

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**HELOISA ALVES GUIMARÃES**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon*  
(APOCYNACEAE): ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**Volume 1**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**ABRIL DE 2013**

**HELOISA ALVES GUIMARÃES**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon*  
(APOCYNACEAE): ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**Volume 1**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho**

**Co-orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**ABRIL DE 2013**

**HELOISA ALVES GUIMARÃES**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon*  
(APOCYNACEAE): ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Naturais.

Aprovada em 29 de abril de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Raquel G. Vega  
(D. Sc., Química Orgânica) – UENF

---

Prof. Dr. Marcelo Francisco de Araújo  
(D. Sc., Química Orgânica) – IFF

---

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira  
(D. Sc., Química de Produtos Naturais) – UENF

---

Prof. Raimundo Braz-Filho  
(D. Sc., Química) – UENF  
(Orientador)

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”.

*Sir Isaac Newton*

Dedico este trabalho à minha família, que é meu apoio, meu ponto de equilíbrio.

Dedico sobretudo ao meu esposo, Shaytner Campos Duarte, meu maior incentivador, meu amor, meu amigo.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo caminho que me deu para trilhar. Nunca foi o mais fácil, mas certamente é o mais enriquecedor. É o meu caminho.

À minha família, que nunca deixou de me apoiar nas minhas escolhas, mesmo as mais arriscadas.

Ao meu esposo, por sempre me tirar da inércia e me trazer para a revolução, por me ensinar a não ter medo de mudar.

Ao professor Raimundo Braz-Filho, por ter me dado a honra de partilhar um pouco do seu conhecimento, não apenas técnico, mas também de vida.

Ao professor Ivo José Curcino Vieira pela co-orientação, amizade e ensinamento durante este trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório: Lara, Marina, Jucimar, Amanda, Michelle, Hádria, Vinícius, Milena, Lidiana, Marcelo, Wagner, Jéssica, Virgínia, Elaine, Moema e Cecília, que tornaram essa jornada mais suave, mais prazerosa.

Aos amigos Melissa Petrucci e Luiz Eckhardt, pela amizade sincera e por nos acolherem em sua família.

Ao professor Rodrigo R. Oliveira, do Laboratório de Ciências Químicas da UENF, pela parceria na técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência e pelos ensinamentos.

À professora Alaíde B. de Oliveira, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela parceria nos testes de atividade antimalárica.

Ao professor Darí Cesarin-Sobrinho, do Departamento de Química/PPGQ – ICE da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela parceria nos testes de Dicroísmo Circular e nos testes de ligação à albumina sérica bovina.

À CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a execução deste trabalho.

Obrigada a todos, enfim, que rezaram, torceram e vibraram para que essa conquista se concretizasse. Compartilho com vocês essa vitória. Muito obrigada!

## RESUMO

GUIMARÃES, Heloisa Alves; **Constituintes químicos de *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon* (APOCYNACEAE): Elucidação Estrutural e Atividade Biológica.** 2013. 158 p. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

**Palavras-chave:** Apocynaceae, alcalóides indólicos, atividade antimalárica, albumina sérica bovina, determinação estrutural.

O material vegetal de *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon* foi coletado nos arredores da reserva da Vale, no município de Linhares – ES. Estas espécies são conhecidas pela produção de metabólitos secundários, com destaque para os alcalóides indólicos, aos quais são atribuídas diversas atividades biológicas, como atividade antimalárica (*A. desmanthum* e *A. nitidum*), contra disfunção erétil (*A. ulei*), contra Leishmaniose (*A. ramiflorum*). O isolamento das substâncias foi realizado utilizando-se as técnicas clássicas de cromatografia e Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência. Com o fracionamento dos extratos brutos, foi possível isolar e identificar dezenove substâncias, sendo onze alcalóides: aspidolimina e aspidocarpina, juntamente com seus derivados acetilados, antirina (de *A. desmanthum*), 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina, 12-desmetóxi-*N*-formilcilindrocarina, 12-desmetóxi-*N*-propionilcilindrocarina, 12-desmetóxi-*N*-butilcilindrocarina, 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina e 12-desmetóxi-*N*-cinamolicilindrocarina (de *A. cylindrocarpon*), sendo estas três últimas inéditas na literatura; quatro triterpenos, sendo lupeol,  $\beta$ -amirina, simiarenol e um análogo não relatado na literatura (de *A. desmanthum*); dois flavonóides: canferol e aromadendrina (de *A. cylindrocarpon*) e duas moléculas de natureza diversa: ácido atrárico e o ácido (z)-eicos-10-enedióico (de *A. cylindrocarpon*). A determinação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base em dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo experimentos bidimensionais (HMQC, HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY) e a partir de informações obtidas dos espectros de massas e absorção na região do IV. A configuração absoluta de alguns dos alcalóides foi determinada através de Dicroísmo Circular. A 12-desmetóxi-*N*-cinamolicilindrocarina apresentou forte interação com a albumina bovina e os alcalóides de *A. desmanthum* mostraram-se ativos contra cepas de *Plasmodium falciparum*, confirmando sua utilização popular no tratamento da malária.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Heloisa Alves; **Constituintes químicos de *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon* (APOCYNACEAE): Elucidação Estrutural e Atividade Biológica.** 2013. 158 p. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

**Keywords:** Apocynaceae, indole alkaloids, antimalarial activity, bovine serum albumin, structural determination.

The plant material of *Aspidosperma desmanthum* and *A. cylindrocarpon* was collected at the surroundings of Vale forest reservation, at the Linhares city – ES, Brazil. These species are known by the production of secondary metabolites, highlighting the indole alkaloids, of whom are attributed several biological activities, such as antimalarial (*A. desmanthum* and *A. nitidum*), against erectile dysfunction (*A. ulei*) and against Leishmaniosis (*A. ramiflorum*). The isolation of the compounds was performed using classic chromatographic techniques and the high-speed countercurrent chromatography. With the fractionation of crude extracts, it was possible to isolate and identify nineteen compounds, being eleven alkaloids: aspidolimine and aspidocarpine, besides its acetylated compounds, anthirine (from *A. desmanthum*), 12-demethoxy-*N*-acetylcylindrocarine, 12-demethoxy-*N*-formylcylindrocarine, 12-demethoxy-*N*-propionylcylindrocarine, 12-demethoxy-*N*-butylcylindrocarine, 12-demethoxy-*N*-benzoylcylindrocarine and 12-demethoxy-*N*-cynnamoilcylindrocarine (from *A. cylindrocarpon*), being these last three ones unprecedented in the literature; four triterpenes, being the lupeol,  $\beta$ -amyrin, simiarenol and its analogue, non-described at literature (from *A. desmanthum*); two flavonols: kaempferol and aromadendrin (from *A. cylindrocarpon*), and two molecules of different nature: atraric acid and (z)-eicos-10-enedioic acid (from *A. cylindrocarpon*). The structural determination of these substances was carried out based on spectroscopic data of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, including bidimensional (HMQC, HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY) and from information obtained from mass spectra and absorption in the IR region. The absolute configuration of some alkaloids was performed through circular dichroism. 12-demethoxy-*N*-cynnamoilcylindrocarine presented a strong interaction to the bovine serum albumine and the alkaloids from *A. desmanthum* were active against *P. falciparum* strains, confirming its popular usage to treat malaria.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição geográfica mundial de <i>Aspidosperma</i> .....	20
<b>Figura 2</b>	Subclasses de alcalóides .....	27
<b>Figura 3</b>	<i>Aspidosperma desmanthum</i> . <b>a)</b> tronco; <b>b)</b> látex; <b>c)</b> folhas .....	32
<b>Figura 4</b>	<i>Aspidosperma desmanthum</i> . <b>a)</b> frutos; <b>b)</b> sementes .....	33
<b>Figura 5</b>	<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i> <b>a)</b> caule; <b>b)</b> folhas .....	34
<b>Figura 6</b>	Representação da luz polarizada: <b>a)</b> com o componente campo elétrico ( $E$ ) em função do tempo ( $t$ ); <b>b)</b> componentes circularmente polarizados, à direita ( $R$ ) e à esquerda ( $L$ ), de mesma amplitude .....	37
<b>Figura 7</b>	Luz elipticamente polarizada, resultante da absorção distinta dos componentes da luz circularmente polarizada .....	39
<b>Figura 8</b>	Regra do octante para a carbonila e os sinais de contribuição em cada face do octante .....	40
<b>Figura 9</b>	Regra do quadrante para cromóforos aromáticos .....	41
<b>Figura 10</b>	Distribuição histórica mundial da malária, desde a metade de século 19 até o ano de 2010 .....	45
<b>Figura 11</b>	Distribuição dos casos confirmados de malária no Brasil, no ano de 2011 .....	46
<b>Figura 12</b>	Cromatograma, mostrando os tempos de retenção e os picos relativos às substâncias isoladas (C, D, E e F) .....	68
<b>Figura 13</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV) para o alcalóide aspidolimina .....	85
<b>Figura 14</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV) para o alcalóide aspidocarpina .....	89
<b>Figura 15</b>	Espectros de Massas (70 eV) de Baixa Resolução (EMBR) obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG/EM) da fração MCD 2.8.3 Acetilada.....	95
<b>Figura 16</b>	Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR, a 50 eV), da fração MCC 1.15.5A .....	99
<b>Figura 17</b>	Condições cromatográficas e parâmetros qualitativos da MCC 1.10.15A.....	102



<b>Figura 18</b>	Confôrmers deduzidos ( <b>91-1</b> e <b>91-2</b> ) através dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY da substância <b>91</b> .....	103
<b>Figura 19</b>	Espectros de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtidos por CG/EM (70 eV) da fração MCC 1.15.5A .....	105
<b>Figura 20</b>	Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR, a 50 eV), da fração MCC 1.10.13 ( <b>96</b> ) .....	108
<b>Figura 21</b>	Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR, a 50 eV), da fração MCC 1.10.16 ( <b>97</b> ) .....	115
<b>Figura 22</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCD 5.9.6.9A ( <b>87</b> ) .....	120
<b>Figura 23</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCD 3.2 .....	125
<b>Figura 24</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCD 1.5.5.5.....	130
<b>Figura 25</b>	Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCC 1.10.10 .....	134
<b>Figura 26</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>Aspidolimina</b> .....	137
<b>Figura 27</b>	Projeção espacial para o alcalóide <b>Aspidolimina</b> , para aplicação da regra do quadrante para aromáticos .....	138
<b>Figura 28</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>Aspidocarpina</b> .....	138
<b>Figura 29</b>	Projeção espacial para o alcalóide <b>Aspidocarpina</b> , para aplicação da regra do quadrante para aromáticos .....	138
<b>Figura 30</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>12-desmetóxi-N-acetilcilindrocarina</b> .....	139
<b>Figura 31</b>	Projeção espacial para o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-acetilcilindrocarina</b> , para aplicação da regra do quadrante para aromáticos .....	139
<b>Figura 32</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>12-desmetóxi-N-benzoilcilindrocarina</b> .....	139
<b>Figura 33</b>	Projeção espacial para o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-benzoilcilindrocarina</b> , para aplicação da regra do quadrante para aromáticos .....	140
<b>Figura 34</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>Antirina</b> .....	140

<b>Figura 35</b>	Espectros de absorção na região do UV e de Dicroísmo Circular (DC) do alcalóide <b>12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina</b> .....	141
<b>Figura 36</b>	Projeção espacial para o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina</b> , para aplicação da regra do quadrante para aromáticos .....	141
<b>Figura 37</b>	<b>A-</b> Espectro de absorção na região do UV-Vis de <b>97</b> em solução de ASB, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L (PBS, pH = 7,4),; <b>B-</b> Espectro de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) da ASB (PBS pH = 7,4) $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L pelo alcalóide <b>97</b> a T = 293K .....	142
<b>Figura 38</b>	Sobreposição entre os espectros de emissão/absorção para o sistema <b>97/ASB</b> .....	143
<b>Figura 39</b>	Espectro de dicroísmo circular de <b>97</b> em ASB (pH = 7,4), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB/ <b>97</b> , $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L .....	143
<b>Figura 40</b>	Curvas de Stern-Volmer nas temperaturas de 296, 303 e 310K (gráficos <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> ) e Vant' Hoff (gráfico <b>D</b> ) para o processo de supressão de fluorescência da ASB pelo alcalóide <b>97</b> .....	144
<b>Figura 41</b>	Curvas dose-resposta das amostras testadas contra parasitos do ciclo sanguíneo de <i>P. falciparum</i> (cepa W2), mostrando os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento ( $CI_{50}$ ) .....	145

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 2, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. desmanthum</i> (MCD).....	59
<b>Fluxograma 2</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 3, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. desmanthum</i> .....	60
<b>Fluxograma 3</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 5, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. desmanthum</i> .....	61
<b>Fluxograma 4</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 5.9, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. desmanthum</i> .....	62
<b>Fluxograma 5</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. cylindrocarpon</i> .....	70
<b>Fluxograma 6</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.5, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. cylindrocarpon</i> .....	71
<b>Fluxograma 7</b>	Esquema operacional simplificado adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.10, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. cylindrocarpon</i> , através da cromatografia em contracorrente de alta eficiência.....	72
<b>Fluxograma 8</b>	Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.15, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. cylindrocarpon</i> .....	73

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Rota biossintética de alcalóides indólicos simples a partir do triptofano (I) .....	25
<b>Esquema 2</b>	Rota biossintética de alcalóides indólicos simples a partir do triptofano (II) .....	25
<b>Esquema 3</b>	Rota biossintética dos alcalóides indólicos monoterpênicos .....	26
<b>Esquema 4</b>	Rearranjos dos esqueletos laterais derivados do geraniol em alcalóides indólicos terpênicos, originando três subclasses: Corinanteano, Aspidospermatano e Ibogano .....	27
<b>Esquema 5</b>	Proposta de fragmentação para os alcalóides Aspidolimina e Aspidocarpina....	86
<b>Esquema 6</b>	Proposta de fragmentação para justificar os espectros de Massas de Baixa Resolução (EMBR, 70 eV) dos componentes da mistura contendo <b>83a</b> ( $[M]^+$ , $m/z$ 412), <b>83a</b> ( $[M]^+$ , $m/z$ 426), <b>83</b> ( $[M]^+$ , $m/z$ 370) e <b>82</b> ( $[M]^+$ , $m/z$ 384) analisada por CG/EM.....	96
<b>Esquema 7</b>	Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no Espectro de Massas de Alta Resolução EMAR (modo positivo) do alcalóide <b>91</b> (12-desmetóxi- <i>N</i> -acetilcilindrocarina).....	100
<b>Esquema 8</b>	Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) da fração MCC 1.15.5A.....	106
<b>Esquema 9</b>	Proposta de fragmentação para MS2 do pico em $m/z = 431,2297$ ( $[M + H]^+$ ) para o alcalóide 12-desmetóxi- <i>N</i> -benzoilcilindrocarina ( <b>96</b> ).....	109
<b>Esquema 10</b>	Formação de adutos protonado e sodado com a substância 12-desmetóxi- <i>N</i> -cinamoilcilindrocarina ( <b>97</b> ).....	115
<b>Esquema 11</b>	Proposta de fragmentação para MS2 do pico em $m/z = 457,2453$ ( $[M + H]^+$ ) para o alcalóide 12-desmetóxi- <i>N</i> -cinamoilcilindrocarina ( <b>97</b> ).....	116
<b>Esquema 12</b>	Proposta do biorrearranjo molecular para o alcalóide antirina ( <b>87</b> ).....	118
<b>Esquema 13</b>	Proposta de fragmentação para EMBR do pico em $m/z = 296$ ( $[M]^+$ ) para o alcalóide antirina ( <b>87</b> ).....	120
<b>Esquema 14</b>	Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no Espectro de Massas de Baixa Resolução (EMBR) da fração MCD 3.2.....	126
<b>Esquema 15</b>	Proposta de fragmentação da MCC 1.5.5.5A ( <b>90</b> ) no espectrômetro de massas.....	130
<b>Esquema 16</b>	Proposta de fragmentação da MCC 1.10.10 ( <b>95</b> ) no espectrômetro de massas.	135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Extratos brutos metanólicos obtidos a partir das cascas do caule dos espécimes vegetais .....	51
<b>Tabela 2</b>	Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas do caule de <i>Aspidosperma desmanthum</i> .....	53
<b>Tabela 3</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD2 .....	53
<b>Tabela 4</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 2.8 .....	54
<b>Tabela 5</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 3 .....	55
<b>Tabela 6</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 5 .....	56
<b>Tabela 7</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 5.8 .....	56
<b>Tabela 8</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9 .....	57
<b>Tabela 9</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.6 .....	57
<b>Tabela 10</b>	Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.7 .....	58
<b>Tabela 11</b>	Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas de <i>Aspidosperma cylindrocarpon</i> .....	63
<b>Tabela 12</b>	Estudo cromatográfico da fração MCC 1 .....	64
<b>Tabela 13</b>	Perfil cromatográfico da fração MCC 1.5 .....	65
<b>Tabela 14</b>	Perfil cromatográfico da fração MCC 1.5.5 .....	65
<b>Tabela 15</b>	Perfil cromatográfico da fração MCC 1.15 .....	66
<b>Tabela 16</b>	Sistemas de solventes testados para a fração MCC 1.10 .....	67
<b>Tabela 17</b>	Coeficientes de partição ( $k_D$ ) e fatores de retenção ( $\alpha$ ) dos picos mostrados no cromatograma.....	68
<b>Tabela 18</b>	Perfil cromatográfico da fração MCC 1.10 .....	69
<b>Tabela 19</b>	Substâncias analisadas por Dicroísmo Circular (DC), com os respectivos códigos e massas utilizadas .....	74
<b>Tabela 20</b>	Descrição das amostras submetidas ao teste <i>in vitro</i> de atividade antimalárica, por espécie .....	77

<b>Tabela 21</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C ( <b>Espectro 2</b> ) e DEPTQ ( <b>Espectro 3</b> ) da MCD 2.8.2a ( <b>82</b> ) .....	83
<b>Tabela 22</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) da MCD 2.8.2a ( <b>82</b> ) em CDCl <sub>3</sub> , incluindo-se os resultados dos espectros 2D HMQC e HMBC e comparação com valores do alcalóide aspidocarpina ( <b>83</b> ) .....	87
<b>Tabela 23</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C ( <b>Espectro 11</b> ) e DEPTQ ( <b>Espectro 12</b> ) da MCD 2.8.2b ( <b>83</b> ) incluindo-se informações de correlações fornecidas pelo HMQC .....	89
<b>Tabela 24</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC do alcalóide aspidocarpina, em comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina.....	90
<b>Tabela 25</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C DEPTQ ( <b>Espectros 20 e 21</b> ) da MCD 2.8.3 A e B acetiladas .....	92
<b>Tabela 26</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC dos alcalóides aspidolimina e aspidocarpina acetilados, em comparação com os mesmos não-acetilados.....	94
<b>Tabela 27</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C DEPTQ ( <b>Espectro 35</b> ) da MCC 1.10.15A .....	98
<b>Tabela 28</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi- <i>N</i> -acetilcilindrocarina, em comparação com valores de referência da literatura.....	101
<b>Tabela 29</b>	Resultado da análise comparativa do espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPTQ ( <b>Espectro 47</b> ) da fração MCC 1.10.13 .....	107
<b>Tabela 30</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi- <i>N</i> -benzoilcilindrocarina ( <b>96</b> ), em comparação com valores de referência do alcalóide <i>N</i> -benzoilcilindrocarina ( <b>96'</b> ).....	111
<b>Tabela 31</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi- <i>N</i> -cinamoilcilindrocarina ( <b>97</b> ), em comparação com valores de referência do alcalóide cilindrocarina ( <b>97'</b> ) .....	114
<b>Tabela 32</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C ( <b>Espectro 75</b> ) e DEPTQ ( <b>Espectro76</b> ) da MCD 5.9.6.9A .....	118

<b>Tabela 33</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC do alcalóide antirina ( <b>87</b> ), em comparação com valores de referência da literatura	121
<b>Tabela 34</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C DEPTQ ( <b>Espectros 86 a 91</b> ) da fração MCD 3.2.....	124
<b>Tabela 35</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC da mistura de terpenos (fração <b>MCD 3.2</b> ), em comparação com valores de referência da literatura.....	127
<b>Tabela 36</b>	Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) do simiarenol ( <b>85</b> como componente da mistura fração <b>MCD 3.2</b> ), inclusive resultados obtidos pelos mapas de correlação HSQC e HMBC, e comparação com valores de modelos descritos na literatura.....	128
<b>Tabela 37</b>	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do ácido atrárico ( <b>90</b> ), em comparação com valores de referência da literatura.....	130
<b>Tabela 38</b>	Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de <sup>13</sup> C-DEPTQ ( <b>Espectro 112 a 114</b> ) da fração MCC 1b.....	131
<b>Tabela 39</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC para o canferol ( <b>88</b> ) e aromadendrina ( <b>89</b> ), em comparação com valores de referência da literatura.....	133
<b>Tabela 40</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) e de <sup>13</sup> C (100 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e as correlações observadas nos mapas de correlação HMQC e HMBC para o ácido (z)-eicos-10-enedióico ( <b>95</b> ), em comparação com valores de referência da literatura.....	136
<b>Tabela 41</b>	Valores termodinâmicos ( $\Delta G^{\circ}$ , $\Delta H^{\circ}$ e $\Delta S^{\circ}$ ) para a interação de <b>102</b> com a ASB a 310K .....	144
<b>Tabela 42</b>	Percentual de redução (% Redução) do crescimento de <i>P. falciparum</i> cloroquina resistente (W2) na presença das amostras de <i>Aspidosperma desmanthum</i> .....	145
<b>Tabela 43</b>	Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI <sub>50</sub> ) do clone W2 (cloroquina-resistente) de <i>P. falciparum</i> contra as amostras avaliadas .....	146

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
3.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
3.1	A FAMÍLIA APOCYNACEAE.....	22
3.2	O GÊNERO <i>Aspidosperma</i> .....	24
3.2.1	<b>Alcalóides indólicos monoterpênicos</b> .....	25
3.2.1.1	Aspectos biossintéticos.....	25
3.2.1.2	Características estruturais.....	26
3.2.2	<b>Atividade biológica</b> .....	29
3.2.3	<b><i>A. desmanthum</i></b> .....	32
3.2.4	<b><i>A. cylindrocarpon</i></b> .....	33
3.3	CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE DE ALTA EFICIÊNCIA .....	35
3.3.1	<b>Isolamento de alcalóides por CCC de alta eficiência</b> .....	35
3.4	DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	36
3.4.1	<b>Atividade Óptica</b> .....	36
3.4.2	Dispersão Rotatória Óptica (DRO).....	47
3.4.3	<b>Dicroísmo Circular (DC)</b> .....	38
3.4.4	<b>Regra de setor e quiralidade</b> .....	39
3.4.5	<b>Dicroísmo Circular de Alcalóides Indólicos</b> .....	41
3.5	LIGAÇÃO À ALBUMINA SÉRICA BOVINA.....	42
3.5.1	<b>Albumina Sérica Humana (ASH) e Bovina (ASB)</b> .....	42
3.5.2	<b>Interação entre as albuminas e alcalóides</b> .....	43
3.6	ATIVIDADE ANTIMALÁRICA.....	45
3.6.1	<b>A Malária no Mundo e no Brasil</b> .....	45
3.6.2	<b>Tratamento da Malária</b> .....	47
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
4.1	ESCOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL.....	50
4.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	50
4.3	SECAGEM E MOAGEM.....	51
4.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	51
4.5	PROSPECÇÃO PRELIMINAR.....	52



4.6	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE <i>A. desmanthum</i> .....	52
4.7	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE <i>A. cylindrocarpon</i> ....	63
<b>4.7.1</b>	<b>Análise da fração MCC 1.10 (504,9 mg) por Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência (CCCAV)</b> .....	<b>66</b>
4.7.1.1	Escolha do sistema de solventes.....	66
4.7.1.2	Procedimento de CCC de Alta Eficiência.....	67
4.8	DICROÍSMO CIRCULAR.....	74
4.9	TESTE DE LIGAÇÃO À ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB).....	74
<b>4.9.1</b>	<b>Análise da ligação à ASB por espectroscopia de absorção no UV-vis</b> .....	<b>75</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Análise da ligação à ASB por Espectrometria de Fluorescência</b> .....	<b>75</b>
<b>4.9.3</b>	<b>Análise da ligação à ASB por dicroísmo circular</b> .....	<b>76</b>
4.10	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA.....	76
<b>4.10.1</b>	<b>Procedimentos Experimentais</b> .....	<b>77</b>
4.10.1.1	Método de incorporação de [ <sup>3</sup> H]-hipoxantina.....	77
4.10.1.2	Método LDH (Lactato Desidrogenase).....	78
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
5.1.	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE <i>Aspidosperma desmanthum</i> E <i>A. cylindrocarpon</i> .....	80
<b>5.1.1</b>	<b>Determinação estrutural dos alcalóides aspidolimina (82), aspidocarpina (83) e seus derivados acetilados (82b e 83b)</b> .....	<b>82</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Determinação estrutural dos alcalóides 12-desmetóxi-N-acetilcilindrocarina (91a e 91b), 12-desmetóxi-N-formilcilindrocarina (92), 12-desmetóxi-N-propionilcilindrocarina (93), 12-desmetóxi-N-butilcilindrocarina (94), 12-desmetóxi-N-benzoilcilindrocarina (96) e 12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina (98)</b> .....	<b>97</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Determinação estrutural do alcalóide Antirina (87)</b> .....	<b>117</b>
5.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS TRITERPENOS ISOLADOS DE <i>A. desmanthum</i> .....	122
<b>5.2.1</b>	<b>Determinação estrutural da fração MCD 3.2</b> .....	<b>122</b>
5.3	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS DEMAIS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	129
<b>5.3.1</b>	<b>Determinação estrutural da fração MCC 1.5.5.5</b> .....	<b>129</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Determinação estrutural de canferol (88) e aromadendrina (89)</b> .....	<b>131</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Determinação estrutural do ácido (z)-eicos-10-enedióico (95)</b> .....	<b>134</b>

5.4	DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA POR DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	137
5.4.1	<b>Aspidolimina (MCD 2.8.2a)</b> .....	137
5.4.2	<b>Aspidocarpina (MCD 2.8.2b)</b> .....	138
5.4.3	<b>12-desmetóxi-<i>N</i>-acetilcilindrocarina (MCC 1.15.5A)</b> .....	139
5.4.4	<b>12-desmetóxi-<i>N</i>-benzoilcilindrocarina (MCC 1.10.13)</b> .....	139
5.4.5	<b>Antirina (MCD 5.9.6.9B)</b> .....	140
5.4.6	<b>12-desmetóxi-<i>N</i>-cinamoilcilindrocarina (MCC 1.10.16)</b> .....	141
5.5	TESTE DE LIGAÇÃO À ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB).....	142
5.6	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA.....	144
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	147
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	148

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde os dias mais remotos da humanidade e formam as bases da atenção em saúde em todo o mundo. Ainda hoje são muito empregadas, mostrando considerável importância no comércio internacional (OMS, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina tradicional, também chamada de complementar, alternativa ou não convencional, é definida como “a soma do conhecimento total, técnicas e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências nativas de diferentes culturas, sejam explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas ou mentais” (OMS, 2000).

Nas últimas décadas, o uso da medicina tradicional tem se expandido mundialmente e ganhado popularidade, sendo um recurso empregado não só por países pobres ou em desenvolvimento, mas também por aqueles nos quais a medicina convencional é predominante no sistema nacional de saúde (OMS, 1998). Em 2000, os Estados Unidos tiveram um faturamento de US\$ 6,6 bilhões e a Europa US\$ 8,5 bilhões com o comércio de fitofármacos, sendo a Alemanha o maior mercado mundial desse segmento (PINTO et al., 2002).

No entanto, esse uso disseminado traz consigo uma concepção equivocada, amplamente difundida, de que “natural” significa “seguro”. A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde, uma vez que os estudos nesse campo ainda são relativamente escassos. São comuns os efeitos adversos, adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica com drogas alopáticas (VEIGA Jr et al., 2005; OMS, 2005).

Plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de drogas, não apenas quando os constituintes da planta são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como material de partida para a síntese de drogas ou como modelos para substâncias farmacologicamente ativas (NEWMAN et al., 2003; OMS, 1998).

Neste contexto, um grande número de moléculas biologicamente ativas como alcalóides, iridóides, proantocianidinas, cianidinas, flavonóides, glicosídeos e sapogeninas tem sido isolado de espécies da família APOCYNACEAE (WATSON e DALLWITZ, 1992). Essa variedade de substâncias é responsável por uma grande variedade de atividades farmacológicas, como por exemplo, ação hipotensora, sedativa, cardiotônica, antimicrobiana, antitumoral, antitérmica e contra disfunção erétil (QUINET, 2002). Além dos fins medicinais, as espécies da família APOCYNACEAE também contribuem de forma relevante, seja pelo fornecimento de madeira e látex, ou pela utilização no paisagismo e na alimentação (WATSON e DALLWITZ, 1992).

Os dados encontrados na literatura são muito divergentes quanto ao número de indivíduos, mas são estimados entre 250 e 550 gêneros de apocináceas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, dos quais se destaca o gênero *Aspidosperma* (WATSON e DALLWITZ, 1992; QUINET, 2002). Este gênero pode conter pouco mais de 50 espécies (dependendo do critério de classificação), de ocorrência restrita às Américas Central e do Sul, entre o México e a Argentina (**Figura 1**) (PEREIRA et al., 2007; WOODSON Jr, 1951).



**Figura 1.** Distribuição geográfica mundial de *Aspidosperma* (Adaptado de: <http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/13932/?fam=APOCYNACEAE>. Acessado em: março de 2010).

*Aspidosperma* apresenta vários constituintes químicos de interesse, com destaque especial para os alcalóides indólicos, os quais demonstram possuir atividades farmacológicas importantes, tais como, ação antitumoral e antimicrobiana (GOMES e CAVALCANTI, 2001).

Dando continuidade ao trabalho que vem sendo desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Produtos Naturais da UENF com espécies desta família, no presente trabalho realizou-se o estudo de duas espécies do gênero *Aspidosperma*, *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon*, buscando o isolamento e identificação dos constituintes químicos, e testes de atividade biológica dos mesmos.

Estudos recentes com *A. desmanthum* vêm sendo desenvolvidos com espécimes coletados na região Amazônica (HENRIQUE et al., 2010). O presente estudo também poderá futuramente apontar diferenças entre os constituintes químicos entre aqueles e os espécimes coletados na região de Mata Atlântica, evidenciando a influência dos fatores ambientais sobre a produção de metabólitos secundários.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos dos extratos metanólicos de cascas das espécies *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon*, contribuindo para o conhecimento quimiotaxonômico dessas espécies.

A fim de corroborar a utilização popular dessas espécies, o trabalho também objetiva a realização de testes de atividade antimalárica e de ligação à albumina sérica bovina, tanto com extratos e frações, quanto com substâncias isoladas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A FAMÍLIA APOCYNACEAE

Pelo conceito mais aceito atualmente, a família APOCYNACEAE está subdividida em 424 gêneros, agrupada em 17 tribos pertencentes a cinco subfamílias, Rauvolfioideae, Apocynoideae, Asclepioideae, Periplocoideae e Secamonioidae (ENDRESS e BRUYNS, 2000). Essa classificação está sujeita a variações de acordo com os critérios analisados, podendo haver outras possibilidades como a aproximação entre taxonomia Linneana e filogenética (com 4 subfamílias e 21 tribos), ou a palinotaxonomia (análise dos grãos de pólen) (SENNBLAD e BREMER, 2002; MOREIRA et al., 2004).

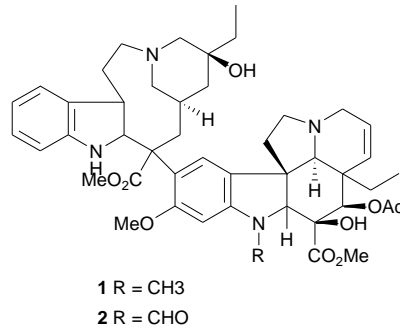
A família APOCYNACEAE está taxonomicamente classificada, segundo Cronquist (1988) no Reino Plantae, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianiales e contém aproximadamente de 3.700 a 5.100 espécies concentradas nas regiões tropicais e subtropicais, em todo o mundo. No Brasil, foram catalogadas cerca de 400 espécies de apocináceas, pertencentes a 41 gêneros, onde 78% desses são encontrados na região amazônica (PEREIRA et al., 2007).

Os indivíduos dessa família apresentam-se como árvores, arbustos ou trepadeiras, mais raramente subarbustos ou ervas rasteiras (PING-TAO et al., 1995). As folhas são simples e inteiras, normalmente pecioladas, usualmente opostas; estípulas ausentes ou pequenas. As flores apresentam tamanho variado, desde pequenas até grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras, hermafroditas, diclamídeas. Fruto seco capsular ou indeiscente, ou dois frutículos secos, deiscentes. Sementes aladas (no caso de *Aspidosperma*), pilosas ou não (ENDRESS e BRUYNS, 2000; BARROSO et al., 1991).

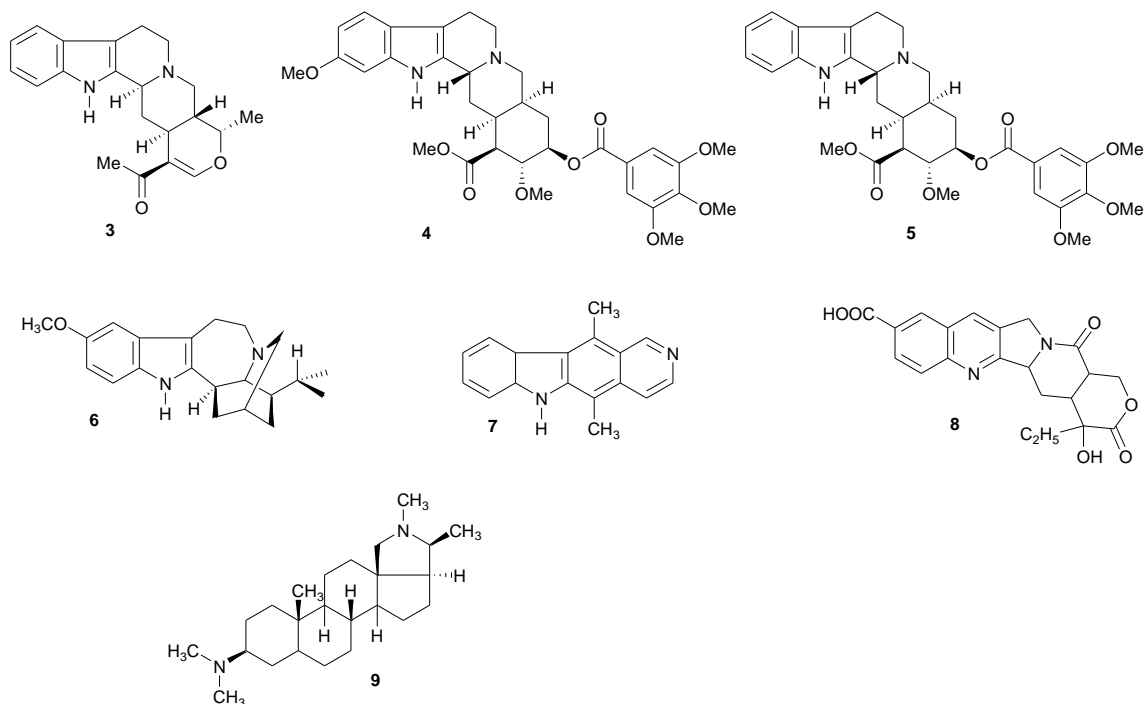
Uma característica universal entre as apocináceas é a presença de lactíferos, que produzem um látex leitoso, de coloração avermelhada ou amarelada (no caso de *Aspidosperma*). Esse látex pode conter hidrocarbonetos poliisoprênicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, fitoesteróis e alcalóides, sendo que a essas substâncias são atribuídas as propriedades de inibição da herbivoria e de cicatrização de ferimentos da própria planta (DEMARCO et al., 2006; ENDRESS e BRUYNS, 2000).

Várias apocináceas são utilizadas em paisagismo, destacando-se os gêneros *Tabernaemontana* e *Plumeria* (jasmim-manga), de porte arbóreo; *Alamanda* e *Mandevilla* (trepadeiras) e *Catharanthus* e *Nerium* que são arbustivas (CEAP Design, 2010). Algumas espécies têm importância comercial devido ao caule lenhoso, apropriado para a confecção de móveis e construção civil, destacando-se a peroba e o guatambu (UFRRJ, 2008), ou por fornecerem frutos comestíveis, como *Hancornia* (mangaba), tornando-se importantes para o desenvolvimento regional.

Uma característica química marcante da família APOCYNACEAE é a presença de alcalóides indólicos, responsáveis, como já dito anteriormente, por uma grande variedade de efeitos biológicos. Importantes exemplos dentro dessa família são os alcalóides de *Catharanthus* - vimblastina (1) e vincristina (2), os quais apresentam uma marcante atividade antitumoral, sendo amplamente utilizadas na clínica médica (DEWICK, 2002).



A ajmalicina (3), que apresenta atividade anti-hipertensiva e antiarrítmica; reserpina (4) e deserpidina (5), amplamente utilizadas como anti-hipertensivo e sedativo. A ibogaina (6), de *Tabernanthe iboga*, é psicoativa e é empregada no tratamento do vício em heroína. A elipticina (7) da *Ochrosia elliptica* tem mostrado atividade antitumoral em estudos preliminares. Camptotecina (8) de *Ervatamia heyneana* tem mostrado amplo espectro de atividade anticâncer, mas a toxicidade e baixa solubilidade têm sido apontadas como fatores limitantes. Também tem sido demonstrada atividade contra *Trypanossoma brucei* (causador da doença do sono) e *Leishmania donovani* (leishmaniose). Conessina (9), de *Holarrhena floribunda*, é usada há muito tempo para tratamento de disenteria amebiana (DEWICK, 2002).



### 3.2 O GÊNERO *ASPIDOSPERMA*

*Aspidosperma*, incluída na subfamília Raulvolfoioideae, tribo Alstonieae (ENDRESS e BRUYNS, 2000), apresenta aproximadamente 57 espécies (variando de acordo com a classificação), agrupadas em oito séries (Rígida, Nitida, Quebranchines, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa), restritas às regiões tropicais e subtropicais das Américas (PEREIRA et al., 2007).

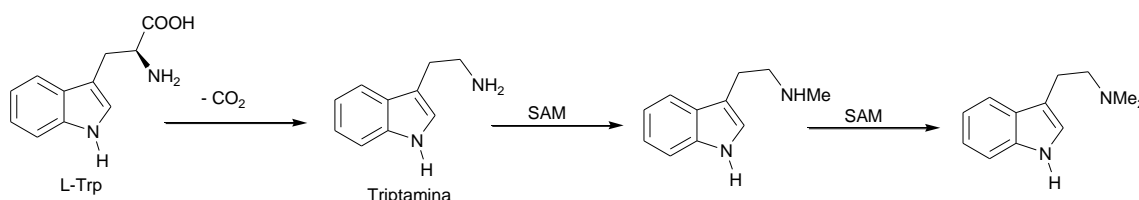
Diversas espécies de *Aspidosperma* apresentam elevado valor comercial devido à qualidade de suas madeiras. Além disso, infusões das cascas das árvores são utilizadas na medicinal tradicional para tratamento de diversas enfermidades, desde a Amazônia até o Cerrado (PEREIRA et al., 2007; SOUZA et al., 2005; GOLONI et al., 2005). Nos extratos de espécies desse gênero há uma predominância de alcalóides indólicos que apresentam uma alta diversidade estrutural, sendo estes os principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos mais marcantes como, por exemplo, a atividade antiplasmodial (MITAINE-OFFER et al., 2002; BOURDY, et al. 2004; MESQUITA et al., 2006).



### 3.2.1 Alcalóides indólicos monoterpênicos

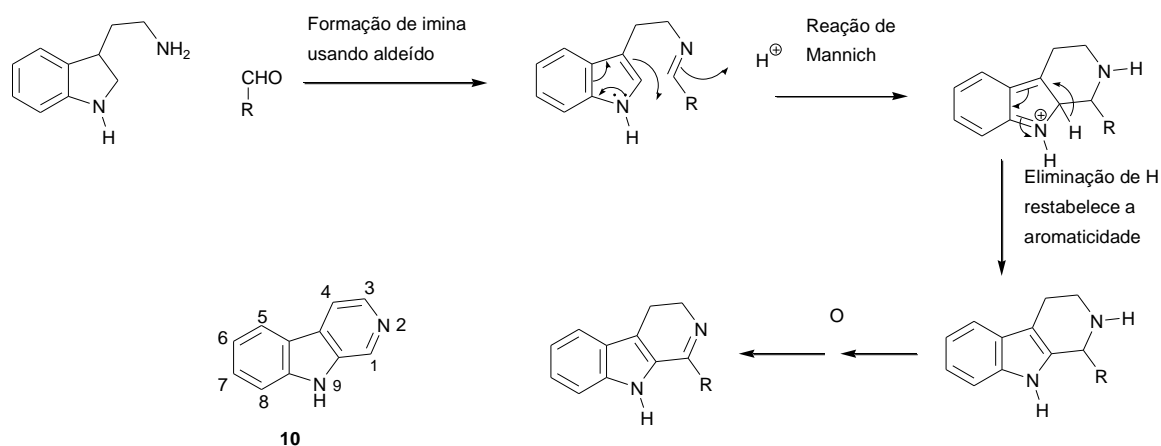
#### 3.2.1.1 Aspectos biossintéticos

Alcalóides indólicos simples (**Esquema 1**) são derivados *N*-metilados e *N,N*-dimetilados do aminoácido Triptofano, onde a parte terpênica é proveniente da via do ácido mevalônico. Estes são amplamente difundidos entre as plantas, caracterizando-se como marcadores quimiotaxonômicos para classificação botânica de espécies de *Aspidosperma* (DEWICK, 2002; PEREIRA et al., 2007).



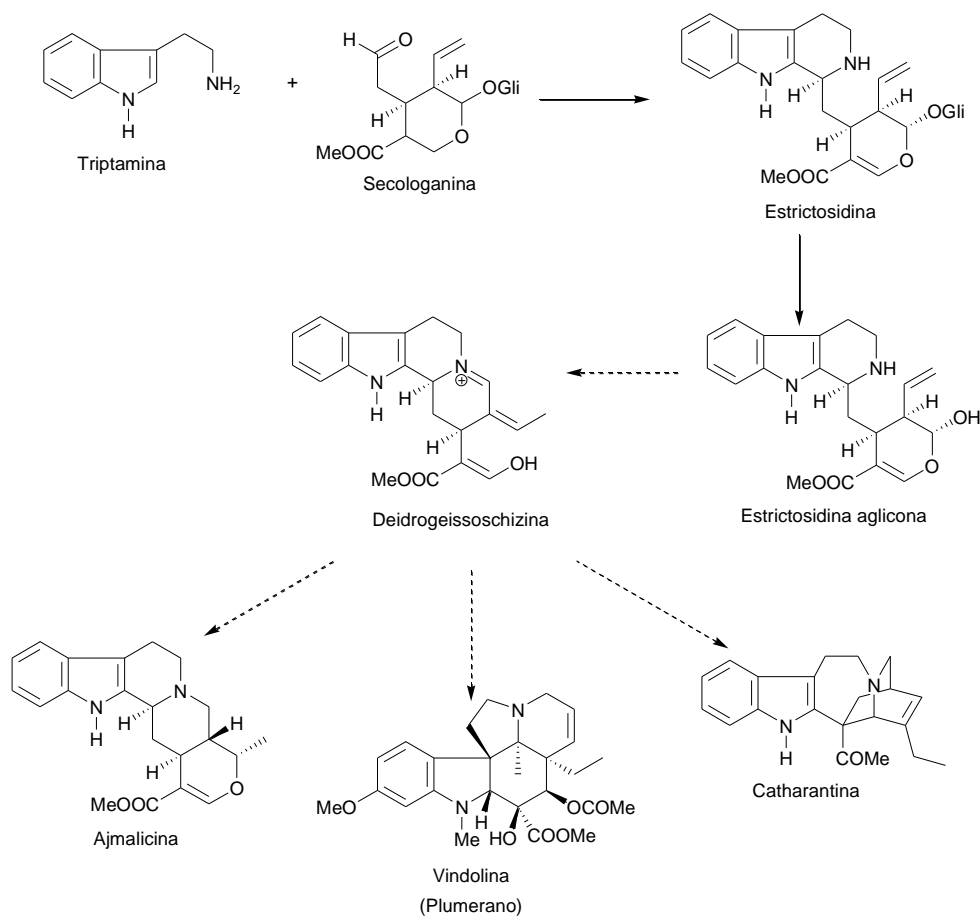
**Esquema 1.** Rota biossintética de alcalóides indólicos simples a partir do triptofano (I).

O L-triptofano é um aminoácido aromático que contém um núcleo indólico originado da via do chiquimato, via ácido antranílico. Esse aminoácido sofre uma descarboxilação inicial, seguida de duas metilações mediadas pela SAM (*S*-adenosilmetionina), resultando em derivados metilados. A triptamina poderá sofrer uma reação de Mannich, utilizando-se um aldeído para formação de uma base de Schiff, levando à formação do núcleo quinolínico, representado pela  $\beta$ -carbolina (**10**) (**Esquema 2**) (DEWICK, 2002).



**Esquema 2.** Rota biossintética de alcalóides indólicos simples a partir do triptofano (II).

Os alcalóides indólicos monoterpênicos são formados a partir da condensação da triptamina com a secologanina (derivada do geraniol, via do ácido mevalônico), produzindo a secologanina-O-glicose, em uma reação catalisada pela enzima strictosidina sintase. Por ação da enzima strictosidina- $\beta$ -D-glicoidrolase, forma-se a molécula de strictosidina aglicona, precursora de um grande número de alcalóides indólicos de *C. roseus*. A strictosidina aglicona se converte espontaneamente em deidrogeissoschizina, a qual pode ser transformada em diversos alcalóides com padrões estruturais característicos (Loyola-Vargas et al., 2004; Dewick, 2008) (**Esquema 3**).



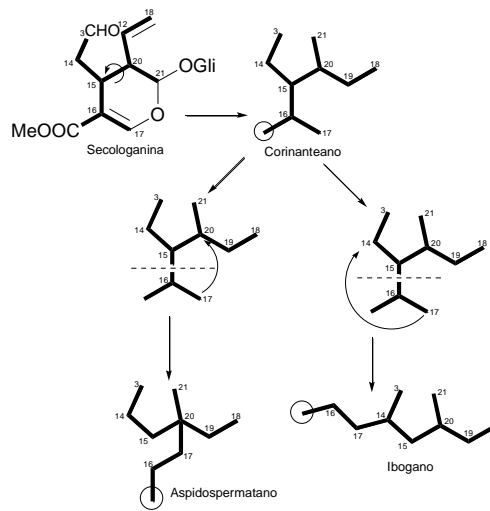
**Esquema 3.** Rota biossintética dos alcalóides indólicos monoterpênicos (adaptado de Loyola-Vargas et al., 2004; Dewick, 2008).

### 3.2.1.2 Características estruturais

Mais de 3.000 alcalóides indólicos terpênicos são conhecidos, sendo encontrados basicamente em oito famílias, das quais APOCYNACEAE, Loganiaceae e Rubiaceae são as principais fontes (Dewick, 2008).

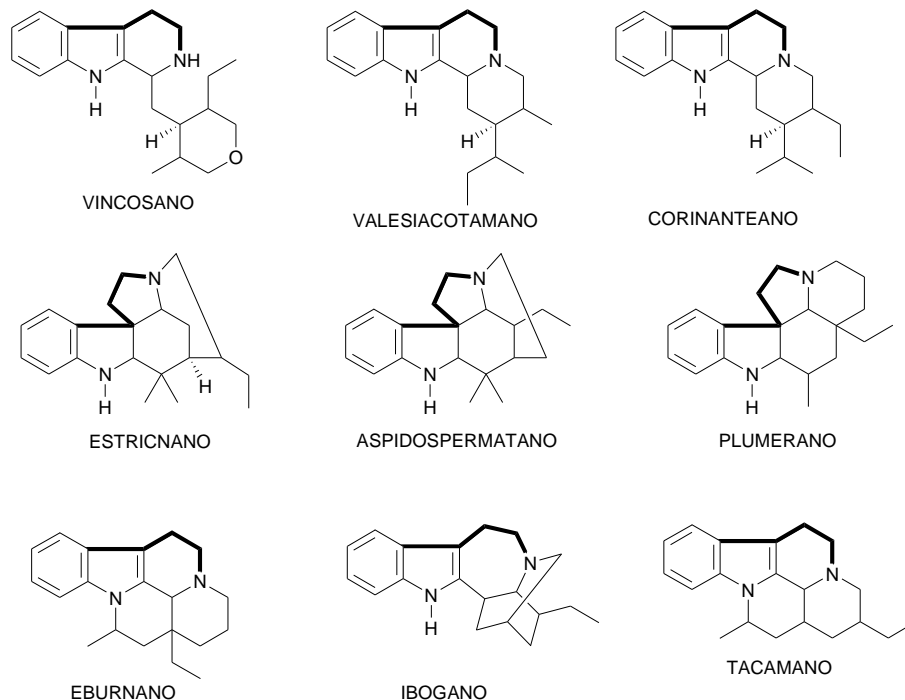
Os alcalóides indólicos monoterpênicos apresentam uma porção derivada do geraniol, uma porção contendo nove ou dez carbonos ( $C_9$  ou  $C_{10}$ ) que se fragmenta em grupos lineares de seis (6 C), um (1 C) e três carbonos (3 C). Esses blocos de construção formam padrões que permitem subdividir

os alcalóides indólicos em três grupos: Corinanteano, Ibogano e Aspidospermatano, de acordo com a subarquitetura da cadeia lateral (Le MEN e TAYLOR, 1965) (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Rearranjos dos esqueletos laterais derivados do geraniol em alcalóides indólicos terpênicos, originando três subclasses: Corinanteano, Aspidospermatano e Ibogano (adaptado de DEWICK, 2008 e OLIVEIRA et al., 2009).

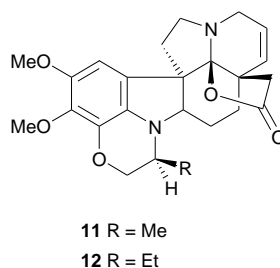
Cada uma dessas subclasses é subdividida, originando nove tipos de esqueletos (DANIELI e PALMISANO, 1986) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Subclasses de alcalóides.

De acordo com Pereira et al. (2007), já foram isolados 247 alcalóides indólicos diferentes de espécies de *Aspidosperma*. Recentemente, dois novos alcalóides com esqueleto plumerano foram

isolados de *A. spruceanum*, denominados de spruceanuminas A (**11**) e B (**12**) (OLIVEIRA, V. et al., 2009).

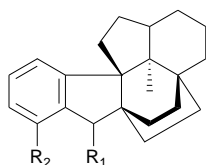
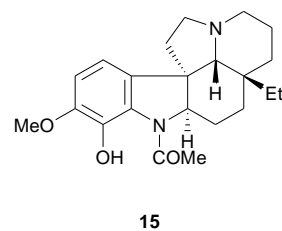
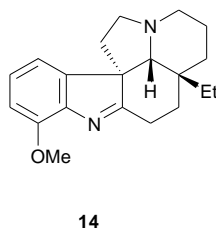
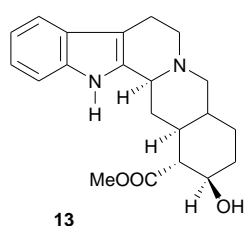


Além destes, em estudo recente de prospecção fitoquímica em *A. illustre*, uma espécie que não consta da revisão de Pereira et al. (2007), foram identificados mais dois alcalóides indólicos,  $\beta$ -ioimbina (**13**) e 1,2-desidroaspidospermidina (**14**) (BARBOSA, 2008).

Também foi relatada a presença do alcalóide aspilocarpina (**15**) em extrato da casca do caule de *A. desmanthum* (HENRIQUE et al., 2010) e de três alcalóides – aspidofractinina (**16**), *N*-formilaspidofractinina (**17**) e 15-desmetoxipirifolina (**18**) – em *A. pyriformium* (ARAÚJO JR. et al., 2007). E ainda, uma série de subincanadinas (A – G) (**19** – **25**) foi isolada em extratos de *A. subincanum* (KOBAYASHI et al., 2002; ISHIAMA et al., 2005).

Cinco alcalóides oxindólicos, três plumeranos (subtipo haplophitina) e um tipo aspidospermatano (subtipo tubotaiwina) foram isolados das espécies *A. rigidum* e *A. schultesii*, sendo um destes compostos identificado como um conformero transóide inédito na literatura, o 18-oxo-*O*-metilaspidoalbina (**26**) (REINA et al., 2011).

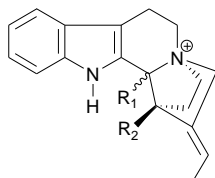
Com estes dados, ficam registrados na literatura 262 alcalóides indólicos diferentes, até o ano de 2011.



16  $R_1 = R_2 = H$

17  $R_1 = CHO; R_2 = H$

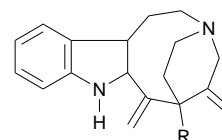
18  $R_1 = COMe; R_2 = OMe$



19  $R_1 = 16\beta Me; R_2 = OH$

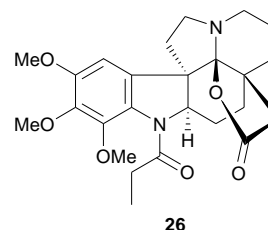
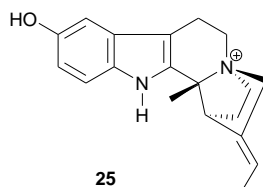
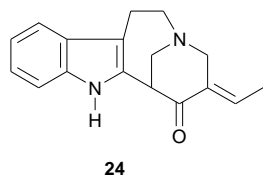
20  $R_1 = 16\alpha Me; R_2 = OH$

21  $R_1 = 16\beta Me; R_2 = H$



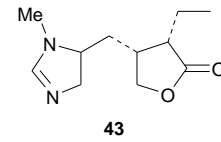
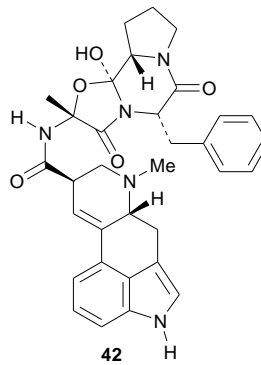
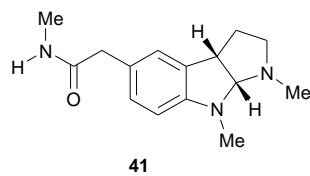
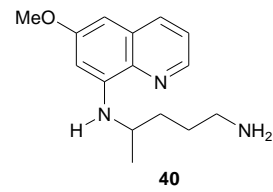
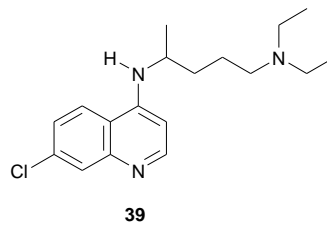
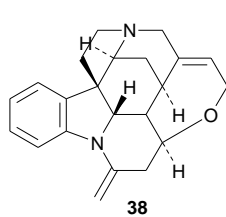
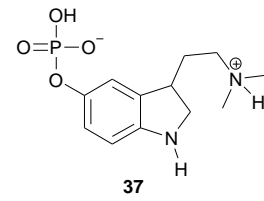
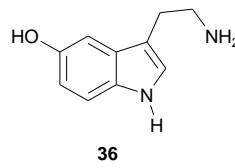
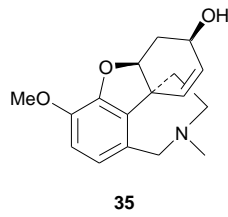
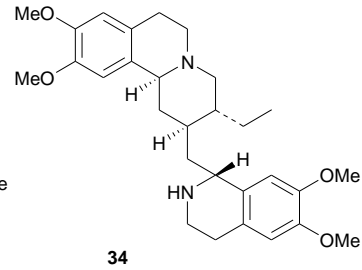
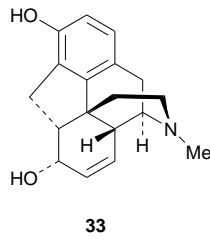
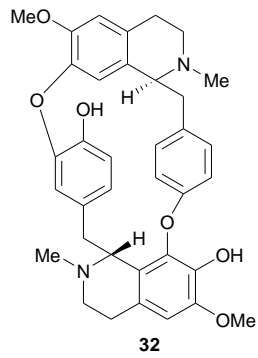
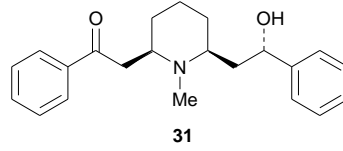
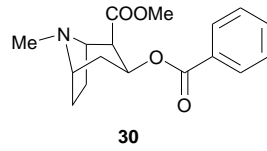
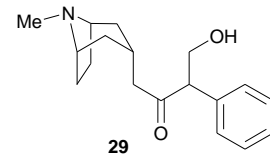
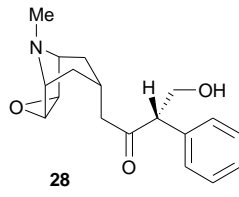
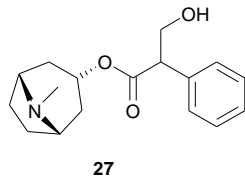
22  $R = OH$

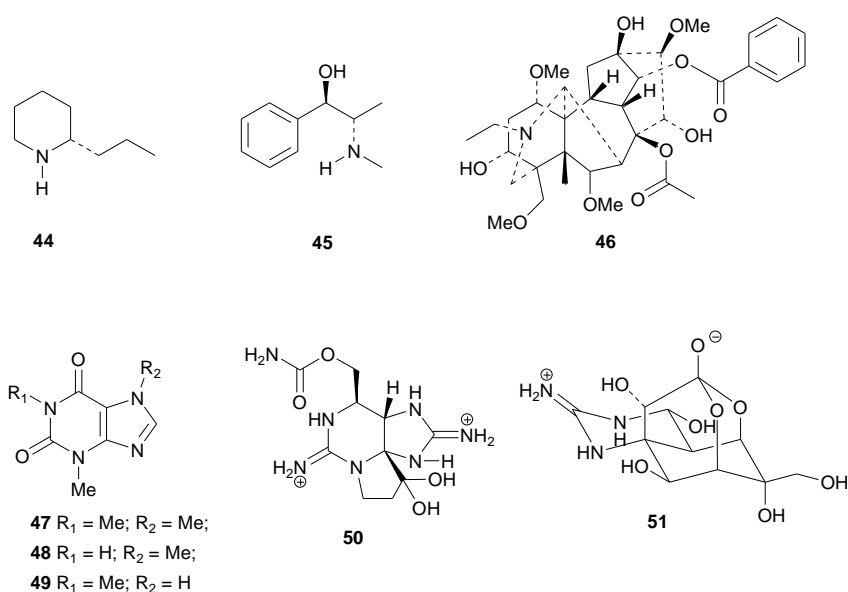
23  $R = H$



### 3.2.2 Atividade biológica

Historicamente tem-se conhecimento de um número muito grande de alcalóides de origem natural, todos apresentando marcantes atividades biológicas. Além das anteriormente citadas vimblastina (1) e vincristina (2), ajmalicina (3), reserpina (4) e deserpidina (5), ibogaína (6), elipticina (7) e camptotecina (8), podem ser citadas a hiosciamina (27), hioscina (28) e atropina (29), cocaína (30), lobelina (31), tubocurarina (32), morfina (33), emetina (34), galantamina (35), serotonina (36), psilocibina (37), stricnina (38), cloroquina (39) e primaquina (40), fisostigmina (41), ergotamina (42), pilocarpina (43), coniína (44), efedrina (45), aconitina (46), cafeína (47), teobromina (48) e teofilina (49), saxitoxina (50) e tetrodotoxina (51), além de outros tantos derivados sintéticos (DEWICK, 2002).



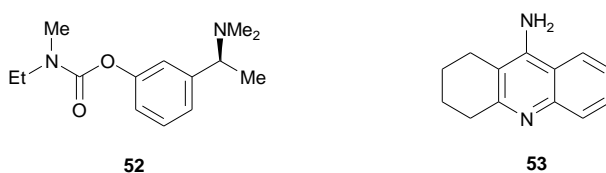


No gênero *Aspidosperma* são conhecidas diversas espécies com comprovada atividade farmacológica. Alcalóides extraídos de *A. ramiflorum* têm demonstrado atividade contra *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis*, além de atividade contra cepas de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) (FERREIRA et al., 2004; TANAKA, et al., 2006).

Alcalóides isolados de *A. ulei* e *A. quebracho-blanco* têm demonstrado utilidade no tratamento da disfunção erétil (CAMPOS et al., 2006; CAMPOS et al., 2008). Esta última também é empregada como febrífugo e no tratamento de distúrbios respiratórios. *A. subicanum* tem sido utilizado popularmente no tratamento de hipercolesterolemias e *Diabetes mellitus*, tendo demonstrado toxidez muito baixa *in vivo* (SOUZA et al., 2005; GOLONI et al., 2005).

Atualmente diversos alcalóides têm sido testados quanto à sua atividade anticolinesterásica. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) tem sido utilizada como estratégia no tratamento sintomático de doenças neurológicas degenerativas, como Parkinson, Alzheimer, demência senil, ataxia e miastenia gravis. Essas doenças têm em comum a hipótese sobre sua origem, a diminuição da transmissão colinérgica em nível sináptico (SIQUEIRA, et al., 2003; MUKHERJEE, et al., 2007).

Os dois fármacos mais utilizados atualmente na clínica médica, rivastigmina (**52**) e tacrina (**53**), são derivados de alcalóides. Porém, a baixa biodisponibilidade e efeitos colaterais colinérgicos periféricos da primeira e a hepatotoxicidade da segunda, impelem as pesquisas no sentido de identificar um inibidor de AChE potente, de longa ação e com menores efeitos colaterais (SIQUEIRA, et al., 2003).



As espécies *A. pyrifolium*, *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum*, *A. polineurom*, *A. macrocarpom*, *A. quebracho-blanco* e *A. megalocarpon* têm sido utilizadas no tratamento de malária, em diversas comunidades da Amazônia e Cerrado brasileiros, Bolívia e Colômbia (BRANDÃO, et al., 1992; WENIGER et al., 2001; MITAINE-OFFER et al., 2002; BOURDY, et al., 2004; MESQUITA, et al., 2007). Outros estudos incluem ainda *A. desmanthum* e *A. auriculatum* (OLIVEIRA, A. et al., 2009).

Muitas das atividades farmacológicas descritas são resultantes da interação dos alcalóides indólicos com receptores/sistemas opióides, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos e GABAérgicos (PEREIRA et al., 2007).

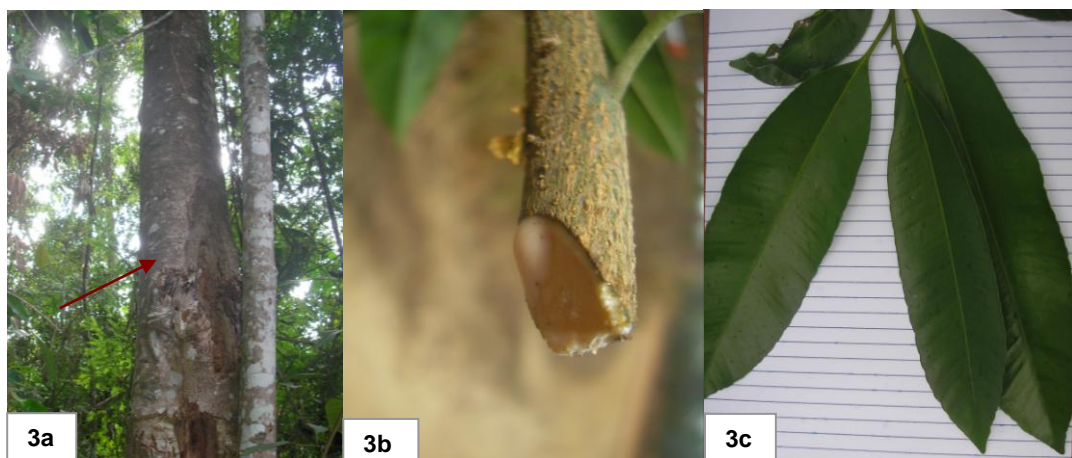
### 3.2.3 *A. desmanthum*

Conhecida popularmente como peroba, araracanga, araraíba, araraúba-da-terra-firme, jacamin, pau-de-arara, pequiá, piquiá, pequiá-marfim, pequiá-marfim-do-roxo, pequiá-verdadeiro, paratudo-branco (BANCO DE DADOS DE MADEIRAS BRASILEIRAS, 2010).

Espécie arbórea de médio porte, que pode atingir até 25 metros de altura e dotada de copa arredondada. O tronco é retilíneo e com mais de 70 cm de diâmetro, revestido por uma espessa camada de cortiça (**Figura 3a**) e exsudando látex bege (**Figura 3b**).

As folhas são rígidas, coriáceas, glabras, pecioladas. Lâmina elíptica ou oblongo-elíptica, de ápice agudo ou curto-acuminado e base aguda; face adaxial verde brilhante, face abaxial opaca com revestimento cerífero branco (**Figura 3c**). As flores são amareladas.

O fruto é deiscente, orbicular, oblíquo, ligeiramente acuminado, contendo de 8 a 10 sementes aladas (**Figuras 4a e 4b**) (CONHECENDO A MADEIRA, 2008).



**Figura 3.** *Aspidosperma desmanthum*. a) tronco; b) látex; c) folhas.



Sua madeira, de boa resistência mecânica e durabilidade, é muito empregada na construção civil, como caibros, vigas e esteios (CONHECENDO A MADEIRA, 2008).

Não há dados disponíveis na literatura sobre a utilização de alcalóides isolados de *A. desmanthum* na clínica médica, mas testes de atividade antiplasmodial realizados com aspidocarpina isolada desta espécie mostraram atividade promissora como protótipo de drogas com atividade contra cepas de *Plasmodium falciparum* multirresistentes (ANDRADE-NETO et al., 2007).



**Figura 4.** *Aspidosperma desmanthum*. a) frutos; b) sementes.

### 3.2.4 *A. cylindrocarpon*

Conhecida popularmente como Guatambu, pereiro, peroba, peroba-de-lagoa-santa, peroba-de-minas, peroba-iquira, peroba-rosa, peroba-osso, peroba-poca (BANCO DE DADOS DE MADEIRAS BRASILEIRAS, 2010).

Floresce nos meses de agosto a outubro e frutifica em julho a outubro. As sementes são aladas, apresentando dispersão anemocórica, ou seja, pela ação do vento.

De porte arbóreo, pode atingir de 8 a 18 m de altura, com 40 a 70 cm de DAP (diâmetro à altura do peito), sendo que seu tronco é cilíndrico, reto, cujo fuste (parte reta entre a raiz e a copa) pode chegar até 10 m de altura. A casca é pardacenta, muito grossa, rígida, rugosa, profundamente sulcada, com cristas mais ou menos planas, com ritidoma amarelo-rosa por dentro (SALOMÃO e SILVA, 2006) (**Figura 5a**).

As folhas são simples elípticas ou ovaladas, glabras, superfície brilhante, face interior mais clara e opaca, com nervação laxa e pecíolo longo, laticífera (**Figura 5b**). As flores são hermafroditas, branca-amareladas, pequenas ( $\pm 1$  cm), dispostas em inflorescência terminal.

O fruto é subcilíndrico, castanho-escuro, lenhoso, densamente salpicado por lenticelas e ferrugíneo, 8 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. As sementes são elípticas a oblongas, com o

núcleo seminífero basal de coloração amarela e ala unilateral bege clara, 4 cm x 8 mm. A germinação das sementes se inicia aos cinco dias após o semeio, não requerendo tratamento pré-germinativo (SALOMÃO e SILVA, 2006).

A madeira apresenta coloração castanha-avermelhada, dura, superfície lisa, com pouco brilho, resistente ao ataque de fungos e com durabilidade mediana, sendo a mesma utilizada para construção civil, naval e rural (SALOMÃO e SILVA, 2006).

Na medicina popular tem sido utilizada no tratamento de dores e úlcera, sendo que um dos metabólicos secundários encontrados nas folhas e no caule são os alcalóides indólicos, os quais atuam como antifúngico e no reparo de DNA de levedura, sugerindo atividade antitumoral (SALOMÃO e SILVA, 2006). Além disso, é uma espécie melífera, ornamental, paisagística e indicada para a recuperação de áreas degradadas.

Essa espécie tem sido intensivamente investigada desde a década de 1960, quando diversos alcalóides indólicos monoterpênicos foram isolados (MILBORROW e DJERASSI, 1969). Muitos deles também foram obtidos através de experimentos de síntese orgânica (SAXTON, SMITH e LAWTON, 1976; LAWTON, SAXTON & SMITH, 1977; BRENNAN e SAXTON, 1986; GEBREYESUS e DJERASSI, 1972).



Figura 5. *Aspidosperma cylindrocarpon* a) caule; b) folhas.

Diversas técnicas cromatográficas foram utilizadas no isolamento das substâncias, a partir dos extratos brutos das espécies acima descritas. Além da tradicional cromatografia em camada delgada (CCD), em escalas analítica e preparativa, e da cromatografia em coluna à pressão atmosférica, também foi utilizada a Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência. Essa técnica mostrou-se

bastante eficiente na separação de substâncias com polaridade elevada, possibilitando o isolamento de diversos alcalóides.

### 3.3 CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia em contracorrente de Alta Eficiência é uma técnica de separação que usa um sistema bifásico líquido, sendo um deles a fase móvel e o outro a fase estacionária. Essa técnica emprega um suporte líquido e, por esse motivo, permite recuperação de 100% da amostra, além de um consumo mínimo de solvente e um tempo reduzido de análise (SILVA et al., 2009).

Os componentes da amostra são separados de acordo com seus coeficientes de distribuição relativos às duas fases imiscíveis do sistema de solventes (RODRIGUES et al., 2009).

Diversos sistemas de solventes são descritos na literatura, mas o popular sistema Arizona tem se mostrado altamente eficiente na separação dos componentes de amostras com polaridade elevada, como é o caso dos alcalóides (MA et al., 2004; BERTHOD, HASSOUN e RUIZ-ANGEL, 2005).

O sistema Arizona consiste de uma ampla variação (A-Z, da) de um sistema bifásico formado por heptano/acetato de etila/metanol/água. Essas associações se mostraram bastante úteis, entretanto, diversos autores frequentemente substituem o heptano por hexano. Esse sistema quaternário tem se mostrado extremamente conveniente quando se deseja desenvolver uma estratégia para encontrar um sistema que seja útil para o isolamento de uma ampla gama de produtos naturais (BERTHOD, HASSOUN, RUIZ-ANGEL, 2005). Estudos anteriores mostraram a eficiência desse método para o isolamento de alcalóides de polaridade elevada, a partir do extrato metanólico de raízes (GONÇALVES et al., 2011).

#### 3.3.1 Isolamento de alcalóides por CCC de alta eficiência

A evolução nas técnicas de cromatografia em contracorrente, associada aos modernos aparelhos desenvolvidos para esse propósito, tornam inegável aplicabilidade desta técnica para fracionamento e purificação de produtos naturais. Segundo Fang et al. (2011), até então 94 alcalóides de 9 diferentes classes haviam sido isolados através dessa técnica, a partir de mais de 30 espécies,

incluindo vegetais e organismos marinhos (esponjas). Para tal, foram utilizados 13 diferentes sistemas de solventes, indicando a versatilidade dessa técnica.

A aplicação da CCC de alta eficiência associada à formação de zonas de pH aumentou o sucesso no isolamento de alcalóides. Uma vez que se vale da propriedade de ionização dos grupos amino presentes nos alcalóides em diferentes faixas de pH, os quais são eluídos de acordo com seus valores de  $pK_a$  e hidrofobicidade (MA et al., 1994). Através desse método, até o ano de 2011, 34 alcalóides haviam sido isolados a partir de 12 espécies vegetais, principalmente aqueles contendo aminas terciárias e secundárias (FANG et al., 2011).

Após o isolamento das diversas substâncias, segue-se a identificação das mesmas, através da utilização de diversas técnicas espectrométricas. Dentre as técnicas utilizadas para esse fim, encontram-se a Espectrometria no Infravermelho (IV), no Ultravioleta (UV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio (RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ ), com destaque especial para esta última.

Como ferramenta importante para a determinação da configuração absoluta das moléculas, sobretudo dos alcalóides, foi empregada uma técnica já consagrada e utilizada há bastante tempo, inclusive em diversos estudos envolvendo Produtos Naturais: o Dicroísmo Circular.

### 3.4 DICROÍSMO CIRCULAR

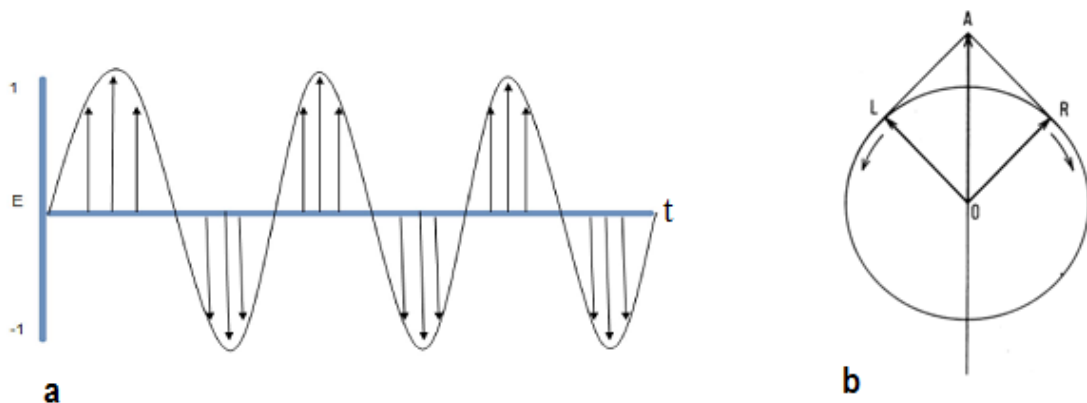
#### 3.4.1 Atividade Óptica

A polarização é um fenômeno que se observa quando um feixe de luz, ao passar através de um prisma, é “filtrado”, passando a se propagar em apenas um plano vibracional. A luz assim transmitida é chamada polarizada (ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

Quando um meio é capaz de desviar o plano da luz polarizada, dizemos que ele possui atividade óptica. Esse meio pode ser um cristal ou, mais especificamente, uma substância orgânica, seja em estado sólido, líquido, gasoso, ou em solução. Sendo assim, é originada como resultado da estrutura molecular de um composto, cujas moléculas contenham um ou vários átomos de carbono assimétricos (CRABBÉ, 1974).

Assim, segundo a teoria mecânico-quântica, para que um composto apresente atividade óptica, ele deve satisfazer algumas condições estereoquímicas, que permitam estados de transições eletrônicas paralelas e antiparalelas (CRABBÉ, 1974).

A luz plano-polarizada está associada a um campo elétrico  $E$  em função do tempo, que vibra perpendicularmente ao eixo de propagação do feixe luminoso (**Figura 6a**). Por outro lado, o vetor campo elétrico  $E$  pode ser considerado como uma resultante de dois vetores circularmente polarizados, de mesma intensidade, girando em sentidos opostos (direita e esquerda). Assim, luz é considerada, então circularmente polarizada (**Figura 6b**) (CREWS, MARCEL e JASPARIS, 1998).



**Figura 6.** Representação da luz polarizada: **a**) com o componente campo elétrico ( $E$ ) em função do tempo ( $t$ ); **b**) componentes circularmente polarizados, à direita (R) e à esquerda (L), de mesma amplitude. Fonte: (adaptado de MONTE, 2012 e BEYCHOK, 1966).

Se, por outro lado, as ondas associadas à esquerda e à direita se deslocam com intensidades diferentes, o plano de polarização do vetor  $E$  sofre uma rotação. Assim, um meio que seja opticamente ativo, terá índices de refração diferentes para a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, ou seja, será circularmente birrefringente (ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

Portanto, se os índices de refração em um meio opticamente ativo são diferentes para uma fase luminosa monocromática circular direita e esquerda, os componentes do campo elétrico terão velocidades diferentes após passar por esse meio, e a diferença observada se traduz como a rotação de um ângulo  $\alpha$  do plano de polarização (CRABBÉ, 1974).

### 3.4.2 Dispersão Rotatória Óptica (DRO)

A variação da atividade óptica em função do comprimento de onda é representada por uma curva de dispersão rotatória. Para uma substância que possui um ou vários cromóforos, ou seja,

compostos que absorvem a luz na região do comprimento de onda estudado, as curvas de DRO são descontínuas, anômalas e apresentam máximos ou mínimos na região do espectro que coincide com a região de absorção dos cromóforos. Se a substância possui um cromóforo ativo que absorve entre 170 e 700 nm, a curva de DRO apresentará um pico ou um vale e esse fenômeno é chamado Efeito Cotton (CREWS, MARCEL e JASPARIS, 1998; ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001). De uma forma geral, o comprimento de onda  $\lambda_0$  onde a curva inverte o seu sinal, corresponde ao comprimento de onda da banda de absorção no ultravioleta (BEYCHOK, 1966).

Assim, o poder rotatório está associado com a presença dos cromóforos, os quais pertencem naturalmente a duas classes, com base nas considerações de simetria:

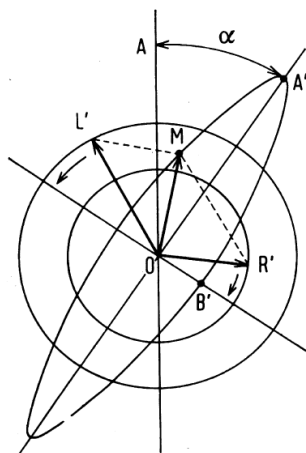
1. cromóforos que são inerentemente aquirais por simetria, como os grupos carbonila e carboxila, os alcenos e o grupo sulfóxido. Moléculas quirais contendo cromóforos inerentemente simétricos exibem efeito Cotton em função de “perturbações quirais” que se originam no cromóforo durante a excitação eletrônica, devido a substituintes vizinhos ao cromóforo ou pelo próprio esqueleto da molécula. Esses tipos de transições tendem a ser fracas, com baixa força rotacional.

2. cromóforos que são inerentemente quirais: inclui compostos em que a molécula como um todo age como um cromóforo único. As transições desses cromóforos podem ser deduzidas com base em considerações teóricas de simetria e grupos, e tendem a serem mais fortes, com alta força rotacional e forte efeito Cotton (CRABBÉ, 1974; ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

### 3.4.3 Dicroísmo Circular (DC)

Ao passo que o efeito da dispersão de um cromóforo opticamente ativo se deve à diferença de velocidade entre os raios de luz circularmente polarizados, pode-se dizer que o dicroísmo circular é decorrente da diferença de **absorção** entre os feixes polarizados à direita e à esquerda (CRABBÉ, 1974).

Uma consequência imediata desta diferença de absorção, é que os vetores  $E$  à esquerda e à direita não têm o mesmo comprimento. Assim, o vetor resultante  $E$  descreve uma elipse ao invés de uma circunferência (**Figura 7**). Então, quando substâncias opticamente ativas são atravessadas por uma luz polarizada em sua zona de absorção, esta luz adquire um movimento elíptico. A onda luminosa resultante está elipticamente polarizada e se diz que o composto apresenta dicroísmo circular (BEYCHOK, 1966).



**Figura 7.** Luz elípticamente polarizada, resultante da absorção distinta dos componentes da luz circularmente polarizada (Fonte: BEYCHOK, 1966).

A rotação  $\alpha$  mede o desvio entre o plano da luz incidente, linearmente polarizada, e o eixo da luz emergente, elípticamente polarizada. A relação entre o eixo menor e maior da elipse é a tangente do ângulo elíptico  $\psi$  (CREWS e MARCEL JASPARIS, 1998).

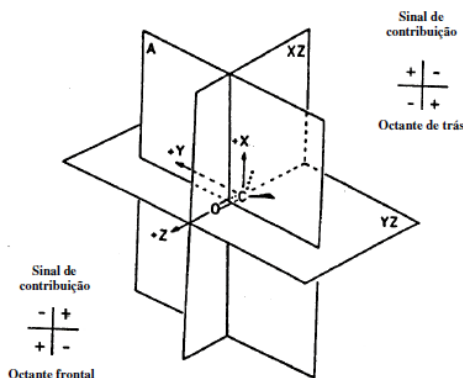
Existem cerca de 150 grupos funcionais e derivados cromofóricos encontrados em química orgânica e que podem ser facilmente investigados por DRO e DC, uma vez que esses grupos funcionais originam o efeito Cotton (CRABBÉ, 1974).

A primeira tentativa significativa de correlacionar a estrutura tridimensional de uma molécula quiral com suas propriedades ópticas foi através da **regra do octante** para carbonilas. Atualmente, como extensões da regra do octante original, foram propostas novas regras, como a regra de setor e regra de quadrantes, para a correlação entre estereoquímica e atividade óptica (CRABBÉ, 1974).

#### 3.4.4 Regra de setor e quiralidade

Regras semiempíricas correlacionando estereoquímica absoluta com propriedades quirópticas, particularmente CD e efeito Cotton incluem regras de setor e regras de quiralidade (helicidade), sendo que apenas esta última é aplicável a cromóforos inerentemente quirais (ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

A regra de setor consiste na divisão tridimensional do espaço ao redor de cromóforos simétricos, em setores por planos nodais ou de simetria, bem como em superfícies nodais (**Figura 8**). Essa regra permite acessar a contribuição dos grupos que perturbam o sinal do efeito Cotton, de acordo com sua localização em um ou outro setor em torno do cromóforo (CREWS, MARCEL e JASPARIS, 1998).



**Figura 8.** Regra do octante para a carbonila e os sinais de contribuição em cada face do octante (Fonte: ARAÚJO, 2011).

A aplicação da regra permite a determinação da configuração, por exemplo, por correlação dos sinais do efeito Cotton com os de substâncias análogas cujas configurações estejam estabelecidas, desde que a constituição e conformação já estejam definidas; permite também a determinação da estrutura, por localização de certos substituintes. Além disso, também possibilita a demonstração da mobilidade conformacional como uma função da polaridade de solventes (ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

Para explicar a regra do octante, utiliza-se a carbonila como exemplo de cromóforo, principalmente devido à sua ampla distribuição no domínio da química orgânica. A fim de prever o sinal do efeito Cotton, o grupo carbonila deve ser visualizado ao longo da dupla ligação, com o carbono da carbonila localizado na cabeça da cadeia (**Figura 8**) (CRABBÉ, 1974). Um conjunto de coordenadas cartesianas é traçado em torno da carbonila, com a origem no ponto médio da ligação C=O e com o eixo z colinear com essa ligação. A carbonila é *bis* seccionada pelos planos x,z e y,z, que são planos nodais e de simetria dos orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica (CREWS, MARCEL e JASPARIS, 1998; ELIEL, WILEN e DOYLE, 2001).

Assim, substituintes no quadrante posterior inferior direito e posterior superior esquerdo contribuem positivamente para o efeito Cotton; substituintes nos quadrantes posterior inferior esquerdo e posterior superior direito contribuem negativamente; nos quadrantes anteriores a contribuição é o inverso e os substituintes que se encontram em qualquer dos planos que dividem os octantes não dão nenhuma contribuição (CREWS, MARCEL e JASPARIS, 1998).

Em sistemas aromáticos, a aplicação da regra do quadrante leva em conta a simetria do sistema rígido e plano sob interferência de um centro quiral. Projeta-se o anel aromático no eixo z, verificando-se a localização dos grupos nos quadrantes e sua contribuição para o efeito Cotton (**Figura 9**). Os quadrantes superior esquerdo e inferior direito oferecem contribuição positiva, enquanto que o superior direito e o inferior esquerdo contribuem negativamente para o efeito Cotton (ARAÚJO, 2011).



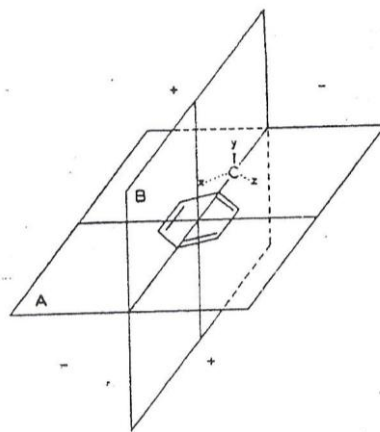


Figura 9. Regra do quadrante para cromóforos aromáticos (Fonte: CRABBÉ, 1974).

### 3.4.5 Dicroísmo Circular de Alcalóides Indólicos

Estudos de Dicroísmo Circular Magnético (DCM) em proteínas mostraram que o cromóforo indólico do triptofano apresenta um padrão de banda muito característico, na região de comprimento de onda de 250-300 nm, o qual pode ser usado para determinação inequívoca desse aminoácido em proteínas intactas (BARTH et al., 1972). Uma vez que esse cromóforo ocorre em uma grande variedade de produtos naturais, como os alcalóides indólicos, esse método espectroscópico tem se mostrado muito útil na identificação e determinação estrutural dessa classe de compostos, sobretudo na definição da configuração absoluta da molécula (NUGROHO e MORITA, 2012).

O espectro de dicroísmo circular magnético (DCM) de diversos alcalóides mostra dois termos de sinais opostos na região de absorção de 250-330 nm, mais especificamente em torno de 225 e 280. Esses valores estão associados às transições eletrônicas  ${}^1L_b$  e  ${}^1L_a$ , sendo  ${}^1L_b$  o comprimento de onda maior e  ${}^1L_a$  o comprimento de onda menor, o primeiro de sinal negativo e o segundo, positivo (BARTH et al., 1972).

A presença de substituintes em diferentes posições do anel indólico causa deslocamento batocrômico das duas bandas ( ${}^1L_b$  e  ${}^1L_a$ ) e alargamento da banda em comprimento de onda mais longo, sem alterar a sequência dos sinais. Substituintes que sejam capazes de interagir diretamente com o sistema de elétrons  $\pi$  do cromóforo indólico, grupos substituintes em *N* ou grupos vinílicos na posição C-2 do anel indólico, por exemplo, são os que causam efeitos mais significativos (BARTH et al., 1972).

Em contraste, a hidrogenação da dupla ligação entre C-2 e C-3 causa **inversão do sinal** dos termos do espectro de DCM, associados às transições em comprimentos de onda maiores (BARTH et al., 1972). Assim, para alcalóides indólicos de esqueleto do tipo Aspidospermatano, onde se inclui o

esqueleto plumerano, o Efeito Cotton apresentará sinal positivo para o comprimento de onda menor e negativo para o maior.

Entretanto, de acordo com a interpretação geral das bandas de DC, os sinais dos efeitos Cotton de derivados indólicos quirais, que não apresentam o anel E dos esqueletos Vincanos (por ex., Aspidospermatanos e Yohimbanos), são determinados principalmente pela helicidade do anel C (TÓTH et al., 1980).

Na correlação entre configuração absoluta e dispersão rotatória óptica, para alcalóides com esqueleto Aspidospermatano, do tipo plumerano *N*-acil substituído, os sinais de efeito Cotton em regiões de comprimento de onda acima de 290 nm são afetados pela substituição no anel indólico, mas os sinais na região de 230-270 nm não. Assim, essa região pode ser útil para a determinação da configuração absoluta. Quando a molécula apresentar efeito Cotton negativo seguido por um positivo, a configuração em torno de C-7 será **R**, ao passo que, se as curvas forem contrárias, a configuração de C-7 será **S** (NUGROHO e MORITA, 2012). Esse fenômeno pode ser observado no espectro de DC da molécula de cilindrocarpina, a qual apresenta um anel indólico *N*-cinamoila substituído. O espectro apresenta duas curvas de efeito Cotton com sinais positivo e negativo respectivamente, na região de 275 nm, demonstrando a configuração absoluta **7S** (BARTH et al., 1972).

### 3.5 LIGAÇÃO À ALBUMINA SÉRICA BOVINA

#### 3.5.1 Albumina Sérica Humana (ASH) e Bovina (ASB)

A albumina é uma proteína solúvel, de aproximadamente 69.000 Daltons, sintetizada primariamente no fígado e que apresenta diversas características que a tornam uma molécula única. Ela consiste de uma única cadeia peptídica, apresentando uma homologia de 76% entre a albumina sérica humana (ASH) e a bovina (ASB), as quais são formadas por 585 e 582 unidades de aminoácidos, respectivamente (KRAGH-HANSEN, 1990; HUANG, KIM e DASS, 2004). Um grande número desses aminoácidos apresenta resíduos carregados, resultando em uma molécula carregada negativamente em pH fisiológico (THROOP, KERL e COHN, 2004; RIBEIRO, 2010).

A albumina se distribui em dois compartimentos corporais: 40% no espaço intravascular (albumina sérica), constituindo 60% do total de proteínas do plasma e os outros 60% encontram-se no espaço extra-vascular.

Dentre as diversas funções desta proteína, estão a manutenção da pressão oncótica e a ligação a uma enorme variedade de moléculas. Além disso, fornece um “pool” de aminoácidos para a síntese protéica, tampona os fluidos extra-vasculares, auxilia na prevenção da formação de trombos e ajuda a manter a permeabilidade microvascular (THROOP, KERL e COHN, 2004).

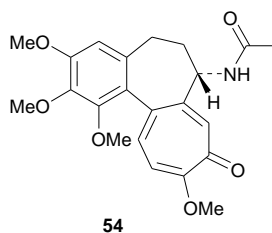
A albumina se liga reversivelmente a uma ampla gama de substâncias endógenas e exógenas, desempenhando um importante papel no transporte de substâncias até os sítios de ação, metabolismo ou excreção. Essa capacidade de ligação implica à albumina também um importante papel de reservatório, o qual é particularmente pronunciado quando se trata de substâncias hidrofóbicas (DOWEIKO e NOMPLEGGI, 1991).

Estudos sobre a ligação de drogas às proteínas plasmáticas são importantes para as ciências biológicas, biomédicas e farmacêuticas, bem como para a descoberta de novos fármacos, uma vez que as interações da droga com a albumina estão diretamente relacionadas à biodisponibilidade e o tempo de meia-vida das substâncias. Assim, esses estudos são de vital importância para se compreender a farmacodinâmica e farmacocinética, tanto de substâncias já consagradas como de potenciais candidatos a fármacos (KHAN, HOSSAIN e KUMAR, 2013).

### 3.5.2 Interação entre as albuminas e alcalóides

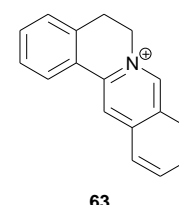
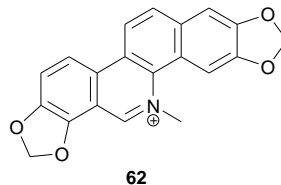
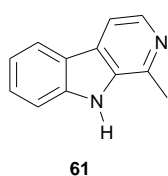
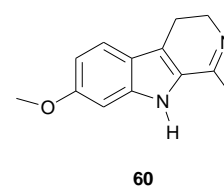
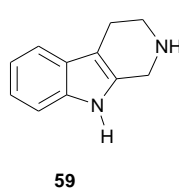
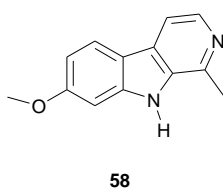
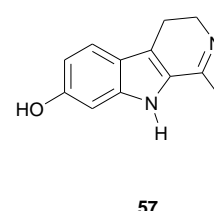
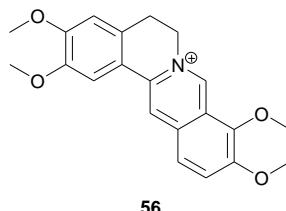
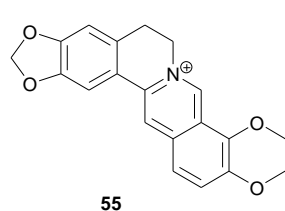
As albuminas humana e bovina apresentam estrutura terciária bastante semelhante. Tanto a ASH quanto a ASB apresentam dois principais domínios homólogos de ligação denominados sítios I (subdomínio IIA) e II (subdomínio IIIA) de Sudlow, onde se ligam preferencialmente compostos aromáticos e heterocíclicos (RIBEIRO, 2010; KHAN, HOSSAIN e KUMAR, 2013).

Segundo Ribeiro (2010), até o ano de 2009 mais de 49 substâncias já haviam sido testadas com relação à interação com ASH, dentre elas cumarinas, glucoronidas, antibióticos, anti-inflamatórios, isoflavonas, porfirinas, psoralenos, flavonóis e diversas outras. Por ser mais barata que a albumina humana, a ASB tem sido utilizada com frequência em estudos de interação com fármacos, tendo sido arroladas mais de 18 substâncias, dentre elas os alcalóides colchicina (54) e stricnina (38).



Na literatura, existem diversos relatos de estudos recentes da interação entre alcalóides e albuminas séricas. Berberina (**55**) e palmatina (**56**) (KHAN, HOSSAIN e KUMAR, 2013), harmalol (**57**) (HEMMATEENEJAD et al., 2012), os alcalóides  $\beta$ -carbólicos harmina (**58**), tryptolina (**59**), harmalina (**60**), harmano (**61**) e harmalol (**57**) (NAFISI, PANAHYAB e BAGHERI SADEGHI, 2012), alcalóides metilxantínicos (XIE et al., 2011), sanguinarina (**62**) (HOSSAIN, KHAN e KUMAR, 2011), alcalóides protoberberínicos (ZHANG et al., 2011), cafeína (**47**), teobromina (**48**) e teofilina (**49**) (ZHANG et al., 2009), camptotecina (**8**) (THAKUR, KUNADHARAJU e SAVVA, 2009), berbamina (**63**) (CHENG et al., 2009).

Dentre as diversas técnicas utilizadas para verificar a interação entre a albumina sérica e as substâncias testadas, destacam-se a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV), espectroscopia de dicroísmo circular (DC), espectroscopia Raman, ressonância magnética nuclear (RMN), eletroquímica, reflectância total atenuada (infravermelho com transformada de Fourier / ATR-FTIR), modelagem molecular (MM) e fotólise por pulso de laser (RIBEIRO, 2010).

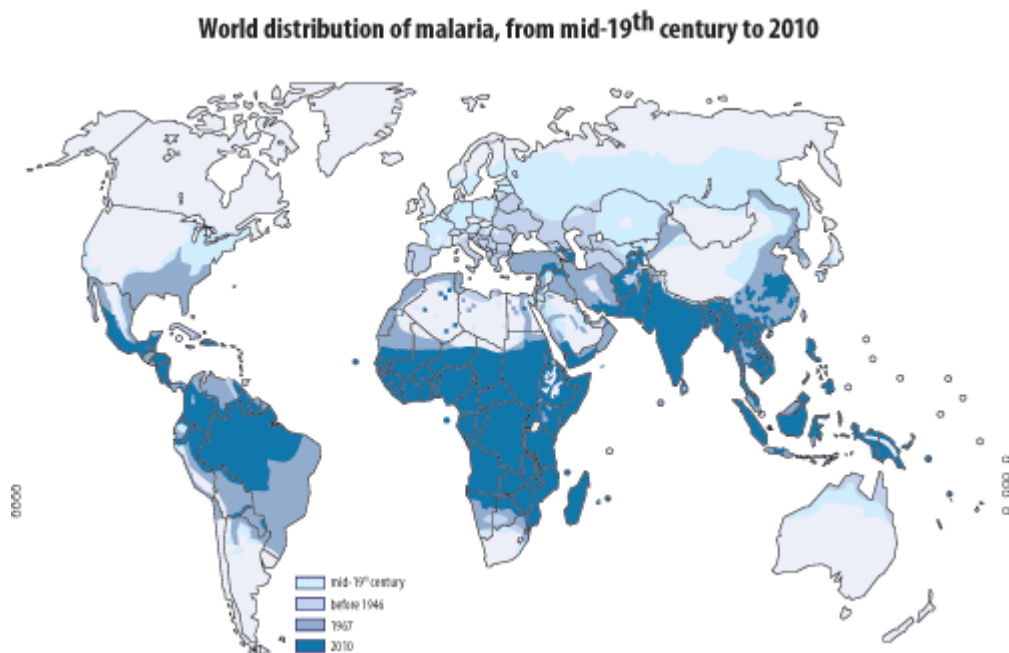


O efeito da transferência de energia nas interações droga-albumina, bem como os efeitos da temperatura tem sido investigados através da combinação dessas técnicas de análise. No presente estudo, foram utilizadas a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorção no UV e espectroscopia de dicroísmo circular.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

#### 3.6.1 A Malária no Mundo e no Brasil

A malária ainda é um dos mais graves problemas de saúde mundial, sendo uma das doenças de maior prevalência. Pelas estimativas da Organização Mundial de Saúde, em 2010 houve uma média de 219 milhões de casos de malária (variando de 154 a 289 milhões), distribuídos por 109 países e territórios, sendo 45 deles em território Africano (**Figura 10**). Nesse mesmo ano foram estimadas 660.000 mortes por malária, variando entre 490.000 e 836.000, principalmente entre crianças africanas (OMS, 2012).



**Figura 10.** Distribuição histórica mundial da malária, desde a metade de século 19 até o ano de 2010.

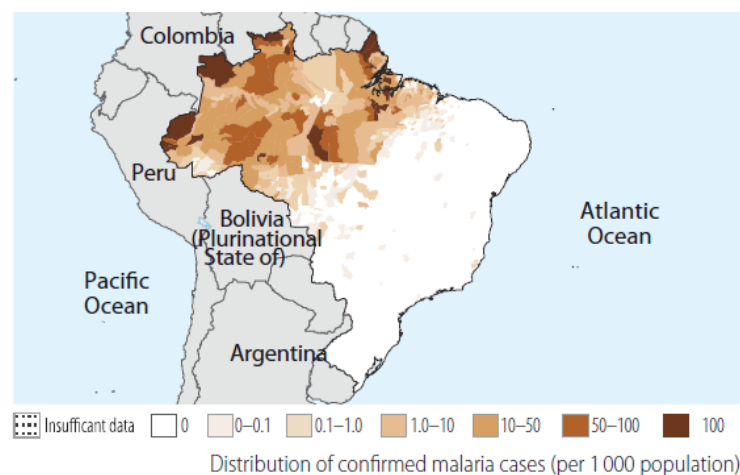
A malária é uma doença infecciosa prevenível e tratável, mas que mata mais de um milhão de pessoas por ano, principalmente na África abaixo do Saara, onde é a maior causa de morte de crianças abaixo de cinco anos de idade (OMS, 2012).

Como a malária é uma doença global que afeta principalmente mulheres e crianças pobres, ela perpetua um ciclo vicioso de pobreza nos países em desenvolvimento, resultando em custos de USD 12 bilhões por ano à economia africana. Atualmente já existem ferramentas disponíveis para prevenção, diagnóstico e tratamento da malária, contudo, estimativas globais indicam a necessidade de USD 4,2 bilhões por ano para abastecer o fundo de luta contra malária (OMS, 2012).

A doença é causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, sendo quatro espécies causadoras da malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Dentre eles, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são os mais comuns no Brasil (13% e 87%, respectivamente), sendo o *P. falciparum* o mais letal. A malária é transmitida através da picada do mosquito *Anopheles*, o qual é o vetor desta doença. No Brasil, as espécies mais comuns do vetor são *Anopheles darlingi*, *A. albicans* e *A. aquasalis* (OMS, 2012).

No Brasil, a transmissão ocorre principalmente na região da Amazônia Legal, onde 20% da população está em situação de risco, segundo o World Malaria Report (OMS, 2012) (**Figura 11**). Dados recentes do Ministério da Saúde apontam para 330.000 casos confirmados da doença no ano de 2010 (Ministério da Saúde, 2012).

Ainda de acordo com o mesmo relatório da OMS, o Brasil está em fase de controle da doença, tendo apresentado uma redução de 50-75% na incidência de casos projetados para 2000-2015.



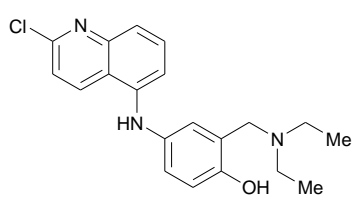
**Figura 11.** Distribuição dos casos confirmados de malária no Brasil, no ano de 2011. (Fonte: World Malaria Report, OMS, 2012).

### 3.6.2 Tratamento da Malária

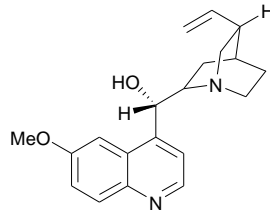
A maioria das substâncias utilizadas atualmente no tratamento da malária pertence às classes das aminoquinolinas, derivados do quimolinometanol, diamonopirimidinas, sulfonamidas, biguanidas, antibióticos, sesquiterpenos e naftoquinonas (**Quadro 1**) (GUÉRIN et al., 2002; OLIVEIRA, A. et al., 2009).

**Quadro 1.** Drogas utilizadas atualmente no tratamento da malária.

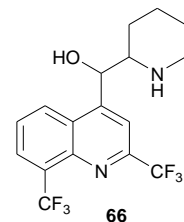
CLASSE	DROGA	ESTRUTURA
Aminoquinolinas	Cloroquina	(38)
	Primaquina	(39)
	Amodiaquina	(64)
Derivados do quimolinometanol	Quinina	(65)
	Mefloquina	(66)
	Halofantrina	(67)
	Pirimetamina	(68)
Diaminopirimidinas		
Sulfonamidas	Sulfadoxina	(69)
	Sulfadiazina	(70)
Biguanidas	Proguanil e seus derivados	(71)
Antibióticos	Tetraciclina	(72)
	Doxiciclina	(73)
	Clindamicina	(74)
Sesquiterpenos	Artemisina	(75)
	Diidroartemisina	(76)
	Artemether	(77)
	Arteether	(78)
	Artesunato	(79)
Naftoquinonas	Atovaquona	(80)



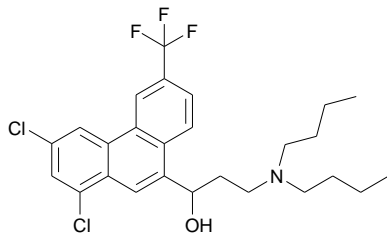
64



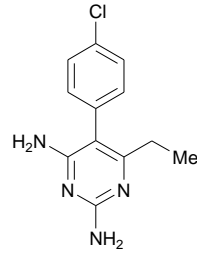
65



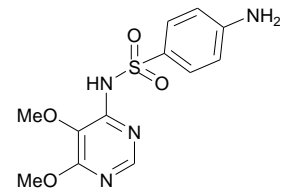
66



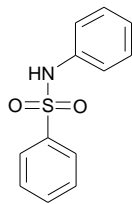
67



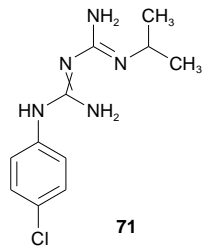
68



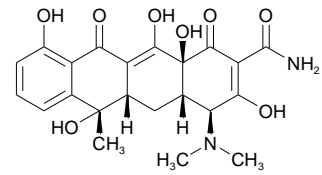
69



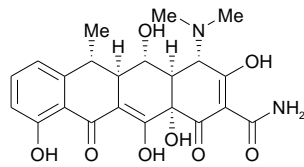
70



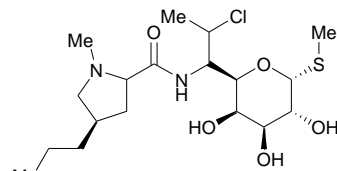
71



72

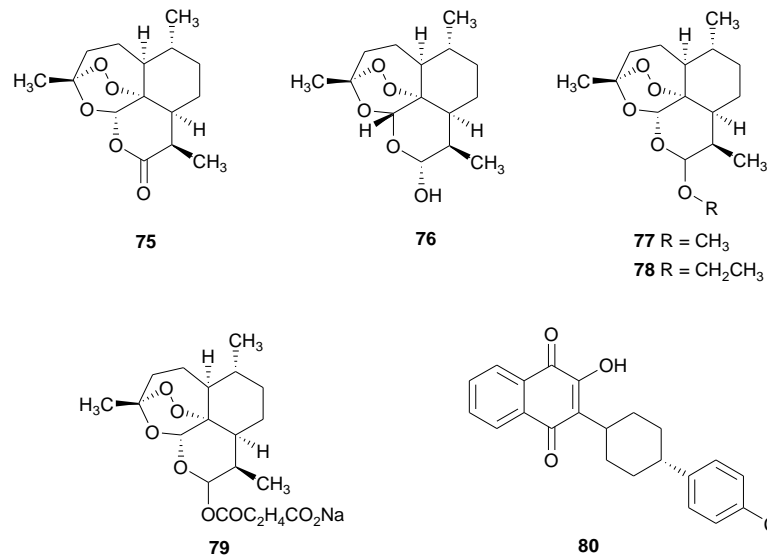


73



74





Os alcalóides estão entre as principais classes de produtos naturais que exibem atividade antimalárica. A primeira droga utilizada para tratamento da malária, a quinina (**65**), é um alcalóide isolado de espécies de *Chinchona*, nativas da América do Sul. De fato, um grande número de alcalóides tem sido testados, principalmente *in vitro*, contra cepas de *P. falciparum*, demonstrando que essa classe de substâncias é bastante promissora no sentido do desenvolvimento de novas drogas com atividade antimalárica (OLIVEIRA A. et al., 2009).

Onze alcalóides indólicos com atividade antiplasmodial foram isolados de espécies de *Aspidosperma*, como *A. pyriformium* e *A. megalocarpon* e testados *in vitro* para atividade antiplasmodial e citotóxica, confirmando a utilização popular de preparados destas espécies vegetais para o tratamento da malária (MITAINE-OFFER et al., 2002).

Os alcalóides elipticina e aspidocarpina foram isolados da casca do caule de *A. vargasii* e *A. desmanthum*, respectivamente, e recentemente testados quanto à atividade antimalárica, tendo demonstrado uma marcante atividade *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* resistentes a múltiplos fármacos (ANDRADE-NETO et al., 2007).

O grande potencial farmacológico dos alcalóides, o grande número de espécies vegetais que produzem esse tipo de metabólito secundário e a utilização popular dessas espécies para o tratamento da malária tornam essa área de pesquisa altamente relevante. Também o surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes a múltiplas drogas e o grande número de novos casos a cada ano em todo mundo, apontam para a necessidade urgente de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESCOLHA DA ESPÉCIE VEGETAL

A planta foi escolhida em concordância com os objetivos propostos pelo grupo de pesquisa de produtos naturais da UENF, no sentido de dar continuidade e consistência a trabalhos anteriormente desenvolvidos com alcalóides indólicos pelo grupo do Setor de Química de Produtos Naturais da UENF.

Embora haja um grande número de alcalóides isolados de espécies de *Aspidosperma* já descritos na literatura, houve uma reclassificação da espécie *A. spruceanum* Müell. Arg. anteriormente estudada fitoquimicamente pelo grupo de pesquisa em Produtos Naturais, passando a ser classificada como *A. desmanthum*, levando à necessidade de uma nova prospecção química a fim de confirmar a caracterização quimiotaxonômica desta espécie. Nesse sentido, uma segunda espécie, *A. cylindrocarpon* foi eleita também como objeto de estudo, a fim de ampliar o conhecimento químico do gênero.

Outro aspecto relevante para a escolha dessas espécies foi a possibilidade da realização de testes de atividade biológica, relacionados à informação popular sobre o uso de espécies do gênero *Aspidosperma* para o tratamento de malária, principalmente a *A. desmanthum*. Ambas também têm pouco ou nenhum estudo relacionado à atividade biológica, seja com extratos brutos ou de suas substâncias isoladas.

A comparação entre os resultados das atividades testadas e a estrutura química das substâncias isoladas pode ser um valioso indicador da relação estrutura-atividade que poderá, em estudos posteriores, contribuir para o desenvolvimento de fármacos antimalariais.

### 4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

As cascas do caule de *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon* foram coletadas em fevereiro de 2010, nas proximidades da Reserva Florestal da Companhia Vale, no município de Linhares – ES. As coordenadas no sistema GPS (Global Positioning System) são, respectivamente, S 19° 36.211'; O 40°

06.170' e S 19° 36.211'; O 39° 57.543'. As exsicatas de cada uma das espécies encontram-se depositadas no herbário da Reserva, codificadas como CVRD-9470 e CVRD-313, respectivamente.

#### 4.3 SECAGEM E MOAGEM

As cascas do caule de *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon* foram secas ao ar livre, a fim de evitar a proliferação de micro-organismos. Posteriormente foram secas em estufa de secagem com circulação de ar a 40° C, e trituradas em moinho de martelos da marca Tecnal.

#### 4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

As cascas trituradas das duas espécies foram submetidas, separadamente, à maceração a frio em metanol (solvente PA – marca Synth), tendo sido realizadas três extrações sucessivas. Os extratos resultantes foram submetidos à evaporação em evaporador rotativo Büchi modelo R-114 sob pressão reduzida, resultando nos extratos com os códigos: MCD (Metanólico Casca Desmanthum) e MCC (Metanólico Casca Cylindrocarpon).

Como estudos anteriores já haviam demonstrado, há a presença de alcalóides em todas as frações obtidas de partições com solventes em ordem crescente de polaridade, e concentrando-se nas frações mais polares do extrato. Ainda que a partição tenha sido realizada, o complexo perfil cromatográfico apresentado e as pequenas massas obtidas não foram suficientes para justificar o particionamento de algumas dessas frações (OLIVEIRA, 2008).

Portanto, no presente trabalho, não foram realizadas partições e/ou extrações ácido/base, tendo sido trabalhados em coluna com gel de sílica à pressão normal, diretamente, os extratos metanólicos brutos.

As massas secas obtidas nos extratos brutos das cascas do caule de *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon* encontram-se descritas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Extratos brutos metanólicos obtidos a partir das cascas do caule dos espécimes vegetais.

Espécie	Peso do material (g)	Peso dos extratos (g)	código do extrato
<i>A. desmanthum</i>	2.625,1	95,35	MCD
<i>A. cylindrocarpon</i>	3.150,0	458,7	MCC

#### 4.5 PROSPECÇÃO PRELIMINAR

O objetivo da prospecção preliminar foi obter uma visão geral das classes de substâncias presentes nos extratos obtidos. Para tal, uma pequena quantidade dos extratos obtidos foi aplicada sobre uma cromatofolha de gel de sílica (60 F<sub>254</sub>) e, após a eluição, as cromatoplasmas foram observadas em luz UV (254 e 365 nm) e reveladas utilizando-se as soluções de Vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, ou o reagente de Dragendorff, específico para visualização de alcalóides (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio) (MERCK, 1972). Puderam ser confirmadas as presenças de esteróides, terpenos e alcalóides, sendo estes últimos os constituintes majoritários de ambos os extratos obtidos.

#### 4.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *A. desmanthum*

Foram utilizadas técnicas de cromatografia em coluna à pressão normal e cromatografia em camada delgada (CCD), em escalas analítica e preparativa.

Para realização das análises cromatográficas em coluna foi utilizado gel de sílica marca Merck (70-230 mesh).

As análises de CCD analítica foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F<sub>254</sub> marca Merck. As substâncias foram visualizadas sob irradiação com lâmpada ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 365 nm, ou por revelação utilizando-se vanilina sulfúrica e aquecimento ou o reagente de Dragendorff.

As frações foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico e sucessivamente retrabalhadas, até que o isolamento de alguma substância fosse bem sucedido. As frações descritas como misturas complexas, com perfis semelhantes a outras, com massa insuficiente ou com impurezas não foram trabalhadas. As substâncias foram apresentadas e numeradas na sequência em que foram obtidas.

Inicialmente, 28,645 g do extrato bruto metanólico das cascas do caule de *A. desmanthum* foi submetido à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. O solvente utilizado para empacotamento da coluna foi diclorometano (100%), criando-se um gradiente de polaridade com metanol puro. Foram coletadas 17 frações, as quais foram posteriormente reunidas em 5 novas frações através de comparação por CCD analítica. O estudo cromatográfico das frações encontra-se detalhado

na **Tabela 2**. As frações consideradas como misturas complexas não foram trabalhadas por mostrarem baixa resolução nos sistemas de solventes testados. As frações contendo alcalóides foram trabalhadas.

**Tabela 2.** Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas do caule de *Aspidosperma desmanthum*.

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	MCD 1	289,5	Mistura complexa de esteróides
7-9	MCD 2	1.163,5	Fração contendo alcalóides
10-12	MCD 3	901,1	Fração contendo alcalóides
13	MCD 4	803,6	Mistura complexa
14-17	MCD 5	1.922,6	Fração contendo alcalóides
Total		5.080,3	

#### Análise da fração MCD2 (1.163,5 mg)

A fração MCD2 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Inicialmente utilizou-se como eluente diclorometano, com um gradiente de polaridade até metanol puro, tendo sido coletadas 25 frações. Posteriormente, essas frações foram comparadas através de CCD analítica e reunidas por similaridade, resultando em 8 novas frações. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 3**. As misturas complexas não foram trabalhadas devido à baixa resolução nos sistemas de solventes testados. As frações contendo alcalóides foram trabalhadas.

**Tabela 3.** Estudo cromatográfico da fração MCD2.

Frações Reunidas	Códigos	Massas (mg)	Observação
1-4	MCD 2.1	34,0	Mistura complexa de esteróides
5-10	MCD 2.2	27,8	Mistura complexa de esteróides
11-17	MCD 2.3	55,8	<b>Lupeol (81)</b>
18	MCD 2.4	35,3	Mistura complexa
19-20	MCD 2.5	10,2	Mistura complexa
22-23	MCD 2.6	86,0	Mistura complexa
21	MCD 2.7	27,2	Fração contendo alcalóides
24-25	MCD 2.8	722,3	Fração de elevada polaridade
Total		998,6	

#### Análise da fração MCD 2.8 (722,3 mg)

A fração MCD 2.8 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando inicialmente como eluente o diclorometano, com gradiente de polaridade até 100% de metanol. Foram coletadas 45 frações, as quais, através de comparação por CCD analítica foram reunidas novamente em 6 frações. A **Tabela 4** mostra o estudo cromatográfico das mesmas. A fração que apresentou polaridade elevada não foi trabalhada, uma vez que não houve um sistema de solventes que o eluísse satisfatoriamente.

**Tabela 4.** Estudo cromatográfico da fração MCD 2.8.

Frações Reunidas	Códigos	Massa (g)	Observação
1-6	MCD 2.8.1	12,4	<b>Aspidolimina (82)</b>
7-12	MCD 2.8.2	175,3	Mistura <b>aspidolimina (82)</b> + <b>aspidocarpina (83)</b>
13-18	MCD 2.8.3	89,0	Mistura <b>aspidolimina (82)</b> + <b>aspidocarpina (83)</b>
19-29	MCD 2.8.4	128,8	Contém o alcalóide <b>Aspidocarpina (83)</b>
30	MCD 2.8.5	14,3	<b>Aspidocarpina (83)</b>
31-45	MCD 2.8.6	120,3	Fração de elevada polaridade
Total		540,1	

#### Análise da fração MCD 2.8.2 (175,3 mg)

Uma alíquota de 45,1 mg da fração MCD 2.8.2 foi submetida a uma CCD preparativa, utilizando como eluente hexano:acetato de etila (3:7 v/v), tendo sido obtidas as substâncias puras **Aspidolimina (82)** e **Aspidocarpina (83)**.

#### Reação de acetilação da fração MCD 2.8.3 (89,0 mg)

Uma pequena alíquota da fração MCD 2.8.3 foi submetida à reação de acetilação, a fim de confirmar a presença das hidroxilas. A essa massa de amostra foi adicionada piridina até a completa dissolução (aproximadamente 1,5 mL). Em seguida, foi adicionado à reação o dobro do volume de solução de anidrido acético (aproximadamente 3,0 mL), homogeneizou-se e deixou-se por 18 horas. Ao fim desse prazo, a solução resultante foi transferida para um funil de separação e lavada 3 vezes com água destilada gelada e clorofórmio (1:1 v/v). A fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro resultando nos produtos acetilados MCD 2.8.3A (**82a**) e MCD 2.8.3B (**83a**) de massa igual a 6,7 mg.

### Análise da fração MCD 3 (901,1 mg)

A fração MCD 3 foi submetida a cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Inicialmente utilizou-se como eluente o hexano puro, com um gradiente de polaridade até acetato de etila (50%), na qual foram coletadas 84 frações. As mesmas foram reunidas, através de comparação por CCD analítica, de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico, originando 3 novas frações. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 5**. As frações descritas como mistura complexa não foram trabalhadas, uma vez que apresentaram baixa resolução frente aos sistemas de solventes testados.

**Tabela 5.** Estudo cromatográfico da fração MCD 3.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1	MCD 3.1	6,9	Massa insuficiente
2-23	MCD 3.2	39,7	<b>Mistura de terpenos*</b>
24-84	MCD 3.3	115,7	Mistura complexa
Total		162,3	

\* **lupeol (81)**,  **$\beta$ -amirina (84)**, **simiarenol (85)** e similar do simiarenol sem equivalente na literatura (**86**).

### Análise da fração MCD 5 (1.922,6 mg)

A fração MCD 5 foi submetida a cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Inicialmente utilizou-se como eluente o diclorometano, com um gradiente de polaridade até metanol puro, na qual foram coletadas 82 frações. As mesmas foram reunidas, através de comparação por CCD analítica, de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico, originando 9 novas frações. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 6**. As frações contendo alcalóides foram trabalhadas. As frações descritas como mistura complexa não foram trabalhadas.

**Tabela 6.** Estudo cromatográfico da fração MCD 5.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-2	MCD 5.1	5,2	<b>Lupeol (81)</b>
3-5	MCD 5.2	6,8	Massa insuficiente
6-29	MCD 5.3	9,3	Massa insuficiente
30-32	MCD 5.4	1,7	Massa insuficiente
33-40	MCD 5.5	8,1	Massa insuficiente
41-44	MCD 5.6	7,8	Massa insuficiente
45-59	MCD 5.7	74,8	Fração contendo alcalóides
60-74	MCD 5.8	155,0	Fração contendo alcalóides
75-82	MCD 5.9	1.118,0	Fração contendo alcalóides
Total		1.386,7	

#### Análise da fração MCD 5.8 (155,0 mg)

A fração MCD 5.8 foi submetida à cromatografia em coluna contendo gel de sílica e diclorometano e eluída com um gradiente de polaridade crescente de solvente, iniciando com diclorometano até 50% de metanol v/v. Foram coletadas 79 frações, as quais foram analisadas por CCD analítica e reunidas em 6 novas frações, de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Estudo cromatográfico da fração MCD 5.8.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-5	MCD 5.8.1	1,4	Massa insuficiente
6-8	MCD 5.8.2	1,6	Massa insuficiente
9-61	MCD 5.8.3	13,9	Mistura complexa
62-63	MCD 5.8.4	1,5	Massa insuficiente
64-75	MCD 5.8.5	67,7	Fração contendo alcalóides*
76-79	MCD 5.8.6	38,5	Fração contendo alcalóides
Total		124,6	

\* Esta fração não foi trabalhada porque, além dos alcalóides, continha várias outras substâncias com  $R_f$ s muito próximos e de difícil resolução.

#### Análise da fração MCD 5.8.6 (38,5 mg)

A fração MCD 5.8.6 foi submetida a uma CCD preparativa, utilizando como eluente diclorometano:metanol (95:5 v/v) saturado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , obtendo-se o alcalóide **Antirina (87)**.



### Análise cromatográfica da fração MCD 5.9 (1.118,0 mg)

A fração MCD 5.9 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada em gel de sílica, utilizando-se como eluente o diclorometano, em um gradiente de polaridade até 100% de metanol. Foram obtidas 90 frações, as quais foram analisadas por CCD analítica e agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos, originando 7 novas frações. O estudo cromatográfico da fração MCD 5.9 está descrito na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	MCD 5.9.1	4,5	Massa insuficiente
7-10	MCD 5.9.2	0,3	Massa insuficiente
11-15	MCD 5.9.3	2,6	Massa insuficiente
16-25	MCD 5.9.4	6,5	Massa insuficiente
26-30	MCD 5.9.5	4,2	Massa insuficiente
31-53	MCD 5.9.6	121,6	Fração contendo alcalóides
54-90	MCD 5.9.7	775,8	Fração contendo alcalóides
Total		915,5	

### Análise da fração MCD 5.9.6 (121,6 mg)

A fração MCD 5.9.6 foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com gel de sílica, tendo como eluente inicial o diclorometano, em um gradiente de polaridade até 50% de metanol. 73 frações foram coletadas e posteriormente agrupadas, de acordo com o perfil cromatográfico exibido em CCD analítica, resultando em 9 novas frações. O estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.6 encontra-se detalhado na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.6.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-3	MCD 5.9.6.1	1,1	Massa insuficiente
4-12	MCD 5.9.6.2	2,1	Massa insuficiente
13-14	MCD 5.9.6.3	2,8	Massa insuficiente
15-19	MCD 5.9.6.4	0,5	Massa insuficiente
20-30	MCD 5.9.6.5	2,4	Massa insuficiente
31-46	MCD 5.9.6.6	5,5	Massa insuficiente
47-55	MCD 5.9.6.7	4,0	Massa insuficiente
56-63	MCD 5.9.6.8	7,2	Massa insuficiente
64-73	MCD 5.9.6.9	76,9	Fração contendo alcalóides
Total		102,5	

### Análise da fração MCD 5.9.6.9 (76,9 mg)

A fração MCD 5.9.6.9 foi submetida a CCD em escala preparativa e eluída com diclorometano:metanol (95:5 v/v) saturado com NH<sub>4</sub>OH, obtendo-se, desta forma, a **Antirina (87)**.

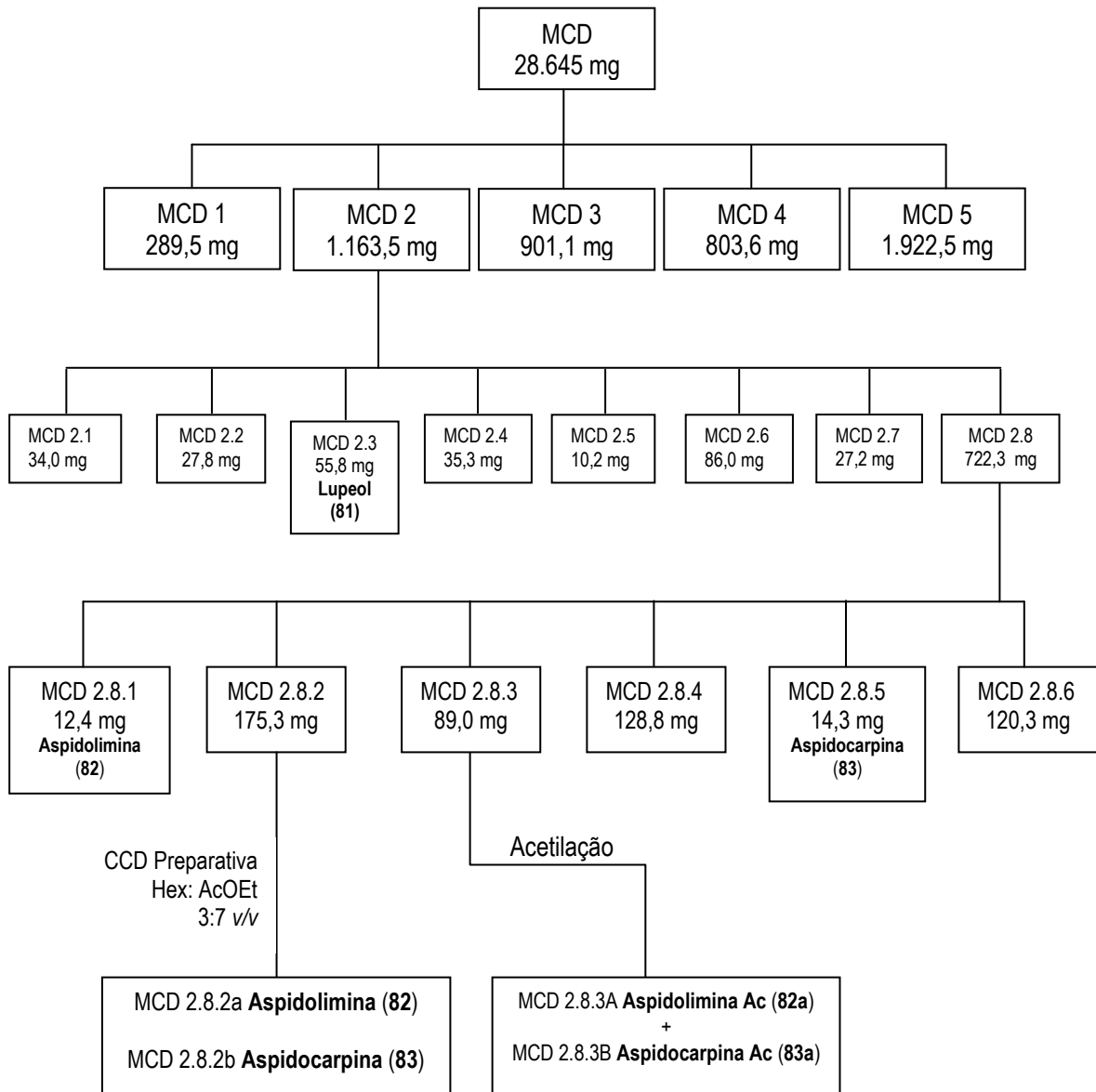
### Análise cromatográfica da fração MCD 5.9.7 (775,8 mg)

A fração MCD 5.9.7 foi submetida a cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, eluída com diclorometano em gradiente de polaridade até 30% de metanol. Foram obtidas 89 frações e as mesmas foram reunidas, após análise em CCD analítica e comparação dos perfis cromatográficos, perfazendo 7 novas frações. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 10**.

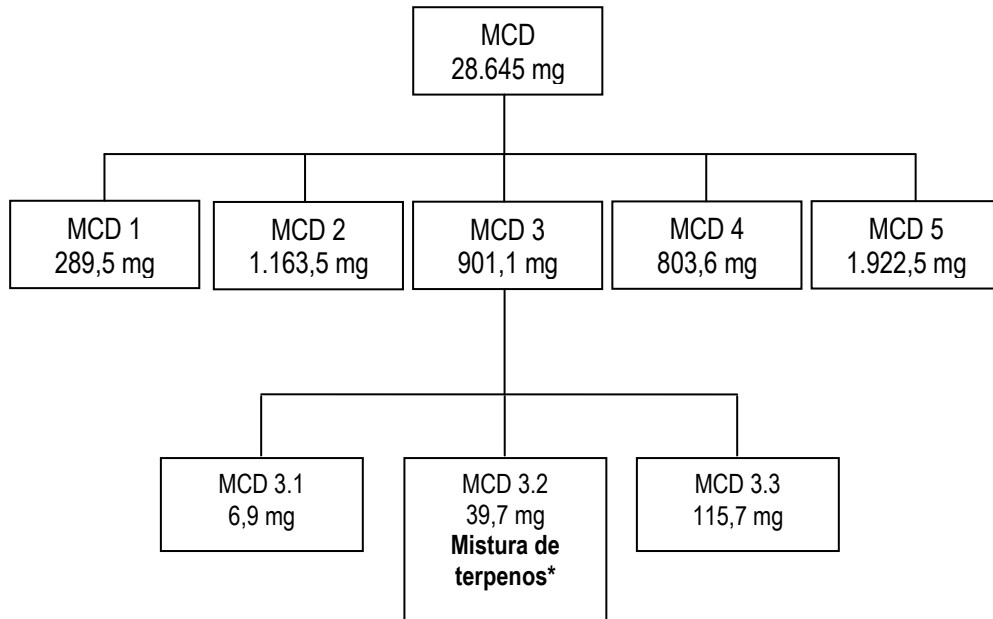
**Tabela 10.** Estudo cromatográfico da fração MCD 5.9.7.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-13	MCD 5.9.7.1	0,7	Massa insuficiente
14-17	MCD 5.9.7.2	1,7	Massa insuficiente
18-21	MCD 5.9.7.3	0,9	Massa insuficiente
22-34	MCD 5.9.7.4	2,1	Massa insuficiente
35-51	MCD 5.9.7.5	3,5	<b>Antirina (87)</b>
52-69	MCD 5.9.7.6	21,3	Contém o alcalóide Antirina
70-89	MCD 5.9.7.7	146,5	Mistura complexa de elevada polaridade
Total		176,7	

A seguir são apresentados os fluxogramas que resumem os procedimentos experimentais adotados no fracionamento do extrato metanólico das cascas de *Aspidosperma desmanthum* (**Fluxogramas 1, 2, 3 e 4**).

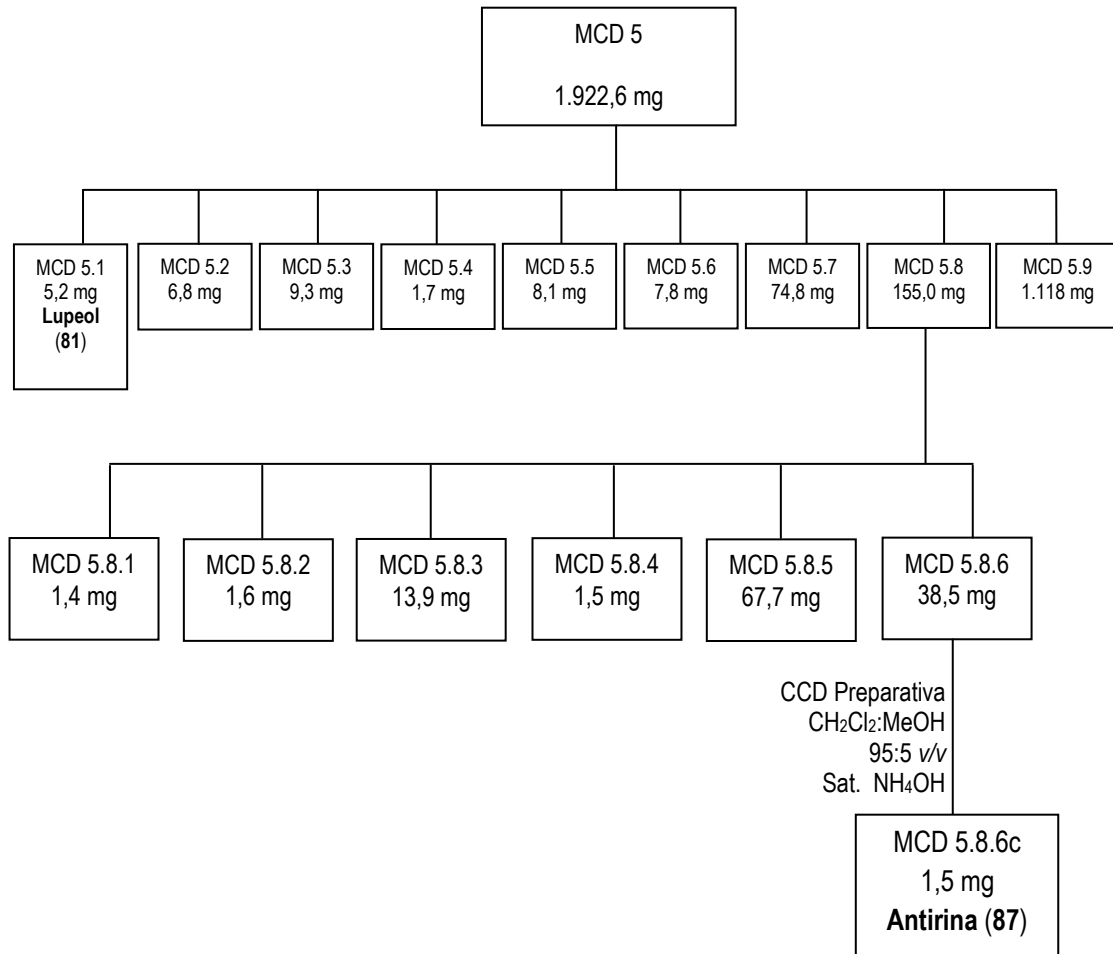


**Fluxograma 1.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 2, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. desmanthum* (MCD).

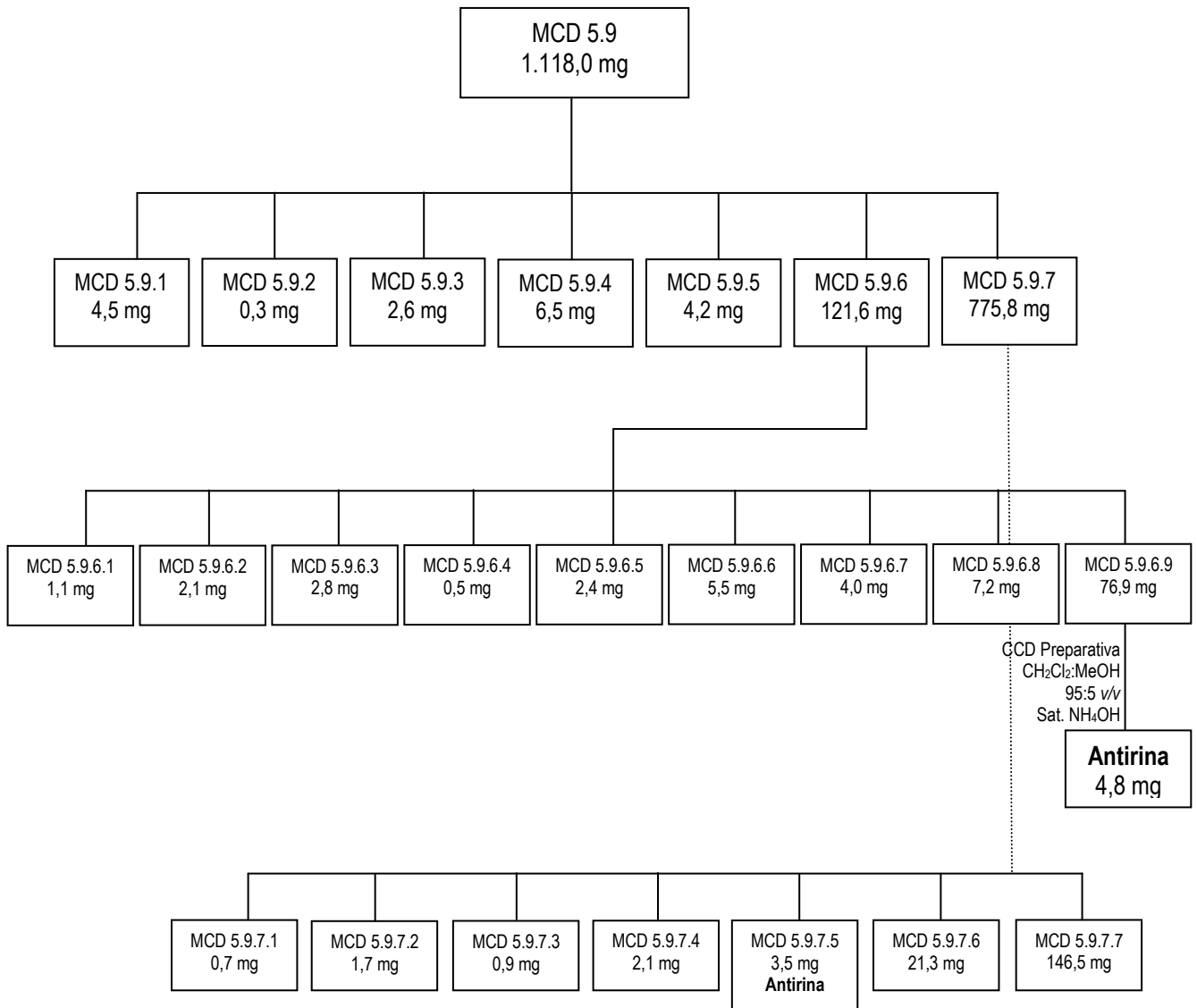


\* **lupeol (81),  $\beta$ -amirina (84), simiarenol (85)** e similar ao simiarenol sem equivalente na literatura (86).

**Fluxograma 2.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 3, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. desmanthum*.



**Fluxograma 3.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 5, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. desmanthum*.



**Fluxograma 4.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCD 5.9, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. desmanthum*.

#### 4.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *A. cylindrocarpon*

Foram utilizadas técnicas de cromatografia em coluna à pressão normal e cromatografia em camada delgada (CCD), em escalas analítica e preparativa. Também foi utilizada a técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência utilizando o equipamento da marca *Dynamic Extractions Ltd. Model Spectrum-1000* (Berkshire, United Kingdom), para a separação dos alcalóides de uma das frações. Essa técnica mostrou-se muito eficaz para se trabalhar amostras polares, tendo possibilitado o isolamento de dois alcalóides novos na literatura.

As análises cromatográficas foram conduzidas da mesma forma anteriormente descrita no Item 4.6.

Uma alíquota correspondente a 504,9 mg da fração MCC 1.10 foi submetida à Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência.

Inicialmente, 44,56 g do extrato bruto metanólico das cascas do caule de *A. cylindrocarpon* foram submetidos à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. O solvente utilizado para empacotamento da coluna foi o diclorometano, criando-se um gradiente de polaridade até metanol 100%. Foram coletadas 20 frações, as quais foram posteriormente reunidas em 7 novas frações através de comparação por CCD analítica. A fração MCC 1, contendo alcalóides, foi sucessivamente trabalhada, dando origem a diversas substâncias isoladas.

O estudo cromatográfico das frações encontra-se detalhado na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas de *Aspidosperma cylindrocarpon*.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	MCC 1	11.100,3	Fração contendo alcalóides
	MCC 1b*	22,0	<b>Canferol (88)</b>
7-8	MCC 2	3.121,2	Trabalhada
9-10	MCC 3	5.560,5	Não trabalhada**
12-14	MCC 4	3.971,9	Não trabalhada**
11	MCC 5	2.463,8	Não trabalhada**
15	MCC 6	551,4	Não trabalhada**
16-20	MCC 7	15.133,1	Não trabalhada**
Total		41.924,2	

\*Da fração MCC 1 foram obtidos vários cristais, sendo essa fração re-codificada MCC 1b (22,0 mg) e identificada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como o flavonóide **canferol (88)**.

\*\*Devido à falta de tempo hábil, as frações seguintes ainda estão sendo trabalhadas e os resultados deverão ser publicados em trabalhos posteriores.

### Análise da fração MCC 1 (11.078,3 mg)

A fração MCC 1 foi submetida a uma coluna de gel de sílica, a qual foi eluída com hexano em gradiente de polaridade até 100% de acetato de etila e adicionado posteriormente metanol até 10%. Desse fracionamento foram obtidas 73 frações e as mesmas foram reunidas, após análise em CCD analítica e comparação dos perfis cromatográficos em CCD analítica, perfazendo 15 novas frações. As frações consideradas misturas complexas não foram trabalhadas devido à baixa resolução nos sistemas de solventes testados. A fração MCC 1.10, contendo alcalóides, foi submetida à Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Estudo cromatográfico da fração MCC 1.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-4	MCC 1.1	57,4	Mistura complexa
5-7	MCC 1.2	282,7	Mistura complexa
8-11	MCC 1.3	141,7	Mistura complexa
12-17	MCC 1.4	250,2	Mistura complexa
18-27	MCC 1.5	316,7	Fração contendo alcalóides
28-32	MCC 1.6	94,0	Mistura complexa
33-40	MCC 1.7	754,3	Mistura complexa
41-43	MCC 1.8	38,3	<b>Aromadendrina (89)</b>
44-45	MCC 1.9	152,1	Trabalhada*
46-52	MCC 1.10	1.326,1	Fração contendo alcalóides
53-58	MCC 1.11	400,0	Trabalhada*
59-62	MCC 1.12	96,5	Trabalhada*
63-66	MCC 1.13	281,2	Trabalhada*
67-68	MCC 1.14	177,0	Trabalhada*
69-73	MCC 1.15	428,9	Fração contendo alcalóides
Total		4.797,1	

\*Essas frações, embora tenham sido sucessivamente trabalhadas, não resultaram no isolamento de nenhuma substância.

### Análise da fração MCC 1.5 (316,7 mg)

A fração MCC 1.5 foi submetida a uma coluna empacotada com gel de sílica, eluída inicialmente com hexano, tendo sido aplicado um gradiente de polaridade até 30% de acetato de etila. As 67 frações obtidas desse fracionamento foram agrupadas por comparação do perfil cromatográfico, originando 6 novas frações. O estudo do perfil cromatográfico encontra-se detalhado na **Tabela 13**.



**Tabela 13.** Perfil cromatográfico da fração MCC 1.5.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-8	MCC 1.5.1	5,2	Massa insuficiente
9-23	MCC 1.5.2	3,7	Massa insuficiente
24-34	MCC 1.5.3	6,2	Massa insuficiente
35-40	MCC 1.5.4	11,4	Massa insuficiente
41-60	MCC 1.5.5	223,7	Fração contendo alcalóides
61-67	MCC 1.5.6	2,8	Fração de polaridade elevada
Total		253,0	

## Análise da fração MCC 1.5.5 (218,8 mg)

A fração MCC 1.5.5 foi submetida a uma coluna empacotada com gel de sílica, eluída com hexano em um gradiente de polaridade até 60% de acetato de etila. Foram coletadas 90 frações, as quais foram reunidas por semelhança do perfil cromatográfico em CCD, resultando em 8 novas frações. As frações consideradas misturas complexas não foram trabalhadas, uma vez que não apresentaram boa resolução mediante os sistemas de solventes testados. A fração MCC 1.5.5.6 foi trabalhada, mas não resultou no isolamento de nenhuma substância. O perfil cromatográfico encontra-se detalhado na **Tabela 14.**

**Tabela 14.** Perfil cromatográfico da fração MCC 1.5.5.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-5	MCC 1.5.5.1	0,3	Massa insuficiente
6-17	MCC 1.5.5.2	1,9	Massa insuficiente
18-24	MCC 1.5.5.3	0,8	Massa insuficiente
25-44	MCC 1.5.5.4	1,1	Massa insuficiente
45-52	MCC 1.5.5.5	6,7	<b>Ácido atrárico (90)*</b>
53-71	MCC 1.5.5.6	80,6	Trabalhada
72-81	MCC 1.5.5.7	39,3	Mistura complexa de esteróides
82-90	MCC 1.5.5.8	17,9	Mistura complexa de esteróides
Total		148,6	

\* ao lado dessa substância, especula-se a presença de fitoesteróis como  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol.

## Análise da fração MCC 1.15 (428,9 mg)

A fração MCC 1.15 foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com gel de sílica e eluída com diclorometano em um gradiente de polaridade, até 50% de metanol. Foram coletadas 66 frações, as quais foram reunidas por semelhança do perfil cromatográfico em CCD, resultando em 7 novas frações. As frações consideradas misturas complexas não foram trabalhadas, uma vez que não apresentaram boa resolução mediante os sistemas de solventes testados. A fração MCC 1.15.4 não foi

trabalhada porque, embora fosse semelhante à fração MCC 1.15.5, apresentava outras substâncias de difícil resolução. O perfil cromatográfico encontra-se descrito na **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Perfil cromatográfico da fração MCC 1.15.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-3	MCC 1.15.1	2,7	Massa insuficiente
4	MCC 1.15.2	26,5	Mistura complexa
5-13	MCC 1.15.3	26,8	Mistura complexa
14-21	MCC 1.15.4	44,8	Mistura complexa
22-48	MCC 1.15.5	173,5	Fração contendo alcalóides
49-57	MCC 1.15.6	72,6	Mistura complexa
58-66	MCC 1.15.7	40,5	Mistura complexa
Total		387,4	

#### Análise da fração MCC 1.15.5 (173,5 mg)

Uma alíquota equivalente a 32,1 mg da fração MCC 1.15.5 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada em escala preparativa, a qual foi eluída em uma mistura de diclorometano/metanol (95:5 v/v), resultando em uma fração MCC 1.15.5A contendo os alcalóides 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (**91-1** e **91-2**), 12-desmetóxi-*N*-formilcilindrocarina (**92**), 12-desmetóxi-*N*-propionilcilindrocarina (**93**) e 12-desmetóxi-*N*-butilcilindrocarina (**94**).

### 4.7.1 Análise da fração MCC 1.10 (504,9 mg) por Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência

#### 4.7.1.1 Escolha do sistema de solventes

A escolha prévia do sistema de solventes utilizado para este método foi feita pelo método de agitação em tubo de ensaio (BERTHOD e CARDA-BROCH, 2004). Esse método se baseia na distribuição de um soluto entre as fases móvel e estacionária, sendo útil para a determinação da constante de distribuição líquido-líquido, comumente chamada de coeficiente de partição.

O método consistiu na solubilização de uma pequena quantidade da amostra a ser analisada (2,0 mg) em 1mL de cada fase do sistema testado e sua subsequente agitação. O sistema foi deixado em repouso até o restabelecimento das duas fases. As fases superior e inferior foram separadas em funil de separação e submetidas à análise qualitativa por CCD analítica. As placas foram eluídas em hexano/acetato de etila (7:3 v/v), em duplicata, visualizadas sob luz ultravioleta a 254 e 365 nm e reveladas em Vanilina sulfúrica seguida de aquecimento ou com o reagente de Dragendorff.

O sistema de solventes ideal deve ser capaz de distribuir igualmente a amostra nas duas fases, o que irá resultar em coeficiente de partição próximo a 1. Isso demonstra que o sistema de solventes a ser escolhido deve ter uma interação adequada com os componentes da amostra, o que praticamente garantirá uma boa separação desses constituintes quando submetidos à análise por CCC de Alta Eficiência.

Uma metodologia baseada no sistema de solventes ARIZONA modificado (hexano/acetato de etila/metanol/água) foi utilizada para testar o sistema de solventes em diversas proporções (**Tabela 16**), sendo que a proporção Hex:AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2:1,75:1 v/v/v/v) foi a que apresentou a melhor distribuição entre as fases (BERTHOD, HASSOUN e RUIZ-ANGEL, 2005).

**Tabela 16.** Sistemas de solventes testados para a fração MCC 1.10.

Sistema	Hexano	Acetato de etila	Metanol	Água
A	1	2	1	1
B	1	2	1,25	1
C	1	2	1,50	1
D	1	2	1,75	1

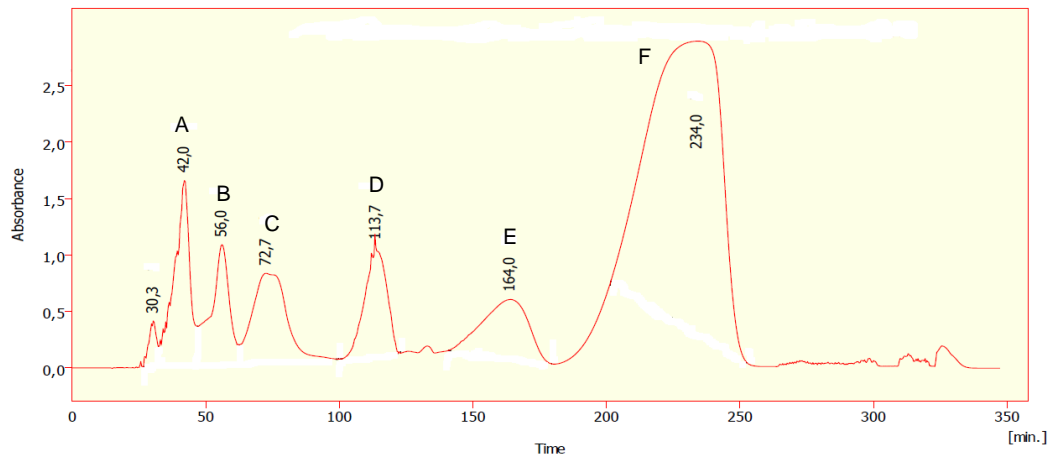
#### 4.7.1.2 Procedimento de CCC de Alta Eficiência

A fração MCC 1.10 foi solubilizada em uma mistura contendo 3,0 mL da fase móvel (MeOH/H<sub>2</sub>O) e 2,0 mL da fase estacionária (Hex/AcOEt).

Uma solução equivalente a 2,0 L do sistema de quatro solventes foi agitada mecanicamente por 30 minutos e desgaseificada em aparelho de ultrassom por mais 30 minutos. A coluna foi completamente preenchida com a fase estacionária (fase orgânica, superior) e o aparelho foi ligado a 1.200 rpm, operando a 22°C e 309 nm, enquanto a fase móvel (fase aquosa, inferior) foi bombeada para o interior da coluna, na direção cauda-cabeça, a um fluxo contínuo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. O sistema

atingiu o equilíbrio hidrodinâmico e então foi verificado um “sangramento” de 36 mL, correspondente a 74,6% de retenção da fase estacionária.

Em seguida, os 5 mL da fração MCC 1.10 solubilizada foram injetados na coluna, a um fluxo de 1,5 mL/min. O perfil cromatográfico pode ser visualizado através do cromatograma (**Figura 12**) e os valores de fator de retenção e coeficientes de partição são apresentados na **Tabela 17**.



**Figura 12.** Cromatograma, mostrando os tempos de retenção e os picos relativos às substâncias isoladas (C, D, E e F).

**Tabela 17.** Coeficientes de partição ( $k_D$ ) e fatores de retenção ( $\alpha$ ) dos picos mostrados no cromatograma.

Pico no cromatograma	Coeficiente de partição ( $k_D$ )	Fator de retenção ( $\alpha$ )
A	0.13	
B	0.29	
C	0.48	$\alpha_{4,3} = 1.46$
D	0.70	$\alpha_{5,4} = 1.80$
E	1.26	$\alpha_{6,5} = 1.50$
F	1.94	$\alpha_{7,6} = 1.50$

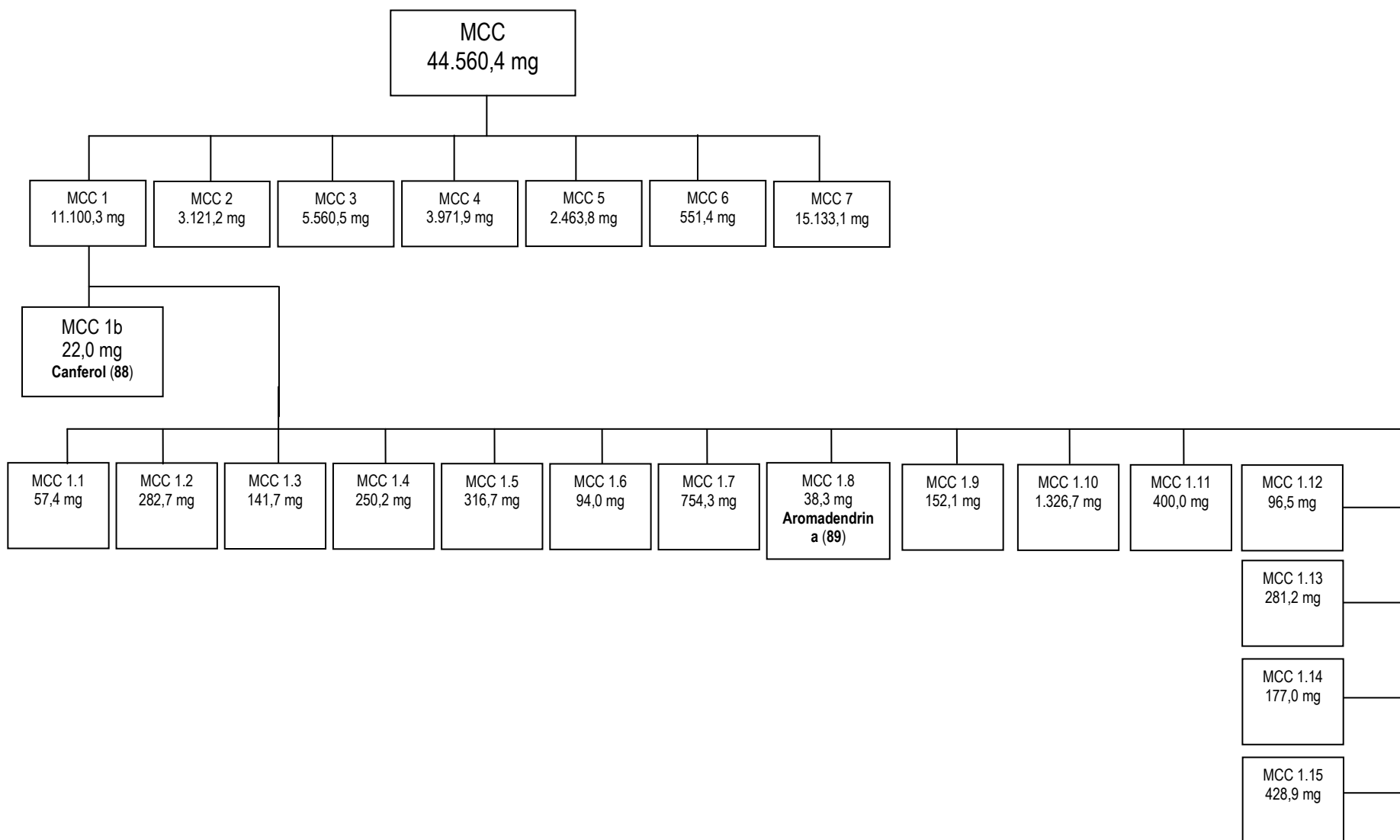
A fase móvel eluída foi coletada em alíquotas de 3,0 mL, dando origem a 195 frações, as quais foram analisadas por CCD analítica e agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico (**Tabela 18**), resultando em 20 novas frações.

As frações descritas como misturas complexas não foram trabalhadas por apresentarem baixa resolução frente aos sistemas de solventes testados. As frações de 152 a 157 e 182 a 195 foram descartadas, uma vez que continham apenas o sistema de solventes (nenhuma substância foi eluída nessas frações).

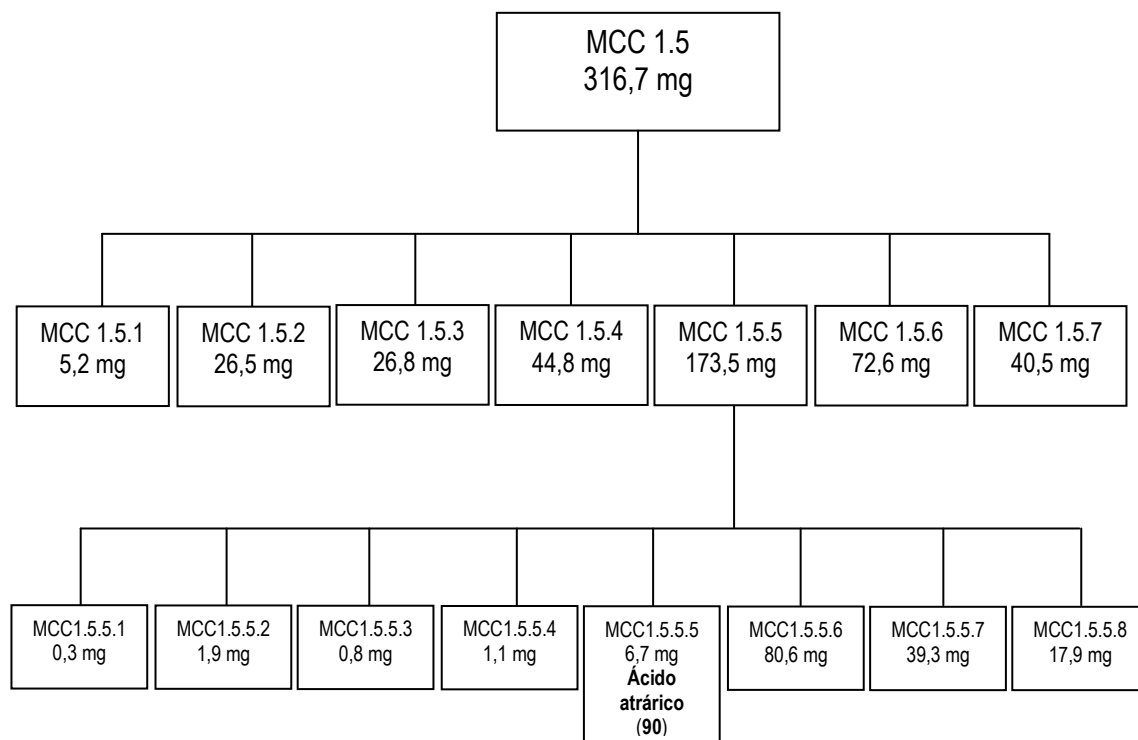
**Tabela 18.** Perfil cromatográfico da fração MCC 1.10.

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-14			Somente solvente
15-18	MCC 1.10.1	6,3	Mistura complexa
19-24	MCC 1.10.2	18,5	Mistura complexa
25-27	MCC 1.10.3	55,4	Mistura complexa
28-31	MCC 1.10.4	10,2	Mistura complexa
32-40	MCC 1.10.5	48,4	<b>Substâncias em fase de elucidação</b>
41-50	MCC 1.10.6	4,4	Massa insuficiente
51-52	MCC 1.10.7	0,7	Massa insuficiente
53-55	MCC 1.10.8	4,6	Mistura complexa
56-61	MCC 1.10.9	29,2	Mistura complexa
62-66	MCC 1.10.10	19,2	<b>Ácido (z)-eicos-10-enedióico (95)</b>
67-68	MCC 1.10.11	3,2	Massa insuficiente
69-83	MCC 1.10.12	62,1	Contém o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-benzoilcandrocarina (96)</b>
84-88	MCC 1.10.13	23,2	<b>12-desmetóxi-N-benzoilcandrocarina (96)</b>
89-92	MCC 1.10.14	3,1	Massa insuficiente
93-118	MCC 1.10.15	78,3	Contém o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-cinamoilcandrocarina (97)</b>
119-126	MCC 1.10.16	26,6	<b>12-desmetóxi-N-cinamoilcandrocarina (97)</b>
127-139	MCC 1.10.17	76,7	Contém o alcalóide <b>12-desmetóxi-N-cinamoilcandrocarina (97)</b>
140-151	MCC 1.10.18	6,6	Mistura complexa
152-157			Descartadas
158-172	MCC 1.10.19	5,4	Mistura complexa
173-181	MCC 1.10.20	1,7	Mistura complexa
182-195			Descartadas
Total		483,8	

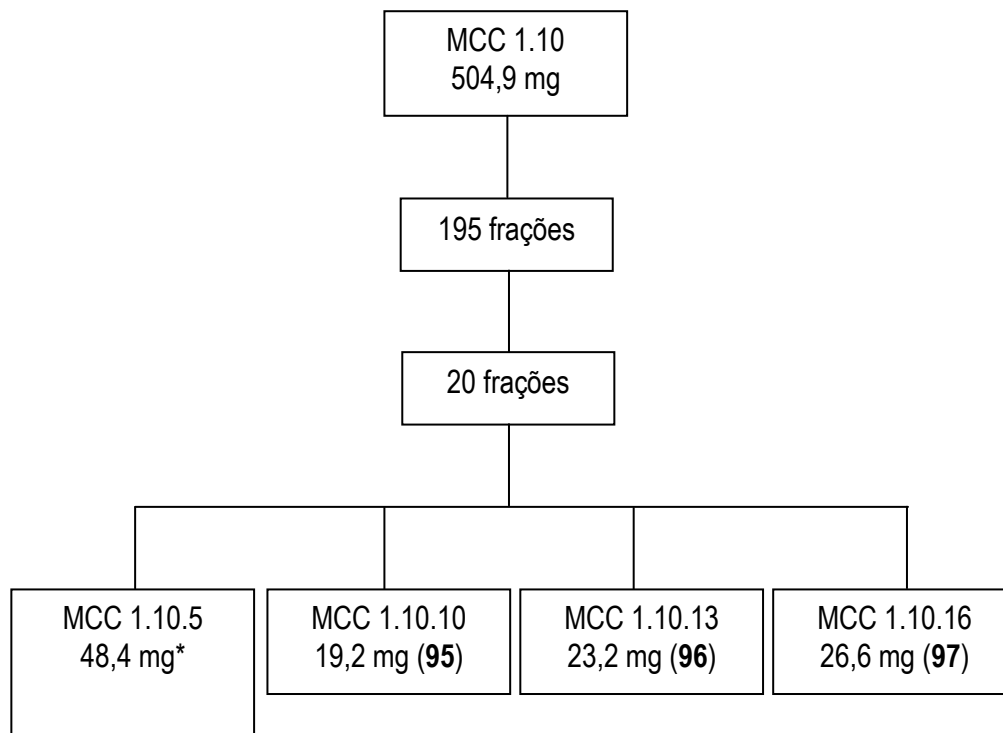
A seguir são apresentados os fluxogramas que resumem os procedimentos experimentais adotados no fracionamento de extrato metanólico das cascas de *Aspidosperma cylindrocarpon* (**Fluxogramas 5 a 8**).



**Fluxograma 5.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. cylindrocarpon*.



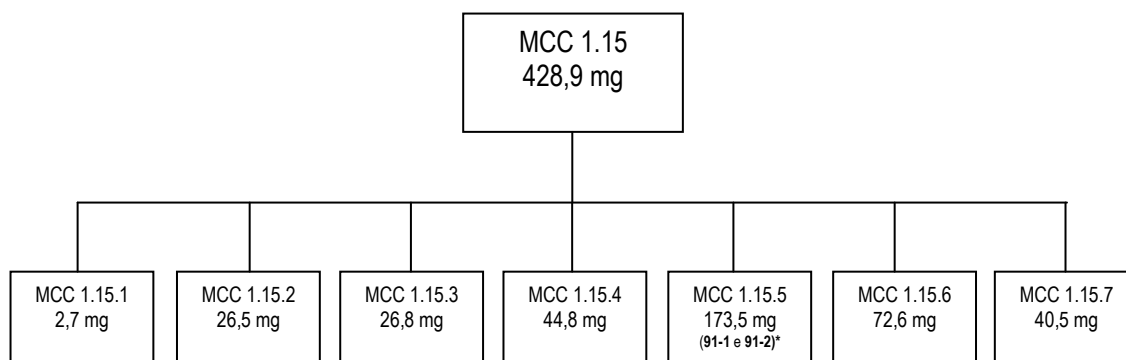
**Fluxograma 6.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.5, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. cylindrocarpon*.



\* as substâncias presentes nesta fração estão ainda em fase de identificação.

**Fluxograma 7.** Esquema operacional simplificado adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.10, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. cylindrocarpon*, através da Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência.





\* ao lado da 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (**91-1**) e seu confômero (**91-2**), foram identificadas outras substâncias: 12-desmetóxi-*N*-formilcilindrocarina (**92**), 12-desmetóxi-*N*-propionilcilindrocarina (**93**) e 12-desmetóxi-*N*-butilcilindrocarina (**94**).

**Fluxograma 8.** Esquema operacional adotado no fracionamento cromatográfico da fração MCC 1.15, obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. cylindrocarpon*.

#### 4.8 DICROÍSMO CIRCULAR

A principal aplicação da técnica de dicroísmo circular (DC) é, segundo Araújo (2011), “o assinalamento da configuração absoluta de um centro quiral vizinho a um cromóforo ou da conformação de um sistema bicromofórico que gera anomalia na curva ou diferença de absorção das componentes apenas pela atropoisomeria”.

Os testes de Dicroísmo Circular foram realizados em parceria com o Departamento de Química /PPGQ – ICE da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro J-815 *Circular Dichroism* da JASCO e os espectros de UV foram obtidos em espectrômetro UV-1601 PC Shimadzu. A medida de dicroísmo circular (DC) foi realizada através de uma varredura nos comprimentos de onda de 250 nm a 400 nm.

As substâncias submetidas ao teste de dicroísmo circular, bem como as massas utilizadas de cada uma encontram-se descritas na **Tabela 19**.

**Tabela 19.** Substâncias analisadas por dicroísmo circular (DC), com os respectivos códigos e massas utilizadas.

Substância	Código	Massa (mg)
Aspidolimina ( <b>82</b> )	MCD 2.8.2a	1,0
Aspidocarpina ( <b>83</b> )	MCD 2.8.2b	1,2
Antirina ( <b>87</b> )	MCD 5.9.6.9A	*
12-desmetóxi- <i>N</i> -acetilcilindrocarina ( <b>91-1</b> e <b>91-2</b> )	MCC 1.15.5A	2,0
12-desmetóxi- <i>N</i> -benzolicilindrarina ( <b>96</b> )	MCC 1.10.13	1,3
12-desmetóxi- <i>N</i> -cinamoilcilindrocarina ( <b>97</b> )	MCC 1.10.16	1,5

\*dado não fornecido

#### 4.9 TESTE DE LIGAÇÃO À ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB)

Estudos baseados na interação entre drogas e a albumina sérica aumentam o arsenal de ferramentas moleculares para determinação do papel biológico de macromoléculas. Além disso, tais estudos são essenciais para a determinação da biodisponibilidade e toxicologia de drogas (HE et al., 2005; RIBEIRO, 2010).

O teste consistiu na investigação do comportamento fotofísico do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina (**97**), submetido a uma solução de albumina (carreador de moléculas) sérica bovina (ASB) ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L) tamponada com PBS (pH= 7,4), utilizando UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular.

#### **4.9.1 Análise da ligação à ASB por espectroscopia de absorção no UV-vis**

Utilizou-se espectrofotômetro de absorção ultravioleta/visível (UV-Vis), Mini UV Shimadzu, modelo 1240, utilizando-se célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm, e 4 faces polidas, uma vez que a mesma célula seria posteriormente utilizada para leitura da fluorescência.

As leituras foram realizadas por varredura em comprimentos de onda de 200 a 500 nm, a fim de estudar a interação entre albumina sérica bovina (ASB) e o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina (**97**). Foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (tampão fosfato salino) (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, às quais foram adicionadas, respectivamente, oito alíquotas da solução do alcalóide, variando de 5 a 40  $\mu$ L, com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L.

#### **4.9.2 Análise da ligação à ASB por Espectrometria de Fluorescência**

Para a realização das análises de fluorescência foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 faces polidas e equipamento Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi.

As análises foram executadas em varredura (faixa de emissão) de 300 nm a 500 nm, com fendas de emissão e excitação de 5,0 nm e velocidade de 1.200 nm/min. O espectrofluorímetro foi acoplado a um termostatizador, o qual manteve a temperatura para os espectros de emissão de fluorescência em  $T = 273\text{K}$ . Foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, as quais foram suprimidas com a adição de oito alíquotas de soluções do alcalóide, de 5 a 40  $\mu$ L, com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L.

#### 4.9.3 Análise da ligação à ASB por dicroísmo circular

A análise foi realizada utilizando-se espectropolarímetro J-180 Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao aquecimento.

Para a medida de dicroísmo circular (DC) foi realizada uma varredura de 190 a 500 nm, com velocidade de 200 nm/min no espectropolarímetro e controle de temperatura ( $T = 273\text{K}$ ). O sinal final obtido para cada amostra foi resultado de uma média de dois espectros registrados. A linha de base foi uma solução aquosa de PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). Os espectros das soluções aquosas de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L foram subtraídos desta linha de base. Para a realização das análises de dicroísmo circular foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 2 faces polidas. Foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L, as quais foram suprimidas com a adição de soluções de 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina (**97**), com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L, nas proporções de 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB/alcalóide.

#### 4.10 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

O gênero *Aspidosperma* é frequentemente citado em estudos de atividade antiplasmodial, sobretudo devido à presença de alcalóides indólicos (MITAINE-OFFER et al., 2002; BOURDY, et al., 2004; MESQUITA et al., 2006).

Em estudo anterior, a aspidocarpina foi isolada da casca do tronco de *A. desmanthum* e testada *in vitro* quanto à atividade antimalárica, mostrando resultados consideráveis frente a cepas multirresistentes (K1) de *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO et al., 2007).

No presente trabalho, foram realizados testes de atividade antimalárica, tanto com os extratos e frações, quanto com substâncias isoladas de *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon*. Foram testados extratos, frações e substâncias isoladas, de acordo com a **Tabela 20**.

**Tabela 20:** Descrição das amostras submetidas ao teste *in vitro* de atividade antimalárica, por espécie.

Espécie		Amostra	
<i>A. desmanthum</i>	EBMC	Fração 2.8.4	Aspidocarpina
<i>A. cylindrocarpon</i>	MCC 1.10.13	MCC 1.10.16	

\*EMBC=Extrato Bruto Metanólico das Cascas; Fração 2.8.4=contém o alcalóide Aspidocarpina (**83**); MCC 1.10.13= 12-desmetóxi-*N*-benzoilcylindrocarina (**96**); MCC 1.10.16= 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcylindrocarina (**97**).

A aspidocarpina (**83**) foi testada mais uma vez, no entanto a cepa de *P. falciparum* utilizada foi aquela preconizada pela OMS (cepa W2) e a metodologia utilizada foi diferente da utilizada anteriormente por Andrade-Neto (2007).

Os testes de atividade antimalárica foram realizados no Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da UFMG, em parceria com a Rede de Produtos Naturais para a Quimioterapia Antimalárica, Projeto PRONEX CNPq/FAPEMIG, coordenado pela Dra. Alaíde Braga de Oliveira e pelo Dr. Fernando de Pilla Varotti, a quem dirigimos nossos agradecimentos.

#### 4.10.1 Procedimentos Experimentais

Os testes *in vitro* foram realizados com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2 (cepa preconizada pela OMS) resistente à cloroquina, tendo sido utilizadas duas metodologias distintas para determinação da atividade antimalárica. Para as amostras obtidas de *A. desmanthum* utilizou-se o método de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (DESJARDINS et al., 1979) e as amostras obtidas a partir de *A. cylindrocarpon* foram testadas segundo o método LDH (Lactato Desidrogenase), descrito por Makler et al. (1993).

##### 4.10.1.1 Método de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina

1. Incubação parasito-droga: 20µl de cada diluição das substâncias testadas foram colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180µl da suspensão de hemácias infectadas (1% hematócrito, 1% de parasitemia), provenientes de um cultivo mantido por pelo menos três dias sem hipoxantina. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

2. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h na presença dos extratos, seguindo-se a adição da [<sup>3</sup>H]-Hipoxantina (0,5μCi por poço) e mais 18 horas de incubação. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24h), para promover a lise das hemácias.

3. O lisado celular foi transferido para filtros de fibra de vidro com auxílio de um coletor de células seguido de adição de líquido de cintilação e leitura da radioatividade, registrada em leitor automático.

Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da média de contagem por minuto (cpm). Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações testadas foram selecionadas para determinação das CI<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50% dos parasitos). Para tanto, as amostras foram testadas nas concentrações de 1,56 a 50 μg/mL. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos (CI<sub>50</sub>) em relação aos controles sem drogas.

#### 4.10.1.2 Método LDH (Lactato Desidrogenase)

Uma solução estoque de cada amostra foi preparada na concentração de 50 mg/mL em DMSO (dimetilsulfóxido). Todas as amostras solubilizaram-se prontamente em DMSO. A amostra MCC 1.10.16 precipitou em RPMI (meio enriquecido para cultura celular).

1. Incubação parasito-droga: 20μL de cada diluição das substâncias testadas foram colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180μL da suspensão de hemácias infectadas (1% hematócrito, 2% de parasitemia), provenientes de um cultivo mantido no laboratório de Bioensaios da UFMG. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

2. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48h, com amostras e controles. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24h), para promover a lise das hemácias.

3. O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100μL de reagente Malstat e 25μL de reagente NBT/PES (Nitroblue Tetrazolium/ Phenazine

Ethosulfate). Após 1h de incubação, a absorbância de cada poço das placas foi registrada em espectrofotômetro (540 nm).

Inicialmente foram empregadas duas concentrações das amostras, 25 e 50 µg/mL, cada uma em triplicata, para a avaliação do percentual de redução da parasitemia, a qual foi determinada pelo método da LDH. Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorbância. Amostras que apresentaram redução da parasitemia > 50% nas duas concentrações testadas tiveram suas  $CI_{50}$  determinadas em 3 experimentos distintos, em seis diferentes concentrações, com triplicatas de cada concentração.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ) em relação aos controles sem drogas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das técnicas cromatográficas de isolamento e espectrométricas de elucidação estrutural, foi possível a caracterização de 19 substâncias, sendo 9 alcalóides naturais e 2 derivados, 4 fitoesteróis, 2 flavonóides e 2 ácidos orgânicos.

As análises espectrométricas foram realizadas em equipamentos do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e através de parcerias com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Universidade Federal do Ceará (UFC) e com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e Carbono-13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em um espectrômetro Jeol (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e em um Brüker (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ) e piridina- $d_5$ , utilizando-se como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) em um aparelho CG/EM-QP-5050 A SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons (70 eV), e por ESI-MS/MS em um espectrômetro micrOTOF-Q II.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em aparelho FTIR-8300 SHIMADZU, utilizando-se pastilhas de KBr.

As medidas de ponto de fusão foram tomadas em aparelho digital tipo Kofler, marca Microquímica, modelo MQRPF-301.

### 5.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE *Aspidosperma desmanthum* e *A. cylindrocarpon*

Através de análises comparativas de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer: ausência dos sinais de carbonos quaternários, DEPT-90° aparecem somente os sinais de carbonos metínicos e DEPT-135° os sinais de carbonos metilêncios em fase oposta de metínicos e metílicos) ou RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT

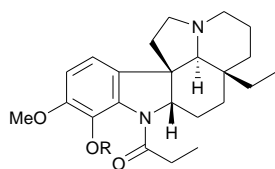


(Attached Proton Test: sinais de carbonos quaternários e metilênicos em fase positiva e metínicos e metílicos em fase negativa) foram usadas para diferenciar, classificar e contar os sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados (C), metínicos (CH), metilênicos (CH<sub>2</sub>) e metílicos (CH<sub>3</sub>). Na técnica DEPTQ (Q = quaternário), uma variação do DEPT convencional, os sinais correspondentes aos átomos de carbono não hidrogenados (C) e metilênicos (CH<sub>2</sub>) aparecem em fase oposta dos metínicos (CH) e metílicos (CH<sub>3</sub>). O esqueleto básico dos alcalóides plumerânicos (em moléculas não-substituídas) revela a presença de quatro carbonos não-hidrogenados (dois sp<sup>2</sup> e dois sp<sup>3</sup>), seis metínicos (quatro aromáticos sp<sup>2</sup> e dois sp<sup>3</sup>), oito metilênicos (todos sp<sup>3</sup>) e um metílico, os quais podem ser reconhecidos através de uma análise comparativa acima mencionada. Obviamente, as modificações dos números de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> pela presença e tipos de substituintes podem ser caracterizadas com relativa facilidade (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO e VIEIRA, 2012). Essa análise, juntamente com a espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), contribuiu significativamente para a dedução da fórmula molecular. Dessa forma, é possível classificar uma molécula desconhecida de alcalóide em termos do padrão de seus carbonos, o que facilitaria sua elucidação estrutural. Além disso, os experimentos bidimensionais (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY: acoplamento spin-spin, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-NOESY: interação dipolo-dipolo, HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence ou HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence: interação heteronuclear de carbono e hidrogênio através de uma ligação, e HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation: interação heteronuclear de carbono e hidrogênio através principalmente de duas e três ligações) são especialmente úteis para resolução de problemas estruturais, permitindo definir a posição de grupos metilênicos que, frequentemente, aparecem em regiões de sobreposição (ZÈCHES et al., 1995).

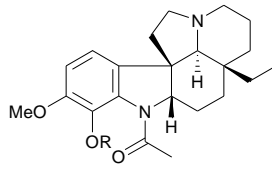
A principal característica de alcalóides indólicos com esqueleto plumerano é o sinal do hidrogênio CH-2, cujo deslocamento químico aparece em torno de  $\delta_H$  4,5 ppm. A multiplicidade deste sinal, como um duplo-dupletto (*dd*) revela o acoplamento típico de H-2 com os dois átomos de hidrogênio em CH<sub>2</sub>-16.

Este padrão espectral revela-se presente em quase todos os alcalóides plumerânicos, exceto naqueles que sustentam substituintes em C-16. Por isso, outros sinais característicos revelam-se também muito importantes, como os deslocamentos químicos do sinal simples correspondente ao hidrogênio H-21 do CH-21, o qual não acopla com nenhum outro localizado na vizinhança, e dos sinais representantes do grupo etila (e seus derivados biossintéticos) ligado em C-20. Em conjunto, esses são as principais características espectrométricas de RMN que caracterizam a presença de um alcalóide com esqueleto plumerano (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO e VIEIRA, 2012).

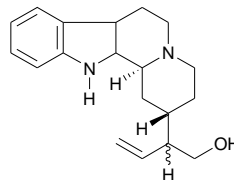
Foram isolados e caracterizados os seguintes alcalóides:



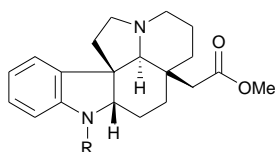
**82** R=H Aspidolimina  
**82a** R=Ac Aspidolimina acetilada



**83** R=H Aspidocarpina  
**83b** R=Ac Aspidocarpina acetilada



**87** Antirina

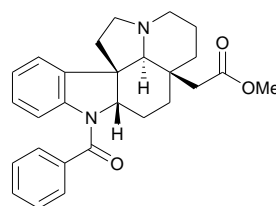


**91** R = OAc 12-desmetóxi-*N*-acetilindrocarina

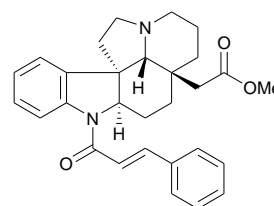
**92** R = COH 12-desmetóxi-*N*-formilindrocarina

**93** R = COEt 12-desmetóxi-*N*-propionilindrocarina

**94** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> 12-desmetóxi-*N*-butilindrocarina

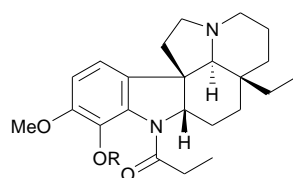


**96** 12-desmetóxi-*N*-benzoylindrocarina

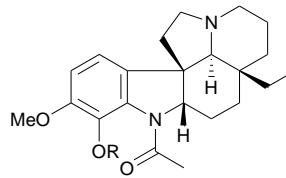


**97** 12-desmetóxi-*N*-cinamoilindrocarina

### 5.1.1 Determinação estrutural dos alcalóides aspidolimina (82), aspidocarpina (83) e seus derivados acetilados (82a e 83).



**82** R=H Aspidolimina  
**82a** R=Ac Aspidolimina acetilada

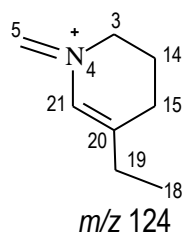


**83** R=H Aspidocarpina  
**83b** R=Ac Aspidocarpina acetilada

A substância presente na fração **MCD 2.8.2a** apresentou-se como um óleo amarelo-claro, revelando-se um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro na região do infravermelho (**Espectro 1**, volume 2, página 11) exibiu uma banda em torno de  $\nu_{\max}$  2936 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-H), em adição a outras bandas em  $\nu_{\max}$  1650, 1462, 1251 cm<sup>-1</sup> (estiramento C=C do anel benzênico) (VERPOORTE, 1986).

O espectro de massas de baixa resolução (EMBR, **Figura 13**, página 86) apresentou pico em  $m/z$  = 384, correspondente ao íon molecular ([M]<sup>+</sup>). Foi observada ainda a presença de pico base em  $m/z$  = 124, indicando o fragmento C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sup>+</sup> (**A**) típico de alcalóides semelhantes à aspidospermina (IKEDA e DJERASSI, 1968).



**A**

A análise comparativa dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 2**, volume 2, página 12) e DEPTQ (**Espectro 3**, volume 2, página 13) permitiu reconhecer sinais correspondentes a sete átomos de carbono não hidrogenados (cinco  $\text{sp}^2$ , inclusive um carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  172,8, e dois  $\text{sp}^3$ ), quatro metínicos (dois  $\text{sp}^2$  e dois  $\text{sp}^3$ ), nove metilênicos (todos  $\text{sp}^3$ ) e três metílicos (inclusive um metoxílico em  $\delta_{\text{C}}$  56,5), resumidos na **Tabela 21**, contendo também dados de hidrogênio obtidos da correlação heteronuclear fornecida pelo HSQC. Estes dados combinados com os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D, **Espectros 4 a 6**, volume 2, páginas 14 a 16) e de massas (EM, **Figura 13**, página 86) possibilitaram propor, para o alcalóide MCD 2.8.2a, a fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{C})_6(\text{C}=\text{O})(\text{CH})_4(\text{CH}_2)_9(\text{CH}_3)_2(\text{MeO})(\text{N})_2(\text{OH})$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove ( $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_3 - \text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3 = \text{H}_{18}$ ), coerentes com a proposta para um esqueleto do tipo plumerano (esqueleto básico  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$  com índice de deficiência de hidrogênio igual a oito = quatro do anel aromático e quatro carbocíclicos) sustentando os grupos OH, MeO e  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$  (carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  172,8), que justificaram a presença dos três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios; em pleno acordo com o alcalóide aspidolimina, anteriormente isolado de *Aspidosperma limae* (PINAR et al., 1962).

**Tabela 21.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 2**) e DEPTQ (**Espectro 3**) da **MCD 2.8.2a (82)**.

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
172,8	112,2	6,60 ( <i>d</i> , 8,2)	53,7	2,98, 1,97	56,5	3,87 ( <i>s</i> )	
149,4	110,0	6,68 ( <i>d</i> , 8,2)	52,5	3,05, 2,27	9,9	1,26 ( <i>t</i> , 7,0)	
137,6	70,7	2,23 ( <i>s</i> )	39,3	2,01, 1,50	6,7	0,64 ( <i>t</i> , 7,0)	
133,1	69,2	4,10 ( <i>m</i> )	34,0	1,65, 1,08			
127,0			30,7	1,37 ( <i>m</i> ), 0,86 ( <i>m</i> )			
52,2			28,1	2,62-2,40 ( <i>m</i> )			
35,5			25,4	1,85, 1,45			
			22,5	2,00, 1,13			
			21,5	1,70, 1,40			
(C) <sub>7</sub>		(CH) <sub>4</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (MeO)	

A confirmação desta dedução baseou-se nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D, **Espectros 4 a 6**, volume 2, páginas 14 a 16), que revelaram a presença de dois sinais duplos, relativos a dois

hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  6,60 (1H, *d*,  $J=8,2$  Hz, H-9) e  $\delta_H$  6,68 (1H, *d*,  $J=8,2$ , H-10), acoplando entre si com valores de  $J$  característico de acoplamento *orto*, condizente com um núcleo indólico 11-OMe,12-OH dissustituído (McLEAN et al., 1987), que foi corroborado pelas correlações heteronucleares no espectro de HMQC (**Espectro 7**, volume 2, página 17), onde foram observadas as interações através de  $^1J_{HC}$  entre CH-9 ( $\delta_C$  112,24) e H-9 ( $\delta_H$  6,60), e CH-10 ( $\delta_C$  110,4) e H-10 ( $\delta_H$  6,68).

Os substituintes no anel aromático e suas posições foram confirmados pela presença de sinais característicos no espectro de RMN de  $^1H$  e RMN de  $^{13}C$ . Primeiramente, o sinal característico do carbono do grupo metoxila em  $\delta_C$  56,52 no espectro RMN de  $^{13}C$  revelou acoplamento direto ( $^1J_{HC}$ ) no espectro 2D HMQC com o sinal dos três átomos de hidrogênio em  $\delta_H$  3,87 no espectro de RMN de  $^1H$ . A localização do grupo metoxila no átomo de carbono C-11 do anel benzênico baseou-se nas correlações a longa distância ( $^3J_{HC}$ ) do C-11 ( $\delta_C$  149,43) com H-9 ( $\delta_H$  6,60), 11-OMe ( $\delta_H$  3,87) e HO-12 ( $\delta_H$  10,98), observadas no espectro 2D HMBC (**Espectros 8 e 9**, volume 2, páginas 18 e 19; **Tabela 22**, página 87).

A presença de uma função hidroxila foi confirmada pelo sinal característico do hidrogênio do grupo hidroxila em  $\delta_H$  10,98 e pela preparação do derivado monoacetilado **82a**, que também confirmou sua posição no anel benzênico ligada ao átomo de carbono C-12, quelada com o grupo carbonila C=O na posição C-1' (McLEAN et al., 1987). A conversão do grupo 12-OH em 12-OAc por reação de acetilação revelou, como esperado pela atenuação do efeito mesomérico do átomo de oxigênio, as modificações (*vide infra*) nos  $\delta_C$  dos átomos de carbono *ipso* (C-12, proteção), *orto* (C-11 e C-13, desproteção) e *para* (CH-9, desproteção). Também a correlação a longa distância do C-12 ( $\delta_C$  137,62) com HO-12 ( $\delta_H$  10,98,  $^2J_{HC}$ ) e H-10 ( $\delta_H$  6,68,  $^3J_{HC}$ ) no espectro de HMBC (**Espectro 9**, volume 2, página 19) revelou-se em acordo com a hidroxila no átomo de carbono C-12.

A presença do grupo etila ligado ao átomo de carbono  $sp^3$  C-20 (tetrasustituído) foi reconhecida no espectro de RMN de  $^1H$  pelo sinal triplo do grupo CH<sub>3</sub>-18 em  $\delta_H$  0,64 (3H, *t*,  $J=7,0$  Hz) e pelos dois sinais múltiplos do grupo metilênico CH<sub>2</sub>-19 em  $\delta_H$  0,86 (1H, *m*, H-19a) e  $\delta_H$  1,37 (1H, *m*, H-19b). Esses sinais apresentaram correlações heteronucleares direta ( $^1J_{HC}$ ) com os átomos de carbono CH<sub>3</sub>-18 ( $\delta_C$  6,67) e CH<sub>2</sub>-19 ( $\delta_C$  30,66) reveladas pelo espectro de HMQC (**Espectro 7**, volume 2, página 17; **Tabela 22**, página 87).

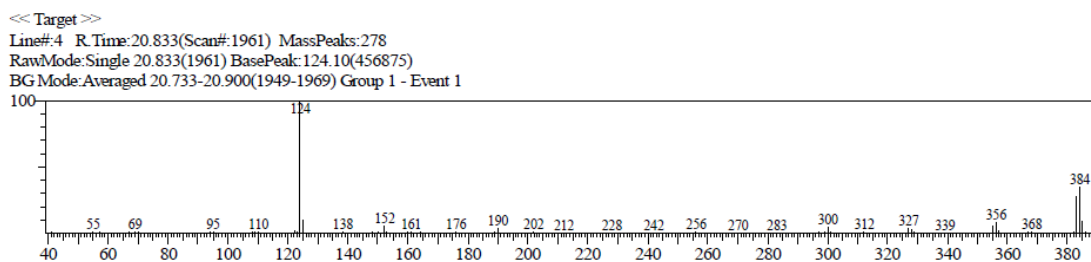
A presença de carbonila ligada ao átomo de nitrogênio N-1 foi deduzida através do sinal em  $\delta_C$  172,81 do espectro de RMN de  $^{13}C$ , característico de uma função amida (BREITMAIER e VOELTER, 1987). Esse carbono carbonílico (C-1') apresentou correlações à longa distância com os 2H-2' (sinais múltiplos em  $\delta_H$  2,40 e 2,62,  $^2J_{HC}$ ) e os 3H-3' (um sinal triplo  $\delta_H$  1,26,  $^3J_{HC}$ ) no

espectro de HMBC, caracterizando-se também a ligação de C-1' a um grupamento etila ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ). A presença desse grupamento também foi confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância entre o átomo de carbono  $\text{CH}_2\text{-2'}$  ( $\delta_{\text{C}}$  28,08) e os  $3\text{H-3'}$  ( $\delta_{\text{H}}$  1,26,  $^2J_{\text{HC}}$ ) e entre  $\text{CH}_3\text{-3'}$  ( $\delta_{\text{C}}$  9,92) e os  $2\text{H-2'}$  ( $\delta_{\text{H}}$  2,40, 2,62,  $^2J_{\text{HC}}$ ). Outras correlações heteronucleares a longa distância observadas no HMBC (**Espectros 8 e 9**, volume 2, páginas 18 e 19) foram resumidas na **Tabela 22** (página 87).

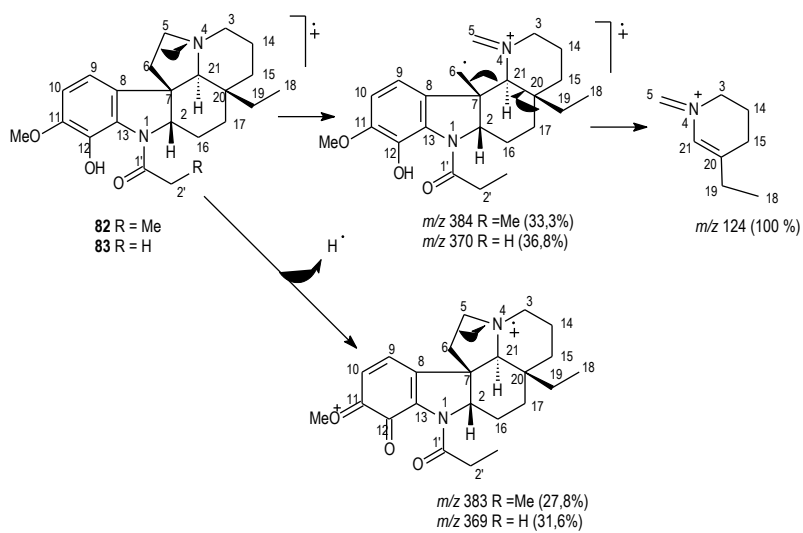
A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula foi feita com base nos dados adicionais fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN, nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Os dados de espectros de RMN e de massas acima relatados para o alcalóide MCD 2.8.2a (**82**, **Tabela 21**, página 83) revelaram-se em acordo com os dados descritos na literatura (PINAR et al., 1962) para o alcalóide aspidolimina (**82**), previamente isolado de *A. limae* e *A. obscurinervium*.

A expressiva utilização de dados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN permitiu a completa e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono ( $\delta_{\text{C}}$ ) e hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) de **MCD 2.8.2a (82, Tabela 22, página 87)**. O **Esquema 5** (página 86) resume a proposta de fragmentação da MCD 2.8.2a (**82**) no espectrômetro de massas, com base no espectro (**Figura 13**, página 86) obtido por impacto de elétrons (70 eV), justificando-se somente o pico base em  $m/z = 124$  (100%). O pico em  $m/z$  383 ( $[\text{M}]^+ - \text{H}$ ) apareceu com abundância relativa significativa (27,8 %) e foi justificado através de eliminação do radical hidrogênio hidroxílico, sem ignorar as outras possibilidades envolvendo os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos metínicos CH-2 e CH-21 e metilênicos CH<sub>2</sub>-3 e CH<sub>2</sub>-5, já que outros alcalóides isolados além do **83** (*vide infra* e **Esquema 5**, página 86) não revelaram tal comportamento.



**Figura 13.** Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto de elétrons (70 eV) para o alcalóide aspidolimina.



Esquema 5. Proposta de fragmentação para os alcalóides Aspidolimina e Aspidocarpina.

**Tabela 22.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) da **MCD 2.8.2a (82)** em  $\text{CDCl}_3$ , incluindo-se os resultados dos espectros 2D HMQC e HMBC e comparação com valores do alcalóide aspidocarpina (**83**). Deslocamentos químicos em ppm ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) e constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz (entre parênteses).\*

	Aspidolimina (82)				Aspidocarpina (83)	
	HMQC		HMBC		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$		
<b>C</b>						
7	52,2	-			52,2	-
8	133,1	-		H-10	133,1	-
11	149,4	-		MeO-11; HO-12; H-9	149,5	-
12	137,6	-	HO-12	H-10	137,5	-
13	127,0	-		H-9	127,5	-
20	35,5	-	2H-19	3H-18	35,5	-
1'	172,8	-	2H-2'	3H-3'	169,3	-
<b>CH</b>						
2	69,2	4,10 ( <i>m</i> )		H-21	70,3	4,07 ( <i>dd</i> , 11,6)
9	112,2	6,60 ( <i>d</i> , 8,2)			112,4	6,61 ( <i>d</i> , 8)
10	110,0	6,68 ( <i>d</i> , 8,2)			110,0	6,69 ( <i>d</i> , 8)
21	70,7	2,23 ( <i>s</i> )		H-19a; H-6a; H-15b	70,6	2,25 ( <i>s</i> )
<b>CH<sub>2</sub></b>						
3	53,7	2,98		H-21	53,7	3,04 ( <i>dm</i> , 12)
		1,97				1,98 ( <i>td</i> , 12, 4)
5	52,5	3,05			52,4	2,27 ( <i>m</i> )
		2,27				3,12 ( <i>m</i> )
6	39,3	2,01			39,4	1,57 ( <i>m</i> )
		1,50				2,04 ( <i>m</i> )
14	21,5	1,70			21,5	1,72 ( <i>tm</i> , 12)
		1,40				1,53 ( <i>dm</i> , 12)
15	34,0	1,65			34,0	1,65 ( <i>td</i> , 12, 4)
		1,08				1,11 ( <i>td</i> , 12, 4)
16	25,4	1,85			25,1	1,86 ( <i>m</i> )
		1,45				1,52 ( <i>m</i> )
17	22,5	2,00		H-19b; H-21	22,9	2,0 ( <i>td</i> , 12, 14)
		1,13				1,15 ( <i>dm</i> , 12)
19	30,7	1,37 ( <i>m</i> )	3H-18		30,0	1,44 ( <i>m</i> )
		0,86 ( <i>m</i> )				0,93 ( <i>m</i> )
2'	28,1	2,62-2,40 ( <i>m</i> )	3H-3'			
<b>CH<sub>3</sub></b>						
18	6,7	0,64 ( <i>t</i> , 7,0)	2H-19		6,8	0,63 ( <i>t</i> , 7,5)
2'					22,7	2,33 ( <i>s</i> )
3'	9,9	1,26 ( <i>t</i> , 7,0)	2H-2'			
MeO	56,5	3,87 ( <i>s</i> )			56,4	3,88 ( <i>s</i> )
HO	-	10,98 ( <i>s</i> )				10,98

\*Número de hidrogênio em cada carbono deduzido pela análise comparativa do RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT. Constantes de acoplamento ( $J$ ) obtidas do espectro 1D de RMN de  $^1\text{H}$ . O espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY foi também usado nestas atribuições.

A substância presente na fração **MCD 2.8.2b** apresentou-se como um sólido de cor alaranjada, com ponto de fusão 175 °C, revelando-se também um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro na região do infravermelho (**Espectro 10**, volume 2, página 20) revelou bandas em torno de  $\nu_{\max}$  2932  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-H), em adição a outras bandas em  $\nu_{\max}$  1650, 1462, 1252  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=C do anel benzênico) (VERPOORTE, 1986).

O espectro de massas de baixa resolução (EMBR, **Figura 14**, página 89) apresentou pico em  $m/z = 370$ , correspondente ao íon molecular ( $[M]^+$ ). Foi observada ainda a presença de pico em  $m/z = 124$ , indicando o fragmento  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}^+$  (**A**) típico de alcalóides semelhantes à aspidospermina (**83**) (IKEDA e DJERASSI, 1968). Observou-se uma diferença de 14 unidades de massa em relação ao alcalóide anteriormente descrito, aspidolimina (**82**), evidenciando a perda de uma unidade de  $\text{CH}_2$ .

Com base na similaridade espectral dessa substância (**83**) com a **82**, utilizou-se o mesmo procedimento analítico para caracterização estrutural. Os espectros 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 11**, página 21, volume 2), RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Espectro 12**, volume 2, página 22) e RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 13 a 15**, volume 2, páginas 23 a 25) combinados aos 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectros 16 e 17**, volume 2, páginas 26 e 27) e de massas (EM, **Figura 14**, página 89), possibilitaram propor (**Tabela 23**, página 89), para **83** a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{C})_6(\text{C}=\text{O})(\text{CH})_4(\text{CH}_2)_8(\text{CH}_3)_2(\text{MeO})(\text{N})_2(\text{OH})$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove ( $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_3 - \text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 = \text{H}_{18}$ ), coerentes com a proposta para um esqueleto do tipo plumerano (esqueleto básico  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$  com índice de deficiência de hidrogênio igual a oito – quatro do anel aromático e quatro carbocíclicos) sustentando os grupos OH, MeO e  $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$  (carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  169,5), que justificaram a presença dos três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios, em pleno acordo com o alcalóide aspidocarpina (**83**), anteriormente isolado de *A. megalocarpon* (McLEAN, PALMER e MARION, 1960).



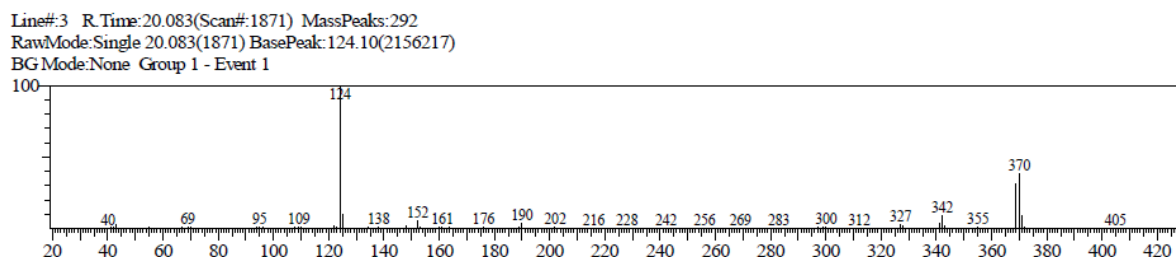
**Tabela 23.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 11**) e DEPTQ (**Espectro 12**) da **MCD 2.8.2b (83)** incluindo-se informações de correlações fornecidas pelo HMQC.

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
169,4	112,4	6,60 ( <i>d</i> , 8,2)	53,7	3,04 ( <i>dl</i> , 9,4), 1,97	56,5	3,87 ( <i>s</i> )	
149,4	110,4	6,69 ( <i>d</i> , 8,2)	53,4	3,12 ( <i>tl</i> , 9,4), 2,28	22,7	2,32 ( <i>s</i> )	
137,6	70,7	2,23 ( <i>s</i> )	39,4	2,01, 1,53	6,7	0,64 ( <i>t</i> , 7,0)	
133,1	70,2	4,05 ( <i>m</i> )	34,0	2,32, 1,64			
127,6			30,1	1,38 ( <i>m</i> ), 0,86 ( <i>m</i> )			
52,5			25,1	1,86, 1,48			
35,5			22,9	1,95, 1,15			
			21,5	1,71, 1,50			
(C) <sub>7</sub>		(CH) <sub>4</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (MeO)	

A presença de carbonila ligada ao átomo de nitrogênio N-1 foi deduzida através do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  169,4 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , característico de uma função amida (BREITMAIER e VOELTER, 1987). Esse carbono carbonílico (C-1') apresentou correlações à longa distância com os 3H-2' (um sinal simpleto  $\delta_{\text{H}}$  2,32,  $^2J_{\text{HC}}$ ) no espectro de HMBC (**Espectro 18**, volume 2, página 28), caracterizando-se também a ligação de C-1' a um grupamento metila ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ), sendo esta a principal diferença entre esta molécula (**83**) e a anteriormente discutida aspidolimina (**82**). Outras correlações heteronucleares observadas nos espectros de HMQC (**Espectro 19**, volume 2, página 29) e HMBC foram resumidas na **Tabela 24** (página 90).

Como no caso do alcalóide **82**, a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula foi feita com base nos dados adicionais fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN, nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Os dados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN permitiu a completa e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio de MCD 2.8.2b (**83**, **Tabela 24**, página 90). O **Esquema 6** (página 96) resume a proposta de fragmentação da MCD 2.8.2b (**83**) no espectrômetro de massas obtido por impacto eletrônico (70 eV), justificando-se somente os picos classificados como principais.



**Figura 14.** Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto de elétrons (70 eV) para o alcalóide aspidocarpina.

Os dados dos espectros de RMN e de massas acima discutidos para o alcalóide **MCD 2.8.2b (83, Tabela 24)** revelaram concordância com os valores descritos na literatura (McLEAN et al., 1987) para o alcalóide aspidocarpina, previamente isolado de *A. megalocarpon*.

**Tabela 24.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide aspidocarpina (**83**), em comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina (literatura).

	Aspidocarpina				aspidocarpina [1]	
	HMQC		HMBC		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>						
7	52,1	-			52,2	-
8	133,	-		H-10	133,1	-
11	149,5	-		H-9; HO-12	149,5	-
12	137,5	-	HO-12	H-10	137,5	-
13	127,5	-		H-9	127,5	-
20	35,5	-	2H-19	3H-18	35,5	-
1'	169,5	-	3H-2'		169,3	-
<b>CH</b>						
2	70,8	4,1 ( <i>m</i> )			70,3	4,07 ( <i>dd</i> , 11,6)
9	112,3	6,59 ( <i>d</i> , 8,2)			112,4	6,61 ( <i>d</i> , 8)
10	110,1	6,69 ( <i>d</i> , 8,2)			110,0	6,69 ( <i>d</i> , 8)
21	70,8	2,27 ( <i>s</i> )			70,6	2,25 ( <i>s</i> )
<b>CH2</b>						
3	53,5	3,10 ( <i>m</i> ) 1,90			53,7	3,04 ( <i>dm</i> , 12) 1,98 ( <i>td</i> , 12,4)
5	52,4	3,16 ( <i>m</i> ) 2,28			52,4	2,27 ( <i>m</i> ) 3,12 ( <i>m</i> )
6	39,2	2,00 1,60			39,4	1,57 ( <i>m</i> ) 2,04 ( <i>m</i> )
14	21,3				21,5	1,72 ( <i>tm</i> , 12) 1,53 ( <i>dm</i> , 12)
15	34,0	2,32 1,64			34,0	1,65 ( <i>td</i> , 12,4) 1,11 ( <i>td</i> , 12,4)
16	25,1	1,86 1,60	H-15		25,1	1,86 ( <i>m</i> ) 1,52 ( <i>m</i> )
17	22,9				22,9	2,0 ( <i>td</i> , 12, 14) 1,15 ( <i>dm</i> , 12)
19	30,1	1,37 ( <i>m</i> ) 0,86 ( <i>m</i> )	3H-18	2H-15	30,0	1,44 ( <i>m</i> ) 0,93 ( <i>m</i> )
<b>CH3</b>						
18	6,7	0,64 ( <i>t</i> , 7,0)	2H-19		6,8	0,63 ( <i>t</i> , 7,5)
2'	22,7	2,31 ( <i>s</i> )			22,7	2,33 ( <i>s</i> )
MeO		3,85 ( <i>s</i> )			56,4	3,88 ( <i>s</i> )
HO		10,95				10,98

[1] McLEAN et al., 1987.

A fração **MCD 2.8.3**, contendo uma mistura dos alcalóides aspidolimina (**82**) e aspidocarpina (**83**) foi submetida à reação de acetilação e o espectro de massas de baixa resolução (CG/EM) apresentou quatro picos principais, cujos cromatogramas correspondem aos íons moleculares  $[M]^+$  dos alcalóides aspidolimina (**82** = **MCD 2.8.3a**,  $m/z = 384$ ) e aspidocarpina (**83** = **MCD 2.8.3b**,  $m/z = 370$ ) não acetilados e outros dois referentes aos seus derivados acetilados (**82a** = **MCD 2.8.3bAc**  $m/z = 426$ ) e (**83a** = **MCD 2.8.3bAc**  $m/z = 412$ ) (**Figura 15**, página 95; **Esquema 6**, página 96).

O cromatograma desta mistura revelou as porcentagens relativas 7,71 % para **82** (aspidolimina), 32,37 % para **83** (aspidocarpina), 11,80 % para **82a** (monoacetilaspidolimina) e 40,88 % para **83a** (monoacetilaspidocarpina), caracterizadas na **Figura 15** (página 95) e **Esquema 6** (página 96).

A diferença mais pronunciada entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos acetilados (**Espectros 20 a 24**, páginas 30 a 34, volume 2) e os alcalóides originais (**Espectro 33**, volume 2, página 43) envolveu a diminuição da intensidade do sinal da hidroxila, em  $\delta_{\text{H}}$  10,99 (1H, s). Essa redução evidenciou a ocorrência de reação de acetilação na única hidroxila presente nas substâncias. Se o rendimento da reação fosse de 100%, esse sinal seria completamente suprimido do espectro.

A análise comparativa dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ dos derivados a acetilados (**Espectros 20 e 21**, volume 2, páginas 30 e 31) com os da mistura original **MCD 2.8.3** (**82 + 83**, **Espectros 30 a 32**, volume 2, páginas 40 a 42) permitiu reconhecer os sinais adicionais correspondentes aos grupos acetoxílicos de cada derivado (**82a** e **83a**) através da comparação envolvendo a **Tabela 21** (página 83) e a **Tabela 25** (página 92). Assim, o aumento no número de átomos de carbonos metílicos e o surgimento de um novo sinal de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  167,6 (HMBC, **Espectros 26 e 27**, volume 2, páginas 36 e 37) foram atribuídos à presença do grupo acetila substituindo o átomo de H da hidroxila em C-12 em aproximadamente 52,68% das moléculas presentes.

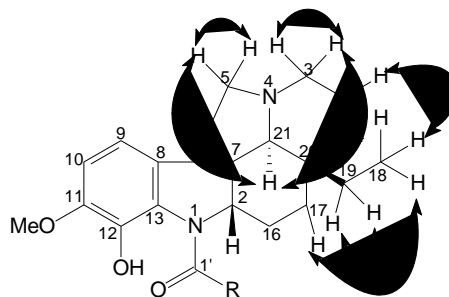
**Tabela 25.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 20 e 21**) da **MCD 2.8.3 a e b** acetiladas (**82a e 83a**).

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
167,6	119,3	6,96 ( <i>d</i> , 8,2)	53,7	3,09 ( <i>d/l</i> ), 1,99	56,5	3,84 ( <i>s</i> )	
151,9	110,0	6,72 ( <i>d</i> , 8,2)	52,5	3,18 ( <i>t/l</i> ), 2,27	22,7	2,22 ( <i>s</i> )	
133,3	71,2	2,32 ( <i>s</i> )	39,3	2,07, 1,61	20,9	2,34 ( <i>s</i> )	
133,3	70,8	4,13 ( <i>m</i> )	34,0	1,62, 1,11	10,2	1,27	
130,2			30,1	1,31 ( <i>m</i> ), 0,85 ( <i>m</i> )	6,9	0,66 ( <i>d</i> , 7,4)	
52,5			25,1	1,95, 1,55			
35,5			22,9	2,02, 1,16			
			21,4	2,09, 1,87			
(C) <sub>7</sub>		(CH) <sub>4</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>		(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (MeO)	

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos alcalóides acetilados **82a e 83a** (**Espectros 22 a 24**, volume 2, páginas 32 a 34) mostraram diferenças significativas (**Tabela 26**, página 94) somente nos sinais representantes do H-9 [ $\Delta\delta_{\text{H}}=6,96$  (**82a**) – 6,64 (**82**)=0,32ppm e  $\Delta\delta_{\text{H}}=6,98$  (**83a**) – 6,62 (**83**)= 0,36ppm]. Também como esperado pela atenuação do efeito mesomérico do átomo de oxigênio, a comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT das misturas de **82a + 83a e 82 + 83** revelou modificações (**Espectros 20 e 21**, volume 2, páginas 30 e 31; **30 a 32**, páginas 40 a 42) nos  $\delta_{\text{C}}$  dos átomos de carbono *ipso* (C-12, proteção), *orto* (C-11 e C-13, desproteção) e *para* (CH-9, desproteção): C-12 [ $\Delta\delta_{\text{C}}=133,3$  (**82a/83a**) – 137,4 (**82/83**) = -4,47 ppm], C-11 [ $\Delta\delta_{\text{C}}=151,9$  (**82a/83a**) – 149,3 (**82/83**) = 2,6 ppm], C-13 [ $\Delta\delta_{\text{C}}=133,3$  (**82a/83a**) – 127,6 (**82/83**) = 5,7 ppm] e CH-9 [ $\Delta\delta_{\text{C}}=119,3$  (**82a/83a**) – 112,3 (**82/83**) = 7,0 ppm]. Tais modificações confirmaram a presença da carboxila do grupo 12-O-acetil, sendo o grupo acetila responsável pela atenuação do deslocamento de elétrons do átomo de oxigênio para o anel aromático através do efeito mesomérico nas posições *orto* e *para*. Outras correlações heteronucleares (**Tabela 26**, página 94) foram observadas nos espectros de HMBC (**Espectros 26 e 27**, volume 2, páginas 36 e 37) e HMQC (**Espectros 28 e 29**, volume 2, páginas 38 e 39).

O espectro de HMBC (**Espectros 26 e 27**, volume 2, páginas 36 e 37) das substâncias acetiladas (**82a e 83a**) revelou também as correlações heteronucleares à longa distância  $^2J_{\text{H,C}}$  entre C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  151,9) e H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  6,72), e  $^3J_{\text{H,C}}$  entre C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  130,2)/H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  6,72), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  151,9)/H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  6,96), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  151,9)/MeO-11 ( $\delta_{\text{H}}$  3,84), C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  133,3)/H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  6,72) e C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  133,3)/H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  6,96).

A estereoquímica relativa dos carbonos estereogênicos dos alcalóides da fração MCD 2.8.3 (**82 e 83**) foi determinada através de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOEDIFF (**Espectros 34 e 35**, volume 2, páginas 44 e 45), onde foi possível verificar as interações principais.



**82** Aspidolimina R = Et  
**83** Aspidocarpina R = Me

A expressiva utilização de dados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN permitiu a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio de MCD 2.8.3 Ac (**Tabela 26**, página 94). O **Esquema 6** (página 96) resume a proposta de fragmentação dos componentes desta fração no espectrômetro de massas de baixa resolução, com base em espectros obtidos por impacto de elétrons (70 eV), justificando-se somente os picos classificados como principais.

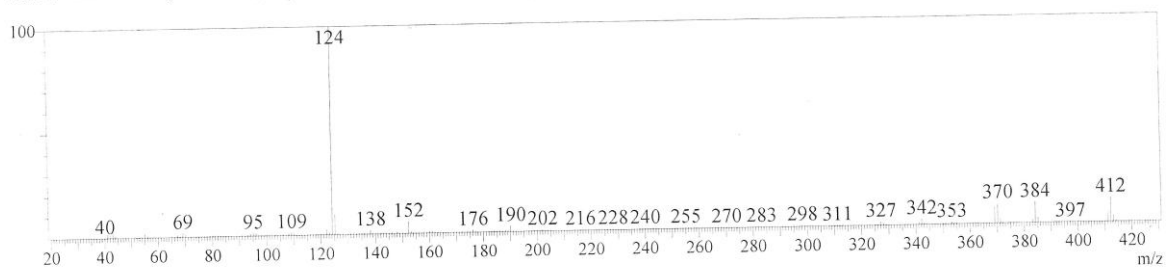
Esses dados analisados em conjunto forneceram prova inequívoca da natureza dos derivados acetilados **82a** e **83a**, permitindo, inclusive, calcular suas respectivas abundâncias. Não foram encontrados relatos de experimentos de acetilação de uma mistura dos alcalóides aspidolimina (**82**) e aspidocarpina (**83**), registrando-se na literatura através deste trabalho a interpretação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para essas substâncias acetiladas **82a** e **83a**.

**Tabela 26.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC dos alcalóides aspidolimina e aspidocarpina acetilados (**82a** e **83a**), em comparação com os mesmos não-acetilados (**82** e **83**).

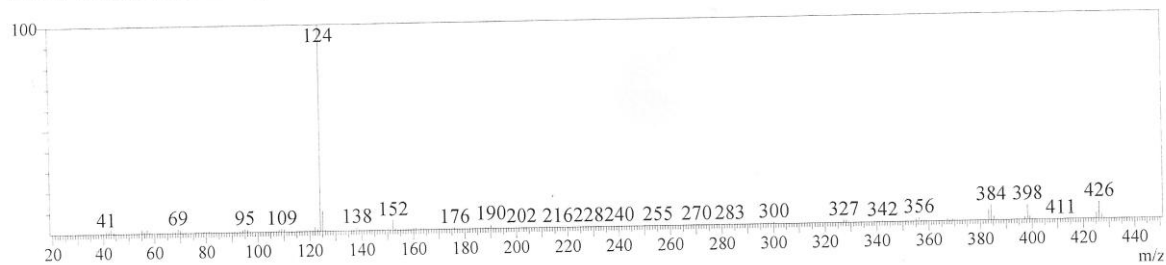
	HSQC				HMBC		HSQC			
	MCD-2.8.3A Ac (82a)		MCD-2.8.3B Ac (83a)		$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	MCD-2.8.3A (82)		MCD-2.8.3B (83)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$			$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>										
7	52,5	-	52,5	-			52,5	-	52,5	-
8	130,2	-	130,2	-		H-10	127,3	-	127,3	-
11	151,9	-	151,9	-	H-10	H-9, MeO	149,3	-	149,3	-
12	133,3	-	133,3	-		H-10	137,4	-	137,4	-
13	133,3	-	133,3	-		H-9	127,6	-	127,6	-
20	35,5	-	35,5	-			35,5	-	35,5	-
1'	167,6	-	167,6	-			169,9	-	174,0	-
Ac	-	-	-	-			-	-	-	-
<b>CH</b>										
2	70,8	4,13	70,8	4,13			70,8	4,13	70,8	4,13
9	119,3	6,96 ( <i>d</i> )	119,3	6,98 ( <i>d</i> )			112,3	6,64	112,3	6,62
10	109,9	6,71 ( <i>d</i> )	109,9	6,71 ( <i>d</i> )			108,7	6,70 ( <i>d</i> )	108,7	6,69 ( <i>d</i> )
21	71,2	2,32 ( <i>s</i> )	71,2	2,32 ( <i>s</i> )			71,2	2,32 ( <i>s</i> )	71,2	2,32 ( <i>s</i> )
<b>CH<sub>2</sub></b>										
3	53,7	3,09; 1,99	53,7	3,09; 1,99			53,7	3,09; 1,99	53,7	3,09; 1,99
5	52,5	3,18; 2,27	52,5	3,18; 2,27			52,5	3,18; 2,27	52,5	3,18; 2,27
6	38,7	2,07; 1,61	38,7	2,07; 1,61			39,3	2,07; 1,61	38,7	2,07; 1,61
14	21,4	2,09; 1,87	21,4	2,09; 1,87			21,4	2,09; 1,87	21,4	2,09; 1,87
15	34,0	1,62; 1,11	34,0	1,62; 1,11			34,0	1,62; 1,11	34,0	1,62; 1,11
16	25,1	1,95; 1,55	25,1	1,95; 1,55			25,1	1,95; 1,55	25,1	1,95; 1,55
17	22,8	2,02; 1,16	22,9	2,02; 1,16			22,9	2,02; 1,16	22,8	2,02; 1,16
19	30,1	1,31; 0,85	30,1	1,31; 0,85			30,1	1,31; 0,85	30,1	1,31; 0,85
2'	28,1	*	-	-			28,1	*	-	-
<b>CH<sub>3</sub></b>										
18	6,9	0,66 ( <i>d</i> , 7,5)	6,9	0,66 ( <i>d</i> , 7,4)			6,9	0,67 ( <i>d</i> )	6,9	0,68 ( <i>d</i> )
2'	-	-	22,8	2,22 ( <i>s</i> )			-	-	22,8	2,22 ( <i>s</i> )
3'	10,2	1,27	-	-			9,94	1,27	-	-
Ac	20,9	2,34	20,9	2,34			20,9	2,34	20,9	2,34
MeO	56,5	3,84	56,5	3,84			56,5	3,90	56,5	3,90
HO		10,99 ( <i>s</i> )		10,99 ( <i>s</i> )				10,99 ( <i>s</i> )		10,99 ( <i>s</i> )

\*não foi possível determinar devido à baixa proporção do sinal

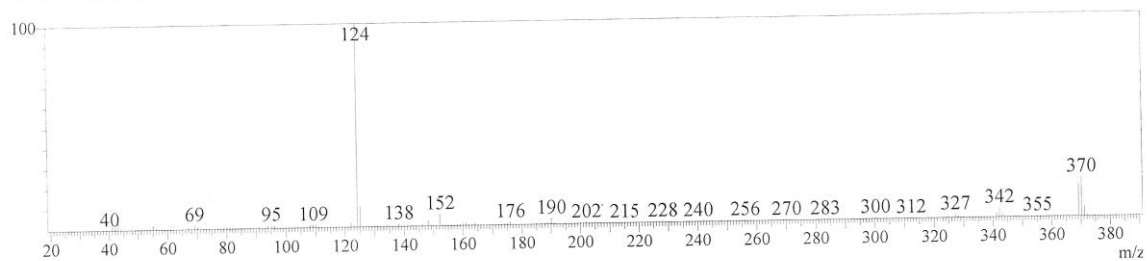
Line#:5 R.Time:19.1(Scan#:1998)



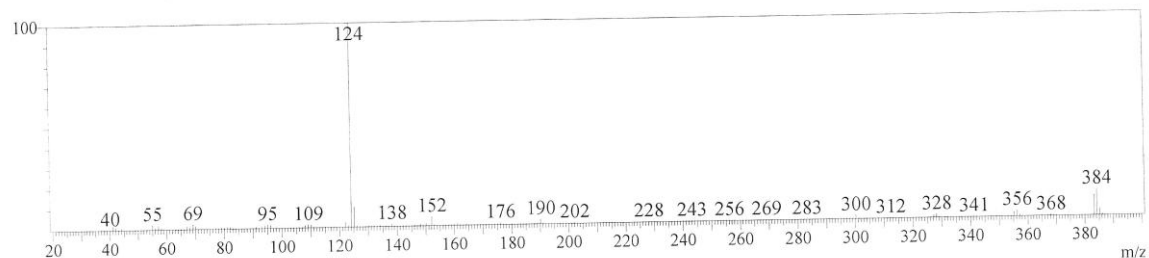
Line#:6 R.Time:19.7(Scan#:2062)



Line#:7 R.Time:20.3(Scan#:2142)



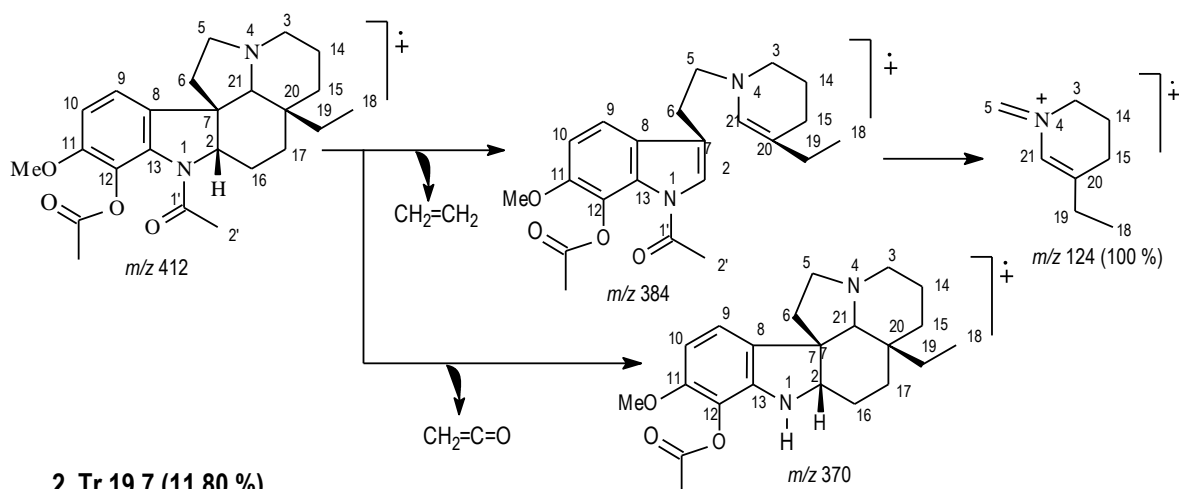
Line#:8 R.Time:21.0(Scan#:2225)



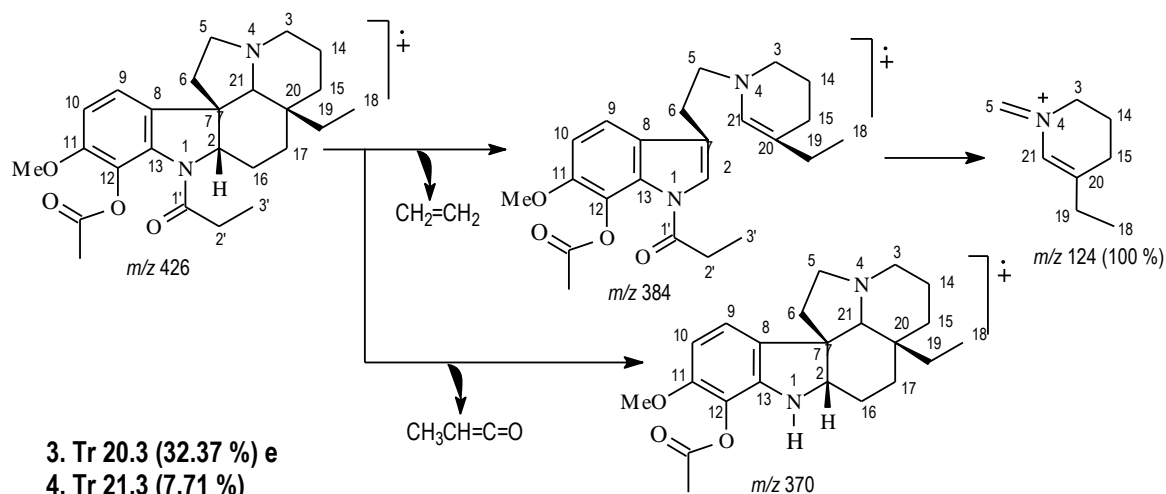
**Figura 15.** Espectros de massas (70 eV) de baixa resolução (EMBR) obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG/EM) da fração **MCD 2.8.3** Acetilada.

## GC/MS:

## 1. Tr 19.1 (40.88 %)

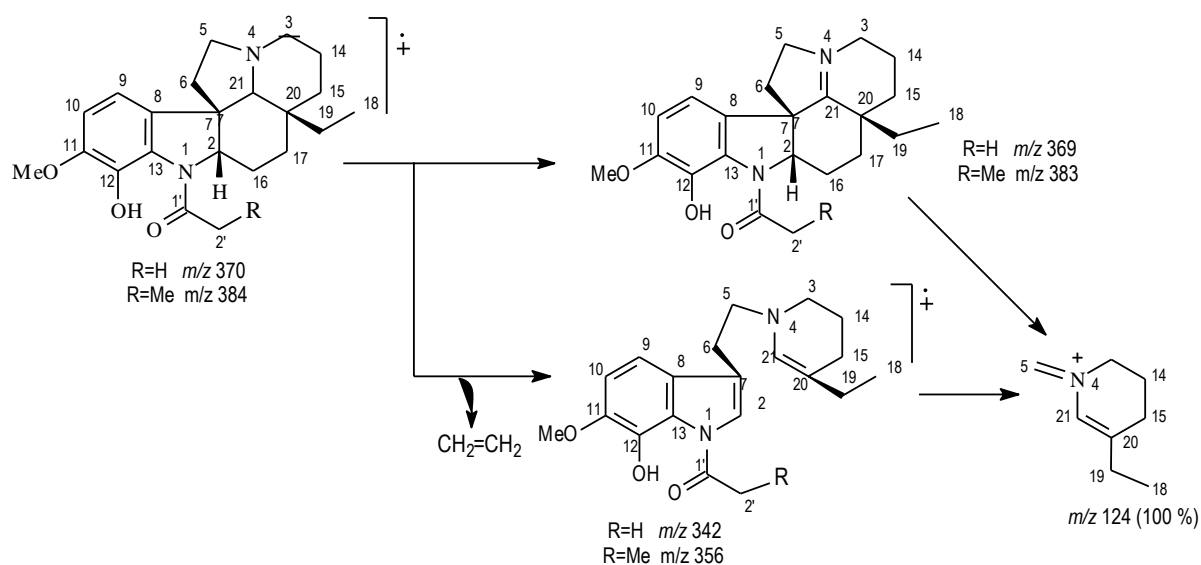


## 2. Tr 19.7 (11.80 %)



## 3. Tr 20.3 (32.37 %) e

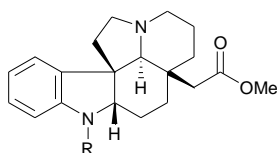
## 4. Tr 21.3 (7.71 %)



**Esquema 6.** Proposta de fragmentação para justificar os espectros de massas de baixa resolução (EMBR, 70 eV) dos componentes da mistura contendo **83a** ( $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  412), **83a** ( $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  426), **83** ( $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  370) e **82** ( $[\text{M}]^+$ ,  $m/z$  384) analisada por CG/EM.



**5.1.2 Determinação estrutural dos alcalóides 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (91a e 91b), 12-desmetóxi-*N*-formilcilindrocarina (92), 12-desmetóxi-*N*-propionilcilindrocarina (93), 12-desmetóxi-*N*-butilcilindrocarina (94), 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina (96) e 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina (97)**

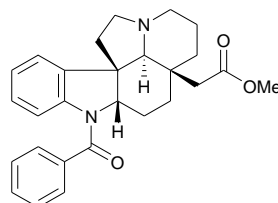


91 R = OAc 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina

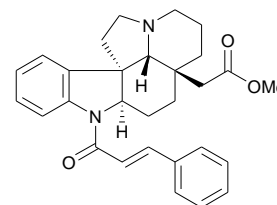
92 R = COH 12-desmetóxi-*N*-formilcilindrocarina

93 R = COEt 12-desmetóxi-*N*-propionilcilindrocarina

94 R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> 12-desmetóxi-*N*-butilcilindrocarina



96 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina



97 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina

A substância presente na fração **MCC 1.15.5A** apresentou-se como um óleo de cor castanha, revelando-se um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro na região do infravermelho (**Espectro 36**, volume 2, página 46) revelou estiramentos em  $\nu_{\max}$  2945-2790 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-H), 1730 cm<sup>-1</sup> (estiramento da função carbonílica grupo carbometoxílico) e 1658 (estiramento do grupo carbonila), em adição a outras bandas em  $\nu_{\max}$ , 1477, 1400 cm<sup>-1</sup> (estiramento C=C do anel benzênico) e em torno de 750 cm<sup>-1</sup> (ligação C-H do anel benzênico monossustituído) (VERPOORTE, 1986).

A análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPTQ (**Espectros 37 e 38**, volume 2, páginas 47 e 48) permitiu reconhecer sinais correspondentes a seis átomos de carbono não-hidrogenados (quatro sp<sup>2</sup> e dois sp<sup>3</sup>), seis carbonos metínicos (quatro sp<sup>2</sup> e dois sp<sup>3</sup>), oito metilênicos (todos sp<sup>3</sup>) e dois metílicos (incluindo um metoxílico em  $\delta_C$  51,2), descritos na **Tabela 27** (página 98). Estes dados, em associação com os dados fornecidos pelos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (1D, **Espectros 39 a 41**, volume 2, páginas 49 a 51; 2D, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, **Espectro 42**, volume 2 página 52) e de massas (EM) possibilitaram propor, para o alcalóide predominante na fração **MCD 1.15.5A**, a fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = (C)<sub>4</sub>(C=O)<sub>2</sub>(CH)<sub>6</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(MeO)(N)<sub>2</sub>, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dez (C<sub>22</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = H<sub>20</sub>), coerentes com a proposta para um esqueleto tipo plumerano (esqueleto básico C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>, com índice de deficiência de hidrogênio do anel aromático igual a oito e quatro carbocíclicos) sustentando um grupo MeO e duas carbonilas (uma em  $\delta_C$  171,9 e outra em  $\delta_C$  168,5). Assim, justificou-se a presença de três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios, em pleno acordo com o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (**91**), anteriormente isolado de *Aspidosperma cylindrocarpon* (MILBORROW e DJERASSI, 1969).

**Tabela 27.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 37 e 38**) da **MCC 1.10.15A (91)**.

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
171,9	127,9	7,23	53,5	3,08 ( <i>td</i> , 11,0, 1,9), 1,98	51,2	3,63 ( <i>s</i> )	
168,5	124,4	7,06 ( <i>dt</i> , 7,4, 1,0)	52,3	3,19 ( <i>dt</i> , 9,2, 3,4), 2,36	23,3	2,30 ( <i>s</i> )	
140,9	122,3	7,21	39,2	2,05, 1,48			
137,4	118,4	8,15 ( <i>d</i> , 8,0)	34,7	1,70, 1,45			
52,8	69,2	2,54 ( <i>s</i> )	25,9	1,98, 1,60			
35,9	67,6	4,10 ( <i>dd</i> , 11,3, 6,2)	24,3	2,08, 1,48			
			21,5	1,60 ( <i>m</i> ), 1,50			
(C) <sub>6</sub>		(CH) <sub>6</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>		(CH <sub>3</sub> )(MeO)	

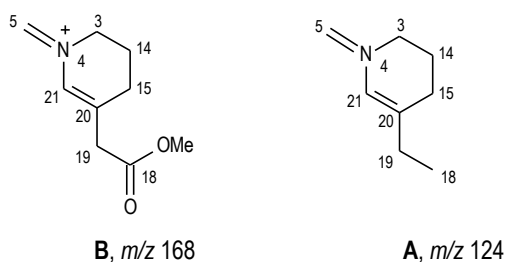
O anel aromático tetrassubstituído, presente nos alcalóides **82** e **83**, revelou-se dissustituído através das correlações heteronucleares observadas no espectro de HSQC de **91** (**Espectros 43 e 44**, volume 2, páginas 53 e 54), verificando-se sinais transversais correspondentes às interações a  $^3J_{\text{HC}}$  entre C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  122,3) e H-11 ( $\delta_{\text{H}}$  7,23), entre C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  124,4) e H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  8,15), entre C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  127,9) e H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7,21) e entre C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  118,4) e H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  7,06) (**Tabela 28**, página 101). O espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectro 42**, volume 2, página 52) corroborou estas deduções.

Assim como para o alcalóide aspilocarpina (**83**), a oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pôde ser verificada através do sinal no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  168,5, relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (BREITMAIER e VOELTER, 1987). Esse carbono apresentou correlações à longa distância  $^2J_{\text{HC}}$  com um sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  2,30 no espectro de HMBC (**Espectros 45 e 46**, volume 2, páginas 55 e 56), caracterizando a ligação de C-1' a um grupamento metila.

O grupamento  $\text{CH}_2\text{COOMe}$  ligado ao átomo de carbono  $\text{sp}^3$  tetrassubstituído C-20 pôde ser caracterizado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  pela presença dos sinais correspondentes aos hidrogênios diastereotópicos  $\text{CH}_2$ -19, representados por dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,36 (1H, *d*,  $J=13,9$ , H-19a) e  $\delta_{\text{H}}$  2,06 (1H, *d*,  $J=13,9$ , H-19b), pelo sinal do grupo carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  171,9 (C-18) e pelo sinal simples em  $\delta_{\text{H}}$  3,63 (3H, *sp* MeO) (**Espectros 37 a 41**, volume 2, páginas 47 a 51). No espectro de HMBC foram observadas correlações heteronucleares à longa distância  $^3J_{\text{HC}}$  entre os átomos de carbono  $\text{CH}_2$ -19 ( $\delta_{\text{C}}$  42,4) com H-15b ( $\delta_{\text{H}}$  1,45) e H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  2,54) e entre C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  171,9) e os hidrogênios da metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,63) (**Tabela 28**, página 101; **Espectros 45 e 46**, volume 2, páginas 55 e 56).

O espectro de massas de alta resolução de **91** (**Figura 16**, página 99; **Esquema 7**, página 100) confirmou estas deduções através da presença de do pico correspondente ao íon molecular protonado  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  369,2141. Observou-se também picos em  $m/z$  337,1884

[(M+H) – MeOH], 295,1783 [(M+H) – CH<sub>2</sub>=COH-OMe, rearranjo de McLafferty], *m/z* 253,1668 [*m/z* 295,1783 - H<sub>2</sub>C=C=O] e 168,0993 justificado pelo fragmento C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> (**B**), análogo ao **A** (*m/z* 124) observado nos espectros de massas de **82** e **83** e seus derivados **82a** e **83a** (MILBORROW e DJERASSI, 1969), fragmentos característicos dos dois tipos de alcalóides pela substituição do grupo etila (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) pelo CH<sub>2</sub>COOMe.



A utilização de dados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN permitiu a completa e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio de **MCC 1.15.5A (95)** (Tabela 28, página 101).

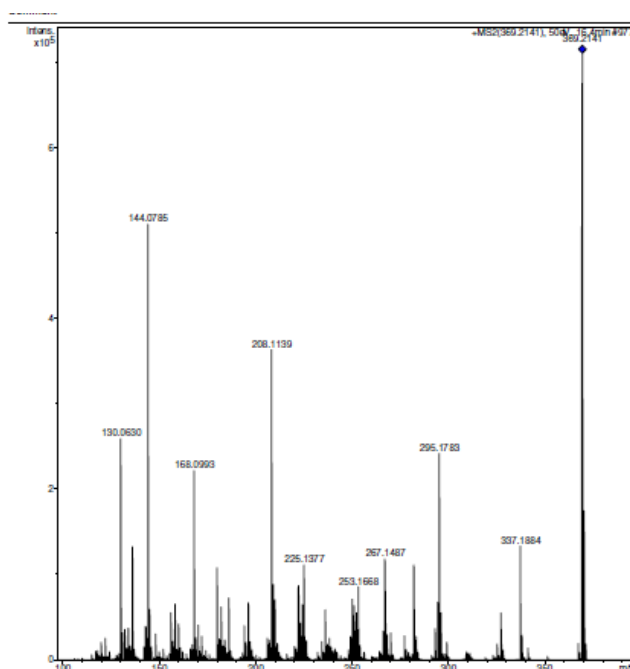
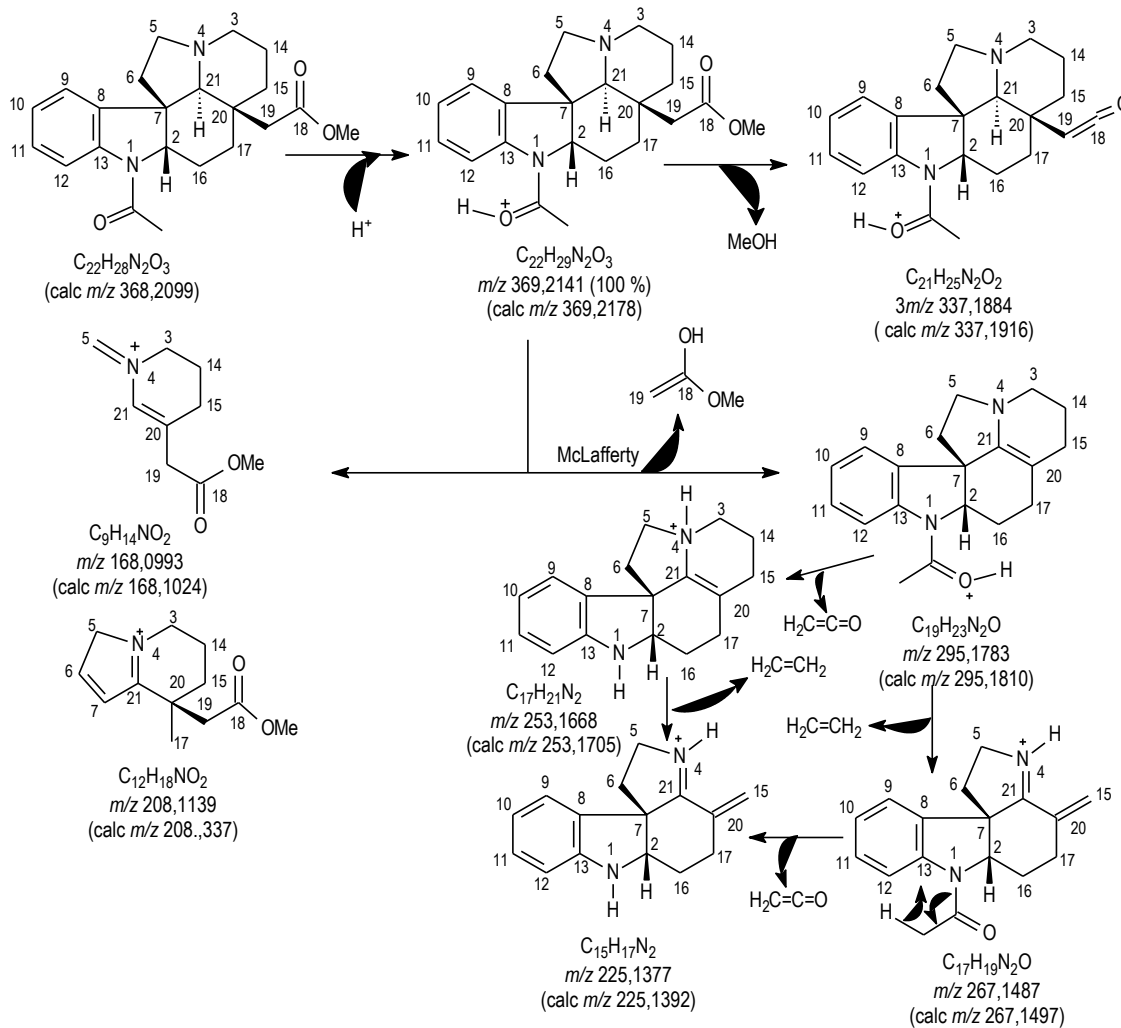


Figura 16. Espectro de massas de alta resolução (EMAR a 70 eV), da fração **MCC 1.15.5A (91)**.

MS2 do  $m/z$  369,2141:

**Esquema 7.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas de alta resolução EMAR, eletrospray, modo positivo) do alcalóide **91** (12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina).

**Tabela 28.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (**91**), em comparação com valores de referência da literatura.

	12-desmetóxi- <i>N</i> -acetilcilindrocarina ( <b>91</b> )				Literatura	
	HSQC		HMBC		HSQC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>						
7	52,8	-	H-2, H-21	2H-5, H-5	53,5	-
8	137,4	-		H-2, H-10, H-12, H-21	137,4	-
13	140,9	-		H-2, H-9, H-1	141,1	-
18	171,9	-	2H-19	MeO-18	171,8	-
20	35,9	-	2H-19		36,0	-
1'	168,5	-	3H-2'		168,3	-
<b>CH</b>						
2	67,6	4,10 ( <i>dd</i> , 11,3, 6,2)		H-21	67,6	4,04 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =10,8, 8,0)
9	122,3	7,21		H-11	124,3	7,3-6,9 (1H, <i>m</i> )
10	124,4	7,06 ( <i>dt</i> , 7,4, 1,0)		H-12	122,3	7,3-6,9 (1H, <i>m</i> )
11	127,9	7,23		H-9	127,9	7,3-6,9 (1H, <i>m</i> )
12	118,4	8,15 ( <i>d</i> , 8,0)		H-10	118,6	8,12 (1H, <i>m</i> )
21	69,2	2,54 ( <i>s</i> )		H-5a, 2H-19	69,9	2,53 (1H, <i>s</i> )
<b>CH<sub>2</sub></b>						
3	53,5	3,08 ( <i>td</i> , 11,0, 1,9) 1,98		H-21	53,0	3,3-2,95 (2H, <i>m</i> )
5	52,3	3,19 ( <i>dt</i> , 9,2, 3,4) 2,36		H-21	52,2	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
6	39,2	2,05, 1,48		H-2	39,3	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
14	21,5	1,60 ( <i>m</i> ), 11,50			21,6	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
15	34,6	1,70, 1,45		H-15b, 2H-19	34,8	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
16	25,9	1,98, 1,60			29,7	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
17	24,3	2,08 1,48		H-15b, 2H-19	24,6	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
19	42,4	2,36 ( <i>d</i> , 13,9) 2,06 ( <i>d</i> , 13,9)		H-15b, H-21	42,4	2,5-1,2 (2H, <i>m</i> )*
<b>CH<sub>3</sub></b>						
MeO-18	51,2	3,63 ( <i>s</i> )			51,0	3,57 (3H, <i>s</i> )
2'	23,3	2,30 ( <i>s</i> )			23,2	2,26 (3H, <i>s</i> )

\* 2,5 – 1,2 (14H, *m*)

O grupo  $\text{CH}_2\text{COOMe}$  presente nesta molécula resultou de sucessivas biotransformações oxidativas da cadeia lateral  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , originando  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  e  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ , seguidas então por uma reação de biometilação, a qual resulta na presença de  $-\text{CH}_2\text{COOMe}$  em C-20 (GUIMARÃES et al., 2012, no prelo).

A utilização de dados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN permitiu a completa e inequívoca atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio de **MCC 1.15.5A (91, Tabela 28)**.

A análise através de CG/EMBR da **MCC 1.10.15A** revelou a presença (**Figura 17**) das duas substâncias com  $T_R = 23,94$  min (68,40 %) e 24,07 (16,31 %). Os espectros de massas das duas substâncias correspondentes a estes  $T_R$  revelaram praticamente o mesmo perfil dos picos principais, com diferenças somente nas intensidades relativas, claramente demonstrando duas substâncias representadas por espectros compatíveis com análogos processos de fragmentações, diferindo apenas nas intensidades relativas de picos de alguns fragmentos (**Figura 19**, página 105). A presença de tais conformações nas condições operacionais de um CG/EM (70 eV) pode ser apontada como improvável, requerendo, conseqüentemente, avaliações rigorosas adicionais para afastar definitivamente a possibilidade de epímeros, que parece mais provável.

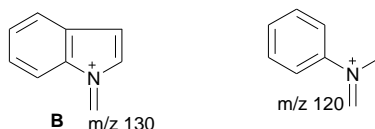
[GC-2010]			Peak Report TIC			
Column Oven Temp. :	100.0 °C		Peak#	R.Time	Area	Area%
Injection Temp.:	250.00 °C		1	19.732	1855946	1.91
Injection Mode	:Split		2	23.405	2920798	3.00
Column Flow:	1.00 mL/min		3	23.943	66554474	68.40
Oven Temp. Program		Hold Time(min)	4	24.067	15870504	16.31
Rate	Temperature(°C)		5	24.542	2485323	2.55
-	100.0	1.00	6	29.984	2624819	2.70
10.00	290.0	50.00	7	30.796	2119535	2.18
			8	31.550	2873167	2.95
					97304566	100.00
[GCMS-QP2010 Plus]						
IonSourceTemp	:250.00 °C					
Interface Temp.	:310.00 °C					
Solvent Cut Time	:2.50 min					

**Figura 17.** Condições cromatográficas e parâmetros qualitativos da **MCC 1.10.15A**

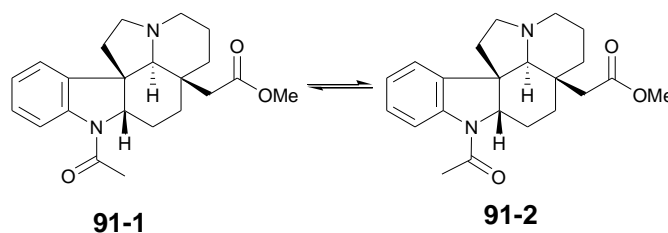
Ao lado desta substância, também foi verificada pelos espectros de massas (EM) obtidos através de análise por CG/EMBR a presença de mais dois outros alcalóides ( $T_R$  24,54 min, 2,55 % e  $T_R$  30,79 min, 2,18 %), semelhantes à 12-desmetóxi-*N*-acetilcincindrocarina (**91**) mas sustentando grupos propionila (*N*-COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) e butila (*N*-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ligados ao nitrogênio no lugar do grupo acetila (*N*-Ac) presente em (**91**). As propostas estruturais para tais substâncias foram embasadas somente nos perfis dos picos revelados pelos correspondentes espectros de massas, destacando-se a diferença de 14 unidades de massa em relação ao alcalóide anteriormente descrito (**91**), uma vez que seus sinais de átomos de hidrogênio e carbono não foram observados através da análise dos espectros de RMN de **91**. O espectro de massas de baixa resolução (EMBR) do alcalóide (**93**) sustentando o grupo propionila ( $T_R$  24,54 min) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z = 382$  ( $[M]^+$ ) e os principais picos ( $m/z$  308, e 168)

justificados perfeitamente através das reações de fragmentação propostas para **91** (**Figura 19**, página 105; **Esquema 8**, página 106).

O alcalóide com  $T_R$  30,79 min (2.18 %) também apresentou o pico do íon molecular em  $m/z = 382$  ( $[M]^+$ ), mas o perfil de picos observados no espectro revelou-se significativamente diferente. Assim, o pico em  $m/z$  308 ( $[M]^- \text{CH}_2\text{COHOMe}$ ), referente à eliminação da cadeia lateral localizada no C-20 através de rearranjo de McLafferty, admitindo a presença do  $\text{CH}_2\text{COOMe}$  no C-20 como observado nos outros alcalóides acima referidos, e os picos em  $m/z$  265, 130 e 120 (favoráveis à presença do grupo butila ligado N-1) foram utilizados para lançar a proposta **94**, cogitada com base somente no EMBR (**Figura 19**, página 105 e **Esquema 8**, página 106). Obviamente, esta proposta estrutural requer dados adicionais para que tal alcalóide sustentasse o grupo butila ligado ao N-1, seja caracterizado definitivamente.

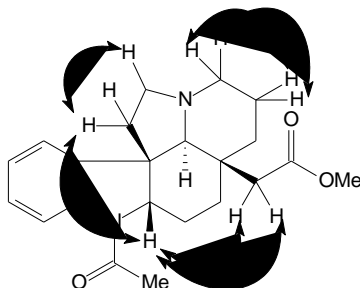


Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D) e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (2D) de **91** (1D **Espectros 37 a 39**, volume 2, páginas 47 a 49; 2D,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, **Espectro 40**, volume 2, página 50) revelaram sinais de H-2 atribuídos à presença de dois conformêros (**91-1** e **91-2**, **Figura 18**). Esse fato ficou evidenciado pela presença de dois sinais atribuídos a H-2, em  $\delta_H$  4,10 e 4,62. O aparecimento destes sinais de H-2 com valores diferentes revelou a orientação deste átomo de hidrogênio em relação ao efeito anisotrópico do grupo carbonila amídico, como já observado em dados espectrais de outras amidas (BREITMAIER e VOELTER, 1987). Assim, a maior proximidade de H-2 (**Figura 18**) em relação ao efeito anisotrópico do grupo carbonílico (**91-2**) foi usada para justificar o maior valor  $\delta_H$  4,62 comparado com valor atribuído ao H-2 de **91-1** ( $\delta_H$  4,10). A presença das duas conformações também ficou claramente demonstrada através do EMBR, o qual apresentou dois espectros com fragmentações idênticas, diferindo apenas nas intensidades de alguns picos (**Figura 19**, página 105).

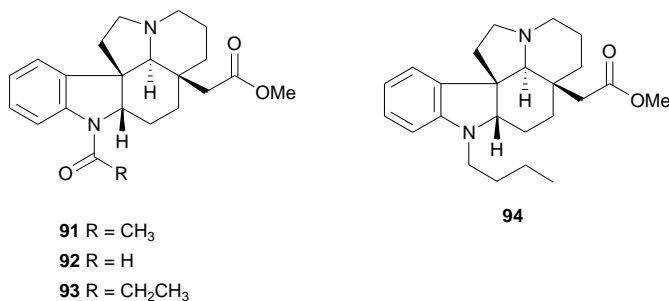


**Figura 18.** Conformêros deduzidos (**91-1** e **91-2**) através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY da substância **91**.

A estereoquímica relativa dos carbonos estereogênicos do alcalóide majoritário da fração **MCD 1.15.5 (91)** foi determinada através de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (**Espectro 47**, volume 2, página 57) e corroborada pelo experimento de Dicroísmo Circular (*vide infra*), onde foi possível verificar as interações principais.

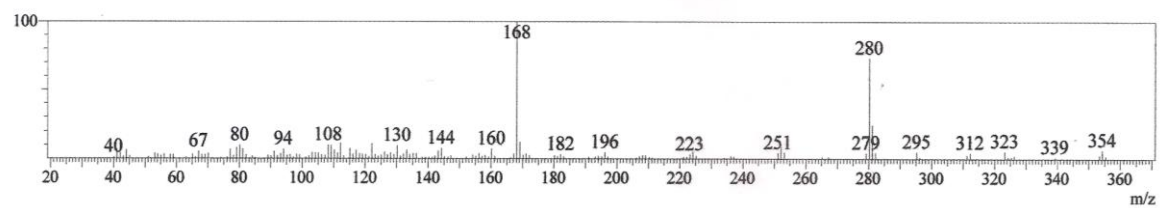


Os dados de RMN e espectrometria de massas acima descritos para o alcalóide **MCC 1.15.5A** estão em acordo com os dados descritos na literatura (MILBORROW e DJERASSI, 1969) para o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-acetilcilandrocarina (**91**) e seu confômero, confirmando assim a proposta estrutural para o alcalóide em investigação. A proposta para o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-butilcilandrocarina (**94**) requer a obtenção de dados adicionais para confirmação estrutural, já que não se encontrou dados análogos na literatura para comparação confiável.

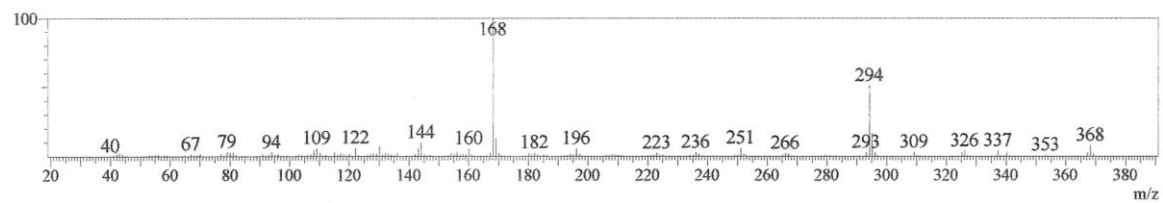




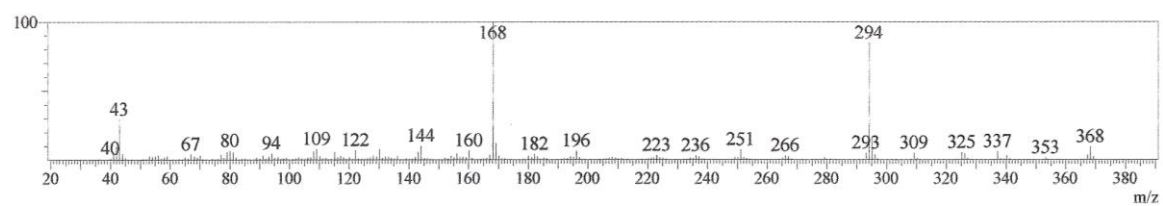
Line#:2 R.Time:23.4(Scan#:2510)



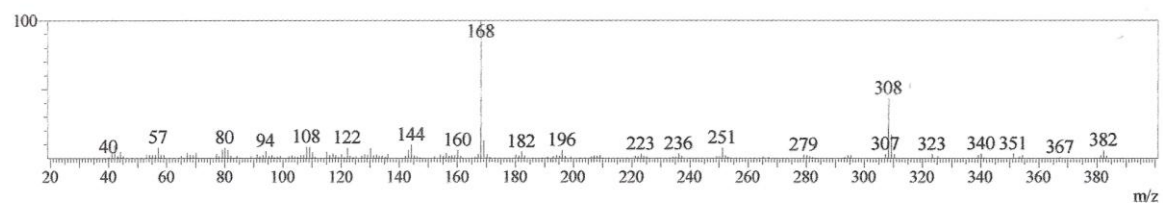
Line#:3 R.Time:23.9(Scan#:2574)



Line#:4 R.Time:24.1(Scan#:2589)



Line#:5 R.Time:24.5(Scan#:2646)



Line#:7 R.Time:30.8(Scan#:3397)

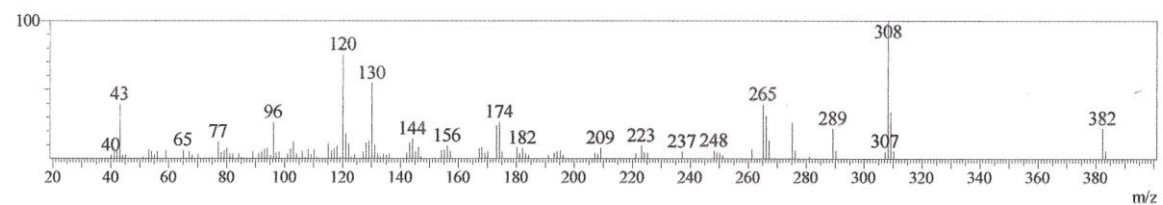
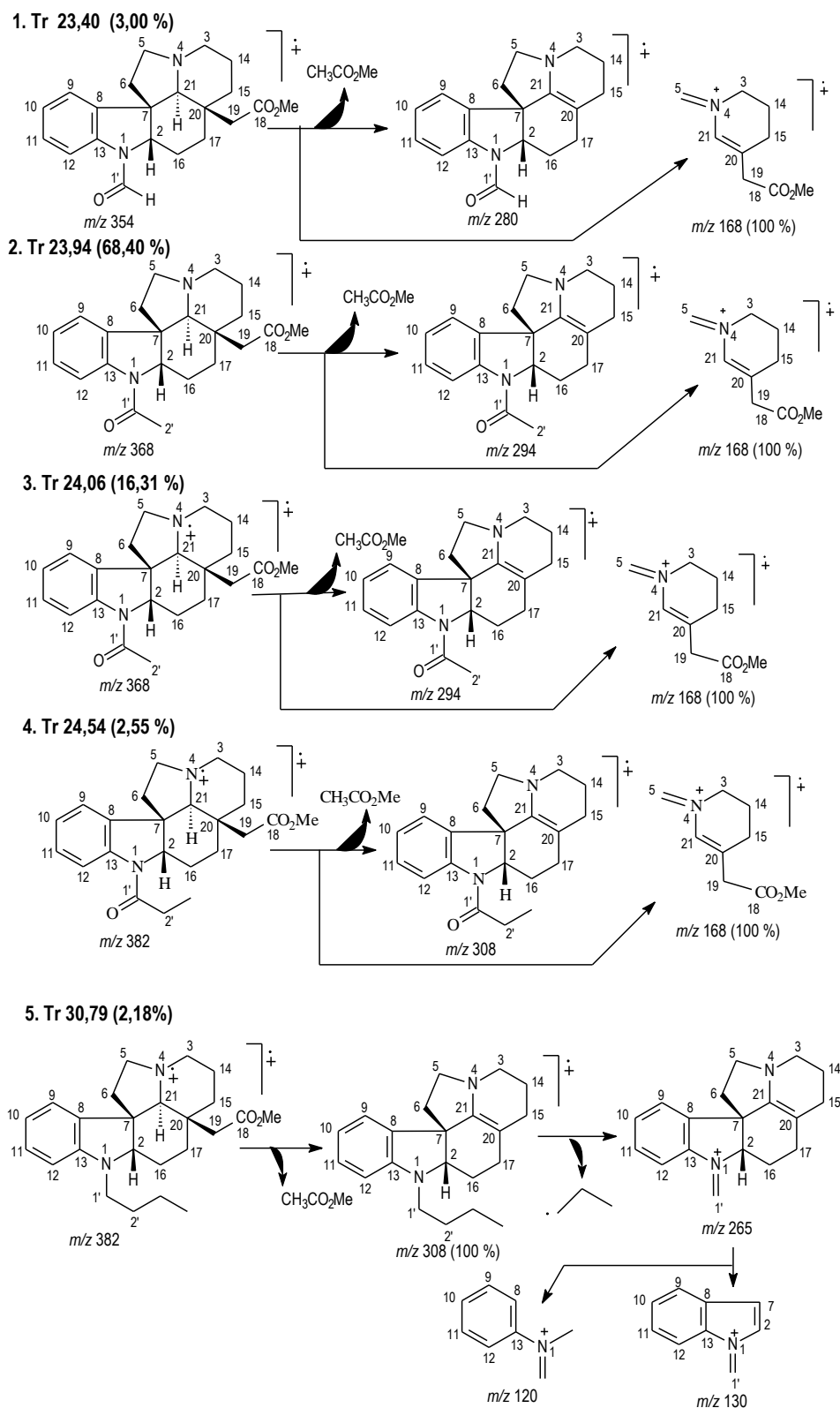


Figura 19. Espectros de massas de baixa resolução (EMBR) obtidos por CG/EM (70 eV) da fração MCC 1.15.5A.



**Esquema 8.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas de baixa resolução (EMBR) da fração MCC 1.15.5A.

A fração **MCD 1.10.13**, obtida através da Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência, apresentou-se como um óleo amarelo. O espectro de infravermelho (**Espectro 48**, volume 2, página 58) mostrou bandas em  $\nu_{\max}$  2943-2789  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-H), 1732  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento da função carbonílica grupo carbometoxílico) e 1643 (estiramento do grupo carbonila da unidade benzoila), em adição a outras bandas em  $\nu_{\max}$ , 1477, 1392  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=C do anel benzênico) e em torno de 750  $\text{cm}^{-1}$  (ligação C-H do anel benzênico monossustituído) (VERPOORTE, 1986).

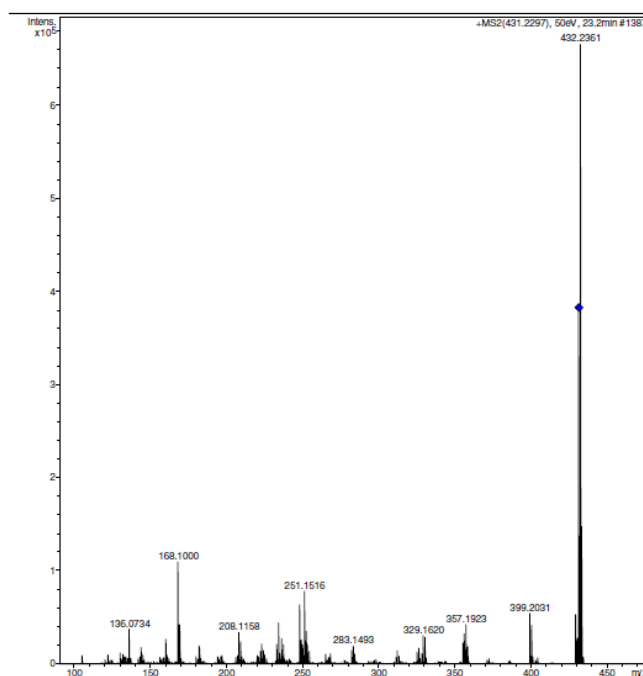
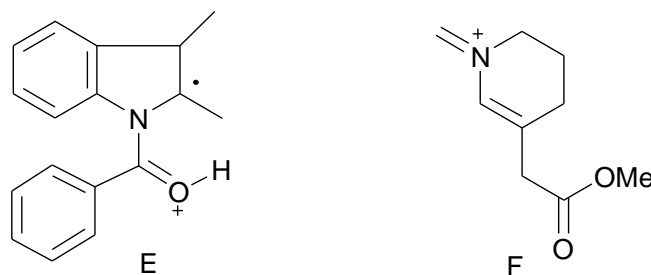
Com base na similaridade espectral desta substância (**96**) com a **91**, utilizou-se o mesmo procedimento analítico através dos espectros de 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 49 e 50**, volume 2, páginas 59 e 60) e RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 51 e 52**, volume 2, páginas 61 e 62), combinados aos resultados dos 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectro 53 e 54**, volume 2, páginas 63 e 64), obtidos a 60° C em piridina- $d_5$  como solvente, e de massas (EM, **Figura 20**, página 108), os quais foram realizados em piridina. Em conjunto esses espectros permitiram propor (**Tabela 29**, página 107), para o alcalóide **MCC 1.10.13 (96)** a fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{C})_5(\text{C}=\text{O})_2(\text{CH})_{11}(\text{CH}_2)_8\text{N}_2(\text{MeO})$ , com índice de deficiência de hidrogênios igual a quatorze ( $\text{C}_{27}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_3 - \text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 = \text{H}_{28}$ ), coerentes com a proposta para um esqueleto plumerano sustentando um grupo MeO ( $\delta_{\text{C}}$  50,7) e duas carbonilas (uma em  $\delta_{\text{C}}$  171,3 e outra em  $\delta_{\text{C}}$  170,3), justificando a presença de três átomos de oxigênio, além de sugerir a presença de um anel aromático adicional, envolvido num grupo benzoila, o qual já havia sido previamente reportado para outros alcalóides anteriormente isolados de *A. cylindrocarpon* (BOLZANI et al., 1987; PEREIRA et al., 2007).

**Tabela 29.** Resultado da análise comparativa do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 49 e 50**) da fração **MCC 1.10.13 (96)**, incluindo-se informações de correlações fornecidas pelo HMQC.

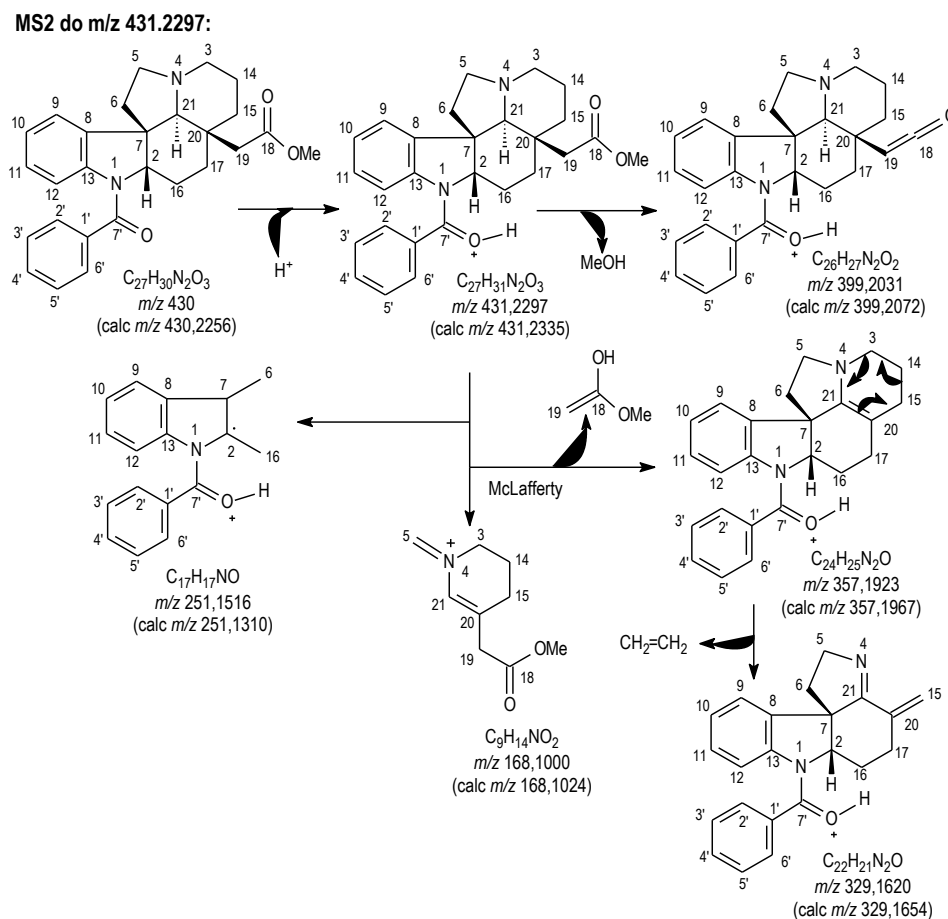
C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
171,3	130,1	7,47 – 7,44 (m)		52,9	2,95 (m), 2,02 (m)	50,7	3,57 (s)
170,3	128,7	7,47 – 7,44 (m)		51,8	3,14 (m), 2,33 (m)		
141,1	128,3	7,47 – 7,44 (m)		42,9	2,46 (d, 14,2), 2,12 (d, 14,2)		
134,8	127,7	7,15 (tl, 7,4)		38,8	2,35 (m), 1,70 (m)		
129,0	127,3	7,73 (m)		34,6	1,72 (m), 1,38 (m)		
52,8	124,5	7,42 (dl, 7,4)		25,9	2,03 (m), 1,68 (m)		
36,1	118,0	7,47 – 7,44 (m)		24,3	1,68 (m), 1,40 (m)		
	68,8	2,75 (s)		21,6	1,73 (m), 1,36 (m)		
	67,8	4,56 (m)					
(C) <sub>7</sub>		(CH) <sub>9</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>		(MeO)	

O espectro de massas de alta resolução (EMAR, eletrospray, modo positivo) mostrou (**Figura 20**, página 108, **Esquema 9**, página 109) o pico base correspondente ao íon molecular

protonado  $[M+H]^+$  em  $m/z$  431,2314 ( $C_{27}H_{31}N_2O_3^+ = m/z$  431,2329 como valor calculado). Também foram observados picos em  $m/z$  399,2031 ( $[M+H]^+ - MeOH^+$ ), relativo à perda de metanol, 357,1923 ( $[M+H]^+ - CH_2=COMeOH^+$ ), referente à um rearranjo de McLafferty envolvendo o substituinte  $CH_2COOMe$  sustentado pelo átomo de carbono C-2) e 329,1620 ( $m/z$  357,1923 -  $CH_2=CH_2$ ), formado pela eliminação de uma molécula de eteno do fragmento correspondente ao pico em 357,1923. Ainda, foram observados picos importantes em  $m/z$  251,1516 e 168,1000, atribuídos aos fragmentos **E** e **F**, respectivamente, sendo este último o fragmento  $C_9H_{14}NO$  observado no espectro de massas de **91**, um análogo direto do pico em  $m/z$  124, característico de aspidospermina e seus derivados (MILBORROW e DJERASSI, 1969).



**Figura 20.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) obtido por eletrospray (70 eV), da fração **MCC 1.10.13 (96)**.



**Esquema 9.** Proposta de fragmentação para MS2 do pico em  $m/z = 431,2297$  ( $[M + H]^+$ ) para o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-benzoilciliandrocarina (**96**).

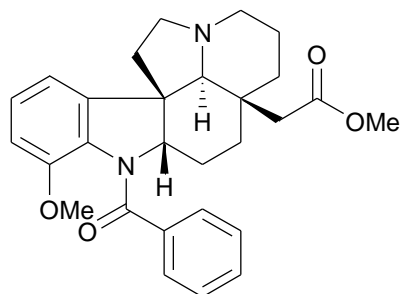
A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos da molécula (**Tabela 30**, página 111) foi feita com base nos dados adicionais fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN (HSQC, **Espectros 58 a 60**, volume 2, páginas 68 a 70), nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Diversos sinais no espectro de RMN de  $^1H$  (1D e 2D  $^1H$ - $^1H$ -COSY) (**Espectros 51 a 53**, volume 2, páginas 61 a 63) foram úteis na identificação desta substância. A presença do anel aromático adicional pôde ser confirmada pelo espectro de HMBC (**Espectros 55 a 57**, volume 2, páginas 65 a 67), através das correlações  $^3J_{HC}$  entre C-1' e H-3'/H-5' e entre C-4' e H-2'/H-6'. A presença do grupo carbometoxila em C-19 foi evidenciada pela correlação de HMBC  $^2J_{HC}$  entre C-18 e CH<sub>2</sub>-19 e pela correlação HMBC  $^3J_{HC}$  entre C-18 e os hidrogênios da metoxila. A correlação de HMBC  $^2J_{HC}$  entre C-20 e CH<sub>2</sub>-19 mostrou o local da inserção da cadeia lateral, característica deste tipo de esqueleto indólico (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO e VIEIRA, 2012).

Essas e outras correlações heteronucleares a longa distância foram relacionadas na **Tabela 30** (página 111).

O deslocamento químico de CH-2, um típico duplo-duplete em  $\delta_H$  4,56, em comparação com a substância anteriormente discutida (**91**), permitiu identificar a posição do grupo benzoil, cuja carbonila interage com os citados hidrogênios e, por efeito mesomérico e anisotrópico, provoca o deslocamento do sinal para regiões mais desprotegidas do espectro.

Os dados de RMN e espectrometria de massas acima relatados para o alcalóide **MCC 1.10.13 (96)** revelaram-se muito semelhantes aos descritos na literatura (MILBORROW e DJERASSI, 1969) para o alcalóide *N*-benzoilcilindrocarina (**96'**) originalmente sintetizado a partir da cilindrocarina e posteriormente isolado do extrato das cascas de *A. cylindrocarpon*, exceto pela ausência do grupo metoxila em CH-12.



**96'**

Comprova-se assim não apenas a proposta estrutural para o alcalóide em questão, mas também fica demonstrado que a substância 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina (**96**) está sendo aqui descrita pela primeira vez na literatura.

**Tabela 30.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina (**96**), em comparação com valores de referência do alcalóide *N*-benzoilcilindrocarina (**96'**).

	12-desmetóxi- <i>N</i> -benzoilcilindrocarina ( <b>96</b> )				<i>N</i> -benzoilcilindrocarina ( <b>96'</b> )
	HSQC		HMBC		HSQC*
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>					
7	52,8	-		H-9	
8	134,8	-		H-10; H-12	
13	141,1	-		H-9; H-11	
18	171,3	-	2H-19	MeO-18	
20	36,1	-	2H-19		
1'	129,0	-		H-3'/H-5'	
7'	170,3	-			
9'					
<b>CH</b>					
2	67,8	4,66-4,46 ( <i>m</i> )			4,24-4,44 (1H, <i>q</i> )
9	124,5	7,42 ( <i>dl</i> , 7,4)			6,6-7,6 (8H, <i>m</i> )
10	127,7	7,15 ( <i>tl</i> , 7,4)			6,6-7,6 (8H, <i>m</i> )
11	128,3	7,47-7,44 ( <i>m</i> )			6,6-7,6 (8H, <i>m</i> )
12	118,0	7,47-7,44 ( <i>m</i> )		H-10	
21	68,8	2,75 ( <i>s</i> )		2H-19	2,50 (1H, <i>s</i> )
2'/6'	127,3	7,74-7,70 ( <i>m</i> )	H-3'/H-5'		
3'/5'	128,7	7,47-7,44 ( <i>m</i> )			
4'	130,1	7,47-7,44 ( <i>m</i> )		H-2'/H-6'	
7'	-	-			
8'	-	-			
<b>CH<sub>2</sub></b>					
3	52,9	2,95-2,93 ( <i>m</i> ) 2,04-2,02 ( <i>m</i> )		H-5b	
5	51,8	3,14-3,12 ( <i>m</i> ) 2,35-2,33 ( <i>m</i> )			
6	38,8	2,36-2,35 ( <i>m</i> ) 1,75-1,69 ( <i>m</i> )			
14	21,6	1,74-1,72 ( <i>m</i> ) 1,39-1,33 ( <i>m</i> )			
15	34,6	1,75-1,72 ( <i>m</i> ) 1,39-1,37 ( <i>m</i> )		2H-19	
16	25,9	2,32-2,29 ( <i>m</i> ) 1,70-1,66 ( <i>m</i> )			
17	24,3	1,70-1,66 ( <i>m</i> ) 1,40-1,98 ( <i>m</i> )		2H-19	
19	42,9	2,46 ( <i>d</i> , 14,2) 2,12 ( <i>d</i> , 14,2)			
<b>CH<sub>3</sub></b>					
MeO-18	50,7	3,57 ( <i>s</i> )			3,56 (3H, <i>s</i> )
MeO-12					3,37 (3H, <i>s</i> ) 2,4-1,2 (14H, <i>m</i> )

\*dados de RMN  $^{13}\text{C}$  não disponíveis

A fração **MCC 1.10.16**, obtida através da Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência, apresentou-se como um óleo incolor e o espectro de infravermelho (**Espectro 62**, volume 2, página 72) mostrou bandas em  $\nu_{\max}$  3059-2727 (estiramento C-H), 1737 (estiramento da carbonila do grupo carboxílico) e 1658  $\text{cm}^{-1}$  (carbonila do grupo benzoíla), além de outras bandas em  $\nu_{\max}$  1614, 1402 (estiramento C=C do anel benzênico) e 976, 860  $\text{cm}^{-1}$  (ligação C-H do anel benzênico não-substituído), em adição às bandas em  $\nu_{\max}$  765, 702  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=C em alcenos) (VERPOORTE, 1986).

Com base na similaridade espectral desta substância (**97**) com a **96**, foi utilizado o mesmo procedimento analítico através dos espectros de 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 63 e 64**, volume 2, páginas 73 e 74) e RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 65 a 68**, volume 2, páginas 75 a 78), combinados aos 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectros 69 e 70**, volume 2, páginas 79 e 80) e de massas (EM, **Figura 21**, página 115) permitiram propor (**Tabela 31**, página 114), para o alcalóide **MCC 1.10.16 (97)** a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{C})_5(\text{C}=\text{O})_2(\text{CH})_{11}(\text{CH}_2)_8(\text{MeO})(\text{N})_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a quinze ( $\text{C}_{29}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_3 - \text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3 = \text{H}_{30}$ ), coerentes com a proposta para um esqueleto tipo plumerano (esqueleto básico  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$ ) sustentando uma cadeia lateral carbometoxilica e um anel aromático adicional inserido num grupo cinamoíla, cuja ocorrência já havia sido relatada previamente, em alcalóides isolados de *A. cylindrocarpon* (BOLZANI et al., 1987; PEREIRA et al., 2007) e justificando a presença dos três átomos de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios.

Em acordo com estas deduções, o espectro de massas de alta resolução (**Figura 21**, página 115; **Esquema 11**, página 116) mostrou o pico base correspondente ao composto protonado  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  457,2453 ( $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3^+ = m/z$  457,2491). Também foram observados picos em  $m/z$  425,2171 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{MeOH}$ ), referente à perda de metanol, em 383,2064 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{CH}_2=\text{COHOME}$ ), referente à perda do substituinte localizado em C-20, em 253,1667 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{O}=\text{CCH}=\text{CHC}_6\text{H}_6$ ), relativo à perda subsequente do grupo cinamoíla, e em 225,1370 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{CH}_2=\text{CH}_2$ ), envolvendo fragmentação do anel D com perda de eteno. E ainda, picos em  $m/z$  327,2030 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{C}=\text{OCH}=\text{CHC}_6\text{H}_6$ ), referente à perda do grupo cinamoíla a partir do íon molecular protonado e em 131,0466, referente ao próprio grupo cinamoíla.

Também foram observados picos correspondentes aos adutos protonado ( $[\text{2M}+\text{H}]^+$ ) em  $m/z$  913,4898 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_6^+$  calc.  $m/z = 913,4899$ ;  $\Delta_{m/z} = -0,1$  ppm) e sodado ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ ) em  $m/z = 935,4707$  ( $\text{C}_{58}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{NaO}_6^+$  calc.  $m/z = 935,4718$ ;  $\Delta_{m/z} = -1,17$  ppm), revelando a formação de adutos que confirmaram alcalóide (**Esquema 10**, página 115).

O espectro de HMBC (**Espectros 73 e 74**, volume 2, páginas 83 e 84) mostrou as correlações  $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$  de C-9' com ambos H-8' e H-7' respectivamente, e a correlação  $^3J_{\text{HC}}$

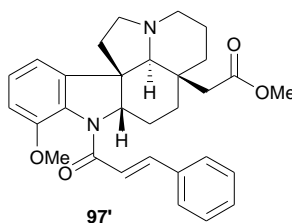


entre C-1' e H-8', em concordância com a presença de um grupo cinamoila nessa estrutura. O anel aromático adicional foi confirmado pelas correlações de C-1' com H-2'/H-6' e de CH-2'/CH-6' com H-3'/H-5'; sendo sua posição definida em C-7' pelas correlações de C-1' com ambos H-7' ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e H-8' ( $^3J_{\text{HC}}$ ).

As correlações no espectro de HMBC (**Espectros 71 e 72**, volume 2, páginas 81 e 82) permitiram ainda deduzir a localização de uma dupla ligação entre CH-7' e CH-8', cujos deslocamentos químicos correspondem aos  $\delta_{\text{C}}$  143,6 (CH-7') e 118,9 (CH-8') e os hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  7,89 (H-7') e 6,82 (H-8') foram confirmados pelo espectro HSQC. O acoplamento vicinal entre esses átomos de hidrogênio foi confirmado através do espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectros 69 e 70**, volume 2, páginas 79 e 80). O valor da constante de acoplamento ( $J = 15,3$  Hz) observado nos sinais dos hidrogênios olefínicos H-7' e H-8' confirmou a configuração *E* (*trans*) da dupla ligação.

É importante salientar que o anel aromático do núcleo indólico da substância **97**, assim como para outros alcalóides descritos anteriormente, não sustenta substituintes, como foi mostrado pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de CH-9 a CH-12 (**Espectros 63 a 68**, volume 2, páginas 73 a 78), que revelam os efeitos mesoméricos de proteção do nitrogênio N-1 nas posições *orto* (CH-12) e *para* (CH-10).

Os dados espectrais acima descritos para o alcalóide **MCC 1.10.16** revelaram-se semelhantes aos descritos na literatura para o alcalóide cilindrocarpina (**97'**), originalmente isolado do extrato das cascas e câmbio de *A. cylindrocarpon* (DJERASSI et al., 1960; DJERASSI et al., 1961), destacando-se pela ausência do grupo metoxila em C-12. Assim, comprova-se a proposta estrutural para o alcalóide em questão e também fica demonstrado que a substância 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarpina (**97**) (ou 12-desmetóxicilindrocarpina) está sendo aqui descrita pela primeira vez na literatura.



**Tabela 31.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarpina (**97**), em comparação com valores de referência do alcalóide cilindrocarpina (**97'**).

	12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina (97)				Cilindrocarpina (97')
	HSQC		HMBC		HSQC
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$	$\delta_H / \delta_C^*$
<b>C</b>					
7	52,9	-	H-2; 2H-6; H-21	2H-5; H-9; 2H-16	
8	135,3	-		H-2; H-10; H-12; H-21	
13	137,6	-	H-2	H-2; H-9; H-11	
18	171,9	-	2H-19	MeO-18	
20	35,9	-	2H-19; H-21		
1'	141,9	-	H-2'/H-6'	H-8'	
9'	164,3	-	H-8'	H-7'	
<b>CH</b>					
2	66,2	4,39 ( <i>dd</i> , 11,3, 6,4)		2H-6; 2H-17; H-21	4,50 (1H, <i>m</i> )
9	128,1	7,28 ( <i>d</i> , 8,8)			
10	124,6	7,10 ( <i>t</i> , 7,1)			
11	122,2	7,26 ( <i>t</i> , 7,4)	H-10	H-9	
12	118,6	8,33 ( <i>d</i> , 8,0)	H-11	H-10	
21	69,3	2,60 ( <i>s</i> )		2H-3; 2H-5; 2H-6; 2H-15; 1H-17	2,48 (1H, <i>s</i> )
2'/6'	128,0	7,62 ( <i>brd</i> , 6,6)			
3'/5'	128,9	7,45-7,35 ( <i>m</i> )			
4'	129,9	7,45-7,35 ( <i>m</i> )			
7'	143,6	7,89 ( <i>d</i> , 15,3)	H-8'		7,85 (1H, <i>d</i> )
8'	118,9	6,81 ( <i>d</i> , 15,3)	H-7'		6,88 (1H, <i>d</i> )
<b>CH<sub>2</sub></b>					
3	55,6	3,11 ( <i>brd</i> , 10,6) 2,07-2,04 ( <i>m</i> )		H-21	
5	52,3	3,21 ( <i>dt</i> , 9,1, 3,2) 2,21-2,28 ( <i>m</i> )		H-21	
6	39,3	2,10-2,08 ( <i>m</i> ) 1,61-1,59 ( <i>m</i> )	2H-5	H-2; H-21	
14	21,5	1,96-1,94 ( <i>m</i> ) 1,61-1,59 ( <i>m</i> )	2H-3; 2H-15		
15	34,9	1,71-1,67 ( <i>m</i> ) 1,48-1,45 ( <i>m</i> )		2H-3; 2H-19	
16	27,0	2,11-2,08 ( <i>m</i> ) 1,48-1,46 ( <i>m</i> )			
17	24,4	2,12-2,11 ( <i>m</i> ) 1,37 ( <i>brd</i> , 13,6)	2H-19; H-21	2H-19; H-21	
19	42,3	2,29 ( <i>d</i> , 14,3) 2,05 ( <i>d</i> , 14,3)		H-15b; H-17a; H-21	
<b>CH<sub>3</sub></b>					
MeO-18	51,2	3,58 ( <i>s</i> )			3,89 (3H, <i>s</i> )
MeO-12					3,89 (3H, <i>s</i> )

\*dados de RMN de  $^{13}C$  não disponíveis

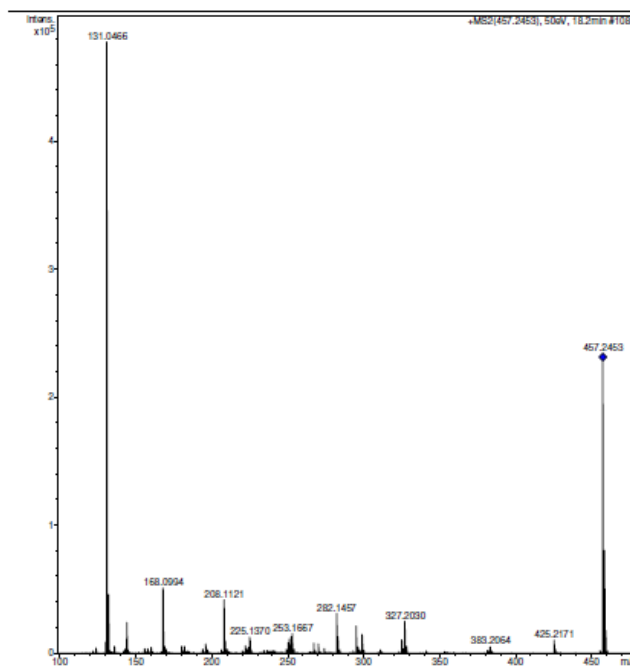
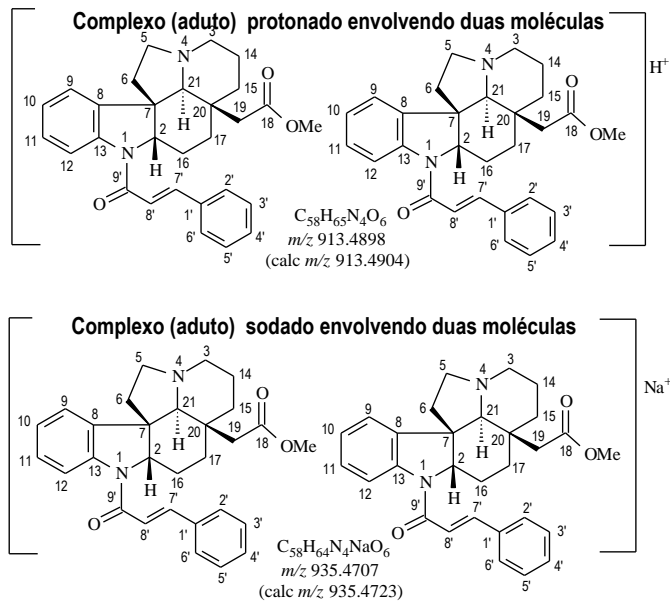
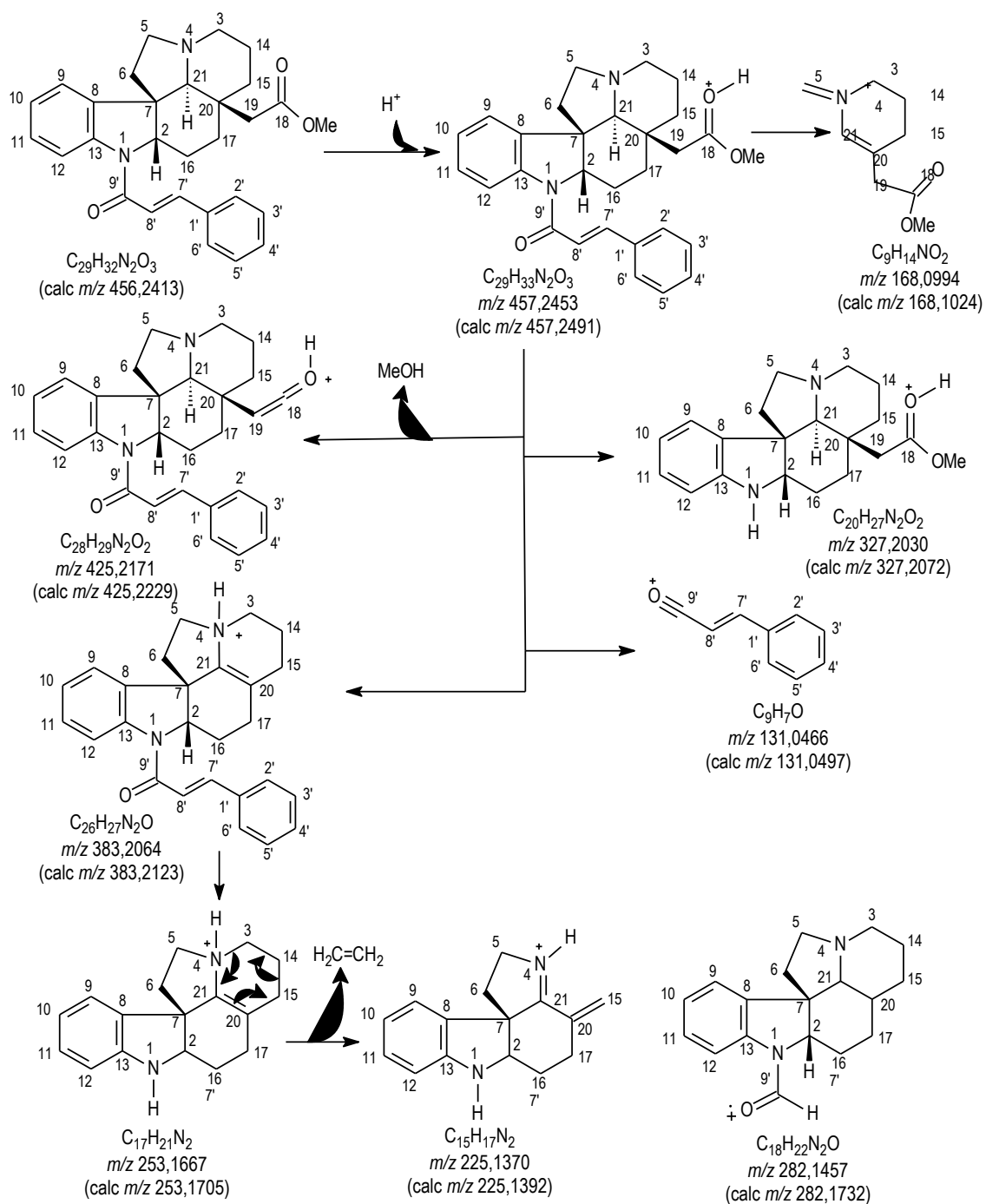


Figura 21. Espectro de massas de alta resolução (EMAR) obtido por eletrospray (70 eV), da fração MCC 1.10.16 (97).

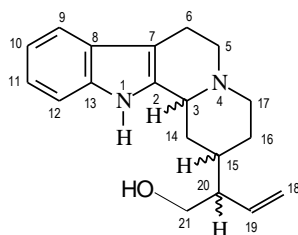


Esquema 10. Formação de adutos protonado e sodado com a substância 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocaina (97).

MS2 de  $m/z$  457.2453:

**Esquema 11.** Proposta de fragmentação para MS2 do pico em  $m/z$  = 457,2453 ( $[M + H]^+$ ) para o alcalóide 12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina (97).

### 5.1.3 Determinação estrutural do alcalóide Antirina (87)

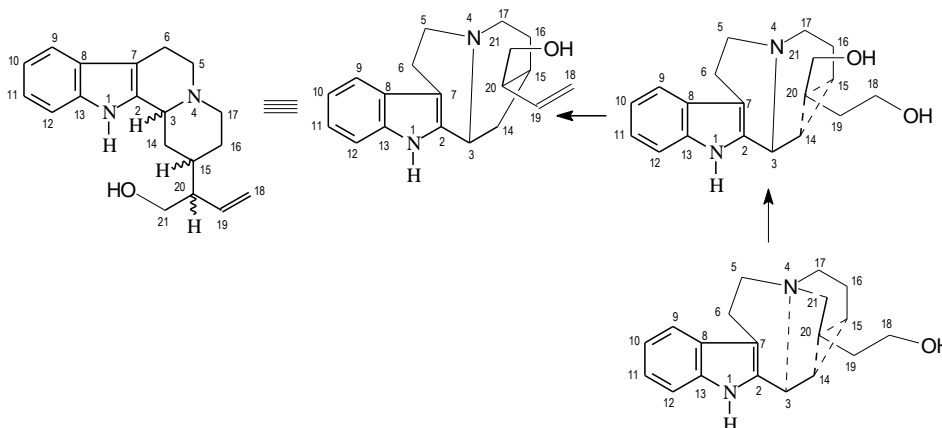


87 Antirina

A substância presente na fração **MCD 5.9.6.9A** apresentou-se como um sólido amorfo de cor castanha, revelando-se uma alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro de massas de baixa resolução (EMBR, **Figura 22**, página 120) apresentou pico em  $m/z$  296, correspondente ao íon molecular ( $[M]^+$ ) e em  $m/z = 295$ , indicando a eliminação de radical hidrogênio. Foram ainda observados picos em  $m/z$  223 e 225, característicos da antirina (JOHNS, LAMBERTON e OCCOLOWTIZ, 1967), indicando a eliminação de radical formado do substituinte 3-buten-1-ol da substância original (**Esquema 13**, página 120).

A análise comparativa dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (**Espectros 75**, volume 2, página 85) e DEPTQ (**Espectro 76**, volume 2, página 86) permitiu reconhecer sinais correspondentes a quatro átomos de carbono não-hidrogenados (todos  $\text{sp}^2$ ), oito metínicos (cinco  $\text{sp}^2$  e três  $\text{sp}^3$ ), sete metilênicos (todos  $\text{sp}^3$ ), revelando a ausência de sinal de carbono metílico (**Tabela 32**, página 118). Estes dados combinados com os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D, **Espectros 77 a 79**, volume 2, páginas 87 a 89; 2D,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY **Espectros 80 e 81**, volume 2, páginas 90 e 91) e de massas (EM) possibilitaram propor, para o alcalóide **MCD 5.9.6.9A (87)**, a fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} = (\text{C})_4(\text{CH})_8(\text{CH}_2)_7(\text{N}_2)(\text{OH})$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove ( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O} - \text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} = \text{H}_{18}$ ). Tal fórmula molecular revelou-se compatível com um esqueleto do tipo ioimbanó (esqueleto básico  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2$  com índice de deficiência de hidrogênios igual a oito: quatro do anel aromático dissubstituído, uma ligação dupla do grupo 3-buten-1-ol e três ciclos) sustentando um grupo OH ( $\delta_{\text{H}}$  10,51) e biorrearranjo molecular para fornecer a ligação dupla entre  $\text{CH}_2$ -18 ( $\delta_{\text{C}}$  117,5) e  $\text{CH}$ -19 ( $\delta_{\text{C}}$  137,6), como proposto sumariamente abaixo (**Esquema 12**, página 118), justificando a presença de um átomo de oxigênio e os demais carbonos e hidrogênios, em pleno acordo com o alcalóide antirina, isolado anteriormente de *Antirhea putaminosa* (JOHNS, LAMBERTON e OCCOLOWTIZ, 1967).



**Esquema 12.** Proposta do biorrearranjo molecular para o alcalóide antirina (**87**).

**Tabela 32.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (**Espectro 75**) e DEPTQ (**Espectro 76**) da **MCD 5.9.6.9A**.

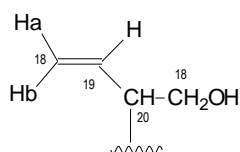
C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
136,8	137,6	5,60	117,5	5,13 ( <i>d</i> , 10,9), 5,08 ( <i>d</i> , 19,2)			
135,0	122,4	7,38 ( <i>d</i> , 9,2)	63,3	3,8; 3,5			
126,0	120,4	7,14 ( <i>t</i> , 7,8)	50,9	3,28; 2,97			
105,8	118,0	7,08 ( <i>t</i> , 7,1)	45,8	3,31; 3,02			
	112,7	7,49 ( <i>d</i> , 6,4)	30,3	2,97 ( <i>m</i> ); 2,90 ( <i>m</i> )			
	55,4	4,37	27,6	1,80; 1,65			
	51,2	2,4	19,4	2,90 ( <i>m</i> ); 2,65 ( <i>d</i> )			
	30,0	1,50					
(C) <sub>4</sub>		(CH) <sub>8</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>			

A confirmação desta dedução baseou-se nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 77 a 79**, volume 2, páginas 87 a 89), que apresentaram dois sinais triplos, relativos a dois hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (1H, t,  $J=7,1$  Hz, H-10) e  $\delta_{\text{H}}$  7,14 (1H, t,  $J=7,8$ , H-11), acoplando entre si e respectivamente com o H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7,40, *d*) e H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  7,35, *d*), com valores de  $J$  característico de acoplamento *orto*. Essas interações spin-spin foram confirmadas pelo espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectros 80 e 81**, volume 2, páginas 90 e 91) e corroboradas pelas correlações heteronucleares nos espectros 2D HSQC (**Espectros 82 e 83**  $^1J_{\text{HC}}$ , volume 2, páginas 92 e 93) e HMBC ( $^nJ_{\text{HC}}$ ,  $n=2$  e  $3$ ; **Espectro 84**, volume 2, página 94). No HMBC observaram-se as correlações a  $^3J_{\text{HC}}$  entre CH-9 ( $\delta_{\text{C}}$  118,1) e H-11 ( $\delta_{\text{H}}$  7,05), entre CH-10 ( $\delta_{\text{C}}$  122) e H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  7,35), entre CH-11 ( $\delta_{\text{C}}$  119,91) e H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7,40) e entre CH-12 ( $\delta_{\text{C}}$  111,83) e H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  7,12). Os valores dos deslocamentos, bem como as multiplicidades e constantes de acoplamento foram condizentes com a presença de um núcleo indólico não-substituído (**Tabela 33**, página 121) (ZÈCHES-HANROT et al., 1995).

A estereoquímica absoluta dos átomos de carbono estereogênicos CH-3 e CH-20, como apresentada na estrutura do alcalóide antirina, foi confirmada através da curva de dicroísmo circular (Item 5.3) e NOESY (**Espectro 85**, volume 2, página 95). Considerações de ordem biogenética sobre a formação deste alcalóide antecipam uma orientação  $\beta$  para o hidrogênio em CH-15, já que esta posição não se encontra passível de epimerização (KAN-FAN, BRILLANCEAU e HUSSON, 1986).

A presença do carbono HOCH<sub>2</sub>-21 foi confirmada pelo sinal em  $\delta_C$  62,97 observado no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Espectros 75 e 76**, volume 2, páginas 85 e 86), mostrando o efeito indutivo de desproteção exercido pelo efeito retirador de elétrons do átomo de oxigênio. Os sinais dos hidrogênios metilênicos de CH<sub>2</sub>-21 em  $\delta_H$  3,49 e 3,75 correspondem à porção AB do sistema ABX (CH<sub>2</sub>=CH). A não equivalência destes hidrogênios pode ser justificada pela proximidade de um centro assimétrico, que nesse caso é justificado pela conformação da molécula, que impede sua rotação, e pela blindagem diferencial da ligação dupla entre CH<sub>2</sub>-18 e CH-19, sendo um *cis* e outro *trans* em relação ao H-19 (JOHNS, LAMBERTON e OCCOLOWTIZ, 1967).

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono CH-19 ( $\delta_C$  137,01) e CH<sub>2</sub>-18 ( $\delta_C$  118,21) no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Espectros 75 e 76**, volume 2, páginas 85 e 86) revelaram-se em pleno acordo com a presença de um grupo vinila. No espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Espectros 77 a 79**, volume 2, páginas 87 a 89), os deslocamentos em  $\delta_H$  5,06 (1H, d,  $J=10,3$ , H-18a),  $\delta_H$  5,02 (1H, d,  $J=17,4$ , H-18b) e  $\delta_H$  5,50 (1H, td,  $J=17,3$  e  $J=10,3$ , H-19) confirmaram a ligação dupla entre esses carbonos, com as constantes de acoplamento indicando a configuração do H-19 *trans* com H-18b e *cis* com H-18a.



As atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula foram também deduzidas com base nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e nos resultados revelados pelos espectros 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY e heteronuclear HSQC (<sup>1</sup>J<sub>HC</sub>) e HMBC (<sup>n</sup>J<sub>HC</sub>, n=2 e 3) envolvendo comparação com valores descritos na literatura (JOHNS, LAMBERTON e OCCOLOWTIZ, 1967).

Os dados de RMN e espectrometria de massas acima descritos para o alcalóide **MCD 5.9.6.9B** revelaram-se em acordo com os dados descritos na literatura (JOHNS, LAMBERTON e

OCCOLOWTIZ, 1967) para o alcalóide antirina (**87**), originalmente isolado de *Antirhea putaminosa*, comprovando assim a proposta estrutural para o alcalóide em questão.

Essa substância está sendo aqui descrita, pela primeira vez na literatura, para a espécie *Aspidosperma desmanthum* (PEREIRA, 2007).

Line# 8 R.Time:17.7(Scan#:1829)

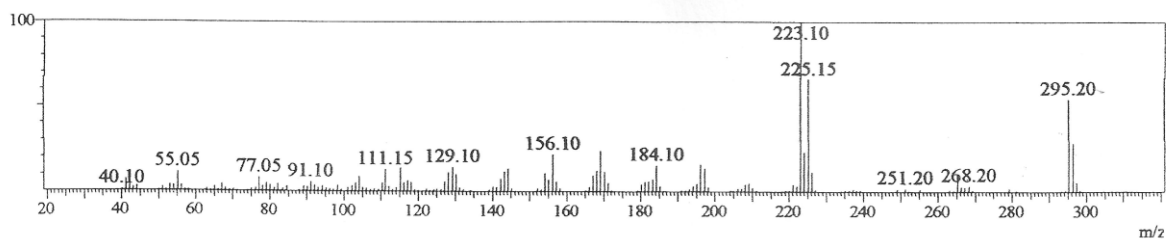
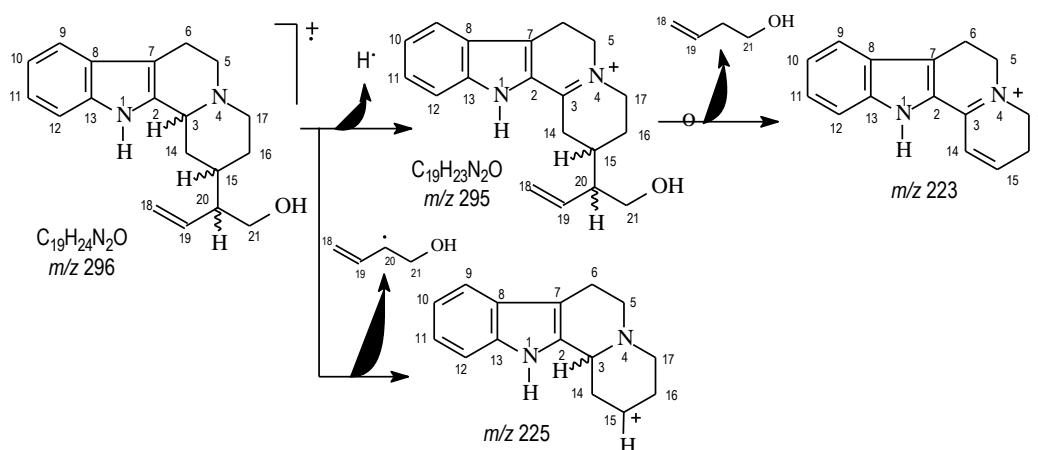


Figura 22. Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCD 5.9.6.9A (**87**).



Esquema 13. Proposta de fragmentação para EMBR do pico em  $m/z = 296$  ( $[M]^+$ ) para o alcalóide antirina (**87**).



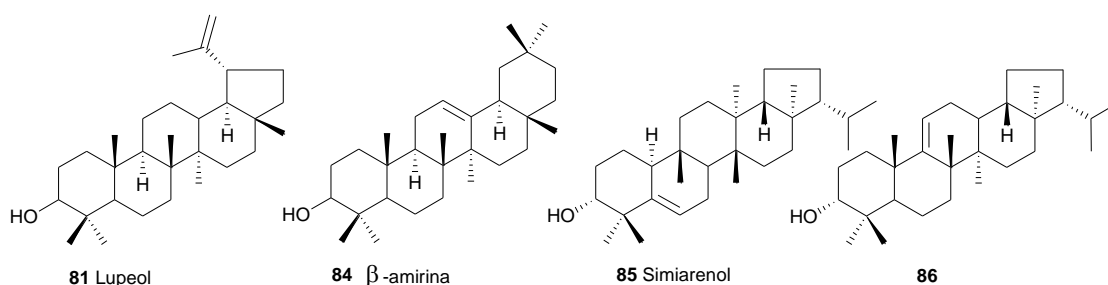
**Tabela 33.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações heteronucleares observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide antirina (**87**), em comparação com valores de referência da literatura. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) e constantes de acoplamento (J) em Hz (entre parenteses).

	HSQC		HMBC		Antirina, $\text{CDCl}_3$	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>						
2	132,9	-				-
7	107,5	-		H-9		-
8	126,0	-	H-9	H-10; H-12		-
13	137,0	-		H-9; H-11		-
<b>CH</b>						
3	56,0	3,46 (s)			54.2	4.2 (s)
9	118,1	7,40 (d, 7,6)		H-11	117.0	7.4 (d)
10	122,0	7,12 (d, 7,6)		H-12	120.4	7.1 (t)
11	119,9	7,05 (t, 7,3)		H-9	118.2	7.15 (t)
12	111,8	7,35 (d, 8,1)		H-10	110.5	7.5 (d)
15	29,7	1,65 (m)			30.9	1.5 (m)
19	137,0	5,50 (td, 17,3; 10,3)			138.0	5.6 (dt)
20	55,0	1,96			49.1	2.15 (m)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
5	49,5	3,18 3,14			53.1	3.2 (dd), 3.(m)
6	18,1	2,97 2,95			17.7	3 (m), 2.6 (dd)
14	29,9	1,74 1,72			30.9	2.7 (m), 2 (m)
16	26,8	0,81 0,80			27.5	1.7 (dl), 1.5 (m)
17					46.7	2.8 (td), 2.7 (m)
18	118,2	5,06 (d, 10,3) 5,02 (d, 17,4)			116.3	5.2 (dd), 5.1 (dd)
21	63,0	3,75 3,49			62.9	3.7 (dd), 3.6 (dd)
HO		10,62				

## 5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS TRITERPENOS ISOLADOS DE *A. desmanthum*

### 5.2.1 Determinação estrutural da fração MCD 3.2

A fração **MCD 3.2** isolada (39,7 mg) de *A. desmanthum* caracterizou-se como uma mistura contendo triterpenos. Mesmo não tendo alcançado o isolamento das substâncias, já que suas características estruturais definem fatores de retenção cromatográfica ( $R_f$ ) muito próximos, foi possível a caracterização de constituintes (**81**, **84**, **85** e **86**) através de dados fornecidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 86 a 91**, volume 2, páginas 96 a 101), RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 92 a 95**, volume 2, páginas 102 a 105) e CG/EM (**Figura 23**, página 125).



O espectro de massas de baixa resolução (EMBR) revelou a presença de quatro triterpenos majoritários [Tr 33,32 (3,64 %), 35,46 (29,19 %), 36,99 (11,16 %) e 39,68 (53,40 %)], para os quais foram postuladas caracterizações estruturais com base em picos característicos atribuídos a determinados tipos triterpenóides (**Figura 23**, página 125; **Esquema 14**, página 126). O espectro de massas (**Figura 23**, página 125) da primeira delas Tr 33,32 (3,64 %) revelou o pico do íon molecular em  $m/z$  426 [(M)+] e outros picos principais em  $m/z$  = 218 [(M -  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}$ ) $^+$ ] e 203, [( $m/z$  218 - radical  $\text{CH}_3$ ) $^+$ ] relativo à perda subsequente de um radical metila e 189 [(M - radical  $\text{C}_{13}\text{H}_{33}$ ) $^+$ ] (**Esquema 14**, página 126). Estes dados revelaram-se compatíveis com a estrutura da  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, sendo a primeira afastada pelos sinais observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  121,9 (CH-12) e 142,6 (C-13) atribuídos a  $\beta$ -amirina **84** (**Tabelas 34 e 35**, páginas 124 e 127, respectivamente).

A segunda substância revelada pelo CG/EM ( $T_R$  35,5 minutos, 29,39 %) apresentou espectro de massas (**Figura 24**) picos principais em  $m/z$  426 [(M)+], 207 [(M - radical  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}$ ) $^+$ ] e 189 [(M - radical  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ ) $^+$ ] relativo à subsequente perda de uma molécula de água (**Esquema 24**). Essa proposta é compatível com a estrutura do lupeol (**81**).

Embora a  $\beta$ -amirina (**84**) tenha sido a primeira a ser eluída no CG, sua numeração é posterior à do lupeol (**81**) devido a este último ter sido isolado em frações anteriores, como

descrito na parte experimental. A numeração das substâncias obedece a ordem em que foram obtidas.

A terceira substância do CG/MS ( $T_R$  37,0 minutos, 11,16 %) apresentou espectro de massas (**Figura 23**, página 125) com picos principais em  $m/z$  426 [(M)+], 411 [(M – radical Me)+], 393 [(M – radical Me) – H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>], 274 [(M – C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O)+], 273 ( $m/z$  274 – radical H), 259 ( $m/z$  274 – radical CH<sub>3</sub>) e 241 ( $m/z$  259 – H<sub>2</sub>O), justificados através de proposta de fragmentação resumida no Esquema 24. Essa substância revelou estreita semelhança estrutural com a substância majoritária ( $T_R$  39,7 minutos, 53,60 %) presente na amostra (*vide infra*). Mesmo se tratando de uma proposta estrutural lançada somente com base na análise do EMBR comparado com resultado favorável revelado pela consulta na biblioteca componente do sistema CG/EM, a consulta realizada no *Chemical Abstract (SciFinder)* revelou a ausência desta substância contendo esta proposta estrutural (**86**).

A substância com maior tempo de retenção ( $T_R$  39,7 minutos) e maior percentagem (53,60 %) revelou espectro de massas (**Figura 23**, página 125) com picos principais em  $m/z$  426 [(M)+], 274 [(M – C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>)<sup>+</sup>], 259 ( $m/z$  274 – radical CH<sub>3</sub>), 152 [(M – C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)+] e 134 [(M – C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O – H<sub>2</sub>O)+], justificados através da proposta de fragmentação sumarizada no Esquema 24. Essa proposta estrutural corresponde à substância descrita na literatura como simiarenil (**85**).

A análise comparativa dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e RMN de <sup>13</sup>C-DEPTQ (**Espectros 86 a 91**, volume 2, páginas 96 a 101) permitiu reconhecer sinais referentes a sessenta e quatro átomos de carbono, sendo quatorze deles referentes a carbonos não hidrogenados [(C)<sub>14</sub>, sendo onze carbonos sp<sup>3</sup> e três sp<sup>2</sup>], quatorze sinais de carbonos metínicos [(H-C)<sub>14</sub>, sendo treze deles sp<sup>3</sup> e um carbono sp<sup>2</sup>], vinte e dois carbonos metilênicos [(H<sub>2</sub>-C)<sub>22</sub>, sendo apenas um carbono sp<sup>2</sup>, os outros todos sp<sup>3</sup>] e sinais referentes a quatorze carbonos metílicos [(H<sub>3</sub>-C)<sub>14</sub>], sumarizados na **Tabela 34** (página 124). Estes dados em combinação com os dados fornecidos pelos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (1D, **Espectros 92 a 96**, volume 2, páginas 102 a 106; 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, **Espectro 96**, volume 2, páginas 106) e de massas (EM) permitiram revelar uma mistura de terpenos.

As principais evidências que permitiram diferenciar entre cada uma das substâncias componentes da mistura foram discutidas através de comparação com os dados da literatura resumidos na **Tabela 35** (página 127). A estrutura da  $\beta$ -amirina (**84**), contendo uma ligação dupla entre os carbonos C-12 e C-13 caracterizada pelos sinais em  $\delta_C$  121,9 (carbono metínico) e  $\delta_C$  142,6 (carbono não hidrogenado), revelou os sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados, metínicos, metilênicos e metílicos no RMN de <sup>13</sup>C-DEPTQ (**Espectros 86 a 91**,

volume 2, páginas 96 a 101; **Tabela 35**, página 127). As outras duas substâncias componentes da mistura (**81** e **85**) representadas por sinais RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Espectros 86 a 91**, volume 2, páginas 96 a 101) sustentam ligações dupla entre carbonos C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  150,9) e CH<sub>2</sub>-29 ( $\delta_{\text{C}}$  109,0), **81**, e entre 5 e 6 (**85**), reconhecida pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  142,0 (C-5) e 121,9 (CH-6). A comparação de todos estes dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com valores da literatura (PEREIRA e et. al., 2006; YOO, JANG e KIM, 2008) permitiu confirmar tais estruturas triperpênicas (**Tabela 35**, página 127).

**Tabela 34.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 86 a 91**) da fração **MCD 3.2**.

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
150,9	121,9	109,0	29,1
142,6	79,0	41,5	28,0
142,0	77,0	40,0	25,5
43,0	76,3	38,8	23,0
42,8	60,0	37,1	22,0
41,5	55,3	35,9	19,3
40,8	51,7	35,4	17,9
39,3	50,4	34,8	16,1
38,9	50,2	29,8	16,0
38,7	48,3	29,1	15,8
38,6	47,9	29,0	15,6
37,1	44,2	28,4	15,4
30,2	38,0	27,8	15,0
29,8	30,7	27,4	14,6
		27,3	
		27,2	
		26,9	
		25,1	
		24,1	
		19,9	
		18,3	
		18,1	
(C) <sub>14</sub>	(CH) <sub>14</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>14</sub>

A caracterização estrutural do simiarenol, (**85**), presente na mistura como componente predominante (53,40 %), envolveu também em dados obtidos através da análise de espectros 2D de RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, **Espectro 96**, volume 2, página 106; HSQC **Espectros 97 e 98**, volume 2, páginas 107 e 108; HMBC, **Espectros 100 e 101**, volume 2, páginas 200 e 201) e comparação com valores descritos na literatura (**Tabela 36**, página 128).

Assim, a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio metilênicos e metínicos restantes da molécula **85** foi feita com base nos dados adicionais

fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN, nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (YOO, JANG e KIM, 2008).

A proposta estrutural da substância **86** baseou-se somente na interpretação do EMBR obtido através do CG/EM e no resultado concordante da consulta à biblioteca Nist acoplada ao próprio CG/EM da Shimadzu, já que o SciFinder não forneceu resultado na consulta efetuada.

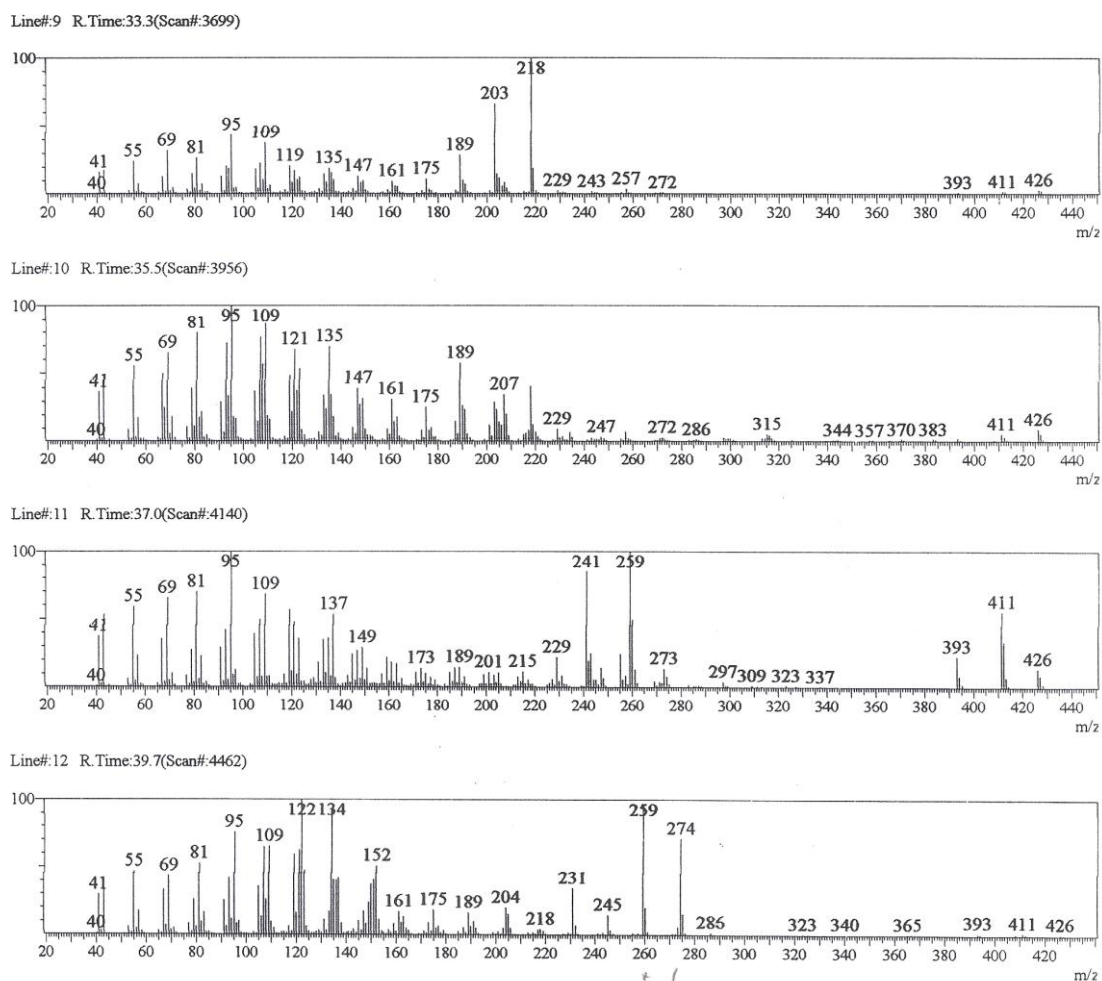
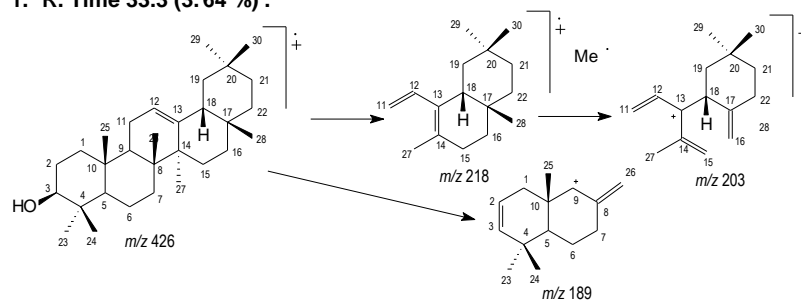
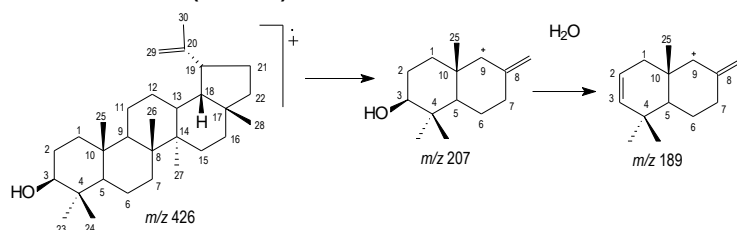


Figura 23. Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração **MCD 3.2**.

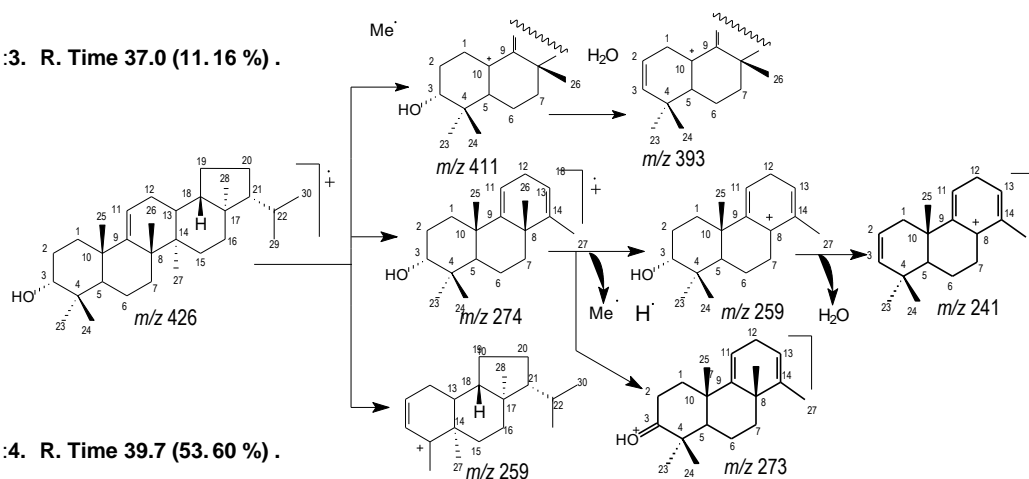
1. R. Time 33.3 (3.64 %).



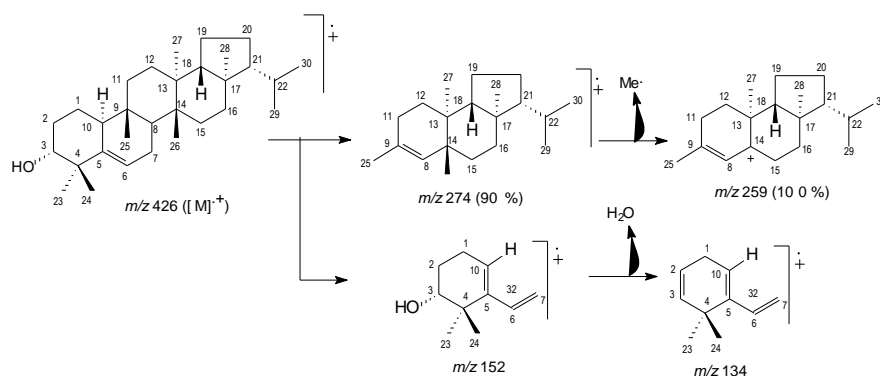
2. R. Time 35.5 (29.39 %).



3. R. Time 37.0 (11.16 %).



4. R. Time 39.7 (53.60 %).



Esquema 14. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas de baixa resolução (EMBR) da fração MCD 3.2.

**Tabela 35.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) dos triterpenos lupeol (**81**),  $\beta$ -amirina (**84**) e simiarenol (**85**) como componentes da mistura fração **MCD 3.2**, e em comparação com valores de referência da literatura.

	<b>Lupeol</b>	[1]	<b><math>\beta</math>-amirina</b>	[1]	<b>Simiarenol</b>	[2]
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
<b>C</b>						
3	-	-	-	-	-	-
4	38,9	38,77	38,9	38,77	40,8	39,5
5	-	-	-	-	142,0	142,2
8	40,8	40,86	39,3	38,81	-	-
9	-	-	-	-	38,7	35,0
10	37,1	37,12	37,1	37,23	-	-
13	-	-	142,6	145,22	38,6	38,8
14	42,8	42,82	41,5	41,78	38,9	41,0
17	43,0	43,0	30,2	32,53	42,8	43,0
20	150,9	150,9	29,8	28,42	-	-
<b>CH</b>						
3	76,3	78,99	79,0	79,07	77,0	76,5
5	55,3	55,34	55,3	55,25	-	-
6	-	-	-	-	121,9	122,2
8	-	-	-	-	44,2	44,4
9	50,4	50,47	47,9	47,31	-	-
10	-	-	-	-	50,2	50,4
12	-	-	121,9	121,78	-	-
13	38,0	38,09	-	-	-	-
18	48,3	48,34	48,3	47,70	51,7	51,9
19	47,9	47,98	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	60,0	60,2
22	-	-	-	-	30,7	30,9
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	38,8	38,74	38,8	38,66	28,4	18,2
2	27,3	27,42	27,2	27,29	27,8	28,0
6	18,3	18,33	18,3	18,42	-	-
7	34,3	34,31	*	31,11	24,1	24,2
11	20,3	20,95	24,1	23,72	29,1	34,3
12	25,1	25,18	-	-	29,0	29,2
15	27,4	27,43	26,9	26,21	34,2	29,3
16	35,9	35,60	24,1	23,57	35,4	35,6
19	-	-	*	46,89	19,9	20,1
20	-	-	*	31,11	18,1	28,5
21	29,8	29,87	34,8	34,79	-	-
22	40,0	39,82	37,1	37,20	-	-
29	109,0	109,31	-	-	-	-
<b>CH<sub>3</sub></b>						
23	28,0	28,10	28,0	28,13	29,1	29,9
24	15,4	15,48	15,4	15,52	25,5	25,6
25	16,1	16,10	15,6	15,60	15,8	18,0
26	16,0	15,99	16,1	16,86	17,9	15,9
27	14,6	14,56	25,5	26,01	15,0	15,2
28	16,1	16,10	29,1	28,42	16,1	16,2
29	-	-	*	32,53	22,0	22,1
30	19,3	19,31	23,0	23,57	23,0	23,1

\* não foi possível a detecção do sinal devido à baixa proporção do espécime.

[1] PEREIRA et. al, 2006.

[2] YOO, JANG and KIM, 2008.

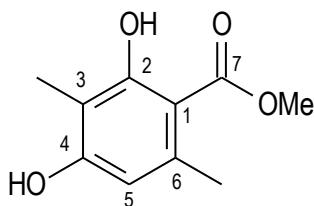
**Tabela 36.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) do simiarenol (**85**) como componentes da mistura fração **MCD 3.2**), inclusive resultados obtidos pelos HSQC e HMBC, e comparação com valores de modelos descritos na literatura.

	HSQC		HMBC		Mo-01		Mo-02	Mo-03	Mo-04
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{HC}}$	$^3\text{J}_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>									
3	-	--	-	-	-	--	-	-	-
4	40,80	-	3H-23; 3H-24	-	41,4	-	34,8	39,0	-
5	141,99	-	-	3H-23; 3H-24	140,6	-	145,6	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	145,0	-
9	38,72	-	3H-25	-	34,5	-	35,7	-	-
10	-	-	-	--	-	-	-	35,3	-
13	38,60	-	3H-27	3H-26	39,3	-	38,7	36,5	-
14	38,85	-	3H-26	3H-27	39,6	-	39,4	41,0	-
17	42,76	-	3H-28	-	39,9	-	42,9	38,2	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	39,0	-
<b>CH</b>									
3	76,95	3,46 (s)	-	3H-23; 3H-24	76,6	-	-	79,3	-
5	-	-	-	-	-	-	-	50,7	-
6	121,93	5,60 (d, 5,7)	-	-	121,5	-	117,6	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	116,2	-
8	44,24	1,50	-	3H-25; 3H-26; H-6	44,5	-	51,8	-	-
10	50,23	2,37	-	3H-25; H-6	37,2	-	44,3	-	-
18	51,73	1,65	-	3H-27; 3H-28	54,5	-	51,9	43,4	-
19	-	-	-	-	48,5	-	-	-	-
20	-	-	-	-	36,0	-	-	-	-
21	60,02	1,02	-	3H-28; 3H-29; 3H-30	-	-	60,8	-	-
22	30,73	1,45	3H-29; 3H-30	-	-	-	30,9	-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>									
1	28,37	1,40, 1,05	-	-	30,8	-	23,8	36,9	-
2	27,78	1,85, 1,70	-	-	28,9	-	21,9	27,8	-
6	-	-	-	-	-	-	-	24,2	-
7	24,05	1,90, 1,80	H-6	-	22,7	-	34,3	-	-
11	29,10	1,56, 1,38	-	3H-25	30,6	-	25,9	16,7	-
12	28,99	1,56, 1,20	-	3H-27	30,7	-	29,2	34,1	-
15	34,16	1,59, 1,38	-	3H-26	29,4	-	29,8	29,1	-
16	35,42	1,62, 1,50	-	3H-28	32,7	-	35,5	27,9	-
19	19,92	1,40, 1,30	-	-	-	-	20,3	23,3	-
20	18,08	1,52, 1,30	-	-	-	-	23,4	21,3	-
21	-	-	-	-	27,9	-	-	27,2	-
22	-	-	-	-	42,4	-	-	-	-
<b>CH<sub>3</sub></b>									
23	29,08	0,99 (s)	-	3H-24	27,3	-	30,8	27,6	-
24	25,48	1,04 (s)	-	3H-23	25,4	-	29,9	14,6	-
25	15,76	1,01 (s)	-	-	28,8	-	16,1	12,9	-
26	17,88	0,90 (s)	-	-	15,4	-	17,9	23,8	-
27	15,01	0,93 (s)	-	-	16,8	-	15,1	22,2	-
28	16,08	0,79 (s)	-	-	33,4	-	15,8	16,1	-
29	21,97	0,86 (d)	-	3H-30	21,3	-	22,0	25,3	-
30	22,95	0,82 (d, 5,7)	-	3H-29	23,4	-	22,9	23,0	-



### 5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS DEMAIS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

#### 5.3.1 Determinação estrutural da fração MCC 1.5.5.5



**90** Ácido atrárico

A fração **MCC 1.5.5.5** apresentou-se como finos cristais brancos, em forma de agulha.

Através da espectrometria de massas de baixa resolução (EMBR, **Figura 24, Esquema 15**, página 130) acoplada a cromatógrafo a gás, observou-se a presença de um componente (**MCC 1.5.5.5A**, Tr 11,78 min, 8,98 %) com pico em  $m/z$  196, correspondente ao íon molecular ( $[M]^+$ ). Essa substância apresentou ainda picos em  $m/z$  164 ( $[M - \text{MeOH}]^+$ ) e 136 ( $[M - \text{MeOH} - \text{CO}]^+$ ) referente à perda subsequente de monóxido de carbono ( $[m/z$  164 -  $\text{CO}]^+$ ), permitindo, pela comparação com os dados da literatura (SCHLEICH et al., 2006) identificar essa substância como éster metílico do ácido 2,4-diidróxi-3,6-dimetilbenzóico ou ácido atrárico (**90**).

Por se tratar de uma mistura complexa, as demais substâncias reveladas pelo CG/EM não puderam ser devidamente elucidadas, uma vez que os sinais nos espectros RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 102 a 106**, volume 2, páginas 112 a 116) não foram suficientes para fornecer provas inequívocas dessas substâncias. Especula-se, pelo padrão dos espectros, que se trata de uma mistura de fitoesteróis, provavelmente contendo  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

A comparação dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 105 e 106**, volume 2, páginas 115 e 116; **Tabela 37**, página 130) da **MCC 1.5.5.5A** permitiu observar a presença de um simpleto intenso em  $\delta_{\text{H}}$  3,94, correspondente aos hidrogênios de uma metoxila em C-7, confirmada pelo espectro de HSQC (**Espectros 108 e 109**, volume 2, páginas 118 e 119), além de outros singletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,13 (s, Me-3) e 2,48 (s, Me-6), atribuídos a grupos metila, cujas posições foram confirmadas pelo espectro de HMBC (**Espectros 110 e 111**, volume 2, páginas 120 e 121). Além disso, foi possível observar um sinal de hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,24 (s, H-5) e o sinal de hidroxila em  $\delta_{\text{H}}$  12,06 (s, HO-2). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  permitiu a verificação de sinais de grupos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  24,2 ( $\text{CH}_3$ -6) e 4,0 ( $\text{CH}_3$ -3, localizado em ambiente espacialmente estérico), de um carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  110,5 (CH-5), e do grupo metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  51,8 (MeO-7'). A atribuição dos sinais relativos aos carbonos aromáticos baseou-se no espectro de HMBC (**Espectros 110 e 111**, volume 2, páginas 120 e 121), onde também foi

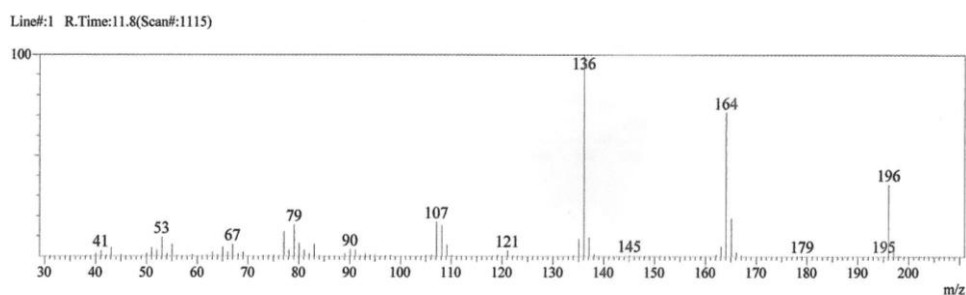
possível observar interações longa distância ( $^2J_{\text{HC}}$  e  $^3J_{\text{HC}}$ ) entre MeO-7 e C-7 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), Me-3 e C-3 ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e entre Me-6 e C-6 ( $^2J_{\text{HC}}$ ), além das interações a entre H-5 e ambos C-1 e C-3 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), Me-3 e ambos C-2/C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e Me-6 e ambos C-1/CH-5 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), bem como mais uma  $^3J_{\text{HC}}$  entre HO-2 e C-1/C-3 (Tabela 37).

Esses dados analisados em conjunto com a espectrometria de massas, associados aos dados da literatura (SCHLEICH et al., 2006) permitiram identificar a substância como o éster metílico do ácido 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzóico, também conhecido como ácido atrárico (90), e atribuição inequívoca de todos os deslocamentos dos átomos de hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) e carbono ( $\delta_{\text{C}}$ ), resumidos na Tabela 37.

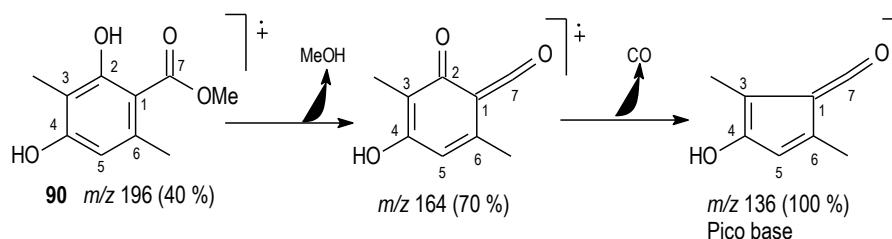
**Tabela 37.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do ácido atrárico (90), em comparação com valores de referência da literatura.

ácido atrárico (90)						
C	HSQC		HMBC		ác. atrárico [1]	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{H}}$	
1	105,6	-		H-5, Me-6, OH-2	-	
2	158,3	-		Me-3	-	
3	108,5	-	Me-3	H-5, OH-2	-	
4	161,4	-		Me-3	-	
6	140,5	-	Me-6		-	
7	172,5	-	OMe-7		-	
<b>CH</b>						
5	110,5	6,24 (1H, s)		Me-6	6,14	
<b>CH<sub>3</sub></b>						
Me-3	4,0	2,13 (3H, s)			2,03	
Me-6	24,2	2,48 (3H, s)			2,39	
MeO-7	51,8	3,94 (3H, s)			3,85	
OH	-	12,06 (1H, s)			11,98	

[1] SCHLEICH et al., 2006.

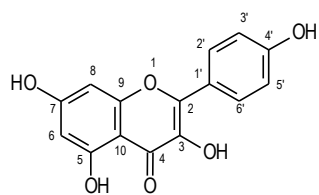


**Figura 24.** Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração MCC 1.5.5.5.

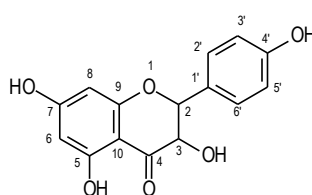


**Esquema 15.** Proposta de fragmentação da MCC 1.5.5.5A (90) no espectrômetro de massas.

### 5.3.2 Determinação estrutural de canferol (88) e aromadendrina (89)



88 Canferol



89 Aromadendrin

A substância presente na fração **MCC 1b** apresentou-se como um sólido de cor amarela, com ponto de fusão 277 °C.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Espectros 112 a 114**, volume 2, páginas 122 a 124) permitiu reconhecer sinais referentes a quinze átomos de carbono principais, sendo nove deles referentes a carbonos não hydrogenados (todos  $\text{sp}^2$ ), incluindo uma carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  175,9 e seis sinais de carbonos metínicos (todos  $\text{sp}^2$ ), não tendo sido identificados sinais relativos a carbonos metilênicos ou metílicos, conforme descritos na **Tabela 38**.

Estes dados em combinação com os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D e 2D **Espectros 115 a 117**, volume 2, páginas 125 a 127) possibilitaram propor a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 = (\text{C})_9(\text{CH})_6\text{O}_2(\text{OH})_4$ , com índice de deficiência de hidrogênios igual a onze ( $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_2(\text{OH})_4 - \text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2(\text{OH})_4 = \text{H}_{22}$ ), coerentes com a proposta de um flavonol, mais especificamente o canferol, em concordância com os dados descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

**Tabela 38.** Resultado da análise comparativa envolvendo os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Espectro 112 a 114**) da fração MCC 1b.

C		CH	
$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	
175,9	129,4	8,08	(d, 8,9)
164,2	114,8	6,91	(d, 8,9)
161,1	97,9	6,19	(d, 2,0)
159,1	93,0	6,39	(d, 2,0)
156,8			
146,6			
135,7			
122,3			
103,2			
(C) <sub>9</sub>		(CH) <sub>4</sub>	

A confirmação desta dedução baseou-se nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D e 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY), que revelaram a presença de dois sinais duplos, referentes a hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (1H, d,  $J = 2,0$ , H-6) e  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (1H, d,  $J = 2,0$ , H-8), acoplado entre si conforme pôde ser

constatado pelas correlações heteronucleares no espectro de HMBC (**Espectro 120**, volume 2, página 130), onde foram observadas as interações através de  $^3J_{\text{HC}}$  entre CH-6 ( $\delta_{\text{C}}$  97,9) e H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,39) e entre CH-8 ( $\delta_{\text{C}}$  93,0) e H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,19). Ainda no espectro de HMBC, observaram-se as interações heteronucleares a  $^2J_{\text{HC}}$  entre C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  161,1) e H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,19), entre C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  164,2) e H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,19) e H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,39) e entre C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  156,8) e H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,39), comprovando a natureza tetrassubstituída do anel aromático A.

Além destes sinais, mais dois sinais duplos, também referentes a hidrogênios aromáticos, foram verificados em  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (2H, d,  $J = 8,9$ , H-3'/H-5') e em  $\delta_{\text{H}}$  8,08 (2H, d,  $J = 8,9$ , H-2'/H-6'), acoplado entre si com valor de  $J$  característico de acoplamento *orto* num sistema AA'/BB'. Foram observadas correlações heteronucleares no espectro de HMBC a  $^2J_{\text{HC}}$  entre o carbono C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  122,3) e os hidrogênios H-2'/H-6' acima citados e entre o C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  159,1) e os hidrogênios H-3'/H-5', além de a  $^3J_{\text{HC}}$  de C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  122,3) com os hidrogênios H-3'/H-5'. Outras correlações heteronucleares a longa distância observadas no HMBC (**Espectro 120**, volume 2, página 130) encontram-se descritas na **Tabela 38** (página 131).

As atribuições dos deslocamentos dos átomos de carbono e hidrogênio restantes da molécula foram feitas a partir dos dados fornecidos pelo HSQC (**Espectros 118 e 119**, volume 2, páginas 128 e 129), com base nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER e VOELTER, 1987).

Os dados de RMN acima descritos para a fração **MCC 1b** (**Tabela 38**, página 131) revelaram-se em acordo com os dados descritos na literatura para o flavonol canferol (**88**).

Com base na similaridade espectral desta substância com a fração **MCC 1.8** utilizou-se o mesmo procedimento analítico, baseando-se nos espectros 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Espectro 121**, volume 2, página 130) e RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 122 a 124**, volume 2, páginas 132 a 134) combinados aos 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (**Espectro 126**, volume 2, página 136), para propor (**Tabela 39**, página 133) para essa fração a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6 = (\text{C})_7(\text{CH})_8\text{O}_2(\text{OH})_4$ , com índice de deficiência de hidrogênios igual a dez ( $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_2(\text{OH})_4 - \text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2(\text{OH})_4 = \text{H}_{20}$ ), coerentes com a proposta de um dihidroflavonol, mais especificamente a aromadendrina (**89**), em concordância com os dados descritos na literatura (LEE et. al., 2011).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostram diferença significativa somente nos sinais referentes ao anel heterocíclico envolvendo carbonos metínicos e não hidrogenados: CH-2 em **89** ( $\delta_{\text{C}}$  83,6) e C-2 em **88** ( $\delta_{\text{C}}$  146,6), CH-3 em **89** ( $\delta_{\text{C}}$  72,2) e C-3 em **88** ( $\delta_{\text{C}}$  135,7) e C-4 [ $\Delta\delta_{\text{C}}$  197,1 (**89**) – 175,9 (**88**) = 21,2] revelando ausência de conjugação da carbonila com ligação dupla na **89**. Assim, tais modificações confirmaram o efeito esperado da ausência da ligação

dupla entre os carbonos C-2 e C-3, mostrando a proteção sobre estes carbonos e a desproteção sobre o átomo carbono C-4, devido ao efeito mesomérico da carbonila, anteriormente atenuado pela presença da insaturação.

As atribuições dos deslocamentos dos átomos de carbono e hidrogênio restantes da molécula foram feitas a partir dos dados fornecidos pelo HSQC (**Espectro 126**, volume 2, página 136) e HMBC (**Espectro 127**, volume 2, página 137), com base nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (BREITMAIER and VOELTER, 1987).

**Tabela 39.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC para o canferol (**88**) e aromadendrina (**89**), em comparação com valores de referência da literatura.

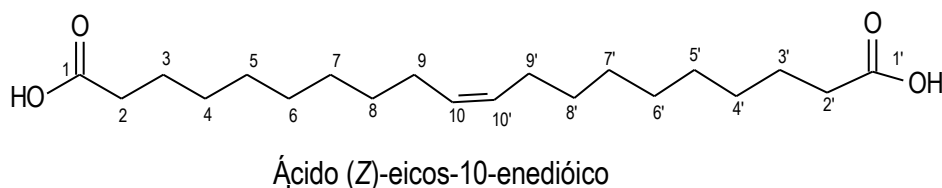
	Canferol ( <b>88</b> )				Aromadendrina ( <b>89</b> )		
	HSQC		HMBC		HSQC	Canferol [1]	Aromadendrina [2]
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{HC}}$	$^3\text{J}_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>							
2	146,6	-		H-2'/H-6'	-	146,8	-
3	135,7	-			-	135,6	-
4	175,9	-			197,1	175,9	198,5
5	161,1	-	H-6		167,3	156,2	168,9
7	164,2	-	H-6; H-8		*	163,9	165,3
9	156,8	-	H-8		163,1	160,7	164,6
10	103,2	-		H-6; H-8	100,5	103,1	101,8
1'	122,3	-	H-2'/H-6'	H-3'/H-5'	129,4	121,7	129,3
4'	159,1	-	H-3'/H-5'		157,8	159,2	159,2
<b>CH</b>							
2	-				83,6		85,0
3	-				72,2		73,6
6	97,9	6.19 (d, 2.0)		H-8	96,0	98,2	97,4
8	93,1	6.39 (d, 2.0)		H-6	95,0	93,5	96,3
2'/6'	129,4	8.08 (d, 8.9)			129,5	129,5	130,4
3'/5'	114,8	6.91 (d, 8.9)			114,9	115,4	116,1

\* não foi possível a detecção do sinal devido à baixa proporção do espécime.

[1] BREITMAIER and VOELTER, 1987.

[2] LEE et. al., 2011.

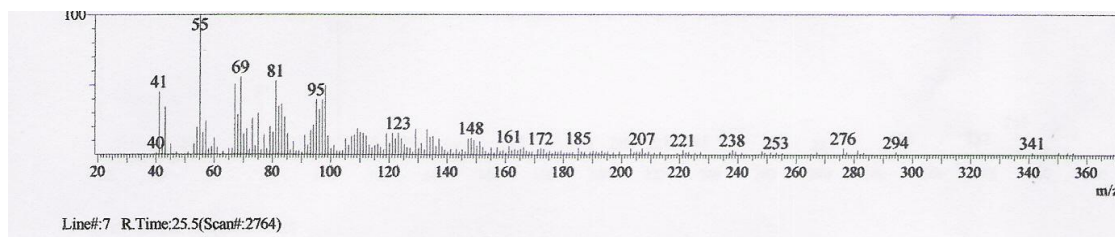
### 5.3.3 Determinação estrutural do ácido (z)-eicos-10-enedióico (95)



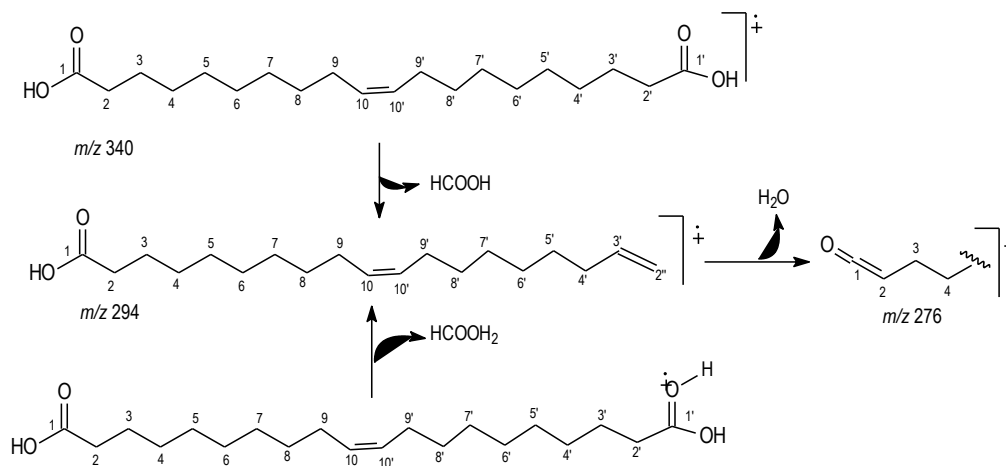
A fração **MCD 1.10.10** foi obtida a partir da cromatografia em contracorrente de Alta Eficiência e apresentou-se como um sólido amorfo castanho-claro.

O espectro de infravermelho (**Espectro 128**, volume 2, página 138) mostrou bandas em  $\nu_{\max}$  1730 (estiramento da carbonila do grupo carboxila).

A análise através de CG/EMBR revelou uma substância no tempo de retenção igual a  $T_R$  20,2 minutos, correspondendo a 67,99% como componente prioritário. Como esperado, o EMBR (**Figura 25**) revelou-se muito ruim e exigindo a preparação do éster metílico para repetir a obtenção do EM. Mesmo assim, na ausência do pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  340, usou-se o pico de baixa intensidade em  $m/z$  341, que pode ser cogitado como molécula protonada para formar  $[M+H]^+$  comum em espectro obtido através de ionização por eletrospray e não em espectro registrado por impacto eletrônico a 70 eV. Assumindo importância relativa o pico em  $m/z$  294, justificado pela eliminação de HCOOH do íon molecular ou HCOOH+H do  $[M+H]^+$ . O pico em  $m/z = 276$  pôde ser justificado pela eliminação subsequente uma molécula de água do íon de  $m/z$  294 (**Esquema 16**, página 135).

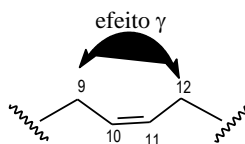


**Figura 25.** Espectro de massas de baixa resolução (EMBR) obtido por impacto eletrônico (70 eV), da fração **MCC 1.10.10**.



**Esquema 16.** Proposta de fragmentação da MCC 1.10.10 (**95**) no espectrômetro de massas.

A análise de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (**Espectros 129 e 130**, volume 2, páginas 139 e 140) permitiu reconhecer sinais correspondentes a dez átomos de carbono, dois  $\text{sp}^2$ , um não hidrogenado atribuído a grupo carbonílico de ácido carboxílico ( $\text{COOH}$ ) e um metínico ( $=\text{CH}$ ), e oito metilênicos  $\text{sp}^3$ , sugerindo tratar-se de uma molécula simétrica, com vinte átomos de carbono no total (**Tabela 40**, página 136). Desses sinais, um  $\text{sp}^2$  corresponde aos dois carbonos carbonílicos, C-1/C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  180,0), um  $\text{sp}^2$  aos dois metínicos da ligação dupla CH-10/CH-10', ( $\delta_{\text{C}}$  129,9), atribuídos a seis  $\text{sp}^3$  metilênicos ( $\text{CH}_2$ )<sub>6</sub> entre  $\delta_{\text{C}}$  29,6 – 29,0 e um  $\text{sp}^3$  correspondendo aos  $\text{CH}_2$ -9/ $\text{CH}_2$ -9' em  $\delta_{\text{C}}$  27,1, revelando efeito  $\gamma$  entre si como consequência da isomeria *cis* (*Z*).



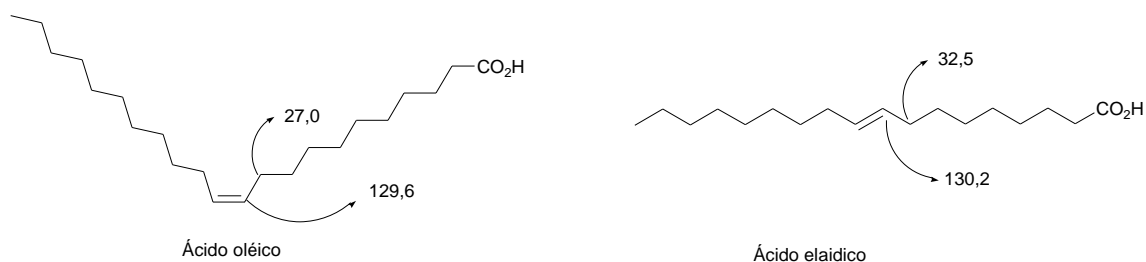
As atribuições dos deslocamentos dos átomos de carbono ( $\delta_{\text{C}}$ ) e hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) restantes da molécula (**Tabela 40**, página 136) foram feitas a partir dos dados fornecidos pelo HSQC (**Espectro 135**, volume 2, página 145) e HMBC (**Espectros 136 e 137**, volume 2, páginas 146 e 147), com base nos parâmetros conhecidos para deduções de deslocamentos químicos e na comparação com valores descritos na literatura (PARDAL et al., 2008).

**Tabela 40.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC para o ácido (z)-eicos-10-enedióico (**95**), em comparação com valores de referência da literatura.

C	Ácido (z)-eicos-10-enedióico ( <b>95</b> )				Literatura [1]
	HSQC		HMBC		Ácido (z)-octadec-9-enedióico
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{HC}}$	$^2J_{\text{HC}}$	HSQC
1/1'	180,0	-	2H-2/2H-19	2H-3/2H-18	166,5
<b>CH</b>					
9/9'	-	5,36 (m)	H-9/H-10		129,9
10/10'	129,9				-
<b>CH<sub>2</sub></b>					
2/2'	34,1	2,36 (t, 7,4)			34,0
3/3'	24,7	1,63 (m)	2H-2		24,5
4/4'	29,6-29,0	1,35 (m)	2H-3	2H-2	29,0
5/5'	29,6-29,0	1,35 (m)	2H-4		29,0
6/6'	29,6-29,0	1,35 (m)			29,3
7/7'	29,6-29,0	1,35 (m)	2H-8/2H-15		29,5
8/8'	29,6-29,0	1,35 (m)	2H-7/2H-14	2H-15	27,0
9/9'	27,1	2,02 (m)	2H-10	2H-14	-

[1] PARDAL et al., 2008.

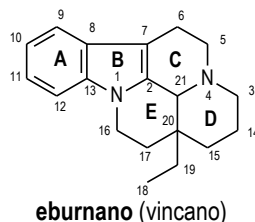
Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono CH-10 e CH-10' ( $\delta_{\text{C}}$  129,9) no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 129 e 130**, volume 2, páginas 139 e 140) revelaram-se em pleno acordo com a presença de uma ligação dupla (Z)-1,2-dissubstituída. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectros 131 a 133**, volume 2, páginas 141 a 143), os hidrogênios H-10/H-10' revelaram, obviamente, o mesmo deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  5,36, aparecendo como um tripleto devido ao acoplamento spin-spin com os 2H-9/2H-9'. A configuração *cis* foi deduzida com base nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono alílicos e olefínicos, envolvendo comparação com dados de modelos da literatura (LEVY, 1974) abaixo descritos, que mostraram que o valor do deslocamento químico para os carbonos olefínicos em ácidos graxos é maior quando a configuração da ligação é *trans*.





## 5.4 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA POR DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

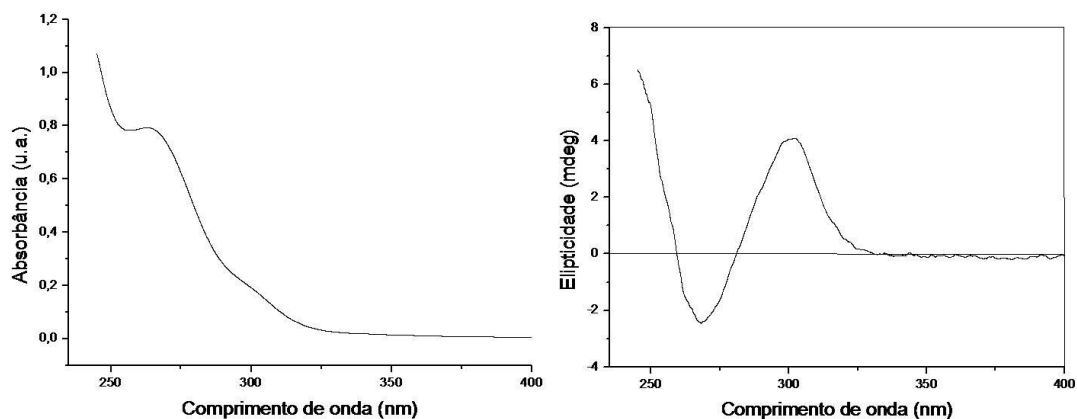
De acordo com a interpretação geral das curvas de dicróismo circular (DC), os sinais do efeito Cotton (EC) de derivados indólicos quirais que não possuem o anel E do sistema vincano (e.g. **eburnano**) são determinados principalmente pela helicidade do anel C (TÓTH et al., 1980).



Assim, para alcalóides indólicos, um sinal de EC negativo seguido por um positivo observado na região de 230-270 nm de um espectro de DC corresponde à configuração 7*R*. Sinais opostos (antipodais, EC positivo seguido por um negativo) são, então, observados quando os compostos apresentam configuração 7*S* (NUGROHO e MORITA, 2012).

A seguir, são apresentados os espectros de absorção no UV e de DC para os alcalóides isolados de *A. desmanthum* e *A. cylindrocarpon*, bem como suas interpretações (**Figuras 26 a 33**).

### 5.4.1 Aspidolimina (MCD 2.8.2a)



**Figura 26.** Espectros de absorção no UV e de dicróismo circular (DC) do alcalóide **Aspidolimina**.

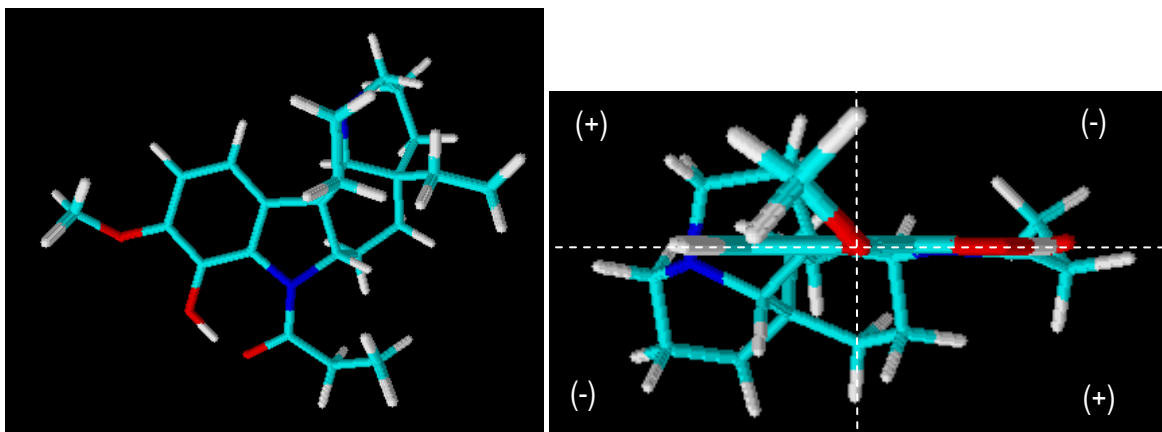


Figura 27. Projeção espacial para a molécula da Aspidolimina, para aplicação da regra do quadrante para aromáticos.

#### 5.4.2 Aspidocarpina (MCD 2.8.2b)

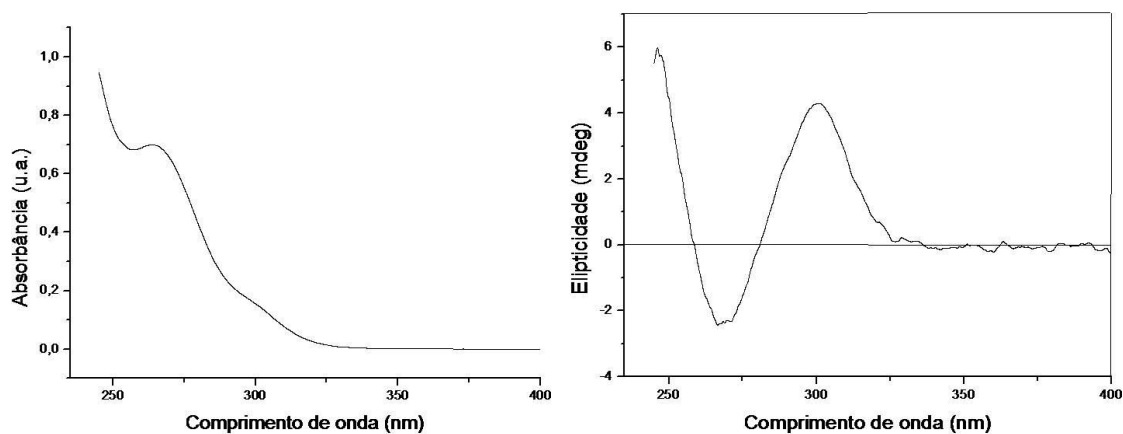


Figura 28. Espectros de absorção no UV e de dicroísmo circular (DC) do alcalóide **Aspidocarpina**.

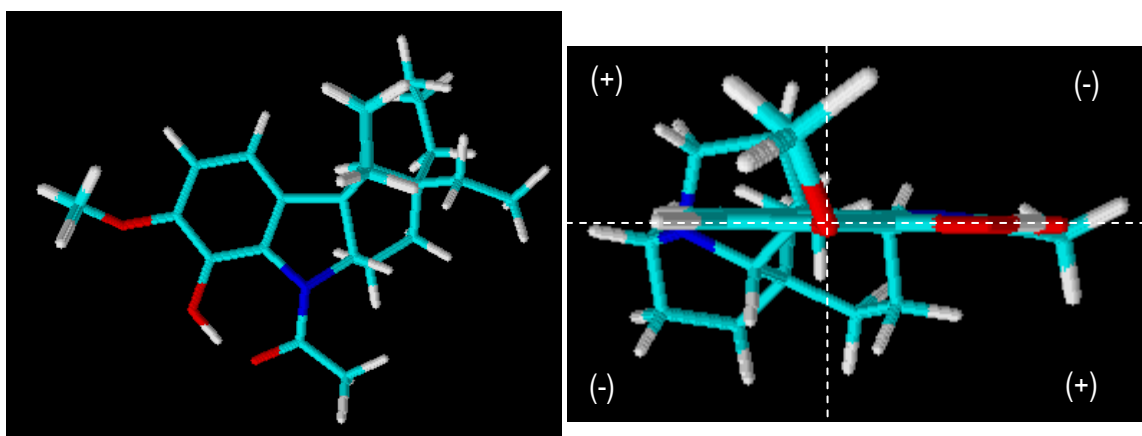


Figura 29. Projeção espacial para a molécula da Aspidocarpina, para aplicação da regra do quadrante para aromáticos.

### 5.4.3 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina (MCC 1.15.5A)

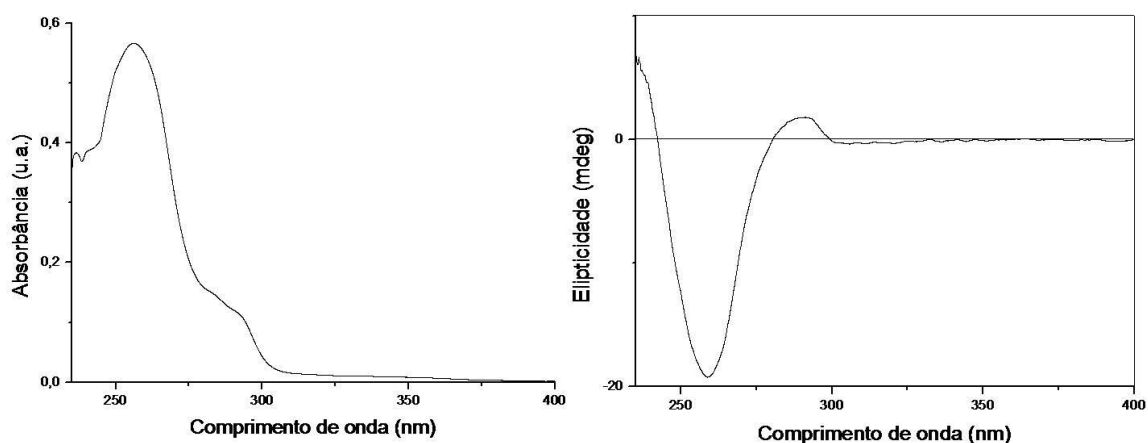


Figura 30. Espectros de absorção no UV e de dicroísmo circular (DC) do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina.

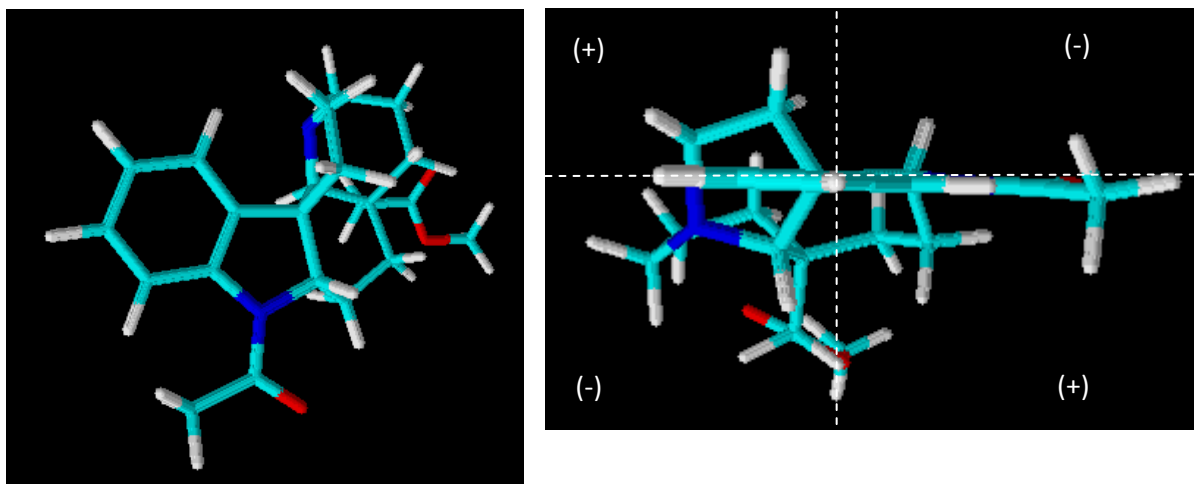


Figura 31. Projeção espacial para a molécula 12-desmetóxi-*N*-acetilcilindrocarina, para aplicação da regra do quadrante para aromáticos.

### 5.4.4 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina

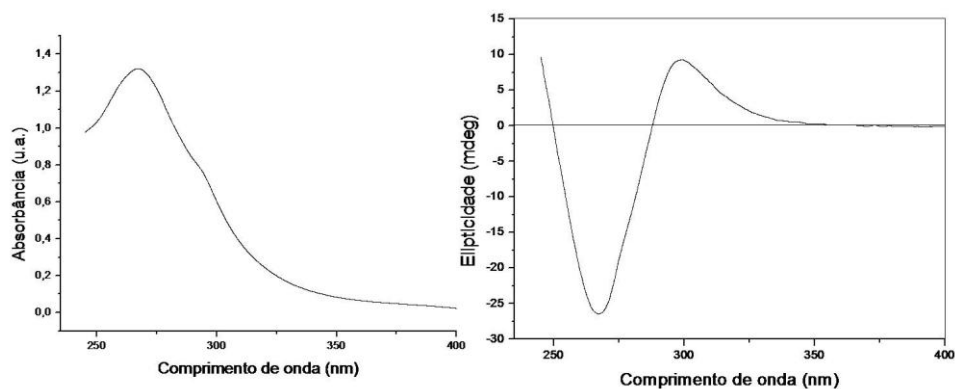
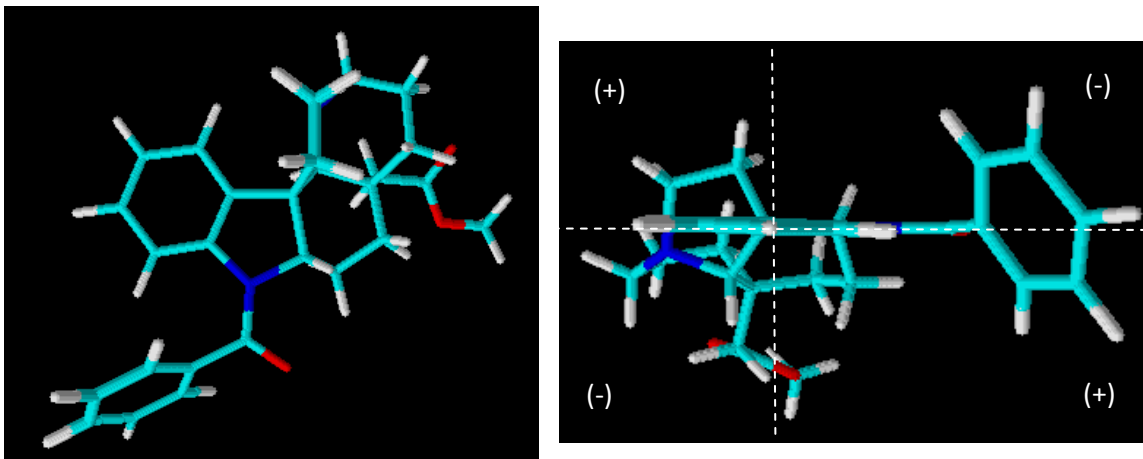


Figura 32. Espectros de absorção no UV e de dicroísmo circular (DC) do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-benzoilcilindrocarina.



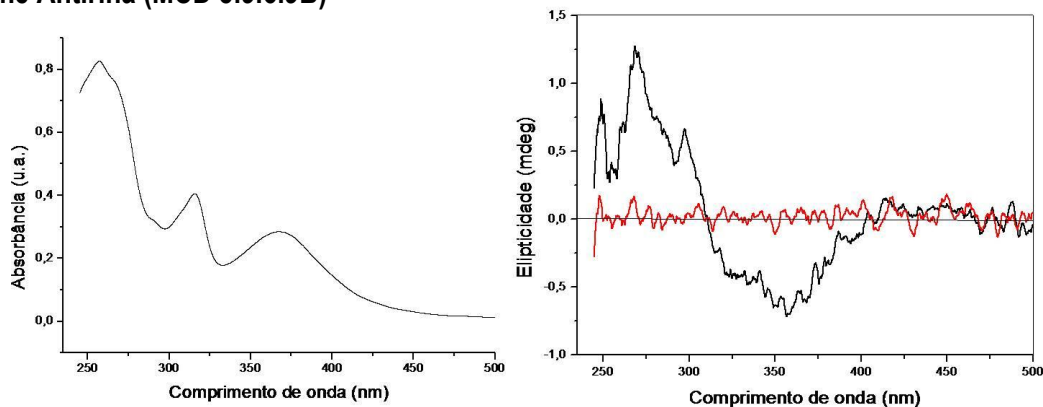
**Figura 33.** Projeção espacial para a molécula 12-desmetóxi-*N*-benzoilcylindrocarina, para aplicação da regra do quadrante para aromáticos.

Pode-se observar pelas **Figuras 26, 28, 30 e 32**, que todos os espectros na região do ultravioleta apresentaram máximo de absorção referente à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , atribuído à carbonila, entre 250 e 275 nm.

De acordo com a regra para alcalóides indólicos, um sinal de EC negativo seguido por um positivo observado na região de 230-270 nm do espectro de DC corresponde à configuração *7R*. Foi então aplicada a regra do quadrante para aromáticos, de forma a confirmar a estereoquímica do carbono citado. Ao se fazer uma projeção da molécula em um plano horizontal, cuja principal contribuição seja dada pela helicidade do anel C, pode-se observar que os hidrogênios H-2 e H-21 contribuem negativamente e que C-19 contribui positivamente para a estereoquímica, uma vez que se encontra no mesmo plano de C-7.

A estereoquímica relativa dos demais centros foi deduzida pelos espectros de NOESY e NOEDIFF (**Espectros 34 e 35**, volume 2, páginas 44 e 45; **Espectro 47**, volume 2, página 57; **Espectro 61** volume 2, página 71).

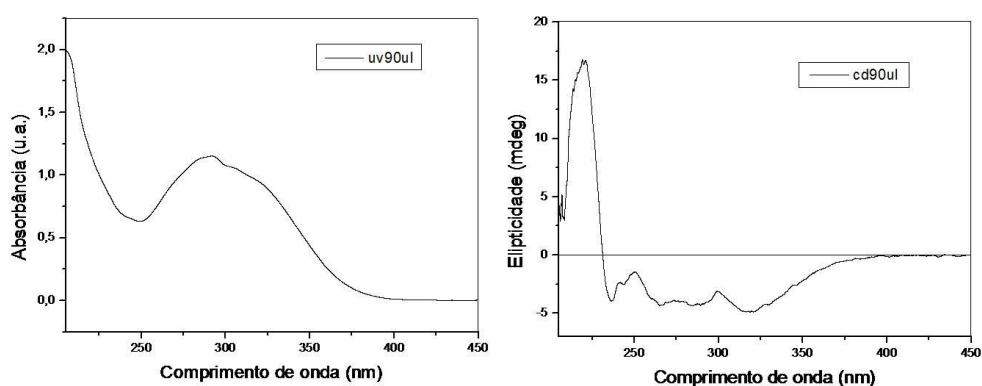
#### 5.4.5 Antirina (MCD 5.9.6.9B)



**Figura 34.** Espectros de absorção no UV e de dicróismo circular (DC) do alcalóide **Antirina**.

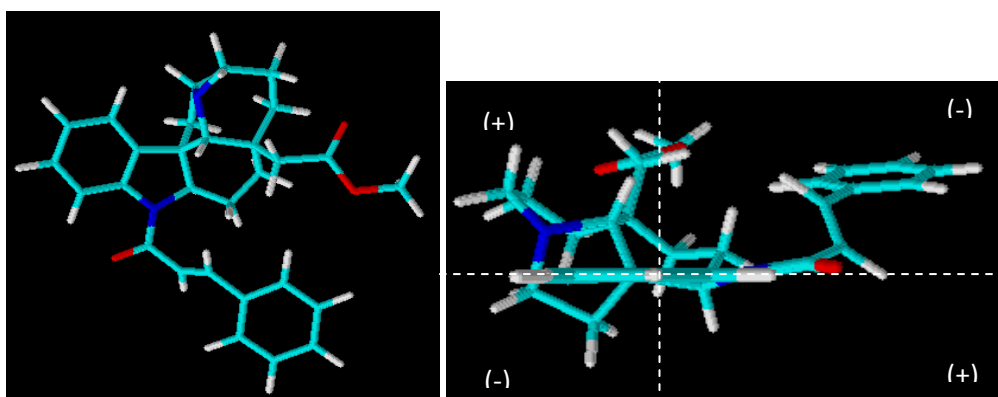
Os esqueletos básicos da corinanteína, yoimbina e heteroyoimbina, bem como seus derivados, mostraram um efeito Cotton positivo na região de  $\lambda_{\max}$  250-280 nm (**Figura 34**, página 140) (NUGROHO e MORITA, 2012). Conseqüentemente, para a molécula de **antirina** isolada de *A. desmanthum*, pode-se deduzir a configuração absoluta S em CH-3. A configuração absoluta desta substância encontra-se descrita na literatura com  $[\alpha]_D -2^\circ$  (SAWA e MATSUMURA, 1969). Assim necessita-se de dados adicionais para a completa definição estereoquímica da antirina descrita neste trabalho de tese.

#### 5.4.6 12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina (MCC 1.10.16)



**Figura 35.** Espectros de absorção no UV e de dicroísmo circular (DC) do alcalóide **12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina**.

O espectro de DC assim como os dados obtidos da literatura pra a substância cilindrocarina (**99**) (BARTH et al., 1972), apresentou Efeito Cotton com sinal positivo na região em torno de 220 nm, seguido por um sinal negativo na região de 240nm, demonstrando a configuração 7S para esse alcalóide.



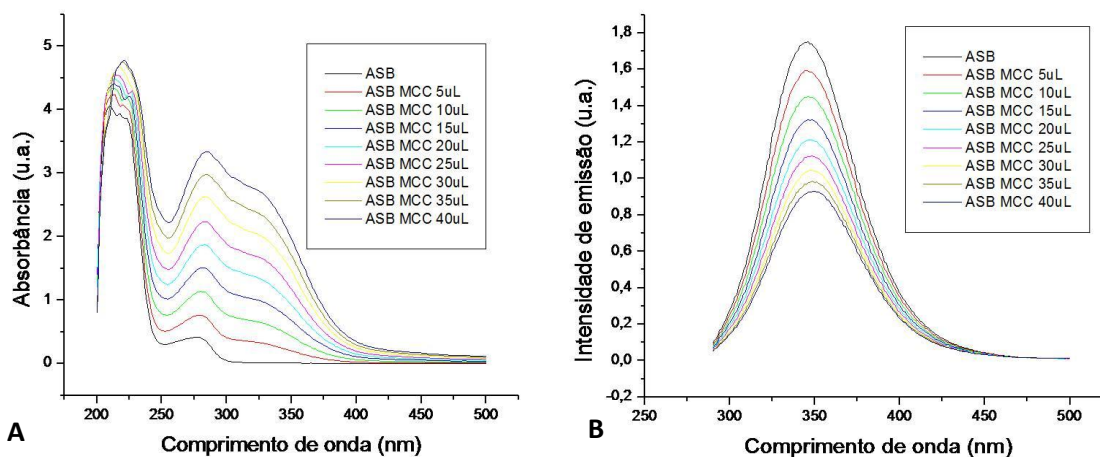
**Figura 36.** Projeção espacial para a molécula 12-desmetóxi-N-cinamoilcilindrocarina, para aplicação da regra do quadrante para aromáticos.

Foi então aplicada a regra do quadrante para aromáticos, de forma a definir as estereoquímicas dos demais centros quirais das moléculas. Ao se fazer uma projeção da molécula em um plano horizontal, cuja principal contribuição seja dada pela helicidade do anel C, pode-se observar que os hidrogênios H-2 e H-21 contribuem positivamente para o Efeito Cotton.

### 5.5 Teste de Ligação à Albumina Sérica Bovina (ASB)

Neste trabalho decidiu-se investigar o comportamento fotofísico do alcalóide 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina (**97**) submetido a uma solução de albumina sérica bovina (ASB) ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L) tamponada com PBS (pH= 7,4), utilizando UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular.

O espectro de absorção no UV-vis revelou a formação do sistema envolvendo o alcalóide **97**/ASB (**Figura 37A**). A supressão da fluorescência da ASB pelo aumento da concentração da 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina foi acompanhada por um deslocamento batocrômico no correspondente  $\lambda(\text{em})$ , confirmando a interação **97**/ASB (**Figura 37B**).



**Figura 37. A-** Espectro de absorção no UV-Vis de **97** em solução de ASB,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L (PBS, pH = 7,4); **B-** Espectro de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) da ASB (PBS pH = 7,4)  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L pelo alcalóide **97** a  $T = 293\text{K}$ .

Através da **Figura 38** (página 143) observou-se a integral sobreposição emissão/absorção do sistema **97**/ASB, utilizado para calcular o raio de Förster ( $r$ ) e o valor de  $r =$

4,14 nm ( $r < 7$  nm), indicando supressão estática, o que foi sustentado pelo valor da constante de supressão ( $K_q = 4,45E+13$ ).

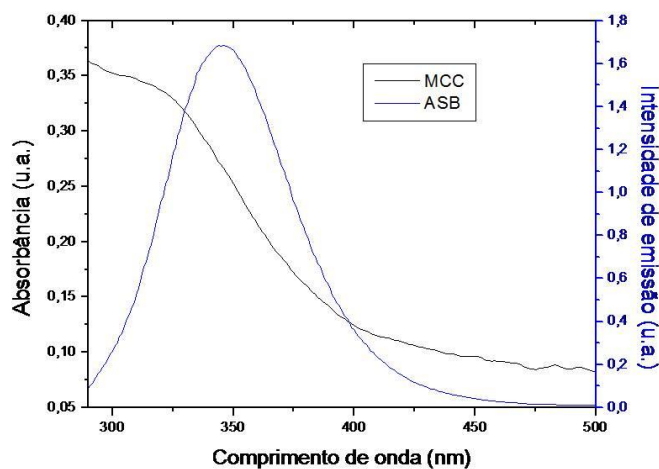


Figura 38. Sobreposição entre os espectros de emissão/absorção para o sistema 97/ASB.

Os espectros de dicroísmo circular (Figura 39) mostraram que a adição de 97 à ASB produziu uma diminuição da % de  $\alpha$ -hélice da proteína (ASB), comprovando a interação entre 97/ASB.

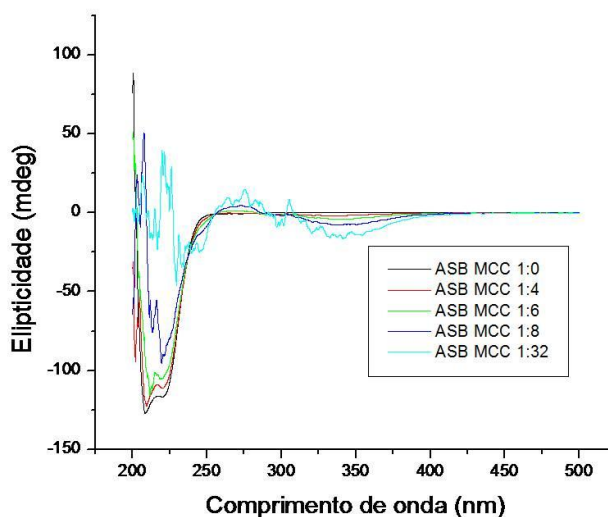
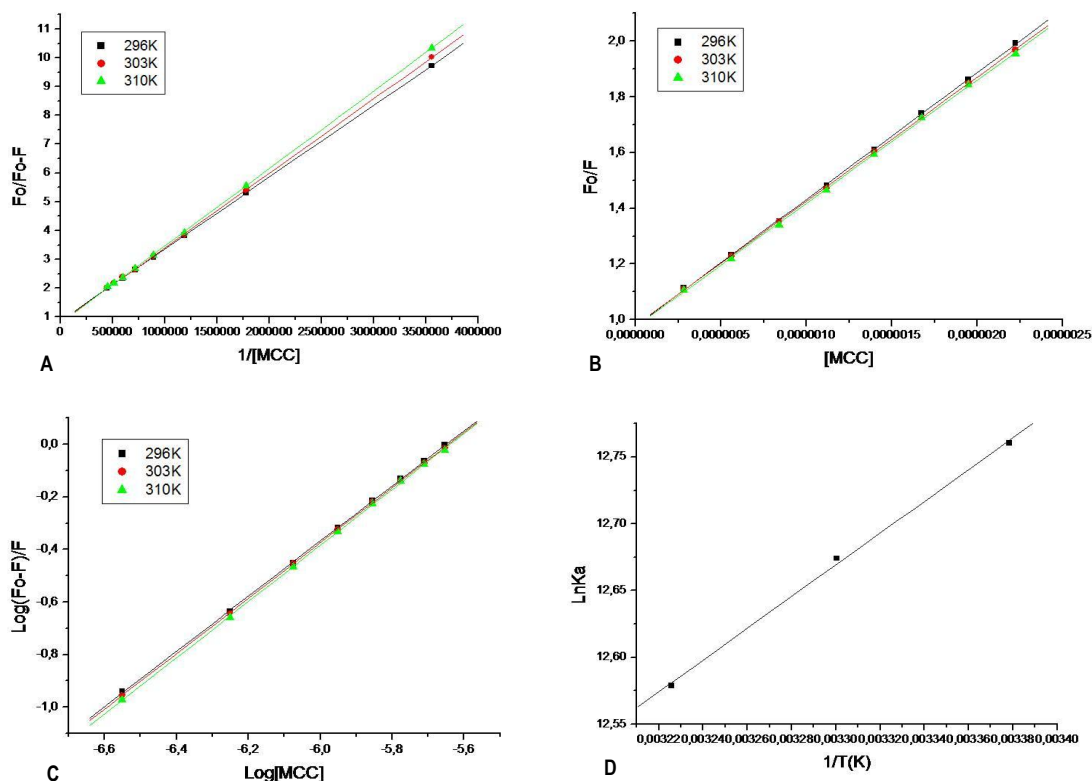


Figura 39. Espectro de dicroísmo circular de 97 em ASB (pH = 7,4), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB/97,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L.

A Figura 40 (página 144) resume os resultados obtidos pela supressão de fluorescência da albumina ASB pelo alcalóide 97, baseados nas equações de Stern–Volmer e Vant’Hoff, permitindo assim obter  $\Delta G^{\circ}$ ,  $\Delta H^{\circ}$  e  $\Delta S^{\circ}$  (Tabela 41, página 144).



**Figura 40.** Curvas de Stern-Volmer nas temperaturas de 296, 303 e 310K (gráficos A, B e C) e Vant' Hoff (gráfico D) para o processo de supressão de fluorescência da ASB pelo alcalóide 97.

**Tabela 41.** Valores termodinâmicos ( $\Delta G^{\circ}$ ,  $\Delta H^{\circ}$  e  $\Delta S^{\circ}$ ) para a interação de 97 com a ASB a 310K.

	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta H^{\circ}$ (kJ/mol)	$T\Delta S^{\circ}$ (kJ/mol)
Alcalóide 101	-32,42	-9,86	22,56

Os resultados obtidos experimentalmente ( $\Delta G^{\circ} < 0$ ) revelaram uma boa interação entre 97/ASB, destacando-se os fatores entálpico e entrópico como contribuintes favoráveis para tal processo bio-interativo.

## 5.6 Teste de Atividade Antimalárica

As amostras foram avaliadas em três experimentos independentes. Em uma triagem inicial, as amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações testadas foram selecionadas para determinação das  $CI_{50}$  (Tabela 42, página 145).



**Tabela 42.** Percentual de redução (% Redução) do crescimento de *P. falciparum* cloroquina resistente (W2) na presença das amostras de *Aspidosperma desmanthum*.

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Redução		
	EBMC	MCD 2.8.4	Aspidocarpina
50	81	100	100
25	17	100	94

Para determinação da  $CI_{50}$ , as amostras foram testadas nas concentrações de 1,56 a 50 $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ) em relação aos controles sem drogas.

De acordo com os resultados (**Figura 41**, página e **Tabela 43**, página), as amostras foram classificadas como:

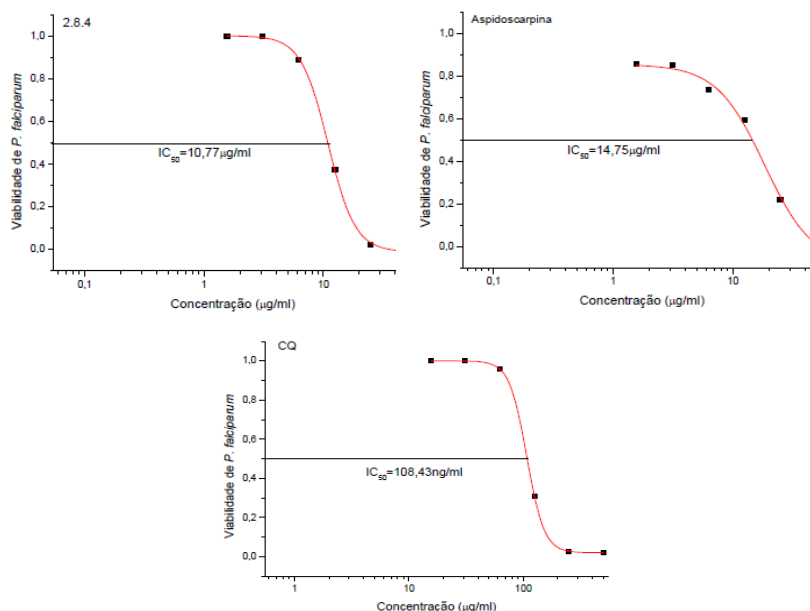
MUITO ATIVAS – valores de  $CI_{50}$  abaixo de 1  $\mu\text{g/mL}$ ;

ATIVAS - valores de  $CI_{50}$  de 1 até 15  $\mu\text{g/mL}$ ;

MODERADAMENTE ATIVAS - valores de  $CI_{50}$  entre 15,1 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ,

POUCO ATIVAS – valores de  $CI_{50}$  entre 25,1 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ,

INATIVAS -  $CI_{50}$  acima de 50  $\mu\text{g/mL}$



**Figura 41.** Curvas dose-resposta das amostras testadas contra parasitos do ciclo sanguíneo de *P. falciparum* (cepa W2), mostrando os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento ( $CI_{50}$ ).

**Tabela 43.** Concentração inibitória de 50% do crescimento ( $CI_{50}$ ) do clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum* contra as amostras avaliadas.

Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Classificação
	Média $\pm$ DP	
Aspidocarpina	13,63 $\pm$ 1,58	Ativa
MCD 2.8.4	12,6 $\pm$ 2,59	Ativa
Cloroquina	0,102 $\pm$ 0,028	Muito ativa

Das três amostras testadas, uma foi inativa. As amostras ativas apresentaram valores de  $CI_{50}$  de 12,6 e 13,63  $\mu\text{g/mL}$ . A cloroquina foi utilizada como antimalárico padrão e foi considerada muito ativa apresentando valor de  $CI_{50} = 0,102 \mu\text{g/mL}$ .

Além dessas amostras, **MCC 1.10.13** (12-desmetóxi-*N*-benzilcilindrocarina) e **MCC 1.10.16** (12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina) também foram submetidas ao teste de atividade antimalárica, pelo método LDH. No entanto, a amostra **MCC 1.10.13** mostrou-se inativa e a amostra **MCC 1.10.16** pouco ativa, frente a cepas W2 do *P. falciparum* ( $CI_{50} > 50$  e  $CI_{50}$  entre 50 e 25, respectivamente). A perda de atividade nesses alcalóides está intimamente ligada às suas estruturas. Mitaine-Offier et al. (2002) observaram que de um grupo de 12 alcalóides testados, os oito mais ativos eram aqueles que continham um grupamento etila livre. Nos quatro menos ativos, os carbonos correspondentes estão envolvidos na formação de um anel tetrahydrofurano. De maneira análoga, podemos concluir que a presença da etoxila como grupamento substituinte em C-20 das amostras **MCC 1.10.13** e **MCC 1.10.16** tem o mesmo efeito deletério para a atividade antimalárica.

Os resultados mostram que tanto a Aspidocarpina quanto a fração que a contém são ativas contra a cepa W2 do *P. falciparum*, respaldando assim a utilização popular das cascas dessa planta para o tratamento da malária. A aspidocarpina é um alcalóide indólico com anel plumerano e que apresenta a etoxila em C-20, tão essencial para a atividade testada.

Entretanto, em comparação com a droga padrão Cloroquina, é possível perceber que a atividade ainda está muito aquém do necessário para o estabelecimento de um novo fármaco. Esses resultados, no entanto, apontam para novas perspectivas na busca por novos agentes antimaláricos, principalmente se aliados às técnicas de Modelagem Molecular. Alterações em sítios específicos da molécula do alcalóide poderão, futuramente, promover o aumento da atividade ou a diminuição de efeitos colaterais, sinalizando para fármacos mais potentes e mais seguros contra a malária.

## CONCLUSÕES

- O estudo fitoquímico de *Aspidosperma desmanthum* e *Aspidosperma cylindrocarpon* possibilitou a identificação de 19 substâncias, sendo 11 alcalóides (9 naturais e 2 derivados acetilados), 4 triterpenos e 2 flavonóides e 2 ácidos orgânicos (ácido atrárico e ácido (z)-eicos-10-enedióico);
- As substâncias 12-desmetóxi-*N*-benzilcilindrocarina e 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina, os derivados acetilados e o triterpeno análogo do simiarenol estão sendo descritos pela primeira vez na literatura;
- O alcalóide antirina está sendo descrito pela primeira vez para a espécie *A. desmanthum*;
- A Cromatografia em Contracorrente de Alta Eficiência mostrou-se eficaz no isolamento de alcalóides, quando foi usado um sistema de solventes baseado no sistema Arizona;
- Os ensaios de Dicroísmo Circular se mostraram bastante úteis na determinação da configuração absoluta dos alcalóides, através da comparação com os dados disponíveis na literatura e também através da regra do quadrante;
- O teste de ligação à albumina sérica bovina (ASB) mostrou uma forte interação entre o alcalóide 12-desmetóxi-*N*-cinamoilcilindrocarina e a albumina, demonstrando a possibilidade de elevada biodisponibilidade desta substância;
- O teste de atividade antimalárica mostrou claramente que os alcalóides que sustentam o grupo etila em C-20 são ativos contra cepas de *P. falciparum*, ao contrário dos alcalóides com grupo etoxila, demonstrando que o grupo etila em C-20 é essencial para a atividade antimalárica.
- O teste de atividade antimalárica corroborou, mais uma vez, com o uso popular da *A. desmanthum* para o tratamento da malária.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHMAD, V. U.; ATTA-UR-RAHMAN. Handbook of Natural Products Data. v. 2.; Pentacyclic Terpenoids. Netherlands: Elsevier, 1994.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102 (3), p. 359-365, 2007.

ARAÚJO, M. F. Metabólitos Especiais Isolados de Madeira de *Simira eliezeriana* e *Simira glaziovii* (Rubiaceae), de Folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) e Atividades Biológicas. Tese. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

ARAÚJO JR., J. X.; ANTHEAUME, C.; TRINDADE, R. C. P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J.; SANT'ANA, A. E. G. Isolation and characterization of the monoterpene indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. *Phytochem. Rev.*, 6, p. 183-188, 2007.

BANCO DE DADOS DE MADEIRAS BRASILEIRAS. Acesso em: 14 de janeiro de 2010. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/caracteristicas.php?ID=18&Característica=304>>.

BARBOSA, L. F. Constituintes Químicos de *Aspidosperma illustre* (APOCYNACEAE). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 3. 1991.

BARTH, G; LINDER, R. E.; BUNNEMBERG, E.; DJERASSI, C. Magnetic Circular Dichroism Studies XXIII [1] Magnetic Circular Dichroism Spectra of Indole Alkaloids. *Helv. Chim. Acta*, 55, p. 2168-2178, 1972.

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods, *J. Chromatogr. A*, 1037, p. 3-14, 2004.

BERTHOD, A; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M.J. Alkane Effects in the Arizona Liquid Systems used in CCC, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, p. 327-340, 2005.

BEYCHOK, S. Circular Dichroism of Biological Molecules. *Science*, 154, p. 1288-1299, 1966.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole Alkaloids Evolution in *Aspidosperma*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 15, p. 187, 1987.

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A Search for Bioactive Compounds in Bolivia Through a Multidisciplinary Approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J. of Ethnopharm.*, 93, p. 269-277, 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. Survey of Medicinal Plants Used as Antimalarial in the Amazon. *J. of Ethnopharm.*, 36, p. 175-182, 1992.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution Methods and applications in organic chemistry and biochemistry. 3. ed., Germany: VCH verlagsgesellschaft, 1987, 515p.

BRENNAN, J.P.; SAXTON, J.E. A new synthesis of the cylindrocarine group of alkaloids. *Tetrahedron*, 42, p. 6719–6734, 1986.

CAMPOS, A. R.; LIMA Jr, R. C. P.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Pro-erectile effects of an Alkaloid Rich Fraction From *Aspidosperma ulei* Root Bark in Mice. *J. of Ethnopharm.*, 104, p. 240-244, 2006.

CAMPOS, A. R.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; SILVEIRA, E. R.; UCHOA, D. E. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; RAO, V. S. N. Relaxant Effects of an Alkaloid-Rich Fraction From *Aspidosperma ulei* Root Bark on Isolated Rabbit Corpus Cavernous. *Int. J. Impot. Res.*, 20, p. 225-263, 2008.

CEAP Design. APOCYNACEAE. Acessado em: 20 de Janeiro de 2010. Disponível em: <[http://www.ceapdesign.com.br/familias\\_botanicas/APOCYNACEAE.html](http://www.ceapdesign.com.br/familias_botanicas/APOCYNACEAE.html)>.

CHENG, X.-X.; LUI, Y.; ZHOU, B.; XIAO, X.-H.; LIU, Y. Probing the binding sites and the effect of berbamine on the structure of bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta, Part A*, 72A(5), p.922-928, 2009.

CONHECENDO A MADEIRA: Piquiá-Marfim-do-Roxo. Acessado em: 05 de fevereiro de 2010. Disponível em: < <http://www.conhecendoamadeira.com/articles/17/1/Piquia-marfim-do-roxo/Page1.html>>.

CRABBÉ, P. Actividad Optica, Dispersion Rotatoria Optica y Dicroismo Circular em Quimica Organica. Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos: Washington, D. C., 1974, 68p.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARIS, M. Organic Structure Analysis. Oxford: New York, 1998, 552p.

CRONQUIST, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2.ed. The New York Botanical Garden: New York, 1988.

DANIELI, B.; PALMISANO, G. Alkaloids from *Tabernaemontana*. In: BROSSI, A. (edit) The Alkaloids, 27. New York: Academic Press, 1986, p. 130.

DEMARCO, D.; KINOSHITA, L. S.; CASTRO, M. M. Laticíferos articulados anastomosados – novos registros para APOCYNACEAE. *Rev. Brasil. Bot.*, 29(1), p.133-144, 2006.

DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 16, p. 710-718, 1979.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2. ed., John Wiley & Sons: England, 2002, 539p.

DJERASSI, C.; ARCHER, A. A. P. G.; GEORGE, T.; GILBERT, B.; SCHOOLERY, J. N.; JOHNSON, L. F. Alkaloid Studies XXV. The structure of *Aspidosperma* alkaloids cylindrocarpine and cylindrocarpidine. *Experientia*, 16, p.532-534, 1960.

DJERASSI, C.; ARCHER, A. A. P. G.; GEORGE, T. Alkaloid Studies XXX. Isolation and constitution of three new *Aspidosperma* alkaloids: cylindrocarpine, cylindrocarpidine and pyrifolidine. *Tetrahedron*, 16, p. 212-223, 1961.

DOWEIKO, J. P.; NOMPLEGGI, D. J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 15 (2), p.207-211, 1991.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; DOYLE, M. P. Basic Organic Stereochemistry. John Wiley & Sons: United States of America, 2001, 688p.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A Revised Classification of the APOCYNACEAE s.l. *The Bot. Rev.*, 66(1), p.1-56, 2000.

FANG, L.; LIU, Y.; YANG, B.; WANG, X.; HUANG, L. Separation of alkaloids from herbs using high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.*, 34, p. 2545-2558, 2011.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial Activity of Alkaloidal Extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99(3), p.325-327, 2004.

GEBREYESUS, T.; DJERASSI, C. Alkaloid studies. Part LXVI. Reactions of some *Aspidosperma* alkaloids with m-chloroperbenzoic acid. Removal of the angular ethyl group of aspidospermine. *J. Chem. Soc. Perkins Transactions 1. Org. Bio-Org. Chem.*, 6, p. 849-860, 1972.

GOLONI, R.; ALVES, N. M.; GARROTE, C. F. D.; PAULA, J. R.; VALADARES, M. C.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C. Estudo da Toxicidade Aguda de *Aspidosperma subcanium* Martius. *Rev. Eletr. Farm.* 2(2), p.89-91, 2005.

GONÇALVES, M. S.; VIEIRA, I. J. C.; OLIVEIRA, R. R.; BRAZ-FILHO, R. Application of preparative high-speed countercurrent chromatography for the separation of alkaloids from the roots of *Tabernaemontana catharinensis* (APOCYNACEAE). *Molecules*, 16, p. 7480-88, 2011.

GOMES, S. M.; CAVALCANTI, T. B. Morfologia Floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (APOCYNACEAE). *Acta Bot. Bras.*, 15(1), p. 73-88, 2001.

GUÉRIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect. Dis.*, 2: p. 564-573, 2002.

GUIMARÃES, H. A.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C data of the simplest plumeran indole alkaloids isolated from *Aspidosperma* species. *Molecules*, 17, p. 3025-3043, 2012.

HE, W.; LI, Y.; TIAN, J.; LIU, H.; HU, Z.; CHEN, X. Spectroscopic studies on binding of shikonin to human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. A*, 174, p. 53-61, 2005.

HEMMATEENEJAD, B.; SHAMSIPUR, M.; SAMARI, F.; KHAYAMIAN, T.; EBRAHIMI, M.; REZAEI, Z. Combined fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies on the interaction between harmalol and human serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 67-68, p. 201-208, 2012.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcalóides Indólicos de Cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Quim. Nova*, 33(2), p.284-287, 2010.

HOSSAIN, M.; KHAN, A. Y.; KUMAR, G. S. Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin. *PLoS One*, 6(4), p. 1-12, 2011.

HUAN, B. X.; KIM, H. Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, p. 1237-1247, 2004.

IKEDA, M.; DJERASSI, C. Alkaloid Studies LX. The structure of two novel *Aspidosperma* alkaloids, deoxyaspidospermine and aspidodispermine. *Tetrahedron Lett.*, 56, p. 5837-5840, 1968.

ISHIYAMA, H.; MATSUMOTO, M.; SEKIGUSHI, M.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Two New Indole Alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*. *Heterocycles*, 66, p. 651-658, 2005.

ITO, Y. (in) ITO, Y.; CONWAY, W. D. High-Speed Countercurrent Chromatography, Wiley: New York, 1996, p. 1-44.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; OCCOLOWTIZ, J. L. Antirhine, a new indole alkaloid from *Antirhea putaminosa* (F. v. Muell.) Bail. *J. Chem. Soc., Chem. Commun. (London)*, p. 229-230, 1967.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M. H.; HUSSON, H. P. Epi-3-atirhine, alcaloïde nouveau extrait de *Guettarda heterosepala*. *J. Nat. Prod.*, 49, p. 1130-1132, 1986.

KHAN, A. Y.; HOSSAIN, M.; KUMAR, G. S. Binding of plant alkaloids berberine and palmatine to serum albumins: a thermodynamic investigation. *Mol. Biol. Rep.*, 40, p. 553-566, 2013.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUSHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A – F, Novel Quaternary Indole Alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. *J. Org. Chem.*, 67, p. 6449-6455, 2002.

KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.*, 37(1), p. 57-84, 1990.

LAWTON, G.; SAXTON, J. E.; SMITH, A. J. The synthesis of *Aspidosperma* alkaloids containing a functional group at C-18; The total synthesis of (±)-N,O-diacetylcylindrocarpinol, (±)-cylindrocarine, (±)-cylindrocarpine, (±)-cylindrocarpidine, and (±)-20-allyl-20-desethyl-20-epiaspidospermine. *Tetrahedron*, 33, p. 1641–1653, 1977.



LEE, C. I.; BAE, J. S.; KIM, T.; KWON, O. J.; KIM, T. H. Polyphenolic Constituents from the Aerial Parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Collected on Ulleung Island. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 54(5), p. 811-816, 2011.

LEVY, G.C. Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy. v.2., Wiley: New York, 1974.

MA, Y.; ITO, Y.; SOKOLOSZY, E.; FALES, H. M. Separation of alkaloids by pH-zone-refining counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 685, p. 259-262, 1994.

MAKLER, M. T.; RIES, J. M.; WILLIAMS, J. A.; BANCROFT, J. E.; PIPER, R. C.; GIBBONS, B. L.; HINRICHS, D. J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48, p. 739-741, 1993.

McLEAN, S.; PALMER, K.; MARION, L. Isolation and structure of a new alkaloid: aspidocarpine. *Can. J. Chem.*, 38, p. 1547-1556, 1960.

McLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; ZHU, X. Assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of aspidocarpine and assignment of the structure and stereochemistry of the von Braun reaction product of aspidocarpine by 2D nmr spectroscopy. *Can. J. Chem.* 65, p. 200-204, 1987.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía em capa fina y em papel. Alemanha: Darmstadt, 1972, p. 130.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In Vitro Antiplasmodial Activity of Brazilian Cerrado Plants Used as Traditional Remedies. *J. of Ethnopharm.*, 110, p. 165-170, 2007.

MILBORROW, B. V.; DJERASSI, C. Alkaloid Studies. Part LXI. The Structure of Twelve New Alkaloids from *Aspidosperma cylindrocarpon*. *J. Chem. Soc. (C)*, 417-424, 1969.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portalsaude>. Acessado em: Dezembro de 2012.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytom.*, 9, p. 1442-145, 2002.

MONTE, Z. S. Desenvolvimento de um Novo Método Para Controle de Qualidade do Cloridrato de Paroxetina e do Cloridrato de Biperideno por Dicroísmo Circular. Dissertação. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

MOREIRA, F. F.; MENDONÇA, C. B. F.; PEREIRA, J. F.; GONÇALVES-ESTEVES, V. Politaxonomia de Espécies de APOCYNACEAE Ocorrentes na Restinga de Carapebus, Carapebus, RJ, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 18(4), p. 711-721, 2004.

MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P. J. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants. *Phytom.*, 14, p. 289-300, 2007.

NAFISI, S.; PANAHYAB, A.; BAGHERI SADEGHI, G. Interactions between  $\beta$ -carboline alkaloids and bovine serum albumin. *J. Lumin.*, 132(9), p. 2361-2366, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66, p. 1022-1037, 2003.

NUGRORO, A. E.; MORITA, H. Absolute Configurational Elucidation of Monoterpene Indole Alkaloids by Circular Dichroism. *Heterocycles*, 84, p. 101-113, 2012.

OLIVEIRA, V. B. Alcalóides Indólicos Isolados de *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE). Tese. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

OLIVEIRA, V. B.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M.; UCHÔA, D. E. A. Spruceanumines A and B, Novel Plumeran Indole Alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE). *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(4), p. 753-759, 2009.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: New leads and efficient phytomedicines. Part I. Alkaloids. *Ann. Braz. Acad. Sci.*, 81(4), p. 715-740, 2009.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Regulatory Situation of Herbal Medicines: a worldwide review. Geneva: 1998.

OMS - Organização Mundial da Saúde. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva: 2000.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Departamento de medicamentos Essenciais e Outros Medicamentos. A Importância da Farmacovigilância / Organização Mundial da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005. (Monitorização da Segurança dos Medicamentos)

OMS – Organização Mundial de Saúde. World Malaria Report. Geneva, World Health Organization. Disponível em: <<http://rbm.who.int>>, Acessado em: dezembro/2012.

PEREIRA, M.M.; SOUZA JÚNIOR, S.N.; ALCÂNTARA, A.F.C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R.B.; MACHADO, P.O.; AZEVEDO, A.O.; MOREIRA, F.H.; CASTRO, M.S.A.; RASLAN, D.S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (APOCYNACEAE). *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8(3), p. 1-8, 2006.

PARDAL, F.; SALHI, S.; BRIGITTE, R.; TESSIER, M.; CLAUDE, S.; FRADET, A. Unsaturated Polyamides from Bio-Based Z-octadec-9-enedioic Acid. *Macromol. Chem. Phys.*, 209, p. 64-74, 2008.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides Indólicos Isolados de Espécies do Gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). *Quim. Nova*, 30(4), p. 970-983, 2007.

PINAR, M.; SCHMID, H. Aspidolimin. *Helv. Chim. Acta*, 45, p. 149-150, 1962.

PING-TAO, L.; LEEUWENBERG, A. J. M.; MIDDLETON, D. J. APOCYNACEAE. *Flora of China*, 16, p. 143-188, 1995.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, 25(1), p.45-61, 2002.

QUINET, C. G. P. APOCYNACEAE Juss. na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

Rede de Sementes do Cerrado. Acessado em: 12 de fevereiro de 2010. Disponível em: <[http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/APOCYNACEAE/Aspidosperma/cylindrocarpon\\_538/index.html](http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/APOCYNACEAE/Aspidosperma/cylindrocarpon_538/index.html)>.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, W.; RUIZ-MESIA, L.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; GINZÁLEZ-COLOMA, A. Indole Alkaloids from *Aspidosperma rigidum* e *A. schultesii* and their Antiparasitic Effects. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, 66, p. 225-234, 2011.

RIBEIRO, A. M. Estudo Espectroscópico da Interação Entre Flavonóides e Albumina Sérica Bovina (ASB). Tese, Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

RODRIGUES, V. F.; CARMO, H. M.; OLIVEIRA, R. R.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. C.; VIEIRA, I. J. C. Isolation of Terpenoids (Meliaceae) by Droplet Counter-Current Chromatography. *Chromatographia*, 70, p. 1191-1195, 2009.

SALOMÃO, A. N.; SILVA, J. A. (Eds.). Reserva Genética Florestal Tamanduá. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 137 p.

SAWA, Y.K.; MATSUMURA, H. Transformation of Quinine Into the Indole Alkaloids – I. The absolute configuration of hunterburnine  $\alpha$ - and  $\beta$ -methochloride. *Tetrahedron*, 25, p. 5319-5328.

SAXTON, J. E.; SMITH, A. J.; LAWTON, G. Aspidosperma alkaloids: The total synthesis of ( $\pm$ )-N,O-diacetylcylindrocarpinol, ( $\pm$ )-cylindrocarine, ( $\pm$ )-cylindrocarpine, and ( $\pm$ )-cylindrocarpidine. *Tetrahedron Lett.*, 47, p. 4161–4164, 1975.

SCHLEICH, S.; PAPAIOANNOU, M.; BANIAHMAD, A.; MATUSCH, R. Activity-Guided Isolation of an Antiandrogenic Compound of *Pygeum africanum*. *Planta Med.*, 6, p. 547-551, 2006

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of APOCYNACEAE s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Syst. Biol.*, 51(3), p. 389–409, 2002.

SETHI, N.; ANAND, A.; SHARMA, A.; CHANDRUL, K. K.; JAIN, G.; SRINIVASA, K. S. High speed counter current chromatography: A support-free LC technique. *J. Pharm. Bio. Sci.*, 1, p. 8-15, 2009.

SILVA, V. P.; OLIVEIRA, R. R.; FIGUEIREDO, M. R. Isolation of Limonoids from Seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Phytochem. Anal.*, 20, p. 77-81, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007, 490p.

SIQUEIRA, I. R.; FOCHESSATTO, C.; SILVA, A. L.; NUNES, D. S.; BATTASTINI, A. M.; NETTO, C. A.; ELIZABETSKY, E. *Ptychopetalum olacoides*, a Tradicional Amazonian “Nerve Tonic”, Possesses Anticholinesterase Activity. *Pharm Biochem Beh.*, 75, p.645-650, 2003.

SOUZA, L.G.; ALVES, N.M.; PAULA, J.R.; VALADARES, M.C.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; GARROTE, C.F.D. Estudo Farmacognóstico de *Aspidosperma subicanum* Mart., APOCYNACEAE. *Rev. Eletr. de Farm.*, 2(2), p. 210-213, 2005.

SOUZA, J.J. Constituintes químicos das cascas das raízes de *Tabernaemontana hystrix* (APOCYNACEAE). Tese. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006

TAHCHY, A.E.; BOISBRUN, M.; PTAK, A.; DUPIRE, F.; CHRÉTIEU, F.; HENRY, M.; CHAPLEUR, Y.; LAURAIN-MATTAR, D. New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochim. Pol.*, 57(1), p. 75-82, 2010.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. I. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial Activity of Indole Alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Bras J of Med Biol Res.*, 39, p. 387-391, 2006.

THAKUR, R.; KUNADHARAJU, S.; SAVVA, M. Kinetic and thermodynamic characterization of camptothecin hydrolysis at physiological pH in the absence and presence of human serum albumin. *Int. J. Chem. Kinet.*, 41(11), p. 704-715, 2009.

THROOP, J. L.; KERL, M. E.; COHN, L. A. Albumin in Health and Disease: Protein Metabolism and Function. Compendium on Continuing Education For The Practicing Veterinarian -North American Edition, 26, p. 932-939, 2004.

TÓTH, G.; CLAUDER, O.; GESZTES, C.; YEMUL, S. S.; SNATZKE, G. Circular Dichroism of Indole Alkaloids. Part 1. Vincane Derivatives. *J. C. S. Perkin II*, 8/907, p. 701-703, 1980.

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Xiloteca. Acessado em 20 de janeiro de 2010. Disponível em: <http://www.if.ufrj.br/npqm/xiloteca/index.php>.

VERPOORTE, R. Methods for the Structure Elucidation of Alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 49, p.1-25, 1986.

VEIGA Jr., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova*, 28(3), p. 519-528, 2005.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The Families of Flowering Plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992. Acessado em: 25 de November de 2009. Disponível em: <http://delta-intkey.com>.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E., ARAGÓN, R., MUÑOZ, V., CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal Activities of Colombian Plants. *J. of Ethnopharm.*, 78, p. 193-200, 2001.

WOODSON, J. E. Jr. Studies in the APOCYNACEAE VIII. An interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. *Annals of the Missouri Bot. Gard.*, 38, p. 119-204, 1951.

XIE, B.; XING, W.; QIU, Y.; CAO, Y.; PANG, J. Study on the interaction between 3 kinds of methylxanthine alkaloids and bovine serum albumin by fluorescence spectrometry. *Zhongguo Yaofang*, 22(37), p. 3497-3500, 2012.

YOO, N.H.; JANG, D.S.; KIM, J.S. Phytochemical constituents of the roots of *Erigeron annuus*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 51(4), p. 305-308, 2008.

ZÈCHES-HANROT, M.; NUZZILARD, J.-M.; RICHARD, B.; SCHALLER, H.; HADI, H.A.; SÉVENET, T.; LE MEN-OLIVIER, L. Alkaloids from leaves and stem bark of *Ervatamia peduncularis*. *Phytochem.*, 40, p. 587-591, 1995.

ZÈCHES, M.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; MORETTI, C.; NUZZILLARD, J.M.; LE MEN-OLIVIER, L. Alkaloids from leaves and stems of *Vallesia glabra*. *Planta Med.*, 61, p. 89-91. 1995.

ZHANG, H.-M.; CHENG, T.-T.; ZHOU, Q.-H.; WANG, Y.-Q. Binding of caffeine, theophylline and theobromine with human serum albumin: A spectroscopic study. *J. Mol. Struct.*, 938, p. 221-228, 2009.

ZHANG, W.; ZHAO, Y.; BAI, X.; WANG, Y.; ZHAO, D. The orientation of protoberberine alkaloids and their binding activities to human serum albumin by surface-enhanced Raman scattering. *Spectrochim. Acta, Part A*, 78A(3), p. 1105-1109, 2011.