

**Investigação fitoquímica de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz****Phytochemical investigation of *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz**

DOI:10.34117/bjdv6n10-405

Recebimento dos originais: 19/09/2020

Aceitação para publicação: 19/10/2020

**Jociano da Silva Lins**

Mestrando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: jociano.lins@ltf.ufpb.br

**Nikole Durand Trigueiro**

Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: durandnikole@gmail.com

**Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva**

Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: anaritarodriguesr@gmail.com

**Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo**

Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: pedrotrigueiredo@hotmail.com

**Carlos Arthur Gouveia Veloso**

Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: arthurgouveia@ltf.ufpb.br

**Emille Wannick Reinaldo da Silva**

Graduanda em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: wannickemille@gmail.com

**Maria de Lourdes Veloso Gouveia Dantas**

Graduanda em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: maria.lvgd@hotmail.com

**Ana Paula do Nascimento Prata**

Doutora em Ciências Biológicas (Botânica) pela Universidade Federal de Alagoas  
Centro de Ciências Agrárias (CECA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção  
Vegetal), Mata do Rolo, Rio Largo, AL, 57000-100, Brasil  
E-mail: apprata@yahoo.com.br

**Josean Fechine Tavares**

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba Centro de  
Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Campus I  
– Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: joseanfechine@yahoo.com.br

**Marcelo Sobral da Silva**

Doutor em química orgânica pela Universidade de São Paulo  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: marcelosobral.ufpb@gmail.com

**Vicente Carlos de Oliveira Costa**

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde (CCS), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM),  
Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa-PB, 58051-900, Brasil  
E-mail: vicente@ltf.ufpb.br

**RESUMO**

*Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz é uma espécie restrita à região Nordeste do Brasil, encontrada nos estados do Ceará, Piauí, Sergipe e Bahia, ocorrendo respectivamente em vegetação de Restinga, Cerrado e Carrasco. O estudo do extrato de *E. rimosum*, reportou a identificação de triterpenos pentacíclicos, esteróide, alcaloide tropânico e flavonoides. Sendo assim, foi realizado um estudo cromatográfico de seu extrato etanólico bruto. O material botânico das partes aéreas foi coletado no município de Pirambu, estado de Sergipe e identificado pela Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Em seguida, foi seco em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C, triturado em moinho mecânico e submetido à maceração com EtOH a 95%. O EEB (105 g) foi dissolvido em uma solução de metanol:água (7:3 v/v) e submetido a um processo de partição com os seguintes solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila. A fase AcOEt foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e como fase móvel, os solventes Hex, AcOEt e MeOH, puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se 30 frações que após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram reunidas de acordo com os seus respectivos fatores de retenção (R<sub>f</sub>). A reunião das frações de 23 a 25 foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a um Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD). Obtendo-se 8 frações. Das frações 4 e 2 obteve-se as substâncias codificadas de Er-1 e Er-2 respectivamente. Estas tiveram suas estruturas identificadas através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, técnicas bidimensionais e em comparação com dados da literatura, sendo denominadas: Camferol-3-rutinosídeo e Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo-α-L-raminosídeo, dois flavonoides glicosilados que estão sendo relatados pela primeira vez na espécie em estudo.

**Palavras-chave:** Erythroxylaceae, *E. rimosum*, Camferol-3-rutinosídeo.

**ABSTRACT**

*Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz is a species restricted to the northeastern region of Brazil, found in the states of Ceará, Piauí, Sergipe and Bahia, occurring respectively in Restinga, Cerrado and Carrasco vegetation. The study of the extract of *E. rimosum*, reported the identification of pentacyclic triterpenes, steroid, tropic alkaloid and flavonoids. Thus, a chromatographic study of its crude ethanol extract was carried out. The botanical material of the aerial parts was collected in the municipality of Pirambu, state of Sergipe and identified by Profa. Dr. Ana Paula do Nascimento Prata, Department of Biology, Federal University of Sergipe (FUS). It was then oven dried with circulating air at an average temperature of 40 ° C, ground in a mechanical mill and subjected to steeping with 95% EtOH. The BSE (105 g) was dissolved in a methanol: water (7: 3 v / v) solution and partitioned with the following solvents: hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The AcOEt phase was subjected to column chromatography, using silica gel 60 as stationary phase and as mobile phase, the Hex, AcOEt and MeOH solvents, pure and in binary mixtures in increasing order of polarity. This yields 30 fractions which after analytical thin layer chromatography (TLC) were pooled according to their respective retention factors (R<sub>f</sub>s). The fractions from 23 to 25 were submitted to High Performance Liquid Chromatography Coupled to a Diode Array Detector (HPLC-DAD). Getting yourself 8 fractions. From fractions 4 and 2 the coded substances of Er-1 and Er-2 respectively were obtained. They have had their structures identified by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C, and two-dimensional techniques in comparison with literature data, namely: Kaempferol-3-rutinoside and Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside-α-L-raminoside, two glycosylated flavonoids that are being reported for the first time in the study species.

**Keywords:** Erythroxylaceae, *E. rimosum*, Kaempferol-3-rutinoside.

**1 INTRODUÇÃO**

As plantas são utilizadas com fins terapêuticos para profilaxia, tratamento e cura das enfermidades, sendo apontada como o primeiro recurso terapêutico utilizado pelo homem (NETO et al., 2014; OLIVEIRA e LUCENA, 2015).

Realmente, as plantas possuem a capacidade de gerar substâncias químicas que podem auxiliar sua sobrevivência e/ou elaboração de mecanismos de defesa. Essas substâncias são denominadas de metabólitos biotivos provenientes do seu metabolismo secundário. Estes metabólitos que as plantas produzem e estocam apresentam aplicações biológicas, desempenhando um papel ecológico, tendo diversos usos e aplicações para o homem como medicamentos, perfumes, alimentos funcionais, herbicidas e inseticidas (GARCÍA; CARRIL, 2009).

O uso dos recursos naturais vem aumentando, isso ocorre devido às plantas estão se tornando importantes agentes produtores de substâncias químicas biologicamente ativas, nessa lógica, a procura por possibilidades terapêuticas para diversas patologias faz da pesquisa de produtos naturais uma área fundamental pra se descobrir novas moléculas com variadas atividades biológicas (MMA, 2014).

Desta forma, os estudos fitoquímicos proporcionam um conhecimento mais abrangente sobre as espécies analisadas, possibilitando uma melhor utilização terapêutica das plantas (RAHMAN et al, 2005).

A imensa variedade de espécies vegetais no Brasil e o seu uso sustentável, se torna um grande desafio para a comunidade científica nacional. Logo, cabem as nossas universidades, transformar um vasto patrimônio natural, em uma gama de compostos bioativos para serem utilizados na terapêutica, produzindo matéria-prima para a elaboração de novos fármacos capazes de debelar enfermidades como: infecções bacterianas e fúngicas, câncer, doenças neurológicas e doenças tropicais. A finalidade na pesquisa de produtos naturais baseia-se na identificação de compostos biotivos das plantas medicinais e posteriormente avaliado em relação a sua atividade biológica (CRAGG; NEWMANN, 2012; KAITIN, 2010).

A região Nordeste do Brasil é um dos principais locais onde pode ser identificadas várias espécies com potencial medicinal, usadas para o tratamento de inúmeras doenças (AGEITEC, 2016).

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

A família Erythroxylaceae é composta por quatro gêneros e aproximadamente 240 espécies com distribuição pantropical, tendo seus principais centros de diversidade e endemismo no Brasil, Venezuela e Madagascar (DALY, 2004). A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum* P. Browne, que apresenta distribuição ampla sendo encontrado nos quatro continentes, principalmente na América tropical (PLOWMAN, 2001). Os outros três gêneros, *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl. E *Pinacopodium* Exell & Mendonça, possuem poucas espécies e apresentam distribuição exclusiva na África (PLOWMAN; BERRY, 1999; DALY 2004).

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

De acordo com ZUANAZZI et al., (2001), o interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam, que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul. Quimicamente, o gênero caracteriza pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre os quais se destaca a cocaína, um alcaloide natural produzido por *Erythroxylum coca* Lam, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (BOHM et al., 1982; GRIFFIN & LIN, 2000). Ele é o maior gênero da família Erythroxylaceae, com ampla distribuição, nas regiões tropicais da Austrália, Ásia, África e Américas (LOIOLA, 2007).

No Brasil, o gênero possui cerca de 74 espécies com distribuição restrita, que corresponde a 40% das espécies da região Neotropical, encontradas nos mais diversos tipos de vegetação do país, ocorrendo desde as florestas úmidas da Amazônia e Atlântica, até as matas secas do Cerrado e da Caatinga (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

*E. rimosum* O. E. Schulz é uma espécie restrita à região Nordeste do Brasil, encontrada nos estados do Ceará, Piauí, Sergipe e Bahia, ocorrendo respectivamente em vegetação de Restinga, Cerrado e Carrasco (LOIOLA, 2010).

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

Em outro estudo realizado por RIBEIRO, et al (2013) com a espécie *E. rimosum*, o alcaloide tropânico 7b-acetoxo-3b,6b-dibenzoyloxytropane exibiu atividade anticolinesterase.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

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

### **2.2 ESPECÍFICOS**

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

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

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

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

As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas cromatográficas da Merck, contendo sílica gel70 com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, diâmetro de 20 x 20 cm e espessura de 0,25 mm.

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

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

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

Para a caracterização do perfil cromatográfico das frações foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Tédia<sup>®</sup>, Brasil) e água ultra-pura obtida por sistema de purificação Milli-Q Millipore<sup>®</sup>. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de desgaseificação DGU-20A5, detector SPD-M20A arranjo de diodo (DAD). A coluna utilizada foi Kromasil<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 $\mu$ m), com pré-coluna Security Guard Gemini<sup>®</sup> C-18 (4 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5  $\mu$ m).

As partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* foram coletadas no município de Pirambu, estado de Sergipe. E em seguida foi identificado pela Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da botânica do centro de ciências Biológicas da saúde da UFS sob identificação AS 37756. Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (**SisGen**), sob número A9BB01C.

### 3.2 PROCESSAMENTO DAS PARTES AÉREAS DE *ERYTHROXYLUM RIMOSUM* O. E. SCHULZ

As partes aéreas (1,0 Kg) foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de trituração em moinho mecânico, obtendo-se 480 g de pó seco (Esquema 1, p. 8).

#### **3.2.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz**

O material vegetal seco e triturado foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95%, em um recipiente de aço inoxidável denominado percolador. Foram feitos quatro processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador a uma temperatura média de 40 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que pesou 105 g (Esquema 1, p. 8).

#### **3.2.2. Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das partes aéreas de *Erythroxyllum rimosum* O. E. Schulz**

O EEB foi dissolvido em uma solução de metanol:água (7:3 v/v) e submetido a um processo de partição com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. Fornecendo as fases, hexânica (4,0 g), diclorometano (2,6 g) e acetato de etila (10,1 g) (Esquema 1, p. 8).

A fase acetato de etila foi submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel, e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias (Tabela 1, p. 9), em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se assim um total de 30 frações. Essas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (Rf), após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas em grupos. Posteriormente foi desenvolvido uma metodologia analítica em CLAE-DAD da reunião das frações de 23 a 25 e em seguida a separação cromatográfica em CLAE-DAD preparativo, as frações obtidas foram analisadas por Ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-APT resultando em duas substâncias denominadas de Er-1 e Er-2 (Esquema 2, p. 9).

### **3.2.3 Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo de Er-1 e Er-2 da fase acetato de etila.**

Para a preparação das amostras, pesou-se em tubos de eppendorf 1 mg da reunião das frações de 14 a 16 (Amostra 1), 17 a 19 (Amostra 2) e 23 a 25 (Amostra 3), sendo estas frações selecionadas para a separação na CLAE por terem as maiores massas. Em seguida, foram adicionados 1 ml de MeOH nas três amostras separadamente e solubilizado por 20 minutos no sonicador, após esse tempo o conteúdo de cada eppendorf foi filtrado em um filtro com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . Após a preparação das amostras, as mesmas foram injetadas no equipamento de CLAE-DAD analítico. Sendo a fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (ac. fórmico 0,1 %) com fluxo da fase móvel de 0,6 ml/min e um volume de injeção de 20  $\mu\text{l}$ . A primeira injeção foi realizada no método exploratório composto por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (0,1% de ácido fórmico) em modo gradiente de 5 a 95% de MeOH. Após análise do cromatograma foi proposto que o método descrito anteriormente deveria passar por modificações para se obter um melhor perfil cromatográfico. Sendo assim, o novo método foi composto por MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada (0,1% de ácido fórmico) na proporção de 40 a 80% de MeOH em 60 min, 80 a 100 % em 10 min, permanecendo em modo isocrático 100% em 20 min, 100 a 40% em 5 min, permanecendo em modo isocrático por 20 min, totalizando 115 min de corrida cromatográfica. Após o desenvolvimento do método analítico a fração escolhida para a separação na CLAE preparativo foi 23 a 25 por ter a melhor separação e resolução dos picos na fase de desenvolvimento do método. Para a preparação da amostra, pesou-se 600 mg da fração 23 a 25 que foi dividida igualmente em 4 eppendorfs, sendo assim cada eppendorf comportou 150 mg. Em seguida foi adicionado em cada tubo 1000  $\mu\text{l}$  de MeOH, ficando na concentração de 150 mg/ml. Foi sonicado por 40 min, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para outros eppendorfs. O volume de injeção feito no HPLC preparativo foi de 200  $\mu\text{l}$  com fluxo da fase móvel de 8 ml/min. Foram realizadas 12 injeções de 200  $\mu\text{l}$ . Ao final foram coletados 8 picos (Figura 15, p. 21). Posteriormente foram concentradas em rota evaporador e submetidas a análises de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-APT para identificação/determinação estrutural.

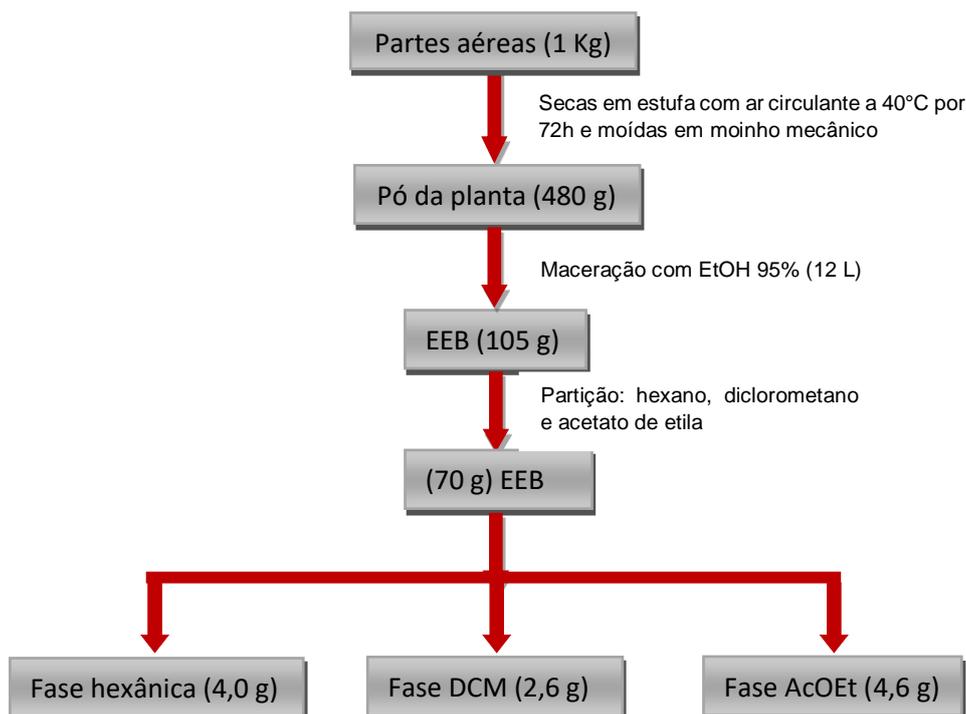
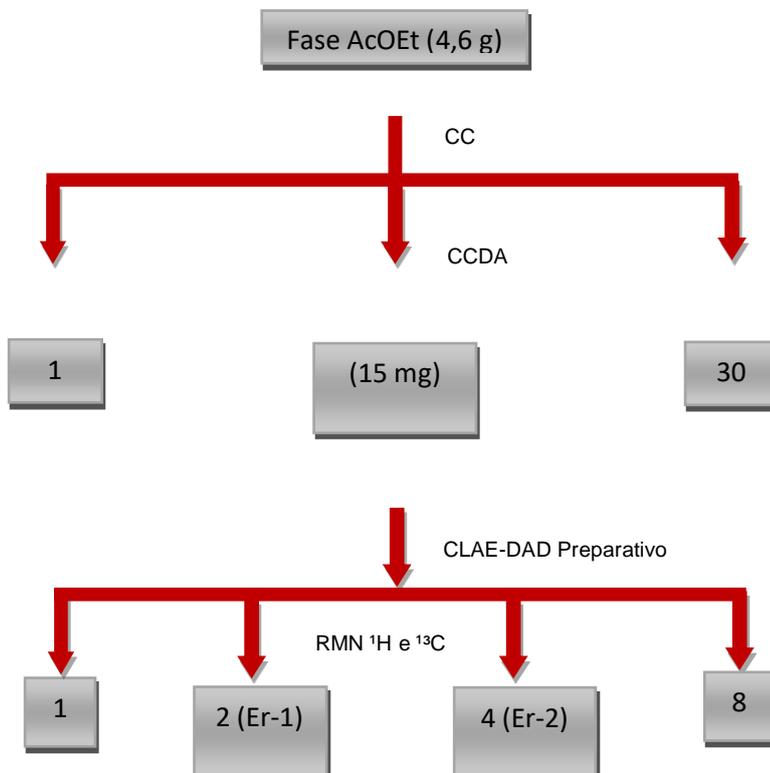
Esquema 1 - Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.Esquema 2 - Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.

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

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

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS PARTES AÉREAS DE *ERYTHROXYLLUM RIMOSUM* O. E. SCHULZ.

#### 4.1.1 Identificação estrutural de Er-1

A substância codificada como Er-1 foi isolada como um sólido marrom com 20 mg. O espectro de <sup>13</sup>C-APT obtido a 125 MHz em CD<sub>3</sub>OD (Figura 4, p. 13) mostrou a presença de 27 sinais. Destes 9 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 16 a carbonos metínicos, 1 carbono metilênico e 1 carbono metílico. Os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  163,1; 101,4; 166,3 e 94,9 foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-5; C-6; C-7 e C-8 respectivamente, sugerindo-se tratar do padrão de substituição do anel A de flavonas oxigenadas em C-5 e C-7. O sinal em  $\delta_c$  132,1 foi correspondente aos carbonos C-2' e C-6' e o sinal em 116,70 foi atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'; sendo estes característicos do anel B de flavonas. Os sinais em  $\delta_c$  158,7; 136,4 e 179,6 foram atribuídos aos carbonos C-2; C-3 e C-4 respectivamente, sendo condizente com uma flavona oxigenada em C-3. De acordo com os dados de <sup>13</sup>C foi possível também sugerir a presença de duas unidades osídicas, sendo uma glicose e uma ramnose, isto foi devido aos sinais dos carbonos anoméricos em  $\delta_c$  103,6 e 102,4 e ainda para o carbono metilênico em 68,6 e carbono metílico em  $\delta_c$  17,8, e, além do conjunto de sinais entre  $\delta_c$  68,6 e 78,2 sugeriram a presença da rutinose.

No espectro de <sup>1</sup>H (Figura 1, p. 9) observou-se dois dupletos em  $\delta_H$  6,38 e 6,20 ( $J= 2,0$  Hz), característicos de hidrogênios H-8 e H-6 de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7, além de um duplete em  $\delta_H$  7,78 ( $J= 8,8$  Hz) que foi atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6', um duplete em  $\delta_H$  6,93 ( $J= 8,8$  Hz) que foi atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' do anel B de flavonas em um sistema AA'BB'.

Complementarmente, foi observado no espectro um duplete em  $\delta_H$  5,37 ( $J = 1,6$  Hz) e um sinpleto em  $\delta_H$  4,57, correspondente aos hidrogênios anoméricos da glicose e rhamnose respectivamente. A presença de um duplete em  $\delta_H$  4,21 (dd,  $J = 3,6; 1,6$  Hz) e outro em 1,10 (d,  $J = 6,0$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilênico e metílico respectivamente. Esses dados corroboram com uma unidade osídica glicose ligada a rhamnose. A constante de acoplamento  $J = 1,6$  Hz foi condizente com uma unidade  $\alpha$ -rutinosídeo (Tabela 2, p. 11).

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC de Er-1 (Figura 5, p. 14) do hidrogênio em  $\delta_H$  5,37 (H-1'') com o carbono C-3 em  $\delta_H$  136,4 a três ligações confirmou a inserção da unidade osídica rutinosídeo em C-3. Após estas análises, foi possível concluir que Er-1 trata-se do Camferol-3-O-rutinosídeo, um flavonoide glicosilado que está sendo relatado pela primeira vez na espécie em estudo.

**Tabela 2** - Dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ -APT de Er-1 e da literatura (500 x 125 MHz em  $CD_3OD$ ).

Er-1			Sousa et al., 2014	
C	$\delta_{^{13}C}$	$\delta_H$	$\delta_{^{13}C}$	$\delta_H$
2	158,69	-	158,70	-
3	136,36	-	135,50	-
4	179,63	-	179,40	-
5	163,10	-	163,10	-
6	101,38	6,20 (d, $J = 2,0$ Hz)	100,00	6,21 sl
7	166,29	-	166,20	-
8	94,92	6,38 (d, $J = 2,0$ Hz)	95,00	6,40 sl
9	159,54	-	159,40	-
10	105,60	-	105,60	-
1'	122,78	-	122,80	-
2'	132,05	7,78 (d, $J = 8,8$ Hz)	132,40	8,06 (d, $J = 9,0$ Hz)
3'	116,70	6,93 (d, $J = 8,8$ Hz)	116,20	6,90 (d, $J = 9,0$ Hz)
4'	161,75	-	161,50	-
5'	116,70	6,93 (d, $J = 8,8$ Hz)	116,20	6,90 (d, $J = 9,0$ Hz)
6'	132,05	7,78 (d, $J = 8,8$ Hz)	132,40	8,06 (d, $J = 9,0$ Hz)
1''	103,66	5,37 (d, $J = 1,6$ Hz)	104,60	5,11 (d, $J = 7,5$ Hz)
2''	72,20	3,52-4,22 (m)	76,80	3,27-3,80 m
3''	77,26	3,52-4,22 (m)	78,20	3,27-3,80 m
4''	71,50	3,52-4,22 (m)	71,50	3,27-3,80 m

5''	78,20	3,52-4,22 (m)	77,20	3,27-3,80 m
6''	68,60	4,21 (dd, $J = 3,6; 1,6$ Hz)	68,60	3,80 m
1'''	102,40	4,57 (s)	102,40	4,52 sl
2'''	72,27	3,32-4,22 (m)	72,10	3,27-3,80 m
3'''	72,48	3,32-4,22 (m)	72,30	3,27-3,80 m
4'''	72,06	3,32-4,22 (m)	74,00	3,27-3,80 m
5'''	69,73	3,32-4,22 (m)	69,70	3,27-3,80 m
6'''	17,80	1,10 (d, $J = 6,0$ Hz)	17,90	1,12 (d, $J = 6,0$ Hz)

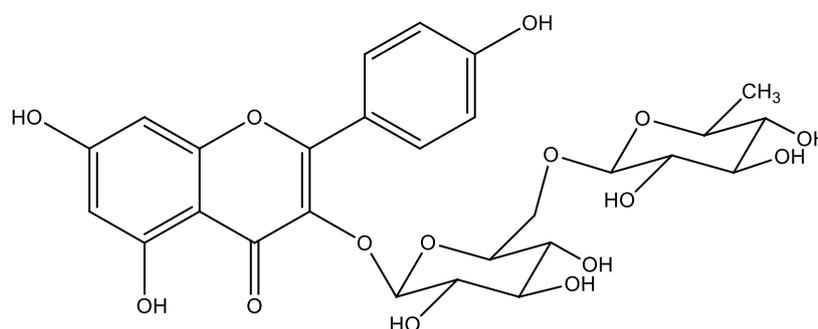
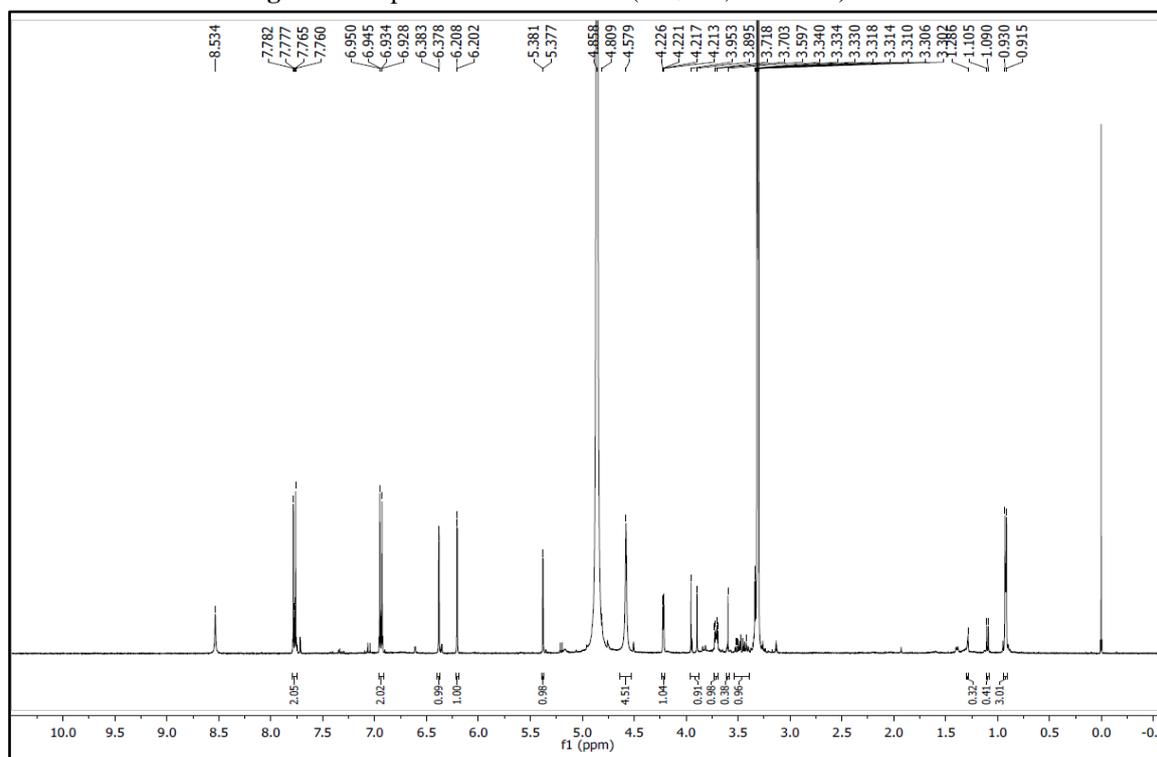
Camferol-3-*O*-rutinosídeoFigura 1 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Er-1.

Figura 2 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de **Er-1** na região de 0,6-5,6 ppm.

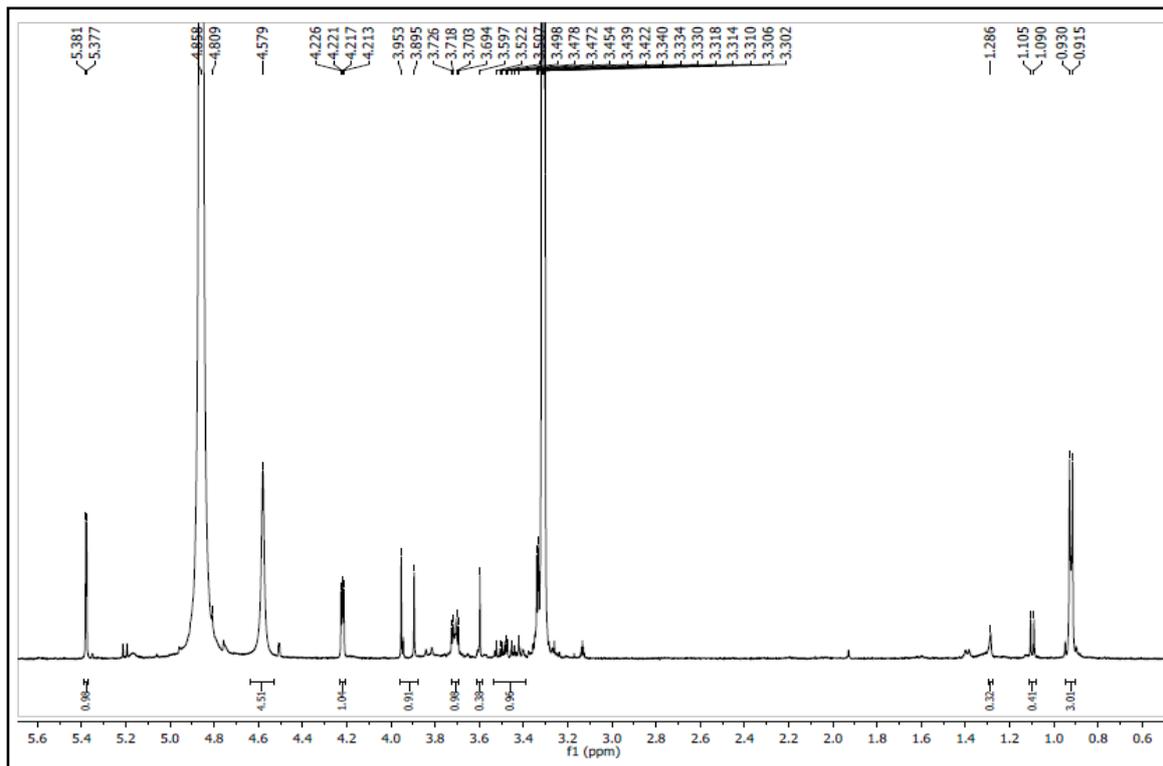


Figura 3 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de **Er-1** na região de 5,2-9,0 ppm.

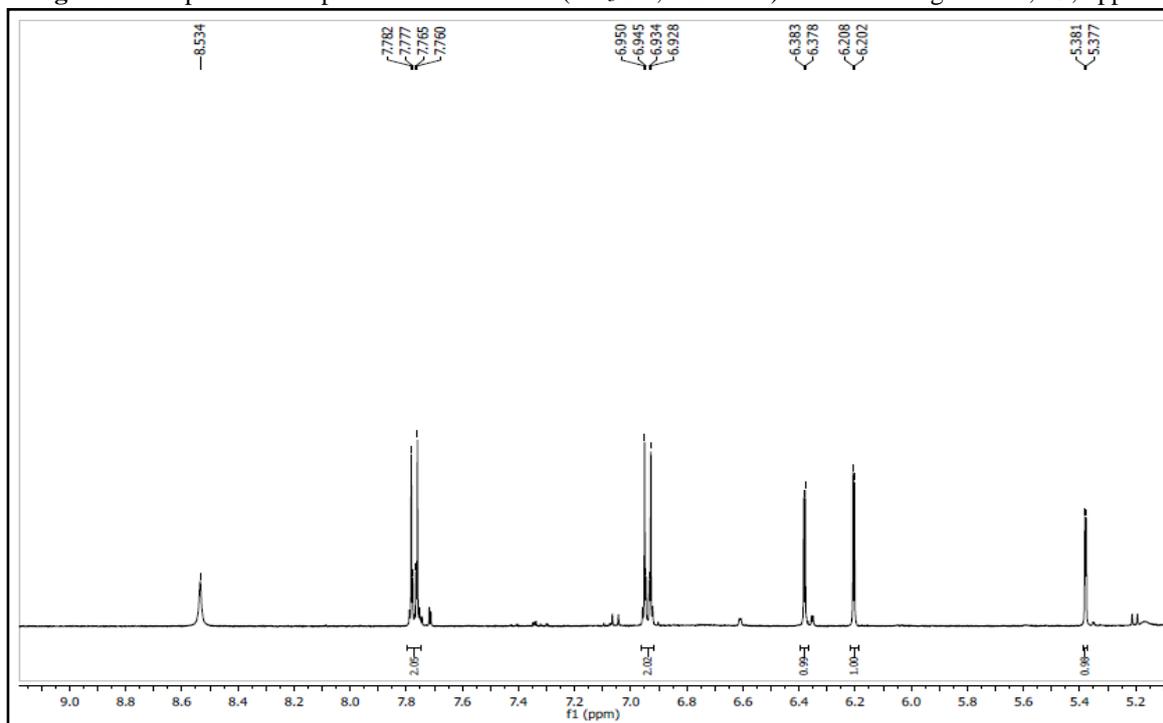
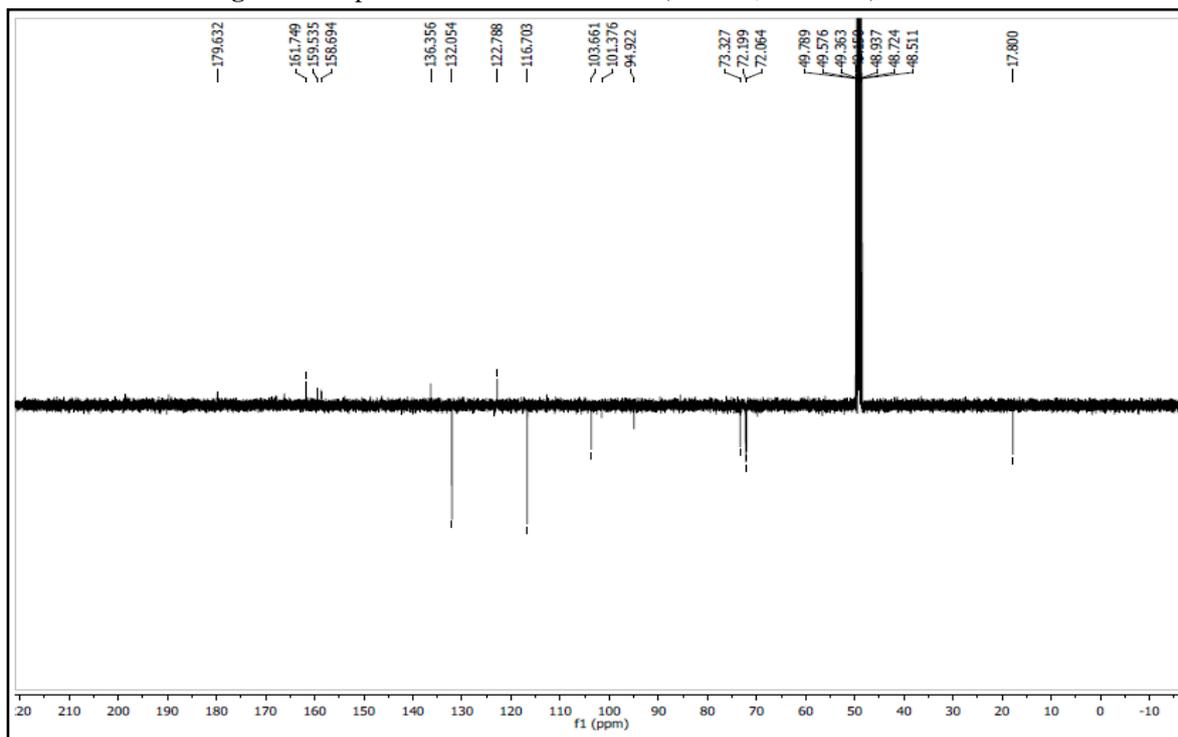
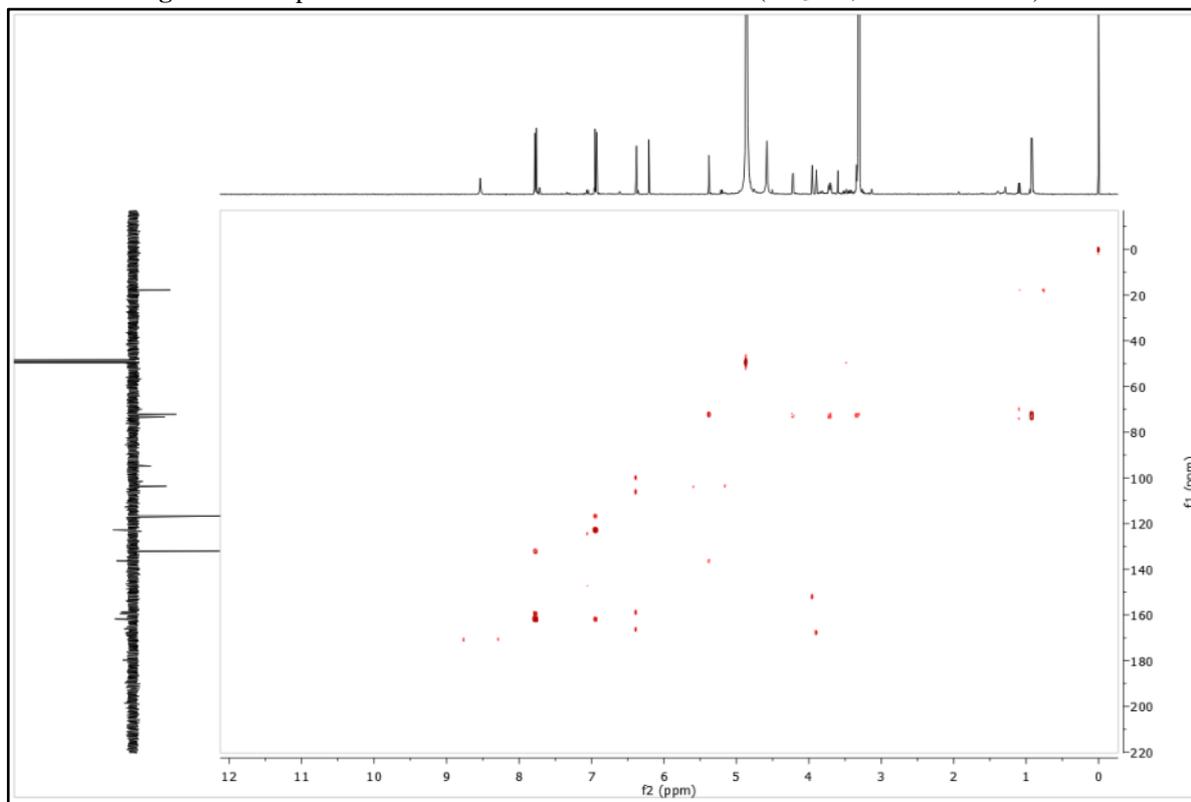
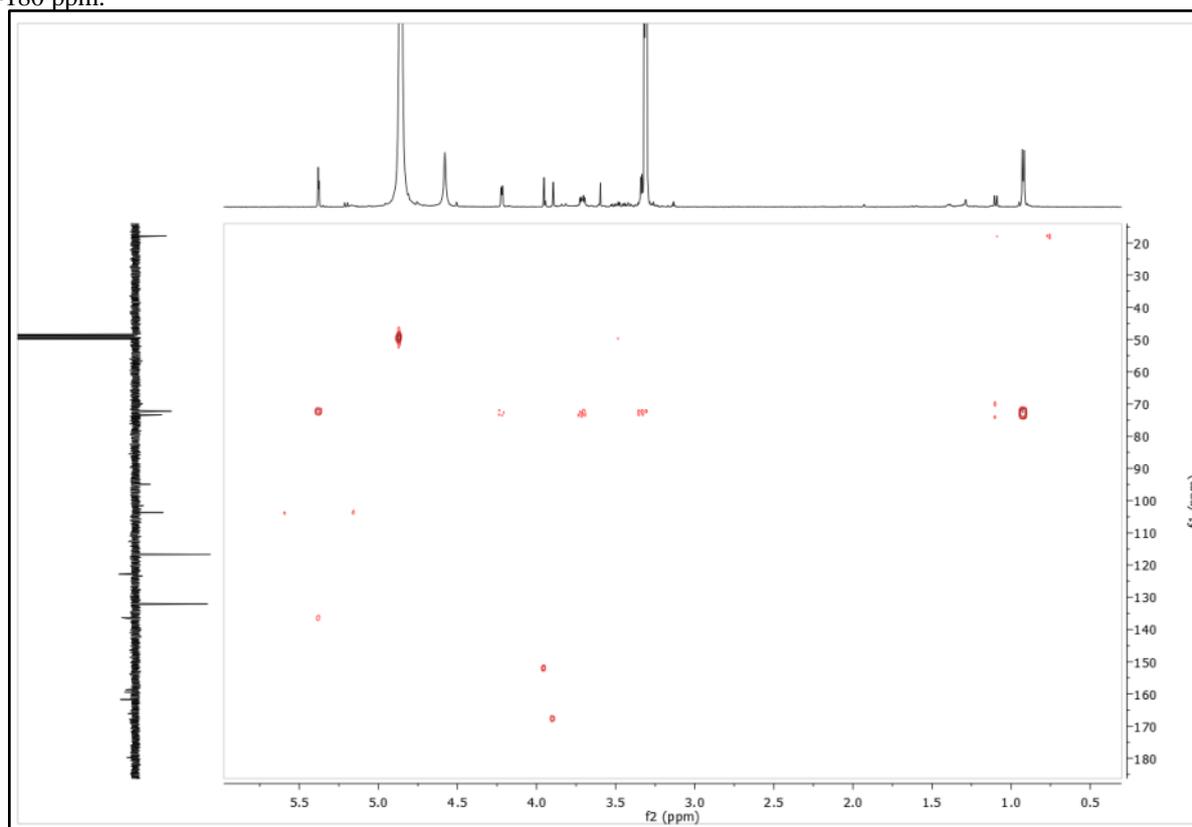
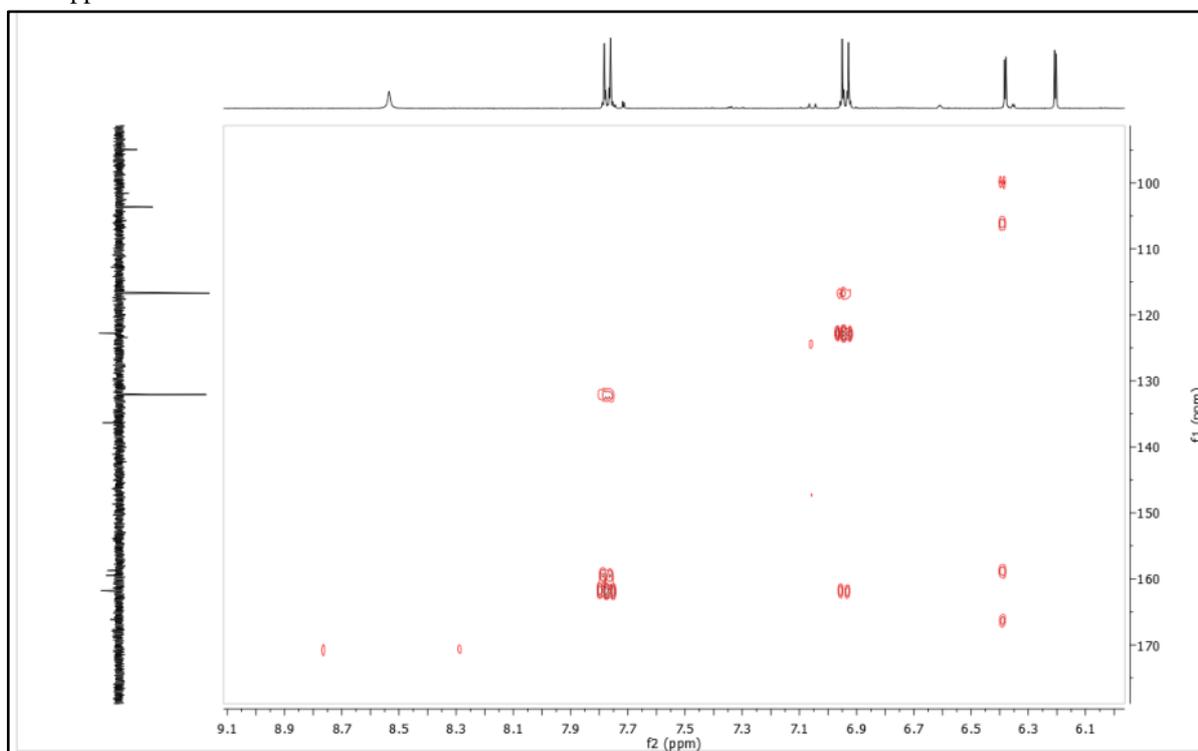


Figura 4 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de Er-1.Figura 5 – Mapa de contorno HMBC da substância Er-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 x 125 MHz).

**Figura 6** – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **Er-1** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz) na região de 0,5-5,5 ppm x 20-180 ppm.



**Figura 7** – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **Er-1** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz) na região de 6,1-9,1 ppm x 100-170 ppm.



#### 4.1.2. Identificação estrutural de Er-2

A substância codificada como Er-2 foi isolada como um sólido marrom com 15 mg. O espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT obtido a 125 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Figura 11, p. 19) mostrou a presença de 27 sinais. Destes 10 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 15 a carbonos metínicos, 1 carbono metilênico e 1 carbono metílico. Os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  166,3; 100,2; 166,3 e 95,1 foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-5; C-6; C-7 e C-8 respectivamente, sugerindo-se tratar do padrão de substituição do anel A de flavonas oxigenadas em C-5 e C-7. Os sinais em  $\delta_c$  117,8; 116,2 e 123,7 correspondentes aos carbonos C-2'; C-5' e C-6' respectivamente, são característicos do anel B de flavonas. Os sinais em  $\delta_c$  158,7; 135,7 e 179,6 foram atribuídos aos carbonos C-2; C-3 e C-4 respectivamente, sendo condizente com uma flavona oxigenada em C-3. De acordo com os dados de  $^{13}\text{C}$  foi possível também sugerir a presença de duas unidades osídicas, sendo uma glicose e uma ramnose, isto foi devido aos sinais dos carbonos anoméricos em  $\delta_c$  102,6 e 101,4 e ainda para o carbono metilênico em 68,6 e carbono metílico em  $\delta_c$  18,0, e, além do conjunto de sinais entre  $\delta_c$  69,8 e 78,3 sugeriram a presença da rutinose.

No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 8, p. 17) observou-se dois dupletos em  $\delta_H$  6,41 e 6,21 ( $J = 2,0$  Hz), característicos de hidrogênios H-8 e H-6 de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7, além de um duplo duplo em  $\delta_H$  7,63 ( $J = 8,4; 2,0$  Hz), um duplo em  $\delta_H$  6,89 ( $J = 8,4$  Hz) e um duplo em  $\delta_H$  7,67 ( $J = 2,0$  Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-6'; H-5' e H-2', respectivamente do anel B de flavonas em um sistema ABX. Complementarmente, foi observado no espectro um duplo em  $\delta_H$  5,10 ( $J = 7,6$  Hz) e um duplo em  $\delta_H$  4,52 ( $J = 2,0$  Hz), correspondente aos hidrogênios anoméricos da glicose e ramnose respectivamente. A presença de um duplo em  $\delta_H$  3,80 (d,  $J = 9,6$  Hz) e outro em 1,13 (d,  $J = 6,0$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilênico e metílico respectivamente. Esses dados corroboram com uma unidade osídica glicose ligada a ramnose. A constante de acoplamento ( $J = 7,6$  Hz) foi condizente com uma unidade  $\beta$ -rutinosídeo (Tabela 3, p.16).

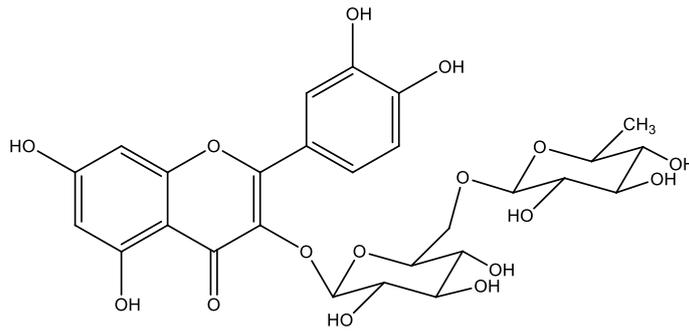
As correlações observadas no mapa de contornos HMBC de Er-2 (Figura 12, p. 19) do hidrogênio em  $\delta_H$  5,10 (H-1'') com o carbono C-3 em  $\delta_H$  135,7 a três ligações confirmou a inserção da unidade osídica rutinosídeo em C-3. Após estas análises, foi possível concluir que Er-2 trata-se da Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo- $\alpha$ -L-raminosídeo, um flavonoide glicosilado que está sendo relatado pela primeira vez na espécie em estudo.

Tabela 3 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -APT de Er-2 e da literatura (500 x 125 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Er-2

Sousa et al., 2014

C	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$
2	158,65	-	158,50	-
3	135,72	-	135,90	-
4	179,56	-	179,50	-
5	166,25	-	163,00	-
6	100,15	6,21 (d, $J = 2,0$ Hz)	100,00	6,21(d, $J = 2,0$ Hz)
7	166,28	-	166,10	-
8	95,05	6,41 (d, $J = 2,0$ Hz)	94,90	6,40 (d, $J = 2,0$ Hz)
9	159,50	-	159,00	-
10	105,74	-	105,60	-
1'	123,25	-	123,00	-
2'	117,82	7,67 (d, $J = 2,0$ Hz)	117,90	7,66 (d, $J = 2,0$ Hz)
3'	145,99	-	145,80	-
4'	149,97	-	150,00	-
5'	116,22	6,89 (d, $J = 8,4$ Hz)	116,10	6,86 (d, $J = 8,5$ Hz)
6'	123,69	7,63 (dd, $J = 8,4; 2,0$ Hz)	123,60	7,60 (dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz)
1''	102,55	5,10 (d, $J = 7,6$ Hz)	104,70	5,11 (d, $J = 7,5$ Hz)
2''	75,85	3,25-3,63 (m)	75,70	3,20-3,90 (m)
3''	77,34	3,25-3,63 (m)	77,20	3,20-3,90 (m)
4''	71,53	3,25-3,63 (m)	71,40	3,20-3,90 (m)
5''	78,30	3,25-3,63 (m)	78,20	3,20-3,90 (m)
6''	68,58	3,80 (d, $J = 9,6$ Hz)	68,60	3,90 (m)
1'''	101,40	4,52 (d, $J = 2,0$ Hz)	102,40	4,52 (d, $J = 1,5$ Hz)
2'''	72,23	3,25-3,63 (m)	72,10	3,20-3,90 (m)
3'''	72,37	3,25-3,63 (m)	72,30	3,20-3,90 (m)
4'''	74,06	3,25-3,63 (m)	73,10	3,20-3,90 (m)
5'''	69,86	3,25-3,63 (m)	69,70	3,20-3,90 (m)
6'''	18,02	1,13 (d, $J = 6,0$ Hz)	18,00	1,18 (d, $J = 6,0$ Hz)



Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo- $\alpha$ -L-raminosideo

Figura 8 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de Er-2.

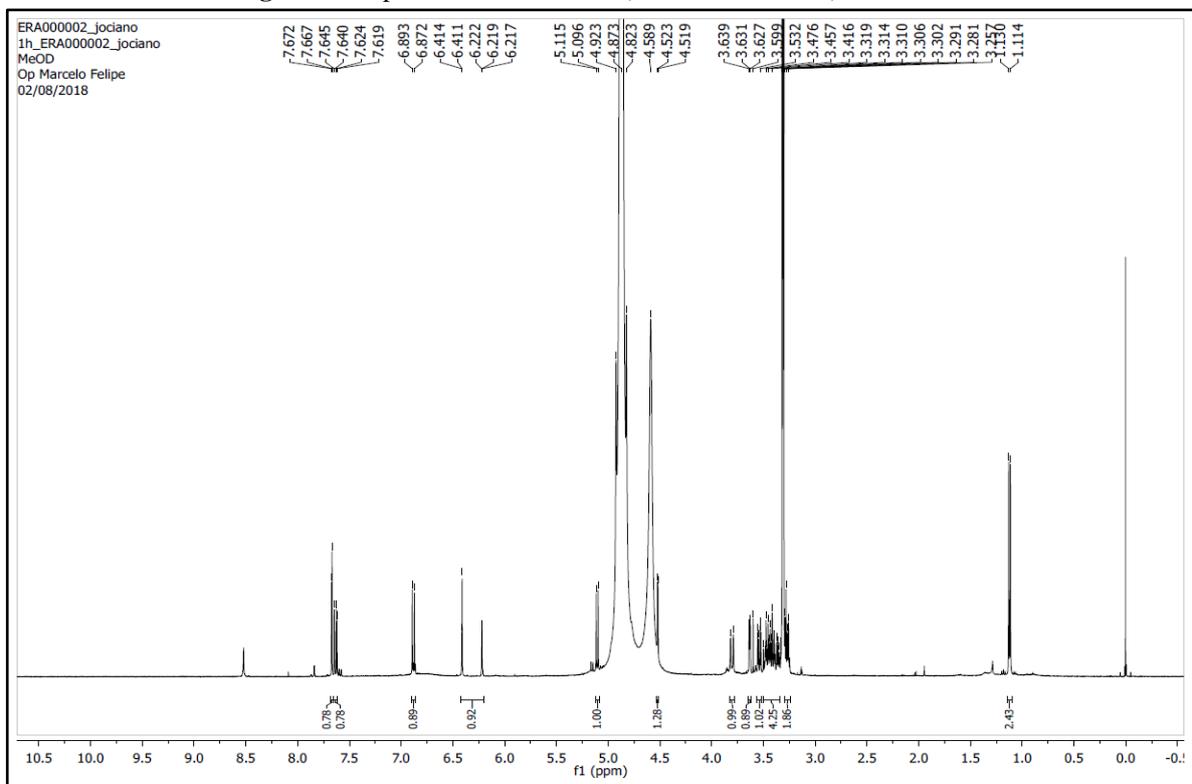


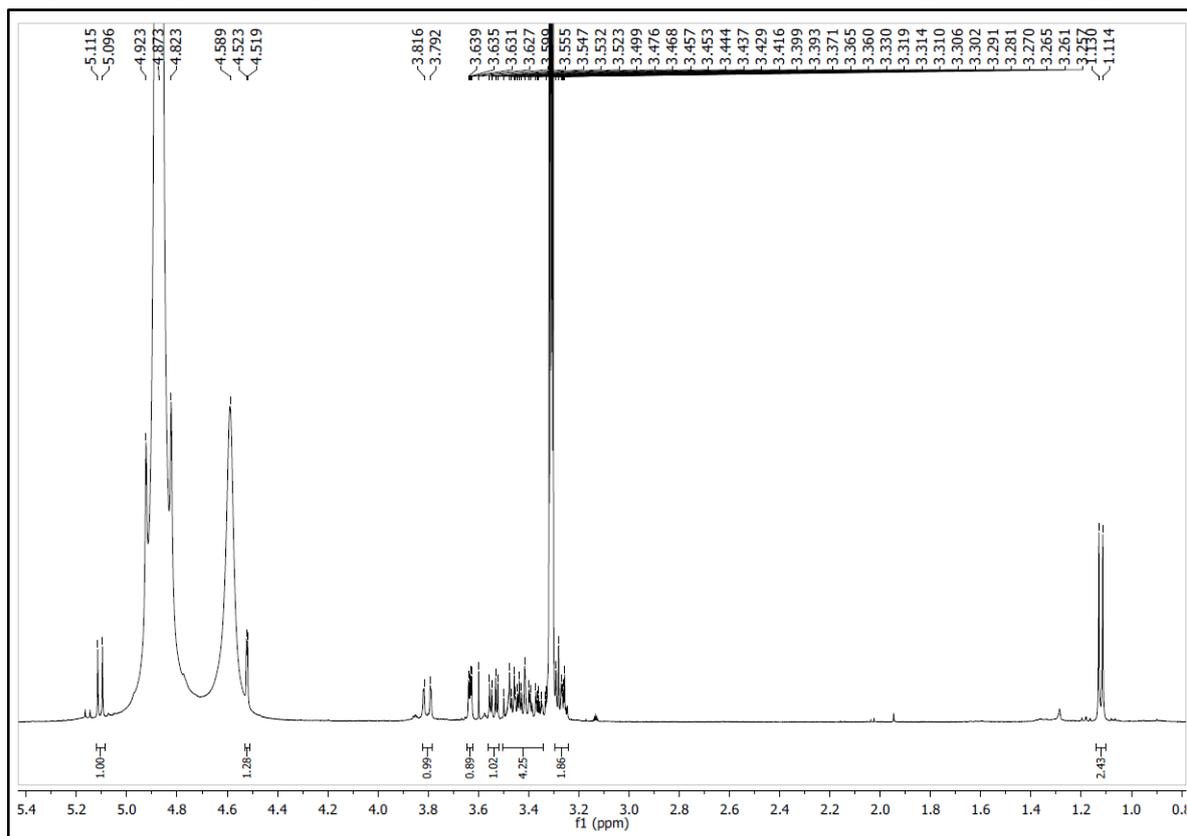
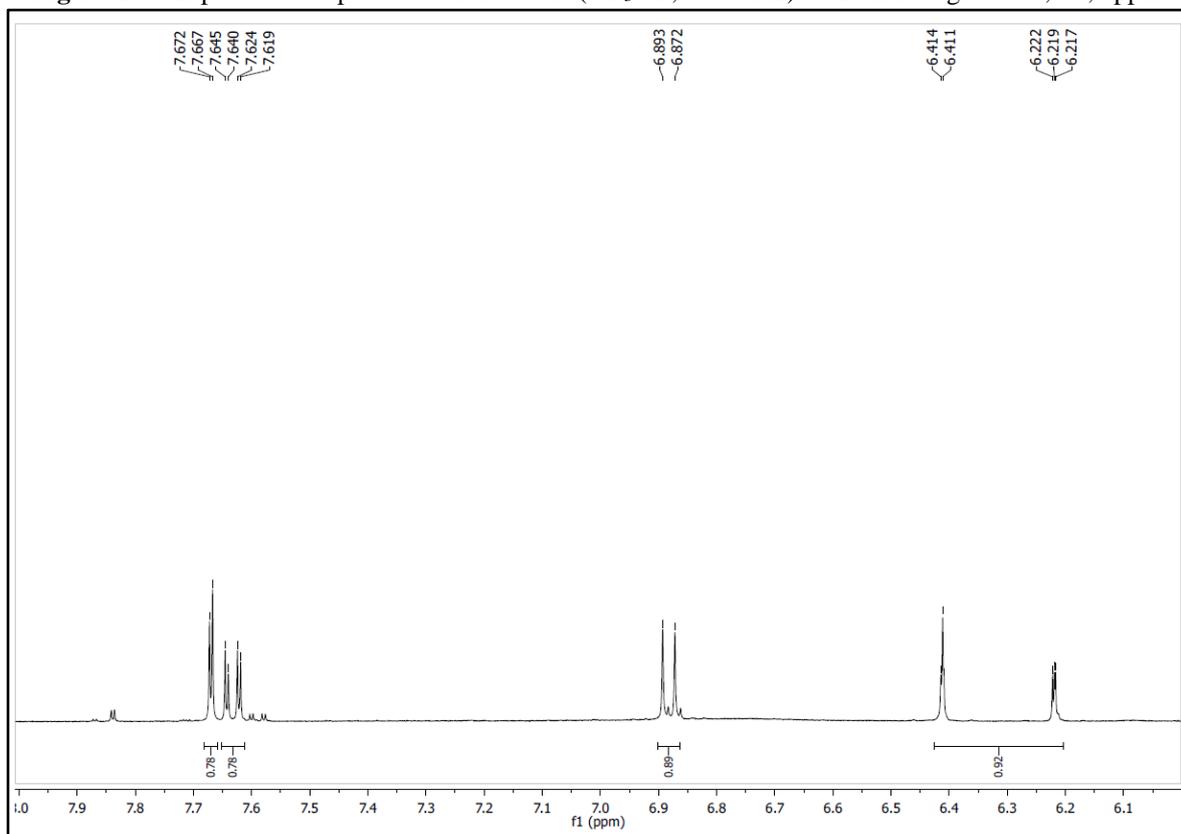
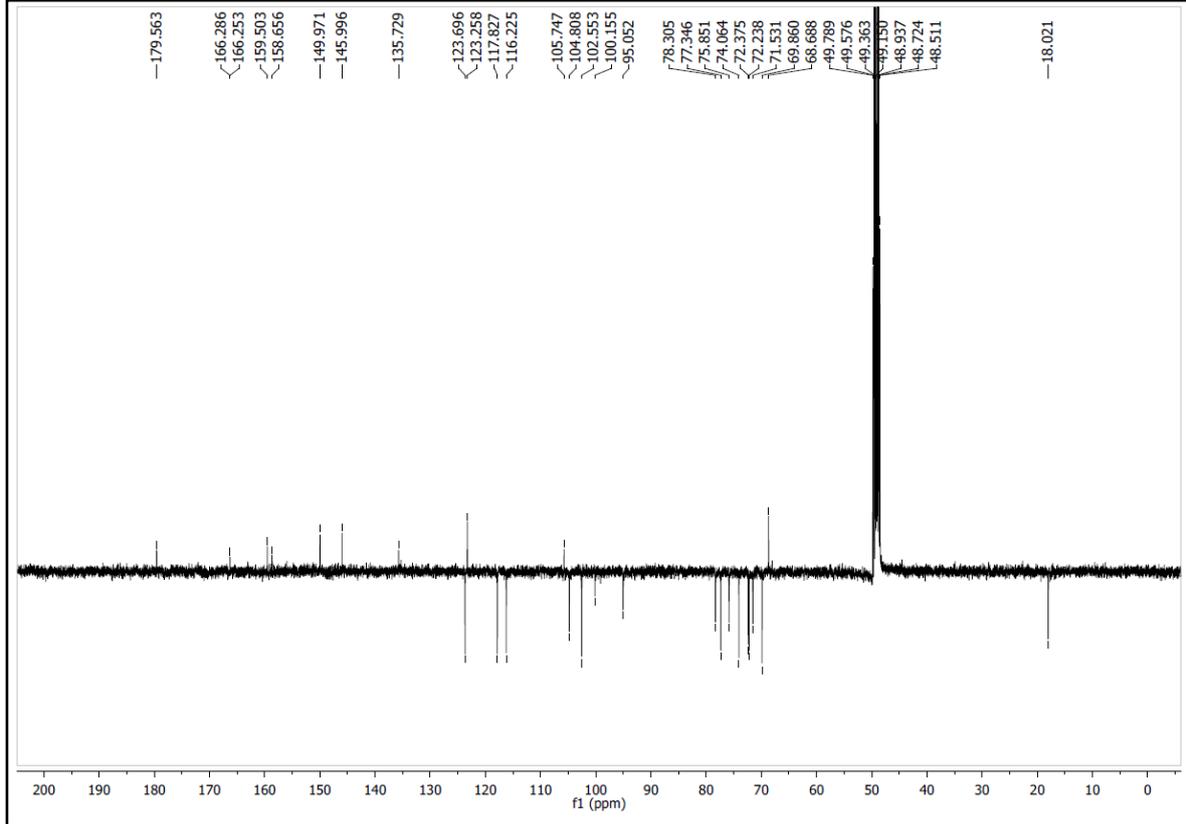
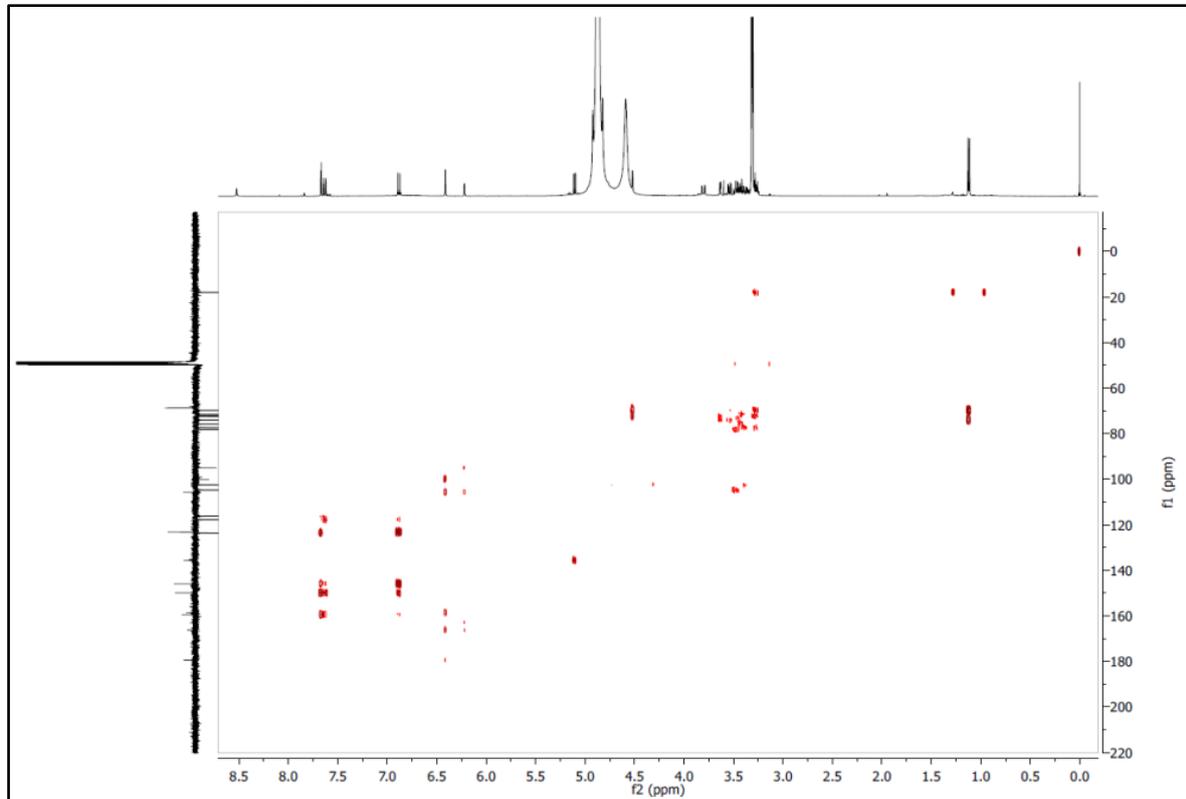
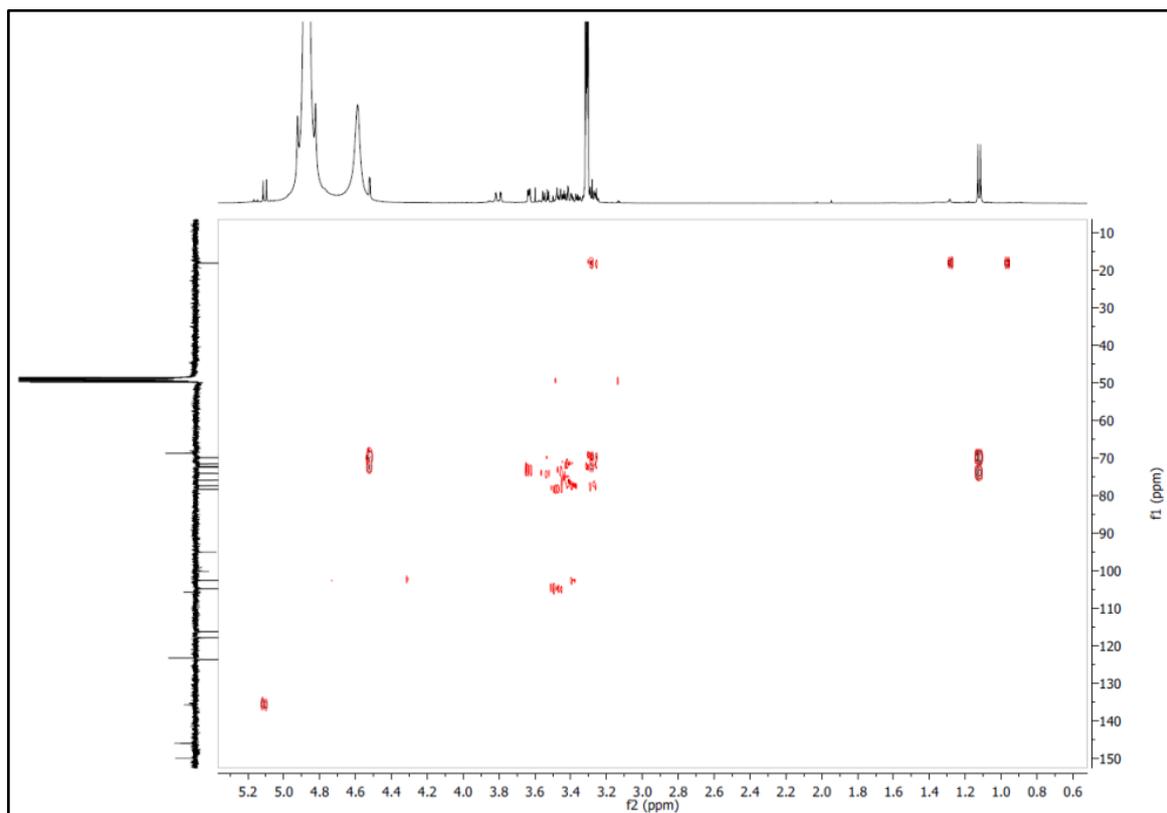
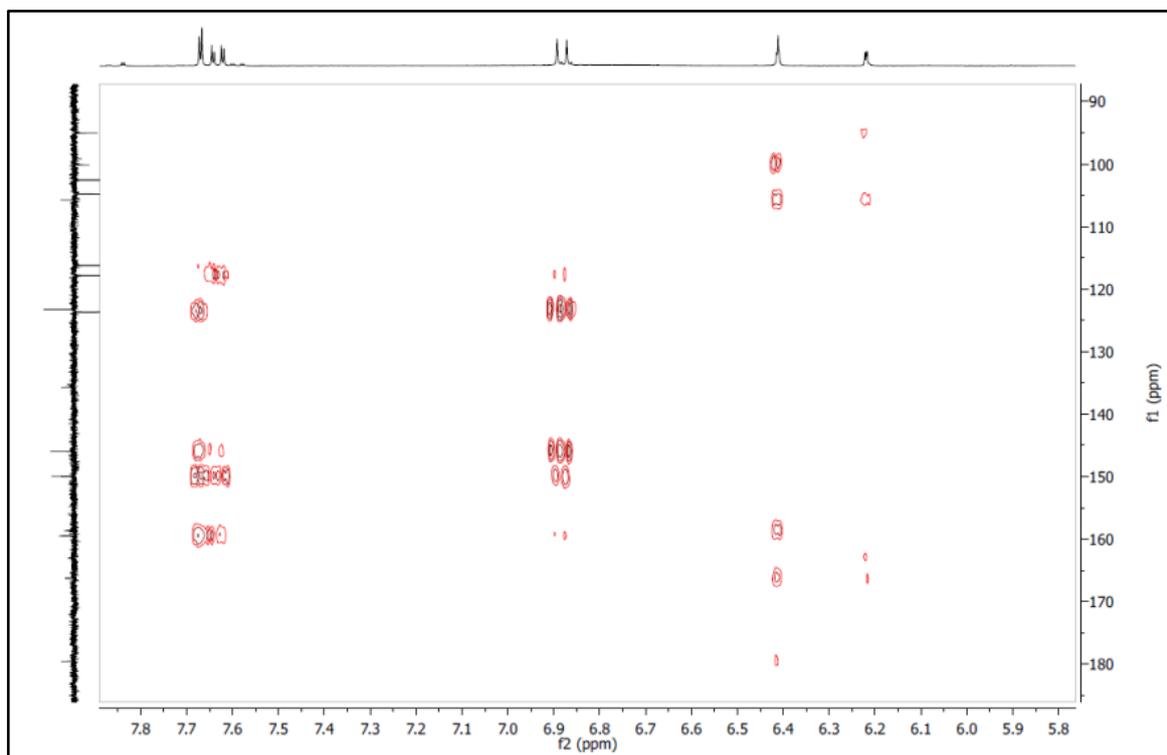
Figura 9 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de **Er-2** na região de 0,5-5,4 ppm.Figura 10 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de **Er-2** na região de 6,1-8,0 ppm.

Figura 11 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de Er-2.Figura 12 – Mapa de contorno HMBC da substância Er-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 x 125 MHz).

**Figura 13** – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz) na região de 0,6-5,2 ppm x 10-150 ppm



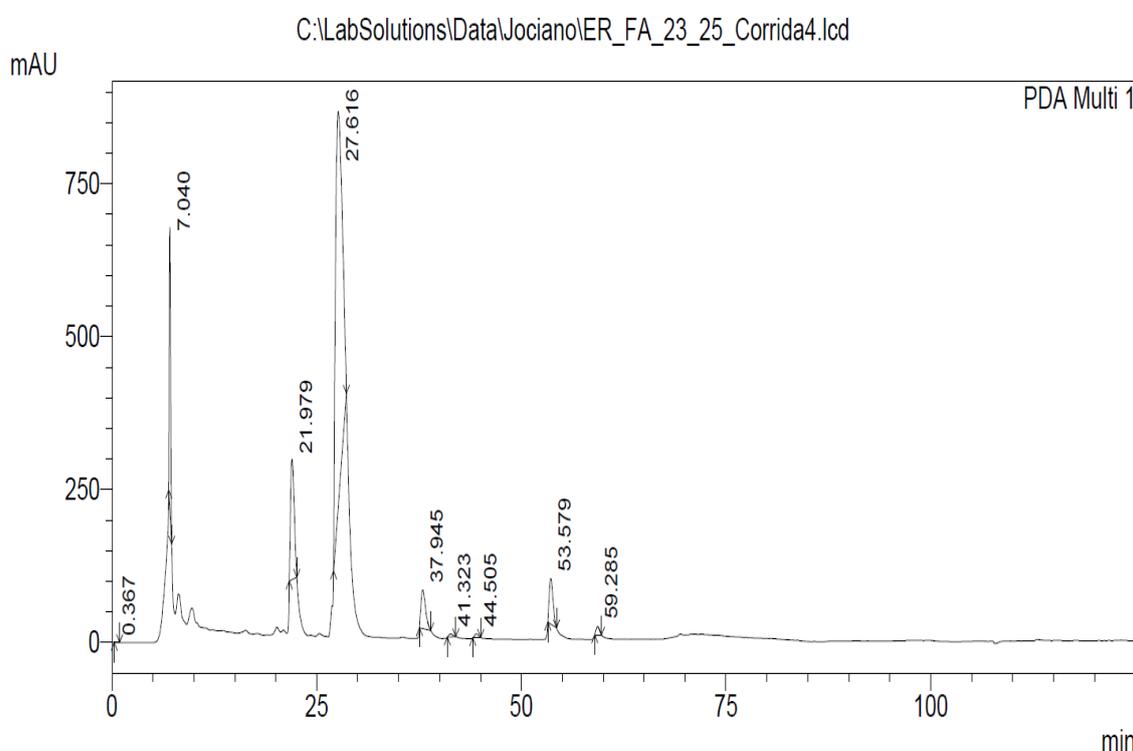
**Figura 14** – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância **Er-2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 x 125 MHz) na região de 5,8-7,8 ppm x 90-180 ppm.



Determinação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD e separação em CLAE Preparativo da fração 23-25 da fase acetato de etila.

Após a análise da fração 23 a 25 em CLAE-DAD, foi obtido o perfil cromatográfico (Figura 15, p. 21) que possibilitou observar oito picos com tempos de retenção entre 7 min 04 s e 59 min 02 s, com índices de purezas: 99 %. O método analítico em CLAE-DAD foi transposto para a CLAE preparativo, sendo injetado 600 mg da fração 23-25 dividido em 12 injeções de 200 µl cada. Os oito picos foram coletados, concentrados em rotaevaporador e analisados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , sendo possível identificar dois picos com tempos de retenção de 37 min 95 s e 21 min 98 s como sendo as substâncias Er-1 e Er-2 respectivamente. Os seis picos restantes estão em fase de elucidação estrutural.

**Figura 15** - Cromatograma da fração 23 a 25 da fase acetato de etila da espécie *E. rimosum*.



## 5 CONCLUSÕES

A partir do estudo fitoquímico dos constituintes do extrato etanólico bruto de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz. Foram isoladas duas substâncias. Através da análise dos espectros e comparação com dados da literatura as substâncias foram identificadas como: Camferol-3-*O*-rutinosídeo e Quercetina-3-*O*-β-*D*-glicopiranosídeo-α-*L*-raminosídeo. Sendo estas relatadas pela primeira vez na espécie em estudo, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico desta espécie.

**REFERÊNCIAS**

- AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Bioma caatinga: medicinais**. Disponível em: [Link] Acesso em: 11 Jul. 2016.
- BOHM, B.A.; GANDERS, F.R. & PLOWMAN, T. Biosystematics and evolution of cultivated coca (Erythroxylaceae). **Systematic Botany** 7: 121-133. 1982.
- CRAGG, G. M. NEWMANN. D. J. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GRIFFIN, W.J. & LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry** 53: 623-637. 2000.
- DALY, D. Erythroxylaceae. In: N. Smith, S. A. Mori, A. Henderson *et al.* (Eds.). **Flowering Plants of Neotropics**. The New York Botanical Gardem. Princeton University Press. USA p. 143-145, 2004.
- LOIOLA, M. I. B; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUIROS, R. T. da flora Paraibana Brasil: Erythroxylaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 473-4887, 2007.
- LOIOLA, M.I.B. Erythroxylaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.
- OLIVEIRA, D. M. S.; LUCENA, E. M. P. O uso de plantas medicinais por moradores de Quixadá–Ceará. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.17, n.3, p.407-412, Botucatu, 2015.
- PLOWMAN, T. C. Erythroxylaceae Kunth. In: W. D. Stevens, C. Ulloa, A. Pool & O. M. Montiel (Eds.). Flora da Nicaragua. **Monographs Sysyematic Botany Missouri Botanical Gardem**, v. 85, p. 834-838, 2001.
- PLOWMAN, T. C. & BERRY, P. E. Erythroxylaceae. In: J. Steyermark, PÁG. Berry, B. Holst & K. Yatskievych (Eds.). **Flora of the Venezuelan Guayana**. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. v. 5 p. 59-71. 1999.
- PLOWMAN, T. C. & HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia** v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>.

NETO, F. R. G.; ALMEIDA, G. S. S. A.; JESUS, N. G.; FONSECA, M. R. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.16, n.4, p.856-865, Botucatu, 2014. ISSN 1516-0572.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; THOMSON, W. J. **Bioassay techniques for drug development**. Harwood academic publishers, 2005.

RIBEIRO, E. M. O. Estudo fitoquímico de *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz e *Erythroxylum betulaceu* mmart. (Erythroxylaceae). **Tese** (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2011.

RIBEIRO, E. M. O. et al. Um novo alcaloide tropano e outros constituintes de *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**. Vol.6, p. 232-235. 2013.

SOUSA, E. A. et al. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 25, No. 4, 704-708, 2014.

ZUANAZZI, J.A.S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R.P; SOBRAL, M. &HENRIQUES, A.T. 2001.**BiochemicalSystematicsandEcology** **29**: 819-825.