

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE
Strychnos peckii B. L. Rob. (LOGANIACEAE)**



CARLA LEVINA GOMES SANTOS

**MANAUS
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CARLA LEVINA GOMES SANTOS

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE
Strychnos peckii B. L. Rob. (LOGANIACEAE)**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva
Coorientadora: Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro

**MANAUS
2020**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237i Santos, Carla Levina Gomes
Investigação fitoquímica das folhas de *Strychnos peckii* B. L. Rob.
(Loganiaceae) / Carla Levina Gomes Santos . 2020
122 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Coorientador: Maria Lúcia Belém Pinheiro
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Alcaloides indólicos monoterpênicos. 2. Hplc-ms/ms. 3. Leaf spray. 4. Molecular networking. I. Silva, Felipe Moura Araújo da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Investigação fitoquímica das folhas
de *Strychnos Peckii* B. L. Rob.
(LOGANIACEAE)

CARLA LEVINA GOMES SANTOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre(a) em Química.

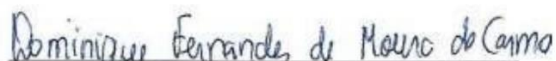
Aprovada em 31 de agosto de 2020.



Dr. Felipe Moura Araújo da Silva (CA/CAM/UFAM)
Presidente/Orientador



Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen (UEA)
Membro Externo



Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo (ICET/UFAM)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 31 de agosto de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades de aprendizado que me concedeu e por todas as pessoas que ele pôs em meu caminho;

A minha família, em especial a minha mãe, Maria de Jesus, que sempre me motivou e incentivou em meu caminho e graças à sua dedicação, incentivo e ensinamentos, pude concluir este trabalho;

A meus irmãos Tábita, Andrezza, Júnior e Miriã que de alguma forma sempre me ajudaram e estiveram comigo;

Ao meu namorado Kidney Neves que sempre esteve comigo em todos os momentos mais difíceis, me incentivando e apoiando quando eu acreditei que não conseguiria;

Ao meu orientador, Dr^o Felipe Moura Araújo da Silva, por *toda* paciência, dedicação e motivação. Por todos valiosos ensinamentos transmitidos e especialmente pela confiança, apoio e pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

A minha coorientadora, Prof^a Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro pelos conhecimentos transmitidos e apoio para a realização este trabalho;

Aos meus amigos Phillip e Carliane, por toda amizade, apoio e incentivo ao longo dos anos e por todos os momentos de descontração;

Aos meus colegas de laboratório e aos que fiz durante o mestrado;

Ao sr. José Ferreira Ramos pelo auxílio na identificação do material botânico;

Ao PPGQ, pela oportunidade de aprimoramento;

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

Aos laboratórios da central analítica por conceder o espaço e equipamentos necessários para que o trabalho pudesse ser realizado;

Ao CNPQ, FAPPEAM e à FINEP pelo suporte financeiro empregado para o desenvolvimento deste projeto;

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Strychnos* destaca-se na Região Amazônica devido ao seu uso na medicina tradicional e em outras práticas etnobotânicas, tais como a caça (curare) e a pesca. Embora algumas espécies pertencentes a este gênero tenham sido investigadas do ponto de vista fitoquímico, muitas outras são praticamente inexploradas, tal como a espécie *S. peckii*, sendo esta reconhecida como um dos ingredientes do curare. Neste contexto, o presente trabalho buscou investigar o conteúdo fitoquímico das folhas de *S. peckii*. Inicialmente, as folhas foram submetidas à análise por espectrometria de massas com fonte de *leaf spray* (LS-MS), sendo seu respectivo extrato aquoso (SPIF) investigado através de análises baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) combinadas com organização de dados via *molecular networking* (MN) e/ou interpretação manual de espectros de MS/MS. Finalmente, os extratos aquosos contendo moléculas supostamente inéditas, ou de interesse, foram fracionados em HPLC semi-preparativo. A análise de LS-MS permitiu a identificação por tentativa dos alcaloides indólicos monoterpênicos (AIMs) strictosidina e desoxicordifolina nas folhas de *S. peckii*, e evidenciou perdas neutras úteis para o reconhecimento de seus análogos. O uso de MN combinado com a interpretação manual dos espectros de MS/MS destacou fragmentações chave para os AIMs e permitiu a identificação por tentativa do ácido strictosidínico, 10-hidroxi-strictosidina, 5-carboxi-strictosidina, lialosídeo, 3,4-dehidro-strictosidina e strictosidina lactama na amostra SPIF, além de sugerir a presença de substâncias inéditas nesta amostra. O fracionamento de SPIF resultou no isolamento dos alcaloides: desoxicordifolina, 5-carboxi-strictosidina, N, β -glucopiranosil vincosamida, strictosidina e o ácido 3-harmanocarboxílico e os flavonoides kaempferol-3-O- α -ramnosídeo e quercetina-3-O- α -ramnosídeo. A abordagem proposta mostrou-se útil para a caracterização do conteúdo fitoquímico das folhas de *S. peckii*, qualificando esta espécie como fonte promissora de substâncias bioativas e contribuindo com o conhecimento químico do gênero *Strychnos*.

Palavras-Chave: Alcaloides indólicos monoterpênicos, HPLC-MS/MS, *Leaf spray*, *Molecular networking*.

ABSTRACT

The genus *Strychnos* stands out in the Amazon region due to its use in traditional medicine and other ethnobotanical practices such as hunting (curare) and fishing. Although some species of this genus have been investigated from the phytochemical point of view, many others are practically unexplored, such as *S. peckii*, which are recognized as curare ingredient. In this context, the present work sought to investigate the phytochemical content of *S. peckii* leaves. Initially, the leaves were subjected to leaf spray mass spectrometry (LS-MS) analysis, being their respective aqueous extracts (SPIF) investigated by high performance liquid chromatography-coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) combined with data organization by molecular network (MN) and/or manual interpretation of MS/MS spectra. Finally, the aqueous extracts containing desired or supposedly unpublished molecules were fractionated on semi-preparative HPLC. The LS-MS analysis allowed the tentative identification of the monoterpene indole alkaloids (MIAs) strictosidine and desoxycordifoline in the leaves of *S. peckii*, and showed useful neutral losses for the recognition of their analogues by HPLC-MS/MS experiments. The use of MN combined with manual interpretation of the MS/MS spectra highlighted key fragmentations for MIAs and allowed the tentative identification of the strictosidinic acid, 10-hydroxy strictosidine, 5-carboxystrictosidine, lyaloside, 3,4-dehydro-strictosidine, and strictosidine lactam from SPIF, besides suggesting the presence of unpublished molecules in this sample. The SPIF fractionation resulted in the isolation of the alkaloids desoxycordifoline, 5-carboxystrictosidine, *N*, β -glucopyranosil vincosamide, strictosidine and the harman-3-carboxylic acid and the flavonoids kaempferol-3-*O*- α -rhamnoside and quecetin-3-*O*- α -rhamnoside. The proposed approach was useful to characterize the phytochemical content of *S. peckii* leaves, qualifying this species as a promising source of bioactive substances and contributing to the chemical knowledge of the genus *Strychnos*.

Keywords: HPLC-MS/MS, Leaf spray, Molecular networking, Monoterpene indole alkaloids

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
DMSO	Dimetil sulfóxido
¹H	Espectro de hidrogênio
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
<i>t</i>	Tripleto
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa carga
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
LS	<i>Leaf Spray</i>
LS-MS	<i>Leaf Spray Mass Spectrometry</i>
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Hz	Hertz
COSY	<i>Correlation Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

ESI	Ionização por electrospray (do inglês <i>Electrospray Ionization</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>tandem Mass Spectrometry</i>)
MN	<i>Molecular Networking</i>
AIM	Alcaloide indólico monoterpênico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica para a família Loganiaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2019) (https://www.gbif.org/species/2502).....	22
Figura 2: Representantes dos gêneros da família Loganiaceae ocorrentes no Brasil	23
Figura 3: Distribuição de espécies do gênero <i>strychnos</i> no Brasil. Fonte: Adaptado de <i>Strychnos</i> in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8663 >. Acesso em: 20 Jun. 2020.....	25
Figura 4: Alcaloides presentes no curare que atuam como bloqueadores neuromusculares	27
Figura 5: Precursores da classe dos alcaloides indólicos terpênicos.	32
Figura 6: Etapas iniciais da biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos.....	32
Figura 7: Núcleo estrutural de flavonoides. Adaptado de (FAGGIO <i>et al.</i> , 2017).....	36
Figura 8: Esquema básico do acoplamento de HPLC-MS e HPLC-UV.	42
Figura 9: Representação da análise por LS-MS. (Figura adaptada de Tadjimukhamedov <i>et al.</i> , 2012).....	44
Figura 10: Perfil alcaloídico por LS-MS das folhas de <i>S. peckii</i> com * denotando possíveis alcaloides (A) e espectros de LS-MS/MS dos íons de m/z 531 (B) e 571 (C).58	58
Figura 11: Proposta de fragmentação para os principais íons produtos observados no espectro de LS-MS/MS do alcaloide strictosidina (m/z 531).....	60
Figura 12: Proposta de fragmentação para os principais íons produtos observados no espectro de LS-MS/MS do alcaloide desoxicordifolina (m/z 571).....	61
Figura 13: Cromatograma representativo obtido a partir da varredura por perda neutra de 17 (A) e 162 Da (B). Anotação do <i>molecular networking</i> , que mostra os alcaloides derivados da strictosidina (pontos azuis), desoxicordifolina (pontos verdes escuros) e AIMs supostamente inéditos (hexágonos verde-claros) (C).....	63
Figura 14: Espectro de MS/MS do íon m/z 517.....	64
Figura 15: Espectro de MS/MS do íon m/z 547.....	65
Figura 16: Espectro de MS/MS do íon m/z 575.....	66
Figura 17: Espectros de MS/MS dos íons m/z 527 e 529.	67
Figura 18: Espectro de MS/MS do íon m/z 499.....	68
Figura 19: Cromatograma da amostra SPIF_LE_SPE destacando os principais picos observados	69
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF8 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	72
Figura 21: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF8 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).	73
Figura 22: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF8 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃)	74
Figura 23: Principais correlações observadas para o alcaloide desoxicordifolina.....	74
Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da amostra SPF7_2 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	77
Figura 25: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF7_2 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).	78
Figura 26: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF7_2 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).	78
Figura 27: Principais correlações observadas para o alcaloide 5-carboxi-strictosidina. 79	79
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPIF_661 (500 MHz, 11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS).....	81

Figura 29: Mapa de correlação HMBC da amostra SPIF_661 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO-d ₆).....	82
Figura 30: Principais correlações observadas para o alcaloide <i>N,β-D</i> -glucopiranosil vincosamida.....	83
Figura 31: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF7_1 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	85
Figura 32: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF7_1 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).....	86
Figura 33: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF7_1 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).....	86
Figura 34: Estrutura proposta para o alcaloide ácido 3-harmanocarboxílico.....	86
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF4 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	88
Figura 36: Estrutura do alcaloide strictosidina.....	89
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF10 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	90
Figura 38: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF10 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).....	91
Figura 39: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF10 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD ₃).....	92
Figura 40: Principais correlações observadas para o flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> - α -ramnosídeo.....	92
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da amostra SPF9_2 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).....	94
Figura 42: Estrutura do flavonoide quercetina 3- <i>O</i> - α -ramnosídeo.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais espécies de <i>strychnos</i> utilizadas na confecção do curare.....	28
Quadro 2: Exemplos de espécies de <i>Strychnos</i> utilizadas na medicina popular.....	30
Quadro 3: Alcaloides relatados para <i>Strychnos</i> spp.....	34
Quadro 4: Flavonoides relatados para <i>Strychnos</i> spp.	37
Quadro 5: Substâncias relatadas para <i>Strychnos</i> spp.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Codificação das frações obtidos após fracionamento cromatográfico.....	56
Tabela 2: Picos observados para SPIF_LE_SPE com seus íons precursores e fragmentos principais	70
Tabela 3: Dados de RMN para amostra SPF8.	75
Tabela 4: Dados de RMN para a amostra SPF7_2.	79
Tabela 5: Dados de RMN para a amostra SPIF_661.	83
Tabela 6: Dados de RMN para amostra SPF7_1.	87
Tabela 7: Dados de RMN para a amostra SPF4.	89
Tabela 8: Dados de RMN para a amostra SPF10	92
Tabela 9: Dados de RMN para a amostra SPF9_2.	95

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso de infusão em micro escala	52
Fluxograma 2: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso de infusão em larga escala	49

LISTA DE ANEXOS

Figura A1: Pesquisa publicada com base nos dados apresentados do presente trabalho	108
Figura A2: Estruturas observadas por HPLC-MS/MS para a amostra SPIF_LE_SPE.	109
Figura A3: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF8.....	110
Figura A4: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF8.....	110
Figura A5: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF7_2.....	111
Figura A6: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF7_2.....	111
Figura A7: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPIF_661.....	112
Figura A8: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPIF_661.....	112
Figura A9: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF7_1	113
Figura A10: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF7_1	113
Figura A11: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF4.....	114
Figura A12: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF4.....	114
Figura A13: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF10.....	115
Figura A14: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF10.....	115
Figura A15: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF9_2.....	116
Figura A16: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF9_2.....	116
Figura A17: Proposta de fragmentação para o íon m/z 517	117
Figura A18: Proposta de fragmentação para o íon m/z 547	117
Figura A19: Proposta de fragmentação para o íon m/z 575	118
Figura A20: Proposta de fragmentação para o íon m/z 527	118
Figura A21: Proposta de fragmentação para o íon m/z 529	119
Figura A22: Proposta de fragmentação para o íon m/z 499	119

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A família Loganiaceae R.Br. ex Mart.....	21
2.1.1 O gênero <i>Strychnos</i> L	22
2.1.2 O gênero <i>Strychnos</i> L. no Brasil.....	23
2.2 Aspectos etnobotânicos e entofarmacológicos de <i>Strychnos</i> L.	24
2.2.1 <i>Strychnos</i> e o curare.....	25
2.2.2 <i>Strychnos</i> na medicina tradicional.....	28
2.3 A química do gênero <i>Strychnos</i> L.	30
2.3.1 Alcaloides	30
2.3.2 Flavonoides.....	34
2.3.3 Outros metabólitos secundários de <i>Strychnos</i> L.....	37
2.4 Abordagens baseadas em espectrometria de massas (MS) na investigação química de matrizes vegetais.....	40
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. Geral	45
3.2. Específicos.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Análises Cromatográficas.....	47
4.2 Solventes.....	47
4.3 Métodos espectroscópicos e espectrométricos	48
4.3.1 Análises por Espectrometria de Massas.....	48
4.3.2 Análises por Ressonância Magnética Nuclear.....	48
4.4 Coleta e identificação do material botânico.....	48
4.5 Análise do perfil químico das folhas de <i>S. peckii</i> espectrometria de massas com fonte ambiente <i>leaf spray</i> (LS-MS)	49
4.6 Obtenção dos extratos aquosos das folhas de <i>S. peckii</i>	49
4.7 Análise por HPLC-MS/MS do extratos SPIF	53
4.8 Análises por <i>molecular networking</i> (MN) de <i>Strychnos peckii</i>	53
4.9 Clean up da amostra SPIF_LE e análise por HPLC-DAD-MS	54
4.10 Fracionamento cromatográfico de SPIF_LE_SPE	54
4.11 Purificação dos constituintes químicos de <i>Strychnos peckii</i>	55

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Perfil alcaloídico das folhas de <i>S. peckii</i> por LS-MS	57
5.2 Análises por HPLC- MS/MS e <i>molecular networking</i> (MN) da amostra SPIF.....	61
5.3 Análises por HPLC-DAD-MS e HPLC-MS/MS da amostra SPIF_LE_SPE.....	68
5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>S. peckii</i>	70
5.4.1 Determinação estrutural da amostra SPF8.....	70
5.4.2 Determinação estrutural da amostra SPF7_2.....	75
5.4.3 Determinação estrutural da amostra SPIF_661	79
5.4.4 Determinação estrutural da amostra SPF7_1.....	83
5.4.5 Determinação estrutural da amostra SPF4.....	86
5.4.6 Determinação estrutural da amostra SPF10.....	89
5.4.7 Determinação estrutural da amostra SPF9_2.....	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9. ANEXOS.....	108

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A Região Amazônica (6.000.000 Km²), maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta, é constituída por aproximadamente 65% de florestas de terra firme, sendo considerada a maior e mais diversa região de Floresta Tropical do planeta (OLIVEIRA; AMARAL, 2004; PRATES; IRVING, 2015; VÁSQUEZ *et al.*, 2014). Em meio a esta vasta biodiversidade, inúmeras espécies pertencentes ao gênero *Strychnos* (Loganiaceae) destacam-se devido ao seu uso na medicina tradicional (BASÍLIO *et al.* 2005; JIANG *et al.*, 2016; VARANDA, 2006) e como ingredientes fundamentais no preparo do curare, veneno utilizado na caça por diversas tribos indígenas da Região Amazônica (SILVA *et al.*, 2005).

O gênero *Strychnos* é caracterizado quimicamente pela presença de alcaloides indólicos e flavonóides (BISSET; PHILLIPSON, 1974; BRASSEUR; ANGENOT, 1986; QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990), substâncias farmacologicamente ativas responsáveis por diversas atividades biológicas (O'CONNOR; MARESH, 2006). Embora a composição química de algumas espécies de *Strychnos* da Região Amazônica tenha sido investigada, a composição de muitas outras são praticamente inexploradas, tal como *S. peckii*, reconhecida como ingrediente no preparo do curare (FOLKERS, 1938; PHILIPPE *et al.*, 2004).

Atualmente a ferramenta analítica mais versátil para a investigação química de amostras biológicas ricas em substâncias polares, tais como alcaloides e flavonoides, é a espectrometria de massas (MS), associada ou não a técnicas cromatográficas (ex. HPLC). Mais recentemente, abordagens baseadas em espectrometria de massas por ionização ambiente, tal como *leaf spray*, têm se caracterizado como métodos de amostragem rápidos e de baixo custo, possibilitando análises diretas de amostras diversas, sendo útil para o rastreio de compostos orgânicos, em especial, compostos

bioativos hidrofílicos (LIMA; *et al.*, 2019; LIU; WANG *et al.*, 2011) (MARTÍNEZ-JARQUÍN *et al.*, 2017; MONGE; *et al.*, 2013). A possibilidade de processamento dos dados de MS em plataforma de acesso aberto, tal como o *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), utilizando ferramentas modernas, tais como o molecular networking (MN), tem auxiliado grandemente nas etapas de interpretação de dados e identificação de novas substâncias (RAMOS *et al.*, 2019). De maneira integrativa, todas as técnicas citadas acima possibilitam inúmeras abordagens analíticas, seja na busca por novas substâncias, ou mesmo na caracterização química satisfatória de matrizes complexas (BAKER *et al.*, 2012 ; MARSHALL *et al.*, 2015.; SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2014; SOARES; *et al.*, 2015).

Visando contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* da Região Amazônica, o presente trabalho teve como ênfase a desreplicação e/ou isolamento de substâncias bioativas presentes nas folhas de *S. peckii*.

Revisão Bibliográfica



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A família Loganiaceae R.Br. ex Mart.

A família Loganiaceae pertence à ordem Gentianales no grupo das angiospermas. É formado por um grupo monofilético que consiste de 12 gêneros (*Antonia* Pohl, *Bonyunia* M.R. Schomb. ex Progel, *Gardneria* Wallich, *Geniostoma* J.R. Forster & G. Forster, *Logania* R. Brown, *Mitrasacme* Labill., *Mitreola* L., *Neuburgia* Blume, *Norrisia* Gardner, *Spigelia* L., *Strychnos* L. e *Usteria* Willd.) e aproximadamente 420 espécies de distribuição pantropical (Figura 1) (BACKLUND *et al.*, 2005).

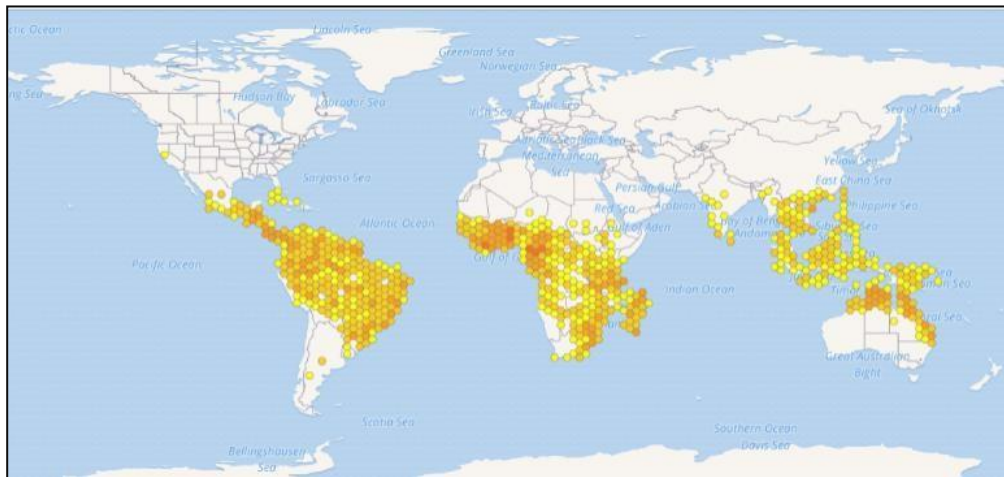


Figura 1: Distribuição geográfica para a família Loganiaceae (Global Biodiversity Information Facility, 2019) (<https://www.gbif.org/species/2502>).

Os indivíduos da família apresentam-se como ervas, trepadeiras, lianas, árvores, arbustos ou subarbustos (ZAPPI; SETUBAL, 2016) e são ocorrentes em caatingas, campos de várzea, florestas ciliares, florestas de igapó, florestas de terra firme dentre outros (REFLORA, 2018). No Brasil, 131 espécies pertencentes a família Loganiaceae foram catalogadas, sendo 67 endêmicas e encontram-se distribuídas em todas as regiões do país (REFLORA, 2018)

Dentre os 12 gêneros que são descritos para a família, apenas 5 (Figura 2) são ocorrentes no Brasil (ANDRADE; FRANKLIN, 2009; FLORA DO BRASIL, 2018).

As espécies ocorrentes no país para a família encontram-se distribuídas por todos os domínios fitogeográficos brasileiros e a região norte é mais abundante, com 65 espécies catalogadas onde destas, 52 encontram-se no estado do Amazonas (FLORA DO BRASIL, 2020).

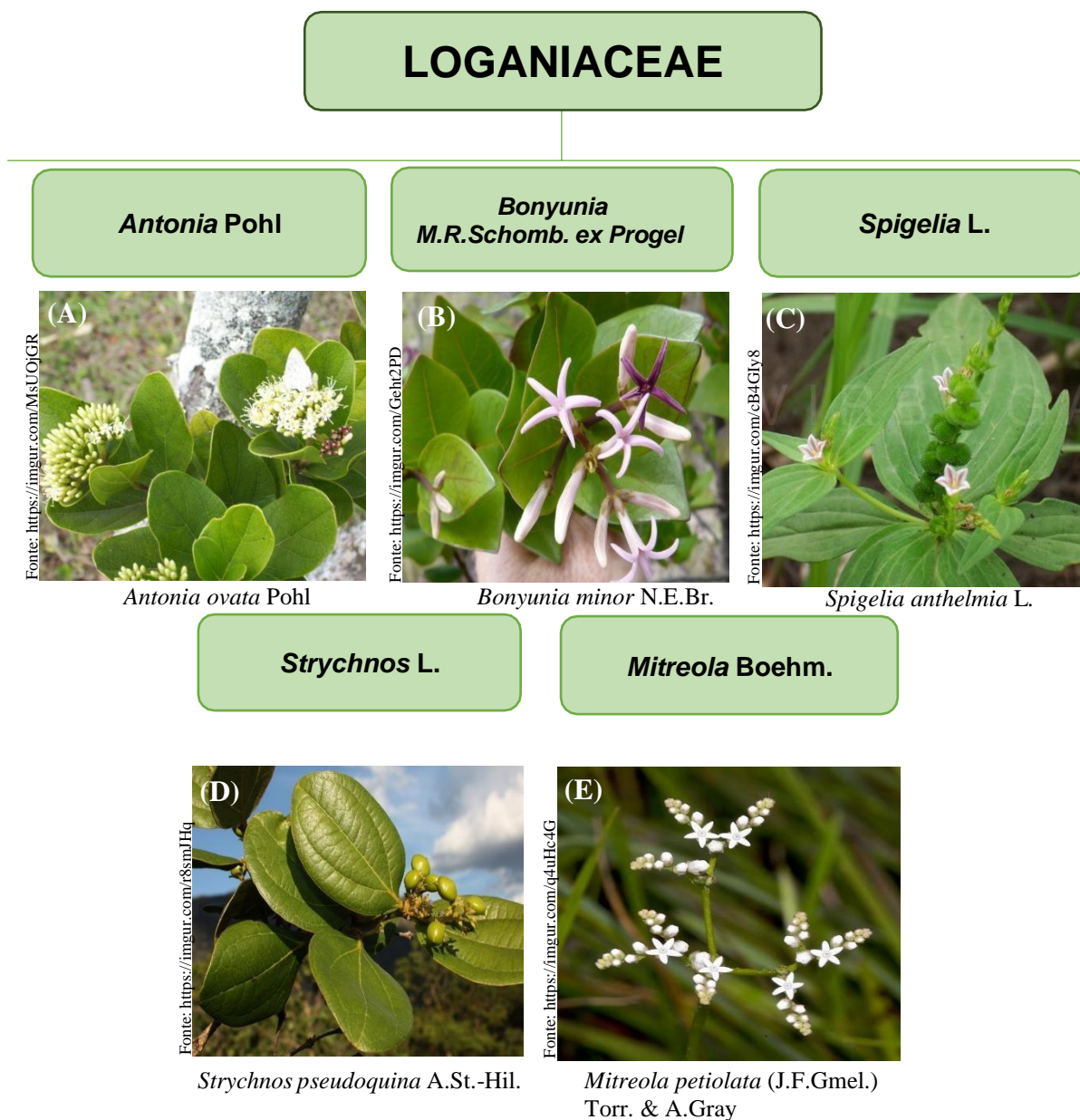


Figura 2: Representantes dos gêneros da família Loganiaceae ocorrentes no Brasil.

2.1.1. O gênero *Strychnos* L.

Strychnos L. é o maior e mais representativo gênero da família Loganiaceae, formado por cerca de 200 espécies ocorrentes no mundo. Foi descrito pela primeira

vez por Linnaeus, tomando como base as espécies *Strychnos nux-vomica* e *Strychnos colubrina* (*S. minor*) (ADEBOWALE *et al.*, 2014; OHIRI *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 2005).

É caracterizado como um gênero Pantropical e suas espécies apresentam-se como lianas, raramente árvores ou arbustos eretos, usualmente com gavinhas e/ou espinhos, tendo caules cilíndricos e nós com plataformas foliares lenhosas. Está distribuído principalmente nas Américas do Sul e Central (73 espécies), África e Ásia (75 espécies), Austrália e Polinésia (44 espécies). Por possuir o maior número de espécies do gênero catalogadas, a África é considerada o centro de origem deste gênero (OHIRI *et al.*, 1983; PHILIPPE *et al.*, 2004; ZAPPI; SETUBAL, 2016).

2.1.2 O gênero *Strychnos* L. no Brasil

Strychnos L. encontra-se amplamente distribuído em todas as cinco regiões do Brasil (Figura 3). O país há alguns anos registrava 62 espécies das 71 catalogadas para o continente americano. Contudo, estudos recentes do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, através do programa Reflora em parceria com o CNPq (Programa REFLORA/CNPq) registrou um total 68 espécies ocorrentes no país (sendo 28 endêmicas). O programa Reflora catalogou 50 espécies ocorrentes para a região Norte (Figura 3) e 43 destas encontram-se no estado do Amazonas. (ADEBOWALE *et al.*, 2014; BASÍLIO *et al.*, 2005; FLORA DO BRASIL, 2018; REFLORA, 2018; SILVA *et al.*, 2005).

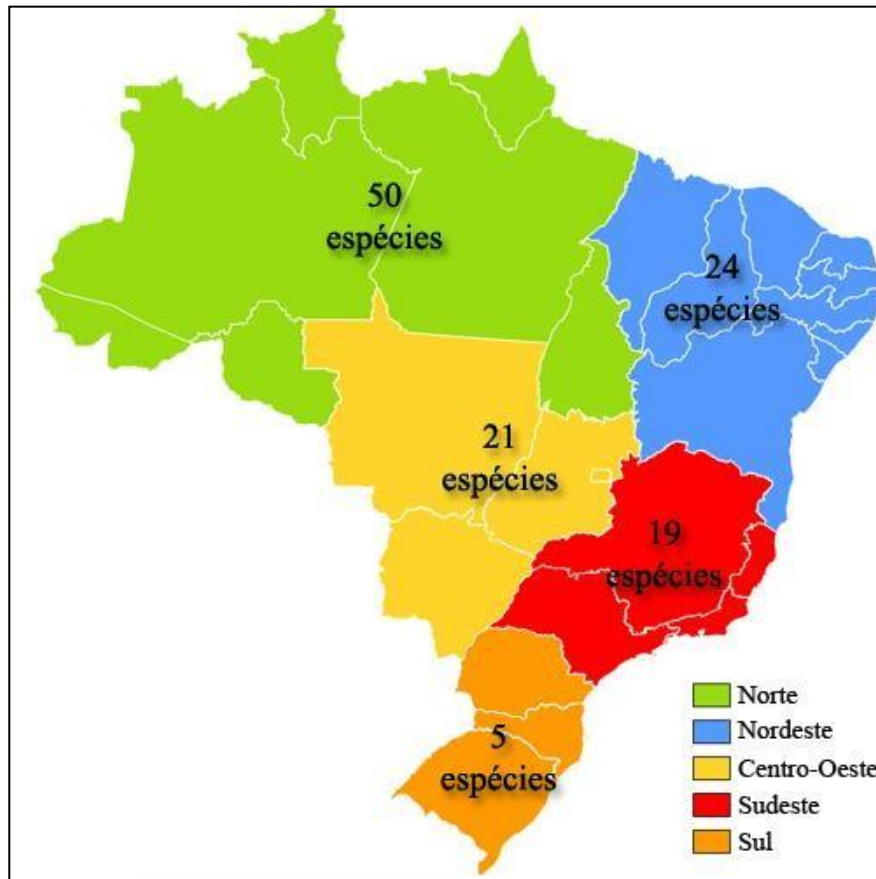


Figura 3: Distribuição de espécies do gênero *strychnos* no Brasil. Fonte: Adaptado de *Strychnos* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8663>>. Acesso em: 20 Jun. 2020.

A maior parte das espécies encontram-se na forma de cipós ou arbustos de pequeno porte, com a espécie *S. pseudoquina* sendo uma exceção, apresentando-se como uma árvore de médio porte e altura variando entre 3 a 5 m de altura (SILVA *et al.*, 2005).

As espécies do gênero ocorrem em regiões de mata pluvial em formação primária (mata virgem). Na Amazônia, *Strychnos* L. encontra-se majoritariamente em mata virgem de terra firme, com ocorrências em restingas de várzea e em matas ribeirinhas, temporariamente inundáveis de rios e igarapés (PINHEIRO, 2000).

2.2 Aspectos etnobotânicos e entofarmacológicos do gênero *Strychnos*

L.

2.2.1 – *Strychnos* L. e o curare

O gênero ganhou notoriedade pois muitas de suas espécies foram e ainda são usadas como venenos de flechas no preparo do curare, um veneno de origem vegetal preparado por algumas tribos de índios da Amazônia a partir de *Strychnos* spp. e/ou espécies pertencentes à família Menispermaceae (BONAMIN *et al.*, 2011; CARL *et al.*, 2014; PHILIPPE *et al.*, 2004; SILVA; SOUZA-BRITO *et al.*, 2005).

Há alguns anos, acreditava-se que as espécies de *strychnos* que continham a estricnina em sua composição e os seus análogos convulsivantes pertenciam apenas às espécies asiáticas, enquanto que as espécies americanas de *strychnos* eram de efeito curarizante.

Rudolf Boehm (1895) classificou os venenos do curare através de uma abordagem etnográfica (ROBERTS; WINK, 1998), sendo eles:

- **Calabash curare:** obtidos de Loganiaceae (espécies de *Strychnos*);
- **Tubo curare:** derivados de Menispermaceae e predominante no Peru próximo aos Andes na planície oriental;
- **Pot curare:** mistura de Loganiaceae e Menispermaceae, sendo encontrados principalmente na área coberta pela porção média da Amazônia e, em menor escala, também na Guiana.

Muitos dos relatos que envolvem o preparo do curare mostram a complexa composição destes. Um exemplo é o curare preparado pela tribo dos Canelo Quechua, que consiste em: Menispermaceae spp.: *Curarea tecunarium*, *Sciadotenia toxifera*, *Cissampelos parreira* e Loganiaceae spp.: *Strychnos toxifera*, *Strychnos peckii*, *Strychnos jobertania*, bem como uma planta não identificada (PHILIPPE *et al.*, 2004).

O curare preparado pelos índios na Amazônia é proveniente de várias espécies de *Strychnos*, as quais apresentam em sua composição química alcaloides quaternários que possuem ação bloqueadora neuromuscular (LIMA *et al.*, 2010). As principais substâncias químicas que compõem o curare são os alcaloides toxiferina e D-

tubocurarina (Figura 4), que atuam no bloqueio dos receptores neuromusculares da acetilcolina. (CZARNOWSK *et al.*, 2007; VAN MAANEN, 1950; VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006)

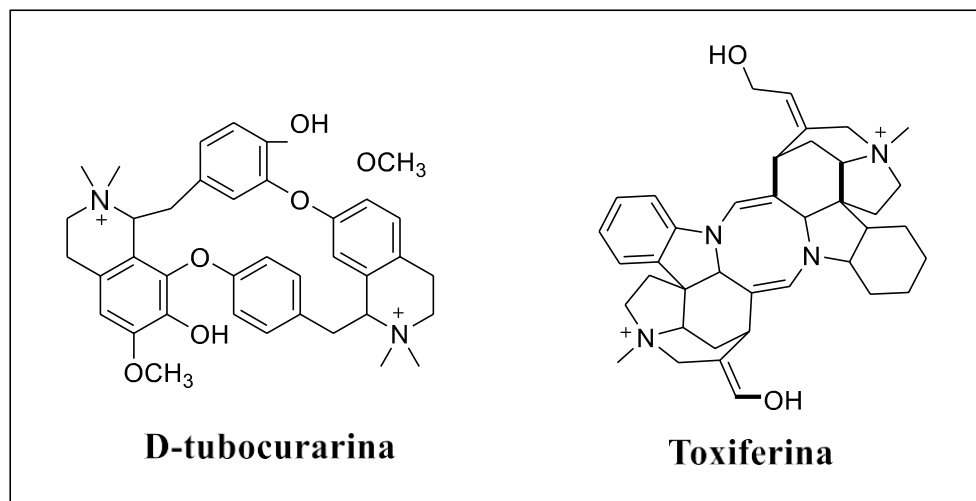


Figura 4: Alcaloides presentes no curare que atuam como bloqueadores neuromusculares.

Algumas tribos preparam o curare a partir de um único gênero de planta, como por exemplo, os Nambikara e os Piaróa que usam apenas *Strychnos*. Os Lamista Quechua preparam o curare unicamente a partir de *Chondrodendron* (Menispermaceae). Na família Loganiaceae, *Strychnos* é o único gênero utilizado no preparo do curare (BISSET, 1992a).

Como o curare era capaz de causar imobilidade completa ao paciente e por conta disso permitir uma boa condição de trabalho ao cirurgião, ganhou popularidade científica no final do século XIX (CARL *et al.*, 2014). Em meados do século XX pela primeira vez foi proposto um mecanismo molecular para o curare, no qual este atuava como um antagonista competitivo das junções sinápticas neuromusculares nicotínicas. Portanto, após entrar na circulação sanguínea, leva rapidamente à paralisia, incluindo a paralisia respiratória (CARL *et al.*, 2014).

Apesar desta descoberta, foi apenas em janeiro de 1942 que o curare teve o seu primeiro uso clínico como relaxante muscular relatado. Contudo, com o

desenvolvimento de novos relaxantes com melhores atividades farmacêuticas, o curare perdeu relevância na medicina moderna (BENNETT; A.E., 1968; CARL *et al.*, 2014). É conhecido que o curare não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, portanto a vítima de envenenamento está ciente do que está acontecendo até seus últimos momentos de vida.

As espécies de *Strychnos* se destacam por comporem a confecção do curare em diferentes países e algumas destas espécies encontram-se descritas no Quadro 1 (CZARNOWSK *et al.*, 2007; PHILIPPE *et al.*, 2004; SILVA; SOUZA-BRITO *et al.*, 2005).

Quadro 1: Principais espécies de *strychnos* utilizadas na confecção do curare.

Espécies utilizadas na confecção do curare	País onde se utiliza no preparo do curare
<i>S. rondeletioides</i> Spruce ex. Benth.	Colômbia, Venezuela
<i>S. brachiata</i> Ruiz et Pav.	Colombia
<i>S. toxifera</i> Rob. Schomb ex. Benth.	Panamá, Colômbia, Venezuela, Equador, Guiana, Guiana Francesa
<i>S. tomentosa</i> Benth.	Brasil, Colômbia, Peru
<i>S. javariensis</i> Krukoff	Brasil, Guiana, Guiana Francesa
<i>S. sandwithiana</i> Krukoff et Barneby	Brasil
<i>S. jobertiana</i> Baill.	Colômbia, Equador, Brasil, Peru
<i>S. solimoesana</i> Krukoff	Brasil
<i>S. peckii</i> B. L. Robinson	Colômbia, Equador, Brasil
<i>S. erichsonii</i> Rich. Schomb. ex. Prog.	Suriname, Colômbia, Guiana
<i>S. bredemeyeri</i> (Schultes) Sprague et Sandw.	Guiana, Brasil
<i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var. <i>mitscherlichii</i>	Colômbia, Brasil, Equador, Guiana
<i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var. <i>pubescentor</i> Sandw.	Colômbia
<i>S. amazonica</i> Krukoff	Colômbia

<i>S. solerederi</i> Gilg	Colômbia, Brasil
<i>S. darienensis</i> Seem.	Equador
<i>S. ignatii</i> P. Bergius	Malásia
<i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.	Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Equador, Brasil
<i>S. glabra</i> Sagot ex. Prog.	Guiana Francesa, Brasil
<i>S. subcordata</i> Spruce ex. Benth.	Colômbia, Brasil
<i>S. panurensis</i> Sprague et Sandw.	Colômbia, Venezuela
<i>S. cogens</i> Benth.	Colômbia, Venezuela, Guiana, Brasil
<i>S. usambarensis</i> Gilg	Ruanda
<i>S. castelnaeana</i> Wedd.	Peru, Brasil
<i>S. progeliana</i> Krukoff et Barneby	Brasil

2.2.2 *Strychnos* na medicina tradicional

Embora o gênero seja conhecido pela toxicidade de seus compostos, folhas e cascas de *Strychnos* spp. são popularmente empregadas, principalmente sob a forma de chás, sendo descrito por apresentarem atividades farmacológicas variadas (BONAMIN *et al.*, 2011; HONÓRIO-FRANÇA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2005).

As espécies *S. atlantica*, *S. parvifolia* e *S. trivervis* são utilizadas na medicina popular nordestina. O uso destas espécies se dá através do infuso, decocto ou alcoolato de suas folhas e cascas do caule atuando como depurativo e utilizado no tratamento da sífilis. As raízes e cascas do caule também são empregadas no combate a diarreia, febres intermitentes e em doenças ligadas ao sistema nervoso central (BASÍLIO *et al.*, 2005).

A espécie *S. pseudoquina* também é relatada no uso popular no tratamento de doenças hepáticas, do estômago, febre e malária (VARANDA, 2006). Sementes de *S. potatorum* são amplamente utilizadas na medicina tradicional nas partes centrais da Índia e Sri Lanka. Além do seu uso medicinal, o pó da semente desta espécie é

também utilizado para na limpeza de água barrenta nas comunidades rurais (JAYARAM *et al.*, 2009).

Outra espécie utilizada na medicina popular é *S. angustiflora*, uma planta medicinal originária do sul da China, utilizada popularmente no tratamento da artrite reumatoide, lesões traumáticas e em miastenia gravis, uma doença autoimune que é resultado da produção de anticorpos anti-receptores da acetilcolina, que atuam na junção neuromuscular (JIANG *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2012). Outras espécies com suas atividades são descritas no Quadro 2.

Quadro 2: Exemplos de espécies de *Strychnos* utilizadas na medicina popular.

Espécie	Uso popular	Referência
<i>S. pseudoquina</i>	Tônico, antimalárico, contra doenças do fígado e estômago.	Bonamin <i>et al.</i> , 2011
<i>S. potatorum</i>	Cálculos renais, úlceras, bronquite, gonorreia e conjuntivite.	Yadav <i>et al.</i> , 2014
<i>S. lucida</i>	Malária, diarreia, febre, hipertensão e antídoto para picada de cobra	Sarmento <i>et al.</i> , 2015
<i>S. henningsii</i>	Reumatismo, dores abdominais, mordida de cobra, malária e diabetes mellitus	Oyedemi <i>et al.</i> , 2010
<i>S. erichsonii</i>	Problemas estomacais e abdominais, tratamento de doenças venéreas e afrodisíaca	Silva <i>et al.</i> , 2005
<i>S. angustiflora</i>	Miastenia gravis, artrite reumatoide e lesão traumática.	Jiang <i>et al.</i> , 2016
<i>S. fendleri</i>	Malária e febres em geral	Suárez <i>et al.</i> , 2015

<i>S. nux vômica</i>	Diabetes, anemia, gonorreia e bronquite.	Eldahshan <i>et al.</i> , 2015
<i>S. spinosa</i>	Tripanossomíase africana	Hoet <i>et al.</i> , 2006
<i>S. wallichiana</i>	Antídoto para mordida de cobra, diarreia e paralisia.	Rao <i>et al.</i> , 2008

Ainda é difícil determinar se algum dos usos populares das espécies pode ser explicado pela presença de um único constituinte ou se essa ação se deve a mistura de constituintes presentes na planta (QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990).

2.3 A química do gênero *Strychnos* L.

Uma grande parte dos compostos isolados a partir do gênero pertencem ao grupo dos alcaloides indólicos que são biogeneticamente derivados da secologanina e da triptamina e diversos estudos fitoquímicos do caule, da casca e da raiz conduziram ao isolamento de diversas substâncias desta classe. Embora os estudos sejam conduzidos em sua maior parte com galhos e cascas, outras partes da planta, tais como folhas e frutos também são estudadas (BISSET; CHOUDHURY, 1974; NICOLETTI; *et al.*, 1984; OHIRI *et al.*, 1983; QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990).

2.3.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos e são encontrados, predominantemente, nas angiospermas e em sua maioria, apresenta caráter alcalino. A partir dos aminoácidos alifáticos, obtém-se os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos (ornitina) e os piperidínicos (lisina), e a partir dos aminoácidos aromáticos, obtém-se os alcaloides isoquinolínicos (tirosina) e os indólicos (triptofano) (DEWICK, 2009; HENRIQUES *et al.*, 1999).

Alcaloides são também os principais constituintes químicos das espécies de *Strychnos*, sendo os alcaloides do tipo indólico característico das espécies deste gênero (MAGNUS *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2005). Estes pertencem ao grupo dos alcaloides

verdadeiros, por possuírem anel heterocíclico contendo um átomo de N e têm como precursor biossintético um aminoácido. Todos os alcaloides indólicos terpênicos são derivados do triptofano e do terpeno iridoide secologanina (Figura 5) (O'CONNOR; MARESH, 2006).

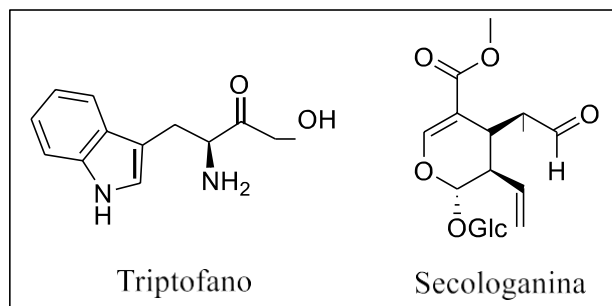


Figura 5: Precursores da classe dos alcaloides indólicos terpênicos.

A descarboxilase do triptofano (com uma enzima de piridoxal) converte o triptofano em triptamina. A presença de um iridoide terpênico na via dos alcaloides indólicos foi proposta pela primeira vez após a elucidação de estruturas de diversos iridoides terpênicos. De forma subsequentemente, a secologanina foi identificada como sendo o iridoide precursor específico dos alcaloides indólicos terpênicos (DEWICK, 2009; O'CONNOR; MARESH, 2006). As etapas iniciais da biossíntese desses alcaloides encontram-se descritos na Figura 6.

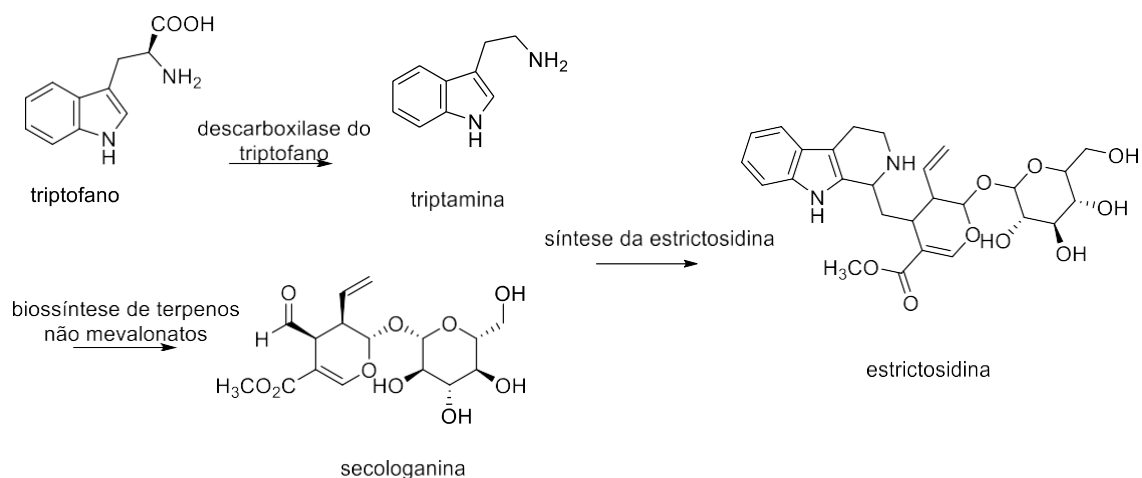
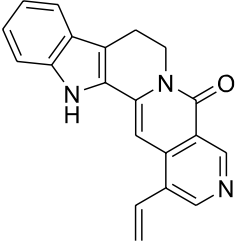
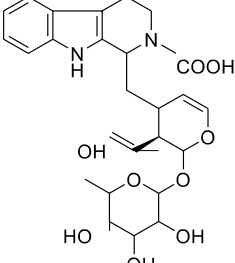
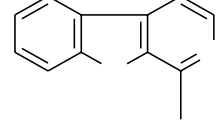
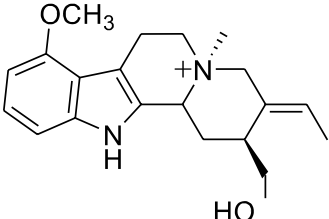
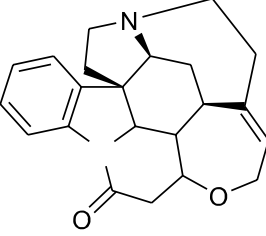
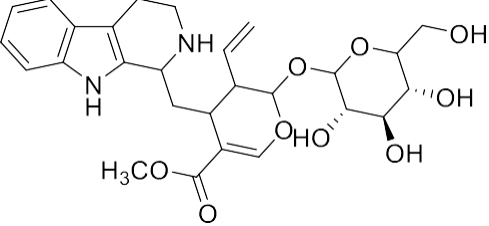


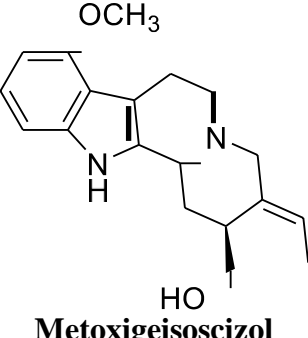
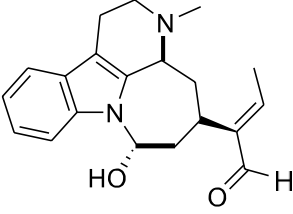
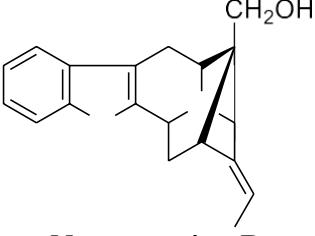
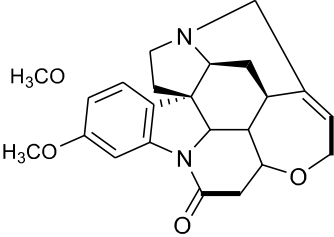
Figura 6: Etapas iniciais da biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos.

Mais de 3000 alcaloides indólicos terpênicos são conhecidos. Encontram-se, principalmente, em oito famílias, dentre elas, a Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae são as que fornecem as melhores fontes dessas classes de compostos (DEWICK, 2009; O'CONNOR; MARESH, 2006).

Mesmo apresentando diversidade química em seus compostos (Quadro 3), uma ampla variedade de estudos em *Strychnos* foca-se na identificação, isolamento e estudo das atividades biológicas dos alcaloides presentes nas espécies do gênero. Embora o alcaloide estricnina seja diretamente associado às espécies do gênero, este é relatado em apenas sete espécies espalhadas pelo mundo, sendo estas: as espécies asiáticas *S. nuxvomica*, *S. ignatii* e *S. wallichiana*, a espécie australiana *S. lucida*, na África a espécie *S. icaja* e dentre as espécies americanas, apenas as *S. tabescana* e *S. panamensis* (PHILIPPE *et al.*, 2004; RAO; PRASAD, 2008). Alguns dos alcaloides relatados na literatura para o gênero encontram-se no Quadro 3.

Quadro 3: Alcaloides relacionados para *Strychnos* spp.

Espécie	Substância	Referência
<p><i>S. peckii</i> <i>S. parviflora</i> <i>S. nigricans</i></p>	 <p>Angustina</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>S. mellodora</i> <i>S. usambarensis</i></p>	 <p>Palicosídeo</p>	<p>Brandt <i>et al.</i>, 1999 Cao <i>et al.</i>, 2012</p>
<p><i>S. guianensis</i></p>	 <p>Harmano</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>S. guianensis</i></p>	 <p>9-metoxi-N-metilgeisoscizol</p>	<p>Penelle <i>et al.</i>, 2001 Silva <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>S. nux-vômica</i></p>	 <p>Estricnina</p>	<p>Angenot <i>et al.</i>, 1990</p>
<p><i>S. amazônica</i></p>	 <p>Estrictosidina</p>	<p>Costa <i>et al.</i>, 2016</p>

<p><i>S. guianensis</i></p>	 <p>Metoxigeisoscizol</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>S. parvifolia</i> <i>S. gardneri</i> <i>S. jobertiana</i> <i>S. usambarensis</i></p>	 <p>Acagerina</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 2005 Cao <i>et al.</i>, 2012</p>
<p><i>S. atlantica</i></p>	 <p>Normacusina B</p>	<p>Mukherjee <i>et al.</i>, 1997</p>
<p><i>S. panamensis</i> <i>S. nux-vômica</i></p>	 <p>Brucina</p>	<p>Bhati <i>et al.</i>, 2012 Silva <i>et al.</i>, 2005</p>

2.3.2 Flavonoides

Os flavonoides compõem a classe de compostos polifenólicos, dos quais encontram-se amplamente distribuídos em plantas, principalmente nas angiospermas onde encontram-se em abundância e caracterizam-se pelo seu núcleo flavonoídico, onde o anel A é condensado com o anel C e tem o anel B como substituinte na posição 2 (Figura 7) (FAGGIO *et al.*, 2017; PARHIZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016).

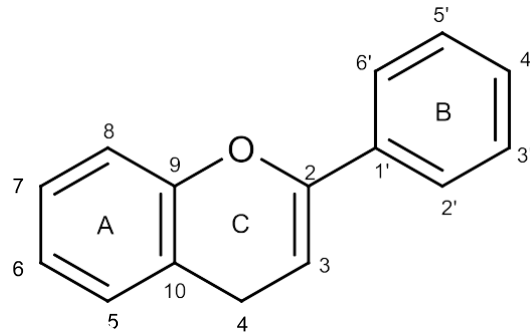
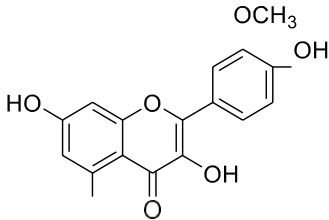
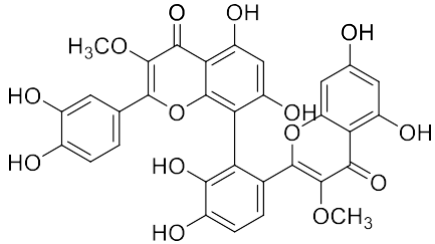
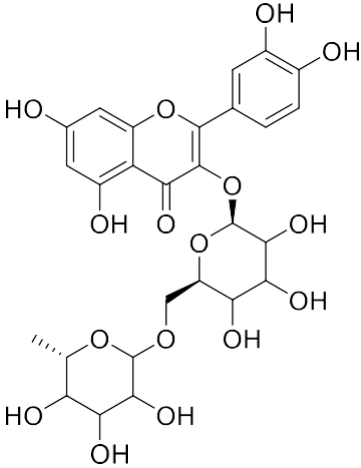
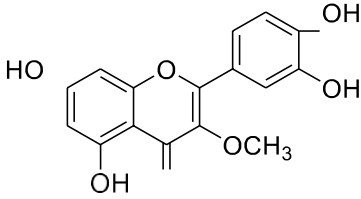
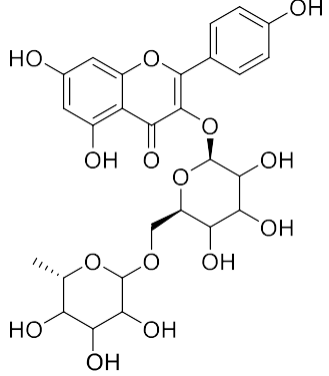
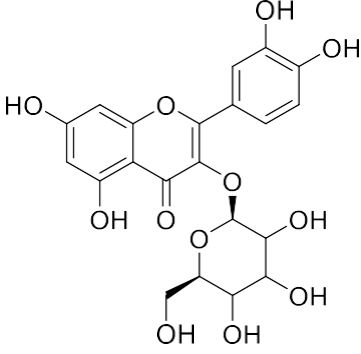


Figura 7:Núcleo estrutural de flavonoides. Adaptado de (FAGGIO *et al.*, 2017).

Quando apresentam glicídios, são denominados glico-flavonoides ou flavonoides glicosilados. *D*-glicose, *L*-rhamnose, galactose e arabinose são exemplos de substituições glicídicas ocorrentes. Em exceção ao grupo das leucoantocianinas, os demais flavonoides, nas plantas, ocorrem acompanhados por glicídios (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MACHADO *et al.*, 2008). Alguns dos flavonoides relatados na literatura para o gênero encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4: Flavonoides relatados para *Strychnos* spp.

Espécie	Substância	Referência
<i>S. pseudoquina</i>	 <p style="text-align: center;">Isorhamnetina</p>	Nicoletti <i>et al.</i> , 1984
<i>S. pseudoquina</i>	 <p style="text-align: center;">Estricnobilflavona</p>	Nicoletti <i>et al.</i> , 1984
<i>S. nux-vômica</i>	 <p style="text-align: center;">Rutina</p>	Gupta <i>et al.</i> , 2016
<i>S. pseudoquina</i>	 <p style="text-align: center;">Quercetina-3-O-metil éter</p>	Boff <i>et al.</i> , 2016

<p><i>S. variabilis</i></p>	 <p>Kaempferol-3-robinobiosideo</p>	<p>Brasseur <i>et al.</i>, 1986</p>
<p><i>S. variabilis</i></p>	 <p>Quercetina-3-O-galactosídeo</p>	<p>Brasseur <i>et al.</i>, 1986</p>

2.3.3 Outros metabólitos secundários de *Strychnos* L.

Embora o gênero seja amplamente estudando visando os compostos de natureza alcaloídica ou flavonoídica, diversas outras classes de compostos são relatadas para o gênero.

Um estudo realizado em 2006 permitiu o isolamento de um novo composto 4-*O*-(3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzoil)-ácido quínico, para a espécie *S. lucida*, um éster de ácido quínico cujo o seu percurso é descrito com atividade (ITOH *et al.*, 2006) (Quadro 5).

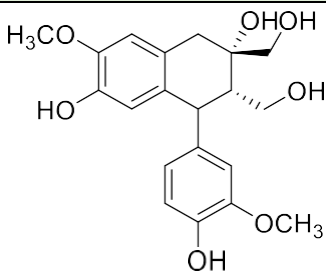
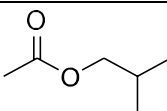
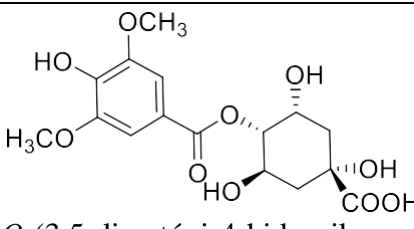
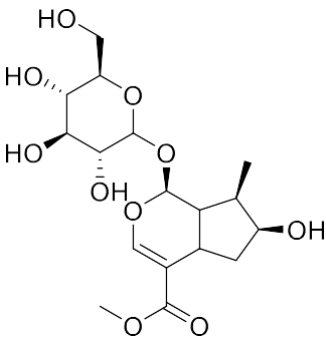
Através de estudos da polpa de frutos da espécie *S. cocculoides* foi identificada presença de ésteres de acetato como os constituintes voláteis majoritários, com uma composição de 86,3% presentes na polpa (SHOKO *et al.*, 2013).

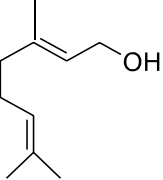
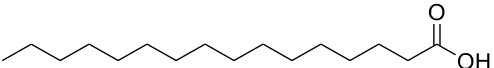
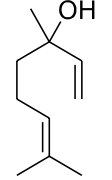
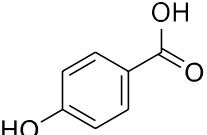
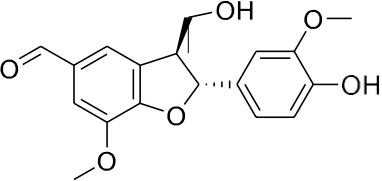
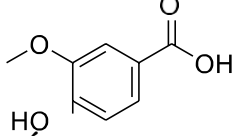
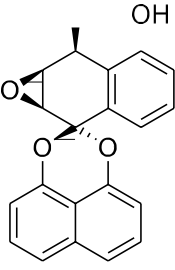
O óleo essencial das folhas de *S. spinosa* apresentou em sua composição como constituintes majoritários o ácido palmítico (34,3%), linalol (16,0%) e o (*E*)-geraniol

(4,0%), sendo o restante de sua composição composto por aldeídos, ésteres e álcoois (HOET *et al.*, 2006) (Quadro 5).

Em 2017, estudos com os frutos de *S. nux-vômica* através de um método de isolamento e quantificação por HPLC conduziu o isolamento da loganina, um iridoide glicosilado no qual recebeu este nome após ser isolado pela primeira vez nos frutos desta espécie (PATIL; LADDHA, 2017). Outros compostos reportados para as espécies do gênero encontram-se no Quadro 5.

Quadro 5: Substâncias relatadas para *Strychnos* spp.

Espécie	Estrutura	Referência
<i>S. guianensis</i>	 <p>(+)-cicloolivil</p>	Pinheiro <i>et al.</i> , 2004
<i>S. cocculoides</i>	 <p>Acetato de isobutila</p>	Shoko <i>et al.</i> , 2013
<i>S. lucida</i>	 <p>4-O-(3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzoil)-ácido quínico</p>	Itoh <i>et al.</i> , 2006
<i>S. nux-vômica</i>	 <p>Loganina</p>	Patil <i>et al.</i> , 2017

<i>S. spinosa</i>	 <p>Geraniol</p>	Hoet <i>et al.</i> , 2006
<i>S. spinosa</i>	 <p>Ácido Palmítico</p>	Hoet <i>et al.</i> , 2006
<i>S. spinosa</i>	 <p>Linalol</p>	Hoet <i>et al.</i> , 2006
<i>S. darienensis</i>	 <p>Ácido 4-hidroxi benzoico</p>	Travasarou <i>et al.</i> , 2019
<i>S. darienensis</i>	 <p>Ficusal</p>	Travasarou <i>et al.</i> , 2019
<i>S. darienensis</i>	 <p>Ácido vanílico</p>	Travasarou <i>et al.</i> , 2019
<i>S. angustiflora</i>	 <p>Palmarumicina SA1</p>	Jiang <i>et al.</i> , 2016

2.4 Abordagens baseadas em espectrometria de massas (MS) na investigação química de matrizes vegetais

A caracterização dos perfis metabólicos de extratos brutos de plantas torna-se uma prática complexa em razão da diversidade estrutural de compostos presentes na matriz estudada. Contudo, graças aos avanços das técnicas que possibilitam a identificação de compostos, as técnicas modernas permitem que haja a seleção de extratos promissores tanto para estudos de avaliação biológica como para auxiliar no direcionamento do isolamento de compostos bioativos de interesse (FUNARI *et al.*, 2013; RODRIGUES; *et al.*, 2006).

A espectrometria de massas (MS) tem desempenhado um importante papel como método analítico desde que foi utilizada por Aston, no século XX na demonstração da existência de isótopos e medição suas massas (BALDWIN, 1995). A espectrometria de massas é uma técnica analítica na qual íons são formados em fase gasosa e separados de acordo com suas diferentes razões de massa/carga (m/z). O uso crescente da técnica se deve a sua aplicabilidade em diversas áreas da ciência e a sua alta sensibilidade, seletividade e precisão (AWAAD *et al.*, 2015).

Independente da forma como a amostra é introduzida no espectrômetro de massas (ex: HPLC, infusão direta, inserção direta), é na fonte de íons que as espécies carregadas serão produzidas, sendo esta etapa fundamental para o sucesso da análise (EL-ANEED *et al.*, 2009). Portanto, os íons são gerados através de uma fonte de íons, para enfim, serem separados e detectados (AWAAD *et al.*, 2015; NIESSEN, 2006; ROMÃO, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Embora no mercado existam espectrômetros de alta e baixa resolução, todos os instrumentos contêm três elementos principais: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector.

Um dos métodos analíticos mais sensíveis e utilizados é a cromatografia líquida hifenada ao detector de ultravioleta e/ou espectrometria de massas (Figura 8). O detector de MS apresenta um alto desempenho na separação de massas. Além disso, informações estruturais podem ser obtidas, em alguns casos, a partir dos fragmentos de MS/MS ou MSⁿ (QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006).

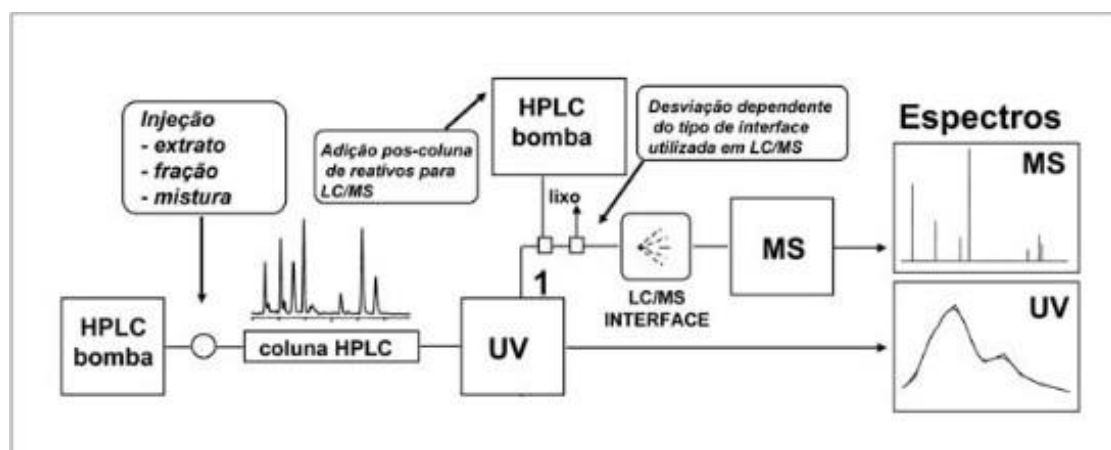


Figura 8: Esquema básico do acoplamento de HPLC-MS e HPLC-UV.

Outra importante aplicação da espectrometria de massas é a desrepliação de compostos conhecidos, onde é possível identificar o composto através das informações espectrais adquiridas e de bancos de dados (KIND; FIEHN, 2017). Os dados obtidos por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) são muito mais discriminantes para o processo de desrepliação do que o íon precursor sozinho, por este motivo, diferentes métodos têm sido desenvolvidos através de abordagens bioinformáticas a fim de organizar e interpretar os conjuntos de fragmentos observados (ALLARD *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2013). Dentre essas novas abordagens, destaca-se o *molecular networking* (MN), parte do *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), o qual baseia-se no fato de que moléculas que possuem estruturas semelhantes compartilham padrões de fragmentação semelhantes (ALLARD *et al.*, 2016; RAHEEM *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2013).

O GNPS é uma plataforma pública que permite o uso do MN. Neste, a visualização das redes moleculares representa cada espectro como um nodo. A obtenção da rede molecular é feita primeiramente na coleta dos espectros de MS/MS e em seguida uma rede molecular é gerada usando escores que irão medir o grau de semelhança nos espectros de MS/MS resultando na representação visual da relação molecular (semelhança química) do conjunto de compostos (WANG *et al.*, 2016; YANG; *et al.*, 2013).

Em adição, a plataforma disponibiliza outros recursos, tais como bibliotecas espectrais. No geral, os dados obtidos através de análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada á-espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) são empregados na construção de uma abordagem baseada em MN.

2.4.1 Leaf spray

Atualmente, uma técnica que têm se destacado é a ionização ambiente por *Leaf Spray* (LS). Isso porque ela permite o acesso ao perfil químico de folhas e outros materiais vegetais sem a necessidade do preparo de amostra, sendo o uso de solvente mínimo ou inexistente (FALCONE; COOKS, 2016).

A análise por LS, permite uma análise *in vivo* de plantas, bem como a caracterização de materiais vegetais. Nesta técnica, os constituintes químicos do material vegetal são analisados por um método simples de pulverização que fornece informações sobre sua composição química e determinadas classes de compostos, como os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídios, alcaloides dentre outros, sendo uma técnica rápida e de baixo custo (LIU *et al.*, 2011).

Na análise por LS, a folha é cortada em forma triangular, presa a uma garra metálica (Figura 9) e uma alíquota de solvente pode então ser aplicada para a extração dos metabólitos de interesse. Embora o uso de solvente seja opcional, observa-se uma

melhora na relação sinal/ruído quando o solvente é adicionado. Por fim, uma alta tensão é aplicada ao suporte metálico, no qual resulta na emissão de gotas carregadas da ponta da folha (FALCONE; COOKS, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016).

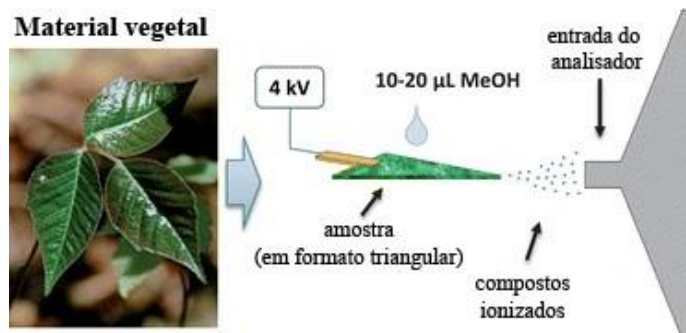


Figura 9: Representação da análise por LS-MS. (Figura adaptada de Tadjimukhamedov *et al.*, 2012).

Como os materiais vegetais, em geral, são de grande interesse para o desenvolvimento de fármacos e para os estudos de produtos naturais e por se tratarem de matrizes complexas, o *leaf spray* permite a sua análise imediata sem a necessidade do preparo de amostra e se mostrando eficiente na análise e identificação dos metabólitos primários e secundários presentes na matriz vegetal (LIU *et al.*, 2011; TADJIMUKHAMEDOV *et al.*, 2012).

Objetivos



3. OBJETIVOS

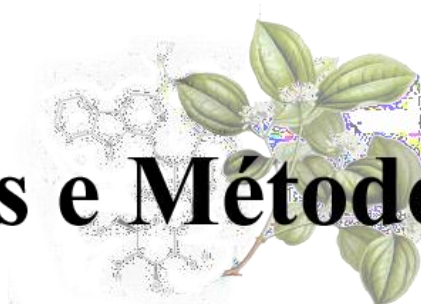
3.1. Geral

Contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* da Região Amazônica através da desreplicação e/ou isolamento de substâncias de interesse da espécie *S. peckii*.

3.2. Específicos

- Acessar o perfil químico das folhas de *S. peckii* através de análises de LS-MS;
- Caracterizar a composição química dos extratos aquosos das folhas de *S. peckii* empregando-se análises baseadas em HPLC-MS em combinação com análises de *molecular networking* (MN) e/ou interpretação manual de espectros de MS/MS;
- Isolar e caracterizar substâncias de interesse químico/farmacológico.

Materiais e Métodos



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da central analítica, UFAM. Análises por HPLC em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo Surveyor Plus® (Thermo Scientific) equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Surveyor PDA Plus Detector e acoplado a espectrômetro de massas (TSQ Quantum Access) e coluna cromatográfica Luna C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm) Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol (MeOH) e água (H₂O).

As análises por HPLC em escala semi preparativa foram realizadas utilizando cromatográfico modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário) looping de 500 µL, degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL) e colunas cromatográficas Luna C18 (5 µm, 250 x 10 mm) e PFP (5 µm, 250 x 10 mm) Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram MeOH e H₂O.

4.2 Solventes

Solventes grau HPLC (Tedia[®]) e água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) foram utilizados para as análises cromatográficas em escala analítica e semi-preparativa, bem como para as análises por espectrometria de massas. Para o preparo dos extratos utilizou-se como solvente água destilada.

Solventes deuterados da marca Cambridge Isotope Laboratories (Scielab) foram utilizados para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

4.3 Métodos espectroscópicos e espectrométricos

4.3.1 Análises por espectrometria de massas

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access, operando com fonte electrospray (ESI). Os modos positivo e negativo foram escolhidos para a obtenção dos espectros de massa em primeira ordem (MS) e em múltiplos estágios (MSⁿ). As fragmentações foram realizadas utilizando energias de colisão entre 30 a 35 eV. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific®).

4.3.2 Análises por ressonância magnética nuclear

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB) da central analítica, UFAM. Os espectros unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE III HD equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™) com gradiente de campo na direção Z, operando a 11,74 tesla, observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento (J) expressas em Hertz (Hz).

4.4 Coleta e identificação do material botânico

O material botânico (folhas) de *S. peckii* foi coletado no dia 24 de maio de 2018 na Reserva Florestal Adolpho Ducke (02° 55' 56.0" S, 059° 58' 16.0" W), localizada na cidade de Manaus/AM. A localização das espécies foi feita seguindo os mapas de trilhas do Projeto Flora da Reserva Ducke (INPA).

A identificação do material botânico foi realizada pelo parataxonomista do INPA, Sr. José Ferreira Ramos, utilizando chaves dicotômicas de identificação e

comparação com material botânico do herbário devidamente identificadas. A exsicata do indivíduo coletado encontra-se depositada no Herbário do INPA sob o número: 282886. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AF4CFA7. Após a coleta, o material botânico foi seco durante o período de 20 dias a temperatura ambiente.

4.5 Análise do perfil químico das folhas de *S. peckii* por espectrometria de massas com fonte ambiente *leaf spray* (LS-MS)

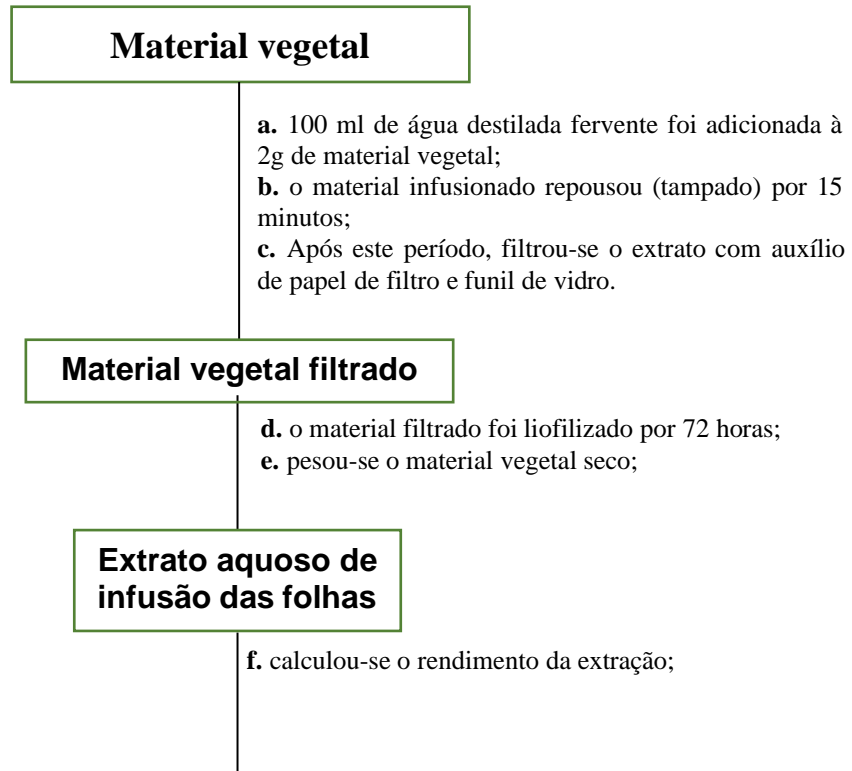
As análises de LS-MS foram realizadas de acordo com metodologia previamente descrita (LIMA; SILVA; SOARES; ALMEIDA *et al.*, 2019). As folhas foram cortadas em pequenos triângulos com tamanho aproximado de 1 cm de largura e mantidos por um clipe de metal a uma distância de 10 mm da entrada dos espectrômetros de massas. Em seguida, 10 µL de metanol (grau HPLC) foram depositados na superfície do material e uma voltagem (4,5 kV, com polaridade positiva) foi aplicada diretamente ao tecido da planta, gerando uma pulverização de gotículas carregadas, transportando substâncias químicas endógenas em direção à entrada dos espectrômetros de massas.

4.6 Obtenção dos extratos aquosos das folhas de *S. peckii*

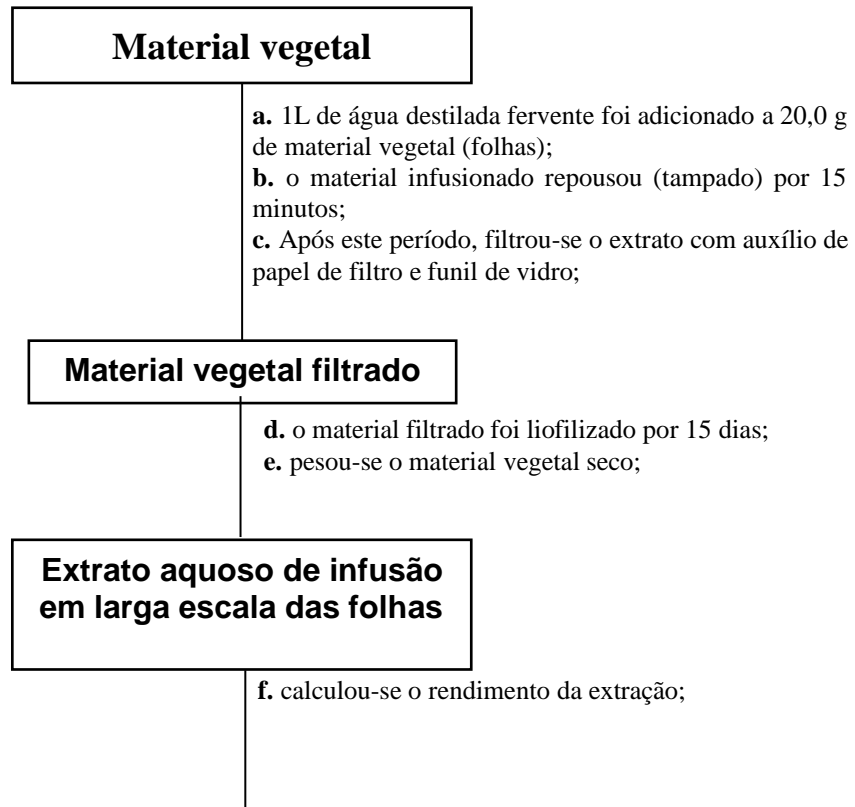
Para a extração aquosa em micro escala, uma alíquota (2g) das folhas de *S. peckii* foi pulverizada em um moinho de facas analítico (80374, Hamilton Beach, SP, Brasil), sendo submetida à extração com água destilada (100 mL) por infusão, seguindo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2011). O material vegetal infundido foi mantido tampado por 15 minutos. Após este período o extrato foi filtrado utilizando de papel de filtro *Whatman* 43 (Sigma-Aldrich) e em seguida liofilizado (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Alemanha), produzindo 0,20 g (10%) do extrato aquoso das folhas (SPIF).

Para extração aquosa em larga escala, 20,0 g das folhas de *S. peckii* foram extraídas com água destilada (1000 mL) utilizando a mesma metodologia empregada para o preparo dos extratos em micro escala. O extrato aquoso filtrado foi congelado e em seguida liofilizado (Liofilizador Christ, Alpha 1-2 LDplus), produzindo 2,49 g (~12%) do extrato aquoso das folhas em larga escala (SPIF_LE).

Após secos, todos os extratos foram pesados em balança analítica (marca Ohaus Adventurer modelo AR2140) e armazenados sob refrigeração. Os processos detalhados de extração encontram-se descritos nos fluxogramas 1 e 2.



Fluxograma 1: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso de infusão em micro escala (SPIF).



Fluxograma 2: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso de infusão em larga escala (SPIF_LE).

4.7 Análise por HPLC-MS/MS do extrato SPIF

Para análise por HPLC-MS/MS, os extratos aquosos foram solubilizados em uma mistura água-metanol (80:20, v/v) a 1 mg/mL e injetado (25 µL) em uma coluna Phenomenex Luna C18 (2) (5 µm, 150 mm x 4,6 mm id) (Torrance, CA, EUA) com a seguinte eluição em modo gradiente: 0-15 min, 20-80% B; 15-25 minutos, 80% de B a uma taxa de vazão de 1,0 mL/min, onde (A) é água e (B) metanol.

Os parâmetros da fonte ESI foram ajustados conforme segue: *spray voltage*, 4500 V; *sheath gas pressure*, 35 arbitrary unit (arb); *ion sweep gas pressure*, 0.0 arb; *aux gas pressure*, 10 arb; *capillary temperature*, 230 °C; *tube lens offset*, 109 V; *skimmer offset*, 0 V; *mass range*; *neutral loss mass range*, m/z 400-800 (17 e 162 Da); *collision energy*, 25-35 eV; *neutral loss scan collision energy*, 35 eV.

4.8 Análises por *molecular networking* (MN) de *S. peckii*

Para as análises de MN, os arquivos obtidos durante as corridas de HPLC- MS/MS foram convertidos no formato mzXML utilizando-se o software ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>). Após convertidos, os arquivos foram carregados diretamente na página do GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>) e processados com a ferramenta MN.

Os parâmetros para obtenção dos dados de MN foram definidos da seguinte forma: tolerância da massa do íon precursor, 1 Da; tolerância de massa de íons de fragmentos, 0,9 Da; min pares de cosseno, 0,6; topk de rede, 10; tamanho máximo do componente conectado, 100; íons fragmentos mínimos correspondentes, 3; tamanho mínimo do cluster, 5. Os dados foram visualizados no Cytoscape (versão 3.7.0, disponível em <https://cytoscape.org>). As substâncias foram desreplcadas a partir do agrupamento observado no MN e interpretação manual dos espectros de MS/MS.

4.9 Clean up da amostra SPIF_LE e análise por HPLC-DAD-MS

Previamente à análise por HPLC-DAD-MS, o extrato foi submetido a um processo de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) para o *clean up* da amostra, utilizando C18 (10 g). A fase estacionária foi previamente ativada utilizando MeOH e em seguida condicionada utilizando 100 mL de água Milli-Q. Utilizou-se 1 g de amostra solubilizada em 3 mL de água. Após a lavagem para obtenção da fase aquosa, a água presente no sistema foi removido a vácuo e em seguida realizado outra lavagem com 100 mL de MeOH para obtenção da fase metanólica. A fase aquosa foi congelada e liofilizada e a fase metanólica seca em N₂ gasoso. Ao final do processo, obteve-se 0,63 g (63%) do extrato metanólico (SPIF_LE_SPE).

Para as análises de LC-DAD-MS dos extratos, utilizou-se um sistema de HPLC modelo Acella® (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo scientific), equipado com fonte ESI (em modos positivo e negativo) e faixa de aquisição de 100-1000 *m/z*. As condições de eluição encontram-se descritas no tópico 4.7.

4.10 Fracionamento cromatográfico de SPIF_LE_SPE

O método utilizado em escala analítica foi escalonado para a realização do fracionamento cromatográfico. A separação foi realizada usando uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 10 mm) Phenomenex, as fases móveis utilizadas foram metanol (B) e água milli-Q (A), com gradiente B de 20-80% durante 24 minutos e em seguida 80% de B por 10 minutos e fluxo de 3,5 mL/min. O detector UV-Vis foi ajustado para monitorar as faixas de 280 e 316 nm, utilizando 30 mg de cada amostra e estas foram solubilizadas em 100 µL de DMSO grau HPLC. Este procedimento foi repetido 5 vezes (5 injeções) para o extrato SPIF_LE_SPE resultando em 13 frações (Tabela 1).

Tabela 1: Codificação das frações obtidos após fracionamento cromatográfico.

<i>S. peckii</i>	
Amostra	Massa (mg)
SPF1	2,9
SPF2	3,1
SPF3	3,7
SPF4	8,4
SPF5	17,8
SPF6	8,3
SPF7	19,4
SPF8	19,9
SPF9	9,7
SPF10	10,9
SPF11	6,3
SPF12	4,9
SPF13	4,2

4.11 Purificação dos constituintes químicos de *Strychnos peckii*

As frações SPF4 (8,4 mg), SPF8 (19,9 mg) e SPF10 (10,9 mg) foram submetidas a análises por MS e RMN. As frações SPF7 (19,4 mg) e SPF9 (9,7 mg) foram submetidas, individualmente, ao fracionamento por HPLC em escala semi-preparativa utilizando a mesma fase móvel e coluna C18 descritas no tópico 4.10, resultando nas subfrações SPF7_1 (2,4 mg) e SPF7_2 (3,3 mg) de SPF7 e SPF9_2 (2,0 mg) de SPF9. A subfração SPF7.3 (3,2 mg) foi ainda fracionada por HPLC semi-preparativa usando uma coluna PFP (250 mm × 10 mm, 5 µm) (Phenomenex - Torrance, CA, EUA) com um gradiente de eluição como segue: 0-24 min, 30-80% B (v:v), proporcionando a subfração SPIF_661 (2,0 mg). Todas essas frações foram submetidas a análises por MSe RMN.

Resultados e discussão



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil alcaloídico das folhas de *S. peckii* por LS-MS

O espectro de LS-MS das folhas de *S. peckii* (Figura 10 (A)), no modo positivo, evidenciou a presença de um íon de m/z 531 como pico base e a presença de outros íons menos intensos, destacando a presença do íon de m/z 571 próximo ao pico base.

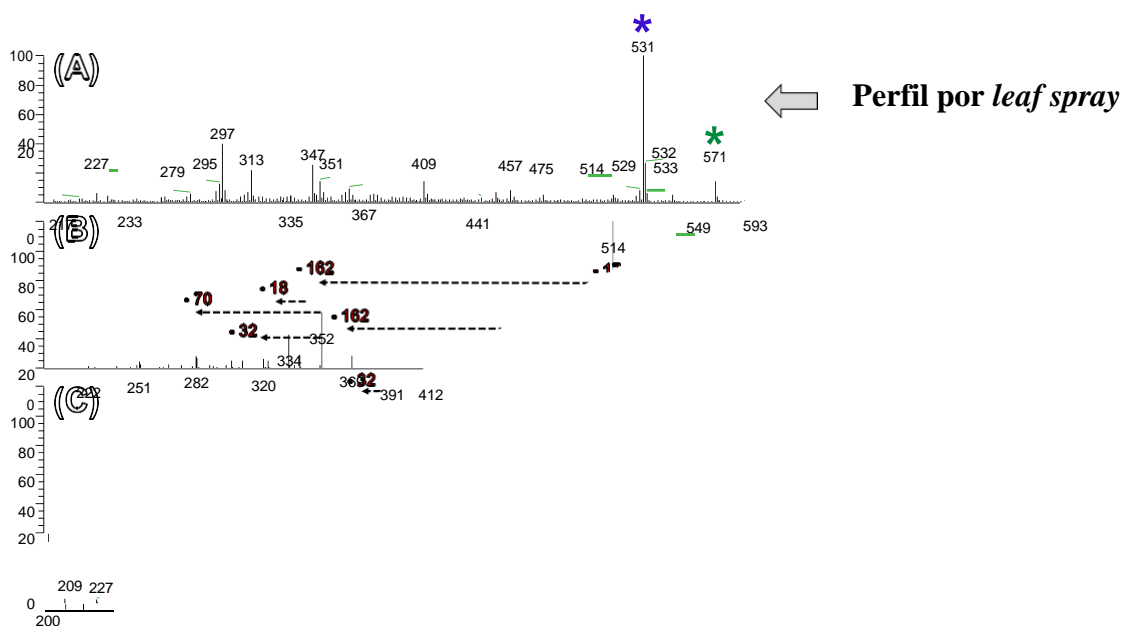


Figura 10: Perfil alcaloídico por LS-MS das folhas de *S. peckii* com * denotando possíveis alcaloides (A) e espectros de LS-MS/MS dos íons de m/z 531 (B) e 571 (C).

Os íons de m/z 571 e 531 foram submetidos a análise de LS-MS/MS onde o espectro de fragmentação (Figura 10 (B e C)) evidenciou para o íon de m/z 531 perdas iniciais competitivas de amônia (17 Da, $-\text{NH}_3$) (m/z 531 \rightarrow m/z 514) e glicose (m/z 531 \rightarrow m/z 369) (162 Da, $-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$). Após a perda de amônia também foi possível observar a perda neutra da glicose (m/z 514 \rightarrow m/z 352), esses padrões de fragmentação (Figura 11) estão de acordo com o alcaloide indólico monoterpênico (AIM) strictosidina (YAMAZAKI; URANO; SUDO; KITAJIMA *et al.*, 2003), previamente reportado em *S. amazonica*, *S. mellodora* e *S. nux-vomica* (COSTA *et al.*, 2016; SCOTT, 1974; TITS *et al.*, 1996). Perdas competitivas de 18 Da ($-\text{H}_2\text{O}$, m/z 352 \rightarrow m/z 334) e 32 Da (-

CH_3OH , m/z 352 \rightarrow m/z 320) e 70 Da ($-\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$, m/z 352 \rightarrow m/z 282) também foram observadas após a perda de glicose da unidade de secologanina.

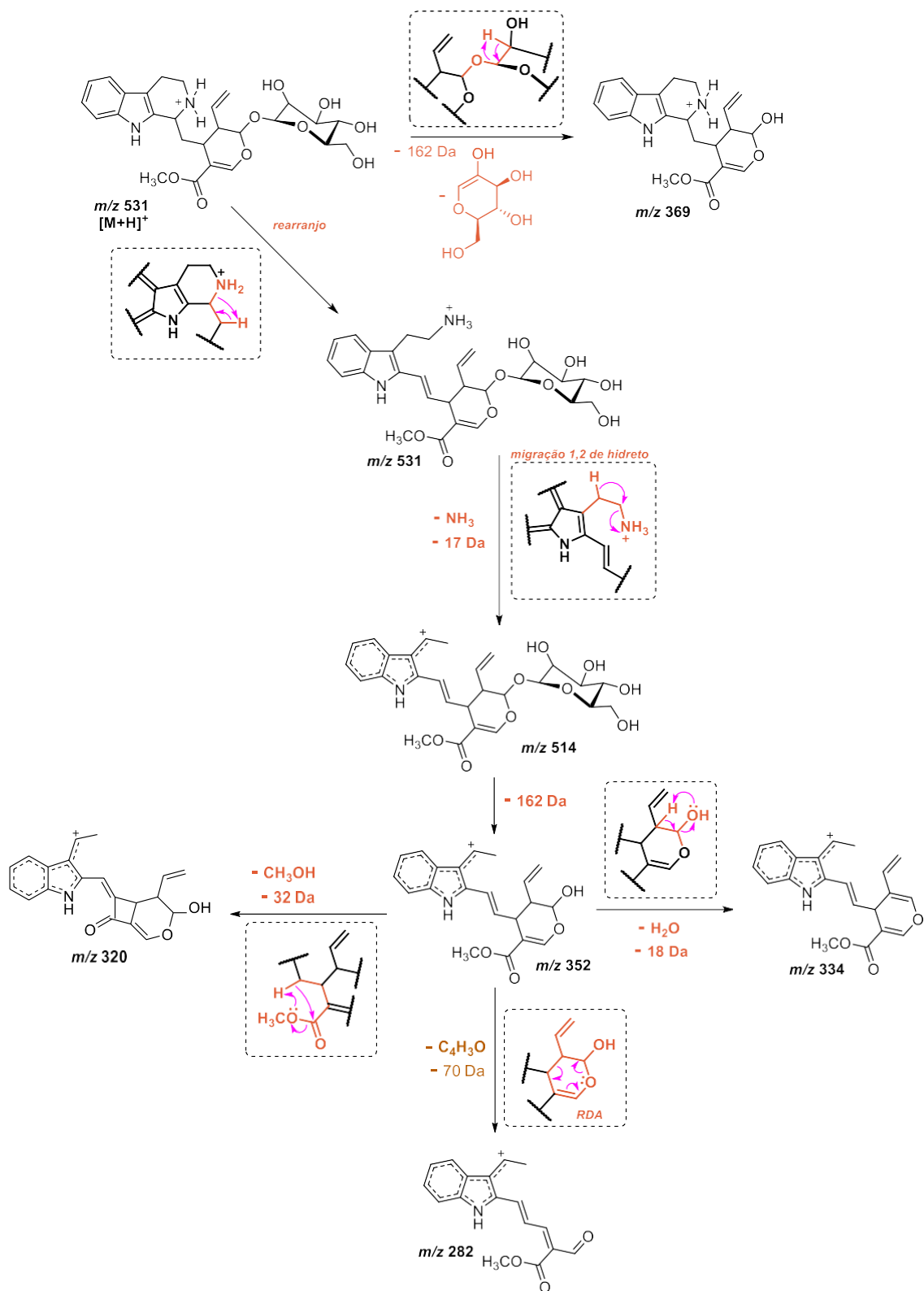


Figura 11: Proposta de fragmentação para os principais íons produtos observados no espectro de LS-MS/MS do alcaloide strictosidina (m/z 531).

Por outro lado, o espectro de MS/MS do íon de m/z 571 demonstrou apenas a perda inicial de glicose (m/z 571 \rightarrow m/z 409), sem a perda competitiva de amônia. Após a perda neutra de glicose, perdas competitivas de 18 Da ($-H_2O$, m/z 409 \rightarrow m/z 391), 32 Da ($-CH_3OH$, m/z 409 \rightarrow m/z 377) e 70 Da ($-C_4H_6O$, m/z 409 \rightarrow m/z 339) foram observadas a partir da unidade de secologanina no composto. Esse padrão de fragmentação (Figura 12) é consistente com o AIM desoxicordifolina (BRANDT *et al.*, 1999), previamente reportado em *S. mellodora* (BRANDT *et al.*, 1999).

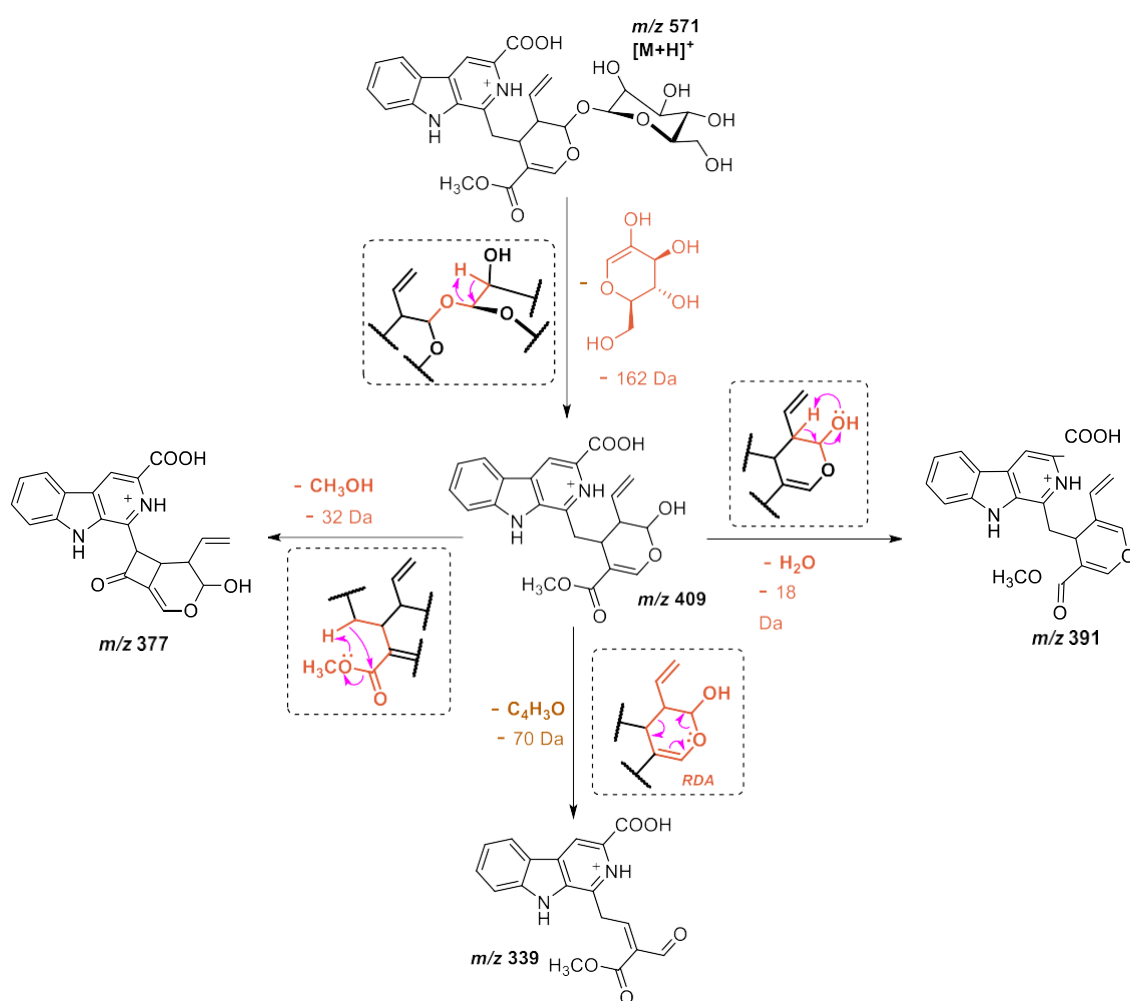


Figura 12: Proposta de fragmentação para os principais íons produtos observados no espectro de LS-MS/MS do alcaloide desoxicordifolina (m/z 571).

Embora a perda de 162 Da (glicose) tenha sido aplicada com sucesso como um filtro de perda neutra para identificar AIMs, essa perda é comum a outras classes, como saponinas triterpênicas e flavonoides glicosilados (MA *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2015;

ZHENG *et al.*, 2010). Em relação à perda de 17 Da (NH₃), esta também é uma perda neutra não restrita aos AIMS, contudo, restrita a alcaloides (LIMA *et al.*, 2019). Portanto, devido à ocorrência histórica de AIMS em espécies de *Strychnos*, ambas as perdas poderiam ser usadas para a triagem de AIMS. Em relação às perdas competitivas decorrentes da parte da secologanina, nenhuma informação de fragmentação foi atribuída até o momento.

Assim, o perfil alcaloídico inicial por LS-MS permitiu o rápido reconhecimento de AIMS nas folhas de *S. peckii*, e revelou perdas neutras úteis que guiaram para o reconhecimento de outros derivados nessa amostra através de experimentos de LC-MS/MS.

5.2 Análises por HPLC-MS/MS e *molecular networking* (MN) da amostra SPIF

A análise do extrato SPIF por HPLC-MS/MS operando com varredura com perda neutra (17 e 162 Da) indicou 11 derivados de strictosidina plausíveis (Figura 13 (A e B)), incluindo aqueles já observados na análise de LS-MS. Os íons de m/z 517, 531, 547 e 575 foram destacados devido à perda de amônia (-17 Da), conforme observado para a strictosidina, enquanto os íons de m/z 499, 515, 527, 529 571, 661, juntamente com um íon isóbaro minoritário de m/z 531, apresentaram apenas a perda do resíduo de glicose (-162 Da), conforme observado para a desoxicordifolina.

Com o objetivo de classificar esses prováveis AIMS derivados de strictosidina de acordo com seus característicos espectros de MS/MS, os espectros de íons produtos foram usados para gerar um MN.

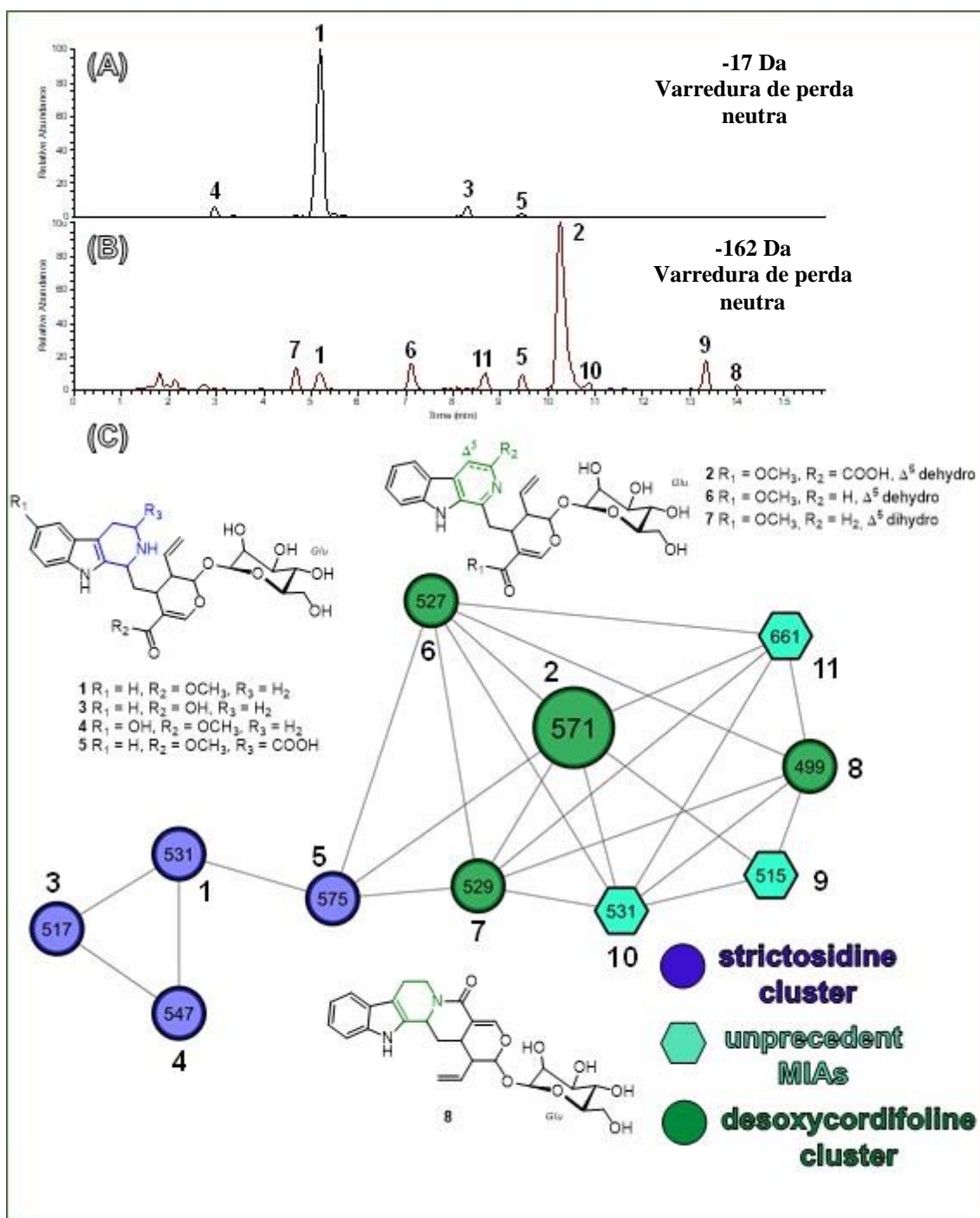


Figura 13: Cromatograma representativo obtido a partir da varredura por perda neutra de 17 (A) e 162 Da (B). Anotação do *molecular networking*, que mostra os alcaloides derivados da strictosidina (pontos azuis), desoxycordifolina (pontos verdes escuros) e AIMS supostamente inéditos (hexágonos verde-claros) (C).

No MN (Figura 13 (C)), foram observados dois *clusters*, um maior (8 nodos) e um menor (3 nodos), atribuídos a estruturas semelhantes da strictosidina e desoxycordifolina, respectivamente. No grupo derivado da strictosidina, os íons de m/z

517 (Figura 14) e 547 (Figura 15) semelhantemente à strictosidina, também apresentaram um pico base após a perda de amônia (m/z 517 \rightarrow m/z 500 e m/z 547 \rightarrow m/z 530), que foi competitivo com a perda do resíduo de glicose da secologanina (m/z 517 \rightarrow m/z 355 e m/z 547 \rightarrow m/z 385).

As perdas competitivas de 18, 32 e 70 Da da porção de secologanina, após a perda do resíduo de glicose, conforme observado anteriormente para a strictosidina, também foram observadas para os íons de m/z 547 (m/z 367 \rightarrow m/z 350, m/z 368 \rightarrow m/z 336 e m/z 368 \rightarrow m/z 298), com as perdas de 18 e 70 Da observadas para o íon de m/z 517 (m/z 338 \rightarrow m/z 320 e m/z 338 \rightarrow m/z 268). A ausência da perda de 32 Da(CH_3OH) para o íon de m/z 517, esperada para o grupo éster da porção secologanina, sugere sua substituição por um ácido carboxílico. Esse padrão de fragmentação é consistente com o AIM ácido estritosidínico (estrutura **3** na Figura 13), reportado anteriormente em *S. axillaris* (ITOH *et al.*, 2008).

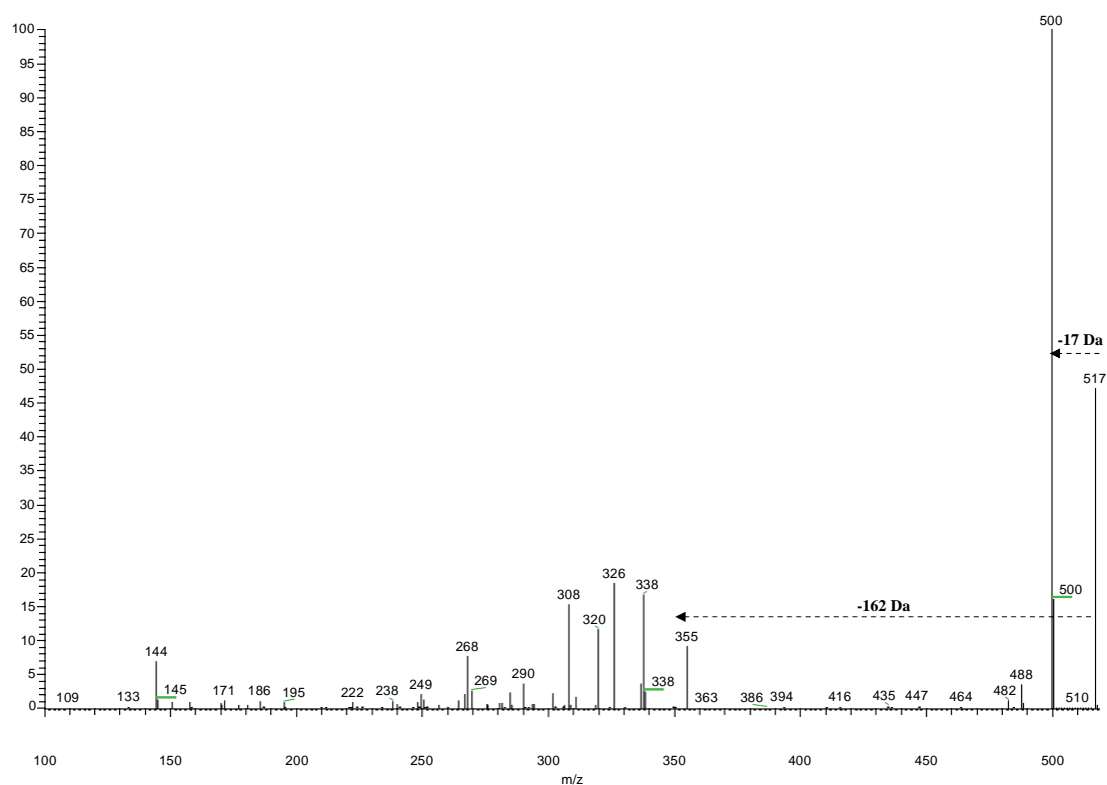


Figura 14: Espectro de MS/MS do íon m/z 517.

Por outro lado, o íon de m/z 547 apresentou o mesmo padrão de fragmentação que a strictosidina, com a diferença de massa de um grupo hidroxila, portanto, esta fragmentação está de acordo com o AIM 10-hidroxi-strictosidina (estrutura **4** na Figura 13) (EHRENWORTH *et al.*, 2015).

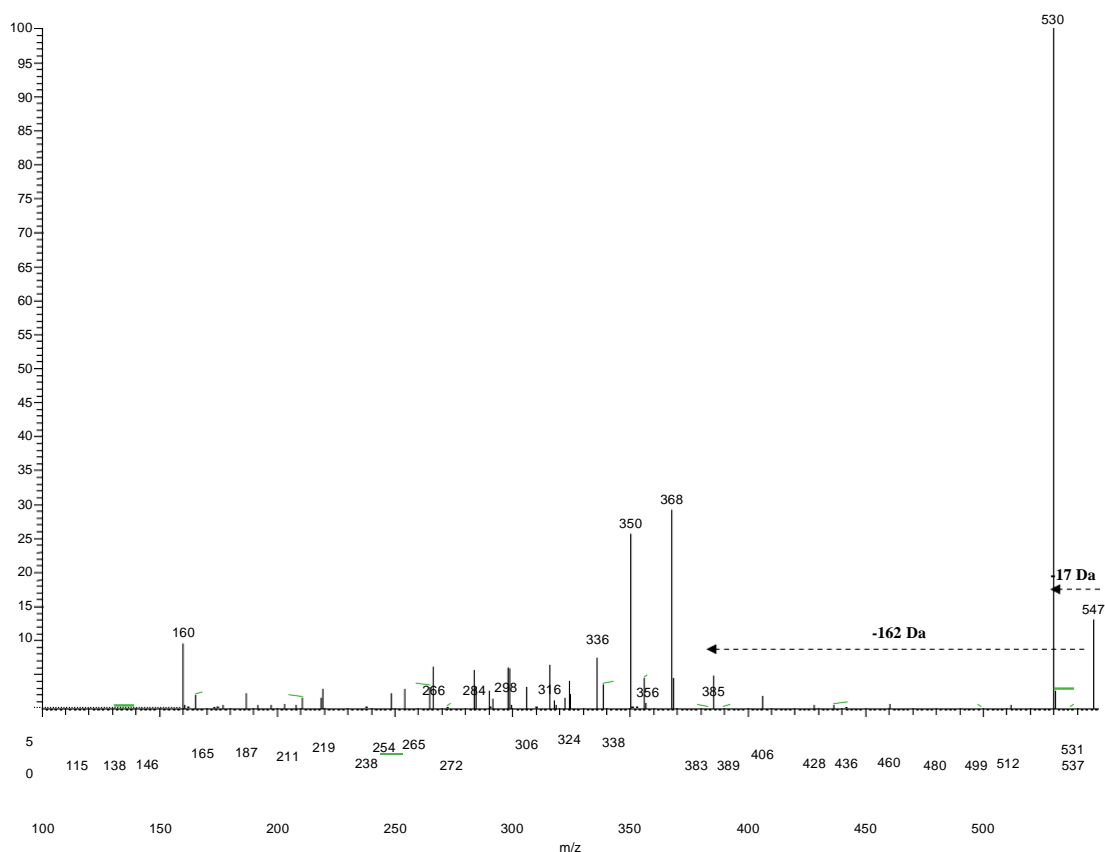


Figura 15: Espectro de MS/MS do íon m/z 547.

A conexão entre os *clusters* de strictosidina e desoxicordifolina no MN foi estabelecida através do íon m/z 575, o qual apresentou conexões diretas com os nodos da strictosidina (m/z 531) e desoxicordifolina (m/z 571), assim sugerindo uma consistente relação estrutural com ambos.

Embora os espectros MS/MS (Figura 16) do íon de m/z 575 tenham apresentado perdas competitivas de 17 Da (m/z 575 \rightarrow m/z 558) e 162 Da (m/z 575 \rightarrow m/z 413), o pico base não foi observado após a perda de amônia. Semelhantemente à desoxicordifolina, as perdas competitivas de 18 Da (m/z 413 \rightarrow m/z 395), 32 Da (m/z 413 \rightarrow m/z 381) e 70 Da (m/z 413 \rightarrow m/z 343) foram observados a partir da porção secologanina, após a perda do

resíduo de glicose. Esse padrão de fragmentação está de

acordo com a AIM 5-carboxistrictosidina (estrutura **5** na Figura 13) (KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015).

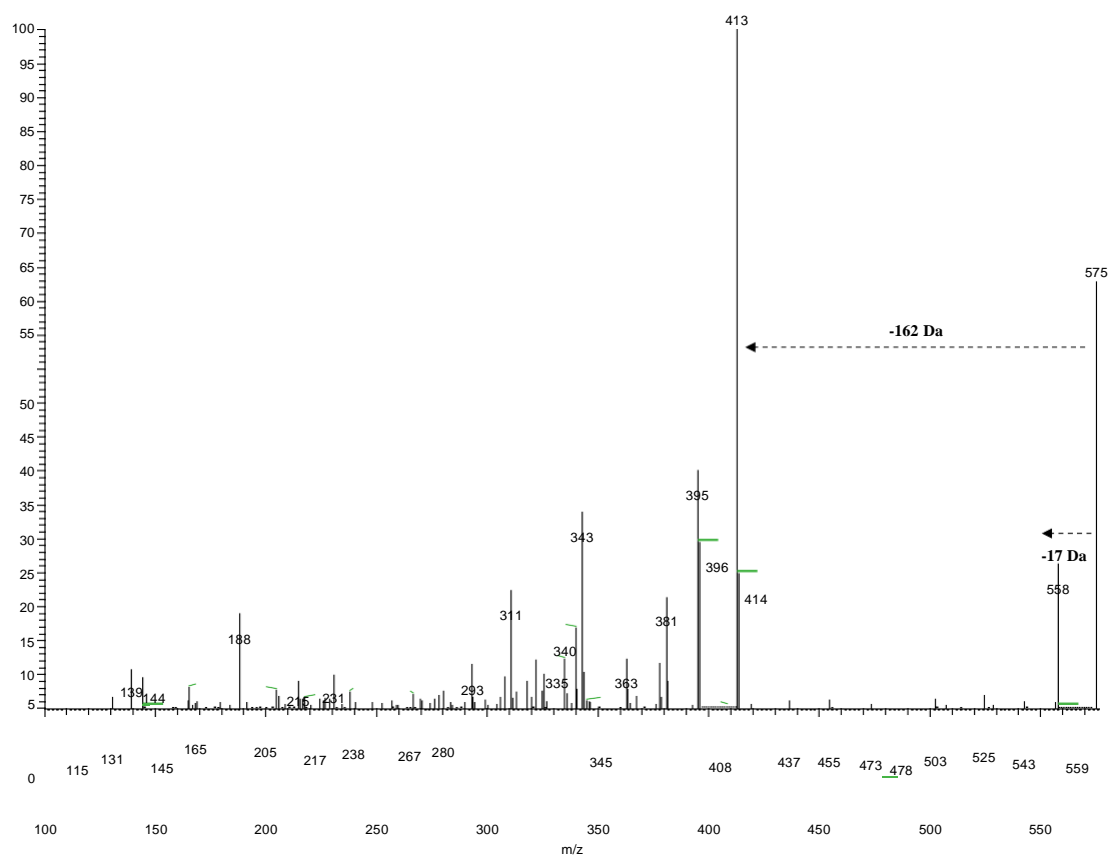


Figura 16: Espectro de MS/MS do íon m/z 575.

No cluster da desoxicordifolina, os íons de m/z 527 e 529 (Figura 17) também apresentaram perdas competitivas de 18, 32 e 70 Da após a perda do resíduo de glicose. Esses padrões de fragmentação estão de acordo com o AIMs lialosídeo e 3,4-dehidro-strictosidina (estruturas **6** e **7**, respectivamente, na Figura 13). Os dados de MS/MS desses compostos foram comparados com AIMs previamente desreplicados e anotados em MN (KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2017).

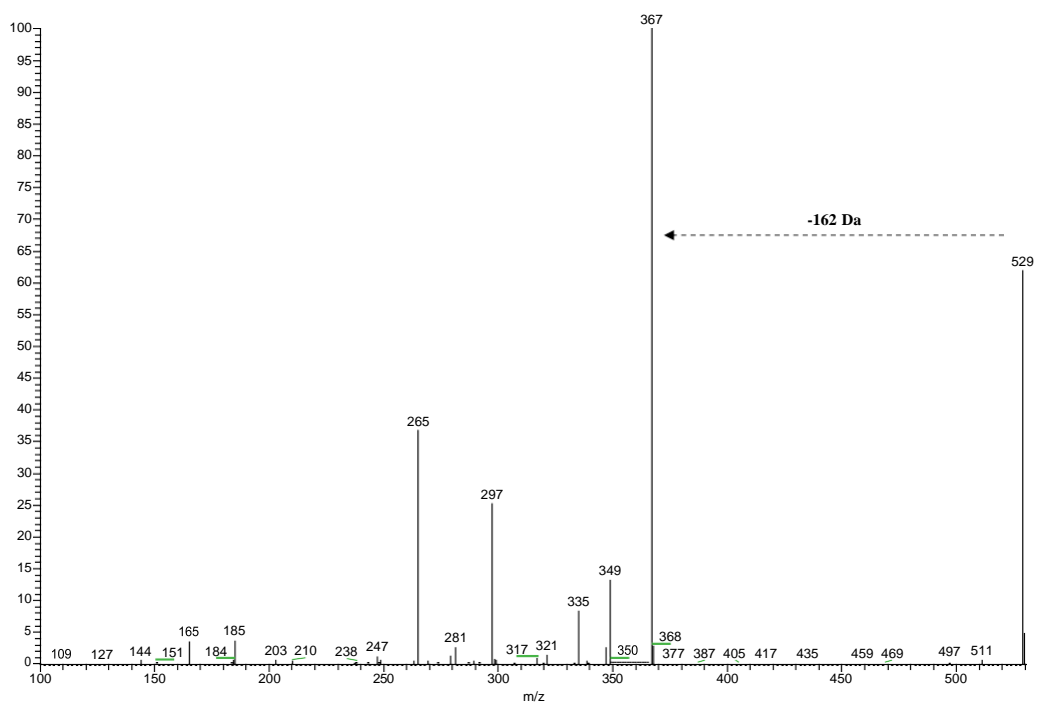
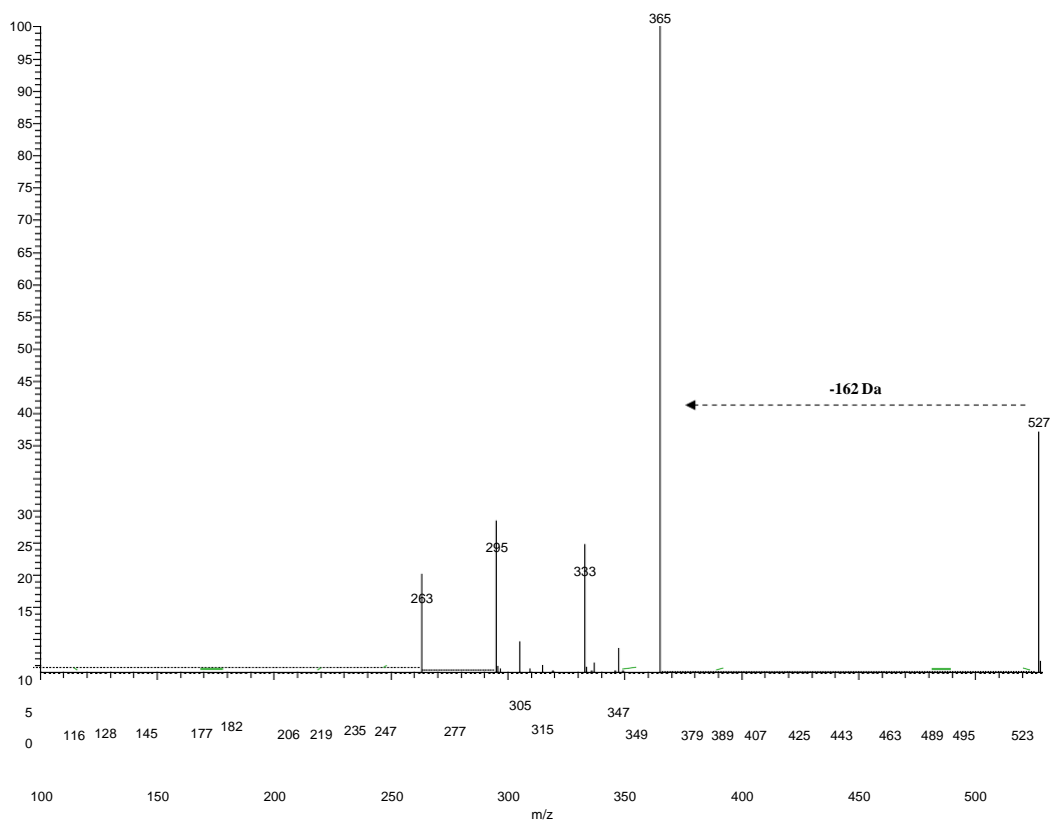


Figura 17: Espectros de MS/MS dos íons m/z 527 e 529.

Embora o íon de m/z 499, conectado aos nodos dos AIMs lialosídeo (m/z 527) e 3,4-dehidro-strictosidina (m/z 529), não tenha mostrado perda de 32 Da nos espectros MS/MS (Figura 18), este íon apresentou perdas competitivas de 18 (m/z 337 \rightarrow m/z

319) e 70 Da (m/z 337 \rightarrow m/z 367), que estão de acordo com o AIM strictosidina

lactama (estrutura **8** na Figura 13) (LIU *et al.*, 2015; SADRE *et al.*, 2016), previamente reportado em *S. nitida* (WANG *et al.*, 2016).

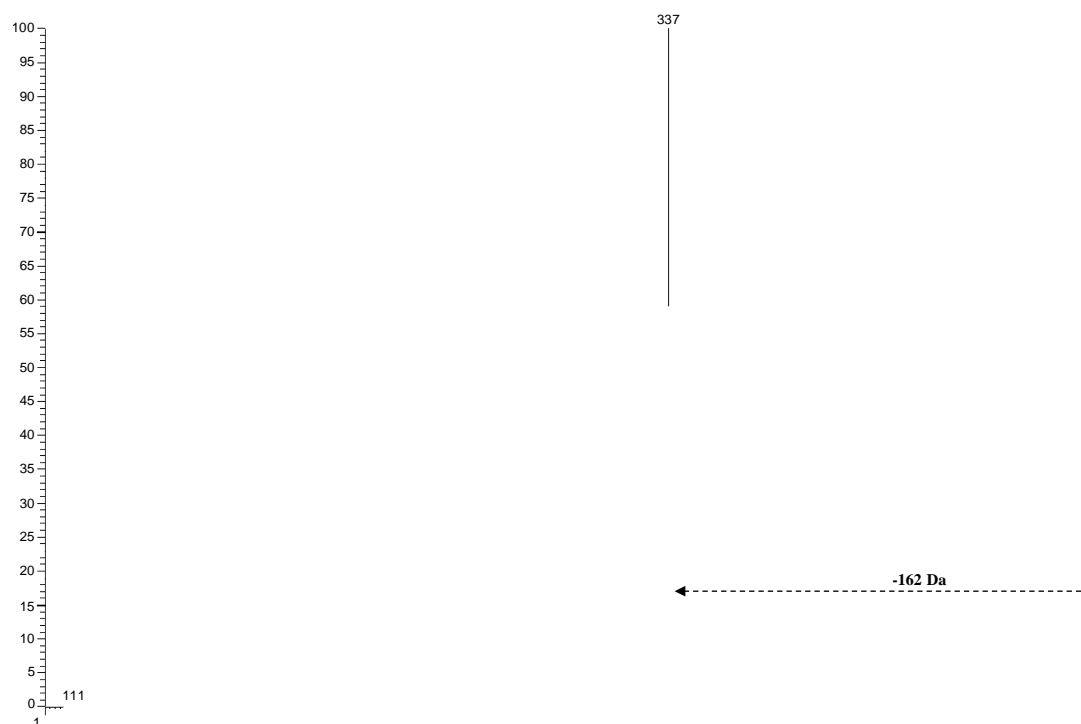


Figura 18: Espectro de MS/MS do íon m/z 499.

Por outro lado, o nodo da strictosidina lactama (m/z 499) está diretamente conectado aos nodos dos íons de m/z 515, 531 e 661. Em relação aos íons em m/z 515 e 531, foi observada uma perda incomum de 72 Da (m/z 515 \rightarrow m/z 443 e m/z 531 \rightarrow m/z 459), que compete com a perda neutra de glicose (m/z 515 \rightarrow m/z 353 e m/z 531 \rightarrow m/z 369). Além disso, foram observadas perdas competitivas de 18, 32 e 72 Da da porção de secologanina após a perda da porção de glicose para o íon de m/z 531 (m/z 369 \rightarrow m/z 351, m/z 369 \rightarrow m/z 337 e m/z 369 \rightarrow m/z 297), com as perdas de 18 e 72 Da (m/z 353 \rightarrow m/z 335 e m/z 353 \rightarrow m/z 281) observadas para o íon de m/z 515 (Figura 13).

A ausência da perda de metanol (-32 Da) para o íon em m/z 515, esperada para o grupo éster na porção secologanina, sugeriu sua substituição por um ácido carboxílico. Surpreendentemente, essas fragmentações ainda estão de acordo com os esqueletos de AIM, nos quais a ligação dupla terminal da secologanina está hidrogenada. Até agora,

para o nosso conhecimento, estas são substâncias ainda não relatadas na literatura. Por outro lado, o íon de m/z 661 (Figura A8, pg. 112) mostrou uma alta similaridade espectral com a strictosidina lactama (- 162 Da, m/z 661 \rightarrow m/z 499; - 18 Da, m/z 499 \rightarrow m/z 481; - 70 Da, m/z 499 \rightarrow m/z 429), apresentando como única diferença uma unidade de açúcar adicional para essa estrutura.

Como a perda inicial do açúcar não afetou as perdas competitivas de 18 e 70 Da, também observadas para a strictosidina lactama, a posição de glicosilação desta estrutura deve estar localizada em sua porção harmano. Portanto, esse padrão de fragmentação também é consistente com um alcaloide não relatado na literatura.

5.3 Análises por HPLC-DAD-MS e HPLC-DAD-MS/MS da amostra SPIF_LE_SPE

A partir da análise do extrato SPIF_LE_SPE por HPLC-DAD-MS (Figura 19) foi possível observar a presença de ao menos 7 picos majoritários (3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) e 4 minoritários (1, 2, 4 e 11). Assim, esses compostos foram submetidos à análise por HPLC-DAD-MS/MS (Tabela 2).

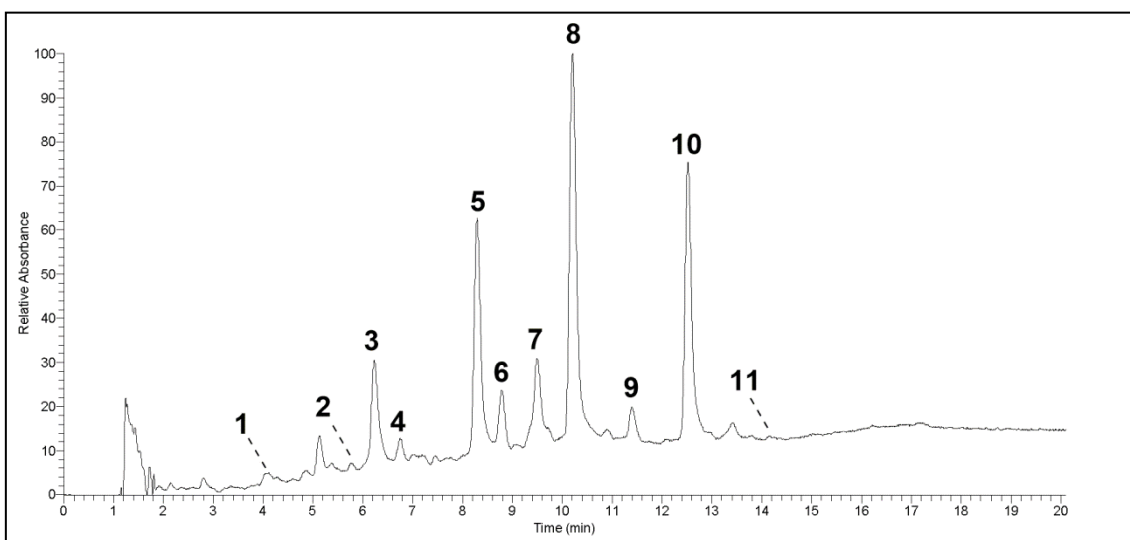


Figura 19: Cromatograma da amostra SPIF_LE_SPE destacando os principais picos observados.

Tabela 2: Picos observados para SPIF_LE_SPE com seus íons precursores e fragmentos principais.

Pico	Rt	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS/MS
1	4.14	547	-	530, 368, 350
2	5.76	529	-	367, 349, 297, 265
3	6.23	531	-	514, 369, 352, 334, 320, 282
4	6.74	517	515	500, 355, 338, 320, 268
5	8.29	227	225	199, 181, 154
6	8.79	661	-	499, 481, 429, 333
7	9.51	575	573	558, 413, 395, 396, 381, 343
8	10.22	571	569	409, 391, 377, 339
9	11.42	449	447	303
10	12.52	433	431	287
11	14.16	499	-	367, 337, 319

Os íons de m/z 531, 575 e 571 (picos 3, 7 e 8, respectivamente) apresentaram padrões de fragmentação de acordo com os alcaloides indólicos monoterpênicos estrictosidina, 5-carboxiestrictosidina e desoxicordifolina, respectivamente. Para os íons de m/z 547, 529, 517 e 499 (picos 1, 2, 4 e 11, respectivamente), os fragmentos obtidos a partir do espectro de MS/MS estão de acordo com os alcaloides 10-hidroxi estrictosidina, 3,4-dehidro estrictosidina, ácido estrictosidínico e estrictosidina lactama, todos previamente reportados nas seções **5.1** e **5.2**.

Além disso, o espectro de MS/MS do pico 6 (m/z 661) mostrou uma alta similaridade espectral com a estrictosidina lactama (estrutura **11** na Figura 13) (- 162 Da, m/z 661 \rightarrow m/z 499; - 18 Da, m/z 499 \rightarrow m/z 481; - 70 Da, m/z 499 \rightarrow m/z 429), sugerindo que esses compostos se diferem entre si por uma unidade de açúcar. Como a perda inicial de açúcar não afetou as demais perdas competitivas de 18 e 70 Da, semelhante ao observado para a estrictosidina lactama, a posição de glicosilação dever ser no esqueleto tetrahydroarmano. Até onde se sabe, não existem estruturas previamente descritas na família Loganiaceae com essas características. Por outro lado, o espectro de MS/MS do pico 5 (m/z 227) mostrou perdas subsequentes de CO (- 28 Da, m/z 227 \rightarrow m/z 199) e H₂O (- 18 Da, m/z 199 \rightarrow m/z 181), também incompatível com

qualquer composto relatado anteriormente da família Loganiaceae. Além disso, os espectros de MS/MS dos picos 9 (m/z 449) e 10 (m/z 433) apresentaram perdas de 146 Da (m/z 449 \rightarrow m/z 303; m/z 433 \rightarrow m/z 287), sugerindo a presença de derivados ramnosídeos na amostra (MARCH et al., 2004), também não relatados anteriormente na família Loganiaceae. Assim, esses compostos juntamente com outros compostos majoritários foram isolados e submetidos a análises de RMN 1D e 2D para confirmação estrutural.

5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas de *S. peckii*

5.4.1 Determinação estrutural da amostra SPF8

A amostra SPF8 foi obtida sob a forma de sólido amorfo e coloração marrom claro. No espectro de massas (Figura A3, pg. 110), observou-se como pico base o íon de m/z 571 $[M+H]^+$ e ao ser submetido a fragmentação (Figura A4, pg. 110) apresentou perda inicial de 162 Da. A partir da análise do espectro de RMN de 1H da amostra SPF8 (Figura 20), foram observados sinais referentes a hidrogênios aromáticos de sistema indólico não substituído em δ_H 8,32 (*d*, $J= 7,90$ Hz, 1H), δ_H 7,39 (*m*, 1H), δ_H 7,69 (*m*) e δ_H 7,69(*m*) referente aos hidrogênios H-9, H-10, H-11 e H-12, respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos carbonos ligados a esses hidrogênios foram atribuídos com base nas correlações observadas pelos experimentos de HMBC e HSQC.

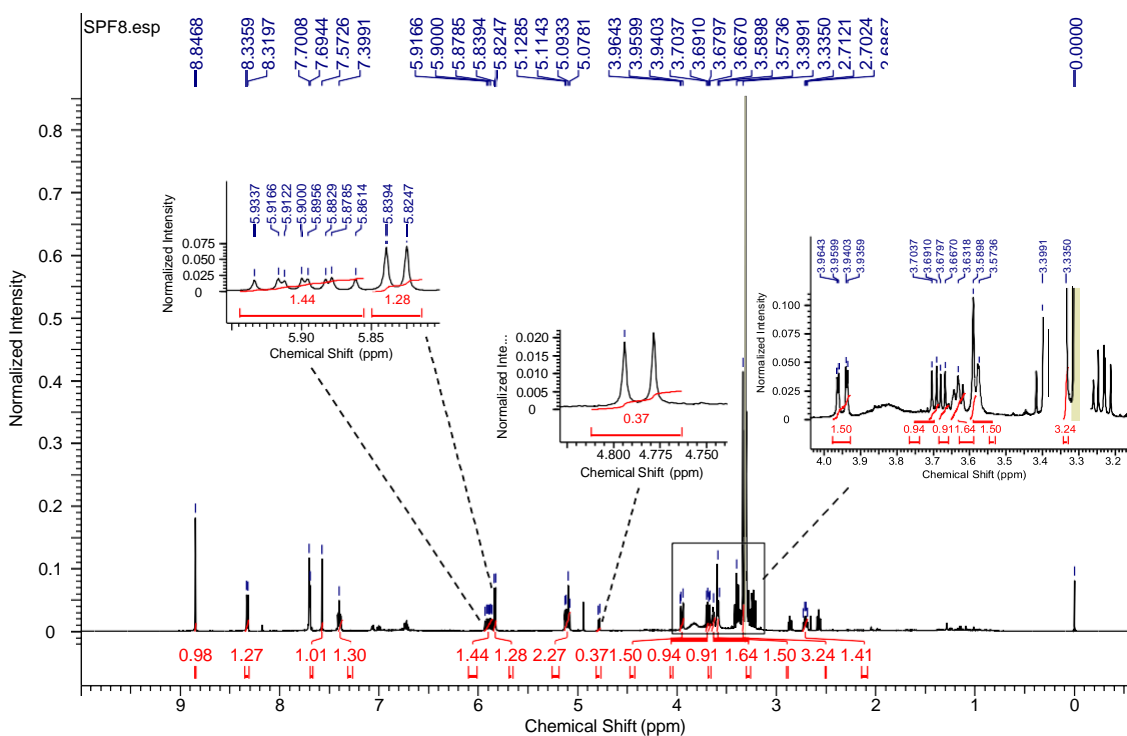


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF8 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

A presença de um singlete em δ_{H} 8,84 (s) referente ao H-6 onde através do HMBC (Figura 22) foi observada a correlação com um carbono em δ_{C} 167,0 (C-24) evidenciou a presença de uma unidade β -carbolínica substituída na posição 5 por uma carboxila.

A análise das correlações observadas no mapa de correlações de HMBC (Figura 22) permitiu atribuir a posição na qual o açúcar encontra-se ligado à substância onde através da presença de um sinal característico de hidrogênio anomérico em δ_H 4,78 (*d*, $J=7,8$ Hz) foi observada a correlação a J^3 do açúcar com a posição C-21. O deslocamento dos hidrogênios H-2' 3,23 (*m*), H-3' 3,39 (*m*), H-4' 3,68 (*m*), H-5' 3,39 (*m*) e H-6' 3,95 (dd, $J=2,22; 11,94$) foram obtidos por correlação COSY e os carbonos ligados a esses hidrogênios por HSQC (Figura 21).

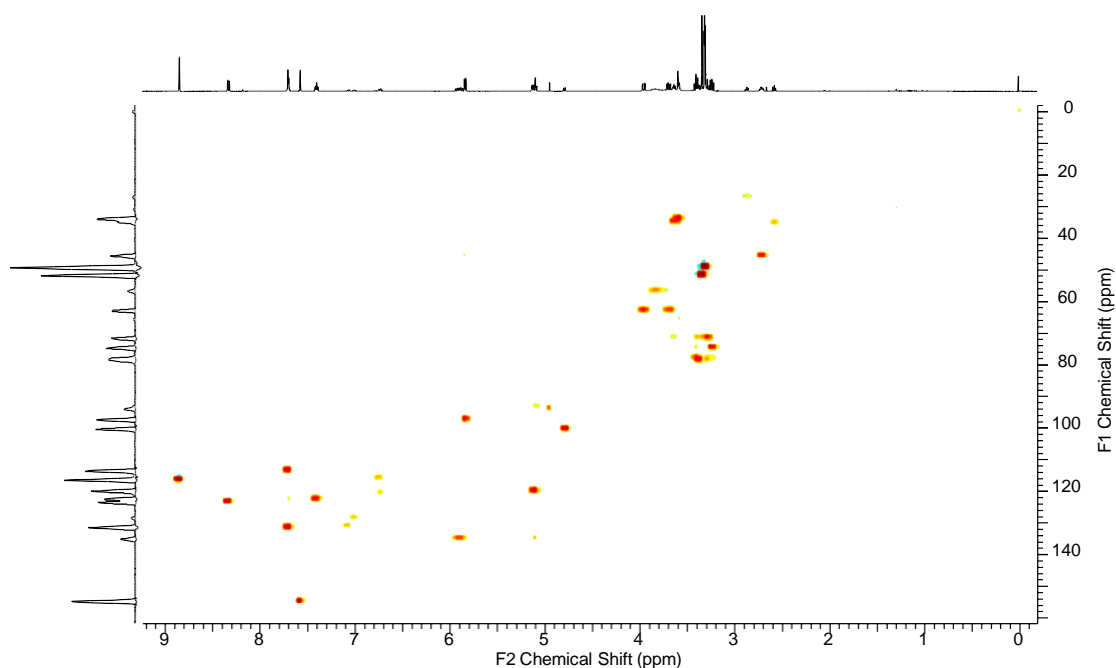


Figura 21: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF8 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

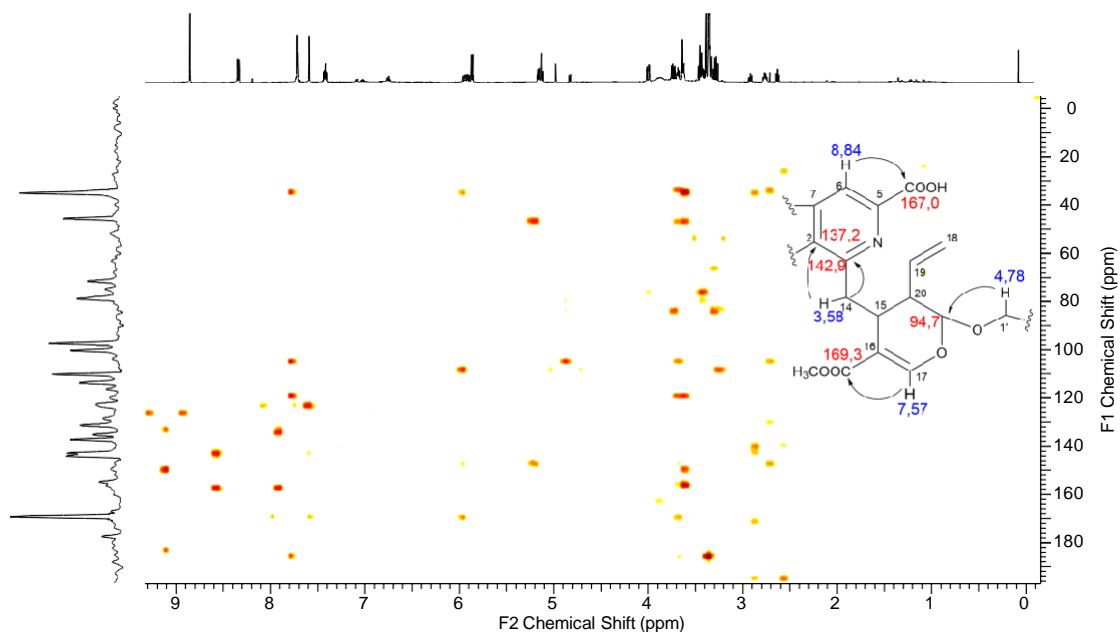


Figura 22: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF8 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3)

Com os dados de MS, RMN (1D e 2D) (

Tabela 3) e comparação com dados da literatura foi possível determinar a estrutura do alcaloide desoxicordifolina (Figura 23), confirmando assim a estrutura proposta por LS-MS/MS e MN para o íon m/z 571. Este composto já foi previamente descrito para a espécie africana *S. mellodora* (BRANDT *et al.*, 1999).

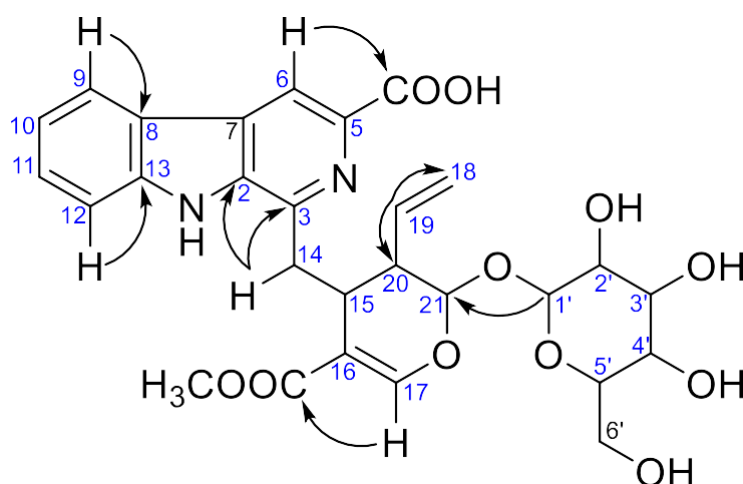


Figura 23: Principais correlações observadas para o alcaloide desoxicordifolina.

Tabela 3: Dados de RMN para amostra SPF8.

Posição	Amostra SPF8			Desoxicordifolina (Brandt et al., 1999)	
	¹³ C ^b	¹ H δ (mult., J em Hz)	HMBC (¹ H – ¹³ C)	¹ H	¹³ C
2	137,2	-	H-6, H-14	-	135,6
3	142,9	-	H-14	-	142,9
5	137,5	-	H-6, H-14	-	135,6
6	116,5	8,84 (s)		8,96	114,2
7	128,4	-		-	128,4
8	123,4	-		-	121,7
9	123,4	8,32 (d, 7,9)	H-11	8,19 (d, 7,8)	121,4
10	122,5	7,39 (m)		7,28 (t, 7,8)	119,9
11	131,4	7,69 (m)	H-9	7,56 (t, 7,3)	128,4
12	113,7	7,69(m)	H-10,	7,59 (d, J= 7,7 Hz)	111,6
13	144,1	-	H-9 e H-11	-	141,6
14	34,0	3,58 (dd, 8,3; 12,7)	H-15, H-20	3,43 (m); 3,27 (m)	34,0
15	35,1	3,63 (t, 5,53; 12,2)	H-14,	3,67 (m)	34,5
16	110,0	-	H-14, H-15, H-17	-	108,7
17	154,9	7,57 (s)	H-15, H-21	7,59 (s)	153,2
18	119,8	5,10 (dd, 10,9; 17,) 5,11 (dd, 8,1; 17,2)	H-20		117,6
19	135,1	5,89 (ddd, 2,2, 8,1, 17,2)	H-14, H-18, H-20	5,67 (ddd, 10,7; 17,3; 7,2)	133,8
20	45,6	2,70 (ddd, 2,7; 7,4)	H-14, H-18	2,62 (dd, 7,3 Hz, 7,2)	44,4
21	97,4	5,87 (d, 7,3)	H-14, H-15, H-18, H-19	5,86 (d, 7,3)	96,1
22 (C=O)	169,3	-	H-17, H-23	-	171,3
-OCH ₃	51,7	3,33 (s, 3H)		3,54 (s)	50,6
COOH	167,0	-	H-6	-	168,4
Glu	-	-	-	-	-
1'	100,3	4,78 (d, 7,8, 1H)	H-21	4,78 (d, J= 7,8 Hz)	99,0
2'	74,7	3,23 (m, 1H)		3,19 (m)	73,2
3'	78,2	3,39 (m, 1H)		3,29 (m)	76,6
4'	62,9	3,68 (m, 1H)		3,22 (m)	70,4
5'	78,2	3,39 (m, 1H)		3,39 (m)	76,6
6'	63,0	3,95 (dd, 2,22;		3,99 (d, 10,7 Hz);	61,8

11,94, 1H)

3,67 (d, 10,7);

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Brandt *et al.*, 1999

^b Carbonos protonados atribuídos através dos dados de HSQC e carbonos quaternários atribuídos por HMBC.

5.4.2 Determinação estrutural da amostra SPF7_2

A amostra SPF7_2 foi obtida sob a forma de sólido amorfo e coloração verde claro. No espectro de massas (Figura A5, pg. 111) o íon 575 [M+H]⁺ foi observado como pico base. Ao ser submetido a fragmentação (Figura A6, pg. 111) apresentou perdas iniciais competitivas de 17 e 162 Da.

No espectro de RMN de ¹H da amostra (Figura 24) observou-se a presença de sinais de hidrogênios aromáticos referentes ao anel indólico não-substituído em δ_H 7,47 (d, $J= 8,17$ Hz), δ_H 7,03 (td, $J= 1,02; 8,06$ Hz), δ_H 7,11 (td, $J= 1,02; 8,06$ Hz) e δ_H 7,29 (d, $J= 8,17$) referentes aos hidrogênios H-9, H-10, H-11 e H-12 respectivamente. Contudo, a presença de um duplo duplete em δ_H 3,95 (dd, $J= 5,10; 12,07$ Hz) referente ao H-5 e dois duplo dupletos em 3,44 (dd, $J= 1,50; 5,00; 12,08$ Hz) e 3,05 (m) referente aos H-6 evidenciaram um sistema do tipo tetrahydro β -carbolina em que um dos hidrogênios da posição C-5 se encontra substituído. Ainda foi possível observar a presença de sinais referentes a açúcares presente na estrutura.

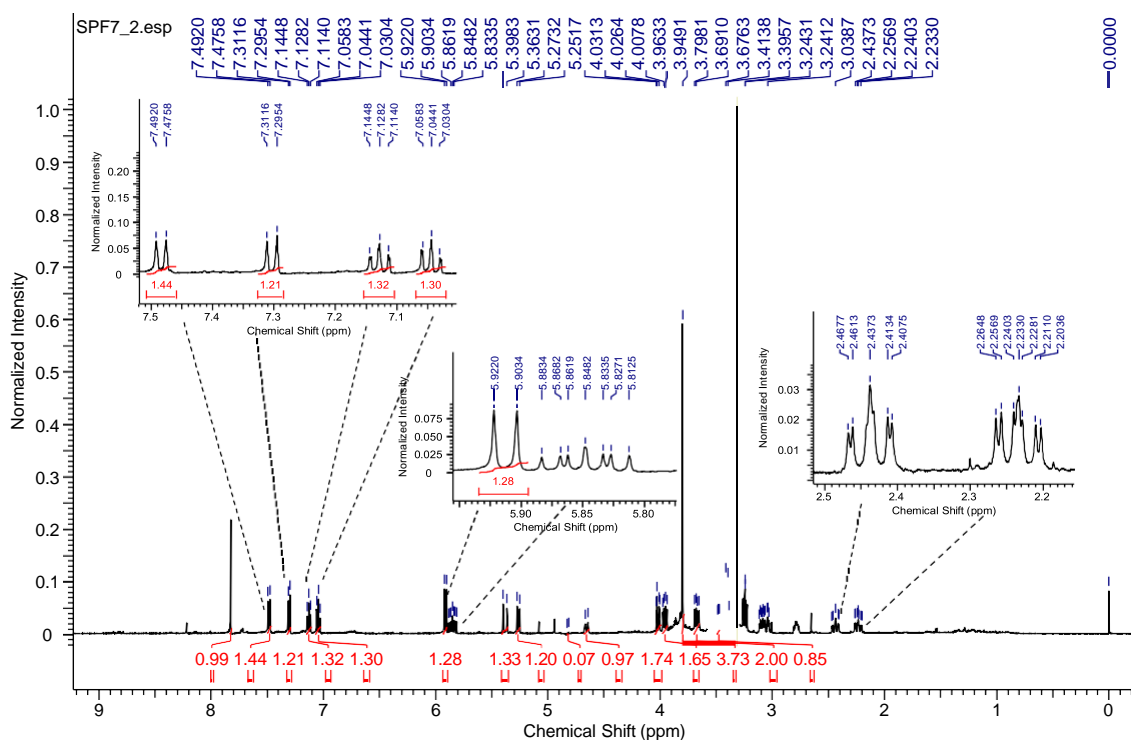


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da amostra SPF7_2 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

Por HMBC (Figura 26) foi possível atribuir a correlação com o hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,80 (d, $J = 8,46$ Hz) com o C-21 em δ_{C} 99,4 permitindo atribuir a posição na qual a unidade glicosídica está ligada ao composto. Também foi possível observar dois singletos onde um está em δ_{H} 7,81 e o outro em δ_{H} 3,78 se correlacionando com uma carbonila em δ_{C} 173,5 permitindo identificar a presença de um éster na estrutura. Outra importante correlação observada foi do H-5 se correlacionando com um sinal em δ_{C} 175,2 sendo este referente a uma carboxila.

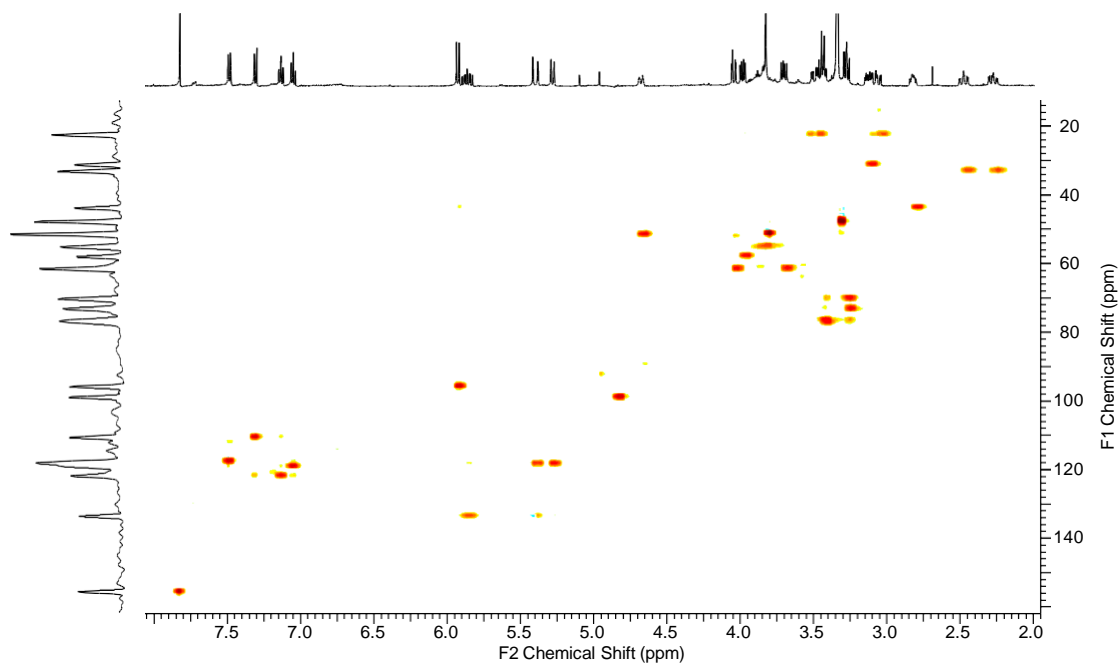


Figura 25: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF7_2 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

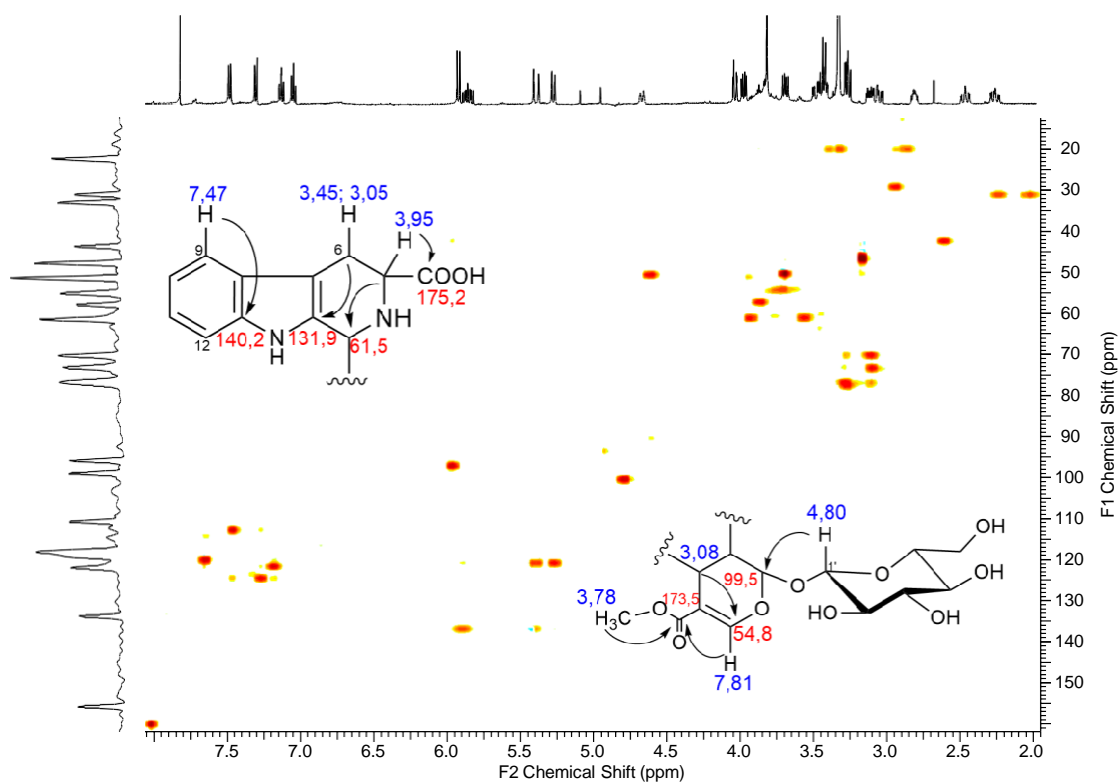


Figura 26: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF7_2 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

Com base nos dados de MS, RMN (1D e 2D) e comparação com dados da literatura, a amostra foi identificada como o glucoalcaloide 5-carboxiestrictosidina (**Figura 27**), confirmando assim a estrutura proposta por LS-MS/MS e MN para o íon m/z 575. Os dados de RMN desta amostra encontram-se dispostos na

Tabela 4.

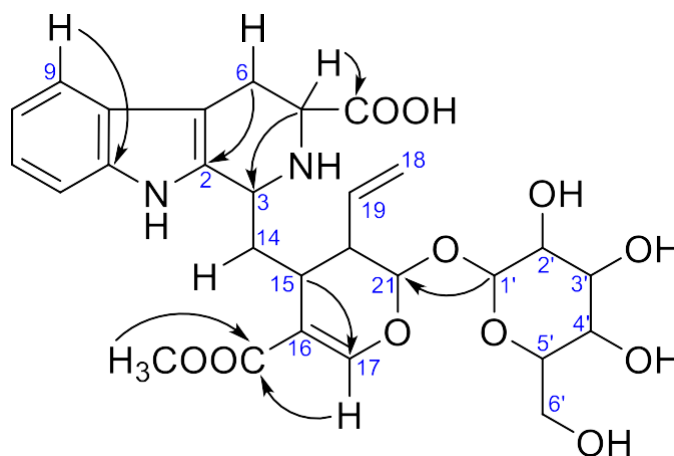


Figura 27: Principais correlações observadas para o alcaloide 5-carboxiestricosidina.

Tabela 4: Dados de RMN para a amostra SPF7_2.

Posição	Amostra SPF7_2			5-carboxiestricosidina	
	¹³ C ^b	¹ H ¹ H δ (mult., J em Hz)	HMBC (¹ H – ¹³ C)	¹ H	¹³ C
2	131,9	-	H-6	-	130,7
3	54,9	4,69 (<i>m</i>)	H-5	4,51 (<i>d</i> , J = 11,3 Hz)	53,2
5	54,6	3,95 (<i>dd</i> , 5,1; 12,07)	H-6	3,83 (<i>ddd</i> , J = 11,8, 4,2, 1,5 Hz)	59,7
6	25,2	3,45 (<i>dd</i> , 1,5; 5,0; 12,0) e 3,05 (<i>m</i>)	H-5	3,37 (<i>dd</i> , J = 16,6, 4,4 Hz) e 2,95 (<i>ddd</i> 16,2, 12,2, 2,5 Hz)	24,2
7	110,4	-	H-9	-	108,8
8	125,2	-	H-9	-	127,7
9	121,1	7,47 (<i>d</i> , 8,1 Hz)	H-11	7,38 (<i>d</i> , J = 8,1 Hz)	120,0
10	122,6	7,03 (<i>td</i> , 1,0; 8,0)	H-12	6,95 (<i>t</i> , J = 7,6 Hz)	120,8
11	125,4	7,11 (<i>td</i> , 1,0; 8,0)	H-9	7,03 (<i>t</i> , 7,5 Hz)	123,5
12	114,2	7,29 (<i>d</i> , 8,17)	H-10, H-11	7,21 (<i>d</i> , J = 8,3 Hz)	112,4
13	140,2	-	H-9, H-11	-	138,7
14	36,0	2,42 (<i>t</i>) e 2,22 (<i>m</i>)	H-20	2,14 (<i>ddd</i> , J = 15,1, 12,4, 3,6 Hz) e 2,35 (<i>ddd</i> , J = 14,9, 11,9, 3,0 Hz)	38,4
15	34,4	3,08 (<i>m</i>)	H-20	2,99 (<i>ddd</i> , J = 12,5,	32,8

				4,2, 4,2 Hz)	
16	110,4	-	H-14	-	108,5
17	159,1	7,81 (<i>s</i>)	H-15	7,72 (<i>s</i>)	157,4
18	121,9	5,24 (<i>d</i> , 10,6) e 5,36 (<i>d</i> , 17,4)	H-12	5,28 (<i>d</i> , J = 17,6 Hz) e 5,17 (<i>d</i> , J = 11,0 Hz)	119,3
19	137,0	5,83 (<i>m</i>)	H-20	5,75 (<i>ddd</i> , J = 17,8, 10,5, 7,5 Hz)	135,4
20	47,1	2,77 (<i>m</i>)	H-18	2,68 (<i>td</i> , J = 8,6, 4,9 Hz)	45,5
21	99,5	5,90 (<i>d</i> , J = 9,3)	H-19, H- 1'	-	97,5
22 (C=O)	173,5	-	H-17, - OCH ₃	-	171,9
COOH	175,2	-	H-5	-	173,8
-OCH₃	54,8	3,78 (<i>s</i>)		3,70 (<i>s</i>)	53,1
Glu	-	-	-	-	-
1'	102,4	4,82 (<i>d</i> , 8,4)	H-21	4,72 (<i>d</i> , J = 7,0 Hz)	100,6
2'	80,0	3,41 (<i>m</i>)		3,16 (<i>t</i>)	74,8
3'	76,5	3,24 (<i>m</i>)	H-1'	3,33 (<i>t</i> , J = 9,0 Hz)	78,1
4'	73,6	3,24 (<i>m</i>)	H-6'	3,16 (<i>t</i>)	71,9
5'	80,7	3,38 (<i>m</i>)	H-1'	3,32 (<i>m</i>)	79,0
6'	65,0	3,67 (<i>dd</i> , 7,0; 11,7 e 4,00 (<i>dd</i> , 2,0; 11,8)	H-5'	3,58 (<i>dd</i> , J = 11,7, 7,1 Hz) e 3,93 (<i>dd</i> , J = 11,7, 2,0 Hz)	63,3

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Rakumitsu *et al.*, 2019

^b Carbonos protonados atribuídos através dos dados de HSQC e carbonos quaternários atribuídos por HMBC.

5.4.3 Determinação estrutural da amostra SPIF_661

A amostra SPIF_661 apresentou-se como um sólido amorfo, de coloração amarelo claro. O espectro de massas (Figura A7, pg. 112) apresentou um pico base em m/z 661 $[M+H]^+$. Ao ser submetido a fragmentação (Figura A8, pg. 112), observou-se a perda inicial de 162 Da, também observadas nas amostras SPF8 e SPF7_2.

A partir da análise do espectro de RMN de ¹H da amostra SPIF_661 (Figura 28), foi possível observar a presença de um sistema indólico não substituído em δ_H 7.52 (1H, *d*, J = 8.3 Hz, H-12), 7.47 (1H, *d*, J = 7.8 Hz, H-9), 7.10 (*m*, H-11), e 7.05 (*m*, H-10) referentes aos hidrogênios H-12, H-9, H-11 e H-10 respectivamente confirmando a ausência de substituições no anel indólico. A presença de duas unidades glicosídicas

pôde ser sugerida pelos sinais dos prótons anoméricos em δ_H 4,52 (*m*, H-1') e δ_H 5,06 (*d*, $J=9,3$ Hz, H-1'').

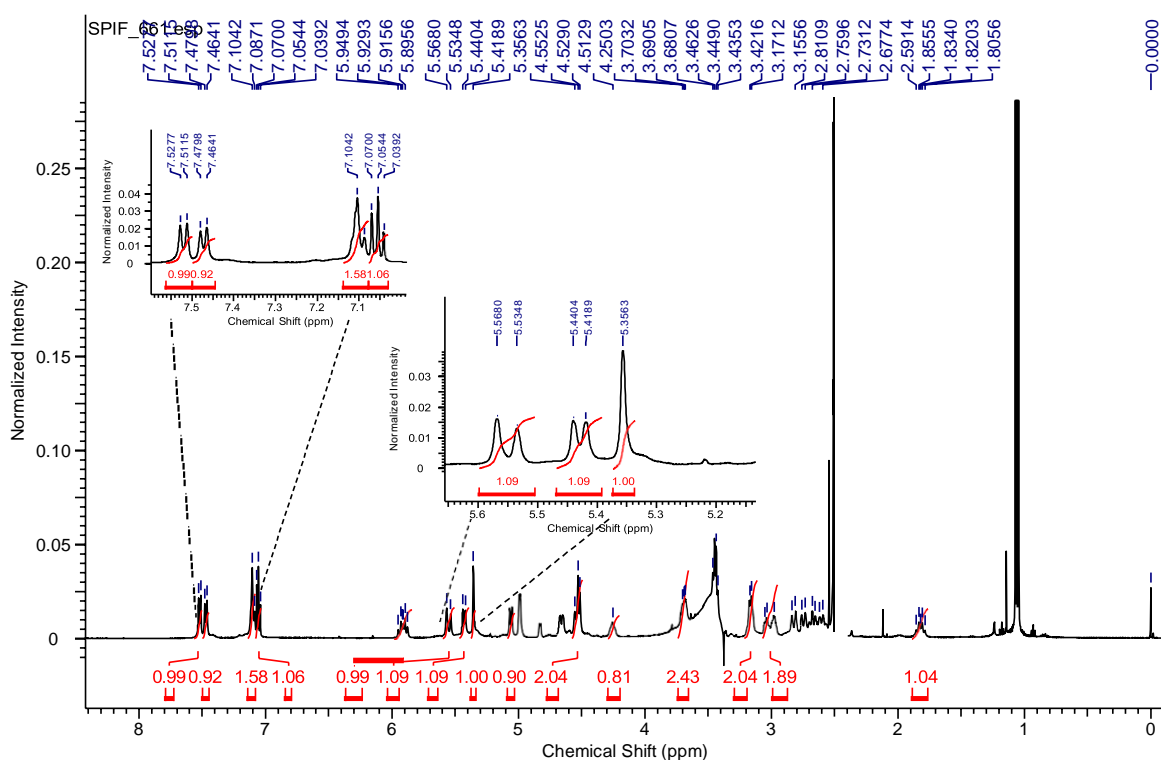


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H para a amostra SPIF_661 (500 MHz, 11,7 T, DMSO-d₆, TMS).

A presença dos sinais em δ_H 2,67; 4,66 e δ_H 2,60; 2,84, referentes aos hidrogênios H-5 e H-6 permitiu identificar a ausência de duplas ligações nos carbonos C-5 e C-6, bem como a ausência de substituições na posição C-6.

Através da análise do mapa de correlações HMBC (Figura 29), foi possível observar a correlação do hidrogênio H-11 com os carbonos C-13 (δ_C 135.0) e C-9 (δ_C 117.8).

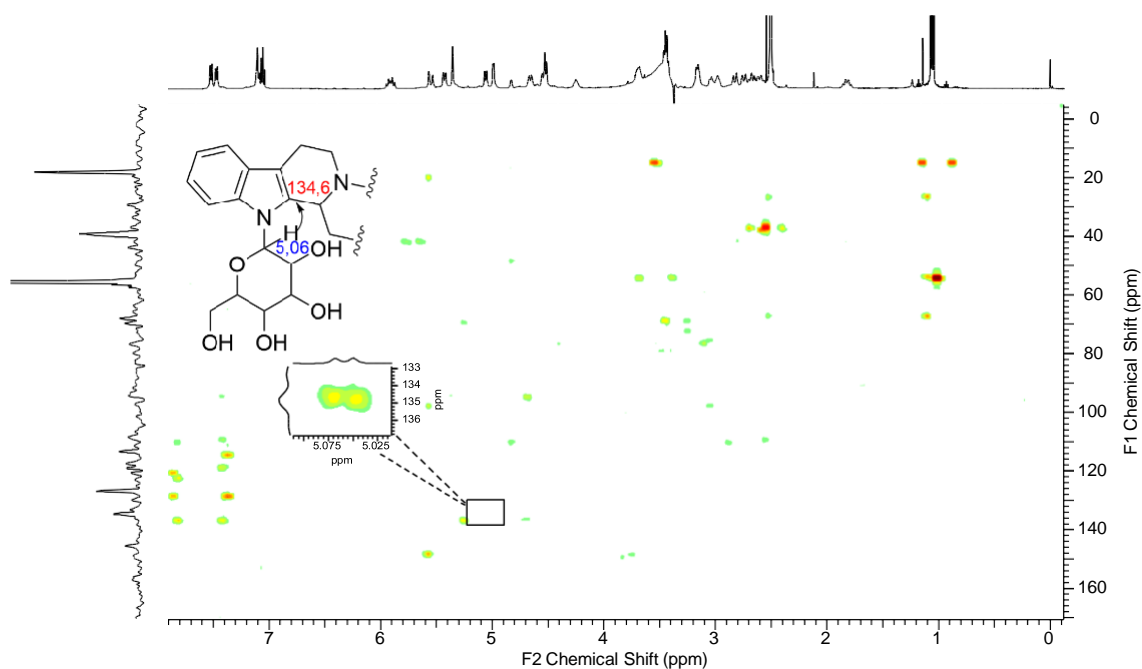


Figura 29: Mapa de correlação HMBC da amostra SPIF_661 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6).

Também por HMBC observou-se a correlação do hidrogênio anomérico H-1'' com o carbono C-21 (δ_{C} 94,7) e a correlação observada entre o hidrogênio anomérico H-1'' com o carbono C-13 (δ_{C} 135,0) permitiu confirmar que esta unidade glicosídica se encontra ligada a estrutura através do nitrogênio do grupo indol.

A configuração do hidrogênio anomérico H-1'' foi atribuída como β através do deslocamento químico característico e alto valor da constante de acoplamento (GURST; E, 1991; HENRIQUES *et al.*, 2004). Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram atribuídos com base nos dados de HMBC e HSQC.

Com base nos dados de MS, RMN (1D e 2D) obtidos e por comparação com a literatura (HENRIQUES *et al.*, 1999), a amostra SPIF_661 foi identificada como o alcaloide *N*, β -*D*-glucopiranosil vincosamida (Figura 30), ainda não reportado para a família Loganiaceae.

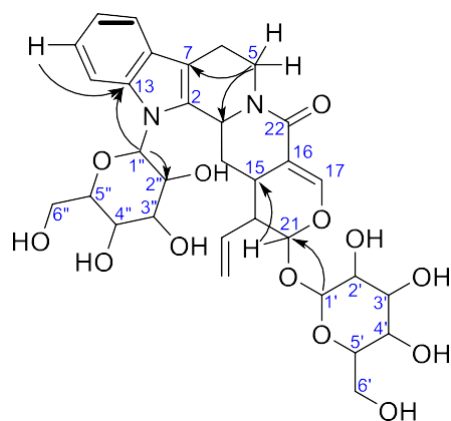


Figura 30: Principais correlações observadas para o alcaloide *N,β-D*-glucopiranosil vincosamida.

Tabela 5: Dados de RMN para a amostra SPIF_661.

Posição	SPIF_661		<i>N, β-D</i> -glucopiranosil vincosamida ^a		HMBC
	¹ H δ (mult., <i>J</i> em Hz)	¹³ C ^b	¹ H δ (mult., <i>J</i> em Hz)	¹³ C	
2	-	134.6	-	136,1	H-1''
3	4.54 (<i>m</i>)	50.1	5,12 (d, 11,3)	54,4	
5	2.67 (<i>m</i>) e 4.66 (<i>m</i>)	38.8	2,84 (ddd, 12,4; 11,8; 3,3) 5,05 (ddd, 12,4; 4,5; 1,5)	41,6	H-6
6	2.63 (<i>m</i>) e 2.80 (<i>m</i>)	20.0	2,65 (ddd, 16,0 11,8, 4,5) 2,78 (ddd, 16,0; 3,3; 1,5)	22,2	
7	-	109.8	-	111,5	H-11
8	-	127.2	-	129,5	H-10; H-12
9	7.47 (<i>d</i> , 7,8)	117.8	7,44 (<i>d</i> , 7,8)	119,3	H-11
10	7.05 (<i>m</i>)	119.4	7,06 (ddd, 7,8; 7,1; 1,1)	121,2	H-12
11	7.10 (<i>m</i>)	121.3	7,12 (ddd, 8,2; 7,1; 1,1)	122,8	H-9
12	7.52 (<i>d</i> , 8,3)	113.7	7,63 (<i>d</i> , 8,2)	114,7	H-10
13	-	135.0	-	137,7	H-1''; H-11; H-9
14	1.81 (<i>m</i>) e 2.73 (<i>m</i>)	32.3	1,38 (dddd, 13,5; 13,5; 11,3; 2,5) 2,30 (<i>d</i> br, 13,5)	35,5	
15	3.16 (<i>m</i>)	23.0	3,40 (<i>m</i>)	27,9	
16	-	108.7	-	109,1	H-17
17	7.10 (<i>m</i>)	146.01	7,48 (2,7)	149,2	H-21
18	5.55 (<i>m</i>) e 5.53	121.1	5,14 (<i>dd</i> , 10,2;	120,7	

	(<i>m</i>)		2,0		
			5,26 (dd, 17,2, 10,2; 9,9)		
19	5.91 (<i>m</i>)	133.5	5,48 (ddd, 17,2; 10,2; 9,9)	133,4	
20	2.50 (<i>m</i>)	44.1	2,75 (<i>m</i>)	44,1	H-18
21	5.35 (<i>s</i>)	94.7	5,51 (<i>d</i> , 1,9)	97,4	H-1'
Glu	-	-	-	-	-
1'	4.52 (<i>m</i>)	97.5	4,71 (<i>d</i> , 8,1)	99,6	H-21
2'	2.98 (<i>m</i>)	72.9	3,24 (dd, 9,2; 8,1)	74,8	H-5'
3'	3.34 (<i>m</i>)	77.4	3,37 (dd, 9,2; 8,8)	77,9	H-4'
4'	3.04 (<i>m</i>)	69.8	3,54 (<i>m</i>)	71,5	H-3'; H-5'
5'	3.15 (<i>m</i>)	76.6	3,50 (<i>m</i>)	78,3	
6'	3.69 (<i>m</i>) e 3.41 (<i>m</i>)	60.8	3,68 (dd, 12,1; 5,4)	62,7	
			3,90 (dd, 12,1; 2,1)		
Glu	-	-	-	-	-
1''	5.06 (<i>d</i> , 9.3)	85.0	5,12 (<i>d br</i> , 8,9)	87,5	
2''	4.25 (<i>m</i>)	70.5	4,12 (dd, 8,9; 9,0)	71,9	H-1''
3''	3.29 (<i>m</i>)	79.4	3,54 (<i>m</i>)	79,1	
4''	3.32 (<i>m</i>)	69.7	3,63 (<i>m</i>)	71,6	
5''	3.29 (<i>m</i>)	79.4	3,54 (<i>m</i>)	81,2	
6''	3.69 (<i>m</i>) e 3.41 (<i>m</i>)	60.8	3,79 (dd, 12,1; 5,9)	62,9	
			3,97 (dd, 12,1; 2,0)		

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Henriques *et al.*, 2004

^b Carbonos protonados atribuídos através dos dados de HSQC e carbonos quaternários atribuídos por HMBC.

5.4.4 Determinação estrutural da amostra SPF7_1

A amostra SPF7_1 foi obtido como um sólido amorfo com coloração amarelo claro. No espectro de massas (Figura A9, pg. 113), foi observado um íon de m/z 227 $[M+H]^+$, que ao ser submetido a fragmentação (Figura A10, pg. 113) apresentou perdas sequenciais de 28 e 18 Da.

A análise feita do espectro de RMN de 1H (Figura 31) evidenciou a presença de sinais aromáticos em δ_H 8,35 (*d*, $J= 7,7$ Hz), δ_H 7,30 (*t*, $J= 7,3$ Hz), δ_H 7,59 (*t*, $J= 7,5$ Hz) e δ_H 7,66 (*d*, $J= 7,5$ Hz) referentes ao anel aromático do núcleo indol de um sistema não substituído. Em adição, um singlete em δ_H 8,75, atribuído ao hidrogênio aromático

da posição H-6, e um singleto em δ_H 2,65, atribuído a uma metila na posição 3, foram observados no espectro de RMN de 1H . Os deslocamentos químicos dos carbonos foram atribuídos com base nos dados obtidos nos experimentos de HSQC (Figura 32) e HMBC (Figura 33).

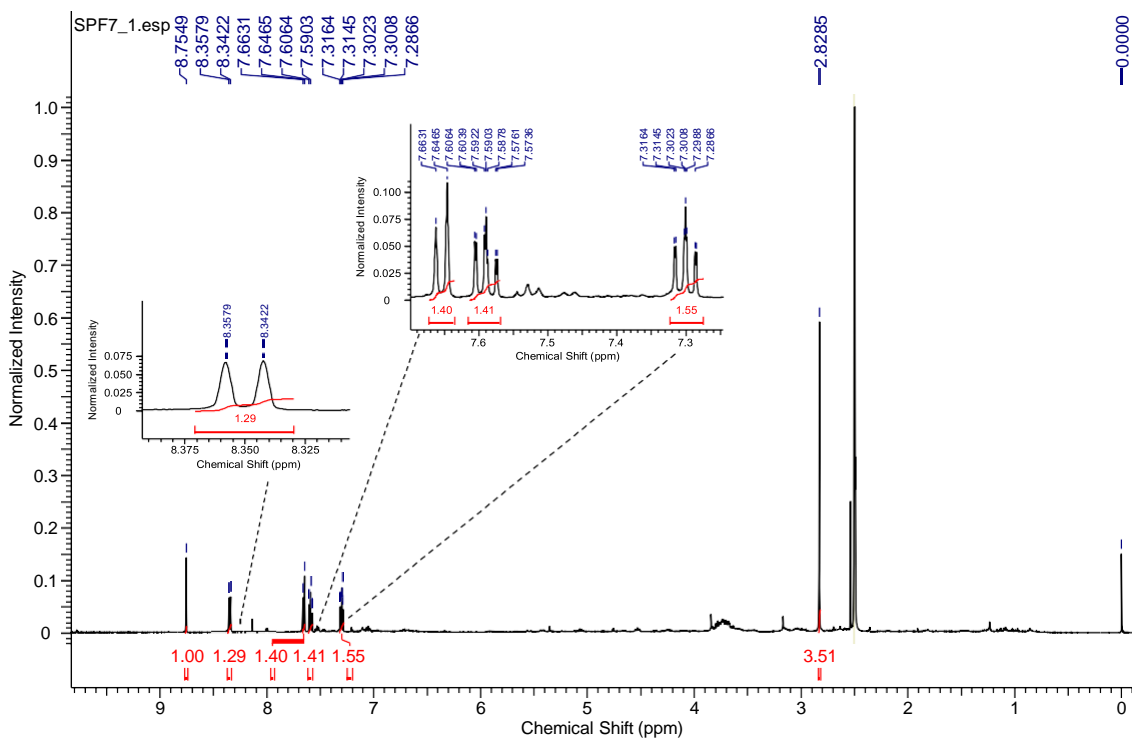


Figura 31: Espectro de RMN de 1H para a amostra SPF7_1 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

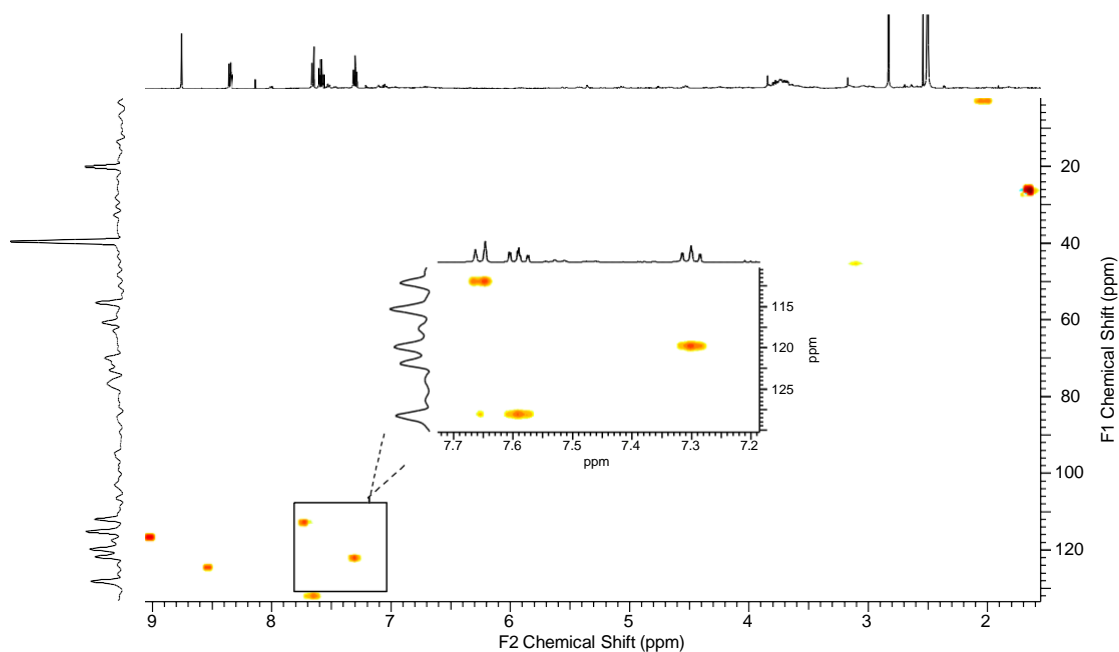


Figura 32: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF7_1 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

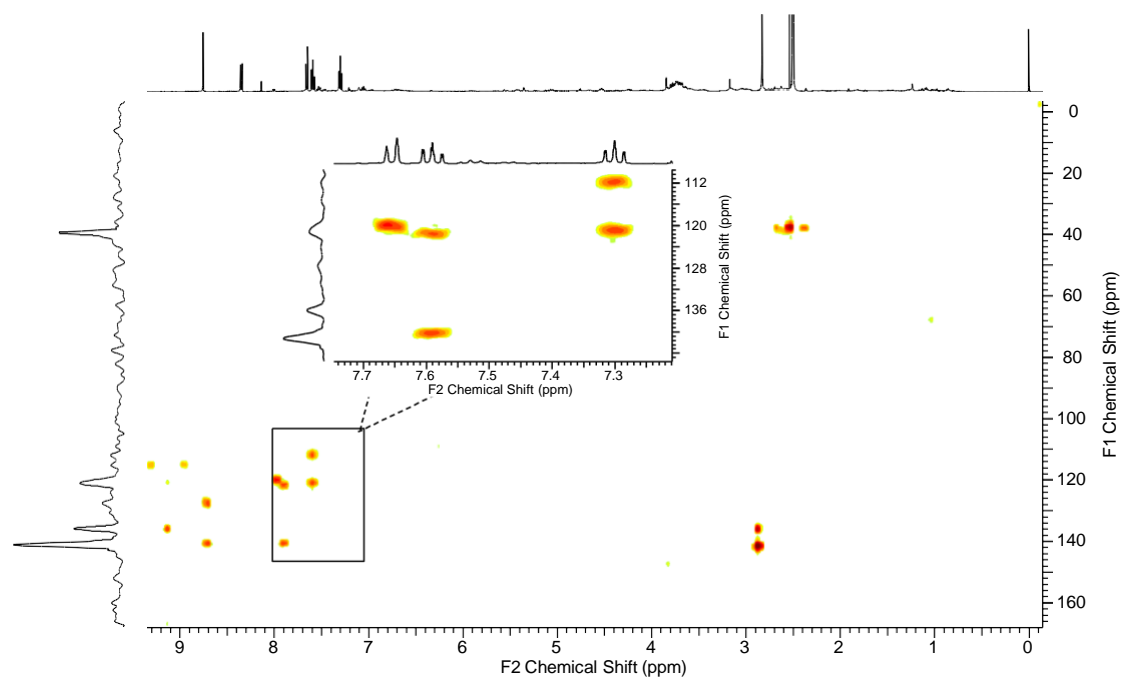


Figura 33: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF7_1 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

Através dos dados de MS, de RMN (1D e 2D) (

Tabela 6) e por comparação com dados da literatura (PEREIRA *et al.*, 2006) foi possível propor a estrutura da amostra como sendo o alcaloide ácido 3- harmanocarboxílico (Figura 34). Os dados da substância encontram-se dispostos natabela.

Figura 34: Estrutura proposta para o alcaloide ácido 3-harmanocarboxílico.

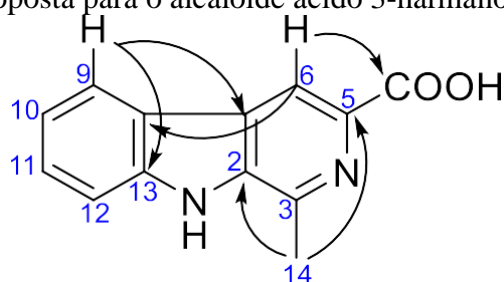


Tabela 6: Dados de RMN para amostra SPF7_1.

SPF7_1		Ácido 3-harmanocarboxílico			
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz)	¹³ C ^b	¹ H δ (mult., J em Hz)	¹³ C	HMBC
2	-	136,1	-	136,1	H-6; H-14
3	-	141,5	-	141,7	H-14
5	-	136,9	-	136,7	H-6
6	8,75 (s)	115,3	8,85 (s)	115,5	
7	-	127,9	-	127,2	
8	-	121,4	-	121,4	H-10
9	8,35 (d, 7,7)	122,0	8,33 (d, 7,8)	122,1	H-11
10	7,30 (t, 7,4)	120,2	7,29 (t, 7,3)	120,2	H-12
11	7,59 (t, 7,5)	128,4	7,58 (t, 7,5)	128,5	H-9
12	7,66 (d, 8,3)	112,4	7,65 (d, 8,1)	112,4	H-10
13	-	140,9	-	140,9	H-9
14	2,65 (s)	20,1	2,82 (s)	20,2	
-COOH	-	166,3	-	166,9	H-6

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Pereira *et al.*, 2006

^b Carbonos protonados atribuídos através dos dados de HSQC e carbonos quaternários atribuídos por HMBC.

5.4.5 Determinação estrutural da amostra SPF4

A amostra SPF4 foi obtida sob a forma de sólido amorfo e coloração amarelo-esverdeada. No espectro de massas (Figura A11, pg. 114) observou-se o íon m/z 531 $[M+H]^+$ como pico base. O espectro de MS/MS da amostra (Figura A12, pg. 114) evidenciou perdas iniciais competitivas de 17 e 162.

A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 35) permitiu identificar a presença de sinais aromáticos em δ_H 7,38 (*d*, $J= 7,5$ Hz), δ_H 6,96 (*td*, $J= 8,0; 1,0$ Hz), δ_H 7,03 (*td*, $J= 8,0; 1,00$ Hz) e δ_H 7,25 (*d*, $J= 8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios do grupo indol. Os sinais em δ_H 3,05–3,43 (*m*), δ_H 2,66–2,78 (*m*) e δ_H 4,62 (*d*, $J= 10,6$ Hz), referentes as posições H-5, H-6 e H-3, respectivamente, são um indicativo da ausência de duplas

ligações ou de substituições nessas posições, permitindo propor um alcaloide do tipo tetrahydro β -carbolina para essa estrutura.

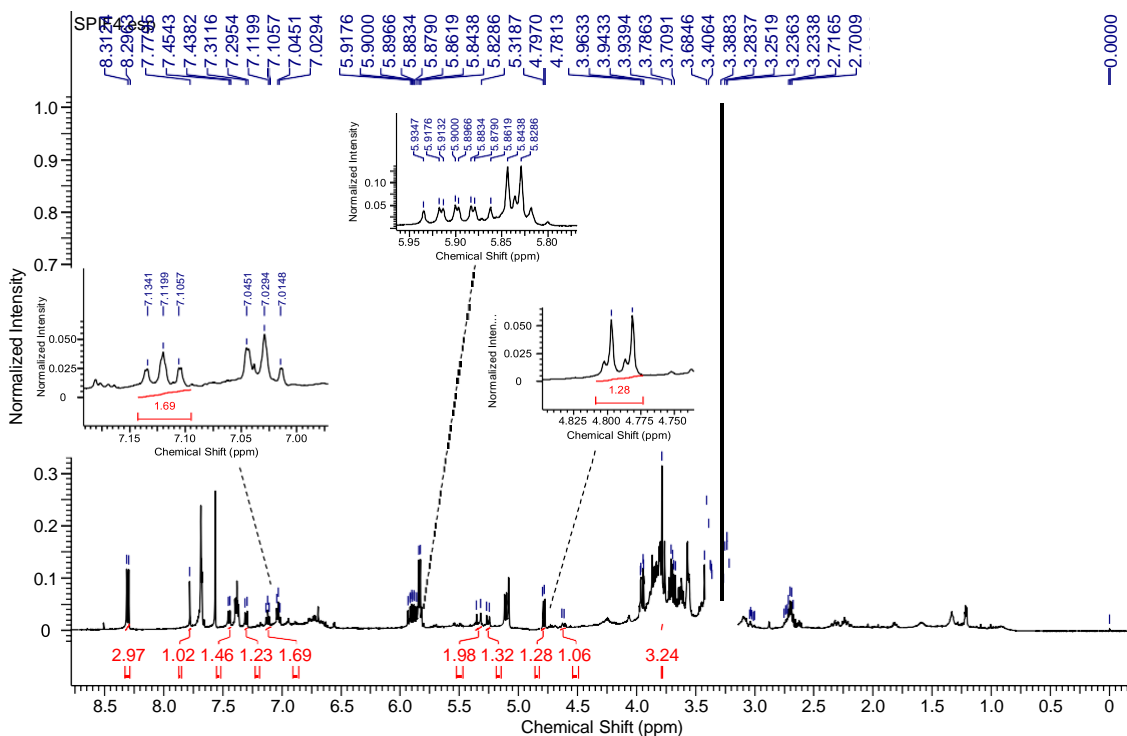


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF4 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

Com base nas substâncias previamente isoladas neste trabalho para a espécie, um singlete em δ_{H} 3,78 sugere a presença de uma metoxila na estrutura. A presença de sinais referentes aos prótons de uma unidade glicosídica são observados em δ_{H} 4,79 (*d*, $J= 8,0$ Hz) e δ_{H} 3,95 (*dd*, $J= 11,8; 2,2$ Hz); 3,68 (*dd*, $J= 11,9; 6,6$ Hz) referentes aos hidrogênios H-1' e H-6'' respectivamente.

Através dos dados de MS/MS, ^1H e por comparação com dados da literatura (SAKAMOTO; UMEDA; RAKUMITSU; SUMIMOTO *et al.*, 2020), foi possível propor a estrutura do alcaloide strictosidina (Figura 36) para a amostra SPF4. Os dados de RMN de ^1H para a amostra encontram-se dispostos na Tabela 7.

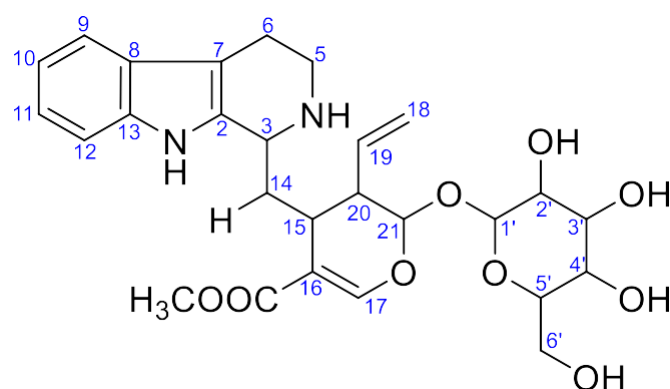


Figura 36: Estrutura do alcaloide estrictosidina.

Tabela 7: Dados de RMN para a amostra SPF4.

	SPF4	Estrictosidina
Posição	$^1\text{H } \delta$ (mult., J em Hz)	$^1\text{H } \delta$ (mult., J em Hz)
2	-	-
3	4,61 (<i>d</i> , 10,6)	4,04 (<i>d</i> , 10,5)
5	3,37 (<i>dd</i> , 2,2; 6,3) 3,04 - 3,00 (<i>m</i>)	3,35 (<i>m</i>); 3,05 (<i>td</i> , 11,4; 4,0)
6	2,75 - 2,67 (<i>m</i>)	2,75 (<i>td</i> , 14,5; 4,0); 2,85 (<i>dddd</i> , 13,5; 7,0; 4,0; 1,5)
7	-	-
8	-	-
9	7,45 (<i>d</i> , 7,7)	7,38 (<i>d</i> , 7,5)
10	7,11 (<i>t</i> , 7,8)	6,96 (<i>td</i> , 8,0; 1,0)
11	7,01-7,03 (<i>m</i>)	7,03 (<i>td</i> , 8,0; 1,00)
12	7,29 (<i>d</i> , 8,1)	7,25 (<i>d</i> , 8,0)
13	-	-
14		2,08 (<i>ddd</i> , 14,0; 11,0; 3,0); 2,00 (<i>ddd</i> , 15,0; 11,0; 4,0)
15	3,04 - 3,00 (<i>m</i>)	3,0 (<i>ddd</i> , 12,0; 9,5; 4,5)
16	-	-
17	7,77 (<i>s</i>)	7,70 (<i>s</i>)
18	5,31 (<i>d</i> , 17,7) 5,24 (<i>d</i> , 10,5)	5,32 (<i>td</i> , 17,5; 1,5); 5,22 (<i>d</i> , 10,5)
19	5,90 (<i>m</i>)	5,85 (<i>ddd</i> , 18,0; 10,5; 7,5)
20	2,75 - 2,67 (<i>m</i>)	2,69 (<i>ddd</i> , 12,5; 9,0; 5,5)
21	5,84 (<i>d</i> , 8,2)	5,83 (<i>d</i> , 8,5)
-OCH ₃	3,78 (<i>s</i>)	3,76 (<i>s</i>)
Glu	-	-
1'	4,78 (<i>d</i> , 8,0)	4,79 (<i>d</i> , 8,0)
2'	3,25 (<i>m</i>)	3,22 (<i>t</i> , 8,0)
3'	3,40 (<i>d</i> , 9,6)	3,39 (<i>d</i> , 9,0)
4'	3,28 - 3,2 (<i>m</i>)	3,25 (<i>t</i> , 9,0)
5'	3,38 (<i>m</i>)	3,36 (<i>m</i>)
6'	3,94 (<i>dd</i> , 11,8; 2,2) 3,68 (<i>dd</i> , 1,9; 6,6)	3,95 (<i>dd</i> , 12,0; 2,0); 3,65 (<i>dd</i> , 12,0; 6,5)

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Sakamoto *et al.*, 2020

5.4.6 Determinação estrutural da amostra SPF10

A amostra SPF10 foi isolada como um sólido amorfo de coloração amarelo esverdeada. No espectro de massas (Figura A13, pg. 115) foi observado a presença do pico base de m/z 433 $[M+H]^+$ e ao ser submetido a fragmentação (Figura A14, pg. 115), apresentou perdas de 146 Da.

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (Figura 37), foi possível constatar que a presença de sinais aromáticos característicos de sistemas flavonoídicos tetra substituídos em δ_{H} 6,37 (d , $J= 2,10$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,20 (d , $J= 2,10$ Hz, 1H) referente aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A. Também foram observados sinais em δ_{H} 6,93(d , $J= 8,85$ Hz) e δ_{H} 7,76 (d , $J= 8,85$ Hz) referente aos hidrogênios H-2' e H-3' do anel C. Por HMBC (Figura 39), foi possível definir as posições C-2 (δ_{C} 161,8), C-3 (δ_{C} 136,3), C-4 (δ_{C} 179,9), C-5 (δ_{C} 163,6), C-7 (δ_{C} 166,4) e C-1' (δ_{C} 122,9), o que permitiu identificar o kaempferol como esqueleto principal.

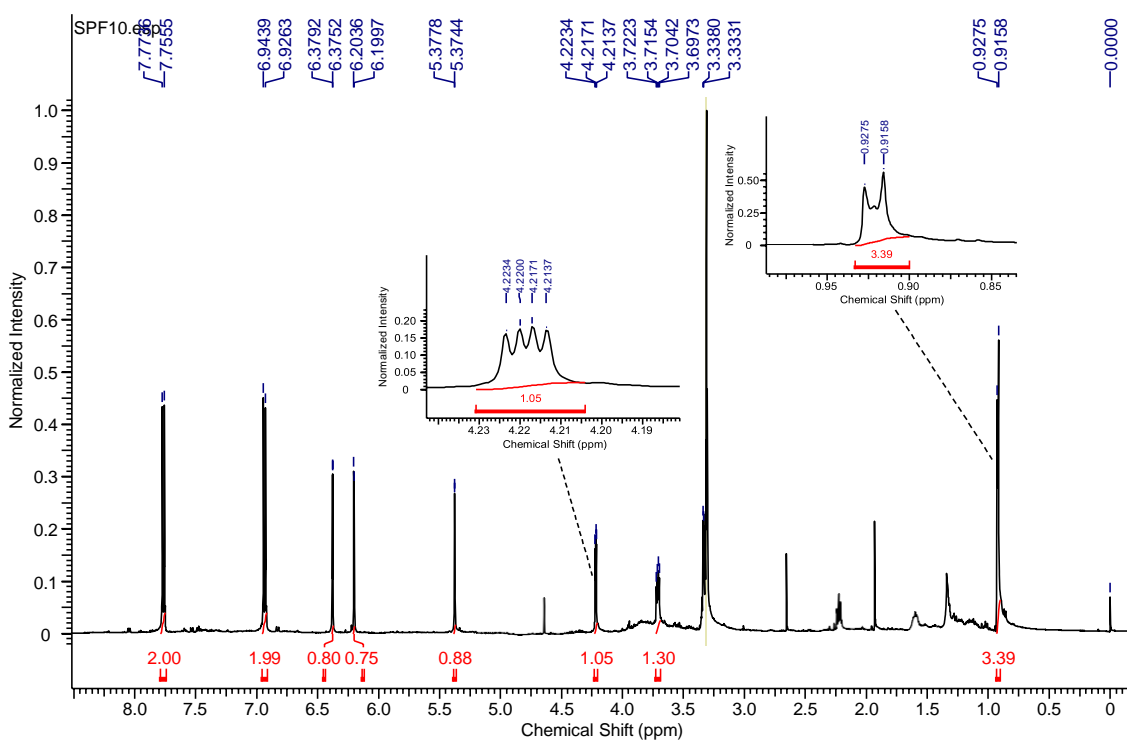


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H para a amostra SPF10 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

Observou-se no espectro de RMN de ^1H a presença de um hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,37 (*d*, $J = 1,70$ Hz). A posição do flavonoide na qual o açúcar encontra-se ligado foi determinada por HMBC (Figura 39), onde foi observada correlação a J^3 do H-1'' com C-3, confirmando assim a posição da unidade glicosídica no flavonoide. As posições dos hidrogênios do açúcar foram determinadas por COSY e a presença de um sinal em δ_{H} 0,91 (*d*, $J = 5,75$ Hz) referente um hidrogênio metílico permitiu confirmar a estrutura do açúcar como sendo a ramnose. Os dados de RMN 1D e 2D (Tabela 7) bem como dados da literatura corroboraram para a identificar a substância como o kaempferol-3-*O*- α -ramnosídeo (Figura 40).

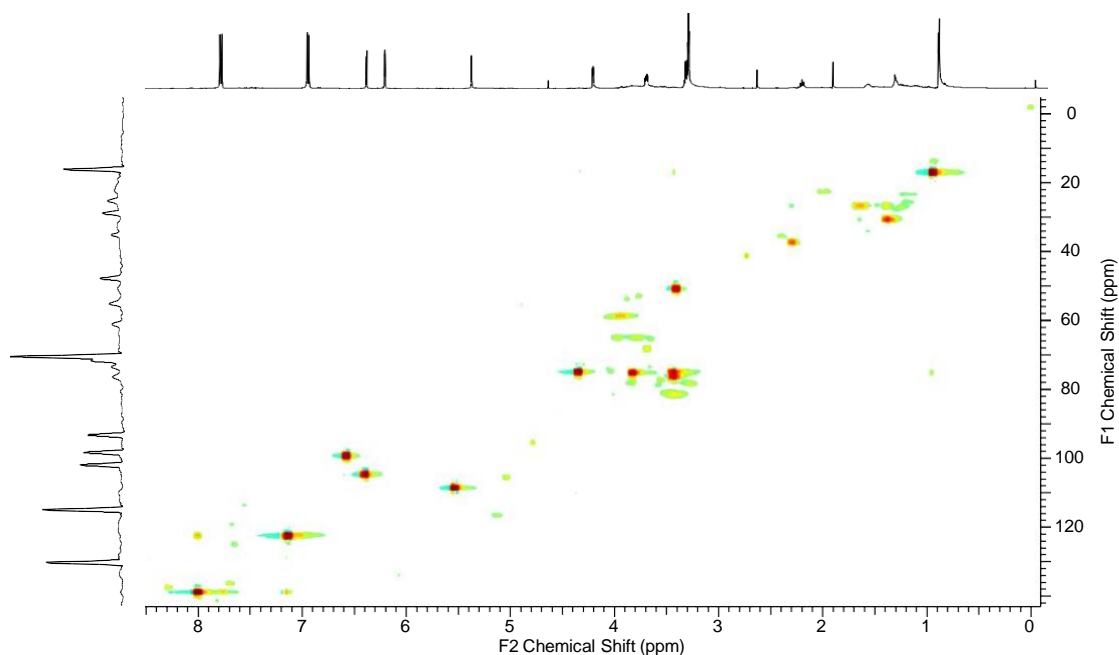


Figura 38: Mapa de correlação HSQC da amostra SPF10 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

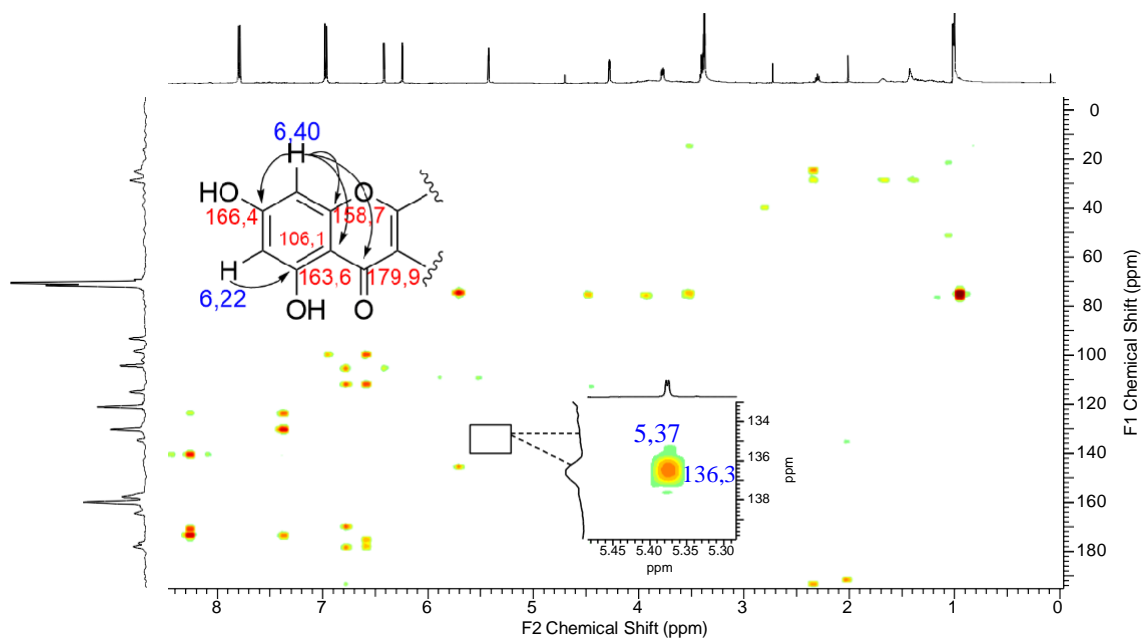


Figura 39: Mapa de correlação HMBC da amostra SPF10 (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, CDOD_3).

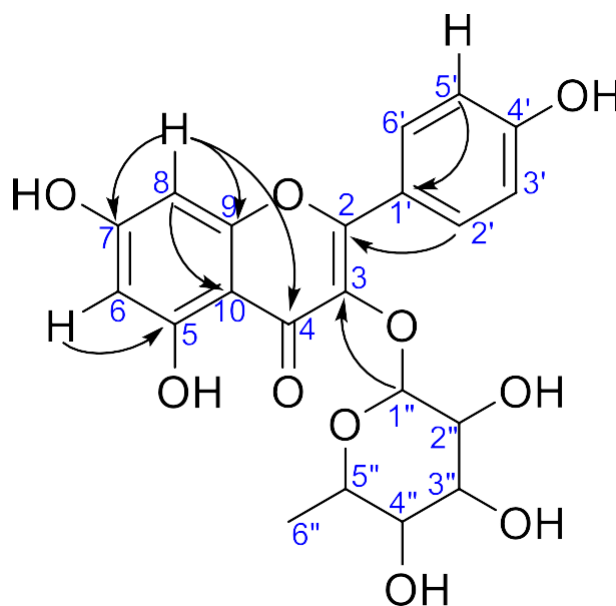


Figura 40: Principais correlações observadas para o flavonoide kaempferol-3- O - α -ramnosídeo.

Tabela 8: Dados de RMN para a amostra SPF10

Posição	SPF10			kaempferol-3- O - α -ramnosídeo	
	$^{13}\text{C}^b$	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	HMBC (^1H – ^{13}C)	^1H δ (mult., J em Hz)	^{13}C
2	161,8	-	H-6', H-2'	-	156,9
3	136,3	-	H-1''	-	134,6
4	179,9	-	H-8	-	178,1
5	163,6	-	H-6	-	161,6

6	100,4	6,22 (<i>d</i> , 2,1, 1H)	H-8	6,21 (<i>d</i> , 2,0, 1H)	99,1
7	166,4	-	H-8	-	164,6
8	95,3	6,40 (<i>d</i> , 2,1, 1H)	H-6	6,42 (<i>d</i> , 2,0, 1H)	94,1
9	158,7	-	H-8	-	157,6
10	106,1	-	H-8	-	104,5
1'	122,9	-	H-2'', H-6''	-	120,9
2'	132,0	7,79 (<i>d</i> , 8,8)	H-3', H-5'	7,76 (<i>d</i> , 8,8)	130,9
3'	116,5	6,93 (<i>d</i> , 8,8)	H-3', H-5'	6,92 (<i>d</i> , 8,8)	115,7
4'	159,8	-	H-3', H-5'	-	160,3
5'	116,7	6,93 (<i>d</i> , 8,85)	H-3', H-6'	6,92 (<i>d</i> , 8,8)	115,7
6'	132,0	7,79 (<i>d</i> , 8,8)	H-3', H-5'	7,76 (<i>d</i> , 8,8)	130,9
Rha	-	-	-	-	-
1''	103,5	5,37 (<i>d</i> , 1,70)	H-4''	5,30 (<i>s</i>)	102,1
2''	72,0	4,21 (<i>q</i> , 1,7)		3,99 (<i>s</i>)	70,9
3''	72,1	3,71 (<i>q</i> , 3,5, 1H)	H-5''	3,48 (<i>d</i> , 6,4 1H)	70,7
4''	72,3	3,33 (<i>d</i> , 2,8)			71,5
5''	73,1	3,71 (<i>q</i> , 3,5, 1H)	H-3''	3,15-3,07 (<i>m</i> , H-4'', 5'')	70,4
6''	17,6	0,91 (<i>d</i> , 5,7, 3H)		0,80 (<i>d</i> , 6,0, 3H)	17,8

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Yuk *et al.*, 2018

^b Carbonos protonados atribuídos através dos dados de HSQC e carbonos quaternários atribuídos por HMBC.

5.4.7 Determinação estrutural da amostra SPF9_2

A amostra SPF9_2 apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo esverdeada. No espectro de massas (Figura A15, pg. 116) foi observado a presença do pico base de m/z 449 $[M+H]^+$ e ao ser submetido a fragmentação (Figura A16, pg. 116), apresentou perda inicial de 146 Da, semelhante ao padrão de fragmentação observado para a amostra SPIF10.

No espectro de RMN de 1H (Figura 41), foram observados sinais característicos de sistemas flavonoídicos em δ_H 6,39 (*d*, $J= 1,9$ Hz, 1H) e 6,20 (*d*, $J= 1,8$ Hz, 1H) referente aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A. Embora esta tenha apresentado similaridade espectral com a amostra SPF10, a ausência do sinal referente ao hidrogênio C-3' sugere a substituição desta posição por uma hidroxila.

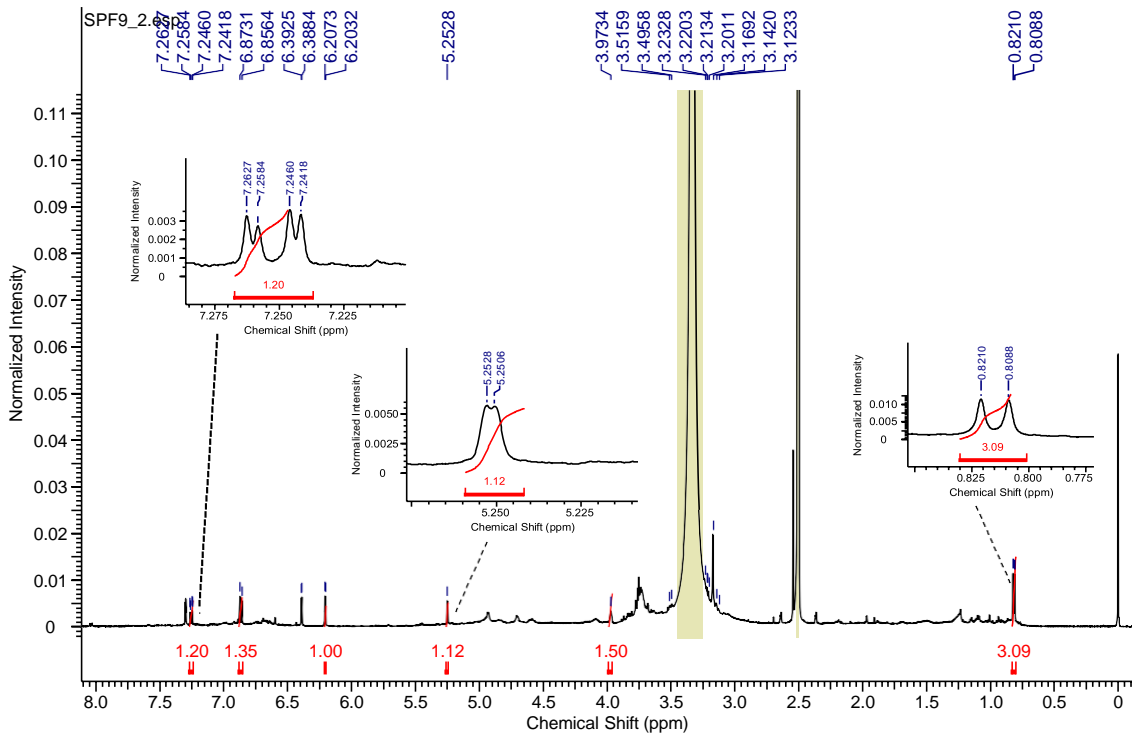


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da amostra SPF9_2 (500 MHz, 11,7 T, MeOD, TMS).

Através dos dados de MS/MS, ^1H e por comparação com dados da literatura (OLSZEWSKA; WOLBIS, 2002) foi possível propor a estrutura da amostra como o flavonoide Quercetina 3- O - α -ramnosídeo (Figura 42), um derivado da amostra SPF10.

Figura 42: Estrutura do flavonoide quercetina 3- O - α -ramnosídeo.

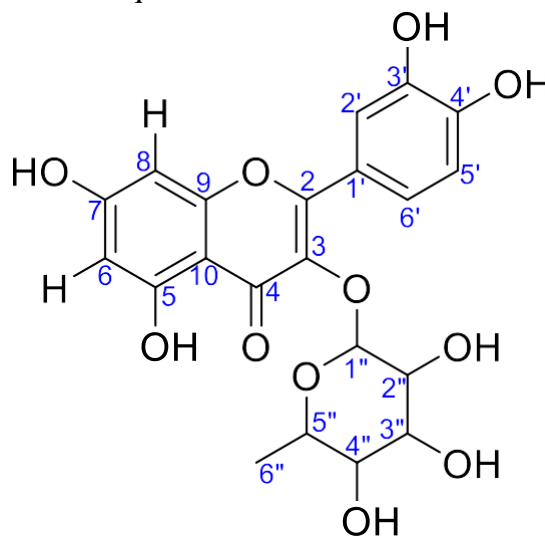


Tabela 9: Dados de RMN para a amostra SPF9_2.

Posição	SPF9_2	quecetina 3-O- α -ramnopiranosídeo ^a
	¹ H δ (mult., <i>J</i> em Hz)	¹ H δ (mult., <i>J</i> em Hz)
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,20 (<i>d</i> , 1,8, 1H)	6,20 (<i>d</i> , 2,0, 1H)
7	-	-
8	6,39 (<i>d</i> , 1,9, 1H)	6,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,23 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	7,29 (<i>d</i> , 2,0)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)	6,86 (<i>d</i> , 8,3)
6'	7,25 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,9; 8,2 Hz)	7,26 (<i>dd</i> , 2,1; 8,2)
Rha	-	-
1''	5,25 (<i>brs</i>)	5,25 (<i>d</i> , 1,1)
2''	3,97 (<i>brs</i>)	3,97 (<i>brs</i>)
3''	3,50 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0; 9,1 Hz, 1H)	3,50 (<i>m</i>)
4''	3,12-3,17 (<i>m</i>)	
5''	3,21 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 6,1; 9,5 Hz, 1H)	3,20 (<i>m</i>)
6''	0,81 (<i>d</i> , 6,1, 3H)	0,81 (<i>d</i> , 6,0, 3H)

^a Valores de acordo com a literatura propostos por Olszewska; Wolbis, 2002

Considerações finais



6. Considerações finais

As análises de LS-MS/MS permitiram o reconhecimento prévio de AIMs nas folhas de *S. peckii*, além de revelar perdas neutras úteis para o reconhecimento de análogos através de experimentos de HPLC-MS/MS;

O uso do MN combinado com a interpretação dos padrões de fragmentação dos AIMs permitiu reconhecer íons diagnóstico e identificar tentativamente os alcaloides strictosidina, desoxicordifolina, ácido strictosidínico, 10-hidroxi-strictosidina, 5-carboxistrictosidina, lialosídeo, 3,4-desidro-strictosidina e strictosidina lactama, todos reportados pela primeira vez em *S. peckii*, além de destacar a presença de possíveis estruturas inéditas;

O estudo do perfil químico dos extratos aquosos das folhas de *S. peckii* conduziu ao isolamento de sete substâncias, os alcaloides: desoxicordifolina, 5-carboxistrictosidina, *N*, β - glucopiranosil vincosamida, strictosidina e o ácido 3-harmanocarboxílico e os flavonoides kaempferol-3-O- α -ramnosídeo e quercetina-3-O- α -ramnosídeo, até então, ainda não descritas para a espécie *S. peckii*;

Os alcaloides *N*, β - glucopiranosil vincosamida, ácido 3-harmanocarboxílico e os flavonoides kaempferol-3-O- α -ramnosídeo e quercetina-3-O- α -ramnosídeo estão sendo reportados pela primeira vez em Loganiaceae;

Dessa forma, o presente trabalho contribuiu com o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* L. ampliando assim o conhecimento da química de produtos naturais de matrizes vegetais da Região Amazônica.

Referências Bibliográficas



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBOWALE, A.; NAIDOO, Y.; LAMB, J.; NICHOLAS, A. Comparative foliar epidermal micromorphology of Southern African *Strychnos* L. (Loganiaceae): taxonomic, ecological and cytological considerations. **Plant Systematics and Evolution**, p. 127–138, 2014.
- ALLARD, P.-M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K. *et al.* Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, 88, p. 3317–3323, 2016.
- ANDRADE, M. E.; FRANKLIN, G. E. O gênero *Strychnos* (Loganiaceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 60, p. 865-877, 2009.
- ANVISA. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira 1ª ed.** 2011. 126p p.
- AWAAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. **Applied Spectroscopy Reviews**, 50, n. 2, p. 158-175, 2015.
- BACKLUND, M.; OXELMAN, B.; BREMER, B. Phylogenetic relationships within the gentianales based on *ndhF* and *rbcL* sequences, with particular reference to the Loganiaceae. **American Journal of Botany**, 87, p. 1029–1043, 2000.
- BAKER, J. M.; WARD, J. L.; BEALE, M. H. Combined NMR and flow injection ESI-MS for Brassicaceae metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, 860, p. 177- 171 191, 2012. .
- BALDWIN, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. **Natural Product Reports**, 12, n. 1, p. 33-44, 1995.
- BASÍLIO, I. J. L. D.; NURIT, K.; AGRA, M. F. Estudo Farmacobotânico das Folhas de três Espécies do Gênero *Strychnos* L. (Loganiaceae) do Nordeste do Brasil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 24, n. 3, p. 356-365, 2005.
- BENNETT; A.E. The history of the introduction of curare into medicine. **Anesthesia and Analgesia: Current Researches**, 47, p. 484 - 492 . 1968.
- BISSET, N. G. Curare. In: Pelletier, W.S., (Ed.), Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. *In: Springer, Berlin*, 1992a. v. 8, cap. 1, p. 3-150.
- BISSET, N. G.; CHOUDHURY, A. K. Alkaloids from the leaves of *strychnos wallichiana*. **Phytochemistry**, 13, p. 259-263, 1974.
- BISSET, N. G.; PHILLIPSON, J. D. Antirrhine and antirrhine metho-salt from the leaves of *Strychnos camptoneura*. **Phytochemistry**, 13, p. 1265-1267, 1974.
- BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; SILVA, M. A. *et al.* Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction

of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Loganiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 138, p. 47– 52, 2011.

BRANDT, V.; TITS, M.; GEERLINGS, A.; FRÉDÉRICH, M. *et al.* b -Carboline glucoalkaloids from *Strychnos mellodora*. **Phytochemistry**, 51, p. 1171-1176, 1999.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, 25, p. 653-564, 1986.

CARL, J.; SCHWARZER, M.; KLINGELHOEFER, D.; OHLENDORF, D. *et al.* Curare - A Curative Poison: A Scientometric Analysis. **Institute for Occupational Medicine, Social Medicine and Environmental Medicine, Goethe University, Frankfurt, Germany**, 9, n. 11, 2014.

COSTA, R. A.; PINHEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, K. M. T.; BARISSON, A. *et al.* Structural, Vibrational, and Electronic Properties of the Glucoalkaloid Strictosidine: A Combined Experimental and Theoretical Study. **Journal of Chemistry**, 2016.

CZARNOWSK, C.; BAILEY, J.; BAL, S. Curare and a Canadian connection. **Canadian Family Physician**, 53, p. 1531-1532, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons: New York, 2009. 546p p. 978-0-470-74168-9.

EHRENWORTH, A. M.; SARRIA, S.; PERALTA-YAHYA, P. Pterin-Dependent Mono-oxidation for the Microbial Synthesis of a Modified Monoterpene Indole Alkaloid. **Synthetic Biology**, 4, n. 12, p. 1295–1307, 2015.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

ELDAHSHAN, O. A.; ABDEL-DAIM, M. M. Phytochemical study, cytotoxic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of *Strychnos nux-vomica*. **Cytotechnology**, 67, p. 831–844, 2015.

FAGGIO, C.; SUREDA, A.; MORABITO, S.; MOCAN, A. *et al.* Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. **European Journal of Pharmacology**, 807, p. 91-101, 2017.

FALCONE, C. E.; COOKS, G. Molecular recognition of emerald ash borer infestation using leaf spray mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, 30, p. 1304–1312, 2016.

FLORA DO BRASIL. Loganiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.ibri.gov.br/reflora/floradobrasil/FB151>>.

<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB151>, 2018. Acesso em: Acesso em: 23 Mai. 2018.

FOLKERS, K. Preliminary studies of the botanical components of tecuna and java curare. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, 27, p. 689-693, 1938.

FUNARI, C. S.; ASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectiva e desafios. **Química Nova**, 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GURST, E. J. NMR and the Structure of D-Glucose. **Journal of Chemical Education**, p. 1003-1004, 1991.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. I. S. E. A. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. Universidade/UFRGS. Porto Alegre, 1999. v. 6, cap. 29.

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S. *et al.* **Phytochemistry**, 65, p. 449-454, 2004.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; HÉRENT, M.-F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, 72, p. 480-482, 2006.

HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; MARINS, C. M. F.; BOLDRINI, F.; FRANÇA, E. L. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of “Quina do Cerrado” (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). **Acta Cirurgica Brasileira**, 36, p. 504-510, 2008.

ITOH, A.; TANAKA, Y.; NAGAKURA, N.; AKITA, T. *et al.* Phenolic and iridoid glycosides from *Strychnos axillaris*. **Phytochemistry**, 69, p. 1208-1214, 2008.

ITOH, A.; TANAKA, Y.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. *et al.* A quinic acid ester from *Strychnos lucida*. **Journal of Natural Medicines**, 60, n. 2, p. 146-148, 2006.

JAYARAM, K.; MURTHY, I. Y. L. N.; LALHRUAITLUANGA, H.; M.N.V., P. Biosorption of lead from aqueous solution by seed powder of *Strychnos potatorum* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 71, n. 2, p. 248-254, 2009.

JIANG, H.; LIU, Y.-B.; LI, Y.; LI, L. *et al.* Analgesic corynanthe-type alkaloids from *Strychnos angustiflora*. **Tetrahedron**, 72, n. 10, p. 1276-1284, 2016.

JIANG, H.; MA, S. G.; LI, Y.; LIU, Y. B. *et al.* Spirobisnaphthalenes and lactones from the seeds of *Strychnos angustiflora* with potential anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, p. 4832-4836, 2016.

KIND, T.; FIEHN, O. Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution *tandem* mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**, 21, p. 313-319, 2017.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CRETTON, S.; ALLARD, P. M.; GENTA-JOUVE, G. *et al.* Targeted Isolation of Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea sessilis*. **Journal of Natural Products**, 80, n. 11, 2017.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A. *et al.* Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 00, p. 1-11, 2019.

LIMA, M. H. D.; FORTES-DIAS, C. L.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**, 56, n. 7, p. 1084-1091, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 83, p. 7608-7613, 2011.

LIU, Y.; PAN, G.; WANG, X.; ANDRE, N. *et al.* Rapid and systematic identification of indole alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* by UPLC-Q-TOF-MS. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 3, n. 2, p. 50-59, 2015.

MA, Y. L.; VEDERNIKOVA, I.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Internal glucose residue loss in protonated *O*-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 11, p. 136-144, 2000.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.

MAGNUS, P.; SEAR, N. L.; KIM, C. S.; VICKER, N. Studies on the Synthesis of *Strychnos* Alkaloids. A New Entry into the Azocino[4.3-h]indole Core Structure and Related Studies. **The Journal of Organic Chemistry**, 57, p. 70-78, 1992.

MARCH, R. E., MIAO, X. S., METCALFE, C. D. A fragmentation study of a flavone triglycoside, kaempferol-3-*O*-robinoside-7-*O*-rhamnoside. **Rapid communications in mass spectrometry** 18, p. 931-934, 2004.

MARSHALL, D. D.; LEI, S.; WORLEY, B.; HUANG, Y. *et al.* Combining DI-ESI-MS and NMR datasets for metabolic profiling. **Metabolomics**, 11, p. 391-402, 2015.

MARTÍNEZ-JARQUÍN, S.; WINKLER, R. Low-temperature plasma (LTP) jets for mass spectrometry (MS): Ion processes, instrumental set-ups, and application examples. **Trends in Analytical Chemistry**, 89, p. 133-145, 2017.

MONGE, M. E.; HARRIS, G. A.; P., D.; M., F. N. F. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. **Chemical Reviews**, 113, n. 4, p. 2269-2308, 2013.

NICOLETTI, M.; GOULART, M. O. F.; LIMA, R. A. D.; GOULART, A. E. *et al.* Flavonoids and Alkaloids From *Strychnos pseudoquina*. . **Journal of Natural Products**, 47, p. 953-957, 1984.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography– Mass Spectrometry**. Taylor & Francis Group, LLC: 2006. 600p p., v. 3^aed).

O'CONNOR, S. E.; MARESH, J. J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Natural Product Reports**, 23, p. 532-547, 2006.

OHIRI, F. C.; VERPOORTE, R.; BAERHEIM, A., SVENDSEN. The African *strychnos* species and their alkaloids: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 9, p. 167-223, 1983.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, L. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 34, p. 21-34, 2004.

OLSZEWSKA, M.; WOLBIS, M. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. **Acta Polonise Pharmaceutica - Drug Research**, 59, n. 2, p. 133-137, 2002.

OYEDEMI, S. O.; BRADLEY, G.; AFOLAYAN, A. J. In -vitro and -vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 4, p. 70-78, 2010.

PAN, H.; YANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, M. *et al.* An integrated strategy for the systematic characterization and discovery of new indole alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* by UHPLC/DAD/LTQ-Orbitrap-MS. . **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407, p. 6057-6070, 2015.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. **Phytotherapy Research**, 2015.

PATIL, S. P.; LADDHA, K., S. Simple method of isolation of loganin from *nux vomica* fruits and its quantification by HPLC. **International Journal of Pharmacognosy**, 4, n. 1, p. 39-42, 2017.

PEREIRA, I.; RODRIGUES, S. R. M.; CARVALHO, T. C.; CARVALHO, V. V. *et al.* Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate? **Analytical Methods**, 8, n. 31, p. 6023-6029, 2016.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, M. R. G. Flavonoides do Gênero Solanum. **Revista Virtual de Química**, 8, n. 1, p. 4-26, 2016.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D. *et al.* Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8, n. 3, p. 1-8, 2006.

- PHILIPPE, G.; ANGENOT, L.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, 44, n. 4, p. 405-416, 2004.
- PINHEIRO, M. L. B.; ROCHA, A. F. I. D.; FERNANDES, M. A. D. N.; MONTE, F. J. Q. *et al.* Lignanas de *Strychnos guianensis* (Aublet) Mart. **Química Nova**, 27, n. 2, p. 188-192, 2004.
- PINHEIRO, M. L. B. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico do Gênero *Strychnos* da Flora Amazônica**. 2000. 260 f. (Doutorado) -, Universidade Federal do Ceará.
- PRATES, A. P. L.; IRVING, M. D. A. Conservação da biodiversidade e políticas públicas para as áreas protegidas no Brasil: desafios e tendências da origem da CDB às metas de Aichi. **Revista Brasileira de Políticas Públicas**, 5, n. 1, p. 28-59, 2015.
- QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos E. F. Queiroz, K. Hostettmann. **Revista Fitos**, 2, n. 3, p. 39-53, 2006.
- QUETIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; BISSET, N. G. South American *Strychnos* species. Ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. **Journal of Ethnopharmacology**, 28, n. 1, p. 1-52, 1990.
- RAHEEM, D. J.; TAWFIKE, A. F.; ABDELMOHSEN, U.; EDRADA-EBEL, R. A. *et al.* Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). **Scientific Reports**, 9, n. 1, 2019.
- RAMOS, A. E. F.; LE POGAM, P.; ALCOVER, C. F. Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. **Scientific Data**, 6, p. 15, 2019.
- RAO, P. S.; PRASAD, M. N. V. Extraction, purification and characterization of indole alkaloids from *strychnos wallichiana* L. - an Endangered medicinal plant from India. **Medicinal and aromatic plant science and biotechnology**, 2, n. 1, p. 63-67, 2008.
- REFLORA. **Strychnos in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8663>, 2018. Acesso em: 02 Abril.
- ROBERTS, M. F.; WINK, M. **Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications**. Plenum Press, New York, NY, 1998. 486 p. 0-306-45465-3.
- RODRIGUES, M. V.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S. *et al.* O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Multi Ciência**, 7, p. 1-14, 2006.
- ROMÃO, W. **Novas aplicações da espectrometria de massa em química forense**. 2010. 200p f. (Tese de Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado.

SADRE, R.; MAGALLANES-LUNDERBACK, M.; PRADHAN, S.; SALIM, V. *et al.* Metabolite Diversity in Alkaloid Biosynthesis: A Multilane (Diastereomer) Highway for Camptothecin Synthesis in *Camptotheca acuminata*. **The Plant Cell**, 28, p. 1926–1944, 2016.

SAKAMOTO, J.; UMEDA, Y.; RAKUMITSU, K.; SUMIMOTO, M. *et al.* Total Syntheses of (-)-Strictosidine and Related Indole Alkaloid Glycosides. **Angewandte Chemie International Edition**, 59, n. 32, p. 13414-13422, 2020.

SANTOS, G., C. L.; ANGOLINI, C. F. F.; NEVES, K. O. G. *et al.* Molecular networking-based dereplication of strictosidine-derived monoterpene indole alkaloids from the curare ingredient *Strychnos peckii*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2019.

SARMENTO, N. C.; WORACHARTCHEEWAN, A.; PINGAEW, R.; PRACHAYASITTIKUL, S. *et al.* Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *strychnos lucida* R. BR. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, 12, n. 4, p. 122-127, 2015.

SCOTT, A. I. Biosynthesis of natural products. **184**, p. 760-764 1974.

SHOKO, T.; APOSTOLIDES, Z.; MONJEREZI, M.; SAKA, J. D. K. Volatile constituents of fruit pulp of *Strychnos cocculoides* (baker) growing in Malawi using solid phase microextraction. **South African Journal of Botany**, 84, p. 11-12, 2013.

SILVA, F. H.; NASCIMENTO, A.; ZWOLINSK, N.; ANDRE, A. Miastenia gravis pós-infeção por vírus H1N1. **Revista SPA**, 21, n. 5, p. 18-21, 2012.

SILVA, F. M. A.; HANNA, A. C. S.; SOUZA, A. A.; SILVA-FILHO, F. A. *et al.* Integrative Analysis Based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* Bark Biomass Residues: Determination of Ellagic Acid Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30, p. 830-836, 2019.

SILVA, F. M. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A. *et al.* Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, 25, p. 45-49, 2014.

SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C., SANNOMIYA, M. *et al.* *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15, p. 256-267, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of organic compounds**. John Wiley & Sons Ed., Danvers: 2005. 550p p., v. 7ed).

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R. *et al.* Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, 26, p. 339-345, 2015.

SUÁREZ, A. I.; MANCEBO, M.; MONACHE, F. D.; TIRRI, M. M. *et al.* A new indole-alkaloid and a new phenolic-glycoside with cytotoxic activity from *Strychnos fendleri*. **Natural Product Research**, 30, n. 4, p. 399-405, 2015.

TADJIMUKHAMEDOV, F. K.; HUANG, G.; OUYANG, Z.; COOKS, G. Rapid detection of urushiol allergens of *Toxicodendron* genus using leaf spray mass spectrometry. **Analyst**, 137, p. 1082–1084, 2012.

TITS, M.; BRANDT, V.; WAUTERS, J. N.; DELAUDE, C. *et al.* Glucoindole alkaloids from stem bark of *Strychnos mellodora* **Planta Medica**, 62, p. 73-74, 1996.

VAN MAANEN, E. F. The antagonism between acetylcholine and the curare alkaloids, d-tubocurarine, c-curarine-i, c-toxiferine-ii and β -erythroidine in the rectus abdominis of the frog. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 99, p. 255-264, 1950.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. D. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

WANG, B.; DAI, Z., .; LIU, L.; WEI, X. *et al.* Indole glycosides from aqueous fraction of *Strychnos nitida* **Natural Products and Bioprospecting**, 6, p. 285-290, 2016.

WANG, M. X.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

YADAV, K.; KADAM, P.; PATEL, J.; PATIL, M. *Strychnos potatorum*: Phytochemical and pharmacological review. **Pharmacognosy Reviews**, 8, n. 15, p. 61- 66, 2014.

YAMAZAKI, Y.; URANO, A.; SUDO, H.; KITAJIMA, M. *et al.* Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. **Phytochemistry**, 62, n. 3, p. 461-470, 2003.

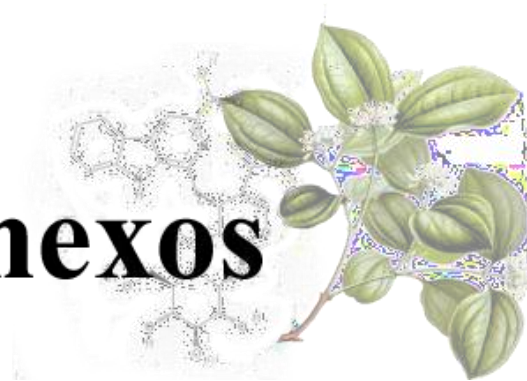
YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X. *et al.* Molecular Networking as a Dereplication Strategy. **Journal of Natural Products**, 76, p. 1686–1699, 2013.

YUK, H. J.; LEE, Y.-S.; RYU, H. W.; KIM, S.-H. *et al.* Effects of *Toona sinensis* Leaf Extract and Its Chemical Constituents on Xanthine Oxidase Activity and Serum Uric Acid Levels in Potassium Oxonate-Induced Hyperuricemic Rats. **Molecules**, 23, n. 12, 2018.

ZAPPI, D. C.; SETUBAL, R. B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Loganiaceae. **Rodriguésia**, 67, p. 1405-1409, 2016.

ZHENG, Y. F.; QI, L. W.; ZHOU, J. L.; LI, P. P. Structural characterization and identification of oleanane-type triterpene saponins in *Glycyrrhiza uralensis* Fischer by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 24, p. 3261-3270., 2010.

Anexos



8. Anexos

Received: 16 August 2019 | Revised: 16 October 2019 | Accepted: 25 November 2019
DOI: 10.1002/rcm.8683

SPECIAL ISSUE RESEARCH ARTICLE

Rapid Communications in Mass Spectrometry WILEY

Molecular networking-based dereplication of strictosidine-derived monoterpene indole alkaloids from the curare ingredient *Strychnos peckii*

Carla L.G. Santos¹ | Célio F.F. Angolini² | Kidney O.G. Neves¹ |
Emmanoel V. Costa³ | Afonso D.L. de Souza^{1,3} | Maria Lúcia B. Pinheiro^{1,3} |
Hector H.F. Koolen⁴ | Felipe M.A. da Silva^{1,3}

¹Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil

²Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, 09210-580, Brazil

³Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil

⁴Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, 69050-010, Brazil

Correspondence

H. H. F. Koolen, Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Universidade do Estado do Amazonas, 69050-010, Manaus, AM, Brazil.
Email: hkoolen@uea.edu.br

F. M. A. Silva, Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69077-000, Manaus, AM, Brazil.
Email: felipemas@ufam.edu.br

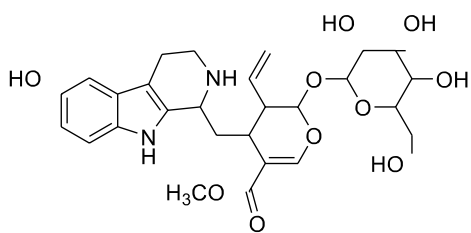
Rationale: Monoterpene indole alkaloids (MIAs) are a large group of biologically active compounds produced by hundreds of plant species in numerous plant families, such as Apocynaceae, Loganiaceae and Rubiaceae. Although this diversity is biosynthetically intermediated by strictosidine, there are no works focused on the fragmentation patterns under collision-induced dissociation of strictosidine-derived alkaloids.

Methods: Initially, the alkaloid fingerprint of *Strychnos peckii* was established using leaf spray with tandem mass spectrometry (LS-MS/MS). Then, high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) analyses were carried out to focus on the patterns of neutral losses in product ion scan experiments with the leaf aqueous extract. Finally, the product ion spectra from a set of presumable strictosidine-type derivatives were analyzed and organized via molecular networking (MN), and dereplicated by manual interpretation of MS/MS spectra.

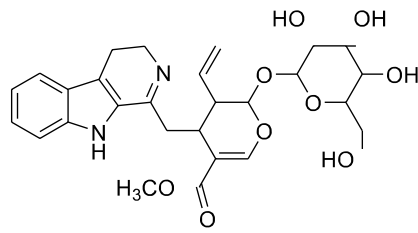
Results: LS-MS/MS allowed the tentative identification of strictosidine-derived alkaloids in the leaves of *S. peckii*, showing useful neutral losses for the dereplication of strictosidine analogues by HPLC/MS/MS experiments. The use of MN combined with manual interpretation of the fragmentation patterns highlighted characteristic fragmentation pathways, and allowed the tentative identification of strictosidine, desoxycordifoline, strictosidinic acid, 10-hydroxystriptosidine, 5-carboxystriptosidine, lyaloside, 3,4-dehydrostrictosidine and strictosidine lactam.

Conclusions: The use of MN combined with the analysis of the fragmentation patterns proved to be a useful strategy for the dereplication of strictosidine-derived MIAs from *S. peckii*, highlighting known and unprecedented structures, as well as useful diagnostic product ions. Therefore, this workflow is an effective approach for the characterization of strictosidine-type alkaloids in future dereplication works.

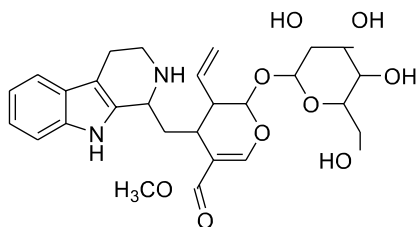
Figura A1: Trabalho publicado com base nos dados apresentados no presente trabalho.



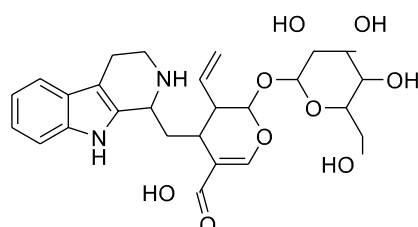
10-hidróxi estrictosidina (1)



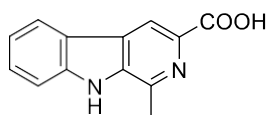
3,4-dehidro-estrictosidina (2)



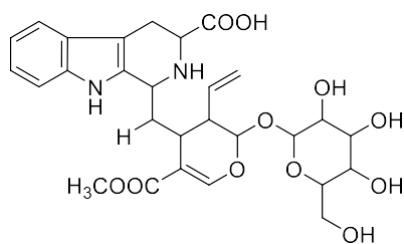
estrictosidina (3)*



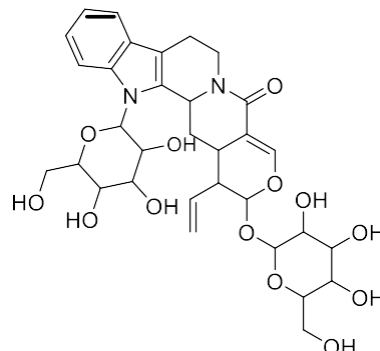
ácido estrictosidínico (4)



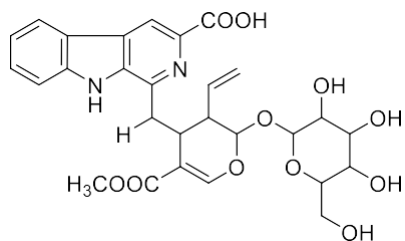
ácido 3-harmanocarboxílico (5)*



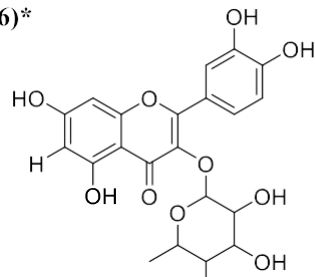
5-carboxiestrictosidina (7)*



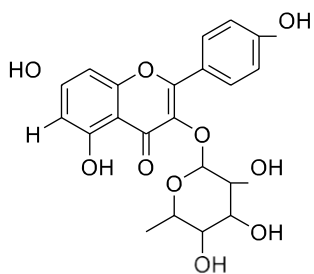
N,B-D-glucopiranosil vincosamida (6)*



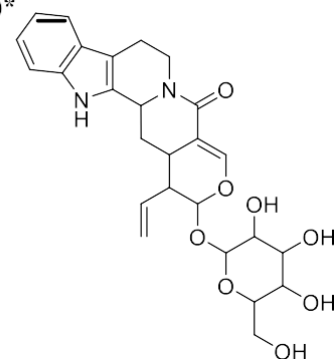
desoxicordifolina (8)*



quercetina-3-*O*- α -ramnosídeo (9)*



kaempferol-3-*O*- α -ramnosídeo (10)*



estrictosidina lactama (11)

Figura A2: Estruturas observadas por HPLC-MS/MS para a amostra SPIF_LE_SPE.

* Substâncias isoladas

Figura A3: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF8.

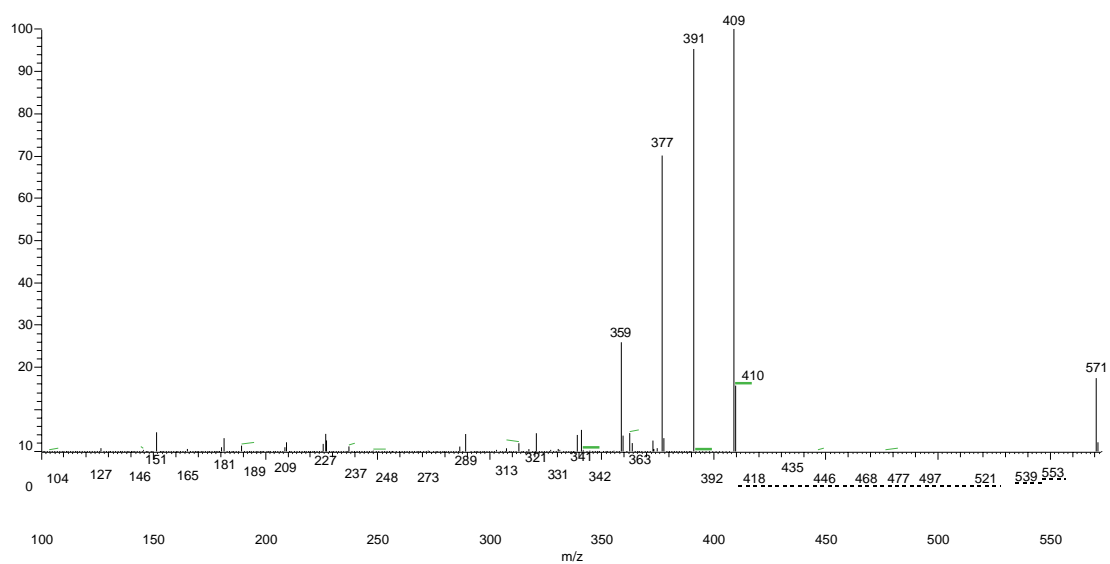


Figura A4: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF8.

Figura A5: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF7_2.

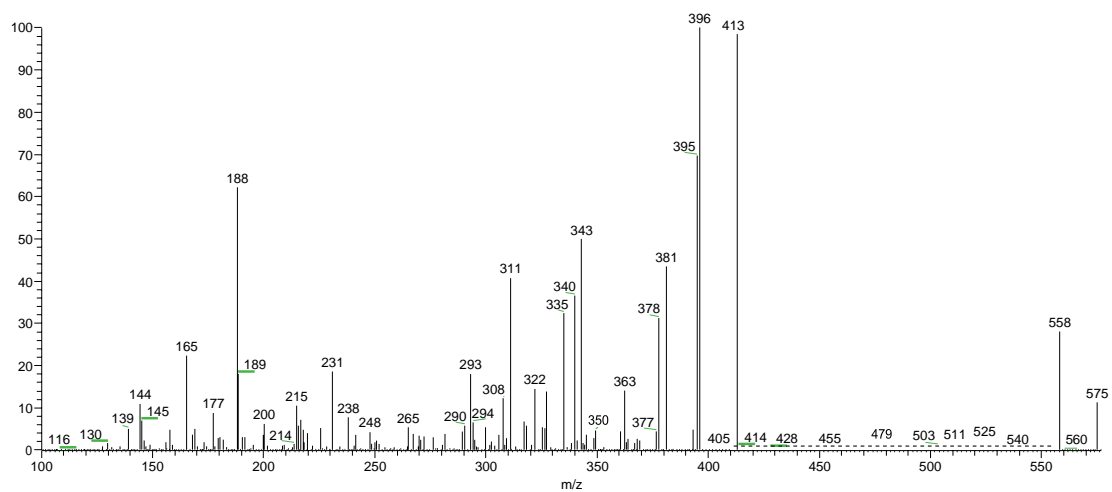


Figura A6: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF7_2.

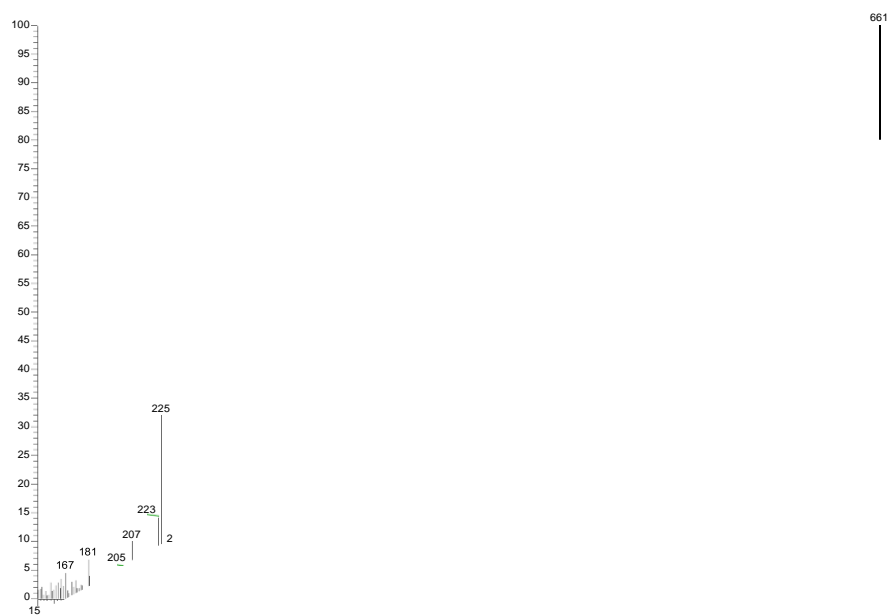


Figura A7: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPIF_661.

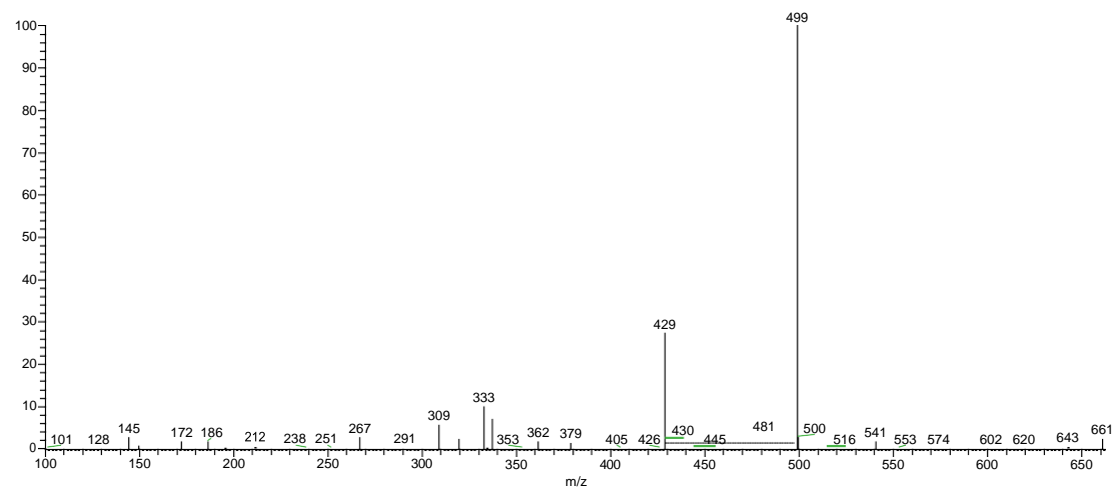


Figura A8: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPIF_661.

Figura A9: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF7_1.

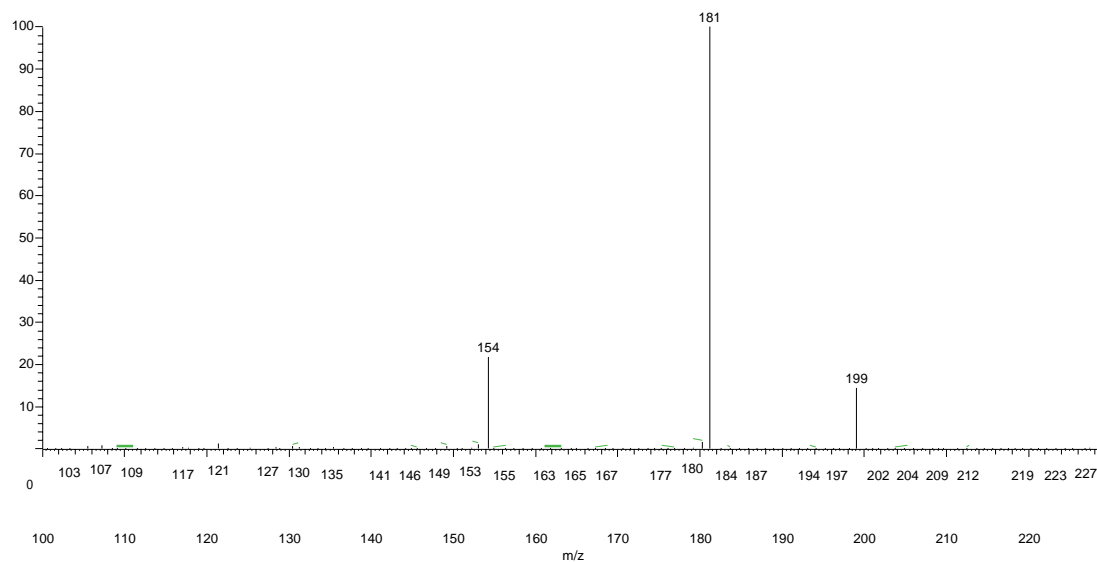


Figura 10: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF7_1.

Figura A11: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF4.

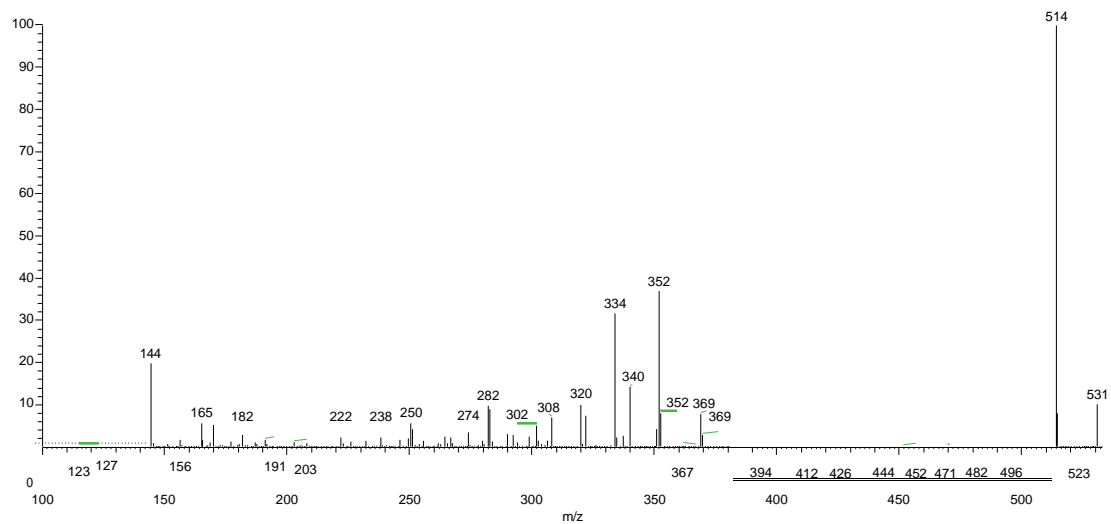


Figura A12: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF4.

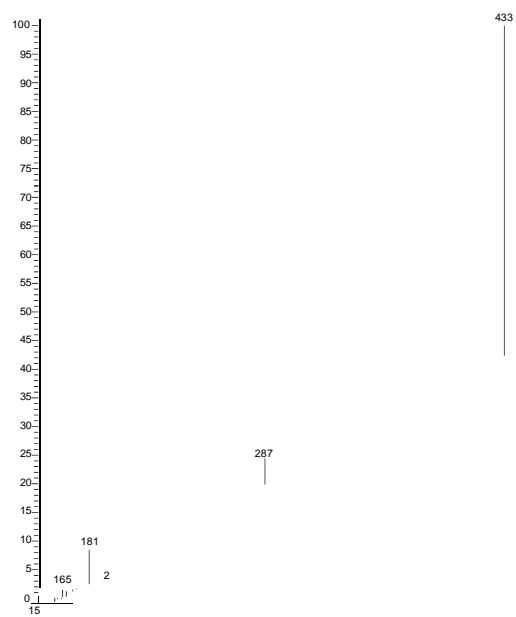


Figura A13: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF10.

Figura A14: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF10.

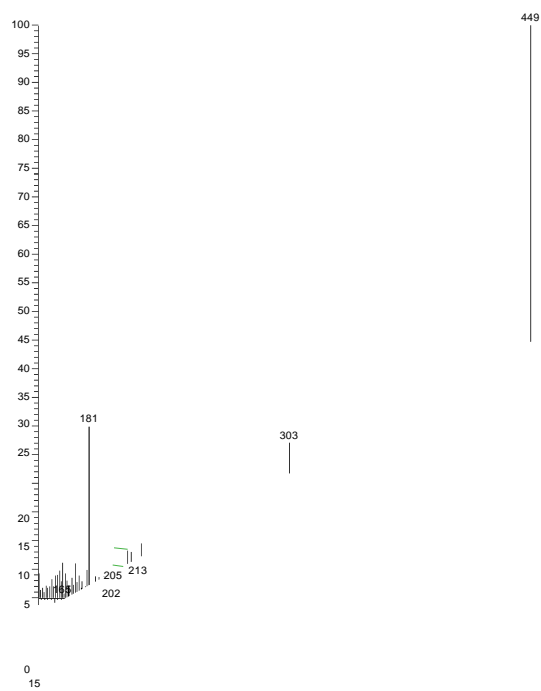


Figura A15: Espectro de LC-ESI-MS (modo positivo) da amostra SPF9_2.

Figura A16: Espectro de LC-ESI-MS/MS (modo positivo) da amostra SPF9_2.

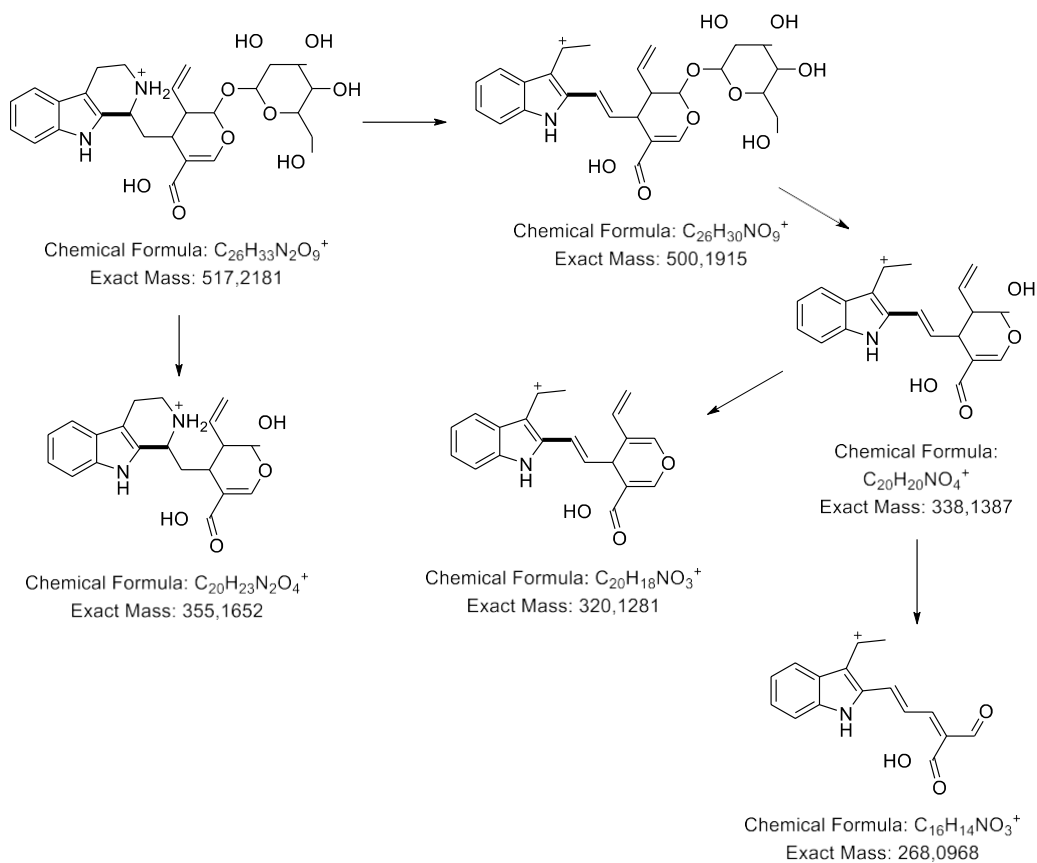


Figura A17: Proposta de fragmentação para o íon m/z 517

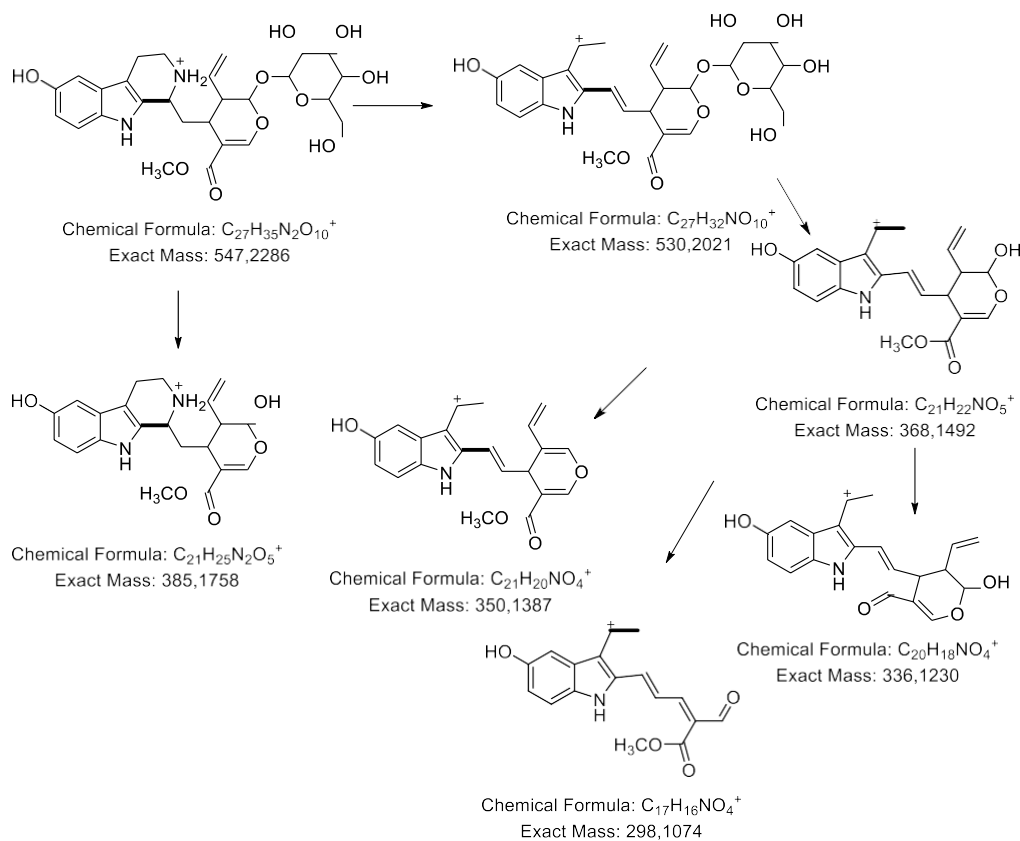


Figura A18: Proposta de fragmentação para o íon m/z 547

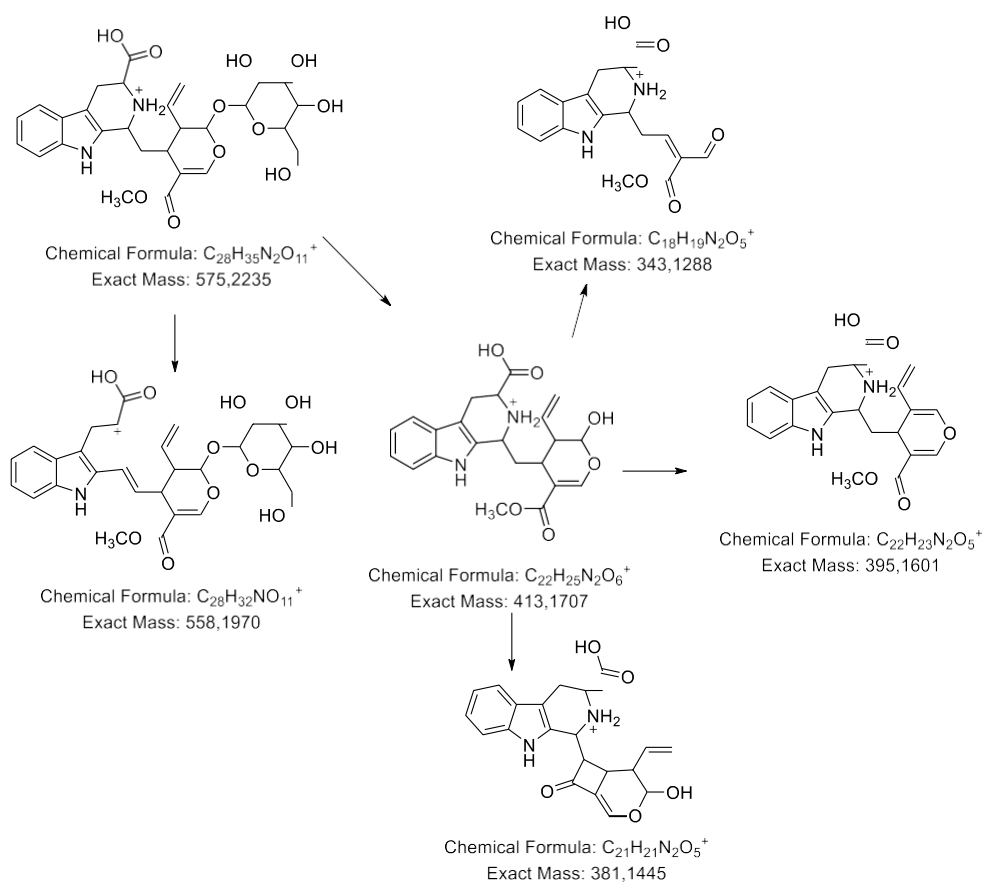


Figura A19: Proposta de fragmentação para o íon m/z 575

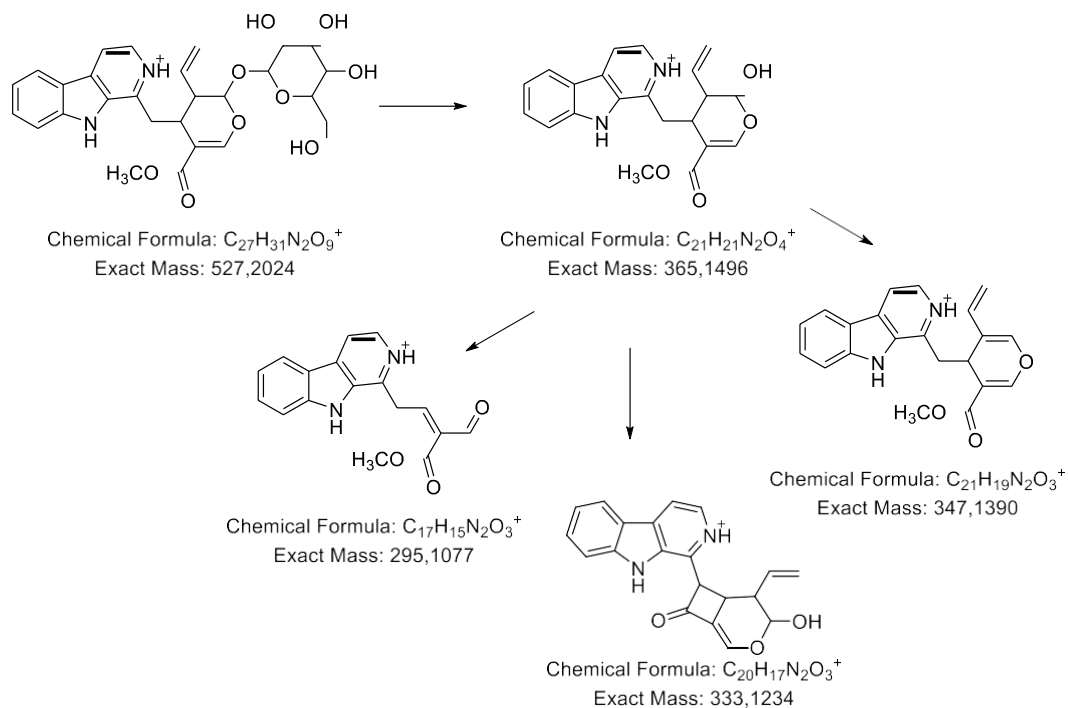


Figura A20: Proposta de fragmentação para o íon m/z 527

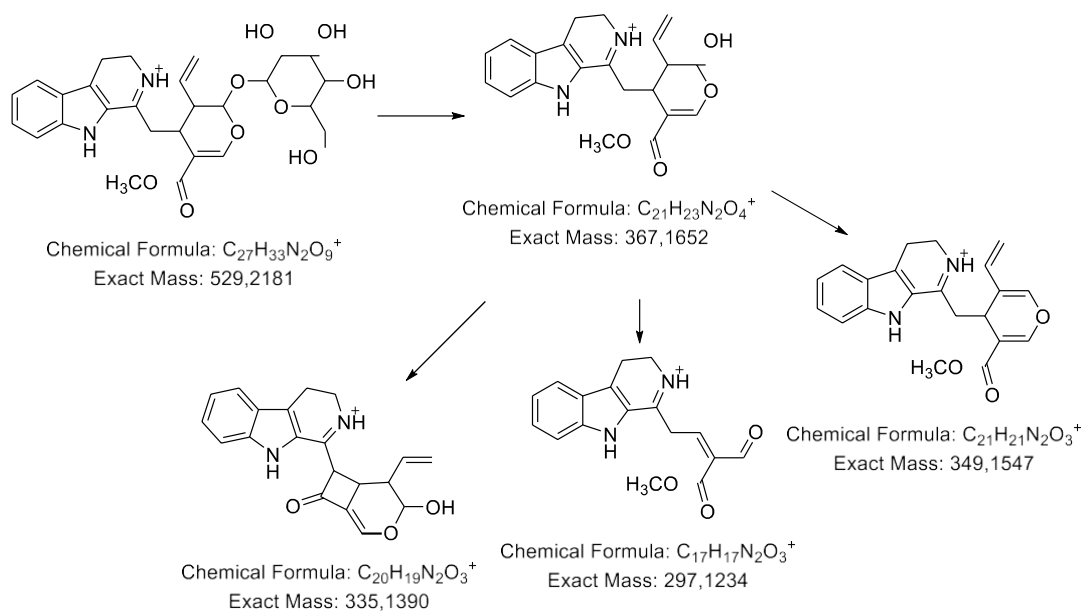


Figura A21: Proposta de fragmentação para o íon m/z 529

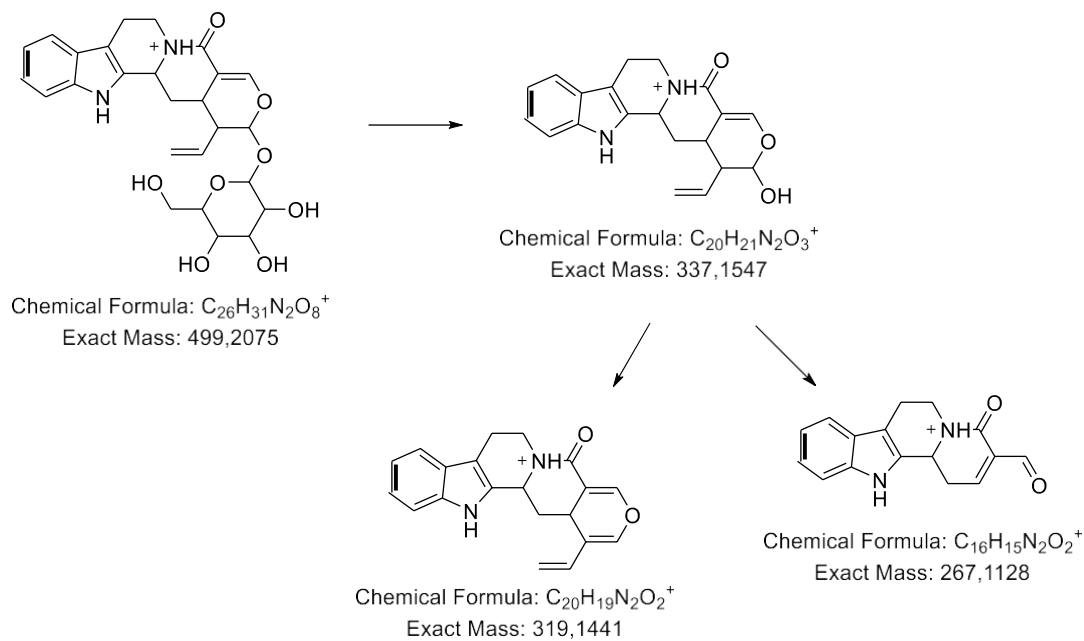


Figura A22: Proposta de fragmentação para o íon m/z 499