

CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS SEMENTES E FOLHAS DE *Erythrina fusca* Lour.

Izadora Bonfim¹; Êmelli Laleska Ferreira de Souza¹; Denise Brentan da Silva²

¹Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM),
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN/UFMS).

²Orientadora. Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM),
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN/UFMS).

Resumo

Espécies do gênero *Erythrina* são amplamente utilizadas na medicina popular como ansiolítico e em rituais, sendo que atualmente a espécie *Erythrina verna* Lour. é também empregada na produção de fitoterápicos utilizados para o tratamento de ansiedade, o qual está associado a presença de alcaloides eritrínicos. A espécie *Erythrina fusca*, alvo de estudo nesta proposta, possui distribuição cosmopolita e caracteriza-se pela produção de um grande volume de sementes. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de extratos enriquecidos em alcaloides eritrínicos, a determinação da composição química dos extratos das folhas e sementes de *E. fusca* por CLAE-DAD-EM, além do isolamento de alguns destes alcaloides e caracterização estrutural por RMN e EM. Os extratos das sementes (Efse-EtOH) e folhas (Eff-EtOH) de *E. fusca* foram obtidos com etanol e água (7:3, v/v). O extrato das folhas apresentou baixo teor de alcaloides, enquanto que no extrato das sementes foi detectado elevado acúmulo deles, sendo por isso selecionado para as etapas subsequentes. A partir da marcha química do extrato etanólico das sementes (Efse-EtOH) foram obtidos o extrato alcaloídico (Efse-ETOH/Alc) e outros relativos ao precipitado (Efse-EtOH/ppt) e fração diclorometânica (Efse-EtOH/DCM). Nas análises por CLAE-DAD-EM foi possível identificar a partir do extrato alcaloídico O-hexosil erisopina (1), hipaforina (2), eritratina (3), eritratidina (4), eritralina (5), oxo-eritralina (6) e cristamidina (7), e a partir de Efse-EtOH/ppt dois pterocarpanos (8 e 10). Os compostos 1 a 7 foram isolados por CLAE semi-preparativa e as estruturas dos alcaloides 3, 4 e 7 foram confirmados por RMN. A partir do estudo realizado, foi possível concluir que o uso das sementes de *E. fusca* como fonte de alcaloides eritrínicos é bastante promissor devido ao alto rendimento (9,83%) do extrato Efse-EtOH-ALC, demonstrando a viabilidade das sementes como fonte renovável destes alcaloides.

Palavras-chave: *Erythrina fusca*; alcaloides eritrínicos; eritralina.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMS

Introdução

O gênero *Erythrina* (erythros=vermelho), pertencente à família Fabaceae, possui mais de 130 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil são descritas sete espécies (*E. verna*, *E. velutina*, *E. crista-galli*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata* e *E. speciosa*), distribuídas nos biomas da Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga e Pantanal (CORRÊA, 1984, PINO-RODRIGUEZ et al., 2004).

O interesse pelas espécies do gênero *Erythrina*, iniciou-se com o isolamento dos alcaloides eritrínicos de *E. americana*, que revelaram atividades semelhantes da tubocurarina (FOLKERS & MAJOR, 1937). A partir disso, estudos químicos foram realizados com espécies do gênero *Erythrina* com o intuito de se obter alcaloides com atividade sobre o sistema colinérgico e/ou serotoninérgico. Todavia, substâncias de outras classes químicas também foram isoladas, como flavonóides da classe dos pterocarpanos, isoflavonóides, cumestanos e flavanonas (DJIOGUE et al., 2009).

A espécie *E. verna* é amplamente utilizada por indústrias farmacêuticas para a produção de medicamentos fitoterápicos com indicação para tratamento de ansiedade e distúrbios de sono (CARVALHO et al., 2008). Dentre os medicamentos registrados, um deles (Maracugina[®]), é o segundo medicamento mais vendido no Brasil dentre a classe terapêutica dos hipnóticos e sedativos (FREITAS, 2007). Alguns autores sugerem que o efeito ansiolítico de espécies *Erythrina* pode ser justificado pela atividade dos alcaloides eritrínicos sobre os receptores GABA (GARÍN-AGUILAR, 2000; CARVALHO et al., 2009), porém em estudos farmacológicos realizados com alcaloides isolados de *E. verna* constatou-se atividade ansiolítica sem alterações das funções motoras, sugerindo a atuação em receptores serotoninérgicos (FLAUSINO JR. et al., 2007).

Os alcaloides eritrínicos são espiroaminas tetracíclicas e até o ano de 1991 havia sido relatado o isolamento de apenas 97 alcalóides desta classe, sendo estes isolados majoritariamente a partir de espécies do gênero *Erythrina* (Leguminosae), e em menor escala em algumas espécies de *Cocculus* (Menispermaceae) (AMER et al., 1991).

Em geral, estes alcaloides ocorrem em baixas concentrações e podem ocorrer em folhas (SOARES, 2012), cascas do caule (FEITOSA et. al, 2012), raízes (RUKACHISIRIKUL, 2007) e sementes (OZAWA, 2011; GARÍN-AGUILAR, 2005). Alguns autores relatam o acúmulo dos alcaloides em maior concentração nas sementes (CHAWLA et. al, 1985; SOTO-HERNANDEZ et. al,1994), porém ainda não foram estudadas as sementes de *E. fusca*.

A espécie *E. fusca*, alvo de estudo nesta proposta, se caracteriza pela produção de um grande volume de sementes e apresenta-se com uma formação monodominante nas planícies da região norte do Rio Paraguai, na sub-região de Cáceres e também ao longo das margens do Rio Aquidauana (POTT et al., 2011).

Em levantamentos realizados no banco de dados *Chemical Abstracts*, foi possível verificar a escassez

de informações químicas e biológicas envolvendo *E. fusca*, sendo que apenas alguns poucos compostos foram descritos, incluindo alcaloides eritrínicos, flavanonas preniladas, petrocarpanos e isoflavonas (MCKEE et 1997, KHAOMEK et al., 2004). Os pterocarpanos e flavanonas preniladas de *E. fusca* exibiram atividade citotóxica, antibacteriana e antimalárica (KHAOMEK et al., 2008).

Todos esses apontamentos demonstram a grande potencialidade dos alcaloides eritrínicos para estudo e desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, uma das principais fontes para a obtenção destes alcaloides é a casca da árvore, sendo que sua coleta pode levar à morte do exemplar vegetal, caso seja feita incorretamente, além do elevado tempo para sua recomposição total e o baixo teor de alcaloides (0,1 a 0,25 % do peso de planta seca) (DJILANI et al., 2006). Dessa forma, acreditamos que as sementes possam ser uma fonte promissora para obtenção destes alcaloides e apresentam-se como uma forma sustentável, uma vez que a espécie *E. fusca* possui uma produção de sementes bastante elevada e a coleta controlada de sementes não prejudicaria a perpetuação da mesma nem causaria injúrias à planta. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de extratos enriquecidos em alcaloides eritrínicos, a determinação da composição química dos extratos das folhas e sementes de *Erythrina fusca* por CLAE-DAD-EM, além do isolamento e caracterização estrutural por RMN e EM de alguns destes alcaloides.

Metodologia

4.1 Coleta do Material Vegetal e Obtenção dos extratos hidroetanólicos de *E. fusca*

A coleta de sementes e folhas da espécie *E. fusca* foi realizada em novembro de 2013 na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres, Mato Grosso. Em seguida, as cascas foram secas em estufa de ar circulante a uma temperatura de 50 °C e uma exsiccata (CGMS 40967) foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A espécie foi identificada pelo prof. Dr. Geraldo Damasceno Junior.

Aproximadamente 460 g de sementes de *E. fusca* foram pulverizadas e intumescidas *overnight* com etanol:água (7:3, v/v). Após este período, o material foi submetido à extração por percolação (72h, vazão de 20 gotas por minuto). O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, sendo obtido 99 g de extrato etanólico denominado Efse-EtOH. O mesmo procedimento foi realizado para as folhas de *E. fusca*, fornecendo o extrato Eff-EtOH, com rendimento de 21,5%.

O extrato da semente Efse-EtOH (30g) foi solubilizado em diclorometano e metanol, adicionado HCl 3% (pH= 4) e filtrado em funil com papel de filtro, sendo obtido um precipitado denominado de Efse-EtOH/ppt. O sobrenadante (solução aquosa ácida) foi lavado com diclorometano (para remoção de substância de natureza graxa), fornecendo o extrato denominado Efse-EtOH/DCM. A fração aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9 e novamente extraída com diclorometano, fornecendo o extrato alcaloídico Efse-EtOH/Alc (2,95 g). A obtenção do extrato alcaloídico do extrato das folhas de *E. fusca* não foi realizado, pois em etapa preliminar (análise por CCD e CLAE-DAD-EM) verificou-se a presença de alcaloides em traços.

4.4 Análises dos extratos por CLAE-DAD-EM e EM/EM

Os extratos Efse-EtOH, Efse-EtOH/DCM, Efse-EtOH/ppt e Efse-EtOH/Alc foram avaliados por CLAE-DAD-EM. Um cromatógrafo UFLC da Shimadzu (Tóquio, Japão) provido por duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20A, detector de arranjo de diodos (DAD, *Diode array detector*) SPD-M20A, controlador CBM-20A e forno CTO-20A foi utilizado nas análises. Este cromatógrafo também foi acoplado ao espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (IES) e analisador QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência). A coluna cromatográfica empregada foi uma Kinetex C18 (2,6µ, 100A, 150 x 2,1 mm, Phenomenex). As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, filtradas em filtros de PTFE (Millex 0,22 mm x 13 mm, Millipore) e 1 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (B) e água deionizada (A) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi o seguinte: 0-2 min - 3% de B, 2-25 min – de 3 a 25% de B, 25-40 min – de 25 a 80% de B e 40-43 min - 80% de B. A coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C durante as análises cromatográficas. Todas as amostras foram analisadas nos modos de ionização positiva e negativa. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (4 Bar), de secagem (9 L/min) e de colisão. A voltagem do capilar foi de 2.500 kV.

A identificação estrutural dos constituintes dos extratos foi realizada a partir dos dados de fragmentação (EM/EM), da massa acurada (EM) para a determinação da possível fórmula molecular e também dos dados dos espectros de ultravioleta (UV), em comparação com dados citados na literatura. Além disso, os alcaloides isolados e caracterizados por RMN foram confirmados por co-injeção.

4.5 Isolamento dos alcaloides por CLAE-DAD em escala semipreparativa

Um método de isolamento por CLAE-DAD em escala semipreparativa foi desenvolvido para o isolamento dos alcaloides das sementes de *E. fusca*. Utilizou-se um CLAE provido com duas bombas modelo LC-20AD (Shimadzu), detector DAD modelo SPD-M20A (Shimadzu) e injetor manual com amostrador de 1 mL. A coluna preparativa utilizada foi uma de fase reversa da Shimadzu (Shim-pack Prep-ODS, 25 cm x 20 mm d.i., partículas de 5 µm), sendo a fase móvel composta por água deionizada e acetonitrila ambas contendo 0,02% de ácido trifluoroacético. A vazão utilizada foi de 9,0 mL/min e a metodologia de análise em sistema de gradiente linear.

Resultados e Discussão

Através da percolação das sementes obteve-se o extrato hidroetanólico Efse-EtOH com um rendimento de 21,5% e a marcha química permitiu a obtenção do extrato Efse-EtOH-ALC com um rendimento de 9,83%. Assim conseguimos definir que cada 100 gramas das sementes secas de *E. fusca* permitem obter 2,1 g do extrato

alcaloídico, um valor considerado alto, uma vez que na literatura o rendimento de extratos ricos em alcaloides varia de 0,1-0,25 g/100g de planta seca (DJILANI et al., 2006).

Os extratos de *E. fusca* (Efse-EtOH/Alc, Efse-EtOH/DCM, Efse-EtOH/ppt e Efse-EtOH) foram analisados por CLAE-DAD-EM. A tabela 1 sumariza os dados espectrais dos compostos identificados. Foi realizado também o isolamento dos alcaloides eritrínicos (1 a 7) por CLAE semi-preparativa e a elucidação estrutural por RMN já foram realizadas para os alcaloides 3, 4 e 7

Tabela 1. Identificação dos constituintes dos extratos de *E. fusca* (Efse-EtOH/Alc, Efse-EtOH/DCM, Efse-EtOH/ppt e Efse-EtOH) por CLAE-DAD-EM.

Pico	TR (min)	Composto	FM	UV (nm)	Modo positivo (m/z)	
					EM [M+H] ⁺	EM/EM
1	5,2	O-hexosil-erisopina	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈	283	448,1954	254, 255, 237, 219, 208, 191
2	8,2	Hipaforina	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	280	247,1435	188, 170, 146
3	11,1	Eritratina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	290	316,1544	298, 284, 266, 236, 240, 226, 214, 149, 208
4	11,9	Eritratidina	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	289	332,1873	314, 300, 282, 251, 242
5	17,8	Eritralina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	289	298,1427	266, 251, 236, 208, 191
6	28,8	Oxo-eritralina	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	270	312,1247	280, 250, 222, 149
7	30,7	Cristamidina	C ₁₈ H ₁₅ NO ₄	265	310,1090	278, 26, 248, 238, 220, 191
8	34,7	Pterocarpano	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	285	337,1453	281, 266, 251, 223, 195
9	35,7	NI	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄	285	354,1467	310, 295, 280, 267, 210
10	37,8	Pterocarpano	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	285	339,1610	283, 269, 255, 191

TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular.

O composto **1** apresentou em seu espectro de massas um íon intenso de m/z 448,1954 [M+H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₂₃H₂₉NO₈, o qual gerou os íons produto m/z 254, 255, 237, 219, 208 e 191. Conforme descrito por Guaratini et al (2017), o fragmento de m/z 254 é referente a perda de uma hexose e uma molécula de metanol. A partir dos dados espectrais foi possível identificar este composto como O-hexosil erisopina, isolado anteriormente das sementes de *E. latissima* (WANJALA & MAJINDA, 2000). O composto **2** apresentou um íon intenso de m/z 247,1435 [M+H]⁺, o qual é relativo a fórmula molecular C₁₄H₁₈N₂O₂, e a partir de todos os dados espectrais foi possível identificar como hipaforina, um alcaloide amplamente relatado em espécies do gênero *Erythrina* (OZAWA et al., 2008; IRANSHAHI et al., 2012).

Os compostos **3** e **5** revelaram íons de m/z 316,1556 (C₁₈H₂₁NO₄) e 298,1435 (C₁₈H₁₉NO₃), respectivamente. As fragmentações desses compostos revelaram perdas de uma molécula de metanol compatíveis com uma metoxila alifática, e todos os dados sugeriram os alcaloides eritralina (**5**) e eritratina (**3**), os quais já foram descritos no gênero *Erythrina* (SOTO-HERNANDEZ & JACKSON, 1994) e este último foi confirmado através de RMN ¹H. O espectro de RMN ¹H da substância **3**, o qual foi isolado por CLAE-DAD e escala semipreparativa, exibiu singletos em δ 6,85 e 6,81 relativos aos hidrogênios H-14 e H-17 em seu espectro de RMN de ¹H. Sinais característicos em δ 6,00 e 5,9 apresentaram-se como dupletos com contante de acoplamento (J) de 1 Hz, cada um integrando para um H, o que indicou a presença do grupo metileno dióxido. Além desses sinais, também foram observados sinais relativos a uma metoxila (δ 3,37, s, 3H) e a um hidrogênio olefínico em δ 5,96. Todos os sinais observados são compatíveis ao alcaloide eritratina (AMER, 1991).

O alcaloide **4** exibiu um íon protonado de m/z 332,1858 [M+H]⁺, o qual é compatível com a fórmula molecular C₁₉H₂₅NO₄. Este íon produziu íons fragmentos a partir da perda de uma molécula de metanol e uma de água de m/z 300 e 314 (GUARATINI et al., 2017), respectivamente, confirmando a presença os substituintes metoxila e hidroxila no anel A. O composto **4** foi isolado através de CLAE-DAD em escala semipreparativa e analisado por RMN. O espectro de RMN de ¹H exibiu dois singletos na região de hidrogênios olefínicos em δ 6,89 e 6,82 relativos a H-17 e H14, além desses também foi observado um multipletos em δ 5,99 compatível com o hidrogênio olefínico em H-1. Foram observados sinais relativos a três metoxilas em δ 3,85, 3,82 e 3,36, sendo deslocamentos característicos de metoxilas aromáticas e o último sinal referente a metoxila alifática. Os multipletos em δ 4,25 e 3,60 indicaram os substituintes oxigenados. Os dados espectrais obtidos para **4** foram compatíveis aos dados descritos para o alcaloide eritratidina (AMER, 1991).

Os picos **6** e **7** foram encontrados apenas em Efse-EtOH/DCM. O composto **6** apresentou íon m/z 312,1247 [M+H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₁₈H₁₇NO₄, sendo o íon produto de m/z 280, o principal fragmento observado, referente a perda de uma molécula de metanol indicando a presença de metoxila alifática no anel A. Os demais fragmentos observados foram compatíveis ao descrito para a oxo-eritralina (GUARATINI et al, 2017). Este alcaloide foi descrito em sementes de *Erythrina latissima* (WANJALA et al., 2000). O composto **7** apresentou íon protonado de m/z 310,1090, compatível com a fórmula molecular C₁₈H₁₅NO₄ e todos os dados espectrais permitiram identificá-lo como cristamidina (GUARATINI et al., 2017), o qual já foi isolado das sementes de seis espécies de *Erythrina* (*E. Americana*, *E. coralloides*, *E. lepthoriza*, *E. mexicana*, *E. oaxacana* e *E. sousae*) (GARCIA-MATEOS et al., 1998). Esse alcaloide foi isolado e confirmado ser cristamidina através de RMN de ¹H. O espectro de RMN ¹H da substância **7**, o qual foi isolado por CLAE-DAD e escala semipreparativa, exibiu singletos em δ 6,85 e 6,73 relativos aos hidrogênios H-14 e H-17 em seu espectro de RMN de ¹H. Sinais característicos em δ 5,95 (2H) apresentaram-se como dupletos com J de 1 Hz, o que indicou a presença do grupo metileno dióxido. Além desses sinais, também foram observados sinais relativos a uma metoxila alifática (δ 3,28,

s, 3H) e a hidrogênios olefínicos em δ 7,04, δ 6,83, δ 6,42, δ 6,27 e δ 6,13. Todos os sinais observados são compatíveis ao alcaloide cristamidina (AMER, 1991).

Os compostos **8** e **10** exibiram dados compatíveis a pterocarpanos como evaridin D e orientanol B, os quais já foram descritos em *E. fusca*, porém devido à ausência de dados de fragmentação descritos na literatura não foi possível confirmar a identificação desses compostos.

Conclusões

A partir do estudo realizado foi possível concluir que o uso das sementes *E. fusca* como fonte de alcaloides é bastante promissora devido ao alto rendimento do extrato alcaloídico Efse-EtOH-ALC (9,83%), além de ser uma fonte sustentável e ter elevada produção das sementes. A partir das análises por CLAE-DAD-EM foi possível identificar 7 alcaloides eritrínicos. Como também, foi possível o isolamento dos alcaloides eritrínicos presentes nas sementes de *E. fusca* por CLAE-DAD em escala semi-preparativa e a elucidação estrutural por RMN de ^1H , sendo confirmado os alcaloides **3**, **4** e **7**.

Referências bibliográficas

- AMER; SHAMMA; FREYER. *Journal of Natural Products*, 54, 329-363, 1991.
- BARKER et. al, *Bioorganic medicinal chemistry*. 13, 4565-4575, 2005.
- CARVALHO et. al, *Journal of Ethnopharmacology* 122, 374-378, 2009.
- CARVALHO Circular técnico, 160. Embrapa Florestas: Colombo – PR, ISSN 1517-5278, 2008.
- CHAWLA; REDHA; JACKSON. *Phytochemistry*, 24, 1821-3, 1985.
- CORRÊA, *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil, 5, 1984.
- CROOKS; BARDO; DWOSKIN. *Advances in Pharmacology* . 69, 513-551, 2014.
- DJILANI et. al. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 518-520, 2006.
- DJIOGUE et. al, *Journal of Natural Products*. 72, 1603-1607, 2009.
- FEITOSA et. al, *Química Nova*, 35, 2177-2180, 2012
- FLAUSINO et. al, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 375-378, 2007.
- FOLKERS; MAJOR. *Journal of the American Chemical Society*, 59, 1580-1581, 1937.
- FREITAS. *Estudo apresentado ao Ministério da Saúde, Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento, Núcleo Nacional de Economia da Saúde*, 2007.
- GARCIA-MATEOS; SOTO-HERNANDEZ; KELLY. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 545-551, 1998
- GARÍN-AGUILAR et. al, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 189-196, 2000.
- GUARATINI et. al, *Journal Mass Spectrom* 52, 571-579, 2017.
- IRANSHAHI et. al, *Planta Medica*, 78, 730-736, 2012.
- KHAOMEK et. al., *Heterocycles*, 63, 879-884, 2004.
- KHAOMEK et. al, *Journal of Natural Medicines*. 62, 217-220, 2008.
- MCKEE et. al, *Journal of Natural Products*, 60, 431-438, 1997.
- OZAWA et. al., *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18, 3992-3994, 2008.
- OZAWA; KISHIDA; OHSAKI. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59, 564-567, 2011.
- PINO-RODRIGUEZ et. al, *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23, 252-258, 2004.
- POTT et. al, *Brazilian Journal of Biology*, 71, 265-273, 2011.
- SOTO-HERNANDEZ; JACKSON. *Planta Medicinal*, 60, 175-7, 1994
- TALY et. al, *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 733-750, 2009.
- WANJALA; MAJINDA. *Journal of natural products*, 63, 871-873, 2000.