

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

KARINA CAVALLIERI

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS ALCALOIDES
PRESENTES EM *Erythrina mulungu* (FABACEAE)**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS PIVATTO
COORIENTADORA: PROFa. DRa. AMANDA DANUELLO PIVATTO**

**UBERLÂNDIA
2019**

KARINA CAVALLIERI

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS ALCALOIDES
PRESENTES EM *Erythrina mulungu* (FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Química, da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Química.

Área de concentração Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto
Coorientadora: Prof^a. Dr. Amanda Danuello Pivatto

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C377 Cavallieri, Karina, 1990-
2019 Estudo químico e avaliação biológica dos alcaloides presentes
em Erythrina mulungu (Fabaceae) [recurso eletrônico] / Karina
Cavallieri. - 2019.

Orientador: Marcos Pivatto.
Coorientadora: Amanda Danuello Pivatto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2255>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Pivatto, Marcos, 1979-, (Orient.). II. Danuello
Pivatto, Amanda, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Química			
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 306, PPQUI			
Data:	trinta de julho de dois mil e dezenove	Hora de início:	8:30	Hora de encerramento: 12:10
Matrícula do Discente:	11722QMI002			
Nome do Discente:	Karina Cavallieri			
Título do Trabalho:	Estudo químico e avaliação biológica dos alcaloides presentes em Erythrina mulungu (Fabaceae)			
Área de concentração:	Química			
Linha de pesquisa:	Química de Produtos Naturais			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção química de espécies nativas do Cerrado brasileiro visando a descoberta de novos compostos bioativos			

Reuniu-se na Sala de Reuniões do Instituto de Química, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Alberto de Oliveira, IQUFU; Aline Coqueiro, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR; e Marcos Pivatto, IQUFU, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Marcos Pivatto, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/08/2019, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/08/2019, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Coqueiro, Usuário Externo**, em 05/08/2019, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1440023** e o código CRC **0C6590D7**.

Referência: Processo nº 23117.066389/2019-62

SEI nº 1440023

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo incentivo, apoio e tranquilidade nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, por tornar possível a realização deste trabalho de Mestrado em Química de Produtos Naturais.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, pela orientação, incentivo, conhecimento, paciência e sobretudo pela amizade e confiança.

À professora Dra. Amanda Danuello, pela contribuição permitindo o aprimoramento desse trabalho.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN) pelos ensinamentos que contribuíram na realização desse trabalho.

Ao colega Dr. Mário Machado Martins, do Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), pela realização dos experimentos de espectrometria de massas.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade bem como seu aluno Allisson Benatti Justino, pela realização do ensaio de atividade anticolinesterásica.

Ao professor Dr. Antônio Otávio de Toledo Patrocínio, do Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo, da Universidade Federal de Uberlândia (GMIT-UFU), bem como seu aluno Leandro Augusto Faustino pela realização das análises de infravermelho.

Às irmãs de alma, Sheila, Mariane, Jéssica, Marthelle e Gabriela pela amizade, ajudando a superar as etapas e desafios, mas também compartilhando as alegrias das vitórias.

Às irmãs científicas, Marília, Michelle, Thamires e Gáveni, amiga Tiara e irmão mais novo Raul, pelo convívio, apoio, amizade e principalmente pela ajuda sempre.

À CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa, o meu muito obrigado!

RESUMO

Espécies do gênero *Erythrina* apresentam diversas propriedades farmacológicas, como sedativa, anti-hipertensiva e hipnótica, atribuídas aos alcaloides. Entre essas espécies, *Erythrina mulungu*, conhecida popularmente como mulungu, é nativa do Cerrado e utilizada na medicina tradicional para o tratamento da insônia, depressão e como calmante. Trabalhos descritos na literatura com os extratos e metabólitos de *E. mulungu* relataram atividade ansiolítica, analgésica, antibacteriana e anti-inflamatória, o que nos motivou para um estudo direcionado para os alcaloides presentes nas cascas do caule. Assim, foi preparado o extrato etanólico que foi submetido a extração líquido-líquido com hexano, CH_2Cl_2 e AcOEt. As frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada e reveladas com iodocloroplatinato, sendo possível identificar que a fração CH_2Cl_2 continha maior concentração de alcaloides. Essa fração foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos como a cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada preparativa, o que resultou no isolamento do alcaloide erisotrina (**II**). Análises por cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* em alta resolução com ionização por *electrospray* permitiram a identificação da erisotramidina (**I**). O extrato etanólico foi ainda submetido a extração ácido-base, de onde foi obtida a fração AcOEt alcaloídica, submetida a CC de onde foi isolada a erisotrina *N*-óxido (**III**). As estruturas dos alcaloides foram elucidadas através das técnicas espectroscópicas (ressonância magnética nuclear uni- e bidimensionais, e ultravioleta) e espectrométrica (espectrometria de massas). Desse modo o extrato etanólico, a fração CH_2Cl_2 , a fração AcOEt alcaloídica e os alcaloides **II** e **III** foram submetidos ao ensaio anticolinesterásico *in vitro*, sendo que **II** exibiu atividade inibitória similar para AChE ($\text{IC}_{50} 1236,1 \pm 173,2 \mu\text{mol/L}$) e BChE ($\text{IC}_{50} 1011,8 \pm 101,7 \mu\text{mol/L}$), assim como o alcaloide **III** ($\text{IC}_{50} 1234,7 \pm 192,4$ e $1235,0 \pm 39,1 \mu\text{mol/L}$). Estes resultados demonstraram que os compostos isolados possuem baixa atividade inibitória destas enzimas quando comparados com o controle positivo galantamina ($\text{IC}_{50} 5,0 \pm 0,3$ e $162,7 \pm 28,8 \mu\text{mol/L}$). O extrato etanólico e a fração CH_2Cl_2 apresentaram baixo potencial de inibição das enzimas, enquanto a fração AcOEt alcaloídica não apresentou atividade inibitória para AChE e BChE dentro do intervalo avaliado.

Palavras chave: *Erythrina mulungu*, alcaloides eritrínicos, atividade anticolinesterásica.

ABSTRACT

Species of the genus *Erythrina* have been shown alkaloids with diverse pharmacological properties, including sedative, anti-hypertensive, hypnotic, bactericidal and fungicidal. *Erythrina mulungu*, known as mulungu, is a native species of the Cerrado and used in folk medicine for insomnia, depression and sedative. Reports in the literature about extracts and metabolites of *E. mulungu* motivated us to a study towards the alkaloids present in the stem bark. Thus, was prepared the ethanolic extract submitted to liquid-liquid extraction with hexane, CH_2Cl_2 and AcOEt . The fractions were evaluated by thin layer chromatography and revealed with iodochloroplatinate to identify the higher concentration of alkaloids in the fraction CH_2Cl_2 . This fraction was submitted to different chromatographic procedures, such as column chromatography (CC), high performance liquid chromatography and preparative thin layer chromatography, which resulted in the isolation of the alkaloid erysotrine (**II**). Analysis by ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization high-resolution tandem mass spectrometry allowed the identification of the erysotramidine (**I**). The ethanolic extract was also subjected to acid-base extraction, from which the alkaloidal fraction AcOEt was obtained. This fraction was subjected to CC from which erysotrine *N*-oxide (**III**) was isolated. The structures were elucidated by the spectroscopic (mono- and bi-dimensional nuclear magnetic resonances, and ultraviolet) and spectrometric (mass spectrometry) techniques. Thus, the ethanolic extract, fraction CH_2Cl_2 , EtOAc alkaloidal fraction, and alkaloids **II** and **III** were submitted to the *in vitro* anticholinesterase assay. Further, compound **II** exhibited similar inhibitory activities for AChE (IC_{50} $1236.1 \pm 173.2 \mu\text{M}$) and BChE (IC_{50} $1011.8 \pm 101.7 \mu\text{M}$), as well the alkaloid **III** (IC_{50} 1234.7 ± 192.4 and $1235.0 \pm 39.1 \mu\text{M}$). These results demonstrated that the isolated compounds have low inhibitory activity when compared with the positive control galantamine (IC_{50} 5.0 ± 0.3 e $162.7 \pm 28.8 \mu\text{M}$). The ethanolic extract and the CH_2Cl_2 fraction presented low inhibition potential of the enzymes, whereas the AcOEt alkaloid fraction showed no inhibitory activity for both AChE and BChE within the evaluated range of concentration.

Keywords: *Erythrina mulungu*, erythrina alkaloids, anticholinesterase activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Quinina, morfina e seus derivados semissintéticos.	17
Figura 2 –	Salicilina e seus derivados.	18
Figura 3 –	Produtos naturais utilizados como medicamentos (Tabela 1).	21
Figura 4 –	Produtos naturais e derivados utilizados como medicamentos (Tabela 2).	24
Figura 5 –	Alcaloides derivados da L-ornitina.	26
Figura 6 –	Alcaloides derivados da L-lisina.	27
Figura 7 –	Alcaloides derivados dos ácidos nicotínio e antranílico.	27
Figura 8 –	Alcaloides derivados do L-triptofano.	27
Figura 9 –	Alcaloides derivados da L-tirosina.	28
Figura 10 –	Alcaloide derivado da L-histidina.	28
Figura 11 –	Alcaloides usados como fármacos.	30
Figura 12 –	Alcaloides com potencial atividade antibacteriana.	30
Figura 13 –	Alcaloides com atividade antiparasitária.	31
Figura 14 –	Alcaloides com capacidade cardioativa.	32
Figura 15 –	Lobelina isolada de <i>Lobelia inflata</i> .	32
Figura 16 –	Alcaloides utilizados como anestésicos locais.	33
Figura 17 –	Alcaloides com propriedade hipertensora.	34
Figura 18 –	Ocorrências do gênero <i>Erythrina</i> no mundo.	35
Figura 19 –	Precursors e alcaloides eritrínicos investigados no estudo da biossíntese.	36
Figura 20 –	Biossíntese da (S)-nor-reticulina (72), precursora dos alcaloides eritrínicos.	37
Figura 21 –	Biogênese da erisotrina a partir da (S)-nor-reticulina (72).	38
Figura 22 –	Alcaloides eritrínicos.	40
Figura 23 –	Alcaloides eritrínicos isolados das folhas de <i>E. poeppigiana</i> , <i>E. macrophylla</i> , <i>E. berteroana</i> e <i>E. salviiflora</i> .	40
Figura 24 –	Alcaloides isolados de <i>E. variegata</i> / <i>E. melanacantha</i> (81) e <i>E. fusca</i> / <i>E. leptorrhiza</i> (82).	41
Figura 25 –	Alcaloides eritrínicos isolados de <i>E. crista-galli</i> L.	41
Figura 26 –	Alcaloides eritrínicos carbonilados nas posições C-10 e C-11.	42

Figura 27 – Alcaloides eritrínicos com potencial antitumoral.	42
Figura 28 – <i>E. mulungu</i> : flores, folhas e frutos (A); Ocorrência no Brasil (B).	43
Figura 29 – Alcaloides eritrínicos isolados de <i>E. mulungu</i> .	44
Figura 30 – Síntese da ACh.	47
Figura 31 – Esquema de ação e hidrólise da ACh que ocorre na fenda sináptica.	48
Figura 32 – Hidrólise da ACh.	48
Figura 33 – Hipótese colinérgica.	49
Figura 34 – Cinserina e análogos, inibidores seletivos da BChE.	50
Figura 35 – Inibidores da AChE indicados para tratamento da DA.	50
Figura 36 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das cascas de <i>E. mulungu</i> .	57
Figura 37 – Extração ácido-base do extrato etanólico das cascas de <i>E. mulungu</i> .	58
Figura 38 – Cromatoplacas do EEC- <i>Em</i> .	59
Figura 39 – Cromatoplacas das frações obtidas na extração líquido-líquido: hexano (A); CH ₂ Cl ₂ (B); AcOEt (C).	60
Figura 40 – Coluna cromatográfica (KMC01) da fração CH ₂ Cl ₂ .	60
Figura 41 – Cromatoplaca das frações obtidas de KMC01.	61
Figura 42 – Procedimentos cromatográficos realizados com a fração CH ₂ Cl ₂ .	62
Figura 43 – Cromatoplaca das frações obtidas de KMC02.	63
Figura 44 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna analítica e CCD da fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	64
Figura 45 – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	65
Figura 46 – Cromatograma (CLAE-EM) da fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	66
Figura 47 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	66
Figura 48 – EM/EM-IES-(+) do sinal de <i>m/z</i> 328 [M + H] ⁺ (20 eV) observado na fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	67
Figura 49 – Propostas de fragmentação para erisotramidina e 11-metoxieritralina.	67
Figura 50 – EM/EM-IES-(+) do sinal de <i>m/z</i> 298 [M + H] ⁺ (20 eV), observado na fração KMC02-F ₂₇₋₂₈ .	68
Figura 51 – Cromatoplaca da fração KMC01-F ₆₄₋₉₃ (A); CCDP (B) e CCD da fração KMP01 (C).	68
Figura 52 – Cromatograma (CG-EM) da fração KMP01.	69
Figura 53 – EM-IE (CG-EM) de KMP01.	70

Figura 54 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna analítica e CCD da fração KMC01-F ₉₄₋₁₄₅ .	71
Figura 55 – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração KMC01-F ₉₄₋₁₄₅ .	71
Figura 56 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna semipreparativa e CCD da fração KMC01-F ₉₄₋₁₄₅ .	72
Figura 57 – Cromatograma (CLAE-EM-IES) da fração CLAE- <i>t</i> _R 8,1 min.	73
Figura 58 – EM-IES-(+) em alta resolução do pico de <i>t</i> _R 4,27 min. observado na fração CLAE- <i>t</i> _R 8,1 min.	73
Figura 59 – EM-IES-(+) em alta resolução do pico de <i>t</i> _R 4,07 min. observado na fração CLAE- <i>t</i> _R 8,1 min.	74
Figura 60 – EM/EM-IES-(+) do íon molecular <i>m/z</i> 314 [M + H] ⁺ (15 eV) observado na fração CLAE- <i>t</i> _R 8,1 min.	74
Figura 61 – EM/EM-IES-(+) do sinal de <i>m/z</i> 330 [M + H] ⁺ (20 eV), observado na fração CLAE- <i>t</i> _R 8,1 min.	75
Figura 62 – Estruturas possíveis para a molécula protonada (<i>m/z</i> 330) e suas respectivas propostas de fragmentação.	76
Figura 63 – Cromatoplaca da fração KMC01-F ₉₄₋₁₄₅ (A); CCDP (B) e CCD do alcaloide purificado (KMP02) (C).	77
Figura 64 – Cromatoplacas das frações obtidas de KMC03.	78
Figura 65 – Procedimento cromatográfico realizado com a fração AcOEt alcaloídica.	79
Figura 66 – Cromatoplaca da fração KMC03-F ₁₆₁₋₂₁₄ .	79
Figura 67 – Cromatograma (CG-DIC) da fração KMC03-F ₁₆₁₋₂₁₄ .	80
Figura 68 – EM-IES-(+) em alta resolução de II .	81
Figura 69 – EM/EM-IES-(+) do alcaloide II (20 eV).	81
Figura 70 – Espectro de absorção na região do infravermelho do alcaloide II .	83
Figura 71 – Espectro de RMN ¹ H do alcaloide II (400 MHz, CDCl ₃).	86
Figura 72 – Ampliação do espectro 71 (δ 1,7–4,2) do alcaloide II .	87
Figura 73 – Ampliação do espectro 71 (δ 5,5–7,3) do alcaloide II .	87
Figura 74 – Mapa de contorno COSY do alcaloide II (CDCl ₃).	88
Figura 75 – Espectro de RMN ¹³ C do alcaloide II (100 MHz, CDCl ₃).	90
Figura 76 – Espectro de RMN ¹³ C DEPT 135 do alcaloide II (CDCl ₃).	91

Figura 77 – Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl ₃).	92
Figura 78 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 77 (δ 0,8–4,4).	93
Figura 79 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 77 (δ 0,8–4,4).	93
Figura 80 – Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl ₃).	95
Figura 81 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 0,6–4,4)	96
Figura 82 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 5,0–7,6).	96
Figura 83 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 1,1–4,3).	97
Figura 84 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 5,2–7,4).	97
Figura 85 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC.	98
Figura 86 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide III .	99
Figura 87 – EM/EM-IES-(+) do alcaloide III (15 eV).	100
Figura 88 – Espectro de absorção na região do infravermelho do alcaloide III .	101
Figura 89 – Espectro de RMN ¹ H do alcaloide III (400 MHz, CDCl ₃).	104
Figura 90 – Ampliação do espectro 89 (δ 2,9–4,0) do alcaloide III .	105
Figura 91 – Ampliação do espectro 89 (δ 4,0–6,7) do alcaloide III .	105
Figura 92 – Mapa de contorno COSY do alcaloide III (CDCl ₃).	106
Figura 93 – Espectro de RMN ¹³ C do alcaloide III (100 MHz, CDCl ₃).	107
Figura 94 – Espectro de RMN ¹³ C DEPT 135 do alcaloide III (CDCl ₃)	108
Figura 95 – Mapa de contorno HSQC do alcaloide III (400 MHz, CDCl ₃).	109
Figura 96 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 95 (δ 0,8–4,6)	110
Figura 97 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 95 (δ 4,9–7,7).	110
Figura 98 – Mapa de contorno HMBC do alcaloide III (400 MHz, CDCl ₃).	111
Figura 99 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 1,0–4,5).	112
Figura 100 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 5,3–7,8).	112
Figura 101 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 0,8–4,4).	113
Figura 102 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 5,3–7,3).	113
Figura 103 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC.	114
Figura 104 – Atividade inibitória da AChE (A e B) e BChE (C e D) do extrato etanólico, fração CH ₂ Cl ₂ , fração AcOEt alcaloídica e alcaloides II e III .	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Produtos naturais utilizados como medicamentos.	21
Tabela 2 –	Produtos naturais e derivados utilizados como medicamentos.	23
Tabela 3 –	Alcaloides utilizados como fármacos.	29
Tabela 4 –	Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.	56
Tabela 5 –	Dados de RMN da erisotrina (II) em CDCl_3 .	85
Tabela 6 –	Dados de RMN da erisotrina <i>N</i> -óxido (III) em CDCl_3	103
Tabela 7 –	Atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, fração CH_2Cl_2 , fração AcOEt alcaloídica e alcaloides isolados.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE	Butilcolinesterase
BNC	(<i>-</i>)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁸ -Bisnorcincerina (do inglês (<i>-</i>)- <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁸ - <i>bisnorcymserine</i>)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
Ch	Colina
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
d	Duplo
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i.	Diâmetro interno
DIC	Detector de ionização de chama
DPN	Derivados de produtos naturais
DZP	Diazepam
ECOD	7-E toxicumarina <i>O</i> -desetilase
EEC- <i>Em</i>	Extrato etanólico das cascas do caule de <i>Erythrina mulungu</i>
EEt	Extrato etanólico
ELSD	Detector evaporativo por espalhamento de luz (do inglês <i>evaporative light scattering detector</i>)
EROD	7-Etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase
ETM	Labirinto em T elevado (do inglês <i>elevated T-maze</i>)
F. AcOEt	Fração acetato de etila
F. CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometano
FE	Fase estacionária

F. H.	Fração hexano
FM	Fase móvel
GABA	Ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50%
IES	Ionização por eletronspray
IQ	Instituto de Química
IQA	Instituto de Química Agrícola
m	Multiplet
MROD	7-Metoxirresorufina <i>O</i> -desmetilase
NMDA	Ácido <i>N</i> -metil-D-aspartato
NuPPeN	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEC	(–)- <i>N</i> ¹ -Feniletilnorcincerina (do inglês (–)- <i>N</i> ¹ - <i>phenethylnorcymserine</i>)
PN	Produtos naturais
PROD	7-Pentoxirresorufina <i>O</i> -despentilase
PTZ	Pentilentetrazol
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
Rf	Fator de retenção
RMN de ¹ H e ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C
s	Simpleto
SNC	Sistema nervoso central
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus</i>
t _R	Tempo de retenção
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
Δ	Delta - representa o erro em ppm entre a massa acurada e exata na EM
δ	Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Produtos Naturais e os metabólitos secundários	19
1.2	Alcaloides	25
1.3	Alcaloides eritrínicos	34
1.4	<i>Erythrina mulungu</i> (sinonímia <i>E. verna</i>)	43
1.5	Atividade anticolinesterásica	47
2	OBJETIVOS	51
2.1	Objetivos específicos	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	Solventes	52
3.2	Reagentes	52
3.3	Soluções reveladoras	52
3.3.1	<i>Vanilina sulfúrica</i>	52
3.3.2	<i>Iodocloroplatinato</i>	52
3.3.3	<i>Dragendorff</i>	53
3.4	Técnicas cromatográficas	53
3.4.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	53
3.4.2	<i>Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)</i>	53
3.4.3	<i>Cromatografia em coluna (CC)</i>	53
3.4.4	<i>Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)</i>	54
3.4.5	<i>Cromatografia a gás</i>	55
3.5	Técnicas espectroscópicas	56
3.6	Equipamentos utilizados	56
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	56
4.1	Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico	56
4.2	Extração líquido-líquido	57
4.3	Extração ácido-base	57
4.4	Atividade biológica	58
4.4.1	<i>Atividade anticolinesterásica</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1	Fracionamento do EEC- <i>Em</i>	59

5.1.1	<i>Estudo químico da fração KMC01-F₆₄₋₉₃</i>	63
5.1.2	<i>Estudo químico da fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅</i>	70
5.2	Estudo químico da fração AcOEt alcaloídica obtida da extração ácido-base	77
5.3	Elucidação estrutural dos alcaloides	80
5.3.1	<i>Elucidação estrutural do alcaloide II</i>	80
5.3.2	<i>Elucidação estrutural do alcaloide III</i>	98
5.4	Avaliação da atividade anticolinesterásica	114
6	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	119

1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas está presente na cultura dos povos desde séculos antes de Cristo. Ao longo dos anos o homem na busca pela compreensão do potencial medicinal das plantas associa ao vitalismo dos seres vivos a capacidade de produção dos compostos orgânicos responsáveis pela cura das enfermidades. No entanto, foi somente no século XIX, com a consolidação da química como ciência, que surgem os primeiros trabalhos científicos de isolamento dos metabólitos secundários, associando as propriedades biológicas afirmadas pela cultura popular, com as estruturas químicas do que chamamos de produtos naturais (PN). O interesse pela investigação das propriedades medicinais das plantas aumentou ao longo dos anos e com essa expansão surgiram os primeiros medicamentos baseados em PN (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

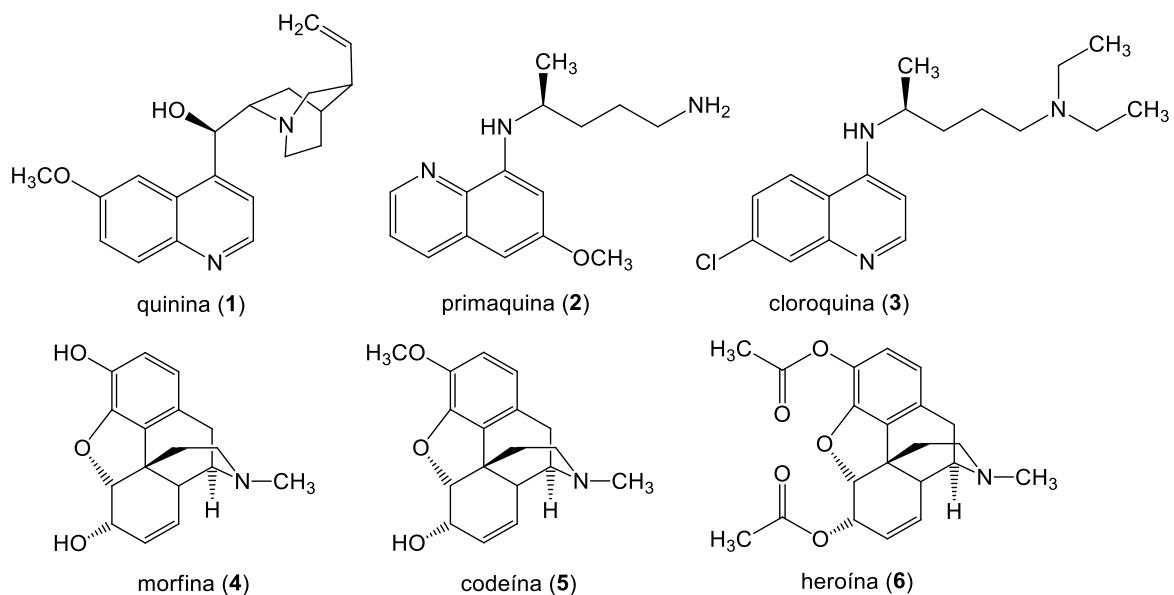
No período pré-cristão, chineses (3000 a.C.) e civilizações que se formaram as margens dos rios Tigre e Eufrates (2300 a.C.) cultivavam ervas medicinais que foram popularizadas através das expedições exploratórias dos europeus. Com as novas rotas comerciais estabelecidas entre Oriente e Europa, especiarias e medicamentos chegaram a parte ocidental. Os europeus, buscando novos caminhos que levassem às Índias, acabaram por chegar no “Novo Mundo”, e de lá levaram consigo os conhecimentos sobre as plantas medicinais (MARTINS et al., 2003; PHILLIPSON; ANDERSON, 1989).

No Brasil, os indígenas também faziam uso das plantas para fins medicinais, o que foi relatado pelos médicos e naturalistas portugueses. Os portugueses ao se depararem com a falta dos medicamentos utilizados na Europa, e que não chegavam à colônia, reconheceram a importância e eficácia dos remédios indígenas (PINTO et al., 2002).

O isolamento dos primeiros compostos ativos a partir de plantas medicinais foram importantes marcos na história dos PN. Em 1820, Pelletier e Caventou isolaram do pó das cascas da *Cinchona*, o princípio ativo contra a malária, que nomearam de quinina (1), que serviu de inspiração para a síntese da primaquina (2) e cloroquina (3), dois importantes antimaláricos sintéticos utilizados na terapêutica atual (Figura 1) (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Outro relato importante do ponto de vista histórico está relacionado ao estudo dos analgésicos presentes em *Papaver somniferum*, cujo principal componente é a morfina (4), isolada em 1803 e que teve a

estrutura química determinada somente em 1923 por Gulland e Robinson (Figura 1). A partir da morfina foi possível sintetizar a codeína (5), que também está presente na planta, e a heroína (6), que foram utilizadas inicialmente como antitussígeno e sedativo, respectivamente (BARREIRO, 1990; CONCHEIRO et al., 2014; GULLAND; ROBINSON, 1923; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

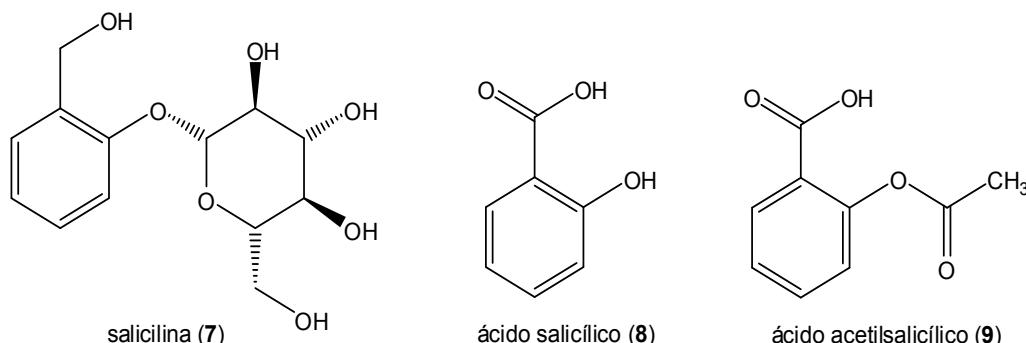
Figura 1 – Quinina, morfina e seus derivados semissintéticos.



Fonte: a autora.

Em 1828 Johann A. Buchner isolou a salicilina (7) (Figura 2), princípio ativo da *Salix alba*. Entretanto, a extração fornecia uma pequena quantidade do composto ativo, o que motivou os pesquisadores a tentar produzi-la em laboratório. Três décadas depois, a síntese do ácido salicílico (8) e de seu sal sódico a partir do fenol foi conseguida por Hermann Kolbe. No entanto, foi em 1898 que Felix Hoffmann produziu o ácido acetilsalicílico (9) por meio de uma reação de acetilação. Este composto se tornou o princípio ativo de um dos analgésicos mais vendidos no mundo, a Aspirina® (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Figura 2 – Salicilina e seus derivados.



Fonte: a autora.

A química de Produtos Naturais no Brasil teve início com os estudos do farmacêutico e pesquisador alemão Theodoro Peckolt (1822–1912), que é considerado por alguns pesquisadores como o pai da fitoquímica brasileira (PINTO et al., 2002). Convencido por von Martius, Peckolt desembarcou no Brasil em 1847 com o intuito de estudar a flora Brasileira. Explorou províncias da atual região sudeste e se instalou em Cantagalo (RJ) onde permaneceu até 1868. Estudou aproximadamente quinhentos extratos de plantas, entre elas, o guaraná da Amazônia (SANTOS; PINTO; ALENCASTRO, 1998).

Em 1918, Mário Saraiva transforma o Laboratório de Fiscalização de Defesa da Manteiga no Rio de Janeiro, responsável pelas análises de laticínios que o país importava, em Instituto de Química que passa a realizar estudos de solos e vegetais a partir de 1921. Dentre os novos objetos de pesquisa estavam as “plantas nativas ou cultivadas, tóxicas, entorpecentes, medicinais e de valor industrial”. Nomeado como Instituto de Química Agrícola (IQA) em 1934, e com um novo regulamento, uma seção dedicada apenas ao estudo de plantas medicinais foi criada. No período de 1946 a 1956, o instituto se tornou referência na área de química vegetal e a seção coordenada por Walter Mors e Oscar Ribeiro se destacou pelos estudos dos produtos naturais, que em grande parte pode ser atribuído a uma política do Ministério da Agricultura de apoio às pesquisas. No entanto, mesmo reconhecido internacionalmente, o Ministério da Agricultura, por meio do decreto nº 1477 de 26 de outubro de 1962, determinou o fechamento do IQA com a justificativa da necessidade de uma reforma estrutural (FARIA, 1997).

No ano seguinte, Mors e pesquisadores do extinto IQA fundaram o Centro de Pesquisas em Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da Universidade do Brasil, atual Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Otto Gottlieb, que também fazia parte do IQA, percorreu grupos de quase todo o país auxiliando na estruturação das pesquisas em

Química de Produtos Naturais, passando depois a integrar o Instituto de Química da Universidade de São Paulo (PINTO et al., 2002).

1.1 Produtos Naturais e os metabólitos secundários

Segundo Dewick (2009), metabólitos secundários são encontrados apenas em organismos específicos ou grupos de organismos e são uma expressão da individualidade das espécies, sejam plantas, microorganismos ou organismos marinhos. No reino vegetal, os metabólitos primários desempenham funções essenciais (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Já os metabólitos secundários também denominados de especiais, não possuem influência direta no crescimento e desenvolvimento; são biossintetizados apenas em determinadas condições dependendo da sua função e da necessidade do espécime, por exemplo, compostos tóxicos produzidos quando o organismo é atacado por predadores. Portanto, é possível considerar que a maioria dos PNs farmacologicamente ativos tem origem nos metabólitos secundários (BERLINCK et al., 2017; DEWICK, 2009).

Dentro deste contexto, espécies do gênero *Citrus* são ricas em diosmina (10) e hesperidina (11) (Figura 3), dois flavonoides utilizados de forma combinada em medicamentos como Daflon® e Diosmin®, ambos indicados para o tratamento da insuficiência venosa crônica como varizes, sintomas de insuficiência venosa do plexo hemorroidário e períodos pós-operatórios (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2015a, 2016a; DEWICK, 2009; VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005).

De *Papaver somniferum* (Papaveraceae) foi isolada a papaverina (12) (Figura 3), que é estruturalmente diferente dos alcaloides 4 e 5 encontrados no ópio, e apresenta atividade hipnótica e analgésica. Na forma de cloridrato é o princípio ativo do Hypoverin®, indicado para o tratamento de espasmos intestinais, gástricos e bronquiais, como vasodilatador para embolia arterial, periférica e pulmonar (ANVISA, 2018a; DEWICK, 2009). De *Taxus brevifolia* foi isolado o paclitaxel (13) (Figura 3), que é o princípio ativo do Taxol®, medicamento anticancerígeno indicado para o tratamento de carcinoma de ovário, câncer de mama e pacientes com câncer de pulmão não indicados a procedimentos cirúrgicos e/ou radioterapia, mas que apresentam potencial de cura (ANVISA, 2016b; DEWICK, 2009; PINTO et al., 2002). Diversas metodologias foram avaliadas para a síntese de 13 visando sua produção em larga escala, porém, devido a complexidade estrutural a síntese total não é viável e atualmente ele é obtido por semissíntese. A partir da obtenção em maiores quantidades de

13 foi possível realizar estudos sobre o seu mecanismo de ação, o que permitiu o preparo de derivados que auxiliaram na identificação dos grupos farmacofóricos. Dessa forma, foi desenvolvido o docetaxel (**21**) (Figura 4), indicado para o tratamento de diversos tipos de câncer, como de mama, próstata, ovário e estômago (ANVISA, 2018b; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A partir do óleo de *Cordia verbenácea* foi obtido o sesquiterpeno α -humuleno (**14**) (Figura 3), atualmente comercializado como Acheflan[®], que é um medicamento fitoterápico de ação anti-inflamatória (ANVISA, 2004; ERENO, 2005; GILBERT; FAVORETO, 2012). Medicamentos fitoterápicos são necessariamente obtidos a partir de matérias-primas ativas vegetais com eficácia e riscos conhecidos (ANVISA, 2019a).

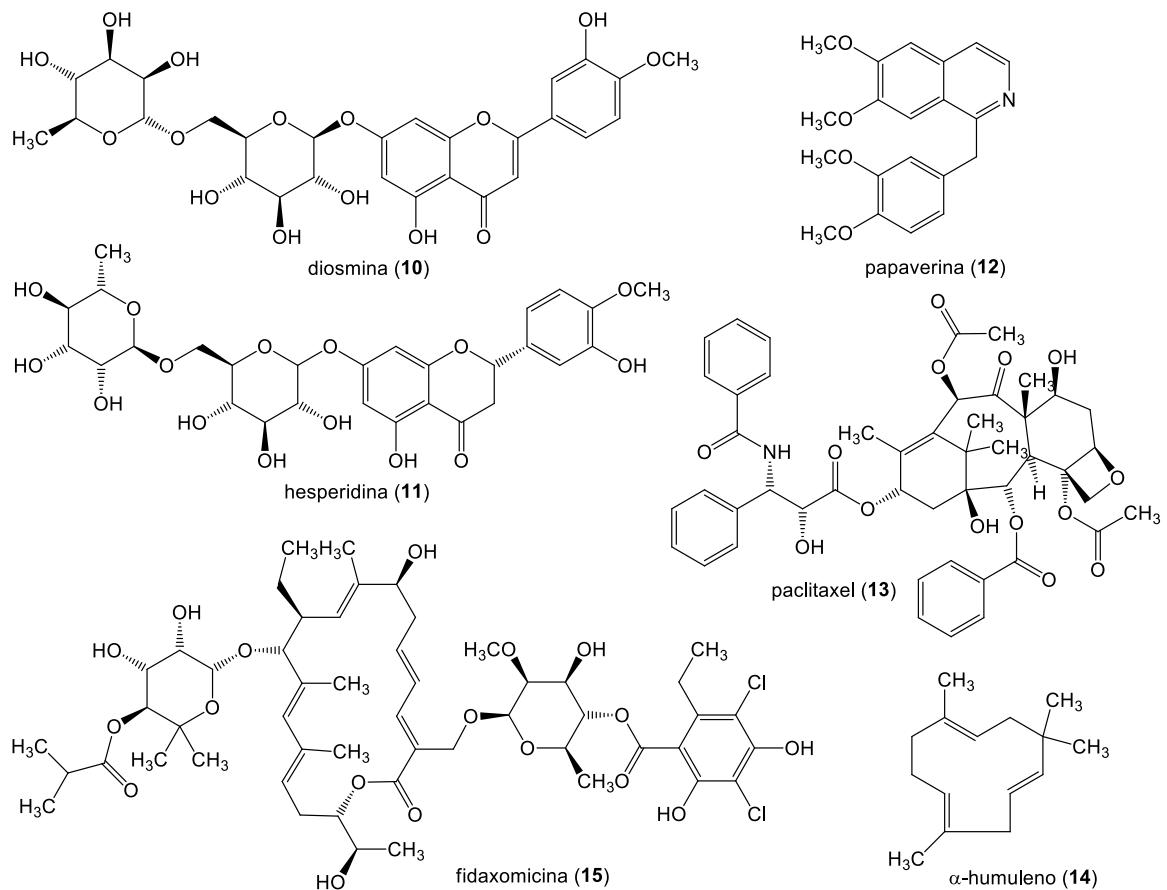
Dos vinte e dois antibióticos aprovados entre 2000 e 2012, dois são PNs, entre eles a fidaxomicina (**15**) (Figura 3), que é obtida da bactéria *Dactylosporangium aurantiacum*. Este medicamento é o primeiro membro de uma nova classe de antibióticos aprovados para humanos que atua contra infecções causadas pelo bacilo *Clostridium difficile* (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013; ZHANEL; WALKTY; KARLOWSKY, 2015). Desta forma é possível constatar que os PNs são uma alternativa promissora para o tratamento de doenças causadas por parasitas resistentes (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FIORAVANTE, 2016; VALLI et al., 2012).

Tabela 1 – Produtos naturais utilizados como medicamentos.

PN ^a	Classe	Encontrado na espécie	Medicamento	Indicação
Diosmina (10) ^e Hesperidina (11) ^b	Flavonoides	Espécies de Citrus ^{b, c}	Diosmin ^{®d} Daflon ^{®e}	Doença venosa crônica; sintomas do plexo hemorroidário ^{d, e}
Papaverina (12) ^b	Alcaloide	<i>P. somniferum</i> ^b	Hypoverin ^{®f}	Antiespasmódico; vasodilatador ^f
Paclitaxel (13) ^g	Terpeno	<i>T. brevifolia</i> ^b	Taxol ^{®b, g}	Carcinoma de ovário ^h
α-humuleno (14) ⁱ	Terpeno	<i>C. verbenacea</i> ⁱ	Acheflan ^{®j}	Anti-inflamatório ^{h, k}
Fidaxomicina (15) ^l	Lactona	<i>D. aurantiacum</i> ^m	Dificlir [®]	Infecções por <i>Clostridium difficile</i> ^{l, m}

^aEstruturas na Figura 3. Fonte: ^bDEWICK, 2009; ^cVENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005; ^dANVISA, 2015a; ^eANVISA, 2016a; ^fANVISA, 2018a; ^gPINTO et al., 2002; ^hANVISA, 2016b; ⁱGILBERT; FAVORETO, 2012; ^jANVISA, 2004; ^kERENO, 2005; ^lBUTLER; BLASKOVICH.; COOPER, 2013; ^mZHANEL; WALKTY; KARLOWSKY, 2015.

Figura 3 – Produtos naturais utilizados como medicamentos (Tabela 1).



Fonte: a autora.

Segundo levantamento feito por Newman e Cragg (2016), dos trezentos e vinte e seis fármacos utilizados para o tratamento de infecções, usados no período de 1981 a 2014, treze são PNs, sendo onze antibacterianos e dois antiparasitários. Oitenta e três são derivados de PNs, sendo setenta e um antibacterianos, três antifúngios, cinco antiparasitários e quatro antivirais. Considerando apenas fármacos anticâncer no mesmo período, dos cento e sessenta e três usados, dezesseis são PNs e trinta e oito são derivados de PNs.

Os produtos naturais podem ainda servir de inspiração no desenvolvimento de novos fármacos, sendo modelos para medicamentos sintéticos (PINTO et al., 2002) como os exemplos mostrados na Tabela 2. Em 1945 e em 1947 foram isoladas pela primeira vez as tetracilinas clorotetraciclina (16) e oxitetraciclina (17) (Figura 4) de *Streptomyces aureofaciens* e *S. rimosus*, respectivamente, que fizeram parte de um novo arsenal de antibióticos. Embora as tetracilinas tenham sido utilizadas por décadas, sua prescrição tem sido restringida devido a diminuição da sua eficácia principalmente para o tratamento de microorganismos resistentes. No entanto, a tigeciclina (18) (Figura 4) foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2005. Modificações estruturais no núcleo tetracíclico (substituinte no anel aromático), levaram ao aumento do espectro de atividade e diminuição da suscetibilidade a resistência, mantendo as tetracilinas no mercado farmacêutico (ANVISA, 2014a; BORGHI; PALMA, 2014; GREER, 2006).

Na busca por substâncias para o tratamento da angina foi descoberto o sildenafila (19), cuja síntese foi inspirada na estrutura da cafeína (20) (Figura 4). No entanto, os resultados dos ensaios clínicos mostraram que o novo composto poderia ser indicado tanto para hipertensão como para disfunção erétil (ANVISA, 2015b; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A partir de *Podophyllum emodi* foi obtida a podofilotoxina (22) (Figura 4), lignana a partir da qual foram obtidos os derivados semissintéticos etoposídeo (23) e teniposídeo (24) (Figura 4) que são os princípios ativos do Tevaetopo® e Vumon® respectivamente, ambos utilizados como antitumorais (ANVISA, 2016c; BRANDÃO et al., 2010; MANN, 2002; SANTOS et al., 2011).

De *Camptotheca acuminata* foi isolada a camptotecina (25) (Figura 4), que apesar de ser citotóxica e apresentar baixa solubilidade, o que a torna inadequada para ser utilizada como fármaco, levou ao desenvolvimento dos análogos topotecan (26) e irinotecan (27) (Figura 4) que apresentam a mesma sub-unidade farmacofórica (anel lactônico hidroxilado) e que na forma de sal, são mais solúveis e consequentemente, mais adequados que seu precursor. O Topotax®, cujo princípio ativo é o 26, é indicado como alternativa no

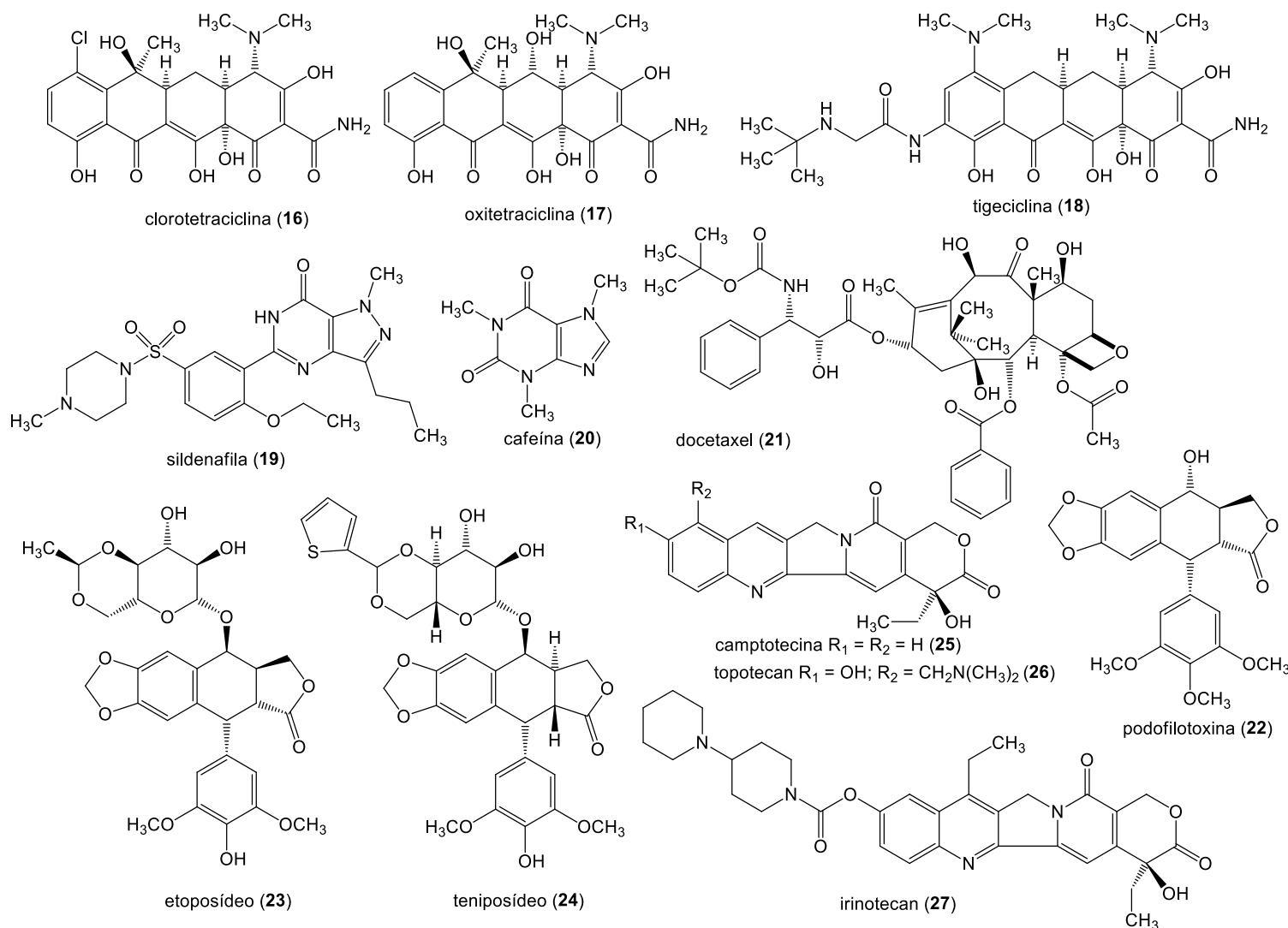
tratamento do câncer de ovário e de pulmão de pequenas células, após falha da quimioterapia. Já o Camptosar[®], cujo princípio ativo é o 27, é indicado para o tratamento de diferentes tipos de câncer (ANVISA, 2014b, 2017; MANN, 2002; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Tabela 2 – Produtos naturais e derivados utilizados como medicamentos.

PN^a (Espécie)	Derivado^a	Medicamento	Indicação
Clorotetraciclina (16) ^b (<i>S. aureofaciens</i>) ^b	(18) Tigeciclina ^c	Tygacil ^{®d}	Antibiótico de amplo espectro ^c
Oxitetraciclina (17) ^b (<i>S. rimosus</i>) ^b			
Cafeína (20) ^e (Espécies de <i>Coffea</i>) ^f	(19) Sildenafil ^e	Viagra ^{®g}	Disfunção erétil ^g
Paclitaxel (13) ^h (<i>T. brevifolia</i>) ^f	(21) Docetaxel ^{h, i}	Taxotere ^{®i}	Antitumoral ⁱ
Podofilotoxina (22) ^j (<i>P. emodii</i>) ^k	(23) Etoposídeo ^j (24) Teniposídeo ^j	Tevaetopo ^{®l} Vumon ^{®j}	Antitumorais ^{j,l}
Camptotecina (25) ^{h,m} (<i>C. accuminata</i>) ^{h,m}	(26) Topotecan ^{h,m} (27) Irinotecan ^{h,m}	Topotacx ^{®n} Camptosar ^{®o}	Antitumorais ^{n, o}

^aEstruturas na Figura 4. Fontes: ^bBORGHI; PALMA, 2014; ^cGREER, 2006; ^dANVISA, 2014a; ^eBARREIRO; BOLZANI, 2009; ^fDEWICK, 2009; ^gANVISA, 2015b; ^hVIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006; ⁱANVISA, 2018b; ^jBRANDÃO et al., 2010; ^kSANTOS et al., 2006; ^lANVISA, 2016c; ^mMANN, 2002; ⁿANVISA, 2017; ^oANVISA, 2014b.

Figura 4 – Produtos naturais e derivados utilizados como medicamentos (Tabela 2).



Fonte: a autora.

Dentro deste contexto podemos afirmar que os PN's têm impacto direto na história da humanidade, uma vez que a expectativa de vida média no século XX foi dobrada devido aos novos medicamentos, que atuam na cura de doenças graves e proporcionam melhora na qualidade de vida (PINTO et al., 2002).

1.2 Alcaloides

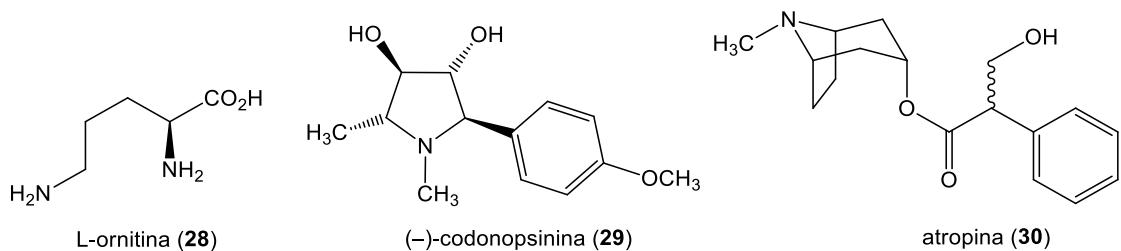
Os metabólitos secundários das plantas desempenham diversas funções como proteção contra herbívoros e infecção por microrganismos patogênicos; podem agir como atratores (odor, cor ou sabor) para animais ou insetos polinizadores e dispersores de sementes; podem atuar como agentes na competição planta-planta e na simbiose entre planta e microrganismo (DEMAIN, 2009). A produção destes compostos está diretamente relacionada com o processo evolutivo, sendo variável de acordo com as necessidades do organismo que os produz, como resposta a situações adversas provocadas pelo meio externo (DEWICK, 2009; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HUSSAIN et al., 2018). Podem ser divididos em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Dentre estes, os alcaloides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular, farmacologicamente ativos, encontrados principalmente em plantas angiospermas e com menor ocorrência em microorganismos e animais. A diversidade estrutural dessa classe pode ser explicada por sua ampla distribuição no reino vegetal. As famílias contendo alcaloides consideradas mais importantes são Amaryllidaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Buxaceae, Celastraceae, Fabaceae, Lauraceae, Liliaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Solanaceae, sendo que de cada uma delas, mais de duzentos e quarenta compostos nitrogenados já foram isolados (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

Nas plantas, os alcaloides podem estar distribuídos em diferentes órgãos, como casca, folhas, raízes e frutos, entretanto, é possível observar com frequência que o acúmulo se dá preferencialmente em um órgão que geralmente é diferente do local em que foi sintetizado. A ausência desses compostos em folhas jovens pode ser explicada pela biossíntese que só acontece no retículo endoplasmático das folhas em estágio de desenvolvimento mais avançado, e em seguida são translocados para os vacúolos onde são acumulados (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

Os alcaloides são classificados como verdadeiros, pseudoalcaloides ou protoalcaloides. Alcaloides denominados verdadeiros são aqueles em que o átomo de nitrogênio faz parte de um heterociclo cuja biossíntese é proveniente de um aminoácido como precursor, mantido durante as etapas biossintéticas. Assim o sistema cíclico presente na estrutura do metabólito é geralmente utilizado para sua classificação em subclasses (DEWICK, 2009; HENRIQUES et al., 2007). Nos pseudoalcaloides, apenas o átomo de nitrogênio é proveniente do aminoácido, incorporado por reações de transaminação, sendo que o esqueleto de carbono deriva de outras vias metabólicas. Já os protoalcaloides tem sua origem em reações de *N*-metilação e descarboxilação de aminoácidos, onde o átomo de nitrogênio não faz parte de um heterociclo (BUCKINGHAM et al., 2010; DEWICK, 2009; HEGNAUER, 1988; KHADEN; MARLES, 2011).

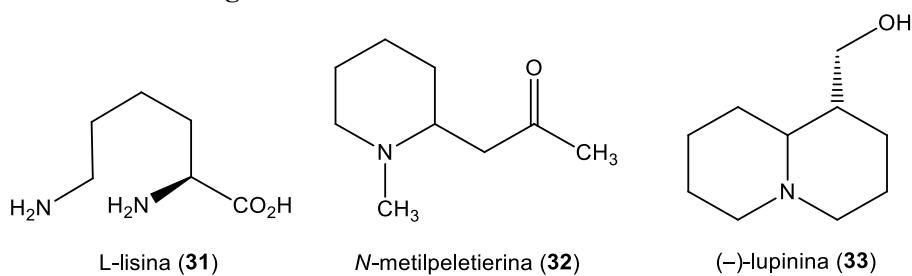
Os principais aminoácidos precursores de alcaloides são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (DEWICK, 2009). A parte estrutural do alcaloide que não é proveniente do aminoácido pode ter origem em diferentes vias como a do acetato ou chiquimato. A partir da L-ornitina (28) são biossintetizados os alcaloides pirrolidínicos como a (–)-codonopsinina (29) encontrada em *Codonopsis clematidea*, e os tropânicos como a atropina (30), encontrada em *Atropa beladona* L. (Figura 5). Da L-lisina (31) derivam os alcaloides piperidínicos como a *N*-metilpeletierina (32), encontrada em *Punica granatum* e os alcaloides quinolizidínicos como a lupinina (33), encontrada em *Lupinus luteus* L. (Figura 6) (DEWICK, 2009; HENRIQUES et al., 2007).

Figura 5 – Alcaloides derivados da L-ornitina.



Fonte: a autora.

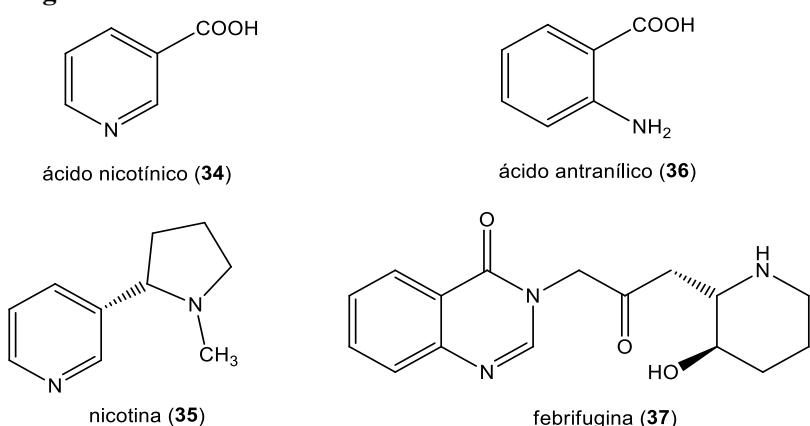
Figura 6 – Alcaloides derivados da L-lisina.



Fonte: a autora.

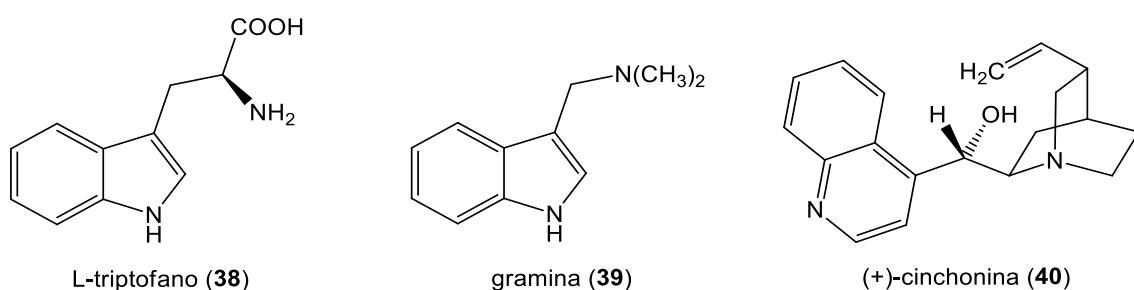
O ácido nicotínico (34) é precursor dos alcaloides piridínicos como a nicotina (35), encontrada em *Nicotiana tabacum*, assim como o ácido antranílico (36) é precursor dos alcaloides quinazolínicos como a febrifugina (37), encontrada em *Dichroa febrífuga* (Figura 7). Já o L-triptofano (38) dá origem aos alcaloides indólicos como a gramina (39), encontrada em *Hordeum vulgare* e aqueles em que o núcleo indólico sofre rearranjo, como a (+)-cinchonina (40), obtida de *Cinchona* spp. (Figura 8) (HENRIQUES et al., 2007; DEWICK, 2009).

Figura 7 – Alcaloides derivados dos ácidos nicotínio e antranílico.



Fonte: a autora.

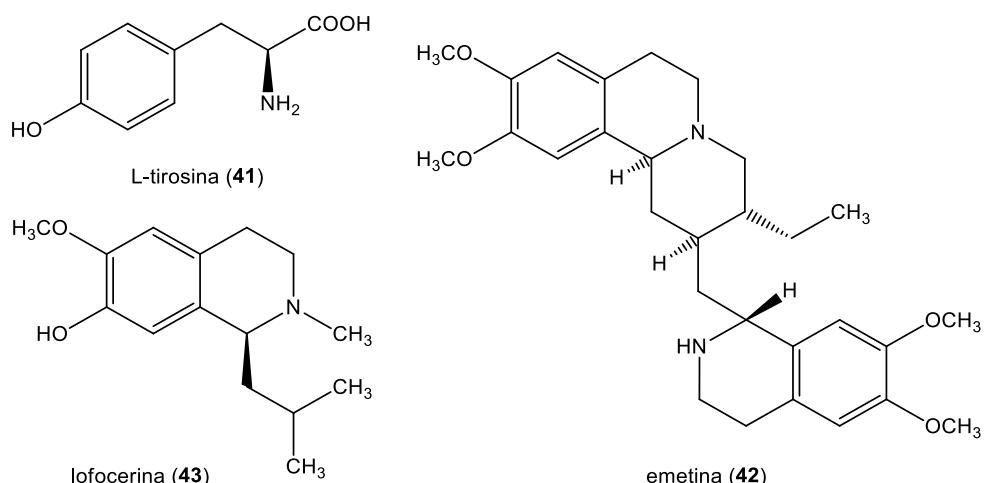
Figura 8 – Alcaloides derivados do L-triptofano.



Fonte: a autora.

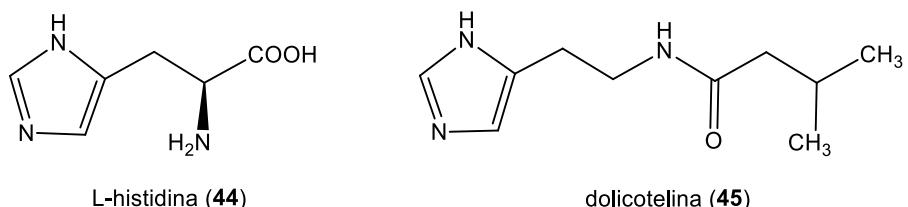
A partir da L-tirosina (41) são biossintetizados os alcaloides isoquinolínicos como a emetina (42), encontrada em *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes e lofocerina (43), encontrada em *Lophophora* spp. (Figura 9). A L-histidina (44) é precursora dos alcaloides imidazólicos como a dolicotelina (45), encontrada em *Dolichothele sphaerica* (Figura 10) (DEWICK, 2009; HENRIQUES et al., 2007).

Figura 9 – Alcaloides derivados da L-tirosina.



Fonte: a autora.

Figura 10 – Alcaloide derivado da L-histidina.



Fonte: a autora.

Além de atuar no mecanismo de defesa das plantas contra predadores ou infestações de microorganismos e vírus, teorias atuais indicam que os alcaloides também podem atuar como hormônios reguladores de crescimento (inibidores de germinação) (ANISZEWSKI, 2007; HENRIQUES et al., 2007).

Seguindo as pesquisas de Pelletier e Caventou com a *Cinchona*, muitos pesquisadores conseguiram correlacionar que a bioatividade das plantas estudadas estava vinculada a presença dos alcaloides que ao longo da história se mostraram bons princípios ativos no tratamento de muitas doenças, e tornando esta classe de metabólitos secundários uma fonte

potencial de moléculas candidatas a fármacos (ANISZEWSKI, 2007; CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

Os alcaloides vimblastina (46) e vincristina (47) (Figura 11), isolados de *Catharanthus roseus*, são os princípios ativos dos medicamentos Velban® e Fauldvincri®, respectivamente, utilizados como quimioterápicos para o tratamento do câncer. Velban® é indicado para tratamento da doença de Hodgkin generalizada, linfomas e micoses causadas por fungos. Fauldvincri® é indicado para o tratamento de leucemia aguda, linfomas malignos não Hodgkin, neuroblastoma e tumor maligno nos rins (ANVISA, 2013a, 2014c; DEWICK, 2009; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

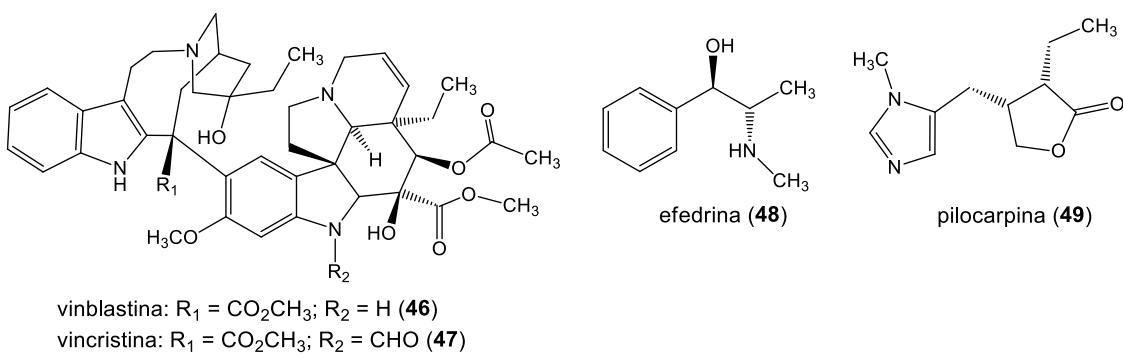
Também são relevantes as misturas de plantas utilizadas na medicina tradicional Chinesa, dentre elas é conhecido que *Ephedra sinica*, utilizada há 5 mil anos, tem efeito estimulante e antiasmático, assim como a *Ephedra gerardiana*, utilizada na medicina popular indiana desde os tempos antigos (ABOURASHED et al., 2003; DEWICK, 2009). O principal alcaloide presente no gênero *Ephedra* é a efedrina (48) (Figura 11), bastante empregado como descongestionante nasal e dilatador brônquico. O medicamento Efedrin®, cujo princípio ativo é a efedrina, também é indicado para o tratamento ou prevenção da hipotensão associada à anestesia e em situação de queda abrupta da pressão arterial (ABOURASHED et al., 2003; ANVISA, 2016d; DEWICK, 2009). O gênero *Pilocarpus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por jaborandi, podem ser fontes da pilocarpina (49) (Figura 11). Entretanto, apenas a espécie *P. microphyllus* Stapf é utilizada pela indústria farmacêutica como fonte deste alcaloide, que é indicado para o tratamento do glaucoma (ANVISA, 2013b; LUCIO; SHARAPIN; FRANÇA, 2002).

Tabela 3 – Alcaloides utilizados como fármacos.

PN ^a	Espécie	Medicamento	Indicação
Vimblastina (46) ^b	<i>C. roseus</i> ^c	Velban ^{®b}	Anticancerígeno ^d
Vincristina (47) ^b	<i>C. roseus</i> ^c	Fauldvincri ^{®d}	Anticancerígeno ^d
Efedrina (48) ^e	Gênero <i>Ephedra</i> ^{c, e}	Efedrin ^{®f, g}	Vasopressor ^{f, g}
Pilocarpina (49) ^h	<i>P. microphyllus</i> ^h	Pilocarpina ^{®g, i}	Glaucoma ^{g, i}

^aEstruturas na Figura 11. Fontes: ^bVIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; ^cDEWICK, 2009; ^dANVISA, 2013a; ^eABOURASHED et al., 2003; ^fANVISA, 2014c; ^gANVISA, 2016d; ^hLUCIO; SHARAPIN; FRANÇA, 2002; ⁱANVISA, 2013b.

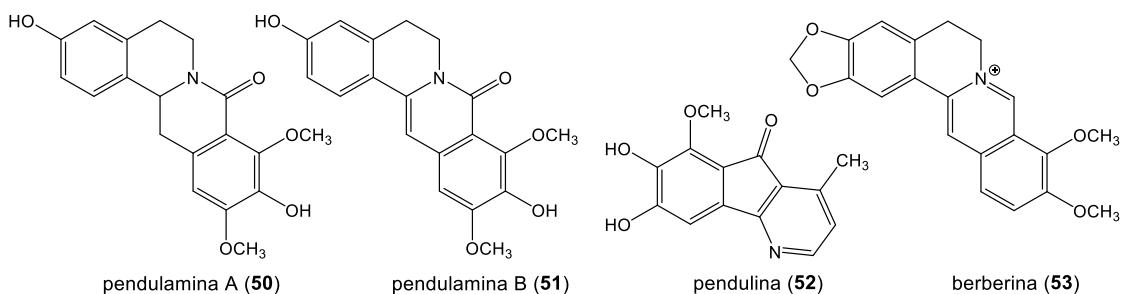
Figura 11 – Alcaloides usados como fármacos.



Fonte: a autora.

Dentre as diferentes propriedades farmacológicas apresentadas pelos alcaloides, vale destacar a atividade antibacteriana apresentada pelo extrato metanólico das raízes de *Polyalthia longifolia var. pendula*, contra *Bacillus subtilis*, de onde foram isolados os alcaloides pendulamina A (50) e pendulamina B (51) (Figura 12), potentes contra *Corynebacterium hoffmannii*, *Micrococcus lysodicklycus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus viridans*; e a pendulina (52), também potente contra *C. hoffmannii*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*. Os valores de concentração inibitória mínima mostraram ainda que a atividade das pendulaminas A e B para *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foi 1250, 500, 200 e 200 vezes maior, respectivamente, que a berberina (53) (controle positivo utilizado clinicamente) (Figura 12) (FAIZI et al., 2003).

Figura 12 – Alcaloides com potencial atividade antibacteriana.

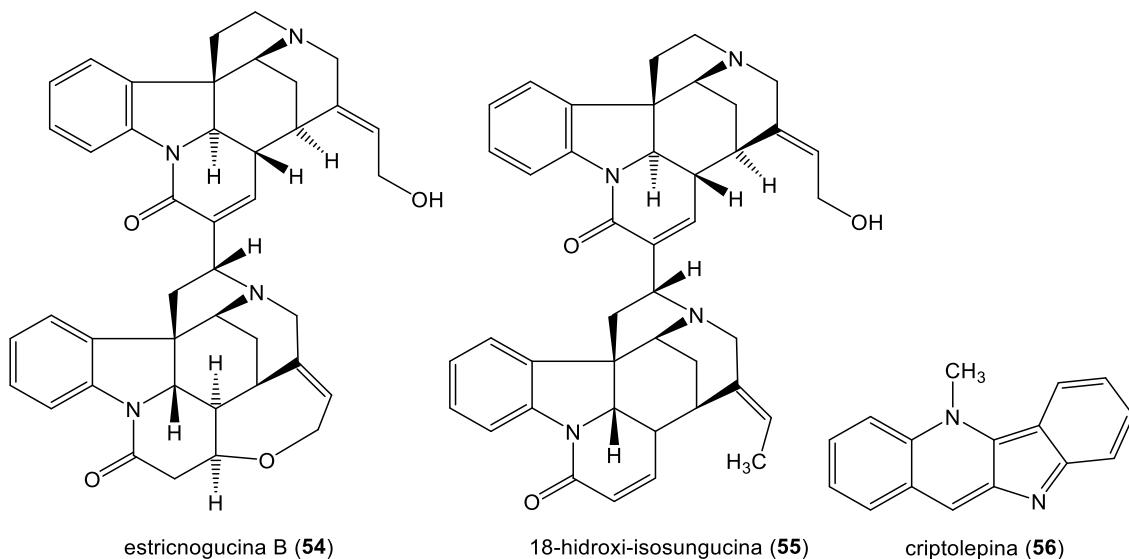


Fonte: a autora.

Devido à resistência de parasitas como o *Plasmodium* frente aos tratamentos convencionais, a descoberta de novos alcaloides tem se tornado uma estratégia promissora (ANISZEWSKI, 2007). Assim, espécies do gênero *Strychnos* (especialmente *S. variabilis*, *S. usambarensis* e *S. icaja*) podem ser consideradas fontes de compostos com potencial

antimalárico, entre eles, a estricnogucina B (54) e a 18-hidroxi-isosungucina (55), que apresentaram valores de IC_{50} próximos de 0,1 μM quando testadas contra linhas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, enquanto a cloroquina e quinina, que são fármacos utilizados no tratamento da malária, apresentaram valores de IC_{50} próximos de 0,5 μM (FREDERICH; ANGENOT; TITS, 2003). A partir da *Cryptolepis sanguinolenta*, cuja decocção das cascas é utilizada em regiões da África para tratamento da malária, foi obtida a criptolepina (56) (Figura 13), que apresentou atividade antimalárica com IC_{50} 0,44 μM quando avaliados no ensaio utilizando o *P. falciparum* (WRIGHT, 2005; WRIGHT et al., 2001).

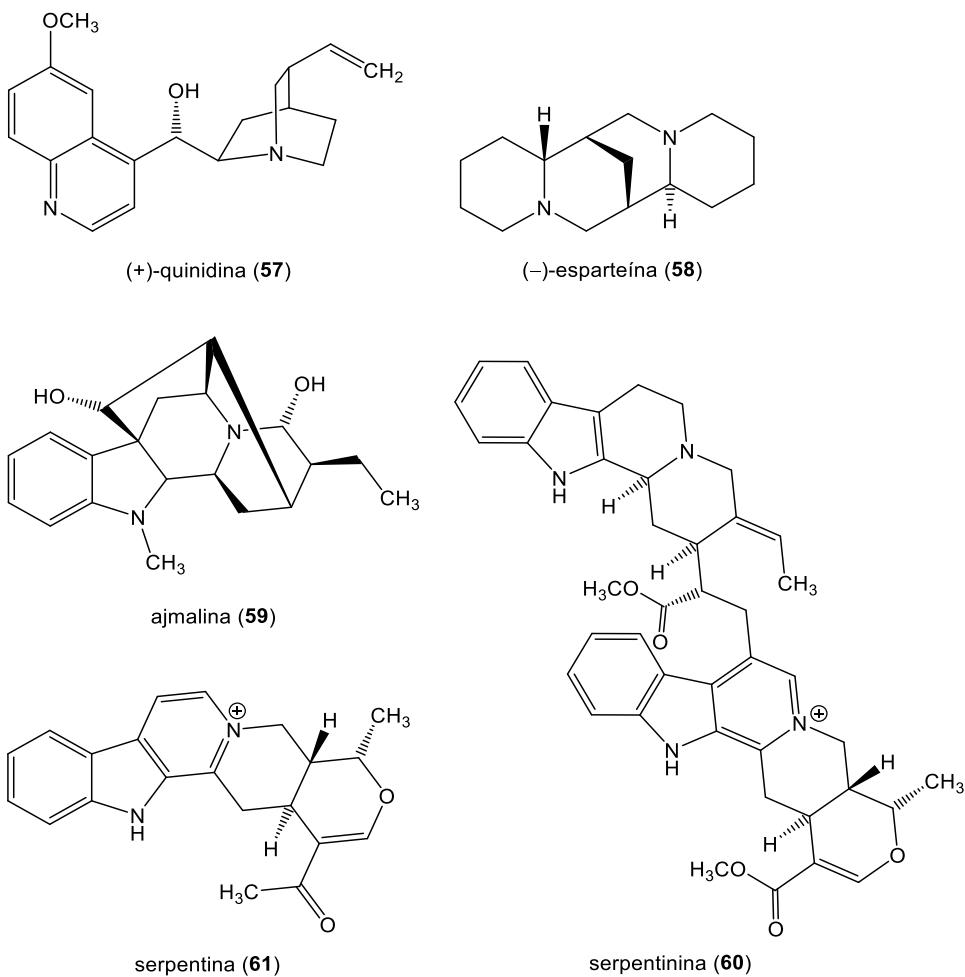
Figura 13 – Alcaloides com atividade antiparasitária.



Fonte: a autora.

Dentre os alcaloides cardioativos, a quinidina (57) e a esparteína (58) (Figura 14), são exemplos de compostos usados no tratamento de arritmias cardíacas, sendo a primeira obtida a partir de espécies do gênero *Cinchona* e a segunda, encontrada em *Cytisus scoparius* e *Lupinus luteus* (DEWICK, 2009; EICHELBAUM et al., 1979; MANSKE, 1955). Ensaios biológicos *in vivo* realizados na década de 50 com alcaloides isolados de *Rauwolfia*, demonstraram que a ajmalina (59) e a serpentinina (60) eram capazes de diminuir as contrações cardíacas, enquanto a serpentina (61) provocava efeito contrário (Figura 14). Atualmente, 59 é utilizada no tratamento de arritmias e também no teste provocativo para diagnóstico da síndrome de Brugada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

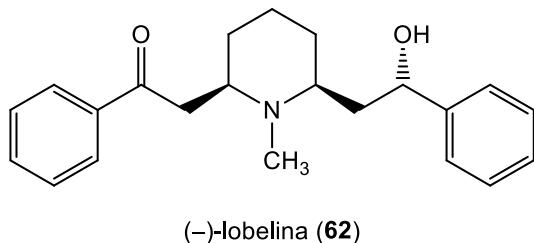
Figura 14 – Alcaloides com capacidade cardioativa.



Fonte: a autora.

Lobelia inflata é considerada uma espécie com potencial toxicológico e conhecida por seu efeito emético, no entanto é utilizada popularmente para o tratamento da asma há mais de um século. Tais propriedades são devidas a lobelina (62) (Figura 15), um alcaloide que provoca intensa estimulação respiratória, cujo efeito significativo ocorre ao se utilizar doses próximas do nível tóxico (MANSKE, 1955).

Figura 15 – Lobelina isolada de *Lobelia inflata*.

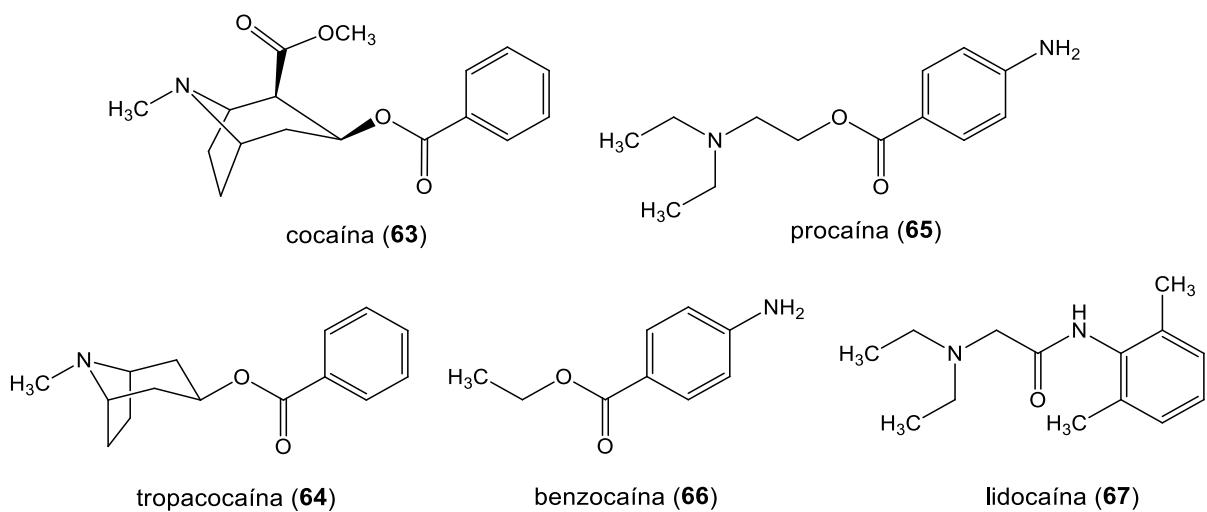


Fonte: a autora.

A história dos alcaloides utilizados como anestésicos locais começa em 1884 com o uso da cocaína (**63**) (Figura 16), isolada das folhas de *Erythroxylum coca*, em procedimentos de cirurgia oftalmica. Desde então, muitos estudos foram feitos objetivando o isolamento ou síntese de compostos com propriedades similares (MANSKE, 1955). Em 1903, a tropacocaína (**64**) (Figura 16), também encontrada nas folhas de coca, foi utilizada na forma de soluções de 2 a 5% como anestésico rápido, porém menos tóxica que **63** (DEWICK, 2009; KROTONSYNER, 1903). A simplificação estrutural de **63** levou ao desenvolvimento de anestésicos que poderiam ser sintetizados mais facilmente, como a procaína (**65**) (Figura 16), o primeiro a ser obtido, mas pouco utilizado atualmente. De acordo com Dewick (2009) e Patrick (2013), a comparação de **63** e **65** permitiu estabelecer que os grupos farmacofóricos importantes para atividade anestésica são o grupamento éster do ácido carboxílico aromático e o grupo amino básico, separados por uma cadeia de hidrocarbonetos.

A benzocaína (**66**) (Figura 16), menos tóxica que **63**, no entanto, não possui o grupo amina ionizável (terminal) como os outros anestésicos similares, tendo assim um efeito de menor duração (DEWICK, 2009; MELO et al., 2010). Os amino-ésteres como **65** e **66**, derivados do ácido para-amino benzoico, tendem a ser tóxicos e possuem rápida metabolização devido a ruptura da ligação éster. A partir de 1943 foram então desenvolvidas amino-amidas com atividade analgésica como a lidocaína (**67**) (Figura 16), um dos mais utilizados, que também é indicada no tratamento de arritmias cardíacas (ARAUJO; PAULA; FRACETO, 2008; DEWICK, 2009).

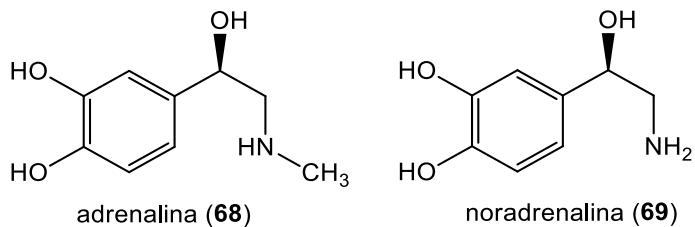
Figura 16 – Alcaloides utilizados como anestésicos locais.



Fonte: a autora.

Outra propriedade farmacológica reconhecida para os metabólitos nitrogenados é a capacidade de provocar aumento da pressão sanguínea devido ao estreitamento dos vasos sanguíneos e/ou estímulo do batimento cardíaco (MANSKE, 1955). Dentro deste contexto, um dos compostos mais importantes é a adrenalina (epinefrina) (68) (Figura 17), que em mamíferos possui a função de neurotransmissor e é produzida nas glândulas suprarrenais e tecido nervoso (DEWICK, 2009). Tanto **68** quanto a noradrenalina (69) (Figura 17) são indicados como medicamentos para elevar a pressão arterial em casos de hipotensão aguda (DEWICK, 2009).

Figura 17 – Alcaloides com propriedade hipertensora.



Fonte: a autora.

1.3 Alcaloides eritrínicos

O gênero *Erythrina*, pertencente à família Fabaceae, compreende mais de 110 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (Figura 18) (JUMA; MAJINDA, 2004; MIGUEL-CHAVEZ et al., 2007; TANAKA et al., 2001). As flores laranjas e vermelhas dão nome ao gênero, que deriva do grego *erythros* e significa “vermelho”. No Brasil, há relatos da ocorrência das espécies *E. mulungu*, *E. velutina*, *E. crista-galli*, *E. falcata*, *E. speciosa*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. indica* e *E. variegata*, principalmente em regiões do Cerrado (CARVALHO, 2008; LORENZI, 1998, 2008).

Figura 18 – Ocorrências do gênero *Erythrina* no mundo.

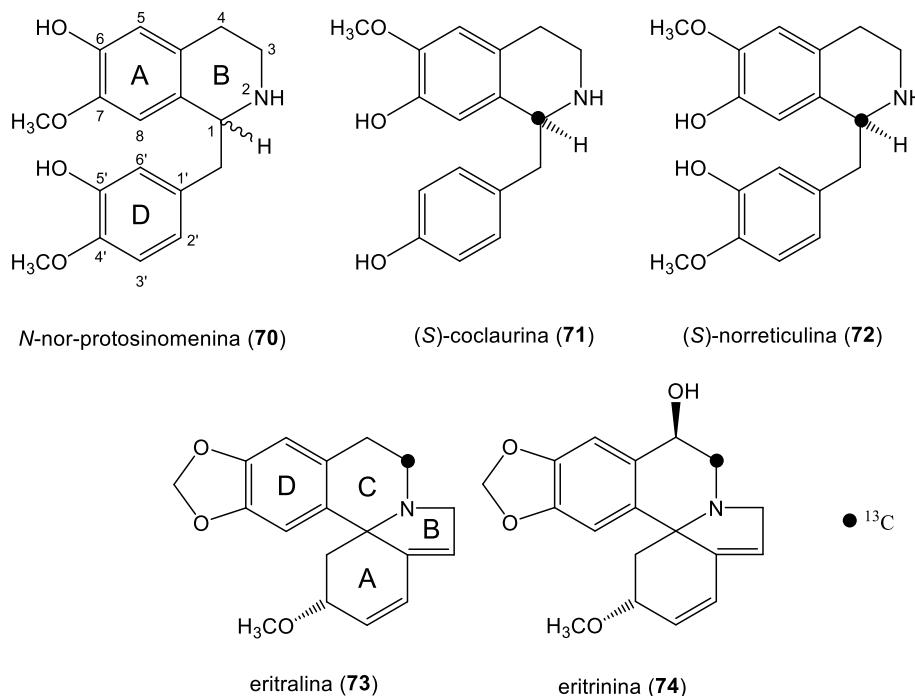


Fonte: GBIF (2018).

Alcaloides eritrínicos foram relatados em espécies de *Erythrina*, cuja biossíntese foi pioneiramente estudada por Barton e colaboradores (1968). Nos experimentos realizados com *E. crista-galli* de 4 a 18 meses, onde foi administrado o precursor marcado (\pm) -[5,2',6'-³H]-*N*-nor-protosinomenina (**70**) (Figura 19), foi observada incorporação do precursor na eritralina (**73**). Na sequência os autores avaliaram separadamente os estereoisômeros (*R*)-**70** e (*S*)-**70** marcados ($[5\text{-}^3\text{H}]\text{-}N$ -nor-protosinomenina), sendo que somente no experimento utilizando o precursor (*S*)-**70** foi observada incorporação em **73** (BARTON; BOAR; WIDDOWSON, 1970). Assim, foi possível constatar que **70** é um dos intermediários na biossíntese destes alcaloides. No entanto, no estudo realizado por Maier (1999), resultados diferentes foram observados. Nesse estudo foram utilizados os precursores (*S*)-[1-¹³C]-coclaurina (**71**) e (*S*)-[1-¹³C]-nor-reticulina (**72**) (Figura 19), marcados isotopicamente com carbono 13 (¹³C), que foram administrados em diferentes órgãos de *E. crista-galli*. No extrato dos frutos foi observada incorporação considerável de **71** e **72** nos alcaloides eritralina (**73**) e eritrinina (**74**) (Figura 19). Entretanto, não foram observados compostos marcados no extrato das folhas, sugerindo a ausência das enzimas nesse órgão ou a dificuldade de translocação dos metabólitos até as folhas (MAIER, 1999). Nesse estudo também foram realizados experimentos utilizando (*R*)-**71** e (*R*)-**72** marcados, que não apresentaram incorporação, indicando a especificidade enzimática do sistema biológico pelos (*S*)-estereoisômeros. Também foi utilizado o precursor (*S*)-**70** marcado, utilizado por Barton, porém não foi observada incorporação desse precursor nos alcaloides eritrínicos, sugerindo que as enzimas

envolvidas na biossíntese, além de serem estereoespecíficas, também reconhecem os substituintes do anel A de (*S*)-70, que provavelmente não deve ser complementar ao sítio ativo da enzima, como é o regioisômero (*S*)-72 (Figura 19). Assim, foi possível constatar que a biossíntese destes metabólitos, que tem como intermediários 71 e 72, também é derivada da via dos aminoácidos, tendo 41 como precursor (Figuras 19 e 20) (DEWICK, 2009; MAIER, 1999).

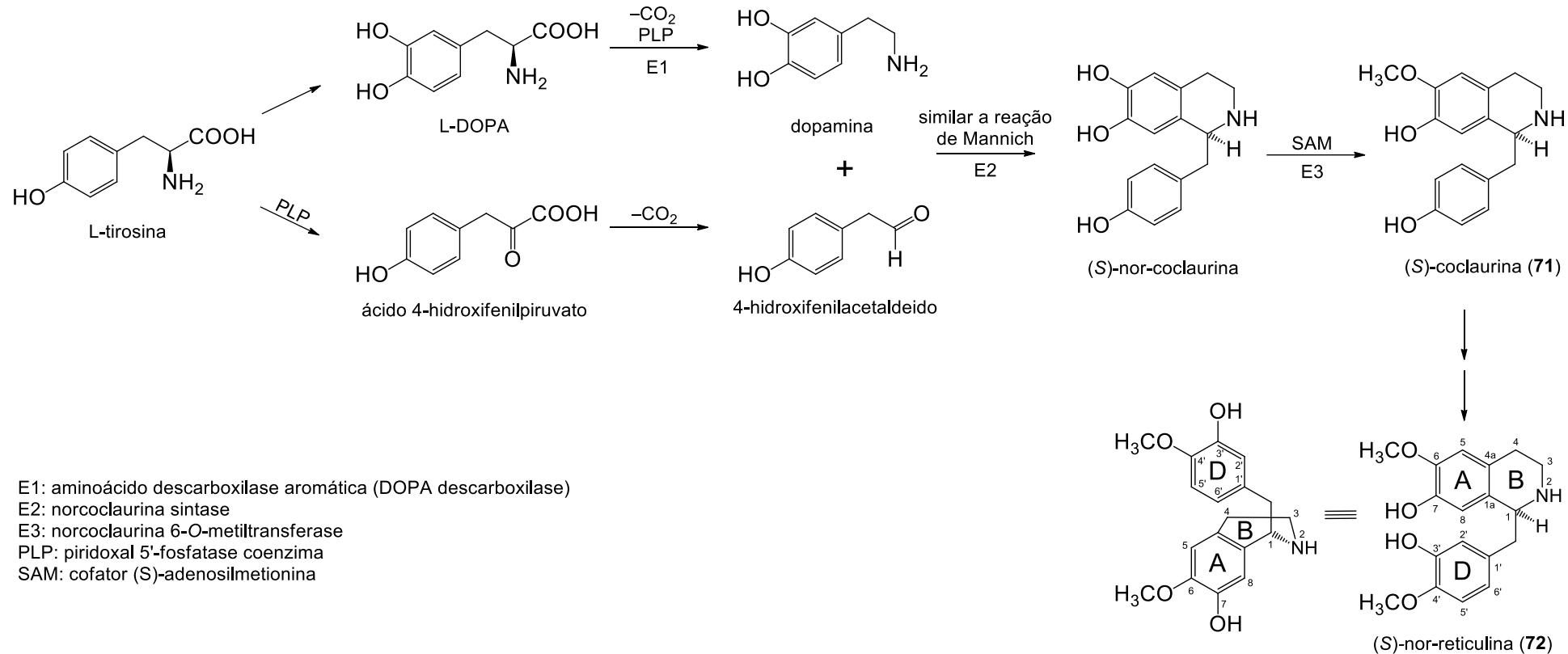
Figura 19 – Precursors e alcaloides eritrínicos investigados no estudo da biossíntese.



Fonte: a autora.

O estudo da biossíntese utilizando os intermediários 71 e 72, mostra que são necessárias duas moléculas do precursor 41, sendo que uma delas sofre oxidação seguida de descarboxilação (E1), para se transformar em dopamina, e a outra perde o grupo $-\text{NH}_2$ por uma reação de transaminação para formar o ácido 4-hidroxifenilpiruvato, que posteriormente sofre descarboxilação para formar o 4-hidroxifenilacetaldeído. A condensação entre a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído é mediada pela enzima nor-coclaurina sintase (E2), através de uma reação semelhante à de Mannich, para formação do enantiômero (*S*)-nor-coclaurina. Em seguida, a reação de *O*-metilação na (*S*)-nor-coclaurina, mediada pela enzima (E3) e o cofator (*S*)-adenosilmetionina (SAM), dá origem a (*S*)-coclaurina (71), que na sequência sofre reação de oxidação e metilação para formar a (*S*)-nor-reticulina (72) (Figura 20).

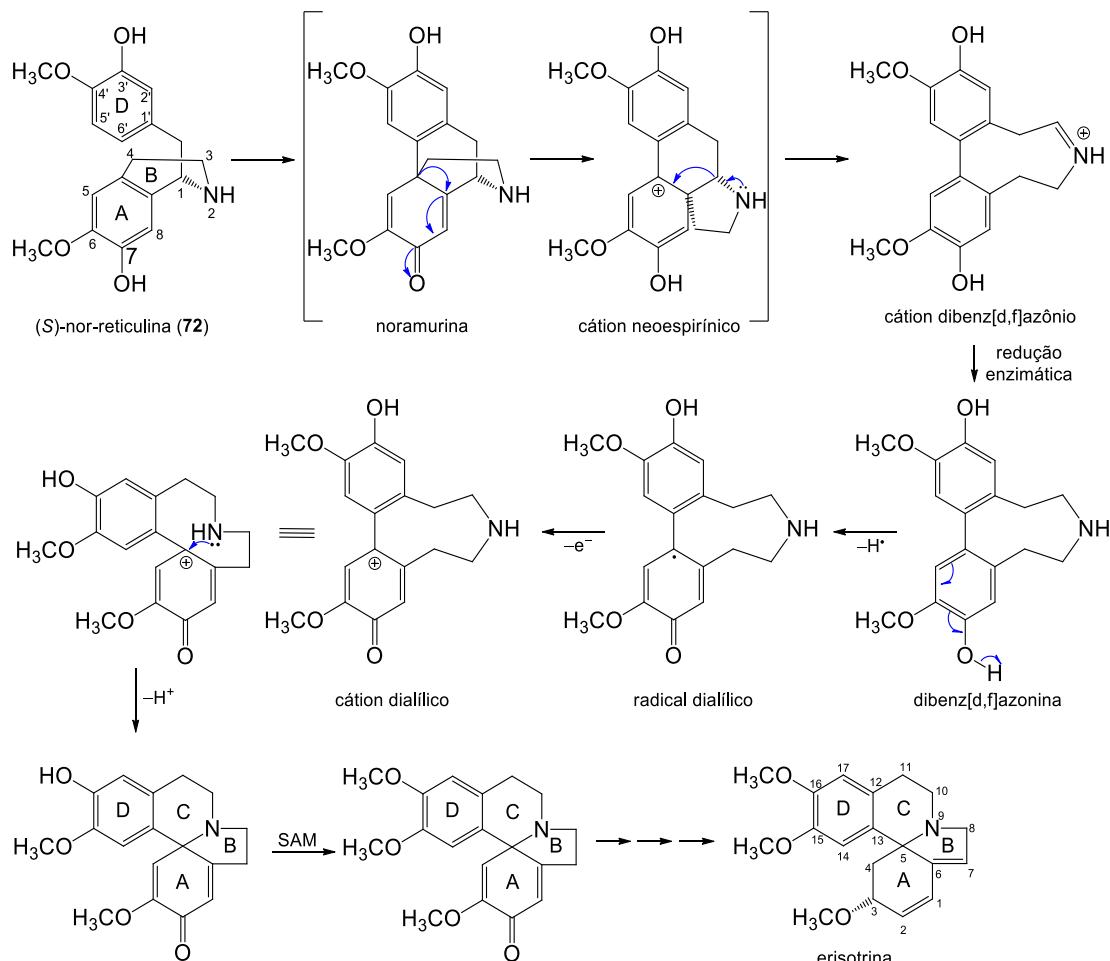
Figura 20 – Biossíntese da *(S)*-nor-reticulina (72), precursora dos alcaloides eritrínicos.



Fonte: adaptado de DEWICK (2009).

A biogênese da erisotrina a partir do intermediário **72** foi proposta a partir do acoplamento oxidativo entre os anéis A (C-4a) e D (C-6') (MAIER et al., 1999), seguido de um rearranjo no intermediário noramurina para formação do cátion neoespirínico (Figura 21). Em seguida o par de elétrons do nitrogênio auxilia uma reação de rearranjo que reestabelece a aromaticidade do anel e transfere a carga positiva para o nitrogênio formando o dibenz[d,f]azônio. Na sequência o nitrogênio sofre redução formando a espécie dibenz[d,f]azonina, que é oxidada via radicalar para formação do radical alílico e posteriormente forma um carbocáton. Em seguida o par de elétrons do nitrogênio reage com o carbocáton formado o núcleo fundamental de quatro anéis dos alcaloides eritrínicos. Esse núcleo sofre reações sucessivas de metilação e redução para formação da erisotrina (Figura 21). Essa proposta de biogênese foi avaliada por Maier et al. (1999), através do estudo com os precursores marcados (**71** e **72**) no C-3, que levou aos metabólitos **73** e **74** com a marcação no C-10 (Figura 21).

Figura 21 – Biogênese da erisotrina a partir da (S)-nor-reticulina (**72**).

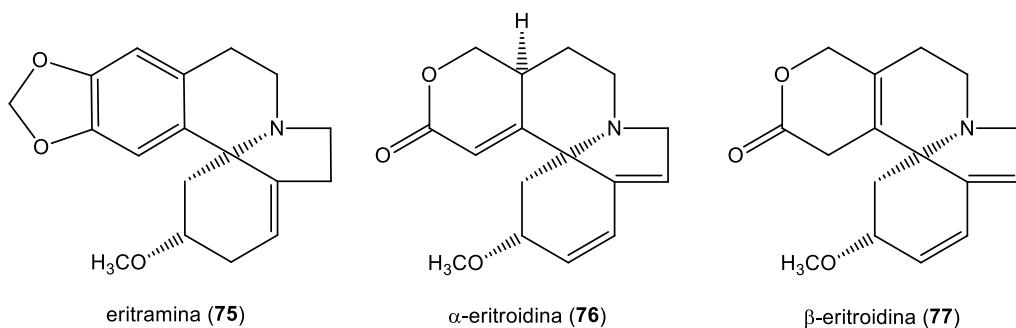


Fonte: adaptado de MAIER et al. (1999).

Muitas espécies de *Erythrina* produzem compostos fenólicos e alcaloides com atividades analgésica, anti-inflamatória, antiplasmódica, bactericida, fungicida, entre outras (MIGUEL-CHAVEZ, 2007). Há mais de um século, são usadas devido aos seus efeitos tranquilizantes atribuídos aos alcaloides. Existem relatos do uso de espécies de *Erythrina* nos curares, que são rapés preparados a partir de diversas plantas pelos indígenas nativos da América do Sul e utilizado como veneno nas flechas de caça devido ao seu poder paralisante (MANSKE, 1955). O estudo de Altamirano em 1888 descreveu os efeitos dos alcaloides de *Erythrina americana* na ação do curare, confirmados pelos ensaios *in vivo* realizados por Lehman (1936) em animais de diferentes espécies. Nesse estudo, a administração de injeções intravenosas de *E. americana* provocou queda da pressão arterial dos animais e injeções intramusculares preveniram convulsões provocadas por estriquinina (LEHMAN, 1936). Folkers e Unna (1938) investigaram se vinte e quatro outras espécies além de *E. americana* e *E. crista-galli* também apresentavam o efeito curare administrando o extrato etanólico, preparado a partir do pó das sementes, utilizando ensaios com rãs. Os testes realizados mostraram que todas as espécies apresentaram efeitos paralisantes semelhantes ao curare.

Em 1937, Folkers e Major isolaram um alcaloide cristalino nomeado de eritroidina, que naquele momento foi proposto apenas a fórmula empírica (FOLKERS; MAJOR, 1937). Dois anos depois, Folkers e Koniuszy descrevem o isolamento e caracterização da eritramina (75) (Figura 22), outro alcaloide fisiologicamente ativo, a partir de *E. sandkicensis* Deg. e *E. subumbrans* (Hassk.) Merrill (FOLKERS; KONIUSZY, 1939). Sabendo da toxicidade das sementes de *E. americana* Miller e do poder levemente hipnótico de suas flores, Aguilar e colaboradores (1981), estudaram os compostos responsáveis por tais propriedades. Os princípios ativos encontrados no extrato das flores foram α - e β -eritroidina (76 e 77, respectivamente) (Figura 22), que consequentemente foram atribuídas ao efeito hipnótico. Considerando que a concentração encontrada desses alcaloides no extrato das sementes foi dezoito vezes maior, é possível correlacionar também o caráter tóxico a esses compostos (AGUILAR; GIRAL; ESPEJO, 1981).

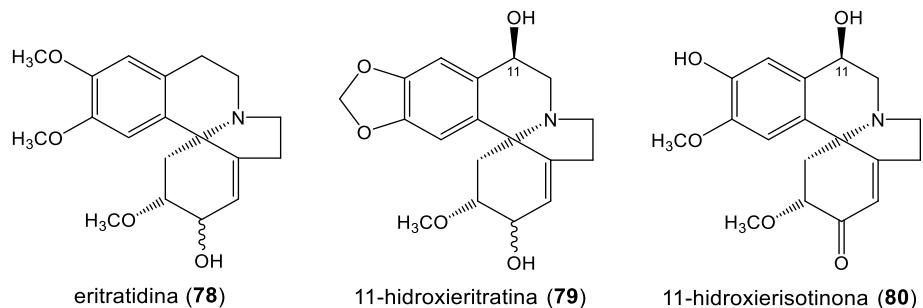
Figura 22 – Alcaloides eritrínicos.



Fonte: a autora.

No estudo das folhas de *E. poeppigiana*, *E. macrophylla*, *E. berteroana* e *E. salviiflora* foram encontrados dezessete alcaloides eritrínicos, dos quais onze estavam presentes em *E. poeppigiana*, tornando esta espécie a de maior diversidade química em relação a estes metabólitos. O composto majoritário em todas as espécies foi **77**, exceto em *E. macrophylla*, que foi **73**. Outros alcaloides encontrados em grande quantidade foram eritratidina (**78**) em *E. poeppigiana*; 11-hidroxieritratina (**79**) e 11-hidroxierisotinona (**80**) em *E. macrophylla* (Figura 23); e **76** em *E. salviiflora* (BARNEBY; KRUOFF; RAVEN, 1982).

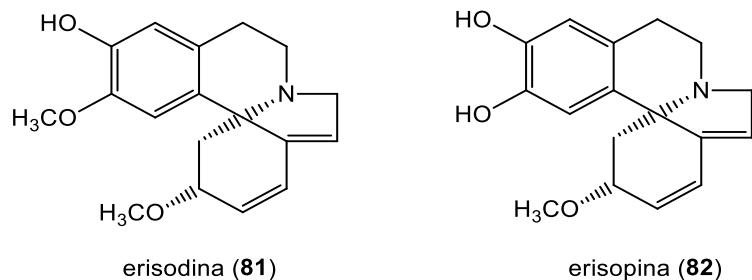
Figura 23 – Alcaloides eritrínicos isolados das folhas de *E. poeppigiana*, *E. macrophylla*, *E. berteroana* e *E. salviiflora*.



Fonte: a autora.

Soto-Hernandez e Jackson (1993), em trabalho semelhante ao descrito anteriormente, estudaram sete espécies de *Erythrina* (*E. fusca*, *E. costaricensis*, *E. leptorhiza*, *E. speciosa*, *E. variegata*, *E. melanacantha* e *E. berteroana*), onde foram identificados dezenas de alcaloides. Destes, a erisodina (81) e erisopina (82) foram encontradas em todas espécies, exceto em *E. leptorhiza* e *E. costaricensis*, respectivamente (Figura 24). Além disso, *E. variegata* e *E. melanacantha* apresentaram maior variedade de alcaloides, sendo 81 o majoritário em ambas.

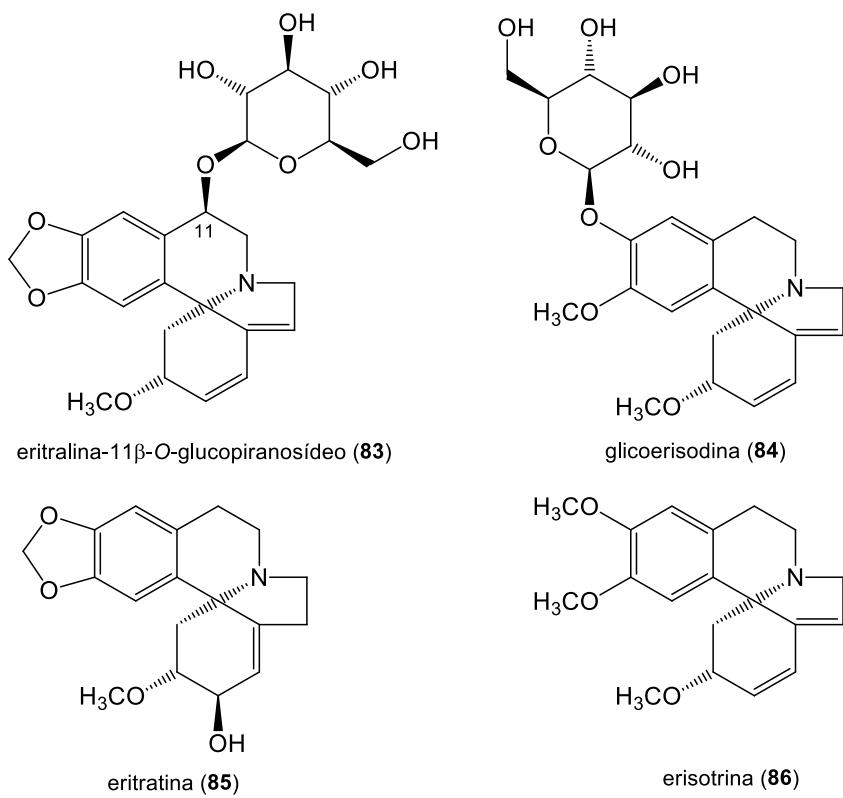
Figura 24 – Alcaloides isolados de *E. variegata*/*E. melanacantha* (81) e *E. fusca*/*E. leptorhiza* (82).



Fonte: a autora.

A partir das sementes de *E. crista-galli* L. foi obtido um novo alcaloide eritrínico glicosilado [eritralina-11 β -O-glucopiranosídeo (**83**)] (Figura 25) e cinco já conhecidos [73, **81**, glicoerisodina (**84**), eritratina (**85**) e erisotrina (**86**)] (Figura 25), todos avaliados quanto ao potencial de inibição do *Tobacco mosaic virus* (TMV). Apesar dos valores de IC₅₀ obtidos serem pelo menos três vezes maior que o controle positivo, ningnanmicina (IC₅₀ 0,18 mM), **73** apresentou IC₅₀ 1,52 mM, enquanto seu análogo glicosilado **83** (IC₅₀ 0,59 mM) apresentou maior potencial de inibição (QING-WEI et al., 2017).

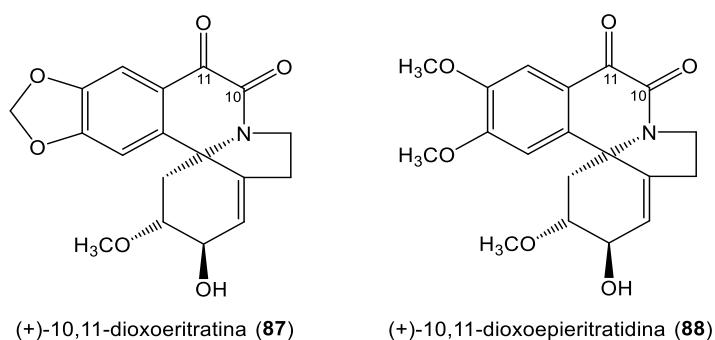
Figura 25 – Alcaloides eritrínicos isolados de *E. crista-galli* L.



Fonte: a autora.

O estudo químico de *Erythrina subumbrans* Merr., utilizada popularmente na Tailândia como planta medicinal para o tratamento para tratamento da tosse, vômitos pós parto e como cataplasma, levou ao isolamento da (+)-10,11-dioxoeritratina (**87**) e da (+)-10,11-dioxoepieritratidina (**88**) (Figura 26), que foram inativas nos testes de avaliação das atividades antiplasmódica, antibacteriana e citotóxica. Entretanto, do ponto de vista químico foi o primeiro relato de grupos carbonila nas posições C-10 e C-11 no núcleo dos alcaloides eritrínicos (RUKACHAISIRIKUL; INNOK; SUKSAMRARN, 2008).

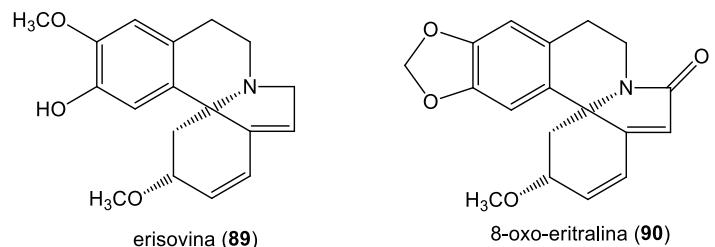
Figura 26 – Alcaloides eritrínicos carbonilados nas posições C-10 e C-11.



Fonte: a autora.

Ozawa e colaboradores (2009) isolaram oito alcaloides eritrínicos de *E. velutina* Willd, que foram avaliados quanto ao aumento do potencial citotóxico quando combinados com o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL). Os resultados mostraram que **73**, **81** e erisovina (**89**) (Figura 27) apresentaram atividade moderada (IC_{50} 23,0; 10,8 e 24,0 μ g/mL, respectivamente), mas que foi aumentada pela adição de TRAIL (IC_{50} 5,0; 4,9 e 14,2 μ g/mL). Já **84**, **86** e a 8-oxo-eritralina (**90**) (Figura 27) apresentaram efeito sinérgico, com citotoxicidade apenas na forma combinada. Estes resultados são importantes pois o TRAIL é capaz de induzir a morte de células tumorais de diferentes tipos de cânceres, sem afetar as células saudáveis.

Figura 27 – Alcaloides eritrínicos com potencial antitumoral.



Fonte: a autora.

1.4 *Erythrina mulungu* (sinonímia *E. verna*)

E. mulungu (Figura 28) é conhecida popularmente por mulungu, termo utilizado popularmente para descrever outras espécies do gênero, o que torna difícil a coleta quando baseada em informações tradicionais (FEITOSA et al., 2012). Além de mulungu, também é conhecida como mulungu-coral, tiriceiro e suinã, é encontrada na região sudeste, especialmente no oeste paulista e triângulo mineiro, e no Acre, com possíveis ocorrências em outros estados. É considerada uma árvore ornamental, podendo atingir de 10 a 14 m de altura e tronco de 40 a 50 cm de diâmetro (LORENZI, 1998). Perde a folhagem para em seguida florescer, geralmente entre os meses de julho e setembro, ocorrendo em seguida o amadurecimento dos frutos que tem formato de vagem (6 a 12 cm de comprimento), que podem conter até seis sementes, sendo comum três ou menos (SCHLEIER; QUIRINO; RAHME, 2016).

Figura 28 – *E. mulungu*: flores, folhas e frutos (A); Ocorrência no Brasil (B).



Fontes: LORENZI (1998); REFLORA (2019).

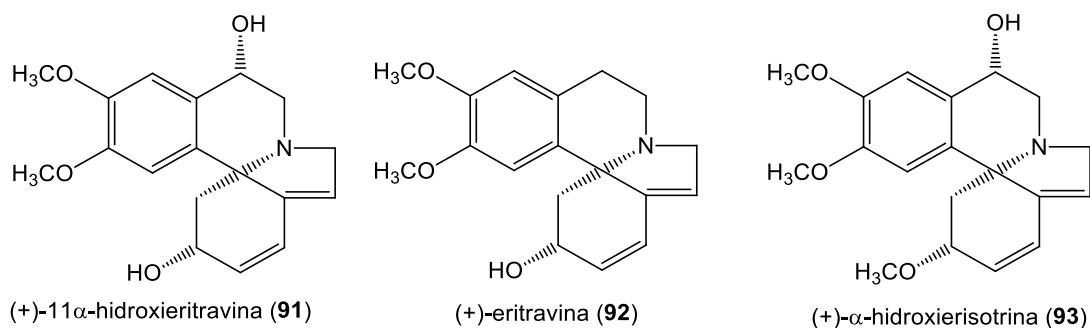
Ao longo dos anos o gênero passou por reclassificação taxonômica e *E. mulungu* foi renomeada para *E. verna*, entretanto as espécies comercializadas no Brasil ainda são vendidas pela nomenclatura anterior, e da mesma forma, em revisões bibliográficas é comum serem encontradas ambas as descrições (FEITOSA, 2012). A identificação e uso medicinal por pessoas leigas pode ser perigosa, considerando que não é recomendado o uso de preparos de

E. mulungu a pessoas com insuficiência cardíaca, principalmente das sementes que apresentam alta concentração de alcaloides, podendo atingir níveis tóxicos (SCHLEIER; QUIRINO; RAHME, 2016). Uma alternativa segura seria o uso de fitoterápicos de laboratórios comprometidos com a qualidade, cuja composição química do fitomedicamento é conhecida e a atividade biológica foi validada por ensaios confiáveis. Na medicina popular, a decocção das cascas é usada como sedativo e para tratar distúrbios do sono e ansiedade, sendo assim indicada para insônia, depressão e como calmante (GUARANTINI et al., 2014; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; LIMA et al., 2006).

Recentemente *E. mulungu* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), elaborada pelo Ministério da Saúde, que tem por finalidade o incentivo e orientação ao uso de plantas medicinais nativas para populações mais carentes que não tem acesso aos medicamentos tradicionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A atividade ansiolítica do extrato etanólico preparado a partir das inflorescências (EEt) de *E. mulungu* e os alcaloides isolados a partir deste extrato foram avaliados em ensaios com animais utilizando teste comportamental, onde o tratamento com 200–400 mg/kg de EEt amenizou a resposta de ansiedade dos camundongos no teste de labirinto em T elevado (do inglês *elevated T-maze*, ETM), efeitos similares aos provocados pelo diazepam (DZP), fármaco utilizado como controle positivo. Além disso, (+)-11 α -hidroxieritravina (91), (+)-eritravina (92) e (+)- α -hidroxierisotrina (93) (Figura 29), em dosagens de 3 e 10 mg/kg, prejudicaram a tarefa de esquiva inibitória no ETM de maneira similar ao DZP em dosagens de 2 mg/kg (FLAUSINO et al., 2007a).

Figura 29 – Alcaloides eritrínicos isolados de *E. mulungu*.



Fonte: a autora.

Outras investigações sobre os possíveis efeitos ansiolíticos dos extratos das inflorescências de *E. mulungu* foram feitos a partir do tratamento agudo (concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg) e crônico (concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg) em ratos submetidos a ensaios de ansiedade. No modelo de transição claro/escuro, tanto o EEt quanto DZP aumentaram o número de transições e o tempo gasto entre os compartimentos claro e escuro em ambos os tratamentos. É importante ressaltar que a atividade motora dos animais não foi afetada. No teste utilizando um pano impregnado com odor de gato, o EEt e DZP não provocaram alteração nas respostas comportamentais em nenhum dos tratamentos. A partir dos resultados obtidos, os autores sugerem que o EEt de *E. mulungu* exerce efeitos ansiolíticos sobre um subconjunto específico de respostas comportamentais defensivas. Resultados semelhantes para o EEt e DZP também foram obtidos no teste ETM, onde as latências de esquiva foram prejudicadas em ambos os tratamentos. Foi possível concluir que o tratamento agudo alterou respostas relacionadas com a ansiedade, cujo efeito seletivo deve estar relacionado ao mecanismo de ação dos alcaloides presentes no EEt; e que os efeitos ansiolíticos observados no tratamento crônico ocorreram em comportamentos relacionados à ansiedade generalizada e transtorno de pânico (ONUSIC et al., 2002, 2003).

Além do potencial ansiolítico, *E. mulungu* também foi avaliada quanto ao potencial antimicrobiano. Em estudo realizado por Lima et al. (2006) que coletou 25 espécies de plantas da medicina tradicional brasileira, cujos extratos etanólicos foram avaliados no ensaio utilizando as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foi observado que o extrato etanólico de *E. mulungu* representa uma fonte em potencial de compostos com atividade antimicrobiana seletiva contra *S. aureus*.

Os extratos hidroalcoólicos da raiz, casca da raiz, caule e casca do caule, e frações clorofórmio e acetato de etila também foram avaliados quanto ao potencial antinociceptivo (efeito de anular ou reduzir a percepção e transmissão dos estímulos que causam dor) e anti-inflamatório. No teste com camundongos foi observada redução de aproximadamente 60% nas contrações abdominais induzidas por ácido acético, sendo os melhores resultados obtidos para os extratos do caule, raiz e casca da raiz, comparáveis a redução provocada por dipirona (medicamento analgésico e antipirético). Os extratos e a fração clorofórmio apresentaram resultados que indicam a presença de compostos com atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2012).

Recentemente, o extrato aquoso comercial das cascas de *E. mulungu* foi avaliado quanto ao potencial sobre as enzimas 7-etoxicumaria *O*-desetilase (ECOD),

7-etoxirresorufina *O*-desetilase (EROD), 7-metoxirresorufina *O*-desmetilase (MROD) e 7-pentoxirresorufina *O*-despentilase (PROD) (enzimas do citocromo P450 hepáticas de rato). O interesse desta pesquisa deve-se ao fato de que algumas plantas medicinais podem alterar a concentração plasmática de fármacos alopáticos por meio da inibição ou indução dessas enzimas. Os resultados mostraram que na concentração de 10 mg/kg, o extrato provocou inibição de 38% da enzima PROD; a concentração de 100 mg/kg provocou redução na atividade da PROD (50%) e MROD (31%); e a concentração de 1000 mg/kg promoveu redução da atividade das enzimas ECOD (23%), MROD (42%) e PROD (51%). Portanto, sendo o extrato de *E. mulungu* capaz de alterar a atividade metabólica de algumas enzimas, seu uso pode acarretar na alteração da concentração de outros fármacos consumidos paralelamente, e por consequência, comprometer sua eficácia (RIBEIRO et al., 2016).

Preparações fitoterápicas contendo extrato de *E. mulungu* são comercializadas em farmácias ou mesmo disponíveis para compra pela internet, dessa forma, como demonstrado, muitos estudos investigam as propriedades ansiolíticas apenas do extrato, sem considerar quais são os princípios ativos (e mecanismos de ação) responsáveis pela atividade farmacológica. Nesse sentido, **91**, **92** e **93**, isolados do extrato obtido das inflorescências, foram avaliados quanto ao potencial ansiolítico em ensaios *in vivo* com camundongos, submetidos a testes comportamentais de ansiedade. No modelo de transição claro/escuro, **92** (3 e 10 mg/kg) aumentou o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado e **91** (3 e 10 mg/kg), além deste efeito, também provocou aumento no número de transições entre os compartimentos. No teste ETM, os três compostos (3 e 10 mg/kg) prejudicaram a tarefa de esquiva inibitória, sugerindo que os efeitos ansiolíticos já relatados para o EEt estão relacionados aos alcaloides eritrínicos (FLAUSINO et al., 2007b).

Estes alcaloides foram posteriormente investigados quanto ao potencial sobre os receptores de acetilcolina e sua seletividade para diferentes subtipos presentes no sistema nervoso central (SNC). Os resultados indicaram que os efeitos comportamentais observados podem ocorrer por meio da inibição dos receptores nicotínicos de acetilcolina do SNC, particularmente aqueles do subtipo a4b2 (SETTI-PERDIGÃO et al., 2013).

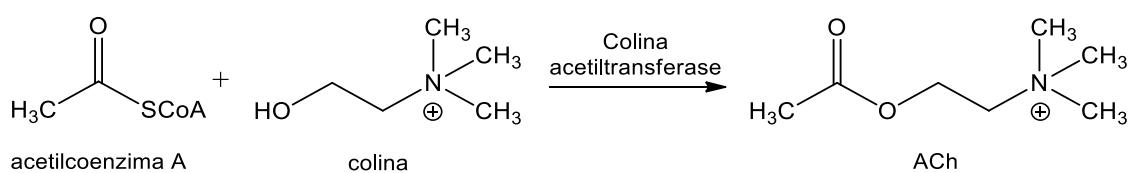
Ensaio *in vivo* que avaliou a atividade anticonvulsivante de **86** mostrou que doses de 3 µg/mL do alcaloide inibiram convulsões provocadas por bicuculina, pentilentetrazol (PTZ) e o ácido *N*-metil-D-aspartato (do inglês *N*-methyl-D-aspartate acid - NMDA). Na concentração de 0,5 µg/mL **86** inibiu convulsões provocadas pelo ácido caínico, entretanto,

nenhuma modificação no glutamato ou nas vias do ácido γ -aminobutírico (do inglês γ -aminobutyric acid - GABA) foi observada em testes neuroquímicos (ROSA et al., 2012).

1.5 Atividade anticolinesterásica

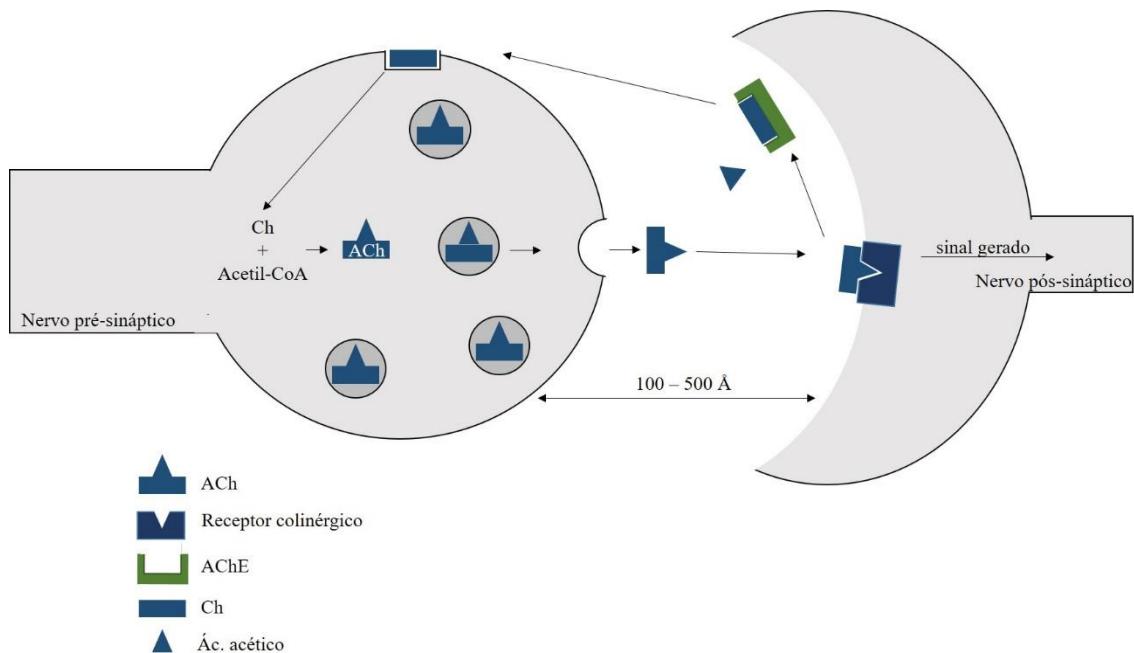
Diferentes classes de alcaloides têm demonstrado potencial de inibir as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BChE), sendo esta uma estratégia no tratamento da doença de Alzheimer (DA) (KONRATH et al., 2013; WILLIANS; SORRIBAS; HOWES, 2011). A hipótese colinérgica é fundamentada a partir do conhecimento de que o neurotransmissor acetilcolina (ACh) atua na fenda sináptica, ativando os receptores colinérgicos, que no SNC estão associados a funções cognitivas e respostas emocionais (DALL'ACQUA, 2013; VENTURA et al., 2010). Assim, a biossíntese da ACh ocorre nos neurônios a partir de colina (Ch) e acetil coenzima A (Acetyl-CoA), catalisada pela enzima colina acetiltransferase (Figura 30). Ao ser liberado, o neurotransmissor atravessa a fenda sináptica e se liga ao receptor colinérgico, que é ativado transmitindo a informação (Figura 31). A AChE (majoritariamente) e BChE são responsáveis por catalisar a hidrólise de ACh em colina e ácido acético, evitando seu acúmulo e permitindo que o neurônio colinérgico ativado retorne ao estado inicial (Figura 32) (PATRICK, 2013; WILLIANS; SORRIBAS; HOWES, 2011).

Figura 30 – Síntese da ACh.



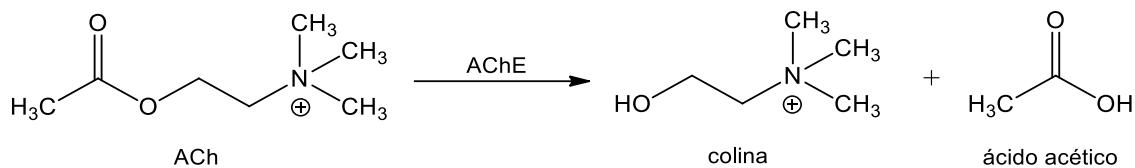
Fonte: PATRICK (2013).

Figura 31 – Esquema de ação e hidrólise da ACh que ocorre na fenda sináptica.



Fonte: Adaptado de PATRICK (2013).

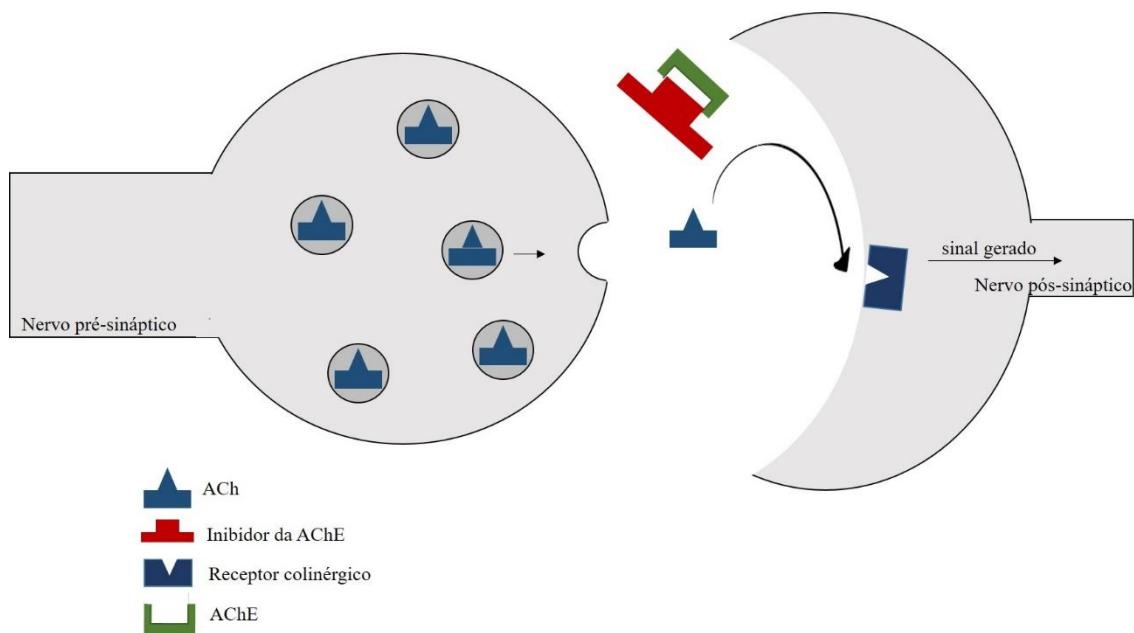
Figura 32 – Hidrólise da ACh.



Fonte: PATRICK (2013).

A hipótese colinérgica foi então proposta a partir das observações de que pacientes com DA apresentavam baixos níveis de ACh, e como consequência, deficiências de memória (ADSERSEN et al., 2007; DALL'ACQUA, 2013; WILLIANS; SORRIBAS; HOWES, 2011). O uso dos inibidores de AChE e BChE, denominados anticolinesterásicos, provém da estratégia de que com a redução na hidrólise de ACh, o neurotransmissor continue na fenda sináptica atuando nos receptores colinérgicos, levando a melhorias no processo cognitivo (PATRICK, 2013) (Figura 33).

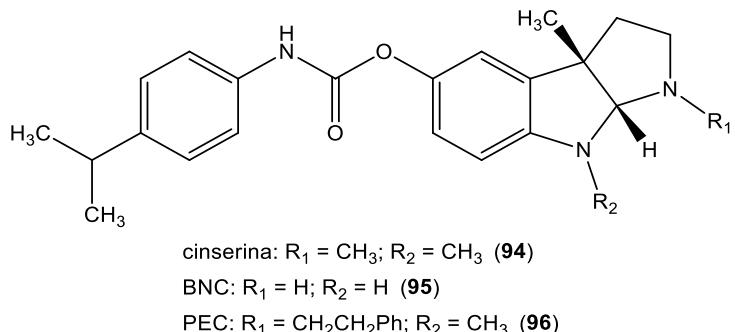
Figura 33 – Hipótese colinérgica.



Fonte: Adaptado de PATRICK (2013).

Já é conhecido que a BChE é menos seletiva para ACh, podendo atuar também na hidrólise de outros ésteres. Embora a hidrólise da ACh seja realizada principalmente pela AChE em condição saudável, altos níveis do neurotransmissor sobrecarregam a enzima que passa a ser auxiliada pela BChE (PATRICK, 2013; GREIG et al., 2005). Entretanto, com o avanço da DA, as atividades enzimáticas colinérgicas são alteradas, ocorrendo diminuição da atividade da AChE que passa a ser compensada com o aumento da atividade da BChE. Assim, a inibição seletiva de BChE também pode aumentar os níveis de ACh no cérebro sem prejudicar o sistema colinérgico, sendo mais uma alternativa para o tratamento da DA avançada (GIACOBINI, 2001). Nesse sentido, a cinserina (94), que é um inibidor seletivo da BChE, foi utilizada como modelo para síntese de análogos como a $(-)-N^1,N^8$ -bisnorcincerina (BNC) (95) e $(-)-N^1$ -feniletilnorcincerina (PEC) (96) (Figura 34), cujos resultados em ensaio *in vivo*, apresentaram melhora na atividade sináptica e no desempenho cognitivo (GREIG et al., 2005).

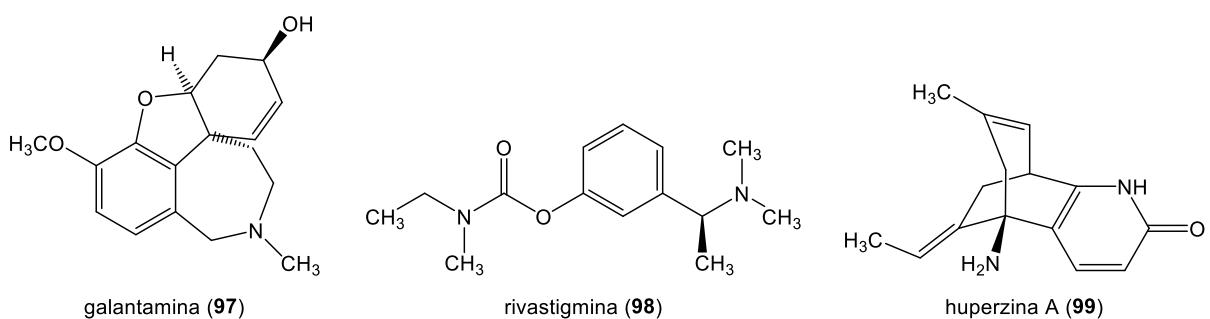
Figura 34 – Cinserina e análogos, inibidores seletivos da BChE.



Fonte: GREIG et al. (2005).

A organização mundial de saúde (OMS) estima que a demência afeta 50 milhões de pessoas no mundo, e a DA é a forma mais comum de demência, responsável por 60–70% dos casos, diagnosticada predominantemente em idosos (OMS, 2019). A galantamina (97), produto natural que pode ser obtido de espécies dos gêneros *Galanthus* e *Narcissus*, está presente em vários medicamentos na forma de bromidrato de galantamina, indicada para o tratamento paliativo dos sintomas da DA (ANVISA, 2019b; DEWICK, 2009; LEI; WANG; DU, 2018; LOPEZ et al., 2002;). A rivastigmina (98), é outro princípio ativo inspirado em PN, a fisostigmina (eserina) isolada de *Physostigma venenosum*, que é comercializada na forma de hemitartrato de rivastigmina. Esse medicamento é indicado para o tratamento de problemas de memória e demência em pacientes com DA ou Parkinson (ANVISA, 2019c; DEWICK, 2009; HOUGHTON; REN; HOWES, 2006). A partir da *Huperzia serrata* foi isolada a huperzina A (99), usada clinicamente na China para DA e outras desordens cognitivas. Nos EUA é vendida como suplemento alimentar para problemas de memória e no Brasil ainda não tem registro na ANVISA (Figura 35) (DAMAR et al., 2017; VIEGAS et al., 2004).

Figura 35 – Inibidores da AChE indicados para o tratamento da DA.



Fonte: a autora.

Os alcaloides eritrínicos também têm sido investigados quanto a sua ação sobre a AChE e receptores de ACh. Em ensaio *in vitro*, **86** apresentou significativa atividade competitiva nos receptores nicotínicos de acetilcolina, e os resultados *in vivo* corroboraram o efeito antagonista do alcaloide em relação aos receptores (DECKER et al., 1995). Os alcaloides **91** e **92** isolados de *E. mulungu*, também apresentaram inibição dos receptores nicotínicos, principalmente aqueles do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (SETTI-PERDIGÃO et al., 2013). A atividade anticolinesterásica foi relatada para o extrato aquoso das folhas de *E. velutina* e para a fração alcaloídica, cujos metabólitos ativos conseguiram ultrapassar a barreira hematoencefálica e inibir a atividade de AChE em ensaios *in vivo*. O extrato aquoso e a fração alcaloídica exibiram atividades inibitórias para AChE com IC_{50} 0,56 e 0,87 mg/mL respectivamente, enquanto o controle positivo neostigmina apresentou IC_{50} 0,36 mg/mL (SANTOS et al., 2012).

Dentro deste contexto, esse trabalho propõe o estudo químico do extrato etanólico das cascas de *E. mulungu*, direcionado para o isolamento dos alcaloides eritrínicos e posterior avaliação quanto ao potencial de inibição das enzimas AChE e BChE utilizando ensaio *in vitro*.

2. OBJETIVOS

Isolar os alcaloides presentes no extrato etanólico das cascas do caule de *E. mulungu* e avaliar a atividade anticolinesterásica.

2.1 Objetivos específicos

- Extração líquido-líquido do extrato etanólico das cascas de *E. mulungu*;
- Estudo químico da fração CH_2Cl_2 e da fração AcOEt alcaloídica visando o isolamento dos metabólitos majoritários e novos compostos;
- Avaliação da atividade anticolinesterásica do extrato, das frações e compostos isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes

- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): Sigma-Aldrich grau HPLC
- Diclorometano (CH₂Cl₂): Vetec P.A.
- Solventes em grau analítico purificados por destilação fracionada: hexano e acetato de etila (AcOEt)
- Solução aquosa de hidróxido de amônio (NH₄OH) 28%: Alphatec P.A. e Neon P.A.

3.2 Reagentes

- Ácido acético glacial (CH₃CO₂H): Synth
- Hexacloroplatinato de potássio (K₂PtCl₆): Vetec
- Iodeto de potássio (KI): Chemicals
- Nitrato de bismuto III (Bi(NO₃)₃): Isofar

3.3 Soluções reveladoras

3.3.1 *Vanilina sulfúrica*:

Preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvida em solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado.

3.3.2 *Iodocloroplatinato* (TOUCHSTONE; DOBBINS, 1978):

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV) ([H₂(PtCl₆).6H₂O]). Também pode ser utilizado o sal K₂PtCl₆.

Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m), iodeto de potássio (KI).

Solução spray: Mistura da solução A, solução B e H₂O (1:9:10).

3.3.3 *Dragendorff* (TOUCHSTONE; DOBBINS, 1978):

Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) em solução de 10,0 mL de ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) e 40,0 mL de água, sob aquecimento.

Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio (KI) em 30,0 mL de água de destilada.

Solução estoque: Mistura da solução A e solução B (1:1).

Reagente: Solução estoque, ácido acético e água (1:2:10).

3.4 Técnicas cromatográficas

3.4.1 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

Foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 (Macherey-Nagel), com 0,20 mm de espessura e indicador de fluorescência (UV 254 nm). As revelações foram feitas por irradiação ultravioleta (254 ou 365 nm) ou por nebulização de revelador específico.

3.4.2 *Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)*

As placas preparativas foram preparadas utilizando uma suspensão de sílica gel 60 (Vetec) e sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV 254 nm) (Macherey-Nagel), além de água, na proporção 1:1:4 (m/m/m) (adaptado de SANTOS et al., 2007). Em cada placa foram aplicadas aproximadamente 15 mg de amostra. As revelações foram feitas por irradiação ultravioleta (254 nm) ou por nebulização de revelador específico, utilizando uma pequena faixa na lateral da placa.

3.4.3 *Cromatografia em coluna (CC)*

Foram utilizadas como fases estacionárias:

- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia (63–200 μm , diâmetro de poro 60 \AA), Merck.
- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia *flash* (40–63 μm , diâmetro de poro 60 \AA) Merck.

3.4.4 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia a líquido de alta eficiência, foram realizadas utilizando um cromatógrafo do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), campus de Santa Mônica:

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu®, modelo LC-6AD, composto pelos seguintes módulos: bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5R, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, autoinjetor SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD, do inglês *evaporative light scattering detector*) LT II, controlados pelo software LC Solutions.

Para o desenvolvimento dos métodos de separação foram utilizadas as colunas:

- Coluna analítica Phenomenex® Luna C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna. As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 µm.
- Coluna semipreparativa Phenomenex® Luna C18 (250,0 × 10,0 mm, 10 µm). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 µm.
- Coluna semipreparativa Phenomenex® Synergi Hydro-RP C18 (100,0 × 21,2 mm, 4 µm). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 µm

As análises por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EM), foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), campus Umuarama:

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent®, modelo Infinity 1260, acoplado a espectrômetro de massa de alta resolução do tipo QTOF, marca Agilent®, modelo 6520 B, com fonte de ionização por eletronspray. Para as análises cromatográficas foi utilizada uma coluna Agilent® C18 modelo Poroshell (10,0 cm × 3,0 mm, 2,7 µm). A ionização foi realizada com gás nebulizante (N₂) a 20 psi; foi utilizado gás secante (N₂) aquecido a 220 °C com fluxo de 8,0 L/min e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

As massas acuradas obtidas dos EMs em alta resolução foram comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), e calculados os erros em ppm. Para isso foi utilizada a equação a seguir:

$$\text{Erro}_{(\text{ppm})} = \left[\frac{\text{massa acurada} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] \times 10^6$$

3.4.5 *Cromatografia a gás*

As análises de cromatografia a gás foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC) do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), campus de Santa Mônica e um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) do Laboratório de Pesquisa em Energias Renováveis (coordenado pelo prof. Ricardo Reis Soares):

- Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) Schimadzu, modelo 2010. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo OV-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A análise foi realizada utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 3 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 280 e 300 °C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL de solução em MeOH. Foi utilizado o modo de injeção splitless (1:10). A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 100 °C e depois aumentada a uma velocidade de 8 °C/min até 280 °C, mantida durante 6,5 min; tempo total de análise 30,0 min.
- Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP2010, com potencial ionizante de 70 eV, com as seguintes condições: gás transportador hélio a um fluxo constante de 1,2 mL/min; coluna SPB-5 (30,0 m × 0,25 mm d.i.) capilar de sílica fundida com 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano como a fase estacionária; temperatura do injetor ajustada a 280 °C, com uma proporção de divisão de 1:20. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 100 °C e depois aumentada a uma velocidade linear de 8 °C/min até 280 °C, mantida durante 6,5 min; tempo total de análise 30,0 min.

3.5 Técnicas espetroscópicas

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no equipamento da marca Bruker AscendTM 400 Avance III HD (9,2 Tesla) do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, operando em frequências de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ($\delta_{TMS} = 0,00$).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer modelo FT-IR Frontier Single Range – MIR, na região de 4000 a 220 cm^{-1} . As medidas foram realizadas no estado sólido, com o auxílio do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante.

3.6 Equipamentos utilizados

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.

Equipamento	Marca	Modelo
Balança analítica	Shimadzu	AUW220D
Rotaevaporador	Ika	RV 10
Liofilizador	Terroni	LS3000
Linha de secagem de amostras a pressão reduzida	Bomba Edwards	RV5

Fonte: autora.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Coleta do material vegetal e preparo do extrato etanólico.

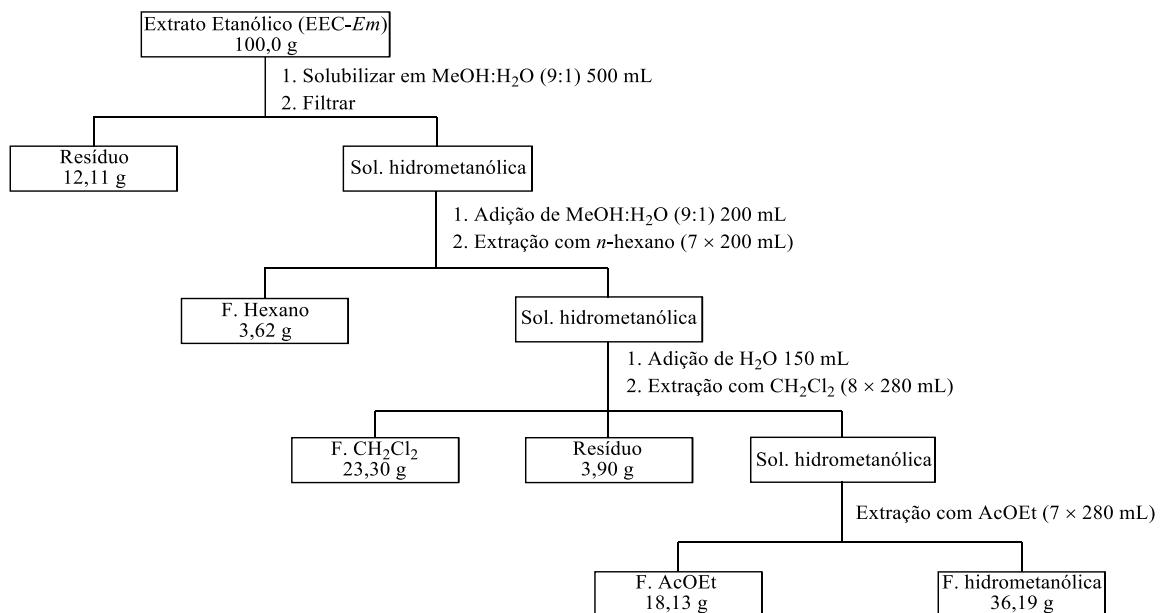
O extrato etanólico (1,14 Kg) das cascas do caule de *Erythrina mulungu* Mart. (EEC-*Em*) foi preparado previamente pelo Professor Dr. Marcos Pivatto a partir do material vegetal, que após seco e triturado (11,5 Kg) foi submetido à extração com etanol 70% (57 L × 3), sendo o solvente removido por destilação em evaporador rotativo a pressão

reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. As cascas foram coletadas (dezembro de 2009) nas proximidades da cidade de Rifaina – SP, sendo a exsicata (HPM0032) depositada no Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto.

4.2 Extração líquido-líquido

O EEC-*Em* (100,0 g) foi solubilizado em 500 mL de MeOH/H₂O (9:1, v/v), filtrado e submetido à extração líquido-líquido com hexano (7 × 200 mL), CH₂Cl₂ (8 × 280 mL) e AcOEt (7 × 280 mL) (Figura 36). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida utilizando banho de aquecimento a 40 °C.

Figura 36 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das cascas de *E. mulungu*.

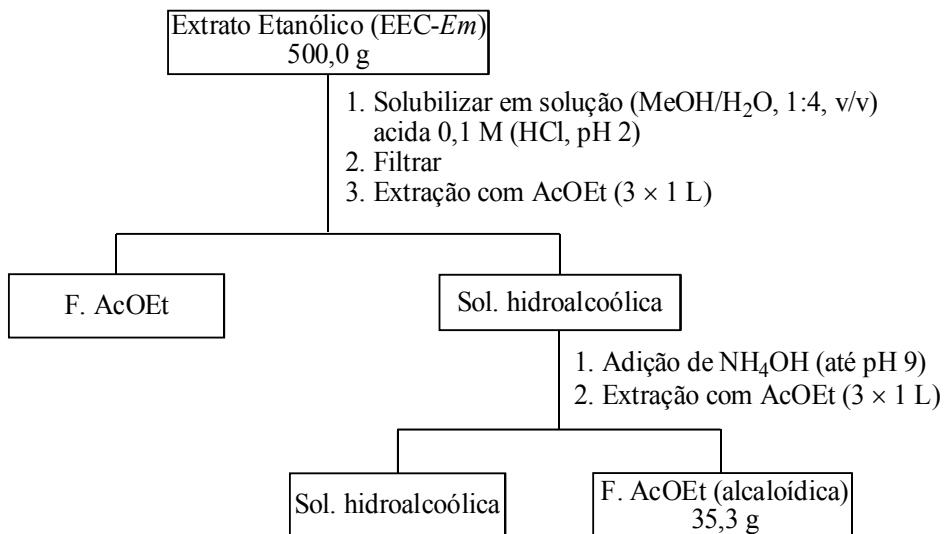


Fonte: a autora.

4.3 Extração ácido-base

O EEC-*Em* (500,0 g) foi solubilizado em 5 L de solução aquosa (MeOH/H₂O, 1:4, v/v) ácida 0,1 M (HCl, pH 2), filtrado e submetido à extração com AcOEt (3 × 1 L). Em seguida, foi adicionado NH₄OH (28% em H₂O) à fase hidroalcoólica até pH 9, e realizada extração com AcOEt (3 × 1 L), para obtenção da fração AcOEt alcaloídica (35,3 g) (Figura 37). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo a pressão reduzida utilizando banho de aquecimento a 40 °C.

Figura 37 – Extração ácido-base do extrato etanólico das cascas de *E. mulungu*.



Fonte: a autora.

4.4 Atividade biológica

Os ensaios para determinar a atividade anticolinesterásica foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola. A metodologia utilizada foi adaptada a partir dos ensaios realizados por Marston et al. (2002), Ellman et al. (1961) e Rhee et al. (2001).

4.4.1 Atividade anticolinesterásica

As atividades inibitórias de AChE e BChE do extrato etanólico, da fração CH₂Cl₂, da fração AcOEt alcaloídica e dos alcaloides **II** e **IV** foram avaliadas usando o método de microplaca de 96 poços (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001). Neste método, as enzimas hidrolisam os substratos acetiltiocolina ou butiriltiocolina, para produzir tiocolina que reage com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocinoína e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 405 nm.

Para os experimentos, 25 µL de solução aquosa de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina (3 mM), 125 µL de DTNB (3 mM) em tampão C, 50 µL de tampão B e 25 µL da amostra diluída em tampão A foram adicionados a microplaca de 96 poços, para dar concentrações de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butirritoínila variando de 3,0 a

300 µg/mL para os compostos isolados e 30 a 2000 µg/mL para o extrato etanólico, fração CH₂Cl₂ e fração AcOEt alcaloídica. A seguir, foram adicionados 25 µL de solução de enzima (AChE ou BChE) de 0,2 U/mL e a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm a cada 30 s, por 20 min (a temperatura foi mantida a 30 °C). Qualquer aumento na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato (ou aos cromóforos presentes nas amostras) que pode ter ocorrido antes da leitura das absorbâncias, foi corrigido subtraindo-se a taxa de reação medida antes do início do experimento (isto é, antes da leitura a cada 30 s por 20 min) a partir dos valores obtidos após o início do experimento. A percentagem de inibição foi calculada em comparação com um branco (MeOH a 10% em tampão A) e o controle positivo utilizado foi a galantamina, no mesmo intervalo de concentração para compostos puros.

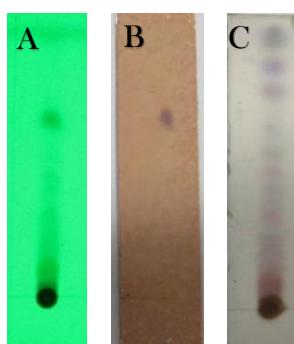
Foram utilizados os seguintes tampões: tampão A: Tris-HCl 50 mM (pH 8); tampão B: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo fração de albumina de soro bovino a 0,1%; tampão C: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo NaCl 0,10 M e MgCl₂.6H₂O 20 mM. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Fracionamento do EEC-*Em*

O EEC-*Em* e as frações obtidas da extração líquido-líquido foram analisadas por CCD utilizando como FM uma mistura de CHCl₃/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25) (Figuras 38 e 39). As cromatoplacas foram analisadas em câmara de UV (254 e 365 nm) e reveladas com IClPt e vanilina sulfúrica. A partir da avaliação das placas, foi possível constatar que a maior concentração de alcaloides estava na fração CH₂Cl₂.

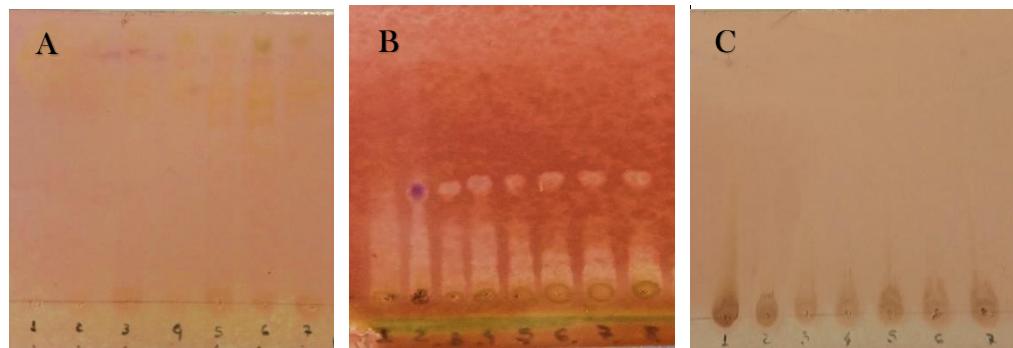
Figura 38 – Cromatoplacas do EEC-*Em*.



Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25). Inspeção em câmara de UV (254 nm) (A); revelador IClPt (B); revelador vanilina sulfúrica (C).

Fonte: a autora.

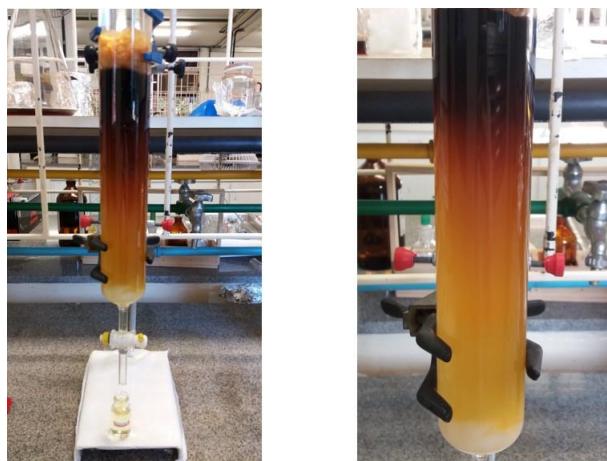
Figura 39 – Cromatoplacas das frações obtidas na extração líquido-líquido: hexano (A); CH_2Cl_2 (B); AcOEt (C).



Nota: FE sílica, FM $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador IClPt .
Fonte: a autora.

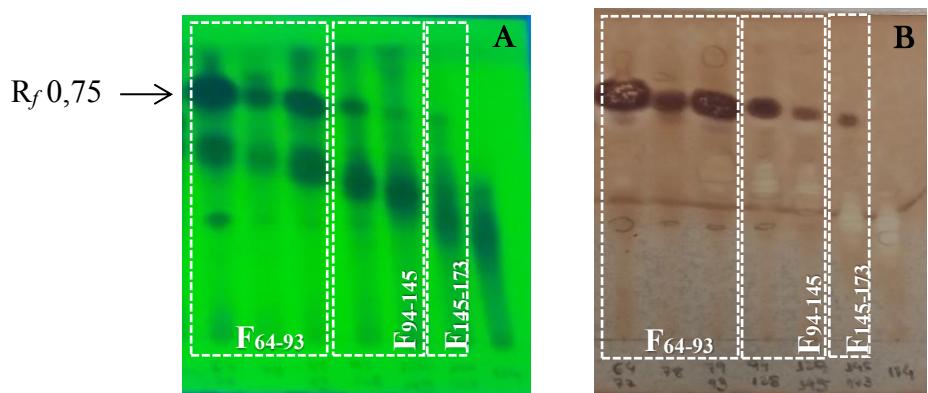
A fração CH_2Cl_2 (7,0 g), foi submetida a CC (KMC01) (364,0 g, $20,0 \times 5,5$ cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (63–200 μm) e FM um gradiente de solventes que iniciou com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (10:0:0,25) até $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (7:3:0,25), e na sequência 100% de MeOH (Figura 40). As frações coletadas (182) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f . O procedimento de CC da fração CH_2Cl_2 foi realizado três vezes para obtenção de maior quantidade de massa, resultando nas frações alcaloídicas KMC01-F_{64–93} (646,4 mg), KMC01-F_{94–145} (644,0 mg) e KMC01-F_{146–173} (464, mg) (Figura 41), submetidas a diferentes procedimentos cromatográficos para isolamento dos alcaloides. O fluxograma da Figura 42 apresenta um panorama dos procedimentos realizados para o isolamento dos alcaloides.

Figura 40 – Coluna cromatográfica (KMC01) da fração CH_2Cl_2 .



Fonte: a autora.

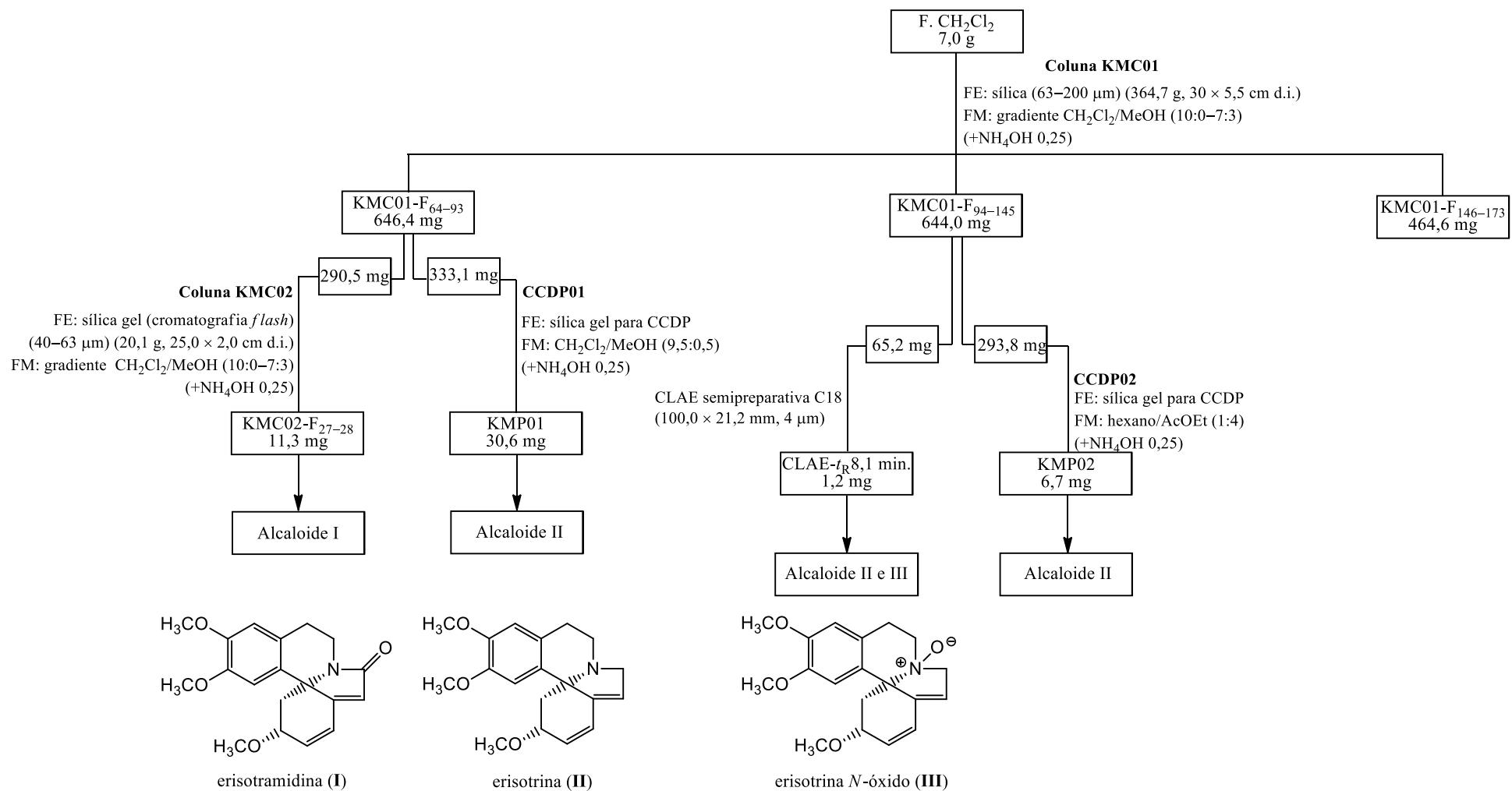
Figura 41 – Cromatoplaca das frações obtidas de KMC01.



Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9,5:0,5:0,25). Inspeção em câmara de UV (254 nm) (**A**); revelador IClPt (**B**).

Fonte: a autora.

Figura 42 – Procedimentos chromatográficos realizados com a fração CH_2Cl_2 .

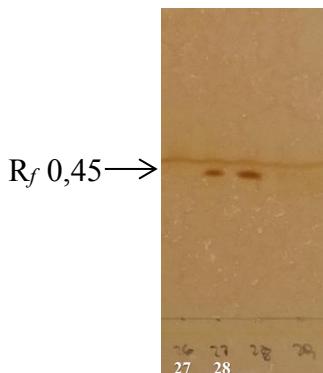


Fonte: a autora.

5.1.1 – Estudo químico da fração KMC01-F₆₄₋₉₃.

A fração KMC01-F₆₄₋₉₃ (646,4 g) foi submetida a dois procedimentos cromatográficos: CC (KMC02) e CCDP (CCDP01). Para a análise da KMC02 (145 mg) por CC (20,1 g, 25,0 × 2,0 cm d.i.) foi utilizado como FE sílica gel para cromatografia *flash* (40–63 µm) e eluição em modo gradiente utilizando como FM um sistema de solventes iniciando com CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (10:0:0,25) até CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (7:3:0,25), e na sequência 100% de MeOH. As frações (40) coletadas foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f , de onde foi obtida uma mistura de dois alcaloides (KMC02-F₂₇₋₂₈, 11,3 mg) (Figura 43).

Figura 43 – Cromatoplaca das frações obtidas de KMC02.

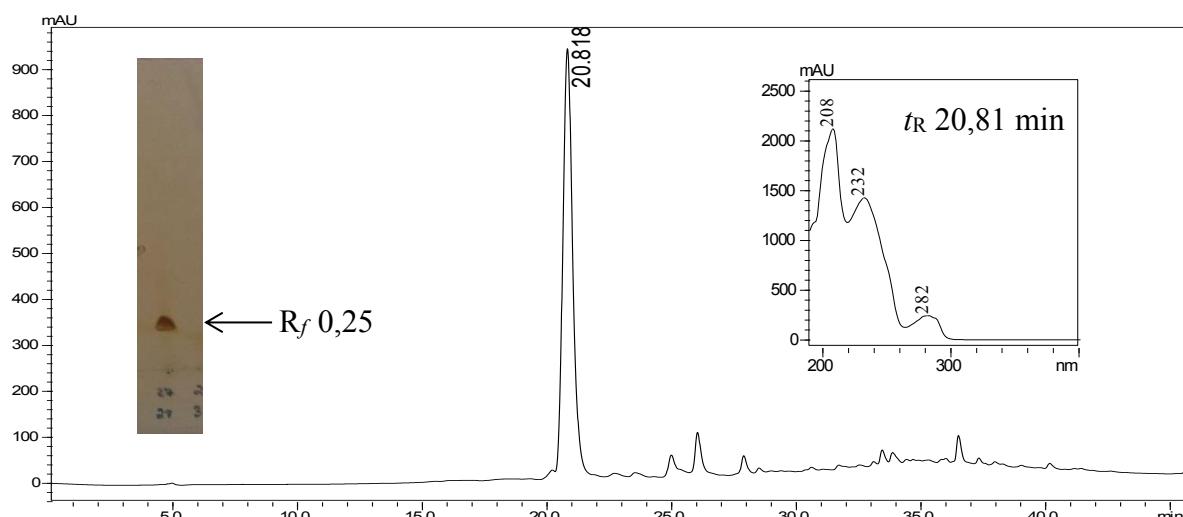


Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (4:1:0,25) e revelador IClPt.
Fonte: a autora.

A fração KMC02-F₂₇₋₂₈ foi analisada por CLAE-DAD-ELSD (Figuras 44 e 45), sendo possível observar um pico principal com t_R 20,8 min., cujo espectro de UV apresentou máximos de absorção em 208, 232 e 282 nm (Figura 44). Estes dados quando comparados com aqueles da literatura, foram similares aos dos alcaloides eritrínicos (204, 234 e 283 nm), relatados por Flausino Junior et al. (2007a). Nos alcaloides eritrínicos, é frequente a presença de um anel aromático (anel D), que apresenta banda de absorção característica no UV em 202 nm. Além disso, podem apresentar também duas ligações duplas em anéis diferentes (anéis A e B) formando um sistema conjugado, cujo valor teórico do comprimento de onda de absorção, considerando as regras empíricas de Woodward-Fieser, é 234 nm. Dessa forma, as absorções observadas em 208 e 232 nm foram atribuídas a transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ características de compostos aromáticos e dienos conjugados, respectivamente (PAVIA et al., 2010). No entanto, o detector por arranjo de diodos (DAD-UV) está limitado à

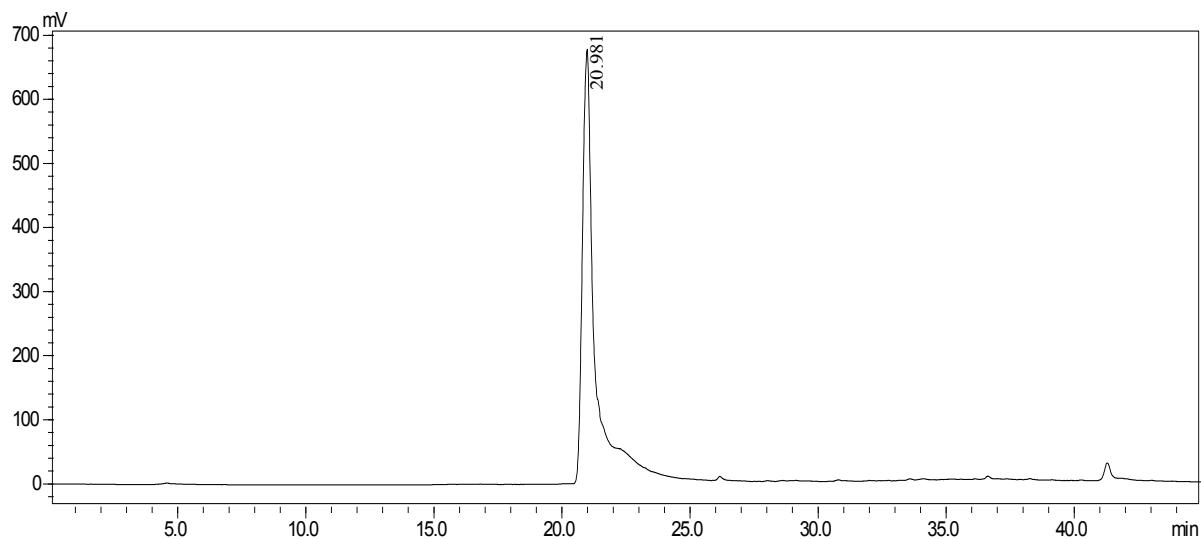
detecção de compostos que absorvam na região do UV-vis pela presença de grupos cromóforos. Já o detector evaporativo por espalhamento de luz (ELSD) é mais abrangente e pode ser empregado para análise de diferentes classes de produtos naturais. Além disso, o sinal gerado está relacionado principalmente com a concentração dos analitos. Portanto, para melhor clareza dos resultados foi utilizado também o ELSD, que garante a detecção daqueles compostos que não apresentam cromóforo (GONZALEZ et al., 2011; URANO; RODRIGUES; BERLINCK, 2012).

Figura 44 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna analítica e CCD da fração KMC02-F₂₇₋₂₈.



Condições CLAE: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (40 min.), 40–100% de MeOH–H₂O e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min.); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector DAD. CCD: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25) e revelador IClPt. Fonte: a autora.

Figura 45 – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração KMC2-F₂₇₋₂₈.



Condições: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (40 min.), 40–100% de MeOH–H₂O, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min.); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector ELSD.

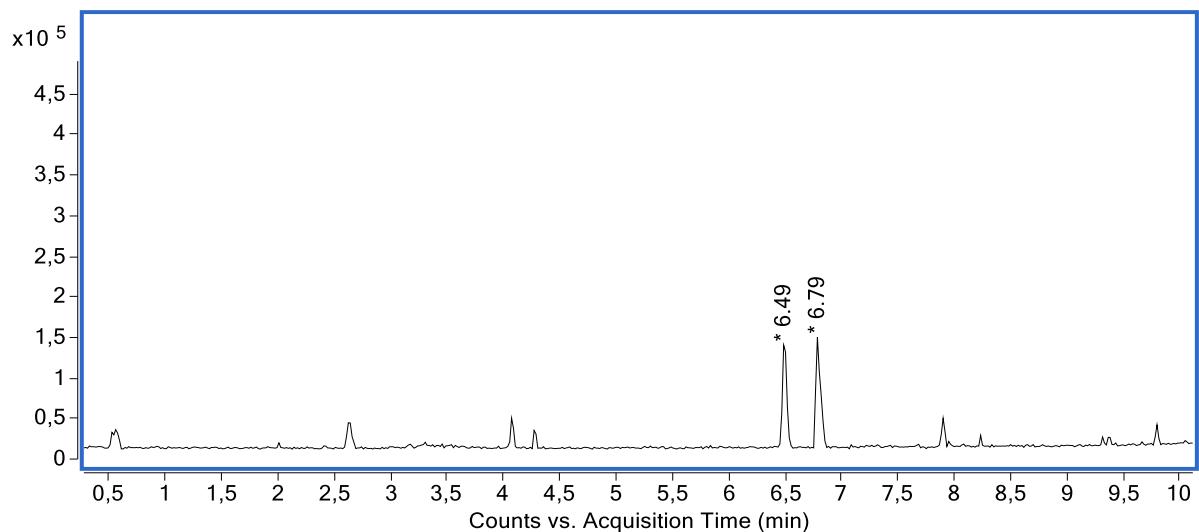
Fonte: a autora.

A análise dos cromatogramas (Figuras 44 e 45), indicaram o isolamento de um alcaloide majoritário, assim como mostra a análise da CCD revelada com IClPt (Figura 43). A análise da fração KMC2-F₂₇₋₂₈ por CLAE-EM-IES em alta resolução permitiu observar no cromatograma dois picos com *t*_R de 6,5 e 6,8 min, referentes aos sinais *m/z* 328,1547 e 298,2743 [M + H]⁺, respectivamente (Figuras 46 e 47). Os sinais de massa par [M + H]⁺ caracterizam a presença de compostos com número ímpar de nitrogênio e foram correlacionados à alcaloides eritrínicos, já relatados na espécie. Assim, foi possível observar que a maior eficiência da CLAE permitiu a separação dos compostos que coeluíram na análise realizada por CLAE.

O sinal de *m/z* 328,1547 [M + H]⁺ foi calculado para C₁₉H₂₁NO₄⁺, 328,1543 (Δ 1,21) e sua fórmula molecular estabelecida como C₁₉H₂₀NO₄, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 10. No entanto, dois alcaloides eritrínicos já foram relatados para mesma fórmula molecular: a 11-metoxieritralina e a erisotramidina. O sinal de *m/z* 328 ao ser submetido à análise por EM sequencial (EM/EM) (Figura 48), apresentou como pico base o sinal de *m/z* 296, que foi correlacionado à eliminação neutra de metanol [M + H – CH₃OH]⁺ (Figura 49). Essa proposta é condizente com a estrutura da erisotramidina (**I**), uma vez que para a 11-metoxieritralina seria esperada uma segunda eliminação de metanol, cujo sinal (*m/z* 264) não foi observado no EM, mesmo utilizando maiores energias de colisão

(Figura 49). Vale destacar que **I** já foi relatada em *E. arborescens* e *E. lysistemon* (AMER, 1991; JUMA; MAJINDA, 2004).

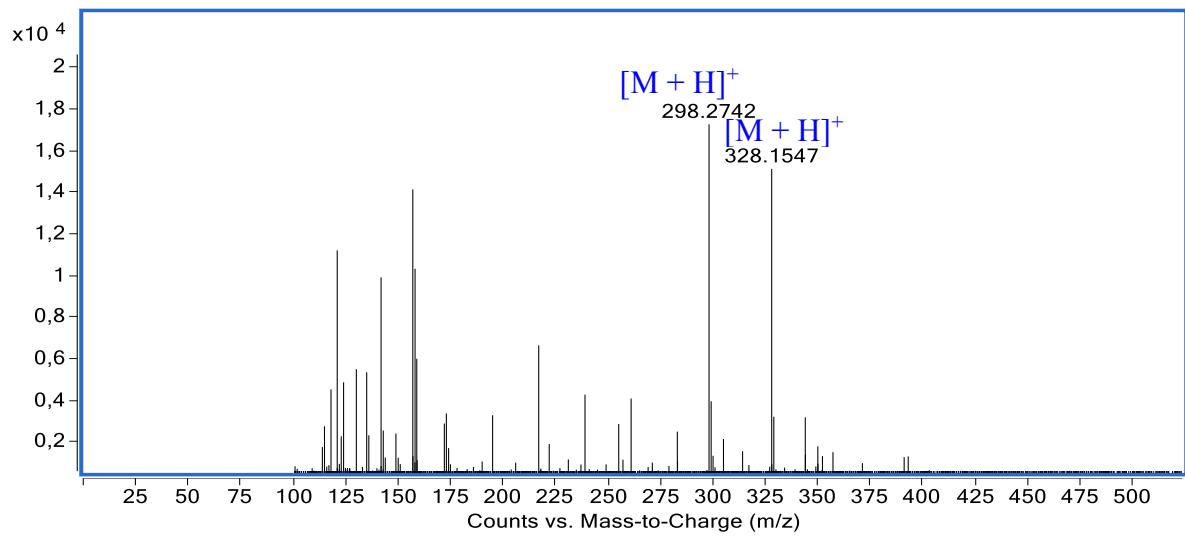
Figura 46 – Cromatograma (CLAE-EM) da fração KMC02-F₂₇₋₂₈.



Condições: Coluna Agilent® C18 Poroshell (10,0 × 3,0 mm, 2,7 µm), gradiente (10 min.), 10–98% de MeOH–H₂O acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) e em seguida foi mantido 98% de MeOH (7 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 2,0 µL, fluxo: 0,7 mL/min. e detector EM.

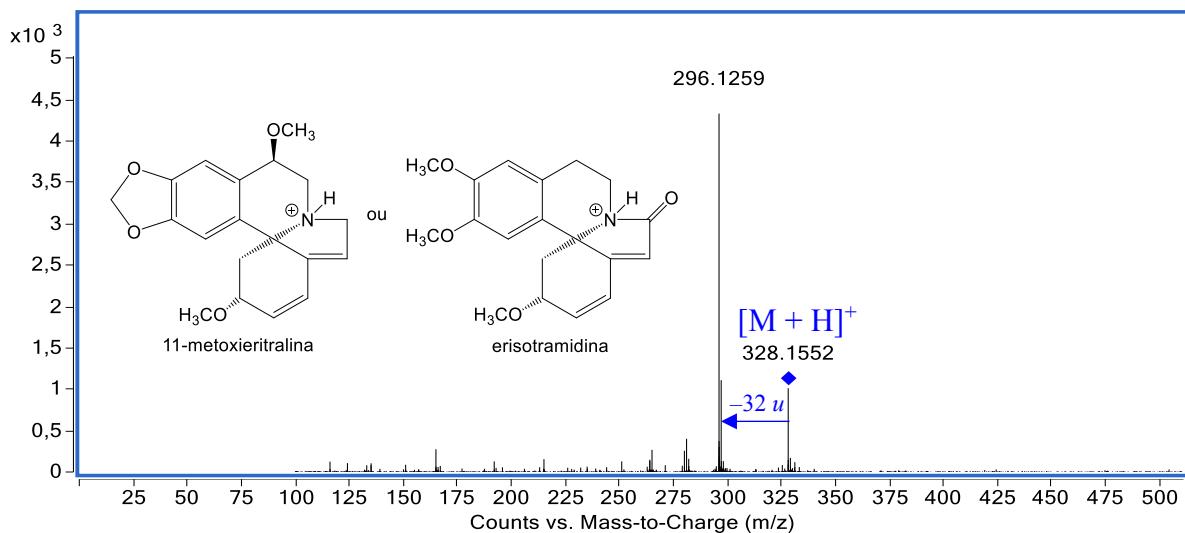
Fonte: a autora.

Figura 47 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração KMC02-F₂₇₋₂₈.



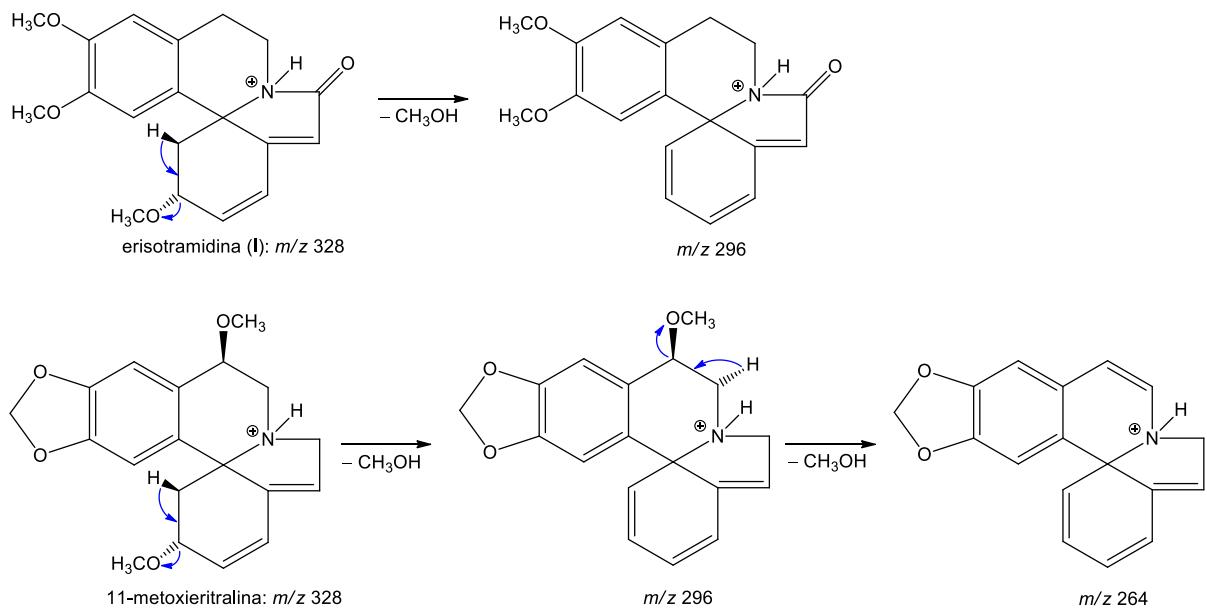
Fonte: a autora.

Figura 48 – EM/EM-IES-(+) do sinal de m/z 328 $[M + H]^+$ (20 eV) observado na fração KMC02-F₂₇₋₂₈.



Fonte: a autora.

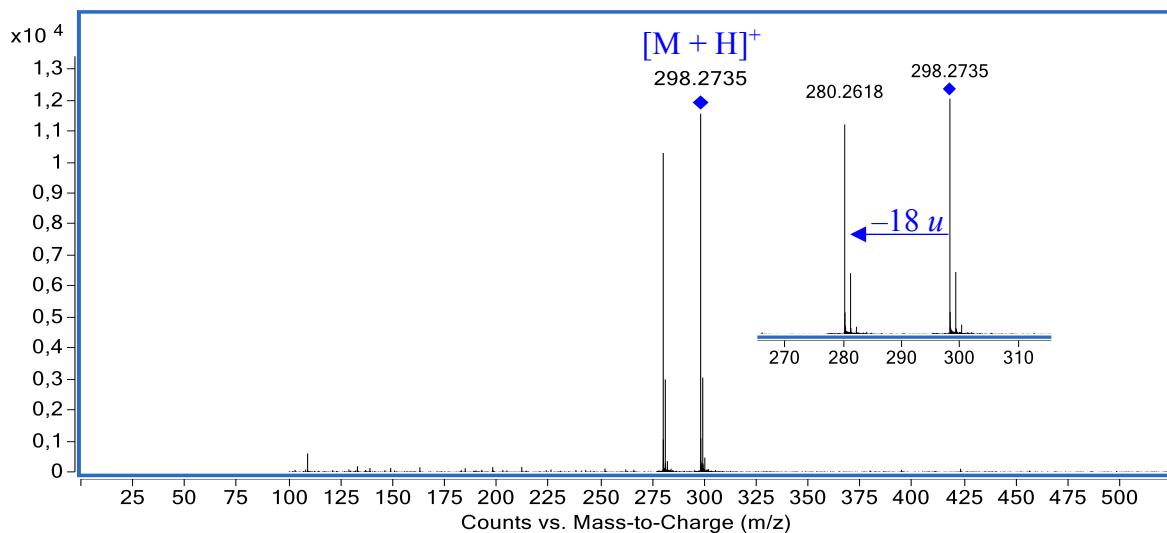
Figura 49 – Propostas de fragmentação para erisotramidina e 11-metoxeritralina.



Fonte: a autora.

O íon de m/z 298,2742 $[M + H]^+$ (Figura 47) não foi identificado, visto que as massas exatas, referentes as possíveis fórmula moleculares dos alcaloides eritrínicos já relatados, apresentavam erros (ppm) muito altos. Além disso, as estruturas propostas não foram condizentes com o observado no espectro de EM/EM, que apresenta um sinal de m/z 280 $[M + H - H_2O]^+$, referente à eliminação de 18 u (Figura 50).

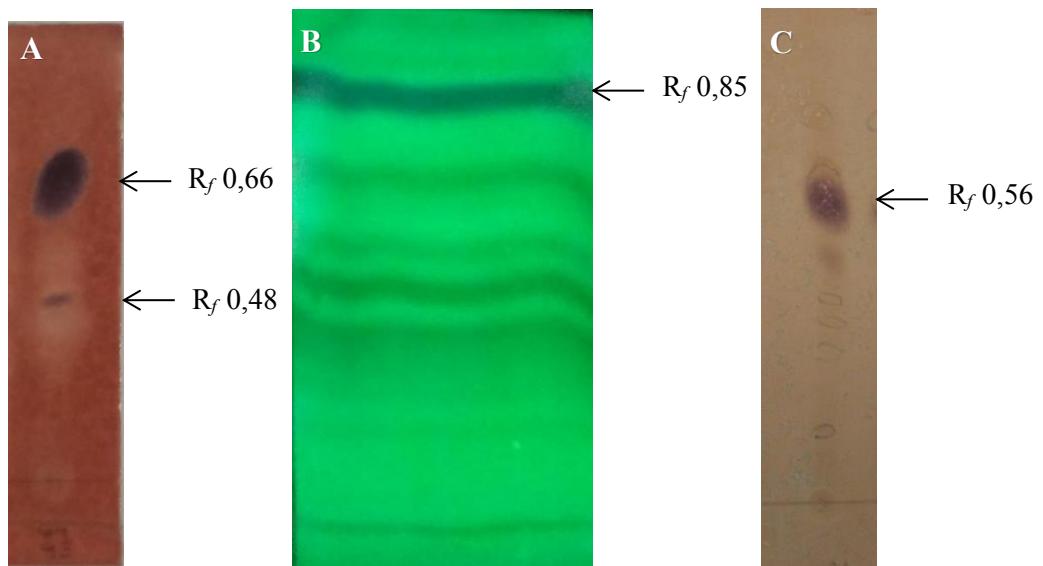
Figura 50 – EM/EM-IES-(+) do sinal de m/z 298 $[M + H]^+$ (20 eV), observado na fração KMC02-F₂₇₋₂₈.



Fonte: a autora.

A análise da CCD da fração KMC01-F₆₄₋₉₃ (333,1 mg) apresentou duas manchas após revelação com IClPt (R_f 0,56 e 0,66) (Figura 51A), assim foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP01) (Figura 51B). No entanto, após o procedimento foi possível recuperar apenas o composto **II** (KMP01, 30,6 mg, R_f 0,56), como mostra a CCD realizada após a separação (Figura 51C).

Figura 51 – Cromatoplaca da fração KMC01-F₆₄₋₉₃ (A); CCDP (B) e CCD da fração KMP01 (C).

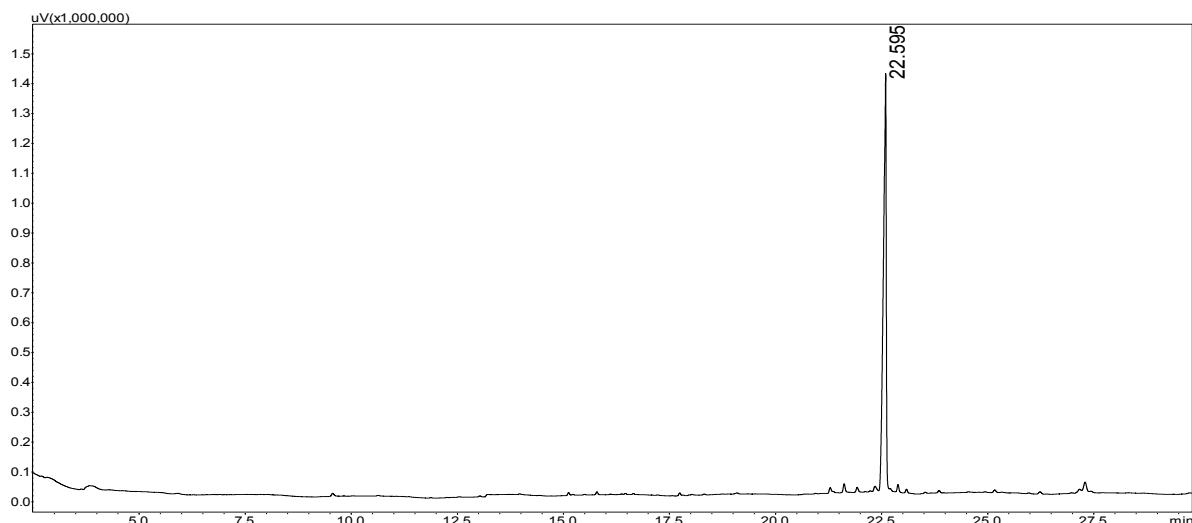


Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9,5:0,5:0,25) e revelador IClPt (A). FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9,5:0,5:0,25), inspeção em câmara de UV (254 nm) (B). FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25) e revelador IClPt (C).

Fonte: a autora.

A fração KMP01 foi submetida à análise por CG-EM, onde foi possível observar a presença de apenas um pico majoritário com t_R 22,6 min. (Figura 52). O EM-IE apresentou um sinal de m/z 313 (30%) que foi atribuído ao íon molecular da erisotrina (II), além de dois íons fragmentos intensos de m/z 282 (100%) e 298 (32%) (Figura 53). Estes sinais podem ser explicados a partir da formação do íon molecular que apresenta carbocáton e radical nos C-1 e C-2, respetivamente (anel A) (Figura 53). O íon fragmento de m/z 282 ($M^{++} - 31$) pode ser explicado pela clivagem homolítica da ligação C–OCH₃, onde a metoxila é eliminada como radical e o elétron desemparelhado do C-2 forma uma nova ligação dupla entre C-2–C-3, que deixa o carbocáton (C-1) em posição alílica em relação as duplas dos anéis A e B, que podem contribuir estabilizando a espécie (Figura 53). Já o íon fragmento de m/z 298 ($M^{+} - 15$) pode ser justificado pela cisão homolítica da ligação O–CH₃ e consequente formação de um anel oxirano e eliminação do radical metila. Estes dados quando comparados com aqueles da literatura são condizentes com o do alcaloide erisotrina (II) (AMER, 1991; FEITOSA, 2012).

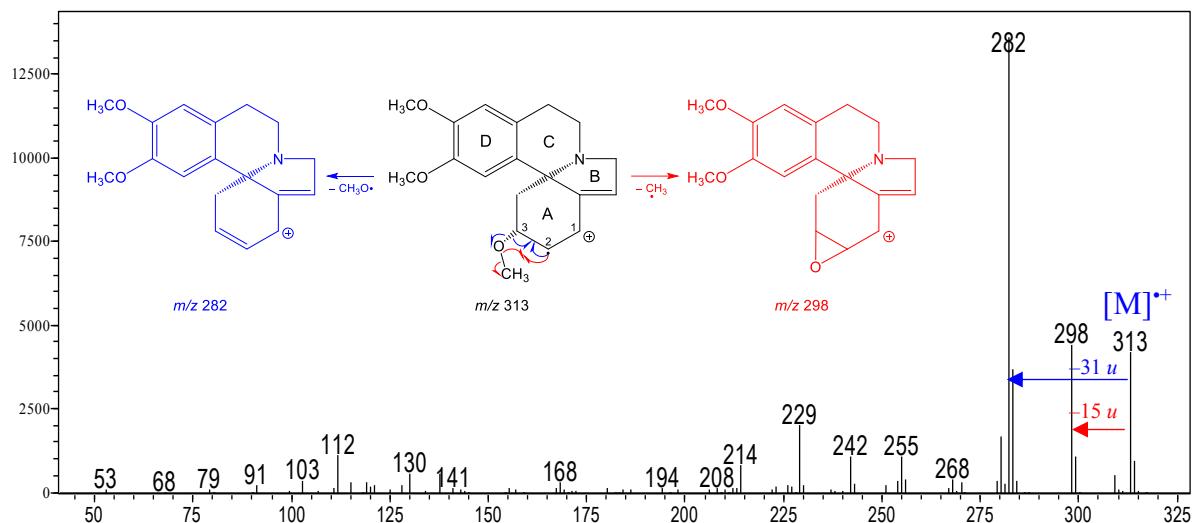
Figura 52 – Cromatograma (CG-EM) de KMP01.



Condições: Coluna SBP-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m), gradiente 100–280 °C (8 °C/min., 22,5 min.), e em seguida foi mantido a 280 °C (6,5 min.); C = 1,0 mg/mL, $V_{inj.}$ = 1,0 μ L, fluxo: 3,0 mL/min., gás de arraste: N₂, e detector EM-IES.

Fonte: a autora.

Figura 53 – EM-IE (CG-EM) de KMP01.

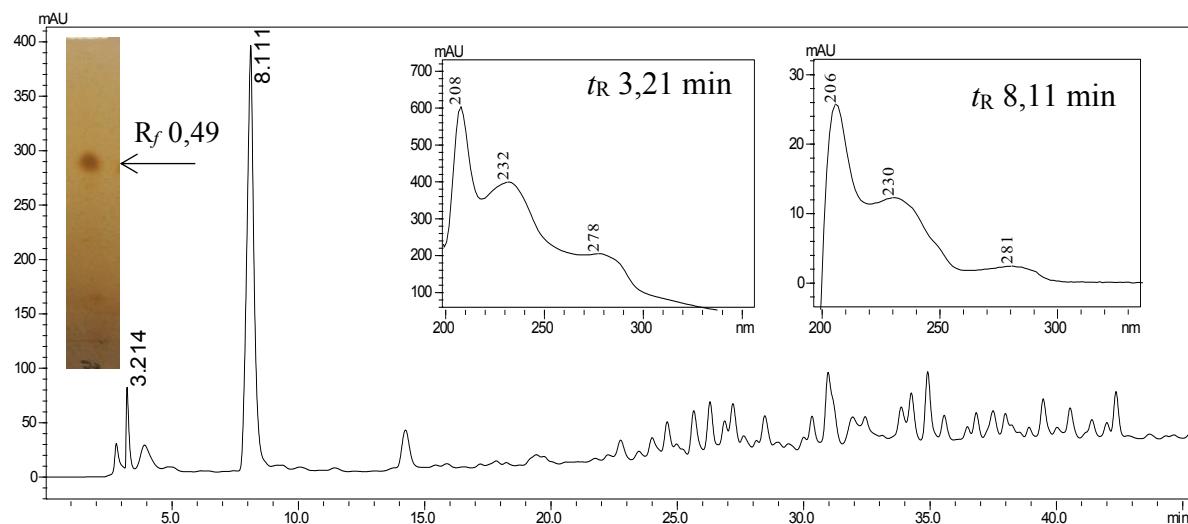


Fonte: a autora.

5.1.2 – Estudo químico da fração KMC01-F94-145

A fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅ (65,2 mg) foi analisada por CLAE-DAD-ELSD (Figuras 54 e 55), onde foi possível observar uma banda majoritária com t_R 8,1 min. e outra de menor intensidade com t_R 3,2 min., ambas com perfil espectral (UV) similares aos dos alcaloides eritrínicos discutidos anteriormente (Figura 44). Essa fração foi submetida à CLAE no modo semipreparativo (Figura 56) de onde foi coletado o composto referente ao t_R 8,1 min. (CLAE- t_R 8,1 min). A análise por CCD mostra a presença de um alcaloide (Figura 56).

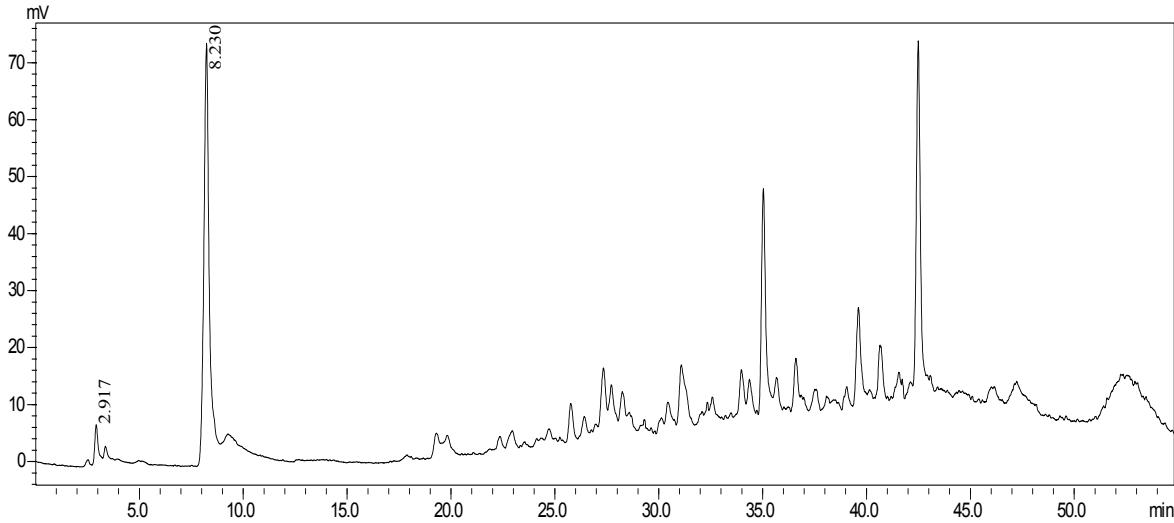
Figura 54 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna analítica e CCD da fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅.



Condições CLAE: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (40 min), 40–100% de MeOH–H₂O e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector DAD. CCD: FE: sílica, FM: AcOEt/hexano/NH₄OH (4:1:0,25) e revelador IClPt.

Fonte: a autora.

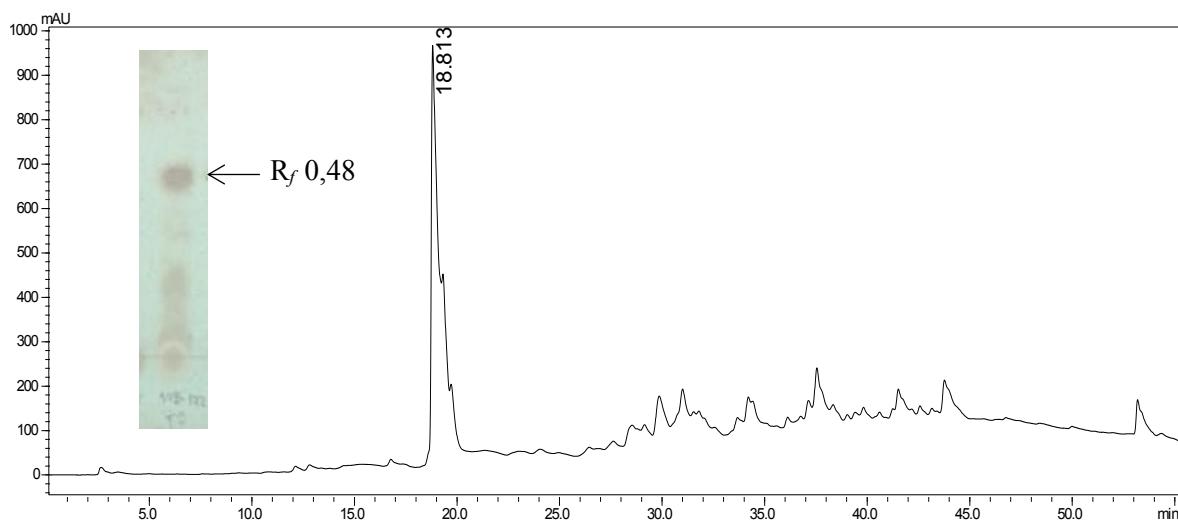
Figura 55 – Cromatograma (CLAE-ELSD) em coluna analítica da fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅.



Condições: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente (40 min), 40–100% de MeOH–H₂O, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (5 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 µL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector ELSD.

Fonte: a autora.

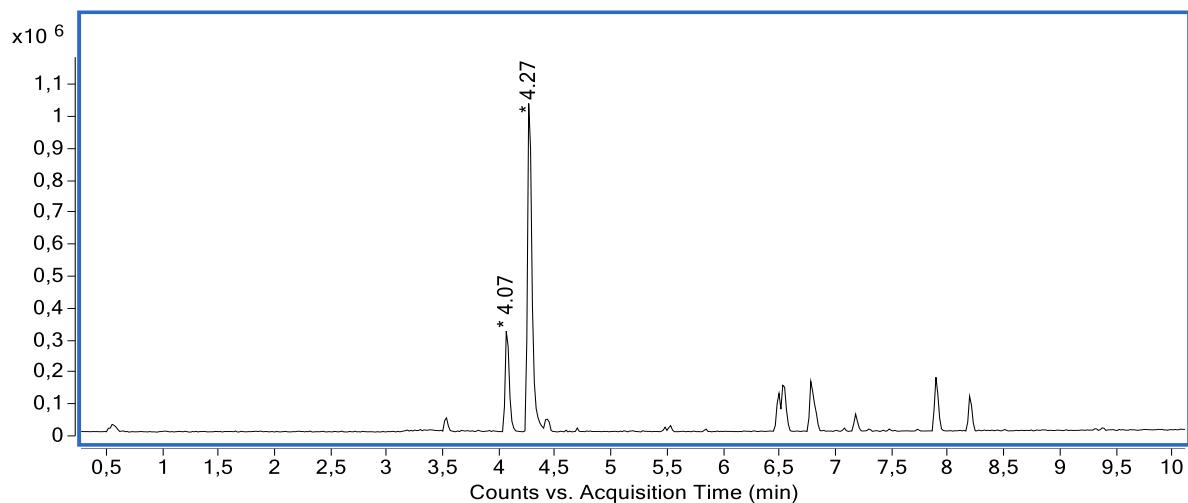
Figura 56 – Cromatograma (CLAE-DAD, UV 254 nm) em coluna semipreparativa e CCD da fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅.



Condições CLAE: Coluna Phenomenex® Synergi Hydro-RP (100,0 × 21,2 mm, 4 μ m), gradiente (50 min), 20–100% de MeOH–H₂O, e em seguida mantido 100% de MeOH (5 min); C = 120,0 mg/mL, V_{inj.} = 150,0 μ L, fluxo: 8,0 mL/min. e detector DAD. CCD: FE sílica, FM AcOEt/hexano/NH₄OH (4:1:0,25) e revelador IClPt
Fonte: a autora.

A fração CLAE- t_R 8,1 também foi submetida a análise por CLAE-EM-IES em alta resolução (Figura 57) onde foi observado um pico majoritário com t_R 4,27 min., e outro de menor intensidade com t_R 4,07 min., cujos EMs (Figuras 58 e 59) apresentaram sinais de *m/z* 314,1752 e 330,1702, respectivamente, que foram correlacionados com as moléculas protonadas C₁₉H₂₄NO₃⁺ (calc. 314,1751, Δ 0,31 ppm) e C₁₉H₂₄NO₄⁺ (calc. 330,1700, Δ 0,60 ppm), o que permitiu estabelecer as fórmulas moleculares C₁₉H₂₃NO₃ e C₁₉H₂₃NO₄, ambas com índice de deficiência de hidrogênio igual a 9.

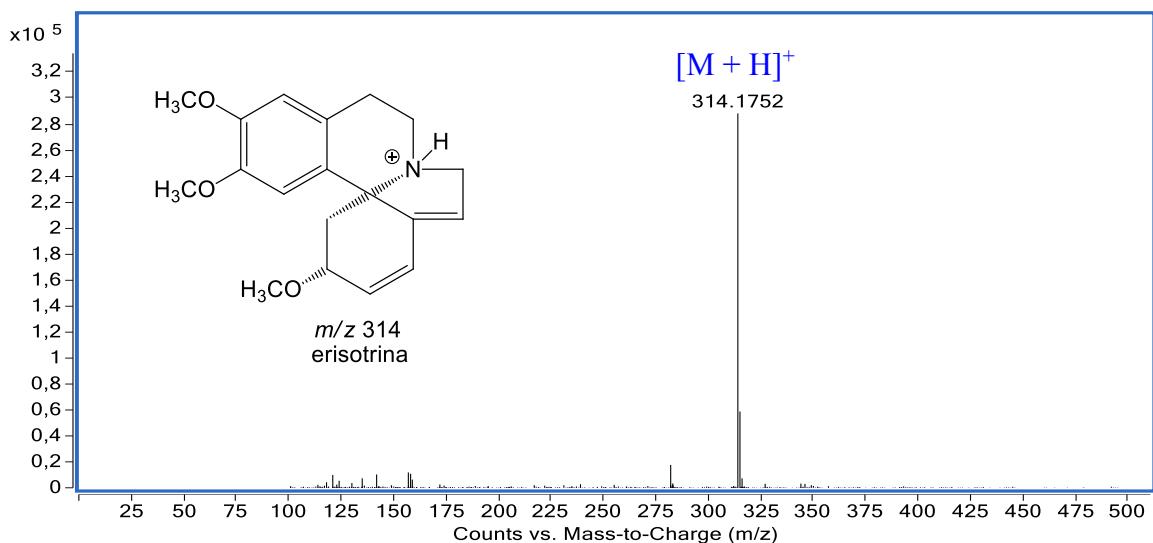
Figura 57 – Cromatograma (CLAE-EM-IES) da fração CLAE- t_R 8,1 min.



Condições: Coluna Agilent® C18 modelo poroshell (10,0 cm × 3,0 mm, 2,7 μ m), gradiente (10 min.), 10–98% de MeOH–H₂O acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) e em seguida foi mantido 98% de MeOH (7 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 2,0 μ L, fluxo: 0,7 mL/min. e detector EM.

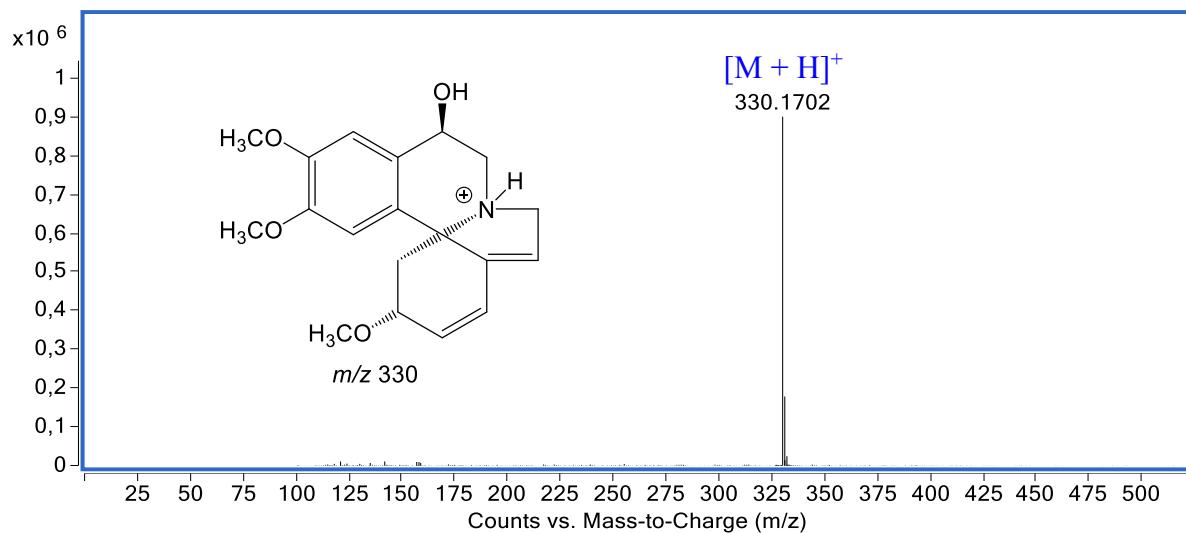
Fonte: a autora.

Figura 58 – EM-IES-(+) em alta resolução do pico de t_R 4,27 min. observado na fração CLAE- t_R 8,1 min.



Fonte: a autora.

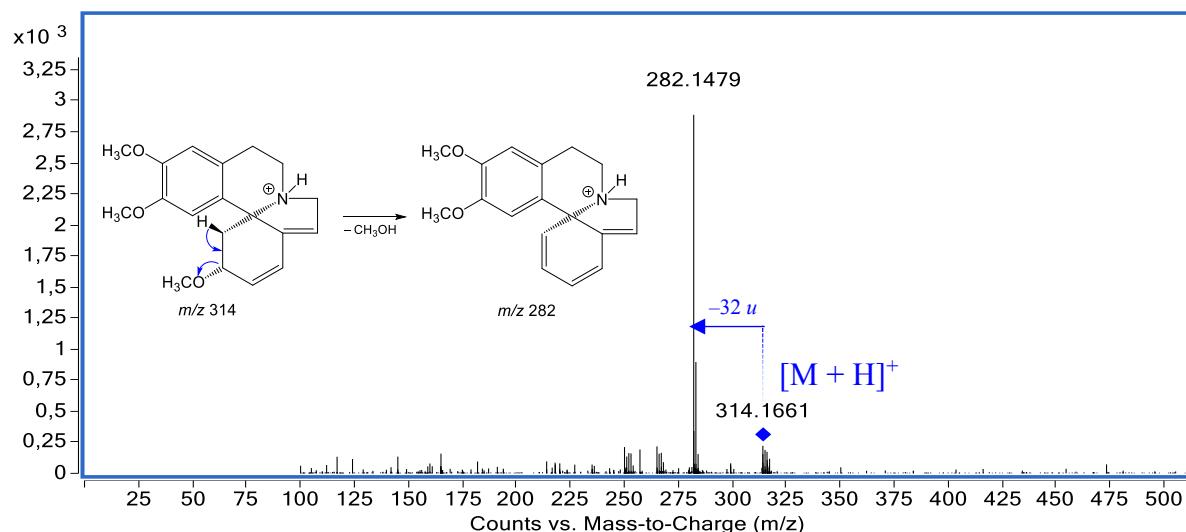
Figura 59 – EM-IES-(+) em alta resolução do pico de t_R 4,07 min. observado na fração CLAE- t_R 8,1 min.



Fonte: a autora.

O sinal de m/z 314,1752 $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi submetido à análise por espectrometria de massas sequencial (Figura 60), que permitiu observar um íon fragmento de m/z 282 que foi atribuído à eliminação neutra de metanol $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$. Estes dados estão condizentes com a estrutura do alcaloide erisotrina (II).

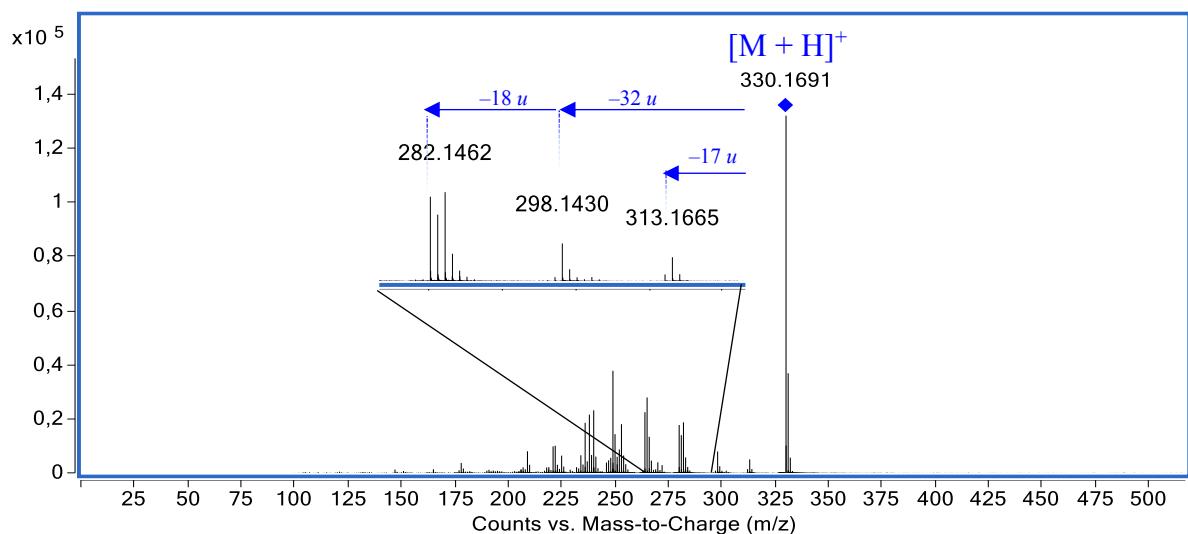
Figura 60 – EM/EM-IES-(+) do íon molecular m/z 314 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (15 eV), observado na fração CLAE- t_R 8,1 min.



Fonte: a autora.

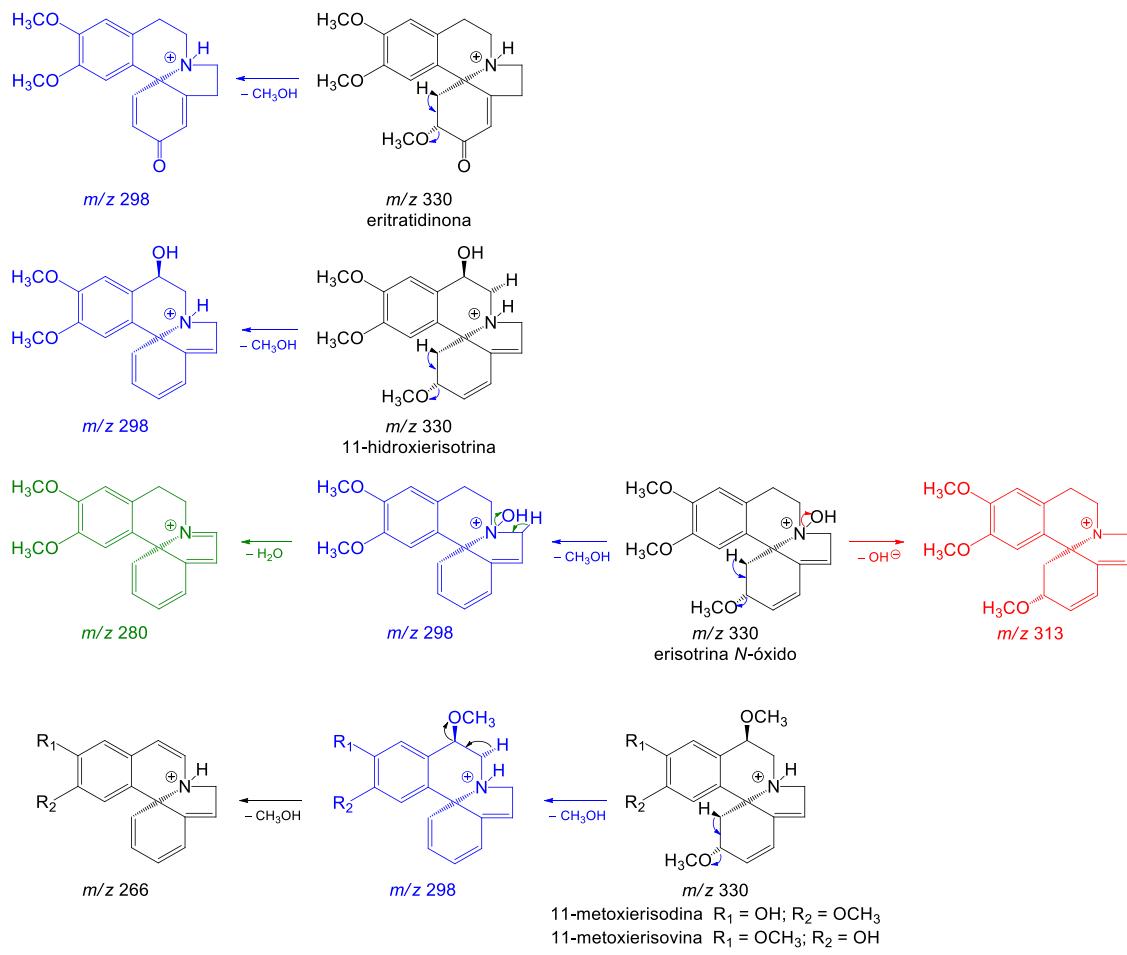
O sinal de m/z 330,1702 $[M + H]^+$, que foi correlacionado com a fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$ já foi relatado na literatura para cinco isômeros de alcaloides eritrínicos: eritratidinona, 11-hidroxierisotrina, erisotrina *N*-óxido e 11-metoxierisodina, 11-metoxierisovina (AMER, 1991; SARRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981; FLAUSINO et al., 2007a). Este sinal quando submetido à análise por EM/EM apresentou os íons fragmentos de m/z 313, 298 e 280 (Figura 61). Estes fragmentos foram condizentes com a eliminação de uma hidroxila (17 u) $[M + H - OH]^+$, e eliminações neutras de metanol (32 u) $[M + H - CH_3OH]^+$ e água e metanol (50 u) $[M + H - H_2O - CH_3OH]^+$, respectivamente. A partir de uma análise criteriosa dos mecanismos de fragmentação das estruturas dos isômeros (Figura 62), foi possível constatar que somente a 11-hidroerisotrina (**III**) é condizente com os sinais observados no espectro (Figura 61).

Figura 61 – EM/EM-IES-(+) do sinal de m/z 330 $[M + H]^+$ (20 eV), observado na fração CLAE- t_R 8,1 min.



Fonte: a autora.

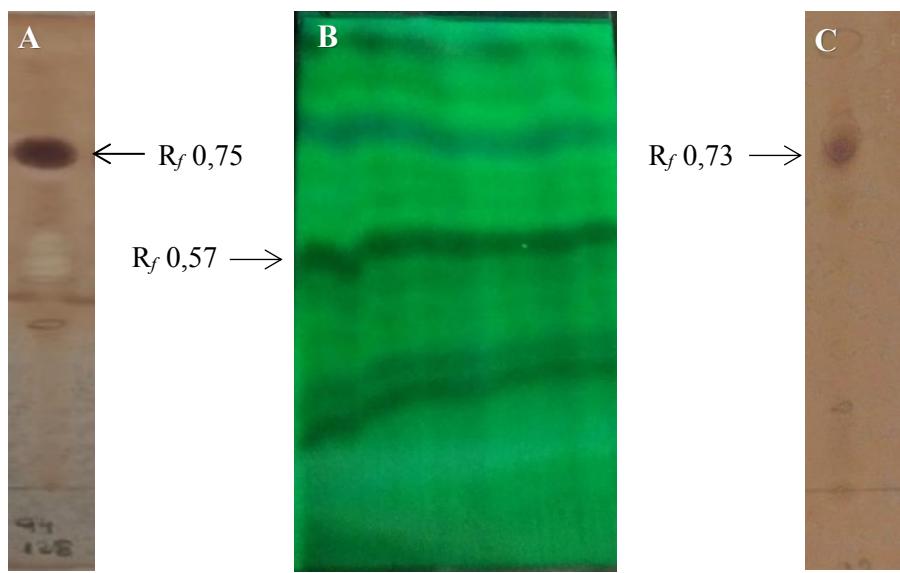
Figura 62 – Estruturas possíveis para a molécula protonada (m/z 330) e suas respectivas propostas de fragmentação.



Fonte: a autora.

Na tentativa de purificar os compostos presentes na fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅, parte dela (293,8 mg) foi submetida a CCDP (Figura 63), de onde foi obtido o alcaloide denominado de KMP02 (**II**) (6,7 mg, R_f 0,73).

Figura 63 – Cromatoplaca da fração KMC01-F₉₄₋₁₄₅ (A); CCDP (B) e CCD do alcaloide purificado (KMP02) (C).



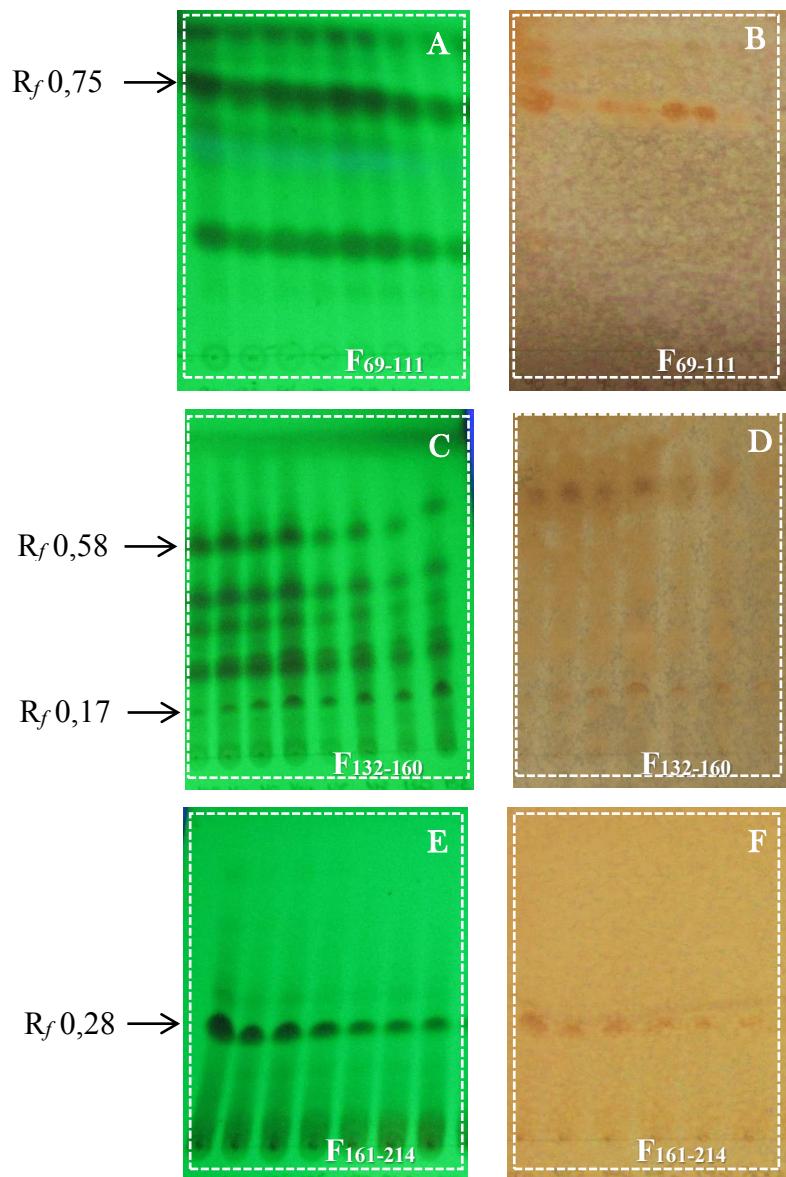
Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9,5:0,5:0,25) e revelador IClPt (A) e (C). FE sílica, FM hexano/AcOEt/NH₄OH (1:4:0,25), inspeção em câmara de UV (254 nm) (B).

Fonte: a autora.

5.2 Estudo químico da fração AcOEt alcaloídica obtida da extração ácido-base

A fração AcOEt alcaloídica obtida da extração ácido-base (7,0 g), foi submetida a CC (KMC03) (25,0 × 5,5 cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (63–200 µm, 409,7 g) e FM um gradiente de solventes que iniciou com CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (10:0:0,25) até CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (8:2:0,25), e na sequência 100% de MeOH. As frações coletadas (237) foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f, resultando nas frações alcaloídicas KMC03-F₆₉₋₁₁₁ (13,7 mg), KMC031-F₁₃₂₋₁₆₀ (327,6 g) e no alcaloide isolado KMC03-F₁₆₁₋₂₁₄ (**IV**) (537, mg) (Figura 64 e 65).

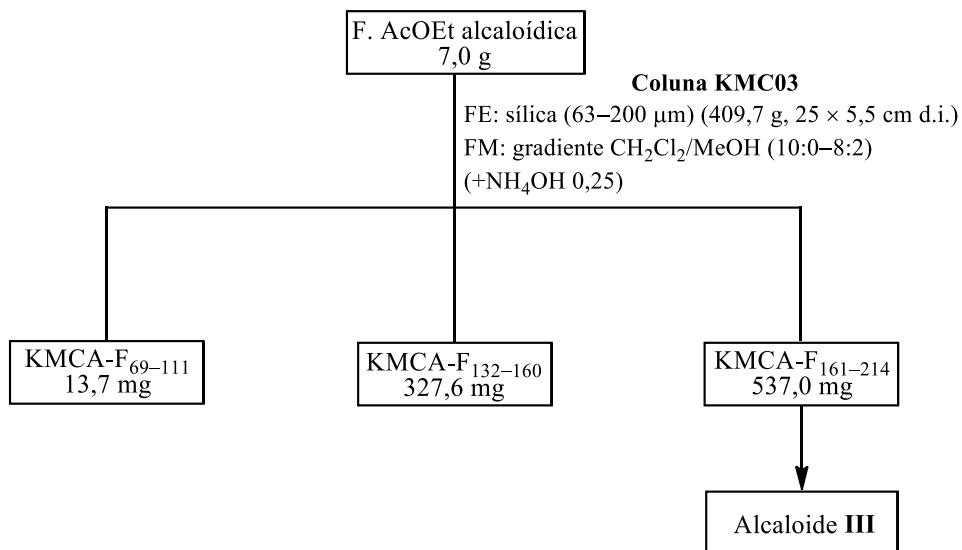
Figura 64 – Cromatoplas das frações obtidas de KMC03.



Nota: FE sílica, FM $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (9,5:0,5:0,25) (A e C) inspeção em câmara de UV (254 nm) (B e D) reveladore IClPt; FE: sílica, FM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) (E) inspeção em câmara de UV 254 nm (F) revelador IClPt.

Fonte: a autora.

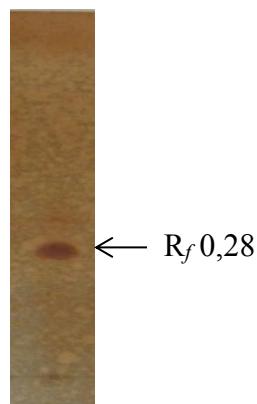
Figura 65 – Procedimento cromatográfico realizado com a fração AcOEt alcaloídica.



Fonte: a autora.

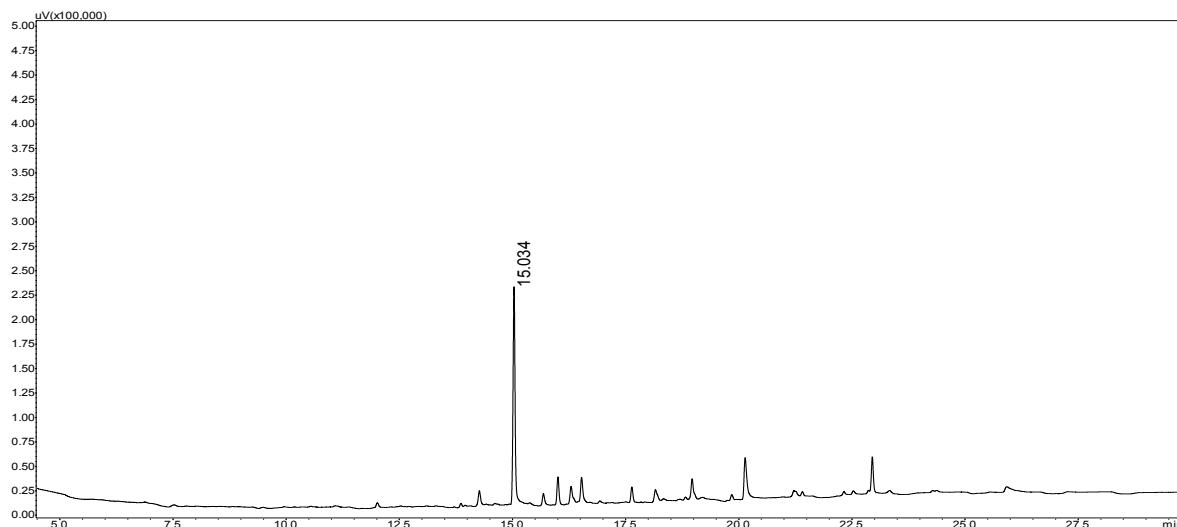
A análise da fração KMC03-F_{161–214} por CCD permitiu observar apenas uma mancha quando inspecionada em câmera de luz UV (254 nm) e revelada com IClPt (R_f 0,28) (Figura 66). Essa fração foi submetida à análise por CG-DIC (Figura 67), que confirmou a presença de um pico majoritário com t_R 15,0 min. que foi correlacionado com a estrutura do alcaloide IV.

Figura 66 – Cromatoplaca da fração KMC03-F_{161–214}.



Nota: FE sílica, FM CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (9:1:0,25) e revelador IClPt.
Fonte: a autora.

Figura 67 – Cromatograma (CG-DIC) da fração KMC03-F_{161–214}.



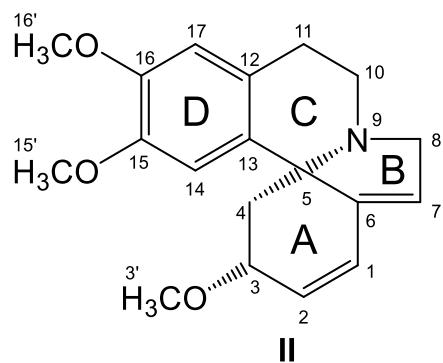
Condições: Coluna OV-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), gradiente 100–280 °C (8 °C/min., 22,5 min.), e em seguida foi mantido a 280 °C (6,5 min.); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 1,0 µL, fluxo: 3,0 mL/min, gás de arraste: N₂, e detector de ionização de chama.

Fonte: a autora.

5.3 Elucidação estrutural dos alcaloides

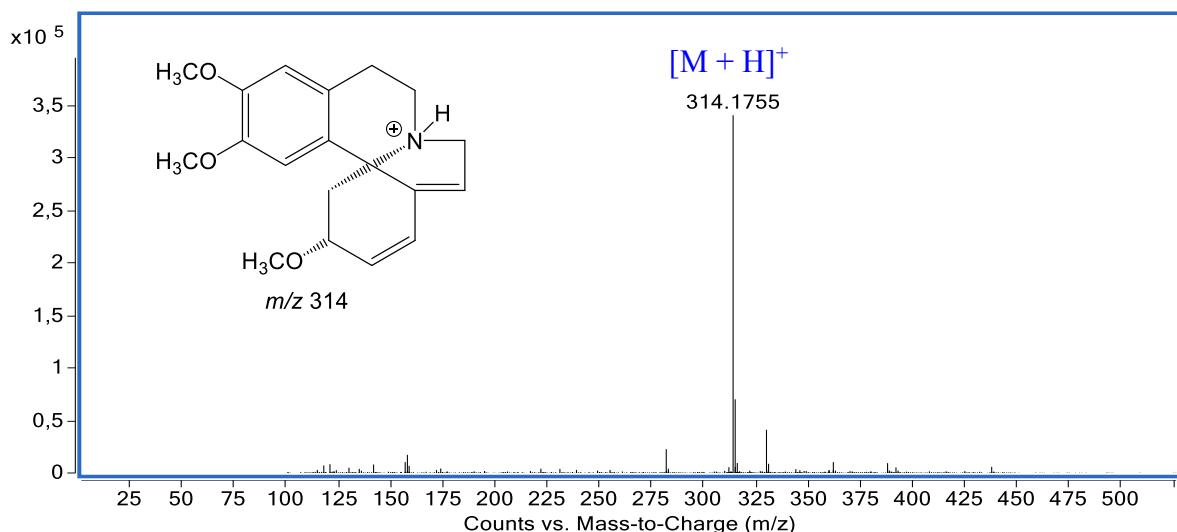
O estudo químico das frações CH₂Cl₂ e AcOEt alcaloídica obtidas do extrato etanólico das cascas do caule de *E. mulungu*, resultou no isolamento de dois alcaloides eritrínicos, cuja identificação foi feita através das técnicas espectroscópicas (IV e RMN – ¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC) e espectrométricas (EM), assim como a comparação dos dados com aqueles descritos na literatura.

5.3.1 Elucidação estrutural do alcaloide **II**



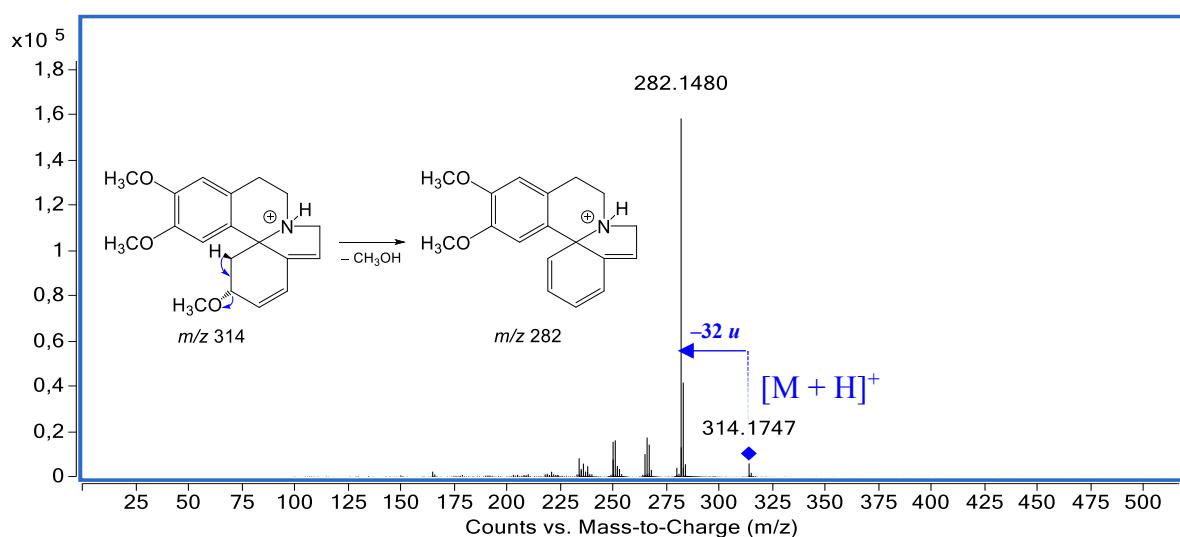
O alcaloide **II** (30,6 mg) foi isolado como um sólido marrom que apresentou teste positivo quando revelado com IClPt (R_f 0,56) (Figura 51). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 9. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 314,1755 $[M + H]^+$, calculado para $C_{19}H_{24}NO_3^+$, 314,1751 (Δ 1,2 ppm) (Figuras 68). Quando o sinal referente à molécula protonada foi submetido à análise sequencial (EM/EM), foi observado um íon fragmento de m/z 282, que foi atribuído à eliminação neutra de metanol (Figura 69).

Figura 68 – EM-IES-(+) em alta resolução de **II**.



Fonte: a autora.

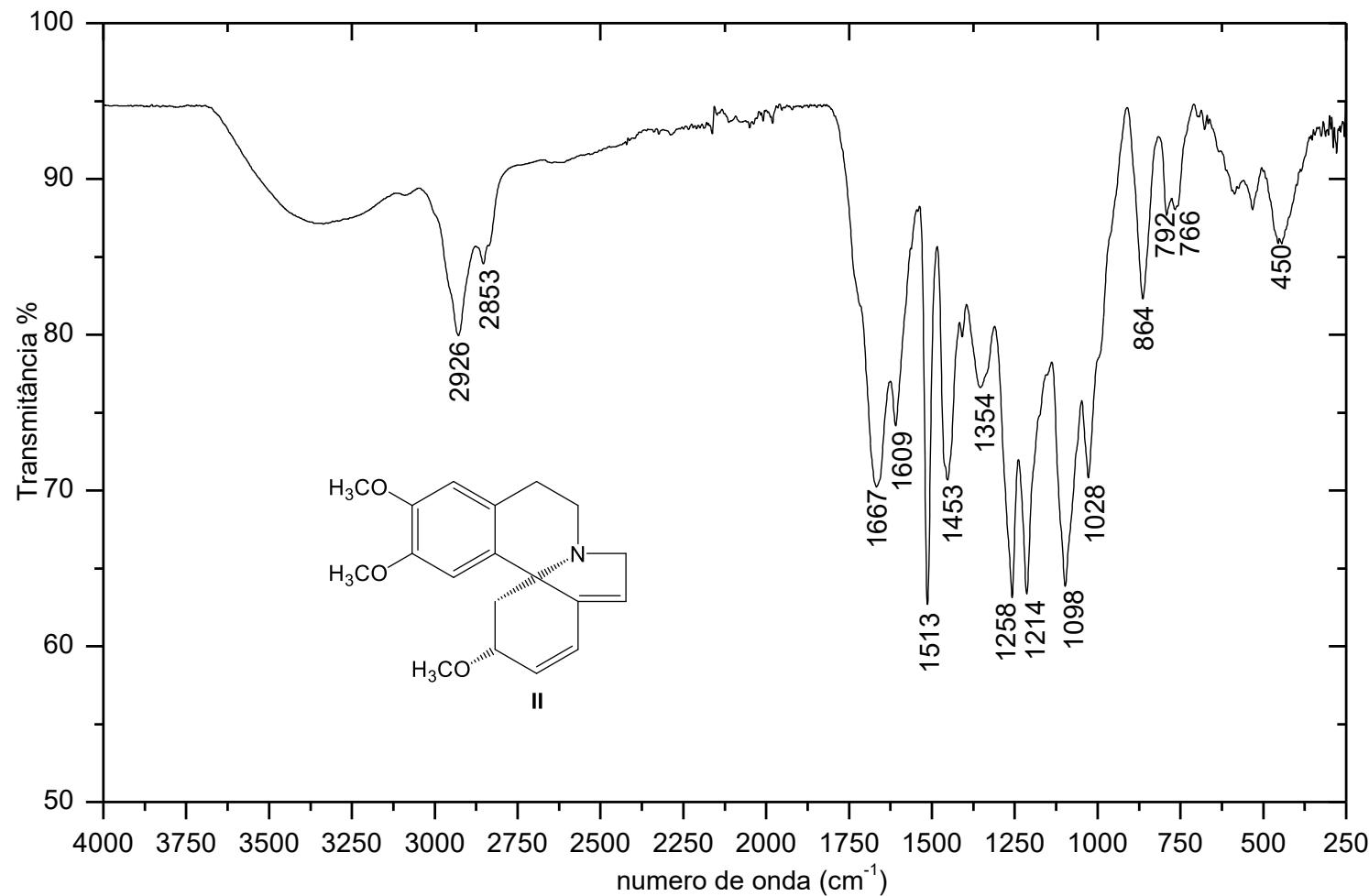
Figura 69 – EM/EM-IES-(+) do alcaloide **II** (20 eV).



Fonte: a autora.

O espectro na região do infravermelho de **I** (Figura 70), apresentou bandas de absorção que foram atribuídas aos estiramentos C–H alifático (ν 2926 e 2853 cm^{-1}), C=C de composto aromático (ν 1609 e 1453 cm^{-1}), C–O–C de éter fenil alquilico (ν 1258 cm^{-1}) e C–N de amina terciária (ν 1098 cm^{-1}). Também foi observada uma banda de absorção característica de estiramento C=C de alceno cíclico (ν 1667 cm^{-1}) (PAVIA et al., 2015; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 70 – Espectro de absorção na região do infravermelho do alcaloide **II**.



Fonte: a autora.

A análise dos espectros de RMN ¹H de **II** (Tabela 5) (Figuras 71–73) permitiu observar a presença de dois simpletos na região de hidrogênios aromáticos em δ 6,82 (1H) e 6,62 (1H), que foram atribuídos aos hidrogênios H-14 e H-17, respectivamente. Esse padrão é característico de um sistema aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído (anel D). Foram observados dois dupletos em δ 6,57 (1H, J = 9,9 Hz, H-1) e 6,00 (1H, J = 9,5 Hz, H-2), cuja correlação no mapa de contorno COSY e a constante de acoplamento caracterizam uma insaturação com configuração *cis*. Na mesma região também foi observado um simpleto largo em δ 5,72 (1H) atribuído ao H-7 que faz parte do dieno conjugado entre os anéis A e B. Foram observados três simpletos em δ 3,84 (3H), 3,74 (3H) e 3,31 (3H), referentes às metoxilas H-15', H-16' (anel D) e H-3' (anel A), respectivamente, e um simpleto largo em δ 4,07, atribuído ao hidrogênio carbinólico (H-3) do anel A. Ainda foram observados três multipletos em δ 3,54 (2H, H-8), 2,97 (2H, H-10) e 2,67 (2H, H-11), um multiplet em δ 2,52 e um triploto em δ 1,89 (J = 10,9 Hz), atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-4a e H-4b, respectivamente. A partir da análise do mapa de contorno COSY (Figura 74) foi possível confirmar as correlações entre os hidrogênios vicinais, o que suporta a proposta de estrutura do alcaloide erisotrina (Tabela 5).

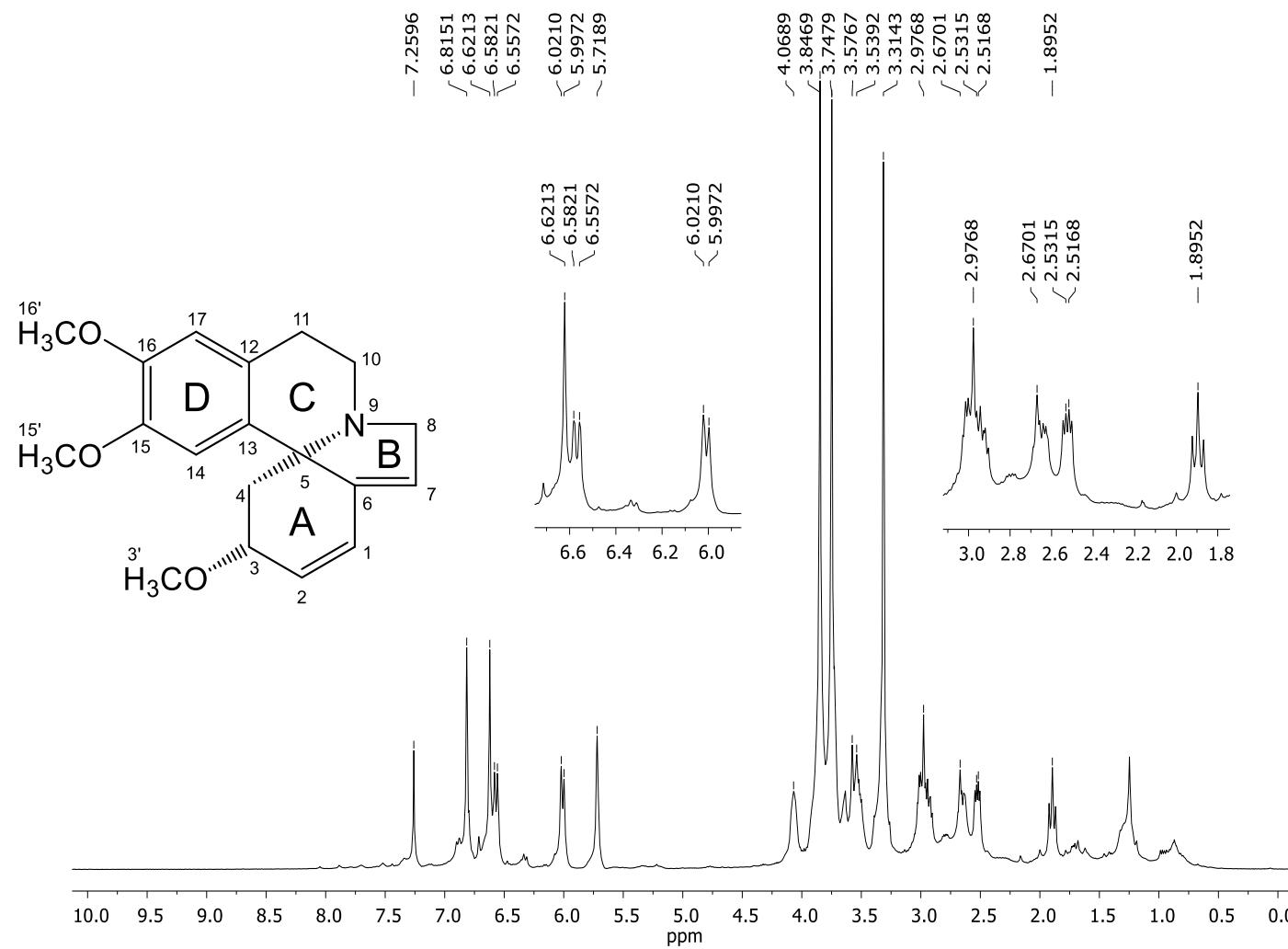
Tabela 5 – Dados de RMN da erisotrina (**II**) em CDCl_3^a .

Posição	δH^a mult. ^b (J em Hz)	δC^a	COSY	HMBC
1	6,57 d (9,9)	125,6	H-2	H-7
2	6,00 d (9,5)	131,8	H-1, H-3	H-4a, H-4b
3	4,07 sl	76,2	H-2, H-4, H-4'	H-1, H-4a, H-4b, H-3'
4a	2,52 m	41,2	H-3, H-4'	H-2
4b	1,89 t (10,9)		H-3, H-4	
5	-	67,1	-	H-1, H-4a, H-4b, H-7, H-10, H-14
6	-	142,3	-	H-1, H-2, H-4a, H-8
7	5,72 sl	122,8	H-8	H-8
8	3,54 m	56,7	H-7, H-10	H-7, H-10
9	-	-	-	-
10	2,97 m	43,6	H-8, H-11	H-11
11	2,67 m	24,0	H-10	H-17
12	-	126,4	-	H-10, H-11, H-14, H-17
13	-	131,1	-	H-4a, H-4b, H-11, H13, H-14, H-17
14	6,82 s	109,6	-	H-17
15	-	147,3	-	H-14, H-17, H-15'
16	-	147,9	-	H-14, H-17, H ₃ -16'
17	6,62 s	111,8	-	H-11
OCH ₃ -3'	3,31 s	55,9	-	H-3
OCH ₃ -15'	3,84 s	56,01 ^c	-	-
OCH ₃ -16'	3,74 s	56,03 ^c	-	-

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$). ^bMultiplicidade: s (singuleto); sl (singleto largo); d (dubleteo); m (multipletos). ^cOs carbonos podem estar interconvertidos na coluna.

Fonte: a autora.

Figura 71 – Espectro de RMN ^1H do alcaloide **II** (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 72 – Ampliação do espectro 71 (δ 1,7–4,2) do alcaloide **II**.

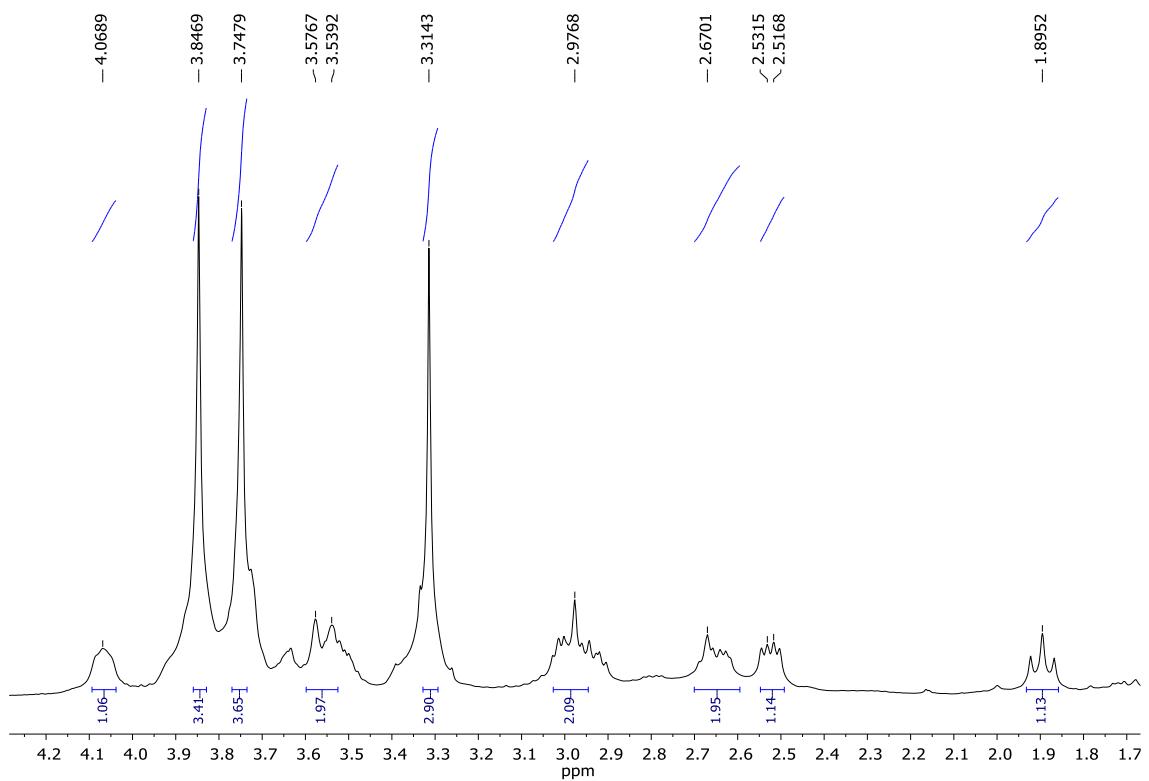


Figura 73 – Ampliação do espectro 71 (δ 5,5–7,3) do alcaloide **II**.

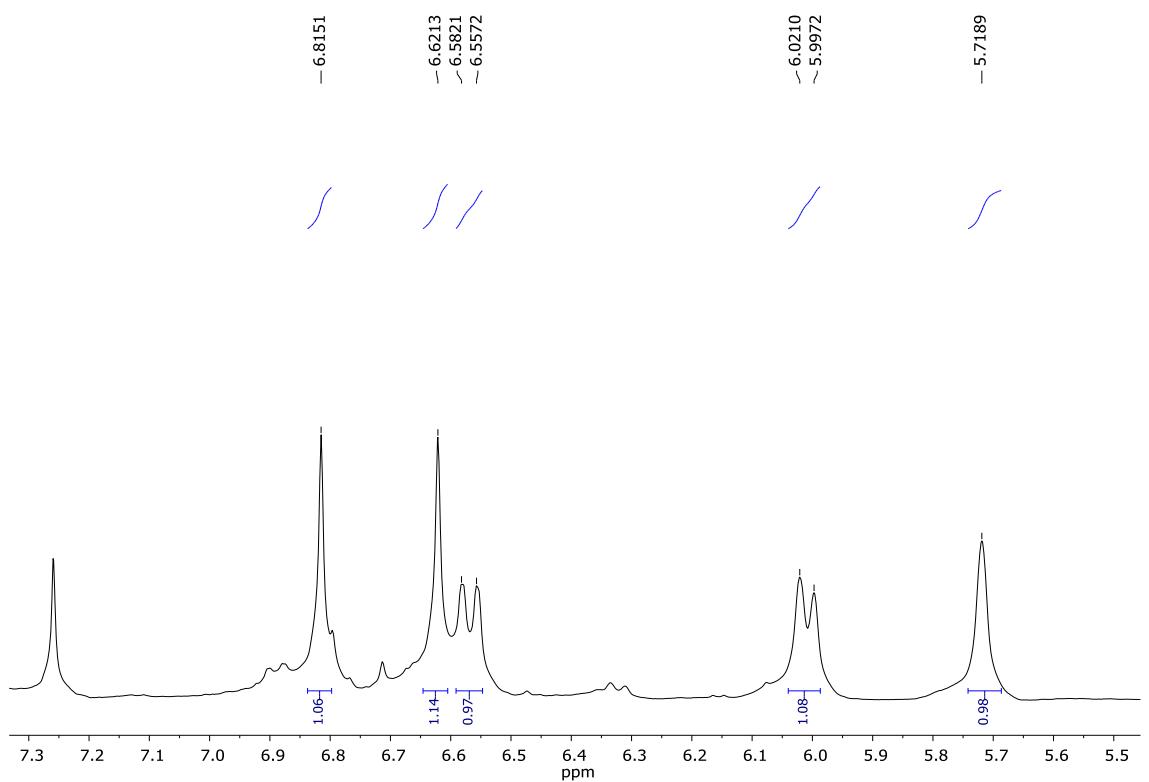
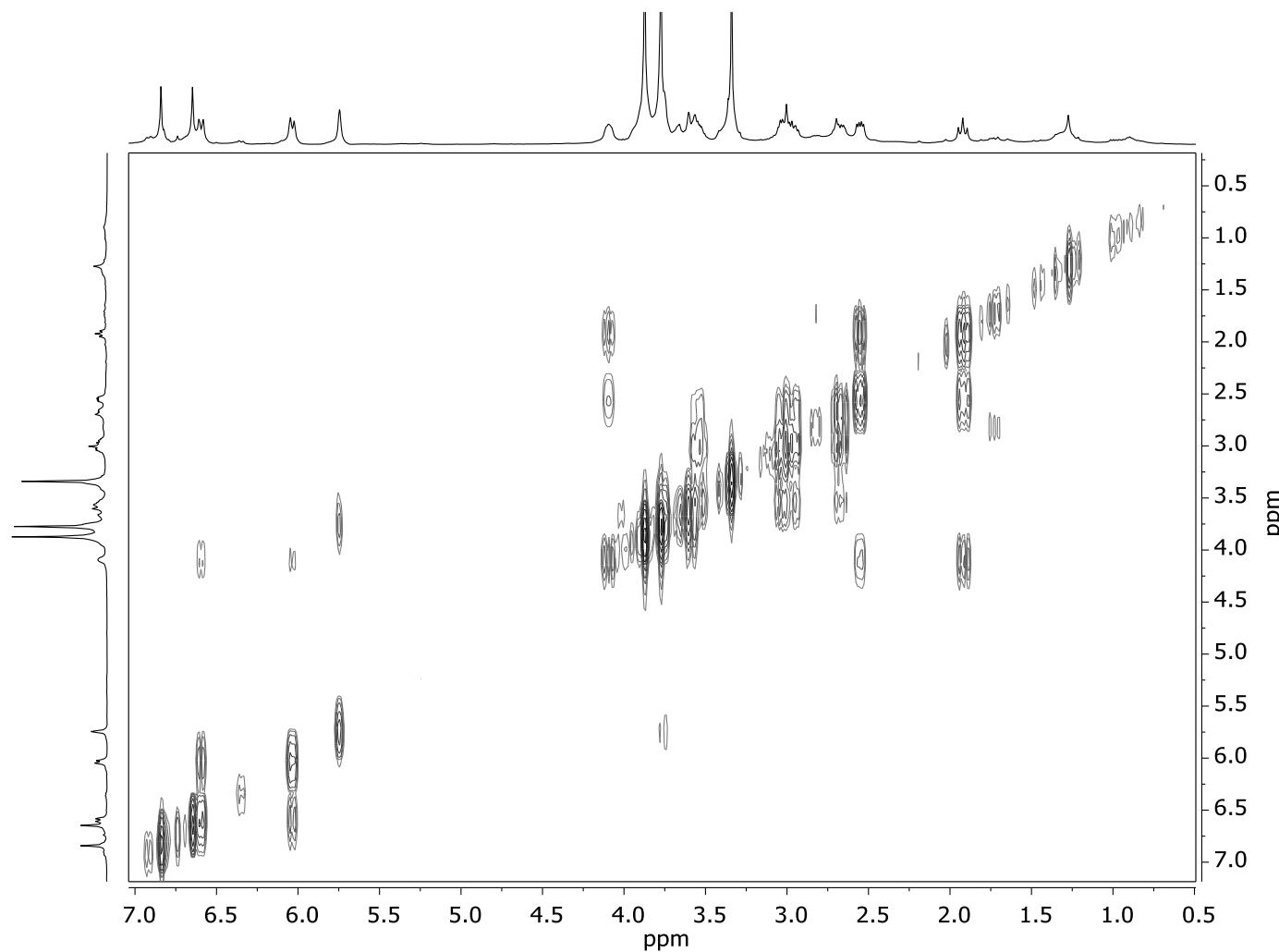


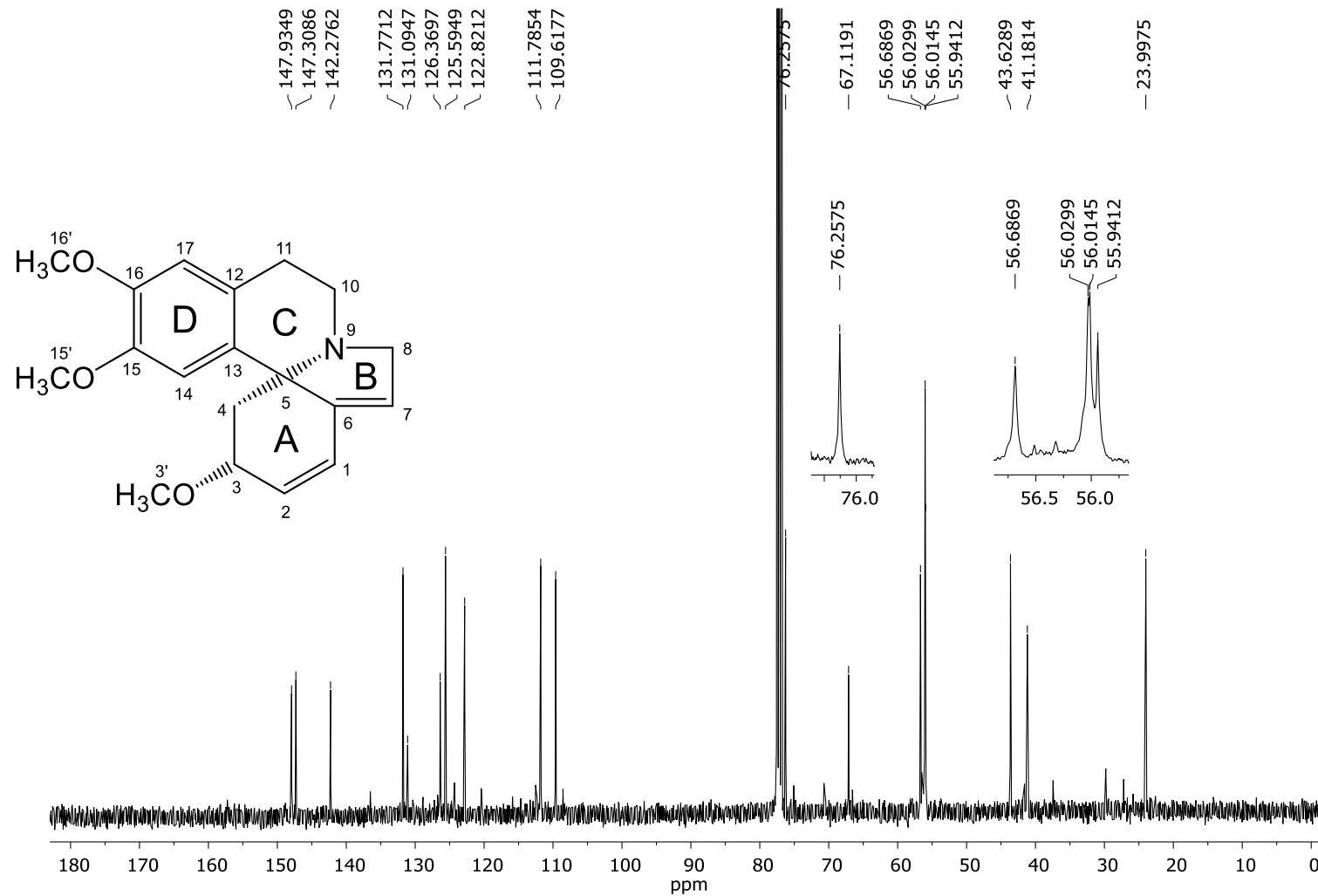
Figura 74 – Mapa de contorno COSY do alcaloide **II** (CDCl_3).



Fonte: a autora.

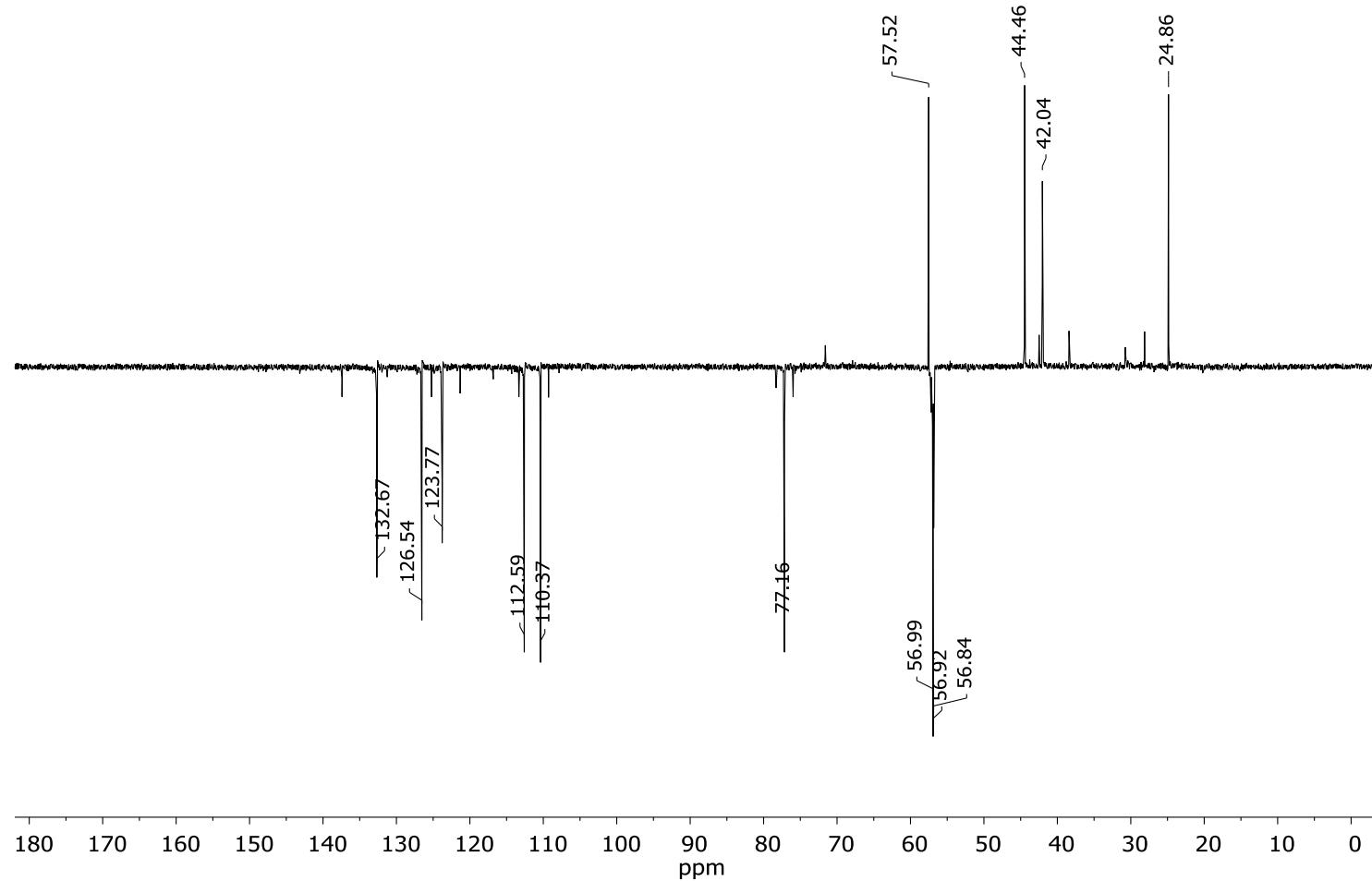
No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 5) (Figura 75) foram observados dezenove sinais, sendo seis sinais na região de carbonos aromáticos em δ 147,9 (C-16), 147,3 (C-15), 131,1 (C-13), 126,4 (C-12), 111,8 (C-17) e 109,6 (C-14) que confirmam a presença do anel D; quatro sinais referentes aos carbonos insaturados do sistema de duplas conjugadas em δ 142,3 (C-6), 131,8 (C-2), 125,6 (C-1) e 122,8 (C-7); quatro sinais referentes a carbonos metilênicos em δ 56,7 (C-8), 43,6 (C-10), 41,2 (C-4) e 24,0 (C-11); um sinal referente ao carbono carbinólico em δ 76,2 (C-3); um sinal referente ao carbono espiro em δ 67,12 (C-5), que conecta os três anéis A, B e C; e três sinais referentes às metoxilas em δ 56,03 (H-16'), 56,01 (H-15'), 55,9 (H-3'), que foram correlacionados aos respectivos hidrogênios por meio do mapa de contorno HSQC (Figuras 77–79).

Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C do alcaloide **II** (100 MHz, CDCl_3).



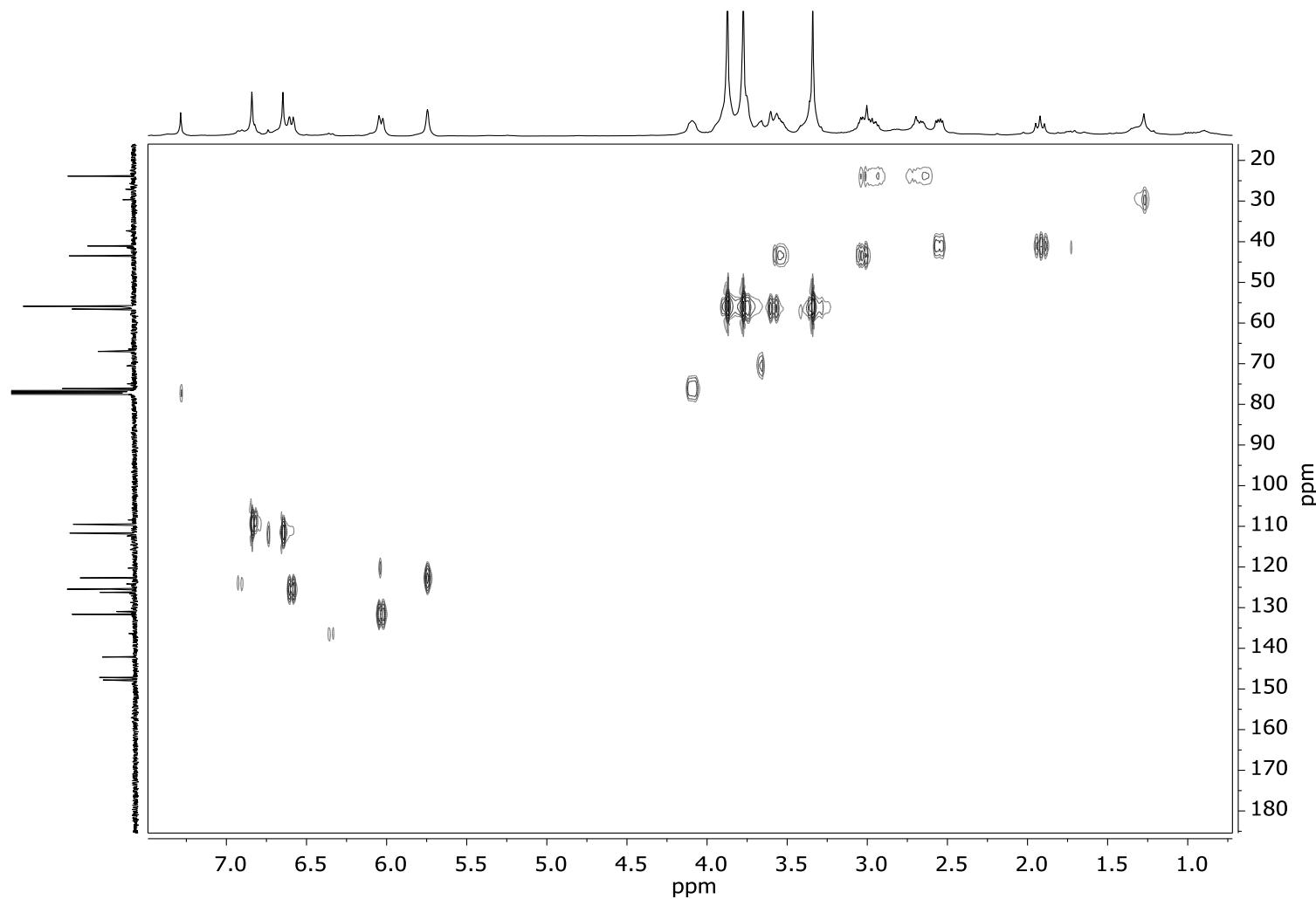
Fonte: a autora.

Figura 76 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 do alcaloide II (CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 77 – Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 78 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 77 (δ 0,8–4,4).

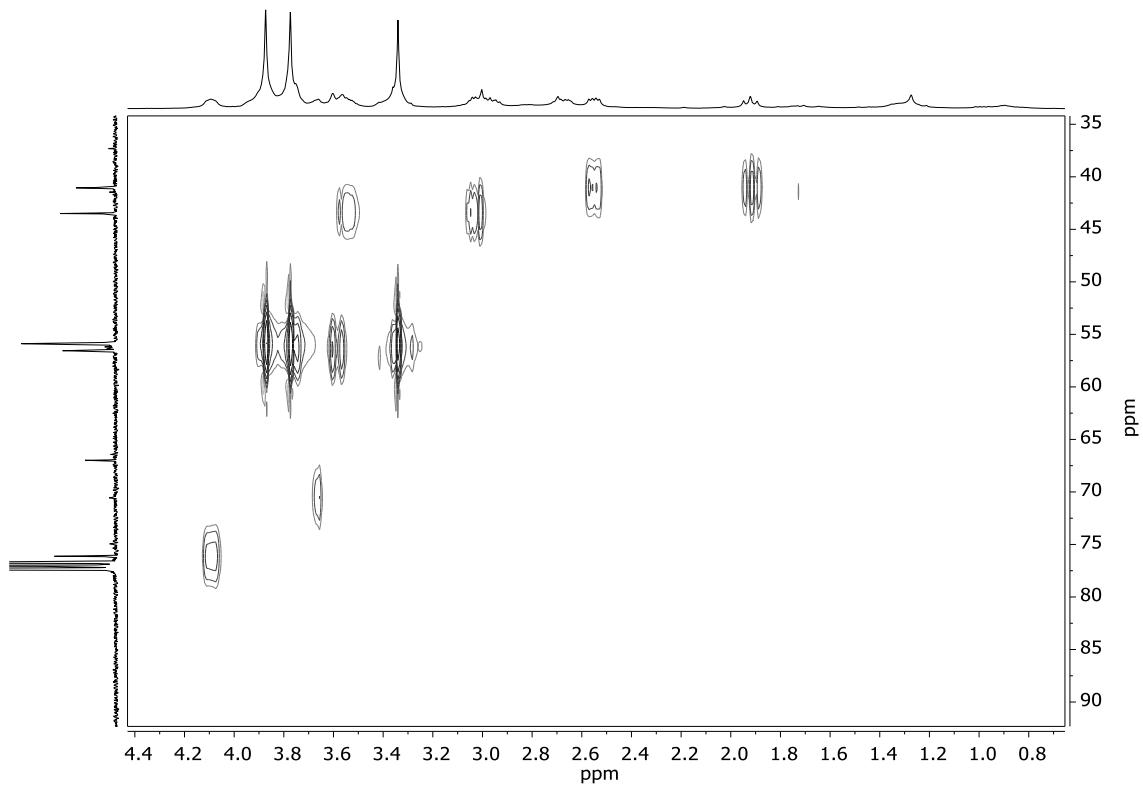
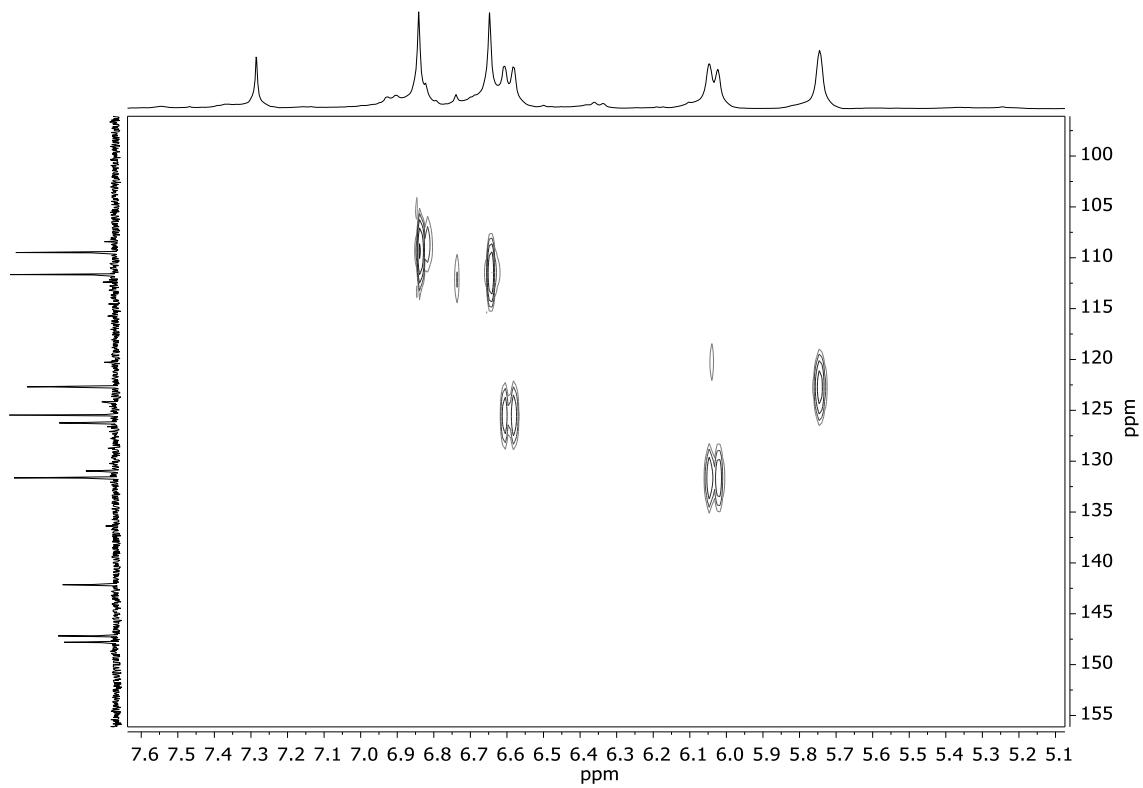
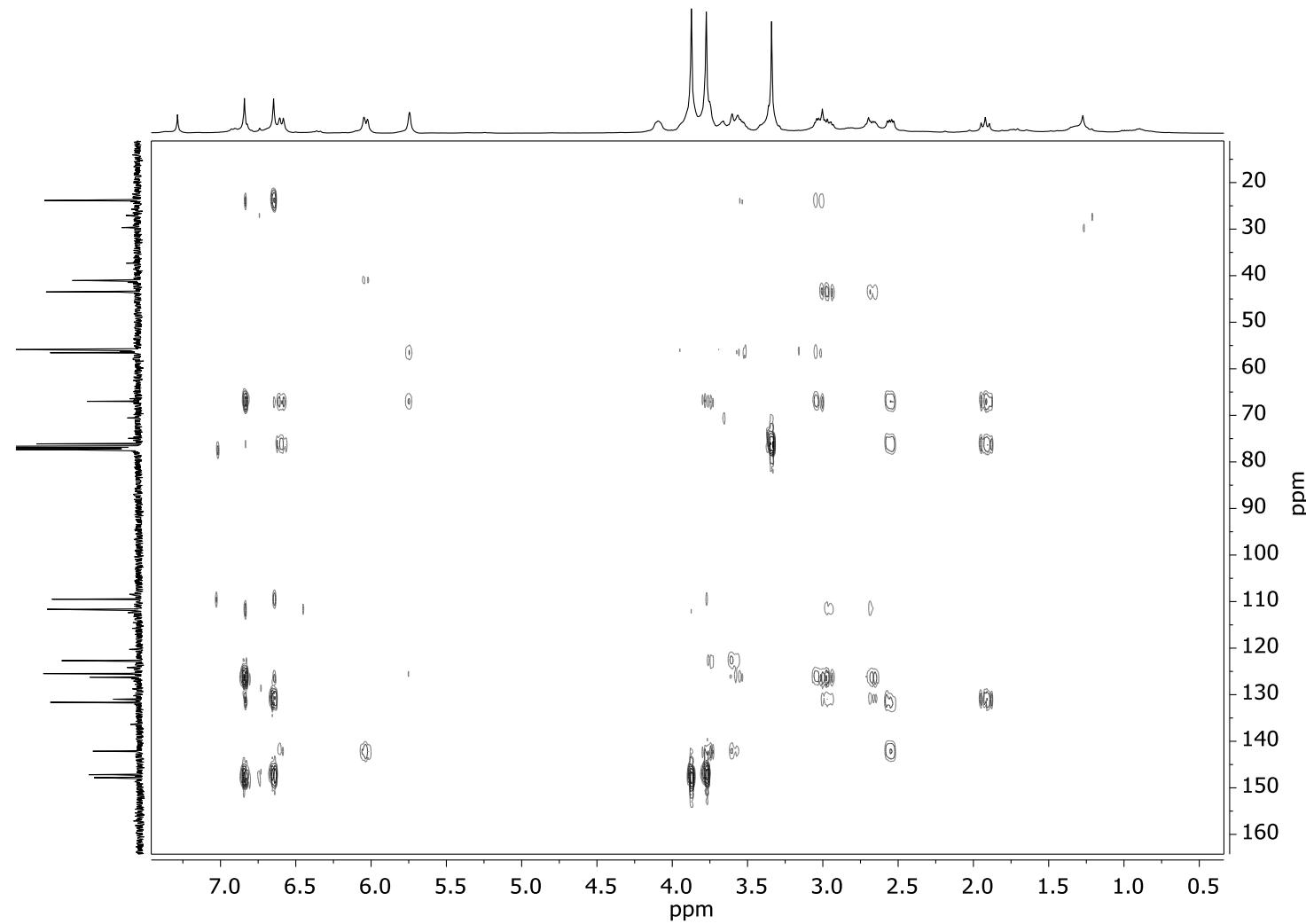


Figura 79 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 77 (δ 0,8–4,4).



A análise do mapa de contorno HMBC (Figura 80–84) (Tabela 5), permitiu correlacionar os sinais δ 3,31 (H-3'), 6,57 (H-1), 2,52 (H-4a), 1,89 (H-4b), com δ 76,2 (C-3), que caracteriza parte do anel A. As correlações entre os sinais δ 2,52 e 1,89 e (H-4a e H-4b) com δ 67,1 (C-5), 142,3 (C-6) e 131,1 (C-13) permitiu estabelecer a conexão entre os quatro anéis (A, B, C e D). A correlação entre o sinal δ 6,81 (H-14) com δ 67,1 (C-5), assim como entre δ 3,84 (H-15') com δ 147,3 (C-15); entre δ 3,74 (H-16') com δ 147,9 (C-16); e entre δ 6,62 (H-17) com δ 131,1 (C-13) e 147,3 (C-15), permitiram confirmar o padrão de substituição do anel D. Correlação adicional entre o sinal δ 6,62 (H-17) com δ 24,0 (C-11), confirma a conexão entre os anéis C e D, assim como as correlações entre δ 2,97 (H-10) com δ 56,7 (C-8) e 67,1 (C-5), e δ 3,54 (H-8) com δ 43,6 (C-10), confirmam a conexão do anel C com A e B. As correlações do sinal δ 3,54 (H-8) com δ 142,3 (C-6), do sinal δ 5,72 (H-7) com δ 125,6 (C-1) e 67,1 (C-5), do sinal δ 6,57 (H-1) com δ 122,8 (C-7) e 67,1 (C-5), e do sinal δ 6,00 (H-2) com δ 142,3 (C-6), confirmam a conexão entre os anéis A e B. Demais correlações podem ser observadas na Figura 85 (Tabela 5) o corroboram com o padrão estruturas da erisotrina (II).

Figura 80 – Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 81 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 0,6–4,4).

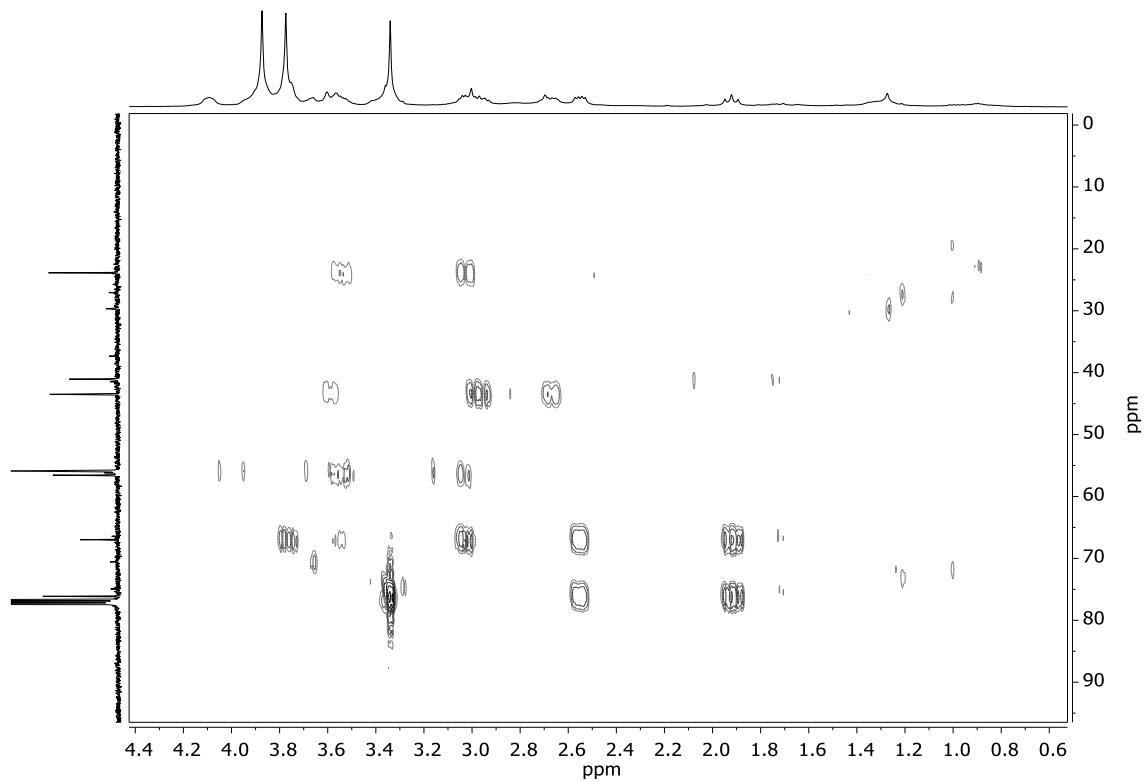


Figura 82 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 5,0–7,6).

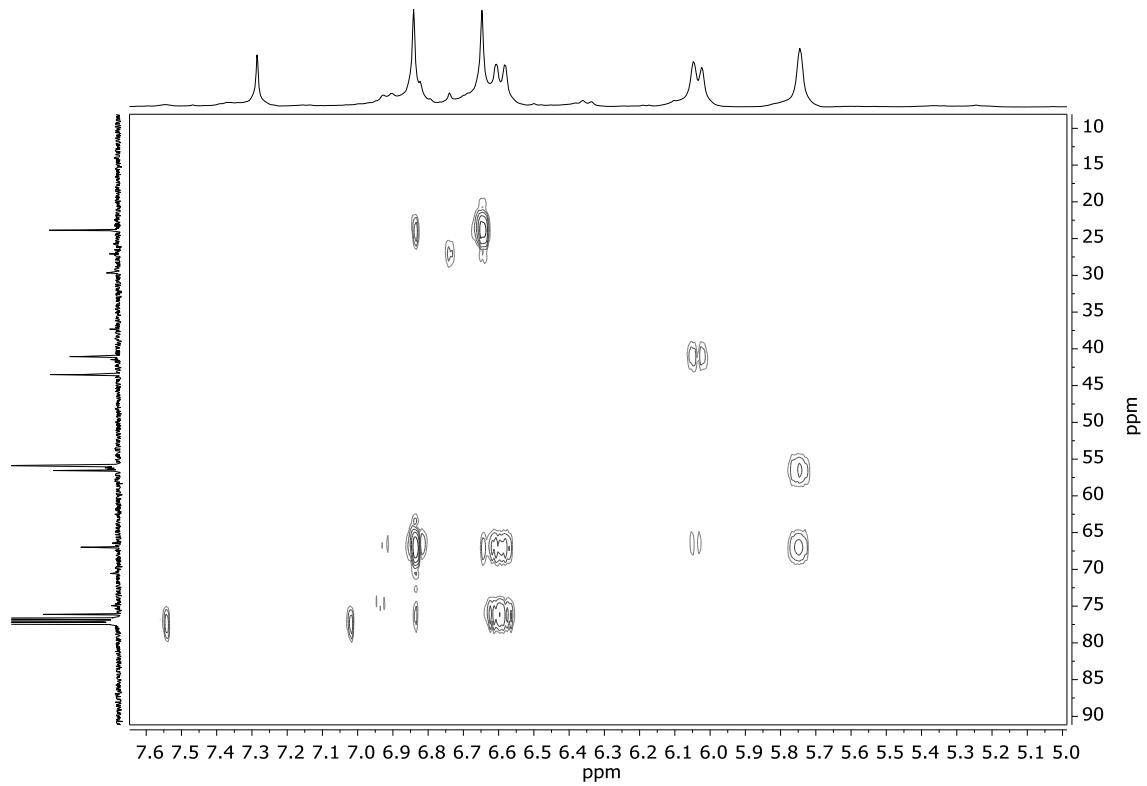


Figura 83 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 1,1–4,3).

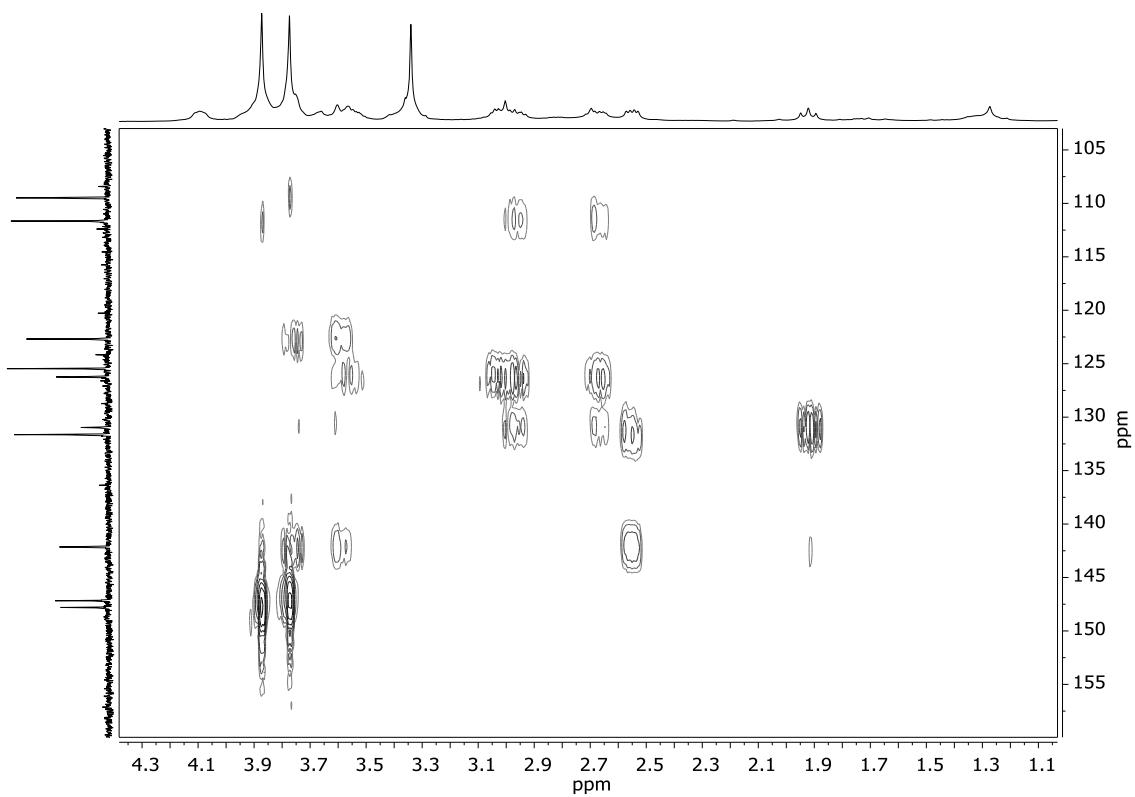


Figura 84 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 80 (δ 5,2–7,4).

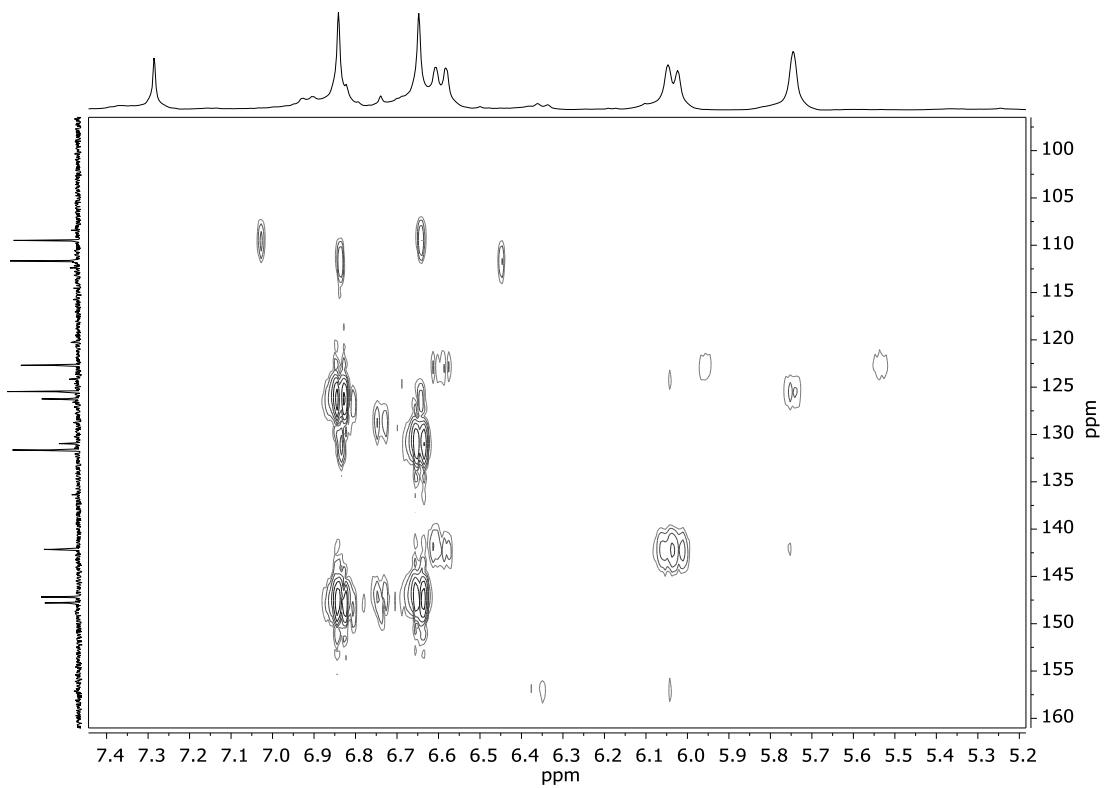
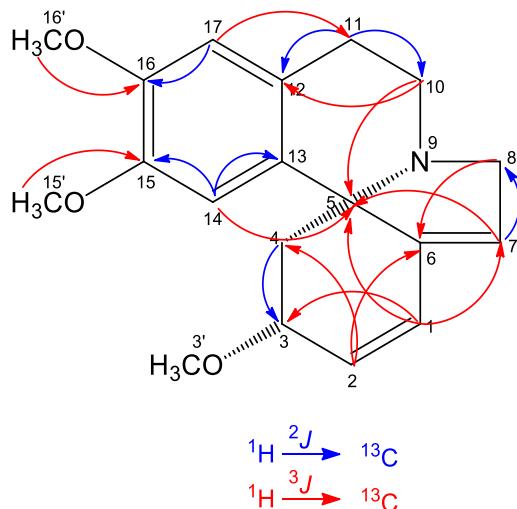


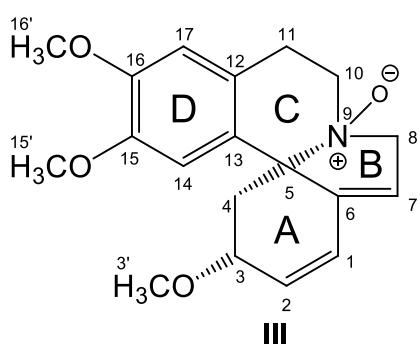
Figura 85 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC.



Fonte: a autora.

Os dados espectroscópicos e espectrométricos foram comparados com aqueles encontrados na literatura (AMER, 1991; FEITOSA, 2012; SARRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981; SERRANO et al., 2011) e são consistentes com a estrutura da (3α) -3,15,16-trimetoxi-1,2,6,7-tetraidroeritrina (**II**), também conhecida como erisotrina. Esse alcaloide foi encontrado em 50 espécies de *Erythrina* investigadas por Raven em 1974 (OLIVER-BEVER, 1986).

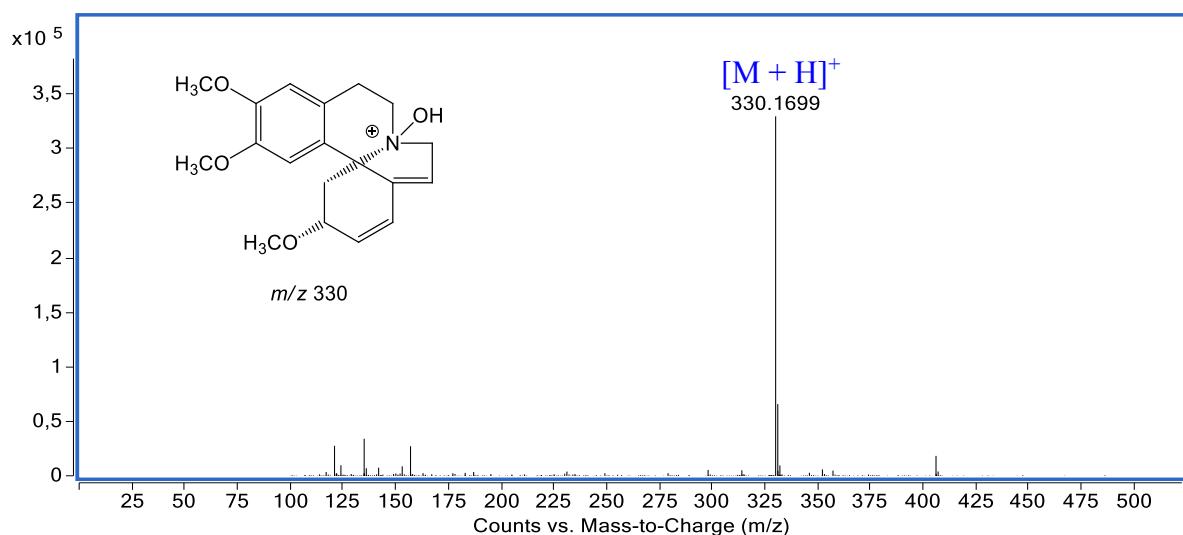
5.3.2 Elucidação estrutural do alcaloide **III**



O alcaloide **III** (532,7 mg), foi isolado como um sólido amorfó, de coloração marrom, que apresentou teste positivo quando revelado com o reagente IClPt (R_f 0,28) (Figura 87). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a 9. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 330,1699 $[M + H]^+$, calculado para $C_{19}H_{24}NO_4^+$,

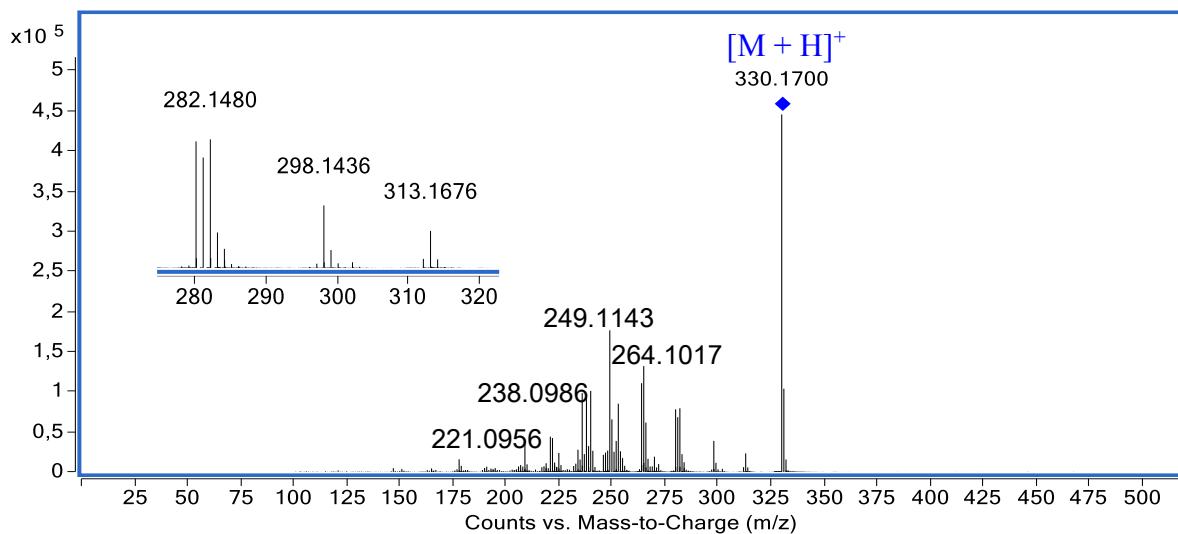
330,1700 (Δ –0,3 ppm) (Figura 86). Quando o sinal referente à molécula protonada foi submetido à análise sequencial (EM/EM), foram observados os íons fragmentos de m/z 313, 298 e 280, que foram atribuídos às eliminações de uma hidroxila (17 u) $[\text{M} + \text{H} - \text{OH}]^+$, metanol (32 u) $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ e água e metanol (50 u) $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$, respectivamente (Figura 87). Fazendo uma comparação entre sinais referentes as moléculas protonadas dos alcaloides **II** e **III** é possível observar uma diferença de massa de 16 u , o que está de acordo com a massa adicional de um oxigênio em **III**, e corrobora as propostas de fragmentação (Figura 62). Os dados de EM/EM indicam que o metabólito **III** trata-se da erisotrina *N*-óxido, e estão de acordo com dados descritos na literatura (AMER, 1991; SARRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981; MARSAIOLI, 1981; CHAWLA et al., 1992).

Figura 86 – EM-IES-(+) em alta resolução de **III.**



Fonte: a autora.

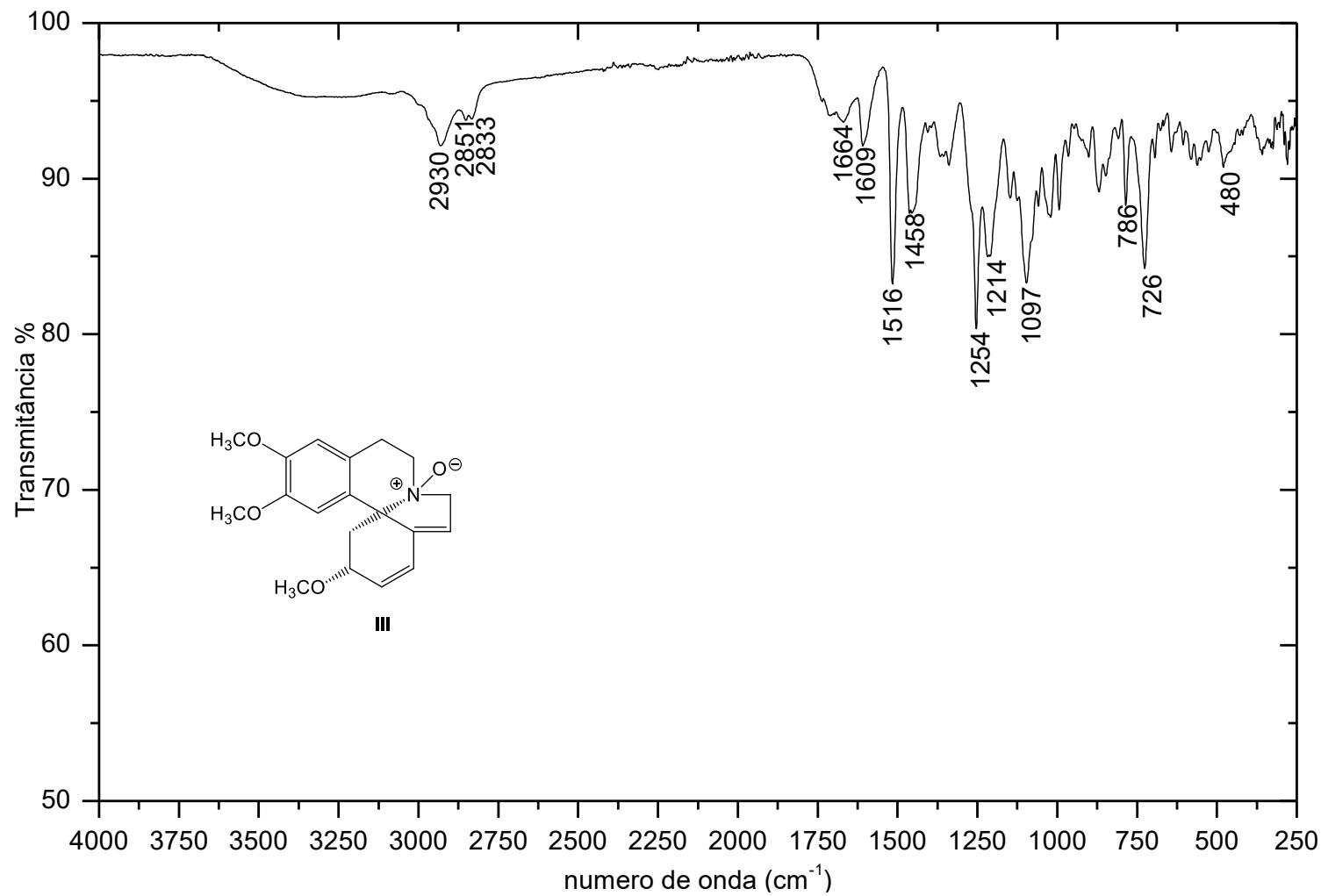
Figura 87 – EM/EM-IES-(+) do alcaloide **III** (15 eV).



Fonte: a autora.

O espectro na região do infravermelho de **III** (Figura 88), apresentou bandas de absorção que foram atribuídas aos estiramentos C–H alifático (ν 2930, 2851 e 2833 cm^{-1}), C=C de compostos de aromáticos (ν 1609 e 1457 cm^{-1}), C–O–C de éter fenil alquilico (ν 1254 cm^{-1}) e C–N de amina terciária (ν 1097 cm^{-1}). Também foi observada uma banda de absorção atribuída a estiramento C=C de alceno (ν 1664 cm^{-1}) (PAVIA et al., 2015; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 88 – Espectro de absorção na região do infravermelho do alcaloide III.



Fonte: a autora.

A análise dos espectros de RMN ^1H do alcaloide **III** (Tabela 6) (Figuras 89–91) permitiu observar grande semelhança com o alcaloide **II**, sugerindo que as estruturas também apresentam perfis estruturais similares, no entanto, no espectro de RMN ^1H do composto **III** os sinais δ 4,41 (2H, d, H-8) e 3,82 (2H, sl, H-10), estão mais desblindados, quando comparados com os sinais de **II**. Este dado aliado a diferença de massa (16 u) observada no EM, sugere a presença do grupo *N*-óxido. Os dados de RMN de ^{13}C (Figura 93) apresentam o mesmo efeito anisotrópico sobre os carbonos C-5, C-8 e C-10, cujos sinais foram deslocados para δ 82,8, 70,8 e 59,3, respectivamente. Além disso, os sinais de quatro carbonos metilênicos observados em δ 70,8 (C-8), 59,3 (C-10), 31,1 (C-4) e 27,2 (C-11), confirmados no espectro de DEPT (Figura 94), de três metoxilas observadas nos espectros de ^1H e ^{13}C , além do sistema de duplas conjugadas (aneis A e B), corroboram a estrutura da erisotrina *N*-óxido (Figura 62). As correlações entre hidrogênios vicinais foram feitas a partir da análise dos mapas de contorno COSY (Figura 92), as correlações diretas entre hidrogênio e carbono foram estabelecidas a partir dos mapas de contorno HSQC (Figuras 95–97), e as correlações a duas (J^2) e três (J^3) ligações foram propostas a partir do mapa de contorno HMBC (Figuras 98–102) (Tabela 6), e estão de acordo com a proposta de estrutura da erisotrina *N*-óxido (**III**). As principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC estão compiladas na Figura 103.

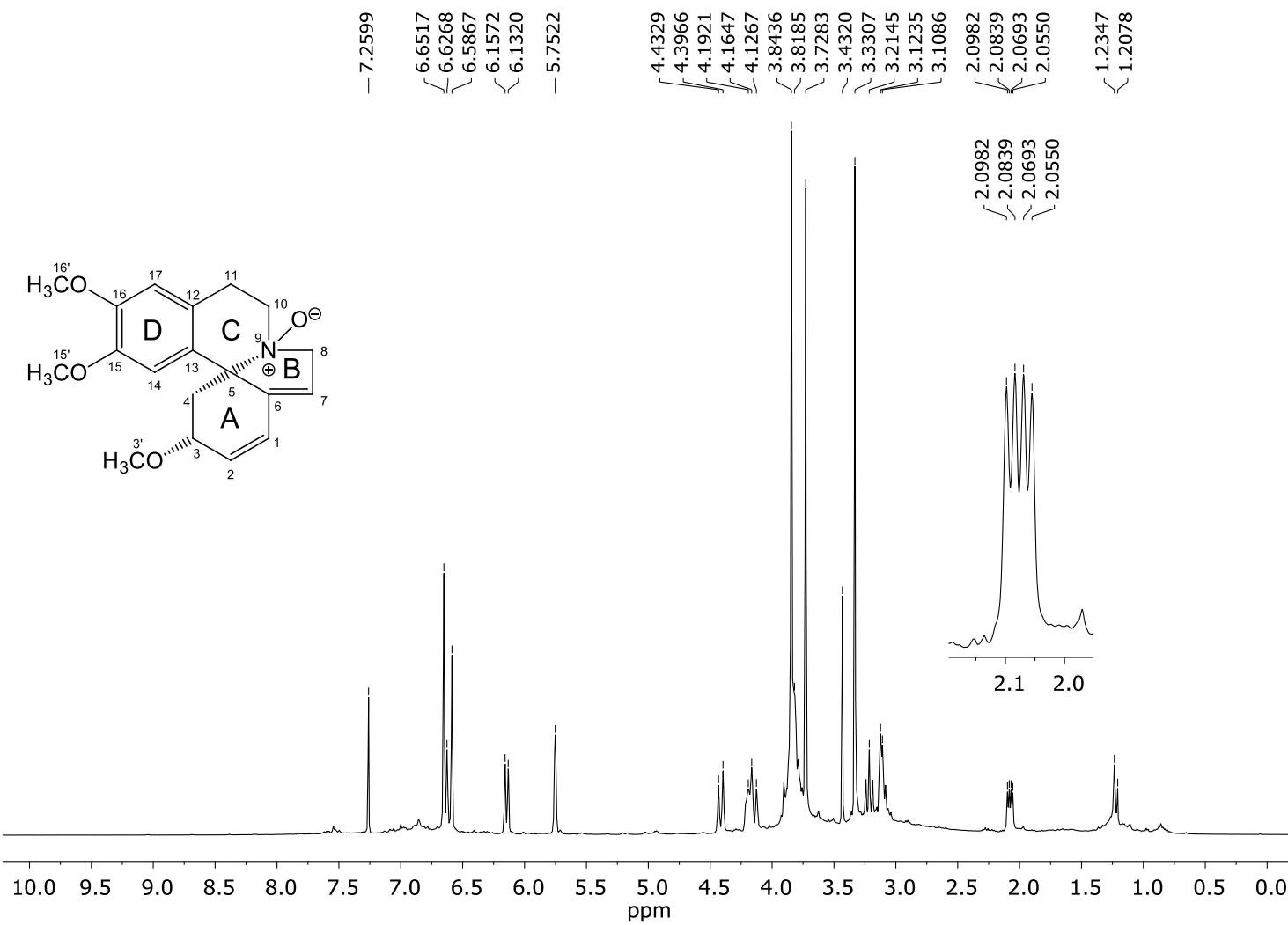
Tabela 6 – Dados de RMN da erisotrina *N*-óxido (III) em CDCl_3^a .

Posição	δH^a mult. ^b (J em Hz)	δC^a	COSY	HMBC
1	6,63 d (10,0)	125,8	H-2	H-7
2	6,14 d (10,0)	133,9	H-1	H-4a, H-4b
3	4,19 m	75,7	H-4a, H-4b	H-1, H-4a, H-4b, H-3'
4a	3,21 dd (11,6; 10,8)	31,1	H-3, H-4b	
4b	2,07 dd (11,6; 5,7)		H-3, H-4	H-2
5	-	82,8	-	H-1, H-3, H-4a, H-4b, H-7, H-8b, H-10, H-14
6	-	138,6	-	H-1, H-2, H-4b, H-8a, H-8b
7	5,75 sl	118,3	H-8a, H-8b	H-1, H-8a, H-8b
8a	4,41 d (14,5)	70,8	H-7, H-8b	
8b	4,14 d (14,5)		H-7, H-8a	H-7
9	-	-	-	-
10	3,82 m	59,3	H-11	H-11
11	3,11 m	27,2	H-10	H-10, H-17
12	-	122,1		H-10, H-11, H-14, H-17
13	-	128,4	-	H-4a, H-4b, H-11, H-14, H-17
14	6,65 s	108,9	-	-
15	-	148,3	-	H-14, H-17, H-15'
16	-	149,1	-	H-14, H-17, H-16'
17	6,59 s	110,8	-	H-11
OCH ₃ -3'	3,33 s	55,91	-	-
OCH ₃ -15'	3,72 s	55,98 ^c	-	-
OCH ₃ -16'	3,84 s	56,0 ^c	-	-

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} 0,00$). ^bMultiplicidade: s (singleto); sl (singleto largo); d (dobleto); m (multiplo). ^cOs carbonos podem estar interconveritos na mesma coluna.

Fonte: a autora.

Figura 89 – Espectro de RMN ^1H do alcaloide III (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 90 – Ampliação do espectro 89 (δ 2,9–4,0) do alcaloide III.

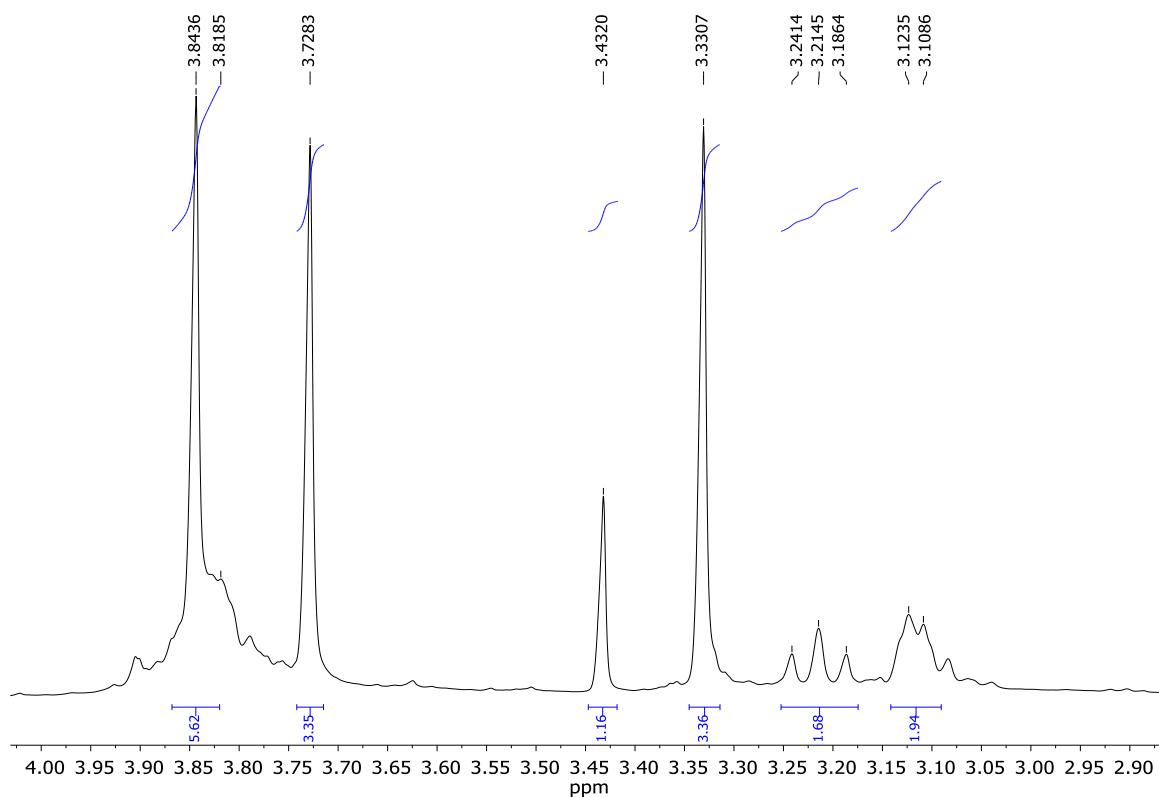


Figura 91 – Ampliação do espectro 89 (δ 4,0–6,7) do alcaloide III.

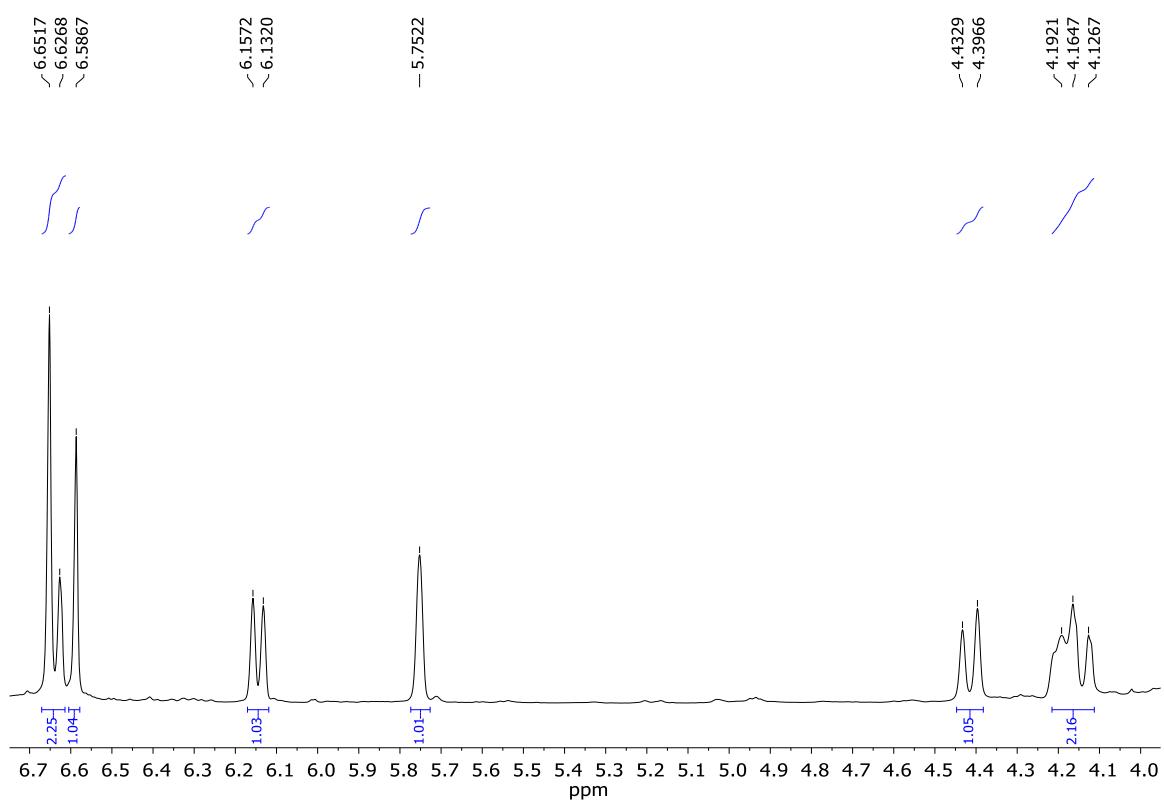
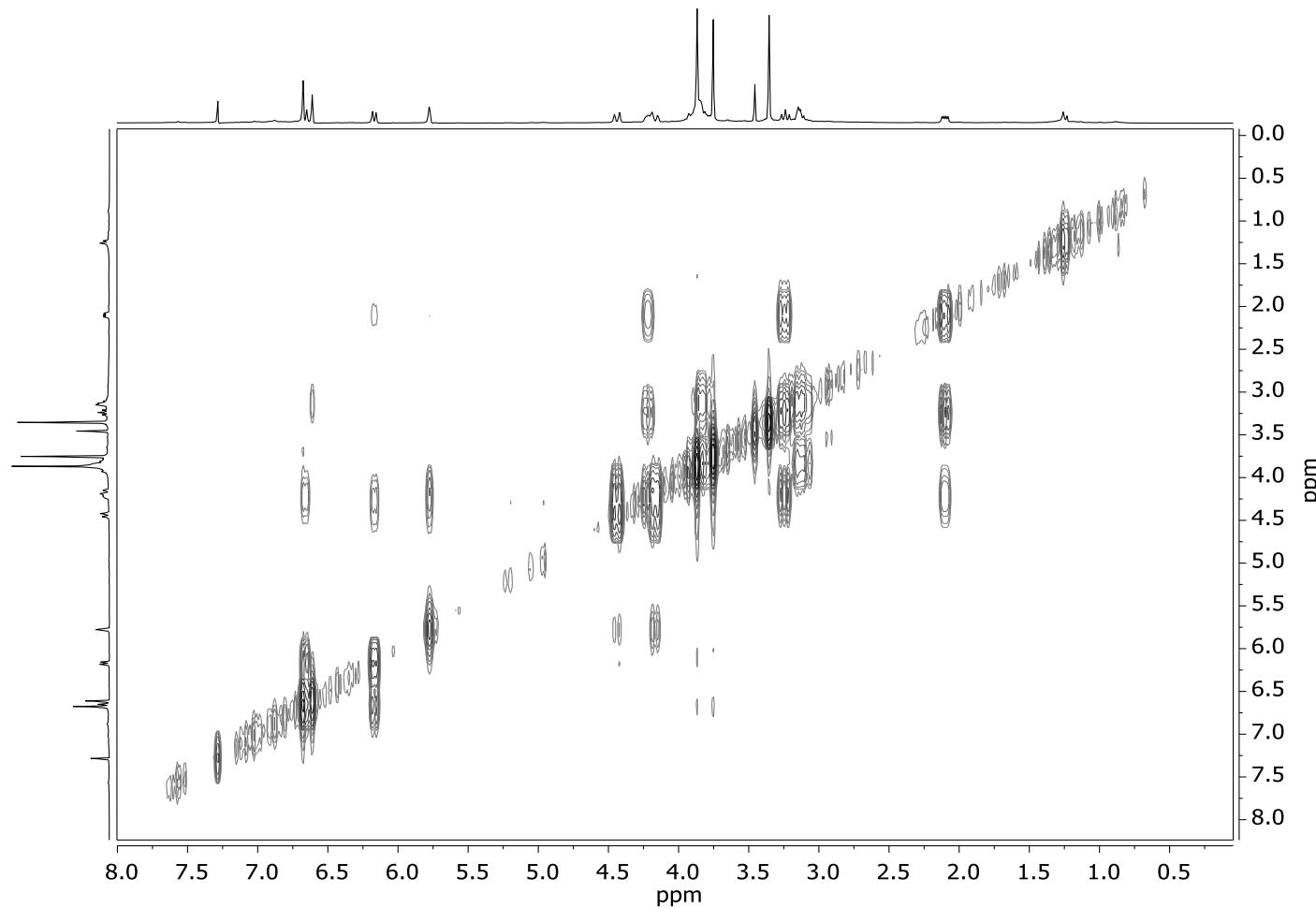
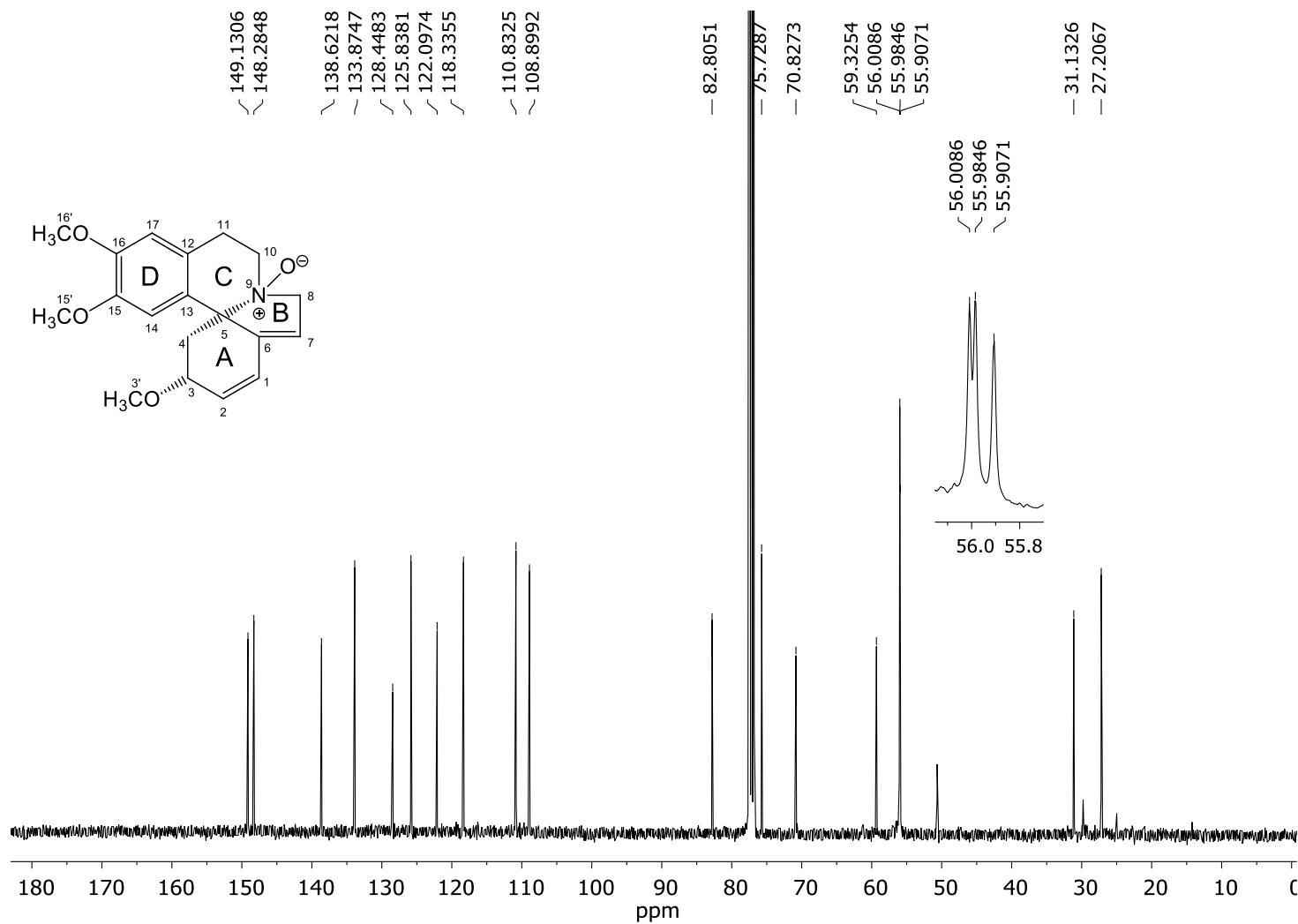


Figura 92 – Mapa de contorno COSY do alcaloide **III** (CDCl_3).



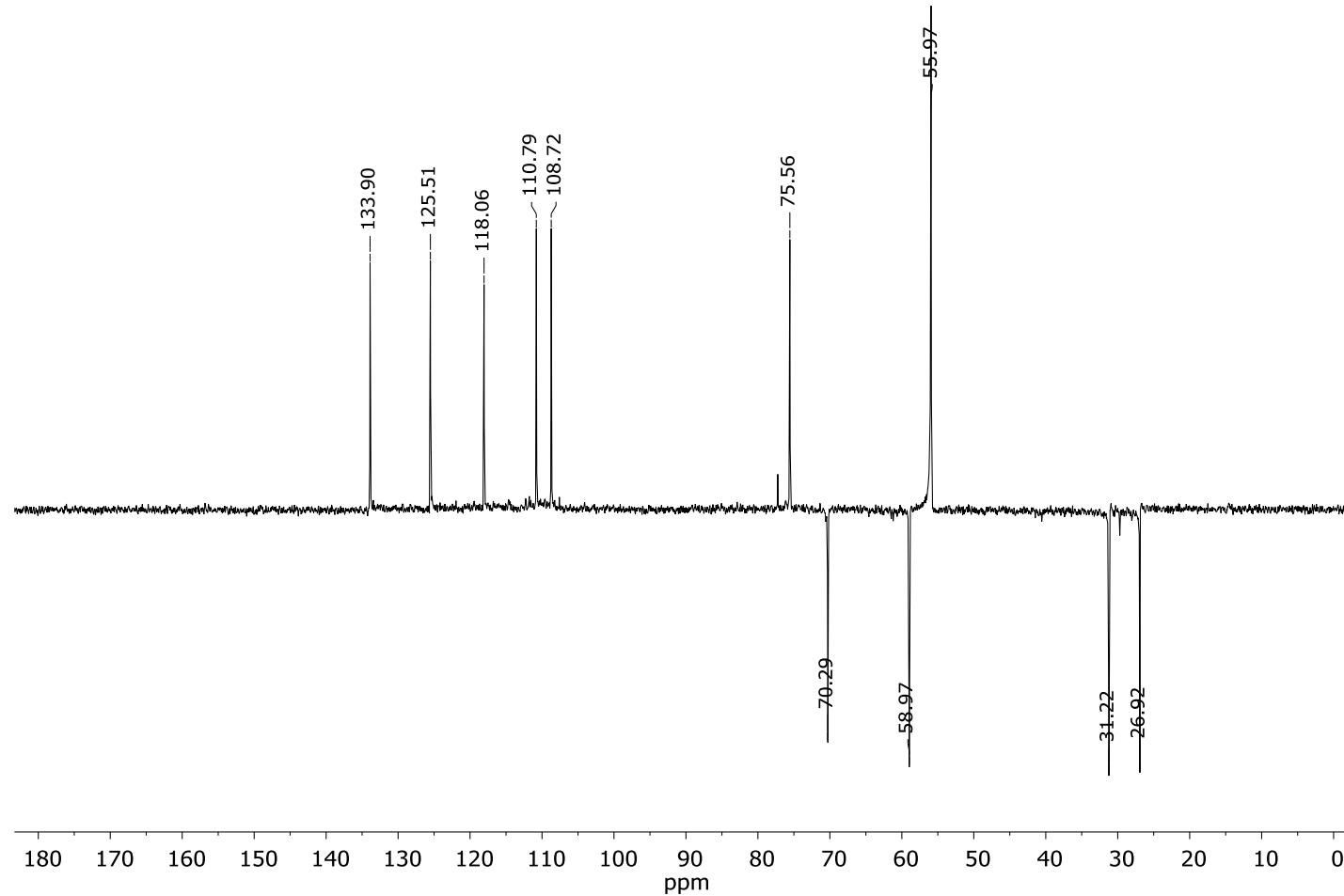
Fonte: a autora.

Figura 93 – Espectro de RMN ^{13}C do alcaloide **III** (100 MHz, CDCl_3).



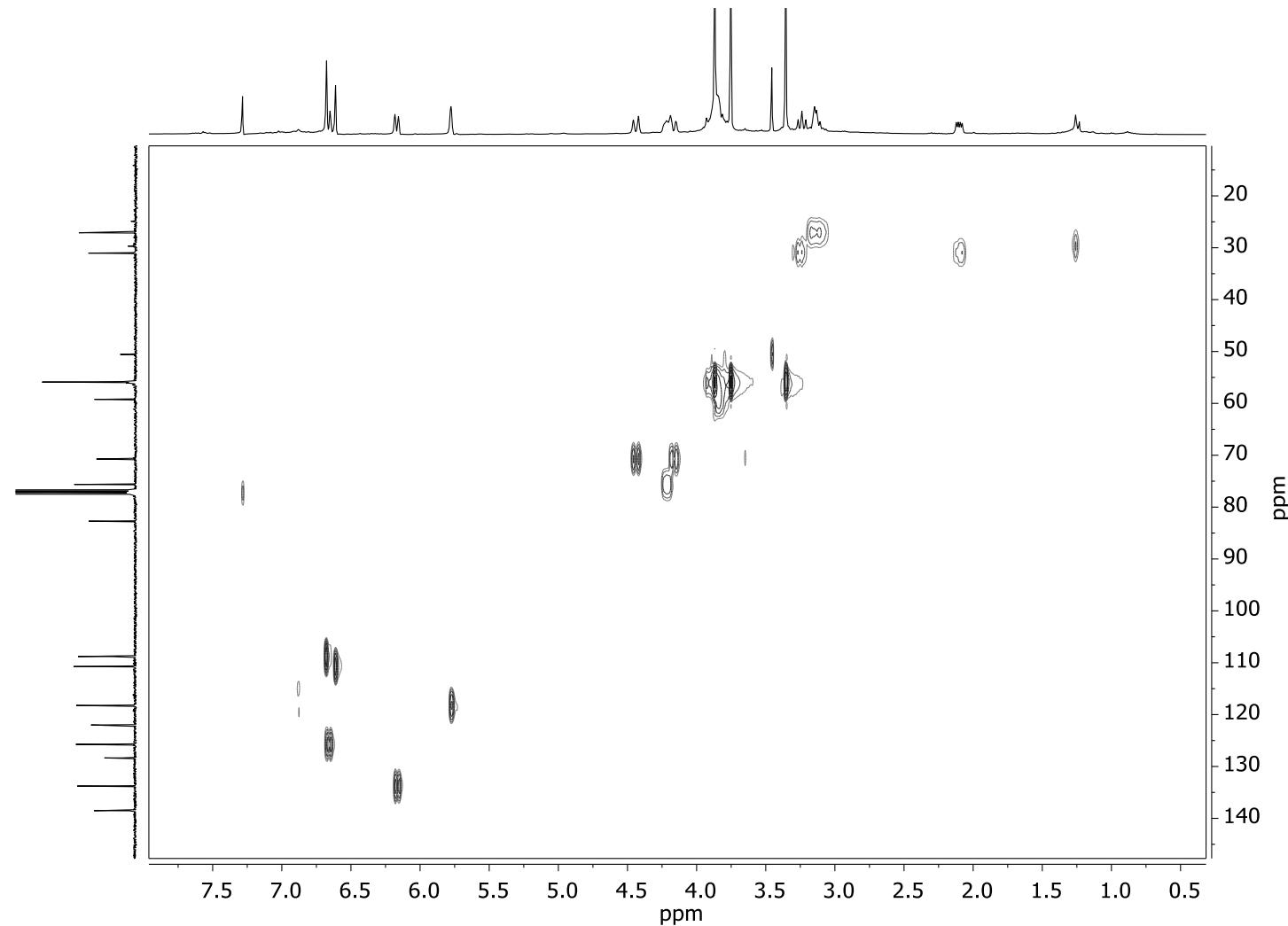
Fonte: a autora.

Figura 94 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 do alcaloide **III** (CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 95 – Mapa de contorno HSQC do alcaloide **III** (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 96 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 95 (δ 0,8–4,6).

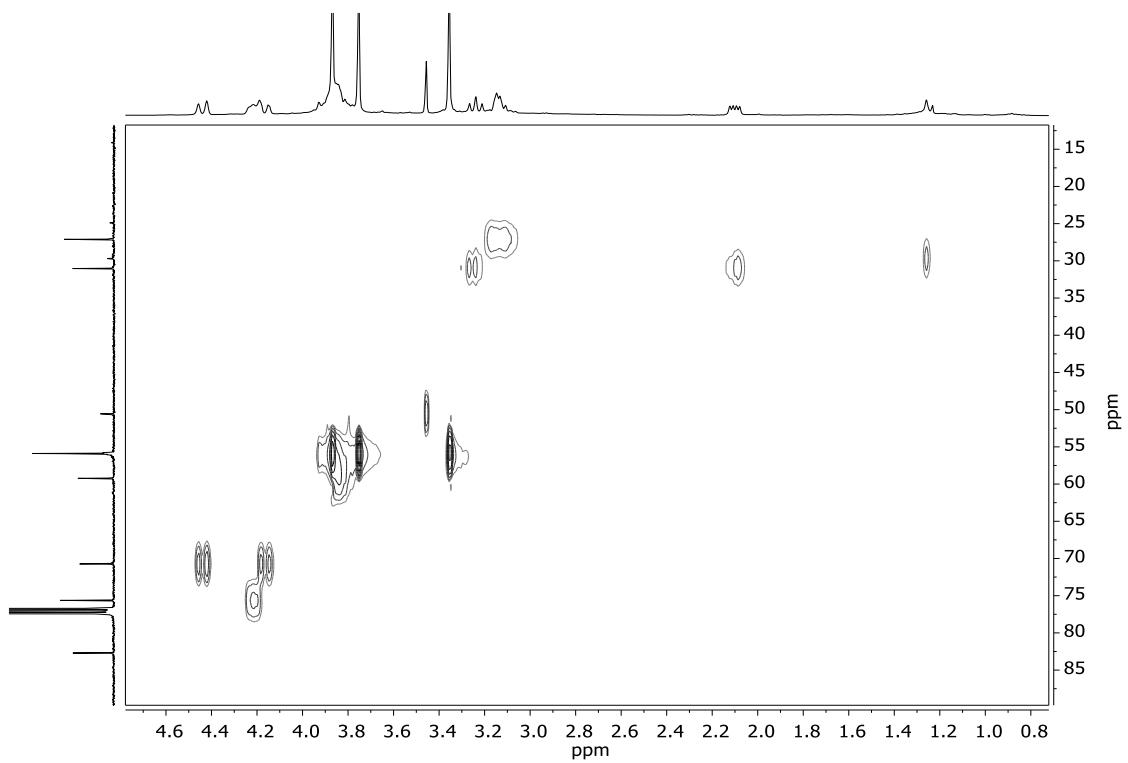


Figura 97 – Ampliação do mapa de contorno de HSQC da Figura 95 (δ 4,9–7,7).

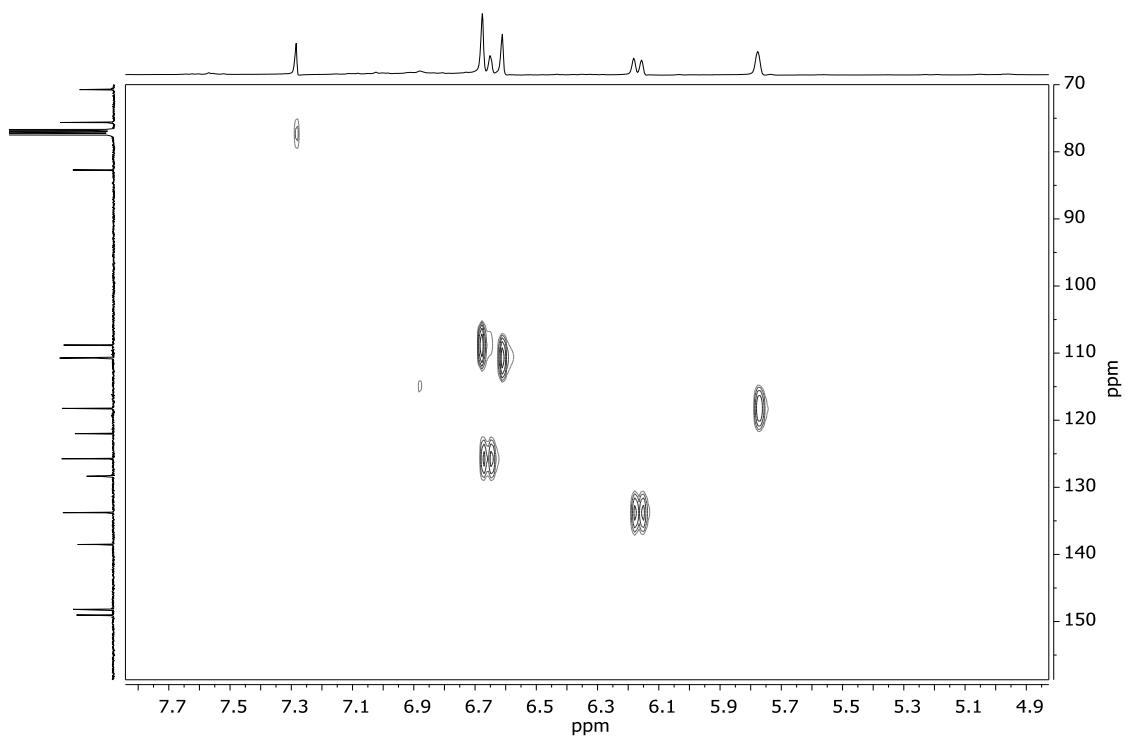
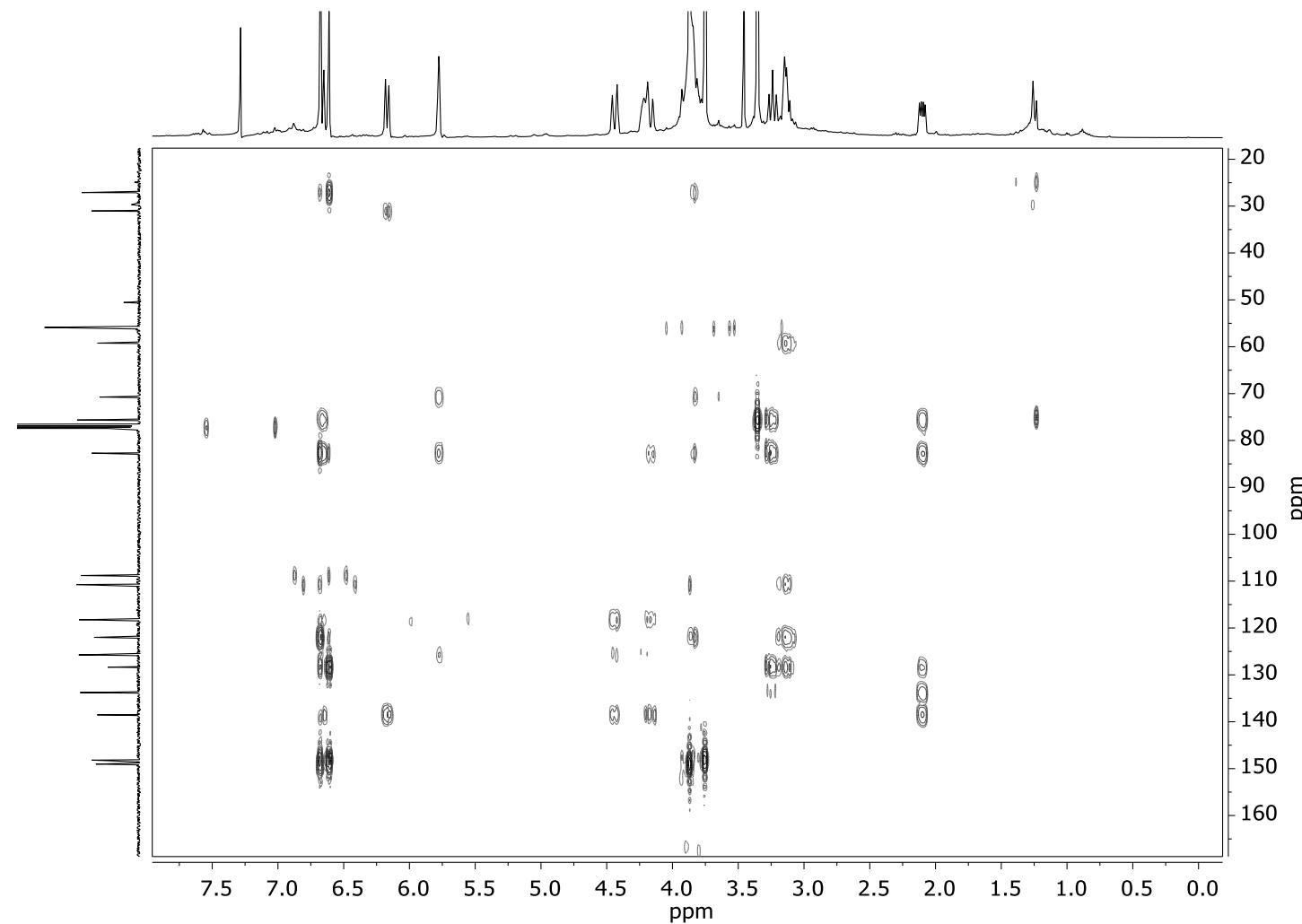


Figura 98 – Mapa de contorno HMBC do alcaloide III (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: a autora.

Figura 99 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 1,0–4,5).

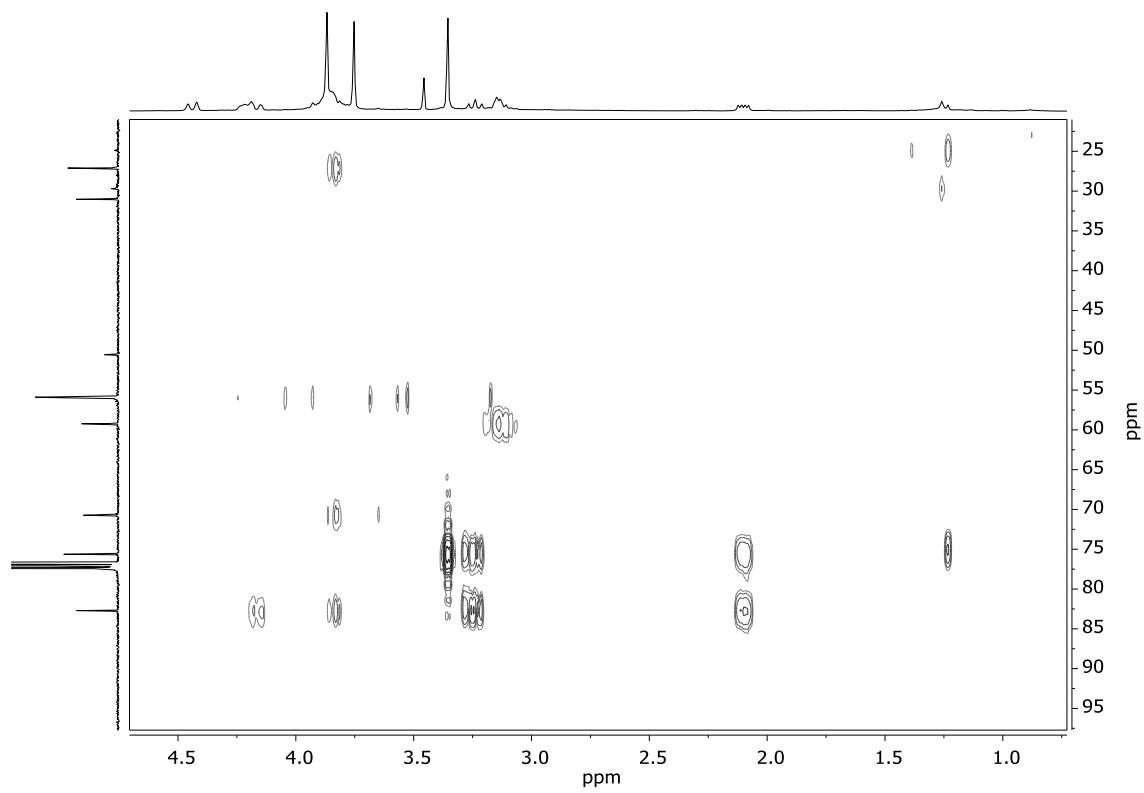


Figura 100 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 5,3–7,8).

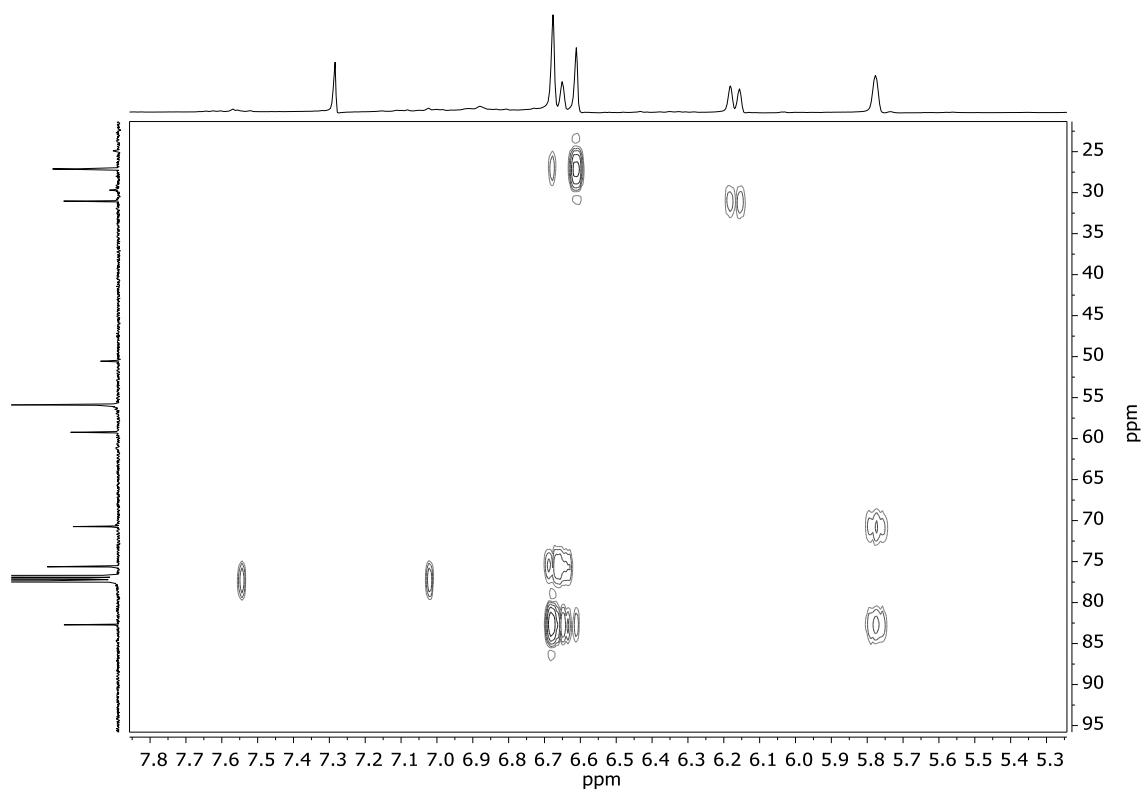


Figura 101 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 0,8–4,4).

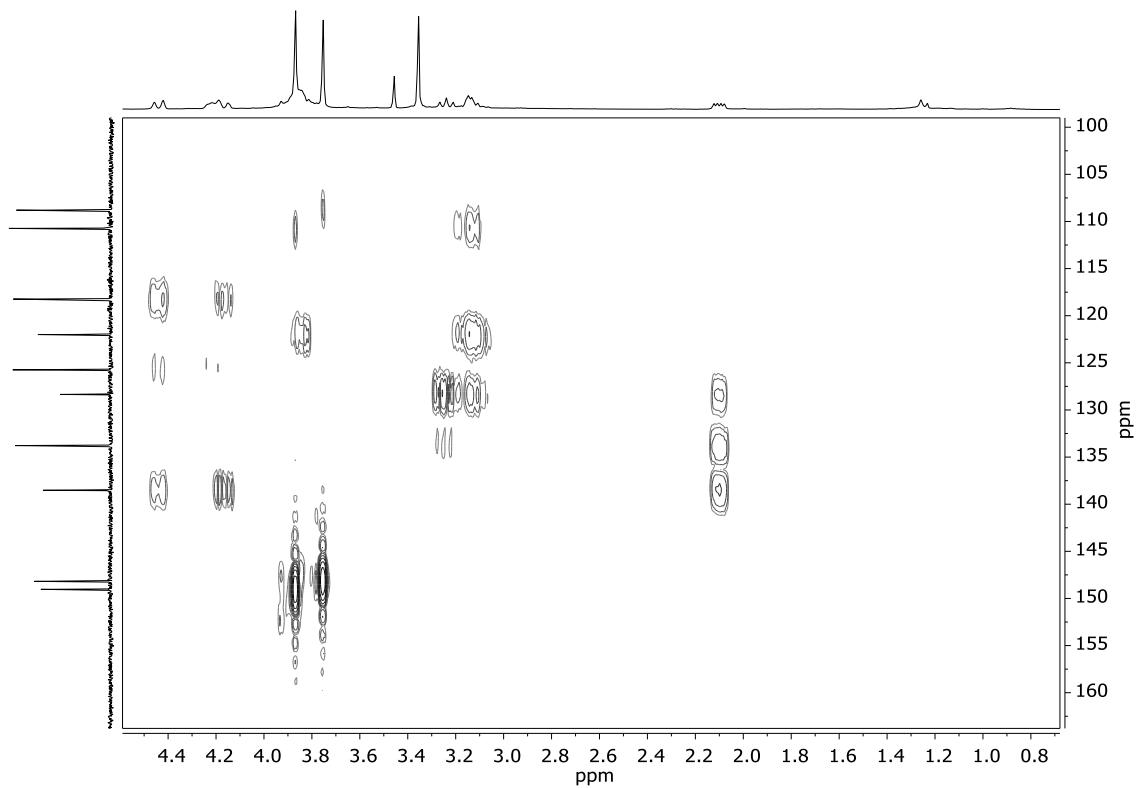


Figura 102 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC da Figura 98 (δ 5,3–7,3).

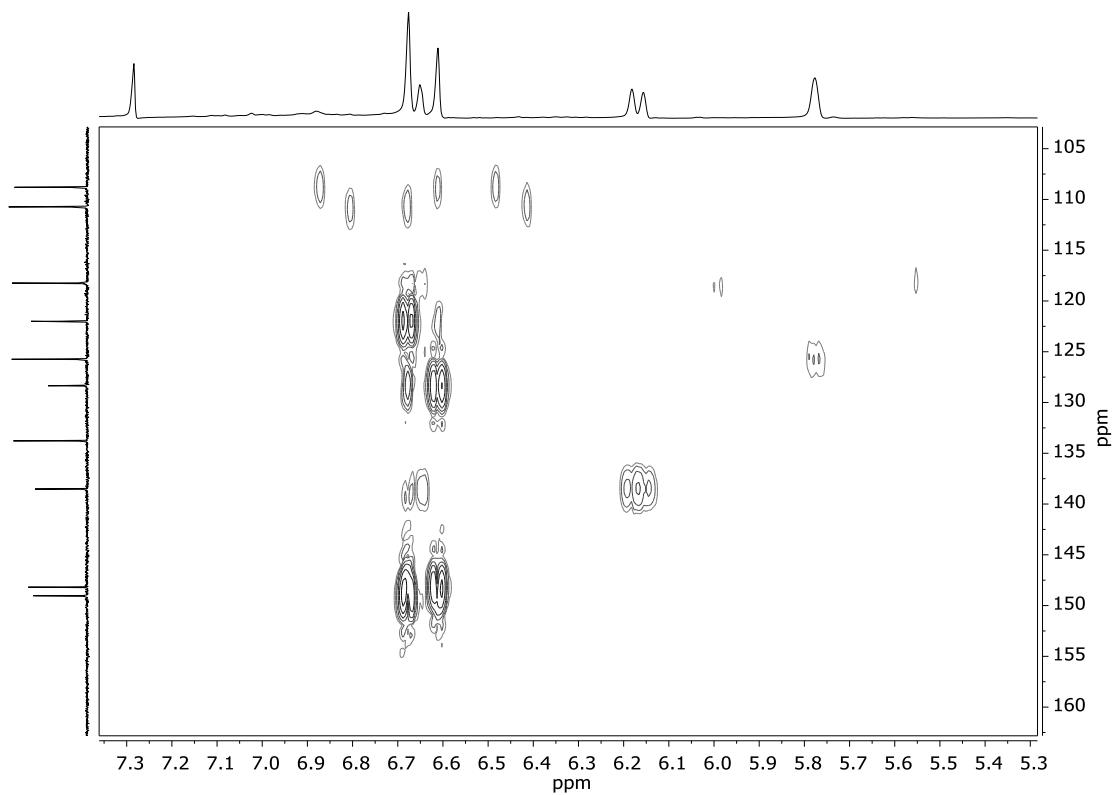
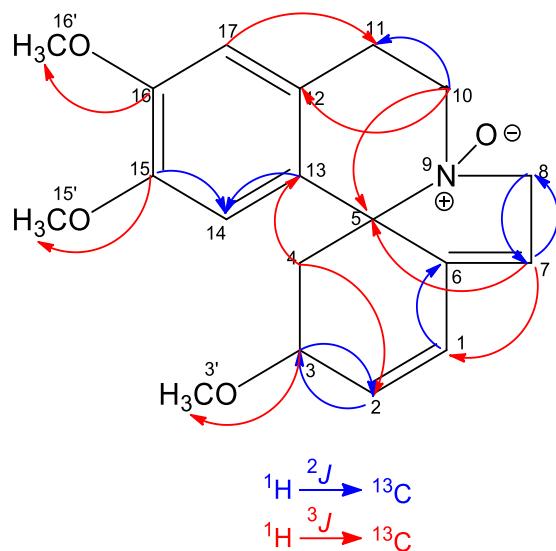


Figura 103 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC.



Fonte: a autora.

Os dados de EM e RMN foram comparados com aqueles encontrados na literatura (AMER, 1991; SARRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981) e são consistentes com a estrutura da erisotrina *N*-óxido (**III**), já isolada das flores de *E. mulungu* e *E. xbidwillii* (SARRAGIOTTO; LEITÃO FILHO; MARSAIOLI, 1981; CHAWLA et al., 1992).

5.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica apresentada por diferentes classes de alcaloides, assim como pelos eritrínicos que também são relatados por atuar na inibição de receptores nicotínicos, nos motivou para um estudo mais direcionado para essa atividade. Dessa forma, o extrato etanólico, a fração CH_2Cl_2 , a fração AcOEt alcaloídica e os alcaloides **II** e **III** foram avaliados quanto ao potencial de inibição da AChE e BChE utilizando o modelo de ensaio em microplaca (Tabela 10) (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001).

Tabela 7 – Atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, fração CH_2Cl_2 , fração AcOEt alcaloídica e alcaloides isolados.

Amostras	IC_{50}			
	AChE		BChE	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{mol/L}$
Extrato EtOH	$1049,7 \pm 9,1$	–	$836,4 \pm 35,9$	–
F. CH_2Cl_2	$857,5 \pm 51,3$	–	$634,4 \pm 10,4$	–
F. AcOEt alcaloídica	> 2000	–	> 2000	–
II	$387,4 \pm 54,3$	$1236,1 \pm 173,2$	$317,1 \pm 31,9$	$1011,8 \pm 101,7$
III	$406,7 \pm 63,4$	$1234,7 \pm 192,4$	$406,8 \pm 12,9$	$1235,0 \pm 39,1$
Galantamina ^a	$1,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,3$	$47,0 \pm 8,3$	$162,7 \pm 28,8$

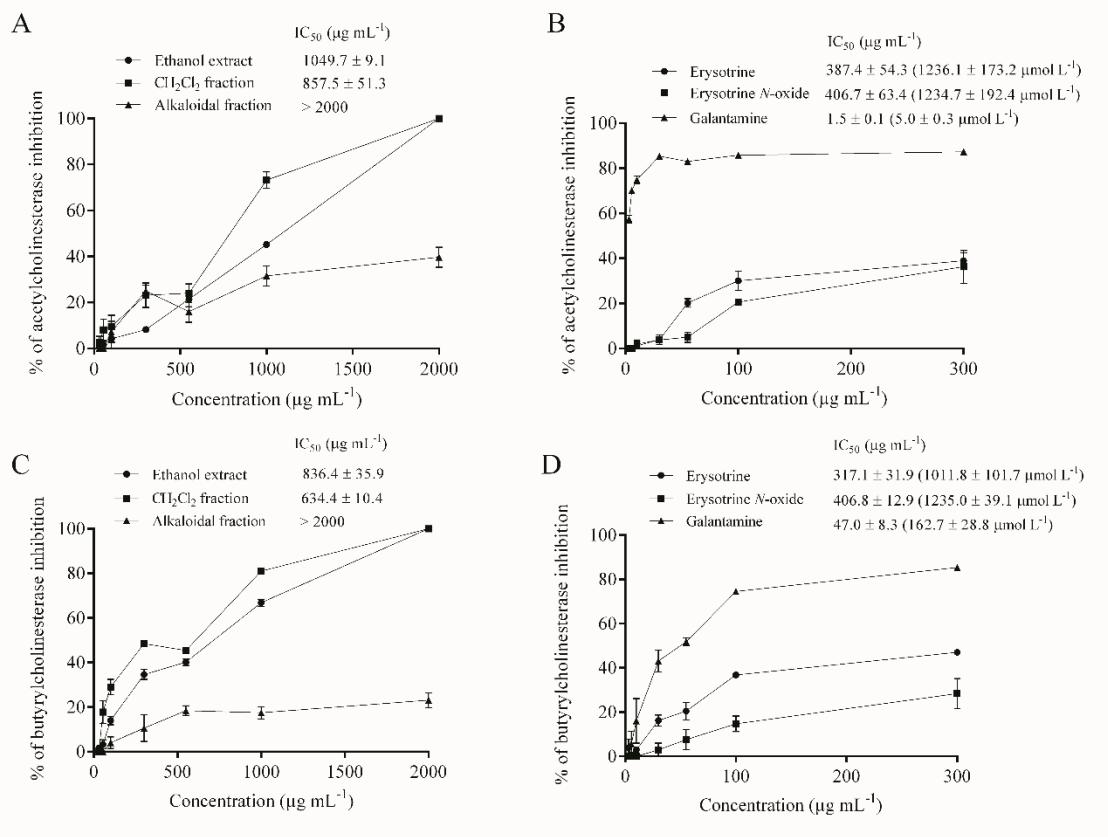
^aControle positivo.

Fonte: a autora.

O extrato etanólico e a fração CH_2Cl_2 apresentaram baixo potencial de inibição das enzimas, enquanto a fração AcOEt alcaloídica não apresentou atividade inibidora da AChE ($\text{IC}_{50} > 2000 \mu\text{mol/L}$) e BChE ($\text{IC}_{50} > 2000 \mu\text{mol/L}$) dentro do intervalo avaliado. Entretanto, é possível observar um aumento da inibição de ambas as enzimas do extrato etanólico para a fração CH_2Cl_2 , indicando que compostos potenciais inibidores da AChE e BChE podem estar presentes nessa fração. Além disso, tanto o extrato etanólico quanto a fração CH_2Cl_2 apresentaram maior seletividade para BChE (Tabela 7) (Figura 104).

Os alcaloides **II** e **III** apresentaram baixa atividade inibidora das enzimas, quando comparados com o controle positivo galantamina ($\text{IC}_{50} 162,7 \pm 28,8 \mu\text{mol/L}$), não havendo diferença significativa de IC_{50} entre os compostos. Apesar disso, foi possível observar o aumento da atividade inibitória quando os resultados da fração CH_2Cl_2 são comparados com aqueles dos compostos puros (aumento da inibição na ordem de 50% para AChE e BChE) (Tabela 7) (Figura 104).

Figura 104 – Atividade inibitória da AChE (A e B) e BChE (C e D) do extrato etanólico, fração CH_2Cl_2 , fração AcOEt alcaloídica e alcaloides **II e **III**.**



Nota: Galantamina foi usada como controle positivo.

Fonte: a autora.

6. CONCLUSÕES

As cascas da *Erythrina mulungu* são utilizadas na medicina popular para o tratamento da ansiedade, insônia e depressão. Com a difusão dos conhecimentos tradicionais, as cascas passaram a ser comercializadas em grande escala, entretanto a composição dos seus metabólitos pode variar dependendo da região de coleta, época do ano, entre outros fatores. Além disso, a maneira como os chás ou infusões são preparados pode interferir na quantidade dos princípios ativos extraídos, o que compromete a eficiência do seu uso. Nesse estudo foi possível constatar que *E. mulungu* apresenta um perfil alcaloídico diverso, cujos resultados biológicos estão relacionados ao uso tradicional.

A análise das frações obtidas na extração líquido-líquido do extrato etanólico de *E. mulungu* mostrou que os alcaloides possuem maior afinidade pelo CH₂Cl₂, solvente de polaridade intermediária, o que sugere que estes compostos também apresentam polaridade similar. Os procedimentos de CC realizados com a fração CH₂Cl₂ permitiu a separação dos alcaloides em frações semipuras, que foram submetidas a CLAE e CCDP, que levou à frações contendo os alcaloides **I** (KMC2-F₂₇₋₂₈), **II** (KMP01 e KMP02) e a mistura de **II** e **III** CLAE-*t_R* 8,1 min.).

A CLAE-EM foi uma ferramenta importante para a identificação dos compostos **I-III**. Também foi fundamental para a análise da fração KMC2-F₂₇₋₂₈ que apresentava dois compostos que coeluíam quando analisados por CLAE-DAD-*light scattering*, o que pode estar relacionado com a grande similaridade estrutural, e só apresentaram tempos de retenção diferentes na análise por CLAE-EM devido ao menor tamanho de partícula da FE.

Ao longo do processo de purificação foi possível constatar que dentre os alcaloides o composto **II** é majoritário. Esse metabólito foi caracterizado por EM-IES e EM sequência, através do estudo de fragmentação, e pela análise dos dados de IV e RMN.

A fração AcOEt alcaloídica obtida da extração ácido-base do extrato etanólico foi submetida a cromatografia em coluna, de onde foi isolado o alcaloide erisotrina *N*-óxido (**IV**) (KMC03-F₁₆₁₋₂₁₄), que foi identificada por EM-IES, IV e RMN.

As ferramentas de EM e RMN foram muito importantes para identificação e elucidação das estruturas dos alcaloides. Os compostos **II** e **III** já haviam sido isolados das flores de *E. mulungu*, sendo que **II** também foi isolado das cascas e folhas de *E. variegata* e *E. velutina*.

Relatos na literatura sobre a atividade anticolinesterásica de alcaloides eritrínicos nos direcionaram para a avaliação dos compostos **II** e **III** quanto ao potencial de inibição da AChE e BChE. Em comparação com o controle positivo galantamina os compostos apresentaram baixa atividade inibitória para ambas as enzimas. Contudo, **II** exibiu atividade ligeiramente melhor que a fração CH₂Cl₂. O extrato etanólico e a fração CH₂Cl₂ apresentaram baixo potencial de inibição das enzimas, enquanto a fração AcOEt alcaloídica não apresentou atividade inibitória dentro do intervalo avaliado.

REFERÊNCIAS

ABOURASHED, E. A.; EL-ALFY, A. T.; KHAN, I. A.; WALKER, L. *Ephedra* in perspective: a current review. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 703–712, 2003. <https://doi.org/10.1002/ptr.1337>

ADSERSEN, A.; KJØLBYE, A.; DALL, O., JAGER, A. K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n.1, p. 179–182, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.006>

AGUILAR, M. I.; GERAL, F.; ESPEJO, O. Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2061–2062, 1981. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)84079-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84079-4)

AMER, M. E. The Tetracyclic Erythrina Alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 329–363, 1991. <https://doi.org/10.1021/np50074a001>

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351148578200429/?nomeProduto=acheflan>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013a. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351192273200616/?nomeProduto=Fauldvinci>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013b. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/2599201166855/?nomeProduto=pilocarpina>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014a. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351036605200501/?nomeProduto=Tygacil>>. Acesso em: out/2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014b. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351099926201753/?nomeProduto=Camptosar>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014c. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351006801200461/?nomeProduto=VELBAN>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=3183582015&pIdAnexo=2565633>. Acesso em: out. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015b. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351097947201706/?nomeProduto=viagra>>. Acesso em: out/2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=14367452016&pIdAnexo=3212391>. Acesso em: out. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016b. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000055229319/?nomeProduto=taxol>>. Acesso em: out/2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016c. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351302547200772/?nomeProduto=tevaetopo>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016d. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000331639661/?nomeProduto=efedrin>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351569497201285/?nomeProduto=Topotacx>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018a. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000272979723>>. Acesso em: out. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018b. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000228399474/?nomeProduto=taxotere>>. Acesso em: nov. 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: abr. 2019.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9272332015&pIdAnexo=2903701>. Acesso em: jun. 2019.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019c. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351693851201871/?substancia=22177>. Acesso em: jun. 2019.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: Secrets of Life**. Amsterdam: Elsevier, 2007. 316 p.

ARAUJO, D. R.; PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com canal de sódio voltage-dependente. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1775–1783, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700032>

BARNEBY, R. C.; KRUKOFF, B. A.; RAVEN, P. H. (Orgs.). **Erythrina Symposium IV**. Erythrina (Fabaceae: Faboideae). Allertonia, v. 3, 1982, 154 p. Disponível em <www.jstor.org/stable/23189306>. Acesso em: dez. 2019.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>

BARTON, D. H. R.; BOAR, R. B.; WIDDOWSON, D. A. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XXI. The biosynthesis of the erythrina alkaloids. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 9, p. 1213–1218, 1970. <https://doi.org/10.1039/j39700001213>

BARTON, D. H. R.; JAMES, R.; KIRBY, G. W.; TURNER, D. W.; WIDDOWSON, D. A. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XVIII. The structure and biosynthesis of erythrina alkaloids. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, n. 0, p. 1529–1537, 1968. <https://doi.org/10.1039/J39680001529>

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>

BORGHI, A. A.; PALMA, M. S. A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 25–40, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000100003>

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>

BUCKINGHAM, J. (Ed.); BAGGLEY, K. H. (Ed.); ROBERTS, A. D. (Ed.); SZABÓ, L. F. (Ed.). **Dictionary of Alkaloids**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 2290 p.

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 10, p. 571–591, 2013. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.86>

CARVALHO, P. E. R. **Mulungu (Erythrina velutina)**. Circular Técnica 160. Colombo: EMBRAPA, 2008. 8 p.

CHAWLA, A. S.; SOOD, A.; KUMAR, M.; JACKSON, A. H. Alkaloid constituents from *Erythrina x bidwillii* flowers. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 372–374, 1992. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83084-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83084-X)

CONCHEIRO, M.; NEWMEYER, M. N.; COSTA, J. L.; FLEGEL, R.; GORELICK, D. A.; HUESTIS, M. A. Morphine and codeine in oral fluid after controlled poppy seed administration. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, n. 7, p. 586–591, 2014. <https://doi.org/10.1002/dta.1742>

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183–205, 2001. <https://doi.org/10.1002/ptr.890>

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B. (Ed.); GRUISSEM, W. (Ed.); JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant, 2000. p. 1250–1318.

DALL'ACQUA, S. Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. **Botanics: Targets and Therapy**, v. 3, p. 19–28, 2013. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S17297>

DAMAR, U.; GERSNER, R.; JOHNSTONE, J. T.; SCHACHTER, S.; ROTENBERG, A. Huperzine A: a promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 99, p. 57–62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.12.006>

DAVID, B.; WOLFENDER, JL.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

DECKER, M. W.; ANDERSON, D. J.; BRIONI, J. D.; DONNELLY-ROBERTS, D. L.; KANG, C. H.; O'NEIL, A. B.; PIATTONI-KAPLAN, M.; SWANSON, S.; SULLIVAN, J. P. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 79–89, 1995. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00191-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00191-M)

DEMAIN, A. L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 6, p. 821–842, 2009. <https://doi.org/10.1002/med.20154>

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 539 p.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

EICHELBAUM, M.; SPANNBRUCKER, N.; STEINCKE, B.; DENGLER, H. J. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 183–187, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00562059>

ERENO, D. Da natureza para a farmácia. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 110, p. 78–81, 2005.

FAIZI, S.; KHAN, R. A.; AZHER, S.; KHAN, S. A.; TAUSEEF, S.; AHMAD, A. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. pendula. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p. 350–355, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38883>

FARIA, L. R. Uma ilha de competência: a história do instituto de química agrícola na memória de seus cientistas. **História, Ciências e Saúde**, v. 4, n. 1, p. 51–74, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-59701997000100004>

FEITOSA, L. G. P. GUARANTINI, T.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; BIZARO, A. C.; SILVA, D. B. da. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2177–2180, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001100014>

FIORAVANTE, C. O Ataque silencioso dos fungos. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 243, p. 42–45, 2016.

FLAUSINO JUNIOR, O.; SANTOS, L. A.; VERLI, H.; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; SOUZA, R. L. N. Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 48–53, 2007a. <http://dx.doi.org/10.1021/np060254j>

FLAUSINO JUNIOR, O. A. PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; SOUZA, L. R. N. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 375–378, 2007b. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.375>

FOLKERS, K.; KONIUSZY, F. Erythrina Alkaloids III. Isolation and characterization of a new alkaloid, erythramine. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 61, n. 5, p. 1232–1235, 1939. <https://doi.org/10.1021/ja01874a065>

FOLKERS, K.; MAJOR, R. T. Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* Mill. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, n. 8, p. 1580–1581, 1937. <https://doi.org/10.1021/ja01287a509>

FOLKERS, K.; UNNA, K. Erythrina alkaloids II. A review and new data on the alkaloids of species of the genus *Erythrina*. **American Pharmaceutical Association**, v. XXVII, n. 8, p. 693–699, 1938. <https://doi.org/10.1002/jps.3080270815>

FREDERICH, M.; ANGENOT, L.; TITS, M. Indole alkaloids from *Strychnos* species and their antiplasmoidal and cytotoxic activities. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 6, p. 513–519, 2003. <https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000018100.67335.b5>

GBIF. Copenhagen: Global Biodiversity Information Facility. Disponível em <<https://www.gbif.org/species/2945830>. Acesso em: dez. 2018>.

GIACOBINI, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase. **Drugs Aging**, v. 18, n. 12, p. 891–898, 2001. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118120-00001>

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. **Revista Fitoterá**, v. 7, n. 1, p. 17–25, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GONZALEZ, M. H.; BIANCHI, S. R.; PEREIRA, C. D.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. **Scientia Chromatographica**, v.3, n. 4, p. 315–325, 2011. <https://doi.org/10.4322/sc.2011.019>

GREER, N. D. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 19, n. 2, p. 155–161, 2006. <https://doi.org/10.1080/08998280.2006.11928154>

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C.; YU, Q. S.; MAMCZARZ, J.; HOLLOWAY, H. W.; GIORDANO, T.; CHEN, D.; FURUKAWA, K.; SAMBAMURTI, K.; BROSSI, A.; LAHIRI, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 47, p. 17213–17218, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508575102>

GUARATINI, T. SILVA, D. B.; BIZARO, A. C.; SARTORI, L. R.; HUMPF, H. U.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LOPES, J. L. C. *In vitro* metabolism studies of erythraline, the major spiroalkaloid from *Erythrina Verna*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 61, n. 14, p. 1–5, 2014. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-61>

GULLAND, J. M.; ROBINSON, R. The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem. **Journal of the Chemical Society**, v. 123, p. 980–998, 1923. <https://doi.org/10.1039/CT9232300980>

HEGNAUER, R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2423–2427, 1988. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)87006-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87006-7)

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.); SCHENKEL, E. P. (Org.); GOSMANN, G. (Org.); MELLO, J. C. P. de (Org.); MENTZ, L. A. (Org.); PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 765–791.

HOUGFTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, v. 23, n. 2, p. 181-299, 2006. <https://doi.org/10.1039/b508966m>

HUSSAIN, G.; RASUL, A.; ANWAR, H.; AZIZ, N.; RAZZAQ, A.; WEI, W.; ALI, M.; LI, J.; LI, X. Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 341-357, 2018. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23247>

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, n. 10, p. 1397–1404, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.029>

KHADEN, S.; MARLES, R. J. Chromone and flavonoid alkaloids: occurrence and bioactivity. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 191–206, 2011.
<https://doi.org/10.3390/molecules17010191>

KONRATH, E. L.; PASSOS, C. S., KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701–1725, 2013.
<https://doi.org/10.1111/jphp.12090>

KROTOSZYNER, M. D. Spinal anesthesia with tropa-cocaine in genito-urinary surgery. **California State Journal of Medicine**, v. 1, n. 4, 118–121, 1903.

LEHMAN, A. J. Curare-actions of *Erythrina Americana*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 501–503, 1936. <https://doi.org/10.3181/00379727-33-8426P>

LEI, TIAN-TIAN; WANG, JIN-HUA; DU, GUAN-HUA. Galantamine. In: DU, GUAN-HUA. **Natural Small Molecule Drugs from Plants**. Singapore: Springer, 2018. p. 253–258

LIMA, M. R. F. LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 137–147, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026>

LOPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 2521–2529, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9)

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2. 352 p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. 5 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1. 384 p.

LUCIO, E. M. R. A.; SHARAPIN, N.; FRANÇA, H. S. Estudo de alcaloides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, Supl. 1, p. 130–131, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300061>

MAIER, U. H.; RÖDL, W.; DEUS-NEUMANN, B.; ZENK, M. H. Biosynthesis of erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 373–382, 1999.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00230-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00230-7)

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143–148, 2002. <https://doi.org/10.1038/nrc723>

MANSKE, R. H. F. (Ed.). **The Alkaloids**: chemistry and physiology. New York: Academic Press Inc, 1955. v, 388 p.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2002. <https://doi.org/10.1002/pca.623>

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. DE; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais:** do cultivo a terapêutica. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003. 247 p.

MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. R.; FRACETO, L. F.; DIAS FILHO, N. L.; PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100013>

MIGUEL-CHAVEZ, R. S.; SOTO-HERNANDEZ, M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; KITE, G. Alkaloid production in elicited cell suspension cultures of *Erythrina americana* Miller. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 167–173, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9045-x>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br>>. Acesso em: jan. 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971–1974, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000700048>

OLIVEIRA, M. S. G.; AQUINO, A. B.; SILVA, D. L.; AQUINO, P. G. V.; SANTOS, M. S.; PORFÍRIO, A. P. R.; SANT'ANA, A. E. G.; SANTOS, B. O. V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ARAUJO-JUNIOR, J. X. de. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 157–161, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000210>

OLIVER-BEVER, B. **Medicinal Plants in Tropical West Africa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 375 p.

ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M. S.; VIANA, M. B. 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, n. 4, p. 473–477, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000400011>

ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M. S.; FLAUSINO JUNIOR, O. A.; VIANA, M. B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 11, p. 1538–1542, 2003. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1538>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: maio 2019.

OZAWA, M. ETOH, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. TRAIL-enhancing activity of erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 234–236, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.10.111>

PATRICK, G. L. Cholinergics, anticholinergics, and anticholinesterases. In: **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2013. p. 578–608.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 733 p.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 61–72, 1989.
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90045-7)

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45–61, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>

QING-WEI, T.; JIAN-CHANG, N.; PEI-HUA, F.; QI-JIAN, C. A new erythrinan alkaloid glycoside from the seeds of *Erythrina crista-galli*. **Molecules**, v. 22, n. 9, p.1558, 2017.
<https://doi.org/10.3390/molecules22091558>

REFLORA. Rio de Janeiro: Flora do Brasil 2020 – Algas, fungos e plantas. Disponível em: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Erythrina_verna>. Acesso em: jan. 2019.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. J. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1–2, p. 217–223, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)

RIBEIRO, P.; SILVA, F. A.; SILVA, B. A.; FIGUEIRÓ, R.; SALLES, J. B. Efeitos *in vivo* de extratos de abacateiro (*Persea gratissima*) e mulungu (*Erythrina mulungu*) sobre atividades de enzimas citocromo P450 hepáticas de rato. **Acta Scientiae & Techniae**, v. 4, n. 2, 15–25, 2016. <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v4i2.140>

RODRIGUES, V. E.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais do cerrado**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001.

ROSA, D. S.; FAGION, S. A.; GAVIN, S. A.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI, R. O. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, n. 3, p. 205–212, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.01.003>

RUKACHAISIRIKUL, T.; INNOK, P.; SUKSAMRARN, A. Erythrina alkaloids and a pterocarpan from the bark of *Erythrina subumbrans*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 156–158, 2008. <https://doi.org/10.1021/np070506w>

SANTOS, E. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; MARTINS, L. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Podophyllotoxin and other aryltetralin lignans from *Eriope latifolia* and *Eriope blanchetii*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 15, p. 1450–1453, 2011. <https://doi.org/10.1080/14786410902809500>

SANTOS, M. H.; MÉGDA, J.; CRUZ, P. B. M.; MARTINS, F. T. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1747–1749, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700042>

SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 666–670, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000500023>

SANTOS, W. P.; CARVALHO, A. C. S.; ESTEVAM, C. S.; SANTANA, A. E. G.; MARÇAL, R. M. *In vitro* and *ex vivo* anticholinesterase activities of *Erythrina velutina* leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 919–924, 2012. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.649429>

SARRAGIOTTO, M. H.; LEITÃO FILHO, H.; MARSAIOLI, A. J. Erysotrine-*N*-oxide and erythrartine-*N*-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Canadian Journal Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 2771–2775, 1981. <https://doi.org/10.1139/v81-400>

SCHLEIER, R.; QUIRINO, C. S.; RAHME, S. *Erythrina mulungu* – descrição botânica e indicações clínicas a partir da antroposofia. **Arte Médica Ampliada**, v. 36, n. 4, p. 162–167, 2016.

SERRANO, M. A. R.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, P. J. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; LATIF, A.; ARFAN, M. Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. **Química Nova**, v. 34, n. 5, 808–811, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000500015>

SETTI-PERDIGÃO, P.; BATISTA, A. N. L.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, P. J. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; LATIF, A.; ARFAN, M. *Erythrina mulungu* alkaloids are potent inhibitors of neuronal nicotinic receptor currents in mammalian cells. **Plos One**, v. 8, n. 12, e82726, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082726>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: Wiley, 2005. 512 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia**. 8. ed. 2016. p. 138. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/img/pockets/POCKETBOOK_2016_interativa.pdf>. Acesso em: jan. 2019.

SOTO-HERNANDEZ, M.; JACKSON, A. H. Erythrina alkaloids: isolation and characterisation of alkaloids from seven *Erythrina* species. **Nature**, v. 60, n. 2, p. 175–177, 1993. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959445>

TANAKA, H.; HATTORI, H.; TANAKA, T.; SAKAI, E.; TANAKA, N.; KULKARNI, A.; ETOH, H. Erythrinan alkaloids and isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*. **Planta Medica**, v. 67, n. 9, p. 871–873, 2001. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18852>

TOUCHSTONE, J. C.; DOBBINS, M. F. Practice of thin layer chromatography. New York: John Wiley, 1978, p. 161–223.

URANO, R. P. M.; RODRIGUES, F. T.; BERLINCK, R. G. S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para análise de produtos naturais. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1198–1208, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000600025>

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278–2287, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001100036>

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361–372, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400018>

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 66–72, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-60832010000200007>

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655–660, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400021>

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. J. R. Natural products as a source of Alzheimers's drug leads. **Natural Products Reports**, v. 28, n. 1, p. 48–77, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0np00027b>

WRIGHT, C. W. Plant derived antimalarial agents: new leads and challenges. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 1, p. 55-61, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-3261-7>

WRIGHT, C. W.; ADDAE-KYEREME, J.; BREEN, A. G.; BROWN, J. E.; COX, M. F.; CROFT, S. L.; GÖKÇEK, Y.; KENDRICK, H.; PHILLIPS, R. M.; POLLET, P. L. Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 19, p. 3187–3194, 2001.
<https://doi.org/10.1021/jm010929+>

ZHANEL, G. Z.; WALKTY, A. J.; KARLOWSKY, J. A. Fidaxomicin: a novel agent for the treatment of *Clostridium difficile* infection. **Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 26, n. 6, 305–312, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/934594>