

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELÉTRON NA ANÁLISE DE ALCALOIDES DO MULUNGU[#]

Luís Guilherme Pereira Feitosa, Thais Guaratini, João Luis Callegari Lopes e Norberto Peporine Lopes*

Departamento de Química e Física, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14049-903, Ribeirão Preto – SP, Brasil

Aline Cavalli Bizaro e Denise Brentan da Silva

Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produtos Naturais, Incubadora SUPERA, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 1/6/12; aceito em 23/8/12; publicado na web em 28/9/12

APPLICATION OF ELECTRON IONIZATION MASS SPECTROMETRY FOR MULUNGU ALKALOID ANALYSIS. *Erythrina verna* is a medicinal plant used to calm agitation popularly known as mulungu. We purchased the barks of *E. verna* from a commercial producer and analyzed the alkaloid fraction of the bark by CG-MS and HRESI-MS. Five erythrinian alkaloids were identified: erysotrine, erythratidine, erythratidinone, epimer, and 11-hydroxieritratidinone. Here we report the compound 11-hydroxieritratidinone for the first time as a natural product.

Keywords: *E. verna*; alkaloids; fragmentation pattern.

INTRODUÇÃO

O Prof. Otto Richard Gottlieb dedicou sua vida científica ao entendimento da natureza para que se pudesse utilizá-la de forma racional. Com uma visão à frente de seu tempo, o Prof. Otto já discutia a análise de perfis químicos para se entender um organismo de maneira completa. Para isso, o referido professor também se dedicou ao estudo e desenvolvimento de aplicações de ferramentas analíticas que pudessem auxiliar nas diferentes áreas de pesquisa em produtos naturais. Isso pode ser confirmado pela publicação de um dos primeiros livros em língua portuguesa sobre espectrometria de massas.¹ Essa técnica hoje, junto com a ideia de análise de perfil químico é um dos pilares da Metabolômica, área que vem crescendo de forma vertiginosa nos diversos campos da ciência e que tem como uma de suas propostas o entendimento mais amplo de metabolismo de um organismo.

Nesse contexto, uma das teorias do Prof. Otto aventou o efeito de borda de diferentes ambientes na expressão do metabolismo secundário. Nesse caso, espécies de um ambiente, quando em áreas de borda como, por exemplo, zona de interface entre o Cerrado e a Mata Atlântica ou o Cerrado e a Floresta Amazônica, poderiam ter amplificado suas substâncias de defesa ou seus mecanismos alelopáticos. Estudos químicos com a espécie *L. ericoides*, conhecida popularmente como arnica da serra, revelou que as populações de *campus rupestris*, habitat natural da espécie, apresentavam um perfil muito semelhante com predomínio de flavonoides e ácidos clorogênicos e sem nenhuma atividade citotóxica significativa.² Por outro lado, a população na região de transição mostrou um acúmulo dos fenólicos citados anteriormente junto com uma intensa expressão de lactonas sesquiterpênicas com alta atividade citotóxica. A análise conjunta de todos os dados obtidos nesse trabalho, levou os autores a proporem que existia sim um possível efeito de borda, alertando para o cuidado sobre a origem da matéria-prima para uso como fitoterápico.³ Essa discussão também tem sido ampliada com outras plantas medicinais brasileiras. Um gênero em especial, o *Erythrina* (família *Fabaceae*),

tem sido alvo de discussão em virtude de possíveis variações em seu marcador químico. Este gênero compreende aproximadamente 115 espécies tropicais e subtropicais distribuídas nos hemisférios norte e sul.⁴ O nome *Erythrina* é proveniente do grego “erythros”, que significa vermelho, em referência à cor das flores das espécies do gênero.⁵ Os marcadores químicos deste gênero são alcaloides eritrínicos, tendo sido descritos mais de uma centena de derivados estruturais desses alcaloides.⁶⁻¹⁰ No Brasil são encontradas 11 espécies de *Erythrina*, sendo *Erythrina verna*, anteriormente classificada como *Erythrina mulungu*, a de maior ocorrência no sudeste do país.¹¹ Essa espécie foi a responsável pela designação popular de mulungu para várias espécies do gênero. Possui hábito arbóreo com exemplares na faixa de 10-14 m de altura.¹² Seu conhecimento popular provém do fato do uso da decoção das cascas como calmante e indicação para insônia.¹³ Estudos recentes realizados pelo Nubbe (IQ-UNESP) e grupos colaboradores¹⁴⁻¹⁶ têm dado suporte ao uso popular através da descrição dos efeitos ansiolíticos de vários derivados eritrínicos.

Como citado anteriormente, apesar do nome popular mulungu estar diretamente relacionado ao nome científico clássico da espécie mais utilizada, a recente reclassificação taxonômica do gênero reúne *E. mulungu* e *E. verna*. A nova nomenclatura passou a ser então *E. verna*.¹¹ O mercado ainda não seguiu a nova classificação e as espécies cultivadas ainda são comercializadas no Brasil como mulungu. Uma análise preliminar de diferentes produtores e espécies nativas mostrou uma não homogeneidade no perfil dos metabólitos secundários. Esse problema pode ser em decorrência de variações no ritmo do metabolismo ou mesmo dos ambientes distintos das matérias-primas, em analogia ao que ocorre com *L. ericoides*.¹⁷ Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a associação da racionalização dos mecanismos de fragmentação em espectrometria de massas por ionização por elétrons de séries homólogas de alcaloides eritrínicos descritos na literatura, com dados de espectrometria de massas de alta resolução obtidos em espectrometria de massas com ionização por eletrospray, visando contribuir com a química de extratos alcaloídicos de *E. verna*.

*e-mail: npelopes@fcfrp.usp.br

[#]Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

PARTE EXPERIMENTAL

Obtenção das frações enriquecidas em alcaloides

As cascas de *E. verna* foram adquiridas de um fornecedor registrado de matéria vegetal. Estas foram trituradas em moinho de facas e, posteriormente, 0,5 kg do material foi extraído por percolação com etanol. Após rotaevaporação a 50 °C, o extrato etanólico apresentou um rendimento de 9,0%. Posteriormente, o extrato etanólico foi submetido à marcha-química para alcaloides. Assim, 0,43 g do extrato etanólico foram dissolvidos em diclorometano 8:2 metanol e submetidos à extração com uma solução de HCl a 5% v/v (pH = 2). A seguir, a fração aquosa foi alcalinizada com NH₄OH em volume suficiente para atingir pH = 10 e extraída com diclorometano. Após a eliminação do solvente à pressão reduzida, obteve-se um rendimento final de 0,09%.

Análise por CG-EM

A fração alcaloídica foi então submetida à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização por elétrons (CG-EM) no cromatógrafo a gás modelo GC-MS-QP-2010 da Shimadzu, com autoinjeter AOC-20i, coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), usando-se hélio como gás de arraste ao fluxo constante de 1,10 mL/min, *split* na razão 1/30, injetor na temperatura de 250 °C e volume de amostra injetado de 1 µL. Foi utilizada a seguinte programação de temperatura: de 100 a 220 °C a 6 °C/min, 220 °C por 10 min, de 220 a 290 °C a 6 °C/min e, finalmente, 290 °C por 11 min. Os espectros de massas foram obtidos pela ionização por elétrons a 70 eV.

Análise por IES-EM

Para a obtenção dos espectros de massas de alta resolução, a fração alcaloídica foi analisada por espectrometria de massas com ionização de eletrospray¹⁸ (IES-EM) pela infusão direta em espectrômetro de massas modelo microTOFq II–ESI-TOF (Bruker Daltonic), temperatura do gás de secagem a 200 °C, fluxo de 4 L/min, nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 0,4 Bar e voltagem do capilar de 4500 V. A calibração interna para alta resolução foi realizada antes das análises com trifluoroacetato de sódio a 10 mg/mL. As análises foram realizadas no modo positivo e a aquisição do espectro foi realizada no modo *full scan* de 0 a 1200 Da.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amer e colaboradores publicaram em 1991 a maior e mais importante revisão sobre dados químicos de alcaloides eritrícos.⁶ Nesse trabalho foram compilados todos os dados de RMN, UV, IV e IE-EM passando a ser um tratado para qualquer iniciante na química destas moléculas. Nos últimos anos, os jornais especializados em espectrometria de massas têm reforçado que a interpretação das reações de fragmentação devem ser fundamentadas na presença de séries homólogas¹⁹ ou no emprego de cálculos teóricos.²⁰ Para as técnicas modernas, esse problema apresenta uma dificuldade maior em virtude dos diferentes parâmetros entre os equipamentos. Contudo, em sistemas de IE, esse processo é muito mais robusto e permite a construção de hipóteses com base em dados da literatura, sem a necessidade de novas aquisições de dados. Com base nesse preceito e no levantamento previamente publicado,²¹ alcaloides eritrícos das duas subclasses (dienoides e alcenoides) foram analisados em detalhe, visando reconhecer parâmetros nos íons formados em ionização por elétrons. Os dados publicados mostram claramente que a subclasse

alcenoide (ligação dupla entre os carbonos 1 e 6) tem como um de seus íons majoritários o produto da reação de Retro Diels-Alder (RDA)²¹ (Figura 1). Por outro lado, o sistema dienóide (ligações duplas entre os carbonos 1 e 2 e entre os carbonos 6 e 7) apresenta uma restrição a essa reação e a ausência desse processo é um forte indicativo da ocorrência dessa subclasse.²² Deve-se observar que o sistema dienóide é bastante lábil para a perda do elétron na fonte, o que origina, pela clivagem α, o íon di-álílico, muito estável e por várias vezes o sinal base do espectro.²¹ Esta observação é útil como uma informação de triagem dessas substâncias (Figura 1).

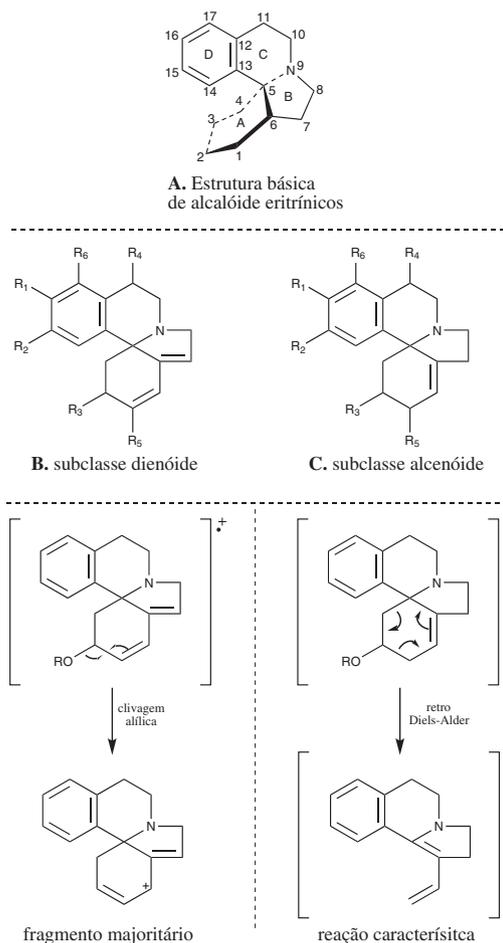


Figura 1. (A) Estrutura básica dos alcaloides eritrínicos e as fragmentações características das subclasses dienóide (B) e alcenoide (C)

Em ambas as subclasses, a ausência de oxidação nos carbonos 11 e 2 mostra com frequência a presença de íons moleculares intensos e bem característicos. Em um trabalho detalhado de Millington e colaboradores, sobre as reações em fase gasosa dos alcaloides de *E. folkersii* e *E. salviiiflora*, foi demonstrado que a presença de um grupamento carbonila na posição 2 leva a uma drástica redução na intensidade dos íons moleculares, levando a valores inferiores a 5%, podendo chegar até mesmo à sua ausência.²² Esse fato pode ser explicado pela retirada de um elétron isolado do oxigênio da carbonila como um novo ponto de iniciação e a clivagem α carbonila gera uma nova coleção de vias de fragmentações.

Com base nas considerações anteriores, o extrato alcaloídico de *E. verna* foi submetido à cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas revelando a presença de 5 possíveis alcaloides. A análise do espectro de massas do constituinte majoritário dessa fração (Tabela 1) mostrou a presença da reação de RDA [$M^+ - 58$] como esperado para a classe dos alcenoides. Além disso, foi observada baixa

Tabela 1. Constituintes da fração alcaloídica de *E. verna*. Dados obtidos em espectrometria de massas com ionização por elétron e espectrometria de massas de resolução com ionização por eletrospray

Alcaloide	(EI) m/z	Fórmula $[M+H]^+$	Massa observada	Massa calculada	Erro (ppm)
Erisotrina ($C_{19}H_{23}NO_3$) ^a	313 (37), 298 (32), 283 (28) 282 (100), 280 (15), 229 (17)	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314,1741	314,175070	-3,1
Eritratidina ($C_{19}H_{25}NO_4$) ^a	331 (5), 300 (10), 273 (46), 258 (26), 257 (100), 244 (59), 242 (15), 226 (13)	$C_{19}H_{26}NO_4^+$	332,1837	332,185635	-5,8
Epierritratidinona ($C_{19}H_{23}NO_4$)	301 (12), 286 (42), 272 (20), 271 (100), 243 (25), 242 (78), 228 (61), 215 (21), 214 (29), 212 (24), 198 (19), 197 (72)	$C_{19}H_{24}NO_4^+$	330,1699	330,169985	-0,26
11-hidroxieritratidinona ($C_{19}H_{23}NO_5$)	327 (12), 299 (9), 284 (45), 270 (16), 269 (84), 241 (34), 240 (80), 226 (31), 213 (20), 212 (29), 210 (29), 196 (22), 195 (100)	$C_{19}H_{24}NO_5^+$	346,1642	346,164899	-2,02
Eritratidinona ($C_{19}H_{23}NO_4$) ^b	329 (3), 301 (10), 286 (38), 272 (17), 271 (100), 243 (22), 242 (69), 228 (55), 215 (18), 214 (24), 212 (24), 198 (17), 197 (74)	$C_{19}H_{24}NO_4^+$	330,1699	330,169985	-0,26

^a ref. 6; ^b ref. 23. Tr: tempo de retenção (em min).

intensidade do íon molecular, sugerindo a presença do grupamento carbonila como apresentado por Millington e colaboradores.²² Com base na revisão da literatura observa-se que Barton e colaboradores descreveram o perfil de fragmentação da eritratidinona em conjunto com outros dados espectroscópicos.²³ A comparação dos dados mostra que os íons observados para esse alcaloide são os mesmos observados para o constituinte majoritário da fração alcaloídica de *E. verna*. A análise das intensidades relativas também está de acordo com a proposta, com destaque para o mesmo valor baixo de intensidade do íon molecular. Finalmente, a presença de eritratidinona foi confirmada pelos dados de IES-EM em alta resolução, com erro de -0,26 ppm para a fórmula molecular esperada (Tabela 1).

Os íons observados no perfil de fragmentação da substância D (Figura 2) correspondem exatamente aos íons notados para eritratidinona, com a diferença de 2 u em cada fragmento (Tabela 1). No entanto, não se observa o íon molecular no espectro de massas devido à perda de uma molécula de água na fonte de ionização. O trabalho de Flausino Jr. e colaboradores relatou a presença do alcaloide eritrínico da subclasse dienoide 11- α -hidroxieritratidina nas flores de *E. verna*,¹⁴ o que indica que o carbono 11 é um dos sítios de oxidação. Com base nessa informação e nos dados espectrométricos obtidos, sugere-se que a substância D (Figura 2) possui a estrutura de um alcenoide com oxidação nos carbonos 2 e 11, sendo que no carbono 2 se tem o grupamento carbonila e no carbono 11 há presença de hidroxila. Esta proposta é corroborada pela presença de um íon com m/z 346,1642 ($C_{19}H_{24}NO_5^+$, erro de -2,02 ppm) no espectro de IES-EM em alta resolução (Tabela 1). Dessa forma, este alcaloide eritrínico recebe o nome de 11-hidroxieritratidinona, o qual é relatado pela primeira vez como produto natural. As vias de fragmentação da eritratidinona e 11-hidroxieritratidinona que envolvem RDA e clivagem α da carbonila são apresentadas na Figura 3, baseando-se nas propostas de Boar e colaboradores.²¹

A substância C (Figura 2) apresenta as mesmas fragmentações observadas para eritratidinona, diferindo apenas na intensidade dos íons e ausência do íon molecular em m/z 329 (Tabela 1). Dessa maneira, sugere-se que as condições de aquecimento, ao qual o extrato foi submetido durante a rotaevaporação, e/ou o baixo pH empregado na marcha-química para obtenção da fração alcaloídica podem ter interferido no equilíbrio ceto-enólico da função enona presente no anel A da eritratidinona. Assim, esse processo pode ter originando

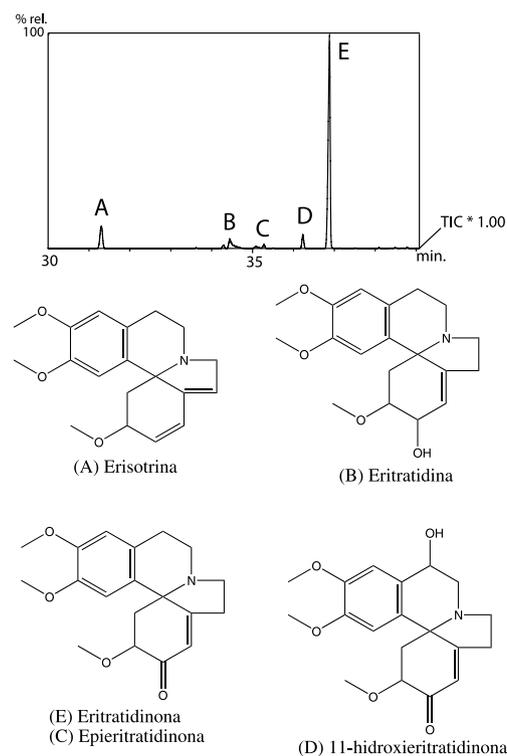


Figura 2. Região do perfil cromatográfico da fração alcaloídica na qual foram identificados os alcaloides e estruturas dos alcaloides eritrínicos. A: Erisotrina, B: Eritratidina, C: Epierritratidinona, D: 11-hidroxieritratidinona, E: Eritratidinona

o epímero do constituinte majoritário da fração, a epierritratidinona (Figura 2). Os perfis de fragmentação das substâncias A e B correspondem às fragmentações descritas na literatura para erisotrina e eritratidina,⁶ respectivamente, e os dados de de IES-EM em alta resolução confirmam a presença desses alcaloides na fração, com erro de -3,1 ppm para erisotrina e -5,8 ppm para eritratidina (Tabela 1). A erisotrina já foi relatada em *E. verna*.²⁴ A eritratidina pertence à subclasse alcenoide e sua estrutura difere da eritratidinona apenas no grupamento oxigenado ligado ao carbono 2 (Figura 2).

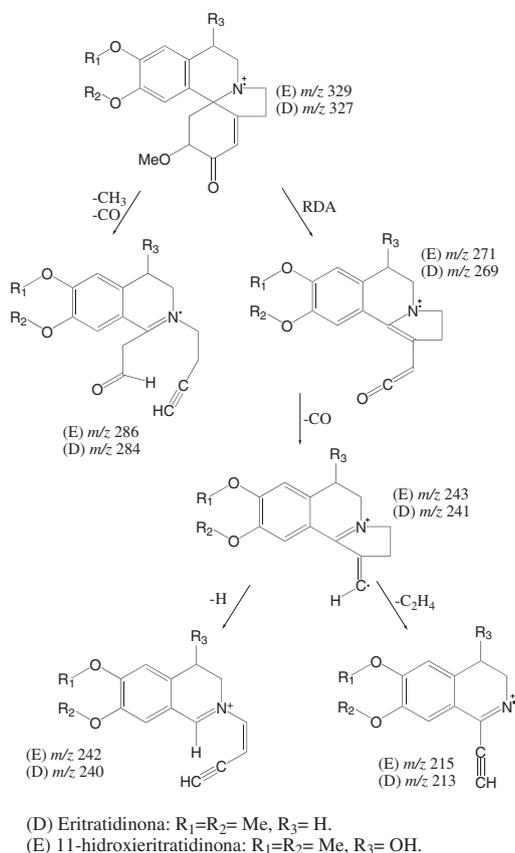


Figura 3. Vias de fragmentação da eritratidinona e 11-hidroxi'eritratidinona. Adaptada da ref. 22

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a abordagem do uso de dados quimiossistemáticos do gênero em conjunto com a técnica de cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas, em adição aos dados de espectrometria de massas de alta resolução, permitiu a identificação direta de uma série homóloga de alcaloides eritrínicos de *E. verna*. Foram identificadas 5 substâncias sendo um epímero, que provavelmente se trata de um artefato da eritratidinona, e a substância 11-hidroxi'eritratidinona relatada pela primeira vez na literatura como produto natural. Esses dados abrem a perspectiva de um trabalho sistemático por essa abordagem para a análise de diferentes fornecedores de matéria-prima, permitindo um maior controle e segurança ao usuário final desses produtos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em arquivo pdf, com acesso livre.

REFERÊNCIAS

- Gottlieb, O. R.; *Introdução à Espectrometria de Massas de Substâncias Orgânicas*, UFRJ: Rio de Janeiro, 1968.
- Keles, L. C.; Melo, N. I.; Aguiar, G. P.; Wakabaiashi, K. A. L.; Carvalho, C. E.; Cunha, W. R.; Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2245.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; *J. Agr. Food Chem.* **2008**, *56*, 1193.
- San Miguel-Chavez, R.; Soto-Hernandez, M.; Ramos-Valdivia, A. C.; Kite G.; *Phytochem. Rev.* **2007**, *6*, 167.
- Carvalho, P. E. R.; *Mulungu (Erythrina velutina)*, Circular Técnica 160, Embrapa Florestas: Colombo, 2008.
- Amer, M. E.; Shamma, M.; Freyer, A. J.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 329.
- Wanjala, C. C. W.; Majinda, R. R. T.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 871.
- Wanjala, C. C. W.; Juma, B. F.; Bojase, G.; Gache, B. A.; Majinda, R. R. T.; *Planta Med.* **2002**, *68*, 640.
- Juma B. F.; Majinda, R. R. T.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1397.
- Tanaka H.; Etoh, H.; Shimizu, H.; Oh-Ochi, T.; Terada, Y.; Tateishi, Y.; *Planta Med.* **2001**, *67*, 871.
- <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022969>, acessada em Abril 2012.
- Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 2ª ed., Plantarum: Nova Odessa, 1992.
- Rodrigues, V. E. G.; Carvalho D. A.; *Plantas Medicinais do Cerrado*, UFPA: Lavras, 2001.
- Flausino Jr, O.; Santos, L. A.; Verli, H.; Pereira, A. M.; Bolzani, V. S.; Nunes-De-Souza, R. L.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 48.
- Flausino Jr, O.; Pereira, A. M.; Bolzani, V. S.; Nunes-De-Souza, R. L.; *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 375.
- Serrano, M. A. R.; Batista, A. N. D.; Bolzani, V. D.; Santos, L. D.; Nogueira, P. J. D.; Nunes-De-Souza, R. L.; Latif, A.; Arfan, M.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 808.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374.
- Vessecchi, R.; Lopes, N. P.; Gozzo, F. C.; Dörr, F. A.; Murgu, M.; Lebre, D. T.; Abreu, R.; Bustillos, O. V.; Riveros, J. M.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1875.
- Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1030.
- Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Nascimento, P. G. D. B.; Crotti, A. E. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 840.
- Boar, R. B.; Widdowson, D. A.; *J. Chem. Soc. B* **1970**, 1591.
- Millington D. S.; Steinman, D. H.; Rinehart Jr., K. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1909.
- Barton, D. H. R.; Guanatilaka, A. A. L.; Letcher, D. A.; Lobbo, A. M. T. F.; Widdowson, D. A.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 874.
- Sarragiotto, M. H.; Leitão-Filho, H. F.; Marsaioli, A. J.; *Can J. Chem.* **1981**, *59*, 2771.

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELÉTRON NA ANÁLISE DE ALCALOIDES DO MULUNGU#

Luís Guilherme Pereira Feitosa, Thais Guaratini, João Luis Callegari Lopes e Norberto Peporine Lopes*

Departamento de Química e Física, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14049-903, Ribeirão Preto – SP, Brasil

Aline Cavalli Bizaro e Denise Brentan da Silva

Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em Produtos Naturais, Incubadora SUPERA, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto – SP, Brasil

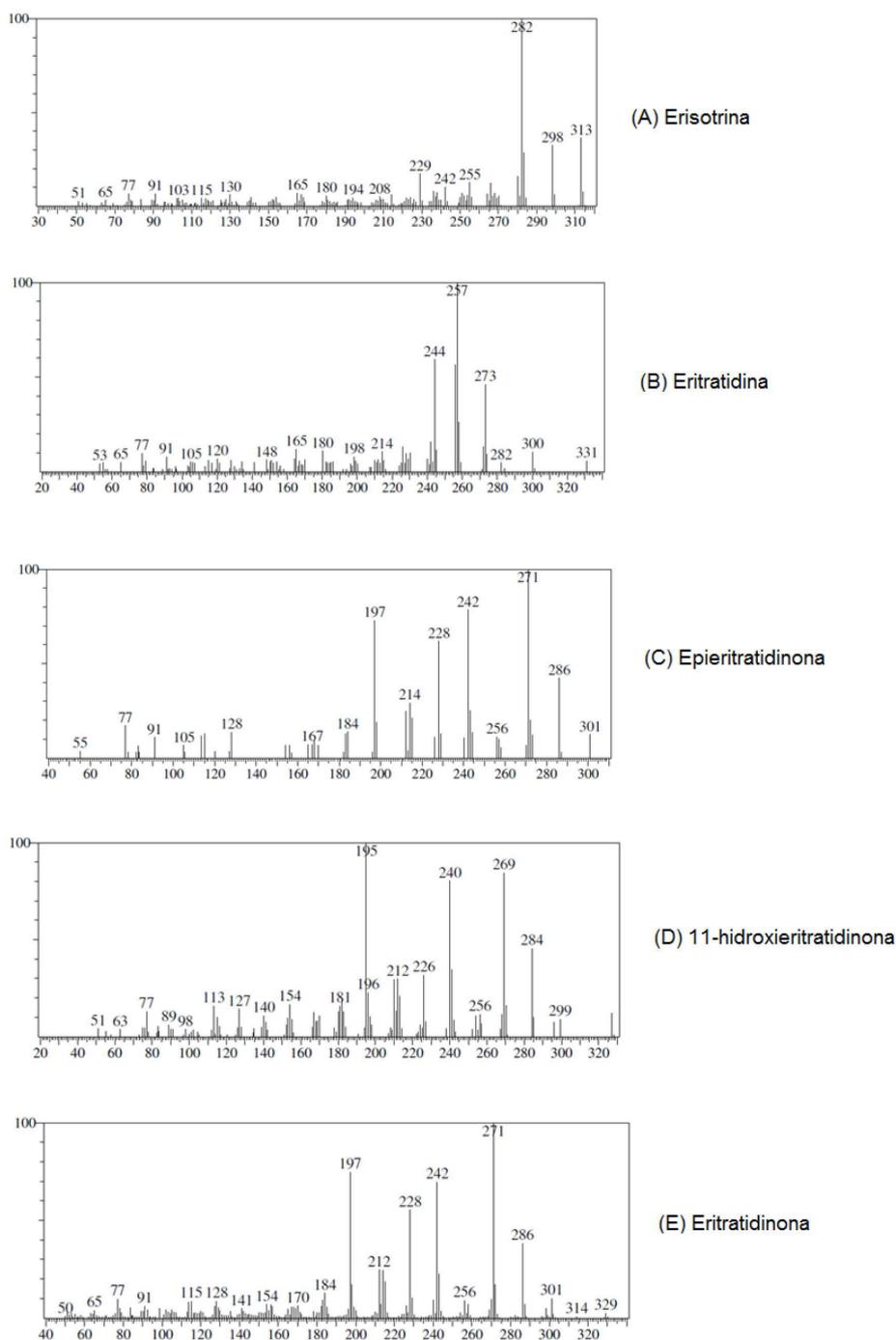


Figura 1S. Espectros de massas (IE-EM) dos alcaloides eritrânicos identificados em *E. verna*

*e-mail: npelopes@fcfrp.usp.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)