

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE CASCA E FOLHAS DE *ERYTHROXYLUM VACCINIIFOLIUM* EM MODELOS *IN VIVO*

PHYTOCHEMICAL EVALUATION AND TOXICOLOGICAL EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACTS OF BARK AND LEAVES FROM ERYTHROXYLUM VACCINIIFOLIUM IN MODELS IN VIVO

Giuseppina Negri^{1*}; Jardel Gonçalves de Sousa Almondes²; Suzana Maria Pereira Galvão²; Joaquim Maurício Duarte-Almeida³; Paulo Marques da Silva Cavalcanti⁴

¹ PhD em Química de Produtos Naturais pela Universidade de São Paulo-USP.

² Acadêmico do Curso de Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina-PI

³ Professora Adjunta da disciplina Farmacologia do Curso de Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina-PI,

³ Professor da disciplina de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis-MG

⁴ Professor Adjunto da disciplina Farmacologia do Curso de Medicina do Departamento de Bioquímica e Farmacologia / Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina -PI.

*Correspondência: gnegri@terra.com.br

RECEBIMENTO: 15/09/15 - ACEITE: 05/02/16

Resumo

Erythroxylum vacciniifolium Mart. (Erythroxylaceae) é uma árvore cuja casca é conhecida popularmente como pau de catuaba e usada popularmente como tônica, estimulante e afrodisíaca. A análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas mostrou a presença de flavonóis glicosídeos derivados da quercetina e do canferol **1-8**, enquanto que flavolignanas tipo cinchonainas **10-13** foram detectadas no extrato etanólico das cascas. Os extratos etanólicos das cascas e das folhas de *Erythroxylum vacciniifolium* em dose-crescente (10-1000 mg/Kg), por via intra peritoneal, 50 e 1000 mg/Kg, por via oral) demonstraram os seguintes efeitos toxicológicos: presença de contorções, redução do reflexo de postura, redução de tônus muscular, aumento de micção, defecação, tremor e salivação. Entretanto, algumas diferenças foram observadas na atividade toxicológica dos dois extratos. A administração do extrato etanólico das cascas causou uma diminuição da atividade motora, enquanto que a administração do extrato etanólico das folhas não causou nenhuma alteração estatisticamente significativa na atividade motora. A administração do extrato etanólico das folhas de *E. vacciniifolium* por via oral (gavagem) diminuiu o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico, enquanto a administração do extrato etanólico das cascas não produziu nenhuma alteração no tempo de sono. Além disso, ocorreu a morte dos animais que receberam 1000 mg/Kg do extrato das cascas, o que poderia ser atribuído a presença de altas concentrações de cinchonainas neste extrato.

Palavras-chave: *Erythroxylum vacciniifolium*. Extrato etanólico. Atividade farmacológica. Cinchonainas. Flavonóis glicosídeos.

Abstract

Erythroxylum vacciniifolium Martius, locally known as catuaba, is a Brazilian endemic plant used in traditional medicine as tonic and aphrodisiac. Flavolignans, cinchonains Ia, Ib and IIa were detected in ethanolic extract of bark from *E. vacciniifolium*, while flavonols glycosides, quercetin and kaempferol derivatives were detected in ethanolic extract of leaves. The ethanolic extracts from bark and leaves in dose response (10-1000 mg/Kg), through intra peritoneal administration, 50-1000 mg/kg through oral administration, exhibited the following toxicological effects, motor activity reduction, writhes, eyelid ptosis, sensibility decrease, posture reflex reduction, muscle tonus reduction, tremor and increase of pee, defecate and saliva. However, some differences were observed among the two extracts. The administration of ethanolic extract from leaves through oral administration decrease the sleeping time induced by sodium thiopental, while the administration of ethanolic extract from bark did not produce changes in sleeping time. Beside this, the administration of ethanolic extract from bark caused the dead of three animals, probably, due to the high content of cinchonains.

Keywords: *Erythroxylum vacciniifolium*. Pharmacological activities. Cinchonains. Flavonols glycosides.

Introdução

A família Erythroxylaceae compreende quatro gêneros: *Erythroxylum* P. Browne, *Aneulophus* BENTH, *Nectaropetalum* ENGL. e *Pinacopodium* EXELL & Mendona, e cerca de 240 espécies com distribuição pantropical. Seus principais centros de diversidade e endemismo são a Venezuela, o Brasil e Madagascar.¹⁻⁴ O maior gênero desta família é o *Erythroxylum*, que possui os principais taxa na América tropical e é encontrado na Floresta Amazônica, Mata Atlântica, regiões semi-áridas e na região da Caatinga. A espécie *Erythroxylum coca* é usada na extração da cocaína e na obtenção do chá de coca.^{1,2}

O Brasil possui a maior diversidade e localização endêmica de espécies de *Erythroxylum*, possuindo 114 do total de 187 espécies registradas na América tropical.³ A *Erythroxylum vacciniifolium* Mart. é uma árvore encontrada na chapada do Araripe e na Serra da Ibiapaba, Ceará, Brasil, cuja casca conhecida popularmente como pau de catuaba é usada como tônica, estimulante e afrodisíaca.⁴⁻⁸ Outras espécies também conhecidas como catuaba são a *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf. ex de Souza⁹ (Bignoniaceae), a qual também é confundida com a *Trichillia catigua* A. Juss. (Meliaceae),^{10,11} uma vez que ambas são denominadas popularmente como catuaba. A identificação e diferenciação dessas espécies são essenciais, visto que a casca de *T. catigua* é atualmente a mais estudada e possui validação farmacológica.¹⁰⁻¹²

Os alcaloides compreendem cerca de 20% dos metabólitos secundários descritos neste gênero. Estudos fitoquímicos realizados com extratos das cascas de *E. vacciniifolium* mostraram a presença de ésteres aromáticos de alcaloides tipo tropano.^{3,13-15} Estudos farmacológicos mostraram que espécies deste gênero exibiram excelentes atividades psicoativa, antimicrobiana e antitumoral.^{16,17} Os alcaloides tropânicos são usados como anestésicos, anti-hipertensivos e anti-colinérgicos entre outras atividades farmacológicas importantes.^{3,4} Estudos realizados com *Erythroxylum* spp. coletadas no Nordeste brasileiro mostraram a presença de alcaloides tropânicos com atividade citotóxica^{15,17,18} e inibidores da acetilcolinesterase.¹⁵ Além dos alcaloides tropânicos, outros metabólitos secundários, tais como, diterpenos,¹⁹⁻²¹ e flavonóides⁵ foram encontrados neste gênero. Estudos realizados com a espécie *E. vacciniifolium* coletada na Paraíba, Brasil, mostraram a presença de 17 alcaloides tropânicos.⁴

O presente estudo teve como objetivo, descrever os efeitos do extrato etanólico das cascas da *E. vacciniifolium* (ECEV) e do extrato etanólico das folhas da *E. vacciniifolium* (EFEV) pelo uso agudo em camundongos ou ratos, realizando um screening farmacológico, o qual incluiu a atividade motora e o tempo de sono induzido por barbitúrico (“Sleeping time”). Além disso, uma caracterização fitoquímica usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-IES-EM/EM) foi realizada para caracterizar os princípios ativos, aos quais poderiam ser atribuídos os efeitos farmacológicos observados.

Método

Animais

Camundongos machos da linhagem Suíça e ratos Wistar, ambos de 3 meses de idade, provenientes do biotério da FACIME e do biotério central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI, foram alojados em gaiolas de polipropileno contendo 20 e 5 animais, respectivamente. O laboratório foi mantido a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12/12 horas (iniciando-se a fase clara às 6:00 horas). Água e ração própria para ratos e camundongos foram fornecidas ad libitum.

Material botânico

Folhas e cascas de *Erythroxylum vacciniifolium*, popularmente conhecida como catuaba foram coletadas em área de Cerrado, na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. A identificação botânica foi feita pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA, Ceará, Brasil. A exsiccata está registrada no referido herbário, sob no 3686.

Preparo do liofilizado

As cascas e folhas desta espécie foram pulverizadas em um moinho de facas, peneiradas em tamis número 20 e cada 100 gramas do pó obtido foi macerado em 1000 mL de etanol durante 24 horas.²² Após a extração, o material foi filtrado em um funil de Büchner e em seguida concentrado em um rotaevaporador até atingir cerca de 10% do volume inicial. Finalmente foi congelado a -40°C e liofilizado durante 48 horas para a obtenção do resíduo seco (liofilizado). Os liofilizados foram armazenados em frasco âmbar, dentro de um dessecador, em geladeira.

Screening farmacológico

Cada grupo contendo três camundongos recebeu respectivamente: água (controle); e doses crescentes dos extratos liofilizados da casca e folhas de *E. vacciniifolium*; com 50 - 1000 mg/Kg por via oral (gavagem) e com 10 - 1000 mg/Kg por via intra peritoneal (ip). Os animais foram colocados em gaiolas de arame (as barras espaçadas em 1 cm) e observados aos 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutos e 24 horas após a administração do extrato, anotando-se a presença ou ausência de efeitos farmacológicos (sinais) de acordo com o protocolo rotineiramente empregado no Departamento de Psicobiologia da UNIFESP.²³

Atividade motora

Cada aparelho consiste de uma caixa de acrílico transparente com piso dividido em 9 quadrados de 10 x 10 cm. Grupos de 8-9 camundongos receberam por gavagem, solução salina (controle) ou duas doses dos extratos liofilizados das cascas e folhas de *E. vacciniifolium*. Imediatamente após a administração, os animais foram colocados individualmente nas caixas por 60 minutos, durante os quais foi anotado o número de invasões em intervalos de 5 minutos.^{24,25}

Tempo de sono induzido pelo pentobarbital sódico (*sleeping time*)

Os camundongos receberam por gavagem, solução salina (controle) ou duas doses dos extratos liofilizados da casca e folhas de *E. vacciniifolium*. Trinta minutos após a administração do extrato, os animais receberam 80mg/Kg de tiopental sódico por via intra peritoneal (ip.). O tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento (tempo de sono) foi avaliado seguindo protocolos já descritos.^{24,25} A perda do reflexo de endireitamento é a incapacidade do animal voltar à posição normal (decúbito ventral) quando colocado na posição dorsal (decúbito dorsal). O critério para a recuperação do reflexo de endireitamento foi fixado no momento em que o animal por 3 vezes consecutivas saiu da posição de decúbito dorsal imposta ao mesmo.

Os procedimentos aqui relatados foram realizados de acordo com o disposto pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí.

Análise estatística

Os dados foram analisados por Análise de Variância de uma via (ANOVA) seguida pelo Teste de comparação múltipla de Duncan, quando necessário, foi utilizada para a avaliação do teste do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico (*Sleeping time*). A Análise de Variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo Teste de comparação múltipla de Duncan, quando necessário, foi utilizada para a avaliação da atividade motora. Nas análises estatísticas foi considerado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Análise fitoquímica usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-IES-EM/EM)

O *screening* fitoquímico dos extratos foi feito de acordo com os métodos descritos por Wagner e Bladt.²⁶ Uma das técnicas hífenadas mais utilizada atualmente na análise de misturas complexas, como extratos de plantas medicinais, é conhecida como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-IES-EM/EM).^{27,28} A caracterização dos constituintes fenólicos encontrados nos extratos liofilizados das cascas e folhas da *E. vacciniifolium* foi realizada utilizando CLAE-DAD-IES-EM/EM. Nesta técnica logo após o processo de separação cromatográfica que ocorre no cromatógrafo líquido (CLAE) através de uma coluna apolar C18, o eluente (fase móvel) é dividido por um fracionador (*splitter*), localizado após a coluna cromatográfica, o qual direciona uma parte da fase móvel para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, e a outra parte é direcionada para o detector DAD. A coluna cromatográfica C18 por ser apolar separa os constituintes polares e a seguir os constituintes menos polares, os quais são identificados através do respectivo espectro de massas obtidos pelo detector do espectrômetro de massas.

No processo de acoplamento das técnicas de CLAE e EM utiliza-se um processo de ionização, conhecida como ionização por *electrospray* (IES). Este método consiste num processo pelo qual, sob pressão atmosférica, um campo elétrico de elevada intensidade dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de uma fina suspensão de gotas eletricamente carregadas, as quais, por evaporação, geram íons na fase gasosa. Na ionização por IES, a formação de íons ocorre, principalmente, por reações do tipo ácido-base de Brønsted-Lowry, que podem causar a protonação e/ou desprotonação de moléculas.^{27,28} Devido ao fato do processo de ionização por *electrospray* ser muito brando, espectrômetros de massas foram desenvolvidos para promover ionização sequencial (EM/EM ou EMⁿ). Esta técnica é conhecida como Espectrometria de Massa em Tandem EM/EM ou EMⁿ. Neste sistema são utilizados dois espectrômetros de massa em sequência, os quais são separados por uma câmara de colisão. Os fragmentos formados passam para o segundo espectrômetro de massas, onde são fragmentados novamente para gerar íons fragmentos menores que serão identificados de acordo com a razão massa carga, o que permitiu uma análise mais detalhada, com a obtenção de maior quantidade de informações para os estudos de elucidação estrutural dos constituintes químicos.^{27,28}

O equipamento utilizado neste estudo foi DADSPD-M10AVP Shimadzu constituído por injetor automático de amostras, detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus - Bruker Daltonics com fonte de ionização por *electrospray*, monitorado pelo software CBM-20A. Os solventes utilizados metanol (MeOH), ácido fórmico, e água Milli-Q tinham grau HPLC de pureza. A separação dos compostos foi realizada em coluna Luna Phenomenex C18 RP 250 x 4,6 x 5u. As fases móveis utilizadas foram: A: água Milli Q com 0,2 % de ácido fórmico e B: metanol, com gradientes de: 0 minutos – 20% de B em A; 10 minutos – 30% de B em A; 20 minutos – 50% de B em A; 30 minutos – 70% de B em A; 40 minutos – 90% de B em A; 45 minutos – 40% de B em A e 50 minutos – 20% de B em A. As separações foram monitoradas em diferentes comprimentos de onda com a finalidade de que várias substâncias fenólicas fossem detectadas; 280 nm para flavanonas, flavanóis, lignanas e taninos; 360 nm para flavonas, flavonóis e chalconas, 220 nm para ácidos benzóicos, e 330 nm para derivados do ácido cinâmico. O fluxo de gás para secagem foi de 6 l/min, a temperatura da coluna de 40 °C e o fluxo para CLAE de 0,8 ml/min. As massas moleculares foram monitoradas na região entre *m/z* 100 e *m/z* 1000. A nebulização foi realizada com nitrogênio (N₂) com uma pressão de 40 psi. A voltagem e a temperatura do capilar foram de 4000 V e 300° C, respectivamente. O fluxo para o espectrômetro de massas foi de 100 ul/min. A dissociação induzida por colisão, ou fragmentação, foi realizada usando Hélio (He) como gás de colisão, e a energia de colisão foi de 10 eV. A caracterização dos compostos fenólicos foi realizada através das análises dos resultados obtidos nos espectros de ultravioleta (UV) utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), o espectro de massas utilizando CLAE-DAD-IES-EM/EM e através da comparação dos respectivos espectros de massas (EM/EM) com dados da literatura. Rutina, quercitrina e canferol raminosídeo foram identificados por comparação com padrões Sigma.

Resultados

Screening farmacológico

As tabelas 1 e 2 mostram os efeitos observados no *screening* farmacológico realizados com os animais, para cada dose administrada dos extratos etanólicos da cascas e das folhas nas doses de 10 - 1000 (mg/kg) via ip. e 50 - 1000 (mg/kg) via oral.

Tabela 1- Sumário dos efeitos observados no *screening* farmacológico do extrato etanólico das cascas da *Erythroxylum vacciniifolium* (ECEV) nas doses de 10 - 1000 (mg/kg) via ip. e 50 - 1000 (mg/kg) via oral

Efeitos Observados	Via ip.				Via oral		
	10	50	100	1000	50	100	1000
contorções	↑	↑	↑			↑	
micção						↑	
defecação					↑		
atividade motora	↓	↓	↓		↑	↓	
cheirar					+		
escalar					+		
escavar					+		
canto de gaiola	+	+	+		-	+	
convulsão							+
morte				3			2

+ = presença do efeito; ↓ = diminuição; ↑ = aumento.

Camundongos machos tratados agudamente com o extrato etanólico das cascas da *E. vacciniifolium* (ECEV) (via ip.) nas doses de 10 a 100 mg/kg, apresentaram contorções até 30 minutos após administração. Nos animais administrados com 10 mg/Kg (ip.) observou-se uma diminuição na atividade motora até 2 horas após a administração, enquanto que nos animais tratados com 50 ou 100 mg/Kg (ip.) e 100 mg/Kg (oral), observou-se diminuição da atividade motora até 4 horas após administração.

Além disso, em animais administrados com 50 mg/Kg (oral) do extrato, observou-se um comportamento de cheirar, escalar e escavar excessivos até 1 hora após administração e um aumento da atividade motora até 30 minutos após administração.

Na administração de 1000 mg/Kg (ip.) do extrato etanólico das cascas (ECEV) verificou-se uma acentuada dificuldade respiratória, perda do reflexo de postura, e a impressão de aumento dos batimentos cardíacos, o que evoluiu para o óbito dos animais aos 10, 15 ou 30 minutos.

Os animais que receberam 1000 mg/Kg (oral) apresentaram uma diminuição de atividade motora, perda do reflexo de endireitamento e diminuição do tônus muscular nos primeiros 30 minutos após administração. Aos 15 minutos um animal apresentou salivação, um segundo um enrijecimento das patas traseiras e os três mostraram dificuldade respiratória. A evolução para morte ocorreu em dois casos após 16 e 19 minutos.

Tabela 2- Sumário dos efeitos observados no *screening* farmacológico do extrato etanólico da folha de *Erythroxylum vacciniifolium* (EFEV) nas doses de 10 - 1000 (mg/kg) via ip. e 50 - 100 (mg/kg) via oral

Efeitos Observados	Via ip.				Via oral	
	10	50	100	1000	50	100
contorções	↑	↑	↑	↑		↑
micção	↑	↑	↑	↑	↑	↑
defecação		↑	↑		↑	↑
atividade motora	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pêlos arrepiados					+	+
tremor						+
salivação						+
ptose palpebral	+	+	+	+	+	+
morte						

+ = presença do efeito; ↓ = diminuição; ↑ = aumento.

Camundongos machos tratados agudamente com o extrato etanólico das folhas da *E. vacciniifolium* (EFEV) com doses de 10 a 100 mg/kg (via ip.) apresentaram contorções até 15 minutos após administração, enquanto que os animais administrados com a dose de 1000 mg/Kg (ip.) apresentaram contorções aos 5 minutos e após 4 horas da administração. Nos animais administrados com 100 mg/Kg (oral), as contorções foram observadas após 4 horas da administração do extrato. Uma diminuição discreta da atividade motora foi observada nos animais tratados com as doses de 10 a 1000 mg/kg (ip.) e 50 e 100 mg/kg (oral) até 4 horas após administração.

A presença de ptose palpebral dose-dependente foi observada em animais administrados com doses de 10 e 50 mg/Kg (ip.) até 30 minutos e após a administração de 100 mg/Kg (ip.) no intervalo de 2 até 4 horas. Nos animais tratados com 50 e 100 mg/Kg (oral) foi observado ptose palpebral dose-dependente até 2 horas e pêlos arrepiados até 15 minutos após a administração. Em um animal observou-se tremor e salivação aos 15 minutos após administração de 100 mg/Kg (oral) do extrato.

Em camundongos machos administrados com 10 a 1000 mg/Kg (ip.) verificou-se aumento da micção enquanto que nos animais administrados com doses de 50 e 100 mg/Kg observou-se aumento da defecação. Aumento de micção e defecação foram observados até 4 horas após a administração de 50 e 100 mg/Kg de extrato por via oral.

Atividade motora

A Figura 1 mostra que houve alteração da atividade motora em camundongos tratados agudamente com o extrato etanólico da cascas da *Erythroxylum vacciniifolium* (ECEV), por via oral (ANOVA para medidas repetidas: $F(10,115) = 3,2809$ $p = 0,0009$). Entretanto, não houve alteração da atividade motora em camundongos tratados com o extrato etanólico da folha da *Erythroxylum vacciniifolium* (EFEV), por via oral (ANOVA para medidas repetidas: $F(10,45) = 0,5508$ $p = 0,84$) (Figura 2).

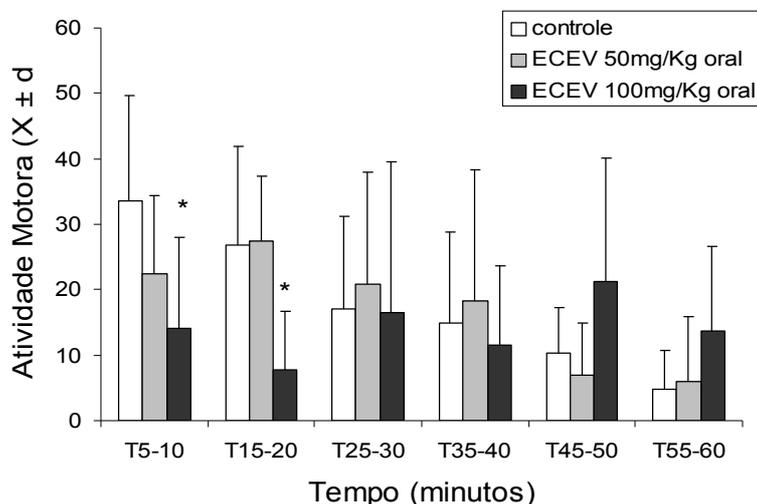


Figura 1- Atividade motora de camundongos administrados agudamente, por via oral (gavagem), com solução salina (controle) ou extrato etanólico das cascas da *E vacciniifolium* (ECEV) nas doses de 50 ou 100 mg/Kg. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão
* Estatisticamente diferente do controle, $p \leq 0,05$, teste de Duncan

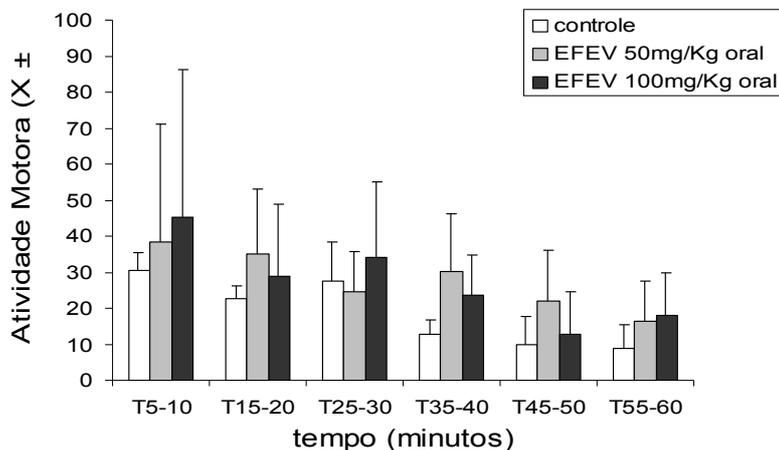


Figura 2- Atividade motora de camundongos administrados agudamente, por via oral (gavagem), com solução salina (controle) ou extrato etanólico das folhas da *E vacciniifolium* (EFEV) nas doses de 50 ou 100 mg/Kg. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão

Sleeping time

O tratamento com o extrato etanólico das cascas de *E. vacciniifolium* (ECEV) (50 ou 100 mg/kg), por gavagem, não alterou o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico em camundongos (ANOVA de 1 via: $F(2,20) = 1,4871$ $p = 0,25$) (Tabela 3). Observamos que entre os animais administrados com 100 mg/Kg, três deles morreram no decorrer do experimento, o que pode ser atribuído a um possível efeito tóxico do extrato, somado ao já conhecido efeito depressor / tóxico do tiopental sódico.

Ao contrário, o tratamento com o extrato etanólico das folhas de *E. vacciniifolium* (EFEV) (50 ou 100 mg/kg), por via oral (gavagem), diminuiu o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico, em camundongos (ANOVA de 1 via: $F(2,12) = 4,7317$ $p = 0,03$) (Tabela 3).

Tabela 3- Efeito do extrato etanólico das cascas (ECEV) e das folhas (EFEV) da *E. vacciniifolium* sobre o tempo de sono induzido por tiopental sódico em camundongos tratados agudamente por via oral (gavagem)

Tratamento	Extrato	Dose (mg/kg)	Tiopental sódico (mg/kg)	N	Tempo de sono (min.) (média ± dp)
Controle		-	80	8	143,0 ± 31,0
<i>E. vacciniifolium</i>	ECEV	50	80	9	108,0 ± 33,0
		100	80	6	185,3 ± 10,8
Controle		-	70	8	275,2 ± 77,3
<i>E. vacciniifolium</i>	EFEV	50	70	6	143,3 ± 80,2 *
		100	70	7	166,0 ± 55,2 *

* Estatisticamente diferente do controle, $p \leq 0,05$, teste de Duncan

Análise fitoquímica usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-IES-EM/EM)

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos na análise usando HPLC-IES-EM, tais como, tempos de retenção (minutos), molécula deprotonada e íons fragmentos (EM/EM) e estrutura sugerida para os constituintes detectados no extrato etanólico liofilizado das folhas da *E. vacciniifolium*.

Tabela 4- Resultados obtidos por HPLC- IES-EM: tempos de retenção (minutos), molécula deprotonada e íons fragmentos (EM/EM) e estrutura sugerida para os constituintes detectados no extrato etanólico liofilizado das folhas da *E. vacciniifolium*

	Rt	[M – H] ⁻ m/z	EM/EM m/z	Estrutura proposta
1	22.7	799	637 (100)	4',7-dimetil quercetina-3-O-rutinosídeo-5-O-glucosídeo (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo)
2	23.3	593	447 (100), 301 (40)	Quercetina-di-3,7-O-ramnosídeo
3	24.5	609	301 (100)	rutina
4	25.7	503	371 (100)	Canferol-7-O-malonil arabinosídeo
5	26.7	447	301 (100)	quercetrina
6	27.0	917	771 (40), 447 (100), 300 (20)	Quercetina-3-O-cumaroil diglucosil ramnosídeo
7	29.3	431	285 (100)	Canferol-7-O-ramnosídeo
8	31.5	637	329 (100), 313 (40), 299 (30)	4',7-dimetil quercetina-3-O-coumaroil glucosídeo

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise usando HPLC-IES- EM, tais como, tempos de retenção (minutos), molécula deprotonada e íons fragmentos (EM/EM) e estrutura sugerida para os constituintes detectados no extrato etanólico liofilizado das cascas da *E. vacciniifolium*. Nas folhas os principais constituintes encontrados são flavonóis glicosídeos **1-8**, os quais possuem quercetina ou canferol como agliconas (Tabela 4), enquanto que nas cascas os principais constituintes encontrados são flavolignanais (flavanóis substituídos com fenilpropanóides), as cinchonainas **10-13** (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados obtidos por HPLC-IES- EM: tempos de retenção (minutos), molécula deprotonada e íons fragmentos (EM/EM) e estrutura sugerida para os constituintes detectados no extrato etanólico liofilizado das cascas da *E. vacciniifolium*

	Rt	[M – H] ⁻ <i>m/z</i>	MS/MS <i>m/z</i>	Estrutura proposta
9	5.6	341	179 (100)	Cafeoil glucosideo
10	15.7	739	587 (100)	Cinchonaína IIa
11	18.2	451	341 (100)	Cinchonaína Ia
12	20.3	901	791 (100), 597 (80)	Cinchonaína IIa glucosideo
13	25.3	451	341 (100)	Cinchonaína Ib

Os alcaloides tropânicos são os principais metabólitos secundários encontrados no gênero *Erythroxylum*.^{3,4} Estes alcaloides foram detectados neste gênero, através da utilização da CLAE-DAD-IES-EM/EM, tanto realizando a ionização no modo negativo⁴ quanto no modo positivo.²⁹ Neste estudo, a análise dos extratos etanólicos das cascas e folhas também foram realizadas usando CLAE-DAD-IES-EM/EM no modo negativo, entretanto não foi detectada a presença de nenhum alcalóide tropânico. Uma possibilidade de não termos detectado estes metabólitos secundários seria a presença de concentrações traços nos extratos etanólicos, ou seja, as condições utilizadas neste estudo para a extração de metabólitos secundários, não foram adequadas para extrair alcaloides. A outra possibilidade é a de não termos utilizado uma metodologia cromatográfica adequada para a separação e detecção de alcaloides, tais como, condições adequadas de pH para a separação e detecção cromatográfica de alcaloides tropânicos.

Discussão

No extrato etanólico das folhas através da utilização da CLAE-DAD-IES-EM/EM foram detectados os flavonóis glicosídeos **1-8** (Tabela 4). O espectro de ultravioleta dos compostos **1-8** apresentou duas bandas, com absorbâncias em regiões típicas de flavonóis, entre 260 e 370 nm, sendo que a banda I apresentou absorbância máxima em 355 nm e um ombro com máxima absorção em 299 nm, e a banda II apresentou absorbância máxima em 260 nm. O espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM do composto **1** mostrou a molécula deprotonada em *m/z* 799, a qual foi atribuída a fórmula molecular C₃₅H₄₄O₂₁. A fragmentação da molécula deprotonada (*m/z* 799) produziu um íon fragmento em *m/z* 637, que é correspondente a perda de glicose (162 unidades de massa atômica) (Figura 3). O composto **1** foi caracterizado como 4',7-dimetil quercetina-3-O-rutinosídeo-5-O-glicosídeo (ombuina-3-O-rutinosídeo-5-O-glicosídeo). A 4',7-dimetil quercetina-3-O-rutinosídeo-5-O-glicosídeo já foi isolada do extrato metanólico das folhas da espécie *Erythroxylum pulchrum* A.St. Hil.⁵

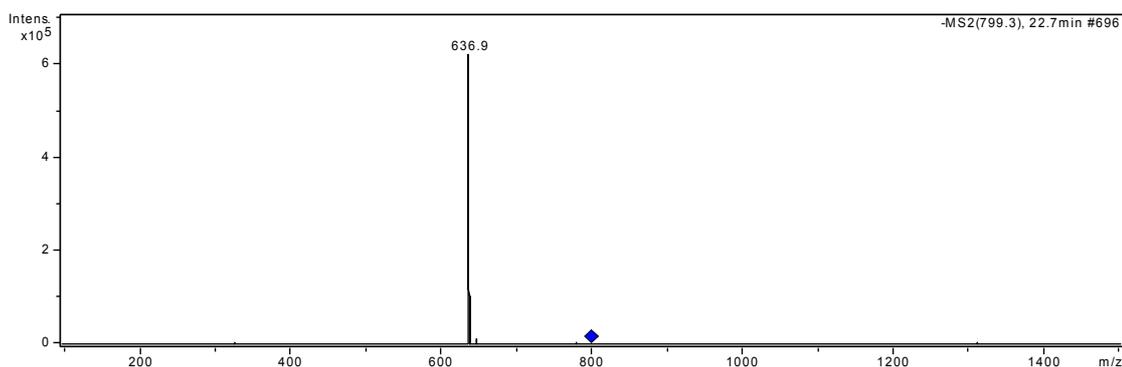


Figura 3- ESI-MS-MS espectro da 4',7-dimetil quercetina-3-O-rutinosídeo-5-O-glucosídeo (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo) (**1**)

Para o composto **2**, o espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM mostrou a molécula deprotonada em *m/z* 593, o qual foi atribuído a fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₅. Enquanto que a fragmentação da molécula deprotonada produziu dois íons fragmentos, um em *m/z* 447 (100), correspondente a perda de raminosídeo (146 unidades de massa atômica) (Figura 4), o qual provavelmente está ligado na posição 3 da aglicona e outro em *m/z* 301 (40) (quercetina deprotonada) também correspondente a perda de raminosídeo. Através de comparação com dados da literatura,²⁸ o composto **2** foi sugerido como quercetina-di-3,7-O-raminosídeo.

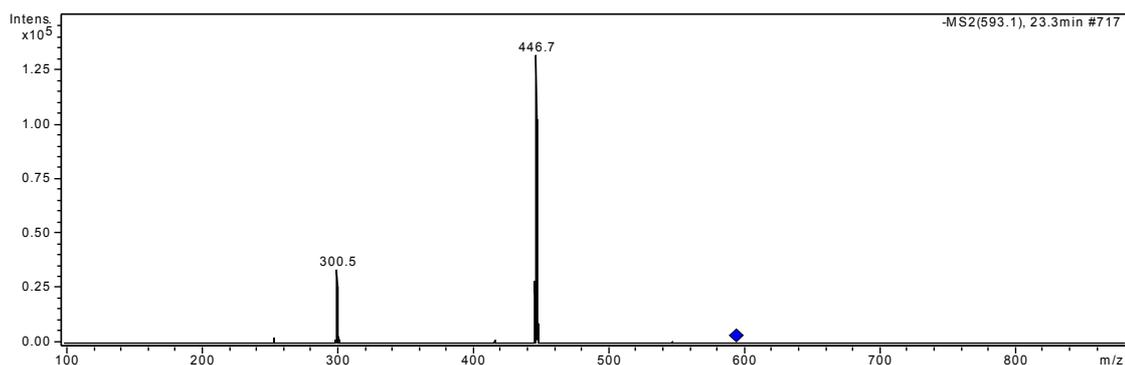


Figura 4 - ESI-MS-MS espectro da quercetina-di-3,7-O-ramnosideo (2)

Os flavonóis rutina (3) (m/z 609 - $C_{27}H_{30}O_{16}$), quercetrina (5) (m/z 447 - $C_{21}H_{20}O_{11}$) e canferol raminosídeo (7) (m/z 431 - $C_{21}H_{20}O_{10}$) foram detectados entre os principais constituintes do extrato das folhas e foram identificados, também por comparação com padrões Sigma. O espectro de massas da rutina (3) produziu um íon fragmento em m/z 301, que corresponde a aglicona quercetina deprotonada (Figura 5).

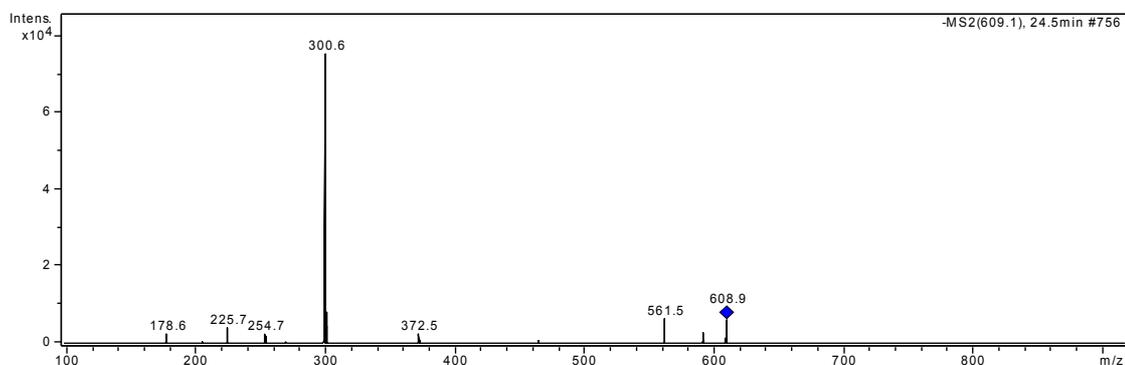


Figura 5 - ESI-MS/MS espectro da rutina (3)

Para o composto 4, o espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM mostrou a molécula deprotonada em m/z 503, à qual foi atribuída a fórmula molecular $C_{23}H_{20}O_{13}$. Após a fragmentação, a molécula deprotonada (m/z 503) produziu um íon fragmento em m/z 371, correspondente à perda de arabinose (132 unidades de massa atômica) (Figura 6). De acordo com os dados dos espectros de massas obtidos por IES-EM/EM, o composto 4 foi sugerido como canferol-7-O-malonil arabinosídeo.

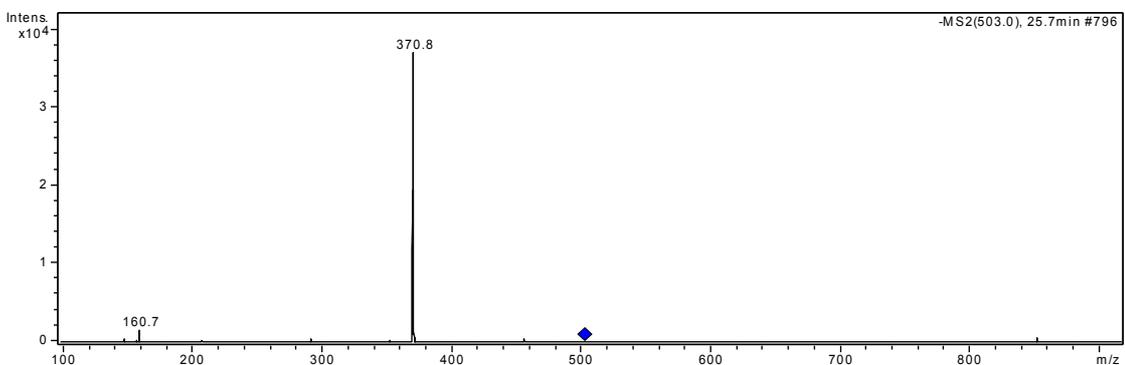


Figura 6 - ESI-MS/MS espectro do canferol-7-O-malonil arabinosideo (4)

O espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM do composto 6 mostrou a molécula deprotonada em m/z 917, à qual foi atribuída a fórmula molecular $C_{42}H_{46}O_{23}$. Após a fragmentação da molécula deprotonada foram observados três íons fragmentos, um em m/z 771 (40%) correspondente a perda de 146 unidades de massa atômica atribuídas ao grupo cumaroil, em m/z 447 (100) correspondente à perda de duas glicoses e em m/z 301 (20), atribuído a quercetina

deprotonada, obtido através da perda de raminosídeo (146 unidades de massa atômica) do fragmento ion em m/z 447 (Figura 7).

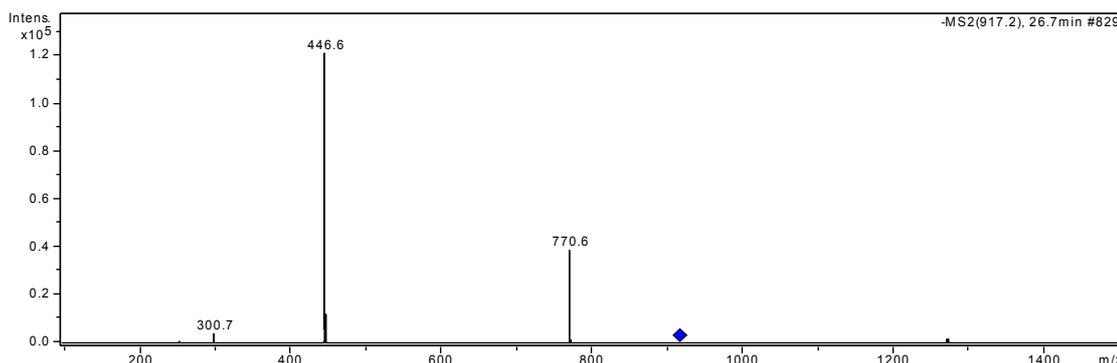


Figura 7 - ESI-MS/MS espectro da quercetina-3-O-cumaroil diglucosil ramnosideo (6)

De acordo com os dados obtidos por IES-EM/EM, o composto **6** foi sugerido como quercetina cumaroil diglucosídeo raminosídeo. Os espectros de massas obtidos com CLAE-IES-EM/EM do composto **7** exibiu a molécula deprotonada em m/z 431, que produziu um íon fragmento em m/z 285, que corresponde à aglicona canferol deprotonada (Figura 8).

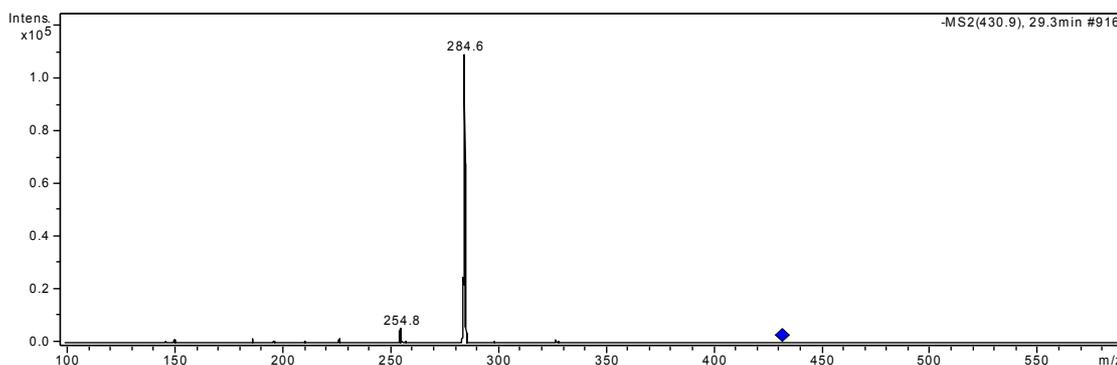


Figura 8 - ESI-MS/MS espectro da canferol ramnosideo (7)

O espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM/EM do composto **7** exibiu a molécula deprotonada em m/z 637, à qual foi atribuída a fórmula molecular $C_{32}H_{30}O_{14}$ e três íons fragmentos em m/z 329 (100), 313 (40) e 299 (30), correspondentes a aglicona 4',7-dimetil quercetina (Figura 9). O composto **8** foi sugerido como 4',7-dimetil quercetina-3-O-cumaroil glucosídeo.

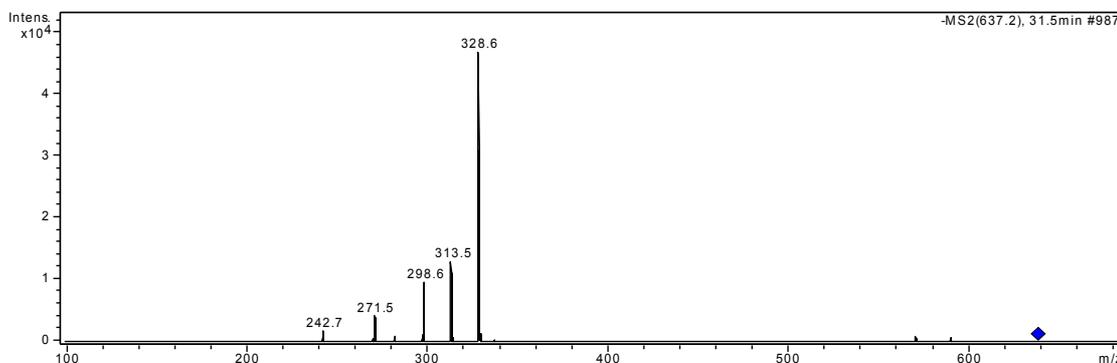


Figura 9 - ESI-MS/MS espectro da 4',7-dimetil quercetina-3-O-coumaroil glucosideo (8)

No extrato etanólico das cascas através da utilização de CLAE-IES-EM foram detectados a presença de cafeoil glucosídeo (**9**) e das flavolignan, cinchonainas **10-13**. O espectro de massas obtido com CLAE-IES-EM/EM do

composto **9** exibiu a molécula deprotonada em m/z 341, à qual foi atribuída a fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_9$ e um íon fragmento em m/z 179, correspondente ao ácido cafeico deprotonado (Figura 10). De acordo com os dados obtidos por espectrometria de massas e dados da literatura,²⁷ o composto **9** foi sugerido como 6-O-cafeoil glucosídeo.

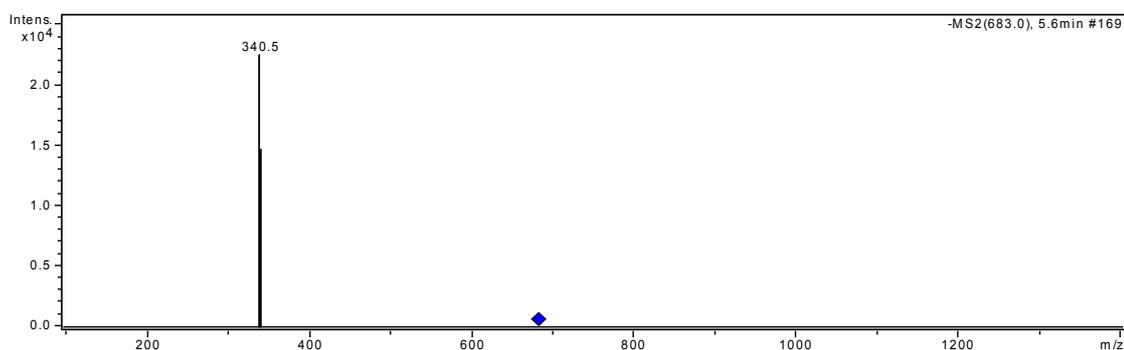


Figura 10 - ESI-MS espectro do cafeoil glucosídeo (**9**)

A identificação das cinchonainas Ia e Ib foi descrita pela primeira vez por Nonaka and Nishioka³⁰ e revisada por Chen et al.,³¹ através das técnicas de espectroscopia nuclear *overhauser* (NOESY-NMR) e efeito nuclear *overhauser* (NOE). Cinchonainas IIa, Ia e Ib foram também encontrada em extratos obtidos com as cascas de *Trichillia catiguá*.¹⁰⁻¹² O espectro de massas do composto **10** apresentou a molécula deprotonada em m/z 739, à qual foi atribuída a fórmula molecular $C_{39}H_{32}O_{15}$. Após a fragmentação a molécula deprotonada (m/z 739) produziu um fragmento em m/z 587, correspondente à perda de 152 unidades de massa atômica – $C_8H_8O_3$ (289 (catequina) – 137 unidades de massa atômica) (Figura 11).

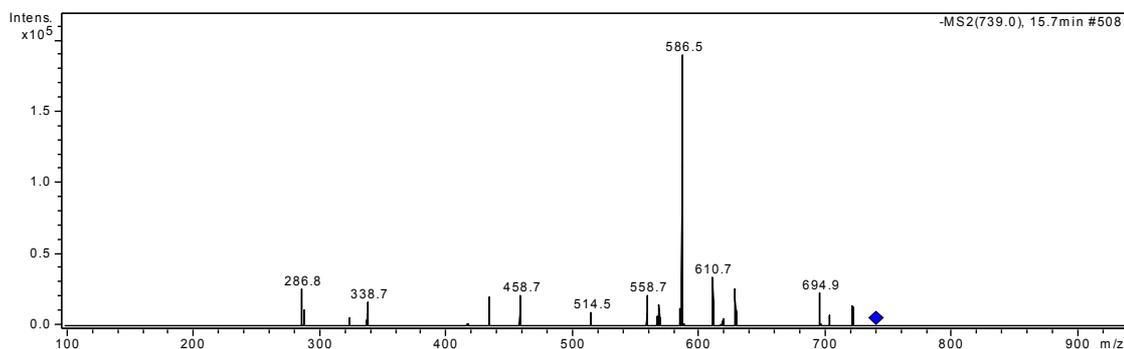


Figura 11 - ESI-MS/MS espectro da cinchonaina IIa (**10**)

O composto **10** é formado por 451 unidades de massa atômica mais 289 unidades de massa atômica (catequina), sendo assim a adição de uma molécula de catequina na estrutura da cinchonaina Ia produz a cinchonaina IIa. O composto **10** foi sugerido como cinchonaina IIa. As cinchonainas Ia (**11**) e Ib (**13**) apresentaram as moléculas deprotonadas em m/z 451, as quais após posterior fragmentação produziram um íon fragmento em m/z 341, correspondente a perda de 110 unidades de massa atômica ($C_6H_6O_2$) (Figura 12).

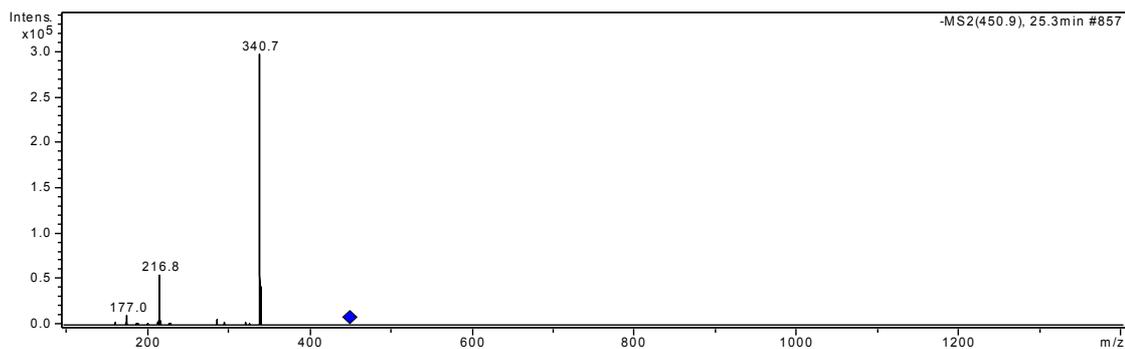


Figura 12 - ESI-MS/MS espectro da cinchonina Ib (**13**)

O íon fragmento em m/z 341 é um íon característico de cinchoninas, o qual é produzido pela perda do grupo 3,4-diidroxifenila ($C_6H_6O_2$), como já foi reportado em outros estudos.³²⁻³⁵ Para o composto **12**, o espectro de massas exibiu a molécula deprotonada em m/z 901, a qual após a fragmentação produziu íons fragmento em m/z 791 (100) e 597 (80) (Figura 13). No composto **12**, o íon fragmento em m/z 791 também corresponde à perda de 110 unidades de massa atômica, a qual é atribuída ao grupo 3,4-diidroxifenila ($C_6H_6O_2$), que é uma perda característica de cinchoninas como já reportado.³²⁻³⁵ O composto **12** é sugerido como cinchonina IIa glucosídeo.

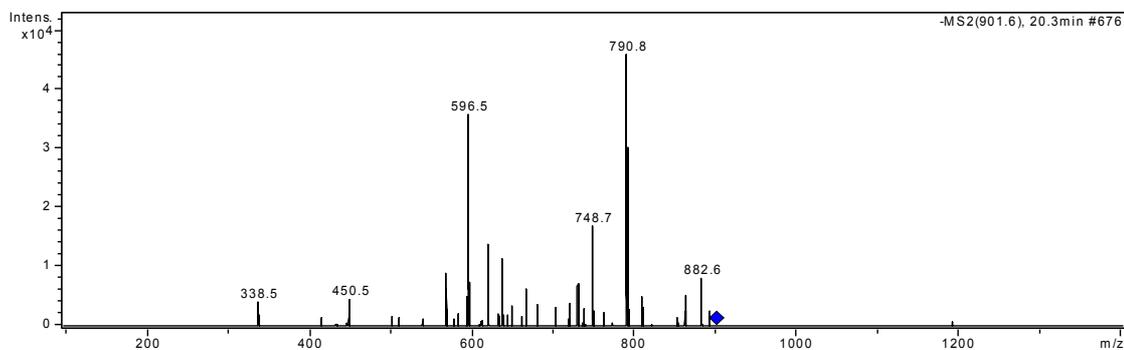


Figura 13 - ESI-MS/MS espectro da cinchonina IIa glucosídeo (**12**)

Como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, a composição química do extrato etanólico das folhas é muito diferente do extrato etanólico das cascas, o que também foi observado através do *screening* farmacológico nas Tabelas 1-3. O extrato etanólico das cascas de *E vacciniifolium* (ECEV) demonstrou os seguintes efeitos farmacológicos em dose-crescente (10-1000 mg/Kg) por via ip., (50-1000 mg/Kg) por via oral: redução de atividade motora, contorções, redução do reflexo de postura, redução de tônus muscular tremor e aumento de micção, defecação e salivação e morte. O extrato etanólico das folhas de *E vacciniifolium* (EFEV) demonstrou os seguintes efeitos farmacológicos nas doses (10-1000 mg/Kg, via ip.; 50 e 100mg/Kg, via oral): pequena redução de atividade motora, contorções, ptose palpebral, tremor e aumento de micção, defecação e salivação. A diminuição da atividade motora foi confirmada para a ECEV na dose de 100 mg/Kg (oral), apenas nos primeiros 20 minutos de observação.

A principal diferença observada entre os efeitos farmacológicos causados pelos dois extratos foi a morte de animais causada pela administração do extrato etanólico das cascas na dosagem de 1000 mg/Kg tanto por via oral quanto por via intraperitoneal. Além disso, a administração do extrato etanólico das folhas de *E vacciniifolium* (EFEV) diminuiu o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico e causou ptose palpebral, enquanto que o extrato etanólico das cascas não mostrou nenhuma alteração no tempo de sono induzido pelo tiopental sódico.

Os efeitos causados pelo extrato etanólico das cascas poderiam ser atribuídos à alta concentração de cinchoninas. Os taninos são considerados potentes inibidores de enzimas devido a sua complexação com proteínas enzimáticas, possuindo a habilidade para interagir e precipitar proteínas.³⁶ Enquanto que os efeitos causados pelo extrato etanólico das folhas poderiam ser atribuído a alta concentração de flavonóis glicosídeos derivados do canferol e quercetina.

Os flavonoides e outros compostos fenólicos presentes em plantas superiores são conhecidos por apresentarem potencial efeito antioxidante. Os flavonóides exibem efeito farmacológico no sistema nervoso central. Flavanols, flavanonas e antocianinas podem agir de maneira protetiva, aumentando o fluxo sanguíneo e protegendo os neurônios dos processos inflamatórios causados por injúrias nas células e das neurotoxinas induzidas pelas injúrias.³⁷ Flavonóides de varias classes são inibidores das enzimas monoamino oxidase A e B, podendo exibir atividade antidepressiva e antiparkinson.³⁸

O receptor GABAA é um dos dois canais iônicos, responsável por mediar os efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor no cérebro. A ativação do receptor GABAA resulta em vários efeitos, incluindo ansiolíticos, efeitos cognitivos, sedação, relaxação muscular e ação anticonvulsiva. Flavonas podem interagir com o receptor GABAA e produzir efeitos ansiolíticos ou anticonvulsivos, através de uma ativação serotoninérgica.³⁷ Os flavonóis detectados no extrato das folhas diminuíram o tempo de sono induzido pelo pentobarbitol, o que mostra que não produziram o efeito ansiolítico, o qual tem sido atribuído para flavonas.³⁸ Para os flavonóis detectados no extrato etanólico das folhas, o *screening* farmacológico indicou uma ação possivelmente estimulante no sistema nervoso central.

Conclusão

Com o crescente uso de plantas medicinais aumenta a necessidade de serem introduzidos os procedimentos de um controle de qualidade pós-colheita, pois nem sempre as espécies são produzidas sob condições apropriadas, o que poderá contribuir na qualidade do produto final. Os resultados da avaliação toxicológica destes extratos mostraram que as cinchonainas encontradas na casca poderiam ter causado a morte de animais e não produziram nenhuma alteração no tempo de sono induzido pelo tiopental sódico, enquanto que os flavonóis glicosídeos derivados da quercetina e canferol encontrados nas folhas poderiam ter causado a ptose palpebral e diminuição do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico, o que pode indicar uma ação possivelmente estimulante no sistema nervoso central.

Referências

- Ducke A. A catuaba na botânica sistemática, científica e pseudo-científica. *Rev. Bras. Farm.* 1966;47(5):267-72.
- Plowman TC, Hensold N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae), *Brittonia* 2004; 56(1):1-53.
- Oliveira SL, Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG, Lucena HFS, Romero MAV, et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. *Chem. Biodiversity* 2010;7(2):302-26.
- Oliveira SL, Tavares JF, Castello Branco MVS, Lucena HFS, Barbosa-Filho JM, Agra MF, et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Chem. Biodiversity* 2011;8(1):155-65.
- Albuquerque CH, Tavares JF, Oliveira SL, Silva TS, Gonçalves GF, de Oliveira Costa VC, et al. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). *Quim. Nova*, 2014;37(4):663-66.
- Ilva AJ. Estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2004;14(1):67-77.
- Daly DC. In: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald SV. eds. *New York Botanical Garden: Princeton*, 2004:143-5.
- Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, Queiroz RT. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Bot. Bras.* 2007;21(2):473-87.
- Costanzo CG, Fernandes VC, Zingaretti S, Belebony RO, Pereira MAS, Marins M, et al. Isolation of flavonoids from *Anemopaegma arvense* (Vell) Steff. ex de Souza and their antifungal activity against *Trichophyton rubrum*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2013;49(3):559-65.
- Resende FO, Rodrigues-Filho E, Luftmann H, Frank Petereit F, Palazzo de Mello JC. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 2011;22 (11):2087-93.
- Rabelo DS, Paula JR, Bara MTF. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss. (Meliaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013;15(2):230-6.
- Longhini R, Klein T, Bruschi ML, da Silva Jr WV, Rodrigues J, Lopes NP, et al. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichillia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Sep. Sci.* 2013;36(7):1247-54.
- Zanolari B, Wolfender JL, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo MQ, et al. On line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2003;1020(1):75-89.
- Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo MQ, Hostettmann K. Tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium* J. *Nat Prod.* 2003;66(4):497-502.
- Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo MQ, Hostettmann K. Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium* J. *Nat Prod.* 2005;68(8):1153-8.
- Oliveira AC, Sena-Filho JG, Mendes-Júnior LG, Anjos RA, Ribeiro TP, Barbosa-Filho JM, et al. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012;22(2) 436-42.
- Aguiar SJ, Oliveira SL, Tavares JF, Branco MV, Lucena HF, Barbosa-Filho JM, et al. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(4):4124-40.
- Ribeiro EMO, Lima LS, David JM, Vale AE, Lopes LMX, David JP. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). *Phytochem. Lett.* 2013;6(2):232-5.
- Barreiros ML, David JP, David JM, Lopes LMX, Sá MS, Costa JFO, et al. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Phytochemistry.* 2007;68(13):1735-39.
- Ribeiro EMO, David JP, David JM, Guedes MLS, Lopes LMX, Krsková Z, et al. Ent-labdane and beyerane diterpenes from *Erythroxylum betulaceum* Mart. *Biochem. Syst. Ecol.* 2013;50(1):90-92.
- Santos CC, Lima MAS, Braz-Filho R, Silveira ER. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006;17(7):1304-08.
- Pires JM, Mendes FR, Negri G, Carlini EA. Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. *Phytother. Res.* 2009;23(3):212-9.
- Carlini, EA. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. *Rev. Brasil. Biol.* 1972;32(2):265-74.
- Mattei R, Carlini EA. Mazindol: anorectic and behavioral effects in female rats. *Arch Internat Pharmacodynamic Thérapie*, 1995;330(3): 279-87.
- Carlini EA, Contar JDP, Silva-Filho AR, Silveira-Filho NG, Frochtengarten ML, Bueno OFA. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 1986;17(1):37-64.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis*. 2^o ed. New York: Springer, 2001.
- Gouveia SC, Castilho PC. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010;24(13):1851-68.
- Negri G, Santi D, Tabach R. Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Rev. Bras. de Pl. Med.* 2013;15(3):217-24.
- Kletter C, Glasl S, Presser A, Werner I, Reznicek G, Narantuya S, et al. Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. *Planta Med.*, 2004;70(8):993-1000.
- Nonaka GI, Nishioka I. Tannins and related compounds. Phenylpropanoids substituted epicatechins. Cinchonans from *Cinchona succirubra*. *Chem. Pharm. Bull.* 1982;30:4268-74.
- Chen HF, Tanaka T, Nonaka GI, Fujioka T, Mihashi K. Phenylpropanoid-substituted catechins from *Castanopsis hystrix* and structure revision of cinchonans. *Phytochemistry* 1993;33(1):183-7.
- Fasciotti, M, Alberici RM, Cabral EC, Cunha VS, Silva PRM, Romeu J, et al. Wood chemotaxonomy via ESI-MS profiles of phytochemical markers: the challenging case of African versus Brazilian mahogany Woods. *Anal. Methods*, 2015;7(9):8576-83.
- Li, X, Zhang YF, Yang L, Feng Y, Deng YH, Liu YM, et al. Chemical profiling of constituents of *Smilacis glabrae* using ultra-high pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *Nat. Prod. Commun.* 2012;7(1):181-4.
- Chen SD, Lu CJ, Zhao RZ. Qualitative and Quantitative Analysis of Rhizoma *Smilacis glabrae* by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with LTQ OrbitrapXL Hybrid Mass

- Spectrometry. *Molecules*. 2014;19:10427-39;
doi:10.3390/molecules190710427.
35. Gu WY, Li N, Leung ELH, Zhou H, Yao XJ, Liu L, et al. Rapid identification of new minor chemical constituents from *Smilacis Glabrae* Rhizoma by combined use of UHPLC-Q-TOF-MS, preparative HPLC and UHPLC-SPE-NMR-MS techniques. *Phytochem. Anal.* 2015; 26:428-35.
36. Silva MR, Pereira da Silva MAA. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. Nutritional aspects of phytates and tannins. *Rev. Nutr., Campinas*, 1999;12(1):5-19.
37. Zhang LM, Yao LZ, Li Y, Li K, Chen HX, Zhang YZ, et al. Anxiolytic Effects of Flavonoids in Animal Models of Post traumatic Stress Disorder. Hindawi Publishing Corporation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine - eCAM* 2012; Article ID 623753, 10 pages.
38. Sakalem ME, Negri G, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012;22(10):1219-32.