

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

Estudo Químico e Biológico de Espécies do Gênero *Erythroxylum* P.
Browne Coletadas no Sul do Brasil

ARNO ERNESTO HOFMANN JUNIOR

PORTO ALEGRE, 2018

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

Estudo Químico e Biológico de Espécies do Gênero *Erythroxylum* P.
Browne Coletadas no Sul do Brasil

Tese apresentada por **Arno Ernesto Hofmann Junior** para obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof.^a Dra. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre, 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.01.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Jorge Reppold Marinho

Universidade Regional Integrada do Alto Uriguai e das Missões

Profa. Dra. Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Hofmann Junior, Arno Ernesto
Estudo químico e biológico de espécies do gênero
Erythroxyllum P. Browne coletadas no Sul do Brasil /
Arno Ernesto Hofmann Junior. -- 2018.
167 f.
Orientadora: Renata Pereira Limberger.

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. Gênero Erythroxyllum. 2. Estudo fitoquímico. 3.
Potencialidades tóxico farmacológicas. 4. Planárias.
I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Título.

Pensamento



Albert Szent Yorgyi

“A descoberta
consiste em ver o que todos veem
e em pensar no que ninguém pensou.”

Resumo: O gênero *Erythroxylum* P. Browne pertence a família Erythroxylaceae Kunth e é principalmente conhecido devido as espécies *E. coca* e *E. novogranatense*, as “plantas da coca”. O gênero é a única fonte natural da cocaína e de outros alcaloides com núcleo ecgonina, principais responsáveis pelos efeitos tóxicos e biológicos originados pelo consumo de suas espécies. A presença da cocaína é amplamente aceita para as plantas de coca, porém a sua biossíntese por outras espécies apresenta divergência, o que pode estar relacionada ao período de coleta. Além destas particularidades fitoquímicas, as espécies do gênero também apresentam importantes atividades como antioxidante e antimicrobiana, além de toxicidade a humanos e a ovinos. O Brasil é o centro da diversidade e do endemismo do gênero e no sul do país, nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, as características fitoquímicas e potencialidades tóxicas e farmacológicas das espécies apresentam um campo aberto para estudos. Desta forma, foram avaliadas características fitoquímicas e potencialidades tóxicas e farmacológicas de espécies nativas dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, coletadas em dois períodos climáticos distintos, verão e inverno, além de revisão bibliográfica sobre as espécies produtoras de cocaína e as implicações segundo a legislação brasileira vigente. Foram utilizadas metodologia de planária, disco-difusão em ágar, microdiluição em caldo, medida da extinção da absorção do cátion 2,2-difenil-1-picrilhidrazil e procedimentos preconizados pelas Nações Unidas para a investigação fitoquímica de espécies produtoras de cocaína. Foi verificado que 24 espécies apresentam o aparato enzimático para a produção da cocaína. Embora *E. novogranatense* origina rendimentos apropriados ao tráfico, segundo a legislação Brasileira vigente, apenas *E. coca* encontra-se proscrita, o que torna necessário a inclusão de *E. novogranatense* na lista de plantas proscritas. Para o estudo toxicológico desenvolvido com *E. deciduum* sobre modelo de planária, foi necessário adaptar a metodologia existente. O extrato da espécie ocasionou aumento significativo da velocidade de locomoção ($p= 0.016$) e comportamentos estereotipados padronizados de posição tipo C e hiperkinesia tipo parafuso, eventos característicos da neurotransmissão dopaminérgica em planárias. Os resultados, além de ampliar as possibilidades do uso destes vermes na busca por extratos ativos, demonstram que *E. deciduum* biossintetiza metabólitos ativos sobre este neurotransmissor, os quais podem

estar relacionados com os efeitos ocasionados pelo consumo da espécie vegetal. A influência do período de coleta sobre as potencialidades farmacológicas e as características fitoquímicas foi investigada e os resultados demonstram esta influência. Diferentes extratos de *E. argentinum* e *E. deciduum*, coletadas durante o verão, apresentaram atividade antimicrobiana superiores a verificada para os extratos obtidos de coletas realizadas no inverno. O extrato etanólico de *E. argentinum*, coleta verão, pode ser considerado um verdadeiro antimicrobiano, MIC= 0,78mg/ mL, e desta forma torna-se uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas antimicrobianas. Os extratos das espécies *E. argentinum* e *E. deciduum* demonstram pertinentes resultados sobre a atividade antioxidante. A influência do período de coleta, verão/inverno, sobre a atividade foi identificada. A influência do período de coleta sobre as atividades tóxico-farmacológicas é corroborada pelo perfil alcaloídico obtido de nove espécies do gênero, coletadas durante o verão e o inverno, nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. O perfil alcaloídico das espécies *E. amplifolium*, *E. argentinum*, *E. cuneifolium*, *E. cuspidifolium*, *E. deciduum*, *E. microphyllum*, *E. myrsinites*, *E. pelleterianum* e *E. vacciniifolium* demonstra a presença dos alcaloides: éster de metecgonidina, éster de metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína e dos intermediários da biossíntese: higrina, tropinona e tropanol. A identificação dos metabólitos éster de metilecgonina e éster de metilecgonidina também demonstra que as espécies do gênero *Erythroxylum* presentes no Sul do Brasil apresentam potencialidade econômicas, pois podem ser empregadas na produção de padrões toxicológicos. Os objetivos propostos foram cumpridos e permitem concluir que espécies do gênero *Erythroxylum* dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, Sul do Brasil, demonstram importância tóxica, farmacológica e química, sendo parte destas influenciada pelo período de coleta, verão/ inverno.

Palavras-chave: Alcaloides Tipo Ecgonina, Antimicrobiano, Antioxidante, Cocaína, Dopamina, *Erythroxylum*, Éster de metilecgonidina, Éster de metilecgonina, Planária, Período de coleta.

Abstract: “Chemical and Biological Study of *Erythroxylum* P. Browne Species Collected in Southern Brazil”. *Erythroxylum* P. Browne genus belongs to the Erythroxylaceae Kunth family and is mainly known due to *E. coca* and *E. novogranatense* species, the "coca plants". The genus is the only natural source of cocaine and other alkaloids with ecgonine nucleus, mainly responsible for the toxic and biological effects caused by the consumption of their species. The presence of cocaine is widely accepted for coca plants, but its biosynthesis by other species shows divergence, which may be related to the collect period. Besides these phytochemical peculiarities, the species of the genus also present important activities such as antioxidant and antimicrobial, besides toxicity to humans and sheep. Brazil is the center of diversity and endemism of the genus and in the south of the country, in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, the phytochemical characteristics, toxic and pharmacological potentials of the species present an open field for studies. Thus, phytochemical characteristics, toxic and pharmacological potentials of native species of the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina were assessed, collected in two distinct climatic periods, summer and winter, as well as a bibliographical review on cocaine producing species and implications under current Brazilian law. Some methodologies were used such as planaria, disc-diffusion in agar, microdilution in broth, extinction measurement of the absorption of cation 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and procedures recommended by the United Nations for the phytochemical investigation of cocaine producing species. It was verified that twenty-four species present the enzymatic apparatus for the production of cocaine. Although *E. novogranatense* originate income appropriate to traffic according to current Brazilian legislation, only *E. coca* is outlawed, which makes it necessary to include *E. novogranatense* in the list of proscribed plants. For the toxicological study developed with *E. deciduum* on planaria model, it was necessary to adapt the existing methodology. The extract of the species caused a significant increase in locomotion velocity ($p= 0.016$) and standardized stereotyped behaviors of type C position and screw- type hyperkinesia, characteristic events of dopaminergic neurotransmission in planarians. The results, besides expanding the possibilities of the use of these worms in search for active extracts, demonstrate that *E. deciduum* biosynthesizes active

metabolites on this neurotransmitter, which may be related to the effects caused by the consumption of the plant species. The influence of the collect period on pharmacological potentials and phytochemical characteristics was investigated and the results demonstrate this influence. Different extracts of *E. argentinum* and *E. deciduum* collected during summer showed higher antimicrobial activity than the extracts obtained from winter collect. The ethanolic extract of *E. argentinum*, summer collect, may be considered a true antimicrobial, MIC= 0.78mg/ mL, on *Staphylococcus aureus*, and in this way it becomes a promising source for the discovery of new antimicrobial molecules. The extracts of *E. argentinum* and *E. deciduum* species demonstrate relevant results on antioxidant activity. The influence of the collecting period, summer/ winter, on the activity was verified. The influence of collect period on toxic- pharmacological activities is corroborated by the alkaloid profile obtained from nine species of the genus, collected during summer and winter in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The alkaloid profile of *E. amplifolium*, *E. argentinum*, *E. cuneifolium*, *E. cuspidifolium*, *E. deciduum*, *E. microphyllum*, *E. myrsinites*, *E. pelleterianum* and *E. vacciniifolium* species shows the presence of alkaloids: ecgonidine methyl ester, ecgonine methyl ester, cuscohygrine and tropacocaine and the biosynthesis intermediates: hygrine, tropinone and tropanol. The identification of the ecgonine methyl ester and ecgonidine methyl ester also shows that *Erythroxylum* genus species present in southern Brazil have economic potential because they can be used in the production of toxicological standards. The aims were met and allow the conclusion that *Erythroxylum* genus of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, south of Brazil, show toxic, pharmacological and chemical importance, part of these being influenced by the collect period, summer/ winter.

Key words: Alkaloids Type Ecgonine, Antimicrobial, Antioxidant, Cocaine, Dopamine, *Erythroxylum*, Methyl Ester Ecgonidine, Methyl Ester Ecgonine, Planaria, Seasonality.

Lista de Figuras

Figura 1	Distribuição do gênero <i>Erythroxylum</i> , através dos pontos de coletas no território Brasileiro	28
Figura 2	Estruturas de metabólitos encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	30
Figura 3	Biossíntese da cocaína	32
Figura 4	Biossíntese do hidroxitropano e de alcaloides de rotas paralelas à síntese dos alcaloides tropânicos	32
Figura 5	Comportamentos Atípicos Padronizados ocasionados por agonistas dopaminérgicos sobre os receptores D1 e D2 em planárias	37
Figure 1	Displacement per minute of the controls and EDV 0.025% Groups, in time of 10 minutes	71
Figura 6	Estrutura molecular do composto higrina	101
Figura 7	Estrutura molecular do alcaloide cuscohigrina	102
Figura 8	Estrutura molecular do intermediário da biossíntese tropinona	102
Figura 9	Estrutura molecular do alcaloide éster de metilecgonina	103
Figura 10	Estrutura molecular do alcaloide tropacocaína	103
Figura 11	Estrutura molecular do composto tropanol	103
Figura 12	Estrutura molecular do alcaloide éster de metilecgonidina	104
Figura 13	Etapa final da biossíntese da cocaína	105
Figura 14	Síntese de cocaína a partir do alcaloide éster de metilecgonina	106
Figura 15	Formação de éster de metilecgonidina por pirólise da cocaína	106

Lista de Tabelas

Tabela 1	Espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> com ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina	28
Tabela 2	Estrutura geral e exemplos das principais classes de alcaloides presentes em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	31
Tabela 3	Alcaloides identificados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> com ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina	33
Tabela 4	Substâncias avaliadas e as metodologias empregadas em análise toxicológica com Planárias	38
Table I	Identification of the metabolite cocaine in Brazilian species	51
Table 1	Results obtained in Escape Test for the last two concentrations that originated atypical behavior in planarian with ethanolic extract free apolar compounds of dried leaves of the <i>E. deciduum</i> collected during the summer	70
Table 1	Antibacterial activity, in disc diffusion method, of the extracts of leaves of <i>Erythroxylum deciduum</i> and <i>Erythroxylum argentinum</i> collected in winter and summer using 10 µL of a solution at a concentration close to 100 mg/mL	87
Table 2	Minimal Inhibitory Concentration in mg/mL of extracts dichloromethane, ethanolic and aqueous of leaves of <i>Erythroxylum argentinum</i> , collect in winter and summer	88
Table 3	Minimum Inhibitory Concentration in mg/mL of ethanolic extracts from leaves of <i>Erythroxylum deciduum</i> , collect during winter and during the summer	88
Table 4	Antioxidant activity presented as EC50 of extracts leaves of <i>Erythroxylum argentinum</i> and <i>Erythroxylum deciduum</i> collected in winter and summer	89
Tabela 5	Localização das coletas realizadas por espécie	99
Tabela 6	Rendimento do extrato metanólico e de alcaloides totais das espécies de <i>E. argentinum</i> e <i>E. deciduum</i> coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina	99
Tabela 7	Alcaloides identificados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> nativas dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina coletadas durante o verão e o inverno	100

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	21
3. Revisão Bibliográfica	25
3.1 Família Erythroxylaceae	27
3.2 Gênero <i>Erythroxylum</i>	27
- 3.2.1 <i>O Homem x Gênero Erythroxylum</i>	29
- 3.2.2 <i>Metabólitos Secundários</i>	30
- 3.2.2.1 <i>Alcaloides</i>	31
- 3.2.3 <i>Estudos e Efeitos Tóxico/ Farmacológicos do Gênero Erythroxylum</i>	34
3.3 Planárias	36
4. Capítulos	41
4.1- <i>Erythroxylum</i> : a genus with "legal" species producing cocaine	45
4.2- Dopaminergic activity evaluation of <i>Erythroxylum deciduum</i> in planarian model	59
4.3- Effect of Seasonality on Antibacterial and Antioxidant Activity of <i>Erythroxylum argentinum</i> O. E. Schulz and <i>Erythroxylum deciduum</i> A. St. Hil.....	79
4.4- Perfil Alcaloídico	95
5. Discussão	109
6. Conclusão	115
7. Referências	119
8. Apêndices	131
Apêndice 1- Cromatogramas das Frações Alcaloídicas	131
Apêndice 2- Espectro de Massas dos Alcaloides Identificados	143
Apêndice 3- Atividade Antioxidante dos Extratos Avaliados	149
Apêndice 4- Velocidade de Locomoção das Planárias	153
Apêndice 5- Imagens de locais de coleta das espécies de <i>Erythroxylum</i>	157
9. Anexos	161
Anexo 1- Carta de recebimentos do artigo encaminhado à Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences com consideração favorável à publicação	161
Anexo 2- Carta de aceite do manuscrito encaminhado a World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences.....	165

Introdução

Erythroxylum P. Browne é o principal gênero da Família Erythroxylaceae, apresenta cerca de 240 espécies com ampla distribuição nas zonas tropical e subtropical do planeta. As espécies *E. coca* e *E. novogranatense*, conhecidas como “plantas de coca” ou simplesmente “coca”, são as principais representantes do gênero por serem fonte da cocaína (Costa-Lima e Alves, 2015; Biondich e Joslin, 2016). O Brasil é o centro da diversidade do gênero, apresenta cerca de 114 espécies distribuídas por todo o país e nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina são registradas 12 espécies (Loiola, 2012).

O início do consumo e da utilização do gênero, pelo ser humano, é remoto e também incerto. Os indícios mais antigos desta relação ocorreram pela identificação de resíduos de folhas de coca em cerâmicas, na costa do Pacífico, que datam de mais de 5.000 anos (Valdez et al., 2015) e pela detecção de cocaína na pele e nos fios de cabelo de múmias egípcias (Görlitz, 2016). Para o povo Inca, a coca era sagrada e por isto consumida apenas pelos líderes e, posteriormente, por todos os membros da sociedade. A coca foi difundida para outros grupos indígenas e as diferentes formas de preparo e uso dependiam da tribo, do usuário e da função a ser realizada.

O principal metabólito do gênero, a cocaína, foi empregado na produção de medicamentos e de bebidas como o Vinho Mariani e a Coca-Cola[®]. A utilização, terapêutica e recreativa, possibilitou identificar os danos provocados ao usuário e a sociedade, o que a levou para classificação de substância de controle internacional.

A fitoquímica do gênero é caracterizada pela presença de alcaloides tipo ecgonina (Bieri et al., 2006; Cordell, 2013) e de alcaloides tropânicos com orientação 3β , também estão presentes outras classes como flavonoides, taninos, terpenos e calisteginas. A biossíntese de alguns constituintes é influenciada pelo estágio de desenvolvimento vegetal e por fatores climáticos, porém esta influência, sobre a fitoquímica e os efeitos biológicos, não é normalmente avaliada.

Além das plantas da coca, outras espécies do gênero também biossintetizam a cocaína, por exemplo, *E. argentinum*, *E. cuneifolium* e *E. laetevirens*, porém a presença do metabólito, em algumas destas espécies, é contraditória (Zuanazzi et al.,

2001; Bieri et al., 2006; Casale et al., 2014), o que pode ter origem das diferentes regiões ou da época de coleta.

Estudo fitoquímico realizado, com exemplares nativos do estado do Rio Grande do Sul, identificou alcaloides em quatro em espécies. Embora a cocaína não fora encontrada, a presença de metilecgonidina (Zuanazzi et al., 2001) demonstra a pertinência de novas investigações fitoquímicas, uma vez que o composto é considerado um artefato originado da pirólise da molécula da cocaína (Rivier, 1981; Garcia et al., 2016).

Estudos farmacológicos com espécies do gênero apresentam pertinência. Foram identificadas relevantes atividades como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, anestésica e pró-convulsivante além da morte de animais (Chaves et al., 1988; Zuanazzi et al., 2000; Borelli et al., 2011; Nascimento, 2011; Aguiar et al., 2012; Syed, 2013).

Das espécies do gênero presentes nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, *E. argentinum* e *E. deciduum* apresentam destaque. São as mais comuns, possibilitam investigar suas potencialidades farmacológicas como as atividades antimicrobiana e antioxidante e originam efeitos neurológicos e morte de ovinos, exclusivamente quando consumidas durante o verão (Borelli et al., 2011). Além disto, *E. deciduum* é consumida por humanos na forma de chá de suas folhas, o que valoriza o estudo com a espécie.

Estudos toxicológicos de extratos vegetais são realizados com animais tradicionalmente empregados em pesquisas, como camundongos e ratos, originando a necessidade de, entre outros, laboratórios adequados e profissionais capacitados além de envolverem questões éticas, o que pode restringir e até mesmo impedir a realização de determinada pesquisa. Assim desenvolver metodologia que substituam estes animais é pertinente. Planárias apresentam potencialidade como metodologia alternativa ao uso de camundongos e ratos, na avaliação de extratos vegetais ativos sobre sistemas neuronais, possuem semelhanças ao cérebro, à medula espinhal e aos neurotransmissores dos mamíferos e não necessitam de aprovações éticas. Atualmente, estes vermes são utilizados apenas na investigação de compostos puros como anfetaminas, cocaína, haloperidol e nicotina (Algeri et al., 1983; Tallarida et al., 2014;

Bach et al., 2016; Nayak et al., 2016; Ross et al., 2017). Assim, há necessidade de adaptar a metodologia existente para utilizar os vermes em análises com extratos vegetais.

Diante da pertinência fitoquímica, dos efeitos ocasionados em humanos e em animais, da possibilidade de avaliação de atividades biológicas e da pouca investigação das consequências dos fatores climáticos sobre as espécies do gênero *Erythroxylum* do Sul do Brasil, o estudo avaliou a influência do período de coleta, verão/inverno sobre o perfil alcaloídico e as potencialidades tóxicas e farmacológicas, de espécies do gênero de ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

Objetivo Geral

Estudar tóxica, biológica e quimicamente as espécies do gênero *Erythroxylum* P. Browne de ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, além de realizar revisão bibliográfica sobre as espécies produtoras de cocaína e as implicações segundo a legislação brasileira vigente.

Objetivos Específicos

Identificar através de revisão bibliográfica, as espécies do gênero *Erythroxylum* que biossintetizam cocaína e analisar as implicações segundo a legislação Brasileira vigente sobre plantas proscritas.

Adaptar a metodologia de planária para a avaliação toxicológica de extratos vegetais e avaliar o efeito de *E. deciduum* sobre esta adaptação.

Identificar alcaloides presentes nas espécies do gênero *Erythroxylum* coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, Sul do Brasil, e analisar a influência qualitativa do período de coleta, verão/ inverno, sobre os mesmos.

Avaliar a influência do período de coleta verão/ inverno sobre as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *E. argentinum* e *E. deciduum*.

3.1 Família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae Kunth pertence às Angiospermas, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae e ordem Linales (Cronquist, 1988), apresenta-se como árvores, arbustos e subarbustos com distribuição pantropical. As folhas são alternas ou opostas, simples e com margem inteira. Os ramos possuem estípulas intrapeciolares, persistentes ou caducas e com ou sem estrias longitudinais. A inflorescência ocorre em fascículos ou é reduzida a uma única flor, as flores são normalmente bissexuadas com estames livres ou unidos e o ovário é súpero (Amaral Jr, 1980; Sobral et al., 2006; Souza et al., 2012; Costa-Lima e Alves, 2015).

A família é formada pelos gêneros *Aneulophus* Benth., *Erythroxylum* P. Browne, *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell e Mendonça. Apresenta cerca de 250 espécies, sendo as pertencentes ao gênero *Erythroxylum* distribuídas de forma pantropical enquanto as demais ocorrem restritas ao continente Africano (Cronquist, 1988; Loiola, 2010; Souza et al., 2012; Costa-Lima et al., 2014).

3.2 Gênero *Erythroxylum*

O termo *Erythroxylum* foi pela primeira vez empregado por Patrick Browne, em 1756, para denominar um novo gênero da família Erythroxylaceae descoberto na Jamaica. Em 1759, Linnaeus utilizou a grafia *Erythroxylon*, motivo pelo qual as duas nomenclaturas podem ser encontradas em literatura técnica e científica. O nome é derivado das palavras gregas *erythros*: vermelho e *xylon*: madeira (Plowman, 1976).

O gênero é constituído por árvores, arbustos e subarbustos, o córtex é geralmente estriado e escassamente à densamente lenticelado. As estípulas são intrapeciolares, caducas ou persistentes, estriadas ou não e com margem inteira a densamente vilosofimbrioladas. As folhas são alternas, pecioladas, inteiras e membranácea, cartácea ou coriácea. A inflorescência é geralmente fasciculada, podendo estar reduzida a uma flor. O fruto é uma drupa, carnosa e normalmente de cor vermelha (Loiola et al., 2007; Costa-Lima e Amorim, 2017).

Apresenta poucos exemplares na África, Índia e Austrália, porém ocorre com frequência na América e tem, no Brasil, o centro de sua diversidade e endemismo com 118 espécies, sendo 79 endêmicas, a distribuição ocorre em todo o território Brasileiro (**Figura 1**) (Costa-Lima et al., 2014). Nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina ocorrem 12 espécies, 9 no Rio Grande do Sul e 11 em Santa Catarina (Loiola, 2010) (**Tabela 1**), destas *E. catharinense* encontra-se ameaçada de extinção (CNCFlora, 2017).

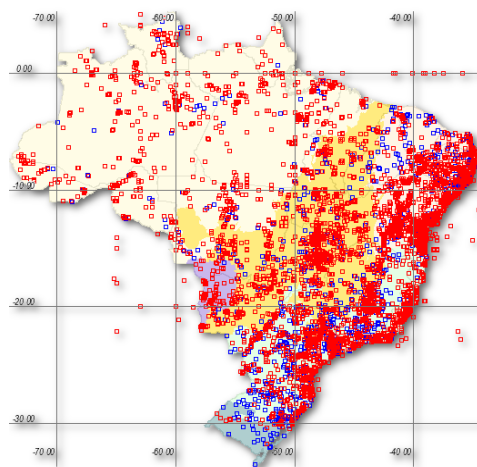


Figura 1: Distribuição do gênero *Erythroxylum* P. Browne, através dos pontos de coletas, no território Brasileiro. **Fonte:** SpeciesLink, 2017

Tabela 1: Espécies do gênero *Erythroxylum* P. Browne com ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina

Espécie	Ocorrência		Referência
	Rio Grande do Sul	Santa Catarina	
<i>E. ambiguum</i> Peyr.	-	X	
<i>E. amplifolium</i> (Mart.) O.E.Schulz	X	X	
<i>E. argentinum</i> O.E.Schulz	X	X	
<i>E. catharinense</i> Amaral	-	X	
<i>E. cuneifolium</i> (Mart.) O.E.Schulz	X	X	
<i>E. cuspidifolium</i> Mart.	X	X	Loiola, 2010
<i>E. deciduum</i> A.St.-Hil.	X	X	
<i>E. gonocladum</i> (Mart.) O.E.Schulz	-	X	
<i>E. microphyllum</i> A.St.-Hil.	X	X	
<i>E. myrsinites</i> Mart.	X	X	
<i>E. pelleterianum</i> A.St.-Hil.	X	-	
<i>E. vacciniifolium</i> Mart.	X	X	

X: presente; -: ausente

3.2.1 O Homem x Gênero *Erythroxylum*

A relação do homem com o gênero *Erythroxylum* é antiga e o seu início incerto. Foram encontrados resíduos de folhas de coca em cerâmicas que datam de mais de 5.000 anos (Valdez et al., 2015) e identificado o alcaloide cocaína no cabelo e na pele de múmias Egípcias. Isto demonstra que, além de antigo, o consumo também ocorreu por transporte transoceânico das espécies produtoras de cocaína (Görlitz, 2016).

A coca apresentou importante relação social no império Inca, considerada sagrada, apenas os líderes podiam consumi-la e os demais membros da sociedade a utilizavam como oferenda em rituais religiosos (Naranjo, 1981; Plowman, 1981; Cortella et al., 2001). Posteriormente, o consumo foi difundido e a coca utilizada pelos indígenas para realizar longas caminhadas sem sentir cansaço ou fome, podendo ser ainda utilizada para o tratamento de pneumonia, reumatismo, asma, dor de dente, náuseas, tontura, dor de cabeça, como anestésico local e para evitar o “mal das Alturas” (Grinspoon e Bakalar, 1981; Scarpa, 2004, Facco e Zanette, 2017).

Em tribos Amazônicas, o consumo fora restrito aos indígenas masculinos. As folhas podiam ser torradas, pulverizadas, misturadas a outras plantas ou a cinzas, mastigadas e a saliva engolida, ou ainda inaladas ou fumadas, dependendo de indivíduo, da tribo e da atividade envolvida (Plowman, 1981; Rivier, 1981; Schultes, 1981).

Na indústria, extratos de *E. coca* e *E. novogranatense* foram incorporados na fabricação de bebidas como o “Vin Mariani” e a Coca-Cola[®]. A partir da cocaína foram desenvolvidos diversos produtos e medicamentos com propriedades afrodisíaca, estimulante, para o tratamento de distúrbios estomacais, dores, melancolia e como substituto da cafeína (Grinspoon e Bakalar, 1981; Plowman, 1981; UNODC, 2012; Maleš, 2017).

Em 1885, o refino da cocaína foi otimizado e resultou na redução dos preços e no aumento do consumo (Karch, 1999; Ferreira e Martini, 2001), principalmente, entre artistas e boêmios (UNODC, 2013). Após este período de glamourização do consumo

recreativo e terapêutico, foram identificados os potenciais de abuso e de dependência e a toxicidade, tolerância e morte, ocasionando a classificação da cocaína como substância de controle internacional, em 1961, pela Convenção de Substâncias Narcóticas (UNODC, 2012).

3.2.2 Metabólitos Secundários

A fitoquímica do gênero *Erythroxylum* é peculiar pela presença dos alcaloides derivados da ecgonina, caracterizados pela presença de substituintes em orientação 3β e presença de grupo carboxil no C_2 do núcleo tropânico, sendo o principal representante a cocaína (Holmstedt et al., 1977; Christen, 2000; Cordell, 2013; Casale, 2014).

Também são encontrados alcaloides tropânicos com orientação 3α (Hegnauer, 1981; de Oliveira et al., 2011), alcaloides tropânicos com orientação 3β , intermediários da biossíntese (Rubio et al., 2013), calisteginas (Christen, 2000; Brock et al., 2005), truxilinas (Lydon, 2009; Casale, 2014), flavonoides (Bohm et al., 1981; Ribeiro et al., 2013), taninos (Hegnauer, 1981; Ishino et al., 2012), saponinas (Syed, 2013), glicosídeos (Kanchanapoom et al., 2005), óleo essencial (Rao et al., 1926; Novák et al., 1987; Ventura, 2009), diterpenos (do Nascimento, 2012), triterpenos (Ribeiro et al., 2013) e compostos alifáticos de cadeia longa (Ansell et al., 1993). A **Figura 2** apresenta algumas estruturas de metabólitos encontrados no gênero *Erythroxylum*.

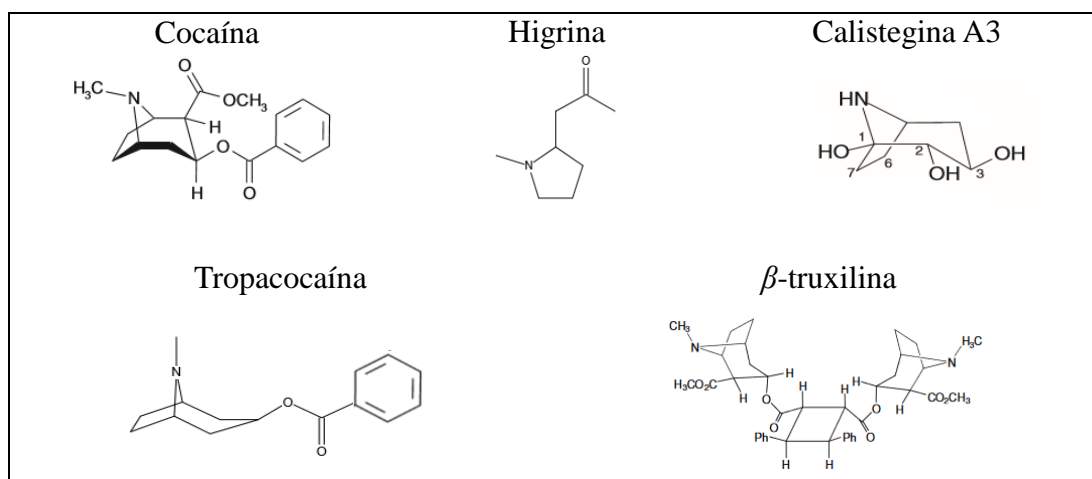
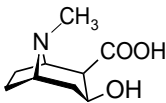
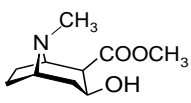
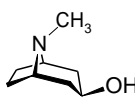
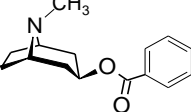


Figura 2: Estruturas de metabólitos encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*

3.2.2.1 Alcaloides

Dentre as classes do metabolismo secundários presentes no gênero *Erythroxylum*, os alcaloides apresentam destaque devido aos importantes efeitos tóxico-farmacológicos e às características químicas presentes. Ocorrem alcaloides tropânicos derivados da ecgonina, como cocaína e metilecgonina e alcaloides tropânicos derivados do hidroxitropano 3 β , como a tropacocaína (Oliveira et al., 2011), **Tabela 2**.

Tabela 2: Estrutura geral e exemplo das principais classes de alcaloides presentes em espécies do gênero *Erythroxylum*

Classificação	Estrutura Básica	Exemplo	Referência
Der. Ecgonina		 Metilecgonina	Oliveira et al. 2011
Der. Hidroxitropano-3 β		 Tropacocaína	

Os relatos na literatura científica sobre a biossíntese dos alcaloides do gênero concentra-se sobre a formação da cocaína e assim, ocorre uma lacuna quanto a biossíntese dos demais alcaloides, como os derivados do hidroxitropano 3 β . A **Figura 3** apresenta a rota biossintética proposta para a biossíntese da cocaína (Jirschitzka et al., 2012), a qual inicia com os aminoácidos ornitina ou arginina formando a *N*-metilputrecina e após o íon *N*-metilpirolínico e este a metilecgonona. Ocorrem duas hipóteses para a formação do anel de seis membros do anel tropânico da metilecgonona, reação do *N*-metilpirolínio com acetoacetato ou reação com duas moléculas de malonil coenzima-A. Por fim a metilecgonona redutase forma a metilecgonina que por benzoilação origina a cocaína (Jirschitzka et al., 2012).

A compreensão sobre a biossíntese dos demais alcaloides, como os derivados do hidroxitropano-3 β , ocorre principalmente, por estudos realizados com a família Solanaceae. O íon *N*-metilpirolínio poderá originar, através de três rotas distintas: a nicotina, a cuscohigrina e a higrina, esta formará a tropinona que por ação da tropinona redutase I, reação reversível, origina os derivados do hidroxitropano-3 α e por ação da

tropinona redutase II, reação irreversível, origina os derivados do hidroxitropano-3 β (Figura 4) (Christen, 2000).

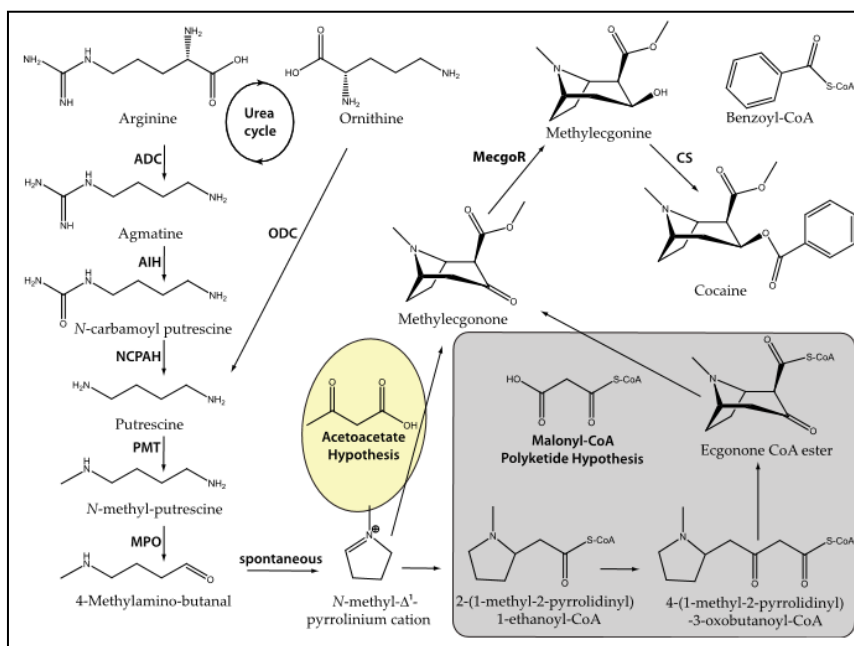


Figura 3: Biossíntese da cocaína. Fonte: Jirschitzka et al., 2012

Jirschitzka et al. (2012), sugere que nas Erythroxylaceae a redução da tropinona em derivados do hidroxitropano-3 β ocorra por ação da enzima metilecgonona redutase e não por ação da enzima tropinona redutase II, assim como ocorre na redução da metilecgonona em metilecgonina na biossíntese da cocaína.

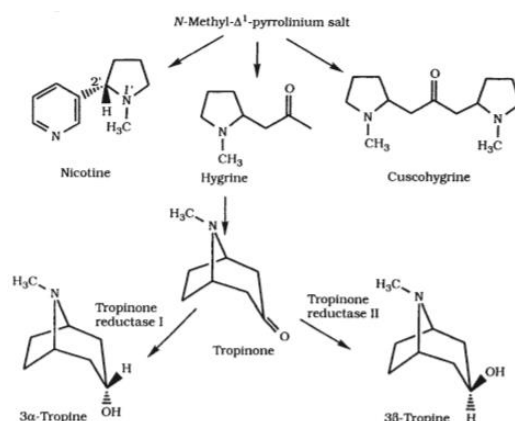


Figura 4: Biossíntese dos derivados do hidroxitropano e de alcaloides de rotas paralelas à síntese dos alcaloides tropânicos. Fonte: Christen, 2000

A biossíntese de compostos presentes no gênero *Erythroxylum* sofre influência do pH, do índice pluviométrico, da temperatura, da exposição à luz solar e do estágio de desenvolvimento vegetal (Acock et al., 1996; Johnson et al., 1996; Sauvain et al.,

1997; Christen, 2000; Jirschitzka et al., 2012; Casale et al., 2014). Assim a influência do período de coleta, verão/ inverno, sobre os compostos do gênero e as consequências tóxico farmacológicas são pertinentes de serem investigada.

Nas espécies presentes nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina foram encontrados alcaloides derivados da ecgonina, do hidroxitropano-3 β , calistegina e alcaloides de rotas paralelas (**Tabela 3**). Porém a influência do período de coleta, verão/ inverno, não foi investigada e existem divergências entre os estudos sobre a presença da cocaína.

Em estudo realizado por Zuanazzi et al. (2001), a presença de cocaína não foi evidenciada nas espécies *E. argentinum*, *E. cuneifolium* e *E. deciduum* coletadas no Sul do Brasil, porém Bieri et al. (2006), identificou o metabólito nas mesmas espécies coletadas, respectivamente, na Bolívia, no Paraguai e no Sul do Brasil. Em ambos estudos as análises ocorreram por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas. Esta contrariedade sobre a presença da cocaína corrobora a pertinência de estudos sobre a influência do período de coleta sobre a biossíntese dos alcaloides presentes no gênero *Erythroxylum*.

Tabela 3: Alcaloides identificados em espécies do gênero *Erythroxylum* com ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina

Espécie	Alcaloides	Referência
<i>E. ambiguum</i>	NAI	-
<i>E. amplifolium</i>	NAI	-
<i>E. argentinum</i>	Cocaína, cuscohigrina, higrina, metilecgonidina, tropacocaína, 3 β ,6 β -ditigloiloxinortropano	El-Imam et al., 1985; Zuanazzi et al., 2001; Bieri et al., 2006
<i>E. catharinense</i>	NAI	-
<i>E. cuneifolium</i>	Calistegina A ₅ , A ₃ , B ₂ , cocaína	Brock et al., 2005
<i>E. cuspidifolium</i>	NAI	-
<i>E. deciduum</i>	Calistegina A ₅ , A ₃ , B ₂ , B ₁ , cocaína	Brock et al., 2005; Bieri et al., 2006
<i>E. gonocladum</i>	Calistegina A ₃ , B ₂ , cocaína	Brock et al., 2005; Bieri et al., 2006
<i>E. microphyllum</i>	Metilecgonidina	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. myrsinites</i>	Calistegina A ₅ , A ₃ , B ₂	Brock et al., 2005
<i>E. pelleterianum</i>	Tropacocaína	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. vacciniifolium</i>	Catuabina A, B, C, D, E, F, G, H e I, Vaccinina A e B, 7 β -hidroxicatuabina D, 7 β -hidroxicatuabina E, 7 β -hidroxicatuabina F, 7 β -hidroxicatuabina H, 7 β -hidroxicatuabina I, 7 β -acetilcatuabina E	Graf et al., 1978; Zanolari et al., 2003; Oliveira et al. 2010

NAI: Não apresenta alcaloides identificados; -: ausência de referência

A identificação de metilecgonidina em *E. argentinum* e *E. microphyllum* e a ausência de cocaína nas mesmas espécies (Zuanazzi et al., 2001), contrapõe a informação de que metilecgonidina é um artefato da pirólise do alcaloide cocaína (Rivier, 1981; Jenkins, et al., 1996; Scheidweiler et al., 2000; Garcia et al., 2016). Assim, novos estudos fitoquímicos com as respectivas espécies são valorizados, uma vez que a presença do artefato metilecgonidina deveria estar acompanhada do seu gerador, a cocaína.

3.2.3 Estudos e Efeitos Tóxico/ Farmacológicos do Gênero *Erythroxylum*

Devido a pertinência histórica do consumo e a relação entre o ser humano e o gênero *Erythroxylum*, estudos são desenvolvidos na tentativa de verificar e compreender suas potencialidades tóxico farmacológicas.

Os primeiros efeitos identificados, do uso do gênero *Erythroxylum*, ocorreram da observação do consumo da coca por indígenas para redução da fome e do cansaço e prevenção ao “Mal das Alturas”, devido ao efeito broncodilatador (Amaral, 1980; Grinspoon et al., 1981). A coca foi popularmente utilizada para o tratamento de pneumonia, problemas estomacais, retenção de placenta (Scarpa, 2004), úlceras estomacais, reumatismo, asma, febre da malária, dor de dente, náuseas, tontura e dor de cabeça (Grinspoon et al., 1981).

As folhas de coca apresentam carboidratos, aminoácidos, cálcio, potássio, vitamina A, riboflavina e outros sais minerais que conseguem suprir muitas necessidades do corpo humano. Também estão presentes β -caroteno, vitamina E, polifenóis, zinco e ferro, os quais apresentam proteção do material genético ao processo cancerígeno, o que poderia justificar a menor incidência de câncer de boca na Bolívia e no Peru em relação ao Brasil e à Argentina, países onde o hábito de mascar folhas de coca não está presente (Amaral, 1980; Knasmüller et al., 2009; Penny et al., 2009; Nersesyanyan et al., 2013).

A cocaína é o principal responsável pelos efeitos cerebrais do consumo das folhas, do chá e da pasta de coca, devido a ativação do sistema dopaminérgico, porém

outros metabólitos também apresentam importância para que estes efeitos ocorram (UNODC, 2013; Siciliano et al., 2016). Isto pode ser evidenciado através dos efeitos gerados por extratos de coca sem a cocaína, como anestesia, convulsão e morte, assim como no fato da DL₅₀ do extrato da coca ser menor que a DL₅₀ da cocaína pura (Bedford et al., 1981; Bedford et al., 1982; Bedford et al., 1984).

A cocaína crack, forma de base livre, origina nos usuários alterações cognitivas distintas das provocadas pelo consumo de cocaína na forma de sal. Parte dos efeitos é atribuída a presença de metilecgonidina formada pela pirólise da molécula de cocaína (Jenkins, et al., 1996; Garcia et al., 2016; Garcia et al., 2017).

No que se refere aos estudos farmacológicos, a atividade antimicrobiana foi observada para diversas espécies do gênero como *E. caatinga*, *E. catuaba*, *E. cuneatum*, *E. coca*, *E. delagoense*, *E. emarginatum*, *E. pictum* e *E. suberosum* (Manabe et al., 1992; Ventura et al., 2009; De Wet, 2011; Violante et al., 2012; Aguiar et al., 2012; Kadchumsang et al., 2015). Assim como a atividade antioxidante, que foi verificada pelas espécies *E. cuneatum*, *E. monogynum*, *E. mummularia* e *E. sideroxyloides* (Barreiros et al., 2003; Soobrattee et al., 2008; Syed, 2013; Kadchumsang et al., 2015). Em algumas destas espécies os estudos apontaram importantes atividades antimicrobianas e antioxidantes.

E. argentinum e *E. deciduum*, popularmente conhecidas por cocão, são as espécies do gênero *Erythroxylum* mais comuns nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Quimicamente apresentam flavonoides e alcaloides e farmacologicamente carecem de estudos antimicrobiano e antioxidante (Tomesi et al., 1986; Chaves et al., 1988; Bieri et al., 2006; Nascimento et al., 2011), o que valoriza a investigação destas atividades

Toxicologicamente, as folhas de *E. deciduum* quando consumidas por ovinos, durante o verão, originam sinais neurológicos como dificuldade de locomoção, respiração acelerada e taquicardia, após estes sintomas ocorre a morte em uma taxa próxima a 100%. A intoxicação durante o inverno é rara e quando ocorre os sinais tóxicos são brandos. É proposto aos alcaloides os responsáveis por, pelo menos, parte desta toxicidade (Borelli, 2011; Colodel et al., 2004).

Observando a fitoquímica da espécie *E. deciduum*, os efeitos ocasionados a ovinos durante o verão, o relato dos efeitos originados pelo chá de suas folhas e as potencialidades por pertencer ao mesmo gênero das “plantas da coca”, há pertinência na investigação toxicológica da espécie.

As metodologias empregadas na avaliação pré-clínica tóxico/ farmacológica de extratos vegetais ocorrem, principalmente, utilizando camundongos e ratos. Porém, para sua execução, necessita-se de investimentos em laboratórios e em materiais de consumo, além da aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, o que poderá tornar o estudo inviável. Paralelamente a estas necessidades e dificuldades, a metodologia de pesquisa com planárias é simples, envolve baixos investimentos, não necessita de aprovação pela referida comissão e origina resultados robustos.

3.3 Planárias

Planárias, filo Platyhelminthes, classe Turbellaria, são vermes de vida livre, considerados os primeiros animais na escala evolutiva a apresentar cefalização (Pagán et al., 2013; Inoue et al., 2015). Apresentam semelhanças ao cérebro, à medula espinhal e aos neurotransmissores de mamíferos como dopamina, serotonina, acetilcolina, GABA e glutamato, além de receptores opioides e canabinoides (Raffa e Valdez, 2001; Buttarelli et al., 2008; Pagán et al., 2009).

Inicialmente, planárias foram empregadas em estudos envolvendo sua capacidade de regeneração. Em segundo momento, estudos descreveram a presença do neurotransmissor dopamina, dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, dos comportamentos relacionados a estes receptores: aumento da velocidade de locomoção, hipercinesia “Tipo Parafuso” e posição “Tipo C” (**Figura 5**) e a quantificação dos mesmos em presença de cocaína. Possibilitando o uso em ensaios toxicofarmacológicos (Algeri et al., 1983; Venturini et al., 1989; Palladini et al., 1996; Raffa et al., 2001; Raffa e Valdez, 2001; Raffa e Desai, 2005).

A avaliação da velocidade de locomoção ocorre transferindo-se a planária para uma placa de petri de plástico, contendo solução teste, disposta sobre papel

quadriculado com espessamento de 0,5 cm, em ambiente bem iluminado. A velocidade de locomoção é quantificada como o número de linhas cruzadas ou recruzadas, por minuto, e com as médias acumuladas no tempo de 10 minutos (Raffa et al., 2001; Prokai et al., 2013; da Silva, 2016). De mesma forma, os comportamentos estereotipados padronizados, posição tipo C e hipercinesia tipo parafuso, também são avaliados em placa de petri de plástico, contendo a solução teste e em ambiente bem iluminado. Estes comportamentos estão relacionadas a presença de atividade dopaminérgica pela solução teste, e também podem ser quantificados (Raffa e Valdez, 2001; Tallarida et al., 2014; Hagstrom, 2016).

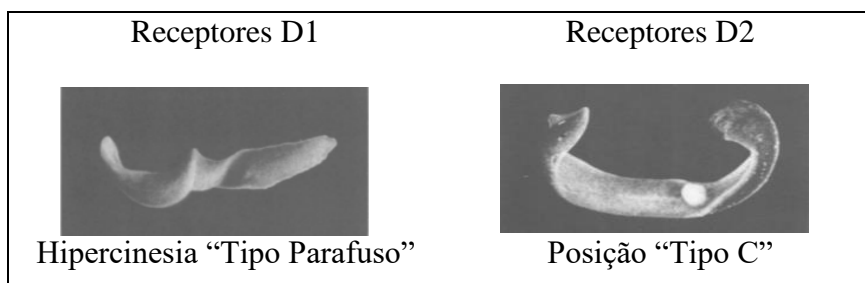


Figura 5: Comportamentos atípicos padronizados ocasionados por agonistas dopaminérgicos sobre os receptores D1 e D2 em planárias. **Fonte:** Venturini et al., 1989

Diante deste novo emprego científico, as planárias são empregadas em diferentes metodologias de avaliação com substâncias ativas sobre o sistema neuronal. A **Tabela 4** apresenta uma compilação dos estudos desenvolvidos com planárias.

De acordo com os dados apresentados na tabela 4, estes vermes são utilizados em diversos estudos, como na determinação de doses tóxicas, na identificação do mecanismo de ação, na avaliação de dependência, no comportamento de abstinência e na interação entre drogas.

Planárias podem ser empregadas em metodologias de velocidade de locomoção, hipercinesia tipo parafuso, posição tipo C e movimentos tipo convulsão, entre outras. Estas características as qualificam como um poderoso método na investigação de mecanismos de toxicidade envolvendo alterações neuronais (Hagstrom, 2016).

Interessante notar que os ensaios existentes ocorrem com compostos puros, principalmente com ativos sobre a neurotransmissão dopaminérgica e com compostos de drogas de abuso. Assim há ausência de metodologia para o uso destes vermes com extratos vegetais que, se desenvolvida, permitirá o emprego em estudos bioguiados para a atividade de interesse, como, por exemplo, sobre o sistema dopaminérgico para candidatos ao tratamento da doença de Parkinson, esquizofrenia e toxicodpendência (Prokai et al., 2013; Raffa et al., 2013).

Tabela 4: Substâncias avaliadas e as metodologias empregadas em análise toxicológica com planárias

Substância Avaliada	Metodologia empregada	Referência
Apomorfina, haloperidol, levodopa, reserpina	Movimentos corporais	Algeri et al., 1983
Cocaína	Velocidade de Locomoção, Posição tipo C, Hipercinesia tipo parafuso (Comportamento de abstinência)	Raffa e Valdez, 2001
Sulpirida	Velocidade de locomoção	Raffa, 2001
Anfetamina, ceftriaxona, clorazepato, cocaína, metanfetamina	Velocidade de locomoção, (Dependência e Comportamento de abstinência)	Rawls et al., 2002
Cafeína, cocaína, GABA, glutamato	Hipercinesia tipo C (Sensibilização cruzada)	Rawls et al., 2010
Clotetona, sulpirida	Velocidade de locomoção	Talbot et al., 2011
Cocaína, harmina, mefedrona, metanfetamina, nicotina	Posição tipo C	Owaisat et al., 2012
Nicotina, pilocarpina, sulpirida	Velocidade de Locomoção, Movimento tipo convulsão	Raffa et al., 2012
Benserazida, levodopa	Velocidade de locomoção, (Mal de Parkinson)	Raffa et al., 2013
Monoiodotirosina	Velocidade de locomoção, (Mal de Parkinson)	Prokai et al., 2013
Benserazida, levodopa	Velocidade de locomoção, Letalidade	Raffa et al., 2013
Cocaína, etanol	Posição tipo C, (Sinergismo)	Tallarida et al., 2014
Cotina, nicotina	Movimento tipo convulsão, Velocidade de locomoção, (Comportamento de abstinência)	Bach et al., 2016
Donezepil, galantamina, tacrina	Movimento tipo convulsão, Velocidade de locomoção	da Silva, 2016
Tributlina	Letalidade	Ofoegbu et al., 2016
Clorazepato, cocaína, etanol	Experimento Claro/ escuro	Nayak, et al., 2016
Bromocriptina,	Motilidade	Chan et al., 2016
Etanol, metanol, permetrina	Neurotoxicidade, Letalidade	Hagstrom et al., 2016

Observa-se que o gênero *Erythroxylum* metaboliza compostos ativos sobre a neurotransmissão dopaminérgica (UNODC, 2013; Siciliano et al., 2016), que *E. deciduum* apresenta efeitos potencialmente ativos sobre a dopamina (Borelli, 2011;

Colodel et al., 2004) e que há necessidade de adaptar a metodologia de planária para empregá-las em estudos com extratos vegetais. Assim, é proposto desenvolver uma adaptação ao modelo de planária existente para o estudo de extratos vegetais, mais especificamente para os efeitos de extrato de *E. deciduum* sobre a neurotransmissão dopaminérgica.

Apresentação

O estudo toxicológico, biológico e a revisão bibliográfica sobre as espécies do gênero *Erythroxylum* resultaram nos manuscritos “*Erythroxylum* P. Browne: a genus with "legal" species producing cocaine”; “Effect of Acute Exposure of *Erythroxylum deciduum* A. St. Hil. on Planarian Model” e “Antibacterial and Antioxidant Activities of the Extract of *Erythroxylum argentinum* O. E. Schulz and *Erythroxylum deciduum* A. St. Hil. from Two Climate Stations” que estão apresentados a seguir.

A avaliação fitoquímica das espécies do gênero *Erythroxylum*, coletadas no sul do Brasil, não pode ser finalizada devido a impossibilidade de identificação botânica de algumas espécies, assim os resultados não serão apresentados na forma de artigo, ficando sua finalização para etapas futuras de trabalho do grupo de pesquisa.

***4.1 Erythroxylum* P. Browne: a genus with "legal" species producing cocaine**

Apresentação

O manuscrito intitulado “*Erythroxylum* P. Browne: a genus with "legal" species producing cocaine” está formatado segundo as normas do *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* e apresenta revisão bibliográfica sobre a presença do metabólito cocaína em espécies do gênero *Erythroxylum* e as implicações segundo a Legislação Brasileira vigente sobre plantas proscritas.

O manuscrito foi considerado favorável à publicação, pelo editor do *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, e atualmente se encontra com os avaliadores da revista (**Anexo 1**).

Foi observado que vinte e quatro espécies metabolizam a cocaína, porém apenas duas originam rendimentos apropriados para o emprego no tráfico. Uma destas, a espécie *E. novogranatense*, não é considerada proscrita segundo a legislação Brasileira vigente, assim sugere-se sua adição na Lista E do Anexo I da Portaria 344/98, Lista de Plantas Proscritas que Podem Originar Substâncias Entorpecentes e/ou Psicotrópicas.

Erythroxylum P. Browne: a genus with "legal" species producing cocaine

Arno Ernesto Hofmann Junior^{1*}, Rafael Scorsatto Ortiz², Renata Pereira Limberger¹

¹Laboratório de Toxicologia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

²INCT Forense, Superintendência da Polícia Federal, Porto Alegre, Brasil.

Resumo: O gênero *Erythroxylum* P. Browne é a fonte natural de alcaloides com núcleo ecgonina, sendo o principal representante a cocaína, e o Brasil é o centro de sua biodiversidade e endemismo. A cocaína é biossintetizada por vinte e quatro espécies, mas somente *E. coca* e *E. novogranatense* são empregadas como fonte do metabólito, uma vez que originam rendimentos apropriados para o tráfico, assim ambas espécies devem ser consideradas proscritas. Na legislação Brasileira vigente sobre plantas proibidas, Portaria 344/98 e atualizações, apenas *E. coca* está proscrita e desta forma se considera necessária a inclusão de *E. novogranatense* na lista de Plantas Proscritas.

Unitermos: Legislação Brasileira, cocaína, *Erythroxylum novogranatense*, Portaria 344/ 98, plantas proscritas, tráfico de drogas.

Abstract: The genus *Erythroxylum* P. Browne is the natural source of alkaloids with ecgonine nucleus, being the main representative the cocaine, and the Brazil is the largest diversity center of genus. The alkaloid is biosynthesized by twenty four species, but only *E. coca* and *E. novogranatense* have appropriate yields for trafficking, which causes the necessity of both being considered proscribed. In the current Brazilian legislation about proscribed plants, Portaria 344/ 98 and their updates, only *E. coca* is proscribed, in this way it is necessary to include *E. novogranatense* in the list of Proscribed Plants.

Keywords: Brazilian legislation, cocaine, *Erythroxylum novogranatense*, Proscribed Plants, Portaria 344/ 98, drug traffic.

* Laboratório de Toxicologia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, 6º Andar, Porto Alegre/ RS, Brasil.
E-mail: arnohofmann@hotmail.com, tel. +55 (51) 3308-5437

Running Title: *Erythroxylum*: a genus with "legal" species producing cocaine.

INTRODUCTION

Erythroxylum is one of the four genus of the Erythroxylaceae family, presents about 250 species in pantropical distribution (Costa-Lima and Loiola, 2014; Loiola, 2010) and the Brazil is the largest diversity center with 114 species and of these 74 are endemic (Loiola, 2010). In the country, new species are still identified (Loiola and Cordeiro, 2014).

Some of the species of the genus are known as "coca plants" or just "coca" and present an ancient use by humans. Coca residues were found in ceramic which date back more than 5,000 years. The Incas used them in religious rituals and to obtain stimulant effects and reduction of hunger and of tiredness (Cortella *et al.*, 2001; Naranjo, 1981; Valdez, Taboada, Valdez, 2015). Archaeological findings have identified concentrations of cocaine in mummies in Egypt, which provides the thought that in addition to ancient the consumption also occurred in other transoceanic cultures in pre-Colombian times (Görlitz, 2016).

The term "coca" refers to the leaves of *E. coca* and *E. novogranatense*, species known to be cocaine-producing (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012; United Nations Office on Drugs and Crime, 2013; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). The alkaloid occurs restricted to the Erythroxylaceae family and is the main responsible for the effects verified when this species are consumed (Christen, 2000; Cordell, 2013). The information that these species are cocaine producing for trafficking is not recent, it is recognized by different areas of science (Plowman, 1981; United Nations Office on Drugs and Crime, 2012; Garrido *et al.*, 2016; Görlitz, 2016) and it is possible find also hybrids of these two species in cocaine production (Bonilla and Fernández-Alonso, 2010; Casale, Mallette, Jones, 2014).

After the isolation of cocaine by Albert Niemann, 1859, it was, for a long time, legally consumed for therapeutic and recreational purposes. With the identification of the harmful consequences to the user and society, the cocaine was

banned as well the *E. coca* species, from which the alkaloid can be obtained (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012; United Nations Office on Drugs and Crime, 2013).

Since *E. novogranatense* is not proscribed, that other species of the genus can be cocaine producers and that Brazil is the center of the diversity of the genus *Erythroxylum*, the article presents a review on the production of cocaine by Brazilian and non- Brazilian species and the implications according the current Brazilian legislation about plants proscribed. The review was based on the following databases: BioMed, Google acadêmico, Lilacs, PubMed, Scielo, SIBI and SpringerLink. The following search terms were used: “cocaine”, “cocaina” and “Erythroxylum”. All searches carried no date or other limits.

The following the results and discussions about the presence of cocaine in species of the genus *Erythroxylum* and the implications for the Brazilian legislation are presented.

Cocaine in Brazilian *Erythroxylum*

Popularly, in Brazil, several species of the genus are known by names that have relation with the plants of "coca": *E. amplifolium*, *E. cuspidifolium*, *E. revolutum* and *E. ligustrinum* are known as "coca" (Silva *et al.*, 2008), *E. argentinum* and *E. deciduum* for “cocão” and *E. microphyllum* as “cocãozinho”. This is an interesting fact, since the population does not present the botanical and phytochemical know-how, but may have experimented many of these plants, which favors the belief that other species of the genus are producers, if not of the cocaine of compounds with similar effects.

Brazil is the center of diversity of *Erythroxylum* genus with one hundred and fourteen species (Loiola, 2010). Twenty-two, not necessarily collected in the respective country, have already been evaluated regarding the presence of cocaine. The **TABLE I** presents the compiled results.

Cocaine was identified in seventeen Brazilian species, such as *E. argentinum*, *E. citrifolium*, *E. cuneifolium* and *E. deciduum*, however the results were contradictory (Holmstedt *et al.*, 1977; Zuanazzi *et al.*, 2001; Bieri, Brachet, Veuthey, 2006). This may be due to the difference between the analytical techniques used, the seasonal period of collection, the collection site, the vegetative stage of the leaves (Docimo *et al.*, 2012) and also to the fact that some samples used have originated from herbariums, stored for up to 50 years.

It is observed that all researched species endemic of Brazil were positive for cocaine: *E. andrei*; *E. frangulifolium*; *E. gonocladum*; *E. laetevirens*; *E. pulchrum* and *E. subrotundum*. This allows to understand that the country besides being the center of the biodiversity of the genus, part of their species present the enzymatic apparatus necessary for the production of the metabolite.

Table I: Identification of the metabolite cocaine in Brazilian species

Brazilian species	Endemism	Presence of cocaine	Yield % in dry leaf	Reference
<i>E. amazonicum</i> Peyr.	Not endemic	+	NQ	Bieri et al., 2006
<i>E. andrei</i> Plowman	Endemic	+	0.001– 0.005	Bieri et al., 2006
<i>E. argentinum</i> O.E.Schulz	Not endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
		-	-	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. campestre</i> A.St.Hil.	Not endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
<i>E. cataractarum</i> Spruce	Not endemic	-	-	Holmstedt et al., 1977
<i>E. citrifolium</i> A.St.Hil.	Not endemic	+	NQ	Bieri et al., 2006
		-	-	Holmstedt et al., 1977
<i>E. coca</i> Lam.	Not endemic	+	0.51- 0,81	Plowman 1981
<i>E. coca</i> var <i>ipadu</i>	Not endemic	+	0.11- 0.41	UNODC, 2012
<i>E. cuneifolium</i> (Mart) O.E.Schulz	Not endemic	+	NQ	Bieri et al., 2006
		-	-	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. deciduum</i> A.St.Hil.	Not endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
		-	-	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. divaricatum</i> Peyr.	Not endemic	+	NQ	Bieri et al., 2006
<i>E. fimbriatum</i> Peyr.	Not endemic	+	0.0005– 0.001	Bieri et al., 2006
<i>E. frangulifolium</i> A.St.Hil	Endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
<i>E. gonocladum</i> (Mart) O.E.Schulz	Endemic	+	NQ	Bieri et al., 2006
<i>E. gracilipes</i> Peyr.	Not endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
		-	-	Holmstedt et al., 1977
<i>E. laetevirens</i> O.E.Schulz	Endemic	+	> 0.005	Bieri et al., 2006
<i>E. ligustrinum</i> var. <i>ligustrinum</i> D.C	Not endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
<i>E. macrophyllum</i> Cav.	Not endemic	-	-	Bieri et al., 2006
<i>E. microphyllum</i> A.St.-Hil.	Not endemic	-	-	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. pelleterianum</i> A.St.-Hil.	Not endemic	-	-	Zuanazzi et al., 2001
<i>E. pulchrum</i> A.St.Hil.	Endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
<i>E. subrotundum</i> A.St.Hil.	Endemic	+	0.0001– 0.0005	Bieri et al., 2006
<i>E. ulei</i> . O.E.Schulz	Not endemic	-	-	Holmstedt et al., 1977

(+): present; (-): absent; NQ: not quantified

Cocaine has also been identified in species not occurring in Brazil: *E. aff. impressum* (yield: 0.0005– 0.001%), *E. areolatum* (0.0005– 0.001%), *E. confusum* (not quantified), *E. cumanense* (not quantified), *E. densum* (not quantified), *E. novogranatense* (0.42- 1.02%) and *E. shatona* (0.0005– 0.001%) (Holmstedt *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1996; United Nations Office on Drugs and Crime, 2012; Bieri, Brachet, Veuthey, 2006; Casale, Mallette, Jones, 2014), totaling twenty four species producing the metabolite.

“Coca Plants” and Cocaine

Although the number of species that biosynthesize cocaine is relatively high, only two species, *E. coca* and *E. novogranatense*, are cocaine producers with economic importance for trafficking, which promotes the cultivation of these species, in Latin American countries, to produce the cocaine drug. The main varieties are *E. coca* var. *coca* with yields up to 0.96% and *E. novogranatense* var. *truxilense* with yields up to 1.02% in dried leaves (Bonilla and Fernández-Alonso, 2010; Casale, Mallette, Jones, 2014; Griffin and Lin, 2000; United Nations Office on Drugs and Crime, 2012).

Curiously, extracts of the *E. novogranatense* species were used by the food industry in the manufacture of coca drinks (Plowman, 1981; Maleš, 2017) and the cocaine legally consumed for recreational and therapeutic purposes. This glamorizing period made it possible, due to high consumption, the identification of the damages caused by cocaine such as toxicity, tolerance, dependence and death, triggered for its classification as a substance with international control, in 1961 by the Convention on Narcotic Substances (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012).

Cocaine is one of the main illicit drugs consumed, presents production estimated at 1,125 ton and 17.1 million users in the world (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). Promotes effects stimulant, toxic, fissure and loss of use control (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012; United Nations Office on

Drugs and Crime, 2016; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017), besides indirect effects as HIV transmission (Azima, Bontella, Strathdee, 2015; Beg, Strathdee, Kazatchkine, 2015).

Although cocaine is produced by plants of the coca, there is an important difference between the consumption of coca, the leaves are consumed in tea or chewed, and the consumption of the metabolite, the cocaine can be aspirated, smoked or injected. The first is inserted in a traditional use, does not cause relevant damage, known, to the user and society and even seems to demonstrate certain benefits due to the presence of nutrients (Biondich and Joslin, 2015; Nersesyan *et al.*, 2013; Penny *et al.*, 2009). For the second, it is related several serious consequences to the user and society (Beg, Strathdee, Kazatchkine, 2015; Manetti *et al.*, 2014).

Brazilian Legislation

Wrongly, the Brazilian legislation recognizes as banned only the species *Erythroxylum coca* (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria nº 344/ 1998; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 39/ 2012; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 8/ 2015). The prohibition occurs due the ability of biosynthesis of cocaine and of its precursors in adequate yields for trafficking, but such capacity also occurs by *E. novogranatense*, whose variety *truxilense* can cause greater accumulation of the metabolite than the proscribed species. Although there is a “legal” difference between the species *E. coca* and *E. novogranatense* both are called "coca" or "coca plants" (Davalos, 2016, Rincón-Ruiz, et al., 2016; United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).

In Brasil, the Decreto No. 154 of 1991 (Presidência da República, 1991) promulgated the result of the United Nations Convention Against Illicit Trafficking of the Narcotics and Psychoactive Substances of 1988, defining the expression "coca shrub" as any shrub of the genus *Erythroxylum*. This definition is not in accordance with the scientific knowledge about the genus and does not restrict only species that

produce high concentrations of cocaine, *E. coca* and *E. novogranatense* (Bonilla and Fernández-Alonso, 2010; Casale, Mallette, Jones, 2014; Garrido *et al.*, 2016; United Nations Office on Drugs and Crime, 2012). Moreover, does not distinguish of the other species of the genus, many still not chemically and toxicologically evaluated or whose accumulation of cocaine is very low or nonexistent.

In this convention, it was also prohibited the cultivation of "coca bushes" for narcotics purposes, which allows the cultivation for non-narcotic purposes. Although the non-prohibition is related, most likely, to the Andean countries where traditional coca consumption occurs, such as Bolivia and Peru, does not eliminate the possibility of cultivation and transportation of the *Erythroxylum novogranatense*, in Brazil, for not narcotics purposes, a fact that could mask illicit activities.

CONCLUSION

Therefore, evaluating the current Brazilian legislation on "proscribed plants" and the phytochemical studies of species of the genus, is relevant and necessary the addition of the specie *Erythroxylum novogranatense* in List E, "List of Proscribed Plants which May Result in Narcotic and/or Psychotropic Substances", of Annex I of the Portaria 344/ 1998, since there is no justification to the contrary.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks the financial support of CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

REFERENCES

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998. Aprova o regulamento Técnico sobre Substâncias e Medicamentos Sujeitos a Controle Especial.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada nº 39 de 9 de julho de 2012. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada nº 8 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências.

Azima T, Bontella I, Strathdee SA. Women, drugs and HIV. *Int J Drug Policy*. 2015, 26, S16–S21.

Beg M, Strathdee SA, Kazatchkine M. State of the art science addressing injecting drug use, HIV and harm reduction. *Int J Drug Policy*. 2015, 26, S1–S4.

Bieri S, Brachet A, Veuthey JL, Christen, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *J Ethnopharmacol*. 2006, 103, 439–447.

Biondich AS, Joslin JD. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med*. 2015, 26, 567-571.

Bonilla AG, Fernández-Alonso JL. Plantas de Coca en Colombia. Discusión crítica sobre la Taxonomía de las Especies Cultivadas del Género *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae). *Rev Acad Colomb Cienc*. 2010, 34, 456- 465.

Christen P. Tropane Alkaloids: Old Drugs Used in Modern Medicine. *Stud Nat Prod Chem*. 2000, 22, 717-749.

Cordell GA. Fifty years of alkaloid biosynthesis in *Phytochemistry*. *Phytochemistry*. 2013, 91, 29-51.

Cortella AR, Pochettino ML, Manzo A, Raviña G. *Erythroxylum coca*: Microscopical Identification in Powdered and Carbonized Archaeological Material. *J Archaeol Sci*. 2001, 28, 787-794.

Costa-Lima JL, Loiola MIB, Jardim JG. Erythroxylaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. *Rodriguésia*. 2014, 65, 659-671.

Davalos E. New answer to an old problem: Social investment and coca crops in Colombia. *Int J Drug Policy*. 2016, 31, 121-130.

De Albuquerque CH, Tavares JF, De Oliveira SL, Silva TS, Gonçalves GF, Costa VCO, *et al*. Flavonoides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). *Quim Nova*. 2014, 37, 663-666.

Docimo T, Reichelt M, Schneider B, Kai M, Kunert G, Gershenzon J, *et al*. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Mol Biol*. 2012, 78, 599-615.

- Garrido JMPJ, Borges F, Brett CMA, Garrido EMPJ. Carbon nanotube β -cyclodextrin-modified electrode for quantification of cocaine in seized street samples. *Ionics*. 2016, 22, 2511-2518.
- Görlitz D. The Occurrence of Cocaine in Egyptian Mummies - New research provides strong evidence for a trans-Atlantic dispersal by humans. *Diffusion-Fundamentals.org*. 2016, 26, 1-11.
- Griffin WJ, Lin GD. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 2000, 53, 623-637.
- Holmstedt B, Jäättmäa E, Leander K, Plowman T. Determination of cocaine in Some South American Species of *Erythroxylum* Using Mass Fragmentography. *Phytochemistry*. 1977, 16, 1753-1755.
- Loiola MIB, Cordeiro LS. *Erythroxylum sobroleanum* (Erythroxylaceae): A new species from Southeastern Brazil. *Phytotaxa*. 2014, 183, 56–60.
- Loiola MIB. Erythroxylaceae. In: Forzza, RC, *et al.* org. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, v. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio/ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2010. p. 959-962.
- Maleš Ž, Šoić D, Tušinec M, Bojić M. Stoljeće Coca-Cole: od Biljnih Droga do Svjetskog Brenda. *Farm Glas*. 2017, 73, 17-24.
- Manetti L, Cavagnini F, Martino E, Ambrogio A. Effects of cocaine on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *J Endocrinol Invest*. 2014, 37, 701-708.
- Naranjo P. Social Function of Coca in Pre-Columbian America. *J Ethnopharmacol*. 1981, 3, 161-172.
- Nersesyan A, Kundi M, Krupitza G, Barcelos G, Misík M, Wultsch G, *et al.* Induction of nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of coca chewers: results of a field study. *Arch Toxicol*. 2013, 87, 529-534.
- Penny ME, Zavaleta A, Lemay M, Liria MR, Huaylinas ML, Alminger M, *et al.* Can coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food Nutr Bull*. 2009, 30, 205–216.
- Plowman T. Amazonian coca. *J Ethnopharmacol*. 1981, 3, 195-225.
- Presidência da República (Brasil). Decreto nº 154 de 26 de junho de 1991. Promulga a Convenção das Nações Unidas Contra o Tráfico ilícito de Entorpecentes e Substância Psicoativas.
- Rincón-Ruiz A, Correa HL, León DO, Williams S. Coca Cultivation and Crop Eradication in Colombia: The Challenges of Integrating Rural Reality into Effective Anti-Drug Policy. *Int J Drug Policy*. 2016, 33, 56-65.
- Silva BMS, Cesarino F, Sader R, Lima JD. Germinação e Armazenamento de Sementes de Coca (*Erythroxylum ligustrinum* DC. - Erythroxylaceae). *Rev Bras Sementes*. 2008, 30, 25-29.
- United Nations Office on Drugs and Crime. UNODC. Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials (Revised and updated):

Manual for use by national drug analysis laboratories. Viena: United Nations publication; 2012.

United Nations Office on Drugs and Crime. UNODC. Pasta Básica de Cocaína: Cuatro décadas de historia, actualidad y desafíos. Lima: Forma e Imagen / Billy Víctor Odiaga; 2013.

United Nations Office on Drugs and Crime. UNODC. World Drug Report 2016. Viena, Austria: United Nations publication; 2016.

United Nations Office on Drugs and Crime. UNODC. World Drug Report 2017. Viena, Austria: United Nations publication; 2017.

Valdez LM, Taboada J, Valdez JE. Ancient Use of Coca Leaves in the Peruvian Central Highlands. *J Anthropol Res.* 2015, 71, 231-258.

Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochem Syst Ecol.* 2001, 29, 819–825.

**4.2 Dopaminergic activity of ethanolic extracts of dried leaves *Erythroxylum*
deciduum A.St.-Hil. in planarian-model**

Apresentação

A partir das informações que indicam a existência de atividade neuroquímica em *E. deciduum* e que planárias são utilizadas na avaliação desta atividade apenas com produtos puros, foi realizada adaptação da metodologia existente para possibilitar o uso dos vermes em estudos com extratos. Os resultados originaram o artigo intitulado “Dopaminergic activity of ethanolic extracts of dried leaves *Erythroxylum deciduum* A.St.-Hil. in planarian-model” o qual está formatado segundo as normas do *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.

O manuscrito foi encaminhado a respectiva revista e encontra-se em avaliação pelos revisores.

O extrato etanólico livre de compostos apolares de *Erythroxylum deciduum* ocasionou, em planárias, o aumento da velocidade de locomoção e a presença de movimentos atípicos padronizados, posição tipo C e hipercinesia tipo parafuso, efeitos característicos do aumento de neurotransmissão dopaminérgica. Os resultados ampliam as possibilidades do uso de planárias na busca por extratos ativos substituindo camundongos e ratos, principalmente em ensaios iniciais e demonstram que *E. deciduum* apresenta efeitos sobre a neurotransmissão de dopamina em modelo de planária.

**Dopaminergic activity of ethanolic extracts of dried leaves *Erythroxylum
deciduum* A.St.-Hil. in planarian-model**

Arno E. Hofmann Jr. ^{*1,2}; Adriane S. Ziembicki³; Andressa L. Dall´Agnol³; Jean Carlos Budke³; Claodomir Martinazzo⁴; Suzana B. Amato⁵; Renata P. Limberger^{*1}

¹Laboratory of Toxicology, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

²Laboratory of Pharmacognosy. Institute of Educational Development of Upper Uruguai, Campus II. Getúlio Vargas, Brazil.

³Laboratory of Pharmaceutical Chemistry. Integrated Regional University of Upper Uruguai and Missions. Erechim, Brazil.

⁴Exact and Earth Sciences. Integrated Regional University of Upper Uruguai and Missions. Erechim, Brazil

⁵Laboratory of Helminthology, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

*Correspondence:

Arno E. Hofmann Jr.: arnohofmann@ideau.com.br

Renata P. Limberger: renata@farmacia.ufrgs.br

Laboratory of Toxicology, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, 6º Andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Tel. +55 (51) 3308-5437

ABSTRACT: Planarians are worms of free life and present neurotransmitters similar to mammals such as dopamine, acetylcholine and serotonin, for this reason they are used in several toxicological studies, however only with isolated substances. Actually, there is no methodology for the use of these worms in studies with plant extracts, which causes the use of animals such as mice and rats in many researches. *Erythroxylum deciduum* A.St.-Hil. belongs to the genus of the “coca plants” (plants known for their stimulants effects through to interaction with neurotransmitters such as dopamine and noradrenaline), synthesizes ecgonine derivatives and present toxicity and death of sheep when consumed its leaves during the summer. With the objective of identification of the activity of *E. deciduum* about the dopamine neurotransmitter, it was necessary an adaptation of existing methodology for the use of worms in study with vegetal extract, and denominated “Escape Test”, the planarian were also evaluated on the locomotion speed. It was verified the presence of stereotyped behaviors characteristic of dopaminergic neurotransmission, as increased locomotion speed, "C-like position" and "screw-like hyperkinesia", caused by an extract of *E. deciduum*. The methodology adapted allows extends the possibilities of use of the planarians in the search for active extracts and leaves of *E. deciduum* present activity about dopaminergic system.

Key words: Alternative Method, Dopamine, Escape Test, *Erythroxylum deciduum*, Planarian, Toxicity.

INTRODUCTION

Planarians are non-parasitic worms, belong to the phylum *Platyhelminthes* and class Turbellaria, represent the most primitive example of centralization and cephalization of the nervous system (Pagán et al., 2013), possess mammalian-like neurotransmitters such as dopamine, acetylcholine, norepinephrine, serotonin, glutamate and GABA, besides opioid and cannabinoid receptors (Carolei et al., 1975; Umeda et al., 2005; Rawls et al., 2006; Buttarelli et al., 2008; Nishimura et al., 2010; Tallarida et al., 2014; Chan et al., 2016; Ross et al., 2017). These worms locomotion is related to dopamine and acetylcholine neurotransmitters. Dopamine is present at high concentration, its stimulation causes increased locomotion (Algeri et al., 1983; Buttarelli et al., 2008; Amaning-Kwarteng et al., 2017), the D1 receptors are related to the screw-like hyperkinesia and the D2 receptors to the C-like position (Palladini et al., 1980; Venturini et al., 1989; Palladini et al., 1996; Hagstrom et al., 2016). The acetylcholine is present in lower concentration and causes hypokinesia (Carolei et al., 1975; Buttarelli et al., 2008).

In this way, planarian has been used as an *in vivo* model for investigating mechanisms of toxicity involving neurotransmitters (Hagstrom et al., 2015; Hagstrom et al., 2016), many studies evaluate the locomotion speed (Raffa and Vadez, 2001; Talbot and Schötz, 2011; Bach et al., 2016) and the standardized stereotyped movements, screw-like hyperkinesia and C-like position (Palladini et al., 1996; Owaisat et al., 2012), among others.

When in the presence of aggressive compounds, planarians detect them most likely by a system of detection of xenobiotics which causes an escape behavior or

mucus production (Kolasa, 2001; Ribeiro and Umbuzeiro, 2014), if the planarian does not develop the escape, its death will occur, which is identified through the disintegration of its body (Buchanan, 1935; Hagstrom et al., 2016).

Besides of the promissor profile of this model in toxicological studies, avoiding vertebrates in toxicological evaluation through the possibility of a bio-guided screening before toxicological assay, is observed that toxicological studies carried in planarians occur only with pure products (Raffa and Desai, 2005; Hutchinson et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Ouyang et al., 2017) which demonstrates the scarcity of methods for the evaluation of extracts with these worms. A number of plant extracts could be screened by planarian model in order to indicate it is possibility of nervous system activity.

The most known species of the *Erythroxylum* genus are the "coca plants", *E. coca* and *E. novogranatense*, because they biosynthesize the cocaine, a natural stimulant with action about the neurotransmitter dopamine (UNODC, 2012; 2017; Siciliano et al., 2016), besides other alkaloids of ecgonina nucleus that contribute for the effects of coca and coca paste consumption (Novák et al., 1984; Silva Junior et al., 2012). In *E. deciduum* were identified alkaloids of ecgonina nucleus (Zuanazzi et al., 2001; Bieri et al., 2006) and the effects of tachycardia, accelerated respiration and death, in sheep, when its leaves are consumed during the summer (Colodel et al., 2004; Borelli et al., 2011). This effects, suggest an increase in neurotransmission, for example of dopamine, such occurs with the species of "coca".

Considering the absence of methodology for use of planarians with plants extracts, in search of new sources of active compounds on the system dopaminergic,

and the possibility of *E. deciduum* exhibit effects on this system, the planarian model was adapted through of Escape Test for the evaluation of the effects of an extract of the *E. deciduum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Leaves of *E. deciduum* were collected during the summer in geographical coordinates 27°39'03.6"S 52°17'56.3"W, Erechim city, north of the Rio Grande do Sul state, Brazil, in transition region between Mixed Ombrophilous Forest and Seasonal Semideciduous Forest. The plant material was identified by the botanist Prof. Dr. Jean Carlos Budke.

The leaves were separated from the branches, dried at a temperature below 40 °C, disintegrated, washed with dichloromethane in a soxhlet extractor, for approximately 1 hour, and after submitted to extraction with ethanol, in exhaustive mode for approximately 2.5 hours. The solvent was removed on rotary evaporator under reduced pressure with temperature below 40 °C and the remainder extract maintained in desiccator to constant weight, resulting in the extract denominated EDV. Afterwards it was stored under nitrogen atmosphere, in freezer, until the moment of use.

The study was developed with leaves of *E. deciduum* collected during the summer because toxic effects occur in summer and the use of ethanol, as solvent extractor, because all alkaloids ecgonine type are soluble in this solvent (Rivier, 1981).

Toxicological Evaluation

Once test sample consists of a complex mixture, a extract, for eliminate the stereotyped behaviors, mucus production, escape and death, interferences on the study of the locomotion speed, it was necessary to adapt the existing methodology to identify the concentration which not cause these behaviors, being denominated "Escape Test".

Experimental Animals

Planarians of the species *Dugesia tigrina* were kept in artificial well water in plastic containers protected from light and at a temperature of 20 °C (± 2 °C), were fed with raw bovine liver once a week and with water exchange after feeding (Venturini et al., 1989; Palladini et al., 1996; Owaisat et al., 2012; Yang et al., 2017). For the tests were used planarians with 2-3 cm, presents on the bottom of containers and after 4 days of feeding.

Escape Test

A series of dilutions with the extract EDV, from a concentration of 1% in artificial well water, were evaluated using five planarians for each concentration. Each planarian was used only once; they were transferred gently with a brush and stored individually, in the dark, in microtubes with lid, filled up to 2/3 of the capacity. It was observed every 5 minutes, for 1 hour, the presence of: escape behavior, mucus secretion, standard atypical movements (posture C-like and hyperkinesia screw-like), non-standard atypical movements and death. The concentration in which these effects were not verified, in the five planarians, during 1 hour, it was used in the evaluation of the locomotion speed. It was also observed and noted the times and the number of worms that presented standardized atypical behaviors of posture C-like and

hyperkinesia screw-like, because these behaviors help in identifying the neurotransmitter involved.

Evaluation of Locomotion Speed Planarians

The evaluation of the locomotion speed in planarian was based on several studies (Palladini et al., 1996; Raffa and Valdez, 2001; Pagán et al., 2009 and Baker et al., 2011). Planarians were kept individually in microtubes containing artificial well water for approximately one hour and in the dark. After wards they were gently transferred with help of brush to plastic Petri dishes with 10 cm diameter, disposed on squared paper with lines spaced at 0,5 cm distance, containing 15 ml of artificial well water (control group) or of *E. deciduum* extract (test group), in a well-lit room and temperature of 20 °C (± 2 °C). Ten planarians for each of the groups were used, filmed for 10 minutes and analyzed subsequently. Locomotion speed was quantified as the number of lines crossed or recrossed per minute with the averages accumulated in the time of 10 minutes. Each planarian was used only once, being always manipulated delicately and in isolation. The tests were developed in two consecutive days, from 11 to 16 hours, avoiding interference of the circadian cycle on the results.

Statistical analysis

The increase in locomotion speed in relation to the control group was evaluated with Mann-Whitney non-parametric hypothesis test.

RESULTS

The planarian methodology denominated “Escape Test”, allowed the use of the worms in toxicology study with plant extract, more especially, ethanolic extract apolar compounds free of dried leaves of the *E. deciduum* collected during the summer, and identified the concentration of the extract to be used in the evaluation of the speed of locomotion.

Through "Escape Test" was possible to verify, by the presence of escape behavior and mucus production, that in a concentration equal or greater to 0.05% the *E. deciduum* ethanolic extract free apolar compounds is aggressive to planarians and causes stereotyped behaviors that interfere in the evaluation of the speed of locomotion, **Table 1**. Therefore, the concentration of 0.025% was used in the evaluation of the speed of locomotion, since it does not cause stereotyped behavior and therefore the test group was denominated EDV 0.025%. The ethanolic extract apolar compounds free of dried leaves used in this work presented pH within 5.0-7.0 range, which does not interfere in the normal planarian behavior (Pagán et al., 2009; Rawls et al., 2010).

Table 1: Results obtained in Escape Test for the last two concentrations, of ethanolic extract free apolar compounds of dried leaves of the *E. deciduum* collected during the summer, which originated atypical behavior in planarian. N= 4 planarian/ concentration.

Effects Verified	Planarian [0.1%]	Planarian [0.05%]	Planarian [0.025%]
Death	-	-	-
Behavior of escape	P ₁ (5)	-	-
Presence of mucus	P ₅ (10-60)	P ₄ (35-60); P ₁ (45-60)	-
Non-standard movement	-	P ₁ (45-60); P ₃ (60)	-
Movements “Screw-like”	P ₃ (10-60); P ₂ (15-55)	P ₂ (45-55)	-
Position “C-like”	P ₅ (60)	-	-

[]: test concentration; Subscript: number of planarians that the event presented; (): Time or time range, in minutes, that the event was observed; -: event not observed

The median speed of locomotion originated by the Control and EDV 0.025% groups in planarians is shown in **Figure 1**. The figure shows some measures such as

the first and third quartiles and extreme values for each treatment. It is important to highlight the difference in average displacements between the treated group and the control group. We chose to present the median in detriment of the mean, because the groups present heterogeneous variances, making impossible the application of parametric tests based on the mean and standard deviation.

The EDV 0.025% group presented a significant increase in locomotion speed in relation to the control group ($p = 0.016$) in Mann-Whitney non-parametric hypothesis test.

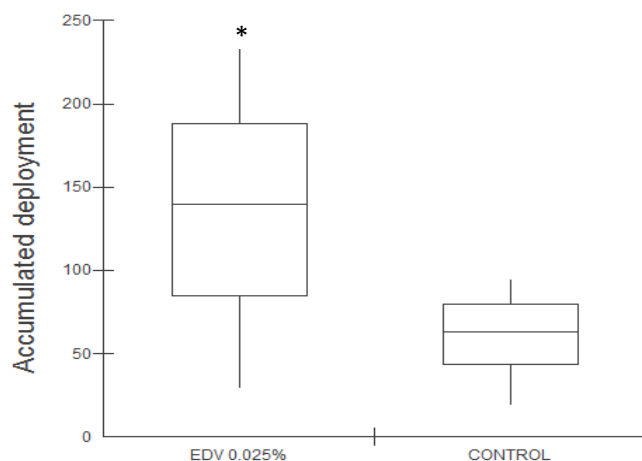


Figure 1: Displacement per minute of the controls and EDV 0.025% Groups, in time of 10 minutes. Significant increase in locomotion speed in relation to the control group ($p = 0.016$) in Mann-Whitney non-parametric hypothesis test. EDV 0.025%: Extract Ethanolic apolar compounds free of dried leaves of the *E. deciduum* collected during the summer at concentration of 0.025% in artificial well water

DISCUSSION

Behavioral researches developed in planarian method occur with isolated products (Tallarida et al., 2014; Bach et al., 2016; Nayak et al., 2016; Amaning-Kwarteng et al., 2017). In our study we used a complex mixture, an extract, where the

sum of the individual effects of each metabolite is observed, which may be toxic, innocuous or active.

The escape test allowed to identify the concentration in which the events that may interfere on the evaluation of the locomotion speed are not present, allowing the originality of the results.

This adaptation was necessary, because when we evaluated the effect of *E. deciduum* extract on the speed of locomotion, in a preliminary study with the current methodology available, the worms presented stereotyped behaviors, mucus production, escape or death. What interferes in the evaluation of the speed of locomotion and makes the study impossible.

The extract of *E. deciduum* originated, in concentration equal or greater to 0.05%, standardized atypical behaviors characteristic of dopaminergic agonists, screw-like hyperkinesia and C-like position (Palladini et al., 1980; Venturini et al., 1989; Palladini et al., 1996; Rafa et al. 2001; Owaisat et al., 2012; Pagán et al., 2013; Hagstrom et al., 2016). These movements, although verified in the aggressive concentration to worms, demonstrated that the escape test allows the identification of standardized atypical behaviors, suggesting that *E. deciduum* is a precursor of active metabolites on D1 and D2 receptors of planarian.

The locomotion of planarians is related to the increase of dopaminergic neurotransmission (Venturini et al., 1989; Raffa et al., 2001; Baker et al., 2011; Hagstrom et al., 2016). Thus, the significant increase of the speed of locomotion ($p = 0.016$), caused by the EDV 0.025% group, suggests to the presence of dopaminergic agonist activity in *E. deciduum*, corroborating the results obtained in the escape test.

The escape test, besides identifying the concentration to be used in the evaluation of the locomotion speed of planarian, provides a better understanding of the activities of the extract, by enabling the identification of behavioral events.

Because *E. deciduum* synthesizes alkaloids of ecgonine nucleus (Zuanazzi et al., 2001; Bieri et al., 2006; Oliveira et al., 2010), characteristic present in coca plants (Casale et al., 2014) and also responsible for the effects of consumption of the leaf, tea and coca paste (Novák et al., 1984; Silva Junior et al., 2012), it is possible to propose to alkaloids the responsibility for the effects produced in planarians.

The methodology used made it possible to identify the presence of dopaminergic agonist activity in *Erythroxylum deciduum*, what explain, at least in part, the effects reported as a sensation of well being, tachycardia and ease of breathing with the use of tea from its leaves.

Lastly, the study also demonstrates that planarians can be used as an experimental model "in vivo" in the evaluation of extracts and not only with isolated products, and corroborates with other studies (Pagán et al., 2013; Hagstrom et al., 2015), as an alternative methods to the use animal, mice and rats, mainly because it does not involve ethical issues. Favoring the search for active extracts on neural systems, as dopaminergic and thus helping the discovery of new sources of treatment for Parkinson disease, schizophrenia and addiction, diseases involving this neurotransmitter.

CONCLUSION

The adapted methodology, through of “Escape Test” (identification of the concentration of the vegetable extract which does not originate stereotyped behaviors, mucus production, escape or death), allows to conclude that planarians are an alternative to the use of animals in the search for active extracts and in toxicity studies. It allows the use of extracts in the evaluation of the locomotion speed of the planaria and in the identification of standardized behaviors characteristics of dopaminergic neurotransmission. Leaves of *Erythroxylum deciduum*, collected in the summer, present activity on dopaminergic system.

CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors have any conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks the financial support of CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil).

REFERENCES

Algeri S, Carolei A, Ferretti P, Gallone C, Palladini G, Venturini G. 1983. Effects of dopaminergic agentes on monoamine levels and motor behaviour in planaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 74C, 27-29.

- Amaning-Kwarteng AO, Asif-Malik A, Pei Y, Canales JJ. 2017. Relapse to cocaine seeking in an invertebrate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 157, 41-46.
- Bach DJ, Tenaglia M, Baker DL, Deats S, Montgomery E, Pagán OR. 2016. Cotinine antagonizes the behavioral effects of nicotine exposure in the planarian *Girardia tigrina*. *Neurosci. Lett.* 632, 204-208.
- Baker D, Deats S, Boor P, Pruitt J, Pagán OR. 2011. Minimal structural requirements of alkyl γ -lactones capable of antagonizing the cocaine-induced motility decrease in planarians. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 174-179.
- Bieri S, Brachet A, Veuthey JL, Christen P. 2006. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *J. Ethnopharmacol.* 103, 439-447.
- Borelli V, Lentz D, Veronezi LO, Da Silva TCE, Kaufer L, Traverso SD, Gava A. 2011. Intoxicação espontânea e experimental por folhas e frutos de *Erythroxylum deciduum* (cocão) em ovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesqui. Vet. Bras.* 31, 213-218.
- Buchanan JW. 1935. An analysis of physiological states responsible for antero-posterior disintegration in *Planaria dorotocephala*. *Protoplasma.* 22, 497-512.
- Buttarelli FR, Pellicano C, Pontieri FE. 2008. Neuropharmacology and behavior in planarians: Translations to mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 399-408.
- Carolei A, Margotta V, Palladini G. 1975. Proposal of a new model with Dopaminergic-Cholinergic Interactions for Neuropharmacological Investigations. *Neuropsychobiology.* 1, 355-364.
- Casale JF, Mallette JR, Jones LM. 2014. Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production. *Forensic. Sci. Int.* 237, 30-39.
- Chan JD, Grab T, Marchant JS. 2016. Kinetic profiling an abundantly expressed planarian serotonergic GPCR identifies bromocriptine as a perdurant antagonist. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.* 6, 356-363.
- Colodel EM, Seitz AL, Schmitz M, Borba MR, Raymundo DL, Driemeier D. 2004. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* em Ovinos. *Pesqui. Vet. Bras.* 24, 165-168.
- De Costa-Lima JL, Loiola MIB, Jardim JG. 2014. Erythroxylaceae of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rodriguésia.* 65, 659-671.
- Hagstrom D, Escartin OC, Zhang S, Khuu C, Collins EMS. 2015. Freshwater Planarians as an Alternative Animal Model for Neurotoxicology. *Toxicol. Sci.* 147, 270-285.
- Hagstrom D, Escartin OC, Collins EMS. 2016. Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology. *Regeneration.* 3, 65-77.
- Hutchinson CV, Prados J, Davidson C. 2015. Persistent conditioned place preference to cocaine and withdrawal hypo-locomotion to mephedrone in the flatworm planaria. *Neurosci. Lett.* 593, 19-23.
- Kolasa J. 2001. Flatworms: Turbellaria and Nemertea. In Thorp JH, Covich AP (Eds.). *Ecology and classification of north American freshwater invertebrates* 2nd Edition. San Diego: Academic Press, pp. 155-180.
- Nayak S, Roberts A, Bires K, Tallarida CS, Kim E, Wu M, Rawls SM. 2016. Benzodiazepine inhibits anxiogenic-like response in cocaine or ethanol withdrawn planarians. *Behav. Pharmacol.* 27, 556-558.

- Nishimura K, Kitamura Y, Taniguchi T, Agata K. 2010. Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*. 168, 18-30.
- Novák M, Salemink CA, Khan I. 1984. Biological Activity of the Alkaloids of *Erythroxyllum coca* and *Erythroxyllum novogranatense*. *J. Ethnopharmacol.* 10, 261-274.
- Oliveira SL, da Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG, Lucena HFS, Romero MAV, Barbosa-Filho JM. 2010. Tropane Alkaloids from *Erythroxyllum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. *Chem. Biodiversity.* 7, 302-326.
- Ouyang K, Nayak S, Lee Y, Kim E, Wu M, Tallarida C, Rawls SM. 2017. Behavioral effects of Splenda, Equal and sucrose: Clues from planarians on sweeteners. *Neurosci. Lett.* 636, 213-217.
- Owaisat S, Raffa RB, Rawls SM. 2012. In vivo comparison of harmine efficacy against psychostimulants: Preferential inhibition of the cocaine response through a glutamatergic mechanism. *Neurosci. Lett.* 525, 12-16.
- Pagán OR, Deats S, Baker D, Montgomery E, Wilk G, Tenaglia M, Semon J. 2013. Planarian Require an intact brain to behaviorally react to cocaine, but not to react to nicotine. *Neuroscience.* 246, 265-270.
- Pagán OR, Rowlands AL, Fattore AL, Coudron T, Urban KR, Bidja AH, Eterovic VA. 2009. A cembranoid from tobacco prevents the expression of nicotine-induced withdrawal behavior in planarian worms. *Eur. J. Pharmacol.* 615, 118–124.
- Palladini G, Margotta V, Carolei A, Hernandez MC. 1980. Dopamine agonist performance in *Planaria* after manganese treatment. *Experientia.* 36, 449-450.
- Palladini G, Ruggeri S, Stocchi F, De Pandis MF, Venturini G, Margotta V. 1996. A Pharmacological Study of Cocaine Activity in *Planaria*. *Camp. Biochem. Physiol.* 115C, 41-45.
- Plowman T. 1976. Orthography of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae). *Taxon.* 25, 141-144.
- Raffa RB, Holland LJ, Schulingkamp RJ. 2001. Quantitative Assessment of Dopamine D2 Antagonist Activity using invertebrate (*Planaria*) Locomotion as a Functional Endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 45, 223-226.
- Raffa RB, Desai P. 2005. Description and quantification of cocaine withdrawal signs in *Planaria*. *Brain Res.* 1032, 200-202.
- Raffa RB, Valdez JM. 2001. Cocaine withdrawal in *Planaria*. *Eur. J. Pharmacol.* 430, 143–145.
- Rawls SM, Gomez T, Stagliano GW, Raffa RB. 2006. Measurement of glutamate and aspartate in *Planaria*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 53, 291-295.
- Rawls SM, Patil T, Yuvasheva E, Raffa RB. 2010. First evidence that drugs of abuse produce behavioral sensitization and cross-sensitization in planarians. *Behav. Pharmacol.* 21, 301–313.
- Ribeiro AR, Umbuzeiro GA. 2014. Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina*. *Env. Sci. Eur.* 26, 22.
- Rodrigues ACM, Henriques JF, Domingues I, Golovkko O, Zlábek V, Barata C, Soares AMVM, Pestana JLT. 2016. Behavioural responses of freshwater

- planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquat. Toxicol.* 170, 371-376.
- Ross KG, Currie KW, Pearson BJ, Zayas RM. 2017. Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. *Dev. Biol.* 6. 10.1002/wdev.266.
- Silva Junior RC, Gomes CS, Goulart Junior SS, Almeida FV, Grobério TS, Braga JWB, Zacca JJ, Vieira ML, Botelho ÉD, Maldaner AO. 2012. Demystifying “oxi” cocaine: Chemical profiling analysis of a “new Brazilian drug” from Acre state. *Forensic. Sci. Int.* 221, 113-119.
- Talbot J, Schötz EM. 2011. Quantitative characterization of planarian wild-type behavior as a platform for screening locomotion phenotypes. *J. Exp. Biol.* 214, 1063-1067.
- Tallarida CS, Bires K, Avershal J, Tallarida RJ, Seo S, Rawls SM. 2014. Ethanol and cocaine: Environmental place conditioning, stereotypy and synergism in planarians. *Alcohol.* 48, 579-586.
- Umeda S, Stagliano GW, Borenstein MR, Raffa RB. 2005. A reverse-phase HPLC and fluorescence detection method for measurement of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in *Planaria*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 51, 73-76.
- UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. 2012. *Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials (Revised and updated): Manual for use by national drug analysis laboratories*. New York: United Nations.
- UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. 2017. *World Drug Report 2017*. Viena: United Nations.
- Venturini G, Stocchi F, Margotta V, Ruggieri S, Bravi D, Bellantuono P, Palladini G. 1989. A pharmacological study of dopaminergic receptors in *Planaria*. *Neuropharmacology.* 28, 1377-1382.
- Yang X, Kaj KJ, Schwab DJ, Collins EMS. 2017. Coordination of size-control, reproduction and generational memory in freshwater planarians. *Phys. Biol.* arXiv:1703.04788v1.
- Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. 2001. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* 29. 819–825.

**4.3 Effect of Seasonality on Antibacterial and Antioxidant Activity of
Erythroxylum argentinum O. E. Schulz and *Erythroxylum deciduum* A. St. Hil.**

Apresentação

O artigo intitulado “Effect of Seasonality on Antibacterial and Antioxidant Activity of *Erythroxylum argentinum* O. E. Schulz and *Erythroxylum deciduum* A. St. Hil.” apresenta os resultados da investigação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos éter de petróleo, diclorometano, etanólico e aquoso das folhas de *E. argentinum* e *E. deciduum* coletadas durante o verão e o inverno.

E. argentinum e *E. deciduum* demonstraram atividades antimicrobiana e antioxidante, as quais variam entre o período de coleta, verão/ inverno. *Erythroxylum argentinum* possui potencial para uso clínico contra *S. aureus*.

O manuscrito está formatado para o World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences e se encontra ceito para publicação (**Anexo 2**).

**EFFECT OF SEASONALITY ON ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF *ERYTHROXYLUM ARGENTINUM* O. E. SCHULZ AND
ERYTHROXYLUM DECIDUUM A. ST. HIL.**

Arno Ernesto Hofmann Junior^{1,2,3*}; Janaina Tomazin³; Bruna Maria Saorin Puton³;
Rogério Luís Cansian³; Jean Carlos Budke³; Neiva Aparecida Grazziotin³; Renata
Perreira Limberger^{1*}

¹Toxicology Laboratory, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Pharmacognosy Laboratory. Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto
Uruguai, Campus II, Getúlio Vargas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³Biotechnology Laboratory. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das
Missões. Erechim, Rio Grande do Sul Brasil.

*Address for correspondence:

Arno E. Hofmann Jr. - arnohofmann@ideau.com.br

Renata P. Limberger - renata@farmacia.ufrgs.br

Abstract: The genus *Erythroxylum* P. Browne presents about 240 species in pantropical distribution and the Brazil is the diversity center, with 114 species. The antimicrobial and antioxidant activities were identified for several species of the genus. In the Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, South of Brazil, occur mainly *E. argentinum* O. E. Schulz e *E. deciduum* A. St. Hil, in both the presence of some metabolites and the toxicity presented variation with the seasonality. Therefore, the influence of climatic stations, summer and winter, on the antimicrobial and antioxidant activities were investigated for different extracts of this species. The study demonstrates which the activities are influenced by climatic stations, the ethanolic extracts were the most actives for the activities investigated and *E. argentinum*, collected in the summer, presented potential for the discovery of antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Seasonality, antimicrobial, antioxidant, *Erythroxylum*.

INTRODUCTION

The genus *Erythroxylum* P. Browne belongs to the family Erythroxylaceae Kunth, present pantropical distribution, comprises about 240 species^{1,2,3} and Brazil is center of diversity and endemism of the genus⁴. In the Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, southern Brazil, the most common species of the genus are *Erythroxylum argentinum* O. E. Schulz and *Erythroxylum deciduum* A. St. Hil. representing about 46% of collections present in Brazilian herbariums and museums. Information obtained through by evaluating the *speciesLink* system (www.splink.org.br).

The genus present important antimicrobial (*E. coca*⁵, *E. suberosum*⁶, *E. caatinga*⁷, *E. delagoense*, *E. emarginatum*, *E. pictum*⁸, *E. catuaba*⁹) and antioxidant (*E. sideroxyloides*¹⁰, *E. mummularia*¹¹, *E. monogynum*¹², *E. suberosum*¹³) activities.

E. argentinum present local anesthetic, anti-inflammatory and antimicrobial activities^{14,15,16} and *E. deciduum* demonstrated cytotoxicity activity¹⁷. Both species cause toxicity of sheep when consumed during the summer, a fact that does not occur when consumed in the winter^{18,19,20}, chemically, present flavonoids^{15,17,21}, alkaloids^{22,23,24} and diterpenes²⁵. The biosynthesis of metabolites in *Erythroxylum* genus can be influenced by climatic variations and developmental stage^{26,27}.

Therefore, the aim of this work was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the *E. argentinum* O. E. Schulz and *E. deciduum* A. St. Hil. collected in two different climatic seasons, summer and winter, in Southern of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Collection and Preparation of Extracts

The *E. argentinum* and *E. deciduum* were collected in Brazil, during the summer and winter, respectively in Dense Ombrophylous Forest (27°26'24.0"S 48°22'07.2"W) Santa Catarina state and in transition region between Mixed Ombrophilous Forest and Seasonal Semideciduous Forest (27°39'03.6"S 52°17'56.3"W) Rio Grande do Sul state.

The leaves were separated of the branches, dried, disintegrated and the extracts obtained by exhaustive extraction in a soxhlet apparatus using in increasing polarity the solvents: petroleum ether, dichloromethane, ethanol and ending with the passage of distilled water, the extractions occurred for about one - two hours. The extracts were concentrated and kept in desiccator until constant weight.

Evaluation of Antimicrobial Activity

For the antibacterial activity it were used standard strains of *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

The antibacterial activity and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were determined *in vitro* by agar disc-diffusion method and microdilution in broth^{28,29}. To

antibacterial activity the microorganisms were standardized with an optical density of McFarland 0.5, corresponds to a concentration of approximately 10^8 UFC/mL, which was transferred to Petri dish with Mueller-Hinton agar. Discs of barren paper (6mm) were impregnated with 10 μ L of the solvents used in the extraction (negative control) or of the solution 100 mg/mL of the petroleum ether, dichloromethane, ethanol or water extracts from the leaves of *E. argentinum* and *E. deciduum* collected in winter and summer. After placing the discs, the plates were incubated for 18–24 hours at 35°C. It was named sensitive when the inhibition halo was equal to or greater than 7 mm and resistant when occurred no inhibition halo²⁹.

The MIC was considered the lowest concentration of extract that no microbial growth occurred. In microplates of 96 wells, each well received 100 μ L Mueller-Hinton broth, 100 μ L extract and a suspension of 10^4 UFC/well of the microorganism. The negative control occurred employing only broth and extract and to positive control only suspension of microorganism and broth. The experiments were performed in triplicate²⁸.

Evaluation of Antioxidant Activity

The methodology performed is based on the extent of the extinction of the radical absorption 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in spectrophotometer at 515 nm, the determination occurred in UV-Visible spectrophotometer brand Agilent Technologies, model 8453E. After the evaluation of the ideal concentration range, was calculated the concentration of extracts required to capture 50% of the DPPH free radical (EC50) by linear regression analysis³⁰. The experiments were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial Activity

The results of the antibacterial activity of different leaves extracts of *E. argentinum* and *E. deciduum*, collected from two different climatic seasons, summer and winter, using the disc diffusion method, are presented in **Table 1**.

Table 1: Antibacterial activity, in disc diffusion method, of the extracts of leaves of *Erythroxylum deciduum* and *Erythroxylum argentinum* collected in winter and summer using 10 µL of a solution at a concentration close to 100 mg/mL

Microorganisms	Extracts								
	EP		CH ₂ Cl ₂		EtOH		H ₂ O		
	W	S	W	S	W	S	W	S	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	A(8)	D(7) A(9)	D(9) A(10)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	D(8)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	-	A(8)	D(8) A(9)	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	A(8)	A(8)	D(8) A(10)	D(9) A(12)	A(8)	A(8)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	A(8)	A(11)	-	-	-

-: Resistent, A: sensible to *E. argentinum*. D: sensible to *E. deciduum*. (): Diameter of the halo of inhibition of microbial growth in millimeter, EP: extract petroleum ether, CH₂Cl₂: extract dichloromethane, EtOH: extract ethanolic, H₂O: extract water, W: collect in winter, S: collect in summer

E. argentinum and *E. deciduum* showed antibacterial activity against *E. faecalis*, *S. choleraesuis* and *S. aureus*. For *P. mirabilis* only *E. deciduum* was active and for *S. epidermidis* only *E. argentinum*. Similar to our results, *E. caatinga* demonstrates activity against *S. aureus* and *E. faecalis* and shows no activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*⁷.

The antibacterial activity, in disc diffusion method, of extracts leaf of *E. deciduum* and *E. argentinum* demonstrate that the seasonality, winter/ summer, interferes about this activity of the species, being more active in the summer. The ethanolic extracts produces more inhibition haloes against the microorganisms studied as the study in *E. delagoense*, *E. emarginatum* and *E. pictum*⁸. The apolar extracts present low or no antibacterial activity, characteristic also observed in other species of genus as *E. caatinga* and *E. suberosum*^{6,7}.

The active extracts in disc diffusion method (zone of inhibition > 7 mm) were evaluated by broth microdilution method, the values MIC obtained are shown in **Table 2** and **Table 3**.

Table 2: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in mg/mL of extracts dichloromethane, ethanolic and aqueous of leaves of *Erythroxylum argentinum*, collect in winter and summer

Microorganisms	CIM (mg/mL) – W			CIM (mg/mL) – S		
	CH ₂ Cl ₂	EtOH	H ₂ O	CH ₂ Cl ₂	EtOH	H ₂ O
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	6.25	-	12.537	3.125	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	12.5	-	-	3.125	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.331	3.125	6.287	6.269	0.78125	3.147
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	12.5	-	-	3.125	-

CH₂Cl₂: extract dichloromethane, EtOH: ethanolic extract, H₂O: water extract, (W): collect in winter, (S): collect in summer and (-): not evaluated

Table 3: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in mg/mL of ethanolic extracts from leaves of *Erythroxylum deciduum*, collect during winter and during the summer

Microorganisms	CIM (mg/mL) - W	CIM (mg/mL) – S
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.252	3.138
<i>Proteus mirabilis</i>	-	12.552
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	6.276
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.126	3.138

(W): collect in winter and (S): collect in summer and (-): not evaluated

According to De Wet⁸ and Van Vuuren³¹, extracts with MIC value below 8 mg/mL are considered active and below 1mg/mL true antimicrobials. In this way, the species evaluated demonstrated antibacterial activity and potential for the discovery of antimicrobial molecules, being *E. argentinum*, collected in summer, the most promising, MIC= 0.78125 mg/mL against *S. aureus*.

S. aureus was the microorganism most sensitive to extracts, this result is important because the bacterium is the main human pathogen, responsible for serious infections, increasing resistance to antimicrobials and their clinical spectrum of diseases to be mutable³², so finding new sources for their treatment is important.

The absence of activity against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* in our study with *E. argentinum* corroborate the results of Tomesi¹⁴ for the same species. However occurs divergence on *S. aureus*, which may originate from the collection period or other edaphoclimatic factors or error in identification of the species.

Practically all extracts collected in summer presented more antimicrobial activity than the respective extracts collected in winter. These differences demonstrate the seasonal influence in the biosynthesis of compounds responsible for the activity in these plants, being more synthesized/accumulated in summer.

The extracts tested were more active on gram positive, the result is in agreement with other studies that demonstrate the gram negative as the more resistant to the action of the vegetal extracts^{6,33,34}. This may be related with the presence of lipoproteins in the membrane, which causes deficiency in the penetration and thus inactivity or reduction of activity³⁵. Ethanolic extracts were active against the gram negative *S. choleraesuis* and *P. mirabilis*, which suggests the production of metabolites with capacity to transpose the lipoproteins or present an alternative mechanism of action or penetration.

It is observed that almost all studies do not present information about the seasonality and the collection site, which impairs the comparison between studies once antimicrobial activity may vary between summer and winter.

Antioxidant Activity

The results obtained of the antioxidant activity, in the form of EC50, of the different extracts of the *E. argentinum* and *E. deciduum* collected in two climatic seasons, summer and winter, are presented in **Table 4**.

Table 4: Antioxidant activity presented as EC50 of extracts leaves of *Erythroxylum argentinum* and *Erythroxylum deciduum* collected in winter and summer

Species	collect	EC50 (mg/mL)			
		EP	CH ₂ Cl ₂	EtOH	H ₂ O
<i>Erythroxylum argentinum</i>	Summer	0.96	0.05	0.03	0.04
	Winter	0.44	0.10	0.02	0.07
<i>Erythroxylum deciduum</i>	Summer	0.99	1.16	0.04	0.10
	Winter	0.65	0.24	0.04	0.13

EP = petroleum ether extract; *CH₂Cl₂* = dichloromethane extract; *EtOH* = ethanolic extract and *H₂O* = water extract

The polar extracts of *E. argentinum* and *E. deciduum* presented antioxidant activity and the ethanolic extracts were the most active, similar to the results found in

*E. cuneatum*³⁵. The apolar extracts presented low antioxidant activity, similar to others studies with species of the genus³⁶, however the dichloromethane extract of *E. argentinum*, collected in summer, had an interesting antioxidant activity. The seasonality does not present important influence on the antioxidant activity of ethanolic extracts of *E. argentinum* and *E. deciduum*, but in the water extracts, this influence occurs.

The antioxidant activity of *E. monogynum*, EC50= 0.05 mg/mL, is responsible for protection of the plant against hepatic damage^{12,37}, therefore *E. argentinum*, EC50= 0.02 mg/mL, and *E. deciduum*, EC50= 0.04 mg/mL, present potential for therapeutic use as antioxidants.

Due to antioxidants present several therapeutic properties such as anti-inflammatory, anticancer and vasodilator¹⁰, the species, *E. argentinum* and *E. deciduum*, also demonstrate are possible source of the news pharmaceutical molecules in the market.

CONCLUSION

Erythroxylum argentinum and *Erythroxylum deciduum* present antioxidant and antimicrobial activity, especially against gram positive bacteria and *Erythroxylum argentinum* present potential for clinical use against *S. aureus*.

The antimicrobial and antioxidant activities of the species evaluated present variation with the seasonality, this demonstrate the need for inform this period of collect in publications, since an interesting activity may not be verified due the influence of the seasonality.

FUNDING

The authors thanks the financial support of CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil).

REFERENCES

- 1- Cronquist A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden. 1988.
- 2- Souza VC, Lorenzi H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª Edição, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2012.
- 3- Costa-Lima JL, Loiola MIB, Jardim JG. Erythroxylaceae of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rodriguésia*, 2014; 65: 659-71.
- 4- Lucas-Filho MD, Silva GC, Cortes SF, Mares-Guia TR, Ferras VP, Serra CP, Braga FC. ACE Inhibition by Astilbin Isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. *Phytomedicine*, 2010; 17: 383-7.
- 5- Ventura G, Castro A, Roque M, Ruiz J. Composición Química del Aceite Esencial de *Erythroxylum coca* Lam var. *coca* (coca) y Evaluación de su Actividad Antibacteriana, *Ciencia e Investigación*, 2009; 12: 24-8.
- 6- Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants from the Cerrado of the Centralwestern Region of Brazil. *Braz J Microbiol*, 2012; 1302-8.
- 7- Aguiar JS, Araújo RO, Rodrigues MD, Sena KXR, Batista AM, Guerra MMP, Oliveira SL, Tavares JF, Silva MS, Nascimento SC, Da Silva TG. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Int J Mol Sci*, 2012; 13: 4124-41.
- 8- De Wet H. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. *Afr J Biotechnol*, 2011; 10: 11511-14.
- 9- Manabe H, Sakagami H, Ishizone H, Kusano H, Fugimaki M, Wada C, Komatsu N, Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. *In Vivo*, 1992; 6: 161-5.
- 10- Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS, Googoolye K, Aruoma OI. Assessment of the Phenolic and Antioxidant Actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae Families of Mauritian endemic plants. *Toxicol In Vitro*, 2008; 22: 45-56.
- 11- Barreiros ALBS, Barreiros ML, David JM, Davis JP, de Queiroz LP. Atividade antioxidante e substâncias presentes em *Dioclea violaceae* e *Erythroxylum mummularia* *Rev Bras Farmacogn*, 2003; 13, supl 2: 8-11.

- 12- Syed SH, Namdeo AG. Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. on paracetamol induced toxicity. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013; 3: 877-81.
- 13- Barros IMC, Leite BHM, Leite CFM, Fagg CW, Gomes SM, Resck IS, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Silveira D. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil. Leaves. *J Appl Pharm Sci*, 2017; 7: 88-94.
- 14- Tomesi CN, Viale AA, Buschi CA, Rofit RD, Schteingart CD, Iñigo RPA, Zalocchi EM, Pomilio AB. Antimicrobial Screening of Some Argentine Higher Plants. *Fitoterapia*, 1986; LVII: 46-50.
- 15- Chaves GG, Schapoval EES, Zuanazzi JA, Diehl E, de Siqueira NCS. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*, 1988; 22: 117-20.
- 16- Zuanazzi JAS, Rates SMK, Henriques AT. Cocaine-like Actions of *Erythroxylum argentinum* Schultz (Erythroxylaceae). *Acta Farm Bonaer*, 2000; 19: 105-8.
- 17- Nascimento GC, Menezes ACS, Lacerda EPP. Identificação do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina-3-O-B-D-Glicopiranosídeo e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Frutos. *Rev Processos Químicos*, 2011: 44-55.
- 18- Barros RR, Teixeira FR, Oliveira FN, Rissi DR, Rech RR, Barros CS. Poisoning in sheep from the ingestion of fruits of *Erythroxylum argentinum*. *Vet Hum Toxicol*, 2004; 46: 173-5.
- 19- Borelli V, Lentz D, Veronezi LO, da Silva TGE, Kaufer L, Traverso SD, Gava A. Intoxicação espontânea e experimental por folhas e frutos de *Erythroxylum deciduum* (cocoão) em ovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq Vet Bras*, 2011; 31: 213-8.
- 20- Colodel EM, Seitz AL, Schmitz M, Borba MR, Raymundo DL, Driemeier D. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. *Pesq Vet Bras* 2004; 24: 165-8.
- 21- Inigo RPA, Pomilio AB. Flavonoids from *Erythroxylum argentinum*. *Phytochemistry*, 1985; 24: 347-9.
- 22- Bieri S, Brachet A, Veuthey JL, Christen P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *J Ethnopharmacol*, 2006; 103: 439-47.
- 23- Oliveira SL, da Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG, Lucena HFS, Romero MAV, Barbosa-Filho JM. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. *Chem Biodivers*, 2010; 7: 302-26.

- 24- Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochem Syst Ecol*, 2001; 29: 819–25.
- 25- Ansell SM, Pegel KH, Taylor DAH. Diterpenes from the Timber of 20 *Erythroxylum* Species. *Phytochemistry*, 1993; 32: 953-9.
- 26- Brock A, Bieri S, Christen P, Dräger B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 2005; 66: 1231-40.
- 27- Docimo T, Reichelt M, Schneider B, Kai M, Kunert G, Gershenzon J, D’Auria JC. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Mol Biol*, 2012; 78: 599-615.
- 28- NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard – Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6, Vol. 23, No. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- 29- NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard-eighth Edition*. NCCLS document M2-A8, Vol. 23, No. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- 30- Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, Mossi A, Toniazzi G, De Oliveira D, Treichel H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Rev Ceres*, 2010; 57: 589-94.
- 31- Van Vuuren SF. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 2008; 119: 462-72.
- 32- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler JVG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev*, 2015; 28: 603-61.
- 33- De Albuquerque CK, Tavares JF, De Oliveira SL, Silva TS, Gonçalves GF, Costa VCO, Agra MF, Pessôa HLF, da Silva MS. Flavonoides Glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). *Quim Nova*, 2014; 37: 663-6.
- 34- Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, Jonat B, Somogy S, Guardado G, Aguirre Chan CR, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A, Effio-Carbajal J, Frías-Fernandez F, Benito M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol*, 2010; 132: 101-8.

35- Kadchumsang S, Sirisa-Ard P, Sookkhee S, Chansakaow S. Antibacterial and Antioxidant Activities of Lanna Medicinal Plants Used in Mahoog Formula. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2015; 7: 366-70.

36- Córdova WHP, Matos MG, Tabart J, Sipel A, Kevers C, Dommes J. In Vitro Characterization of Antioxidant Properties of Cuban Endemic Varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. Isolation of Two Flavonol Glycosides. *J Chil Chem Soc*, 2012; 57: 1340-43.

37- Kumar VR, Reddy GV, Krishna MR. Screening of Phytochemicals and Antioxidant Activity of *Erythroxylum monogynum*. *Int J Bioassays*, 2014; 3: 3005-7.

Apresentação

A influência do período de coleta, verão/ inverno, sobre o perfil alcaloídico de espécies do gênero *Erythroxylum*, coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, foi investigada segundo metodologia e parâmetros preconizados pela UNODC (2012) para “plantas da coca”.

Uma vez que não foi possível a identificação botânica de algumas das espécies coletadas, esta parte do trabalho não será apresentada no formato de artigo. A continuidade do estudo, sobre o perfil alcaloídico de espécies do gênero *Erythroxylum*, será realizada por futuros trabalhos de nosso grupo de pesquisa.

Metodologia

Espécies do gênero *Erythroxylum* foram coletadas, durante o verão e o inverno, nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, identificadas pelos botânicos prof. Jean Carlos Budke, profa. Márcia Vignoli e/ou prof. Sérgio Bordignon. As exsicatas encontram-se depositadas no Herbário Padre Balduino Rambo da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

As folhas foram separadas dos galhos e secas em estufa com circulação de ar à temperatura inferior a 40 °C. Os extratos totais e as frações alcaloídicas foram obtidas segundo a metodologia preconizada para análise das espécies do gênero *Erythroxylum* produtoras de cocaína (UNODC, 2012), utilizando porém, 10 vezes a massa de planta preconizada, conforme segue: aproximadamente 10 gramas de folhas secas e desintegradas foram extraídas com metanol sob refluxo na proporção de 1 g : 40 mL por 20 minutos. Após resfriado, o extrato foi filtrado, seco em evaporador rotatório a pressão reduzida e temperatura inferior a 40 °C, ressuspenso em clorofórmio e extraído com ácido cítrico. A fase ácida foi alcalinizada com carbonato de sódio e extraída com clorofórmio originando a fração alcaloídica, esta foi concentrada em evaporador rotatório a pressão reduzida a temperatura inferior a 40 °C, mantida em

dessecador até peso constante e após armazenada em freezer sob atmosfera de nitrogênio.

A análise ocorreu por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG/ EM), também empregando a metodologia e os parâmetros preconizados pela UNODC (2012) para espécies produtoras de cocaína, conforme segue: as frações alcaloídicas foram solubilizadas em solução de metanol: clorofórmio (1: 1), obtendo concentrações próximas a 1 mg/ mL, e após 1 µL foi injetado no cromatógrafo. As condições operacionais foram: temperatura da coluna: inicial a 60 °C, isoterma por 3 minutos, seguido de rampa de aquecimento a 300 °C, em gradiente de 40 °C/ min e finalizando em isoterma por 6 minutos; fluxo do gás de arraste: hélio a 1 mL/ min; detector: ionização por impacto eletrônico a 70 eV e temperatura de 300 °C. Entre as análises com as frações alcaloídicas era realizada uma análise de purga (branco), evitando interferências entre as análises.

Para auxiliar na identificação dos alcaloides, as metodologias anteriormente descritas também ocorreram com “sachês de chá de coca” de *E. novogranatense*. Os espectros de massas e suas fragmentações, obtidas a partir das espécies coletadas, foram analisados e comparados com espectros de massas padrão e espectros de massas dos alcaloides presentes no “chá de coca”, assim como os “tempos de retenção” dos picos das frações alcaloídicas comparados aos tempos de retenção dos picos do chá de coca.

Resultados e Discussão

Foram realizadas 33 coletas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Destas, foram identificadas nove espécies (**Tabela 5**), as quais foram coletadas durante o verão e o inverno. Quatro espécies coletadas não foram ainda identificadas botanicamente, embora as análises iniciais sugerem ser espécies diferentes das demais.

Os rendimentos do extrato metanólico e da fração alcaloídica das espécies coletadas, nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, empregando metodologia preconizada pela UNODC (2012), estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 5: Localização das coletas realizadas

Espécie	Dados da coleta (GPS)	Estado de Coleta
<i>E. amplifolium</i>	27°46'45.2"S 48°30'40.5"W	SC
<i>E. argentinum</i>	27°26'20.4"S 48°22'00.7"W	SC
<i>E. cuneifolium</i>	28°45'03.3"S 50°03'49.9"W	RS
<i>E. cuspidifolium</i>	27°46'44.5"S 48°29'49.4"W	SC
<i>E. deciduum</i>	27°39'03.7"S 52°17'56.3"W	RS
<i>E. microphyllum</i>	27°50'57.4"S 52°21'29.0"W	RS
<i>E. myrsinites</i>	27°50'57.4"S 52°21'29.0"W	RS
<i>E. pelleterianum</i>	27°24'52.0"S 51°59'02.2"W	RS
<i>E. vacciniifolium</i>	27°26'20.8"S 48°27'30.4"W	SC

GPS: Sistema de Posicionamento Global

Tabela 6: Rendimento do extrato metanólico e da fração alcaloídica das espécies de *E. argentinum* e *E. deciduum* coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina

Espécie	RET (%)		RAT (%)	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
<i>E. amplifolium</i>	14,34	17,10	1,71	1,15
<i>E. argentinum</i>	15,54	14,08	1,63	1,26
<i>E. cuneifolium</i>	25,26	21,70	0,43	0,53
<i>E. cuspidifolium</i>	13,92	13,26	0,91	1,41
<i>E. deciduum</i>	16,30	20,75	1,70	0,48
<i>E. microphyllum</i>	15,02	13,08	1,54	1,16
<i>E. myrsinites</i>	14,02	17,92	1,01	0,56
<i>E. pelleterianum</i>	12,80	14,09	0,98	1,02
<i>E. vacciniifolium</i>	17,74	12,58	0,33	1,94

RET: Rendimento do extrato metanólico em relação a massa de folhas secas; RAT: Rendimento da fração alcaloídica em relação a massa do extrato metanólico

A análise dos rendimentos dos extratos metanólicos e das frações alcaloídicas não demonstra relação a um determinado período de coleta, verão ou inverno. Em algumas espécies o maior rendimento ocorre durante o verão, enquanto que para outras ocorre durante o inverno.

O desenvolvimento da CG/ EM, empregando a metodologia preconizada pela UNODC (2012), resultou em cromatogramas com boa resolução e eficiência, para as espécies do gênero *Erythroxylum* analisadas (**Apêndice 1**). Isto demonstra que a metodologia inicialmente desenvolvida, para identificação da cocaína e demais

alcaloides em *E. coca* e *E. novogranatense* (UNODC, 2012), também pode ser empregada na investigação fitoquímica de outras espécies do gênero.

Com base no cromatograma obtido para a fração alcaloídica do “sache de chá de coca”, os picos e os respectivos espectros de massas (**Apêndice 2**), referentes aos principais alcaloides presentes, foram investigados quanto sua presença nos cromatogramas das frações alcaloídicas das espécies coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

Foram identificados, na fração alcaloídica obtida do “sache de chá de coca”, os seguintes compostos: higrina (5,825 min), tropinona (6,416 min), éster de metilecgonidina (7,192 min), éster de metilecgonina (7,516 min), cuscohigrina (8,111 min), tropacocaína (8,935), cocaína (9,554 min) e *cis*-cinamoilcocaína (10,082 min) e *trans*-cinamoilcocaína (10,549 min).

A análise das frações alcaloídicas, originadas das espécies coletadas, resultou na identificação de sete (7) compostos, os alcaloides: éster de metilecgonidina, éster de metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína e os intermediários da biossíntese higrina, tropinona e tropanol (**Tabela 7**).

Tabela 7: Alcaloides identificados em espécies do gênero *Erythroxylum* nativas dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina coletadas durante o verão e o inverno

Espécie	Coleta	Higr	Tropi	Tropa	MED	MEN	Cusc	Tropac
	Tr	5,825	6,416	6,525	7,192	7,516	8,111	8,935
Chá de coca	--	P	P	(-)	P	P	P	P
<i>E. amplifolium</i>	I	P	P	(-)	(-)	P	P	P
	V	(-)	P	(-)	(-)	(-)	P	(-)
<i>E. argentinum</i>	I	P	P	(-)	P	P	P	P
	V	P	P	(-)	P	P	P	P
<i>E. cuneifolium</i>	I	P	P	P	P	P	P	P
	V	(-)	P	P	P	P	P	P
<i>E. cuspidifolium</i>	I	P	(-)	P	(-)	P	P	P
	V	P	(-)	P	(-)	P	P	P
<i>E. deciduum</i>	I	P	(-)	(-)	P	(-)	(-)	P
	V	(-)	(-)	(-)	P	(-)	(-)	P
<i>E. microphyllum</i>	I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	V	(-)	(-)	(-)	P	P	P	P
<i>E. myrsinites</i>	I	(-)	(-)	P	(-)	(-)	(-)	P
	V	(-)	(-)	P	(-)	P	(-)	P
<i>E. pelleterianum</i>	I	P	P	(-)	(-)	P	P	P
	V	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P	P
<i>E. vacciniifolium</i>	I	P	P	(-)	(-)	P	P	P
	V	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P

Tr: Tempo de retenção em minutos; I: coleta realizada durante o inverno; V: coleta realizada durante o verão; Higr: higrina. Tropi: tropinona; Tropa: tropanol; MED: éster de metilecgonidina; MEN: éster de metilecgonina; Cusc: cuscohigrina; Tropac: tropacocaína; P: presente; (-): ausente; NA: não analisado

As regiões nos cromatogramas das espécies coletadas, em que os alcaloides cocaína e cinamoilcocaína deveriam aparecer, de acordo com o cromatograma obtido para o “sache de chá de coca”, foram intensamente analisadas e não apresentaram os íons qualificadores para cocaína (m/z 82, 182 e 303) e cinamoilcocaína (m/z 82, 182 e 329). Desta forma, os respectivos alcaloides não estão presentes em nenhuma das espécies, em ambos períodos de coleta.

A não identificação do alcaloide cocaína e do seu produto de degradação benzoilecgonina, corrobora os resultados encontrados por Zuanazzi e colaboradores (2001). Porém a identificação do alcaloide por Bieri e colaboradores (2006), demonstra a presença de rota biossintética, para a produção da cocaína, sendo influenciada por fatores além do período de coleta, verão/ inverno, uma vez que a influência desta não originou a identificação do composto.

Pela primeira vez, estão sendo reportados os seguintes intermediários de biossíntese e alcaloides nas espécies: *E. amplifolium*: higrina, tropinona, éster metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína; *E. argentinum*: tropinona e éster de metilecgonina; *E. cuneifolium*: higrina, tropinona, tropanol, éster de metilecgonidina, éster de metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína; *E. cuspidifolium*: higrina, tropinona, tropanol, éster de metilecgonidina, éster de metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína; *E. deciduum*: higrina, éster de metilecgonidina e tropacocaína; *E. microphyllum*: éster de metilecgonina, cuscohigrina e tropacocaína; *E. myrsinites*: tropanol, éster de metilecgonina e tropacocaína; *E. pelleterianum*: higrina, tropinona, éster de metilecgonina e cuscohigrina; e *E. vacciniifolium*: higrina, tropinona, éster de metilecgonina e cuscohigrina.

A identidade do composto higrina (**Figura 6**), foi confirmada através dos fragmentos m/z 141 (pico do íon molecular), 84 (pico base) (Rubio et al., 2012) e ao tempo de retenção semelhante ao encontrado para o chá de coca.

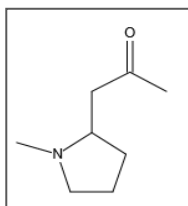


Figura 6: Estrutura molecular do composto higrina

O alcaloide cuscohigrina, (**Figura 7**) apresenta espectro de massas com fragmentação muito semelhante à higrina, porém a presença de sinal em m/z 209, de baixa intensidade, caracteriza o alcaloide (Rubio et al., 2012), mesmo que não seja possível verificar o sinal do íon molecular. O alcaloide apresenta fragmentação característica pelos sinais em m/z 84 (pico base) e 209 ($M^+ - CH_3$). O tempo de retenção foi compatível ao verificado no chá de coca o que auxiliou na identificação do composto.

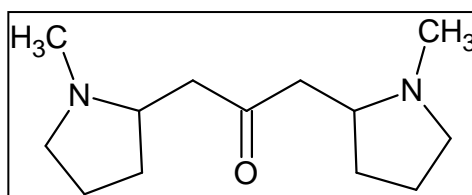


Figura 7: Estrutura molecular do alcaloide cuscohigrina

O pico em tempo de retenção de 6,41 min apresentou fragmentos m/z 139 (determinado como íon molecular), 124 ($M^+ - CH_3$), 96 e 82. Além desta análise, a fragmentação foi compatível a fragmentação padrão do composto tropinona e ao tempo de retenção deste composto no cromatograma do chá de coca. Assim o composto pode ser identificado como o intermediário tropinona (**Figura 8**).

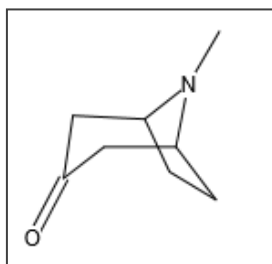


Figura 8: Estrutura molecular do intermediário da biossíntese tropinona

Em tempo de retenção próximo a 7,50 min, foi verificado um pico cujo espectro de massas apresenta, como principais fragmentações, m/z 199; 182; 96 e 82, sendo possível identificar os íons qualificadores para o composto éster de metilecgonina, m/z 199; 96 e 82 (Jenkins et al. 1996). Assim, aliando o espectro de massas e o tempo de retenção compatível ao alcaloide presente no cromatograma do chá de coca, o composto foi identificado como metil éster ecgonina (**Figura 9**).

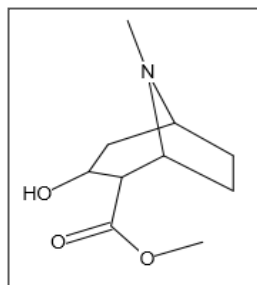


Figura 9: Estrutura molecular do alcaloide éster de metilecgonina

Um pico em tempo de retenção de 8,93 min apresentou como principais fragmentações m/z 245, 140, 124, 105, 94 e 82. A análise possibilitou verificar m/z 245 (íon molecular) e 124 (pico base). O espectro de massas foi compatível a um espectro padrão e ao espectro e ao tempo de retenção de alcaloide presente no cromatograma do chá de coca, o que permite concluir que o composto refere-se ao alcaloide tropacocaína (**Figura 10**).

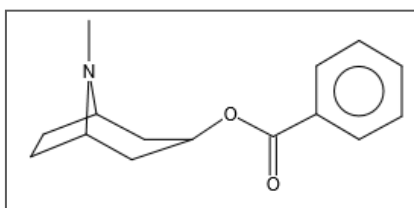


Figura 10: Estrutura molecular do alcaloide tropacocaína

Em tempo de retenção 6,53 min, foi verificada a presença de um pico cuja análise de seu espectro de massas demonstra: m/z 141 (íon molecular), 124, 113, 96, 82 (pico base). Embora não ocorra o sinal deste composto, no cromatograma referente a chá de coca, o espectro de massas é compatível a um espectro de massas padrão. Assim, o composto foi identificado como o intermediário da biossíntese dos alcaloides tropanicos, o tropanol (**Figura 11**).

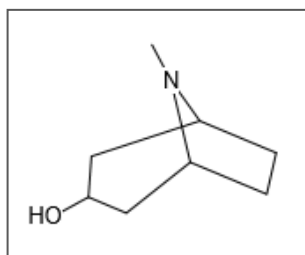


Figura 11: Estrutura molecular do composto tropanol

A presença de um pico majoritário, nas espécies *E. argentinum*, *E. cuneifolium* e *E. deciduum*, ocorreu em tempo de retenção 7,19 min. O espectro de massas apresenta: m/z 181 (íon molecular); 166 ($M^+ - CH_3$); m/z 152 ($M^+ - NCH_3$) e m/z 122 ($M^+ - COOCH_3$). Os íons qualificadores para a molécula éster de metilecgonidina m/z 181; 166 e 152 (Rivier, 1981), foram identificados. O espectro de massas foi compatível ao espectro de massa padrão do composto éster de metilecgonidina e ao espectro de massas do alcaloide presente no cromatograma referente ao chá de coca. Desta forma o composto foi identificado como o alcaloide éster de metilecgonidina (**Figura 12**).

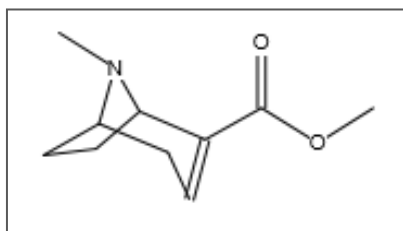


Figura 12: Estrutura molecular do alcaloide éster de metilecgonidina

A análise fitoquímica demonstra, através da presença do alcaloide cuscohigrina, que com exceção de *E. deciduum* e *E. myrsinites*, as demais espécies apresentam rota paralela à síntese dos alcaloides ecgonínicos (Jirschitzka et al., 2012).

Em cinco espécies, a higrina está presente apenas durante o inverno. Por ser um precursor na síntese dos alcaloides em *Erythroxylum* (Jirschitzka et al., 2012) e durante o inverno a presença de folhas novas ser frequente, a identificação do composto vem ao encontro da maior expressão dos genes de transcrição das enzimas “ornitina descarboxilase” e “arginina descarboxilase” que ocorre em brotos e folhas jovens (Docimo et al., 2012).

Tropacocaína foi identificada em todas espécies nas duas estações climáticas, exceto em *E. amplifolium*, na qual está presente apenas durante o verão. Embora o alcaloide já fora identificado em *E. argentinum* e *E. pelleterianum*, o atual estudo demonstra que a mesma não sofre variações qualitativas entre o verão e o inverno.

Com exceção de *E. deciduum*, todas as demais espécies apresentam o alcaloide éster de metilecgonina (**Figura 9**). Este sofre variação qualitativa entre o

período de coleta, verão/ inverno, para *E. amplifolium*, *E. myrsinites* e *E. vacciniifolium*. A identificação do alcaloide é pertinente, pois demonstra a existência de rota biossintética até o precursor imediato da cocaína (**Figura 13**), em diversas espécies do gênero *Erythroxylum* presentes nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, excluindo-se apenas a etapa de benzoilação, mediada pela enzima cocaína sintetase (Jirschitzka et al. 2012). A identificação do alcaloide éster de metilecgonina pode justificar, pelo menos em parte, as divergências quanto a identificação da cocaína em algumas espécies do gênero, podendo a ausência de fontes de radicais benzoil ser o fator limitante para a etapa final da biossíntese da cocaína (Leete, 1990).

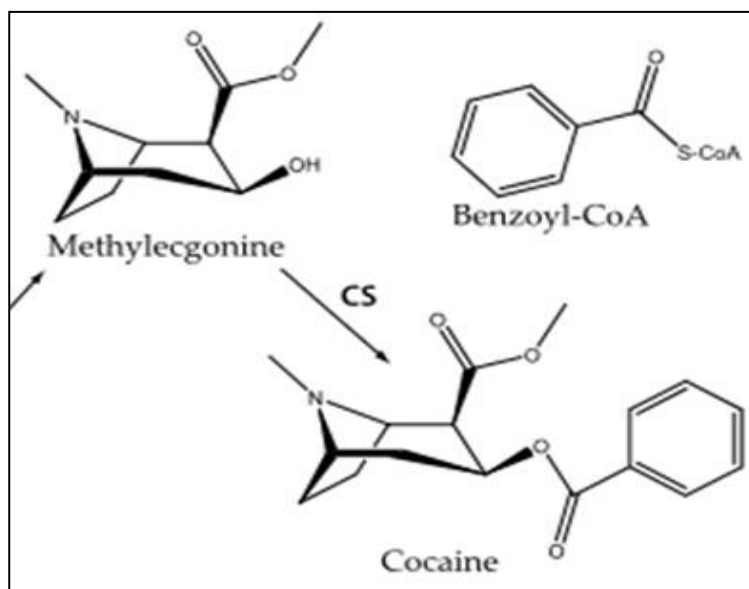


Figura 13: Etapa final da biossíntese da cocaína
Fonte: Jirschitzka et al., 2012

Outra informação pertinente da produção deste alcaloide, por espécie não proscritas do gênero, é a possibilidade de após sua extração, ser transformada em cocaína, através de reação com cloreto de benzoíla (UNODC, 2012), **Figura 14**. Embora para fins de tráfico não seja rentável, devido ao baixo rendimento obtido das frações alcaloídicas (**Tabela 2**), quando comparado ao rendimento de cocaína obtido por *E. coca* e *E. novogranatense*, há potencialidade de interesse comercial pelas espécies para produção de padrões de referência em toxicologia, empregando biotecnologia.

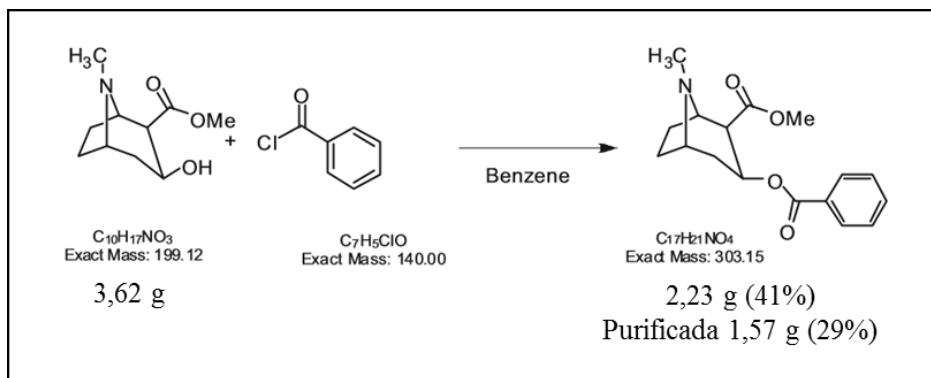


Figura 14: Síntese de cocaína a partir do alcaloide éster de metilecgonina

Fonte: UNODC, 2012

Éster de metilecgonidina (**Figura 12**) está presente em *E. argentinum*, *E. cuneifolium* e *E. deciduum* sem variação qualitativa entre o verão/ inverno. Fontes bibliográficas demonstram que o composto é considerado um artefato, com origem da pirólise da cocaína (**Figura 15**) (Rivier, 1981; Jenkins et al., 1996; Scheidweiler et al., 2000, Garcia et al., 2012; Rubio et al., 2013; Garcia et al., 2017), porém a presença de éster de metilecgonidina aliada a ausência da cocaína nos extratos, contradiz esta informação. Éster de metilecgonidina pode não ser originário apenas da pirólise da cocaína (**Figura 15**), mas pode ter origem de outros alcaloides ou não ser exclusivamente um artefato. Verificando a intensidade dos picos referentes ao alcaloide, nos cromatogramas das espécies *E. argentinum*, *E. cuneifolium* e *E. deciduum* (**Apêndice 1**), sugere-se que o composto, além de um artefato da pirólise da cocaína, faça parte do perfil alcaloídico das espécies de gênero *Erythroxylum*.

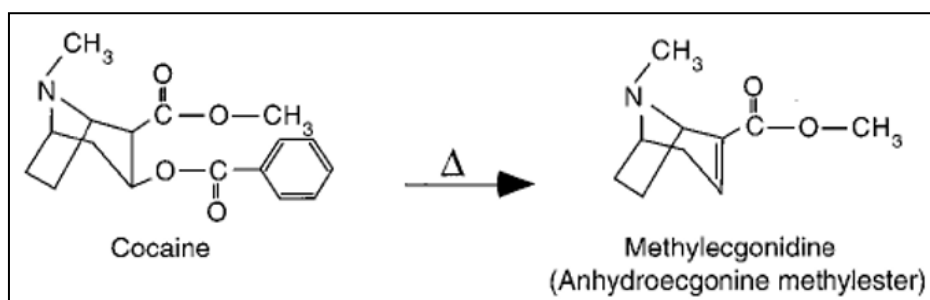


Figura 15: Formação de éster de metilecgonidina por pirólise da cocaína

Fonte: Scheidweiler et al., 2000

A identificação de éster de metilecgonidina (**Figura 12**) como substância naturalmente presente em espécies do gênero *Erythroxylum* apresenta pertinência, uma

vez que o composto é empregado como marcador toxicológico do consumo fumado de cocaína na forma de base livre. Assim, identificar fontes deste composto pode auxiliar na produção de padrões de referência em toxicologia.

Discussão

O desenvolvimento da revisão bibliográfica sobre as espécies que biossintetizam cocaína permite verificar que a legislação Brasileira vigente, sobre plantas proscritas, encontra-se defasada em relação às espécies produtoras do composto. De um total de 24 espécies produtoras do metabólito, das quais estão presentes espécies nativas do sul do Brasil, apenas *E. novogranatense* e *E. coca*, realizam biossíntese em rendimentos apropriados ao tráfico, o que possibilita o cultivo das mesmas para este fim. *E. novogranatense*, reconhecida pela capacidade de biossíntese de cocaína não se encontra proscrita, embora a produção do alcaloide possa atingir rendimento de 1,02%, superior ao da espécie *E. coca* atualmente considerada proscrita. Provavelmente, a não proibição ocorre devido ao cultivo legal da espécie *E. novogranatense* em países como Bolívia e Peru, onde se encontra vinculada a um consumo tradicional. Observando, porém, os diversos danos e problemas ocasionados à sociedade e ao usuário pelo consumo de cocaína, cuja maior biossíntese ocorre por *E. novogranatense*, sugere-se que a espécie seja classificada como planta proscrita, assim como ocorre para a espécie *E. coca*.

A cocaína e outros alcaloides de núcleo ecgonínico são identificados, além das plantas da coca, em *E. deciduum*, o que valoriza o estudo tóxico farmacológico da espécie. Planárias são consideradas uma alternativa a estes estudos com animais vertebrados, porém o emprego destes vermes com extratos vegetais é inexistente. Os primeiros ensaios realizados na avaliação dos efeitos do extrato de *E. deciduum* sobre a velocidade de locomoção de planárias, seguiram a metodologia existente. Porém, fora verificado que as planárias não desenvolviam um deslocamento normal o que influencia na velocidade de locomoção das planárias. Assim, foi necessário aptar a metodologia existente para possibilitar a avaliação de um extrato de *E. deciduum* em modelo de planária. A adaptação realizada e denominada “teste de fuga” possibilitou o uso dos vermes na avaliação de extratos. O teste possibilita a identificação da concentração tóxica do extrato às planárias e consequentemente a concentração de uso na avaliação da velocidade de locomoção, além de possibilitar a observação dos

movimentos de hipercinesia tipo parafuso e a posição tipo C que auxiliam na identificação do neurotransmissor envolvido, no caso a dopamina.

A metodologia desenvolvida demonstrou que *E. deciduum* origina, em planária, posição tipo C, hipercinesia tipo parafuso e aumento significativo ($p= 0.016$) da velocidade de locomoção, comportamentos característicos do aumento da neurotransmissão dopaminérgica. O efeito sobre esta neurotransmissão pode justificar, pelo menos em parte, alguns dos efeitos tóxicos observados em ovinos.

O estudo fitoquímico da espécie demonstra presença éster de metilecgonidina e tropacocaína, que podem estar relacionados aos efeitos verificados em planárias e em parte dos originados a ovinos, principalmente éster de metilecgonidina, composto responsável por alguns efeitos cerebrais presentes em usuários de crack (Scheidweiler et al., 2003; Garcia et al., 2017).

Diante da pertinência farmacológica identificada para *E. deciduum* e ao fato do gênero apresentar espécies com comprovadas atividades antioxidante e antimicrobiana, foi realizado estudo destas atividades para as espécies mais frequentes no sul do Brasil. Sabendo-se que algumas atividades e compostos apresentam variação com o período de coleta, a influência deste período sobre as atividades também foi avaliada. Assim extratos em diferentes polaridades de *E. argentinum* e de *E. deciduum* coletados durante o verão e o inverno foram avaliados e apresentaram atividades antimicrobiana e antioxidante. Os extratos mais ativos estão relacionados às coletas realizadas durante o verão, o que demonstra a influência do período de coleta, verão/inverno, sobre o metabolismo dos compostos responsáveis por esta atividade. A maior atividade ocorreu com extratos mais polares, estando de acordo com outros estudos antimicrobianos realizados com o gênero. As bactérias gram positivas foram mais sensíveis aos extratos avaliados que as gram negativas, isto pode estar relacionado a presença de lipoproteínas na membrana das bactérias gram negativas, o que gera uma deficiência na penetração. Interessantemente, extratos etanólicos de ambas espécies originaram atividade antimicrobiana sobre bactérias gram negativas, *S. choleraesuis* e *P. mirabilis*, o que demonstra a biossíntese de compostos com capacidade de transpor esta barreira ou apresentam mecanismo alternativo de ação ou penetração. A maior

atividade antimicrobiana foi obtida sobre *S. aureus* com o extrato etanólico de *E. argentinum*, coletado no verão, MIC= 0,78125mg/ mL, desta forma a espécie apresenta potencialidade para a descoberta de agentes antimicrobianos sobre a referida bactéria.

A avaliação antioxidante apresentou, assim como para a atividade antimicrobiana, resultados pertinentes. *E. argentinum* e *E. deciduum* demonstram atividade antioxidante com potencialidade para o uso clínico e como fontes de novos fármacos. A influência do período de coleta, verão/ inverno, sobre esta atividade está presente nos extratos aquosos de ambas as espécies, porém não ha relação entre um determinado período de coleta e a maior atividade.

A influência do período de coleta, verão/ inverno, sobre as atividades antimicrobiana e antioxidante, também está presente sobre o perfil alcaloídico das espécies do gênero *Erythroxylum* coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Além desta influência, o perfil dos principais alcaloides demonstra que as espécies apresentam relevância tóxica, farmacológica e econômica. Possibilita a compreensão de parte dos efeitos provocados por algumas espécies, identifica fontes vegetais de padrões de referência em toxicologia e origina uma melhor compreensão biossintética nas espécies estudadas.

Espécies do gênero *Erythroxylum* biossintetizam o alcaloide éster de metilecgonina, o que demonstra a existência do aparato enzimático necessário para a biossíntese do precursor imediato da cocaína. Desta forma, podem ser empregadas na produção de padrões toxicológicos, seja pela produção do éster de metilecgonina ou pela possibilidade deste ser usado como precursor para semi- síntese da cocaína.

O perfil alcaloídico também demonstra que éster de metilecgonidina não ocorre apenas da pirólise da cocaína. Isto pode ser compreendido, pois o composto aceito como precursor não está presente nos extratos, porém o seu artefato está, soma-se a isto a intensidade dos sinais, nos cromatogramas, referentes a éster de metilecgonidina. O que possibilita propor que o alcaloide não se trata exclusivamente um artefato da cocaína, mas pode ter origem de outros alcaloides do gênero *Erythroxylum* e/ ou fazer parte do perfil de alcaloides do referido gênero.

Finalizando, o estudo demonstra a relevância e as potencialidades tóxica, farmacológicas, fitoquímicas e econômicas de espécies do gênero *Erythroxylum* presentes nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, assim como a influência do período de coleta sobre partes destas características.

Conclusão

Espécies do gênero *Erythroxylum* do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, sul do Brasil, demonstram potencial tóxico, farmacológico e químico. Podem ser fonte de ativos antimicrobianos e antioxidantes, apresentam efeitos característicos de agonistas dopaminérgicos, em modelo de planária e sua fitoquímica possibilita serem fontes de padrões toxicológicos.

A metodologia de planária denominada de “teste de fuga” possibilita o uso das mesmas na investigação toxicológica de extratos vegetais e amplia o emprego destes vermes como metodologia alternativa ao uso de animais, como camundongos e ratos, na busca de extratos ativos.

O extrato etanólico livre de compostos apolares das folhas de *E. deciduum* coletadas durante o verão ocasiona em planárias comportamentos característicos do aumento da neurotransmissão dopaminérgica.

E. argentinum e *E. deciduum* apresentam atividades antimicrobiana e antioxidante, com potencialidade para a descoberta de novos candidatos a fármacos.

Espécies nativas dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina apresentam rota biossintética de alcaloides, até o alcaloide éster de metilecgonina, precursor imediato da cocaína.

Éster de metilecgonidina não é exclusivamente obtida da pirólise da molécula de cocaína, pode ser originada de outros alcaloides ou não se tratar exclusivamente de um artefato.

Erythroxylum novogranatense, por sintetizar cocaína em rendimentos que possibilitam o seu uso pelo tráfico, deve ser incluída na Lista E do Anexo I da Portaria 344/ 98, Lista de Plantas Proscritas que Podem Originar Substâncias Entorpecentes e/ou Psicotrópicas da Legislação Brasileira.

Referências Bibliográficas

Acock, M.C.; Lydon, J.; Johnson, E.; Collins, R. Effects of Temperature and Light Levels on Leaf Yield and Cocaine Content in Two *Erythroxylum* Species. *Annals of Botany*, v. 78, pp. 49-53 1996.

Aguiar, J.S.; Araújo, R.O.; Rodrigues, M.D.; Sena, K.X.R.; Batista, A.M.; Guerra, M.M.P.; Oliveira, S.L.; Tavares, J.F.; Silva, M.S.; Nascimento, S.C.; da Silva, T.G. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, pp. 4124- 4141, 2012.

Algeri, S.; Carolei, A.; Ferretti, P.; Gallone, C.; Palladini, G.; Venturini, G. Effects of dopaminergic agentes on monoamine levels and motor behaviour in planaria. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 74C, pp. 27-29, 1983.

Amaral Jr, A. *Flora Ilustrada Catarinense, Eritroxiláceas*. Itajaí, Santa Catarina, 1980.

Bach, D.J.; Tenaglia, M.; Baker, D.L.; Deats, S.; Montgomery, E.; Pagán, O.R. Cotinine antagonizes the behavioral effects of nicotine exposure in the planarian *Girardia tigrina*. *Neuroscience Letters*, v. 632, pp. 204-208, 2016.

Barreiros, A.L.B.S.; Barreiros, M.L.; David, J.M.; Davis, J.P.; de Queiroz, L.P. Atividade antioxidante e substâncias presentes em *Dioclea violaceae* e *Erythroxylum mummularia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, supl. 2, pp. 8-11, 2003.

Barros, I.M.C.; Leite, B.H.M.; Leite, C.F.M.; Fagg, C.W.; Gomes, S.M.; Resck, I.S. et al., Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A.St. Hil. Leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, pp. 88-94, 2017.

Bedford, J.A.; Turner, C.E.; Elsohly, H.N. Comparative lethality of coca and cocaine. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 17, pp. 1087-1088, 1982.

Bedford, J.A.; Turner, C.E.; Elsohly, H.N. Local anesthetic effects of cocaine and several extracts of the coca leaf (*E. coca*). *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 20, pp. 819-821, 1984.

Bedford, J.A.; Wilson, M.C.; Elsohly, H.N.; Elliott, C.; Cottam, G.; Turner, C.E. The effects cocaine free extracts of the coca leaf on food consumption and locomotor activity. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 14, pp. 725-728, 1981.

Bieri, S.; Brachet, A.; Veuthey, J.L.; Christen, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, pp. 439–447, 2006.

Biondich, A.S.; Joslin, J.D. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Emergency Medicine International*, v. 2016, doi: 10.1155/2016/4048764. 2016.

Borelli, V.; Lentz, D.; Veronezi, L.O.; Emmerich Da Silva, T.C.; Kaufer, L.; Traverso, S.D.; Gava, A. Intoxicação espontânea e experimental por folhas e frutos de *Erythroxylum deciduum* (cocão) em ovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, pp. 213-218, 2011.

Brock, A.; Bieri, S.; Christen, P.; Dräger, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, v. 66, pp. 1231-1240, 2005.

Buttarelli, F.R.; Pellicano, C.; Pontieri, F.E. Neuropharmacology and behavior in planarians: Translations to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 147, pp. 399–408, 2008.

Casale, J.F.; Mallette, J.R.; Jones, L.M. Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production. *Forensic Science International*, v. 237, pp. 30-39, 2014.

Chaves, C.G.; Shapoval, E.R.S.; Zuanazzi, J.A.S; Diehl, E.; de Siqueira, N.C.S.; Henriques, A.T. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, pp. 117-120, 1988.

Christen, P. Tropane Alkaloids: Old Drugs Used in Modern Medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 22, pp. 717-749, 2000.

CNCFlora. *Erythroxylum catharinense* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Erythroxylum_catharinense>. Acesso em: 18 dez. 2017.

Colodel, E.M.; Seitz, A.L.; Schmitz, M.; Borba, M.R.; Raymundo, D.L.; Driemeier, D. Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* em Ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, pp. 165-168, 2004.

Cordell, G.A. Fifty years of alkaloid biosynthesis in *Phytochemistry*. *Phytochemistry*, v. 91, pp. 29-51, 2013.

Cortella, A.R.; Pochettino, M.L.; Manzo, A.; Raviña, G. *Erythroxylum coca*: Microscopical Identification in Powdered and Carbonized Archaeological Material. *Journal of Archaeological Science*, v. 28, pp. 787-794, 2001.

Costa-Lima, J.L.; Alves, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Erythroxylaceae. *Rodriguésia*, v. 66, pp. 285-295, 2015.

Costa-Lima J.L.; Amorim, A.M. A new name and nomenclatural adjustments in *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Phytotaxa*, v. 306, pp. 066–074, 2017.

Costa-Lima, J.L.; Loiola, M.I.B. Jardim, J.G. Erythroxylaceae of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rodriguésia*, v. 65, pp. 659-671, 2014.

Cronquist, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden. 1988.

De Wet, H. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, pp. 11511-11514, 2011.

Docimo, T.; Reichelt, M.; Schneider, B.; Kai, M.; Kunert, G.; Gershenzon, J.; D'Auria, J.C. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Molecular Biology*, v. 78, pp. 599-615, 2012.

Facco, E.; Zanette, G. The Odyssey of Dental Anxiety: From Prehistory to the Present. A Narrative Review. *Frontiers in Psychology*, v. 306, pp. 1155-1169, 2017.

Ferreira, P.E.; Martini, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 23, pp. 96-99, 2001.

Garcia, R.C.; Dati, L.M.M; Torres, L.H.; da Silva, M.A.A.; Udo, M.S.B.; Abdalla, F.M.F.; da Costa, J.L.; Gorjão, R.; Afeche, S.C.C.; Yonamine, M.; Niswender, C.M.; Conn, P.J.; Camarini, R.; Sandoval, M.R.L; Marcourakis, T. M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. *Scientific Reports*, v. 5, p. 17555, 2015.

Garcia, R.C.; Torres, L.H.; Balestrin, N.T.; Andrioli, T.C.; Flório, J.C.; de Oliveira, C.D.; da Costa, J.L.; Yonamine, M.; Sandoval, M.R.; Camarini, R.; Marcourakis, T. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. *Toxicology*, v. 376, pp. 44-50, 2017.

Görlitz, D. The Occurrence of Cocaine in Egyptian Mummies - New research provides strong evidence for a trans-Atlantic dispersal by humans. *Journal for the Basic Principles of Diffusion Theory, Experiment and Application*, v. 26, pp. 1-11, 2016.

Graff, E.; Lude, W. Alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* MARTIUS, II: The structures of catuabine A, B, and C. *Archiv der Pharmazie*, v. 311, pp. 139-152, 1978.

Grinspoon, L.; Bakalar, J.B. Coca and Cocaine as Medicines: an Historical Review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, pp. 149-159, 1981.

Hagstrom, D.; Escartin, O.C.; Collins, E.M.S. Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology. *Regeneration*, v. 3, pp. 65-77, 2016.

Holmstedt, B.; Jäättmaa, E.; Leander, K.; Plowman, T. Determination of Cocaine in Some South American Species of *Erythroxylum* Using Mass Fragmentography. *Phytochemistry*, v. 16, pp. 1753-1755, 1977.

Inoue, T.; Hoshino, H.; Yamashita, T.; Shimoyama, S.; Agata, K. Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function. *Zoological Letters*, v. 1, p. 7, 2015.

Ishino, M.N.; De Sibio, P.R.; Rossi, M.N. Edge effect and phenology in *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae), a typical plant of the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, pp. 587-594, 2012.

Jenkins, A.J.; Llosa, T. Montoya, I.; Cone, E.J. Identification and Quantitation of Alkaloids in Coca Tea. *Forensic Science International*, v. 77, pp. 179-189, 1996.

Jirschitzka, J.; Schmidt, G.W.; Reichelt, M.; Schneider, B.; Gershenzon, J.; D'Auria, J.C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, pp. 10304-10309, 2012.

Johnson, E.L.; Foy, C.D. Biomass Accumulation and Alkaloid Content in Leaves of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* Grown in Soil with Varying pH. *Journal of Plant Physiology*, v. 149, pp. 444-450, 1996.

Kadchumsang, S.; Sirisa-Ard, P.; Sookkhee, S.; Chansakaow, S. Antibacterial and Antioxidant Activities of Lanna Medicinal Plants Used in Mahoog Formula. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, pp. 366-370, 2015.

Karch, S.B. Cocaine: history, use, abuse. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 92, pp. 393-397, 1999.

Leete, E. Recent Developments in the Biosynthesis of the Tropane Alkaloids. *Planta Medica*, v. 56, pp. 339-352, 1990.

Loiola, M.I.B.; Cordeiro, L.S. *Erythroxylum sobraleanum* (Erythroxylaceae): A new species from Southeastern Brazil. *Phytotaxa*, v. 183, pp. 56-60, 2014.

Loiola, M.I.B. Erythroxylaceae. In: Forzza, RC, *et al.* org. *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*, v. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio/ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 959-962, 2010.

Maleš, Ž.; Šoić, D.; Tušinec, M.; Bojić, M. Stoljeće Coca-Cole: od Biljnih Droga do Svjetskog Brenda. *Farmaceutski glasnik*, v. 73, pp. 17-24, 2017.

Manabe, H.; Sakagami, H.; Ishizone, H.; Kusano, H.; Fugimaki, M.; Wada, C.; Komatsu, N.; Nakashima, H.; Murakami, T.; Yamamoto, N. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. *In Vivo*, v. 6, pp. 161-165, 1992.

Naranjo, P. Social Function of Coca in Pre-Columbian America. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, pp. 161-172, 1981.

Nascimento, G.C.; Menezes, A.C.S.; Lacerda, E.P.P. Identificação do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina-3-O-B-D-Glicopiranosídeo e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Frutos. *Revista Processos Químicos*, pp. 44-55, 2011.

Nayak, S.; Roberts, A.; Bires, K.; Tallarida, C.S.; Kim, E.; Wu, M.; Rawls, S.M. Benzodiazepine inhibits anxiogenic-like response in cocaine or ethanol withdrawn planarians. *Behavioural pharmacology*, v. 27, pp. 556–558, 2016.

Oliveira, M.F.; Alves, J.Q.; de Andrade, J.F.; Saczk, A.A.; Okumura, L.L. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. *Eclética Química*, v. 34, pp. 77-83, 2009.

Oliveira, S.L.; Silva, M.S.; Tavares, J.F.; Sena-Filho, J.G.; Lucena, H.F.S.; Romero, M.A.V. Barbosa-Filho, J.M. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C-NMR Spectral Data. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, pp. 302-326, 2010.

Pagán, O.R.; Deats, S.; Baker, D.; Montgomery, E.; Wilk, G.; Tenaglia, M.; Semon, J. Planarian Require an intact brain to behaviorally react to cocaine, but not to react to nicotine. *Neuroscience*, v. 246, pp. 265-270, 2013.

Pagán, O.R.; Rowlands, A.L.; Fattore, A.L.; Coudron, T.; Urban, K.R.; Bidja, A.H.; Eterovic, V.A A cembranoid from tobacco prevents the expression of nicotine-induced withdrawal behavior in planarian worms. *European Journal of Pharmacology*, v. 615, pp. 118–124, 2009.

Plowman, T. Orthography of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Taxon*, v. 25, pp. 141-144, 1976.

Plowman, T. Amazonian Coca. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, pp. 195-225, 1981.

Prokai, D.; Nguyen, T.; Kamrowski, K.; Chandra, A.; Talamantes, T.; Baxter, L.R.; Prokai, L. An Exploratory Evaluation of Tyrosine Hydroxylase Inhibition in Planaria as a Model for Parkinsonism. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, pp. 23189-23296, 2013.

Raffa, R.B.; Desai, P. Description and quantification of cocaine withdrawal signs in *Planaria*. *Brain Research*, v. 1032, pp. 200-202, 2005.

Raffa, R.B.; Danah, J.; Tallarida, C.S.; Zimmerman, C.; Gill, G.; Baron, S.J.; Rawls, S.M. Potential of a planarian model to study certain aspects of anti-Parkinsonism drugs. *Advances in Parkinson's Disease*, v. 2, pp. 70-74, 2013.

Raffa, R.B.; Holland, L.J.; Schulingkamp, R.J. Quantitative Assessment of Dopamine D2 Antagonist Activity using invertebrate (*Planaria*) Locomotion as a Functional Endpoint. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 45, pp. 223-226, 2001.

Raffa, R.B.; Valdez, J. M. Cocaine withdrawal in *Planaria*. *European Journal of Pharmacology*, v. 430, pp. 143-145, 2001.

Ribeiro, E.M.O.; Lima, L.S.; David, J.M.; Do Vale, A.E.; Lopes, L.M.X.; David, J.P. A New Tropane Alkaloid and Other Constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). *Phytochemistry Letters*, v. 6, pp. 232-235, 2013.

Rivier, L. Analysis of Alkaloids in Leaves of Cultivated *Erythroxylum* and Characterization of Alkaline Substances Used During Coca Chewing. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, pp. 313-335, 1981.

Ross, K.G.; Currie, K.W.; Pearson, B.J.; Zayas, R.M. Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. *Developmental Biology*, v. 6, 2017.

Rubio, C.; Strano-Rossi, S.; Taberner, M.J.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Science International*, v. 227, pp. 60-63, 2013.

Sauvain, M.; Rerat, C.; Moretti, C.; Saravia, E.; Arrazola, S.; Gutierrez, E.; Lema, A.M.; Muñoz, V. A study of the chemical composition of *Erythroxylum coca* var. *coca* leaves collected in two ecological regions of Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, pp. 179-191, 1997.

Scarpa, G.F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, pp. 115-135, 2004.

Siciliano, C.A.; Ferris, M.J.; Jones, S.R. Cocaine self-administration disrupts mesolimbic dopamine circuit function and attenuates dopaminergic responsiveness to cocaine. *European Journal of Neuroscience*, v. 42, pp. 2091-2096, 2016.

Sobral, M.; Jarenkow, J.A.; Brack, P. Irgang, B.; Larocca, J.; Rodrigues, R.S. *Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil*. São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 2006.

Scheidweiler, K.B.; Plessinger, M.A.; Shojaie, J.; Wood, R.W.; Kwong, T.C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, v. 307, pp. 1179-1187, 2003.

Soobrattee, M.A.; Baborun, T.; Neergheen, V.S.; Googoolye, K.; Aruoma, O.I. Assessment of the Phenolic and Antioxidant Actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae Families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro*, v. 22, pp. 45-56, 2008.

Souza, V.C.; Lorenzi, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil*, baseado em APG III. 3ª Edição, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2012.

Syed, S.H.; Namdeo, A.G. Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. on paracetamol induced toxicity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 3, pp. 877-881, 2013.

Tallarida, C.S.; Bires, K.; Avershal, J.; Tallarida, R.J.; Seo, S.; Rawls, S.M. Ethanol and cocaine: Environmental place conditioning, stereotypy and synergism in planarians. *Alcohol*, v. 48, pp. 579-586, 2014.

Tomesi, C.N.; Viale, A.A.; Buschi, C.A.; Rofit, R.D.; Schteingart, C.D.; Iñigo, R.P.A.; Zallocchi, E.M.; Pomilio, A.B. Antimicrobial Screening of Some Argentine Higher Plants. *Fitoterapia*, v. LVII, p. 46-50, 1986.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. *Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials (Revised and updated): Manual for use by national drug analysis laboratories*. Viena: United Nations publication; 2012.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. *Pasta Básica de Cocaína: Cuatro décadas de historia, actualidad y desafíos*. Lima: Forma e Imagen / Billy Víctor Odiaga; 2013.

Valdez, L.M.; Taboada, J.; Valdez, J.E. Ancient Use of Coca Leaves in the Peruvian Central Highlands. *Journal of Anthropological Research*, v. 71, pp. 231-258, 2015.

Ventura, G.; Castro, A.; Roque, M.; Ruiz, J. Composición Química del Aceite Esencial de *Erythroxylum coca* Lam var. *coca* (coca) y Evaluación de su Actividad Antibacteriana. *Ciencia e Investigación*, v. 12, pp. 24-28, 2009.

Venturini, G.; Stocchi, F.; Margotta, V.; Ruggieri, S.; Bravi, D.; Bellantuono, P.; Palladini, G. A pharmacological study of dopaminergic receptors in Planaria. *Neuropharmacology*, v. 28, pp. 1377-1382, 1989.

Violante, I.M.P.; Hamerski, L.; Garcez, W.S.; Batista, A.L.; Chang, M.R.; Pott, V.J.; Garcez, F.R. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants from the Cerrado of the Central-Western Region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.43, pp. 1302-1308, 2012.

Zanolari, B.; Guilet, D.; Marston, A.; Queiroz, E.F.; Paulo, M.Q.; Kurt, Hostettmann, K. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *Journal of Natural Products*, v. 66, pp. 497-502, 2003.

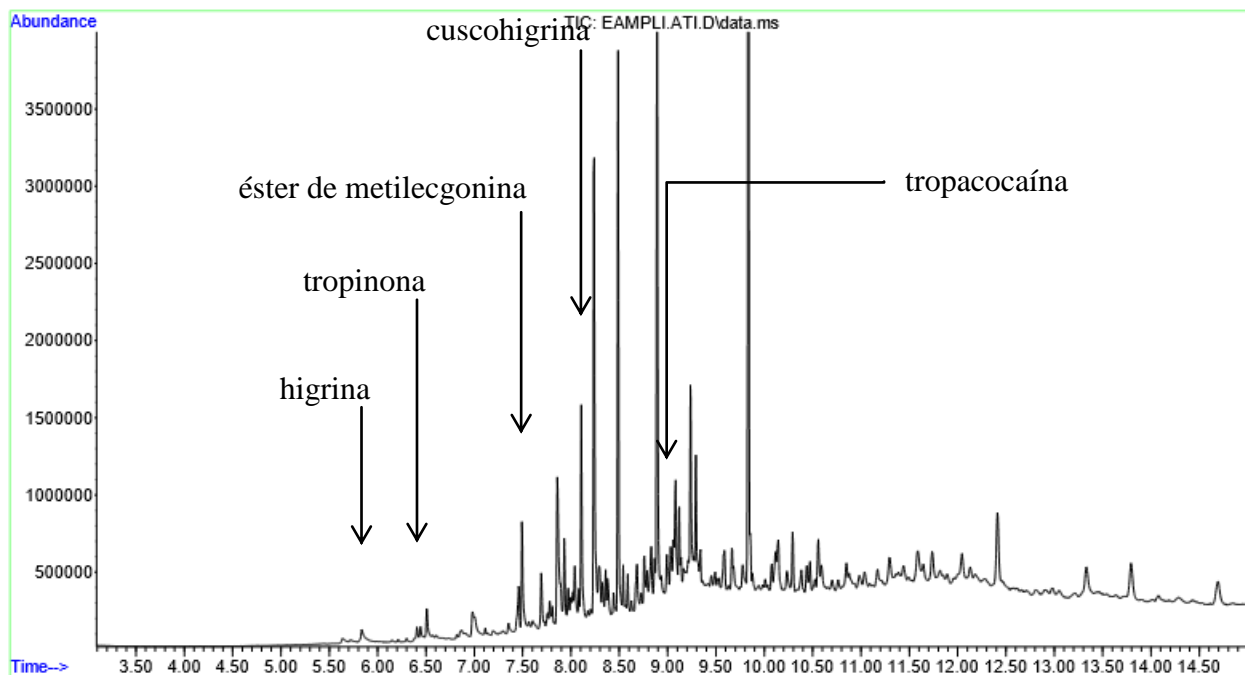
Zuanazzi, J.A.S.; Tremea, V.; Limberger, R.P.; Sobral, M.; Henriques, A.T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 29, pp. 819–825, 2001.

Zuanazzi, J.A.; Rates, S.M.K.; Henriques, A.T. Cocaine-Like Actions of *Erythroxylum argentinum* Schulz (Erythroxylaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 19, pp. 105-108, 2000.

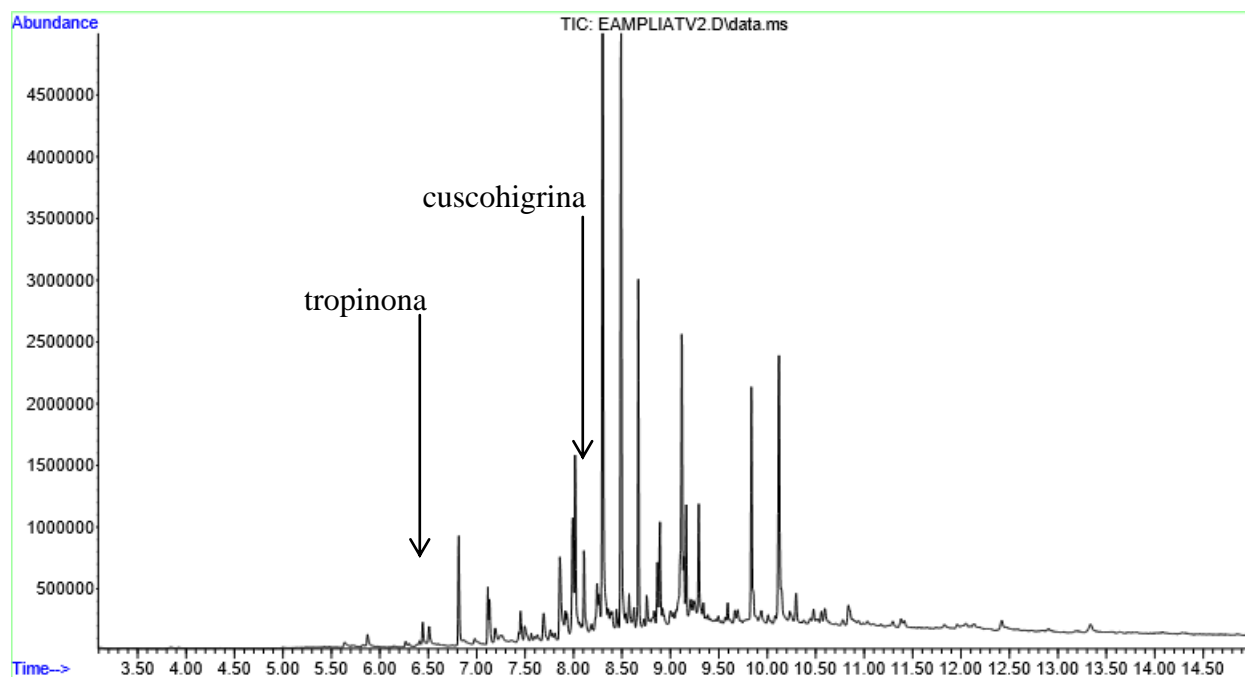
Apêndice 1

Cromatogramas das Frações Alcalóidicas das Espécies - Coletas Verão e Inverno

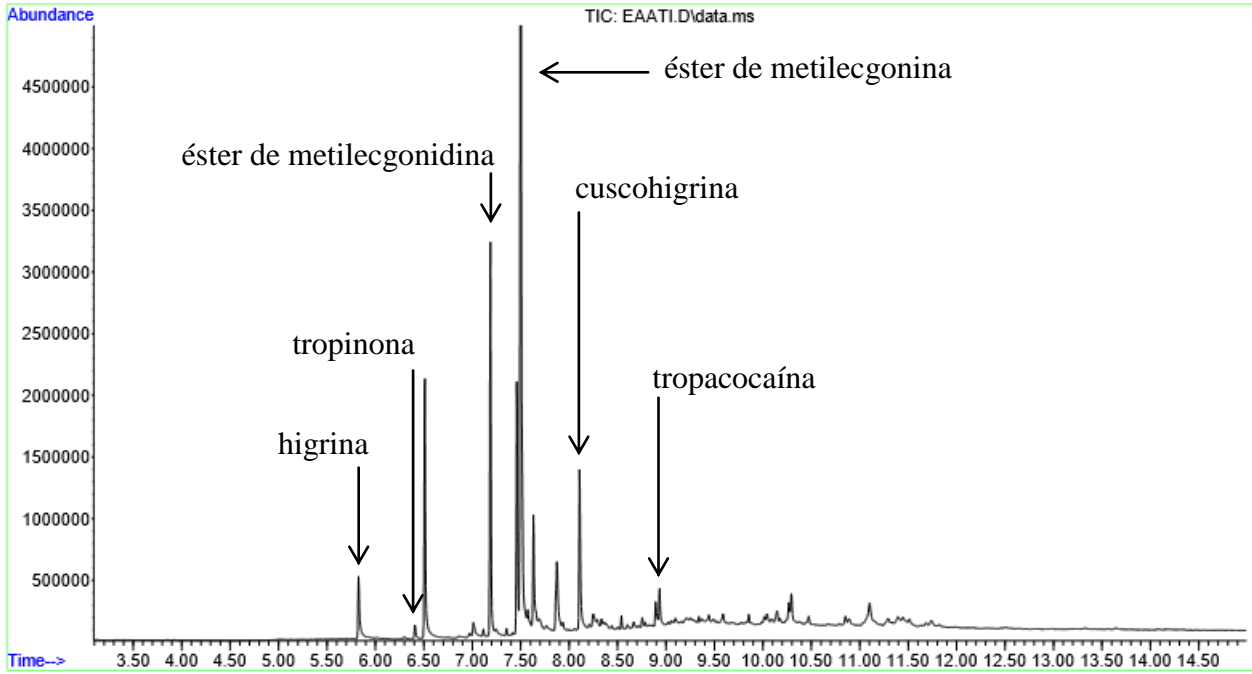
Erythroxylum amplifolium - coleta inverno



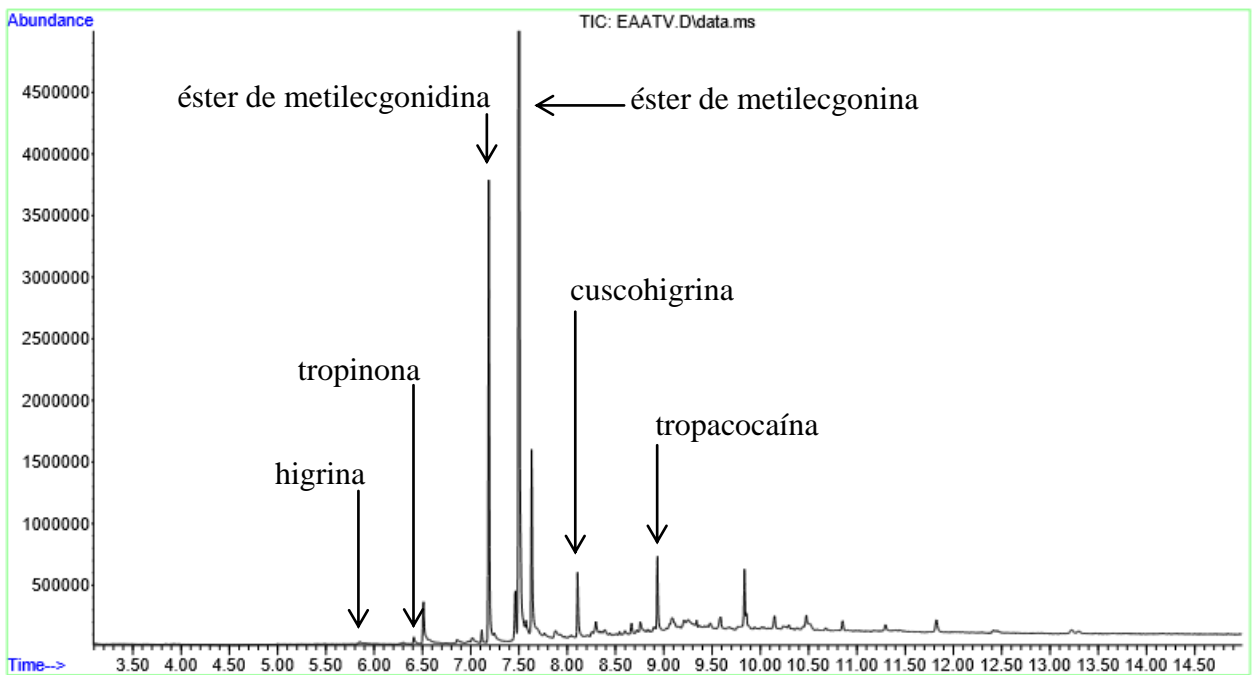
Erythroxylum amplifolium - coleta verão



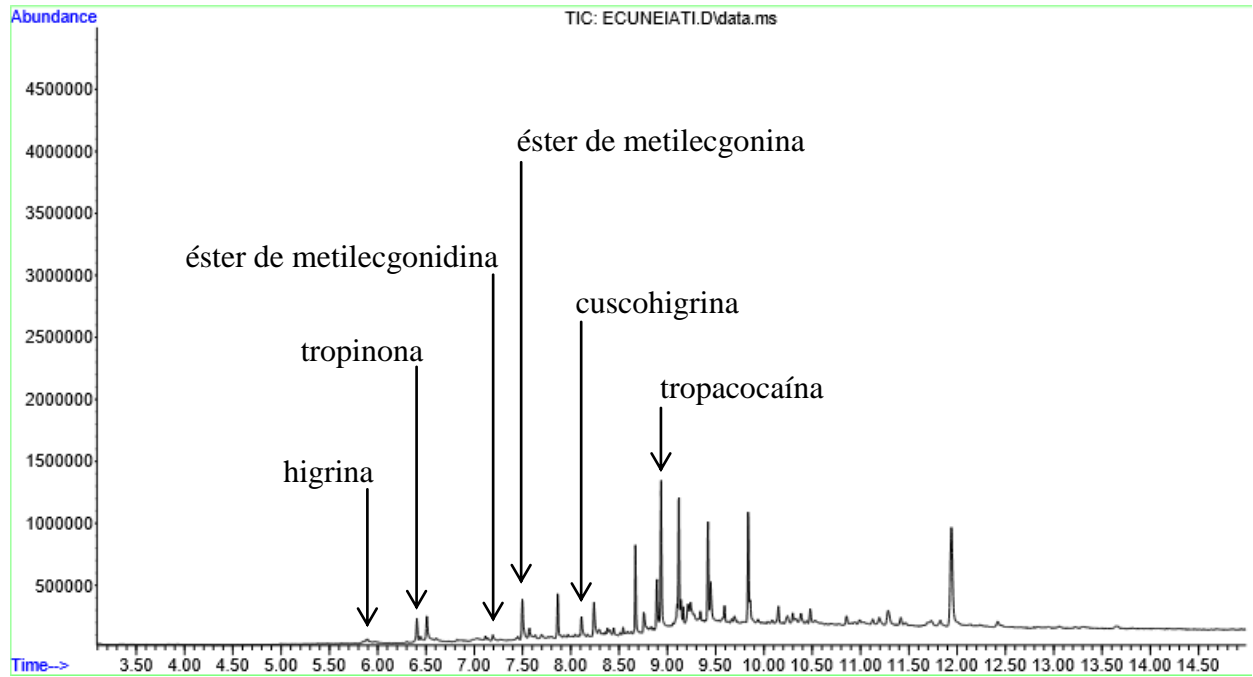
Erythroxylum argentinum - coleta inverno



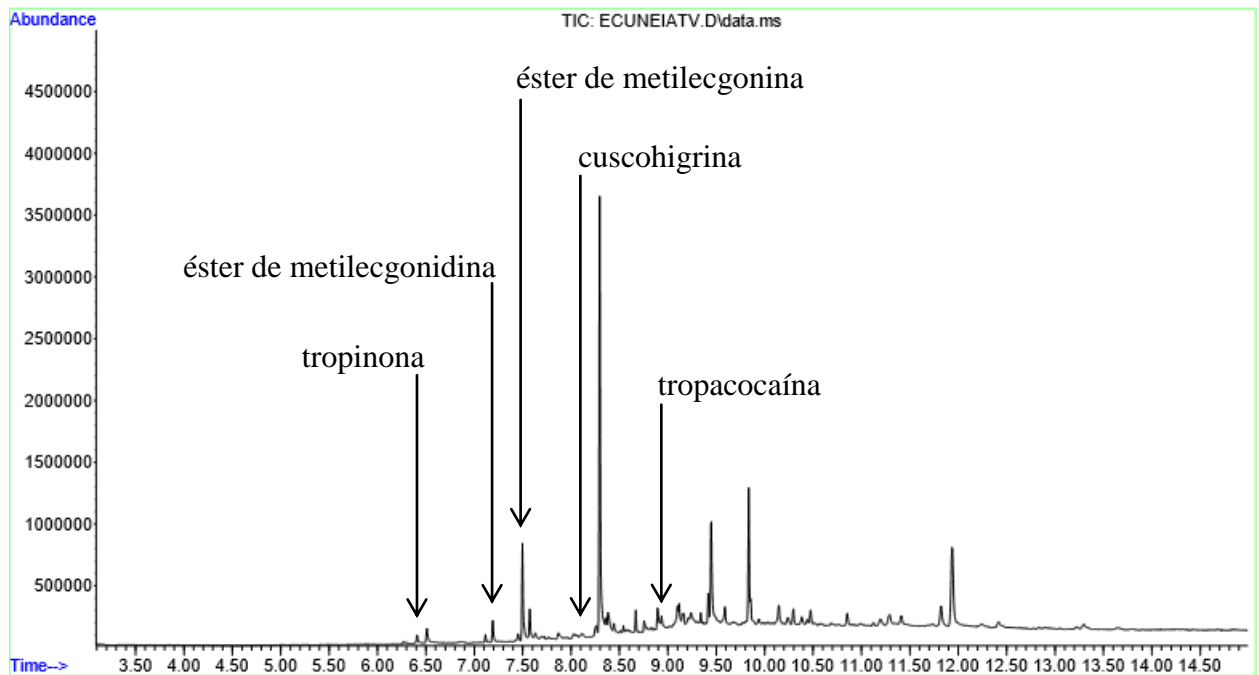
Erythroxylum argentinum - coleta verão



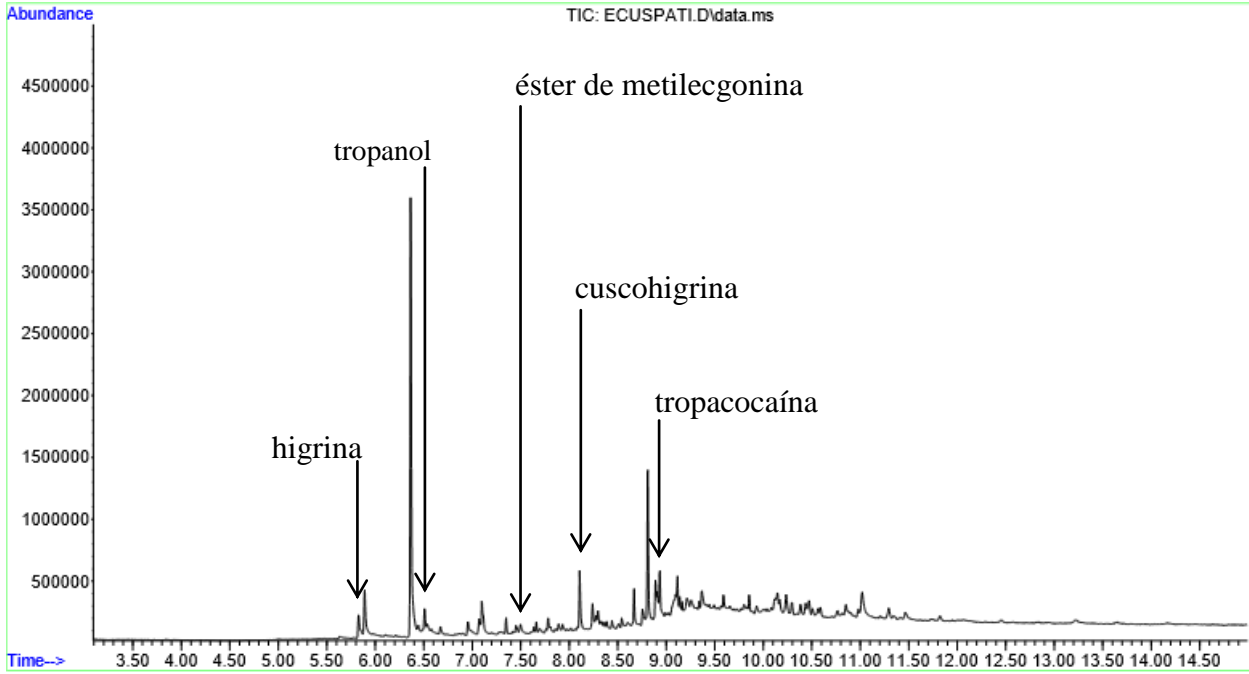
Erythroxylum cuneifolium - coleta inverno



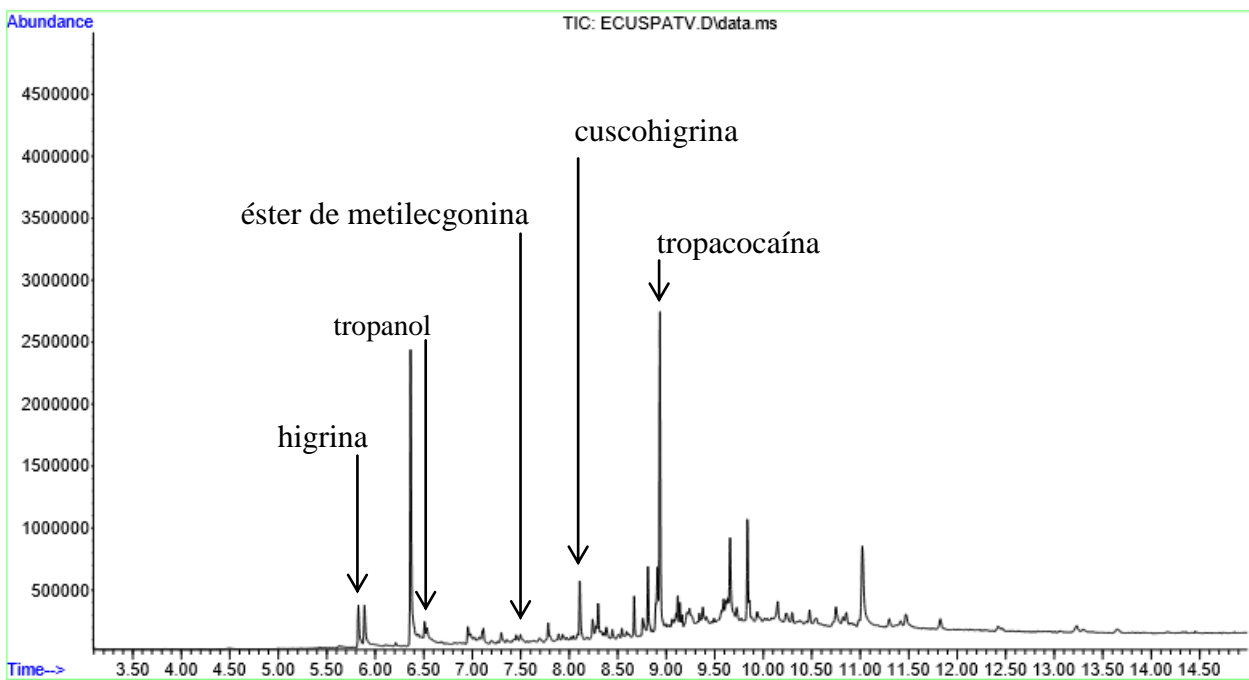
Erythroxylum cuneifolium - coleta verão



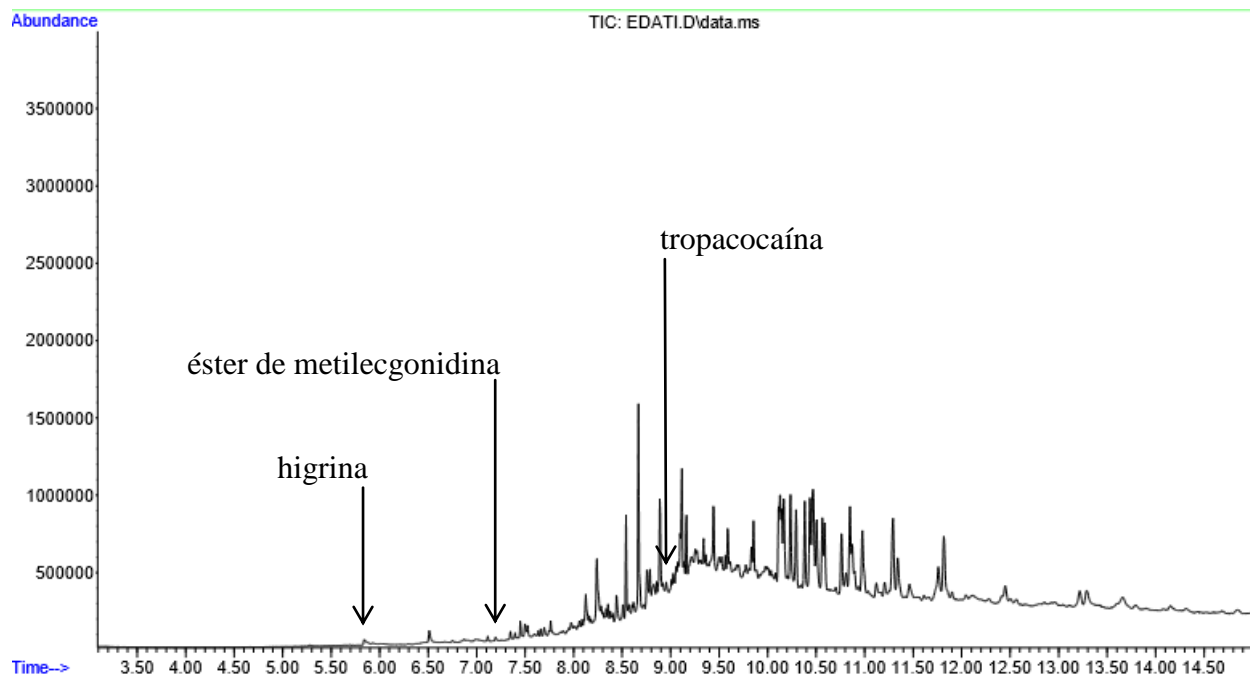
Erythroxylum cuspidifolium - coleta inverno



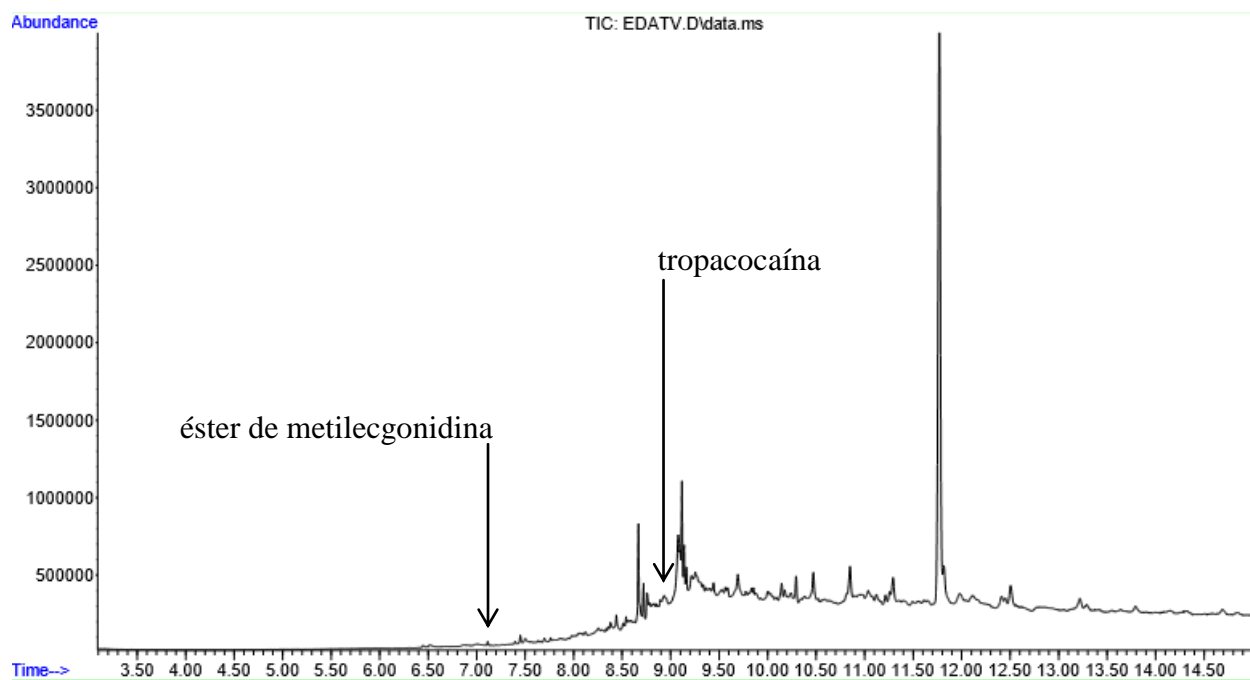
Erythroxylum cuspidifolium - coleta verão



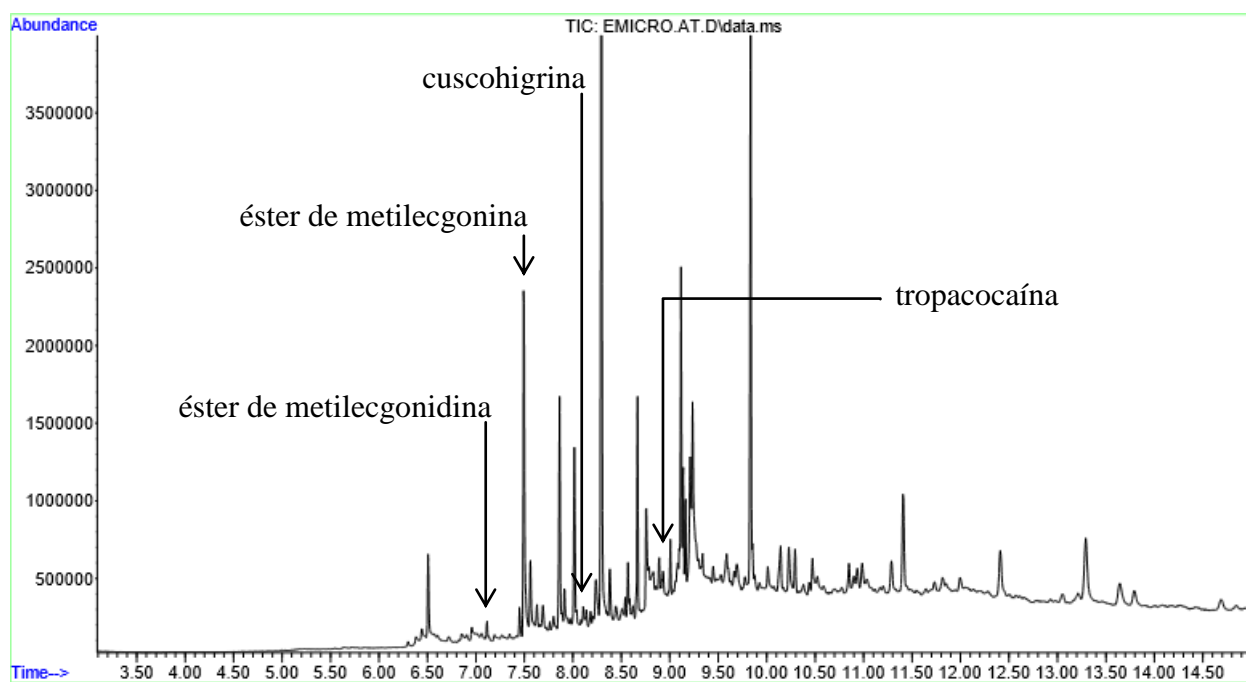
Erythroxylum deciduum - coleta inverno



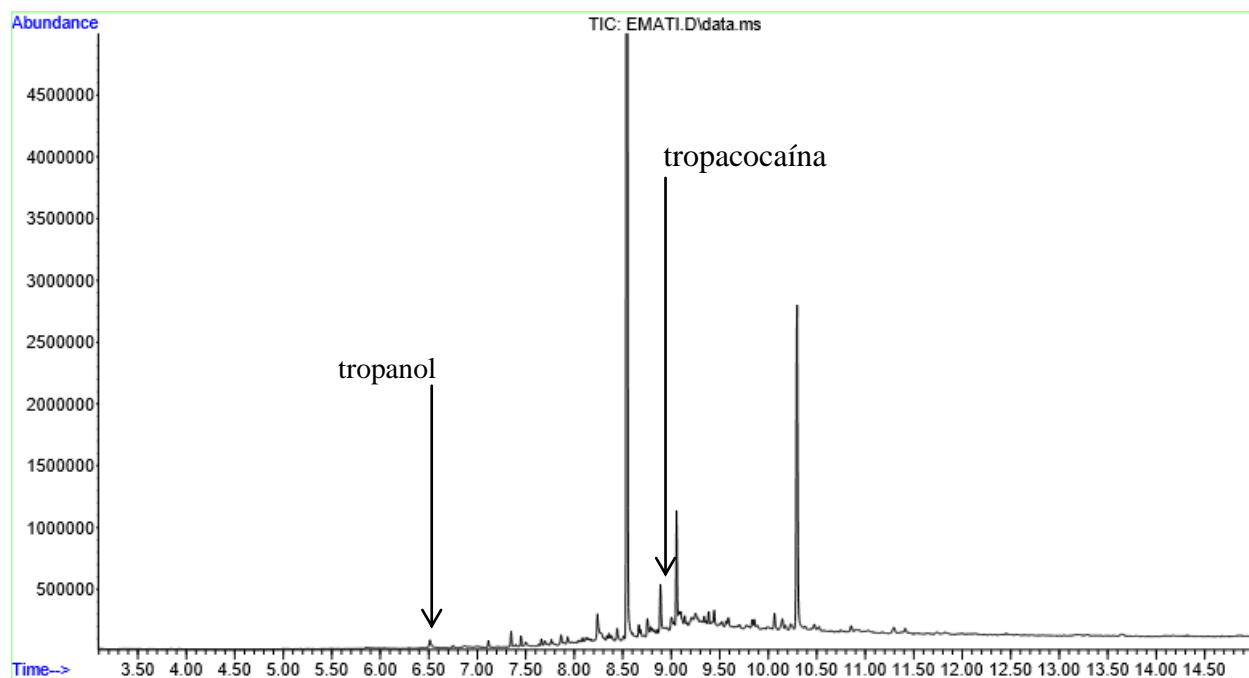
Erythroxylum deciduum - coleta verão



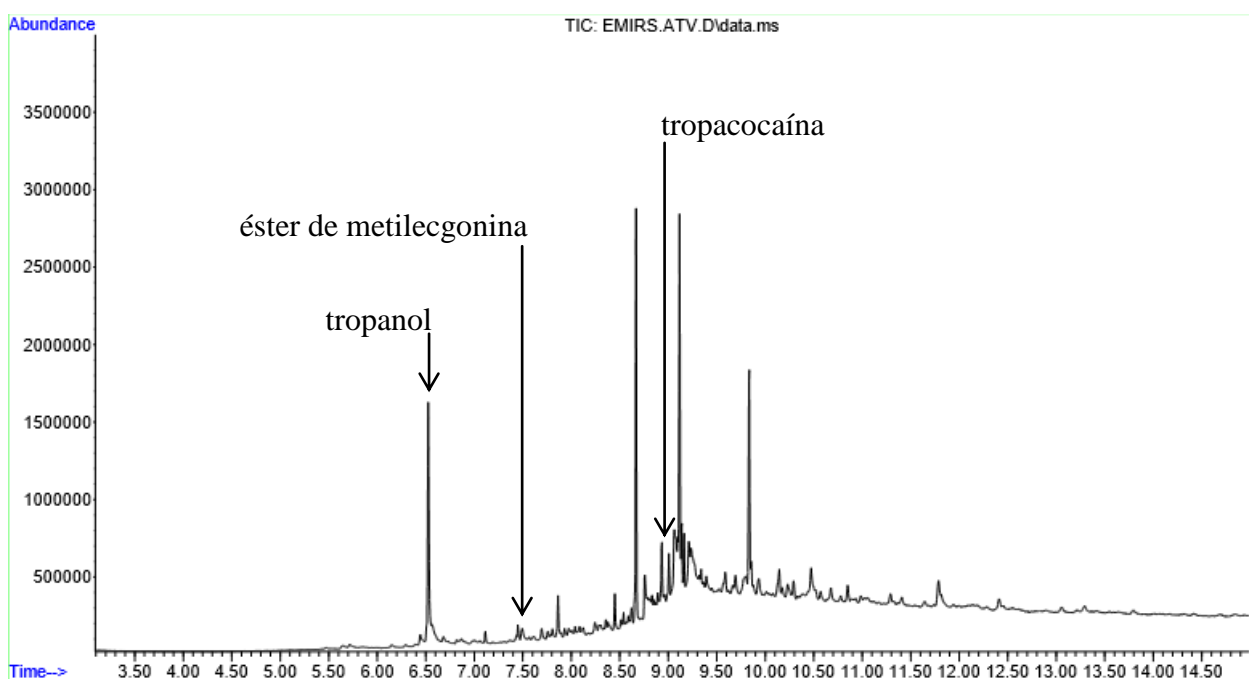
Erythroxylum microphyllum - coleta verão



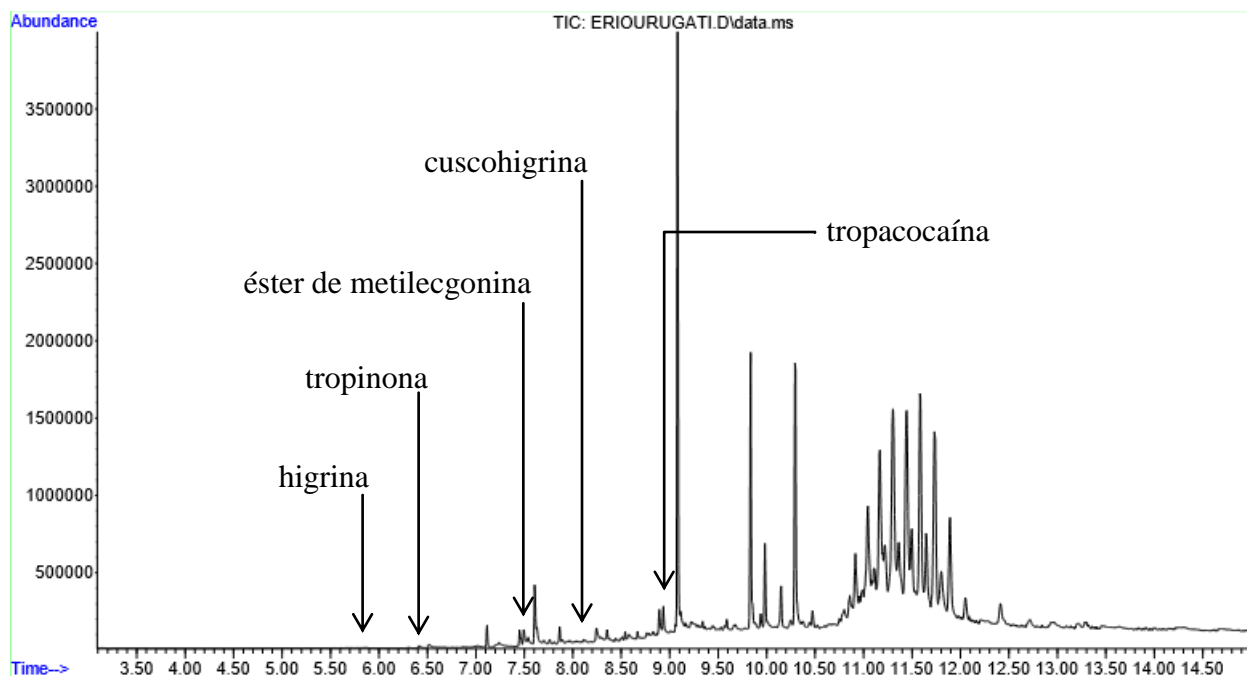
Erythroxylum myrsinites - coleta inverno



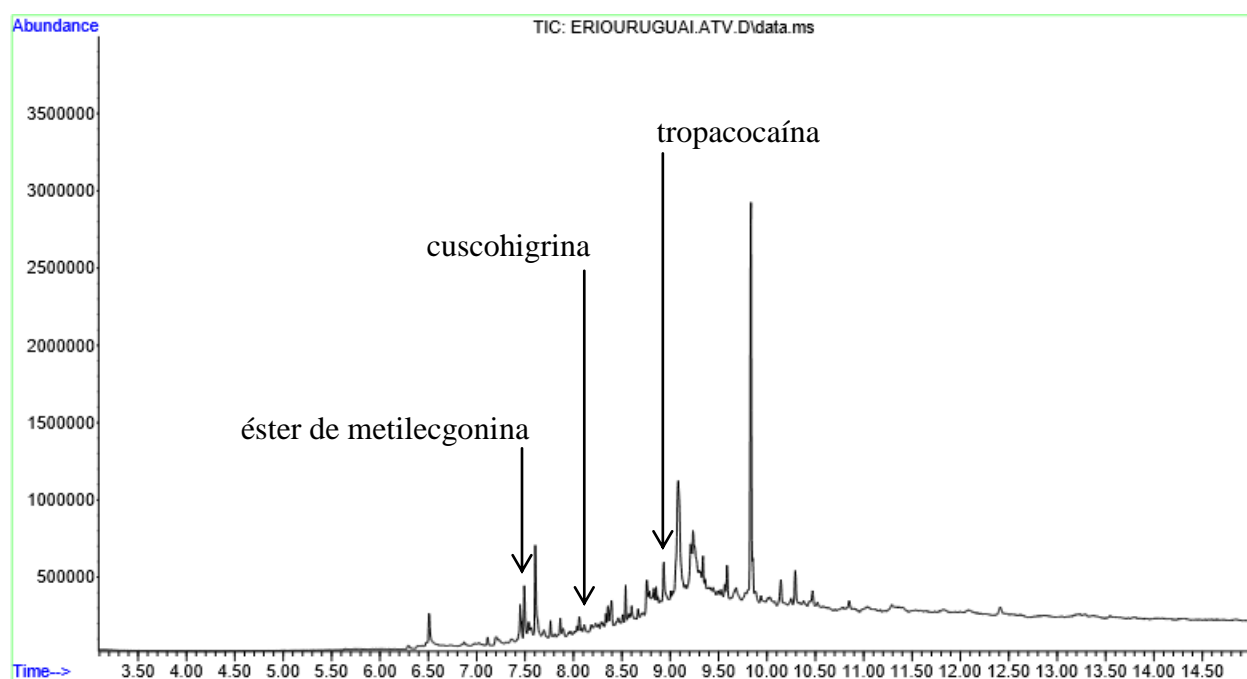
Erythroxylum myrsinites - coleta verão



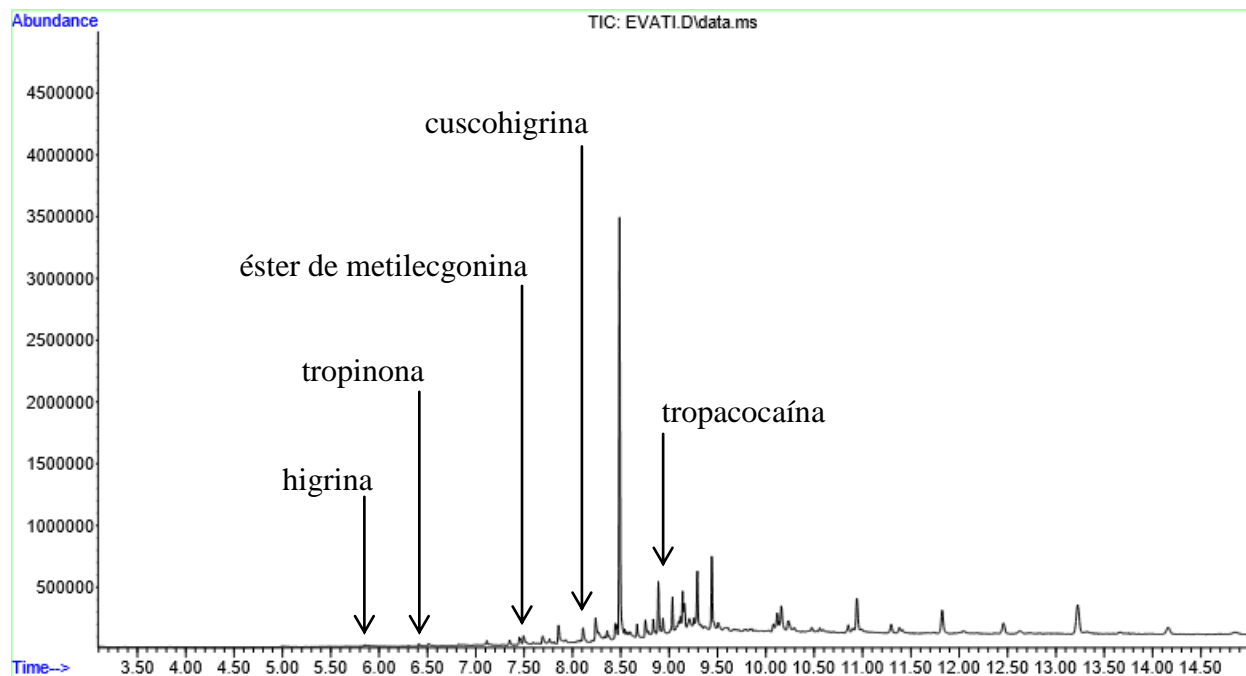
Erythroxylum pelleterianum - coleta inverno



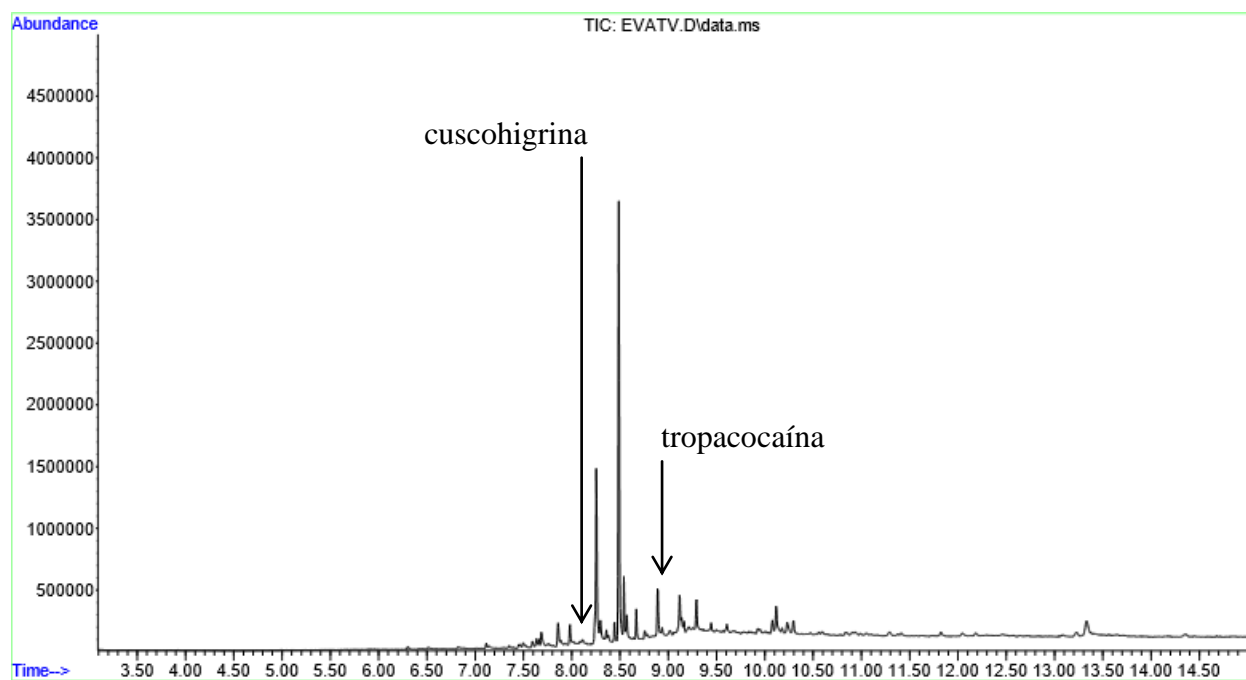
Erythroxylum pelleterianum - coleta verão



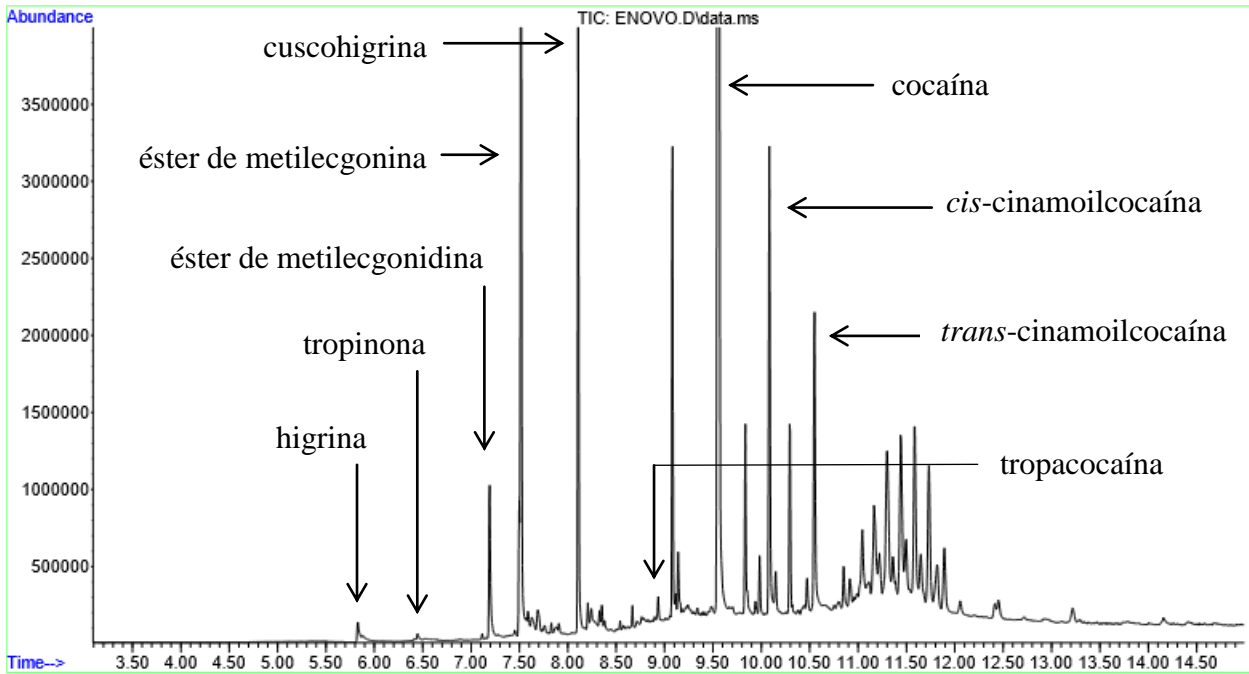
Erythroxylum vacciniifolium - coleta inverno



Erythroxylum vacciniifolium - coleta verão



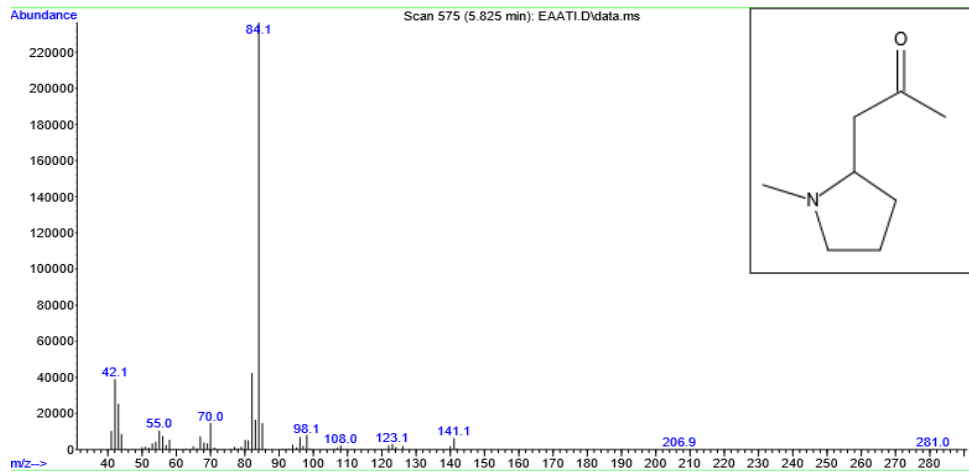
Chá de *Erythroxylum novogranatense*



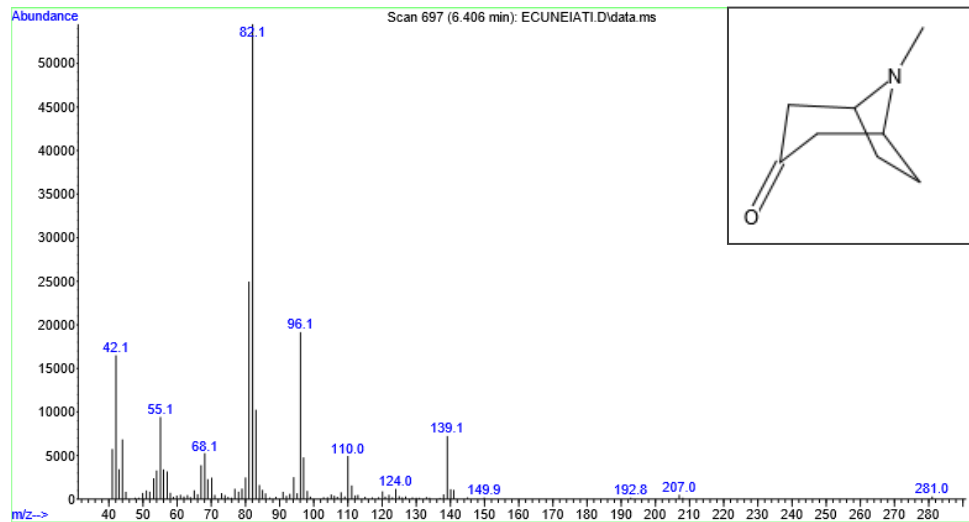
Apêndice 2

Espectro de Massas dos Alcaloides Identificados

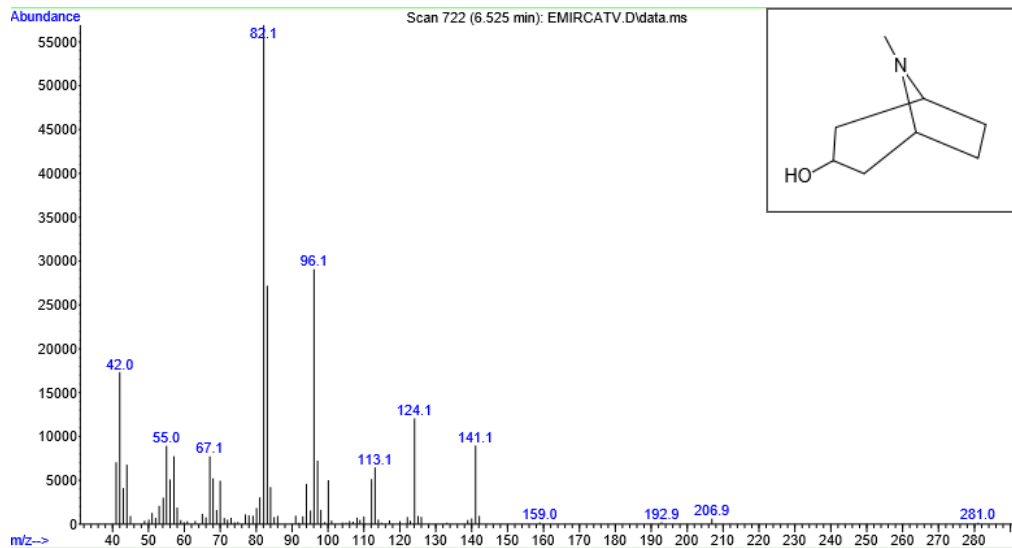
Espectro de Massas do composto higrina (Tempo de retenção: 5,825 min)



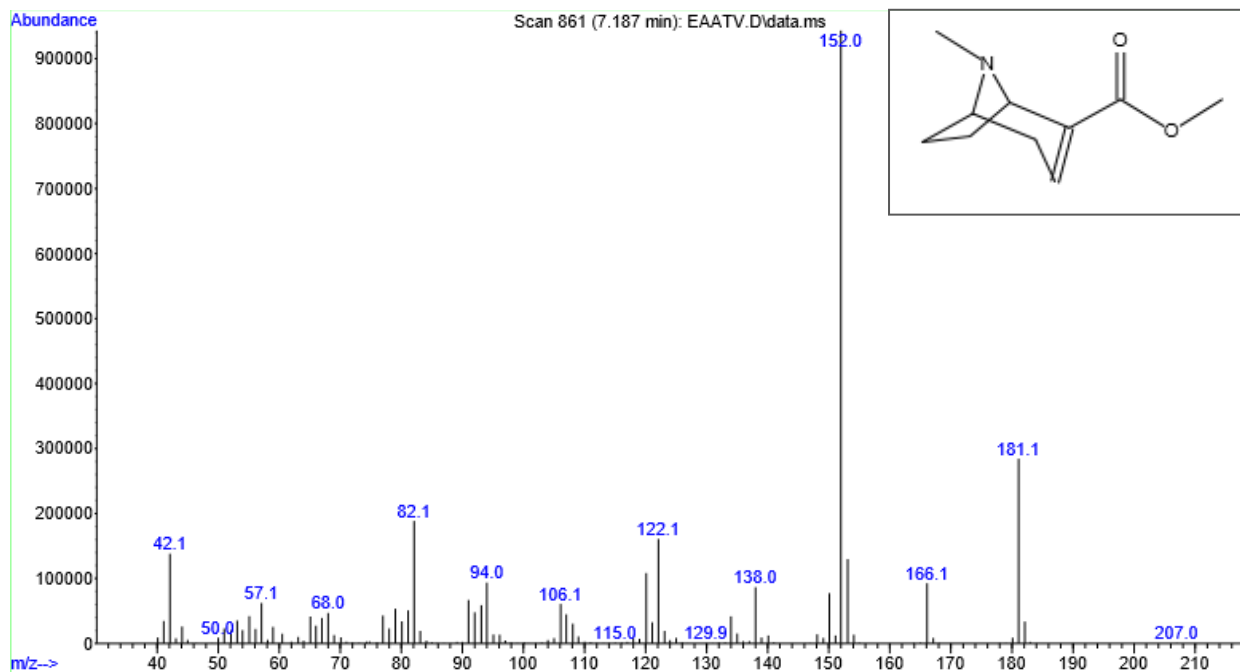
Espectro de Massas do composto tropinona (Tr: 6,406 min)



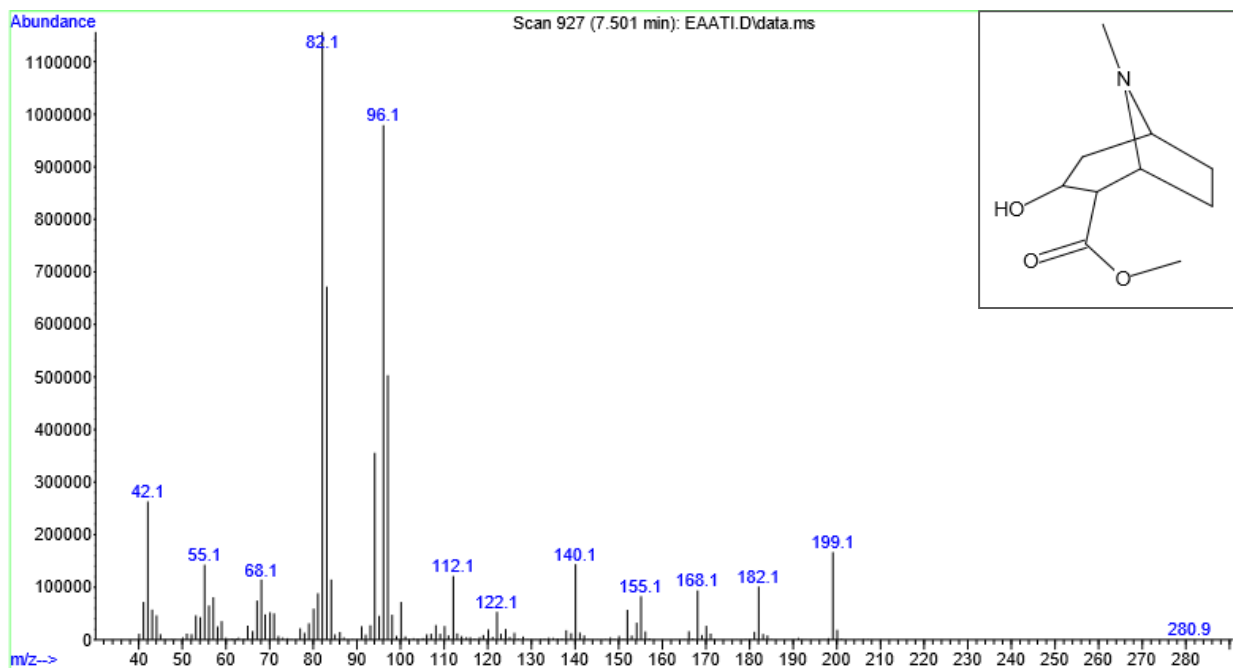
Espectro de Massas do composto tropanol (Tr: 6,525 min)



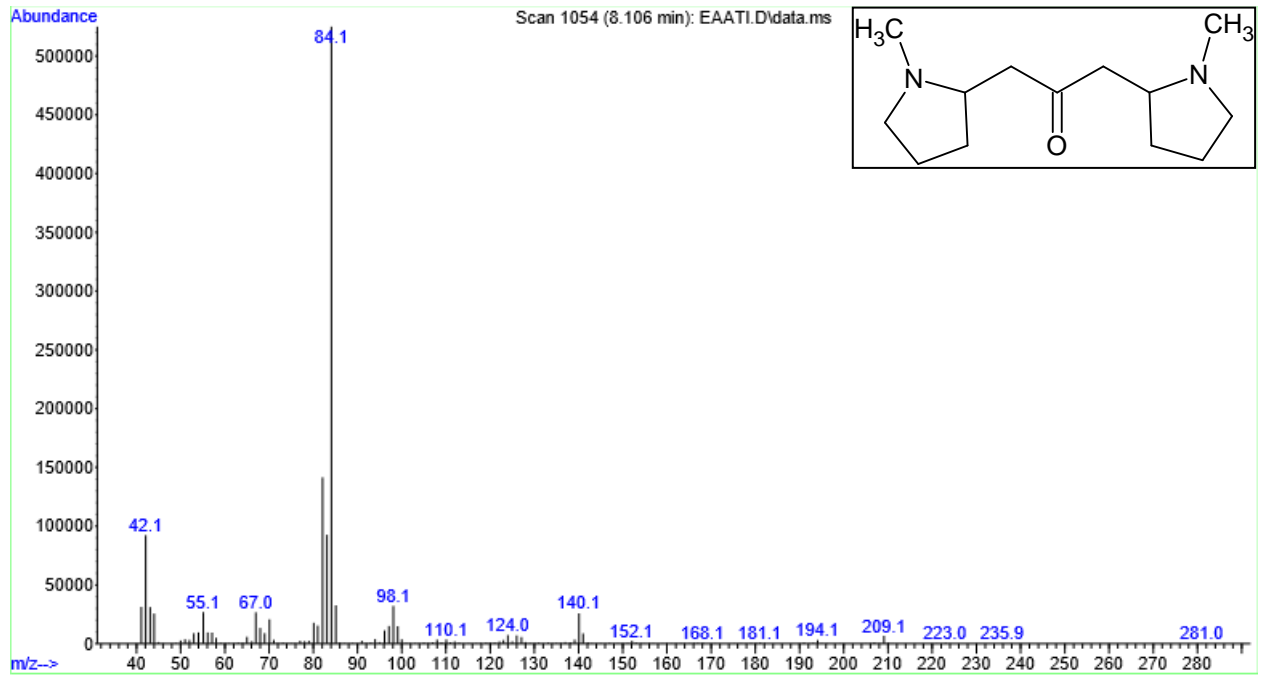
Espectro de Massas do alcaloide éster de metilecgonidina (Tr: 7,187 min)



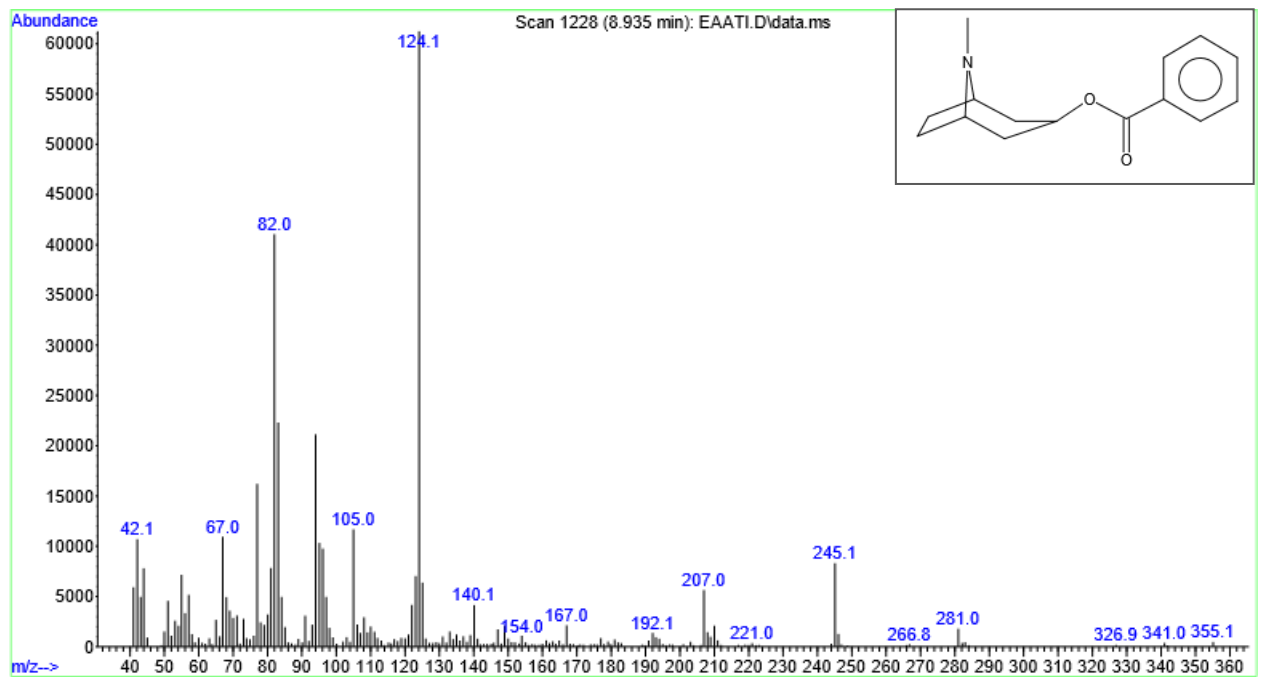
Espectro de Massas do alcaloide éster de metilecgonina (Tr: 7,501 min)



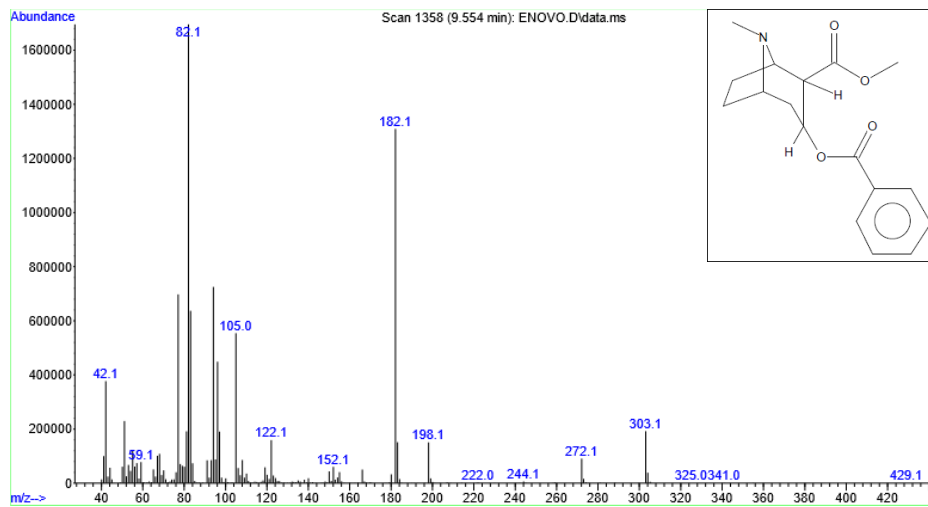
Espectro de Massas do alcaloide cuscohigrina (Tr: 8,106 min)



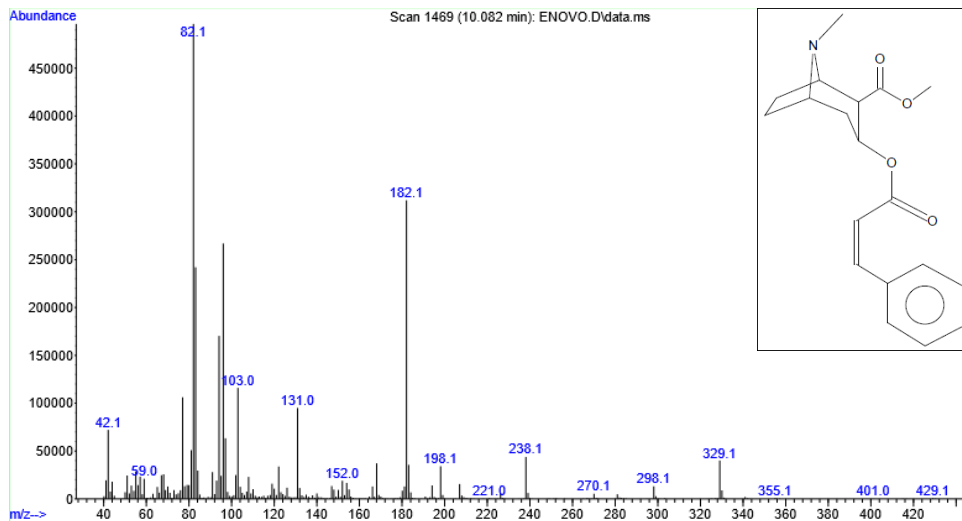
Espectro de Massas do alcaloide tropacocaína (Tr: 8,935 min)



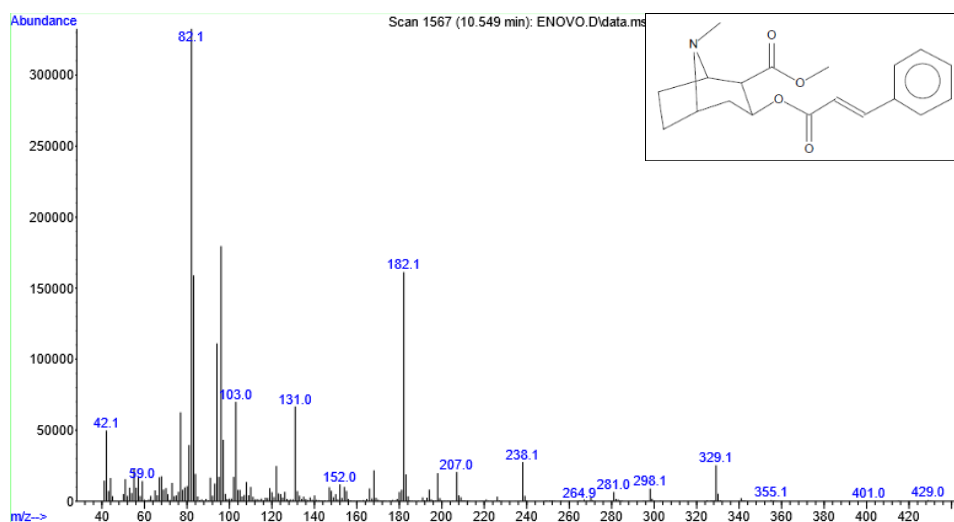
Espectro de Massas do alcaloide cocaína (Tr: 9,554 min)



Espectro de Massas do alcaloide *cis*-cinamoilcocaína (Tr: 10,082 min)



Espectro de Massas do alcaloide *trans*-cinamoilcocaína (Tr: 10,549 min)



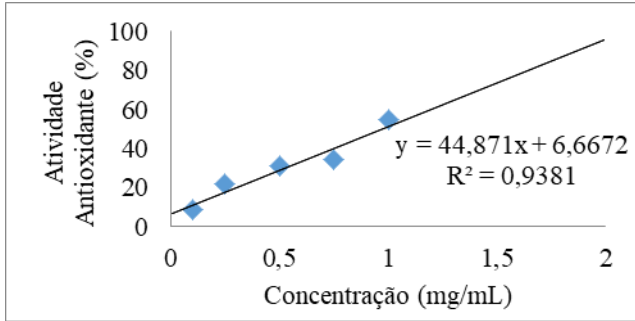
Apêndice 3

Atividade Antioxidante dos Extratos Avaliados

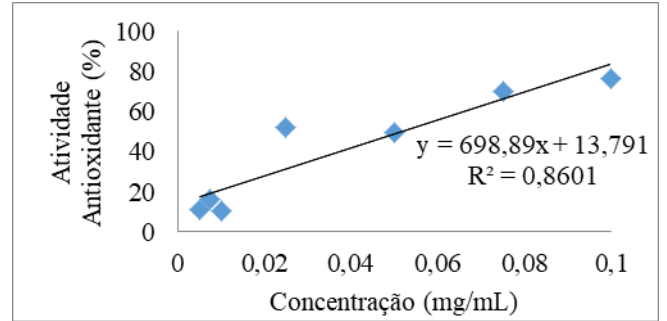
Atividade Antioxidante dos extratos *Erythroxylum argentinum*

Coleta Verão

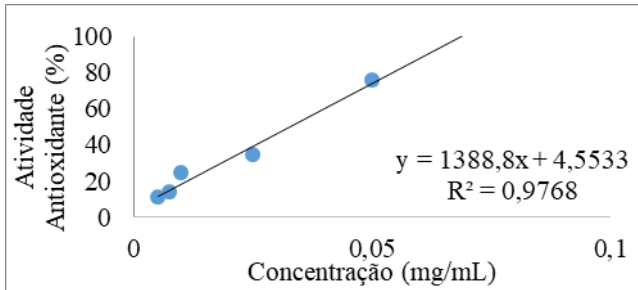
Extrato Éter



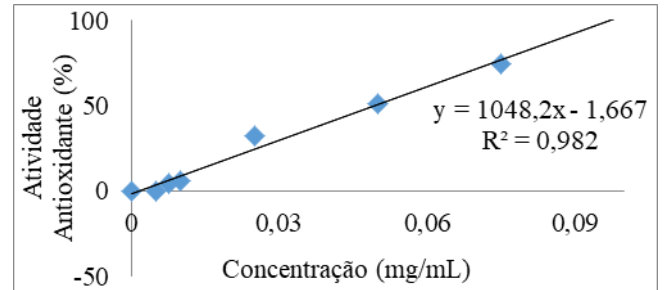
Extrato Diclorometano



Extrato Etanólico

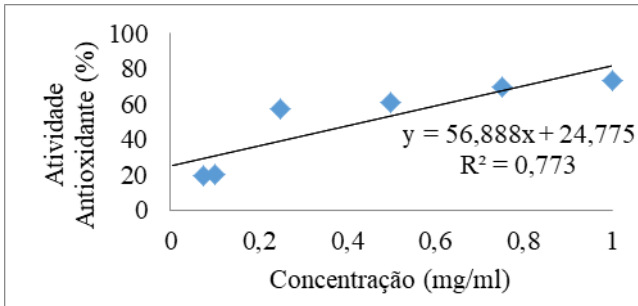


Extrato Aquoso

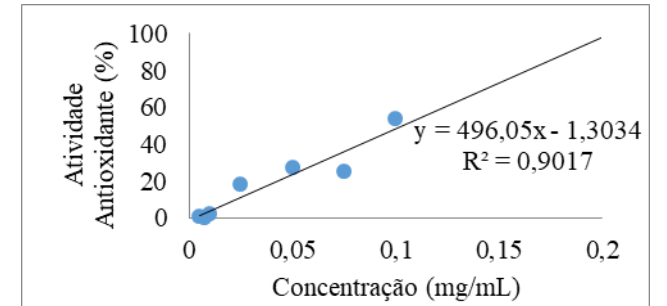


Coleta Inverno

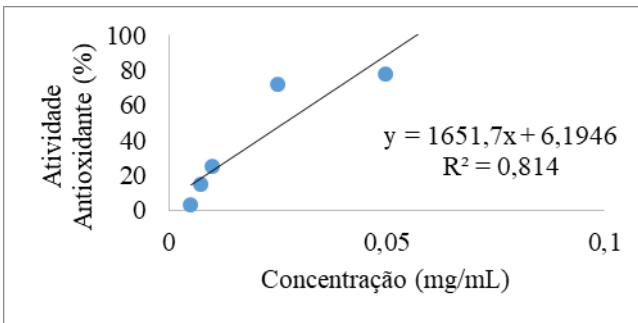
Extrato Éter



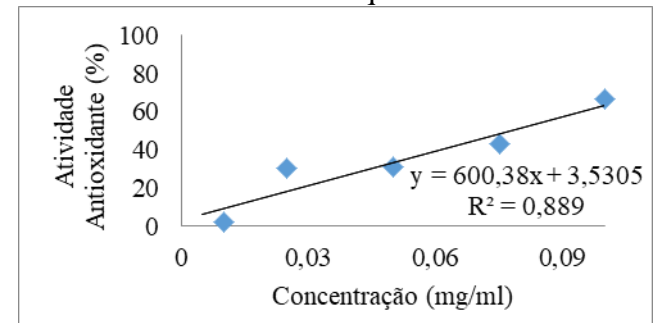
Extrato Diclorometano



Extrato Etanólico



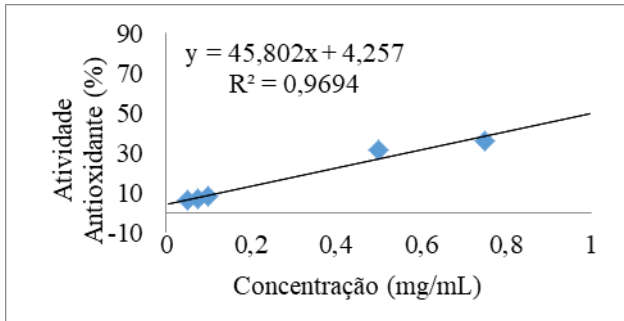
Extrato Aquoso



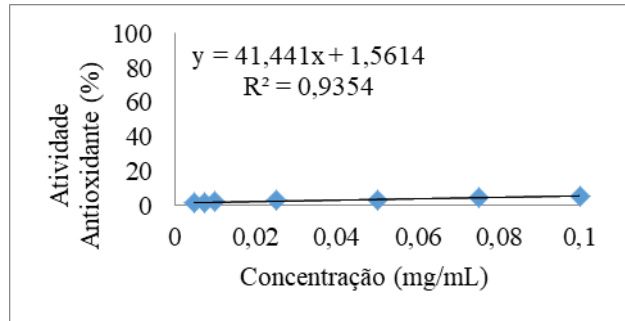
Atividade Antioxidante dos Extratos *Erythroxylum deciduum*

Coleta Verão

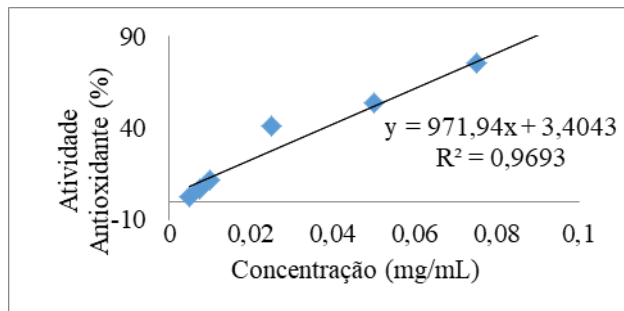
Extrato Êter



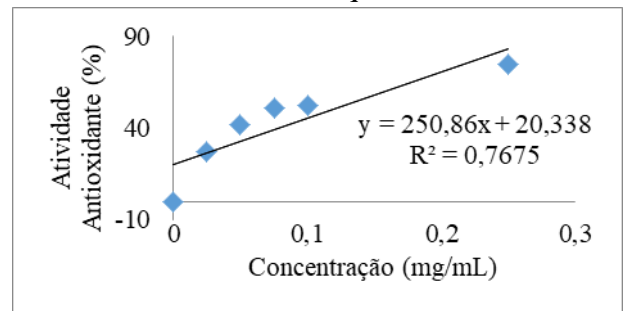
Extrato Diclorometano



Extrato Etanólico

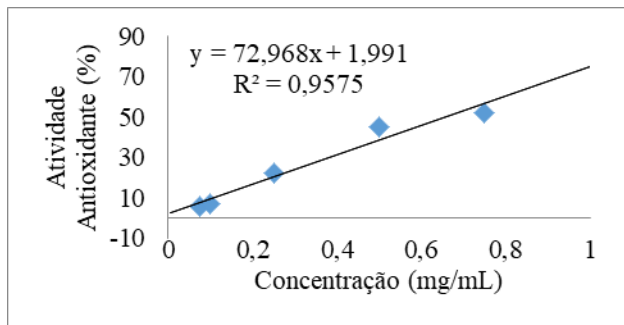


Extrato Aquoso

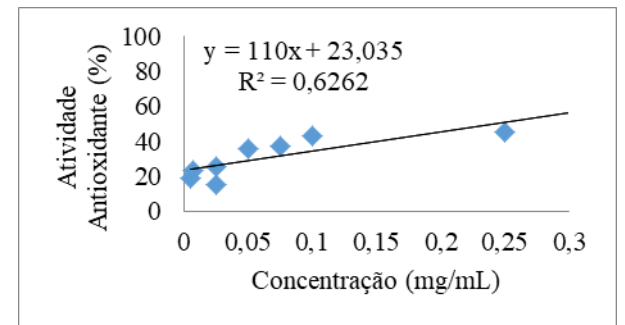


Coleta Inverno

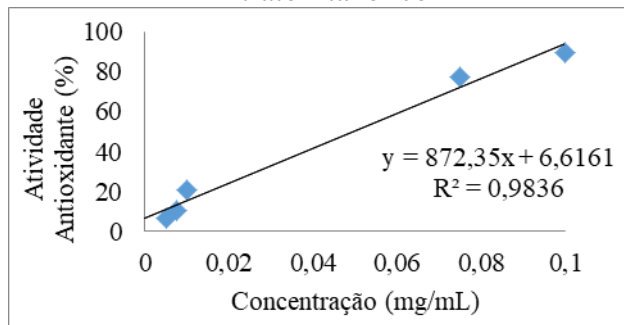
Extrato Êter



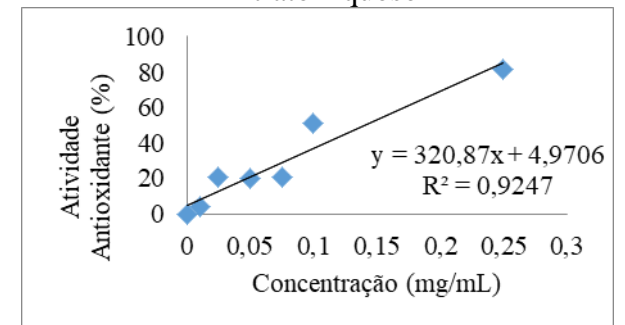
Extrato Diclorometano



Extrato Etanólico



Extrato Aquoso



Apêndice 4

Velocidade de Locomoção das Planárias por minutos e acumulado

Grupo EDV 0,025% - Extrato etanólico livre de compostos apolares das folhas de *Erythroxylum decituum* coletas verão à concentração de 0,025%

Tempo (min)	Planária 1		Planária 2		Planária 3		Planária 4		Planária 5		Planária 6		Planária 7		Planária 8		Planária 9		Planária 10	
	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado
1	32	32	32	27	27	28	28	32	32	34	34	34	27	27	27	27	30	30	24	24
2	21	53	24	56	25	52	20	48	27	59	29	63	21	48	25	52	32	62	24	48
3	21	74	28	84	18	70	19	67	25	84	33	96	21	69	26	78	27	89	26	74
4	18	92	29	113	19	89	29	96	18	102	24	120	27	96	27	105	30	119	29	103
5	18	110	25	138	19	108	28	124	22	124	28	148	20	116	33	138	29	148	28	131
6	20	130	28	166	18	126	20	144	23	147	18	166	26	142	20	158	30	178	21	152
7	25	155	26	192	17	143	16	160	23	170	15	181	25	167	21	179	29	207	18	170
8	18	173	26	218	19	162	17	177	24	194	14	195	28	195	18	197	28	235	16	186
9	12	185	22	240	19	181	16	193	23	217	16	211	25	220	18	215	24	259	23	209
10	14	199	24	264	20	201	10	203	20	237	19	230	30	250	27	242	25	284	32	241

Grupo Controle - Água artificial de poço

Tempo (min)	Planária 1		Planária 2		Planária 3		Planária 4		Planária 5		Planária 6		Planária 7		Planária 8		Planária 9		Planária 10	
	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado	Cruzamentos	No. Acumulado
1	19	19	15	15	16	16	15	15	17	17	23	23	20	20	25	25	23	23	20	20
2	14	33	10	25	7	23	14	29	11	28	11	34	20	40	12	37	8	31	13	33
3	3	36	7	32	9	32	11	40	9	37	9	43	17	57	8	45	10	41	16	49
4	4	40	10	42	5	37	10	50	8	45	7	50	15	72	12	57	7	48	10	59
5	12	52	7	49	10	47	9	59	9	54	9	59	9	81	7	64	8	56	12	71
6	5	57	6	55	6	53	9	68	6	60	7	66	12	93	8	72	5	61	13	84
7	7	64	9	64	7	60	7	75	8	68	7	73	11	104	9	81	0	61	9	93
8	4	68	8	72	6	66	6	81	10	78	7	80	9	113	5	86	0	61	15	108
9	6	74	8	80	5	71	11	92	4	82	7	87	12	125	2	88	0	61	11	119
10	6	80	5	85	6	77	10	102	1	83	6	93	10	135	5	93	0	61	10	129

Apêndice 5

Imagens de alguns locais de coleta das espécies de *Erythroxylum* realizados nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina



Anexo 1

Carta de recebimentos do artigo encaminhado à Brazilian Journal of Pharmaceutical
Sciences com consideração favorável à publicação

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Preview

From: bjps@usp.br

To: arnohofmann@hotmail.com

CC: arnohofmann@hotmail.com, ortiz.rs@gmail.com, renata@farmacia.ufrgs.br

Subject: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences - Manuscript ID BJPS-2017-0598

Body: 22-Sep-2017

Dear Dr. Hofmann:

Your manuscript entitled "Erythroxylum: a genus with "legal" species producing cocaine" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Your manuscript ID is BJPS-2017-0598.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjps-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Sincerely,
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences Editorial Office

Date Sent: 22-Sep-2017

Anexo 2

Carta de aceite do manuscrito encaminhado a World Journal of
Pharmaceutical and Life Sciences

Acceptance Letter

Manuscript No: WJPLS/1279/4/2018

Date: 09/01/2018

TITLE: EFFECT OF SEASONALITY ON ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ERYTHROXYLUM ARGENTINUM* O. E. SCHULZ AND *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* ST. HIL.

Dear Arno Ernesto Hofmann Junior, Janaina Tomazin, Bruna Maria Saorin Puton, Rogério Luís Cansian, Jean Carlos Budke, Neiva Aparecida Grazziotin and Renata Perreira Limberger

We are pleased to inform you that out of various research articles submitted, Experts/ Referees Panel of WJPLS has recommended your manuscript for publication, so **World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences** has been accepted your manuscript for publication in Current (January) Issue of **WJPLS**.

World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences publishes all its article in full open access format which are easily accessible for scientific community.

Kindly send the scanned copy of CTA form (Copyright Transfer Agreement). As early as possible. CTA form available at

www.wjpls.org

Thanking You

Editor in chief

Prof. Dr. Valentina Petkova

WJPLS