

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO EM QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Strychnos Amazonica*

MANAUS
2014

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

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Strychnos amazonica*

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

Mestrando: Renyer Alves Costa

Orientador: Maria Lúcia Belém Pinheiro

Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza

Início: Agosto/2011

MANAUS

2014

Ficha Catalográfica

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

C837e Costa, Renyer Alves
Estudo químico e biológico de Strychnos amazonica / Renyer
Alves Costa. 2014
144 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maria Lúcia Belém Pinheiro
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Etnofarmacologia. 3. Métodos
espectroscópicos . 4. Família Loganiaceae. 5. Alcaloides. I.
Pinheiro, Maria Lúcia Belém II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

Dedicatória

À minha querida mãe Maria Arlete Alves de Matos por todo o cuidado, carinho e amor durante sua existência na terra

Agradecimentos

À Deus pai criador do universo, que com a sua inteligência suprema me ajudou a concluir este trabalho

À minha mãe Maria Arlete Alves de Matos que dedicou 21 anos de sua vida na minha criação, ajudando a me tornar a pessoa que sou hoje e que sem a sua presença, mesmo indiretamente, a realização deste trabalho não seria possível, assim como muitas outras coisas em minha vida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, que oferece oportunidade para a formação e aperfeiçoamento de profissionais na Química, em especial na área de Química Orgânica.

Ao CNPq e Capes, pela concessão da bolsa de doutorado, sem a qual não seria possível a minha dedicação exclusiva ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Belém, pelo apoio, amizade, paciência e por ajudar na minha formação como profissional e como ser humano.

Ao Prof Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pelo apoio e acolhimento no laboratório de espectrometria de massas.

Ao Prof Dr. Andersson Barison pela disponibilização do seu laboratório para análises de RMN,

Ao Kahlil Salomé pela paciência e análises das amostras em RMN.

A professora Antonia Queiroz Lima pelo apoio, amizade e pela ajuda com os testes antimicrobianos.

A Msc Tiara Cabral pelos ensaios barcoding que foram essenciais para a identificação da espécie título do trabalho.

Aos amigos do laboratório de espectrometria de massas, agora atual central analítica: Richardson, Elzalina, Mayane (Ui!), Bruna (a brunas!) e ao Felipe (massas).

Aos amigos do laboratório de produtos naturais: Diego, Priscilla Oliver, Renilto, Jaqueline, Ana Lucia, Danielle, Dominique, Junior Ribeiro, Levy, André (cabeludo), Sidney, Carol Mathias, Klenicy, Andrezza, Alcilene e a todos que eu esqueci.

Aos amigos do laboratório de microorganismos, Liviane, Paulo e a Dra. Fátima

Aos companheiros Igor Medeiros, Victor Augusto, Rodrigo Cavalcanti, Jésika Maria, José Luiz, Thaisa (japa), Thaisa Mara, Maria Oneide, João Vitor, Ravalry e Fernando.

Ao professor Dr. Kelson Mota e a todos os membros do Laboratório de Química Teórica pelo apoio na reta final.

Abstract

The *Strychnos* genus, the main of the Loganiaceae family, is distributed in tropical regions, principally on Africa, Asia, Central and South America. It is well known for its toxic properties, which led to the isolation of a wide variety of indole alkaloids with diverse biological properties and medicinal application. In addition to the use in the manufacture of curare the *Strychnos* genus is important in ethnopharmacology due to antimalarial, aphrodisiac, tonic, and anti-anemic effects for American species. However, the most studied biological activities are anticonvulsants and relaxing. In this study, was performed a phytochemical and biological studies on the leaves and stem of the species *Strychnos amazonica* Krukoff. From the hexane extracts of the leaves and stem were obtained, respectively, as binary mixtures, the pentacyclic triterpenes, friedelin and friedelanol and the steroids, sitosterol and stigmasterol. Conventional methodology for obtaining alkaloids led to isolation of strictosidine from leaves and 17-O-methyl-akagerine along with its derivative named 4-hydroxy-metileno-17-O-methyl-akagerine, from core of the stem. However, the presence of impurities evidenced in the NMR spectra indicate further analysis for confirmation of the proposed structure of this derivative. The identification of compounds was done by spectroscopic techniques, especially, ¹H NMR, HSQC and HMBC MS, and comparison with the literature data. Theoretical studies were performed on 17-O-methyl-akagerine alkaloids and strictosidine, where optimization geometric data obtained by DFT calculation (bond distances and angles) are presented and compared to experimental data (angles provided by coupling constants and X-ray data for similar molecules). Antimicrobial tests performed with methanol extracts of

leaves, bark and heartwood, and the isolated alkaloids, showed significant activity of the samples, especially the alkaloid 17-O-methyl-akagerine against *Candida albicans*, confirming the great pharmacological potential of this species.

Resumo

O gênero *Strychnos*, principal representante da família Loganiaceae, distribui-se em regiões tropicais, principalmente, na África, Ásia, América Central e América do Sul. O estudo deste gênero, muito conhecido por suas propriedades tóxicas, levou ao isolamento de diversos alcaloides com importantes atividades biológicas e aplicabilidade medicinal. Além do emprego na confecção dos curares o gênero *Strychnos* tem história na etnofarmacologia, registrando-se para as espécies americanas efeitos antimaláricos, afrodisíacos, tônicos, febrífugos e anti-anêmicos. No entanto, as atividades biológicas mais estudadas são as convulsivantes e relaxantes. No presente trabalho, foi realizado um estudo fitoquímico e biológico sobre a espécie da flora americana, *Strychnos amazônica* Krukoff. A partir dos extratos hexânicos das folhas e do cerne do caule, foram obtidas, respectivamente, misturas binárias, dos tritepenos pentacíclicos, friedelina e friedelanol e dos esteroides sitosterol e estigmasterol. Marcha química convencional para obtenção de alcaloides levou ao isolamento do alcaloide strictosidina, das folhas, e 17-O-metil-acagerina e seu derivado inédito, denominado de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina, do cerne. Contudo, a presença de impurezas evidenciadas nos espectros de RMN, recomendam novas análises para confirmação da estrutura proposta para este derivado. A identificação dos compostos foi feita por técnicas espectroscópicas,

principalmente, RMN H¹, HSQC HMBC e EM, e comparação com dados da literatura. Foram realizados estudos teóricos sobre os alcaloides 17-O-metil-acagerina e strictosidina, onde dados de otimização geométrica obtidos por cálculos DFT (distancias de ligação e ângulos) são apresentados e confrontados com dados experimentais (ângulos previstos pelas constantes de acomodamento e dados de Raio X de moléculas análogas). Testes antimicrobianos realizados com os extratos metanólicos das folhas, casca e cerne, e com os alcalóides isolados, revelaram significativa atividade das amostras, com destaque para o alcaloide 17-O-metil-acagerina frente à *Candida albicans*, evidenciando o grande potencial farmacológico desta espécie.

Palavras chave: *Strychnos amazonica*, alcaloides, atividade antimicrobiana, estudos teóricos

Lista de siglas

CCD = cromatografia em camada delgada

RMN ^1H = Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

COSY = correlation spectroscopy

HMBC = Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence

ESI –IT-MS= Eletron spray inozation ion trap mass spectrometry

EM = espectrometria de massas

UV = ultra violeta

DFT = Density functional theory

δppm = deslocamento químico em parte por milhão

B3LYP – 6-31G(d) = funcional híbrido densidade funcional com o uso do funcional de troca de correlação de Becke e funcional desenvolvido por Lee, Yang e Parr, além da implementação de 6 gaussianas internas primitivas, 3 orbitais de valência e função de polarização ao qual atribui-se orbital d a átomos não hidrogenoides

B3LYP-6-311++G(2d,p) = funcional híbrido de densidade funcional com a implementação de 6 gaussianas internas primitivas, 3 orbitais de valência e função de polarização ao qual atribui-se orbital d a átomos não hidrogenoides, orbitais p a átomos de hidrogênio e dupla difusão, envolvimento aumento da densidade eletrônica de átomos pesados e hidrogênio,

B3LYP 6 -311+G(2d,p) = funcional híbrido densidade funcional com implementação de 6 gaussianas internas primitivas, 3 orbitais de valência e função de polarização ao qual atribui-se orbital d a átomos não hidrogenoides, orbitais p a átomos de hidrogênio e monodifusão, envolvimento aumento da densidade eletrônica de átomos pesados.

Lista de figuras

Fig 1. Alcaloides: Morfina, Quinina e Cocaína. pág 15

Fig. 2: Alcaloides: Vimblastina, Vincristina, Taxol e Talidomida. pág 16

Fig3. Distribuição do gênero *Strychnos* pelo mundo, podendo ser dividida geograficamente em três grupos, um na América Central e do Sul, um na África e um na Ásia. Pág 20

Fig 4. Estrutura do alcaloide eestricnina. Pág 23

Figura 5. Estrutura dos alcalóides: (a) Brucina, e (b) Vomocina. Pág 24

Fig.6. Distribuição de *Strychnos curare*, região preta em destaque chamada de Hiléia, abrange a bacia do Amazonas e do Orinoco. Pág 30

Fig 7. Estrutura de alcaloides com atividade muscular relaxante de *Strychnos*. Pág 39

Fig 8. Estrutura de alcaloides diméricos quaternários. Pág 44

Fig 9. Receptores nicotínicos de acetilcolina vistos lateralmente e panoramicamente. Os cinco protômeros formam um cluster que cercam o poro central, onde entre as subunidades α e $\alpha\delta$ se encontram os sítios de ligação da acetilcolina, que podem ser vistos melhor panoramicamente. Quando a acetilcolina se liga, uma mudança rotacional conformacional é transmitida pelo receptor, resultando na abertura do poro canal. A composição lipídica da membrana ao redor do receptor é muito importante, 50% de colesterol deve ser sua constituição para a correta função do receptor. Tais receptores estão “inervados” na membrana, não havendo locomoção destes através do plasma celular. Pág 39

Fig 10. Alcaloides curare usados como medicamentos (+) tubocurarina (18), alcuronium (19) e atracurium(20). Pág 46

Fig 11. Espectro do sólido 1 em APCI íon trap. Pág 62

Fig 12. Perfil alcaloídico dos galhos. Pág 64

Fig 13. Perfil Alcaloídico do cerne. Pág 65

Fig14. Acoplamentos COSY do alcaloide 17-O-metil-acagerina. pág 68

Fig15. Correlações HMBC do alcaloide 17-O-metil-acagerina . pág 68

Fig16. Espectro ESI-IT da amostra A4 .pág 70

Fig 17. Espectro ms2 do íon m/z 399. Pág 71

Fig18. Espectro ms2 do íon 307 (acima) e ms3 do íon m/z 276. Pág 72

Fig 19 espectro ms4 do íon m/z 246. Pág 73

Fig 20. Chaves de fragmentação do alcaloide 17-O-metil-acagerina. Pág 73

Fig21. Espectro ms3 do íon m/z 264 que gera o íon m/z 236. PÁG 74

Fig22. Chaves de fragmentação do alcaloide 17-O-metil-acagerina, Pág 75

Fig 23. Estruturas A,B,C e D obtidas através do cálculo de otimização geométrica usando as bases teóricas RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G(2d,p), tendo como ponto de partidas as diferentes possibilidades frente aos cálculos das constantes de acoplamento. pág 80

Fig24. (a) Conformação da otimização geométrica proposta A, (b) conformação de otimização geométrica proposta B (c) conformação da otimização geométrica levando em consideração a conformação W entre os hidrogênios H15 e H21. pág 81

Fig25. Estrutura do alcaloide 17-Ometil acagerina obtida através de cálculo DFT single point usando níveis de cálculo RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G(2d,p) tendo como base a estrutura do alcaloide acagerina obtida por difração de raio x de Dupont et al. Pág 81

Fig26. Etapas de monitoramento e purificação do alcalóide Estrictosidina. Pág 87

Fig27. Estrutura do alcaloide estrictosidina, pág 89

Fig 28 acoplamentos HMBC do alcaloide estrictosidina, pág 89

Fig 29. Espectro de fragmentação CID do íon m/z 531 que gera os íons filhos m/z 514, m/z 369 e m/z 352. pág 92

Fig30. Espectro de fragmentação CID ms2 do íon m/z 514, que gera como fragmento principal o íon m/z 352. pág 92

Fig 31. Espectro de fragmentação CID ms3 do íon m/z 352, que gera o íon m/z 344 de difícil dedução estrutural. pág 93

Fig 32. Chaves de fragmentação do alcaloide estrictosidina. pág 94

Fig 33 Geometria espacial do alcaloide estrictosidina segundo cálculos DFT. pág 97

Fig34 Espectro ms2 do íon m/z 339,17-O-metil acagerina e m/z 355. Pág 102

Fig35. Espectro ms3 do íon m/z 307 e abaixo espectro ms3 do íon m/z 323, ambos originando os íons m/z 276 e m/z 264. Pág 102

Fig 37. Espectro ms3 do íon m/z 296 oriundo do íon m/z339 (acima) e do m/z 355(abaixo) ambos gerando os fragmentos m/z 264 e m/z 236. Pág 103

Fig 38. Espectro ms3 do fragmento m/z 276 oriundo do íon m/z 339 (acima) e do íon m/z 355 (abaixo). pág 103

Fig 39. Possíveis estruturas do alcaloide de massa m.w 354. pág 104

Fig40. Acoplamentos HMBC do alcaloide 4 hidroximetileno-17-O-metil-acagerina. Pág 106

Fig41. Acoplamentos TOCSY de 4-hidroximetileno-17-O-metil-acagerina. Pág 106

Lista de Quadros Tabelas

Tabela 1: Principais *Strychnos* usadas para o preparo de venenos curare segundo Bisset *et al.*, 1992. Pág 28

Tabela 2: Alcalóides curares isolados de *Strychnos*. Pág 41

Tabela 3: Uso medicinal popular de espécies de *Strychnos* da zona do curare. pag 49

Tabela 4. Obtenção de alcaloides de *Strychnos amazônica*. Pág 55

Tabela 5a. íons presentes nas frações obtidas do cerne. pág 66

Tabela 5b. Fragmentos dos íons mais abundantes obtidos por ESI MS² ion trap. Pág 66

Tabela 6. Sinais δ espectros RMN 1 De 2D de 17-metil-akagerina. Pág 69

Tabela 7. Valores de energia eletrônica, energia nuclear e momento dipolo das estruturas A,B,C e D, onde 1 corresponde a valores calculados pelo método B3LYP6-31G(d) e 2 corresponde aos valores calculados pelo método B3LYP 6-311 + (2d,p). pág 77

Tabela 8. Valores de distância das ligações entre os átomos de carbono nitrogênio e oxigênio calculados teoricamente e comparados com dados da literatura. pág 82

Tabela 9. Comparação de ângulos de torção entre as estruturas calculadas a nível de teoria B3LYP 6-31G(d) e B3LYP 6-311G+(2d,p) e com a estrutura obtida experimentalmente do trabalho de Dupont *et al.* Pág 83

Tabla 10. Comparação de sinais de ¹³C em δ obtidos teoricamente e experimentalmente relativos a 17-O-metil-acagerina. Pág 85

Tabela 11 Sinais δ dos espectros RMN 1D e 2D do gluco alcalóide strictosidina.pág 89

Tabela 12 Distâncias das ligações interatômicas calculadas teoricamente a nível de teoria B3LYP 6-31 G (d) para a Strictosidina. Pág 97

Tabela 13. Valores teóricos e experimentais de RMN ¹³C do alcaloide strictosidina.pág 100

Tabela 14. Sinais em δ de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina. Pág 107

Tabela 15. Matrizes de convergência entre espécime alvo e diversas espécies de *Strychnos* calculados para genes concatenados. Pág 109

Tabela 16. Índice das exsicatas coletadas no herbário e seus respectivos códigos, obs: amostras com índice 6 e 7 são as amostras alvo do respectivo trabalho. Pág 109

Sumário

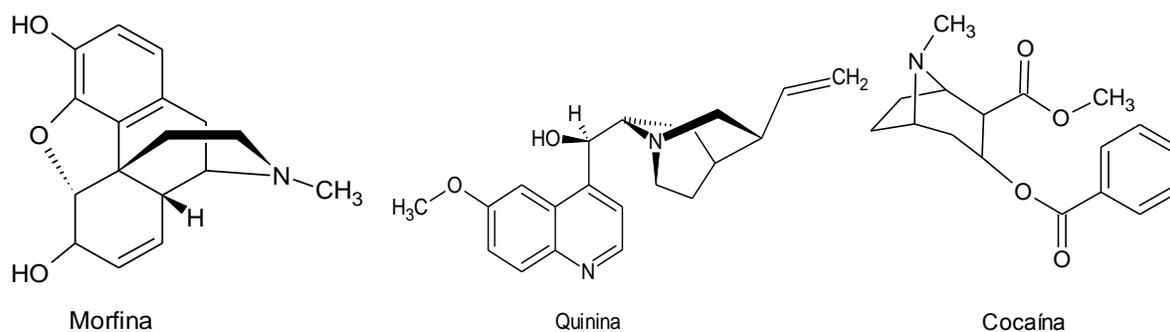
Abstract	6
Resumo.....	7
1. Introdução.....	15
2. Revisão da literatura	18
2.1. Família Loganiaceae	18
2.1.1. Gênero <i>Strychnos</i>	19
2.1.2. <i>Strychnos tetanizantes</i> e curare.....	22
2.1.3. Espécies Tetanizantes	22
2.1.4. Eestricnina e outros alcaloides tetanizantes.....	23
2.1.5. <i>Strychnos</i> e o curare.....	26
2.2. Aspectos Etnobotânicos	46
2.3 A espécie <i>Strychnos amazonica</i> Krukoff.....	50
3. Objetivos	51
3.1. Objetivo Geral:	51
3.2. Objetivos Específicos:	51
4. Metodologia.....	52
4.1. Análises cromatográficas	52
4.2. Solventes e reveladores	52
4.3. Métodos espectroscópicos e espectrométricos	53
4.4. Coleta do Material Botânico	53
4.5. Obtenção dos extratos brutos	53
4.6. Marcha química para obtenção das frações alcaloídicas	54
4.7. Perfil Químico das frações alcaloídicas	55
4.8. Obtenção de alcaloides	55
4.8.1. Alcaloides do cerne do caule	55
4.8.2. Alcalóide das folhas.....	57
4.9. Realização do Ensaio Biológico	57
4.9.1. Atividade antimicrobiana.....	57
4.10. Identificação botânica por barcoding	59
4.11. Metodologia computacional.....	60
5. Resultados	61
5.1 Identificação de S1 e S2	61
5.2. Perfis alcaloídicos	64
5.3. Identificação estrutural do sólido A4	65
5.3.1. Estudos de fragmentação por espectrometria de massas do sólido A4	70
5.3.2. Otimização geométrica	76
5.3.3. Estudo de RMN teórico	84
5.4. Identificação estrutural do A6.....	86

5.4.1.	Estudos de fragmentação por espectrometria de massas	91
5.4.2.	Otimização geométrica	95
5.4.3.	Estudo RMN teórico	99
5.5.	Identificação estrutural do sólido A7	101
5.6.	Resultados antimicrobiano	108
5.7.	Resultado barcoding	109
6.	Conclusões.....	111
7.	Bibliografia.....	113
8.	Anexo-Dados espectrais das substâncias isoladas	125
8.1.	Espectro RMN ^1H S1 – 400 MHz	125
8.2.	Espectro RMN ^1H S2 – 400 MHz	126
8.3.	Espectro RMN ^{13}C S2 – 100 MHz	127
8.4.	Espectro RMN ^1H do alcaloide A4- 400 MHz.....	128
8.5.	Espectro HSQC do Sólido A4.....	132
8.6.	Espectro COSY do Sólido A4.....	133
8.7.	Espectro HMBC do alcaloide A4.....	134
8.8.	Espectro H^1 do alcaloide A6 – 600 MHz	135
8.9.	Espectro HSQC do alcaloide A6.....	140
8.10.	Espectro HMBC do alcaloide A6.....	141
8.11.	Espectro HSQC do alcaloide A7 – 600 MHz.....	142
8.12.	Espectro HMBC do alcaloide A7 – 600 MHz.....	143
8.13.	Espectro TOCSY alcaloide A7 – 600 MHz	144

1. Introdução

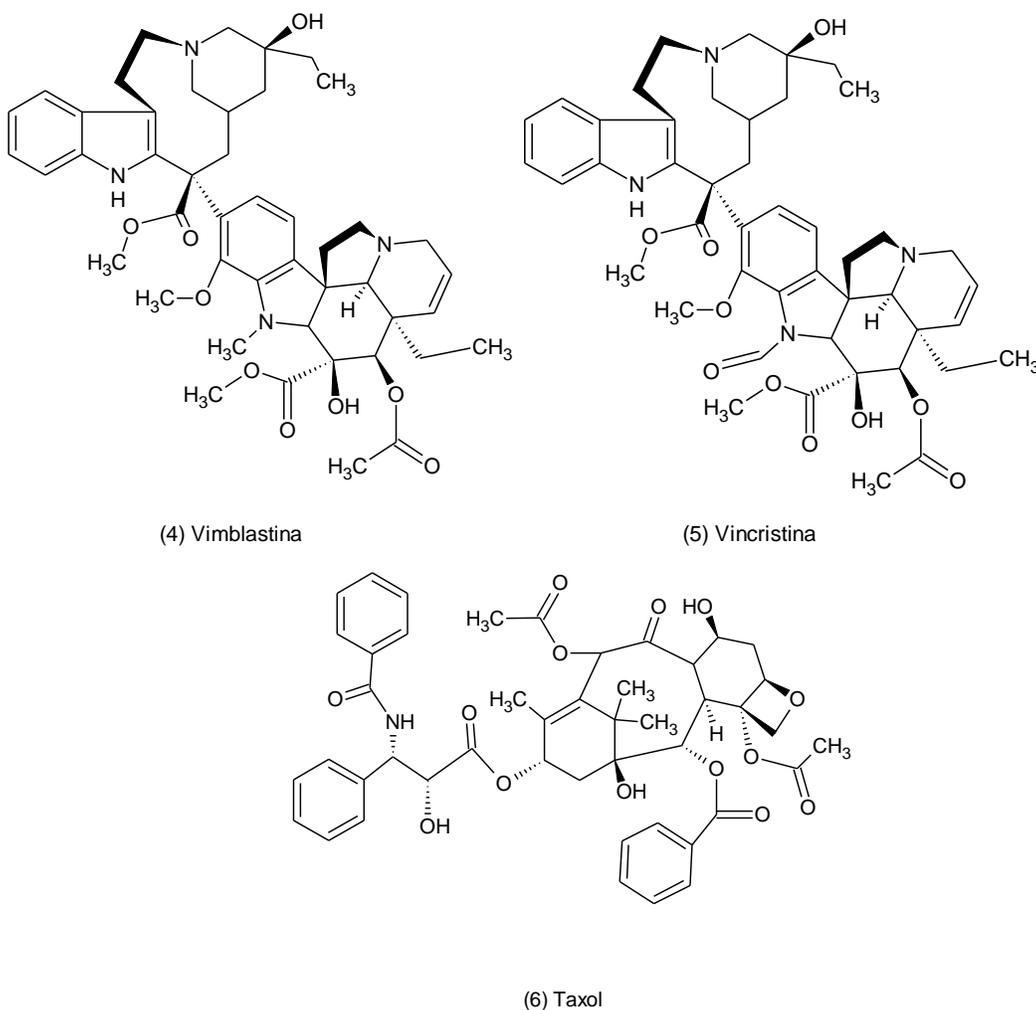
A Amazônia representa um imenso reservatório de novas moléculas, sendo uma das áreas de maior biodiversidade em espécies vegetais do planeta (Gottlieb et al.,1996.). Entretanto, apenas 1% desta riqueza foi investigada fitoquimicamente e a percentagem submetida a estudos de bioatividade é ainda menor (Strobel, 1998). Assim a intensificação do estudo da sua flora é fundamental não somente pela perspectiva de se conhecer espécies inéditas e esclarecer a sistemática de diversos grupos taxonômicos, mas também pela necessidade de se chegar a descoberta de moléculas bioativas importantes. Os primeiros registros de estudos científicos sobre plantas medicinais resultaram no isolamento de alguns princípios ativos, que se consagraram como eficazes e ainda hoje são bastante empregados na clínica médica, a exemplo dos alcaloides morfina (1), quinina (2) e cocaína (3) (Fig 1).

Fig 1. Alcaloides: Morfina, Quinina e Cocaína



A descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (4) (Velban[®]), vincristina (5) (Oncovin[®]) e o taxol (6) (plaxitaxel; Taxol[®]), despertou o interesse das indústrias farmacêuticas pela busca de fármacos de origem vegetal devido a sua complexidade estrutural dificultar processos de síntese (Montanari & Bolzani, 2001). Estima-se que a participação de fármacos no mercado ou cerca de 50 bilhões de dólares/ano entre 1990 e 2001 (Pinto et al., 2002).

Fig. 2: Alcalóides: Vimblastina, Vincristina, Taxol e Talidomida



Grande parte dos estudos fitoquímicos baseiam-se em aspectos etnobotânicos característicos, principalmente nos que circundam os aspectos etnofarmacológicos. Dentro desse âmbito o gênero *Strychnos* surge como uma

nova alternativa farmacológica em virtude da presença de alcalóides quaternários, que por muitos anos chamaram a atenção do homem em virtude do seu emprego no preparo do curare. Tendo em vista que a taxa de espécies com atividade citotóxica ou anticâncer usadas como venenos de ponta de flecha revelou-se cinco vezes superior à taxa apresentada pelo total das espécies pesquisadas, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Farnsworth & Kaas, 1981). As pesquisas atuais em *Strychnos* têm se voltado para este alvo, revelando estruturas de alcaloides indólicos com significativa ação antimitótica, antimicrobiana, amebicida, hipotensiva e antipalúdicas (Phillipe et al., 2004).

Deste modo, a potencialidade químico-farmacológica do gênero *Strychnos*, inerente a sua posição filogenética e história na etnomedicina, aliada à carência de estudos botânicos, químicos, farmacológicos e quimiotaxonômicos das espécies americanas, justifica um estudo sistemático e contínuo do gênero em um amplo contexto.

2. Revisão da literatura

2.1. Família Loganiaceae

Família heterogênea composta por 470 espécies divididas em 29 gêneros de distribuição tropical e subtropical, com algumas espécies vivendo em zonas temperadas. É representada por quatro gêneros principais: *Strychnos*, *Spigelia*, *Potalia* e *Bonyunia*. (Ribeiro et al., 1999)

As folhas de espécies da família Loganiaceae são sempre opostas e raramente verticuladas ou agrupadas no ápice, simples, inteiras alobadas, estipuladas e o pecíolo, às vezes, tem uma estípula interpeciolar (*Potalia* e *Spigelia*). As folhas de *Strychnos* são 3-7 nervadas, diferentes das outras Loganiaceae, e as espécies brasileiras possuem gavinhas axilares em forma de gancho. A inflorescência é variada, normalmente paniculada, panículas cimosas ou cimeiras escorpióides, terminais ou axilares. As flores de *Strychnos* são, geralmente pequenas atingindo 3 cm de comprimento, de coloração branca, creme-amarelada, esverdeada ou alaranjado-pálida e internamente tomentosas. O fruto varia de uma cápsula 2-valvada (*Spigelia*), frequentemente com sementes aladas ou uma baga (*Strychnos*) ou drupa (*Potalia*) carnosa e indeiscente. A polpa dos frutos de *Strychnos* é adocicada e carnosa, servindo de alimento para animais e peixes de várzea. Apesar de a planta ser tóxica, algumas espécies são consumidas por humanos (*Strychnos parviflora*)(Ribeiro, 1996).

2.1.1. Gênero *Strychnos*

O gênero *Strychnos* é muito conhecido pelo fato de suas plantas produzirem metabólitos de propriedades venenosas, como o alcalóide eestricnina. *Strychnos* é um gênero pantropical que compreende cerca de 200 espécies que são divididas em três grupos separados geograficamente: Um na América Central e do Sul (cerca de 73 espécies) outro na África (75 espécies) e um na Ásia, incluindo Austrália e Polinésia (45 espécies) (Neuwinger, 1996). A hiléia é o centro de dispersão de *Strychnos* que ocorre principalmente em mata virgem ou em capoeira, com algumas espécies em áreas alagadas (igapó ou várzea) (Ribeiro et al, 1999).

O gênero *Strychnos* começa como arbustos eretos, mas depois com o crescimento tornam-se lianas de dossel. No Brasil, somente duas espécies são lianas (*S.pseudoquina* e *S. rubiginosa*). No campo, pode ser identificada pelo hábito do caule que é cilíndrico. A casca da maioria das espécies é amarga e com cheiro forte e desagradável, exceto a da *S. parviflora*, que tem cheiro de cravo, conhecida como cipó-cravo. Quando jovens, *Strychnos* podem ser confundidas com Melastomaceae com folhas opostas e ventilação palmada (Neuwinger,1996).

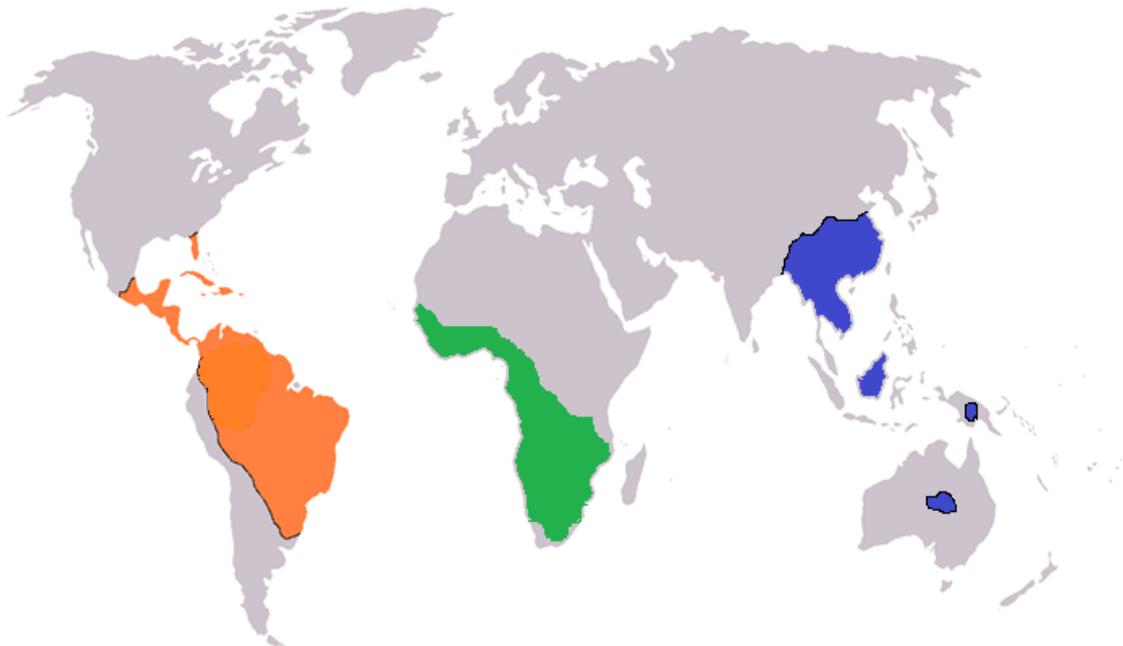


Fig3. Distribuição do gênero *Strychnos* pelo mundo, podendo ser dividida geograficamente em tres grupos, um na América do central e do sul, uma na África e um na Ásia

Devido a sua toxicidade, muitas espécies foram usadas para extrair venenos usados em ponta de flechas ou como poções por parte dos índios da Amazônia (Phillipe, 2004). Os alcaloides presentes nesse gênero, aos quais são atribuídas tais propriedades tóxicas, apresentam dois meios diferentes de mecanismo de toxicidade: eestricnina e seus derivados, alcaloides terciários que possuem atividade convulsivante (tetanizante) e os alcaloides quaternários, que possuem ação paralisante e são componentes do curare. O curare é um veneno de origem vegetal preparado por algumas tribos de índios que vivem nas regiões montanhosas e cobertas de matas da América Equatorial (Bisset, 1992b). Tem aspecto de alcatrão, possui sabor muito amargo e pode ser produzido por plantas pertencentes a dois gêneros: *Chondodendron* (família Menispermaceae, *C.*

tomentosum, *C. toxicofera* e *C. candicans*), que produz alcaloides isoquinolínicos e *Strychnos* (Loganiaceae), que produzem os alcaloides indólicos monoterpênicos (Bruneton, 1999).

Em 1895, baseado nos ingredientes usados no preparo do curare, Boehm (1895) criou a seguinte classificação:

- *Calabash curare*: produzidos a partir de plantas pertencentes à família Loganiaceae
- *Tabo curare*: produzidos a partir de plantas pertencentes à família Menispermaceae
- *Pot curare*: produzido pela mistura de plantas pertencentes às famílias Loganiaceae e Menispermaceae

Em virtude de suas propriedades tóxicas, o curare foi usado pelos índios tanto na caça quanto na guerra (Biocca, 1954) o que despertou o interesse dos pesquisadores pelo seu incrível poder paralisante e aplicabilidade medicinal. Várias espécies de *Strychnos* estão envolvidas na elaboração do curare, tendo ação tóxica, como por exemplo: *S. amazonica*, *S. castelnaeana*, *S. panamensis*, *S. solimoesana*, *S. subcordata*, *S. tomentosa*, *S. trinervis* e *S. toxifera* (Bisset, 1992b).

2.1.2. Strychnos tetanizantes e curare

Acreditava-se que *Strychnos* contendo agentes convulsivantes (tetanizantes) tais como a eestricnina, eram provenientes apenas da Ásia, ao passo que as *Strychnos* provenientes do continente americano eram espécies produtoras de alcaloides curarizantes (quaternários). Entretanto, em 1971, uma importante descoberta realizada por Angenot, em Ruanda quebrou tal mito. Percebeu-se que os caçadores da tribo Banyambo, que habitavam região próxima ao rio Akagera, usavam cascas de *S.usambarensis* para o preparo de venenos de caça. A análise de tal planta evidenciou a presença de alcaloides curarizantes previamente isolados de *Strychnos* sul-americanas (Angenot, 1971). Estudos posteriores de *S. nux vomica* e *S. icaia*, conhecidas por apresentarem atividades convulsivantes, revelaram a presença de alcalóides bis indólicos quaternários na casca de suas raízes e sementes (Philippe, 2004; Bassleer et al, 1982; Bisset e Philipson, 1976; Kambu et al 1980; Yang et al, 2010).

2.1.3. Espécies Tetanizantes

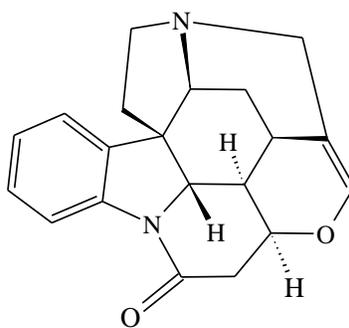
Os efeitos tetanizantes ou convulsivantes, podem ser diferenciados em convulsões espasmódicas ou tônicas. Na convulsão espasmódica ocorre uma alternância entre contração e relaxamento muscular ao passo que na tônica, uma rigidez mais prolongada é observada. A atividade orgânica se realiza por um efeito antagônico da glicina, um importante inibidor da transmissão de impulsos nervosos da espinha dorsal (Laube et al, 2002). As espécies *Strychnos* tetanizantes são espécies que contém eestricnina ou alcalóides terciários

análogos, possuindo atividade convulsivante. Presente principalmente em *Strychnos* asiáticas como *S. nux vomica*, *S. iginatti* e *S wallichiana*, assim como em *S. lucinda*, proveniente da Austrália. Das espécies africanas, *S. icaja* é a única da qual foi isolada estricnina e das espécies americanas o mesmo alcaloide só foi encontrado em *S.panamensis* (Marini-Betollo, 1972).

2.1.4. Eestricnina e outros alcaloides tetanizantes

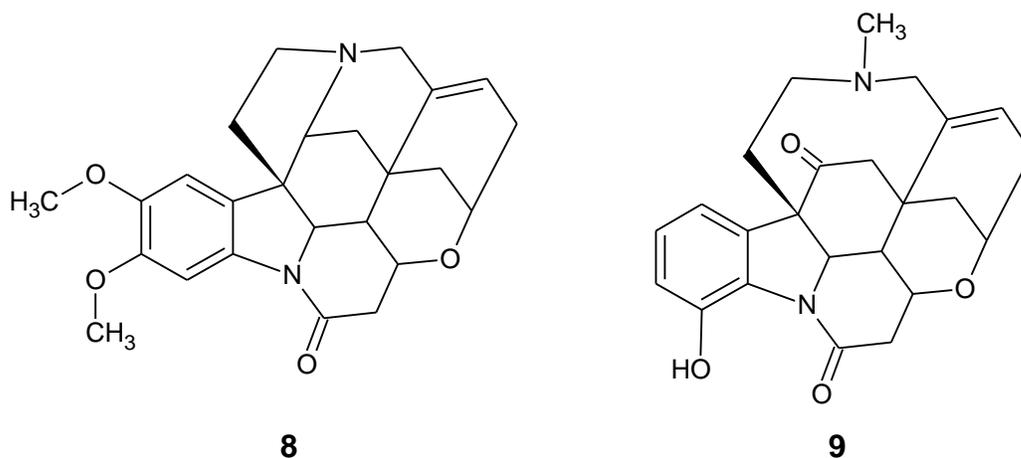
É um alcalóide indolomonoterpênico de massa molecular 334.2 pertencente ao grupo estricnano altamente tóxico. Foi isolado pela primeira vez em 1818-1819 por Pelletier e Caventou das sementes de *S.nux vômica*. A estrutura química dessa molécula foi elucidada em 1947 por Sir Robert Robinson por cristalografia de raio X e em 1963 sua síntese foi realizada por Woodward *et al.* (Phillipe, 2004)

Figura 4. Estrutura do alcalóide eestricnina



Tal molécula é acompanhada na planta por outros alcalóides derivados da mesma como a brucina, pseudoestricnina, icajina, vomicina e novacina. Tais compostos podem estar presentes em muitas espécies do gênero, entretanto a composição química de muitas *Strychnos* continua desconhecida (Phillipe, 2004).

Figura 5. Estrutura dos alcalóides: (8) Brucina, e (9) Vomicina



Em geral alcalóides que contém esqueleto do tipo eestricnina possuem propriedades convulsivantes, podendo apresentar grande ou pequena atividade, Ohiri et al (1983) citam um estudo feito por Sandberg and Kristiansson (1970) que comparou a atividade convulsivante de diversos alcalóides do tipo eestricnina e os dividiu em quatro grupos

- Grupo 1- alcalóides da série normal e pseudo: Eestricnina e 12-hidroxi-eestricnina, pertencentes a série normal, são os mais potentes do grupo. O grupo fenólico em 12-hidroxi-eestricnina faz uma ligação de hidrogênio com a carbonila da amida na posição 1, reduzindo assim a dispersão eletrônica do grupo hidroxil e do grupo carbonila. Tal efeito proporciona a 12-hidroxi-eestricnina propriedades adsorvitivas similares a da eestricnina.

Compostos que possuem substituintes hidroxila e metoxila na posição 10 e 11 apresentam uma grande diminuição no efeito convulsivante, indicando que átomos de nitrogênios livres nas posições 10 e 11 são importantes como receptores. Eestricnina N-óxido possui pouco efeito

convulsivante, sugerindo que um nitrogênio terciário sem substituintes é essencial para a atividade. Todos os alcalóides terciários desse grupo possuem atividades convulsivantes, em virtude do esqueleto similar ao da estricnina, porém com algumas modificações.

- Alcalóides da série pseudo-sec-N-metil: Icajina e vomicina

Os alcalóides pertencentes a esse grupo são análogos a estricnina, porém com uma atividade convulsivante menos expressiva. A explicação reside no fato de os alcalóides possuírem um anel, com um grupo 3-ceto, retrátil, fazendo com que o grupo cetona fique na parte de trás da molécula, conferindo uma menor conectividade com o sítio do receptor.

A metilação do nitrogênio na posição 4 torna a substância menos acessível ao sítio do receptor, o que leva a um decréscimo substancial na atividade convulsivante. A introdução de um grupo hidroxila na posição 15, a adição de um grupo epoxy nas posições 19, 20 ou a abstração da dupla na posição 19, 20 também produz um decréscimo na atividade convulsivante.

- Alcalóides tipo Diabolina: Mudanças no esqueleto básico da estricnina, como a abertura do anel e a presença de um grupo hidroxila na posição 17 causa um decréscimo na atividade tóxica.
- Alcalóides tipo Espermoestricnina: Os alcalóides desse grupo também são muito tóxicos, porém assim como nos grupos anteriores mudanças no esqueleto básico da estricnina tornam sua atividade tóxica diminuta.

No que concerne à atividade convulsivante, os alcaloides que possuem esqueleto tipo estriçnina são os mais proeminentes, porém vale destacar os alcaloides tipo acagerina. Verpoorte et al, 1975, testou acagerina e constatou atividade convulsivante. Trabalhos posteriores (Rolfsen et al., 1978, 1980b), testaram os alcaloides derivados da acagerina e comprovaram as atividades convulsivantes dos mesmos. A presença de grupo metil nas posições 17, 21 e a introdução de um grupo hidroxil na posição 10 não influi na atividade tóxica dos alcalóides desse grupo.

2.1.5. *Strychnos* e o curare

O veneno das flechas dos índios é referido nos antigos livros, pelas mais diversas denominações, isto é facilmente explicável se considerar o grande número de línguas indígenas existentes na América equatorial (Biocca, 1954). Entretanto este veneno ainda é conhecido como *curare* ou *curaro* e farmacologicamente, está relacionado à atividade paralisante ou relaxante de uma substância atuante nas junções neuromusculares (Philippe, 2004; Bisset, 1992b). O animal quando atingido pela flecha envenenada pelo curare é imobilizado rapidamente, os primeiros músculos a serem paralisados são os do pescoço, da nuca e depois os dos membros. O diafragma resiste mais tempo. A morte sobrevém lentamente por asfixia devido à impossibilidade de respirar (Neuwinger, 1996; Biocca, 1954; Vellard, 1959).

Conhecido na Europa há séculos, o curare chamou atenção de grandes pesquisadores, etnólogos, fisiologistas e químicos. Seu emprego na clinica foi

tentado muitas vezes no passado, entretanto somente em 1942 foi introduzido na cirurgia como coadjuvante da anestesia e desde então o curare teve aplicações cada vez mais amplas (Bennet, 1968).

Na América do Sul seu uso abrangeu uma ampla região que se estendia da Guiana Francesa ao Mato Grosso, passando pelo norte e oeste da bacia amazônica, o médio e norte da Bacia do rio Orenoco, montanhas do Equador e Peru (Fig 6) (Bisset, 1992b). A zona do curare envolvia 15 famílias lingüísticas diferentes, enquadradas sob o ponto de vista cultural, cuja principal característica era agricultura de “corte e queima”, onde tinha mandioca como produto básico. Estas famílias possuíam vilas mais estáveis, tecnologia mais desenvolvida em relação às tribos vizinhas e melhores meios de comunicação. Registra-se também um intenso intercâmbio entre essas tribos, que seria responsável pela difusão dos curares. Muitas tribos excluídas desse ciclo cultural, como os Guaharibo, Karijona, Makú e Nambikuara, também produziam curares (Ribeiro & Melo de Carvalho, 1959).

Segundo Krukoff (1972), 21 espécies de *Strychnos* eram usadas para o preparo de venenos curare. Em 1992 Bisset adicionou novas espécies de *Strychnos* à lista: *S. amazonica*, *S. dariensis*, *S. usumbarensis* e *S. ignatii* (casca da raiz) (Philippe, 2004; Bisset, 1992a), totalizando 25 espécies (Tabela 1). Porém vale ressaltar que muitas espécies contendo alcalóides não eram usadas no preparo do veneno.

Tabela 1: Principais *Strychnos* usadas para o preparo de venenos curare segundo Bisset *et al.*, 1992.

Espécies Curare	Região localizada
<i>S. rondeletioides</i> Spruce ex. Benth	Colômbia, Venezuela
<i>S. brachiata</i> Ruiz et Pav	Colômbia
<i>S. toxifera</i> Rob Schomb. ex. Benth	Panamá, Colômbia, Venezuela, Equador, Guiana, Guiana Francesa
<i>S. tomentosa</i> Benth	Guiana, Guiana Francesa e Brasil
<i>S. javariensis</i> Krukoff	Colômbia, Peru e Brasil
<i>S. sandwithiana</i> Krukoff et Barneby	Brasil
<i>S. jobertiana</i> Baill	Colômbia, Equador, Brasil e Peru
<i>S. solimoesana</i> Krukoff	Brasil
<i>S. peckii</i> B. L. Robinson	Colômbia, Equador e Brasil
<i>S. erichsonii</i> Rich. Schomb. ex. Prog.	Colômbia, Guiana e Suriname
<i>S. bredemeyeri</i> (Schultes) Sprague et Sandw.	Guiana e Brasil
<i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var. mitscherlichii	Equador, Guiana, Equador e Brasil
<i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var pubescentor Sandw.	Colômbia
<i>S. amazonica</i> Krukoff	Colômbia
<i>S. solerederi</i> Gilg	Colômbia e Brasil
<i>S. darienensis</i> Seem	Equador
<i>S. ignatii</i> P. Bergius	Malásia
<i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart	Colômbia, Venezuela, Equador, Suriname e Brasil
<i>S. glabra</i> Sagot ex. Prog.	Guiana francesa e Brasil

<i>S. subcordata</i> Spruce ex. Benth	Colômbia e Brasil
<i>S. panurensis</i> Sprague et Sandw	Colômbia e Venezuela
<i>S. cogens</i> Benth	Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil
<i>S. usambarensis</i> Gilg	Ruanda
<i>S. castelnaeana</i> Wedd	Peru e Brasil
<i>S. progeliana</i> Krukoff et Barneby	Brasil

Até o século XVIII não existia um conceito que diferenciava os venenos preparados pelos índios, sendo estes confundidos. Havia relatos de emprego por parte das tribos caribenhas de sucos vegetais em flechas, causando profundo terror nos exploradores, porém com efeitos diferentes dos curares. A partir do momento da conquista muitas lendas foram aplicadas ao curare com relação ao seu preparo, ao cuidado na escolha das plantas, à obtenção de princípios ativos, aos rituais secretos e à morte dos preparadores (Vellard, 1959).

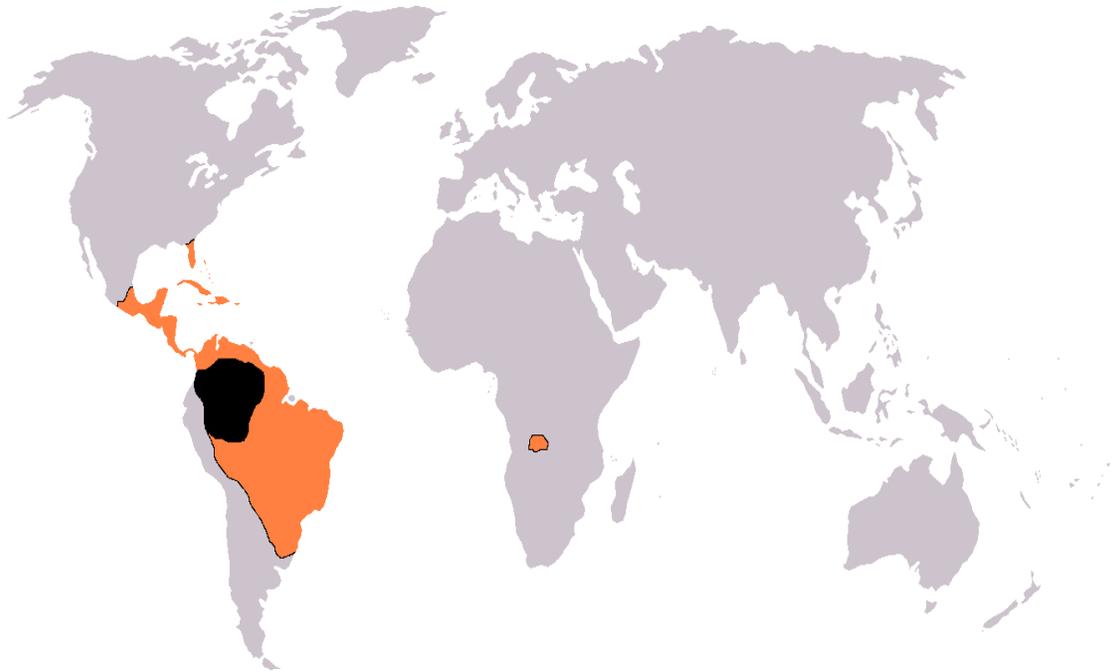


Fig.6. Distribuição de *Strychnos curare*, região preta em destaque chamada de Hiléia, abrange a bacia do Amazonas e do Orinoco

2.1.5.1. *Historia dos curares*

Nas antigas crônicas há uma vasta informação sobre o emprego de venenos de origem vegetal em flechas, seus sintomas produzidos e até mesmo a fabricação por parte de algumas tribos. Dentre os relatos dos cronistas registram-se que, após serem atingidos pelas flechas envenenadas, os exploradores apresentavam convulsões e morte dentro de 24 horas em meio à dor excruciante (Aguado, 1920; Herrera, 1727).

Na primeira metade do século XVI, quando começaram as crônicas relacionadas à conquista do continente americano é que se iniciou o relato em torno da ação dos venenos de flecha. Uma das primeiras publicações a respeito do assunto parece ser a do italiano Pietro Martire d'Anghera em seu livro *De orbe*

novo em 1530, entretanto em 1516, em uma carta enviada ao Papa Leão X, relata o uso de poções a base de vegetais onde mulheres idosas morriam durante seu preparo (D'Anghera, 1530). Em 1553 Cieza de León escreveu em sua *Crónica Del Perú* a respeito de uma erva conhecida pelos índios de Cartagena e Santa Marta por suas propriedades venenosas. Ainda acrescenta que eram utilizados muitos outros ingredientes no preparo de poções venenosas como, aranhas, vermes venenosos, sapos, cabeças e caudas de serpentes, variedades de plantas, onde sempre era escolhido um escravo, uma mulher idosa ou índio de pouco valor no preparo do curare, devido aos vapores venenosos durante a fervura serem mortais (Vellard, 1959; Leon, 1553)

A descrição de Lopez de Gomara na crônica *Historia general de las Indias* (1553) (Gomara, 1553), resume bem os conhecimentos da época, relatando que os indígenas faziam poções venenosas com uma erva de diferentes formas, onde cita o preparo de um veneno em que se misturavam sangue de cobras, uma planta que se parecia uma cerra, uma goma de uma determinada árvore e frutos venenosos de *Hippomane mancinella* (Vellard, 1959). Descreve ainda que uma anciã era trancafiada pelos índios em uma cabana com os ingredientes para preparar o veneno, se depois de um determinado tempo, no momento em que se abria o local, a anciã fosse encontrada viva ou moribunda, o veneno era lançado fora e a mesma, condenada a graves torturas (Biocca, 1954). Venenos a base de *Hippomane mancinella* eram bastante conhecidos por todas as tribos guerreiras que habitavam as margens do caribe, Colômbia, Venezuela, penetrando até a Guiana e se estendendo do sul da Amazônia ao norte do México (Vellard, 1959). Durante todo o século XVII outros cronistas e historiadores repetiram mais

descrições absurdas sobre a preparação e atividade desses venenos(Biocca, 1954).

No século XVIII os jesuítas do Rio da Prata citam um veneno utilizado para guerra pelos índios Chiquitos, no norte do Chaco, onde relatam também o preparo por mulheres idosas que não sobreviviam devido aos vapores tóxicos e que ao penetrar em um simples arranhão era capaz de causar a morte de um ser humano. Ainda descrevem que quando uma árvore era atingida por uma flecha impregnada com esse veneno, suas folhas caíam e o tronco secava (Lozano, 1733; Paucke, 1765).

Antes do século XVIII não se havia criado um conceito adequado para o curare, havendo uma grande confusão com outros venenos empregados em flechas, ficando sempre envolvido em um profundo mistério (Vellard, 1959). Uma das primeiras observações importantes a cerca do curare parece ser a de Alonso Perez Tolosa em 1548 (Tolosa, 1881) e que mais tarde foi reportado por Lucas Fernandes de Piedrahita, onde acrescenta o uso de flechas utilizadas pelos índios que produziam uma letargia profunda nos invasores (Piedrahita, 1688).

O termo Curare é uma corruptela das palavras indígenas “ourari” ou “uiraery” (Rodrigues, 1903), erroneamente se dava crédito à Sir Walter Raleigh pelo uso do termo *Ourari*, por levar a Europa o veneno em 1595, o que não é verdade, pois sim Sir L. Keymis foi primeiro a designar tal expressão para os venenos que causavam paralisia, quando explorava a região do Orenoco em 1596 (Linheart, 2009). Tal termo parece ter origem na Guiana e se referia a lianas do gênero *Strychnos*, (Vellard, 1959) por outro lado reporta-se que o significado remete aos índios que usavam venenos para caçar (Bisset, 1992a). Entretanto a etimologia da

palavra empregada por varias tribos e proposta por vários autores não se sustenta em nenhuma base lingüística séria (Biocca, 1954; Bisset, 1992b, Vellard, 1959).

Na segunda metade do século XVIII as observações se multiplicaram e vários autores a partir de então começaram a descrever com exatidão a preparação do curare (Vellard, 1959). Juan George e Antonio de Ulloa (Ulloa, 1930) em *Relacion histórica del viaje a La America Meridional*, publicada em Madrid em 1748 forneceu o primeiro documento importante sobre a preparação do curare. Junto com Ulloa, La Condamine (Condamine, 1751) percorreu o Rio Amazonas e descreveu sumariamente a preparação do veneno, que seria feito com extrato concentrado ao fogo de mais trinta plantas diferentes. Também La Condamine se refere a história das mulheres idosas condenadas a morrer durante a preparação do veneno.

Podemos considerar acabado o obscurantismo medieval que se relacionava ao curare em 1781 com F.Fontana (Biocca, 1954). De fato, em 1781 ele publicou um admirável tratado sobre o veneno americano no qual demonstrava com extraordinária profundidade e precisão a ação paralisante do curare sobre os músculos do corpo e a resistência do músculo cardíaco ao veneno (Fontana, 1781).

A primeira planta de curare identificada botanicamente foi coletada no Suriname e descrita, em 1783, com o nome de *Toxicaria americana*, sendo posteriormente identificada como *Strychnos guianensis* (Ducke, 1955). Entretanto é a chegada de Humboldt e Bonpland à América, no começo do século XIX, que assinala o início das pesquisas científicas sobre o curare (Pinheiro, 2000). Humboldt e Bonpland tiveram o privilégio de assistir a preparação do curare no Alto Orinoco, em uma

localidade chamada Esmeralda. A descrição minuciosa se encontra no livro “*Voyage aux regions equinoxiales Du Nouveu Continent*”. Provavelmente a descrição mais importante relatada até os dias de hoje, onde assinala com clareza os pontos essenciais na preparação do curare (Biocca, 1954). O método usado pelos índios foi estudado cientificamente e consistia em duas etapas. No primeiro são extraídos e concentrados lentamente pelo calor os princípios ativos do que eles denominavam de *Bejuco do Mavacure*. No segundo os índios conseguem mediante a adição de segundo suco de uma planta chamada *Kirakaguero*, provocam uma modificação na cor e na consistência do extrato, que se torna escuro e consistente como o alcatrão (Humboldt, 1804).

Humboldt não hesita em considerar o *Bejuco do mavacure* como sendo uma *Strychnos* (Biocca, 1954). Muitos anos após a viagem de Humboldt e Bonpland, um outro naturalista, Waterton, descreveu a preparação do curare segundo o método dos makuxí, nas regiões do Alto Essequibo, atual Guiana Inglesa (Waterton, 1891). A descrição por ele feita não fornece dados muito relevantes, talvez o relato mais importante seja relativo ao tratamento do envenenado, onde afirma que enchendo os pulmões de ar por meio de um fole, pode-se retardar o efeito do veneno, porém afirma a existência de um antídoto por parte dos índios . Na Guiana inglesa Robert e Richard Schomburgk em sucessivas expedições, se ocuparam do curare, indicando que os índios *Makuxi* utilizavam *Strychnos toxifera* como ingrediente, entretanto não conseguiram obter dos índios o preparo do mesmo (Schomburgk, 1841). O irmão Richard Schomburgk afirmou mais tarde ter presenciado o preparo do curare, publicando tal relato em 1879 (Schomburgk, 1879) sendo esta considerada a descrição mais importante que existe atualmente

sobre os índios da Guiana Inglesa, entretanto pesquisadores descobriram que tal descrição foi uma mera cópia de uma carta do missionário T. Yound enviada à seu irmão Robert Schomburgk, que inclusive publicou antes tal relato em 1841 (Biocca, 1954).

O caminho aberto por Fontana foi seguido quase um século depois pelo grande fisiologista francês Claude Bernard o qual pôde confirmar com fatos que o veneno age seletivamente sobre as sinapses neuromusculares, impedindo que o impulso nervoso passe ao músculo (Bernard, 1857).

Depois do Claude Bernard os fisiologistas procuraram interpretar o mecanismo pelo qual se determina o bloqueio da terminação nervosa ao nível das sinapses neuromusculares. No princípio do século XIX foi admitida a hipótese de que o curare agisse modificando o isocronismo elétrico que deveria existir entre o nervo e o músculo excitado. Entretanto descobriu-se mais tarde que os alcaloides presentes no curare agem no processo antagônico de competição com acetilcolina (Bowman, 2006).

Segundo Biocca (Biocca, 1954) a história dos curares pode ser dividida em dois períodos, um período de lendas e outro de pesquisas científicas, porém é difícil fixar uma data que indique o fim e o início de cada período, pois muitos absurdos sobre o curare foram escritos até o final do século XVIII, época em que se deu início o clássico trabalho de F. Fontana, publicado em 1781 e a viagem dos naturalistas Humboldt e Bonpland, iniciada em 1799.

2.1.5.2. Alcalóides *curare de Strychnos*

Cerca das 40 espécies de *Strychnos* que vem sendo investigadas ao longo de aproximadamente 100 anos de pesquisa, 200 alcalóides diferentes já foram isolados, grande parte pertencente ao grupo dos alcaloides indólicos que biogenticamente são derivados da triptamina e secologanina, onde a atividade paralisante/convulsivante é a que mais chamou atenção (Ohiri et al, 1983).

Os primeiros estudos sobre a constituição química dos curares foram feitos por Boussingault, a convite de Bolívar, por indicação de Humboldt. Em 1828, junto com Roulin, Boussingault, relatou que o *Bejuco do Mavacure* não continha estricnina, mas alcalóides altamente hidrossolúveis, posteriormente identificados como sais de amônio quaternários (Boussingault e Roulin, 1828). Seguiram-se os trabalhos de Boehm mostrando que nos curares, além de sais de amônio, denominados curarinas, existem bases terciárias, as curinas, sem efeitos curarizante (Boehm, 1895). Trabalhos de King, Barredo-Carneiro, Marini-Bettolo e outros, confirmaram que alcalóides dos curares eram idênticos ou aproximadamente relacionados aos obtidos dos extratos de plantas usadas em suas preparações, com destaque para o alcaloide *d*-tubocurarina, isolado inicialmente de tubo curare e depois no gênero *Chododendron* (Pinheiro, 2002). Sabe-se, todavia, que alcaloides do curare são muito sensíveis a ácidos e ao calor, podendo sofrer transformações durante os processos de extração, tanto no laboratório como nas preparações artesanais (Karrer et al, 1959).

Karrer et al descrevem que a atividade curarizante de alcalóides de *Strychnos* está associada a 2 grupos de amônio quaternários presentes na molécula (Karrer,

1959), entretanto alcaloides contendo apenas um grupo amino quaternário ou 1, 2, 3 grupos amino já apresentam atividade relaxante muscular (Ohiri et al, 1983). Os alcaloides que apresentam atividade curarizante/relaxante muscular isolados de *Strychnos* são listados na Tabela 2.

2.1.5.2.1. Decussina, Rouhamina, Malindina (Alcalóides trinitrogenados):

Coune (1980) elaborou uma classificação de alcaloides indólicos onde os mesmos são organizados de acordo com sua posição na evolução metabólica.

Segundo a classificação proposta por Coune o grupo I é formado pelos Glucoalcalóides (Dolichantosida derivados) e alcaloides trinitrogenados (Angustina derivados, Decussina derivados, Malindina e Camptoneirina), dos quais os que apresentam pronunciada atividade curarizante são os alcaloides Decussina, 5.1µg/ml in vitro e 50mg/ml in vivo, Rouhamina, 16µg/ml in vitro e Malindina que mostra uma grande atividade relaxante muscular in vitro, 0,5 mg/ml e in vivo 75mg/Kg (Rolfsen et al, 1980b) (Fig 7).

2.1.5.2.2. Estrinocarpina (Alcalóide não terpenóide do tipo Harmano):

Pertencente ao grupo dos Alcalóides não terpenoides de estrutura derivada do harmano, Estrinocarpina (Fig7) possui uma atividade muscular relaxante pronunciada tanto in vitro (56,6 µg/ml) quanto in vivo (125 mg/Kg) (Rolfsen, et al, 1980a).

2.1.5.2.3. Caracurina V e Bisnordriidrotoriferina Curacurina II(Alcalóides terciários diméricos):

Inclusos dentro do Grupo VII, estão os alcalóides diméricos (derivados da Retulina, Diabolina, Estrichnina, Estrincnina-Diabolina). O alcalóide Caracurina V (dímero da diabolina) possui uma fraca atividade relaxante muscular. Bisnordiidrotoriferina possui uma atividade muscular relaxante relativa (Verpoorte e Svendensen, 1978) assim como o Caracurina II (Fig7).

2.1.5.2.4. N-acetilestricnoesplendina e O-metil- estricnoesplendina (Alcaloides do tipo espermoestricnina):

Os alcalóides do tipo Espermoestricnina pertencente ao grupo V (compreendendo também os alcaloides do tipo Tsilanina) possuem uma atividade tetanizante bem mais enfraquecida com relação a estricnina, em virtude da abertura do anel amida, dificultando a interação com os receptores. Os alcaloides N-acetilestricnoesplendina e O-metil-estricnoesplendina apresentam fatores estruturais que ajudam na manifestação da atividade muscular relaxante, metilação do nitrogênio e a já mencionada abertura do anel (Gonetileke et al, 1980)(Fig 7).

2.1.5.2.5. Alcalóides quaternários diméricos:

Essas moléculas são potentes agentes curarizantes, podendo-se afirmar que são os verdadeiros agentes curares, em virtude da presença de dois nitrogênios quaternários. Há entretanto uma ampla variedade da atividade paralisante, onde não somente o tamanho mas a forma da molécula influem bastante no mecanismo de ação. Observa-se que nos alcalóides mais tóxicos, a distância entre os dois átomos de nitrogênios quaternários é em cerca de 14 Å. A medida que a distância diminui a atividade paralisante decresce. Esses alcaloides podem ser divididos em três grupos (Ohiri et al, 1983)(Fig 8):

- Grupo da Toxiferina- Apresentam um efeito progressivo muito lento de paralisia, porém com um efeito de duração longa. C-toxiferina constitui o alcaloide mais potente do grupo, com atividade muito mais expressiva do que a *d*-tubocurarina .
- Grupo da C-curarina- C-curarina é o alcaloide mais potente deste grupo, sendo mais potente que a *d*-tubocurarina, entretanto os alcalóides desse grupo apresentam um curto efeito de duração.
- Grupo da C-calebassina - os alcalóides deste grupo são menos potentes que a *d*-tubocurarina e seu efeito tem pouca duração. A baixa atividade curarizante se dá pela deformação que a molécula sofre na ponte C-C do anel central fazendo com que a distância entre os dois grupos quaternários seja de 8,6 Å.

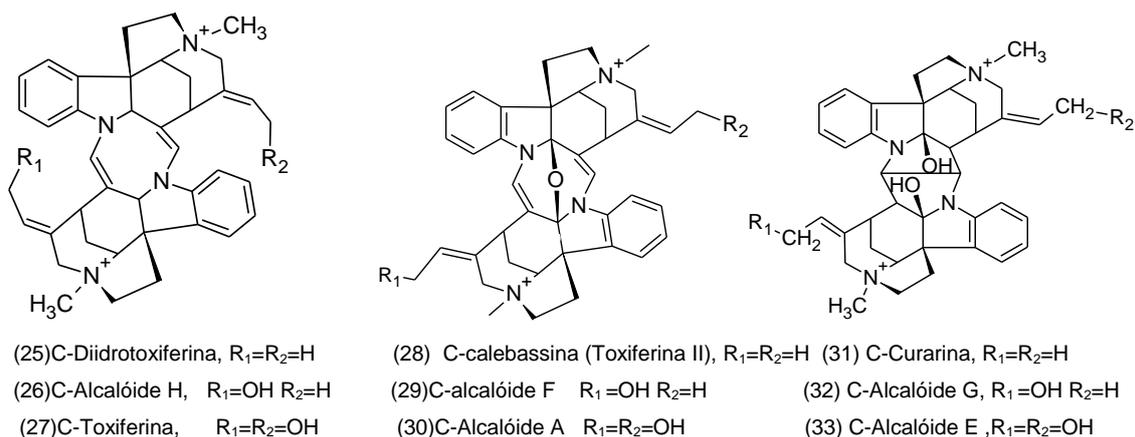


Fig 8. Estrutura de alcalóides diméricos quaternários

Tabela 2: Alcalóides curares isolados de *Strychnos*

Alcalóide	Espécie botânica	Referência
Decussina(1)	<i>S. decussata</i>	Rolfesen et al 1981
	<i>S. floribunda</i>	Vepoorte et al 1980
Rouhamina(2)	<i>S. decussata</i>	Rolfesen et al 1981
Malindina(3)	<i>S. decussata</i>	Rolfesen et al 1981
Estricnocarpina(4)	<i>S. floribunda</i>	Vepoorte et al 1980
	<i>S. elaeocarpa</i>	Rolfesen et al 1980a
Caracurina V(5)	<i>S. toxifera</i>	Asmis et al. 1954
	<i>S. afzelii</i>	Verpoorte et al 1978
	<i>S. dolichothyrsa</i> Gilg. Ex	Verpoort and
	Oniche et Hepper	Svendesen 1978
	<i>S. angolensis</i>	
Bisnordiihidrotoxiferina(6)	<i>S. amazônica</i>	Verpoote and
	<i>S. atlantica</i>	Svedensen 1976
	<i>S. pseudoquina</i>	Asmis, 1955
	<i>S. toxifera</i>	Delle Monache, 1969
	<i>S. trinervis</i>	

	<i>S.afzelii</i> Gilg <i>S.decussata</i> <i>S.dolichothyrsa</i> Gilg Ex Oniche et Hepper	
Curacuina II(7)	<i>S. toxifera</i>	Asmis et al. 1954
C-Diidrotoxiferina(8)	<i>S. divaricans</i> <i>S. froessi</i> <i>S. panamensis</i> <i>S. toxifera</i> <i>S. trinervis</i>	Asmis ,1955 Marini-Bettolo, 1973 Pellicciari, 1966 Forgacs, 1986
C-Alcalóide H(9)	<i>S. gardneri</i> <i>S. trinervis</i>	Mukheeje, 1990
C-Toxiferina(10)	<i>S. froessi</i> <i>S. tomentosa</i> <i>S. toxifera</i>	Penna, 1957 Marinni-Bettolo, 1954 Pimenta, 1954
C-calebassina (Toxiferina II),	<i>S. trinervis</i> <i>S. solimoesana</i> <i>S. divaricans</i> <i>S. mitscherlichii</i> <i>S. parvifolia</i>	Marinni-Betollo, 1972 Marinni-betollo, 1973 Marinni-Bettolo, 1957 Marinni-Bettolo, 1954
C-alcalóide F	<i>S. mitscherlichii</i> v. <i>amapensis</i> <i>S. panamensis</i> <i>S. solimoesana</i>	Marinni-Bettolo, 1957 Marinni-Bettolo, 1954 Pellicciari, 1966
C-Alcalóide A	<i>S. solimoesana</i> <i>S. toxifera</i>	Angenot et al.1992

C-Curarina	<i>S. divaricans</i>	Marinni-Betollo, 1972
	<i>S. froesii</i>	Marinni-Bettolo, 1957
	<i>S. gardneri</i>	Bovet, 1954
	<i>S. guianensis</i>	Galeffi, 1973
	<i>S. mitscherlichii</i>	
	v. <i>amapensis</i>	Pimenta, 1954
	<i>S. solimoesana</i>	
	<i>S. tomentosa</i>	
	<i>S. trinervis</i>	
C-Alcalóide, G	<i>S. panamensis</i>	Marinni-Bettolo, 1957
	<i>S. solimoesana</i>	Pellicciari, 1966
C-Alcalóide E	<i>S. froessi</i>	Pimenta, 1954
	<i>S. solimoesana</i>	
	<i>S. tomentosa</i>	

2.1.5.3. Atividades farmacológicas de alcalóides curare

Como abordado previamente, existem dois mecanismos de atuação da toxicidade do gênero *Strychnos*, o convulsivante e o paralisante, que compreende o efeito curarizante (letárgico) e muscular relaxante.

O efeito paralisante se dá através de três mecanismos (Vale, 1994): Inibição da liberação de acetilcolina; inibição da enzima sintetizadora da acetilcolina, a acetilcolina-transferase ou por interferência na ação pós-sináptica da acetilcolina, podendo ser despolarizantes, que são antagonistas nos receptores de acetilcolina, ou não despolarizantes, bloqueando os receptores da acetilcolina.

Inicialmente o impulso nervoso, que percorre o neurônio, ativa a abertura de canais que permitem a entrada de cátions cálcio dentro da célula. Tais cátions estimulam a liberação de vesículas de acetilcolina, que por exocitose são liberadas do receptor pré-sináptico para o receptor pós-sináptico, onde se ligam a receptores nicotínicos de acetilcolina (receptores N) (Fig 9). Esses receptores são canais formados por cinco protômeros na ordem $\alpha\gamma\alpha\delta\beta$. Cada uma dessas unidades possui uma face negativa e uma positiva, onde se reorganizam de tal forma que a face positiva interage com a face positiva do protômero vizinho. As junções das unidades $\alpha\gamma$ e $\alpha\delta$ tornam-se sítios ligantes de acetilcolina e quando ocorre a ligação da mesma em ambos os sítios há a abertura do canal que permite a entrada de íons sódio, polarizando a membrana, gerando um potencial de 40Mv (Bowman, 2006).

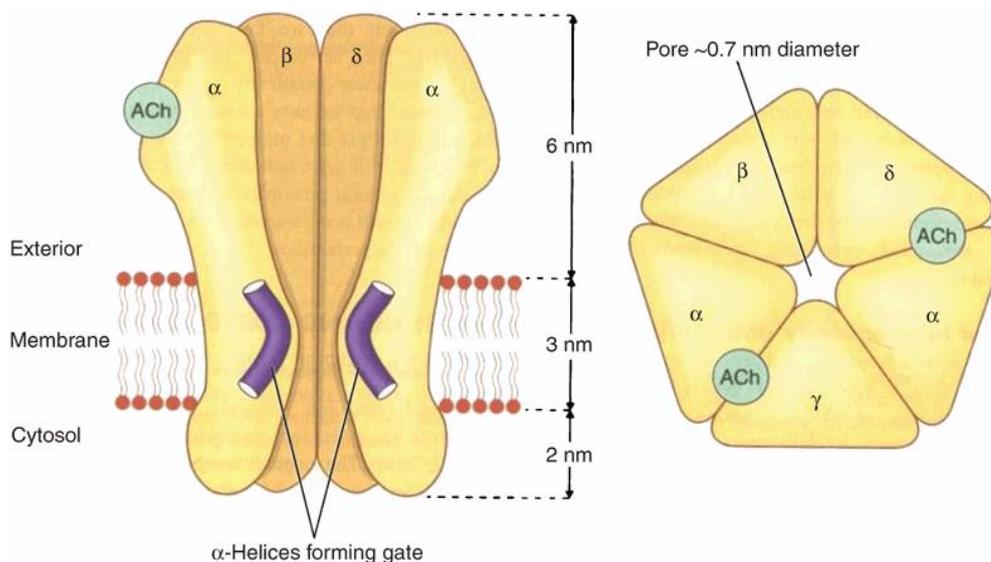


Fig 9. Receptores nicotínicos de acetilcolina vistos lateralmente e panoramicamente. Os cinco protômeros formam um cluster que cercam o poro central, onde entre as subunidades $\alpha\epsilon$ e $\alpha\delta$ se encontram os sítios de ligação da acetilcolina, que podem ser vistos melhor panoramicamente. Quando a acetilcolina se liga, uma mudança rotacional conformacional é transmitida pelo receptor, resultando na abertura do poro canal. A composição lipídica da membrana ao redor do receptor é muito importante, 50% de colesterol deve ser sua constituição para a correta função do receptor. Tais receptores estão “inervados” na membrana, não havendo locomoção destes através do plasma celular.

Alcalóides curare bisquaternários atuam como antagonistas competidores nos receptores N, ligando-se simultaneamente nos sítios $\alpha\epsilon$ e $\alpha\delta$, inibindo a ação da acetilcolina (Lee, 2003; Naguib et al 2002). O bloqueio dos canais iônicos evita a entrada de sódio, não ocorrendo assim a despolarização da membrana das placas motoras, impedindo a transmissão do impulso nervoso (Bowman, 2009).

A presença de grupos N-quaternários distanciados por um comprimento de 14 Å torna-se fator estrutural essencial para a ação nos sítios receptores de acetilcolina (Lee, 2003; Mertes, 2010).

2.1.5.4. Alcalóides curare na medicina

Desde 1935 alcalóides curare têm sido introduzidos na medicina, tendo seu primeiro uso para o tratamento terapêutico de choques elétricos. O alcaloide (+) tubocurarina, isolado de *Chodendron tomentosum* (Menispermaceae), tem seu uso em processos cirúrgicos devido sua atividade relaxante neuromuscular desde 1942 (Bennett, 1968). Seguindo os estudos de *Strychnos*, C-Toxiferina foi submetida a ensaios clínicos e concluiu-se que pode chegar a ser mais potente e razoavelmente livre de efeitos colaterais, mas a longa duração de ação e instabilidade em solução impede a exploração clínica do alcaloide. Muitos outros alcaloides usados na medicina foram sintetizados com estruturas muito próximas a dos alcalóides naturais como atracurium (Tracrium®), derivado da (+) tubocurarina e o alcuronium, derivado da C-toxiferina (Ouhiri, 1983 ; Lee, 2003).

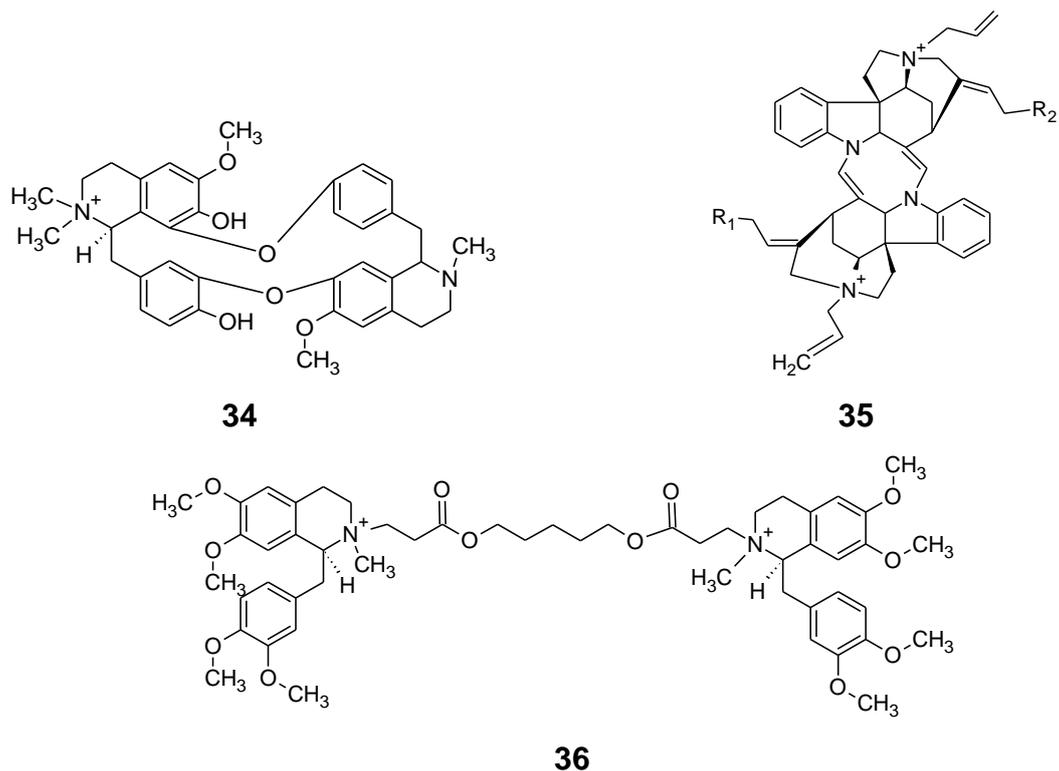


Fig 10. Alcalóides curare usado como medicamentos (+) tubocurarina (34), alcuronium (35) e atracurium(36)

2.2. Aspectos Etnobotânicos

Da maioria das descrições conhecidas, pode ser resumido que o curare, é um veneno de origem vegetal, preparado por algumas tribos de índios da Amazônia a partir de espécies do gênero *Strychnos* e/ou da Família Menispermaceae. O processo de preparação consiste de um modo geral na preparação de extratos aquosos de material vegetal produzidos pela decocção de cascas da raiz e do caule das espécies. A estes extratos podem ser adicionados sucos de outras plantas ou substâncias de origem vegetal, cuja função é reforçar a toxicidade, facilitar a absorção pelo sangue ou apenas torná-los mais aderentes as flechas. Entre os ingredientes usados estão sucos de plantas pertencentes a família das Euforbiaceae, Piperaceae, Apocinaceae,

dentes de serpentes, cobras, formigas e etc. variando com a tribo (Pinheiro, 2000; Biocca, 1954).

O segredo desse veneno foi mantido por muitos anos pelos índios, conforme descrito antes. O curare é em essência um veneno de caça, embora algumas tribos, como a dos Maku e Nhambikwaras, também o tenham empregado para a guerra. É possível dividir a zona geográfica dos curares em 4 regiões, formando um semicírculo, abaixo da linha do equador: a região ocidental pré-andina, estendendo-se pelos rios Napo, afluentes do Marañon e Ucayali, onde predominava os curares a base de menispermáceas, as regiões orientais guiano-amazonenses, compreendendo as bacias do rio Orenoco e Amazonas, a do Planalto Central, onde predominava os curares a base de *Strychnos* e a região intermediária entre os rios Napo, Negro e Javari, onde se usava, alternativamente *Strychnos*, Menispermaceae, ou a mistura das duas (Bisset, Acta Amazônica, ano) .Considera-se ser o curare um elemento característico dos caçadores inferiores da Amazônia, que não conheciam o arco e flecha e dos quais a arma de guerra era a lança e a zarabatana. Viviam em pequenos grupos isolados na floresta e só ficaram conhecidos quando os conquistadores europeus penetraram nos afluentes secundários do Amazonas, daí os verdadeiros curares não terem sido descritos até o século XVIII (Pinheiro, 2000), Vellard comenta que os agricultores aprenderam com os caçadores o uso e preparação do curare e o empregaram nas suas flechas, ao passo que os caçadores aprenderam a arte do arco e flecha dos agricultores, substituindo algumas vezes as zarabatanas (Vellard, 1959). Além do famoso emprego na confecção de curare, o gênero *Strychnos* tem história na medicina folclórica, justificando o interesse na intensificação do estudo das espécies. Muitas

propriedades a elas estão relacionadas, além de tetanizante e curare, como a antiplasmodica (Frederich, 1999; Rasoanaivo, 1994), citotóxica (Bassleer, et al, 1982; Frederich, 2003), antibacteriana (Caron et al, 1988), antifúngica (Quetin-Leclercq, 1995), espasmódica (Demedeiros et al, 1991) hipotensiva (Kappor et al., 1988), e anti-inflamatória (Tits et al, 1991). Espécies da Ásia e da África fazem parte de inúmeras preparações aborígenes. Monique Tits assinala o emprego em: cura de doenças venéreas e do tubo digestivo, como afrodisíacos, anti-epiléticos, analgésicos e cicatrizantes, contra mordida de serpentes e em alguns casos doenças mentais. No que concerne as *Strychnos* da América do sul, onde se encontram a maioria das espécies usadas no preparo do curare, são encontradas referências do seu uso medicinal, entretanto em menor proporção que dos países africanos e asiáticos. O relato de Humboldt e Bonpland de que índios de Esmeralda consideravam o curare bom para o estômago, pode ser considerado como o primeiro registro do seu uso medicinal. São conhecidos o emprego como antimalárico de *S.pseudoquina* “a quina do campo”, usada para preparar a chamada “água inglesa”, de ação tônica e febrífuga (Corrêa, 1952). *Strychnos brasiliensis*, *Strychnos fendleri*, *S.trinervis* também são usadas como antimaláricos (Quetin-Leclercq et al., 1990) . Ducke cita *S.rubiginosa* como planta medicinal em Pernambuco. Os extratos de “murapê vermelho” (*S.rubiginosa*) e “murapê preto” (*S.tomentosa*) tem emprego farmacológico no Pará (Pinheiro, 2000). Na tabela a seguir é apresentado o emprego de uso medicinal de algumas espécies de *Strychnos* sul-americanas (Tabela 3).

Tabela 3: Uso medicinal popular de espécies de *Strychnos* da zona do curare (Pinheiro,2000)

spécie	Uso popular
<i>S.acuta</i>	Estimulante e tônico
<i>S.brasiliensis</i>	Estimulante, tônico, antipirético e antimalárico
<i>S.erichsonii*</i>	Males do abdómen e estômago, na menstruação, no aborto, doenças venéreas, afrodisíaco e antimalárico (Grenard, 1987)
<i>S.fendleri</i>	Antipirético e antimalárico
<i>S.guianensis*</i>	Estimulante tônico
<i>S.javanensis</i>	Analgésico e anti-reumático
<i>S.melinoniana</i>	Afrodisíaco
<i>S.mitscherlichii*</i>	Afrodisíaco
<i>S.nigricans</i>	Afrodisíaco
<i>S.oiapocensis</i>	Afrodisíaco
<i>S.panamensis</i>	Analgésico e anti-reumático
<i>S.pseudoquina</i>	Estimulante, tônico, males do estômago e abdómen antipirético, antimalárico
<i>S.rondeletioides</i>	Veneno de pesca
<i>S.trinervis</i>	Estimulante, tônico, problemas estomacais, antimalárico e antipirético
<i>S.tomentosa</i>	Analgésico
<i>S.toxifera*</i>	Anticonvulsivante (Pinheiro, 2000)

(*) *Strychnos* usadas no preparo dos curares calabash

2.3 A espécie *Strychnos amazonica* Krukoff

A espécie *Strychnos amazonica* Krukoff apresenta-se como um cipó de porte grande que habita mata pluvial amazônica, alcançando de Maués e Manaus, onde é frequente, sendo encontrada nos rios Juruá e Solimões e no Perú amazônico (Rio Napo) (Ducke, 1965). Há relatos na literatura datados das décadas de cinquenta e setenta de estudos sobre as cascas do caule, das quais foram isolados os alcaloides macusina B e 11-methoxydiabolina e a base quaternaria mavacurina (Galeffi et al, 1973; Bovet et al 1955; Casinovi, 1957), das cascas da raiz, além de macusina B e 11-metoxidiabolina, foram isolados o alcaloide nor-dihidroxitoxiferina e o 18-desoxi Wieland Gumlich aldeído (Galeffi et al, 1973; Marini-Bettolo e Delle Monache, 1969). Não foi encontrado nenhum registro sobre alcaloides nas folhas (Quetin-Leclercq, Angenot, Bisset, 1990).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Realizar o estudo químico de *Strychnos amazonica* e avaliar o potencial antimicrobiano da espécie.

3.2. Objetivos Específicos:

- Isolar através de métodos cromatográficos os principais alcalóides e terpenos de *Strychnos amazonica*;
- Identificar a estrutura dos compostos químicos isolados na espécie, por métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos;
- Realizar testes antimicrobianos dos extratos e compostos isolados;
- Investigar a existência de alcalóides indólicos no gênero através da análise de perfil químico (CCD Dragendorff e HPLC) de *Strychnos amazônica* e isolá-los
- Realizar cálculos teóricos e relacionar com os dados obtidos experimentalmente no intuito de promover um estudo mais profundo acerca da estrutura molecular dos constituintes alcaloídicos de *S. amazonica*

4. Metodologia

4.1. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas em CCD foram realizadas utilizando placas cromatográficas Alugram® Xtra SIL G 0,20mm Macherey – Nagel e TLC SILG 0,20mm Sobert Technologies. Colunas cromatográficas de bancada foram realizadas usando sílica flash SL® G60 70-200 mesh SILICYCLE. Para isolamento foram utilizadas placas preparativas PLC Silicagel 60, 0,5 cm Merck.

4.2. Solventes e reveladores

No presente trabalho foram utilizados solventes Nuclear grau P.A (Metanol, acetato de etila, Hexano, Diclorometano, Clorofórmio e Hidróxido de Amônio 30%), Metanol TEDIA grau HPLC e água deionizada MilliQ (para análises HPLC). Os reveladores utilizados para análises em ccd foram, Vanilina sulfúrica, regente de Dragendorff e Sulfato cérico.

Reagente de Dragendorff com modificação de Munier (MUNIER, 1953 *apud* Merck, 1971). Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,0 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplas, adicionou-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os *spots* das substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

4.3. Métodos espectroscópicos e espectrométricos

As análises espectrométricas foram realizadas em espectrômetro de massas *ion trap* LQC FLEET (Thermo Scientific) equipado com fonte de ionização Eletrospray (ESI) e APCI. Voltagens de capilar e de fonte foram respectivamente 26 V e 5 kV no modo positivo e -15 V e 4,5 kV no modo negativo. As taxas de fluxo dos gases auxiliar e de bainha foram respectivamente 12 e 15%. Temperatura do capilar a 225°C e Tube Lens à 100V no modo positivo e -80V no modo negativo. Os espectros de RMN 1D (1H, 13C) foram adquiridos em CD₃OD e CDCl₃ a 295 K em espectrômetros de RMN Bruker Avance 400 e 600, magnetos de 9,4 Tesla para H¹ a 400 MHz e C¹³ a 100 MHz (Amostras S1,S2 e A4) e de 12,4 Tesla a 600MHz (Amostras A6 e A7).

4.4. Coleta do Material Botânico

O material botânico de *Strychnos amazonica*, folhas, galhos e casca do tronco, foi coletado na reserva Ducke, localizada à 25 km da cidade de Manaus no dia 26 de novembro de 2011. Uma amostra coletada da espécie foi identificada por técnica de Barcoding em comparação com espécies já identificadas no herbário do INPA pela Dra Doriane Picanço Rodrigues do Departamento de Biotecnologia da Ufam.

4.5. Obtenção dos extratos brutos

Após a coleta, as diferentes partes das plantas, foram colocadas para secar em uma estufa de circulação de ar a 50 °C por um período de dois dias, sendo em seguida trituradas em moinho de quatro facas e pesadas. O material

botânico (608,0 g de folhas, 831,0 g de cerne, 539,0 g de galhos, 407 g de cascas) depois de pulverizado foi submetido à extração a frio (maceração) com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano e metanol), ocorrendo a remoção e renovação de solvente a cada três dias. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura de até 50 °C e em seguida secos em dessecador. Após completa secagem foi calculado o rendimento de cada extrato, resultando em 48,0 g de extrato de folhas, 56,0 g de extrato cerne do caule, 21,3 g de extrato dos galhos e 12,2 g de cascas do caule. Durante a concentração dos extratos hexânicos houve a precipitação do sólido **1 (S1)** do extrato hexânico das folhas e do sólido **2 (S2)** no extrato hexânico do cerne do caule. Os precipitados foram lavados, recristalizados e submetidos a análises cromatográficas e espectroscópicas.

4.6. Marcha química para obtenção das frações alcaloídicas

Os extratos metanólicos que confirmaram a presença de alcaloides, após avaliação por ccd e revelação com Dragendorff (Tabela 4), foram submetidos à extração ácido-base, conforme a metodologia convencional (Costa et al, 2004).

Cada extrato metanólico foi tratado da seguinte forma: o extrato bruto solubilizado em diclorometano foi extraído três vezes com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, obtendo-se duas frações de cada extrato: a fração aquosa ácida e a fração diclorometânica neutra. A fração aquosa ácida foi basificada a pH 10 com hidróxido de amônio concentrado e em seguida feita a extração três vezes com diclorometano, levando a duas novas frações: a fração

diclorometânica alcaloídica, que foi concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida, e a fração aquosa básica que foi desprezada.

Tabela 4. Obtenção de alcaloides de *Strychnos amazonica*

Parte da planta	Material coletado	Massa do extrato	Massa da fração alcaloídica
Folhas	0,608kg	48g	Negativo Dragendorff
Cerne	0,831kg	56g	1,28g
Galhos	0,539kg	21,3g	0,250g
Casca	0,407kg	12,2g	Fracá revelação em Dragendorff

4.7. Perfil Químico das frações alcaloídicas

Para análise de perfil químico, foram preparadas soluções de 500 ppm das frações alcaloídicas para análise em HPLC-DAD. Foi usado fluxo de 1ml/min modo gradiente de eluição, MeOH 20%-100% 45 min, colunas C-18 Luna 5µm e Fenil ciclo-hexil Luna 5 µm ambas 150x4,6 mm. Faixa de detecção 200 a 600 nm no UV.

4.8. Obtenção de alcaloides

4.8.1. Alcaloides do cerne do caule

As frações alcaloídicas do cerne do caule foram fracionados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 MERCK como fase estacionária e modo de eluição gradiente CH₂Cl₂/MeOH no sentido do aumento da polaridade. Em seguida as frações foram analisadas por CCD com

revelador de Dragendorff e submetidas a análise por espectrometria de massas no intuito de monitorar a presença alcalóides. Primeiramente, 1,28 g da fração alcaloídica do cerne foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica como fase estacionária e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 14 frações, das quais 9 (frações 3 à 5 e 10 à 14) apresentaram alcaloides através de análise CCD usando o reagente de Dragendorff como revelador. As frações 2, 3, 4 e 5, em virtude da maior massa, foram reunidas e a fração resultante (123 mg) foi submetida à purificação por placa preparativa de sílica e eluente AcOEt com 0,5 mL de NH₄OH, onde foi obtido 10,5mg de um sólido amorfo amarelo denominado de **A4**. Este sólido, por análise em ccd, apresentou intensa cor alaranjada quando revelado com regente de Dragendorff e verde escuro, quando revelado com sulfato cérico, confirmando sua natureza alcaloídica.

Tendo em vista a pequena massa das outras frações alcaloídicas obtidas nesta fase e visando obter isolamento de outros alcaloides presentes, foram submetidas mais 11,0 g de extrato metanólico do cerne ao processo de extração de alcaloides, como descrito anteriormente para o isolamento de **A4**, onde foram obtidas 9,93 g de fração alcaloídica. Tal fração foi sujeita a cromatografia em coluna resultando em 12 frações. A análise por ccd utilizando reagente de Dragendorff como revelador, indicou a presença de dois alcaloides nas frações 7, 8, 9 e 10, que foram reunidas e a fração resultante analisada por ESI-IT-MS. A partir da análise dos fragmentos, tal fração foi submetida a cromatografia preparativa, levando ao obtenção 3,5 mg de um sólido amarelo que ao se revelar com Dragendorff em ccd apresentou cor alaranjada, sendo codificado como **A7**.

4.8.2. Alcalóide das folhas

30,0 g de extrato metanólico das folhas de *Strychnos amazonica* foram submetidos à cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como fase móvel, em ordem crescente de polaridade, Hex, AcOEt e MeOH. Foram obtidas 31 frações, das quais as frações 10-16 evidenciaram a presença de alcaloides em CCD (revelação reagente de Dragendorff). A fração resultante da reunião de 10-16 foi analisada em ESI MS-IT. Após análise, a fração foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída sucessivamente com AcOEt, AcOEt/MeOH 9:1 e MeOH 100% ,fornecendo 20mg de um sólido amorfo escuro que revelou pureza em CCD/Dragendorff codificado como composto **A6**.

4.9. Realização do Ensaio Biológico

4.9.1. Atividade antimicrobiana

Os testes antimicrobianos foram realizados no laboratório de Microbiologia da UEA supervisionado pela professora Antonia Queiroz Lima de Souza. Os extratos metanólicos e os alcaloides isolados foram testados contra as seguintes linhagens: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Enterococcus faecalis*.

4.9.1.2. Preparo do material biológico

As culturas foram reativadas em meio sólido apropriado. Para *Cândida albicans* usou-se Sabouraud Agar. Para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* usa-se BHI (Brain Heart Infusion Agar). Após 24 horas os patógenos foram então passados para meio líquido correspondente com um volume de 10 ml. Os controles utilizados foram específicos para cada patógeno. Foram empregados Fluconazol para *Cândida albicans*, tetraciclina para *Pseudomonas* e Ampicilina para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados reveladores específicos também, onde para *Candida* usou-se INT (Cloreto de Iodonitrotetrazólio) e para as demais patógenos usou-se TTC (Cloreto 2,3,5 Trifeniltetrazólio)

4.9.1.3. Preparo das amostras e microrganismos para inóculo

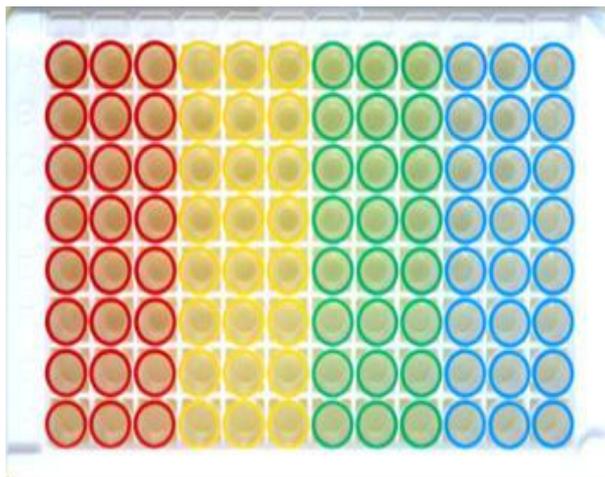
Os extratos, alcaloides, assim como os antibióticos foram diluídos a uma concentração de 2 mg/mL. Os antibióticos foram preparados diretamente de um comprimido específico a uma concentração de 50 mg/ml sendo necessário uma diluição usando a fórmula $C_1V_1=C_2V_2$. Os extratos e alcaloides foram pesados e em seguida diluídos em DMSO á concentração de 2mg/ml.

4.9.1.4. Teste em placa

O primeiro passo foi aplicar 100 µL do meio de cultura em cada poço. A placa foi dividida dividida em 4 áreas diferentes, cada uma contendo 3 fileiras de poços, onde em duas foram aplicados os extratos e em apenas uma o antibiotico. O segundo passo consistiu na aplicação de 100 µL (para obtermos

uma concentração de 1 mg/mL) de cada extrato nos dois primeiros poços de cada grupo de cores e antibiótico no terceiro. Após isso foi realizada a diluição seriada da seguinte forma:

Poço 1,
1mg/ml.
Poço 2,
0,5mg/ml.
Poço 3,
0,25mg/ml.
Poço 4,
0,125mg/ml.
Poço 5,
0,0625mg/ml.
Poço 6,
0,03125mg/ml.
Poço 7,
0,01563mg/ml.
Poço 8,
0,00782mg/ml.



O terceiro passo foi inocular 10 μ L do microrganismo. O microrganismo deve obedecer a escala de MacFarland garantindo assim a mesma quantidade de células em todos os poços.

Após 24 h do inóculo em placa de elisa, foi aplicado um volume de 10 μ L de INT, para *Candida* e TTC, para as bactérias e 48 h depois foi avaliado a eficácia das amostras contra o crescimento das colônias dos patógenos.

4.10. Identificação botânica por barcoding

A extração de DNA foi realizada a partir de tecidos foliares de exsiccatas depositadas no Herbário INPA e dos espécimes coletados no presente trabalho, seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com adaptações. As regiões *rbcL* e *rpoC1* do DNA cloroplastidial foram escolhidas para amplificação e sequenciamento baseado em Lahaye et al. (2008) e consultas ao BOLD

Systems (<http://www.boldsystems.org/>). Os primers e as condições de amplificação e sequenciamento foram adaptadas de Hollingsworth et al. (2009). As sequências foram visualizadas e editadas no Geneious (Biomatters) e submetidas ao alinhamento no MEGA 5 (Tamura et al., 2011), onde também foram calculadas matrizes de distância par a par para cada sequência separada e concatenadas, utilizando distância p .

4.11. Metodologia computacional

Os estudos teóricos foram realizados no Laboratório de Química Teórica e computacional da Universidade Federal do Amazonas (LQTC-UFAM) sob orientação do prof Dr Kelson Mota. Usou-se para os cálculos teóricos máquina PC INTEL®*inside*™QuadCore™ com processadores CORE™i7 (8GB de memória RAM mais 2GB de memória dedicada), em plataforma Linux. Utilizou-se o programa HyperChem 7.5 na preparação e estruturação das moléculas de partida (etapa inicial da preparação dos inputs de cálculo). Usou-se o modo de otimização AM1 no programa HyperChem 7.5 para obtenção de ajustes estruturais iniciais. Em seguida foram realizados cálculos DFT de otimização geométrica à nível de teoria B3LYP 6-31G (d), B3LYP 6-311+G(2d,p) e B3LYP 6-311++G(2d,p) e cálculos de RMN ¹³C teóricos a nível de teoria B3LYP 6-311G+(2d,p) e B3LYP 6-311G ++(2d,p) método GIAO usando o software Gaussian 03W.

5. Resultados

5.1 Identificação de S1 e S2

Os precipitados S1 e S2, após recristalização foram submetidos à análise CCD e comparados com padrões de sitosterol, estigmastrol, α e β amirina, friedelina e lupeol. O sólido 1, branco em formato de agulhas, eluído em Hexano/acetato de etila 8:2 mostrou ser uma mistura de duas substâncias, uma com o mesmo Rf do padrão friedelina e a outra não apresentou Rf semelhante a nenhum dos padrões. A análise por infusão direta no espectrômetro de massas, usando fonte APCI para ionização, revelou a presença de duas substâncias de massas m/z 427 $[M+H]^+$ e 411 $[M-H_2O]^+$ atribuídas a friedelina e possivelmente friedelanol, respectivamente (Fig7). A comparação dos espectros de RMN 1H e ^{13}C (Anexo I) com os dados da literatura (Almeida et al.,2011) confirmou os dados de espectrometria de massas, sendo o sólido 1 identificado como uma mistura dos triterpenos, friedelina e friedelanol. Foram observados características de triterpenos do tipo friedelano, por sinais verificados em δ 0,7 a 1,7, referentes à átomos de hidrogênios de grupo metílicos e metilénicos; multipletos em δ 3,72 e em δ 2,4, característicos, respectivamente, de hidrogenio carbinólico e de hidrogenio vizinho à carbonila. No espectro de RMN ^{13}C à presença de sinais em δ 72, típicos de carbono carbinólico e δ 214, característico de carbonila cetônica, e em δ 6,8, correspondente ao carbono da metila (C-23), indicaram a constituição do sólido como sendo uma mistura de friedelina e friedelanol.

O sólido 2 eluído em hexano/acetato de etila 7:3 apresentou um único *spot* com o mesmo Rf do padrão de sitosterol. O espectro de RMN ^1H (Anexo I) apresentou características de uma estrutura esteroidal, com sinais de metilas e metilenos na região de $\delta 0,5$ à $2,5$, presença de um dubleto largo em $\delta 5,35$ característico de hidrogênio olefínico e um multiplete em $\delta 3,51$, relacionado ao átomo de hidrogênio carbinólico, indicativos, respectivamente, aos hidrogênios H-6 e H-3 do sitosterol. Contudo, sinais em $\delta 5,15$ (dd, $J=15,1$ e $8,0$ Hz) e em $\delta 5,01$ (dd, $J =15,1$ e $8,0$ Hz) atribuídos aos átomos de hidrogênio vinílicos H-23 e H-22, confirmaram a presença do estigmasterol. Com análise de tais evidências e a comparação dos dados de RMN ^1H com dados da literatura (Costa, 2009), foi possível concluir que o sólido 2 trata-se de uma mistura de sitosterol e estigmasterol.

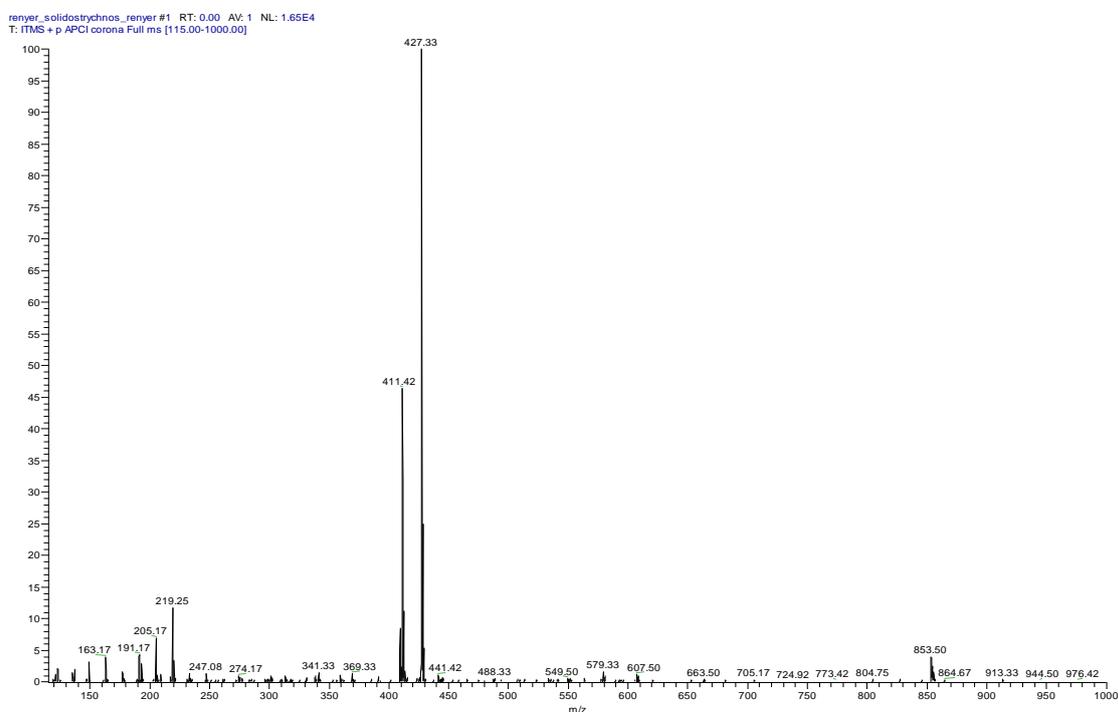


Fig 11. Espectro do sólido1 em APCI *ion trap*

Friedelina (S1A) RMN de ^1H [400 MHz, CDCl_3 , d, J (Hz)]: 1,96 (m; H-1a), 1,68 (dq; J=13,0; 5,1; H-1b), 2,39 (ddd; J = 13,7; 5,1; 1,9; H-2a), 2,29 (m; J = 13,8; 13,6; 6,5; H-2b), 2,24 (q; J = 6,5; H-4), 1,75 (m; H-6a), 1,27 (m; H-6b), 1,59 (m; H-7a), 1,47 (m; H-7b), 1,44 (m; H-8a), 1,39 (m; H-8b), 1,55 (m; H-10), 1,38 (m; H-11), 1,35 (m; H-12), 1,47 (m; H-15a), 1,27 (m; H-15b), 1,54 (m; H-16a); 1,36 (m; H-16b), 1,56 (m; H-18), 1,37 (m; H-19), 1,49 (m; H-21), 1,48 (m; H-22), 0,87 (d; J = 6,5 Hz; H-23), 0,73 (s; H-24), 0,88 (s; H-25), 1,01 (s; H-26), 1,05 (s; H-27), 1,18 (s; H-28), 1,00 (s; H-29), 0,95 (s; H-30). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , d): 22,3 (C-1); 41,5 (C-2); 213,2 (C-3), 58,2 (C-4); 42,1 (C-5); 41,3 (C-6); 18,2 (C-7), 53,3 (C-8); 37,5 (C-9); 59,5 (C-10); 35,6 (C-11); 30,5 (C-12); 39,7 (C-13); 38,3 (C-14); 32,8 (C-15); 36,0 (C-16); 30,0 (C-17); 42,8 (C-18); 35,4 (C-19); 28,2 (C-20); 32,4 (C-21); 39,3 (C-22); 6,8 (C-23); 14,7 (C-24); 17,9 (C-25); 20,3 (C-26); 18,7 (C-27); 32,1 (C-28); 31,8 (C-29); 35,0 (C-30).

3- β -Friedelanol (S1B) RMN de ^1H [400 MHz, CDCl_3 , d, J (Hz)]: 1,43 (m; H-1), 1,90 (dt; J = 10,0; 2,3; H-2a), 1,56 (m; H-2b), 3,73 (m; H-3), 0,94 (s; H-4), 1,74 (dt; J = 10,0; 3,0; H-6a), 1,45 (m; H-6b), 1,57 (m; H-18), 0,91 (m; H-22), 0,93 (d; J = 7,3; H-23), 0,97 (s; H-24), 0,86 (s; H-25), 0,99 (s; H-26), 1,01 (s; H-27), 1,17 (s; H-28), 0,95 (s; H-29); 1,00 (s; H-30). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , d): 15,8 (C-1); 36,3 (C-2); 72,9 (C-3); 49,4 (C-4); 38,1 (C-5); 41,9 (C-6); 17,6 (C-7); 53,4 (C-8); 37,4 (C-9); 61,6 (C-10); 35,6 (C-11); 30,6 (C-12); 38,6 (C-13); 39,9 (C-14); 32,3 (C-15); 35,8 (C-16); 30,0 (C-17); 43,1 (C-18); 35,4 (C-19); 28,2 (C-20); 32,8 (C-21); 39,5 (C-22); 11,6 (C-23); 16,4 (C-24); 18,2 (C-25); 20,1 (C-26); 18,6 (C-27); 32,1 (C-28); 35,2 (C-29); 31,8 (C-30).

5.2. Perfis alcaloídicos

Os extratos metanólicos do cerne e dos galhos, que confirmaram presença de alcaloides, foram submetidos à extração dos mesmos e a análise por HPLC-DAD, que revelou picos relativamente intensos com absorções em $\lambda_{\text{máx}}$ 270, 275 e 280 nm, confirmando a presença de alcaloides, em acordo com os dados da literatura (Figuras 11 e 12).

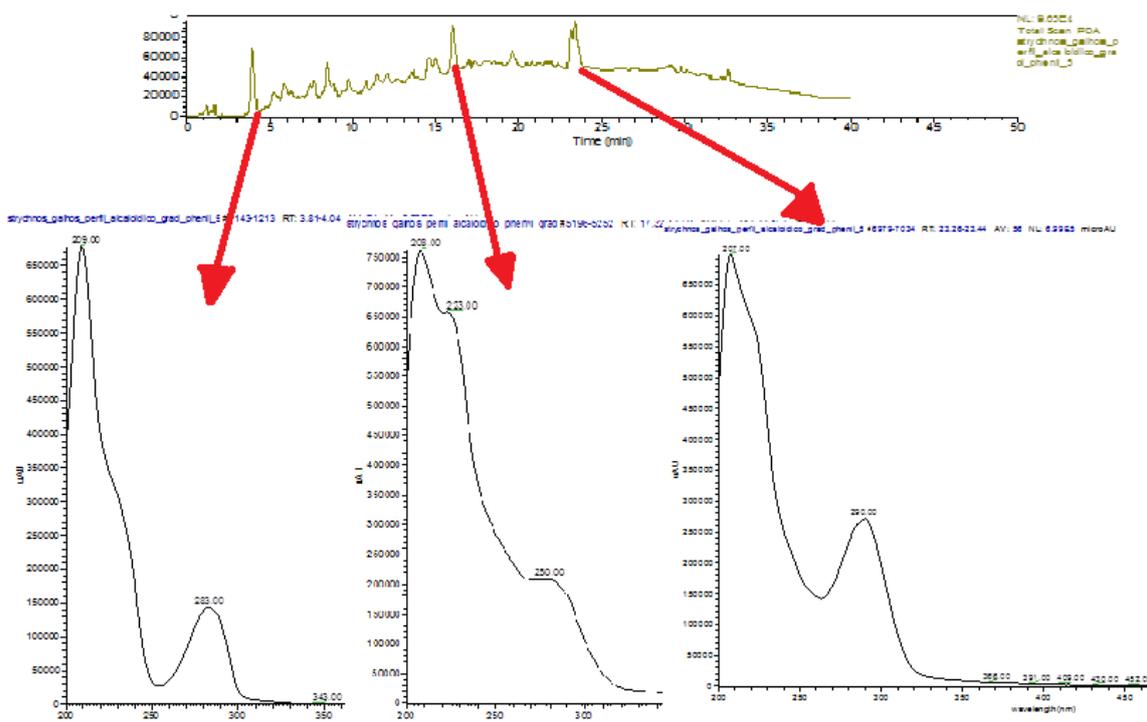


Fig 12. Perfil alcaloídico dos galhos

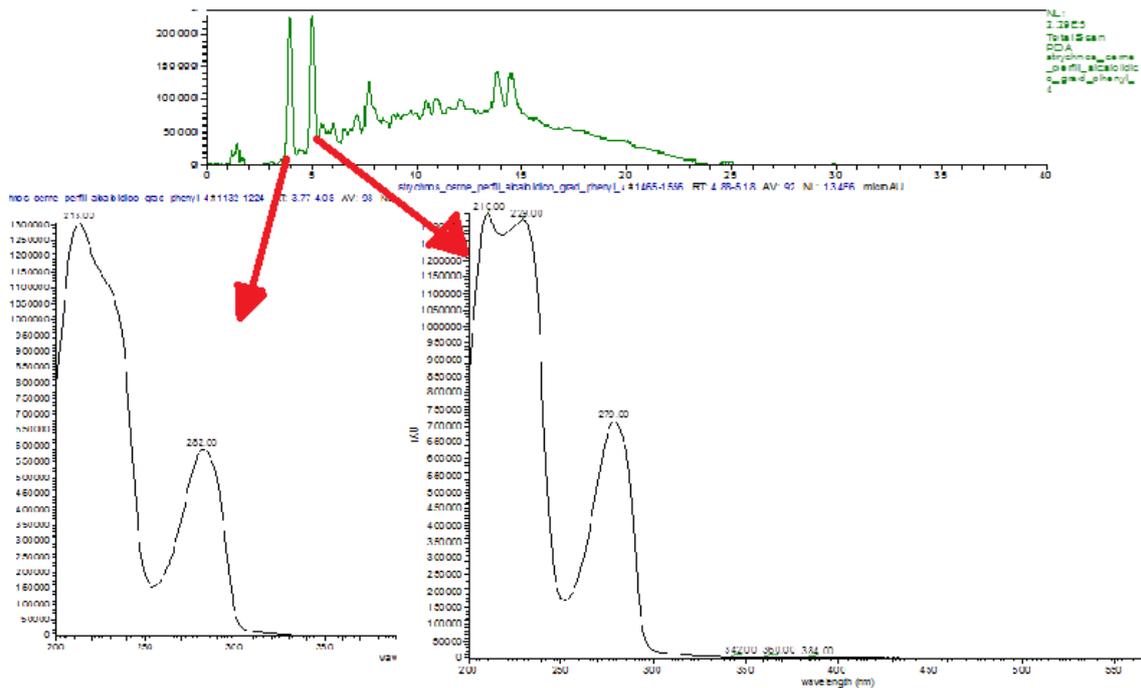


Fig 13. Perfil Alcaloídico do cerne

5.3. Identificação estrutural do sólido A4

.As frações oriundas do fracionamento da fração alcaloídica foram analisadas em ESI-IT-MS modo positivo e os principais íons estão resumidos na Tabela 5a. Os íons mais abundantes, m/z 339, 353, 355, 327 e 383 foram submetidos à fragmentação por CID e os íons filhos obtidos foram avaliados e comparados com dados da literatura evidenciando massas coincidentes com a de alcaloides indólicos encontrados no gênero *Strychnos* (tabela 5b). As frações promissoras (2, 3, 4 e 5) foram reunidas e a fração resultante submetida a purificação por placa preparativa resultando no sólido **A4**. O sólido revelou pureza em ccd e apresentou um único pico em m/z 339 por infusão direta em espectrômetro de massas ESI-IT.

Tabela 5a. Íons presentes nas frações obtidas do cerne

Fração	Íons m/z [M+H]
3	339, 325, 676 e 662
4	339, 325, 371, 676, 634
5	339, 325 e 385
9	325, 355, 339
10	325, 355, 709
11	355, 709
12	335, 431, 768
13	355 e 327 (íon pouco intenso)
14	353, 327 e 383

Tabela 5b. Fragmentos dos íons mais abundantes obtidos por ESI MS² íon trap

Íon m/z [M+H]	% CID	Fragmentos	Alcaloides prováveis
327	25	199, 183, 169, 156 e 144	17-o-metil-akagerina Ajmalicina
339	30	307, 295 e 264	
353	25	266, 144	
355	25	323, 307, 296, 276, 264	
383	25	351, 293, 180, 144	

Os espectros RMN ¹H apresentaram sinais em δ 7,45 (2H,d, J= 8Hz, H-9 e H-12), δ 7,06 (1H, t, J= 8Hz, H-10), δ 7,16 (1H, t, J=8Hz, H-11), característicos de esqueleto indólico sem substituição no anel aromático (Morales-Rios et al, 1987). Sinais em δ 3,12 (1H,m,H-5), δ 2,80 (1H,m,H-5); δ 2,80(2H,m,H-6), confirmados pelas correlações com os respectivos átomos de carbono no mapa de contorno HSQC (Anexo), e um sinal em δ 2,53 (3H, s), referente à metila ligada a nitrogênio, evidenciaram a presença de um segmento CH₂-CH₂-N-Me, indicando a porção triptamínica da molécula. Sinais em δ 6,7(1H,q, J= 7,2 Hz)

e δ 2,07(3H, d, J= 7,2Hz), compatíveis com uma cadeia lateral etilidênica, aliados a presença de sinal aldeídico em δ 9,30 (1H, d, J=4Hz), acoplado a um sinal em δ 3,60 (1H, m), sugeriram tratar-se de um alcaloide tipo acagerina. O mapa de contorno COSY (Anexo I) evidenciou os acoplamentos H-14-H-15 (δ 3,60 e δ 1,9-2,1), H-17/H-16 (δ 5,80 e δ 2,17-1,99) e H-3/H-14 (δ 3,72 e δ 2,17-2,22), confirmando o anel heptacíclico do alcalóide. A observação de um sinal em δ 3,03 (3H, s), característico de grupo metoxila, correlacionado no HMBC ao sinal δ 84,7 indicou tratar-se do derivado metoxilado na posição 17 (C-17) da acagerina. As correlações do espectro HSQC (Anexo II) ratificaram as conectividades dos átomos de hidrogênio com os respectivos átomos de carbono. Finalmente, o HMBC (Anexo III) revelou correlações entre: os átomos de hidrogênio da metila ligada ao nitrogênio com os carbonos 5 e 3 (δ 2,53 - 62,7-52,3); H-18 com os carbonos C-19 e C-20 (δ 2,07-153-148); H-21 e C-20 (δ 9,3-148); H-15 e C-20 (δ 3,6-148); H-3 e C-2 (δ 3,7-137); H-17 e C-2 (δ 5,8-137), confirmando o composto **A4** como o alcaloide 17-O-metil-acagerina.

Tabela6. Dados de RMN 1D e 2D de 17-O-metil-acagerina

Posição	¹ H	¹³ C	COSY	HMBC
2		137,5		
3	3,73 (dd, J=1:12 Hz, 1H)	62,8	H-14	C-2
5	3,12 (m,1H) e 2,8(m, 1H)	52,5	H-6	C-7
6	2,8 (2,8, m, 2H)	20,2	H-5	C-2,C-7
7		109,6		
8		127,7		
9	7,45 (d,J=8Hz, 1H)	119,6	H-10	C7, C-11, C-13
10	7,05 (, dt, J=1:8Hz, 1H)	120,8	H-9	C8, C12
11	7,16 (dt, J=1:8Hz, 1H)	123,3	H-12	C-9, C-13
12	7,45 (d,J=1:8Hz, 1H)	109,8	H-11	C-9, C-10
13		139,9		
14	2,213(m, 1H) 1, 99 (1,99,m, 1H)	37,4	H-3 , H1-5	C-3, C-15
15	3,6 (dt, J=4:12 Hz, 1H)	31,1	H-14, H-16, H-21	C-20, C-21
16	2,2 (m, 2H)	38,23	H-15, H-17	C-15
17	5,8 (dd,J=1,6:4,8Hz, 1H)	84,7	H-16	C-15, C-2, C23
18	2,07 (d, J=7,2 Hz, 1H)	15,3	H-19	C-19, C-20
19	6,7 (q J=7,2Hz,	153,0	H-18	C-18,C-21

	1H)			C-15
20		149,6		
21	9,3 (d, J=4Hz,	197,1	H-15	C-20, C-15
	1H)			
(22)N-CH ₃	2,53 s	43,2		C-3,C-5
(23)O-CH ₃	3,02 s	55,2		C-17

5.3.1. Estudos de fragmentação por espectrometria de massas do sólido A4

A análise por espectrometria de massas ESI-IT evidenciou um único pico majoritário em m/z 339 [M+H], o espectro de fragmentação por CID do íon 339 evidenciou os fragmentos m/z 307, 296, 276, 264 e 236.

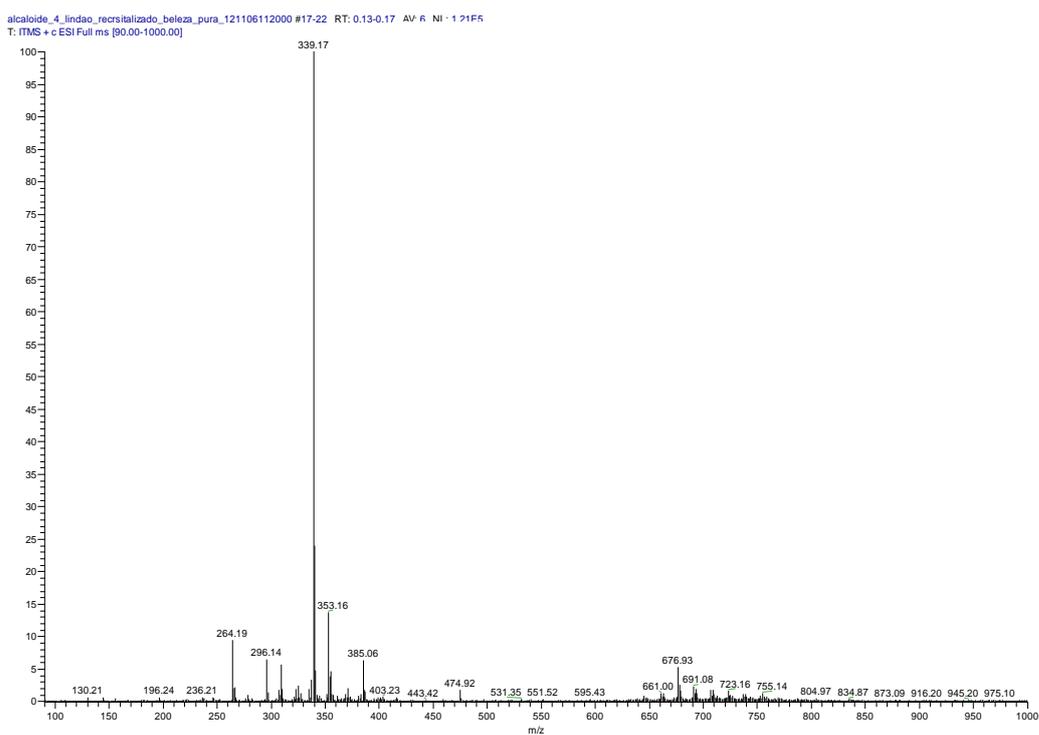


Fig16. Espectro ESI-IT do sólido A4

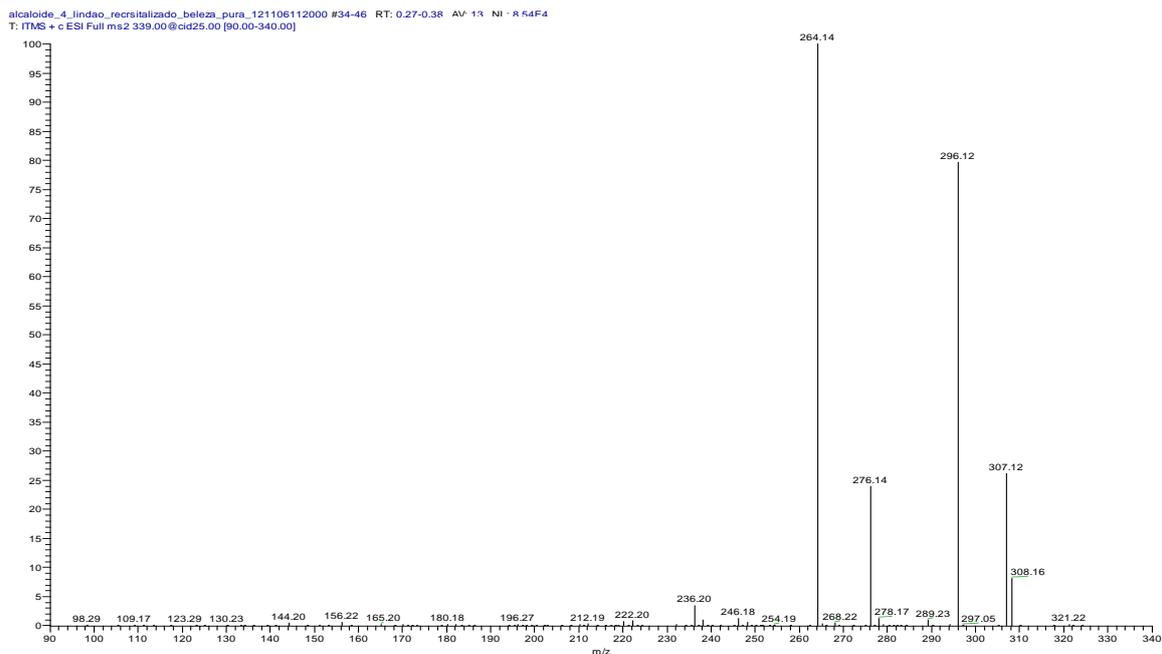
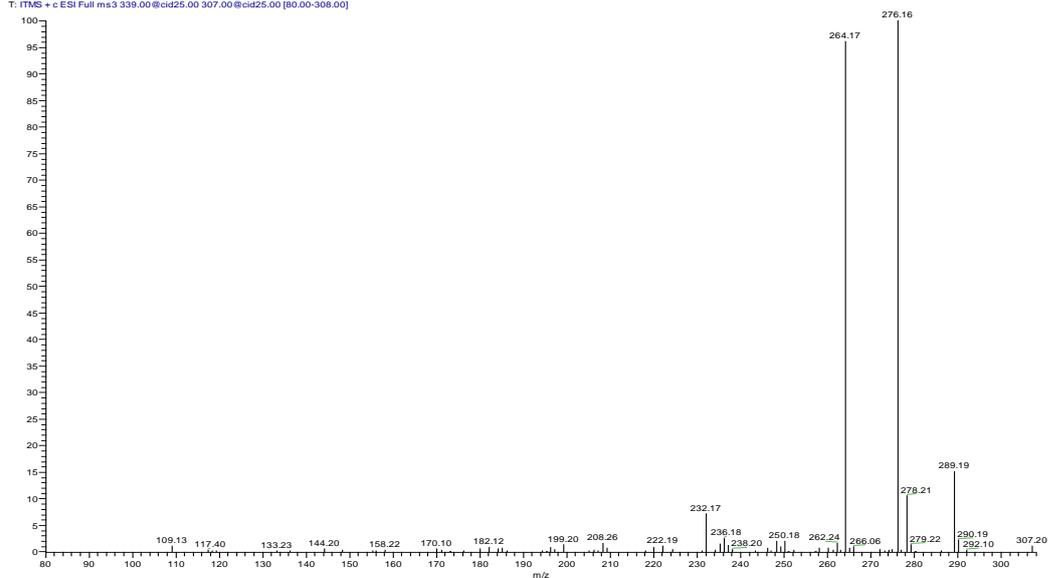


Fig 17. Espectro ms2 do íon m/z339

O espectro ms2 do íon m/z 307 oriundo do íon m/z 339 [M+H] por perda de $\text{CH}_3\text{OH}(-32\text{Da})$ evidenciou picos em m/z 276 [M+H-NH₂-CH₃] e m/z 264 [M+H-CH₂=N-CH₃], resultante da perda de grupo imino da cadeia lateral do esqueleto triptamínico. O espectro ms3 relativo ao íon m/z 276 gerou o íon m/z 248 resultante da perda da carbonila do grupo aldeído ligado ao carbono C-20 e o espectro ms4 do íon m/z 248 gerou o íon m/z 233 referente a perda radicalar do grupo -CH₃ (C-18) (Fig18 e 19).

alcaloide_4_lindao_recristalizado_beleza_pura_121106112000 #71-84 RT: 0.66-0.82 AV: 14 NI: 4 7NF3
T: ITMS + c ESI Full ms3 339.00@cid25.00 307.00@cid25.00 [80.00-308.00]



alcaloide_4_lindao_recristalizado_beleza_pura_121106113548 #105-120 RT: 1.13-1.96 AV: 12 NI: 4 10F3
T: ITMS + c ESI Full ms3 339.00@cid25.00 276.00@cid25.00 [75.00-277.00]

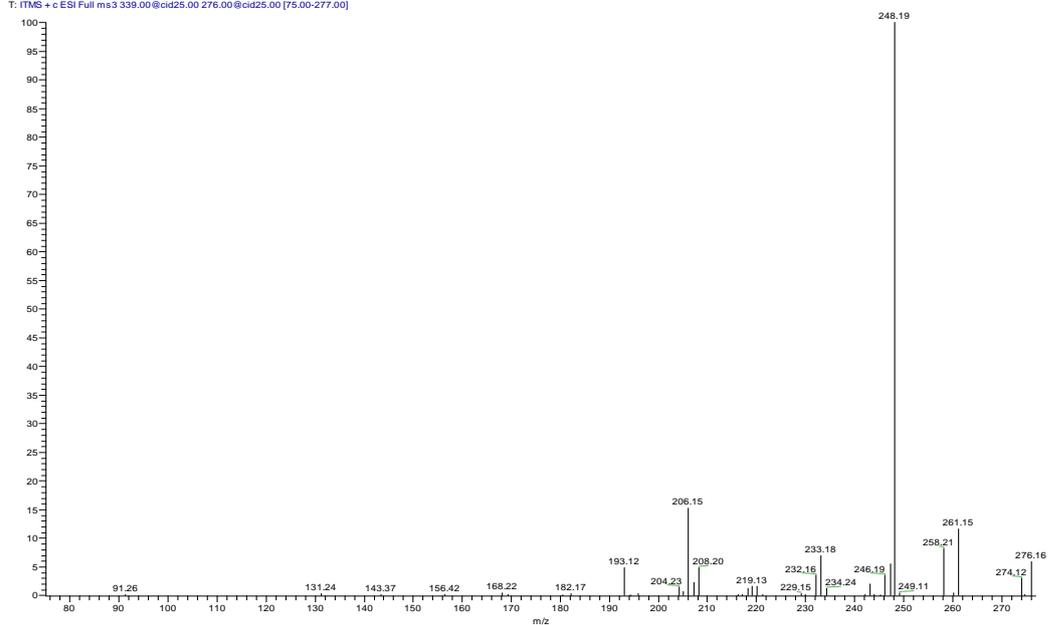


Fig18. Espectro ms2 do íon 307 (acima) e ms3 do íon m/z 276

alcaloide_4_lindao_recristalizado_beleza_pura_121106113548 #129-139 RT: 1.45-1.69 AV: 11 NI: 1 12F2
T: ITMS + c ESI Full ms 4 339.00@cid25.00 276.00@cid25.00 248.00@cid25.00 [65.00-

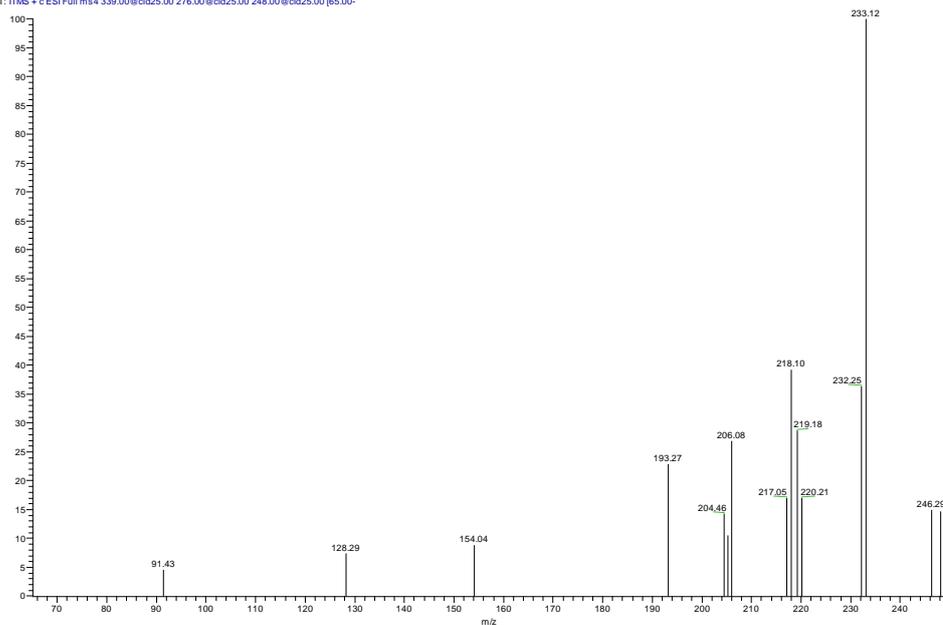


Fig 19 espectro ms4 do ion m/z 248

alcaloide_4_lindao_recristalizado_beleza_pura_121106113548 #57-71 RT: 0.63-0.79 AV: 15 NI: 1 R7F4
T: ITMS + c ESI Full ms 3 339.00@cid25.00 296.00@cid25.00 [80.00-297.00]

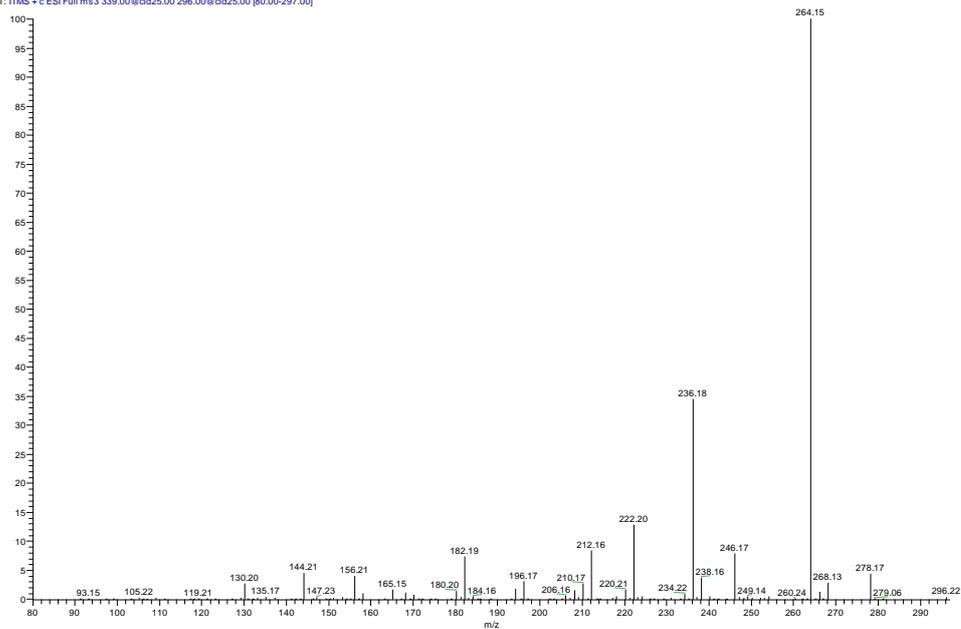


Fig 20. Espectro ms2 do íon m/z 296 gerando como fragmento principal ion m/z 264

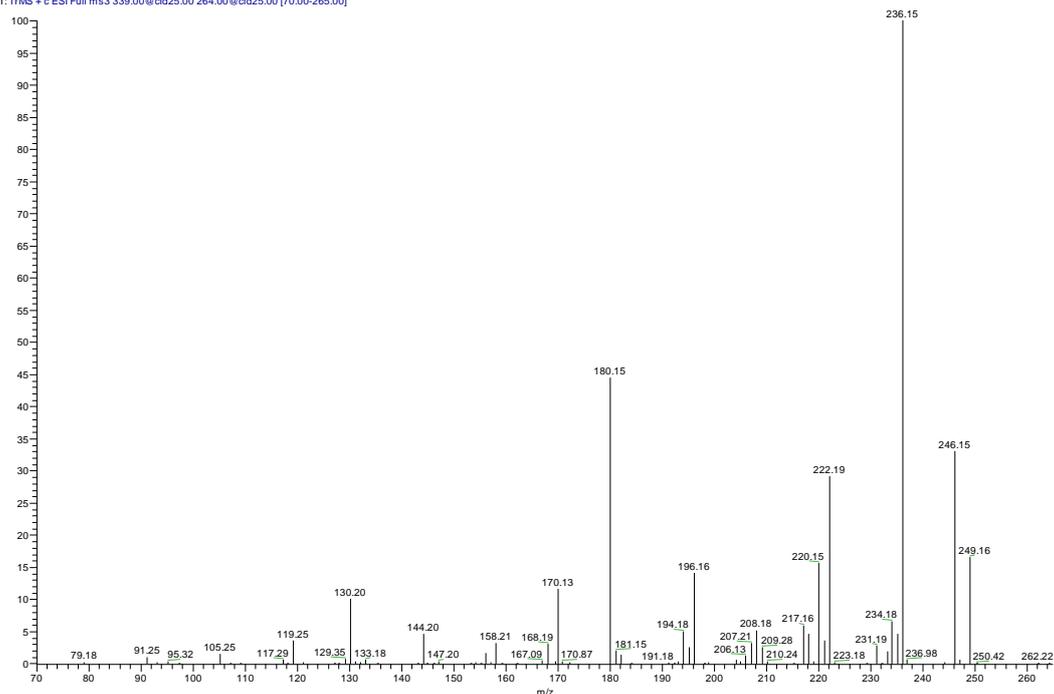


Fig 21. Espectro ms3 do íon m/z 264 que gera o íon m/z 236

O espectro ms2 do íon m/z 296, oriundo do íon 339 pela perda de um grupo imínico $[M+H-H_2C=N-CH_3]$ dá origem ao íon m/z 264 devido a perda de CH_3OH . O espectro ms3 do Íon 264 dá origem ao fragmento m/z 236 em virtude da perda da carbonila do grupo aldeído ligado ao carbono C-20 (Fig 20, Fig 21). Diante de tais evidências foi possível propor um mecanismo de fragmentação para tal substância (Fig 22), dado inédito, contribuindo desta forma nas identificações futuras desta molécula por espectrometria de massas.

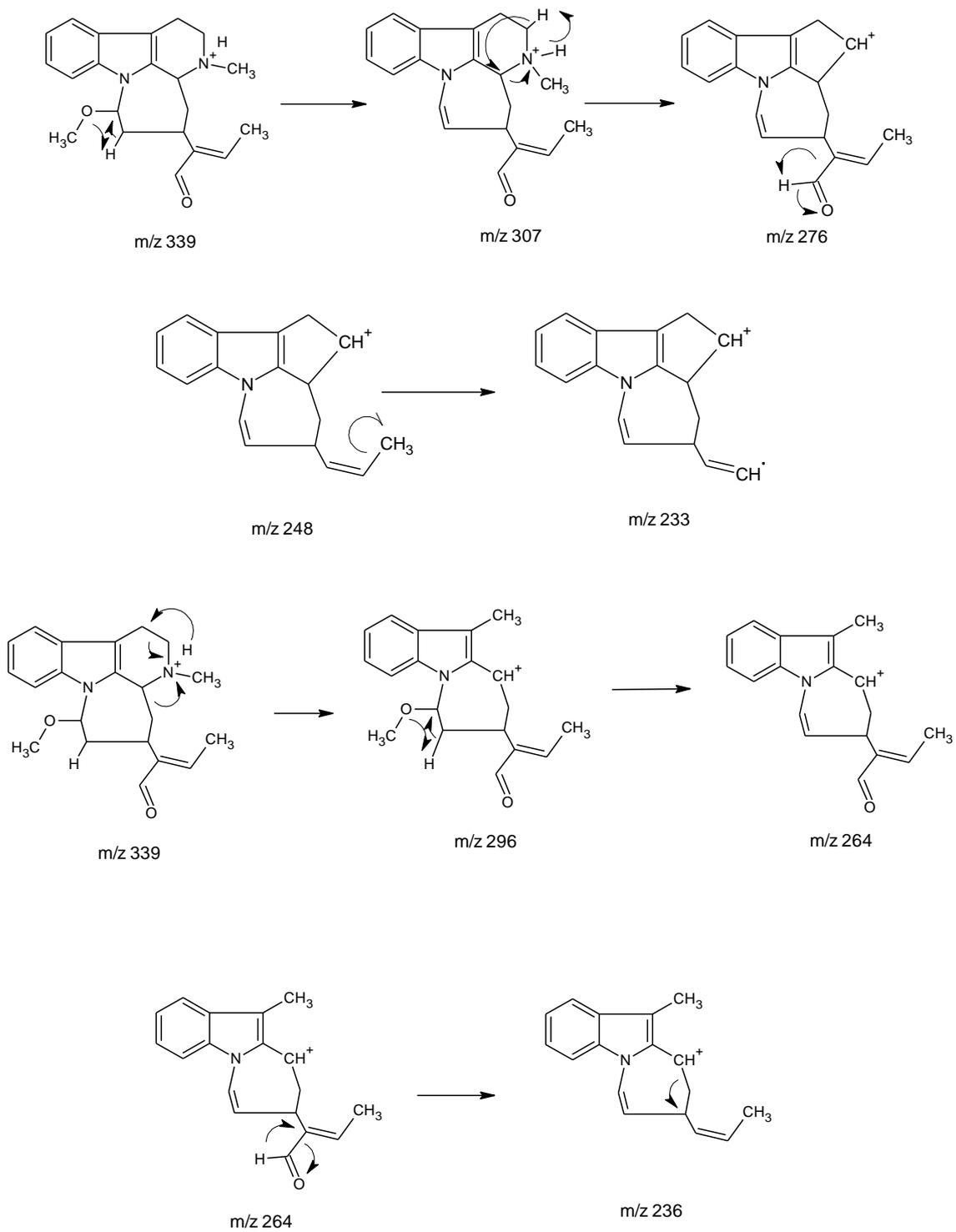


Fig 22. Fragmentações chaves do alcaloide 17-O-metil-acagerina

5.3.2. Otimização geométrica

Levando em conta os dados de RMN ^1H e as equações de Karplus, que relacionam valores de constante de acoplamento calculadas à valores de ângulos diedros aproximados sem considerar substituintes eletronegativos, foram realizados cálculos de otimização geométrica a nível DFT com estruturas que possivelmente estão relacionadas a geometria do alcaloide 17-O-metilakagerina, onde avaliou-se quais seriam as mais estáveis.

A análise do espectro COSY experimental evidenciou um acoplamento entre o H-21 e H-15, $J_{21-15} = 4,0\text{Hz}$ (RMN ^1H), sugerindo uma conformação em W entre as posições 15, 20 e 21, diferentemente dos dados de cristalografia de raio X do alcaloide acagerina (Dupont et al, 1975). A conformação do anel central de 7 membros foi avaliada também, tendo como base diferentes configurações e conformações envolvendo H-14, H-15, H-16 e H-17, haja visto que dados de cristalografia para este alcaloide não constam na literatura. Diante de tais evidências foram calculadas diferentes geometrias usando as bases teóricas RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G(2d,p) e avaliados os valores de energia eletrônica, energia nuclear e momento dipolo (Tabela7) das quatro estruturas sugeridas (Fig. 23) envolvendo a rotação no eixo C20-C15 e C20-21(Fig25), representado pelas estruturas A, B e C e mudanças angulares entre os átomos C-14,C-15,C-16 e C-17 representado pela estrutura C.

Tabela 7. Valores de energia eletrônica, energia nuclear e momento dipolo das estruturas A,B,C e D, onde 1 corresponde a valores calculados pelo método B3LYP-31G(d) e 2 corresponde aos valores calculados pelo método B3LYP 6-311 + (2d,p)

	Estrutura A		Estrutura B		Estrutura C		Estrutura D	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Energia eletrônica	-1075,81 a.u.	-1076,12 a.u.	-1075,81 a.u.	-1076,12 a.u.	-1075,86 a.u.	-1076,12 a.u.	-1075,81 a.u.	-1076,12 a.u.
Energia nuclear	2303,11 Hartrees	2306,18 Hartrees	2318,14 Hartrees	2321,20 Hartrees	2317,45 Hartrees	2320,39 Hartrees	2302,90 Hartrees	2306,90 Hartrees
Momento dipolo	3,56 D	3,82 D	5,26 D	5,83D	3,96 D	4,72 d	3,98 D	4,32 D

Os valores de J para a região dos átomos de hidrogênio aromáticos não permitem muitas possibilidades estruturais, onde H-9 (d, $J=8\text{Hz}$ 1H), H-10 (dt, $J= 1: 8\text{Hz}$, 1H), H-11 (dt, $J= 1:8 \text{ Hz}$, 1H) e H-12 (dt, $J= 1:8 \text{ Hz}$, 1H), evidenciando uma estrutura planar da região indólica. No entanto, os valores de constantes de acoplamento para H-15 (dt, $J= 4:12\text{Hz}$, 1H) e H-17 (dd, $J_{17}= 1,6:4,8\text{Hz}$, 1H), permitem duas possibilidades estruturais: uma com o C-17 e C-15 apresentando uma configuração R, evidenciada pelas estruturas A, B e C, e outra, com o C-17 e C-15 apresentando uma configuração S, evidenciada pela estrutura D (Fig23). Com base nos cálculos teóricos, verifica-se que na estrutura A, os valores dos ângulos diedros obtidos para H-17 são, $32, 94^\circ$ entre H17e $\beta\text{H}16$, sendo $J_{17,\beta16}= 1,6\text{Hz}$ e $-81,38^\circ$ para H17 e $\alpha\text{H}16$, sendo $J_{17,\alpha16}= 4,8\text{Hz}$. Em relação ao H-15 os ângulos diedros calculados foram, $157, 81^\circ$ entre H-15 E $\alpha\text{H}-14$ e $-85,89^\circ$ entre H-15 e $\beta\text{-H}14$; e os valores entre H15 e H16 α/β foram respectivamente $165,97^\circ$ e $49,65^\circ$, compatíveis com os valores calculados das constantes $J_{15,\alpha14}=J_{15,\alpha16}= 12\text{Hz}$ e $J_{15,\beta14}=J_{15,\beta16}=4\text{Hz}$. Para a estrutura D os ângulos diedros obtidos foram, $-32,63^\circ$ entre H-17 e $\alpha\text{H}-16$ e $81,78^\circ$ entre H-17 e $\beta\text{H}-16$. Entre H-15 e H-14(α e β)/H17(α e β) os valores dos ângulos diedros obtidos são $86,42^\circ$, $-157,37^\circ$, $-50,26^\circ$ e $-166,55^\circ$ respectivamente, coincidentes também com os valores de J . As estruturas B e C levam em consideração as mesmas conformações para os carbonos C-17 e C-15 que a estrutura A, apresentando os mesmos ângulos, dispensando comentários.

Concernente à geometria da ponte C15-C20-C21, os modelos A, B e C levaram em consideração três diferentes disposições: A, B (giro de 180° no eixo C20-C21) e C (giro de 180° no eixo C15-C20, conformação W) (Fig 24). A

diferença energética entre as três estruturas não é muito significativa mostrando uma interconversão entre elas (Tab 7), o que indica que uma rotação nesse eixo ocorre e que a estrutura em W, confirmada pelo espectro COSY, pode ser alcançada, porém tal conformação não é rígida, o que justifica o seu valor $J = 4\text{Hz}$ (Silvertein,2000). Diante dos dados experimentais de RMN e os dados de energia nuclear e eletrônica, pode-se afirmar que todas as estruturas são plausíveis.

No intuito de inferir um modelo que melhor representasse a estrutura do alcaloide 17-O-metil-acagerina, foi feita a comparação com o trabalho de Dupont et al. (Dupont et al, 1975), onde foi realizado um estudo de cristalografia de raio X com o alcaloide acagerina, bem similar ao alcaloide em questão. Nota-se uma similaridade com as distâncias interatômicas e ângulos de torção (tabelas 8 e 9) entre as estruturas todas as estruturas e dados experimentais. Em relação à geometria espacial, a estrutura D parece ser a mais próxima da estrutura proposta experimentalmente para a acagerina, diferenciando-se na disposição espacial do hidrogênio H-15 e da metila na posição 4. Cálculos feitos em *single point* tendo como base a estrutura da literatura (Fig 25) evidenciaram valores de energia eletrônica de -1075.78 a.u. para B3LYP-6-31G(d) e -1076,08 a.u para B3LYP 6-311+G (2d,p) e valores de energia nuclear de 2360.88 Hartrees para B3LYP-6-31G(d) e de 2360.88 Hartrees B3LYP 6-311+G (2d,p), mostrando que tal estrutura apresenta valor ligeiramente superior de energia nuclear em relação às demais estruturas obtidas através de cálculos DFT a nível RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G(2d,p). A proposta não consiste em invalidar ou confrontar os dados da literatura, visto que em uma estrutura cristalina a molécula pode assumir uma

geometria que seja mais estável, que é o caso experimental e em meio a solvente, outra geometria pode ser mais adequada, como é o caso dos cálculos teóricos onde foi considerado solvente metanol. Os resultados do presente estudo são importantes, mas não conclusivos a respeito da estrutura preferencial do alcaloide 17-O-metil-acagerina, indicando, por isto, a necessidade de mais investigações, combinando estudos teóricos e experimentais de RMN, particularmente estudos de interações dipolares através do Efeito Nuclear Overhauser (NOE e NOESY).

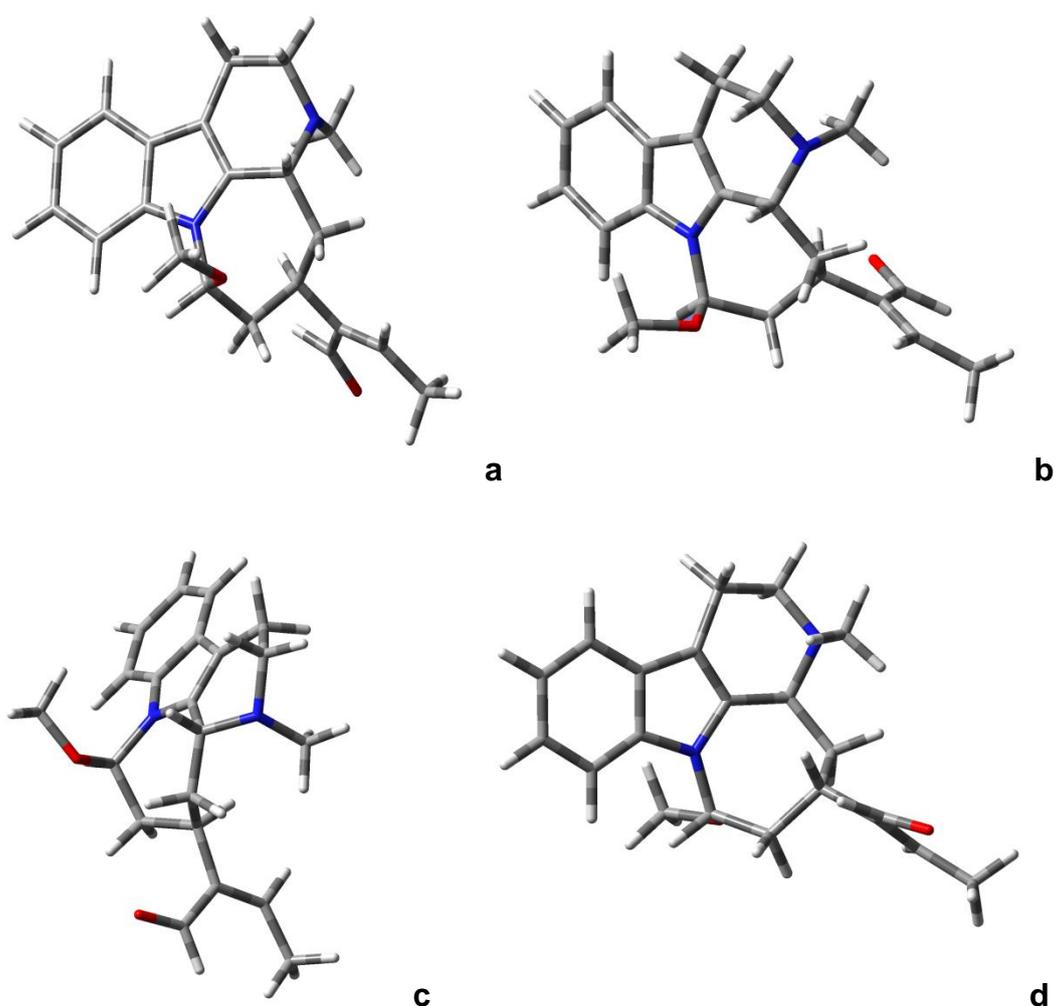


Fig23. Estruturas A, B, C e D obtidas através do cálculo de otimização geométrica usando as bases teóricas RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G (2d,p), tendo como ponto de partidas as diferentes possibilidades frente aos cálculos das constantes de acoplamento.

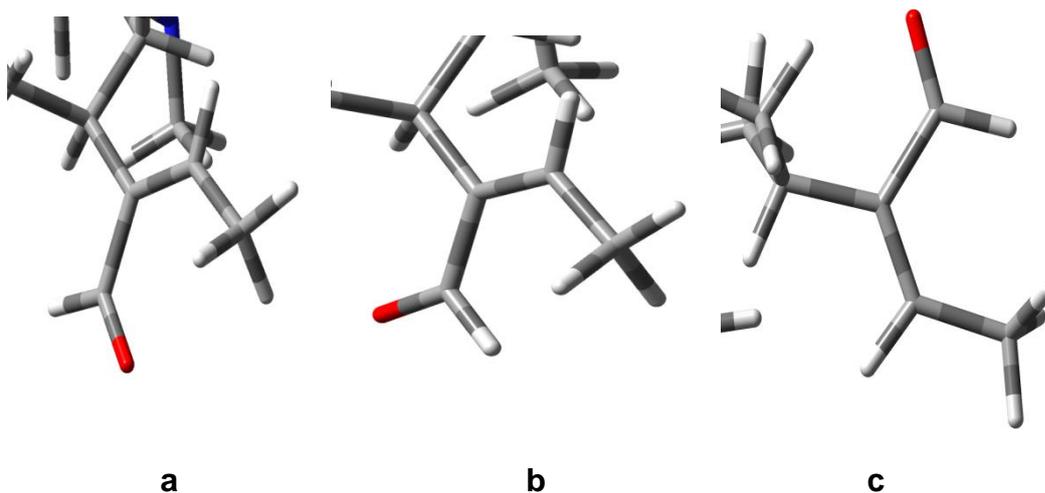


Fig24. (a) conformação da otimização geométrica da estrutura A, (b) conformação da otimização geométrica da estrutura B (c) conformação da otimização geométrica da estrutura C levando em consideração a conformação W entre os hidrogênios H15 e H21.

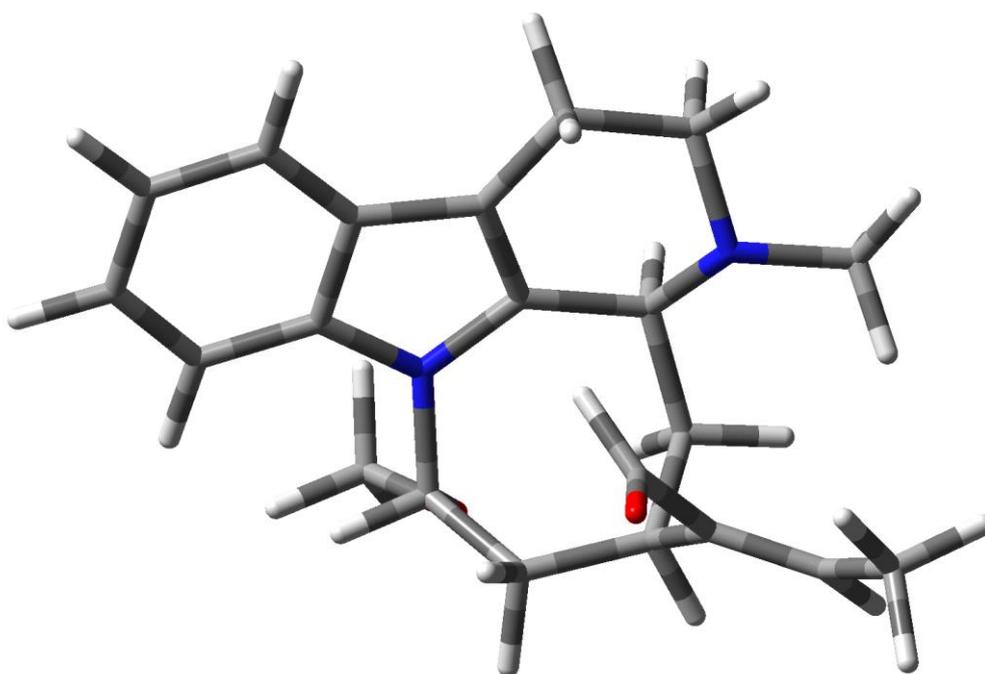


Fig 25. Estrura do alcaloide 17-Ometil acagerina obtida através de calculo DFT single point usando níveis de calculo RDFT B3LYP 6-31G(d), RDFT B3LYP 6-311+G(2d,p) tendo como base a estrutura do alcaloide acagerina obtida por difração de raio x de Dupont et al.

Tabela 8. Valores de distância das ligações entre os átomos de carbono nitrogênio e oxigênio calculados teoricamente e comparados com dados da literatura

Distância de ligação	B3LYP/ 6-31G(d)	B3LYP 6-311+G(2d,p)	Valor experimental
N1-C2	1,396	1,394	1,400
C2-C3	1,519	1,515	1,488
C3-N4	1,485	1,485	1,477
C4-C5	1,471	1,470	1,482
C5-C6	1,547	1,543	1,523
C6-C7	1,501	1,498	1,490
C7-C8	1,437	1,434	1,429
C8-C9	1,406	1,402	1,425
C9-C10	1,391	1,387	1,432
C10-C11	1,409	1,405	1,377
C11-C12	1,393	1,389	1,346
C12-C13	1,400	1,396	1,409
C13-N1	1,392	1,388	1,379
C14-C3	1,553	1,549	1,541
C14-C15	1,542	1,538	1,542
C15-C16	1,552	1,547	1,520
C16-C17	1,537	1,533	1,522
C17-N1	1,456	1,453	1,457
C18-C19	1,501	1,497	1,436
C19-C20	1,353	1,347	1,297
C20-C15	1,527	1,525	1,519
C20-C21	1,477	1,474	1,462
O-C17	1,419	1,421	-
CH ₃ -O	1,423	1,425	-
N4-CH ₃	1,464	1,453	1,470

Tabela 9. Comparação de ângulos de torção entre as estruturas calculadas a nível de teoria B3LYP 6-31G(d) e B3LYP 6-311G+(2d,p) e com a estrutura obtida experimentalmente do trabalho de Dupont et al.

Átomos envolvidos	Ângulos teóricos				Experimental
	B3LYP 6-31G(d)		B3LYP 6-311G+(2d,p)		
	Demais estruturas	D	Demais estruturas	D	
C13-N1-C2	108,33	108,31	108,28	108,27	107,3
N1-C2-C3	126,68	126,73	126,69	126,76	123,2
C2-C3-N4	109,22	109,23	109,30	109,31	106,6
C2-C3-C14	116,58	116,51	116,60	116,47	110,8
C3-N4-C5	110,16	110,16	109,30	110,19	112,6
C5-N4-CH ₃	111,49	111,53	111,51	111,53	111,8
C3-N4-CH ₃	114,92	114,87	114,98	114,97	113,3
C3-C14-C15	115,24	115,21	115,59	115,43	112,7
C14-C15-C16	111,94	112,04	112,15	112,06	115,8
C17-C16-C15	116,71	116,67	116,85	116,81	115,8
N1-C17-C16	113,19	113,21	113,36	113,40	112,0
C8-C7-C2	107,32	107,33	109,35	107,36	107,0
C7-C8-C9	106,90	106,89	106,88	107,87	107,2
C8-C13-N1	107,70	107,72	107,73	107,77	108,0
C15-C20-C21	115,23	114,77	114,89	114,77	120,4
C15-C20-C19	122,99	121,59	122,97	122,10	125,9
C19-C20-C21	121,76	123,57	122,12	123,02	113,5

5.3.3. Estudo de RMN teórico

Inicialmente os valores obtidos teoricamente (estrutura D) usando B3LYP/6-311+G(2d,p) se mostraram próximos dos valores obtidos experimentalmente, com pequenos desvios, de 4,13 ppm (Tabela1), sinais da região aromática calculados teoricamente apresentaram bastante proximidade com dados experimentais com desvio padrão de 2,058 ppm. Outros sinais calculados teoricamente se mostraram bem similares aos dados experimentais, a destacar os sinais dos átomos de carbono C-3 (Exp δ 62,8 e Calculado δ 61,8), C-14 (Exp δ 37,4 e Calculado δ 37,3) C-20 (Exp δ 149,6 e calculado δ 151,1) CH₃-O (Exp δ 55,2 e calculado δ 56,8) no entanto alguns sinais apresentaram desvios significativos a destacar C-21 (Exp δ 197 e Calculado δ 207,4), C-7(Exp δ 109 e Calculado δ 115,5), C-15 (Exp δ 31,1 Calculado δ 40,2) e C-16 (Exp δ 38,2 e Calculado δ 48,1).

Tabela 10. Comparação de sinais de ^{13}C em δ obtidos teoricamente (estrutura D) e experimentalmente relativos a 17-O-metil-acagerina

Posição	^{13}C Teórico	^{13}C experimental
2	141,1	137,5
3	61,8	62,8
5	56,5	52,5
6	19,8	20,2
7	115,5	109,6
8	132,9	127,7
9	122,4	119,6
10	124,3	120,8
11	125,7	123,3
12	113,1	109,8
13	142,6	139,9
14	37,3	37,4
15	40,2	31,1
16	48,1	38,23
17	87,7	84,7
18	20,3	15,3
19	157,5	153,0
20	151,5	149,6
21	207,4	197,1
(22)N-CH ₃	34,2	43,2
(23)O-CH ₃	56,8	55,2

5.4. Identificação estrutural do A6

O fracionamento do extrato metanólico das folhas levou a obtenção de 31 frações, das quais as frações 10-16 evidenciaram a presença de alcaloides em CCD (revelação reagente Dragendorff). A fração resultante da reunião de 10-16 foi analisada em ESI MS-IT, observando-se a presença de íon m/z 531 e fragmentos ms^2 em m/z 514, m/z 369 e m/z 356, compatíveis com o alcaloide strictosidina (Yamazaki et al. 2003). Esta fração, submetida à cromatografia de coluna resultou na obtenção de 20mg de um sólido amorfo escuro (**A6**) que apresentou um único pico em m/z 531 em ESI IT-MS (Figura 24).

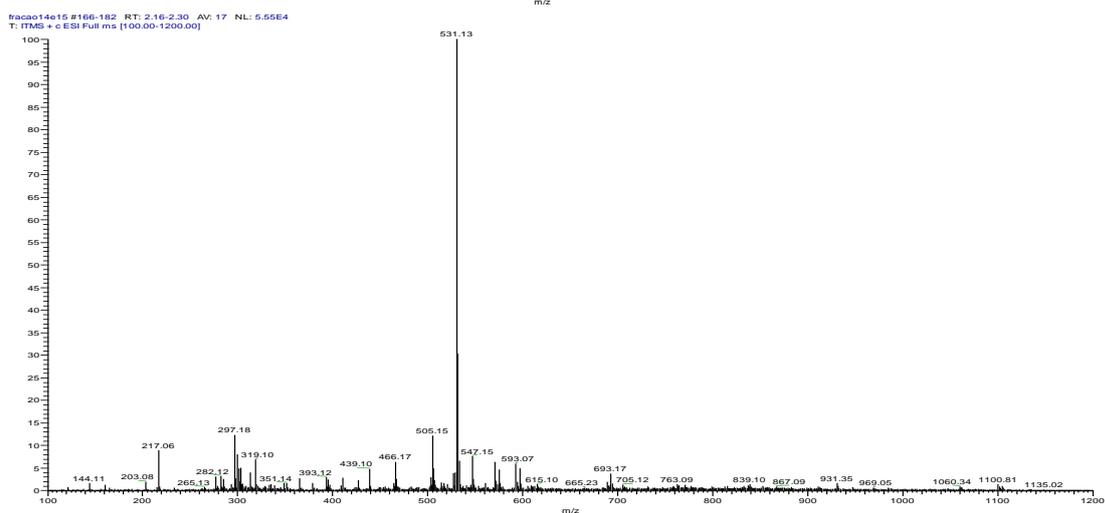
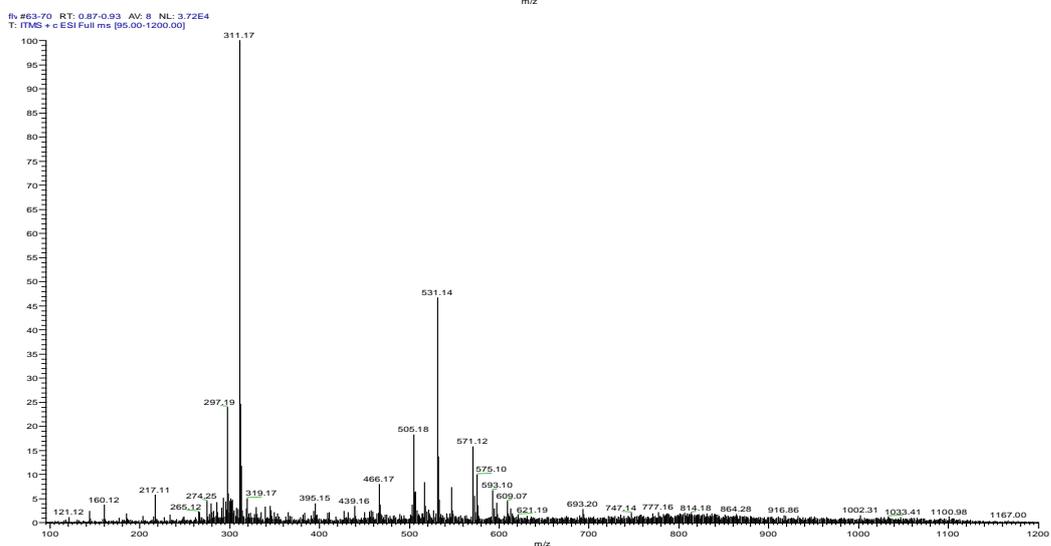
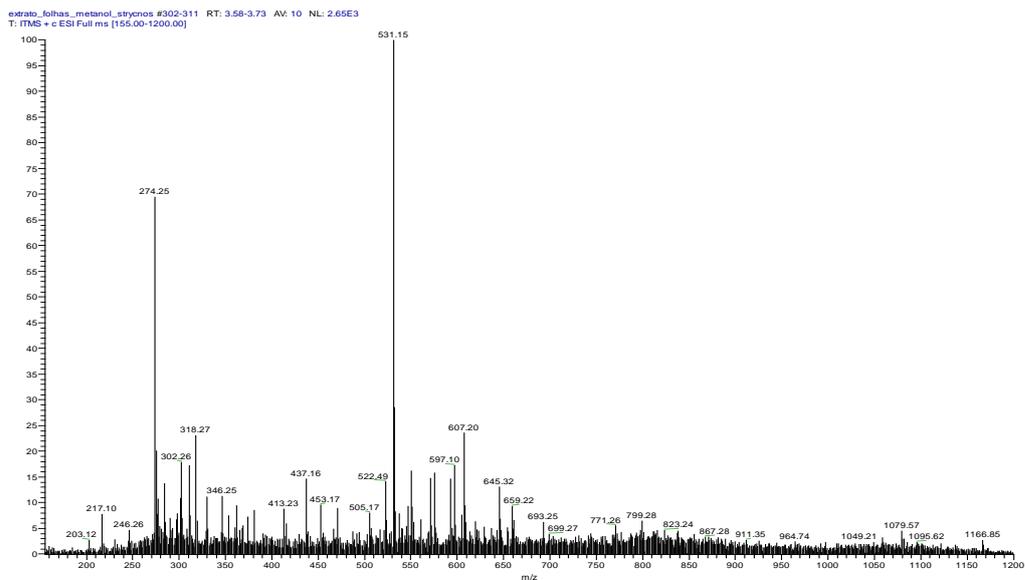


Fig26. Etapas de monitoramento e purificação do alcalóide Estrictosidina. Acima constiui a análise inicial por inserção direta do extrato metanólico das folhas de *Strychnos amazonica*. No meio o espectro da fração resultante da reunião das frações 10 -16. Abaixo o espectro de massas das reunião das frações 14 e 15 oriundas do segundo fracionamento.

As análises através de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, (RMN ^1H , HSQC e HMBC-tabela 11) e a comparação com dados da literatura (Patthy-Lukats et al, 1997) permitiram a confirmação da amostra como o alcalóide strictosidina (fig 27). Os espectros de RMN ^1H e HSQC evidenciaram sinais característicos de glicosídeo do alcaloide com acoplamentos entre δ 3,2 – 3,6 e δ 70-78, juntamente com um singlete δ 4,82 acoplado com sinal em ^{13}C δ 100,1 característico da posição C1' do anel glicosídico. Sinal em δ 7,8 acoplado com o sinal em δ 156,0, característico de H-17/C-17, confirmaram a presença do anel dihidropirano. Deslocamentos entre δ 7,47-7,04 aliados com correlações HSQC, δ 7,47-119, δ 7,04-120, δ 7,13-123 e δ 7,33-112 ratificaram a região aromática característica da parte indólica do alcalóide. O espectro de HMBC (Tabela 11 e Fig. 2) foi decisivo na identificação estrutural da molécula. Acoplamentos característicos do anel indólico, H-9 com C-7, C-11 e C-13 (δ 7,47 – δ 106,123, 138), H-10 com C-8 e C-12 (δ 7,04 - δ 127,112), H-11 com C-9 e C-13 (δ 7,13- δ 119; 138) e H-12 com C8 e C10 (δ 7,33- δ 127, 120). Correlações de H-17 com C-15, C-16, C-21 e C-22 (δ 7,8- δ 32,4;106,2, 45,3;171,0) e dos átomos de hidrogênio da metila com a carbonila em C-22 (δ 3,8 – δ 171) ratificaram estruturalmente a porção oriunda da secologanina. E por fim, a presença de correlações entre H-21 e C-1' (δ 5,8 e δ 100,1) e H-21 e C-19 (δ 5,8 e δ 134,5), respectivamente, indicativos da ligação da glicose e de um carbono vinílico ao anel dihidropirano. A partir dessas informações pode-se inferir que o composto se trata do alcalóide strictosidina.

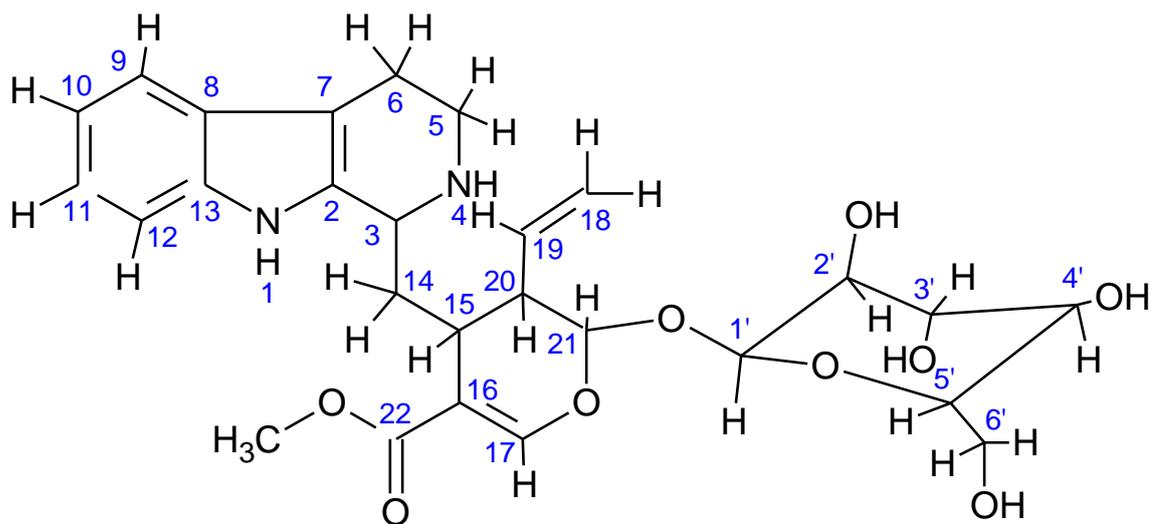


Fig27. Estrutura do alcaloide strictosidina

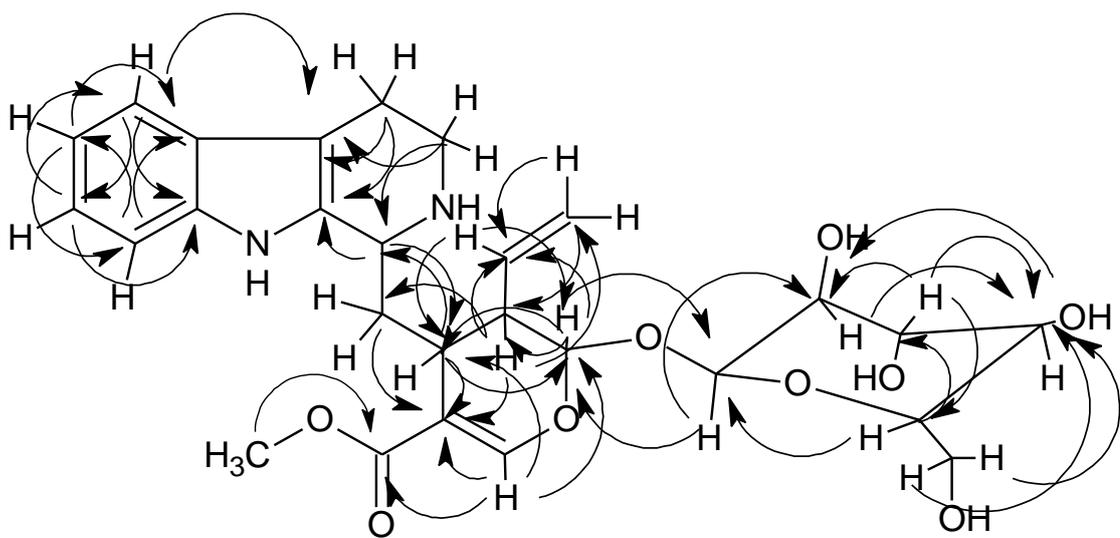


Fig28. Acoplamentos HMBC do alcaloide strictosidina

Tabela11 Sinais δ dos espectros RMN 1D e 2d do glucoalcalóide strictosidina

posição	^{13}C	^1H	HMBC
1	-	-	-
2	130	-	-
3	53,4	4,68 (d,J=11,4Hz, 1H)	C2,C15
4	-	-	-
5	42	3,74(d, J=6Hz, 1H) e 3,1 (m, 1H)	C3,C6, C7
6	23	3,4(t,J= 4,8Hz, 1H) e 3,0(d, J= 6,6 Hz, 1H)	C7,C2
7	108	-	-
8	127	-	-
9	119	7,47	C7,C11, C13
10	120	7,04	C8, C12
11	123	7,13	C9,C13
12	112	7,33	C8, C10
13	138	-	-
14	34,7	2,3 (t,J=11,4Hz, 1H) e 2,2(dd,J=3,6:12Hz,1H)	C16
15	32,4	3,12 (d, J=4,8Hz, 1H)	C3, C16,C21
16	108	-	-
17	156	7,8	C15,C16,C21,C22
18	119	5,2 e 5,3	C19, C20

19	134	5,9 (dd, J=3:12 Hz, 1H)	C15,C21
20	45,3	2,7(dd, J= 3:8,4 Hz, 1H)	C14,C16,C18,C1,C1'
21	97	5,9(d, J= 8,4Hz, 1H)	C15,C19,C20,C1'
22	171	-	-
1'	100	4,82	C3'
2'	74	3,6	C4'
3'	78	3,5	C2',C4', C5'
4'	73	3,6	C2'
5'	71	3,2	C3',C1'
6'	62,7	3,6 e 3,5	C4'
CH ₃ O-	52,7	3,8(s,3H)	C22

5.4.1. Estudos de fragmentação por espectrometria de massas

A análise ESI-IT-MS da strictosidina revelou um pico em m/z 531 e o espectro CID ms² mostrou picos em m/z 514, m/z 369 e m/z 352. O espectro ms³ de m/z 514 [M+H-17Da], originado de m/z 531 pela perda de um grupo NH₃ da porção triptofânica (Stévigny et al. 2004), similar a fragmentação dos alcaloides aporfínicos (caminho A), gera um pico em m/z 352 [M+H-162 Da], devido ao rearranjo do hidrogênio do glicosídeo seguido de uma quebra heterolítica na ponte C21-O-C1', constituindo um cátion (caminho C). O fragmento em m/z 369 [M+H-162 Da] possivelmente surge diretamente da quebra heterolítica da porção glicosídica da strictosidina, pela quebra da ponte C21-O-C1' (caminho B), similar ao caminho C. O espectro ms³ de m/z

369 não gera nenhum fragmento estável. Guiados pelos dados ESI-IT-MS, uma chave de fragmentação é proposta na figura 32.

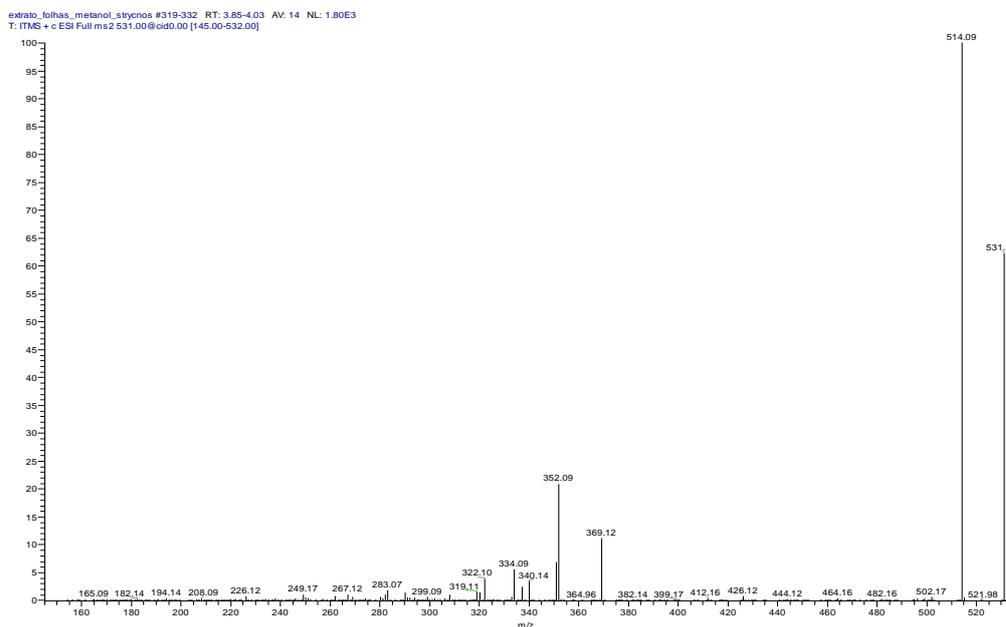


Fig29. Espectro fragmentação CID do ion m/z 531 que gera os íons filhos m/z 514, m/z 369 e m/z 352

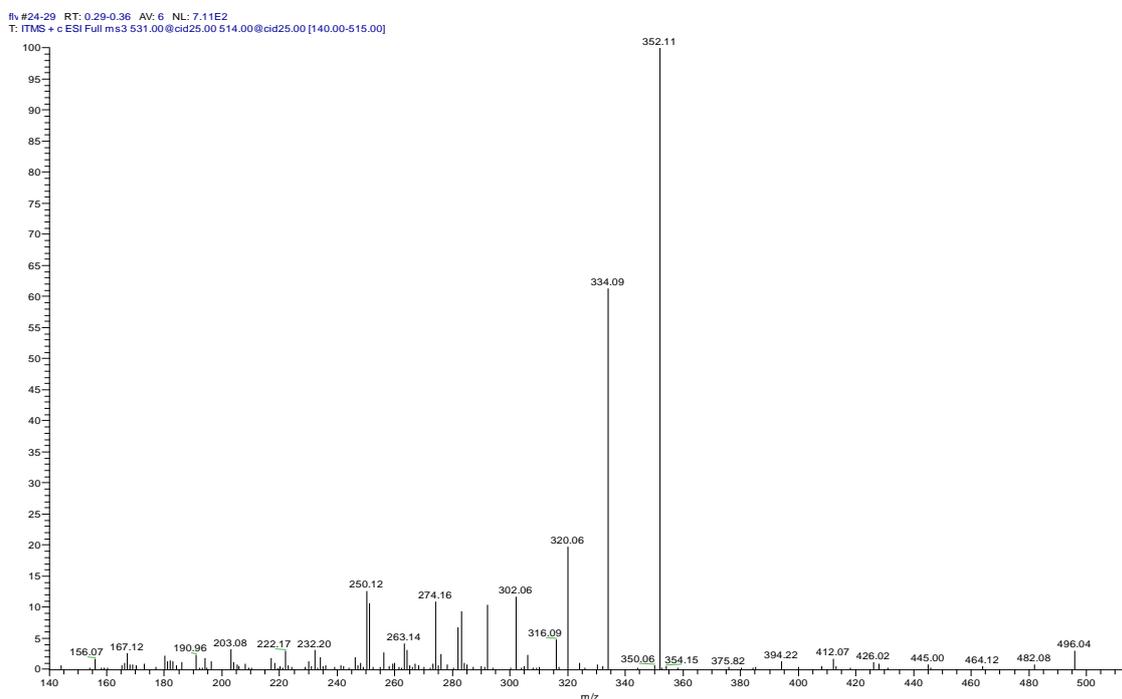


Fig 30 Espectro de fragmentação CID ms2 do ion m/z 514, que gera como fragmento principal o íon m/z 352

lv #48-51 RT: 0.65-0.70 AV: 4 NL: 9.90E1
T: ITMS v c ESI Full ms 4 531.00@cid25.00 514.00@cid25.00 352.00@cid0.00 [95.00-3

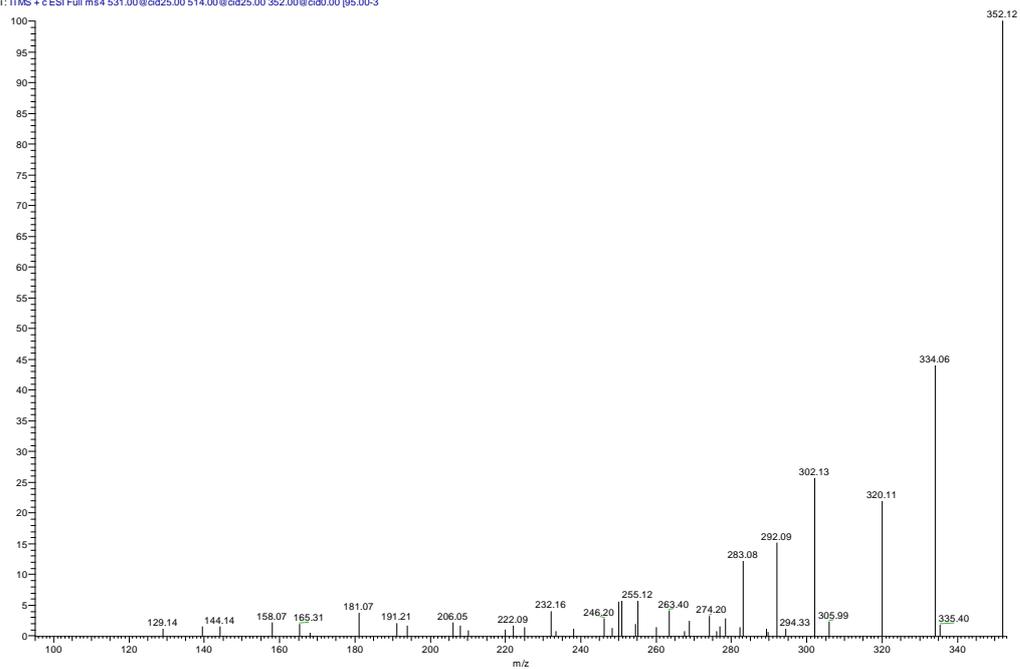


Fig 31. Espectro de fragmentação CID ms3 do íon m/z 352, que gera o íon m/z 344 de difícil dedução estrutural

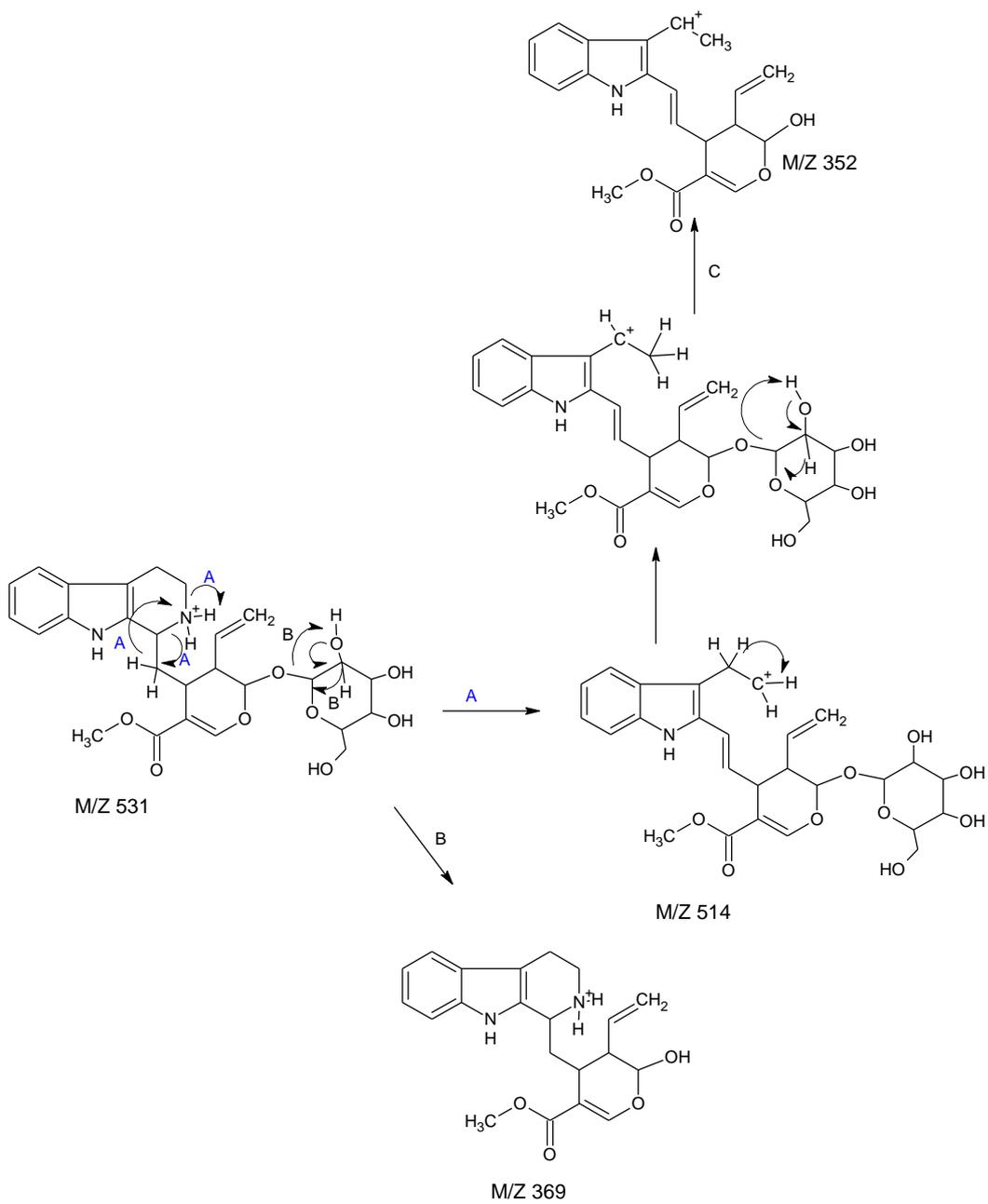


Fig32.Chaves de fragmentação do alcaloide strictosidina

5.4.2.Otimização geométrica

Estrictosidina mostra significativa polaridade, sendo solúvel em metanol e apresentando eluição em CCD em acetato de etila/meoh 1:1 em sílica gel. Isto implica que valores de energia potencial e momento dipolo são importantes para descrever a estabilidade e as distribuições das cargas na molécula. A otimização geométrica apresentou estável conformação com simetria C₁, valor baixo de energia total (-1835.80 a.u) e momento de 5.30 D, revelando uma boa coesão estrutural. Pelo fator de não haver dados de cristalografia para strictosidina, os dados de otimização geométrica foram comparados com dados de raio X de estruturas similares (Lentz and Rossman, 1969; Nyburg et al, 1983).

As distâncias de ligação (tabela 11) indicam uma pequena distorção no anel pentacíclico do anel triptofânico, revelando uma maior distância das ligações entre C7-C8(1.44 Å) e C8-C13 (1,42 Å) comparadas as ligações N1-C2, C2-C7 e C13-N1. Distorções significantes são observadas no segundo anel de seis membros na porção triptofânica, onde são distintas para todas as ligações. Distorções similares são observadas no anel diidropirano, 1.52 Å (C15-C16), 1.35 Å (C16-C17), 1.34 Å (C7-O), 1.53 Å (C20-C21) e 1.56 Å (C20-C15). O anel pentacíclico mostrou uma uniformidade não-angular, com exceção dos ângulos entre N1-C2-C7 (109.56°) e entre C13-C2-N1 109.22°. Os ângulos diedros foram comparados com os valores das constantes de acoplamentos obtidas experimentalmente no espectro RMN ¹H. Os ângulos diedros para os hidrogênios 5 e 6 do terceiro anel da região triptofânica são 162.78° (H5a e H6b) e 46.76° (H5a e H6b), revelando uma disposição pseudoaxial-axial entre os hidrogênios H5a-H6a e disposição axial-equatorial entre H5a-H6a. Estes

resultados são consistentes com os valores medidos das constantes de acoplamento, $J_{5a-6b} = 6.0$ Hz, $J_{6b-5a} = 6.6$ Hz e $J_{6a-5a} = 4.8$ Hz. Para a ponte C3-C14-C15, os ângulos diedros obtidos para os átomos de hidrogênio também mostraram valores consistentes com as constantes de acoplamento: H3-H14R (172.28° e $J_{14R-3} = 11.4$ Hz, $J_{3-14R} = 11.4$ Hz), H3-H14S (-72.41° e $J_{14S-3} = 3.6$ Hz), H14R-H15 (-87.53° e $J_{14R-15} = 1.8$ Hz), H14S-H15 (155.92° e $J_{14S-15} = 12$ Hz). Ângulos diedros envolvendo H15-H20 (-56.90°), H20-H21 (-178.69°) e H19-H20 (65.23°), também são plausíveis quando comparados com as respectivas constantes de acoplamento $J_{15-20} = 4.8$ Hz, $J_{21-20} = 8.4$ Hz e $J_{19-20} = 3.0$ Hz, mostrando-se de acordo com a configuração S do carbon 15 reportado em estudos anteriores [19,20,21]. Finalmente, devido coesão entre a geometria calculada pelo método DFT B3LYP/631-G(d) e os valores das constantes de acoplamento medidas experimentalmente do espectro de RMN ^1H , a estereoquímica da ponte C21-O-C1' é descrita, com ângulos de $81,17^\circ$ e distância de ligação de $2,65 \text{ \AA}$ entre H21-H1', coerente com o dado de NOESY provido por Patthy-lukats et al.

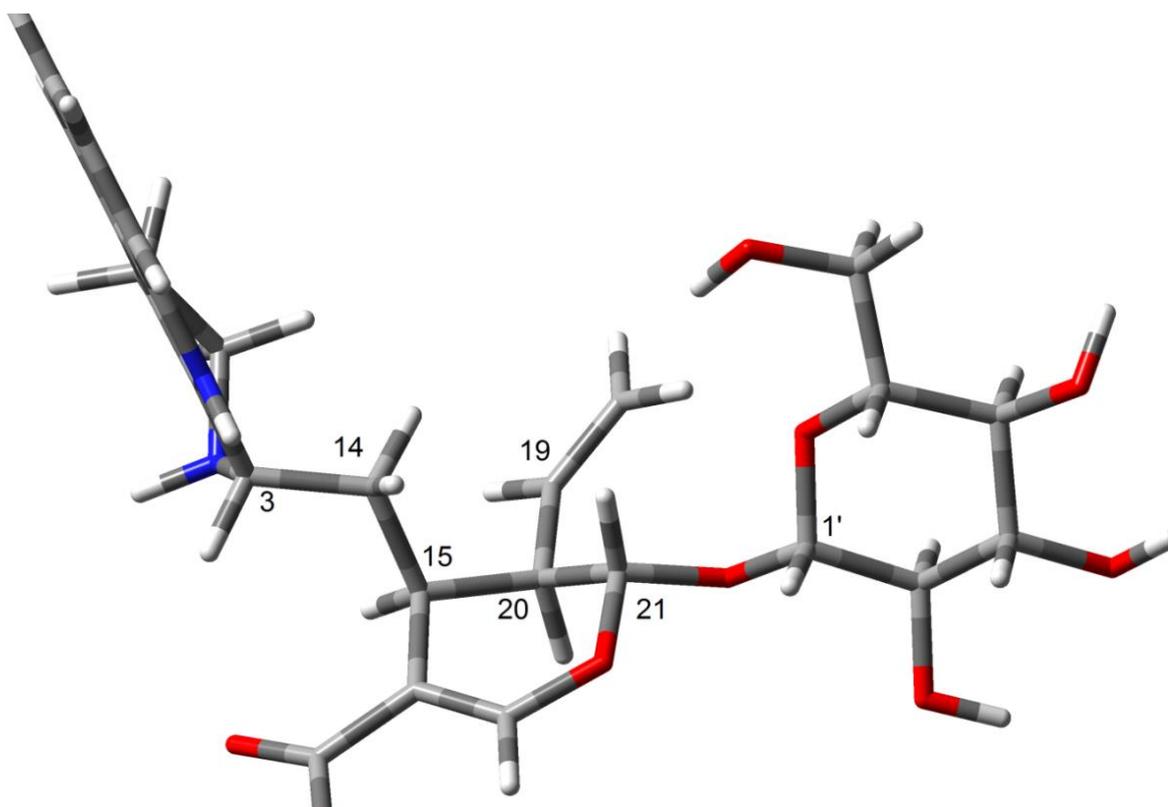


Figura 33. Geometria da strictosidina Segundo cálculos DFT em B3LYP/6-31 G(d), destacando os átomos de hidrogênio H3, H14, H15, H19, H20, H21 e H1'.

Tabela 12. Comparação dos dados de geometria de strictosidina obtidos por DFT com dados experimentais da literatura

Paramêtros	B3LYP 6-31G(d)	Molina et al.	Dupont et al.	Lentz and Rossman
<i>Distância de ligação</i>				
N1-C2	1.386	1.363	1.400	
C2-C3	1.507	-	1.488	
C3-N4	1.479	-	1.477	
N4-C5	1.472	-	1.482	
C5-C6	1.543	-	1.523	
C6-C7	1.501	-	1.490	
C7-C2	1.375	1.442	1.429	
C7-C8	1.439	1.457	1.425	
C8-C9	1.406	-	1.432	
C8-C13	1.427	-	1.406	
C9-C10	1.392	-	1.432	
C10-C11	1.411	-	1.377	
C11-C12	1.393	-	1.346	
C12-C13	1.399		1.409	
C13-N1	1.381	1.406	1.379	
C14-C3	1.548	-	1.541	
C14-C15	1.552	-		1.62
C15-C16	1.515	-		1.48

C16-C17	1.350	-	1.60
C18-C19	1.335	-	1.51
C19-C20	1.512	-	1.60
C20-C21	1.526	-	1.50
C21-O	1.401	-	1.43
C22-C16	1.469	-	1.60
C22-O	1.437	-	1.49
C1'-O	1.403	-	1.42
C1'-C2'	1.528	-	1.52
C2'-C3'	1.528	-	1.51
C3'-C4'	1.527	-	1.55
C4'-C5'	1.537	-	1.52
C5'-C6'	1.523	-	1.52
C5'-O	1.438	-	1.45
<i>Ângulo planar</i>			
N1-C2-C7	109.570	108.7	110.5
C2-C7-C8	107.063	105.7	107.0
C7-C8-C13	106.793	107.5	107.2
C8-C13-N1	107.347	-	108.0
C13-N1-C2	109.221	-	107.3
C2-C3-N4	110.742	-	106.6
C3-N4-C5	114.580	-	112.6
N4-C5-C6	114.370	-	110.1
C5-C6-C7	108.976	-	109.4
C6-C7-C2	121.873	128.9	122.1
C7-C2-C3	125.545	107.9	126.2
C13-C8-C9	118.786	-	119.7
C8-C9-C10	119.165	-	115.3
C9-C10-C11	121.057	-	122.7
C10-C11-C12	121.177	-	122.2
C11-C12-C13	117.626	-	117.6
C12-C13-C8	122.186	-	122.4
C2-C3-C14	111.904	-	110.8
N4-C3-C14	110.456	-	116.9
C3-C14-C15	113.558	-	112.7
C15-C16-C20	112.883	-	-
C15-C16-C17	112.915	-	-
C16-C17-O	125.412	-	-
C17-O-C21	119.937	-	-
C18-C19-C20	129.038	-	-
C16-C22-O	113.414	-	-
CH3-O-C22	115.912	-	-
C21-O-C1'	115.516	-	-
O-C1'-C2'	108.278	-	-
C1'-C2'-C3'	109.237	-	-
C2'-C3'-C4'	111.945	-	-
C3'-C4'-C5'	109.024	-	-
C4'-C5'-O	108.796	-	-

C5'-O-C1'	114.025	-	-	108
-----------	---------	---	---	-----

5.4.3. Estudo RMN teórico

Em virtude da consistência dos dados resultantes da otimização geométrica, cálculos de RMN teórico empregando B3LYP e as bases 6-311+G(2d,p) e 6-311++G(2d,p) foram realizados (tabela 3). Os deslocamentos químicos em ^{13}C calculados se mostraram bem próximos dos obtidos experimentalmente, especialmente os carbonos C3 (Exp δ 52.3 and calc δ 53.20), C5 (Exp δ 42.4 and calc δ 43.00), C9 (Exp δ 119.1 and calc- δ 121.80) e todos os deslocamentos químicos da região glicosídica. Discrepâncias entretanto são observadas em C2 (Exp δ 129.3 e calc δ 144.50), C7 (Exp δ 106.3 e calc δ 113.98), C17 (Exp δ 156.6 e calc δ 163.23) and C19 (Exp δ 134.9 e calc δ 147.03). A base de cálculo B3LYP 6-311 ++G (2d, p) mostrou deslocamentos químicos próximos aos obtidos experimentalmente assim como B3LYP 6-311G+(2d,p), revelando as mesmas discrepâncias nos átomos de carbono C2, C7, C17 e C9. Os cálculos de deslocamento químico usando essas bases estão em concordância com os valores obtidos experimentalmente com desvio padrão de 3,75 ppm para B3LYP 6-311G+(2d,p) e 3.73 para B3LYP 6-311G++(2d,p).

Tabela 13. Comparação de sinais de ^{13}C obtidos teoricamente e experimentalmente relativos ao alcaloide strictosidina

Position	^{13}C Experimental	^{13}C calculado em B3LYP 6-311G +(2d,p)	^{13}C calculado em B3LYP 6- 311G++(2d,p)
1	-	-	-
2	129.3	144.50	144.43
3	52.3	53.20	53.18
4	-	-	-
5	42.4	43.00	43.08
6	20.1	26.59	26.76
7	106.3	113.98	114.00
8	127.2	133.10	133.17
9	119.1	121.89	121.92
10	120.2	123.29	123.35
11	123.3	125.33	125.33
12	112.2	114.49	114.49
13	137.3	141.08	141.07
14	35.1	41.68	41.77
15	32.5	35.22	35.20
16	108.2	117.38	117.32
17	156.6	163.23	163.25
18	120.2	122.37	122.42
19	134.9	147.03	146.98
20	43.3	47.71	47.75
21	97.5	101.73	101.78
22	171.3	177.08	177.07
1'	100.1	103.54	103.58
2'	74.2	78.35	78.39
3'	73.4	81.84	81.89
4'	78.1	77.38	77.40
5'	71.5	82.65	82.63
6'	62.7	67.94	68.07

CH ₃ O-	52.7	53.71	53.76
--------------------	------	-------	-------

5.5. Identificação estrutural do sólido A7

11 gramas de extrato metanólico do cerne de *Strychnos amazonica* foram submetidos ao processo de extração de alcaloides usual, resultando em 9,93 gramas de fração alcaloídica, a qual foi sujeita a cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade, como fase móvel, resultando em 12 frações. A presença de dois alcaloides nas frações 7, 8, 9 e 10, resultou na reunião e análise em espectrômetro de massas. A análise por ESI-IT-MS identificou a fração resultante como sendo uma mistura de dois alcaloides m/z 339, 17-O-metil-acagerina e m/z 355. A partir do estudo dos espectros ms² e ms³ concluiu-se que provavelmente a única diferença estrutural entre as duas moléculas seja a presença de um átomo de oxigênio visto que 354-338=16. (fig 35). O primeiro fragmento do alcaloide 17-O-metil acagerina, em m/z 307 (perda de 32 Da referente ao grupo metoxila), gera os íons m/z 276 e m/z 264. Para o íon m/z 355 percebe-se que todos os fragmentos são iguais com exceção do fragmento m/z 323 (perda de 32 Da também, indicando presença de metoxila na molécula), porém o espectro ms³ do íon 323 gera íons m/z 276 e m/z 264 iguais ao íon m/z 307. O fragmento 323 difere do m/z 307 em apenas 16 Da (Fig 36), sugerindo que um átomo a mais de oxigênio esteja nesse primeiro fragmento e que o resto da estrutura seja idêntica à do alcaloide 17-O-metil-acagerina. Analisando os demais fragmentos, percebe-se a igualdade das chaves de fragmentação (Fig 37 e 38):

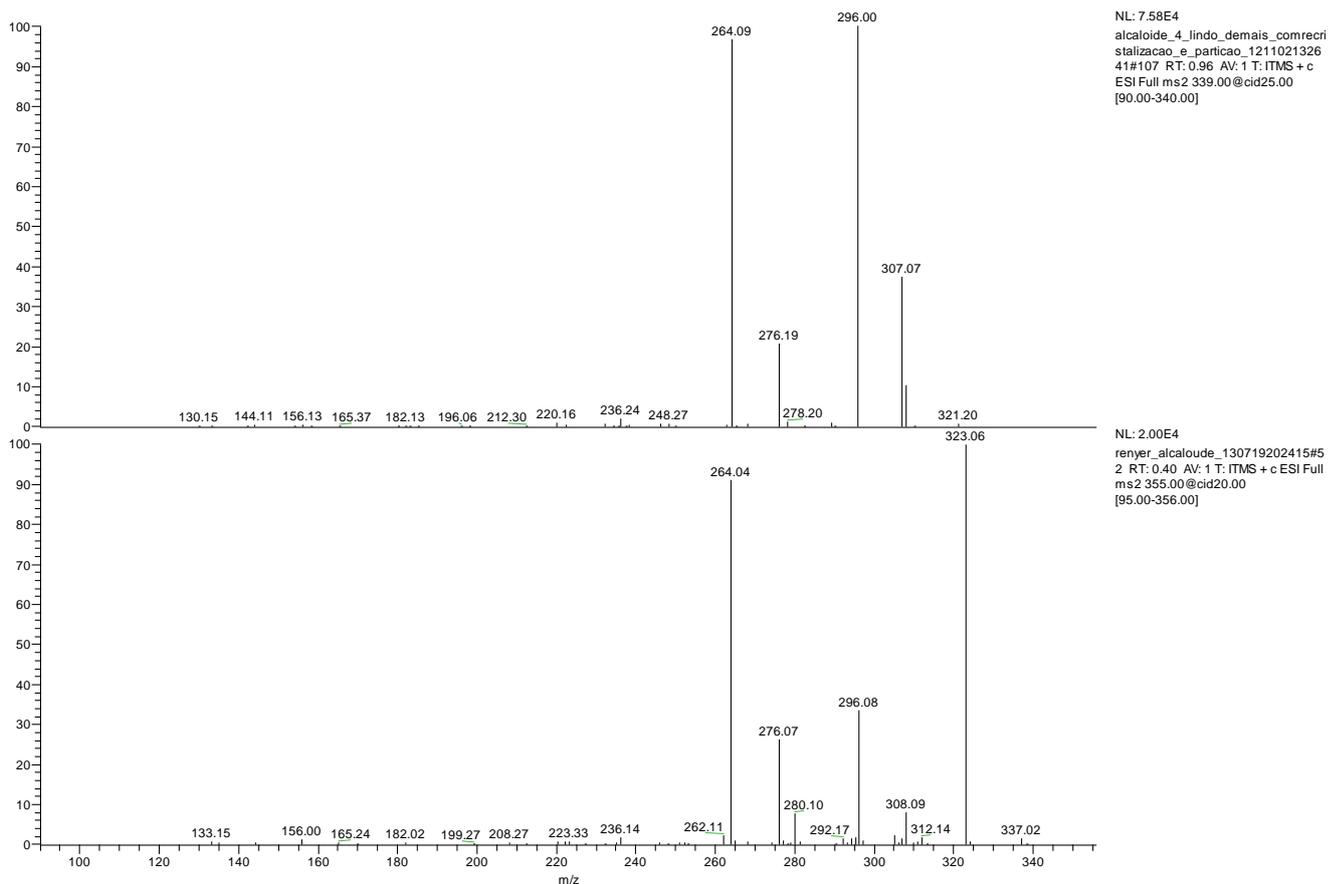


Fig 34 espectro ms2 dos ions m/z 339 ,17-O-metil akagerina e m/z 355

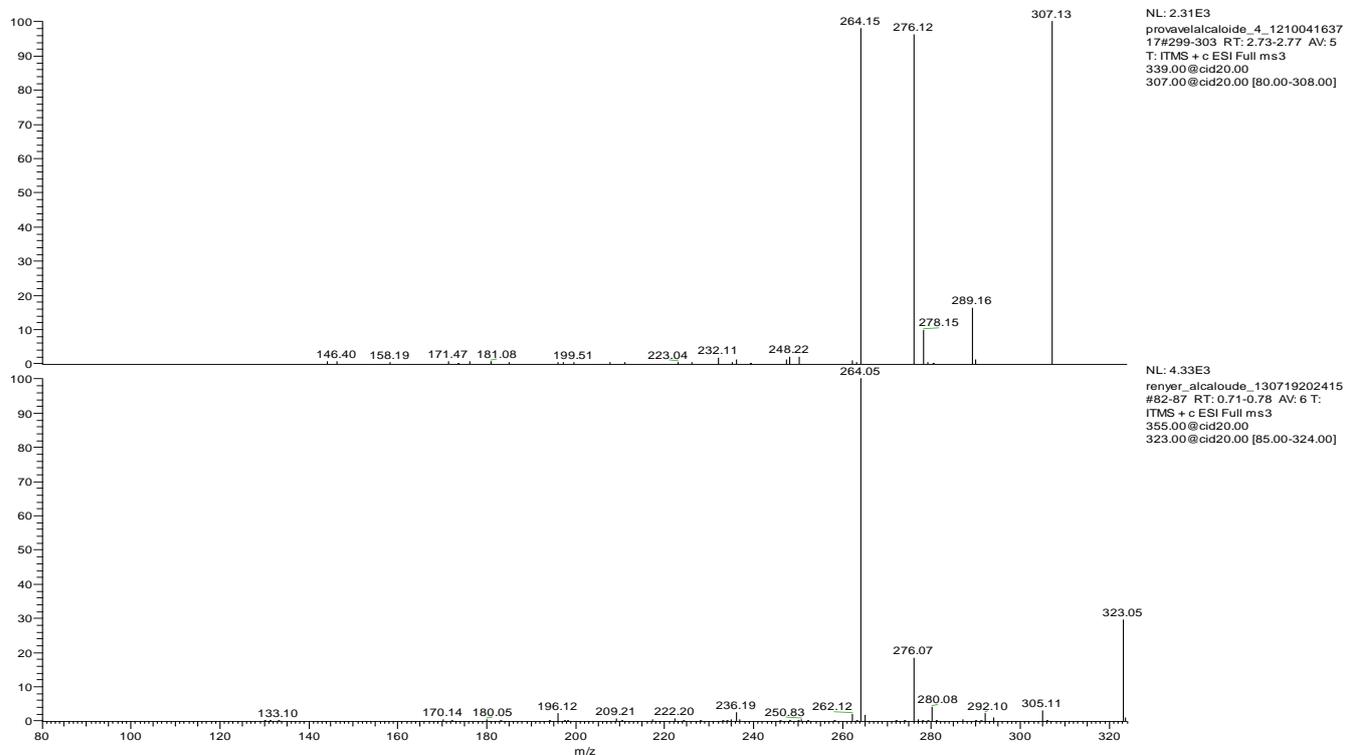


Fig 35. Espectro ms3 do íon m/z 307 e abaixo espectro ms3 do íon m/z 323, ambos originando os íons m/z 276 e m/z 264

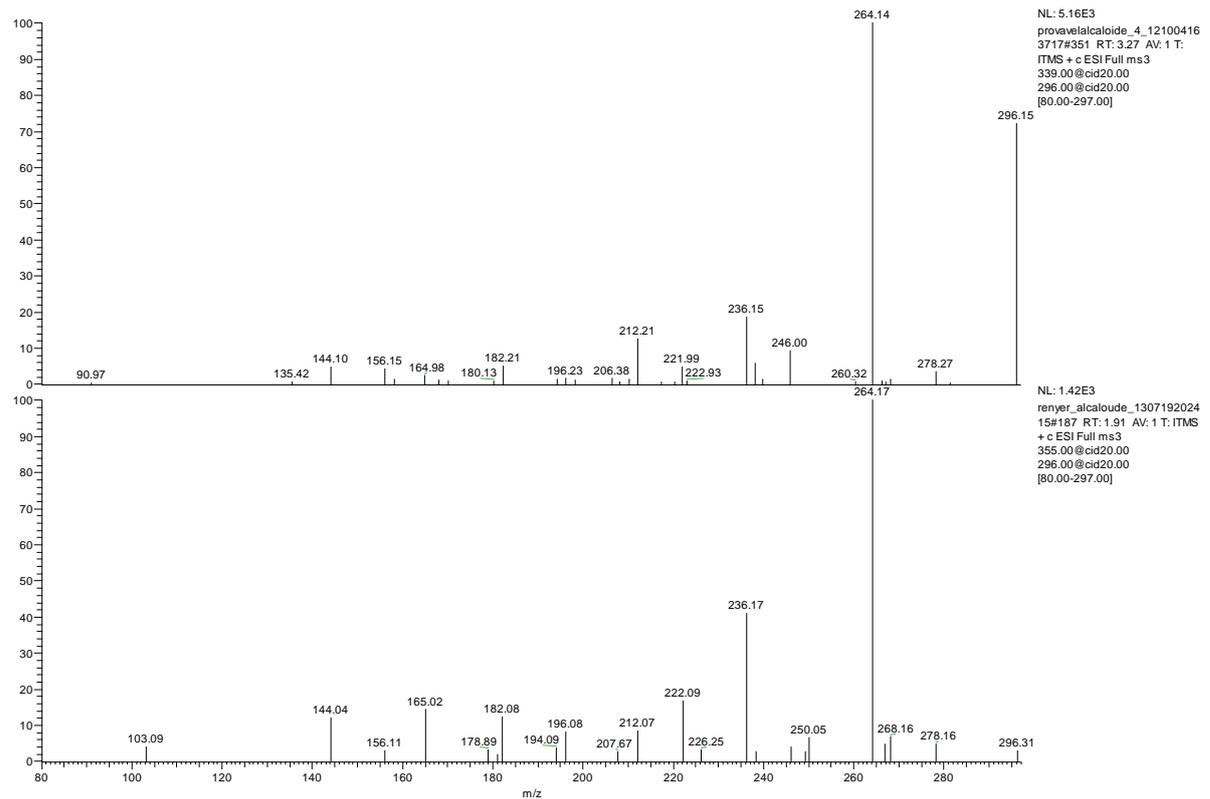


Fig37 Espectro ms3 do íon m/z 296 oriundo do íon m/z339 (acima) e do m/z 355(abaixo) ambos gerando os fragmentos m/z 264 e m/z 236.

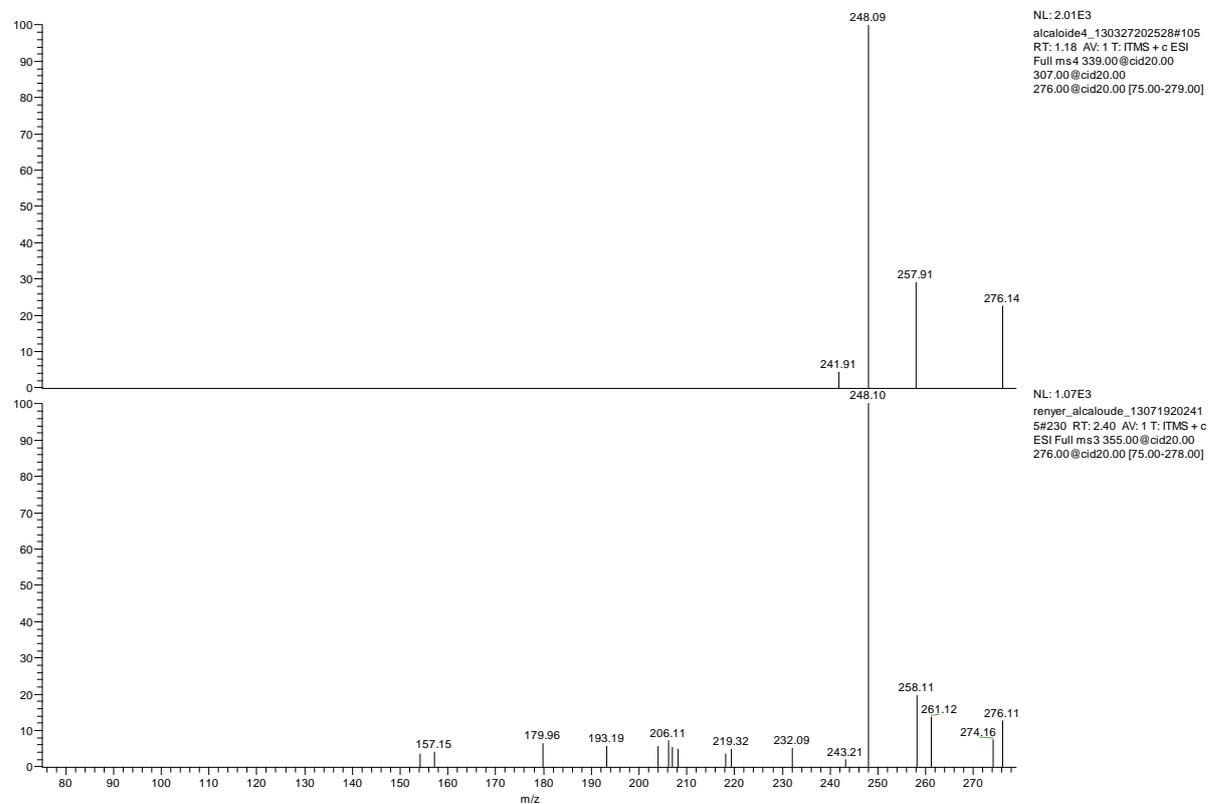


Fig38. Espectro ms3 do fragmento m/z 276 oriundo do ion m/z 339 (acima) e do ion m/z 355(abaixo)

Diante do mecanismo de fragmentação do alcaloide previamente elucidado (Fig 22), a existência dos fragmentos m/z 296, 276 e 264, impossibilita a presença de tal substituinte nas posições 3, 5, 6 e no anel indólico, sugerindo que o oxigênio deve estar localizado na posição 4 resultando em duas possíveis estruturas:

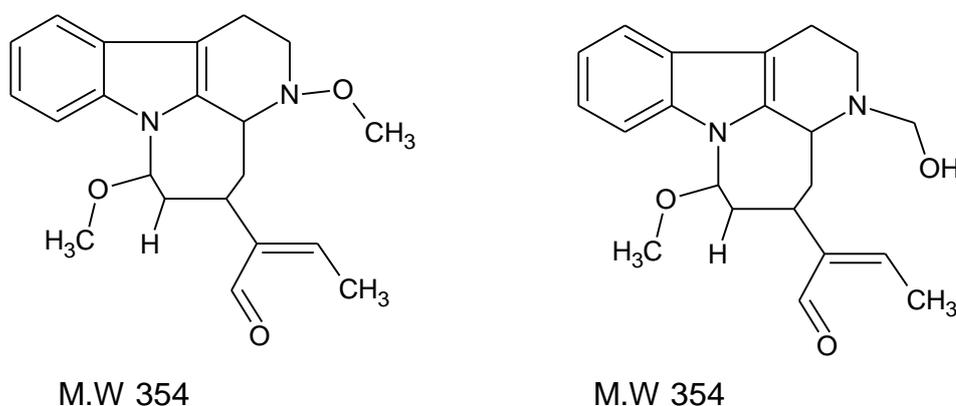


Fig 39. Possíveis estruturas do alcaloide de massa m.w 354

A fração em estudo foi submetida a purificação em placa preparativa resultando em 3,5 mg de um sólido amarelo (**A7**) que ao se revelar em Dragendorff em ccd apresentou cor alaranjada e massa m/z 355 [M+H] em ESI-IT-MS. O espectro RMN ^1H apresentou-se muito similar ao do alcaloide 17-O-metil-acagerina com sinais em δ 7,54 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 2H), δ 7,26 (dt, $J=1:8\text{Hz}$), δ 7,15 (dt, $J=1:8\text{Hz}$) característico do esqueleto indólico, δ 5,8 (1H, dd, $J=1,2:4,4\text{Hz}$) indicando um substituinte no carbono 17, δ 9,3 (1H, d, $j=1,7$ H=21) característico de aldeído presente alcaloide e δ 3,6 (3H,s) característico do grupo metoxila na posição 17. O mapa de contorno HSQC indentificou conexões dos átomos de hidrogênio à seus respectivos carbonos nas posições 9, 10, 11 e 12 (anel aromático indólico), 17 (δ 5,8 e δ 84,7), CH₃-O-

(δ 3,6 e δ 53,2), 18 (δ 2, 17 e δ 15,3), 19 (δ 6,7 e δ 153) e 21 (δ 9,3 e δ 197,2), também muito semelhante às correlações do alcaloide 17-O-metil-acagerina. A presença de um sinal em δ 4,6 e correlação no mapa de contorno HSQC (δ 4,6 e δ 78,1), referente à HO-CH₂-N, sugere que a estrutura seja similar a 17-O-metil-acagerina, porém com carbono metilênico na posição 4. O Mapa de contorno HMBC (Fig41) não evidenciou muitos sinais, porém a presença de acoplamentos importantes como H-5 com -CH₂OH (δ 3,02 e δ 78), H-3 com -CH₂OH (δ 3,3 e δ 78), H-6 com C-2 e C-7, (δ 1,7 com δ 119 e δ 138), H-17 com metoxila (δ 5,8 com δ 50), H-18 com C-19 e C-20, (δ 2,1 com δ 153 e δ 148) contribuem para ratificar a estrutura do alcaloide. Os demais sinais estão reunidos na tabela 8. O espectro de correlações TOCSY (Anexo), evidenciou acoplamentos H-3, H-14, H-15, H-16, H-17 e entre H-18, H-17, H-21 e H-15, ressaltando-se acoplamentos não muito usuais como os acoplamentos entre H-17 e os hidrogênios da metoxila e entre H-5 e hidrogênios do grupo metileno. Diante destes dados e os dados de espectrometria de Massas e RMN (tabela 13), pode-se sugerir que o íon m/z 355 [M+H] se trata de um alcaloide derivado da acagerina, similar a 17-O-metil acagerina, porém com um grupo HO-CH₂ ligado ao nitrogênio na posição 4, até o momento não descrito na literatura e denominado de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina (Fig40). Contudo, a presença de impurezas evidenciadas nos espectros de RMN, recomendam novas análises para confirmação da estrutura proposta.

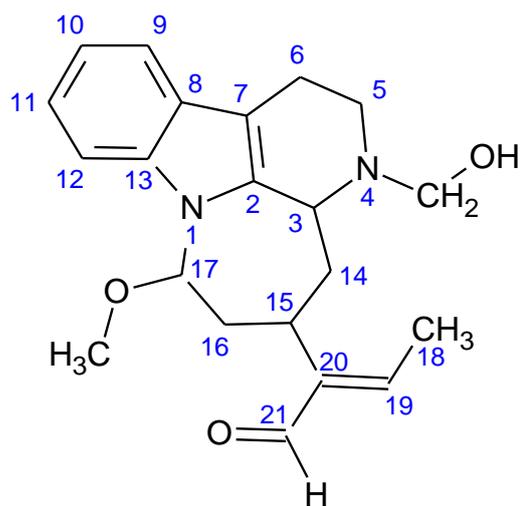


Fig 40. Estrutura do alcaloide 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina

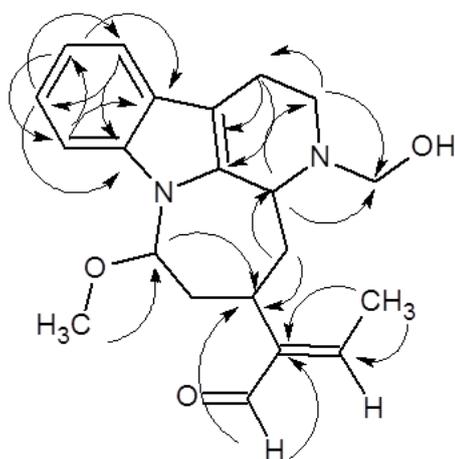


Fig41. Acoplamentos HMBC do alcaloide 4 hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina

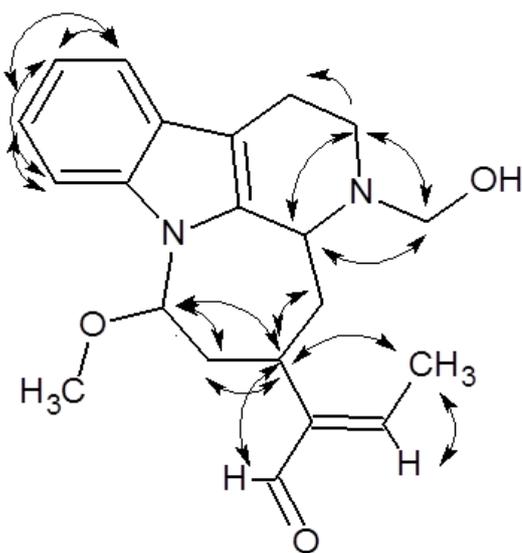


Fig42. Acoplamentos TOCSY de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina

Tabela 14. Sinais em δ de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina

Posição	^1H	^{13}C	HMBC
1			
2	-	138	-
3	3,36 (dd, J= 2:11Hz, 1H)	57	C5, CH ₂ -OH
4	-	-	-
5	3,03 (m, 1H) e 3,13(m, 1H)	49	C6, -CH ₂ -OH
6	1,7(m, 1H) e 1,5(m, 1H)	23,4	C7, C2
7	-	119	-
8	-	127	-
9	7,54(d, J=9,1Hz, 1H)	119,2	C11, C13
10	7,15(dt, J=1:8Hz, 1H)	121	C8, C12
11	7,26(dt, J=1:8Hz)	124	C9, C13
12	7,54(d, J=9,1Hz)	110,2	C8, C10
13	-	140	-
14	1,33(m,1H) e 1,16(m, 1H)	30	C3, C15
15	3,6(dt, J=2:12Hz)	30	-
16	2,1(m,1H) e 2,06(m,1H)	38	-

17	5,8(dd,J=1,2:4,4Hz)	84,7	C16
18	14,2(d,J=6, 3H)	2,1	C19, C20
19	6, 79(m, 1H)	153,2	C15, C21
20	-	149	-
21	9,7(d, J=1,7, 1H)	197	C15, C20
CH ₃ -O	3,6(s, 1H)	53	C17
-CH ₂ -OH	4,6(m, 1H)	78	-

5.6. Resultados antimicrobiano

A tabela a seguir resume os valores de concentração mínima inibitória (CIM) das amostras analisadas contra os patógenos testados

Amostra/microorganismo	<i>C.albicans</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.feacalis</i>
17-o-metil-akagerina	0,03125mg/ml	0,125mg/ml	0,125 mg/ml	0,125 mg/ml
Fração alcalóidica do cerne	0,025mg/ml	0,25mg/ml	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml
Extrato metanólico da casca	0,125mg/ml	-	0,125 mg/ml	-
Extrato metanólico do cerne	0,125mg/ml	0,25mg/ml	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml
Extrato metanólico das folhas	0,0625mg/ml	0,0625mg/ml	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml
Estrictosidina	0,0625mg/ml	0,25mg/ml	0,125 mg/ml	0,125 mg/ ml

Aligianis et al (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada - CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL. Utilizando tal parâmetro, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram forte inibição da grande maioria das amostras testadas com destaque para o alcaloide 17-o-metil acagerina (CIM de 0,03125 mg/ml ou 31,25 µg/mL) contra *Candida albicans*. O extrato metanólico das cascas apresentou forte inibição para *C.albicans* e *S.aureus*, porém mostrou inibição nula contra *P.aeruginosa* e *E.feacalis*.

5.7. Resultado barcoding

As regiões gênicas foram amplificadas e sequenciadas com sucesso, resultando em sequências com cerca de 600pb para ambos os genes. As matrizes de distância calculadas para os genes *rcbL*, *rpoC1* e genes concatenados (*rcbL+rpoC1*) mostram valores nulos de divergência genética entre o espécime alvo e *Strychnos amazonica* (Tabelas 15 e 16). Esses valores indicam que os espécimes que possuíam classificação taxonômica incerta podem ser classificados como *S. amazonica*.

Tabela 15. Matrizes de convergência entre espécime alvo e diversas espécies de *Strychnos* calculados para genes conectados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	0.025									
3	0.003	0.028								
4	0.001	0.027	0.004							
5	0.057	0.065	0.060	0.059						
6	0.057	0.065	0.060	0.059	0.000					
7	0.057	0.065	0.060	0.059	0.000	0.000				
8	0.059	0.067	0.061	0.060	0.004	0.004	0.004			
9	0.059	0.067	0.061	0.060	0.004	0.004	0.004	0.000		
10	0.068	0.048	0.071	0.069	0.080	0.080	0.080	0.083	0.083	
11	0.048	0.073	0.051	0.049	0.075	0.075	0.075	0.076	0.076	0.073

Tabela 16. Índice das exsicatas coletadas no herbário e seus respectivos códigos, obs: amostras com índice 6 e 7 são as amostras alvo do respectivo trabalho

índice	Exsicata
1	<i>Strychnos macrophylla</i> INPA46731
2	<i>Strychnos</i> sp. INPA 91660
3	<i>Strychnos cogens</i> INPA 96399
4	<i>Strychnos mitscherlichii</i> INPA 172318
5	<i>Strychnos amazonica</i> INPA 216208
6	# <i>Strychnos</i> sp.
7	# <i>Strychnos</i> sp.
8	<i>Strychnos cogens</i> INPA 210550
9	<i>Strychnos jobertiana</i> INPA 35194
10	<i>Strychnos peckii</i> INPA 20430
11	<i>Strychnos cogens</i> INPA 38450

6. Conclusões

O presente estudo contribui para o conhecimento do gênero *Strychnos*. A espécie alvo, *Strychnos amazonica* apresenta poucos estudos, sendo que os mais recentes datam das décadas de cinquenta e setenta, onde foram isolados os alcaloides macusina B, 11-methoxydiabolina, base quaternária mavacurina, dihidroxitoxiferina e o 18-desoxi Wieland Gumlich aldeído das cascas da raiz e do caule.

A partir do cerne foram isolados dois alcaloides: 17-O-metil-acagerina e seu derivado denominado de 4-hidroxi-metileno-17-O-metil-acagerina, até o momento não descrito na literatura. Contudo, a presença de impurezas evidenciadas nos espectros de RMN, recomendam novas análises para confirmação da estrutura proposta para este derivado.

Estudos das folhas desta espécie, até então de composição química desconhecida, levou ao isolamento do gluco alcaloide strictosidina, dado inédito referente à presença deste alcaloide em *Strychnos* americanas.

A presença destas estruturas também encontradas em espécies africanas contribui para o conhecimento taxonômico do gênero, evidenciando sua unidade.

Cálculos teóricos referentes às possíveis estruturas sugeridas para alcaloide 17-O-metil-acagerina evidenciaram que todas são possíveis do ponto de vista energético. A comparação com um modelo baseado na estrutura proposta por Dupont et al evidenciou que todas as estruturas propostas são similarmente estáveis, entretando não se descarta o fato de que a estrutura do alcaloide 17-O-metil-acagerina seja idêntica do alcaloide acagerina. A respeito da estrutura preferencial do alcaloide 17-O-metil-acagerina, os resultados não são

conclusivos indicando a necessidade de mais investigações, combinando estudos teóricos e experimentais de RMN, particularmente estudos de interações dipolares através do Efeito Nuclear Overhauser. Cálculos teóricos de RMN ^{13}C mostraram bastante similaridade com os dados experimentais. Em contrapartida foi possível constatar, com base nos desvios entre os sinais teóricos e experimentais, que os dados experimentais obtidos apresentam coesão e que não se referem a contaminantes ou a uma mistura.

Calculos teóricos de otimização geométrica associados a cálculos de constante de acoplamento confirmaram a geometria da molécula de strictosidina apresentada na literatura, levando em consideração não somente dados RMN, mas cálculos a nível B3LYP 6-31G(d), fornecendo informações adicionais, como ângulos e distâncias interatômicas, até então desconhecidas. Calculos teóricos de RMN ^{13}C também se mostraram coesos com os dados experimentais, evidenciando que os níveis de calculo escolhidos são bastante precisos pra tal tipo de molécula.

Os testes antimicrobiano, inéditos para a espécie, revelaram significativa atividade dos extratos dessa planta e dos alcaloides isolados, com destaque para a atividade do alcaloide 17-O-metil acagerina frente à *Candida albicans*. Tais dados fornecem novas informações a cerca da atividade biológica dessa espécie, da qual até então somente era conhecido o seu potencial curarizante/convulsivante, e reforçam o potencial farmacológico do gênero *Strychnos*.

7. Bibliografia

Aguado, Frei Pedro de. 1920. Estudios arqueológicos y etnográficos, II, Madrid, citado por Vellard

Almeida, M.F.O; Melo, A.C.R; Pinheiro, M.L.B; Silva, J.R.A; Souza, A.D.L; Barison, A.; Campos; F.R; Amaral, A.C; Machado, G.M.C; Leon, L.L.P. 2011. Chemical constituents and Leishmanicidal activity of *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). Quím. Nova vol.34 no.7

ALIGIANIS N., KALPOUTZAKIS E., MITAKU S., CHINOUE I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.

Angenot, L. 1971. De l'existence en Afrique Centrale d'un poison de fleche curarisant africain, issu du *Strychnos usambarensis* Gilg. Ann. Pharm. Franç. 29,353-364.

Asmis, H; Schmid, H; Karrer, P. 1954. Über alkaloids aus einer *Strychnos toxifera* Rinde aus Venezuela. Helv. Chim. Acta, 37, 1983-1992.

Asmis, H; Waser, P.; Schmid, H; Karrer, P. 1955. Zur Kenntnis der Caracurine des nor C-dihydrotoxiferins. Helv. Chim. Acta, , 38, 1661-1668.

Barbosa Rodrigues, J. L'uraêry ou curare. 1903. Veuve Mormon, Bruxelles, p180.

Baser, K.H.C.; Bisset, N.G., 1982. Alkaloids of Sri Lankan *Strychnos nuxvomica*. Phytochemistry 21, 1423–1429

Bassleer, R., Depauw-Gillet, M.C., Massart, B., Marnette, J.M., Wiliquet, P., Caprasse, M., Angenot, L., 1982. *Effets de trios alcaloides extraits du*

Strychnos usambarensis sur des cellulosecance´reuses en culture. *Planta Med.* 45, 123–126.

Bennett, A.E., 1968. *The history of the introduction of curare into medicine.* *Anesth. Analg.* 47, 484–492 .

Bernard, C. *Leçons sur les effects des substances toxiques et medicamenteuses.* Paris, 1857.

Biocca, E. 1954. Pesquisa sobre o método de preparação do curare pelos índios. *Revista do Museu Paulista, N.S.,* 8, 164-226 .

Bisset, N.G.; Phillipson, J.D., 1976. The Asian species of *Strychnos*. Part IV. The alkaloids. *Lloydia* 39, 263–325

Bisset, N.G., 1992a. Curare. In: Pelletier, W.S., (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, vol. 8. Springer, Berlin, pp. 3–150.

Bisset, N.G., 1992b. War and hunting poisons of the New World. Part 1. Notes on the early history of curare. *J. Ethnopharmacol.* 36, 1–26.

Bisset, N.G. *Curare, Botany, Chemistry and Pharmacology.* *Acta Amazonica*, 18, ½ Suplemento. (falta a data)

Boehm, R., 1895. Das su¨damerikanische Pfeilgift Curare in chemischer und pharmacologischer Beziehung. *Abhandl. Math-Phys. Cl., Ko¨nigl. Sa¨chs. Gesell. Wissen* 22, 201–238.

Bovet, D; Ducke. A.; Adank, K; Marini-Bettolo, G.B. Ricerche sugli alcaloidi curazzanti di varie specie di *Strychnos* del Brasile. Not VIII. Gli alcaloidi della *S. macrophyla* Barb. *Rendconi dell istituto superior di sanitá.* 1957, 20, 334-341.

Bowman, W.C. *Neuro Muscular Block.* *British Journal of Pharmacology.* 2006 147, 277–286

Boussingault et Roulin 1828. Examen chimique du curare. Ann de Chim. Et de Phys. 39-29. cited por E. Biocca .

Bruneton J 1999. Monoterpenoid indole alkaloids. In: *Pharmacognosy, phytochemistry and medica lplant*. 2ed. France: Lavoisier Publishing, p. 1000-1043.

Caron, C., Hoizey, M.J., Men-Olivier, L., Massiot, G., Zeches, M., Choisy, C., Le Magrex, E., Verpoorte, R., 1988. *Antimicrobial and antifungal activities of quasi-dimeric and related alkaloids*. *Planta Med.* 54, 409–412.

Condamine, de La. Journal Du Voyage fait par orde Du Roi à l'Equateur. Imprimerie Royale, Paris, 1751.

Corrêa, P. 1952. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das cultivadas exóticas*. Vol III. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro. P 646

D'Anghera, Pietro Martire, 1530, De orbe novo,.

Demedeiros, C.L.C., Thomas, G., Mukherjee, R., 1991. *The source of Ca²⁺ for the spasmolytic actions of longicaudatine. A bisindole alkaloid isolated from Strychnos trinervis (Vell) Mart (Loganiaceae)*. *Phytother. Res.* 5, 24–2.

de Aguado, F.P., Citado por Carlos Cuervos Marques, Estudios arqueológicos y etnográficos, II, Madrid, 1920, p 231. In: Curare and Curare-like agents. Ed Bovet, D; Marini-Betollo, G.B, Elsevier Publishing Co. Amsterdam p 3-33.

de Gomara, Lopez, Historia general de las índias, LXXXI, 1553, Ed Espasa Calpe, Buenos Aires, I, 1941, PP. 193-94.

Delle Monache, F.; Aldo, P.F; Marini-Bettolo, G.B. 1969. Occurrence of nordihidrotoxiferine in *Strychnos pseudoquina*. *Tetrahedron Letters*. 1969, 25, 2009-2010.

de Léon, Cieza, Crónica Del Perú, VII, 1553, Éd Espasa-Calpe, Buenos Aires, 1945 citado por J. Vellard.

Ducke, A. 1965. O gênero *Strychnos* no Brasil. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte. 30.1-64.

DUPONT, L. DIDEBERG, O. ANGENOT, L Acta Cryst. B31 (1975) 2378

Farnsworth, N.R e Kaas, C.J. Na approach utilizing information from traditional medicine to indentify tumor-inhibinting plants. Journal of Ethnopharmacology 1981,3,85-99.

Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., Oliveira, J., Faria,J., Gaspar, L. , Andrade, P.B., *Simple and reproducible HPLC–DAD–ESI-MS/MS analysis of alkaloids inCatharanthus roseus roots*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010. 51 65–69.

Fontana, F. *Traité sur le venin de la vipère, sur lês poisons americains, sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons végéteux*. Florence, 1781.

Frederich, M., Bentires-Alj, M., Tits, M., Angenot, L., Greimers, R.,Gielen, J., Bours, V., Merville, M.P., 2003. *Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from Strychnos usambarensis, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 304, 1103–1110.

Frederich, M., Hayette, M.P., Tits, M., De Mol, P., Angenot, L.,. *In vitro activities of Strychnos alkaloids and extractsagainst Plasmodium falciparum*.Antimicrob. Agents Chemother. 1999 43, 2328–2331.

Galeffi, C., Delle Monache, E.M and Marini-Bettòlo, G.B. (1973) Gli alcaloide di *Strychnos amazônica* e di *Strychnos brachiata*. XXVIII. – Sugli alcaloid di *Strychnos*. *Annali chimica* 63, 849-853.

Goonetilleke, A. ; Rolfsen, W.; Rajapakse, L. Tertiary indole Alkaloids of *Strychnos aculeata* . *Planta Medica*, 1980,39,208.

Gottlieb OR, Kaplan MAC & Borin MR de MB 1996a. *Biodiversidade. Um Enfoque Químico-Biológico*. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 267 pp

Herrera, Antonio, Historia general de los hechos de los Castellanos en las Islas y Tierra Firme Del Mar Caribe, Madrid, 1726-1727, VIII, Decada 8^o, Ed Gaurania .

Humboldt, A. Von. *Personal narrative of travels to the Equinocial regions of Americ during the years 1799-1804 by A.Von Humbold and A.Bonpland*.

Hutchinson, C.R; Heckendorf A.H; Straughn, J.L; Daddona, P.E; Cane, D.E. Biosynthesis of Camptothecin. 3. Definition of Strictosamide as the Penultimate Biosynthetic Precursor Assisted by ¹³C and ²H NMR Spectroscopy. Journal of American Chemical Society, 1979, 3358-3369.

Kambu, K., Coune, C., Angenot, L., 1980. Nouveaux alcaloïdes des racines du *Strychnos icaia*. *Planta Med.* 37, 161–164.

Kapoor, V.K., Sharma, S.K., Chagti, K.K., Singh, M., 1988. *Synthesis and hypotensive activity of diaboline*. *Indian J. Chem. Sect. B—Org. Chem. Incl. Med. Chem.* 27, 641–644.

Karrer, P. Alkaloids of calabash curare and *Strychnos* barks In: Curare and Curare-like agents. Ed Bovet, D; Marini-Betollo, G.B, Elsevier Publishing Co. Amsterdam p 125-136.

Krukoff, B.A. 1972. American species of *Strychnos*, *Lloydia*, 35,3,193-271.

Laube, B., Maksay, G., Schemm, R., Betz, H., 2002. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol.Sci.* 23.519–527 .

Lee, C., 2003. *Conformation, action, and mechanism of action of neuromuscular blocking muscle relaxants*. *Pharmacol. Ther.* 98,143–169

Le Men, J. and Taylor, W. I., 1965. *A uniform numbering system for indole alkaloids*. *Experientia*, 508-10.

Lentz, J.P; Rossman, M.G. *The Crystal Structure of Loganiin Penta-acetate Monomethyl Ether Bromide*. 1969. *Chem Com.* 1269

Linheart, A.2009. *Autopsy of a common error: the introduction of curare in Europe by W. Raleigh*. *Ann Fr Anesth Reanim.*;28(4):332-8

Lizarraga,E. Romano, E. Raschi, A. B Leyton. Paipa,P. C. Catalána, S C.A.N. Brandán A,. *Journal of Molecular Structure* 1048 (2013) 331–338

Lozano, Pedro, *Descripcion geográfica Del Gran Chaco*. Cordoba, 1733; Ed Université de Tucuman, 1941

Maab, A. ; Mohr K. *Opposite effects of alcuronium on agonist and on antagonist binding to muscarinic receptors*. *European Journal of Pharmacology* 305 (1996) 231-234.

Marini-Bettolo, G.B.; Jorio, M.A; Ducke, A.; Bovet, D. *Ricerche sugli alcaloidi curarizzanti di varie specie di Strychnos Del Brasile. Nota V. Studi cromatografici su carta degli alcaloidi quaternari della S.guianensis. Mart. S.divaricans e S.mitscherlichii*. *Gazz. Chim.Ital*, 1954, 84, 1161-1170.

Marini-Bettolo, G.B; Berredo-Carneiro, P., Casinovi, G.C. *Gli alcaloidi della Strychnos solimoesana*. *Rend. Ist. Super. Sanità.* 1957, 20, 342-357.

Marini-Betolo, G.B; Bisset, N.G. *Chemical studies on the alkaloids of American Strychnos species*. *Lloydia*, 1972, 35, 195-202.

Marini-Bettolo, G.B; Delle Monache F. *The occurrence of nordihydrofluo curatine in Strychnos amazônica and Strychnos froesii.* Ducke XXV. On the alkaloids of Strychnos XXV Gazz. Chim.Ital. 1973, 103,543-549.

Martius, C. F. von- Flora Brasiliensis. 6: Paris I, 295, Vindobonce et Lipsiae, 1840-1928 citado por Biocca, 1954.

Mertes, P.M; Regnier, M.A.; Hasdenteufel, F.; Guéant-Rodriguez, R.M; Mouton-Faivre, C.; Malinovsky, J.M; Guéant, J.-L; Kanny, G. Controverse : La sensibilisation aux ammoniums quaternaires est impliquée dans l'allergie aux curares : pour. Revue française d'allergologie 50 (2010) 174–178

Molina, P. Fresneda, P. M. Sanz, M. Foces-Foces, A. C. M. Ramirez de Arellano, C. Tetrahedron 54 (1998) 9623-9638

Montanari, A.C., Bolzani, V. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS. Quim. Nova, Vol. 24, No. 1, 105-111, 2001.

Mukherjee R, Melo MDF, Santos CAM, Das BC, Guittet E 1990. Trinervine, a new indole alkaloid from *Strychnos trinervis*. *Heterocycles* 31: 1819-1822.

Nyburg, Stanley C; Siew, Pik Y; Saunders, Gavin N; Purdy, John R; Mclean; Stewart. Can. J. Chem. 61 (1983) 282

Naguib, M., Flood, P., McArdle, J. J., & Brenner, H. R. *Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist.* Anesthesiology. 2002, 96, 202– 231.

Neuwinger, H.D., 1996. *African Ethnobotany: Poisons and Drugs, Chemistry, Pharmacology, Toxicology*, Chapman & Hall, London.

Olaniyi, F.C, Verpoote, R., Rolfsen, W. *Quaternary alkaloids of Strychnos decusata.* Planta Medica, 1981, 595-597.

Ouhiri, F.C.; Verpoorte, R.; Svendsen, A.B. *The African Strychnos Species and their Alkaloids: A review*. Journal of Ethnopharmacology. 1983.167-223

Patthy Lukatzs, L. Károlyházy, L. F. Szabó, and B. Podányi. J. Nat. Prod. 60 (1997) 69-75

Paucke, P. Florián. *Hacia Allá y para aça. Uma estadia entre los índios Mocobies. 1749-1765*. Ed Université de Tucuman. 1943.

Pellicciari, R; Delle Monache, F.; Reyes, N.L;Casinovi, C.G; Marini-Bettolo, G.B. Ricerche sugli alcaloidi delle Strychnos. Nota XV. Gli alcaloidi della Strychnos panamensis Seem. Ann Is. Super. Sanità., 1966, 2, 411-413.

Penna, A.; Jorio, M.A.; Chiavarelli, S.; Marini-Bettolo, G.B. Gli alcaloidi della Strychnos subcordata Spruce. Gazz. Chim.Ital. 1957, 87, 1163-1173.

Philippe, G.; Angenot, L.; Tits, M., Frédérich, M. 2004. *About the toxicity of some Strychnos species and their alkaloids*.Toxicon 44,405–416

Piedrahita, Lucas Fernandez, *Historia general de las conquistas Del Nuevo Reino de Granada*, Anvers, 1688, Ed de Bogotá, 1881

Pimenta, A; Jorio, M. A; Adank, K; Marini-Bettolo, G.B. Ricerchi sugli alcaloidi di varie specie di Strychnos de Brasile. Gli alcaloidi della Strychnos tomentosa della Strychnos froesiie della Strychnos rubginosa. Gazz.Chim. Ital, 1954, 84, 1147-1154.

Pinheiro MLB 2000. *Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero Strychnos da flora Amazônica*. Fortaleza,260p. Tese de Doutorado em Química Orgânica - Universidade Federal do Ceará, UFC.

Pinto, A.C, Silva, D., Bolzani, V. S., Lopes, N.P., Epifânio, R.A. *PRODUTOS NATURAIS: ATUALIDADE, DESAFIOS E PERSPECTIVAS*. Quim. Nova, 2002, Vol. 25, Supl. 1, 45-61,

Quetin-Leclercq, J., Bisset, N.G., Angenot, L., 1990. *South American strychnos (except curare) and alkaloids screening*. Journal of Ethnopharmacology. 1990 28, 1–52.

Quetin-Leclercq, J., Favel, A., Balansard, G., Regli, P., Angenot, L., 1995. *Screening for in vitro antifungal activities of some indole alkaloids*. Planta Med. 61, 475–477

Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urverg, S., Milijaona, R., Rafatro, H., Rakoto-Ratsimamanga, A., Galeffi, C., Nicoletti, M., 1994. *In vitro and in vivo chloroquine-potentiating action of Strychnos myrtoides alkaloids against chloroquine-resistant strains of Plasmodium malaria*. Planta Med. 60, 13-16.

Ribeiro, B.G.; Melo de Carvalho, J.C; *CURARE: WEAPON FOR HUNTING AND WARFARE*, 1996. Musel Nacional, Universidade do rio de janeiro. In: Curare and Curare Like agents. Editado por Bovet, D.; Marini-Betollo, G.B. Elsevier Publishing Co. Amsterdam p 34-38.

Ribeiro, J . E . L . S ., Hopkins, M . J . G ., Vincentini, A ., Sothers, C . A ., Costa, M.A.S. Brito, J . M ., Souza, M . A . D ., Martins, L . H . P ., Lohmann, L . G., Assunção, P.A.C.L ., Pereira, E . C ., Silva, C . F ., Mesquita, M . R ., Procópio, L.C. 1999. Flora da Reserva Ducke . INPA-DFID, Manaus, Amazonas . 800 pp

Rolfen, W.; Bresky, A.M.; Andersson, M.; Sttombom, J. *Isolation, synthesis and pharmacological activity of strychnocarpine, a new b-carboline alkaloid from Strychnos elaeocarpa*. Acta Pharmaceutica Suecica. 1980a. 17, 333-340.

Rolfen, W.; Olaniyi, A.; Sandberg, F. ; Kvick, A.K. *Muscle-relaxant activity of descussine, a new indole alkaloid of Strychnos decussate*. Acta Pharmaceutica Suecica, 17, 1980b, 105-111.

Rolfesen, W., Olaniyi, A., Verpoote, R., Bohlin, L. Some new decussine-type alkaloids from *Strychnos decussate*, *Strychnos dale*, and *Strychnos elaeocarpa*, *Journal of natural products*, 44, 415-421, 1981. Cited by Ouhiri, F.C.; Verpoote, R.; Svendsen, A.B. *The African Strychnos Species and their Alkaloids: A review*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1983.167-223

Schomburk, Robert. On the Urari: the arrow poison of the Indians of Guiana, with a description of the Plant from which it is extracted. *The Ann and Mag of Nat. Hist*, 7; 407.1841.

Schomburk, Richard. On the Urari: the deadly arrow poison of the Macusis, an Indian tribe in British Guiana. Adelaide, Australia, 1879.

Stévigny, Caroline; Jiwan, Jean-Louis Habib ; Rozenberg, Raoul ; Hoffmann, Edmond de , Quetin-Leclercq, Joëlle . *Rap Comm Mass Spec* 18 (2004) 523-528

Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Warzecha, H., Stöckigt, D. *High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups*. *Journal of chromatography*. 2002, 967 85–113.

Strobel, G. A & Long 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential, *ASM News*. 64, 5, 236-8

Sievänen, E. Toušek, J. K. J. Lunerová, D. Marek, M. Jankovská, R. Dvorská, Marek. *Journal of Molecular Structure* 979 (2010) 172–179

Tits, M., Damas, J., Quetin-Leclercq, J., Angenot, L.,. *From ethnobotanical uses of *Strychnos henningsii* to antiinflammatories, analgesics and antispasmodics*. *J. Ethnopharmacol*. 1991.34,261–267.

Tits, M., Tarvenier, D., Angenot, L. Alcaloides indolínicos de *Strychnos variabilis*. *Phytochemistry*. 1980. Vol. 19, pp. 1531-1534.

Teichgraber, J. & Holzgrabe, U. A novel class of allosteric modulators of the muscarinic M2 acetylcholine receptor: terphenyl derivatives. *Tetrahedron* 59 (2003) 8697–8703

Tolosa, Alonzo Perez, citado por L.F. Piedrahita, 1881

Ulloa, S. *Relacion Histórica Del viaje á La America meridional*. A. marin. Madrid, 1748

Vale, N.B. Princípios de Farmacodinâmica de Drogas Anestésicas. *Rev Bras Anesthesiol* 1994; 44: 1: 13 – 23.

Vellard, J. Le preparation de curare indiens: légends et rélités. In: Curare and Curare-like agents. Ed Bovet, D; Marini-Betollo, G.B, Elsevier Publishing Co. Amsterdam p 3-33.

Verpoorte, R.; Gronink, H; Svendsen, A. *Minor alkaloids and sterols in Strychnos afzelii*. *Planta Medica* 1980, 38, 388-390.

Verpoorte, R.; Kodde, E.; Svendsen, A.B.; Van Doorne, H. Antimicrobial effect of the alkaloids from *Strychnos afzelii* Gilg. *Planta medica*, 1978, 33, 237-242.

Verpoorte, R., Svendsen, A.B. *Alkaloids of Strychnos dolichothyrsa Gilg. ex Oniche et Hepper*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1978 67, 11-174.

Verpoort, R. ; Svendsen, A.B. Alkaloids of *Strychnos Dolichothyrsa Gilg. Ex. Lloydia*. 1976, 39, 357-362.

Waterton, C. *Wanderings in South America*. The Nelson and sons. London, 1891.

Yang, G. Tu, X., Liu, L., Pan, Y. Two new bisindole alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica*. *Fitoterapia*, 2010, 932-936.

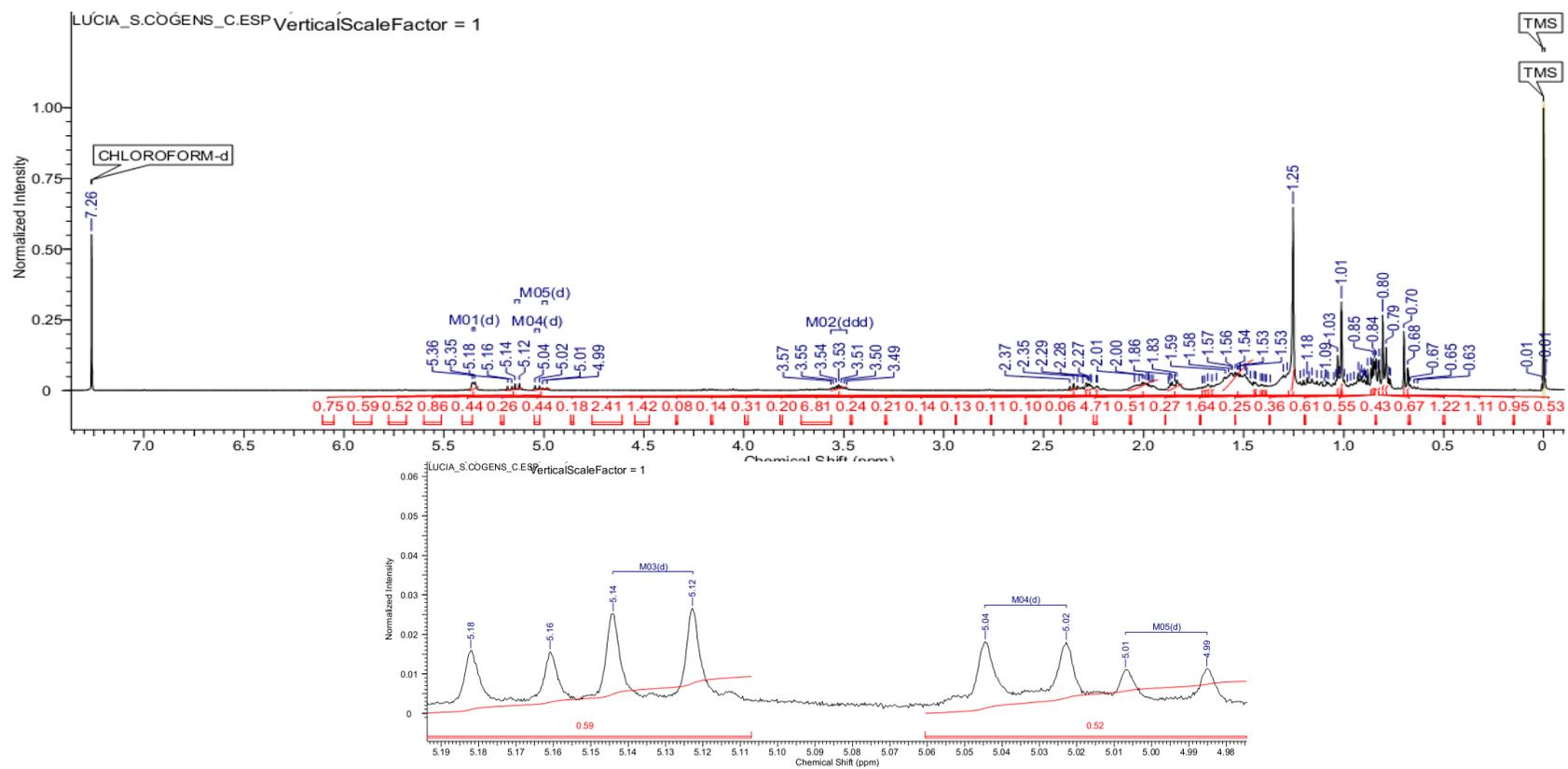
Yamazaki, Y.; Urano, A.; Sudo, H.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Yamazaki, M.; Aimi, N.; Saito, K. *Phytochemistry* 62 (2003) 461–470

Zlotos, D. P.; Gudishn, D.; Mohr, K.; Trankle, C.; Radaki, K.; Braunschweig, H. *6H,13H-Pyrazino[1,2-a;4,5-a0]diindole analogs: Probing the pharmacophore for allosteric ligands of muscarinic M2 receptors*. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, 1481-1845

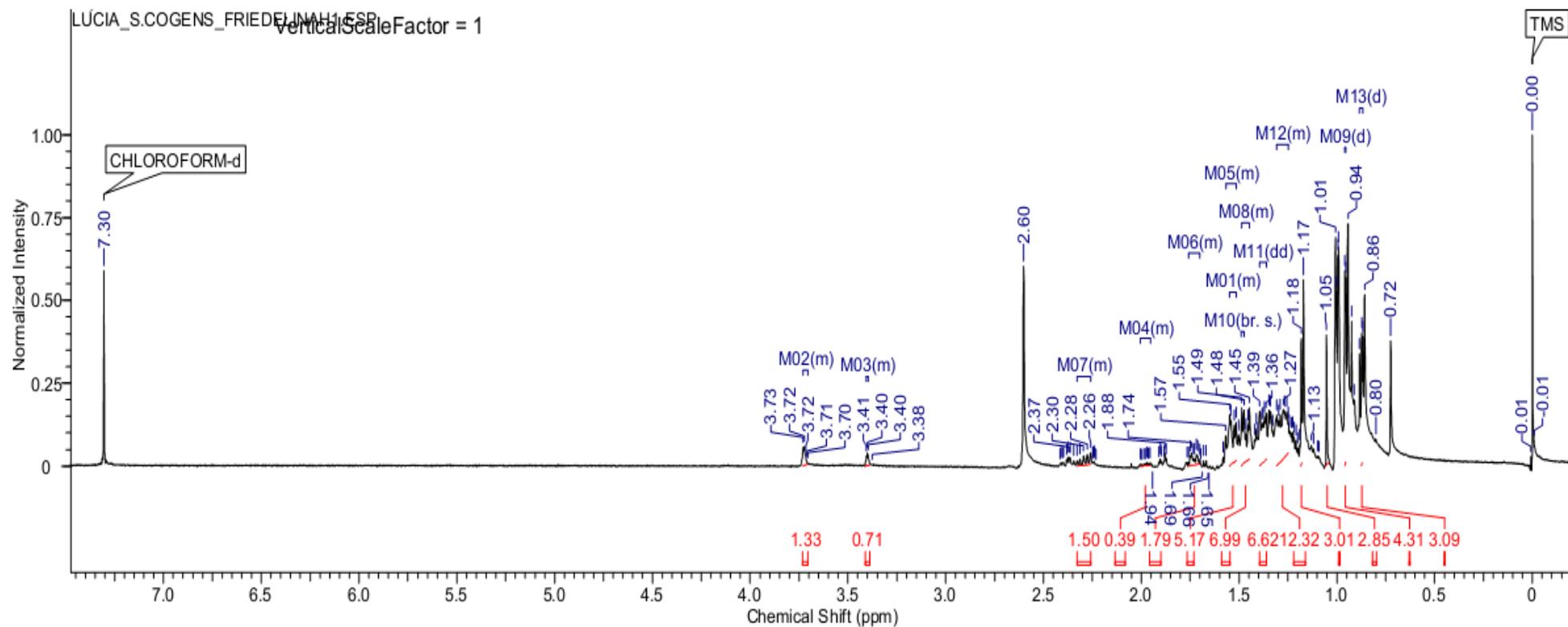
Zlotos, D.P.; Gundish, D.; Ferraro, S.; Tillota, M.C.; Stiefl, N. e Baumann, K. *Bisquaternary caracurine V and iso-caracurine V salts as ligands for the muscle type of nicotinic acetylcholine receptors: SAR and QSAR studies*. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 2004, 6277-6285

8. Anexo-Dados espectrais das substâncias isoladas

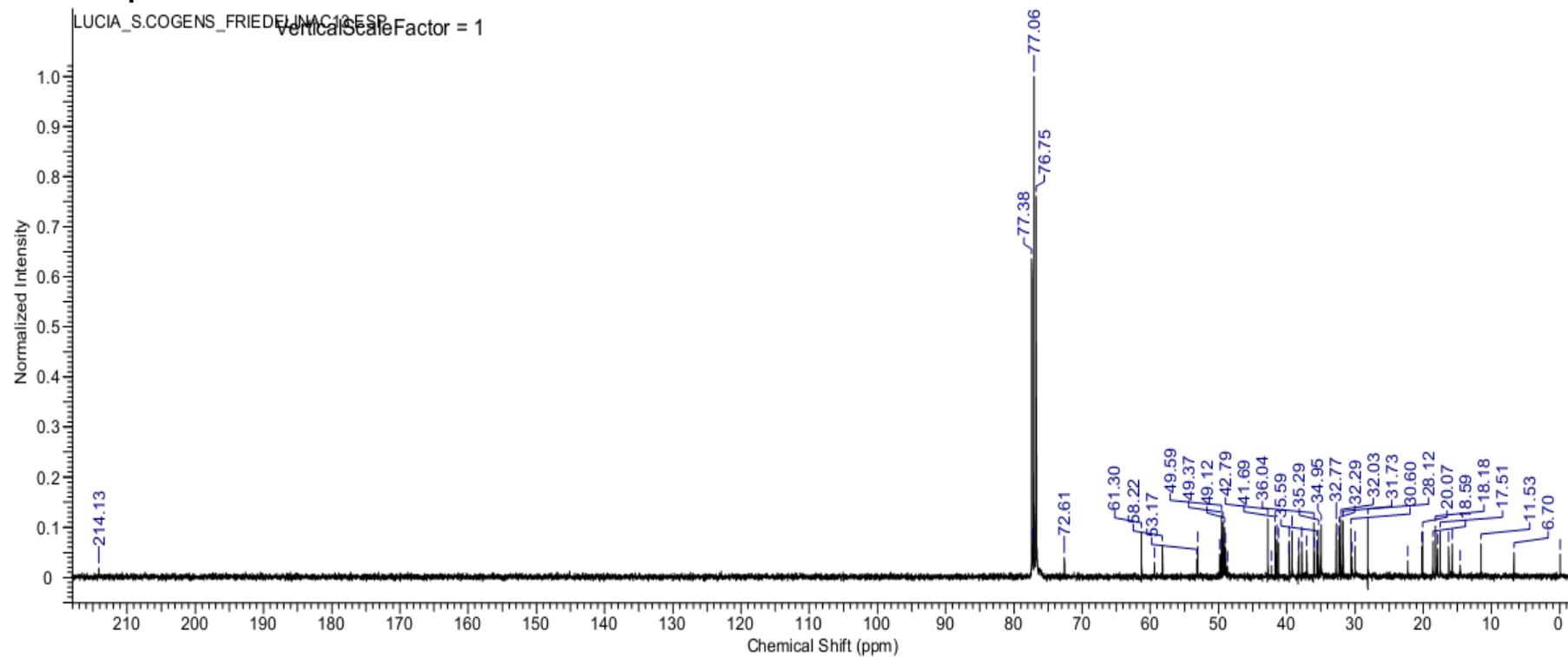
8.1. Espectro RMN 1H S1 – 400 MHz



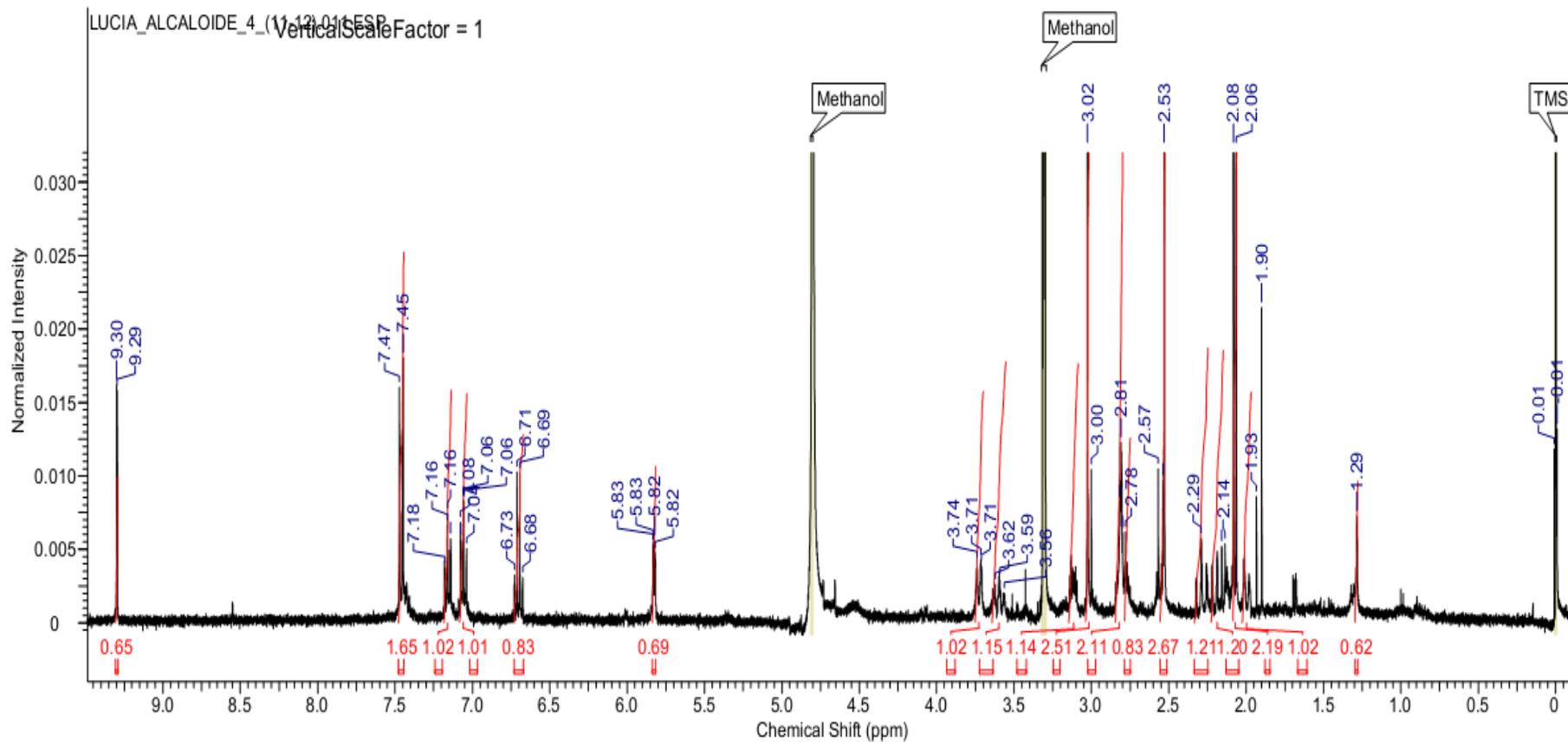
8.2. Espectro RMN ¹H S2 – 400 MHz

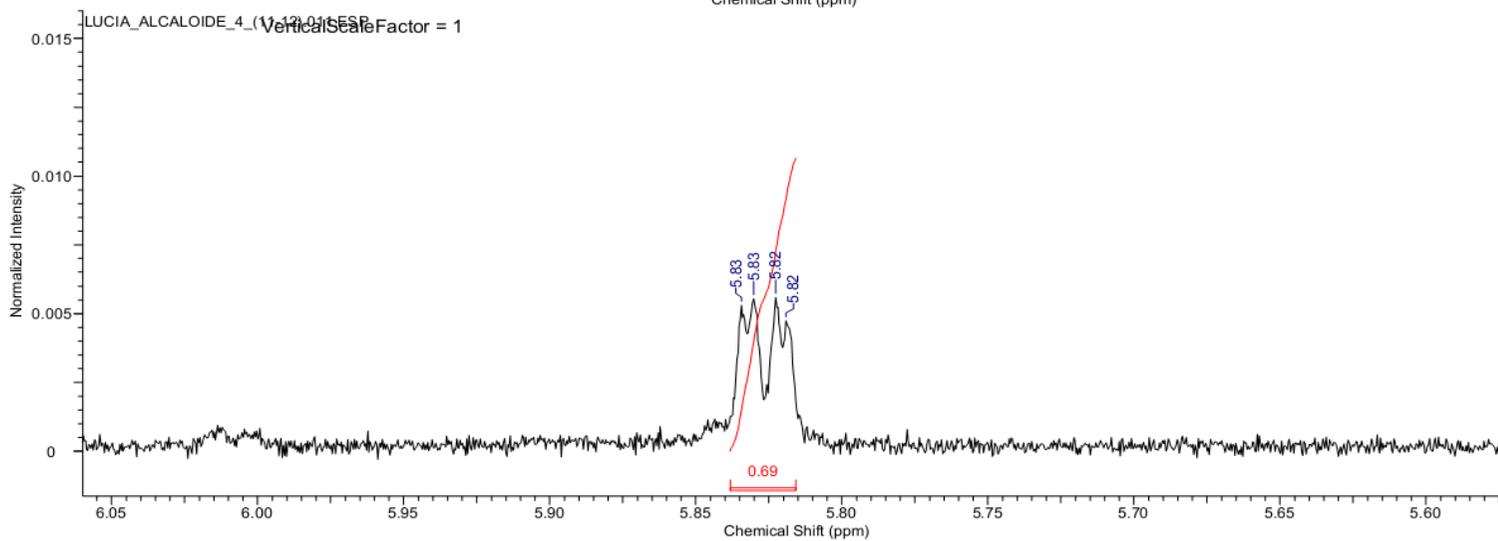
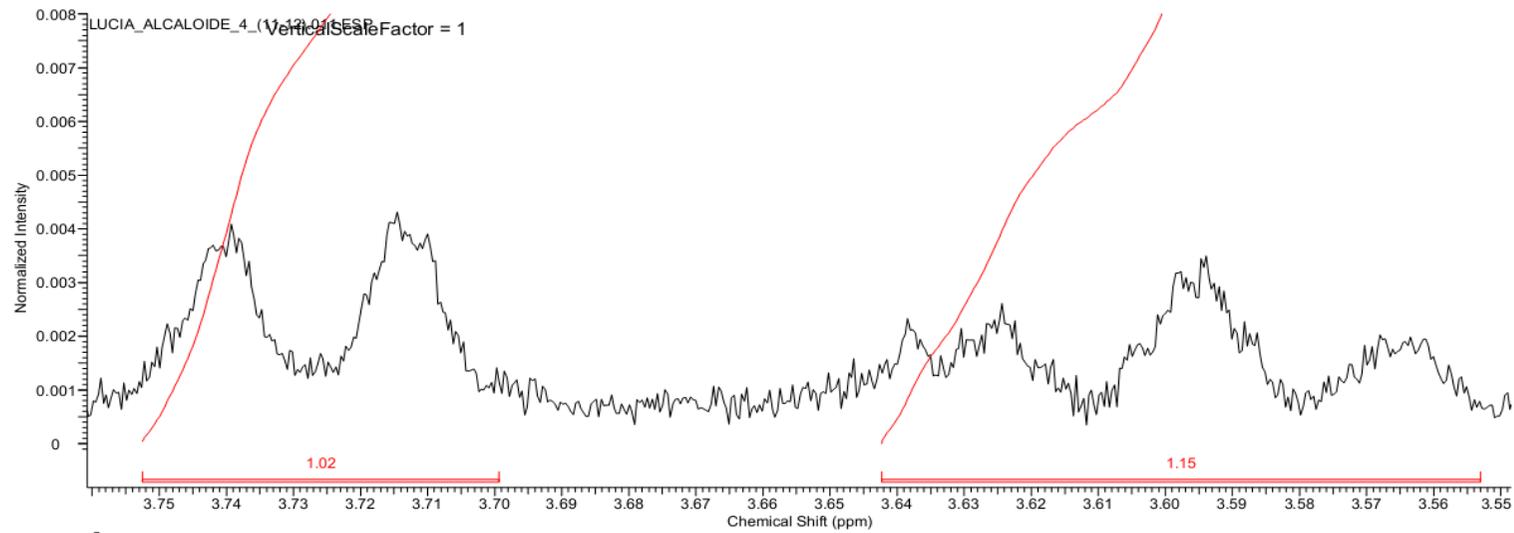


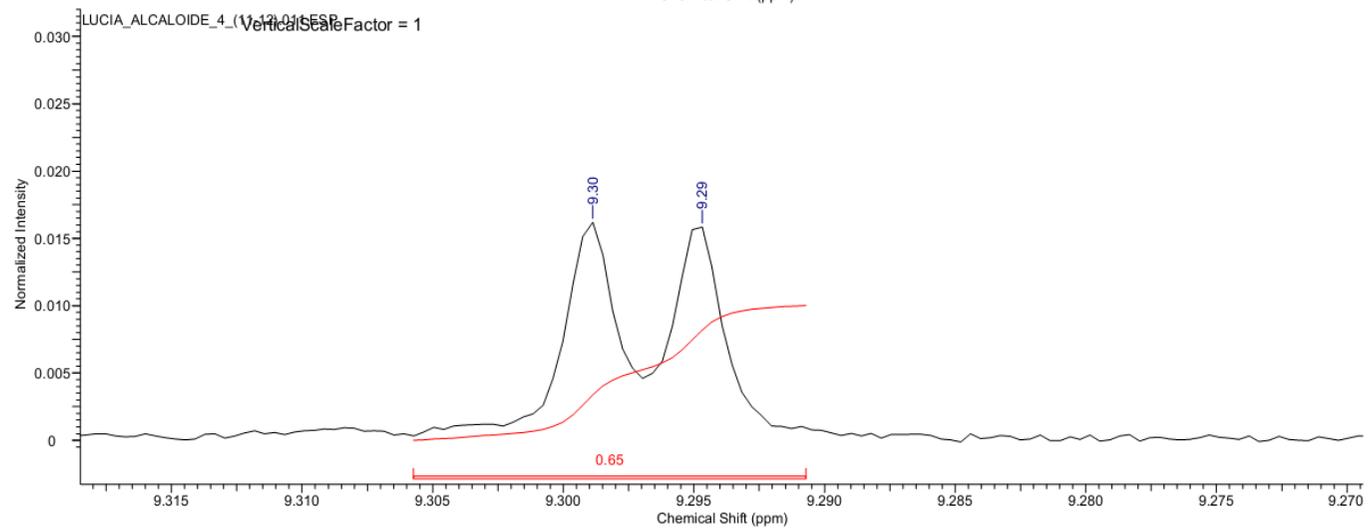
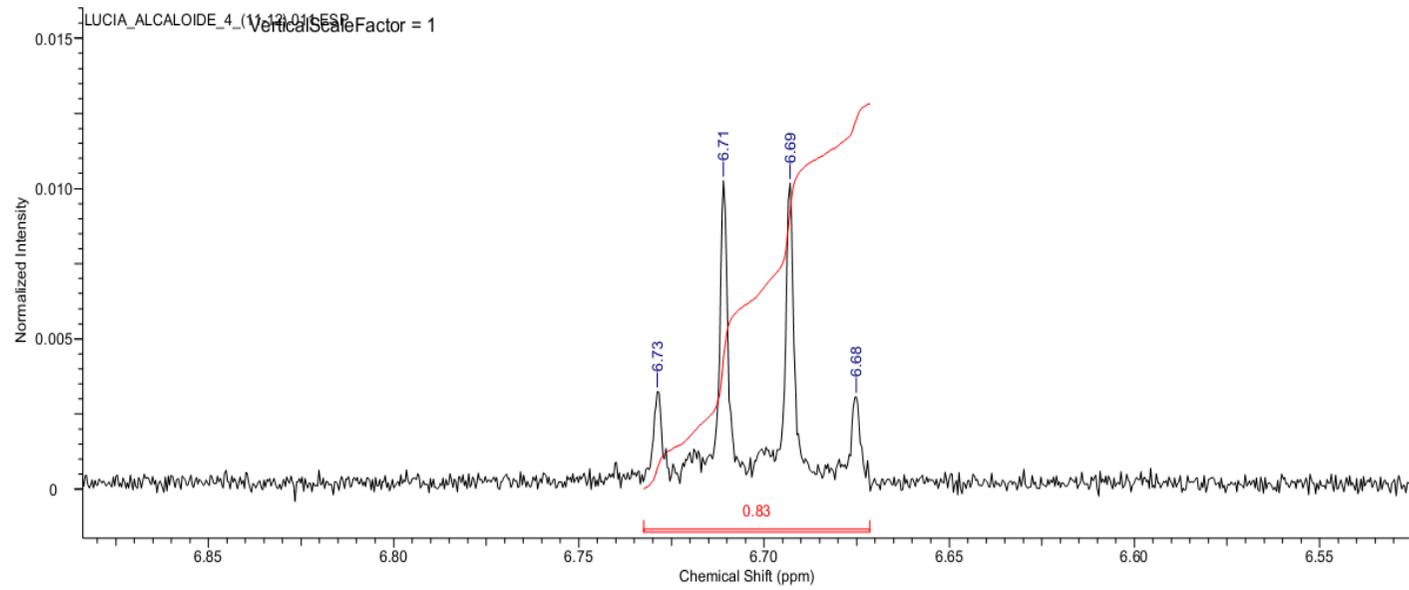
8.3. Espectro RMN ^{13}C S2 – 100 MHz

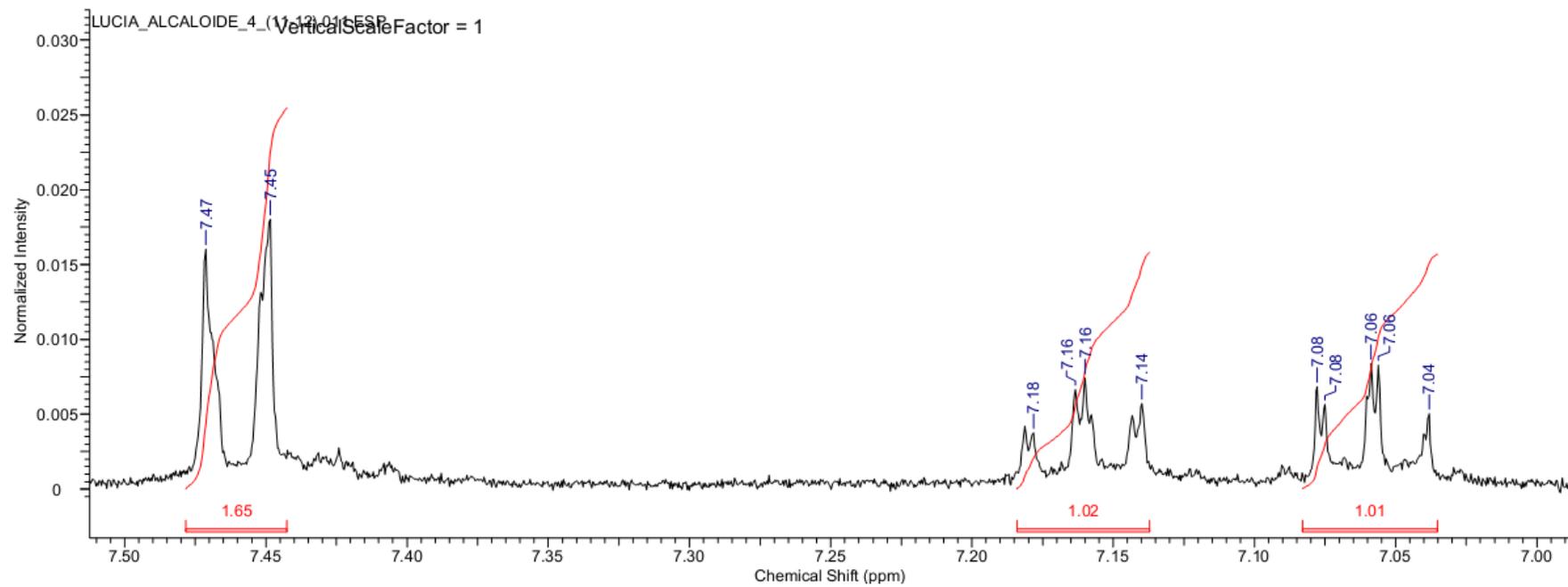


8.4. Espectro RMN ¹H do alcaloide A4- 400 MHz



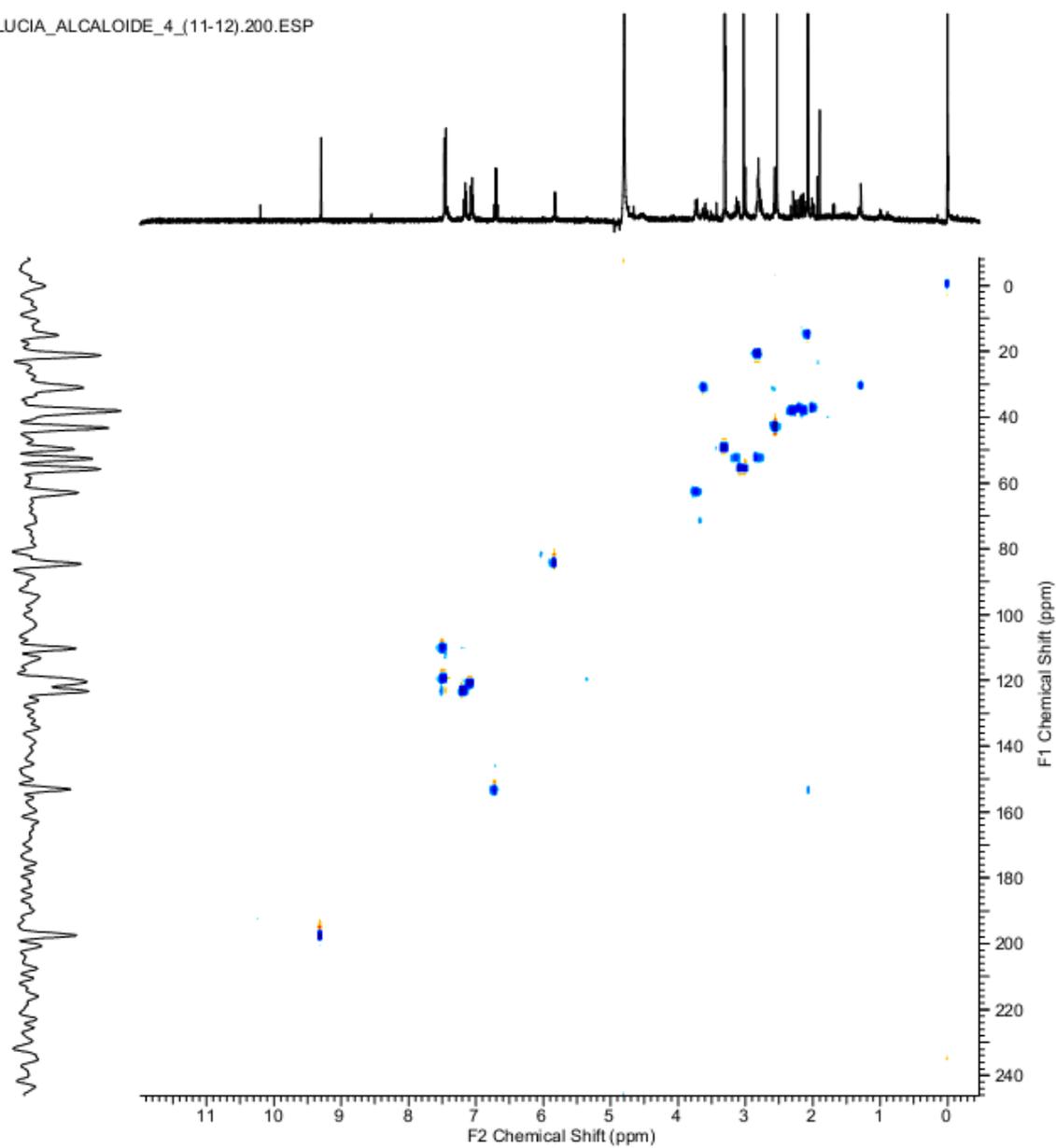






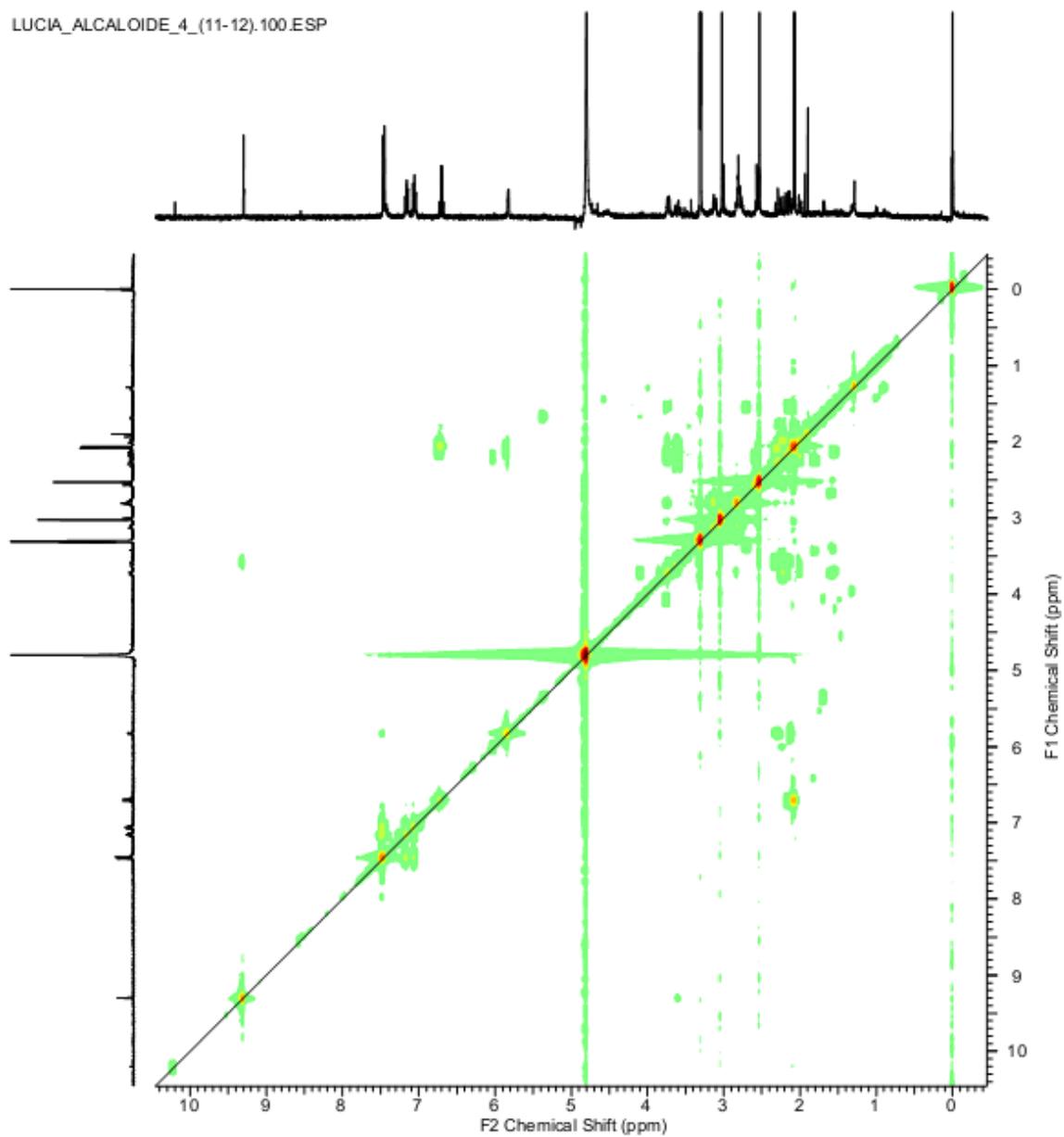
8.5. Espectro HSQC do Sólido A4

LUCIA_ALCALOIDE_4_(11-12).200.ESP



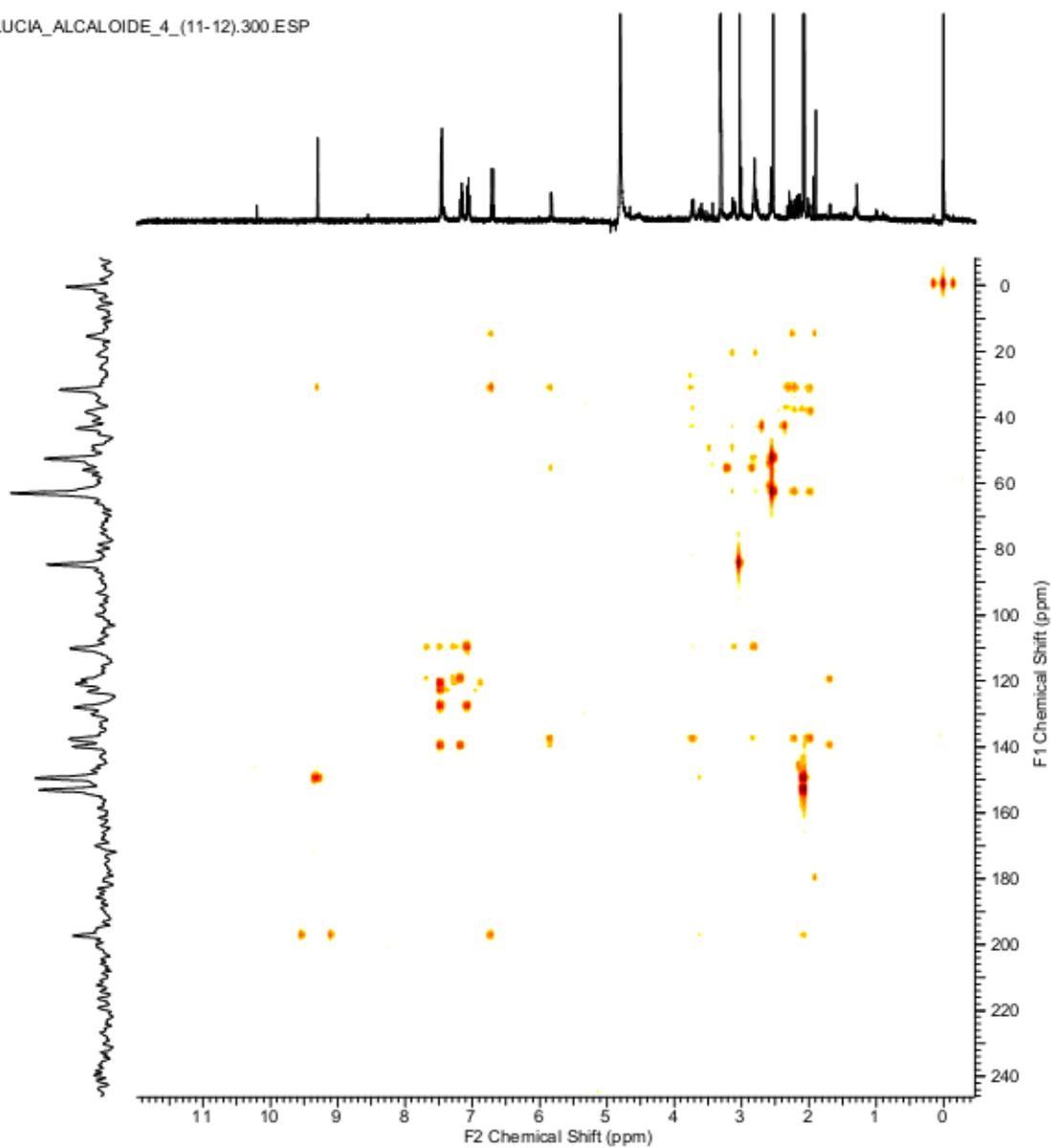
8.6. Espectro COSY do Sólido A4

LUCIA_ALCALOIDE_4_(11-12).100.ESP

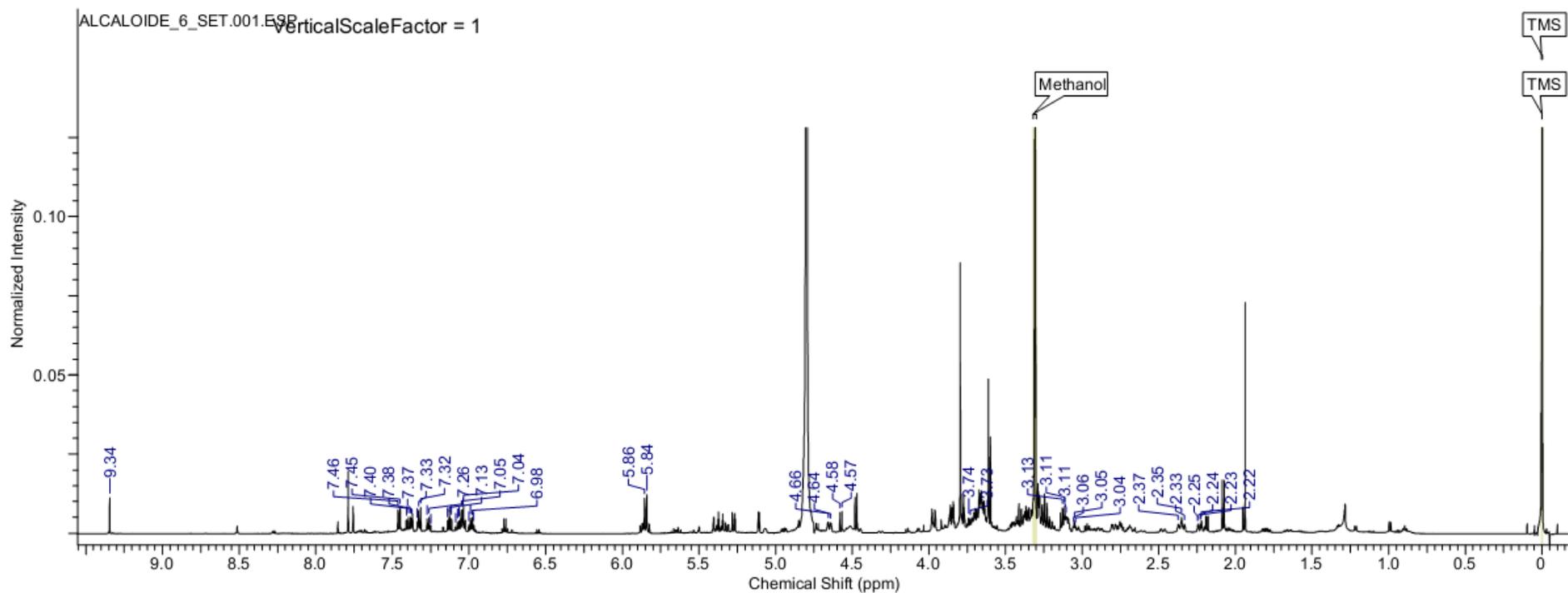


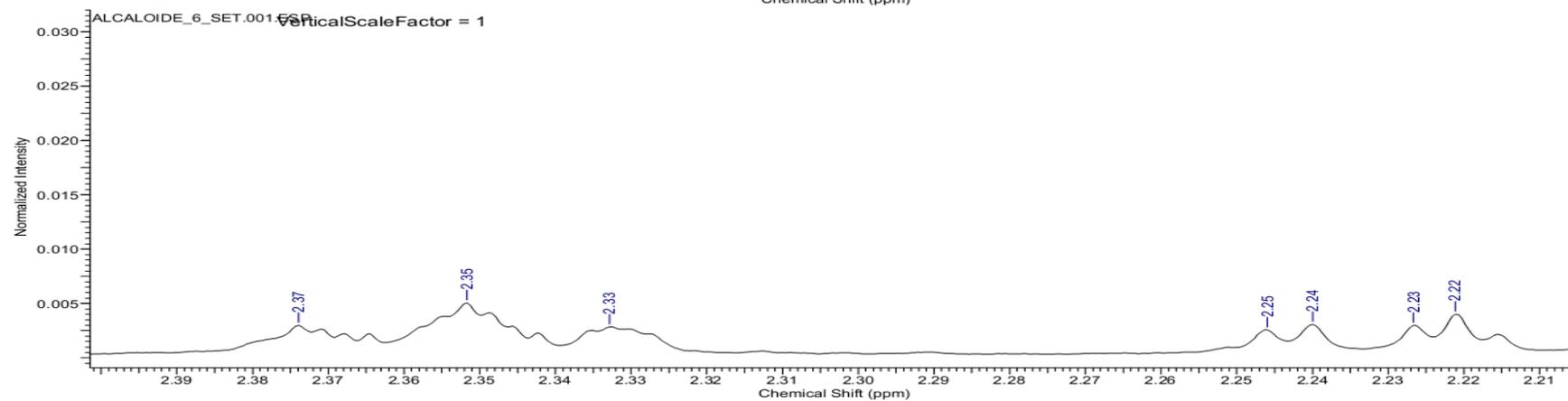
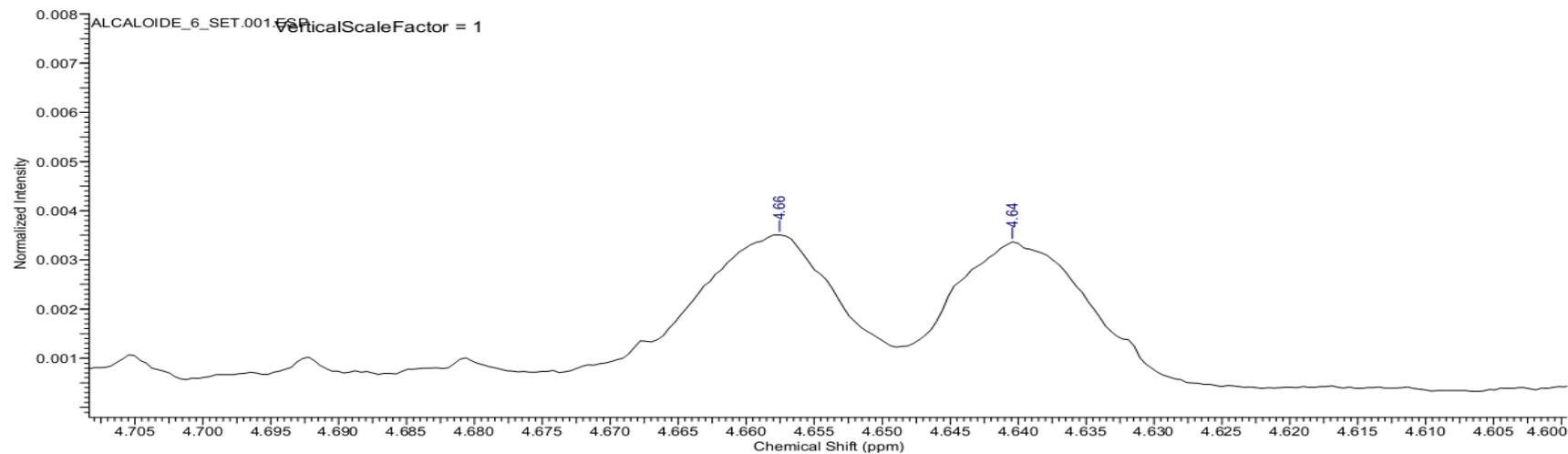
8.7. Espectro HMBC do alcaloide A4

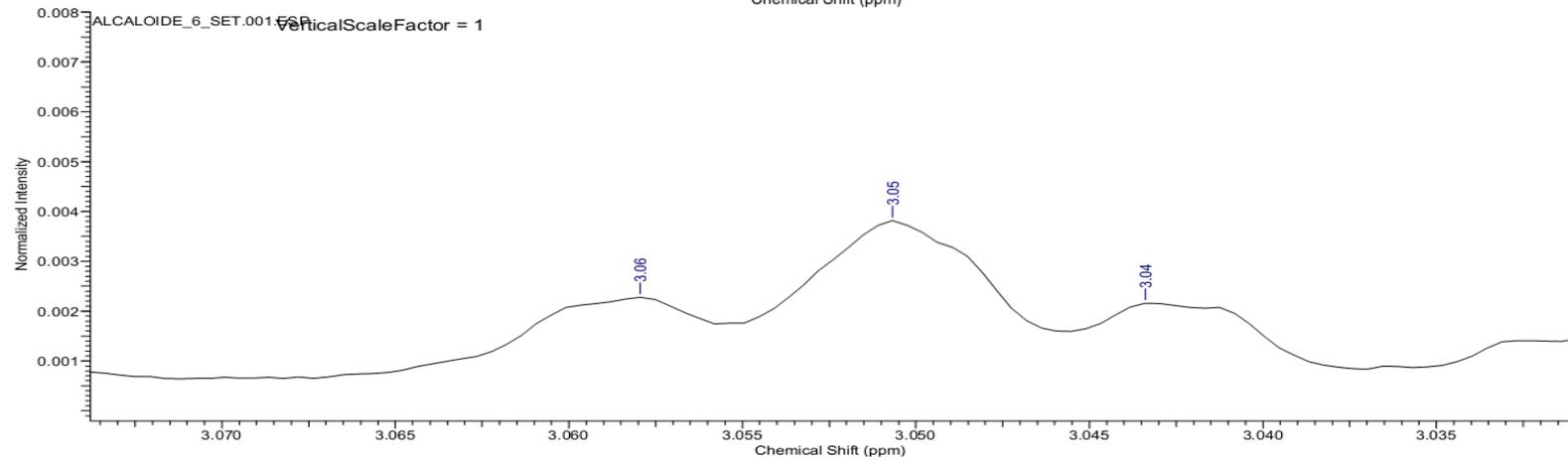
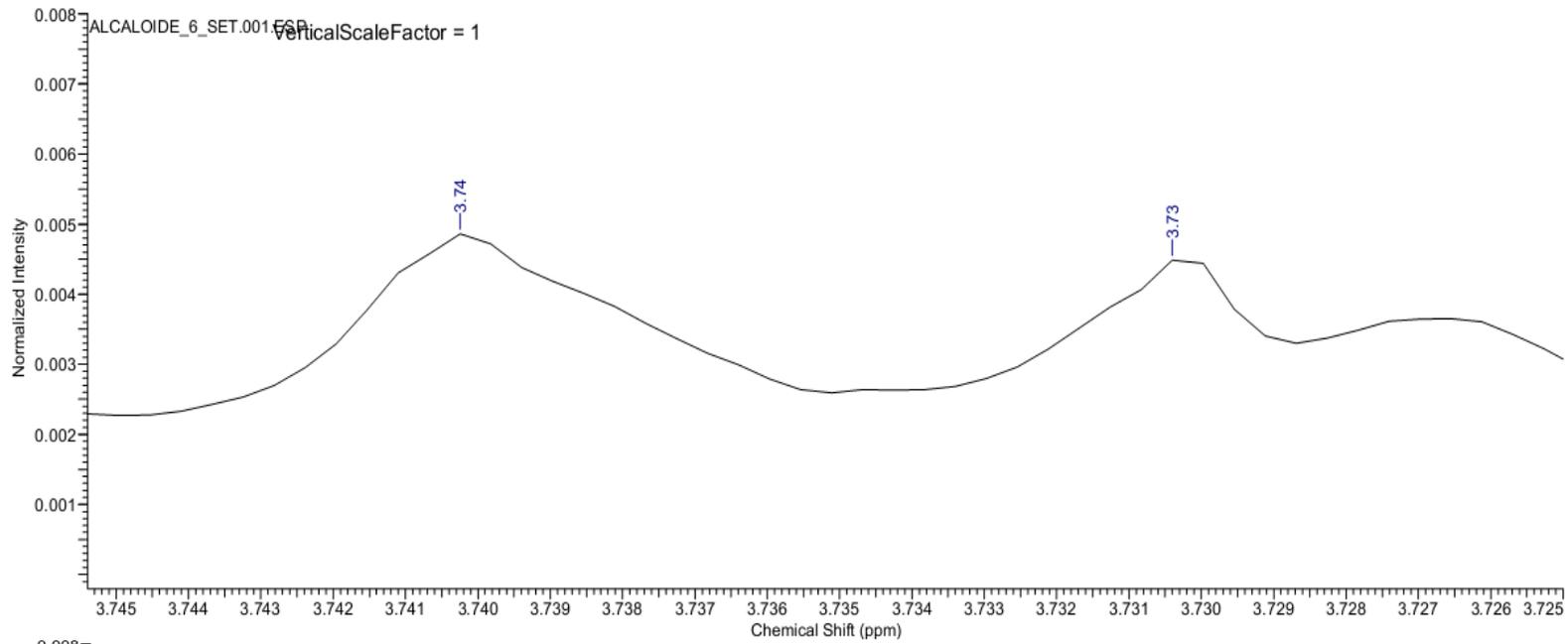
LUCIA_ALCALOIDE_4_(11-12).300.ESP

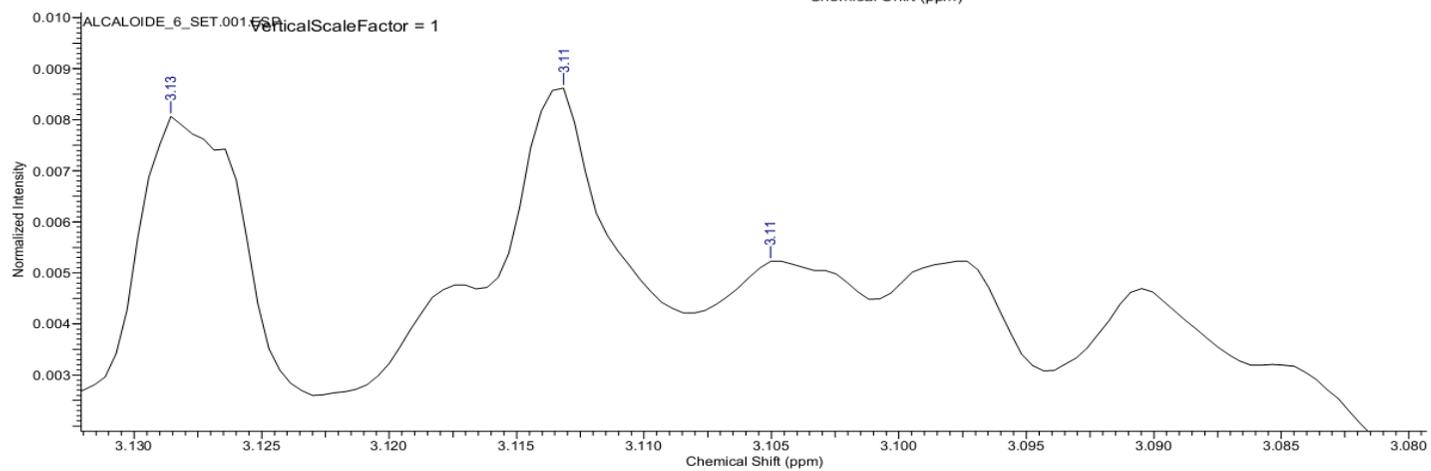
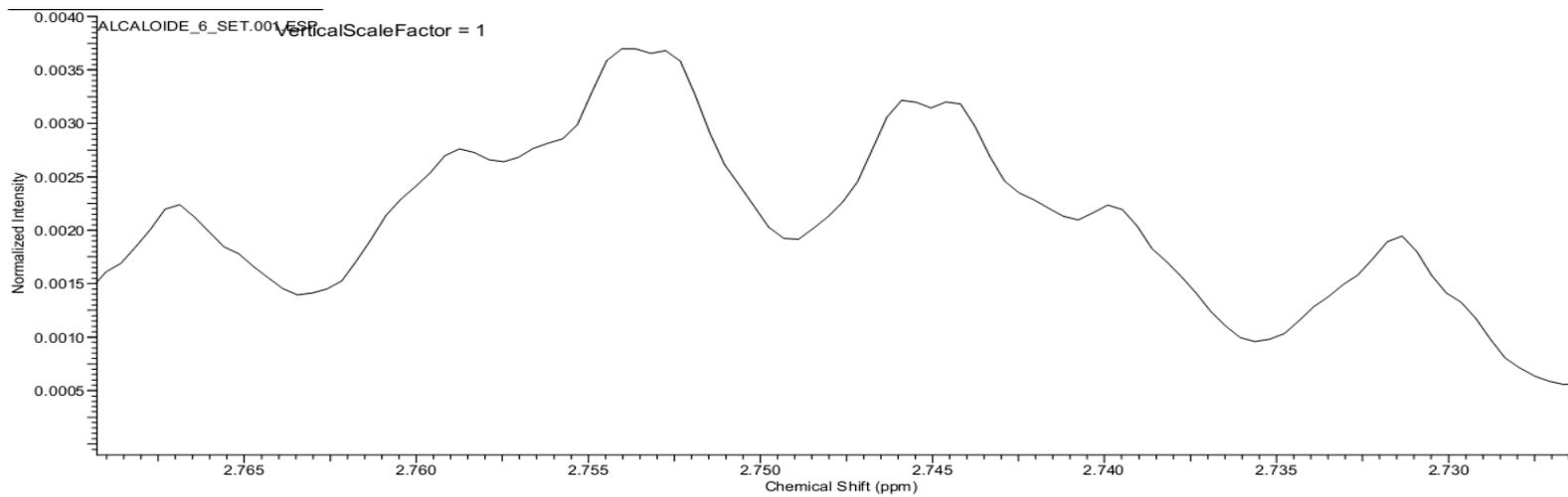


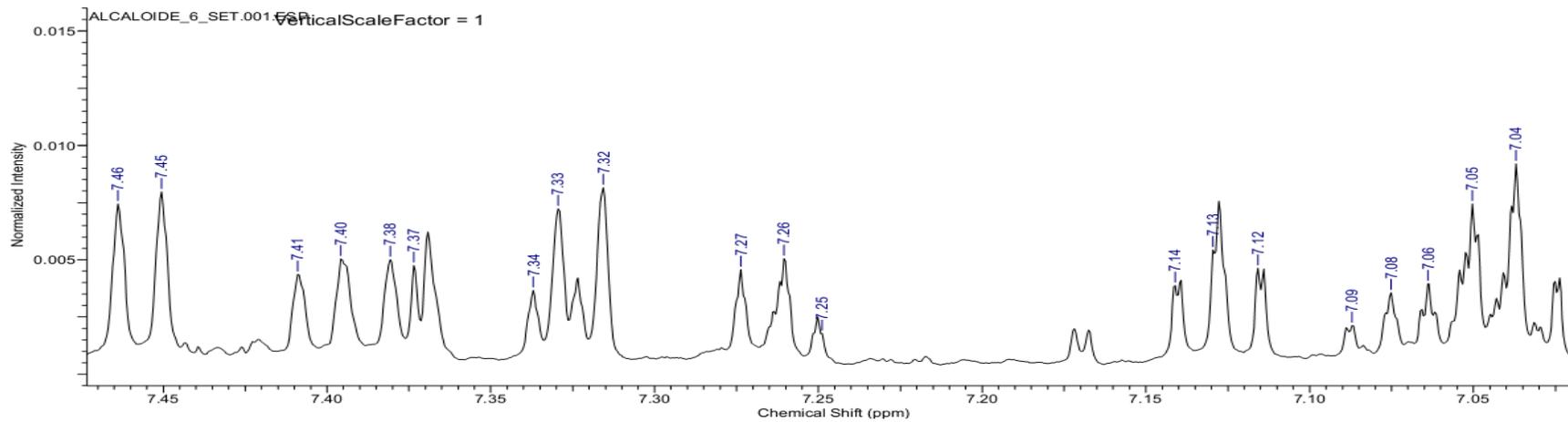
8.8. Espectro H¹ do alcaloide **A6** – 600 MHz





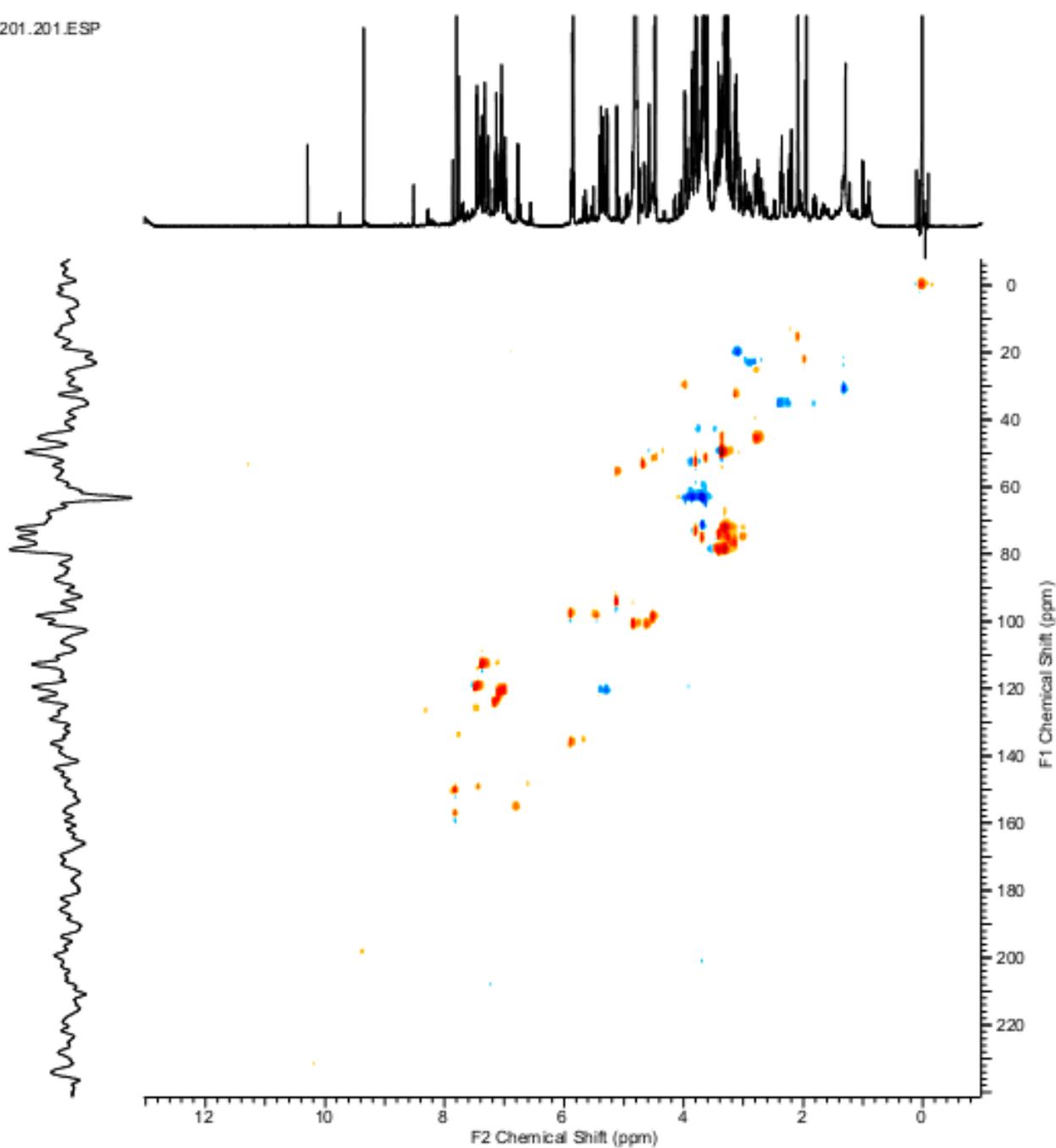






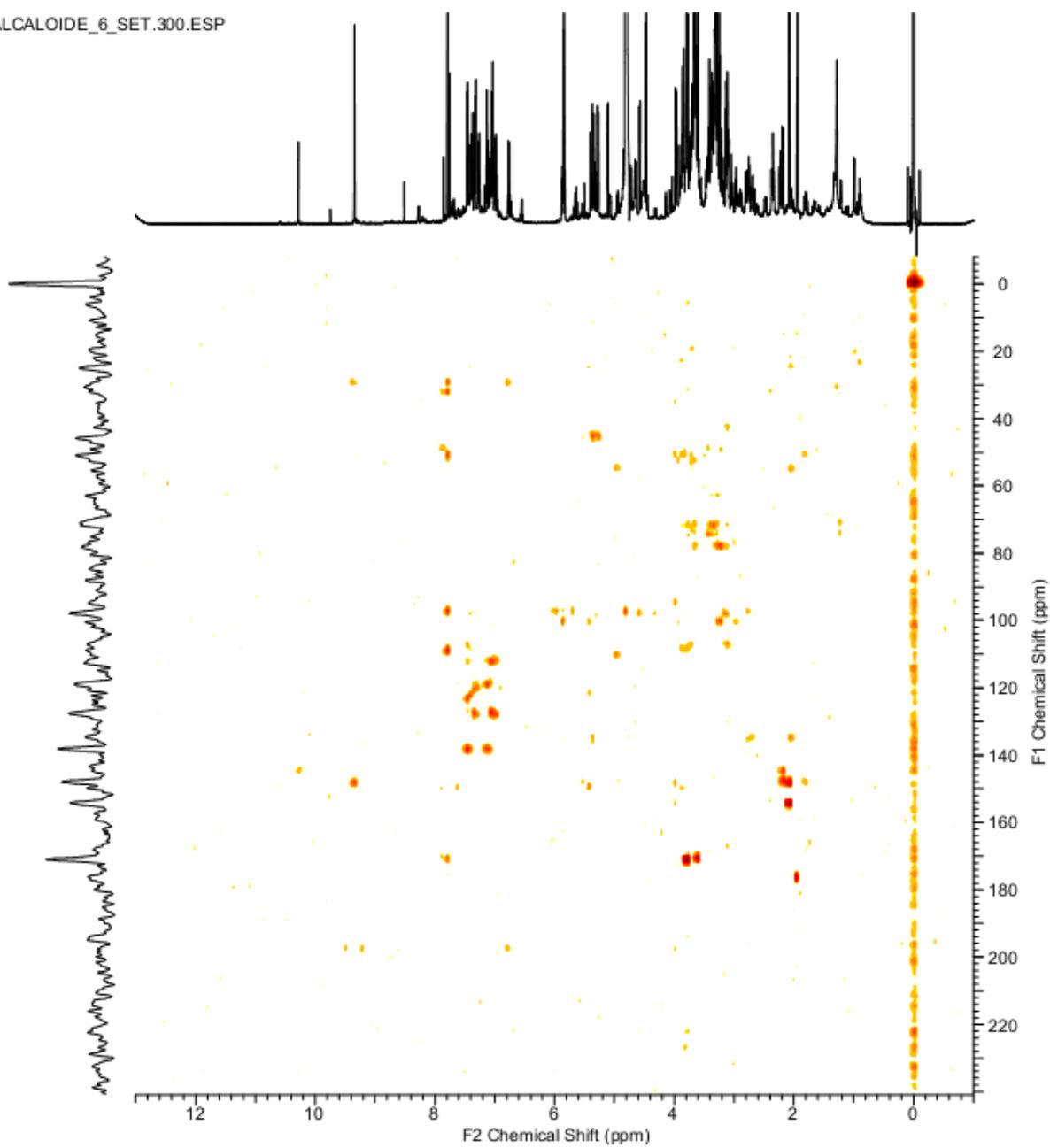
8.9. Espectro HSQC do alcaloide A6

201.201.ESP



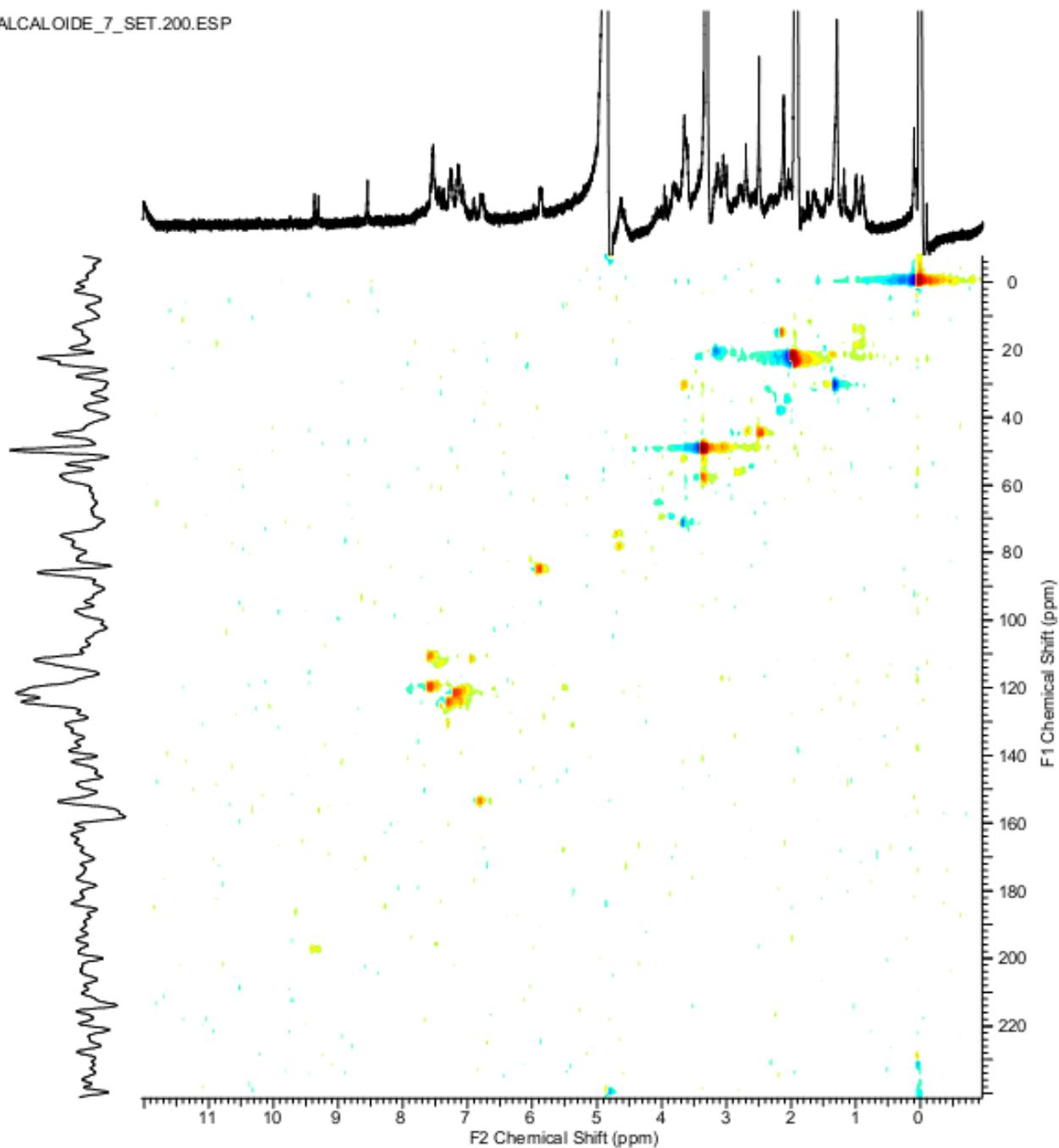
8.10. Espectro HMBC do alcaloide **A6**

ALCALOIDE_6_SET.300.ESP



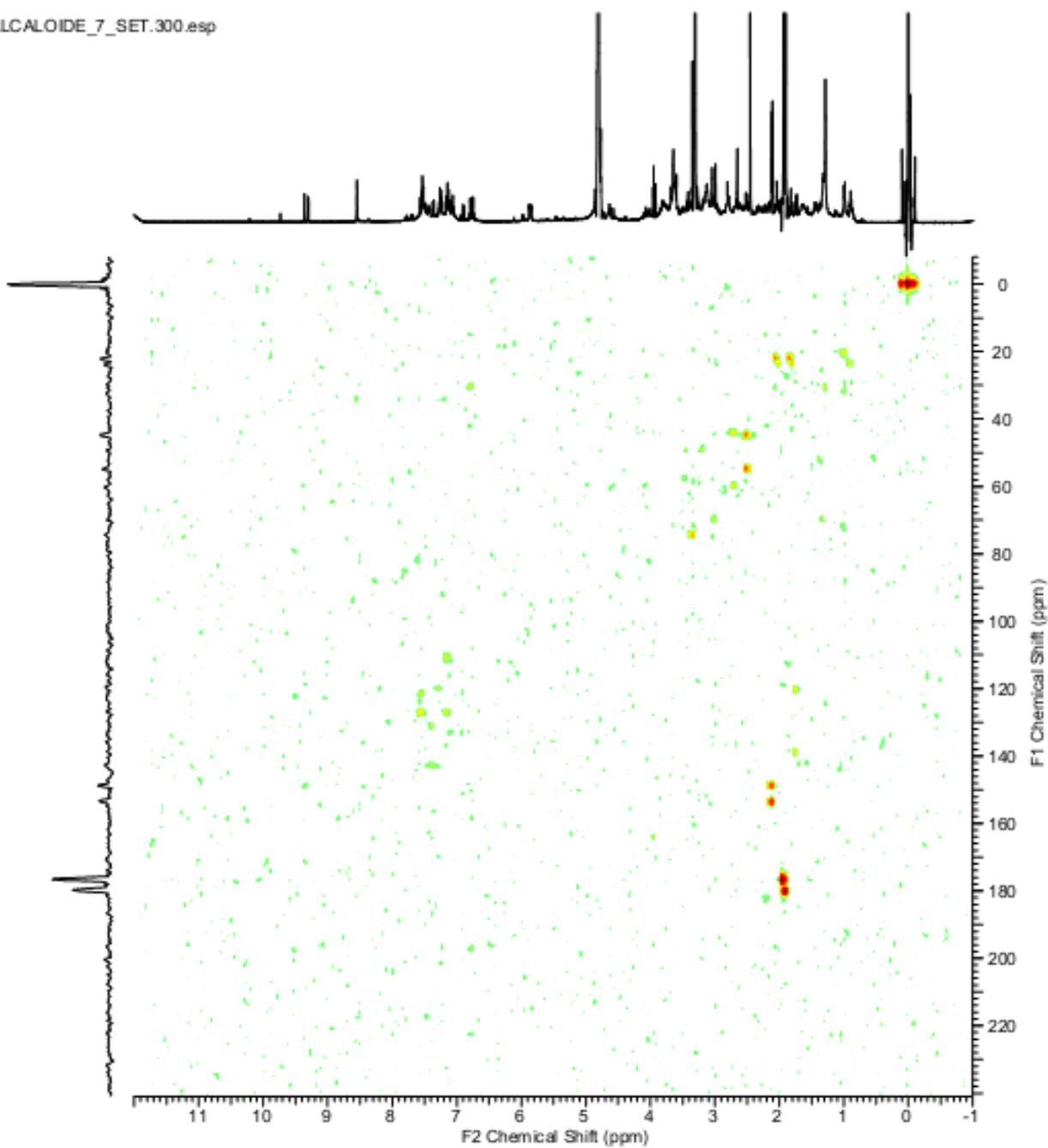
8.11. Espectro HSQC do alcaloide A7 – 600 MHz

ALCALOIDE_7_SET.200.ESP



8.12. Espectro HMBC do alcaloide A7 – 600 MHz

ALCALOIDE_7_SET.300.esp



8.13. Espectro TOCSY alcaloide A7 – 600 MHz

