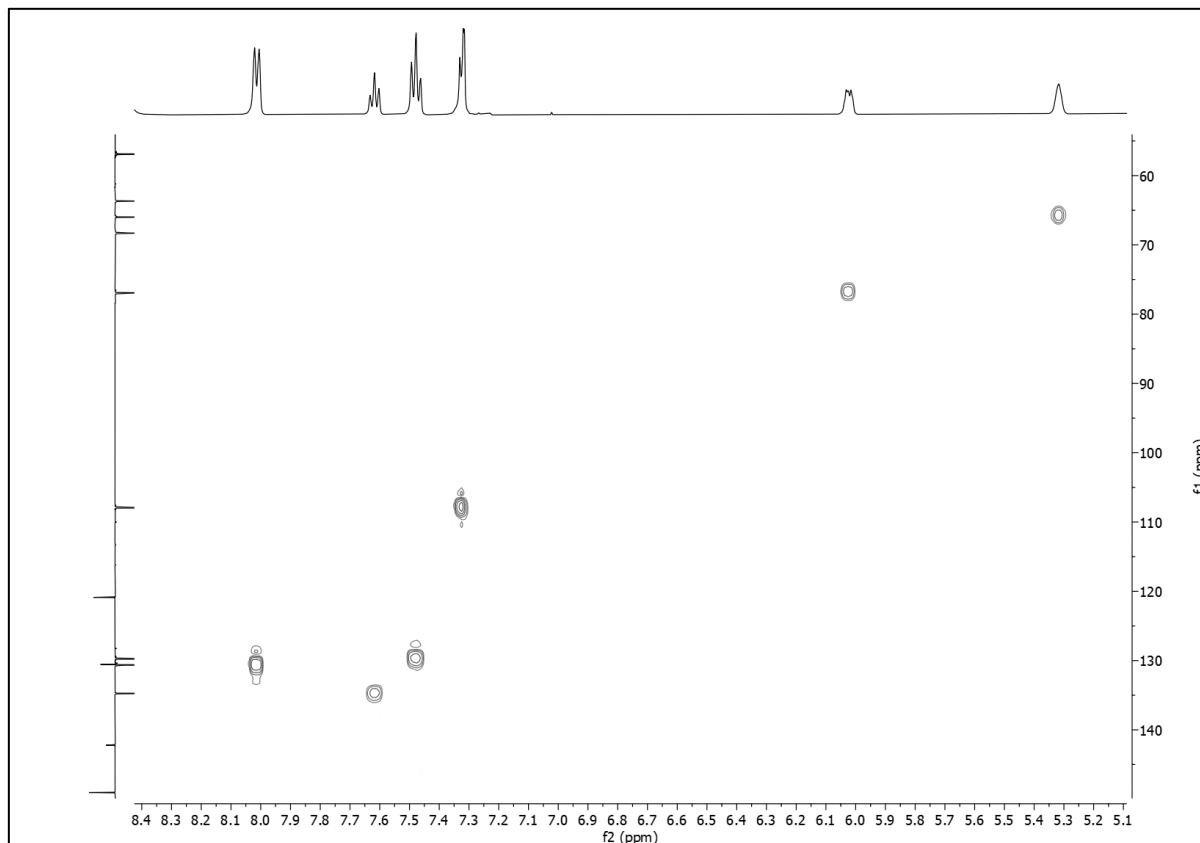


Figura 113 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1.

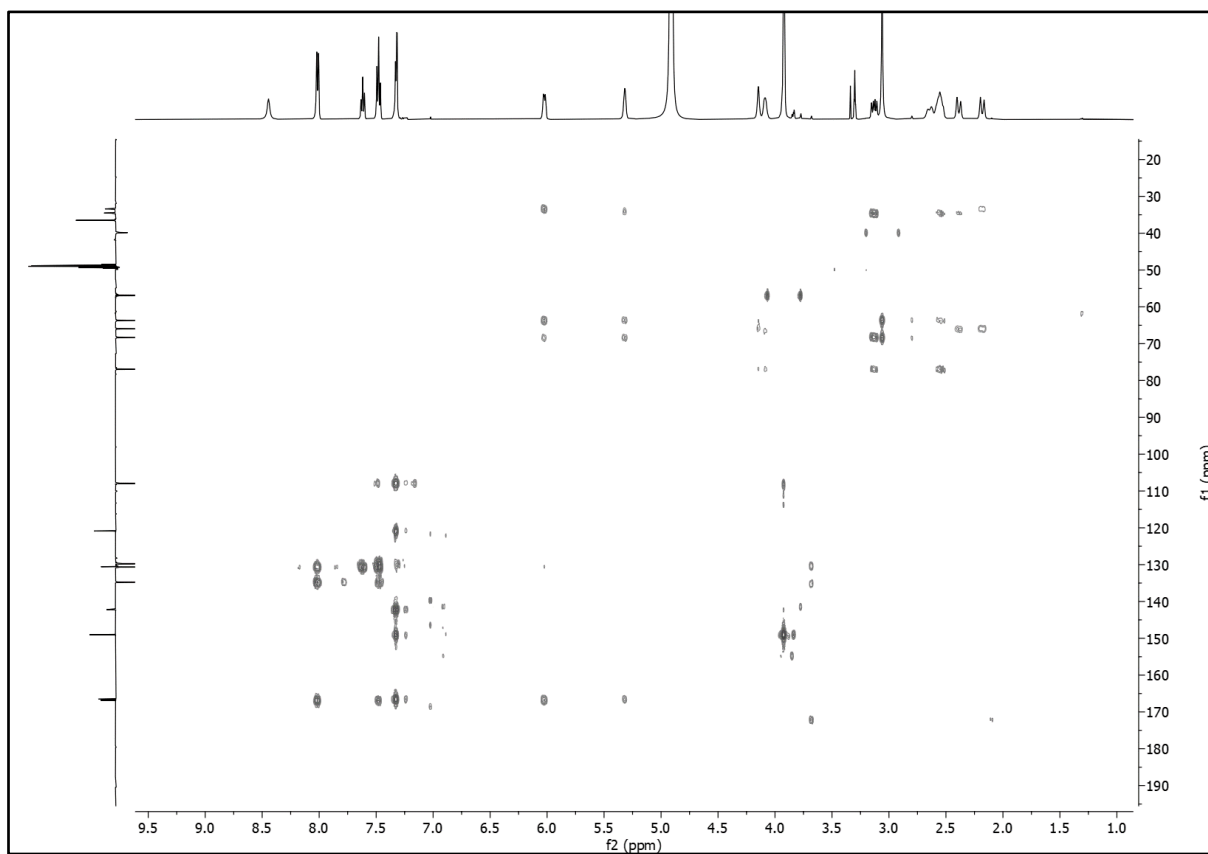


Figura 114 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (1,90 – 4,50 ppm) x (20,0 – 90,0 ppm).

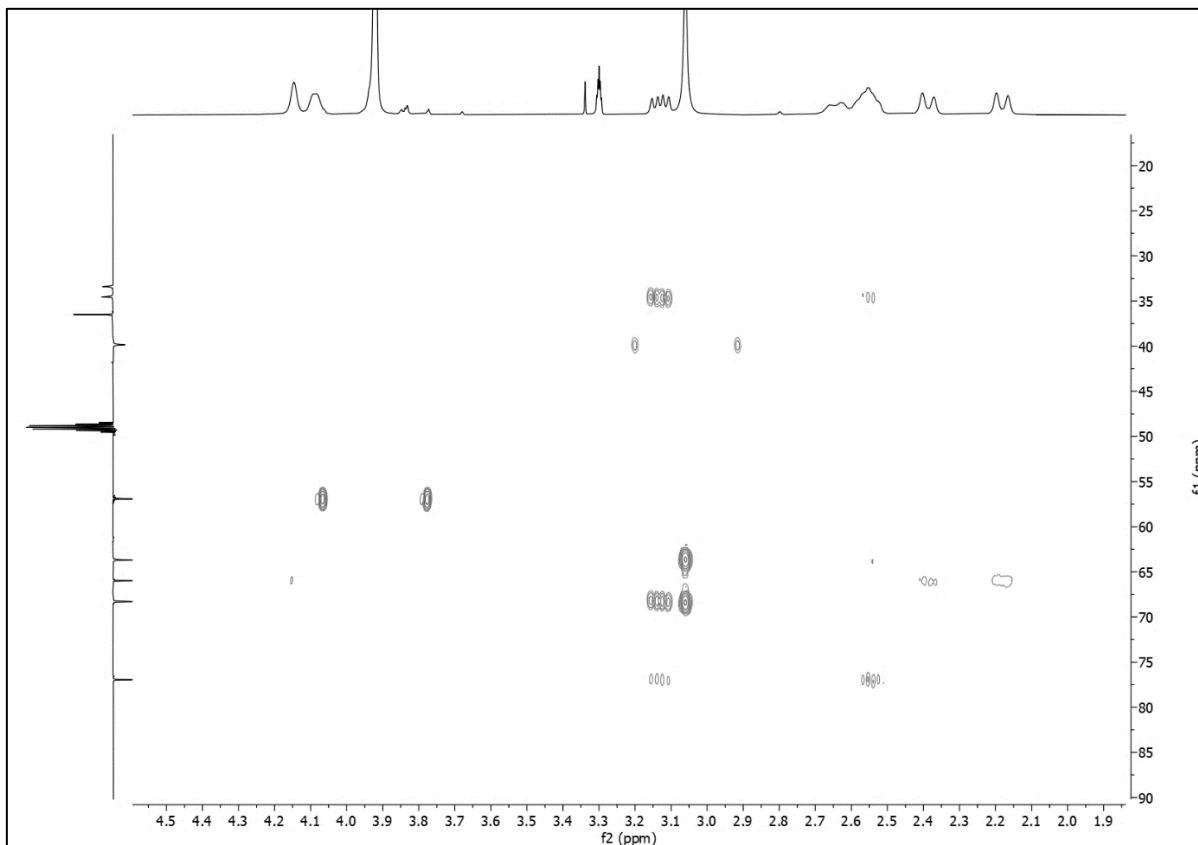


Figura 115 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (3,10 – 4,15 ppm) x (105,0 – 180,0 ppm).

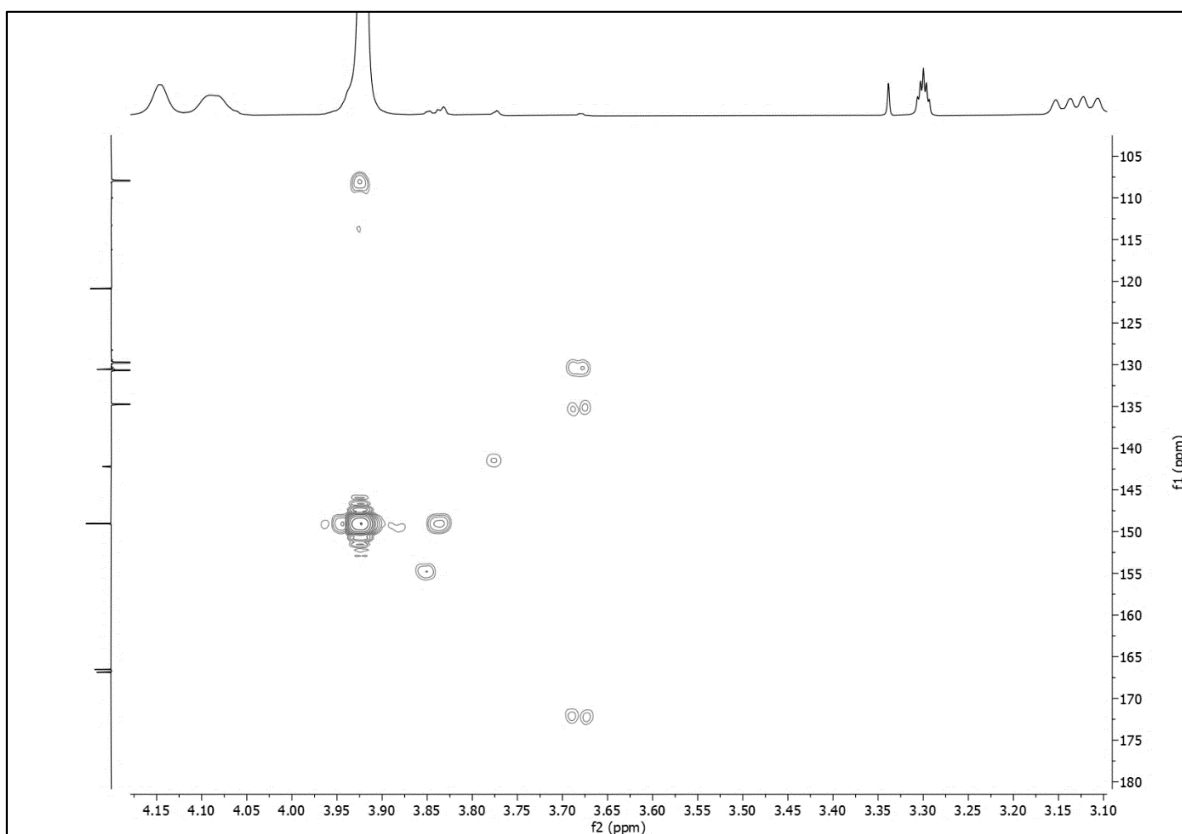


Figura 116 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (4,80 – 6,30 ppm) x (30,0 – 170,0 ppm).

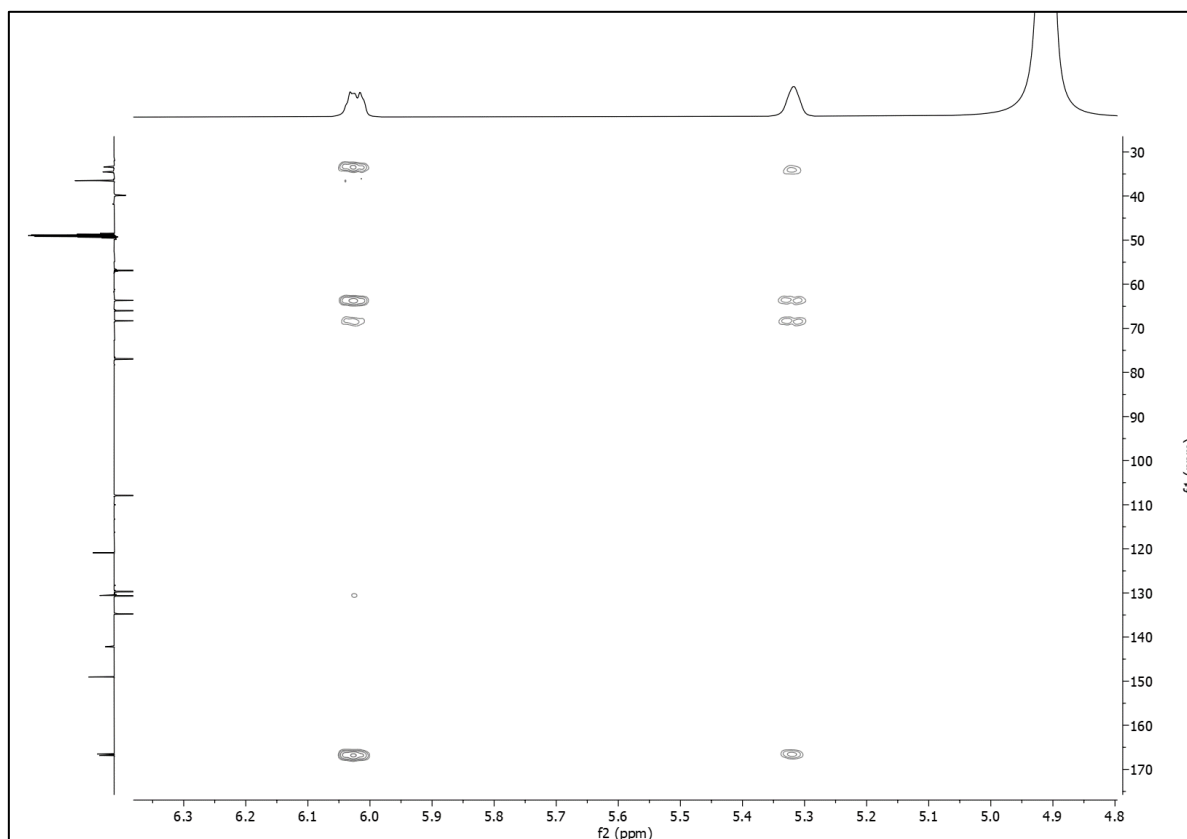


Figura 117 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-1 na região de (6,60 – 8,50 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).

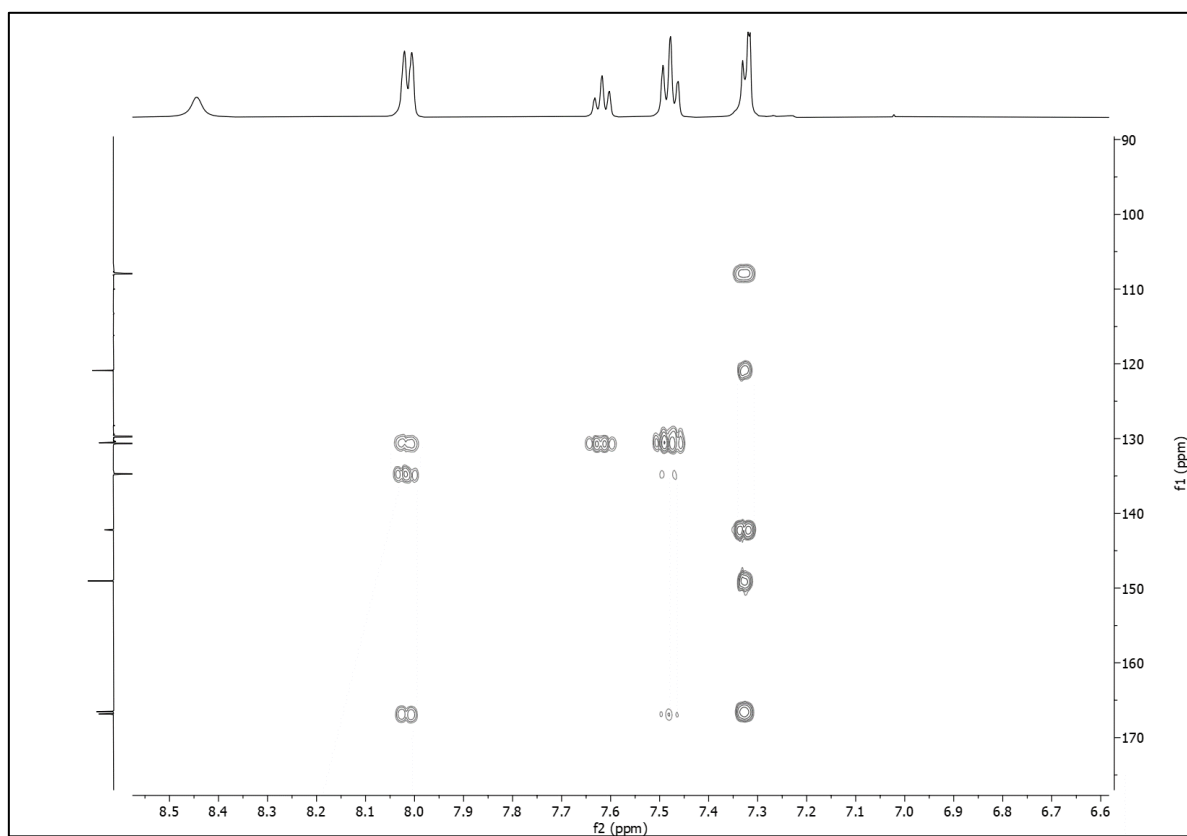
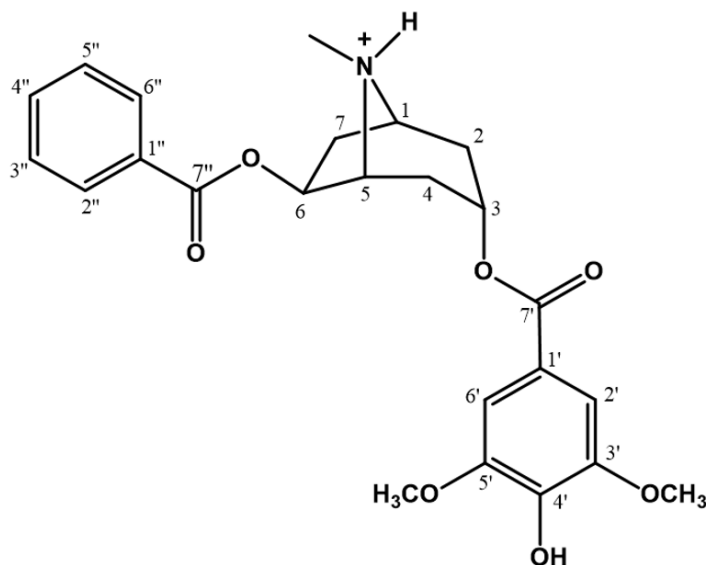


Figura 118 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano protonado.



5.9. Identificação estrutural de Er-2

O composto Er-2 foi isolado na forma de cristais esverdeados com 0,0097 g. O espectro de massas obtido (Figura 119) mostrou um pico em m/z 456,2036 $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{25}H_{29}NO_7$. Com base nesses dados, e em comparação com os obtidos no estudo de desreplicação, levantou-se a hipótese que possivelmente o composto Er-2 se tratava da substância do pico **26**.

Os espectros de RMN de 1H (Figuras 120 a 122), obtido a 500 MHz em CD_3OD e de ^{13}C – BB (Figuras 123 a 125), obtido a 125 MHz em CD_3OD , apresentaram sinais com multiplicidade e deslocamentos químicos semelhantes aos do composto Er-1. Após esta análise, foi possível sugerir que o composto também correspondia a um alcaloide tropanico dissustituído, sendo também o ácido benzoico um dos seus substituintes. No mapa de contorno HMBC (Figuras 126 a 128) foi possível visualizar a correlação entre o hidrogênio H-6 com o carbono C-7'' da unidade benzoiloxi confirmou sua inserção no carbono C-6 do anel tropano. O segundo grupo substituinte foi confirmado como sendo o 3,4,5-trimetoxibenzoiloxi, diante dos seus sinais característicos exibidos no espectro de RMN de 1H , que foram ao singlete em δ_H 7,37 condizente aos hidrogênios H-2' e H-6' e os dois sinais para hidrogênios de metoxilas, um singlete em δ_H 3,93 com integral para seis átomos, sendo assim atribuídos aos hidrogênios das metoxilas das posições *meta*, e outro em δ_H 3,83 com integral para

três átomos, equivalente aos hidrogênios da metoxila posição *para* (OLIVEIRA et al, 2011). A posição de esterificação deste grupo no carbono C-3 pode ser confirmada por meio da visualização da correlação no mapa de contorno HMBC entre o hidrogênio H-3 do núcleo tropano com o carbono C-7' do grupo esterificante (OLIVEIRA et al, 2011). A partir destes dados o alcaloide tropanico foi identificado como sendo o 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropane, que também foi obtido em sua forma protonada (Figura 129). Este composto também é conhecido como catuabine B, já relatado na espécie *E. caatingae* e *Erythroxylum vacciniifolium* Martius em sua forma não protonada, sendo agora descrito em *E. revolutum* (OLIVEIRA et al, 2011; GRAF, LUDE, 1977).

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-2, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropane protonada, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA et al., 2011.

Position	HSQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Er-2	δ_{C} Er-2	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	4,05 (1H; s)	68,0	H-7 e H-MeN	3,43 (m)	60,0
2	2,35 (1H; d; J = 14 Hz)	33,4	H-6	2,26 (m)	34,6
3	5,33 (t; 1H)	66,8	-	5,34 (t; J = 5 Hz)	67,6
4	2,15 (1H; d; J = 15 Hz)	34,5	H-3	2,33 (m)	33,3
5	4,00 (1H; s)	63,2	H-MeN	3,42 (m)	65,7
6	6,01 (1H; dd; J = 8 e 3 Hz)	77,5	-	5,92 (dd; J = 3 e 7 Hz)	79,8
7	3,10 (1H; dd; J = 8 e 15 Hz)	36,6	-	2,80 (dd; J = 7 e 15 Hz)	36,6
1'	2,59 (1H; m)	126,1	H-2' e H-6'	2,30 (m)	125,3
2', 6'	-	107,8	H-6'/H-2'	-	106,3
3', 5'	7,37 (2H; s)	154,5	H-2', H-6' e H-m-MeO	7,39 (s)	153,1
4'	-	143,7	H-2', H-6' e H-p-MeO	-	153,1
7'	-	166,2	H-3, H-2' e H-6'	-	165,3
1''	-	130,6	H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	-	130,1
2'' 6''	8,02 (2H; d; J = 7,5 Hz)	130,6	H-6''/H-2''	8,02 (dd; J = 1,5 e 8,5 Hz)	129,4
3'', 5''	7,48 (2H; t; J = 7,5 Hz)	129,7	H-5''/H-3''	7,42 (t, J = 8 Hz)	128,3
4''	7,62 (1H; t; J = 7,5 Hz)	134,6	-	7,55 (t, J = 7,5 Hz)	132,9
7''	-	166,9	H-6, H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	-	166,0
MeN	3,00 (3H; s)	39,8	-	2,60 (s)	40,1
m-MeO	3,93 (6H; s)	56,8	-	3,98 (s)	56,3
p-MeO	3,83 (3H; s)	61,1	-	3,92 (s)	60,0

Figura 119 - Espectro de massa de Er-2.

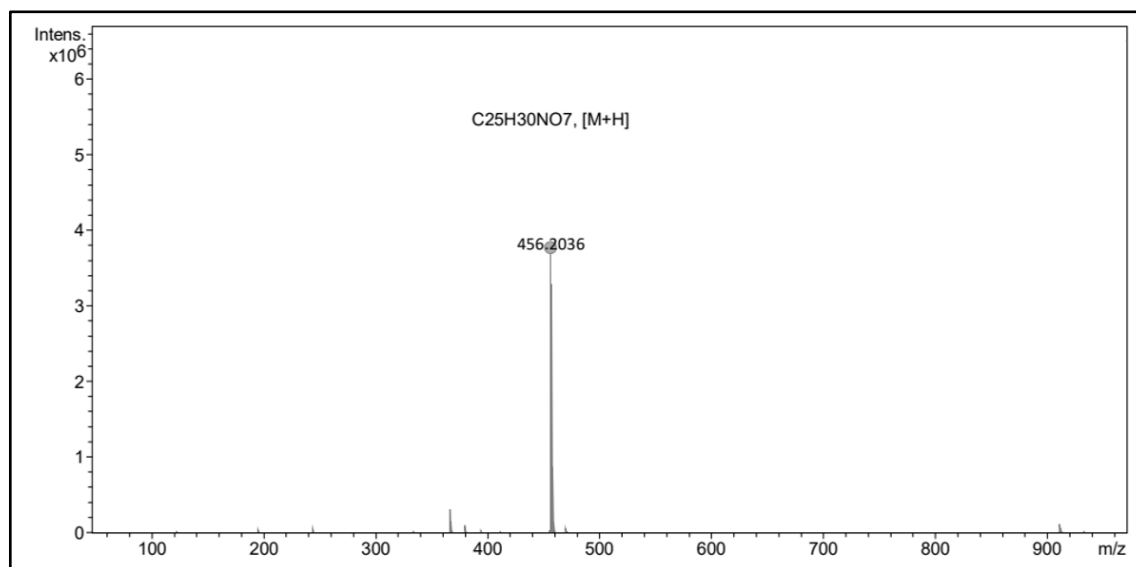


Figura 120 - Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2.

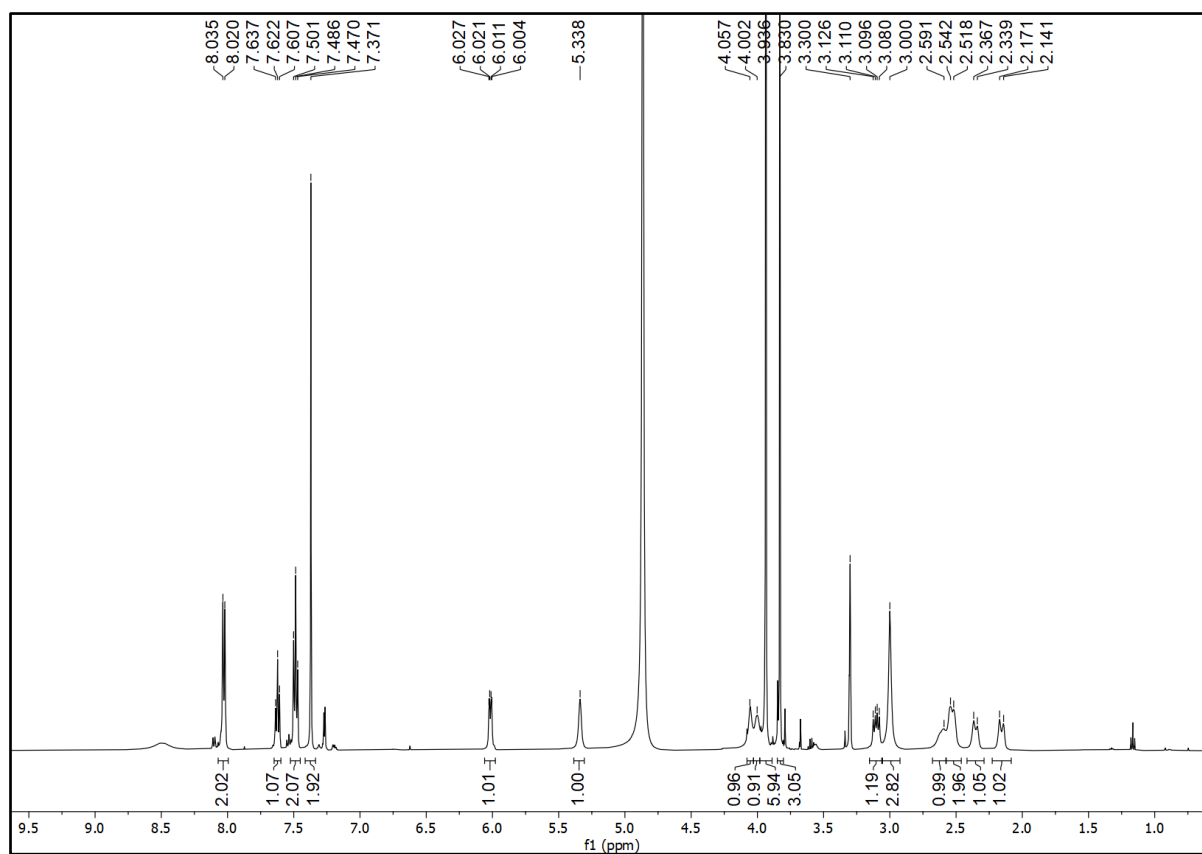


Figura 121 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 2,10 – 4,20 ppm.

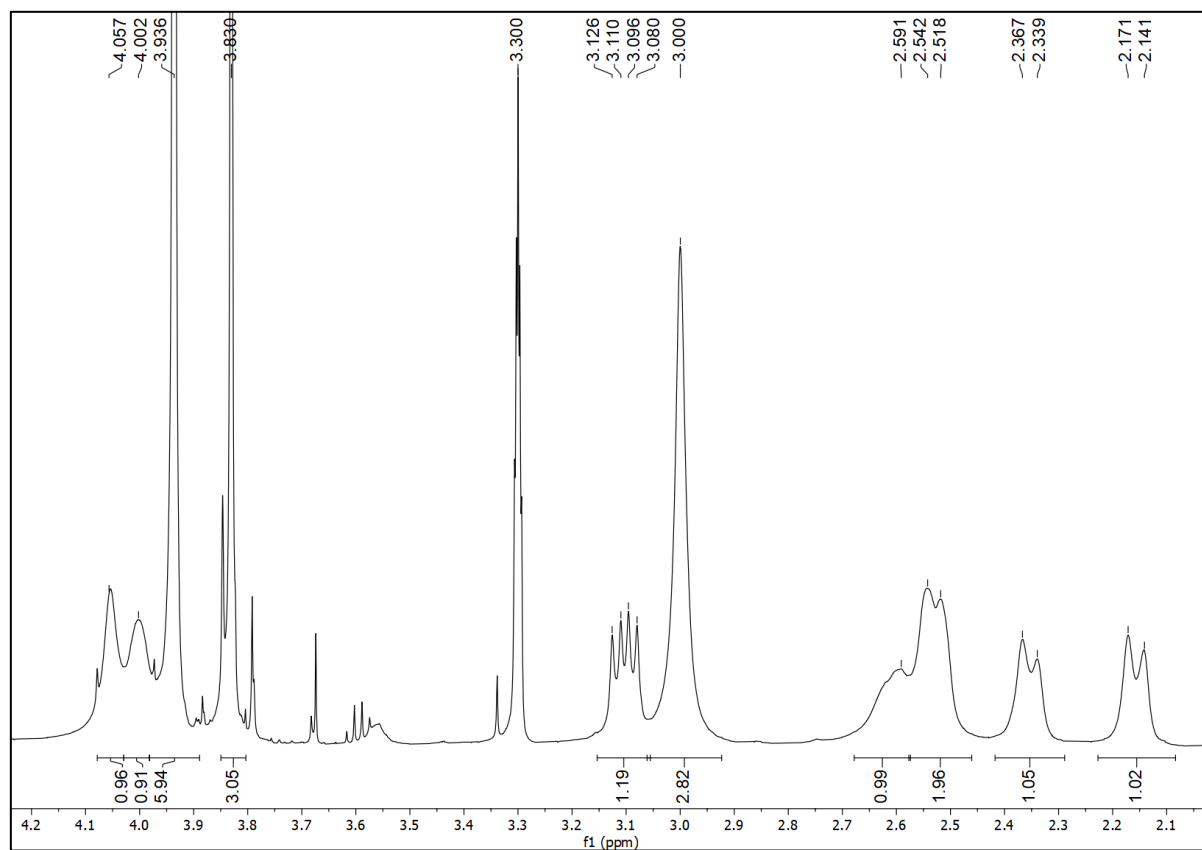


Figura 122 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 5,30 – 8,10 ppm.

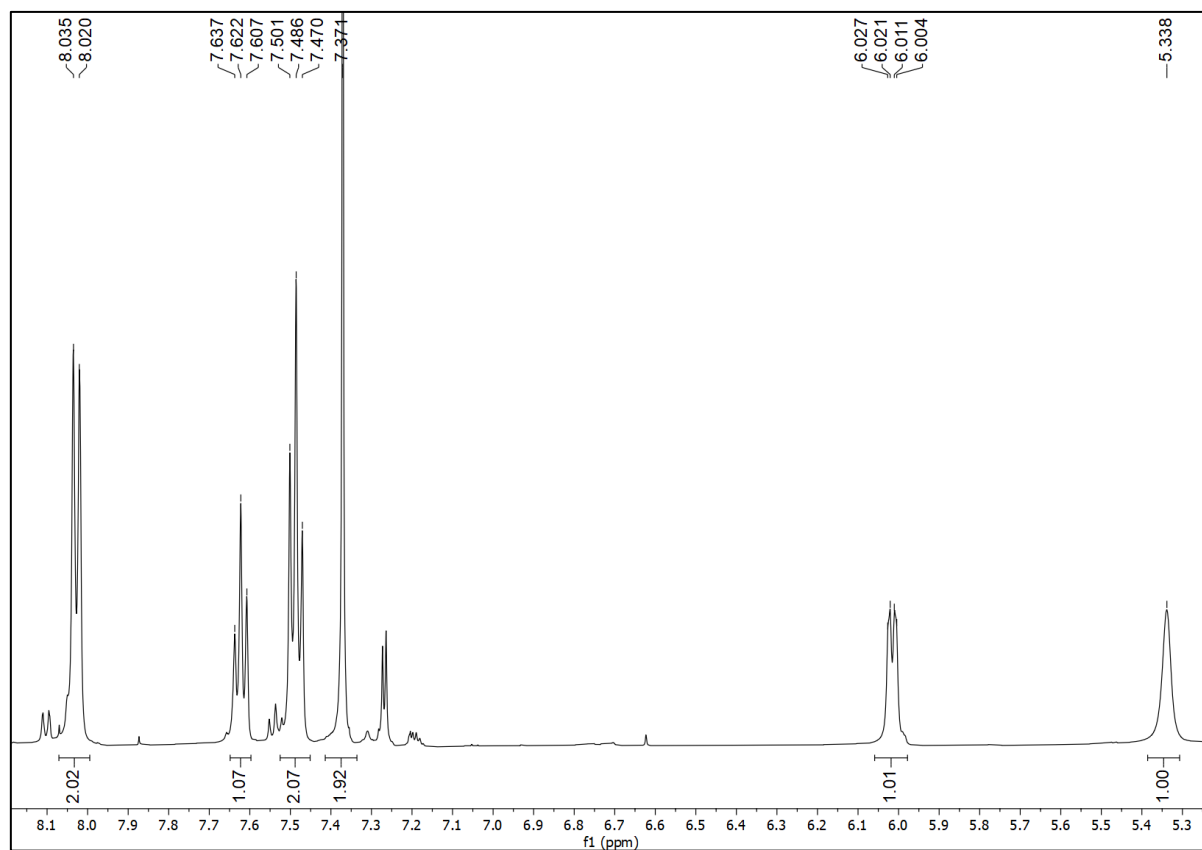


Figura 123 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2.

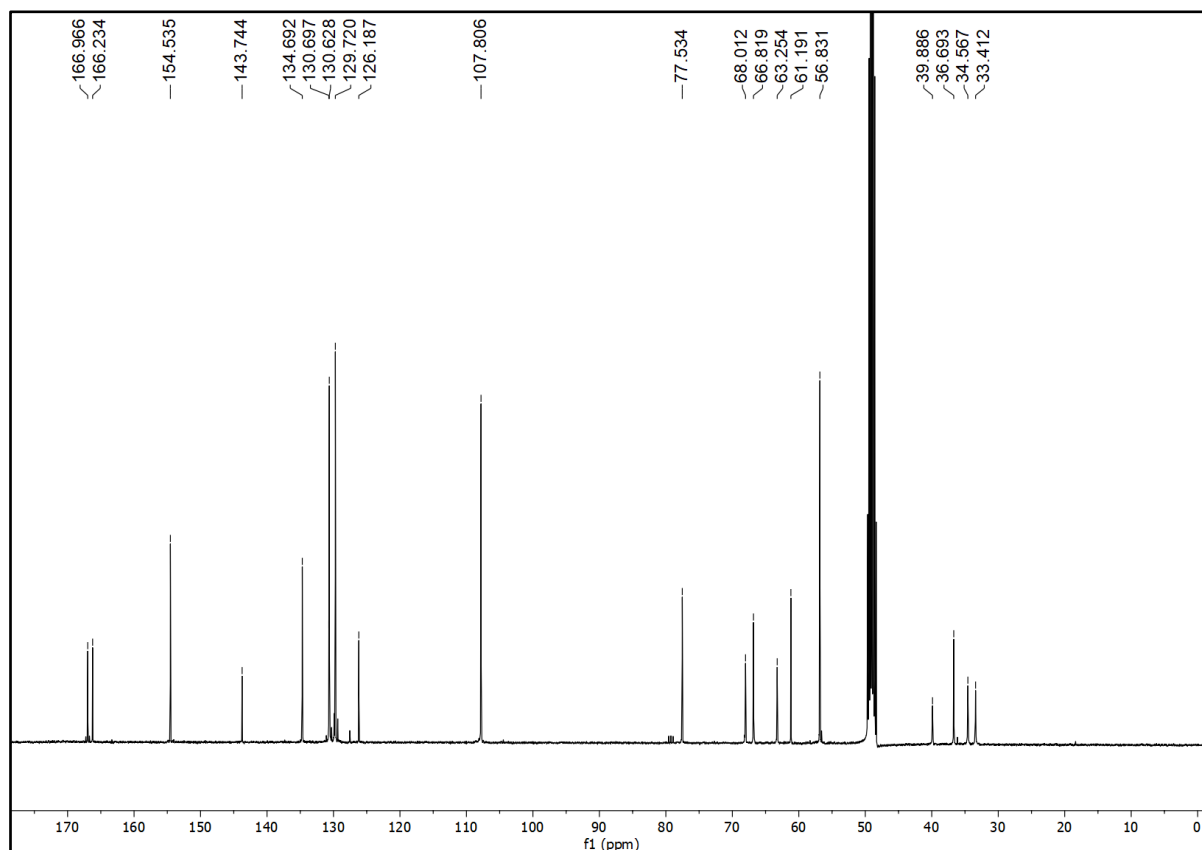


Figura 124 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 30 – 78 ppm.

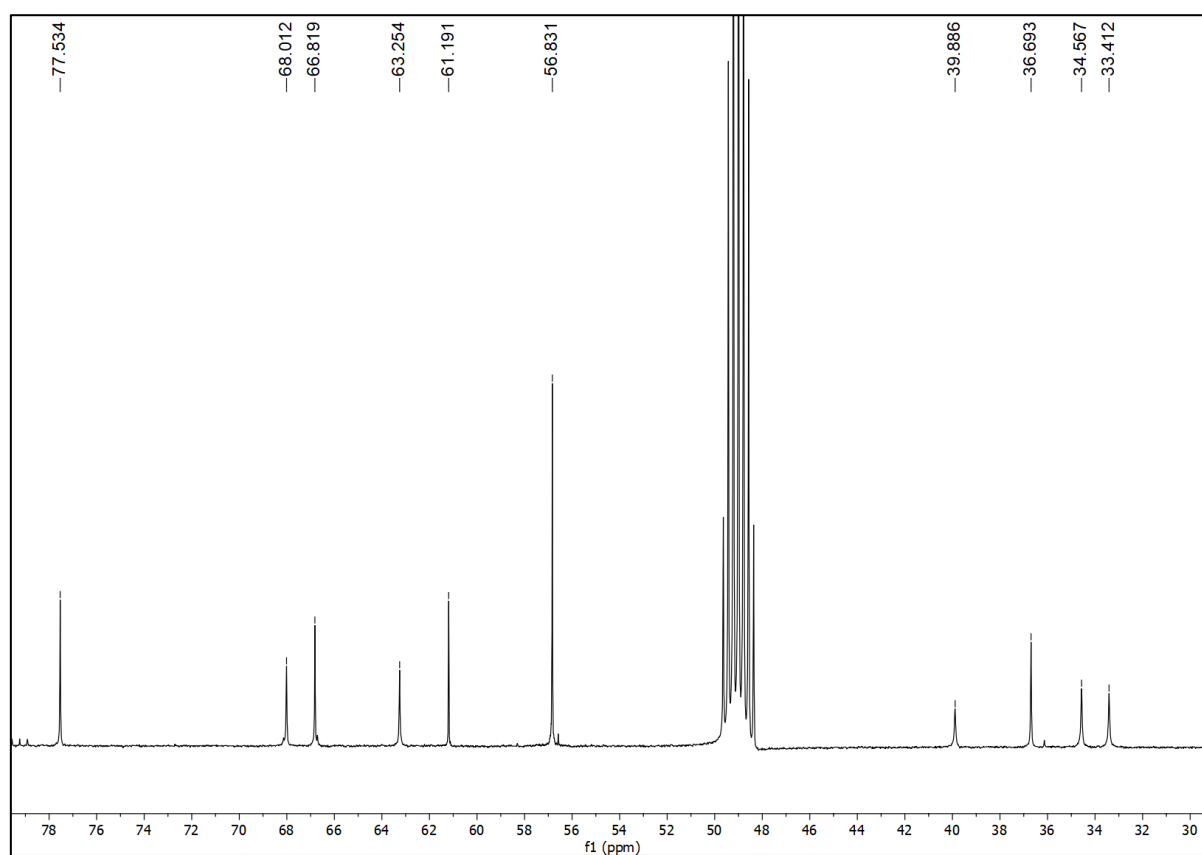


Figura 125 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-2 na região de 104 – 170 ppm.

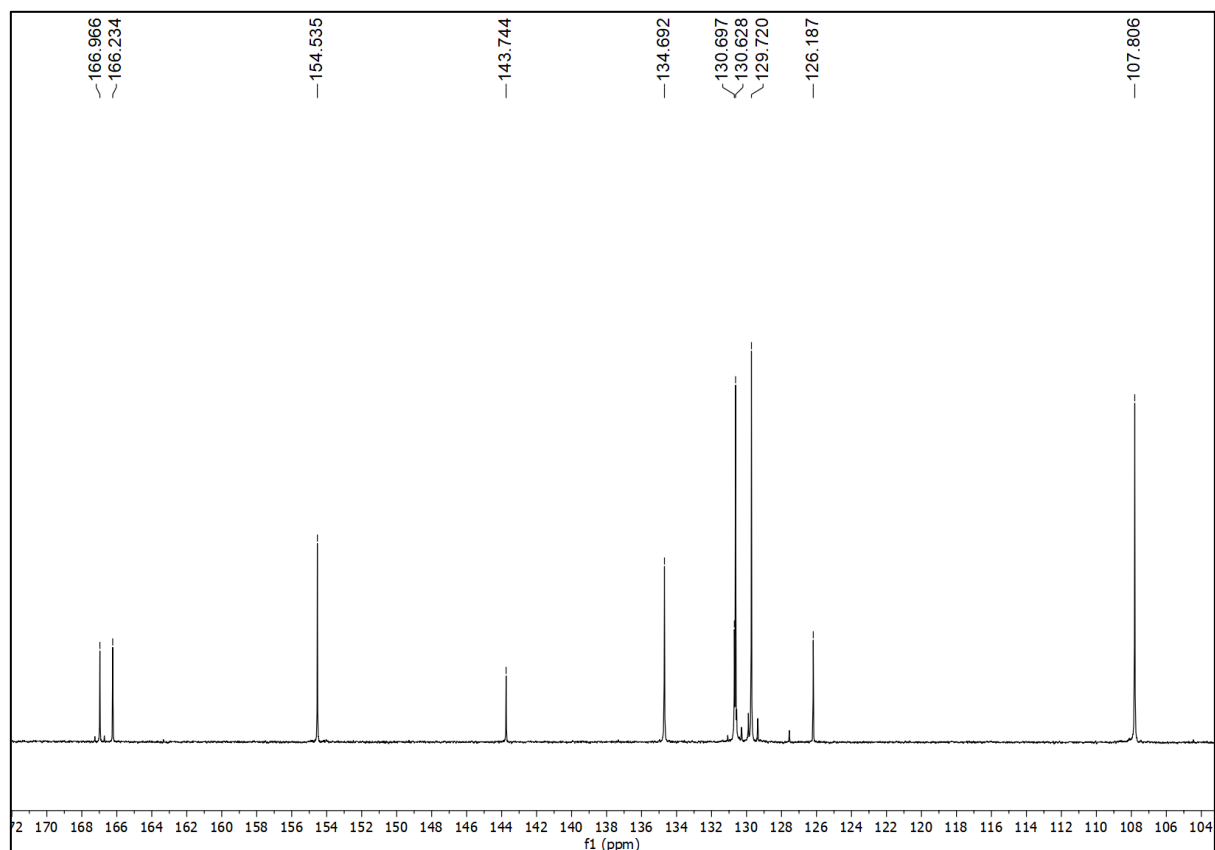


Figura 126 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Es-2.

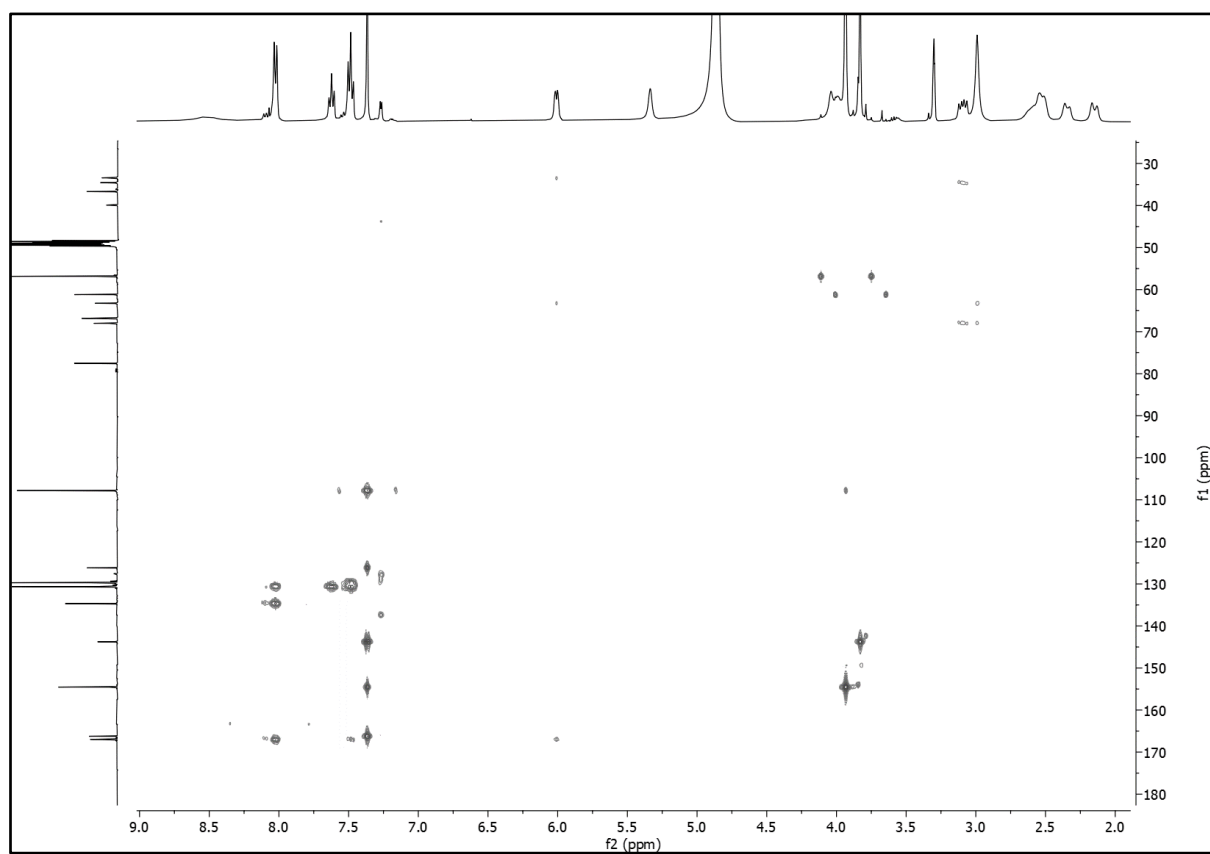


Figura 127 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-2 na região de (2,40 – 5,20 ppm) x (30,0 – 120,0 ppm).

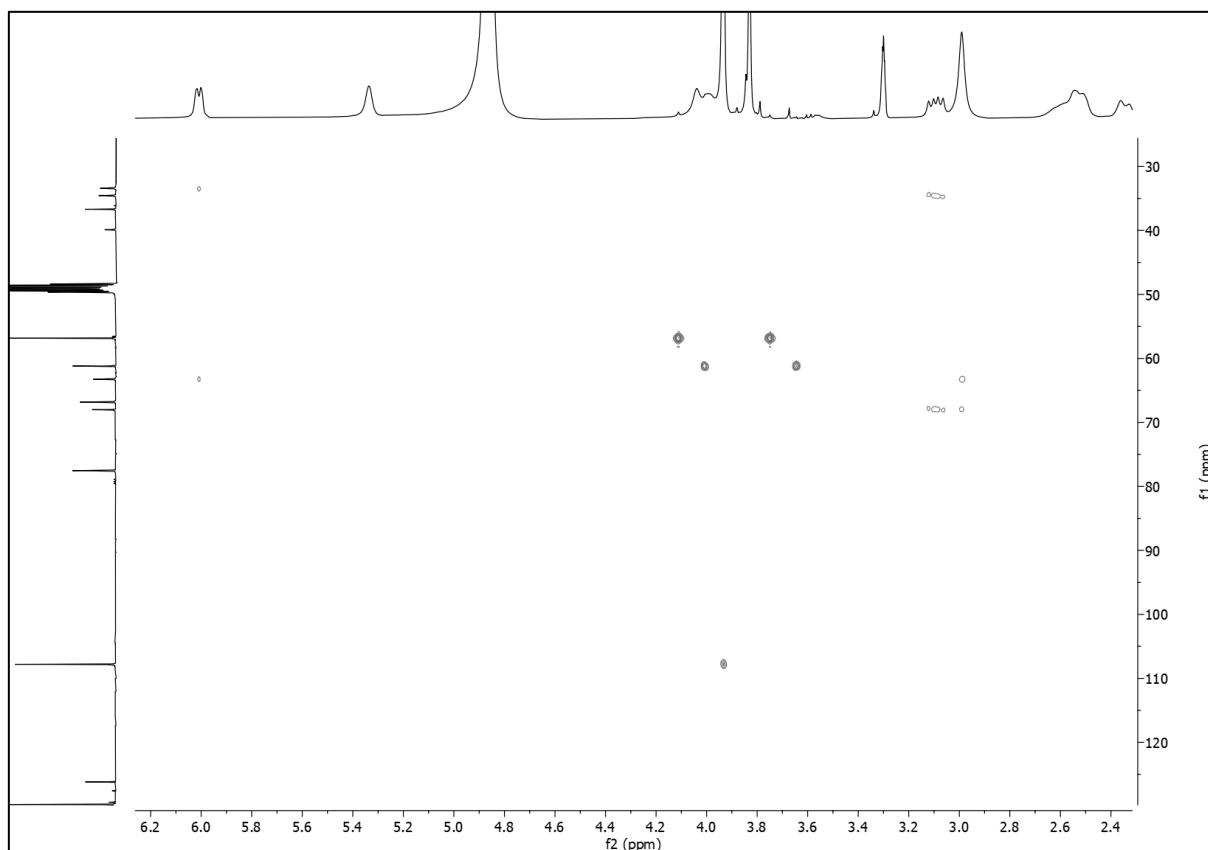


Figura 128 - Expansão do espectro HMBC (500 e 120 MHz, CD₃OD) de Er-2 na região de (3,00 – 9,50 ppm) x (90,0 – 180,0 ppm).

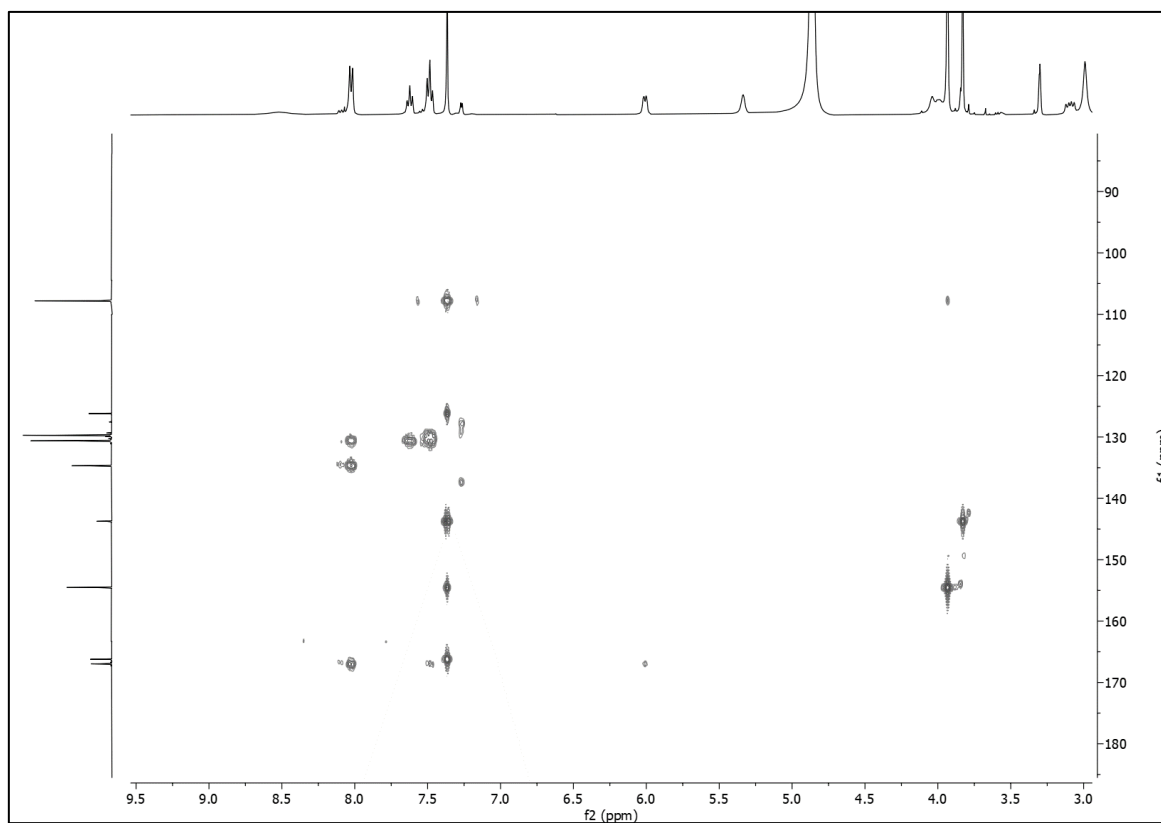
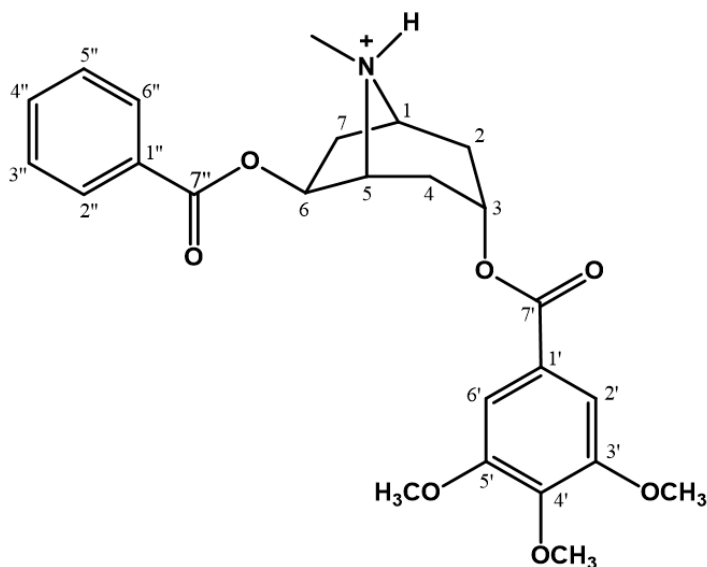


Figura 129 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)tropane protonada.



5.10. Identificação estrutural de Er-3

O composto Er-3 foi isolado na forma de cristais brancos com 0,0101 g. O espectro de massas obtido (Figura 130) mostrou um pico em m/z 482,2176 $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{31}NO_7$. Com base nesses dados, e em comparação com os obtidos no estudo de desreplicação, levantou-se a hipótese que possivelmente o composto Er-3 se tratava da substância do pico **28**.

Os espectros de RMN de 1H (Figuras 131 a 133) e ^{13}C (Figuras 134 a 136) mostraram sinais semelhantes e equivalentes aos apresentados pelos outros dois compostos isolados, a diferença observada foi com relação aos sinais do substituinte inserido no carbono C-3 do anel tropano. O grupo 3,4,5-trimetoxicinamico foi confirmado como sendo esse substituinte a partir de seus sinais característicos que correspondem a dois dubletos, ambos com integral para um hidrogênio, um em δ_H 7,74 ($J = 16$ Hz) e outro em δ_H 6,52 ($J = 16$ Hz), foram equivalentes ao par de hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos do grupo esterificante, H-7' e H-8' respectivamente (CHAVEZ et al, 2002). Suas constantes de acoplamento, indicaram que os mesmos estão *trans*-acoplados devido ao fato de que em uma ligação dupla, prótons substituídos *trans* se acoplam com maior intensidade, com um valor característico de 3J por volta de 16 Hz. O singlete em δ_H 7,03 foi atribuído ao par de

hidrogênios H-2'/H-6', e por fim as metoxilas foram assinaladas após os singletos em δ_H 3,88 e δ_H 3,79 serem evidenciados, o primeiro deslocamento químico apresentou integral para seis átomos de hidrogênio, sendo assim atribuídos aos hidrogênios das metoxilas das duas posições *meta*, e o segundo deslocamento foi atribuído aos hidrogênios da metoxila da posição *para*, por apresentar a integral para três átomos de hidrogênio (CHAVEZ et al, 2002). No mapa de contorno HMBC (Figuras 140 a 142) foi observada a correlação entre o hidrogênio H-3 do núcleo tropano com o carbono C-9' do grupo substituinte, confirmando sua inserção no carbono C-3 do alcaloide tropanico. Diante dos dados analisados composto foi identificado como 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropane protonado (Figura 143), descrito anteriormente na espécie *E. caatingae*, no entanto está descrito pela primeira vez em *E. revolutum*.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropane protonado, em comparação aos dados obtidos por OLIVEIRA, 2012.

Posição	HSQC		HMBC	Referência	
	δ_{H} Er-3	δ_{C} Er-3	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	4,06 (1H; s)	68,1	H-3, H-6 e H-MeN	4,03 (<i>dl</i> ; $J = 5,5$ Hz)	63,0
2	2,31 (1H; <i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	33,4	H-6	2,08 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	34,0
3	5,22 (<i>tl</i> ; 1H)	65,8	-	5,33 (<i>tl</i> ; $J = 5$ Hz)	64,2
4	2,09 (1H; <i>d</i> ; $J = 15,5$ Hz)	34,5	H-7	2,29 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	32,8
5	4,00 (1H; s)	63,3	H-6 e H-MeN	4,00 (<i>s</i>)	68,0
6	6,01 (1H; <i>dd</i> ; $J = 3$ e 8,5 Hz)	77,5	H-7	6,01 (<i>dd</i> ; $J = 3$ e 8,4 Hz) 3,15 (<i>m</i>) 2,47 (<i>dd</i> ; $J = 5$ e 14,5 Hz)	75,3
7	3,10 (1H; <i>dd</i> ; $J = 8$ e 15,0 Hz) 2,64 (1H; <i>m</i>)	36,2	-	-	35,2
1'	-	131,3	H-2', H-6', H-7' e H-8'	-	128,0
2', 6'	7,03 (2H; s)	107,0	H-6'/H-2', H-7', H-8' e H- <i>m</i> -MeO	6,85 (<i>s</i>)	105,7
3', 5'	-	154,8	H-2', H-6', H-7', H-8', H- <i>m</i> -MeO e H- <i>p</i> -MeO	-	153,5
4'	-	141,4	H-2', H-6' e H- <i>p</i> -MeO	-	140,6
7'	7,74 (1H; <i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	147,1	H-3, H-2', H-6' e H-8'	7,68 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	146,2
8'	6,52 (1H; <i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	117,8	H-7'	6,29 (<i>d</i> ; $J = 16$ Hz)	116,1
9'	-	166,9	H-3, H-2', H-6', H-7' e H-8'	-	165,7
1''	-	130,6	H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	-	129,3
2'' 6''	8,03 (2H; <i>d</i> ; $J = 7,5$ Hz)	130,7	H-3'', H-4'' e H-5''	7,93 (<i>t</i> ; $J = 8$ Hz)	129,4
3'', 5''	7,50 (2H; <i>t</i> ; $J = 7,5$ Hz)	129,7	-	7,47 (<i>t</i> ; $J = 8$ Hz)	128,8
4''	7,63 (1H; <i>t</i> ; $J = 7,5$ Hz)	134,7	H-2'', H-3'', H-5'' e H-6''	7,62 (<i>t</i> ; $J = 8$ Hz)	134,0
7''	-	167,3	H-6, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''	-	165,5
MeN	2,98 (3H; s)	39,8	-	3,06 (<i>s</i>)	-
<i>m</i> -MeO	3,88 (6H; s)	56,7	-	3,90 (<i>s</i>)	56,2
<i>p</i> -MeO	3,79 (3H; s)	61,1	-	3,86 (<i>s</i>)	60,9

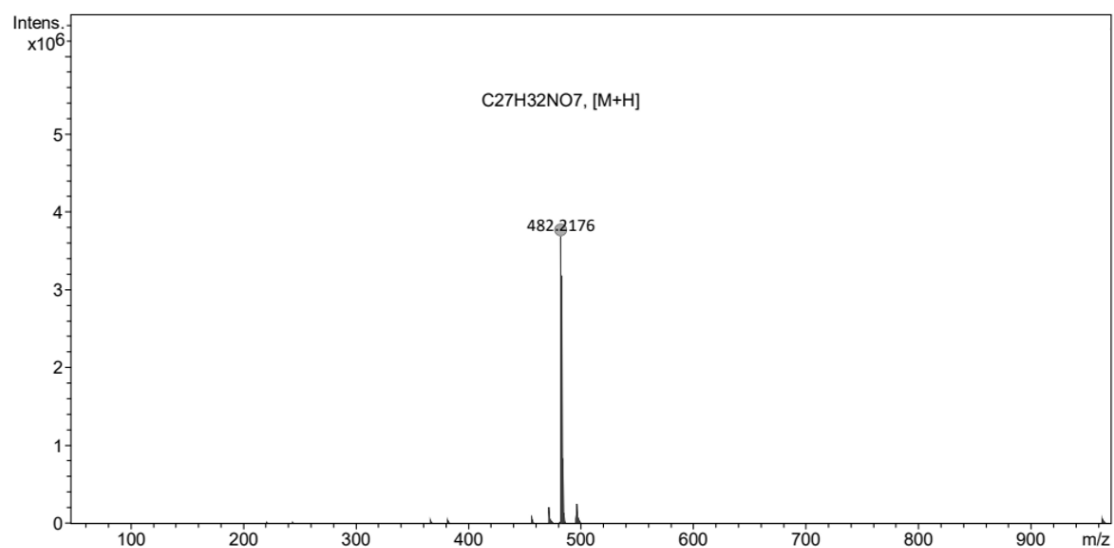
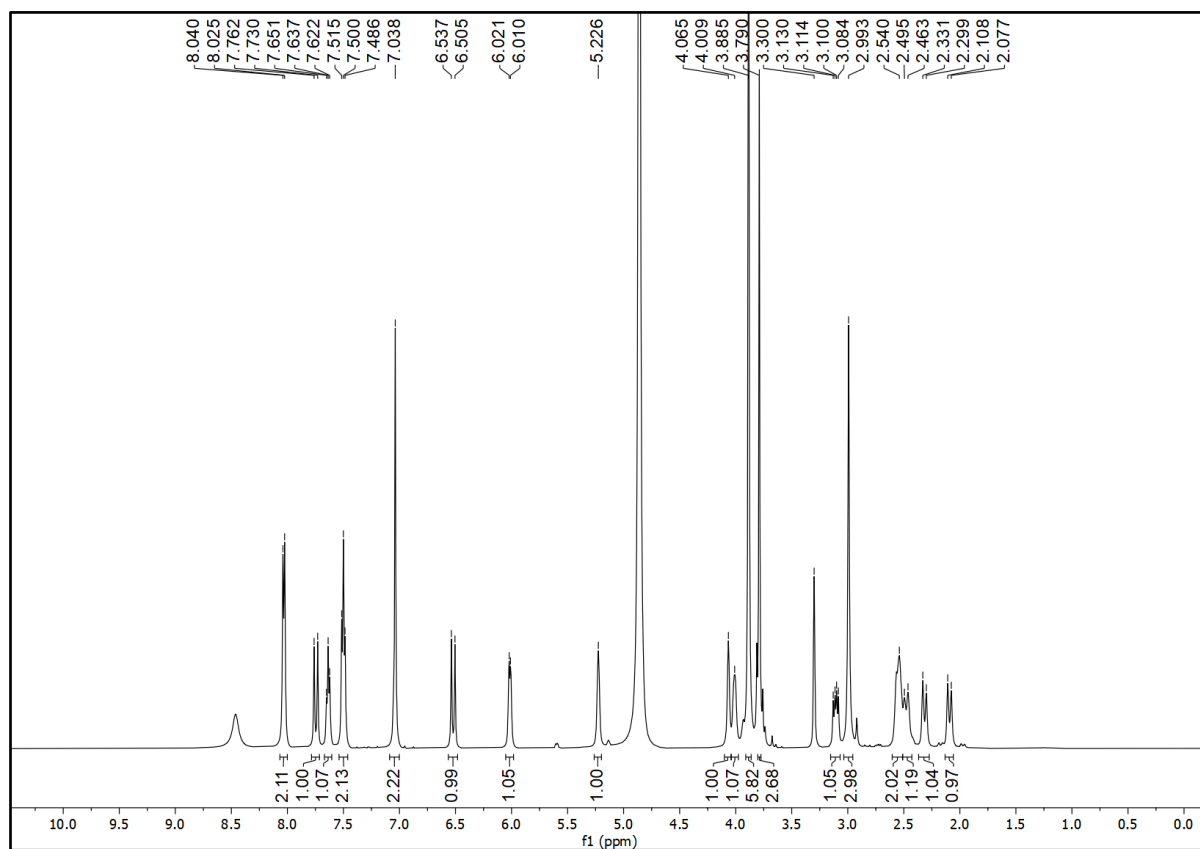
Figura 130 - Espectro de massa de Er-3.**Figura 131** - Espectro de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3.

Figura 132 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 1,80 – 4,30 ppm.

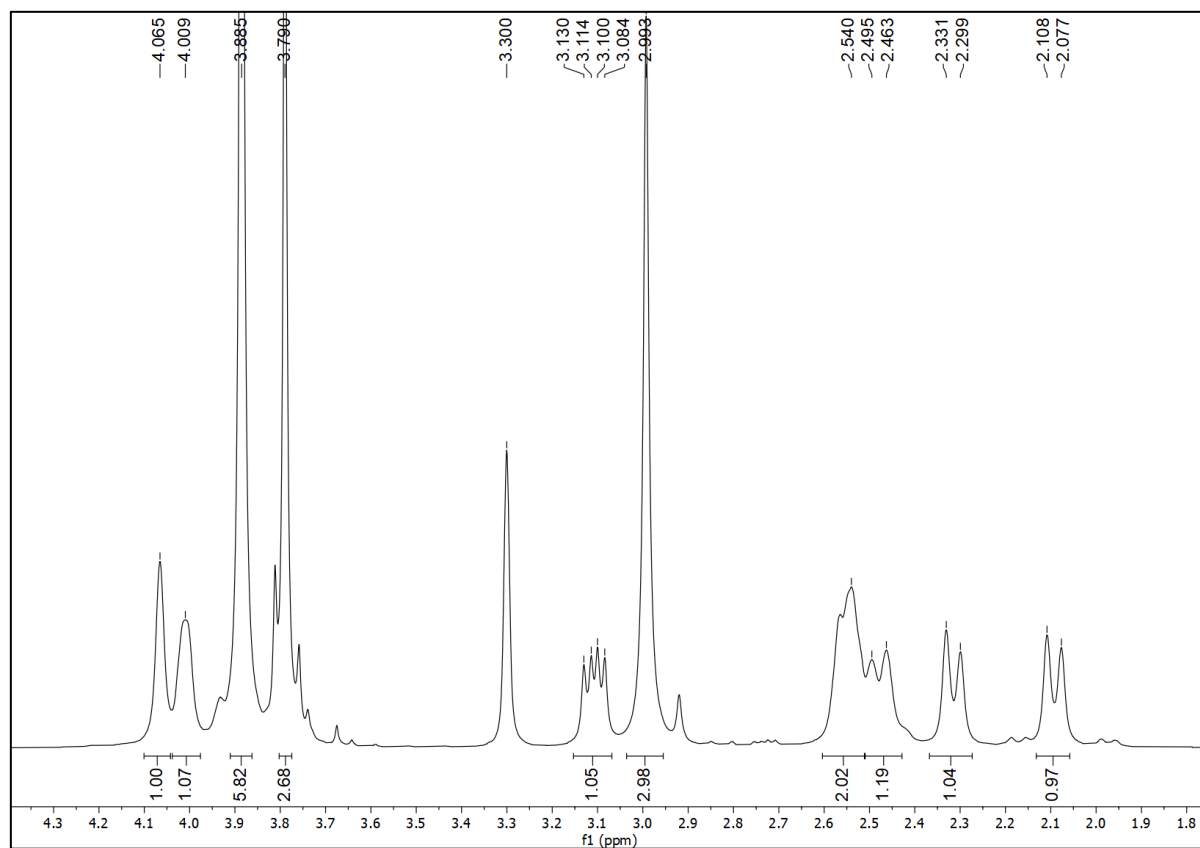


Figura 133 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 5,20 – 8,10 ppm.

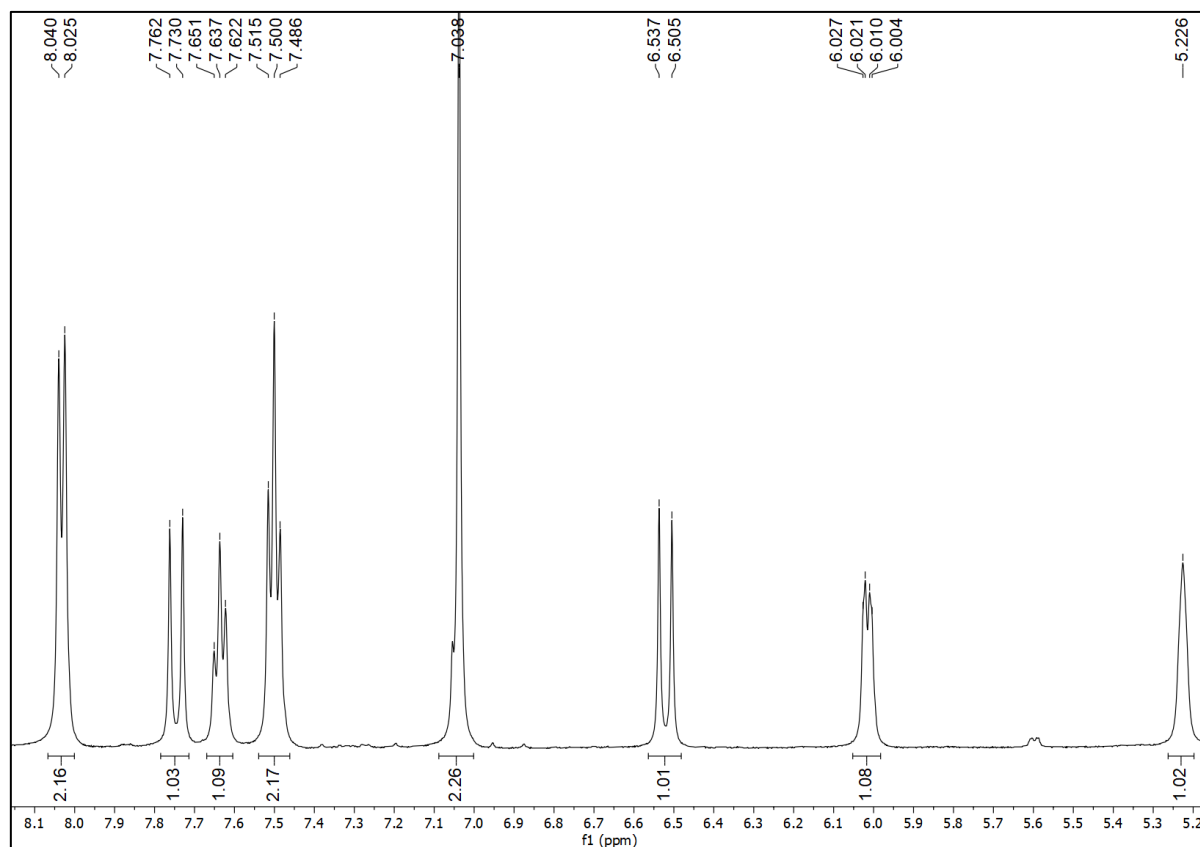


Figura 134 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3.

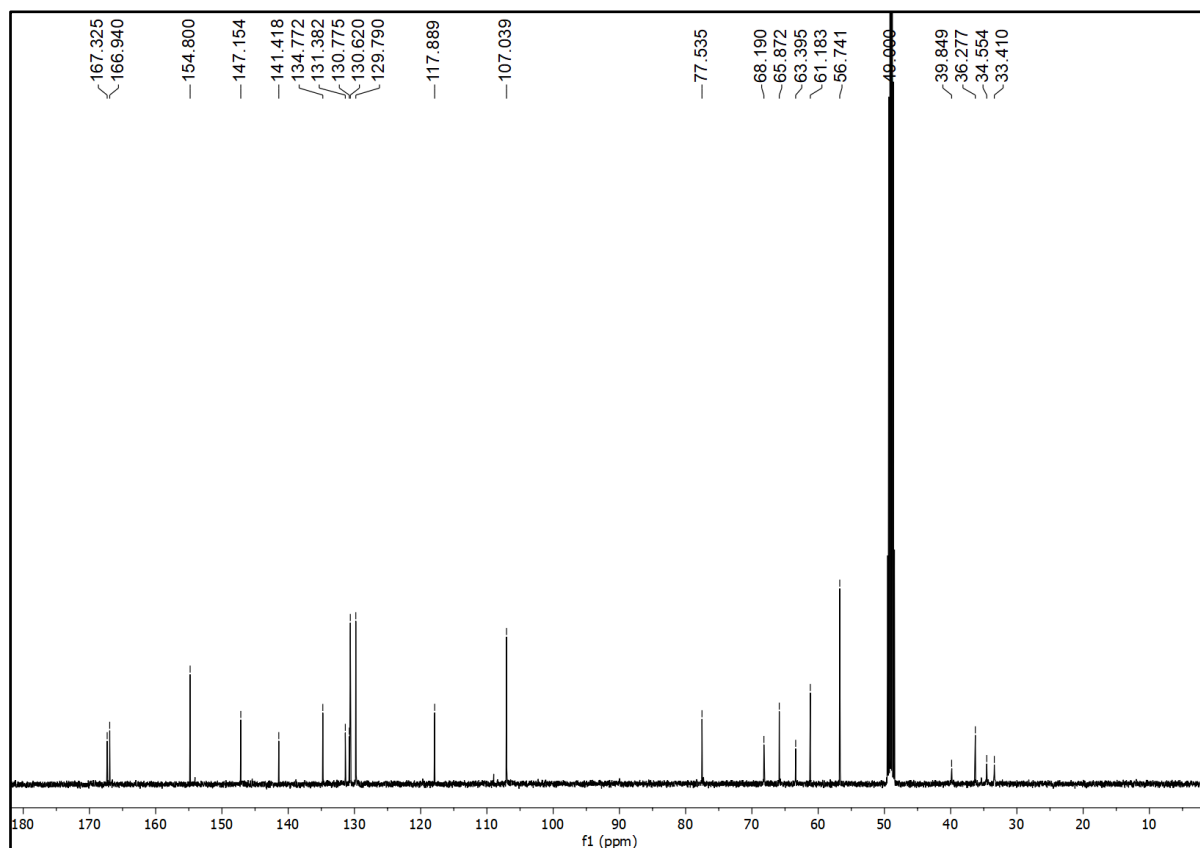


Figura 135 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 30 – 84 ppm.

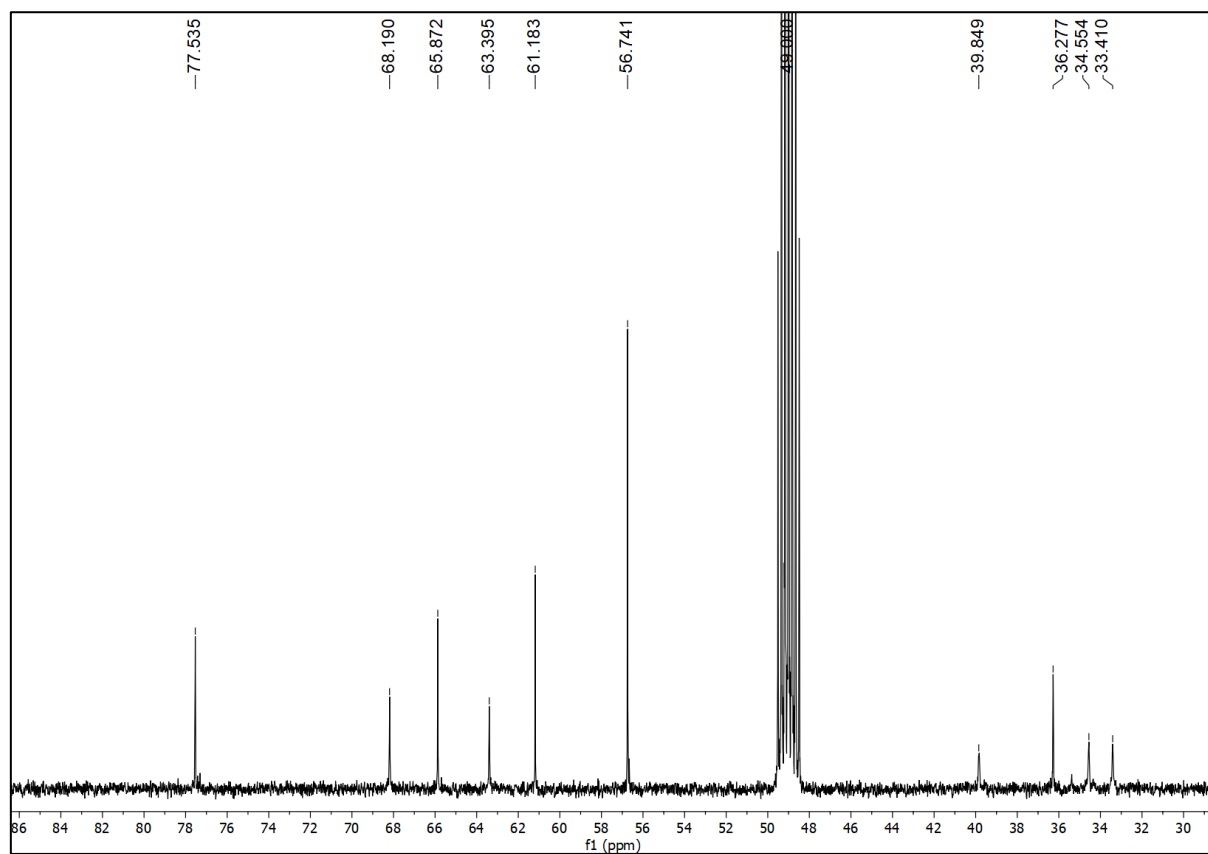


Figura 136 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Er-3 na região de 106 – 168 ppm.

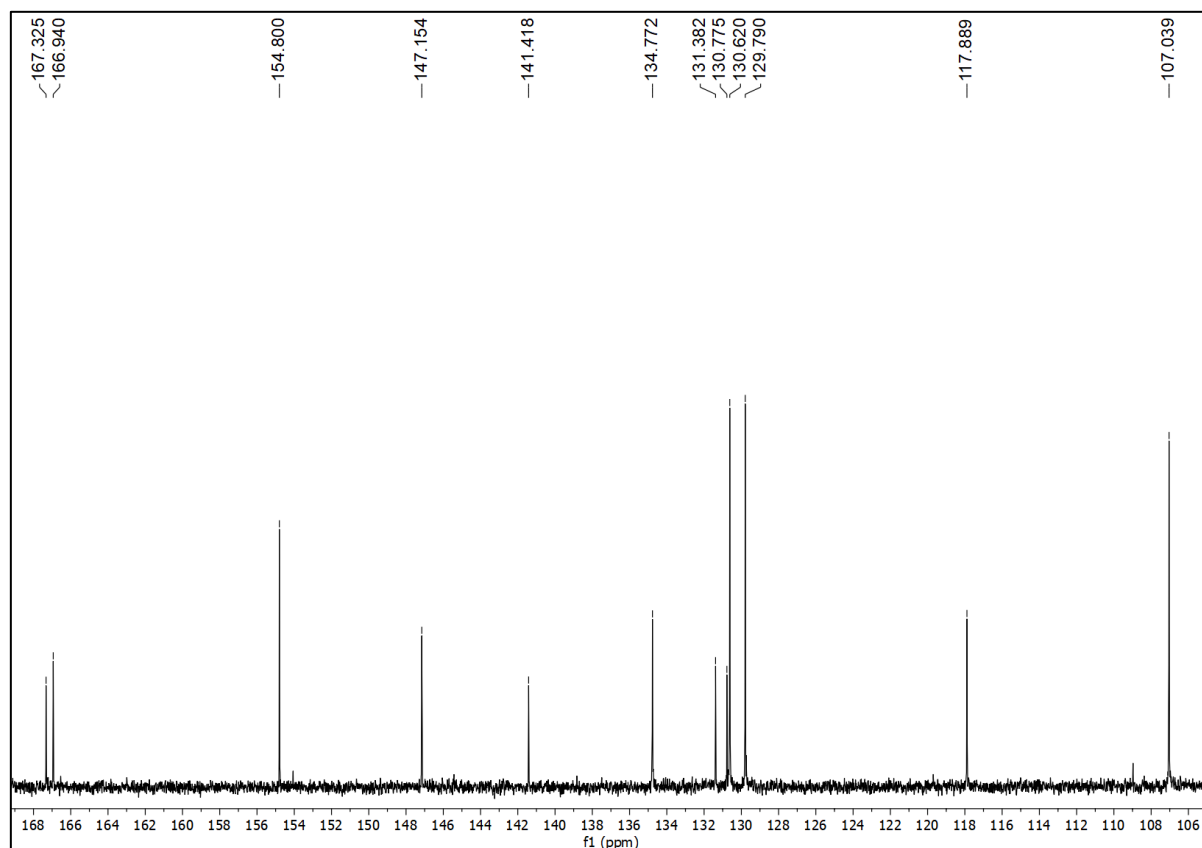


Figura 137 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Er-3.

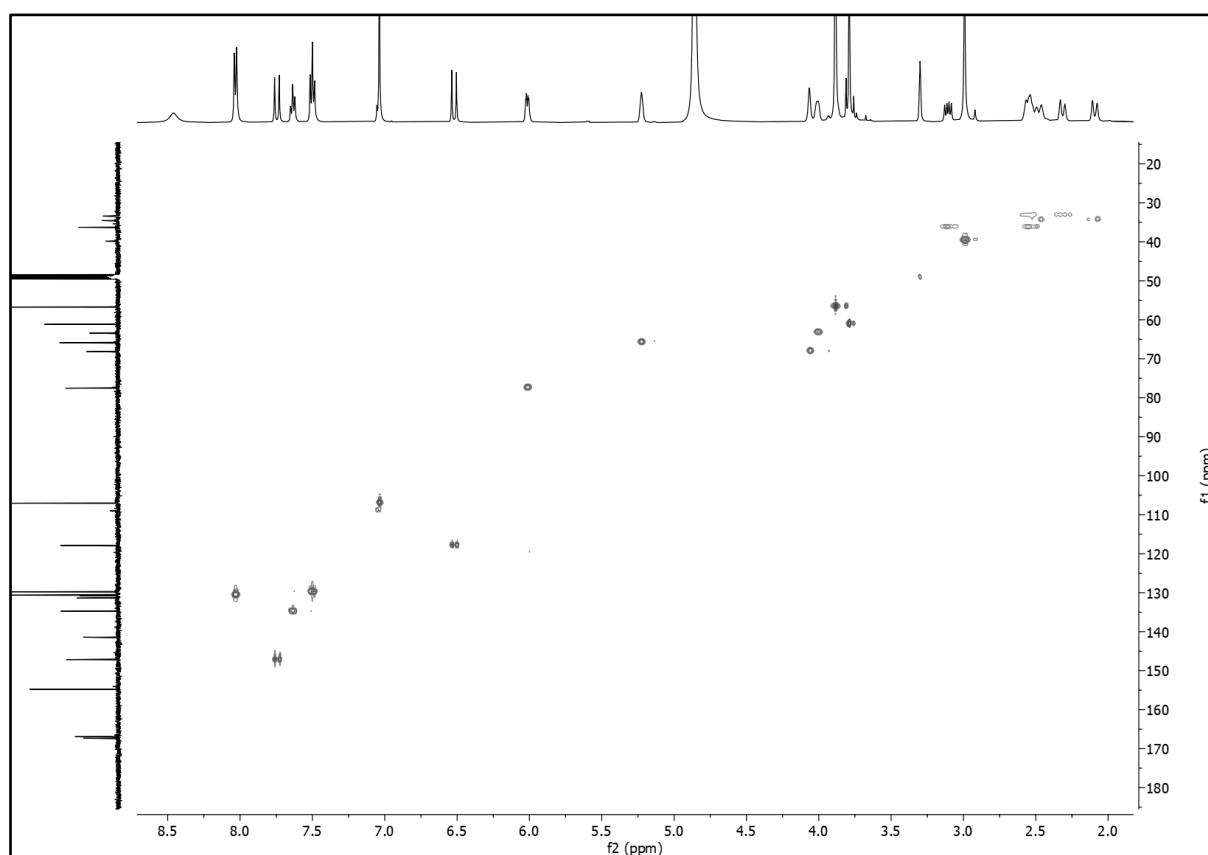


Figura 138 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-3 na região de (2,80 – 6,10 ppm) x (20,0 – 100,0 ppm).

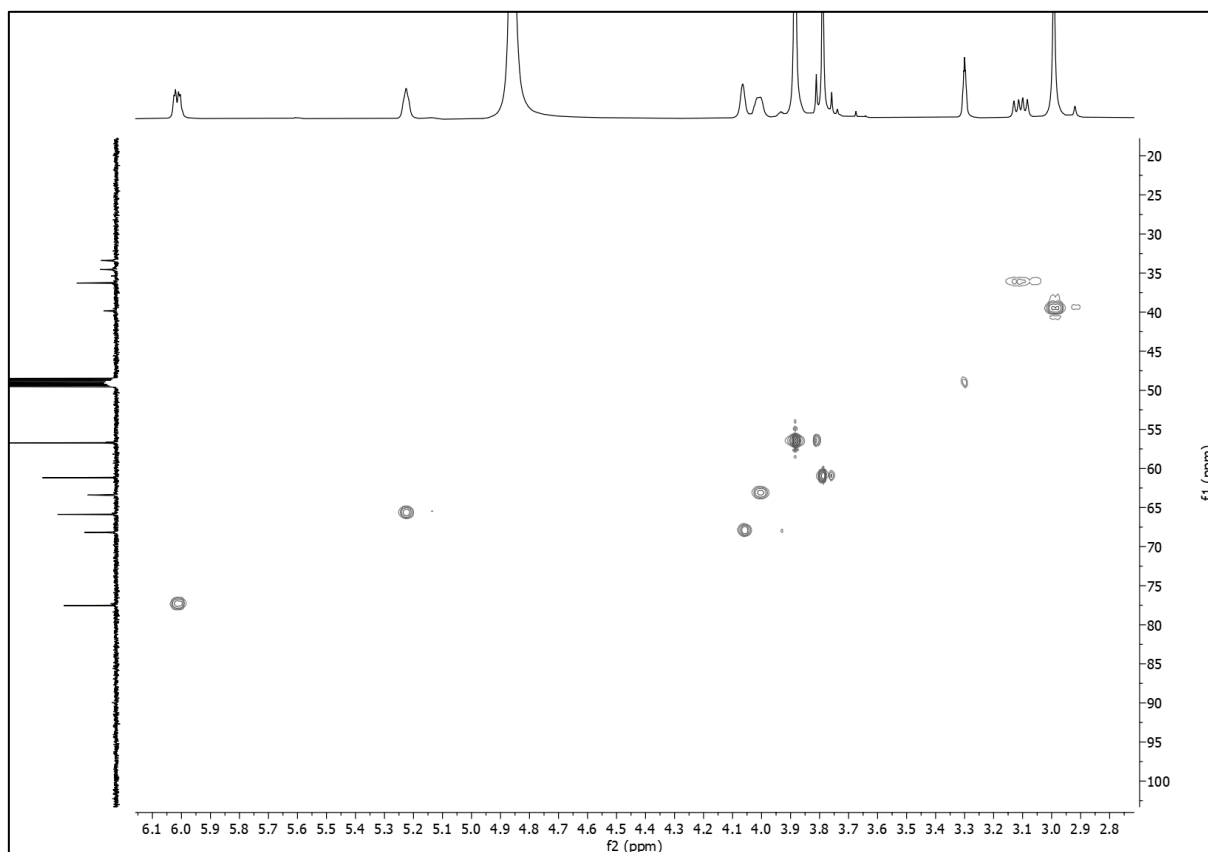


Figura 139 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-3 na região de (5,80 – 8,30 ppm) x (80,0 – 170,0 ppm).

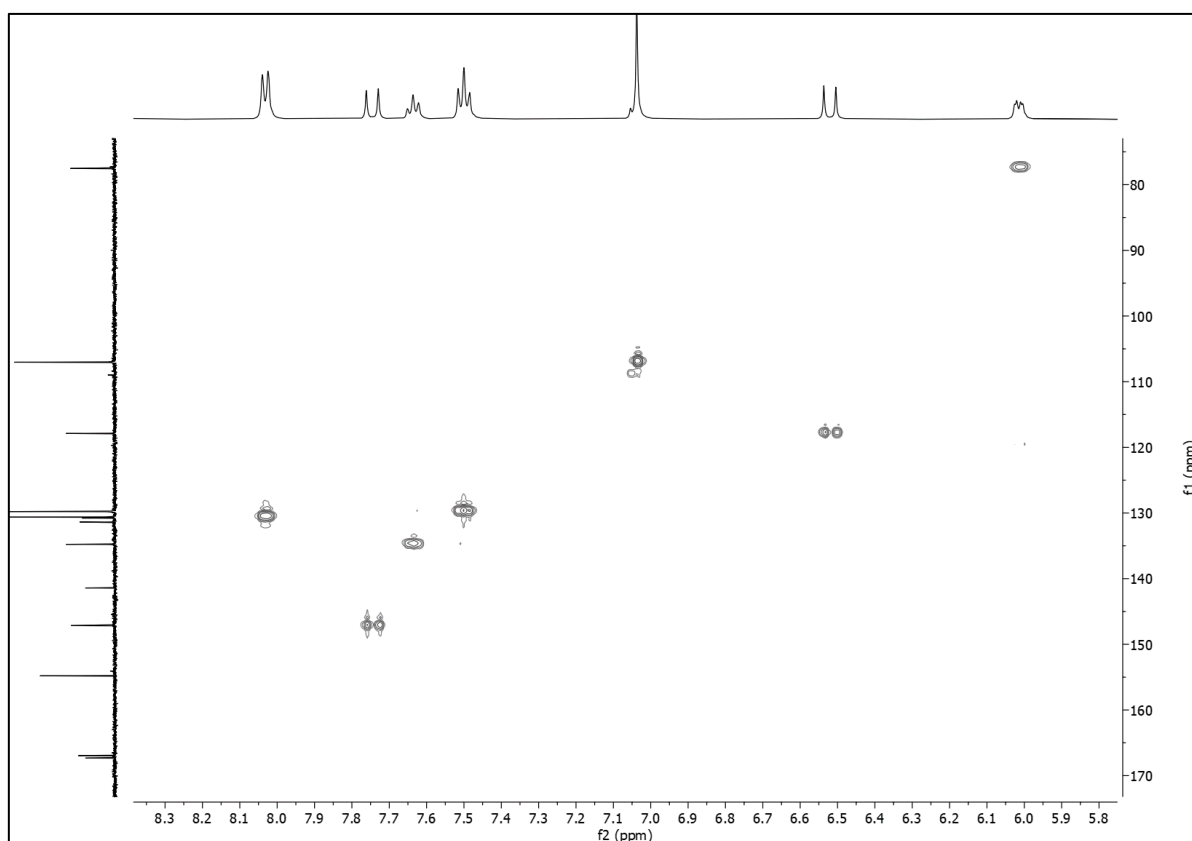


Figura 140 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-3.

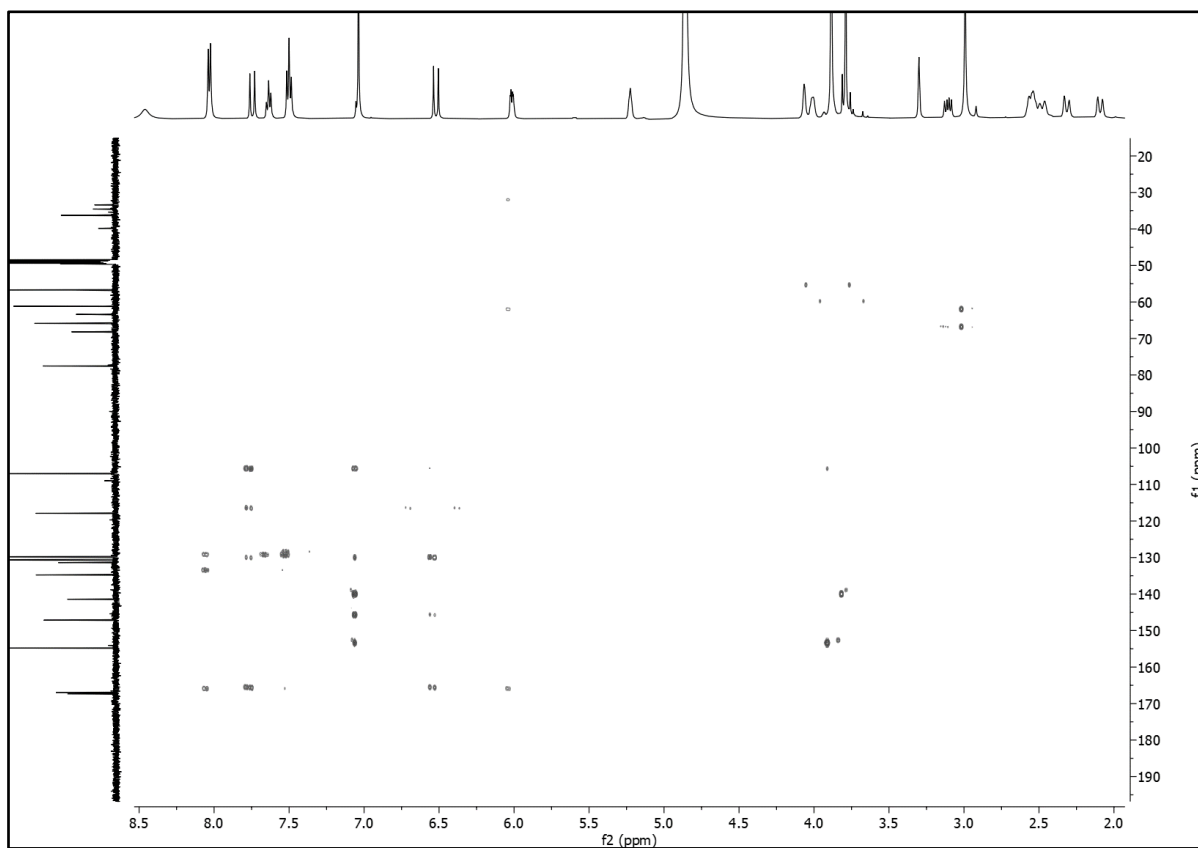


Figura 141 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-3 na região de (2,80 – 6,20 ppm) x (30,0 – 120,0 ppm).

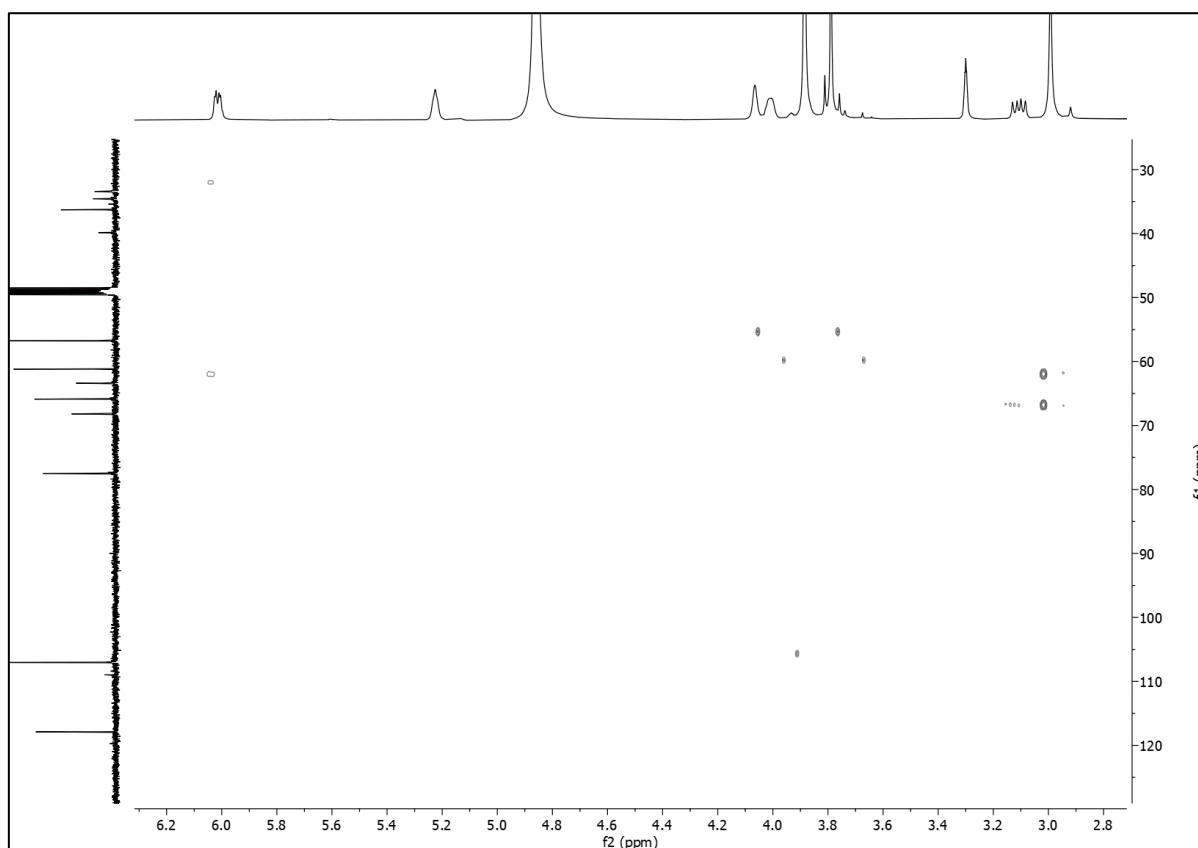


Figura 142 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD₃OD) de Er-3 na região de (5,80 – 8,30 ppm) x (80,0 – 170,0 ppm).

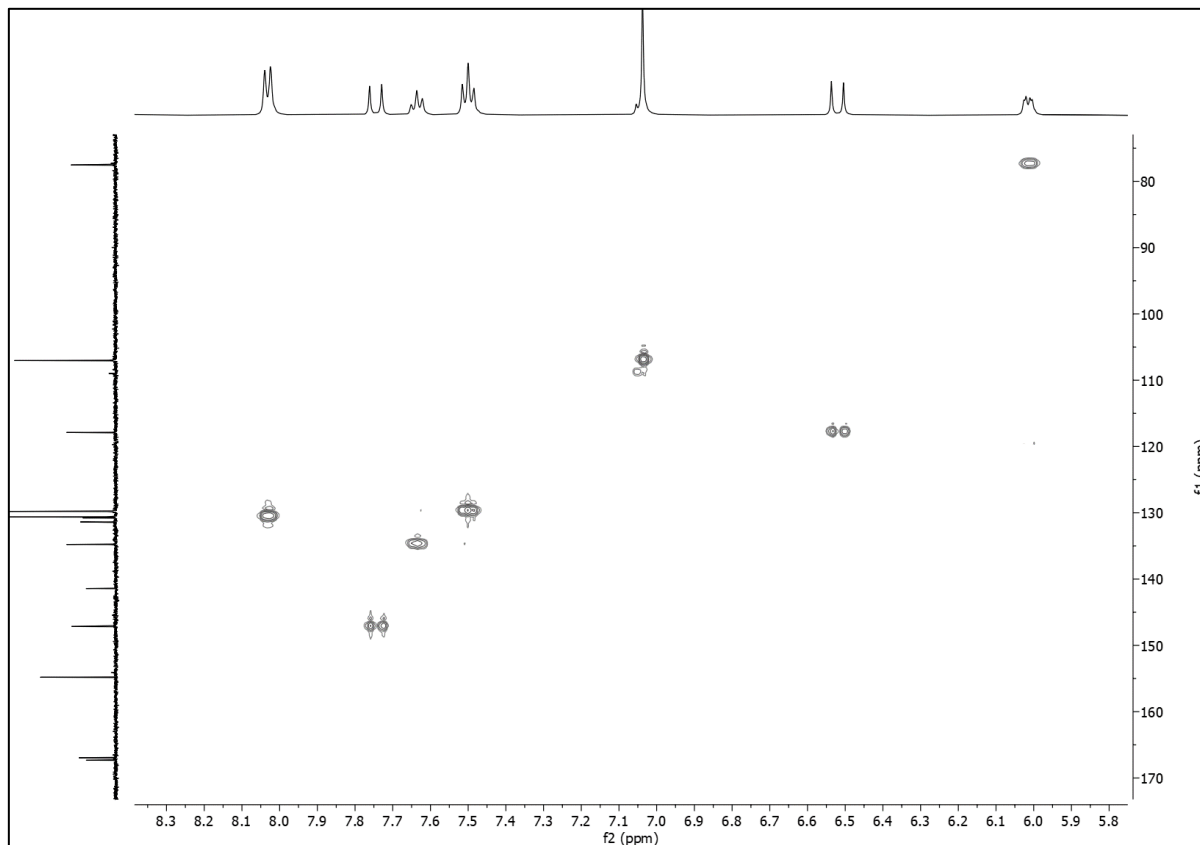
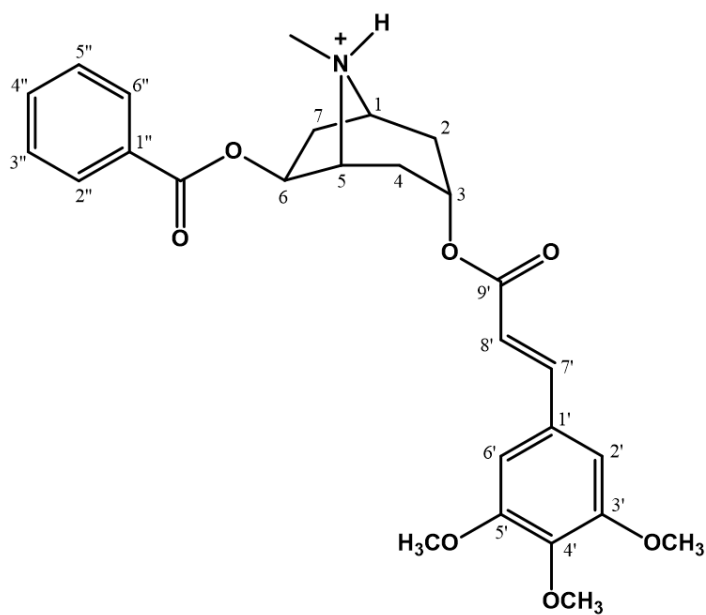


Figura 143 - Estrutura da 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxicinaamoiloxi)tropane protonado.



6. CONCLUSÃO

A desreplicação realizada por CLAE-ESI-MSⁿ permitiu traçar o perfil químico dos compostos presentes nas fases analisadas das partes aéreas de *E. simonis*, *E. pauferrense*, *E. pulchrum* e *E. revolutum*. Foram anotados 55 compostos nas fases acetato de etila e *n*-butanólica, sendo a maioria flavonoides derivados dos núcleos quercetina, metilquercetina, dimetilquercetina e canferol, ácidos fenólicos derivados do ácido clorogênico e uma série de flavolignanas do tipo cinchonaína. Nas fases clorofórmicas foram anotados 29 compostos, se destacando os alcaloides tropânicos com o núcleo central monossustituído na posição C-3, dissustituído nas posições C-3 e C-6, trissustituído nas posições C-3, C-6 e C-7, além de alcaloides tropânicos com o grupo epóxi no anel tropano e um do tipo nortropano.

O estudo proporcionou ainda o isolamento, a partir da fase acetato de etila de *E. simonis*, dos compostos cinchonaínas Ia e Ib, epicatequina, quercetina-O-hexosídeo, e do bifenil-3,3',4,4'-tetraol, este, descrito pela primeira vez na família Erythroxylaceae. Da fase clorofórmica de *E. revolutum* foi realizado o isolamento dos alcaloides 6-(benzoiloxi)-3-(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoiloxi)tropano, 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimetoxibenzoilox)tropano e 6-(benzoiloxi)-3-(3,4,5-trimethoxycinamoiloxi)tropano, relatados pela primeira vez na espécie *E. revolutum*.

Os resultados obtidos ressaltaram a importância do processo de desreplicação por CLAE-ESI-MSⁿ na pesquisa de metabólitos secundários, demonstrando ser uma ferramenta útil para uma anotação segura de compostos em matrizes vegetais, uma vez que foi possível identificar diversos metabólitos sem procedimentos clássicos e extensos, como o isolamento, além de empregar pequenas quantidades de solventes orgânicos quando comparado a estas metodologias.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, M. S. Flavonoid glycosides from *Erythroxylum pulchrum* a. st.-hil. (Erythroxylaceae). **Química Nova**, v. 37, n.4, p. 663-666, 2014.
- AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 851-853, 1986.
- AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum hypericifolium* stem bark. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 671-673, 1989.
- ATAY, I.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; GÖREN, A. C.; YEŞİLADA, E. Secondary metabolites from *Sambucus ebulus*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 34-41, 2015.
- BALKRISHNA, A.; THAKUR, P.; VARSHNEY, A. Phytochemical profile, pharmacological attributes and medicinal properties of *Convolvulus prostratus* – A cognitive enhancer herb for the management of neurodegenerative etiologies. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 171, 2020.
- BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. **Rev Bras Farm**, v. 13, p. 47-49, 2003.
- BARBOSA, M. F.; MIRANDA, P. H.; SOUZA, C. A.; RAMOS, C. S.; MELO, A. L.; ROCHA, J. E. et al. Effect of hybrid combinations of *Erythroxylum revolutum* Mart. leaf ethanolic extract or alkaloid-enriched fraction with antibiotic drugs against multidrug-resistant bacteria strains. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100105, 2021.
- BARROS, L.; DUEÑAS, M.; FERREIRA, I. C.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C. Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 169-173, 2011.
- BASTOS, D. H.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A.; CUNHA, I. B.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, 2007.
- BELTRAME, F. L.; RODRIGUES FILHO, E.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A.; CASS, Q. B. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1-2, p. 257-263, 2006.
- 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.
- BITTNER, K.; RZEPPA, S.; HUMPF, H. U. Distribution and quantification of flavan-3-ols and procyanidins with low degree of polymerization in nuts, cereals, and legumes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 38, p. 9148-9154, 2013.

BITZER, J., KÖPCKE, B., STADLER, M., HELLWIG, V., JU, Y. M., SEIP, S., & HENKEL, T. Accelerated dereplication of natural products, supported by reference libraries. **Chimia International Journal for Chemistry**, v. 61, n. 6), p. 332-338, 2007.

BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H.; KOLODZIEJ, H. (+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. **Phytochemistry**, v.25, n 5, p. 1205-1207, 1986.

BOROS, B.; FARKAS, A.; JAKABOVÁ, S.; BACSKAY, I.; KILÁR, F.; FELINGER, A. LC-MS quantitative determination of atropine and scopolamine in the floral nectar of *Datura* species. **Chromatographia**, v. 71, n. 1, p. 43-49, 2010.

BOUKHRIS, M. A.; DESTANDAU, É.; EL HAKMAOUI, A.; EL RHAFARI, L.; ELFAKIR, C. A dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu). **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 9, p. 1124-1132, 2016.

BRACHET, A.; MUÑOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J. L.; CHRISTEN, P. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1439-1442, 1997.

BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by CFP von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, 2013.

BRITO, A.; RAMIREZ, J. E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. J. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400-17421, 2014.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRÄGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 66, n. 11, p. 1231-1240, 2005.

CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI (–)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 2, p. 109-115, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total 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, n. 8, p. 2442-2451, 2011.

CHAVES, C. G.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ZUANAZZI, J. A.; DIEHL, E.; DE SIQUEIRA, N. C. S.; HENRIQUES, A. T. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. **J Ethnopharmacol**, v. 22, n. 1, p. 117-120, 1988.

CHÁVEZ, D.; CUI, B.; CHAI, H. B. et al. Reversal of Multidrug Resistance by Tropane Alkaloids from the Stems of *Erythroxylum rotundifolium*. **Journal of natural products**. v. 65, n. 4, p. 606-610, 2002.

CHEN, H.; CHEN, Y.; WANG, H.; DU, P.; HAN, F.; ZHANG, H. Analysis of scopolamine and its eighteen metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 67, n. 5, p. 984-991, 2005.

CHEN, H.; WANG, H.; CHEN, Y.; ZHANG, H. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of anisodamine and its phase I and II metabolites in rat urine. **Journal of chromatography B**, v. 824, n. 1-2, p. 21-29, 2005.

CHRISTEN, P.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; EVANS, W. C. Alkaloids of *Erythroxylum zambesiacum* stem-bark. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1147-1151, 1993.

CHRISTEN, P.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; EVANS, W. C. Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* root-bark. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1053-1056, 1995.

CINELLI, M. A.; JONES, A. D. Alkaloids of the Genus *Datura*: Review of a Rich Resource for Natural Product Discovery. **Molecules**. 2021, v. 26, n. 9, p. 2629, 2021.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Erythroxylaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 881-903, 2018.

COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J. G. Erythroxylaceae of Rio Grande do Norte, Brazil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 659-671, 2014.

CRUZ, R. A. S.; ALMEIDA, H.; FERNANDES, C. P.; JOSEPH-NATHAN, P.; ROCHA, L.; LEITÃO, G. G. A new tropane alkaloid from the leaves of *Erythroxylum subsessile* isolated by pH-zone-refining counter-current chromatography. **Journal of separation Science**, v. 39, n. 7, p. 1273-1277, 2016.

CUNHA, H. N. **COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Erythroxylum pauferrense* Plowman: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS** Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

DA COSTA, M. F.; GALAVERNA, R. S.; PUDENZI, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; DOS SANTOS, C. Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical methods**, v. 8, n. 31, p. 6056-6063, 2016.

DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. Flowering plants of the neotropics. Princeton University Press, 2004.

DANTAS, C. A. G. **Estudo fitoquímico e investigação da atividade imunomoduladora de metabólitos secundários de *Erythroxylum simonis***

Plowman (Erythroxylaceae). Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Unifersidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

DANTAS, C. A. G.; ABREU, L. S.; CUNHA, H. N. et al. Dereplication of phenolic derivatives of three *Erythroxylum* species using liquid chromatography coupled with ESI-MSⁿ and HRESIMS. **Phytochemical analysis**, v. 32, n. 6, p. 1011-1026, 2021.

DE TOMMASI, N.; PIZZA, C.; AQUINO, R.; CUMANDÀ, J.; MAHMOOD, N. Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens leucantha*. **J Nat Prod**, v. 60, n. 3, p. 270-273, 1997.

DEL BUBBA, M.; CHECCHINI, L.; CHIUMINATTO, U.; DOUMETT, S.; FIBBI, D.; GIORDANI, E. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of *Fragaria vesca* L. berries and their comparative evaluation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1207-1220, 2012.

DRÄGER, B. Analysis of tropane and related alkaloids. **Journal of chromatography A**, v. 978, n. 1-2, p. 1-35, 2002.

DU, N.; ZHOU, W.; JIN, H.; LIU, Y.; ZHOU, H.; LIANG, X. Characterization of tropane and cinnamamide alkaloids from *Scopolia tangutica* by high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of separation Science**, v. 42, n. 6, p. 1163-1173, 2019.

EKLUND, P. C.; BACKMAN, M. J.; KRONBERG, L. Å.; SMEDS, A. I.; SJÖHOLM, R. E. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 97-107, 2008.

EL-ASKARY, H.; HANDOUSSA, H.; BADRIA, F.; EL-KHATIB, A. H.; ALSAYARI, A.; LINSCHIED, M. W.; MOTAAL, A. A. Characterization of hepatoprotective metabolites from *Artemisia annua* and *Cleome droserifolia* using HPLC/PDA/ESI/MS–MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 2, p. 213-220, 2019.

EL-IMAM, Y. M.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2181-2184, 1988.

EVANS, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylon*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 3, n. 2-3, p. 265-277, 1981.

Fasciotti, M.; Alberici, R. M.; Cabral, E. C.; Cunha, V. S.; Silva, P. R.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Wood chemotaxonomy via ESI-MS profiles of phytochemical markers: the challenging case of African versus Brazilian mahogany woods. **Analytical Methods**, v. 7, n. 20, p. 8576-8583, 2015.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA J. W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FIGUEROA, J. G.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive characterization of phenolic and other polar

compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 105, p. 752-763, 2018.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camucamu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chem**, v. 139, n. 1–4, p. 578-588, 2013.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; DE FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. (2018). Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Phytochemical analysis**, v. 29, n. 2, p. 196-204, 2018.

GALAVARNA, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; BARATA, L. E. S.; EBERLIN, M. N.; FIDELIS, C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting. **Analytical methods**, v. 7, n. 5, p. 1984-1990, 2015.

GAPPAROV, A. M.; OKHUNOV, I. I.; ARIPOVA, S. F.; NABIEV, A.; KHUZHAEV, V. U. Derivatives of the alkaloid convolvine and their pharmacological activity. **Chemistry of natural compounds**, v. 47, n. 4, p. 608-611, 2011.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; ZANELLA, D. D. F.; HAMERSKI, L.; FERREIRA, A. G.; BARISON, A.; ABOT, A. R. Two unusual epicatechin and epiafzelechin derivatives from *Mascagnia pubiflora*, a plant toxic to cattle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 674-679, 2009.

GHAREEB, M.; SAAD, A.; AHMED, W.; REFAHY, L.; NASR, S. HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of bioactive secondary metabolites from *Strelitzia nicolai* leaf extracts and their antioxidant and anticancer activities in vitro. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 4, p. 368, 2018.

GÓMEZ-CANELA C, EDO S, RODRÍGUEZ N, GOTOR G, LACORTE S. Comprehensive Characterization of 76 Pharmaceuticals and Metabolites in Wastewater by LC-MS/MS. **Chemosensors**, v. 9, n. 10, p. 273, 2021.

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.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; DA SILVA, B. A.; MAIA, J. G. S.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7688-7699, 2011.

GRAF, E.; LUDE, W. Alkaloide aus *Erythroxylum vacciniifolium* Martius, 1. Mitt. Isolierung von Catuabin A, B und C. **Archiv der pharmazie**, v. 310, n. 12, p. 1005-1010, 1977.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization

mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55-95, 2017.

JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MS n of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471-5484, 2010.

JOUANEH, T. M. M.; ROSARIO, M. E.; LI, Y.; LEIBOVITZ, E.; BERTIN, M. J. Incorporating LC-MS/MS Analysis and the Dereplication of Natural Product Samples into an Upper-Division Undergraduate Laboratory Course. **Journal of chemical education**, v. 99, n. 7, p. 2636-2642, 2022.

JOUSSE, C.; VU, T. D.; TRAN, T. L. M. Tropane Alkaloid Profiling of Hydroponic *Datura innoxia* Mill. Plants Inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. **Phytochemical analysis**, v. 21, n. 1, p. 118-127, 2010.

LAVOIE, S.; SWEENEY-JONES, A. M.; MOJIB, N.; DALE, B.; GAGARING, K.; MCNAMARA, C. W.; QUAVE, C. L.; SOAP, K.; KUBANEK, J. Antibacterial oligomeric polyphenols from the green alga *Cladophora socialis*. **The Journal of organic chemistry**, v. 84, n. 9, p. 5035-5045, 2019.

LEI, Z.; KRANAWETTER, C.; SUMNER, B. W.; HUHMAN, D.; WHERRITT, D. J.; THOMAS, A. L.; ROHLA, C.; SUMNER, L. W. Metabolomics of Two Pecan Varieties Provides Insights into Scab Resistance. **Metabolites**, v. 8, n. 4, p. 56, 2018.

LI, A.; HOU, X.; WEI, Y. Fast screening of flavonoids from switchgrass and *Mikania micrantha* by liquid chromatography hybrid-ion trap time-of-flight mass spectrometry. **Analytical methods**, v. 10, n. 1, p. 109-122, 2018.

LI, C.; HUANG, C.; LU, T.; WU, L.; DENG, S.; YANG, R.; LI, J. Tandem mass spectrometric fragmentation behavior of lignans, flavonoids and triterpenoids in *Streblus asper*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 21, p. 2363-2370, 2014.

LIANG, Y. F.; LI, X.; WANG, X.; ZOU, M.; TANG, C.; LIANG, Y.; SONG, S.; JIAO, N. Conversion of simple cyclohexanones into catechols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 37, p. 12271-12277, 2016.

LIN, L. Z.; SUN, J.; CHEN, P.; MONAGAS, M. J.; HARNLY, J. M. UHPLC-PDA-ESI/HRMS n profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9387-9400, 2014.

LIU, C.; HUA, Z.; MENG, X. Applicability of ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry for cocaine profiling. **Drug testing and analysis**, v. 9, n. 8, p. 1152-1161, 2017.

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.

LV, Q.; LUO, F.; ZHAO, X.; LIU, Y.; HU, G.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. **PloS one**, v. 10, n. 3, 2015.

LV, Y.; TIAN, T.; WANG, Y. J.; HUANG, J. P.; HUANG, S. X. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Erythroxylum*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 12, n. 1, p. 15, 2022.

MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2-3, p. 157-167, 2004.

MENDONÇA, J. D. O.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. O gênero *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 3, 0-0, 1998.

MOHIMANI, H.; GUREVICH, A.; SHLEMOV, A. et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

MOREIRA, L. G. L.; FERREIRA, M. E. L.; REGINALDO, F. P. S. et al. *Erythroxylum pungens* Tropane Alkaloids: GC-MS Analysis and the Bioactive Potential of 3-(2-methylbutyryloxy) tropan-6, 7-diol in Zebrafish (*Danio rerio*). **Planta medica**, v. 87, n. 01/02, p. 177-186, 2021.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NAJMI, A. A.; XIAO, Z.; BISCHOFF, R.; DEKKER, F. J.; PERMENTIER, H. P. Electrochemical *N*-demethylation of tropane alkaloids. **Green chemistry**, v. 19, p. 6455-6463, 2020.

NEGRI, G.; DE SOUSA ALMONDES, J. G.; GALVÃO, S. M. P.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DA SILVA CAVALCANTI, P. M. Avaliação da composição química e efeitos toxicológicos de extratos etanólicos de casca e folhas de *Erythroxylum vacciniifolium* em modelos in vivo. **Revista Ciência e Saúde On-line**, v. 1, n. 1, p. 17-31, 2016.

NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. VII. Phenylpropanoid-substituted epicatechins, cinchonains from *Cinchona succirubra*.(1). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 4268-4276, 1982.

OLIVEIRA, S. L. **Alcalóides Tropânicos de *Erythroxylum caatingae* Plowman (Erythroxylaceae)**. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

OLIVEIRA, S. L. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e**

diterpenos. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; SENA-FILHO, J. G.; MENDES-JÚNIOR, L. G. et al. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 436-442, 2012.

OLIVEIRA, S. L.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. et al. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 2, p. 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; BRANCO, M. V. C. et al. Tropane alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 155-165, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, G. M.; MOREIRA, L. G. L.; NETO, T. D. S.N.; DE ALMEIDA, W. A. M. et al. Isolation, spectral characterization, molecular docking, and cytotoxic activity of alkaloids from *Erythroxylum pungens* OE Shulz. **Phytochemistry**, v. 155, p. 12-18, 2018.

PLOWMAN, T. Four new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from northeastern Brazil. **Brittonia**, v. 38, n. 3, p. 189-200, 1986.

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

POUPARD, P.; SANONER, P.; BARON, A.; RENARD, C. M.; 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, n. 11, p. 1186-1197, 2011.

POUPKO, J. M.; BASKIN, S. I.; MOORE, E. The pharmacological properties of anisodamine. **Journal of Applied Toxicology: An international jornal**, v. 27, n. 2, p. 116-121, 2007.

QUEIROZ, E. F.; ZANOLARI, B.; MARSTON, A. et al. Two new tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae). **Nat Prod Commun**, v. 4, n. 10, p. 1337-1340, 2009.

REINA, M.; BURGUEÑO-TAPIA, E.; BUCIO, M. A.; JOSEPH-NATHAN, P. Absolute configuration of tropane alkaloids from *Schizanthus* species by vibrational circular dichroism. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 810-815, 2010.

RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.

RESTREPO, D. A.; SAENZ, E.; JARA-MUÑOZ, O. A. et al. *Erythroxylum* in focus: an interdisciplinary review of an overlooked genus. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3788, 2019.

Rubio, N. C.; Bermejo-Barrera, P.; Bermejo, A. M.; Moreda-Piñeiro, A. Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC–MS–MS. **Journal of analytical toxicology**, v. 43, n. 3, p. 196-202, 2019.

RUE, E. A.; RUSH, M. D.; VAN BREEMEN, R. B. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2018.

SAID, R.; HAMED, A. I.; MAHALEL, U. A.; AL-AYED, A. S.; KOWALCZYK, M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 512, 2017.

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, 2005.

SATOH, M.; SATOH, Y.; FUJIMOTO, Y. Cytotoxic constituents from *Erythroxylum catuaba* isolation and cytotoxic activities of cinchonain. **Nat Med**, v. 54, n. 2, p. 97-100. 12, 2000.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; GONZÁLEZ, B. Phenolic profiling of the south American “baylahuen” tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 913-928, 2015.

SENA-FILHO, J. G.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. et al. Cytotoxic evaluation of pungencine: a new tropane alkaloid from the Roots of *Erythroxylum pungens* OE Schulz. **Helvetica chimica acta**, v. 93, n. 9, p.1742-1744, 2010.

SENDKER, J.; PETEREIT, F.; LAUTENSCHLÄGER, M.; HELLENBRAND, N.; HENSEL, A. Phenylpropanoid-substituted procyanidins and tentatively identified procyanidin glycosides from hawthorn (*Crataegus* spp.). **Planta medica**, v. 79, n. 1, p. 45-51, 2013.

SIDDIQUI, N. A.; AHMAD, N.; MUSTHAQ, N.; CHATTOPADHYAYA, I.; KUMRIA, R.; GUPTA, S. Neuropharmacological profile of extracts of aerial parts of *Convolvulus pluricaulis* Choisy in mice model. **The open neurology journal**, v. 8, p. 11-14, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. LTC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUSA, R. M. F. **Estudo químico de *Eugenia calycina* Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 12, p. 2010-2013, 2007.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química nova**, v. 29, n. 5, p. 965-971, 2006.

TORRE, J. C. P.; SCHMIDT, G. W.; PAETZ, C.; REICHELT, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J. C. The biosynthesis of hydroxycinnamoyl quinate esters and their role in the storage of cocaine in *Erythroxylum coca*. **Phytochemistry**, v. 91, p. 177-186, 2013.

TRAPP, M. A. **Estratégias de desreplicação aplicadas ao estudo da planta *Alternanthera brasiliana* e dos fungos endofíticos associados**. Dissertação (mestrado em química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

UPADHYAY, R.; MOHAN RAO, L. J. An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 9, p. 968-984, 2013.

WANG, S.; LIU, L.; WANG, L.; HU, Y.; ZHANG, W.; LIU, R. Structural characterization and identification of major constituents in Jitai tablets by high-performance liquid chromatography/diode-array detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10470-10493, 2012.

WANG, Y.; BERHOW, M. A.; BLACK, M.; JEFFERY, E. H. A comparison of the absorption and metabolism of the major quercetin in brassica, quercetin-3-O-sophoroside, to that of quercetin aglycone, in rats. **Food chemistry**, v. 311, p. 125880, 2020.

WILLEMS, J. L.; KHAMIS, M. M.; SAEID, W. M.; PURVES, R. W.; KATSELIS, G.; LOW, N. H.; EL-ANEED, A. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 933, p. 164-174, 2016.

WU, J.; FANG, X. A.; YUAN, Y.; DONG, Y.; LIANG, Y.; XIE, Q.; BAN, J.; CHEN, Y.; LV, Z. UPLC/Q-TOF-MS profiling of phenolics from *Canarium pimela* leaves and its vasorelaxant and antioxidant activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 6, p. 716-723, 2017.

WUST, K. M.; CORNELIUS, M. T. F.; SCHIRMANN, J.; BRAUN, G.; SARRAGIOTTO, M. H.; CONCEIÇÃO DE FÁTIMA, A. O. Investigação Fitoquímica, Atividade Antioxidante, Antifúngica e Antibacteriana da Parte Aérea da Macrófita *Paspalum Repens* PJ Bergius. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1392-1403, 2016.

XU, S.; SHANG, M. Y.; LIU, G. X.; XU, F.; WANG, X.; SHOU, C. C.; CAI, S. Q. Chemical constituents from the rhizomes of *Smilax glabra* and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5265-5287, 2013.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of natural products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

YUZUAK, S.; BALLINGTON, J.; XIE, D. Y. HPLC-qTOF-MS/MS-Based Profiling of Flavan-3-ols and Dimeric Proanthocyanidins in Berries of Two Muscadine Grape Hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66. **Metabolites**, v. 8, n. 4, p. 57, 2018.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. Q.; HOSTETTMANN, K. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of natural products**, v. 66, n. 4, p. 497-502, 2003.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. Q.; HOSTETTMANN, K. Methylpyrrole Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 8, p. 1153-1158, 2005.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J. L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. D. 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**, v. 1020, n. 1, p. 75-89, 2003.

ZHANG, L.; TU, Z. C.; XIE, X.; LU, Y.; WANG, Z. X.; WANG, H.; SHA, X. M. Antihyperglycemic, antioxidant activities of two *Acer palmatum* cultivars, and identification of phenolics profile by UPLC-QTOF-MS/MS: New natural sources of functional constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 522-532, 2016.

ZHANG, Y.; XIONG, H.; XU, X.; XUE, X.; LIU, M.; XU, S.; LIU, H.; GAO, Y.; ZHANG, H.; LI, X. Compounds identification in semen cuscuteae by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCs) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1199, 2018.

ZHOU, M.; MA, X.; SUN, J. et al. Active fragments-guided drug discovery and design of selective tropane alkaloids using ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with virtual calculation and biological evaluation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, n. 4, p. 1145-1157, 2017.

ZHOU, S.; HUANG, G.; CHEN, G. Synthesis and biological activities of local anesthetics. **RSC advances**, v. 9, n. 70, p. 41173-41191, 2019.

Anexos

Anexo 1: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Phytochemical Analysis*, em 2021.

Received: 30 July 2020 | Revised: 21 January 2021 | Accepted: 22 February 2021

DOI: 10.1002/pca.3043

RESEARCH ARTICLE

Phytochemical
Analysis WILEY

Dereplication of phenolic derivatives of three *Erythroxylum* species using liquid chromatography coupled with ESI-MSⁿ and HRESIMS

César Augusto Gonçalves Dantas | Lucas Silva Abreu |
Hidna Nascimento da Cunha | Carlos Arthur Gouveia Veloso |
Augusto Lopes Souto | Maria de Fátima Agra | Vicente Carlos de Oliveira Costa |
Marcelo Sobral da Silva | Josean Fachine Tavares

Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade
Federal da Paraíba, João Pessoa, PB,
58051-900, Brazil

Correspondence

Josean Fachine Tavares, Multi-User
Characterization and Analysis Laboratory,
Federal University of Paraíba, João Pessoa,
Brazil, 58051-900.
Email: josean@lta.ufpb.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico, Grant/Award
Number: INCT-RENNOFITO 465536/2014-0;
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior, Grant/Award Number: 001

Abstract

Introduction: Given the diversity of secondary metabolites produced by species of the genus *Erythroxylum*, in addition to the many methods that have already been described in the literature, modern screening and identification methodologies, such as dereplication, represent an efficient and quick strategy compared to the classic techniques linked to natural product research.

Objective: The objective of the present study was to determine the phenolic profiles obtained from three species of *Erythroxylum* (*Erythroxylum pauferrense* Plowman, *Erythroxylum pulchrum* A.St.-Hil. and *Erythroxylum simonis* Plowman) by dereplication using liquid chromatography coupled with ESI-MSⁿ and HRESIMS.

Material and Methods: Ethyl acetate and *n*-butanolic fractions from crude ethanolic extract of *Erythroxylum* species were analyzed by HPLC-ESI-MSⁿ and HPLC-HRESIMS, in order to identify its corresponding compounds. Experiments were performed in negative ionization mode, and the metabolites were provisionally identified based on deprotonated molecules, molecular formulas, fragmentation patterns and literature data. The corresponding isolated compounds were characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

Results: According to the dereplication method, it was possible to establish and compare the phenolic profile of the corresponding species by the assignment of 55 compounds, most of which were first described in these species and among which some were also new to the *Erythroxylum* genus. Additionally, nine compounds were isolated, including biphenyl-3,3',4,4'-tetraol, where the mass spectral data were not sufficient for their identification, and reported for the first time in the Erythroxylaceae family.

Conclusion: This research contributes to the phytochemical knowledge of the *Erythroxylum* genus and demonstrates the importance of the dereplication method regarding the investigation of natural products, enabling accurate identification of the metabolites while avoiding the efforts and material expenses involved in the isolation of known compounds.