



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**DANIEL SILVA DE SANTANA**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Erythroxylum*  
*plowmanii* Amaral (ERYTHROXYLACEAE)**

**JEQUIÉ-BA**  
**DEZEMBRO/2020**

**DANIEL SILVA DE SANTANA**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Erythroxylum plowmanii* Amaral (ERYTHROXYLACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> D.ra Vanderlúcia Fonseca de Paula

**JEQUIÉ-BA  
DEZEMBRO DE 2020**

S232e Santana, Daniel Silva de.

Estudo químico e atividade leishmanicida de erythroxyllum plowmanii  
Amaral (erythroxyllaceae) / Daniel Silva de Santana. - Jequié, 2021.  
84f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da  
Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula)

1.Alcaloides tropânicos 2.Atividade leishmanicida 3.Erythroxyllum  
Plowmanii 4.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

## TERMO DE APROVAÇÃO

### DANIEL SILVA DE SANTANA

Estudo Químico e Atividade Leishmanicida de *Erythroxylum  
plowmanii* Amaral (Erythroxylaceae)

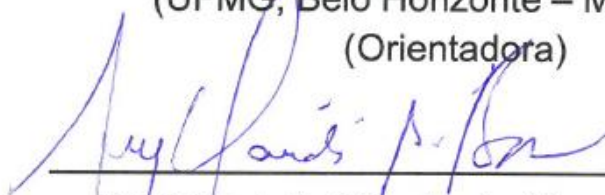
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Química.

#### COMISSÃO EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Vanderlucia Fonseca de Paula  
(UFMG, Belo Horizonte – MG, 1999)  
(Orientadora)



---

Prof. Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa  
(University of Reading, Grã-Bretanha, 1991)



---

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira  
(UFBA, Salvador - BA, 2014)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação  
em Química em 30 / 12 / 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer aos meus pais e irmãs(ãos) por tudo que fizeram para eu estar aqui hoje. Aos meus amigos, por sempre me apoiarem. Aos meus professores, pelos diversos ensinamentos, tanto profissional quanto pessoal. À UESB, aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, por financiar todas as pesquisas nas quais eu participei. À minha orientadora, a Prof.<sup>a</sup> D.ra Vanderlúcia Fonseca de Paula, por todas as oportunidades que tem me dado durante essa estadia desde a graduação. Ao colega de laboratório, o Prof. M.e Lauro José Caires da Silva Júnior, por ter contribuído enormemente na pesquisa, meu muito obrigado. Agradecer ainda ao Prof. M.e Hion Oliveira, por ter cedido seu tempo para ajudar nas análises. Agradecer aos demais colegas de laboratório, pela troca de conhecimento e experiência. Também aos profissionais da Fiocruz-BH, pelo teste de atividade biológica, pelos profissionais da UNESP e UFSCar, pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Enfim, agradecer a todos que contribuíram por esse momento.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição territorial do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	14
<b>Figura 2:</b> Distribuição territorial da espécie <i>E. plowmanii</i> .....	15
<b>Figura 3:</b> Estrutura da cocaína.....	16
<b>Figura 4:</b> Alguns alcaloides isolados de espécies de <i>Erythroxylum</i> .....	18
<b>Figura 5:</b> Estruturas das principais agliconas isoladas de espécies de <i>Erythroxylum</i> .....	19
<b>Figura 6:</b> Esquema do fracionamento por coluna filtrante do EEFEp.....	27
<b>Figura 7:</b> Esquema da obtenção das frações totais de alcaloides do EEFEp.....	28
<b>Figura 8:</b> Reação ácido-base entre o anel tropano e o HCl.....	28
<b>Figura 9:</b> Espectro no infravermelho (ATR) da <b>FEp1</b> .....	33
<b>Figura 10:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, em piridina-D <sub>5</sub> ) da <b>FEp1</b> .....	34
<b>Figura 11:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (150 MHz, em piridina-D <sub>5</sub> ) da <b>FEp1</b> .....	35
<b>Figura 12:</b> Estrutura do β-sitosterol glicosilado.....	36
<b>Figura 13:</b> Espectro no infravermelho (ATR) da <b>FEp2</b> .....	38
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) da <b>FEp2</b> .....	39
<b>Figura 15:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (150 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) da <b>FEp2</b> .....	40
<b>Figura 16:</b> Estrutura do 2-acetamidobenzoato de metila.....	41
<b>Figura 17:</b> Mapa de contornos HSQC obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila.....	41
<b>Figura 18:</b> Mapa de contornos HMBC obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila.....	42
<b>Figura 19:</b> Espectro de massas obtido por IE obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila.....	42
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) da <b>FEp3</b> .....	45
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, em CDCl <sub>3</sub> + gota de CD <sub>3</sub> OD) da <b>FEp3</b> .....	46
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (150 MHz em CDCl <sub>3</sub> ) da <b>FEp3</b> .....	47
<b>Figura 23:</b> Estrutura do 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-diidroxitropano.....	48
<b>Figura 24:</b> Mapa de contornos COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H obtido com gota de CD <sub>3</sub> OD para o 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-diidroxitropano.....	48
<b>Figura 25:</b> Mapa de contornos HMBC obtido para o 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-diidroxitropano.....	49
<b>Figura 26:</b> Mapa de contornos HSQC e as correlações diretas entre <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C obtido para o 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-diidroxitropano.....	50

<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) da <b>FEp4</b> .....	53
<b>Figura 28:</b> Expansão da região de hidrogênios em anel aromático do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <b>FEp4</b> .....	54
<b>Figura 29:</b> Expansão da região de hidrogênios alifáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <b>FEp4</b> .....	55
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) da <b>FEp4</b> .....	56
<b>Figura 31:</b> Estrutura do $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	57
<b>Figura 32:</b> Mapa de contornos HMBC obtido para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano, mostrando importantes correlações para H-3.....	57
<b>Figura 33:</b> Mapa de contornos HSQC obtido para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano, mostrando expansões com as correlações dos grupos substituintes (a) e para o anel tropânico (b).....	58
<b>Figura 34:</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano, mostrando a expansão com as correlações dos grupos 2-aminobenzoiloxi (a) e 2-acetamidobenzoiloxi (b).....	59
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de alcaloides tropânicos presentes em <b>FEp5</b> .....	63
<b>Figura 36:</b> Comparação entre os sinais de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de alcaloides tropânicos presentes em <b>FEp5</b> e do alcaloide de <b>FEp4</b> .....	64
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de alcaloides tropânicos presentes na <b>FEp5</b> .....	65
<b>Figura 38:</b> Estruturas dos alcaloides presentes na mistura <b>FEp5</b> .....	67
<b>Figura 39:</b> Mapa de contornos HMBC, mostrando as principais correlações para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	68
<b>Figura 40:</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região hidrogênios em anel aromático, para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	69
<b>Figura 41:</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região de hidrogênios do anel tropânico, para o $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	70
<b>Figura 42:</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região dos hidrogênios aromáticos para o $3\alpha,6\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	71
<b>Figura 43:</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região de hidrogênios do anel tropânico para o $3\alpha,6\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.....	72

**Figura 44:** Mapa de contornos HMBC com as principais correlações para o 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.....73



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alguns estudos sobre as atividades biológicas para espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> .....	22
<b>Tabela 2:</b> Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C da <b>FEp1</b> com os descritos na literatura.....	32
<b>Tabela 3:</b> Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da <b>FEp2</b> com os descritos na literatura.....	37
<b>Tabela 4:</b> Dados das análises de RMN 1D e 2D para a <b>FEp3</b> .....	50
<b>Tabela 5:</b> Dados das análises de RMN 1D e 2D para a <b>FEp4</b> .....	60
<b>Tabela 6:</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da mistura de alcaloides tropânicos de <b>FEp5</b> ...	66
<b>Tabela 7:</b> Resultado da avaliação de atividade leishmanicida de extratos de <i>Erythroxylum plowmanii</i> .....	74

## RESUMO

### ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Erythroxyllum plowmanii* Amaral (ERYTHROXYLACEAE)

**Autor:** Daniel Silva de Santana

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> D.ra Vanderlúcia Fonseca de Paula

*Erythroxyllum plowmanii* Amaral é uma espécie da família Erythroxyllaceae, endêmica do Brasil. Espécies do gênero *Erythroxyllum* geralmente são produtoras de alcaloides tropânicos, além de terpenos e flavonoides. No presente trabalho, foi realizado o estudo químico do extrato etanólico das folhas de *E. plowmanii* e a avaliação da atividade leishmanicida de extratos das folhas, galhos e caule. Por meio de técnicas clássicas de isolamento, tais como cromatografia, e de análise de dados espectrais (Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e Espectrometria de Massas), cinco substâncias foram isoladas e identificadas:  $\beta$ -sitosterol glicosilado; 2-acetamidobenzoato de metila; e três alcaloides tropânicos inéditos, 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -diidroxitropano, 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano e 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano. As leishmanioses caracterizam-se por doenças tropicais infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários de diversas espécies do gênero *Leishmania* sp., que são transmitidos pela picada de insetos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, que se infectam ao picar animais silvestres e domésticos. Os extratos etanólicos das folhas, dos galhos e do caule foram submetidos à avaliação da atividade leishmanicida. Os resultados foram expressos em porcentagem da inibição do crescimento das formas amastigotas em relação aos controles sem amostra. Para este ensaio, foram consideradas ativas as amostras com porcentagem de inibição acima de 70%, na concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dentre os extratos que tiveram seu potencial leishmanicida avaliado, o extrato etanólico das folhas apresentou o melhor resultado, apresentando 84% de atividade inibitória, demonstrando ser uma promissora fonte de compostos bioativos, que podem ser usados no combate às leishmanioses. Portanto, estudos futuros deverão ser realizados com as substâncias isoladas do extrato das folhas para avaliar suas respectivas atividades leishmanicida, bem como, outras atividades biológicas dessas substâncias.

**Palavras chaves:** Alcaloides tropânicos. Atividade leishmanicida. *Erythroxyllum plowmanii*.

## ABSTRACT

### CHEMICAL STUDY AND LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF *Erythroxylum plowmanii* Amaral (ERYTHROXYLACEAE)

Author: Daniel Silva de Santana

Advisor: Prof.<sup>a</sup> D.ra Vanderlúcia Fonseca de Paula

*Erythroxylum plowmanii* Amaral is a species of the family Erythroxylaceae, endemic to Brazil. Species of the genus *Erythroxylum* are generally producers of tropane alkaloids, in addition to terpenes and flavonoids. In the present study, the chemical study of the ethanolic extract of the leaves of *E. plowmanii* and the evaluation of the leishmanicidal activity of extracts of the leaves, branches and stem were carried out. By classical isolation techniques, such as chromatography, and analysis of spectral data (Infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry), five substances were isolated and identified: glycosylated  $\beta$ -sitosterol; methyl 2-acetamidobenzoate; and three new tropane alkaloids, 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoyloxy)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxytropane, 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoyloxy)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoyloxy)-7 $\beta$ -hydroxytropane and 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoyloxy)-7 $\beta$ -hydroxytropane. Leishmaniasis are characterized by infectious, non-contagious tropical diseases, caused by protozoa of different species of the genus *Leishmania* sp., which are transmitted by the bite of female insects of the genus *Lutzomyia*, which become infected when biting wild and domestic animals. The ethanolic extracts of leaves, branches and stem were submitted to the evaluation of leishmanicidal activity. The results were expressed as a percentage of growth inhibition of amastigote forms relative to controls without a sample. For this assay, samples with an inhibition percentage above 70%, at a concentration of 200  $\mu$ g/mL, were considered active. Among the extracts evaluated about their leishmanicidal potential, the ethanolic extract of the leaves showed the best result, showing 84% of inhibitory activity, demonstrating to be a promising source of bioactive compounds that can be used to fight leishmaniasis. Therefore, future studies should be carried out with the isolated substances from the leaf extract to evaluate their respective leishmanicidal activities, as well as, other biological activities of these substances.

**Key words:** Tropane alkaloids. Leishmanicidal activity. *Erythroxylum plowmanii*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	A família Erythroxylaceae .....	14
2.2	O gênero <i>Erythroxylum</i> P. Browne.....	14
2.3	<i>Erythroxylum plowmanii</i> Amaral.....	15
2.4	Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas de espécies de <i>Erythroxylum</i> . 16	
2.4.1	Alcaloides tropânicos.....	16
2.4.2	Flavonoides .....	18
2.4.3	Terpenos .....	19
2.5	Considerações sobre Leishmanioses .....	20
3	OBJETIVOS .....	25
3.1	Objetivo Geral.....	25
3.2	Objetivos Específicos.....	25
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	26
4.1	Materiais e reagentes .....	26
4.2	Equipamentos.....	26
4.3	Material vegetal e preparo dos extratos .....	26
4.3.1	Fracionamentos do extrato .....	27
4.3.2	Isolamentos dos constituintes.....	28
4.3.3	Avaliação da atividade leishmanicida.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1	Identificação da substância FE <sub>p</sub> 1: β-sitosterol glicosilado.....	31
5.2	Identificação da substância FE <sub>p</sub> 2: 2-acetamidobenzoato de metila .....	36
5.3	Identificação da substância FE <sub>p</sub> 3: 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-diidroxitropano .....	42
5.4	Identificação da substância FE <sub>p</sub> 4: 6β-(2-acetamidobenzoiloxi)-3α-(2-aminobenzoiloxi)-7β-hidroxitropano.....	51
5.5	Identificação da mistura FE <sub>p</sub> 5: 6β-(2-acetamidobenzoiloxi)-3α-(2-aminobenzoiloxi)-7β-hidroxitropano e 3α,6β-bis(2-aminobenzoiloxi)-7β-hidroxitropano.....	61
5.6	Avaliação da atividade Leishmanicida .....	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
7	REFERÊNCIAS .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela humanidade não é algo recente, sabe-se que, desde a antiguidade, essas plantas são utilizadas no tratamento de diversas doenças que afligem a população (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrou que mais de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais, ou preparações dessas, como alternativa aos tratamentos da medicina moderna, sendo que a própria OMS incentiva sua utilização, pois, além de se tratar de uma prática tradicional, traz benefícios para quem as utiliza (SALVAGNINI *et al.*, 2008).

O uso de plantas medicinais favorece, não somente a melhoria de vida das pessoas, como também direcionam as pesquisas relacionadas ao isolamento e identificação de substâncias que possuem atividade biológica, comprovando que a planta possui, de fato, determinadas propriedades terapêuticas (LIMA *et al.*, 2014). Os compostos biologicamente ativos, identificados a partir dessas plantas, norteiam as pesquisas que visam a produção de fármacos ou produtos utilizados na formulação de medicamentos, bem como os elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, conhecidos como fitoterápicos (SCHENKEL *et al.*, 2007). Esses princípios ativos podem pertencer a classes de compostos, tais como os terpenoides, compostos fenólicos, alcaloides dentre outros.

Por possuir uma grande variedade de vegetação e de plantas nativas ainda não estudadas, tanto do ponto de vista químico quanto biológico, o Brasil acaba se tornando um grande potencial biológico a ser explorado (PINTO *et al.*, 2002).

O gênero *Erythroxylum* possui um grande potencial farmacológico das substâncias isoladas de suas espécies, entretanto, há a ocorrência de espécies ainda não devidamente exploradas, tanto do ponto de vista químico quanto do ponto de vista farmacológico. Assim, reconhecendo a importância do gênero, no presente trabalho a espécie *E. plowmanii* foi estudada, cuja constituição química e aspectos farmacológicos não são conhecidos, o que poderá conduzir a descoberta de novas substâncias bioativas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae Kunth pertence ao grupo das Angiospermas, abrangendo quatro gêneros: *Erythroxylum* P. Browne (descrito em 1756), *Aneulophus* Benth (descrito em 1862), *Nectaropetalum* Engl. (descrito em 1902) e *Pinacopodium* Exell & Mendonça (descrito em 1951), sendo que apenas o gênero *Erythroxylum* P. Browne é amplamente distribuído em toda região tropical, enquanto os demais se encontram restritos ao continente africano (COSTA-LIMA *et al.*, 2014). As plantas pertencentes a essa família podem ser encontradas como árvores, arbustos ou subarbustos (SOUZA e LORENZI, 2008).

### 2.2 O gênero *Erythroxylum* P. Browne

O gênero *Erythroxylum* possui distribuição subtropical, pantropical e neotropical, sendo Venezuela, Brasil e Madagascar os maiores centros de diversidade e endemismo do gênero (DALY, 2004; BARBOSA *et al.*, 2014). O Brasil possui cerca de 127 espécies nativas catalogadas, sendo 83 endêmicas, com distribuição em todo território brasileiro (LOIOLA e COSTA-LIMA, 2015a) (Fig. 1).



**Figura 1:** Distribuição territorial do gênero *Erythroxylum*.  
**Fonte:** <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB111>.

Loiola e Cordeiro (2018, p. 202), descrevem as espécies do gênero da seguinte forma:

[...] hábito variando de subarbustos a árvores de pequeno a médio porte (3-10 m de altura), catafilos geralmente semelhantes às estípulas; folhas sempre alternas e inteiras, com estípulas intrapeciolares, estriadonervadas ou não, frequentemente 2 a 3-setulosas no ápice; inflorescências constituídas por uma a várias flores, em geral menores que um

cm, actinomorfas, diclamídeas, pentâmeras, hermafroditas e heterostílicas; estames dez, com os filetes concrecidos na base formando um pequeno tubo; ovário súpero, tricarpelar, com três lóculos (dos quais dois são vazios e o terceiro aloja um único óvulo) e fruto do tipo drupa.

Dentre os diversos autores que descreveram o gênero, Plowman é um dos que mais se destacam. Descreveu novas espécies de *Erythroxylum* para o Brasil e Venezuela, em 1983; em 1984 identificou novas espécies na Amazônia Brasileira; descreveu novas espécies para o Nordeste, em 1986; e no ano seguinte propôs dez novas espécies para o estado da Bahia (LOIOLA e CORDEIRO, 2018). Os autores destacam também Amaral Jr., Loiola e Costa-Lima como contribuintes importantes no conhecimento taxonômico das espécies de *Erythroxylum*.

Muitas espécies têm sido utilizadas na medicina popular para diversos fins terapêuticos: diurético; tônico; estimulante; antidiarreico, tratamento de asma; contra parasitas intestinais; febre, amenorreia; sangramento; distúrbio renal; influenza; sinusite; problemas estomacais; combater a fadiga e fome, dentre outros (RIBEIRO *et al.*, 2013a).

### 2.3 *Erythroxylum plowmanii* Amaral

A espécie *Erythroxylum plowmanii* Amaral é uma árvore terrícola, podendo atingir até 12 m de altura, sendo endêmica do Brasil, ocorrendo apenas nos estados da Bahia e Espírito Santo, sendo a Mata Atlântica seu principal domínio fitogeográfico (LOIOLA e COSTA-LIMA, 2015b) (Fig. 2).



**Figura 2:** Distribuição territorial da espécie *E. plowmanii*.  
**Fonte:** [http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Erythroxylum\\_plowmanii](http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Erythroxylum_plowmanii).

Pesquisas na literatura, em bases de dados como o Web of Science e SciFinder Web, revelaram que não há estudos fitoquímicos ou de avaliação de atividades farmacológicas para essa espécie.

## 2.4 Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas de espécies de *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum* é bastante conhecido pela produção de alcaloides tropânicos, além de terpenos e flavonoides (EL-IMAN *et al.*, 1985; BOHM *et al.*, 1988; ANSELL *et al.*, 1993; ZUANAZZI *et al.*, 2001). Diversas atividades biológicas são relatadas para espécies desse gênero. Na Tab. 1 (p. 22) são demonstradas algumas.

### 2.4.1 Alcaloides tropânicos

O gênero é bastante conhecido pela produção de alcaloides tropânicos, sendo também relatado a presença de alcaloides piridínicos e pirrolidínicos (EL-IMAN *et al.*, 1985; BOHM *et al.*, 1988; ANSELL *et al.*, 1993; ZUANAZZI *et al.*, 2001; GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006). A cocaína (Fig. 3) é o principal alcaloide tropânico, até então, descrito para o gênero, e foi isolada pela primeira vez em 1860 por Albert Nieman, que estudava as folhas de *E. coca* var. *coca* (BIONDCHI e JOSLIN, 2016). Esse alcaloide é encontrado principalmente nas folhas das variedades das espécies de *E. coca* e *E. novogranatense*, sendo um importante anestésico local. Mas devido à sua propriedade psicoativa no sistema nervoso central, a cocaína passou a ter uso recreativo, se tornando um problema de saúde pública (ZUANAZZI *et al.*, 2001; BIONDCHI e JOSLIN, 2016; BARROS *et al.*, 2017). Segundo Oliveira *et al.*, 2010, a cocaína também foi relatada em outras espécies do gênero.

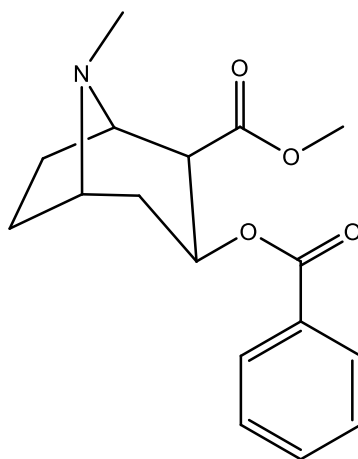
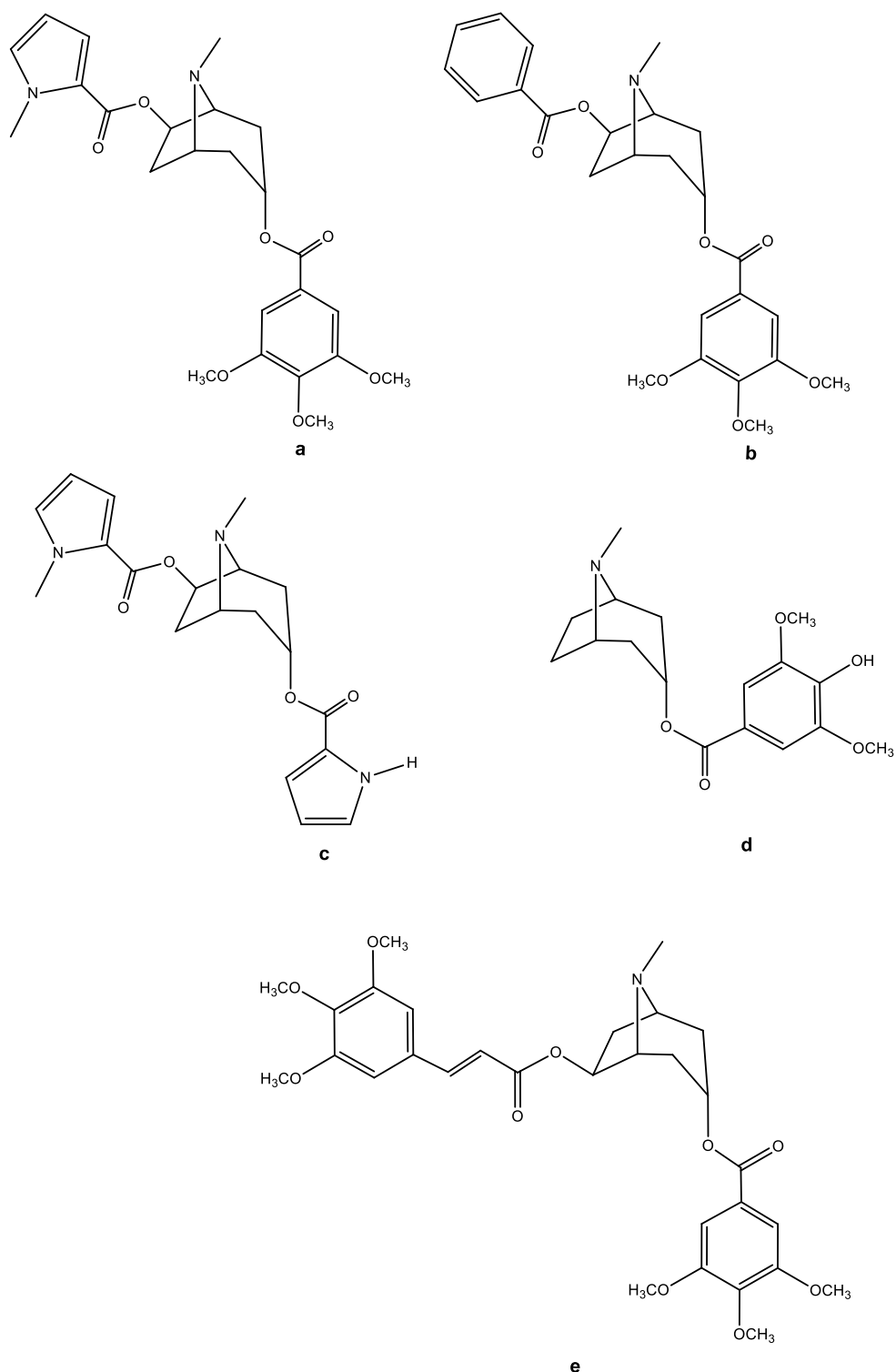


Figura 3: Estrutura da cocaína.



A descoberta da cocaína fez com que o interesse em estudar o gênero *Erythroxylum* crescesse. Pesquisas na literatura demonstram o isolamento de inúmeros alcaloides tropânicos, bem como a avaliação de atividades biológicas dos mesmos (PEREIRA, 2017). Por exemplo, extratos alcalinos de *E. vacciniifolium*, popularmente conhecida como catuaba, demonstraram atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de significativa inibição do HIV e de infecções oportunistas em portadores do vírus (MANABE *et al.*, 1992). Desses extratos, foram isolados diversos alcaloides tropânicos, dentre eles as catuabinas A, B e C (Fig. 4a, 4b e 4c, respectivamente) (GRAF e LUDE, 1977; GRAF e LUDE, 1978; ZANOLARI *et al.*, 2003, QUEIROZ *et al.*, 2009). Estes alcaloides podem estar associados, também, às propriedades estimulante do sistema nervoso central, afrodisíaca e contra disfunção erétil apresentadas em bebidas e remédios que contém essa planta, normalmente cascas e/ou raízes (ZANOLARI *et al.*, 2003). Alcaloides tropânicos isolados de *E. caatingae* tiveram suas atividades antimicrobiana e antitumoral avaliadas. Dentre eles, a catuabina B exibiu significativa citotoxicidade contra NCL-H292 (OLIVEIRA *et al.*, 2011; AGUIAR *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2014). A pungencina (Fig. 4d), isolada de *E. pungens*, demonstrou excelentes resultados na atividade vasorelaxadora em ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Das raízes de *E. pervillei* foi isolado a pervilleina A (Fig. 4e), que demonstrou ser um potencial modulador da glicoproteína-P, quando testado frente a células KB-V1, na presença de vimblastina (SILVA *et al.*, 2001; CHIN *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Alguns alcaloides isolados de espécies de *Erythroxylum*.

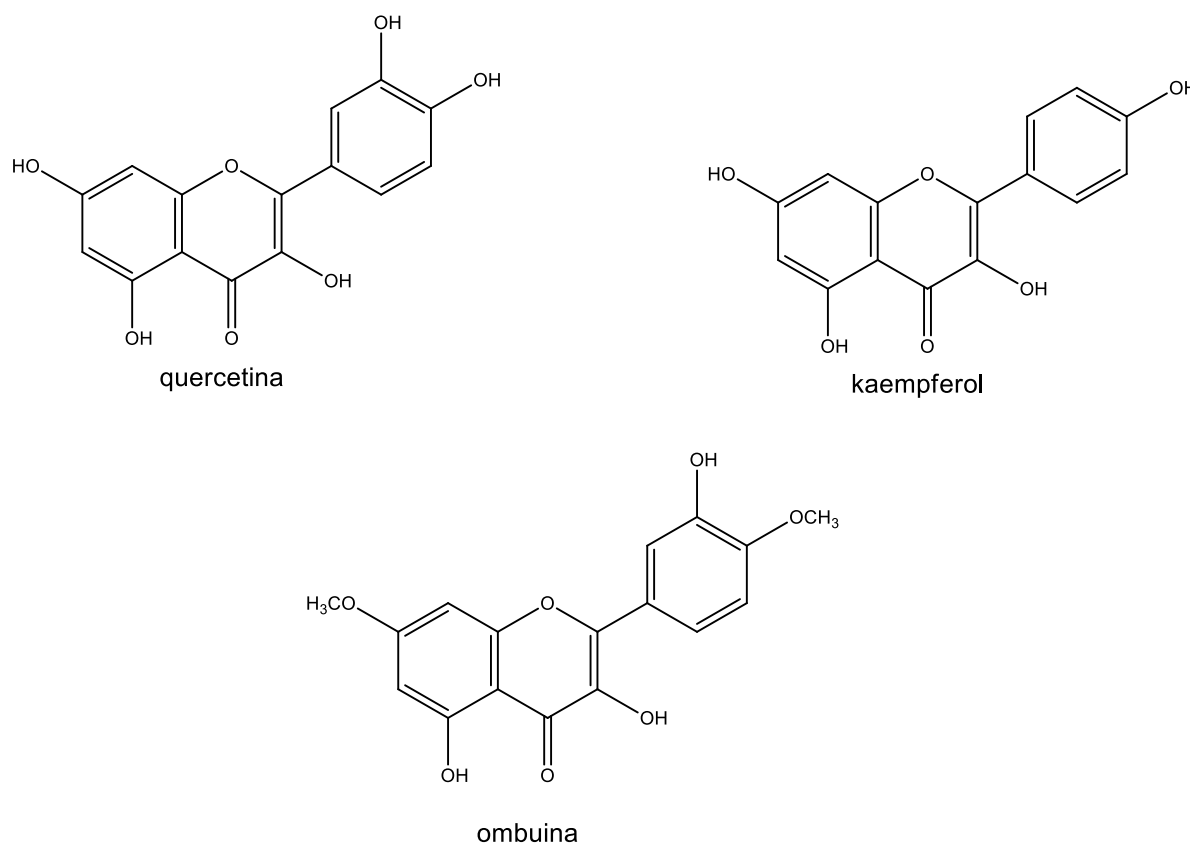
### 2.4.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos abundantes em plantas, estando associados a diversos efeitos bioquímicos. Possuem ampla aplicação nas áreas farmacêuticas, medicinais e cosméticas por conta das diversas atividades biológicas já comprovadas. Dentre elas podemos destacar as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticancerígenas, juntamente com sua capacidade

de modular funções enzimáticas celulares essenciais (PANCHE *et al.*, 2016). Podem ser divididos em diversos subgrupos: isoflavonas, neoflavonoides, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavonoides, catequinas, antocianinas e chalconas.

Para o gênero é descrito que os flavonoides mais comuns isolados são os do tipo flavonol, sendo a maioria como 3-*O*-monoglicosídeo e 3-*O*-diglicosídeos. Quercetina, kaempferol e ombuina (Fig. 5) são as principais agliconas isoladas, podendo ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006; CÓRDOVA *et al.*, 2012).

Alguns flavonoides isolados em espécies de *Erythroxylum* demonstraram possuir diversas atividades biológicas, dentre elas, antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênico, antibacteriana, citotóxica; inibidora da acetilcolinesterase (HANSEN *et al.*, 1996; LUCAS-FILHO *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2017; RESTREPO *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Estruturas das principais agliconas isoladas de espécies de *Erythroxylum*.

### 2.4.3 Terpenos

O gênero também é rico em diterpenos do tipo *ent*-kaurano, *ent*-beyerano, *ent*-devadarano, ryanodano, *ent*-labdano e *ent*-rosano (ANSELL *et al.*, 1993; BARREIROS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013b). Também é descrito o isolamento de triterpenos, comumente com esqueleto oleanano (BARREIROS *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que diversos composto terpênicos isolados de espécies do gênero já demonstraram moderada proteção contra efeitos tóxicos do veneno de *Lachesis muta* (surucucu) (OLIVEIRA *et al.*, 2016); atividade antitumoral (MENEZES-FILHO *et al.*, 2014, ELIAS *et al.*, 2016); atividade anti-inflamatória (SALEEM, 2009); dentre outras atividades farmacológicas.

## 2.5 Considerações sobre Leishmanioses

As leishmanioses caracterizam-se por doenças tropicais infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários de diversas espécies do gênero *Leishmania* sp. Insetos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, que se infectam ao picar animais silvestres e domésticos contaminados são os principais meios de transmissão desses parasitas aos seres humanos, e podem resultar em um espectro de doenças clínicas dependentes das espécies infectantes (ESCH e PETERSEN, 2013; MENEZES *et al.*, 2014). São consideradas doenças negligenciadas pois, afetam principalmente pessoas de baixa renda, que vivem em péssimas condições de moradia e sem acesso a saneamento básico, como por exemplo, em áreas de esgoto a céu aberto, principal fator de atração dos mosquitos transmissores (OMS, 2020a).

Segunda a OMS (2020a) existem basicamente três formas de manifestação das leishmanioses:

➤ **Leishmaniose visceral (LV)** - conhecida como calazar, é a forma mais grave, sendo fatal, se não tratada, em mais de 95% dos casos. Se caracteriza por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado, além de anemia. Brasil, África Oriental e Índia concentram a maioria dos casos. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, mas apenas entre 25 a 45% relatados à OMS. Continua sendo uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade. Em 2018, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão;

➤ **Leishmaniose cutânea (LC)** - também conhecida como tegumentar, é a forma mais comum de leishmaniose, causando lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida e graves incapacidades ou estigma. Estima-se que 95% dos casos desse tipo ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2018, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã Iraque, Paquistão, República

Árabe Síria e Tunísia. Estima-se que ocorram anualmente entre 600.000 a 1 milhão de novos casos em todo o mundo;

➤ **Leishmaniose mucocutânea (LMC)** - leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. É a forma mais incapacitante da doença.

A maioria das pessoas infectadas com o parasita não desenvolve nenhum sintoma durante a vida. Assim, o termo leishmaniose refere-se à condição de adoecer por causa de uma infecção causado por *Leishmania*, e não de estar infectado pelo parasita (OMS, 2020b). Ainda segundo a OMS, em 2018, 92 e 83 países ou territórios foram considerados endêmicos ou haviam relatado casos de LC e LV, respectivamente. Estima-se ainda que, atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas para leishmaniose estão sob risco de infecção e, possivelmente, 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente. No Brasil, em 2018, foram notificados 16.432 casos de LC e 3.460 casos de LV.

O tratamento das leishmanioses envolve, principalmente, a utilização de medicamentos que visam combater o agente infeccioso. O tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes (antimoniato de *N*-metilglucamina, comercializado como Glucantime® aqui no Brasil), anfotericina B e derivados, pentamidina, paromomicina e o miltefosine (RATH *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006; MARTINS e LIMA, 2013). Entretanto, essas substâncias são tóxicas, acarretando em diversos efeitos colaterais nocivos aos pacientes (alterações cardíacas, problemas renais, pancreáticos e hepáticos, e até mesmo morte repentina), além de serem de custo elevado e difícil administração, podem causar resistência do parasita (RATH *et al.*, 2003; CROFT e COOMBS, 2003; ROCHA *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Assim, diversos estudos estão sendo realizados, visando buscar, a partir de fontes naturais, fármacos que possam substituir tais substâncias, mas que mantenham a eficácia e que sejam menos agressivos ao organismo de quem recebe o tratamento (ROCHA *et al.*, 2005; MOREIRA, *et al.*, 2006; MACHADO, 2013; KAUFFMANN *et al.*, 2017).

**Tabela 1:** Alguns estudos sobre as atividades biológicas para espécies do gênero *Erythroxylum*

<b>Espécie</b>	<b>Atividade estudada</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Referência(s)</b>
<i>E. alaternifolium</i>	Antioxidante	Folhas	Córdova <i>et al.</i> , 2012
<i>E. aerolatum</i>	Antiviral	Folhas	González-Guevara <i>et al.</i> , 2004
<i>E. argentinum</i>	Anti-inflamatória Antinociceptiva Antioxidante Antimicrobiana	Folhas	Chaves <i>et al.</i> , 1988 Junior <i>et al.</i> , 2018
<i>E. barbatum</i> <i>E. cuneifolium</i> <i>E. rosuliferum</i> <i>E. stipulosum</i>	Alelopática	Folhas	Taveira <i>et al.</i> , 2013
<i>E. caatingae</i>	Antimicrobiana Antinociceptiva Antitumoral Citotóxica	Caule	Oliveira <i>et al.</i> , 2011 Aguiar <i>et al.</i> , 2012 Maia <i>et al.</i> , 2014
<i>E. campestre</i>	Citotóxica	Folhas	Mello <i>et al.</i> , 2010 Pereira <i>et al.</i> , 2015
<i>E. confusum</i>	Hepatoprotetora	Folhas	González-Guevara <i>et al.</i> , 2004 Rodeiro <i>et al.</i> , 2008
<i>E. cuneatum</i>	Antioxidante Anti-inflamatória Antinociceptiva Antidependente contra morfina Citotóxica Genotóxica	Folhas	Saleh <i>et al.</i> , 2012 Wesam <i>et al.</i> , 2013 Suliman <i>et al.</i> , 2016 Li <i>et al.</i> , 2020
<i>E. daphnites</i>	Antifúngica Antioxidante Citotóxica	Folhas	Martins, 2015 Correia <i>et al.</i> , 2016 Elias <i>et al.</i> , 2016
<i>E. deciduum</i>	Antiviral Antioxidante Antimicrobiana Antitumoral Toxicidade	Folhas Frutos	Colodel <i>et al.</i> , 2004 Lima <i>et al.</i> , 2007 Simoni <i>et al.</i> , 2007 Borelli <i>et al.</i> , 2011 Junior <i>et al.</i> , 2018

## Continuação da Tabela 1...

<i>E. delagoense</i> <i>E. emarginatum</i> <i>E. pictum</i>	Antibacteriana	Folhas Casca	De Wet, 2011
<i>E. gonocladum</i>	Inibição da ACE	Partes áreas	Lucas-Filho <i>et al.</i> , 2010
<i>E. hypericifolium</i> <i>E. macrocarpum</i> <i>E. sideroxyloides</i>	Antibacteriana Antifúngica	Folhas	Gurib-Fakim <i>et al.</i> , 2005 Gurib-Fakim <i>et al.</i> , 2005
<i>E. laurifolium</i>	Antibacteriana Inibição da ACE	Folhas	Hansen <i>et al.</i> , 1996 Gurib-Fakim <i>et al.</i> , 2005
<i>E. macrophyllum</i>	Pesticida	Folhas	Guldbrandsen <i>et al.</i> , 2015
<i>E. minutifolium</i> var. <i>minutifolium</i>	Antigenotóxica Hepatoprotetora	Folhas	Leyva <i>et al.</i> , 2003 Rodeiro <i>et al.</i> , 2008
<i>E. monogynum</i>	Antioxidante Antimicrobiana Antidiabética Anti-hiperlipidêmica Antitumoral Citotóxica Hepatoprotetora Nefroprotetora	Folhas Raiz e casca da raiz Caule e Casca do caule	Syed e Namdeo, 2013 Kumar <i>et al.</i> , 2014 Fatima e Abbulu, 2017 Kumar <i>et al.</i> , 2019
<i>E. moonii</i>	Antifúngica Nematicida	Folhas	Rahmam <i>et al.</i> , 1998 Prasadika <i>et al.</i> , 2014
<i>E. novogranatense</i> var. <i>truxillense</i>	Anestésica Antibacteriana Antioxidante Colinolítica	Folhas	Novák <i>et al.</i> , 1984 Luna, 2008 Pastor, 2011
<i>E. ovalifolium</i> <i>E. subsessile</i>	Contra veneno de cobra	Caules	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
<i>E. passerinum</i>	Antioxidante Antimicrobiana Citotóxica Imunomoduladora	Fruto Folhas	Barreiros <i>et al.</i> , 2007 Menezes-Filho <i>et al.</i> , 2014 Melo <i>et al.</i> , 2017
<i>E. pervillei</i>	Anticolinérgica Antiadrenérgica Anticâncer	Raízes	Silva <i>et al.</i> , 2001 Chin <i>et al.</i> , 2007
<i>E. pulchrum</i>	Antibacteriana	Folhas	Albuquerque <i>et al.</i> , 2014

**Continuação da Tabela 1...**

<i>E. pungens</i>	Citotóxica Cardiovascular Vasorelaxante	Raízes Casca das raízes Casca do caule Folhas	Sena-Filho <i>et al.</i> , 2010 Oliveira <i>et al.</i> , 2012 Pereira <i>et al.</i> , 2018
<i>E. suberosum</i>	Citotóxica Antimicrobiana Antioxidante	Folhas Casca do caule	Violante <i>et al.</i> , 2012 Macedo <i>et al.</i> , 2016 Barros <i>et al.</i> , 2017
<i>E. subrotundum</i>	Antifúngica	Folhas	Correia <i>et al.</i> , 2016
<i>E. tortuosum</i>	Antitumoral Vasodilatadora Anti-hipertensiva	Casca do caule Folhas	Pires <i>et al.</i> , 2009 Filho, 2009
<i>E. vacciniifolium</i>	Alelopática Antimicrobiana Anti-HIV Citotóxica	Folhas Casca do caule	Graf <i>et al.</i> , 1977 Graf <i>et al.</i> , 1978 Manab <i>et al.</i> , 1992 Satoh <i>et al.</i> , 2000 Taveira <i>et al.</i> , 2013



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Realizar o estudo químico e avaliar a atividade leishmanicida de extratos de *Erythroxylum plowmanii* Amaral (Erythroxylaceae).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Isolar por meio de técnicas clássicas constituintes químicos presentes no extrato etanólico das folhas de *E. plowmanii*;
- Identificar os constituintes químicos isolados por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas (EM, IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ );
- Avaliar o potencial leishmanicida dos extratos etanólicos das folhas, dos galhos e do caule de *E. plowmanii*.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais e reagentes

Foram utilizados solventes orgânicos com grau P.A, de diversas marcas, para obtenção e partição dos extratos brutos, análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e separações por cromatografia em coluna (CC). Como fase estacionária nas análises por CCD, foi utilizada Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> da Merck adsorvidas em placas de vidros. Como agentes reveladores para as placas cromatográficas, iodo, reagente de Dragendorff e luz UV (254 e 365 nm) foram utilizados. Os processos de separações por CC, foram realizados utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Sigma-Aldrich, empacotada em colunas de vidro com diâmetros e comprimentos variados. Para extração de alcaloides foram utilizados ácido clorídrico P.A (HCl) da Vetec e hidróxido de amônio P.A (NH<sub>4</sub>OH) da Vetec (também utilizado em análises por CCD e separações em CC). Nas análises por CG-EM as amostras foram dissolvidas em solventes grau HPLC, e nas análises por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram utilizados solventes deuterados.

### 4.2 Equipamentos

O material vegetal foi seco em estufa com circulação e renovação de ar e as placas cromatográficas foram ativadas em estufa sob aquecimento à 100 °C por aproximadamente 2 h. Os solventes dos extratos e frações obtidas foram evaporados sob pressão reduzida utilizando um rotaevaporador Fisatom. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos na Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Araraquara, e na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), todos a 600 MHz e em aparelhos Bruker Avance III 600. As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho da Shimadzu modelo QP2010 SE (temp. do injetor e da interface, 290 °C; temp. inicial da coluna 100 °C, durante 1 min, sendo aumentada 5 °C/min, até atingir 285 °C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 mL/min). Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em aparelho da Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, pelo método da reflectância atenuada.

### 4.3 Material vegetal e preparo dos extratos

O estudo foi realizado com a espécie *E. plowmanii*, coletada na Fazenda Brejo Novo, a 9 Km da cidade de Jequié-BA, e identificada pela especialista da família Erythroxylaceae, a D.ra Maria Iracema Bezerra Loyola. Uma exsicata (HUESB 12829) encontra-se depositada no Herbário da UESB – *Campus* Jequié.

Os extratos foram preparados a partir do material vegetal seco (folhas, galhos e caule) em estufa com circulação de ar à uma temperatura de 40 °C, e submetidos à maceração com etanol à temperatura ambiente (3 extrações de 48 h cada). Os extrato foram filtrados e o solvente removido no rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C.

#### 4.3.1 Fracionamentos do extrato

Nesse trabalho foram aplicadas duas metodologias para o fracionamento e estudo do extrato etanólico das folhas de *E. plowmanii* (abreviado como **EEFEp**). A primeira consistiu em submeter parte do extrato a uma coluna filtrante. Esse procedimento consiste em adsorver o extrato em sílica gel 60 e fracionar em coluna a partir da percolação dos solventes hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), conforme mostra a Fig. 6.

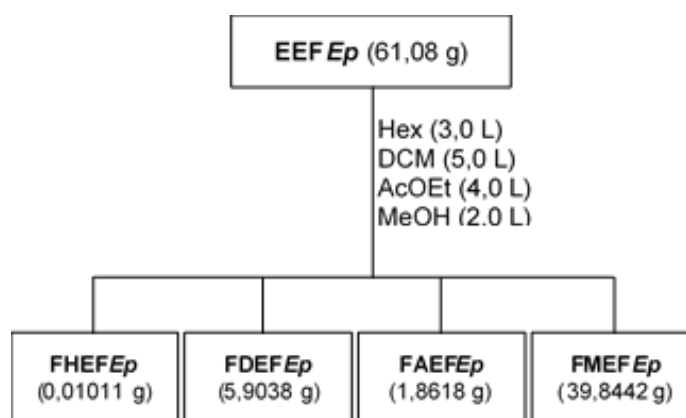


Figura 6: Esquema do fracionamento por coluna filtrante do EEFEp.

A segunda metodologia aplicada foi para obter as frações de alcaloides totais (FAT), conforme demonstra a Fig. 7. O **EEFEp** foi solubilizado em MeOH puro, e posteriormente acidificada com uma solução de HCl (5%) até pH  $\approx$  2,0 e mantida sob agitação, por cerca de 1 h. Após esse tempo, a mistura foi extraída exaustivamente com DCM. A solução aquosa ácida foi então basificada com solução de NH<sub>4</sub>OH (5%) até pH  $\approx$  10 e mantida sob agitação por cerca de 1 h. Em seguida, a solução foi submetida à uma extração exaustiva com os solventes DCM, AcOEt e BuOH (butanol).

Esta metodologia se baseia na propriedade básica dos alcaloides (que possuem nitrogênio com par de elétrons não compartilhado no núcleo tropano). Quando em meio ácido são convertidos no sal correspondente (Fig. 8). Este sal migrará para a fase aquosa na extração, e após ser basificado, será desprotonado retornando para a fase orgânica, a depender de sua polaridade.

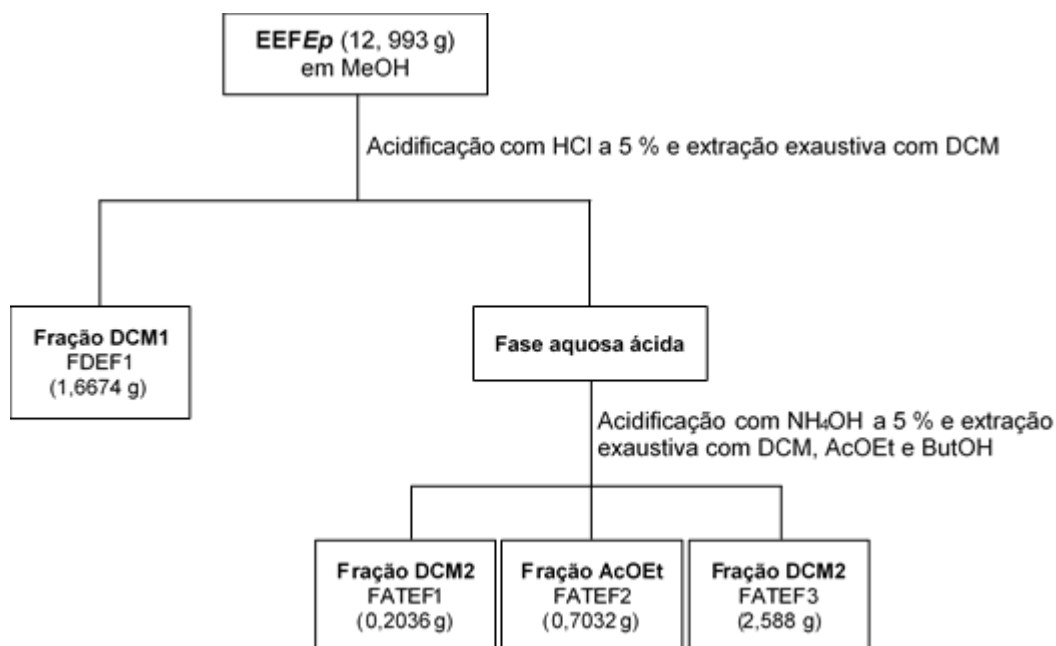


Figura 7: Esquema da obtenção das frações totais de alcaloides do EEFEp.

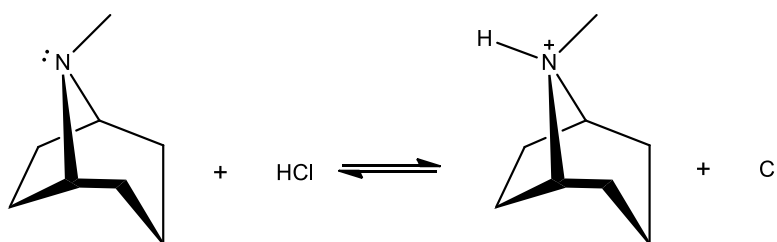


Figura 8: Reação ácido-base entre o anel tropano e o HCl.

#### 4.3.2 Isolamentos dos constituintes

A fração FAEFEp (1,8618 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de DCM/MeOH (95:5) como fase móvel, em gradiente crescente de polaridade, dando origem a 11 frações. Um sólido branco (5,0 mg), solúvel em piridina, foi obtido da fração FAEFEp8 (127,5 mg). O mesmo foi codificado como **Fep1** e submetido a análises espectroscópicas. A FAEFEp4 (427,0 mg) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e, inicialmente, DCM (puro), seguido de uma mistura de DCM/MeOH (1:1) e, por fim, MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 09 frações. A FAEFEp4.5, após análises por CCD, se mostrou pura. A mesma foi codificada como **Fep2** (6,6 mg) e submetida a análises espectroscópicas.

Dentre as frações de alcaloides totais, a FATEF1 (203,6 mg) se demonstrou a mais simples para ser analisada, após análises por CCD. Dessa forma, a fração foi

submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura inicial de DCM/AcOEt/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (50:45:5:1%), seguido de MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 06 frações. Após análises por CCD, a FATEF1.6 apresentou um único ponto. A mesma foi codificada como **Fep3** (2,1 mg) e submetida a análises espectroscópicas. A FDEF1 (1,6674 g) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de inicial de AcOEt (puro), seguida de AcOEt/MeOH (97,5:2,5) e, por fim, MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 09 frações. A FDEF1.7 (745,2 mg) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de inicial de Hex/AcOEt/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (25:40:2:0,3%), seguido de Hex/AcOEt/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (15:40:3,75:0,3%) e, por fim, MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 11 frações. A FDEF.1.7.5 (13,2 mg) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de inicial de DCM/MeOH (95:5), seguida por uma mistura de DCM/MeOH (8,5:1,5), DCM/MeOH (7:3) e, por fim, MeOH (puro), como fases móveis, dando origem a 07 frações. Após análises por CCD, a fração FDEF1.7.5.2 se mostrou pura. A mesma foi codificada como **Fep4** (2,1 mg) e enviada para análise. A FATEF1.3 (49,0 mg) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de inicial de Hex/AcOEt/MeOH (25:40:2), seguido de MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 06 frações. A FATEF1.3.5 (27,3 mg) foi submetida à coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura de inicial de DCM/MeOH (90:10), seguido de MeOH (puro) como fases móveis, dando origem a 07 frações. Após análises por CCD, a fração FATEF1.3.5.2 se mostrou pura. A amostra foi codificada como **Fep5** (8,6 mg) e enviada para análise.

#### 4.3.3 Avaliação da atividade leishmanicida

Formas promastigotas extracelulares de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/196/PH-8), obtidas de lesões de “hamsters” foram cultivadas em meio Schneider's pH 7,2 a 26 °C. Após 7 dias de cultivo, quando o crescimento das formas promastigotas atingiram a fase estacionária, a cultura foi centrifugada por 10 min a 1000 RCF, ressuspendida em meio Schneider's pH 6,0 e incubada a 32 °C, permitindo a obtenção das formas amastigotas. Uma alíquota de 90 µL de um inóculo contendo 1x10<sup>8</sup> parasitas/mL e 10 µL das amostras a 200 µg/mL foram adicionadas a cada poço. As microplacas foram incubadas a 32 °C por 72 h e a viabilidade celular foi determinada colorimetricamente usando 10 µL de metil tiazolil tetrazólio (MTT) à 5

mg/mL em 570 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Anfotericina B a 0,2  $\mu$ g/mL foi a droga leishmanicida padrão. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição e comparados com o grupo de controle. Os extratos etanólicos das folhas, galhos e caule tiveram suas atividades leishmanicida avaliadas. O ensaio leishmanicida foi realizado no Instituto René Rachou - IRR, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Minas Gerais, em Belo Horizonte.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *E. plowmanii* resultou no isolamento de 05 substâncias: um esteroide glicosilado (**FEp1**) e um derivado do ácido antranílico (**FEp2**); dois alcaloides tropânicos puros (**FEp3 e FEp4**) e uma mistura de dois alcaloides tropânicos (**FEp5**). Os três alcalóides tropânicos identificados (**FEp3, FEp4 e FEp5**) são inéditos. As discussões dos dados espectrais que possibilitaram a identificação, bem como os nomes e estruturas das substâncias estão descritos nos itens a seguir.

### 5.1 Identificação da substância **FEp1**: $\beta$ -sitosterol glicosilado

A substância **FEp1** foi isolada com um sólido amorfo branco, solúvel em piridina, se decompondo quando aquecida acima de 240 °C. A discussão dos dados espectrais da substância segue abaixo.

O espectro no IV (Fig. 9) da amostra apresenta uma banda larga em torno de 3396  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação O-H; bandas intensas entre 2959 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , características de estiramentos assimétrico e simétrico das ligações dos grupos metina (CH), metileno ( $\text{CH}_2$ ) e metila ( $\text{CH}_3$ ), evidenciando a natureza alifática do composto. Não é possível visualizar absorções para a ligação  $\text{H-C}_{sp^2}$  de alquenos e/ou anel aromático entre 3100-3000  $\text{cm}^{-1}$ , nem bandas de estiramento de C=C para este composto. A região entre 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$  é de difícil atribuição, pois muitas absorções podem se sobrepor: estiramento da ligação C-O de álcool (primário e secundário) e da ligação de C-O-C para acetal, além das bandas de deformação angular das ligações O-H de álcoois.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 10) da amostra revelou sinais característicos de anéis esteroidais: múltiplos sinais entre 2,05 – 0,60 ppm, de hidrogênios dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos; dois singletos, um em 0,67 ppm e outro em 0,94 ppm, referentes aos H-18 e H-19, respectivamente; um dubleto em 1,00 ppm ( $J = 6,5$  Hz), referente aos H-21; um multipletto em 5,36 ppm, referente ao hidrogênio olefínico de H-6. A ausência de dois duplos dubletos no espectro (um em torno de 5,08 ppm,  $J_1 \approx 12$  Hz e  $J_2 \approx 8$  Hz, do hidrogênio olefínico H-22; e outro em torno 4,96 ppm,  $J_1 \approx 12$  Hz e  $J_2 \approx 8$  Hz, do hidrogênio olefínico H-23) descarta a hipótese da aglicona ser o estigmasterol ou uma mistura contendo este composto. Foi possível identificar, ainda, sinais referentes a uma unidade glicosídica, na região entre 5,10 – 3,85 ppm, com um dubleto em 5,06 ppm ( $J = 7,8$  Hz), característico de um hidrogênio anomérico com

configuração  $\beta$  da glicose (H-1'). Sinais de resíduos de água na amostra ou no solvente podem se sobrepor a esse sinal (KIM *et al.*, 2006; KHATUN *et al.*, 2012).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 11) permitiu confirmar a presença de 35 carbonos na estrutura do composto. Foram observados: em 78,4 ppm um sinal correspondente ao C-3; os sinais em 141,3 ppm e 122,3 ppm para os C-5 e C-6, respectivamente; e os sinais em 26,7 ppm e 34,6 ppm, para C-23 e C-22, respectivamente, que são típicos do sitosterol. O sinal do carbono anomérico (C-1') é visto em 103,0 ppm, além dos sinais dos outros característicos de carbonos glicosídicos, 75,7 (C-2'), 78,9 (C-3'), 72,05 (C-4'), 79,0(C-5') e 63,2 ppm (C-6') (IRIBARREN e POMILIO, 1983).

As análises dos espectros de IV, de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiram identificar a substância como sendo o  $\beta$ -sitosterol glicosilado (Fig. 12), quando comparados com dados descritos na literatura. A Tab. 2 compara os valores de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  encontrados para a amostra com os descritos por Iribarren e Pomilio (1983).

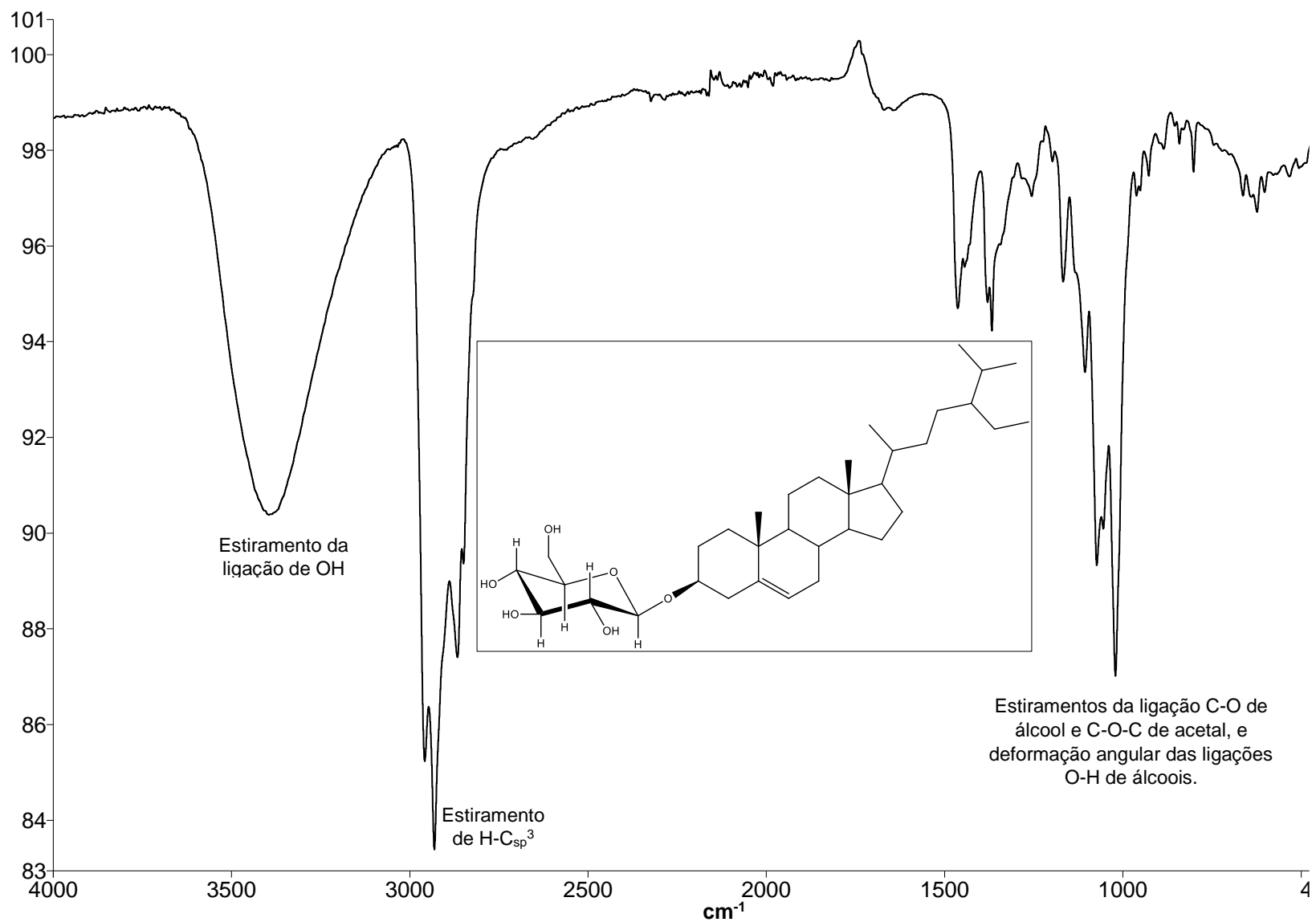
**Tabela 2:** Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da **FEp1** com os descritos na literatura

	<b>FEp1</b> <sup>a</sup>	<b>Literatura</b> <sup>b</sup>		<b>FEp1</b>	<b>Literatura</b>
<b>C1</b>	37,8	37,6	<b>C19</b>	19,8	19,5
<b>C2</b>	30,6	30,4	<b>C20</b>	36,8	36,5
<b>C3</b>	78,4	78,1	<b>C21</b>	19,6	19,1
<b>C4</b>	40,3	40,0	<b>C22</b>	34,6	34,3
<b>C5</b>	141,3	140,8	<b>C23</b>	26,7	26,5
<b>C6</b>	122,3	121,9	<b>C24</b>	46,4	46,1
<b>C7</b>	32,6	32,7	<b>C25</b>	29,8	29,6
<b>C8</b>	32,4	32,7	<b>C26</b>	19,4	19,3
<b>C9</b>	50,7	50,4	<b>C27</b>	20,4	20,1
<b>C10</b>	37,3	37,0	<b>C28</b>	23,8	23,5
<b>C11</b>	21,7	21,4	<b>C29</b>	12,3	12,3
<b>C12</b>	39,7	39,4	<b>C1'</b>	102,9	102,6
<b>C13</b>	42,8	42,6	<b>C2'</b>	75,7	75,3
<b>C14</b>	57,2	56,9	<b>C3'</b>	78,9	78,5
<b>C15</b>	24,9	24,6	<b>C4'</b>	72,0	71,7
<b>C16</b>	28,9	28,6	<b>C5'</b>	79,0	78,6
<b>C17</b>	56,6	56,3	<b>C6'</b>	63,2	62,9
<b>C18</b>	12,5	12,1			

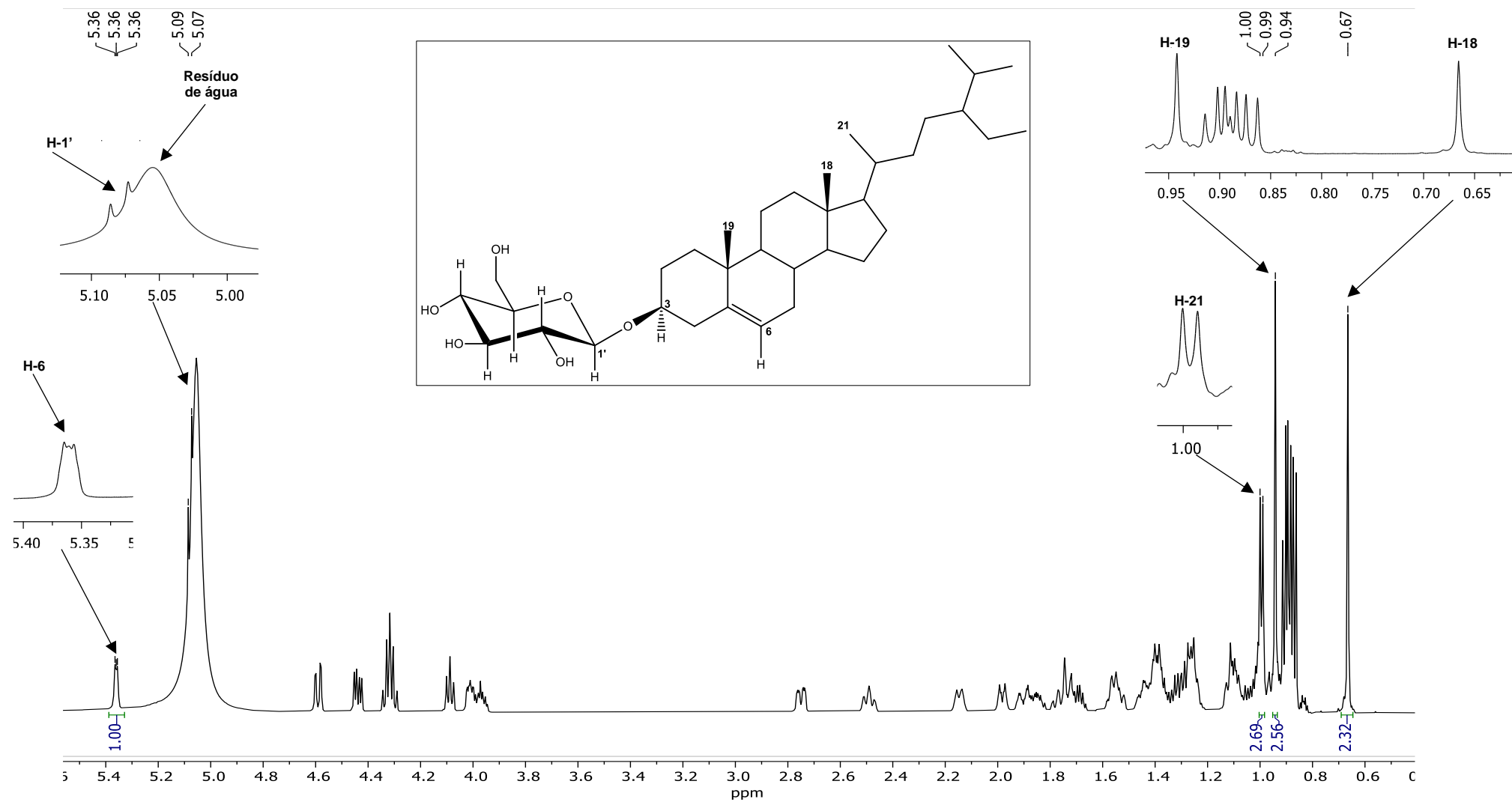
<sup>a</sup>análise realizada a 150 MHz em piridina-D<sub>5</sub>.

<sup>b</sup>análise realizada a 25,5 MHz em piridina-D<sub>5</sub>.





**Figura 9:** Espectro no infravermelho (ATR) da **Fep1**.



**Figura 10:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em piridina- $\text{D}_5$ ) da **FEp1**.

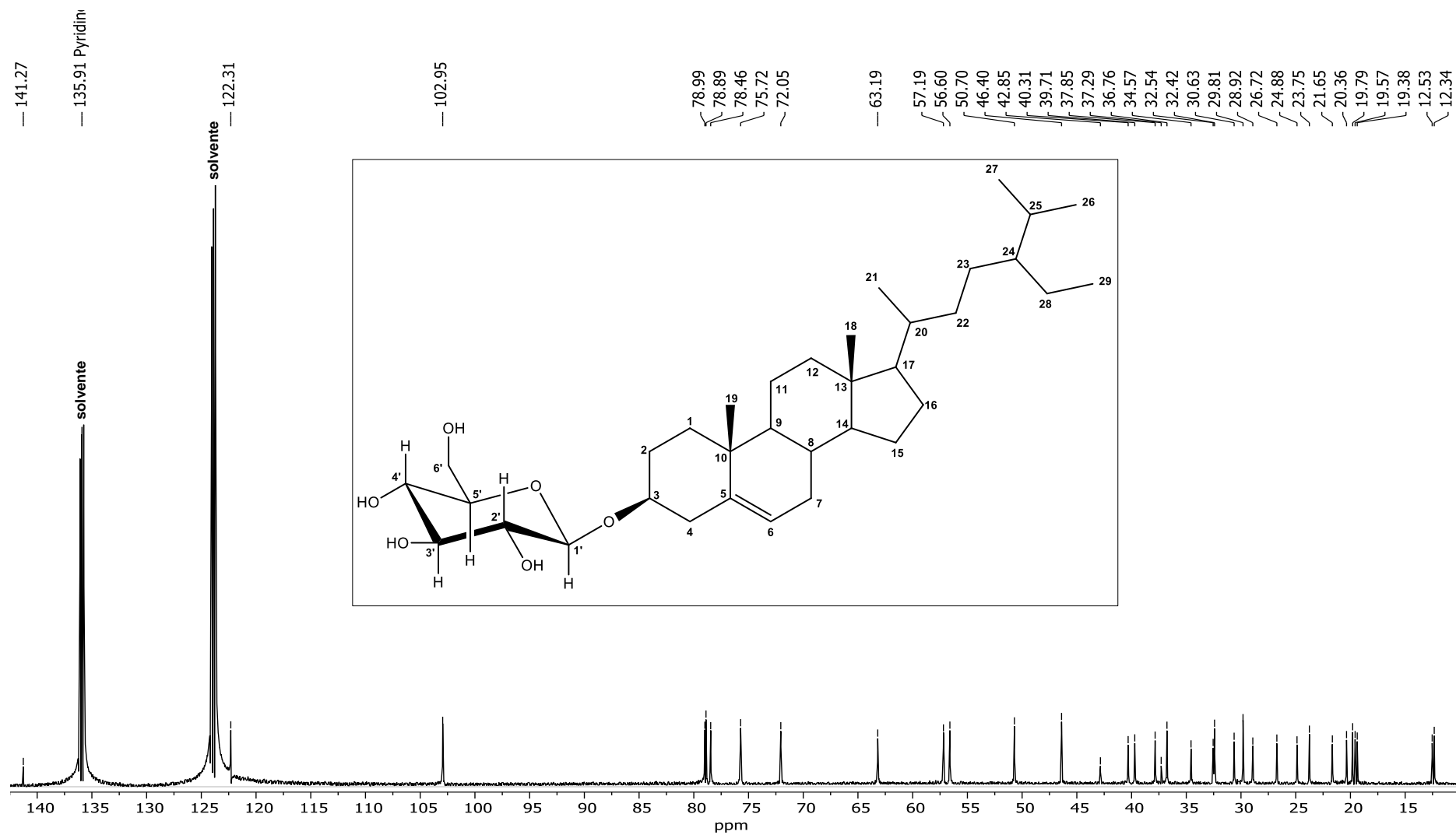


Figura 11: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, em piridina- $\text{D}_5$ ) da **FEp1**.

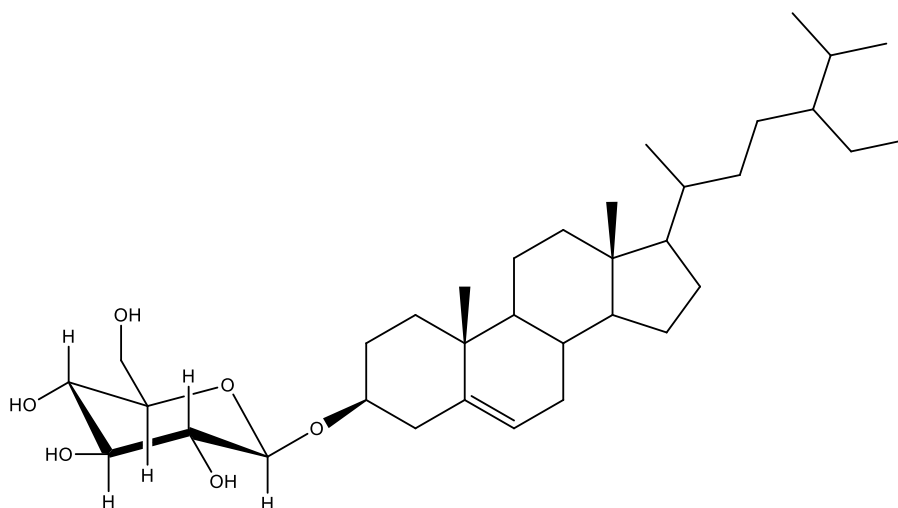


Figura 12: Estrutura do  $\beta$ -sitosterol glicosilado.

## 5.2 Identificação da substância **Fep2**: 2-acetamidobenzoato de metila

A substância **Fep2** foi isolada como um sólido cristalino ( $T_f = 93,4-95,5\text{ }^\circ\text{C}$ ), de coloração amarelada, solúvel em clorofórmio. A discussão dos dados espectrais da **Fep2** segue abaixo.

O espectro no IV (Fig. 13) da amostra apresentou absorção na região entre  $3380-3100\text{ cm}^{-1}$ , característica do estiramento de ligação N-H para amidas *N*-substituída (ou aminas secundárias). Algumas outras bandas podem aparecer sobrepostas nessa região, pois, segundo Barbosa (2011), amidas *N*-substituídas podem se apresentar nas conformações *s-cis* e *s-trans*, sendo esta última majoritária. O espectro apresentado na Fig. 13 foi obtido com a amostra no estado sólido. Nessa condição, o autor explica que as amidas se encontram associadas por ligação de hidrogênio, podendo resultar, principalmente, em duas bandas de absorção: uma na região entre  $3370-3270\text{ cm}^{-1}$  (*s-trans*) e outra entre  $3180-3140\text{ cm}^{-1}$  (*s-cis*). O autor explica ainda que, a depender do grau de associação das moléculas, é possível observar mais de duas bandas nessa região. No espectro é possível observar também a banda de estiramento da carbonila, em  $1689\text{ cm}^{-1}$ , confirmando se tratar de uma amida. Esse valor indica se tratar de uma amida com o nitrogênio ligado a sistema insaturado, pois está acima do valor esperado. Entre  $1600\text{ a }1420\text{ cm}^{-1}$  podem ser observadas bandas de deformação angular da ligação N-H e deformação axial da ligação C-N que podem sobrepor outras bandas de absorções, como as de C=C de anel aromático, por exemplo, sendo assim, uma região de difícil atribuição. Entre  $1300\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$  é possível observar algumas bandas características de estiramentos das ligações C-(C=O)-O e O-C-C- para ésteres aromáticos (BARBOSA, 2011; SILVERSTEIN *et al.*, 2012). Para comprovar essa afirmação, uma banda de carbonila

de éster deveria aparecer no espectro. Entretanto, quando a carbonila de éster faz ligação de hidrogênio intramolecular, o valor de sua absorção pode estar bem abaixo do previsto, apresentando uma banda fraca, podendo ser sobreposta por uma absorção mais forte, tal como a carbonila de amida (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 14) da amostra apresentou quatro sinais na região de aromático, característicos de anel benzênico 1,2-dissubstituído: em 8,69 ppm (*d*,  $J = 8,4$  Hz, H-3); 8,02 ppm (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-6); 7,54 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,4$  Hz e  $J_2 = 7,2$  Hz, H-4) e outro em 7,07 ppm (*dd*,  $J_1 = 7,8$  Hz e  $J_2 = 7,2$  Hz, H-5). Apresentou ainda dois singletos referentes a duas metilas, um em 3,92 ppm (H-8) e outro em 2,24 ppm (H-10). É possível observar ainda um singlete largo em 11,05 ppm (N-H).

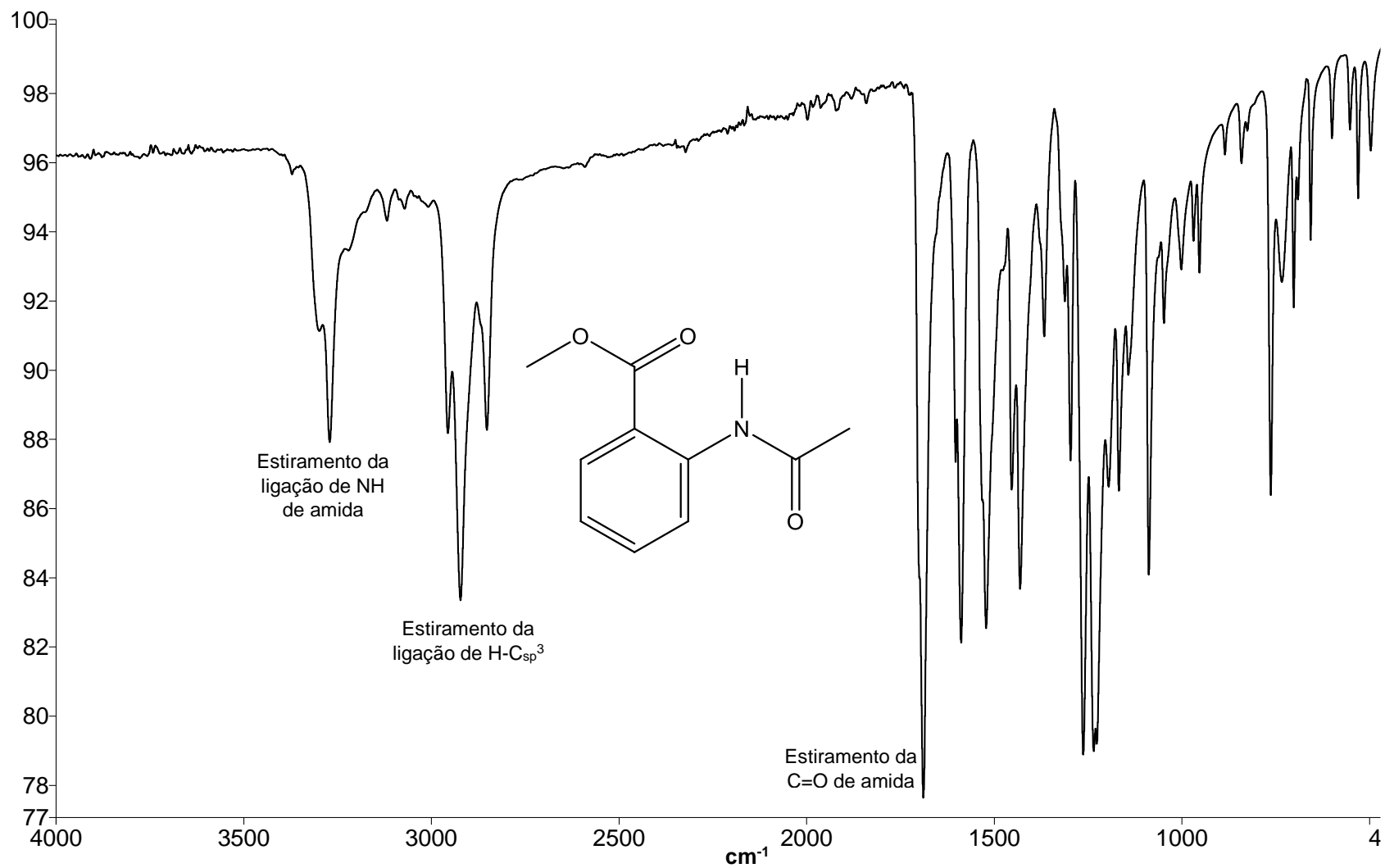
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 15) apresentou dez sinais para a amostra: 114,9 ppm (C1); 141,7 ppm (C2); 120,4 ppm (C3); 134,8 ppm (C4); 122,6 ppm (C5); 130,9 ppm (C6); 168,9 ppm (C-7); 52,5 ppm (C-8); 169,2 ppm (C-9) e 25,6 ppm (C-10).

Quando comparados com dados descritos na literatura (KALBANDHE *et al.*, 2015), as análises dos espectros permitem identificar a substância como sendo o 2-acetamidobenzoato de metila (Fig. 16), um derivado do ácido antranílico. Os dados que comparam os valores da FEp2 com os descritos na literatura se encontram na Tab. 3.

**Tabela 3:** Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da **FEp2** com os descritos na literatura

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)/(mult, J/Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	FEp2	2-acetamidobenzoato de metila <sup>a</sup>	FEp2	2-acetamidobenzoato de metila <sup>a</sup>
1	-	-	114,9	114,7
2	-	-	141,7	141,6
3	8,69 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ )	8.69 ( <i>dd</i> , $J_1 = 8,6$ e $J_2 = 0,76$ )	120,4	120,3
4	7,54 ( <i>dd</i> , $J_1 = 8,4$ e $J_2 = 7,2$ )	7.53 ( <i>td</i> , $J_1 = 8,6$ e $J_2 = 1,6$ )	134,8	134,6
5	7,07 ( <i>dd</i> , $J_1 = 7,8$ e $J_2 = 7,2$ )	7.07 ( <i>td</i> , $J_1 = 8,2$ e $J_2 = 1,2$ )	122,6	122,4
6	8,02 ( <i>d</i> , $J = 7,8$ )	8.01 ( <i>dd</i> , $J_1 = 8,0$ e $J_2 = 1,6$ )	130,9	130,7
7	-	-	168,9	168,7
8	3,92 ( <i>s</i> )	3,92 ( <i>s</i> )	52,5	52,3
9	-	-	169,2	169,0
10	2,23 ( <i>s</i> )	2,23 ( <i>s</i> )	25,6	25,4

<sup>a</sup>KALBANDHE *et al.*, 2015. RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente.



**Figura 13:** Espectro no infravermelho (ATR) da **Fep2**.

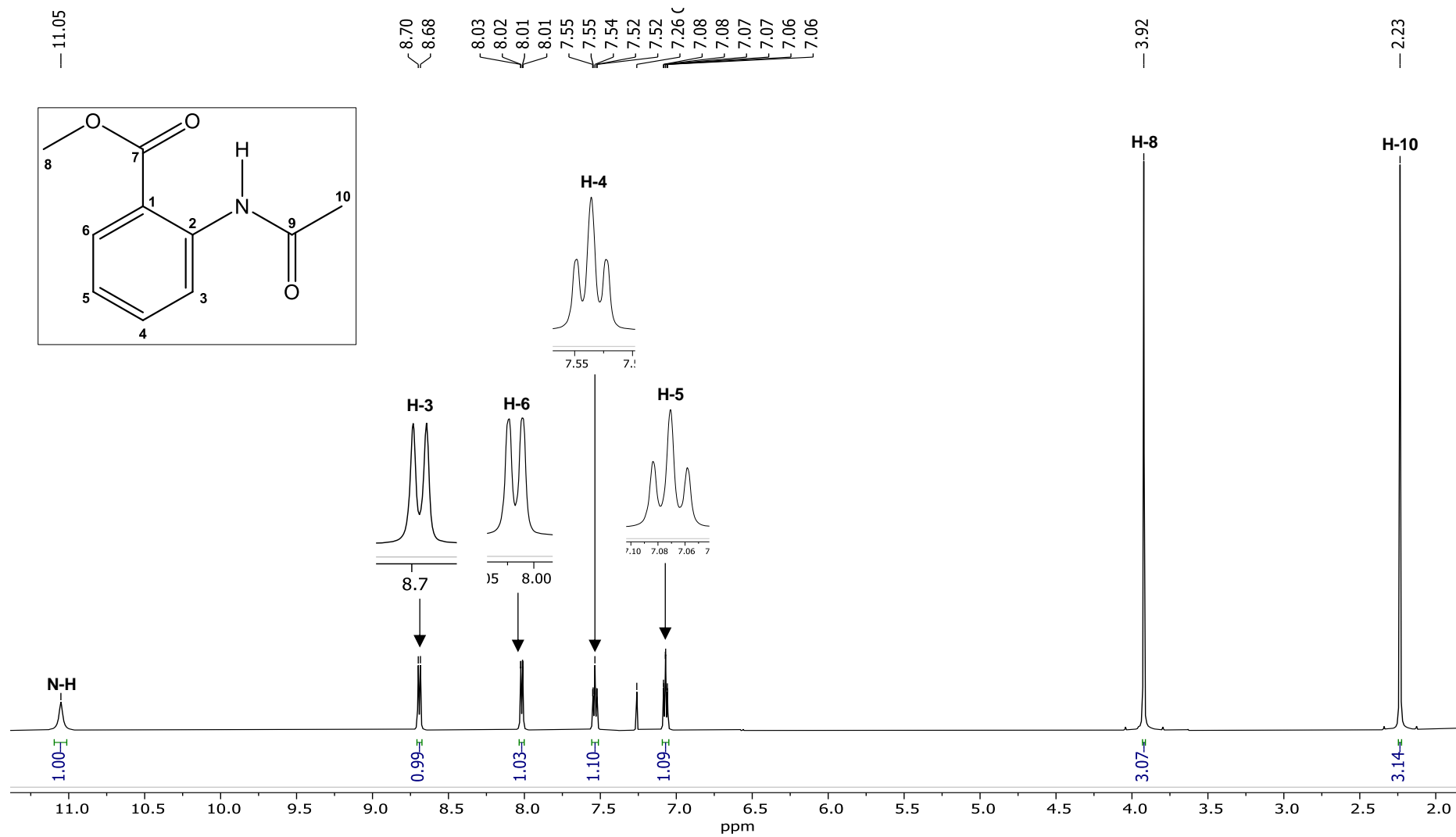


Figura 14: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da **FEp2**.

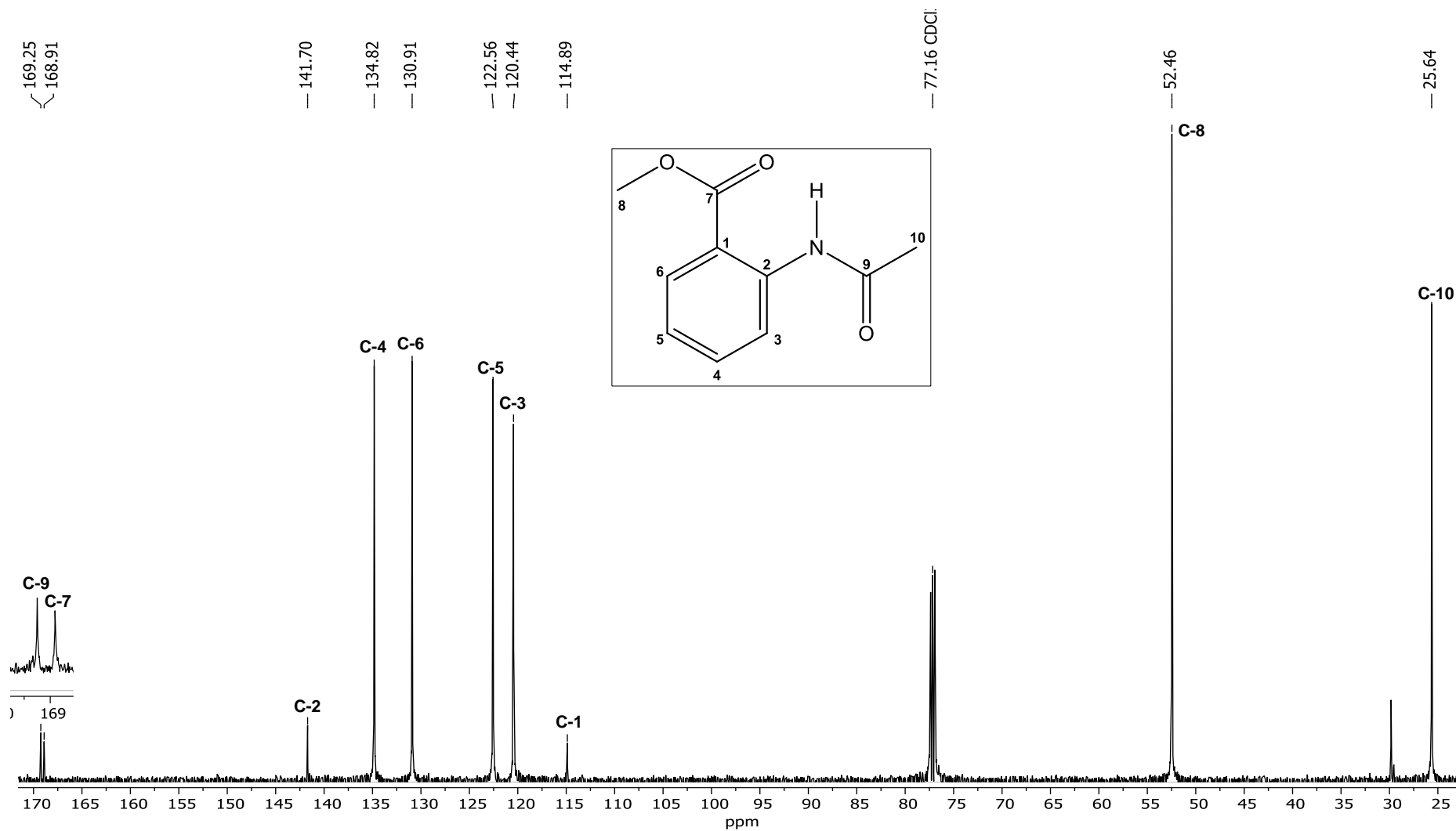
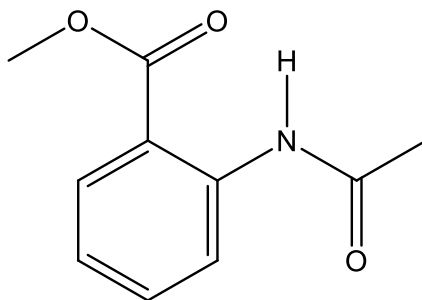


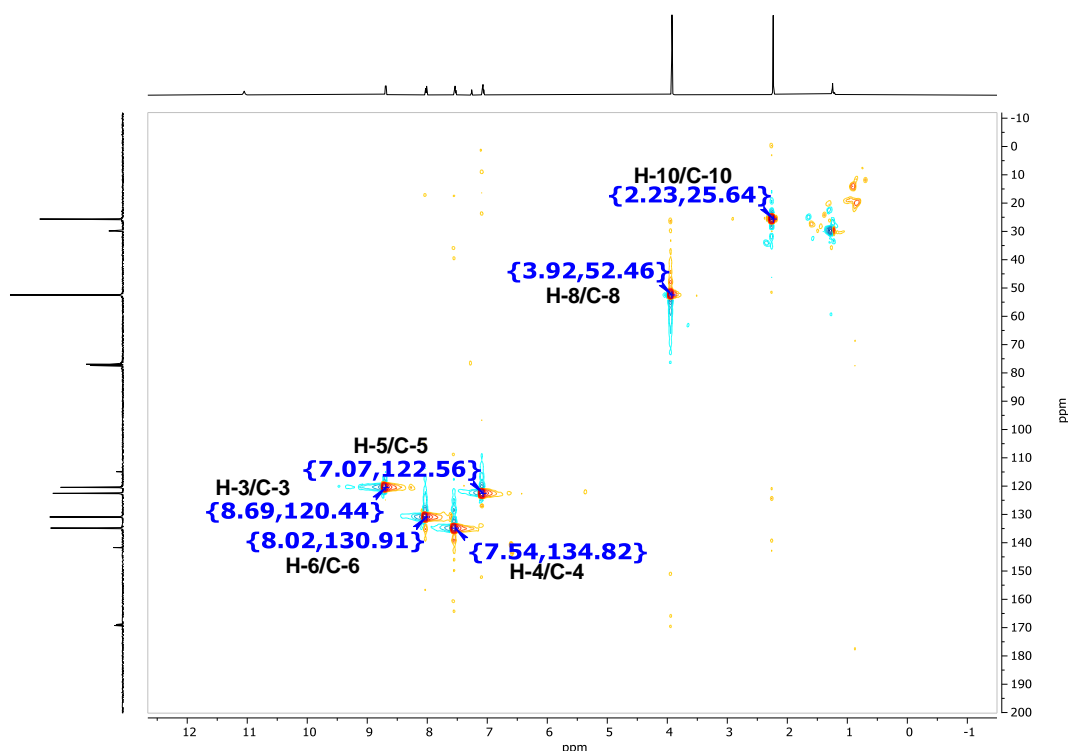
Figura 15: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da *FEp2*.





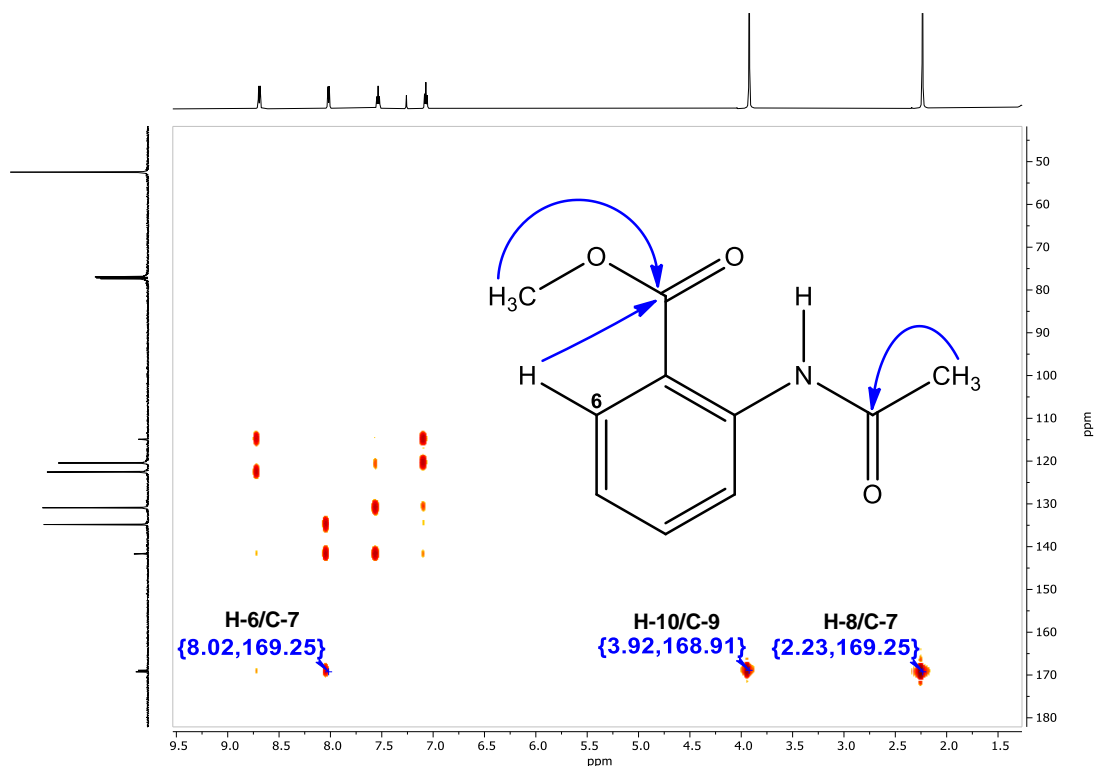
**Figura 16:** Estrutura do 2-acetamidobenzoato de metila.

As atribuições dos sinais podem ser confirmadas quando os mapas de correlação HSQC (Fig. 17) e HMBC (Fig. 18) são analisados. O HSQC permite visualizar a correlação direta entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , enquanto no HMBC permite visualizar a correlação a longa distância entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

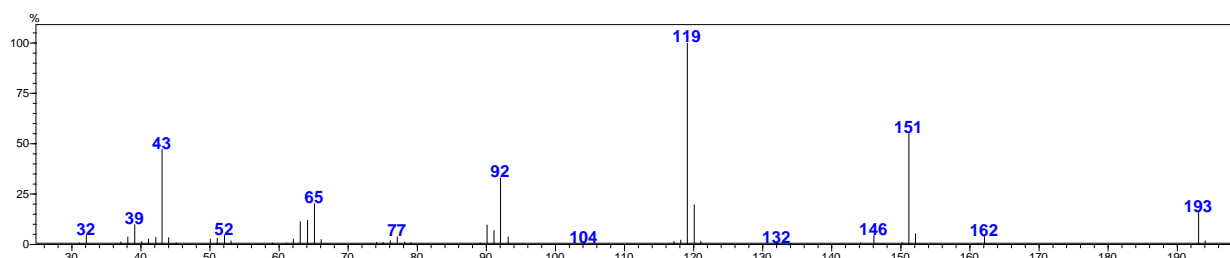


**Figura 17:** Mapa de contornos HSQC obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila.

A Fig. 19 apresenta o espectro de massas por impacto de elétrons (IE) da amostra. No espectro é possível identificar o pico que corresponde à massa do composto ( $m/z = 193$ ), condizente com a fórmula molecular de  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , além dos picos em  $m/z = 151$ ;  $119$ ;  $92$  e  $65$ , característicos em fragmentação de derivados mais simples do ácido antranílico (LI *et al.*, 2014).



**Figura 18:** Mapa de contornos HMBC obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila. São mostradas apenas as correlações que confirmam as atribuições para as carbonilas.



**Figura 19:** Espectro de massas obtido por IE obtido para o 2-acetamidobenzoato de metila.

A temperatura de fusão encontrada para a **FEp2** ficou entre 93,4-95,5 °C, faixa que abrange o valor descrito por Kalbandhe *et al.* (2015), que foi de 94 °C, para o 2-acetamidobenzoato de metila.

### 5.3 Identificação da substância **FEp3**: 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -diidroxitropano

A substância **FEp3** foi isolada com um aspecto oleoso incolor, solúvel em clorofórmio. A análise por CCD forneceu resultado positivo para reagente de Dragendorff, indicando se tratar de um alcaloide. A discussão dos dados espectrais da **FEp3** segue abaixo.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 20), obtido em  $\text{CDCl}_3$ , apresentou um singlete largo em 5,76 ppm característico de um grupo  $-\text{NH}_2$  ligado a um anel benzênico (SILVERSTEIN *et al.*, 2012). A presença do anel aromático pôde ser confirmada pelos

sinais em 7,74 ppm (*m*, 1H), 7,27 ppm (*m*, 2H – sobreposição com sinal do solvente) e 6,66 ppm (*m*, 2H). A adição de uma gota metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) ao tubo da amostra, possibilitou a obtenção de um espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Fig. 21) com uma melhor resolução desses sinais. Por meio de sua análise é confirmado um padrão dissubstituído do anel aromático: 7,73 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,2$  Hz e  $J_2 = 1,5$  Hz, 1H); 7,28 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 7,5$  Hz e  $J_3 = 1,5$  Hz, 1H); 6,71 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,5$  Hz e  $J_2 = 0,9$  Hz, 1H) e 6,65 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 7,5$  Hz e  $J_3 = 0,9$  Hz, 1H). A separação dos sinais pode ser explicada pelo fato de que alguns solventes, por meio de interações com as moléculas do composto analisado, provocam alterações bem expressivas nos deslocamentos químicos em RMN de <sup>1</sup>H, alguns até mesmo na ordem de 1,0 ppm. O analista pode, então, usar essas alterações para resolver sinais que se sobrepõem, trazendo uma melhor resolução ao espectro obtido. Algumas gotas do segundo solvente é adicionada à solução contendo a amostra e submetida à análise (PAVIA *et al.*, 2010). O sinal do Ar-NH<sub>2</sub> não aparece no espectro da Fig. 21 em função da troca com o deutério do solvente adicionado. Hidrogênios ligados a oxigênio também podem sofrer essa troca com o deutério do CD<sub>3</sub>OD ou até mesmo do CDCl<sub>3</sub>. O inconveniente dessa análise é um sinal de resíduo de água presente, possivelmente, no CD<sub>3</sub>OD, que aparece como um pico largo e intenso, podendo sobrepor sinais importantes no espectro. Os demais sinais observados podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel tropânico: 5,20 ppm (*ta*,  $J = 5,4$  Hz, 1H); 4,58 ppm, (*s*, 2H); 3,16 ppm (*sl*, 2H); 2,57 ppm (*s*, 3H); 2,31 ppm (*dt*,  $J_1 = 15,8$  Hz e  $J_2 = 4,8$  Hz 2H); 1,73 ppm (*d*,  $J = 15,8$  Hz, 2H). Quando esses dados são comparados com alguns descritos na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2013a; SILVA JUNIOR *et al.*, 2020), sugere-se que a **Fep3** é um alcaloide tropânico substituído nas posições 3, 6 e 7. O sinal em 4,58 ppm é atribuído aos hidrogênios H-6 e H-7, enquanto o sinal em 3,16 ppm aos hidrogênios H-1 e H-5. Como não foi observado um desdobramento ou diferença de deslocamento desses hidrogênios, os substituintes nas posições 6 e 7 são iguais, denotando uma simetria no anel tropânico (SILVA JUNIOR *et al.*, 2020). Os sinais em 2,31 ppm e 1,73 estão atribuídos aos H-2/H-4 axiais e H-2/H-4 equatoriais, respectivamente. O sinal em 5,20 ppm é atribuído ao H-3, que está ligado a um oxigênio de éster. A estrutura do substituinte aromático no C-3 pode ser deduzida como sendo o 2-aminobenzoiloxi. Dessa forma, o *dd* em 7,73 ppm é atribuído ao H-6', em posição *orto* à carbonila e o *ddd* em 7,28 ppm é atribuído ao H-4', em posição *para*- à carbonila. Esses hidrogênios são mais desblindados devido ao efeito da anisotropia diamagnética provocado pela presença desse grupo. O *dd* em 6,71 ppm

pode ser atribuído ao H-3', próximo ao grupo amino e o *ddd* em 6,65 ppm ao H-5'. Todos os valores atribuídos são referentes ao espectro da Fig. 21.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 22) apresentou 12 sinais para a amostra. O tripleto centrado em 77,0 ppm é do solvente e o sinal em 29,7 ppm se deve a alguma impureza de natureza graxa. A presença do substituinte 2-aminobenzoiloxi é confirmada pelo sinal da carbonila em 167,2 ppm (C-7'), indicando conjugação com o anel aromático; do carbono ligado ao grupo  $\text{NH}_2$  (C-2') que aparece em 150,8 ppm e pelos demais sinais em 110,5 ppm (C-1'); 116,9 ppm (C-3'); 134,3 ppm (C-4'); 116,5 ppm (C-5') e 130,6 ppm (C-6'). O grupo  $\text{H}_3\text{C-N}$  aparece em 34,1 ppm, enquanto C-1 e C-5 aparecem em 65,5 ppm. O sinal de C-3, ligado ao oxigênio do 2-aminobenzoiloxi aparece em 66,6 ppm. Os substituintes em C-6 e C-7 podem ser identificados como o grupo -OH, em função do valor em 74,6 ppm ser característico de carbono ligado a esse grupo. Hidrogênios de álcool possuem pouca intensidade nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , podendo às vezes nem aparecer ou serem muito largos a ponto de serem confundidos com a linha de base. A ausência de sinais de outros grupos reforça a presença das hidroxilas na estrutura. Por fim, o sinal de C-2 e C-4 aparece em 26,1 ppm.

As análises dos espectros bidimensionais da **Fep3** permitiram sua identificação como sendo o  $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $6\beta,7\beta$ -diidroxitropano (Fig. 23), um alcaloide ainda não descrito na literatura. Por meio do COSY  $^1\text{H},^1\text{H}$  (Fig. 24), que permite estabelecer os acoplamentos entre os núcleos de  $^1\text{H}$ , pode-se confirmar a substituição do anel tropânico como  $3\alpha,6\beta,7\beta$ . Assim, H-1 acopla com H-2ax/H-2eq e H-5 acopla com H-4ax/H-4eq, mas não há acoplamento entre H-1 e H-7, nem entre H-5 e H-6, indicando que H-6 e H-7 estão na posição alfa no anel, formando um ângulo de aproximadamente  $90^\circ$  com H-5 e H-1, respectivamente. Nesse caso, o valor da constante é quase nulo, não havendo desdobramento do sinal. Essa informação também permite explicar o acoplamento entre H-3, que está na posição beta, apenas com H-2 e H-4 axiais (SILVA JUNIOR *et al.*, 2021).

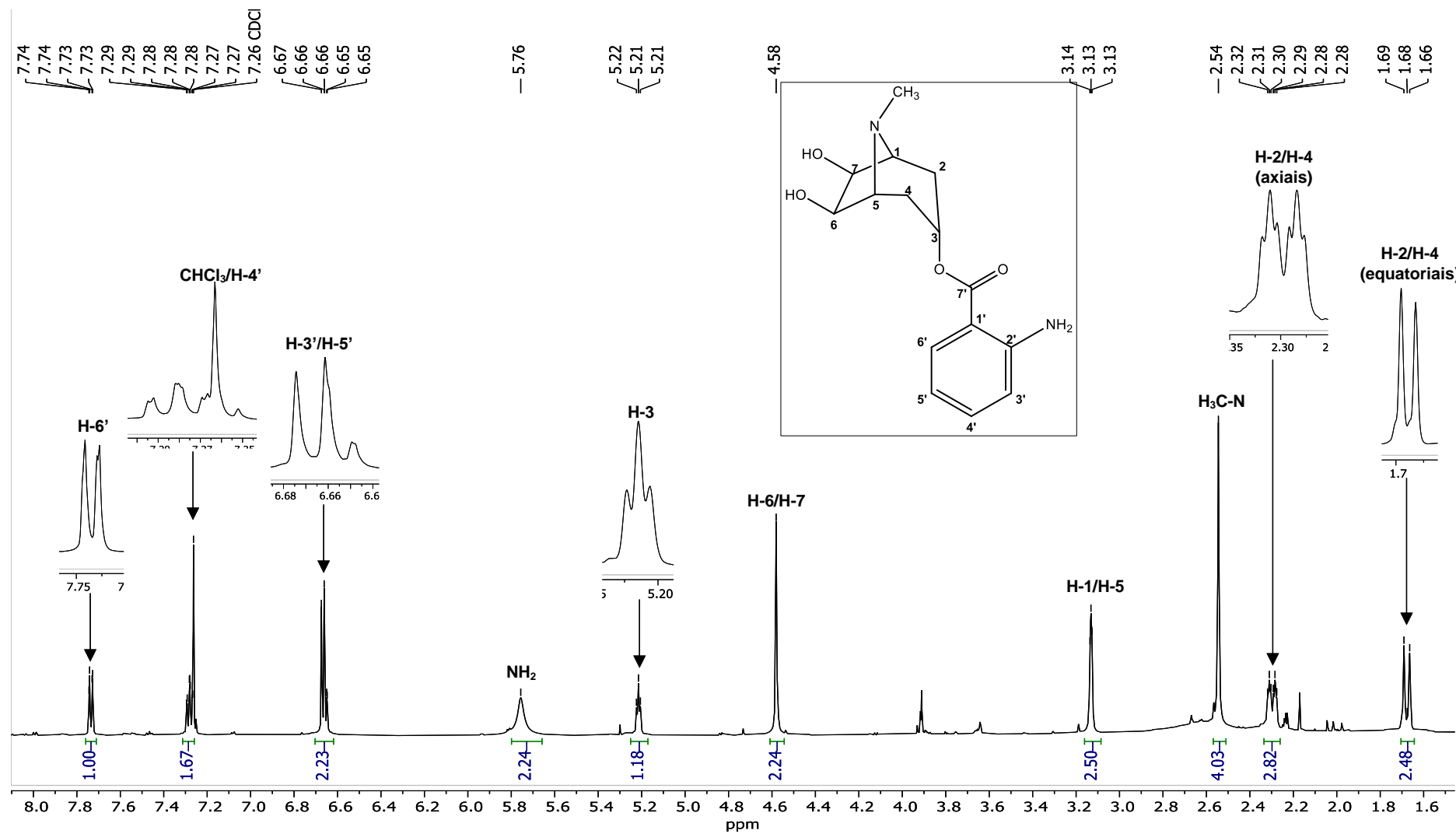


Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da FEp3.

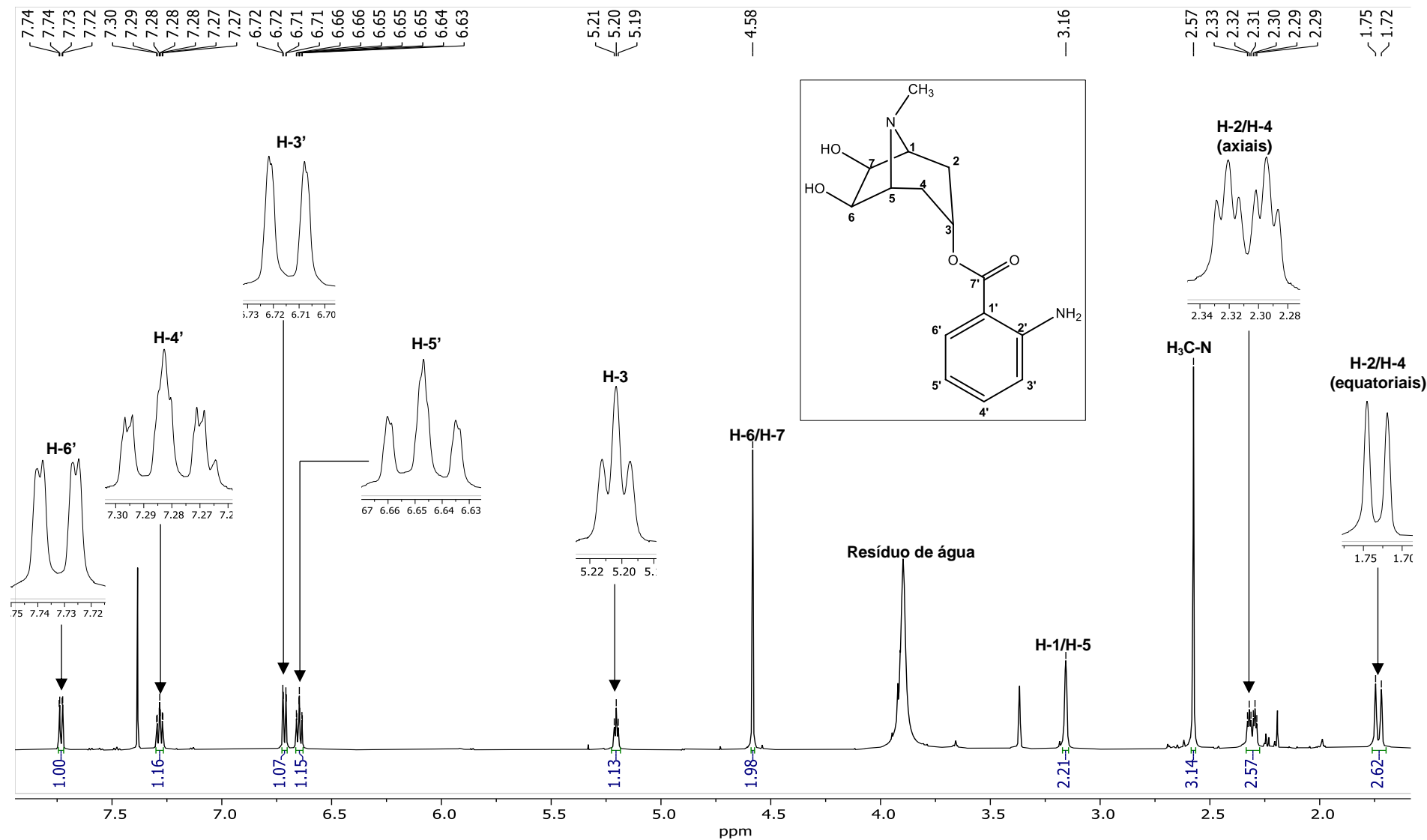


Figura 21: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$  + gota de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da FEp3.

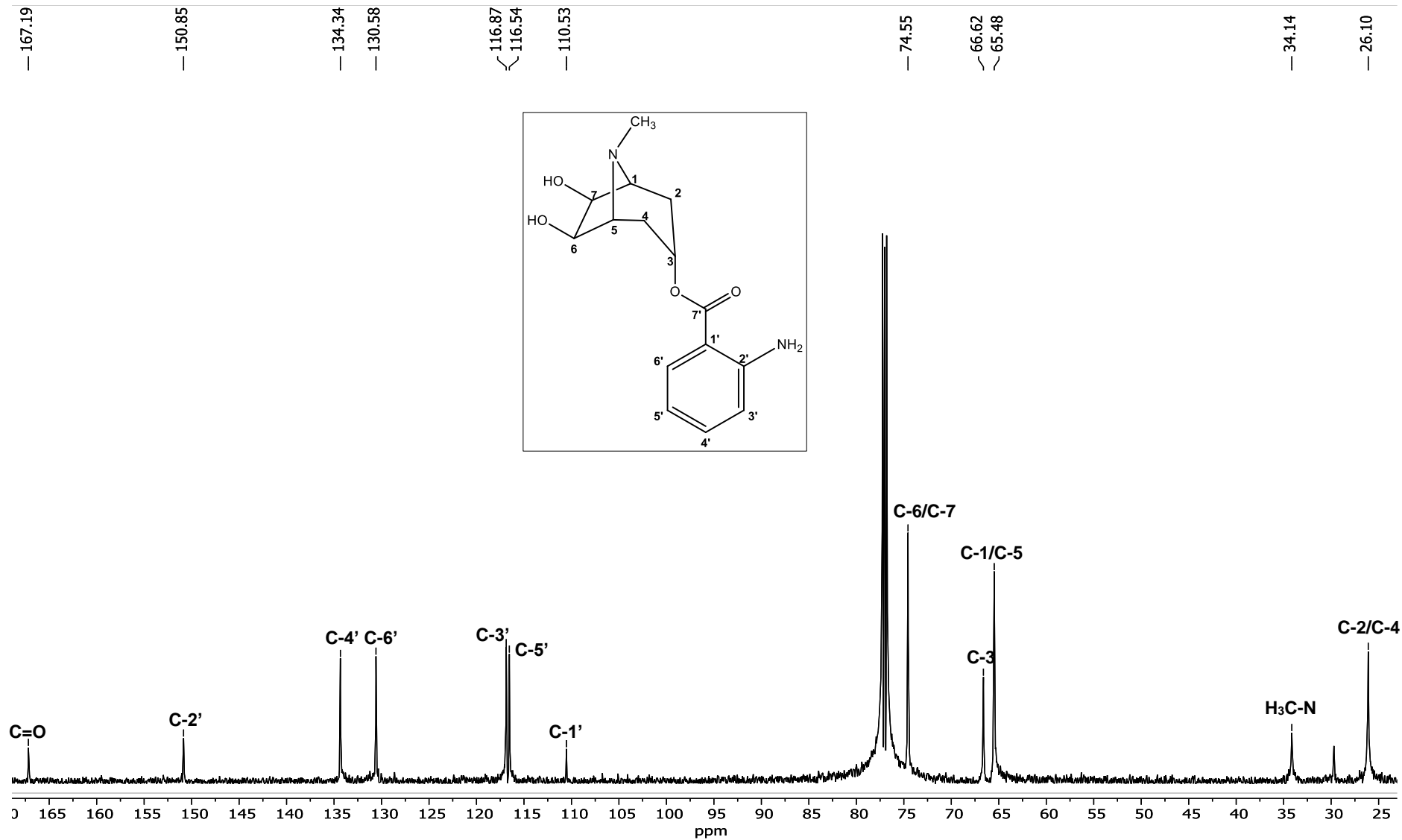
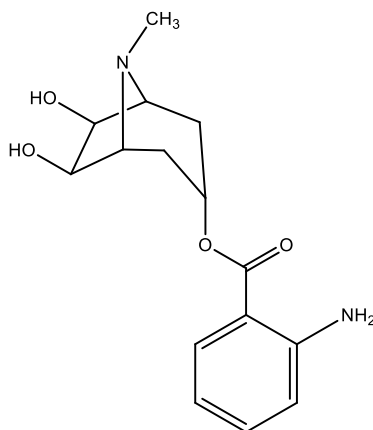
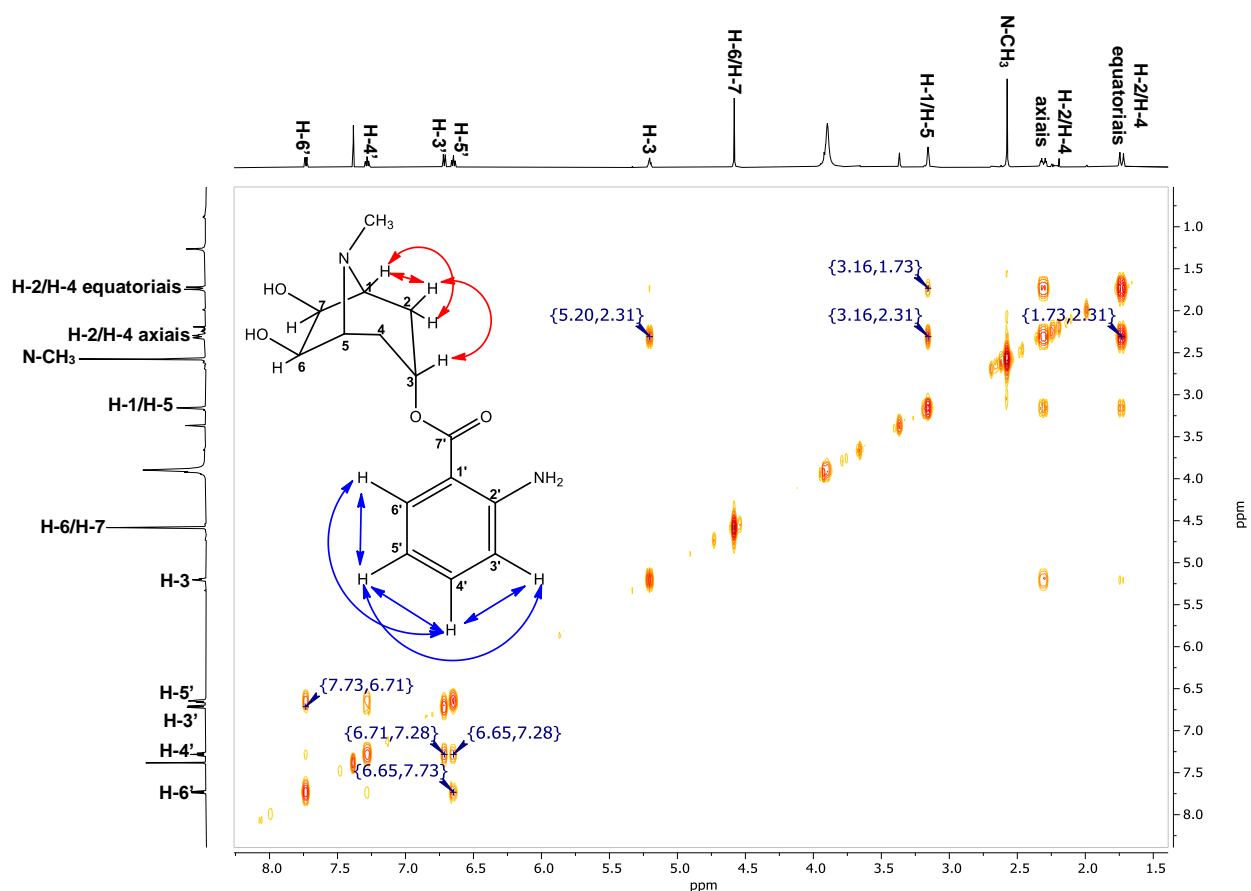


Figura 22: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) da **FEp3**.



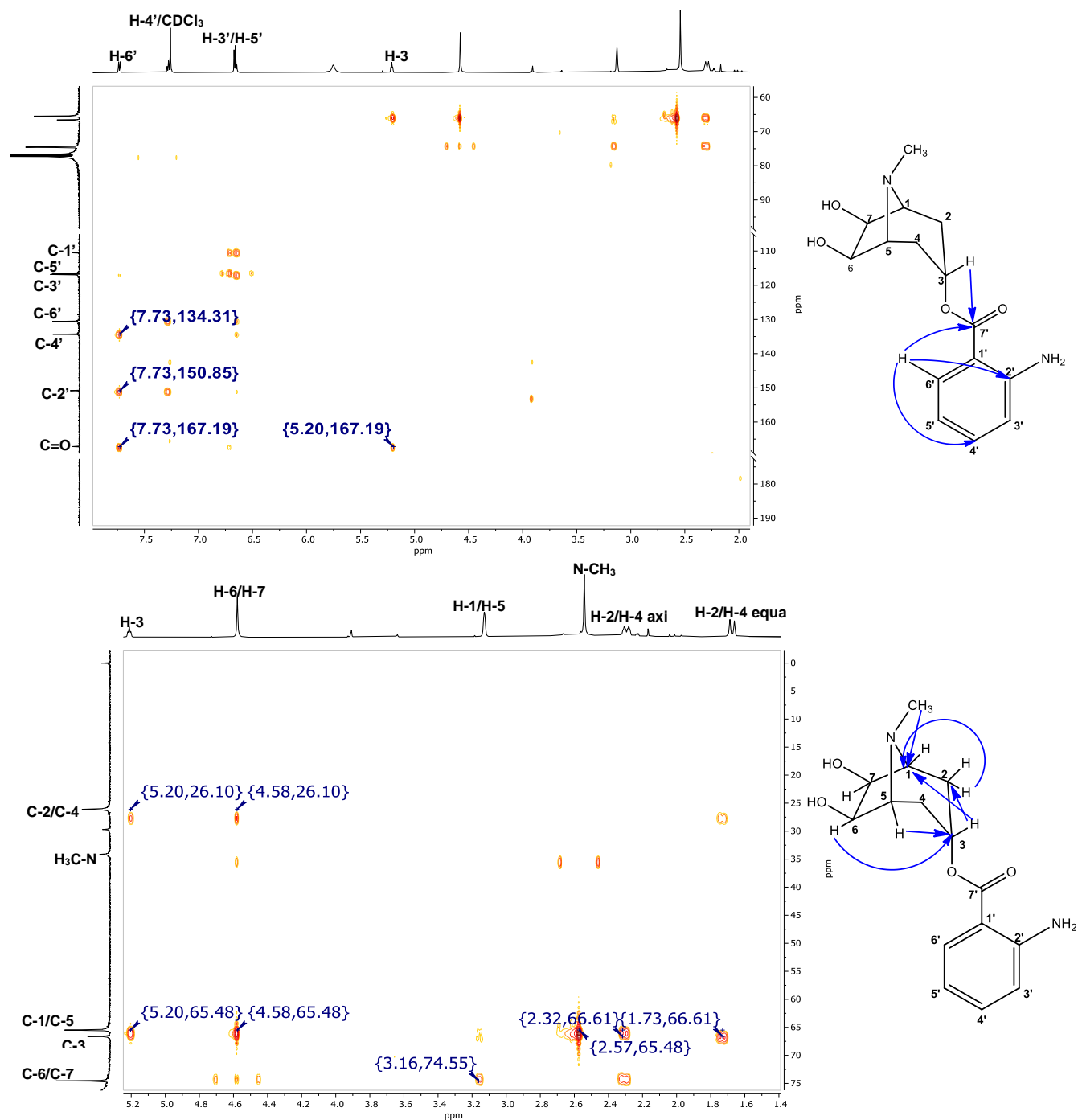
**Figura 23:** Estrutura do 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -diidroxitropano.



**Figura 24:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  obtido com gota de  $\text{CD}_3\text{OD}$  para o 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -diidroxitropano. As setas duplas indicam os núcleos de  $^1\text{H}$  que acoplam entre si no anel tropanico (em vermelho) e no anel aromático (em azul).

Os mapas de contorno HMBC e HSQC são apresentados nas Fig. 25 e Fig. 26, respectivamente. No HMBC são demonstradas apenas as correlações mais importantes, como a entre H-3 com a carbonila e com C-2/C-4 e com C1/C-5, a fim de auxiliar na confirmação estrutural da **FEp3**.





**Figura 25:** Mapa de contornos HMBC obtido para o 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-dihidroxitropano. A imagem superior é a expansão da região de aromático e a imagem inferior é dos hidrogênios do anel troponico

A análise dos dados que contribuíram para a identificação da **FEp3** como o 3α-(2-aminobenzoiloxi)-6β,7β-dihidroxitropano estão descritos na Tab. 4.

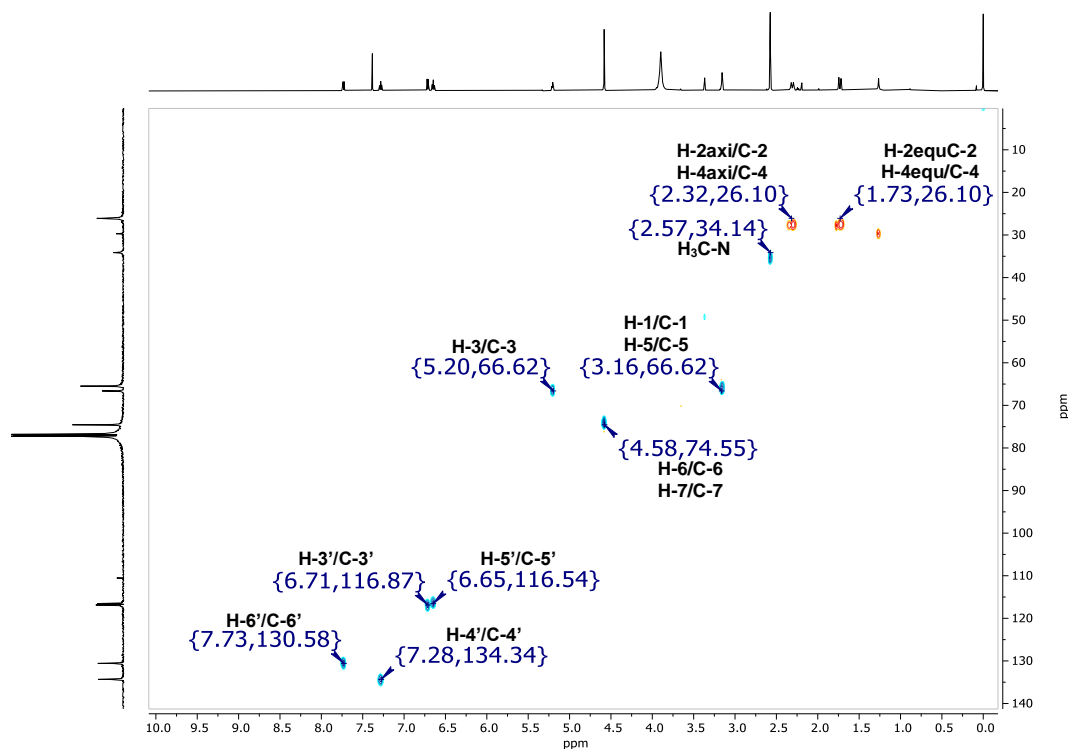


Figura 26: Mapa de contornos HSQC e as correlações diretas entre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  obtido para o 3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -diidroxitropano.

Tabela 4: Dados das análises de RMN 1D e 2D para a **FEp3**

Posição/ grupo	FEp3 $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$	$^1\text{H}, ^{13}\text{C-HMBC}$
	$^1\text{H}$ (mult.; J/Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$ <sup>b</sup>		
1	3,16 (sl)	65,5	H-2 (eq e ax)	C-3/C-7
5	3,16 (sl)	65,5	H-4 (eq e ax)	C-3/C-6
2eq	1,73 (d; 15,8)	26,1	H-1/H-2ax/	C-4/C-3
4eq	1,73 (d; 15,8)	26,1	H-4ax/H-5	C-2/C-3
2ax	2,31 (dt; 15,8; 4,8)	26,1	H-1/H-2eq/H-3	C-4/C-3
4ax	2,31 (dt; 15,8; 4,8)	26,1	H-3/H-4eq/H-5	C-2/C-3
3	5,20 (ta; 5,4)	66,6	H-2/H-4 (ax)	C-1/C-2/C-4/C-5/C-7'
6	4,58 (s)	74,6	H-7	C-1/C-2/C-4/C-5
7	4,58 (s)	74,6	H-6	C-1/C-2/C-4/C-5
1'	-	110,5	-	-
2'	-	150,8	-	-
3'	6,71 (dd; 8,5 e 0,9)	116,9	H-4'/H-5'	C-1'/C-4'
4'	7,28 (ddd; 8,5; 7,5 e 1,5)	134,3	H-3'/H-5'/H-6'	C-2'/C-6'
5'	6,65 (ddd; 8,2; 7,5 e 0,9)	116,5	H-3'/H-4'/H-5'	C-1'/C-4'
6'	7,73 (dd; 8,2 e 1,5)	130,6	H-4'/H-5'	C-2'/C-4'/C-7'
7'	-	167,2	-	-
N-CH <sub>3</sub>	2,57 (s)	34,1	-	C-1/C-5
-OH <sup>c</sup>	-	-	-	-
-NH <sub>2</sub>	5,76 (sl)	-	-	-

<sup>a</sup>espectro obtido a 600 MHz em CDCl<sub>3</sub> + 1 gota de CD<sub>3</sub>OD.

<sup>b</sup>espectro obtido a 150 MHz em CDCl<sub>3</sub> sem adição de CD<sub>3</sub>OD.

<sup>c</sup>não observado.

#### 5.4 Identificação da substância **Fep4**: 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano

A substância **Fep4** foi isolada como um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio. Na análise por CCD forneceu resultado positivo para reagente de Dragendorff, indicando se tratar de um alcaloide. A discussão dos dados espectrais da **Fep4** segue abaixo.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 27) é possível observar oito sinais na região de aromáticos, integrando para um hidrogênio cada, o que indica a presença de dois substituintes com natureza aromática na estrutura do composto. Alguns valores de deslocamento nessa região sugerem que um dos substituintes seja o 2-aminobenzoiloxi. Os sinais em 11,02 ppm (*s*) e 2,24 ppm (*s*, 3H), juntamente com os alguns sinais na região de aromáticos, sugerem que o segundo substituinte seja o 2-acetamidobenzoiloxi. Os sinais que indicam o 2-aminobenzoiloxi como substituinte são: H-3' em 6,69 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,3$  Hz e  $J_2 = 0,9$  Hz, 1H), H-4' em 7,32 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,3$ ;  $J_2 = 7,7$  Hz e  $J_3 = 1,7$  Hz, 1H), H-5' em 6,74 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,1$ ;  $J_2 = 7,7$  Hz e  $J_3 = 0,9$  Hz, 1H) e H-6' em 8,01 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,1$  Hz e  $J_2 = 1,7$  Hz, 1H). Para o 2-acetamidobenzoiloxi: H-3'' em 8,11 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,1$  e  $J_2 = 1,7$  Hz, 1H), H-4'' em 7,08 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,1$ ;  $J_2 = 7,9$  Hz e  $J_3 = 1,2$  Hz, 1H), H-5'' em 7,54 ppm (*ddd*,  $J_1 = 8,5$ ;  $J_2 = 7,9$  Hz e  $J_3 = 1,7$  Hz, 1H) e H-6'' em 8,69 ppm (*dd*,  $J_1 = 8,5$  Hz e  $J_2 = 1,2$  Hz, 1H). Os sinais do anel tropânico da **Fep4** são compatíveis com os de um alcaloide 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -trissubstituído assimetricamente. Os sinais que permitem chegar a essa conclusão são: H-1 em 3,43 ppm (*s*) e H-5 em 3,24 (*s*); H-6 em 5,80 ppm (*d*,  $J = 6,0$  Hz); e H-7 em 4,83 ppm (*d*,  $J = 6,0$  Hz). O sinal do grupo  $-\text{NH}_2$  (*sl*, em  $\sim 5,77$  ppm) aparenta estar parcialmente sobreposto ao sinal de H-6. Os demais sinais para o anel tropânico são: H-2 e H-4 axiais, que aparecem em 2,38 ppm (*m*), enquanto H-2 e H-4 equatoriais aparecem em 1,78 ppm (*ta*, 13,4 Hz), H-3 em 5,35 ppm (*ta*,  $J = 4,9$  Hz); N-CH<sub>3</sub> em 2,64 ppm (*s*) e H-9'' em 2,24 ppm (*s*). Nas Fig. 28 e 29 estão as expansões da região de aromático e do anel tropânico, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 30) apresentou sinais para três carbonilas. Para o 2-acetamidobenzoiloxi: C-1'' em 114,8 ppm, C-2'' em 141,8 ppm, C-3'' em 131,0 ppm, C-4'' em 122,6 ppm, C-5'' em 134,9, C-6'' em 120,5 ppm, C-7'' em 168,1 ppm, C-8'' em 169,2 ppm e C-9'' em 25,6 ppm. Para o 2-aminobenzoiloxi: C-1' em 110,6 ppm, C-2' em 151,1 ppm, C-3' em 117,0 ppm, C-4' em 134,6 ppm, C-5' em 116,7 ppm, C-6' em 131,1 ppm e C-7' em 167,2 ppm. Os demais sinais, que pertencem ao anel tropânico são: N-CH<sub>3</sub> em 35,2 ppm, C-1 em 62,7 ppm, C-2 e C-4 em 27,1 ppm,

C-3 e C-5 em 66,6 ppm; C-6 em 79,0 ppm e C-7 em 75,4 ppm. Quando comparados com alguns valores descritos na literatura, quando C-6 ou C-7 estão próximos a uma carbonila, (geralmente do grupo benzoiloxi e/ou seus derivados) por uma ou duas ligações, os valores de deslocamento químico para esses carbonos tendem a aumentar (RIBEIRO *et al.*, 2013a; SILVA JUNIOR *et al.*, 2020). Esse acréscimo pode ser explicado pela anisotropia diamagnética causada pela carbonila do éster, que desblinda o carbono. A influência desses grupos em hidrogênios adjacentes a C-6 ou C-7 não é tão acentuada. A ausência de sinais para outros grupos sugere a hidroxila como um terceiro substituinte. Pelo valor dos deslocamentos químicos, C-3 e C-6 estão esterificados.

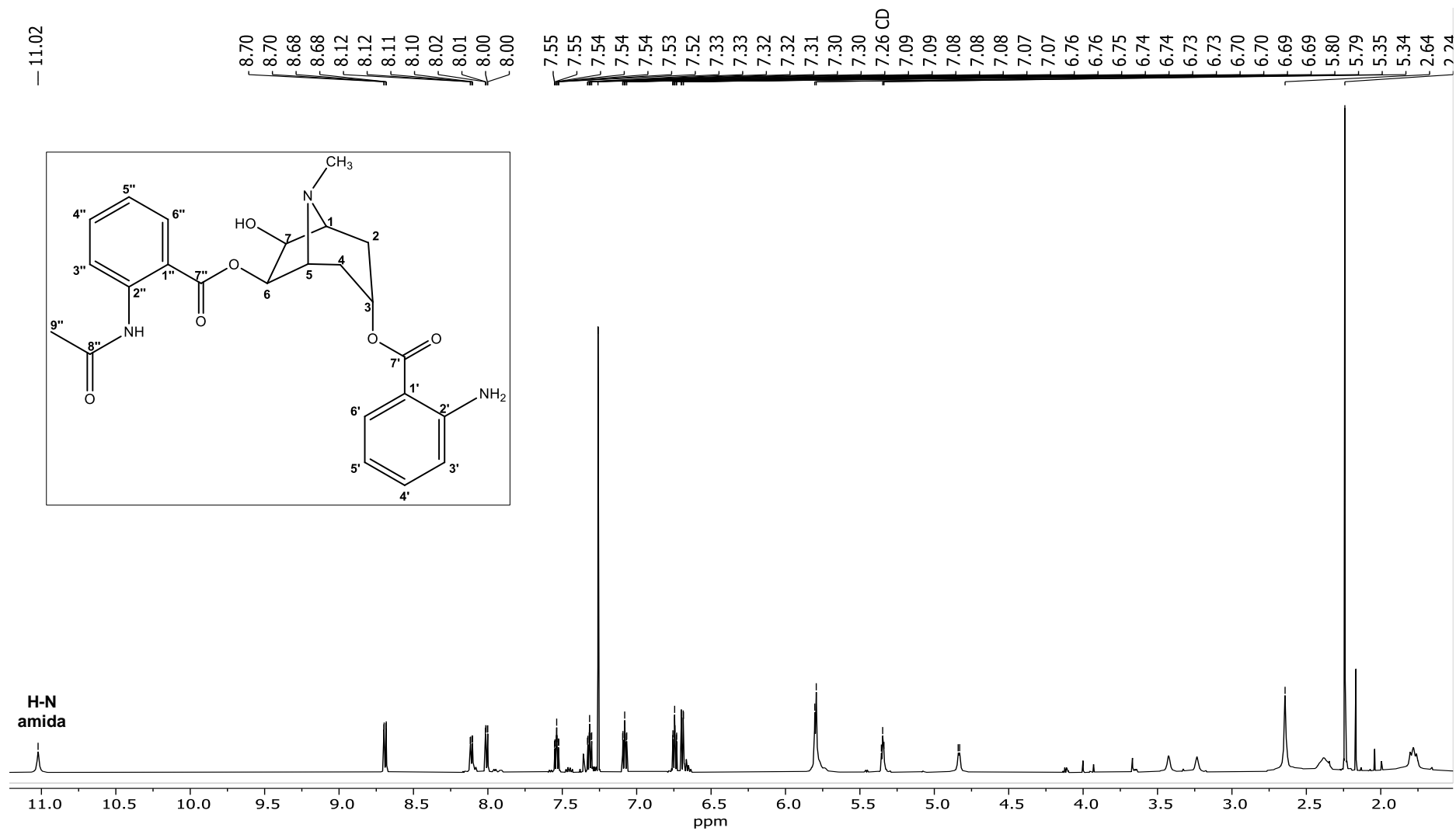


Figura 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da **FEp4**.

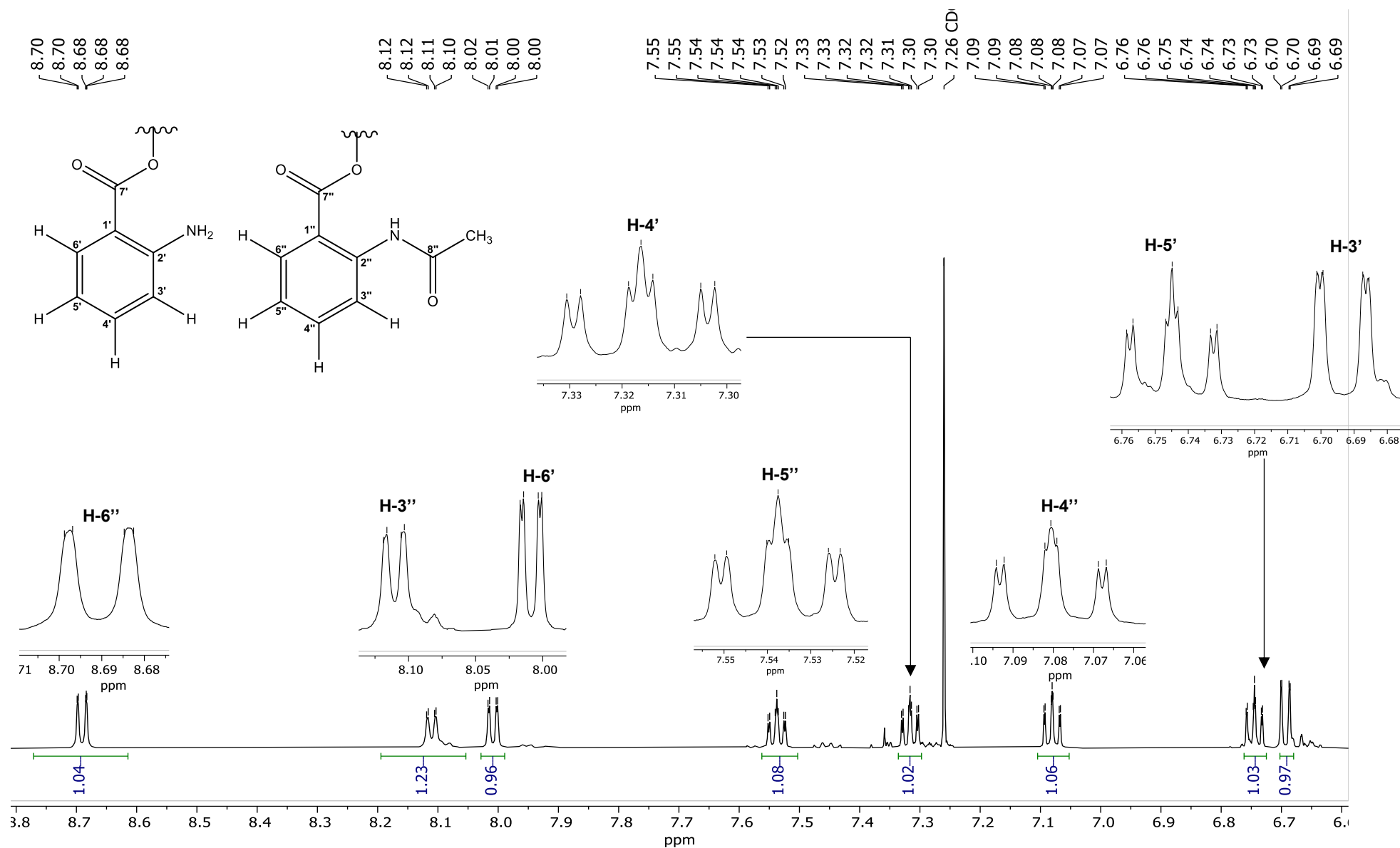


Figura 28: Expansão da região de hidrogênios em anel aromático do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da **Fep4**.

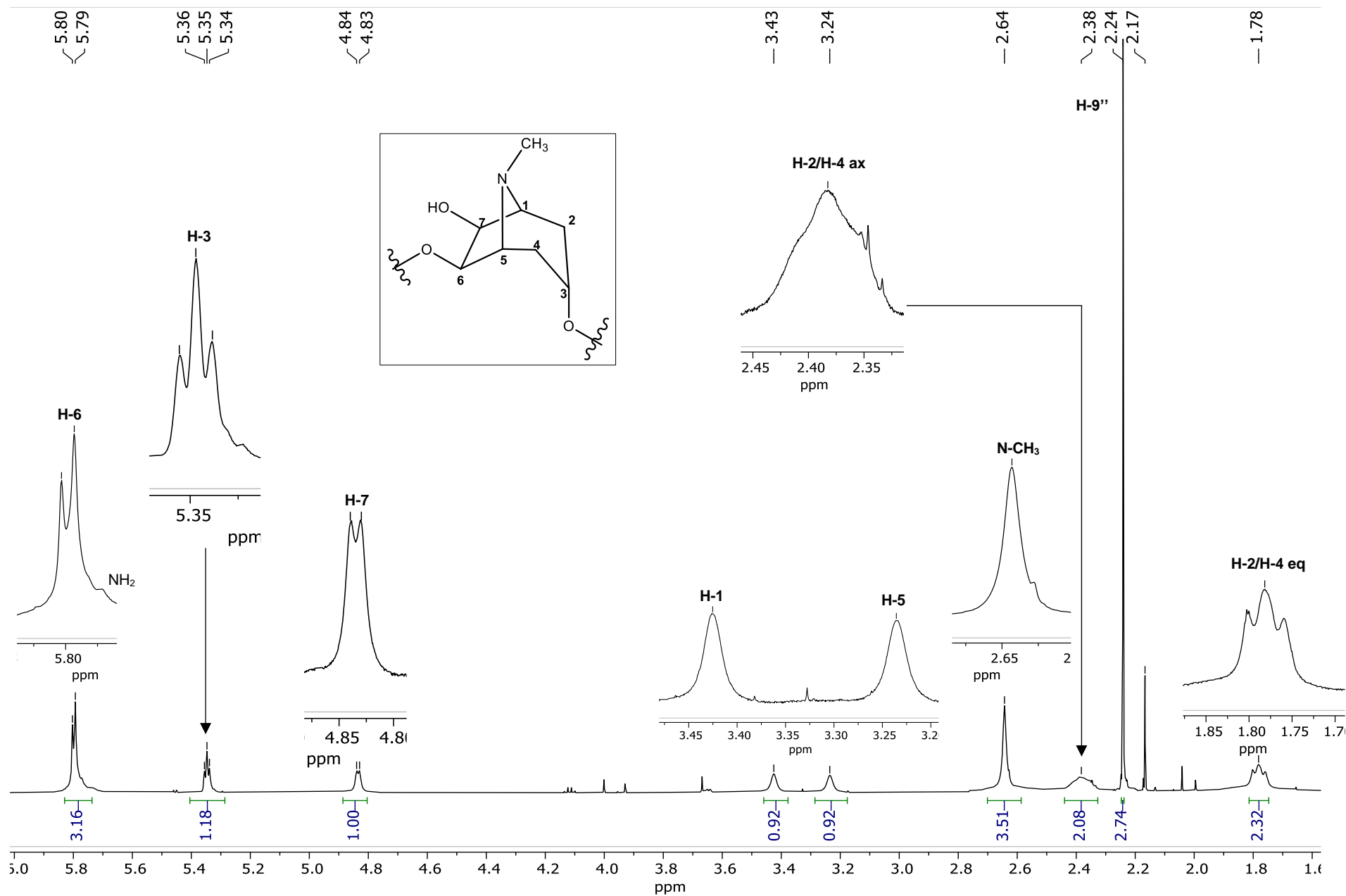


Figura 29: Expansão da região de hidrogênios alifáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da FEp4.

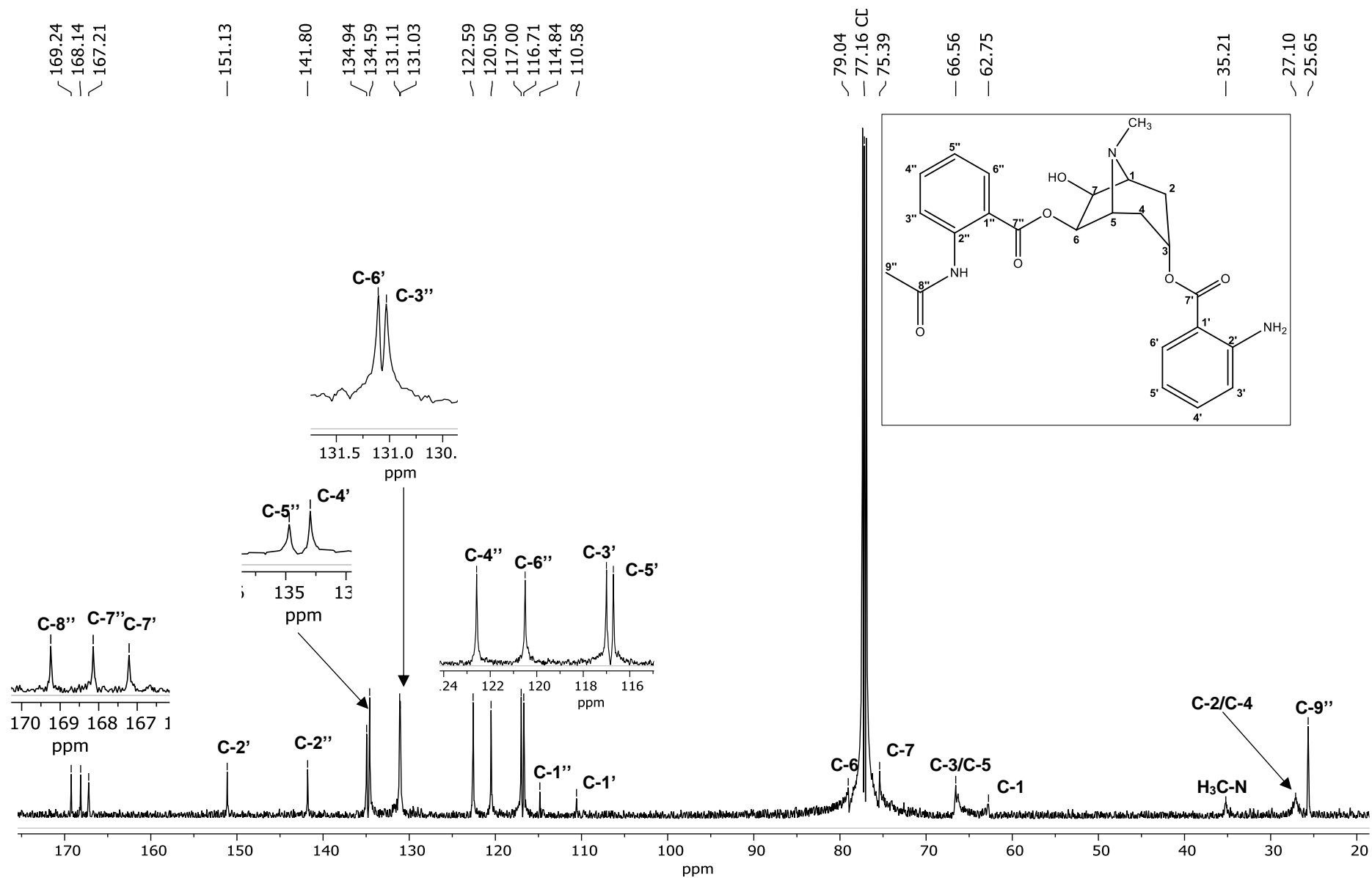
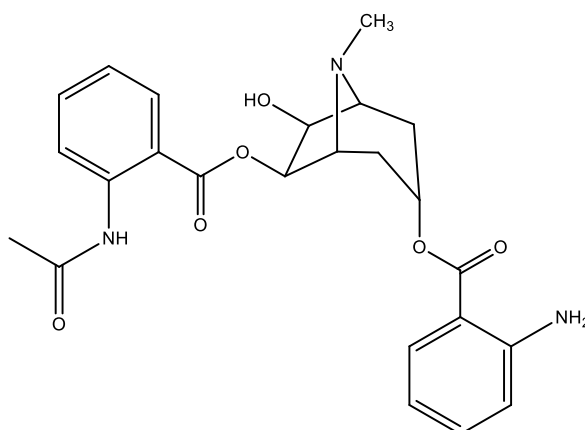


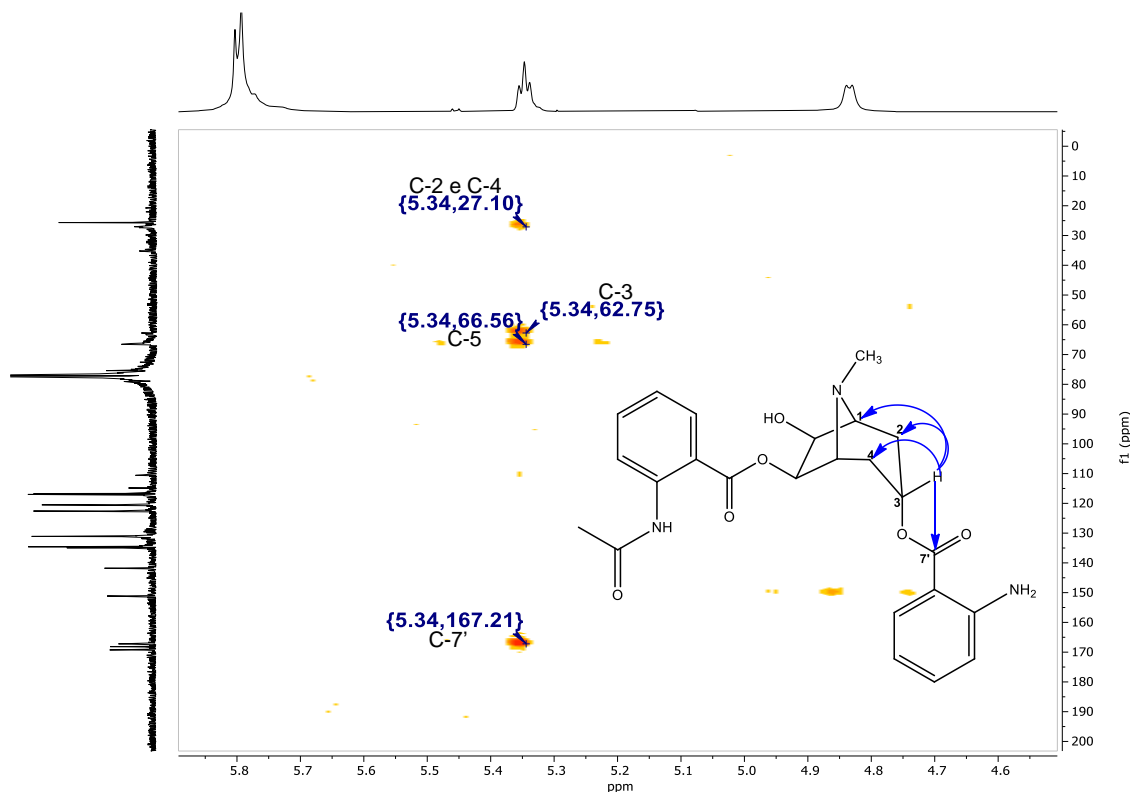
Figura 30: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da FEp4.



As análises dos espectros bidimensionais possibilitaram a identificação da **Fep4** como sendo o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano (Fig. 31), um alcaloide ainda não descrito na literatura. Pela análise da expansão do mapa de contorno HMBC (Fig. 32), foi possível identificar o 2-aminobenzoiloxi como substituinte em C-3, por meio da correlação entre o sinal do H-3 (5,35 ppm) com o sinal em 167,2 ppm (C-7'). Apesar de não poder confirmar sua correlação pelo COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , com os H-2 e H-4 axiais, é evidente que H-3 acopla com esses hidrogênios, em função da sua multiplicidade característica, quando esse se encontra em posição beta (SILVA JUNIOR *et al.*, 2021).

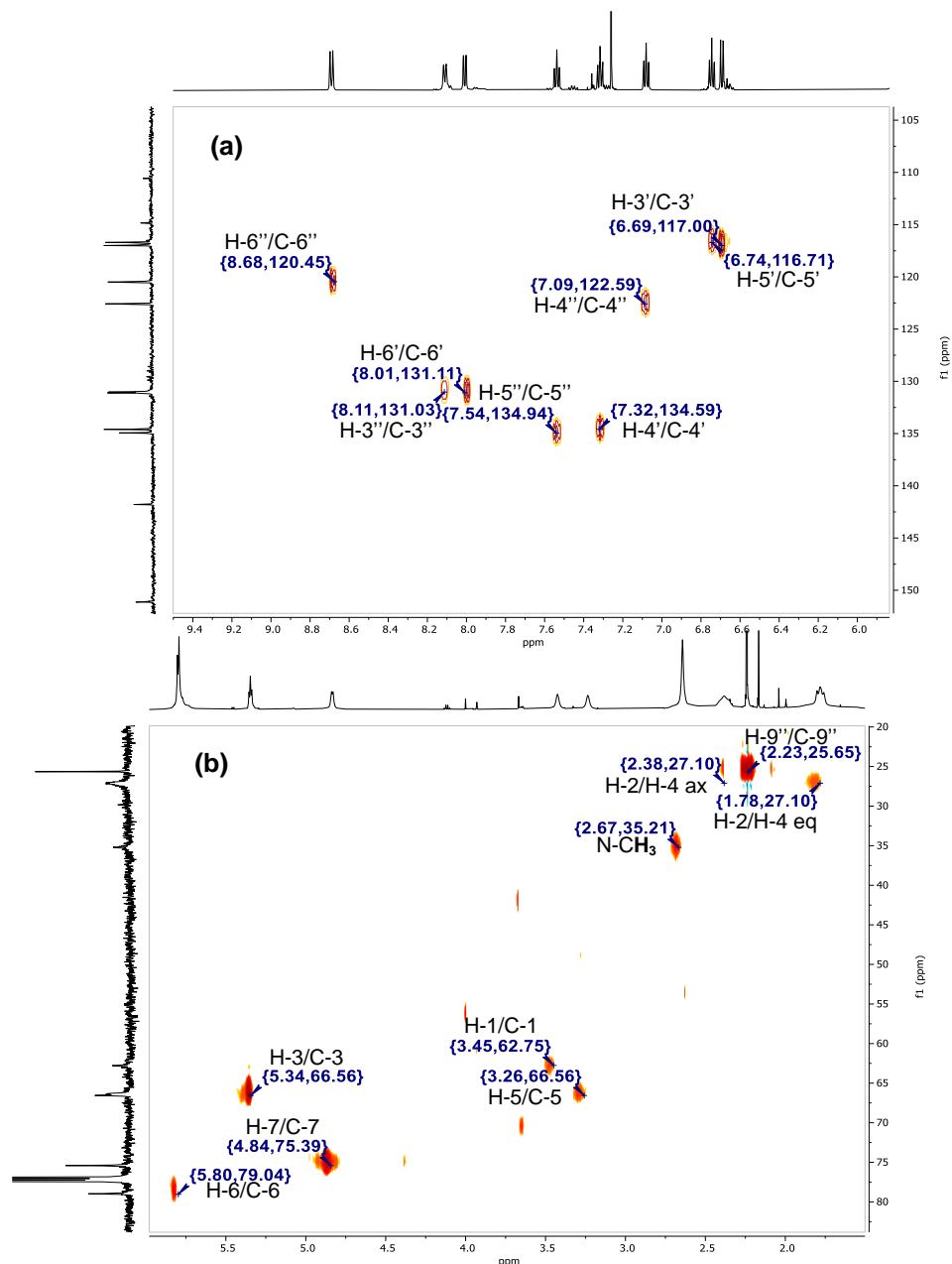


**Figura 31:** Estrutura do 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.

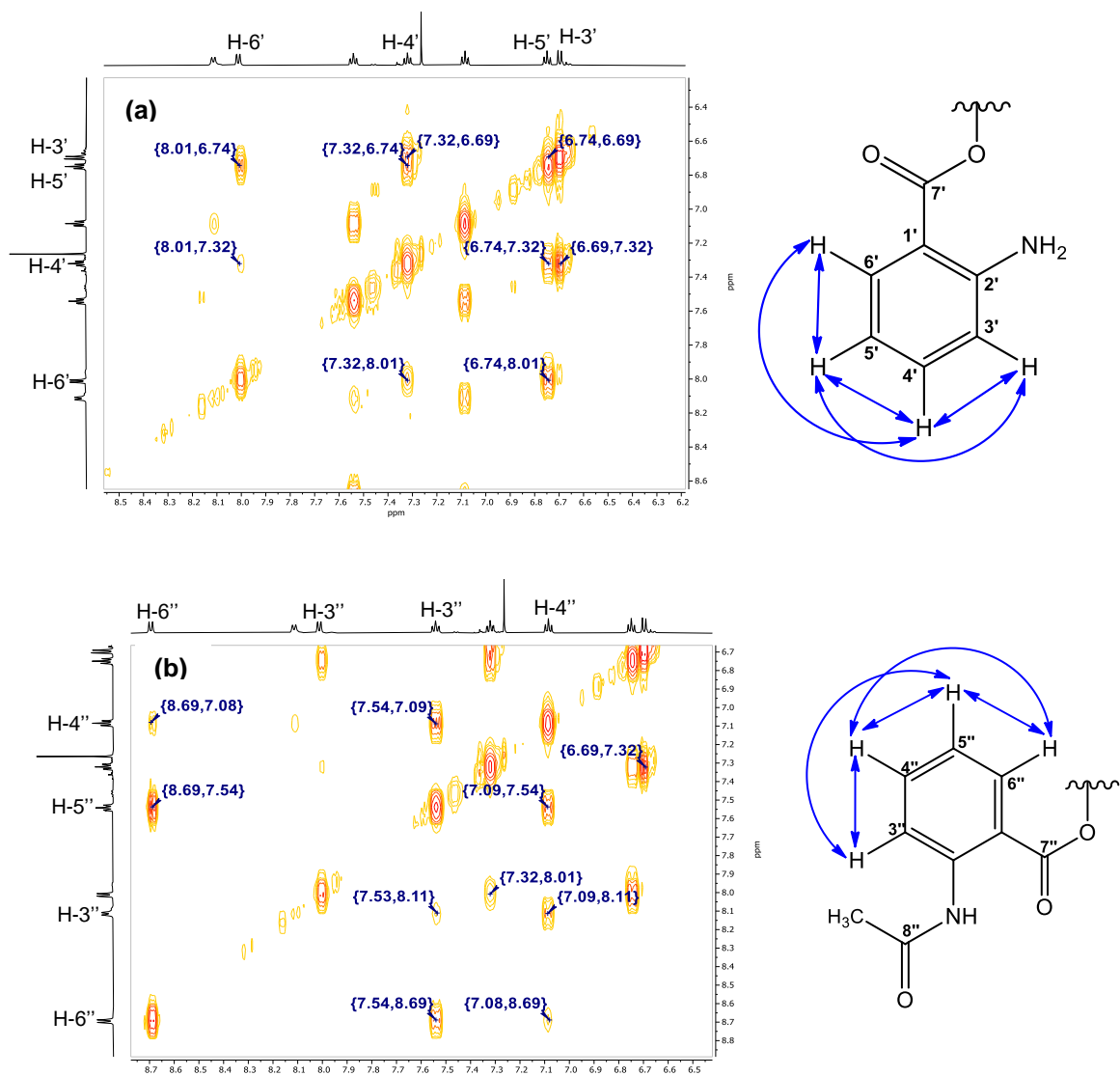


**Figura 32:** Mapa de contornos HMBC obtido para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano, mostrando importantes correlações para H-3.

A ausência de sinais para os demais hidrogênios do anel tropânico no HMBC dificultou estabelecer algumas correlações. A análise por COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  nessa região também não viabilizou as correlações entre os hidrogênios, já que os sinais não apareceram no espectro. As atribuições nesse caso foram asseguradas pela análise do HSQC (Fig. 33). As atribuições para os substituintes foram confirmadas após análise do COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMBC.



**Figura 33:** Mapa de contornos HSQC obtido para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano, mostrando expansões com as correlações dos grupos substituintes (a) e para o anel tropânico (b).



**Figura 34:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano, mostrando a expansão com as correlações dos grupos 2-aminobenzoiloxi (a) e 2-acetamidobenzoiloxi (b).

A Tab. 5 reúne os dados mais importantes que possibilitaram a caracterização do alcaloide isolado.

**Tabela 5:** Dados das análises de RMN 1D e 2D para a **FEp4**

Posição/ grupo	Deslocamentos químicos (ppm)		<sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HMBC
	<sup>1</sup> H (mult., J/Hz)	<sup>13</sup> C		
1	3,43 ( <i>s</i> )	62,7	-	-
2eq	1,78 ( <i>ta</i> , 13,4)	27,1	-	-
4eq	1,78 ( <i>ta</i> , 13,4)	27,1	-	-
2ax	2,38 ( <i>m</i> )	27,1	-	-
4ax	2,38 ( <i>m</i> )	27,1	-	-
3	5,35 ( <i>ta</i> , J = 4,9)	66,6	-	C-1/C-5/C-2/C-4
5	3,24 ( <i>s</i> )	66,6	-	-
6	5,80 ( <i>d</i> , J = 6,0)	79,0	-	-
7	4,83 ( <i>d</i> , J = 6,0)	75,4	-	-
1'	-	110,6	-	-
2'	-	151,1	-	-
3'	6,69 ( <i>dd</i> ; 8,3 e 0,9)	117,0	H-4'/H-5'	C-1'/C-5'/C-7'
4'	7,32 ( <i>ddd</i> ; 8,3; 7,7 e 1,7)	134,6	H-3'/H-5'/H-6'	C-6'/C-2'
5'	6,74 ( <i>ddd</i> ; 8,1; 7,7 e 0,9)	116,7	H-3'/H-4'/H-6'	C-1'/C-3'
6'	8,01 ( <i>dd</i> ; 8,1 e 1,7)	131,1	H-4'/H-5'	C-4'/C-2'/C-7'
7'	-	167,2	-	-
1''	-	114,8	-	-
2''	-	141,8	-	-
3''	8,11 ( <i>dd</i> ; 8,1 e 1,7)	131,0	H-4''/H-5''	-
4''	7,08 ( <i>ddd</i> ; 8,1; 7,9 e 1,2)	122,6	H-3''/H-5''/H-6''	C-1''C-2''/C-7''
5''	7,54 ( <i>ddd</i> ; 8,5; 7,9 e 1,7)	134,9	H-3''/H-4''/H-6''	C-1''/C-2''/C-3''
6''	8,69 ( <i>dd</i> ; 8,5 e 1,2)	120,5	H-4''/H-5''	C-1''/C-2''/C-4''
7''	-	168,1	-	-
8''	-	169,2	-	-
9''	2,24 ( <i>s</i> )	25,6	-	C-8''
HN-amida	11,02 ( <i>s</i> )	-	-	-
N-CH <sub>3</sub>	2,64 ( <i>s</i> )	35,2	-	-
-OH <sup>a</sup>	-	-	-	-
-NH <sub>2</sub>	~5,77 ( <i>s</i> )	-	-	-

<sup>a</sup>não observado.

### 5.5 Identificação da mistura **FEp5**: **6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano** e **3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano**

A amostra se apresentou com aspecto oleoso e incolor, solúvel em clorofórmio. A análise por CCD forneceu resultado positivo para reagente de Dragendorff, indicando que a amostra é um alcaloide. A discussão dos dados espectrais da **FEp5** segue abaixo.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 35) indicou que a **FEp5** é uma mistura de dois alcaloides, pois, dois sinais referentes ao grupo  $\text{H}_3\text{C-N}$  do anel tropânico são observados: 2,64 ppm (s, 3H) e 2,62 (s, 3H) ppm, corroborados com os múltiplos sinais sobrepostos em algumas regiões no espectro. Na região de aromáticos é possível observar sinais para 16 hidrogênios, indicando a presença de quatro anéis aromáticos 1,2-dissubstituídos. O grupo 2-acetamidobenzoiloxi é confirmado pelos sinais em 11,03 ppm (-NH de amida, s); pelos *dd* em 8,69 ppm (H-6'') e 8,11 ppm (H-3''); pelos *ddd* em 7,54 ppm (H-5'') e 7,08 ppm (H-4''); além do singleto em 2,24 ppm (3H), referente à grupo  $-\text{CH}_3$  ligado a uma carbonila de amida (H-9''). Três grupos 2-aminobenzoiloxi são confirmados pelos sinais entre 5,00 e 6,00 ppm ( $\text{NH}_2$ , que aparecem parcialmente sobrepostos pelos sinais dos dois H-6) e pelos sinais restantes de aromáticos. Os sinais dos H-7 aparecem no espectro como um *dd* (em torno de 4,82 ppm). Mas o valor da constante de acoplamento ( $J = 6,2$  Hz) confirma que são, na verdade, os dubletos de cada hidrogênio se sobrepondo parcialmente. Os valores das constantes de acoplamento de cada H-6 (*d*,  $J = 6,2$  Hz) confirmam a multiplicidade de cada H-7. Os tripletos aparentes (*ta*) correspondentes aos dois sinais de H-3 aparecem quase sobrepostos, próximos a 5,34 e 5,32 ppm, dando a impressão equivocada de um *dt*. Essas multiplicidades para H-3 já indicam sua posição em  $\beta$ . As multiplicidades dos H-6 e H-7 também indicam que o anel tropânico tenha um padrão de substituição  $3\alpha,6\beta,7\beta$ . Quando o espectro da Fig. 35 é comparado com o espectro da Fig. 27 obtido para a **FEp4**, nota-se semelhanças entre alguns sinais, sugerindo que o alcaloide discutido no item 5.4 seja um dos componentes da mistura. Assim, foram realizadas comparações entre os espectros, na região de aromático e na do anel tropânico (Fig. 36). Essas comparações reforçam a presença de **FEp4** na mistura. Os valores de deslocamento químico e de  $J$ , bem como as multiplicidades de cada componente da mistura se encontram na Tab. 6.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 37) apresentou sinais de cinco carbonilas, duas pertencem ao 2-acetamidobenzoiloxi e três aos grupos 2-aminobenzoiloxi.

Comparando os valores de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  da mistura com os descritos na Tab. 5, acredita-se que um dos alcaloides da mistura se trata, de fato, do alcaloide isolado na **Fep4**. Os valores de  $^{13}\text{C}$  para as duas substâncias também são apresentados na Tab. 6.

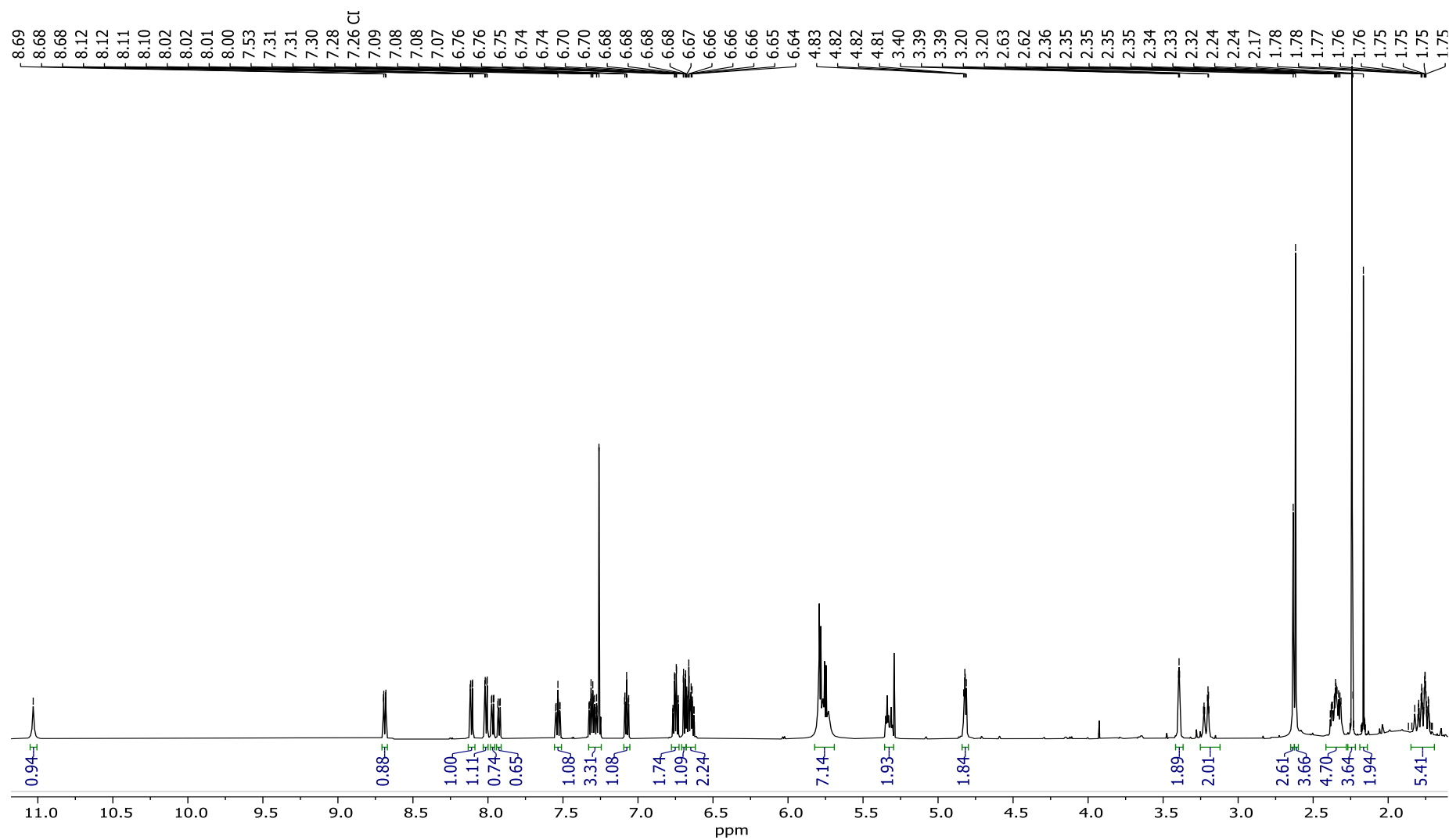
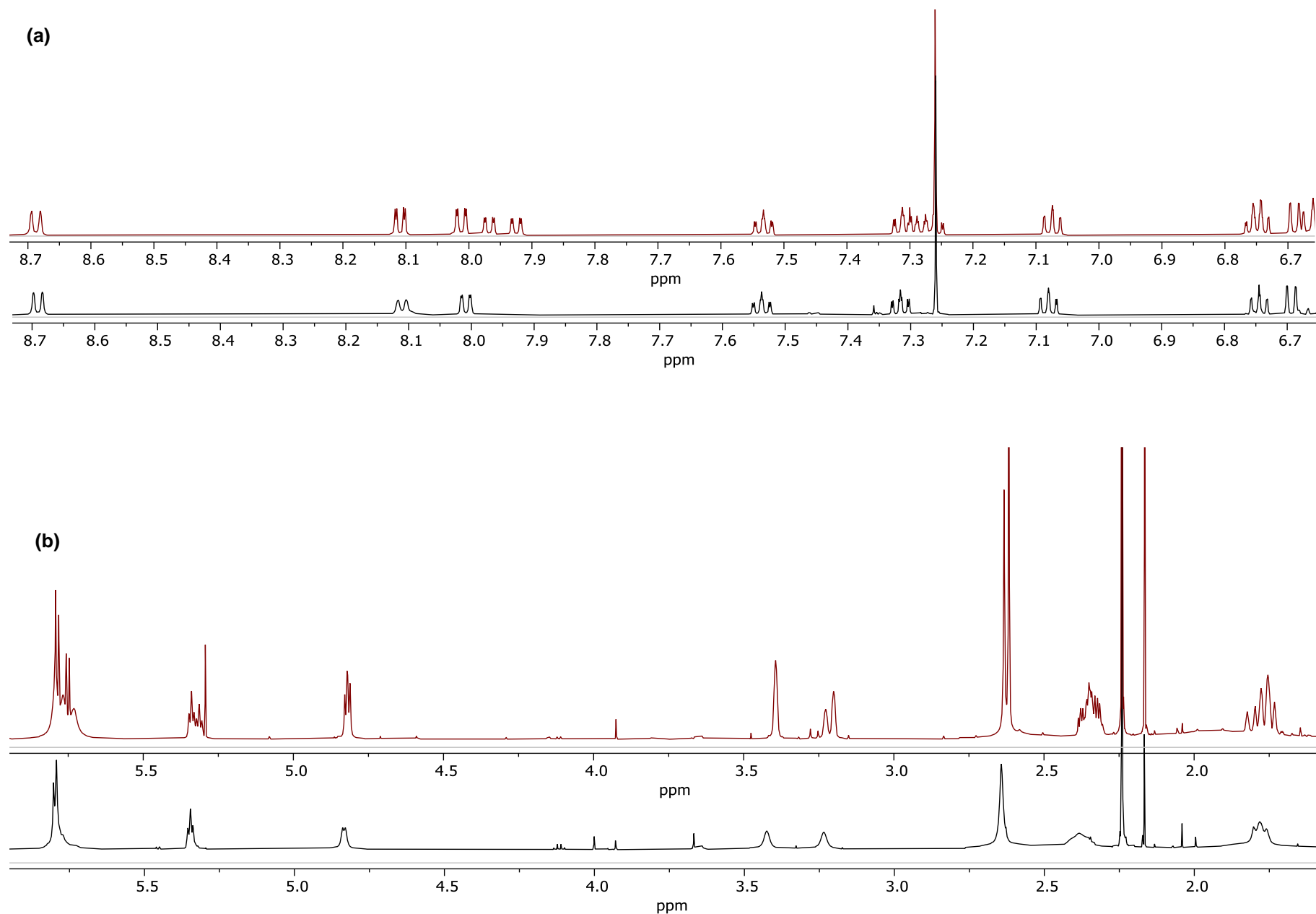


Figura 35: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de alcaloides tropicânicos presentes em **Fep5**.



**Figura 36:** Comparação entre os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de alcaloides tropanicos presentes em **Fep5** e do alcaloide de **Fep4**. Em (a) tem-se a região de hidrogênios em anéis aromáticos e em (b) a região de hidrogênios do anel tropanico. Espectros da **Fep5** em vermelho, e da **Fep4** em preto.



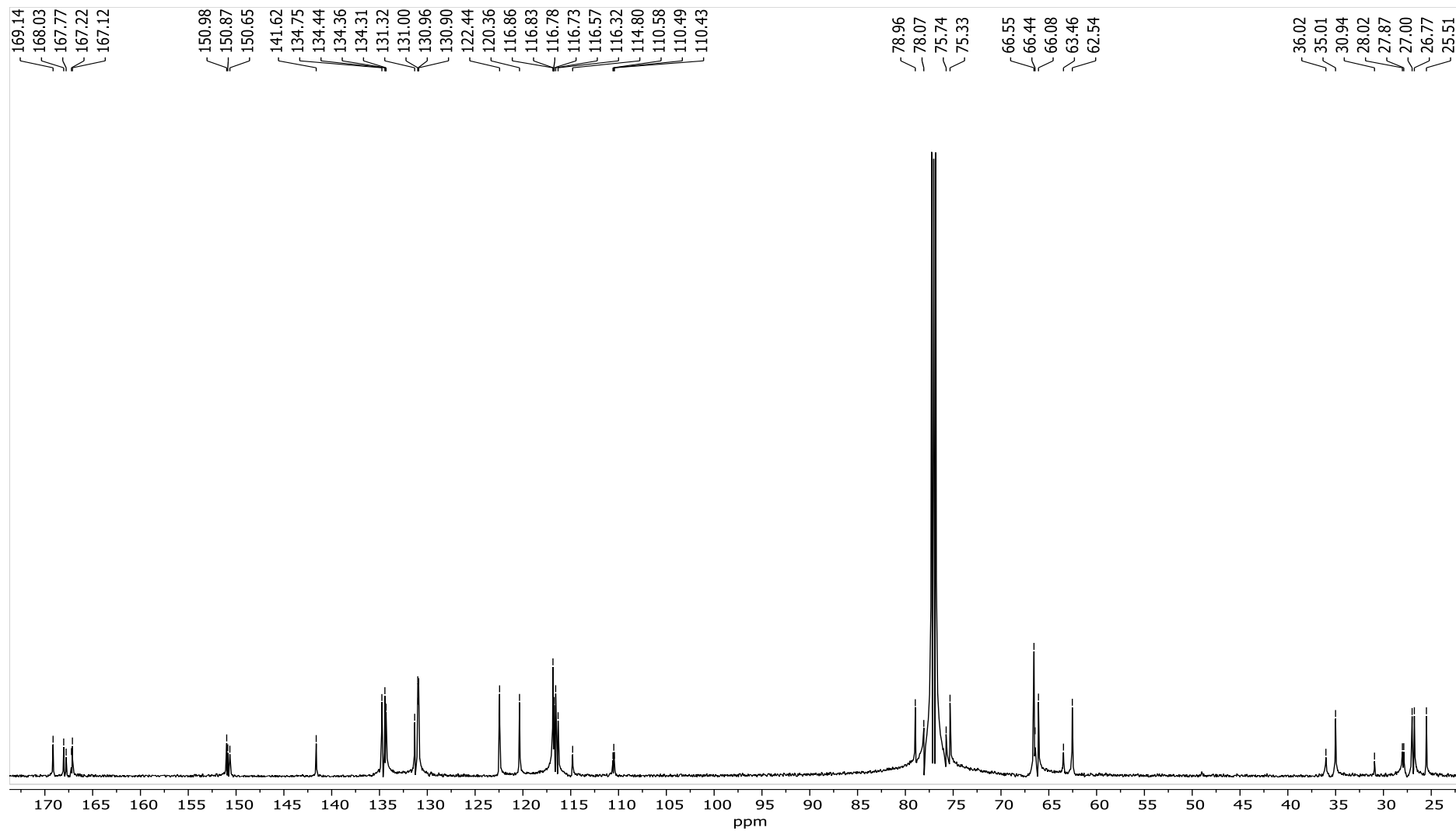


Figura 37: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de alcaloides tropânicos presentes na **FEp5**.

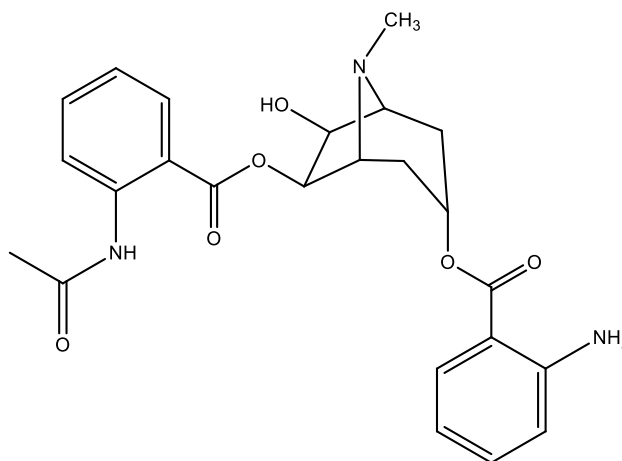
**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da mistura de alcaloides tropânicos de **FEp5**

Posição/ grupo	Deslocamentos Químicos (ppm)			
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J/Hz)		$\delta_{\text{C}}$	
	<b>FEp4</b>	<b>FEp5</b>	<b>FEp4</b>	<b>FEp5</b>
<b>1</b>	3,40 (s)	3,40 (s)	62,5	63,5
<b>2ax</b>	2,35 (m)	2,35 (m)	26,8	27,9
<b>2eq</b>	1,77 (m)	1,77 (m)		
<b>3</b>	5,34 (ta, J = 5,1)	5,32 (ta, J = 5,3)	66,6	66,6
<b>4ax</b>	2,35 (m)	2,35 (m)	27,0	28,0
<b>4eq</b>	1,77 (m)	1,77 (m)		
<b>5</b>	3,20 (s)	3,23 (s)	66,1	66,4
<b>6</b>	5,79 (d, J = 6,2)	5,76 (d, J = 6,2)	79,0	78,1
<b>7</b>	4,82 (d, J = 6,2)	4,83 (d, J = 6,2)	75,3	75,7
<b>1'</b>	-	-	110,6	110,5
<b>2'</b>	-	-	151,0	150,9
<b>3'</b>	6,69 (dd; 8,3 e 0,9)	6,65 (m)	116,9	116,7
<b>4'</b>	7,32 (m)	7,29 (m)	134,44	134,36
<b>5'</b>	6,75 (m)	6,75 (m)	116,83	116,78
<b>6'</b>	8,02 (dd; 8,0 e 1,4)	7,97 (dd; 8,0 e 1,6)	130,96	130,90
<b>7'</b>	-	-	167,2	167,1
<b>1''</b>	-	-	114,8	110,4
<b>2''</b>	-	-	141,6	150,7
<b>3''</b>	8,11 (dd; 8,0 e 1,6)	6,65 (m)	131,00	116,3
<b>4''</b>	7,08 (ddd; 8,0; 7,9 e 1,2)	7,26 (m)	122,4	134,3
<b>5''</b>	7,54 (ddd; 8,5; 7,9 e 1,6)	6,65 (m)	134,7	116,6
<b>6''</b>	8,69 (dd; 8,5 e 1,2)	7,93 (dd; 8,0 e 1,6)	120,4	131,3
<b>7''</b>	-	-	168,0	167,8
<b>8''</b>	-	-	169,1	-
<b>9''</b>	2,24	-	25,5	-
<b>N-CH<sub>3</sub></b>	2,62	2,64	35,0	36,0
<b>NH<sub>2</sub></b>	5,77 (s)	5,73 (s) – 4H	-	-
<b>-OH<sup>a</sup></b>	-	-	-	-
<b>NH amida</b>	11,03 (s)	-	-	-

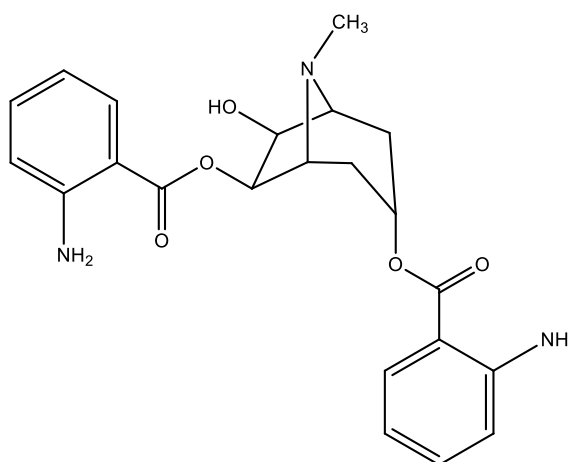
<sup>a</sup>não observado.

As atribuições dos sinais aos seus respectivos núcleos foram confirmadas após análises dos espectros bidimensionais COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC. Apesar de possuir uma baixa resolução, por conta da sobreposição de diversos sinais de carbono, a análise do mapa HSQC da mistura demonstrou que os valores atribuídos aos hidrogênios dos substituintes de um dos componentes da mistura são semelhantes aos atribuídos para o alcaloide identificado na **FEp4**. O COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permitiu estabelecer, para o anel tropânico, o acoplamento de H-3 com H-2/H-4 axiais, para as duas estruturas, bem como o fato de H-6 e H-7 não acoplarem com H-5 e H-1, respectivamente, o que comprova o padrão de substituição  $3\alpha,6\beta,7\beta$ . Após a análise do mapa de contorno HMBC da mistura, os alcaloides puderam ser identificados como  $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano e  $3\alpha,6\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano, representados nas

Fig. 38a e 38b. A Fig. 39 apresenta a expansão do mapa de contorno HMBC com as principais correlações para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano, tais como as correlações de H-3'' e de H-6 com C-7'', bem como as correlações de H-3 e de H-6' com C-7. As Fig. 40 e 41 apresentam as expansões do COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano. As Fig. 42 e 43 apresentam as expansões do COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e a Fig. 44 apresenta a expansão do mapa de contorno HMBC, com as principais correlações, para 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.

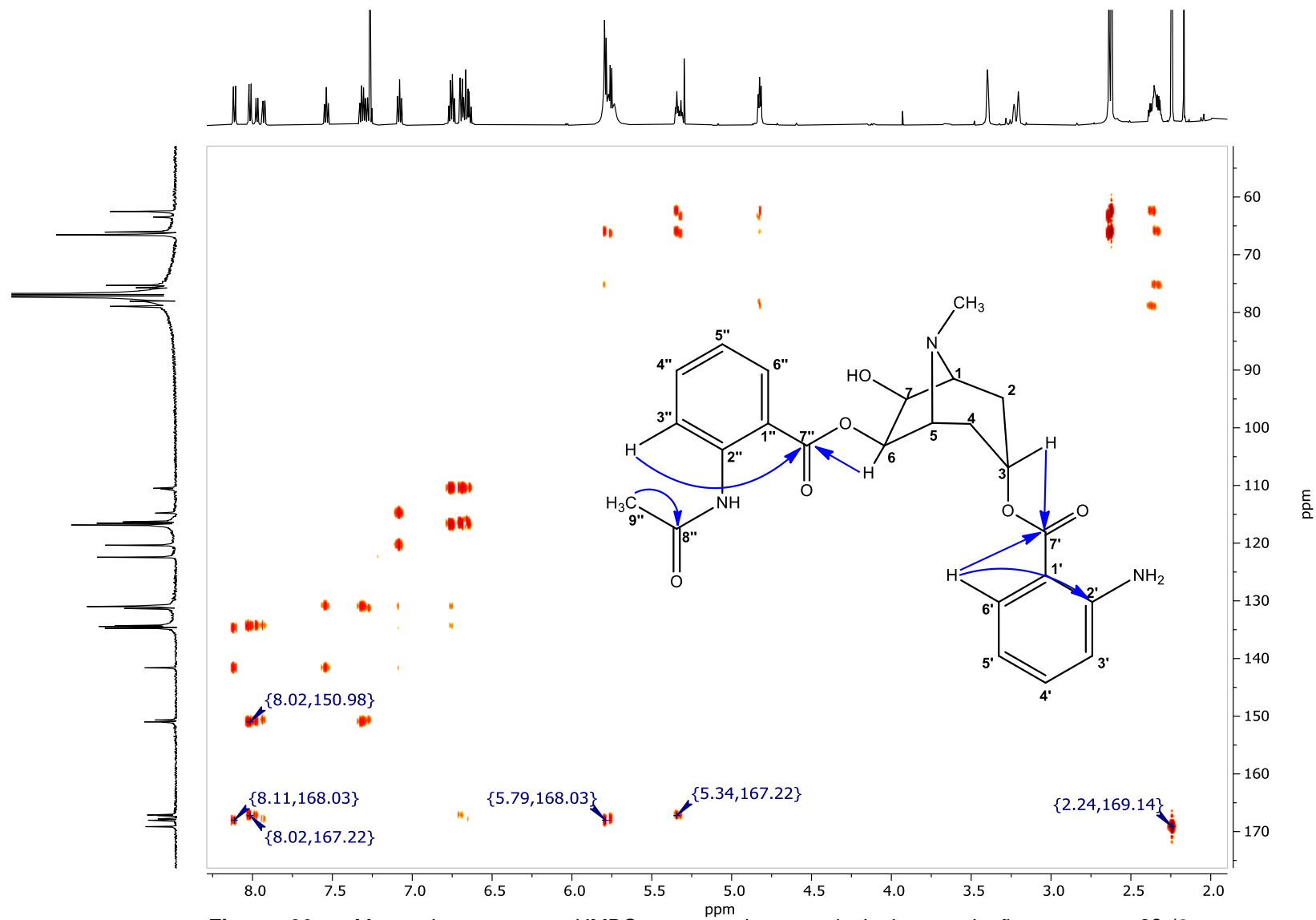


(a) 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano

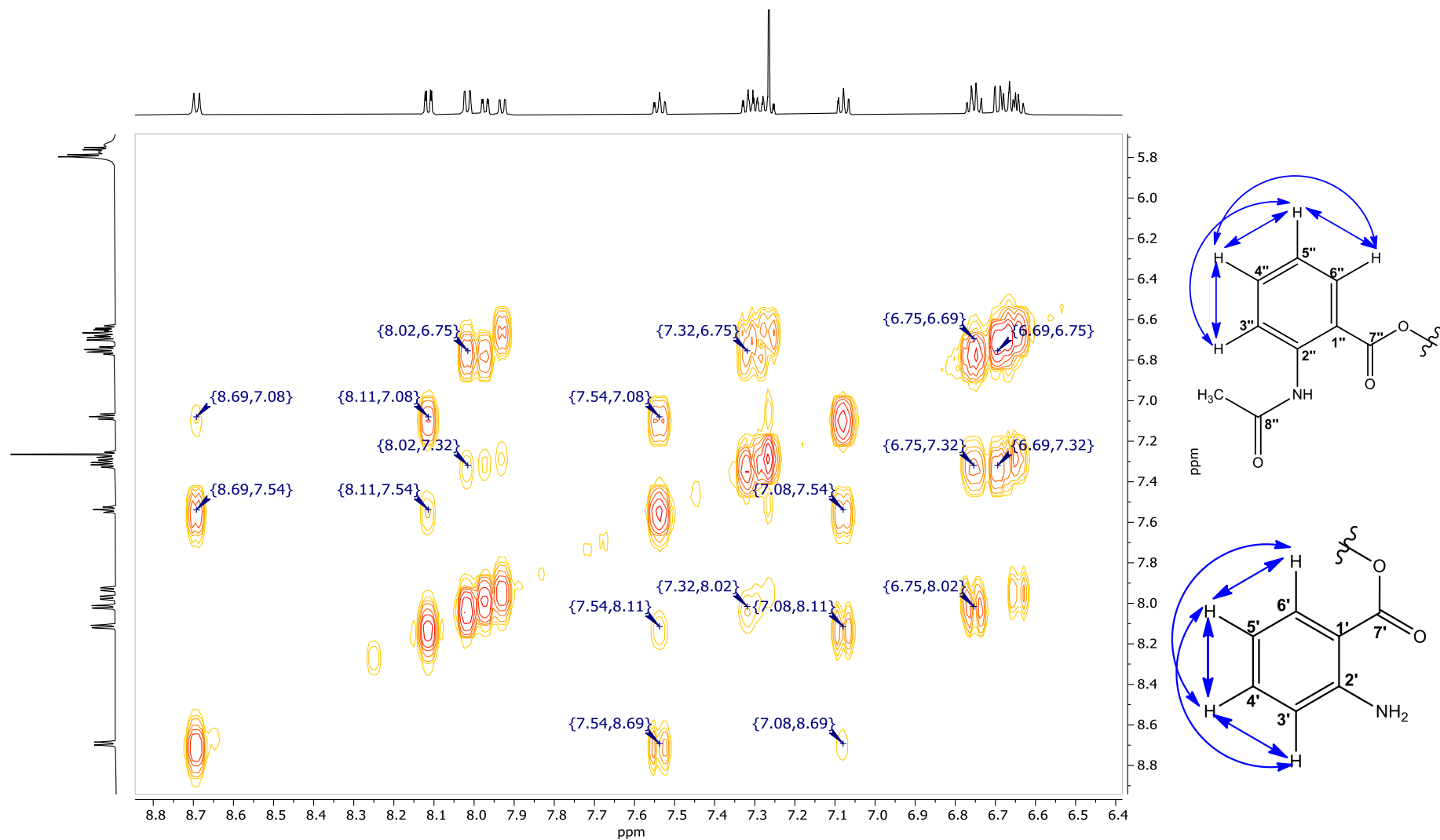


(b) 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano

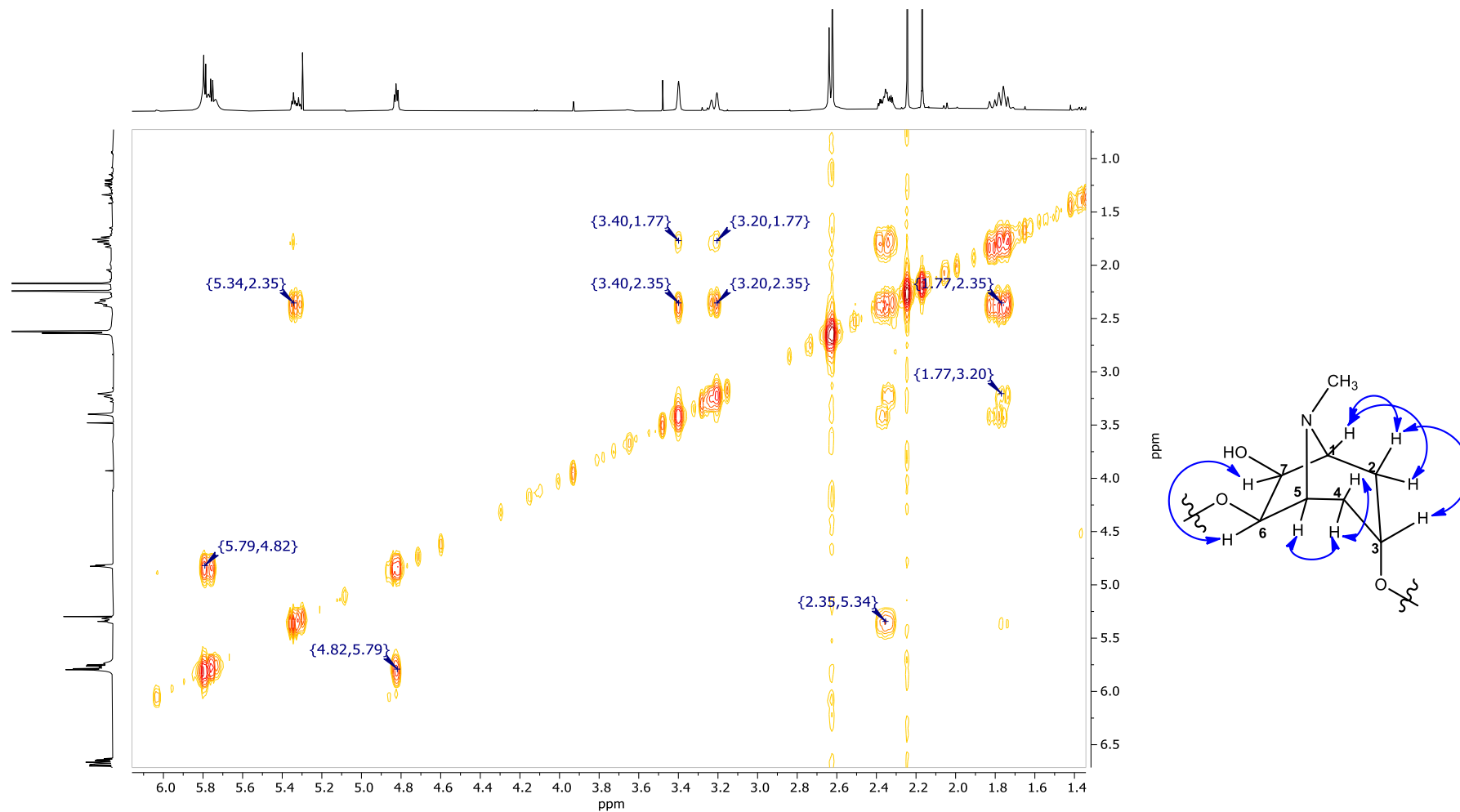
**Figura 38:** Estruturas dos alcaloides presentes na mistura **FEp5**.



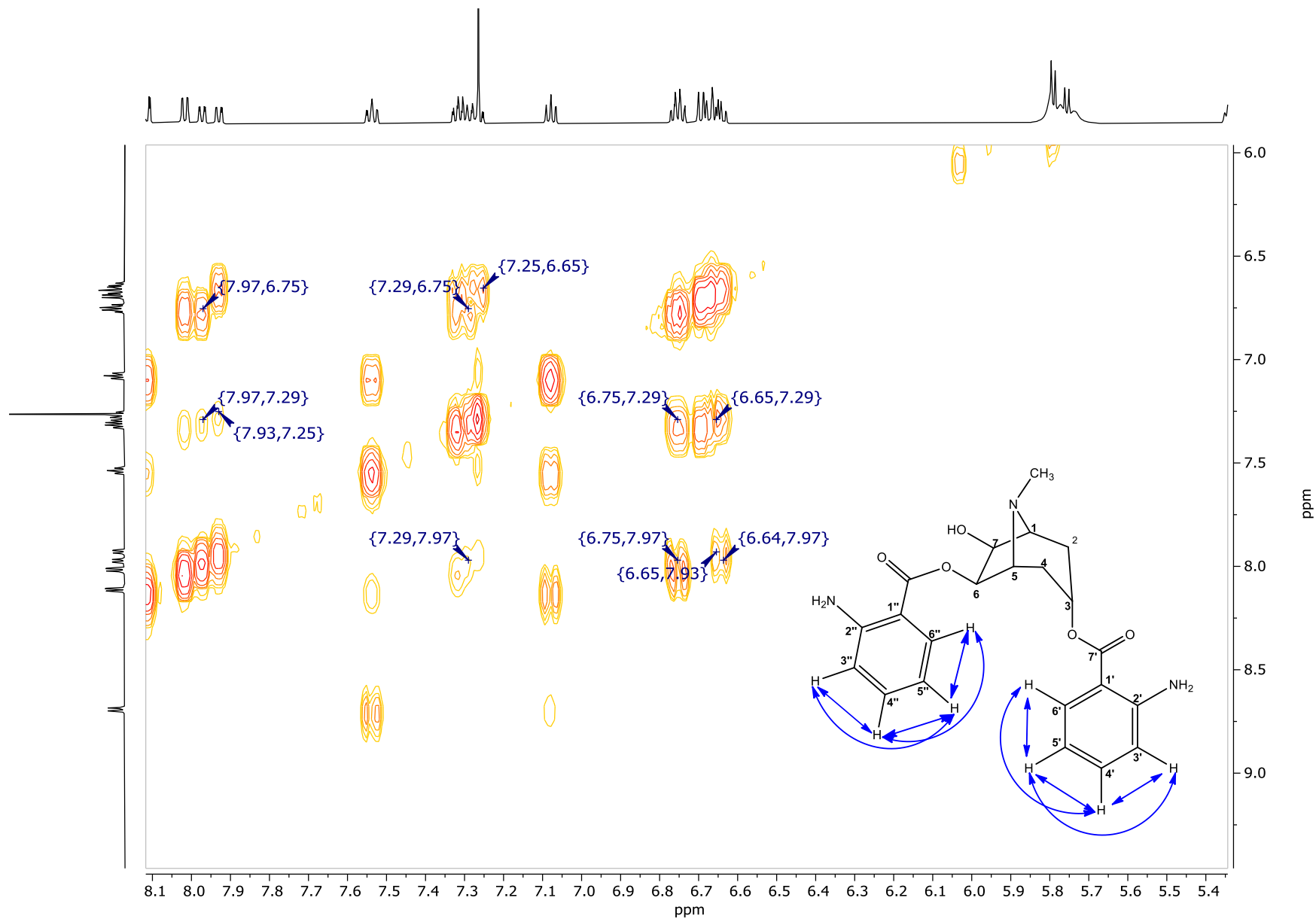
**Figura 39:** Mapa de contornos HMBC, mostrando as principais correlações para o 6β-(2-acetamidobenzoiloxi)-3α-(2-aminobenzoiloxi)-7β-hidroxitopano.



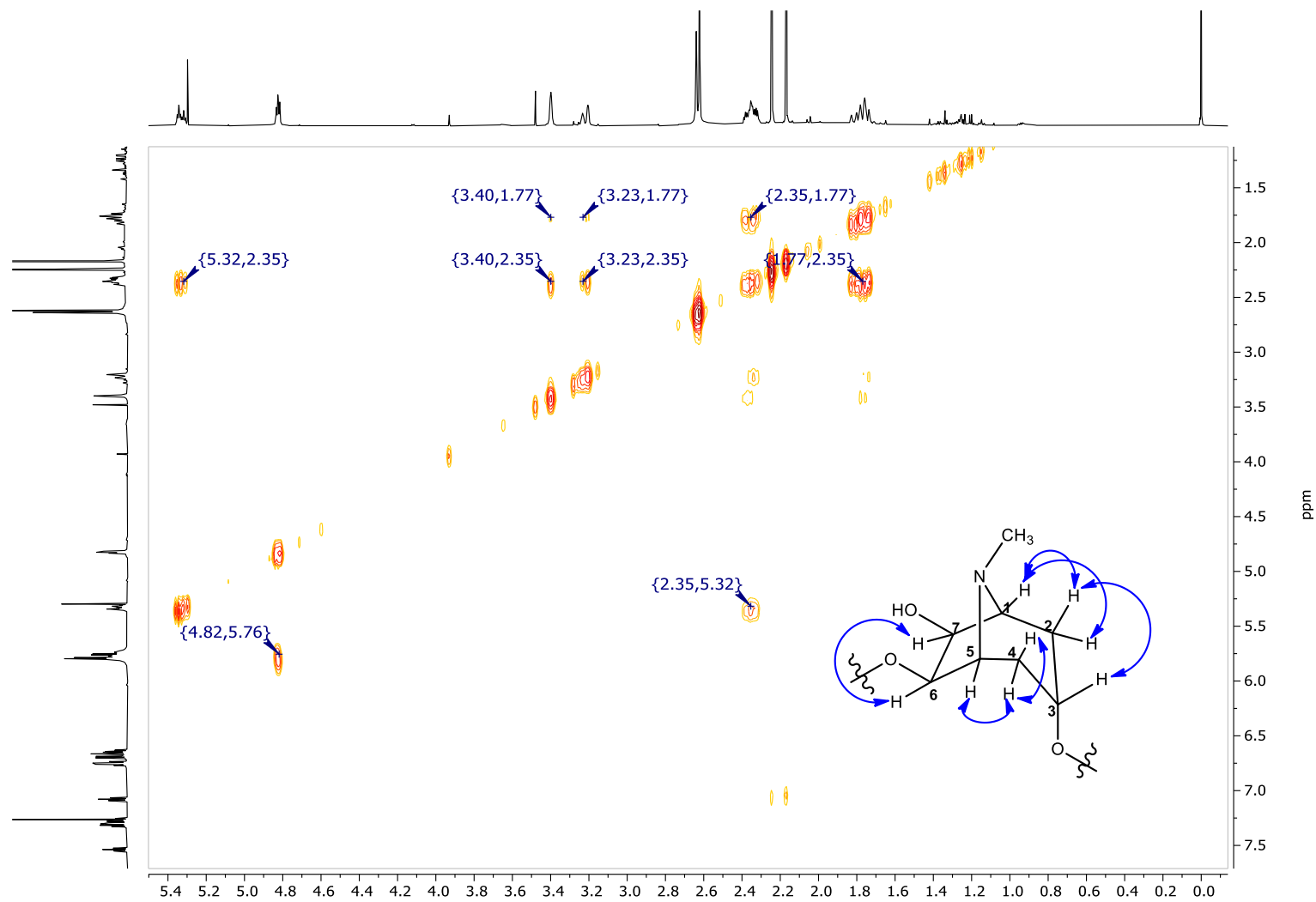
**Figura 40:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região hidrogênios em anel aromático, para o  $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano.



**Figura 41:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região de hidrogênios do anel tropânico, para o 6 $\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)-3 $\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.

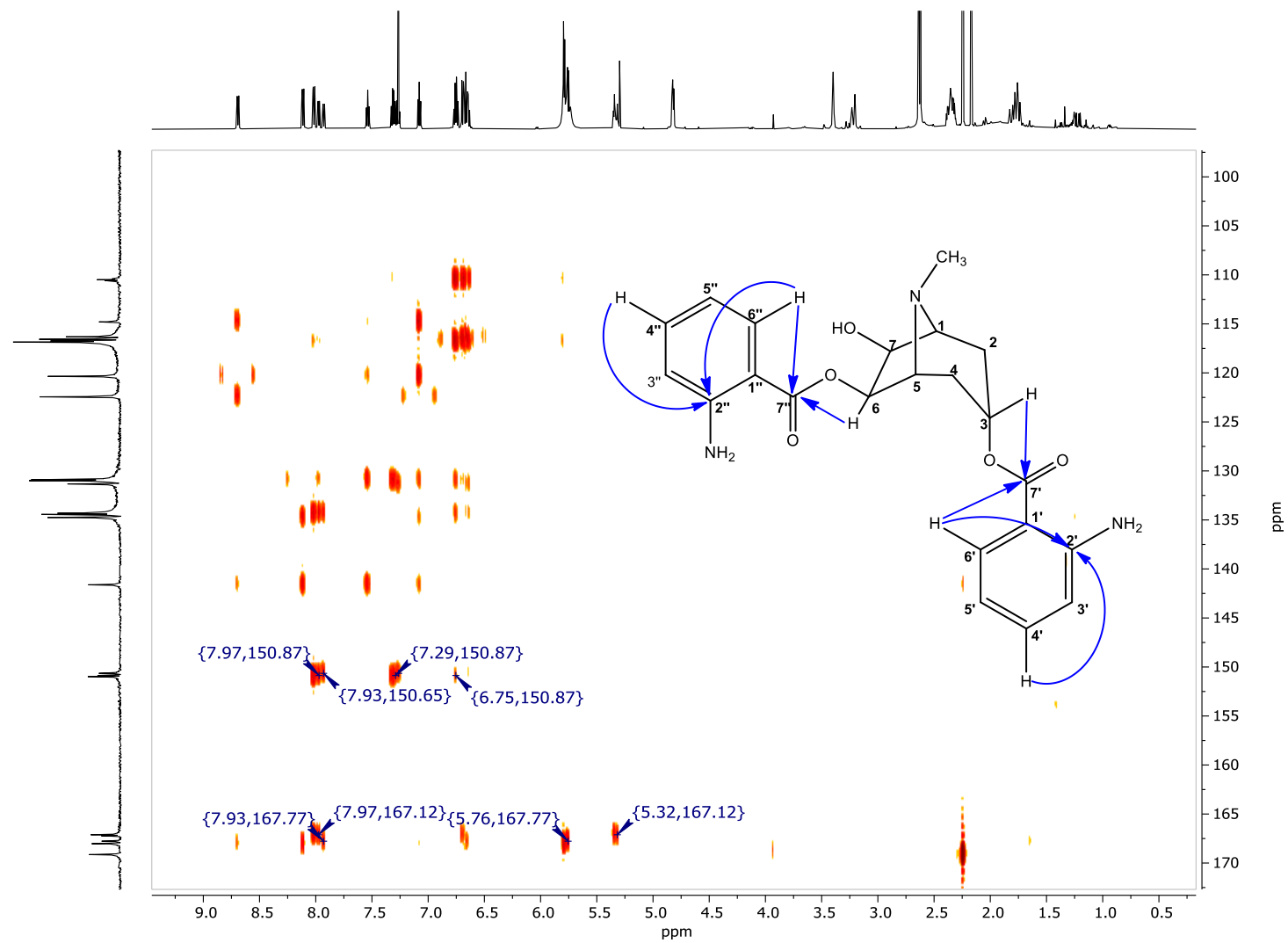


**Figura 42:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região dos hidrogênios aromáticos para o 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.



**Figura 43:** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , região de hidrogênios do anel tropânico para o 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxitropano.





**Figura 44:** Mapa de contornos HMBC com as principais correlações para o 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -bis(2-aminobenzoiloxy)-7 $\beta$ -hidroxitropano.

## 5.6 Avaliação da atividade Leishmanicida

Por conta da elevada toxicidade dos medicamentos usuais no tratamento de contra leishmania, diversos estudos estão sendo realizados a fim de se obter novas terapêuticos menos agressivos e mais eficazes. Espécies da família Fabaceae apresentaram chalconas e isoflavonas que exibiram expressiva atividade leishmanicida (BEZERRA *et al.*, 2006). Benzofenonas e biflavonóis de fontes vegetais demonstraram promissora atividade leishmanicida (PEREIRA *et al.*, 2011). Ferreira et al (2002) testaram o extrato rico em alcaloides da casca do caule de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolia* (Rutaceae), que demonstrou promissora atividade leishmanicida. Avaliaram também triterpenoides isolados das folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae), onde o ácido ursólico e ácido oleanólico demonstraram elevada atividade leishmanicida. Triterpenos, quinolonas, saponinas, chalconas, glicosídeos, acetogeninas, óleos essenciais, flavonoides e derivados polifenólicos, alcaloides se demonstram fármacos promissores na busca por novos meios de tratamento contra as leishmanioses.

Dessa forma, os extratos etanólicos brutos das folhas, galhos e caule de *E. plowmanii* tiveram seu potencial leishmanicida avaliado. Os resultados foram expressos em porcentagem da inibição do crescimento das formas amastigotas em relação aos controles sem amostra. Para este ensaio, seriam consideradas ativas as amostras com porcentagem de inibição acima de 70%, na concentração de 200 µg/mL. O resultado do estudo está descrito na Tab. 7.

**Tabela 7:** Resultado da avaliação de atividade leishmanicida de extratos de *Erythroxylum plowmanii*

Extratos	Concentração	Inibição (%)
Folhas	200 µg/mL	84
Galhos	200 µg/mL	74
Caule	200 µg/mL	48

Os extratos das folhas apresentaram o resultado mais expressivo em relação ao seu potencial leishmanicida. As espécies de *Erythroxylum* possuem uma extensa lista de atividades biológicas avaliadas, mas ainda não foi encontrada nenhuma associação com atividade leishmanicida.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato etanólico das folhas de *E. plowmanii* possibilitou o isolamento e identificação, por meio de análises espectrais e espectrométricas, de 5 substâncias, sendo elas o  $\beta$ -sitosterol glicosilado, 2-acetamidobenzoato de metila, ambos já descritos na literatura, e três alcaloides tropânicos inéditos:  $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $6\beta,7\beta$ -diidroxitropano;  $6\beta$ -(2-acetamidobenzoiloxi)- $3\alpha$ -(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano e  $3\alpha,6\beta$ -bis-(2-aminobenzoiloxi)- $7\beta$ -hidroxitropano. Essa classe de alcaloides é comum em espécies do gênero *Erythroxylum* e já demonstraram inúmeras atividades farmacológicas. O isolamento desses três novos compostos é de grande contribuição ao conhecimento químico dessas espécies, principalmente para a planta objeto dessa pesquisa, pois não há relatos de estudos desse tipo para ela. Quanto à atividade leishmanicida, o extrato etanólico das folhas parece ser uma promissora fonte de novos fármacos no tratamento de leishmanioses.

Como perspectivas futuras, tem-se a continuidade dos estudos com a planta, para isolamento e identificação de outras substâncias, e avaliação da atividade leishmanicida e outras atividades biológicas para as substâncias isoladas.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; RODRIGUES, M. do D.; SENA, K. X. F. R.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.
- ALBUQUERQUE, C. H. de; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L. de; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. de O.; AGRA, M. de F.; PESSÔA, H. de L. F.; SILVA, M. S. da. Flavonoid glycosides from *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 663-666, 2014.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 953-959, 1993.
- ARAÚJO, M. V.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, J. F. M.; SILVA, A. E.; SILVA, J. K. S.; SILVA, G. R.; SILVA, E. C. O.; SOUZA, S. T.; FONSECA, E. J. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Flavonoids induces cell death in *Leishmania amazonensis*: in vitro characterization by flow cytometry and raman spectroscopy. **The Analyst**, v. 144, n. 17, p. 1-13, 2019.
- BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011, 189p.
- BARBOSA, C. C.; SILVA, F. D.; SANTOS, A. M.; VAZ, M. R. F.; NÓBREGA, F. F. F. aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxylum*. **Revista Saúde e Ciência**, v.3, n.3, p.207-216, 2014.
- BARREIROS, M. L. **Flavonoides e terpenoides de três espécies do gênero *Erythroxylum* e suas atividades biológicas**. 2005. 172f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S. de; COSTA, J. F.O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIRÓZ, L. P. de; SANT'ANA, A. E. G. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, n. 13, p. 1735-1739, 2007.
- BARROS, I. M. de C.; LEITE, B. H. M.; LEITE, C. F. M.; FAGG, C. W.; GOMES, S. M.; RESCK, I. S.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHÃES, P. O.; SILVEIRA, D. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A.St. Hil.leaves. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, v. 07, n. 03, p. 88-94, 2017.
- BEZERRA, J. M. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS**. Dissertação de mestrado. 64f. Universidade do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. São Luiz/MA, 2006.
- BIONDICH, A. S.; JOSLIN, J. D. Coca: the history and medical significance of an ancient andean tradition. **Emergency Medicine International**, v. 2016, p. 1-5, 2016.
- BOHM, B. A.; Loo, T.; NICHOLLS, K. W.; PLOWMAN, P. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 833-837, 1988.
- BORELLI, V.; LENTZ, D.; VERONEZI, L. O.; SILVA, T. C. E.; KAUFER, L.; TRAVERSO, S. D.; GAVA, A. Intoxicação espontânea e experimental por folhas e

frutos de *Erythroxylum deciduum* (cocão) em ovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 3, p. 213-218, 2011.

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

CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D.; PATIL, P. N. Evaluation of the cholinergic and adrenergic effects of two tropane alkaloids from *Erythroxylum pervillei*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 1002-1005, 2007.

COLODEL, E. D.; SEITZ, A. L.; SCHMITZ, M.; BORBA, M. R.; RAYMUNDO, D. L.; DRIEMEIER, D. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 3, p. 165-168, 2004.

CÓRDOVA, W. H. P.; MATOS, M. G.; TABART, J.; SIPEL, A.; KEVERS, C.; DOMMES, J. IN VITRO CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CUBAN ENDEMIC VARIETIES OF *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. ISOLATION OF TWO FLAVONOL GLYCOSIDES. **J. Chil. Chem. Soci.**, v. 57, n. 4, p. 1340-1343, 2012.

CORREIA, A. F.; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHÃES, P. O.; FAGG, C. W.; SILVA, E. C. da; GOMES, S. M.; GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; NÓBREGA, Y. K. de M. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

COSTA-LIMA, J. L. da; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J. G. Erythroxylaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, v.65, n.3, p.659-671, 2014.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends In Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Flowering plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden, Princeton University Press, New York, p.143-145, 2004.

DE WET, H. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11511-11514, 2011.

EL-IMAN, Y. M. A.; EVANS, W. C.; PLOWMAN, T. Alkaloids of some South American *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2285-2289, 1985.

ELIAS, S. T.; MACEDO, C. C. S.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; COLETTA, R. D.; NEVES, F. A. R.; GUERRA, E. N. S. Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Cell Cycle**, v. 15, n. 7, p.948-956, 2016.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

FATIMA, K.; ABBULU, K. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Chonemorpha fragrans* and *Erythroxylum monogynum* combined ethanolic leaf extract in alloxan induced diabetic wistar rats. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 7428-7436, 2017.

FERREIRA, M. E.; ARIAS, R. A de; ORTIZ, S. T. de; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H. C.; THOUVENEL, A. C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **J Ethnopharmacol**; 80(2-3):199-202, 2002.

FILHO, M. D. L. **Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina**. 2009. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; PINO-RODRÍGUEZ, S.; GARCÍA-TORRES, M.; CARBALLO-GONZÁLEZ, M. T.; ECHEMENDIA-ARANA, O. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Phytochemical screening and in vitro antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 506-509, 2004.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 6, p. 539-542, jun. 2006.

GRAF, E.; LUDE, W. Alkaloide aus *Erythroxylum vacciniifolium* MARTIUS, 1. Mitt. **Arch. Pharm. (Weinheim)** 310, p. 1005-1010, 1977.

GRAF, E.; LUDE, W. Alkaloide aus *Erythroxylum vacciniifolium* MARTIUS, 2. Mitt. **Arch. Pharm. (Weinheim)** 311, p. 139-152, 1978.

GULDBRANDSEN, N.; DE MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T.; WIEBE, C.; DICKHAUT, J.; REINGRUBER, R.; SORGENFREI, O.; HAMBURGER, M. Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties, and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 2, p. 353-367, 2015.

GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, H.; NAROD, F.; GOVINDEN-SOULANGE, J.; MAHOMOODALLY, F. Biological activity from indigenous medicinal plants of Mauritius. **Pure And Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2005.

HANSEN, K.; ADSERSEN, A.; SMITI, U. W. ; NYMAN, U.; CHRISTENSEN, S. B.; SCHWARTNER, C.; WAGNER, H. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 313-317, 1996.

IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 752-753, 1983.

JUNIOR, A. E. H.; TOMAZIN, J.; PUTON, B. M. S.; CANSIAN, R. L.; BUDKE, J. C.; GRAZZIOTIN, N. A.; LIMBERGER, R. P. Effect of seasonality on antibacterial and antioxidant activity of *Erythroxylum argentinum* o. e. schulz and *Erythroxylum deciduum* ST. HIL. al. **World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, v. 4, p. 11-16, 2018.

KALBANDHE, A. H.; KAVALE, A. C.; THORAT, P. B.; KARADE, N. N. Oxidative Cleavage of C2-C3 Bond in Isatin Using (Diacetoxyiodo)benzene: A Facile Synthesis of Carbamates or Alkyl Anthranilates. **Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York — Synlett**, v. 27, 763-768, 2015.

KAUFFMANN, C.; PACHECO, L. A.; BUHL, B.; SCHEIBEL, T.; FREITAS, E. M. de; HOEHNE, L.; MACHADO, G. M. de C.; CAVALHEIRO, M. M. do C.; GNOATTO, S. C. B.; ETHUR, E. M. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de espécies da família

Myrtaceae, nativas do sul do Brasil. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 9, n. 3, p. 246-258, 2017.

KHATUN, M.; BILLAH, M.; QUADER, M. A. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. **Dhaka Univ. J. Sci.** v. 60, n. 1, p. 5-10, 2012.

KIM, J. S.; KIM, J. C.; SHIM, S. H.; LEE, E. J.; JIN, W.; BAE, K.; SON, K. H.; KIM, H. P.; KANG, S. S.; CHANG, H. W. Chemical Constituents of the Root of *Dystaenia takeshimana* and Their Anti-Inflammatory Activity. **Arch Pharm Res**, v. 29, n. 8, p. 617-623, 2006.

KUMAR, R. V.; REDDY, G. V.; REDDY, M. K. Screening of phytochemicals and antioxidant activity of *Erythroxylum monogynum*. **Int. J. Bioassays**, v. 3, n. 5, p. 3005-3007, 2014.

KUMAR, C. D.; ANITHA, S.; VARALAKSHMI, P.; RAO, D. M. Evaluation of Potential Phytochemicals and Phyto Pharmacological Activities of *Erythroxylum monogynum* Roxb. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 16, n. 2, p. 441-449, 2019.

LEITE, C. F. M.; LEITE, B. H. M.; BARROS, I. M. C.; GOMES, S. M.; FAGG, C. W.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M. Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 2, p. 135 - 143, 2014.

LEYVA, O.; ALONSO, A.; ROSARIO, L. A.; DÍAZ, A.; PRADO, Y.; RODEIRO, I.; ARENCIBIA, D. F. Evaluación antigenotóxica del extracto etanólico de *Erythroxylum minutifolium* grises utilizando el ensayo SOS. **Revista de Toxicología em Linha**, p. 36-48, 2003.

LI, L. S.; CHIROMA, S. M.; HASHIM, T.; ADAM, S. K.; MOKLAS, M. A. M.; YUSUF, Z.; RAHMAN, S. A. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Erythroxylum cuneatum* alkaloid leaf extract. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2020.

LI, J.; CHANG, H.; ZHAO, W.; PI, H.; RUAN, H.; ZHANG, P. New alkaloids from *Aconitum vaginatum*. **Helvetica Chimica Acta** – vol. 97, 2014.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; RIBEIRO, A. S. B. B.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; MENEZES, C. S. R.; MENEZES, A. C. S.; NASCIMENTO, G. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral do extrato metanólico da planta *Erythroxylum deciduum* em linhagem celular de leucemia mielóide crônica K562. **Resumo do 53º Congresso Brasileiro de Genética**, 2007.

LIMA, D. F.; PEREIRA, D. L.; FRANCISCON, F. F.; REIS, C.; LIMA, V. S.; CAVALCANTI, P. P. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de duas unidades básicas de saúde. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**. v. 15, n. 3, p. 383-390, 2014.

LOIOLA, M. I. B.; COSTA-LIMA, J. L. 2015a. **Erythroxylaceae: *Erythroxylum P.Browne*** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7680>. Acesso em: 18 de fev. 2019.

LOIOLA, M. I. B.; COSTA-LIMA, J. L. 2015b. **Erythroxylaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7727>. Acesso em: 18 Fev. 2019.

LOIOLA, M. I. B.; CORDEIRO, L. S. Check-list das Erythroxylaceae no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, p. 201-206, 2018.

LUCAS-FILHO, M. D.; SILVA, G. C.; CORTES, S. F.; MARES-GUIA, T. R.; FERRAZ, V. PERPÉTUA; SERRA, C. P.; BRAGA, F. C. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 383-387, 2010.

LUNA, A. J. C. **Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans***. 2008. Tese (Doutorado Farmácia e Bioquímica), 66f. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú, 2008.

MACEDO, T. B. C.; ELIAS, S. T.; TORRES, H. M.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; GUERRA, E. N. S.; SILVA, M. A. G. Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 1, p. 108-112, 2016.

MACHADO, P. A. **Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol em *Leishmania amazonensis***. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

MAIA, A. K.H. L.; QUEIROZ, R. B.; FONSÊCA, D. V.; PINHO, A. S.; SANTOS, S. G.; ALENCAR, J. L.; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, R. N.; MORAIS, L. C. S. L. Antinociceptive activity of the extract of *Erythroxylum caatingae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 2, p. 152-162, 2014.

MANABE, H.; SAKAGAMI, H.; ISHIZONE, H.; KUSANO, H.; FUJIMAKI, M.; WADA, C.; KOMATSU, N.; NAKASHIMA, H.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, N. Effects of Catuaba Extracts on Microbial and HIV Infection. **In Vivo**, v. 6, n. 2, p. 161-165, 1992.

MARTINS, C. A. S.; LIMA, M. D. de. Leishmaniose: do diagnostico ao tratamento. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16; p. 2556-2569, 2013.

MARTINS, D. H. N. **Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart.** 2015. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MELO, A. J. O.; LIMA, T. C. J.; OLIVEIRA, A. K. S.; SILVA, A. M. O.; DUARTE, M. C. Avaliação preliminar do efeito antioxidante do extrato etanólico de *Erythroxylum passerinum* Mart. In: 2º Congresso Internacional de Atividade Física, Nutrição e Saúde, 2017.

MELLO, F. M. S.; LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; RIBEIRO, A. S. B. B.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Triagem citotóxica do extrato bruto de *Erythroxylum campestre* A.ST.-HIL em células tumorais. **Resumo do 56º Congresso Brasileiro de Genética**, 2010.

MENEZES, J. A.; MAIA, K. N.; VERNE, R. N.; MADUREIRA, A. P.; SCHALL, V. T.; SOUZA, C. M. de. Leishmanioses: o conhecimento dos profissionais de saúde em área endêmica. **Rev. Bras. Promoç. Saúde**, v. 27, n. 2, p. 207-215, 2014.



MENEZES-FILHO, N. J.; SOUZA, C. S.; COSTA, T. C. S.; SILVA, V. D. A. DA; RIBEIRO, C. S. O.; BARREIROS, M. L.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L.; COSTA, S. L. Cytotoxicity of the Diterpene 14-O-Methyl-ryanodanol from *Erythroxylum passerinum* in an Astrocytic Cells Model. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 9, p. 1245 - 1248, 2014.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBÊLO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** v.17, n. 1, p. 59-63, 2007.

NOVÁK, M.; SALEMINK, C.A.; KHAN, I. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 261-274, 1984.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 13, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; SENA-FILHO, J. G.; LUCENA, H. F. S.; ROMERO, M. A. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of <sup>13</sup>C-NMR spectral data. **Chemistry & Biodiversity** v. 7, n. 1, p. 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. S.; BRANCO, M. V. S. C.; LUCENA, H. F. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; NASCIMENTO, S. C.; AGUIAR, J. S.; SILVA, T. G.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SILVA, M. S. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; SENA-FILHO, J. G.; MENDES-JÚNIOR, L. G.; ANJOS, R. M.; RIBEIRO, T. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 436-442, 2012.

OLIVEIRA, E. C. de; CRUZ, R. A. S.; AMORIM, N. de M.; SANTOS, M. G.; PEREIRA JUNIOR, L. C. S.; SANCHEZ, E. F.; FERNANDES, C. P.; GARRETT, R.; ROCHA, L. M.; FULY, A. L. Protective Effect of the Plant Extracts of *Erythroxylum* sp. against Toxic Effects Induced by the Venom of *Lachesis muta* Snake. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1-14, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2020a. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 04 de dezembro de 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2020b. **Leishmaniasis**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em 04 de dezembro de 2020.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal Of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1-15, 2016.

PASTOR, C. B. V. Efecto inhibitorio “in vitro” del extracto acuoso y extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* vas truxillense (coca)

**sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans***. 2011. 63f. Tese (Bacharel em Estomatologia). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú, 2011.

PAVIA, D. L.; EISBERG, R.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; **Introdução à Espectroscopia**. 4ª. ed. Cengage. Learning, 2010.

PEREIRA, I. O.; ASSIS, D. M.; JULIANO, M. A.; CUNHA, R. L. O. R.; BARBIERI, L. V. S. do S.; MARQUES, M. J.; SANTOS, M. H. dos. Natural Products from *Garcinia brasiliensis* as Leishmania Protease Inhibitors. *Journal of Food and Medicine*, 14 (6), 557–562 2011.

PEREIRA, A. G.; MENEZES, A. C. S.; SANTOS, M. L.; VIEIRA, T. S.; SANTOS, R. G.; LACERDA, E. P. S. Avaliação da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de *Erythroxylum campestre* (Erythroxylaceae) Frente às Células Sarcoma 180. **Revista Processos Químicos**, p. 41-48, 2015.

PEREIRA, G. M. ***Erythroxylum pungens* O. E. Shulz**: proteômica total e bioprospecção de alcaloides tropânicos. 2017. 155f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

PEREIRA, G. M.; MOREIRA, L. G. L.; NETO, T. da S. N.; ALMEIDA, W. A. M. de; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O.; BARBOSA, E. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; ALMEIDA, M. V. de; GRAZUL, R. M.; NAVARRO-VÁZQUEZ, A.; HALLWASS, F.; FERREIRA, L. de S.; FERNANDES-PEDROSA, M. de F.; GIORDANI, R. B. Isolation, spectral characterization, molecular docking, and cytotoxic activity of alkaloids from *Erythroxylum pungens* O. E. Shulz. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 155, p. 12-18, 2018.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIRES, W. C.; BATISTA, M. P.; AGUIAR, S. S.; MELLO, F. M. S.; PEREIRA, E. B.; LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; REZENDE, M. R. M.; RIBEIRO, A. S. B. B.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; MENEZES, A. C. S.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto metanólico de *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae) pelo teste de exclusão por Azul de Tripano em células K-562. Resumo do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009.

PRASADIK, T. H. S.; SUBASINGHE, S.; KUMARASINGHE, H. K. M. S. Effect of Aqueous Leaf Extracts of Two Medicinal Plant Species (*Erythroxylum moonii*, *Lantana camara*) Against Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. **International Symposium on Agriculture and Environment**, 2014.

QUEIROZ, E. F.; ZANOLARI, B.; MARSTON, A.; GUILLET, D.; BURGNER, L.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K. Two New Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae). **Natural Product Communications**, v. 4, n. 10, p. 1337-1340, 2009.

RAHMAN, A-U.; KHATAKK, F.; NIGHAT, F.; SHABBIR, M.; HEMALAL, K. D.; TILLEKERATNE, L. M. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 2, p. 377-383, 1998

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. DE; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

- RESTREPO, D. A.; SAENZ, E.; JARA-MUÑOZ, O. A.; CALIXTO-BOTÍA, I. F.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, S.; ZULETA, P.; CHÁVEZ, B. G.; SANCHEZ, J.A.; D'AURIA. *Erythroxylum* in Focus: an interdisciplinary review of an overlooked genus. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 1-27, 2019.
- RIBEIRO, E. M. de O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E. do; LOPES, L. M. X.; DAVID, J. P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 232-235, 2013a.
- RIBEIRO, E. M. de O.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; VALE, A. E. do; GUEDES, M. L. S.; LOPES, L. M. X.; KRŠKOVÁ, Z.; DUŠEK, J. Ent-labdane and beyerane diterpenes from *Erythroxylum betulaceum* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 50, p. 90-92, 2013b.
- ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 514-535, 2005.
- RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ, I.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; MENÉNDEZ, R.; LAGUNA, A.; CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. **Toxicology In Vitro**, v. 22, n. 5, p. 1242-1249, 2008.
- SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.
- SALEH, S. R.; HASAN, M. H.; SAID, M. I. M.; ADENAN, M. I.; ADAM, A. Antioxidant, Anti-Inflammatory And Antinociceptive Activities of *Mitragyna speciosa* And *Erythroxylum cuneatum*. In: Symposium on Humanities, Science and Engineering Research, 2012.
- SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E. dos; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.
- SATOH, M.; SATOH, Y.; FUJIMOTO, Y. Cytotoxic constituents from *Erythroxylum catuaba* isolation and cytotoxic activities of cinchonain. **Natural Medicines**, v. 54, n. 2, p. 97-100, 2000.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 371-400.
- SENA-FILHO, J. G.; SILVA, M. S. DA; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; ROMERO, M. A. V.; XAVIER, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Cytotoxic Evaluation of Pungencine: A New Tropane Alkaloid from the Roots of *Erythroxylum pungens* O. E. Schulz. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1742- 1744, 2010.
- SILVA, G. L.; CUI, B.; VEZ, D. C.; YOU, M.; CHAI, H. B.; RASOANAIVO, P.; LYNN, O. S. M.; O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J.M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A.D. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1514-1520, 2001.

SILVA JÚNIOR, L. J. C., ALVES, L.A., SILVA, V.R., SANTOS, L. S., BEZERRA, D. P., SOARES, M. B. P., DORIGUETTO, A. C., BARBOSA, L. C. A, NASCIMENTO, J. C., MACEDO, G. E. L., QUEIROZ, R. F., PAULA, V. F. A new tropane alkaloid and other metabolites from *Erythroxylum macrocalyx* (Erythroxylaceae) and their antiproliferative activities. **Phytochem. Lett.** v.41, p.168-174, 2021.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2007, 506p.

SIMONI, I. C.; MANHA, A. P. S.; SCIESSERE, L.; HOE, V. M. H.; TAKINAMI, V. H.; FERNANDES, M. J. B. Evaluation of the antiviral activity of brazilian cerrado plants against animal viruses. **Vírus Reviews & Research** 12, p. 25-31, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II. 2.ed. Nova Ondessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 703 p.

SULIMAN, N. A.; MOKLAS, M. A. M.; TAIB, C. N. M.; ADENAN, M. I.; BAHARULDIN, M. T. H.; BASIR, R.; AMOM, Z. Morphine Antidependence of *Erythroxylum cuneatum*(Miq.) Kurz in Neurotransmission ProcessesIn Vitro. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

SYED, S. H.; NAMDEO, A. G. Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. on paracetamol induced toxicity. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 11, p. 877-881, 2013.

TAVEIRA, L. K. P. D.; SILVA, M. A. P.; LOIOLA, M. I. B. Allelopathy in five species of *Erythroxylum*. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 325-331, 2013.

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; GARCEZ, F. R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central- western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, nº 4, p. 1302-1308, 2012.

WESAM, R. K.; GHANYA, A. N.; MIZATON, H. H.; ILHAM, M.; AISHAH, A. Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of standardized aqueous extract from leaves of *Erythroxylum cuneatum* in human HepG2 and WRL68 cells line. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n.10, p. 811-816, 2013.

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

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 819–825, 2001.