

ALICE TEREZA SAMPAIO DE MATOS

Detecção *in silico* dos constituintes majoritários de *Strychnos
brasiliensis* e *S. pseudoquina* (Loganiaceae) usando CLAE-
DAD/EMAR

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

M433d	Matos, Alice Tereza Sampaio de Detecção <i>in silico</i> dos constituintes majoritários de <i>Strychnos brasiliensis</i> e <i>S. pseudoquina</i> (Loganiaceae) usando CLAE-DAD/EMAR / Alice Tereza Sampaio de Matos. – Araraquara : [s.n], 2009 90 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Ian Castro-Gamboa 1. Produtos naturais. 2. Espectrometria de massas de alta resolução. 3. Técnicas hifenadas. 4. Derreplicação. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados Curriculares

Nome: Alice Tereza Sampaio de Matos

Nascimento: 14/07/1984 **RG:** 28.422.929-5 **CPF:** 226.798.698-18

Endereço: Avenida José Cezarine, 1162, Jd. Santa Lúcia, CEP: 14800-510,
Araraquara/ SP

Nacionalidade: brasileira **Naturalidade:** São Paulo/ SP

Estado civil: solteira

Filiação:

Mãe: Diva Teodoro Sampaio de Matos

Pai: Jaime Ferreira Matos

Profissão: Bacharel em Química

Endereço profissional: Rua Professor Francisco Degni, s/n, Quitandinha, CEP:
14800-900, Araraquara/ SP

Formação:

Graduação: Bacharelado em Química pelo I. Q. UNESP - Araraquara,
concluído em 12/2006

Pós-graduação: Mestrado em Química pelo I. Q. UNESP - Araraquara,
concluído em 02/2009

Trabalhos apresentados na forma de painéis:

MATOS, A. T. S. et al. Detecção *in silico* dos constituintes micromoleculares majoritários presentes nas folhas de *Strychnos brasiliensis* (Loganiaceae) usando EMAR/CLAE-DAD. 30ª SBQ, Águas de Lindóia, 2007

MATOS, A. T. S. et al. Detecção *in silico* de alguns constituintes majoritários presentes em espécies do gênero *Strychnos* (Loganiaceae) usando CLAE-DAD/EMAR. 31ª SBQ, Águas de Lindóia, 2008

ALICE TEREZA SAMPAIO DE MATOS

Detecção *in silico* dos constituintes majoritários de *Strychnos
brasiliensis* e *S. pseudoquina* (Loganiaceae) usando CLAE-
DAD/EMAR

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara, de de 2009

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
I. Q. UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Lúcia Maria Xavier Lopes
I. Q. UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Maria Inês Genovese Rodriguez
F. C. F. Usp – São Paulo

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha mãe Diva, a meu pai Jaime e à minha irmã Anne, por todo apoio, ajuda e incentivo que me deram para que eu pudesse chegar até aqui.

Dedico também ao professor Ian pela confiança depositada e por todo o incentivo que me deu acreditando na minha capacidade.

Agradecimientos

Agradeço a Deus por todas as coisas e pessoas que ele pôs no meu caminho para que tudo corresse bem.

Agradeço a meus pais e à minha irmã por terem me apoiado, me ajudado, mesmo de longe, e me dado força durante toda essa jornada para que eu nunca desistisse.

Agradeço ao meu orientador, Ian, por tudo que me ensinou, pela paciência que teve e por todo apoio que me deu durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório pelas dicas, auxílios, momentos de descontração e apoio durante a realização da pesquisa.

Agradeço aos funcionários do IQ, como um todo, por todas as informações, ajudas e serviços prestados durante esses dois anos em que fui aluna de pós-graduação.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

Epígrafe

É melhor fazer pouco e bem do que muito e mal.

(Sócrates)

É a teoria que decide o que podemos observar.

(Albert Einstein)

Resumo

O Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) condensa, em suas atividades de pesquisa, o estudo de micromoléculas bioativas provenientes de plantas do Cerrado e Mata Atlântica Paulistas. Nos últimos anos o NuBBE investe no desenvolvimento de metodologias analíticas de derreplicação, utilizando diversas técnicas acopladas, tais como, CLAE/DEQ-DAD, EMAR/CLAE-DAD e EM/CLAE-DAD, para acelerar a escolha de extratos vegetais brutos. Técnicas analíticas de detecção *in silico* vêm sendo incorporadas às metodologias cromatográficas de construção de perfis micromoleculares, auxiliando na seleção apenas dos metabólitos de interesse presentes em matrizes brutas. Nesta dissertação foi abordado o estudo dos extratos de *Strychnos brasiliensis* e *S. pseudoquina* (Loganiaceae) através de bioensaios de atividade antioxidante e de inibição de polimerização da hematina. Esses bioensaios revelaram a fração acetato de etila, dos galhos de *S. brasiliensis*, como matriz promissora em ambos os testes assim como os galhos de *S. pseudoquina* com potencial atividade antioxidante. A fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* e o extrato bruto das folhas de *S. pseudoquina* foram avaliados fazendo uso da técnica hifenada EMAR/CLAE-DAD. Como resultado desta análise, quatro micromoléculas foram elucidadas: a 10-hidroxi-17-*O*-metilacagerina para as folhas de *S. pseudoquina*, estricnohirsutina, 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-oleído e acagerina para a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*. Além disso, foi construída uma base de dados que reúne algumas informações físico-químicas e espectroscópicas valiosas, ajudando na detecção e isolamento das substâncias presentes nas duas espécies de *Strychnos*, objeto do nosso estudo.

Abstract

The Nuclei of Bioassays, Biosynthesis and Natural Products Ecophysiology (NuBBE) condenses in their research activities, the study of bioactive micromolecules from plants of the Cerrado and Atlantic Forest from São Paulo's State. In recent years, NuBBE has increased efforts in the development of analytical dereplication methods using various coupled techniques such as HPLC/DAD-ECD, EMAR/DAD and HPLC-MS/HPLC-DAD, to speed-up the selection of crude plant extracts. *In silico* analytical techniques have been incorporated into chromatographic methodologies aiming to build micromolecular profiles, assisting in the selection only of metabolites of interest in crude matrixes. This dissertation aims the study of extracts from *Strychnos brasiliensis* and *Strychnos pseudoquina* (Loganiaceae) throughout bioassays of antioxidant activity and inhibition of polymerization of heme, which showed the ethyl acetate fraction from branches of *S. brasiliensis*, as a promising matrix in both *in vitro* tests as well as the branches of *S. pseudoquina* that showed potential antioxidant properties. The ethyl acetate fraction from *Strychnos brasiliensis* branches and the crude extract from leaves of *Strychnos pseudoquina* were evaluated using HRMS/HPLC-DAD. From that analysis, four structures have been elucidated: 10-hydroxy-17-*O*-methylakagerine, from leaves of *S. pseudoquina*, strychnohirsutine, 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-olide and akagerine from the ethyl acetate fraction of branches from *S. brasiliensis*. In addition, we have built up a database that gathers information about the structures detected in this study, such as molecular weight, structure, molecular formula, mass spectrum, aiming to facilitate the structural as well as the total elucidation of molecules of interest.

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração das partes de <i>Strychnos brasiliensis</i>	30
Figura 2: Frutos, folhas e galhos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	32
Figura 3: Página inicial de busca de estruturas no DPN.....	49
Figura 4: Lista de alcalóides com massa entre 308,0 e 308,9 compiladas pelo Dicionário de Produtos Naturais.....	50
Figura 5: Página com as informações compiladas no DNP sobre a substância estricnóhirsutina.....	51
Figura 6: Base de dados mostrando os links para o EM e a estrutura da substância estricnóhirsutina a título de exemplo.....	52
Figura 7: Teste com β -caroteno para as frações AcOEt, hexânica, butanólica e hidro-alcoólica de <i>S. brasiliensis</i> e para os extratos brutos das folhas e galhos de <i>S. pseudoquina</i>	54
Figura 8: Redução do reagente DPPH.....	55
Figura 9: Gráfico da % de redução de DPPH em função da concentração dos extratos das folhas e dos galhos de <i>S. pseudoquina</i> e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	55
Figura 10: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração acetato de etila das folhas de <i>S. brasiliensis</i>	57
Figura 11: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração hidro-alcoólica das folhas de <i>S. brasiliensis</i>	57
Figura 12: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração butanólica das folhas de <i>S. brasiliensis</i>	58
Figura 13: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração hexânica das folhas de <i>S. brasiliensis</i>	58
Figura 14: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	58
Figura 15: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração hidro-alcoólica dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	59
Figura 16: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração butanólica dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	59

Figura 17: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) da fração hexânica dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	59
Figura 18: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) do extrato das folhas de <i>S. pseudoquina</i>	60
Figura 19: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H ₂ O) do extrato dos galhos de <i>S. pseudoquina</i>	60
Figura 20: Perfil cromatográfico das frações acetato de etila das folhas (1) e galhos (2) de <i>S. brasiliensis</i> depois do aperfeiçoamento das condições cromatográficas....	61
Figura 21: Perfil cromatográfico do extrato das folhas (1) e galhos (2) de <i>S. pseudoquina</i> depois do aperfeiçoamento das condições cromatográficas.....	62
Figura 22: Contagem de íons totais da fração AcOEt dos galhos de <i>S. brasiliensis</i> .	64
Figura 23 Contagem de íons totais do extrato bruto das folhas de <i>S. pseudoquina</i> ..	64
Figura 24: Alguns alcalóides detectados na fração AcOEt dos galhos de <i>S. brasiliensis</i> , oriundos do íon $m/z = 309$	66
Figura 25: Alguns alcalóides detectados no extrato das folhas de <i>S. pseudoquina</i> oriundos dos íons $m/z = 413$ e $m/z = 397$	66
Figura 26: Algumas estruturas detectadas <i>in silico</i> para o fragmento de m/z : 355,24732.....	67
Figura 27: Padrão de fragmentação proposto para a 10-hidroxi-17-O-metilacagerina após análise via EMAR-EM-EM.....	70
Figura 28: Algumas estruturas detectadas <i>in silico</i> para o fragmento de m/z : 309,20751.....	71
Figura 29: Padrão de fragmentação proposto para a estricnohirsutina após análise via EMAR-EM-EM.....	74
Figura 30: Mecanismo proposto para a formação do íon m/z 183,09.....	75
Figura 31: Algumas estruturas detectadas <i>in silico</i> para o fragmento de m/z : 341,15140.....	75
Figura 32: Padrão de fragmentação proposto para a acagerina.....	77
Figura 33: Algumas estruturas detectadas <i>in silico</i> para o fragmento de m/z : 301,16565.....	78
Figura 34. Padrão de fragmentação proposto para o 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-oleído após análise via EMAR-EM-EM.....	81
Fluxograma 1: Obtenção do extrato bruto a partir das folhas trituradas de <i>Strychnos brasiliensis</i> e partição líquido – líquido com acetato de etila, hexano e butanol.....	37

Fluxograma 2: Obtenção do extrato bruto a partir dos galhos triturados de <i>Strychnos brasiliensis</i> e partição líquido – líquido com acetato de etila, hexano e butanol.....	38
Fluxograma 3: procedimento experimental utilizado para a avaliação de atividade antioxidante de todas as frações de <i>S. brasiliensis</i> e dos dois extratos de <i>S. pseudoquina</i>	41
Fluxograma 4: Procedimento experimental para a avaliação de inibição de polimerização da hematina aplicado a todas as frações de <i>Strychnos brasiliensis</i> e aos extratos de <i>S. pseudoquina</i>	44
Exemplo 1: Cálculo da porcentagem de redução de DPPH pela fração acetato de etila dos galhos de <i>Strychnos brasiliensis</i>	42
Exemplo 2: Cálculo da porcentagem de inibição de polimerização da hematina pela fração acetato de etila dos galhos de <i>Strychnos brasiliensis</i>	45
Fragmentograma 1: Experimento EMAR referente ao íon <i>m/z</i> : 355,24732, presente no extrato das folhas de <i>S. pseudoquina</i>	68
Fragmentograma 2: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon <i>m/z</i> : 355,2, presente nas folhas de <i>S. pseudoquina</i>	69
Fragmentograma 3: Experimento EMAR referente ao íon <i>m/z</i> : 309,20751, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	72
Fragmentograma 4: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon <i>m/z</i> : 309,16, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	73
Fragmentograma 5: Fragmentograma 5: Experimento EMAR referente ao íon <i>m/z</i> : 341,15140, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	76
Fragmentograma 6: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon <i>m/z</i> : 341,2, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	77
Fragmentograma 7: Experimento EMAR referente ao íon <i>m/z</i> : 301,16565, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	79
Fragmentograma 8: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon <i>m/z</i> : 301,15, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	80
Fragmentograma 9. Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon <i>m/z</i> : 263,20, presente na fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	80

Lista de tabelas e quadros

Quadro 1: Alcalóides já isolados de <i>Strychnos brasiliensis</i>	28
Quadro 2: Alcalóides já isolados de <i>Strychnos pseudoquina</i>	31
Tabela 1: Absorbâncias medidas para a fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i> para demonstração do cálculo de % de redução de DPPH.....	41
Tabela 2: Absorbâncias medidas para a fração acetato de etila dos galhos de <i>S. brasiliensis</i> para demonstração do cálculo de % de inibição da hematina.....	44
Tabela 3: Condições utilizadas para análise em EMAR/CLAE-DAD dos extratos brutos dos galhos e das folhas de <i>S. pseudoquina</i> e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	46
Tabela 4: Resultados do teste para avaliação da inibição de polimerização da hematina pelos extratos das folhas e dos galhos de <i>S. pseudoquina</i> e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	56

Lista de siglas e abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
CC	Coluna cromatográfica
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/DEQ/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência/ detector eletroquímico/ diode array detector (detector de arranjo de diodos)
CLAE/PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência/ photodiode array (arranjo de fotodiodos)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPN	Dicionário de produtos naturais
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay (Ensaio imunoenzimático direto)
EMAR ⁿ /CLAE	Espectrometria de massas de alta resolução/cromatografia líquida de alta eficiência
EMAR/CLAE/DAD	Espectrometria de massas de alta resolução/cromatografia líquida de alta eficiência/ diode array detector (detector de arranjo de diodos)
EMAR/IES/TOF	Espectrometria de massas de alta resolução/ionização por eletro-spray /time of flight (tempo de voo)
EM/IES/CLAE	Espectrometria de massas de alta resolução/ionização por eletro-spray/cromatografia líquida de alta eficiência
EM/EM/CLAE	Espectrometria de massas sequencial/ cromatografia líquida de alta eficiência
Ext	Extrato
HOAc	Ácido acético

min	Minutos
NuBBE	Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais
ODS	Octadecil silano
RMN/CLAE	Ressonância magnética nuclear/ cromatografia líquida de alta eficiência
TIC	Total ion current (Contagem de íons totais)
UV	Ultra-violeta

Lista de símbolos

m	Massa
m/z	Relação massa carga
g	Gramas
L	Litros
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mol/L	Mol por litro
mg/mL	Miligramas por litro
μL	Microlitros
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
L/min	Litros por minuto
μs	Microsegundo
$[\text{M}+\text{H}]^+$	Aduto protonado
$[\text{M}+\text{K}]^+$	Aduto cationizado com potássio
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Aduto cationizado com sódio
S	Desvio padrão

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Derreplicação.....	22
1.2	<i>Loganiaceae</i>	25
1.3	<i>Strychnos</i>	26
1.4	<i>Strychnos brasiliensis</i> (Spreng.) Mart.....	28
1.5	<i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil.....	30
2	OBJETIVOS.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1.	<i>Strychnos brasiliensis</i>	36
3.2.	<i>Strychnos pseudoquina</i>	39
3.3	Avaliação da capacidade antioxidante usando o radical estável DPPH.....	39
3.4	Ensaio de inibição da polimerização da hematina.....	42
3.5	Análise cromatográfica de alta eficiência.....	45
3.6	Deteção <i>in silico</i> dos constituintes majoritários.....	47
3.7	Construção da base de dados.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Avaliação da capacidade antioxidante usando o radical estável DPPH.....	54
4.2	Ensaio de inibição da polimerização da hematina.....	56
4.3	Análise cromatográfica de alta eficiência.....	57
4.4	Deteção <i>in silico</i> dos constituintes majoritários.....	63
4.5	Construção da base de dados.....	65
4.6	Proposta de fragmentação para a série isomérica de <i>m/z</i> : 355,24732.....	67
4.7	Proposta de fragmentação para a série isomérica de <i>m/z</i> : 309,20751.....	71
4.8	Proposta de fragmentação para a série isomérica de <i>m/z</i> : 341,15140.....	75

4.9 Proposta de fragmentação para a série isomérica de m/z : 301,16565.....	78
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

1 Introdução

1.1 Derreplicação

Os produtos naturais continuam a exercer um importante papel na descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas. Consideráveis esforços estão sendo feitos por muitos grupos de pesquisa no isolamento de produtos naturais de macro e microorganismos terrestres, assim como de diversos organismos marinhos. Esses esforços são geralmente combinados a bioensaios, aplicados aos extratos brutos, para identificar aqueles que podem conter compostos bioativos que podem ser isolados por um processo de fracionamento bio-monitorado (Lang et al, 2008).

Convencionalmente esses processos envolvem a extração de quantidades significantes do organismo fonte, seguido por extensiva cromatografia direcionada a compostos puros, que são então caracterizados por técnicas instrumentais incluindo espectrometria de massas, ultra-violeta e infra-vermelho, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esse procedimento se torna cada vez mais caro em termos de mão de obra, custos de coleta e tecnologia e, crescentemente, o resultado é o isolamento de um composto previamente caracterizado (Lang et al, 2008).

Para evitar o consumo de tempo isolando constituintes conhecidos, técnicas cromatográficas hifenadas de derreplicação vêm sendo utilizadas na análise preliminar de extratos brutos (Wolfender, Terreaux e Hostettmann, 2000).

Tal abordagem vem exercendo um crescente e importante papel como uma ferramenta estratégica para ajudar na pesquisa de produtos naturais bioativos. De fato, estas técnicas provêm muita informação prévia a respeito da natureza dos constituintes de extratos brutos. Isto é muito útil quando um grande número de amostras deve ser processado e almeja-se evitar o isolamento desnecessário de compostos conhecidos (Wolfender, Terreaux e Hostettmann, 2000).

A derreplicação refere-se ao processo de detectar e analisar, sem isolamento, um produto natural, uma fração, ou um extrato por meio de informações estruturais, espectroscópicas ou físicas, comparando a informação com bases de dados internas e/ou comerciais, chegando à conclusão da existência de compostos inéditos e/ou conhecidos, e determinando uma estratégia racional para o isolamento dessa micromolécula da matriz bruta. A eficiência e a qualidade desse processo determinará o tempo de obtenção da varredura primária dos resultados para

descobrir novas entidades químicas de interesse. Desenvolvimentos recentes em purificações de alta eficiência como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de fotodiodos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas tandem e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear, para derreplicação *on line* de quimiotipos e criação de bases de dados informatizadas têm, fundamentalmente, mudado o modo como os produtos naturais bioativos são derreplicados (Jia, 2003).

Dessas técnicas, aquelas que utilizam cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são as mais comumente utilizadas (Waridel et al., 2004). Isso porque, dentre as técnicas hifenadas, aquelas que utilizam espectrometria de massas de alta resolução acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência requerem equipamentos de menor custo, menor quantidade de amostra e menor tempo de análise. Todavia, diversas técnicas de derreplicação e análise de produtos naturais que utilizam a hifenação RMN/CLAE foram desenvolvidas, apesar de seu alto custo, tanto dos equipamentos para análise, como da técnica *per se* (Jaroszewski, 2005).

A interface EMAR-IES (ionização por eletrospray)/CLAE provê a conexão entre cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. Ela é responsável pela transferência segura e eficiente de analitos da fase líquida para a gasosa. Também é responsável pelo elemento crítico da análise por espectrometria de massas: a ionização. A técnica ideal de ionização geraria um único íon que corresponda ao peso molecular do composto, com pequena ou nenhuma fragmentação. A confirmação da estrutura seria facilitada e a quantificação se procederia com um alto grau de sensibilidade. Elementos de seletividade seriam providos por CLAE e/ou EM/EM (Mike e Kerns, 1999).

O método EMAR/CLAE é aplicável para um amplo número de compostos, e apresenta poderosas figuras de mérito analíticas (sensibilidade, seletividade, velocidade de análise e baixo custo). Essas características analíticas têm melhorado continuamente, resultando em instrumentos mais fáceis e seguros de se usar (Mike e Kerns, 1999).

Ainda assim, técnicas de derreplicação estão atualmente muito bem estabelecidas no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos

brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas (Wolfender, Queiroz e Hostettmann, 2006).

Atualmente, a derreplicação constitui uma etapa absolutamente essencial na descoberta de produtos naturais bioativos estruturalmente inéditos (Sheo e Barrett, 2006). Sendo assim, o processo de derreplicação na pesquisa e descoberta de produtos naturais deve ser cada vez mais utilizado e aprimorado.

O Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) condensa, dentro das suas atividades de pesquisa, o estudo de micromoléculas bioativas provenientes de plantas do Cerrado e Mata Atlântica Paulistas. Técnicas analíticas de detecção *in silico* (através de simulação computacional, usada apenas para processos naturais ou de laboratório, e não para cálculos computacionais genéricos) vêm sendo incorporadas às metodologias cromatográficas de construção de perfis micromoleculares, auxiliando na seleção apenas dos metabólitos de interesse presentes em matrizes brutas. Os resultados da conjunção dessas técnicas permitem orientar apenas o estudo dos extratos ou das frações que possuam alvos micromoleculares promissores.

Nos últimos anos este grupo de pesquisa investe no desenvolvimento de métodos analíticos de derreplicação, utilizando diversas técnicas acopladas, tais como, CLAE/DEQ/DAD, EMAR/CLAE-DAD e EM/CLAE-DAD, para acelerar a escolha de extratos brutos pertencentes a sua extratoteca (Castro-Gamboa e Castro, 2004; Hamerski et al., 2005; Cardoso et al., 2005; Pivatto et al., 2005; Silva et al., 2006; Teles et al., 2006).

O NuBBE vem investindo esforços na pesquisa colaborativa para desenvolvimento de ensaios biológicos alternativos que sejam simples, rápidos, seletivos, reprodutíveis e de baixo custo. O planejamento de ensaios capazes de selecionar extratos, frações e substâncias que apresentem propriedades farmacoterapêuticas úteis (eficácia elevada, toxidez baixa) é fundamental nessa fase de descoberta.

Trabalhos recentes com a espécie *Strychnos brasiliensis* evidenciaram interessantes resultados no que diz respeito a ensaios preliminares *in vitro* (processos efetuados fora dos sistemas vivos, em ambiente controlado e fechado de um laboratório) de polimerização da hematina, assim como avaliações da

capacidade antioxidante dos seus extratos. A análise dos galhos e folhas dessa espécie vegetal utilizando EMAR/CLAE/DAD evidenciou classes micromoleculares interessantes tais como alcalóides indólicos monoterpênicos, alcalóides quinolínicos, flavonóides e triterpenos. Algumas dessas micromoléculas, além de serem marcadores quimiosistemáticos do gênero, possuem relevantes atividades biológicas já comprovadas (Bruneton, 1999; Peres, Nagem e Oliveira, 1997; Peres, Nagem e Oliveira, 2000; Bennett e Lee, 1989; Hay et al., 2004).

Atualmente o NuBBE desenvolve uma bateria de bioensaios *in vitro* em placas de 96 poços adequadas a leitores ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) para a detecção, em matrizes naturais, de compostos com atividades de inibição de polimerização da hematina e antioxidante.

1.2 Loganiaceae

Loganiaceae é uma família extremamente heterogênea que compreende aproximadamente 30 gêneros e 600 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais (Mabberley, 1997) e subtropicais, além de possuir 12 gêneros neotropicais. As plantas dessa família são raramente encontradas em regiões temperadas (Zappi, 2006). A maioria dos representantes desta família são árvores, arbustos ou ervas, sendo raramente epífitas (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

Desde que começou a ser estudada, a família Loganiaceae já foi classificada de diversas maneiras diferentes. No Brasil, Progel (1868) descreveu 75 espécies pertencentes a sete gêneros para esta família.

Leeuwenberg e Leenhouts (1980) consideram a família constituída de um grande número de táxons, 29 gêneros e 600 espécies, distribuídos em dez tribos, alguns dos quais com apenas uma espécie.

Para Hutchinson (1974), *Antonia*, *Spigelia*, *Strychnos* e *Potalia* são famílias distintas. Cronquist (1988), entretanto, manteve *Antonia*, *Spigelia*, *Strychnos* e *Potalia* como parte das Loganiaceae e excluiu *Buddleja*. A família é considerada por Struwe, Albert e Bremer (1994) como um grupo parafilético, dividido em quatro famílias diferentes: Loganiaceae *sensu stricto*, Gelsemiaceae, Strychnaceae e Geniostomaceae. Já em Struwe (2004), Loganiaceae R. Br. ex Mart. *sensu stricto* é considerada como parte da ordem *Gentianales*, constituindo um grupo monofilético,

com 10 gêneros e aproximadamente 400 espécies, sendo *Strychnos* o maior deles, com cerca de 200 espécies.

Para Takhtajan (1997), Loganiaceae é dividida em 12 diferentes famílias, sendo *Logania* o único gênero considerado parte do grupo. De acordo com Aimi, Sakai e Ban (1989), a família é dividida em seis tribos, sendo elas Gelsemieae, Loganieae, Spigeliaeae, Antonieae, Strychneae e Potalieae.

Baseada na forma de vida, prefloração da corola e morfologia do fruto, as espécies da família podem ser reunidas em quatro tribos: Loganieae, Antonieae, Spigeliaeae e Strychneae. A tribo Strychneae é formada por três gêneros, *Gardneria*, *Neuburgia* e *Strychnos*, este último possuindo o maior número de espécies, que compartilham várias características, destacando-se entre elas o fruto suculento (Nurit et al. 2005).

1.3 *Strychnos*

Krukoff e Barneby (1969a) descrevem que o Brasil é um dos centros de diversidade do gênero *Strychnos*, onde se podem encontrar 62 espécies das 71 catalogadas para a América. Só para a região Amazônica registra-se a presença de 43 espécies, Ducke (1955).

O gênero *Strychnos* é formado por mais de 150 espécies, com ocorrência no mundo todo, principalmente na América Latina, Ásia, África e Austrália. A maioria sendo cipós ou arbustos de pequeno porte (Lorenzi, 1998; Aimi, Sakai e Ban, 1989; Silva et al., 2005).

As plantas deste gênero são conhecidas há muito tempo devido à sua utilização por índios como remédio ou veneno. De acordo com Ducke (1965), esses princípios em geral são tetanizantes nas espécies asiáticas e curarizantes nas espécies americanas, mas esta teoria está completamente fora de uso. A estricnina é, de fato, isolada de *S. nux vomica* e de tantas outras espécies asiáticas, mas também de algumas *Strychnos* vindas de outras partes do mundo. Além disso, alcalóides curarizantes não são isolados apenas de espécies americanas (Philippe et al, 2004).

O curare, um veneno natural muito forte preparado pelos índios sul-americanos, é uma composição de vários arbustos das famílias Loganiaceae e Menispermaceae, sendo *Strychnos* o único gênero da família Loganiaceae cujas espécies estão envolvidas no preparo do mesmo (Philipe et al, 2004). Devido às suas diversas propriedades tóxicas, essas plantas são utilizadas pelos índios tanto em atividades de caça, quanto de guerra (Biocaa, 1954), como um complemento a armas utilizadas, não somente para procurar comida e roupas, mas também para prevenir a depredação por animais selvagens.

Por sua natureza, venenos como a estricnina e curare afetam o funcionamento do corpo das vítimas. Por isso eles são também importantes ferramentas farmacológica e medicinal em todo mundo, utilizadas como relaxante muscular e anestésico (Philipe et al, 2004).

Revisão bibliográfica sobre o perfil químico do gênero *Strychnos* revelou principalmente a ocorrência de alcalóides indólicos monoterpênicos e bisindólicos (Peres, Nagem e Oliveira, 1997; Peres, Nagem e Oliveira, 2000; Bennett e Lee, 1989; Hay et al., 2004).

Algumas espécies do gênero *Strychnos* têm importância comercial, sendo que a mais conhecida é *S. ignatii* empregada em homeopatia (Bruneton, 1999).

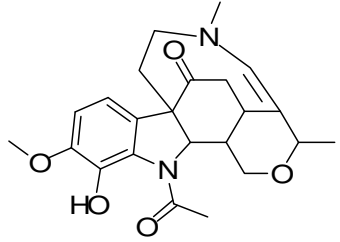
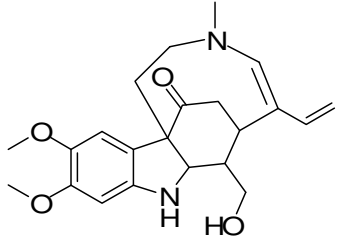
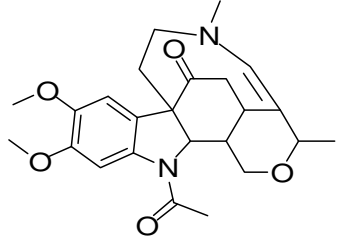
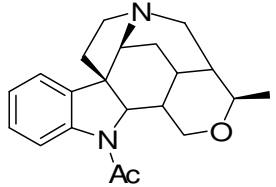
Embora várias espécies sejam tóxicas, muitas vêm sendo utilizadas popularmente para diversas afecções. A maioria das espécies usadas popularmente emprega o chá das folhas ou cascas (Angenot, Quertin-Leclercq e Bisset, 1990; Frederich et al., 2000), com as subseqüentes ações farmacológicas: estimulante e tônica (*S. acuta*, *S. brasiliensis*, *S. guianensis*, *S. pseudoquina*, *S. rubiginosa* e *S. trinervis*), contra problemas estomacais e abdominais (*S. erichsonii*, *S. pseudoquina* e *S. trinervis*), antipirética e antimalárica (*S. brasiliensis*, *S. fendleri* e *S. pseudoquina*), analgésica e antireumática (*S. javariensis*, *S. panamensis* e *S. tansentosa*), espasmolítica (*S. toxifera*), no tratamento de doenças venéreas (*S. erichsonii*), como abortiva (*S. erichsonii*), como afrodisíaca (*S. erichsonii*, *S. melinoniana*, *S. mitscherlichii* var. *mitscherlichii*, *S. nigricans* e *S. oiapocensis*) e no tratamento da anemia (*S. guianensis*) (Silva et al, 2005).

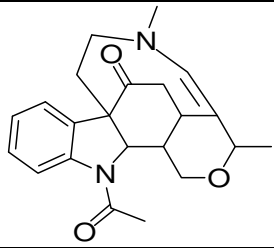
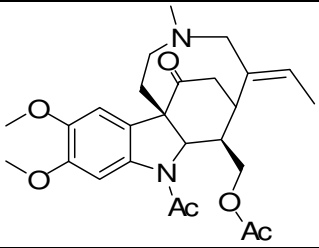
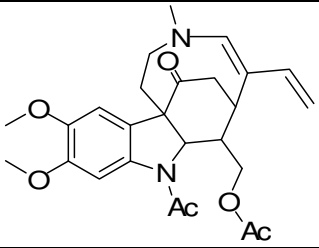
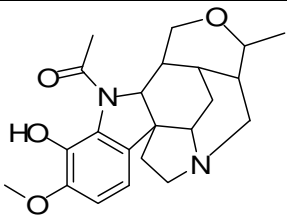
1.4 *Strychnos brasiliensis* (Spreng.) Mart.

Localiza-se nas regiões mais ao sul do continente americano, crescendo no nordeste da floresta tropical da Argentina.

Extração com água gelada de seu tronco dispõe cerca de 1% de uma complexa mistura de bases terciárias das quais, por cromatografia, produz espermostricnina e seis novos alcalóides indólicos que foram isolados e suas estruturas e configurações determinadas. Não há relatos, nessa espécie, de bases alcaloídicas quaternárias (Iwataki e Comin, 1971). O quadro 1 mostra os alcalóides já isolados dessa espécie.

Quadro 1: Alcalóides já isolados de *Strychnos brasiliensis*

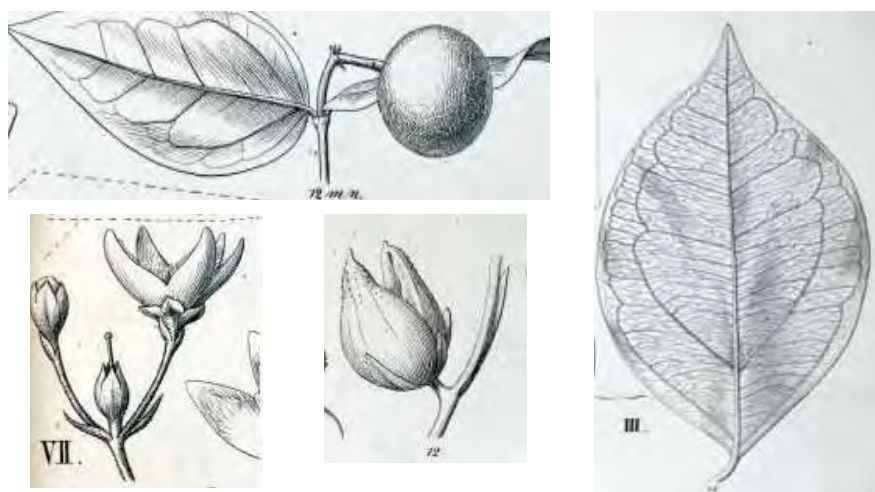
Fonte	Nome	Massa	Estrutura
<i>Strychnos brasiliensis</i>	12-hidroxi-11-metoxistricnobrasilina	412,19982	
	diacetilestricnosilidina	384,20491	
	10,11-dimetoxistricnobrasilina	426,21547	
	espermostricnina	338,19943	

	estricnobrasilina	366,19434	
	estricnosilidina	470,24169	
	estricnosilina	468,22604	
	12-hidroxi-11-metoxispermostricina	384,20491	

A *Strychnos brasiliensis* é conhecida popularmente por diferentes nomes, entre eles: quaçá, quina-cruzeiro, anzol-de-lontra, salta-martinho, esporão-de-galo e pula-pula. É utilizada em muitas regiões como um remédio. Rodrigues, Carvalho e Botrel (2001) registram a utilização da casca da raiz para males do estômago. Essa planta é arbustiva no início de sua vida, podendo passar a liana quando mais desenvolvida (Barddal et al, 2002). Silva et al (2005) comentam o uso dessa espécie ainda como estimulante, tônica, antipirética e antimalárica.

Alcalóides contendo o anel hexahidropirano foram encontrados até agora em três espécies de *Strychnos*: *S. psilosperma*, *S. splendens* e *S. brasiliensis*. Esta última sendo a primeira espécie americana em que bases terciárias com um esqueleto diferente do esqueleto da diabolina foram relatados. Esse fato pode ser interpretado como uma ligação distante entre várias áreas dispersas do gênero, mas se a falta de bases quaternárias e de alcalóides do tipo da diabolina for levada em conta, isso poderia levar a dúvidas quanto à real origem geográfica da espécie

(Iwataki e Comin, 1971). A figura 1 mostra ilustrações das folhas, frutos e flores de *Strychnos brasiliensis*.



<http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>

Figura 1: Ilustração das partes de *Strychnos brasiliensis*

1.5 *Strychnos pseudoquina* St. Hil.

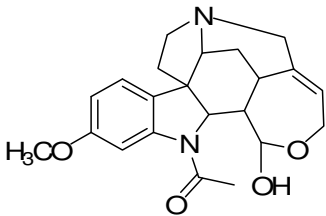
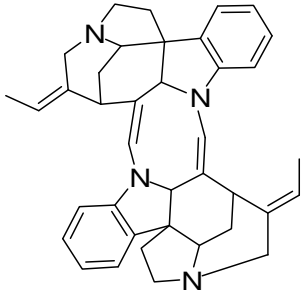
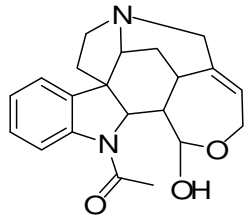
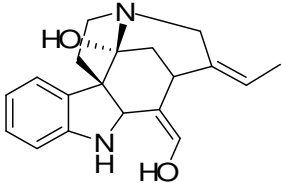
Strychnos pseudoquina St. Hil. (Loganiaceae) é uma árvore de tamanho médio, entre 3 a 5 metros de altura (Lorenzi, 1998), com copa frondosa, caule e galhos tortuosos, casca espessa e mole; folhas opostas, flores pequenas, brancas ou branco-esverdeadas, perfumadas. Os frutos são comestíveis e consistem em pequenas bagas globosas, lisas, escuras quando maduras; contêm polpa amarela envolvendo as sementes.

A planta cresce no Cerrado brasileiro onde é conhecida pelos nomes populares de “quina-do-campo”, “falsa-quina”, “quina-branca” e “quina-do-cerrado” (Silva et al, 2005).

O chá de suas folhas é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de malária e para preparação da chamada “agua inglesa”, largamente utilizada no Brasil como um tônico e febrífugo e também para afecções do fígado e baço, assim como distúrbios gastrointestinais, com destaque para suas propriedades antiulcerogênicas (Nicoleti et al, 1984 e Silva et al, 2005).

Estudos prévios demonstraram não haver presença de quinina na casca das raízes, do tronco, e dos galhos, mas um número de alcalóides indólicos, principalmente do tipo *nor*-dihidrotoxiferina (Nicoleti et al, 1984). Investigação prévia desta planta mostrou a presença dos alcalóides bisnordihidrotoxiferina, diabolina e 11-metoxidiabolina, assim como os flavonóides isorhamnetina e estricnobilflavona. A presença de alcalóides, entretanto, é um alerta contra o uso indiscriminado dessa espécie como medicinal (Silva et al, 2005). O quadro 2 mostra os alcalóides já isolados de *Strychnos pseudoquina*.

Quadro 2: Alcalóides já isolados de *Strychnos pseudoquina*

Fonte	Nome	Massa	Estrutura
<i>Strychnos pseudoquina</i>	11-metoxidiabolina	382,18926	
	bisnordihidrotoxiferina	552,3253	
	diabolina	352,17869	
	3,17-dihidroxisenquerina	310,16813	

Strychnos pseudoquina é a espécie com o maior percentual de citações de uso na medicina caseira local. Pertence a mais evoluída subclasse das *Magnoliophyta sensu* Cronquist (Asteridae) dentro da ordem Gentianales, rica em

iridóides, que no gênero citado possui propriedades relaxantes musculares e curarizantes (Barroso et al., 1986; Souza, 2007).

A figura 2 mostra ilustrações das folhas, galhos e frutos de *S. pseudoquina*.



<http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>

Figura 2: Frutos, folhas e galhos de *Strychnos pseudoquina*

2 Objetivos

1- Desenvolver novas estratégias cromatográficas de seleção e triagem de novos produtos, a partir da implementação de técnicas hifenadas e de derreplicação.

2- Implementar metodologias analíticas inovadoras nas técnicas espectrométricas e espectroscópicas mencionadas, que permitam determinar qualitativamente as micromoléculas em *S. brasiliensis* e *S. pseudoquina*.

3- Obter o perfil metabólico de *S. brasiliensis* e *S. pseudoquina*, selecionar e elucidar estruturas de micromoléculas presentes nas duas espécies.

4- Fortalecer a nossa base de dados, enriquecendo mapas metabolômicos em construção e contribuindo no entendimento da produção metabólica de micromoléculas com potenciais atividades farmacológicas.

3 Materiais e Métodos

3.1. *Strychnos brasiliensis*

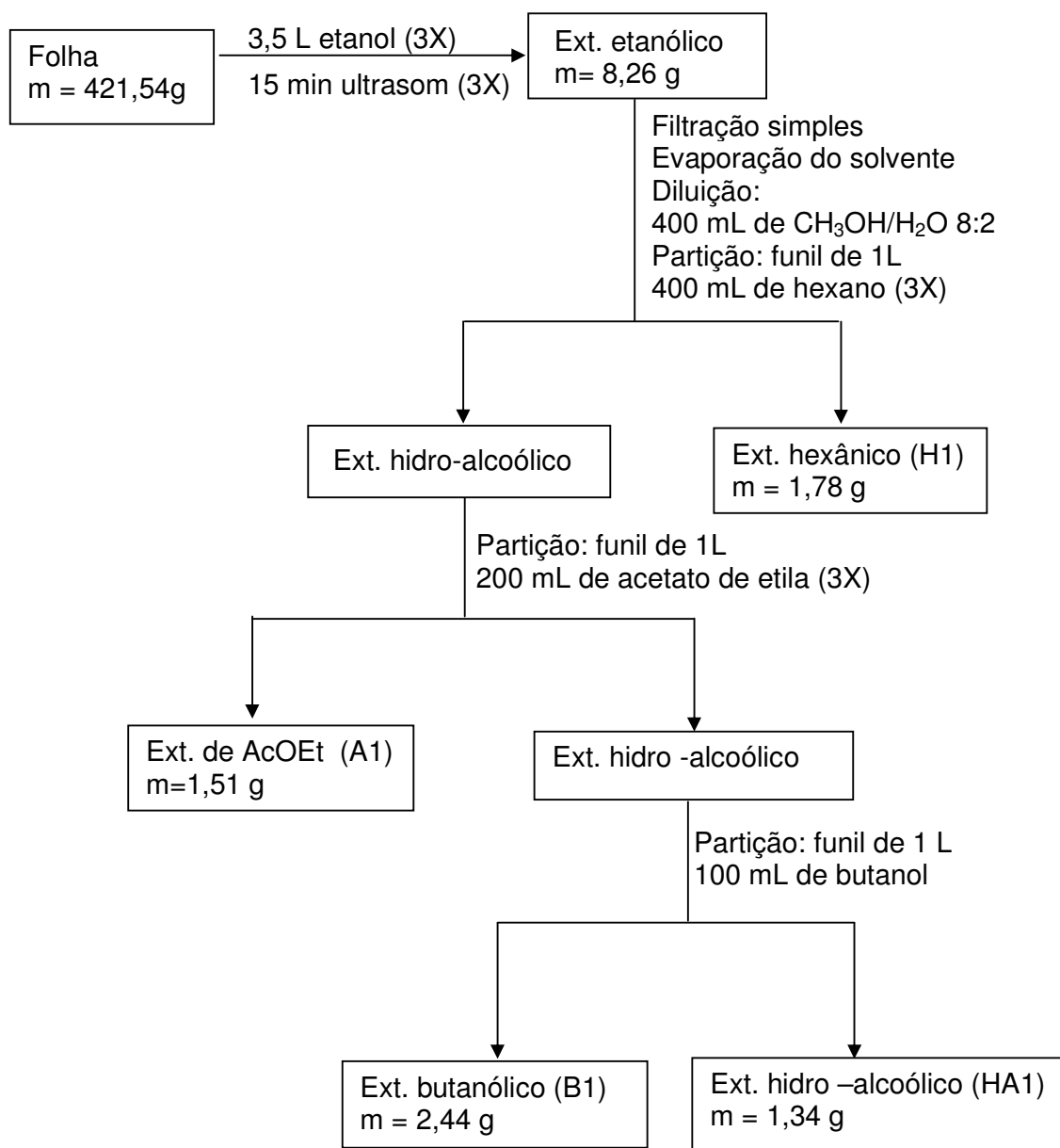
As folhas e os galhos de *Strychnos brasiliensis* utilizados nos experimentos descritos, foram coletados na Reserva Ecológica de Mogi Guaçu e a espécie identificada pela Profa. Dra. Inês Cordeiro, em 2005.

A estratégia inicial adotada foi aquela proposta nos protocolos do NuBBE: extração dos galhos e das folhas com o uso de etanol. O mesmo procedimento foi utilizado para ambas as partes da planta: inicialmente os galhos e as folhas, previamente secos ao ar, foram triturados, em seguida foram colocados em frascos e adicionou-se etanol até cobrir por completo o conteúdo de ambos. Os frascos foram colocados no ultra-som por 15 minutos e em seguida foram submetidos a uma filtração simples. Os filtrados foram colocados em evaporador rotatório para redução do volume final. O procedimento foi repetido três vezes reutilizando-se o etanol. Ao final da operação foi possível obter 8,26 g de extrato etanólico bruto das folhas e 7,34 g de extrato etanólico bruto dos galhos.

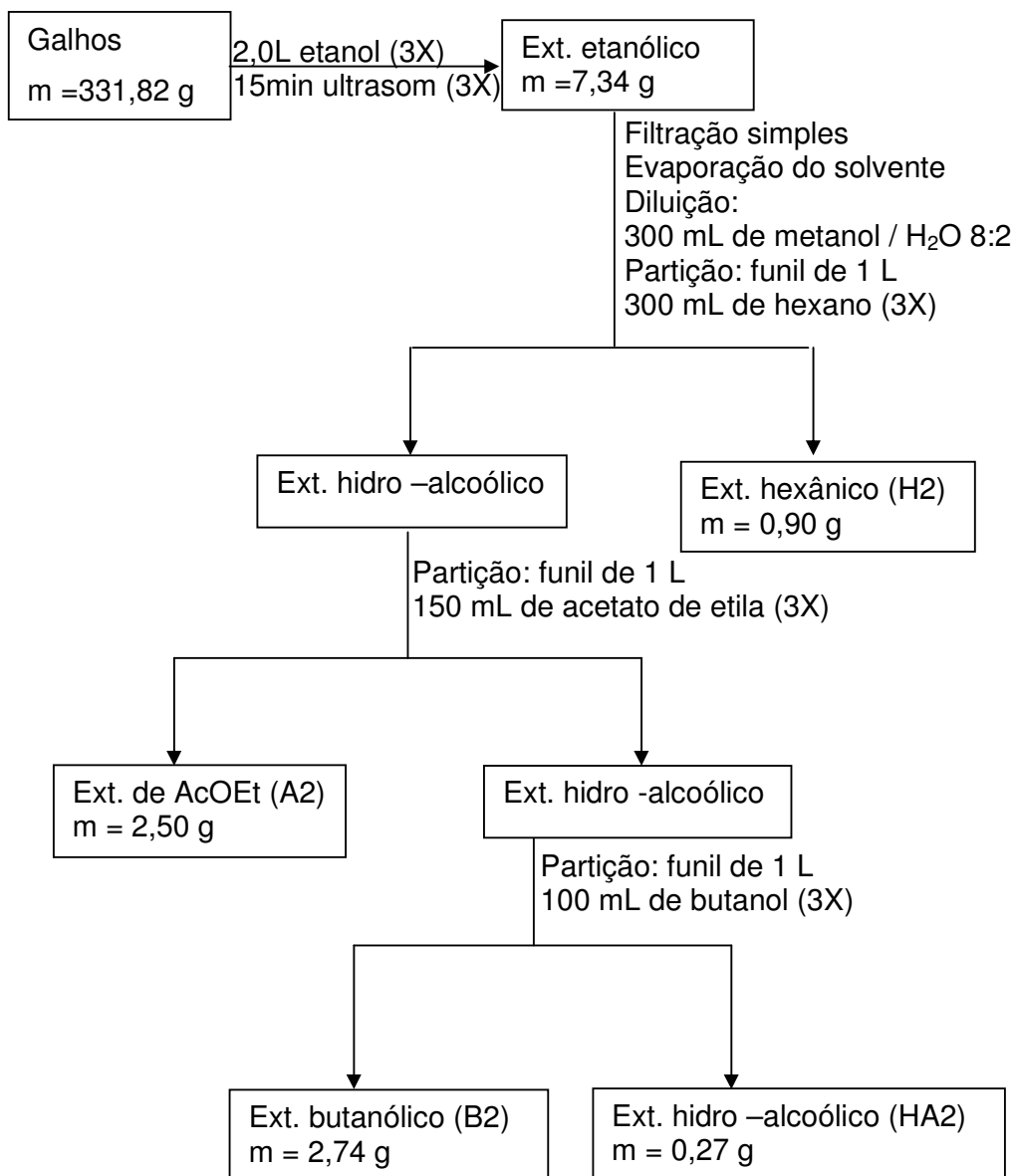
Os extratos brutos foram submetidos à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo utilizado, como fase móvel, uma proporção de hexano/acetato de etila 9:1, 7:3, 1:1 e 3:7. Fez-se eluição dos extratos dos galhos e das folhas na mesma placa para comparação utilizando, como agente de revelação, o reagente de anisaldeído e Dragendorff.

A seguir, conforme os protocolos estabelecidos pelo NuBBE, fez-se extração líquido - líquido dos extratos das folhas e dos galhos utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, acetato de etila e butanol.

Os fluxogramas 1 e 2 mostram as etapas efetuadas para extração das folhas e dos galhos de *Strychnos brasiliensis*.



Fluxograma 1: Obtenção do extrato bruto a partir das folhas trituradas de *Strychnos brasiliensis* e partição líquido – líquido com acetato de etila, hexano e butanol



Fluxograma 2: Obtenção do extrato bruto a partir dos galhos triturados de *Strychnos brasiliensis* e partição líquido – líquido com acetato de etila, hexano e butanol

3.2. *Strychnos pseudoquina*

As folhas e galhos de *Strychnos pseudoquina* foram coletados na Reserva Ecológica de Mogi Guaçu e identificada pela Profa. Dra. Inês Cordeiro, em 2005.

Os extratos etanólicos (EtOH/H₂O 80:20) das folhas (77,5 mg) e dos galhos (74,6 mg) de *S. pseudoquina* foram obtidos da extratoteca do NuBBE, localizada no Instituto Botânico de São Paulo.

As duas amostras foram submetidas à análise em CCD, depois analisadas em CLAE para determinação de um gradiente de separação apropriado a ser submetido à técnica EMAR/CLAE-DAD.

3.3 Avaliação da capacidade antioxidante usando o radical estável DPPH

Antes de aplicar o teste com DPPH aos extratos brutos das duas espécies analisadas, fez-se primeiramente um teste com β -caroteno com o intuito de saber sobre o potencial antioxidante das matrizes. Nesse experimento, placas cromatográficas foram nebulizadas com o reagente e deixadas expostas ao ar por 15 minutos.

Os resultados ajudaram a orientar na seleção das matrizes antioxidantes promissoras que, seguidamente, foram submetidas ao teste com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

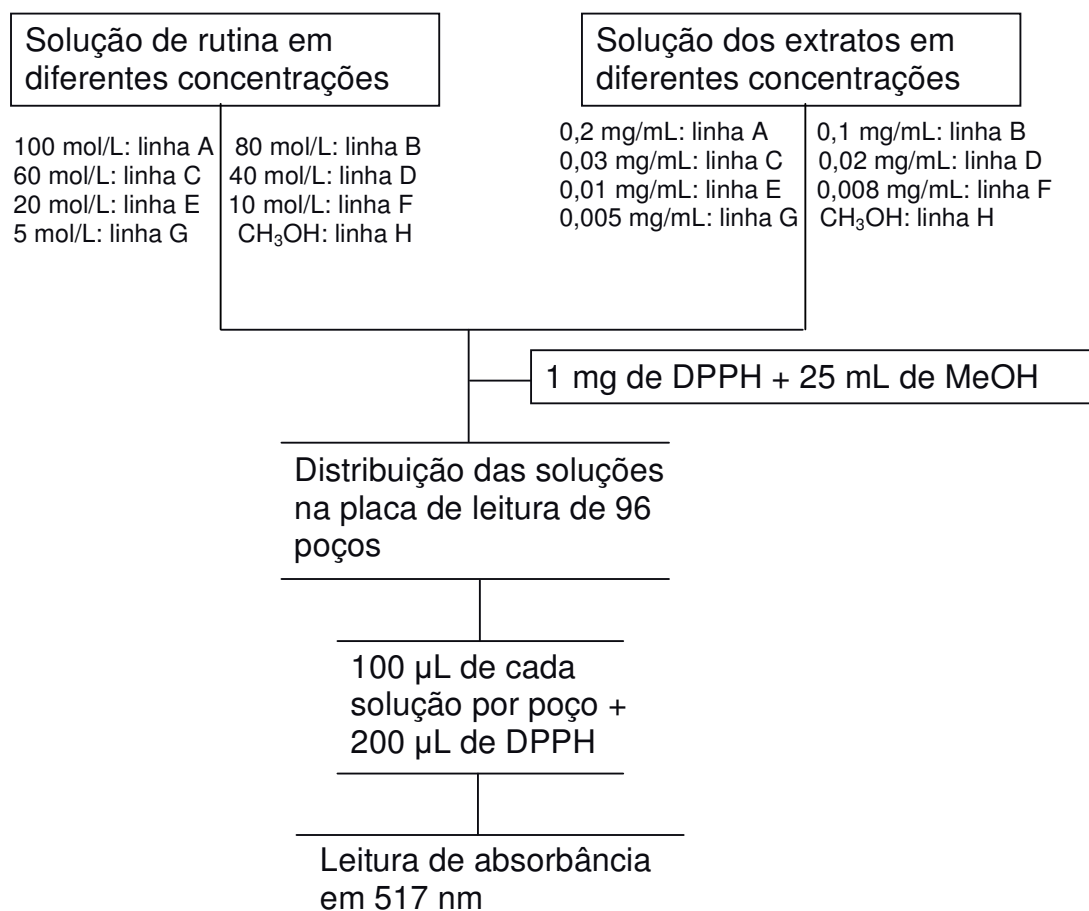
O experimento foi adequado à escala de uma micro-placa de diluição de 96 poços com o intuito de agilizar a leitura de absorbância através do nosso leitor de ELISA. Foram preparadas soluções de rutina, utilizada como padrão, em concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mol/L. A mesma micro-placa foi utilizada para preparar soluções das frações a serem analisadas. As concentrações preparadas foram de 0,005, 0,008, 0,01, 0,02, 0,03, 0,1 e 0,2 mg/mL.

Em cada coluna da micro-placa de leitura, identificada por um número, foi pipetado o padrão ou extrato e, cada linha identificada por letras, continha uma diferente concentração das amostras. A última linha, H, continha somente metanol, utilizado como branco.

O preparo do DPPH foi feito em recipiente envolto em papel alumínio para proteger a substância da luz. A solução foi feita misturando-se 1 mg de DPPH e 25 mL de metanol grau CLAE. Essa quantidade de solução é suficiente para uma micro-placa de leitura de 96 poços.

Em seguida foram transferidos 100 μ L de cada uma das soluções dos extratos e dos padrões por poço, em triplicata, para a placa, utilizando um pipetador automático de oito canais.

Seguidamente, foram transferidos 200 μ L da solução de DPPH, por poço, utilizando-se um pipetador automático de 12 canais. A placa foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos e, após esse tempo procede-se à leitura em leitor de ELISA a 517 nm (Fernades et al, 2008). A coleta e análise dos resultados foi realizada pelo software KC4, versão 3.4 (Bio Tek). O procedimento é apresentado a seguir no fluxograma 3.



Fluxograma 3: Procedimento experimental utilizado para a avaliação de atividade antioxidante de todas as frações de *S. brasiliensis* e dos dois extratos de *S. pseudoquina*.

Para obterem-se os valores de porcentagem de redução de DPPH a partir dos valores de absorbância obtidos, procede-se o cálculo a seguir, tomando como exemplo os valores da fração acetato de etila dos galhos de *Strychnos brasiliensis*.

Tabela 1: absorbâncias medidas para a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* para demonstração do cálculo de % de redução de DPPH

AcOEt galhos				%		média	S
0,048	0,050	0,035	91,38	91,02	93,71	92,04	1,46
controle						0,557	0,01

$$\begin{aligned}\%_{seq-1} &= \frac{A_{controle} - A_{amostra-1}}{A_{controle}} * 100 & \%_{seq-2} &= \frac{A_{controle} - A_{amostra-2}}{A_{controle}} * 100 \\ \%_{seq-1} &= \frac{0,557 - 0,048}{0,557} * 100 & \%_{seq-2} &= \frac{0,557 - 0,050}{0,557} * 100 \\ \%_{seq-1} &= 91,38 & \%_{seq-2} &= 91,02\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\%_{seq-3} &= \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} * 100 \\ \%_{seq-3} &= \frac{0,557 - 0,035}{0,557} * 100 \\ \%_{seq-3} &= 93,72\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\%_{seq} &= \frac{\%_{seq-1} + \%_{seq-2} + \%_{seq-3}}{3} \\ \%_{seq} &= 92,04\end{aligned}$$

Exemplo 1: Cálculo da porcentagem de redução de DPPH pelo extrato acetato de etila dos galhos de *Strychnos brasiliensis*

Para cada uma das concentrações testadas faz-se o mesmo cálculo e então se procedeu à construção do gráfico mostrado na figura 9 em Resultados e Discussões.

3.4 Ensaio de inibição da polimerização da hematina

Pesaram-se 14,6 mg de hematina (hemina bovina) e diluíram-se em 3,5 mL de NaOH (0,2 mol/L) para preparo de uma solução de 6,4 mM. Essa solução permaneceu ao abrigo da luz por uma hora, para que pudesse reagir.

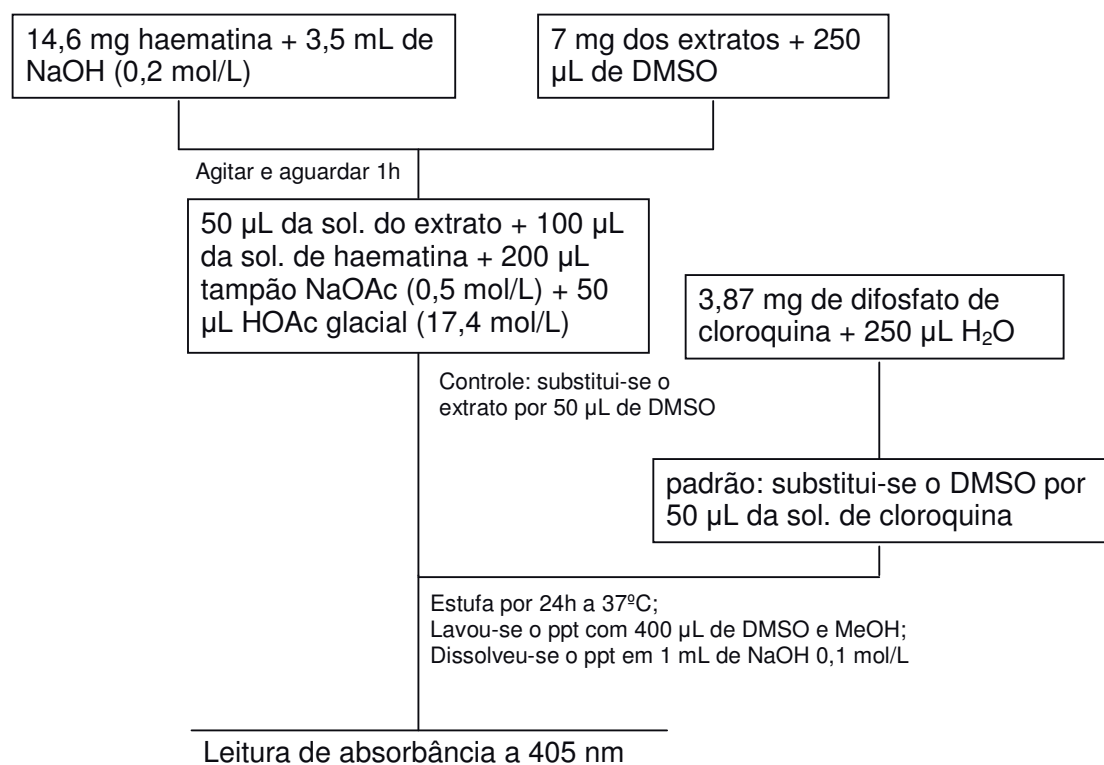
Pesaram-se, então, 7 mg de cada um dos extratos secos. Em seguida dissolveram-se os mesmos em 250 µL de DMSO. De cada um deles foi retirado uma alíquota de 50 µL e colocado em recipiente Eppendorf™ devidamente identificado. Aos extratos adicionou-se 100 µL da solução de haematina previamente preparada, 200 µL de tampão acetato de sódio (0,5 mol/L) e 50 µL de ácido acético glacial (17,4 mol/L) totalizando 400 µL de solução em cada Eppendorf™.

Para o controle fez-se a mesma solução descrita acima utilizando em lugar de 50 µL de extrato 50 µL de solvente puro (DMSO).

Como padrão foi utilizado o difosfato de cloroquina. Para tanto pesou-se 3,87 mg do sal de cloroquina e dissolveu-se em 250 μL de H_2O . Fez-se a mesma solução supracitada utilizando-se 50 μL da solução salina no lugar dos 50 μL de extrato.

As soluções foram todas preparadas em triplicata. Elas foram agitadas para homogeneização e deixadas em estufa a 37°C por 24 horas. O pH final das soluções deve ser igual a 3,8.

Depois de 24 horas descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à lavagem do precipitado, primeiramente com 400 μL de DMSO, deixando-o em centrífuga por seis minutos, depois com a mesma quantidade de metanol, por mais seis minutos em centrífuga. Depois de seco, o precipitado foi dissolvido em 1000 μL de NaOH (0,1 mol/L). 20 μL de cada solução foram transferidos para placa de leitura e diluída com 180 μL de NaOH (0,1 mol/L). A leitura foi feita em leitor de ELISA num comprimento de onda de 405 nm, também utilizando o software KC4 da Bio Tek. O fluxograma 4 mostra como foi procedido o experimento.



Fluxograma 4: Procedimento experimental para a avaliação de inibição de polimerização da hematina aplicado a todas as frações de *Strychnos brasiliensis* e aos extratos de *S. pseudoquina*

Para obterem-se os valores de porcentagem de inibição da hematina a partir dos valores de absorbância obtidos, procede-se o cálculo a seguir, tomando como exemplo os valores da fração acetato de etila dos galhos de *Strychnos brasiliensis*.

Tabela 2: Absorbâncias medidas para a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* para demonstração do cálculo de % de inibição da hematina

	Absorbância				%		média	S
AcOEt galhos	0,160	0,165	0,154	81,460	80,881	82,155	81,499	1
controle	0,851	0,863	0,875				0,863	

$$\%_{inib_1} = \frac{A_{controle} - A_{amostra_1}}{A_{controle}} * 100$$

$$\%_{inib_1} = \frac{0,863 - 0,160}{0,863} * 100$$

$$\%_{inib_1} = 81,46$$

$$\%_{inib_2} = \frac{A_{controle} - A_{amostra_2}}{A_{controle}} * 100$$

$$\%_{inib_2} = \frac{0,863 - 0,165}{0,863} * 100$$

$$\%_{inib_2} = 80,881$$

$$\%_{inib_3} = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} * 100$$

$$\%_{inib_3} = \frac{0,863 - 0,154}{0,863} * 100$$

$$\%_{inib_3} = 82,155$$

$$\%_{inib} = \frac{\%_{inib_1} + \%_{inib_2} + \%_{inib_3}}{3}$$

$$\%_{inib} = 81,50$$

Exemplo 2: Cálculo da porcentagem de inibição de polimerização da hematina pela fração acetato de etila dos galhos de *Strychnos brasiliensis*

3.5 Análise cromatográfica de alta eficiência

As amostras dos extratos das folhas e galhos de *S. pseudoquina* e das frações acetato de etila, hexânica, butanólica e hidro-alcoólica das folhas e dos galhos de *S. brasiliensis* foram preparadas pesando-se 5,0 mg de cada matriz e diluindo-as em 2,0 mL de solução de MeOH/H₂O (95:5). As amostras diluídas foram filtradas em membrana porosa de 0,2 µm de diâmetro, para retirar possíveis partículas suspensas. Fez-se a análise, primeiramente para avaliação do perfil cromatográfico e, posteriormente, iniciaram-se os processos de otimização do experimento com o fim de adquirir uma melhor separação das bandas cromatográficas de interesse.

A avaliação dos extratos de *S. brasiliensis* e *S. pseudoquina* foi iniciada utilizando um gradiente exploratório: de 5 a 100% de MeOH em relação à H₂O, em 20 minutos. Um aumento significativo da resolução das bandas cromatográficas foi observado quando 0,1% de ácido acético foi acrescentado à fase móvel.

As figuras 10 a 19 mostram os perfis cromatográficos das oito frações de *S. brasiliensis* e dos dois extratos de *S. pseudoquina*.

Avaliando-se os resultados dos ensaios biológicos aplicados aos extratos, principalmente os de *S. brasiliensis*, foi dada ênfase ao estudo dos extratos de acetato de etila das folhas e dos galhos.

Para posterior análise por EMAR/CLAE-DAD, foi necessário aplicar uma melhor condição cromatográfica que permitisse a máxima separação dos constituintes das amostras que seriam analisadas. Foi utilizada, como fase móvel, H₂O:MeOH a uma razão de fluxo de 3,0 mL/min. A separação foi realizada usando uma coluna monolítica Phenomenex ODS. As melhores condições encontradas para cada extrato são mostradas na tabela 3. Os cromatogramas obtidos para cada extrato são mostrados nas figuras 20 e 21 em Resultados e Discussões.

Tabela 3: Condições utilizadas para análise em EMAR/CLAE-DAD dos extratos brutos dos galhos e das folhas de *S. pseudoquina* e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de *S. brasiliensis*.

Extrato	Condição	
	Tempo (min)	[MeOH]
Folhas <i>S. pseudoquina</i>	0	10
	5	22
	10	43
	15	100
	18	5
	20	5
Galhos <i>S. pseudoquina</i>	0	5
	5	16
	16	66
	18	100
	19	5
	20	5
Fração AcOEt galhos e folhas de <i>S. brasiliensis</i>	0	15
	12	40
	15	40
	16	70
	17	100
	19	100
	20	15

3.6 Detecção *in silico* dos constituintes majoritários

O extrato das folhas de *S. pseudoquina* e a fração AcOEt dos galhos de *S. brasiliensis*, após melhoramento das condições cromatográficas, foram selecionados, para serem analisados através da técnica hifenada EMAR/CLAE-DAD.

O sistema cromatográfico utilizado foi o CBM-20A (SHIMADZU) equipado com uma bomba binária, detector DAD (SPD-M20A), alça de amostragem de 20 µL e controlado pelo programa LC Solution, versão 1.23 SP1 da SHIMADZU.

A coluna utilizada nessa análise foi a mesma empregada em todas as análises cromatográficas prévias: coluna monolítica Phenomenex ODS Onyx (100 x 4.60 mm) com pré-coluna do mesmo material (5 x 4.60 mm), e os gradientes de eluição utilizados foram aqueles compilados na tabela 3.

Os espectros de massa foram obtidos no EMAR-IES-TOF (Bruker Daltonics) fazendo uso de ionização por *eletro-spray*. Ar comprimido (pressão 2 bar) foi utilizado para ajudar na nebulização. O controle do instrumento, aquisição de dados e processamento foram feitos empregando o programa Xmas version 6.1.0 (Bruker Daltonics). Os parâmetros de aquisição utilizados foram: voltagem do capilar, 4500 V; voltagem do prato final, 4000 V; potencial de saída do capilar, 300 V; temperatura do gás de secagem (N₂), 150 °C; fluxo de nitrogênio, 4 L/min; e transferência 90 µs. Os espectros foram adquiridos na faixa de 100-1200 Da.

A detecção foi feita através das massas de alta resolução emuladas pelo Bruker Data Analysis, obtidas do espectro de massas que, depois de analisadas, e contrastadas com aquelas compiladas no dicionário de produtos naturais, forneceram classes moleculares isoméricas.

Para definir entre as classes de compostos detectados, foi realizada uma segunda ionização (EMAR-EM-EM), fragmentando seletivamente esses íons e, através de propostas mecanísticas racionais, justificou-se a molécula detectada *in situ* (Choi et al 2004, Yan et al, 2006).

A abordagem *in silico*, para cada íon majoritário, forneceu um grande número de metabólitos que foi diminuído com um estudo prévio do perfil químico do gênero,

destacando, nesse caso, a presença de alcalóides indólicos, bisindólicos, indoloquinolínicos e isoquinolínicos, assim como flavonóides (Iwataki et al, 1971).

Devido ao grande número de informações, concluiu-se que seria mais fácil, e extremamente útil, iniciar a construção de uma base de dados que reunisse as principais informações utilizadas durante a detecção dos metabólitos majoritários das duas espécies de *Strychnos* abordadas nesse trabalho.

3.7 Construção da base de dados

Para auxiliar no processo de derreplicação, foi observada a necessidade de construir uma base de dados que reunisse, numa única ferramenta, algumas das informações cruciais para o sucesso da detecção micromolecular em *Strychnos*.

Com base no grande número de informações disponíveis, algumas restrições foram aplicadas, de modo que a confecção dessa base se tornasse viável.

O primeiro passo seria decidir quais estruturas seriam incluídas na base de modo que convergissem, com a pesquisa proposta.

A base foi inspirada nas informações que possuíamos dos íons moleculares encontrados nas duas matrizes de *Strychnos*, estudadas através de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida. Observando os íons moleculares disponíveis, escolhendo aqueles que efetivamente se fragmentaram quando foram levados ao experimento EMAR/EM/EM, decidimos quais massas das estruturas fariam parte do trabalho.

As massas escolhidas foram: $m/z = 308, 340, 262, 302$ e 278 para a fração acetato de etila dos galhos de *Strychnos brasiliensis*; $m/z = 358, 392, 396, 412, 320, 354, 358, 374, 336, 370$, e 390 para as folhas de *Strychnos pseudoquina*.

Todas essas massas foram analisadas junto àquelas acumuladas no Dicionário de Produtos Naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>) e todas as estruturas, correspondentes aos dados de massas, foram listadas, restringindo-se apenas a alcalóides, quimiomarcadores do gênero estudado.

Todas as estruturas constantes na base de dados apresentada em anexo, foram formatadas e redesenhadas com a ajuda do *software* ChemDraw Ultra 8.0.

A seguir mostram-se esquemas ilustrativos em sequência com o intuito de explicar o funcionamento da base de dados construída.

No Dicionário de Produtos Naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>), preenchemos os campos com as informações pertinentes. Neste caso, um intervalo de massas no campo *Accurate Mass* e a restrição para alcalóides em *All Text*, como destacado na figura 3.

The screenshot shows the 'Search' page of the DNP database. The 'Structure Matching' dropdown is set to 'Substructure'. The 'Draw Query' area is empty, displaying 'Query Not Defined'. Below this, the 'Combine with Properties' dropdown is set to 'AND'. The 'Add Property...' section contains a table with search criteria:

Property	Comparison	Value	Boolean	Delete
Chemical Name		Browse... Clear	AND	X
All Text		alkaloid Browse... Clear	AND	X
CAS Registry No.		Browse... Clear	AND	X
Molecular Formula		Browse... Clear	AND	X
Melting Point	=	Clear	AND	X
Boiling Point	=	Clear	AND	X
Accurate Mass	Range	308.0 - 308.9 Clear		X

The URL at the bottom of the browser window is: <http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=1009194&si=&>

Figura 3: Página inicial de busca de estruturas no DNP

Uma vez realizada a busca, a página que se abre é aquela que mostra os resultados encontrados. Aqui vemos que 45 alcalóides diferentes foram encontrados para o intervalo de massas entre 308,0 e 308,9 (figura 4).

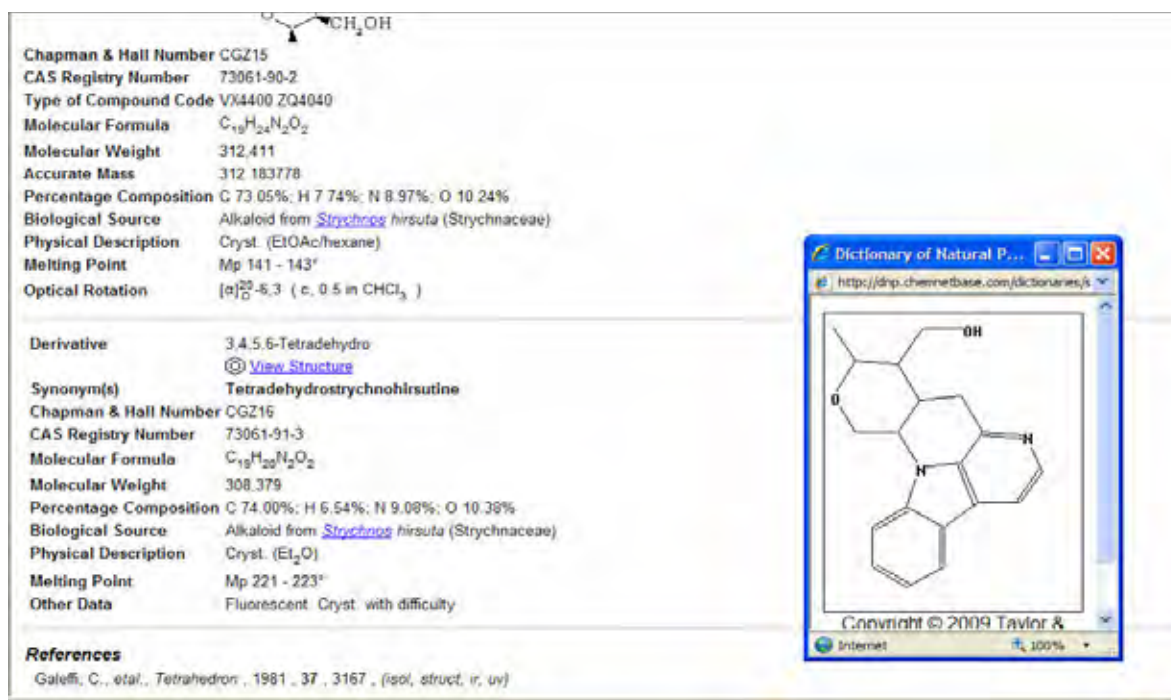
Found 45 matches from 214549 documents.

Details	Name	Molecular Formula	Accurate Mass	Biological Source	Type of Compound
☐	Nitrazane	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Nitrobia schobertii</i>	ZQ7220
☐	Nor-C-fluoriscourarine; (-)-form, 12-Hydroxy	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from roots of <i>Vinca erecta</i> . Major alkaloid of leaves of <i>Hezunia membranacea</i> (Apocynaceae)	ZQ8400
☐	Nor-C-fluoriscourarine; (-)-form, 18-Hydroxy	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from stem bark of <i>Strychnos ngounensis</i> and root bark of <i>Strychnos gossweileri</i> , also from <i>Strychnos angolensis</i> (Strychnaceae)	VX5260
☐	Nor-C-fluoriscourarine; (-)-form, N ⁶ -Oxide	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from <i>Vinca erecta</i> and <i>Leuconotis griffithii</i> . Also isol. from <i>Ervatamia hirta</i> (Apocynaceae)	VX5260
☐	Pericidine	$C_{19}H_{22}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from the stem bark of <i>Kopsia arborea</i>	VX9400
☐	Polyandrocarpane A; Debrone	$C_{18}H_{16}N_2O_3$	308.116093	Alkaloid from <i>Polyandrocarpa</i> sp.	ZV5000
☐	Rhazinane; (R)-form, 3-Oxo	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from <i>Kopsia desyrrachis</i> and a <i>Rauwolfia serpentina</i> x <i>Rhazya stricta</i> hybrid	ZQ8400
☐	Roemerine; (R)-form, N-De-Me, N-carbamoyl	$C_{19}H_{20}N_2O_3$	308.116093	Alkaloid from the stem bark and root bark of <i>Hevalobus crispiflorus</i> (Annonaceae)	VX2640
☐	Rosbiline	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from the root bark of <i>Strychnos variabilis</i> (Strychnaceae)	ZQ4040
☐	Rosbiline; 16-Epimer	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Strychnos floribunda</i> stem bark and from <i>Strychnos malapensis</i> (Strychnaceae)	ZQ4040
☐	Spiquetidine; (L)-form	$C_{19}H_{20}N_2O_3$	308.116093	Alkaloid from the bark of <i>Bolivia Dupetia aplysiata</i> (Annonaceae)	ZQ8400
☐	Strychnohirsutine; 3,4,5,6-Tetrahydro	$C_{19}H_{22}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from <i>Strychnos hirsuta</i> (Strychnaceae)	ZQ4040
☐	Taberpsychine	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Tabernaemontana psychotriplis</i> , <i>Tabernaemontana brachyantha</i> and <i>Conocopharyngia dunitziana</i> (Apocynaceae)	VX5140
☐	Taberpsychine; 19Z-isomer	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Minor alkaloid from roots of <i>Gelsemium elegans</i> (Lepanaceae)	ZQ4040
☐	Tangutrine	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Nitrobia tangutorum</i>	VX5100
☐	Tetraphylline	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Rauwolfia tetraphylla</i> and several other <i>Rauwolfia</i> spp. (Apocynaceae)	ZQ8400
☐	Tetraphylline; 12-Hydroxy, 17-ketone, N-De-Me	$C_{19}H_{22}N_2O_2$	308.152478	Alkaloid from the leaves of <i>Rauwolfia cumminisii</i> (Apocynaceae)	VX5120
☐	Tombozine; 16-Epimer, N ¹ -Me	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from <i>Ervatamia hirta</i> (Apocynaceae)	ZQ8400
☐	Tombozine; Me ether	$C_{20}H_{24}N_2O$	308.188863	Alkaloid from the stem bark of <i>Rauwolfia cumminisii</i> (Apocynaceae)	ZQ8400

<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search/results.do?id=1009194&props=&struct=&disp=&si=>

Figura 4: Lista de alcalóides com massa entre 308,0 e 308,9 compiladas pelo Dicionário de Produtos Naturais

Clicando sobre o nome de cada composto teremos acesso a maiores informações sobre ele e também a sua fórmula estrutural. A figura 5 mostra as informações disponíveis sobre a estrichohirsutina, a título de exemplo.



Chapman & Hall Number CGZ15
 CAS Registry Number 73061-90-2
 Type of Compound Code V04400 ZQ4040
 Molecular Formula $C_{19}H_{24}N_2O_2$
 Molecular Weight 312.411
 Accurate Mass 312.183778
 Percentage Composition C 73.05%; H 7.74%; N 8.97%; O 10.24%
 Biological Source Alkaloid from *Strychnos hirsuta* (Strychnaceae)
 Physical Description Cryst. (EtOAc/hexane)
 Melting Point Mp 141 - 143°
 Optical Rotation $[\alpha]_D^{25} -5.3$ (c. 0.5 in $CHCl_3$)

Derivative 3,4,5,6-Tetradehydro
 Ⓢ [View Structure](#)
 Synonym(s) Tetradehydrostrychnohirsutine
 Chapman & Hall Number CGZ16
 CAS Registry Number 73061-91-3
 Molecular Formula $C_{19}H_{20}N_2O_2$
 Molecular Weight 308.379
 Percentage Composition C 74.00%; H 6.54%; N 9.08%; O 10.38%
 Biological Source Alkaloid from *Strychnos hirsuta* (Strychnaceae)
 Physical Description Cryst. (Et₂O)
 Melting Point Mp 221 - 223°
 Other Data Fluorescent Cryst. with difficulty

References
 Galeffi, C., et al., *Tetrahedron*, 1981, 37, 3167, (isol, struct, ir, uv)

<http://dnp.chemnetbase.com/entry.do?id=CFL66&method=view&si=>

Figura 5: Página com as informações compiladas no DNP sobre a substância estricnohirsutina, a título de exemplo

Deste ponto procede-se à construção propriamente dita da base de dados. As estruturas encontradas para todas as massas pesquisadas foram redesenhadas e compiladas numa planilha Excel, na qual foram acrescentados o nome da matriz na qual o íon molecular foi encontrado, nome da substância, massa de alta resolução, a matriz de onde essa substância foi isolada e o espectro de massa de cada uma (figura 6).

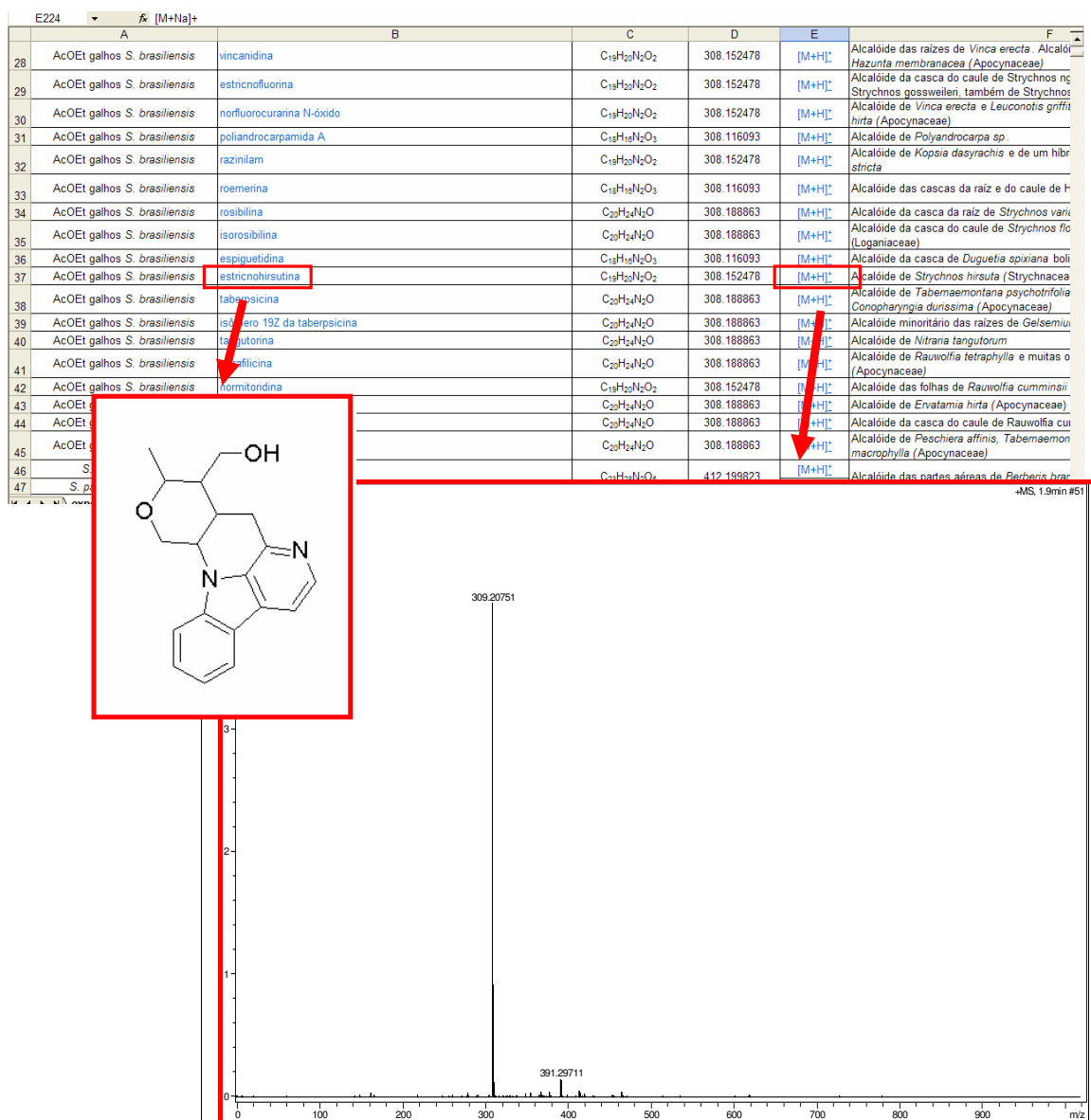


Figura 6: Base de dados mostrando os links para o EM e a estrutura da substância estricnohirsutina a título de exemplo.

De posse dessas informações foi possível determinar, mais facilmente, qual das várias estruturas detectadas poderiam realmente sofrer fragmentações que correspondessem aos espectros que tínhamos em mãos e, portanto, serem as substâncias representadas por eles.

4 Resultados e Discussões

4.1 Avaliação da capacidade antioxidante usando o radical estável DPPH

O teste com o reagente β -caroteno, a fim de determinar a capacidade antioxidante das matrizes estudadas, apresentou resultados significativos apenas para as frações butanólica das folhas (B1) e acetato de etila dos galhos (A2) de *S. brasiliensis* (placa 1) e para o extrato das folhas (4) de *S. pseudoquina* (placa 2), como pode ser observado na figura 7.

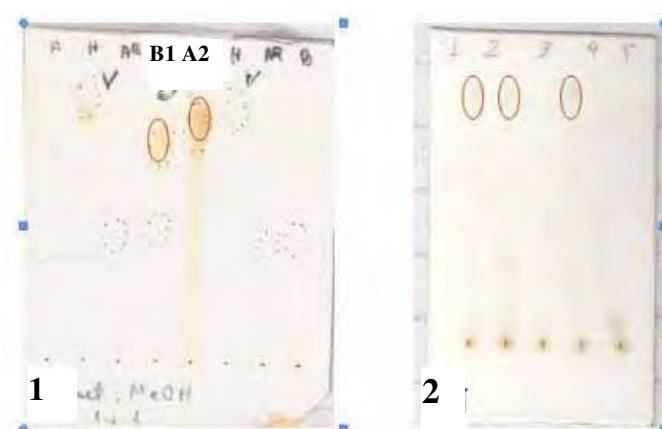


Figura 7: Teste com β -caroteno para as frações AcOEt, hexânica, butanólica e hidroalcoólica de *S. brasiliensis* e para os extratos brutos das folhas e galhos de *S. pseudoquina*

Os resultados ajudaram a orientar na seleção das matrizes antioxidantes promissoras que, seguidamente, foram submetidas ao teste com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o qual se baseia na redução do radical estável DPPH pelo composto antioxidante (figura 8). O DPPH possui coloração lilás e, quando se reduz, muda para amarelo de modo que é possível notar uma mudança na absorbância a qual pode ser monitorada através de espectroscopia UV/Visível (Arouma, Halliwell, e Williamson, 1997).

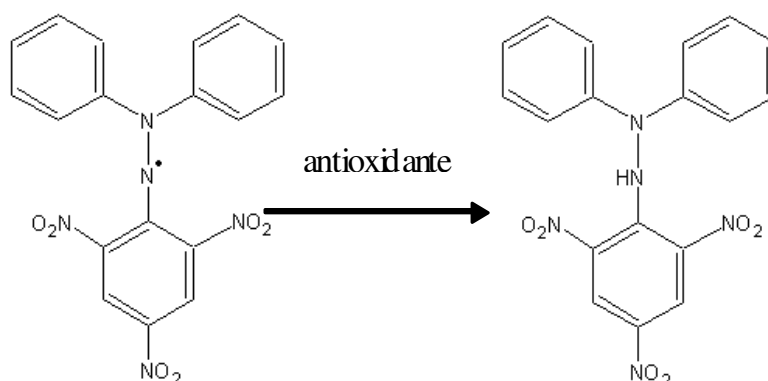


Figura 8: Redução do reagente DPPH

De acordo com o gráfico apresentado na figura 9, o qual compara as atividades antioxidantes dos extratos e frações analisados, concluiu-se que a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* apresenta a maior atividade antioxidante seguido do extrato dos galhos de *S. pseudoquina*. Os demais extratos mostrados no gráfico apresentaram atividade baixa em relação a rutina.

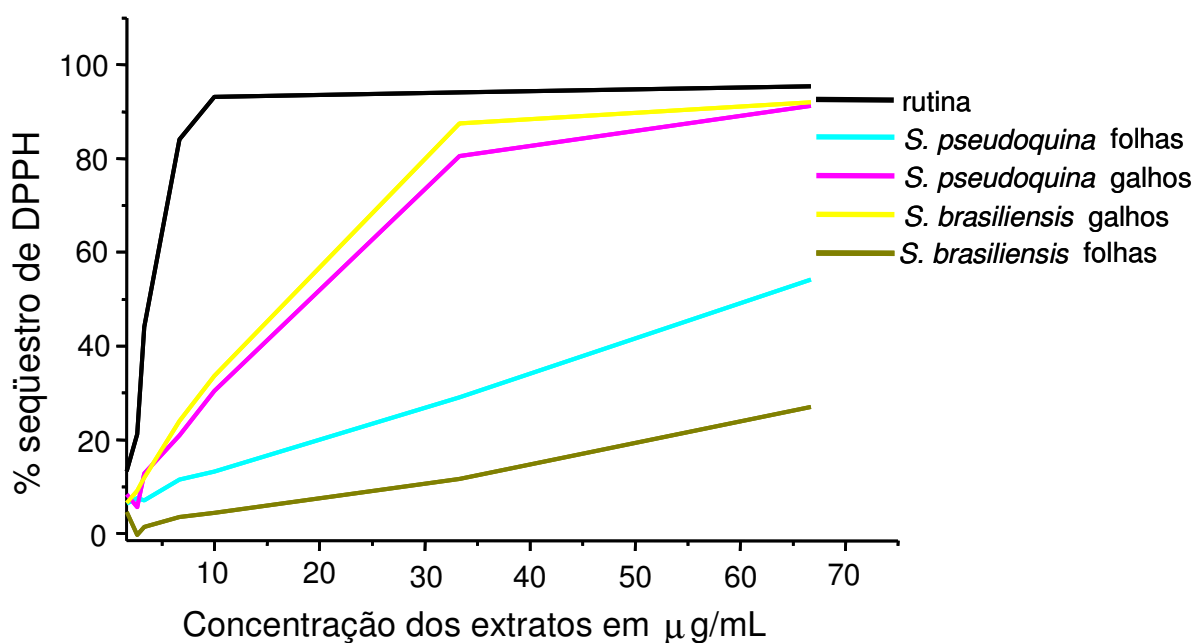


Figura 9: Gráfico da % de redução de DPPH em função da concentração dos extratos das folhas e dos galhos de *S. pseudoquina* e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de *S. brasiliensis*

4.2 Ensaio de inibição da polimerização da hematina

O teste para avaliação de inibição de polimerização da hematina baseia-se na hipótese da presença, no *Plasmodium falciparum*, agente infectante da malária, de uma enzima capaz de polimerizar a hematina livre que se forma no processo de fagocitose da célula infectada. Essa hematina livre, altamente oxidante, é capaz de promover a lise da membrana celular matando a célula e, por consequência, o parasita. A polimerização da hematina livre pelo parasita forma o pigmento malárico conhecido como hemozoína (Egan, Ross e Adams, 1994; Dorn et al, 1998). O ensaio busca matrizes capazes de impedir a polimerização da hematina e assim possibilitar a morte seletiva do *Plasmodium*.

A tabela 4 apresenta os resultados de porcentagem de inibição de polimerização da hematina. Foi possível constatar que a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* apresentou a maior atividade na inibição da polimerização da hematina quando comparado aos demais extratos, ficando abaixo apenas da porcentagem de inibição do padrão, difosfato de cloroquina.

Tabela 4: Resultados do teste para avaliação da inibição da polimerização do heme pelos extratos das folhas e dos galhos de *S. pseudoquina* e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de *S. brasiliensis*.

Amostra	% inibição de polimerização
Difosfato de Cloroquina	96,25 ± 1
AcOEt galhos <i>S. brasiliensis</i>	81,50 ± 1
<i>S. pseudoquina</i> folhas	44,96 ± 3
AcOEt folhas <i>S. brasiliensis</i>	42,41 ± 3
<i>S. pseudoquina</i> galhos	41,95 ± 0

4.3 Análise cromatográfica de alta eficiência

As figuras de 10 a 19 mostram os perfis cromatográficos das frações acetato de etila, hexânica, butanólica e hidro-alcoólica das folhas e dos galhos de *Strychnos brasilienses* e os perfis dos extratos das folhas e dos galhos de *Strychnos pseudoquina*.

Para obtenção desses perfis foi utilizada fase móvel MeOH/H₂O com 0,1% de ácido acético na forma de gradiente exploratório com polaridade decrescente, já que a coluna cromatográfica utilizada era de fase reversa.

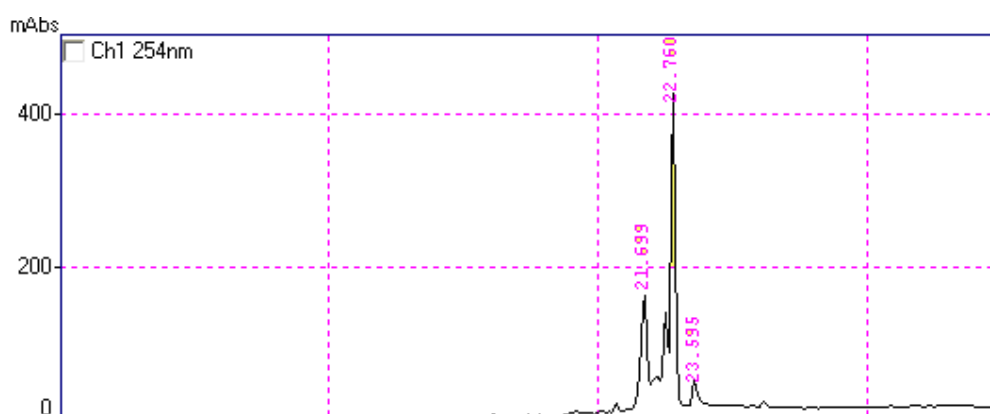


Figura 10: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração acetato de etila das folhas de *S. brasiliensis*

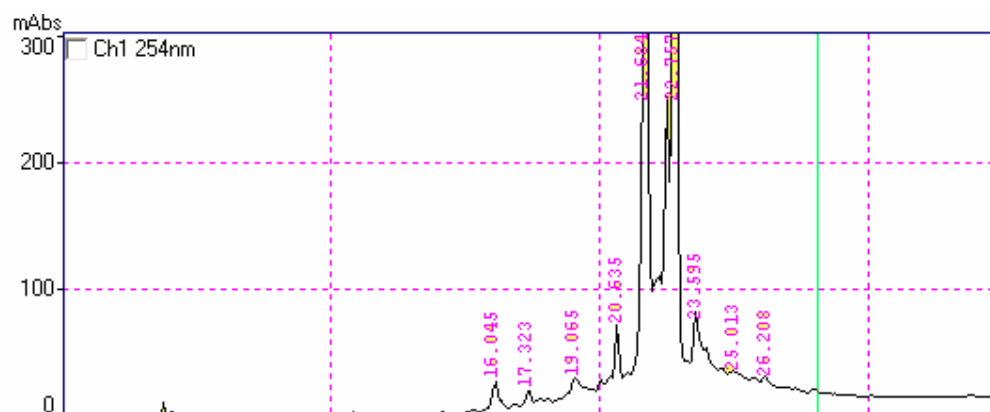


Figura 11: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração hidro-alcoólica das folhas de *S. brasiliensis*

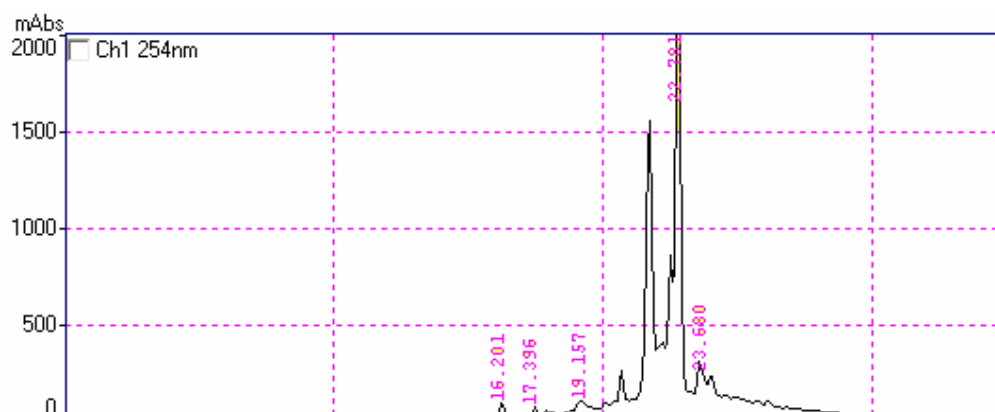


Figura 12: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração butanólica das folhas de *S. brasiliensis*

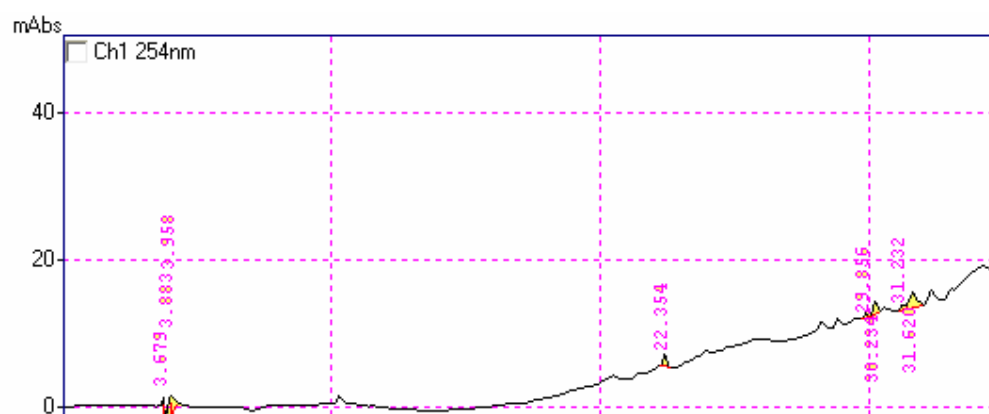


Figura 13: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração hexânica das folhas de *S. brasiliensis*

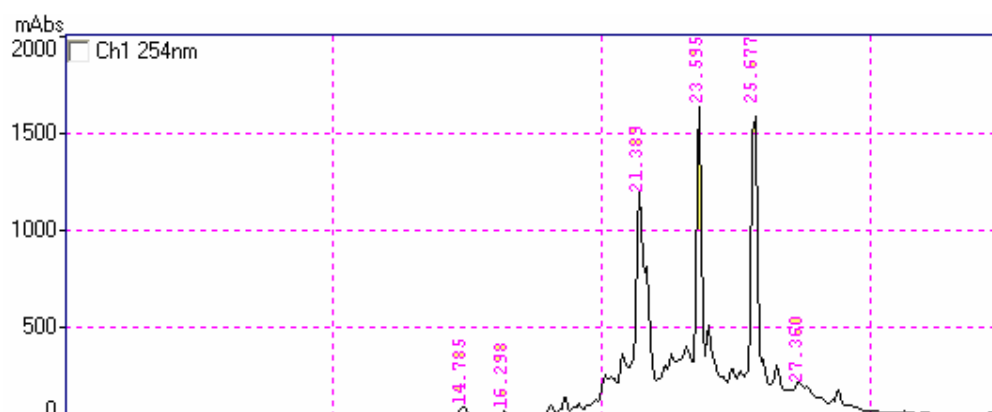


Figura 14: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

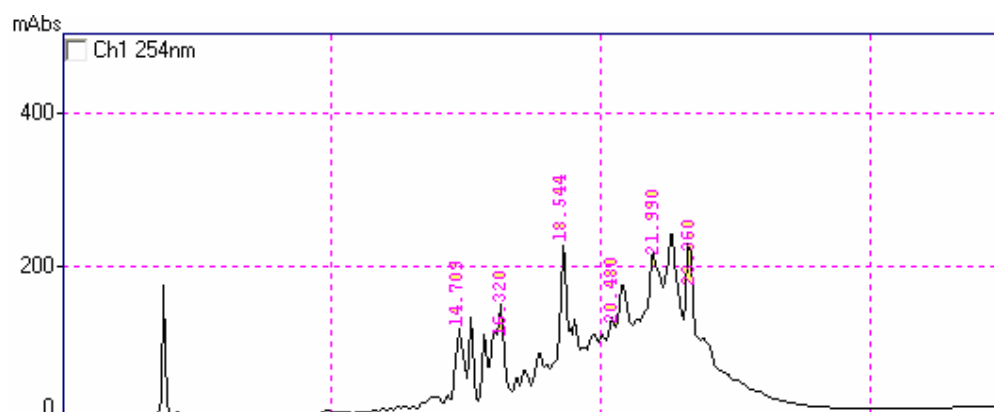


Figura 15: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração hidro-alcóolica dos galhos de *S. brasiliensis*

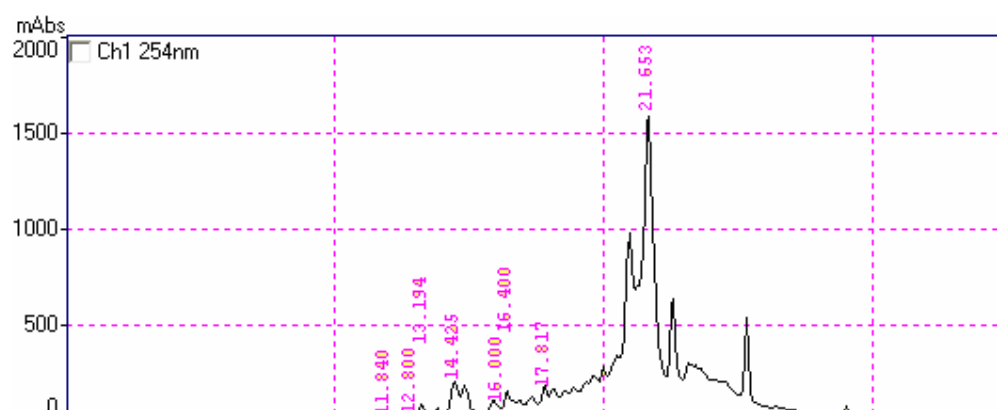


Figura 16: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração butanólica dos galhos de *S. brasiliensis*

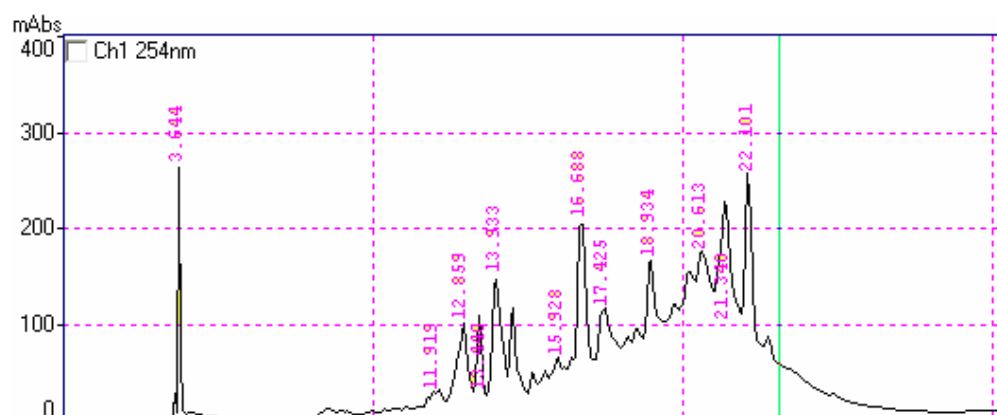


Figura 17: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) da fração hexânica dos galhos de *S. brasiliensis*

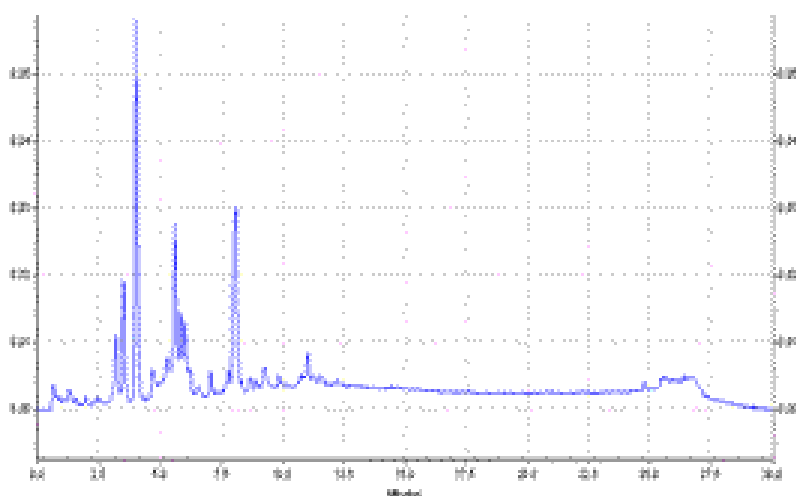


Figura 18: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) do extrato das folhas de *S. pseudoquina*

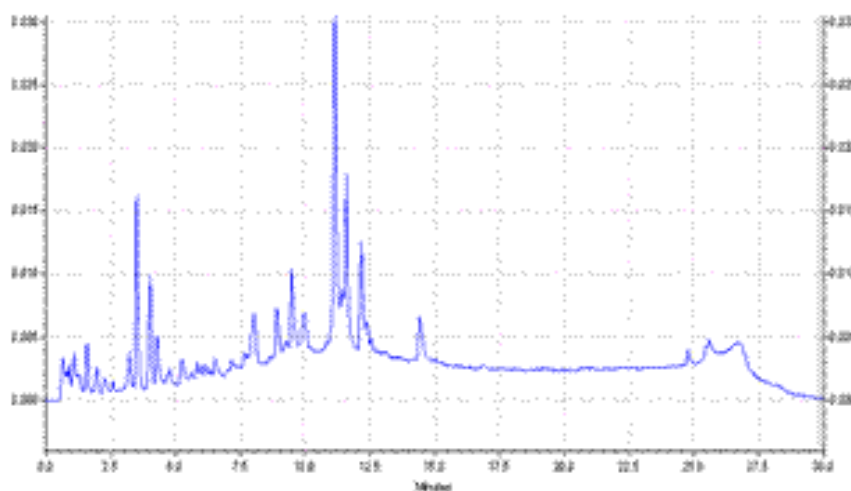


Figura 19: Perfil cromatográfico avaliado em gradiente decrescente de polaridade (MeOH/H₂O) do extrato dos galhos de *S. pseudoquina*

Conhecendo-se os perfis das frações e extratos em estudo, optou-se por fazer um estudo mais aprofundado apenas de algumas das amostras disponíveis.

Comparando-se as frações obtidas da espécie *S. brasiliensis*, escolheram-se apenas a fração acetato de etila dos galhos, devido ao número elevado de marcadores expressivos em seu cromatograma, e das folhas, por se diferenciar ligeiramente dos perfis das outras frações do mesmo órgão, para prosseguimento do estudo.

Então se procedeu a otimização das condições cromatográficas buscando uma maior separação das bandas observadas nos cromatogramas escolhidos.

As figuras 20 e 21 mostram os perfis cromatográficos dos extratos das folhas e galhos de *S. pseudoquina* e das frações AcOEt das folhas e dos galhos de *S. brasiliensis*, adquiridos utilizando-se as condições mostradas na tabela 3 da seção 3.5.

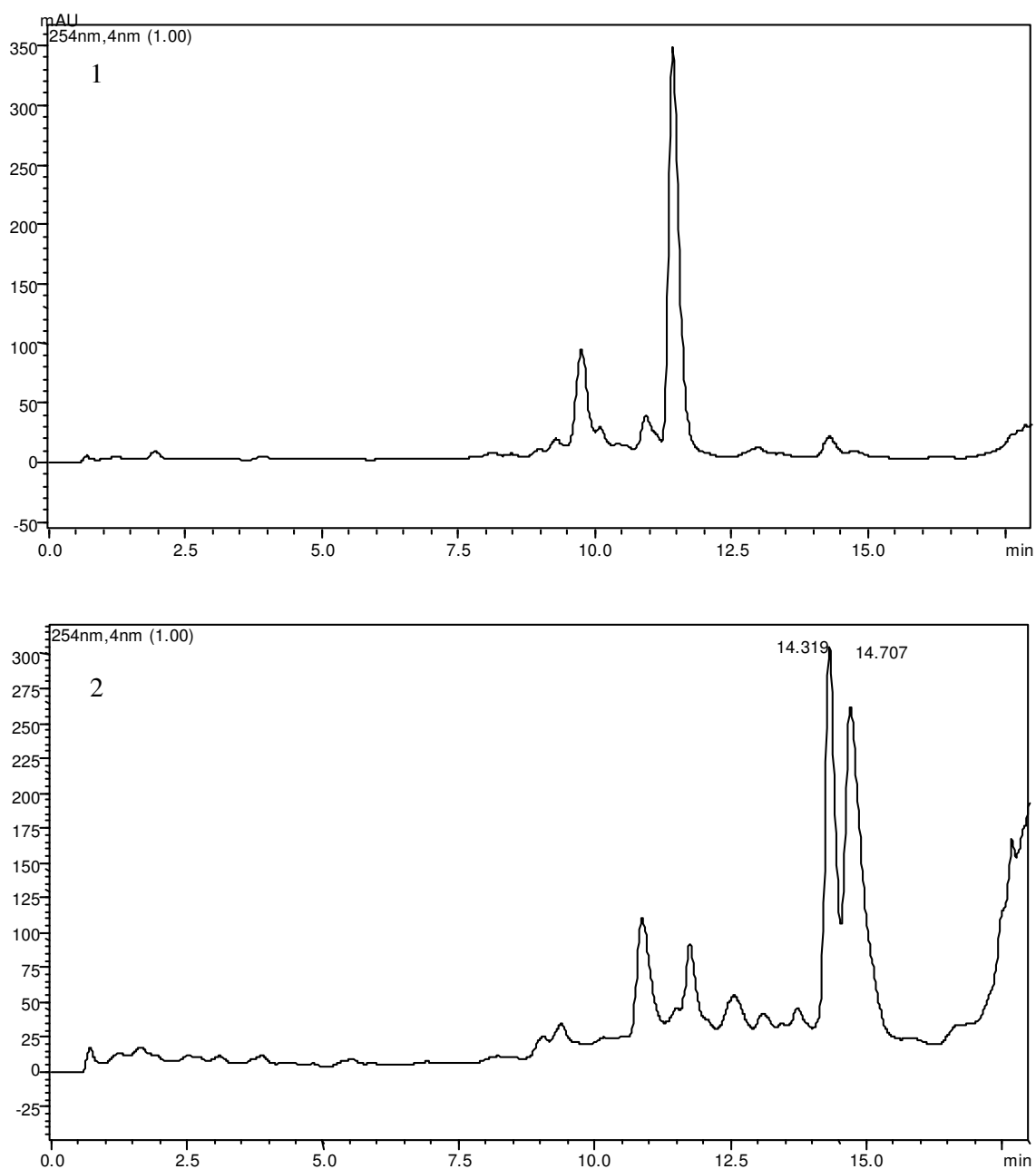


Figura 20: Perfil cromatográfico das frações acetato de etila das folhas (1) e galhos (2) de *S. brasiliensis* depois do aperfeiçoamento das condições cromatográficas.

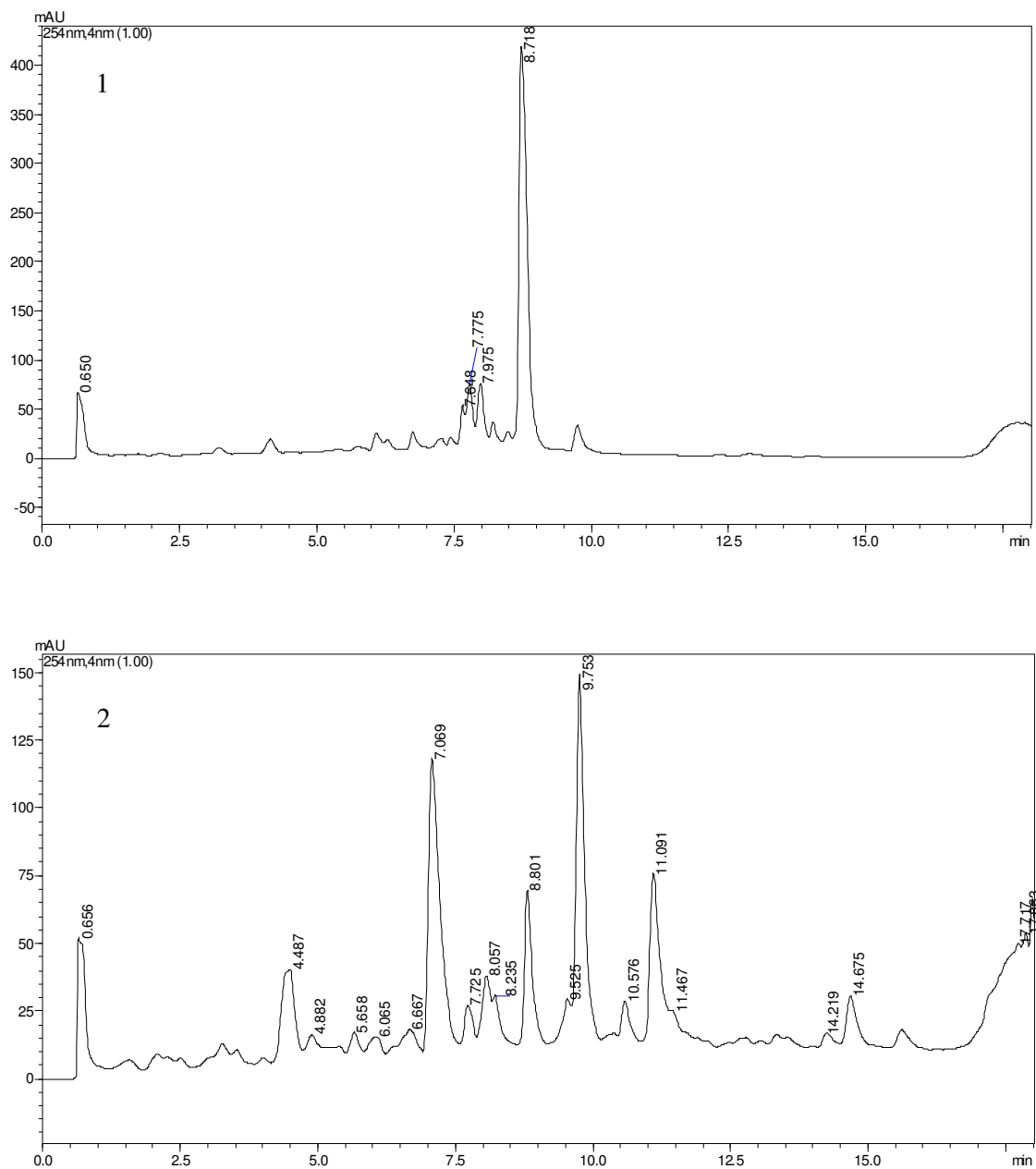


Figura 21: Perfil cromatográfico do extrato das folhas (1) e galhos (2) de *S. pseudoquina* depois do aperfeiçoamento das condições cromatográficas.

Apenas dois desses extratos foram escolhidos para aplicação das técnicas hífenadas e de detecção *in silico* de constituintes majoritários. Além dos bons resultados apresentados nos testes biológicos, principalmente os galhos de *S. brasiliensis*, levou-se em conta a presença de uma única banda muito intensa no cromatograma das folhas de *S. pseudoquina*, quando comparada as demais bandas observadas para esses mesmos extratos, o que despertou a curiosidade a respeito da constituição dessa fração.

4.4 Detecção *in silico* dos constituintes majoritários

Fez-se um estudo comparativo do perfil das duas amostras, levando-se em consideração as massas de alta resolução observadas dos íons mais abundantes apresentados no TIC (*Total Ion Current* ou Contagem de Íons Totais).

Os espectros de massas obtidos por esta técnica hífenada foram realizados no modo positivo. Nesse modo, os adutos preferencialmente formados seriam aqueles oriundos de reações ácido/base, nesse caso protonação, ou adutos formados pela coordenação com cátions, geralmente os da família 1A. (Lopes, Lopes e Vessechi, 2006). Assim, os fragmentos gerados pela ionização por *eletrospray* podem ser oriundos de adutos cationizados formados por H^+ , Na^+ , K^+ , entre outros.

As figuras 22 e 23 mostram os TICs das frações de *Strychnos brasiliensis* e dos extratos de *S. pseudoquina* utilizados para escolha dos íons que seriam analisados mais minuciosamente, passando pela espectrometria de massas tandem. Os tempos de retenção dos íons analisados aparecem destacados nas respectivas figuras.

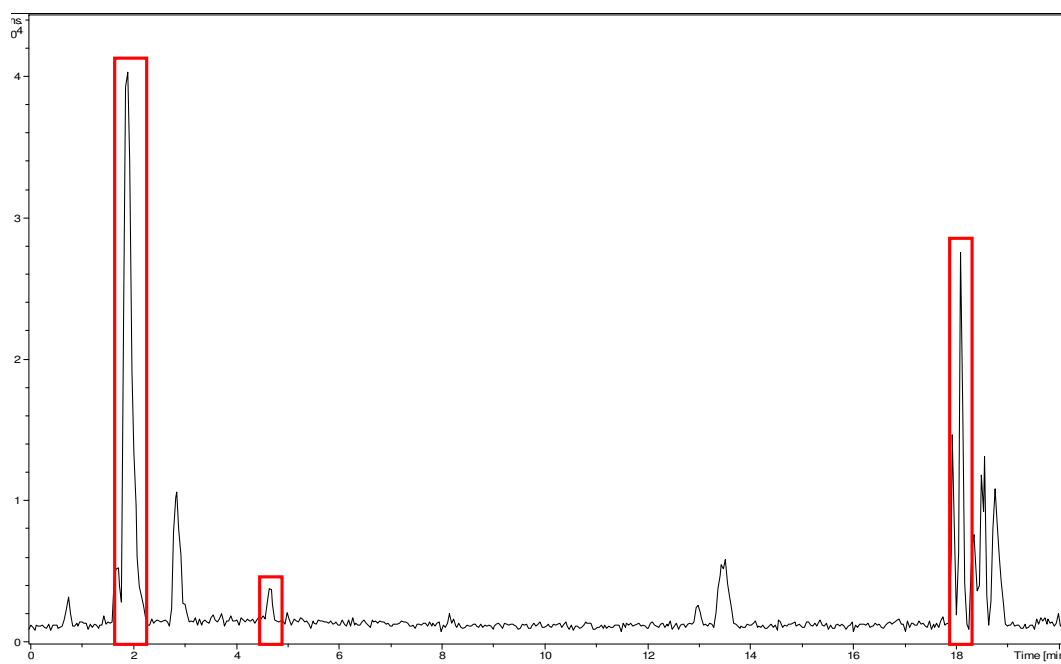


Figura 22: Contagem de íons totais da fração AcOEt dos galhos de *S. brasiliensis*

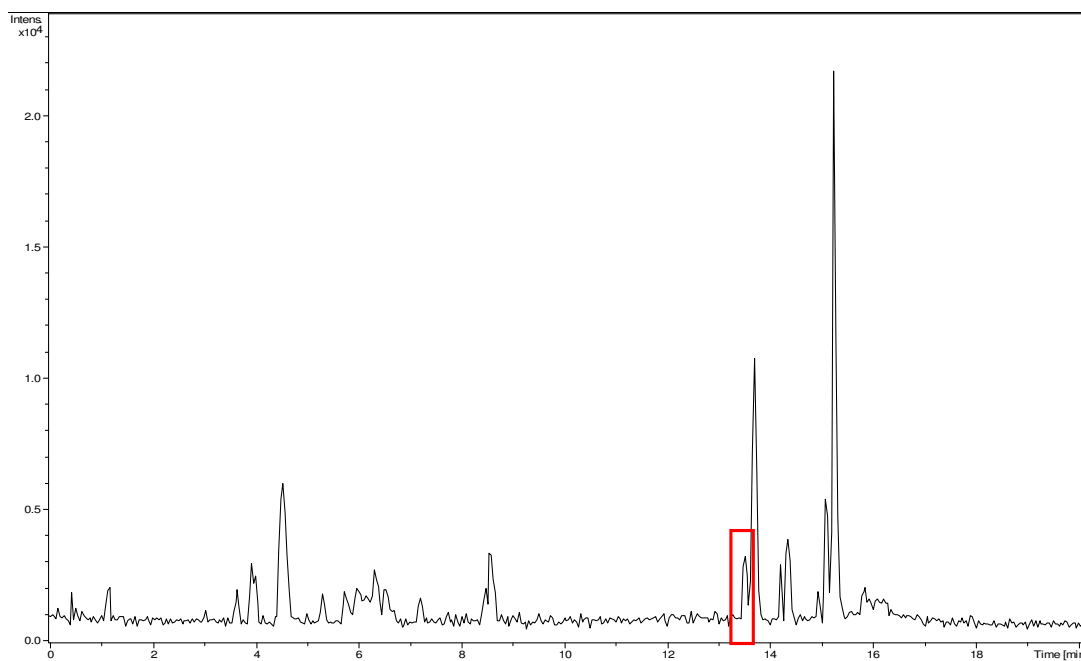


Figura 23 Contagem de íons totais do extrato bruto das folhas de *S. pseudoquina*

4.5 Construção da base de dados

Esta base teve como objetivo, compilar algumas das moléculas detectadas no estudo dos espectros de massas adquiridos para as duas amostras analisadas, levando em conta o quimiotipo mais freqüente em plantas desse gênero: os alcalóides.

Por não compilar apenas substâncias isoladas nas plantas do gênero *Strychnos*, mas sim alcalóides de várias fontes, essa base será de grande ajuda para futuras pesquisas em matrizes que contenham alcalóides complexos como os estudados neste gênero.

Durante o tempo dispensado para a construção dessa ferramenta, foi possível adquirir mais informações a respeito da estrutura básica dessa classe de substâncias e pré-avaliar o tipo de fragmentações que poderiam ocorrer, facilitando na escolha das estruturas que seriam analisadas com maior cuidado em relação a propostas mecanísticas de fragmentação.

As figuras 24 e 25 mostram algumas estruturas, das várias séries homólogas compiladas na base de dados construída, a partir dos íons observados nos fragmentogramas adquiridos dos experimentos EMAR realizados.

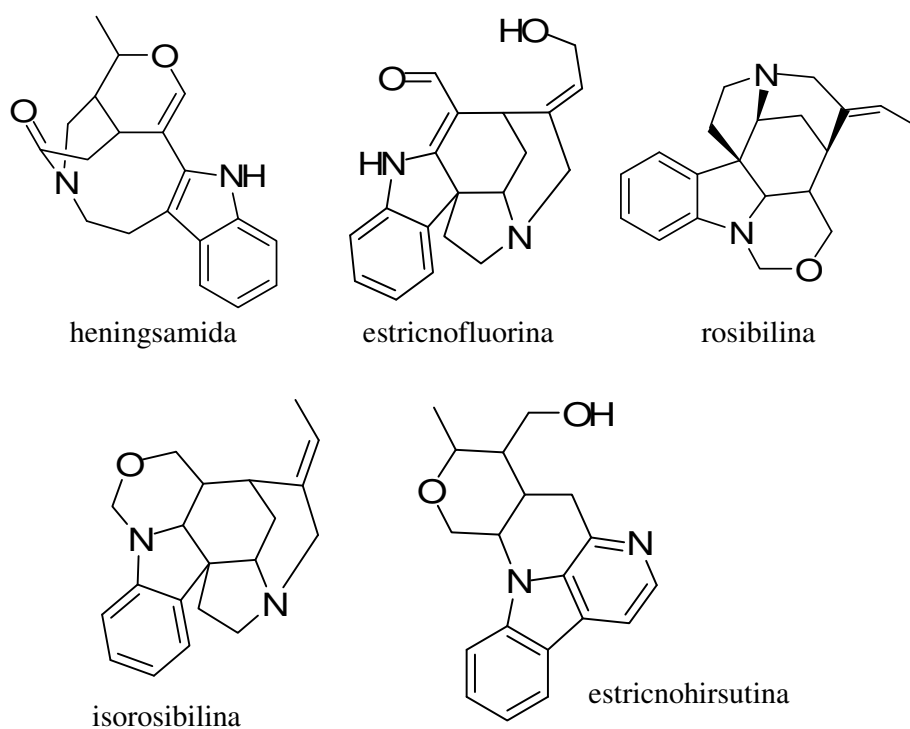


Figura 24: Alguns alcalóides detectados na fração AcOEt dos galhos de *S. brasiliensis*, oriundos do íon $m/z = 309$

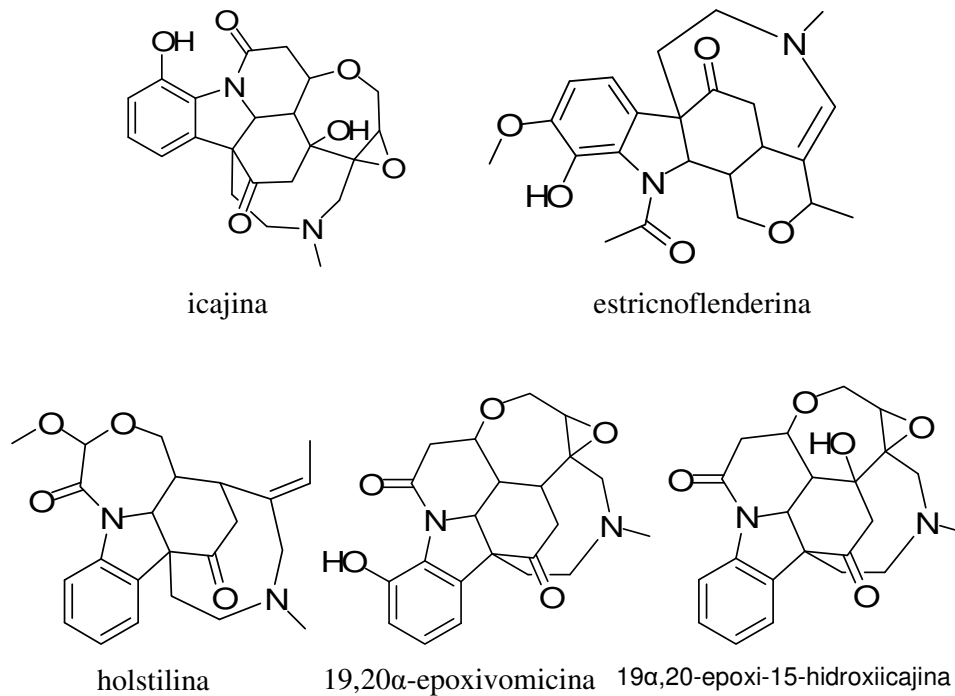


Figura 25: Alguns alcalóides detectados no extrato das folhas de *S. pseudoquina* oriundos dos íons $m/z = 413$ e $m/z = 397$

Esses íons, cujas propostas de fragmentação são mostradas no tópico seguinte, foram obtidos através dos TICs (contagem de íons totais) de cada extrato analisado. Da observação desses TICs, algumas bandas foram selecionadas e, por meio do tempo de retenção, levadas a espectrometria tandem. Algumas dessas bandas apresentaram íons que se fragmentaram com a energia de ionização fornecida durante o experimento, os quais foram listados na base de dados, sendo possível elucidar alguns deles.

4.6 Proposta de fragmentação para a série isomérica de m/z : 355,24732

O aduto cationizado $[M+H]^+$ de relação m/z : 355,24732, presente no extrato das folhas de *S. pseudoquina*, mostrou em sua série isomérica alguns alcalóides indólicos, entre eles: 10-hidroxi-17-*O*-metilacagerina, *N*-acetilestricnoesplendina, 10-hidroxi-21-*epi-O*-metilcribina, *N*-deacetil-17-*O*-acetil-18-hidroxiisoretulina e 19,20-dideidro-17,18-epoxy-11,17-dimetoxicurana, como mostrado na figura 26.

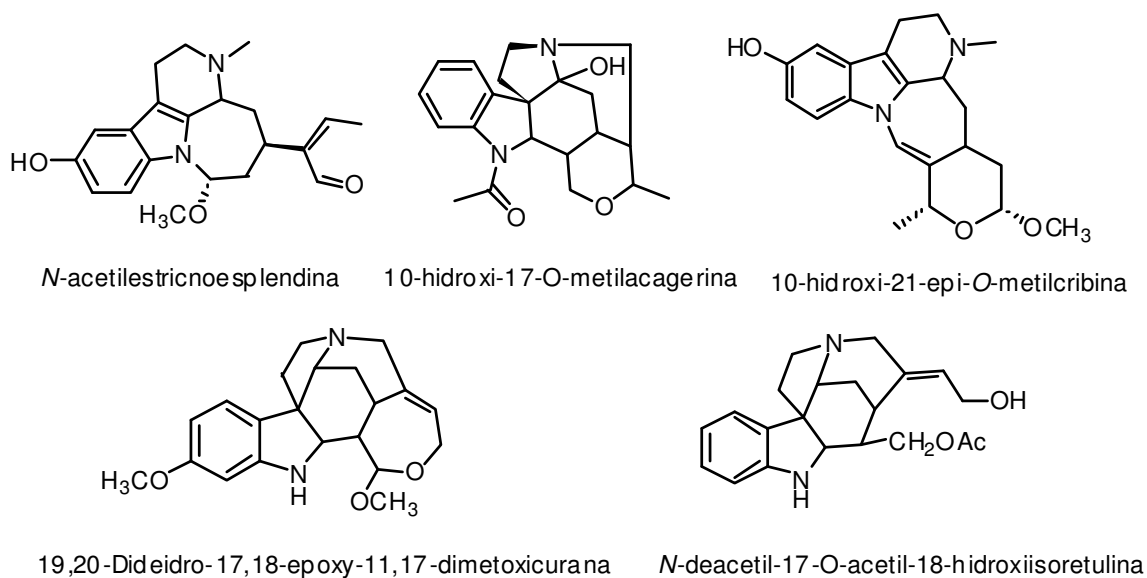
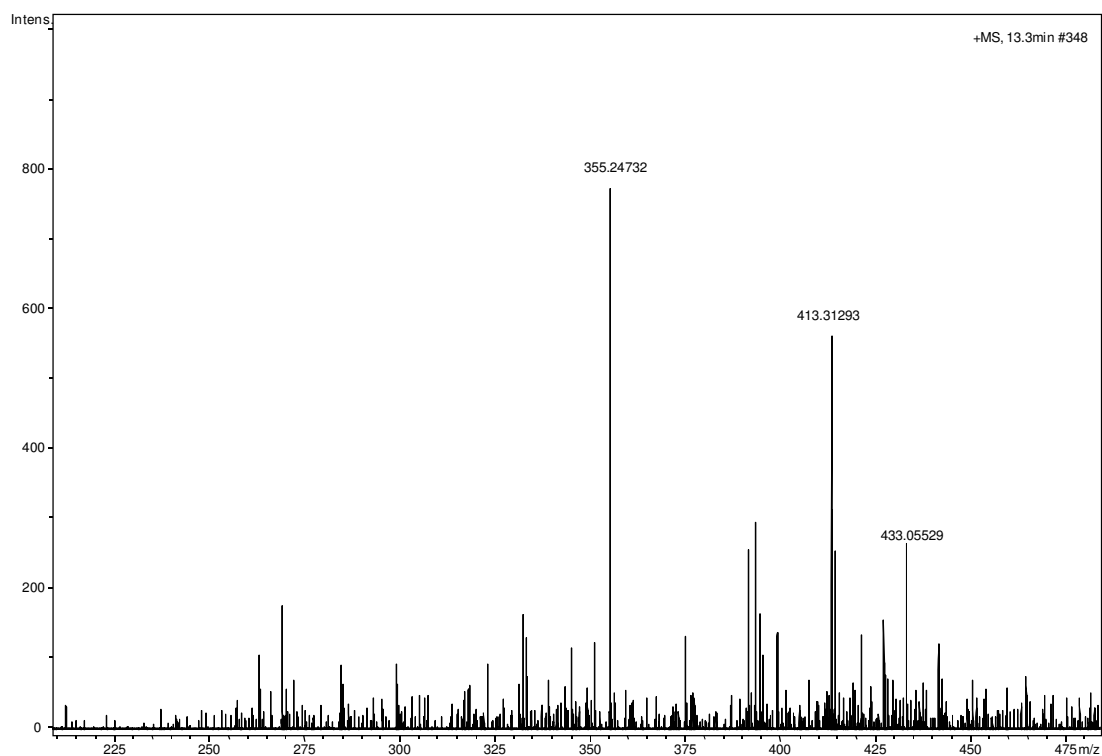


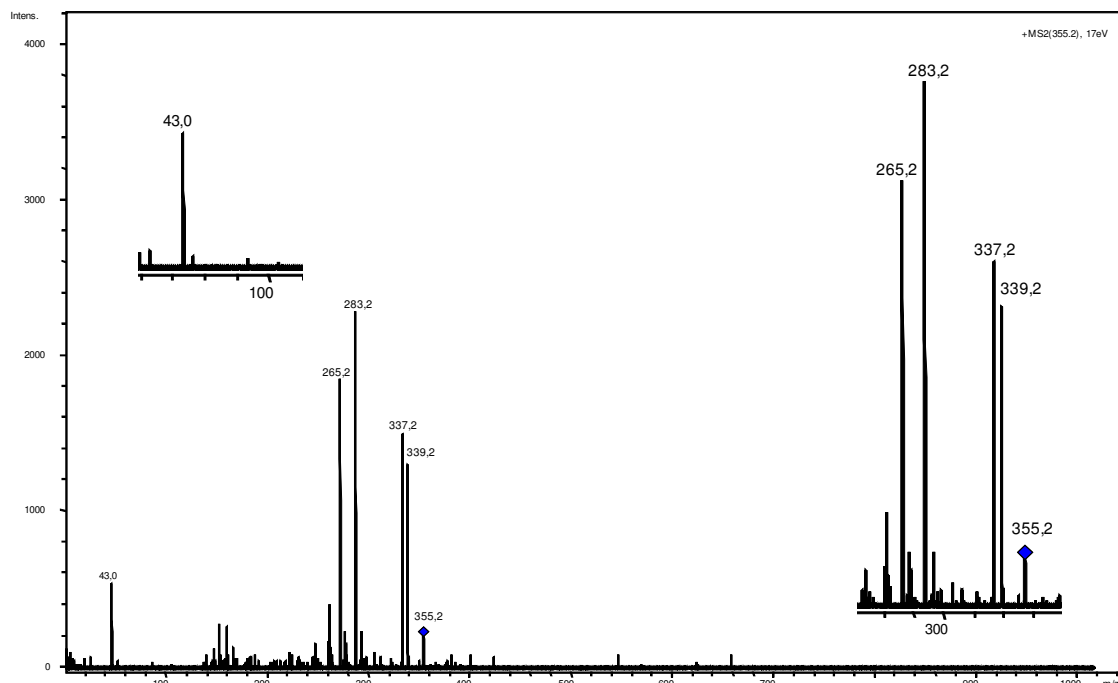
Figura 26: Algumas estruturas detectadas *in silico* para o fragmento m/z : 355,24732



Fragmentograma 1: Experimento EMAR referente ao íon m/z : 355,24732, presente no extrato das folhas de *S. pseudoquina*

Após análise cuidadosa do fragmentograma 1, não foi possível detectar nenhuma informação vinda de possíveis dissociações na fonte que pudesse permitir a seleção de algumas das propostas evidenciadas na análise *in silico*.

O experimento EMAR-EM-EM (Fragmentograma 2) revelou cinco íons filhos de relação m/z : 339,2; 337,2; 283,2; 265,2 e 43,0.



Fragmentograma 2: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon m/z : 355,2, presente nas folhas de *S. pseudoquina*

O produto de desidratação correspondente ao fragmento de m/z : 337,2 permitiu definir a 10-hidroxi-17-*O*-metilacagerina como provável isômero presente na matriz. A *N*-deacetil-17-*O*-acetil-18-hidroxiisoretulina poderia apresentar esse mesmo íon, porém a perda de água não seria favorecida já que ela apresenta um álcool primário na sua estrutura (Solomons et al, 1996). A presença do íon m/z : 43,0, permitiu inferir a presença de uma função acetila na molécula, evidência que também não descarta a possibilidade entre as duas propostas. Os outros íons majoritários vindo de rearranjos retro-Diels-Alder e perdas neutras de metano, permitiram elucidar a molécula como a 10-hidroxi-17-*O*-metilacagerina e foram justificados através de propostas racionais de fragmentação como observado na figura 27.

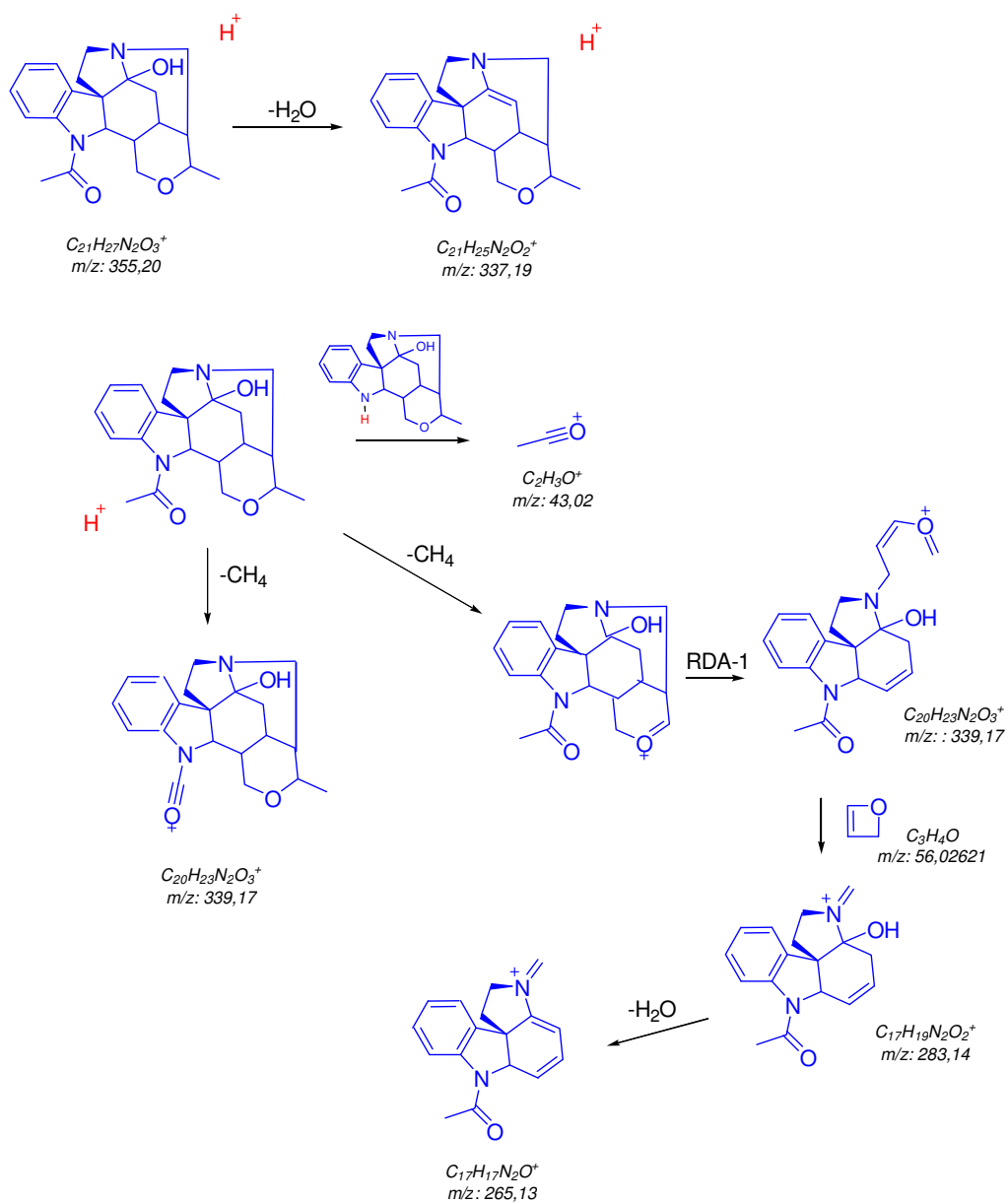


Figura 27: Padrão de fragmentação proposto para a 10-hidroxi-17-O-metilacagerina após análise via EMAR-EM-EM

4.7 Proposta de fragmentação para a série isomérica de m/z : 309,20751

A análise *in silico* da fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* revelou a possibilidade deste íon ser um aduto cationizado $[M+H]^+$. Foram detectados alguns alcalóides, entre eles um indoloisoquinolínico e um indólico, ambos já isolados em outras espécies de *Strychnos*. São estes a estricnohirsutina e a rosibilina, respectivamente.

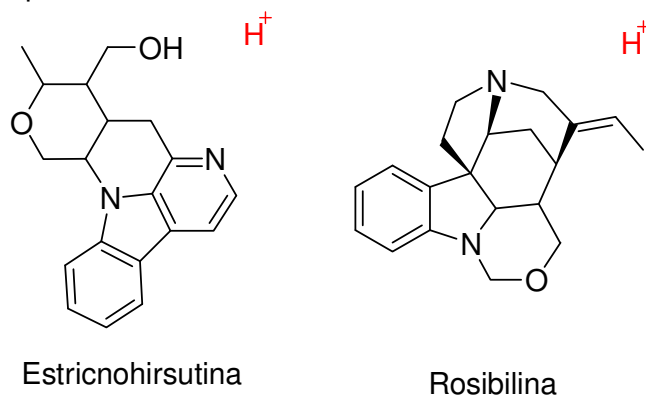
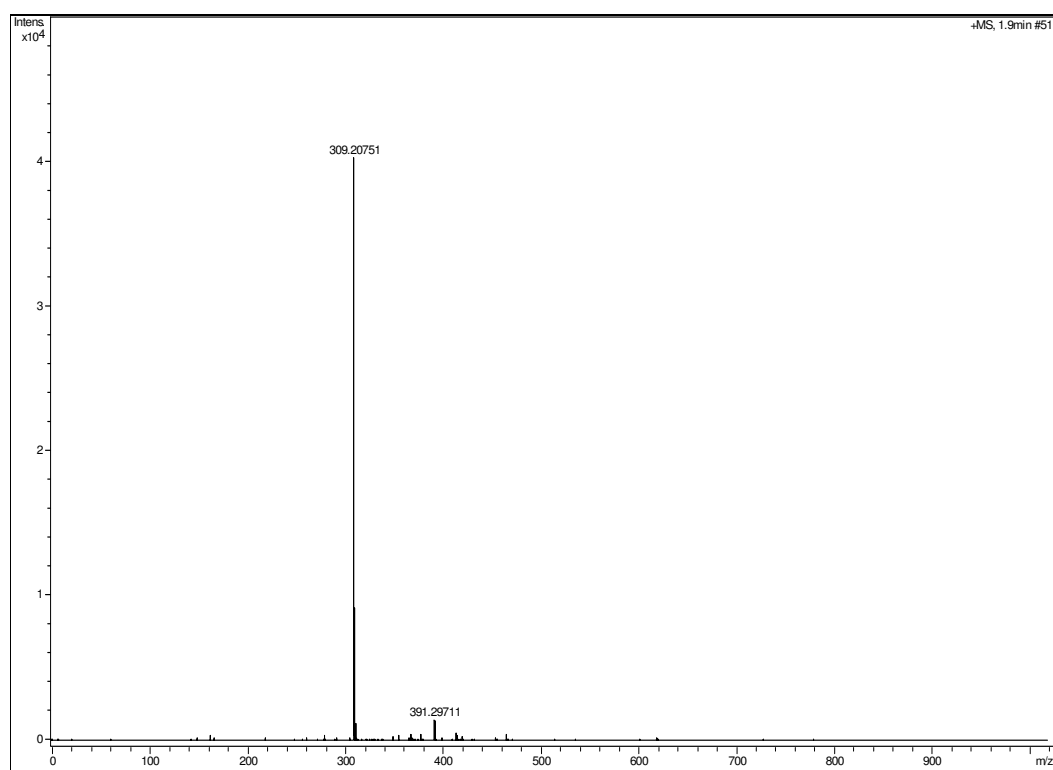


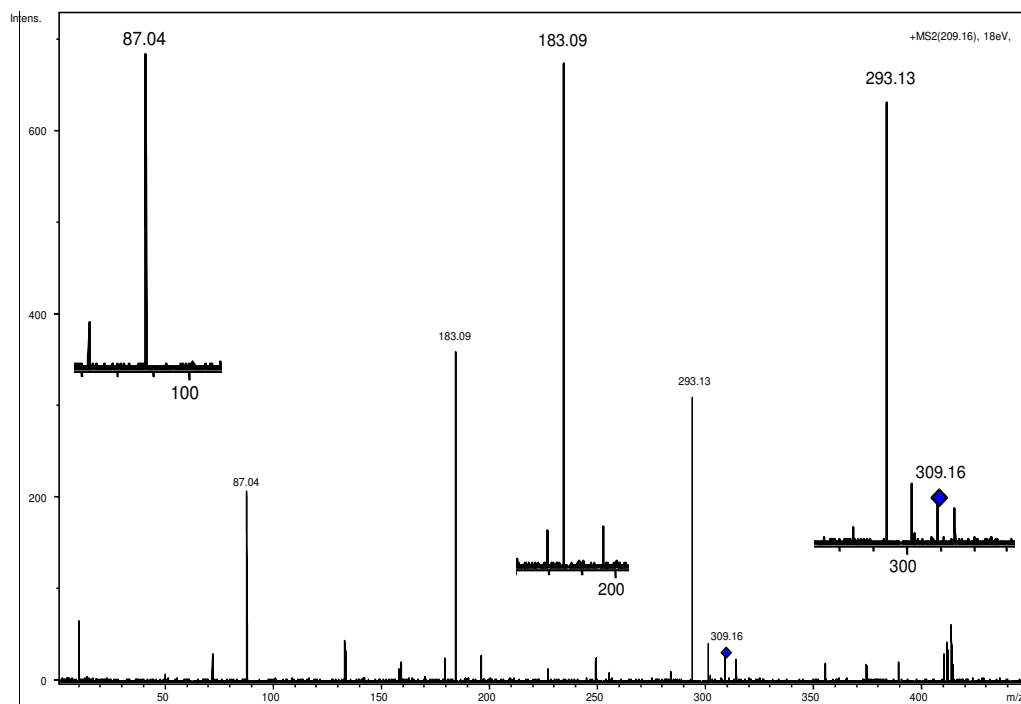
Figura 28: Algumas estruturas detectadas *in silico* para o fragmento m/z : 309,20751

Análise do fragmentograma 3 não revelou dados sobre possíveis dissociações na fonte que pudessem fornecer critérios para a seleção de uma das propostas encontradas.



Fragmentograma 3: Experimento EMAR referente ao íon m/z : 309,20751, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

O experimento de EMAR-EM-EM (Fragmentograma 4), selecionando este íon, foi realizado utilizando uma energia de 18 eV revelando três fragmentos filhos principais com relação m/z : 293,13; 183,09 e 87,04.



Fragmentograma 4: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon m/z : 309,16, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

Após análise e propostas de padrões de fragmentação (fragmentograma 4) onde foram evidenciadas perdas neutras de metano assim como rearranjos retro-Diels-Alder para justificar os íons filhos observados, concluímos que a molécula presente é a estricnohirsutina. Essa proposta é mostrada na figura 29 e uma proposta de formação do íon filho m/z : 183,09 encontra-se na figura 30.

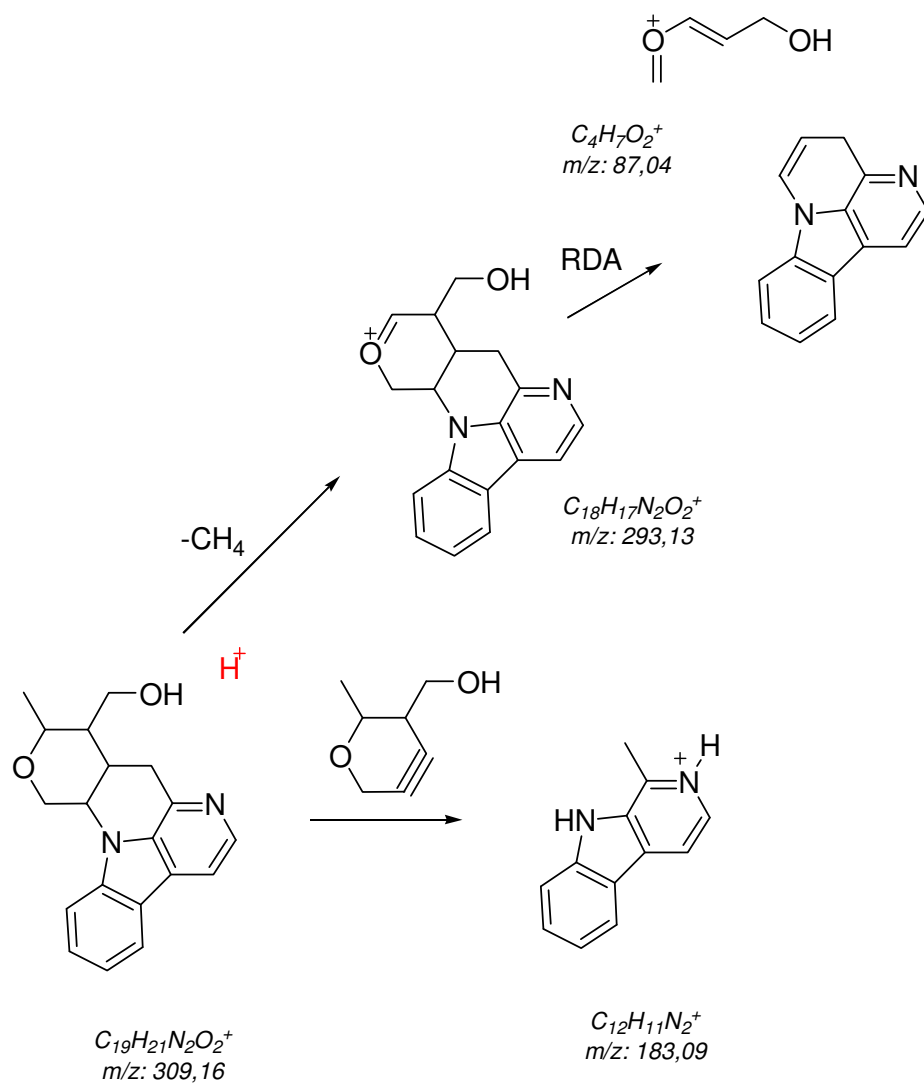


Figura 29: Padrão de fragmentação proposto para a estricnohirsutina após análise via EMAR-EM-EM

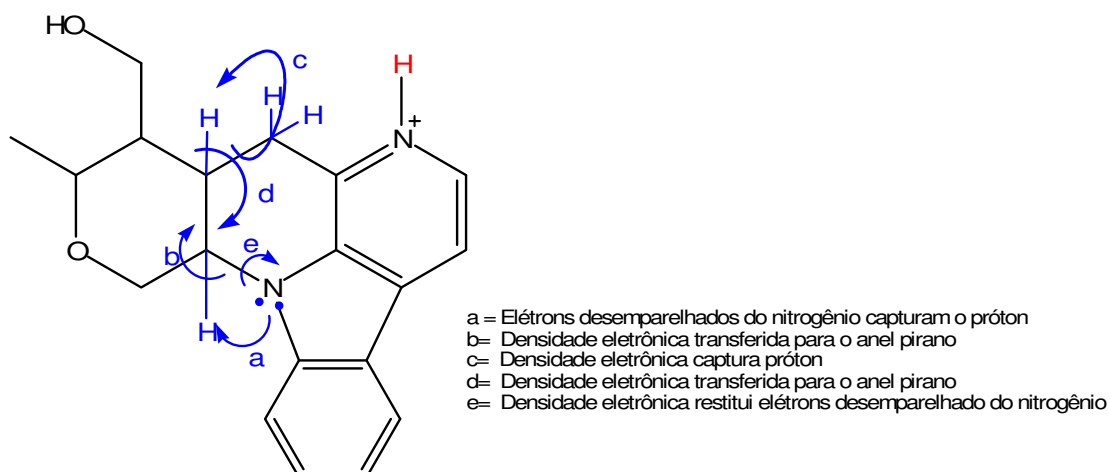


Figura 30: Mecanismo proposto para a formação do íon m/z 183,09

4.8 Proposta de fragmentação para a série isomérica de m/z : 341,15140

Também na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*, a análise *in silico* forneceu dados de alguns alcalóides indólicos, entre eles: caracurina VII e acagerina (figura 31). O fragmentograma 5 mostra o aduto cationizado com próton.

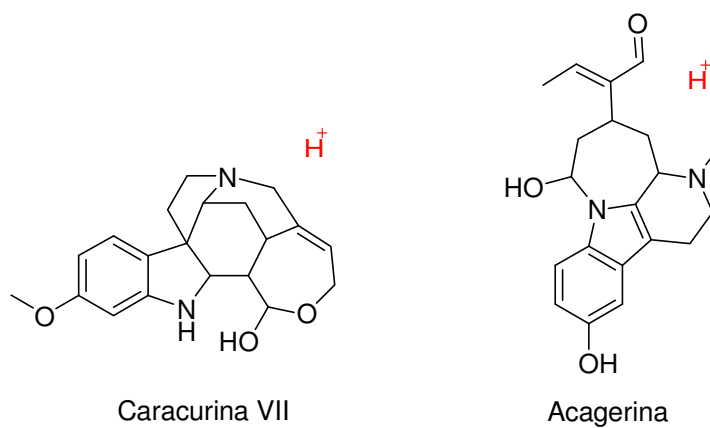
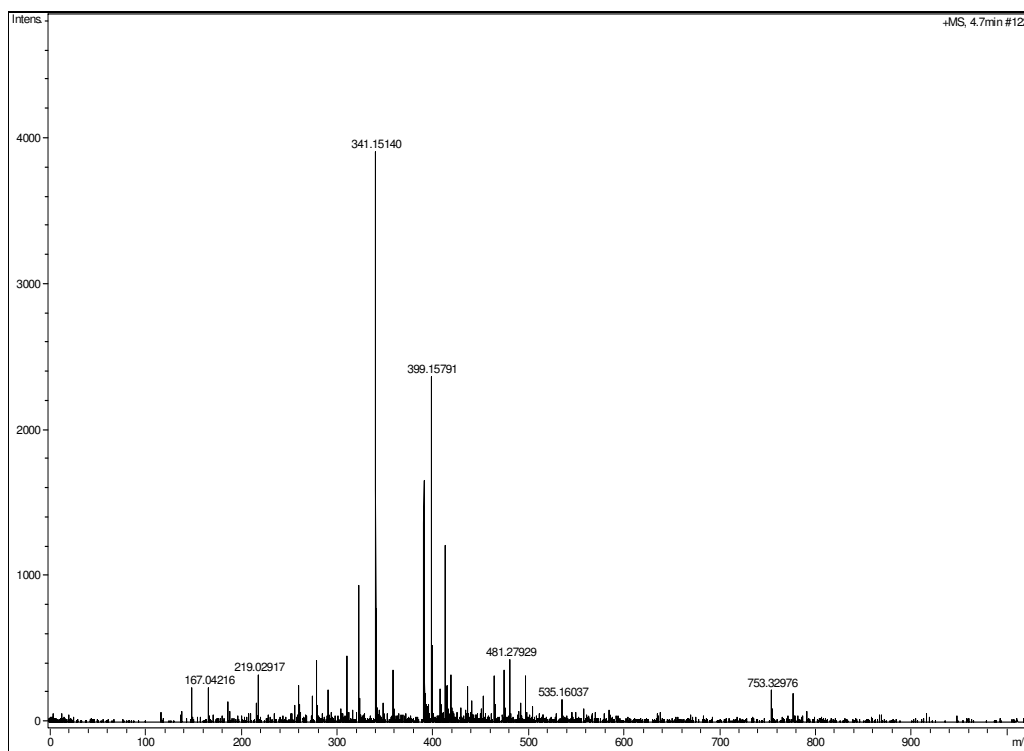
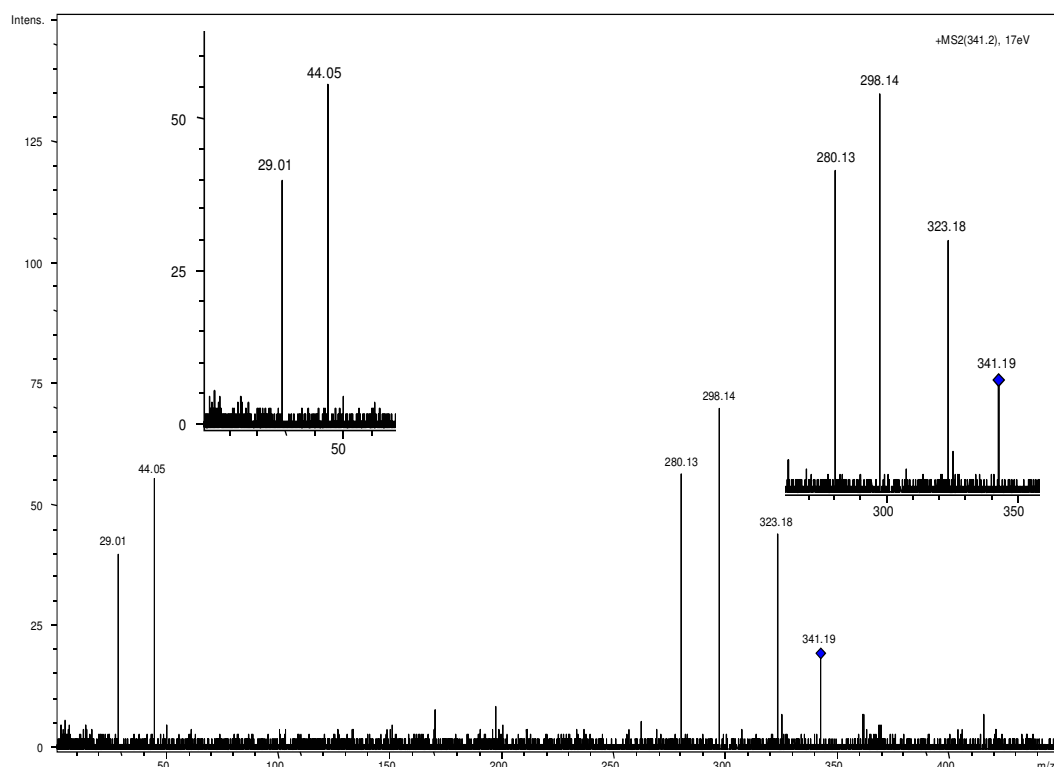


Figura 31: Algumas estruturas detectadas *in silico* para o fragmento m/z : 341,15140



Fragmentograma 5: Experimento EMAR referente ao íon m/z : 341,15140, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

A análise do experimento EMAR-EM-EM (Fragmentograma 6) permitiu evidenciar cinco íons filhos com relação m/z : 323,18; 298,14; 280,13; 44,05 e 29,01. A presença de uma função aldeído na molécula foi determinada pela presença do íon acilium (m/z : 29). Após cuidadosa análise e propostas racionais de desidratação, retro-Diels-Alder e perdas neutras, para justificar os fragmentos filhos observados (figura 32), concluímos que a molécula presente é a acagerina.



Fragmentograma 6: Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon m/z 341,2, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

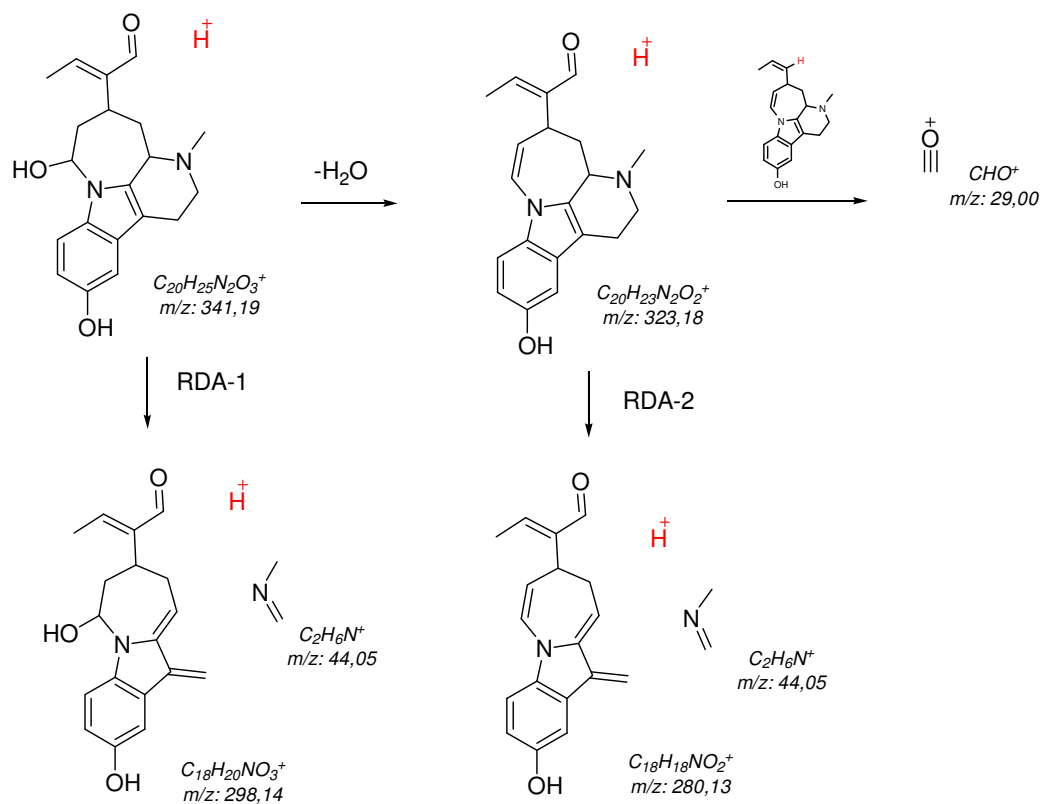


Figura 32: Padrão de fragmentação proposto para a acagerina

4.9 Proposta de fragmentação para a série isomérica de m/z : 301,16565

Esta interessante série isomérica, detectada na fração AcOEt dos galhos de *S. brasiliensis*, apresentou alguns alcalóides indoloisoquinilínicos, entre eles a elipticina, e o seu isômero a 9-hidroxielipticina, além de um nor-diterpeno da série dos labdanos: 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-olídeo.

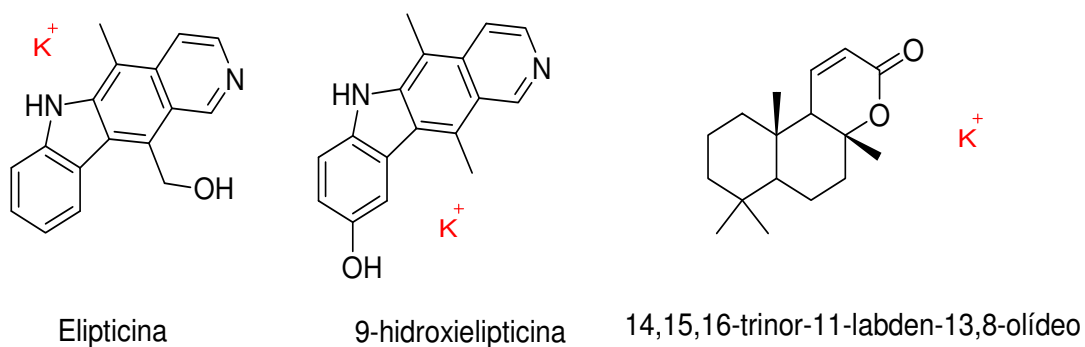
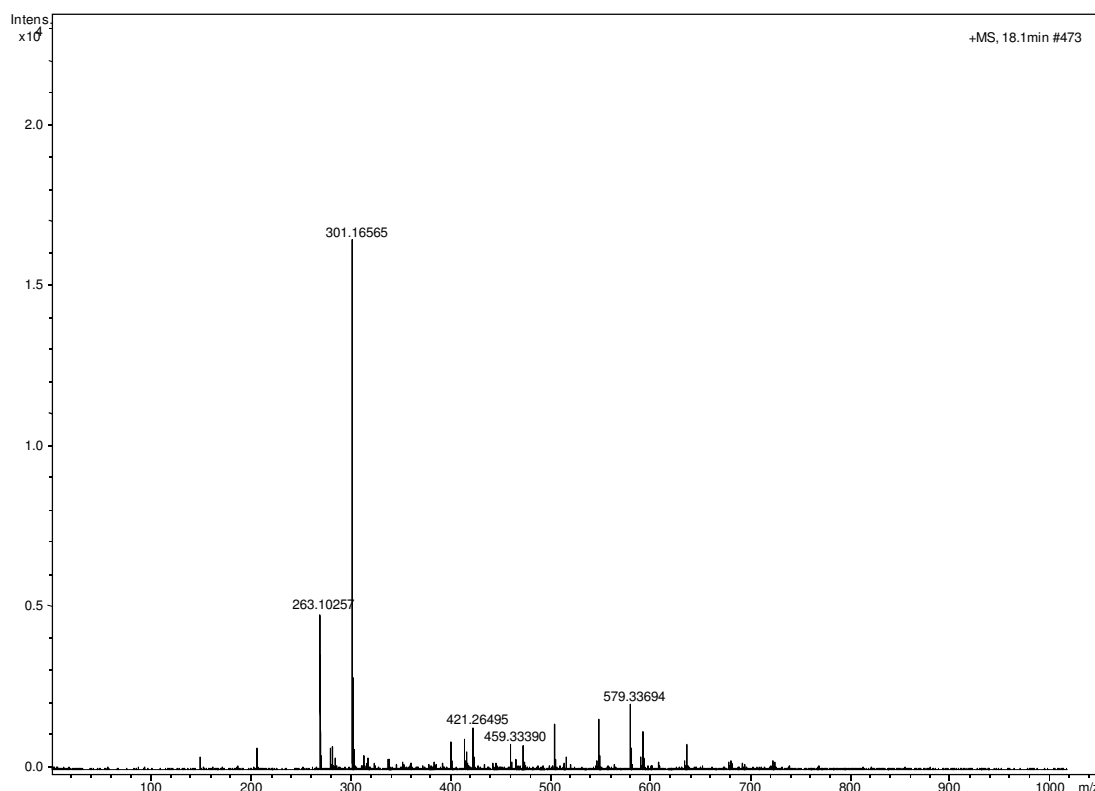


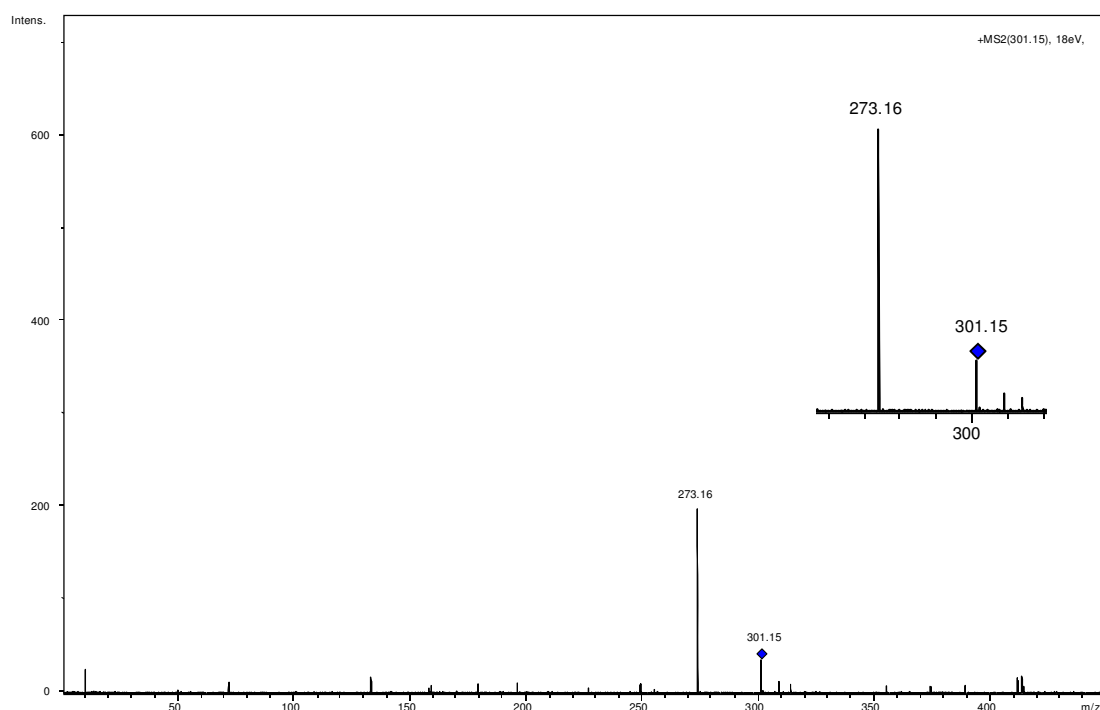
Figura 33: Algumas estruturas detectadas *in silico* para o fragmento m/z : 301,16565

O fragmentograma 7 mostra a presença de dois íons mais populosos um com relação m/z de 301,16565 e outro de menos intensidade com relação m/z : 263,10257, ambos adutos cationizados, sendo o primeiro referente à espécie com potássio $[M+K]^+$ e o segundo com próton $[M+H]^+$.

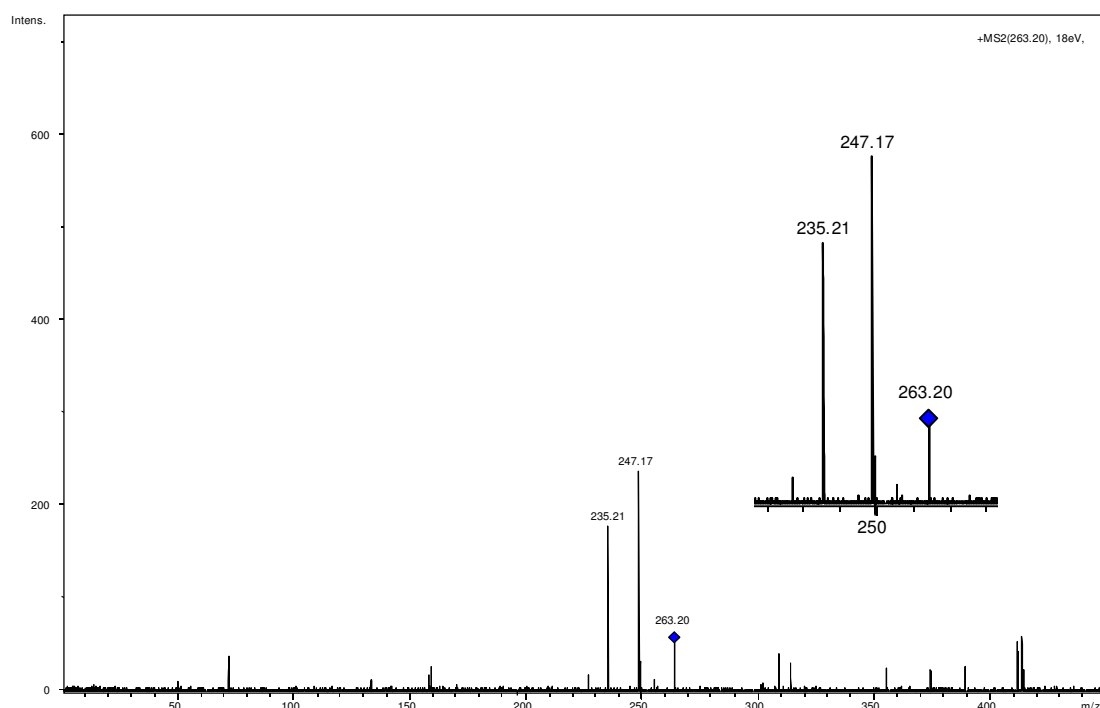


Fragmentograma 7. Experimento EMAR referente ao íon m/z : 301,16565, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

Procedemos a realizar o experimento EMAR-EM-EM para o aduto com potássio (fragmentograma 8), experimento que revelou apenas um íon de m/z : 273,16, referente à perda de monóxido de carbono o que nos levou a descartar os alcalóides. No intuito de encontrar mais informações estruturais para elucidar a nossa proposta, selecionamos o aduto cationizado com próton e realizamos o experimento tandem a 18 eV. O fragmentograma 9 mostra perda de metano como pico base m/z : 247,17 e monóxido de carbono (m/z : 235,21). A perda de CH_4 sugere a presença do diterpeno. Propostas racionais de fragmentação podem ser observadas na figura 34. Em andamento estamos realizando novos experimentos tandem com uma energia de colisão maior para evidenciar mais íons filhos que possam dar subsídios espectroscópicos para a elucidação final de proposta.



Fragmentograma 8. Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon m/z : 301,15, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*



Fragmentograma 9. Experimento EMAR-EM-EM referente ao íon m/z : 263,20, presente na fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*

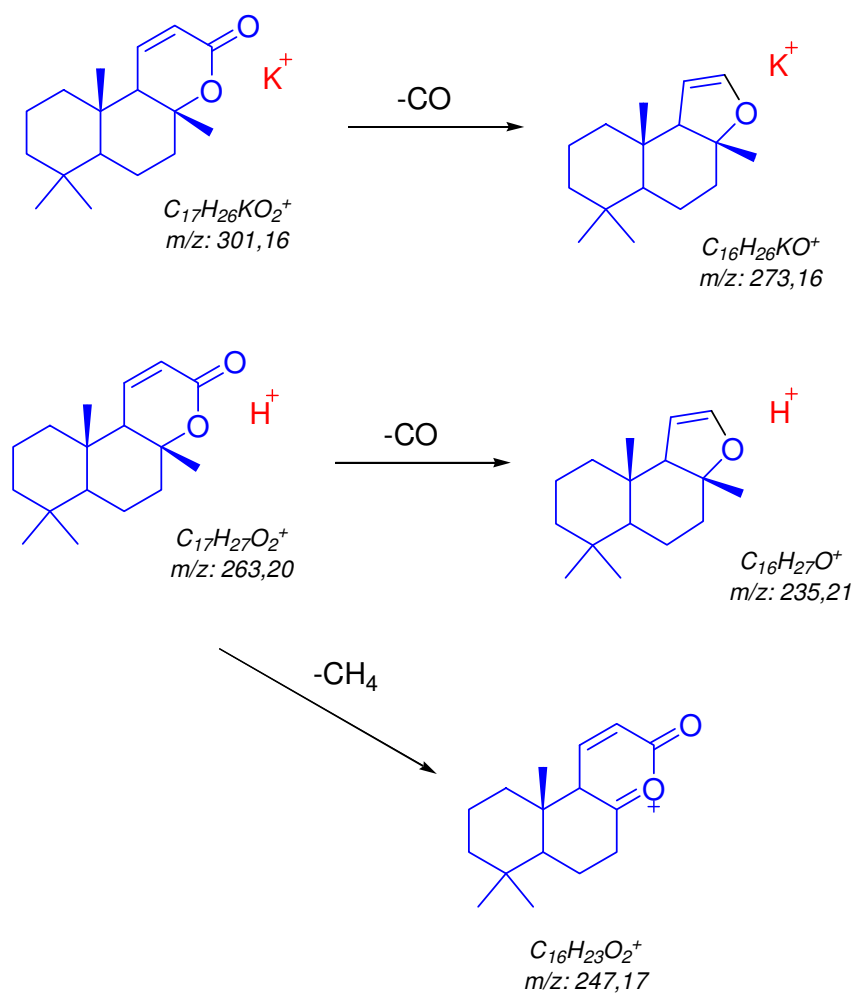


Figura 34. Padrão de fragmentação proposto para o 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-olídeo após análise via EMAR-EM-EM.

5 Conclusões e perspectivas

Através da análise preliminar *in vitro* de avaliação da atividade antioxidante e de inibição de formação de hemozoína, foi possível selecionar a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*, como matriz promissora em ambos os testes assim como os galhos de *S. pseudoquina* com potencial antioxidante.

O uso de técnicas hifenadas mostrou-se viável para detecção *in silico* de constituintes majoritários micromoleculares presentes em extratos brutos, sendo eles a 10-hidroxi-17-*O*-metilacagerina detectado em folhas de *S. pseudoquina* e a estricnohirsutina, acagerina e 14,15,16-trinor-11-labden-13,8-oleído para a fração acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis*.

Alcalóides de *Strychnos*, na sua maioria, são substâncias muito difíceis de serem detectadas, elucidadas e purificadas por técnicas convencionais devido a sua alta labilidade e reatividade. O fato de termos detectado e elucidado, por meio de técnicas hifenadas e de derreplicação três alcalóides nas matrizes em estudo valida a nossa proposta metodológica e indica uma abordagem diferente e inovadora para o estudo de outras espécies ricas em alcalóides complexos.

A construção da base de dados, reunindo uma série de ricas informações utilizadas para a continuidade da pesquisa, foi uma ferramenta crucial e facilitadora do trabalho, permitindo selecionar as estruturas com maiores probabilidades de serem encontradas em cada espécie.

Futuramente, outros dados moleculares poderão ser incorporados à base com o intuito de torná-la mais robusta visto que, o mostrado aqui, é apenas uma parte de todos os íons detectados nos experimentos realizados por espectrometria de massas sendo incorporados à base, apenas aqueles que apresentaram íons filhos.

A aquisição de novas informações espectrométricas, fazendo uso de técnicas como RMN, permitirá um maior entendimento das características estruturais de moléculas em mistura, favorecendo processos de derreplicação e futuras elucidações *in situ* em matrizes complexas.

Referências

AIMI, N.; SAKAI, S. I.; BAN, Y. Alkaloids of *Strychnos* and *Gardneria* species. In: BROSSI, A. (Ed.). **The Alkaloids**. San Diego: Academic Press, 1989. v.36, cap.1, p.1-69.

ANGENOT, L.; QUERTIN-LECLERCQ, J.; BISSET, N. G. South american *Strychnos* species: ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, p.1-52, Feb. 1990.

AROUMA, O. I.; HALLIWELL, B.; WILLIAMSON, G. *In vitro* methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plants foods. In: AROUMA, I.; CUPPETT, S. L. (Ed.). **Antioxidant methodology**. Champaign: AOCS Press, 1997. p.173-204.

BARDAL, M. L.; RODERJAN, C.V.; GALVÃO, F.; CURCIO, G. R. Fitossociologia do sub - bosque de uma floresta ombrófila mista aluvial, no município de Arucária, Paraná. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 1, p. 35-45, 2002. Disponível em: <www.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v14n1/A5V14N1.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2006.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. IU/UFV, 1986. v. 3, p. 326.

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 Farmacológica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 356-65, 2005.

BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthonenes from *Guttiferae*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 967-998, Nov. 1989.

BIOCAA, E. Pesquisa sobre o método de preparação do curare pelos índios. **Revista do Museu Paulista**, v. 8, p. 164-226, 1954.

BRUNETON, J. Monoterpenoid indole alkaloids. In: _____. **Pharmacognosy, phytochemistry and medical plant**. 2nd ed. Paris: Lavoisier Publisher, 1999. p. 1000-1043.

CARDOSO, C. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. New biflavonoid and other flavonoids from leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1353-1359, 2005.

CASTRO-GAMBOA, I.; CASTRO, O. Unusual iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2369-2372, 2004.

CASTRO-GAMBOA, I.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. HPLC-EICD: an useful tool for the pursuit of novel analytical strategies for the detection of antioxidant secondary metabolites. **Journal of Brazilian Chemical Society**, n. 5, v. 14, p. 771-776, 2003.

CHOI, Y. H.; SOHN, Y.; KIM, C. Y.; OH, K. Y.; KIM, J. Analysis of strychnine from detoxified *Strychnos nux-vomica* seeds using liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 109-112, 2004.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988.

DICIONÁRIO de Produtos Naturais. Accurate Mass. Disponível em: <<http://dnp.chemnetbase.com>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. p. 390-392.

DORN, A.; VIPPAGUNTA, S. R.; MATILE, H.; JAQUET, C.; VANNERSTROM, J. L. ; RIDLEY, R. G. A comparison and analysis of several ways to promote haematin (Haem) polymerisation and an assessment of its initiation *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, 1998. p. 727-736.

DUCKE, A. O gênero *Strychnos* L. no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte**, v. 30, p. 5-64, 1955.

DUCKE, A. O gênero *Strychnos* no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte**, v. 30, p. 1-64, 1965. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/sites/links.htm>>. Acesso em: 04 mar. 2004.

EGAN, T. J.; NCOKAZI, K. K. Quinoline antimalarials decrease the rate of b-hematin formation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1532-1539, 2005.

EGAN, T. J.; ROSS, D. C.; ADAMS, P. A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta - haematin (malaria pigment). **FEBS Letter**, v. 352, n. 1, p. 54-57, 1994.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M.; SILVA, D. H. S. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 723-726, 2008.

FLORA Brasiliensis. *Strychnos brasiliensis*, *Strychnos pseudoquina* e *Strychnos trinervis*. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

FREDERICH, M.; DE PAUW, M-C.; LLABRES, G.; TITS, M.; HAYETTE, M-P.; BRANDT, V.; PENELLE, J.; DE MOL, P.; ANGENOT, L. New antimalarial and cytotoxic sungucine derivatives from *Strychnos icaia* roots. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 262-269, 2000.

GALEFFI, C.; MARINI-BETTOLO, G. B. On the alkaloids of *Strychnos*-XXXVI. **Tetrahedron**, v. 37, p. 3167-3170, Jan. 1981.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, n. 7,

p. 670-717, Feb. 2002.

HAMERSKI, L. ; CASTRO-GAMBOA, I. ; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; EBERLIN, M. N.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Phenylpropanoid glucosides from leaves of *Coussarea hydrangeifolia* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1927-1932, 2005.

HAY, A. E. ; AUMOND, M. C. ; MALLET, S. ; DUMONTET, V. ; LITAUDON, M.; RONDEAU, D. ; RCHOMME, P. Antioxidant xanones from *Garcinia vieillardii*. **Jornal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 707-709, 2004.

HUTCHINSON, J. **Evolution and phylogeny of flowering plants**. 2nd ed. Kew: Royal Botanic Gardens, 1974.

IWATAKI, I.; COMIN, J. Studies on Argentine plants-XXXI. **Tetrahedron**, v. 27, p. 2541-2552, Jan. 1971.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; TOMIYASU, H.; LITAUDON, M.; COSSON, J. P.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive agents. New depsidones from *Garcinia* plants. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 147, 2001.

JAROSZEWSKI, J. M. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 691-700, 2005a.

JAROSZEWSKI, J. M. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. **Planta Medica**, v. 71, n. 9, p. 795-802, 2005b.

JIA, Q. Generating and screening a natural product library for cyclooxygenase and lipoxygenase dual inhibitors. **Study in Natural Products Chemistry**, v. 29, part J, p. 643-718, 2003.

KLAUS, A. Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 199-211, 1999.

KRUKOFF, B. A. American species of *Strychnos*. **Lloydia**, v. 35, n. 3, p. 193-271, 1972.

KRUKOFF, B. A.; BARNEBY, R. C. Supplementary notes on the American species of *Strychnos*. VIII. **Memoirs of New York Botanical Garden**, v. 20, n. 1, p. 1-93, 1969a.

KRUKOFF, B. A.; BARNEBY, R. C. Supplementary notes on the American species of *Strychnos*. IX. **Memoirs of New York Botanical Garden**, v. 20, n. 1, p. 94-99, 1969b.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.

LEEUWENBERG, A. J. M.; LEENHOUTS, P. W. Taxonomy. In: LEEUWENBERG, A. J. M. (Ed.). **Die natuerlichen Pflanzenfamilien 28b**. Berlin: Duncker & Humblot. 1980. v. 1, p. 8-96.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum. 1998.

LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; VESSECCHI, R. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book**. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

MacILWAIN, C. Briefing bioprospecting: when rethoric hits reality in debate on bioprospecting. **Nature**, v. 392, p. 535-542, Apr.1998.

MIKE, S. L.; KERNS, E. H. LC/MS Applications in drug development. **Mass Spectrometry Reviews**, v.18, p.187-279, 1999.

NEOTROPICAL Herbarium Specimens. o gênero *Strychnos*. Disponível em: <<http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/>>. Acesso em: 22 nov. 2006.

NICOLETTI, M.; GOULART, M. O. F.; LIMA, R. A.; GOULART, A. E.; MONACHE, F. D. ; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina* **Journal of Natural Products**, v. 20, n. 6, p. 953-957, 1984.

NURIT, K.; AGRA, M. F.; BASÍLIO, I. J. L. D.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: Loganiaceae. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n. 2, p. 407-416. abr./jun. 2005. Disponível em: <<http://scielo.br/pdf/abb/v19n2/26236.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2006.

PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Trioxxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-214, May 1997.

PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Tetraoxxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 683, 2000.

PESSOA, J.; CHIAPPETA, A. A. O gênero *Strychnos* (Loganiaceae) em Pernambuco. **Biologica Brasílica**, v. 3, n. 1, p. 61-96, 1991.

PHILLIPE, G.; ANGENOT, L.; MONIQUE, T.; MICHEL, F. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, v. 44, p. 405-416, June 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidades, desejos e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, jul. 2002. Supl. 1.

PIVATO, M.; CROTTI, A. E.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. A; VIEGAS, J. C.; YOUNG, M. C .M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the**

Brazilian Chemical Society, v. 16, p. 1431-1438, 2005.

PLANTAS Medicinais: falsa quina. **Phitoherb**. Disponível em:
<<http://www.phitoherb.com/PhitoHerb/article.asp?id=367>>. Acesso em: 9 dez. 2008.

PROGEL, A. Loganiaceae. In: MARTIUS C.F. (Ed.). **Flora Brasiliensis**. Monachii: F. Fleisher, 1868. v. 6, n. 1, p. 251-300.

RAO, A. V. R.; SARMA, M. R.; VENKATARAMAN, K.; YEMUL, S. S. A benzophenone and xanthone with unusual hidroxylation patterns from the heartwood of *Garcinia pendiculata*. **Phytochemistry**, v. 13, p.1241-1244, Sept. 1974.

RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, D. A.; BOTREL, R. T. **Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminária, Minas Gerais**. Disponível em:
< http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_52.pdf >. Acesso em: 23 jan. 2009.

RODRIGUES, V. E. G. **Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto Rio Grande - MG**. 1998. 235 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998. Disponível em: <www.editora.ufla.br/revista/25_1/art13htm>. Acesso em: 14 nov. 2006.

SHEO, B. S.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery. **Foundation in Natural Products Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; CASTRO-GAMBOA, I.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Cardinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SILVA, L. A.; SOARES, J. J. Levantamento fitossociológico em um fragmento de floresta estacional semidecídua, no município de São Carlos, São Paulo. **Acta Botânica Brasílica**, v.16, n. 2, p. 205-216, abr. 2002. Disponível em:
<<http://scielo.br/pdf/abb/v16n2/a07v16n2.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2006.

SILVA, M. A. **Estudo químico e biológico de *Strychnos pseudoquina* (Loganiaceae)**. 2003. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 256-267. 2005.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic chemistry**. 7th ed. New York: John Willey & Sons, 2000. 2v.

SOUZA, L. F. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do Cerrado (comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 4, p. 44-54, 2007.

STRUWE, L. Loganiaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.;

STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Flowering plants of the neotropics**. Bronx: Pricenton University Press, 2004. p. 221-223,

STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. Cladistics and family-level classification of the *Gentianales*. **Cladistics**, v. 10, p. 175-206, 1994.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1997.

TELES, H. L.; SORDI, R.; SILVA, G. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; PFENNING, L. H.; ABREU, L. M.; COSTA-NETO, C. M.; YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2689-2690, 2006.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; LACHAVANNE, J-B.; HOSTETTMANN, K. Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2401-2410, 2004.

WOLFENDER, J-L.; QUEIROZ, E-F.; HOSTETTMANN, K. The importance of hyphenated techniques in the Discovery of new lead compounds from nature. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 237-260, 2006.

WOLFENDER, J-L.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 41-54, 2000. Supplement.

YAN, J.; LIU, Z.; YAN, C.; XING, J.; LIU, S. Analysis of *Strychnos* alkaloids using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance multi-stage tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1335-1344, 2006.

ZAPPI, D. C. Loganiaceae. In: STANNARD, B. L. (Ed.). **Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens. 1995. p. 406-407.

ZAPPI, D. C. Loganiaceae. In: MELO, M. M. R. F.; BARROS, F.; CHIEA, S. A. C.; KIRIZAWA, M.; JUNG- MENDAÇOLLI, S. L.; WANDERLEY, M. G. L. (Ed.). **Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1996. v. 4, p. 9-13.

ZAPPI, D. **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil**: Loganiaceae. Kew: Royal Botanical Gardens, Disponível em:
<http://www.jbrj.gov.br/publica/rodriguesia/rodrig57_2/Loganiaceae2.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2006.