UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização dos alcaloides de *Erythrina verna*

Luís Guilherme Pereira Feitosa

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização dos alcaloides de *Erythrina verna*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Luís Guilherme Pereira Feitosa

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 27/03/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Feitosa, Luís Guilherme Pereira

Caracterização dos alcaloides de *Erythrina verna*, Ribeirão Preto, 2014.
124p. : il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Alcalóides eritrínicos. 2. *Erythrina verna*. 3. Mulungu 4. Marcadores químicos. 5. Espectrometria de massas. 6. RMN.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Luís Guilherme Pereira Feitosa

Título do trabalho: Caracterização dos alcaloides de *Erythrina verna*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, Eurico e Telma, minha avó Nydia e a minha irmã Ana
Luísa pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.*

Agradecimentos

A Deus

Pela minha vida, pela saúde e capacidade para desenvolver esse trabalho e por permitir que pessoas maravilhosas estivessem em meu caminho para me apoiar em todas as situações.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Pela orientação, apoio, amizade e dedicação, tornando possível o desenvolvimento desse trabalho, assim como pelos ensinamentos tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

A Denise Brentan da Silva

Pelos ensinamentos, idéias e apoio durante o planejamento e execução deste trabalho.

A Aline Cavalli Bizaro e Elídia Fernandes Nogueira

Pelo auxílio na execução dos experimentos deste trabalho.

Aos técnicos e amigos Izabel Cristina Casanova Turatti e José Carlos Thomaz

Pelo apoio durante a execução das técnicas de espectrometria de massas. Obrigado pela dedicação.

Aos amigos do laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Pela ótima convivência, apoio durante as atividades desse trabalho e discussões científicas durante o horário do café.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Pela excelente formação profissional e pessoal que me proporcionou, permitindo o acesso à informação e pesquisa através de excelentes profissionais e amigos.

Aos pesquisadores e gestores da Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produtos Naturais

Pela ótima convivência, constante aprendizado e crescimento profissional.

Aos amigos da graduação na 4ª turma do curso noturno de Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Pela amizade e momentos inesquecíveis.

A Amanda Cristina Trabuco

Pelo amor, carinho e dedicação tanto nos melhores como nos mais difíceis momentos nesses últimos três anos.

A todos que tornaram possível o desenvolvimento e conclusão do presente trabalho

"[...] Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante

Dê o melhor de você assim mesmo

Veja que, no final das contas, é entre você e Deus

Nunca foi entre você e as outras pessoas."

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

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

Erythrina verna, conhecida popularmente como mulungu, é uma espécie nativa da flora brasileira e de maior ocorrência no sudeste do país. As cascas de *E. verna* são utilizadas na medicina popular como calmante e para outras desordens do sistema nervoso central, como insônia e depressão. Também é importante matéria-prima na indústria farmacêutica para produção de fitoterápicos ansiolíticos com grande participação no mercado de medicamentos fitoterápicos. Os marcadores químicos do gênero *Erythrina* são os alcaloides eritrínicos, aos quais se atribui a atividade ansiolítica. No presente trabalho, extratos alcaloídicos das cascas da espécie nativa de *E. verna* e dos produtores comerciais A e B foram analisados por CG-EM e IES-EM em alta resolução para caracterização dos alcaloides eritrínicos presentes nas amostras. Verificou-se que o perfil de alcaloides encontrado nas cascas de B apresentou maior similaridade com o perfil de *E. verna* nativa. Observou-se também diferença de perfis alcaloídicos entre extratos de mulungu dos diferentes produtores comerciais, sendo que nas cascas de A os alcaloides majoritários são eritralina e erisovina, enquanto nas cascas de B o majoritário é a eritratidinona. Além disso, notou-se discrepância nos rendimentos em massa das frações alcaloídicas entre produtores comerciais e entre estes e a espécie nativa. Essa possível variação dos teores de alcaloides eritrínicos nos materiais vegetais analisados pode ser decorrente da influência de fatores ambientais ou sazonalidade sobre o conteúdo de metabólitos secundários, ou da comercialização de espécies distintas do gênero *Erythrina* como *E. verna*. Não houve diferença qualitativa no perfil de alcaloides obtidos por extração ácido-base e partição L/L, o que sugere que estes marcadores não são degradados no baixo pH empregado na extração ácido-base. Realizou-se também o isolamento dos alcaloides eritralina, 8-oxo-eritralina, eritrinina e erisovina a partir das cascas de A e eritratidinona a partir das cascas de B. Esses alcaloides foram identificados por associação de dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução e suas estruturas foram determinadas por RMN. Os dados obtidos neste trabalho constituem o primeiro relato de alcaloides eritrínicos presentes nas cascas de *E. verna* e pode ser um alerta aos usuários de preparações medicinais e fitoterápicos baseados em mulungu em relação a possíveis riscos quanto a ineficácia terapêutica e/ou toxicidade decorrentes de variações de perfil e teor dos marcadores químicos na espécie.

Palavras-chave: Alcaloides eritrínicos, mulungu, *Erythrina verna*, espectrometria de massas, marcadores químicos, RMN.

ABSTRACT

FEITOSA, L. G. P. **Characterization of alkaloides from *Erythrina verna***. 2014. 124p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Erythrina verna, popularly known as mulungu, is a native species from Brazil and occurs in brazilian southeast. The stem bark of *E. verna* are used in folk medicine to calm agitation and another disorders from nervous system, as insomnia and depression. It is also important raw material in pharmaceutical industry for the production of herbal anxiolytics with great interest in herbal medicines market. Chemical markers of the genus *Erythrina* are erythrinian alkaloids, which have demonstrated anxiolytic activity. In this work, we have analyzed alkaloid extracts from stem barks of *E. verna* native species and from commercial producers A and B by GC-MS and ESI-MS in high resolution to characterize erythrinian alkaloids. Alkaloid profile of barks extracts from B showed greater similarity with native *E. verna* profile. We also observed difference between alkaloid profiles of different extracts from commercial producers. Majority alkaloids found in A extract are erythraline and erysovine, while the major constituent of B extract is erythratidinone. Furthermore, it was noted discrepancy in yields between the alkaloid fractions from commercial producers and between commercial producers and native species. These possible changes in the levels of erythrinian alkaloids may be due to the influence of environmental factors or seasonality on the content of secondary metabolites, or also due to the marketing of distinct species from genus *Erythrina* as *E. verna*. It was also observed that there was no qualitative difference in the alkaloid profile between extracts obtained by acid-base extraction and liquid/liquid extraction, suggesting that these markers are not degraded in the low pH used in the acid-base extraction. We have also performed the isolation of erythraline, 8-oxo-erithraline, erythrinin and erysovine from A and erythratidinone from B. These alkaloids were identified by EI-MS data combined with ESI-MS in high resolution data. Alkaloid structures were determined by NMR. The data obtained in this study represent the first report of erythrinian alkaloids in *E. verna* barks and can alert users of mulungu based medicinal preparations about potential risks, therapeutic ineffectiveness and/or toxicity resulting from variations in profile and chemical markers contents in the species.

Keywords: Erythrinian alkaloids, mulungu, *Erythrina verna*, chemical markers, mass spectrometry, NMR.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por Arranjo de Diodo
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DCM	Diclorometano
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
EAB	Extração Ácido-Base
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
HCl	Ácido Clorídrico
HEX	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IE-EM	Espectrometria de Massas com Ionização por Elétrons
IES-EM	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
IV	Infravermelho
L/L	Líquido/líquido
MeOH	Metanol

m/z	Relação massa/carga
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
NOE	<i>Nuclear Overhouser Effect</i>
ppm	Partes por Milhão
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RDA	Retro Diels-Alder
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>E. verna</i> (A) e inflorescência avermelhada da espécie (B).	6
Figura 2 - Classes terapêuticas com maior participação em vendas no mercado de fitoterápicos do Brasil. Modificado de FREITAS, 2007.	7
Figura 3 - Estrutura básica dos alcaloides eritrínicos (A) e das subclasses dienoide (B), alcenoide (C) e lactônica (D) com as posições dos substituintes oxigenados.	10
Figura 4 - Extração ácido-base (EAB) dos extratos etanólicos do mulungu. MeOH: metanol; DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila.	17
Figura 5 - Partição L/L dos extratos etanólicos de <i>E. verna</i> lotes A1 e B2. HEX: hexano; MeOH: metanol; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila.	19
Figura 6 - Fragmentações características em IE-EM das subclasses de alcaloides eritrínicos. A: subclasse alcenoide. B: subclasse dienoide.	24
Figura 7 - Regiões dos perfis cromatográficos em CG-EM dos extratos das cascas de <i>E. vernanativa</i> e dos produtores comerciais nas quais foram identificados os alcaloides eritrínicos. 1: erisodina, 2: eritrinina, 3: eritralina, 4: erisotrina, 5: NI, 6: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_3$), 7: erisovina, 8: eritratidina/ <i>epi</i> -eritratidina, 9: 11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina, 10: eritratidina/ <i>epi</i> -eritratidina, 11: erisotina ou esrisosalvina, 12: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_4$ ou $C_{18}H_{23}NO_4$), 13: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_4$ ou $C_{18}H_{23}NO_4$), 14: NI, 15: NI, 16: NI, 17: NI, 18: NI, 19: NI, 20: NI, 21: NI, 22: 8-oxoeritralina, 24: 3-demetoxy-eritratidinona, 25: alcenoide ($C_{19}H_{23}NO_4$), 26: alcenoide ($C_{19}H_{23}NO_4$), 27: 11-hidroxieritratidinona, 28: eritratidinona, 31: NI, 32: NI, 33: NI, 34: NI, 35: NI, 36: NI, 37: NI. NI: não identificado.	30
Figura 8 - Alcaloides eritrínicos identificados nos extratos alcaloídicos de <i>E. verna</i>	31
Figura 9 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato A1.	39
Figura 10 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato B1.	45
Figura 11 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato de <i>E. verna</i> nativa.	49
Figura 12 - Mecanismos de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila na posição 2. (A): via iniciada pela reação de RDA. (B): via iniciada pela segmentação α	52

Figura 13 - Mecanismos de fragmentação dos isômeros 11-hidroxi-erisosalvina e 11-hidroxi-erisotina. (A): via iniciada pela reação de RDA. (B): via iniciada pela segmentação α	54
Figura 14 - Mecanismos de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com carbonila na posição 2 a partir da via de reação RDA. Eritratidinona (28). 3-demetoxi-eritratidinona (24).	56
Figura 15 - Mecanismos de fragmentação de íons formados a partir da via de segmentação α -carbonila de derivados eritrínicos alcanoides com carbonila na posição 2. Eritratidinona (28). 3-demetoxi-eritratidinona (24).	58
Figura 16 - Cromatogramas dos extratos DCM A1 e EAB A1.	60
Figura 17 - Cromatogramas dos extratos DCM B2 e EAB B2.	62
Figura 18 - Cromatograma do grupo 3 (frações 9-25) obtido na purificação em CLAE-DAD semipreparativo ($\lambda = 280$ nm) e frações coletadas.	66
Figura 19 - Cromatograma do extrato alcaloídico B2 obtido na purificação em CLAE-DAD semipreparativo ($\lambda = 280$ nm) e frações coletadas. (A): cromatograma de 20-50 min; (B): cromatograma de 50-65 min.	68
Figura 20 - Estruturas dos alcaloides eritrínicos das subclasses dienoide e alcenoide com indicação dos hidrogênios e carbonos olefínicos, bem como a região de seus deslocamentos químicos característicos. Em vermelho: hidrogênios vinílicos; em azul: hidrogênios aromáticos; em verde: carbonos sp^2	71
Figura 21 - Estrutura de eritralina (substância 3).	72
Figura 22 - Estrutura da 8-oxoeritralina (substância 22).	74
Figura 23 - Estrutura da eritrinina (substância 2).	77
Figura 24 - Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC (8 Hz) (em azul) e no mapa de contornos NOESY (em alaranjado) da erisovina (substância 7).	83
Figura 25 - Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC (8 Hz) (em azul) e no mapa de contornos COSY (em alaranjado) da eritratidinona (substância 28).	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Participação dos principais produtos no mercado de medicamentos fitoterápicos da classe hipnóticos/sedativos	7
Tabela 2 - Alcaloides eritrínicos de maior ocorrência no gênero <i>Erythrina</i>	11
Tabela 3 - Extratos etanólicos obtidos através de percolação das cascas comerciais e da espécie nativa de <i>E. verna</i>	16
Tabela 4 - Massas de extratos etanólicos e frações alcaloídicas (F2) obtidas a partir das cascas de <i>E. verna</i> nativa e adquiridas de produtor comercial	18
Tabela 5 - Fracionamento cromatográfico do extrato alcaloídico A2	21
Tabela 6 - Gradiente de eluição utilizado na purificação dos constituintes do grupo 3 (frações 9-25) por CLAE-DAD semipreparativo	22
Tabela 7 - Gradiente de eluição utilizado na purificação da fração alcaloídica B2 por CLAE-DAD semipreparativo	23
Tabela 8 - Padrões de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide	25
Tabela 9 - Padrões de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse dienoide	26
Tabela 10 - Rendimentos em massa das frações alcaloídicas obtidas por EAB das cascas da espécie nativa e dos lotes dos fornecedores A e B de <i>E. verna</i>	28
Tabela 11 - Dados de IE-EM dos constituintes dos extratos de mulungu do produtor comercial A	37
Tabela 12 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritrínicos identificados no extrato de <i>E. verna</i> do lote A1	39
Tabela 13 - Dados de IE-EM dos constituintes dos extratos de mulungu do produtor comercial B	43
Tabela 14 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritrínicos identificados no extrato do lote B1	46
Tabela 15 - Dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução dos alcaloides identificados nos extratos de <i>E. verna</i> nativa	48
Tabela 16 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloide eritrínicos identificados no extrato de <i>E. verna</i> nativa	49

Tabela 17 - Dados de ionização por elétrons dos alcaloides identificados nos extratos de A1 obtidos por EAB e partição L/L	60
Tabela 18 - Dados de ionização por elétrons dos alcaloides identificados nos extratos de B2 obtidos por EAB e partição L/L	63
Tabela 19 - Grupos provenientes do fracionamento do extrato alcaloídico A2	65
Tabela 20 - Frações/picos obtidos na purificação do grupo 3 (frações 9-25) do extrato alcaloídico A2 por CLAE-DAD semipreparativo	66
Tabela 21 - Substâncias obtidas na purificação do grupo 25 (136-144) por CCDP.....	67
Tabela 22 - Frações/picos obtidos na purificação do extrato alcaloídico de B2 por CLAE-DAD semipreparativo.....	69
Tabela 23 - Dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução dos alcaloides isolados	70
Tabela 24 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 3 e da eritralina	73
Tabela 25 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 22 e da 8-oxoeritralina.....	76
Tabela 26 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 2 e da eritrinina.....	79
Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC da substância 7 e da erisovina	82
Tabela 28 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C , COSY e HMBC da substância 28 e da eritratidinona..	85

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 - Plantas medicinais e marcadores químicos vegetais	3
1.2 - <i>Erythrina verna</i>	5
1.3 - Alcaloides eritrínicos.....	9
2. OBJETIVOS	13
2.1 - Objetivos gerais	13
2.2 - Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 - Especificações de materiais, instrumentos, reagentes e solventes.	14
3.2 - Obtenção dos materiais vegetais	15
3.2.1 - Coleta e identificação do material vegetal.....	15
3.2.2 - Aquisição das cascas de <i>E. verna</i>	15
3.3 - Obtenção dos extratos etanólicos	16
3.4 - Desenvolvimento de método extrativo para obtenção de fração alcaloídica	16
3.4.1 - Extração ácido-base (EAB)	16
3.4.2 - Partição L/L	18
3.5 - Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação dos alcaloides do mulungu	19
3.5.1 - Análise em CG-EM	19
3.5.2 - Análise por IES-EM em alta resolução	20
3.6 - Isolamento e caracterização dos alcaloides eritrínicos	21
3.6.1 - Isolamento dos alcaloides eritralina e 8-oxoeritralina.....	21
3.6.2 - Isolamento da eritrinina e erisodina	22
3.6.3 - Isolamento da eritratidinona	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 - Caracterização dos alcaloides eritrínicos nos extratos de mulungu	24

4.1.1 - Identificação dos padrões de fragmentação em IE-EM das subclasses de alcaloides eritrínicos	24
4.1.2 - Identificação dos alcaloides eritrínicos e análise dos perfis alcaloídicos nos extratos de <i>E. verna</i>	27
4.2 - Propostas de mecanismos de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide	50
4.2.1 - Mecanismos de fragmentação de alcaloides alcenoides com hidroxila na posição 2	50
4.2.2 - Mecanismos de fragmentação de alcaloides alcenoides com carbonila na posição 2	55
4.3 - Análise do perfil de alcaloides nos extratos de mulungu obtidos através de EAB e partição L/L.....	59
4.3.1 - Análise do perfil de alcaloides na fração DCM A1	59
4.3.2 - Análise do perfil de alcaloides na fração DCM B2	62
4.4 - Isolamento, identificação e determinação estrutural dos alcaloides eritrínicos	65
4.4.1 - Isolamento e identificação da eritralina e 8-oxo-eritralina.....	65
4.4.2 - Isolamento e identificação da eritrinina e erisodina	67
4.4.3 - Isolamento e identificação da eritratidinona.....	68
4.5 - Determinação estrutural dos alcaloides eritrínicos isolados por RMN	71
4.5.1 - Análises dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C característicos das subclasses de alcaloides eritrínicos	71
4.5.2 - Determinação estrutural da substância 3 (eritralina)	72
4.5.3 - Determinação estrutural da substância 22 (8-oxoeritralina).....	74
4.5.4 - Determinação estrutural da substância 2 (eritrinina).....	77
4.5.5 - Determinação estrutural da substância 7 (erisovina).....	80
4.5.6 - Determinação estrutural da substância 28 (eritratidinona).....	83
5 - CONCLUSÕES	87
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	93
ANEXO A – Perfis cromatográficos em CG-EM no modo SIM	96
ANEXO B – Espectros de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritrínicos isolados ..	97
ANEXO C – Espectros de RMN dos alcaloides eritrínicos isolados.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Plantas medicinais e marcadores químicos vegetais

Define-se planta medicinal como toda espécie, cultivada ou não, utilizada com finalidade terapêutica (ANVISA, 2010). O uso de plantas com fins medicinais é uma antiga prática da humanidade (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; FEIJÓ *et al.*, 2012), sendo que as primeiras referências escritas sobre seus empregos datam de 2800 a.c. (CZELUSNIAK *et al.*, 2012). Até o século XIX, plantas e extratos vegetais constituíam o recurso terapêutico predominante e estes usos terapêuticos foram registrados nas farmacopéias da época (REIS *et al.*, 2007). Já no final do século XX, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que cerca de 80% da população mundial utilizava plantas medicinais como recurso para suas necessidades básicas de saúde. Entretanto, somente 1% desta flora medicinal possui estudos químicos e farmacológicos (CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 2000).

O Brasil apresenta uma das mais ricas biodiversidades em espécies vegetais do planeta, uma vez que detém cerca de 1/3 das espécies conhecidas, o que proporciona ao país o maior potencial para pesquisas com plantas medicinais (BELLA CRUZ *et al.*, 2011). As espécies nativas brasileiras são amplamente empregadas na medicina popular de acordo com conhecimentos desenvolvidos inicialmente por comunidades indígenas (SCHENCKEL, 2007a). No entanto, a utilização de plantas nativas comercializadas em mercados e feiras livres representa risco aos consumidores, uma vez que muitas espécies não possuem comprovação de seus efeitos farmacológicos e/ou podem apresentar toxicidade, como efeitos mutagênicos e carcinogênicos (SCHENCKEL *et al.*, 2007b, FENNELL *et al.*, 2004; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Os efeitos tóxicos de plantas usadas na medicina tradicional estão muitas vezes relacionados com a identificação incorreta das espécies comercializadas, bem como equívocos na preparação e administração dos extratos (FENNELL *et al.*, 2004). Assim, as pesquisas com plantas medicinais necessitam de investigações etnobotânicas, fitoquímicas e farmacológicas que contribuam para utilização terapêutica de espécies da medicina tradicional (MACIEL, 2002).

Nesse sentido, a fitoquímica dedica-se à caracterização química dos constituintes de extratos vegetais através de purificações por métodos cromatográficos e identificação por técnicas espectrais, como espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia nas regiões do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV). O advento de técnicas hífenadas, como cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e, posteriormente, do acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com EM e RMN permitiu a otimização das análises, uma vez que podem ser obtidas maiores informações estruturais de cada componente nas matrizes complexas concomitantes ao processo de separação cromatográfica (PINTO *et al.*, 2002; LIANG *et al.*, 2004).

O incremento de dados químicos de diversas espécies ao longo dos séculos conduziu ao conhecimento das classes de metabólitos secundários, substâncias que constituem uma interface entre a planta e o meio ambiente, sendo responsáveis por funções como proteção ao ataque de insetos e herbívoros, interações planta-planta e atração de polinizadores (POSER; MENTZ, 2007; KUTCHAN, 2001). As classes de metabólitos secundários com ocorrência característica em determinados táxons (POSER; MENTZ, 2007) permitem as suas utilizações como marcadores químicos, os quais são definidos como substâncias ou classe de substâncias empregadas como referência no controle de qualidade das matérias-primas vegetais nas quais são encontrados e que preferencialmente têm relação com os efeitos terapêuticos das espécies (ANVISA, 2010; ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). Os estudos fitoquímicos têm contribuído para o estabelecimento dos marcadores de diversas espécies consagradas pelo uso medicinal. Alguns desses marcadores e as espécies nas quais ocorrem estão descritos em monografias da sétima edição da Farmacopeia Europeia (ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). No Brasil, a Instrução Normativa (IN) 5/2008 da ANVISA publicou uma lista com mais de trinta espécies medicinais utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos e seus respectivos marcadores, como as lactonas sesquiterpênicas encontrados na arnica (*Arnica montana* L.), ácido clorogênico na alcachofra (*Cynara scolymus* L.), ginkgo flavonoides em *Ginkgo biloba*, apigenina-7-glicosídeo na camomila (*Matricaria recutita* L.), taninos na espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* L.), cumarinas no guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), cascarosídeos na cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), entre outros (ANVISA, 2008).

Apesar de estarem relacionados às propriedades terapêuticas relatadas para as plantas medicinais, os marcadores químicos também podem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos destas plantas, pois a literatura reporta a toxicidade de várias classes de substâncias de origem vegetal, como a maioria dos agentes antitumorais, digitálicos, alcaloides pirrolizidínicos (CALIXTO, 2000) e alquilfenóis (BARON-RUPPERT; LUEPKE, 2001). Nesse sentido, o isolamento e a caracterização das substâncias de origem vegetal utilizadas como marcadores químicos permitem suas utilizações em ensaios para avaliação de atividade biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), estudos toxicológicos ou de metabolismo e avaliação da toxicidade *in vivo* (FERNANDES, 2013; MESSIANO *et al.*, 2013; FERREIRA, 2013). Além disso, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010 da ANVISA, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelece a caracterização dos(s) marcadores(s) químico(s) de uma determinada espécie constituinte de um fitoterápico como requisito para desenvolvimento e registro deste (ANVISA, 2010).

A determinação dos marcadores químicos é muito importante para o desenvolvimento de medicamentos que têm como base as plantas medicinais, pois:

- Permite o controle da matéria-prima e do produto final;

- Auxilia na determinação dos constituintes farmacologicamente ativos;
- Permite a execução dos ensaios de metabolização importantes para obtenção do perfil de metabolização desses marcadores;
- Permite a execução de ensaios toxicológicos importantes para avaliar a segurança da utilização dos extratos de plantas medicinais.

Um dos principais problemas na determinação destes marcadores relaciona-se ao fato de que a composição química das plantas pode apresentar-se inconstante devido a possíveis variações no ritmo de metabolismo, bem como influência de fatores ambientais como índice pluviométrico, nutrientes do solo, composição atmosférica, temperatura, altitude, idade da planta e sazonalidade sobre o acúmulo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso, fatores que podem alterar a composição química dos extratos das espécies analisadas pode-se citar condição de coletado material, estabilização, estocagem (CALIXTO, 2000), adulterações e contaminações dos materiais vegetais (VEIGA JUNIOR, 2005), ou até mesmo equívocos na identificação da espécie (FENNELL *et al.*, 2004).

Esta variação no conteúdo de metabólitos secundários pode afetar a eficácia e segurança das preparações medicinais a partir dessas espécies (CALIXTO, 2000; GOBO-NETO; LOPES, 2007). A espécie medicinal *Erythrina verna* têm sido alvo de discussões sobre possíveis variações em seus marcadores químicos a partir de análises preliminares realizadas por nosso grupo, nas quais verificou-se não homogeneidade no perfil de metabólitos secundários entre extratos das cascas de *E. verna* nativa e adquiridas de diferentes produtores comerciais.

1.2 - *Erythrina verna*

O gênero *Erythrina* (*Fabaceae*) compreende aproximadamente 115 espécies tropicais e subtropicais distribuídas nos hemisférios norte e sul (PINO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004a; SAN MIGUEL-CHAVEZ, 2007,). O nome deste gênero é proveniente do grego “*erythros*”, que significa vermelho, em referência à cor das flores das espécies do gênero (CARVALHO, 2008) (Figura 1B). No Brasil são encontradas 11 espécies de *Erythrina*: *E. amazonica*, *E. crista-galli*, *E. dominguezii*, *E. falcata*, *E. fusca*, *E. poeppigiana*, *E. similis*, *E. speciosa*, *E. ulei*, *E. velutina* e *E. verna* (REFLORA, 2013a). A *Erythrina verna*, anteriormente chamada de *Erythrina mulungu*, é uma espécie nativa do Brasil e de maior ocorrência na região sudeste do país (REFLORA, 2013b). A planta possui hábito arbóreo com exemplares na faixa de 10-14 m de altura (LORENZI, 1992) (Figura 1A). O nome popular mulungu vem do tupi *mussungú* ou *muzungú* e do africano mulungu, o que significa “pandeiro” e pode estar relacionado ao som emitido pela batida em seu tronco oco (CARVALHO, 2008).

Figura 1 - Exemplar de *E. verna* (A) e inflorescência avermelhada da espécie (B).

O mulungu é utilizado como alimento na América Central (PINO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004b). Além disso, as plantas do gênero *Erythrina* têm sido empregadas na medicinal tradicional do continente americano desde as civilizações pré-colombianas (TOWLE, 2007). Na medicina popular, a decocção das cascas de *E. verna* é usada como calmante e indicada para outras desordens do sistema nervoso central (SNC) como insônia, depressão e epilepsia (RODRIGUES, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2006; TEIXEIRA-SILVEIRA *et al.*, 2008). A *E. verna* também pode ser encontrado nas farmácias brasileiras (OLIVEIRA *et al.*, 2012) na forma de extrato seco das cascas. Em virtude de seu uso tradicional a *E. verna* foi relacionada entre as espécies medicinais com potencial de gerar produtos de interesse ao SUS na lista do RENISUS (PORTAL SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O extrato de *E. verna* é utilizado em associação com espécies de outros gêneros para produção de três medicamentos fitoterápicos ansiolíticos pela indústria brasileira: Maracujina Composta[®] (Hypermarcas), Passaneuro[®] (Bunker) e Calmapax[®] (Delta). Estes fitoterápicos pertencem à classe dos hipnóticos/sedativos responsável por 21,67 % das vendas entre as classes terapêuticas de medicamentos fitoterápicos que representam 63,73 % das vendas totais no mercado fitoterápico nacional, como pode ser verificado na Figura 2. O medicamento Maracujina Composta[®] possui a terceira maior participação acumulada (46,80 %) no mercado

dos fitoterápicos hipnóticos/sedativos (Tabela 1). Estes dados mostram que *E. verna* destaca-se além do âmbito da medicina popular, visto que a espécie também é utilizada como matéria-prima para produção de medicamentos com grande utilização na fitoterapia para tratamento transtornos de ansiedade, os quais representam o grupo de enfermidades com maior incidência entre os indivíduos com distúrbios psiquiátricos (KESSLER *et al.*, 2005), proporcionam uma redução da qualidade de vida, reduzem a produtividade e estão relacionados com o aumento dos índices de mortalidade e de doenças coronarianas (HOUT *et al.*, 2004).

Figura 2 - Classes terapêuticas com maior participação em vendas no mercado de fitoterápicos do Brasil. Modificado de FREITAS, 2007.

Tabela 1 - Participação dos principais produtos no mercado de medicamentos fitoterápicos da classe hipnóticos/sedativos

Classe terapêutica	Produto	Participação acumulada (%)
Hipnóticos/sedativos	Pasalix	32,90
	Passiflorine	
	Maracugina	46,80
	Composta	
	Serenus	56,60
	Valeriane	66,20

Modificado de FREITAS, 2007

O fato da *E. verna* ser a espécie mais utilizada como calmante foi responsável pela designação de mulungu para outras espécies do gênero, desde a *E. velutina*, de ocorrência nas regiões nordeste e sudeste, (CARVALHO, 2008; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2008; OZAWA *et*

al., 2009; PODEROSO *et al.*, 2010) até a *E. amazonica*, de ocorrência restrita a região norte e nordeste do Brasil (REFLORA, 2013c). Assim, ocorreu uma reclassificação taxonômica que reúne *E. mulungu* e *E. verna* como sinônimos, sendo que a nova nomenclatura passou a ser *E. verna* (REFLORA, 2013b). No entanto, os distribuidores de matéria-prima e os fabricantes dos medicamentos a partir de *E. verna* ainda não se atentaram a esta reclassificação e a espécie ainda é comercializada como *E. mulungu*.

Os estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Erythrina* iniciaram-se com o isolamento do alcaloide eritroidina de *E. americana*, o qual demonstrou atividade de bloqueio neuromuscular semelhante à da tubocurarina (SOTO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). A partir dessa observação, diversos estudos químicos foram realizados com espécies do gênero *Erythrina* com o intuito de se obter alcaloides com atividade sobre o sistema colinérgico e/ou serotoninérgico. Porém, substâncias de outras classes químicas também foram isoladas, como flavonoides da classe dos pterocarpanos, isoflavonoides, cumestanos e flavanonas (FARIA *et al.*, 2007; INNOK *et al.*, 2009; DJIOGUE *et al.*, 2009). Entre as substâncias isoladas, os alcaloides eritrínicos são os mais abundantes e característicos nas espécies de *Erythrina*, sendo que já foram descritos cerca de uma centena de derivados estruturais desses alcaloides (AMER *et al.*, 1991; WANJALA; MAJINDA, 2000; TANAKA *et al.*, 2001; WANJALA *et al.*, 2002; JUMA; MAJINDA, 2004; FLAUSINO JR, *et al.*, 2007a; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2009).

Os efeitos dos extratos *E. verna* e dos alcaloides eritrínicos isolados sobre o SNC têm sido avaliados em diversos estudos com a finalidade de investigar o uso medicinal da espécie. Alguns estudos demonstraram o efeito anticunvulsivante do extrato hidroalcoólico das cascas de *E. verna*, bem como dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11- α -hidroxieritravina isolados das flores desta espécie (VASCONCELOS *et al.*, 2007; FAGGION *et al.*, 2001). Os relatos das atividades ansiolíticas dos extratos hidroalcoólicos das cascas e das flores de *E. verna* (ONUSIC *et al.*, 2002, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2004) e dos alcaloides eritrínicos eritravina e (+)-11- α -hidroxieritravina, erisodina e erisotrina isolados das flores de *E. Verna* (FLAUSINO JR, *et al.*, 2007b) sustentam a sua utilização no tratamento da ansiedade. Os alcaloides (+)-eritravina e (+)-11- α -hidroxieritravina também mostraram inibição de receptores nicotínicos de acetilcolina no SNC que podem estar relacionados a efeitos ansiogênicos em ratos (SETTI-PERDIGÃO *et al.*, 2013).

Com base nesses resultados, sugere-se que os alcaloides eritrínicos podem ser empregados como marcadores químicos das espécies de *Erythrina*, uma vez que essa classe

tem ocorrência característica nesse gênero e relação com o efeito ansiolítico descrito na medicina tradicional.

Embora alcaloides eritrínicos como erisotrina, eritratina, N-óxido-erisotrina e N-óxido-eritratina, (+)- α -hidroxierisotrina, eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina tenham sido reportados nas flores de *E. verna* (SARRAGIOTTO *et al.*, 1981; FLAURSINO JR *et al.*, 2007a), os alcaloides presentes nas cascas desta espécie ainda não foram identificados.

1.3 - Alcaloides eritrínicos

Como citado anteriormente, os marcadores químicos do gênero *Erythrina* são os alcaloides eritrínicos. Apesar de notável ocorrência no gênero *Erythrina*, estes alcaloides também são encontrados em algumas espécies do gênero e *Cocculus* (*Menispermaceae*) (AMER, *et al.*, 1991).

A estrutura básica dos alcaloides eritrínicos é composta por uma espiroamina tetracíclica (Figura 3A), a qual pode se apresentar livre ou conjugada com carboidrato (ESTRADA, 2011). Além da espiroamina, a estrutura também apresenta um espirocentro C-5 (Figura 3A).

Os derivados eritrínicos são classificados como dienoides, alcenoides ou lactônicos (DYKE; QUESSY, 1981), como mostrado na Figura 2. Os alcaloides dienoides (Figura 3B) possuem dupla ligação entre os carbonos 1 e 2 e entre os carbonos 6 e 7. Já os alcaloides da subclasse alcenoide (Figura 3C) possuem dupla ligação entre os carbonos 1 e 6. Os alcaloides dienoides e alcenoides são classificados como aromáticos em virtude do anel D em sua estrutura (Figura 3). Estas duas subclasses estão presentes em maior abundância no gênero *Erythrina*, enquanto os derivados eritrínicos com o anel D lactônico são de menor ocorrência neste gênero, sendo que entre as estruturas da subclasse lactônica geralmente apresentam o sistema dienoide (Figura 3D) (AMER, *et al.*, 1991). Estas subclasses de alcaloides eritrínicos apresentam diferentes substituintes oxigenados em posições específicas, sendo que na grande maioria desses derivados é comum a presença de grupamento metoxila na posição 3, como apresentado na Figura 3.

A. Estrutura básica dos alcaloides eritrínicos

B. Subclasse dienoide

C. Subclasse alcenoide

D. Subclasse lactônica

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
OH	OH	OH	OH	O**	OH	OH
OMe	OMe	OMe	O*		OAc	OMe
-O-CH ₂ -O-						

*subclasse alcenoide

** subclasse dienoide

Figura 3 - Estrutura básica dos alcaloides eritrínicos (A) e das subclasses dienoide (B), alcenoide (C) e lactônica (D) com as posições dos substituintes oxigenados.

Estudos sobre a composição alcaloídica de espécies do gênero *Erythrina* mostraram que entre os alcaloides mais amplamente distribuídos neste gênero estão os dienoides erisotrina, erisovina, erisodina e eritralina, conforme mostrado na Tabela 2.

Entre as técnicas analíticas para caracterização de alcaloides eritrínicos destaca-se o acoplamento da cromatografia em fase gasosa com a espectrometria de massas com ionização por elétrons, a qual oferece rápida análise dos extratos alcaloídicos e identificação baseada nos padrões de fragmentação de derivados eritrínicos (BOAR *et al.*, 1970; MILLINGTON *et al.*, 1974; DYKE; QUESSY, 1981). Tendo em vista a abundância dos dados de ionização por elétrons desses alcaloides na literatura, uma revisão publicada por AMER e colaboradores (1991) compilou dados de fragmentação com ionização por elétrons de mais de 90 derivados eritrínicos isolados de *Erythrinae* obtido através de síntese, além de informações espectrais de UV, IV e RMN, tornando-se uma referência de grande relevância para caracterização dessas moléculas.

Tabela 2 - Alcaloides eritrínicos de maior ocorrência no gênero *Erythrina*

Alcaloide	Estrutura	Espécies ^a
Erisotrina		<i>E. caffra</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalensis</i> , <i>E. livingstoniana</i> , <i>E. suberosa</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. fucosa</i> , <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. flabelliformis</i> , <i>E. coralloides</i> , <i>E. goldmanii</i> , <i>E. folkersi</i> , <i>E. atitlanensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. verna</i> , <i>E. blakei</i> , <i>E. crista-galli</i> , <i>E. cobealeata</i> , <i>E. lysistemom</i>
Erisovina		<i>E. caffra</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalensis</i> , <i>E. livingstoniana</i> , <i>E. abyssinica</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. fucosa</i> , <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. flabelliformis</i> , <i>E. coralloides</i> , <i>E. goldmanii</i> , <i>E. folkersi</i> , <i>E. atitlanensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. tajumulcensis</i> , <i>E. guatemalensis</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. verna</i> , <i>E. blakei</i> , <i>E. crista-galli</i> , <i>E. cobealeata</i> , <i>E. lysistemom</i>
Erisodina		<i>E. caffra</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalensis</i> , <i>E. livingstoniana</i> , <i>E. abyssinica</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. fucosa</i> , <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. flabelliformis</i> , <i>E. coralloides</i> , <i>E. goldmanii</i> , <i>E. folkersi</i> , <i>E. atitlanensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. tajumulcensis</i> , <i>E. guatemalensis</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. verna</i> , <i>E. blakei</i> , <i>E. crista-galli</i> , <i>E. cobealeata</i> , <i>E. lysistemom</i>
Eritralina		<i>E. fusca</i> , <i>E. coralloides</i> , <i>E. tajumulcensis</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. guatemalensis</i> , <i>E. globcalyx</i> , <i>E. oliviae</i> , <i>E. steyermarkii</i> , <i>E. buebuetanensis</i> , <i>E. lanceolata</i> , <i>E. barqueroana</i> , <i>E. folkersii</i> , <i>E. velutina</i> , <i>E. stricta</i> , <i>E. lysistemom</i> , <i>E. zeyberi</i> , <i>E. senegalensis</i> , <i>E. excelsa</i> , <i>E. latissima</i> , <i>E. absynica</i> , <i>E. tabitensis</i> , <i>E. vespertilio</i> , <i>E. burana</i> , <i>E. perrieri</i> , <i>E. suberosa</i> , <i>E. arborenses</i> , <i>E. variegata</i> , <i>E. glauca</i> , <i>E. crista-galli</i> , <i>E. milbraedii</i> , <i>E. caffra</i>

^aAMERet al., 1991

Apesar das utilizações da *E. verna* na medicina tradicional e na produção de fitoterápicos ansiolíticos e da demonstração da atividade ansiolítica dos alcaloides eritrínicos, ainda não foram determinados os marcadores químicos das cascas de *E. verna*. Dessa forma, a caracterização dos alcaloides eritrínicos presentes nas cascas desta espécie é necessária, pois:

- Amplia os conhecimentos acerca da química dos extratos alcaloídicos da espécie;
- Pode auxiliar nas investigações sobre eficácia e segurança de preparações medicinais a partir das cascas do mulungu;

- Contribui para o desenvolvimento e produção de medicamentos fitoterápicos que têm *E. verna* como base, uma vez que o conhecimento de marcadores químicos proporcionam a realização de um controle de qualidade mais rígido das matérias-primas vegetais e está de acordo com os requisitos estabelecidos na RDC 14/2010 (ANVISA, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral a caracterização dos alcaloides eritrínicos das cascas de *Erythrina verna*.

2.2 - Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método extrativo para obtenção de frações enriquecidas em alcaloides eritrínicos a partir das cascas de *E. verna*;
- Identificação dos alcaloides eritrínicos em extratos alcaloídicos através de dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução;
- Comparação entre os perfis de alcaloides eritrínicos identificados nos extratos obtidos a partir de cascas da espécie nativa e cascas de *E. verna* e adquiridas de diferentes produtores comerciais;
- Desenvolvimento de métodos cromatográficos para isolamento de alcaloides;
- Determinação estrutural dos alcaloides isolados por RMN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Especificações de materiais, instrumentos, reagentes e solventes.

- Os solventes e reagentes de grau PA utilizados na extração ácido-base foram da marca QUEMIS.
- O pH da solução de HCl e da fração aquosa alcalinizada durante a extração ácido-base foi monitorado com papel indicador MERCK.
- Para realização de CCDC foram utilizadas placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ da marca MERCK, com dimensões de 20 x 20 cm e 0,25 mm de espessura do adsorvente e ativação a 105 °C por 30 minutos.
- A revelação das placas de CCDC foi realizada com reagente de Dragendorff produzido de acordo com o protocolo de WAGNER; BLADT (1996).
- Para realização de CCDP foram utilizadas placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ 20 x 20 cm preparadas no laboratório, com 1 mm de espessura do adsorvente e ativação a 105°C por 60 minutos.
- No isolamento de alcaloides por CCC foi utilizada coluna de vidro com 37,4 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, usando-se como fase estacionária sílica gel 70-230 Mesh, com poros de 60 Å da marca MERCK.
- Para a análise em CG-EM utilizou-se o cromatógrafo a gás modelo GC-MS-QP-2010 da Shimadzu, em um sistema equipado com injetor *split/splitless* e operando com ionização por elétrons. Utilizou-se uma coluna DB-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de dimensões (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio como gás de arraste.
- As análises em CLAE-DAD e as purificações em CLAE-DAD em escala semipreparativa foram realizadas no cromatógrafo líquido da Shimadzu, equipado com bombas modelo LC-6AD da Shimadzu, detector de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, sistema de controle CBM-20 Shimadzu e injetor manual.
- A coluna utilizada para CLAE-DAD em escala analítica foi uma C18 com 200 mm X 4,6 mm com partículas de 5 µm, pertencente Shim-pack-ODS da marca Shimadzu. As purificações em CLAE-DAD em escala semipreparativa foram realizadas em C18 200 mm X 20 mm com partículas de 5 µm, pertencente kit Shim-pack-ODS da marca Shimadzu.

- Para filtração das amostras submetidas á purificação por CLAE-DAD em escala semipreparativa foram utilizados filtros de seringa de 30 mm de diâmetro e membrana de PTFE com poros de 0,45 µm da marca Allcrom.
- Os solventes grau HPLC utilizados para as análises por CLAE-DAD em escalas analítica e semipreparativa são da marca J T Baker e água deionizada (18 mΩ; Milli-Q, Millipore).
- A centrifugação das amostras dos extratos foi realizada na centrífuga Biosystems HT modelo MCD 2000.
- Para auxílio na solubilização das amostras foi utilizado o banho de ultrassom modelo Ultra Cleaner 1400 da marca Unique.
- A liofilização foi realizada em liofilizador modelo LC 3000 da Terroni.
- As análises de IES-EM foram realizadas em espectrômetro de massas com analisador híbrido triplo quadrupolo e tempo de vôo modelo microTOFq II– ESI-TOF da marca Bruker Daltonics.
- As massas exatas dos alcloides eritríncos foram calculadas no software Compass Isotope Pattern (Brucker Daltonics).
- Os espectros de RMN foram obtidos no espectrômetro da marca Bruker-Advance, Departamento de Química da FFCLRP-USP, operando nas frequências de 400 MHz e 500 MHz.

3.2 - Obtenção dos materiais vegetais

3.2.1 - Coleta e identificação do material vegetal

As cascas de *E. verna* foram coletadas de um exemplar no interior do campus da USP Ribeirão Preto, coordenadas (-21.161942,-47.863551) (GOOGLE, 2013). Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP e identificada pela Dra. Milena Ventrichi Martins. O material vegetal coletado foi seco em estufa de ar circulante a 40°C durante 48 horas.

3.2.2 - Aquisição das cascas de *E. verna*

Realizou-se a aquisição das cascas de mulungu de dois produtores comerciais de matéria-prima vegetal, identificados neste trabalho como A e B, sendo que ao longo do trabalho foram adquiridos dois lotes de cascas de cada fornecedor. Assim, foram solicitados

inicialmente 300 g do lote A1 do fornecedor A e 300 g do lote B1 fornecedor B com a finalidade de avaliar a presença de alcaloides eritrínicos nesses materiais vegetais. Posteriormente, foram adquiridos mais 6,0 kg do lote A2 e 4,0 kg do lote B2 com o objetivo de obter extratos alcaloídicos em maior escala para isolamento dos alcaloides.

3.3 - Obtenção dos extratos etanólicos

As cascas da espécie nativa de *E. verna* e aquelas adquiridas comercialmente foram primeiramente rasuradas em moinho de facas e, em seguida, extraídas através de percolação com etanol destilado. As percolações das cascas dos lotes A1 (200 g), B1 (200 g), A2 (5400 g) e B2 (3400 g) e espécie nativa (240 g) foram realizadas ao fluxo de 3,0 ml/min. Os extratos etanólicos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a 50 °C e apresentaram rendimentos em massa semelhantes, em torno de 8-9% (Tabela 3).

Tabela 3 - Extratos etanólicos obtidos através de percolação das cascas comerciais e da espécie nativa de *E. verna*

Fornecedor	Lote	Massa de cascas(g)	Massa (g) ext. EtOH	Rendimento (%) ext. EtOH
A	A1	250	20,5	8,2
	A2	5400	472,5	8,7
B	B1	250	21,0	8,4
	B2	3400	285,6	8,4
<i>E. verna</i> nativa		240	19,7	8,2

3.4 - Métodos extrativos para obtenção de fração alcaloídica

3.4.1 - Extração ácido-base (EAB)

A obtenção de frações enriquecidas em alcaloides foi realizada através de extração ácido-base dos extratos etanólicos de mulungu, conforme ilustrado na Figura 4. A EAB foi realizada com a solubilização do extrato etanólico em solução DCM: MeOH (8:2) com auxílio do banho de ultrassom por 20 min. Em seguida, esta fração orgânica (F1) foi extraída com solução de HCl a 5% (v/v). Posteriormente, a fração aquosa ácida foi alcalinizada com solução de NH₄OH em volume suficiente para atingir pH= 10. Por fim, a fração aquosa foi extraída com diclorometano (F2) (Figura 4). As frações diclorometânicas (F2) enriquecidas em alcaloides obtidas em cada marcha-química foram concentradas por rotaevaporação a 30°C.

Figura 4 - Extração ácido-base (EAB) dos extratos etanólicos do mulungu. MeOH: metanol; DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila.

Os extratos alcaloídicos (F2) de A1 e A2 apresentaram rendimentos médios em massa semelhantes de 0,91 e 0,96%, respectivamente. Já os extratos B1 e B2 apresentaram rendimentos de 0,17 e 0,13%, respectivamente (Tabela 4). Dessa forma, os rendimentos em massa das frações alcaloídicas de diferentes produtores comerciais de *E. verna* foram discrepantes. Além disso, o extrato alcaloídico da espécie nativa apresentou rendimento de 3,1%, o qual foi superior ao observado para os extratos de fornecedores de mulungu (Tabela 4).

Tabela 4 - Massas de extratos etanólicos e frações alcaloídicas (F2) obtidas a partir das cascas de *E. verna* nativa e adquiridas de produtor comercial

Fornecedor	Lote	Massa (g) ext. EtOH EAB	Massa (g) Fr. DCM alcaloídica	Rendimento médio (%) F2 ± desv.pad.
A	A1	10	0,091	0,91 ± 0,0021
	A2	459	4,41	0,96 ± 0,0027
B	B1	10	0,013	0,13 ± 0,0018
	B2	266	0,45	0,17 ± 0,0014
<i>E. verna</i> nativa		10	0,31	3,1

3.4.2 -Partição L/L

A extração dos alcaloides através de partição L/L foi realizada com o objetivo de comparar o perfil alcaloídico das frações obtidas por esse método com o perfil obtido na EAB e avaliar se os alcaloides eritrínicos são passíveis de degradação no baixo pH empregado na EAB.

Para realização da partição L/L foram utilizados 10 g do extrato etanólico de A1 e 10 g do extrato de B2 (Figura 5). Estes extratos etanólicos foram solubilizados em MeOH: água (9:1) mL com o auxílio do banho de ultrassom durante 10 min. Em seguida, a solução hidrometanólica foi particionada com HEX, seguido de DCM e AcOEt, conforme ilustrado na Figura 5. As frações HEX, DCM, AcEOT e MeOH/água obtidas nas partição L/L dos extratos etanólicos A1 e B2 foram concentradas por rotaevaporação a 35°C, sendo que a fração MeOH/água foi posteriormente liofilizada.

Figura 5 - vPartição L/L dos extratos etanólicos de *E. verna* lotes A1 e B2. HEX: hexano; MeOH: metanol; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila.

3.5 - Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação dos alcaloides do mulungu

3.5.1 - Análise em CG-EM

Os extratos alcaloídicos de mulungu obtidos por EAB, bem como as frações DCM da partição L/L e os alcaloides eritrínicos isolados (especificação dos métodos utilizados para o isolamento no item 3.6) foram analisados em CG-EM. Para tanto, o método de cromatografia em fase gasosa foi desenvolvido utilizando-se injeção no modo *split*(1/10), temperatura de injeção de 250°C, hélio como gás carreador ao fluxo de 1,1 mL/min e emprego do seguinte gradiente de temperatura: de 100 a 220°C a 6°C/min, 220°C por 10 min, de 220 a 290°C a

6°C/min e, finalmente, 290°C por 11 min. As amostras analisadas foram solubilizadas em MeOH e o volume de injeção foi de 1 µL.

Nas análises das frações DCM obtidas na partição L/L por CG-EM foi utilizado o modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). Assim, foram selecionados para monitoramento os íons moleculares e íons majoritários dos espectros de alcaloides previamente identificados nas frações alcaloídicas de A1 e B2 obtidas por EAB em seus respectivos tempos de retenção.

3.5.2 - Análise por IES-EM em alta resolução

Amostras dos extratos alcaloídicos do mulungu coletado, dos lotes A1 e B1 obtidos na extração ácido-base e dos alcaloides isolados foram analisadas por IES-EM em alta resolução através infusão direta em espectrômetro de massas, com a finalidade de se obter as fórmulas moleculares em alta resolução dos alcaloides e complementar os dados de IE-EM obtidos. Para análise em IES-EM, empregou-se temperatura do gás de secagem a 200°C, fluxo de 4 L/min, nitrogênio como gás nebulizador a pressão de 0,4 Bar e voltagem do capilar de 4500 V. A calibração interna para alta resolução foi realizada antes das análises com trifluoroacetato de sódio a 10 mg/L. As amostras foram solubilizadas em MeOH e analisadas no modo positivo, sendo que a aquisição dos espectros foi realizada no modo *full scan* de 0 a 1200 Da.

3.6 - Isolamento e caracterização dos alcaloides eritrínicos

3.6.1 - Isolamento dos alcaloides eritralina e 8-oxoeritralina

3.6.1.1 - Cromatografia em coluna clássica

Uma massa de 2,57 g do extrato alcaloídico do lote A2 foi submetida à fracionamento em CCC do tipo *short column* em fase normal (sílica gel), utilizando-se proporção em massa de amostra:FE de 1:10. Empregou-se o gradiente de eluição HEX: AcOEt (8:2, 7:3, 6:4, 4:6 e 1:9) ao fluxo de 16 mL/min e foram coletadas 155 frações de 100 mL cada (Tabela 5). Após a eluição, amostras de todas as frações coletadas foram analisadas por CCDC com a fase móvel AcOEt: MeOH (7:3) e reveladas com reagente de Dragendorff. Em seguida, as frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em 28 grupos apresentados e analisadas em CG-EM.

Tabela 5- Fracionamento cromatográfico do extrato alcaloídico A2

Frações	Proporção Hex: AcOEt
1-52	8:2
53-121	7:3
122-133	6:4
133-142	4:6
143-155	1:9

3.6.1.2 - CLAE-DAD em escala semipreparativa

Uma massa de 454,4 mg do grupo 3(9-25) foi submetida a purificação por CLAE-DAD em escala semipreparativa para isolamento da eritralina, alcaloide majoritário no extrato de A2, e da 8-oxoeritralina. Utilizou-se uma coluna C18 semipreparativa, eluição com água (A): ACN (B) acrescidos de 0,02 % (v/v) de ácido trifluoroacético conforme o gradiente descrito na Tabela 6, fluxo de 9,0 mL/min e detecção em $\lambda = 280$ nm.

As amostras foram preparadas através da solubilização da amostra em ACN: água acrescidos de 0,02% de ácido trifluoroacético (3,5: 6,5) com o auxílio de banho de ultrassom. A amostra solubilizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado foi filtrado em filtro de seringa de PTFE 30 mm com poros de 0,45 μ m e imediatamente injetado no cromatógrafo líquido. O volume de cada injeção foi de 1,8 mL, sendo que foram realizadas 45 injeções.

As amostras das frações coletadas foram concentradas à pressão reduzida a 35 °C para eliminação de solvente orgânico e, posteriormente, liofilizadas. Todas as amostras obtidas na purificação por CLAE-DAD semipreparativa foram analisadas por CG-EM (especificações no item 3.5.1) para verificação de suas purezas, obtenção de dados de IE-EM e seleção daquelas que seriam analisadas por IES-EM e RMN para identificação e determinação estrutural dos alcaloides isolados.

Tabela 6 - Gradiente de eluição utilizado na purificação dos constituintes do grupo 3 (frações 9-25) por CLAE-DAD semipreparativo

Tr (min)	Porcentagem de B (ACN acrescido de 0,02% de TFA)
0	15
25	60
30	80
32	100
35	100

Tr: tempo de retenção

3.6.2- Isolamento da eritrinina e erisodina

3.6.2.1 - Cromatografia em camada delgada em escala preparativa

A massa de 74,4 mg do grupo 25 (136-144) foi solubilizada em 3 mL de MeOH e esta amostra foi submetida à CCDP em sílica gel para isolamento da eritrinina. Três placas cromatográficas foram eluídas, aplicando-se as amostras na concentração de 24,8 mg/mL em cada placa. Para eluição empregou-se a fase móvel AcOEt: MeOH (7:3) e a revelação foi realizada com luz UV no comprimento de 254 nm. As quatro zonas de absorção visualizadas foram retiradas das placas cromatográficas e filtradas à vácuo em funil de placa sinterizada, usando-se eluição com AcOEt: MeOH (1:1) e, em seguida, MeOH. As amostras eluídas foram concentradas por rotaevaporação a 35 °C e secas em N₂ (g). As substâncias isoladas foram analisadas por CG-EM para avaliação de suas purezas cromatográficas, obtenção de dados de IES-EM e seleção daquelas que seriam analisadas por RMN.

3.6.3 - Isolamento da eritratidinona

3.6.3.1 - CLAE-DAD em escala semipreparativa

A eritratidinona foi isolada a partir da fração alcaloídica do lote B2. Para tanto, uma massa de 400,0 mg deste extrato alcaloídico foi submetida à purificação por CLAE-DAD em escala semipreparativa para o isolamento da eritratidinona, usando-se coluna C-18 semipreparativa, eluição com água (A): ACN (B) acrescidos de 0,02 % de TFA conforme o gradiente descrito na Tabela 7, fluxo de 9,0 mL/min e detecção em $\lambda = 280$ nm.

As amostras foram preparadas através da solubilização da amostra em ACN: água acrescidos com 0,02% de ácido trifluoroacético (3,5: 6,5) com o auxílio de banho de ultrassom. A amostra solubilizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado foi filtrado em filtro de seringa de PTFE 30 mm com poros de 0,45 μ m e imediatamente injetado no cromatógrafo líquido. Neste processo de isolamento foram realizadas 23 injeções com o volume de 1,8 mL cada.

As amostras desses picos foram concentradas à pressão reduzida a 35 °C para eliminação de solvente orgânico e, posteriormente, liofilizadas. Todas as amostras obtidas na purificação por CLAE-DAD semipreparativa foram analisadas em CG-EM para verificação de suas purezas, obtenção de dados de IE-EM e seleção daquelas que seriam analisadas por IES-EM e RMN para identificação e determinação estrutural dos alcaloides isolados.

Tabela 7 - Gradiente de eluição utilizado na purificação da fração alcaloídica B2 por CLAE-DAD semipreparativo

Tempo (min)	Porcentagem de B (ACN acrescido de 0,02% de TFA)
0	10
10	10
35	30
55	60
60	100
64	100

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização dos alcaloides eritrínicos nos extratos de mulungu

4.1.1 - Identificação dos padrões de fragmentação em IE-EM das subclasses de alcaloides eritrínicos

Com base no preceito de que a racionalização das reações de fragmentação em espectrometria de massas pode ser fundamentada no reconhecimento de padrões de fragmentação de congêneres, foi realizada a análise dos perfis de fragmentação em ionização por elétrons de alcaloides eritrínicos das subclasses dienoide e alcenoide reportados em uma revisão de AMER e colaboradores (1991) com a finalidade de identificar parâmetros nas reações de fragmentação. Assim, notou-se a ocorrência da reação de retro Diels-Alder (RDA) [$M^{+} - 58$] como fragmentação característica dos derivados eritrínicos alcenoides (ligação dupla entre os carbonos 1 e 6), como apresentado na Tabela 8 e Figura 6A. Em alguns alcaloides alcenoides, como dihidroerisotrina, eritroculina, eritroculinol e eritlaurina a reação de RDA origina opico base do espectro (Tabela 8). A fragmentação por reação de RDA em eritrínicos alcenoides também foi proposta por BARTON e colaboradores (1968) e MILLINGTON e colaboradores (1974).

Figura 6 - Fragmentações características em IE-EM das subclasses de alcaloides eritrínicos. A: subclasse alcenoide. B: subclasse dienoide.

Tabela 8 - Padrões de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide

Alcaloide eritrínico	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₇	m/z ^a
Dihidroerisotrina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	315, 284, 257 (100), 256 (30)
Eritratidina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	331, 300, 273, 257 (100), 244
Eritramina	-O-CH ₂ -O-		OCH ₃	H	H	299 (20), 268 (15), 241 (74), 240 (100)
Eritratina	-O-CH ₂ -O-		OCH ₃	H	H	315, 297, 284, 282, 266, 257, 241 (100)
Erisosalvina	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	317 (8), 286 (14), 259 (93), 258 (23), 243 (100), 242 (26)
Erisosalvinona	OCH ₃	OH	OCH ₃	O	H	315 (3), 257 (75), 256 (11), 229 (70), 228 (100), 242 (15)
Erisotina	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	317 (8), 286 (14), 259 (93), 258 (23), 243 (100), 242 (26)
Erisotinona	OH	OCH ₃	OCH ₃	O	H	315 (3), 257 (75), 256 (11), 229 (70), 228 (100), 242 (15)
Eritroculina	OCH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₃	H	H	343 (7), 328 (0,5), 312 (13), 285 (100)
Eritroculinol	OCH ₃	CH ₂ OH	OCH ₃	H	H	315, 284, 257 (100), 238, 226
Eritlaurina	OCH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₃	H	OH	359, 328, 301 (100)
Eritratidinona	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	O	H	329, 301, 298, 286, 272, 271 (100), 243, 242, 228, 215, 214, 197

^aAMER *et al.*, 1991.

Já em alcaloides dienoides (ligações duplas entre os carbonos 1 e 2 e entre os carbonos 6 e 7) não é possível a ocorrência da reação de RDA. Nota-se que o sistema dienóide é lábil para ejeção de elétron e fragmenta-se por uma clivagem α -alílica que origina um íon dí-alílico estável, o qual geralmente é o fragmento majoritário do espectro (Figura 6B) (BOAR *et al.*, 1970; MILLINGTON *et al.*, 1974). Dessa forma, o pico base de derivados eritrínicos da subclasse dienóide grupo metoxila na posição 3 ($R_3 = \text{OCH}_3$) é originado a partir de clivagem α -alílica $[M^{*+} - 31]$ do íon molecular, com perda de radical metóxi nesta posição, conforme apresentado nos perfis de fragmentação de dienoides na Tabela 9 e Figura 6B. Nos derivados com grupamento hidroxila na posição 3 ($R_3 = \text{OH}$), o fragmento majoritário do espectro de massas forma-se a partir de clivagem α -alílica $[M^{*+} - 17]$ do íon molecular com a perda do radical hidróxi, como observado nas fragmentações de dienoides da Tabela 9 e Figura 6B. Esses padrões de fragmentação são fundamentais para distinção das subclasses alcenoide e dienóide dos alcaloides eritrínicos.

Tabela 9 - Padrões de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse dienóide

Alcaloide eritrínico				m/z^a
	R_1	R_2	R_3	
Erisotrina	OCH_3	OCH_3	OCH_3	313(84), 298 (81), 282 (100)
Eritravina	OCH_3	OCH_3	OH	299 (94), 282 (100), 280 (17), 266 (23)
Erisovina	OCH_3	OH	OCH_3	299 (39), 284 (41), 268 (100)
Erisolina	OCH_3	OH	OH	285 (100), 268 (89), 266 (21), 254 (11)
Erisonina	OH	OCH_3	OH	285 (100), 268 (89), 266 (21), 254 (11)
Eritralina	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$		OCH_3	297, 282, 266 (100), 264, 239, 225, 212

^aAMER *et al.*, 1991

Com base nessas informações, o reconhecimento dos padrões de fragmentação dos constituintes das frações alcaloídicas em conjunto com a abundância de dados com ionização por elétrons de alcaloides eritrínicos publicados na literatura e associação com os dados de IES-EM em alta resolução obtidos permitiram a identificação dos alcaloides eritrínicos nos extratos analisados.

4.1.2 - Identificação dos alcaloides eritrínicos e análise dos perfis alcaloídicos nos extratos de *E. verna*

A análise dos dados de CG-EM das frações alcaloídicas de mulungu do produtor comercial A conduziu à identificação de dez alcaloides em comum nos extratos A1 e A2: erisodina (1), eritrina (2), eritralina (3), erisotrina (4), erisovina (7), eritratidina e seu possível epímero (8 e 10), os isômeros 11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina (9) e isômeros da subclasse dienoide com fórmula molecular $C_{18}H_{19}NO_4$ (12 e 13), como pode ser visto na comparação dos perfis cromatográficos destes lotes na Figura 7. As estruturas desses alcaloides são apresentadas na Figura 8. No entanto, é possível observar a inconstância do marcador químico majoritário nos extratos A1 e A2, visto que no extrato A1 o componente majoritário é a erisovina (7), enquanto no extrato de A2 o alcaloide majoritário é a eritralina (3) (Figura 7). Essa variação pode ser decorrente da influência de fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento ou cultivo em ambientes distintos na produção de metabólitos secundários, como observado em várias espécies (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A erisovina (7) e a eritralina (3) estão entre os alcaloides amplamente distribuídos no gênero *Erythrina*, como mostrado na Tabela 1 (item 1.3).

A análise dos dados CG-EM dos extratos dos dois lotes adquiridos do produtor comercial B revelou a presença dos alcaloides erisotrina (4), eritradina ou epieritratidina (8), 3-demetoxi-eritratidinona (24), eritratidinona (28) e seu isômero (25) em comum nessas frações alcaloídicas (Figura 7). Além disso, verificou-se nos cromatogramas de B1 e B2 mostrados na Figura 7 a constância do marcador químico majoritário nesses extratos, o qual foi identificado como eritratidinona (28). As estruturas dos alcaloides identificados nos extratos lotes do fornecedor B são mostradas na Figura 8.

Na comparação dos perfis alcaloídicos entre os produtores comerciais A e B, verificou-se que os alcaloides erisodina (1), eritralina (3) e erisotrina (4) estão presentes nos extratos de A1 e B2 (Figura 7). Contudo, nota-se que nos extratos de B2 estes alcaloides são minoritários, ao passo que a eritratidinona (28) representa o alcaloide majoritário em ambos os lotes de B e não foi identificada nos extratos de A (Figura 7). Assim, verifica-se diferença no perfil de alcaloides presentes nas cascas de mulungu dos diferentes produtores comerciais analisados neste trabalho. Além da variação dos marcadores químicos, observou-se também a discrepância dos rendimentos em massa das frações alcaloídicas obtidas por EAB entre os dois produtores comerciais (Tabela 10), o que sugere diferentes teores de alcaloides nos materiais vegetais comercializados. Estes resultados alertam para os riscos aos quais os usuários de preparações medicinais a partir dessas cascas estão expostos, uma vez que a

variação qualitativa dos marcadores químicos e do teor destes nos extratos podem resultar em ineficácia terapêutica e/ou toxicidade da planta medicinal. No caso dos medicamentos fitoterápicos, a utilização de matérias-primas com baixos teores de alcaloides pode proporcionar uma dosagem abaixo da necessária para eficácia, o que contribui para redução do efeito do medicamento (BARA *et al.*, 2006).

É interessante notar que no extrato da espécie nativa de *E. verna* foram identificados cinco alcaloides em comum com os extratos dos lotes B1 e B2: erisotrina (4), eritratidina ou *epi*-eritratidina (8), 3-demetoxi-eritratidinona (24), e eritratidinona (28) e seu isômero (25), sendo que a eritratidinona (28) é o alcaloide majoritário no extrato da espécie nativa e pode ser usado como marcador químico de *E. verna* (Figura 7). Já na comparação dos perfis alcaloídicos do mulungu nativo e das cascas do fornecedor A, observou-se que apenas a erisotrina (4) está presente em ambos os materiais vegetais, como é visto na Figura 7. Esses resultados indicam uma maior homogeneidade entre o conteúdo de metabólitos secundários da espécie nativa e produtor comercial B. No entanto, a análise dos rendimentos em massa das frações alcaloídicas obtidas por EAB das cascas de B e da espécie nativa também são discrepantes (Tabela 10). Essa observação sugere novamente que os teores de alcaloides foram variáveis entre cascas de *E. verna* comercializadas e da espécie nativa, o que representa problemas na utilização de preparações e medicamentos a partir das cascas de mulungu.

Tabela 10 - Rendimentos em massa das frações alcaloídicas obtidas por EAB das cascas da espécie nativa e dos lotes dos fornecedores A e B de *E. verna*

Fornecedor	Lote	Rendimento (%)
A	A1	0,91
	A2	0,96
B	B1	0,13
	B2	0,17
<i>E. verna</i> nativa		3,1

As diferenças nos perfis dealcaloides eritrínicos e no teor destes nas cascas comercializadas por diferentes produtores comerciais podem estar relacionadas às condições do ambiente em que as plantas são cultivadas, uma vez que os metabólitos secundários representam a interação química da planta com o ambiente. É importante ressaltar que são relatadas variações sazonais de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como flavonoides, cumarinas, saponinas, lactonas sesquiterpênicas, taninos, óleos essenciais

e também os alcaloides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Sugere-se ainda que a diferença de marcadores erirínicos identificados nas cascas dos diferentes produtores comerciais pode estar relacionada ao fato de que do nome popular mulungu é usado para designar diferentes espécies do gênero *Erythrina*, o que pode resultar em equívocos na identificação das cascas de *E. verna* comercializadas e, conseqüentemente, comercialização de espécies distintas deste gênero com o nome de *E. verna*.

E. verna nativa

Figura 7 - Regiões dos perfis cromatográficos em CG-EM dos extratos das cascas de *E. vernanativa* e dos produtores comerciais nas quais foram identificados os alcaloides eritrínicos. 1: erisodina, 2: eritrinina, 3: eritralina, 4: erisotrina, 5: NI, 6: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_3$), 7: erisovina, 8: eritratidina/*epi*-eritratidina, 9: 11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina, 10: eritratidina/*epi*-eritratidina, 11: erisotina ou esrisosalvina, 12: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_4$ ou $C_{18}H_{23}NO_4$), 13: dienoide ($C_{18}H_{19}NO_4$ ou $C_{18}H_{23}NO_4$), 14: NI, 15: NI, 16: NI, 17: NI, 18: NI, 19: NI, 20: NI, 21: NI, 22: 8-oxoeritralina, 24: 3-demetoxi-eritratidinona, 25: alcenoide ($C_{19}H_{23}NO_4$), 26: alcenoide ($C_{19}H_{23}NO_4$), 27: 11-hidroxi-eritratidinona, 28: eritratidinona, 31: NI, 32: NI, 33: NI, 34: NI, 35: NI, 36: NI, 37: NI. NI: não identificado.

Figura 8 - Alcaloides eritrínicos identificados nos extratos alcaloídicos de *E. verna*.

4.1.2.1 - Alcaloides eritrínicos identificados nos extratos de *E. verna* do produtor comercial A

No perfil de fragmentação da substância 1 foi observado que o íon molecular de m/z 299 fragmenta-se por clivagem α -alílica e origina o pico base do espectro em m/z 268 (Tabela 11). A formação do íon molecular através da perda de 31 u é característico de alcalenoides com grupometoxila na posição 3. SINGH e colaboradores (1981) publicaram dados de IES-EM, IV e RMN ^1H dos isômeros dienoides erisovina e erisodina, cujas estruturas diferem pela posição dos substituintes metoxila e hidroxila nas posições R_1 e R_2 (Figura 8). Verificou-se que os íons majoritários do espectro de massas da substância 1 em m/z 299, 284, 269 e 268 (100), estão de acordo com os perfis de fragmentação descritos para estes isômeros. Em seguida, na análise do espectro de IES-EM em alta resolução da fração alcaloídica do extrato de A1 mostrado na Figura 9 observou-se um íon intenso de m/z 300,1630 $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondente à fórmula molecular protonada $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+$ com erro de 1,0 ppm, o que confirmou presença de um alcaloide com fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ no extrato A1, a qual é condizente com os isômeros erisodina e erisovina (Tabela 12). Observou-se também que a substância 7 apresentou fragmentações idênticas às verificadas no perfil de fragmentação do alcaloide 1, sendo que as intensidades dos íons nos perfis das substâncias 1 e 7 também são semelhantes (Tabela 11). Esses dados sugerem a presença dos isômeros erisovina e erisodina no extrato A1. No entanto, os dados de espectrometria de massas obtidos foram insuficientes para distinção dos isômeros, razão pela qual realizou-se o isolamento e determinação estrutural do alcaloide 7 por RMN, o qual foi caracterizado como erisovina (Figura 8). Assim, estes resultados sugerem que a substância 1 corresponde ao alcaloide erisodina (Tabela 11).

Na análise do perfil de fragmentação da substância 2 observou-se a fragmentação do íon molecular de m/z 295 através de clivagem α -alílica $[\text{M}^+-31]$, o que originou o íon majoritário do espectro em m/z 264 (Tabela 11) e classifica esta estrutura como dienóide com metoxila na posição 3. Entretanto, notou-se no espectro de ionização por eletrospray em alta resolução do extrato A1 mostrado na Figura 9 um íon de m/z 314,1499 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}^+$, erro de 3,4 ppm ou $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}^+$, erro de 8,2 ppm) referente às fórmulas moleculares $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}$ e $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$ (Tabela 12). Posteriormente, ocorreu o isolamento da substância 2 a partir do extrato A2 e os dados da determinação estrutural através de RMN sugeriram que este alcaloide corresponde a eritrinina ($\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}$), um derivado eritrínico dienóide com hidroxila na posição 11, o qual tem a estrutura apresentada na Figura 8. Com base nesses resultados, sugere-se que a ausência de íon molecular de m/z 313 no espectro de ionização por elétrons deste alcaloide seja decorrente da eliminação de uma molécula de água $[\text{M}^+-18]$ na fonte de

ionização relacionada à presença de hidroxila em C-11, o que origina o íon de m/z 295. Em seguida, o íon de m/z 295 fragmenta-se para originar o pico base do espectro em m/z 264, como pode ser observado na Tabela 11.

Verificou-se que os íons formados na fragmentação das substâncias 12 e 13 são idênticos, sendo que ocorre diferença apenas nas intensidades desses íons nos perfis de fragmentação dessas substâncias, o que sugere que estas sejam isômeros (Tabela 11). Observou-se também que o pico base do espectro dessas substâncias é originado a partir da clivagem α -alílica [$M^{*+} - 31$] do íon molecular em m/z 313 (Tabela 11), o que indica que são alcaloides da subclasse dienoide com metoxila em C-3. No espectro de IES-EM em alta resolução do extrato A1 (Figura 9) nota-se a presença do íon de m/z $[M+H]^+ 314,1499$ ($C_{18}H_{20}O_4N^+$, erro de 3,4 ppm ou $C_{19}H_{24}O_4N^+$, erro de 8,2 ppm) relacionado às fórmulas moleculares $C_{18}H_{19}O_4N$ e $C_{19}H_{23}O_4N$, correspondentes a isômeros da subclasse dienoide de massa 313 Da no extrato do fornecedor A1 (Tabela 12).

Embora a substância 4 não tenha apresentado perfil de fragmentação idêntico aos isômeros 12 e 13, os dados da Tabela 11 mostram que o pico base do espectro desta substância em m/z 282 também é originado por clivagem α -alílica [$M^{*+} - 31$] do íon em m/z 313, o que sugeriu a presença de outro isômero dienoide com fórmula molecular $C_{18}H_{19}O_4N$ ou $C_{19}H_{23}O_4N$ no extrato A1. Contudo, os íons majoritários do espectro do alcaloide 4 em m/z 313, 298 e 282 apresentados na Tabela 11 estão de acordo com perfil de fragmentação da erisotrina mostrado na Tabela 9, o que sugere a presença deste alcaloide no extrato A1. Dessa forma, a substância 4 foi identificada como erisotrina, cuja fórmula molecular é $C_{19}H_{23}O_4N$ (Tabela 12). A erisotrina foi anteriormente relatada em *E. verna* por SARRAGIOTTO e colaboradores (1981).

As substâncias 3 e 6 também apresentaram clivagem α -alílica [$M^{*+} - 31$] do íon molecular em m/z 297 para formar o pico base do espectro em m/z 268 (Tabela 11), o que sugere a presença de metoxila em C-3 desta estrutura dienoide. Além do padrão de fragmentação estas substâncias apresentaram em comum os demais íons de suas fragmentações, com diferença apenas nas intensidades relativas, o que sugere que 3 e 6 sejam isômeros (Tabela 11). Os íons majoritários de m/z 297, 282, 266 e 264 dos espectros de massas das substâncias 3 e 6 (Tabela 11) estão em concordância com a fragmentação da eritralina (AMER *et al.*, 1991). Os dados de IES-EM em alta resolução do extrato A1 mostrados na Figura 9 sugeriram a presença de eritralina nesta fração alcaloídica, uma vez que foi observado um íon em m/z $[M+H]^+ 298,1445$ referente a molécula protonada deste

alcaloide ($C_{18}H_{20}NO_3^+$, erro de 6,1 ppm), conforme mostrado na Tabela 12. Dessa forma, o conjunto de dados espectrométricos sugeriu que os alcaloides 3 e 6 correspondem a isômeros da eritralina, cuja estrutura é mostrada na Figura 8. Os dados de IE-EM também indicaram a presença de eritralina no extrato A2 (Tabela 11), sendo que este alcaloide foi posteriormente isolado a partir do extrato A2 e teve sua estrutura determinada por RMN.

As substâncias 8 e 10 apresentaram as mesmas fragmentações, sendo notada diferença apenas nas intensidades dos íons em seus espectros, o que sugere a presença de isômeros no extrato (Tabela 11). Além disso, estas substâncias mostraram em comum uma reação de RDA $[M^+ - 58]$ no íon molecular em m/z 331 para originar o íon em m/z 273 (Tabela 11), o que sugere um alcaloide de estrutura alcenoide com metoxila em C-3. Os dados de IE-EM das substâncias 8 e 10 estão de acordo com o perfil de fragmentação reportado no trabalho de MILLINGTON e colaboradores (1974) para a eritratidina, um alcaloide eritrínico alcenoide com hidroxila na posição 2, cuja estrutura é mostrada na Figura 8. Em adição a esses dados, o íon em m/z 332,1732 $[M+H]^+$ observado no espectro de IES-EM em alta resolução de A1 (Figura 9), corresponde a fórmula molecular protonada $C_{19}H_{26}NO_4^+$ referente a eritratidina, com erro de 3,9 ppm, o que também sugere a presença deste alcaloide no extrato A1 (Tabela 12). BARTON e colaboradores (1973) publicaram dados de IE-EM em conjunto com dados de RMN da eritratidina e seu epímero, a *epi*-eritratidina, sendo possível observar íons idênticos nos perfis de fragmentação dessas substâncias. Com base nesses resultados, sugere-se que as substâncias 8 e 10 correspondam a eritratidina e a *epi*-eritratidina (Tabela 11), sendo que a epimerização pode estar relacionada ao centro estereogênico C-2 devido à ocorrência do tautomerismo ceto-enólico no anel A.

Para identificação das substâncias 9 e 11 foram investigados com mais detalhes dados espectrométricos de alcaloides alcenoides. Assim, observou-se nas fragmentações descritas na literatura para alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide com hidroxila na posição 2, como eritratidina, erisosalvina, erisopitina, erisotina e eritratina (GHOSAL *et al.*, 1972; ITO *et al.*, 1973; BARTON *et al.*, 1973; MILLINGTON *et al.*, 1974) que a reação de RDA não origina o pico base, como pode ser observado na Tabela 11. Porém, na fragmentação do eritroculinol descrita por INUBUSHI e colaboradores (1970) verificou-se que o íon em m/z 257 originado pela reação de RDA é o pico base do espectro (Tabela 11), enquanto no espectro de massas das substâncias 9 e 11 este íon não representa o pico base (Tabela 12). Em complemento a essas informações, tanto no perfil de fragmentação das substâncias 9 e 11 como no da eritratidina e de seu possível epímero foi observada redução na intensidade dos íons moleculares desses alcaloides, sendo que não foi possível observar os íons moleculares no

perfil de fragmentação da eritratidina e de seu possível epímero identificados no extrato A2 (Tabela 11). A redução nas intensidades de íons moleculares de alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide com substituinte oxigenado na posição 2 também foi verificada nos estudos de MILLINGTON e colaboradores (1974). Dessa forma, sugere-se que a presença de hidroxila em C-2 seja outro ponto para início de fragmentação dos eritrínicos alcenoides, haja vista que essa clivagem origina uma via de fragmentação distinta da iniciada pela reação de RDA. A presença de hidroxila em C-2 também pode estar relacionada às fragmentações subseqüentes ao íon formado pela reação de RDA para formação do pico base do espectro dos alcaloides 8, 9 e 10, o que está discutido em detalhes com mecanismos de fragmentação propostos no item 4.2.1 deste trabalho.

No perfil de fragmentação da substância 11 notou-se a ocorrência da reação de RDA com perda de 58 u na fragmentação do íon molecular em m/z 317 para formar o íon em m/z 259, um dos majoritários do espectro (Tabela 11), o que é característico de alcaloides alcenoides com metoxila em C-3. O perfil de fragmentação da substância 11 observado corresponde às fragmentações descritas por MILLINGTON e colaboradores (1974) para os isômeros alcenoides com hidroxila em C-2 erisotina e erisosalvina mostrados na Tabela 9, com destaque para as baixas intensidades dos íons moleculares desse alcaloides. Os dados de IES-EM em alta resolução também sugerem a presença de um desses isômeros, erisotina e erisosalvina, no extrato A1, pois observou-se um íon de m/z 318,1696 $[M+H]^+$ (Figura 9), o qual corresponde a fórmula molecular protonada $C_{18}H_{24}NO_4^+$ desses alcaloides, com erro de 2,9 ppm (Tabela 12). As estruturas dos isômeros erisotina e erisosalvina são mostradas na Figura 8. Porém, apenas os dados espectrométricos obtidos não permitiram distinção do isômero presente no extrato A1.

A substância 9 apresentou ocorrência da reação de RDA com perda de 58 u do íon em m/z 315 para formação do íon em m/z 257 (Tabela 13), o que sugere a presença da metoxila na posição 3 deste alcaloide alcenoide. Foi observado também baixa intensidade do íon molecular e que a reação de RDA não originou o pico base do espectro da substância 9, o que sugere substituinte oxigenado na posição 2. No espectro de IES-EM em alta resolução do extrato A1 (Figura 9), foi observado um íon em m/z 334,1701 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{24}O_5N^+$, erro de 1,4 ppm), o qual refere-se a fórmula molecular $C_{18}H_{23}NO_5$ correspondente aos isômeros 11-hidroxierisotina e 11-hidroxi-erisosalvina (Tabela 12). Assim, sugere-se a ocorrência de desidratação desta molécula na fonte de ionização, o que impossibilita a visualização do íon molecular em m/z 333 no espectro. Esta desidratação origina o íon em m/z 315, o qual inicia

as vias de fragmentação propostas no item 4.2.1 deste trabalho, as quais sugerem a presença dos isômeros 11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina no extrato de A1.

A substância 22 apresentou um íon em m/z 280, o qual é formado a partir de clivagem α -alílica $[M^{*+} - 31]$ do íon molecular em m/z 311, o que sugere um alcaloide dieonoide com metoxila em C-2 (Tabela 11). Este alcaloide foi identificado apenas no extrato A2, a partir do qual foi isolado e identificado através da análise estrutural por RMN como 8-oxoeritralina, um alcaloide dienoide com carbonila na posição 8 (Figura 8).

A análise dos dados de IE-EM da substância 18 mostrou a ocorrência de clivagem α -alílica $[M^{*+} - 31]$ do íon em m/z 309 para formação do íon em m/z 278 (Tabela 11), o que sugere uma estrutura dienoide. Os íons em m/z 309, 294, 278 e 276 do perfil do espectro deste alcaloide estão de acordo com o perfil de fragmentação do alcaloide eritrínico cristamidina, também conhecido como 10,11-desidro-8-oxoeritralina (ITO *et al.*, 1976), cuja estrutura apresenta o sistema dionoide com carbonila na posição 8. Observa-se também que a clivagem α -alílica do alcaloide 18 não origina o pico base do espectro, a exemplo do perfil de fragmentação da 8-oxoeritralina. Apesar dos dados de IE-EM sugerirem a presença da cristamidina no extrato A2, não foram obtidos dados de IES-EM em alta resolução do extrato A2.

Os fragmentos majoritários dos espectros das substâncias 5, 14 e 20 em m/z 286, 266 e 300, respectivamente, podem ser originados a partir das perdas de 31 u dos íons em m/z 301, 297 e 331, respectivamente (Tabela 11), o que pode estar relacionado a ocorrência de clivagem α -alílica nas fragmentações dessas substâncias. No entanto, não houve correspondência dos perfis de fragmentação destas substâncias com os perfis de fragmentação de derivados eritrínicos descritos na literatura. Assim, os dados de IE-EM obtidos para essas substâncias não permitiram suas identificações.

Não foram identificados os padrões de fragmentação conhecidos para subclasses de alcaloides eritrínicos nos espectros de massas das substâncias 15, 16, 18, 19 e 20 (Tabela 11) e não foi observada correspondência dos íons dos perfis de fragmentação desses alcaloides com perfis publicados na literatura.

Tabela 11 - Dados de IE-EM dos constituintes dos extratos de mulungu do produtor comercial A

Pico	Alcaloide	Tr (min) A1	Tr (min) A2	m/z (IE-EM) A1	m/z (IE-EM) A2
1	Erisodina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	29,66	30,19	299 (37), 284 (36), 269 (27), 268 (100), 266 (19), 253 (12), 241 (11), 228 (13) 215 (23)	299 (39), 284 (32), 269 (28), 268 (100), 266 (17), 253 (14), 241 (14), 228 (12), 215 (25)
2	Eritrinina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	29,84	30,39	295 (30), 280 (39), 265 (28), 264 (100), 262 (21), 224 (16), 211 (29)	295 (38), 280 (33), 265 (27), 264 (100), 262 (20), 224 (16), 211 (31)
3	Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	30,67	31,10	297 (31), 282 (32), 267 (24), 266 (100), 264 (24), 239 (10), 226 (16), 213 (25)	297 (38), 282 (31), 267 (27), 266 (100), 264 (23), 239 (13), 226 (15), 213 (26)
4	Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	30,77	--	313 (34), 298 (35), 283 (29), 282 (100), 280 (16), 229 (17)	--
5	NI	31,75	--	301 (44), 287 (21), 286 (97), 271 (27), 270 (84), 257 (24), 242 (19), 216 (20)	--
6	Dienoide (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	31,93	--	297 (31), 282 (38), 267 (31), 266 (100), 264 (16), 239 (13), 226 (13), 213 (17)	--
7	Erisovina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	33,01	33,21	299 (36), 284 (33), 269 (26), 268 (100), 266 (18), 253 (11), 241 (10), 228 (10), 215 (16)	299 (40), 284 (31), 269 (28), 268 (100), 266 (17), 253 (12), 241 (13), 228 (10), 215 (17)
8	Eritratidina ou epieritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	34,08	34,41	331 (5), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 258 (27), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)	300 (1), 273 (45), 272 (4), 258 (20), 257 (100), 256 (52), 244 (58), 242 (8)
9	11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₃)	34,46	34,78	315 (8), 284 (12), 257 (57), 256 (32), 242 (16), 241 (100), 240 (77), 228 (84)	315 (9), 284 (13), 257 (52), 256 (19), 242 (15), 241 (100), 240 (79), 228 (76)
10	Eritratidina ou epieritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	34,71	35,04	331 (2), 300 (11), 273 (79), 272 (20), 258 (29), 257 (100), 256 (45), 244 (80), 242 (14)	300 (9), 273 (63), 272 (20), 258 (27), 257 (100), 256 (45), 244 (78), 242 (12)
11	Erisotina ou Erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	36,01	--	317 (7), 286 (11), 259 (46), 258 (14), 243 (100), 242 (80)	--

Tabela 11- continuação

Pico	Alcaloide	Tr (min) A1	Tr (min) A2	m/z (IE-EM) A1	m/z (IE-EM) A2
12	Dienoide (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ ou C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	36,35	36,58	313 (42), 298 (22), 283 (26), 282 (100), 280 (36), 264 (37), 262 (23), 255 (15), 224 (19), 211 (17)	313 (44), 298 (22), 283 (29), 282 (100), 280 (36), 264 (36), 262 (24), 255 (15), 224 (17), 211 (17)
13	Dienoide (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ ou C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	36,67	--	313 (43), 298 (25), 283 (30), 282 (100), 280 (39), 264 (40), 262 (26), 255 (18), 224 (23), 211 (22)	--
14	NI	37,34	--	297 (44), 293 (17), 282 (29), 267 (24), 266 (100), 265 (19), 264 (42), 248 (31), 240 (19), 222 (24), 219 (18), 213 (15)	--
15	NI	37,51	--	266 (19), 265 (100), 250 (59), 222 (33), 204 (20)	--
16	NI	--	37,54	--	294 (10), 293 (70), 249 (14), 248 (100), 220 (24), 191 (22)
17	NI	37,77	--	258 (14), 257 (83), 256 (57), 255 (73), 240 (23), 227 (18), 226 (100)	--
18	NI	--	38,40	--	309 (46), 294 (11), 280 (14), 278 (49), 277 (48), 276 (100), 266 (30), 250 (56), 248 (17), 238 (15)
19	NI	38,68	38,86	331 (4), 258 (16), 257 (91), 256 (62), 255 (82), 240 (23), 227 (19), 226 (100)	258 (17), 257 (93), 256 (63), 255 (72), 240 (24), 227 (20), 226 (100)
20	NI	--	38,94	--	264 (21), 263 (100), 257 (18), 234 (19), 226 (19), 205 (17), 204 (19)
21	NI	39,01	--	331 (29), 314 (17), 300 (97), 295 (45), 257 (15), 256 (66), 248 (38), 243 (28), 242 (57), 228 (20), 226 (42), 220 (19), 215 (16), 214 (100), 213 (51)	--

Tabela 11- conclusão

Pico	Alcaloide	Tr (min) A1	Tr (min) A2	m/z (IE-EM) A1	m/z (IE-EM) A2
22	8-oxoeritralina (C ₁₈ H ₁₇ NO ₄)	--	39,77	--	311 (86), 296 (44), 280 (56), 279 (51), 278 (100), 268 (20), 266 (19), 252 (26), 251 (31), 250 (52)

Tr: tempo de retenção.NI: não identificado

Figura 9 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato A1.

Tabela 12 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritínicos identificados no extrato de *E. verna* do lote A1

Alcaloide	Fórmula [M+H] ⁺	Massa observada m/z [M+H] ⁺	Massa calculada m/z [M+H] ⁺	Erro (ppm)
Erisovina e erisodina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃ ⁺	300,1630	300,159969	1,0
Eritrinina e isômeros dienoides (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ ⁺	314,1499	314,139233	3,4
Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃ ⁺	298,1445	298,144319	0,6
Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	314,1499	314,175619	8,2
Eritratidina/ <i>epi</i> -eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	C ₁₉ H ₂₆ NO ₄ ⁺	332,1732	332,186183	3,9
11-hidroxi-erisotina ou 11-hidroxi-erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₅)	C ₁₈ H ₂₃ O ₅ N ⁺	334,1701	334,165448	1,4
Erisotina ou Erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ ⁺	318,1696	318,170533	2,9

4.1.2.2 - Alcaloides eritrínicos identificados nos extratos de *E. verna* do produtor comercial B

Como discutido na análise dos perfis de fragmentações dos alcaloides presentes nos extrato do fornecedor A, além do reconhecimento de padrões de fragmentação para distinção das subclasses dienoide e alcenoide, são necessárias informações espectrométricas adicionais para identificação dealcaloides alcenoides com grupamento oxigenado na posição 2. Um trabalho detalhado sobre fragmentação de derivados eritínicos em IE-EM publicado por MILLINGTON e colaboradores (1974) demonstrou que os íons moleculares têm suas intensidades reduzidas para valores inferiores a 5 % ou estão ausentes no espectro de massas em alcaloides alcenoides com grupo carbonila na posição 2. A redução na intensidade dos íons moleculares ocorre devido à formação de uma via de fragmentação originada a partir de uma clivagem α -carbonila, a qual é distinta da via originada pela reação de RDA. Essas considerações foram importantes para identificação dos congêneres alcenoides com carbonila em C-2 presentes nos extratos do fornecedor B.

A análise do espectro de massas da substância 28 mostrou a ocorrência da reação de RDA $[M^+ - 58]$ na fragmentação do íon molecular em m/z 329 para formação do íon majoritário do espectro em m/z 271 (Tabela 13), como esperado para a subclasse alcenoide. O perfil de fragmentação desta substância foi comparado ao perfil da eritratidinona mostrado na Tabela 9 e sugere a presença deste alcaloide nos extratos B1 e B2. Além disso, a baixa intensidade do íon molecular da substância 28 indica a presença do grupamento carbonila em C-2 conforme apresentado por MILLINGTON e colaboradores (1974). Além dos dados de ionização por elétrons, o íon em m/z 330,1699 $[M+H]^+$ visto no espectro de IES-EM em alta resolução do extrato B1 (Figura 10) corresponde a fórmula molecular protonada $C_{19}H_{24}NO_4^+$ (erro de 1,9 ppm) a qual está de acordo com a eritratidinona, o que também sugere a presença deste alcaloide nos extratos do produtor comercial B (Tabela 14). A eritratidinona foi identificada como alcaloide majoritário nos dois lotes do extrato do produtor comercial B analisados e tem sua estrutura mostrada na Figura 8. A substância 26, observada apenas no extrato B2, apresentou íons idênticos e de intensidade semelhantes aos verificados no perfil de fragmentação da eritratidinona, exceto a ausência do íon molecular em m/z 329, como pode ser visto na Tabela 13, o que é característico dos alcenoides com carbonila em C-2. Assim, sugere-se que as substâncias 26 e 28 sejam isômeros. A substância 25 foi observada em ambos extratos de B e também apresentou fragmentos idênticos e com intensidades

semelhantes aos das substâncias 26 e 28, como verificado na Tabela 13, o sugere que a substância 25 seja um outro isômero da eritratidinona.

Os íons observados no perfil de fragmentação da substância 27 correspondem exatamente aos íons observados na fragmentação da eritratidinona com a diferença de 2 *u* em cada fragmento (Tabela 13). Contudo, não se observa o íon molecular no espectro de massas devido a perda de uma molécula de água desta substância na fonte de ionização, como discutido anteriormente no perfil de fragmentação da eritrinina. O trabalho de FLAUSINO JR e colaboradores (2007a) relatou a presença do alcaloide eritrínico da subclasse dienoide 11- α -hidroxieritratidina nas flores de *E. verna*, o que sugere que o carbono 11 é um dos sítios de oxidação. A eritrinina isolada e identificada no presente trabalho também apresenta hidroxilação na posição 11, conforme visto na Figura 8. Com base nessas informações e nos dados espectrométricos obtidos, sugere-se que a substância 27 possui a estrutura de um alcenoide com oxidação nos carbonos 2 e 11, sendo que no carbono 2 tem-se o grupamento carbonila e no carbono 11 há presença de hidroxila. Dessa forma, este alcaloide eritrínico pode ser denominado como 11-hidroxieritratidinona, a qual é reportada pela primeira vez como produto natural e tem sua estrutura sugerida na Figura 8. Esta proposta é corroborada pela presença de um íon com m/z 346,1642 $[M+H]^+$ no espectro de IES-EM em alta resolução do extrato B1 (Figura 10), correspondente a fórmula molecular protonada $C_{19}H_{24}NO_5^+$, com erro de 3,6 ppm, a qual é compatível com a fórmula molecular de da 11-hidroxieritratidinona, $C_{19}H_{23}NO_5$ (Tabela 14).

Na observação do perfil de fragmentação da substância 24, notou-se o pico base do espectro em m/z 271, mas não foi possível identificar o íon a partir do qual esse fragmento foi originado (Tabela 13). Contudo, foi verificado no espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução mostrado na Figura 10 um íon de m/z 300,1590 $[M+H]^+$, correspondente a fórmula molecular protonada $C_{18}H_{22}NO_3^+$, com erro de 3,2), o que sugeriu a presença de um alcaloide com fórmula molecular $C_{18}H_{22}NO_3$ de massa 299 Da no extrato (Tabela 14). A partir desses dados, sugere-se a ausência do íon molecular em m/z 299 no espectro de IE-EM deste alcaloide, como observado em alcenoides que apresentam grupamentos oxigenados em C-2. Assim, construiu-se a hipótese que o íon em m/z 299 fragmenta-se por RDA com a perda de 28 *u* para formar o pico base do espectro, sendo que esta perda está possivelmente relacionada a uma molécula neutra de eteno. Nesse caso, nota-se que a reação de RDA neste não ocorreu com a perda de 58 *u*, o que sugere ausência de grupo metoxila na posição 3 da substância 24. Diante dessas informações, os resultados das análises espectrométricas sugerem que a substância 24 corresponde a um alcaloide da

subclasse alcenoide com ausência de substituinte em C-3 e fórmula molecular $C_{18}H_{21}NO_3$, sendo que estes dados estão de acordo com a 3-demetoxi-eritratidinona, cuja estrutura é apresentada na Figura 8. As propostas dos mecanismos de fragmentação com ionização por elétrons que podem auxiliar na identificação de alcaloides alcenoides com carbonila na posição 2 são discutidas no item 4.2.2 desse trabalho.

Os perfis de fragmentação da substância com $Tr = 34,44$ min, presente nos extratos de B1, e das substâncias com $Tr = 34,02$ min, $Tr = 34,66$ min, verificadas no extrato de B2 (Tabela 13), correspondem ao perfil observado para eritratidina previamente identificada no extrato do lote A1 de mulungu do produtor comercial A (Tabela 11). No espectro de IES-EM em alta resolução do extrato B1 exibido na Figura 10, é possível observar um íon em m/z 332,1837 $[M+H]^+$, o qual corresponde a fórmula molecular protonada da eritratidina $C_{19}H_{26}NO_4^+$, com erro de 7,6 ppm (Tabela 14), o que também sugere a presença desse alcaloide e de seu possível epímero nos extratos de B.

O perfil de fragmentação do componente do extrato B2 com $Tr = 29,55$ min observado na Tabela 13 apresenta os mesmos íons verificados na fragmentação dos isômeros erisodina (1) e erisovina (7) identificados nos extratos do fornecedor A (Tabela 11). A similaridade do tempo de retenção desta substância no extrato B2 com o tempo de retenção da erisodina ($Tr = 29,55$ min) previamente identificada em A1 e A2 (Tabela 11) sugere a presença deste alcaloide também no extrato B2.

Notou-se também os íons da fragmentação da substância com $Tr = 30,50$ min do extrato B2 observado na Tabela 13 são os mesmos vistos no perfil de fragmentação da eritralina (Tabela 11), sendo que além dos dados espectrométricos, pode ser verificada também a correspondência do tempo de retenção desta substância no extrato B2 com os tempos de retenção da eritralina identificada nos extratos A1 ($Tr = 30,67$ min) e A2 ($Tr = 31,10$ min) exibidos na Tabela 11, o que sugere a presença deste alcaloide na fração alcaloídica B2 (Tabela 13).

A erisotrina, anteriormente identificada no extrato A1, também está presente no extrato B1 com $Tr = 31,31$ min e B2 com $Tr = 30,71$ min, conforme observado na Tabela 13. A confirmação deste alcaloide nos extratos do fornecedor B ocorreu através da observação do íon em m/z 314,1741 $[M+H]^+$ no espectro de ionização por eletrospray em alta resolução do extrato B1 (Figura 10), o qual está de acordo com a fórmula molecular $C_{19}H_{24}NO_3^+$, referente a erisotrina, com erro de 4,8 ppm (Tabela 14).

O pico base do espectro da substância 30 em m/z 296 é formado através da perda de 31 u do íon em m/z 327. Contudo, não verificou-se correspondência dos dados de fragmentação

dessa substância com perfis de fragmentação de alcaloides eritrínicos presentes na literatura. Assim, não é há dados suficientes para sugerir que a perda de 31 *u* esteja relacionada a uma clivagem α -alílica na fragmentação desta substância.

O íon majoritário do espectro da substância 33 em *m/z* 269 pode ser originado a partir da perda de 58 *u* do íon de *m/z* 327 (Tabela 13), o que pode estar relacionado à ocorrência da reação de RDA nessa substância. Porém, não foi observada correspondência do perfil de fragmentação da substância 33 com fragmentações com ionização por elétrons descritas para alcaloides eritrínicos na literatura. Assim, os dados de IES-EM obtidos não permitiram a identificação desta substância.

Não foram reconhecidos padrões de fragmentação das subclasses de alcaloides eritrínicos nos perfis de fragmentação das substâncias 29, 31 e 32, as quais não foram identificadas.

Tabela 13 - Dados de IE-EM dos constituintes dos extratos de mulungu do produtor comercial B

Pico	Alcaloide	Tr (min) B1	Tr (min) B2	<i>m/z</i> (IE-EM) B1	<i>m/z</i> (IE-EM) B2
1	Erisodina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	--	29,55	--	299 (39), 284 (37), 269 (29), 268 (100), 266 (18), 253 (12), 241 (14), 215 (22)
4	Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	31,31	30,71	313 (36), 298 (28), 283 (28), 282 (100), 280 (16), 229 (17)	313 (35), 298 (35), 283 (26), 282 (100), 280 (15), 229 (16)
24	3-demetoxi- eritratidinona (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	34,29	33,90	272 (19), 271 (100), 270 (37), 256 (98), 243 (17), 242 (78), 240 (18), 228 (37), 215 (13), 214 (19), 212 (18), 197 (35)	299 (3), 272 (19), 271 (100), 270 (39), 256 (88), 243 (17), 242 (75), 240 (22), 228 (34), 215 (12), 214 (19), 212 (19), 197 (31)
8	Eritratidina ou <i>epi</i> - eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	34,44	34,02	331 (7), 300 (12), 273 (45), 272 (15), 258 (27), 257 (100), 244 (58), 242 (17), 226 (14)	331 (6), 300 (12), 273 (53), 272 (17), 258 (26), 257 (100), 244 (57), 242 (16), 226 (12)
10	Eritratidina ou <i>epi</i> - eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	--	34,66	--	331 (2), 300 (10), 273 (77), 272 (21), 258 (29), 257 (100), 244 (76), 242 (17), 226 (12)

Tabela 13 - continuação

Pico	Alcaloide	Tr (min) B1	Tr (min) B2	m/z (IE-EM) B1	m/z (IE-EM) B2
25	Alcenoide (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	35,28	34,95	301 (12), 286 (42), 272 (20), 271 (100), 256 (20), 243 (25), 242 (78), 228 (62), 215 (21), 214 (30), 212 (25), 198 (19), 197 (81)	329 (4), 301 (10), 286 (42), 272 (18), 271 (100), 256 (10), 243 (25), 242 (77), 228 (56), 215 (19), 214 (25), 212 (26), 198 (17), 197 (71)
26	Alcenoide (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	--	35,89	--	301 (10), 286 (39), 272 (17), 271 (100), 243 (23), 242 (74), 228 (53), 215 (19), 214 (24), 212 (24), 198 (15), 197 (67)
27	11-hidroxierritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₅)	36,23	--	327 (12), 299 (9), 284 (45), 270 (16), 269 (85), 241 (35), 240 (80), 226 (32), 213 (21), 212 (30), 210 (29), 196 (23), 195 (100)	--
28	Eritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	36,89	36,66	329 (3), 301 (10), 286 (38), 272 (17), 271 (100), 256 (9), 243 (22), 242 (69), 228 (55), 215 (18), 214 (24), 212 (25), 198 (17), 197 (75)	329 (2), 301 (10), 286 (39), 272 (17), 271 (100), 256 (9), 243 (23), 242 (74), 228 (53), 215 (19), 214 (24), 212 (24), 198 (15), 197 (67)
29	NI	--	38,08	--	329 (14), 287 (20), 286 (100), 242 (12), 229 (21)
30	NI	--	38,51	--	327 (15), 297 (20), 296 (100), 284 (11), 253 (12)
31	NI	--	38,99	--	328 (20), 327 (10), 312 (43), 282 (10), 281 (100), 280 (13)
32	NI	39,33	--	261 (14), 217 (25), 173 (27), 163 (22), 155 (39), 145 (24), 101 (50), 100 (29), 99 (33), 89 (37), 85 (35), 72 (29), 57 (100)	--

Tabela 13 - conclusão

Pico	Alcaloide	Tr (min) B1	Tr (min) B2	m/z (IE-EM) B1	m/z (IE-EM) B2
33	NI	39,92	--	327 (12), 270 (19), 269 (100), 244 (14), 241 (12), 240 (15), 238 (46), 226 (59), 213 (17)	--

Tr: tempo de retenção. NI: não identificado.

Figura 10 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato B1.

Tabela 14 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritrínicos identificados no extrato do lote B1

Alcaloide	Fórmula [M+H] ⁺	Massa observada m/z [M+H] ⁺	Massa calculada m/z [M+H] ⁺	Erro (ppm)
Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	314,1741	314,175619	4,8
3-demetoxi-eritratidinona (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃ ⁺	300,1590	300,159969	3,2
Eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	C ₁₉ H ₂₆ NO ₄ ⁺	332,1837	332,186183	7,5
11-hidroxieritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₅)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₅ ⁺	346,1642	346,165448	3,6
Eritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄ ⁺	330,1699	330,170533	1,9

4.1.2.3 - Alcaloides eritrínicos identificados no extrato de *E. verna* nativa

O perfil de fragmentação da substância com Tr= 31,0 min exibido na Tabela 17 mostra os mesmos íons observados para erisotrina previamente identificada nos extratos de A e B, como verificado na Tabela 13 e Tabela 15, respectivamente. O íon em m/z 314,1753 [M+H]⁺ observado no espectro de IES-EM em alta resolução do extrato de *E. verna* nativa apresentado na Figura 11 corresponde a fórmula molecular protonada C₁₉H₂₄NO₃⁺, com erro de 1,0 ppm, a qual é condizente com a molécula de erisotrina (Tabela 16).

Os íons observados no perfil de fragmentação da substância com Tr= 34,07 min (Tabela 15) estão em concordância com os fragmentos da 3-demetoxi-eritratidinona previamente identificada nos extratos B observados na Tabela 15, sendo que no perfil de fragmentação da 3-demetoxi-eritratidinona identificada no extrato do mulungu nativo o íon em m/z 299 está presente e possui baixa intensidade (Tabela 15). A observação do íon em m/z 300,1594 [M+H]⁺ nos espectro de massas com ionização por eletrospray da Figura 11 confirmou a identificação da 3-demetoxi-eritratidinona no extrato de *E. verna* coletada, com erro de ppm 1,9 (Tabela 16).

Os dados de ionização por elétrons do constituinte com Tr= 36,66 min no extrato de *E. verna* nativa (Tabela 15) estão de acordo com os dados de CG-EM da eritratidinona anteriormente identificada nos extratos do fornecedor B (Tabela 13), sendo que a eritratidinona é o alcaloide majoritário nos extratos de B e da espécie nativa de *E. verna*,

conforme mostrado na Figura 9. No espectro de ionização por eletrosparay do extrato de *E. verna* nativa mostrado na Figura 11 nota-se um íon em m/z $[M+H]^+$ 330,1706, correspondente a fórmula molecular protonada da eritratidinona $C_{19}H_{24}NO_4^+$, com erro de 2,0 ppm (Tabela 16).

Verificou-se que a substância 25 apresenta perfil de fragmentação idêntico ao observado para eritratidinona (Tabela 15), o que sugere a presença de um isômero deste alcaloide no extrato de *E. verna* nativa. Este possível isômero da eritratidinona também foi anteriormente identificado nos extratos de B, como pode ser visto na Tabela 13.

O íon em m/z 269 do perfil de fragmentação da substância 35 pode ser originado a partir da perda de 58 u do íon em m/z 327 (Tabela 15), fragmentação que pode estar relacionada à ocorrência de RDA nesta substância. Contudo, não foi encontrada correspondência entre o perfil de fragmentação da substância 35 e perfis de alcaloides eritrínicos disponíveis na literatura. Assim, a substância 35 não foi identificada.

Não foram observados os padrões de fragmentação conhecidos para as subclasses de alcaloides eritrínicos nos perfis de fragmentação das substâncias 34, 36 e 37 (Tabela 15), as quais não foram identificadas neste trabalho.

Os alcaloides eritrínicos de *E. verna* nativa identificados neste trabalho constituem o primeiro relato dos marcadores químicos nas cascas desta espécie. Entre os alcaloides identificados no extrato de *E. verna* nativa neste trabalho apenas a erisotrina foi relatada anteriormente nas flores da espécie por SARRAGIOTTO e colaboradores (1981). Este alcaloide foi o único identificado nos extratos dos dois produtores comerciais e espécie nativa analisados neste trabalho e está entre os derivados eritrínicos com maior ocorrência no gênero *Erythrina*, como mostrado anteriormente na Tabela 1.

Tabela 15 - Dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução dos alcaloides identificados nos extratos de *E. verna* nativa

Pico	Alcaloide	Tr (min)	m/z
4	Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	31,00	313 (35), 298 (44), 283 (33), 282 (100), 280 (17), 229 (14)
34	NI	32,67	278 (41), 277 (100), 206 (33), 200 (26), 199 (41)
24	3-demetoxi-eritratidinona (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	34,07	299 (5), 272 (23), 271 (100), 270 (36), 256 (79), 243 (17), 242 (83), 240 (20), 228 (39), 215 (16), 214 (20), 212 (24), 197 (41)
25	Alcenoide (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	35,08	329 (9), 286 (54), 272 (12), 271 (100), 243 (17), 241 (68), 228 (41), 215 (27), 214 (45), 212 (46), 197 (61)
35	NI	36,04	327 (9), 299 (5), 284 (26), 272 (100), 269 (55), 268 (15), 256 (20), 254 (23), 240 (42), 239 (72), 226 (39), 212 (36), 211 (37), 210 (35), 197 (19), 196 (32), 195 (87)
28	Eritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	36,66	329 (2), 301 (13), 286 (47), 272 (19), 271 (100), 243 (31), 242 (85), 228 (68), 215 (25), 214 (31), 212 (31), 198 (19), 197 (91)
36	NI	37,13	281 (18), 280 (100), 279 (63), 158 (27), 147 (70)
37	NI	39,85	285 (19), 284 (100), 283 (26), 167 (29), 165 (30).

Tr: tempo de retenção; NI: não identificado

Figura 11 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) do extrato de *E. verna* nativa.

Tabela 16 - Dados de IES-EM em alta resolução dos alcaloide eritrínicos identificados no extrato de *E. verna* nativa

Alcaloide	Fórmula [M+H] ⁺	Massa observada m/z [M+H] ⁺	Massa calculada m/z [M+H] ⁺	Erro (ppm)
Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	314,1753	314,175619	1,0
3-demetoxi-eritratidinona (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃ ⁺	300,1594	300,159969	1,9
Eritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄ ⁺	330,1706	330,170533	2,0

4.2 - Propostas de mecanismos de fragmentação em IE-EM de alcaloides eritrínicos da subclasse alcenoide

Com base no padrão de fragmentação em IE-EM da subclasse alcenoide discutido anteriormente neste trabalho e nos estudos sobre fragmentação com ionização por eletros dessa subclasse publicados de BOAR e colaboradores (1970) e MILLINGTON e colaboradores (1974), foram propostos os mecanismos de fragmentação de alguns íons das vias que envolvem a reação de RDA e segmentação em alcenoides com substituintes na posição 2, o que contribui para identificação desses alcaloides nos extratos de mulungu.

4.2.1 - Mecanismos de fragmentação de alcaloides alcenoides com hidroxila na posição 2

Para discussão dos mecanismos de fragmentação dos alcenoides com hidroxila na posição 2 foram selecionados os íons formados na fragmentação da eritratidina e seu possível epímero (8 e 10), os isômeros 11-hidroxi-erisosalvina e 11-hidroxi-erisotina (9) e os isômeros erisotina e erisosalvina (11), identificados nos extratos do produtor comercial A.

Os íons moleculares dos alcaloides 8, 10 e 11 fragmentam-se pela reação de RDA [$M^{+} - 58$] com perda de molécula neutra ($- 58 u$), o que dá origem a um cátion radical em m/z 273 (8 e 10) e m/z 259 (11), como observado na Figura 12A. Em seguida, este cátion radical fragmenta-se através de clivagem guiada pelo radical com a perda de um hidrogênio radicalar e origina os íons de camada fechada em m/z 272 (8 e 10) e m/z 258 (11) (Figura 12A). Estes íons podem fragmentar-se através da perda de metila radicalar devido ao aumento do comprimento da ligação C-O em éteres aromáticos, sendo que a perda de um radical a partir de um íon de camada fechada é uma exceção a regra do elétron par. Essa fragmentação origina os fragmentos majoritários nos espectros dos alcaloides analisados, em m/z 257 (8 e 10) e m/z 243 (11).

Os íons originados pela reação de RDA em m/z 273 (8 e 10) e m/z 259 (11) também podem sofrer perda radicalar de metila, o que origina os íons de camada fechada de m/z 258 (8 e 10) e m/z 244 (11), conforme mostrado na Figura 12A. No caso dos isômeros erisotina e erisosalvina (11), a perda de metila radicalar está relacionada a metila do substituinte metoxila R_1 (erisosalvina) ou R_2 (erisotina) (Figura 12A). Propõe-se que uma outra via de fragmentação dos alcaloides 8, 10 e 11 inicia-se com a ejeção de um elétron do oxigênio do grupo hidroxila na posição 2, o que caracteriza uma segmentação α (Figura 12B). A presença desta outra via justifica a baixa intensidade dos íons moleculares da eritratidina e seu epímero, erisosalvina e erisotina relatados na literatura (Tabela 11) e verificados neste trabalho (Tabela

13). A segmentação α dos íons moleculares em m/z 331 (8 e 10) e 317 (11) origina os cátions radicais em m/z 273 (8 e 10) e 259 (11) através da perda de uma molécula neutra de 58 u. Os íons em m/z 273 (8 e 10) e 259 (11) podem, em seguida, fragmentar-se por clivagem guiada pelo radical com a perda de hidrogênio radicalar para originar os íons de camada fechada em m/z 272 (8 e 10) e m/z 258 (11) ou fragmentam-se com a perda de metila radicalar para formar os íons em m/z 258 (8 e 10) e 244 (11), respectivamente (Figura 14B). Os íons em m/z 272 (8 e 10) e m/z 258 (11) sofrem a perda de metila radicalar (-15 u) para originar os íons majoritários nos espectros dos alcaloides analisados em m/z 258 (8 e 10) e 244 (11), respectivamente (Figura 12B). Os mecanismos propostos sugerem que os íons formados a partir da via originada por segmentação α possuem mesma m/z que os íons da via iniciada pela reação de RDA (Figura 12).

Figura 12 - Mecanismos de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com hidroxila na posição 2. (A): via iniciada pela reação de RDA. (B): via iniciada pela segmentação α .

Do mesmo modo, o íon em m/z 315 dos isômeros 11-hidroxi-erisosalvina e 11-hidroxi-erisotina (9), resultante da desidratação desta molécula na fonte de ionização, pode fragmentar-se através da reação de RDA e da via iniciada pela segmentação α , sendo que os fragmentos iniciados por essas duas vias possuem mesma m/z , como observado na Figura 13A e Figura 13B. As fragmentações que originam os íons de m/z 242 e 241 envolvem perda de metila radical do substituinte metoxila R_1 (11-hidroxi-erisosalvina) ou R_2 (11-hidroxi-erisotina) (Figura 13).

Figura 13 - Mecanismos de fragmentação dos isômeros 11-hidroxi-erisosalvina e 11-hidroxi-erisotina. (A): via iniciada pela reação de RDA. (B): via iniciada pela segmentação α .

4.2.2 - Mecanismos de fragmentação de alcaloides alcenoides com carbonila na posição 2

Para discussão dos mecanismos de fragmentação dos alcenoides com carbonila na posição 2 foram selecionados os íons formados na fragmentação com ionização por elétrons da eritratidinona (28) e 3-demetoxi-eritratidinona (24), alcaloides identificados nos extratos do fornecedor B (Tabela 15) e da espécie nativa de *E. verna* (Tabela 17).

Sabe-se que o íon molecular da eritratidinona (28) em m/z 329 fragmenta-se através da reação de RDA [$M^{+} - 58$] com perda de molécula neutra e origina o íon majoritário do espectro em m/z 271. A carga do cátion radical em m/z 271 pode estar no átomo de oxigênio, o que conduz a hipótese de que este íon fragmenta-se através de uma clivagem direcionada pela carga (segmentação indutiva) com perda de uma molécula neutra de CO (-28 u) para originar outro cátion radical em m/z 243 (Figura 14). Verifica-se que o íon molecular da 3-demetoxi-eritratidinona (24) em m/z 299 também fragmenta-se pela reação de RDA com a perda de 28 u correspondente a uma molécula de eteno (Figura 14). A reação de RDA nos dois alcaloides analisados origina íons idênticos de m/z 271, o que indica que as fragmentações seguintes apresentadas na Figura 14 são idênticas para a eritratidinona (28) e 3-demetoxi-eritratidinona (24). Propõe-se que o íon de m/z 243 fragmenta-se através da abertura do anel B da estrutura devido ao rearranjo 1,3 de hidrogênio e perda de etil radicalar (-29 u), o que origina o íon de cadeia fechada em m/z 214 (Figura 14). Sugere-se outra via para fragmentação do cátion radical em m/z 243, a qual também envolve a abertura do anel B, mas ocorre com perda de uma molécula neutra de eteno, o que origina um cátion radical em m/z 215 (Figura 14). O cátion radical em m/z 243 fragmenta-se ainda através de clivagem guiada pelo radical com a perda de metila radicalar de um dos grupos metoxilas ligados ao anel aromático e origina o íon em m/z 228, conforme mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Mecanismos de fragmentação de derivados eritrínicos alcenoides com carbonila na posição 2 a partir da via de reação RDA. Eritratidinona (28). 3-demetoxi-eritratidinona (24).

O início de outra via de fragmentação de alcaloides com carbonila em C-2 inicia-se com a ejeção de elétron do oxigênio deste grupo carbonila, o que origina os íons moleculares de m/z 329 da eritratidinona (28) e m/z 299 da 3-demetoxi-eritratidinona (24), como mostrado na Figura 15. Assim, ocorre uma fragmentação iniciada no sítio radical, chamada segmentação α -carbonila, a qual envolve a perda de uma molécula neutra de CO (-28 u) a partir dos íons moleculares em m/z 329 (28) e 299 (24). O íon de m/z 301 da eritratidinona (28) formado nessa fragmentação pode sofrer uma clivagem guiada pelo radical com perda de metila radicalar da metoxila representada por R na Figura 15 para originar o íon de camada fechada em m/z 286. O íon em m/z 301 também pode fragmentar-se através da perda de uma molécula neutra de 58 u para formar o cátion radical em m/z 243 (Figura 15), o que justifica a baixa intensidade (valores inferiores a 15 %) do íon em m/z 301 na fragmentação da eritratidinona (28), como verificado na Tabela 15 e Tabela 17. Propõe-se que a segmentação α -carbonila do íon molecular da eritratidinona (28) em m/z 329 também pode ocorrer com a perda de uma molécula neutra de 58 u para originar o íon em m/z 271, o que indica que tanto a reação de RDA como clivagem α -carbonila do íon molecular deste alcaloide podem originar íons de m/z 271, como verificado na Figura 14 e na Figura 15, e justifica o fato deste íon representar o pico base no espectro da eritratidinona (28), como verificado na Tabela 15 e na Tabela 17. O íon de m/z 271 da eritratidinona (28) pode sofrer uma clivagem guiada pelo radical com perda de uma metila radicalar ligada do grupo metóxi ligado ao anel aromático para originar o íon de camada fechada em m/z 256 (Figura 18).

Foi observado também que na molécula de 3-demetoxi-eritratidinona (24), tanto a reação de RDA como a segmentação α -carbonila ocorrem com a perda de uma molécula neutra de eteno (- 28 u), o que indica que nesse caso as diferentes vias convergem para a formação de íons com m/z 271, como pode ser observado na Figura 14 e na Figura 18, sendo que este íon representa o pico base do espectro da 3-demetoxi-eritratidinona (24), como visto na Tabela 15 e na Tabela 17. O íon em m/z 271 pode sofrer uma clivagem guiada pelo radical com perda metil radicalar para formar o íon de camada fechada em m/z 256 (Figura 15). A segmentação α -carbonila do íon molecular em m/z 299 da 3-demetoxi-eritratidinona (24) também pode ocorrer com a perda de uma molécula neutra de CO (- 28 u), o que origina outro cátion radical de m/z 271 e justifica este íon como pico base do espectro desta molécula, conforme observados na Tabela 15 e na Tabela 17. O íon em m/z 271 pode fragmentar-se através da perda de uma molécula de eteno (- 28 u) e origina o cátion radical em m/z 243, o qual também é observado na via iniciada pela reação de RDA. O íon em m/z 243 fragmenta-se

para originar os íons em m/z 214, m/z 215 e m/z 228, sendo que os mecanismos envolvidos nessas fragmentações são exibidos na Figura 14.

As duas vias de fragmentação iniciadas a partir dos íons moleculares da eritratidinona (28) e 3-demetoxi-eritratidinona propostas na Figura 14 e na Figura 15 justificam a baixa intensidade ou ausência dos íons moleculares destes dois alcaloides com carbonila em C-2, como observado na Tabela 15 e na Tabela 17, o que está de acordo com os estudos de MILLINGTON e colaboradores (1974).

Figura 15 - Mecanismos de fragmentação de íons formados a partir da via de segmentação α -carbonila de derivados eritrínicos alcaloides com carbonila na posição 2. Eritratidinona (28). 3-demetoxi-eritratidinona (24).

4.3 - Análise do perfil de alcaloides nos extratos de mulungu obtidos através de EAB e partição L/L

4.3.1 - Análise do perfil de alcaloides na fração DCM A1

A análise dos cromatogramas em CG-EM das frações DCM A1 e EAB A1 mostra homogeneidade entre os perfis cromatográficos desses extratos (Figura 16). Verificou-se também correspondência entre os tempos de retenção e os íons verificados na análise em CG-EM modo SIM dos constituintes da fração DCM A1 (ANEXO A) com os tempos de retenção e os íons majoritários dos espectros de massas dos componentes identificados e não identificados no extrato EAB A1, conforme mostrado na Tabela 17. Assim, esses resultados sugerem que os alcaloides previamente encontrados no extrato EAB A1 também estão presentes na fração DCM A1, ou seja, o perfil qualitativo de alcaloides presentes nas cascas de mulungu do lote A1 não é alterado pela acidificação do meio/temperatura empregada na rotaevaporação do extrato obtido pelo método de extração ácido-base.

No entanto, a metodologia escolhido para extração dos alcaloides foi a EAB, tendo em vista que os alcaloides possuem um átomo de nitrogênio com um par de elétrons livres em sua estrutura, o que faz com que essas substâncias se comportem como bases. Assim, em soluções de ácidos os alcaloides podem sofrer protonação no nitrogênio e serem convertidos em sais e, quando tratados com soluções alcalinas, o nitrogênio libera o próton e origina novamente uma amina livre (HENRIQUES *et al.*, 2003). Dessa forma, a EAB, também denominada de marcha-química para alcaloides, permitiu a extração seletiva das substâncias nitrogenadas, o que resultou em extratos enriquecidos em alcaloides e possibilitou o isolamento dessas substâncias neste trabalho a partir dos extratos obtidos por esse método. Já a fração DCM obtida na partição L/L não apresentou a mesma seletividade da EAB, pois juntamente com os alcaloides ocorreu a extração de outros componentes do extrato de mulungu. Assim, os alcaloides estão em menor concentração nessa fração, o que justifica o emprego do modo SIM para aumento da sensibilidade analítica do método de CG-EM utilizado e a não utilização dessa fração para purificação e isolamento dos derivados eritrínicos.

Figura 16 - Cromatogramas dos extratos DCM A1 e EAB A1.

Tabela 17 - Dados de ionização por elétrons dos alcaloides identificados nos extratos de A1 obtidos por EAB e partição L/L

Pico	Tr (min) Fr. DCM A1	Tr (min) EAB A1	Alcaloide	<i>m/z</i> (SIM) (Fr. DCM A1)	<i>m/z</i> (EAB A1)
1	29,58	29,66	Erisovina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	299, 284, 268	299 (37), 284 (36), 269 (27), 268 (100), 266 (19), 253 (12), 241 (11), 228 (13) 215 (23)
2	29,80	29,84	Eritrinina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	295, 280, 264	295 (30), 280 (39), 265 (28), 264 (100), 262 (21), 224 (16), 211 (29)
3	30,55	30,67	Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	297, 282, 266	297 (31), 282 (32), 267 (24), 266 (100), 264 (24), 239 (10), 226 (16), 213 (25)
4	30,76	30,77	Erisotrina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	313, 298, 282	313 (34), 298 (35), 283 (29), 282 (100), 280 (16), 229 (17)
5	31,69	31,75	NI	301, 286, 270	301 (44), 287 (21), 286 (97), 271 (27), 270 (84), 257 (24), 242 (19), 216 (20)
6	31,93	31,93	Alcaloide Dienoide (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	297, 282, 266	297 (31), 282 (38), 267 (31), 266 (100), 264 (16), 239 (13), 226 (13), 213 (17)

Tabela 17 - continuação

Pico	Tr (min) Fr. DCM A1	Tr (min) EAB A1	Alcaloide	m/z(SIM) (Fr. DCM A1)	m/z (EAB A1)
7	32,80	33,01	Erisodina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	299, 284, 268	299 (36), 284 (33), 269 (26), 268 (100), 266 (18), 253 (11), 241 (10), 228 (10), 215 (16)
8	34,05	34,08	Eritratidina ou <i>epi</i> - eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	331, 300, 273, 257, 244	331 (5), 300 (13), 273 (50), 272 (15), 258 (27), 257 (100), 256 (54), 244 (60), 242 (15)
9	34,43	34,46	Eritratina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₄)	315, 284, 257, 241, 228	315 (8), 284 (12), 257 (57), 256 (32), 242 (16), 241 (100), 240 (77), 228 (84)
10	34,71	34,71	Eritratidina ou <i>epi</i> - eritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	331, 300, 273, 257, 244	331 (2), 300 (11), 273 (79), 272 (20), 258 (29), 257 (100), 256 (45), 244 (80), 242 (14)
11	36,03	36,01	Erisotina ou Erisosalvina (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	317, 300, 259, 243	317 (7), 286 (11), 259 (46), 258 (14), 243 (100), 242 (80)
12	36,30	36,35	Eritrínico dienoide (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	313, 298, 282, 264	313 (42), 298 (22), 295 (12), 283 (26), 282 (100), 280 (36), 264 (37), 262 (23), 255 (15), 224 (19), 211 (17)
15	37,54	37,51	NI	266, 250, 222, 204	266 (19), 265 (100), 250 (59), 222 (33), 204 (20)
17	37,76	37,77	NI	331, 257, 240, 226	258 (14), 257 (83), 256 (57), 255 (73), 240 (23), 227 (18), 226 (100)
19	38,65	38,68	NI	331, 300, 256, 214	331 (4), 258 (16), 257 (91), 256 (62), 255 (82), 240 (23), 227 (19), 226 (100)

Tr: tempo de retenção. DCM: diclorometano. EAB: extração ácido-base

4.3.2 - Análise do perfil de alcaloides na fração DCM B2

Constatou-se homogeneidade entre os perfis cromatográficos da fração DCM B2 com o extrato EAB B2, como apresentado na Figura 17. Observou-se correspondência entre os tempos de retenção e perfis de fragmentação dos alcaloides e dos constituintes não identificados entre a fração DCM B2 (ANEXO A) e extrato B2 obtido por EAB (Tabela 18). Estes resultados sugerem que o perfil de alcaloides identificados no extrato EAB B2 é o mesmo da fração DCM B2 (Tabela 18), ou seja, o perfil alcaloídico qualitativo das cascas de mulungu do lote B2 também não é alterado pela acidificação do meio/temperatura empregada na rotaevaporação do extrato obtido pelo método de extração ácido-base.

Figura 17 - Cromatogramas dos extratos DCM B2 e EAB B2.

Tabela 18 - Dados de ionização por elétrons dos alcaloides identificados nos extratos de B2 obtidos por EAB e partição L/L

Pico	Tr (min) Fr. DCM B2	Tr (min) EAB B2	Alcaloide	m/z(SIM) (Fr. DCM B2)	m/z (EAB B2)
1	29,55	29,55	Erisovina (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	299, 284, 268	299 (39), 284 (37), 269 (29), 268 (100), 266 (18), 253 (12), 241 (14), 215 (22)
3	30,50	30,50	Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	297, 282, 266	297 (32), 282 (33), 267 (29), 266 (100), 264 (29), 239 (12), 226 (19), 313 (26)
4	30,70		Erisotrina (C ₁₉ H ₂₃ NO ₃)	313, 298, 282	313 (35), 298 (35), 283 (26), 282 (100), 280 (15), 229 (16)
24	33,88	33,90	3-demetoxi- eritratidinona (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	299, 271, 256	299 (3), 272 (19), 271 (100), 270 (39), 256 (88), 243 (17), 242 (75), 240 (22), 228 (34), 215 (12), 214 (19), 212 (19), 197 (31)
8	34,01	34,02	Eritratidina ou Epieritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	331, 273, 257	331 (6), 300 (12), 273 (53), 272 (17), 258 (26), 257 (100), 244 (57), 242 (16), 226 (12)
10	34,66	34,66	Eritratidina ou Epieritratidina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	331, 300, 273, 257, 244	331 (2), 300 (10), 273 (77), 272 (21), 258 (29), 257 (100), 244 (76), 242 (17), 226 (12)
25	34,90	34,95	Alcaloide Alcenoide (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	329, 286, 271, 242	329 (4), 301 (10), 286 (42), 272 (18), 271 (100), 243 (25), 242 (77), 228 (56), 215 (19), 214 (25), 212 (26), 198 (17), 197 (71)

Tabela 18 - continuação

Pico	Tr (min) Fr. DCM B2	Tr (min) EAB B2	Alcaloide	m/z(SIM) (Fr. DCM B2)	m/z (EAB B2)
26	35,88	35,89	Alcaloide Alcenoide (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	329, 286, 271, 242	301 (10), 286 (39), 272 (17), 271 (100), 243 (23), 242 (74), 228 (53), 215 (19), 214 (24), 212 (24), 198 (15), 197 (67)
28	36,51	36,66	Eritratidinona (C ₁₉ H ₂₃ NO ₄)	329, 286, 271, 242	329 (2), 301 (10), 286 (39), 272 (17), 271 (100), 243 (23), 242 (74), 228 (53), 215 (19), 214 (24), 212 (24), 198 (15), 197 (67)
29	38,09	38,08	NI	329, 286, 271, 229	329 (14), 287 (20), 286 (100), 242 (12), 229 (21)
30	38,52	38,51	NI	327, 312, 281	327 (15), 297 (20), 296 (100), 284 (11), 253 (12)
31	40,00	38,99	NI	327, 312, 281	328 (20), 327 (100), 312 (43), 282 (10), 281 (100), 280 (13)

Tr: tempo de retenção. DCM: diclorometano. EAB: extração ácido-base

4.4 - Isolamento, identificação e determinação estrutural dos alcaloides eritrínicos

4.4.1 - Isolamento e identificação da eritralina e 8-oxo-eritralina

O fracionamento do extrato alcaloídico A2 através de CCC resultou na obtenção de 28 grupos de frações (Tabela 19), os quais foram analisados em CG-EM.

Tabela 19 - Grupos provenientes do fracionamento do extrato alcaloídico A2

Frações	Grupo	Massa (mg)
1-3	1	75,3
4-8	2	66,4
9-25	3	664,4
26-30	4	53,3
31-37	5	36,9
41-47	6	10,7
50-54	7	7,5
55-57	8	18,2
58-60	9	16,4
61-62	10	11,6
63-65	11	13,4
66-69	12	16,5
70-74	13	42,39
75-79	14	20,7
80-82	15	12,0
83-87	16	42,2
88-97	17	10,4
98-103	18	21,0
104-109	19	19,3
110-113	20	17,2
114-116	21	13,8
117-121	22	21,3
127-130	23	26,1
131-135	24	44,0
136-144	25	122,2
145-149	26	58,3
150-152	27	31,8
153-155	28	27,3

Os dados de CG-EM mostraram que o grupo 3 (frações 9-25) apresentou-se enriquecido em eritralina, sendo que este grupo foi submetido a purificação por CLAE-DAD em escala semipreparativa para isolamento da eritralina. As frações purificadas foram recolhidas de acordo com a Figura 18 e Tabela 20.

Figura 18 - Cromatograma do grupo 3 (frações 9-25) obtido na purificação em CLAE-DAD semipreparativo ($\lambda = 280$ nm) e frações coletadas.

Tabela 20 - Frações/picos obtidos na purificação do grupo 3 (frações 9-25) do extrato alcaloídico A2 por CLAE-DAD semipreparativo

Frações/Picos	Tr (min)	Massa (mg)
1	7,56	9,4
2	15,13	367,5
3	20,18	8,8
4	21,68	9,4
5	24,90	12,8
6	25,09	14,1
7	28,29	10,3

Tr: tempo de retenção

A substância referente ao pico 2 (367,5 mg) foi coletada no tempo de retenção de 15,13 min e, após secagem e liofilização, foi analisada por CG-EM e IES-EM. Na análise dados de IE-EM desta substância isolada foi reconhecida a clivagem α -alílica do íon molecular em m/z 297 para formação do pico base em m/z 266 (Tabela 23). No espectro de IES-EM desta substância (ANEXO B) foi observado também um íon intenso em m/z 298,14536 $[M+H]^+$, correspondente o a fórmula molecular $C_{18}H_{20}NO_3^+$ (erro de 3,5 ppm), a qual está de acordo com eritralina (Tabela 23). A eritralina é o alcaloide majoritário do extrato alcaloídico das cascas de mulungu do lote A2.

A substância referente ao pico 5 (12,8 mg) foi coletada no tempo de retenção 24,90 min (Tabela 20) e após a secagem e liofilização, foi analisada por CG-EM e IES-EM. O perfil de fragmentação com ionização por elétrons desta substância corresponde aos íons descritos na fragmentação da 8-oxoeritralina por MANTLE e colaboradores (1984). Os dados de ionização por eletrospray também sugeriram o isolamento da 8-oxoeritralina, uma vez que neste espectro foi observado um íon m/z 312,1232 $[M+H]^+$ relacionado a fórmula molecular $C_{18}H_{18}NO_4^+$ (erro de 1,2 ppm), a qual corresponde a 8-oxoeritralina (Tabela 23).

4.4.2 - Isolamento e identificação da eritrinina e erisodina

Os dados de CG-EM mostraram que o grupo 25 (frações 136-144) apresentou alcaloides eritrinina e erisodina, sendo que este grupo foi submetido à CCDP para isolamento dessas substâncias. Após revelação com luz UV das placas cromatográficas foram observadas quatro zonas de absorção, as quais foram retiradas da placa, filtradas e secas (Tabela 21). A substância 2 (10,1 mg) (Tabela 21) foi analisada por CG-EM e IES-EM. Os dados de ionização por eletros foram analisados e foi observada a ocorrência de clivagem α -alílica do íon molecular em m/z 299 desta substância para formação do íon di-alílico majoritário do espectro em m/z 268 (Tabela 23). Verificou-se que perfil de fragmentação deste alcaloide está de acordo com as fragmentações dos isômeros erisovina e erisodina descritos por SINGH e colaboradores (1981). Em associação a esses dados, no espectro de IES-EM em alta resolução desta substância (ANEXO B) observou-se o íon majoritário de m/z 300,1594 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{22}NO_3^+$, erro de 1,9 ppm), o qual está de acordo com a fórmula molecular dos isômeros erisovina e erisodina (Tabela 23). Entretanto, a identificação do isômero isolado ocorreu somente após a análise dos dados de RMN desta substância.

Tabela 21 - Substâncias obtidas na purificação do grupo 25 (136-144) por CCDP

Substâncias	Rf	Massa (mg)
1	0,10	5,8
2	0,22	10,1
3	0,72	12,3
4	0,91	23,4

Rf: fator de retenção

A substância 3 (12,3 mg) (Tabela 21) também foi analisada por CG-EM e IES-EM. Na análise do perfil de fragmentação desta substância em IE-EM foi observado o íon molecular em m/z 264 originado pela clivagem α -alílica do íon em m/z 295 (Tabela 23). No entanto, novamente não foi possível observar o íon molecular em m/z 313 deste alcaloide no espectro de massas,

possivelmente relacionado à desidratação da molécula na fonte de ionização o que sugeriu a presença de um grupamento hidroxila na molécula. Os dados de IES-EM em alta resolução desta substância isolada (ANEXO B) dão suporte a esta hipótese, pois foi verificado neste espectro um íon em m/z 314,1403 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{20}NO_4^+$, erro de 3,4 ppm), o qual corresponde a fórmula molecular da eritrinina, um derivado eritrínico dienoide com hidroxila na posição 11 (Tabela 21).

4.4.3 - Isolamento e identificação da eritratidinona

A fração alcaloídica de B2 foi purificada através de CLAE-DAD em escala semipreparativa. As frações purificadas foram recolhidas de acordo com a Figura 19 e Tabela 19. O pico 2 (52,0 mg) apresentou tempo de retenção de 28,2 min (Tabela 22) e foi analisado por CG-EM e IES-EM. O perfil de fragmentação desta substância mostra reação de RDA no íon em m/z 329 para formação do pico base do espectro em m/z 271 (Tabela 23), o que classifica este alcaloide com um alcenoide. No espectro de IES-EM da substância isolada (ANEXO B) foi observado um íon de m/z $[M+H]^+$ 330,1690 referente a fórmula molecular $C_{18}H_{24}NO_4^+$ (erro de 4,6 ppm), o qual está de acordo com a eritratidinona (Tabela 21). A eritratidinona é o alcaloide majoritário nos extratos dos dois lotes adquiridos do produtor comercial B.

Figura 19 - Cromatograma do extrato alcaloídico B2 obtido na purificação em CLAE-DAD semipreparativo ($\lambda=280$ nm) e frações coletadas. (A): cromatograma de 20-50 min; (B): cromatograma de 50-65 min.

Tabela 22 - Frações/picos obtidos na purificação do extrato alcaloídico de B2 por CLAE-DAD semipreparativo

Frações/Picos	Tr (min)	Massa (mg)
1	26,63	0,9
2	28,20	52,0
3	30,63	1,7
4	31,58	1,9
5	35,21	2,7
6	36,31	7,3
7	40,80	8,4
8	42,60	7,5
9	43,40	6,2
10	49,86	4,0
11	50,38	3,2
12	50,92	2,5
13	52,38	3,9
14	52,89	4,2
15	53,56	4,6
16	54,51	1,8
17	60,53	1,3
18	62,02	2,8

Tr: tempo de retenção

Os alcaloides isolados e identificados através dos dados de espectrometria de massas foram identificados nas frações alcaloídicas a partir das quais foram isolados, conforme discutido anteriormente neste trabalho. Assim, os alcaloides isolados eritralina, eritrinina, erisovina e 8-oxoeritralina correspondem à substância 3, substância 2, substância 7 e substância 22, respectivamente, identificadas no extrato A2. A eritratidinona corresponde à substância 28 identificada nos extratos do produtor comercial B.

Tabela 23 - Dados de IE-EM e IES-EM em alta resolução dos alcaloides isolados

Tr (min)	<i>m/z</i> (IE-EM)	Alcaloide	Fórmula [M+H] ⁺	Massa observada <i>m/z</i> [M+H] ⁺	Massa calculada <i>m/z</i> [M+H] ⁺	Erro (ppm)
31,49	297 (35), 282 (31), 267 (26), 266 (100), 264 (21), 239 (11), 226 (13), 213 (22)	Eritralina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₃)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃ ⁺	298,14536	298,144319	3,5
33,28	299 (38), 284 (34), 269 (27), 268 (100), 266 (17), 253 (12), 241 (11), 228 (10), 215 (16)	(Erisovina) C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃ ⁺	300,1594	300,159969	1,9
30,45	295 (32), 280 (37), 265 (26), 264 (100), 262 (19), 224 (12), 211 (28)	Eritrinina (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ ⁺	314,1403	314,139233	3,4
38,88	311 (81), 296 (42), 280 (57), 279 (51), 278 (100), 268 (20), 266 (17), 250 (48)	8-oxoeritralina (C ₁₈ H ₁₇ NO ₄)	C ₁₈ H ₁₈ NO ₄ ⁺	312,1232	312,123583	1,2
36,98	329 (2), 301 (10), 286 (40), 272 (18), 271 (100), 256 (9), 243 (25), 242 (76), 228 (54), 215 (18), 214 (23), 212 (24), 198 (15), 197 (66)	Eritratidinona (C ₁₈ H ₂₃ NO ₄)	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ ⁺	330,1690	330,170533	4,6

Tr: tempo de retenção

4.5 - Determinação estrutural dos alcaloides eritrínicos isolados por RMN

4.5.1 - Análises dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C característicos das subclasses de alcaloides eritrínicos

Na análise dos espectros de RMN ^1H das substâncias isoladas neste trabalho foram observados sinais de hidrogênios olefínicos na região de δ 5,6 – 7,0 a finalidade de identificar diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios vinílicos e alílicos nas estruturas dienoides e alcenoides. Notou-se que nas estruturas da subclasse dienoide (ligação dupla entre C-1 e C-2 e entre C-6 e C-7) podem ser encontrados três sinais na região dos hidrogênios olefínicos referentes aos hidrogênios H-1, H-2 e H-7, como ilustrado na Figura 20. Já na região de hidrogênios olefínicos de alcaloides eritrínicos alcenoides (ligação dupla entre C-1 e C-6) é possível observar somente um sinal referente ao hidrogênio vinílico H-1 (Figura 20). Na grande maioria dos derivados eritrínicos, os sinais na região dos hidrogênios aromáticos correspondem a H-14 e H-17 devido à presença de substituintes em R1 e R2 no anel D (Figura 20).

No espectro de RMN ^{13}C da subclasse alcenoide são verificados oito sinais na região de δ 100 a 150, referentes aos carbonos com hibridização sp^2 aromáticos e da ligação π entre C-1 e C-6, enquanto no espectro de RMN de ^{13}C dos alcaloides dienoides são vistos dez sinais na região de δ 100 a 150, pois o sistema dienoide apresenta uma ligação π a mais que o alcenoide e, conseqüentemente, dois carbonos sp^2 mais que a subclasse alcenoide (Figura 20).

Figura 20 - Estruturas dos alcaloides eritrínicos das subclasses dienoide e alcenoide com indicação dos hidrogênios e carbonos olefínicos, bem como a região de seus deslocamentos químicos característicos. Em vermelho: hidrogênios vinílicos; em azul: hidrogênios aromáticos; em verde: carbonos sp^2 .

4.5.2 - Determinação estrutural da substância 3 (eritralina)

Figura 21 - Estrutura de eritralina (substância 3).

Para determinação estrutural da substância 3 foram obtidos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

No espectro de RMN ^1H da substância 3 (ANEXO C) foram visualizados cinco sinais na região dos hidrogênios olefínicos, sendo que os sinais em δ 6,57 (*dl*, $J = 10,1$ Hz), 6,15 (*dl*, $J = 10,1$ Hz) e 5,79 (*sl*) são relativos aos hidrogênios vinílicos do sistema dienoide H-1, H-2 e H-7, respectivamente (Tabela 24), enquanto os dois sinais em δ 6,71 (*s*) e 6,74 (*s*), correspondentes aos dois hidrogênios aromáticos em H-14 e H-17 (Tabela 24). O sinal em δ 3,31 (*s*) aprsnetou integração para três hidrogênios, sendo correspondente aos hidrogênios do grupo metoxila da posição C-3 (Tabela 24), os quais ressonam na região dos hidrogênios α em éteres (δ 3,2-3,8), sendo que é característico do grupo metóxi um singlete com integração para três hidrogênios (PAVIA *et al.*, 2009) (ANEXO C). Os dubletos em δ 5,98 (*sl*) e 5,99 (*sl*) correspondem aos hidrogênios do grupo metilenodióxido da estrutura (Tabela 24).

No espectro de RMN ^{13}C da substância 3 (ANEXO C) foram observados dez sinais referentes a carbonos sp^2 na região de δ 100 a 150, sendo que seis deles são referentes aos carbonos aromáticos C-12, C-13, C-14, C-15, C-16 e C-17 e os outros quatro referentes aos carbonos olefínicos do sistema dienoide C-1, C-2, C-6 e C-7. A preesença de dez carbonos sp^2 é característica da subclasse dienoide. Já os sinais com δ 126,4, 127,8, 140,7, 146,9, 147,6 correspondem a carbonos quaternários, uma vez que estes não foram observados no espectro de DEPT 135 da substância 3 (ANEXO C). No entanto, não foi possível observar o sinal do carbono espiro C-5 no espectro de RMN ^{13}C , cujo deslocamento nas estruturas de derivados eritrínicos situa-se na região de δ 63–68 (AMER *et al.* 1991), possivelmente decorrente do maior tempo de relaxação dos carbonos não ligados a hidrogênios (PAVIA *et al.*, 2009). Assim, os cinco sinais não observados no espectro de DEPT $^{135}^\circ$ correspondem aos carbonos sp^2 não ligados a hidrogênio C-6, C-12, C-13, C-15 e C-16. Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT $^{135}^\circ$ da substância 3 (ANEXO C) também foram observados cinco sinais referentes

aos carbonos metilênicos correspondentes a C-4, C-8, C-10, C-11 e o carbono relativo ao grupometilenodióxido (Figura 21).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 3 estão de acordo com os dados descritos na literatura para eritralina (AMER *et al.*, 1991).

Tabela 24 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 3 e da eritralina

Posição	Substância 3 ^a $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	Eritralina ^b δH (mult., J [Hz])	Substância 3 $\delta^{13}\text{C}$	Eritralina ^b $\delta^{13}\text{C}$
1	6,57 (<i>dl</i> , J= 10,1)	6,54 (<i>dd</i> , J= 2,2 e 10,1)	123,8	125,2
2	6,15 (<i>dl</i> , J = 10,1)	5,96 (<i>dl</i> , J= 10,1)	134,2	131,5
3	4,49 (<i>dl</i> , J= 13,9)	3,96 (<i>m</i>)	75,2	76,1
4	2,79 (<i>m</i>) 2,56 (<i>dd</i> , J= 5,2 e 11,3)	2,49 (<i>dd</i> , J= 10,4 e 11,6) 1,85 (<i>dd</i> , J= 5,5 e 11,6)	38,3	41,8
5	--	--	--	67,4
6	--	--	140,7	142,2
7	5,79 (<i>sl</i>)	5,73 (<i>m</i>)	119,7	122,8
8	3,65 (<i>dl</i> , J= 14,2 Hz) 4,11 (<i>m</i>)	3,50 (<i>m</i>) 3,75 (<i>dd</i> , J = 2,8 e 14,5)	58,5	57,6
10	3,16 (<i>m</i>) 3,90 (<i>m</i>)	2,90 (<i>m</i>) 3,52 (<i>m</i>)	45,7	44,5
11	2,96 (<i>m</i>) 3,07 (<i>m</i>)	2,70 (<i>m</i>) 2,90 (<i>m</i>)	25,2	25,2
12	--	--	126,4	127,9
13	--	--	127,8	132,4
14	6,74 (<i>s</i>)	6,77 (<i>s</i>)	106,0	106,1
15	--	--	146,9	145,8
16	--	--	147,6	146,1
17	6,71 (<i>s</i>)	6,63 (<i>s</i>)	108,8	108,5
-OCH ₂ O-	5,98 (<i>sl</i>) 5,99 (<i>sl</i>)	5,88 (<i>d</i> , J= 1,4) 5,91 (<i>d</i> , J= 1,4)	101,3	100,6
3-OCH ₃	3,31 (<i>s</i>)	3,33 (<i>s</i>)	55,9	55,9

^a500 MHz; CDCl₃. ^b(360 MHz), [AMER *et al.*, 1991]

4.5.3-Determinação estrutural da substância 22 (8-oxoeritralina)

Figura 22 - Estrutura da 8-oxoeritralina (substância 22).

Para determinação estrutural da substância 22 foram obtidos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H da substância 22 (ANEXO C) exibiu cinco sinais referentes aos hidrogênios olefínicos, sendo que os sinais de δ 6,88 (*dd*, $J = 2,4$ e $10,2$ Hz), 6,35 (*dl*, $J = 10,2$ Hz) e 6,01 (*sl*) correspondem aos hidrogênios vinílicos do dieno conjugado H-1, H-2 e H-7 respectivamente, e os sinais em δ 6,72 (*sl*) e 6,73 (*sl*) são referentes aos hidrogênios do anel aromático H-14 e H-17 (Tabela 25). O singlete intenso δ 3,27 com integração para três hidrogênios sugere a presença dos hidrogênios do grupo metoxilana posição C-3. Os dois sinais em δ 5,91 (*d*, $J = 1,3$ Hz) e 5,95 (*d*, $J = 1,3$ Hz) sugerem presença do grupo metilenodióxido (Tabela 25). A presença de carbonila na posição 8 da substância 22 foi sugerida através da observação do deslocamento para campo baixo do sinal em H-7 (+0,22 ppm) (Tabela 25) em comparação ao sinal de H-7 observado para a eritralina (Tabela 24).

Na análise do espectro de RMN ^{13}C da substância 22 (ANEXO C) observou-se o sinal em δ 171,6, o qual também sugere a presença do grupo carbonila em C-8, pois este sinal apresenta um deslocamento característico de carbonila em amidas, o qual situa-se na região entre δ 155-185 (PAVIA *et al.*, 2009). Além disso, o sinal δ 171,6 não foi observado no espectro de DEPT 135° da substância 22 (ANEXO C), o que confirma que este carbono é quaternário. Outros seis sinais não foram observados no espectro de DEPT 135° e caracterizam outros carbonos quaternários na estrutura, como C-5, C-6, C-12, C-13, C-15 e C-16. A observação dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° da substância 22 (ANEXO C) mostra a presença de quatro sinais referentes aos carbonos metilênicos (δ 38,0, 41,1, 27,3 e 101,2), os quais correspondem a C-4, C-10, C-11 e ao carbono do grupo metilenodióxido. No espectro de RMN ^{13}C da substância 22 também são observados dez sinais na região de δ 100–

150, os quais correspondem carbonos sp^2 , sendo que quatros sinais correspondem aos carbonos do sistema dienoide e seis carbonos pertencem ao anel aromático.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C da substância 22 sugerem uma estrutura da subclasse dienoide com anel metilenodioxido, como observado na estrutura da eritralina. Contudo, as diferenças nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 desses congêneres sugerem a presença de carbonila na posição 8 da substância 22, o que corresponde a estrutura da 8-oxoeritralina, cuja estrutura é mostrada na Figura 22. Os sinais do espectro RMN 1H observados para a substância 22 estão de acordo com os dados de RMN descritos para 8-oxoeritralina por MANTLE e colaboradores (1984) e seus os dados de RMN ^{13}C estão de acordo com os descritos para 8-oxoeritralina por CHAWLA e colaboradores (1983).

Tabela 25 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 22 e da 8-oxoeritralina

Posição	Substância 22 ^a $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	8-oxoeritralina ^b $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	Substância 22 $\delta^{13}\text{C}$	8-oxoeritralina ^c $\delta^{13}\text{C}$
1	6,88 (<i>dd</i> , $J = 2,4$ e $10,2$)	6,87 (<i>dd</i> , $J = 2,6$ e $10,2$)	123,8	124,1
2	6,35 (<i>dl</i> , $J = 10,2$)	6,30 (<i>dd</i> , $J = 2,3$ e $10,2$)	136,9	136,5
3	3,78 (<i>m</i>)	3,78 (<i>ddd</i> , $J = 2,3$; $2,6$; $5,3$ e $10,1$)	74,8	75,1
4	1,71 (<i>dd</i> , $J = 10,2$; $11,5$) 2,82 (<i>ddd</i> , $J = 5,1$; $10,5$; $11,6$)	1,57 (<i>ddd</i> , $J = 11,5$) 2,80 (<i>ddd</i> , $J = 5,3$; $10,1$ e $11,5$)	37,9	37,9
5	--	--	67,3	67,0
6	--	--	157,7	157,2
7	6,01 (<i>sl</i>)	6,0	119,7	120,5
8	--	--	171,6	171,2
10	3,67 (<i>ddd</i> , $J = 7,3$, $9,2$, $12,7$) 3,89 (<i>m</i>)	3,62 (<i>ddd</i> , $J = 7,1$; $9,0$ e $15,8$) 3,87 (<i>ddd</i> , $J = 7,1$; $9,0$ e $15,8$)	41,1	41,5
11	2,98 (<i>ddd</i> , $J = 7,0$; $9,8$ e $16,0$) 3,16 (<i>ddd</i> , $J = 7,0$; $9,8$ e $16,0$)	2,95 (<i>ddd</i> , $J = 7,1$; $9,0$ e $15,8$) 3,10 (<i>ddd</i> , $J = 7,1$; $9,0$ e $15,8$ Hz)	27,3	27,6
12	--	--	127,7	120,1
13	--	--	129,5	130,3
14	6,73 (<i>sl</i>)	6,74	105,0	105,2
15	--	--	147,1	147,3
16	--	--	146,1	146,3
17	6,72 (<i>sl</i>)	6,72	109,5	108,7
-OCH ₂ O-	5,95 (<i>d</i> , $J = 1,3$ Hz) 5,91 (<i>d</i> , $J = 1,3$ Hz)	5,95 5,91	101,2	101,3
3-OCH ₃	3,36 (<i>s</i>)	3,33	56,5	56,5

^a400MHz; CDCl₃. ^bCDCl₃; [MANTLE *et al.*, 1984], ^c90,6 MHz, [CHAWLA *et al.*, 1983].

4.5.4 - Determinação estrutural da substância 2 (eritrinina)

Figura 23 - Estrutura da eritrinina (substância 2).

Para determinação estrutural da substância 2 foram obtidos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

No espectro de RMN ^1H da substância 2 (ANEXO C) podem ser observados cinco sinais na região dos hidrogênios olefínicos, sendo que os sinais em δ 6,56 (*dd*, $J = 10,2$ e $2,2$ Hz), δ 6,00 (*d*, $J = 10,2$ Hz) e 5,75 (*m*) correspondem aos hidrogênios vinílicos do sistema dienoide H-1, H-2 e H-7, respectivamente, e os singletos em δ 6,81 e 6,99 referem-se aos hidrogênios aromáticos em H-14 e H-17 (Tabela 26). Os hidrogênios H-1, H-2 e H-7 caracterizam a estrutura dienoide da substância 2, enquanto os dois sinais de hidrogênios aromáticos sugerem a presença de substituintes nas posições 15 e 16 (Figura 23). O sinal intenso em δ 3,34 refere-se aos hidrogênios do grupo metoxila em C-3, uma evz que apresenta deslocamento químico e integração condizente com tal grupo. Já os dois dubletos em δ 5,96 ($J = 1,4$ Hz) e δ 5,93 ($J = 1,4$ Hz) correspondem aos dois hidrogênios do grupo metilenodióxido (Tabela 23). Na comparação dos espectros de RMN ^1H da substância 2 e eritralina observa-se que o sinal de H-11 em 4,72 (*dd*, $J = 4,5$ Hz) para a substância 2 (Tabela 26) é mais desblindado que o sinal de H-11 da eritralina (Tabela 24), o que sugere a presença de hidroxila na posição 11.

A presença de hidroxila em C-11 é também sugerida pela comparação dos espectros de RMN ^{13}C da substância 2 e da eritralina (ANEXO C), pois verifica-se que o sinal de C-11 em δ 64,9 no espectro da eritrinina (Tabela 26) está mais desblindado que o sinal deste carbono, situado em δ 27,3, no espectro da eritralina (Tabela 24). Essa observação sugere que o sinal de C-11 da eritrinina está na região de carbonos sp^3 ligados a átomos eletronegativos, enquanto o sinal de C-11 da eritralina situa-se em uma região mais blindada, correspondente a

carbonos sp^3 saturados não ligados a átomos de oxigênio. No espectro de DEPT 135° da eritrinina o sinal com δ 64,9 revelou ser um carbono metínico em C-11, enquanto no espectro da eritralina o sinal de C-11 em δ 27,3 é um carbono metilênico, corroborando com a presença do substituinte nessa posição. Na análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° da substância 2 (ANEXO C) também foram observados quatro sinais referentes a carbonos metilênicos em 40,9, 59,1, 51,6 e 100,9, correspondentes aos carbonos C-4, C-8, C-10 e ao carbono do grupo metilenodióxido.

No espectro de RMN ^{13}C da substância 2 também foram verificados dez sinais na região os carbonos sp^2 , referentes a quatro carbonos do sistema dienoide (C-1, C-2, C-6 e C-7) e seis carbonos do anel aromático D. Dentre os carbonos sp^2 , os sinais em δ 130,2, 131,5, 142,1, 146,7 e 147,2 não puderam ser observados no espectro de DEPT 135° desta substância (ANEXO C), pois correspondem aos carbonos quaternários C-6, C-12, C-13, C-6, C-15 e C-16 (Tabela 26). O sinal em δ 66,8 corresponde ao carbono espiro C-5 e também não foi visualizado no espectro de DEPT 135° , confirmando ser um carbono quaternário.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C da substância 2 sugerem uma estrutura da subclasse dienoide com substituinte metilenodióxido, como na estrutura da eritralina. Além disso, os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono na posição 11 desses congêneres sugerem hidroxilação na posição 11 da substância 2, o que corresponde à estrutura da eritrinina (Figura 23). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C da substância 2 também estão de acordo com os descritos na literatura para eritrinina (Tabela 26).

Tabela 26 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 2 e da eritrinina

Posição	Substância 2 ^a $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	Eritrinina ^b $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	Substância 2 $\delta^{13}\text{C}$	Eritrinina ^c $\delta^{13}\text{C}$
1	6,56 (<i>dd</i> , $J= 10,2$ e $2,2$)	6,56 (<i>dd</i> , $J= 10,1$ e $2,2$)	125,3	124,6
2	6,00 (<i>d</i> , $J= 10,2$)	6,0 (<i>dm</i> , $J= 10,1$)	131,2	131,2
3	3,97 (<i>m</i>)	3,97 (<i>m</i>)	76,0	75,5
4	2,39 (<i>dddd</i> , $J= 5,4$ e $11,5$) 1,80 (<i>m</i>)	2,38 (<i>dddd</i> , $J=10,5$; $5,5$; $11,6$ e $1,1$) 1,79 (<i>dd</i>)	41,0	41,5
5	--	--	66,8	66,8
6	--	--	142,1	141,5
7	5,75 (<i>m</i>)	5,74 (<i>m</i>)	123,5	123,3
8	3,87 (<i>m</i>)	3,87 (<i>m</i>)	59,2	55,4
9	3,59 (<i>dd</i> , $J= 4,7$)	3,59 (<i>dd</i> , $J= 4,8$ e $4,2$)	--	--
10	3,00 (<i>dd</i> , $J= 4,2$)	3,02 (<i>dd</i> , $J= 4,8$ e $4,2$)	51,6	53
11	4,72 (<i>dd</i> , $J= 4,5$)	4,71 (<i>dd</i> , $J= 4,8$ e $4,2$)	64,9	62,9
12	--	--	130,2	130,7
13	-	-	131,5	132,3
14	6,81 (<i>s</i>)	6,81(<i>s</i>)	105,8	104,5
15	--	--	147,2	145,8
16	--	--	146,7	145,7
17	6,99 (<i>s</i>)	6,98(<i>s</i>)	107,3	106,7
-OCH ₂ O-	5,96 (<i>d</i> , $J= 1,4$) 5,93 (<i>d</i> , $J= 1,4$)	5,95 (<i>d</i> , $J= 1,4$) 5,92 (<i>d</i> , $J= 1,4$)	101,0	100,5
3-OCH ₃	3,34 (<i>s</i>)	3,33	56,1	55,4

^a400 MHz, CDCl₃. ^b360 MHz, DMSO-*d*6 [AMER *et al.*, 1991]. ^c22,6 MHz, DMSO-*d*6 [DAGNE; STEGLICH, 1984].

4.5.5-Determinação estrutural da substância 7 (erisovina)

Para determinação da estrutura da substância 7, além dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , também foram utilizados dados obtidos a partir de correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC (8 Hz), os quais exibidos no ANEXO C e as correlações espaciais entre hidrogênios foram obtidas através do espectro de NOESY (ANEXO C). As correlações obtidas nos espectros de HMBC, HMQC e NOESY são apresentadas na Tabela 27.

No espectro de RMN ^1H da substância 7 (ANEXO C) foram observados cinco sinais na região de hidrogênios olefínicos, o que é característico dos alcaloides dienoides. No espectro de HMQC foi observada a correlação dos hidrogênios vinílicos δ 6,54 (*dd*, $J=10,2$; $2,1$ Hz), 6,01 (*d*, $10,2$ Hz) e 5,71 (*sl*), com os carbonos sp^2 125, 1 (C-1), 131,8 (C-2) e 122,3 (C-7), respectivamente (Tabela 27). O sinal de hidrogênio aromático em δ 6,64 (*s*), relativo a H-17, correlacionou com o C-11 no espectro de HMBC. Além disso, observou-se correlação espacial do sinal δ 6,64 (*s*) (H-17) com um dos hidrogênios da posição 11 no espectro de NOESY (Figura 24). Esses dados confirmam que este sinal de hidrogênio aromático refere-se a H-17. Já o sinal em δ 6,86 (*s*) (H-14) apresentou correlação com C-5 no espectro de HMBC e correlação espacial com H-3 no espectro de NOESY, o que sugere que este sinal de hidrogênio aromático refere-se a H-14 (Figura 24). A correlação espacial de H-3 e H-14 foi relatada no estudo de NOE *diff* com derivados eritrínicos realizado por DYKE; QUESSY (1981), no qual observou-se que a irradiação de H-3 axial produz cerca de 15 % de NOE no sinal de H-14. Este efeito ocorre pelo fato de H-14 estar espacialmente próximo de H-3.

No espectro de RMN ^1H foram observados dois singletos intensos em δ 3,35 e 3,39, os quais apresentaram integração para três hidrogênios em cada sinal, o que sugere a presença de dois grupos metoxilas na estrutura. O sinal em δ 3,35 (*s*) mostrou correlação com C-3 no espectro de HMBC, o que caracteriza uma estrutura com metoxila na posição 3 (Figura 24). Já o sinal com δ 3,89 (*s*) mostrou correlação espacial com H-17 no espectro de NOESY, o que sugere a presença de metoxila em C-16 (Figura 24).

No espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (ANEXO C) foram observados dez sinais correspondentes a carbonos sp^2 na região de δ 100 a 150, sendo quatro sinais referentes aos carbonos do dieno conjugado (C-1, C-2, C-6 e C-7) e seis carbonos do anel aromático (C-12, C-12, C-14, C-15, C-16 e C-17). Dentre os sinais referentes aos carbonos sp^2 , cinco deles não podem ser visualizados no espectro de DEPT 135° da substância 7 (ANEXO C), pois correspondem aos carbonos quaternários C-6, C-12, C-13, C-15 e C-16. O sinal em δ 66,8 também não foi observado no espectro de DEPT 135° , pois corresponde ao carbono relativo

ao espirocentro C-5. Na análise dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° ainda foi possível verificar quatro sinais referentes aos carbonos metilênicos C-4, C-8, C-10 e C-11.

Os dados de RMN unidimensionais e bidimensionais obtidos para a substância 7 sugerem a estrutura de um alcaloide dienoide com metoxila nas posições 3 e 16, o que corresponde à estrutura da erisovina. Os dados de RMN ^1H da substância 7 correspondem aos dados da erisovina publicado por SINGH e colaboradores (1981), exceto nos sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-14 e H-17, uma vez que neste trabalho observou-se que o sinal de H-14 é mais desblindado que o sinal de H-17, enquanto na literatura encontra-se uma atribuição inversa (Tabela 27). CHAWLA e colaboradores (1983) publicaram dados de RMN ^{13}C da erisovina com atribuições dos sinais baseadas nos espectros de RMN ^{13}C de congêneres deste alcaloide. A comparação dos dados de RMN ^{13}C da substância 7 com estes dados da literatura também sugere que este alcaloide seja a erisovina, apesar das inversões entre os sinais atribuídos C-1 e C-2, bem como inversão dos sinais atribuídos a C-14 e C-17 e entre C-15 e C-16. Contudo, as correlações observadas nos espectros de RMN bidimensionais proporcionam mais informações estruturais em relação às técnicas de 1D e atribuições com base em dados das substâncias na literatura (KAISER, 2000). As correlações H-H e H-C observadas nos espectros bidimensionais de RMN proporcionam uma determinação estrutural e atribuição de sinais de maneira mais segura.

Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC da substância 7 e da erisovina

Posição	Substância 7 ^a $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	Erisovina ^b $\delta^1\text{H}$ (mult., J [Hz])	HMBC	NOESY	Substância 7 $\delta^{13}\text{C}$	Erisovina ^c $\delta^{13}\text{C}$
1	6,54 (<i>dd</i> , $J=10,1; 2,2$)	6,45	C-3, C-5	H-2	125,1	125,6
2	6,01 (<i>dl</i> , $J=10,1$)	6,00	C-6	H-1	131,8	132,0
3	4,06 (<i>m</i>)	--	-OCH ₃	H-14	76,0	76,4
4	1,87 (<i>dd</i> , $J=11,0$) 2,53 (<i>m</i> , $J=5,6$ e 11,6)	--	C-3, C-5, C-13 C-3, C-5, C-6, C-13	H-4	41,0	41,1
5	--	--	--	--	66,8	66,8
6	--	--	--	--	142,2	142,4
7	5,71 (<i>sl</i>)	5,67	--	H-8	122,3	122,4
8	3,54 (<i>m</i>) 3,74 (<i>dd</i> , $J=3,0$ e 14,4)	--	C-7 C-5, C-7, C-6	H-7, H-8, H-10, H-11	56,5	56,8
10	3,00 (<i>m</i>) 3,50 (<i>m</i>)	--	C-5, C-11, C-12 --	H-11	43,5	44,0
11	2,67 (<i>m</i>) 2,97 (<i>m</i>)	--	C-10 C-12, C-17 C-10, C-12	H-10, H-11, H-17	24,1	24,2
12	--	--	--	--	125,7	125,2
13	--	--	--	--	131,6	131,5
14	6,86 (<i>s</i>)	6,63 (<i>s</i>)	C-5, C-12, C-16, C-15, C-17	H-3	112	111
15	--	--	--	--	143,6	145,6
16	--	--	--	--	145,3	143,9
17	6,64 (<i>s</i>)	6,85 (<i>s</i>)	C-11, C-13, C-14, C-15, C-16	H-11	110,8	112,5
-OCH ₃	3,89 (<i>s</i>)	3,87 (<i>s</i>)	C-16	H-17	56,1	55,7
3-OCH ₃	3,35 (<i>s</i>)	3,33 (<i>s</i>)	C-3	--	55,8	55,7

^a400 MHz, CDCl₃. ^b60 MHz, CDCl₃ [SINGH *et al.*, 1981]. ^c90,6 MHz, [CHAWLA *et al.*, 1983]

Figura 24 - Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC (8 Hz) (em azul) e no mapa de contornos NOESY (em alaranjado) da erisovina (substância 7).

4.5.6 - Determinação estrutural da substância 28 (eritratidinona)

Para determinação da estrutura da substância 28, além dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , foram obtidas as correlações entre os hidrogênios através do espectro de COSY (ANEXO C) e as atribuições dos sinais de hidrogênios e carbonos da estrutura foram realizadas através das correlações entre hidrogênios e carbonos observados nos espectros de HMQC e HMBC (8 Hz) mostrados no ANEXO C. Todas as correlações obtidas nos espectros de COSY, HMBC e HMQC são mostradas na Tabela 26.

Na análise do espectro de RMN ^1H da substância 28 (ANEXO C) foram observados apenas três sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ 6,29 (*m*), 6,45 (*s*) e 6,72 (*s*), o que sugere uma estrutura alcenoide. No espectro de HMQC foi observada a correlação do sinal em δ 6,29 (*m*) com o sinal δ 126,7 na região de carbonos sp^2 , o que sugere que este sinal seja relativo ao único hidrogênio vinílico da estrutura, H-1 (Tabela 28). Essa hipótese foi corroborada pela correlação do sinal em H-1 com o sinal atribuído a H-7 no espectro de COSY (Tabela 28). No espectro de HMQC os sinais em δ 6,45 e 6,72 mostraram correlação com os dois carbonos sp^2 aromáticos ligados a hidrogênio na estrutura em 108,5 e 112,7, respectivamente (Tabela 28). A correlação do sinal do hidrogênio em δ 6,45 com C-13 e C-5 indica que este sinal corresponde a H-14, enquanto a correlação do sinal de hidrogênio em δ 6,72 com C-12 e C-11 sugere que este sinal corresponde a H-17. Os singletos intensos em δ 3,42, 3,72 e 3,84 no espectro de RMN ^1H sugerem a presença de três grupos metoxilas na estrutura. Na análise do espectro de HMBC foi observada a correlação do sinal referente a metoxila mais blindada (δ 3,42) com o carbono C-3 (δ 75,7) e o sinal de H-3 correlacionou com o carbono metoxílico δ 58,6 (Tabela 25). Para atribuição dos sinais das metoxilas ligadas

a C-15 e C-16 também foi importante a observação da correlação do sinal de H-11 com C-16 no espectro de HMBC (Figura 25). Observou-se que os hidrogênios das metoxilas mais desblindadas em δ 3,72 e 3,84 correlacionaram com os carbonos aromáticos em C-15 e C-16, respectivamente, como mostrado na Tabela 28 e Figura 25. Os dados de RMN de ^1H da substância 28 estão de acordo com os dados descritos na literatura para eritratidinona descrita por BARTON e colaboradores (1973). No entanto, nos dados de RMN ^1H da literatura o sinal dos hidrogênios metoxílicos mais blindado foram atribuídos a C-15, enquanto o hidrogênio metoxílico mais desblindado foi atribuído a C-16, ao passo que os dados de RMN obtidos neste trabalho mostraram que o hidrogênio metoxílico mais blindado corresponde ao grupo metoxílico da posição 16 e o mais desblindado à posição 15 (Tabela 28).

Na análise do espectro de RMN ^{13}C da substância 28 (ANEXO C) foram verificados oito sinais de carbonos sp^2 na região de 100 a 150 ppm, como o esperado para um alcaloide alcenoide, sendo que seis destes sinais correspondem aos carbonos anel aromático da estrutura (C-12, C-13, C-14, C-15, C-16 e C-17) e dois deles às posições 1 e 6 do alceno. Dentre os sinais referentes aos carbonos sp^2 (região δ 100 – 150), cinco deles não podem ser visualizados no espectro de DEPT 135° da substância 28 (ANEXO C), pois correspondem aos carbonos quaternários C-6, C-12, C-13, C-15 e C-16. Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° da substância 28 também foi possível observar cinco sinais referentes aos carbonos metilênicos C-4, C-7, C-8, C-10 e C-11. O sinal em δ 68,1 foi atribuído ao carbono espiro da posição 5, uma vez que este não apresentou correlação no espectro de HMQC, não foi visualizado no espectro de DEPT 135° e situa-se na região de deslocamento químico característico do espirocentro de derivados eritrínicos, entre δ 65– 68. O sinal mais desblindado no espectro de RMN ^{13}C em δ 196,0 situa-se na região característica do grupo carbonila, entre δ 185–220 (PAVIA *et al.*, 2009), e não foi observado no espectro de DEPT 135 da substância 28 (ANEXO C). Os dados de HMBC mostraram a correlação dos hidrogênios H-3 e H-4 com o sinal em δ 196,0, o que sugere a carbonila na posição 2 (Figura 25).

Com base nos dados de RMN obtidos, sugere-se uma estrutura alcenoide com carbonila na posição 2 e grupos metoxila nas posições 15 e 16 para a substância 28, a qual é condizente com a estrutura da eritratidinona mostrada na Figura 25.

Tabela 28 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C , COSY e HMBC da substância 28 e da eritratidinona

Posição	Substância 28 ^a $\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> [Hz])	COSY	Substância 28 $\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Eritratidinona ^b $\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> [Hz])
1	6,29 (<i>m</i>)	H-7	126,7	C-3, C-5	6,13 (<i>m</i>)
2	--	--	195,0	--	--
3	3,92 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,5 e 12,6)	H-4	75,7	C-2, 3-OCH ₃ , C-4	4,05 (<i>m</i>)
4	2,58 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,5 e 11,6) 2,75 (<i>m</i>)	H-3, H-4	38,4	C-2, C-3, C-5, C-6, C-12	2,16 (<i>t</i> , 13)
5	--	--	68,2	--	--
6	--	--	158,7	--	--
7	2,69 (<i>m</i>) 3,05 (<i>m</i>)	H-7, H-8	26,9	C-6	
8	3,07 (<i>m</i>) 3,88 (<i>m</i>)	H-7, H-8	47,0	C-13	
10	3,58 (<i>m</i>) 3,77 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,6 e 8,6)	H-10, H-11	40,6	C-5, C-8, C-11, C-13	2,08-3,50
11	3,11 (<i>m</i>)	H-10	21,6	C-10, C-12, C-13, C-16, C-17	
12	--	--	119,5	--	--
13	--	--	122,6	--	--
14	6,45 (<i>s</i>)	--	108,6	C-15, C-16, C-13, C-5	6,57 (<i>s</i>)
15	--	--	150,4	--	--
16	--	--	148,5	--	--
17	6,72 (<i>s</i>)	--	112,8	C-11, C-12, C-15, C-16	6,68 (<i>s</i>)
3-OCH ₃	3,42 (<i>s</i>)	--	58,6	C-3	3,50
15-OCH ₃	3,84 (<i>s</i>)	--	56,1	C-15	3,78
16-OCH ₃	3,72 (<i>s</i>)	--	56,3	C-16	3,88

^a400MHz, CDCl₃, ^b[AMER *et al.*, 1991]

Figura 25 - Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC (8 Hz) (em azul) e no mapa de contornos COSY (em alaranjado) da eritratidinona (substância 28).

5 - CONCLUSÕES

A associação dos dados de espectrometria de massas com ionização por elétrons e ionização por eletrospray em alta resolução permitiu a identificação de treze possíveis alcaloides eritrínicos nos extratos alcaloídicos das cascas da espécie nativa e de produtores comerciais de *E. verna*. A identificação através dos dados de IE-EM foi embasada em padrões de fragmentação das subclasses de alcaloides previamente publicados na literatura e mecanismos de fragmentação propostos neste trabalho. Dentre os alcaloides identificados, a eritralina, 8-oxoeritralina, eritrinina, erisodina e eritratidinona foram isolados a partir dos extratos dos produtores comerciais e tiveram suas estruturas determinadas por RMN.

A observação de que não houve diferença no perfil qualitativo dos alcaloides em extratos obtidos por metodologias de extração distintas indica que não há degradação dos derivados eritrínicos quando estes são submetidos a pH ácido. Além disso, a EAB mostrou-se mais adequada para obtenção de frações enriquecidas em alcaloides, a partir das quais os derivados eritrínicos foram isolados.

Verificou-se, no presente trabalho, uma maior homogeneidade entre o perfil alcaloídico do extrato do produtor comercial B e da espécie nativa de *E. verna*. Entretanto, notou-se diferença entre os alcaloides identificados nas cascas dos fornecedores A e B, o que mostra variação dos marcadores químicos de *E. verna* nos materiais vegetais comercializados. Além disso, a diferença dos rendimentos em massa das frações alcaloídicas obtidas a partir das cascas de *E. verna* nativa e comercializadas sugerem variação nos teores de alcaloides presentes nesses materiais vegetais.

Dessa forma, o presente trabalho contribui tanto para obtenção de dados químicos de marcadores do gênero *Erythrina*, quanto para alertar os usuários de preparações medicinais e fitoterápicas baseadas em mulungu em relação a possíveis riscos quanto a ineficácia terapêutica e/ou toxicidade decorrentes de variações de perfil e teor dos marcadores químicos na espécie. Deve-se ressaltar que a variação qualitativa e no teor dos marcadores químicos observados nos diferentes materiais vegetais de mulungu analisados neste trabalho podem decorrer da influência de efeitos da sazonalidade e/ou do cultivo das plantas em ambientes distintos sobre a produção de metabólitos secundários, ou até da comercialização equivocada de espécies distintas do gênero *Erythrina* como *E. verna*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANVISA. Instrução Normativa nº 5, de 11 de Dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 Dez. 2008.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 Abr. 2010.

BARA, M. T. F. et al. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(2), 211-215, 2006.

BARON-RUPPERT, G.; LUEPKE, N. P. Evidence for toxic effects of alkylphenols from *Ginkgo biloba* in the hen's egg test (HET). **Phytomedicine**, v. 8(2), p. 133-138, 2001.

BARTON, D. H. R. et al. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XVIII. The structure and biosynthesis of *Erythrina* alkaloids. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, p. 1529-1537, 1968.

BARTON, D. H. R. et al. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XXII. The alkaloids of *Erythrina lysistemon*, *E. abyssinica*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, and *E. lithosperma*: the structure of erythratidine. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p.874-880, 1973.

BELLA CRUZ, A. et al. Potencial terapêutico de algumas plantas medicinais de flora catarinense. In: SOUZA, G. H. B; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia – Coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011, p. 117-156.

BOAR, R. B.; WIDDOWSON, D. A. Mass spectra of the *Erythrina* alkaloids: a novel fragmentation of the spiran system. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, p. 1591-1595, 1970.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33(2), p. 179-189, 2000.

CARVALHO, P. E. R.; Mulungu (*Erythrina Velutina*). **Embrapa Florestas**, Colombo, circular técnica 160, p. 1-8, Dez. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/circ-tec160.pdf>>. Acesso em: 10 Dez. 2013.

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

CHAWLA, A. S.; CHUNCHATPRASERT, S.; JACKSON, A. H. Studies of *Erythrina* alkaloids. VII-¹³C NMR spectral studies of some *Erythrina* alkaloids. **Organic Magnetic Resonance**, v. 21(10), p. 39-41, 1983.

CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L. C., SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2ª Edição. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 2000. 151 p.

CUI, L. et al. A new erythrinian alkaloid from the seed of *Erythrina addsoniae*. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 32(3), p. 325-328, 2009.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulz Bip. Ex Baper. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 14(2), p. 400-409, 2012.

ESTRADA, E. I. et al. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller, **Revista Fitotecnica Mexicana**, v. 34(4), p. 241-246, 2011.

DAGNE, E.; STEGLICH, W. 8-oxoerythraline: an alkaloid from *Erythrina brucei*. **Phytochemistry**, v. 23(2), p. 449-451, 1984.

DJIOGUE, S. et al. Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1603-1607, 2009.

DYKE, S. F.; QUESSY, S. N. *Erythrina* and related alkaloids. In: MANSKE, R. H. F.; RODRIGO, R. G. A. **The alkaloids**. Volume 18. New York: Academic Press, 1981. cap. 1, p. 1-93.

FAGGION, S. A. et al. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-erythravine and (+)-11- α -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae–Papilionaceae). **Epilepsy e Behavior**, v. 20, p. 441-446, 2011.

FEIJÓ, A. M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 14(1), p. 50-56, 2012.

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94(2), p. 205–217, 2004.

FERNANDES, E. F. A. **Metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenóico**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FERREIRA, L. S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. 2013. 86 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FLAUSINO JR, O. A.; SANTOS, L. A.; VERLI H; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiolytic Effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70(1), p. 48-53, 2007a.

FLAUSINO JR, O. A.; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. **Biological & Pharmaceutica Bulletin**, v. 30(2), p. 375-378; 2007b.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007, 28 p. Relatório do estudo apresentado a Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento e Núcleo Nacional de Economia da Saúde do Ministério da Saúde.

GHOSAL, S.; DUTTA, S. K. BATTACHARYA, S. K. Erythrina – chemical and pharmacological evaluation II: alkaloids of *Erythrina variegata* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61(8), p. 1274-1277, 1972.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30(2), p. 374-381, 2007.

GOOGLE - Mapas. Disponível em: <<https://maps.google.com.br/maps?q=-21.161942,+47.863551&hl=pt&sll=21.166484,-47.856445&sspn=26.070881,39.506836&t=h&z=17>>. Acesso em 1 Dez. 2013.

HENRIQUES, T. A.; LIMBERGER R. P.; KERBER, V. A. MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P., MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6ª Edição. Editora da UFSC, 2007. Cap 29, p. 765-790.

HOUT, H. P. V. et al. Anxiety and risk of death in older men and women. *The British Journal of Psychiatry*, v. 185(5), p. 399-404, 2004.

INNOK, P.; RUKACHAISIRIKUL, T.; SUKSAMRARN, A. Flavanoids and pterocarpanes from the bark of *Erythrina fusca*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57(9), p. 993-996, 2009.

INUBUSHI, Y.; FURUKAWA, H.; JUICHI, M. Alkaloids of the leaves of *Cocculus laurifolius* DC. II. The structure of Erythroculine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.18(10), 1951-1959, 1970.

ITO, K.; FURUKAWA, H. TANAKA, H. Studies on the *Erythrina* alkaloids. I. Alkaloids of *Erythrina x bidwillii* LINDL. (1). Isolation and characterization of bases. **Yakugaku Zasshi**, v. 93(9), p. 1211-1244, 1973.

ITO, K. et al. Studies on the *Erythrina* alkaloids. XI. Alkaloids of *Erythrina crista galli* Linn. Structure of new alkaloid, crystamidine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24(1), p. 52-55, 1976.

JUMA B. F.; MAJINDA, R. R. T. Erythraline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. **Phytochemistry**, v. 65(10), p. 1397-1404, 2004.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K.; Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª edição. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

KAISER, C. R. RMN 2D detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23(2), p. 231-236, 2000.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. **The New England Journal of Medicine**, v. 352(22), p. 2515-2523, 2005.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and development dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125(1), p. 58-60, 2001.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25(3), p. 429-438, 2002.

MANTLE, P. G. et al. 8-oxoeritraline, a natural-occurring principal alkaloid from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 23(6), p. 1336-1338, 1984.

MESSIANO, G. B. et al. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (-)-grandisin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 72, p. 240-244, 2013.

MILLINGTON D. S.; STEINMAN, D. H.; RINEHART JR., K. L. Isolation, gas chromatography-mass spectrometry, and structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* and *Erythrina salviiflora*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96(6), p. 1909-1917, 1974.

OLIVEIRA, M. S. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22(1), p. 157-161, 2012.

ONUSIC, G. M. et al. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35 (4), p. 473-477, 2002.

ONUSIC, G. M. et al. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26(11), p. 1538-1542, 2003.

OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19(1), p. 234-236, 2009.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4th Ed. Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning, 2009. 752 p.

PINO-RODRIGUEZ, S. et al. Género *Erythrina*: fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23(2), p. 252-258, 2004a.

PINO-RODRIGUEZ, S. et al. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of *Erythrina fusca* Lour. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23(4), p. 453-458, 2004b.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

PODEROSO, J. C. M *et al.* Primeiro registro no Brasil de *Erythrina velutina* Willd. como hospedeira de *Tetranychus neocaledonicus* (Acari: *Tetranychidae*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12 (3), p. 398-401, 2010.

PORTAL DA SAÚDE - Plantas de interesse do SUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277>. Acesso em: 10 Dez. 2013.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P., MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia - Da planta ao medicamento**. 6ª Edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 4, p. 75-88.

REFLORA - Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22965>>. Acesso em: 10 Dez. 2013a.

REFLORA - Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22969>>. Acesso em: 10 Dez. 2013b.

REFLORA - Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22966>>. Acesso em: 10 Dez. 2013c.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOOK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P., MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia - Da planta ao medicamento**. 6ª Edição; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap 3, p. 45-74.

RIBEIRO, M. D. *et al.* Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 263-270, 2006).

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SAN MIGUEL-CHAVEZ, R.; SOTO-HERNANDEZ, M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; KITE G. Alkaloid production in elicited cell suspension cultures of *Erythrina americana* Miller. **Phytochemistry Reviews**, v. 6(1), p. 167-173, 2007.

SARRAGIOTTO, M. H.; LEITÃO-FILHO, H. F.; MARSAIOLI, A. J. Erysotrine-N-oxide and erythartine-N-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 59, p. 2771-2775, 1981.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P., MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia - Da planta ao medicamento**. 6ª Edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007a. cap 15, p. 371-400.

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

SETTI-PERDIGÃO, P. et al. *Erythrina mulungu* alkaloids are potent inhibitors of neuronal nicotinic receptor currents in mammalian cells. **PLOS One**, v. 8(12), p. 1-5, 2013.

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

SOTO-HERNÁNDEZ, R. M et al. Erythrina, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. In: RASOOLI, I. **Bioactive Compounds in Phytomedicine**. Rijeka: InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/erythrina-a-potential-source-of-chemicals-from-the-neotropics>>. Acesso em 10 Dez. 2012.

TANAKA, H. et al. Erythrinan alkaloids and isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*. **Planta Medica**, v. 67(9), p. 71-873, 2001.

TANAKA, H. et al. A new *Erythrina* alkaloid from *Erythrina herbacea*. **Journal of Natural Medicine**, v. 62(2), p. 228-231, 2008.

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. Benzodiazepine-Like effects of the alcohol extract from *Erythrina velutina* leaves: memory, anxiety e epilepsy. **Pharmaceutical Biology**, v. 46(5), p. 321-328, 2008.

VASCONCELOS, S. M. et al. Central activity of hidroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56(3), p. 389-293, 2004.

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

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.38(3), p. 519-28, 2005.

WAGNER, H.; BLADT S. Alkaloid Drugs. In: _____. **Plant and Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1996. cap. 1, p. 6-51.

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

WANJALA, C. C. W.; JUMA, B. F.; BOJASE, G. ; GACHE, B. A.; MAJINDA, R. R. T. Erythrinaline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Eryrhina latissima*. **Planta Medica**, v. 68(7), p. 640-642, 2002.

ZÖLLNER, T., SCHWARZ, M. Herbal reference standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31(1), p. 1-21, 2013.

ANEXO B – Espectros de IES-EM em alta resolução dos alcaloides eritrínicos isolados

Figura 3 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) da substância 3.

Figura 4 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) da substância 2.

Figura 5 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) da substância 22

Figura 6 - Espectro de massas com ionização por eletrospray em alta resolução (modo positivo) da substância 28

ANEXO C – Espectros de RMN dos alcaloides eritrínicos isolados

Figura 7 -Espectro de RMN ^1H da substância 3 (eritralina) (CDCl_3 ,500 MHz)

Figura 8 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da substância 3(eritralina) (CDCl_3 ,500 MHz)

Figura 9 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹H da substância 3(eritralina) (CDCl₃,500 MHz)

Figura 10 - Espectro de RMN ¹³C dasubstância 3 (eritralina) (CDCl₃,125 MHz)

Figura 11 - Ampliação 1 do espectro de RMN ^{13}C da substância 3 (eritralina) (CDCl_3 , 125 MHz)

Figura 12 - Espectro de DEPT 135 da substância 3 (eritralina) (CDCl_3 , 125 MHz)

Figura 13 - Espectro de RMN ^1H da substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 14 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 15 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H da substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 16 - Expansão 3 do espectro de RMN ^1H da substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 17 - Espectro de RMN ¹³C da substância 22 substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 18 - Ampliação do espectro de RMN ¹³C da substância 22 substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 19 - Espectro DEPT 135° da substância 22 (8-oxo-eritralina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 20 - Espectro de RMN ¹H da substância 2 (eritrina) (CDCl₃, 400 MHz)

Figura 21 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 22 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 23 - Expansão 3 do espectro de RMN ^1H da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 25 - Ampliação 1 do espectro de RMN ^{13}C da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 26 - Espectro de DEPT 135° da substância 2 (eritrinina) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 28 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 29 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 30 - Expansão 3 do espectro de RMN ^1H da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 31 - Espectro de RMN ¹³C da substância 7 (erisovina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 32 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹³C da substância 7 (erisovina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 33 - Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 34 - Espectro de DEPT 135° da substância 7 (erisovina) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 35 - Expansão 1 do espectro de DEPT 135° da substância 7 (erisovina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 36 - Expansão 2 do espectro de DEPT 135° da substância 7 (erisovina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 37 - Expansão 3 do espectro de DEPT 135° da substância 7(erisovina) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 38 - Mapa de contornos em HMQC da substância 7 (erisovina)

Figura 39 - Expansão 1 do mapa de contornos em HMQC da substância 7 (erisovina)

Figura 40 - Expansão 2 do mapa de contornos em HMQC da substância 7 (erisovina)

Figura 41 - Mapa de contornos em HMBC (8 Hz) da substância 7 (erisovina)

Figura 42 - Expansão 1 do mapa de contornos em HMBC (8 Hz) da substância 7 (erisovina)

Figura 43 - Expansão 2 do mapa de contornos em HMBC (8 Hz) da substância 7 (erisovina)

Figura 44 - Mapa de contornos em NOESY da substância 7 (erisovina)

Figura 45 - Expansão 1 do mapa de contornos NOESY da substância 7 (erisovina)

Figura 46 - Expansão 2 do mapa de contornos de NOESY da substância 7 (erisovina)

Figura 47 - Expansão 3 do mapa de contornos de NOESY da substância 7 (erisovina)

Figura 48 - Espectro de RMN ^1H da substância 28 (eritratidinona) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 49 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H da substância 28 (eritratidinona) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 50 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H da substância 28 (eritratidinona) (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 28 (eritratidinona) (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 52 - Ampliação 1 do espectro de RMN ¹³C da substância 28 (eritratidinona) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 53 - Ampliação 2 do espectro de RMN ¹³C da substância 28 (eritratidinona) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 54 - Espectro de DEPT 135° da substância 28 (eritratidinona) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 55 - Expansão 2 do espectro de DEPT 135° da substância 28 (eritratidinona) (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 56 - Mapa de contornos em COSY da substância 28 (eritratidinona)

Figura 57 - Expansão 1 do mapa de contornos COSY da substância 28 (eritratidinona)

Figura 58 - Mapa de contornos de HMBC (8 Hz) da substância 28 (eritratidinona)

Figura 59 - Expansão 1 do mapa de contornos de HMBC (8 Hz) da substância 28 (eritratidinona)

Figura 60 - Expansão 2 do mapa de contornos de HMBC (8 Hz) da substância 28 (eritratidinona)

Figura 61 - Mapa de contornos de HMQC da substância 28 (eritratidinona)

Figura 62 - Expansão 1 mapa de contornos de HMQC da substância 28 (eritratidinona)

Figura 63 - Expansão 2 mapa de contornos de HMQC da substância 28 (eritratidinona)