

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Caracterização de Extratos de**  
*Erythrina verna* Vell.

**DOUGLAS FERNANDO RAMBO**

Porto Alegre, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Caracterização de Extratos de  
*Erythrina verna* Vell.**

Tese apresentada por **Douglas Fernando Rambo** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Porto Alegre, 2018.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05.03.18, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo dos Santos Miron  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Juliana Maria de Mello Andrade Fasolo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Roger Remy Dresch  
Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul

Rambo, Douglas Fernando  
Desenvolvimento de Metodologia Analítica para  
Caracterização de Extratos de *Erythrina verna* Vell. /  
Douglas Fernando Rambo. -- 2018.  
195 f.  
Orientadora: Amélia T. Henriques.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2018.

1. *Erythrina verna*. 2. alcaloides. 3. medicamentos  
fitoterápicos. 4. controle de qualidade. I. Henriques,  
Amélia T., orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Amélia T. Henriques no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança".

*Albert Einstein*





## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amélia T. Henriques, pela oportunidade ímpar de me proporcionar conhecimento e desenvolvimento, sobretudo humano. Pelos anos passados no laboratório de farmacognosia, sorvendo da mais pura fonte do conhecimento.

Aos demais professores do laboratório, Dr. José Angelo Zuanazzi e Dr<sup>a</sup>. Míriam Appel agradeço todos os momentos que estive na convivência com tão sábias pessoas, vocês engrandeceram minha passagem pela UFRGS.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, obrigada por fazerem parte desta longa caminhada, pelos momentos de descontração e pela troca de conhecimentos. Sejamos nós o diferencial de um país que carece de bons exemplos, que tenhamos a sabedoria para engrandecer a vida das pessoas, assim como nossos mestres.

Aos amigos do 102 e demais amigos que me acompanham a anos, vocês foram o esteio que segurou a barra quando os tempos difíceis vieram. Obrigado pelo carinho e incentivo, levo vocês como parte de minha família.

Aos meus queridos pais, Irineu e Dulce Rambo pelo amor, carinho, incentivo e por sempre torcerem por mim. Por sacrificarem o convívio diário em prol da minha educação. Em especial à minha colega de laboratório e irmã Michele Rambo (*in memoriam*), que fez parte dessa conquista. Saiba, que mesmo não estando presente fisicamente, sempre foste a força para que eu continuasse em frente, foi muito difícil continuar sem você.

E finalmente, à pessoa mais importante nesse projeto. Minha querida e amada esposa Renata Biegelmeyer, por todo incentivo, companheirismo, amor, amizade. Obrigado por não me deixar esmorecer, por mostrar que juntos podemos mais!



## RESUMO

A utilização de matérias-primas para a produção de medicamentos exige criteriosa inspeção para que seja classificada como apta ao processo industrial. Nesse sentido, se faz necessário o estabelecimento de técnicas e critérios a serem inseridos em compêndios oficiais, como no Brasil, a Farmacopeia Brasileira (FB). Com o lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, no ano de 2006, o mercado nacional de produtos naturais recebeu um forte impulso para o desenvolvimento do setor fitoterápico. Dentre as plantas com possível exploração pela indústria de fitoterápicos, destacamos a leguminosa *Erythrina verna* Vell., popularmente conhecida como mulungu, que é uma espécie arbórea, nativa do sudeste do Brasil, medindo cerca de 15 metros e apresentando flores vermelho-vivo em cacho. Inúmeros estudos creditam aos alcaloides contidos na espécie as suas propriedades ansiolíticas, anticonvulsivante, analgésica, entre outras. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi definir os parâmetros para o controle de qualidade das cascas de *Erythrina verna*, droga vegetal inscrita na primeira edição da FB. Assim, foram determinados os parâmetros de identificação por Cromatografia em Camada Delgada e os parâmetros físico-químicos farmacopeicos como material estranho, cinzas totais e perda por dessecação. Desenvolveu-se um método por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a quantificação dos alcaloides de *E. verna*, com a adição de bromidrato de galantamina como padrão interno. O método cromatográfico proposto foi validado conforme parâmetros preconizados pela RDC 166/17, e demonstrou ser linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa dos extratos alcaloídicos das cascas de *Erythrina verna* Vell.. A fim de maximizar o rendimento do teor total de alcaloides das cascas de *Erythrina verna*, empregou-se a técnica de delineamento experimental de Box-Behnken Design (BBD). Para isto, o modelo verificou a influência da relação planta: solvente ( $X_1$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) e granulometria ( $X_3$ ) no rendimento do extrato alcaloídico das cascas de *E. verna*. Os resultados demonstraram a influência dos fatores estudados, sendo que a condição ótima para a extração de alcaloides de *E. verna* encontra-se na razão droga:solvente 1:60 (m/v), tempo de 5,47 horas com faixa granulométrica de 710-1000  $\mu\text{m}$ , proporcionando um rendimento estimado pelo modelo matemático de 0,625 g%. Do extrato alcaloídico obtido, foram isolados 5 compostos por CLAE, que foram analisados através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução – Ionização de Eletrospray (EMAR-IES). Assim, foi possível identificar um alcaloide pertencente à subclasse dienoide, 11-hidroxi-eritratidina, e quatro alcaloides alcenoides: 11-hidroxi-eritratidina, 3-demetoxi-eritratidina, eritratidina e dihidroeritratidina.

Ainda, a metodologia de CLAE desenvolvida neste trabalho permitiu distinguir as quatro espécies de cascas de *Erythrina* (*E. verna*, *E. velutina*, *E. poeppigiana* e *E. falcata*) utilizadas sob a mesma denominação comum e diferentes partes de *E. verna* (cascas, flores e folhas). Tendo em vista os efeitos dos alcaloides eritrínicos sobre o sistema nervoso central, a fração de alcaloides totais otimizada de *E. verna* foi avaliada quanto a seus efeitos inibitórios frente a enzima Monoamina Oxidase (MAO), utilizando modelo de *zebrafish*. *E. verna* apresentou uma concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) de  $0,8538 \pm 0,1806$  mg/mL. Considerando que não existem dados farmacopeicos disponíveis sobre cascas de *E. verna*, esses resultados podem ser úteis para o controle de qualidade e para produzir derivados padronizados.

#### **UNITERMOS:**

*Erythrina verna*, alcaloides, medicamentos fitoterápicos, controle de qualidade.

## ABSTRACT

The use of raw materials for the industrial production requires careful inspection to be in accordance of quality control parameters. In this sense, it is important to establish techniques and criteria to be inserted in official compendia, as in Brazil, the Brazilian Pharmacopoeia. The National Policy on Medicinal Plants and Phytotherapy was published in 2006 and the national market of natural products received a strong incentive for the development of phytotherapies. Among plants with industrial interest, we highlight the leguminous *Erythrina verna* Vell., popularly known as mulungu. *E. verna* is a tree, measuring about 15 meters, native from southeastern Brazil and showing bright red flowers in a bunch. Several studies correlate the alkaloids of this specie with their anxiolytic, anticonvulsive, analgesic and others properties. In this context, this study aimed to determinate parameters for quality control of *Erythrina verna* trunk barks, plant drug enrolled in the first edition of BF. Thus, it was performed the identification parameters by Thin Layer Chromatography and the pharmacopoeial physicochemical parameters, such as foreign matter, total ashes and loss on drying. A method by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) was developed for quantification of *E. verna* alkaloids using galantamine hydrobromide as internal standard. The proposed chromatographic method was validated according to the RDC 166/17 and was linear, sensitive, specific, precise, accurate and robust for the quantitative analysis of the *E. verna* trunk barks alkaloid extracts. In order to maximize the yield of total alkaloid content of *E. verna* trunk barks, the Box-Behnken Design (BBD) experimental design was employed. So, the model verified the influence of the plant: solvent ratio (X1), extraction time (X2) and granulometry (X3) on the alkaloid extract yield of *E. verna* trunk barks. The results showed the influence of these factors and the optimal condition for alkaloids extraction of *E. verna* was on the drug: solvent ratio 1:60 (w/v), time of 5.47 hours with granulometric range of 710-1000  $\mu\text{m}$ . The estimated yield of the mathematical model was 0.625 g%. It was isolated by HPLC 5 compounds from the alkaloids extract which were analyzed by GC-MS and HRMS-ESI. Thus, it was possible to identify one alkaloid of dienoid subclass, 11-hydroxyerythravine, and four alkenoid alkaloids: 11-hydroxyerythratidinone, 3-demethoxyerythratidinone, erythratidinone and dihydroerysotrine. Also, the CLAE methodology developed in this work allowed to distinguish four *Erythrina* bark species (*E. verna*, *E. velutina*, *E. poeppigiana* and *E. falcata*) used under the same common denomination and different parts of *E. verna*, (barks, flowers and leaves). Taking in account the effects of erythrin alkaloids on central nervous system, the optimum total alkaloid fraction of *E. verna* was evaluated for its inhibitory effects against the Monoamine Oxidase (MAO) enzyme using

a zebrafish model. *E. verna* showed an inhibitory concentration of 50% (IC<sub>50</sub>) of 0.8538 ± 0.1806 mg/mL. Considering that there are no pharmacopoeial data available for *E. verna* trunk barks, these results may be useful for quality control and to produce standardized derivatives.

**KEYWORDS:**

*Erythrina verna*, alkaloids, phytotherapics, quality control.

## LISTA DE FIGURAS

### III. REVISÃO DO TEMA - ARTIGO 1

Figure 1: Number of publications at Scopus database for <i>Erythrina</i> genus up to 2017.....	81
Figure 2: (I) Basic structure of erythrinan alkaloids; (II) dienoid subclass; (III) alkenoids subclass and (IV) lactonic dienoid subclass.....	82
Figure 3: Biosynthetic precursors of morphinan, Amarilidaceae and Erythin alkaloids. Adapted from Dewick 2009 and Maier et al., 1999.....	83
Figure 4: Alkaloids identified for <i>Erythrina</i> species, which presents the basic dienoid structure. ....	84
Figure 5: Dienoid alkaloids with some modifications in the basic structure reported for <i>Erythrina</i> species.....	85
Figure 6: <i>N</i> -oxide dienoid alkaloids described for <i>Erythrina</i> species.....	86
Figure 7: Lactonic dienoid alkaloids identified for <i>Erythrina</i> species.....	87
Figure 8: Alkenoids alkaloids reported for <i>Erythrina</i> species.....	88
Figure 9: Other classes of alkaloids identified for <i>Erythrina</i> species. ....	89
Figure 10: Dimeric and trimeric alkaloids reported for <i>Erythrina</i> species.....	90

### IV. CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura química dos alcaloides eritrínicos dienoides (A) e estrutura química da galantamina (B).....	100
Figura 2: Fotografia ilustrativa do perfil da droga <i>Erythrina verna</i> por cromatografia em camada delgada observada em luz ultravioleta.....	101
Figura 3: Fotografia ilustrativa do perfil da droga <i>Erythrina verna</i> por cromatografia em camada delgada observada após nebulização com reagente de Dragendorff.....	102
Figura 4: Perfil cromatográfico do extrato total de alcaloides de <i>Erythrina verna</i> .....	107
Figura 5: Perfil cromatográfico do extrato total de alcaloides de <i>E. verna</i> utilizando coluna Kinetex 5 $\mu$ C18 (250 x 4,60 mm) em 230 nm.....	107
Figura 6: Perfil cromatográfico de galantamina obtido por CLAE.....	109

Figura 7: Variação do perfil cromatográfico de diferentes amostras de cascas de <i>Erythrina verna</i> .....	110
Figura 8: Cromatograma referente a amostra das cascas de <i>Erythrina verna</i> intitulada EV-2 em 230nm.....	112
Figura 9: Cromatograma referente a amostra EV-6 em 230 nm. ....	113
Figura 10: Cromatograma referente a amostra EV-7 em 230 nm. ....	114
Figura 11: Cromatograma referente a amostra EV-8 em 230nm.....	114
Figura 12: Avaliação da atividade da enzima MAO de <i>zebrafish</i> .....	117

## V. CAPÍTULO II - ARTIGO II

Figure 1: Preliminary extraction results for <i>E. verna</i> alkaloids.....	157
Figure 2: Chromatographic profile of <i>E. verna</i> FTA added of the internal standard.....	158
Figure 3: (A) Basic structure of Erythrina alkaloids; (B) Alkaloids identified for <i>E. verna</i> trunk barks.....	159
Figure 4: Response surface plots showing the effect of plant:solvent ratio (X1), extraction time (X2), and granulometry (X3) on <i>E. verna</i> alkaloids yield.....	160
Figure S1. Chromatographic profile of different parts of <i>E. verna</i> . (A) barks; (B) leaves and (C) flowers.....	166
Figure S2: Chromatographic profile of different species of <i>Erythrina</i> barks at 230 nm: (A) <i>E. verna</i> , (B) <i>E. velutina</i> and (C) <i>E. falcata</i> .....	167
Figure S3: Specificity parameter for the galantamine standard solution, obtained by scanning from 210 to 400 nm, in a photodiode array detector. ....	168
Figure S4: Predictive optimized response maximizing the alkaloid content of <i>E. verna</i> trunk barks.....	169

## VI. DISCUSSÃO GERAL

Figura 1: Perfil cromatográfico apresentado por Rambo e colaboradores, baixa resolução cromatográfica e longo período de análise.....	174
Figura 2: Perfil cromatográfico alcaloídico obtido das cascas de <i>Erythrina verna</i> . Ambos os picos apresentam espectro de ultravioleta compatível com alcaloides em 230nm. ....	176



Figura 3: Estrutura molecular dos alcaloides eritrínicos (I), subtipo dienoide (II) e alcenoide (III).....	177
Figura 4: Espectro de ultravioleta dos alcaloides das cascas de <i>E. verna</i> , bem como o radical dos alcaloides eritrínicos isoquinolínicos.....	178
Figura 5: Estruturas químicas dos alcaloides de 11-hidroxi-eritravina (1), 11 Hidroxi-eritratidinona (2), 3-demetoxi-eritratidinona (3) e eritratidinona (4) e dihidroerisotrina (5) de <i>Erythrina verna</i> .....	182



## LISTA DE TABELAS

### III. ARTIGO I - REVISÃO

Table 1: Alkaloids identified or isolated from *Erythrina* species.....70

### IV. CAPÍTULO I

Tabela 1: Identificação das amostras de *Erythrina verna*.....96

Tabela 2: Amostras adicionadas ao processo de determinação do teor de alcaloides de *Erythrina verna*.....96

Tabela 3: Material estranho obtido das amostras de *Erythrina verna*.....103

Tabela 4: Resultados do ensaio de perda por dessecação das amostras de *Erythrina verna*, determinada em estufa a 100-105 °C.....104

Tabela 5: Resultados obtidos após a realização do ensaio de teor de cinzas utilizando as amostras de *Erythrina verna*.....105

Tabela 6: Fases móveis e colunas testadas durante o procedimento de desenvolvimento da metodologia de análise por CLAE de *Erythrina verna*.....106

Tabela 7: Gradiente utilizado para a determinação do teor de alcaloides totais em cascas de *Erythrina verna*.....108

Tabela 8: Resultados do teor de alcaloides para o método de quantificação nas cascas de *Erythrina* por CLAE.....111

Tabela 9: Percentual inibitório de atividade da enzima MAO frente FTA de *E. verna* e controles positivos, clorgilina e pargilina em diferentes tempos de reação.....116

### V. CAPÍTULO II - ARTIGO II

Table 1: Chemical characterization of *E. verna* trunk bark alkaloids observed in the HPLC-DAD. Data acquired by Mass Spectrometry with electron ionization (MS-EI) and Electrospray Ionization (HRMS-ESI).....154

Table 2: Box–Behnken design (RSD 3-level-3-factor) of the independent variables (X1, X2, X3) and observed experimental and theoretical results for alkaloids content from *E. verna* trunk barks.....155

Table 3: The analysis of variance for the response surface model of the independent variables of dynamic maceration for alkaloids content from <i>E. verna</i> trunk barks.....	156
Table S1: Experimental values obtained for repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) in the analysis of alkaloid content of <i>E. verna</i> trunk barks by HPLC.....	163
Table S2: Experimental values obtained in the recovery test for galantamine from <i>E. verna</i> FTA.....	164
Table S3. Results for robustness of the LC method: variations in flow and column.....	165

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	21
II. OBJETIVOS.....	29
III. REVISÃO DO TEMA – ARTIGO I.....	33
IV. CAPÍTULO I.....	91
IV.1 INTRODUÇÃO.....	93
IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
IV.2.1 Amostras.....	95
IV.2.2 Determinação do Perfil Químico por Cromatografia em Camada Delgada.....	96
IV.2.3 Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos para o Controle de Qualidade da Matéria-prima Vegetal.....	97
IV.2.4 Determinação da Atividade Frente a MAO.....	98
IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
IV.3.1 Ensaio de Controle de Qualidade.....	98
IV.3.2 Desenvolvimento de Metodologia para Quantificação do Teor de Alcaloides..	105
IV.3.3 Doseamento de Alcaloides.....	109
IV.3.4 Determinação da atividade da MAO.....	115
V. CAPÍTULO II - ARTIGO 2.....	121
VI. DISCUSSÃO GERAL.....	171
VII. CONCLUSÕES.....	183
VIII. REFERÊNCIAS.....	187



## **I. INTRODUÇÃO**

---

---





Produtos naturais sempre formaram a base da medicina popular, porém nos últimos anos esse perfil se intensificou e extrapolou os limites da mesma. Recentemente novas terapias foram introduzidas como complementares aos processos convencionais, destacando-se o emprego de produtos isentos de agrotóxicos, também chamados de orgânicos, ou seja, produtos menos agressivos à natureza e à saúde dos usuários. Ainda, dez anos atrás, o Ministério da Saúde lançou um programa para uso de terapias complementares, o qual ganhou grande repercussão e atualmente encontra-se em expansão. Neste contexto, inserem-se os produtos fitoterápicos e seus derivados, os quais devem apresentar efeitos terapêuticos comprovados por ensaios clínicos, composição química definida, garantia de qualidade e segurança de uso para a população (BRASIL, 2014).

Estima-se que o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 26 bilhões no ano 2011. O mercado nacional de fitoterápicos no ano de 2008 era composto por 119 empresas que possuíam registro de seus produtos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), movimentando aproximadamente US\$ 1,1 milhões por ano (ALVES, 2013). Levantamentos publicados demonstraram que, até março de 2008 haviam 512 medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA, sendo 80 associações e 432 simples. Esses medicamentos eram produzidos a partir de 162 espécies vegetais que possuíam derivados registrados (matéria-prima vegetal e extratos), cabendo destacar que a maioria dessas plantas (70%) não era nativa da América do Sul (CARVALHO et al., 2008).

Recentemente, a Farmacopeia Brasileira lançou o segundo suplemento à sua 5 Ed. no qual consta uma atualização de todas as espécies vegetais e seus derivados que possuem protocolos de qualidade. Neste constam 147 monografias referentes a 85 distintas espécies vegetais. Esta publicação torna inválidos todos os protocolos anteriormente publicados nas diversas edições da FB (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2017).

O Governo Brasileiro tem estimulado, nos programas de saúde pública, o atendimento primário através do Programa de Saúde da Família (PSF), sob o enfoque da atenção primária. Entre diversas propostas encontra-se a utilização de terapias tradicionais, como o emprego de plantas medicinais. Cumpre referir que o órgão responsável pela normatização do setor de programas de saúde é a ANVISA, que tem por objetivo proteger e promover a saúde da população, através da garantia da segurança sanitária de produtos e serviços a ela disponibilizados no mercado (BRASIL, 1999; SILVA et al., 2006). Várias foram as políticas públicas relacionadas à saúde, induzindo a utilização de plantas medicinais na prevenção e no tratamento de enfermidades (BRASIL, 2006a,b). Neste contexto, o Ministério da Saúde publicou, através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, uma lista contendo 71 plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS-RENISUS, 2009).

Dentre as espécies descritas na lista supramencionada, encontra-se a leguminosa *Erythrina verna* Vell. (sinonímia de *E. mulungu* Mart. ex Benth.), da família Fabaceae. Trata-se de uma espécie arbórea nativa do sudeste do Brasil (litoral sudeste), que mede cerca de 15 metros, com flores vermelho-vivo em cacho, folhas compostas, trifoliadas e grandes (em média atingem 12cm). Popularmente a *E. verna* é conhecida por mulungu, amansa-senhor, bico-de-papagaio, canivete, cotriceira, flor-de-coral, suína-suinã, árvore-de-coral, mulungu-coral, capa-homem, tiriceiro entre outros (LORENZI, 1992 e 2002; BISBY et al., 1994; UNOSIC et al.; 2003, DANTAS et al., 2004; PEREIRA & MACHADO, 2008).

O gênero *Erythrina* compreende mais de 100 espécies, das quais 70 são nativas da América, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil podem ser encontradas 12 espécies de *Erythrina*, destacando-se *E. velutina* e *E. verna* como as de maior importância, tanto como medicinais quanto pelo emprego como ornamentais e sombreadoras das lavouras de café e de cacau. O nome *Erythrina*, do grego

“erythros”, significa “vermelho” em alusão à cor de suas flores (CUI et al., 2008; VIRTUOSO et al., 2005; CRAVEIRO et al., 2008).

É de longa data o interesse pelas propriedades dessa planta, já que a mesma se encontra descrita na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, que entrou em vigor através do Decreto nº 17.509, de 4 de novembro de 1926. A monografia apresenta a descrição macro e microscópica das cascas da planta, bem como prova de identificação da presença de alcaloides, controle de impurezas e avaliação de sua atividade biológica. Esta avaliação refere-se a um ensaio de letalidade em camundongos.

O primeiro estudo químico de espécie do gênero *Erythrina* foi publicado em 1937 por Folkers e Major (CRAVEIRO et al., 2008). A partir desse, deu-se início a uma série de trabalhos de isolamento e identificação de várias substâncias, dentre elas destacam-se os alcaloides.

Trabalhos enfocando *E. verna* permitiram a identificação de erisotrina, eritratina e seus óxidos, em extratos de folhas, além de outros grupos de metabólitos, como flavonoides e terpenos (SARRAGIOTO & MARSAIOLI, 1981; NKENGFAK et al., 1994; GARCÍA-MATEOS, SOTO-HERNANDEZ & KELLY, 1998; FLAUSINO et al., 2007). Mais recentemente, Feitosa e colaboradores (2012), relataram a presença de erisotrina, eritratidina, eritratidinona, seu epímero e hidróxi derivado nas cascas de material adquirido de fornecedor nacional.

Em trabalho anterior realizado no laboratório de Farmacognosia desta Faculdade, identificamos variabilidade no perfil químico e na concentração de alcaloides totais presentes em *E. verna*. Outras diferenças constatadas foram decorrentes da idade, da parte da planta analisada e da localização geográfica.

Para alguns extratos e alcaloides identificados na espécie foram caracterizadas atividades anticonvulsivante, ansiolítica, hipotensora, anti-inflamatória, hipnótica e analgésica (GARCÍA-MATEOS, SOTO-HERNANDEZ & KELLY, 1998; ONUSIC et

al., 2003; MARCHIORO et al., 2005; FLAUSINO et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2003 e 2007; RAUPP et al., 2008). Na medicina popular, as cascas e flores da espécie são utilizadas no tratamento da asma, insônia, tosses de fundo nervoso, como febrífugo, calmante e outras (SARRAGIOTTO, LEITÃO-FILHO & MARSAIOLI, 1981; ONUSIC et al., 2003; PEREIRA & MACHADO, 2008).

É importante destacar que as informações bibliográficas disponíveis sobre a espécie são escassas restringindo-se, principalmente, à investigação da atividade farmacológica de *E. verna*. Os dados químicos disponíveis são referentes aos alcaloides com núcleo eritrínico (por exemplo: erisotrina, erisotrina-*N*-óxido, eritrartina e eritrartina *N*-óxido), que são também encontrados em diversas partes da planta e ainda, comuns a outras espécies do gênero *Erythrina*, o que pode ocasionar substituição de extratos obtidos a partir das matérias-primas de diferentes espécies (BISBY et al., 1994).

Assim, a comparação dos perfis metabólicos (*fingerprint*) das amostras é uma importante ferramenta para a correta identificação da espécie e estabelecer critérios de diferenciação para espécies correlatas ou amostras inadequadas. Ao observarmos o mercado de matérias-primas para a produção de fitoterápicos à base de *E. verna*, percebe-se que a grande maioria dos fornecedores comercializa o produto somente pela denominação de Mulungu. Este fato é problemático já que *E. velutina* Willd também é conhecida popularmente como mulungu e apresenta composição química diferente (BISBY et al., 1994).

Uma vez que os principais produtos ativos desta matéria-prima são alcaloides e que esta classe química tem como característica intensa atividade biológica e, que a maioria dos fitoterápicos são utilizados pela população sem prescrição médica, torna-se imprescindível o estabelecimento de rígidos parâmetros de controle de qualidade dos produtos disponibilizados no mercado nacional de fitoterápicos.

Onusic e colaboradores (2003) demonstraram que o tratamento crônico em ratos com o extrato hidroalcoólico das inflorescências de *E. verna* apresentou atividade

ansiolítica. Nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg o extrato aumentou o tempo de início da locomoção sem interferir na atividade de locomoção e tempo de transição no modelo claro/escuro similarmente ao medicamento referência diazepam.

Vasconcellos e colaboradores (2003 e 2007) testaram as atividades farmacológicas do extrato hidroalcoólico das cascas de *E. mulungu* (*E. verna*) e *E. velutina* em camundongos. Num primeiro momento foi demonstrada a atividade antinociceptiva do extrato bruto de ambas as espécies nas concentrações de 200 e 400 mg/kg no teste de contrações abdominais induzidas por ácido acético. Além de suas atividades antinociceptivas, ambas as espécies apresentam atividades anticonvulsivantes somente no teste de convulsão induzida pela estricnina nas concentrações de 200 e 400 mg/kg.

Flausino e colaboradores (2007) relataram ações ansiolíticas para o extrato hidroalcoólico das inflorescências e para os alcaloides isolados (eritravina e hidroxieritravina) em camundongos. Os resultados demonstraram atividade nas concentrações de 100 e 200 mg/kg de extrato bruto, 3 e 10 mg/kg de eritravina e 10 mg/kg para hidroxieritravina, comparáveis ao diazepam. Sendo que hidroxieritravina não apresentou a mesma atividade que os demais alcaloides.

Considerando o emprego farmacológico de *Erythrina verna* e a ausência de monografia farmacopeica atualizada, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a diferenciação, classificação e quantificação da matéria-prima contida no mercado. Tal monografia possibilitará a comprovação da qualidade dos insumos utilizados pela indústria nacional de Fitomedicamentos, garantindo assim, a confiabilidade exigida pelo setor.



## **II. OBJETIVOS**

---

---





O objetivo geral deste trabalho consistiu no desenvolvimento de método para o controle químico das cascas de *Erythrina verna*, visando estabelecer critérios de qualidade dos insumos disponíveis para o mercado nacional de produtos farmacêuticos fitoterápicos.

Os objetivos específicos incluíram:

- Desenvolvimento de método para análise qualitativa e quantitativa da droga vegetal;
- Validação de método por CLAE-DAD para a quantificação do teor de alcaloides totais de *E. verna*;
- Isolamento dos compostos majoritários de *E. verna* por CLAE-DAD preparativo;
- Caracterização dos compostos isolados por métodos espectroscópicos;
- Otimização do método extrativo utilizando metodologia de delineamento experimental Box–Behnken;
- Comparação da composição química de *E. verna*:
  - nas diversas partes da espécie;
  - em espécies coletadas em diferentes locais.
- Análise de diferentes amostras adquiridas no mercado nacional:
  - Ensaio físico-químico;
  - Verificação do perfil químico (*fingerprint*);
  - Quantificação do teor de alcaloides totais na matéria-prima vegetal.
- Avaliação da atividade inibitória frente à enzima Monoamina Oxidase (MAO) utilizando cérebros de *zebrafish*.



### **III. REVISÃO DO TEMA - ARTIGO 1**

**The Genus *Erythrina* L.: a review on its Alkaloids, Preclinical and Clinical Studies**

*Artigo publicado no periódico Phytotherapy Research*

*doi: 10.1002/ptr.6321*

---

---



A revisão do tema é constituída por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 35 – 90.

Rambo, D.F.; Biegelmeier, R.; Toson, N.S.B.; Dresch, R.R.; Moreno, P.R.H.; Henriques, A.T. The genus *Erythrina* L.: A review on its alkaloids, preclinical, and clinical studies. *Phytotherapy Research*, 2019. doi: 10.1002/ptr.6321. [Epub ahead of print]





























































































































#### **IV. CAPÍTULO I**

### **Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos para Monografia Analítica e Avaliação de Atividade Biológica**

---

---



O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 93– 120, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Trata sobre a determinação dos parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade das cascas de *Erythrina verna*, avaliação do perfil químico por cromatografia em camada delgada e desenvolvimento do método por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação dos alcaloides. Adicionalmente, apresenta a avaliação da atividade da fração de alcaloides totais de *E. verna* frente a atividade da enzima monoamina oxidase (MAO), empregando modelo de *zebrafish*.































































## V. CAPÍTULO 2 - ARTIGO 2

**Box–Behnken experimental design for extraction optimization of alkaloids from *Erythrina verna* Vell. trunk barks and LC Method Validation**

*Artigo submetido ao periódico Industrial Crops and Products*

---

---



O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 123 – 169, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido ao periódico *Industrial Crops and Products*. Este capítulo apresenta a validação do método desenvolvido por CLAE/DAD para quantificação dos alcaloides de *Erythrina verna*, bem como o isolamento a caracterização dos alcaloides majoritários, analisados através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução – Ionização de Eletrospray (EMAR-IES). Ademais, consta da descrição da técnica de delineamento experimental de Box-Behnken Design (BBD) para otimização da extração dos alcaloides através da avaliação da influência da relação planta: solvente (X1), tempo de extração (X2) e granulometria (X3).











































































































## **VI. DISCUSSÃO GERAL**

---

---



Incentivando a utilização de plantas medicinais como matéria-prima para o tratamento de enfermidades, o Ministério da Saúde (MS) lançou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no ano de 2006, que visa desenvolver o cuidado básico nas unidades de saúde através de plantas medicinais. Sua criação pelo MS estipulou a determinação de regras para utilização da fitoterapia baseada em achados científicos (BRASIL, 2006a; WHO, 2007; FIGUEREDO et al, 2014).

Para a utilização como matéria-prima vegetal, destinada à produção de fitoterápicos, é necessário que essas plantas contenham níveis mínimos de qualidade. Nesse sentido, cabe à indústria farmacêutica assegurar a qualidade dos seus insumos através de ensaios, ficando a critério dos compêncios oficiais fornecer os níveis de aceitação para tais produtos (ALVES, 2013; CASTRO & ALBIERO, 2016).

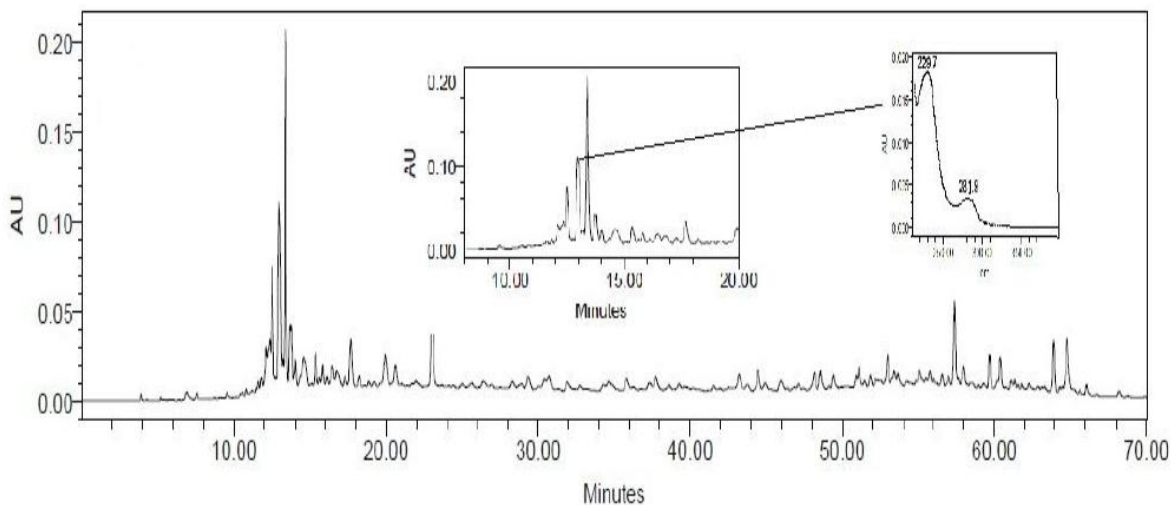
Mesmo o Brasil sendo considerado o país com a maior biodiversidade vegetal do planeta, em uma breve análise na literatura, percebe-se o pequeno número de dados relativos às matérias-primas nativas brasileiras, ficando a produção nacional de fitomedicamentos, a cargo de matérias primas de origem estrangeira. Desta forma, torna-se imprescindível que centros de pesquisa, como as universidades, fomentem estudos para o estabelecimento dos critérios de análise, uma vez que a falta destes, apresenta-se como ponto crítico de todo o processo industrial (ALVES, 2013; CASTRO & ALBIERO, 2016).

No desenvolvimento de metodologias analíticas, tanto para o controle de qualidade ou pesquisa, há a necessidade da investigação e otimização de inúmeros parâmetros, que vão desde as etapas de preparo, extração seletiva do metabólito de interesse, isolamento cromatográfico, detecção e quantificação, devendo estes serem intensivamente estudados (LIANG et al., 2004).

O processo de validação constitui uma das etapas de maior importância no desenvolvimento de metodologias analíticas, esta etapa visa assegurar que o método proposto seja capaz de produzir resultados fidedignos ao analito estudado. Para esse

processo, a ANVISA recomenda a utilização da RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017, devendo ser comprovados os critérios de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise (SIMÕES et al., 2017).

Face à potencialidade do tema, nosso grupo de pesquisa têm focado há anos no desenvolvimento de metodologias que contemplem tal escopo. Dando sequência a estudos desenvolvidos por Rambo e colaboradores (2013), foi realizada a melhoria do método de separação dos alcaloides de eritrina por cromatografia a líquido de alta eficiência, uma vez que o método apresentado não possibilitava boa separação (resolução) dos compostos e ainda, demandava grande período de análise (cerca de 70 minutos) (Figura 1).



**Figura 1:** Perfil cromatográfico apresentado por Rambo e colaboradores (2013), baixa resolução cromatográfica e longo período de análise.

Para obter uma melhor separação dos compostos alcaloídicos contidos no extrato das cascas de *E. verna*, foram testados vários sistemas eluentes, diferentes proporções de fase móvel, fluxo, tempos de análise e colunas. A técnica que melhor satisfizes as condições cromatográficas foi a utilização de coluna de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano



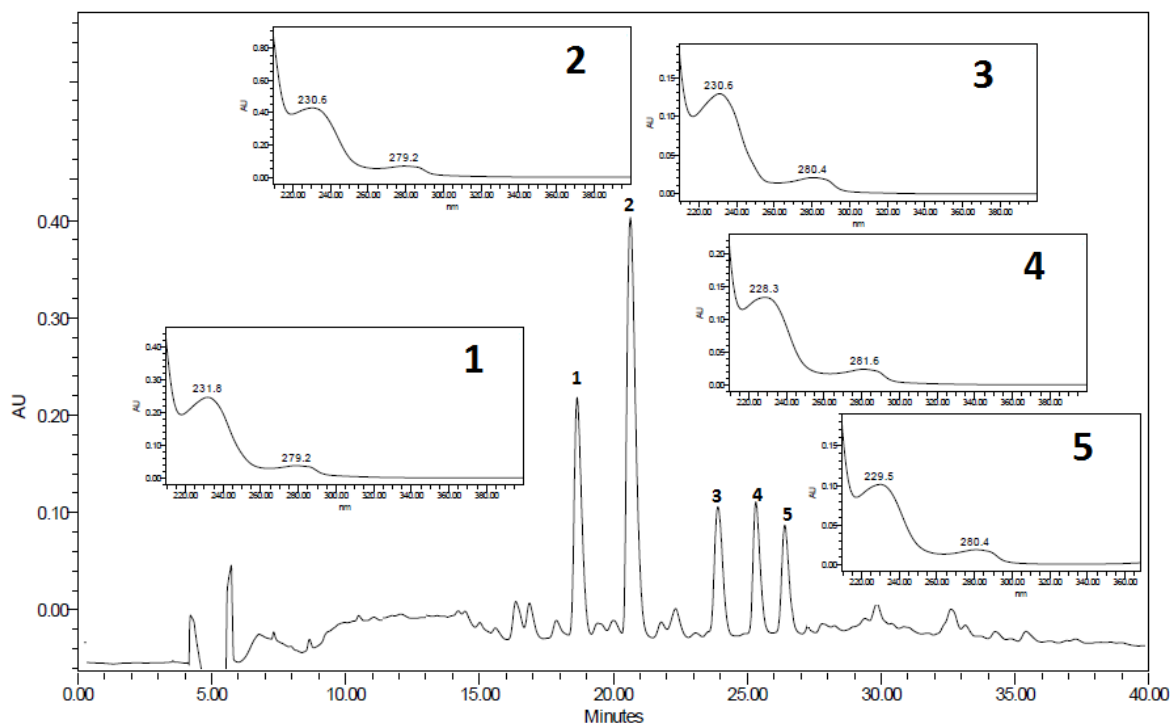
(3  $\mu\text{m}$ ). Sabe-se que a eficiência de uma técnica de separação de compostos é determinada pela resolução da separação em função ao tempo de análise. Essa capacidade pode ser expressa pelo número de pratos teóricos (N), o qual é determinado diretamente no cromatograma por meio da relação entre o tempo de retenção de um composto e a largura de sua base (LANÇAS, 2011; JANDERA & HÁJEK, 2017).

Com a evolução das técnicas de análise, no anseio de melhorar a eficiência das colunas, o tamanho médio das partículas da fase estacionária foi sendo reduzido, apresentando atualmente, nas colunas cromatográficas de alto desempenho, partículas de 3  $\mu\text{m}$  com grande capacidade de interação com os analitos. Uma vez que reduzindo-se o tamanho das partículas da fase estacionária, pode-se operar com fluxos maiores, sem perda de eficiência, conseqüentemente, diminuindo o tempo de análise (LANÇAS, 2011; JANDERA & HÁJEK, 2017).

Para a seleção da fase móvel e criação de um sistema de eluição, levou-se em consideração o potencial de ionização dos alcaloides, que por apresentarem nitrogênio, sofrem influência do pH. Ainda, o método deveria proporcionar a separação de amostras que contenham inúmeros compostos, na maioria das vezes compostos de mesmo núcleo estrutural (LANÇAS, 2011; JANDERA & HÁJEK, 2017).

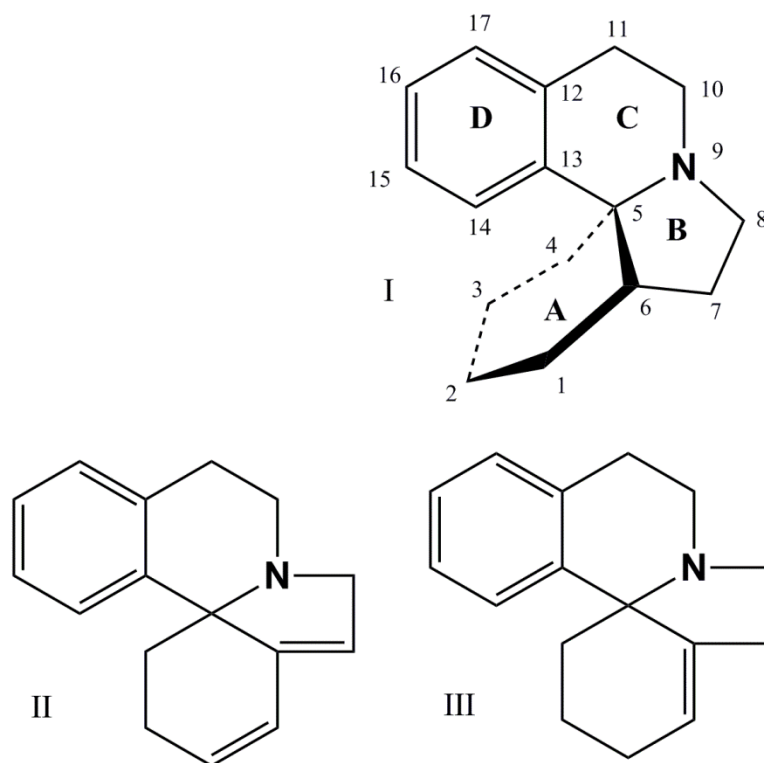
A fase móvel selecionada é constituída de *dietilamina R, água R:TFA* (0,1:99,9:até pH=3V/V) na fase A e - *dietilamina R: acetonitrila R* (0,1:99,9 V/V) na fase B. A maioria dos alcaloides possui propriedades básicas, com solubilidade em solventes orgânicos e não em água. A adição de fases móveis ácidas resultará na protonação do nitrogênio da base livre alcaloídica, resultando em um composto solúvel em água. Cabe ressaltar a instabilidade da sílica das fases estacionárias, tanto frente a fases móveis ácidas como básicas, o que pode resultar na perda de eficiência da coluna analítica (VERPOORTE, 2000).

O perfil alcaloídico do extrato das cascas de *Erythrina verna* (EV-2) apresentou cinco picos majoritários como pode ser observado na Figura 2.



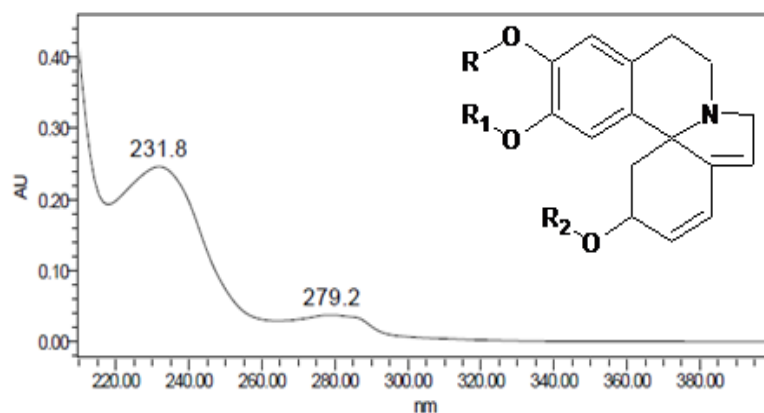
**Figura 2:** Perfil cromatográfico alcaloídico obtido das cascas de *Erythrina verna*. Todos os picos apresentam espectro de ultravioleta compatível com alcaloides em 230nm.

Os perfis de ultravioleta apresentados demonstram a presença de alcaloides eritrínicos aromáticos isoquinolínicos, subtipo dienoide e alcenoide, sendo estes diferenciados pela dupla ligação nos átomos de C1, 2, 6 e 7, enquanto o segundo grupo possui apenas uma ligação dupla na posição 1,6, (Figura 3) (REIMANN, 2007; FEITOSA, 2014).



**Figura 3:** Estrutura molecular dos alcaloides eritrínicos (I), subtipo dienoide (II) e alcenoide (III).

Quando analisados perante ao seu espectro de ultravioleta, esses compostos apresentam máximos de absorção de aproximadamente 235-240 e 285-290 nm, valores similares aos encontrados no extrato alcaloídico das cascas de *E. verna*, que apresentam máximos de absorção entre 228-231 e 279-281 nm (Figura 4), característicos dos alcaloides eritrínicos isoquinolínicos (SANGSTER & STUART, 1964).



**Figura 4:** Espectro de ultravioleta dos alcaloides das cascas de *E. verna*, bem como o radical dos alcaloides eritrínicos isoquinolínicos.

Na ausência de substância referência comercial contida na planta, conforme recomendação RDC 166/17, artigo 16- Parágrafo Único, utilizou-se método de padronização interna, onde uma substância referência é adicionada em concentrações conhecidas, servindo de parâmetro para o doseamento das substâncias da amostra de interesse (FORTUNATO, 2017). Escolheu-se a galantamina, por ser também um alcaloide, por apresentar similaridade estrutural e de peso molecular (287,354g/mol) aos alcaloides eritrínicos (PATEL et al, 2017).

De acordo com ICH (2005) e a RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (BRASIL, 2017), um método para ser utilizado deve ser validado e para isso deve submeter-se a testes que confirmem sua eficiência em termos de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e robustez.

O método proposto apresentou adequado comportamento quando submetido aos ensaios de validação. Como critérios de verificação da aceitabilidade dos resultados seguiu-se as recomendações da RDC 166/17 que norteia tal definição, por exemplo, a curva analítica realizada apresentou coeficiente de determinação ( $r^2$ ) com valor de 0,9985, valor de acordo com o preconizado pela RDC 166/17 que estabelece um  $r^2$  mínimo de 0,990.

Ainda, os valores experimentais obtidos para análise do teor de alcaloides em cascas de *E. verna*, indicaram uma boa precisão intra-dia, uma vez que RSD foi de 3,85%. A variabilidade inter-dias foi determinada a partir de ensaios em 3 dias consecutivos e demonstrou uma RSD média de 2,99%. Ao analisarmos a legislação vigente (RDC 166/17), pode-se observar que, segundo o Art. 39, os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo a proposta do método, ou seja, variações serão aceitas dentre a complexidade da amostra. Com esses resultados, fica evidente a eficiência do método proposto, bem como a escolha do alcaloide galantamina para a quantificação dos alcaloides das cascas de *E. verna*.

Com o método de quantificação validado, partiu-se então para a otimização das condições extrativas dos alcaloides de *Erythrina verna* por Box–Behnken, já que sem a quantificação, seria impossível determinar pequenas alterações de teor sem um método validado.

Uma vez definidos os parâmetros iniciais da técnica de extração como método de extração e solvente (modelo de primeira ordem), aplicou-se um modelo exploratório de segunda ordem (Box-Behnken) para monitorar a Superfície de Resposta (Método Superfície de Resposta-MSR) envolvida na extração dos alcaloides de *E. verna*. A técnica de Box-Behnken é uma das mais conhecidas em metodologia de superfícies de resposta e é obtida pela subtração de pontos de um planejamento fatorial de três níveis original, sua principal vantagem é a redução do número de ensaios para estudar um maior número de fatores (FERREIRA et al, 2007).

Foi determinada a influência dos parâmetros como relação planta: solvente ( $X_1$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) e granulometria ( $X_3$ ). Os resultados evidenciaram a influência no rendimento do teor de alcaloides dos parâmetros  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  em sua função linear, bem como de seus termos quadráticos ( $X_1$  e  $X_2$ ). Assim, pode-se concluir que esses fatores apresentam relevância nos processos de extração de alcaloides, ficando expresso na

curvatura do modelo apresentado, que os fatores  $X_1$  e  $X_2$  apresentam maior peso frente à resposta do teor de alcaloides.

Bulduk e colaboradores (2015) demonstraram uma maior influência da relação planta:solvente no rendimento de morfina juntamente com o tempo de extração e as variáveis de pH. Teng e Choi (2012), demonstraram importância semelhante na obtenção de alcaloides, apresentando que tanto os termos lineares quanto a interação do tempo e razão planta:solvente influenciaram significativamente o teor total de alcaloides. Kaiser e colaboradores (2013) também revelaram que a proporção planta: solvente é um fator significativo para a extração de alcaloides por maceração dinâmica aplicando o design Box-Behnken.

Assim, o rendimento ótimo previsto pelo modelo matemático foi de 0,625 g%, utilizando uma relação planta: solvente de 1:60 (m/v), 5,47 horas e uma gama de granulometria de 710-1000  $\mu\text{m}$ . Aplicando as condições otimizadas foi obtido uma média de teor de alcaloides de  $0,597 \pm 0,016$  g%. O modelo polinomial de segunda ordem demonstrou uma capacidade preditiva de  $95,57 \pm 2,586\%$ . Dentre os valores observados na literatura, o modelo apresentou uma boa resposta, tendo em vista a quantidade de variáveis envolvidas na extração de compostos de interesse e a origem complexa da matriz de estudo (KAISER et al, 2013; KLANIAN & PRECIAT, 2017).

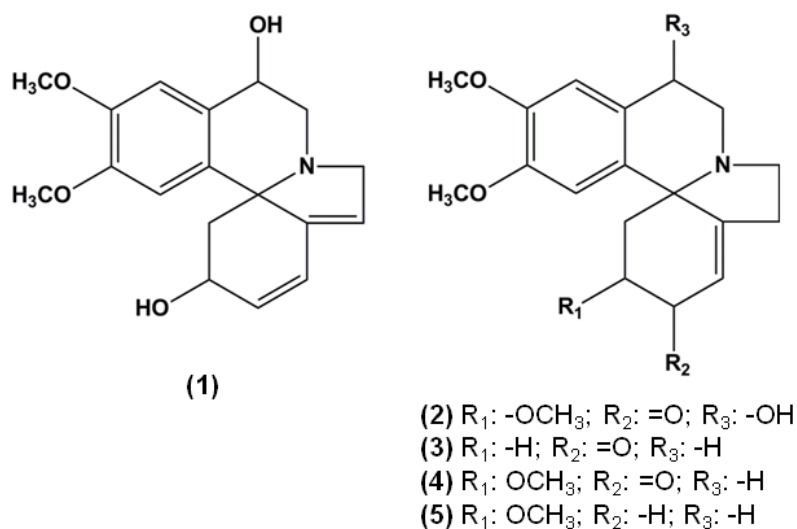
Devido à falta de metodologia analítica oficial para a determinação de alcaloides de *Erythrina verna*, poucos dados referentes ao teor de alcaloides são encontrados na literatura. As amostras estudadas apresentaram variabilidade quantitativa, tendo o teor médio variando entre 0,01 e 1,40g%, de alcaloides totais. Esses valores encontram-se compatíveis aos valores apresentados na literatura para outras espécies, apresentando valores entre 0,009 a 1,37% em diferentes partes de plantas do gênero *Erythrina* (FOLKES & KONIUSZY, 1940; GARCIA-MATEOS et al, 1998 e 2002).

Nota-se também, que além da variabilidade quantitativa do teor de alcaloides de *E. verna*, há grande variabilidade qualitativa, tendo inúmeras amostras apresentado perfil cromatográfico completamente distinto ao apresentado pelas amostras coletadas e identificadas botanicamente. Fato não incomum, tendo em vista inúmeros relatos apresentados na literatura, de inconsistências na qualidade das amostras vegetais encontradas no mercado de produtos naturais (BOOKER et al, 2016a; BOOKER et al, 2016b; CALAHAN et al, 2016). Ainda, a questão da alteração das matérias-primas vegetais engloba aspectos de saúde pública, uma vez que esses produtos podem ser alvos de adulteração intencional pela adição de agentes farmacológicos para produzir a tão esperada atividade terapêutica a qual se propõem (CALAHAN et al, 2016).

Esse pensamento impacta no cerne do senso comum, uma vez que grande parte da população crê que produtos naturais são isentos de contra-indicações e toxicidade, o que não é verdadeiro, devendo cada vez mais, o estabelecimento de parâmetros que garantam a qualidade e explicitem os riscos da utilização indevida de tais produtos (MOREIRA & GARRIDO, 2013; BOOKER et al, 2016a; BOOKER et al, 2016b; MA et al, 2016).

A identificação de compostos presentes no material vegetal proporciona um preciso aspecto para o controle de qualidade, uma vez que determinado o marcador químico da planta, torna-se possível a identificação inequívoca da sua autenticidade, distinguindo-a das outras espécies do gênero, bem como estabelece-se os critérios mínimos para a sua quantificação (VIRK et al, 2016).

Por isso, a confirmação da presença de 11-hidroxi-eritravina (1), 11-hidroxi-eritratidinona (2), 3-demetoxi-eritratidinona (3), eritratidinona (4) e dihidroerisotrina (5) (Figura 5) torna possível a identificação e a quantificação dos alcaloides de *Erythrina verna* (FLAUSINO, 2007; FAGGION et al., 2011; FEITOSA et al., 2012; FEITOSA, 2014; GUARATINI et al., 2017).



**Figura 5:** Estruturas químicas dos alcaloides de 11-hidroxi-eritravina (1), 11-hidroxi-eritratidinona (2), 3-demetoxi-eritratidinona (3) e eritratidinona (4) e dihidroerisotrina (5) de *Erythrina verna*.

Por fim, foi otimizado o método para a determinação da atividade da enzima MAO utilizando homogenato de cérebro de *zebrafish*, uma vez que as enzimas comerciais apresentam elevado custo para a técnica, ficando o método alternativo para posteriores pesquisas. Os resultados para a fração de alcaloides de cascas de *E. verna* foram promissores, devendo ser realizados novos ensaios com os alcaloides isolados e/ou frações.



## **VII. CONCLUSÕES**

---

---



Os experimentos realizados nesta tese incrementam enormemente os critérios para o controle de qualidade de matéria-prima vegetal cascas de *Erythrina verna*. Assim podemos concluir que:

Quanto à avaliação química quali e quantitativa:

- ✓ O teor médio de perda por dessecação das amostras estudadas variou entre 1,6 a 6,7% para cascas de *Erythrina verna* Vell.;
- ✓ O conteúdo de materiais estranhos encontrado apresenta-se baixo, indicando que as amostras estudadas possuem a qualidade requerida para a produção de produtos farmacêuticos;
- ✓ O teor de cinzas totais variou entre 5,35 a 9,09%;
- ✓ A técnica de Cromatografia em Camada Delgada apresentou-se eficiente para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, proporcionando um controle rápido e de baixo custo;
- ✓ Foram identificados os alcaloides 11-hidroxi-eritratidina, 11-hidroxi-eritratidinona, 3-demetoxi-eritratidinona, eritratidinona e dihidroerisotrina;
- ✓ Foi possível inferir o teor de alcaloides de *E. verna* em função da inclusão de galantamina como padrão interno na metodologia de quantificação dos alcaloides totais de *E. verna*;
- ✓ O método desenvolvido utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência foi validado, demonstrando ser linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa dos extratos alcaloídicos das cascas de *Erythrina verna* Vell.;
- ✓ O método analítico por CLAE foi capaz de distinguir as demais espécies do gênero *Erythrina*, proporcionando uma ferramenta eficaz frente a substituições que possam ocorrer na cadeia produtiva;
- ✓ A técnica de delineamento experimental por Box-Behnken proporcionou uma metodologia eficiente para a extração otimizada de alcaloides de *E. verna*;

- ✓ A análise da Superfície de Resposta evidenciou a influência dos fatores: proporção droga:solvente, tempo e granulometria para a produção de extrato de alcaloides totais de cascas de *E. verna*;
- ✓ A condição ótima para a extração de alcaloides de *E. verna* encontra-se na razão droga:solvente 1:60 (m/v), tempo de 5,47 horas com faixa granulométrica de 710-1000  $\mu\text{m}$ ;
- ✓ O modelo matemático obtido apresentou um teor estimado de alcaloides de 0,625 g%, sendo que a média experimental foi de 0.597 g%;
- ✓ O modelo matemático apresentou uma adequabilidade de 95,57%, sendo capaz de descrever o comportamento da técnica de extração de alcaloides;
- ✓ A avaliação do teor de alcaloides para as cascas de *E. verna* variou entre 0,01 a 1,4 g%;
- ✓ Tendo em vista a sua importância, sugere-se a elaboração de uma monografia da espécie para a inclusão na Farmacopeia Brasileira;
- ✓ O extrato dos alcaloides de *E. verna* apresentou  $\text{CI}_{50}$  de  $0,8538 \pm 0,1806$  mg/mL frente à enzima MAO de *zebrafish*.

## VIII. REFERÊNCIAS

---

---



ABRAHAM, E. Coagulation abnormalities in acute lung injury and sepsis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 22, p. 401-404. 2000.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.

BOOKER, A.; JALIL, B.; FROMMENWILER, D.; REICH, E.; ZHAI, L; KULIC, Z.; HEINRICH, M. The authenticity and quality of *Rhodiola rosea* products. **Phytomedicine**, v. 23, p. 754–762, 2016a.

BOOKER, A.; FROMMENWILER, D.; REICH, E.; HORSFIELD, S.; HEINRICH, M. Adulteration and poor quality of Ginkgo biloba supplements. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, p. 79–87, 2016b.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª edição, Brasília, 2010.

BRASIL. Congresso Nacional. *Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999*. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

\_\_\_ Ministério da Saúde. *Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006*. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006a.

\_\_\_ Presidência da República. *Decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006*. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **Diário Oficial da União** 2009.

BRASIL, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Diário Oficial da União**. 2014.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Diário Oficial da União**. 2017.

BISBY, F. A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. B.; ZARUCCHI, J. L. **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**. v.1, Chapman & Hall Chemical Database, CRC Press, pág 302. 1994.

BULDUK, I.; GEZER, B.; CENGIZ, M. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Morphine from Capsules of *Papaver somniferum* by Response Surface Methodology. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015; 796349, 2015.

CALAHAN, J.; HOWARD, D.; ALMALKI, A. J.; GUPTA, M. P.; CALDERÓN, A. I. Chemical Adulterants in Herbal Medicinal Products: A Review. **Planta Medica**, v. 82, p. 505–515, 2016.

CARVALHO, ANA; BALBINO, EVELYN.; MACIEL, ARTUR; PERFEITO, JOÃO. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.314-319, 2008.

CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n.1, p. 1-93, 2016.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. S.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 739-743, 2008.

CUI, L.; THUONG, P. T.; LEE, H. S.; NDINTEH, D. T.; MBAFOR, J. T.; FOMUM, Z. T.; OH, W. K. Flavanones from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & Medicinal chemistry**. v. 16, p. 10356-10362, 2008.

DANTAS, M. C.; OLIVEIRA F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; SILVA, C. D.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects



of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 129-133, 2004.

FAGGION, S. A.; CUNHA, A. O. S.; FACHIM, H. A.; GAVIN, A. S.; DOS SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; BELEBONI, R.O. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-91 erythravine and (+)-11- $\alpha$ -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae–Papilionaceae). **Epilepsy & Behavior**, v. 20, n.3, 441-446, 2011.

FEITOSA, L.G.P.; GUARATINI,T.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2177-2180, 2012

FEITOSA, L.G.P. **Caracterização dos alcaloides de *Erythrina verna***. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. 2014.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; DA SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; DOS REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; DOS SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FIGUEREDO, C.A.; GURGEL, I.G.D.; GURGEL JUNIOR, G.D. *A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios*. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

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

FOLKERS, K.; KONIUSZY, F. Isolation and characterization of the new alkaloids, *Erythraline* and *Erythratine*. **Journaul of American chemistry Society**, v. 62, p. 436-431, 1940.

FORTUNATO, F.M. **Avaliação do método de adição de padrão interno em técnicas espectroscópicas**. Tese de Doutorado– Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara. 2017.

FLAUSINO, O.A.; PEREIRA, A.M.; BOLZANI, V.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Effects of Erythrinian Alkaloids Isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in Mice Submitted to Animal Models of Anxiety. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 375-378, 2007.

GARCÍA-MATEOS, R.; SOTO-HERNANDEZ, M.; KELLY, D. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 545-551, 1998.

GUARATINI, T.; FEITOSA, L. G. P.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; VESSECCHI, R. Gas-phase dissociation study of erythrinian alkaloids by electrospray ionization mass spectrometry and computational methods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, p. 571–579, 2017

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2A **Guideline Validation of analytical procedures: definitions and methodology**, 2005.

JANDERA, P.; HÁJEK, T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction – reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. **Journal of Separation Science**. Epub 2017.

KAISER, S.; VERZA, S.G.; MORAES, R.C.; PITTOL, V.; PENALOZA, E.M.C.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G. Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinic acid glycosides from cat's claw bark by Box–Behnken design. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 153-161. 2013.

KLANIAN, M.G.; PRECIAT, M.T. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Brosimum alicastrum* Leaves and the evaluation of their radical-scavenging activity. **Molecules**. v. 22, 1286, 2017.

LANÇAS, F.M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, v. 3, n.1, p. 17-23, 2011.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v.1, 2ª Ed. Nova Odessa, SP. Plantarum, 1992.

LORENZI, H; MATOS, F.F.A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2002.

MA, Y.; MANI, A.; CAI, Y.; THOMSON, J.; MA, J.; PEUDRU, F.; CHEN, S.; LUO, M.; ZHANG, J.; CHAPMAN, R.G.; SHI, Z. An effective identification and quantification method for *Ginkgo biloba* flavonol glycosides with targeted evaluation of adulterated products. **Phytomedicine**, v. 23, p. 377–387, 2016.

MARCHIORO, M.; BLANK, M.F.A.; MOURÃO, R.H.V.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**, v. 76, p. 637-642, 2005.

MOREIRA, V.F.; GARRIDO, E. Hepatotoxicidad por productos de herboristería. **Revista Espanhola Enfermagem e Diagnostico** (Madrid ), v. 105, n. 7, p. 433, 2013.

NKENGFACK, A.E, VOUFFO, T.W.; VARDAMIDES, J.C.; KOUAM, J.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M.; STERNER, O. Prenylated isoflavanone from the roots of *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 36, p.1047-1051, 1994.

ONUSIC, G.M.; NOGUEIRA, R.L.; PEREIRA, A.M.S.; FLAUSINO JR, O. A.; VIANA, M.B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related response in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** v. 26, n 11. p. 1538-1542, 2003.

PATEL, R; PATEL, K. Significance of various chromatographic techniques in herbal drug analysis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 877-882, 2016,.

PEREIRA, W.F; MACHADO, M. Q. de M. Estudo comparativo do efeito ansiolítico da *Erythrina verna* (mulungu) e o clonazepam (Rivotril) em modelo animal de ansiedade. **Horizonte Científico (Revista Eletrônica da Universidade Federal de Uberlândia)**, v. 1, n. 9, p. 315-333, 2008.

RAMBO, D. F., VIGNOLI-SILVA, M., DRESCH, R. R., BIEGELMEYER, R., PASSOS, C. S., MORENO, P. R. H., NUNES, E., MENTZ, L. A., HENRIQUES, A. T., Morphoanatomical identification and physicochemical parameters of the drug *Erythrina*

verna Vell. Trunk bark. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 12, p. 243-256. 2013.

RAUPP, I.M. *et al.* Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 295-299, 2008.

REIMANN, E. **Synthesis pathways to *Erythrina* alkaloids and *Erythrina* type compounds** In: Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G.W. Progress in the Chemistry of organic Natural products Springer Wien New Youk, v. 88, 2007.

SANGSTER, A.W.; STUART, K.L. Ultraviolet spectra of alkaloids. **Chemical Review**, p. 89-90, 1964.

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

SILVA, M.I.G, SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI,C.; CAVALCANTI E SILVA, E.L.; TREBIEN, H.A.; MIGUEL, O.G.; ANDREATINI, R. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.16, n.4, p.455-462, 2006.

SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL E. P.; DE MELLO J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed: Porto Alegre, 2017.

TENG, H.; CHOI, Y.H. Optimization of Extraction of Total Alkaloid Content from Rhizome *Coptidis* (*Coptis chinensis* Franch) using Response Surface Methodology. **Journal Korean Society Applicable Biology Chemistry**, v. 55, p. 303–309, 2012.

VASCONCELOS, S.M.M.; OLIVEIRA, G.R.; CARVALHO, M.M.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVEIRA, E.R.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 946-949, 2003.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, N.M.; SALES, G.T.M.; CUNHA, G.M.A.; AGUIAR, L.M.V.; SILVEIRA, E.R.; RODRIGUES, A.C.P.; MACEDO, D.S.; FONTELES,

M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 271-274, 2007.

VERPOORTE, R. **Liquid Chromatography**. In: VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

VIRK, J.K.; KUMAR, S.; SINGH, R.; TRIPATHI, A.C.; SARAF, S.K.; GUPTA, V.; BANSAL, P. Isolation and characterization of quinine from *Polygonatum verticillatum*: A new marker approach to identify substitution and adulteration. **Journal of Advanced Pharmacology and Technology Research**. v. 7, n. 4, p. 153-158, 2016.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D., OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WHO, World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**, 2007.