

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

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Strychnos*  
*subcordata* Spruce ex Benth. (LOGANIACEAE)**

**REBECA DOS SANTOS FRANÇA  
MESTRADO**

**Manaus/AM  
2026**

**REBECA DOS SANTOS FRANÇA**



**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Strychnos*  
*subcordata* Spruce ex Benth. (LOGANIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, com ênfase na linha de pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

Prof. Dr. Felipe Moura Araujo da Silva  
**Orientador**

**Manaus/AM  
2026**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

F814i      França, Rebeca dos Santos  
              Investigação fitoquímica das folhas de *Strychnos subcordata* Spruce ex  
              Benth. (Loganiaceae) / Rebeca dos Santos França. - 2026.  
              208 f. : il., color. ; 31 cm.

              Orientador(a): Felipe Moura Araujo da Silva.  
              Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa  
              de Pós-Graduação em Química, Manaus, 2026.

              1. Espectrometria de massas. 2. 2D-LC. 3. Coluna bifenil. 4. Flavonas. 5.  
              Isoflavonas. I. Silva, Felipe Moura Araujo da. II. Universidade Federal do  
              Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título

---



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE STRYCHNOS SUBCORDATA  
SPRUCE EX BENTH. (LOGANIACEAE)"**

**REBECA DOS SANTOS FRANÇA**

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

Aprovada em 05 de fevereiro de 2026.

**Banca Examinadora:**

---

PROF. DR. FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA (PPGQ/UFAM)  
PRESIDENTE/ORIENTADOR(A)

---

PROF. DR. SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA (INPA)

MEMBRO INTERNO

---

PROF. DR. ANDRÉ CORRÊA DE OLIVEIRA (INPA)

MEMBRO EXTERNO

## UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Manaus, 05 de fevereiro de 2026.



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Moura Araujo da Silva**, **Usuário Externo**, em 10/02/2026, às 10:00, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Massayoshi Nunomura**, **Usuário Externo**, em 10/02/2026, às 10:37, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Correa de Oliveira**, **Usuário Externo**, em 10/02/2026, às 11:21, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2953776** e o código CRC **4E96BF21**.

Av. General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroadó 1 Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Norte - Telefone: (92) (92) 3305-1181 / Ramal 2403  
CEP 69080-900 Manaus/AM - [ppgq@ufam.edu.br](mailto:ppgq@ufam.edu.br)

Referência: Processo nº 23105.054642/2025-12

SEI nº 2953776

Dedico este trabalho a Deus, a minha  
família e a todos que amo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria, discernimento, proteção e pelas oportunidades concedidas ao longo desta jornada;

À minha querida família, em especial à minha amada e admirada mãe, Regina Lúcia, pelo amor incondicional, carinho, apoio constante, dedicação e pelos valores transmitidos ao longo de toda a minha vida;

Ao meu querido tio, Thiago dos Santos, pelo amor, amizade e apoio inestimáveis;

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Felipe Moura Araujo da Silva, pela orientação excepcional, confiança, paciência, apoio e motivação contínuos, sendo sempre o meu maior incentivador e contribuindo de forma decisiva para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass, do Separare – Núcleo de Pesquisa em Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela análise criteriosa e apontamentos precisos e construtivos, que contribuíram de forma significativa para o aprimoramento deste trabalho;

Ao Dr. Fernando Cassas Salles Machado, membro do Separare – Núcleo de Pesquisa em Cromatografia (UFSCar), pela realização da análise por HRMS;

Aos membros da Banca Avaliadora do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura e Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães, pelas considerações e sugestões feitas;

Às agências de fomento e apoio à pesquisa científica (FAPEAM, CNPq, CAPES e FINEP), pela concessão de bolsas de estudo e recursos financeiros, fundamentais para a execução e o desenvolvimento desta pesquisa;

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), bem como ao Departamento de Química (DQ-UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-UFAM), pelas oportunidades de formação e aprimoramento acadêmico, científico e profissional;

À Central Analítica da UFAM, em especial ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), pela infraestrutura disponibilizada para o preparo de amostras e para a realização das análises;

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e desenvolvimento deste trabalho, expresso meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

*Quando a gente anda sempre em frente,  
não pode ir muito longe...*  
Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

O gênero *Strychnos* L., principal representante da família Loganiaceae, é nativo das regiões tropicais e subtropicais, compreendendo 204 espécies aceitas. Este gênero, reconhecido mundialmente pelo uso tradicional na preparação do curare, um veneno de flecha utilizado por povos indígenas da América do Sul, destaca-se como uma fonte promissora de produtos naturais bioativos. Embora o conteúdo fitoquímico de várias espécies de *Strychnos* tenha sido extensivamente investigado, outras permanecem amplamente inexploradas, tal como *S. subcordata* Spruce ex Benth., uma liana distribuída por toda a Região Amazônica, e reconhecida como ingrediente do curare. Assim, o presente trabalho buscou contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* da Região Amazônica, por meio da desreplicação e/ou isolamento de substâncias das folhas da espécie *S. subcordata*. Para isso, as folhas foram submetidas à extração por infusão, sendo o extrato aquoso resultante submetido ao procedimento de extração em fase sólida (SPE). A fração metanólica obtida foi analisada por injeção direta em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (DI-MS), utilizando o modo de varredura de perda neutra por meio da aquisição dependente de dados (DDA) para reconhecimento e desreplicação de glicosídeos de flavonoides. Posteriormente, a fração metanólica foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), utilizando seis colunas diferentes (Luna C18(2), Kinetex C8, Luna PFP(2), Luna fenil-hexil, Luna CN, e Kinetex bifenil). A partir dessas análises, foram propostas diversas estratégias de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) no modo *offline single heart-cutting* para isolar as cinco substâncias majoritárias da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, três das quais não puderam ser preliminarmente identificadas a partir das análises por MS. A combinação de uma coluna C18 na primeira dimensão (<sup>1</sup>D) e uma coluna bifenil na segunda dimensão (<sup>2</sup>D) foi a estratégia escolhida para o isolamento de: uma isoflavona previamente não descrita, denominada subcordatina, dois glicosídeos de flavonoides raros (apigenina 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo e apigenina 7-metil éter 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo), além dos glicosídeos de flavonas isovitexina e swertisina. As estruturas das substâncias foram elucidadas a partir da interpretação manual de espectros de MS e análise de dados de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional (RMN 1D e 2D). No intuito de entender a seletividade das colunas observada para as substâncias investigadas, foi apresentada uma discussão baseada nas interações soluto-coluna previstas pelo modelo de subtração hidrofóbica (HSM) de Snyder. A subcordatina, em particular, apresentou maior retenção em colunas do tipo fenil, especialmente na coluna bifenil, provavelmente devido às similaridades conformacionais entre as isoflavonas e os grupos bifenil da fase estacionária. Essas observações ressaltam a importância de interações moleculares específicas na seletividade cromatográfica e enfatizam o potencial dos métodos de 2D-LC no modo *offline heart-cutting* para o isolamento de produtos naturais estruturalmente complexos. Além disso, este estudo revelou a espécie *S. subcordata* como uma fonte promissora de substâncias bioativas, expandindo o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos*.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massas, 2D-LC, Coluna bifenil, Flavonas, Isoflavonas.

## ABSTRACT

The genus *Strychnos* L., the principal representative of the Loganiaceae family, is native to tropical and subtropical regions, encompassing 204 accepted species. This genus is globally recognized for its traditional use in the preparation of curare, a arrow poison utilized by indigenous peoples of South America, and stands out as a promising source of bioactive natural products. Although the phytochemical content of several *Strychnos* species has been extensively investigated, others remain largely unexplored, such as *S. subcordata* Spruce ex Benth., a liana species distributed throughout the Amazon region, traditionally used in the preparation of curare. Thus, the present study aimed to contribute to the phytochemical knowledge of the *Strychnos* genus in the Amazon region through the dereplication and/or isolation of substances from the leaves of *S. subcordata*. To achieve this, the leaves were subjected to infusion extraction, and the resulting aqueous extract was submitted to solid-phase extraction (SPE) procedure. The obtained methanol fraction was analyzed by direct injection into a ion trap mass spectrometer (DI-MS), employing neutral loss scanning mode through data-dependent acquisition (DDA) for the recognition and dereplication of flavonoid glycosides. Subsequently, the methanol fraction was analyzed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS), utilizing six different columns (Luna C18(2), Kinetex C8, Luna PFP(2), Luna phenyl-hexyl, Luna CN, and Kinetex biphenyl). Based on these analyses, several offline single heart-cutting two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) strategies were proposed to isolate the five major compounds from the methanol fraction of *S. subcordata* leaves, three of which could not be preliminarily identified by MS analyses. The combination of a C18 column in the first dimension (<sup>1</sup>D) and a biphenyl column in the second dimension (<sup>2</sup>D) was selected as the strategy for the isolation of a previously undescribed isoflavone, named subcordatine; two rare flavonoid glycosides (apigenin 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glucopyranoside and apigenin 7-methyl ether 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glucopyranoside); as well as the flavone glycosides isovitexin and swertisin. The structures of these compounds were elucidated by integrating manual interpretation of MS spectra and one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance (1D and 2D NMR) data. In an effort to understand the column selectivity observed for the investigated compounds, a discussion was presented based on the solute-column interactions predicted by Snyder's hydrophobic subtraction model (HSM). In particular, subcordatine exhibited greater retention on phenyl-type columns, especially on the biphenyl column, likely due to conformational similarities between isoflavones and the biphenyl groups of the stationary phase. These observations underscore the importance of specific molecular interactions in chromatographic selectivity and highlight the potential of 2D-LC methodologies in the offline heart-cutting mode for isolating structurally complex natural products. Furthermore, this study revealed *S. subcordata* as a promising source of bioactive substances, expanding the phytochemical knowledge of the *Strychnos* genus.

**Keywords:** Mass spectrometry, 2D-LC, Biphenyl column, Flavones, Isoflavones.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                                  |                                                                                                      |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1D</b>                        | Unidimensional                                                                                       |
| <b>2D</b>                        | Bidimensional                                                                                        |
| <b>1D-LC</b>                     | Cromatografia Líquida Unidimensional (do inglês <i>One-dimensional Liquid Chromatography</i> )       |
| <b>2D-LC</b>                     | Cromatografia Líquida Bidimensional (do inglês <i>Two-dimensional Liquid Chromatography</i> )        |
| <b>APCI</b>                      | Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> ) |
| <b>CD<sub>3</sub>OD</b>          | Metanol deuterado                                                                                    |
| <b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b> | Dimetilsulfóxido deuterado                                                                           |
| <b>ESI</b>                       | Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>Electrospray Ionization</i> )                        |
| <b>HMBC</b>                      | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>                                                       |
| <b>HPLC</b>                      | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )  |
| <b>HSQC</b>                      | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>                                                        |
| <b>IT</b>                        | Armadilha de íons (do inglês <i>Ion trap</i> )                                                       |
| <b><i>m/z</i></b>                | Razão massa/carga                                                                                    |
| <b>MS</b>                        | Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i> )                                       |
| <b>MS/MS</b>                     | Espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )                     |
| <b>MS<sup>n</sup></b>            | Espectrometria de massas em múltiplos estágios (do inglês <i>Multiple-Stage Mass Spectrometry</i> )  |
| <b>ppm</b>                       | Parte por milhão                                                                                     |
| <b>RMN</b>                       | Ressonância Magnética Nuclear (do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )                         |
| <b>TMS</b>                       | Tetrametilsilano                                                                                     |
| <b>UFAM</b>                      | Universidade Federal do Amazonas                                                                     |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribuição geográfica da família Loganiaceae (STEVENS, 2017).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 28 |
| Figura 2. Distribuição da família Loganiaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira e (B) domínio fitogeográfico (Adaptado de SETUBAL <i>et al.</i> , 2020). .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| Figura 3. Distribuição geográfica do gênero <i>Strychnos</i> L. (POWO, 2025c).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 30 |
| Figura 4. Distribuição do gênero <i>Strychnos</i> no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira e (B) domínio fitogeográfico (Adaptado de SETUBAL, 2020a). .....                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 |
| Figura 5. Aspectos morfológicos de espécies do gênero <i>Strychnos</i> . (A) Folhas e flores de <i>S. pseudoquina</i> (POWO, 2025d), (B) frutos de <i>S. spinosa</i> (SOW EXOTIC, 2025) e (C) folhas e gavinhas de <i>S. panganensis</i> Gilg (HYDE <i>et al.</i> , 2025).....                                                                                                                                                 | 33 |
| Figura 6. Precusores biossintéticos das classes de alcaloides indólicos frequentemente reportadas no gênero <i>Strychnos</i> (Adaptado de DEWICK, 2009; STÖCKIGT <i>et al.</i> , 2008). .....                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| Figura 7. Exemplos de MIAs das séries normal, pseudo e sec-pseudo reportados no gênero <i>Strychnos</i> (Adaptado de OHIRI <i>et al.</i> , 1983; PINHEIRO, 2000). .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 43 |
| Figura 8. Flavonois, flavonas, isoflavonas, biflavonoides, homoflavonoides e glicosídeos de isoflavonas isolados de espécies do gênero <i>Strychnos</i> (CHENG <i>et al.</i> , 2001; FRANCIS & SUSEEM, 2022; ITOH <i>et al.</i> , 2005; LAGE <i>et al.</i> , 2013; NICOLETTI <i>et al.</i> , 1984; SANTOS <i>et al.</i> , 2024; SILVA <i>et al.</i> , 2005b; SILVA <i>et al.</i> , 2023; TRAVASAROU <i>et al.</i> , 2019)..... | 53 |
| Figura 9. Glicosídeos de flavonois isolados de espécies do gênero <i>Strychnos</i> (Parte 1) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; CHENG <i>et al.</i> , 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; ITOH <i>et al.</i> , 2005; SANTOS <i>et al.</i> , 2023; SUÁREZ <i>et al.</i> , 2016). .....                                                                                                                                      | 54 |
| Figura 10. Estrutura básica dos flavonoides (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2023). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| Figura 11. Rota biossintética dos flavonoides e suas diversas classes (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999). .....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| Figura 12. Principais posições de <i>O</i> - e <i>C</i> -glicosilação nas diferentes classes de flavonoides (Adaptado de KACHLICKI <i>et al.</i> , 2016; PLAZA <i>et al.</i> , 2014; VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG <i>et al.</i> , 2018). .....                                                                                                                                                                                  | 64 |
| Figura 13. Nomenclatura de íons fragmentos comumente aplicada a (A) <i>O</i> -diglicosídeos, (B) <i>O,C</i> -diglicosídeos, (C) agliconas de flavona e (D) agliconas de isoflavona (Adaptado de CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI <i>et al.</i> , 2016; WOJAKOWSKA <i>et al.</i> , 2013). .....                                                                                                                               | 67 |
| Figura 14. Um fluxograma geral ilustrando o isolamento por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> de uma nova substância e de glicosídeos de flavonoides raros contendo uma unidade apiosil, juntamente com etapas analíticas chave para extração, reconhecimento preliminar e caracterização estrutural dessas substâncias. ....                                                                                   | 75 |
| Figura 15. Etapas do procedimento de <i>cleanup</i> do extrato aquoso das folhas de <i>S. subcordata</i> , por meio de SPE, e obtenção da fração metanólica (A autora, 2025). .....                                                                                                                                                                                                                                            | 82 |
| Figura 16. Análises exploratórias por HPLC-UV e análises otimizadas por HPLC-UV e HPLC-MS da fração metanólica (A autora, 2025). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 84 |
| Figura 17. Etapas do procedimento de isolamento por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> das substâncias 1 a 5 presentes na fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> (A autora, 2025). .....                                                                                                                                                                                                          | 87 |
| Figura 18. Espectros de massas no modo (A) negativo e (B) positivo da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> . .....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 90 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 19. Espectros de MS/MS no modo negativo para os íons precursores em $m/z$ 431 (A – substância 1), 445 (B – substância 2), 563 (C – substância 3), 577 (D – substância 4), e 609 (E – substância 5). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 91  |
| Figura 20. Estrutura química da isovitexina (substância 1).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 92  |
| Figura 21. Estrutura química da swertisina (substância 2).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 94  |
| Figura 22. Estrutura química sugerida para a substância 3. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 95  |
| Figura 23. Estrutura química sugerida para a substância 4. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 96  |
| Figura 24. Espectros de (A) $MS^2$ e (B) $MS^3$ no modo negativo do íon em $m/z$ 609 (substância 5).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 97  |
| Figura 25. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna C18(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (45:55, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas. ....         | 100 |
| Figura 26. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna PFP(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (49:51, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas. ....         | 101 |
| Figura 27. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Kinetex bifenil 100A (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (45:55, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas..... | 102 |
| Figura 28. Estratégias para o isolamento das substâncias 1 a 5 da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 103 |
| Figura 29. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna fenil-hexil (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (49:51, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas. ....    | 104 |
| Figura 30. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Kinetex C8 (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (35:65, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas. ....          | 105 |
| Figura 31. (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna CN (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (20:80, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em $m/z$ 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas. ....             | 106 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 32. Cromatogramas do isolamento das substâncias 1 a 5 da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> .                                                                                                                                                                                                                                                        | 107 |
| Figura 33. Espectro de HRESIMS no modo negativo da substância 5.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 109 |
| Figura 34. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 5 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 109 |
| Figura 35. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (com supressão do sinal da água) da substância 5 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 110 |
| Figura 36. Ampliação da região aromática/olefinica e da região alifática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 5 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                | 111 |
| Figura 37. Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 5.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 112 |
| Figura 38. Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$ 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 5.                                                                                                                                                                                                                                                                         | 113 |
| Figura 39. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 5 para os prótons em $\delta_{\text{H}}$ 8,30 (H-2), 6,99 (H-2'), 6,80 (H-6') e 6,77 (H-5').                                                                                                                                                                                               | 114 |
| Figura 40. Correlações-chave observadas no (A) espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 5 para os prótons em $\delta_{\text{H}}$ 6,49 (H-8) e 5,10 (H-1''), juntamente com os espectros de NOESY 1D obtidos por irradiação seletiva do (B) sinal do próton anomérico em $\delta_{\text{H}}$ 5,10 (H-1'') e do (C) sinal do próton quelato em $\delta_{\text{H}}$ 13,12 (OH-5). | 116 |
| Figura 41. Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância 5.                                                                                                                                                                              | 118 |
| Figura 42. Estrutura química da isoflavona subcordatina (5).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 120 |
| Figura 43. Espectro de massas no modo negativo da substância 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 121 |
| Figura 44. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 121 |
| Figura 45. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (com supressão do sinal da água) da substância 1 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 123 |
| Figura 46. Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 124 |
| Figura 47. Ampliação da região de próton anomérico e prótons carbinólicos do mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$ 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1.                                                                                                                                                                                                                                                                           | 125 |
| Figura 48. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1 para os prótons em $\delta_{\text{H}}$ 7,92 (H-2'/H-6'), 6,93 (H-3'/H-5') e 6,77 (H-3).                                                                                                                                                                                                  | 126 |
| Figura 49. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1 para os prótons em $\delta_{\text{H}}$ 6,52 (H-8) e 4,58 (H-1'').                                                                                                                                                                                                                        | 127 |
| Figura 50. Correlações-chave observadas no espectro de COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1 para o próton anomérico em $\delta_{\text{H}}$ 4,58 (H-1'') e para os prótons carbinólicos.                                                                                                                                                                                                                       | 128 |
| Figura 51. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 1 para os prótons carbinólicos em $\delta_{\text{H}}$ 3,68 (H-6''), 3,41 (H-6''), 3,20 (H-3'') e 3,12 (H-4'').                                                                                                                                                                             | 129 |
| Figura 52. Estrutura química da flavona isovitexina (1).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 131 |
| Figura 53. Espectro de massas no modo negativo da substância 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 131 |
| Figura 54. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (com supressão do sinal da água) da (A) substância 1 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) e da (B) substância 2 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                             | 132 |
| Figura 55. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ da (A) substância 1 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) e da (B) substância 2 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 133 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 56. Ampliação das regiões de (A) prótons aromáticos/olefínicos e (B) prótons alifáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 2. ....                                                                                                                      | 134 |
| Figura 57. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 2 para os prótons em $\delta_{\text{H}}$ 7,99 (H-2'/H-6'), 6,94 (H-3'/H-5'), 6,86/6,84 (H-8), 4,60/4,58 (H-1'') e 3,90/3,87 (OCH <sub>3</sub> -7). ....                                    | 136 |
| Figura 58. Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) para os prótons dos anéis A, B e C, bem como para os prótons anoméricos, referentes (A) ao rotâmero 1 e (B) ao rotâmero 2 da substância 2. ....                                                          | 137 |
| Figura 59. Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, DMSO- $d_6$ ) e no espectro de COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, DMSO- $d_6$ ) para os prótons do resíduo de hexose do (B) rotâmero 1 e do (C) rotâmero 2 da substância 2. ....                                         | 139 |
| Figura 60. Estrutura química da flavona swertisina (2), com asteriscos (*) denotando as posições associadas aos sinais duplicados observados nos espectros de RMN. ....                                                                                                                                                             | 142 |
| Figura 61. Variações no sinal do próton quelato OH-5 no espectro de RMN de $^1\text{H}$ da swertisina em função da temperatura (Adaptado de FRANK <i>et al.</i> , 2012). ....                                                                                                                                                       | 143 |
| Figura 62. Representações 3D das conformações de energia mínima da swertisina, correspondentes aos rotâmeros a e b (Adaptado de FRANK <i>et al.</i> , 2012). ....                                                                                                                                                                   | 144 |
| Figura 63. Espectros de massas no modo negativo da (A) substância 3 e da (B) substância 4. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 145 |
| Figura 64. Ampliação da região aromática/olefínica dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da (A) substância 3 e da (B) substância 4. ....                                                                                                                                                               | 147 |
| Figura 65. Ampliação da região alifática dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da (A) substância 3 e da (B) substância 4. ....                                                                                                                                                                         | 148 |
| Figura 66. Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para os prótons dos (B) anéis A, B e C, bem como para o próton anomérico do resíduo de C-hexose da substância 3. ....                                                                          | 150 |
| Figura 67. Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para os prótons dos anéis A, B e C, bem como para os prótons anoméricos dos resíduos de C-hexose, referentes (B) ao rotâmero 1 e (C) ao rotâmero 2 da substância 4. ....                       | 151 |
| Figura 68. Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância 3. ....                                                             | 152 |
| Figura 69. Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância 4. ....                                                             | 153 |
| Figura 70. Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) e no espectro de COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) para os prótons dos resíduos de açúcar da (A) substância 3, bem como do (B) rotâmero 1 e do rotâmero 2 da substância 4. .... | 154 |
| Figura 71. Representações 3D das estruturas químicas otimizadas dos epímeros (A) $\alpha$ e (B) $\beta$ da substância 4, destacando os ângulos diedros teóricos entre os hidrogênios H-1''' e H-2''' (A Autora, 2025). ....                                                                                                         | 156 |
| Figura 72. Estrutura química da flavona apigenina 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo (3). ....                                                                                                                                                                                            | 161 |
| Figura 73. Estrutura química da flavona precatorina III (4), com asteriscos (*) denotando as posições associadas aos sinais duplicados observados nos espectros de RMN. ....                                                                                                                                                        | 161 |

Figura 74. Gráfico de barras mostrando o fator de retenção ( $k$ ) para as substâncias 1 a 5 nas seis colunas cromatográficas avaliadas. .... 163

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Tribos e gêneros da família Loganiaceae R.Br. ex Mart. (Gentianales).....                                                                                                                                                   | 27  |
| Tabela 2. Principais especificações das colunas cromatográficas utilizadas e suas respectivas pré-colunas.....                                                                                                                        | 77  |
| Tabela 3. Composição da fase móvel utilizada nas análises por HPLC-UV e HPLC-MS em modo de eluição isocrático, empregando seis colunas cromatográficas. ....                                                                          | 84  |
| Tabela 4. Substâncias resultantes do isolamento por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> . ....                                                                                                                          | 86  |
| Tabela 5. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância 5 (subcordatina). ....                                                                         | 119 |
| Tabela 6. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância 1 (isovitexina). ....                                                                          | 130 |
| Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do rotâmero 1 da substância 2 (swertisina). ....                                                             | 140 |
| Tabela 8. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do rotâmero 2 da substância 2 (swertisina). ....                                                             | 141 |
| Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância 3 (apigenina 6- <i>C</i> -[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo)..... | 158 |
| Tabela 10. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do rotâmero 1 da substância 4 (precatorina III).....                                                                  | 159 |
| Tabela 11. Dados espectroscópicos de RMN ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do rotâmero 2 substância 4 (precatorina III). ....                                                                    | 160 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Espécies do gênero <i>Strychnos</i> com ocorrência confirmada no Estado do Amazonas (SETUBAL, 2020a).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 31 |
| Quadro 2. Espécies do gênero <i>Strychnos</i> utilizadas na preparação do curare e países onde são utilizadas (Adaptado de BISSET, 1992; KRUKOFF, 1972; PHILLIPE <i>et al.</i> , 2004)..                                                                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| Quadro 3. Panorama geral do uso etnomedicinal de espécies americanas de <i>Strychnos</i> , incluindo partes da planta e os países onde são utilizadas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 40 |
| Quadro 4. Exemplos de alcaloides indólicos frequentemente reportados no gênero <i>Strychnos</i> (BONNET <i>et al.</i> , 2022; CHENG <i>et al.</i> , 2001; COSTA <i>et al.</i> , 2016; NEUWINGER, 1998; OHIRI <i>et al.</i> , 1983; PINHEIRO, 2000; RAJESH <i>et al.</i> , 2012; SANTOS <i>et al.</i> , 2023; SAXTON, 1989; SILVA <i>et al.</i> , 1993; SILVA <i>et al.</i> , 2005a; TITS <i>et al.</i> , 1996; TRAVASAROU <i>et al.</i> , 2019)..... | 44 |
| Quadro 5. Espécies do gênero <i>Strychnos</i> estudadas fitoquimicamente com ênfase na caracterização do conteúdo flavonoídico. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 51 |

## LISTA DE APÊNDICES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura A1. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna C18(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. ....          | 185 |
| Figura A2. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Kinetex C8 (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. ....           | 185 |
| Figura A3. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna PFP(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. ....          | 186 |
| Figura A4. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna fenil-hexil (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. ....     | 186 |
| Figura A5. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Luna CN (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. ....              | 187 |
| Figura A6. Cromatograma da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> , obtido usando uma coluna Kinetex bifenil 100A (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min <sup>-1</sup> , monitorada a 240 e 350 nm. .... | 187 |
| Figura A7. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz). ....                                                                                                                                                                                                                                              | 189 |
| Figura A8. Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>5</b> . ....                                                                                                                                                                                                              | 190 |
| Figura A9. Mapa de correlação COSY ( <sup>1</sup> H 500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>5</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                       | 191 |
| Figura A10. Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>1</b> . ....                                                                                                                                                                                                             | 192 |
| Figura A11. Mapa de correlação COSY ( <sup>1</sup> H 500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>1</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                      | 193 |
| Figura A12. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (com supressão do sinal da água) da substância <b>2</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz). ....                                                                                                                                                                                                            | 194 |
| Figura A13. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>2</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz). ....                                                                                                                                                                                                                                            | 194 |
| Figura A14. Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>2</b> . ....                                                                                                                                                                                                             | 195 |
| Figura A15. Ampliação da região de próton anomérico e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( <sup>1</sup> H 500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>2</b> . ....                                                                                                                                                                      | 196 |
| Figura A16. Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H 500 MHz, <sup>13</sup> C 125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>2</b> . ....                                                                                                                                                                                                             | 197 |
| Figura A17. Mapa de correlação COSY ( <sup>1</sup> H 500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) da substância <b>2</b> . ....                                                                                                                                                                                                                                      | 198 |
| Figura A18. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (com supressão do sinal da água) da substância <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz). ....                                                                                                                                                                                                                      | 199 |
| Figura A19. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (com supressão do sinal da água) da substância <b>4</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz). ....                                                                                                                                                                                                                      | 199 |
| Figura A20. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>3</b> (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz). ....                                                                                                                                                                                                                                                      | 200 |

|                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura A21. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).....                                                                                     | 200 |
| Figura A22. Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 3.....                 | 201 |
| Figura A23. Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 4.....                 | 201 |
| Figura A24. Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 3.....                                                          | 202 |
| Figura A25. Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 4.....                                                          | 203 |
| Figura A26. Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 3.....                                                          | 204 |
| Figura A27. Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 4.....                                                          | 205 |
| Figura A28. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 3. ....                                                                                  | 206 |
| Figura A29. Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 4. ....                                                                                  | 207 |
| Figura A30. Sinais típicos da pentose apiose observados nos espectros de HSQC ( $^1\text{H}$ 500 MHz, $^{13}\text{C}$ 125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias (A) 3 e (B) 4. .... | 208 |

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela A1. Fator de similaridade ( $F_s$ ) e parâmetros de seletividade das seis colunas cromatográficas avaliadas.....                | 184 |
| Tabela A2. Fatores de retenção relativa (FRR) calculados para cada par de substâncias nas seis colunas cromatográficas avaliadas. .... | 188 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                    |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| RESUMO .....                                                                                       | ix    |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....                                                             | xi    |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                             | xii   |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                             | xvii  |
| LISTA DE QUADROS .....                                                                             | xviii |
| LISTA DE APÊNDICES .....                                                                           | xix   |
| SUMÁRIO.....                                                                                       | xxi   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                 | 23    |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                                      | 27    |
| 2.1. A família Loganiaceae R.Br. ex Mart.....                                                      | 27    |
| 2.2. O gênero <i>Strychnos</i> L. ....                                                             | 29    |
| 2.3. Aspectos etnobotânicos do gênero <i>Strychnos</i> L. ....                                     | 34    |
| 2.3.1. O gênero <i>Strychnos</i> L. e o curare .....                                               | 34    |
| 2.3.2. O gênero <i>Strychnos</i> L. na medicina tradicional.....                                   | 38    |
| 2.4. Aspectos fitoquímicos do gênero <i>Strychnos</i> L. ....                                      | 42    |
| 2.4.1. Flavonoides no gênero <i>Strychnos</i> L.....                                               | 50    |
| 2.5. Flavonoides: classificação e aspectos químicos e biossintéticos .....                         | 58    |
| 2.6. Espectrometria de massas (MS) aplicada ao estudo de flavonoides em matrizes vegetais .....    | 65    |
| 2.7. Cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) aplicada ao isolamento de produtos naturais ..... | 69    |
| 2.8. A espécie <i>Strychnos subcordata</i> Spruce ex. Benth. ....                                  | 71    |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                                  | 73    |
| 3.1. Geral .....                                                                                   | 73    |
| 3.2. Específicos.....                                                                              | 73    |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                        | 74    |
| 4.1. Procedimentos experimentais gerais .....                                                      | 76    |
| 4.1.1. Métodos cromatográficos .....                                                               | 76    |
| 4.1.2. Métodos espectrométricos e espectroscópicos .....                                           | 78    |
| 4.1.3. Outros equipamentos .....                                                                   | 79    |
| 4.1.4. Solventes.....                                                                              | 79    |
| 4.2. Coleta e identificação do material botânico .....                                             | 80    |
| 4.3. Obtenção do extrato aquoso das folhas de <i>S. subcordata</i> .....                           | 80    |

|                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4. Cleanup do extrato aquoso das folhas de <i>S. subcordata</i> .....                                                                                                                             | 81  |
| 4.5. Análise do perfil químico da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por DI-MS e DI-MS/MS .....                                                                                   | 82  |
| 4.6. Análises da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por HPLC-UV e HPLC-MS em escala analítica .....                                                                               | 83  |
| 4.7. Isolamento por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> .....                                                                                                                         | 85  |
| 4.8. Otimização estrutural e previsão das constantes de acoplamento .....                                                                                                                           | 87  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                     | 89  |
| 5.1. Análise do perfil químico da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por DI-MS .....                                                                                              | 89  |
| 5.1.1. Desreplcação da substância 1 (ion em <i>m/z</i> 431) pela análise do padrão de fragmentação .....                                                                                            | 92  |
| 5.1.2. Desreplcação da substância 2 (ion em <i>m/z</i> 445) pela análise do padrão de fragmentação .....                                                                                            | 93  |
| 5.1.3. Desreplcação da substância 3 (ion em <i>m/z</i> 563) pela análise do padrão de fragmentação .....                                                                                            | 94  |
| 5.1.4. Desreplcação da substância 4 (ion em <i>m/z</i> 577) pela análise do padrão de fragmentação .....                                                                                            | 95  |
| 5.1.5. Desreplcação da substância 5 (ion em <i>m/z</i> 609) pela análise do padrão de fragmentação .....                                                                                            | 96  |
| 5.2. Avaliação da seletividade da coluna para o isolamento das substâncias-alvo da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> por 2D-LC no modo <i>offline single heart-cutting</i> ..... | 98  |
| 5.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> .....                                                                                   | 108 |
| 5.3.1. Elucidação estrutural da substância 5 .....                                                                                                                                                  | 108 |
| 5.3.2. Elucidação estrutural da substância 1 .....                                                                                                                                                  | 120 |
| 5.3.3. Elucidação estrutural da substância 2 .....                                                                                                                                                  | 131 |
| 5.3.4. Elucidação estrutural da substância 3 e da substância 4.....                                                                                                                                 | 145 |
| 5.4. Racionalização da seletividade cromatográfica para as substâncias-alvo da fração metanólica das folhas de <i>S. subcordata</i> com base no modelo HSM .....                                    | 162 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                                   | 166 |
| 7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2024-2026.....                                                                                                                                                               | 167 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                   | 169 |
| APÊNDICES .....                                                                                                                                                                                     | 184 |

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Strychnos* L. (Loganiaceae) há muito tempo tem atraído interesse significativo na etnofarmacologia e na descoberta de fármacos, principalmente devido ao seu uso tradicional na preparação do curare, um veneno de flecha produzido e utilizado por povos indígenas na América do Sul (PHILIPPE *et al.*, 2004; WEST, 1935). Além de sua importância cultural e etnofarmacológica, as espécies de *Strychnos* produzem uma gama diversificada de produtos naturais, incluindo alcaloides indólicos monoterpênicos (MIAs, do inglês *Monoterpene Indole Alkaloids*) e flavonoides, que exibem diversas atividades biológicas, como efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, leishmanicidas e anticancerígenos (ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; FRÉDÉRICH *et al.*, 2003; LAGE *et al.*, 2015; VERPOORTE *et al.*, 1978). No entanto, enquanto espécies amazônicas como *S. guianensis* (Aubl.) Mart., *S. peckii* B.L.Rob. e *S. mattogrossensis* S.Moore foram extensivamente caracterizadas em termos de seu conteúdo fitoquímico (ANGENOT *et al.*, 1990; CASSAS *et al.*, 2025; MAVAR-MANGA *et al.*, 1996; QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2023), outras, como *S. subcordata* Spruce ex. Benth, permanecem completamente inexploradas. Essa espécie, tradicionalmente utilizada na preparação do curare, é uma liana que se distribui ao longo da Região Amazônica, estendendo-se do Sul da Colômbia ao Peru e ao Norte do Brasil (PHILLIPE *et al.*, 2004; POWO, 2025a).

Embora os MIAs tenham sido extensivamente estudados em espécies de *Strychnos*, o conteúdo flavonoídico permanece pouco investigado, particularmente no que diz respeito aos glicosídeos de flavonoides (BRASSEUR & ANGENOT, 1986; 1987; 1988; OHIRI *et al.*, 1983; PINHEIRO, 2000; SILVA *et al.*, 2005a). Essa classe de compostos tem atraído considerável atenção devido à sua complexidade estrutural e potencial farmacológico

promissor (CHEN *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2018). Nesses compostos, a glicosilação desempenha um papel fundamental não apenas na definição de características estruturais, mas também na modulação de propriedades farmacológicas. Essa modificação aumenta a bioatividade, a solubilidade e a estabilidade dos flavonoides, além de possibilitar a atribuição de funções biológicas distintas em relação à aglicona correspondente (VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG *et al.*, 2018).

A glicosilação pode levar à formação de *C*- ou *O*-glicosídeos de flavonoides, dependendo do sítio de ligação do açúcar na aglicona flavonoide. Os açúcares mais comumente envolvidos nesse processo incluem hexoses (ex., glicose), 6-desoxihexoses (ex., ramnose) e pentoses (ex., xilose). Embora a *O*-glicosilação possa ocorrer em várias posições ao longo da aglicona flavonoide, a *C*-glicosilação ocorre preferencialmente em C-6 e C-8 (KACHLICKI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018). Apesar de sua relevância estrutural e farmacológica, a purificação de glicosídeos de flavonoides é frequentemente desafiadora devido à ocorrência de formas isoméricas e padrões de glicosilação semelhantes, que são difíceis de resolver usando cromatografia líquida unidimensional (1D-LC) (KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, abordagens baseadas em espectrometria de massa (MS) têm se mostrado ferramentas eficazes para o reconhecimento de matrizes complexas, como extratos vegetais, facilitando a anotação de metabolitos conhecidos (desreplicação) e direcionando o isolamento de novas substâncias potencialmente bioativas (KACHLICKI *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2001). Em relação aos glicosídeos de flavonoides, sua desreplicação é tipicamente baseada na análise de padrões de fragmentação característicos. Em *C*-glicosídeos, a fragmentação comumente envolve a clivagem das ligações internas dos anéis de açúcar, enquanto *O*-glicosídeos exibem comportamento de fragmentação distinto, caracterizado pela

perda de toda a unidade de açúcar (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2001). No entanto, essas fragmentações nem sempre fornecem informações estruturais definitivas, particularmente no caso de resíduos de pentoses, pois suas estruturas podem variar significativamente, incluindo açúcares como xilose, arabinose e apiose (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Essa limitação ressalta a importância do emprego de estratégias de isolamento para obter substâncias puras, permitindo uma elucidação estrutural abrangente.

Nesse sentido, a cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) surgiu como uma técnica poderosa para enfrentar os desafios inerentes ao isolamento de produtos naturais, proporcionando maior capacidade de separação por meio da combinação de mecanismos de seletividade ortogonal (DANG *et al.*, 2025; KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2017). Para fins preparativos, a abordagem *offline heart-cutting*, na qual frações-alvo isoladas da primeira dimensão ( $^1D$ ) são submetidas a uma nova separação em uma segunda dimensão ( $^2D$ ), promove práticas sustentáveis com instrumentações simples (DANG *et al.*, 2025; KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2017). Um estudo recente destacou a eficiência dessa abordagem para a separação preparativa de produtos naturais intimamente relacionados, como análogos de C-glicosídeos de flavonas, a partir das folhas de *Ligustrum qianluoenenst* (DANG *et al.*, 2025).

Contudo, uma etapa crítica no desenvolvimento de métodos para 2D-LC é a seleção de combinações de colunas que oferecem seletividade distinta para garantir a separação ortogonal entre as dimensões (DOLAN & SNYDER, 2009; LINDSEY *et al.*, 2019; TIRAPELLE *et al.*, 2025). Em sistemas de modo reverso (RP, do inglês *reversed-phase*), essa ortogonalidade é frequentemente estimada previamente usando o fator de similaridade da coluna ( $F_s$ ), com base no modelo de subtração hidrofóbica de Snyder (HSM) (SNYDER

*et al.*, 2004). No entanto, além da ortogonalidade teórica, fatores práticos como o modificador orgânico da fase móvel são igualmente importantes (CROES *et al.*, 2005). Além disso, como a ortogonalidade é influenciada pelo perfil químico específico da amostra, a avaliação empírica de pares de colunas pode ainda ser necessária para matrizes complexas, ressaltando a importância da avaliação da ortogonalidade *a posteriori* na otimização do método (LINDSEY *et al.*, 2019).

Nesse contexto, com o intuito de contribuir para o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* da Região Amazônica, o presente estudo teve como objetivo a investigação do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata*. Para isso, realizou-se um reconhecimento inicial do perfil químico por meio de abordagens baseadas em espectrometria de massas (MS) e estabeleceram-se estratégias de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) no modo *offline single heart-cutting*, baseadas em seis colunas diferentes, visando o isolamento direcionado de substâncias ainda não descritas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

A família Loganiaceae R.Br. ex Mart., pertencente à ordem Gentianales, é constituída por 504 espécies distribuídas em 16 gêneros (POWO, 2025b). Dados de sequenciamento de DNA dos genomas nucleares e cloroplastidiais, juntamente com análises morfológicas, sustentaram o agrupamento desses gêneros em quatro tribos: Antonieae Endl., Loganieae Endl., Spigeliae Dumort. e Strychneae Dumort, conforme apresentado na Tabela 1 (STEVENS, 2017; STRUWE *et al.*, 2018). Dentre essas tribos, Strychneae é a mais abundante em termos de espécies, totalizando 221, sendo composta por dois gêneros pequenos, *Gardneria* e *Neuburgia*, e pelo gênero *Strychnos*, responsável por abrigar cerca de 40% das espécies da família Loganiaceae (POWO, 2025b; STRUWE *et al.*, 2018).

**Tabela 1.** Tribos e gêneros da família Loganiaceae R.Br. ex Mart. (Gentianales).

| <b>Tribo<sup>a</sup></b>  | <b>Gênero<sup>a,b</sup></b>                       | <b>Nº de espécies<sup>b</sup></b> |
|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Antonieae Endl.</b>    |                                                   | <b>14</b>                         |
|                           | <i>Antonia</i> Pohl                               | 1                                 |
|                           | <i>Bonyunia</i> R.H.Schomb. ex Progel             | 10                                |
|                           | <i>Norrisia</i> Gardner                           | 2                                 |
|                           | <i>Usteria</i> Willd.                             | 1                                 |
| <b>Loganieae Endl.</b>    |                                                   | <b>172</b>                        |
|                           | <i>Logania</i> R.Br.                              | 23                                |
|                           | <i>Geniostoma</i> J.R.Forst. & G.Forst.           | 49                                |
|                           | <i>Mitreola</i> L.                                | 21                                |
|                           | <i>Mitrasacme</i> Labill.                         | 55                                |
|                           | <i>Schizacme</i> Dunlop                           | 5                                 |
|                           | <i>Phyllangium</i> Dunlop                         | 5                                 |
|                           | <i>Adelphacme</i> K.L.Gibbons, B.J.Conn & Henwood | 1                                 |
|                           | <i>Orianthera</i> C.S.P.Foster & B.J.Conn         | 13                                |
| <b>Spigeliae Dumort.</b>  |                                                   | <b>97</b>                         |
|                           | <i>Spigelia</i> L.                                | 97                                |
| <b>Strychneae Dumort.</b> |                                                   | <b>221</b>                        |
|                           | <i>Strychnos</i> L.                               | 204                               |
|                           | <i>Neuburgia</i> Blume                            | 12                                |
|                           | <i>Gardneria</i> Wall.                            | 5                                 |

<sup>a</sup>STEVENS, 2017; STRUWE *et al.*, 2018; <sup>b</sup>POWO, 2025b

Os gêneros da família Loganiaceae apresentam padrões de distribuição predominantemente tropicais, com a maior diversidade de espécies contida nos trópicos da América do Sul e África, Sudeste Asiático e Austrália (Figura 1) (POWO, 2025b; STEVENS, 2017; STRUWE *et al.*, 2018). Embora a maioria dos gêneros ocorra em florestas tropicais de terras baixas (por exemplo, *Antonia*, *Bonyunia*, e a maioria das espécies de *Geniostoma*, *Strychnos* e *Usteria*), alguns gêneros possuem espécies que crescem em altitudes mais elevadas, tais como *Bonyunia* (tepui do Planalto das Guianas), *Mitreola* (Himalaia e Monte Kinabalu), *Geniostoma* (montanhas Havaianas e da Nova Guiné), *Schizacme* (região alpina e montanha do sudeste da Austrália e Nova Zelândia) e *Spigelia* (Brasil). Além disso, os gêneros herbáceos, tais como *Adelphacme*, *Logania* (algumas espécies), *Mitrasacme*, *Mitreola*, *Orianthera*, *Phyllangium* e *Spigelia*, são comuns em pastagens, savanas e matagais (POWO, 2025b; STRUWE *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da família Loganiaceae (STEVENS, 2017).

No Brasil, há ocorrência de espécies dos gêneros *Antonia*, *Bonyunia*, *Mitreola*, *Spigelia* e *Strychnos*. No total, foram registradas 122 espécies, das quais 68 pertencem ao gênero *Strychnos*, e 53 são endêmicas (SETUBAL *et al.*, 2020). Na Região Norte, há ocorrência de 65 espécies (Figura 2A), sendo 49 registradas no Estado do Amazonas (SETUBAL *et al.*, 2020). Além disso, embora existam registros de espécies em todos os

domínios fitogeográficos brasileiros, há maior ocorrência na Floresta Amazônica (65 espécies) (Figura 2B). No entanto, a Mata Atlântica (48 espécies) e o Cerrado (39 espécies) também se destacam pela diversidade de espécies da família Loganiaceae (SETUBAL *et al.*, 2020).

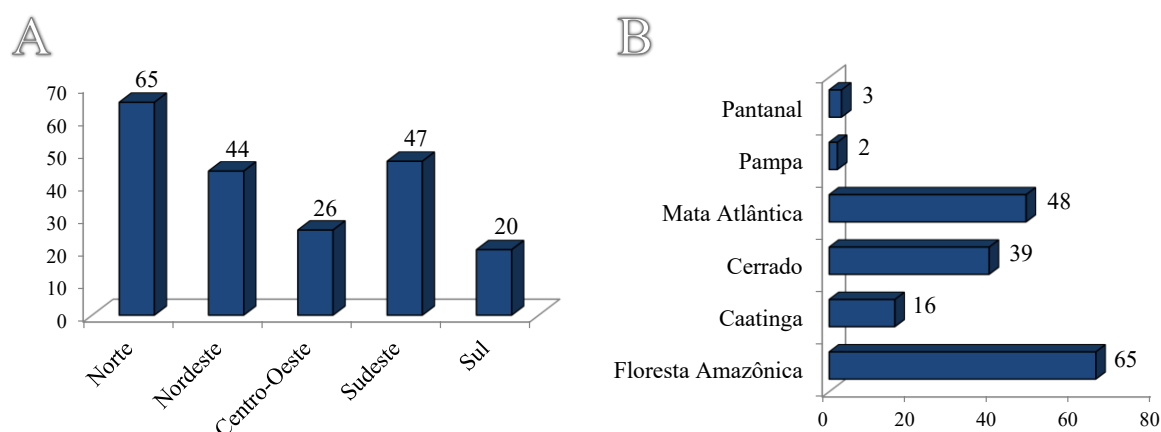


**Figura 2.** Distribuição da família Loganiaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira e (B) domínio fitogeográfico (Adaptado de SETUBAL *et al.*, 2020).

## 2.2. O gênero *Strychnos* L.

O gênero *Strychnos* L. é caracterizado como o principal representante da família Loganiaceae, e foi descrito pela primeira vez por Linnaeus (1753) com base na espécie *Strychnos nux-vomica* L., a espécie-tipo (SETUBAL *et al.*, 2021). Esse gênero compreende 204 espécies aceitas com distribuição pantropical (Figura 3), onde: aproximadamente 75 espécies ocorrem na África tropical e Madagascar, 46 espécies no Sul e Sudeste Asiático, 4 espécies no Norte e Nordeste da Austrália, e cerca de 85 espécies na América Central e do Sul (POWO, 2025c; SETUBAL, 2020a; SETUBAL *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Distribuição geográfica do gênero *Strychnos* L. (POWO, 2025c).

Setubal e colaboradores (2021) destacam a Bacia Amazônica como centro da diversidade de espécies do gênero *Strychnos* na Região Neotropical. No Brasil, são registradas 68 espécies, das quais 22 são endêmicas. Na Região Norte, há ocorrência de 50 espécies (Figura 4A), sendo 40 registradas no Estado do Amazonas (Quadro 1) (SETUBAL, 2020a). Em relação aos domínios fitogeográficos brasileiros, a Floresta Amazônica detém a maior parte da diversidade das espécies do gênero no país, com 49 espécies registradas, conforme ilustrado na Figura 4B (SETUBAL, 2020a).

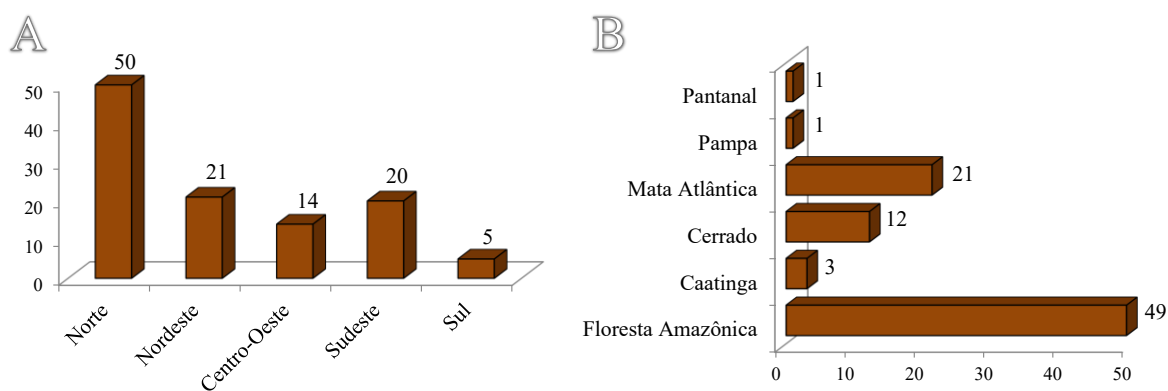


**Figura 4.** Distribuição do gênero *Strychnos* no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira e (B) domínio fitogeográfico (Adaptado de SETUBAL, 2020a).

**Quadro 1.** Espécies do gênero *Strychnos* com ocorrência confirmada no Estado do Amazonas (SETUBAL, 2020a).

| <b>Espécies</b>                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| <i>S. amazonica</i> Krukoff                                     |
| <i>S. asperula</i> Sprague & Sandwith                           |
| <i>S. barnhartiana</i> Krukoff                                  |
| <i>S. brachiata</i> Ruiz & Pav.                                 |
| <i>S. bredemeyeri</i> (Schult. & Schult.f.) Sprague & Sandwith  |
| <i>S. castelnaeana</i> Wedd. ex Castelnau                       |
| <i>S. cogens</i> Benth.                                         |
| <i>S. darienensis</i> Seem.                                     |
| <i>S. diaboli</i> Sandwith                                      |
| <i>S. duckei</i> Krukoff & Monach.                              |
| <i>S. erichsonii</i> M.R.Schomb. ex Progel                      |
| <i>S. froesii</i> Ducke                                         |
| <i>S. glabra</i> Sagot ex Progel                                |
| <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.                              |
| <i>S. hirsuta</i> Spruce ex Benth.                              |
| <i>S. javariensis</i> Krukoff                                   |
| <i>S. jobertiana</i> Baill.                                     |
| <i>S. krukoffiana</i> Ducke                                     |
| <i>S. macrophylla</i> Barb.Rodr.                                |
| <i>S. mattogrossensis</i> S.Moore                               |
| <i>S. medeola</i> Sagot ex Progel                               |
| <i>S. melinoniana</i> Baill.                                    |
| <i>S. mitscherlichii</i> M.R.Schomb.                            |
| <i>S. mitscherlichii</i> M.R.Schomb. var. <i>mitscherlichii</i> |
| <i>S. mitscherlichii</i> var. <i>pubescentior</i> Sandwith      |
| <i>S. neglecta</i> Krukoff & Barneby                            |
| <i>S. pachycarpa</i> Ducke                                      |
| <i>S. panurensis</i> Sprague & Sandwith                         |
| <i>S. parviflora</i> Spruce ex Benth.                           |
| <i>S. peckii</i> B.L.Rob.                                       |
| <i>S. poeppigii</i> Progel                                      |
| <i>S. progeliana</i> Krukoff & Barneby                          |
| <i>S. ramentifera</i> Ducke                                     |
| <i>S. rondeletiioides</i> Spruce ex Benth.                      |
| <i>S. sandwithiana</i> Krukoff & Barneby                        |
| <i>S. schultesiana</i> Krukoff                                  |
| <i>S. solerederi</i> Gilg                                       |
| <i>S. solimoesana</i> Krukoff                                   |
| <i>S. subcordata</i> Spruce ex Benth.                           |
| <i>S. tarapotensis</i> Sprague & Sandwith                       |
| <i>S. toxifera</i> R.H.Schomb. ex Benth.                        |
| <i>S. tomentosa</i> Benth.                                      |

As espécies de *Strychnos* têm como habitats florestas (úmidas ou secas, inundadas ou não), savanas e campos, desde o nível do mar até elevadas altitudes (2000 m), os quais podem influenciar diretamente na sua forma de crescimento. No geral, as espécies podem se apresentar como arbustos trepadores ou lianas (1,5 a 45 m de altura, 4 a 120 m de comprimento, e até 50 cm de diâmetro), subarbustos ou arbustos (0,3 a 2 m de altura) e árvores (2 a 40 m de altura e até 100 cm de diâmetro) (SETUBAL *et al.*, 2021; STRUWE *et al.*, 2018).

As espécies africanas de *Strychnos* se apresentam predominantemente como lianas dentro das florestas, e mais comumente como árvores/arbustos nas bordas das florestas ou em matas de savana. Um exemplo é a espécie *S. usambarensis* Gilg ex Engl., que pode se apresentar como uma liana (na África Ocidental, Oriental e Central) ou como uma árvore (na África Oriental) (ADEBOWALE *et al.*, 2016). Por outro lado, espécies americanas de *Strychnos* se apresentam frequentemente como cipós ou arbustos que se tornam escandentes, tal como a espécie *S. hirsuta*, um arbusto natural de submata caracterizado por seus ramos flageliformes e cuja ocorrência está confirmada na Floresta Amazônica (Quadro 1) (DUCKE, 1955; SETUBAL, 2020a). Em contraste, a espécie *S. pseudoquina* A.St.-Hil., nativa da América do Sul e com ocorrência confirmada no Cerrado brasileiro, se apresenta como uma árvore de pequeno porte (KRUKOFF & MONACHINO, 1942; SILVA *et al.*, 2005b).

Morfologicamente, as espécies de *Strychnos* são consideradas um grupo bem definido, apresentando características diagnósticas consistentes (Figura 5). Suas folhas são simples, inteiras e opostas com venação acródroma (3 a 5 nervuras) (Figura 5A e 5C). Comumente, apresentam gavinhas herbáceas ou lignificadas, em forma de gancho, solitárias, pareadas ou em 2 ou 3 pares sucessivos ao longo do caule (Figura 5C) (SETUBAL *et al.*,

2021; STRUWE *et al.*, 2018). Suas flores são relativamente pequenas (0,3–2,0 cm), de coloração clara, simpétalas, e têm cheiro agradável, com exceção da espécie *S. nigricans* Progel, que apresenta odor fétido (DUCKE, 1955; KRUKOFF & MONACHINO, 1942; SETUBAL, 2020a). Os frutos são bagas que variam de pequenas (1–2 cm) a grandes (6–10 cm). Notavelmente, algumas espécies produzem frutos comestíveis de polpa doce e odor agradável, tais como a espécie africana *S. spinosa* Lam. (Figura 5B) e a sul-americana *S. parviflora*. (DUCKE, 1955; KRUKOFF & MONACHINO, 1942; SETUBAL, 2020a; SETUBAL *et al.*, 2021; STRUWE *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Aspectos morfológicos de espécies do gênero *Strychnos*. (A) Folhas e flores de *S. pseudoquina* (POWO, 2025d), (B) frutos de *S. spinosa* (SOW EXOTIC, 2025) e (C) folhas e gavinhas de *S. panganensis* Gilg (HYDE *et al.*, 2025).

## 2.3. Aspectos etnobotânicos do gênero *Strychnos* L.

### 2.3.1. O gênero *Strychnos* L. e o curare

O gênero *Strychnos* ganhou reconhecimento mundial devido ao uso de algumas de suas espécies americanas na preparação do “curare”, um termo genérico usado para nomear um grupo de venenos de flechas de origem vegetal preparados por indígenas da América do Sul (PHILLIPE *et al.*, 2004; PINHEIRO, 2000). O curare tem sido preparado e usado por tribos indígenas da região que se estende da Guiana Francesa ao Mato Grosso (Brasil), incluindo as áreas norte e oeste da Bacia Amazônica, as partes média e alta da Bacia do Orinoco (Venezuela), a Montana do Equador e Peru, além do nordeste da Bolívia e áreas adjacentes do planalto central brasileiro (BISSET, 1992; PHILLIPE *et al.*, 2004).

A primeira planta de curare identificada botanicamente foi nomeada *Toxicaria americana* em 1783, tendo sido posteriormente reconhecida como a espécie *S. guianensis* (Aubl.) Mart. (DUCKE, 1955; PINHEIRO, 2000). Por outro lado, segundo Krukoff (1972), 21 espécies de *Strychnos* foram irrefutavelmente utilizadas no preparo do curare (Quadro 2), destacando-se como principais as espécies americanas: *S. toxifera* R.H.Schomb. ex Lindl., *S. solimoesana* Krukoff, *S. guianensis*, *S. glabra* Sagot ex Progel, e *S. castelnaeana* Baill. Posteriormente, as espécies americanas *S. amazonica* Krukoff e *S. darienensis* Seem., bem como a espécie africana *S. usambarensis*, também foram relatadas como ingredientes de curare (Quadro 2) (BISSET, 1992; PHILLIPE *et al.*, 2004). Além de espécies de *Strychnos*, algumas plantas pertencentes à família Menispermaceae Juss. também são utilizadas como ingredientes do curare (DUCKE, 1955; PHILLIPE *et al.*, 2004).

**Quadro 2.** Espécies do gênero *Strychnos* utilizadas na preparação do curare e países onde são utilizadas (Adaptado de BISSET, 1992; KRUKOFF, 1972; PHILLIPE *et al.*, 2004).

| <b>Espécie de <i>Strychnos</i> utilizada como ingrediente do curare</b> | <b>País onde é utilizada</b>                                            |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. rondeletii</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.                                              | Brasil, Guiana, Guiana Francesa                                         |
| <i>S. javariensis</i> Krukoff                                           | Colômbia, Peru, Brasil                                                  |
| <i>S. sandwithiana</i> Krukoff et Barneby                               | Brasil                                                                  |
| <i>S. jobertiana</i> Baill.                                             | Colômbia, Equador, Brasil, Peru                                         |
| <i>S. solimoesana</i> Krukoff                                           | Brasil                                                                  |
| <i>S. peckii</i> B. L. Robinson                                         | Colômbia, Equador, Brasil                                               |
| <i>S. erichsonii</i> Rich. Schomb. ex. Prog.                            | Suriname, Colômbia, Guiana                                              |
| <i>S. bredemeyeri</i> (Schultes) Sprague et Sandw.                      | Brasil, Guiana                                                          |
| <i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var. <i>mitscherlichii</i>        | Brasil, Colômbia, Equador, Guiana                                       |
| <i>S. mitscherlichii</i> Rob. Schomb. Var. <i>pubescentor</i> Sandw.    | Colômbia                                                                |
| <i>S. amazonica</i> Krukoff                                             | Colômbia                                                                |
| <i>S. solerederi</i> Gilg                                               | Brasil, Colômbia                                                        |
| <i>S. darienensis</i> Seem.                                             | Equador                                                                 |
| <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.                                      | Brasil, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Equador |
| <i>S. glabra</i> Sagot ex. Prog.                                        | Brasil, Guiana Francesa                                                 |
| <i>S. subcordata</i> Spruce ex. Benth.                                  | Brasil, Colômbia                                                        |
| <i>S. panurensis</i> Sprague et Sandw.                                  | Venezuela, Colômbia                                                     |
| <i>S. cogens</i> Benth.                                                 | Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana                                     |
| <i>S. usambarensis</i> Gilg                                             | Ruanda                                                                  |
| <i>S. castelnaeana</i> Wedd.                                            | Brasil, Peru                                                            |
| <i>S. progeliana</i> Krukoff et Barneby                                 | Brasil                                                                  |

Embora algumas tribos utilizem uma única planta como ingrediente principal do curare, a maioria dos relatos sobre sua preparação demonstra uma considerável complexidade em sua composição (BISSET, 1992; PHILLIPE *et al.*, 2004). O grupo indígena *Nambikwara*, do Mato Grosso (Brasil), utiliza exclusivamente espécies do gênero *Strychnos*, particularmente *S. guianensis* (BISSET, 1992; PHILLIPE *et al.*, 2004). Em contraste, os indígenas Quechua-Lamistas, do Peru, utilizam somente a espécie da família Menispermaceae, especificamente *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav. (BISSET, 1992). Por outro lado, o povo indígena Canelos-Quechuas, do Equador, emprega uma mistura de espécies da família Menispermaceae (*Curarea iquitana* (Diels) R.Ortiz, *Sciadotenia toxifera* Krukoff & A.C.Sm. e *Cissampelos pareira* L.) juntamente com várias espécies do gênero *Strychnos*, incluindo *S. toxifera*, *S. peckii*, *S. jobertiana* e uma planta não identificada (KRUKOFF & SMITH, 1939; PHILLIPE *et al.*, 2004).

Nesse contexto, em 1895, Rudolf Boehm classificou os curares etnograficamente em três categorias distintas: *calabash-curare*, *tubo-curare* e *pot-curare*. Essa classificação foi realizada com base na relação entre resíduos de incineração, conteúdo do veneno e o recipiente em que eram conservados (NEUWINGER, 1998; PHILLIPE *et al.*, 2004). O *calabash-curare*, assim denominado por ser embalado em cabaças, é geralmente obtido de espécies de *Strychnos*, sendo principalmente proveniente da região entre o rio Orinoco, ao norte, e os rios Negro e Amazonas, ao sul. Por outro lado, o *tubo-curare*, armazenado em tubos de bambu, é obtido principalmente de espécies da família Menispermaceae (*Chondrodendron* spp. e *Curarea* spp.), sendo predominantemente preparado pelas tribos indígenas que habitam o Peru, na região delimitada pelos rios Napo, Marañon e Ucayali. Finalmente, o *pot-curare*, acondicionado em potes de barro, é obtido de uma mistura de espécies da família Menispermaceae e do gênero *Strychnos*, sendo encontrado na porção

média do Amazonas e, em menor extensão, na Guiana (BATTERSBY & HODSON, 1965; NEUWINGER, 1998; PHILLIPE *et al.*, 2004).

Em relação ao modo de preparo do curare, o processo consiste na extração dos princípios ativos do material botânico (cascas da raiz e do caule) pulverizado, utilizando água fria ou quente, seguida de filtração e concentração por aquecimento brando (NEUWINGER, 1998; PINHEIRO, 2000). Além disso, é comum adicionar adjuvantes ao extrato para acentuar a toxicidade, favorecer a absorção pelo sangue ou modificar o caráter físico do veneno, facilitando a aderência às flechas. Alguns desses ingredientes secundários são sucos de plantas das famílias Solanaceae Juss. (*Nicotiana* L. spp.), Apocynaceae Juss. (*Tabernaemontana* Plum. ex L. spp.), Simaroubaceae DC. (*Picrasma* Blume spp.), Menispermaceae (*Abuta* Aubl. spp.) e Annonaceae Juss. (*Guatteria* Ruiz & Pav. spp.), além de formigas e dentes de serpentes (BATTERSBY & HODSON, 1965; NEUWINGER, 1998; PINHEIRO, 2000; PRANCE, 1972).

Devido ao seu efeito paralisante, o curare é essencialmente utilizado pelas tribos indígenas como um veneno de caça. Após ser atingido pela flecha envenenada, o animal sofre instantaneamente paralisia progressiva dos movimentos: inicialmente, os músculos dos olhos e ouvidos são paralisados, seguidos pelo pescoço, membros, músculos intercostais e, por fim, pelo diafragma. O resultado é a morte por anóxia, causada por insuficiência respiratória. Como o veneno não é absorvido pelo trato digestivo, a caça pode ser aproveitada como alimento sem nenhum risco (NEUWINGER, 1998; PHILLIPE *et al.*, 2004; PINHEIRO, 2000).

### 2.3.2. O gênero *Strychnos* L. na medicina tradicional

Além de seu uso tradicional na preparação de venenos, como o curare, o gênero *Strychnos* possui valor etnomedicinal reconhecido. Em diversas regiões dos continentes africano e asiático, diferentes partes do material botânico de espécies de *Strychnos* são empregadas popularmente para tratar diversas doenças e condições (PHILLIPE *et al.*, 2004; TITTIKPINA *et al.*, 2020).

Na África Austral, por exemplo, os extratos das raízes da espécie *S. cocculoides* Baker são usados como estimulante sexual (URSO *et al.*, 2016), além de serem empregados no tratamento de dismenorreia, fluxo menstrual intenso, hemorragia devido a lesões e sangramento pós-parto, cólica neonatal, isquemia cerebral, furúnculos nas pernas e infertilidade masculina (MAROYI, 2011; NOVOTNA *et al.*, 2020). Na África Oriental, o extrato obtido pela decocção das cascas do caule da espécie *S. henningsii* Gilg é tradicionalmente utilizado no tratamento da malária (KARERU *et al.*, 2007), enquanto as folhas e as cascas do caule da espécie *S. panganensis* Gilg são usadas no tratamento da tripanossomíase africana (IBRAHIM *et al.*, 2014). Por outro lado, na África Ocidental, mais especificamente em Benim, os extratos das folhas da espécie *S. spinosa* são usados para tratar picadas de cobra, problemas uterinos, distúrbios dos órgãos masculinos, resfriados, febre, dor de ouvido e conjuntivite (AVAKOUDJO *et al.*, 2020; DJIDOHOKPIN *et al.*, 2025).

No Sudeste Asiático, as sementes da espécie *S. potatorum* L.f. são utilizadas no tratamento de gastropatia, bronquite, diarreia crônica, cálculos renais e vesiculares, diabetes, gonorreia, conjuntivite e úlceras (YADAV *et al.*, 2014). Além disso, na Ásia Oriental, as sementes secas da espécie *S. nux-vomica* têm sido empregadas na medicina tradicional

chinesa para melhorar a circulação sanguínea e aliviar dores reumáticas, reduzir inchaços e tratar câncer (CHEN *et al.*, 2012).

Comparativamente, há um número menor de informações sobre o uso etnomedicinal das espécies americanas de *Strychnos* (QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2005a). Na América do sul, por exemplo, as espécies *S. erichsonii* R.H.Schomb. ex Progel, *S. melinoniana* Baill., *S. mitscherlichii* M.R.Schomb., *S. nigricans* Progel e *S. oiapocensis* Fróes são empregadas como afrodisíacos. Em contraste, a infusão dos brotos jovens da espécie *S. guianensis* é usada no tratamento de anemia, conforme apresentado no Quadro 3 (QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2005a).

No Brasil, o chá das cascas do caule e/ou folhas da espécie *S. pseudoquina*, popularmente conhecida como “quina-branca”, “falsa-quina” ou “quina-do-cerrado”, tem sido tradicionalmente empregado como tônico, antipirético, antimalárico e, particularmente, contra distúrbios hepáticos e digestivos (ALMEIDA *et al.*, 1998; BONAMIN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2008; QUETIN-LECLERCQ *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2005b). Por outro lado, na Região Nordeste do país, o infuso, decocto ou alcoolato das folhas e cascas do caule das espécies *S. atlantica* Krukoff & Barneby, *S. parvifolia* A.DC. e *S. trinervis* (Vell.) Mart., conhecidas popularmente como “capitãozinho”, é utilizado no tratamento de sífilis, diarreia, febre e doenças relacionadas ao sistema nervoso central (BASÍLIO *et al.*, 2005).

Dessa forma, observa-se que as diferentes espécies de *Strychnos* desempenham um papel significativo na medicina tradicional, variando conforme a região e as necessidades locais.

**Quadro 3.** Panorama geral do uso etnomedicinal de espécies americanas de *Strychnos*, incluindo partes da planta e os países onde são utilizadas.

| Espécie                                    | Uso medicinal                                                                                                             | Parte da planta         | País      | Referências                                                                       |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. atlantica</i> Krukoff & Barneby      | Antipirético, distúrbios estomacais, tratamento de sífilis, doenças relacionadas ao sistema nervoso central               | Folhas e cascas         | Brasil    | BASÍLIO <i>et al.</i> , 2005                                                      |
| <i>S. acuta</i> Progel                     | Tônico e estimulante                                                                                                      | Folhas                  | Brasil    | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                              |
| <i>S. brasiliensis</i> (Spreng.) Mart.     | Estimulante, tônico, antipirético, antimalárico                                                                           | -                       | Brasil    | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                              |
| <i>S. parvifolia</i> A.DC.                 | Antipirético, distúrbios estomacais, tratamento de sífilis, doenças relacionadas ao sistema nervoso central               | Raízes, folhas e cascas | Brasil    | BASÍLIO <i>et al.</i> , 2005                                                      |
| <i>S. erichsonii</i> R.H.Schomb. ex Progel | Afrodisíaco, distúrbios estomacais e abdominais, sangramento após menstruação e aborto, doenças venéreas, veneno de pesca | Cascas                  | Suriname  | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                              |
| <i>S. fendleri</i> Sprague & Sandwith      | Antimalárico e antipirético                                                                                               | Cascas                  | Venezuela | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                              |
| <i>S. gardneri</i> A.DC.                   | Antipirético                                                                                                              | -                       | -         | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                              |
| <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.         | Antianêmico                                                                                                               | Brotos jovens           | -         | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990; SILVA <i>et al.</i> , 2005a |
| <i>S. javariensis</i> Krukoff              | Analgésico e anti-reumático                                                                                               | Cascas                  | -         | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                              |

|                                          |                                                                                                             |                   |                   |                                                                                                 |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. melinoniana</i> Baill.             | Afrodisíaco                                                                                                 | Cascas das raízes | Suriname          | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |
| <i>S. mitscherlichii</i> M.R.Schomb.     | Afrodisíaco                                                                                                 | -                 | Guiana            | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |
| <i>S. nigricans</i> Progel               | Afrodisíaco                                                                                                 | -                 | -                 | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                                            |
| <i>S. oiapocensis</i> Fróes              | Afrodisíaco                                                                                                 | Cascas das raízes | Guiana Francesa   | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |
| <i>S. panamensis</i> Seem.               | Analgésico e anti-reumático                                                                                 | -                 | Honduras          | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |
| <i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.         | Tônico e estimulante, distúrbios estomacais e abdominais, antipirético, antimalárico                        | Cascas e folhas   | Brasil            | BONAMIN <i>et al.</i> , 2011; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990; SILVA <i>et al.</i> , 2005b |
| <i>S. rondeletii</i> Spruce ex Benth.    | Veneno de pesca                                                                                             | Cascas e folhas   | Brasil            | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                                            |
| <i>S. rubiginosa</i> A.DC.               | Tônico e estimulante                                                                                        | -                 | -                 | QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                                            |
| <i>S. trinervis</i> (Vell.) Mart.        | Tônico e estimulante, distúrbios estomacais e abdominais, antipirético, antimalárico, tratamento de sífilis | Cascas e folhas   | Brasil            | BASÍLIO <i>et al.</i> , 2005; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                              |
| <i>S. tomentosa</i> Benth.               | Analgésico e anti-reumático                                                                                 | Cascas            | Brasil e Suriname | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |
| <i>S. toxifera</i> R.H.Schomb. ex Lindl. | Espasmolítico                                                                                               | -                 | -                 | PINHEIRO, 2000; QUETIN-LECLERCQ <i>et al.</i> , 1990                                            |

## 2.4. Aspectos fitoquímicos do gênero *Strychnos* L.

Fitoquimicamente, o gênero *Strychnos* é caracterizado principalmente pela presença de alcaloides indólicos, biossinteticamente derivados do aminoácido aromático L-triptofano (Figura 6). Embora outras classes de alcaloides indólicos, como os  $\beta$ -carbolínicos (Quadro 4), estejam presentes no gênero, os alcaloides indólicos monoterpênicos (MIAs, do inglês *Monoterpene Indole Alkaloids*) são considerados predominantes (OHIRI *et al.*, 1983; PINHEIRO, 2000; RAJESH *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2005a). Esses metabólitos possuem origem biossintética mista, onde a fração contendo nitrogênio é proveniente da triptamina e a fração terpenoide é derivada do secoiridoide secologanina. Tais precursores se combinam para gerar a strictosidina, o principal intermediário biossintético dessa importante classe de alcaloides indólicos (Figura 6) (DEWICK, 2009; OHIRI *et al.*, 1983; STÖCKIGT *et al.*, 2008).

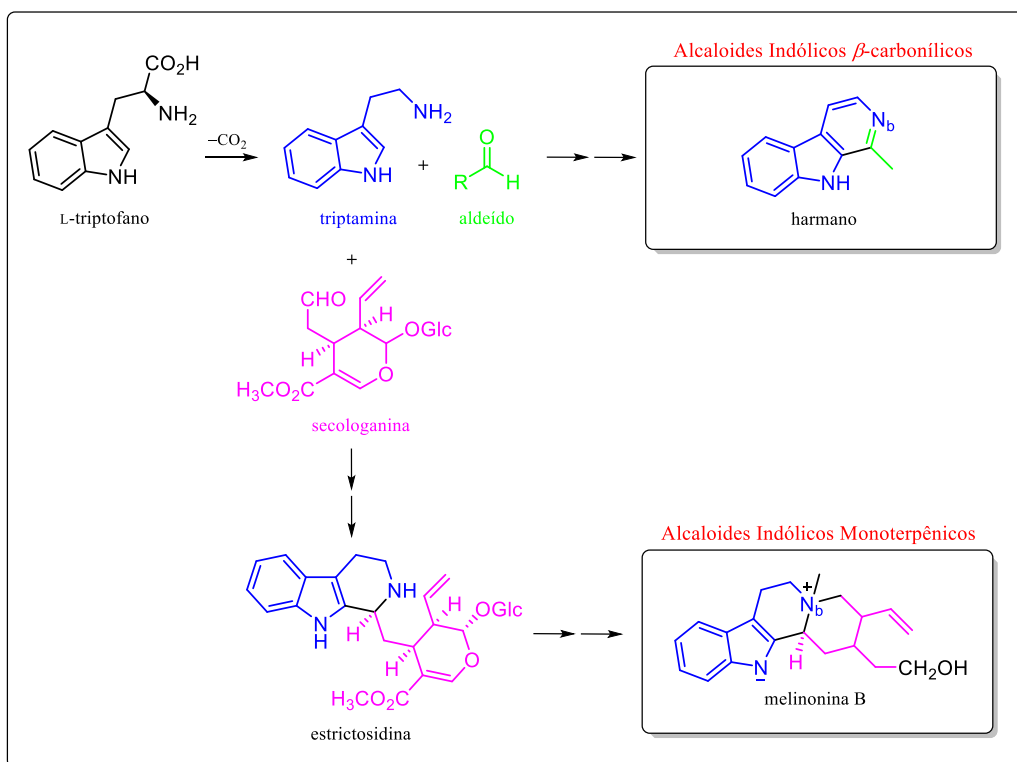


**Figura 6.** Precursores biossintéticos das classes de alcaloides indólicos frequentemente reportadas no gênero *Strychnos* (Adaptado de DEWICK, 2009; STÖCKIGT *et al.*, 2008).

No Quadro 4 são apresentados alguns dos MIAs frequentemente reportados em espécies de *Strychnos*, os quais podem ser organizados em grupos de acordo com seu grau de evolução biogenética, definido pelo número e posição de ciclizações na molécula (OHIRI *et al.*, 1983; PINHEIRO, 2000; SILVA *et al.*, 2005a). Além disso, observa-se que esses alcaloides podem ser subdivididos em três séries distintas em função da substituição em C-3 (Figura 7). Os MIAs da série normal são caracterizados pela presença de um hidrogênio em C-3, enquanto aqueles da série pseudo possuem um grupo hidroxila (–OH) nessa posição. Por outro lado, os alcaloides da série sec-pseudo apresentam uma carbonila em C-3 e um substituinte em N-4 ou N-b, que comumente é uma metila (PINHEIRO, 2000; SILVA *et al.*, 2005a).

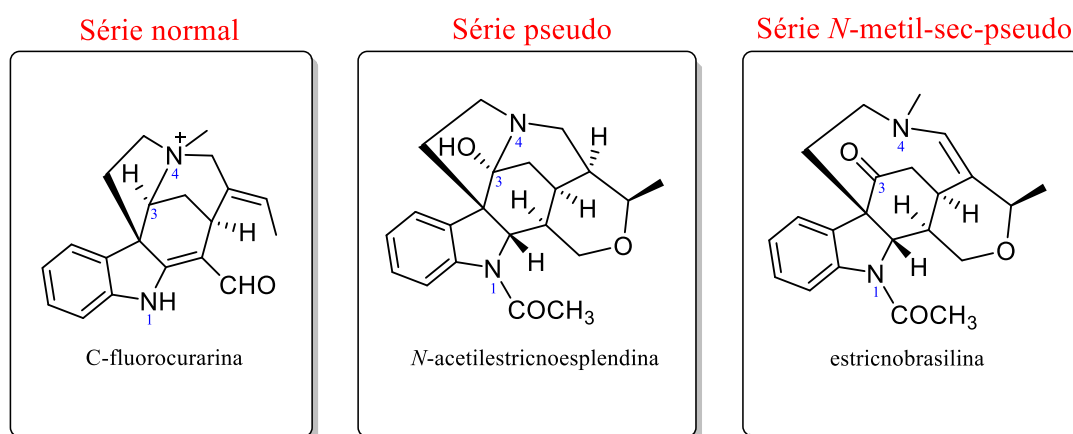
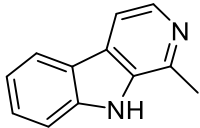
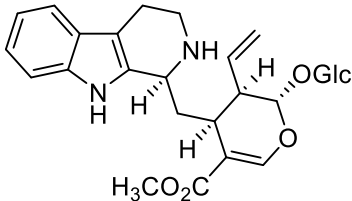
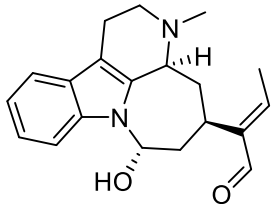
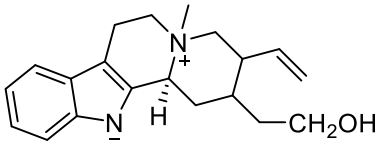
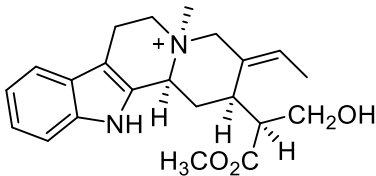
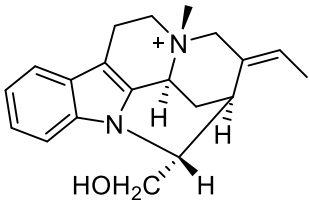
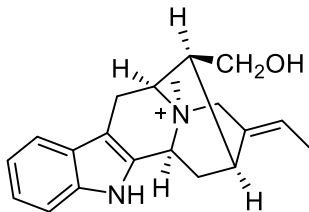
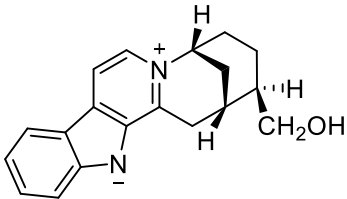


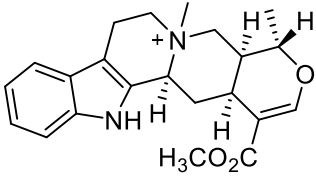
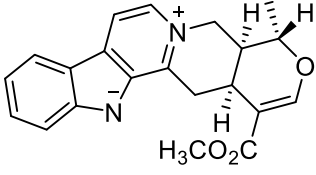
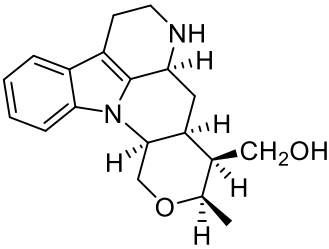
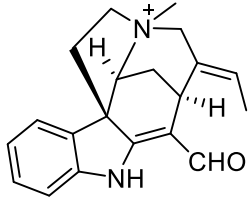
**Figura 7.** Exemplos de MIAs das séries normal, pseudo e sec-pseudo reportados no gênero *Strychnos* (Adaptado de OHIRI *et al.*, 1983; PINHEIRO, 2000).

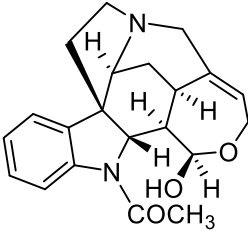
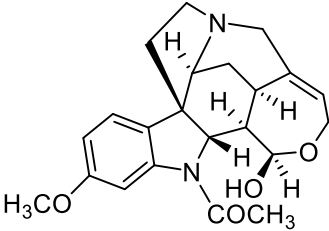
Nas plantas, esses alcaloides desempenham um papel essencial na proteção contra predadores e patógenos, além de oferecerem resistência a estresses abióticos (MATSUURA *et al.*, 2014). Além disso, exibem diversas atividades biológicas, incluindo ação antiplasmódica, anticâncer, antiprotozoária, espasmolítica e relaxante muscular (FRÉDÉRICH *et al.*, 2002; PHILIPPE *et al.*, 2004; PHILIPPE *et al.*, 2005; SAH *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 1993; WRIGHT *et al.*, 1991).

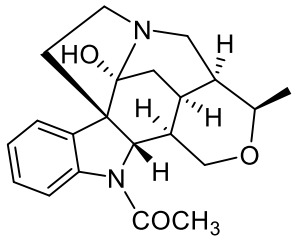
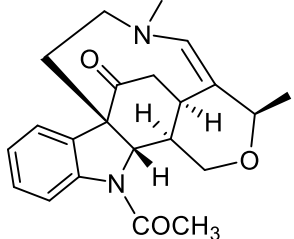
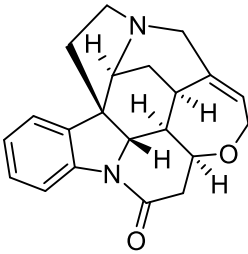
**Quadro 4.** Exemplos de alcaloides indólicos frequentemente reportados no gênero *Strychnos* (BONNET *et al.*, 2022; CHENG *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2016; NEUWINGER, 1998; OHIRI *et al.*, 1983; PINHEIRO, 2000; RAJESH *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2023; SAXTON, 1989; SILVA *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2005a; TITS *et al.*, 1996; TRAVASAROU *et al.*, 2019).

| Grupo                | Tipo/Alcaloide                | Estrutura                                                                            | Espécies                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                             |                                                                                       |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                      |                               |                                                                                      | Africanas                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Asiáticas                   | Americanas                                                                            |
| $\beta$ -carbolínico | Harmano/Harmano               |     | <i>S. usambarensis</i> Gilg ex Engl.                                                                                                                                                                                                                                                                | <i>S. cathayensis</i> Merr. | <i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.                                                    |
| I                    | Glicoalcaloide/Estrictosidina |    | <i>S. mellodora</i> S.Moore                                                                                                                                                                                                                                                                         | -                           | <i>S. amazonica</i> Krukoff<br><i>S. peckii</i> B.L.Rob.                              |
| II                   | Acagerina/Acagerina           |    | <i>S. barteri</i> Soler.<br><i>S. camptoneura</i> Gilg & Busse<br><i>S. dale</i> De Wild.<br><i>S. decussata</i> (Pappe) Gilg<br><i>S. elaeocarpa</i> Gilg ex Leeuwenb.<br><i>S. floribunda</i> Gilg<br><i>S. nigrimana</i> Baker<br><i>S. spinosa</i> Lam.<br><i>S. usambarensis</i> Gilg ex Engl. | <i>S. vanprukii</i> Craib   | <i>S. gardneri</i> A.DC.<br><i>S. jobertiana</i> Baill.<br><i>S. parvifolia</i> A.DC. |
|                      | Corinante/Melinonina B        |  | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | -                           | <i>S. melinoniana</i> Baill.                                                          |

|     |                         |                                                                                      |                                                                          |                               |                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | Corinante/Diplocelina   |    | <i>S. gossweileri</i> Exell                                              | -                             | -                                                                                                                                                                                                                                  |
| III | Mavacurina/C-Mavacurina |     | <i>S. scheffleri</i> Gilg<br><i>S. variabilis</i> De Wild.               | <i>S. nux-vomica</i> L.       | <i>S. amazonica</i> Krukoff<br><i>S. divaricans</i> Ducke<br><i>S. froesii</i> Ducke<br><i>S. macrophylla</i> Barb.Rodr.<br><i>S. melinoniana</i> Baill.<br><i>S. parvifolia</i> A.DC.<br><i>S. toxifera</i> R.H.Schomb. ex Lindl. |
|     | Macusina/Macusina B     |     | <i>S. decussata</i> (Pappe) Gilg<br><i>S. usambarensis</i> Gilg ex Engl. | <i>S. ignatii</i> P.J.Bergius | <i>S. amazonica</i> Krukoff<br><i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.<br><i>S. toxifera</i> R.H.Schomb. ex Lindl.                                                                                                                      |
|     | Ioimbina/Melinonina E   |  | -                                                                        | -                             | <i>S. melinoniana</i> Baill.                                                                                                                                                                                                       |

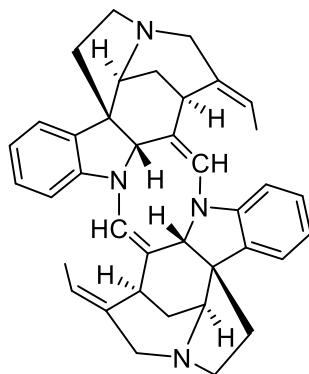
|    |                                            |                                                                                    |                                                                   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Ajmalicina/Melinonina A                    |   | -                                                                 | - | <i>S. melinoniana</i> Baill.                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|    | Ajmalicina/Alstonine                       |   | <i>S. camptoneura</i> Gilg & Busse<br><i>S. gossweileri</i> Exell | - | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | Estricnohirsutina/<br>Estricnohirsutina    |   | -                                                                 | - | <i>S. hirsuta</i> Spruce ex Benth.                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| IV | Retulina/Série normal/<br>C-Fluorocurarina |  | <i>S. usambarensis</i> Gilg ex Engl.                              | - | <i>S. divaricans</i> Ducke<br><i>S. mitscherlichii</i> M.R.Schomb.<br>var. <i>mitscherlichii</i><br><i>S. mitscherlichii</i> var.<br><i>pubescentior</i> Sandwith<br><i>S. parvifolia</i> A.DC.<br><i>S. solimoesana</i> Krukoff<br><i>S. tomentosa</i> Benth.<br><i>S. trinervis</i> (Vell.) Mart. |

|  |                                                       |                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>Diabolina/Série normal/<br/>Diabolina</p>          |   | <p><i>S. afzelii</i> Gilg<br/><i>S. henningsii</i> Gilg<br/><i>S. potatorum</i> L.f.</p>                                                                                                                                   | <p><i>S. cathayensis</i> Merr.<br/><i>S. ignatii</i> P.J.Bergius</p> | <p><i>S. castelnaeana</i> Baill.<br/><i>S. chlorantha</i> Progel<br/><i>S. diabolii</i> Sandwith<br/><i>S. aff. darienensis</i> Seem.<br/><i>S. erichsonii</i> R.H.Schomb. ex Progel<br/><i>S. fendleri</i> Sprague &amp; Sandwith<br/><i>S. froesii</i> Ducke<br/><i>S. jobertiana</i> Baill.<br/><i>S. panamensis</i> Seem.<br/><i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.<br/><i>S. rondeletiioides</i> Spruce ex Benth.<br/><i>S. solerederi</i> Gilg<br/><i>S. solimoesana</i> Krukoff</p> |
|  | <p>Diabolina/Série normal/<br/>11-Metoxidiabolina</p> |  | <p><i>S. angolensis</i> Gilg<br/><i>S. dolichothyrsa</i> Gilg ex Onochie &amp; Hepper<br/><i>S. henningsii</i> Gilg<br/><i>S. malacoclados</i> C.H.Wright<br/><i>S. spinosa</i> Lam.<br/><i>S. urceolata</i> Leeuwenb.</p> | <p><i>S. cathayensis</i> Merr.</p>                                   | <p><i>S. amazonica</i> Krukoff<br/><i>S. brachiata</i> Ruiz &amp; Pav.<br/><i>S. aff. darienensis</i> Seem.<br/><i>S. gardneri</i> A.DC.<br/><i>S. medeola</i> Sagot ex Progel<br/><i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.<br/><i>S. romeu-belenii</i> Krukoff &amp; Barneby<br/><i>S. rubiginosa</i> A.DC.</p>                                                                                                                                                                              |

|    |                                                                              |                                                                                    |                                                                                                        |                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                |
|----|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| V  | Espermoestricnina/<br>Série pseudo/<br><i>N</i> -acetilestricnoesplendina    |   | <i>S. scheffleri</i> Gilg                                                                              | -                                                                                                                                   | <i>S. fendleri</i> Sprague & Sandwith                                                                                                                          |
|    | Espermoestricnina/<br>Série <i>N</i> -metil-sec-pseudo/<br>Estricnobrasilina |   | <i>S. myrtoides</i> Gilg & Busse<br><i>S. scheffleri</i> Gilg<br><i>S. soubrensis</i> Hutch. & Dalziel | -                                                                                                                                   | <i>S. alvimiana</i> Krukoff & Barneby<br><i>S. brasiliensis</i> (Spreng.) Mart.<br><i>S. mattogrossensis</i> S.Moore<br><i>S. tabascana</i> Sprague & Sandwith |
| VI | Estricnina/Série normal/<br>Estricnina                                       |  | <i>S. densiflora</i> Baill.<br><i>S. icaja</i> Baill.                                                  | <i>S. cathayensis</i> Merr.<br><i>S. ignatii</i> P.J.Bergius<br><i>S. nux-vomica</i> L.<br><i>S. wallichiana</i> Steud.<br>ex A.DC. | <i>S. diaboli</i> Sandwith<br><i>S. panamensis</i> Seem.                                                                                                       |

VII\*

Retulina/  
Bisnordihidrotoxiferina

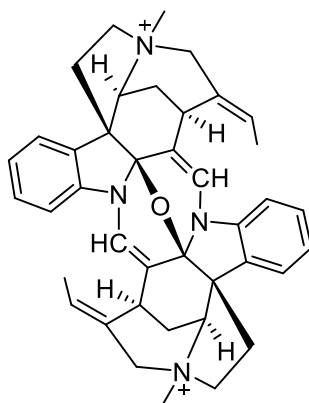


*S. afzelii* Gilg  
*S. decussata* (Pappe) Gilg  
*S. dolichothyrsa* Gilg ex Onochie  
& Hepper  
*S. elaeocarpa* Gilg ex Leeuwenb.  
*S. floribunda* Gilg  
*S. icaja* Baill.  
*S. scheffleri* Gilg  
*S. urceolata* Leeuwenb.  
*S. variabilis* De Wild.

-

*S. divaricans* Ducke  
*S. pseudoquina* A.St.-Hil.  
*S. toxifera* R.H.Schomb. ex  
Lindl.  
*S. trinervis* (Vell.) Mart.

Retulina/C-Curarina I



*S. usambarensis* Gilg ex Engl.

-

*S. divaricans* Ducke  
*S. froesii* Ducke  
*S. gardneri* A.DC.  
*S. guianensis* (Aubl.) Mart.  
*S. solimoesana* Krukoff  
*S. tomentosa* Benth.  
*S. trinervis* (Vell.) Mart.

\*tipos diméricos

Embora o conteúdo alcaloídico das espécies deste gênero tenha sido extensivamente explorado, outras classes igualmente relevantes de produtos naturais, como os flavonoides, permanecem relativamente pouco estudadas.

#### **2.4.1. Flavonoides no gênero *Strychnos* L.**

Existe uma quantidade limitada de investigações fitoquímicas direcionadas à caracterização de flavonoides em espécies do gênero *Strychnos* (Quadro 5). Até o momento, apenas nove espécies foram estudadas: duas espécies africanas (*S. variabilis* De Wild. e *S. spinosa* Lam.) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; ITOH *et al.*, 2005), três espécies asiáticas (*S. cathayensis* Merr., *S. nux-vomica* L. e *S. colubrina* L., sinônimo de *S. wallichiana* Steud. ex A.DC.) (CHENG *et al.*, 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; FRANCIS & SUSEEM, 2022) e quatro espécies americanas (*S. pseudoquina* A.St.-Hil., *S. fendleri* Sprague & Sandwith, *S. aff. darienensis* Seem. e *S. peckii* B.L.Rob.) (LAGE *et al.*, 2013; NICOLETTI *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2024; SILVA *et al.*, 2005b; SILVA *et al.*, 2023; SUÁREZ *et al.*, 2016; TRAVASAROU *et al.*, 2019).

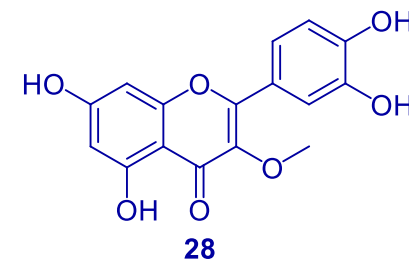
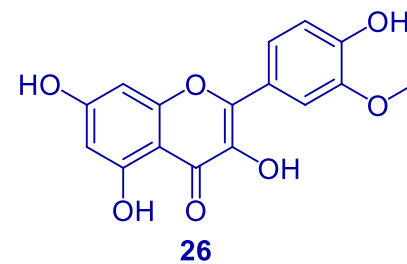
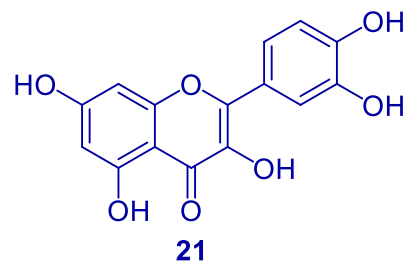
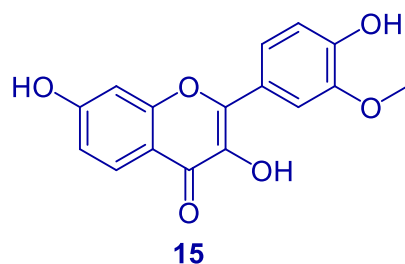
Embora o número de espécies estudadas seja limitado, foram isolados e caracterizados um total de 32 flavonoides, incluindo 4 flavonóis, 2 flavonas, 1 isoflavona, 1 biflavonoide, 1 homoflavonoide, 1 glicosídeo de isoflavona e 22 glicosídeos de flavonóis (Figuras 8 e 9). Essa diversidade de classes e a complexidade estrutural das substâncias identificadas não apenas ressaltam a riqueza química das espécies de *Strychnos*, mas também as posicionam como uma fonte promissora de flavonoides, um potencial ainda pouco explorado. Adicionalmente, destaca-se nesses estudos que as folhas se sobressaem como a principal parte da planta de onde a maioria dessas substâncias foi isolada (Quadro 5).

**Quadro 5.** Espécies do gênero *Strychnos* estudadas fitoquimicamente com ênfase na caracterização do conteúdo flavonoídico.

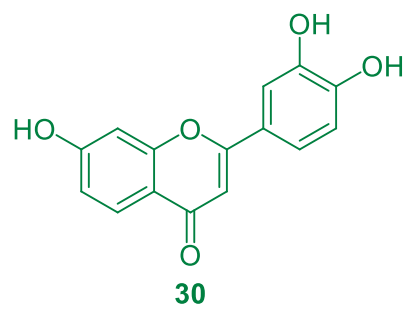
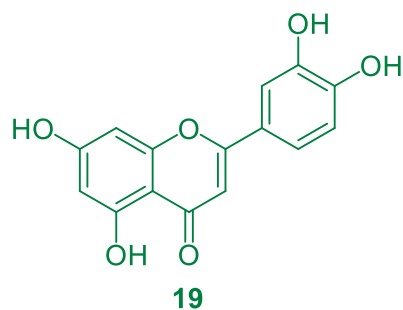
| Espécies  |                               | Substâncias isoladas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Partes estudadas | Referências                          |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| Africanas | <i>S. variabilis</i> De Wild. | Quercetina 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo (1)<br>Quercetina 3- <i>O</i> -robinobiosídeo (2)<br>Variabilosídeo A (3)<br>Variabilosídeo B (4)<br>Variabilosídeo E (5)<br>Variabilosídeo F (6)<br>Quercetina 3- <i>O</i> -robinobiosídeo-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosídeo (7)<br>Kaempferol 3- <i>O</i> -robinobiosídeo (8)<br>Variabilosídeo C (9)<br>Variabilosídeo D (10)<br>Variabilosídeo G (11)<br>Variabilosídeo H (12)<br>Kaempferol 3- <i>O</i> -robinobiosídeo-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosídeo (13) | Folhas           | BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988 |
|           | <i>S. spinosa</i> Lam.        | Trifolina (14)<br>Geraldol (15)<br>Quercetina 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo (1)<br>Astragalina (16)<br>Hirsutrina (17)<br>Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo (18)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Ramos            | ITOH <i>et al.</i> , 2005            |
| Asáticas  | <i>S. cathayensis</i> Merr.   | Luteolina (19)<br>Rutina (20)<br>Quercetina (21)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Caule            | CHENG <i>et al.</i> , 2001           |
|           | <i>S. nux-vomica</i> L.       | Kaempferol 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosídeo (22)<br>Quercitrina (23)<br>Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo (18)<br>Rutina (20)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Folhas           | ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015         |

|            |                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                       |                                                                                                                                                         |
|------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | <i>S. colubrina</i> L. (sinônimo de <i>S. wallichiana</i> Steud. ex A.DC.) | Daidzeína <b>(24)</b><br>5,7-dihidroxi-3-(3-hidroxi-4-(3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-tetrahydro-piran-2-iloxi)fenil)cromen-4-ona <b>(25)</b>                                                                                                   | Cascas e partes aéreas                                | FRANCIS & SUSEEM, 2022                                                                                                                                  |
| Americanas | <i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.                                           | Isoramnetina <sup>a</sup> <b>(26)</b><br>Estricnobiflavona <sup>a,b</sup> <b>(27)</b><br>Rutina <sup>a</sup> <b>(20)</b><br>Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo <sup>a</sup> <b>(18)</b><br>3- <i>O</i> -metil quercetina <sup>b</sup> <b>(28)</b> | <sup>a</sup> Folhas e<br><sup>b</sup> cascas do caule | NICOLETTI <i>et al.</i> , 1984<br>SANTOS <i>et al.</i> , 2024<br>LAGE <i>et al.</i> , 2013<br>SILVA <i>et al.</i> , 2005b<br>SILVA <i>et al.</i> , 2023 |
|            | <i>S. fendleri</i> Sprague & Sandwith                                      | 3- <i>O</i> -metil quercetina <b>(28)</b><br>Kaempferitrina <b>(29)</b>                                                                                                                                                                            | Folhas e caule                                        | SUÁREZ <i>et al.</i> , 2016                                                                                                                             |
|            | <i>S. aff. darienensis</i> Seem.                                           | Luteolina <b>(19)</b><br>3',4',7-trihidroxi-flavona <b>(30)</b><br>3- <i>O</i> -metil quercetina <b>(28)</b><br>Estricnobiflavona <b>(27)</b><br>Minaxina <b>(31)</b>                                                                              | Cascas do caule                                       | TRAVASAROU <i>et al.</i> , 2019                                                                                                                         |
|            | <i>S. peckii</i> B.L.Rob.                                                  | Quercitrina <b>(23)</b><br>Kaempferol 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnopiranosídeo <b>(32)</b>                                                                                                                                                         | Folhas                                                | SANTOS <i>et al.</i> , 2023                                                                                                                             |

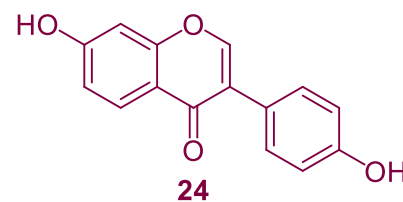
## Flavonol



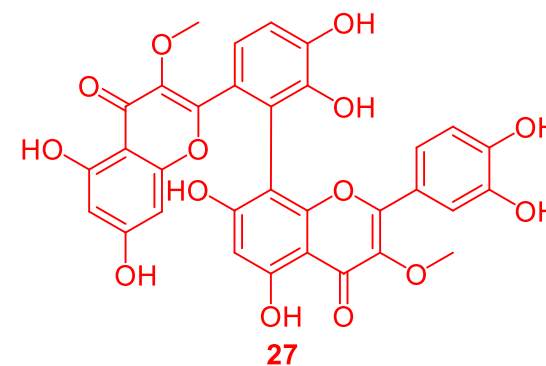
## Flavona



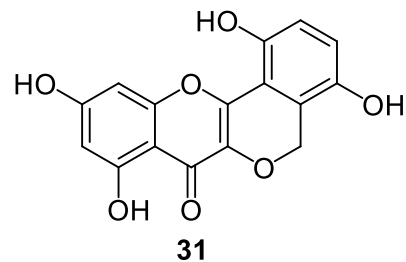
## Isoflavona



## Biflavonoide



## Homoflavonoide



## Glicosídeo de isoflavona

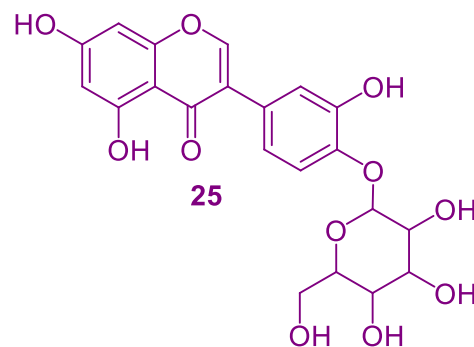


**Figura 8.** Flavonóis, flavonas, isoflavonas, biflavonoides, homoflavonoides e glicosídeos de isoflavonas isolados de espécies do gênero *Strychnos* (CHENG *et al.*, 2001; FRANCIS & SUSEEM, 2022; ITOH *et al.*, 2005; LAGE *et al.*, 2013; NICOLETTI *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 2024; SILVA *et al.*, 2005b; SILVA *et al.*, 2023; TRAVASAROU *et al.*, 2019).

## Glicosídeo de flavonol

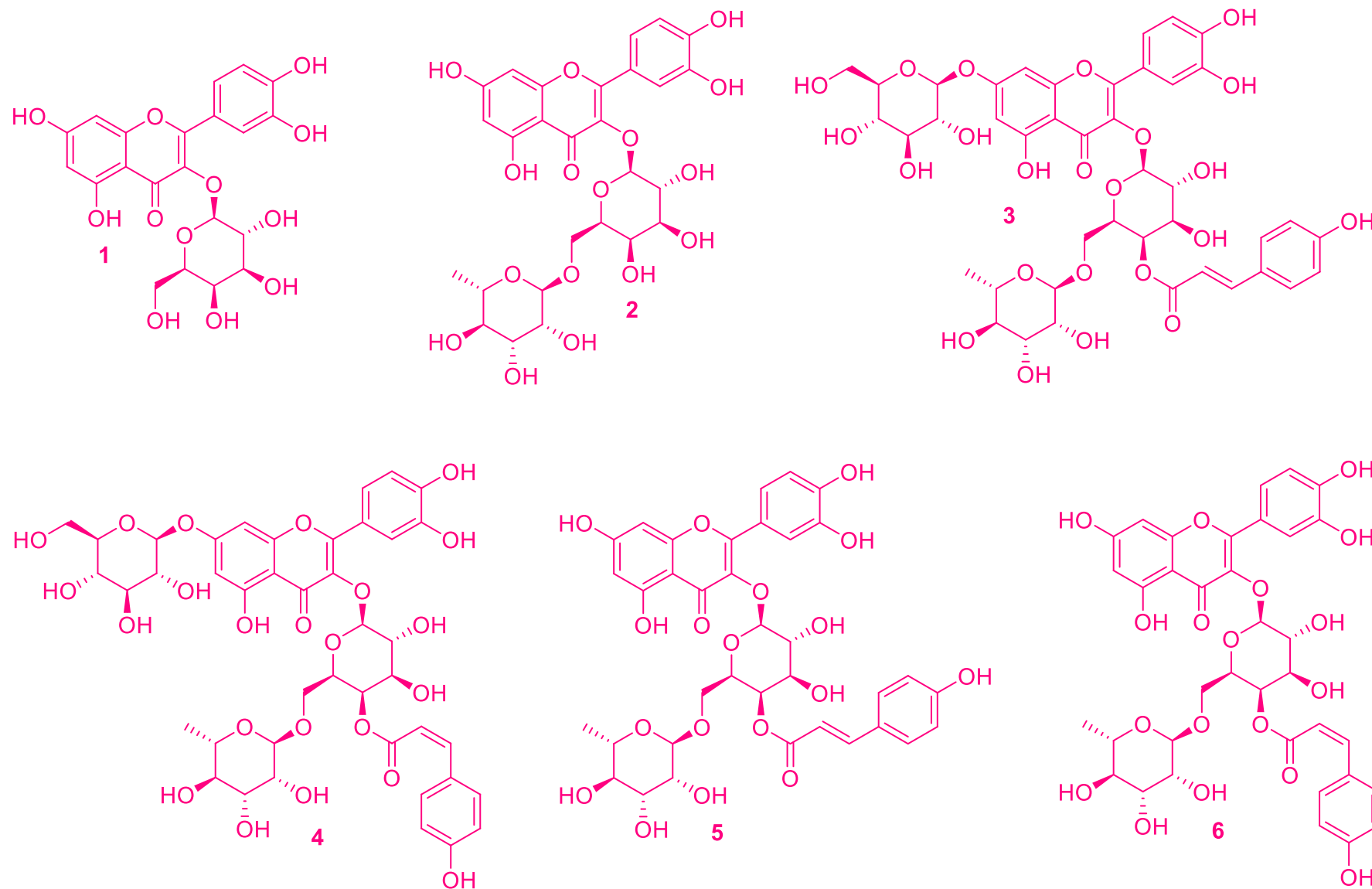


**Figura 9.** Glicosídeos de flavonóis isolados de espécies do gênero *Strychnos* (Parte 1) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; CHENG *et al.*, 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; ITOH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2023; SUÁREZ *et al.*, 2016).

## Glicosídeo de flavonol

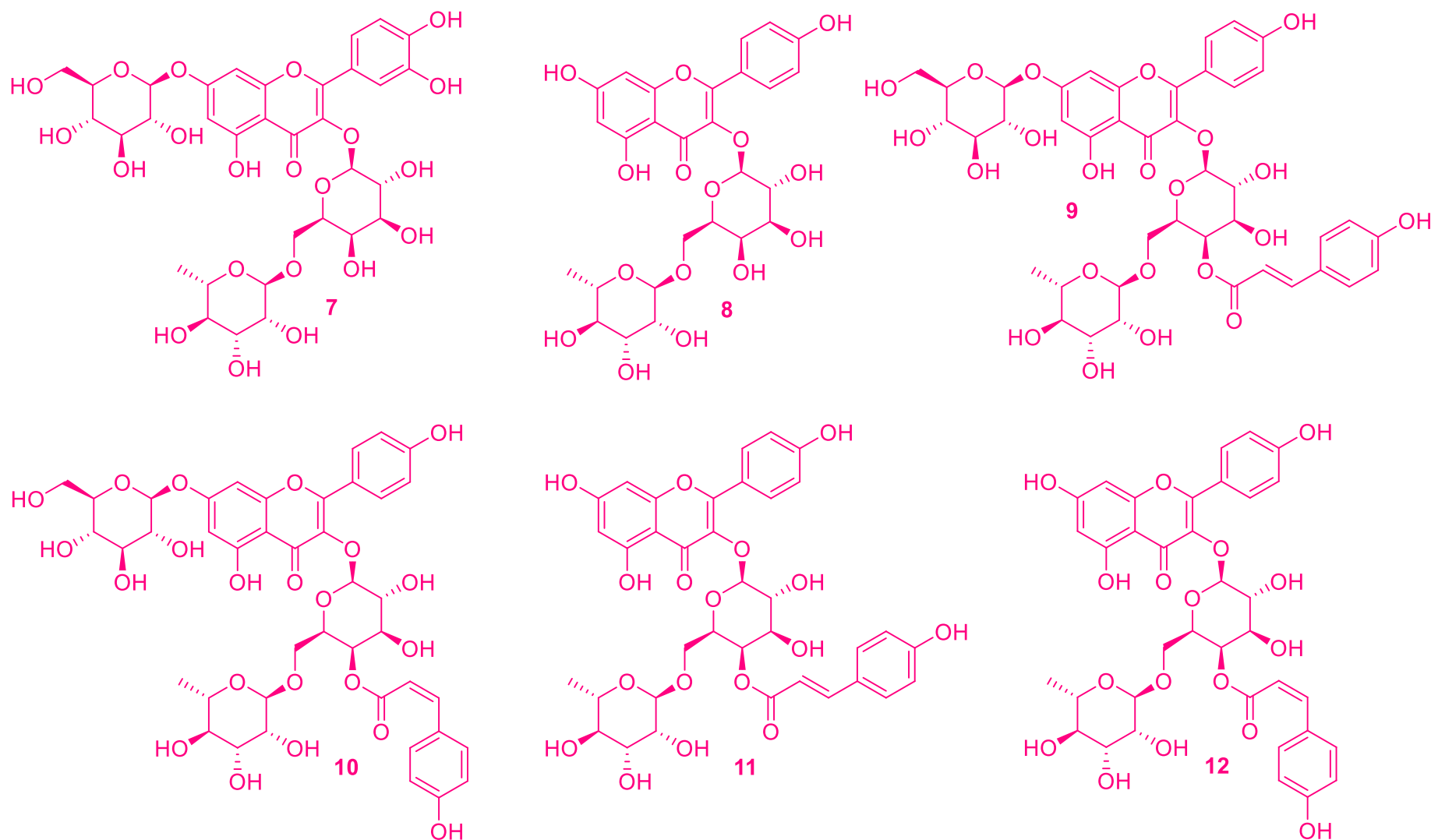


**Figura 9.** Glicosídeos de flavonois isolados de espécies do gênero *Strychnos* (Parte 2) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; CHENG *et al.*, 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; ITOH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2023; SUÁREZ *et al.*, 2016).

## Glicosídeo de flavonol

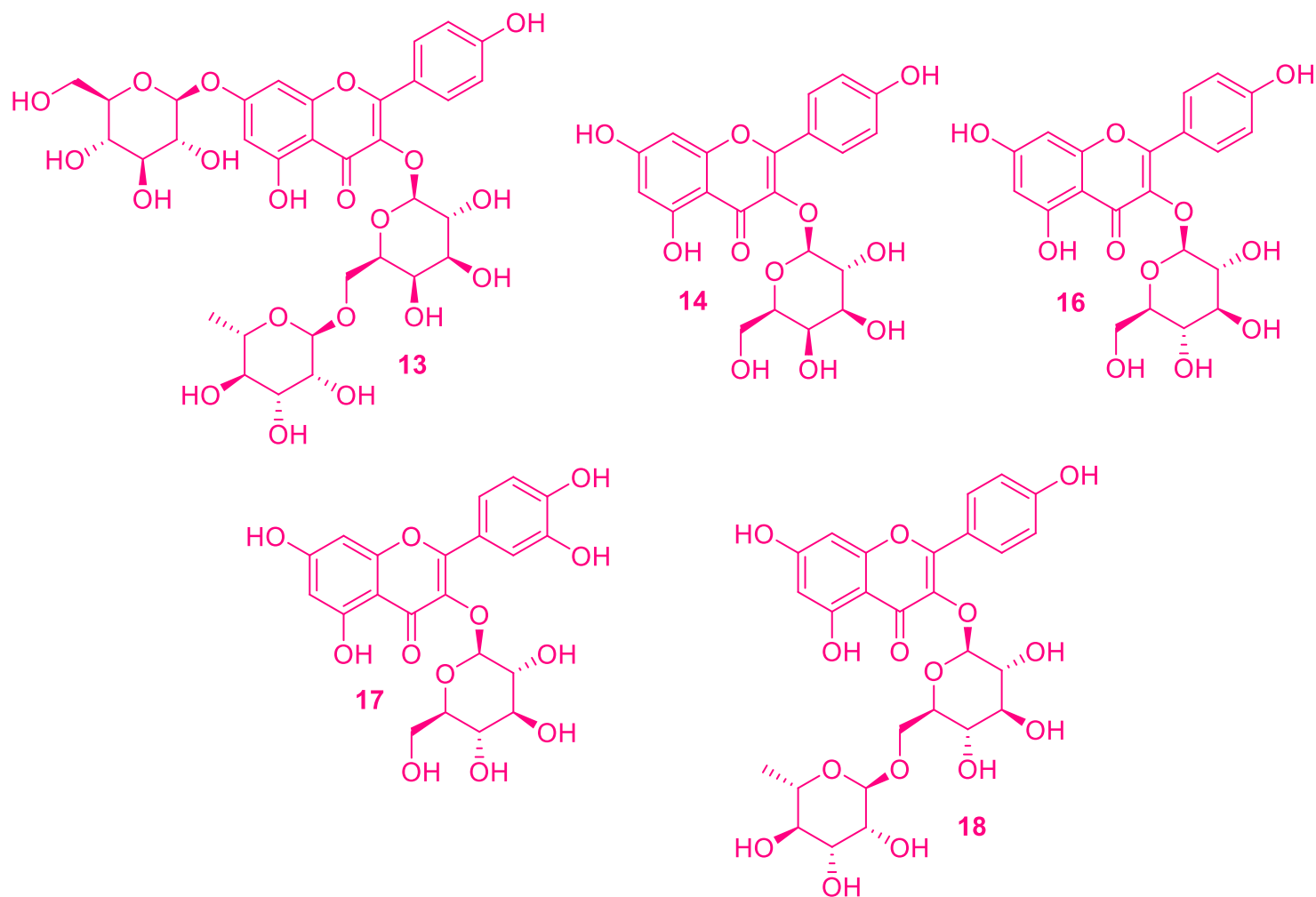


**Figura 9.** Glicosídeos de flavonois isolados de espécies do gênero *Strychnos* (Parte 3) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; CHENG *et al.*, 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; ITOH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2023; SUÁREZ *et al.*, 2016).

## Glicosídeo de flavonol

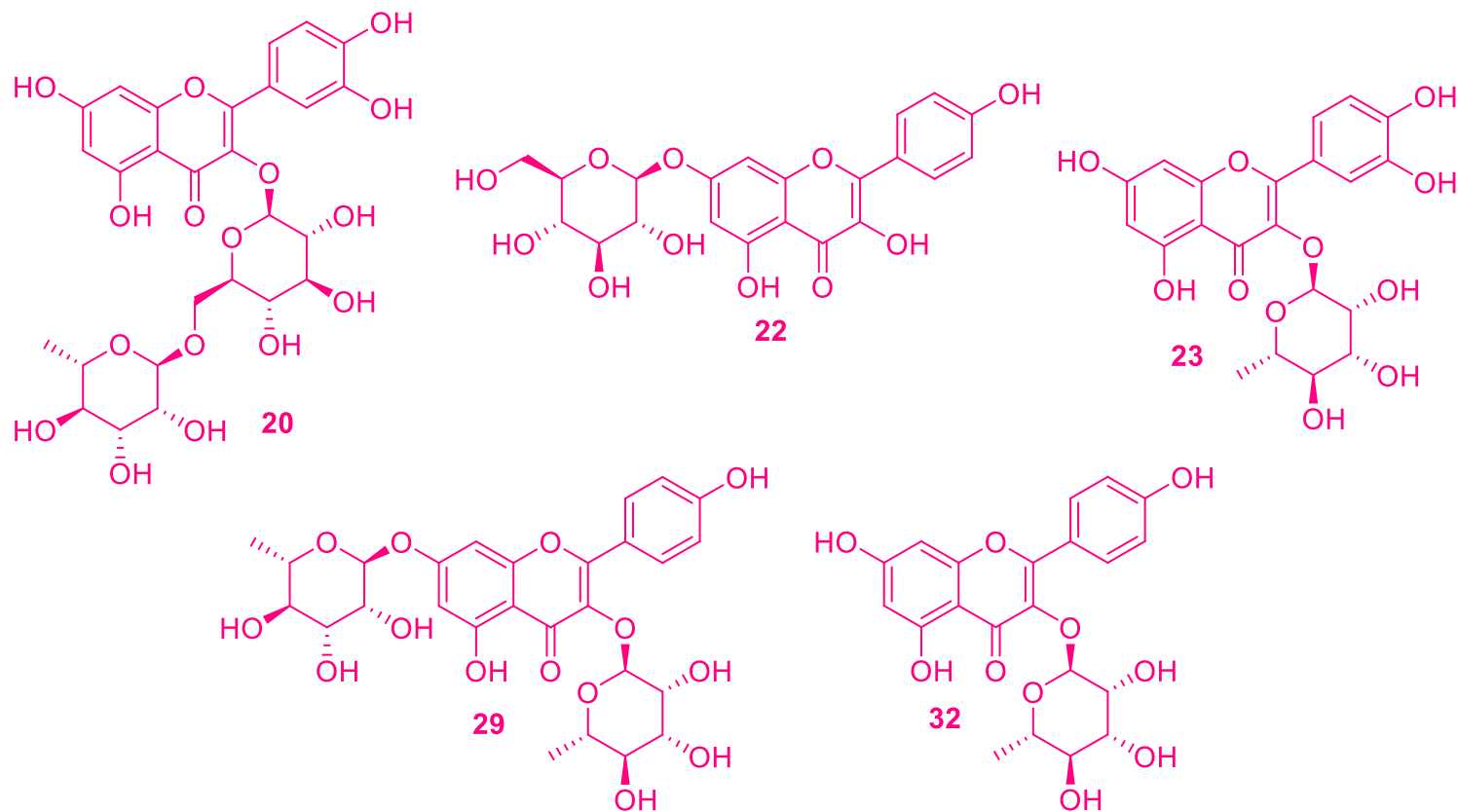


**Figura 9.** Glicosídeos de flavonois isolados de espécies do gênero *Strychnos* (Parte 4) (BRASSEUR & ANGENOT, 1986, 1987, 1988; CHENG *et al.*, 2001; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; ITOH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2023; SUÁREZ *et al.*, 2016).

## 2.5. Flavonoides: classificação e aspectos químicos e biossintéticos

Os flavonoides constituem uma classe diversificada de compostos polifenólicos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. Nas plantas, esses metabólitos podem ser encontrados em diferentes partes do organismo vegetal, com variações de acordo com a espécie, o tecido e a função biológica desempenhada. Além de contribuírem para características relacionadas à coloração, os flavonoides desempenham um papel fundamental na defesa contra estresses bióticos (herbívoros, fungos e bactérias) e abióticos (radiação ultravioleta, frio, seca e metais pesados). Adicionalmente, estão envolvidos na regulação do crescimento celular, alelopatia e atração de polinizadores (KUMAR & PANDEY, 2013; ZHUANG *et al.*, 2023).

Para além de suas funções fisiológicas e ecológicas nas plantas, os flavonoides exibem uma vasta gama de atividades biológicas, tais como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, leishmanicidas e anticancerígenos (BOFF *et al.*, 2016; ELDAHSHAN & ABDEL-DAIM, 2015; LAGE *et al.*, 2015; LEDOUX *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2023; TRAVASAROU *et al.*, 2019), os quais estão diretamente relacionados às suas características estruturais (CHEN *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2021; SHEN *et al.*, 2022).

Quimicamente, os flavonoides consistem de um esqueleto básico de quinze carbonos (C6-C3-C6) formado por dois anéis benzênicos (A e B), que quase sempre estão conectados por meio de um anel heterocíclico contendo um átomo de oxigênio (anel pirano C) (Figura 10) (KUMAR & PANDEY, 2013). Esses metabólitos podem ser divididos em diversas classes, incluindo chalconas, flavanonas, isoflavonoides, flavonas, dihidroflavonois, flavonois, flavandiois, antocianidinas e catequinas, as quais diferem no grau de oxidação e no padrão de substituição do anel C (CHEN *et al.*, 2023). Por outro lado, dentro de uma

classe, os compostos individuais podem apresentar distintos padrões de substituição dos anéis A e B, de modo que as posições C-5, C-7, C-3', C-4' e C-5' são frequentemente hidroxiladas. No entanto, prenilação, metilação e glicosilação também são notadas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KUMAR & PANDEY, 2013).

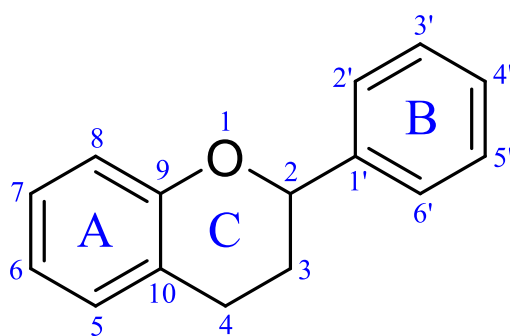


**Figura 10.** Estrutura básica dos flavonoides (Adaptado de CHEN *et al.*, 2023).

Biossinteticamente, os flavonoides são considerados produtos de via metabólica mista, pois combinam elementos das vias do chiquimato e do acetato (DEWICK, 2009). Inicialmente, uma unidade de 4-hidroxicinamoil-CoA (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>), um precursor proveniente da via do chiquimato, e três moléculas de malonil-CoA (C<sub>6</sub>), oriundas da via do acetato, se combinam por meio de uma reação catalisada pela enzima chalcona-sintase (E1). Esse processo resulta na primeira classe de flavonoides, as chalconas, tal como a naringenina-chalcona, caracterizadas como uma classe com ausência do anel C (Figura 11). Em seguida, sob a ação da enzima chalcona isomerase (E2), as chalconas sofrem isomerização para formar as flavanonas (por exemplo, naringenina), uma classe caracterizada pela ausência de insaturação entre as posições C-2 e C-3 no anel C, além da presença de oxidação em C-4 e um centro estereogênico em C-2 nesse anel. Posteriormente, a partir de reações catalisadas por grupos de enzimas específicos, as flavanonas podem dar origem às demais classes de flavonoides (CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999).

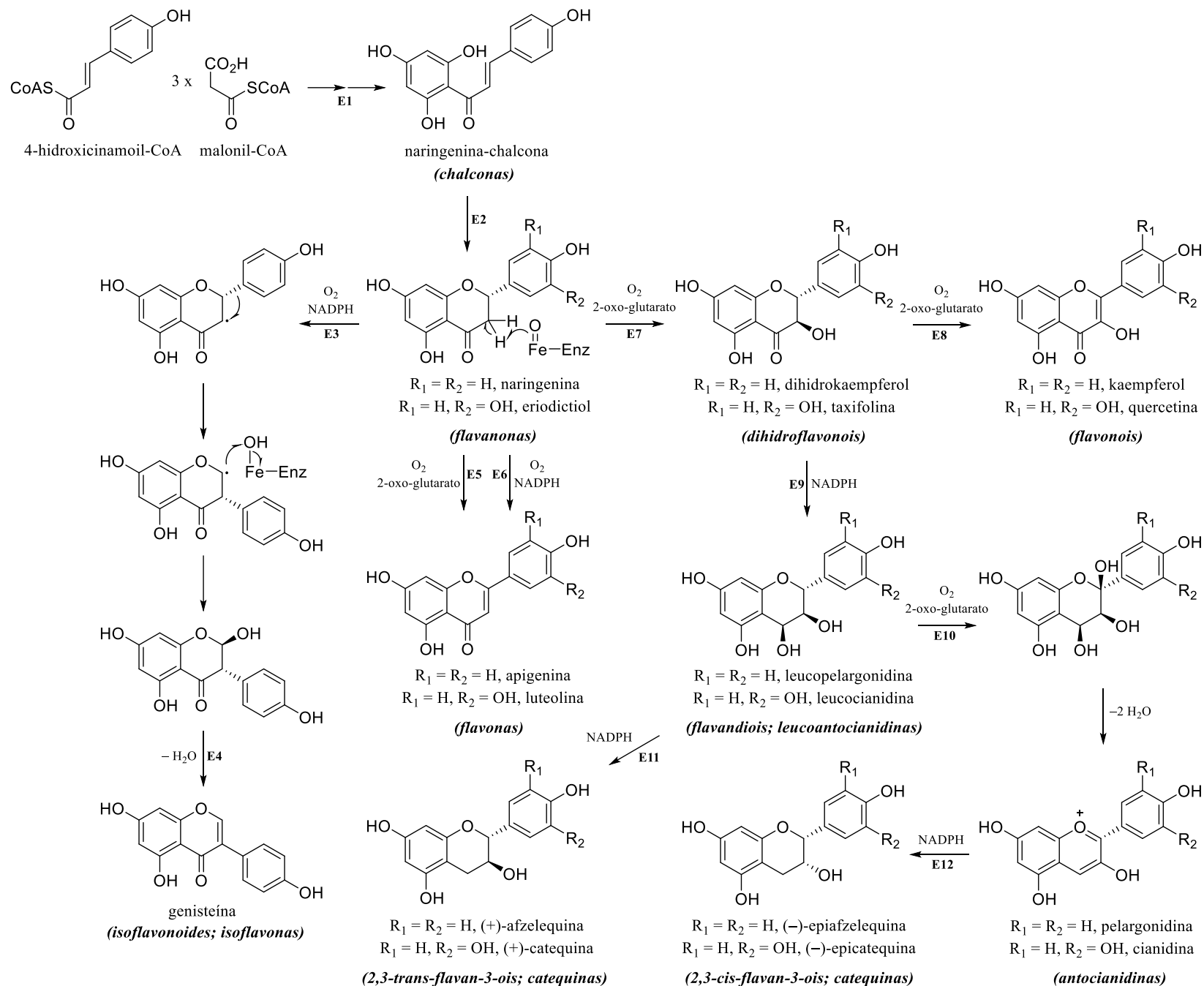


**Figura 11.** Rota biossintética dos flavonoides e suas diversas classes (Adaptado de CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999).

Os isoflavonoides resultam da migração 1,2-arila do anel B das flavanonas acoplada à hidroxilação da posição C-2 no anel C, seguida de uma reação de desidratação. O processo é catalizado pelas enzimas 2-hidroxi-isoflavanona sintase (E3) e 2-hidroxi-isoflavanona desidratase (E4) (Figura 11) (DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999). Essa classe de flavonoides difere das demais pela ligação do anel B à posição C-3 no anel C. Seus representantes mais comuns são as isoflavonas genisteína e daidzeína, classificadas como fitoestrógenos devido às similaridades estruturais com o hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol. Consequentemente, esses metabólitos apresentam afinidade por receptores de estrogênio, exibindo potente atividade estrogênica. Além disso, apresentam elevada atividade antioxidante, inibindo danos ao DNA induzidos por radicais livres (CHEN *et al.*, 2023; HASSAN *et al.*, 2025). Desse modo, as isoflavonas podem auxiliar no tratamento de distúrbios metabólicos, osteoporose, sintomas pós-menopausa, cânceres hormonais, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (CHEN & CHEN, 2021; GONG *et al.*, 2025; HASSAN *et al.*, 2025).

Por outro lado, as flavonas, a classe mais representativa dos flavonoides, são provenientes da oxidação das flavanonas, catalisada por um grupo de enzimas denominadas flavonas-sintases (E5 e E6), resultando em uma ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 no anel C (Figura 11) (DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999). Apigenina e luteolina são exemplos de flavonas amplamente difundidas em grãos, vegetais e ervas medicinais, exibindo atividades antiviral, antifúngica e anti-inflamatória (CHEN *et al.*, 2023; DIAS *et al.*, 2021).

Em contraste, os dihidroflavonois resultam da hidroxilação da posição C-3 no anel C das flavanonas, catalisada pela enzima flavanona-3-hidroxilase (E7). Desse modo, essa classe apresenta dois centros estereogênicos no anel C, sendo um em C-2 e o outro em C-3,

como no caso da taxifolina (dihidroquercetina) (Figura 11). Posteriormente, os flavonóis, como o kaempferol e a quercetina, são formados pela desidrogenação dos dihidroflavonóis, por meio da enzima flavonol sintase (E8), resultando em uma instauração entre as posições C-2 e C-3 no anel C (Figura 11). Por outro lado, os dihidroflavonóis também podem ser convertidos em flavandióis, conhecidos como leucoantocianidinas (por exemplo, a leucopelargonidina). Esse processo ocorre pela redução do grupo carbonila da posição C-4 no anel C, sob a ação da enzima dihidroflavanol 4-redutase (E9). Assim, os flavandióis são caracterizados pela presença de centros estereogênicos em C-2, C-3 e C-4 no anel C (Figura 11) (CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999).

Em seguida, os flavandióis podem então dar origem a outras duas classes de flavonoides, as antocianidinas e os flavan-3-óis. As antocianidinas são formadas sob a ação da enzima leucoantocianidina dioxigenase (E10), sendo caracterizadas por sua estrutura de cátion flavílio (Figura 11) (CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999). Essa classe é responsável pelas cores das flores e frutos, sendo a pelargonidina (cor laranja a rosa) e a cianidina (cor vermelha a magenta) seus principais representantes (DIAS *et al.*, 2021). Por outro lado, os flavan-3-óis ou catequinas, os quais apresentam centros estereogênicos em C-2 e C-3 no anel C, podem ser formados pela redução direta dos flavandióis ou a partir da redução das antocianidinas. Essas vias distintas são catalisadas pelas enzimas leucoantocianidina redutase (E11) e antocianidina redutase (E12), respectivamente, de modo que cada uma resulta em um estereoisômero diferente, como no caso da (+)-catequina e da (-)-epicatequina (Figura 11) (CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009; DIXON & STEELE, 1999).

Embora os flavonoides possam ser encontrados nas plantas na forma livre (agliconas), uma ampla gama ocorre naturalmente em vacúolos de células vegetais ligados

a açúcares (glicosídeos de flavonoides) (CHEN *et al.*, 2023; DEWICK, 2009). O processo de glicosilação aumenta a solubilidade no ambiente celular aquoso, além de ser um modo eficaz de melhorar a estabilidade e diminuir a toxicidade dos flavonoides, modulando suas atividades biológicas (PLAZA *et al.*, 2014; VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG *et al.*, 2018).

Nesse sentido, os glicosídeos de flavonoides presentes na natureza exibem alta complexidade e diversidade estrutural, diferindo em relação aos sítios de glicosilação, número e natureza dos açúcares (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; YANG *et al.*, 2018). A glicosilação é realizada por enzimas denominadas glicosiltransferases, que possuem especificidade regional e estérica para o substrato, sendo classificadas como *O*-glicosiltransferases ou *C*-glicosiltransferases. Essas enzimas catalisam a transferência de uma fração de açúcar para uma aglicona flavonoide, formando uma ligação glicosídica. As *O*-glicosiltransferases catalisam a glicosilação do átomo de oxigênio do grupo hidroxila do núcleo flavonoide por meio da formação de ligação glicosídica O–C. Em contraste, as *C*-glicosiltransferases viabilizam a formação de ligação glicosídica C–C, conectando diretamente o carbono anomérico da fração de açúcar ao carbono da aglicona (KACHLICKI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018).

As *O*-glicosiltransferases estão comumente envolvidas na formação de 7-*O*-glicosídeos de flavanonas, isoflavonas, flavonas, flavonois e flavan-3-óis; 3-*O*-glicosídeos de flavonois, flavan-3-óis e antocianidinas; e 5-*O*-glicosídeos de antocianidinas (Figura 12). No entanto, a *O*-glicosilação também pode ocorrer nas posições C-6, C-8 (anel A) e C-4' (anel B) (KACHLICKI *et al.*, 2016; PLAZA *et al.*, 2014; VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG *et al.*, 2018). Os *O*-glicosídeos de flavonoides mais abundantes são os derivados de

flavonois, especialmente aqueles relacionados às agliconas kaempferol e quercetina (YANG *et al.*, 2018).

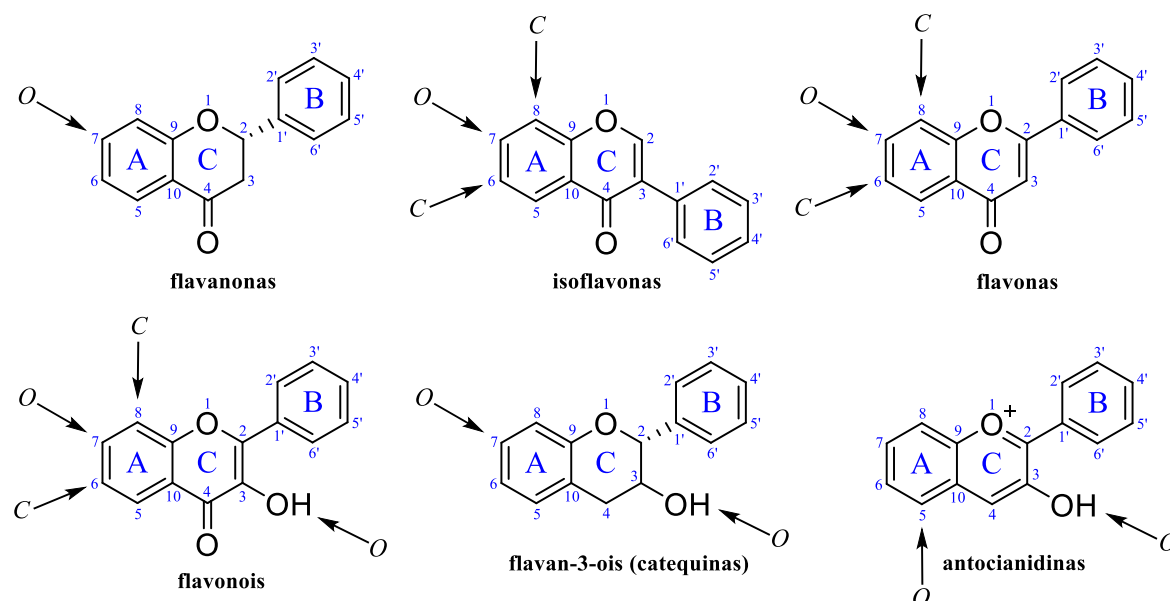


**Figura 12.** Principais posições de *O*- e *C*-glicosilação nas diferentes classes de flavonoides (Adaptado de KACHLICKI *et al.*, 2016; PLAZA *et al.*, 2014; VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG *et al.*, 2018).

Por outro lado, as *C*-glicosiltransferases catalisam principalmente a *C*-glicosilação nas posições C-6 e/ou C-8 (anel A) das unidades agliconas (Figura 12). Embora *C*-glicosídeos de isoflavonas, flavonois e chalconas tenham sido reportados, os derivados de flavonas são os mais comuns, com apigenina e luteolina sendo as agliconas mais amplamente distribuídas (KACHLICKI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018).

Além disso, algumas glicosiltransferases podem catalisar glicosilações adicionais nas frações de açúcar ou aglicona dos glicosídeos de flavonoides, resultando em di-, tri- ou tetraglicosídeos. Desse modo, ambos os tipos de ligações glicosídicas podem ser observados simultaneamente em uma aglicona, como no caso de *O,C*-diglicosídeos. Adicionalmente, é comum a acilação com ácidos alifáticos ou aromáticos na fração glicídio (KACHLICKI *et al.*, 2016; VASUDEVAN & LEE, 2020; YANG *et al.*, 2018).

Em relação à natureza da fração de açúcar dos glicosídeos de flavonoides, glicose (hexose) e ramnose (desoxihexose) são os monossacarídeos mais comumente encontrados, seguidos por galactose (hexose), xilose e arabinose (pentoses). Em contraste, manose e frutose (hexoses), juntamente com apiose (pentose) são consideradas raras. No caso dos dissacarídeos, rutinose ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) e neohesperidose ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) são frequentemente descritas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018).

## **2.6. Espectrometria de massas (MS) aplicada ao estudo de flavonoides em matrizes vegetais**

Nos últimos anos, abordagens baseadas em espectrometria de massas (MS), como a espectrometria de massas por injeção direta (DI-MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), têm se mostrado ferramentas eficazes para a caracterização química de matrizes complexas, como extratos de plantas, facilitando a anotação de metabolitos conhecidos (desreplicação) e direcionando o isolamento de novas substâncias potencialmente bioativas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2001; VILLIERS *et al.*, 2016).

Devido à relevância estrutural e farmacológica dos flavonoides, foram realizados estudos extensivos buscando elucidar as vias de fragmentação de seus glicoconjugados e agliconas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Para a análise, técnicas de ionização *soft*, como a ionização por *eletrospray* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI), são frequentemente utilizadas. Contudo, o uso de APCI associado ao modo de polaridade negativo se destaca por sua maior sensibilidade para essa classe de compostos (KACHLICKI *et al.*, 2016; RIJKE *et al.*, 2003). Além disso, embora a utilização de diferentes analisadores de massas possa acarretar variações nos padrões de

fragmentação e nas intensidades relativas dos íons produto, os espectros de fragmentação obtidos por dissociação induzida por colisão (CID) de moléculas desprotonadas têm se mostrado particularmente úteis para a triagem de glicosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, Domon e Costello (1988) introduziram um sistema de nomenclatura amplamente utilizado para designar os íons produtos provenientes de glicosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Conforme apresentado nas Figuras 13A e 13B, os rótulos  $X_j$ ,  $Y_j$  e  $Z_j$  ( $j \geq 0$ ) referem-se a íons fragmentos que contêm a aglicona, sendo o índice  $j$  referente ao número da ligação interglicosídica clivada, contada a partir da porção aglicona. Por outro lado, os rótulos  $A_i$ ,  $B_i$  e  $C_i$  ( $i \geq 1$ ) referem-se a íons fragmentos que retêm a carga na porção carboidrato, onde o índice  $i$  indica a unidade de açúcar que está sendo clivada, contada a partir da porção terminal de açúcar. Além disso, os íons fragmentos resultantes de clivagens cruzadas dos anéis de açúcar são rotulados como  $^{k,l}X_j$  ( $j \geq 0$ ) e  $^{k,l}A_i$  ( $i \geq 1$ ), onde os índices  $k$  e  $l$  denotam quais ligações foram quebradas dentro do anel de açúcar (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a análise por  $MS^3$  do íon aglicona livre dos glicoconjugados fornece informações sobre o número e o tipo de substituintes nos anéis A e B. Nesse caso, segundo a nomenclatura proposta por Ma *et al.* (1997), os rótulos  $^{ij}A_0$  e  $^{ij}B_0$  correspondem a íons fragmentos derivados da aglicona que contêm os anéis A e B intactos, respectivamente, com os índices  $i$  e  $j$  indicando quais ligações do anel C foram clivadas (Figuras 13C e 13D) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

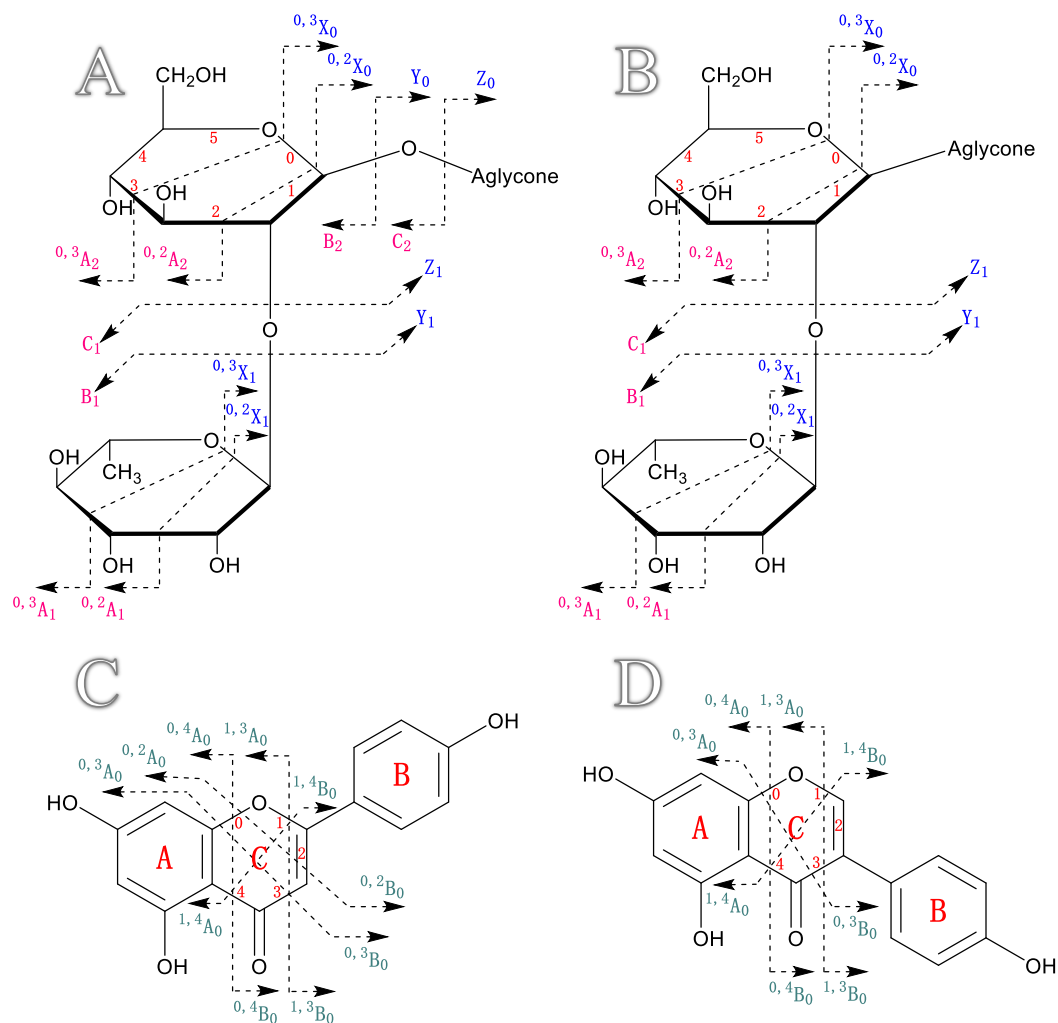


**Figura 13.** Nomenclatura de íons fragmentos comumente aplicada a (A) *O*-diglicosídeos, (B) *O*,*C*-diglicosídeos, (C) agliconas de flavona e (D) agliconas de isoflavona (Adaptado de CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; WOJAKOWSKA *et al.*, 2013).

Devido às diferenças entre o padrão de fragmentação de *C*- e *O*-glicosídeos de flavonoides, algumas regras comuns possibilitam a distinção entre o tipo de glicosilação e fornecem informações a respeito da natureza das unidades de açúcar e aglicona (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Os espectros de MS/MS de *C*-glicosídeos exibem íons fragmentos característicos resultantes da clivagem cruzada dos anéis de açúcar, como para *C*-hexosídeos:  $[M-H-90]^-$  ( $^{0,3}X_0^-$ ) e  $[M-H-120]^-$  ( $^{0,2}X_0^-$ ); *C*-desoxihexosídeos:  $[M-H-74]^-$  ( $^{0,3}X_0^-$ ) e  $[M-H-104]^-$  ( $^{0,2}X_0^-$ ); e *C*-pentosídeos:  $[M-H-60]^-$  ( $^{0,3}X_0^-$ ) e  $[M-H-90]^-$  ( $^{0,2}X_0^-$ ) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016).

Nesse caso, os íons  $^{0,3}X_0^-$  e  $^{0,2}X_0^-$ , correspondentes a  $[Aglicona-H+72]^-$  e  $[Aglicona-H+42]^-$ , respectivamente, permitem a identificação da  $m/z$  da aglicona desprotonada (KACHLICKI *et al.*, 2016). Em contraste, os espectros de MS/MS de *O*-glicosídeos exibem íons fragmentos resultantes da perda da unidade de açúcar inteira, como para *O*-hexosídeos  $[M-H-162]^-$  ( $Y_0^-$ ), *O*-deoxihexosídeos  $[M-H-146]^-$  ( $Y_0^-$ ) e *O*-pentosídeos  $[M-H-132]^-$  ( $Y_0^-$ ). Esses íons  $Y_0^-$  são correspondentes à aglicona desprotonada (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; WOJAKOWSKA *et al.*, 2013).

Por outro lado, no caso de *O*-diglicosídeos de flavonoides, os espectros de MS/MS evidenciam padrões de fragmentação que permitem a distinção entre ligações interglicosídicas do tipo 1→6 e 1→2. Em geral, os espectros da maioria dos *O*-diglicosídeos são caracterizados pela predominância de íons  $Y_0^-$ , resultantes da perda da unidade dissacarídica inteira. Entretanto, espectros de MS/MS de flavonoides que contêm dissacarídeos com ligação 1→2 exibem, adicionalmente, íons  $Z_1^-$  em elevada abundância, os quais se originam da clivagem da unidade de açúcar terminal. Em contraste, nos espectros de substâncias cujas unidades de açúcar estão conectadas por ligações 1→6, tais íons estão ausentes ou são observados com baixa intensidade relativa. Como exemplo, para *O*-neohesperidosídeos (ramnosil-(1→2)-glicosídeos), observam-se como principais íons fragmentos  $[M-H-164]^-$  ( $Z_1^-$ ) e  $[M-H-308]^-$  ( $Y_0^-$ ), enquanto para *O*-rutinosídeos (ramnosil-(1→6)-glicosídeos), detecta-se exclusivamente o íon  $[M-H-308]^-$  ( $Y_0^-$ ) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; WOJAKOWSKA *et al.*, 2013).

Em relação aos *O,C*-diglicosídeos, o primeiro estágio de fragmentação envolve predominantemente a quebra das ligações *O*-glicosídicas, e seus espectros de MS/MS exibem íons fragmentos como  $Y_1^-$  e/ou  $Z_1^-$ . Esse comportamento é atribuído à maior estabilidade das ligações glicosídicas C-C, que permanecem intactas durante a CID.

Consequentemente, também são observados os íons fragmentos gerados a partir da clivagem cruzada dos anéis de açúcar, como  $^{0,2}X_0^-$  e/ou  $^{0,2}X_1^-$  (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016; WOJAKOWSKA *et al.*, 2013).

No entanto, essas fragmentações podem não fornecer informações estruturais definitivas, particularmente no caso das pentoses, cujas estruturas podem variar significativamente, incluindo açúcares como xilose, arabinose e apiose (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Essa limitação ressalta a importância de empregar estratégias de isolamento para obter substâncias puras, permitindo uma elucidação estrutural abrangente.

## **2.7. Cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) aplicada ao isolamento de produtos naturais**

A purificação de produtos naturais, particularmente compostos polares como glicosídeos, enfrenta dois grandes desafios: (1) a coexistência de compostos estruturalmente análogos nos extratos de plantas e (2) as limitações da cromatografia líquida unidimensional (1D-LC) em resolver sutis diferenças de polaridade, estereoquímica e padrões de glicosilação (DANG *et al.*, 2025; KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2017). Por exemplo, *C*- e *O*-glicosídeos de flavonoides isoméricos frequentemente coeluem em sistemas de modo reverso (RP, do inglês *reversed-phase*), enquanto isoflavonas podem requerer seletividade ortogonal para uma separação eficaz (KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; VERARDO *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2017).

Diferentes estratégias em cromatografia líquida (LC) podem ser utilizadas para direcionar o isolamento de metabólitos de um extrato vegetal. Além disso, o avanço na química de fase estacionária das colunas cromatográficas permitiu a ampliação da escala de separações analíticas para semipreparativas ou preparativas com alta seletividade e

resolução. Nesse sentido, a cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) surgiu como uma técnica poderosa para enfrentar os desafios inerentes ao isolamento de produtos naturais, proporcionando maior capacidade de separação por meio da combinação de mecanismos de seletividade ortogonais (DANG *et al.*, 2025; KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014).

Existem dois modos principais de 2D-LC: *comprehensive* (LC×LC) e *heart-cutting* (LC-LC). No modo *comprehensive*, toda a amostra é analisada em ambas as dimensões. Em contraste, no modo *heart-cutting*, frações-alvo isoladas da primeira dimensão (<sup>1</sup>D) são submetidas a uma nova separação em uma segunda dimensão (<sup>2</sup>D) (KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2017). Além disso, as duas etapas de separação cromatográfica podem ser realizadas *offline* (exigindo intervenção manual) ou *online* (automatizada). Para fins preparativos, a abordagem *offline heart-cutting* promove práticas sustentáveis e simplifica a instrumentação, eliminando a necessidade de equipamentos complexos (DANG *et al.*, 2025; KRÓL-KOGUS *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2017). Um estudo recente destacou a eficiência dessa abordagem para a separação preparativa de produtos naturais estruturalmente similares, como análogos de C-glicosídeos de flavonas, a partir das folhas de *Ligustrum qianluoenenst* (DANG *et al.*, 2025).

No entanto, uma etapa crítica no desenvolvimento de métodos para 2D-LC é a seleção de colunas apropriadas, que devem apresentar seletividades distintas para garantir a separação ortogonal entre dimensões. Em sistemas de modo reverso, a ortogonalidade da separação é comumente avaliada *a priori* usando o fator de similaridade da coluna ( $F_s$ ) (DOLAN & SNYDER, 2009; LINDSEY *et al.*, 2019; TIRAPELLE *et al.*, 2025). Valores de  $F_s$  superiores a 3 indicam ortogonalidade, enquanto valores de  $F_s$  inferiores a 3 sugerem seletividade equivalente entre as colunas. Esse fator, baseado no modelo de subtração hidrofóbica de Snyder (HSM), é projetado para levar em conta exclusivamente os parâmetros

de seletividade da coluna: hidrofobicidade (**H**), resistência estérica (**S**), acidez da ligação de hidrogênio (**A**), basicidade da ligação de hidrogênio (**B**) e troca catiônica (**C**), sendo este último fortemente dependente do pH (SNYDER *et al.*, 2004). Contudo, além da ortogonalidade teórica, fatores práticos como o modificador orgânico da fase móvel são igualmente importantes. Por exemplo, a acetonitrila leva à seletividade reduzida em fases estacionárias baseadas em doadores  $\pi$ , como no caso de colunas contendo grupos fenil (CROES *et al.*, 2005). Além disso, uma vez que a ortogonalidade é influenciada pelo perfil químico específico da amostra, a avaliação empírica de pares de colunas pode ainda ser necessária para matrizes complexas, ressaltando a importância da avaliação da ortogonalidade *a posteriori* na otimização do método (LINDSEY *et al.*, 2019).

## **2.8. A espécie *Strychnos subcordata* Spruce ex. Benth.**

*Strychnos subcordata* Spruce ex. Benth é uma espécie caracterizada como liana ou arbusto de pequeno porte, sendo encontrada em florestas ombrófilas densas ou áreas de terra-firme na Amazônia (SETUBAL, 2020b). Sua distribuição se entende da Colômbia ao Peru e Norte do Brasil, com ocorrência confirmada nos estados do Amazonas, Amapá e Pará (SETUBAL, 2020b; POWO, 2025a). Nas regiões próximas ao Rio Negro, no Estado do Amazonas, essa espécie é popularmente conhecida como iraryrana (KRUKOFF & MONACHINO, 1942).

Morfologicamente, a espécie apresenta um caule com ramos que variam de esparsamente a densamente pubescentes, apresentando coloração acinzentada, castanha ou castanho-avermelhada. Adicionalmente, destaca-se a presença de gavinhas solitárias. Suas folhas são pequenas, com pecíolos curtos e base subcordada ou arredondada, também pubescentes, especialmente em folhas jovens, que, à medida que amadurecem, podem se

tornar glabrescentes ou não. Suas flores, presentes em número reduzido, possuem coloração branca ou branco-amarelada e são perfumadas. Seus frutos maduros são pequenos, possuem uma casca fina e coriácea, e podem conter de uma a duas sementes de testa crustácea (KRUKOFF & MONACHINO, 1942; SETUBAL, 2020b).

Até o momento, essa espécie permanece fitoquimicamente inexplorada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos* da Região Amazônica por meio da desreplicação e/ou isolamento de substâncias das folhas da espécie *S. subcordata*.

#### 3.2. Específicos

- Investigar o perfil químico do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata* por DI-MS e DI-MS<sup>n</sup>;
- Estabelecer estratégias para o isolamento de novos produtos naturais e/ou substâncias de interesse químico/farmacológico, empregando abordagem baseada em cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) no modo *offline single heart-cutting*;
- Elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio da análise conjunta dos dados de MS e de RMN 1D e 2D;
- Examinar e compreender a retenção das substâncias isoladas e caracterizadas em seis colunas cromatográficas diferentes, bem como destacar o papel de interações moleculares específicas na seletividade cromatográfica para glicosídeos de flavonoides.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Um fluxograma geral que ilustra não apenas o desenvolvimento de estratégias de isolamento por cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) no modo *offline single heart-cutting*, mas também outros passos cruciais no fluxo de trabalho, é apresentado na Figura 14. Inicialmente (I), a fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, rica em glicosídeos de flavonoides, obtida por meio de um protocolo de extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*), foi analisada pela técnica de espectrometria de massas por injeção direta (DI-MS) no modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês *Data-Dependent Acquisition*), utilizando varredura de perda neutra para reconhecer e desreplcar glicosídeos de flavonoides. Em seguida (II), a fração metanólica foi analisada por HPLC-UV e HPLC-MS utilizando seis fases estacionárias diferentes para desenvolver estratégias com o objetivo de isolar cinco glicosídeos de flavonoides, incluindo três substâncias que não puderam ser preliminarmente identificadas a partir das análises por MS. Por fim (III), uma estratégia empregando uma coluna C18 na primeira dimensão (<sup>1</sup>D) e uma coluna bifenil na segunda dimensão (<sup>2</sup>D) foi selecionada para resolver os analitos-alvo. Uma nova substância, juntamente com dois glicosídeos de flavonoides raros contendo uma unidade apiosil terminal, e dois glicosídeos de flavonoides de ocorrência comum, foram devidamente caracterizados estruturalmente por espectroscopia de RMN 1D e 2D e MS.

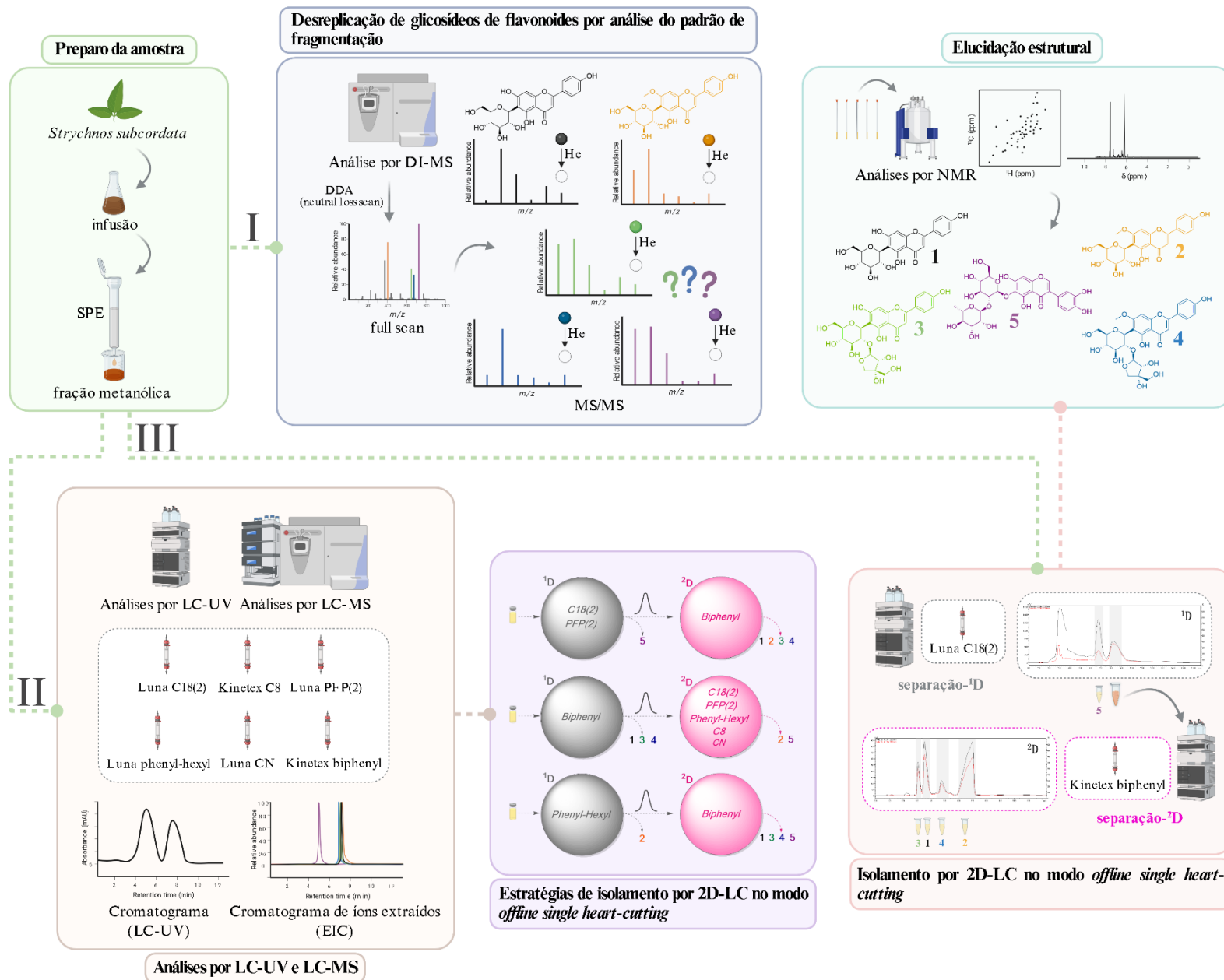


**Figura 14.** Um fluxograma geral ilustrando o isolamento por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting* de uma nova substância e de glicosídeos de flavonoides raros contendo uma unidade apiosil, juntamente com etapas analíticas chave para extração, reconhecimento preliminar e caracterização estrutural dessas substâncias.

## **4.1. Procedimentos experimentais gerais**

### **4.1.1. Métodos cromatográficos**

#### **4.1.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM), localizado na Central Analítica (CA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

As análises por HPLC em escala analítica e semipreparativa foram realizadas em um sistema UFLC<sup>®</sup> (Shimadzu, Columbia, MD, EUA), equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, detector UV SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (25 µL ou 200 µL). Os cromatogramas foram registrados e processados utilizando o software LCSolution 5.92 (Shimadzu, Columbia, MD, EUA). As análises por HPLC em escala analítica também foram realizadas em um cromatógrafo modelo Accela<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os cromatogramas foram registrados e processados utilizando o software Xcalibur<sup>®</sup> 2.0.7 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

Os cartuchos Strata<sup>®</sup> SPE C18-E (55 µm, 100 Å), juntamente com as colunas cromatográficas e suas respectivas pré-colunas (suporte e cartucho da marca SecurityGuard<sup>®</sup>), foram adquiridos da Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, CA, EUA). As principais especificações das colunas e pré-colunas utilizadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Principais especificações das colunas cromatográficas utilizadas e suas respectivas pré-colunas.

| Especificações                       | Coluna                   |                   |                    |                      |                   |                       |                          |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|
|                                      | Luna C18(2) <sup>a</sup> | Kinetex C8        | Luna PFP(2)        | Luna fenil-hexil     | Luna CN           | Kinetex bifenil 100 A | Luna C18(2) <sup>b</sup> |
| <b>Comprimento (mm)</b>              | 150                      | 150               | 150                | 150                  | 150               | 150                   | 250                      |
| <b>Diâmetro interno (mm)</b>         | 4,6                      | 4,6               | 4,6                | 4,6                  | 4,6               | 4,6                   | 10                       |
| <b>Tamanho de poro (Å)</b>           | 100                      | 100               | 100                | 100                  | 100               | 100                   | 100                      |
| <b>Tamanho de partícula (µm)</b>     | 5                        | 5                 | 5                  | 5                    | 5                 | 5                     | 5                        |
| <b>Carga de carbono (%)</b>          | 17,5                     | 8,0               | 11,5               | 17,5                 | 7,0               | 11,0                  | 17,5                     |
| <b>Cartucho da pré-coluna (fase)</b> | C18 <sup>c,d</sup>       | C8 <sup>c,d</sup> | PFP <sup>c,d</sup> | fenil <sup>c,d</sup> | CN <sup>c,d</sup> | fenil <sup>c,d</sup>  | C18 <sup>c,e</sup>       |

<sup>a</sup>utilizada nas análises em escala analítica; <sup>b</sup>utilizada na análise em escala semipreparativa; <sup>c</sup>marca do suporte/cartucho: SecurityGuard; <sup>d</sup>dimensões: 4 mm × 3 mm (comprimento × diâmetro);

<sup>e</sup>dimensões: 10 mm × 10 mm (comprimento × diâmetro)

#### **4.1.2. Métodos espectrométricos e espectroscópicos**

##### **4.1.2.1 Espectrometria de massas (MS)**

As análises por MS foram realizadas no LABCEM, na Central Analítica da UFAM. Os espectros foram registrados em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, modelo LCQ Fleet® (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). A aquisição e o processamento dos dados de MS foram realizados no software Xcalibur® 2.0.7 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

##### **4.1.2.2. Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)**

As análises por HRMS foram realizadas no Separare – Núcleo de Pesquisa em Cromatografia, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os espectros foram registrados em um espectrômetro de massas de alta resolução, do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), modelo Impact HD QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, HB, Alemanha), operando com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A aquisição e o processamento dos dados de HRMS foram realizados no software Data Analysis® 4.3 (Bruker Daltonics, Bremen, HB, Alemanha).

##### **4.1.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

As análises por RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), na Central Analítica da UFAM. Os espectros unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , e NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) e bidimensionais (COSY – *Correlation Spectroscopy*, HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, e J-RES – *J-resolved*) foram adquiridos em um espectrômetro de RMN, modelo AVANCE III HD (Bruker, Karlsruhe, BW, Alemanha), operando a 11,75 T, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus

SmartProbe™) e um gradiente de campo na direção Z. Os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram observados a 500,13 MHz e 125,76 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm relativos aos sinais do tetrametilsilano (TMS) ou aos sinais residuais do solvente não deuterado, e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em hertz (Hz). Todos os experimentos foram realizados à temperatura de 25 °C. A aquisição dos espectros de RMN foi realizada no software TopSpin 3.6.3 (Bruker, Karlsruhe, BW, Alemanha), e o processamento dos dados, no software ACD/NMR Processor 12.0 (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canadá).

#### **4.1.3. Outros equipamentos**

Um moinho analítico, modelo Q298A (Quimis, Diadema, SP, Brasil), foi utilizado para moer o material vegetal. Uma balança analítica, modelo M214A (BEL Engineering, Monza, MB, Itália), foi utilizada para pesagem. Um liofilizador, modelo Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ, Osterode am Harz, NI, Alemanha), foi empregado para a liofilização. Um sistema de rotaevaporação sob pressão reduzida, constituído por evaporador rotativo modelo 802 (Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), suporte manual, banho de aquecimento analógico modelo 550 (Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), bomba de vácuo modelo MZ 2C NT (Vacuubrand, Wertheim, BW, Alemanha) e condensador vertical, foi empregado para evaporação de solvente e concentração de frações. Um sistema de filtração a vácuo e papel de filtro Whatman Grau 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para filtração.

#### **4.1.4. Solventes**

Os solventes utilizados para extração, cromatografia e experimentos de MS eram grau de pureza HPLC, adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Os solventes utilizados

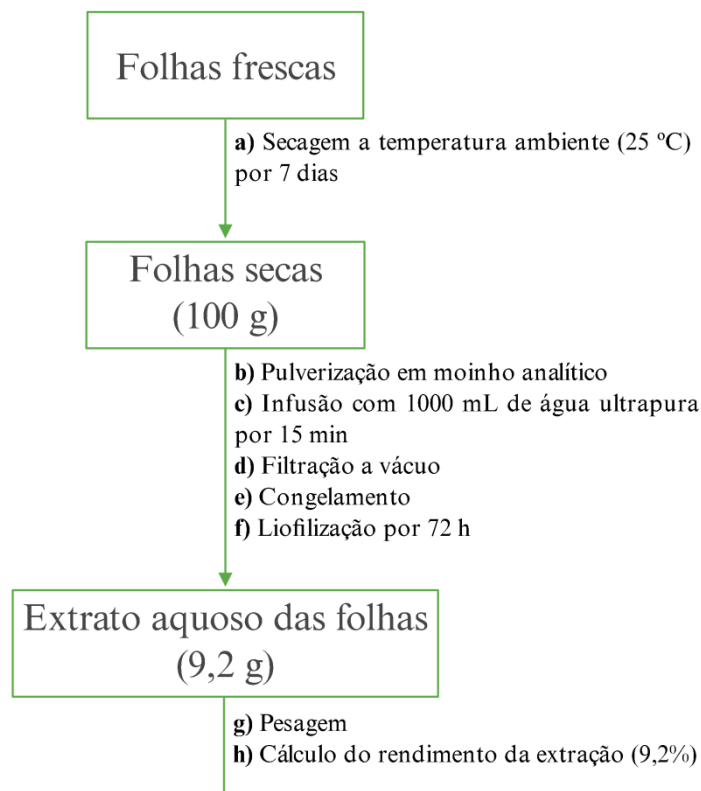
para experimentos HRMS eram grau de pureza LC-MS, adquiridos da J.T. Baker (Philipsburg, PA, EUA). A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha). Os solventes deuterados utilizados nas análises de RMN foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA).

#### **4.2. Coleta e identificação do material botânico**

O material foliar de *S. subcordata* foi coletado em janeiro de 2025 no campus sede da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizado em Manaus/AM (3°06'03,6"S, 59°58'20,64"W). A identificação botânica foi realizada no Herbário da UFAM (HUAM), onde uma exsicata está depositada sob o nº 12419. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código #A8760F8.

#### **4.3. Obtenção do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata***

Após a coleta, as folhas de *S. subcordata* foram secas a temperatura ambiente (25 °C) por um período de 7 dias. Aproximadamente 100 g das folhas secas foram pesados, pulverizados, e, então, submetidos à extração por infusão (1000 mL de água ultrapura (~100 °C) por 15 min), conforme descrito anteriormente (SANTOS *et al.*, 2020). O extrato foi filtrado através de papel de filtro em sistema de filtração a vácuo, congelado e, em seguida, liofilizado e pesado, resultando no extrato aquoso das folhas. O rendimento da extração foi calculado dividindo-se a massa do extrato aquoso das folhas (g) pela massa do material inicial (g) e multiplicando-se o resultado por 100. As etapas desse procedimento estão descritas no Fluxograma 1.



**Fluxograma 1.** Etapas do procedimento de obtenção do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata*.

#### 4.4. Cleanup do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata*

O extrato aquoso das folhas (9,2 g) foi submetido a um procedimento de *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), a fim de remover interferentes prejudiciais às análises por espectrometria de massas, tais como sais e açúcares, conforme descrito anteriormente (BRAGA *et al.*, 2025; SANTOS *et al.*, 2020). Resumidamente, a amostra foi solubilizada em 30 mL de água ultrapura e passada por uma coluna de vidro contendo aproximadamente 100 g de adsorvente (Strata<sup>®</sup> SPE C18-E), previamente ativado com metanol (600 mL) e condicionado com água ultrapura (600 mL). O sistema foi lavado com água ultrapura (600 mL) e, posteriormente, eluído com metanol (250 mL). A fração resultante foi concentrada em um sistema de rotaevaporação sob pressão reduzida a 40 °C, e o metanol residual foi eliminado sob uma corrente de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>). Esse procedimento resultou na fração metanólica (6,1 g), conforme ilustrado na Figura 15.

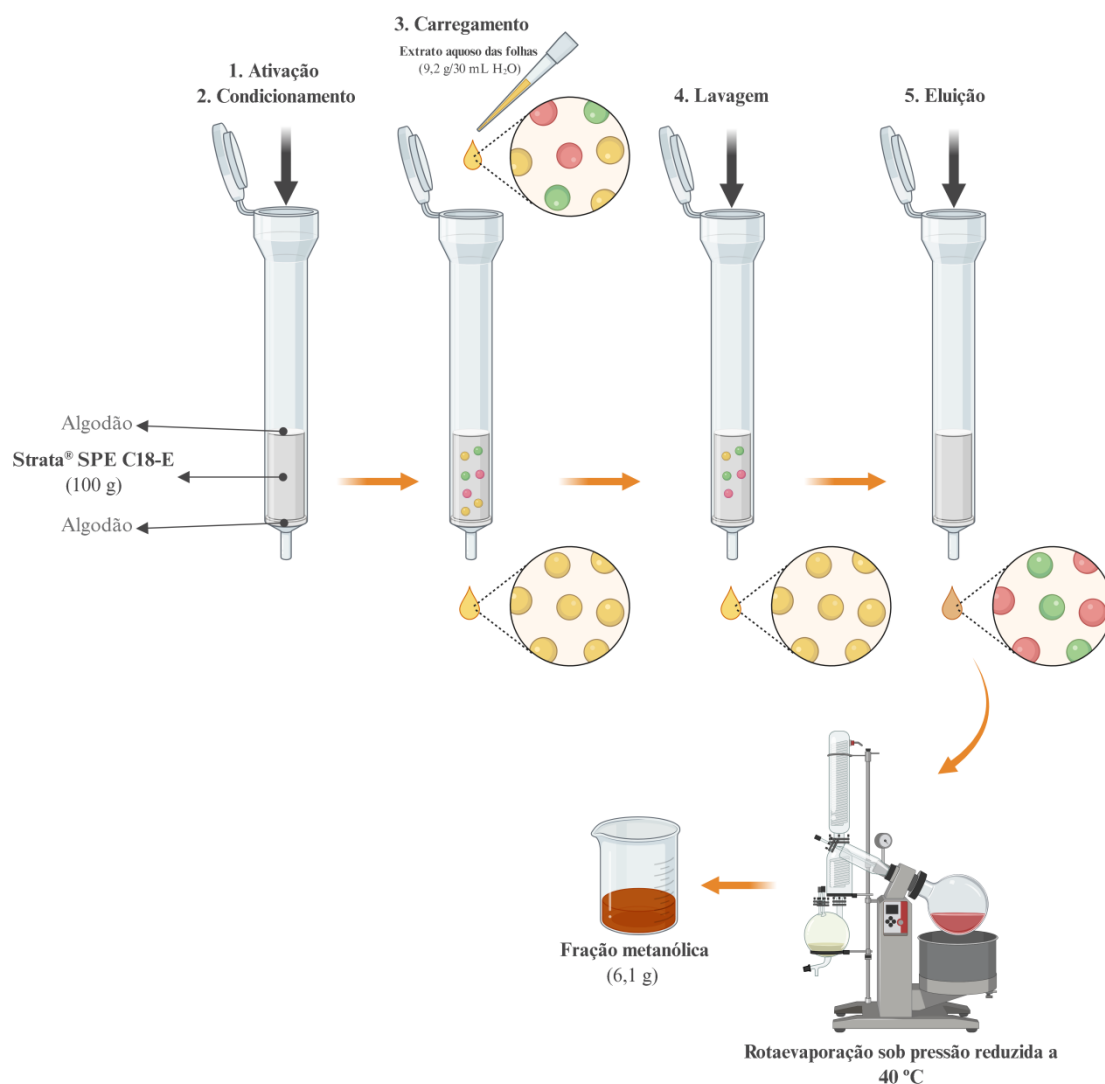


**Figura 15.** Etapas do procedimento de *cleanup* do extrato aquoso das folhas de *S. subcordata*, por meio de SPE, e obtenção da fração metanólica (A autora, 2025).

#### 4.5. Análise do perfil químico da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por DI-MS e DI-MS/MS

Uma solução estoque ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) da fração metanólica foi preparada em metanol. Uma alíquota ( $10 \text{ }\mu\text{L}$ ) da solução estoque foi transferida para frascos contendo  $1 \text{ mL}$  de metanol. Finalmente, a solução diluída ( $\approx 10 \text{ ppm}$ ) foi analisada por injeção direta (DI) em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, modelo LCQ Fleet<sup>®</sup>, equipado com uma fonte APCI e operando em ambos os modos de polaridade (positivo e negativo). Em seguida, o modo de varredura de perda neutra foi empregado para o reconhecimento de glicosídeos de

flavonoides, utilizando aquisição dependente de dados (DDA) em modo de polaridade negativo. As perdas neutras características incluíram 132, 146, 162 e 308 Da para *O*-glicosídeos, e 90 e 120 Da para *C*-glicosídeos (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Os espectros de MS/MS no modo DDA foram adquiridos por meio de dissociação induzida por colisão (CID), utilizando hélio como gás de colisão e uma energia de colisão de 20%. O espectro de MS<sup>3</sup> do íon em *m/z* 301 foi adquirido no modo manual, utilizando CID, hélio como gás de colisão e uma energia de 28%. Os parâmetros de MS utilizados foram os seguintes: *discharge current*: 5 µA; *vaporizer temperature*: 350 °C; *capillary temperature*: 150 °C; *sheath gas*: 30 psi; *auxiliary gas*: 10 arb; e *mass range, m/z* 150 a 1000. Os espectros processados foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos.

#### **4.6. Análises da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por HPLC-UV e HPLC-MS em escala analítica**

As análises da fração metanólica por HPLC-UV (Figura 16) em escala analítica foram realizadas no sistema cromatográfico UFLC<sup>®</sup>, conforme descrito na seção 4.1.1.1, utilizando seis colunas cromatográficas diferentes (Tabela 2). Inicialmente, as análises foram conduzidas em modo de eluição gradiente, utilizando metanol (MeOH) (B) como modificador orgânico em água (A), conforme segue: 0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B, com uma taxa de fluxo de 1,00 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 240 e 350 nm. O volume de injeção foi de 20 µL de uma solução estoque (1 mg mL<sup>-1</sup>) da fração metanólica, preparada em MeOH:DMSO (90:10, v/v). Em seguida, a eluição isocrática foi realizada sob as mesmas condições instrumentais, mantendo a composição da fase móvel para cada coluna conforme descrita na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição da fase móvel utilizada nas análises por HPLC-UV e HPLC-MS em modo de eluição isocrático, empregando seis colunas cromatográficas.

| Coluna           | Solvente |     | Tempo (min) |
|------------------|----------|-----|-------------|
|                  | % A      | % B |             |
| Luna C18(2)      | 55       | 45  | 15          |
| Kinetex C8       | 65       | 35  | 15          |
| Luna PFP(2)      | 51       | 49  | 15          |
| Luna fenil-hexil | 51       | 49  | 15          |
| Luna CN          | 80       | 20  | 15          |
| Kinetex bifenil  | 55       | 45  | 15          |

A = H<sub>2</sub>O; B = MeOH

As análises por HPLC-MS (Figura 16) foram realizadas no sistema descrito na seção 4.1.1.1, sob as mesmas condições cromatográficas que os experimentos isocráticos supracitados (Tabela 3). Os parâmetros de MS foram os mesmos utilizados anteriormente na análise por DI-MS, com as seguintes modificações: *sheath gas*: 35 psi; *auxiliary gas*: 15 arb. Os cromatogramas de íons extraídos (EIC) foram construídos individualmente para os íons em *m/z* 431, 445, 563, 577 e 609 e, posteriormente, sobrepostos, utilizando o software Xcalibur® 2.0.7.

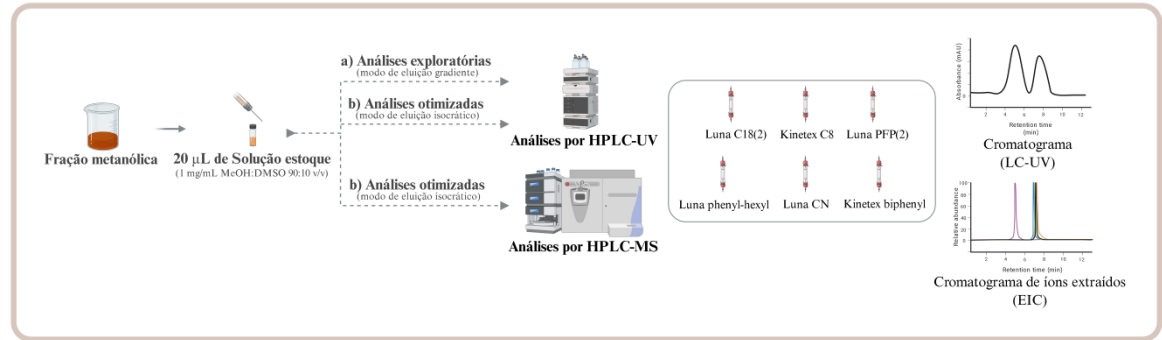


**Figura 16.** Análises exploratórias por HPLC-UV e análises otimizadas por HPLC-UV e HPLC-MS da fração metanólica (A autora, 2025).

O cálculo do fator de retenção (*k*) para as substâncias correspondentes aos íons mencionados foi realizado de acordo com a Equação 1. O tempo de retenção (*t<sub>R</sub>*) de cada

substância nas seis colunas cromatográficas foi obtido a partir do EIC de seu respectivo íon. Para todas as colunas, o tempo de retenção do DMSO foi considerado como o tempo morto da coluna ( $t_0$ ).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Onde:

$t_R$  = tempo de retenção da substância-alvo

$t_0$  = tempo morto da coluna (tempo de retenção do DMSO)

Finalmente, o fator de retenção relativa (FRR) entre cada par de substâncias foi calculado pela razão entre os fatores de retenção ( $k$ ) de cada substância, conforme a Equação 2.

$$FRR = \frac{k_B}{k_A} \quad (2)$$

Onde:

$k_A$  = fator de retenção da substância menos retida

$k_B$  = fator de retenção da substância mais retida

#### **4.7. Isolamento por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting***

O fracionamento da fração metanólica em duas dimensões (Figura 17) foi realizado no sistema cromatográfico UFLC<sup>®</sup>, descrito na seção 4.1.1.1. A separação na primeira dimensão (<sup>1</sup>D) foi conduzida em modo de eluição isocrático em uma coluna Luna C18(2) (250 mm × 10 mm, 100 Å, 5 µm), utilizando como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (45:55, v/v) a uma taxa de fluxo de 4,70 mL min<sup>-1</sup>, com detecção em 240 e 350 nm. Foram realizadas oito injeções sucessivas, cada uma contendo 20 mg da fração metanólica previamente dissolvida em DMSO (150 µL por injeção). Esse procedimento resultou no isolamento da substância **5** (54,0 mg) e em uma fração adicional correspondente a um único pico cromatográfico

contendo as substâncias **1–4** (40,1 mg) (Tabela 4), as quais foram coletadas, concentradas e liofilizadas.

Na segunda dimensão (<sup>2</sup>D), a separação da fração *heart-cut* proveniente da <sup>1</sup>D, contendo as substâncias **1–4**, foi realizada em modo isocrático em uma coluna Kinetex bifenil 100 A (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), utilizando como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (45:55, v/v) a uma taxa de fluxo de 2,00 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 240 e 350 nm. Foram realizadas treze injeções sucessivas, cada uma contendo 3 mg da fração <sup>1</sup>D previamente dissolvida em MeOH (20 µL por injeção). Esse procedimento resultou no isolamento das substâncias **3** (6,2 mg), **1** (11,7 mg), **4** (4,8 mg) e **2** (15,3 mg) (Tabela 4), as quais foram coletadas, concentradas e liofilizadas.

**Tabela 4.** Substâncias resultantes do isolamento por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting*.

| Dimensão       | Substância | tr (min) | Massa obtida (mg) |
|----------------|------------|----------|-------------------|
| <sup>1</sup> D | <b>5</b>   | 6,4-7,2  | 54,0              |
|                | <b>1-4</b> | 7,8-9,0  | 40,1              |
| <sup>2</sup> D | <b>3</b>   | 2,9-3,3  | 6,2               |
|                | <b>1</b>   | 3,4-3,9  | 11,7              |
|                | <b>4</b>   | 4,4-5,4  | 4,8               |
|                | <b>2</b>   | 6,0-7,2  | 15,3              |

Uma solução (10 ppm) da substância **5**, preparada em MeOH grau LC-MS, foi submetida a análises por HRMS em um espectrômetro de massas de alta resolução, conforme descrito na seção **4.1.2.2**, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando em modo de polaridade negativo. Posteriormente, a substância foi solubilizada em 600 µL de DMSO-*d*<sub>6</sub> e submetida a experimentos de RMN 1D e 2D em um espectrômetro de RMN, modelo AVANCE III HD, conforme descrito na seção **4.1.2.3**.

Soluções (10 ppm) das substâncias **1-4**, preparadas em MeOH grau HPLC, foram submetidas a análises por DI-MS, utilizando os mesmos parâmetros de MS descritos na

seção 4.5. Em seguida, as substâncias **3** e **4** foram solubilizadas em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CD}_3\text{OD}$ , enquanto as substâncias **1** e **2** foram solubilizadas em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{DMSO}-d_6$ , e todas foram submetidas a experimentos de RMN 1D e 2D nas mesmas condições que a substância **5**.

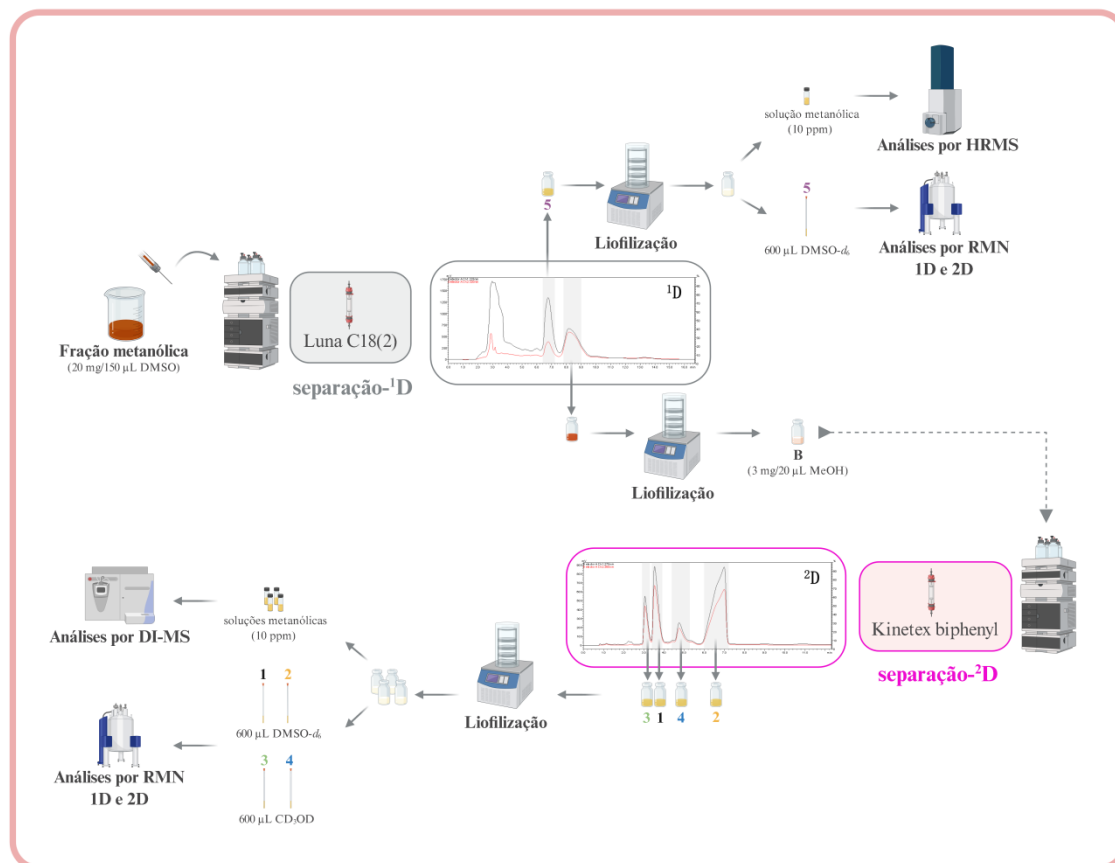


**Figura 17.** Etapas do procedimento de isolamento por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting* das substâncias **1** a **5** presentes na fração metanólica das folhas de *S. subcordata* (A autora, 2025).

#### 4.8. Otimização estrutural e previsão das constantes de acoplamento

As estruturas dos epímeros  $\alpha$  e  $\beta$  da substância **4** foram construídas utilizando o software Marvin Sketch 17.1.2.0 (ChemAxon, Budapeste, BUD, Hungria). Inicialmente, para identificar as conformações de menor energia, as estruturas foram otimizadas pelo método semiempírico PM7 (STEWART, 2013) utilizando o software MOPAC2016 (STEWART, 2016). Posteriormente, o software Discovery Studio 16.1.0 (AccelrysInc, San

Diego, CA, EUA) foi usado para a determinação do ângulo diedro teórico entre os hidrogênios H-1''' e H-2''' em cada um dos epímeros. Por fim, as constantes de acoplamento vicinal próton–próton ( $^3J_{H-1'''H-2'''}$ ) foram previstas com o auxílio do software MestReJ 1.1 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, GA, Espanha): para o epímero  $\beta$ , empregou-se a equação de Barfield, enquanto para o epímero  $\alpha$  foi utilizada a equação de Karplus (OLIVEIRA *et al.*, 2025; VÁZQUEZ *et al.*, 2018).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise do perfil químico da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por DI-MS

A fim de investigar o perfil químico das folhas de *S. subcordata*, a fração metanólica, obtida após o procedimento de *clean-up* do extrato aquoso das folhas por SPE, foi submetida à análise de *full scan* por injeção direta (DI) em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, em modo de polaridade negativo e positivo, na faixa de  $m/z$  150-1000. O espectro de DI-MS no modo negativo (Figura 18A) exibiu um pico base em  $m/z$  609, juntamente com outros íons intensos na faixa de  $m/z$  430-610. Por outro lado, o espectro de DI-MS no modo positivo (Figura 18B) exibiu um pico base em  $m/z$  447, além de outros íons intensos na faixa de  $m/z$  430-612. A recorrência de íons nessa faixa de  $m/z$  em ambos os modos de polaridade sugere a detecção das mesmas substâncias nas formas desprotonada ( $[M-H]^-$ ) e protonada ( $[M+H]^+$ ), como exemplificado pelos íons em  $m/z$  609  $[M-H]^-$  e 611  $[M+H]^+$ . As diferenças observadas nas intensidades relativas dos sinais podem ser atribuídas à eficiência de ionização de cada substância em função do modo de polaridade empregado, refletindo suas distintas afinidades por prótons (KACHLICKI *et al.*, 2016).

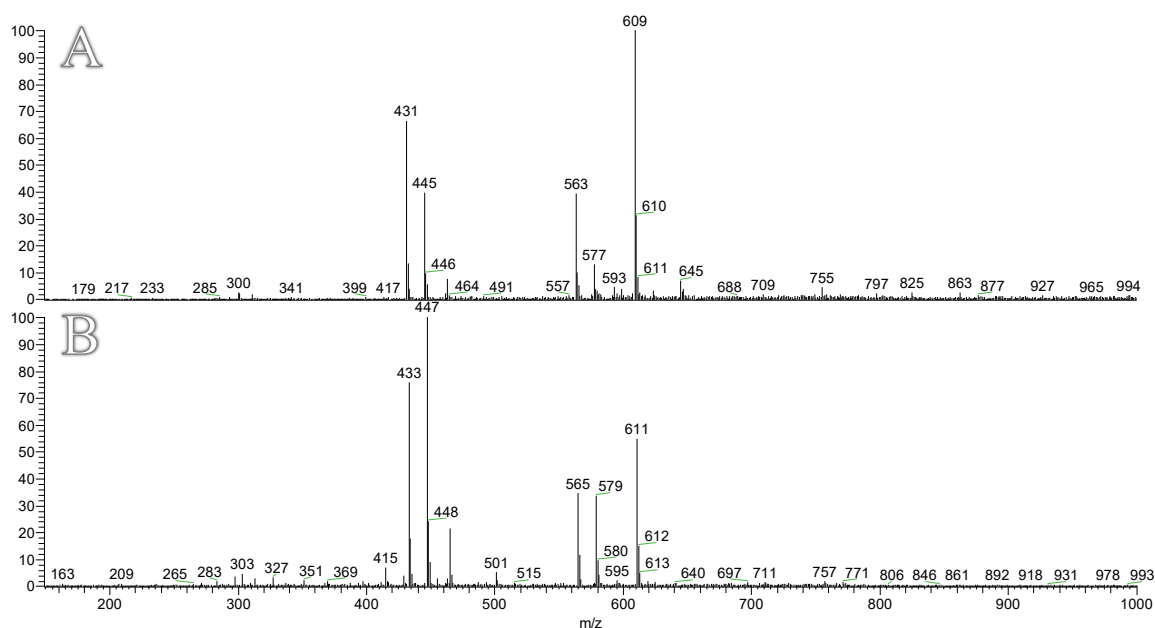


**Figura 18.** Espectros de massas no modo (A) negativo e (B) positivo da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*.

Adicionalmente, a análise por DI-MS em modo de varredura de perda neutra, utilizando aquisição dependente de dados (DDA) no modo negativo, revelou os íons em  $m/z$  431, 445, 563, 577 e 609 como supostos glicosídeos de flavonoides, devido às perdas neutras características associadas aos *C*- e *O*-glicosídeos (Figura 19) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016).

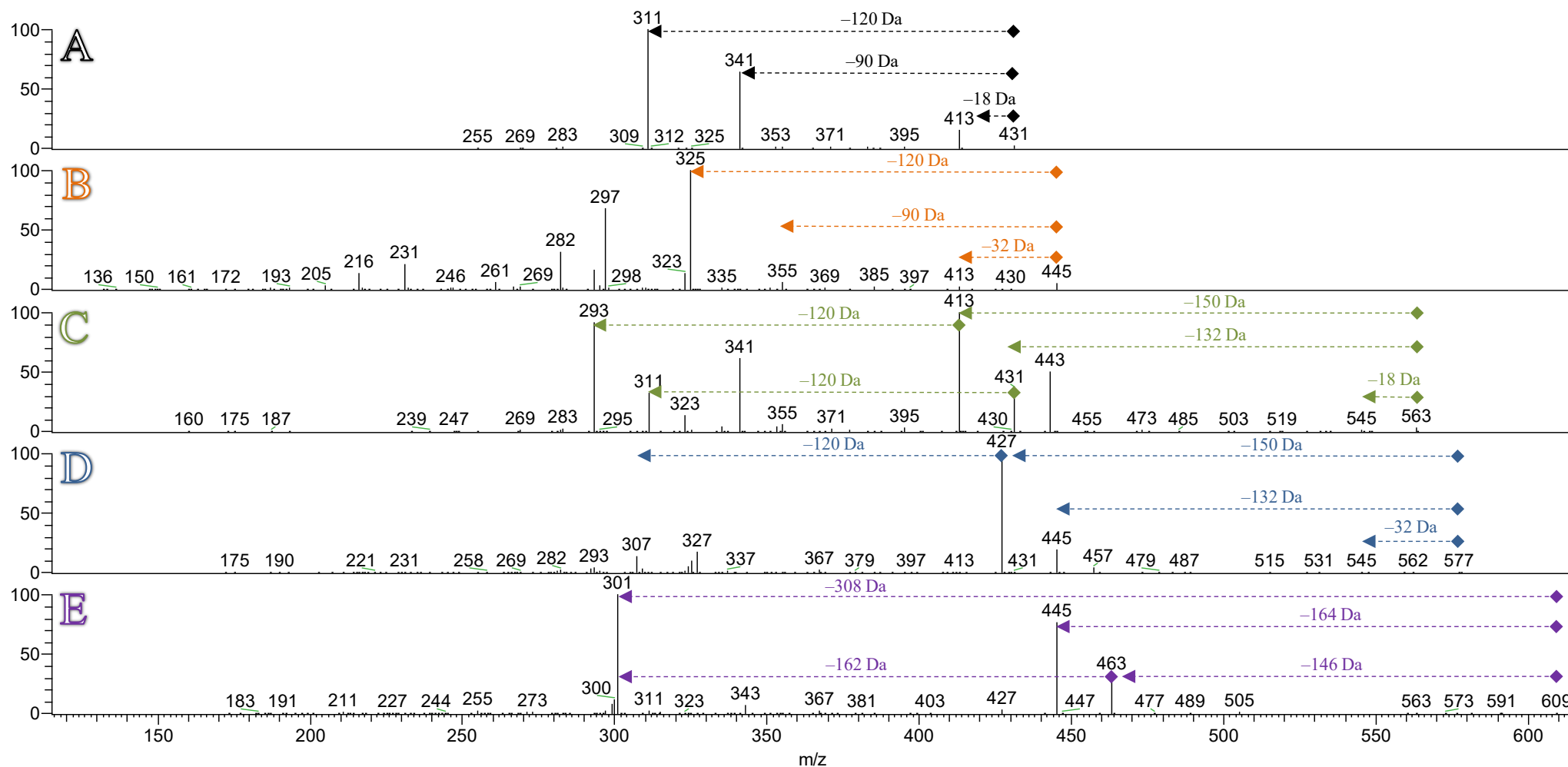


**Figura 19.** Espectros de MS/MS no modo negativo para os íons precursores em  $m/z$  431 (A – substância 1), 445 (B – substância 2), 563 (C – substância 3), 577 (D – substância 4), e 609 (E – substância 5).

### 5.1.1. Desreplicação da substância 1 (íon em $m/z$ 431) pela análise do padrão de fragmentação

O espectro de MS/MS do íon em  $m/z$  431 (substância 1) (Figura 19A) exibiu íons fragmentos resultantes de clivagens cruzadas do anel de C-hexose (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). As perdas neutras competitivas de 90 e 120 Da levaram à formação dos íons em  $m/z$  341 ( $^{0,3}X_0^-$ ) e 311 ( $^{0,2}X_0^-$ ), respectivamente. A presença desses íons sugere a apigenina ( $m/z$  269) como a aglicona, uma vez que o íon em  $m/z$  341 corresponde a  $[Aglicona-H+72]^-$  e o íon em  $m/z$  311 a  $[Aglicona-H+42]^-$  (KACHLICKI *et al.*, 2016). Além disso, o íon em  $m/z$  413  $[M-H-18]^-$ , gerado pela perda de uma molécula de água, foi observado — uma característica comumente relatada em espectros de MS/MS de flavonoides 6-C-glicosilados (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Nesses compostos, particularmente, a eliminação de água é favorecida pela ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo éter do açúcar e o grupo hidroxila nas posições C-5 ou C-7 da aglicona, que estabiliza a conformação do resíduo de açúcar (CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Assim, esses dados sugerem que uma unidade de glicose está ligada à posição C-6 da aglicona apigenina. Portanto, com base na comparação com dados da literatura, a substância 1 foi provisoriamente identificada como a flavona isovitexina (Figura 20) (WANG *et al.*, 2008).

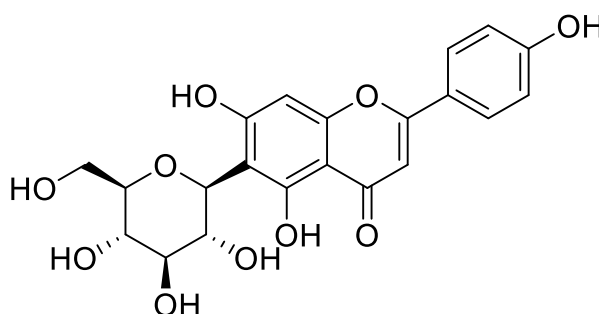


**Figura 20.** Estrutura química da isovitexina (substância 1).

### 5.1.2. Desreplicação da substância 2 (íon em $m/z$ 445) pela análise do padrão de fragmentação

O espectro de MS/MS do íon em  $m/z$  445 (substância **2**) (Figura 19B) também exibiu íons fragmentos característicos de *C*-hexosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Neste caso, as perdas neutras competitivas de 90 e 120 Da resultaram nos íons em  $m/z$  355 ( $^{0,3}X_0^-$ ) e 325 ( $^{0,2}X_0^-$ ), respectivamente. A correspondência dos íons em  $m/z$  355 e 325 com  $[Aglicona-H+72]^-$  e  $[Aglicona-H+42]^-$  (KACHLICKI *et al.*, 2016), respectivamente, indica uma diferença de 14 Da entre a aglicona da substância **2** ( $m/z$  283) e a apigenina ( $m/z$  269). Além disso, a intensidade relativa do íon resultante da perda neutra de 90 Da foi significativamente menor para a substância **2** ( $m/z$  355,  $^{0,3}X_0^-$ ) do que para a substância **1** ( $m/z$  341,  $^{0,3}X_0^-$ ). Essa observação sugere que diferenças estruturais entre as duas substâncias podem ter tornado a ligação C3–C4 da fração *C*-hexose menos suscetível à clivagem no caso da substância **2**. Adicionalmente, o íon em  $m/z$  413  $[M-H-32]^-$ , resultante da perda neutra de 32 Da ( $CH_3OH$ ), sugere a presença de um grupo metoxila (MENEZES *et al.*, 2013). Em flavonas, a metilação é favorecida no grupo 7-hidroxila, pois o grupo 5-hidroxila é menos reativo devido à ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonila na posição C-4 (YANG *et al.*, 2018). Assim, esses dados sugerem que a substância **2** é um análogo 7-*O*-metilado da isovitexina (substância **1**). Portanto, em comparação com dados da literatura, a substância **2** foi provisoriamente identificada como a flavona swertisina (Figura 21) (WANG *et al.*, 2008).

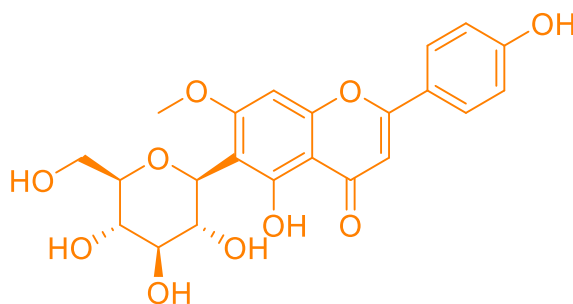


**Figura 21.** Estrutura química da swertisina (substância 2).

### 5.1.3. Desreplicação da substância 3 (íon em $m/z$ 563) pela análise do padrão de fragmentação

O espectro de MS/MS do íon em  $m/z$  563 (substância 3) (Figura 19C) exibiu íons fragmentos característicos de *O,C*-diglicosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). O pico base em  $m/z$  413 ( $Z_1^-$ ), resultante da perda neutra de 150 Da, indica a presença de uma fração *O*-pentosil com uma ligação interglicosídica 1→2 (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Competitivamente, a perda neutra de 132 Da produziu um íon menos intenso em  $m/z$  431 ( $Y_1^-$ ), corroborando a presença de uma unidade pentosil terminal (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Além disso, ambos os íons exibiram perdas neutras de 120 Da ( $m/z$  413 →  $m/z$  293 e  $m/z$  431 →  $m/z$  311), decorrentes da clivagem das ligações internas do resíduo *C*-hexose. O íon em  $m/z$  293 [*Aglicona*-H+(42-18)]<sup>-</sup>, relatado anteriormente como característico para *C*-[2''-*O*-glicosil]-glicosídeos (KACHLICKI *et al.*, 2016), sugere a apigenina ( $m/z$  269) como a aglicona da substância 3. Adicionalmente, o íon em  $m/z$  545 [*M*-H-18]<sup>-</sup>, resultante da perda neutra de H<sub>2</sub>O, sustenta a *C*-glicosilação na posição C-6 da aglicona (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016), conforme descrito para a substância 1. Assim, esses dados sugerem que a substância 3 é um derivado 2''-*O*-pentosil da isovitexina (substância 1) (Figura 22). No entanto, pelo menos três tipos diferentes de pentoses (arabinose, xilose e apiose) foram relatados no gênero *Strychnos*

(CORSARO *et al.*, 1995; ITOH *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2016), o que comprometeu a identificação preliminar da substância **3**.

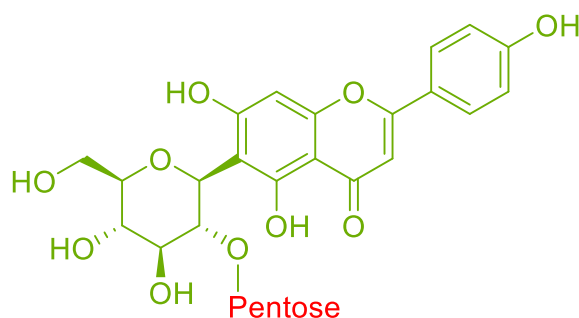


**Figura 22.** Estrutura química sugerida para a substância **3**.

#### 5.1.4. Desreplificação da substância **4** (íon em $m/z$ 577) pela análise do padrão de fragmentação

O espectro de MS/MS do íon em  $m/z$  577 (substância **4**) (Figura 19D) também exibiu íons fragmentos característicos de *O,C*-diglicosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Mais uma vez, perdas neutras competitivas de 150 e 132 Da ( $m/z$  577  $\rightarrow$   $m/z$  427 ( $Z_1^-$ ) e  $m/z$  577  $\rightarrow$   $m/z$  445 ( $Y_1^-$ ), respectivamente) foram observadas, correspondendo à fragmentação da ligação interglicosídica 1 $\rightarrow$ 2 da fração *O*-pentosil (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). No entanto, a substância **4** apresentou menor extensão de fragmentação em relação à substância **3**, e a presença da fração *C*-hexose foi confirmada pela perda sequencial de 120 Da, observada exclusivamente para o íon em  $m/z$  427 ( $m/z$  427  $\rightarrow$   $m/z$  307). Além disso, o íon em  $m/z$  307, correspondente a  $[Aglicona-H+(42-18)]^-$  (KACHLICKI *et al.*, 2016), evidencia uma diferença de 14 Da entre a aglicona da substância **4** ( $m/z$  283) e a apigenina ( $m/z$  269), como também observado para a substância **2**. Complementarmente, a presença do íon em  $m/z$  545  $[M-H-32]^-$ , resultante da perda neutra de  $CH_3OH$ , sugere metilação no grupo 7-hidroxila da aglicona (MENEZES *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2018). Assim, esses dados sugerem que a

substância **4** é um derivado 2"-*O*-pentosil da swertisina (substância **2**) (Figura 23). Conforme mencionado para a substância **3**, a presença de diferentes possíveis pentoses (ex., arabinose, xilose, apiose) no gênero *Strychnos* (CORSARO *et al.*, 1995; ITOH *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2016) complicou a identificação conclusiva da fração pentosil na substância **4**.

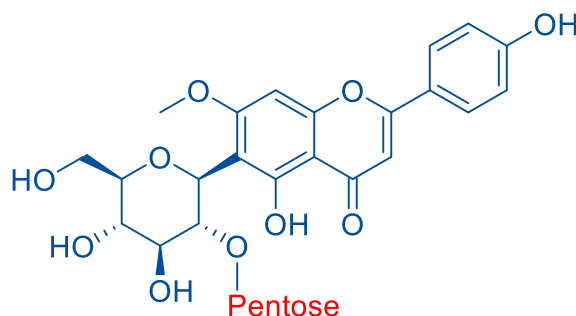


**Figura 23.** Estrutura química sugerida para a substância **4**.

#### 5.1.5. Desreplificação da substância **5** (íon em $m/z$ 609) pela análise do padrão de fragmentação

O espectro de MS/MS do íon em  $m/z$  609 (substância **5**) (Figura 19E) exibiu íons fragmentos característicos de *O*-diglicosídeos de flavonoides (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Os principais íons produtos em  $m/z$  445 ( $Z_1^-$ ) e 301 ( $Y_0^-$ ), resultantes de perdas neutras competitivas de 164 e 308 Da, respectivamente, são característicos de *O*-neohesperidosídeos (ramnosil-(1→2)-glicosídeos) (KACHLICKI *et al.*, 2016). O íon em  $m/z$  445  $[M-H-164]^-$  surge da eliminação de uma fração *O*-ramnosil com uma ligação interglicosídica 1→2, enquanto o íon em  $m/z$  301  $[M-H-308]^-$  se origina da perda de toda a unidade dissacarídica (ramnosil-(1→2)-glicosídeo) (KACHLICKI *et al.*, 2016). Além disso, as perdas neutras sequenciais de 146 e 162 Da ( $m/z$  609 →  $m/z$  463 ( $Y_1^-$ ) →  $m/z$  301 ( $Y_0^-$ )) corroboram a presença de um grupo *O*-ramnosil terminal ligado à fração *O*-glicose (KACHLICKI *et al.*, 2016). A análise por MS<sup>3</sup> do íon aglicona em  $m/z$  301 ( $Y_0^-$ ) revelou um padrão de fragmentação característico de isoflavonas (Figura 24).

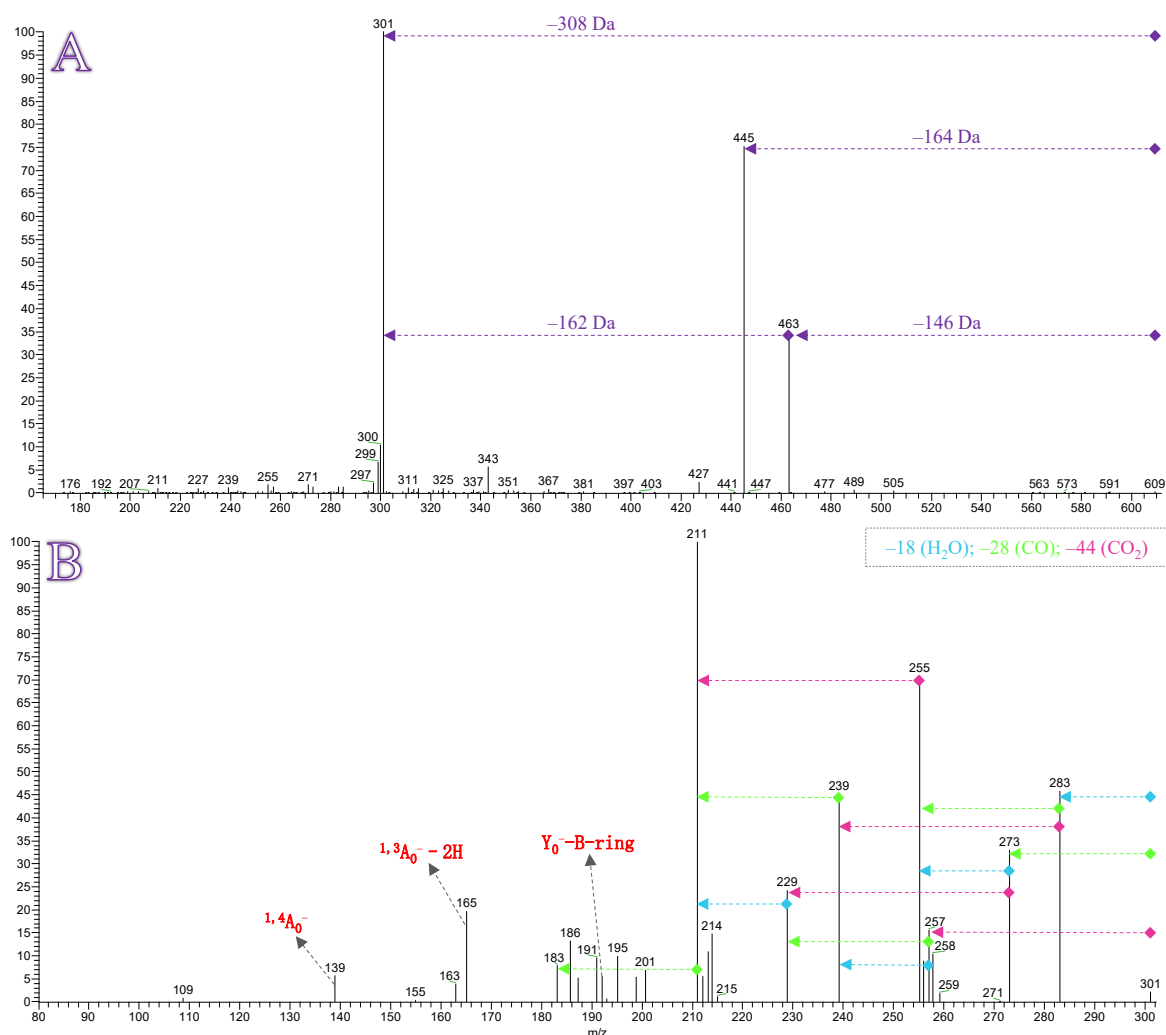


**Figura 24.** Espectros de (A) MS<sup>2</sup> e (B) MS<sup>3</sup> no modo negativo do íon em  $m/z$  609 (substância 5).

O pico base em  $m/z$  211, juntamente com os outros íons fragmentos na região de maior massa ( $m/z$  283, 273, 257, 255, 239, 229), resultou de perdas neutras sequenciais e competitivas de 18, 28 e 44 Da, presumivelmente correspondendo a H<sub>2</sub>O, CO e CO<sub>2</sub>, que foram relatadas como proeminentes em espectros de IT-MS<sup>n</sup> de isoflavonas (KANG *et al.*, 2007). Por outro lado, íons do tipo  $^{ij}A_0^-$  (Figura 13D), formados por meio de fragmentações Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, foram observados em menores proporções, em concordância com o padrão de fragmentação das isoflavonas (KANG *et al.*, 2007). Esses íons, observados em  $m/z$  165 ( $1,3A_0^- - 2H$ ) e 139 ( $1,4A_0^-$ ), são característicos de um anel A trioxigenado (ES-SAFI *et al.*, 2005; MARKHAM & PORTER, 1975). Notavelmente,

nenhum fragmento do tipo  $^{ij}\text{B}_0^-$  RDA (Figura 13D) foi observado, o que pode indicar que a retenção de carga ocorreu preferencialmente no anel A. Esse comportamento foi ainda mais evidenciado pelo íon em  $m/z$  192 ( $\text{Y}_0^-$ -anel B), resultante da perda de todo o anel B (–109 Da) por meio da clivagem direta da ligação entre os anéis B e C, conforme relatado anteriormente (ES-SAFI *et al.*, 2005). Além disso, a perda de 109 Da sugere um anel B dihidroxilado. As múltiplas perdas de  $\text{H}_2\text{O}$  corroboram ainda mais a presença de grupos hidroxila vicinais nos anéis B e A (ES-SAFI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2004). Essas observações sugerem que a substância **5** é um *O*-neohesperidosídeo de uma isoflavona, com padrões de tri- e dihidroxilação nos anéis A e B, respectivamente. No entanto, uma busca em bancos de dados indicou que a substância **5** ainda não havia sido reportada.

Assim, os experimentos de DI-MS permitiram a identificação preliminar das substâncias **1** e **2**, enquanto a elucidação estrutural das unidades pentosil nas substâncias **3** e **4**, bem como a caracterização completa da substância **5**, exigiram a obtenção de dados espectroscópicos adicionais por RMN. Diante disso, procedeu-se ao isolamento eficiente dessas substâncias-alvo.

## **5.2. Avaliação da seletividade da coluna para o isolamento das substâncias-alvo da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting***

Com o intuito de desenvolver estratégias de 2D-LC no modo *offline single heart-cutting* para isolar as substâncias-alvo, seis colunas ortogonais (C18, C8, PFP, fenil-hexil, CN e bifenil) foram avaliadas com base no modelo de subtração hidrofóbica de Snyder ( $F_s > 3$ ) (Tabela A1). Inicialmente, foram realizadas análises exploratórias em modo de eluição gradiente por HPLC-UV para determinar as condições de eluição adequadas. Com base nos

resultados (Figuras A1-A6), a eluição isocrática foi ajustada para cada coluna (Tabela 3), a fim de garantir a força apropriada da fase móvel para a etapa de isolamento. Para isso, as substâncias-alvo **1** a **5** também foram monitoradas por HPLC-MS.

As análises por HPLC-UV e HPLC-MS revelaram que as substâncias **1** a **4** apresentaram fraca absorção em  $\lambda = 240$  nm e forte absorção em  $\lambda = 350$  nm, o que é consistente com o comportamento típico de flavonas, como a apigenina (HARBORNE *et al.*, 1975; TANIGUCHI *et al.*, 2023). Em contraste, a substância **5** exibiu forte absorção em  $\lambda = 240$  nm e fraca absorção em  $\lambda = 350$  nm, um padrão característico de isoflavonas (HARBORNE *et al.*, 1975; TANIGUCHI *et al.*, 2023).

Embora as substâncias **1** e **2** tenham sido identificadas preliminarmente a partir das análises por DI-MS, as condições cromatográficas desenvolvidas foram projetadas para isolá-las, visando a confirmação estrutural, juntamente com as substâncias **3**, **4** e **5**, que necessitaram de elucidação estrutural. No entanto, as colunas testadas em condições de 1D-LC não forneceram resolução suficiente para a separação completa de todas as substâncias. Portanto, estratégias de 2D-LC foram investigadas e propostas.

Para a primeira dimensão (<sup>1</sup>D), tanto a coluna C18 quanto a PFP poderiam ser utilizadas, visto que ambas proporcionaram resolução próxima à linha de base entre a substância **5** e as substâncias coeluídas **1** a **4**, conforme monitorado por HPLC-MS (Figuras 25 e 26). Notavelmente, a seletividade semelhante observada entre essas duas colunas foi inesperada, dado seu fator de similaridade ( $F_s$ ) de 13,02 (Tabela A1). A ortogonalidade esperada entre as colunas C18 ou PFP e a coluna bifenil ( $F_s = 24,34$  e  $F_s = 11,44$ , respectivamente) mostrou-se vantajosa para alcançar a seletividade adequada para as substâncias **1** a **4** na segunda dimensão (<sup>2</sup>D) (Figura 27).

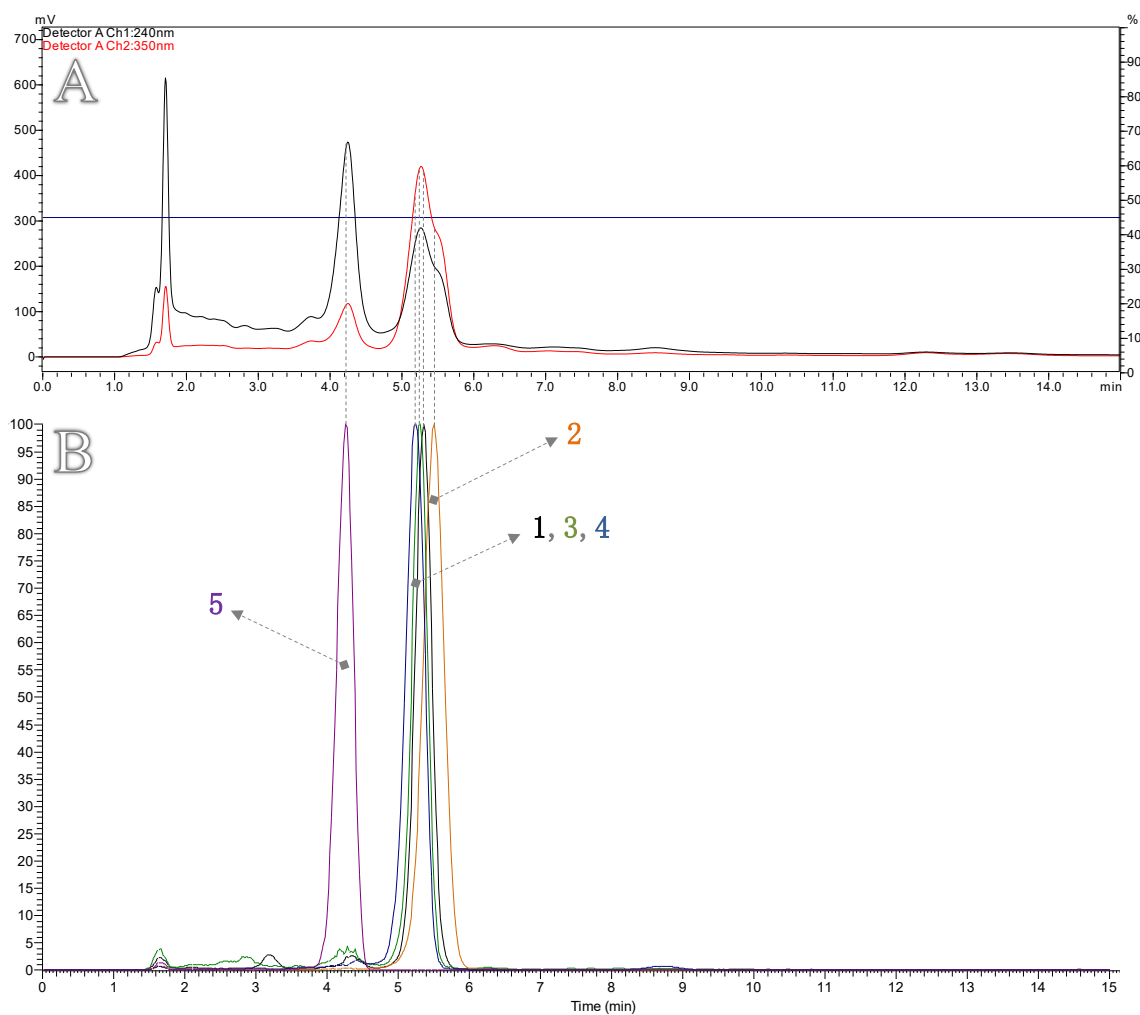


**Figura 25.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna C18(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (45:55, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em *m/z* 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

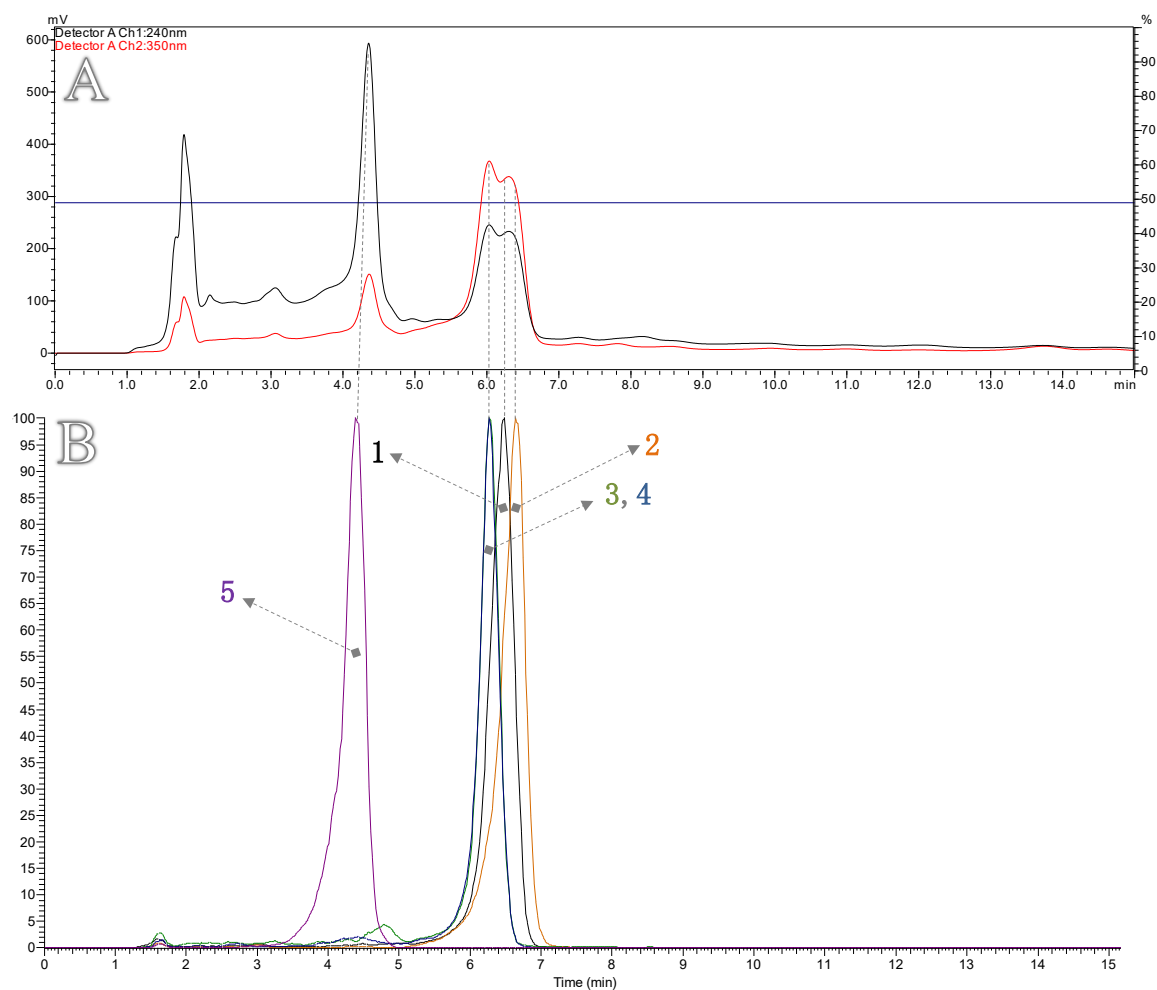


**Figura 26.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna PFP(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (49:51, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em *m/z* 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

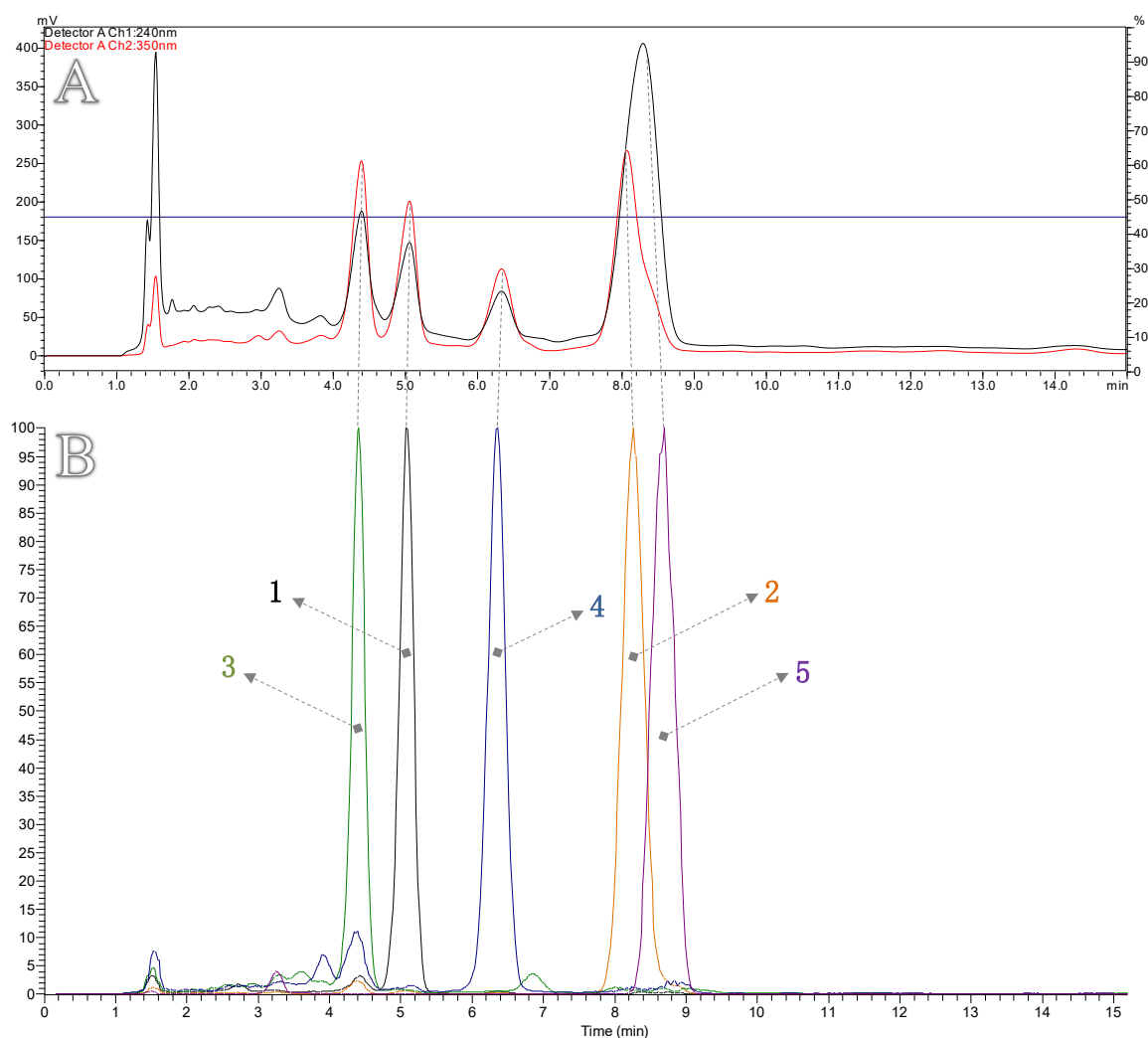


**Figura 27.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Kinetex bifenil 100A (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) sob eluição isocrática com metanol-água (45:55, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em *m/z* 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

Combinações alternativas de colunas também poderiam ser exploradas (Figura 28). Por exemplo, a coluna bifenil pode ser utilizada na <sup>1</sup>D, pois oferece separação à linha de base para as substâncias 1, 3 e 4 (Figura 27). Nesse caso, colunas ortogonais como C18, PFP, fenil-hexil, C8 ou CN poderiam servir como <sup>2</sup>D, devido à sua seletividade para as substâncias 2 e 5 (Figuras 25,26,29-31). Por outro lado, dada sua seletividade para a substância 2, a coluna fenil-hexil pode ser empregada na <sup>1</sup>D, em conjunto com a coluna bifenil na <sup>2</sup>D, devido a sua seletividade superior para as substâncias 1, 3, 4 e 5.

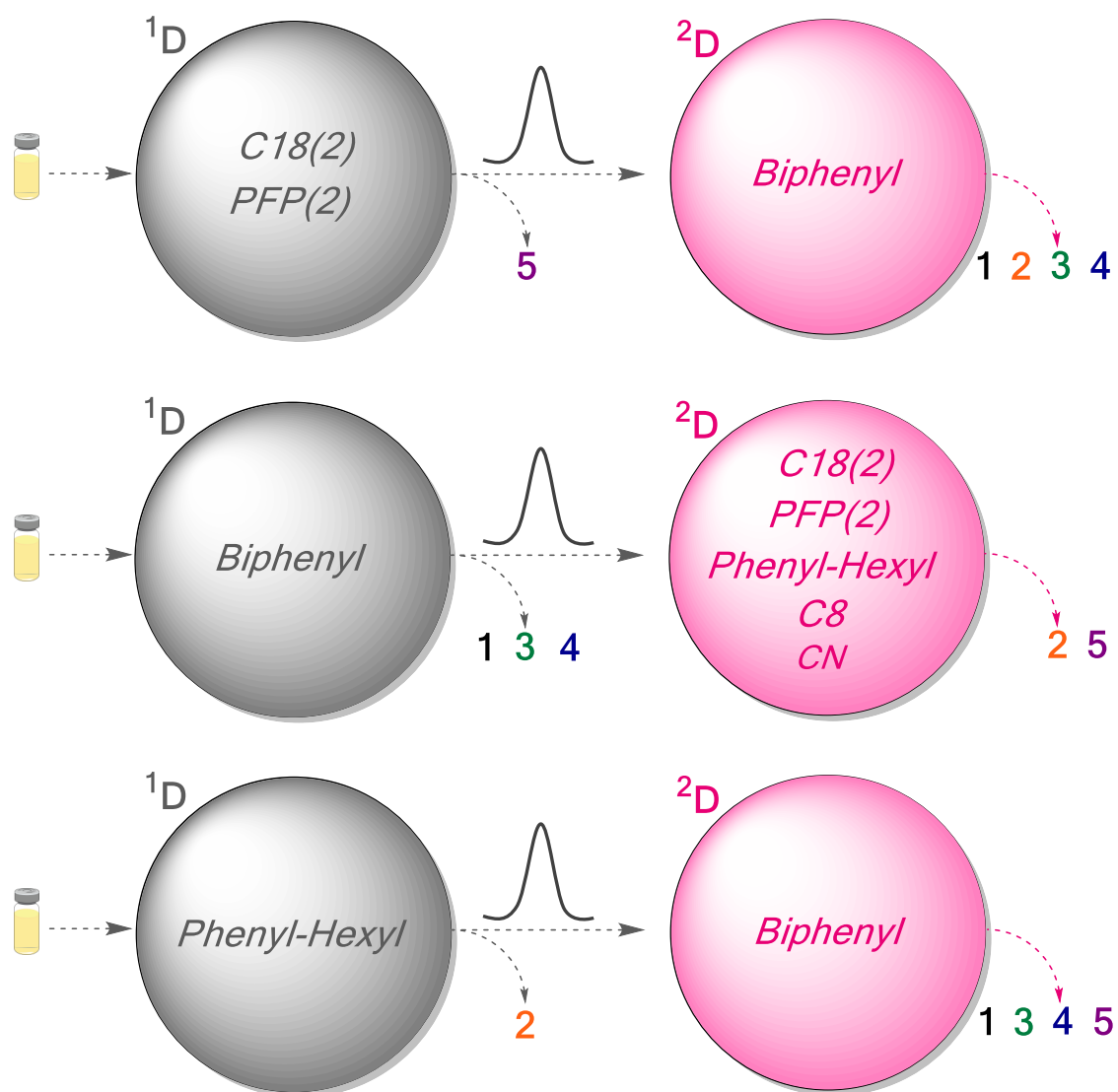


**Figura 28.** Estratégias para o isolamento das substâncias 1 a 5 da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting*.

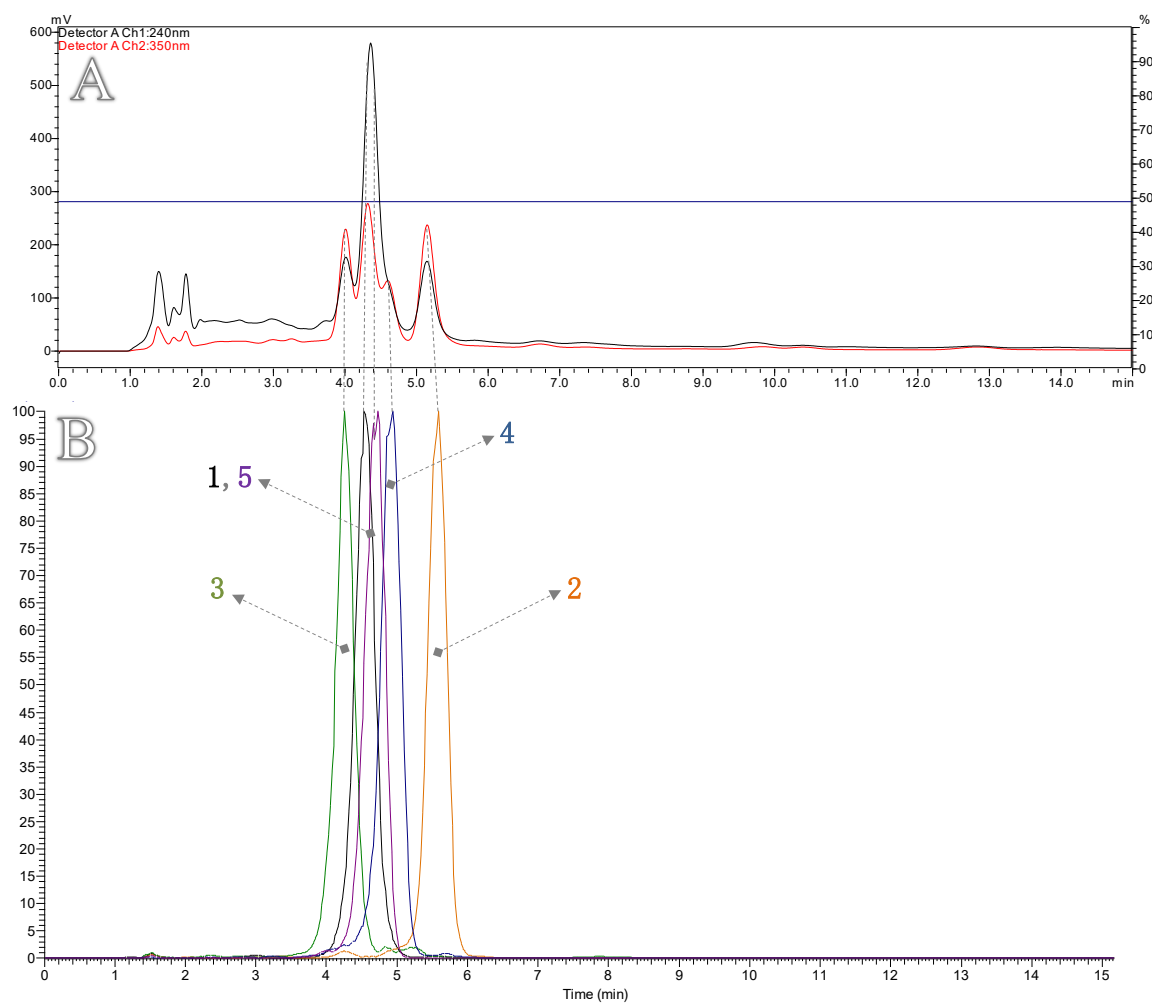


**Figura 29.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna fenil-hexil (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m) sob eluição isocrática com metanol-água (49:51, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em  $m/z$  431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

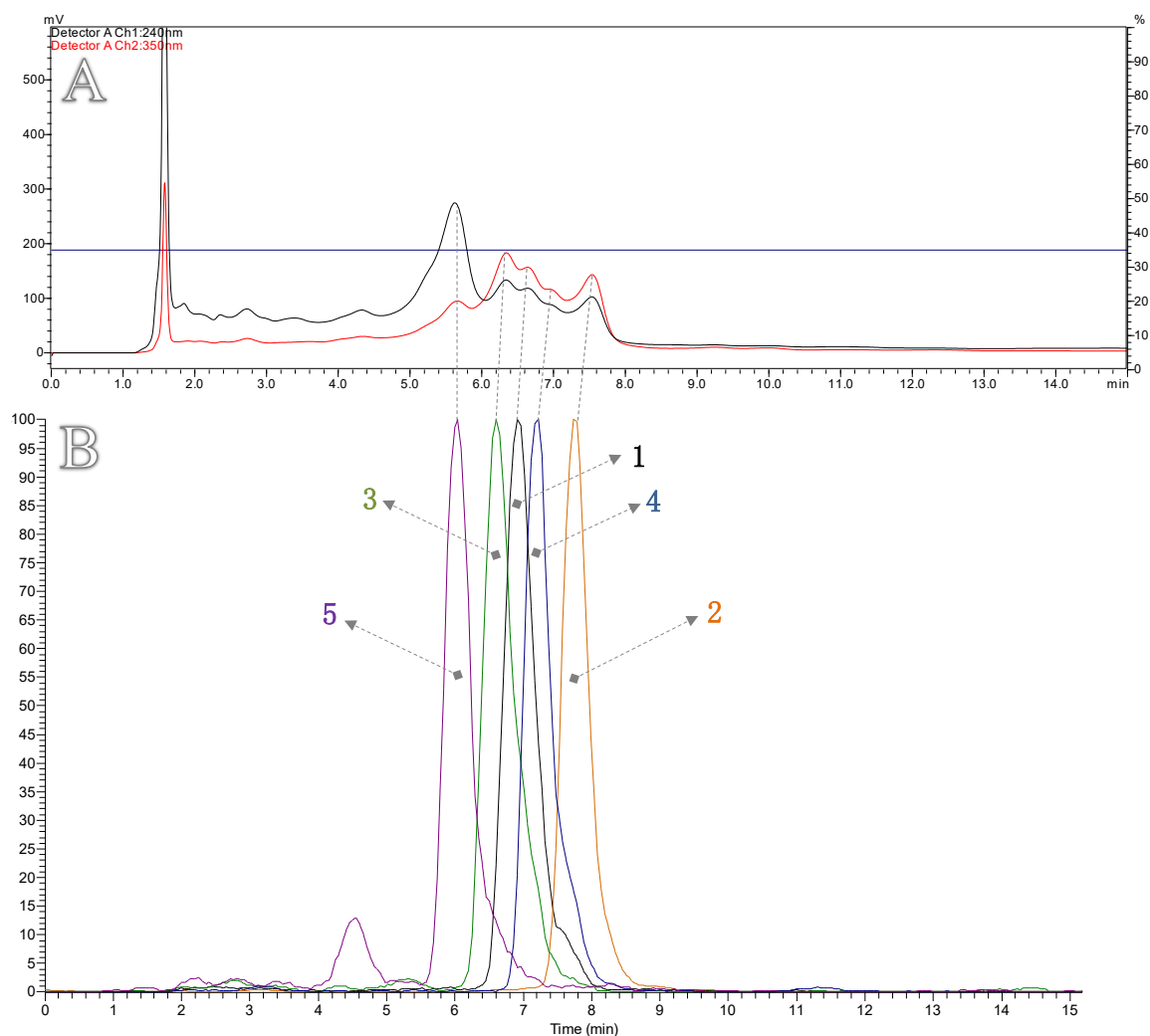


**Figura 30.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Kinetex C8 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m) sob eluição isocrática com metanol-água (35:65, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em  $m/z$  431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

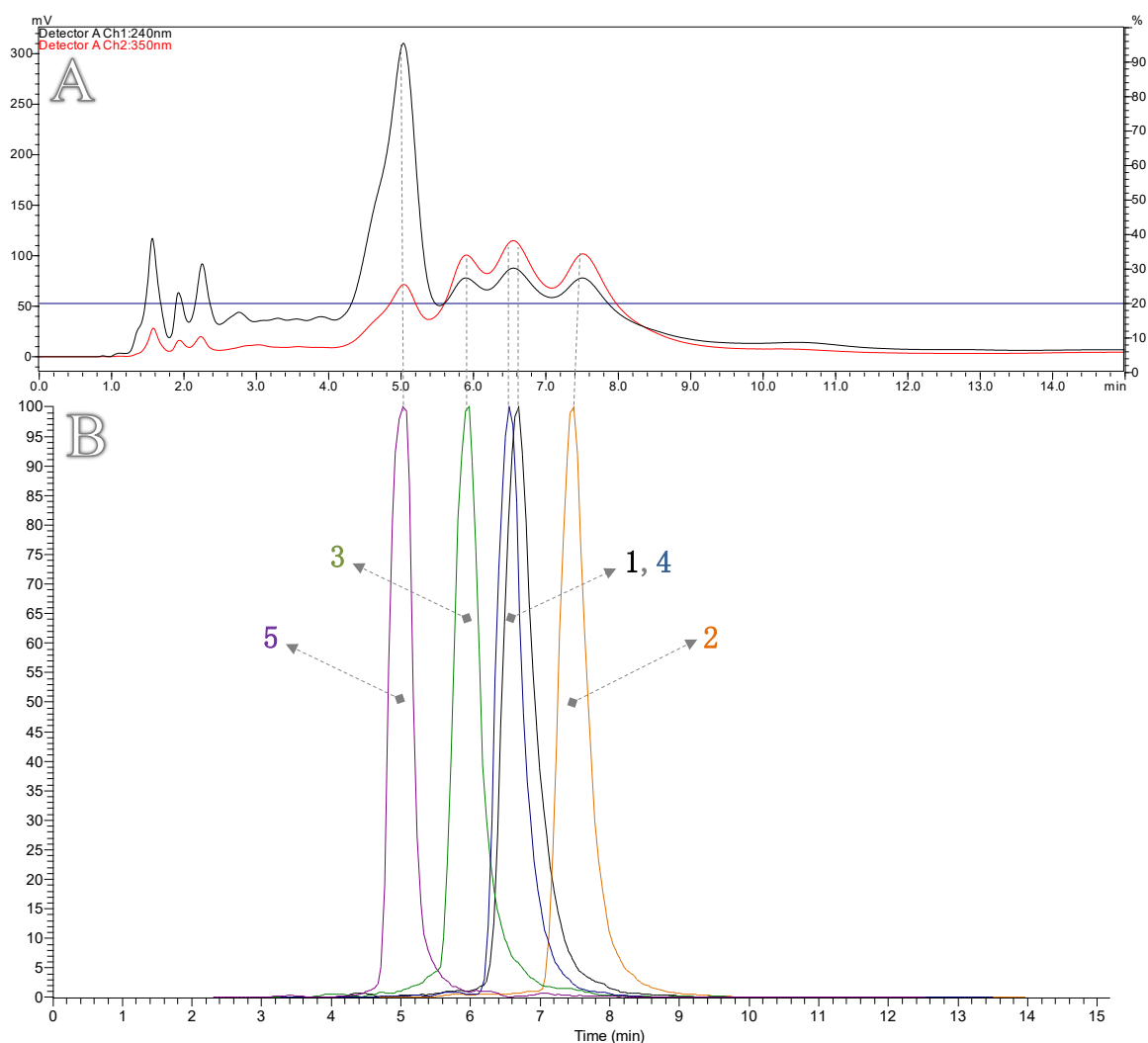


**Figura 31.** (A) Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna CN (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m) sob eluição isocrática com metanol-água (20:80, v/v) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm. (B) Cromatogramas de íons extraídos (EIC) para os íons em *m/z* 431 (substância 1), 445 (substância 2), 563 (substância 3), 577 (substância 4) e 609 (substância 5) sob as mesmas condições cromatográficas.

A Figura 32 mostra os cromatogramas obtidos a partir do isolamento das substâncias 1 a 5 utilizando uma das estratégias propostas por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting*. Devido à disponibilidade em nosso laboratório, uma coluna semipreparativa Luna C18(2) (250 mm  $\times$  10 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m) foi selecionada para a <sup>1</sup>D, permitindo o rápido isolamento da substância desconhecida 5 em alta concentração. As substâncias 1 a 4, coeluídas em uma segunda banda, foram coletadas, concentradas e, posteriormente, reinjetadas na <sup>2</sup>D, que utilizou uma coluna analítica Kinetex bifenil 100 A (150 mm  $\times$  4,6

mm, 100 Å, 5 µm) (ver Seção 4.7 para detalhes experimentais). Partindo de 160 mg da fração metanólica, o método de 2D-LC permitiu a obtenção de 54,0 mg (33,7%) da substância **5**, 11,7 mg (7,3%) da substância **1**, 15,3 mg (9,5%) da substância **2**, 6,2 mg (3,8%) da substância **3** e 4,8 mg (3,0%) da substância **4**. Esses resultados correspondem a uma recuperação de 57,3% dos glicosídeos de flavonoides da porção analisada da fração metanólica, o que, quando extrapolado para os 6,1 g obtidos a partir de 100 g de folhas secas, representa aproximadamente 3,5 g de glicosídeos de flavonoides. Esse valor indica que tais substâncias constituem cerca de 3,5% do material foliar seco, confirmando que esses metabólitos ocorrem em quantidades relevantes nas folhas de *S. subcordata* e que o método de 2D-LC desenvolvido proporcionou uma recuperação eficiente para o isolamento preparativo e a caracterização estrutural.

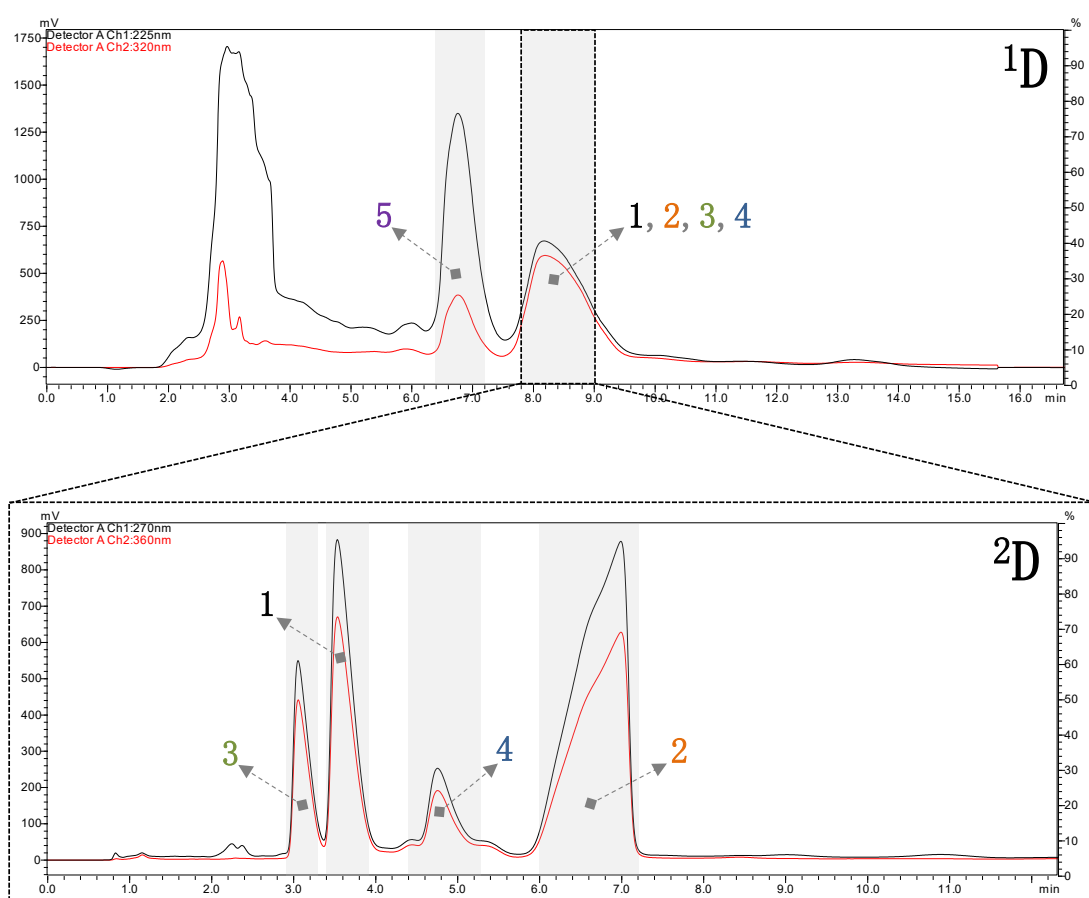


**Figura 32.** Cromatogramas do isolamento das substâncias **1** a **5** da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* por 2D-LC no modo *offline single heart-cutting*.

Além disso, o fator de retenção relativa (FRR) (Tabela A2) para cada par de substâncias foi determinado com base nos dados dos cromatogramas de íons extraídos (EIC), visando auxiliar na seleção de colunas apropriadas para um fracionamento subsequente de bandas que contenham substâncias coeluídas. Observou-se que valores de  $FRR \geq 1,2$ , quando associados à resolução à linha de base, indicam uma separação satisfatória para a etapa de isolamento. Como exemplo, a banda contendo as substâncias **2** e **5** coeluídas na coluna bifenil ( $k_5/k_2 = 1,0$ ) pode ser resolvida utilizando as colunas C18 ( $k_2/k_5 = 1,5$ ), C8 ( $k_2/k_5 = 1,5$ ), PFP ( $k_2/k_5 = 1,8$ ), fenil-hexil ( $k_2/k_5 = 1,3$ ) e CN ( $k_2/k_5 = 1,7$ ). Assim, esse parâmetro complementa as análises de ortogonalidade teórica e experimental, oferecendo um critério quantitativo e comparativo entre os diferentes sistemas cromatográficos avaliados.

### **5.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas da fração metanólica das folhas de *S. subcordata***

#### **5.3.1. Elucidação estrutural da substância 5**

A substância **5** foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de HRESIMS (Figura 33) foi observado um pico base em  $m/z$  609,1470  $[M-H]^-$  (calculado para  $C_{27}H_{29}O_{16}$ , 609,1456), que juntamente com os dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}C$  (Figura 34), permitiu a confirmação da fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{16}$ .

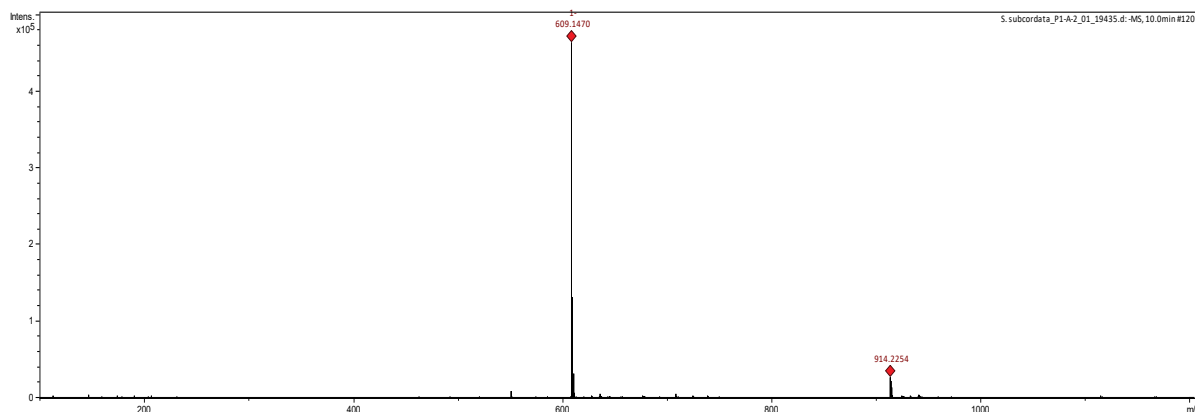


**Figura 33.** Espectro de HRESIMS no modo negativo da substância **5**.

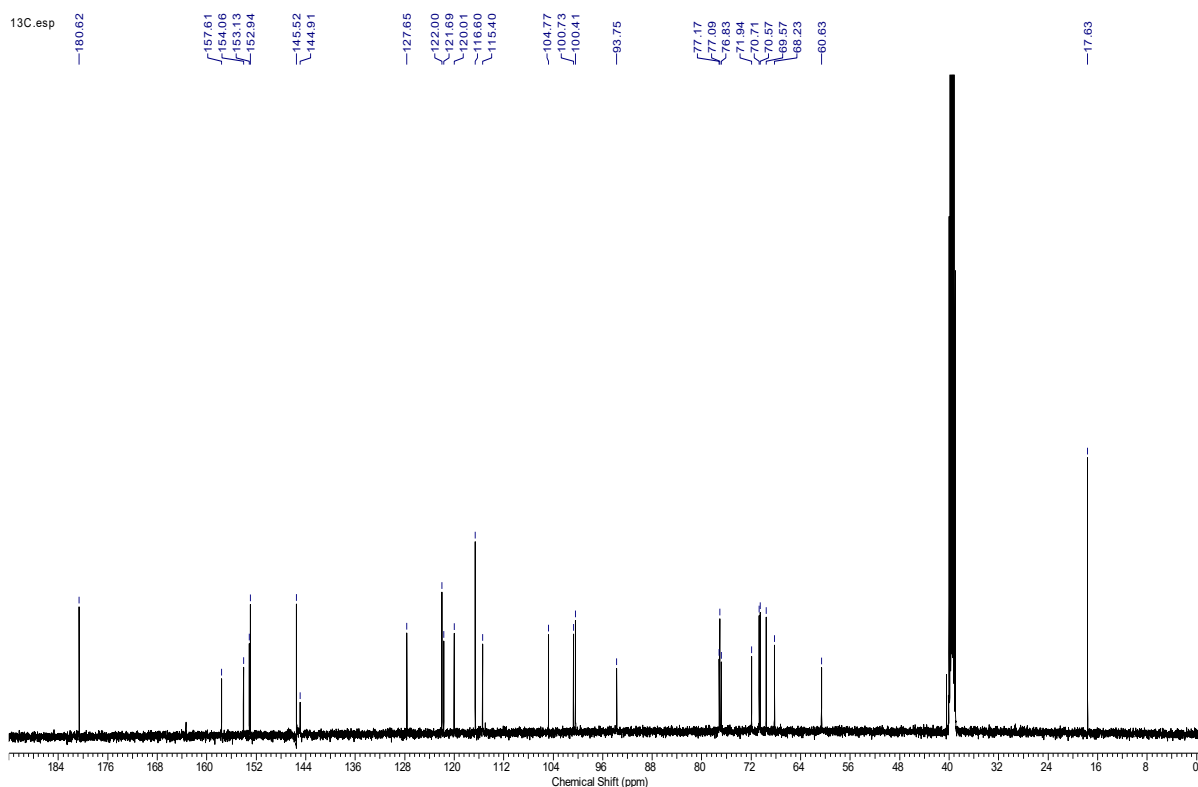


**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

Conforme descrito na seção **5.1.5**, a análise do padrão de fragmentação sugeriu que a substância **5** é um *O*-neohesperidosídeo de uma isoflavona, com padrões de tri- e dihidroxilação nos anéis A e B, respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 35, 36 e A7) foi observado um simpleto desblindado em  $\delta_{\text{H}}$  8,30 (1H, s), que se correlacionou

com o sinal de carbono em  $\delta_C$  154,1 no espectro de HSQC (Figura 37). De fato, esses sinais são característicos da posição 2 do anel C de isoflavonas (EL-SOHLY *et al.*, 1999). Além disso, três sinais de prótons aromáticos foram observados em  $\delta_H$  6,99 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz), 6,80 (1H, dd,  $J = 8,3, 2,0$  Hz) e 6,77 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz), consistentes com um sistema de spin ABX (ANDERSEN *et al.*, 2010). As constantes de acoplamento observadas (2,0 e 8,3 Hz) são características de acoplamentos *meta* e *orto*, como tipicamente encontrados no anel B de flavonoides 3',4'-dihidroxilados (EL-SOHLY *et al.*, 1999). No espectro de HSQC (Figura 37), esses prótons exibiram picos cruzados em  $\delta_H$  6,99 (H-2')/ $\delta_C$  116,6 (C-2'),  $\delta_H$  6,80 (H-6')/ $\delta_C$  120,0 (C-6') e  $\delta_H$  6,77 (H-5')/ $\delta_C$  115,4 (C-5'). Por outro lado, ainda na região de prótons aromáticos do espectro de RMN de  $^1H$ , um simpleto foi observado em  $\delta_H$  6,49 (1H, s), o qual se correlacionou com o sinal de carbono em  $\delta_C$  93,7 no espectro de HSQC, sendo esses sinais característicos de um anel A trissubstituído em flavonoides (AQUINO *et al.*, 2001; EL-SOHLY *et al.*, 1999).

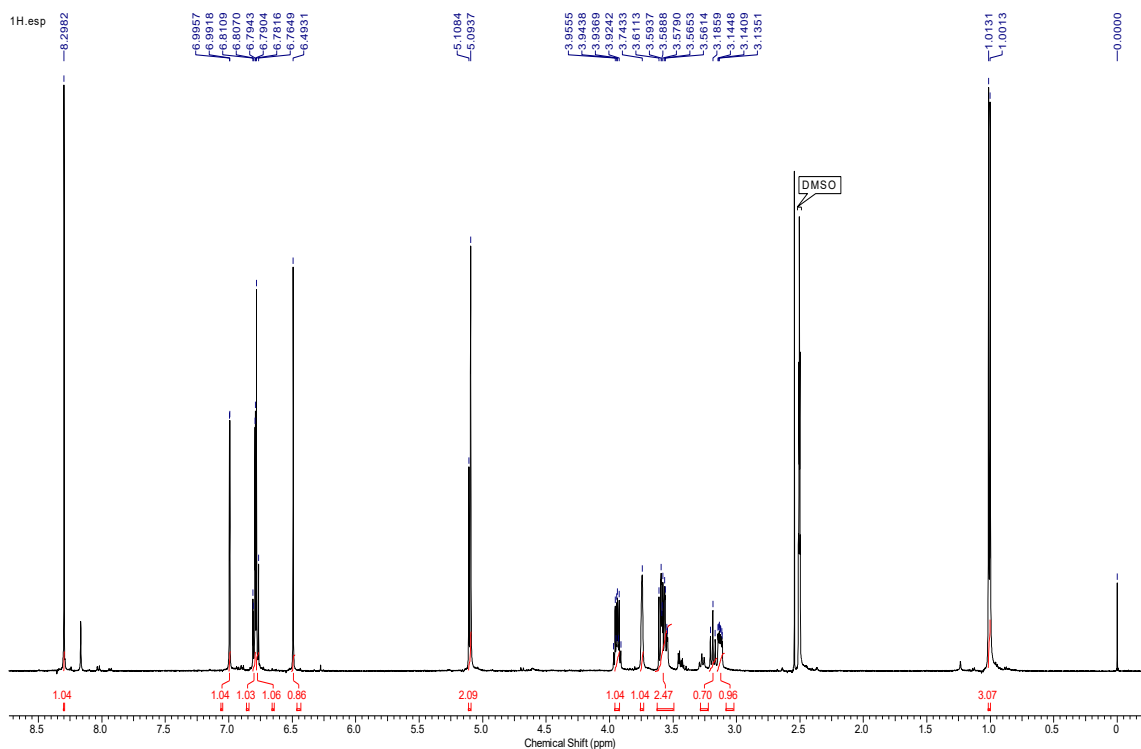
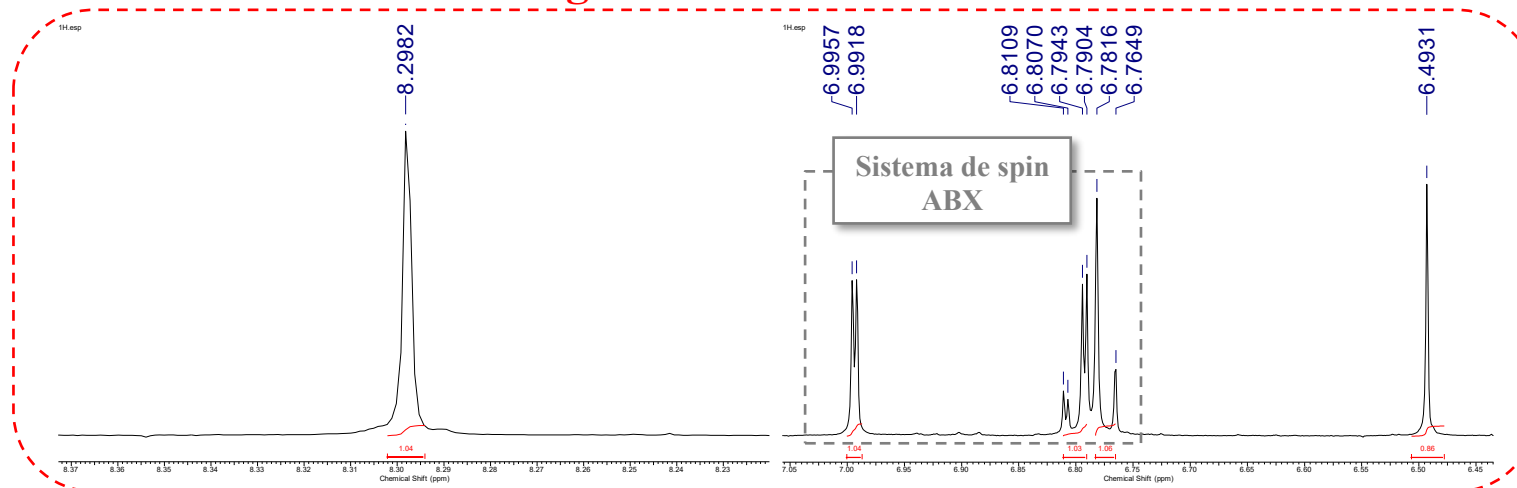


**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1H$  (com supressão do sinal da água) da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

## Região aromática/olefínica



## Região alifática

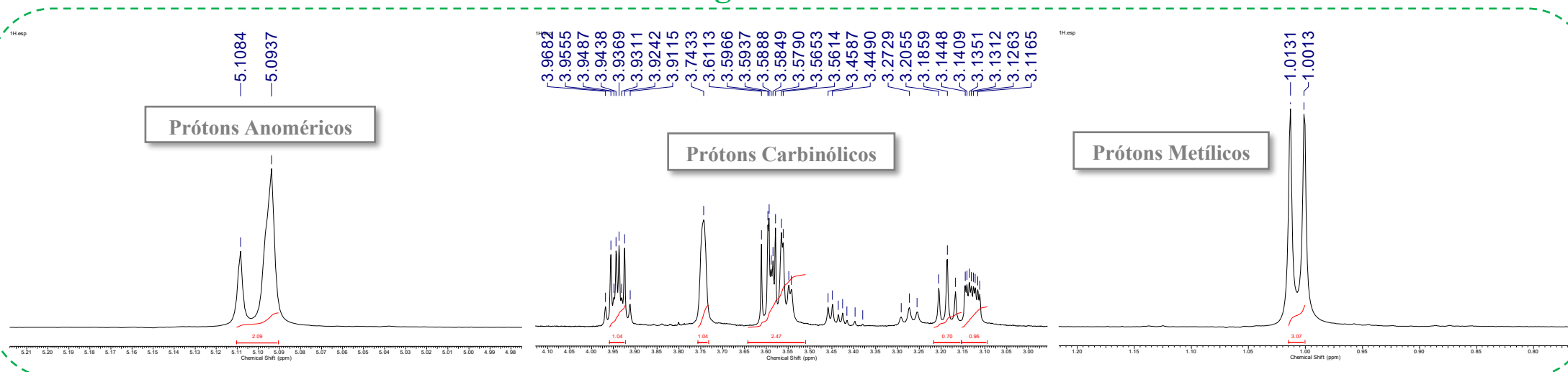


**Figura 36.** Ampliação da região aromática/olefínica e da região alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

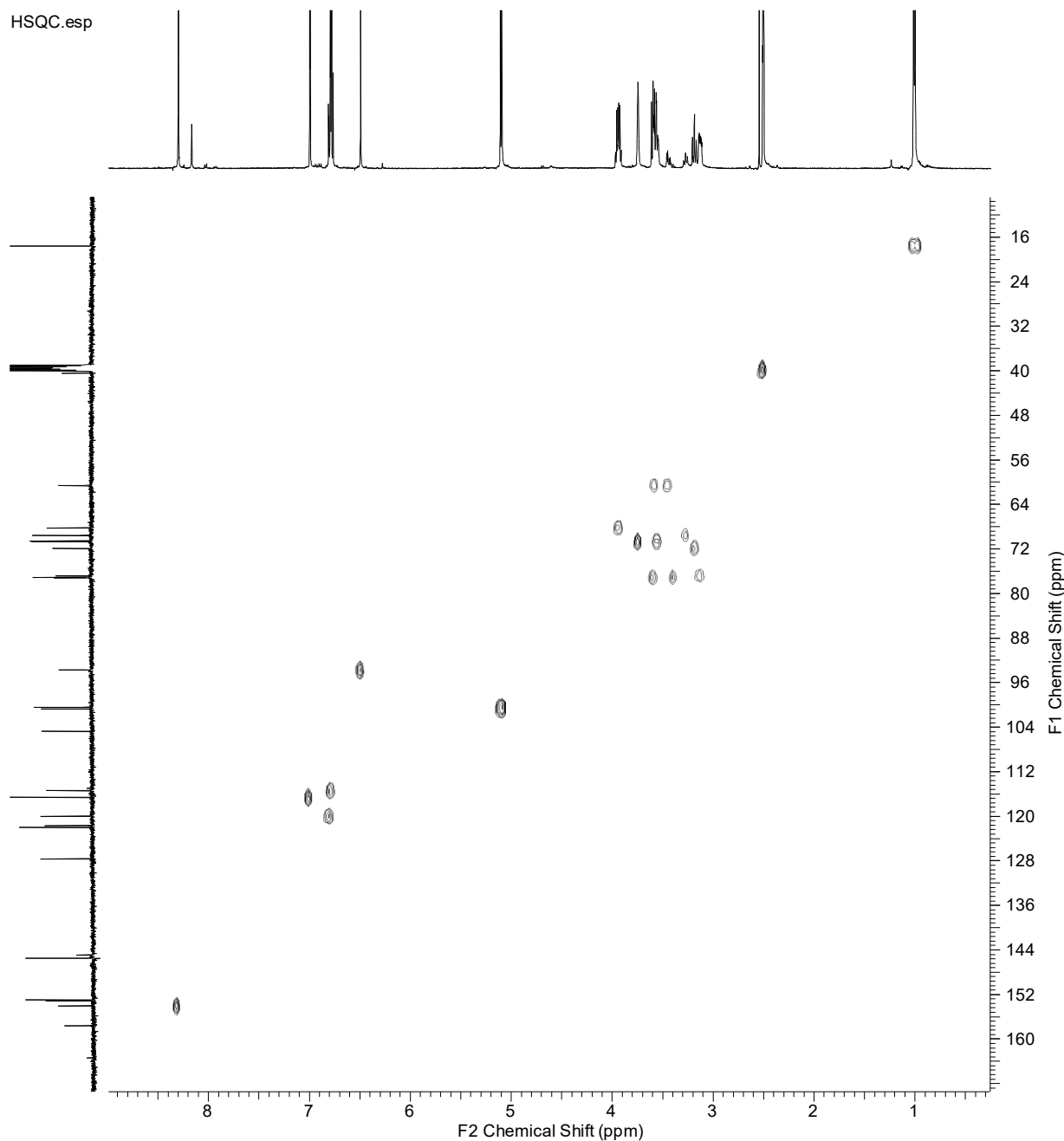


**Figura 37.** Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **5**.

A região de prótons alifáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 36) exibiu sinais sobrepostos para dois prótons anoméricos em  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (1H, d,  $J = 7,4$  Hz) e 5,09 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz); sinais sobrepostos para dez prótons carbinólicos entre  $\delta_{\text{H}}$  3,94 e 3,13; e um duplete referente a prótons metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (3H, d,  $J = 5,9$  Hz), confirmando a presença de dois resíduos de açúcar. Devido à sobreposição, as constantes de acoplamento ( $J$ ) e as

multiplicidades desses sinais foram atribuídas usando o espectro de JRES (Figura 38). O espectro de HSQC (Figura 37) mostrou correlações entre os sinais de prótons anoméricos em  $\delta_H$  5,10 e 5,09 e seus respectivos sinais de carbonos anoméricos em  $\delta_C$  100,7 e 100,4. Por outro lado, os sinais de prótons carbinólicos entre  $\delta_H$  3,94 e 3,13 correlacionaram-se com sinais de carbonos carbinólicos entre  $\delta_C$  77,2 e 60,6, enquanto o sinal de prótons metílicos ( $\delta_H$  1,01, 3H, d,  $J = 5,9$  Hz) foi associado ao carbono metílico em  $\delta_C$  17,6.

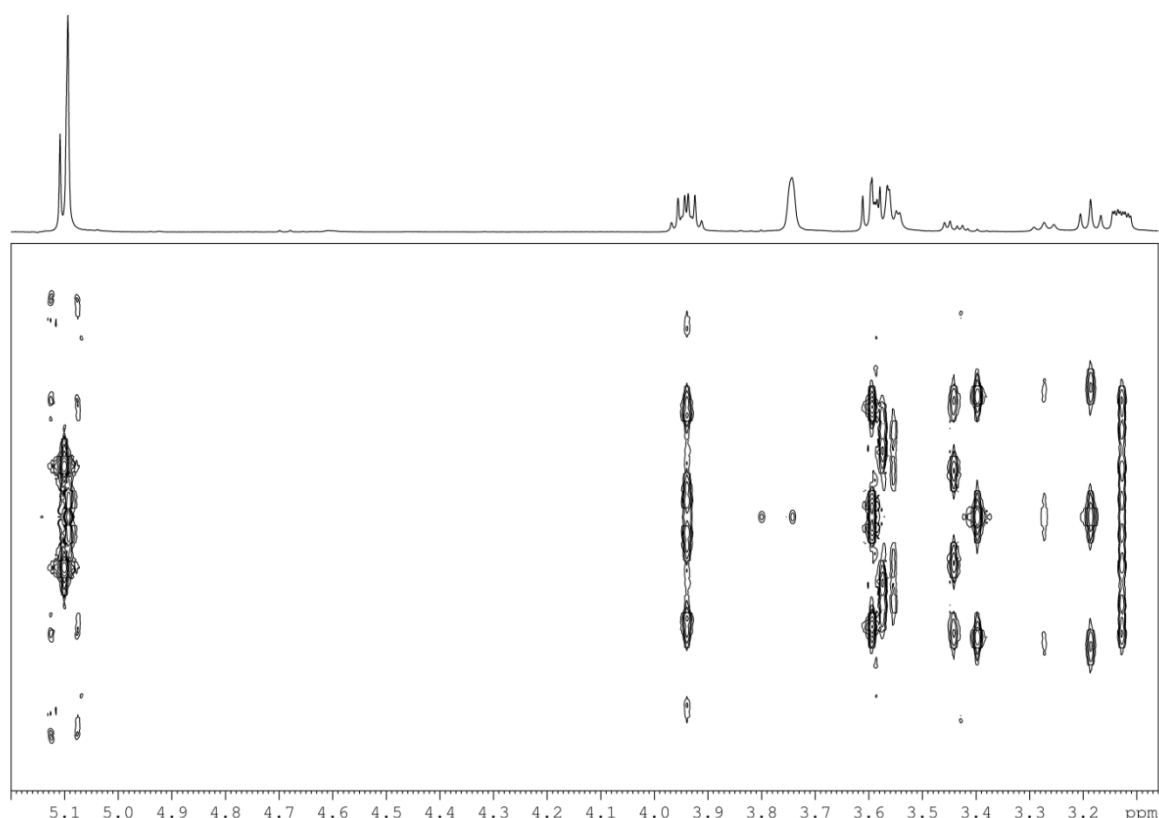


**Figura 38.** Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1H$  500 MHz,  $DMSO-d_6$ ) da substância **5**.

No espectro de HMBC (Figuras A8 e 39), as correlações intensas do simpleto desblindado em  $\delta_H$  8,30 (H-2) com o sinal de carbono carbonílico em  $\delta_C$  180,6 (C-4), bem como com os dois sinais de carbonos aromáticos em  $\delta_C$  152,9 (C-9) e 122,0 (C-1'), suportam a atribuição deste hidrogênio à posição 2 do anel C. As correlações observadas para os sinais

em  $\delta_H$  6,99 (H-2') e 6,80 (H-6') com o sinal de carbono desblindado em  $\delta_C$  145,5 (C-4'), juntamente com a correlação do sinal em  $\delta_H$  6,77 (H-5') com o sinal de carbono desblindado em  $\delta_C$  144,9 (C-3'), confirmam a presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B. Além disso, os prótons em  $\delta_H$  6,80 (H-6') e 6,77 (H-5') exibiram correlações com o sinal de carbono em  $\delta_C$  121,7, atribuído a C-3 do anel C.

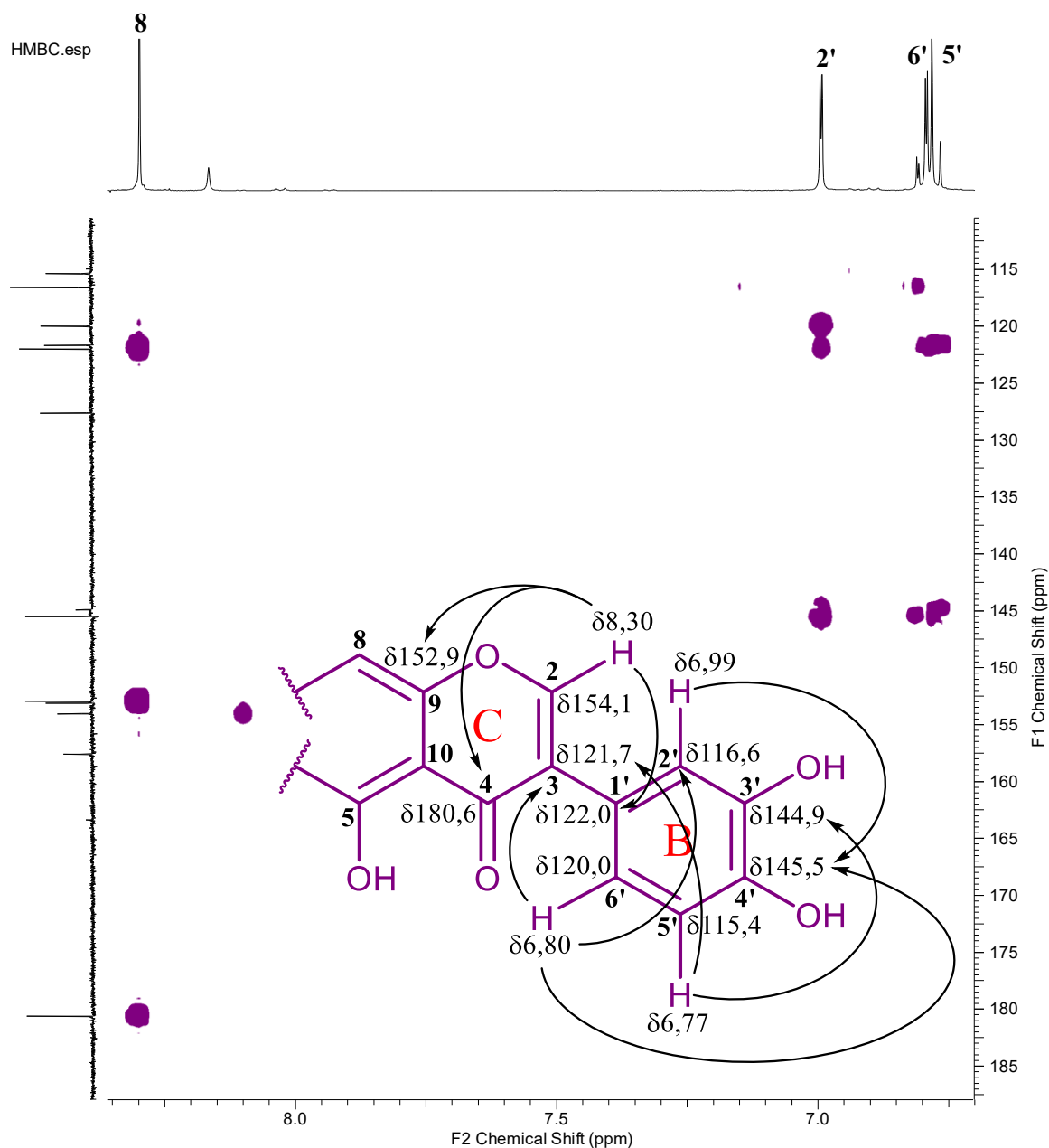


**Figura 39.** Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1H$  500 MHz,  $^{13}C$  125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **5** para os prótons em  $\delta_H$  8,30 (H-2), 6,99 (H-2'), 6,80 (H-6') e 6,77 (H-5').

Por outro lado, ainda no espectro de HMBC (Figuras A8 e 40A), o simpleto aromático em  $\delta_H$  6,49 (1H, s), associado ao anel A, mostrou correlações com os sinais de carbono em  $\delta_C$  152,9 (C-9), 157,6 (C-7) e 104,8 (C-10), bem como com um sinal de carbono desblindado em  $\delta_C$  127,7. Adicionalmente, a correlação entre o sinal do próton anomérico em  $\delta_H$  5,10 (1H, d,  $J = 7,4$  Hz) e o sinal em  $\delta_C$  127,7 indica *O*-glicosilação neste carbono.

A determinação inequívoca da localização da ligação *O*-glicosídica entre a aglicona e a fração de açúcar foi alcançada por meio de experimentos seletivos de NOESY 1D. A excitação seletiva do sinal do próton anomérico em  $\delta_H$  5,10 (H-1'') mostrou correlação NOE exclusivamente com o sinal em  $\delta_H$  13,12 (1H, s), característico de próton quelato do grupo OH-5 (Figura 40B) (EL-SOHLY *et al.*, 1999; NAKAMURA & HATTORI, 1998). Além disso, a excitação seletiva de  $\delta_H$  13,12 (OH-5) também exibiu intensa correlação NOE com o sinal em  $\delta_H$  5,10 (H-1'') (Figura 40C), indicando que o açúcar está ligado na posição C-6 da aglicona. Assim, o simpleto aromático em  $\delta_H$  6,49 e o sinal de carbono em  $\delta_C$  127,7 foram atribuídos a H-8 e C-6 do anel A, respectivamente.

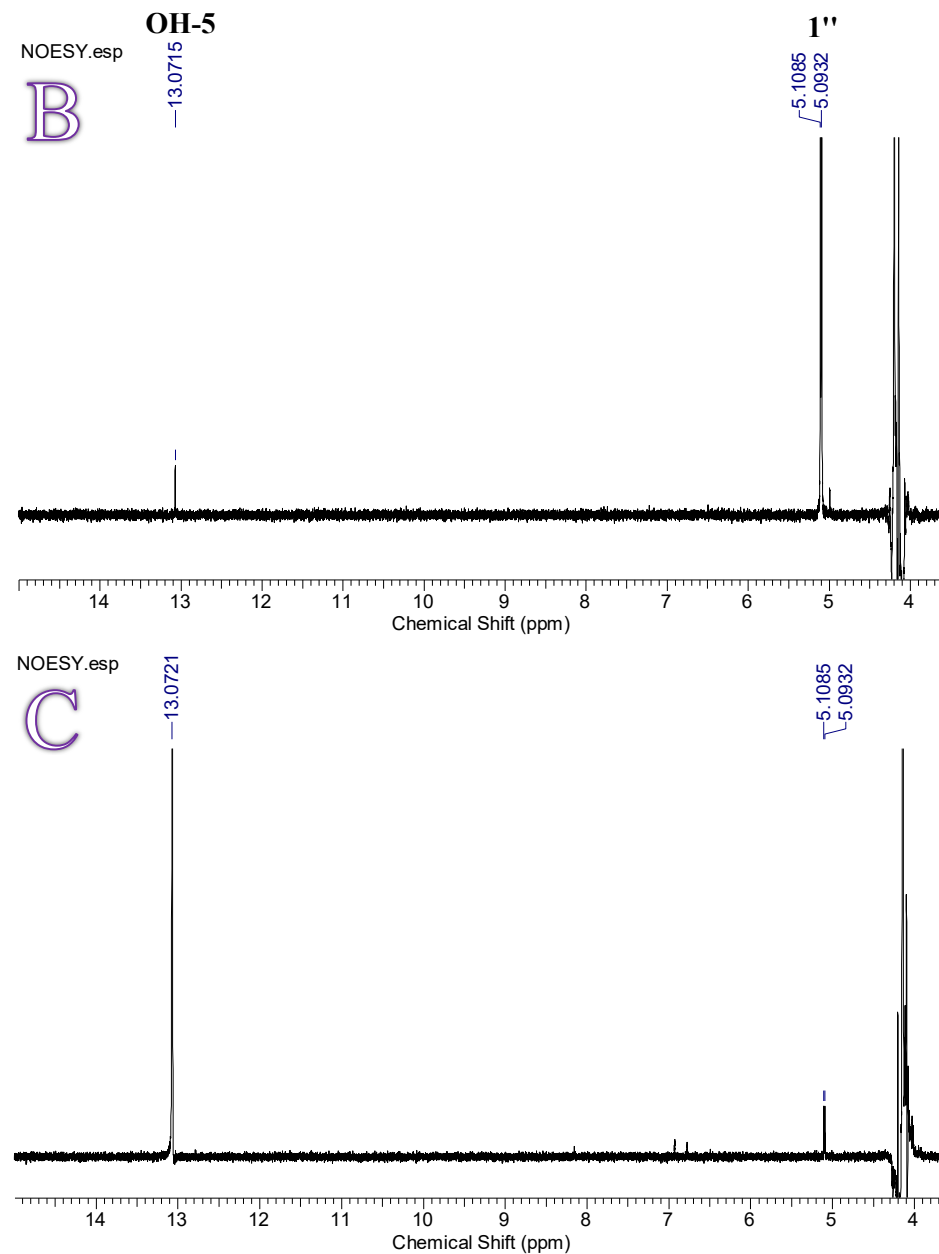
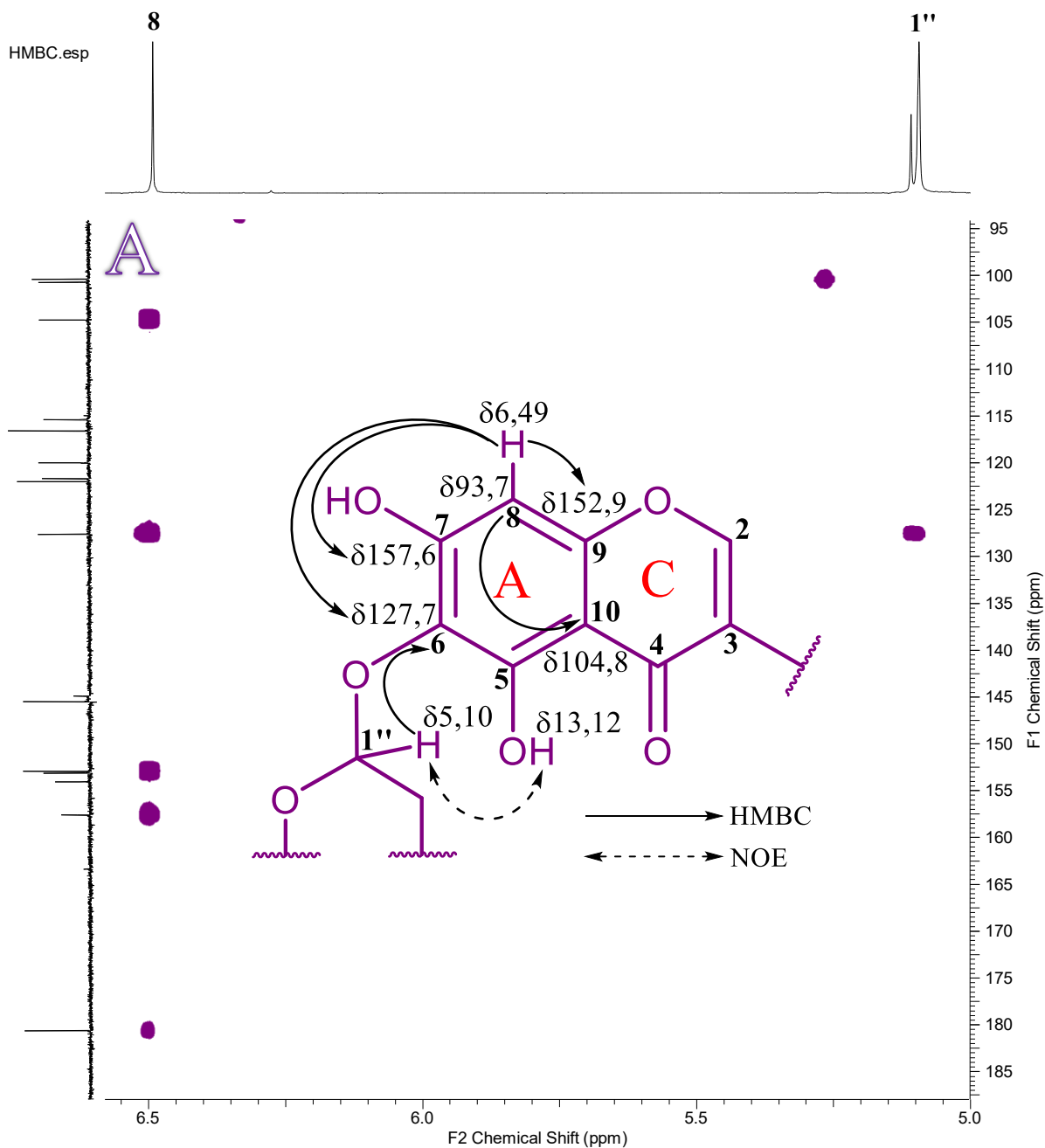


**Figura 40.** Correlações-chave observadas no (A) espectro de HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **5** para os prótons em  $\delta_{\text{H}}$  6,49 (H-8) e 5,10 (H-1''), juntamente com os espectros de NOESY 1D obtidos por irradiação seletiva do (B) sinal do próton anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (H-1'') e do (C) sinal do próton quelato em  $\delta_{\text{H}}$  13,12 (OH-5).

As correlações observadas nos espectros de COSY (Figuras A9 e 41A) e HMBC (Figuras A8 e 41B) estabeleceram a sequência dos prótons referentes aos resíduos de açúcar. A alta constante de acoplamento observada para o próton anomérico em  $\delta_H$  5,10 (1H, d,  $J = 7,4$  Hz), juntamente com as altas constantes de acoplamento diaxial dos prótons vizinhos e os deslocamentos químicos dos seus respectivos carbonos, confirmam a presença de uma fração *O*- $\beta$ -glicopiranosil ligada à aglicona (GURST, 1991; NAKAMURA & HATTORI, 1998). A correlação observada no espectro de HMBC (Figuras A8 e 41B) entre o sinal do próton anomérico da segunda fração de açúcar em  $\delta_H$  5,09 (H-1'') e o sinal de carbono em  $\delta_C$  77,2, atribuído a C-2'' do anel *O*- $\beta$ -glicopiranosil, confirma a ligação glicosídica 1 $\rightarrow$ 2 entre os resíduos de açúcar. Além disso, uma baixa constante de acoplamento foi observada para o próton anomérico em  $\delta_H$  5,09 (H-1'', d,  $J = 2,5$  Hz), bem como para os sinais de prótons carbinólicos em  $\delta_H$  3,74 (1H, m) e 3,56 (1H, dd,  $J = 9,5, 2,9$  Hz), atribuídos a H-2'' e H-3'', respectivamente, do segundo resíduo de açúcar. Esses dados, em conjunto com a correlação observada no espectro de COSY (Figuras A9 e 41A) entre o sinal de próton carbinólico em  $\delta_H$  3,94 (1H, dq,  $J = 9,5, 5,9$  Hz), atribuído a H-5'', e o sinal de prótons metílicos (H-6'') em  $\delta_H$  1,01 (3H, d,  $J = 5,9$  Hz), corroboram a presença do grupo  $\alpha$ -ramnopiranosil terminal (AQUINO *et al.*, 2001).

Portanto, com base nos dados de RMN (Tabela 5), a substância **5** foi elucidada como a isoflavona-3',4',5,7-tetrahidroxi-6-*O*-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo não descrita anteriormente, e foi denominada subcordatina (Figura 42).

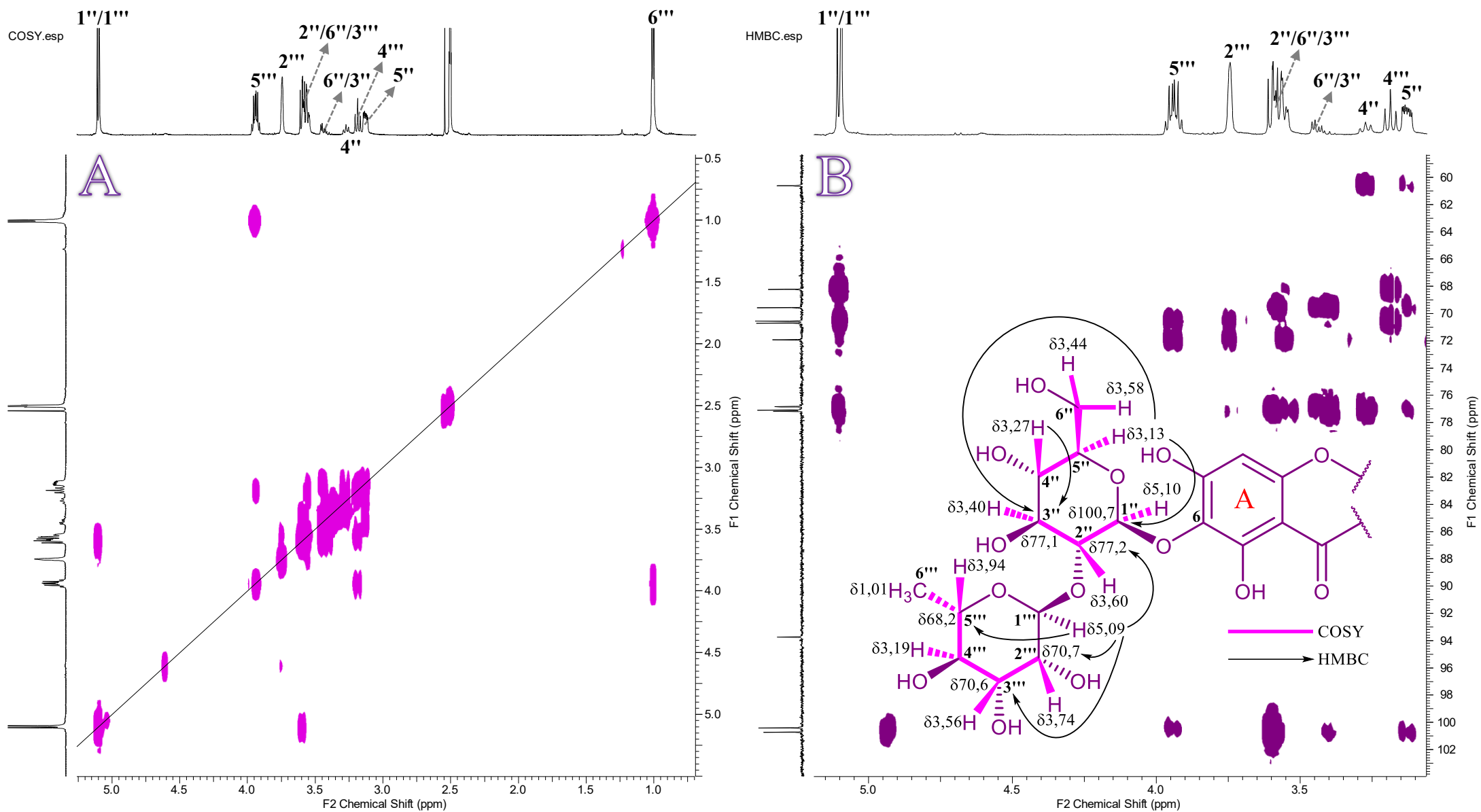


**Figura 41.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância **5**.

**Tabela 5.** Dados espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **5** (subcordatina).

| Posição                                         | $\delta_{\text{H}}$ (integral, mult., $J$ em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup> | HMBC <sup>b</sup>                 |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Aglicona</i>                                 |                                                               |                   |                                  |                                   |
| 2                                               | 8,30 (1H, s)                                                  | -                 | 154,1                            | 122,0; 152,9; 180,6               |
| 3                                               | -                                                             | -                 | 121,7                            | -                                 |
| 4                                               | -                                                             | -                 | 180,6                            | -                                 |
| 5                                               | -                                                             | -                 | 153,1                            | -                                 |
| 6                                               | -                                                             | -                 | 127,7                            | -                                 |
| 7                                               | -                                                             | -                 | 157,6                            | -                                 |
| 8                                               | 6,49 (1H, s)                                                  | -                 | 93,7                             | 104,8; 127,7; 152,9; 157,6; 180,6 |
| 9                                               | -                                                             | -                 | 152,9                            | -                                 |
| 10                                              | -                                                             | -                 | 104,8                            | -                                 |
| 1'                                              | -                                                             | -                 | 122,0                            | -                                 |
| 2'                                              | 6,99 (1H, d, 2,0)                                             | -                 | 116,6                            | 120,0; 122,0; 145,5               |
| 3'                                              | -                                                             | -                 | 144,9                            | -                                 |
| 4'                                              | -                                                             | -                 | 145,5                            | -                                 |
| 5'                                              | 6,77 (1H, d, 8,3)                                             | 6,80              | 115,4                            | 121,7; 144,9; 145,5               |
| 6'                                              | 6,80 (1H, dd, 8,3 e 2,0)                                      | 6,77              | 120,0                            | 116,6; 121,7; 145,5               |
| OH-5                                            | 13,11 (1H, s)                                                 | -                 | -                                | -                                 |
| <i>6-O-<math>\beta</math>-glicopiranosídeo</i>  |                                                               |                   |                                  |                                   |
| 1''                                             | 5,10 (1H, d, 7,4)                                             | 3,60              | 100,7                            | 127,7                             |
| 2''                                             | 3,60 (1H, dd, 8,9 e 7,4)                                      | 3,40; 5,10        | 77,2                             | 77,1; 100,4; 100,7                |
| 3''                                             | 3,40 (1H, t, 8,9)                                             | 3,60              | 77,1                             | 69,6; 77,2; 100,7                 |
| 4''                                             | 3,27 (1H, dd, 8,9 e 9,5)                                      | 3,13              | 69,6                             | 60,6; 77,1; 77,2; 76,8            |
| 5''                                             | 3,13 (1H, ddd, 9,5, 5,0 e 2,1)                                | 3,44              | 76,8                             | 60,6; 69,6; 77,1; 100,7           |
| 6''                                             | 3,58 (1H, dd, 11,8 e 2,1) e 3,44 (1H, dd, 11,8 e 5,0)         | 3,13; 3,44; 3,58  | 60,6                             | 69,6; 76,8                        |
| <i>2''-O-<math>\alpha</math>-ramnopiranosil</i> |                                                               |                   |                                  |                                   |
| 1'''                                            | 5,09 (1H, d, 2,5)                                             | -                 | 100,4                            | 68,2; 70,6; 70,7; 77,2            |
| 2'''                                            | 3,74 (1H, m)                                                  | 3,56              | 70,7                             | 70,6; 71,9                        |
| 3'''                                            | 3,56 (1H, dd, 9,5 e 2,9)                                      | 3,19              | 70,6                             | 71,9                              |
| 4'''                                            | 3,19 (1H, t, 9,5)                                             | 3,56; 3,94        | 71,9                             | 17,6; 68,2; 70,6                  |
| 5'''                                            | 3,94 (1H, dq, 9,5 e 5,9)                                      | 1,01; 3,19        | 68,2                             | 17,6; 70,6; 71,9; 100,4           |
| 6'''                                            | 1,01 (3H, d, 5,9)                                             | 3,94              | 17,6                             | 68,2; 71,9                        |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos ao sinal do TMS ( $\delta_{\text{H}}$  0,00)

<sup>b</sup>Deslocamentos químicos relativos ao sinal residual do DMSO não deuterado ( $\delta_{\text{C}}$  39,5)

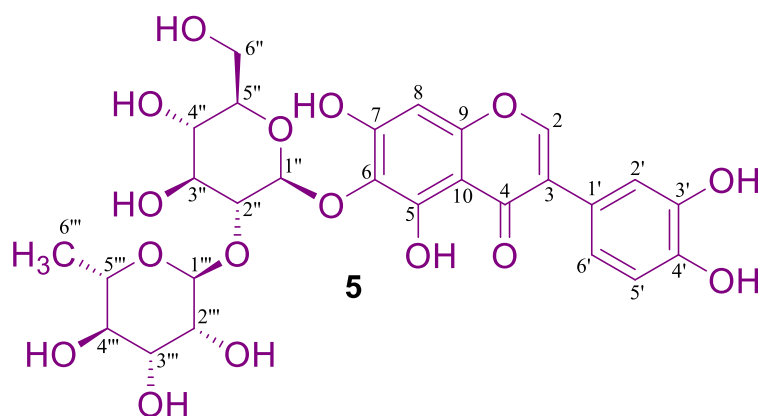


**Figura 42.** Estrutura química da isoflavona subcordatina (**5**).

É importante destacar que a aglicona da subcordatina foi recentemente projetada e sintetizada para combater eficazmente múltiplos elementos patológicos associados à doença de Alzheimer. Com base em uma avaliação sistemática da relação estrutura-atividade, Park e colaboradores (2023) destacam que a presença de um anel A trihidroxilado, juntamente com um anel catecol (anel B) ligado à posição C-3 do anel C, são características estruturais críticas que conferem a esse flavonoide sua versatilidade nas reatividades contra os múltiplos alvos patológicos investigados, incluindo radicais livres, acetilcolinesterase (AChE), amiloide- $\beta$  livre de metal ( $A\beta$ ) e amiloide- $\beta$  ligado a metal (metal- $A\beta$ ).

### 5.3.2. Elucidação estrutural da substância 1

A substância **1** foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de DI-MS (Figura 43) foi observado um pico base em  $m/z$  431  $[M-H]^-$ . Conforme descrito na seção 5.1.1, a análise do padrão de fragmentação sugeriu que a substância **1** corresponde à flavona isovitexina.

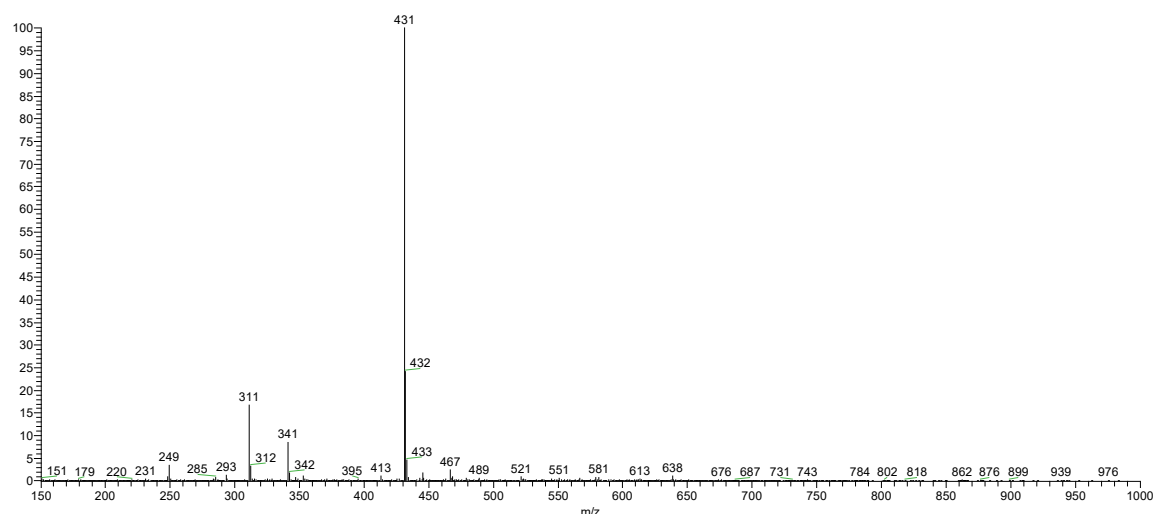


**Figura 43.** Espectro de massas no modo negativo da substância **1**.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 44) exibiu sinais correspondentes a 21 carbonos, incluindo 1 carbono  $\text{sp}^2$  carbonílico ( $\delta_{\text{C}}$  182,1), 14 carbonos  $\text{sp}^2$  aromáticos ou olefinicos ( $\delta_{\text{C}}$  163,7–93,8) e 6 carbonos  $\text{sp}^3$  carbinólicos ( $\delta_{\text{C}}$  81,7–61,6), caracterizando um conjunto de sinais típico de monohexosídeos de flavonas (ZHANG *et al.*, 2009).

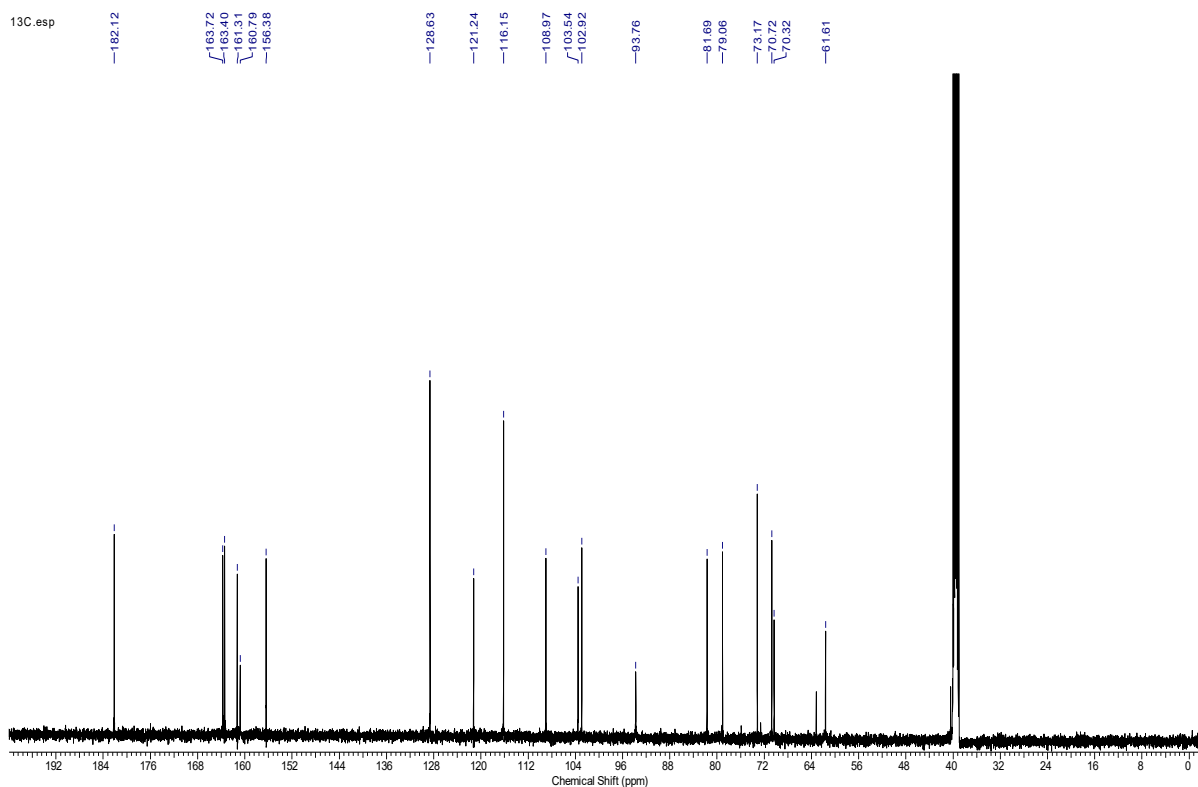


**Figura 44.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45), os dupletos aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 (2H, d,  $J = 9,2$  Hz) e 6,93 (2H, d,  $J = 9,2$  Hz), com constantes de acoplamento do tipo *orto*, derivam de um sistema de spin AA'XX', compatível com H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B 4'-hidroxilado do núcleo apigenina (VAN LOO *et al.*, 1986). O duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (H-3'/H-5') apresentou-se mais protegido em relação ao duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 (H-2'/H-6'), em virtude do efeito de blindagem promovido pelo substituinte em C-4'. No espectro de HSQC (Figura 46), esses prótons exibiram picos cruzados em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 (H-2' e H-6')/ $\delta_{\text{C}}$  128,6 (C-2' e C-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (H-3' e H-5')/ $\delta_{\text{C}}$  116,2 (C-3' e C-5').

Além disso, ainda na região de sinais aromáticos/olefinicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45), foram observados os simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (1H, s) e 6,52 (1H, s). No espectro de HSQC (Figura 46), a correlação entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 e o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  102,9, bem como entre os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,52 e  $\delta_{\text{C}}$  93,8, sugere a presença de ambientes químicos distintos para cada um desses prótons. Na literatura, esses sinais são reportados como característicos da posição 3 no anel C ( $\delta_{\text{H}}$  6,77/ $\delta_{\text{C}}$  102,9) e da posição 8 no anel A ( $\delta_{\text{H}}$  6,52/ $\delta_{\text{C}}$  93,8) da isovitexina (ZHANG *et al.*, 2009).

Na região alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45), observou-se um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 (1H, d,  $J = 9,8$  Hz) referente ao próton anomérico H-1'', além de sinais sobrepostos para seis prótons carbinólicos entre  $\delta_{\text{H}}$  4,04 e 3,12, confirmando a presença de uma hexose. Devido à sobreposição, as constantes de acoplamento e as multiplicidades foram determinadas com auxílio do espectro de JRES (Figura 47). No espectro de HSQC (Figura 46), o próton anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 (H-1'') se correlacionou com seu respectivo sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  73,2 (C-1''), cujo descolamento químico é típico de ligação glicosídica C-C entre o açúcar e a aglicona (ZHANG *et al.*, 2009). Adicionalmente, os prótons carbinólicos correlacionaram-se com carbonos entre  $\delta_{\text{C}}$  81,7 e 61,6.

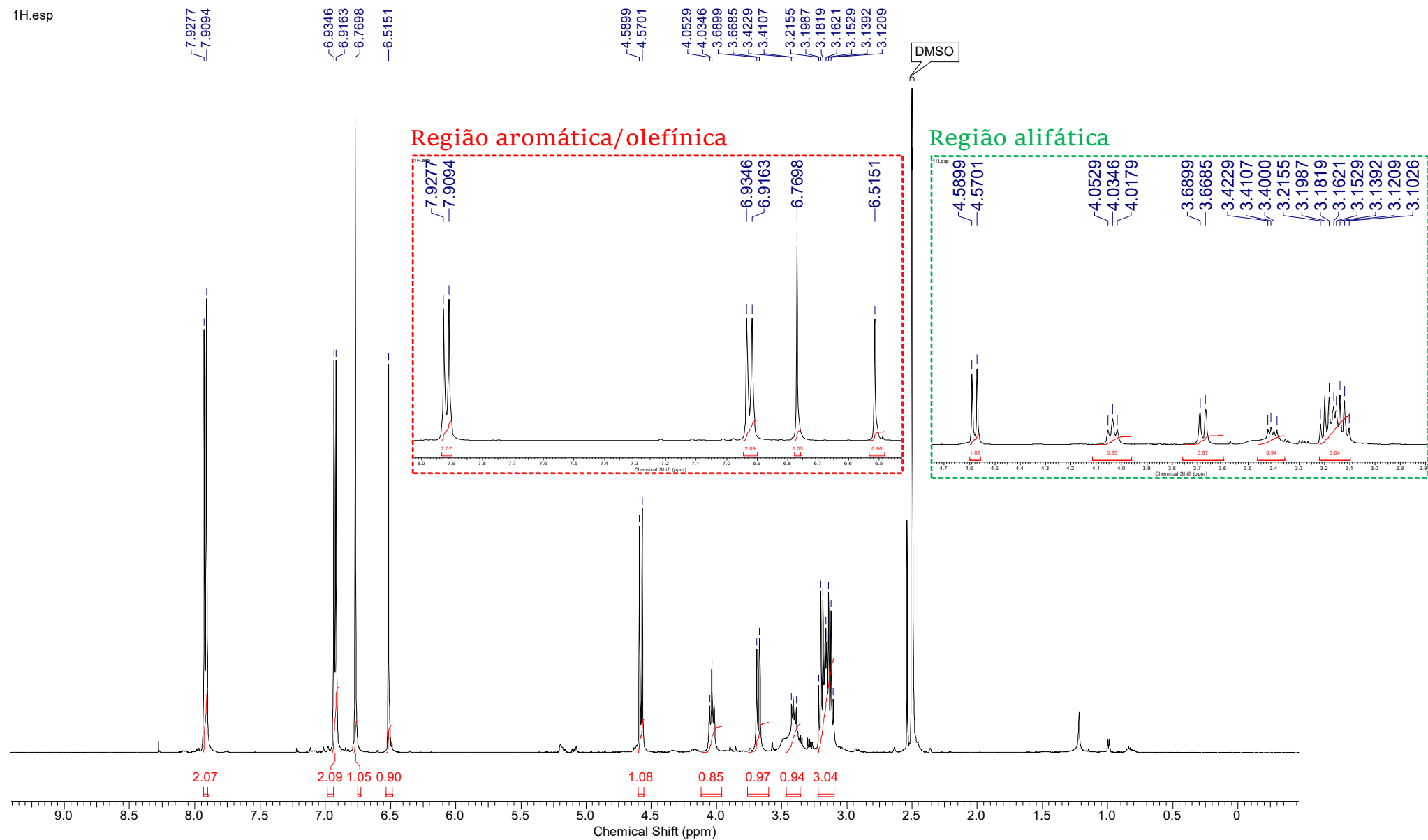


**Figura 45.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com supressão do sinal da água) da substância **1** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

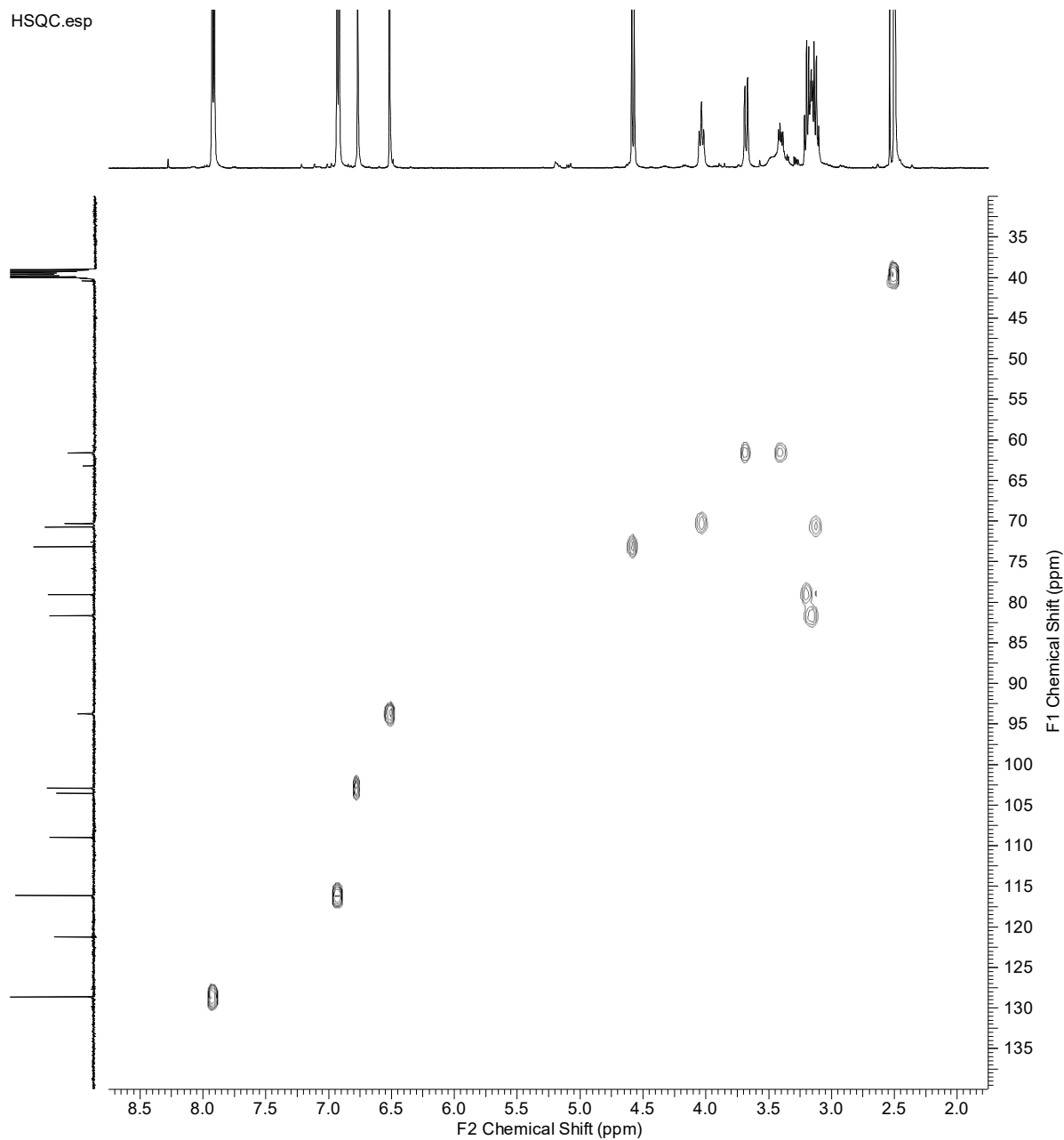


**Figura 46.** Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1**.

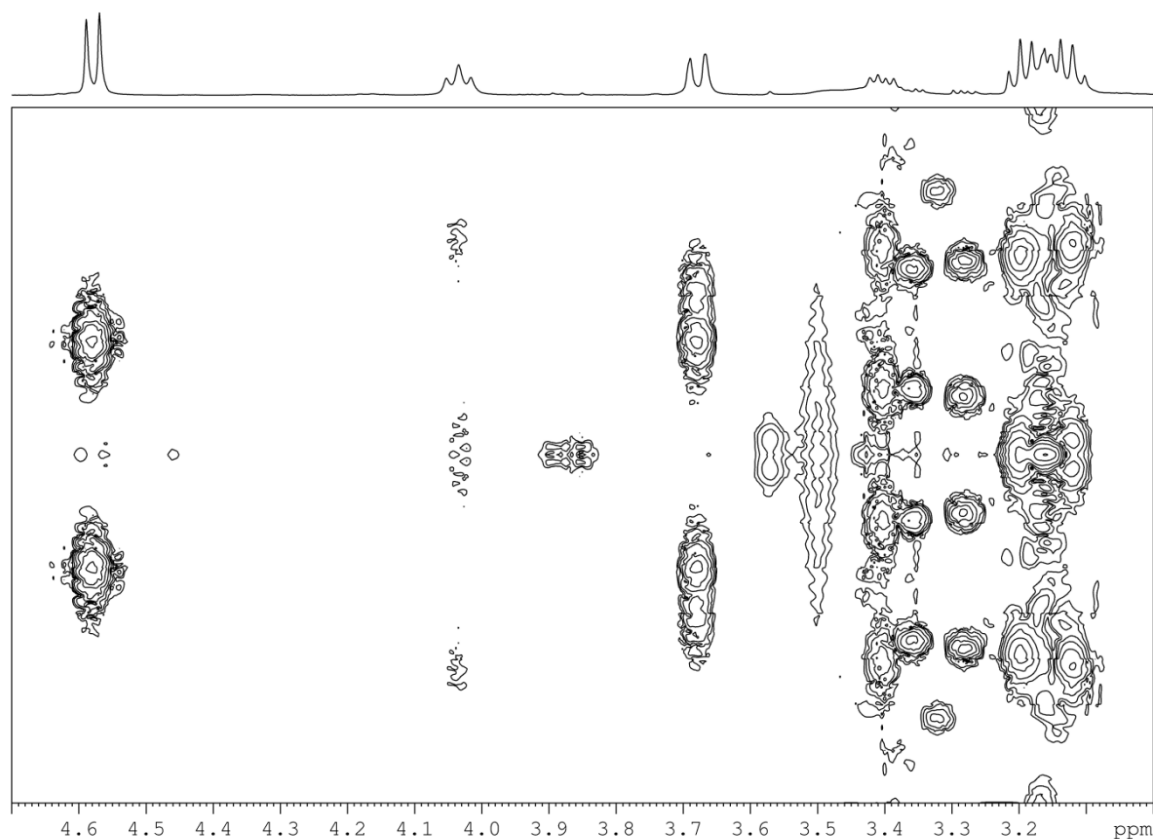


**Figura 47.** Ampliação da região de próton anomérico e prótons carbinólicos do mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1**.

No espectro de HMBC (Figura A10), observou-se uma intensa correlação entre o duplete aromático em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 (H-2'/H-6') e o sinal de carbono desblindado em  $\delta_{\text{C}}$  161,3, típico de C-4' hidroxilado (Figura 48) (ZHANG *et al.*, 2009). Tal observação, em conjunto com a correlação entre o duplete aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (H-3'/H-5') e esse sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  161,3 (C-4') (Figura 48), corrobora o padrão de substituição do anel B. Por outro lado, as correlações intensas do simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (H-3) com o sinal de carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  182,1 (C-4) e com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  163,7 (C-2), 121,2 (C-1') e 103,5 (C-10), suportam a atribuição deste hidrogênio à posição 3 no anel C (Figura 48).

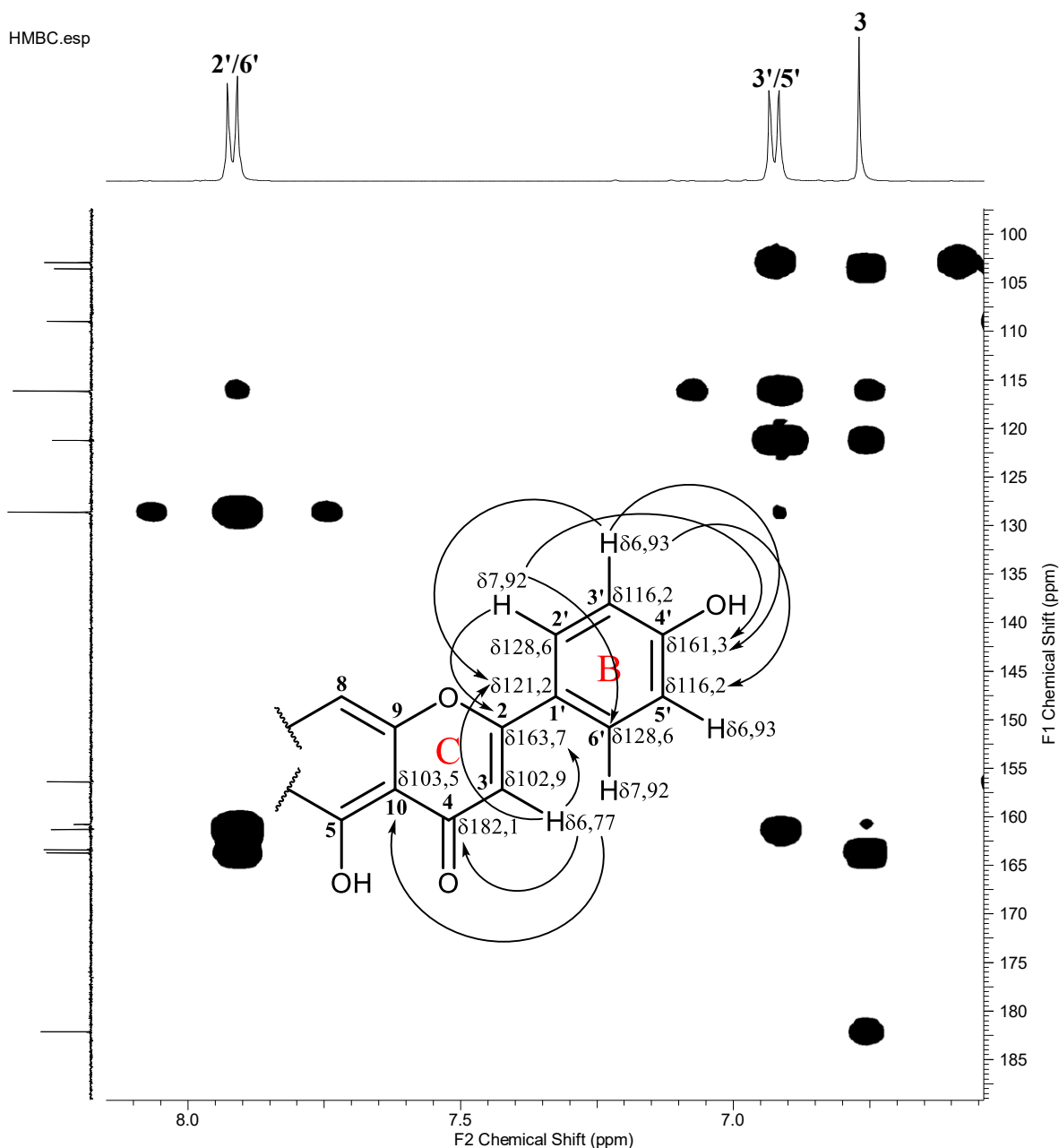


**Figura 48.** Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1** para os prótons em  $\delta_{\text{H}}$  7,92 (H-2'/H-6'), 6,93 (H-3'/H-5') e 6,77 (H-3).

As correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 49) para o simpleto aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,52 (H-8), bem como para o duplete referente ao próton anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 (H-1''), foram cruciais para confirmação da posição de glicosilação. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,52 (H-8) se correlacionou com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  156,4 (C-9), 163,4 (C-7) e 103,5 (C-10), bem como com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  109,0, típico de C-6 com C-glicosilação (ZHANG *et*

*al.*, 2009). Em adição, as correlações do duplete em  $\delta_H$  4,58 (H-1'') com os sinais de carbono em  $\delta_C$  109,0 (C-6) e 160,8 (C-5) corroboram a C-glicosilação na posição 6 do anel A, conforme sugerido pela análise por DI-MS.

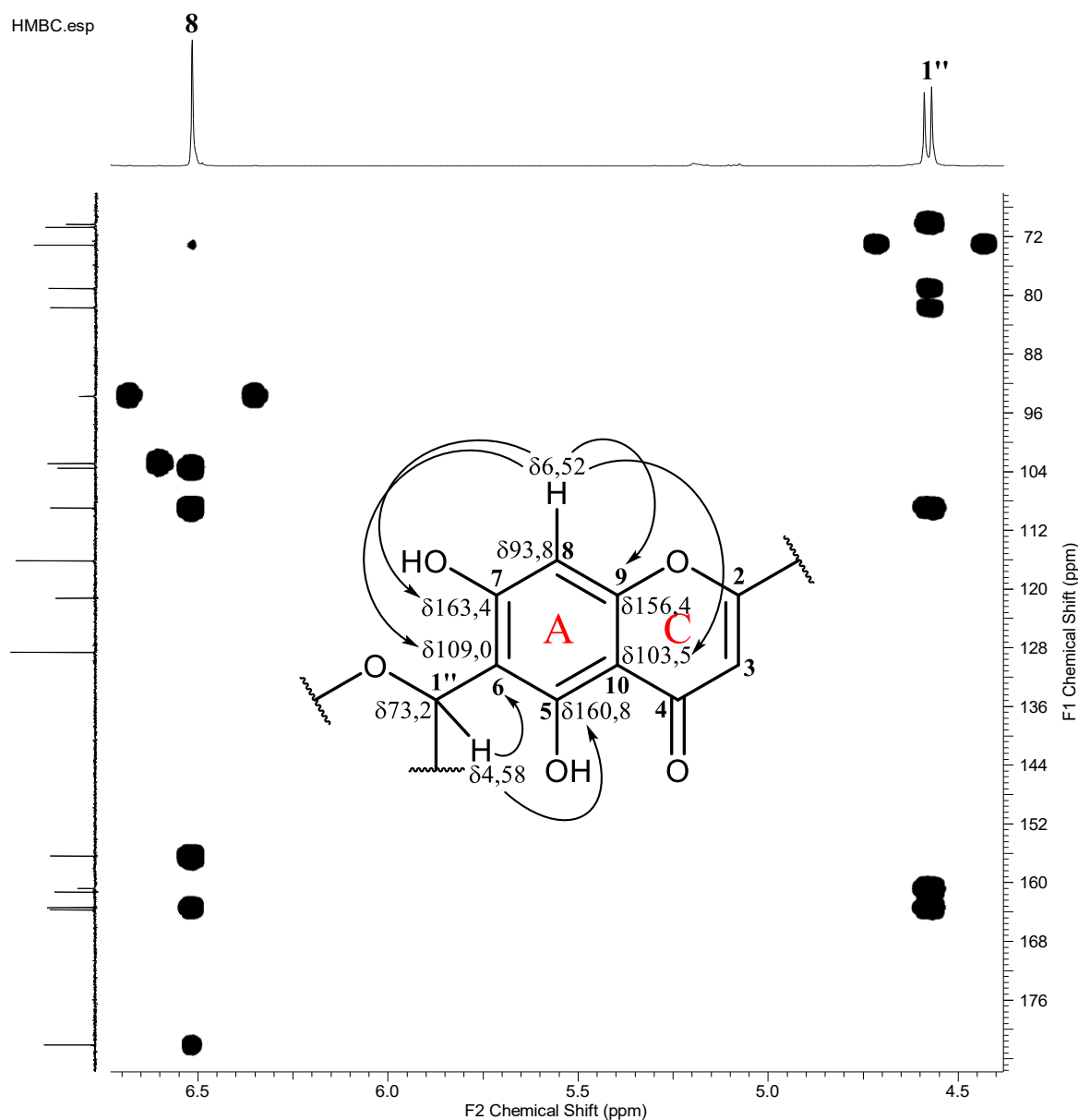


**Figura 49.** Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1H$  500 MHz,  $^{13}C$  125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **1** para os prótons em  $\delta_H$  6,52 (H-8) e 4,58 (H-1'').

Finalmente, a análise das correlações observadas nos espectros de COSY (Figuras A11 e 50) e HMBC (Figuras A10 e 51) estabeleceu a sequência de prótons dentro do resíduo

de hexose. A alta constante de acoplamento observada para o próton anomérico H-1'' em  $\delta_H$  4,58 (1H, d,  $J = 9,8$  Hz), em conjunto com as altas constantes de acoplamento diaxial dos demais prótons e os deslocamentos químicos dos seus respectivos carbonos, confirmam a presença de uma fração C- $\beta$ -glicopiranosil ligada à aglicona (GURST, 1991; NAKAMURA & HATTORI, 1998).

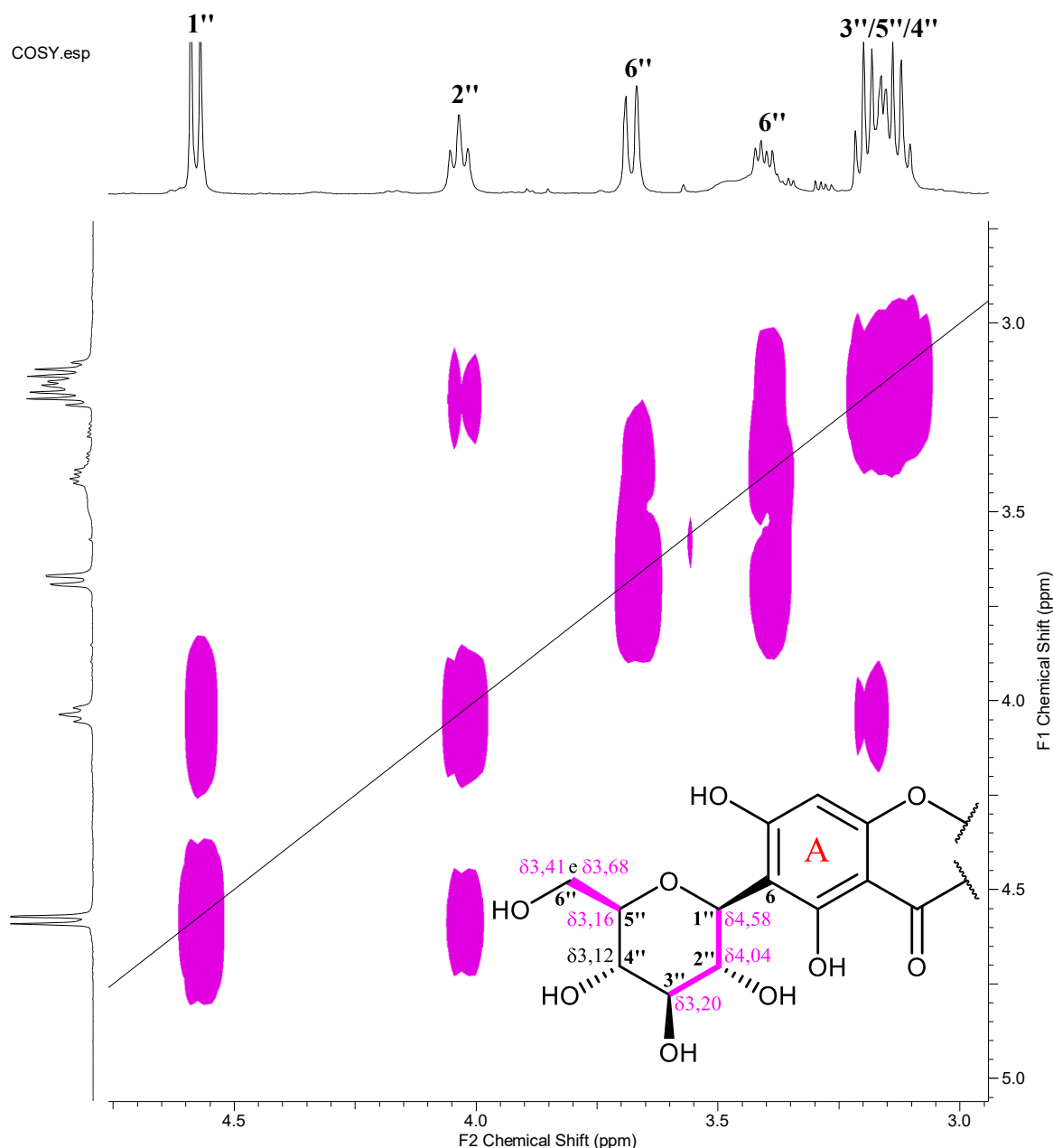


**Figura 50.** Correlações-chave observadas no espectro de COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1** para o próton anomérico em  $\delta_H$  4,58 (H-1'') e para os prótons carbinólicos.

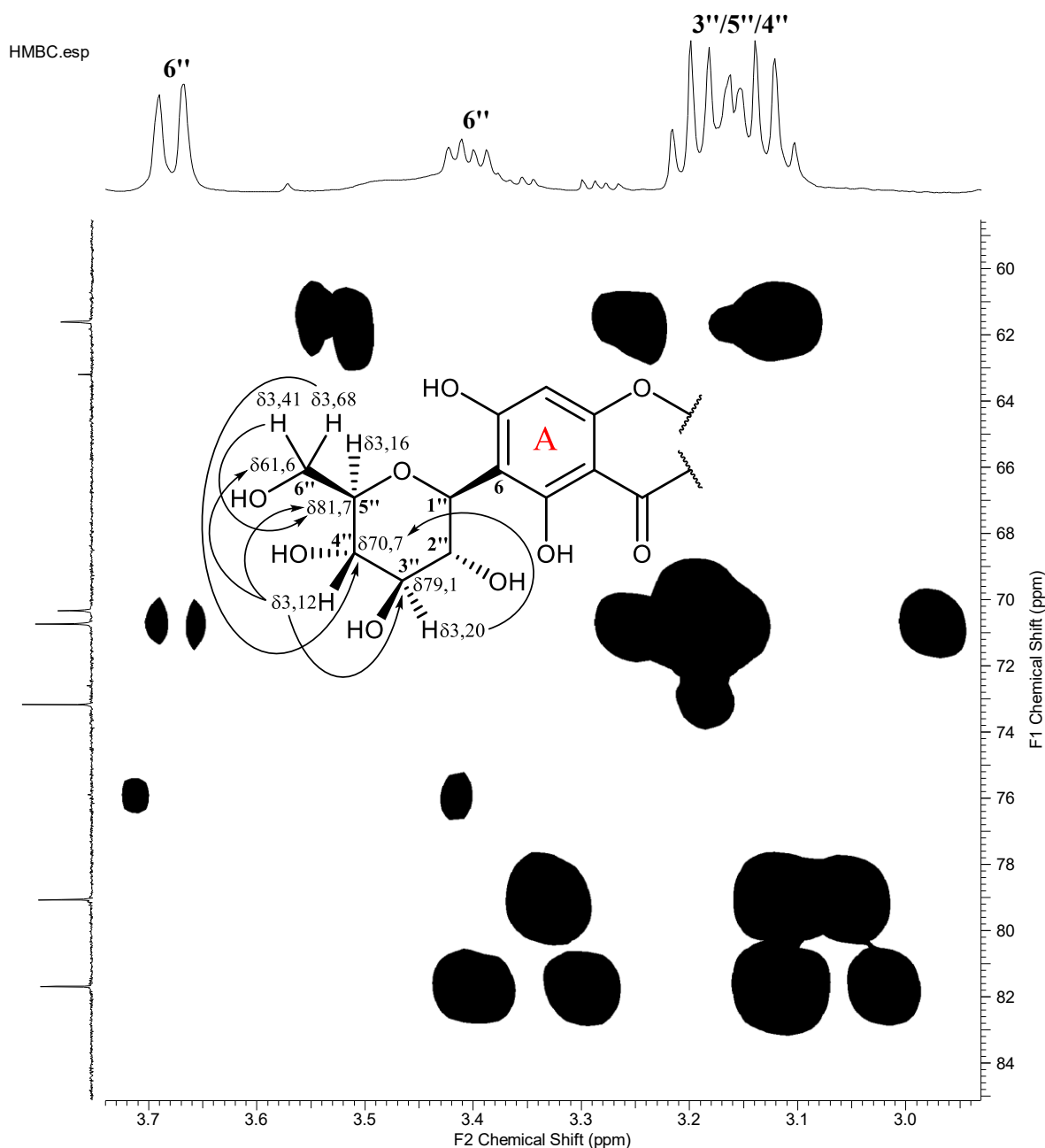


**Figura 51.** Correlações-chave observadas no espectro de HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1** para os prótons carbinólicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,68 (H-6''), 3,41 (H-6''), 3,20 (H-3'') e 3,12 (H-4'').

Portanto, a partir da comparação dos dados de RMN obtidos (Tabela 6) com dados da literatura (ZHANG *et al.*, 2009), a substância **1** foi caracterizada como a flavona isovitexina (apigenina 6-*C*- $\beta$ -glicopiranosídeo) (Figura 52), corroborando a identificação preliminar realizada a partir da análise por DI-MS.

**Tabela 6.** Dados espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **1** (isovitexina).

| Posição                                        | $\delta_{\text{H}}$ (integral, mult., $J$ em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                       |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Aglicona</i>                                |                                                               |                   |                                  |                                  |                                         |
| 2                                              | -                                                             | -                 | 163,7                            | 164,6                            | -                                       |
| 3                                              | 6,77 (1H, s)                                                  | -                 | 102,9                            | 102,6                            | 103,5; 121,2; 163,7; 182,1              |
| 4                                              | -                                                             | -                 | 182,1                            | 181,7                            | -                                       |
| 5                                              | -                                                             | -                 | 160,8                            | 160,6                            | -                                       |
| 6                                              | -                                                             | -                 | 109,0                            | 108,9                            | -                                       |
| 7                                              | -                                                             | -                 | 163,4                            | 163,3                            | -                                       |
| 8                                              | 6,52 (1H, s)                                                  | -                 | 93,8                             | 93,8                             | 73,2; 103,5; 109,0; 156,4; 163,4; 182,1 |
| 9                                              | -                                                             | -                 | 156,4                            | 156,3                            | -                                       |
| 10                                             | -                                                             | -                 | 103,5                            | 102,8                            | -                                       |
| 1'                                             | -                                                             | -                 | 121,2                            | 121,0                            | -                                       |
| 2' e 6'                                        | 7,92 (2H, d, 9,2)                                             | 6,93              | 128,6                            | 128,3                            | 116,2; 128,6; 161,3; 163,7              |
| 3' e 5'                                        | 6,93 (2H, d, 9,2)                                             | 7,92              | 116,2                            | 116,0                            | 116,2; 121,2; 128,6; 161,3              |
| 4'                                             | -                                                             | -                 | 161,3                            | 161,3                            | -                                       |
| <i>6-C-<math>\beta</math>-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                                  |                                  |                                         |
| 1''                                            | 4,58 (1H, d, 9,8)                                             | 4,04              | 73,2                             | 73,2                             | 70,3; 79,1; 81,7; 109,0; 160,8; 163,4   |
| 2''                                            | 4,04 (1H, dd, 9,8 e 7,8)                                      | 3,20; 4,58        | 70,3                             | 70,2                             | 73,2; 79,1; 109,0                       |
| 3''                                            | 3,20 (1H, dd, 9,6 e 7,8)                                      | 4,04              | 79,1                             | 78,9                             | 70,7; 73,2                              |
| 4''                                            | 3,12 (1H, dd, 9,6 e 8,3)                                      | -                 | 70,7                             | 70,5                             | 61,6; 79,1; 81,7                        |
| 5''                                            | 3,16 (1H, ddd, 8,3, 6,0 e 2,0)                                | -                 | 81,7                             | 81,4                             | -                                       |
| 6''                                            | 3,68 (1H, dd, 11,9 e 2,0) e 3,41 (1H, dd, 11,9 e 6,0)         | 3,16; 3,41; 3,68  | 61,6                             | 61,4                             | 70,7; 81,7                              |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais residuais do DMSO não deuterado ( $\delta_{\text{H}}$  2,50 e  $\delta_{\text{C}}$  39,5)

<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Zhang *et al.* (2009) (DMSO- $d_6$ ,  $^{13}\text{C}$  100 MHz)

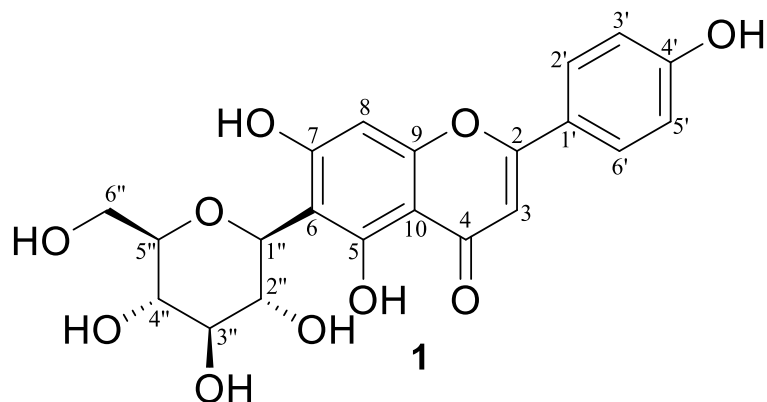


**Figura 52.** Estrutura química da flavona isovitexina (1).

### 5.3.3. Elucidação estrutural da substância 2

A substância **2** foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de DI-MS (Figura 53) foi observado um pico base em  $m/z$  445  $[M-H]^-$ . Conforme descrito na seção **5.1.2**, a análise do padrão de fragmentação sugeriu que a substância **2** corresponde à flavona swertisina, um análogo 7-*O*-metilado da isovitexina (substância 1).

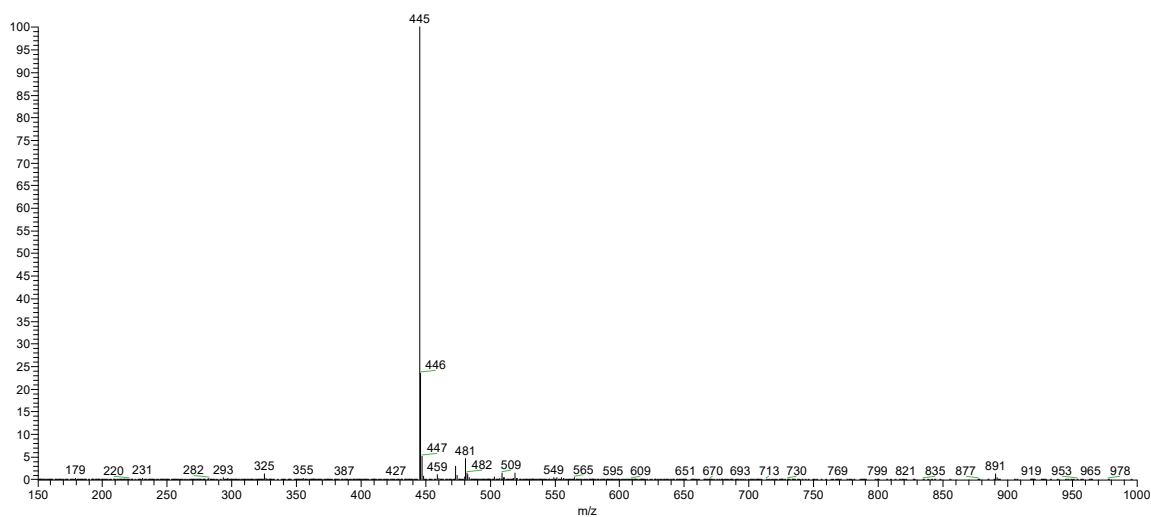


**Figura 53.** Espectro de massas no modo negativo da substância **2**.

De fato, os espectros de RMN das substâncias **1** e **2** apresentaram grande similaridade (Figuras 54 e 55). No entanto, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras A12 e 54B) e  $^{13}\text{C}$  (Figuras A13 e 55B) da substância **2** mostraram duplicação de sinais à temperatura ambiente (25 °C).

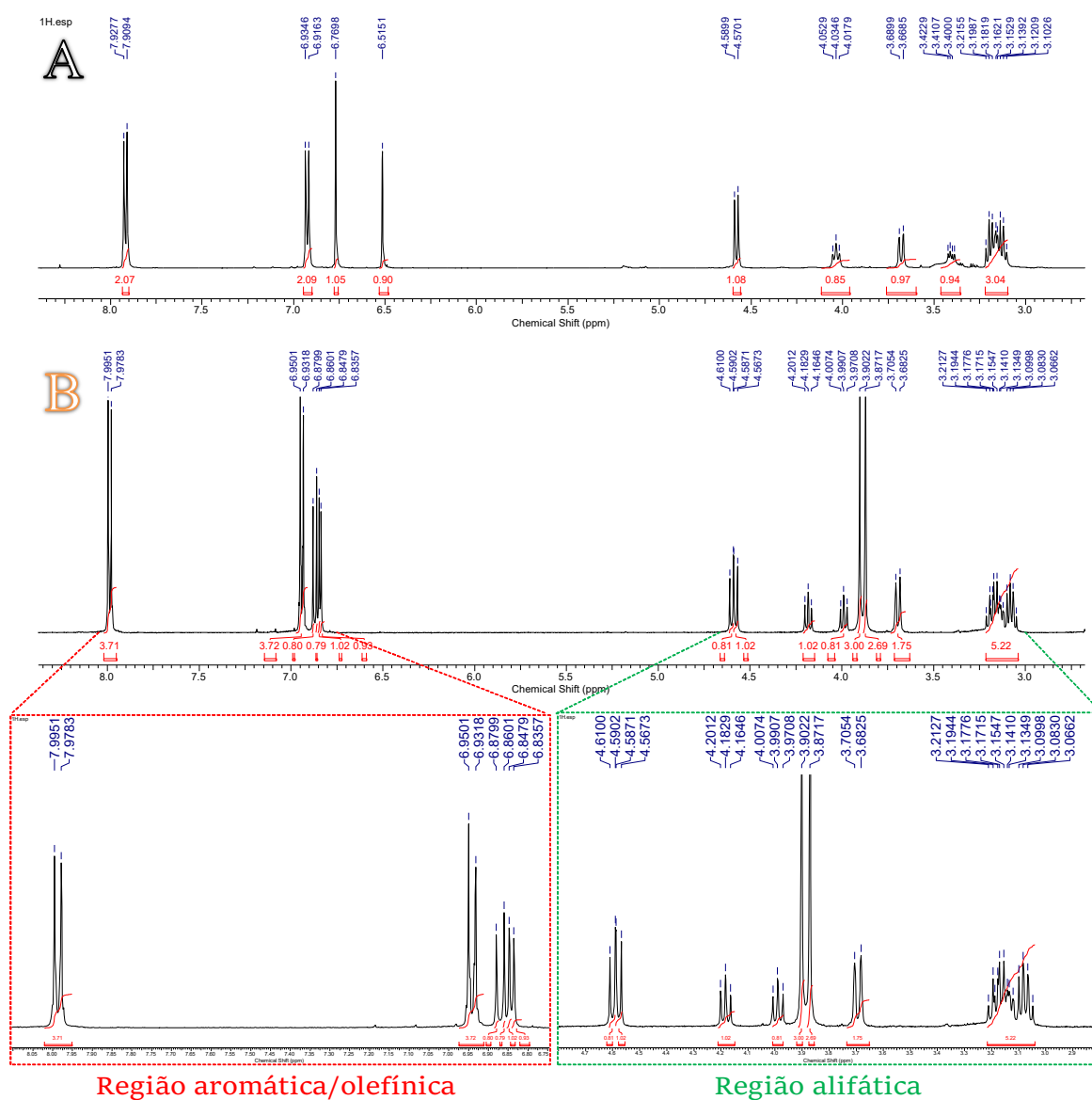


**Figura 54.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (com supressão do sinal da água) da (A) substância **1** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) e da (B) substância **2** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

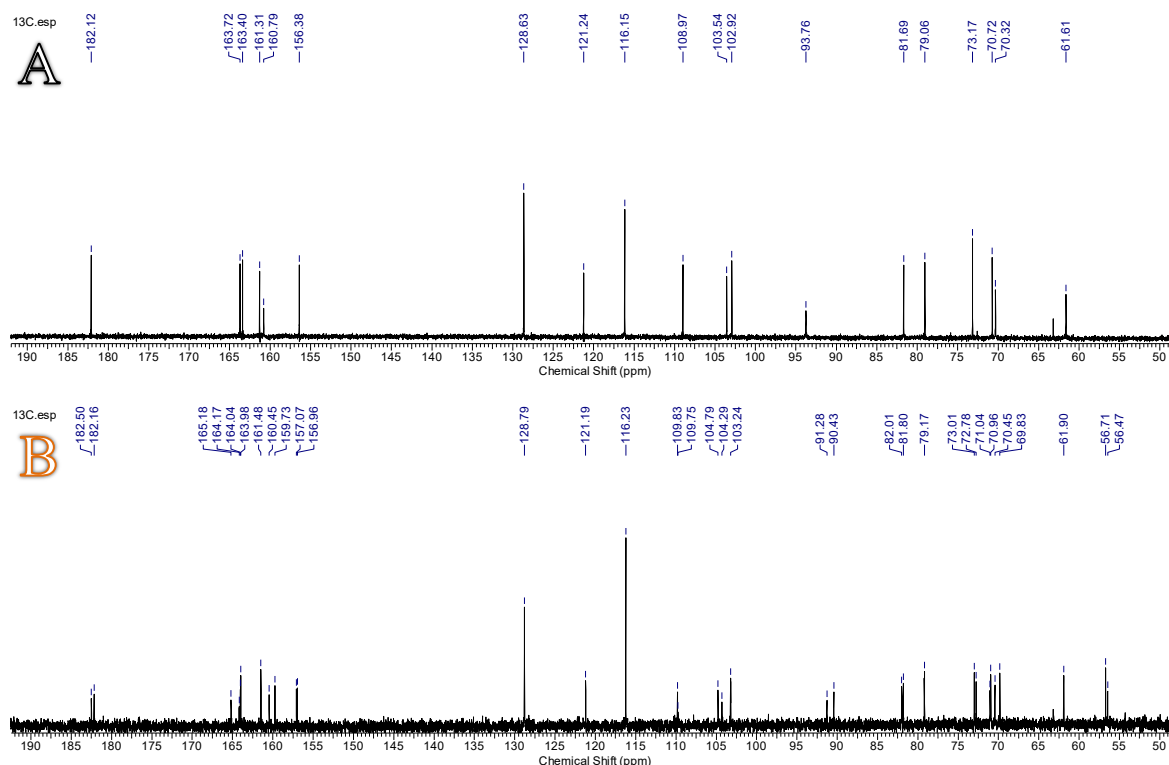


**Figura 55.** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da (A) substância **1** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz) e da (B) substância **2** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz).

Na região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras A12 e 54B) da substância **2**, foi observado novamente um sistema de spin  $\text{AA}'\text{XX}'$ , caracterizado pelos dupletos aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (4H, d,  $J = 9,2$  Hz) e 6,94 (4H, d,  $J = 9,2$  Hz), que foram atribuídos a H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente, do anel B 4'-hidroxilado (VAN LOO *et al.*, 1986). No espectro de HSQC (Figuras A14 e 56), observaram-se os picos cruzados em  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (H-2' e H-6')/ $\delta_{\text{C}}$  128,79 (C-2' e C-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (H-3' e H-5')/ $\delta_{\text{C}}$  116,23 (C-3' e C-5').

Ainda na região aromática/olefínica do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras A12 e 54B), foram observados quatro simpletos. No espectro de HSQC (Figuras A14 e 56), os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (1H, s) e 6,85 (1H, s) exibiram correlações com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  103,24 e 103,21, respectivamente, sendo atribuídos a H-3/C-3 do anel C. Em contraste, os prótons em  $\delta_{\text{H}}$  6,86 (1H, s) e 6,84 (1H, s) apresentaram correlações com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  90,43 e 91,28, respectivamente, e foram atribuídos a H-8/C-8 do anel A.

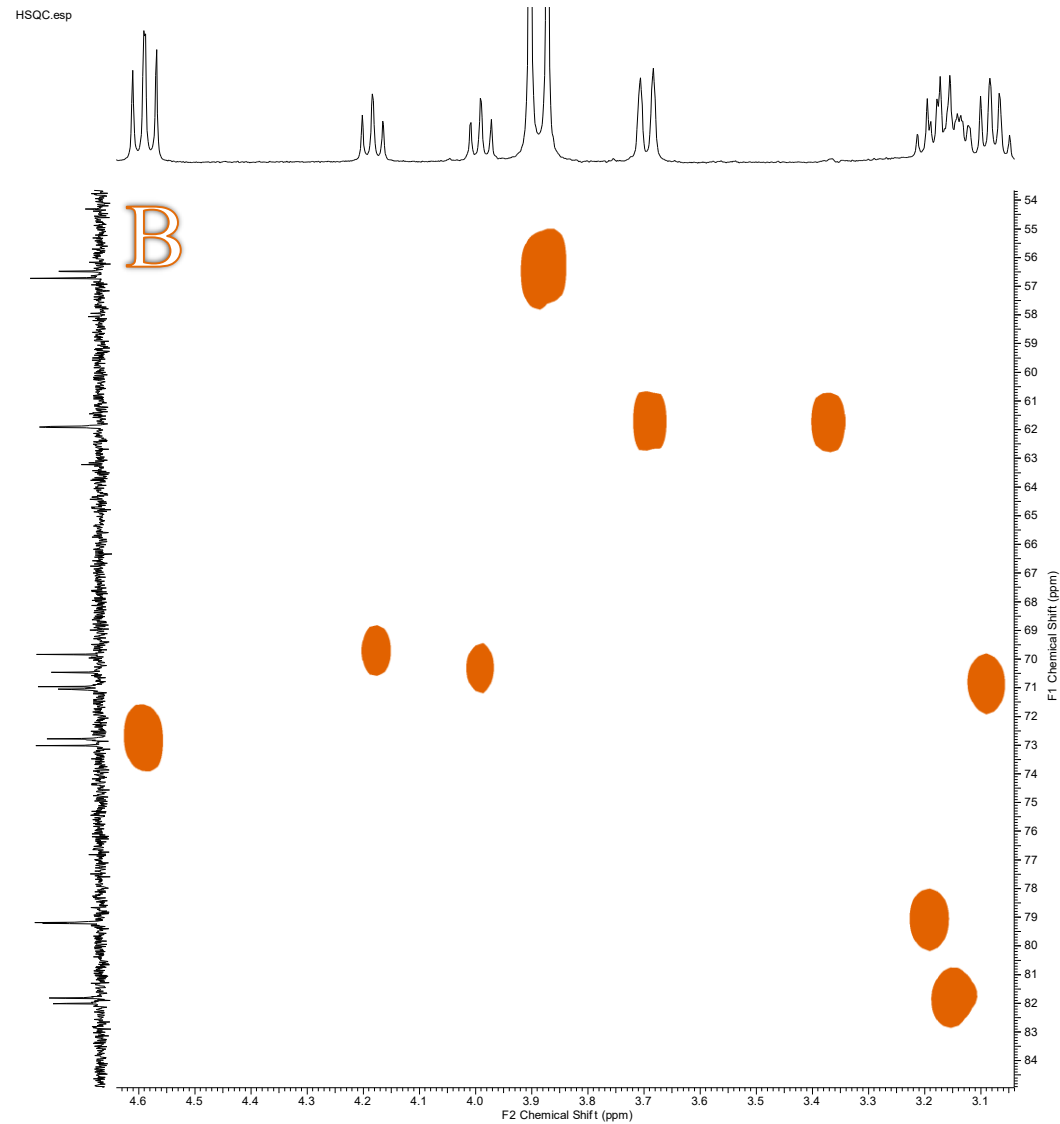
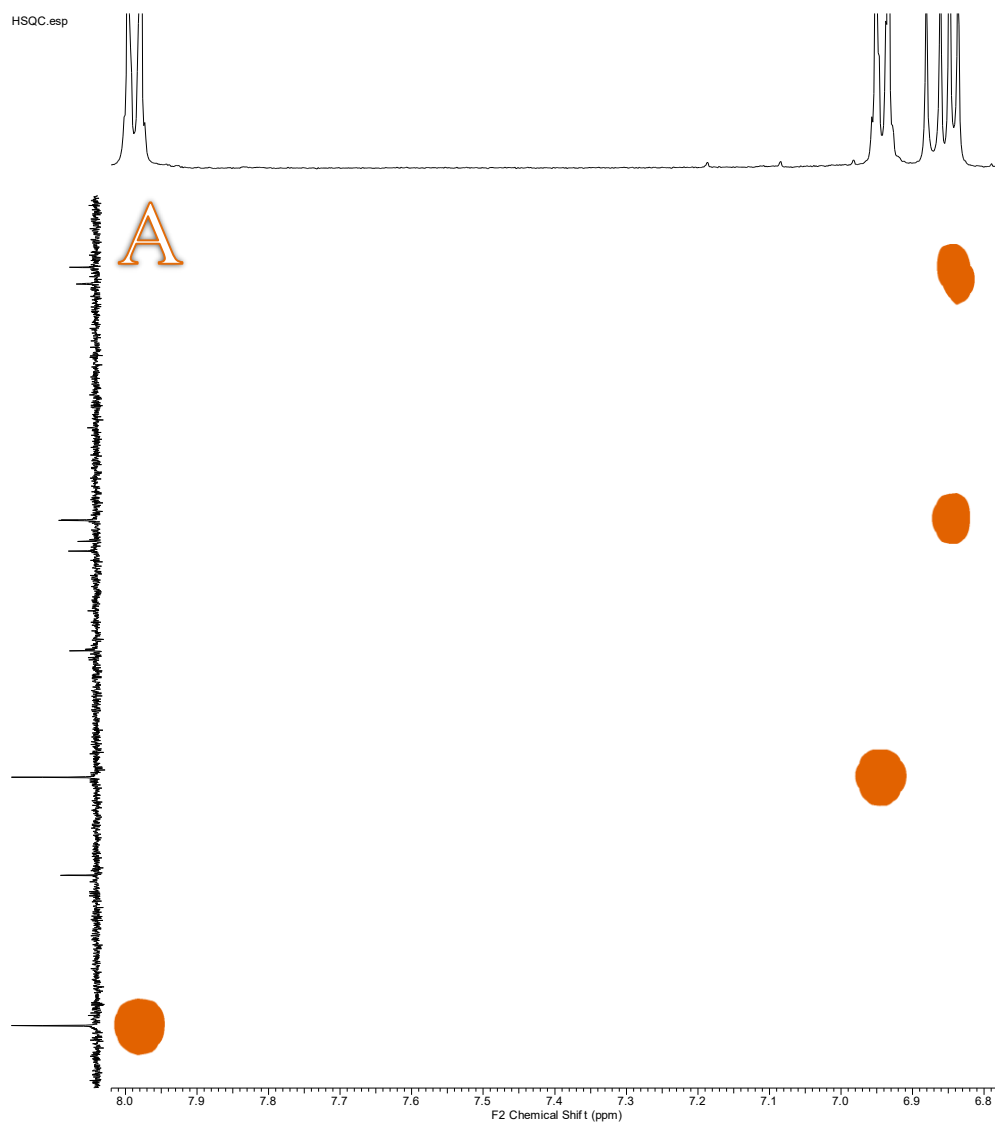


**Figura 56.** Ampliação das regiões de (A) prótons aromáticos/olefínicos e (B) prótons alifáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância **2**.

A região alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras A12 e 54B) apresentou sinais duplicados referentes ao resíduo de hexose ( $\delta_{\text{H}}$  4,60-3,08), cujas constantes de acoplamento ( $J$ ) e as multiplicidades foram atribuídas usando o espectro de JRES (Figura A15). No espectro de HSQC (Figuras A14 e 56), os sinais duplicados do próton anomérico H-1" em  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) e 4,58 (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) apresentaram correlações com seus respectivos sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  72,78 (C-1") e 73,01 (C-1"), cujos deslocamentos químicos são característicos de C-glicosilação (FRANK *et al.*, 2012). Por outro lado, a natureza carbinólica dos demais prótons foi confirmada pelas correlações com seus respectivos sinais de carbonos ( $\delta_{\text{C}}$  82,01-61,90) (Figuras A14 e 56).

Notavelmente, também foram observados dois simpletos adicionais integrados para três prótons, em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (3H, s) e 3,87 (3H, s). No espectro de HSQC (Figuras A14 e 56), esses prótons exibiram picos cruzados em  $\delta_{\text{H}}$  3,90/ $\delta_{\text{C}}$  56,71 e  $\delta_{\text{H}}$  3,87/ $\delta_{\text{C}}$  56,47, corroborando a presença de grupo metoxila na estrutura da substância **2**.

As correlações observadas no espectro de HMBC (Figuras A16, 57 e 58) confirmaram as atribuições dos hidrogênios referentes aos anéis B e C. Em relação aos hidrogênios do anel B, o duplete aromático em  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (H-2'/H-6') apresentou correlações com os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  164,17/163,98 (C-2), 161,48 (C-4'), 128,79 (C-2'/C-6') e 116,23 (C-3'/C-5'). Por sua vez, o duplete aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (H-3'/H-5') correlacionou-se com os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  161,48 (C-4'), 128,79 (C-2'/C-6'), 121,19 (C-1') e 116,23 (C-3'/C-5'). Em contraste, os simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 e 6,85, atribuídos ao hidrogênio olefínico H-3 do anel C, exibiram picos cruzados em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (H-3)/ $\delta_{\text{C}}$  163,98 (C-2) e  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (H-3)/ $\delta_{\text{C}}$  121,19 (C-1'), bem como em  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (H-3)/ $\delta_{\text{C}}$  164,17 (C-2) e  $\delta_{\text{H}}$  6,85 (H-3)/ $\delta_{\text{C}}$  121,19 (C-1').

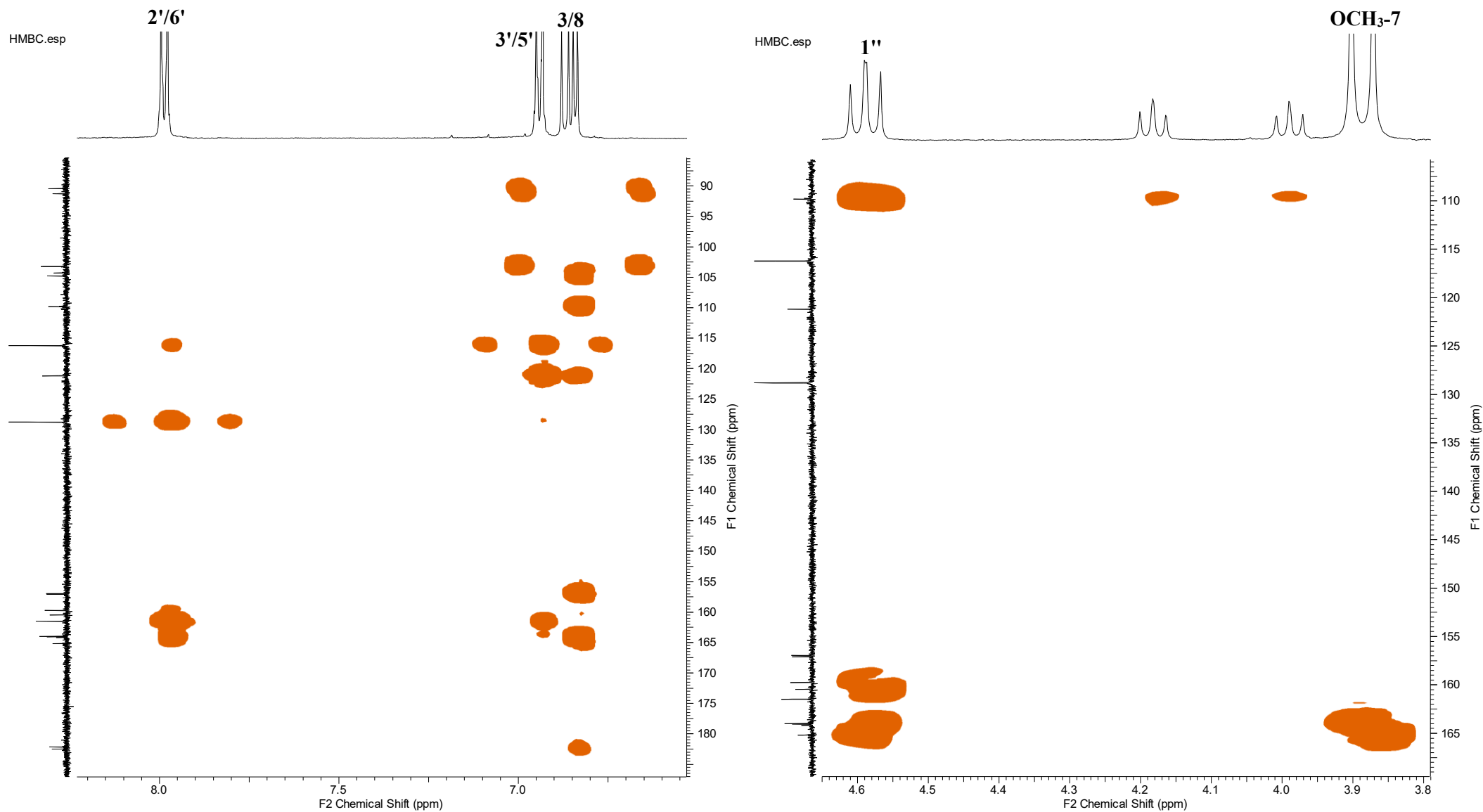


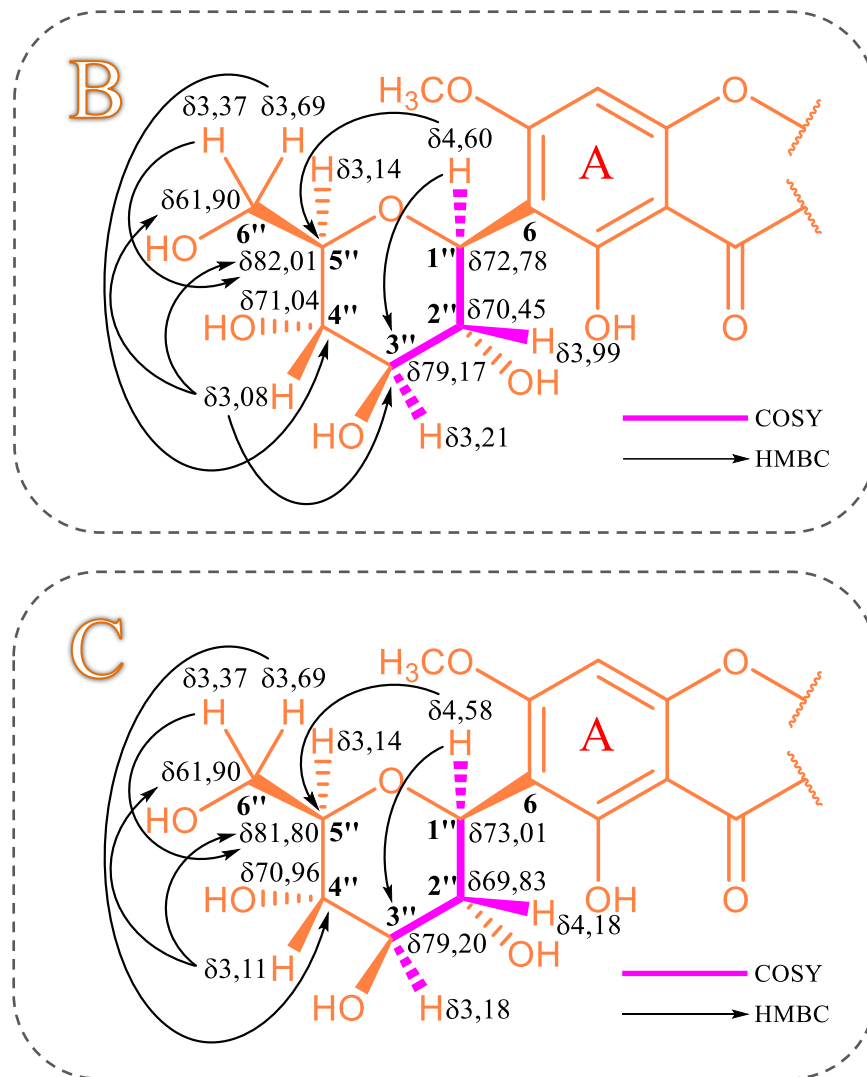
**Figura 57.** Correlações-chave observadas no espectro de HMBC (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) da substância **2** para os prótons em  $\delta_H$  7,99 (H-2'/H-6'), 6,94 (H-3'/H-5'), 6,86/6,84 (H-8), 4,60/4,58 (H-1'') e 3,90/3,87 (OCH<sub>3</sub>-7).



No espectro de HMBC (Figuras A16, 57 e 58), as correlações observadas para os simpletos aromáticos em  $\delta_H$  6,86 e 6,84, atribuídos a H-8 do anel A, para os prótons anoméricos H-1" em  $\delta_H$  4,60 e 4,58, e para os simpletos correspondentes aos prótons metoxílicos em  $\delta_H$  3,90 e 3,87 foram cruciais para confirmar as posições de glicosilação e metilação. Os picos cruzados em  $\delta_H$  6,86 (H-8)/ $\delta_C$  109,75 (C-6) e  $\delta_H$  6,84 (H-8)/ $\delta_C$  109,83 (C-6);  $\delta_H$  4,60 (H-1'')/ $\delta_C$  165,18 (C-7),  $\delta_H$  4,60 (H-1'')/ $\delta_C$  159,73 (C-5),  $\delta_H$  4,60 (H-1'')/ $\delta_C$  109,75 (C-6), assim como em  $\delta_H$  4,58 (H-1'')/ $\delta_C$  164,04 (C-7),  $\delta_H$  4,58 (H-1'')/ $\delta_C$  160,45 (C-5),  $\delta_H$  4,58 (H-1'')/ $\delta_C$  109,83 (C-6), corroboram a C-glicosilação na posição 6 do anel A. Por outro lado, as correlações dos simpletos em  $\delta_H$  3,90 e 3,87 com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  164,04 e 165,18, respectivamente, atribuídos a C-7, confirmam a 7-O-metilação nesse mesmo anel.

Finalmente, assim como no caso da substância **1**, a natureza do resíduo de hexose foi confirmada com base nas correlações observadas nos espectros de COSY (Figuras A17, 59B e 59C) e HMBC (Figuras A16 e 59A), em conjunto com as constantes de acoplamento do próton anomérico e dos prótons carbinólicos, bem como pelos deslocamentos químicos de seus respectivos carbonos. Desse modo, constatou-se a presença de uma unidade 6-C- $\beta$ -glicopiranosil (GURST, 1991; NAKAMURA & HATTORI, 1998).

Portanto, a partir da comparação dos dados de RMN obtidos (Tabelas 7 e 8) com dados da literatura (FRANK *et al.*, 2012), a substância **2** foi caracterizada como a flavona swertisina (apigenina 7-metil éter 6-C- $\beta$ -glicopiranosídeo) (Figura 60), corroborando a identificação preliminar realizada a partir da análise por DI-MS.



139

**Tabela 7.** Dados espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do rotâmero 1 da substância **2** (swertisina).

| Posição                                        | $\delta_{\text{H}}$ (integral, mult., $J$ em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                           |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Aglicona</i>                                |                                                               |                   |                                  |                                  |                                             |
| 2                                              | -                                                             | -                 | 163,98                           | 163,87                           | -                                           |
| 3                                              | 6,88 (1H, s)                                                  | -                 | 103,24                           | 102,79                           | 121,19; 163,98                              |
| 4                                              | -                                                             | -                 | 182,16                           | 181,88                           | -                                           |
| 5                                              | -                                                             | -                 | 159,73                           | 159,57                           | -                                           |
| 6                                              | -                                                             | -                 | 109,75                           | 109,65                           | -                                           |
| 7                                              | -                                                             | -                 | 165,18                           | 164,92                           | -                                           |
| 8                                              | 6,86 (1H, s)                                                  | -                 | 90,43                            | 90,16                            | 104,29; 109,75; 156,96; 182,16              |
| 9                                              | -                                                             | -                 | 156,96                           | 156,70                           | -                                           |
| 10                                             | -                                                             | -                 | 104,29                           | 104,07                           | -                                           |
| 1'                                             | -                                                             | -                 | 121,19                           | 120,37                           | -                                           |
| 2' e 6'                                        | 7,99 (2H, d, 9,2)                                             | 6,94              | 128,79                           | 128,52                           | 116,23; 128,79; 161,48; 163,98              |
| 3' e 5'                                        | 6,94 (2H, d, 9,2)                                             | 7,99              | 116,23                           | 116,16                           | 121,19; 128,79; 116,23; 161,48              |
| 4'                                             | -                                                             | -                 | 161,48                           | 162,12                           | -                                           |
| OCH <sub>3</sub> -7                            | 3,87 (3H, s)                                                  | -                 | 56,47                            | 56,24                            | 165,18                                      |
| <i>6-C-<math>\beta</math>-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                                  |                                  |                                             |
| 1''                                            | 4,60 (1H, d, 9,9)                                             | 3,99              | 72,78                            | 72,58                            | 70,45; 79,17; 82,01; 109,75; 159,73; 165,18 |
| 2''                                            | 3,99 (1H, dd, 9,9 e 8,4)                                      | 3,21; 4,60        | 70,45                            | 70,27                            | 72,78; 79,17; 109,75                        |
| 3''                                            | 3,21 (1H, dd, 9,4 e 8,4)                                      | 3,99              | 79,17                            | 78,38                            | 71,04                                       |
| 4''                                            | 3,08 (1H, dd, 9,4 e 8,4)                                      | -                 | 71,04                            | 70,92                            | 61,90; 79,17; 82,01                         |
| 5''                                            | 3,14 (1H, ddd, 8,4, 5,3 e 1,6)                                | -                 | 82,01                            | 81,86                            | -                                           |
| 6''                                            | 3,69 (1H, dd, 10,9 e 1,6) e 3,37 (1H, dd, 10,9 e 5,3)         | -                 | 61,90                            | 61,75                            | 71,04; 82,01                                |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais do TMS ( $\delta_{\text{H}}$  0,00 e  $\delta_{\text{C}}$  0,00)

<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Frank *et al.* (2012) ( $\text{DMSO}-d_6$ ,  $^{13}\text{C}$  150 MHz)

**Tabela 8.** Dados espectroscópicos de RMN (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) do rotâmero 2 da substância **2** (swertisina).

| Posição                       | δ <sub>H</sub> (integral, mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Aglicona</i>               |                                                               |                   |                             |                             |                                             |
| 2                             | -                                                             | -                 | 164,17                      | 164,01                      | -                                           |
| 3                             | 6,85 (1H, s)                                                  | -                 | 103,21                      | 102,79                      | 121,19; 164,17                              |
| 4                             | -                                                             | -                 | 182,50                      | 182,21                      | -                                           |
| 5                             | -                                                             | -                 | 160,45                      | 160,31                      | -                                           |
| 6                             | -                                                             | -                 | 109,83                      | 109,65                      | -                                           |
| 7                             | -                                                             | -                 | 164,04                      | 163,71                      | -                                           |
| 8                             | 6,84 (1H, s)                                                  | -                 | 91,28                       | 91,00                       | 104,79; 109,83; 157,07; 182,50              |
| 9                             | -                                                             | -                 | 157,07                      | 156,80                      | -                                           |
| 10                            | -                                                             | -                 | 104,79                      | 104,58                      | -                                           |
| 1'                            | -                                                             | -                 | 121,19                      | 120,37                      | -                                           |
| 2' e 6'                       | 7,99 (2H, d, 9,2)                                             | 6,94              | 128,79                      | 128,52                      | 116,23; 128,79; 161,48; 164,17              |
| 3' e 5'                       | 6,94 (2H, d, 9,2)                                             | 7,99              | 116,23                      | 116,16                      | 121,19; 128,79; 116,23; 161,48              |
| 4'                            | -                                                             | -                 | 161,48                      | 162,12                      | -                                           |
| OCH <sub>3</sub> -7           | 3,90 (3H, s)                                                  | -                 | 56,71                       | 56,48                       | 164,04                                      |
| <i>6-C-β-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                             |                             |                                             |
| 1"                            | 4,58 (1H, d, 9,9)                                             | 4,18              | 73,01                       | 72,82                       | 69,83; 79,20; 81,80; 109,83; 160,45; 164,04 |
| 2"                            | 4,18 (1H, dd, 9,9 e 8,4)                                      | 3,18; 4,58        | 69,83                       | 69,62                       | 73,01; 79,20; 109,83                        |
| 3"                            | 3,18 (1H, dd, 9,4 e 8,4)                                      | 4,18              | 79,20                       | 79,08                       | 69,83; 70,96                                |
| 4"                            | 3,11 (1H, dd, 9,4 e 8,4)                                      | -                 | 70,96                       | 70,83                       | 61,90; 81,80                                |
| 5"                            | 3,14 (1H, ddd, 8,4, 5,3 e 1,6)                                | -                 | 81,80                       | 81,68                       | -                                           |
| 6"                            | 3,69 (1H, dd, 10,9 e 1,6) e 3,37 (1H, dd, 10,9 e 5,3)         | -                 | 61,90                       | 61,75                       | 70,96; 81,80                                |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais do TMS (δ<sub>H</sub> 0,00 e δ<sub>C</sub> 0,00)<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Frank *et al.* (2012) (DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>13</sup>C 150 MHz)

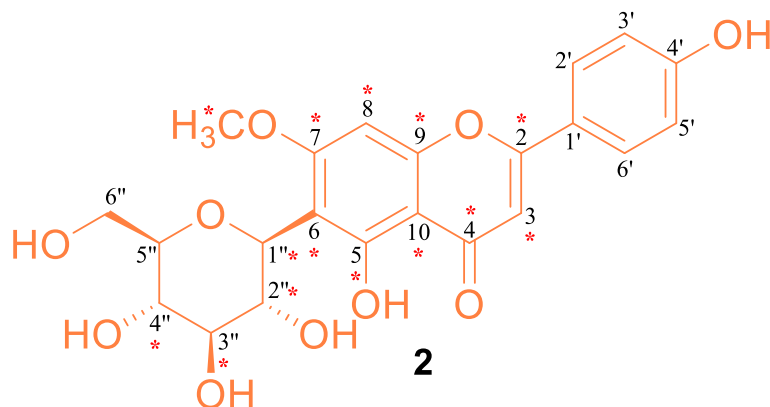


**Figura 60.** Estrutura química da flavona swertisina (**2**), com asteriscos (\*) denotando as posições associadas aos sinais duplicados observados nos espectros de RMN.

A duplicação de sinais em espectros de RMN de 6-*C*-glicosilflavonas, registrados à temperatura ambiente (25 °C), é frequentemente relatada na literatura (ZHOU *et al.*, 2019) e tem sido atribuída à presença de dois isômeros rotacionais (rotâmeros) em interconversão lenta (FRANK *et al.*, 2012). A detecção desses rotâmeros, na escala de tempo da RMN, está relacionada à existência de uma barreira de energia rotacional relativamente elevada em torno da ligação C(sp<sup>3</sup>)–C(sp<sup>2</sup>) entre a fração glicosil e a aglicona flavona (FRANK *et al.*, 2012; RAYYAN *et al.*, 2005). Embora a isovitexina (substância **1**) e a swertisina (substância **2**) sejam ambas 6-*C*-glicosilflavonas, no caso desta última há um impedimento estérico adicional imposto pelo substituinte OCH<sub>3</sub>-7, *orto* ao grupo 6-*C*-glicosil, o qual pode ter sido o fator-chave que restringiu a rotação em torno dessa ligação (RAYYAN *et al.*, 2005). Como consequência, a presença desse substituinte resultou na duplicação dos sinais referentes à unidade de açúcar e aos carbonos próximos à ligação C-glicosídica (Figura 60).

Embora a barreira de energia rotacional em torno da ligação C-glicosídica (C-1''–C-6) não possa ser superada sob condições de temperatura ambiente (25 °C), o fornecimento de energia térmica por aquecimento pode ser suficiente para ultrapassá-la, promovendo um equilíbrio rápido entre os confôrmeros e, consequentemente, a coalescência dos sinais. Frank

e colaboradores (2012) combinaram experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  a temperatura variável (VT- $^1\text{H}$  NMR) e cálculos teóricos (MM2) na investigação da swertisina (substância **2**), obtendo resultados consistentes com essa hipótese.

Segundo os autores, os estudos de VT- $^1\text{H}$  NMR mostraram que, a baixas temperaturas (262 K), os sinais para os dois rotâmeros podiam ser detectados separadamente, enquanto o aumento gradual da temperatura levou à aproximação e, posteriormente, à coalescência dos sinais em 321 K, evidenciando o início da interconversão rápida (Figura 61).

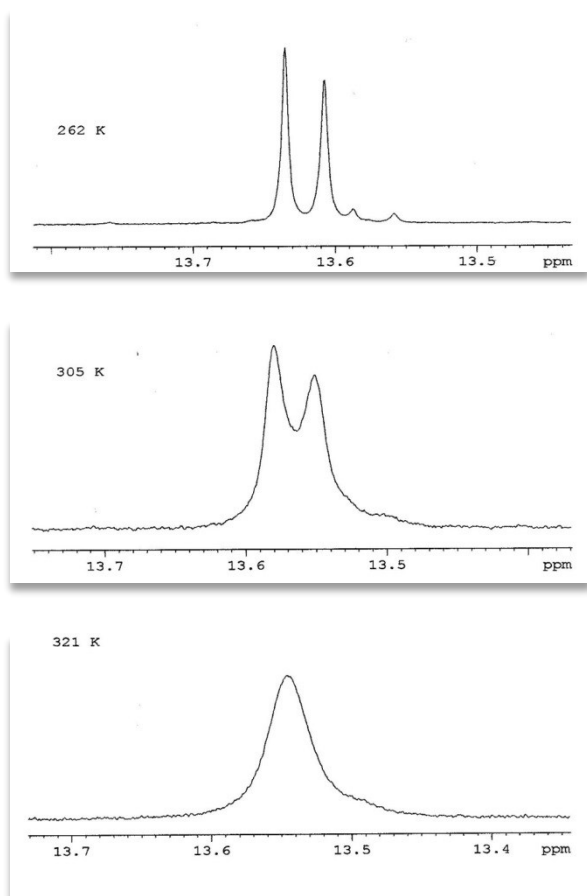


**Figura 61.** Variações no sinal do próton quelato OH-5 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da swertisina em função da temperatura (Adaptado de FRANK *et al.*, 2012).

Adicionalmente, experimentos de T-ROESY a 262 K revelaram correlações espaciais fracas entre os respectivos prótons metoxílicos (OCH<sub>3</sub>-7) e os prótons H-1" e H-2", indicando rotação lenta da unidade  $\beta$ -C-glicopiranosil em torno da ligação C-1"-C-6. Nessa perspectiva, foi proposto que, em um dos confôrmeros, o próton H-1" encontra-se orientado de forma *syn* em relação ao grupo OCH<sub>3</sub>-7, enquanto no outro, essa orientação *syn* é assumida pelo próton H-2". Complementarmente, cálculos teóricos (MM2) identificaram duas conformações de energia mínima (Figura 62) separadas por uma barreira de energia rotacional ( $\Delta G^{\#}_{\text{rot}}$ ) de aproximadamente 70 kJ mol<sup>-1</sup>, valor em excelente concordância com o determinado experimentalmente (~71 kJ mol<sup>-1</sup>). Desse modo, os autores afirmam que, em conjunto, esses resultados confirmam que a duplicação dos sinais nos espectros de RMN a 262 K da swertisina decorre da rotação restrita em torno da ligação C-glicosídica, em consequência do impedimento estérico ocasionado pela presença do grupo OCH<sub>3</sub>-7.

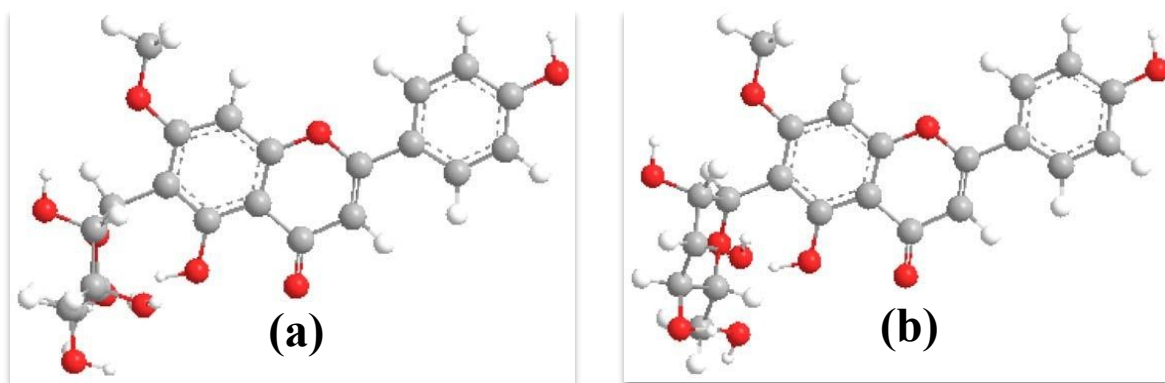


**Figura 62.** Representações 3D das conformações de energia mínima da swertisina, correspondentes aos rotâmeros **a** e **b** (Adaptado de FRANK *et al.*, 2012).

### 5.3.4. Elucidação estrutural da substância 3 e da substância 4

As substâncias **3** e **4** foram obtidas como sólidos amorfos de coloração amarela. No espectro de DI-MS da substância **3** (Figura 63A) foi observado um pico base em  $m/z$  563  $[M-H]^-$ , enquanto o espectro da substância **4** (Figura 63B) exibiu um pico base em  $m/z$  577  $[M-H]^-$ . A análise do padrão de fragmentação, detalhada nas seções 5.1.3 e 5.1.4, sugeriu que as substâncias **3** e **4** correspondem, respectivamente, a derivados 2"-*O*-pentosil da isovitexina (substância **1**) e da swertisina (substância **2**).

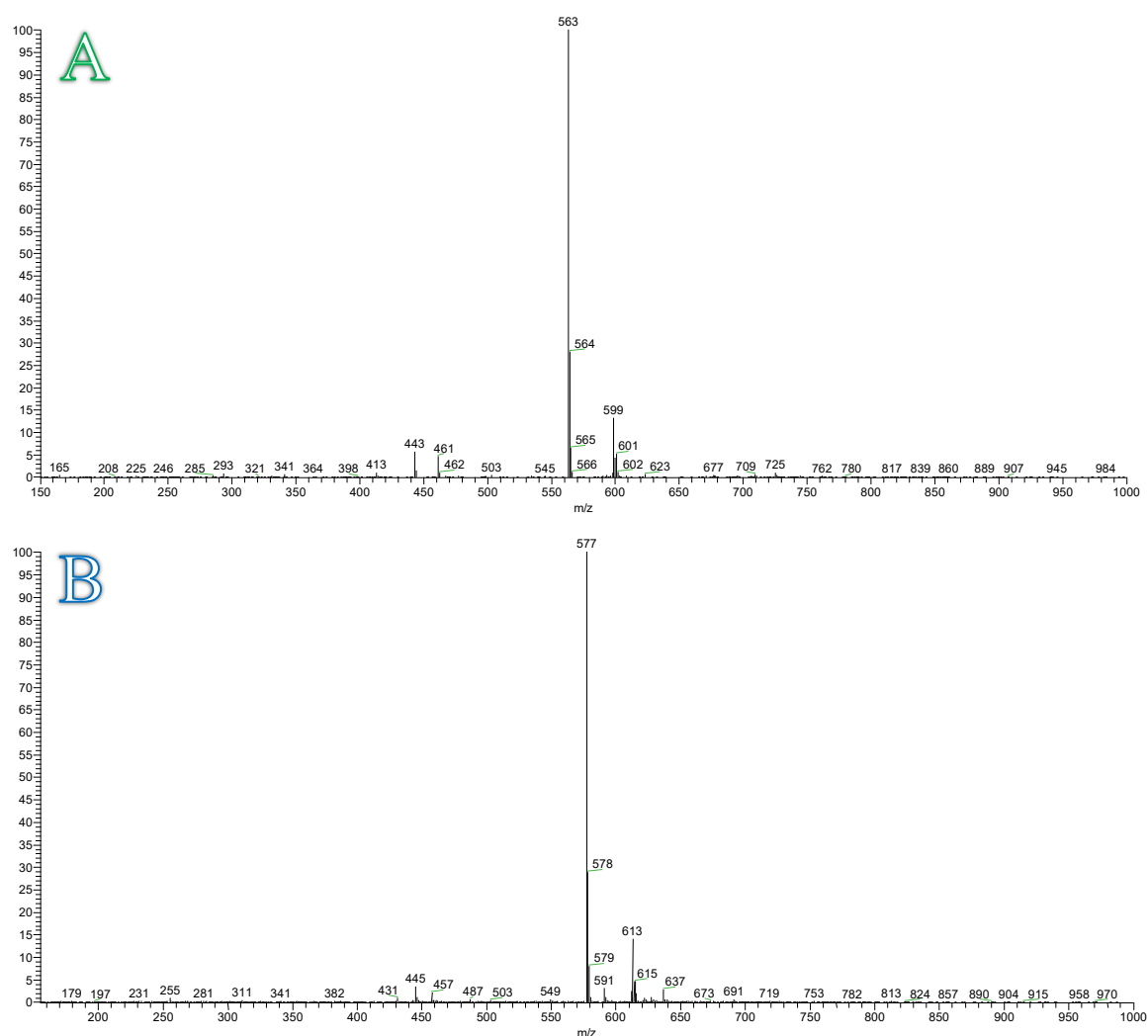


**Figura 63.** Espectros de massas no modo negativo da (A) substância **3** e da (B) substância **4**.

Diversas similaridades entre os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 54, A18, A19) e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 55, A20, A21) dessas quatro substâncias foram identificadas. Na região aromática/olefínica dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **3** e **4** (Figura 64), observou-se o mesmo conjunto de sinais descrito para as substâncias **1** e **2** (Seções 5.3.2 e 5.3.3), incluindo um sistema de spin AA'XX' compatível com H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B 4'-hidroxilado, além de um simpleto referente a H-3 do anel C e outro simpleto correspondente a H-8 do anel A (VAN LOO *et al.*, 1986). Por outro lado, na região alifática (Figura 65), além do conjunto de sinais relativos ao resíduo de C-hexose, previamente detectado nos espectros das substâncias **1** e **2**, também foram observados sinais compatíveis com uma segunda unidade de açúcar. Além disso, especificamente para a substância **4**, foram observados sinais característicos de prótons metoxílicos, e seus espectros (Figuras A19 e A21) exibiram duplicação de sinais à temperatura ambiente (25 °C), sugerindo a presença de dois rotâmeros com interconversão lenta, assim como descrito anteriormente para a substância **2** (Seção 5.3.3).

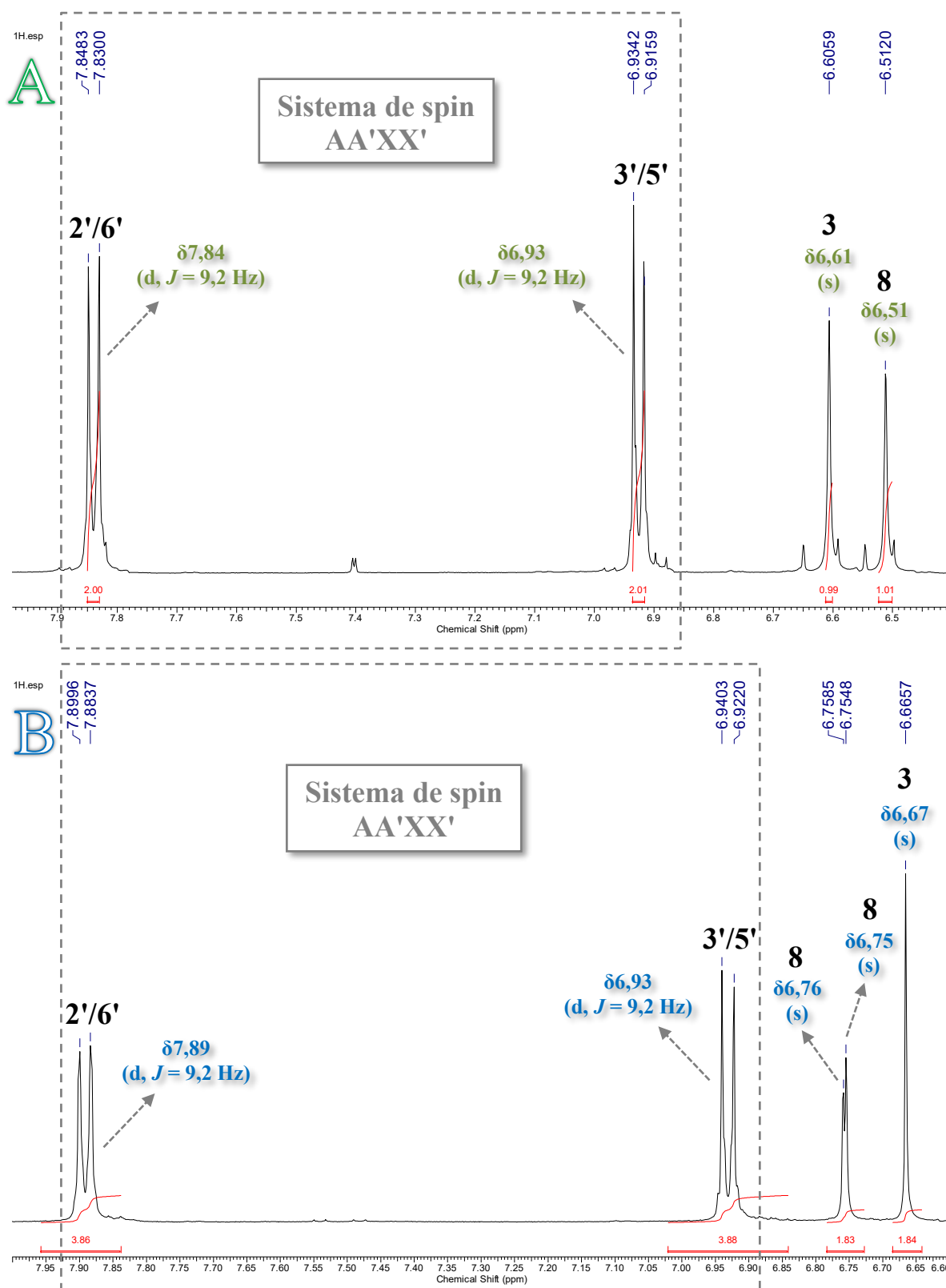


**Figura 64.** Ampliação da região aromática/olefínica dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da (A) substância **3** e da (B) substância **4**.

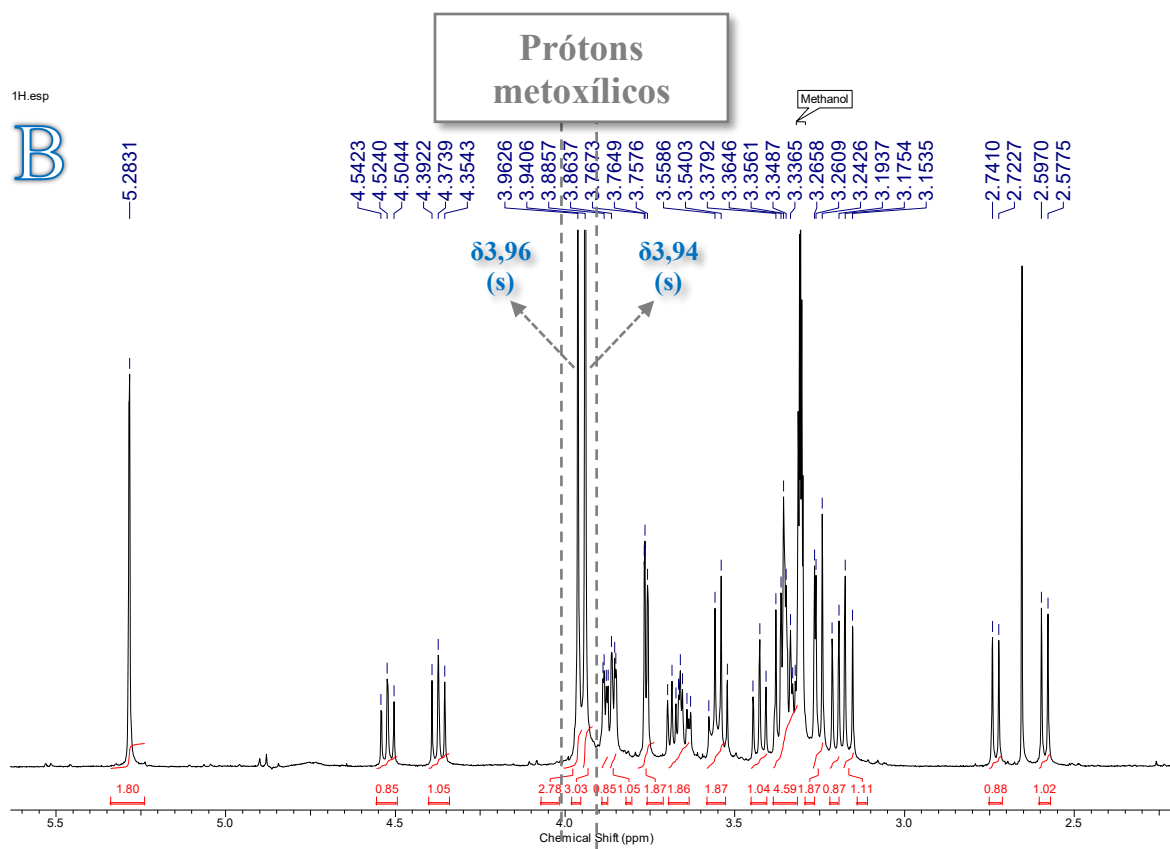
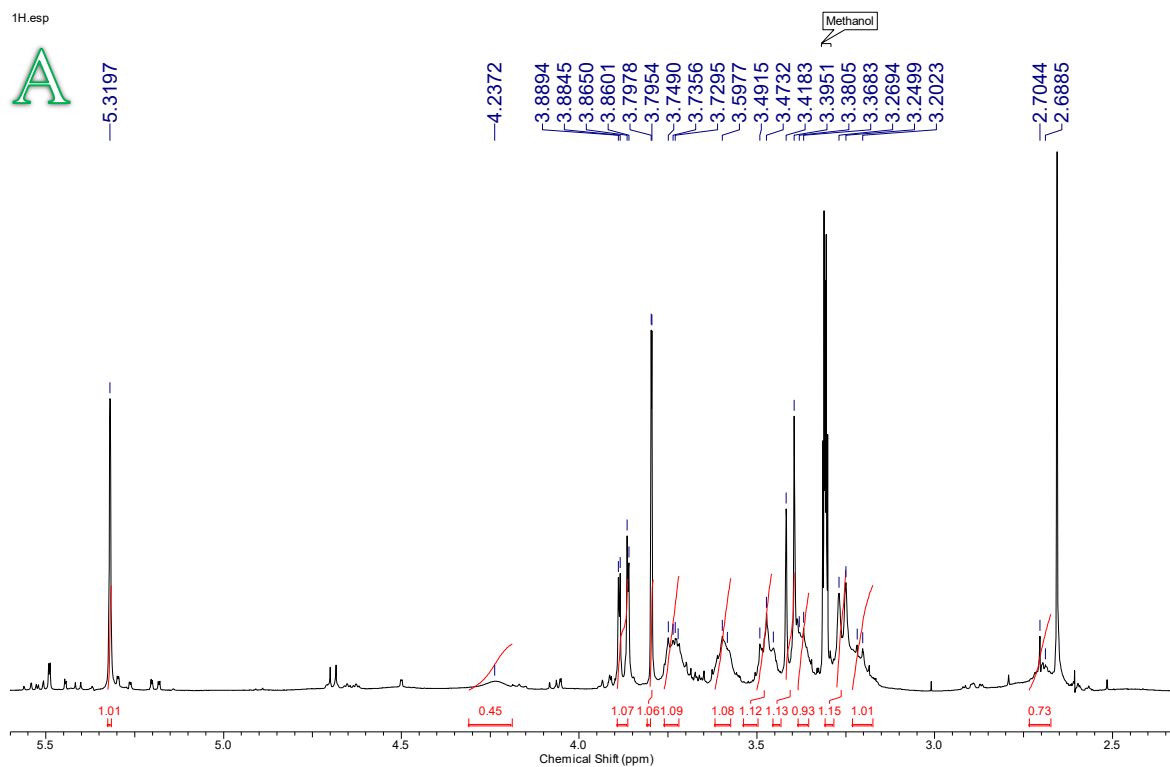


**Figura 65.** Ampliação da região alifática dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da (A) substância 3 e da (B) substância 4.

Para ambas as substâncias **3** e **4**, as constantes de acoplamento ( $J$ ) e as multiplicidades dos prótons anoméricos e carbinólicos foram determinadas usando os espectros de JRES (Figuras A22 e A23). Todos os sinais de prótons e carbonos referentes às agliconas e aos resíduos de açúcar foram atribuídos com base nas correlações observadas nos espectros de HSQC (Figuras A24 e A25), HMBC (Figuras A26 e A27) e COSY (Figuras A28 e A29). Em conjunto, esses dados suportam a caracterização do resíduo de *C*-hexose como uma unidade  $\beta$ -glicopiranosil ligada à posição 6 do anel A em ambas as substâncias (Figuras 66-70) (GURST, 1991; NAKAMURA & HATTORI, 1998). Além disso, para a substância **4**, as correlações observadas no espectro de HMBC para os simpletos correspondentes aos prótons metoxílicos (Figuras A27 e 67) confirmam a *O*-metilação na posição 7 do anel A.

Por outro lado, a natureza da unidade 2''-*O*-pentosil terminal presente nas duas substâncias, que não pôde ser caracterizada a partir das análises por DI-MS, foi confirmada pela presença de sinais de RMN correspondentes a um grupo metino (posição 2'''), dois grupos metileno (posições 4''' e 5''') e um carbono quaternário (posição 3'''), típicos do açúcar apiose (Figura A30) (ANDERSEN *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2001). Além disso, as correlações observadas nos espectros de HMBC (Figuras 68-70) entre o sinal do próton anomérico H-1''' e os sinais do carbono quaternário C-3''' e do carbono metilênico C-4''' corroboram a estrutura furanose deste substituinte (ANDERSEN *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2001). Complementarmente, a correlação entre H-1''' e o sinal do carbono C-2'' do anel *C*- $\beta$ -glicopiranosil confirma a ligação glicosídica do tipo 1 $\rightarrow$ 2 entre os resíduos de açúcar nas duas substâncias, assim como sugerido pelas análises por DI-MS.

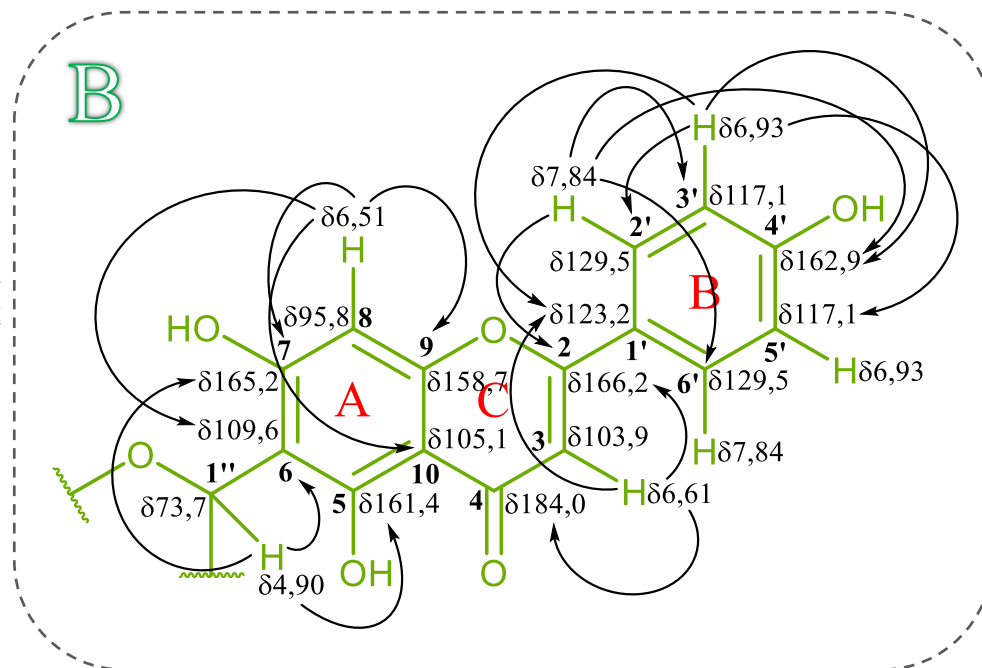
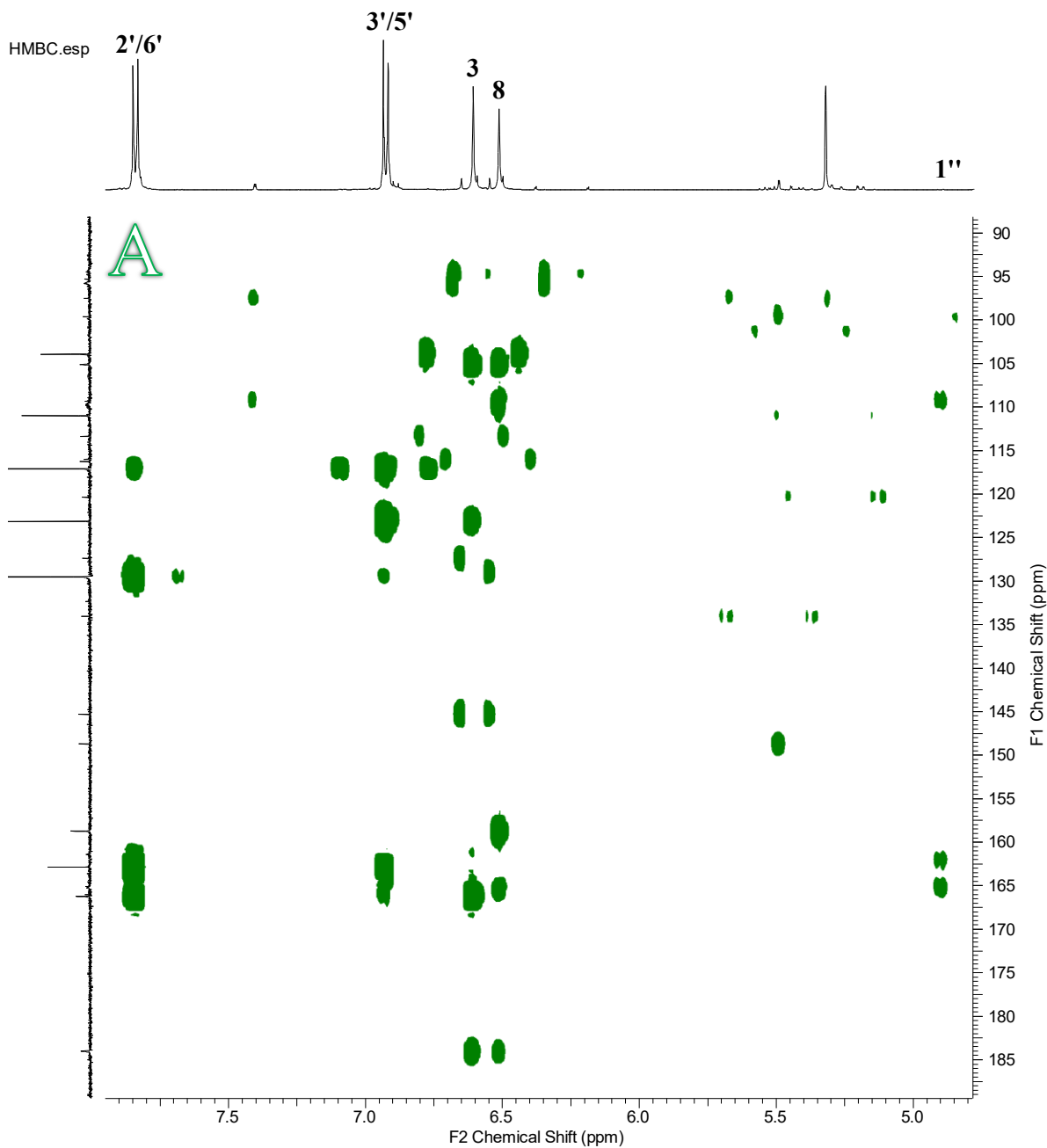


**Figura 66.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para os prótons dos (B) anéis A, B e C, bem como para o próton anomérico do resíduo de C-hexose da substância **3**.

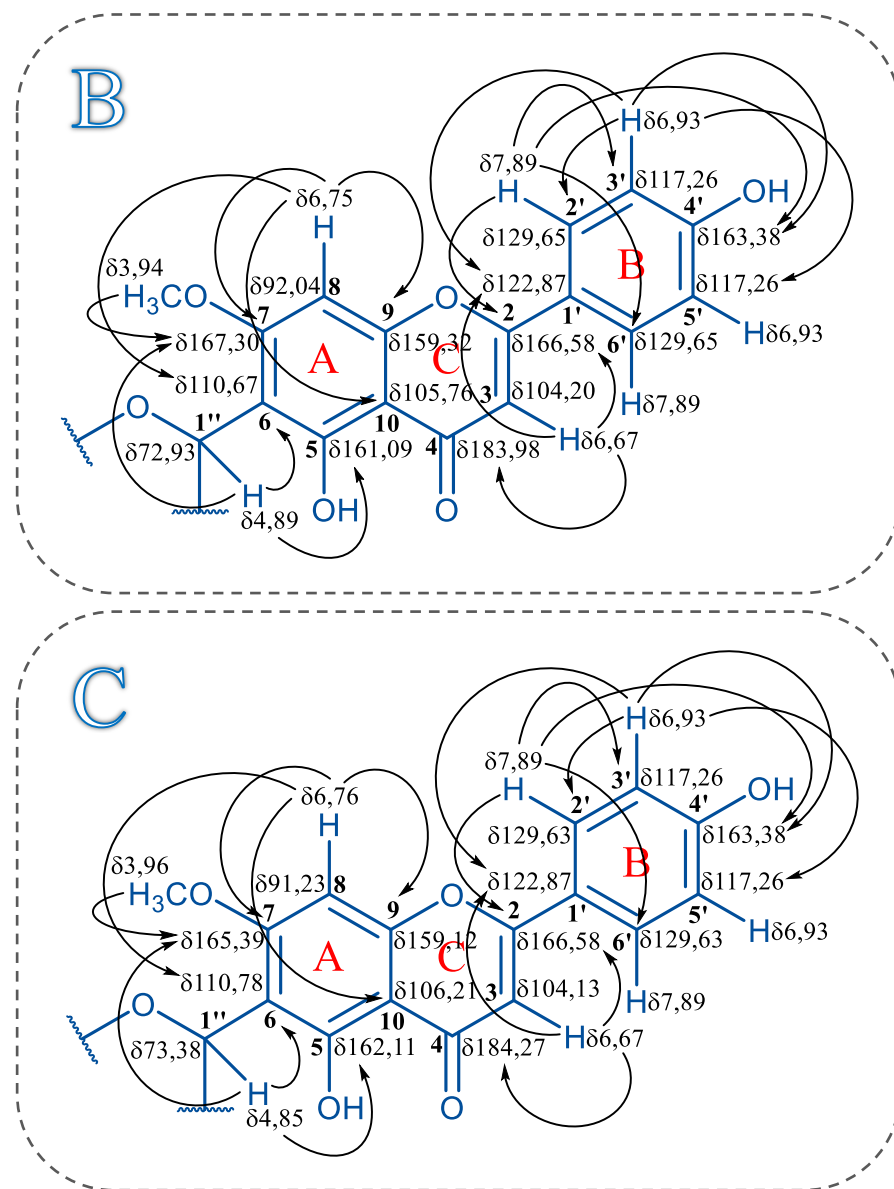
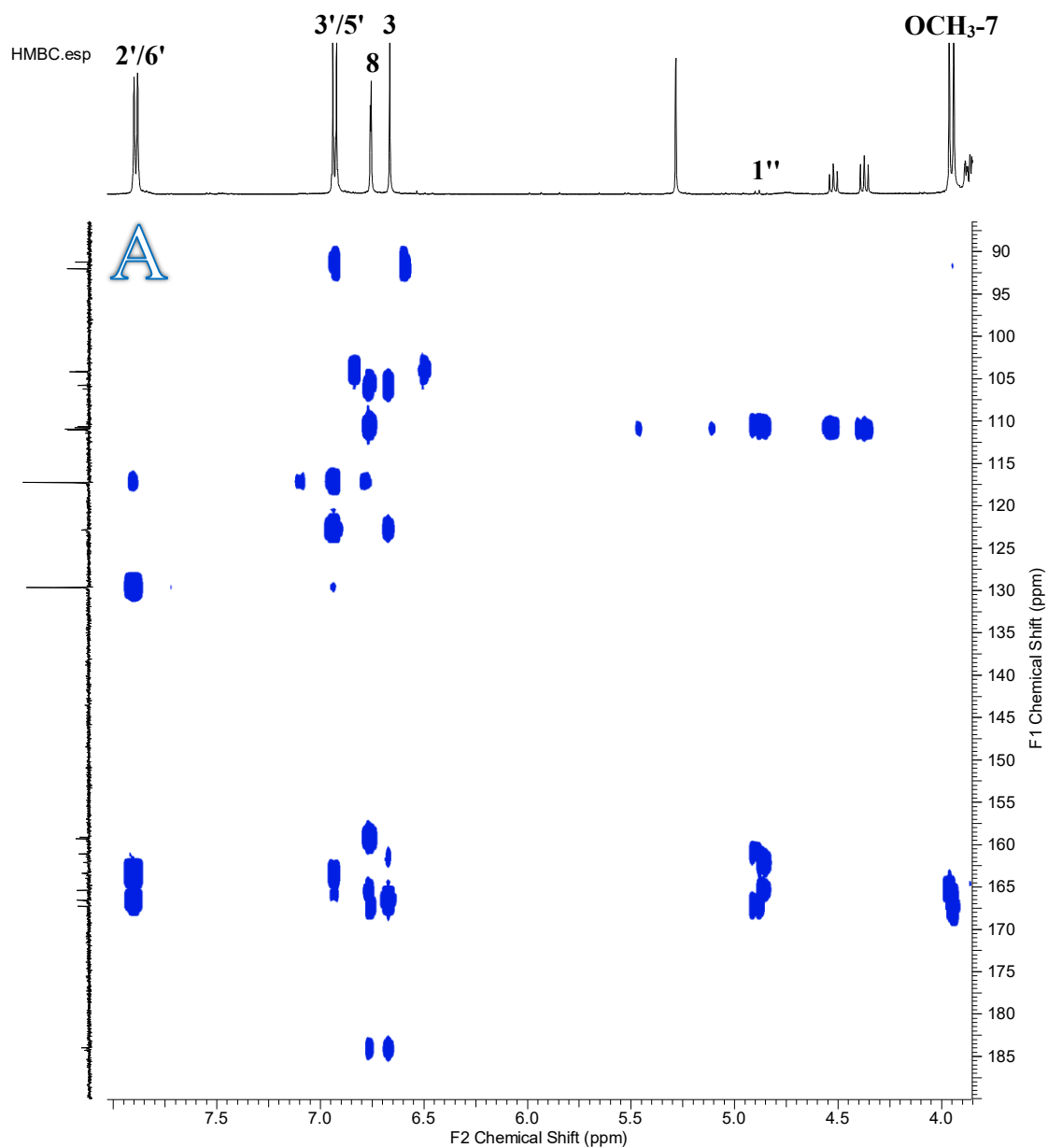


**Figura 67.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) para os prótons dos anéis A, B e C, bem como para os prótons anoméricos dos resíduos de C-hexose, referentes (B) ao rotâmero 1 e (C) ao rotâmero 2 da substância 4.

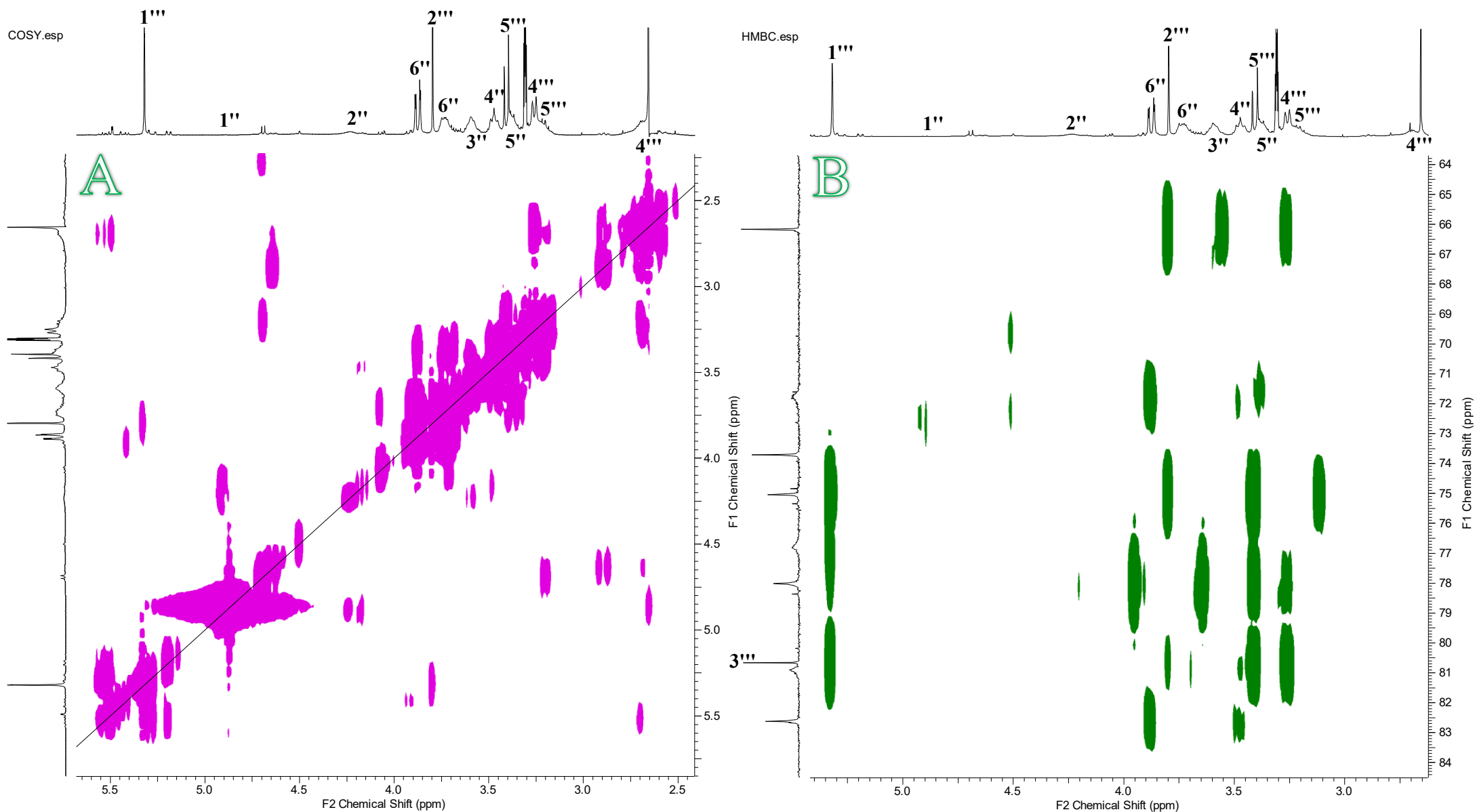


**Figura 68.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância **3**.

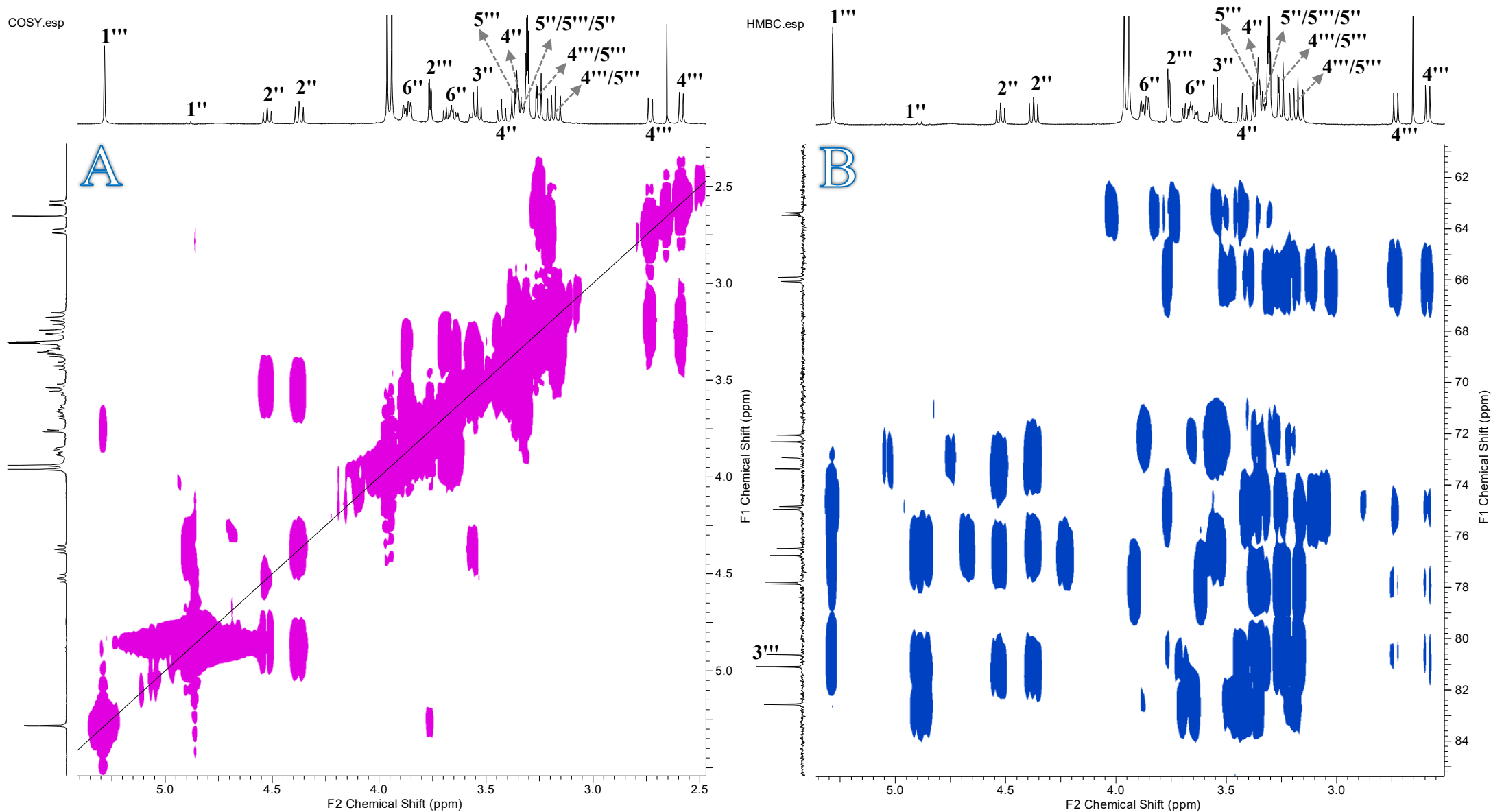


**Figura 69.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e no espectro de (B) HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para os prótons dos resíduos de açúcar da substância 4.

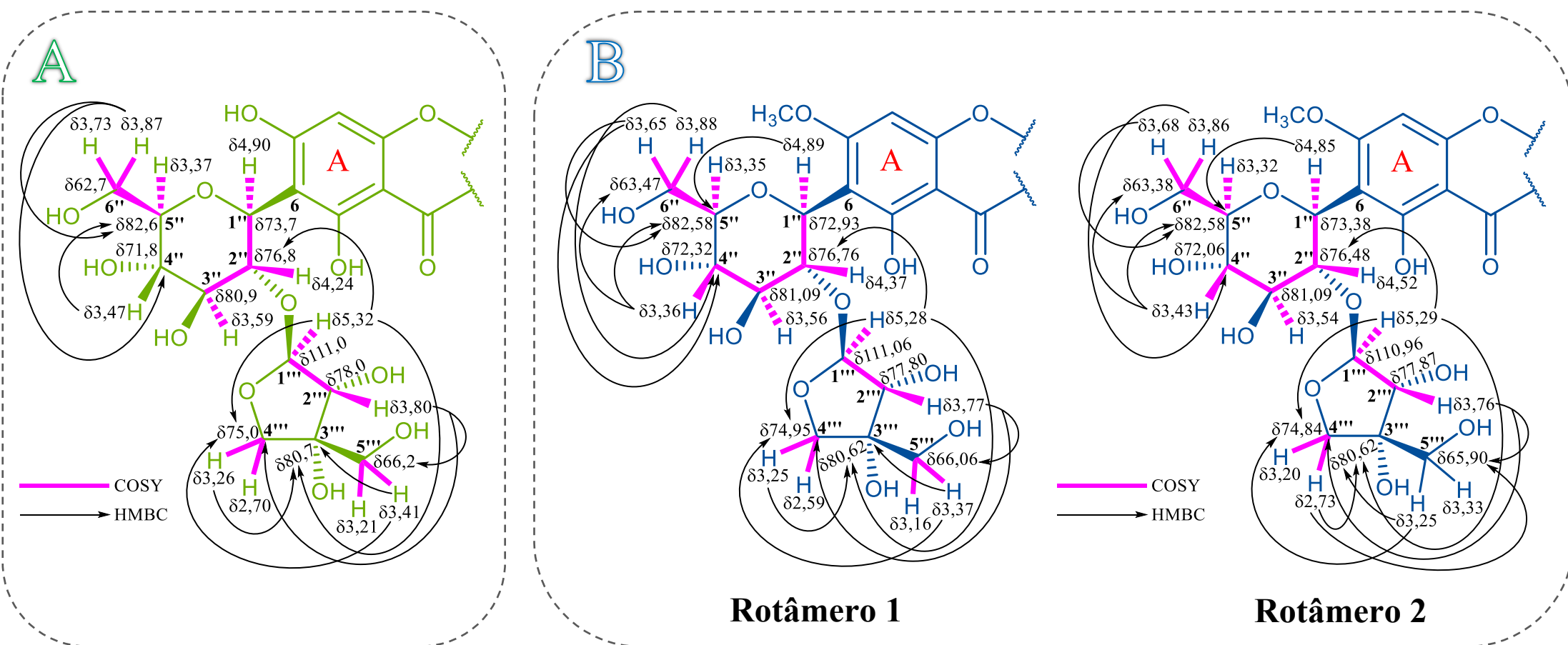


**Figura 70.** Correlações-chave observadas no espectro de (A) HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e no espectro de COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para os prótons dos resíduos de açúcar da (A) substância **3**, bem como do (B) rotâmero 1 e do rotâmero 2 da substância **4**.

Finalmente, a configuração do carbono anomérico C-1''' da fração 2''-O-apiofuranosil foi estabelecida com base nas constantes de acoplamento e nas multiplicidades dos sinais atribuídos a H-1''' e H-2'''. As constantes de acoplamento vicinal próton-próton ( $^3J_{HH}$ ) dependem fortemente do ângulo diedro ( $\phi_{HCC'H'}$ ) entre os prótons acoplados, relação que é descrita pelas equações do tipo Karplus (VÁZQUEZ *et al.*, 2018). Essas equações permitem prever a magnitude de  $^3J_{HH}$  a partir do valor de  $\phi_{HCC'H'}$ , o qual pode ser estimado mediante otimização da estrutura molecular por cálculos teóricos. Assim, as constantes de acoplamento previstas pelas equações generalizadas de Karplus podem ser diretamente comparadas com os valores obtidos experimentalmente. Essa abordagem tem se mostrado particularmente útil na determinação estereoquímica de produtos naturais estruturalmente complexos (OLIVEIRA *et al.*, 2025; VÁZQUEZ *et al.*, 2018).

No caso da substância **4**, o ângulo diedro entre H-1''' e H-2''' calculado para a configuração  $\beta$  foi de  $108,58^\circ$  (Figura 71B), resultando em uma constante de acoplamento relativamente baixa ( $^3J_{HH} \approx 1,8$  Hz, de acordo com a equação de Barfield). Em contraste, para a configuração  $\alpha$ , o ângulo diedro teórico de  $34,89^\circ$  entre os mesmos prótons (Figura 71A) corresponderia a uma constante de acoplamento significativamente maior ( $^3J_{HH} \approx 5,7$  Hz, segundo a equação de Karplus). Esses valores teóricos estão em consonância com dados da literatura, que descrevem constantes de acoplamento entre H-1''' e H-2''' próximas de 2,0 Hz para unidades O- $\beta$ -apiofuranosil e em torno de 5,0 Hz para unidades O- $\alpha$ -apiofuranosil (AQUINO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2018). Dessa forma, a convergência entre o valor previsto e os valores experimentais (d,  $^3J_{HH} = 1,2$  Hz para a substância **3**; d,  $^3J_{HH} = 1,7$  Hz para a substância **4**) confirma que o carbono anomérico C-1''' apresenta configuração  $\beta$  em ambas as substâncias.

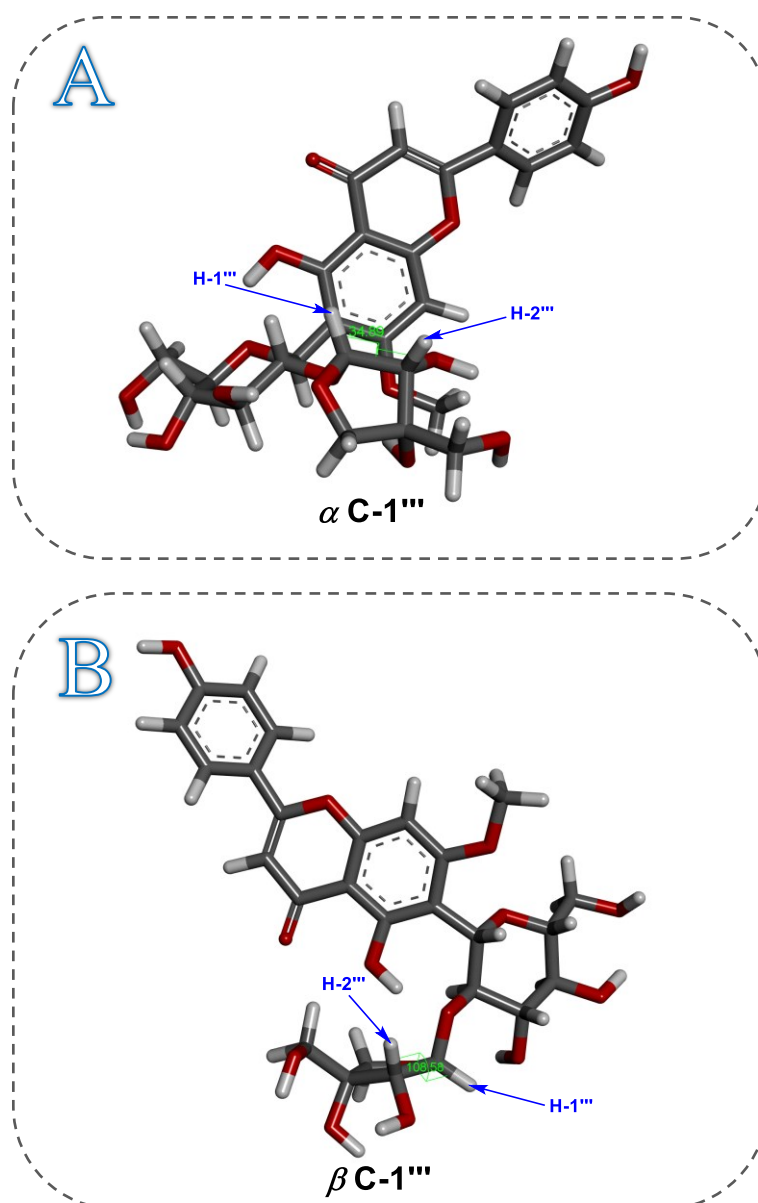


**Figura 71.** Representações 3D das estruturas químicas otimizadas dos epímeros (A)  $\alpha$  e (B)  $\beta$  da substância 4, destacando os ângulos diedros teóricos entre os hidrogênios H-1''' e H-2''' (A Autora, 2025).

Assim, com base na comparação dos dados de RMN (Tabelas 9-11) com a literatura, as substâncias 3 e 4 foram caracterizadas como as flavonas apigenina 6-*C*-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo (TSOLMON *et al.*, 2021) e precatorina III (apigenina 7-metil éter 6-*C*-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo) (NAKAMURA & HATTORI, 1998), respectivamente (Figuras 72 e 73). Este é o primeiro registro dessas substâncias na família

Loganiaceae. A substância **3** havia sido reportada apenas uma vez em toda a literatura, enquanto a substância **4**, somente duas, evidenciando sua raridade.

**Tabela 9.** Dados espectroscópicos de RMN (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **3** (apigenina 6-C-[β-apiofuranosil-(1→2)]-β-glicopiranosídeo).

| Posição                       | δ <sub>H</sub> (integral, mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                 |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <i>Aglicona</i>               |                                                               |                   |                             |                             |                                   |
| 2                             | -                                                             | -                 | 166,2                       | 166,1                       | -                                 |
| 3                             | 6,61 (1H, s)                                                  | -                 | 103,9                       | 103,8                       | 105,1; 123,2; 166,2; 184,0        |
| 4                             | -                                                             | -                 | 184,0                       | 183,9                       | -                                 |
| 5                             | -                                                             | -                 | 161,4                       | 161,3                       | -                                 |
| 6                             | -                                                             | -                 | 109,6                       | 109,5                       | -                                 |
| 7                             | -                                                             | -                 | 165,2                       | 164,9                       | -                                 |
| 8                             | 6,51 (1H, s)                                                  | -                 | 95,8                        | 95,7                        | 105,1; 109,6; 158,7; 165,2; 184,0 |
| 9                             | -                                                             | -                 | 158,7                       | 158,6                       | -                                 |
| 10                            | -                                                             | -                 | 105,1                       | 105,1                       | -                                 |
| 1'                            | -                                                             | -                 | 123,2                       | 122,9                       | -                                 |
| 2' e 6'                       | 7,84 (2H, d, 9,2)                                             | 6,93              | 129,5                       | 129,4                       | 117,1; 129,5; 162,9; 166,2        |
| 3' e 5'                       | 6,93 (2H, d, 9,2)                                             | 7,84              | 117,1                       | 117,0                       | 117,1; 123,2; 129,5; 162,9        |
| 4'                            | -                                                             | -                 | 162,9                       | 162,7                       | -                                 |
| <i>6-C-β-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                             |                             |                                   |
| 1"                            | 4,90 (1H, d, 10,0)                                            | 4,24              | 73,7                        | 73,6                        | 109,6; 161,4; 165,2               |
| 2"                            | 4,24 (1H, m)                                                  | 4,90              | 76,8                        | 76,7                        | -                                 |
| 3"                            | 3,59 (1H, m)                                                  | 4,24              | 80,9                        | 80,8                        | -                                 |
| 4"                            | 3,47 (1H, m)                                                  | -                 | 71,8                        | 71,6                        | 82,6                              |
| 5"                            | 3,37 (1H, m)                                                  | 3,73              | 82,6                        | 82,5                        | -                                 |
| 6"                            | 3,87 (1H, dd, 12,2 e 2,4) e 3,73 (1H, dd, 12,2 e 5,5)         | 3,37; 3,73        | 62,7                        | 62,7                        | 71,8; 82,6                        |
| <i>2''-O-β-apiofuranosil</i>  |                                                               |                   |                             |                             |                                   |
| 1'''                          | 5,32 (1H, d, 1,2)                                             | 3,80              | 111,0                       | 110,9                       | 75,0; 76,8; 80,7                  |
| 2'''                          | 3,80 (1H, d, 1,2)                                             | 5,32              | 78,0                        | 78,0                        | 66,2; 75,0; 80,7; 111,0           |
| 3'''                          | -                                                             | -                 | 80,7                        | 80,6                        | -                                 |
| 4'''                          | 3,26 (1H, d, 9,6) e 2,70 (1H, m)                              | 2,70; 3,26        | 75,0                        | 74,9                        | 78,0; 80,7; 111,0                 |
| 5'''                          | 3,41 (1H, d, 11,6) e 3,21 (1H, m)                             | 3,21; 3,41        | 66,2                        | 66,1                        | 75,0; 78,0; 80,7                  |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais do TMS (δ<sub>H</sub> 0,00 e δ<sub>C</sub> 0,0)<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Tsolmon *et al.* (2021) (CD<sub>3</sub>OD, <sup>13</sup>C 100 MHz)

**Tabela 10.** Dados espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do rotâmero 1 da substância **4** (precatorina III).

| Posição                                        | $\delta_{\text{H}}$ (integral, mult., $J$ em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>a</sup> | $\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                           |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Aglicona</i>                                |                                                               |                   |                                  |                                  |                                             |
| 2                                              | -                                                             | -                 | 166,58                           | 163,6                            | -                                           |
| 3                                              | 6,67 (1H, s)                                                  | -                 | 104,20                           | 103,1                            | 105,76; 122,87; 166,58; 183,98              |
| 4                                              | -                                                             | -                 | 183,98                           | 181,8                            | -                                           |
| 5                                              | -                                                             | -                 | 161,09                           | 159,1                            | -                                           |
| 6                                              | -                                                             | -                 | 110,67                           | 109,4                            | -                                           |
| 7                                              | -                                                             | -                 | 167,30                           | 165,1                            | -                                           |
| 8                                              | 6,75 (1H, s)                                                  | -                 | 92,04                            | 91,1                             | 105,76; 110,67; 159,32; 167,30; 183,98      |
| 9                                              | -                                                             | -                 | 159,32                           | 156,9                            | -                                           |
| 10                                             | -                                                             | -                 | 105,76                           | 104,1                            | -                                           |
| 1'                                             | -                                                             | -                 | 122,87                           | 120,9                            | -                                           |
| 2' e 6'                                        | 7,89 (2H, d, 9,2)                                             | 6,93              | 129,65                           | 128,6                            | 117,26; 129,65; 163,38; 166,58              |
| 3' e 5'                                        | 6,93 (2H, d, 9,2)                                             | 7,89              | 117,26                           | 116,0                            | 117,26; 122,87; 129,65; 163,38              |
| 4'                                             | -                                                             | -                 | 163,38                           | 161,3                            | -                                           |
| OCH <sub>3</sub> -7                            | 3,94 (3H, s)                                                  | -                 | 56,84                            | 56,4                             | 92,04; 167,30                               |
| <i>6-C-<math>\beta</math>-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                                  |                                  |                                             |
| 1"                                             | 4,89 (1H, d, 10,0)                                            | 4,37              | 72,93                            | 71,1                             | 76,76; 81,09; 82,58; 110,67; 161,09; 167,30 |
| 2"                                             | 4,37 (1H, dd, 10,0 e 8,8)                                     | 3,56; 4,89        | 76,76                            | 74,2                             | 72,93; 81,09; 111,06                        |
| 3"                                             | 3,56 (1H, dd, 9,0 e 8,8)                                      | 3,36; 4,37        | 81,09                            | 79,0                             | 72,32; 76,76                                |
| 4"                                             | 3,36 (1H, dd, 9,9 e 9,0)                                      | -                 | 72,32                            | 70,9                             | 63,47; 82,58                                |
| 5"                                             | 3,35 (1H, ddd, 9,9, 6,3 e 2,3)                                | 3,65              | 82,58                            | 81,8                             | -                                           |
| 6"                                             | 3,88 (1H, dd, 12,0 e 2,3) e 3,65 (1H, dd, 12,0 e 6,3)         | 3,35; 3,65; 3,88  | 63,47                            | 61,8                             | 72,32; 82,58                                |
| <i>2''-O-<math>\beta</math>-apiofuranosil</i>  |                                                               |                   |                                  |                                  |                                             |
| 1'''                                           | 5,28 (1H, d, 1,7)                                             | 3,77              | 111,06                           | 109,0                            | 74,95; 76,76; 80,62                         |
| 2'''                                           | 3,77 (1H, d, 1,7)                                             | 5,28              | 77,80                            | 75,6                             | 66,06; 74,95; 111,06                        |
| 3'''                                           | -                                                             | -                 | 80,62                            | 79,5                             | -                                           |
| 4'''                                           | 3,25 (1H, d, 9,4) e 2,59 (1H, d, 9,4)                         | 2,59; 3,25        | 74,95                            | 73,6                             | 66,06; 77,80; 80,62; 111,06                 |
| 5'''                                           | 3,37 (1H, d, 11,5) e 3,16 (1H, d, 11,5)                       | 3,16; 3,37        | 66,06                            | 64,5                             | 74,95; 77,80; 80,62                         |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais do TMS ( $\delta_{\text{H}}$  0,00 e  $\delta_{\text{C}}$  0,00)<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Nakamura e Hattori (1998) ( $\text{DMSO}-d_6$ ,  $^{13}\text{C}$  75 MHz)

**Tabela 11.** Dados espectroscópicos de RMN (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do rotâmero 2 substância **4** (precatorina III).

| Posição                       | δ <sub>H</sub> (integral, mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup> | COSY <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>a</sup> | δ <sub>C</sub> <sup>b</sup> | HMBC <sup>a</sup>                           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Aglicona</i>               |                                                               |                   |                             |                             |                                             |
| 2                             | -                                                             | -                 | 166,58                      | 163,7                       | -                                           |
| 3                             | 6,67 (1H, s)                                                  | -                 | 104,13                      | 103,1                       | 106,21; 122,87; 166,58; 184,27              |
| 4                             | -                                                             | -                 | 184,27                      | 182,1                       | -                                           |
| 5                             | -                                                             | -                 | 162,11                      | 160,5                       | -                                           |
| 6                             | -                                                             | -                 | 110,78                      | 109,5                       | -                                           |
| 7                             | -                                                             | -                 | 165,39                      | 163,1                       | -                                           |
| 8                             | 6,76 (1H, s)                                                  | -                 | 91,23                       | 90,1                        | 106,21; 110,78; 159,12; 165,39; 184,27      |
| 9                             | -                                                             | -                 | 159,12                      | 156,7                       | -                                           |
| 10                            | -                                                             | -                 | 106,21                      | 104,5                       | -                                           |
| 1'                            | -                                                             | -                 | 122,87                      | 120,9                       | -                                           |
| 2' e 6'                       | 7,89 (2H, d, 9,2)                                             | 6,93              | 129,63                      | 128,6                       | 117,26; 129,63; 163,38; 166,58              |
| 3' e 5'                       | 6,93 (2H, d, 9,2)                                             | 7,89              | 117,26                      | 116,0                       | 117,26; 122,87; 129,63; 163,38              |
| 4'                            | -                                                             | -                 | 163,38                      | 161,3                       | -                                           |
| OCH <sub>3</sub> -7           | 3,96 (3H, s)                                                  | -                 | 57,04                       | 56,5                        | 91,23; 165,39                               |
| <i>6-C-β-glicopiranosídeo</i> |                                                               |                   |                             |                             |                                             |
| 1"                            | 4,85 (1H, d, 10,0)                                            | 4,52              | 73,38                       | 71,2                        | 76,48; 81,09; 82,58; 110,78; 162,11; 165,39 |
| 2"                            | 4,52 (1H, dd, 10,0 e 8,8)                                     | 3,54; 4,85        | 76,48                       | 74,0                        | 73,38; 81,09; 110,96                        |
| 3"                            | 3,54 (1H, dd, 9,0 e 8,8)                                      | 3,43; 4,52        | 81,09                       | 79,1                        | 72,06; 76,48                                |
| 4"                            | 3,43 (1H, dd, 9,9 e 9,0)                                      | -                 | 72,06                       | 70,9                        | 63,38; 81,09; 82,58                         |
| 5"                            | 3,32 (1H, ddd, 9,9, 6,3 e 2,3)                                | 3,68              | 82,58                       | 81,5                        | -                                           |
| 6"                            | 3,86 (1H, dd, 12,0 e 2,3) e 3,68 (1H, dd, 12,0 e 6,3)         | 3,32; 3,68; 3,86  | 63,38                       | 61,8                        | 72,06; 82,58                                |
| <i>2''-O-β-apiofuranosil</i>  |                                                               |                   |                             |                             |                                             |
| 1'''                          | 5,29 (1H, d, 1,7)                                             | 3,76              | 110,96                      | 108,9                       | 74,84; 76,48; 80,62                         |
| 2'''                          | 3,76 (1H, d, 1,7)                                             | 5,29              | 77,87                       | 75,7                        | 65,90; 74,84; 110,96                        |
| 3'''                          | -                                                             | -                 | 80,62                       | 79,5                        | -                                           |
| 4'''                          | 3,20 (1H, d, 9,4) e 2,73 (1H, d, 9,4)                         | 2,73; 3,20        | 74,84                       | 73,4                        | 65,90; 77,87; 80,62; 110,96                 |
| 5'''                          | 3,33 (1H, d, 11,5) e 3,25 (1H, d, 11,5)                       | -                 | 65,90                       | 64,5                        | 74,84; 77,87; 80,62                         |

<sup>a</sup>Deslocamentos químicos relativos aos sinais do TMS (δ<sub>H</sub> 0,00 e δ<sub>C</sub> 0,00)<sup>b</sup>Dados da literatura de acordo com Nakamura e Hattori (1998) (DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>13</sup>C 75 MHz)

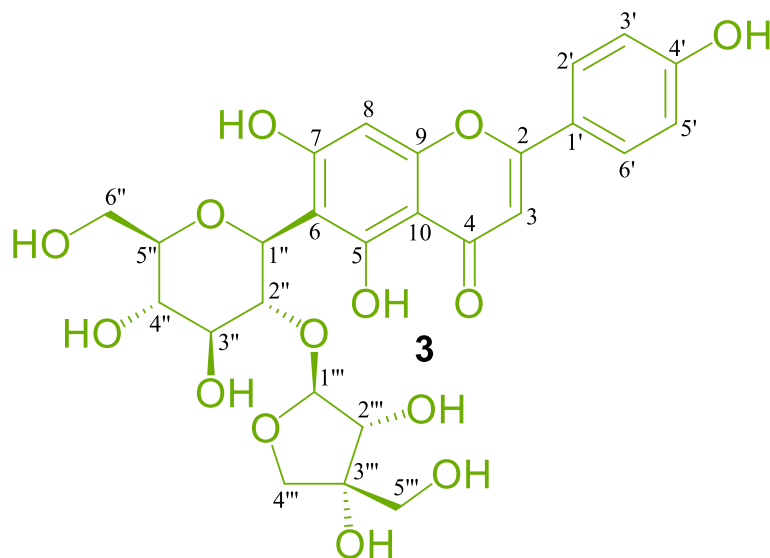


**Figura 72.** Estrutura química da flavona apigenina 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo (**3**).

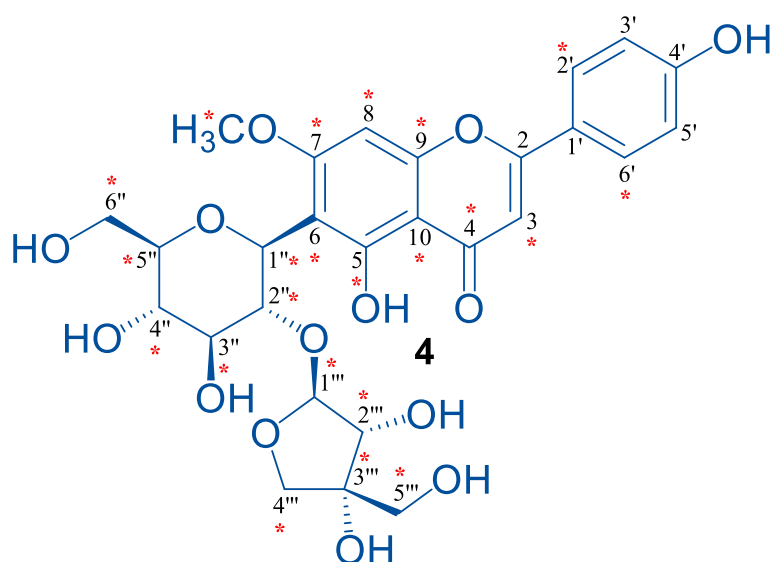


**Figura 73.** Estrutura química da flavona precatorina III (**4**), com asteriscos (\*) denotando as posições associadas aos sinais duplicados observados nos espectros de RMN.

A duplicação de sinais observada nos espectros de RMN da substância **4** (precatorina III) resulta do mesmo fenômeno conformacional previamente descrito para a substância **2** (swertisina) (Seção 5.3.3), da qual difere apenas pela adição de uma unidade 2''-O-pentosil. Esse comportamento é atribuído principalmente à interconversão lenta entre rotâmeros na escala de tempo da RMN, decorrente da restrição da rotação em torno da ligação C-

glicosídica. Tal restrição é causada pelo impedimento estérico significativo imposto pelo grupo OCH<sub>3</sub>-7 em posição *orto* ao substituinte 6-C-glicosil (RAYYAN *et al.*, 2005). A ausência de duplicação de sinais nos espectros de RMN da substância **3**, um derivado 2"-*O*-pentosil da substância **1** (isovitexina), assim como da própria substância **1**, reforça que a restrição conformacional é determinada principalmente pelo grupo OCH<sub>3</sub>-7, independentemente do substituinte 2"-*O*-pentosil.

#### **5.4. Racionalização da seletividade cromatográfica para as substâncias-alvo da fração metanólica das folhas de *S. subcordata* com base no modelo HSM**

Em um esforço para racionalizar a seletividade cromatográfica observada para os glicosídeos de flavonoides investigados, particularmente isoflavonas, a discussão a seguir é apresentada e tem como base o modelo de subtração hidrofóbica (HSM) de Snyder (MARCHAND *et al.*, 2008; SNYDER *et al.*, 2004). De acordo com este modelo, a seletividade da coluna é definida por cinco principais interações soluto-fase estacionária: hidrofobicidade (**H**), resistência estérica (**S\***), acidez da ligação de hidrogênio (**A**), basicidade da ligação de hidrogênio (**B**) e capacidade de troca catiônica (**C**).

A subcordatina (**5**) apresentou a menor retenção nas colunas C18, PFP, C8 e CN quando comparada às demais substâncias (Figura 74). Para as colunas C18, PFP e C8, essa retenção reduzida pode ser atribuída à resistência estérica (**S\***) (Tabela A1). De acordo com o HSM, colunas com valores mais elevados de **S\*** discriminam mais fortemente solutos volumosos (MARCHAND *et al.*, 2008; SNYDER *et al.*, 2004). A subcordatina (**5**) é um *O*-diglicosídeo com elevada massa molecular e apresenta flexibilidade conformacional em torno da ligação *O*-glicosídica aglicona-açúcar, como evidenciado pela ausência de duplicação de sinais em seus espectros de RMN. Consequentemente, ela pode ser

caracterizada como o membro mais volumoso da série e, portanto, sua interação com essas fases é limitada.

A coluna CN representa um caso contrastante. Fases ligadas a nitrila tipicamente apresentam menor hidrofobicidade (**H**) e resistência estérica reduzida (**S\***) (Tabela A1), em decorrência do alinhamento dos grupos nitrila, o que favorece o acesso de solutos volumosos (CROES *et al.*, 2005; MARCHAND *et al.*, 2008; SNYDER *et al.*, 2004). Com base nesses parâmetros, seria esperado que substâncias polares, como a subcordatina (**5**), apresentassem forte retenção. No entanto, seu comportamento na coluna CN foi comparável ao observado na coluna C8, apesar do uso de uma fase móvel mais fraca (20 % de metanol *vs.* 35 % de metanol). Essa discrepância evidencia que, na prática, fatores adicionais — como a seletividade da força do solvente e diferenças sutis na química da fase estacionária — modulam a retenção para além do que é previsto pelo HSM (MARCHAND *et al.*, 2008; SNYDER *et al.*, 2004). Conforme destacado por Marchand e colaboradores (2008), embora o HSM forneça uma descrição abrangente da seletividade da coluna, desvios podem ocorrer devido aos processos de fabricação da coluna, à eficiência do *end-capping* ou à heterogeneidade da superfície da partícula.

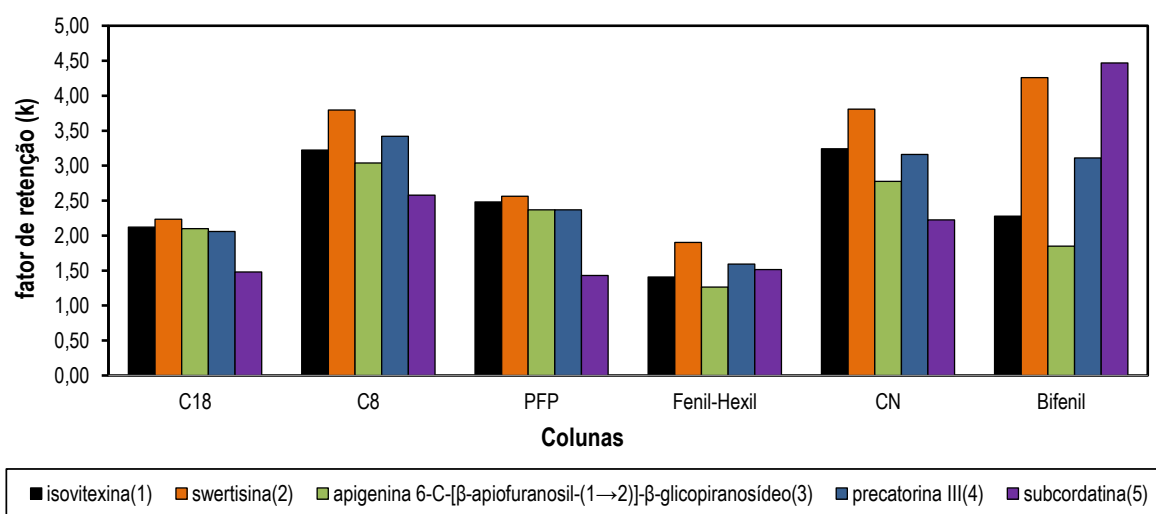


**Figura 74.** Gráfico de barras mostrando o fator de retenção (*k*) para as substâncias **1** a **5** nas seis colunas cromatográficas avaliadas.

Em contraste com sua fraca retenção nas colunas C18, PFP, C8 e CN, a subcordatina (5) exibiu forte retenção em colunas do tipo fenil, particularmente na coluna bifenil (Figura 74). Esse comportamento pode ser atribuído a uma maior extensão das interações  $\pi$ - $\pi$ , que desempenham um papel predominante no mecanismo de retenção de compostos aromáticos nessas fases estacionárias (CROES *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2019; JANDERA *et al.*, 2017; SNYDER *et al.*, 2004). A compatibilidade conformacional entre o ângulo diedro das isoflavonas (44–48° entre o plano do anel B e o plano da porção benzopirano) (THE *et al.*, 2019; TOŠOVIĆ *et al.*, 2015) e o dos grupos bifenil (~46,8°) (TRUJILLO & MATTA, 2007) provavelmente intensifica o empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , explicando a retenção excepcional da subcordatina (5). Essas observações também estão de acordo com Croes e colaboradores (2005), que demonstraram que fases fenil amplificam as interações  $\pi$ - $\pi$  (P), particularmente em sistemas metanol-água, nos quais tais interações não são competitivamente suprimidas pela fase móvel. Assim, a forte contribuição  $\pi$ - $\pi$  observada para a subcordatina (5) reforça a capacidade do HSM de racionalizar a retenção quando a estrutura do soluto e a química da fase estacionária favorecem interações aromáticas.

A isovitexina (1) e a swertisina (2) (C-monoglicosídeos de flavonas), bem como a apigenina 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1→2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo (3) e a precatorina III (4) (O,C-diglicosídeos de flavonas), apresentaram comportamento semelhante nas colunas C18 e PFP, com a retenção seguindo a ordem  $k_4 \simeq k_3 < k_1 \simeq k_2$  (Figura 74). Nesse caso, a resistência estérica (S\*) novamente parece modular a separação de glicosídeos estruturalmente análogos (MARCHAND *et al.*, 2008; SNYDER *et al.*, 2004). Contudo, nas colunas C8, fenil-hexil e bifenil, a ordem de retenção foi alterada para  $k_3 < k_1 < k_4 < k_2$ , indicando um papel dominante da hidrofobicidade (H). A presença de grupos metoxila nas estruturas da swertisina (2) e da

precatorina III (4) intensificou as interações hidrofóbicas, enquanto as contribuições  $\pi$ - $\pi$  aumentaram significativamente a seletividade na coluna bifenil (CROES *et al.*, 2005).

Por fim, os perfis de retenção comparáveis observados para as colunas C8 e CN ao longo da série de substâncias (Figura 74) ilustram que, embora o HSM forneça um arcabouço preditivo robusto e abrangente para a seletividade em modo reverso, a retenção pode ser influenciada pelo perfil químico específico da amostra. Assim, as interações aqui propostas devem ser consideradas representativas da presente série de substâncias, e não universalmente aplicáveis a todas as misturas de flavonoides.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, uma abordagem de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC) no modo *offline single heart-cutting* foi aplicada com sucesso para o isolamento de glicosídeos de flavonoides das folhas de *S. subcordata* Spruce ex Benth., levando à identificação de dois glicosídeos de flavonoides raros (apigenina 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo e apigenina 7-metil éter 6-C-[ $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glicopiranosídeo) e à descoberta de uma isoflavona não relatada anteriormente, denominada aqui como subcordatina.

Embora várias estratégias de 2D-LC *offline* tenham sido relatadas aqui, a combinação de uma coluna semipreparativa C18 na primeira dimensão ( $^1D$ ) e uma coluna analítica bifenil na segunda dimensão ( $^2D$ ) proporcionou ortogonalidade e resolução ótimas, permitindo o isolamento eficiente de substâncias estruturalmente relacionadas com rendimentos mais elevados.

A subcordatina apresentou retenção notavelmente mais forte nas colunas do tipo fenil — especialmente na coluna bifenil — o que foi atribuído às interações  $\pi$ - $\pi$  predominantes. Essas interações foram provavelmente intensificadas por similaridades conformacionais entre a substância e os grupos bifenil da fase estacionária. No geral, essas descobertas mostram a importância de interações moleculares específicas para atingir a seletividade cromatográfica e destacam o potencial da 2D-LC no modo *offline single heart-cutting* como uma ferramenta poderosa para isolar metabólitos estruturalmente complexos de extratos de produtos naturais.

Além disso, este estudo revelou a espécie *S. subcordata* como uma fonte de substâncias biologicamente promissoras, expandindo o conhecimento fitoquímico do gênero *Strychnos*.

## 7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2024-2026

A seguir, são listadas as referências dos artigos científicos publicados a partir de trabalhos desenvolvidos durante os 24 meses de duração do Mestrado, incluindo um artigo derivado da dissertação e cinco artigos desenvolvidos em colaboração.

1. FRANÇA, R. S.; BATAGLION, G. A.; CASTRO, A. P. A.; LEOCADIO, B. L. C.; NEVES, K. O. G.; SILVA FILHO, F. A.; LIMA, B. R.; CASSAS, F.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; CASS, Q. B.; SILVA, F. M. A. Systematic assessment of column selectivity for the isolation of subcordatine and other flavonoid glycosides from *Strychnos subcordata* Spruce ex Benth. using off-line single heart-cutting two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1766, p. 466598, 2026. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466598>.
2. CASTRO, A. P. A.; LIMA, B. R.; FRANÇA, R. S.; LEOCADIO, B. R. C.; SILVA FILHO, F. A.; FERNANDES, C. C.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, F. M. A. Integrative approach based on DI-MS and LC-MS/MS analysis for comprehensive characterization of flavonoid glycoside isomers from *Onychopetalum periquino* (Annonaceae). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 40, n. 2, p. e10163, 2026. <https://doi.org/10.1002/rcm.10163>.
3. LIMA, E. J. S. P.; SILVA, C. V. A.; ROCHA, F. A. S.; RODRIGUES, A. M.; COSTA, S. C.; FRANÇA, R. S.; GURGEL, R. S.; BATISTA, B. N.; ALBUQUERQUE, P. M.; GOMES, W. R.; KOOLEN, H. H. F.; BATAGLION, G. A. Nutritional composition, volatile profiles, and biological evaluation of honeys from *Melipona interrupta* and *Melipona seminigra* from Amazonas State, Brazil. **Plants**, v. 14, p. 2106, 2025. <https://doi.org/10.3390/plants14142106>.
4. ALMEIDA, L. A. F.; SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOUSA, A. B. B.; SILVA FILHO, F. A.; LEOCADIO, B. R. C.; CASTRO, A. P. A.; FRANÇA, R. S.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. LC-MS/MS based dereplication of isoquinoline-derived alkaloids from the trunk bark of *Unonopsis rufescens* (Baill.) R.E.Fr. (Annonaceae). **Química Nova**, v. 48, n. 6, p. e-20250159, 2025. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20250159>.
5. LIMA, B. R.; NEVES, K. O. G.; CHIBLI, L. A.; CASTRO, A. P. A.; FRANÇA, R. S.; BATAGLION, G. A.; MACHADO, M. B.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, F. M. A. Optimization of ultrasound-assisted extraction of (–)-stepholidine from *Onychopetalum amazonicum* leaves using response surface methodology. **ACS Omega**, v. 10, n. 46, p. 55652-55659, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c06822>.

6. BRAGA, S. M. R.; SILVA, F. M. A.; BATAGLION, G. A.; ALMEIDA, M. G. A.; SOUZA, L. O.; FRANÇA, R. S.; SOUZA, C. A. S.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B. Botanical authenticity of Miraruirá sold in the Amazonas State, Brazil, based on chemical profiling using DI-MS and chemometric analyses. **Plants**, v. 14, p. 2012, 2025. <https://doi.org/10.3390/plants14132012>.

## REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, A.; LAMB, J.; NICHOLAS, A.; NAIDOO, Y. Molecular systematics of southern African monkey orange *Strychnos* L. (Loganiaceae). **Kew Bulletin**, v. 71, n. 2, p. 17, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12225-016-9630-0>.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC, 1998, 464 p.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M.; BYAMUKAMA, R.; MBABAZI, A.; OGWENG, G.; SKAAR, I.; KIREMIRE, B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1558-1563, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.025>.
- ANGENOT, L.; PINHEIRO, M. L. B.; ROCHA, A. F. I.; POUKENS-RENWART, P.; QUETIN-LECLERCQ, J.; WARIN, R. An indolinic cryptoalkaloid from *Strychnos matogrossensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2746-2749, 1990. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85240-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85240-G).
- AQUINO, R.; MORELLI, S.; LAURO, M. R.; ABDO, S.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1019-1023, 2001. <https://doi.org/10.1021/np0101245>.
- AVAKOUDJO, H. G. G.; HOUNKPÈVI, A.; IDOHOU, R.; KONÉ, M. W.; ASSOGBADJO, A. E. Local knowledge, uses, and factors determining the use of *Strychnos spinosa* organs in Benin (West Africa). **Economic Botany**, v. 74, n. 1, 15-31, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12231-019-09481-0>.
- BASÍLIO, I. J. L. D.; NURIT, K.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico das folhas de três espécies do gênero *Strychnos* L. (Loganiaceae) do Nordeste do Brasil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 356-365, 2005. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6755>.
- BATTERSBY, A. R.; HODSON, H. F. Alkaloids of calabash curare and *Strychnos* species. In: MANSKE, R. H. F. (Eds). **The alkaloids: chemistry and physiology**. v. 8. Elsevier, p. 515-579, 1965. [https://doi.org/10.1016/S1876-0813\(08\)60054-8](https://doi.org/10.1016/S1876-0813(08)60054-8).
- BISSET, N. G. Curare. In: PELLETIER, S. W. (Eds). **Alkaloids: chemical and biological perspectives**. v. 8. New York, NY, Springer, p. 1-150, 1992. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2908-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2908-7_1).
- BOFF, L.; SILVA, I. T.; ARGENTA, D. F.; FARIAS, L. M.; ALVARENGA, L. F.; PÁDUA, R. M.; BRAGA, F. C.; LEITE, J. P. V.; KRATZ, J. M.; SIMÕES, C. M. O. *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.: a brazilian medicinal plant with promising *in vitro* antiherpes activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1519-1529, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13279>.

BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; SILVA, M. A.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H.; BAUAB, T. M.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? ulcer healing action from alkaloid fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil.(Loganiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 47-52, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.020>.

BONNET, O.; BENIDDIR, M. A.; CHAMPY, P.; KAGISHA, V.; NYIRIMIGABO, A.; HAMANN, C.; JGERENAIA, G.; LEDOUX, A.; TCHINDA A. T.; ANGENOT, L.; FRÉDÉRICH, M. Exploration by molecular networking of *Strychnos* alkaloids reveals the unexpected occurrence of strychnine in seven *Strychnos* species. **Toxicon**, v. 215, p. 57-68, 2022.

BRAGA, S. M. R.; SILVA, F. M. A.; BATAGLION, G. A.; ALMEIDA, M. G. A.; SOUZA, L. O.; FRANÇA, R. S.; SOUZA, C. A. S.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B. Botanical authenticity of miraruira sold in the Amazonas state, Brazil, based on chemical profiling using DI-MS and chemometric analyses. **Plants**, v. 14, n. 13, p. 2012, 2025. <https://doi.org/10.3390/plants14132012>.

BRANDÃO, M. G.; ZANETTI, N. N.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F.; SANTOS, A. C.; MONTE-MÓR, R. L. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.004>.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 563-564, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85534-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85534-X).

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Four acylated flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3331-3334, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82498-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82498-X).

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Six flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1487-1490, 1988. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80221-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80221-8).

CASSAS, F.; SANTOS, C. L.; SILVA, F.; CASS, Q. B. *Strychnos peckii* BL Rob.: secondary metabolite annotation by liquid chromatography tandem high-resolution mass spectrometry with insights from biogenesis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 417, p. 1-13, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00216-025-05967-0>.

CHEN, J.; WANG, X.; QU, Y. G.; CHEN, Z. P.; CAI, H.; LIU, X.; XU, F.; LU, T. L.; CAI, B. C. Analgesic and anti-inflammatory activity and pharmacokinetics of alkaloids from seeds of *Strychnos nux-vomica* after transdermal administration: effect of changes in alkaloid composition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 181-188, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.038>.

CHEN, L. R.; CHEN, K. H. Utilization of isoflavones in soybeans for women with menopausal syndrome: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 6, p. 3212, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22063212>.

CHEN, S.; WANG, X.; CHENG, Y.; GAO, H.; CHEN, X. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*, v. 28, n. 13, p. 4982, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>.

CHENG, M. J.; TSAI, I. L.; CHEN, I. S. Chemical constituents from *Strychnos cathayensis*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 48, n. 2, p. 235-239, 2001. <https://doi.org/10.1002/jccs.200100038>.

CORSARO, M. M.; GIUDICIANNI, I.; LANZETTA, R.; MARCIANO, C. E.; MONACO, P.; PARRILLI, M. Polysaccharides from seeds of *Strychnos* species. *Phytochemistry*, v. 39, n. 6, p. 1377-1380, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00193-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00193-B).

COSTA, R. A.; PINHEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, K. M. T. D.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; IANK, J. R.; SILVA, N. G.; CABRAL, T. S.; COSTA, E. V. Structural, vibrational, and electronic properties of the glucoalkaloid strictosidine: a combined experimental and theoretical study. *Journal of Chemistry*, v. 2016, n. 1, p. 1752429, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1752429>.

CROES, K.; STEFFENS, A.; MARCHAND, D. H.; SNYDER, L. R. Relevance of  $\pi$ - $\pi$  and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1098, n. 1-2, p. 123-130, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.090>.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004. <https://doi.org/10.1002/jms.585>.

DANG, J.; LV, Y.; EL-ATY, A. A.; LI, G. Practically complementary size exclusion chromatography and reversed-phase liquid chromatography for the preparative separation of structurally similar flavone-C-glycosides. *Journal of Chromatography A*, v. 1740, p. 465558, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465558>.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Wiley, 2009, 539 p.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C.; SILVA, A. M. Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, v. 26, n. 17, p. 5377, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, v. 4, n. 10, p. 394-400, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01471-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01471-5).

DJIDOHOKPIN, D.; DASSOU, G. H.; FAVI, G. A.; ZOUNTANGNI, O. M.; OUACHINO, J. M. A. S.; MAKPONSÈ, J.; KPETIKOU, G.; TOSSOU, G.

M.; YÉDOMONHAN, H.; ADOMOU, A. C. Traditional uses and importance of *Strychnos* L.(Loganiaceae): a cross-cultural and spatial variation study in Benin. **Trees, Forests and People**, v. 20, p. 100865, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2025.100865>.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R. Selecting an “orthogonal” column during high-performance liquid chromatographic method development for samples that may contain non-ionized solutes. **Journal of chromatography A**, v. 1216, n. 16, p. 3467-3472, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.039>.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397-409, 1988. <https://doi.org/10.1007/bf01049915>.

DUCKE, A. O gênero *Strychnos* no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, n. 30, p. 1-64, 1955.

ELDAHSHAN, O. A.; ABDEL-DAIM, M. M. Phytochemical study, cytotoxic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of *Strychnos nux-vomica*. **Cytotechnology**, v. 67, n. 5, p. 831-844, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9723-2>.

EL-SOHLI, H. N.; JOSHI, A.; LI, X. C.; ROSS, S. A. Flavonoids from *Maclura tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 1, p. 141-145, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00126-0).

ES-SAFI, N. E.; KERHOAS, L.; DUCROT, P. H. Application of positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry to a study of the fragmentation of 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside and 7-*O*-glucosyl-(1→3)-glucoside. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 19, p. 2734-2742, 2005. <https://doi.org/10.1002/rcm.2122>.

FERRO, M. D.; SANTOS, S. A.; SILVESTRE, A. J.; DUARTE, M. F. Chromatographic separation of phenolic compounds from extra virgin olive oil: development and validation of a new method based on a biphenyl HPLC column. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 201, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20010201>.

FRANCIS, P.; SUSEEM, S. R. Isolation, structural characterization and anti-inflammatory screening of three compounds from *Strychnos colubrina* linn extract. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 15, n. 3, p. 1235-1240, 2022. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00206>.

FRANK, J. H.; POWDER-GEORGE, Y. L.; RAMSEWAK, R. S.; REYNOLDS, W. F. Variable-temperature <sup>1</sup>H-NMR studies on two *C*-glycosylflavones. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7914-7926, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17077914>.

FRÉDÉRICH, M.; BENTIRES-ALJ, M.; TITS, M.; ANGENOT, L.; GREIMERS, R.; GIELEN, J.; BOURS, V.; MERVILLE, M. P. Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and

apoptosis in human colon cancer cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1103-1110, 2003. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.044867>.

FRÉDÉRICH, M.; JACQUIER, M. J.; THÉPENIER, P.; DE MOL, P.; TITS, M.; PHILIPPE, G.; DELAUDE, C.; ANGENOT, L.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1381-1386, 2002. <https://doi.org/10.1021/np020070e>.

GONG, G.; GANESAN, K.; WAN, Y.; LIU, Y.; HUANG, Y.; LUO, Y.; WANG, X.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y. Unveiling the neuroprotective properties of isoflavones: current evidence, molecular mechanisms and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 65, n. 16, p. 3112-3148, 2025. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2357701>.

GURST, J. E. NMR and the structure of D-glucose. **Journal of Chemical Education**, v. 68, n. 12, p. 1003-1004, 1991. <https://doi.org/10.1021/ed068p1003>.

HARBORNE, J. B.; MABRY, J. T.; MABRY, H. **The flavonoids**. 1. ed. New York, NY, Springer, 1975, 1204 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2909-9>.

HASSAN, M. H. U.; SHAHBAZ, M.; IMRAN, M.; MOMAL, U.; NAEEM, H.; MUJTABA, A.; HUSSAIN, M.; ANWAR, M. J.; ALSAGABY, S. A.; ABDULMONEM, W. A.; YEHUDALA, T. F.; ABDELGAWAD, M. A.; EL-GHORAB, A. H.; SELIM, S.; MOSTAFA, E. M. Isoflavones: promising natural agent for cancer prevention and treatment. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 3, e70091, 2025. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70091>.

HYDE, M. A.; WURSTEN, B. T.; BALLINGS, P.; COATES PALGRAVE, M. *Strychnos panganensis*. In: Flora of Zimbabwe, 2025. Disponível em <[https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species\\_id=174420&image\\_id=4](https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species_id=174420&image_id=4)>, acessado em 07 de julho de 2025.

IBRAHIM, M. A.; MOHAMMED, A.; ISAH, M. B.; ALIYU, A. B. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 26-54, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.012>.

ITOH, A.; OYA, N.; KAWAGUCHI, E.; NISHIO, S.; TANAKA, Y.; KAWACHI, E.; AKITA, T.; NISHI, T.; TANAHASHI, T. Secoiridoid glucosides from *Strychnos spinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 9, p. 1434-1436, 2005. <https://doi.org/10.1021/np058062w>.

ITOH, A.; TANAKA, Y.; NAGAKURA, N.; AKITA, T.; NISHI, T.; TANAHASHI, T. Phenolic and iridoid glycosides from *Strychnos axillaris*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1208-1214, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.12.002>.

JANDERA, P.; HÁJEK, T.; RŮŽIČKOVÁ, M. Retention models on core-shell columns. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 6, p. 1636-1646, 2017. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0233>.

KACHLICKI, P.; PIASECKA, A.; STOBIECKI, M.; MARCZAK, Ł. Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques: review. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1494, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21111494>.

KANG, J.; HICK, L. A.; PRICE, W. E. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MS<sup>n</sup> ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 6, p. 857-868, 2007. <https://doi.org/10.1002/rcm.2897>.

KARERU, P. G.; KENJI, G. M.; GACHANJA, A. N.; KERIKO, J. M.; MUNGAI, G. Traditional medicines among the Embu and Mbeere people of Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 75-86, 2007. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v4i1.31193>.

KRÓL-KOGUS, B.; GŁÓD, D.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; MATŁAWSKA, I. Application of one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography methodologies for the analysis of C-glycosylflavones from fenugreek seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 1367, p. 48-56, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.039>.

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

KRUKOFF, B. A.; MONACHINO, J. The American species of *Strychnos*. **Brittonia**, v. 4, p. 248-322, 1942. <https://doi.org/10.2307/2804715>.

KRUKOFF, B. A.; SMITH, A. C. Notes on the botanical components of curare-II. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 66, n. 5, p. 303-314, 1939. <https://doi.org/10.2307/2480853>.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 1, p. 162750, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.

LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R.; LOPES, A. S.; FUMAGALLI, M. A. C.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; SOUZA FILHO, J. D.; TAVARES, C. A. P.; PÁDUA, R. M.; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective in vitro antileishmanial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 304354, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/304354>.

LAGE, P. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MESQUITA, J. T.; MATA, L. M.; FERNANDES, S. O.; CARDOSO, V. N.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; LEITE, J. P. V.; TEMPONE, A. G.; COELHO, E. A. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 12, p. 4625-4635, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4708-4>.

LEDOUX, A.; LEKA, K.; JANSEN, O.; BONNET, O.; HAMANN, C.; ANGENOT, L.; GARIGLIANY, M. M.; FRÉDÉRICH, M. Exploring the antiviral activity of flavonoids from *Strychnos variabilis* leaves against SARS-CoV-2. **Planta Medica**, v. 89, n. 14, p. 1421, 2023. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1774261>.

LINNAEUS, C. **Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitae, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas**. v. 2. Estocolmo (SE), Impensis Laurentii Salvii, 1753, 680 p.

LINDSEY, R. K.; EGGIMANN, B. L.; STOLL, D. R.; CARR, P. W.; SCHURE, M. R.; SIEPMANN, J. I. Column selection for comprehensive two-dimensional liquid chromatography using the hydrophobic subtraction model. **Journal of Chromatography A**, v. 1589, p. 47-55, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.018>.

MA, Y. L.; LI, Q. M.; HEUVEL, H. V. D.; CLAEYS, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, n. 12, p. 1357-1364, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199708\)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199708)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9).

MA, Y. L.; CUYCKENS, F.; HEUVEL, H. V. D.; CLAEYS, M. Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric *O*-diglycosyl flavonoids. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 159-165, 2001. <https://doi.org/10.1002/pca.573>.

MARCHAND, D. H.; SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Characterization and applications of reversed-phase column selectivity based on the hydrophobic-subtraction model. **Journal of Chromatography A**, v. 1191, n. 1-2, p. 2-20, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.079>.

MARKHAM, K. R.; PORTER, L. J. Isoscutellarein and hypolaetin 8-glucuronides from the liverwort *Marchantia berteroana*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 4, p. 1093-1097, 1975. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85194-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85194-6).

MAROYI, A. Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Nhema communal area, Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 347-354, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.003>.

MATSUURA, H. N.; RAU, M. R.; FETT-NETO, A. G. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 2, p. 191-200, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1348-6>.

MAVAR-MANGA, H.; QUETIN-LECLERCQ, J.; LLABRES, G.; PINHEIRO, M. L. B.; ROCHA, A. F. I.; ANGENOT, L. 9-Methoxygeissoschizol, an alkaloid from bark of *Strychnos guianensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1125-1127, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00454-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00454-2).

MENEZES, J. C. J. M. D. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; KAMAT, S. P.; BARROS, C. M. R. F.; DOMINGUES, M. R. M. Electrospray tandem mass spectrometry analysis of

methylenedioxy chalcones, flavanones and flavones. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1303-1310, 2013. <https://doi.org/10.1002/rcm.6577>.

NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Saponins and C-glycosyl flavones from the seeds of *Abrus precatorius*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 982-987, 1998. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.982>.

NEUWINGER, H.D. Alkaloids in arrow poisons. In: ROBERTS, M.F.; WINK, M. (Eds). **Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications**. Boston, MA, Springer, p. 45-84, 1998. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4_3).

NICOLETTI, M.; GOULART, M. O. F.; LIMA, R. A.; GOULART, A. E.; MONACHE, F. D.; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 953-957, 1984. <https://doi.org/10.1021/np50036a007>.

NOVOTNA, B.; POLESNY, Z.; PINTO-BASTO, M. F.; VAN DAMME, P.; PUDIL, P.; MAZANCOVA, J.; DUARTE, M. C. Medicinal plants used by 'root doctors', local traditional healers in Bié province, Angola. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 112662, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112662>.

OHIRI, F. C.; VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A. B. The African *Strychnos* species and their alkaloids: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, n. 2-3, p. 167-223, 1983. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90032-6).

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, F. M. A.; SÁ, I. S.; COSTA, M. L. L.; NUNOMURA, S. M.; ROQUE, R. A.; NUNOMURA, R. D. C. S. Larvicidal mechanism of the rare sesquiterpene ishwarol B from *Piper alatipetiolatum* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles darlingi*, and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae): oxidative damage, defense enzyme modulation, and acetylcholinesterase inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 420, p. 111719, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.111719>.

PARK, S.; KIM, M.; LIN, Y.; HONG, M.; NAM, G.; MIECZKOWSKI, A.; KARDOS, J.; LEE, Y. H.; LIM, M. H. Designing multi-target-directed flavonoids: a strategic approach to Alzheimer's disease. **Chemical Science**, v. 14, n. 35, p. 9293-9305, 2023. <https://doi.org/10.1039/D3SC00752A>.

PHILIPPE, G.; ANGENOT, L.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 405-416, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.006>.

PHILIPPE, G.; ANGENOT, L.; DE MOL, P.; GOFFIN, E.; HAYETTE, M. P.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. In vitro screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 535-539, 2005.

PINHEIRO, M. L. B. **Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero *Strychnos* da flora amazônica**. 2000. 275 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

PINHEIRO, M. L. B.; COUCEIRO, P.; ROCHA, A. F. I.; MONTE, F.; VILLAR, J. A new strychnobrasiline base of *Strychnos mato Grossoensis*. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 4, p. 229-233, 2002. <https://doi.org/10.1080/10575630290020479>.

PLAZA, M.; POZZO, T.; LIU, J.; ARA, K. Z. G.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 62, n. 15, p. 3321-3333, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf405570u>.

POWO, Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. ***Strychnos subcordata* Spruce ex Benth.** 2025a. Disponível em <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:547493-1>>, acessado em 25 de julho de 2025.

POWO, Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. **Loganiaceae R.Br. ex Mart.** 2025b. Disponível em <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30002038-2>>, acessado em 07 de julho de 2025.

POWO, Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. ***Strychnos L.*** 2025c. Disponível em <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30010060-2>>, acessado em 07 de julho de 2025.

POWO, Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. ***Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil.** 2025d. Disponível em <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:547425-1/images>>, acessado em 07 de julho de 2025.

PRANCE, G. T. Ethnobotanical notes from Amazonian Brazil. **Economic Botany**, v. 26, n. 3, p. 221-237, 1972. <https://doi.org/10.1007/BF02861035>.

QUETIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; BISSET, N. G. South american *Strychnos* species: ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1-52, 1990. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90064-Z](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90064-Z).

QUETIN-LECLERCQ, J.; LLABRES, G.; WARIN, R.; PINHEIRO, M. L. B.; MAVAR-MANGA, H.; ANGENOT, L. Guianensine, a zwitterionic alkaloid from *Strychnos guianensis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1557-1560, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00502-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00502-X).

RAJESH, P.; KANNAN, V. R.; LATHA, S.; SELVAMANI, P. Phytochemical and pharmacological profile of plants belonging to *Strychnos* genus: a review. In: GUPTA, V. K. (Eds). **Bioactive phytochemicals: perspectives for modern medicine**. v. 1. New Delhi, IN, Daya Publishing House, p. 275-328, 2012.

RAYYAN, S.; FOSSEN, T.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, Ø. M. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'crataegi folium cum flore' (hawthorn). **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 334-341, 2005. <https://doi.org/10.1002/pca.853>.

RIJKE, E.; ZAPPEY, H.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 984, n. 1, p. 45-58, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01868-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01868-X).

SAH, A.; KHATIK, G. L.; VYAS, M.; YADAV, P. A short review on anticancer investigations of *Strychnos nux-vomica*. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 10, n. 3, p. 87-90, 2016. <https://doi.org/10.22377/ijgp.v10i3.659>.

SANTOS, C. K. G.; CUNHA, G. O. S.; PINHEIRO, J. P.; MENDES, C. E.; RAMOS, L. M.; MENEZES, A. C. S. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica de *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. (Loganiaceae). **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 13, n. 4, p. 204-219, 2024. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2024v13i4.p204-219>.

SANTOS, C. L.; ANGOLINI, C. F.; NEVES, K. O.; COSTA, E. V.; SOUZA, A. D.; PINHEIRO, M. L. B.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. Molecular networking-based dereplication of strictosidine-derived monoterpene indole alkaloids from the curare ingredient *Strychnos peckii*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, p. e8683, 2020. <https://doi.org/10.1002/rcm.8683>.

SANTOS, C. L. G.; NEVES, K. O. G.; SILVA-FILHO, F. A.; LIMA, B. R.; COSTA, E. V.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, F. M. D. LC-MS guided isolation of *N*,  $\beta$ -glucopyranosyl vincosamide and other compounds from the curare ingredient *Strychnos peckii*. **Frontiers in Natural Products**, v. 2, 1189619, 2023. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2023.1189619>.

SAXTON, J. E. Recent progress in the chemistry of indole alkaloids and mould metabolites. **Natural Product Reports**, v. 6, n. 5, p. 433-474, 1989. <https://doi.org/10.1039/NP9890600433>.

SETUBAL, R. B. *Strychnos* L. In: Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020a. Disponível em <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB8663>>, acessado em 07 de julho de 2025.

SETUBAL, R. B. *Strychnos subcordata* Spruce ex Benth. In: Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020b. Disponível em <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB84531>>, acessado em 25 de julho de 2025.

SETUBAL, R. B.; FRASIER, C. L.; MOLINA, J.; TORKE, B. M.; FORZZA, R. C.; STRUWE, L. A toxic story: phylogeny and classification of *Strychnos* L. (Loganiaceae).

**Systematic Botany**, v. 46, n. 3, p. 639-655, 2021.  
<https://doi.org/10.1600/036364421X16312067913444>.

SETUBAL, R. B.; SIQUEIRA, C. E.; ZAPPI, D. **Loganiaceae**. In: Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB151>>, acessado em 07 de julho de 2025.

SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S.; WANG, L.; JIN, B. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>.

SILVA, B. A.; ARAUJO FILHO, A. P.; MUKHERJEE, R.; CHIAPPETA, A. D. A. Bisnordihydrotoxiferine and vellosimine from *Strychnos divaricans* root: spasmolytic properties of bisnordihydrotoxiferine. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 6, p. 419-424, 1993. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070607>.

SILVA, M. C.; CUNHA, G.; FIRMINO, P.; SALLUM, L. O.; MENEZES, A.; DUTRA, J.; ARAUJO-NETO, J.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; NAPOLITANO, H. B. Structural and anticancer studies of methoxyflavone derivative from *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil.(Loganiaceae) from Brazilian Cerrado. **ACS Omega**, v. 8, n. 43, p. 40764-40774, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05841>.

SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 256-267, 2005a.

SILVA, M. A.; RAFACHO, B. P. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* S T. H IL. leaves extract on gastrointestinal activity in mice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005b. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.881>.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; CARR, P. W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, n.1-2, p. 77-116, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.121>.

SOW EXOTIC. **Monkey orange masala klapper fruit tree**, 2025. Disponível em <[https://sowexotic.com/cdn/shop/products/Strychnos\\_spinosa\\_african\\_monkey\\_orange\\_umkwakwa\\_live\\_plant\\_for\\_sale\\_sow\\_exotic\\_fruit\\_tree.png?v=1575503701](https://sowexotic.com/cdn/shop/products/Strychnos_spinosa_african_monkey_orange_umkwakwa_live_plant_for_sale_sow_exotic_fruit_tree.png?v=1575503701)>, acessado em 07 de julho de 2025.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**, Versão 14, 2017. Disponível em <<https://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>>, acessado em 07 de julho de 2025.

STÖCKIGT, J.; BARLEBEN, L.; PANJIKAR, S.; LORIS, E. A. 3D-Structure and function of strictosidine synthase—the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis.

**Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 340-355, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.011>.

STRUWE, L.; GIBBONS, K. L.; CONN, B. J.; MOTLEY, T. J. Loganiaceae. In: KADEREIT, J., BITTRICH, V. (Eds). **The families and genera of vascular plants: flowering plants. eudicots.** v. 15. Springer, Cham., p. 511-526, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93605-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93605-5_8).

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1-32, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-X>.

STEWART, J. J. Stewart Computational Chemistry, 2016. Colorado Springs. Disponível em: <http://OpenMOPAC.net>.

SUÁREZ, A. I.; MANCEBO, M.; MONACHE, F. D.; TIRRI, M. M.; SOJO, F.; ARVELO, F.; TILLET, S. A new indole-alkaloid and a new phenolic-glycoside with cytotoxic activity from *Strychnos fendleri*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 4, p. 399-405, 2016. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1019351>.

TANIGUCHI, M.; LARocca, C. A.; BERNAT, J. D.; LINDSEY, J. S. Digital database of absorption spectra of diverse flavonoids enables structural comparisons and quantitative evaluations. **Journal of Natural Products**, v. 86, n. 4, p. 1087-1119, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00720>.

THE, S. N.; MINH, T. D.; VAN, T. N. Isoflavones and isoflavone glycosides: structural-electronic properties and antioxidant relations — a case of DFT study. **Journal of Chemistry**, v. 2019, n. 1, p. 4360175, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4360175>.

TIRAPELLE, M.; DUANMU, F.; CHIA, D. N.; BESENHARD, M. O.; MAZZEI, L.; SORENSEN, E. Method development of comprehensive two-dimensional liquid chromatography: a new metric for preliminary column selection. **Journal of Chromatography A**, v. 1741, p. 465593, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465593>.

TITS, M.; BRANDT, V.; WAUTERS, J. N.; DELAUDE, C.; LLABRES, G.; ANGENOT, L. Glucoindole alkaloids from stem bark of *Strychnos mellodora*. *Planta Medica*, v. 62, n. 1, p. 73-74, 1996. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957807>.

TITIKPINA, N. K.; ATAKPAMA, W.; HOEKOU, Y.; DIOP, Y. M.; BATAWILA, K.; AKAPAGANA, K. *Strychnos spinosa* Lam: comprehensive review on its medicinal and nutritional uses. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 17, n. 2, p. 8-28, 2020. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v17i2.2>.

TOŠOVIĆ, J.; MILOŠEVIĆ, Ž.; MARKOVIĆ, S. Simulation of the UV/Vis spectra of flavonoids. In: **2015 IEEE 15th International Conference on Bioinformatics and**

**Bioengineering (BIBE).** Belgrade, RS, IEEE, p. 1-6, 2015. <https://doi.org/10.1109/BIBE.2015.7367646>.

TRAVASAROU, A.; ANGELOPOULOU, M. T.; VOUGOGIANNOPOULOU, K.; PAPADOPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; CANTRELL, C. L.; KLETSAS, D.; FOKIALAKIS, N.; PRATSINIS, H. Bioactive metabolites of the stem bark of *Strychnos* aff. *dariensis* and evaluation of their antioxidant and UV protection activity in human skin cell cultures. **Cosmetics**, v. 6, n. 1, p. 7, 2019. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6010007>.

TRUJILLO, J. H.; MATTA, C. F. Hydrogen–hydrogen bonding in biphenyl revisited. **Structural Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 849-857, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11224-007-9231-5>.

TSOLMON, B.; FANG, Y.; YANG, T.; GUO, L.; HE, K.; LI, G. Y.; ZHAO, H. Structural identification and UPLC-ESI-QTOF-MS<sup>2</sup> analysis of flavonoids in the aquatic plant *Landoltia punctata* and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128392, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128392>.

URSO, V.; SIGNORINI, M. A.; TONINI, M.; BRUSCHI, P. Wild medicinal and food plants used by communities living in Mopane woodlands of southern Angola: results of an ethnobotanical field investigation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 177, p. 126-139, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.041>.

VAN LOO, P.; BRUYN, A.; BUDĚŠÍNSKÝ, M. Reinvestigation of the structural assignment of signals in the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of the flavone apigenin. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 879-882, 1986. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260241007>.

VASUDEVAN, U. M.; LEE, E. Y. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. **Biotechnology Advances**, v. 41, p. 107550, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107550>.

VÁZQUEZ, A. N.; FERNÁNDEZ, R. S.; SARDINA, F. J. MSpin-JCoupling. A modular program for prediction of scalar couplings and fast implementation of Karplus relationships. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 505-512, 2018. <https://doi.org/10.1002/mrc.4667>.

VERARDO, V.; RICIPUTI, Y.; GARRIDO-FRENICH, A.; CABONI, M. F. Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. **Food Chemistry**, v. 185, p. 239-244, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.090>.

VERPOORTE, R.; KODE, E. W.; VAN DOORNE, H.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial effect of the alkaloids from *Strychnos afzelii* Gilg. **Planta Medica**, v. 33, n. 3, p. 237-242, 1978. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097382>.

VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 16-78, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.077>.

WANG, B.; DAI, Z.; LIU, L.; WEI, X.; ZHU, P. F.; YU, H. F.; LIO, Y. P.; LUO, X. D. Indole glycosides from aqueous fraction of *Strychnos nitida*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 6, p. 285-290, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13659-016-0112-8>.

WANG, Z.; MA, C.; TANG, S.; XIAO, H.; KAKIUCHI, N.; KIDA, H.; HATTORI, M. Qualitative and quantitative analysis of Swertia herbs by high performance liquid chromatography–diode array detector–mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 485-490, 2008. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.485>.

WEST, R. The pharmacology and therapeutics of curare and its constituents. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 28, n. 5, p. 565-578, 1935. <https://doi.org/10.1177/003591573502800537>.

WOJAKOWSKA, A.; PERKOWSKI, J.; GÓRAL, T.; STOBIECKI, M. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 3, p. 329-339, 2013. <https://doi.org/10.1002/jms.3160>.

WRIGHT, C. W.; BRAY, D. H.; O'NEILL, M. J.; WARHURST, D. C.; PHILLIPSON, J. D.; QUETIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L. Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. **Planta Medica**, v. 57, n. 4, p. 337-340, 1991. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960112>.

WU, W.; YAN, C.; LI, L.; LIU, Z.; LIU, S. Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 2, p. 213-220, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.128>.

YADAV, K. N.; KADAM, P. V.; PATEL, J. A.; PATIL, M. J. *Strychnos potatorum*: phytochemical and pharmacological review. **Pharmacognosy reviews**, v. 8, n. 15, p. 61-66, 2014. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125533>.

YANG, B.; LIU, H.; YANG, J.; GUPTA, V. K.; JIANG, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 116-124, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>.

YAO, C. L.; YANG, W. Z.; SI, W.; SHEN, Y.; ZHANG, N. X.; CHEN, H. L.; PAN, H. Q.; YANG, M.; WU, W. Y.; GUO, D. A. An enhanced targeted identification strategy for the selective identification of flavonoid *O*-glycosides from *Carthamus tinctorius* by integrating offline two-dimensional liquid chromatography/linear ion-trap-orbitrap mass spectrometry, high-resolution diagnostic product ions/neutral loss filtering and liquid chromatography–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 87-97, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.041>.

ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHANG, X. Q.; ZHANG, Q. W.; YE, W. C. Chemical constituents from the leaves of *Lophatherum gracile*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, n. 6, p. 428-431, 2009. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2009.00428>.

ZHANG, N.; HUANG, W. X.; XIA, G. Y.; OPPONG, M. B.; DING, L. Q.; LI, P.; QIU, F. Methods for determination of absolute configuration of monosaccharides. **Chinese Herbal Medicines**, v. 10, n. 1, p. 14-22, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2017.12.009>.

ZHOU, G.; YAN, R.; WANG, X.; LI, S.; LIN, J.; LIU, J.; ZHAO, Z. The overlooked rotational isomerism of C-glycosyl flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 2, p. 443-461, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09601-7>.

ZHUANG, W. B.; LI, Y. H.; SHU, X. C.; PU, Y. T.; WANG, X. J.; WANG, T.; WANG, Z. The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3599, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083599>.

## APÊNDICES

**Tabela A1.** Fator de similaridade ( $F_s$ ) e parâmetros de seletividade das seis colunas cromatográficas avaliadas.

| $F_s$ | Coluna                      | H     | S      | A      | B      | C(2.8) | C(7.0) | Tipo  | Designação USP | Fabricante |
|-------|-----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------|------------|
| 0     | <b>Luna C18(2)</b>          | 1,002 | 0,024  | -0,124 | -0,007 | -0,269 | -0,174 | B     | L1             | Phenomenex |
| 3,25  | <b>Kinetex C8</b>           | 0,864 | 0,013  | -0,208 | -0,009 | -0,089 | 0,002  | B     | L7             | Phenomenex |
| 13,02 | <b>Luna PFP(2)</b>          | 0,753 | -0,076 | -0,382 | -0,051 | 0,088  | 0,548  | F     | L43            | Phenomenex |
| 15,17 | <b>Luna Fenil-Hexil</b>     | 0,782 | -0,118 | -0,277 | -0,004 | 0,004  | 0,387  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 16,37 | <b>Luna CN</b>              | 0,452 | -0,112 | -0,323 | -0,024 | 0,439  | 1,321  | CN    | L10            | Phenomenex |
| 24,34 | <b>Kinetex Bifenil 100A</b> | 0,697 | -0,173 | -0,583 | 0,034  | 0,122  | 0,817  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 0     | <b>Kinetex C8</b>           | 0,864 | 0,013  | -0,208 | -0,009 | -0,089 | 0,002  | B     | L7             | Phenomenex |
| 10,41 | <b>Luna PFP(2)</b>          | 0,753 | -0,076 | -0,382 | -0,051 | 0,088  | 0,548  | F     | L43            | Phenomenex |
| 13,30 | <b>Luna Fenil-Hexil</b>     | 0,782 | -0,118 | -0,277 | -0,004 | 0,004  | 0,387  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 13,95 | <b>Luna CN</b>              | 0,452 | -0,112 | -0,323 | -0,024 | 0,439  | 1,321  | CN    | L10            | Phenomenex |
| 21,84 | <b>Kinetex Bifenil 100A</b> | 0,697 | -0,173 | -0,583 | 0,034  | 0,122  | 0,817  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 0     | <b>Luna PFP(2)</b>          | 0,753 | -0,076 | -0,382 | -0,051 | 0,088  | 0,548  | F     | L43            | Phenomenex |
| 5,26  | <b>Luna Fenil-Hexil</b>     | 0,782 | -0,118 | -0,277 | -0,004 | 0,004  | 0,387  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 5,50  | <b>Luna CN</b>              | 0,452 | -0,112 | -0,323 | -0,024 | 0,439  | 1,321  | CN    | L10            | Phenomenex |
| 11,44 | <b>Kinetex Bifenil 100A</b> | 0,697 | -0,173 | -0,583 | 0,034  | 0,122  | 0,817  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 0     | <b>Luna Fenil-Hexil</b>     | 0,782 | -0,118 | -0,277 | -0,004 | 0,004  | 0,387  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 4,39  | <b>Luna CN</b>              | 0,452 | -0,112 | -0,323 | -0,024 | 0,439  | 1,321  | CN    | L10            | Phenomenex |
| 10,75 | <b>Kinetex Bifenil 100A</b> | 0,697 | -0,173 | -0,583 | 0,034  | 0,122  | 0,817  | fenil | L11            | Phenomenex |
| 0     | <b>Luna CN</b>              | 0,452 | -0,112 | -0,323 | -0,024 | 0,439  | 1,321  | CN    | L10            | Phenomenex |
| 10,36 | <b>Kinetex Bifenil 100A</b> | 0,697 | -0,173 | -0,583 | 0,034  | 0,122  | 0,817  | fenil | L11            | Phenomenex |

H – hidrofobicidade, S – resistência estérica, A – acidez da ligação de hidrogênio, B – basicidade da ligação de hidrogênio, C – troca catiônica

Dados do Banco de Dados USP-PQRI disponíveis em <https://apps.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html>

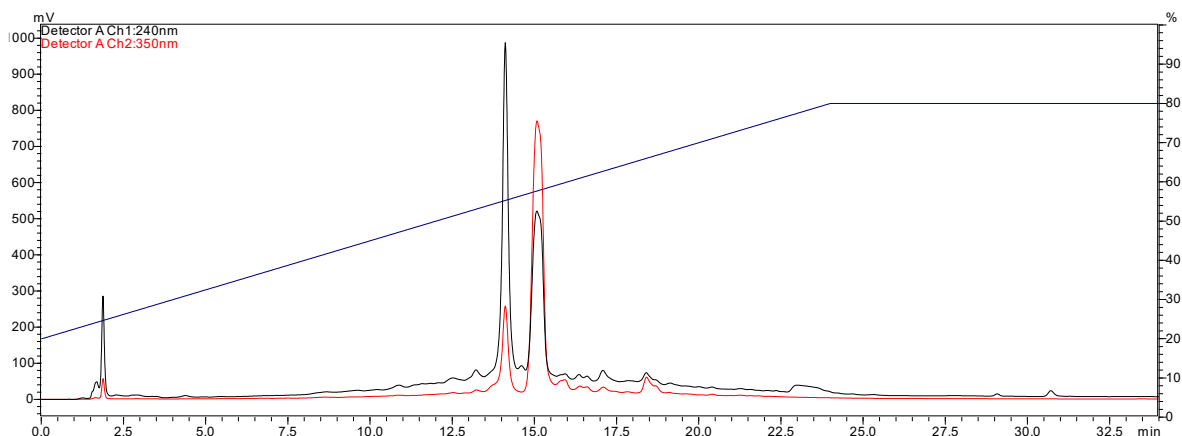


**Figura A1.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna C18(2) (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

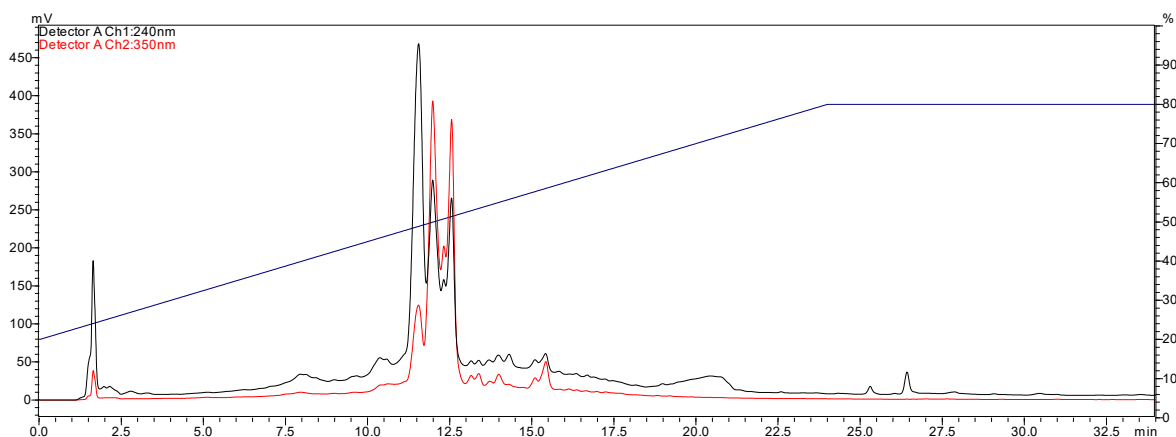


**Figura A2.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Kinetex C8 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

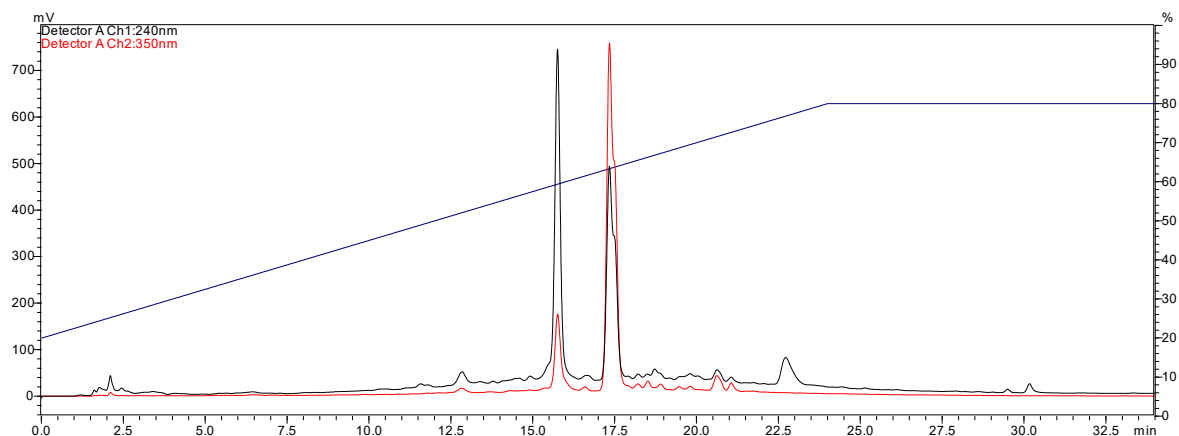


**Figura A3.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna PFP(2) (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

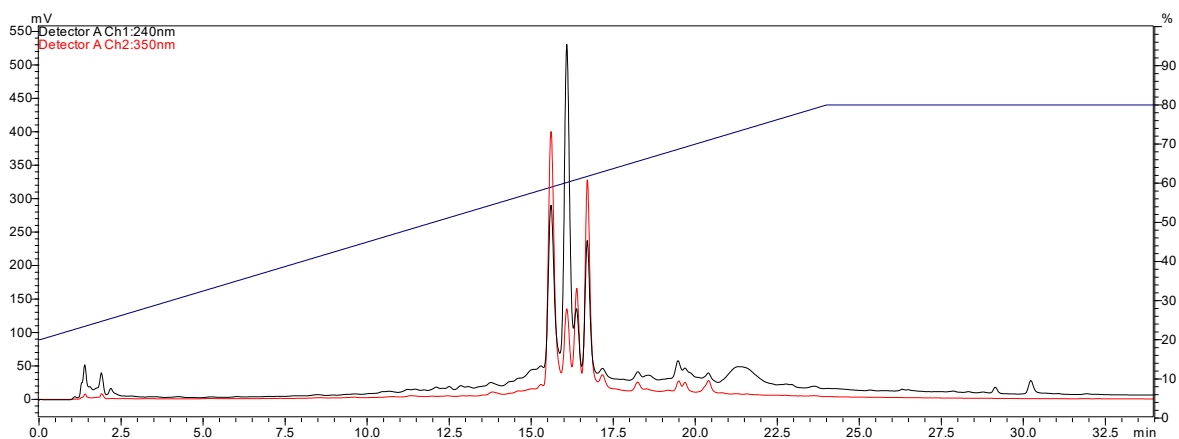


**Figura A4.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna fenil-hexil (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

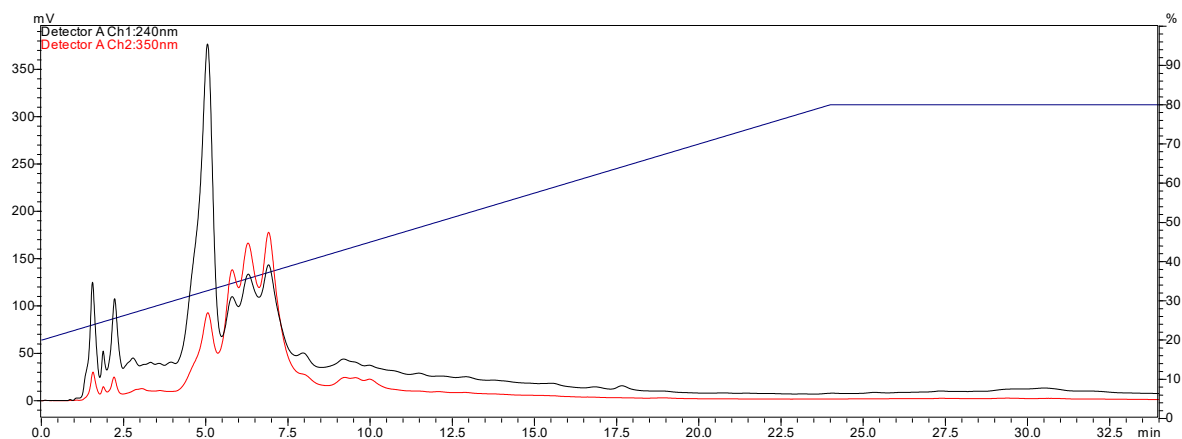


**Figura A5.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Luna CN (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

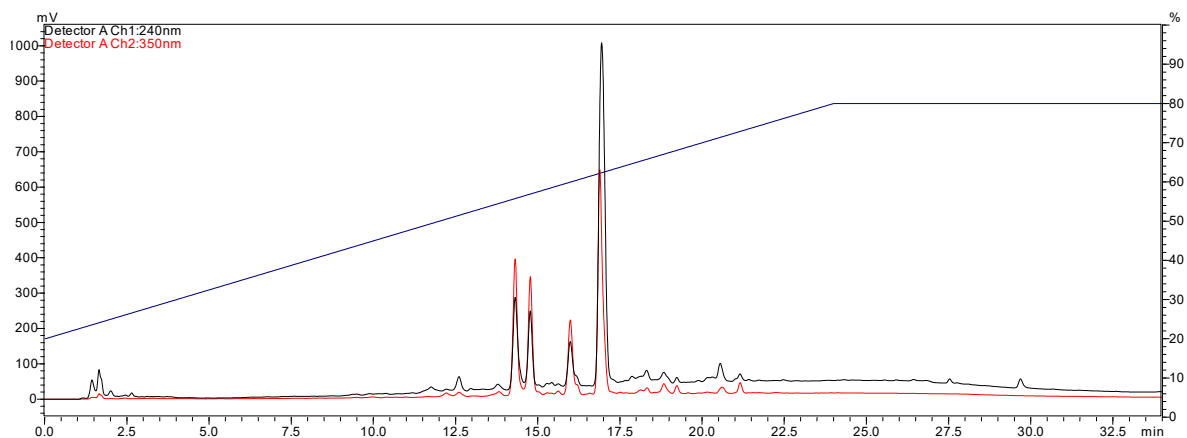


**Figura A6.** Cromatograma da fração metanólica das folhas de *S. subcordata*, obtido usando uma coluna Kinetex bifenil 100A (150 mm  $\times$  4,6 mm, 100 Å, 5  $\mu$ m), metanol como modificador orgânico (B) em água (A) no modo de eluição gradiente (0–24 min 20–80% B, 24–34 min 80% B) a uma vazão de 1,00 mL min<sup>-1</sup>, monitorada a 240 e 350 nm.

**Tabela A2.** Fatores de retenção relativa (FRR) calculados para cada par de substâncias nas seis colunas cromatográficas avaliadas.

| <b>Fator de retenção<br/>relativa</b> | <b>C18</b> | <b>C8</b> | <b>PFP</b> | <b>Fenil-Hexil</b> | <b>CN</b> | <b>Bifenil</b> |
|---------------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------|-----------|----------------|
| k <sub>1</sub> /k <sub>3</sub>        | 1,0        | 1,1       | 1,0        | 1,1                | 1,2       | 1,2            |
| k <sub>1</sub> /k <sub>4</sub>        | 1,0        | -         | 1,0        | -                  | 1,0       | -              |
| k <sub>1</sub> /k <sub>5</sub>        | 1,4        | 1,2       | 1,7        | -                  | 1,5       | -              |
| k <sub>2</sub> /k <sub>1</sub>        | 1,1        | 1,2       | 1,0        | 1,4                | 1,2       | 1,9            |
| k <sub>2</sub> /k <sub>3</sub>        | 1,1        | 1,2       | 1,1        | 1,5                | 1,4       | 2,3            |
| k <sub>2</sub> /k <sub>4</sub>        | 1,1        | 1,1       | 1,1        | 1,2                | 1,2       | 1,4            |
| k <sub>2</sub> /k <sub>5</sub>        | 1,5        | 1,5       | 1,8        | 1,3                | 1,7       | -              |
| k <sub>3</sub> /k <sub>4</sub>        | 1,0        | -         | -          | -                  | -         | -              |
| k <sub>3</sub> /k <sub>5</sub>        | 1,4        | 1,2       | 1,7        | -                  | 1,2       | -              |
| k <sub>4</sub> /k <sub>1</sub>        | -          | 1,1       | -          | 1,1                | -         | 1,4            |
| k <sub>4</sub> /k <sub>3</sub>        | -          | 1,1       | 1,0        | 1,3                | 1,1       | 1,7            |
| k <sub>4</sub> /k <sub>5</sub>        | 1,4        | 1,3       | 1,7        | 1,1                | 1,4       | -              |
| k <sub>5</sub> /k <sub>1</sub>        | -          | -         | -          | 1,1                | -         | 2,0            |
| k <sub>5</sub> /k <sub>2</sub>        | -          | -         | -          | -                  | -         | 1,0            |
| k <sub>5</sub> /k <sub>3</sub>        | -          | -         | -          | 1,2                | -         | 2,4            |
| k <sub>5</sub> /k <sub>4</sub>        | -          | -         | -          | -                  | -         | 1,4            |

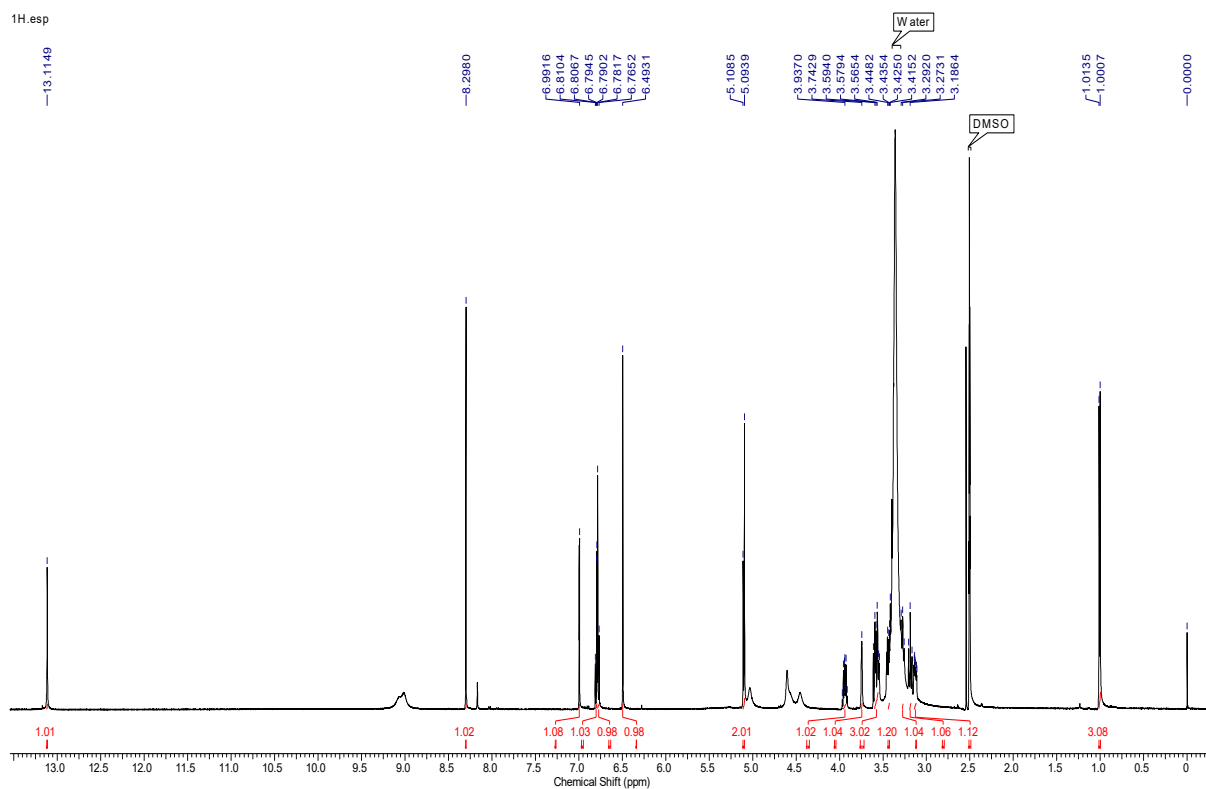


**Figura A7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

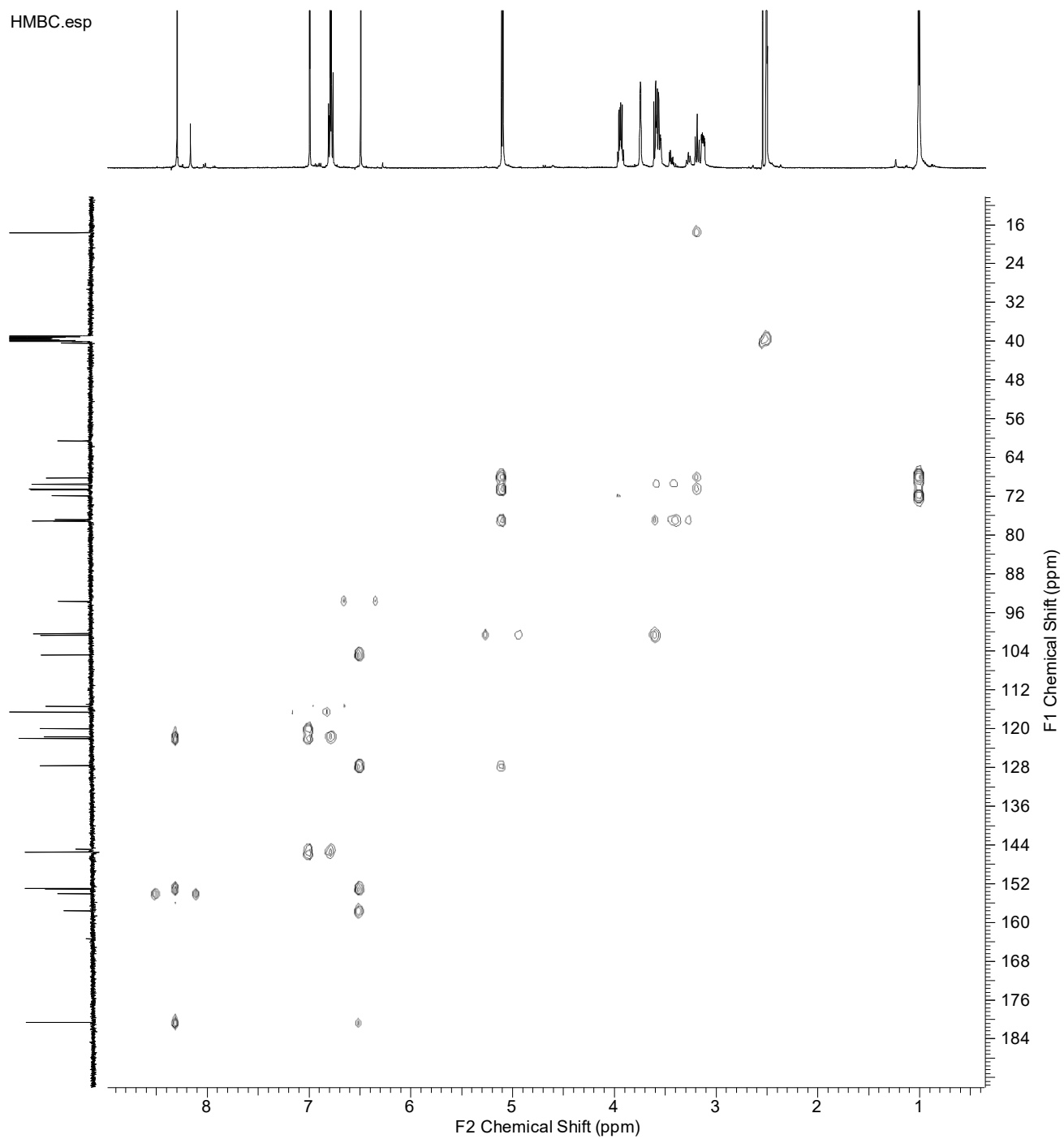


**Figura A8.** Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **5**.

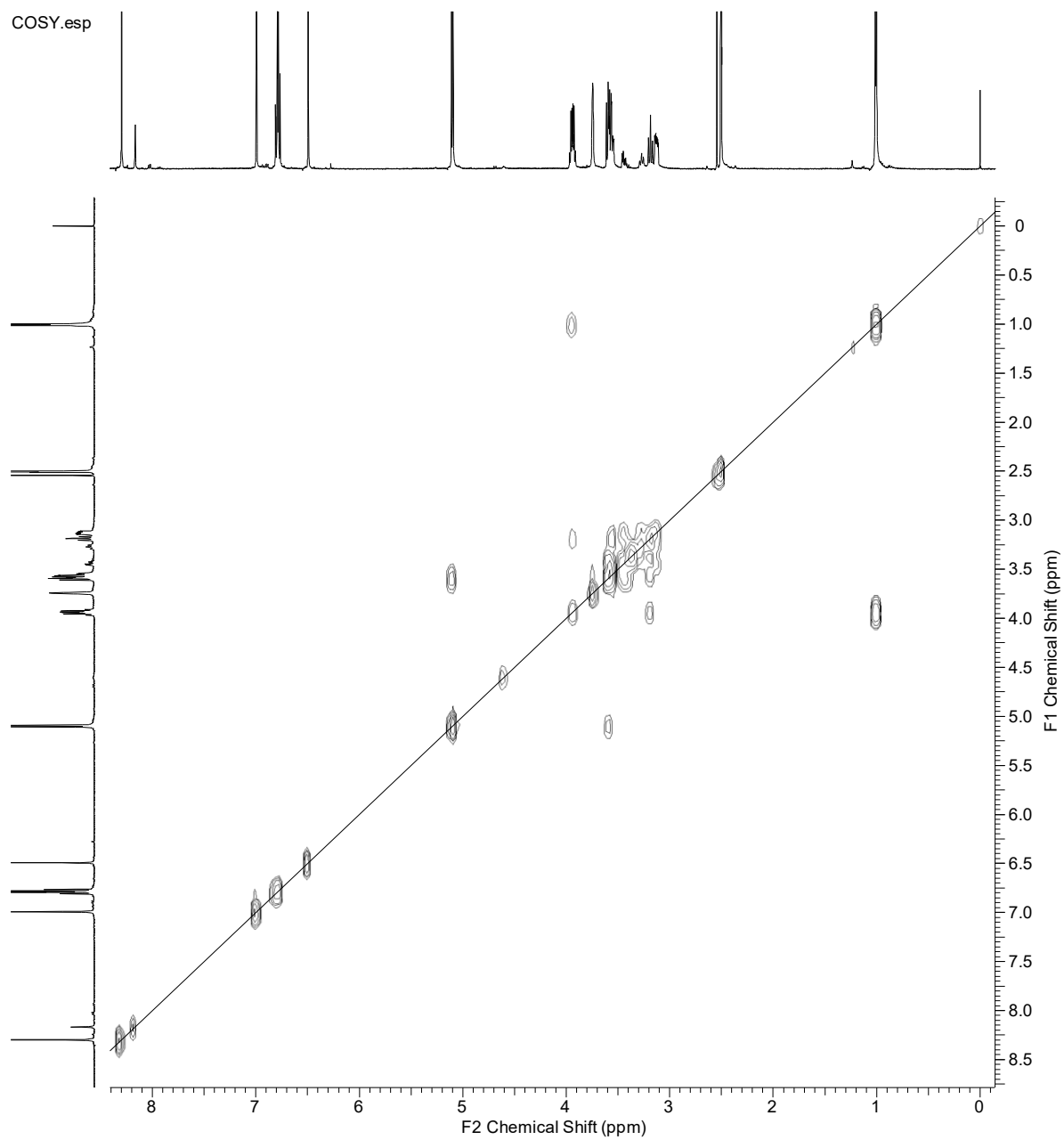


**Figura A9.** Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **5**.

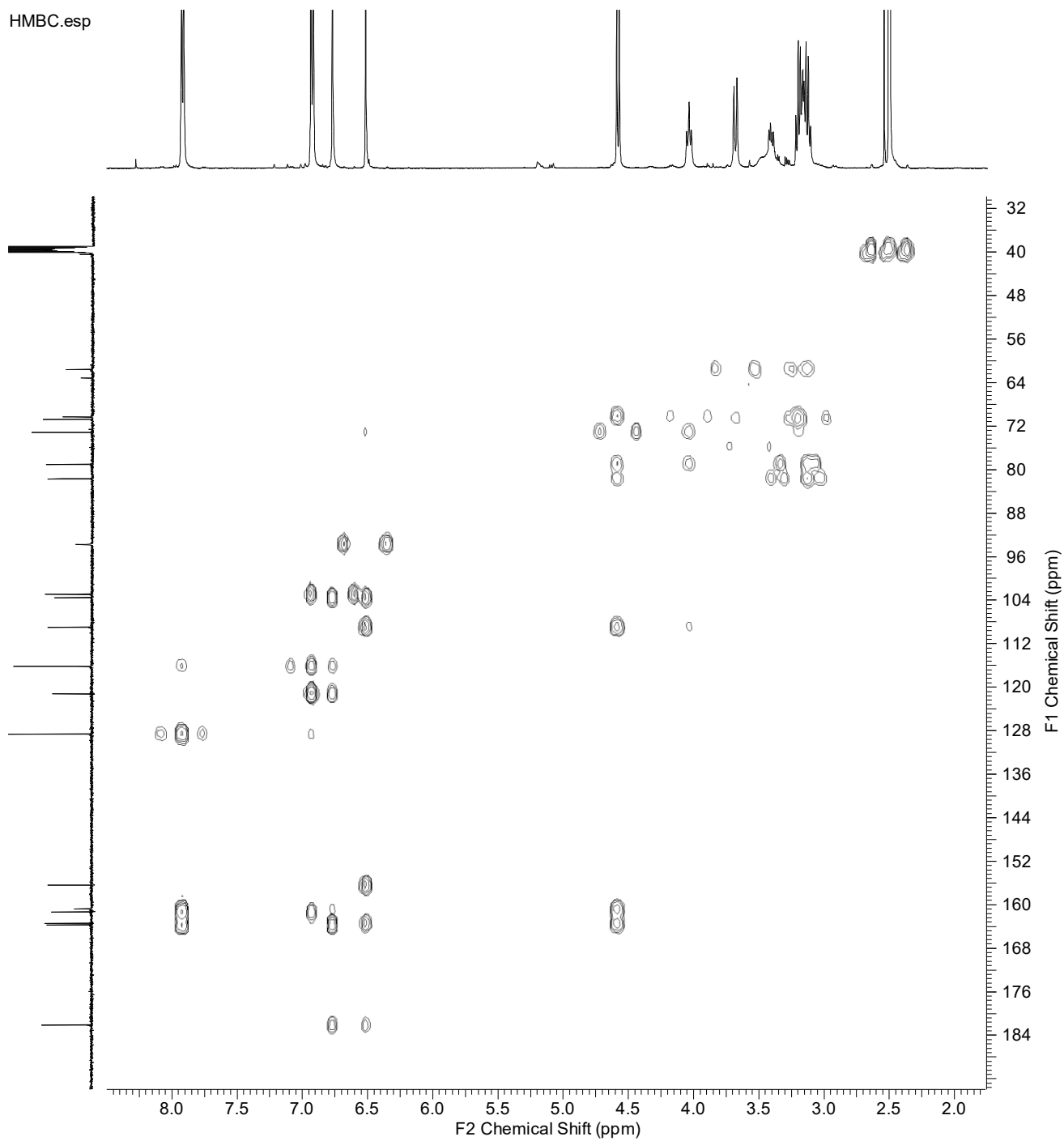


**Figura A10.** Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância **1**.

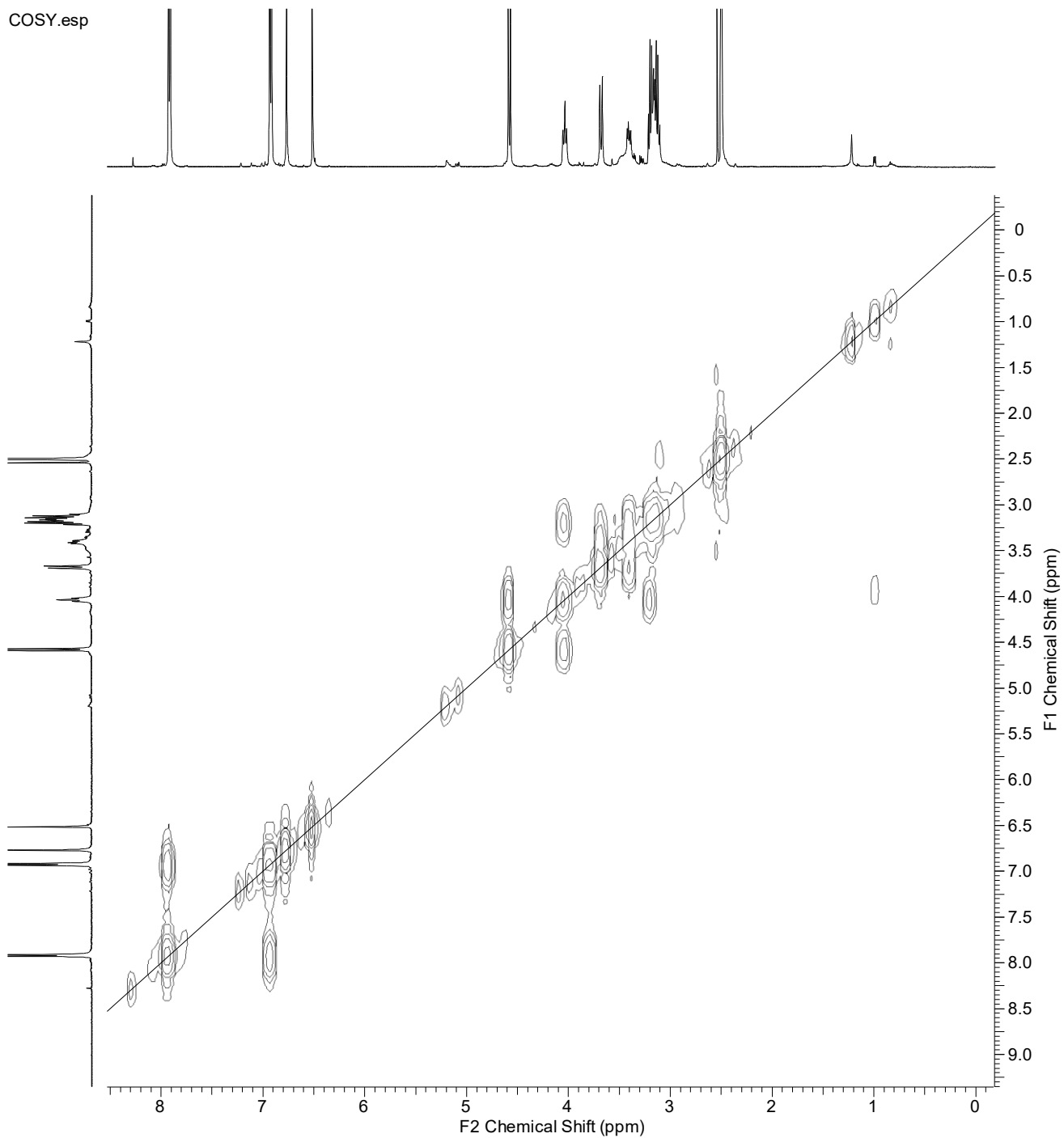


**Figura A11.** Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **1**.

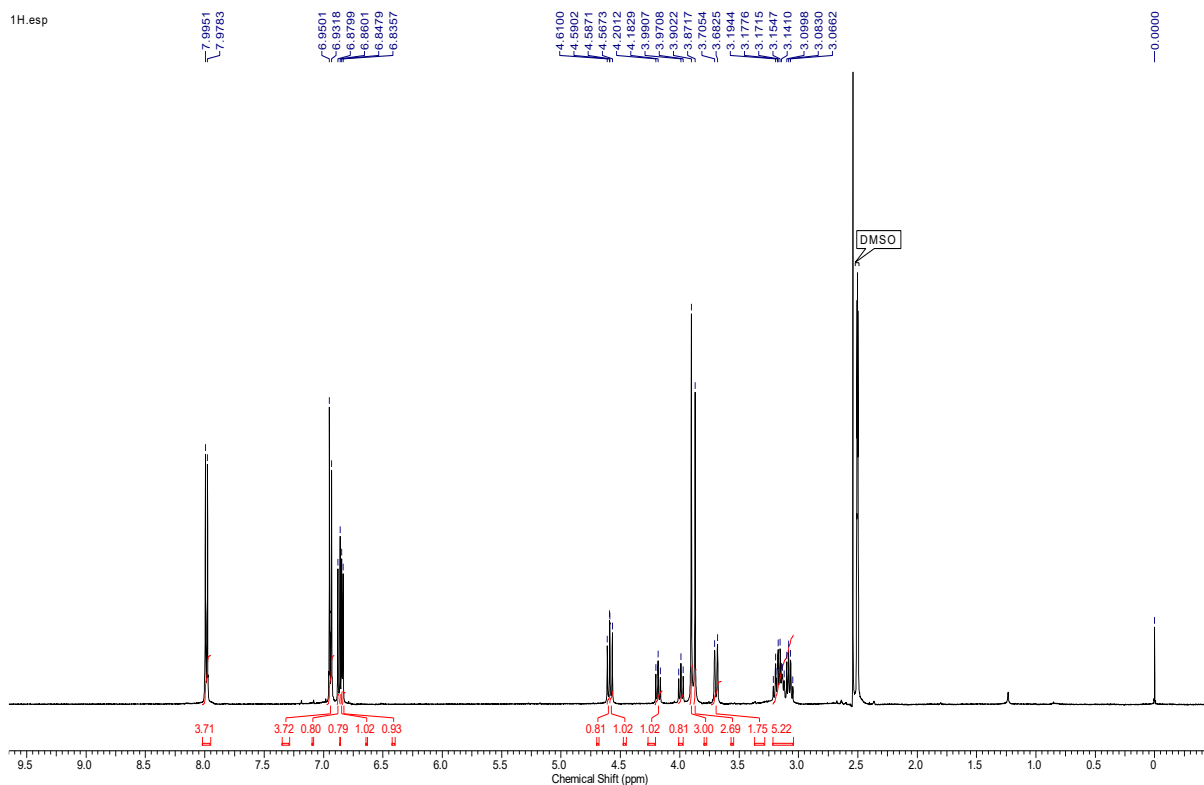


**Figura A12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com supressão do sinal da água) da substância **2** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

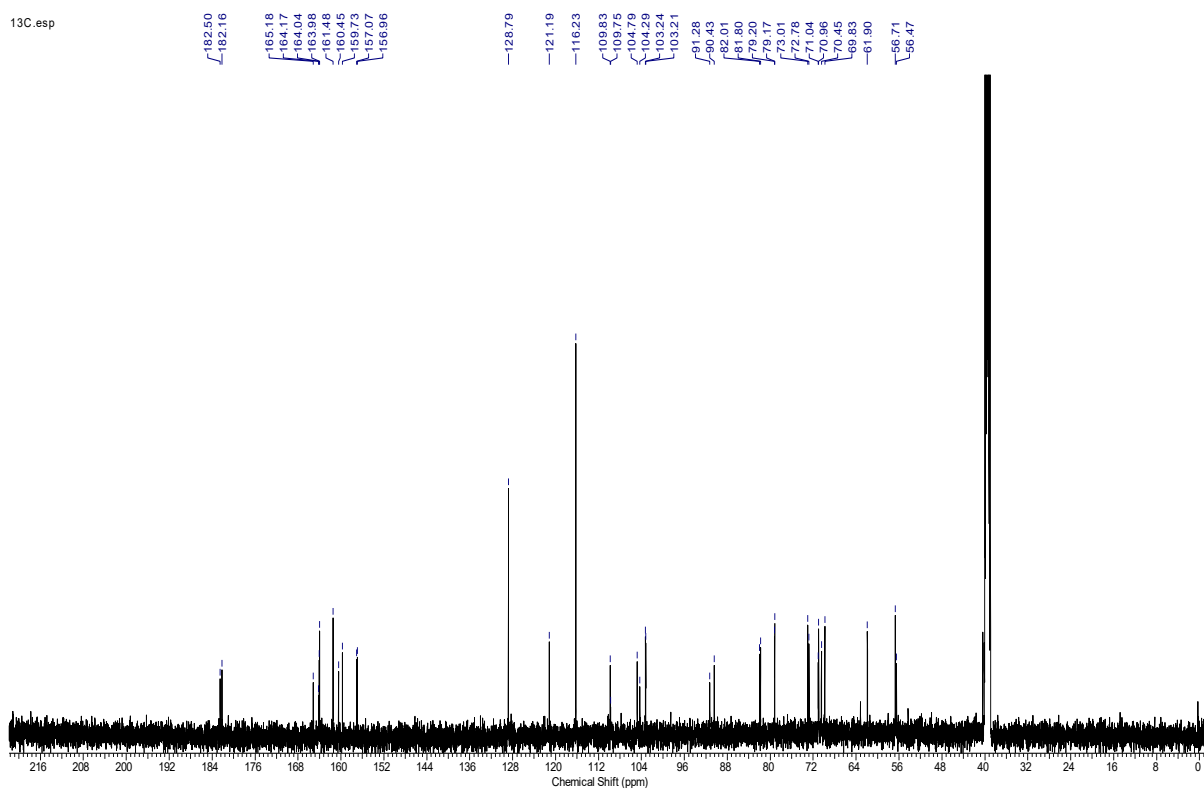


**Figura A13.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

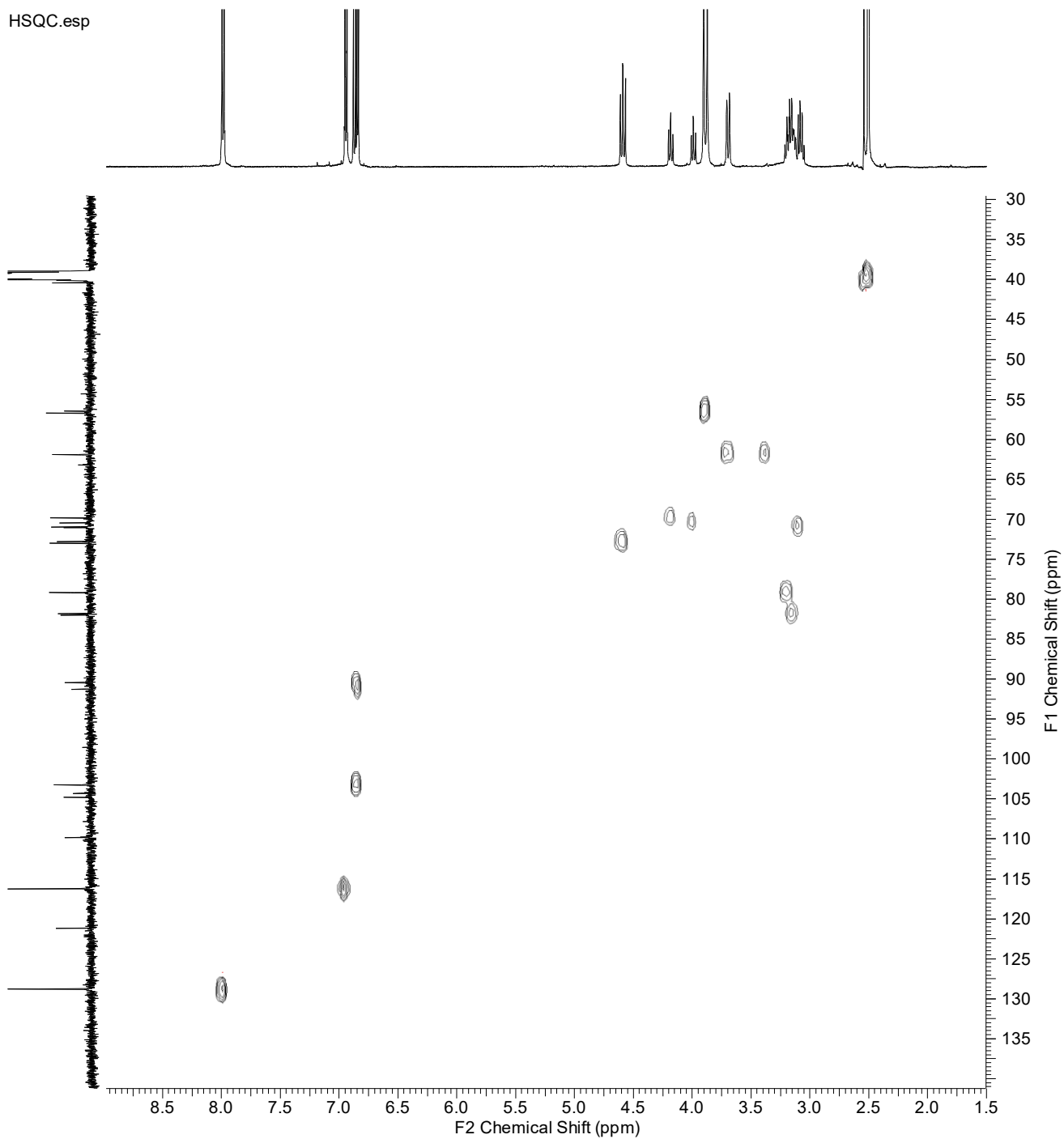


**Figura A14.** Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **2**.

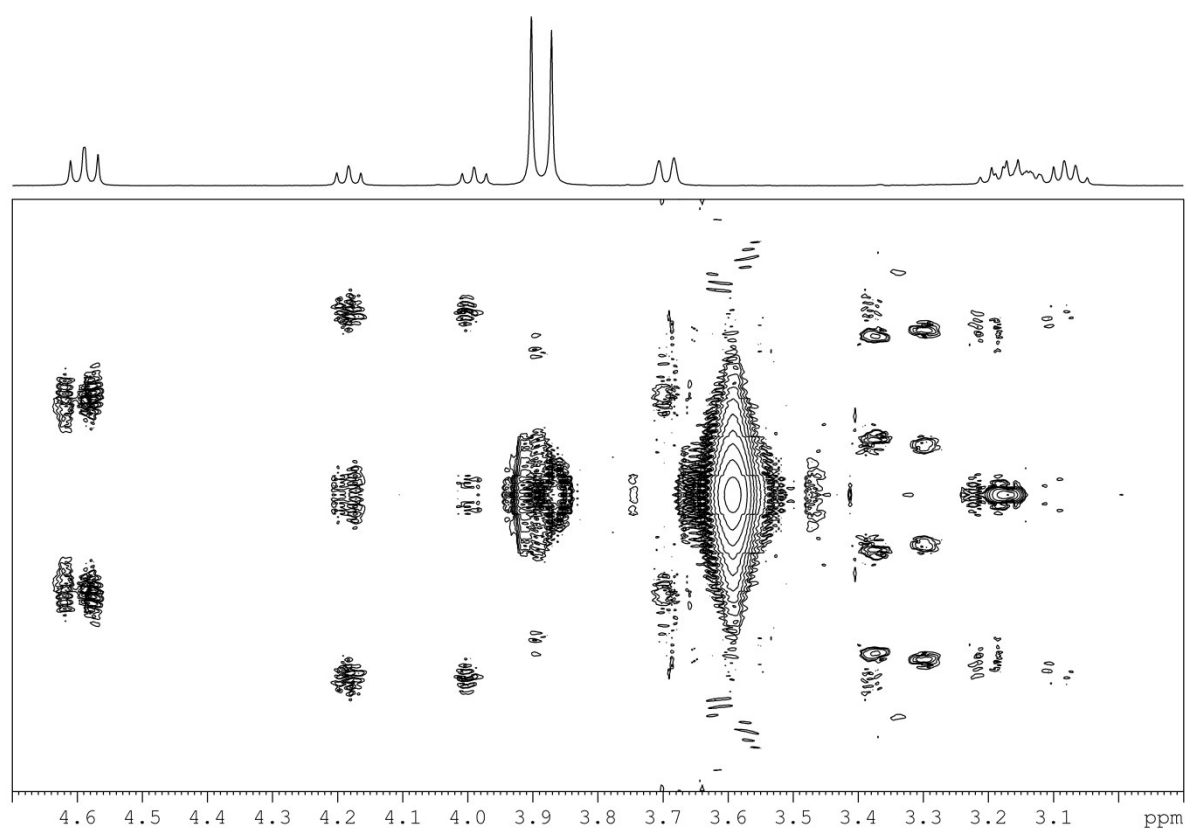


**Figura A15.** Ampliação da região de próton anomérico e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES (<sup>1</sup>H 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) da substância **2**.

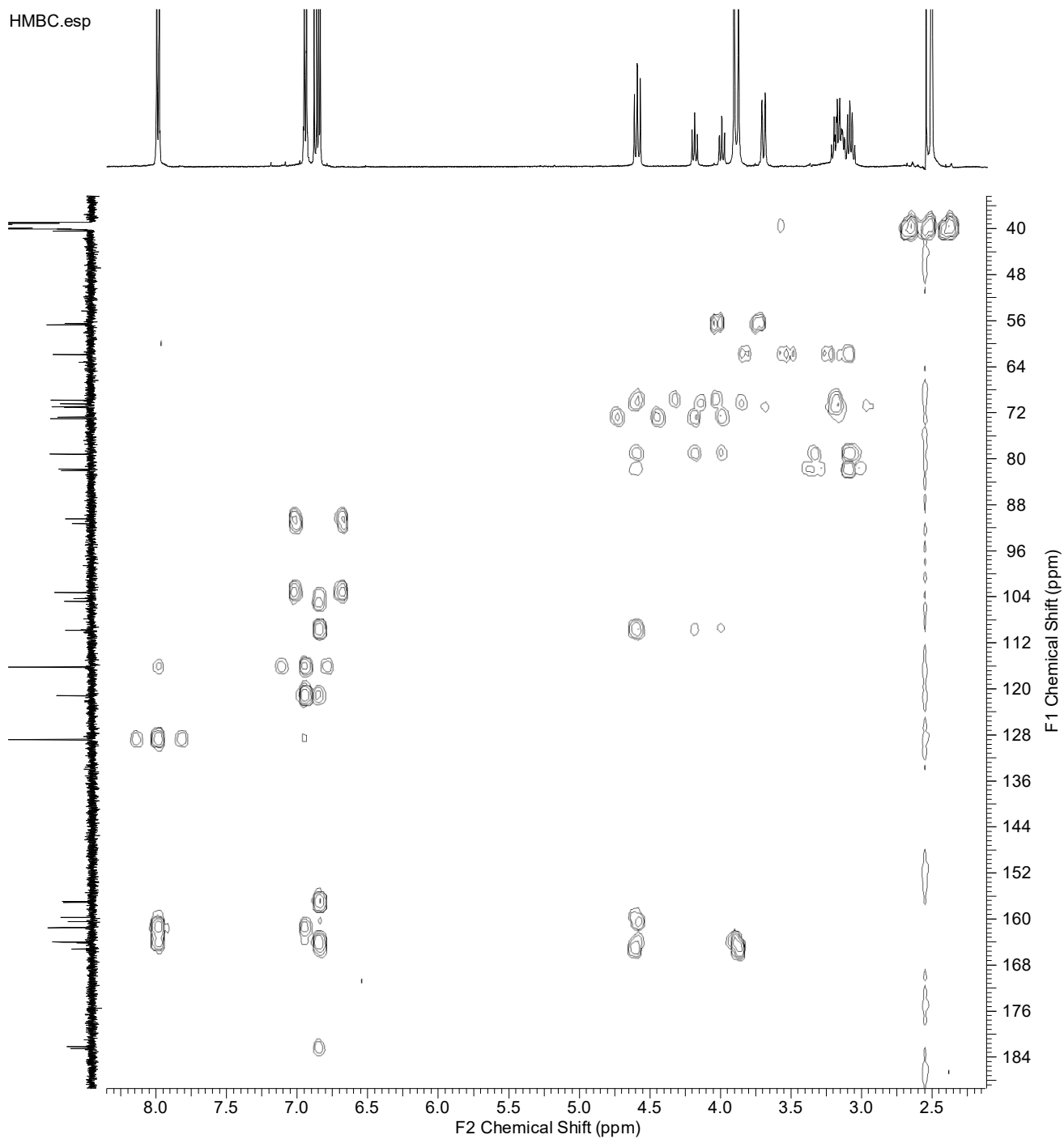


**Figura A16.** Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância **2**.

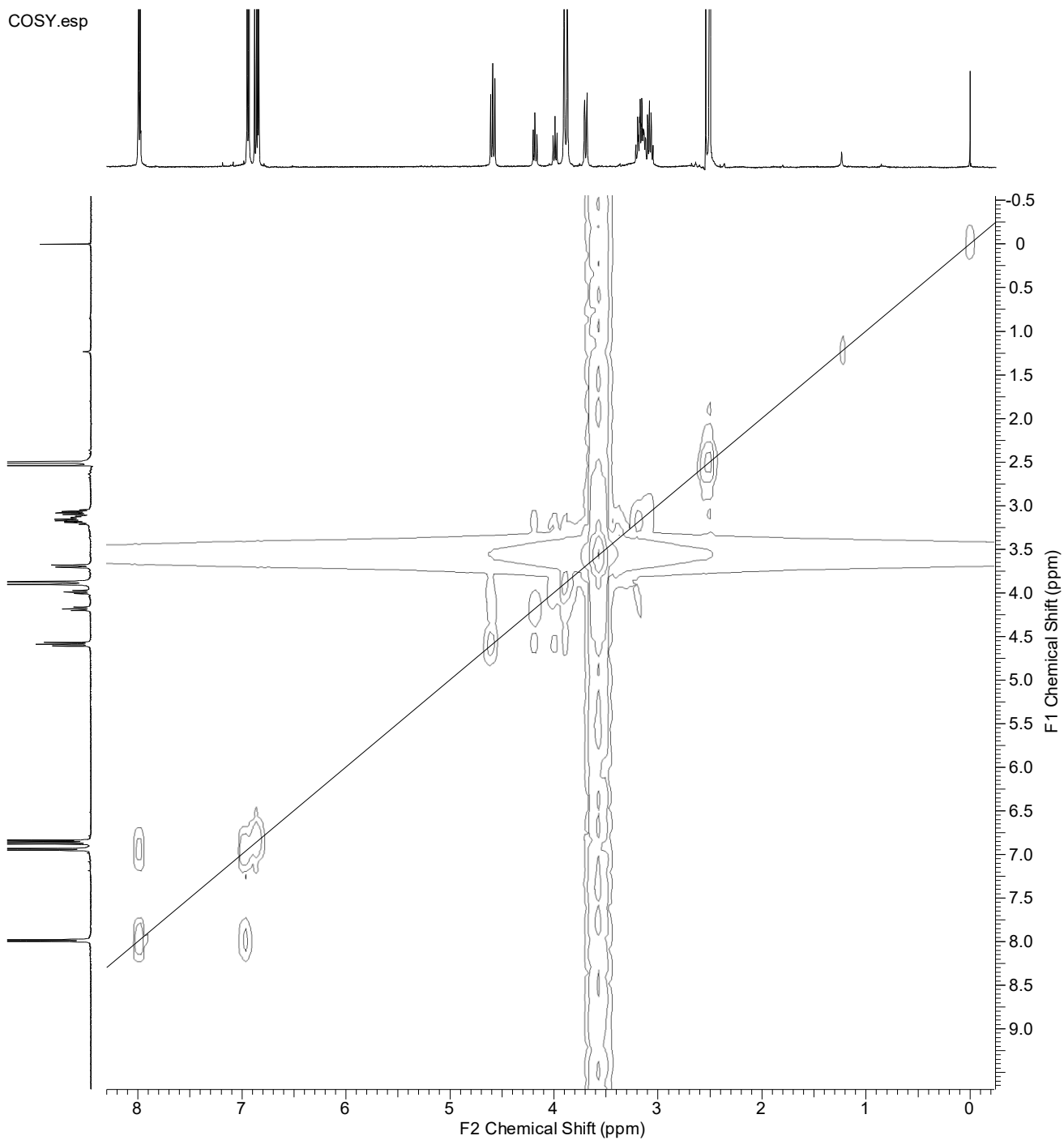


**Figura A17.** Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da substância **2**.

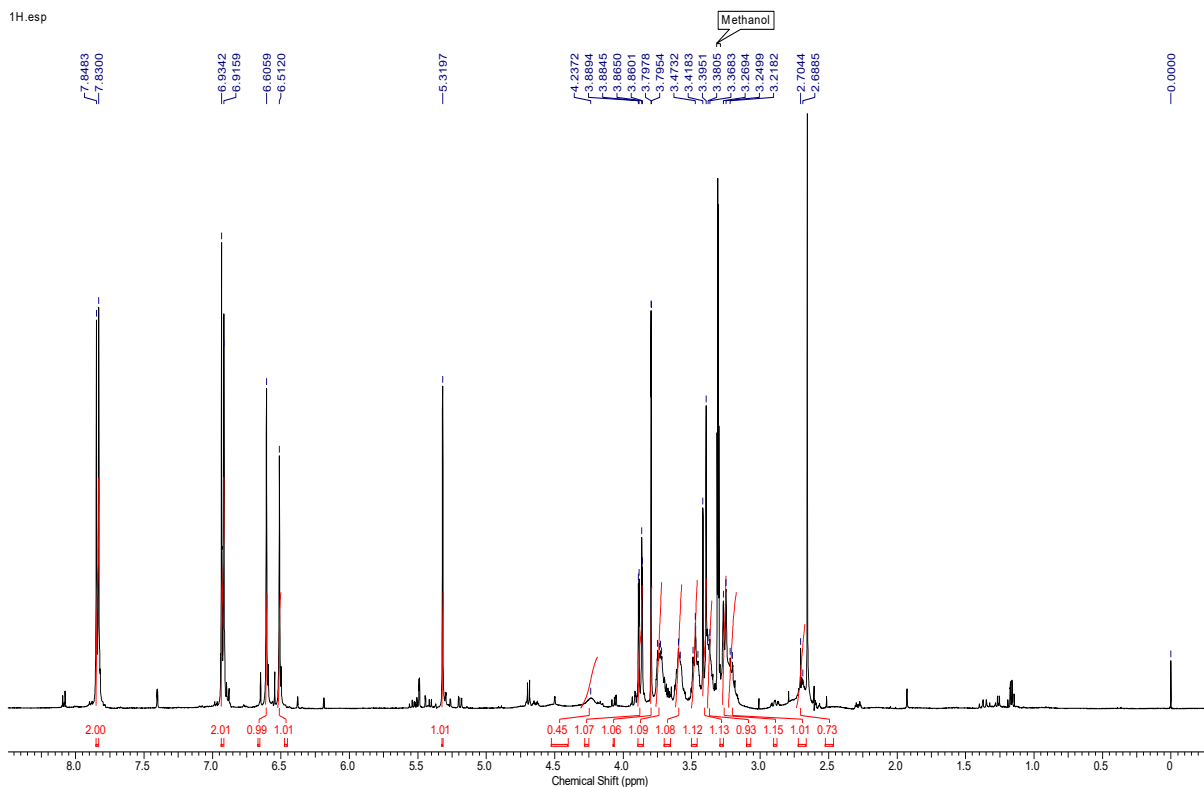


**Figura A18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com supressão do sinal da água) da substância **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

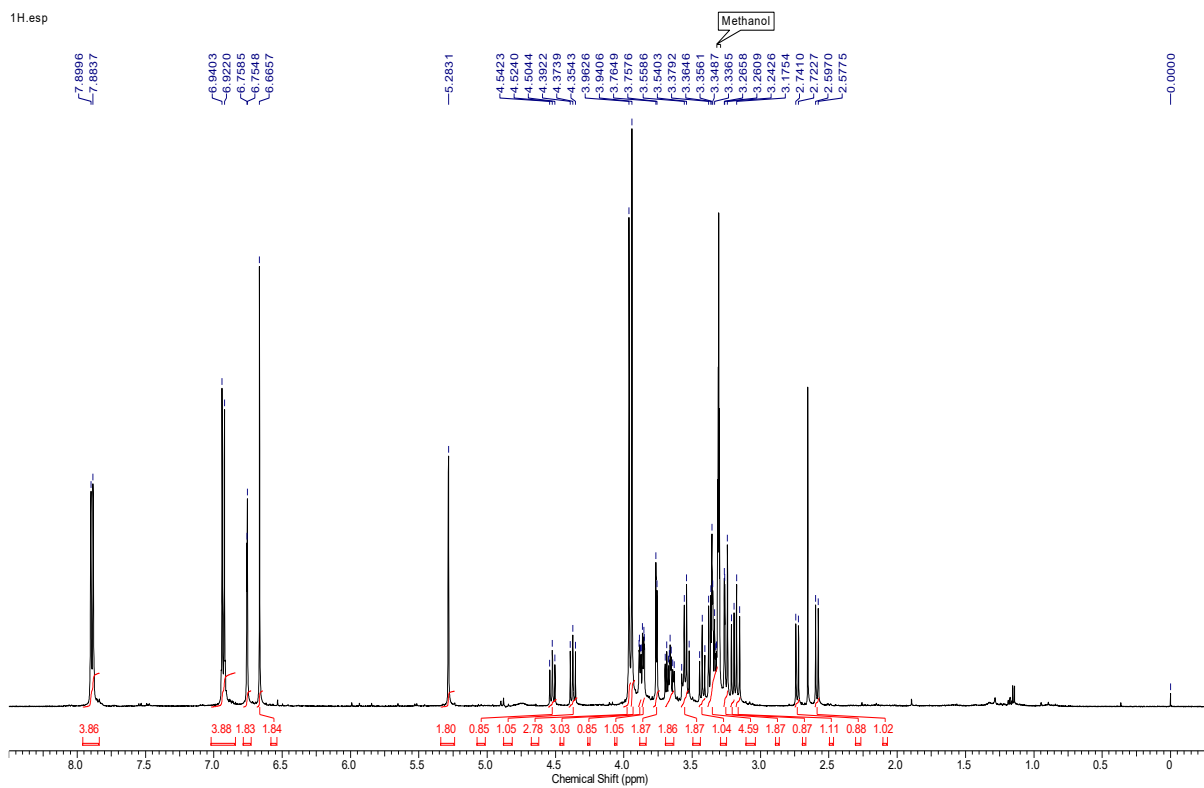


**Figura A19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com supressão do sinal da água) da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

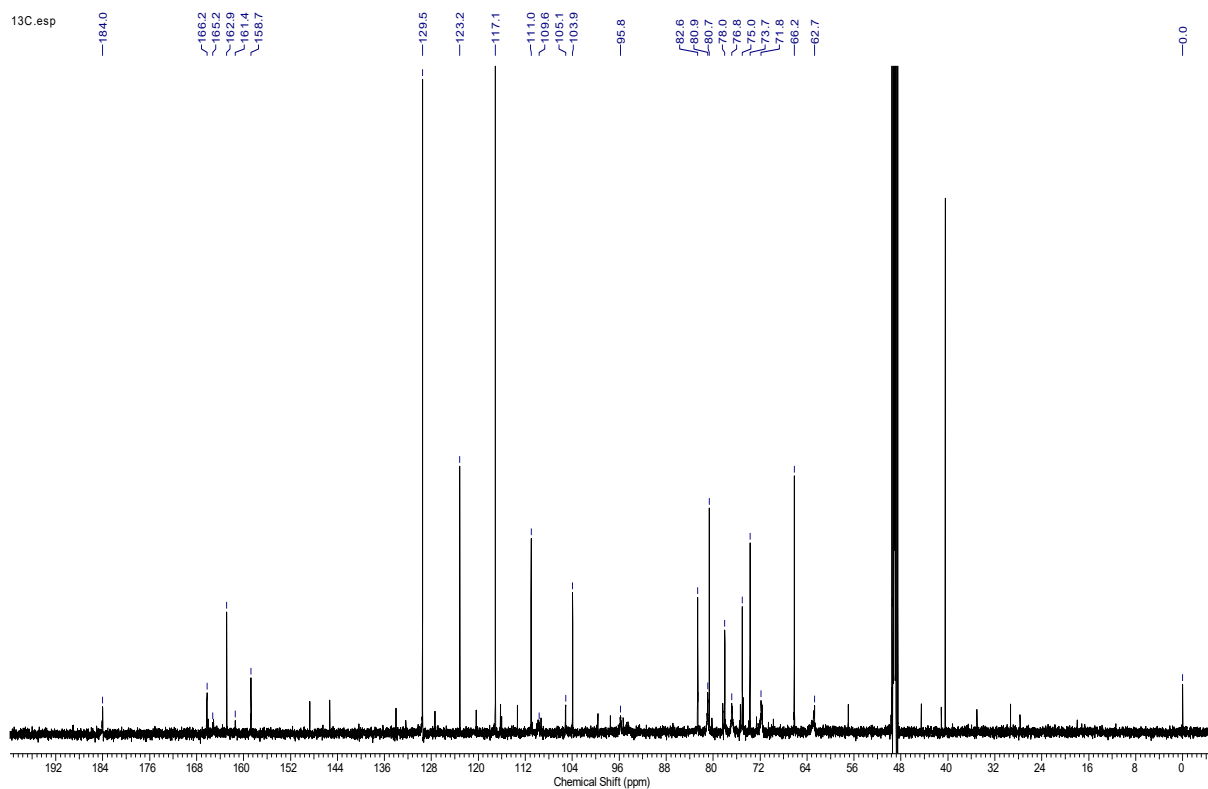


**Figura A20.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

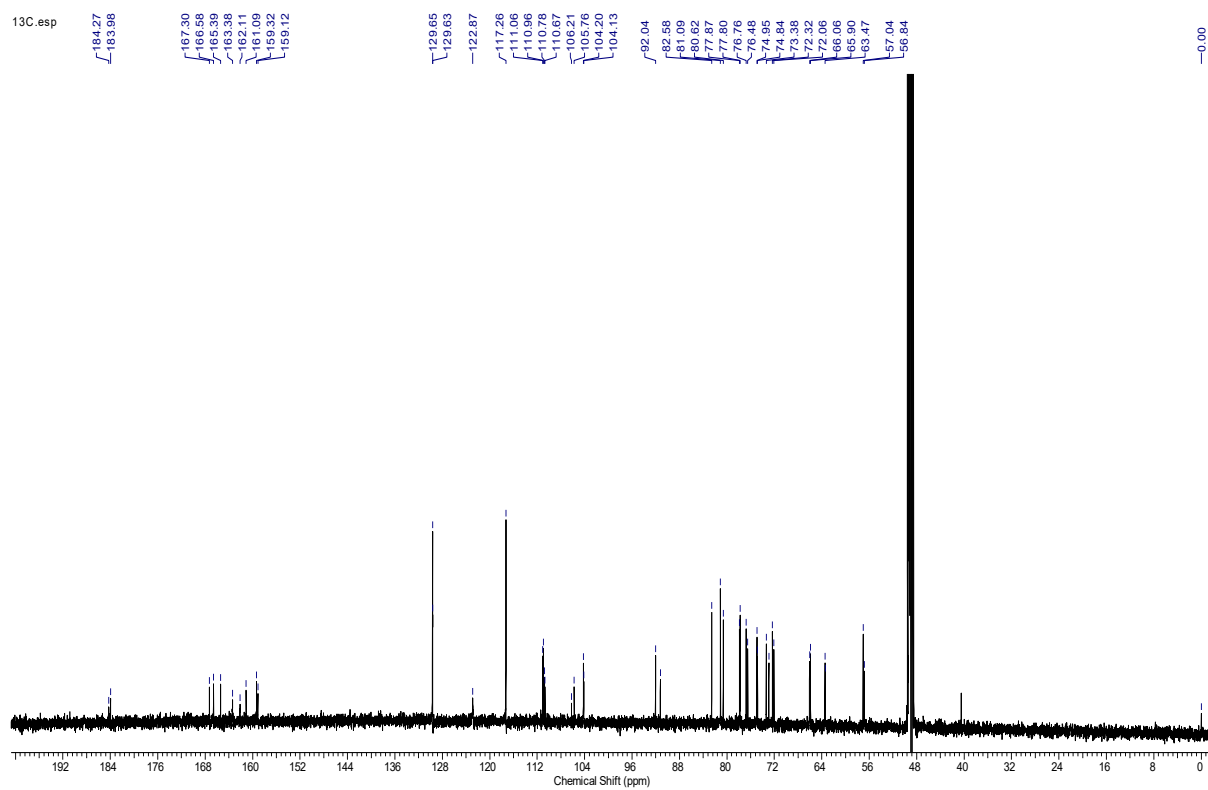


**Figura A21.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

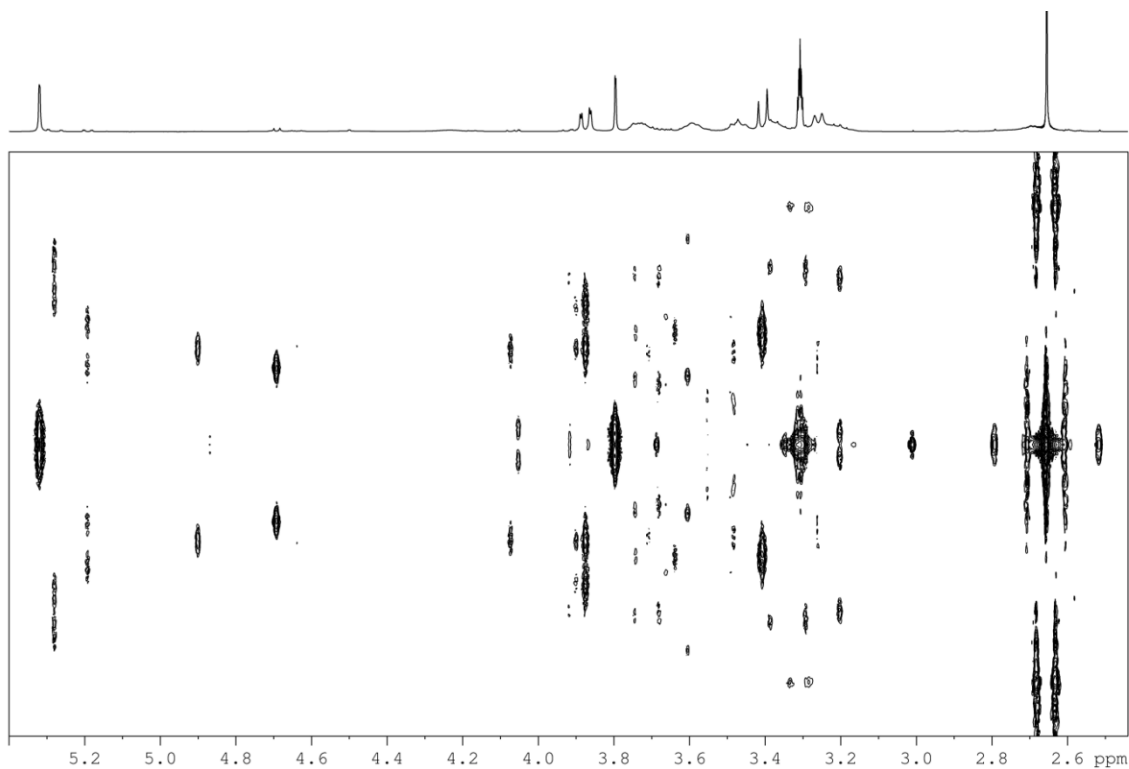


**Figura A22.** Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **3**.

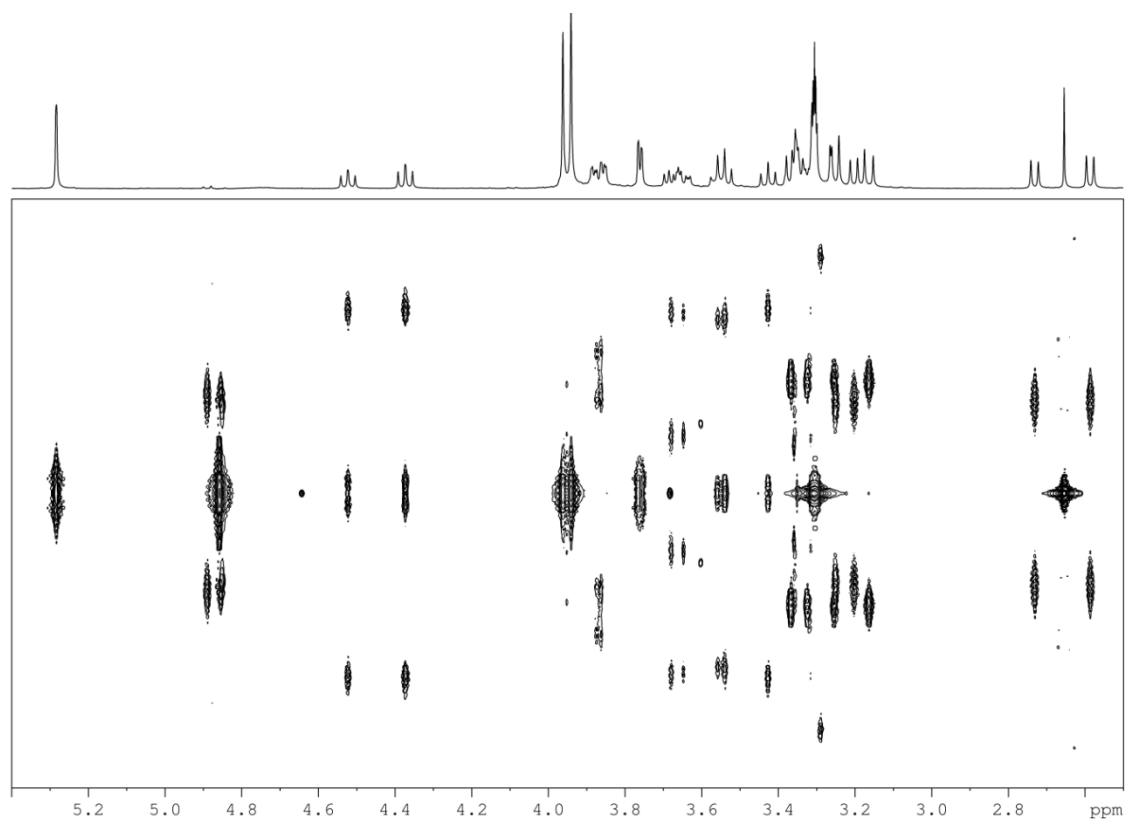


**Figura A23.** Ampliação da região de prótons anoméricos e prótons carbinólicos no mapa de contorno JRES ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **4**.

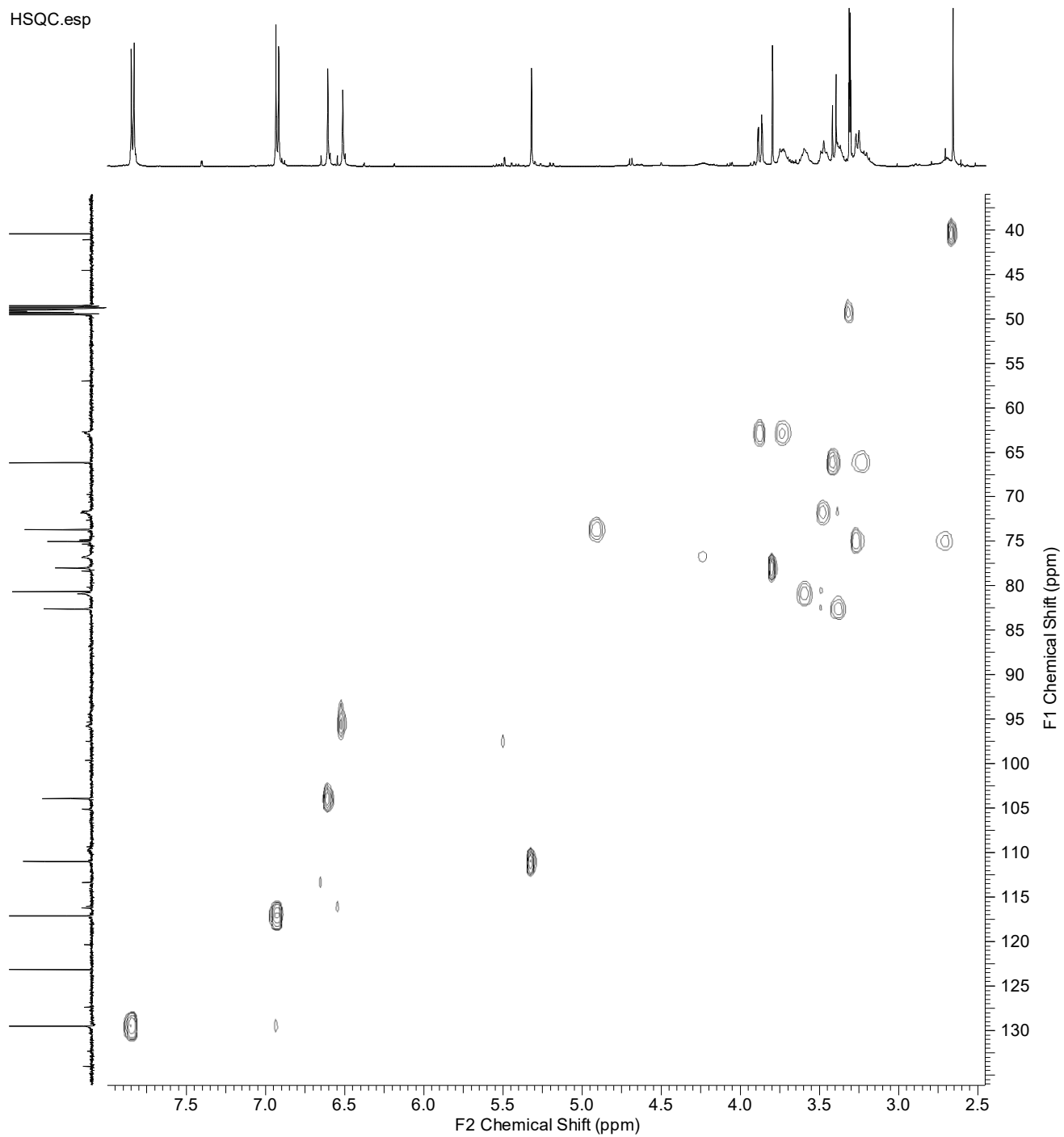


**Figura A24.** Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **3**.

HSQC.esp

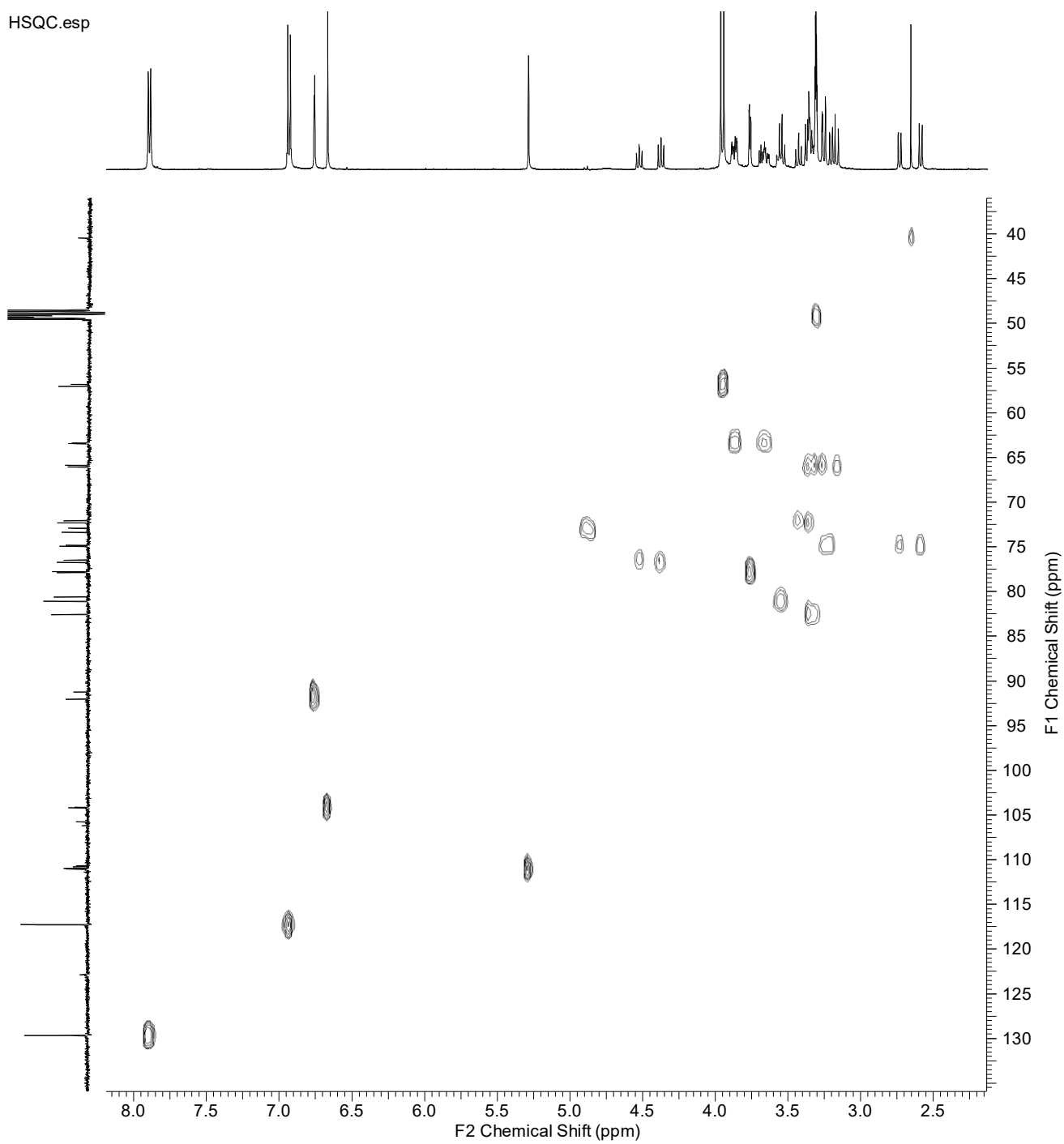


**Figura A25.** Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **4**.

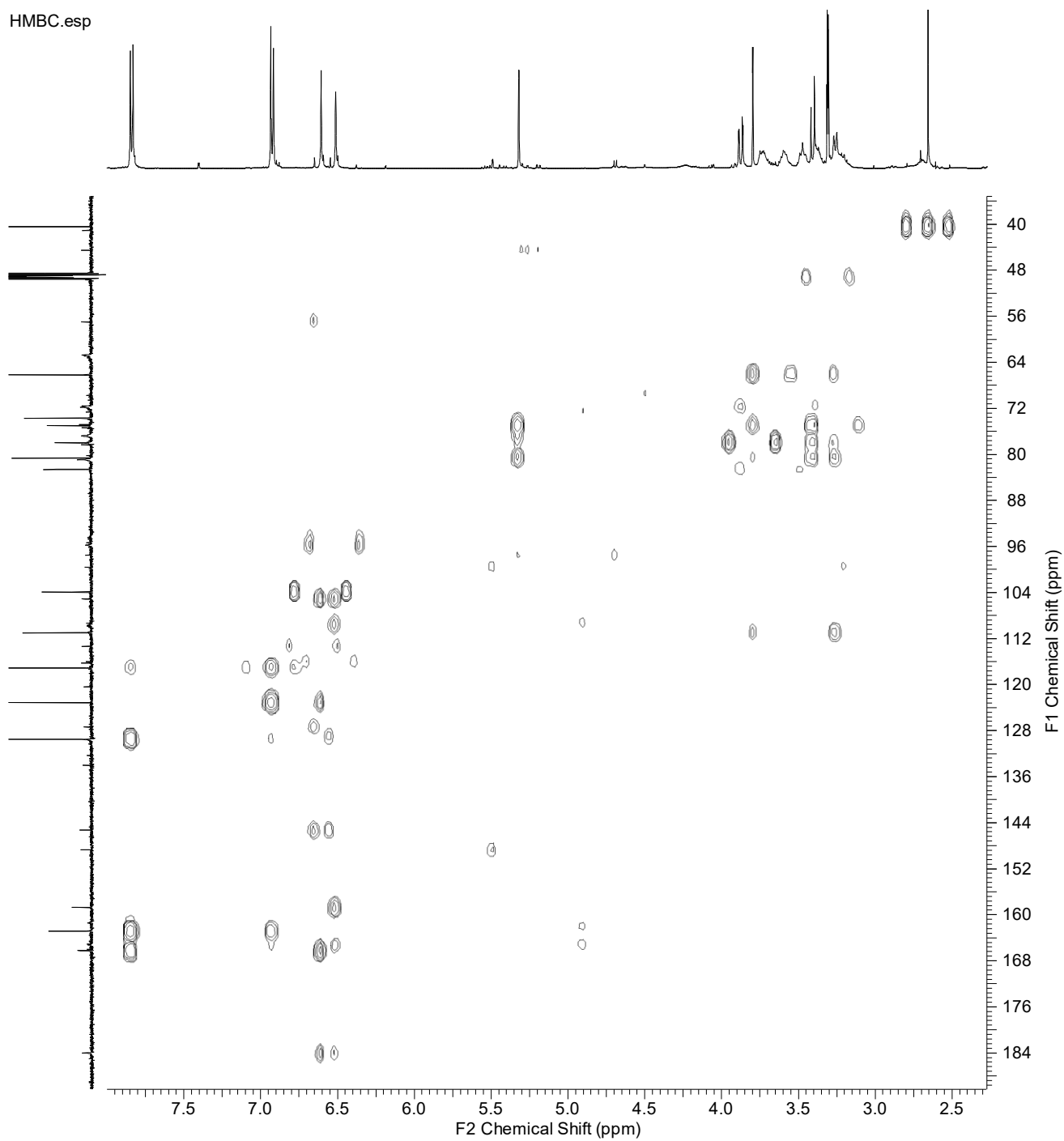


**Figura A26.** Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **3**.

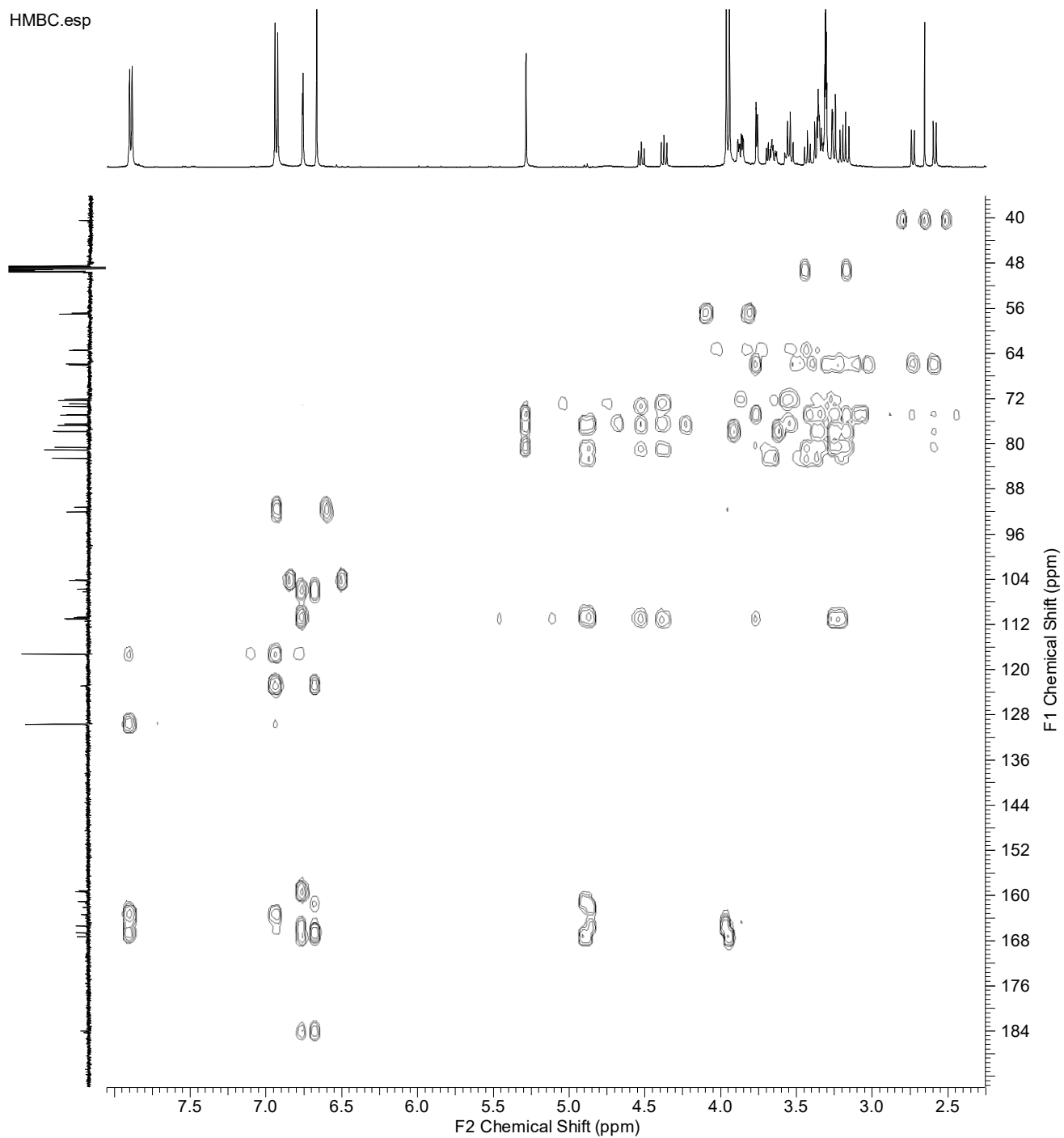


**Figura A27.** Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **4**.

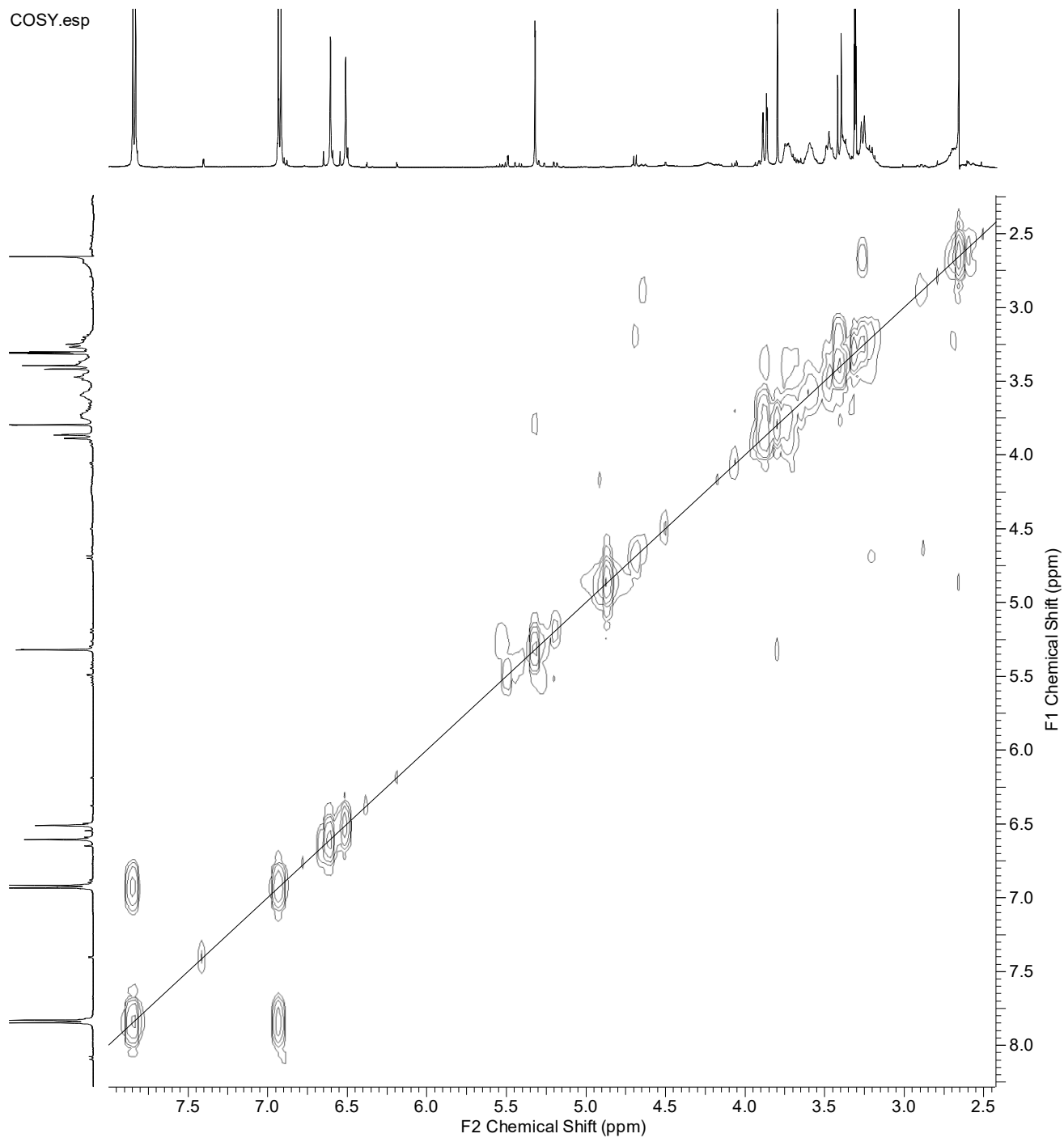


**Figura A28.** Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **3**.

COSY.esp

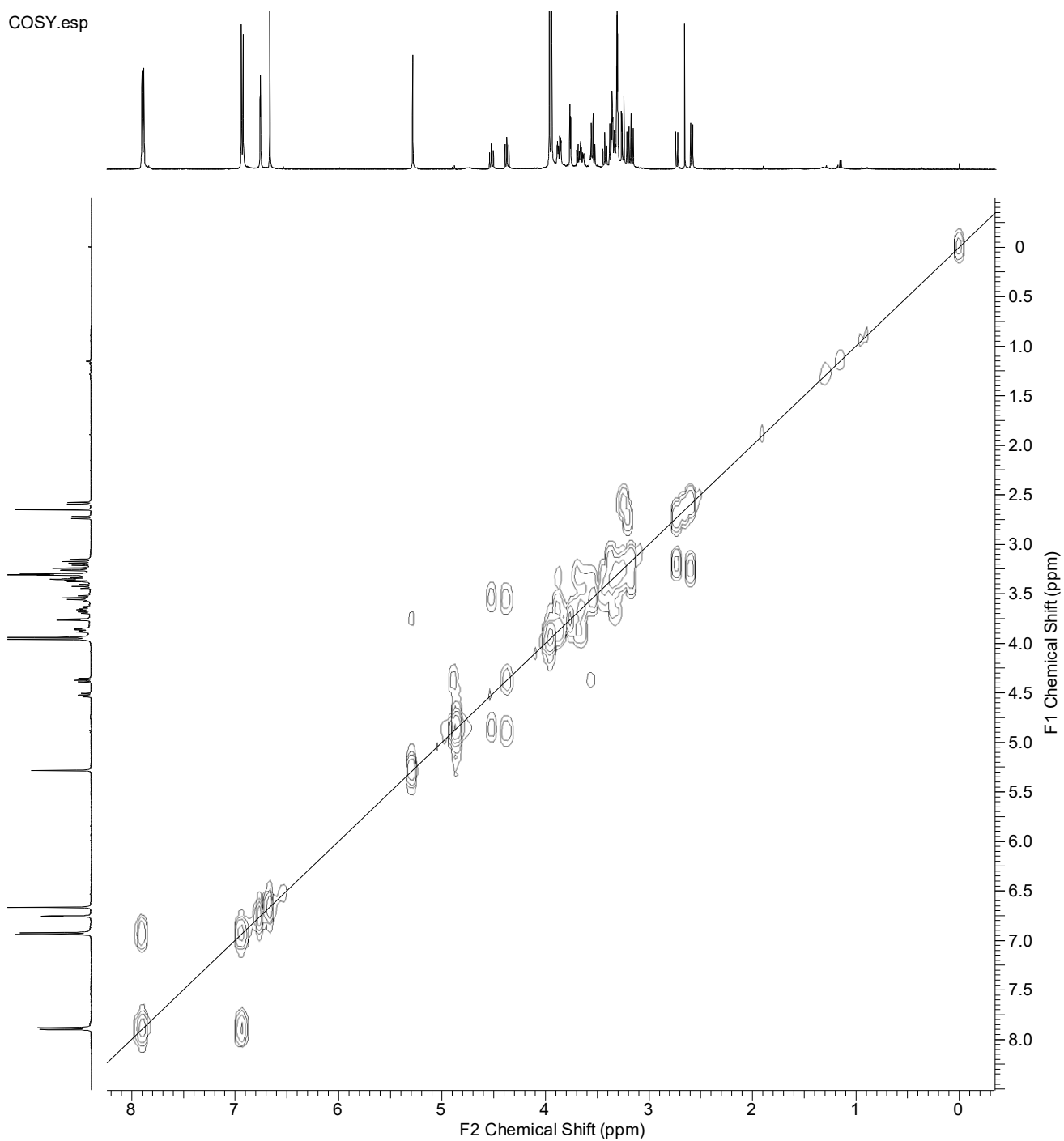


**Figura A29.** Mapa de correlação COSY (<sup>1</sup>H 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 4.

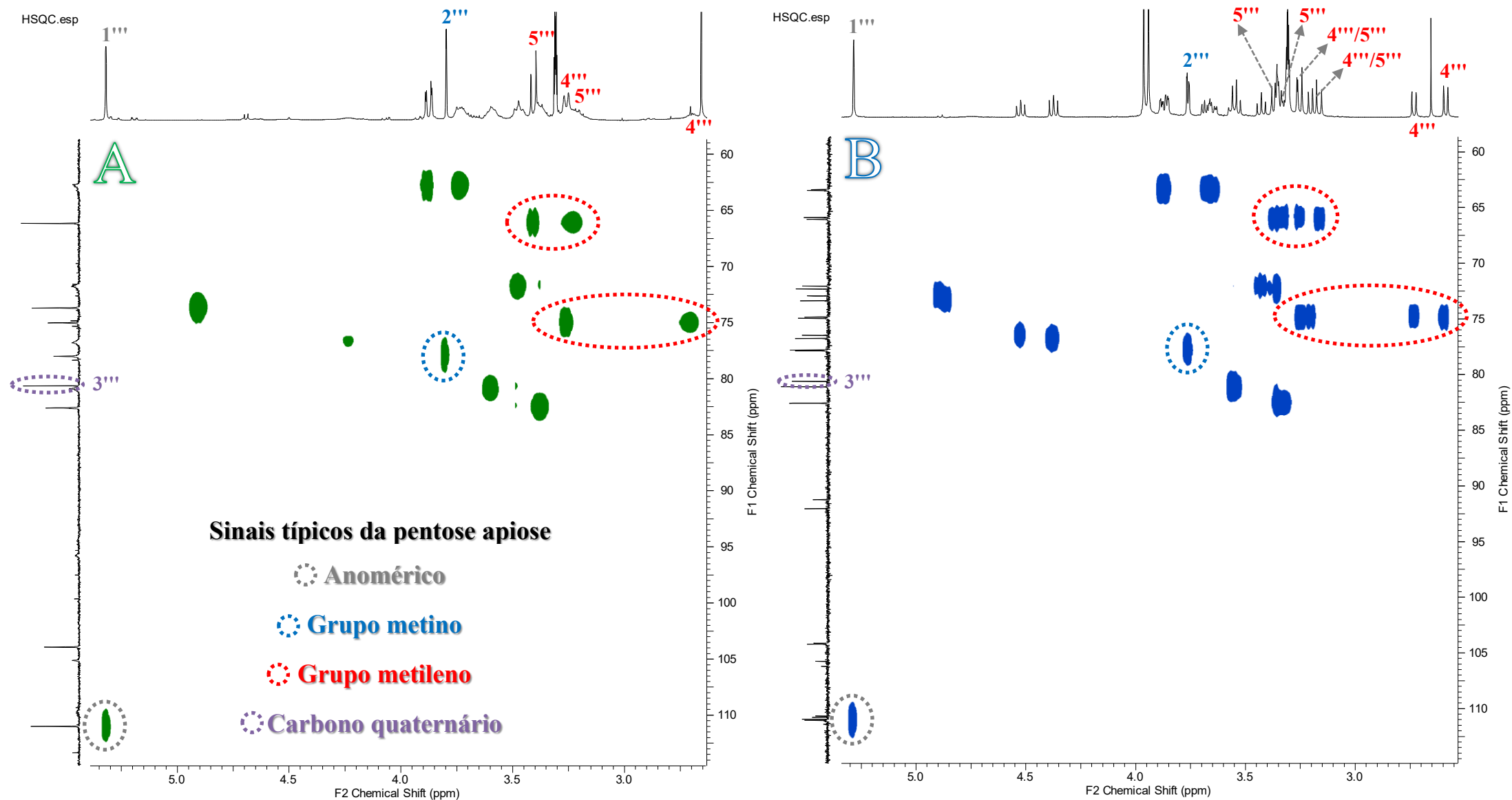


**Figura A30.** Sinais típicos da pentose apiose observados nos espectros de HSQC ( $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias (A) 3 e (B) 4.