

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

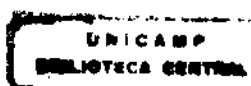
INSTITUTO DE QUIMICA

**Estudo de Seis Espécies do Gênero *Aspidosperma*
Utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise Qualitativa e
Quantitativa. Teste Bioautográfico; Cultura de Tecidos e
Células Vegetais e Rota de Preparação dos Compostos
Diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B**

Aluno: Arildo José Braz de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Koike

Campinas, Setembro de 1999.



UNIDADE	I Q
N.º CHAMADA:	I/UNICAMP
	OL4e
V.	Ex.
TOMBO BC	43995
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/08/00
N.º CPD	

Verifica OK | 2001

CM-00146946-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

OL4e

Oliveira, Arildo José Braz de
Estudo de seis espécies do gênero *aspidosperma* utilizando GC, GC/MS e HPLC: análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautográfico; cultura de tecidos e células vegetais e rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B / Arildo José Braz de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Luzia Koike.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química.

1. Alcaloides indólicos. 2. Fitoquímica. 3. Biotecnologia.
I. Koike, Luzia. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Dedico este trabalho em especial à

Minha Esposa, Solange

Meu Filho, Pedro

Meus Pais, Elizeu e Nelza

Meu Irmão, Luiz

Minha Sogra, Vaneide

Meus Novos Irmãos, Carlos,

Luís, Regina e Zeca

Resumo

Estudo Integrado de Seis Espécies do Gênero *Aspidosperma*; Análise Qualitativa e Quantitativa por CG, CG/EM e CLAE; Bioatividade; Biotecnologia e Rota de Preparação dos Compostos Ramiflorina A e Ramiflorina B

Arildo José Braz de Oliveira e Luzia Koike

Palavras Chaves: alcalóides indólicos, CG/EM, *Aspidosperma*, biotecnologia

O desenvolvimento de um método de análise rápido e econômico de plantas contendo alcalóides indólicos utilizando CG, CG/EM e CLAE foi a principal proposição desta tese.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado espécies do gênero *Aspidosperma* e nesta tese o objetivo foi estudar seis espécies e realizar a análise qualitativa e quantitativa dos alcalóides por CG, CG/EM e CLAE. O estudo fitoquímico de cinco espécies permitiu o isolamento de vinte e duas substâncias puras, entre elas quatorze que não haviam sido isoladas anteriormente destas espécies. A (+)-aspidospermina, (+)-pirifolidina, (-)-aspidofractinina, (-)-aspidofilina, (+)-15-desmetóxi-pirifolina e (+)-pirifolina (*Aspidosperma olivaceum*); *N*-acetil-cilindrocarina e 12-*O*-metil-21-oxo-aspidalbina (*A. polyneuron*); (-)-aspidospermina, (+)-1,2-desidro-aspidospermidina e geissosvellina (*A. dispersum*); 19-*E*-isositsiriquina (*A. ramiflorum*); 15-metóxi-aspidospermina e 15 metóxi-pirifolidina (*A. pyrifolium*), estas duas ultimas são substâncias novas. As substâncias isoladas foram utilizadas como padrões nos estudos cromatográficos e o método de análise exigiu pequena quantidade do extrato da planta, utilizando o método do padrão interno para quantificação.

Testes autobiográficos, antibacterianos e antifúngicos nos extratos e padrões isolados mostraram uma potente ação antibacteriana. Os melhores resultados ocorreram nas substâncias (+)-ramiflorina A e (+)-ramiflorina B, (+)-aparcina, (-)-aspidospermina, (-)-*N*-acetil-cilindrocarina e normacusina B. Os resultados obtidos nas espécies *A. ramiflorum* e *A. polyneuron* incentivou-nos a desenvolver experimentos de cultura *in vitro* de tecidos e células vegetais, visando produzir os alcalóides ativos. *A. ramiflorum* foi a espécie que apresentou os melhores resultados, levando a produção dos alcalóides ramiflorina A e ramiflorina B.

A análise utilizando CG, CG/EM e CLAE do extrato *A. ramiflorum* revelou que o (+)-10-metóxi-geissoschizol (10MG) estava presente em quantidades consideráveis, o que sugeriu-nos realizar a semi-síntese dos alcalóides ramiflorina A e B, utilizando esta substância como substrato. Portanto testamos a reação em um modelo o triptofol, cuja estrutura é similar ao 10MG. O triptofol foi condensado com a triptamina para dar uma substância dimérica que foi identificada por métodos físicos. Estes resultados mostram a viabilidade de se preparar as ramiflorinas A e B por esta semi-síntese proposta.

Abstract

Integrated Study of Six Species of *Aspidosperma* Genera; Qualitative and Quantitative Analysis by GC, GC/MS and HPLC; Bioactivity; Biotechnology; and a Route for Preparation of the Compounds Ramiflorine A e Ramiflorine B

Arildo José Braz de Oliveira and Luzia Koike

Keywords: indolic alkaloids, GC/MS, *Aspidosperma*, biotechnology

The development of a fast and economical method of analysis in plant that contain indolic alkaloid using GC and GC/MS techniques was the principal aim of this thesis.

Our research group have been studying species from *Aspidosperma* genera and the subject of this thesis, was to study steam bark extracts of six species as will to perform qualitative and quantitative analysis by GC, GC/MS and HPLC. The phytochemical study of the plants resulted in the isolation of twenty-two pure compounds, among which, fourteen have not been previously, described these species. The (+)-aspidospermine, (+)-pyrifolidine, (-)-aspidofractinine, (-)-aspidofiline, (+)-15-demethoxypyrifoline and (+)-pyrifoline (*Aspidosperma olivaceum*); *N*-acetyl-cylindrocarine and 12-*O*-methyl-21-oxo-aspidobaine (*A. polyneuron*); (-)-aspidospermine, (+)-1,2-dehidroaspidospermidine and geissosvelline (*A. dispersum*); 19-*E*-isositsirikine (*A. ramiflorum*); 15-methoxyaspidospermine and 15 methoxypyrifolidine (*A. pyrifolium*), and the latter two are novel compounds. These compounds isolated were used as standards in the chromatographic studies and the analytical method required small quantities of the plant extracts, using internal standard method for quantification.

Bioautographic test, antibacterial and antifungi, using extracts and pure substances showed strong antibacterial action. The best results were obtained with the substances (+)-ramiflorine A e (+)-ramiflorine B, (+)-apparicine, (-)-aspidospermine, (-)-*N*-acetyl-cylindrocarine and normacusine B. The results obtained with *A. ramiflorum* and *A. polyneuron* encouraged us to develop assays with tissue and plant cell culture to produce the active alkaloids. *A. ramiflorum* showed the first good results with production of (+)-ramiflorine A and (+)-ramiflorine B.

In the GC, GC/MS and HPLC analysis of extract the *A. ramiflorum* reveled that one component, 10-methoxygeissochizol (10MG), in considerable concentration, this suggested to us the possibility of semi-synthesis of alkaloids (+)-ramiflorine A and B, using 10MG as a substrate. Therefore, we tested in reaction using a tryptophol model with has a similar structure to the 10MG. The condensation of tryptophol with tryptamine gave the dimmeric compound which was identified by spectroscopy data. These results show that the semi-synthesis of (+)-ramiflorine A e (+)-ramiflorine B is possible.

Agradecimentos

À Professora Dra. Luzia Koike, pela orientação pelo grande incentivo demonstrado durante o decorrer deste trabalho, pela introdução à Química de Produtos Naturais, em especial aos Alcalóides Indólicos, deixando em aberto um caminho a trilhar muito maior do que se mostra neste momento, os meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade Estadual de Campinas e aos Institutos de Química e Biologia pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação Universidade Estadual de Maringá em especial ao Departamento de Farmácia e Farmacologia pela liberação para cursar o Programa de Doutorado em Química no IQ-Unicamp.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo bolsa de estudo concedida.

Aos colegas Professores do Departamento de Farmácia e Farmacologia, em especial aos meus colegas de disciplina, Professoras Izabel Cristina Piloto Ferreira, Maria Lucília Zamuner, Regina Celi Espires e Regina Correia. Gonçalves, pelo apoio e boa vontade, sem os quais a conclusão deste trabalho não seria possível.

Aos colegas Íris, Norberto, Luís, Simone, Sandro, Carlos, Marcos, Claudio pelo incentivo e amizade.

À Dircilei, Angélica, Dulce, Paula e Sônia Cláudia do Nascimento Queiroz e a todos os Funcionários e Professores do Instituto de Química que de uma forma ou de outra contribuíram pela realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Reis pelos extratos de *A. ramiflorum* e por seu incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Fred Yokio Fugiwara pelo auxílio na obtenção e manipulação dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Armando de Mattos Filho pela coleta e identificação da espécie *A. pyricollum*.

Ao Prof. Dr. Antônio José de Araújo pela coleta e identificação da espécie *A. olivaceum*.

Ao Prof. Dr. Milton Faccione pela coleta e identificação da espécie *A. polyneuron*.

Ao Dr. Washington Marcondes Ferreira Neto pela coleta e identificação das espécies *A. pyriforme* e *A. dispersum*.

À Professora Simone Liliiane Kirszenzaft Shepherd, por ceder as instalações de seu laboratório para a realização dos trabalhos de cultura de tecidos sob sua supervisão, pela amizade e incentivo todo tempo demonstrada.

À Fundação Tropical “André Tosello” de Pesquisa e Tecnologia, e a Dra. Silvia Yoko Eguchi, pelo material, espaço físico e treinamento que permitiram-nos realizar os testes autobiográficos.

À Fundação de Auxílio e Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP projeto 3454-0.

Aqueles que por qualquer motivo não tenham sido citados nominalmente, não os esquecerei tão cedo, por tudo que tenham feito para que este trabalho fosse concluído.

À Deus por ter me dado força e vontade para executar esse trabalho.

Curriculum Vitae

1. Graduação

Bacharel em Farmácia e Bioquímica pela Fundação Universidade Estadual de Maringá – Maringá-Paraná

Período: Novembro de 1987

2. Pós-Graduação

Mestre em Química Orgânica pela Universidade Estadual de Campinas- Campinas-São Paulo.

Período: Fevereiro de 1994

3. Trabalhos Apresentados em Congressos e Simpósios

- 3.1.** Título: “Estudo em CG/EM de Extratos Apolares de Alcalóides do Gênero *Aspidosperma*”

Autores: Arildo J. B. Oliveira e Luzia Koike

Evento: XII Simpósio de Plantas Medicinais

Período e Local: Setembro de 1992 – Curitiba-Paraná

- 3.2.** Título: “Identificação de Alcalóides de Quatro Espécies do Gênero *Aspidosperma* por GC/MS”.

Autores: Arildo J. B. Oliveira e Luzia Koike

Evento: 17ª Reunião Anual da SBQ

Período e Local: Junho de 1994 – Caxambú-Minas Gerais

- 3.3.** Título: “Análise dos Alcalóides do Gênero *Aspidosperma* por GC/MS”.
Autores: Arildo J. B. Oliveira e Luzia Koike
Evento: 19ª Reunião Anual da SBQ
Período e Local: Maio de 1996 –Poços de Caldas-Minas Gerais
- 3.4.** Título: “Análise Qualitativa e Quantitativa dos Extratos Alcaloidicos de *A. ramiflorum* por CGAR Associada a CLAE”.
Autores: Arildo J. B. Oliveira, Francisco A. M. Reis e Luzia Koike
Evento: VII Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques
Período e Local: Março de 1998 – Águas de São Pedro-São Paulo.
- 3.5.** Título: “Efeito de Fitorreguladores sobre a Formação de Calos em *A. ramiflorum*”.
Autores: Arildo J. B. Oliveira e Simone L. K. Shepherd.
Evento: 4ª Jornada Paulista de Plantas Medicinais
Período e Local: Junho de 1997 – Campinas-São Paulo
- 4. Trabalhos Apresentados em Congressos e Simpósios na Forma de Resumo Completo, Anais ou Apresentação Oral**
- 4.1.** Título: “Plantas Medicinais Brasileiras: Desenvolvimento de Métodos de Análise Qualitativa e Quantitativa por GCHR e GC/MS do Gênero *Aspidosperma*”.
Autores: Arildo J. B. Oliveira e Luzia Koike
Evento: 5ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis
Período e Local: Agosto de 1997 – Águas de São Pedro-São Paulo.
Forma de Apresentação: Apresentação Oral e Resumo Completo.

5. Experiência Profissional

5.1. Farmacêutico

Instituição: Farmácia Catedral – Homeopatia e Plantas Medicinais

Período: Janeiro-Setembro de 1997.

Função: Farmacêutico Responsável

Local: Apucarana-Paraná

5.2. Professor Universitário

Instituição: Fundação Universidade Estadual de Maringá

Data de Admissão: Setembro de 1988

Função: Professor Assistente – nível 3

Lotação: Departamento de Farmácia e Farmacologia

Disciplinas Ministradas: Química Farmacêutica, Análise de Medicamentos e Síntese de Medicamentos.

ÍNDICE

	Páginas
1. Introdução	1
2. Objetivos	6
 CAPÍTULO 1: Método de Análise Qualitativa e Quantitativa por GC e GC/MS Associada a HPLC de Seis Espécies do Gênero <i>Aspidosperma</i> .	 7
1. Experimental	7
1.1. Matéria-Prima Vegetal	7
1.1.1. <i>Aspidosperma pyricollum</i> Muell. Arg.	8
1.1.2. <i>Aspidosperma olivaceum</i> Muell. Arg.	10
1.1.3. <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Martius	13
1.1.4. <i>Aspidosperma polyneuron</i> Muell. Arg.	15
1.1.5. <i>Aspidosperma ramiflorum</i> Muell. Arg.	18
1.1.6. <i>Aspidosperma dispernum</i> Muell. Arg.	20
1.2. Procedimentos Experimentais Gerais	22
1.3. Preparação das Amostras	22
1.4. Análise por CG/EM	25
1.5. Análise por CLAE	25
1.6. Compostos Padrões	26
2. Resultados e Discussão	28
2.1. Obtenção dos Padrões	28
2.1.1. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma pyricollum</i>	29
2.1.2. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma olivaceum</i>	30
2.1.3. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma pyrifolium</i>	100

2.1.4. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma polyneuron</i>	127
2.1.5. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	152
2.1.6. Obtenção dos Padrões em <i>Aspidosperma dispersum</i>	165
2.2. Análise Qualitativa por GC/MS	186
2.3. Análise Qualitativa e Quantitativa das Espécies Estudadas	201
2.3.1. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma pyricollum</i>	201
2.3.2. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma olivaceum</i>	208
2.3.3. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma pyriforme</i>	218
2.3.4. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma polyneuron</i>	230
2.3.5. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	238
2.3.6. Análise Qualitativa e Quantitativa em <i>Aspidosperma dispersum</i>	244
2.4. Análise por CLAE dos Alcalóides das Seis Espécies do Gênero <i>Aspidosperma</i>	254
3. Conclusão	262

CAPÍTULO 2: Atividade Antibacteriana dos Extratos Alcaloídicos de Seis Espécies do Gênero <i>Aspidosperma</i> .	263
1. Considerações Gerais	263
2. Resultados e Discussão	266

3. Experimental	271
4. Conclusão	262
 CAPÍTULO 3: Cultura de Tecidos: Produção de Alcalóides em Calos e Células em Suspensão	
1. Aspectos Gerais	275
2. Resultados e Discussão	279
3. Experimental	302
4. Conclusão	306
 CAPÍTULO 4: Rota de Preparação dos Alcalóides Diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B	
1. Considerações Gerais	307
2. Resultados e Discussão	312
3. Conclusão	319
4. Experimental	320
 Conclusão Final	 362
 Bibliografia	 363

Lista de Abreviaturas

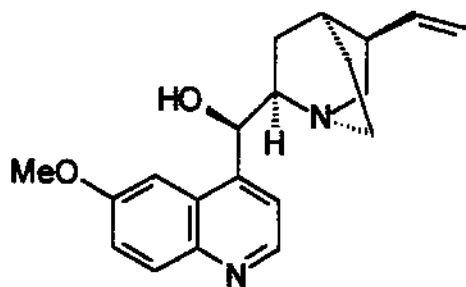
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
COSY	Correlação Homomolecular ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)
DCM	Diclorometano
d	dubleto
dd	duplo dubleto
δ	deslocamento químico em partes por milhão
DEPT	Experimento de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
MEM	Medidas Exatas de Massa
EtOH	Etanol
DIC	Detector de Ionização de Chama
HETCOR	Espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) a uma ligação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hz	Hertz

IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
M⁺	Íon molecular
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
m/z	Relação massa carga
m	Multiplete
MeOH	Metanol
EM	Espectrometria de Massas
P.F.	Ponto de Fusão
Plântula	Planta jovem, obtida logo após o processo de germinação
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
t	Tripleto
UV	Ultravioleta

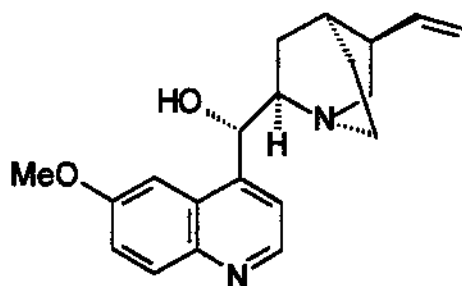
INTRODUÇÃO

De todos os produtos naturais conhecidos 20% (cerca de 16.000 compostos) são classificados como alcalóides [1]. Atividades biológicas diversas são reportadas para uma grande variedade de alcalóides, mais atualmente apenas 30 são comercializados [1]. A maioria destes são medicamentos, alguns são usados como flavorizantes, praguicida e como compostos modelos para estudos farmacológicos. Estes alcalóides, são classificados como "especialidades químicas", e o seu volume de produção a nível mundial é limitado.

Alcalóides como a quinina (1) e a quinidina (2) já tem uma produção em torno de 300-500 toneladas/ano, a ajmalicina (3) cerca de 3600 Kg/ano e compostos como a vinblastina (4) e vincristina (5) atingem uma quantidade de alguns Kg/ano [2, 3]. As quantidades de material necessárias para a extração destes alcalóides são pequenas se comparadas com os de outros produtos agrícolas. Por exemplo, são necessárias cerca de 5000-10000 toneladas métricas das cascas de *Chinchona* para a extração da quinina (1) e quinidina (2) e de cerca de 200-300 toneladas das raízes de *Catharanthus roseus* para a produção de ajmalicina (3). O valor no mercado destes alcalóides está na faixa de milhões de dólares [4].



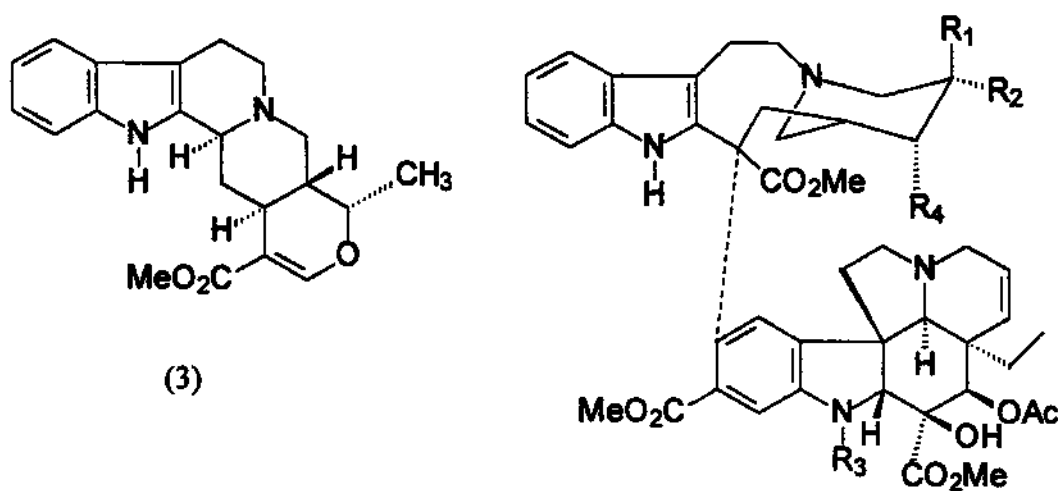
(1)



(2)

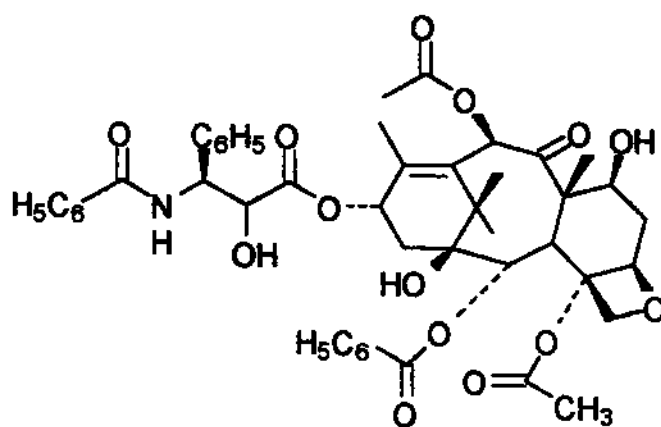
Hoje em dia estas "especialidades químicas" são produzidas pela extração de plantas cultivadas ou até mesmo de plantas coletadas em seu "habitat" natural. Existem diversos problemas ligados a este tipo de produção, a saber as variações nas quantidades e na qualidade dos produtos obtidos de plantas, são alguns dos problemas ligados a extração destes produtos químicos. Os métodos alternativos

para a obtenção destes produtos naturais de alto valor econômico são de grande interesse. Como consequência disso, muitos trabalhos vem sendo realizados com o objetivo de se obter sinteticamente estes produtos naturais, como uma alternativa aos processos extrativos. Ainda que as sínteses de alguns produtos naturais sejam viáveis quimicamente, de um modo geral, são inviáveis economicamente. As semi-sínteses partindo de precursores mais disponíveis, ocorre com sucesso em alguns casos, como por exemplo o acoplamento de monômeros na produção do alcalóide dimérico vinblastina (4) [18]. A produção de novos compostos úteis, também podem ser desenvolvidos por esta estratégia, como por exemplo, o trabalho de semi-síntese do taxol (6) que resultou no produto comercial Taxotere ® [5, 18].



Nas décadas de 70 e 80, a produção de alcalóides empregando biotecnologia de plantas, foi muito estudada como um método alternativo ao extrativismo e as sínteses orgânicas, a mesma utiliza células cultivadas em laboratórios em vez de plantas. Um exemplo interessante da aplicação da técnica de cultura de células vegetais ocorreu recentemente [6]. Descobriu-se que uma árvore rara, chamado "teixo" (*Taxus brevifolia*), que cresce principalmente no Canadá, produz o taxol (6), substância promissora no combate de certos tipos de câncer (mama e ovário). O

consumo anual de taxol (6) exigiria a derrubada anual de 6.000 árvores. A produção do taxol (6) sintético, revelou-se bastante complicada inviabilizando a síntese [7, 8]. Partiu-se então para a técnica de cultura de células vegetais. A técnica permite a obtenção do taxol (6) de um modo economicamente viável e ecologicamente correta.



(6)

A análise qualitativa e quantitativa dos alcalóides é portanto de fundamental importância tanto para a produção por métodos baseados no extrativismo vegetal, como também nos métodos alternativos de obtenção dos alcalóides. Por isso existem diversos métodos disponíveis para a análise e identificação de alcalóides conhecidos. A análise destas misturas complexas (extratos vegetais e extratos de cultura de células) é frequentemente feito por CCD, através da comparação de valores de R_f em diferentes sistemas de solventes, e pela comparação dos componentes da mistura com compostos padrões frente a reagentes cromogênicos específicos [9].

Ainda que diferentes técnicas analíticas sejam descritas para a quantificação dos alcalóides indólicos, inexistente um método quantitativo de análise destes extratos complexos que empregue quantidades limitadas de matéria-prima vegetal. Como os alcalóides indólicos são normalmente polares, pouco voláteis e instáveis, a CLAE é o método mais utilizado [10]. A análise de algumas classes de compostos emprega a CLAE com detecção por UV-VIS. O uso de detectores eletroquímicos é limitado

devido a não tolerância da eluição por gradiente, apesar de ser um método sensível [111], pois poucos extratos alcalóidicos são analisados apropriadamente e o método de eluição isocrático apresenta problemas de coeluição.

A disponibilidade comercial e a grande variabilidade de fases estacionárias das colunas de CG de sílica fundida, muitas das quais permitem trabalhar à temperaturas mais elevadas, aumentou as possibilidades de análise por cromatografia gasosa, incluindo aí uma variedade de drogas e produtos naturais, entre estes os alcalóides [12, 13, 14].

A CG usando colunas capilares demonstrou ser um método simples, rápido, sensível e reprodutível para a quantificação de algumas classes de alcalóides incluindo os indólicos [14].

Esta tese, focaliza o estudo de alcalóides indólicos de seis espécies do gênero *Aspidosperma*, no que tange à análise qualitativa e quantitativa por CG/EM, CLAE. O isolamento fitoquímico para obter padrões, pesquisa de atividade antimicrobiana, cultura de células vegetais e transformações químicas de compostos que apresentaram atividade biológica, também fazem parte deste trabalho.

Devido as suas importantes funções biológicas e aplicações na indústria farmacêutica, os alcalóides indólicos de *Aspidosperma* apresentam demanda suficiente para o desenvolvimento de uma metodologia que permita uma separação rápida e eficiente, associada a uma atribuição inequívoca dos componentes individuais. A CG com coluna capilar foi a técnica escolhida por nós para a análise de misturas complexas de plantas do gênero *Aspidosperma*.

O gênero *Aspidosperma* pertence a família Apocynaceae e segundo Woodson [15] no gênero existem 52 espécies distribuídas em nove séries.

- **Macrocarpa (2 espécies)**
- **Ramiflora (1 espécie)**
- **Pyricolla (11 espécies)**
- **Polyneura (4 espécies)**
- **Rígida (1 espécie)**

- Nitida (1 espécie)
- Stegomeria (3 espécies)
- Quebrachines (2 espécies)
- Nobiles (14 espécies)

No Brasil encontram-se a maioria delas. Muitas destas espécies são conhecidas por fornecerem madeira de excelente qualidade [16].

Estudos realizados por B. Gilbert [17] e colaboradores com um grande número de espécies do gênero *Aspidosperma* resultou no isolamento de mais de uma centena de alcalóides indólicos com as mais variadas estruturas.

Os alcalóides indólicos presentes nas espécies deste gênero apresentam um variado espectro de atividades farmacológicas incluindo antiviral [18], bloqueadoras dos receptores α -2 adrenérgicos [18], antineoplásica [19, 20], analgésica [21], antimalárica [22], antimicrobiana [23] entre outras.

A presença dos alcalóides de interesse farmacológico faz com que seja necessário o desenvolvimento de métodos que permitam realizar a análise qualitativa e quantitativa dos alcalóides indólicos presentes nos extratos destas espécies.

As técnicas de culturas de células vegetais podem ser aplicadas as espécies do gênero *Aspidosperma* pois além das mesmas possuírem alcalóides com grande interesse farmacológico, também existem espécies deste gênero ameaçadas de extinção, como por exemplo a "Peroba-rosa" (*A. polyneuron*) no estado do Paraná, que poderiam ser preservadas aumentando-se a oferta de mudas utilizando-se o processo biotecnológico, com o intuito não só de produzir alcalóides, mas como também desenvolver metodologias que permitam a micropropagação, o que poderá garantir a sobrevivência e o reflorestamento planejado visando a exploração sustentada destas espécies arbóreas de ciclo de vida longo.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1)- Realizar a análise qualitativa e quantitativa dos extratos alcalóidicos de seis espécies do gênero *Aspidosperma* utilizando-se a CG com Detector de Ionização de Chama (DIC) e CG/ES.
- 2)- Realizar o estudo fitoquímico com o intuito de isolar alcalóides para serem utilizados como padrões nos estudos cromatográficos.
- 3)- Realizar a análise dos extratos alcalóidicos das seis espécies por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e fazer uma comparação com a cromatografia gasosa.
- 4)- Investigar a existência de atividade antimicrobiana nos extratos alcalóidicos das seis espécies estudadas.
- 5)- Desenvolver metodologias que permitam a cultura de células vegetais "in vitro" em algumas espécies do gênero *Aspidosperma*.
- 6)- Realizar a semi-síntese dos alcalóides diméricos presentes em *A. ramiflorum*, ramiflorina A e ramiflorina B.
- 7)- Usar as informações obtidas como mais uma forma de contribuição na quimiosistemática e biossíntese dos alcalóides indólicos em espécies do gênero *Aspidosperma*.

CAPÍTULO 1

MÉTODO DE ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA POR GC E GC/MS ASSOCIADA A HPLC DE SEIS ESPÉCIES DO GÊNERO

Aspidosperma.

1. EXPERIMENTAL

1.1. Matéria-prima vegetal

O gênero *Aspidosperma* possui espécies com acentuada similaridade, criando controvérsias na classificação, rico em espécies de distinção laboriosa, que se caracteriza pela presença, no tubo corolino, de fissuras ou rimas por detrás das anteras [15], e pelos folículos achatados, contendo sementes aladas. Woodson considera que este gênero contém 52 espécies. Como várias de suas fusões de espécies próximas são ilegítimas, baseadas na insuficiência de amostragem completa das coleções que examinou, o desconhecimento das árvores naturais e dos respectivos habitats; este gênero atualmente pode avançar-se a cerca de 130 espécies, sendo perto de 80 no Brasil, abrindo lugar para as identificadas subsequentemente [24]. Vivem em todo tipo de vegetação, estendendo-se desde o México até a Argentina; a maioria porém são brasileiras [24].

Numerosas espécies fornecem estimadas madeiras amarelas, amareladas ou amareladas, ditas localmente *pereiro*, *peroba*, *guatambu* e *perobinha*, nomes esses seguidos de vários qualificativos; na região amazônica ouvem-se *caranapaíba* e *araracanga*. Todas são ricas com variadas classes de alcalóides.

As espécies por nós estudadas são de uma maneira geral assim classificadas:

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotyledoneae

Ordem: Gentianales

Família: Apocynaceae

Sub-Família: Plumerioidae

Tribo: Plumeriae

Gênero: *Aspidosperma*

1.1.1. *Aspidosperma pyricollum* Muell. Arg. [15, 24, 25, 26]

Denominação Vulgar: pequiá-da-restinga

Características Gerais (Figura 1): Árvore pequena, dificilmente superando 5m x 20 cm, cujo lenho é esbranquiçado e duríssimo. A casca é parda, fina e bem áspera. As folhas são lanceoladas a oblongas, agudas ou arredondadas no ápice e 5-10 cm x 1-3 cm.

A inflorescência é subterminal a terminal, glabra, medindo 3-4 cm. A corola é branca ou amarelo-claro com 5-6 cm de comprimento. O fruto é piriforme, medindo 4-5 cm x 3-4 cm e as sementes elipsóides de 4 x 2,5 cm.

Informações Gerais: Floresce de novembro a janeiro em São Paulo ou de setembro a novembro em Minas Gerais. Frutifica nove meses depois (São Paulo) e quatorze meses depois (Minas Gerais). Reproduz-se por sementes.

Ocorrência: Próprio das areias do litoral (restinga) desde Pernambuco até o Rio de Janeiro, sendo raro na mata de encosta da Serra do Mar.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n^o 49.176, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): as amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados no Rio de Janeiro, Mata de Maricá, pelo Dr. Armando de Mattos Filho, Pesquisador do Jardim Botânico do Rio de Janeiro



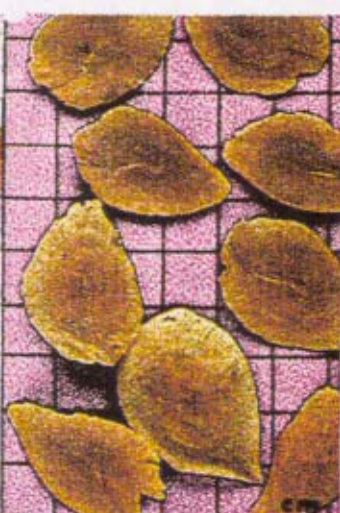
Planta adulta



Folhas



Frutos



Sementes



Casca



Madeira

Figura 1. *Aspidosperma pyricollum* Muell. Arg. [25].

1.1.2. *Aspidosperma olivaceum* Muell. Arg. [15, 24, 25, 27]

Denominação Vulgar: Guatambu, guatambu-branco, guatambu-amarelo, guatambu-legítimo, guatambu-rosa, amarelão, peroba (SC), tambu.

Características Gerais (Figura 2): Árvore que alcança usualmente 10-15 m , podendo ir a 20m x 60 cm. A casca é parda, fina (cerca de 5 mm), rígida, compacta, bem áspera devido à superfície minutamente irregular, por dentro pardo amarelada; nas matas secas, a casca mostra-se bem mais grossa, rimosa, anfractuosa e amarela por dentro. As folhas lanceoladas a oblongas, agudas ou arredondadas no ápice, cuneiformes na base, firmemente membranáceas, glabras, as margens onduladas, quase sem nervuras visíveis, mais pálida em baixo, 5-10 cm x 1-3 cm ; pecíolo com 1-2 cm; espécimes das florestas secas do Brasil Central apresentam folhas tomentelas e com nervuras algo marcadas na face inferior, onde são bem glaucas. A inflorescência é subterminal a terminal, glabra, medindo 3-4 cm; pedúnculos com 1-2 cm; pedicelos alcançando 1-3 mm de comprimento. As flores com cálice provido de lobos ovado-agudos, os quais tem 1 mm; corola branca ou amarelo-claro, 5-6 mm de comprimento, pilosa internamente ou sem pêlos; ovário constantemente vestido de pêlos brancos; estigma quase clavado. O fruto é piriforme, contraído em delgado estipe com 1-2 cm, grosso, medindo 4-5 cm x 3-3,5 cm, recoberto de numerosas lenticelas pequeninas, visíveis sob lente; sementes elipsóides, 4 cm x 2,5 cm, dotadas de núcleo seminífero pardo, central e cordiforme, a asa amarela estreita e subcoriácea.

Informações Gerais: Floresce de novembro a janeiro (SP) ou de setembro a novembro (MG). Frutifica em julho-agosto (SP) ou em dezembro -fevereiro (MG).

Um quilo de sementes encerra cerca de 5.500 sementes, que germinam em cerca de 8-12 dias. Podem multiplicar-se mediante de estacas de uns 30 cm x 10 mm, colocadas em areia lavada úmida, onde enraízam.

Ocorrência: Característica da floresta pluvial atlântica, ocorrendo de Minas Gerais e Rio de Janeiro a Santa Catarina, muito frequente, neste último estado chama-se "peroba", achando-se altamente difundida. Em Minas Gerais encontra-se ainda na margem dos campos e nas

matas secas, suportando a fortes períodos sem chuvas. Vulgar também no Rio de Janeiro é o mais espalhado dos Guatambus.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n.º 99844, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): As amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados na região de Curitiba pelo Dr. Antônio José de Araújo, Professor Titular da Faculdade de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná.



Est. 108 – PEROBA (*Aspidosperma olivaceum*). Árvore de 25 m de altura. Foto de Raulino Reitz, em 14.05.1960.

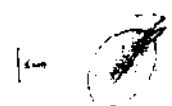


Planta adulta

Folhas



Frutos



Sementes

Figura 2. *Aspidosperma olivaceum* Muell. Arg. [26].

1.1.3. *Aspidosperma pyrifolium* Martius [15, 24, 25, 28]

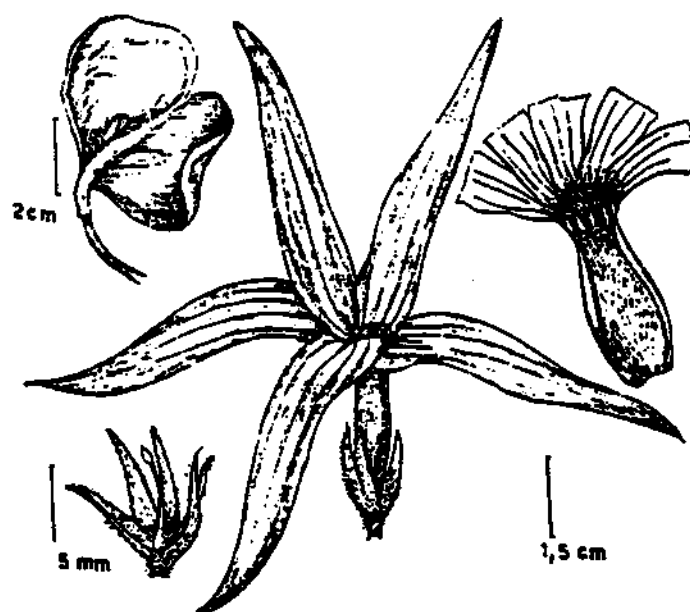
Denominação Vulgar: Brasil: pereiro, pereiro-branco (BA); pereiro -preto (CE); peroba-rosa, trevo (GO); pereiro-vermelho, peroba-paulista (MG); pau-pereiro, pereiro-de-saia (PI); e no Paraguai: kirandi, palo-de-rosa, palorroso.

Características Gerais (Figura 3): Árvore ou arvoreta, cerca de 3-8 m, ramos castanhos, glabros, com algumas lenticelas, pubérulo a tomentoso quando bem jovem. As folhas são ovais a obovadas, membranáceas cartáceas, glabras ou pilosa, quando jovens pubérulas a tomentosa; base arredondada a obtusa; ápice obtuso, agudo ou acuminado, cerca de 7 x 3,5 cm a 8,5 x 5 cm, face inferior discolor, às vezes venação reticulada um pouco emersa; pecíolo cerca de 1,5 - 2,5 cm. A inflorescência subterminal, dicásio modificado, reduzido, chegando a ser quase subfasciculado, pubérula a tomentosa, raramente glabra, pedicelos cerca de 2 mm. O cálice de cerca de 2-3 mm, lacínios ovais, longamente agudos, pubérulo a tomentoso.

As flores possuem corola brancacenta, pubérula a tomentosa externamente, internamente com pelos longos abaixo da inserção dos estames e, mais abaixo, bem curtos; tubo de cerca de 2,5-5 cm; lobos cerca de 10-23 mm, oblongos, estreitando em direção ao ápice, estames inseridos no quarto superior do tubo, anteras ovais, cerca de 1 mm. O ovário é globoso, cerca de 1 mm, com alguns pelos longos; estigma globoso, com alguns pelos, estiletos do estigma com cerca de 3 mm. Folículos de cerca de 5,5 cm x 4 cm, piriformes, lenhosos, castanhos, com lenticelas, estipitado, geralmente não mucronado, glabros. As sementes são ovaladas, com ala concêntrica, cerca de 3 x 2,5 cm, cerca de 4 a 5 sementes por fruto.

Informações Gerais: A espécie é largamente distribuída no sertão nordestino sob o nome de *pereiro*; pode assumir o hábito de simples arbusto na caatinga mais sáfara; ocorre também no chaco Paraguaio. Floresce de setembro a janeiro.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n^o 46125, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): As amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados no Piauí pelo Dr. Washington Marcondes Ferreira Neto.



Flores e elementos florais



Fruto



Folhas e galhos

Figura 3. *Aspidosperma pyrifolium* Martius [27].

1.1.4. *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. [15, 24, 25, 26]

Denominação Vulgar: Peroba, peroba-rosa, peroba-amargosa, peroba-rajada, peroba-açu, sôbro (ES).

Características Gerais (Figura 4): Árvore que atinge até 35 m x 150 cm, gerando excelentes fustes retilíneos de uns 12-20 m x 70-100 cm por via de regra: copa rala de ramificação corimbiforme; râmulos trifurcados, esparsamente lenticelos na ponta. A casca é espessa (1,5-4,0 cm), rija, pardacenta, profundamente sulcada, rugosa, com ritidoma rosado por dentro e a parte viva amarelada, do que resultam dois estratos nítidos compondo a casca. As folhas são variáveis quanto a forma, oblongas a obovado-elípticas, curta e obtusamente acuminadas ou com ápice arredondado, atenuadas na base, firmemente membranáceas ou subcoriáceas, algumas vezes lustrosas na face superior, as nervuras secundárias muito apertadas e paralelas, a venação terciária caracteristicamente bem impressa e saliente em ambas as páginas, sem pelos, 7-15 x 2-4 cm; pecíolo 5-15 mm. A inflorescência em glomérulos terminais e subterminais, fulvo-pubérulos ou glabros, compactos e globosos quando jovens, depois mais ou menos corimbiformes, 1-4 cm de comprimento; pedúnculo nulo ou até 5 mm; pedicelos com cerca de 1 mm. O cálice apresenta lobos largamente ovados, com cerca de 1 mm, pilósulos. A corola cor de creme, cerca de 3-4 mm de comprimento; levemente pilósala ou quase glabra. O ovário puberulento; estigma clavátulo. O fruto é elipsóide e manifestamente achatado (às vezes atenuado na base), rostrado no ápice, séssil, 3,5-5 cm x 10-15 mm, com uma crista mais ou menos proeminente, pardo escuro, densamente coberto de lenticelas bem visíveis; sementes 1-4, elípticas, 25-40 mm x 8-10 mm, providas de núcleo seminífero basal, do qual parte uma asa membranácea parda.

Informações Gerais: Floresce em novembro-dezembro e frutifica em outubro; para o sul, assinalam-se, respectivamente abril-maio e junho-agosto. Um quilo de sementes contém cerca de 11500 sementes, que germinam em cerca de 16 dias. A espécie é encontrada em matas da América do Sul, principalmente do Brasil, nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná e na Colômbia.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n^o 78.273, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): As amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados no Campus da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, pelo Dr. Milton Faccione, Professor da Universidade Estadual de Londrina.



Planta adulta



Folhas



Frutos



Sementes



Casca



Madeira

Figura 4. *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. [25].

1.1.5. *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. [15, 24, 26]

Denominação Vulgar: Guatambu, guatambu-amarelo, guatambu-grande, peroba-amarela, peroba-café, tambu.

Características Gerais (Figura 5): É uma árvore de uns 12-30 m. A casca é integra, relativamente fina (4-8 mm), dura, lisa ou ligeiramente áspera, uniformemente pardo-avermelhada, usualmente com manchas líquênicas mais claras. As folhas são oblongas e elípticas, cuneadas na base, acuminadas, membranáceas, glabras, as nervuras secundária distantes umas das outras e delicadamente impressas, 10-22 cm x 3,6 cm, concolores; pecíolo 1-2 cm. As inflorescências são glomérulos quase sésseis, paucifloros, inseridos nos nós localizados abaixo das pontas dos ramos mais novos, densamente rufo-tomentosos; tais ramos geralmente são desprovidos de folhas na inserção da inflorescência. As flores são inteiramente ferrugíno-tomentosas; o cálice com lobos agudos, com cerca de 2 mm de comprimento; corola medindo 10-12 mm, as lacínias obtusas, com 2-3 cm de comprimento; ovário glabro ou quase. O fruto é obovado ou suborbicular, grande (7-15 cm x 6-8 cm), grosso, com as valvas dobradas para fora após a deiscência, pardo, densa e grosseiramente lenticeloso, sementes disciformes, com 6-7 cm de diâmetro, providas de núcleo seminífero central e asa ampla, parda e membranácea.

Informações Gerais: Espécie exclusiva da floresta pluvial atlântica, desde o Rio de Janeiro e Minas Gerais até Santa Catarina; comum sobretudo no Rio de Janeiro. Observada ainda na Bolívia. Floresce de julho a outubro e frutifica em agosto e setembro. Um quilo encerra 1000 a 2000 sementes. É uma espécie bastante isolada, imediatamente distinta pelas curtas inflorescências fasciculadas e ramifloras.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n.º 32802, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): As amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados em Porto-Ferreira - São Paulo e classificadas pelo Dr. Hermógenes Ferreira Leitão Filho, Professor da Universidade Estadual de Campinas.



Planta adulta



Folhas



Frutos



Sementes



Casca



Madeira

Figura 5. *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. [25].

1.1.6. *Aspidosperma dispernum* Muell. Arg. [15, 24, 25, 28]

Denominação Vulgar: Pereiro da serra.

Características Gerais (Figura 6): Árvores com cerca de 6 m de altura, com os galhos relativamente escassos, minutamente puberulento quando jovem, blabada e finamente rimosa quando adulta. As folhas largamente elípticas a elípticas-ovaladas, o ápice é escasso e pouco acuminado a obtuso, a base é largamente obtusa, 5-12 cm de comprimento, 2-7 cm de largura, firmemente membranácea, o retículo da nervura terciária é bem visível, glabroso; pecíolos de 2-3 cm de comprimento. As inflorescências são agrupadas subterminalmente nas partes superiores das folhas axilares, dicotomamente dicásias, 2-3 cm de comprimento, os pecíolos e pedicelos são densamente branco-puberulantes, as bracteias muito pequenas; os pedicelos com cerca de 1 mm de comprimento. Os lobos do calice são grandemente ovalados-trigonais, agudo a obtuso, com cerca de 0,5 cm de comprimento, densamente branco-puberulento. Corola esverdeada, o tubo com cerca de 2,5 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro de comprimento, sem glabro, os lobos oblongos, arredondados, com cerca de 1,5 mm de comprimento. Os estames são inserido um pouco acima da metade do tubo da corola, as anteras tem cerca de 0,7 mm de comprimento. Os ovários são ovóides, glabros, com cerca de 0,5 mm de comprimento, o estigma é subcapitado. Os folículos são largamente elípticos, acuminados, com 2-3 cm de comprimento, 1-2cm de largura, sésseis; as sementes, são ovais, com cerca de 2 cm de comprimento e 1,0-1,5 cm de largura, com uma estreita asa concentrica e embrião bilateral simétrico.

Informações Gerais: Ocorre no sudeste brasileiro em regiões montanhosas em meio a terrenos pedregosos.

Classificador e Local de Coleta (Escicata n.º 86367, depositada no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP): As amostras do caule e galhos desta espécie foram coletados no estado de Minas Gerais entre as cidades de Diamantina e Governador Valadares pelo Dr. Washington Marcondes Ferreira Neto.



Folhas e galhos

Figura 6. *Aspidosperma dispernum* Muell. Arg. [27].

1.2. Procedimentos experimentais gerais

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Mettler FP-5. As rotações ópticas foram determinadas em um polarímetro fotoelétrico Carl Zeiss Jena Polamat A, em lâmpada de Mercúrio e corrigidos para lâmpada de sódio, solubilizando-se os compostos em etanol ou clorofórmio.

Os espectros no Ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 3A usando-se etanol como solvente. Os espectros no Infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR série 1000, utilizando-se pastilhas de KBr contendo aproximadamente 1% de amostra ou na forma de um filme em clorofórmio ou diclorometano.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram registrados nos instrumentos Varian Gemini 300 – 300 MHz com campo de 7 Tesla e Varian Inova 500 MHz, utilizando-se TMS ou HMDS como padrões interno e CDCl_3 , MeOD e $(\text{D}_3\text{C})_2\text{CO}$ como solventes.

As cromatografias Líquida de Alta Eficiência e Pressão (HPLC) foram feitas no equipamento HP 1090 série II. A Cromatografia Gasosa com DIC foi feita no equipamento HP 5890A e a Cromatografia Gasosa com Detector Seletivo de Massas (CG/EM) foi feita no equipamento HP-5970 B.

Os espectro de massas pela injeção direta na fonte e EMM (medidas exatas de massas) foram feitas no Autospec-Micromass-EBE e no MS 5870B.

Todos os solventes utilizados foram purificados ou possuíam grau espectroscópico

1.3. Preparação das amostras

As cascas e galhos das seis espécies foram secos em uma estufa com ar circulante a 40°C . O material vegetal seco foi então triturado em um moinho de facas do tipo Wiley e extraído à frio com etanol à 70 %, o extrato etanólico seco a seguir foi submetido a uma extração ácido-base conforme o descrito na Figura 7.

Os extratos clorofórmicos ácidos e básicos obtidos foram secos e evaporados em evaporador rotatório. As massas dos extratos obtidas no processo extrativo são mostradas na Tabela 1.

As amostras dos extratos ácidos e básicos foram pesadas, para dar uma massa de 30 mg, a seguir as mesmas foram diluídas com 9 ml de uma solução de diclorometano:metanol (80:20, v/v) e 1,0 ml de uma solução de triptofol (7) [padrão interno], a uma concentração de 2,5 mg/ml. A mistura foi homogenizada e submetida a filtração em coluna (0,5 cm de diâmetro) com sílica-gel 60 Merck 70-230 mesh (1g). A coluna foi eluída com uma solução de diclorometano:metanol (80:20, v/v). O filtrado foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 2,5 ml mesma solução. As amostras assim obtidas foram utilizadas nas análises por CG, CG/EM e CLAE.

Tabela 1. Massas dos extratos a pH ácido e básico da 6 espécies estudadas

Espécie	planta seca (g)	extrato ácido (g)	extrato básico (g)
<i>A. pyricollum</i>	1000	8,40	0,96
<i>A. olivaceum</i>	1000	5,33	0,76
<i>A. pyriforme</i>	1000	17,0	7,42
<i>A. polyneuron</i>	1000	8,69	12,1
<i>A. dispernum</i>	1000	0,78	2,25
<i>A. ramiflorum</i>	1000	7,70	11,6

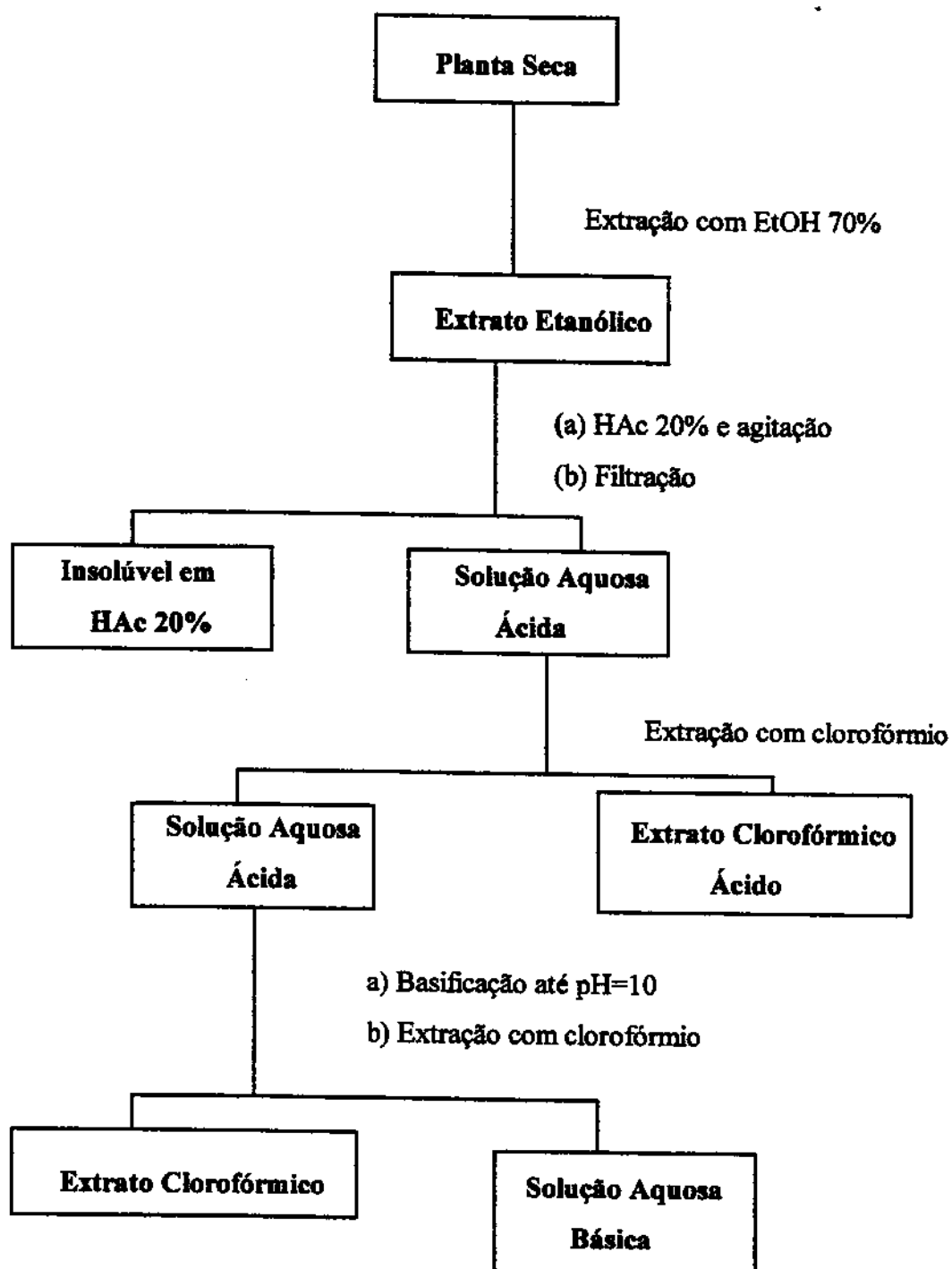


Figura 7. Esquema de extração ácido-base para os alcalóides de *Aspidosperma*.

1.4. Análise por CG e CG/EM

Utilizou-se nas análises uma coluna capilar DB-1 (12m, 0,25mm ϕ , 0,2mm de espessura do filme da fase estacionária, J&W Scientific, CA). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (50KPa) e a razão de split nas injeções foi 1:50. A temperatura de injeção foi de 270°C. As temperaturas da coluna foram programadas para uma velocidade de 15°C /min a partir de uma temperatura inicial de 100°C e então de 225-260°C à 2,5°C/min, e foi mantida por mais 10 minutos a 260°C. A temperatura do detector foi de 270°C.

A análise por CG/EM foi realizada no equipamento HP 5970B com um detector seletivo de massas. Os programas de análise foram idênticos às condições empregadas nas análises por GC. Utilizou-se duas colunas para GC/MS a fim de obtermos os índices de retenção de "Kováts" (IK) dos componentes identificados (DB-1 e DB-2 de mesmo comprimento, espessura e diâmetro interno, diferindo apenas na composição da fase estacionária.).

As soluções de todos os padrões foram preparadas para dar uma concentração de aproximadamente 1mg/ml. Um volume de 1 μ l de todas as soluções foram injetados em todas as análises.

1.5. Análise por CLAE

A separação cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido da Hewlett-Packard Series II/M-1090, equipado com um injetor automático com volume de injeção variável até 25 μ l, uma bomba de alta pressão recíproca, do tipo pistão cabeça dupla modelo DR5 com fluxo de até 5.000 μ L.min⁻¹ e um detector espectrofotométrico por conjunto de fotodiodos, com cela de 8 μ l de volume. O sistema de aquisição de dados foi feito numa Chemstation, série Pascal, com computador modelo HP 7994A. A coluna utilizada foi a μ -Bondapak C-18, fase reversa, 10 μ m (300mm, 3,9mm D.I., Waters Associates).

As análises foram feitas através de eluição por gradiente na qual o ELUENTE B: consistindo de formiato de amônio 100mM - octanossulfonato de sódio 2mM/ ácido fórmico / acetonitrila (64:4:32 v/v), foi adicionado ao ELUENTE A: consistindo de formiato de

amônio 100mM - octanossulfonato de sódio 2mM/ ácido fórmico / acetonitrila (88:4:8 v/v), através de quatro rampas lineares de 0 à 100% em uma hora (gradiente de eluição mostrado no Quadro 1 a seguir) numa adaptação do programa desenvolvido por Verpoorte para alcalóides de *Chinchona sp* [29]

tempo(min.)	[% A]	[% B]
0	100	0
15	100	0
25	90	10
40	60	40
55	10	90
60	0	100

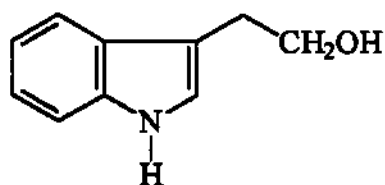
Quadro 1. Gradiente de eluição em CLAE:

1.6. Compostos Padrões

Os padrões dos alcalóides indólicos foram obtidos das respectivas espécies usando os métodos tradicionais de extração e separação por técnicas cromatográficas e foram identificados por comparação com suas constantes físicas (P.F., $[\alpha]_D^{25}$) e dados espectroscópicos (IV, EM, UV, RMN ^1H e ^{13}C) utilizando sempre que possível a literatura [30, 31, 32]. A pureza dos compostos foi determinada por CLAE e CG usando como detectores a Espectrometria de Massas (EM) e o Detector de Ionização de Chama (FID).

O método utilizado [33] para quantificação dos alcalóides por GC foi o de padronização interna, que foi desenvolvido para compensar os erros pela variação da quantidade de amostra injetada, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância padrão à amostra analisada, e relacionar as áreas obtidas. A substância usada como padrão interno ideal deve ter estrutura e funções similar às substâncias problema, de concentração e tempo de retenção próximos, ser inerte, não fazer parte da amostra e não

coeluir com os componentes presentes na amostra. O triptofol (3-indol-etanol) (7) foi o padrão interno escolhido, obtido com 99% de pureza da Carlo Erba e adicionado antes do tratamento das amostras numa concentração de 2,5 mg/ml.



(7)

Estudos de recuperação foram realizados, para o triptofol (7), yohimbina (8) e aspidospermina (9). As recuperações observadas foram de 99, 95 e 95% respectivamente.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Obtenção do Padrões

Ao iniciar a discussão deste trabalho, se faz necessário mencionar os esclarecimentos, por se tratar do resultado de um desenvolvimento de dados previamente por mim apresentados na tese de mestrado [33] já defendida no IQ/UNICAMP.

A tese de mestrado se constituiu na análise qualitativa por CG/EM da fração de alcalóides indólicos de quatro espécies do gênero *Aspidosperma*, a saber, *A. pyricollum*, *A. olivaceum*, *A. pyriforme* e *A. polyneuron*. Estas análises geraram um grande volume de dados necessitando de um domínio amplo a respeito dos espectros de dezenas de classes de alcalóides indólicos já isolados, presentes na literatura para a interpretação dos resultados proveniente da técnica de CG/EM. Para que este trabalho fosse validado foi necessário o isolamento de compostos puros dos extratos das espécies em estudo, para serem utilizados como padrões. A seguir estão listados os alcalóides isolados no trabalho de Mestrado [34].

Espécie Estudada: *A. pyricollum*

Alcalóides Isolados: uleína (11), 17-metil-uleína*, yohimbina (8), β -yohimbina (10), *N*-desmetil-uleína (12), sitsiriquina* e diidrositsiriquina*.

* compostos não numerados não foram utilizados neste trabalho.

Portanto, os resultados discutidos neste trabalho se referem ao desenvolvimento das análises qualitativa e quantitativa onde foram incluídas mais duas espécies a *A. ramiflorum* e a *A. dispernum*.

O estudo fitoquímico da *A. pyricollum* foi terminado e as demais cinco espécies foram submetidas ao mesmo estudo, com o objetivo de se isolar e identificar o maior número possível de alcalóides indólicos para serem utilizados como padrões na análise qualitativa e quantitativa por CG e CG/EM.

Neste item (2.1) serão discutidos os compostos que não haviam sido isolados anteriormente nas espécies bem como compostos modelos.

Todos os espectros e dados físicos das substâncias discutidas a seguir no decorrer de todo este trabalho, se encontram logo após a discussão de cada composto isolado.

2.1.1. Obtenção de padrões em *A. pyricollum*

Os extratos a pH ácido (EA) e básico (EB) de todas espécies estudadas foram obtidos conforme o descrito na parte experimental e ilustrado na Figura 7.

Os extratos foram fracionados utilizando-se combinadamente a cromatografia em coluna com sílica-gel 230-400 mesh e cromatografia em camada delgada (CCD) e CCD preparativa. Os extratos alcaloídicos (1,0 g EA, 0,8 g de EB) foram fracionados em uma coluna de sílica gel 230-400 mesh (50 g, 2 cm X 40 cm). A coluna foi eluída (frações de 20 ml) inicialmente com CH₂Cl₂ e a polaridade foi aumentada gradualmente com porções de MeOH, até a eluição com MeOH puro. Este procedimento foi realizado em todas as espécies estudadas.

Na espécie *A. pyricollum* (Tabela 2), uma nova e rápida reinvestigação permitiu-nos isolar o composto aparicina (13), que teve sua estrutura elucidada por métodos físicos e espectroscópicos, que foram coerentes com os dados existentes para este composto na literatura [35,36].

Tabela 2. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. pyricollum*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
(+)- <u>yohimbina</u> (8), 4,7 mg	+++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
(-)- <u>β-yohimbina</u> (10), 6,5 mg	+++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
(+)- <u>uleína</u> (11), 10 mg	++++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
N-desmetil-uleína (12) 2,5 mg	+	UV, IV, EM, RMN ¹ H
(+)- <u>aparicina</u> (13), 3,0 mg	++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

2.1.2. Obtenção de padrões em *A. olivaceum*

O estudo fitoquímico da espécie *A. olivaceum* resultou no isolamento de seis compostos que não haviam sido isolados anteriormente nesta espécie [37], conforme ilustra a Tabela 3.

Tabela 3. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. olivaceum*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
(+)- <u>ulcina</u> (11)	++++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(+)- <u>Aparicina</u> (13)	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(+)-pirifolidina (14)	+++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(-)-aspidofractinina (15)	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(-)-aspidofilina (16)	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(+)-15-desmetóxi-pirifolina (17)	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(+)-pirifolina (18)	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
(+)-aspidospermina (9A)	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

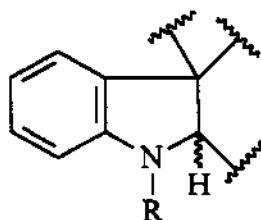
sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

Composto (9A) - (+)-aspidospermina:

Este composto apresentou ponto de fusão (P.F.) na faixa de 189-190 °C, e o valor da rotação ótica, realizada em etanol a 25 °C, foi de $[\alpha]_D^{25} = +92^\circ$.

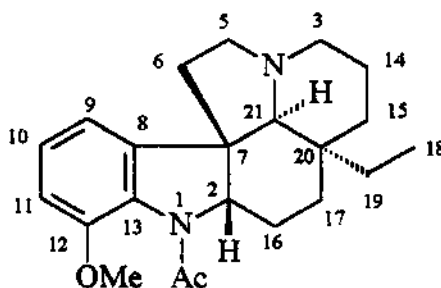
Analisando o espectro na região do Infravermelho (IV) podemos observar uma banda a 1640 cm^{-1} característica de uma carbonila de amida [38].

O espectro no UV com máximos a 290 nm (3,46), 256 nm (4,06) e 220 nm (4,61) sugerem para este composto um cromóforo indolina [39].



Indolina

O espectro de massas exibiu um ion molecular a m/z 354, correspondendo a uma fórmula molecular $C_{22}H_{30}N_2O_2$, e picos a m/z 325 [$M^+ - 28$], 124 (pico base, a na Fig. 10 pag. 56), produzidos via uma retro Diels-Alder, todos característicos de um alcalóide com esqueleto aspidoesperma, lembrando muito o do composto conhecido como (+)-aspidoespermina relatado por Craveiro e colaboradores em *A. pyrifolium* [40].



(+)-aspidoespermina

Os sinais observados nos espectros de RMN de 1H , ^{13}C do composto 9A, Quadro 2 na pag. 34, foram feitas usando os experimentos de DEPT, HETCOR e COSY [41] com

objetivo de confirmar a estrutura sugerida. Os sinais de ressonância dos hidrogênios foram atribuídos utilizando-se dados da literatura [38, 42]. O espectro de RMN de ^1H mostrou claramente um tripleto a campo alto a 0,62 δ (CH_2CH_3), os singletos a 2,20 δ (NCOCH_3) e 3,88 δ (OCH_3) e os sinais aromáticos a $\sim 7,0$ δ .

A análise cuidadosa em RMN ^1H de alta resolução permitiu assinalar os hidrogênios aromáticos do H-10 (dd a 7,07 δ , $J = 8,0$ Hz), H-9 (dd a 6,83 δ , $J = 8,0$ Hz) e H-11 (dd a 6,81 δ , $J = 8,0$ Hz) com base nos acoplamentos esperados e nos efeitos eletrônicos causados pelo substituinte metóxi no C-12. O espectro de COSY confirma os acoplamentos entre H-10 e os prótons vizinhos, e o HETCOR identifica o próton associado ao carbono correspondente.

Os sinais dos carbonos aromáticos foram assinalados e confirmados utilizando-se os dados da literatura [42]. É importante salientar as atribuições dos carbonos alifáticos e nestes foram utilizados espectros 2D, a saber relacionando sinais de hidrogênios e carbonos. O singlete largo a 4,60 δ está relacionado com o sinal de carbono a 69,5 δ , o qual foi atribuído como H-2. Os hidrogênios metóxi, atribuídos a 3,88 δ , estão associados ao sinal de carbono a δ 55,3 (DEPT).

Todos os carbonos metilênicos foram atribuídos utilizando o experimento em DEPT e os prótons a eles ligados foram obtidos do espectro de HETCOR. Os sinais de prótons a campo mais baixo ($\sim 3,0$ δ) foram assinalados como H-5 α e H-3 α devido a proximidade ao par de elétrons não compartilhados do N-4. As atribuições individuais foram feitas via espectro de alta resolução a 300 MHz e mostrou os modelos de acoplamento de um triplo dubleto a 3,12 δ (H-5 α , geminal de $J = 11$ Hz e axial de $J = 8,0$ Hz) e um dubleto largo a 3,10 δ , que foi atribuído ao H-3 α ($J = 11$ Hz). Esta última atribuição foi confirmada pelo COSY onde claramente o sinal a 1,74 δ é o único que apresenta um modelo de acoplamento na forma de um dubleto devido ao acoplamento geminal de H-14 α com H-14 β , este dubleto por sua vez se desdobra em dois tripletos devido aos acoplamentos entre H-14 α , H-15 α e H-15 β e H-3 α , H-3 β . Este sinal deve-se ao H-14 α pois o C-14 é o único átomo de carbono adjacente a dois grupos metilênicos.

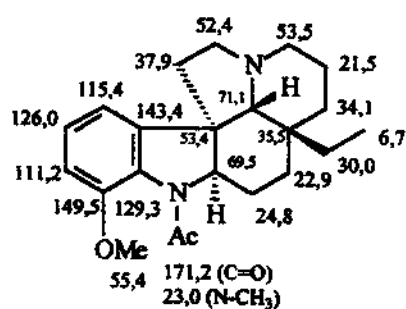
Os prótons remanescentes H-5 β , H-6 β , H-6 α , H-3 β e H-14 β , H-15 α e H-15 β ,

foram identificados pelo espectro de COSY, usando o H-3 α e H-5 α como ponto de partida (quadro 2, pag. 34). O espectro de HETCOR permitiu também a atribuição ao C-21 a 71,1 δ e o C-20 a 35,4 δ .

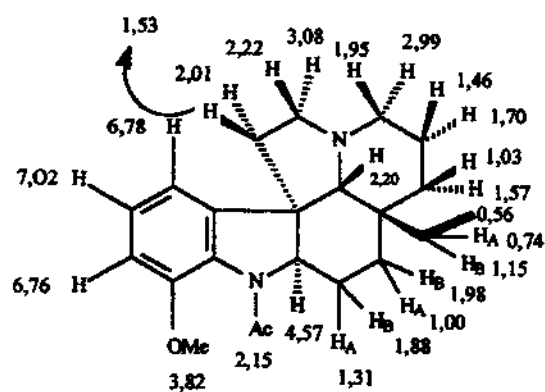
Os carbonos que mostram sinal a 24,6 e 22,7 δ respectivamente, foram assinalados aos C-17 e C-16. O C-2 mostrou um sinal a 69,5 δ , e por último confirmou-se o deslocamento químico do carbono da carbonila amídica a 171,2 δ .

A atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do composto 9A foram discutidos pois este servirão de modelo para muitos dos outros compostos isolados neste trabalho.

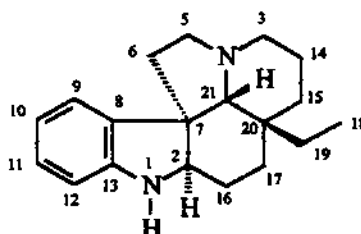
O conjunto de todos estes dados permitiram atribuir a estrutura do composto 9A como sendo a da (+)-aspidospermina.



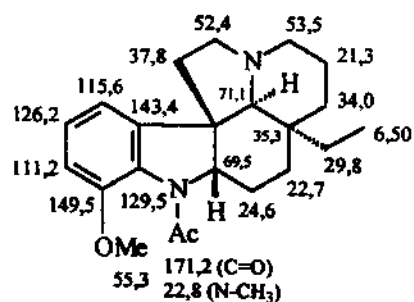
dados de ^{13}C NMR em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42].



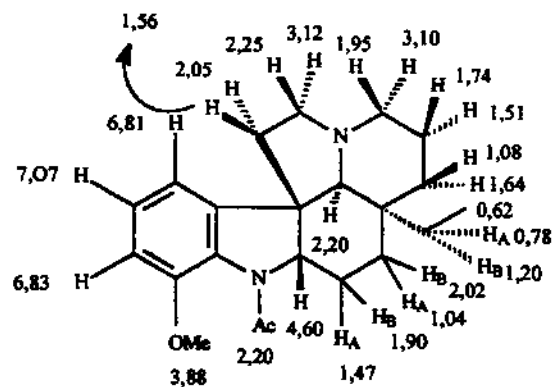
dados de ^1H NMR em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42]



(33)



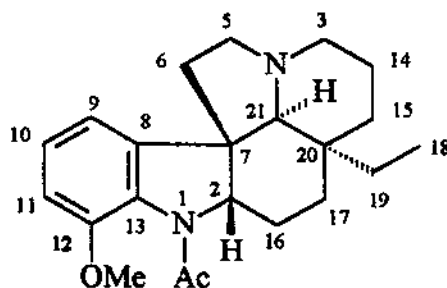
dados de ^{13}C NMR em CDCl_3
do composto (9A) atribuído
como (+)-aspidospermina



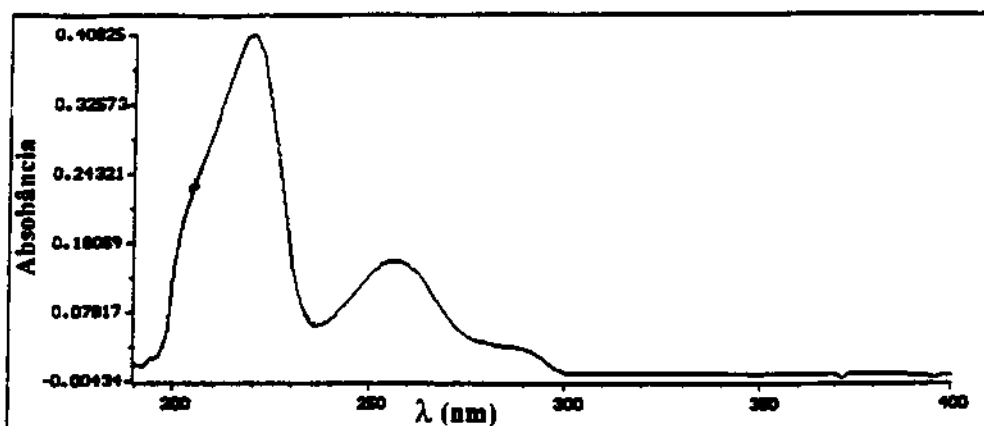
dados de ^1H NMR em CDCl_3
do composto (9A) atribuído
como (+)-aspidospermina

Quadro 2. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (9A) e do composto modelo (-)-aspidospermina (9B).

(+)-*aspidospermina* (9A): Cristais, P.F. = 189-190 °C (CH₂Cl₂); P. F. lit. = 208-209 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = +92,0$ (c = 1,0); $[\alpha]_D^{25}$ lit. = +90,0 (CHCl₃, c = 1,0), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1634 (N-C=OMe). UV λ_{max} nm: 290 (log_e = 3,46), 256 (log_e = 4,06), 220 (log_e = 4,61). RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,6 (1H, s, H-2 α), 3,10 (1H, d, J = 11,0, H-3 α), 1,95 (1H, m, H-3 β), 3,12 (1H, dt, J = 8,0 Hz, H-5 α), 2,25 (1H, m, H-5 β), 2,05 (1H, m, H-6 α), 1,56 (1H, m, H-6 β), 6,83 (2H, t, J = 8,0 Hz, H-9), 6,81 (2H, t, J = 8,0 Hz, H-11), 7,07 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-10), 3,88 (3H, s, 12-OMe), 1,74 (1H, J = 12,8 Hz, J = 3,6 Hz, H-14 α), 1,51 (1H, m, H-14 β), 1,64 (1H, m, H-15 α), 1,08 (1H, m, H-15 β), 1,47 (1H, m, H-16A), 1,90 (1H, m, H-16B), 1,04 (1H, m, H-17A), 1,90 (1H, m, H-17B), 0,62 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-18), 0,78 (1H, q, J = 6,9 Hz, H-19A), 1,20 (1H, m, H-19B), 2,20 (1H, s, H-21 α), 2,20 (3H, s, NC=OMe). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 69,5 (C-2), 53,5 (C-3), 52,4 (C-5), 37,8 (C-6), 143,4 (C-8), 115,6 (C-9), 126,2 (C-10), 111,2 (C-11), 149,5 (C-12), 129,5 (C-13), 21,3 (C-14), 34,0 (C-15), 24,6 (C-16), 22,7 (C-17), 6,50 (C-18), 29,8 (C-19), 35,3 (C-20), 71,1 (C-21), 22,8 (NCOMe), 171,2 (N-C=O), 55,3 (OMe). EMIE m/z (A. R. %): 354 (30), 326 (20), 124 (100).



(+)-*aspidospermina* (9A)



Marked Wavelengths

Reg A: L 290 = 0.03458

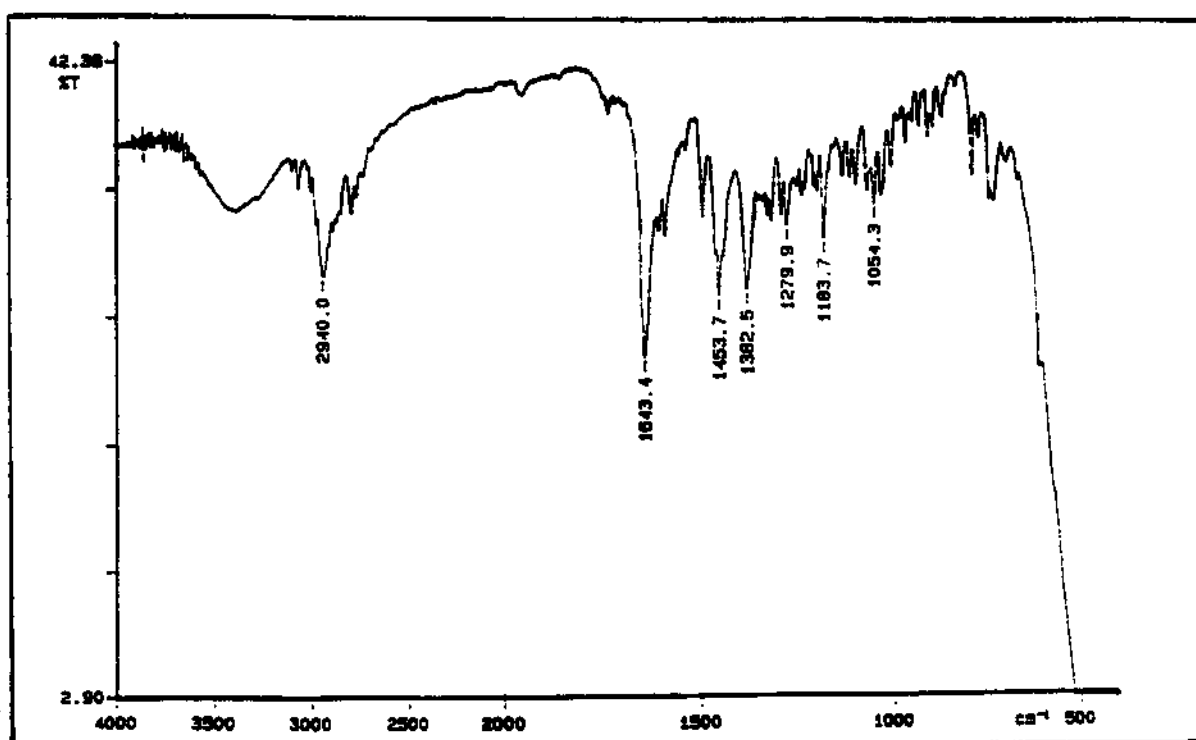
Reg A: L 256 = 0.13902

Reg A: L 236 = 0.06207

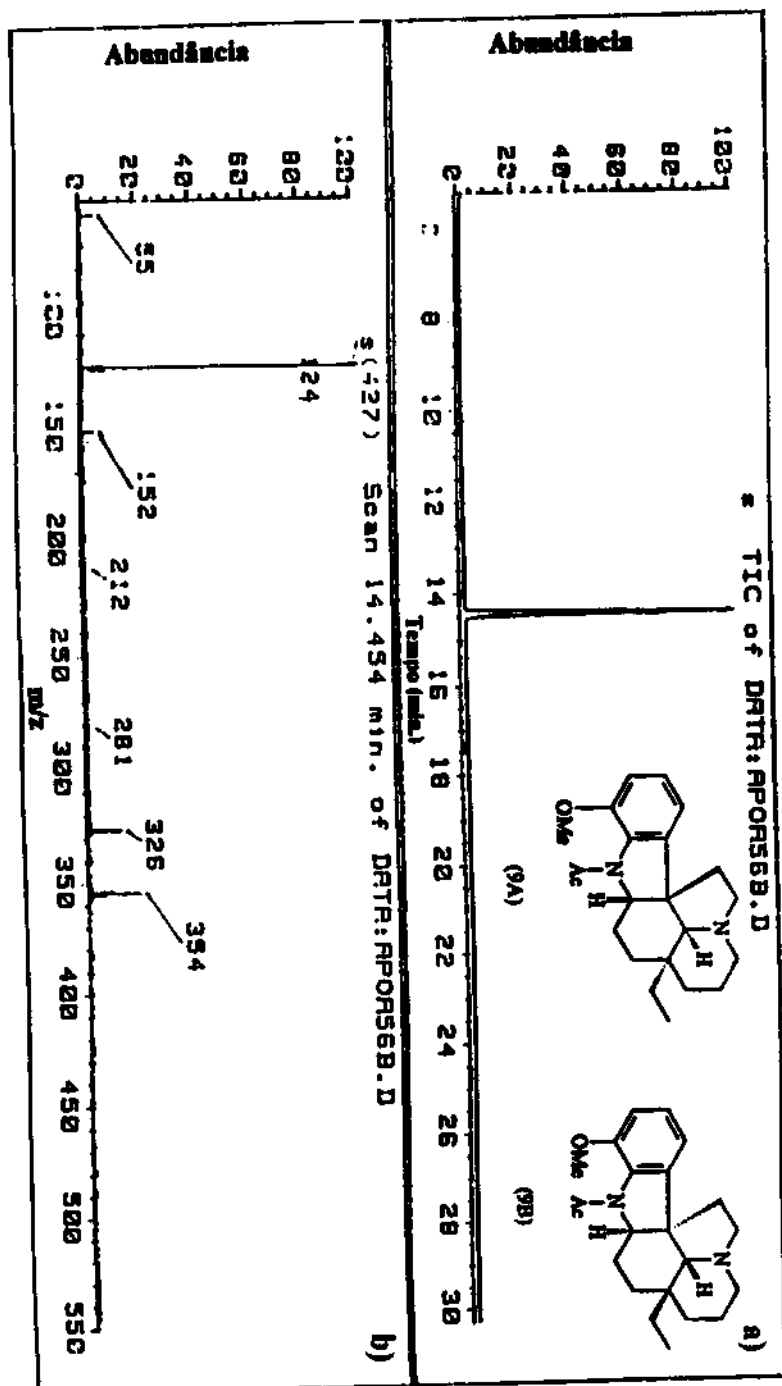
Reg A: L 220 = 0.40825

Reg A: L 204 = 0.21680

Espectro no UV-VIS da (+)-aspidospermina (9A).

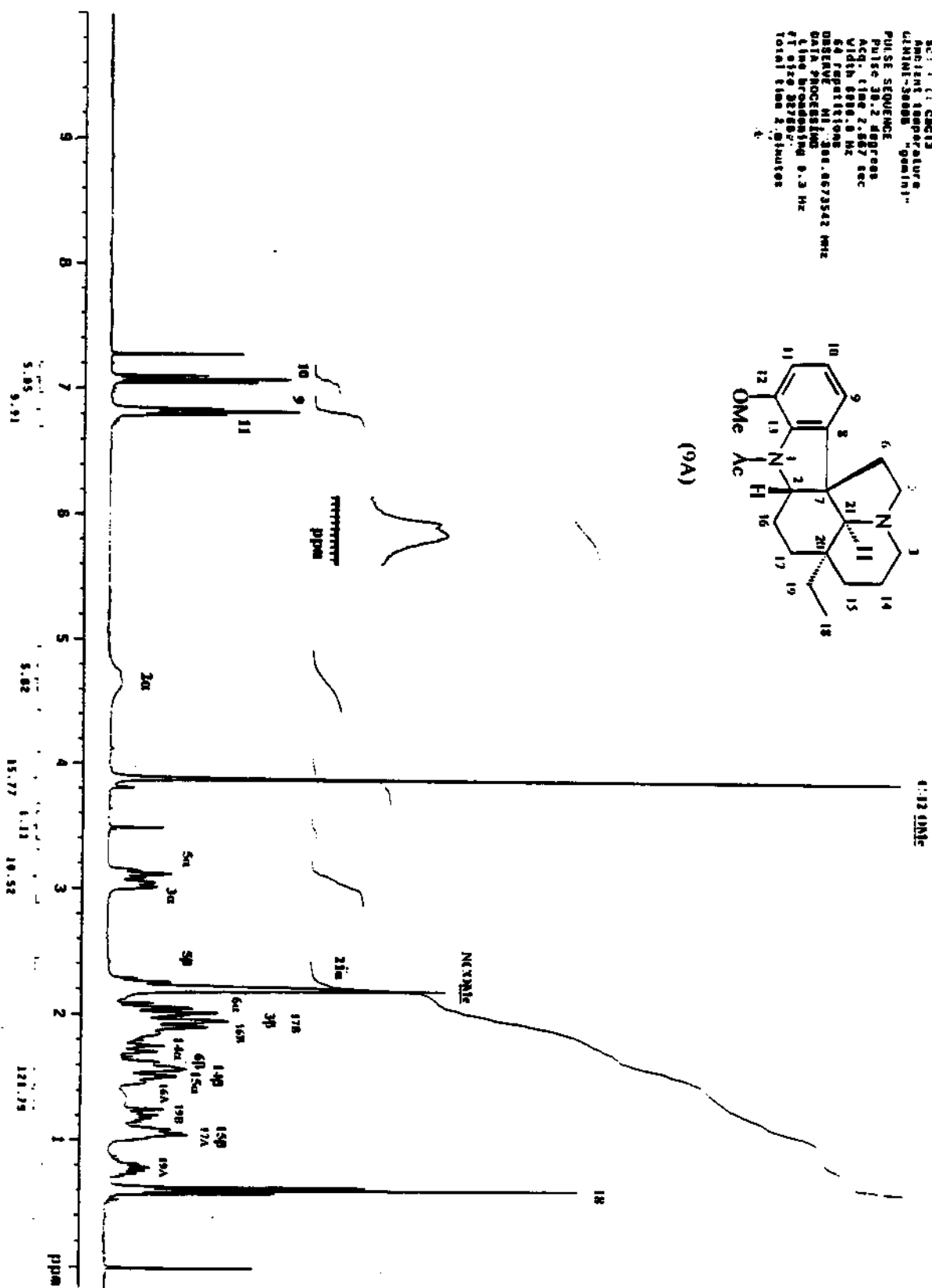
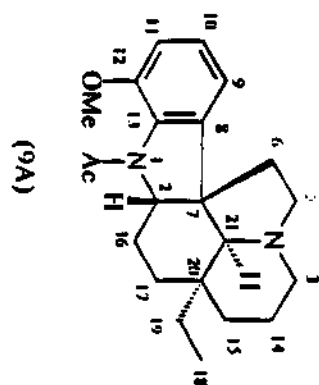


Espectro no Infravermelho da (+)-aspidospermina (9A).

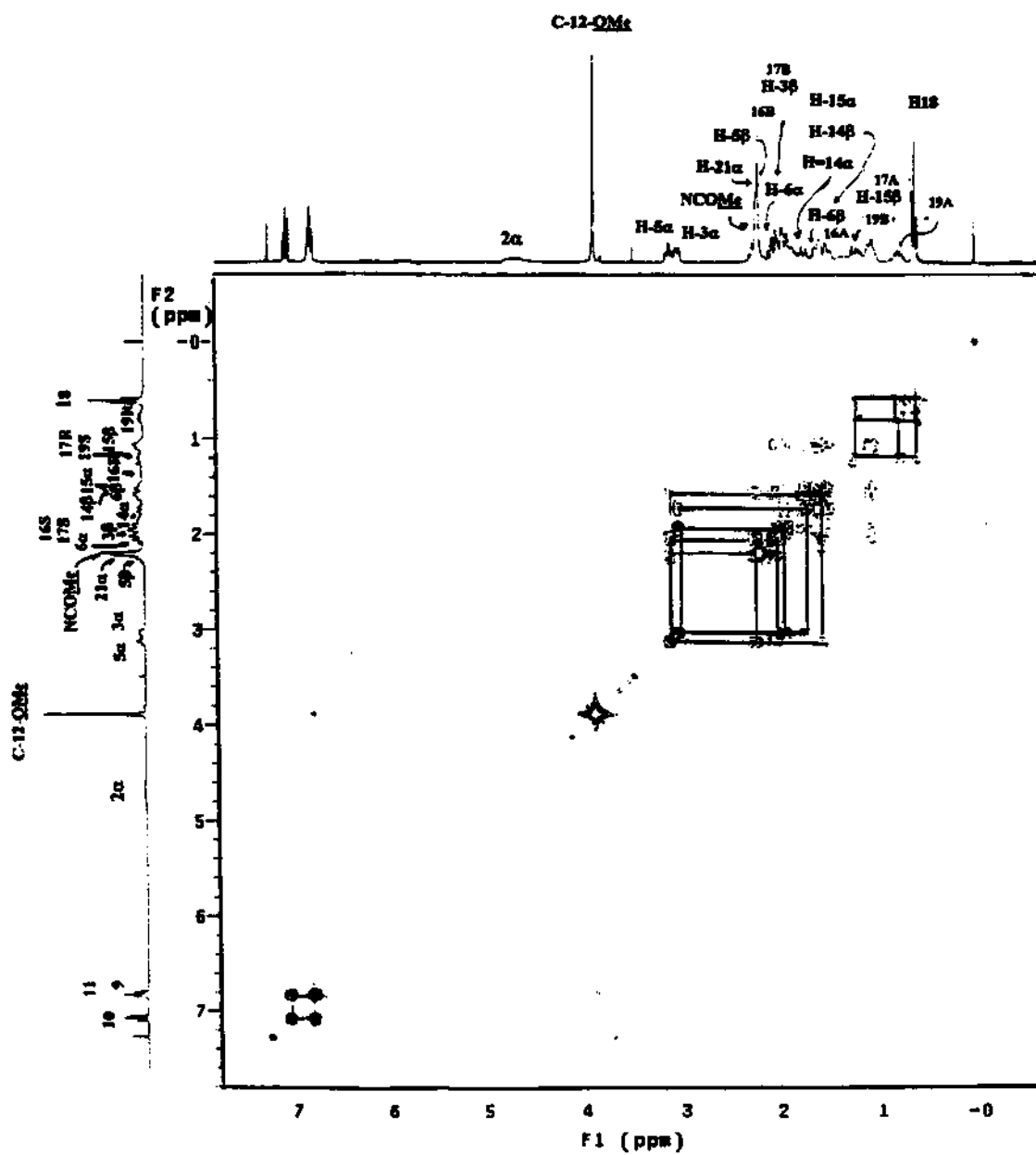


- a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (+)-aspidospermina (9A).
- b) Espectro de massas da (+)-aspidospermina (9A).

A1: \JB-SB" cdc13 ab720a.jbr2
 Sc: 1: C, C6C13
 Ambient temperature
 C4H10N13O000 "gualini"
 PULSE SEQUENCE
 Pulse 30.2 degrees
 Acq. time 2.667 sec
 Width 6000.0 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE: M1: 300.6673542 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.3 Hz
 F1 size 32768
 Total time 2.0 minutes
 4

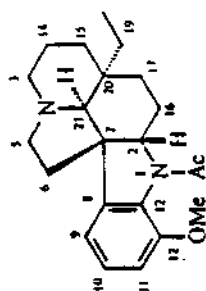


Espectro de RMN ^1H da (+)-aspidospermina (9A).

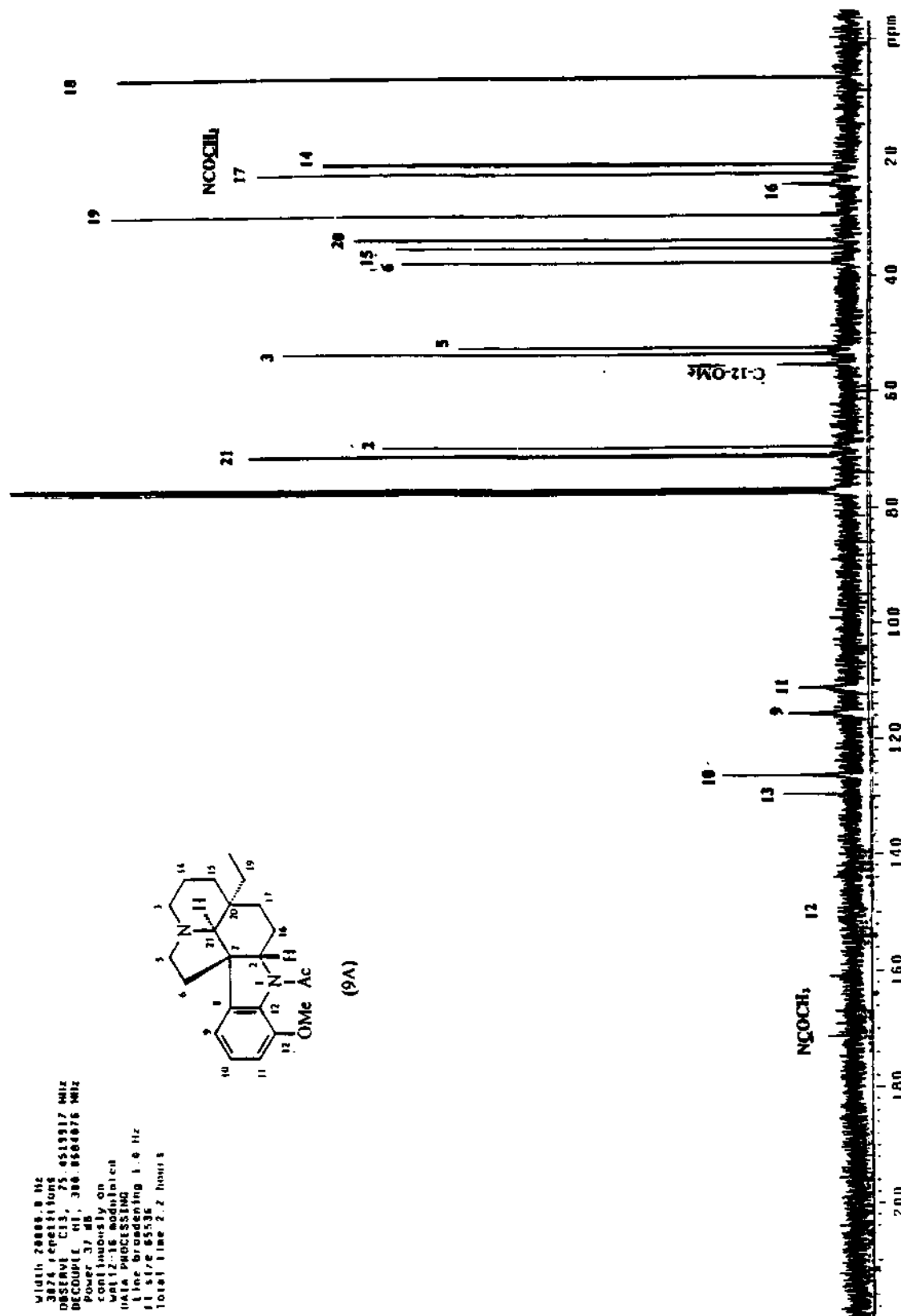


Espectro de correlação H-H (COSY) da (+)-aspidospermina (9A).

Width 20000.0 Hz
 3274 repetitions
 OBSERVE C13, 75.451917 MHz
 DECOUPLE 1, 41.380.8564976 MHz
 Power 3.00 dB
 Cont. delay on
 Cont. delay on
 DATA PROCESSING
 line broadening 1.0 Hz
 fl size 65536
 Total time 2.2 hours

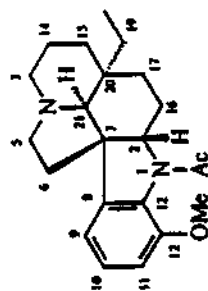


(9A)

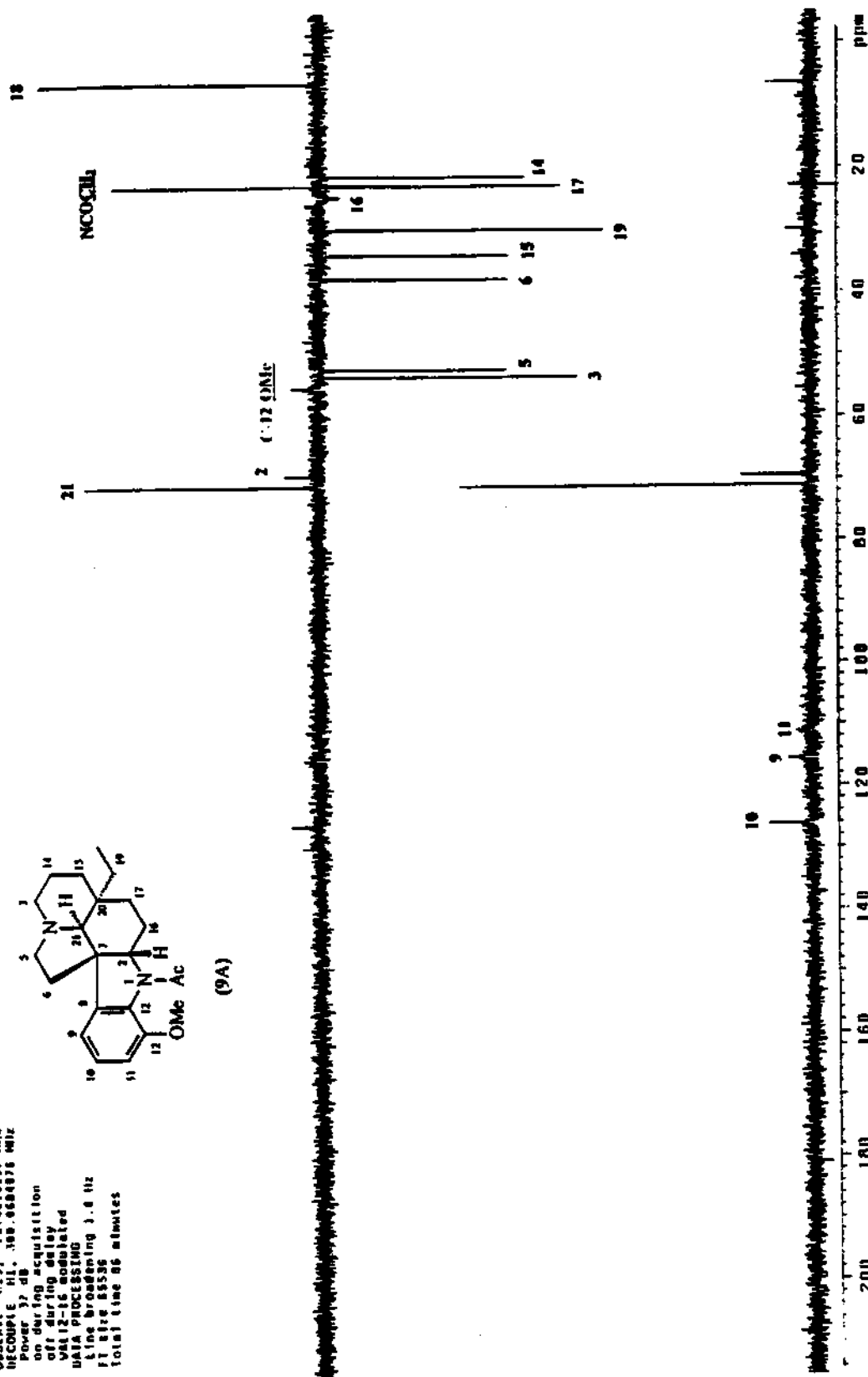


Espectro de RMN ^{13}C da (+)-aspidospermina (9A).

vfidn 47558.2 Hz
 1600 repetitions
 observe f13. 75.4519817 MHz
 recouple f1. 100.6268716 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 on 1215.000000
 data processing
 file name 1.4 Hz
 f1 81.6 85530
 Total time 85 minutes



(9A)



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (+)-aspidospermina (9A).

Composto (14) - (+)-pirifolidina:

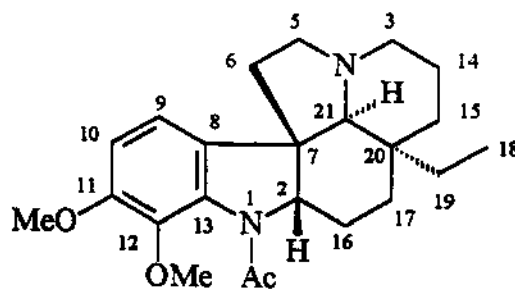
Este composto apresentou ponto de fusão (P.F.) na faixa de 130-135 °C, e valor da rotação ótica, realizada em clorofórmio a 25 °C, foi de $[\alpha]_D^{25} = + 57,8^\circ$.

O espectro no IV mostrou bandas de absorção a 1653 cm^{-1} característica de uma carbonila de amida, e 2850 cm^{-1} relacionada a metoxila aromática [38].

O espectro no UV com máximos a 289 nm (3,46), 253 nm (4,06) e 223 nm (4,61) sugerem para este composto um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas de 14 apresentou algumas analogias com o espectro da aspidospermina (9A). Entretanto, o seu espectro de massas mostrou um íon molecular a m/z 384, correspondendo a uma fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$, e o fragmento a $[\text{M}^+ - 28]$ a m/z 356, ambos apresentam 30 unidades de massa a mais do que (9A), quadro3 na pag. 56. Como o pico base aparece a m/z 124 deduz-se que a 30 uma a mais estão ligadas ao anel benzênico do sistema indólico. Estas informações associadas levaram-nos a sugerir para o composto 14 a estrutura da pirifolidina. O dado de rotação ótica sugere ser a forma (+).

As atribuições dos sinais nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do composto 14, Quadro 3 pag. 46, não foram encontradas na literatura porém o modelo 9A foi útil e utilizando os experimentos de DEPT, HETCOR e COSY [41] foi possível confirmar a estrutura sugerida. O espectro de RMN ^1H mostrou claramente o tripleto a campo alto a 0,63 δ (CH_2CH_3), os singletos a 2,15 (NCOCH_3), 3,98 (C-11- OCH_3) e 3,78 δ (C-12- OCH_3). O sinal do carbono da metoxila sobre C-12 mostra que não possui rotação livre por ser diorto substituída, isto sugere que a outra metoxila está no C-11.



(+)-pirifolidina

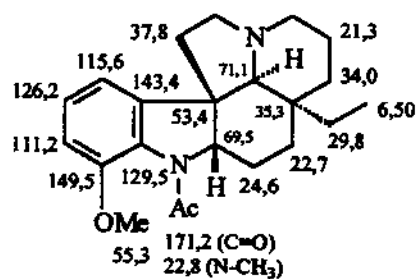
Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram assinalados como H-9 (d a 6,83 δ , J= 8,6 Hz) e H-10 (d a 6,64 δ , J= 8,6 Hz), e consideramos que o composto (14) tenha a estrutura base do composto 9A e a segunda metoxila poderia estar localizada sobre os carbonos C-11 ou C-9 pelos dados de RMN ^1H , sinais com acoplamento diorto, a hipótese sobre o C-9 foi descartada pois tornaria a substituição no anel aromático ligeiramente simétrica no anel indólico, e os prótons deveriam apresentar sinais relativamente equivalentes, e o dado de deslocamento químico da metoxila sobre C-12 (59,6 δ) mostra que esta deve estar fora do plano do anel benzênico ao invés de coplanar.

O espectro de COSY confirma o acoplamento entre H-9 e H-10, e o HETCOR identifica a qual carbono cada sinal está correlacionado. Este espectro mostra que o singlete largo a 4,60 que foi assinalado como H-2 com base na análise de deslocamento químico, como anteriormente descrito para o composto (9A), o carbono que faltava assinalar no anel indolina (C-7) foi atribuído como o sinal de carbono quaternário a 52,6 δ e pela comparação com os dados RMN ^{13}C da (+)-aspidospermina (9A) (C-7 a 53,3 δ). Os hidrogênios das metoxilas, atribuídos aos sinais em 3,78 e 3,98 δ , estão correlacionados aos sinais de carbono a 59,6 δ e 56,0 δ (HETCOR) respectivamente.

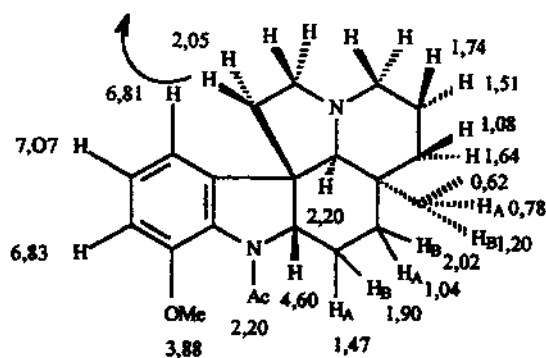
Todos os carbonos metilênicos foram revelados pelo experimento de DEPT e os prótons a eles ligados foram obtidos do espectro de HETCOR. Os sinais de prótons metilênicos a campo mais baixos (~3,10 δ) foram assinalados como H-5 α e H-3 α devido a sua proximidade ao par de elétrons não compartilhados do N-4. Este fato pôde ser confirmado pelos modelos de acoplamento, um triplo dubleto a 3,10 δ do H-5 α e um duplo tripleto do H-3 α a 3,02 δ . Esta última atribuição foi confirmada pelo COSY onde claramente o sinal a 1,73 δ é o único que apresenta um modelo de acoplamento na forma de

um duplo tripleto remontado semelhante ao do composto (9A). Este sinal é devido ao H-14 α pois o C-14 é único carbono adjacente a dois grupos metilênicos. Os prótons remanescentes nestes dois sistemas de spin foram atribuídos pelo espectro de COSY, usando-se o H-3 α e H-5 α como ponto de partida. O espectro de HETCOR permitiu também a atribuição do C-21 a 71,1 δ e C-20 a 35,4 δ . Os carbonos a 24,7 δ e 22,9 δ respectivamente e foram assinalados aos C-17 e C-16 análogos ao 9A, o sinal do C-2 foi atribuído em 69,6 δ .

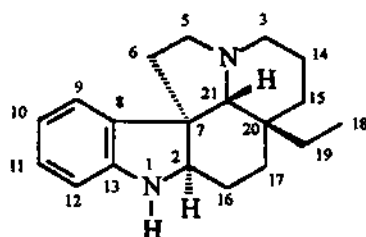
O conjunto de todos estes dados espectrais, associados aos dados físicos e comparados com a atribuição feita anteriormente para o composto (+)-aspidospermina (9A) permitiram atribuir ao composto 14 a estrutura do alcalóide (+)-pirifolidina.



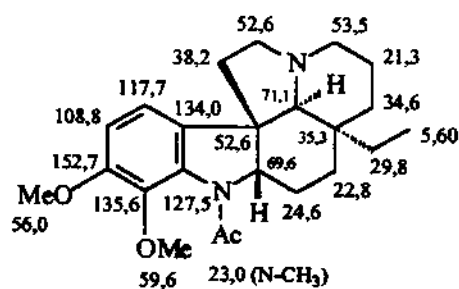
dados de ^{13}C NMR em CDCl_3
do composto (9A) atribuído
como (+)-aspidospermina



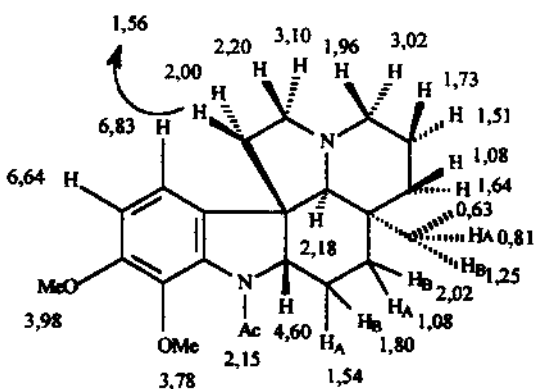
dados de ^1H NMR em CDCl_3
do composto (9A) atribuído
como (+)-aspidospermina



(33)



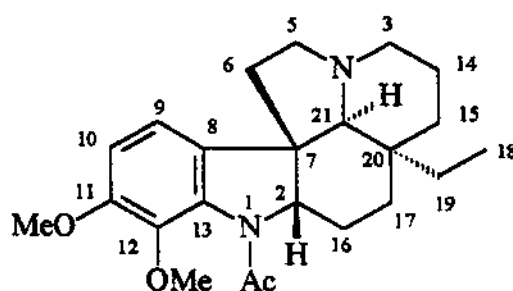
dados de ^{13}C NMR em CDCl_3
do composto (14) atribuído
como (+)-pirifolidina



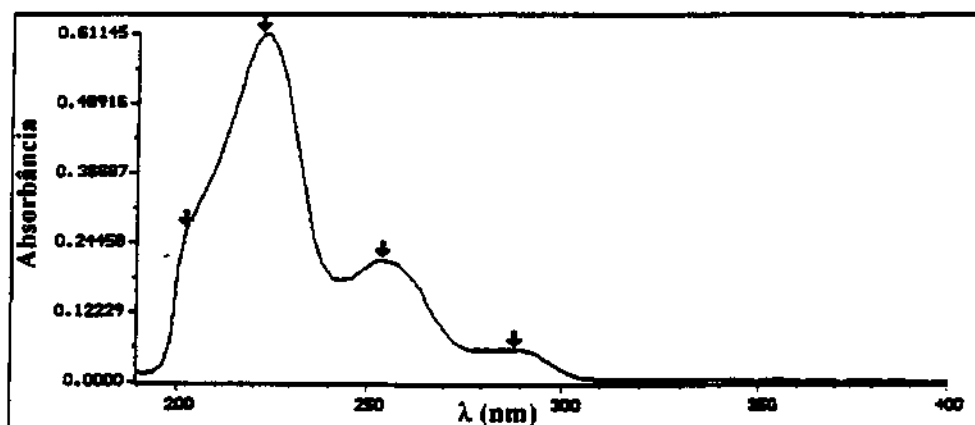
dados de ^1H NMR em CDCl_3
do composto (14) atribuído
como (+)-pirifolidina

Quadro 3. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (14) e do composto modelo (+)-aspidospermina (9A).

(+)-*pirifolidina* (14): Cristais, P.F. = 130-135 °C (CH₂Cl₂); P. F. lit. = 147,5-150 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = + 57,8$ (c = 1,0); $[\alpha]_D^{25}$ lit. = + 90,0 (CHCl₃, c = 1,0), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1653 (N-C=OMe). UV λ_{max} nm: 289 (log ϵ = 3,46), 253 (log ϵ = 4,06), 223 (log ϵ = 4,61). RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,60 (1H, s, H-2 α), 3,02 (1H, d, J = 11,0, H-3 α), 1,96 (1H, m, H-3 β), 3,10 (1H, dt, J = 8,0, H-5 α), 2,20 (1H, m, H-5 β), 2,00 (1H, m, H-6 α), 1,56 (1H, m, H-6 β), 6,83 (1H, d, J = 8,6, H-9), 6,64 (1H, d, H-10), 3,98 (3H, s, 11-OMe), 3,78 (3H, s, 12-OMe), 1,73 (1H, J = 4,0, H-14 α), 1,51 (1H, m, H-14 β), 1,64 (1H, m, H-15 α), 1,08 (1H, m, H-15 β), 1,54 (1H, m, H-16A), 1,80 (1H, m, H-16B), 1,08 (1H, m, H-17A), 2,02 (1H, m, H-17B), 0,63 (3H, t, J = 7,3, H-18), 0,81 (1H, q, J = 6,9, H-19A), 1,25 (1H, m, H-19B), 2,18 (1H, s, H-21 α), 2,15 (3H, s, NC=OMe). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 69,6 (C-2), 53,5 (C-3), 52,6 (C-5), 38,2 (C-6), 52,6 (C-7), 143,4 (C-8), 117,7 (C-9), 108,8 (C-10), 152,7 (C-11), 152,7 (C-12), 21,3 (C-14), 34,6 (C-15), 24,6 (C-16), 22,8 (C-17), 5,60 (C-18), 29,8 (C-19), 35,3 (C-20), 71,1 (C-21), 56,0 (11, 12-OMe). CG/EM m/z (A. R. %): 384 (65), 356 (10), 124 (100).



(+)-*pirifolidina*



Marked Wavelengths

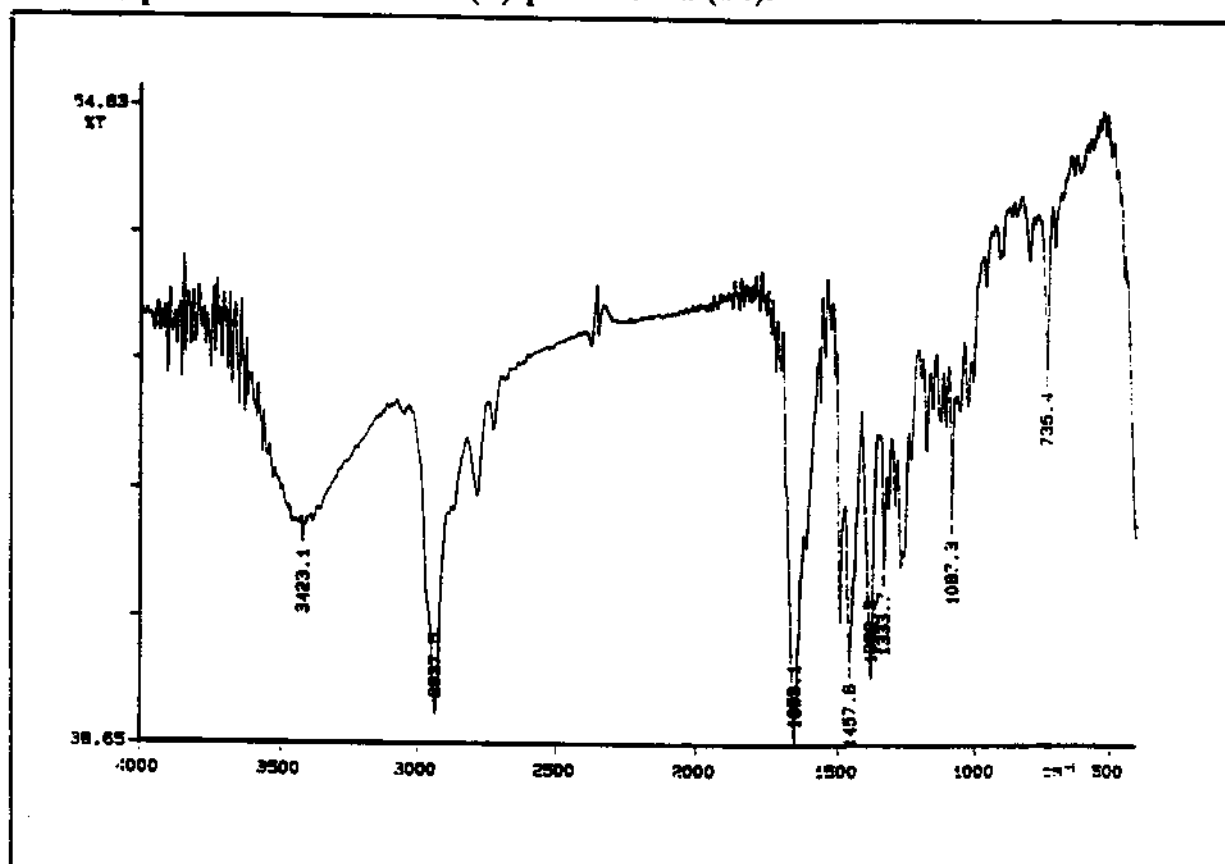
Reg A: L 288 = 0.05708

Reg A: L 254 = 0.21431

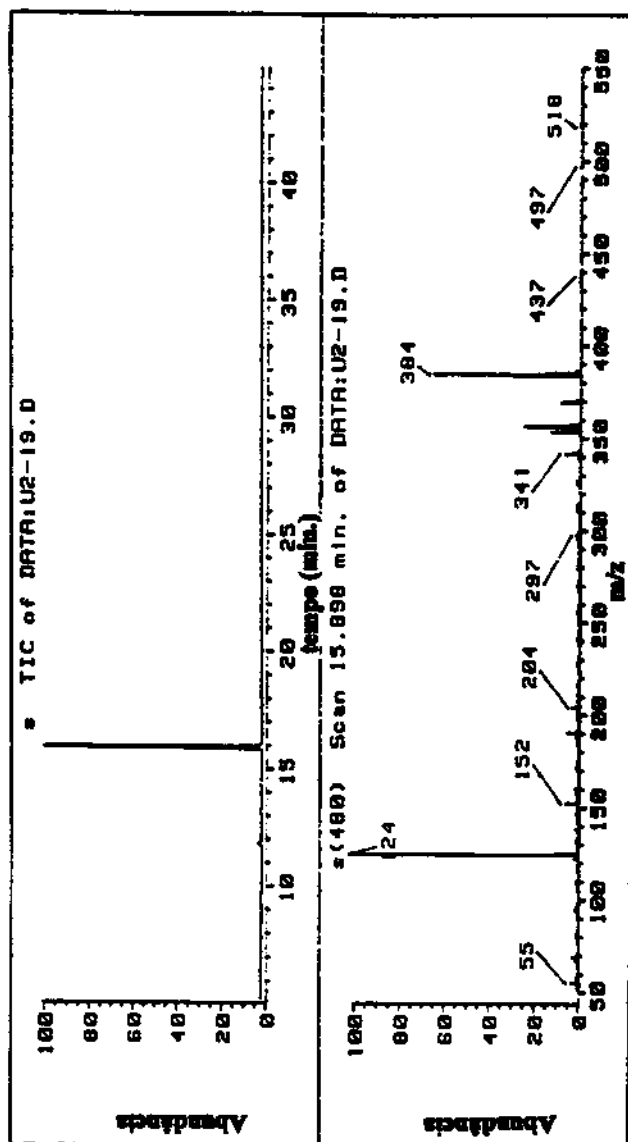
Reg A: L 222 = 0.61145

Reg A: L 202 = 0.26884

Espectro no UV-VIS da (+)-pirifolidina (14).

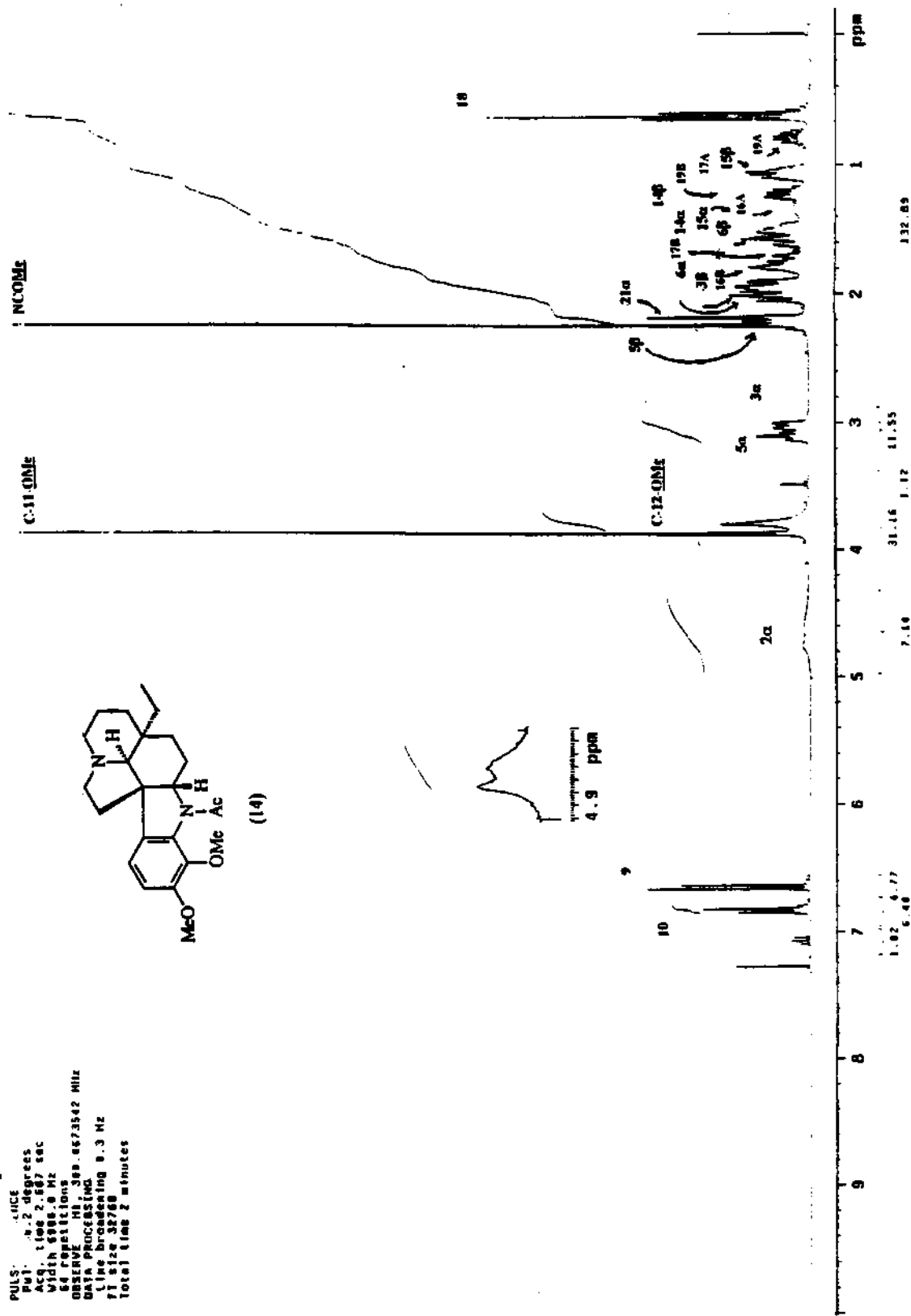
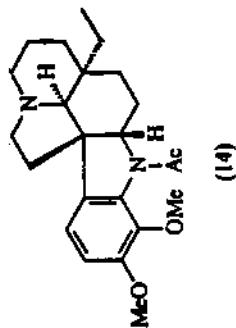


Espectro no Infravermelho da (+)-pirifolidina (14).

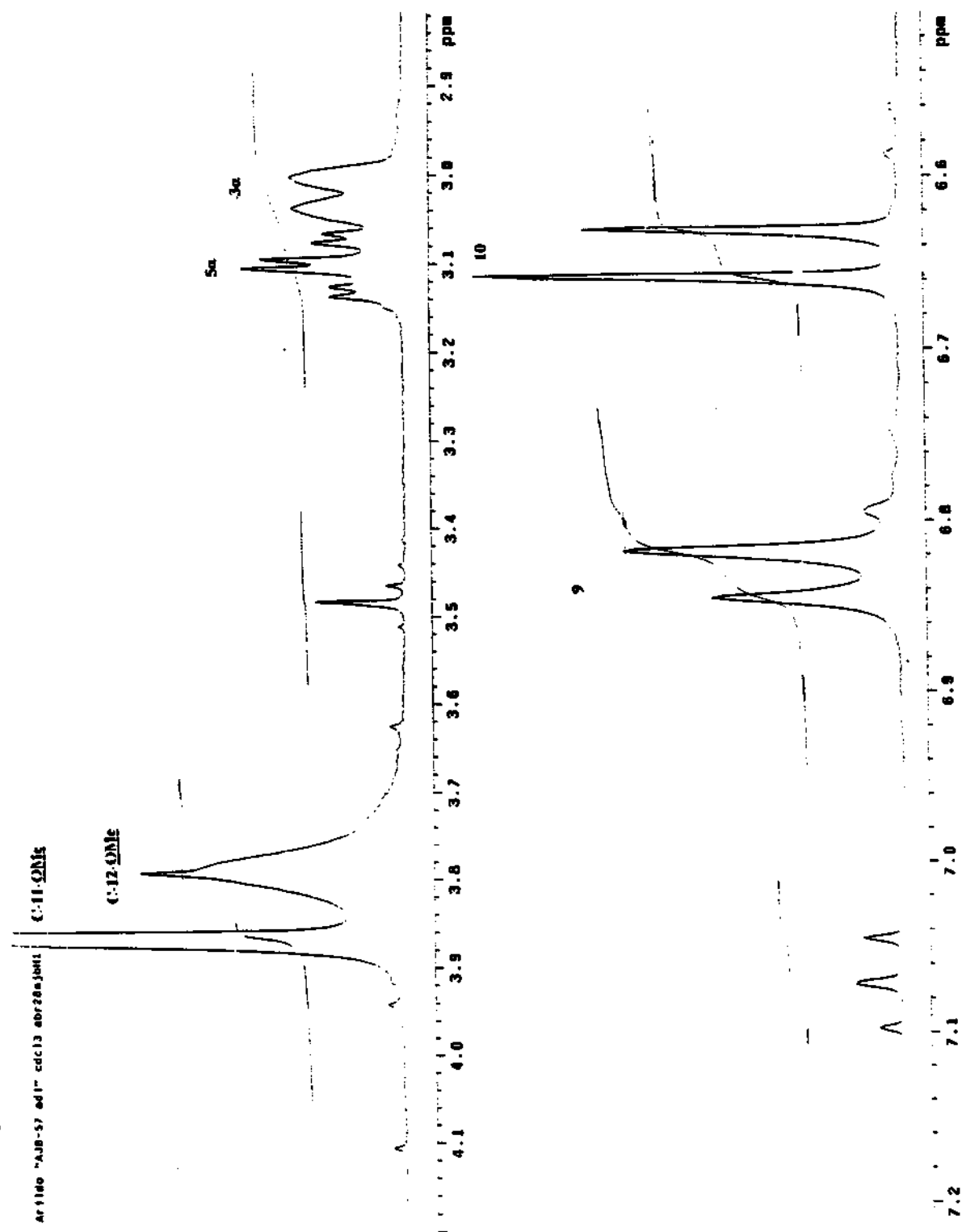


Espectro de CG/EM da (+)-pirifolidina (14).

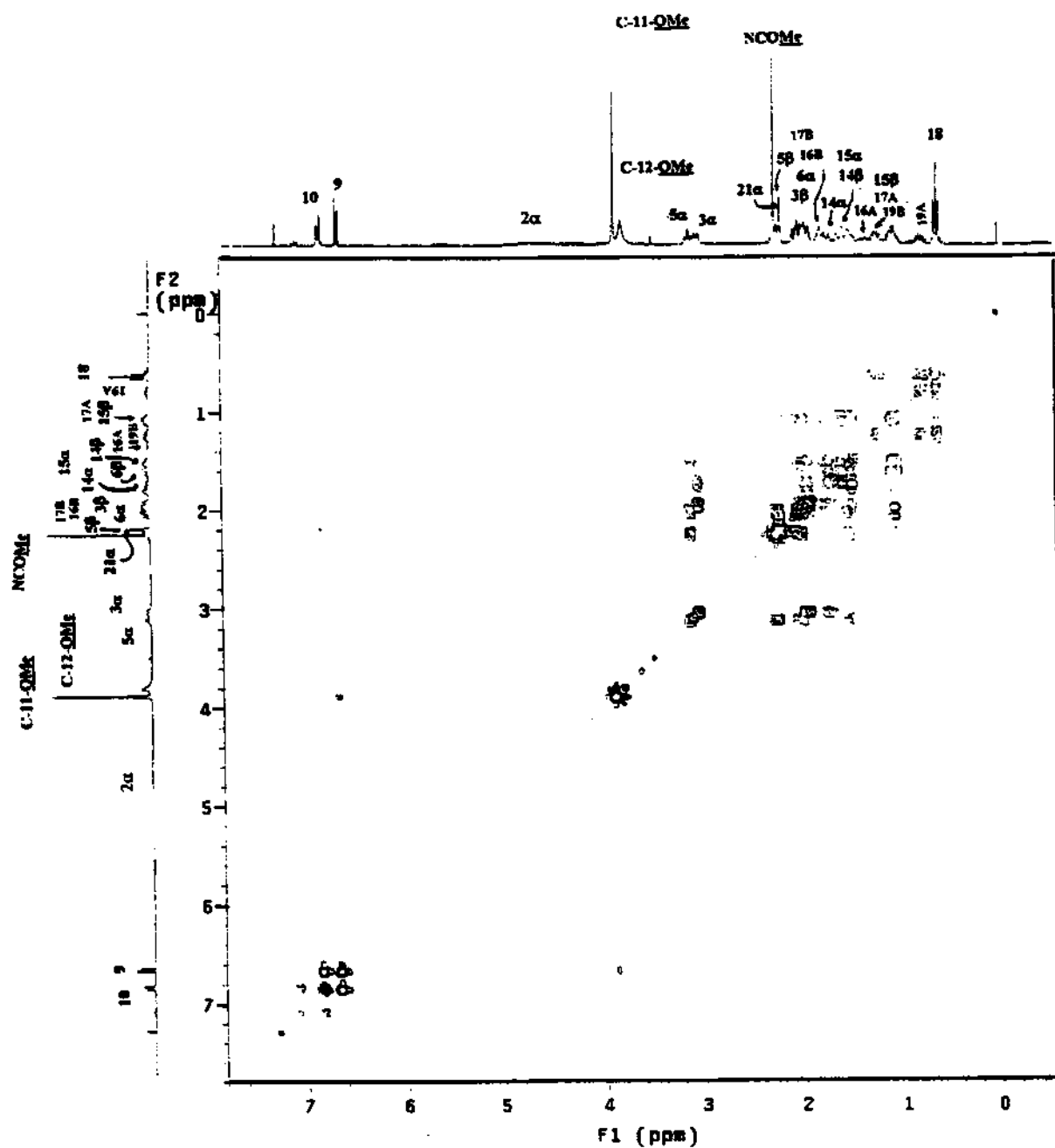
PULS: 1.000000
 PUL: 0.2 degrees
 Acq. time 2.667 sec
 Width 6000.0 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0073542 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.3 Hz
 FI size 32768
 Total time 2 minutes



Espectro de RMN ¹H da (+)-pirifolidina (14).

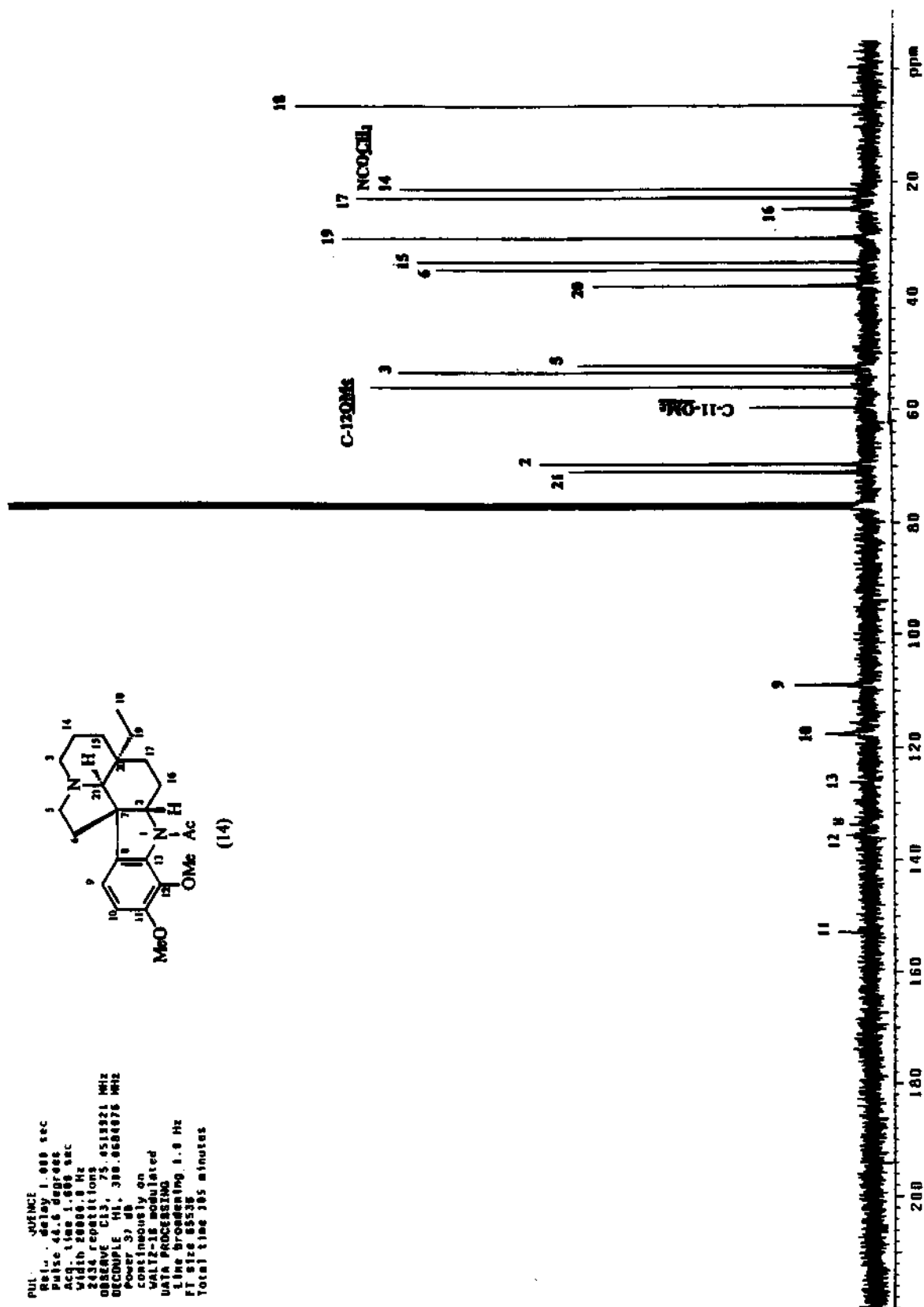
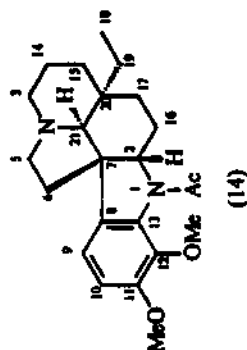


Espectro de RMN ^1H da (+)-pirifolidina (14), ampliado de (a) 2,9-4,1 e (b) 6,6-7,2.



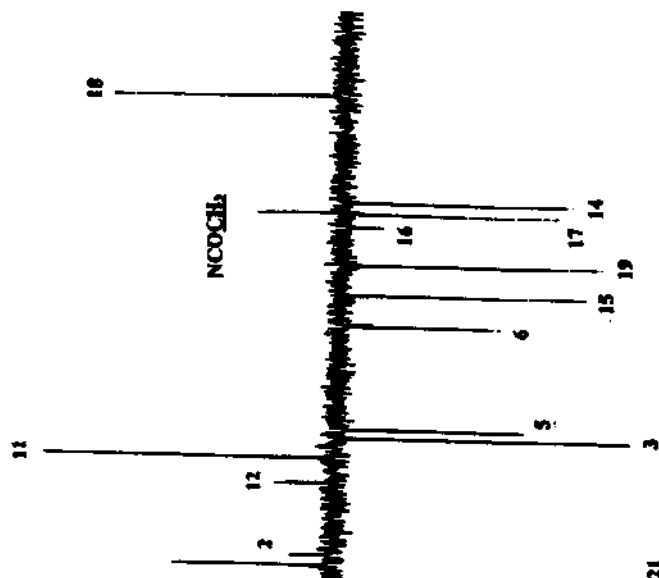
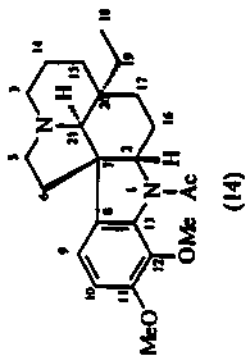
Espectro de correlação H-H (COSY) da (+)-pirifolidina (14).

PUL.SEQUENCE
 Pulse. . . 40.100 sec
 Pulse. . . 44.6 degree
 Acq. time 1.000 sec
 Width 20000.0 Hz
 2434 repetitions
 OBSERVE C13, 75.4513221 MHz
 DECOUPLE H1, 399.0684076 MHz
 Power 57 dB
 continuously on
 VAL12-18 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 185 minutes



Espectro de RMN ¹³C da (+)-pirifolidina (14).

0.1400 "AJS-57" (0.11 g, 2.9 mmol)
 solvent: CDCl_3
 temperature: 25.00
 HMIN-3000 "Gemin"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax delay 1.000 sec
 Pulse 30.0 degrees
 Acq. time 1.500 sec
 Wdth 12430.4 Hz
 NMR repetitions 15
 OBSERVE C13 5 4519316 MHz
 DECOUPLE H1 300.0004076 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 VAL12-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 69 minutes



9

10

Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (+)-pirifolidina (14).

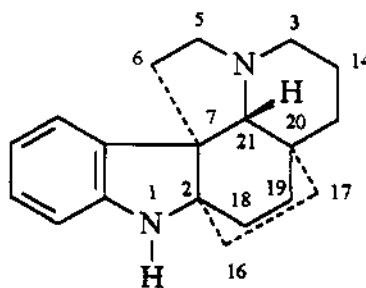
Composto (15) - (-)-aspidofractinina:

Este composto foi obtido como um sólido, P.F. 116-120 °C, e o valor da rotação óptica, realizada em CHCl₃ em 25 °C, foi de $[\alpha]_D^{25} = -27,7^\circ$.

A análise de seu espectro na região do Infravermelho mostrou uma banda a 3346 cm⁻¹ referente a um estiramento NH e uma outra a 1607 cm⁻¹ que é característica de um sistema indolina [38]

O espectro de UV ($\lambda_{\text{máx}}$) a 292 nm (2,90), 242 nm (3,34) e 214 nm (3,78) mostra absorções típicas para um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um íon molecular a m/z 280, correspondendo a uma fórmula molecular C₁₉H₂₆N₂, o fragmento a m/z 252 [M⁺ - 28]. Os fragmentos piperidínicos a m/z 124 e m/z 109 (pico base) são fortes indicativos que este se trata de um alcalóide do tipo aspidosperma hexacíclico. A literatura mostra que se o alcalóide for pentacíclico do tipo 9A o fragmento a 100%, corresponde ao íon m/z 124 e se for hexacíclico o pico base é a m/z 109 (Figuras 8 e 10, nas páginas 56 e 57) [43]. Este conjunto de picos no espectro de massas do composto 15 associados aos dados físicos e espectrais anteriores, sugerem que 15 tenha uma estrutura similar a do alcalóide conhecido como (-)-aspidofractinina.



(-)-aspidofractinina

As atribuições dos espectros de RMN ¹H, ¹³C do composto 15, Quadro 4 na pag. 61, foram feitas usando os experimentos de DEPT, HETCOR e COSY [41] com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida.

O RMN ¹H mostrou a ausência de grupos metila no composto, a análise deste

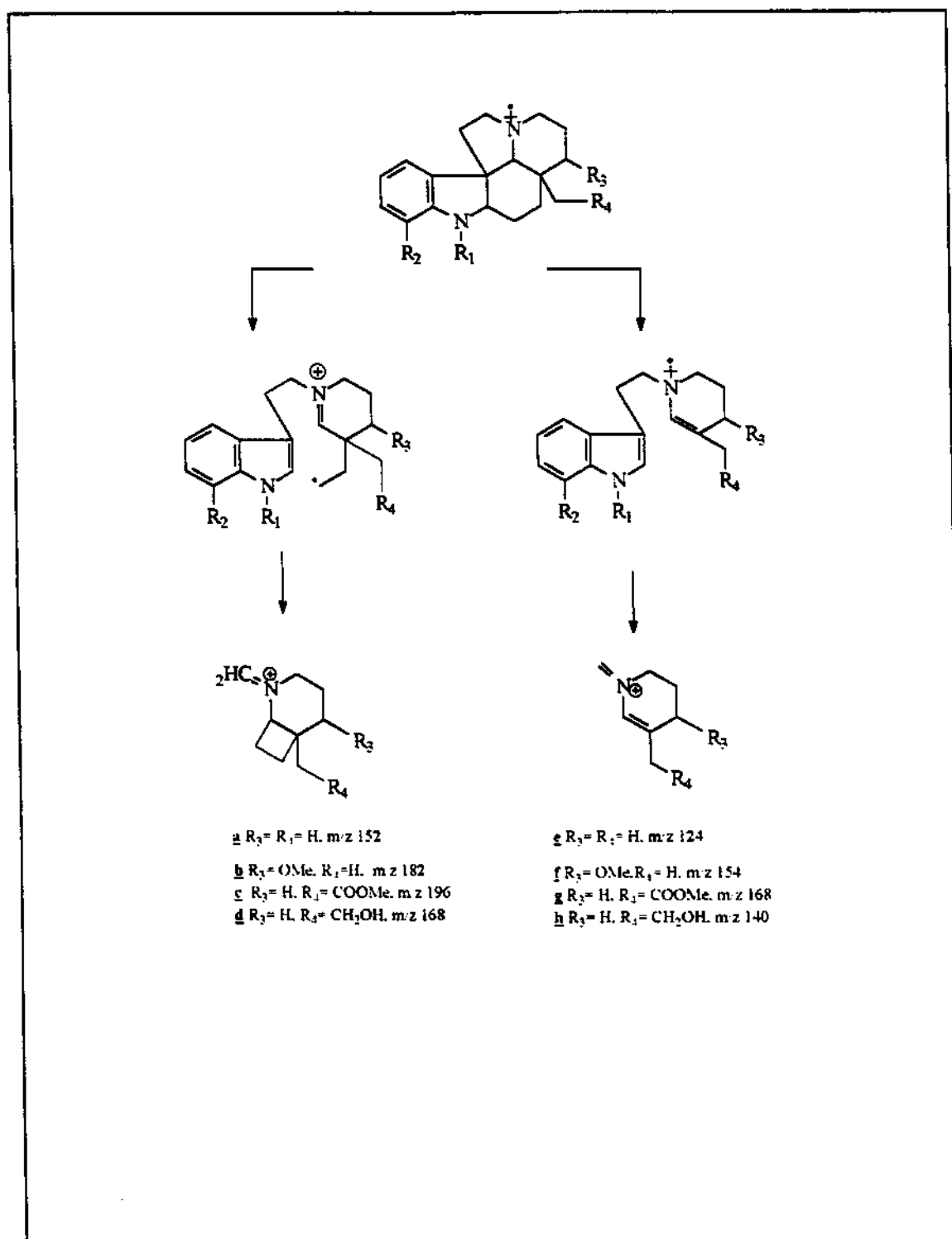


Figura 10. Modo de fragmentação proposto para os alcalóides pentacíclicos derivados da aspidospermina (9A, 9B).

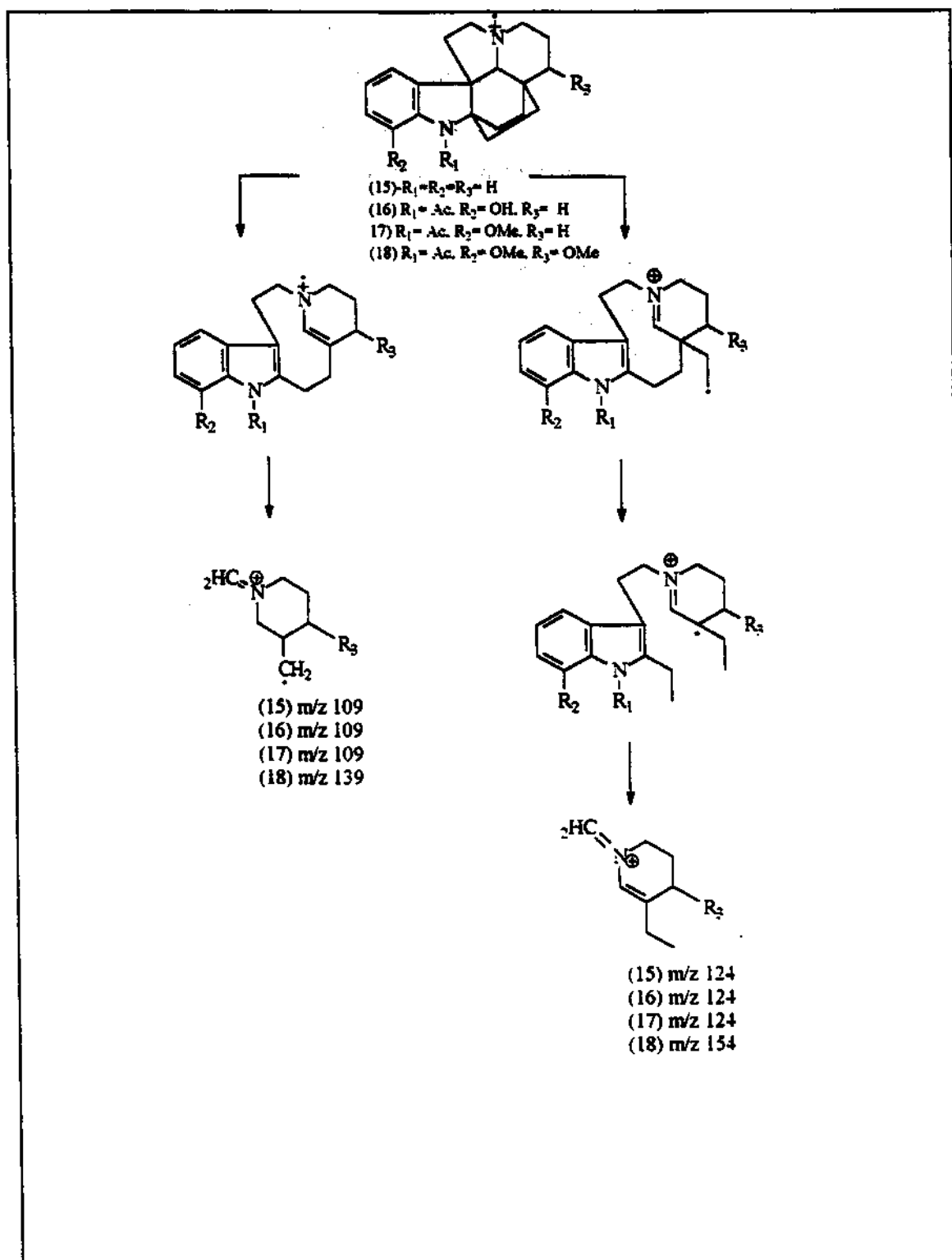


Figura 8. Modo de Fragmentação proposto para os alcalóides hexacíclicos derivados da (-)-apidofractinina (15).

espectro permitiu também atribuir os hidrogênios aromáticos do H-9 (dd a 7,28 δ , $J = 7,8$ Hz), H-10 (dt a 6,78 δ , $J = 7,8$ Hz), H-11 (dt a 7,05 δ , $J = 7,8$ Hz) e H-12 (dd a 6,65 δ , $J = 7,8$), os prótons H-9, H-12 e H-10, H-11 foram atribuídos utilizando-se o modelo (78) além da magnitude das constantes de acoplamento entre os hidrogênios em posição orto. O espectro de HETCOR permitiu identificar a qual carbono está associado o respectivo hidrogênio.

O composto 15 possui anéis C e D em fusão *trans* e os modelos moleculares mostram que os anéis C e F possuem conformação barco. Embora o modelo 33 (fusão *cis* nos anéis C e D) e 106 (com anéis C e F, na conformação barco) e este último com centro assimétrico C-21 invertido, estes modelos auxiliaram muito na atribuição dos carbonos e hidrogênios.

O carbono C-2 foi atribuído como sendo o sinal de um carbono não ligado a hidrogênio a 64,5 δ . Além deste carbono podemos atribuir os outros carbonos não ligados a hidrogênio restantes no esqueleto indolina, o C-7 a 56,9 δ , C-8 a 140,0 δ e o C-13 a 149,9 δ .

A presença dos carbonos metilênicos foram evidenciadas no experimento de DEPT e os hidrogênios a eles ligados foram confirmados pelo espectro obtido em HETCOR. Considerando o composto 33 semelhante ao 15 nos anéis D e E, os sinais dos hidrogênios a campo baixo (3,30-3,08 δ) foram atribuídos como H-5 α e H-3 α , devido a sua grande proximidade do par de elétrons não ligantes do N-4. As atribuições individuais foram feitas via espectro de alta resolução. O que revelou também os modelos de acoplamento de um duplo dubleto a 3,25 δ (H-5 α , $J = 8,4$ Hz) e um duplo dubleto remontado a 3,12 δ (H-3 α , $J = 10,8$ Hz, $J = 2,7$ Hz e $J = 1,8$ Hz). O hidrogênio H-14 α foi atribuído ao sinal a 1,82 δ com base nas informações obtidas do espectro de HETCOR, neste caso não podemos utilizar o modelo de acoplamento para auxiliar na atribuição pois os dois hidrogênios sobrepõem-se a outros sinais no espectro.

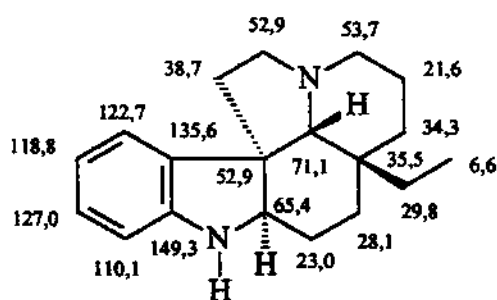
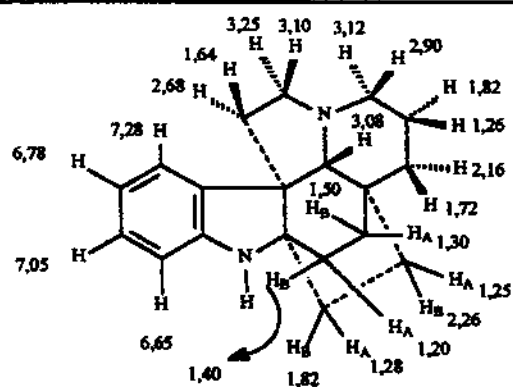
Os hidrogênios remanescentes H-5 β , H-6 α , H-6 β e H-3 β , H-14 β , H-15 α , H-15 β , foram identificados pelos espectros de HETCOR, usando os H-3 α e H-5 α como ponto de partida. O espectro de HETCOR permitiu também a atribuição do H-21 a 3,08 δ , pois o

sinal do carbono (68,9 δ) associado a este hidrogênio é o único carbono metínico não aromático do espectro, e pode portanto ser atribuído com absoluta certeza. Por fim também atribuiu-se o último carbono não ligado a hidrogênio ainda não atribuído, como sendo o C-20 que mostra sinal a 29,6 δ .

O espectro de HETCOR permitiu definir aos dois conjuntos de pares de hidrogênios metilênicos ainda não atribuídos, ao sinal referente ao C-16 a δ 31,4 atribuiu-se os hidrogênios a 1,28 δ e 1,82 δ ao C-17 a δ 29,2 os prótons a δ 2,26 e 1,25 δ . A atribuição dos hidrogênios metilênicos que estão ligados aos C-19 (35,0 δ e os hidrogênios a 1,50 e 1,30 δ) e C-18 (34,7 δ e os hidrogênios a 1,40 e 1,28 δ , também foi feita.

O fechamento do anel F de 15 quando comparado ao 33, provoca alguns efeitos visíveis ou seja, γ gauche entre C-6 com C-18 ($\Delta\delta = -2,5$) e C-14 com C-19 ($\Delta\delta = -4,7$), notou-se o efeito β de desproteção no C-19 ($\Delta\delta = +5,2$) e desproteção no C-18 (efeito α) somados aos da transformação de CH_3 em CH_2 ($\Delta\delta = +28,1$). O que se nota nos modelos moleculares é que ocorre uma grande aproximação dos C-16 e C-17 com C-5 e C-6 que deve apresentar interferência estérica e eletrônica nos deslocamentos dos hidrogênios.

O uso conjunto dos dados físicos e espectrais obtidos, bem como o valor do $[\alpha]_D^{25} = -27,7$ para o composto 15 permitiram atribuir a estrutura deste composto como sendo a da (-)-aspidofractinina (15).



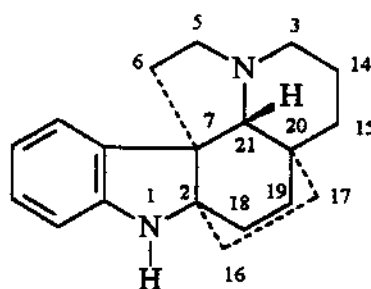
aspidospermidina (33) [42]

61

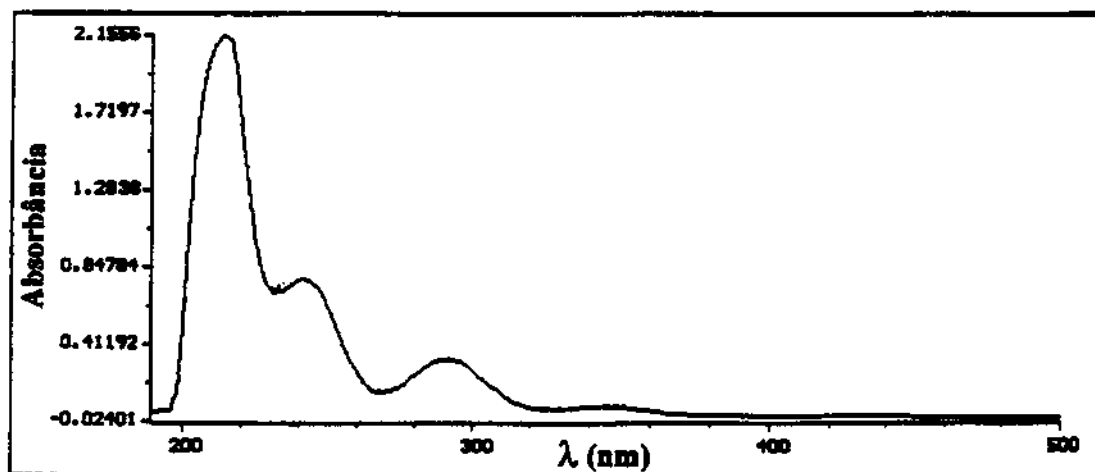
(-)-*aspidofractinina* (15): Cristais, P.F.= 116-120 °C (CH₂Cl₂); P. F. lit.= 101-102 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = -27,7$ (c= 0,0049); $[\alpha]_D^{25}$ lit.= - 20,0 (CHCl₃, c= ,58), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3346 (N-H), 1607 (indolenina). UV λ_{max} nm: 292 (log_e= 2,90), 242 (log_e= 3,34), 214 (log_e= 3,78). RMN ¹H (CDCl₃): δ 3,12 (1H, dq, J= 10,8 Hz, J= 2,7 Hz, J= 1,8 Hz, H-3 α), 2,90 (1H, m, H-3 β), 3,25 (1H, dt, J= 8,4 Hz, H-5 α), 3,10 (1H, m, H-5 β), 2,68 (1H, m, J= 13,5 Hz, H-6 α), 1,64 (1H, m, H-6 β), 7,28 (1H, d, J= 7,8 Hz, H-9), 6,78 (1H, t, J= 7,8 Hz, H-10), 7,05 (dt, J= 7,8 Hz, H-11), 6,65 (dd, J= 7,8 Hz, H-12), 1,82 (1H, m, H-14 α), 1,26 (1H, m, H-14 β), 2,16 (1H, m, H-15 α), 1,72 (1H, m, H-15 β), 1,28 (1H, m, H-16A), 1,82 (1H, m, H-16B), 1,25 (1H, m, H-17A), 2,26 (1H, m, H-17B), 1,20 (1H, m, H-18A), 1,40 (1H, m, J= 8,4 Hz, J= 3,6 Hz, H-18B), 1,30 (1H, m, H-19A), 1,50 (1H, m, J= 5,4, H-19B), 3,08 (1H, s, H-21 β), 2,15. RMN ¹³C (CDCl₃): δ 64,5 (C-2), 47,7 (C-3), 50,6 (C-5), 35,9 (C-6), 56,9 (C-7), 140,0 (C-8), 122,1 (C-9), 119,8 (C-10), 126,7 (C-11), 110,8 (C-12), 149,9 (C-13), 16,9 (C-14), 26,4 (C-15), 31,4 (C-16 *), 29,2 (C-17 *), 34,7 (C-18 #), 35,0 (C-19 #), 29,6 (C-20), 68,9 (C-21). CG/EM (A. R. %): 280 (60), 252 (90), 124 (46), 109 (100).

* - a atribuição pode ser interconvertida

- a atribuição pode ser interconvertida



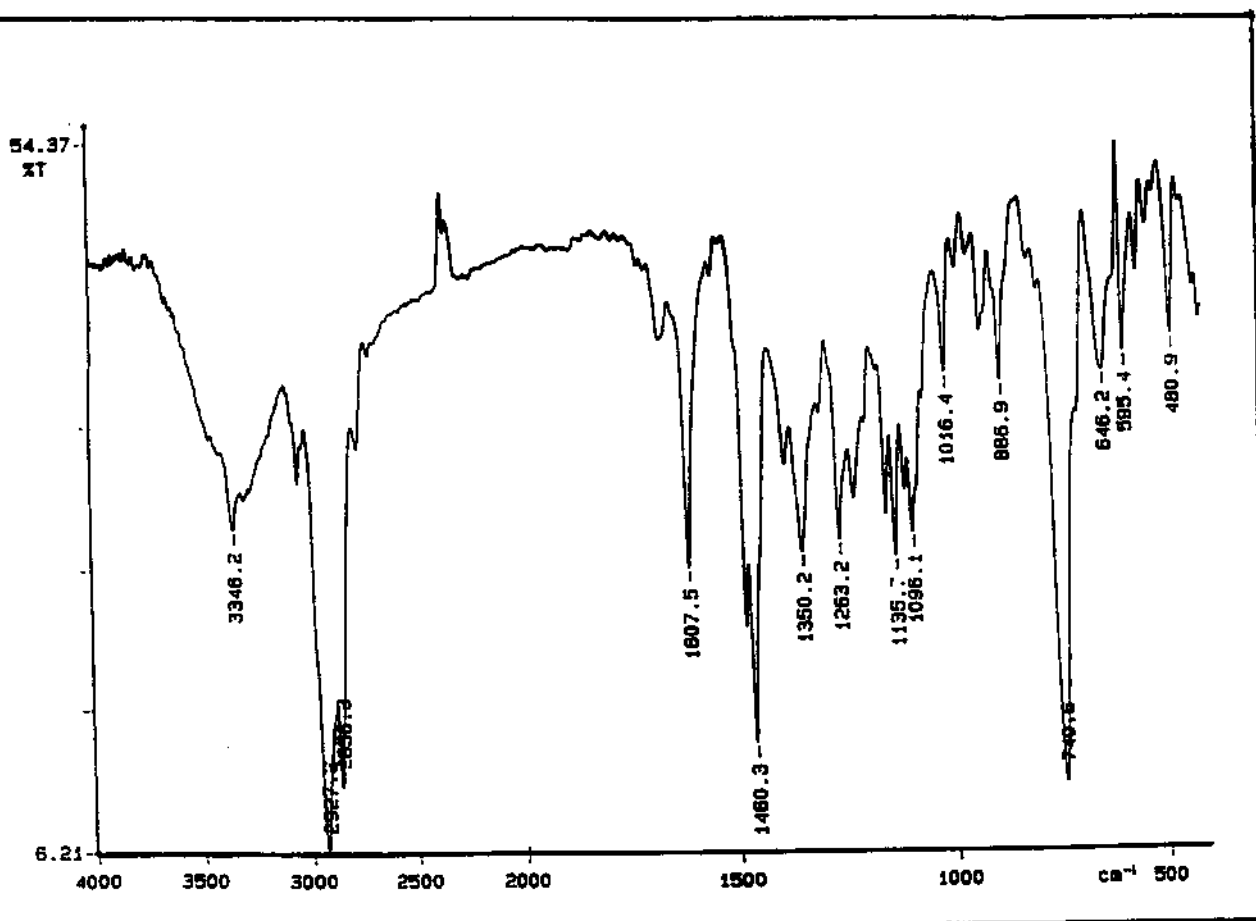
(-)-*aspidofractinina*



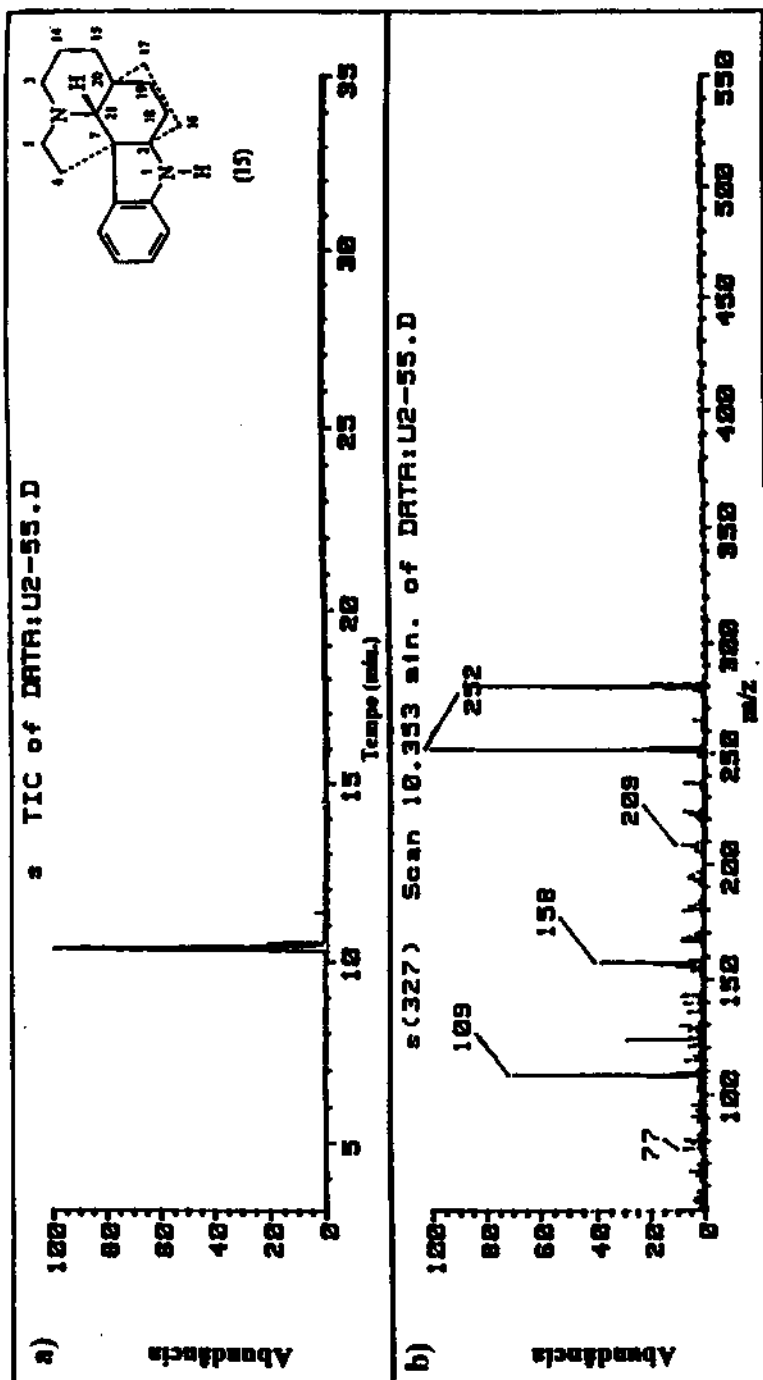
Marked Wavelengths

Reg A: L 342 = 0.05798
 Reg A: L 292 = 0.33247
 Reg A: L 268 = 0.14041
 Reg A: L 242 = 0.78418
 Reg A: L 232 = 0.70369
 Reg A: L 214 = 2.1556

Espectro no UV-VIS da (-)-aspidofractinina (15).



Espectro no Infravermelho da (-)-aspidofractinina (15).

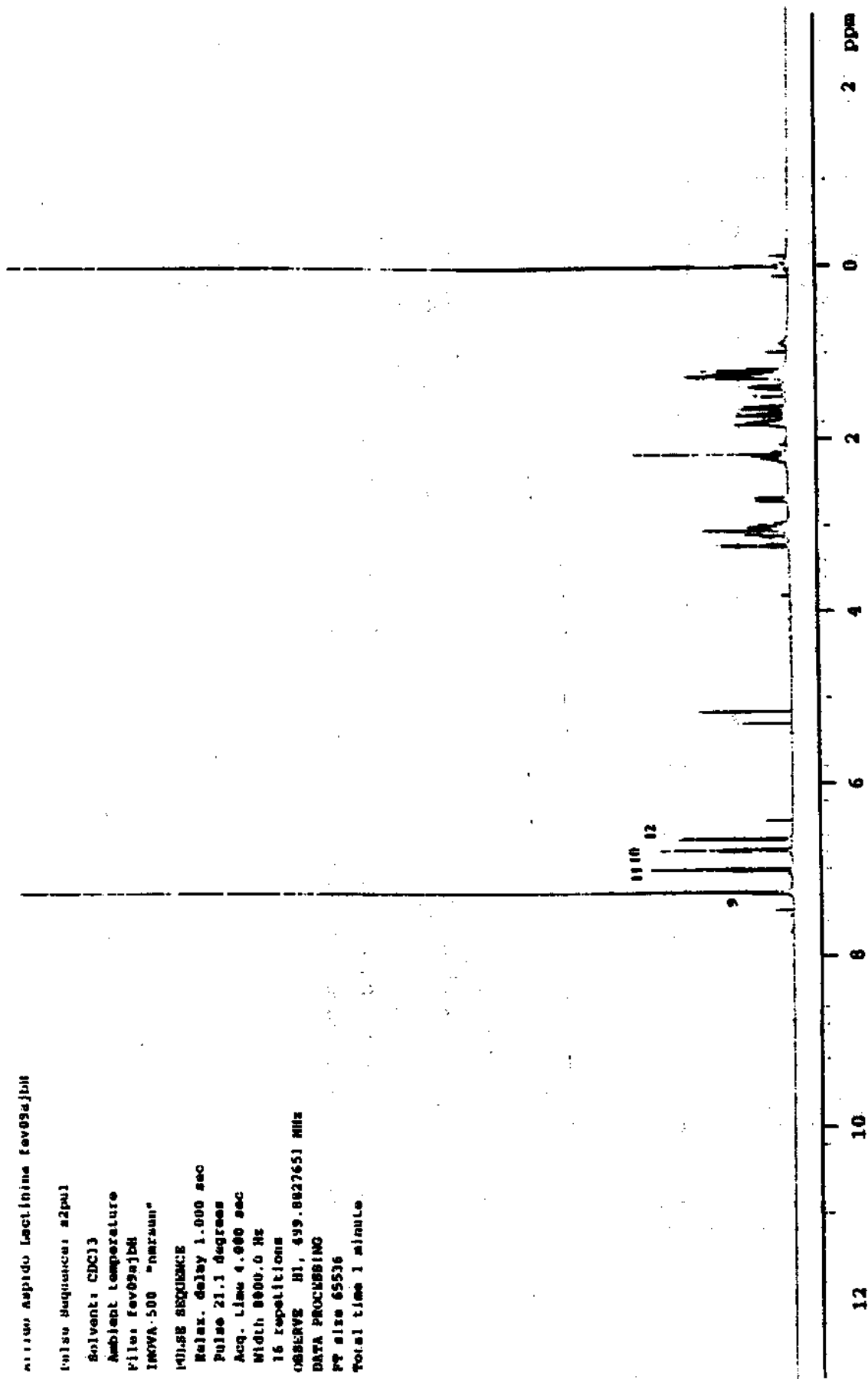


a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (-)-aspidofractinina (15).

b) Espectro de massas da (-)-aspidofractinina (15).

1
ASPIRO ASPIDO LACTININA rev09ajb8

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient Temperature
File: rev09ajb8
INSTR: 500 "Bruker"
MUSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 21.1 degrees
Acq. Time 4.000 sec
Width 8000.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 499.8027651 MHz
DATA PROCESSING
PE size 65536
Total time 1 minute



Espectro de RMN ¹H de (-)-aspidofractinina (15).

Arildo Aspido Lactinina fev09a.jbh

Pulse sequence: zgpg

Solvent: CHCl3

Ambient temperature

File: fev09a.jbh

INOVIA 500 "nmrsum"

NAME SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 21.1 degrees

Acq. time 4.000 sec

Width 8000.0 Hz

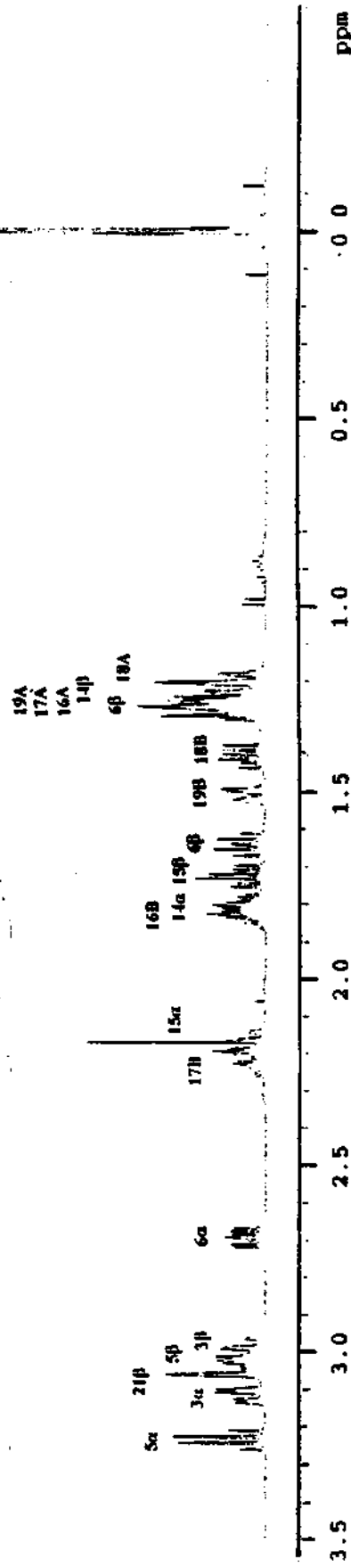
16 repetitions

OBSERVE H1, 499.8027651 MHz

DATA PROCESSING

FT size 65536

Total time 1 minute



8 Espectro de RMN ¹H da (+)-aspidofractinina (15), ampliado de (a) 0,0-3,5.

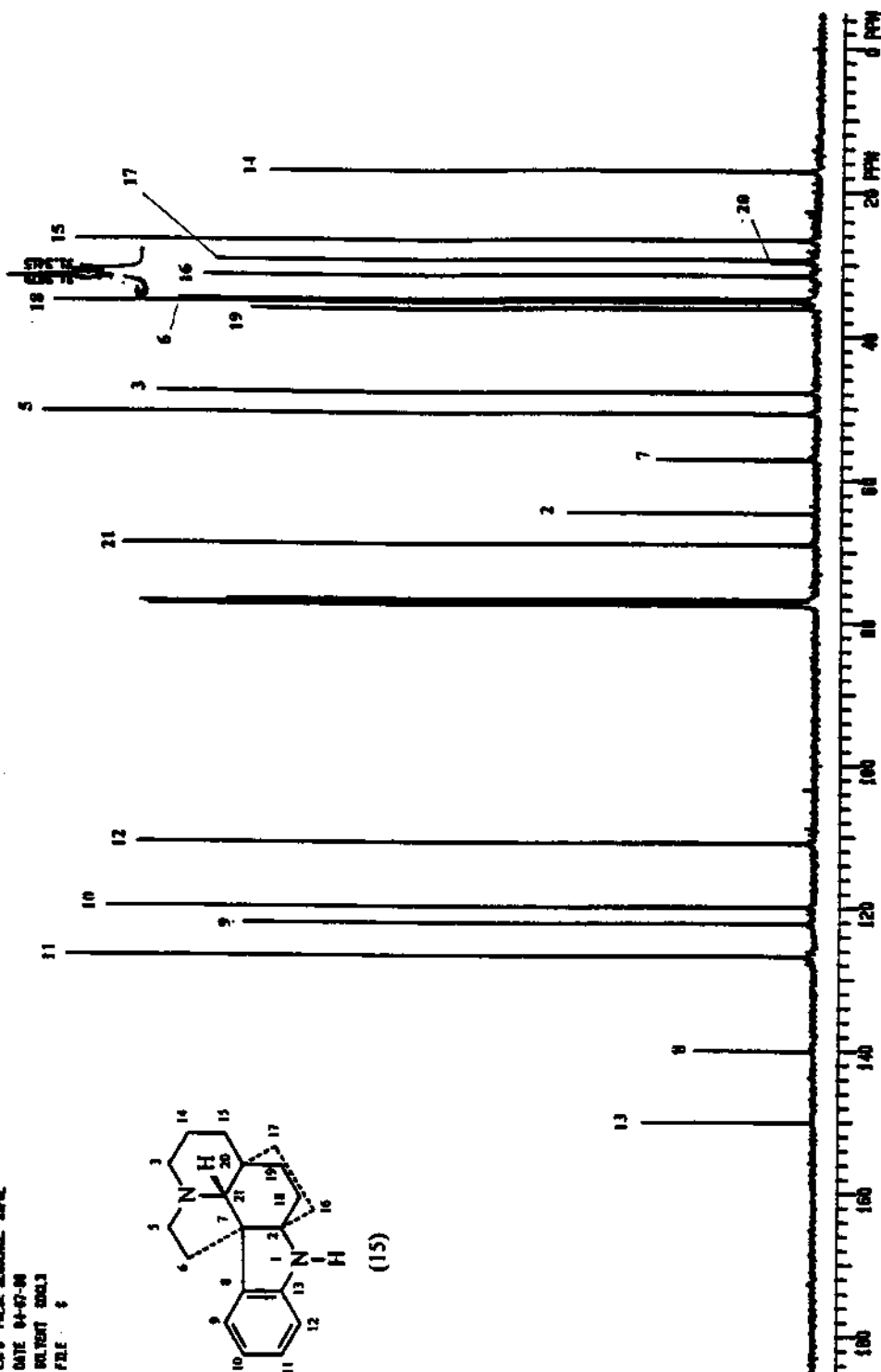
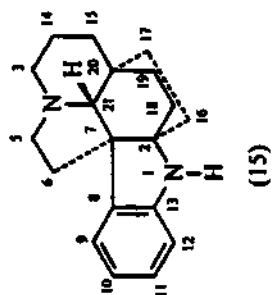
4.8-21 0001.3

EXP. PULSE PROGRAM: 02P01

DATE 04-07-80

SOLVENT CDCl₃

FILE 5



Espectro de RMN ¹³C da (-)-aspidofractinina (15).

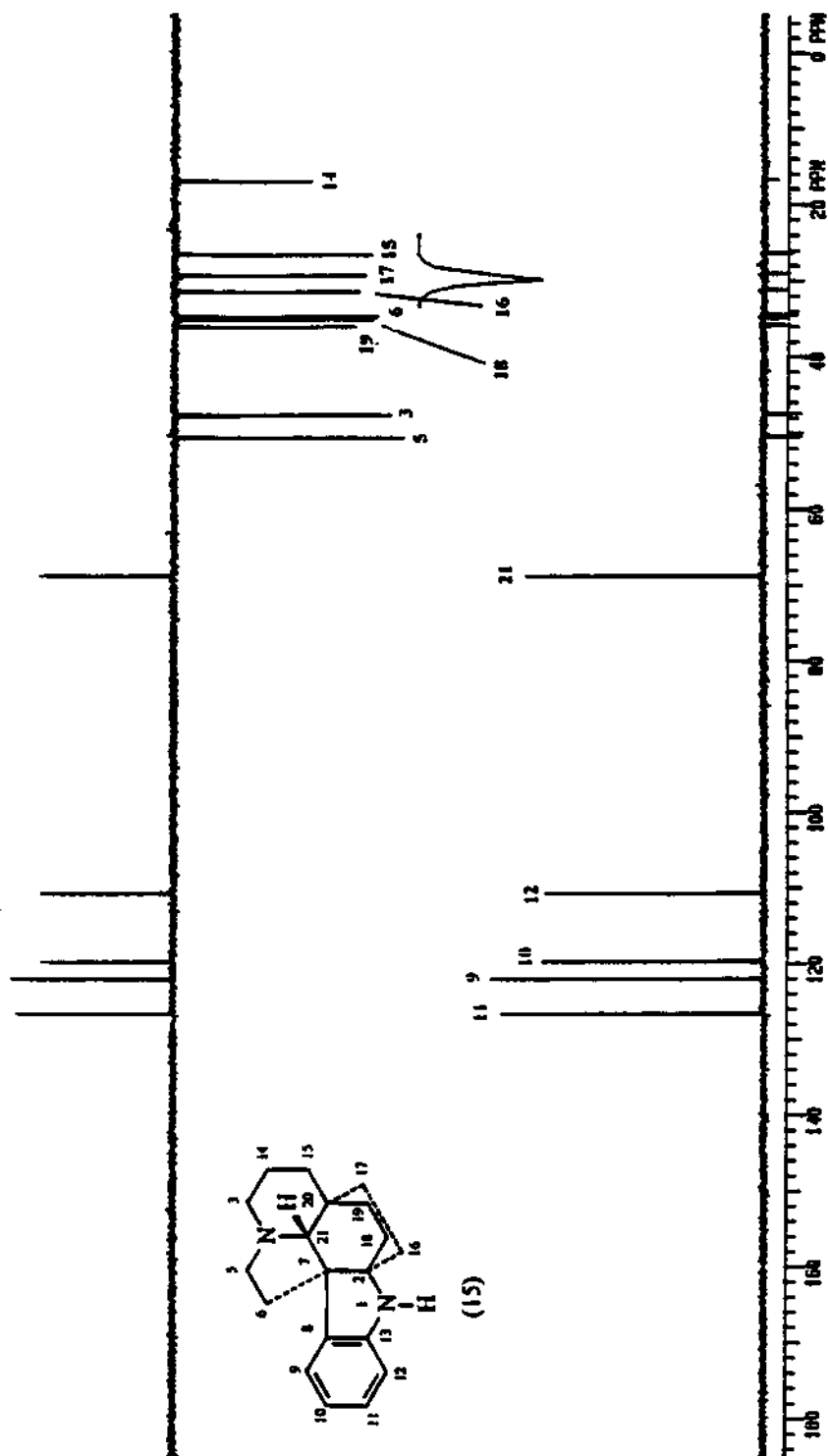
AJB-41 0003

EXP# PULSE SEQUENCE: DEPT

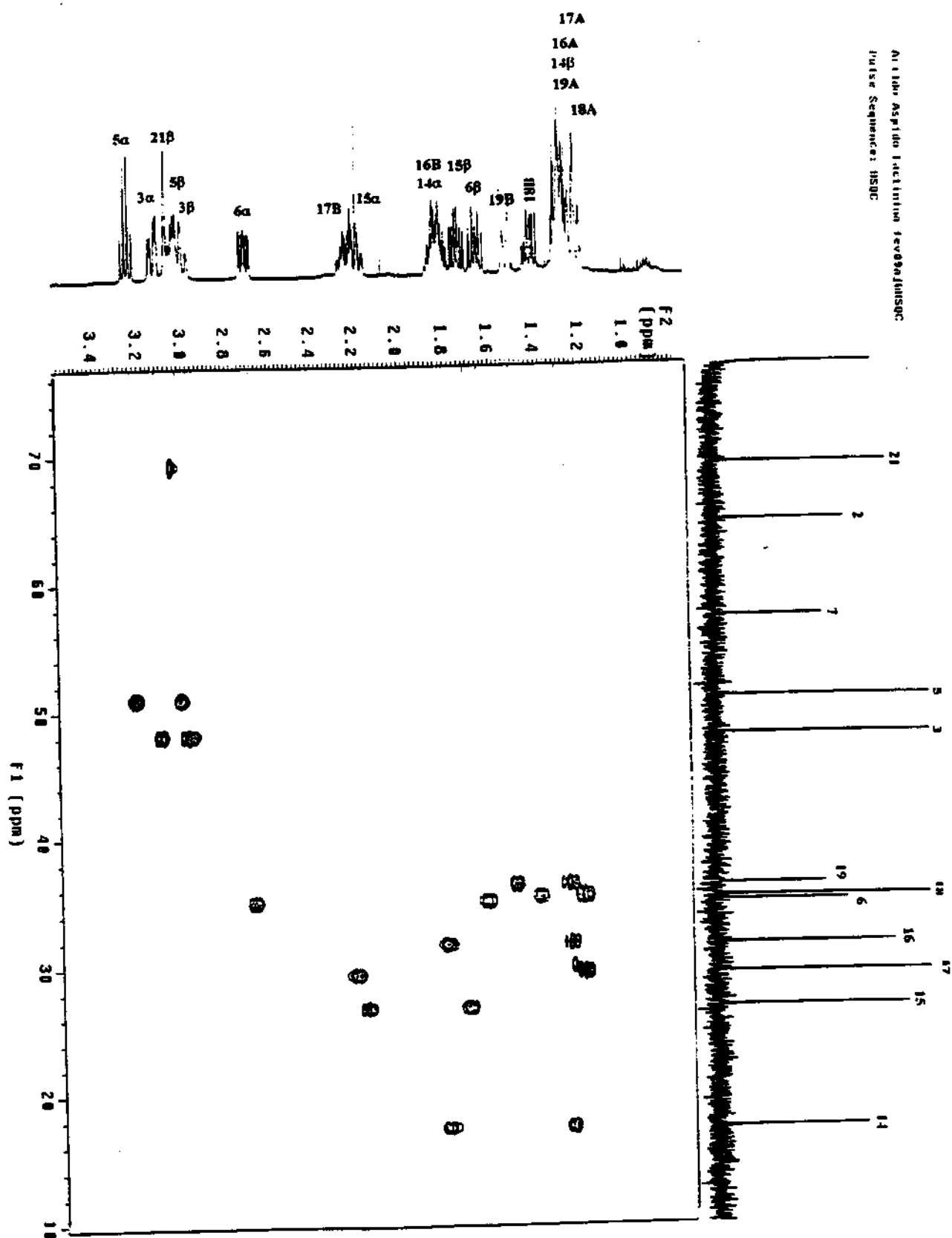
DATE 04-07-90

SOLVENT 0003

FILE DEPT



Espectro DEPT de RMN ¹³C da (-)-aspidofractinina (15).



Espectro de correlação C-H (HETCOR) da (-)-aspidofractinina (15).

Composto (16) - (-)-aspidofilina:

O composto 16 foi obtido como um sólido e apresentou P.F. na faixa de 175-180 °C, e o valor da rotação óptica, realizada em CHCl₃ foi de $[\alpha]^{25}_D = -24,2^\circ$.

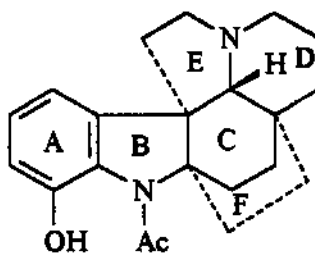
A análise do espectro na região do infravermelho permitiu assinalar uma banda a 1623 cm⁻¹, característica de uma carbonila de amida [38], a banda a 3412 cm⁻¹ referente ao estiramento OH, e outra a 1258 cm⁻¹ referente a um estiramento C-O de uma hidroxila fenólica [38].

O espectro no UV com máximos a 288 nm (4,04), 244 nm (4,40) e 214 nm (5,20) são típicos de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um íon molecular a m/z 338, correspondendo a uma fórmula molecular C₂₁H₂₆N₂O₂, o fragmento a m/z 310 [M⁺ - 28], e os fragmentos piperidínicos a m/z 124 e m/z 109 (íon base). Os fragmentos referentes aos íons piperidínicos indicam que a estrutura básica é hexacíclica, Figuras 8 e 10 nas páginas 56 e 57 respectivamente [43], e a porção monoterpênica não possui substituintes, o fragmento a m/z 295 [M⁺ - 43] e a banda amídica a 1623 cm⁻¹ no infravermelho, indicam a presença de um grupo acila na molécula, confirmado pela presença do íon m/z 45. O espectro de massas do composto (16) quando comparado ao 15 mostra uma diferença de 17 unidades de massas, este fato indica a presença de uma hidroxila fenólica, anteriormente observada no infravermelho.

Analisando a literatura, o estudo da biogênese dos compostos de estruturas semelhante, na qual indica que a substituição ocorre preferencialmente no C-12 [44], levou-nos a inicialmente acreditar que o grupo fenólico localiza-se neste carbono.

Este conjunto de picos no espectro de massas associados aos dados físicos e espectrais anteriores permitiram-nos sugerir que o composto 16 possua uma estrutura semelhante a do composto conhecido como (-)-aspidofilina.



(-)-aspidofilina (16)

As atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C de 16, Quadro 5 na pag.72, foram realizadas usando-se o experimento de DEPT e por comparações com os dados de NMR ^1H , ^{13}C obtidos para os compostos 9B e 15, Quadros 2, 4, 5.

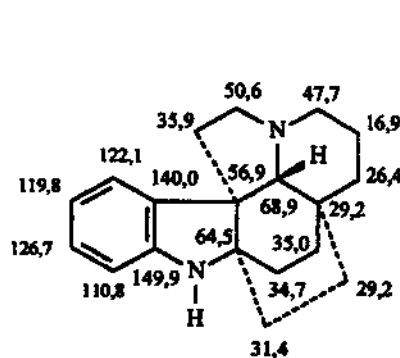
Nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do composto 16 os hidrogênios aromáticos puderam ser assinalados, o H-9 (dd a 6,82 δ , $J = 7,8$ Hz e $J = 2,5$ Hz), H-10 (t a 7,09 δ , $J = 7,8$ Hz), H-11 (dd a 6,84 δ , $J = 7,8$ Hz, $J = 2,5$ Hz) com base nos acoplamentos esperados para o sistema indólico com um substituinte ligado no C-12. O singlete em 10,0 δ o qual foi atribuído como o sinal de um hidrogênio de hidroxila fenólico ligado ao C-12, confirmada pelo deslocamento químico típico de carbono fenólico C-12 a 147,5 δ , que mostra efeitos de proteção eletrônica acentuada nos carbonos C-11 ($\Delta\delta = -9,0$), C-9 ($\Delta\delta = -8,9$) e o C-13 ($\Delta\delta = -22,1$), sendo este último somado ao efeito de proteção da acilação do nitrogênio indólico, quando se compara com os compostos 15 e 16 (Quadro 5, pag. 72).

Os carbonos não ligados a hidrogênio do sistema indolina foram atribuídos pela combinação das informações obtidas dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT.

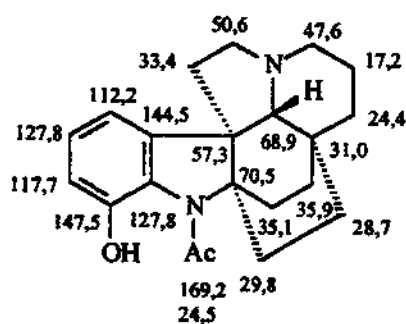
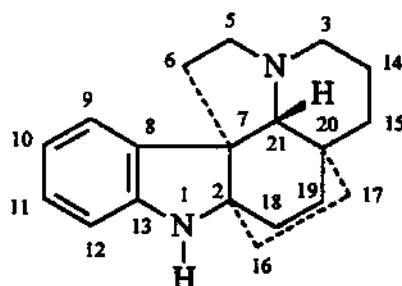
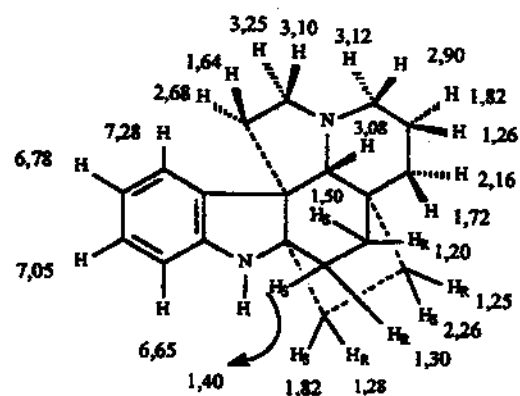
Todos os carbonos metilênicos foram identificados pelo experimento em DEPT e os hidrogênios a eles ligados foram atribuídos por comparação com os deslocamentos químicos dos compostos 9B e 15 Quadro 2, 4, 5. O espectro em DEPT revelou que 16 possui 9 carbonos metilênicos, o que está coerente com a estrutura sugerida. O único carbono metínico não aromático a 68,9 δ foi atribuído ao C-21 (DEPT).

As atribuições dos hidrogênios deste composto, Quadro 5 foram confirmadas após a atribuição do composto 18, descrito mais adiante.

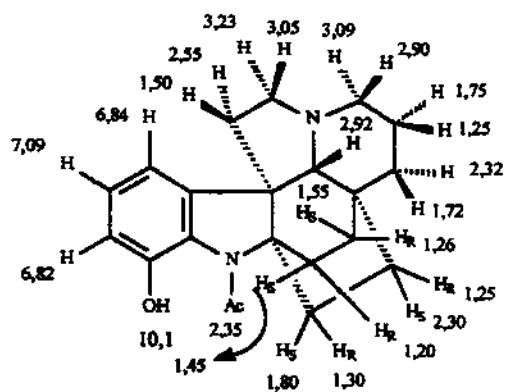
O uso conjunto dos dados físicos e espectrais obtidos para 16 permitiram atribuir a este composto a estrutura (-)-aspidofilina.



(-)-aspidofractinina (15)



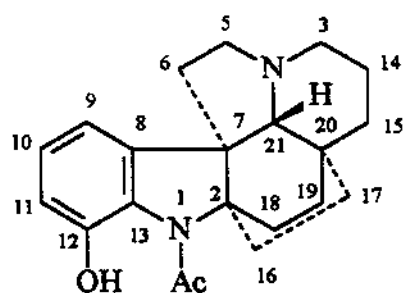
(-)-aspidofilina (16)



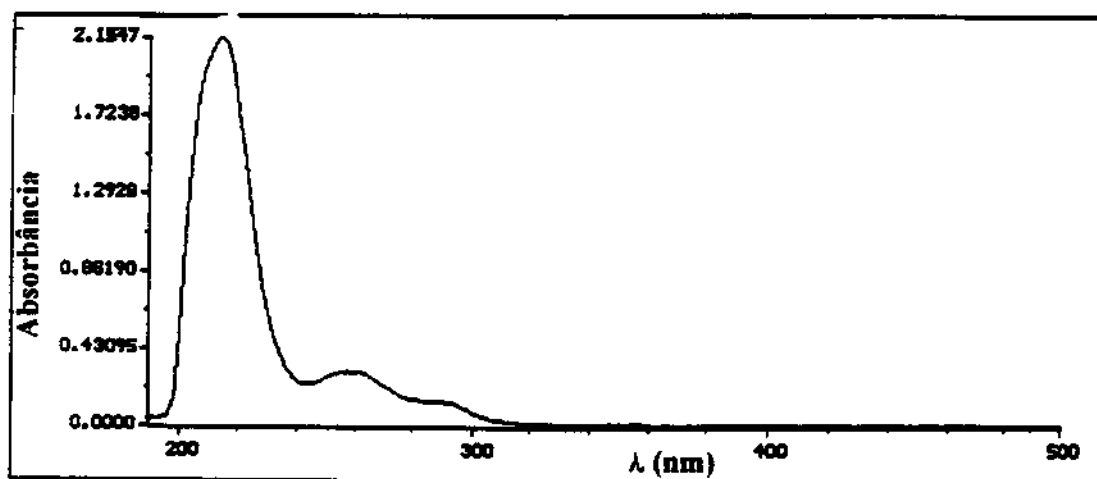
Quadro 5. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (16) e do composto modelo (-)-aspidofractinina (15).

(-)-*aspidofilina* (16): Cristais, P.F.= 179-180 °C (Hexano); P. F. lit.= 181-184 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = -24,2$ ($c=0,0032$); $[\alpha]_D^{25} = -20,0$ (CHCl_3 , $c=0,58$), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3412 (N-H), 1623 ($\nu_{\text{N-C=O}}$), 1258 (Ar-OH). UV $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$: 288 ($\log \epsilon=4,04$), 244 (inflexão, $\log \epsilon=4,40$), 214 ($\log \epsilon=5,20$). RMN¹H (CDCl_3): δ 3,09 (1H, m, H-3 α), 2,90 (1H, dt, $J=13,0 \text{ Hz}$, H-3 β), 3,23 (1H, dq, $J=15,0 \text{ Hz}$, $J=7,5 \text{ Hz}$, $J=2,4 \text{ Hz}$, H-5 α), 3,05 (1H, m, H-5 β), 2,55 (1H, m, H-6 α), 1,50 (1H, m, H-6 β), 6,82 (1H, dd, $J=7,8 \text{ Hz}$, $J=2,5 \text{ Hz}$, H-9), 7,09 (1H, t, $J=7,8 \text{ Hz}$, H-10), 6,84 (dd, $J=7,8 \text{ Hz}$, $J=2,5 \text{ Hz}$, H-11), 1,75 (1H, m, H-14 α), 1,25 (1H, m, H-14 β), 2,32 (1H, m, H-15 α), 1,72 (1H, m, H-15 β), 1,30 (1H, m, H-16A), 1,80 (1H, m, H-16B), 1,25 (1H, m, H-17A), 2,30 (1H, m, H-17B), 1,20 (1H, m, H-18A), 1,45 (1H, m, $J=1,5 \text{ Hz}$, H-18B) 1,25 (1H, m, H-19A), 1,55 (1H, m, H-19B), 2,92 (1H, d, $J=2,1$, H-21 β), 2,35 (3H, s, NCOMe), 10,1 (1H, s, C-12-OH). RMN ¹³C (CDCl_3): δ 70,5 (C-2), 47,6 (C-3), 50,6 (C-5), 33,4 (C-6), 57,3 (C-7), 144,5 (C-8), 112,3 (C-9), 127,8 (C-10), 117,7 (C-11), 147,5 (C-12), 127,8 (C-13), 17,2 (C-14), 24,4 (C-15), 29,8 (C-16 *), 28,7 (C-17 *), 35,1 (C-18 #), 35,9 (C-19 #), 31,0 (C-20), 68,9 (C-21), 24,5 (NCOCH₃), 169,2 (NCOCH₃). CG/EM m/z (A. R. %): 338 (100), 295 (40), 124 (20), 109 (100).

* - a atribuição pode ser interconvertida, # - a atribuição pode ser interconvertida



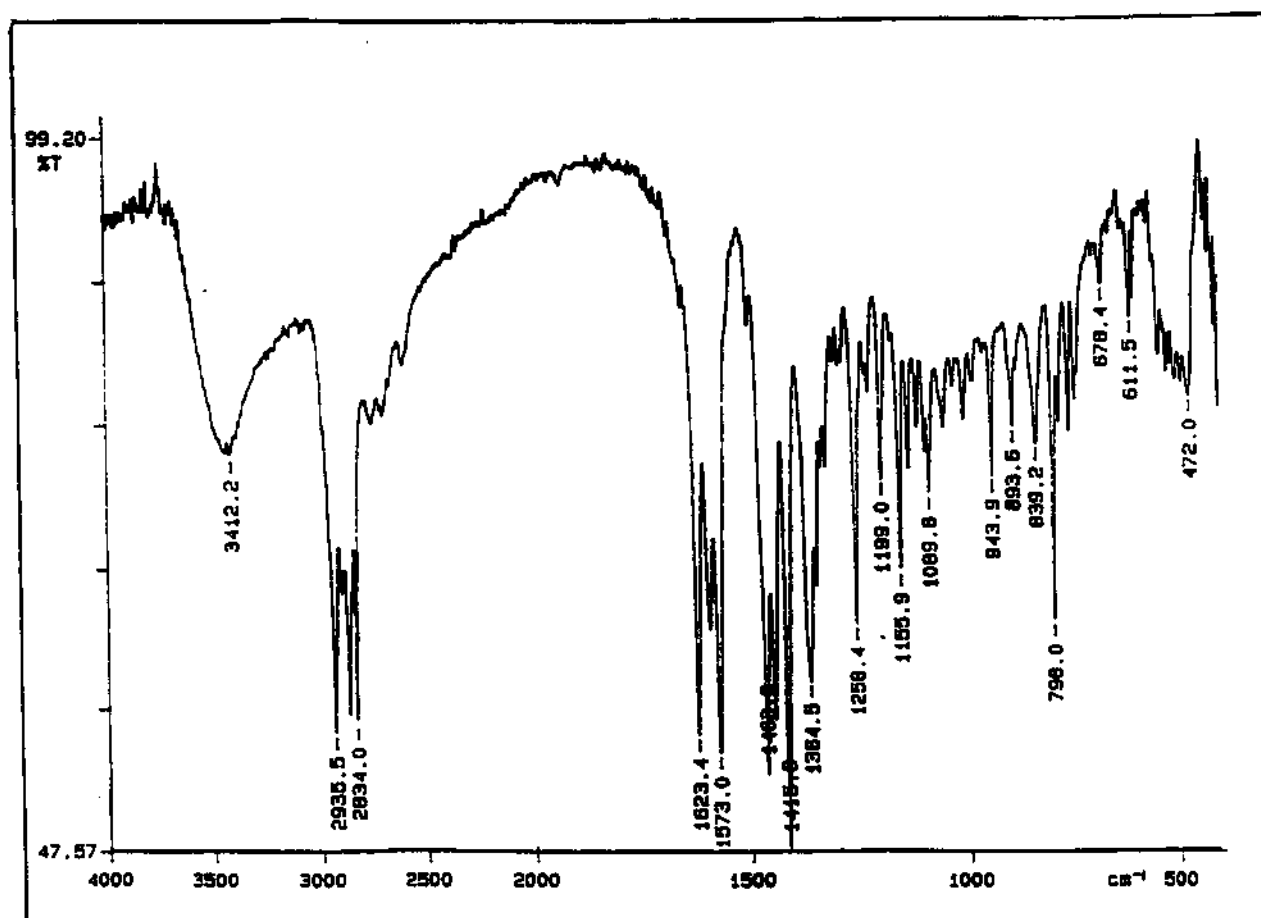
(-)-*aspidofilina*



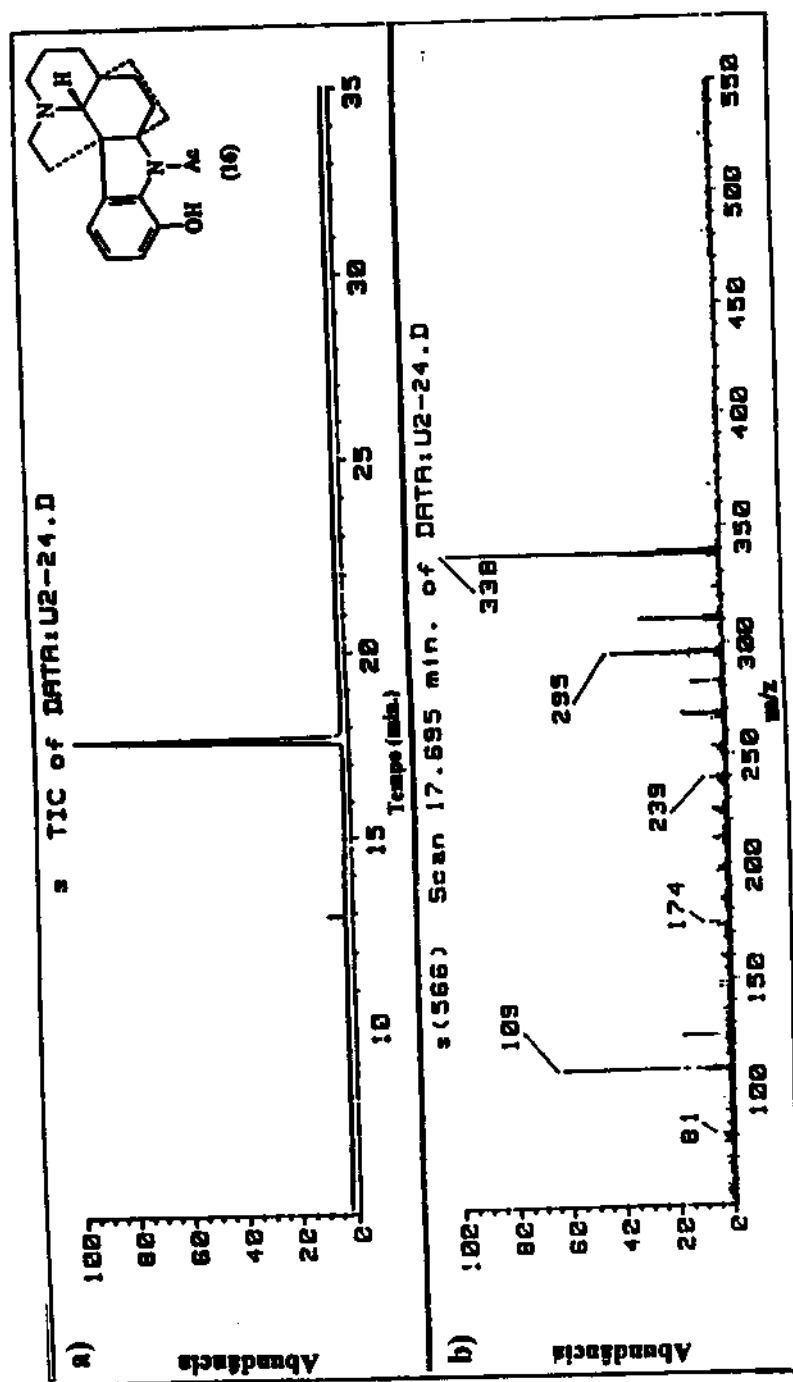
Marked Wavelengths

Reg A: L 332 = 0.00793
 Reg A: L 288 = 0.13200
 Reg A: L 260 = 0.29901
 Reg A: L 244 = 0.23209
 Reg A: L 214 = 2.1547

Espectro no UV-VIS da (-)-aspidofilina (16).



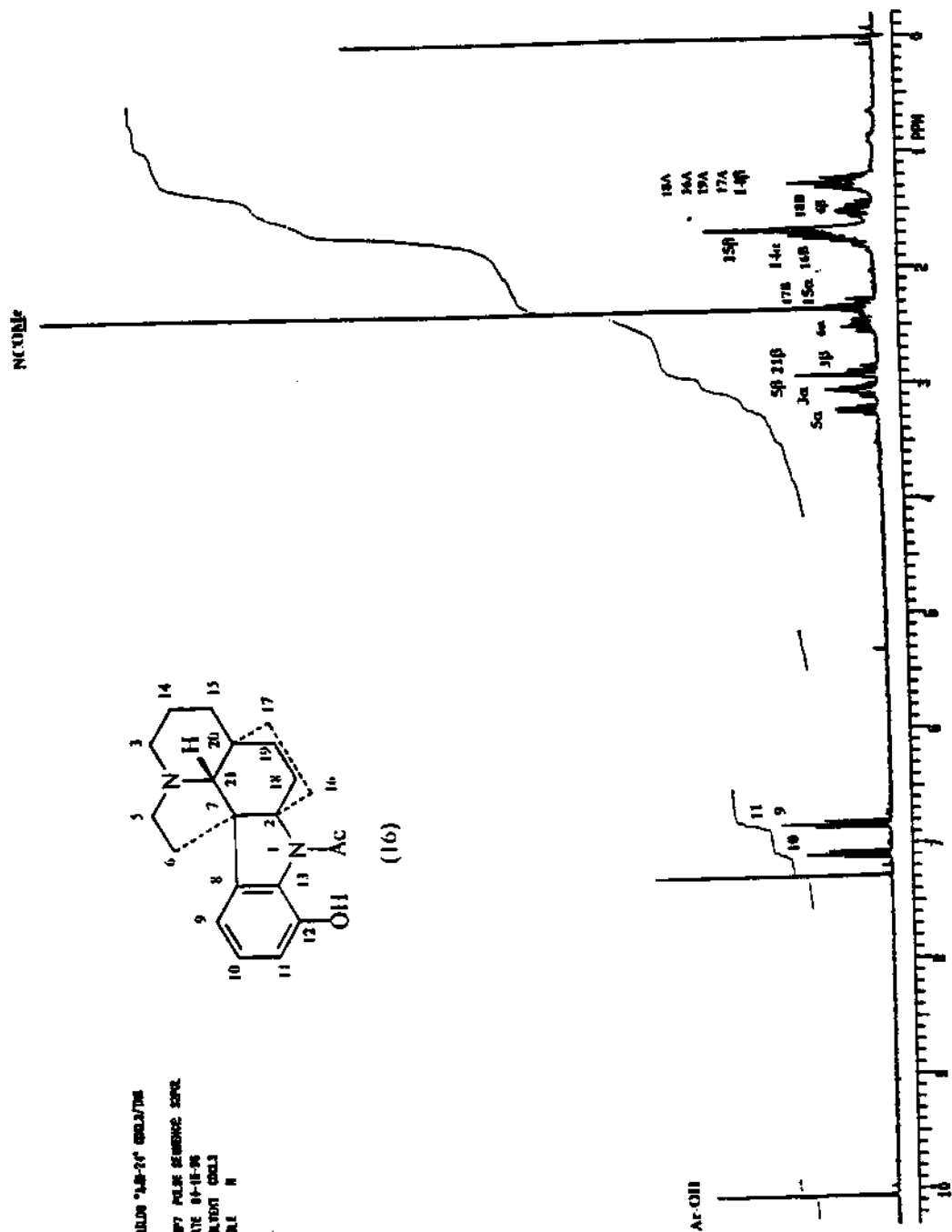
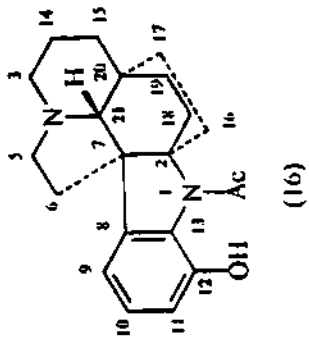
Espectro no Infravermelho da (-)-aspidofilina (16).



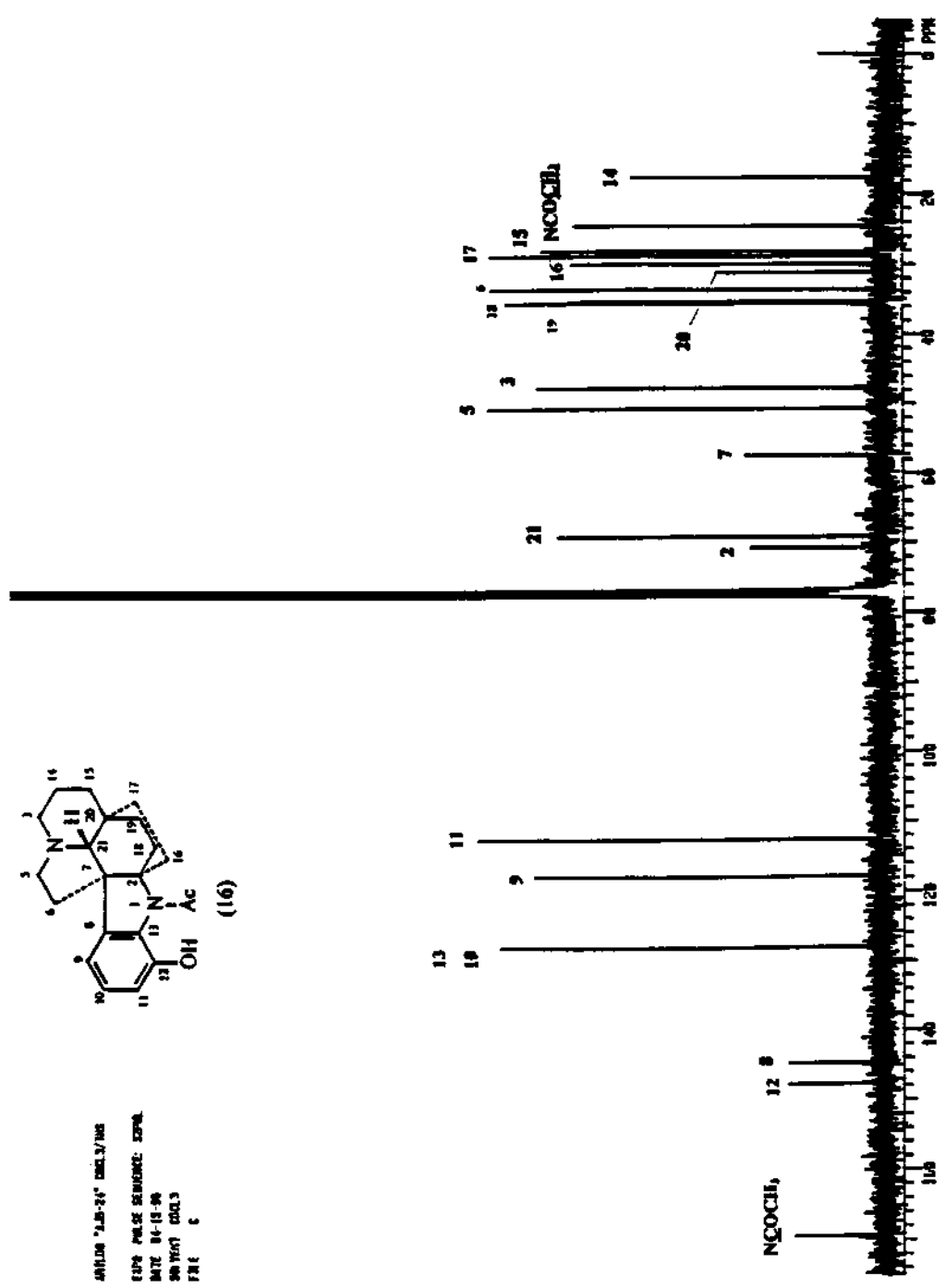
a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (-)-aspidofilina (16).

b) Espectro de massas da (-)-aspidofilina (16).

001009 "A,B-24" 0003/706
 EXP7 PULS SEQUENCE 32002
 DATE 04-18-76
 ANALYST GML3
 FILE 11



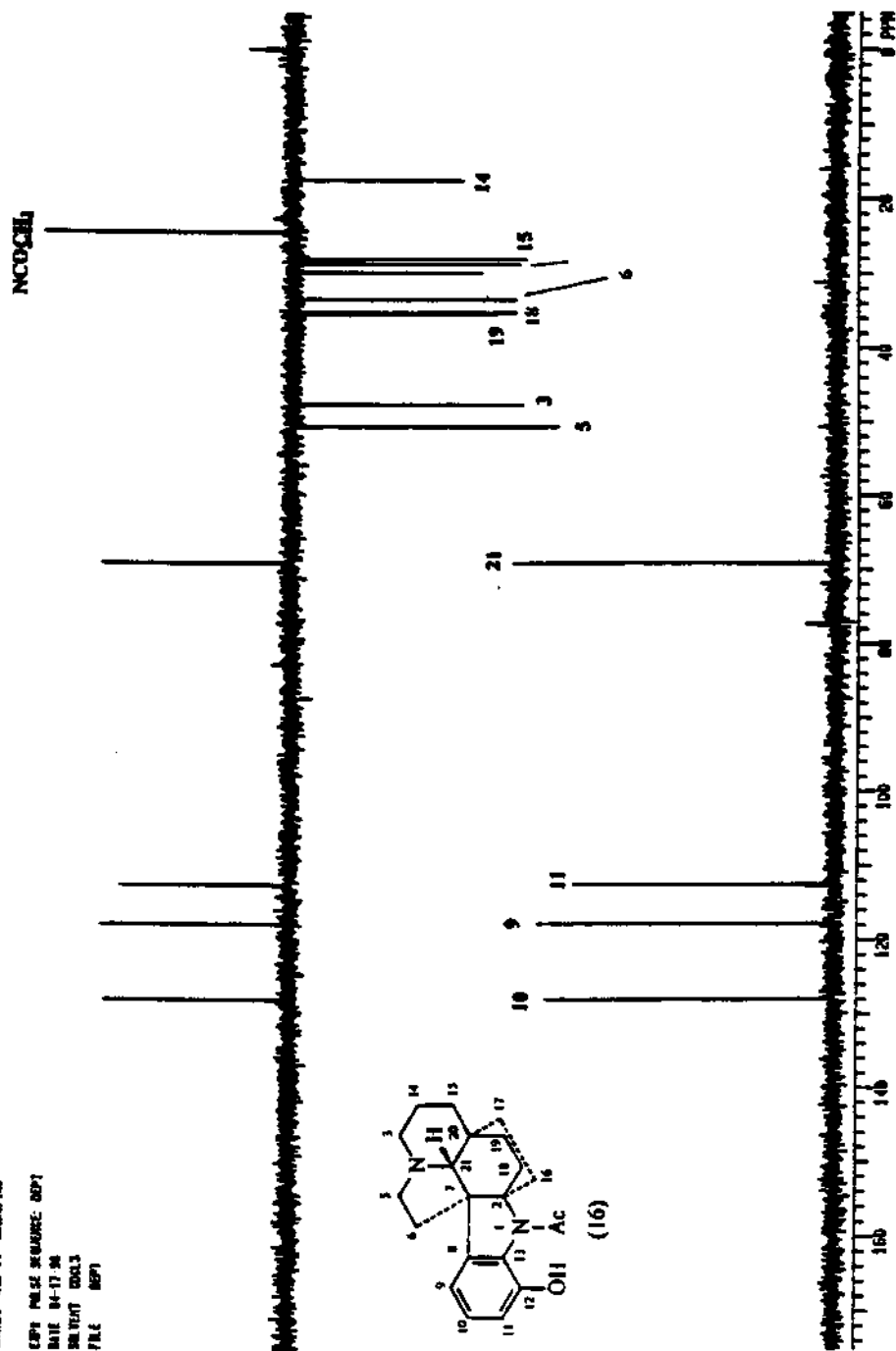
Espectro de RMN ^1H da (-)-aspidoflina (16).



Espectro de RMN ¹³C da (-)-aspidofilina (16).

ANALISE "J.M.-24" 0203/1985
 EPR PULSE SEQUENCE: zgpg
 DATE 04-11-90
 500 MHz 0203
 F2 C

000009 "400-21" 000.1710
 CPM PULSE PROGRAM: DEPT
 DATE 04-11-90
 SUBJECT 00013
 FILE DEPT



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (-)-aspidofilina (16).

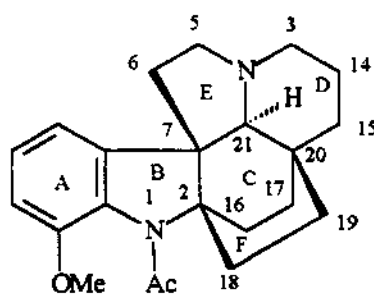
Composto (17) - 15-desmetóxi-pirifolina:

O composto apresentou um P.F. na faixa de 122-125 °C, e o valor da rotação óptica, realizada em CHCl₃ foi de $[\alpha]_D^{25} = + 81,3^\circ$.

A análise do espectro na região do infravermelho permitiu assinalar uma banda a 1654 cm⁻¹, característica de uma carbonila de amida [38]

O espectro de UV com máximos a 280 nm (3,57) 260 nm (4,00) e 216 nm (4,3) são típicos de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um íon molecular a m/z 352, correspondendo a uma fórmula molecular C₂₂H₂₈N₂O₂, o fragmento a m/z 324 [M⁺ - 28], e os fragmentos piperidínicos a m/z 124 e m/z 109 (pico base), hexacíclico, Figuras 8 e 10 nas pags. 56 e 57. Estes fragmentos evidenciam que 17 é um composto com estrutura similar aos compostos 9A e 15 descritos anteriormente. A conclusão a que chegou-se interpretando o espectro de massas e os modelos de fragmentação de 17 é que trata-se de um composto com uma estrutura muito parecida com a de 16, Quadro 5, com 14 unidades de massa a menos. Estas conclusões e os outros dados físicos e espectrais apresentados anteriormente pelo composto 17, possuindo uma estrutura muito similar ao alcalóide conhecido como (+)-15-desmetóxi-pirifolina.



(+)-15-desmetóxi-pirifolina (17)

As atribuições dos espectros de RMN ¹H, ¹³C de 17 foram efetuadas pela primeira vez neste trabalho, Quadro 6 na pag. 81, usando-se o experimento de DEPT e por comparações com os dados de ¹H, ¹³C RMN obtidos para os compostos 15 e 16 lembrando

que a configuração do C-2, C-7 e C-21 de 15 e 16 estão invertidos, na análise dos modelos moleculares nota-se que os deslocamentos químicos dos carbonos em geral, não devem sofrer grandes alterações pois os carbonos em geral possuem as mesmas interações com pequenas distorções angulares. Uma observação que deve ser relatada é a aproximação dos hidrogênios H-16A e B e H-17A e B se aproximam dos H-5 α e β e H-6 α e β nos compostos da série (-), 15 e 16

O espectro de hidrogênio mostrou a presença de dois grupos metila, um singlete a 2,18 δ referente a metila da acetamida (24,6 δ), e o singlete a 3,85 δ relacionado ao carbono da metoxila ligado ao anel benzênico a 55,3 δ .

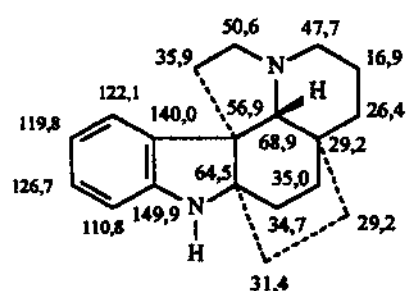
O RMN ^1H também permitiu assinalar os três hidrogênios aromáticos H-9 (d a 7,34 δ , J= 9,0 Hz), H-10 (t a 7,12 δ , J= 9,0 Hz) e H-11 (d a 6,80 δ , J= 9,0 Hz) com base nos acoplamentos esperados para um sistema indólico com um substituinte metoxila ligado ao C-12, o que pôde ser confirmado quando comparamos o modelo de substituição com os dos compostos 9B. A metilação provoca desproteção em C-13 e C-9 e proteção em C-11 [101].

Os carbonos não ligados a hidrogênio do sistema indolina foram atribuídos pela combinação do espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado e DEPT.

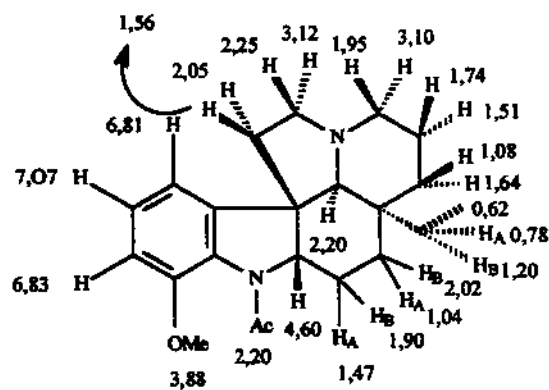
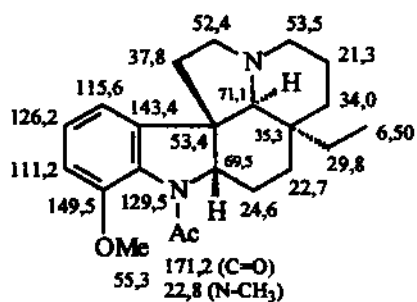
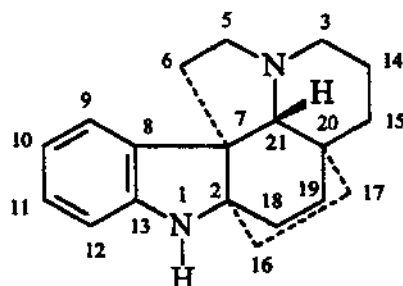
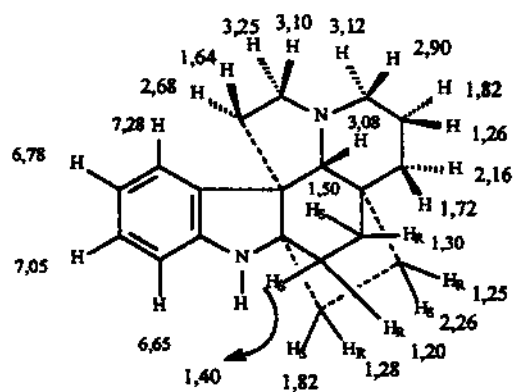
Todos os carbonos metilênicos foram assinalados pelo experimento de DEPT e os hidrogênios a eles ligados foram atribuídos por comparação com os deslocamentos químicos dos compostos 9A e 106, Quadros 4 e 6. O espectro de DEPT revelou que esta molécula possui nove hidrogênios metilênicos, coerentes com a estrutura sugerida. A presença do sinal referente ao C-15 a δ 25,0 mostra associação deste com os sinais de seus respectivos hidrogênios H-15 α a 1,82 δ e H-15 β 2,30 δ .

O único carbono metínico não aromático a 67,3 δ foi atribuído ao C-21 cujo hidrogênio é um singlete a 3,35 δ .

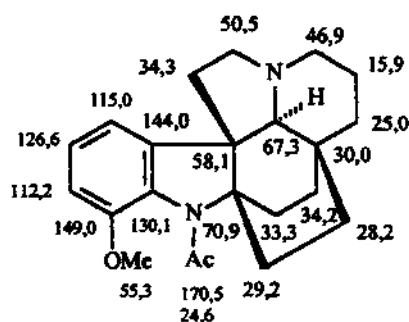
O uso conjunto dos dados físicos e espectrais obtido para 17 permitiram atribuir a este composto a estrutura (+)-15-desmetóxi-pirifolina.



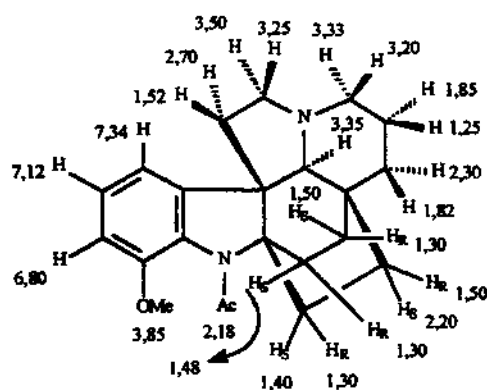
(-)-aspidofractinina (15)



dados de ^1H NMR em CDCl_3
do composto (9A) atribuído
como (+)-aspidospermina



(+)-15-desmetoxi-pirifolina (17)

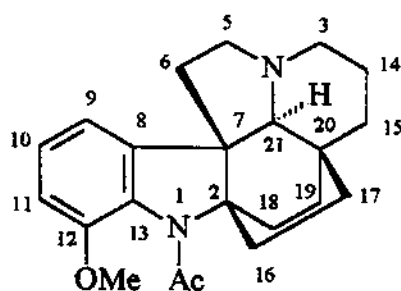


Quadro 6. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (17) e dos compostos modelos (+)-aspidospermina (9A) e (-)-aspidofractinina (15).

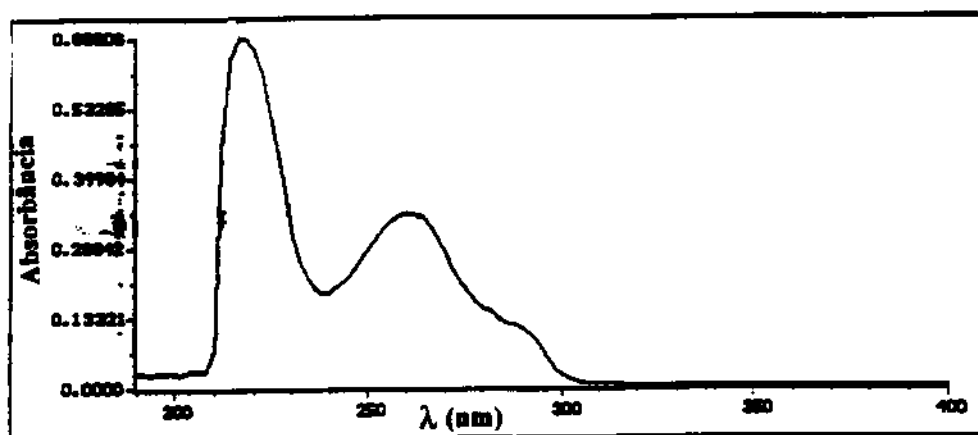
(+)-15-desmetóxi-pirifolina (17): Cristais, P.F.= 122-125 °C (Hexano); P. F. lit.= 121-123 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = +81,3$ ($c=0,0043$); $[\alpha]_D^{25} = -6,40$ (CHCl_3), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 1654 ($\nu_{\text{N-C=O}}$). UV $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$: 288 ($\log \epsilon=3,57$), 260 ($\log \epsilon=4,00$), 216 ($\log \epsilon=4,30$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,33 (1H, m, H-3 α), 3,20 (1H, m, H-3 β), 3,50 (1H, dt, H-5 α), 3,25 (1H, m, H-5 β), 2,70 (1H, m, H-6 α), 1,80 (1H, m, H-6 β), 7,34 (1H, d, $J=9,0$ Hz, H-9), 7,12 (1H, t, $J=9,0$ Hz, H-10), 6,80 (d, $J=9,0$ Hz, H-11), 1,85 (1H, m, H-14 α), 1,25 (1H, m, H-14 β), 2,30 (1H, m, H-15 α), 1,82 (1H, m, H-15 β), 1,30 (1H, m, H-16A), 1,40 (1H, m, H-16B), 1,50 (1H, m, H-17A), 2,20 (1H, m, H-17B), 1,30 (1H, m, H-18A), 1,48 (1H, m, H-18B), 1,30 (1H, m, H-19A), 1,50 (1H, m, H-19B), 3,35 (1H, s, H-21 α), 2,18 (3H, s, NCOMe), 3,85 (3H, s, C-12-OMe). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 70,9 (C-2), 46,9 (C-3), 50,5 (C-5), 34,3 (C-6), 58,1 (C-7), 144,0 (C-8), 112,2 (C-9), 126,6 (C-10), 115,0 (C-11), 149,0 (C-12), 130,1 (C-13), 15,9 (C-14), 25,0 (C-15), 29,2 (C-16 *), 28,2 (C-17 *), 33,3 (C-18 #), 34,2 (C-19 #), 30,0 (C-20), 67,3 (C-21), 24,6 (NCOCH₃), 55,3 (C-12-OCH₃), 170,5 (NCOMe). CG/EM m/z (A. R. %): 352 (100), 324 (60), 124 (40), 109 (70).

* - a atribuição pode ser interconvertida

- a atribuição pode ser interconvertida



(+)-15-desmetóxi-pirifolina



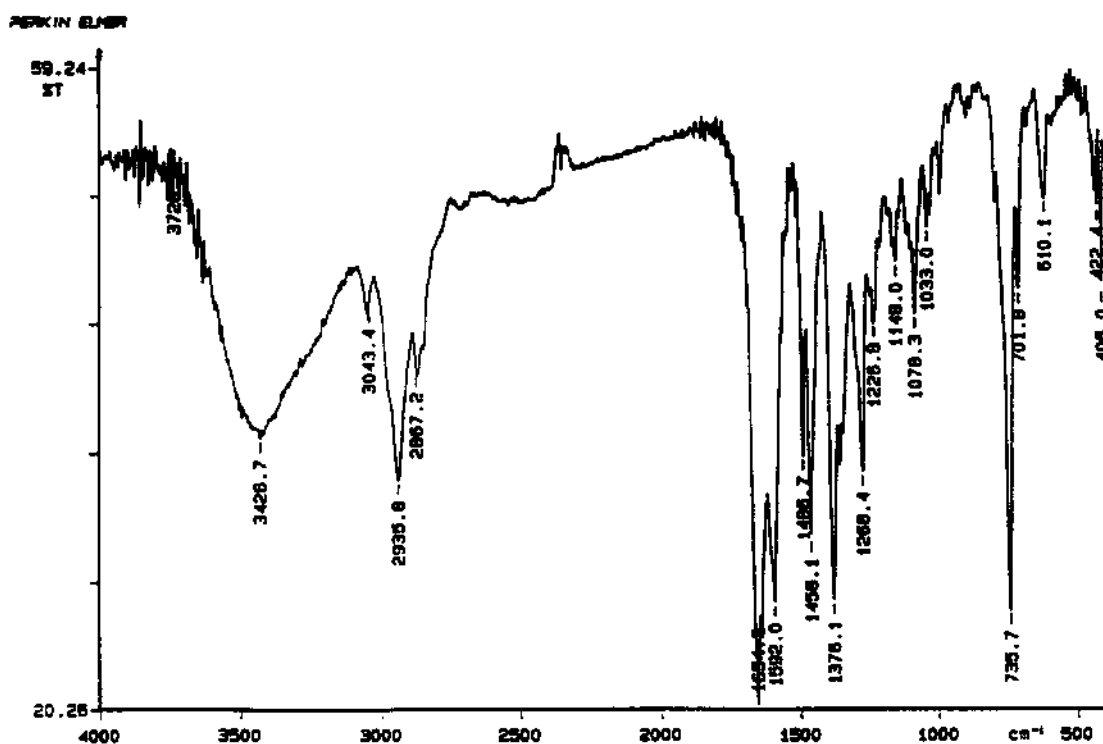
Marked Wavelengths

Reg A: L 260 = 0.32973

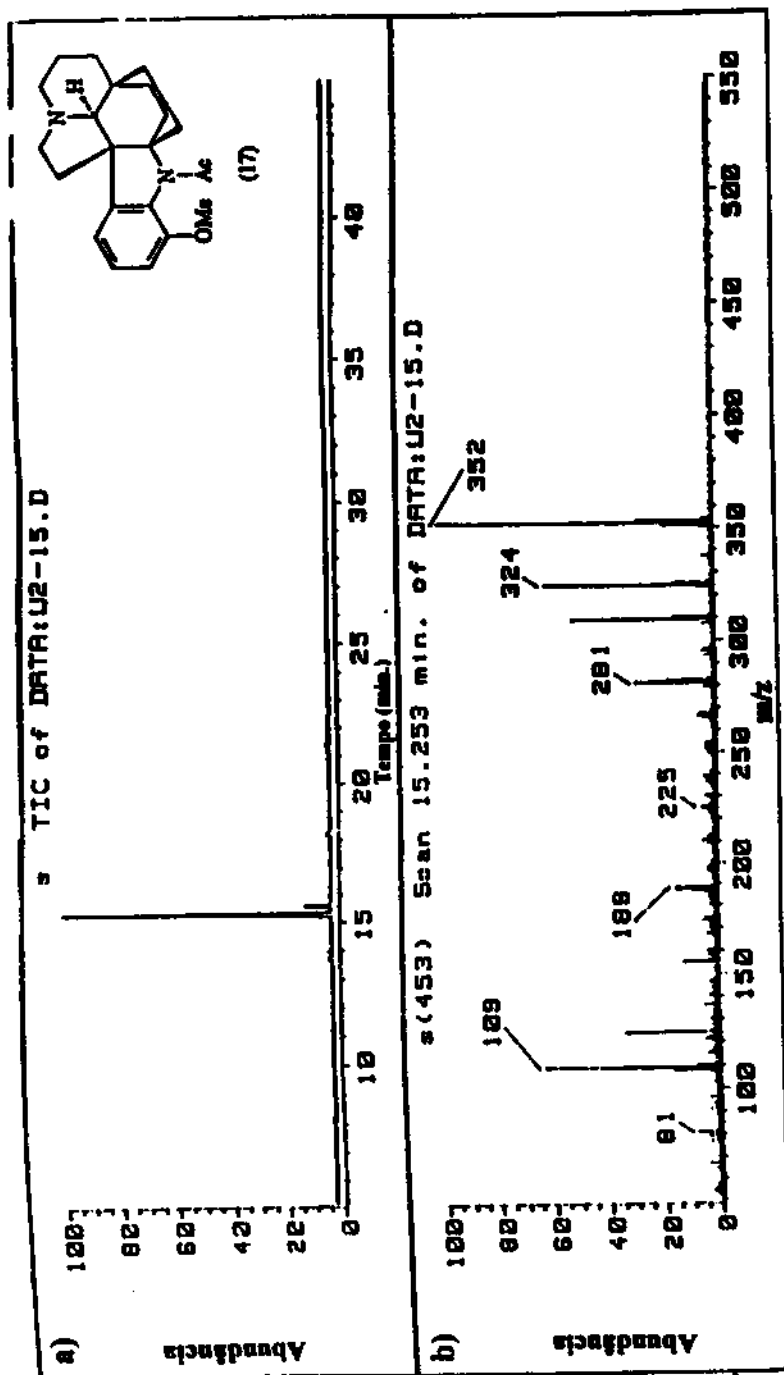
Reg A: L 288 = 0.11903

Reg A: L 216 = 0.66484

Espectro no UV-VIS da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).

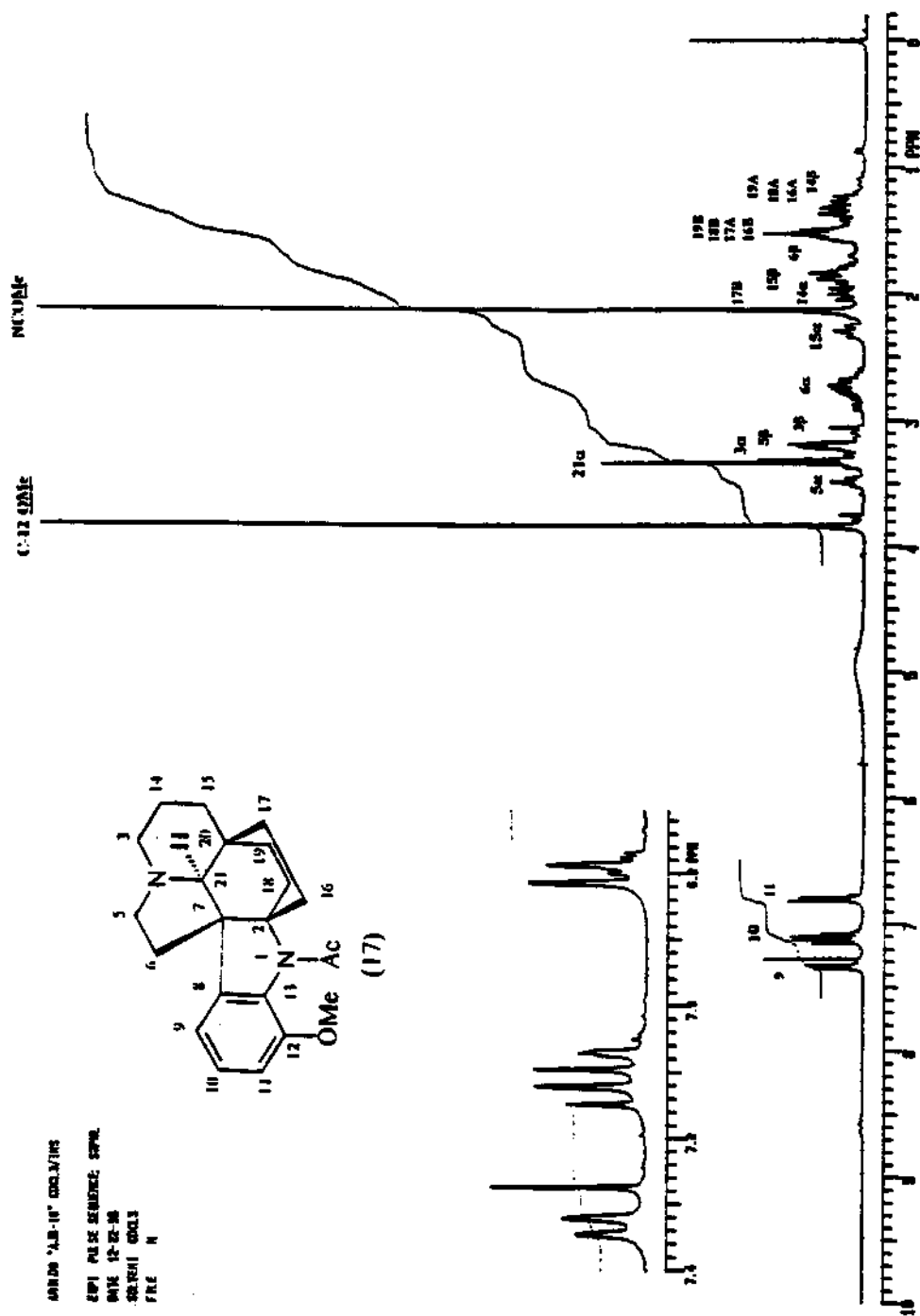


Espectro no Infravermelho da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).

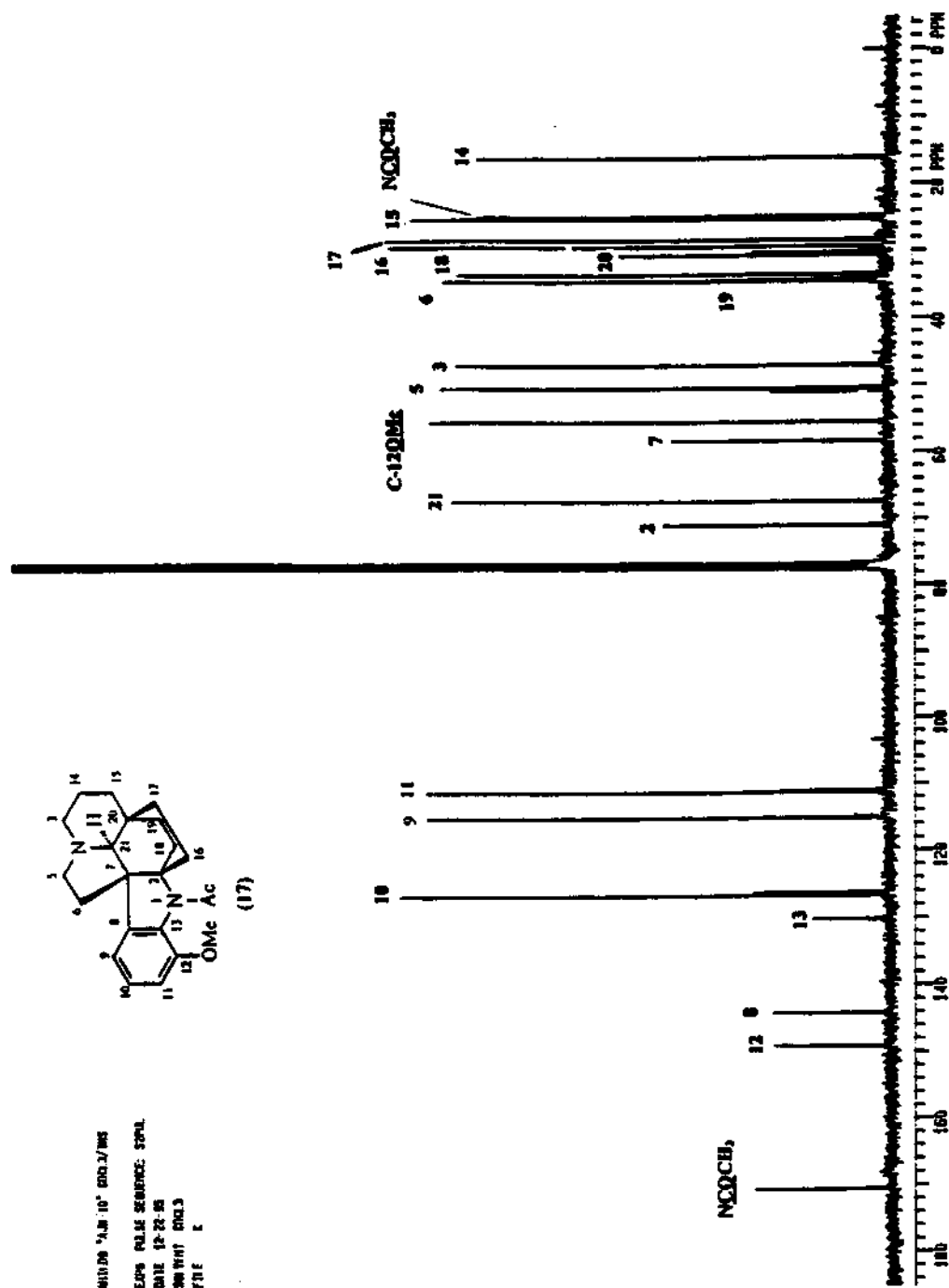


a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).

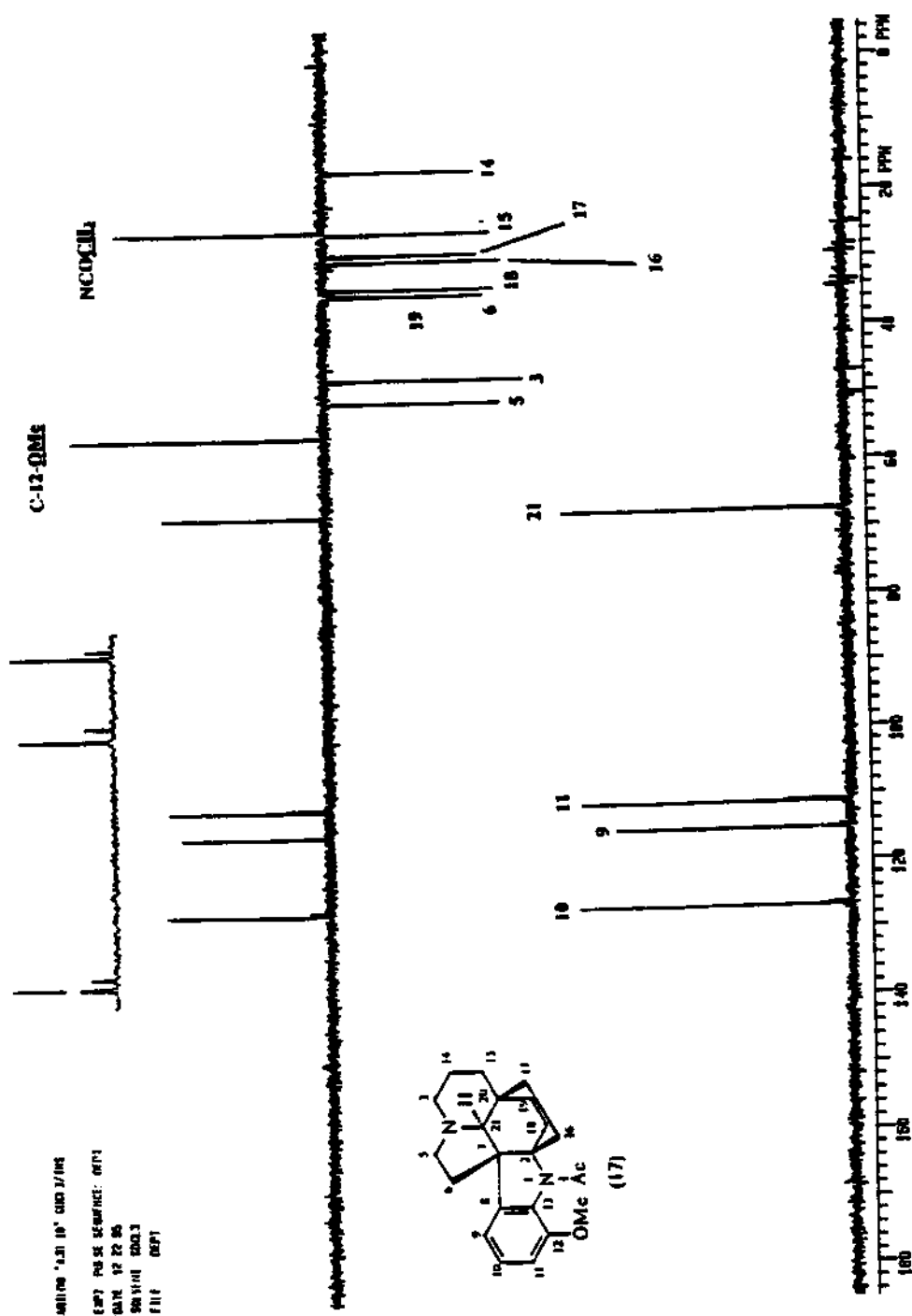
b) Espectro de massas da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).



Espectro de RMN ¹H da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).



Espectro de RMN ^{13}C da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17).

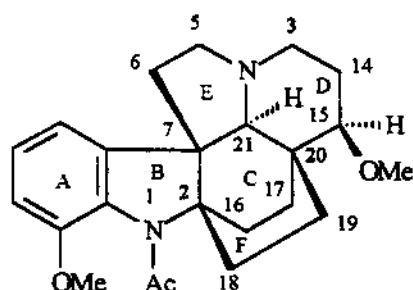
Composto (18) - (+)-pirifolina:

Este composto apresentou P.F. na faixa de 100-102 °C, e o valor da rotação óptica, realizado em CHCl₃ a 25 °C, foi de $[\alpha]_D^{25} = +182,8^\circ$.

A análise do espectro na região do Infravermelho mostrou uma banda a 1650 cm⁻¹, característica de uma carbonila de amida [38].

O espectro de UV com máximos a 288 nm (4,10), 262 nm (3,50) e 216 nm (3,88), característico de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um íon molecular a m/z 382, correspondendo a uma fórmula molecular C₂₃H₃₀N₂O₃, o fragmento a m/z 354 [M⁺ - 28], e os fragmentos piperidínicos a m/z 154 e 139. Os fragmentos piperidínicos lembram aqueles presentes no composto aspidofractinina (15), Figura 8 na pag.57, só que com 30 unidades de massa a mais. Este fato nos levou a sugerir que estas 30 unidades adicionais sejam devido a um grupo metoxila ligado ao anel D. Este conjunto de dados anteriormente descritos levou-nos a sugerir que o composto 18 apresenta uma estrutura semelhante ao do alcalóide (+)-pirifolina, ainda que restem dúvidas sobre a localização exata da metoxila sobre o anel D.



(+)-pirifolina

As atribuições dos espectros de RMN ¹H, ¹³C do composto 18, Quadro 7 na pag. 92, foram realizadas pela primeira vez utilizando-se os experimentos de DEPT, HETCOR e COSY e os modelos 9A, 15 e 17 anteriormente discutidos, com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida anteriormente, uma vez que, RMN ¹H, ¹³C deste composto não estão relatados na literatura. Estes espectros mostraram a presença de sinais de três grupos metila,

um singlete a 2,12 δ corresponde a metila do grupo N-acetamida, e outros dois singletos a 3,81 δ e 3,33 δ relacionados aos carbonos das metoxilas, um ligado a um dos carbonos do anel benzênico a 55,4 δ (justificado pela presença de 3 hidrogênios aromáticos) e outro provavelmente ligado a um carbono não aromático a 57,1 δ .

O espectro de RMN ^1H também permitiu assinalar os hidrogênios aromáticos, o H-9 (d a 6,98 δ , J= 8,0 Hz, J= 1,0 Hz), H-10 (t a 7,09 δ , J= 8,0 Hz) e H-11 (d a 6,78 δ , J= 8,0 Hz), com base nos acoplamentos esperados para um sistema indólico com um único substituinte no anel benzênico, semelhante ao composto (9A). Este fato, associado a biogênese dos compostos do tipo aspidospermina [43], a qual relata que a metoxilação ocorre preferencialmente no C-12, permitiu definir o modelo de substituição do anel benzênico da porção indólica do composto 18.

O C-2 foi atribuído como sendo o sinal de um carbono não ligado a hidrogênio a 71,7 δ . Além deste carbono atribuímos os outros três carbonos do mesmo tipo restantes no esqueleto indolina, o C-7 a 58,2 δ , C-8 a 146,3 δ , e C-13 a 130,5 δ .

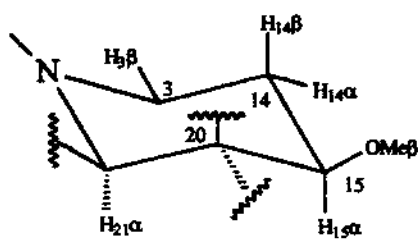
Todos os carbonos metilênicos foram observados pelo experimento de DEPT e os hidrogênios a eles ligados foram assinalados utilizando o experimento em HETCOR. Os sinais a campo mais baixo (3,10-3,40 δ) foram assinalados como H-5 α e H-3 α , como nos compostos 9A e 15. As atribuições individuais foram feitas via espectro de alta resolução a 500 MHz. O que revelou também os modelos de acoplamento destes hidrogênios na forma de um duplo dubleto a 3,26 δ para o H-5 α (J= 5,10 Hz e J= 3,18 Hz) e na forma de um duplo quarteto a 3,18 δ para o H-3 α (J= 13,5 Hz). Os hidrogênios H-14 α e H-14 β foram atribuídos aos sinais a 1,80 e 1,64 δ respectivamente, com base nas informações dos espectros de COSY, HETCOR e por comparação com os dados espectrais da (+)-aspidospermina (9A) e (-)-aspidofractinina (15), Quadros 2 e 4, descritos anteriormente.

Os hidrogênios H-5 β e os vizinhos H-6 α e H-6 β foram atribuídos pelos espectros de COSY e HETCOR, usando H-5 α como ponto de partida. O problema ainda a ser solucionado foi definir corretamente em que posição a segunda metoxila estaria ligada ao anel D.

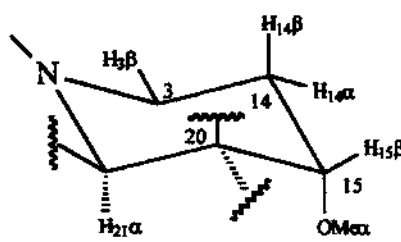
Como os C-3 a 46,2 δ e C-14 a 21,3 δ sofrem uma variação muito pequena nos seus deslocamentos químicos quando comparados ao do modelo não substituído 15, concluímos

que o grupo metoxila não está ligado no C-3 nem no C-14, e sim no C-15, um carbono metínico a 85,6 δ no espectro de DEPT, como também pelo fragmento a m/z 154 no seu espectro de massas. Portanto a inserção da metoxila no carbono 15 induz desproteção α no C-15 ($\Delta\delta = +60,6$) e desproteção nos C-14 ($\Delta\delta = +5,3$) e C-20 ($\Delta\delta = +7,3$) e proteção γ gauche nos carbonos C-19 ($\Delta\delta = -5,8$) e C-3 ($\Delta\delta = -0,7$) e desproteção γ anti no C-21 de ($\Delta\delta = +15,0$).

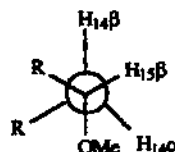
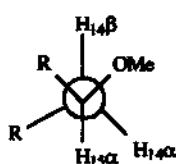
Esta análise mostra que o grupo metoxila se posiciona β (pseudo-equatorial). O espectro de RMN de hidrogênio confirma a posição do grupo metoxila, ou seja as constantes de acoplamento do hidrogênio H-15, um quarteto a 2,85 δ , são $J_{H15-H14\beta} = 10,5$ Hz e $J_{H15-H14\alpha} = 5,5$ Hz, estão de acordo com as constantes de acoplamento previstas para estrutura por nós sugerida anteriormente, onde o grupo metoxila está na posição β (pseudo-equatorial), pois os valores das constantes indicam que o hidrogênio H-15 posiciona-se a um ângulo próximo a 180° em relação ao hidrogênio H-14 β e de aproximadamente 60° do hidrogênio H-14 α [38], conforme o ilustrado no modelo A.



A



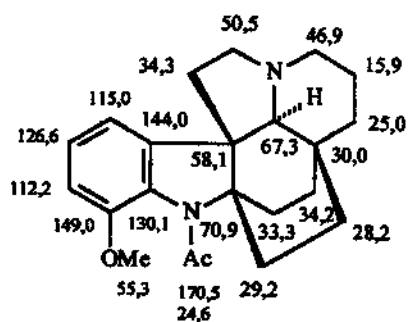
B



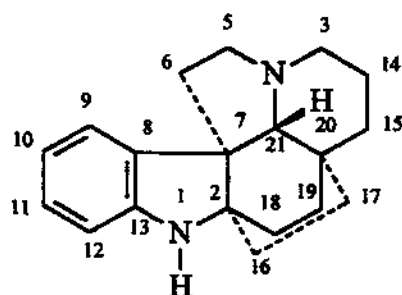
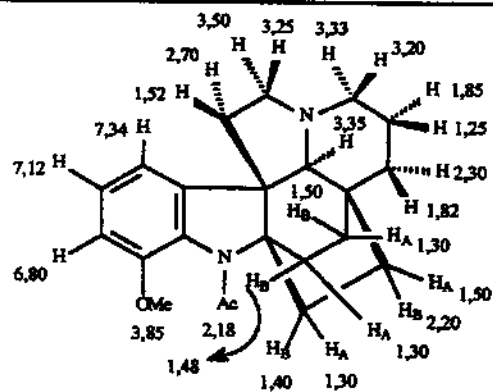
Se o grupo metoxila estivesse na posição α (axial) o arranjo espacial seria o mostrado no modelo B, onde as constantes de acoplamento entre H-15 e H-14 α , H-14 β teriam que ser em torno de $J = 2,7$ Hz e $J = 3,0$ Hz [38] respectivamente. Baseados nestes resultados atribuímos que o H-15 encontra-se na posição α (axial) no anel D.

O espectro de HETCOR permitiu definir os conjuntos de pares de hidrogênios metilênicos ainda não atribuídos, ao sinal referente ao C-16 a 25,4 δ atribuiu-se os hidrogênios H-16A a 2,30 δ e H-16 B 2,65 δ e ao sinal do C-17 a 22,5 δ os prótons H-17A a 1,42 e H-17B a 1,80 δ . E por fim as atribuições do último par de hidrogênios metilênicos que estão ligados ao C-19 a 28,4 δ os hidrogênios H-19A a 1,44 e H-19B a 1,80 δ e ao C-18 a 30,1 δ os hidrogênios H-18A a 1,06 δ e H-18B a 1,98 δ .

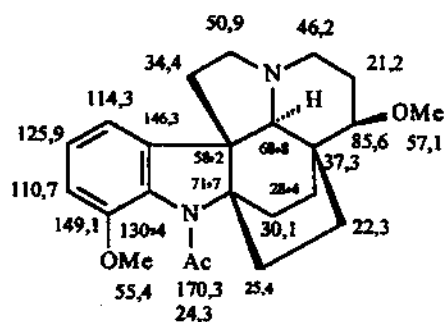
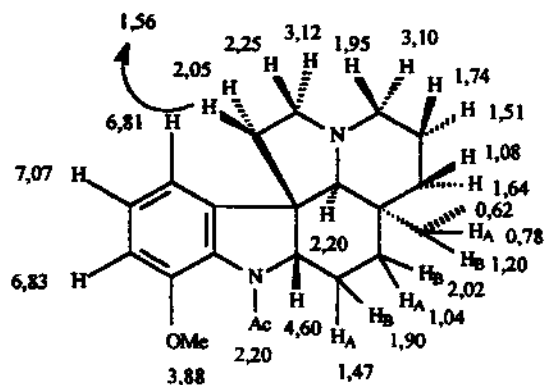
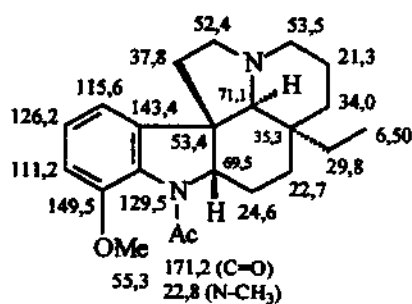
O uso conjunto dos dados físicos e espectrais obtidos para o composto 18 permitiram atribuir-lhe a estrutura da (+)-pirifolina. A obtenção de dados de RMN bidimensionais deste composto a 500 MHz, foi de grande importância na atribuição dos espectros de RMN ^1H dos compostos 16 e 17 (Quadros 5 e 6).



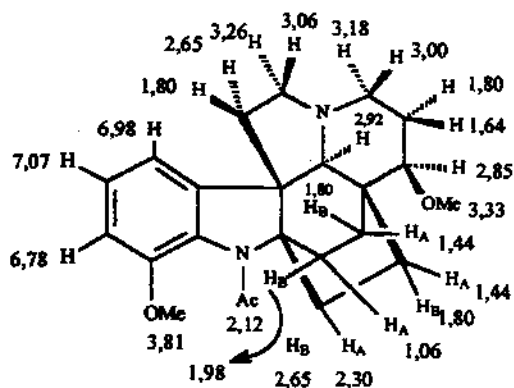
(+)-15-desmetoxi-pirifolina (17)



(+)-aspidospermina (9A)



composto (18)

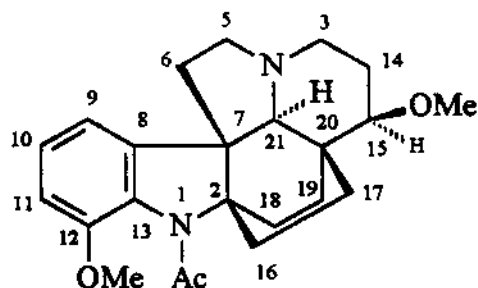


Quadro 7. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (18) e dos compostos modelos 15-desmetoxi-pirifolina (17) e (+)-aspidospermina (9A).

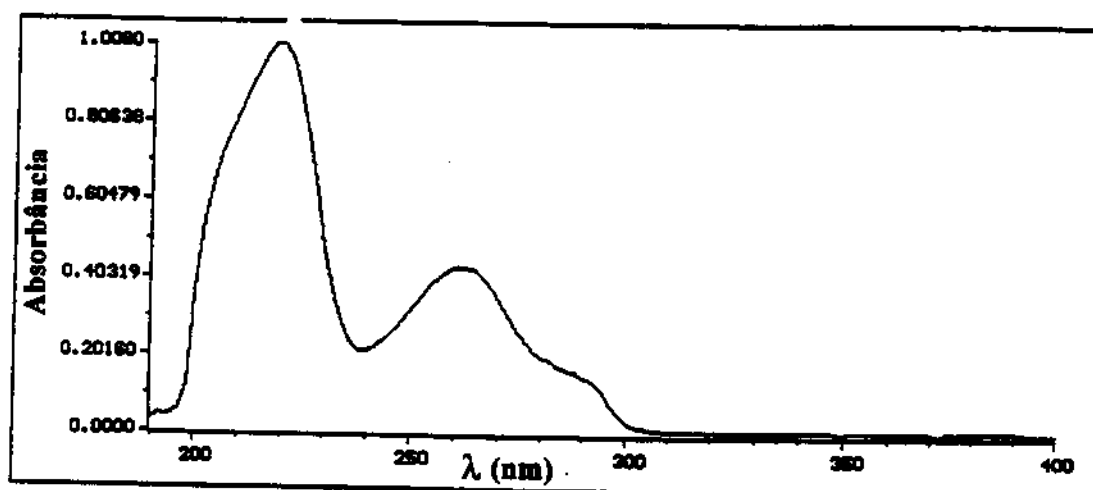
(+)-*pirifolina* (18): Cristais, P.F. = 100-102 °C (Hexano); P. F. lit. = 138-140 °C, ref. [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = +182,8$ ($c = 0,38$, CHCl_3); $[\alpha]_D^{25} = +105,0$ (CHCl_3), ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1650 ($\nu_{\text{N-C=O}}$). UV λ_{max} nm: 288 ($\log \epsilon = 4,10$), 262 ($\log \epsilon = 3,50$), 216 ($\log \epsilon = 3,88$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,18 (1H, dq, $J = 13,5$ Hz, H-3 α), 3,00 (1H, m, H-3 β), 3,26 (1H, dd, $J = 3,5$ Hz, $J = 5,1$ Hz, H-5 α), 3,18 (1H, q, $J = 16,0$ Hz, $J = 5,1$ Hz, H-5 β), 2,65 (1H, m, H-6 α), 1,80 (1H, m, H-6 β), 6,98 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,0$ Hz, H-9), 7,09 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-10), 6,78 (d, $J = 8,0$ Hz, H-11), 1,80 (1H, m, H-14 α), 1,64 (1H, m, H-14 β), 2,85 (1H, q, $J = 10,5$, $J = 5,5$ Hz, H-15 α), 2,30 (1H, m, H-16A), 2,65 (1H, m, H-16B), 1,42 (1H, m, H-17A), 1,80 (1H, m, H-17B), 1,06 (1H, m, $J = 9,2$ Hz, H-18A), 1,98 (1H, m, H-18B), 1,44 (1H, tq, H-19A), 1,80 (1H, m, H-19B), 2,92 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-21 α), 2,12 (3H, s, NCOMe), 3,33 (3H, s, C-15-OMe), 3,81 (3H, s, C-12-OMe). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 71,7 (C-2), 46,2 (C-3), 50,9 (C-5), 34,6 (C-6), 58,2 (C-7), 146,3 (C-8), 114,3 (C-9), 125,9 (C-10), 110,7 (C-11), 149,1 (C-12), 130,5 (C-13), 21,3 (C-14), 85,6 (C-15), 25,4 (C-16 *), 22,5 (C-17 *), 30,1 (C-18 #), 28,4 (C-19 #), 37,3 (C-20), 68,8 (C-21), 24,6 (NCOCH $_3$), 57,1 (C-15-OCH $_3$), 55,4 (C-12-OCH $_3$). CG/EM m/z (A. R. %): 382 (100), 354 (20), 154 (40), 139 (18), 109 (20).

* - a atribuição pode estar invertida

- a atribuição pode estar invertida



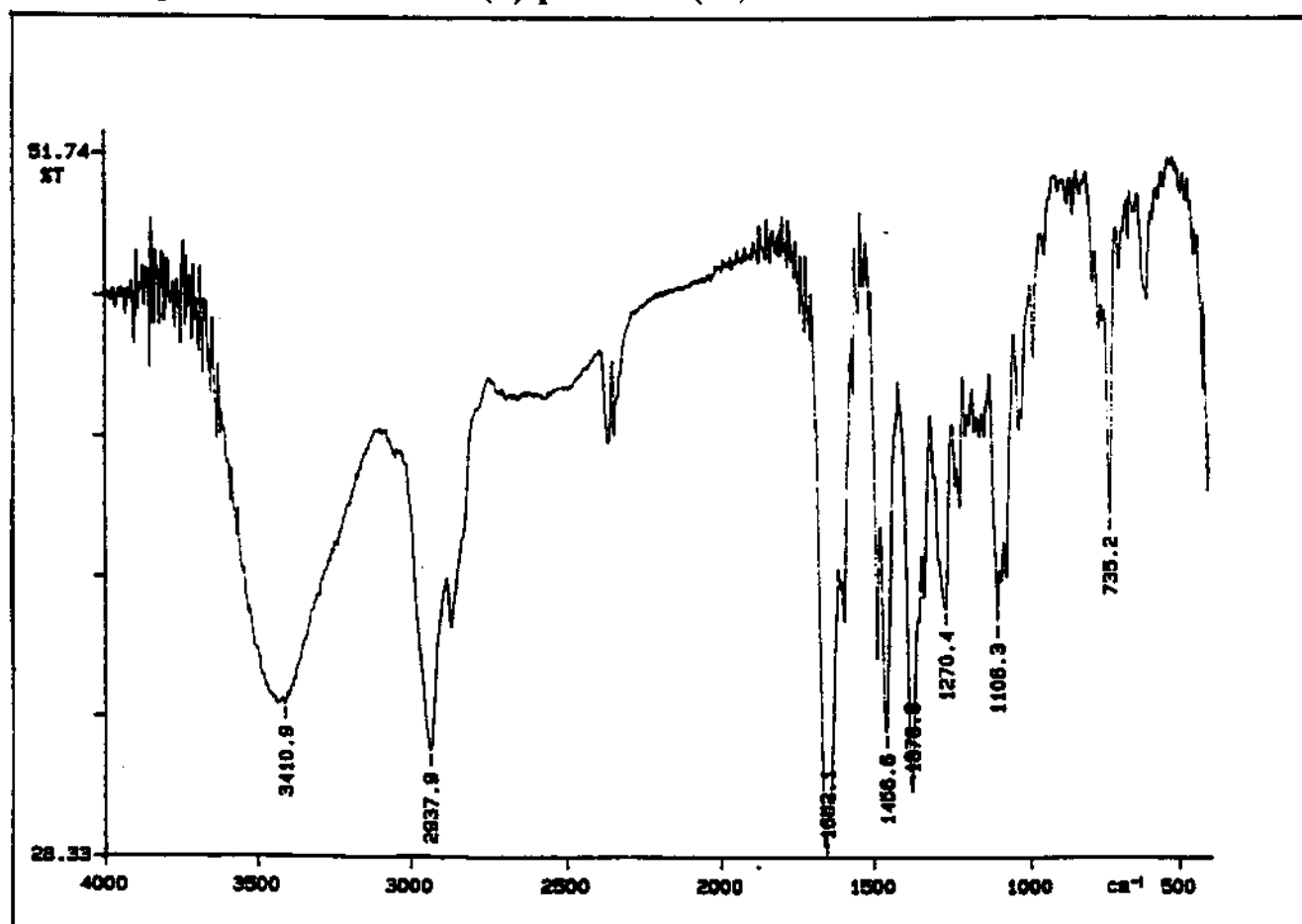
(+)-pirifolina



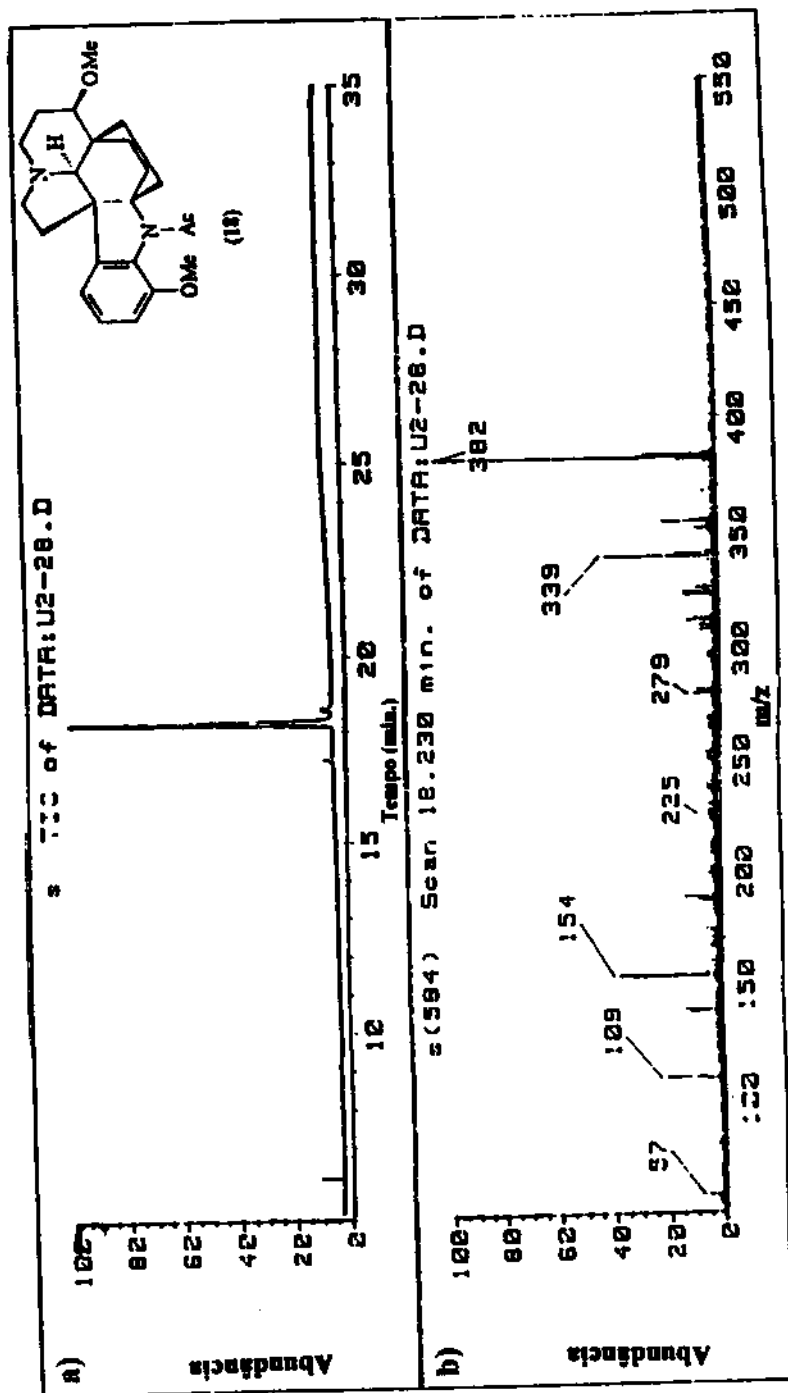
Marked Wavelengths

Reg A: L 288 = 0.15717
 Reg A: L 262 = 0.43277
 Reg A: L 240 = 0.21492
 Reg A: L 220 = 1.0076

Espectro no UV-VIS da (+)-pirifolina (18).



Espectro no Infravermelho da (+)-pirifolina (18).



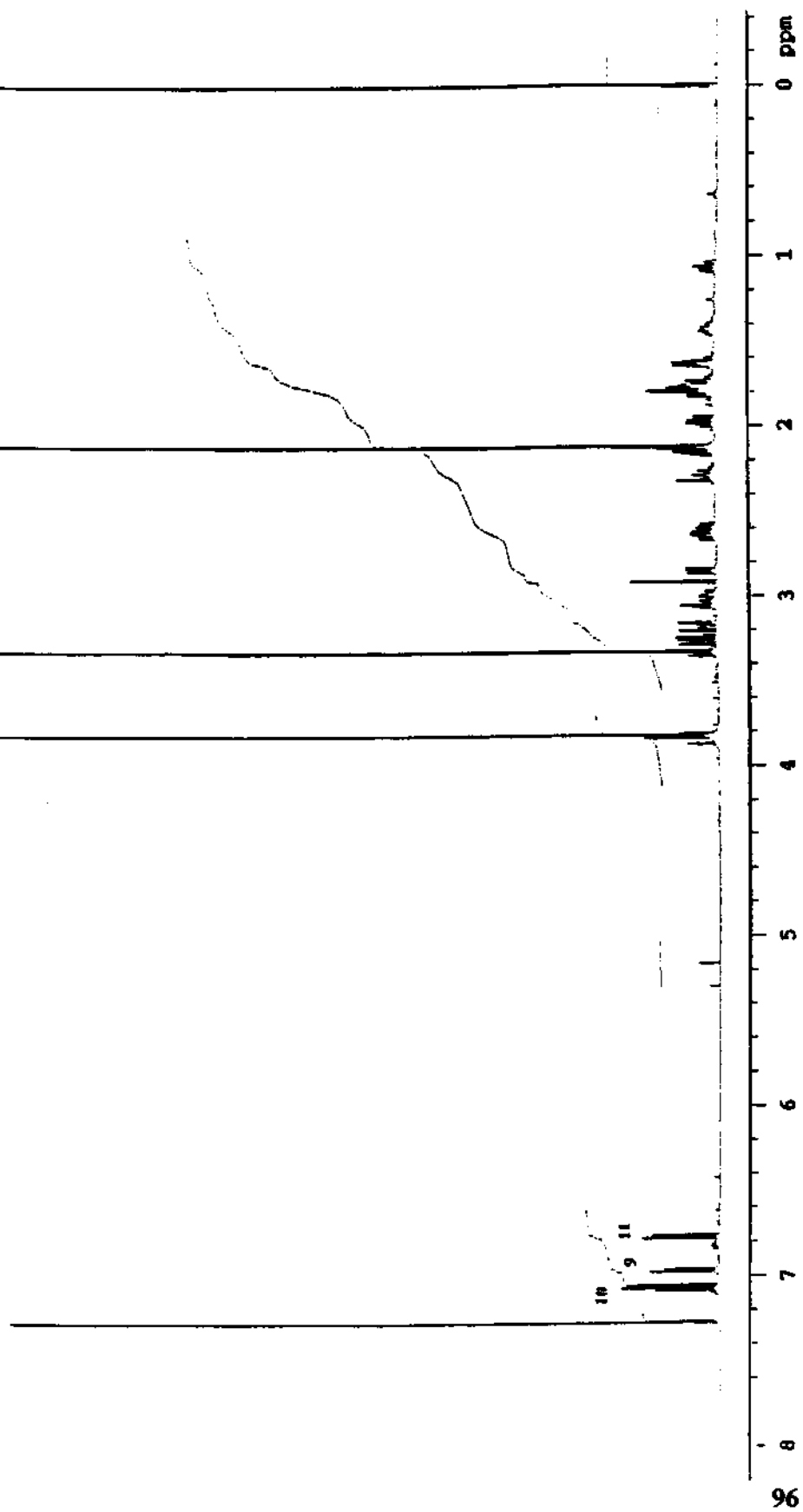
a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (+)-pirifolina (18).

b) Espectro de massas da (+)-pirifolina (18).

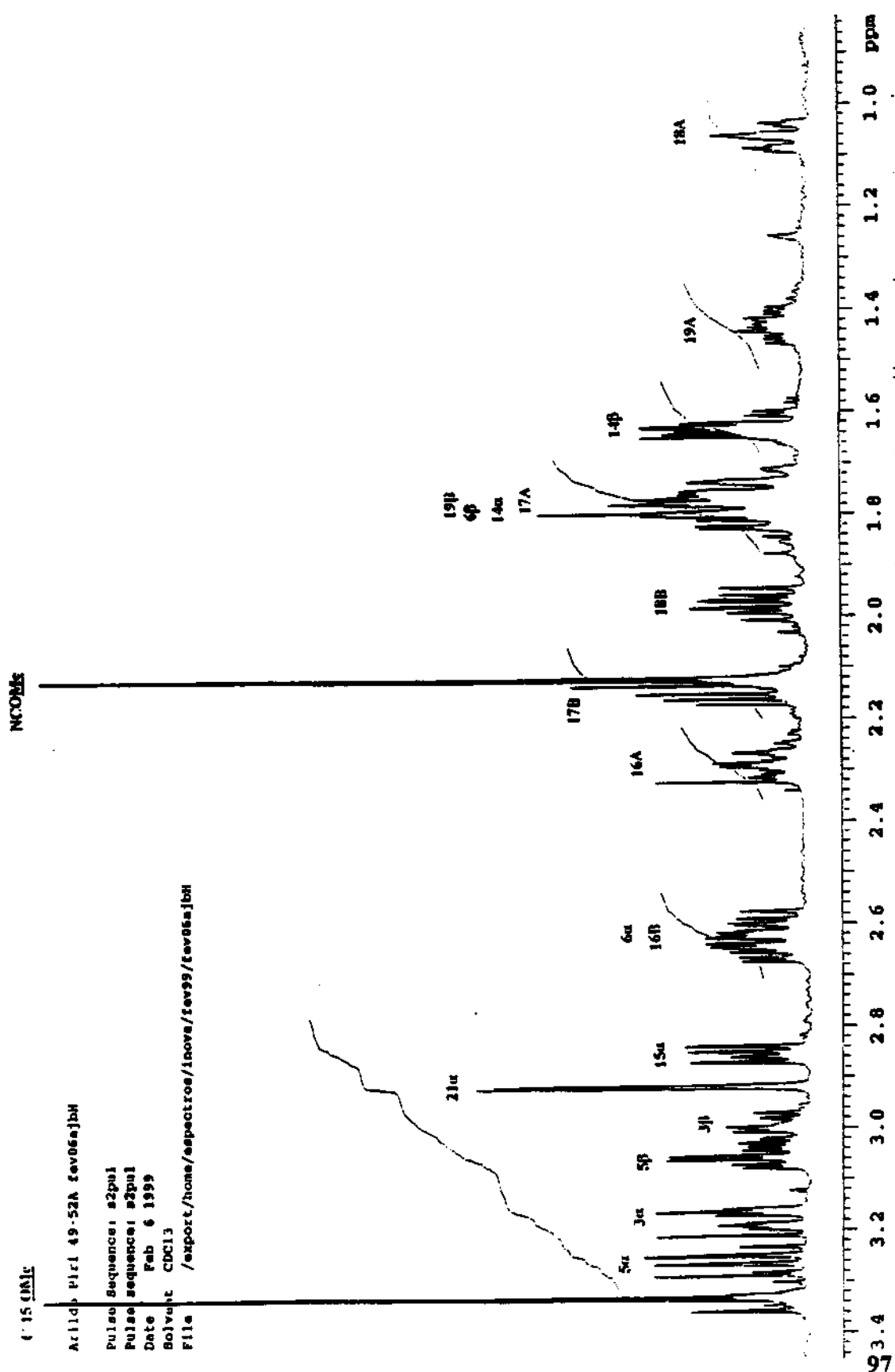
C-12-ONE

Arquivo Plr1 48-52A fav06a1b1b

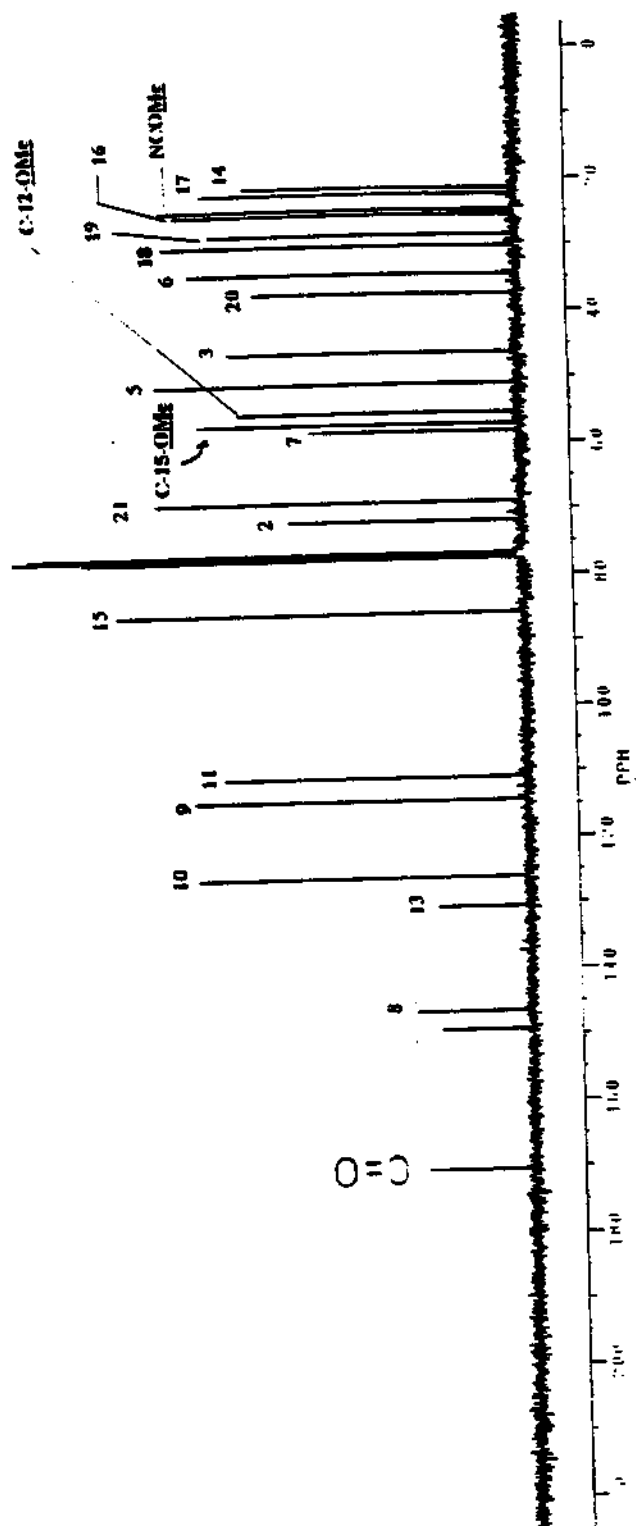
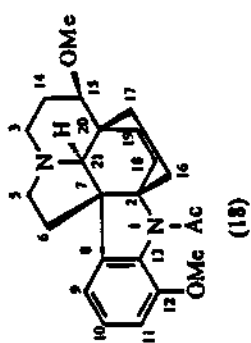
Pulse Sequencia: s2pu1



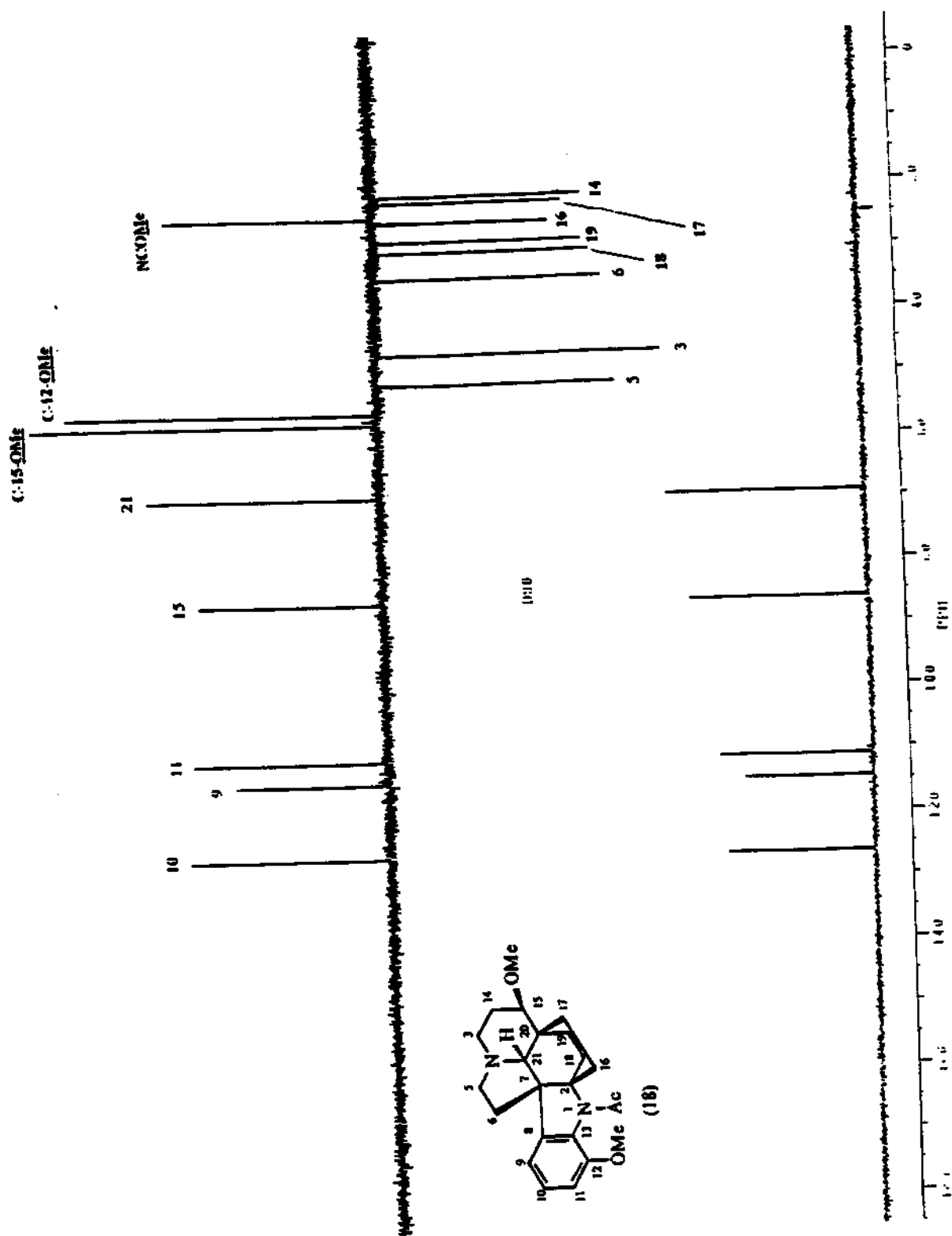
Espectro de RMN ¹H da (+)-pirifolina (18).



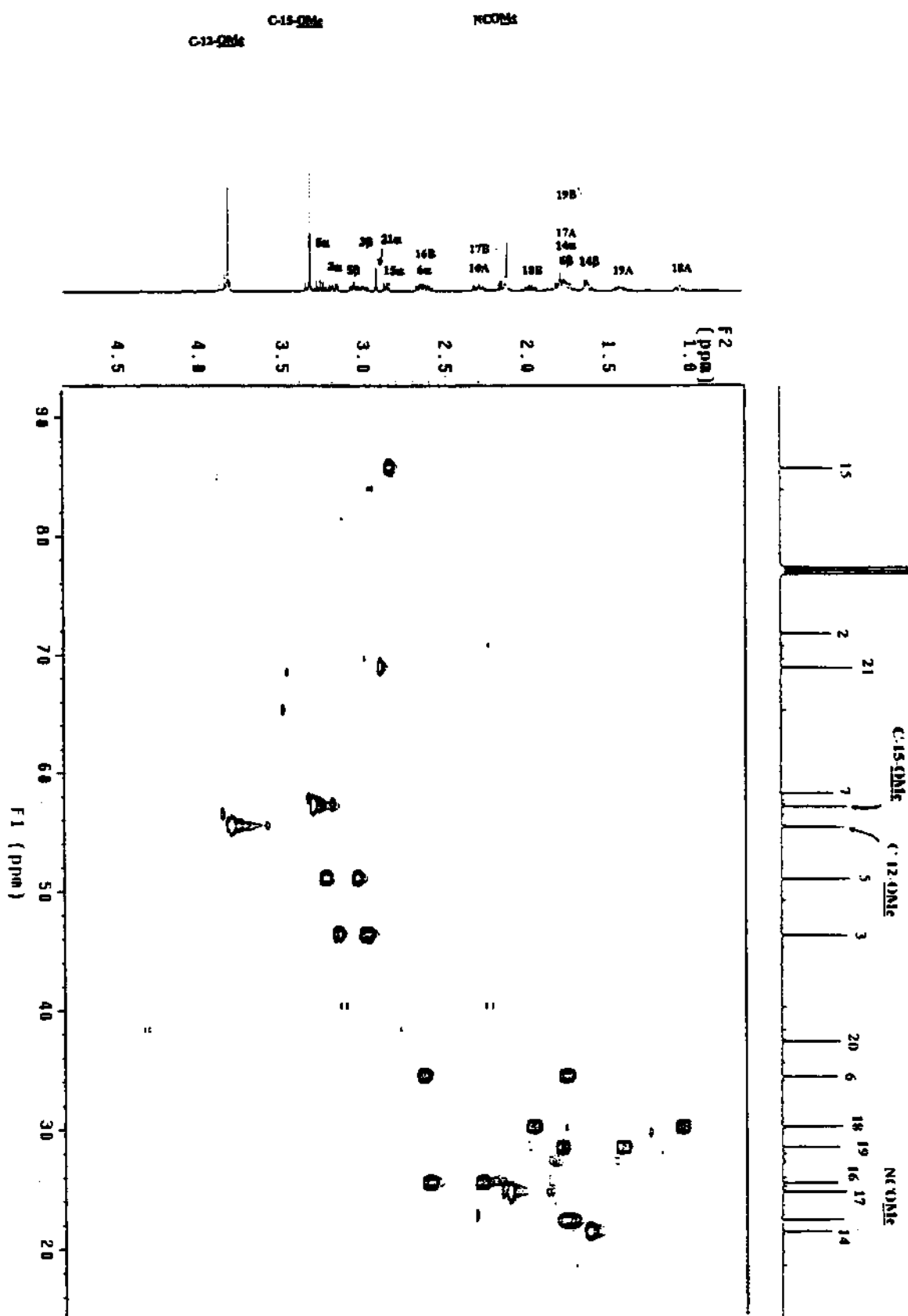
Espectro de RMN ^1H da (+)-pirifolina (18) ampliado de 1,0-3,4 ppm.



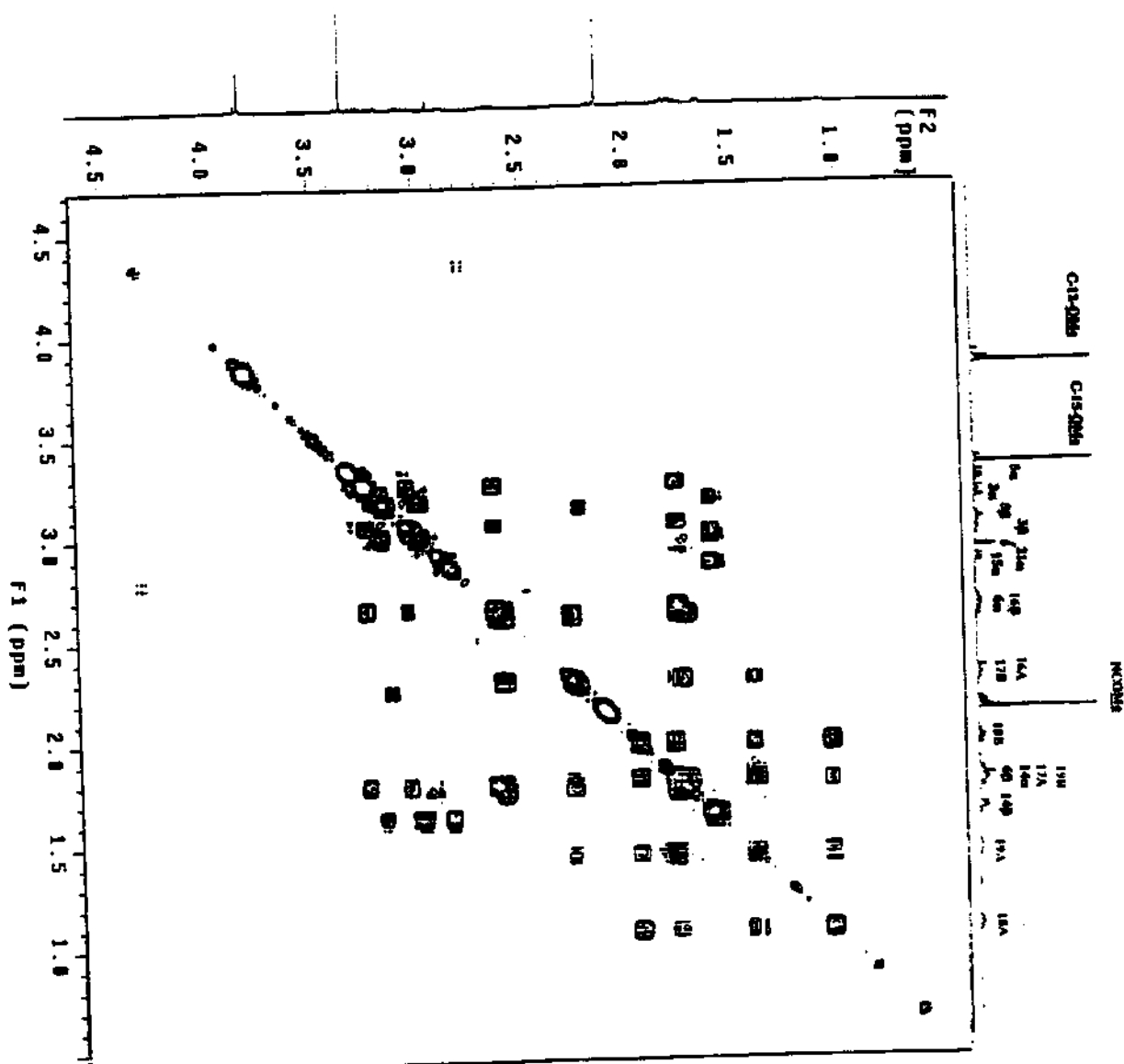
Espectro de RMN ^{13}C da (+)-pirifolins (18).



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (+)-pirifolina (18).



Espectro de correlação C-H (HETCOR) da (+)-pirifolina (18).
ampliado de δ 0.00-90,0.

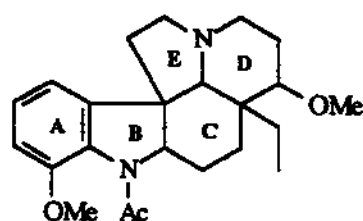


Espectro de correlação H-H (COSY) da (+)-pirifolina (18),
Ampliado de δ 0,00-4,50.

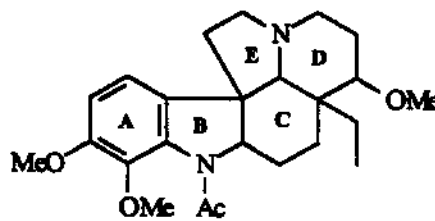
2.1.3. Obtenção de padrões em *A. pyrifolium*.

Seis alcalóides conhecidos foram isolados de *A. pyrifolium*, Tabela 4. As estruturas dos alcalóides conhecidos são: (+)-aspidospermina (9A), (+)-pirifolidina (14), (-)-aspidofilina (16), (+)-15-desmetóxi-pirifolina (17) e (+)-pirifolina (18), foram estabelecidos a partir de seus dados físicos e espectrais ou por comparação com padrões autênticos. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 4. O composto aspidofractinina (15), não havia sido isolado em nenhum dos estudos realizados anteriormente com esta espécie [40,45,46].

O estudo fitoquímico permitiu também o isolamento e elucidação estrutural de dois alcalóides inéditos: 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15-metóxi-pirifolidina (20). Estes compostos foram observados pela primeira vez quando realizou-se a análise qualitativa por CG/EM desta espécie [34], nesta sugeriu-se que os mesmos deveriam apresentar as estruturas planares mostradas abaixo.



estrutura planar proposta para
a 15-metóxi-aspidospermina



estrutura planar proposta para
a 15-metóxi-pirifolidina

A seguir iremos discutir a atribuição das estruturas de cada um destes compostos separadamente.

Tabela 4. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. pyriforme*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
<u>(+)-pirifolidina (14)</u>	+++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(-)-aspidofractinina (15)</u>	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(-)-aspidofilina (16)</u>	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(+)-15-desmetóxi-pirifolina (17)</u>	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(+)-pirifolina (18)</u>	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(+)-aspidospermina (9A)</u>	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<i>15-metóxi-aspidospermina (19)</i>	+	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<i>15-metóxi-pirifolidina (20)</i>	+	IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

italico - composto inédito

Composto (15) - (-)-aspidofractinina:

Este composto foi obtido como um sólido, P.F. 116-120 °C, e o valor da rotação óptica, realizada em CHCl₃ em 25 °C, foi de -27,7 °. Os seus dados cromatográficos (CG, CLAE, CCD) e espectrais foram idênticos aos obtidos para o composto 15 isolado de *A. olivaceum*, o que levou-nos a atribuir a este composto também a estrutura da (-)-aspidofractinina.

Composto (19) - 15-metóxi-aspidospermina:

Um aspecto a ressaltar é que os compostos 19 e 20 foram isolados, inicialmente na forma de uma mistura (1:1) entre eles, de separação muito difícil, para que as atribuições pudessem ser realizadas efetuamos repetidas purificações procurando fazer com que um dos a um dos componente permanecesse em excesso. Após este processo, a partir dos compostos foram obtidos os dados espectrais para cada um deles. As Figuras 9 a,b ilustram este processo, mostrando os espectros de RMN ¹H do composto 19 antes e após este procedimento e as Figuras 9 c,d,e,f mostram os cromatogramas destas misturas e seus respectivos espectros de massas.

No espectro na região do infravermelho de 19 pode-se observar uma banda de absorção a 1651 cm⁻¹, característica de uma carbonila de amida [38]. A banda de absorção a 3439 cm⁻¹ deve ser relacionada a presença de umidade na amostra, isto é observado também no espectro de RMN ¹H a 1,3 δ.

O espectro no UV com máximos a 288 nm, 256 nm e 222 nm é característico de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um ion molecular a m/z 384, correspondendo a uma fórmula molecular C₂₃H₃₂N₂O₃, o fragmentos a m/z 356 [M⁺ - 28], e os fragmentos piperidínicos a m/z 154 (pico base) e 182, mostra ser um composto pentacíclico [17, 18, 43]. Este é um espectro de massas típico de um composto derivado da aspidoespermina 9A [17 18]. Os fragmentos piperidínicos análogos aqueles de 14, só que com 30 unidades de

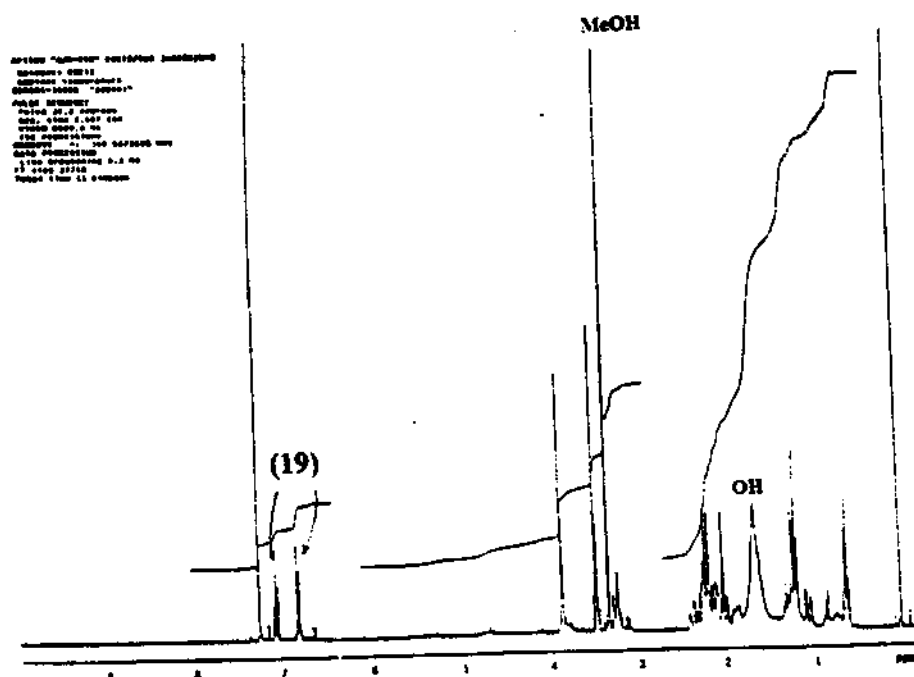
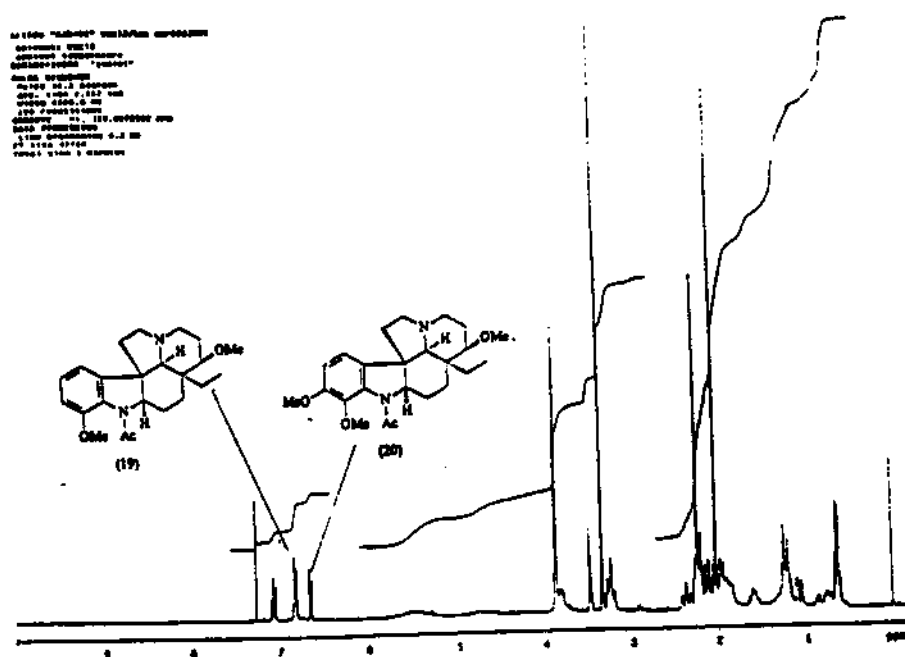


Figura 9a Espectro de ^1H NMR da mistura de 19 e 20 antes do enriquecimento.
Figura 9b. Espectro de ^1H NMR do composto 19 enriquecido.

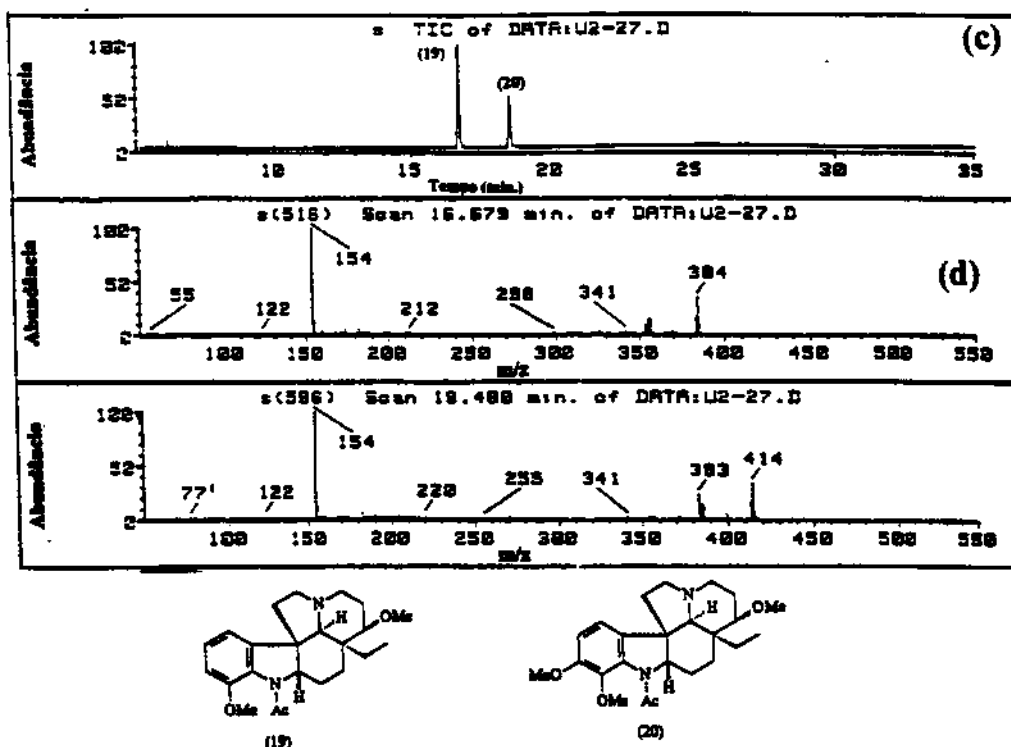


Figura 9c. Cromatograma do composto (19) antes do enriquecimento.
Figura 9d. Espectros de massas dos compostos (19) e (20).

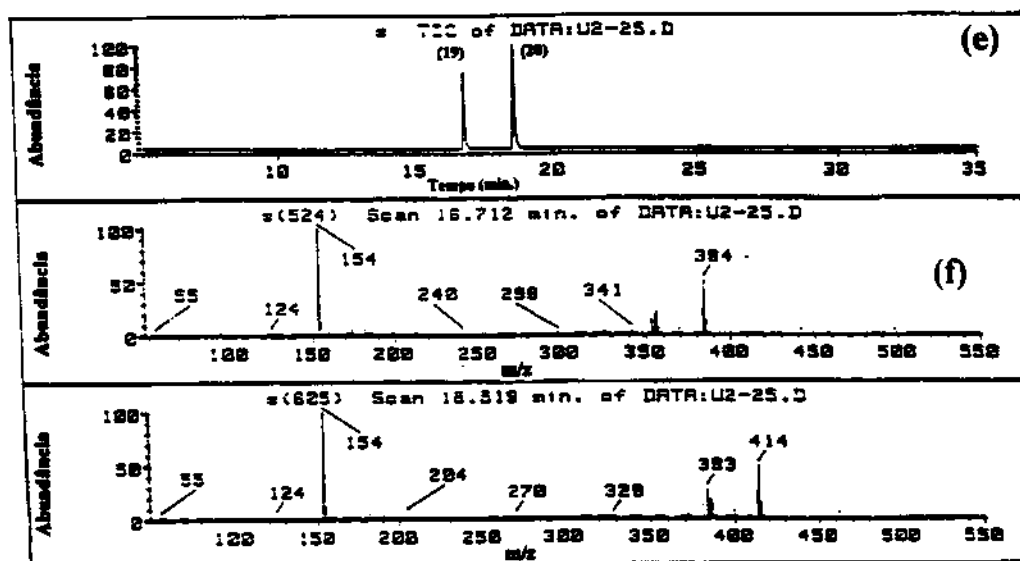


Figura 9e. Cromatograma do composto (20) antes do enriquecimento.
Figura 9f. Espectros de massas dos compostos (19) e (20).

massa a mais. Este fato levou-nos a sugerir que estas 30 unidades adicionais sejam referentes a uma metoxila ligada ao anel D, Figura 10. Este conjunto de dados anteriormente descritos e a detecção do composto (+)-pirifolina (18) nos extratos desta espécie, que apresenta também uma metoxila ligada ao C-15 do anel D, levou a mais uma evidência para a estrutura 19.

As atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C de 19 foram realizadas usando-se o experimento de DEPT e o experimento em COSY foi imprescindível para a identificação do composto por comparação com os dados de RMN ^1H , ^{13}C obtidos para os compostos (+)-aspidospermina (9A), (+)-pirifolidina (14) e (+)-pirifolina (18), Quadros 2, 3 e 7, com o objetivo de confirmar a estrutura.

O RMN ^1H mostrou a presença de três grupos metila, um singlete a 2,22 δ da metila do grupo N-acetamida com sinal de carbono a 22,9 δ , e outros dois singletos um a 3,90 δ , a metoxila ligada a um dos carbonos do anel benzênico a 53,5 δ , e o outro singlete a 3,23 δ com o carbono a 56,5 δ referente a metoxila ligada ao anel D.

O espectro de RMN ^1H permitiu também atribuir os prótons aromáticos do H-9 (d a 6,82 δ , $J=8,1$ Hz), H-10 (t a 7,08 δ , $J=8,1$ Hz) e H-11 (d a 6,82 δ , $J=8,1$ Hz), com base nos acoplamentos esperados para um sistema indólico com um substituinte no anel benzênico.

O espectro de RMN ^1H apresenta um sinal largo a 4,65 δ referente ao próton H-2 β , cujo carbono metínico mostra sinal em 66,04 δ . A atribuição dos outros carbonos restantes no esqueleto indolina foi feita, o C-7 mostra sinal a 53,7 δ os carbonos aromáticos não ligados a hidrogênio não foram observados pela baixa concentração da amostra.

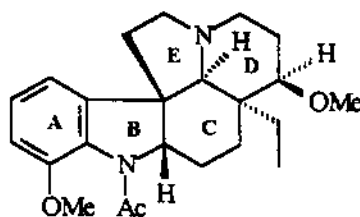
Todos os carbonos metilênicos foram revelados pelo experimento de DEPT, os prótons a eles ligados foram revelados pelos deslocamentos químicos, modelos e constantes de acoplamento e por comparação com os deslocamentos químicos dos compostos (+)-aspidospermina (9A) e pirifolina (18), Quadros 2 e 7 e 8 (pag. 106). Os sinais em campo mais baixo (3,5-3,28 δ) foram assinalados como os prótons H-5 α a 3,48 δ , H-3 α a 3,28 δ e H-15 α a 3,22 δ , cuja atribuição será discutida em mais detalhes a seguir e os prótons H-14 α e H-14 β foram atribuídos aos sinais a 2,00 e 1,60 δ .

O próton H-5 β e os prótons vizinhos também foram atribuídos de maneira similar.

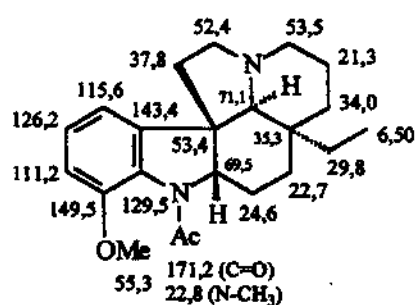
Como descrito anteriormente no caso da (+)-pirifolina (18) o problema neste caso também foi definir corretamente em que posição a segunda metoxila estaria ligada no anel D. Como os deslocamentos químicos de C-3 a δ 52,8 e C-14 a δ 24,0 apresentaram uma variação muito pequena, quando comparados com os da (+)-aspidospermina (9A), que não possui a metoxila ligada no anel D, concluímos que a metoxila só poderia estar ligada ao C-15. A última dúvida a ser esclarecida foi a estereoquímica relativa do H-15 e do grupo metoxila em relação ao anel D. As constantes de acoplamento para o hidrogênio H-15 um multipeto a 3,12 δ , com $J = 14,5$ Hz e 7,0 Hz, estão de acordo com os valores esperados quando o hidrogênio H-15 está posicionado α em relação ao anel D, conforme já discutido anteriormente para o composto (+)-pirifolina (18). Baseado nestes resultados atribuímos que o hidrogênio H-15 está na posição α em relação ao anel D.

Os outros conjuntos de hidrogênios metilênicos ainda não atribuídos, ao sinal referente ao C-16 a 22,5 δ atribuímos os hidrogênios a 1,10 (A) e 2,18 (B) δ , e ao C-17 a 24,5 δ os hidrogênios a 1,30 (A) e 2,04 (B) δ . E por fim a atribuição dos hidrogênios metilênicos ligados ao C-19 a 29,9 δ , os sinais a 0,75 (A) e 1,22 (B) δ .

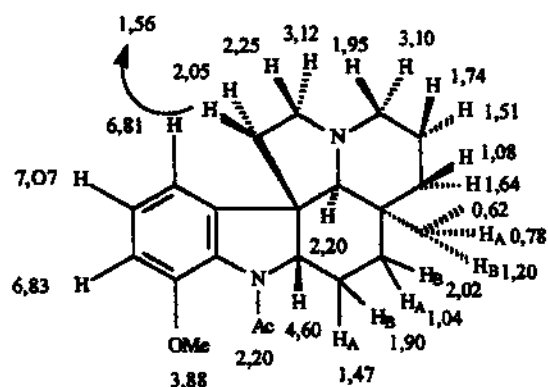
Embora não tenhamos conseguido localizar os carbonos aromáticos não ligados a hidrogênio e o carbono carbonílico da acetamida o uso conjunto dos dados espectrais de 19, Quadro 8 (pag. 109), e dos dados dos compostos 9A e 18 permitiram propor para o composto a estrutura mostrada a seguir, a qual nós denominamos de 15-metóxi-aspidospermina.



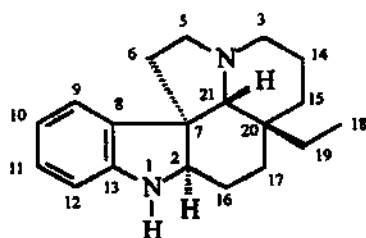
15-metóxi-aspidospermina



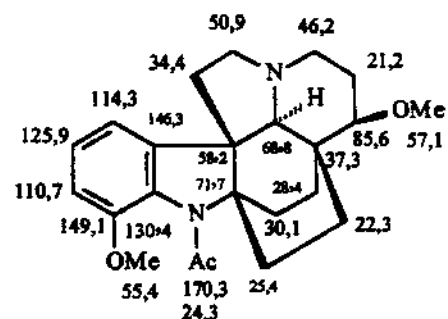
(+)-aspidospermina (9A)



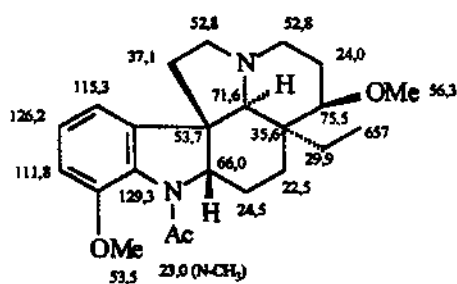
(+)-aspidospermina (9A)



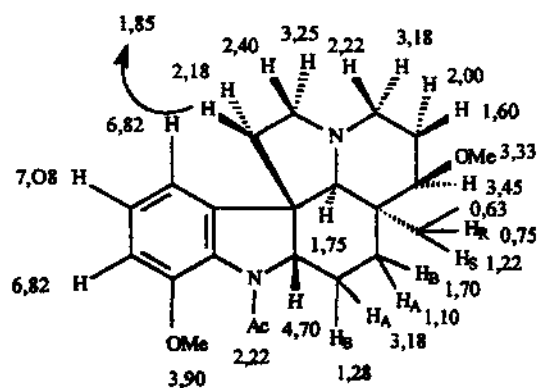
(33)



(+)-pirifolina (18)



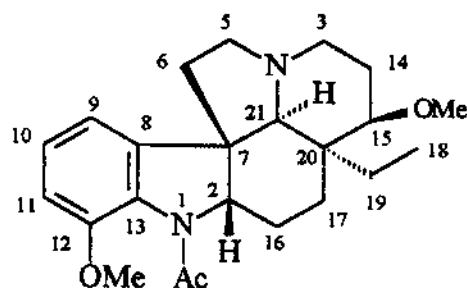
15-metóxi-aspidospermina (19)



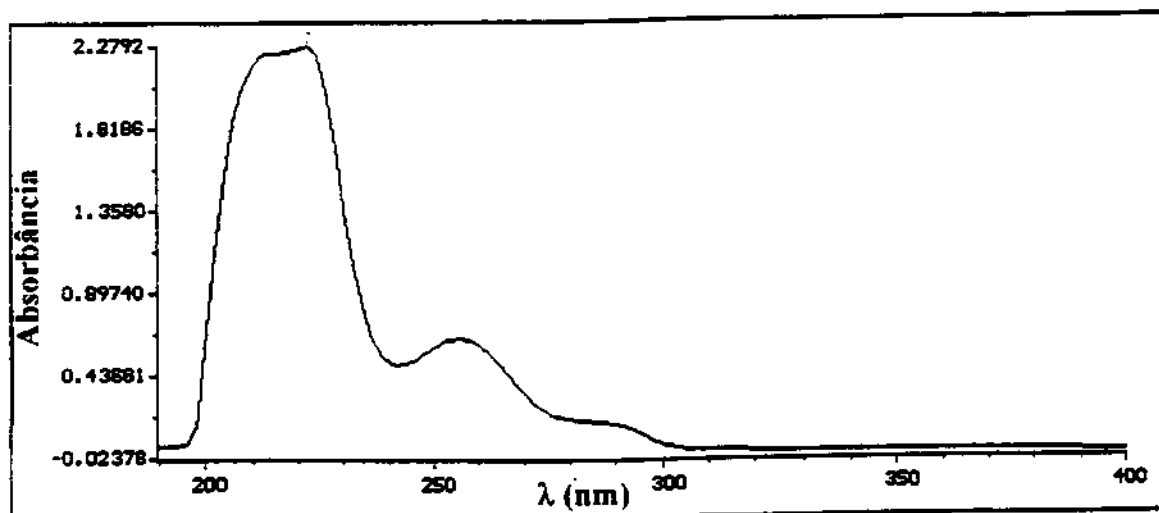
15-metóxi-aspidospermina (19)

Quadro 8. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 15-metóxi-aspidospermina (19) e da (+)-aspidospermina (9A) isolados de *A. pyriforme*.

(+)-15-metóxi-aspidospermina (19): IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1651 (N-C=OMe). UV λ_{max} nm: 288, 256, 222. RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,70 (1H, s, H-2 α), 3,28 (1H, m, H-3 α), 2,22 (1H, H-3 β), 3,48 (1H, m, H-5 α), 2,40 (1H, m, J = 13,8 Hz, H-5 β), 2,20 (1H, m, H-6 α), 1,80 (1H, m, H-6 β), 6,82 (2H, t, J = 8,0, H-9 e H-11), 7,08 (1H, d, J = 8,0, H-10), 3,90 (3H, s, 12-OMe), 2,00 (1H, H-14 α), 1,60 (1H, m, H-14 β), 3,22 (1H, m, J = 14,5 Hz e J = 7,0 Hz, H-15 α), 1,30 (1H, m, H-16A), 2,04 (1H, m, H-16B), 1,10 (1H, dq, J = 14,7, H-17A), 2,18 (1H, m, H-17B), 0,63 (3H, t, J = 6,9, H-18), 0,75 (1H, q, J = 6,9, H-19A), 1,22 (1H, m, H-19B), 2,20 (1H, s, H-21 α), 2,22 (3H, s, NC=OMe), 3,33 (3H, s, C-15-OMe). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 66,0 (C-2), 52,8 (C-3), 52,8 (C-5), 37,1 (C-6), 53,7 (C-7), 143,3 (C-8), 115,3 (C-9), 126,2 (C-10), 111,8 (C-11), 149,5 (C-12), 130,1 (C-13), 24,0 (C-14), 75,5 (C-15), 24,5 (C-16), 22,5 (C-17), 6,57 (C-18), 29,9 (C-19), 35,6 (C-20), 71,6 (C-21), 171,2 (N-C=O), 53,5 (12-OMe), 56,3 (15-OMe), 23,0 (NCOMe). CG/EM m/z (A. R. %): 384 (40), 356 (20), 154 (100).



(+)-15-metóxi-aspidospermina



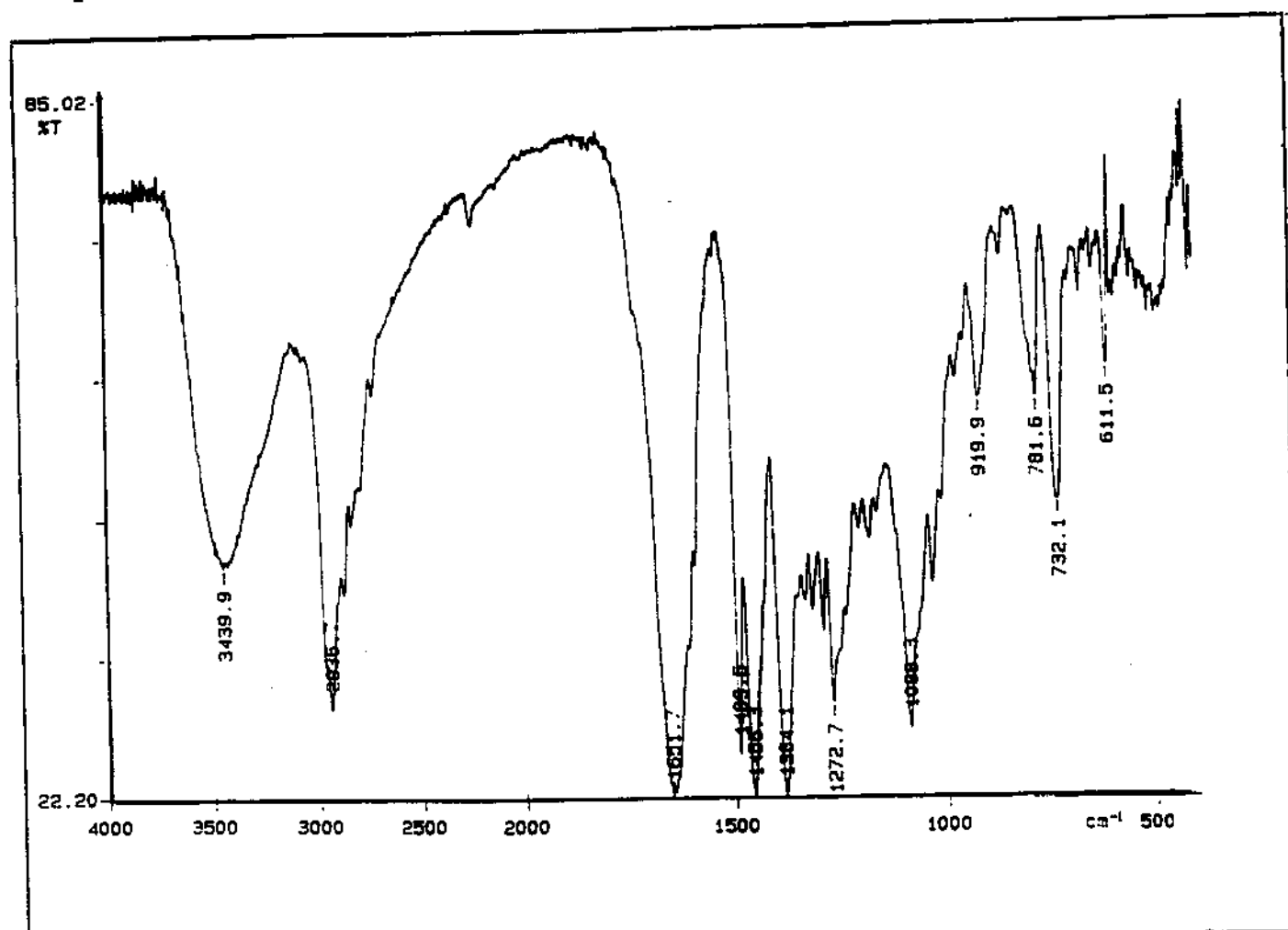
Marked Wavelengths

Reg A: L 288 = 0.17198

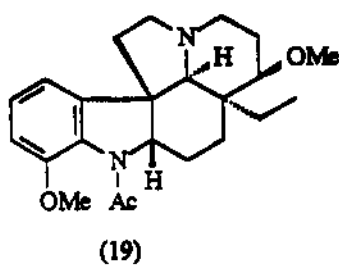
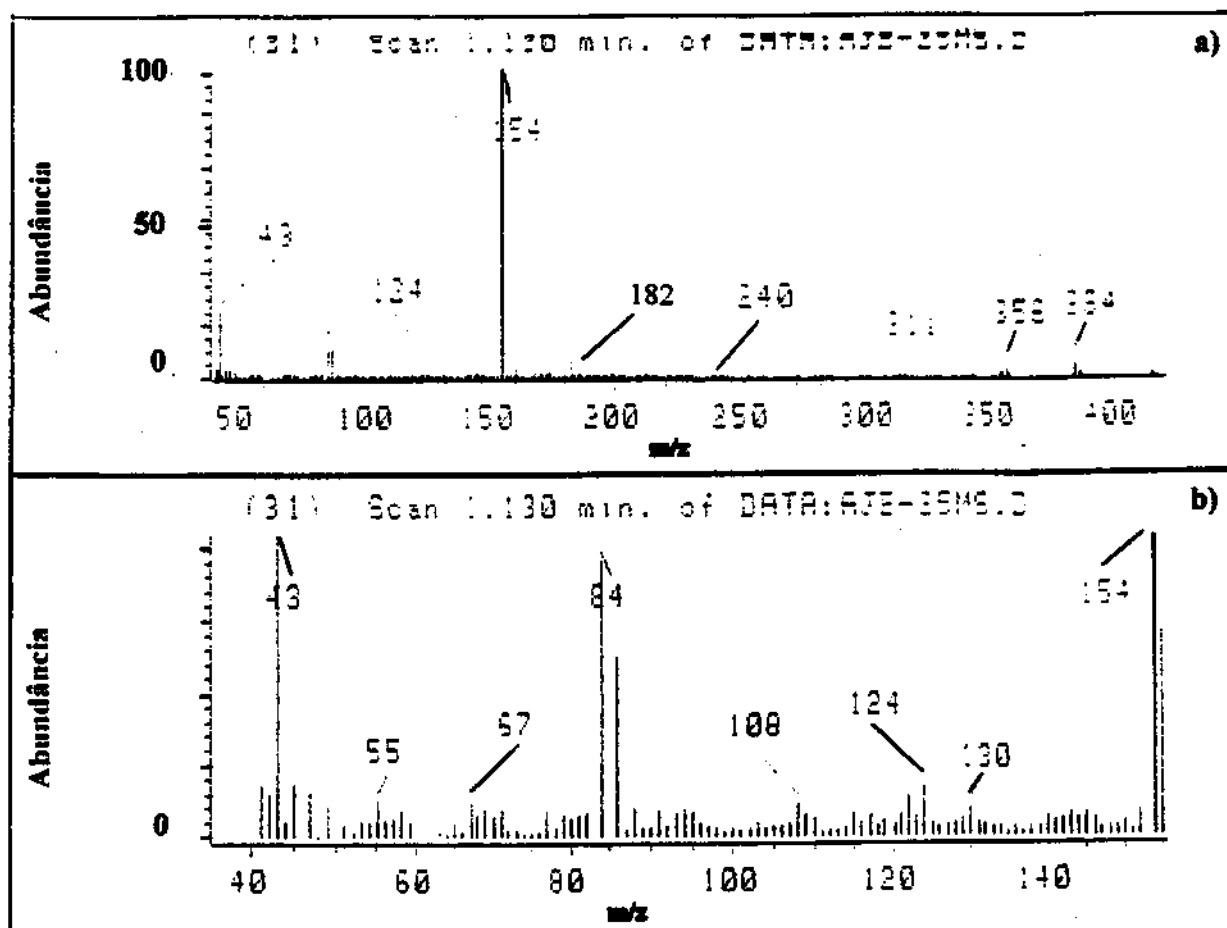
Reg A: L 256 = 0.64055

Reg A: L 222 = 2.2792

Espectro no UV-VIS da 15-metóxi-aspidospermina (19).



Espectro no Infravermelho da 15-metóxi-aspidospermina (19).



Espectro de Massas de Alta Resolução da 15-metóxi-aspidospermina (19).

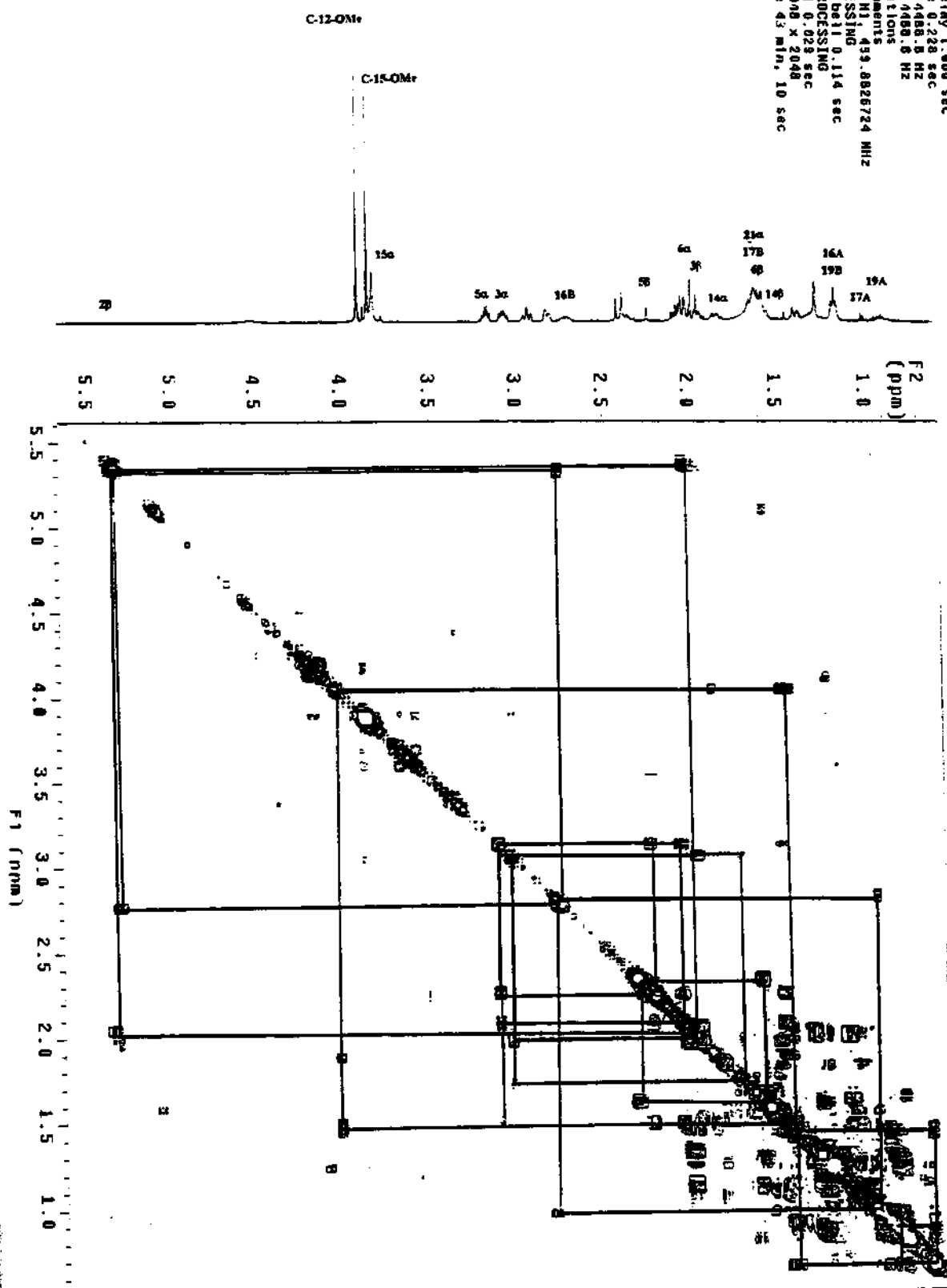
a) Espectro de massas total.

b) Espectro de massas ampliado de m/z 40 a m/z 160.

(19)

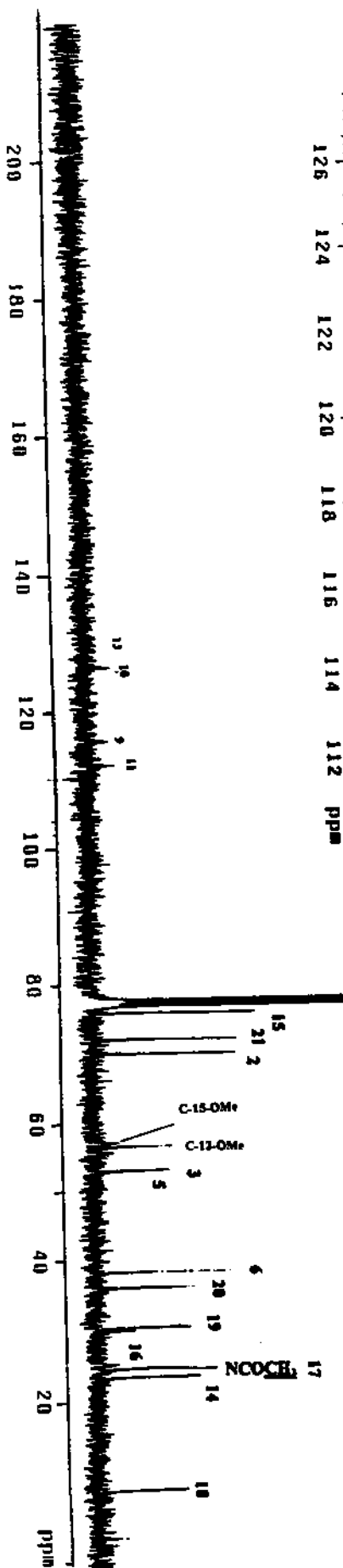
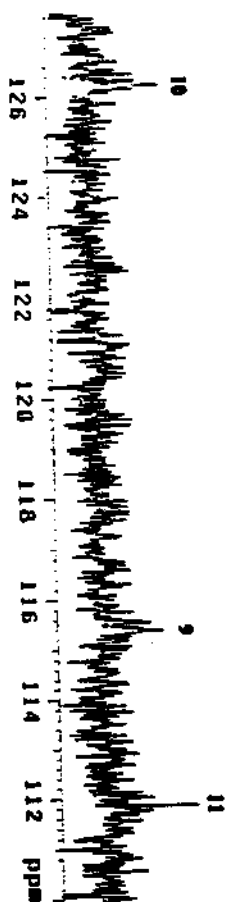
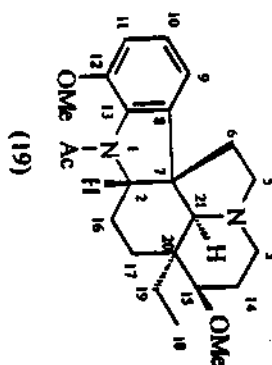


Ar1140 d1j1226 jun27a1j00SY
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 INOVA-500 "INOVA500"
 PULSE SEQUENCE: gCOSY
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.228 sec
 Width 4068.8 Hz
 2D Width 4068.8 Hz
 16 repetitions
 128 increments
 OBSERVE: H1 459.8826724 MHz
 DATA PROCESSING
 Sg. time bet 0.114 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bet 0.028 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 43 min, 10 sec



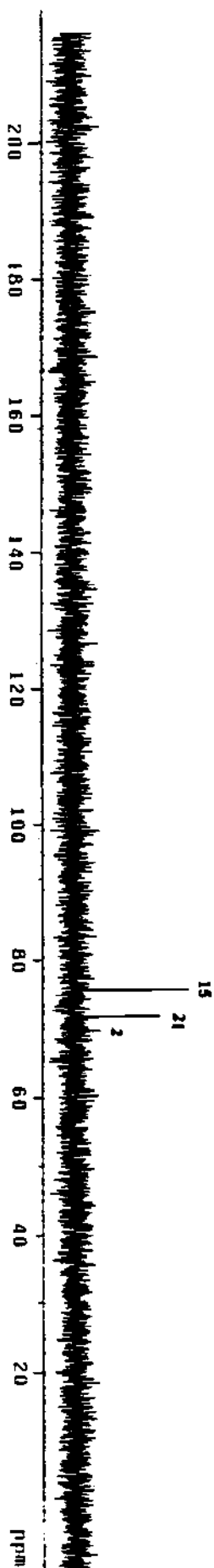
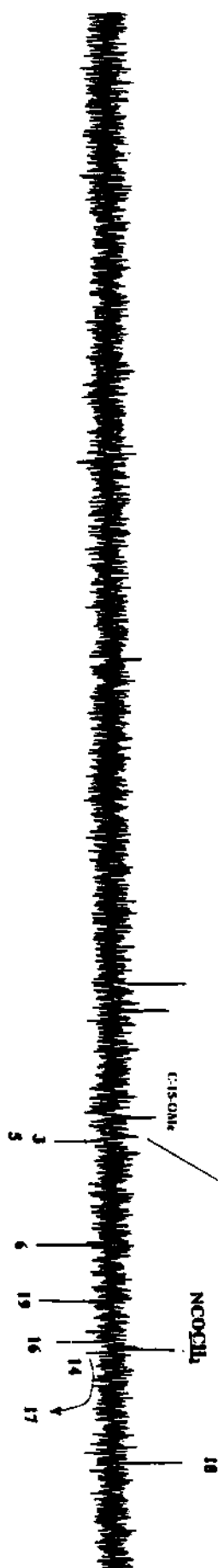
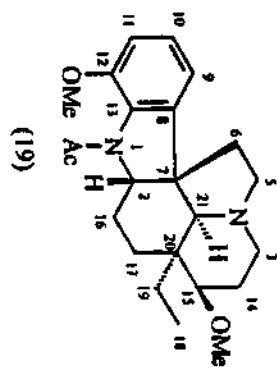
Espectro de correlação H-H (COSY) da 15-metóxi-aspidospermina (19)

Pulse: 44.6 degrees
 Acq. time: 1.000 sec
 Width: 20000.0 Hz
 29140 repetitions
 OBSERVE: C13, 75.451911 MHz
 HECORPL: H1, 300.0604076 MHz
 Power: 37 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening: 1.0 Hz
 FT size: 65536
 Total time: 13.0 hours



Espectro de RMN ^{13}C da 15-metóxi-aspidospermina (19).

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.580 sec
 Width 20000.0 Hz
 4144 repetitions
 INVERSE G13, 75.451942 MHz
 HECORDE M1, 300.063076 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FI size 65536
 Total time 6.0 hours



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da 15-metóxi-aspidospermina (19).

Composto (20) - 15-metóxi-pirifolidina:

O espectro na região do infravermelho podemos observar uma banda a 1652 cm^{-1} , característica de uma carbonila de amida [38].

O espectro no UV com máximos a 288 nm, 254 nm e 223 nm é característico de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas exibiu um íon molecular a m/z 414, correspondendo a uma fórmula molecular $C_{24}H_{34}N_2O_4$, o fragmentos a m/z 386 [$M^+ - 28$], e os fragmentos piperidínicos a m/z 154 (pico base) e 182. Este é um espectro de massas típico de um composto derivado da aspidospermina (9A/9B) [17, 18], baseados no íon molecular e no seu modelo de fragmentação semelhante ao do composto (19) anteriormente discutido. O seu íon molecular sugere que 20 tenha 30 unidades de massas a mais do que o composto (19), devido provavelmente a um grupo metoxila. A localização deste grupo pode ser feita interpretando o modo de fragmentação do composto por espectrometria de massas. Inicialmente pode se concluir que esta metoxila adicional não está localizada na porção monoterpênica, pois os íons piperidínicos permaneceram inalterados com relação aos mesmos íons no composto (19). O íon a 386 [$M^+ - 28$] nos sugere que a metoxila está localizada no anel benzênico do sistema indólico, pois ocorreu o acréscimo de 30 unidades em relação ao íon m/z [$M^+ - 28$] do composto (19), Figura 10 (pag.56). Este conjunto de dados e a presença de compostos relacionados a (+)-pirifolidina (14), (+)-pirifolina (18) e (+)-15-metóxi-pirifolidina (19), nos extratos desta espécie, permitiram sugerir a mesma estrutura que a proposta anteriormente por CG/EM.

As atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C de 20, Quadro 9 na pag. 120, foram realizadas usando-se o experimento de DEPT e por comparação com os dados de RMN ^1H , ^{13}C obtidos para os compostos (+)-aspidospermina (9A), (+)-pirifolidina (14), (+)-pirifolina (18) e (+)-15-metóxi-aspidospermina (19), Quadros 2, 3, 7 e 8, com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida anteriormente.

O RMN ^1H mostrou a presença de quatro grupos metila, um singlete a 2,25 δ da metila do grupo N-acetamida, outros dois singletos a 3,88 e 3,90 δ e os carbonos das metoxilas ligadas ao anel benzênico a 59,6 e 56,4 δ , e o singlete a 3,35 δ do carbono a 56,4

δ referente a metoxila ligada ao anel D.

O espectro de RMN ^1H permitiu também assinalar os hidrogênios aromáticos do H-9 (d a 6,65 δ , $J=8,0$ Hz), H-10 (t a 6,82 δ , $J=8,0$), com base nos acoplamentos esperados para um sistema indólico com dois substituinte no anel benzênico. Este fato associado as informações obtidas do RMN ^1H dos compostos 14 e 18, Quadros 2, 3, 7 e 8, confirmaram a substituição no C-12.

O espectro de RMN ^1H apresenta um sinal largo a 4,71 δ referente ao hidrogênio H-2 β , e o sinal do carbono metínico a 66,0 δ . A atribuição dos outros carbonos restantes no esqueleto indolina foi feita, o C-7 ressona a 52,6 δ .

Todos os carbonos metilênicos foram revelados pelo experimento de DEPT, os hidrogênios a eles ligados foram revelados pelos deslocamentos químicos, modelos e constantes de acoplamento e por comparação com os deslocamentos químicos dos compostos (+)-aspidospermina (9A) e pirifolina (18), Quadros 2 e 7.

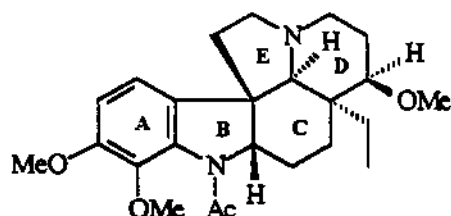
Os sinais em campo mais baixo (3,50-3,28 δ) foram assinalados como os hidrogênios H-5 α a 3,48 δ , H-3 α a 3,26 δ e H-15 α a 3,22 δ , esta última atribuição será discutida em mais detalhes a seguir. Os hidrogênios H-14 α e H-14 β foram atribuídos aos sinais a 2,10 e 1,52 δ , respectivamente, por comparação com os dados espectrais de 14 e 19.

Os hidrogênios H-5 β e os vizinhos também foram atribuídos de maneira similar. Como descrito anteriormente no caso da (+)-pirifolina (18) o problema também foi definir corretamente em que posição a segunda metoxila estaria ligada no anel D. O H-15 foi atribuído como estando na posição α em relação ao anel D, em função de suas constantes de acoplamento ($J_{\text{H15}\alpha\text{-H14}\beta}=14$ Hz e $J_{\text{H15}\alpha\text{-H14}\alpha}=7,0$ Hz) e da comparação com os compostos (18) e (19).

Os outros conjuntos de hidrogênios metilênicos ainda não atribuídos foram relacionados aos sinais referentes ao C-16 22,5 δ ao qual atribuiu-se os hidrogênios a 1,25 (A) e 2,00 (B) δ e o ao sinal do C-17 a 2,28 δ cujos hidrogênios são 1,09 (A) e 2,15 (B) δ . Por último a atribuição dos hidrogênicos ligados ao C-19 a 29,9 δ atribuídos aos sinais a 0,75 (A) e 1,22 (B) δ .

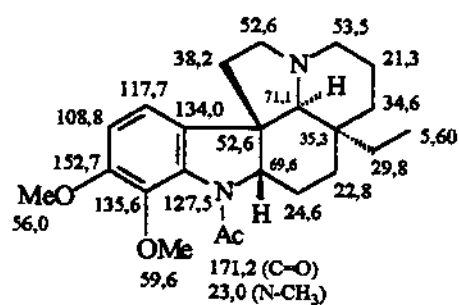
O uso conjunto dos dados espectrais de (20), Quadro 9 na pag. 120, e dos

compostos 14, 18 e 19 permitiram propor para o composto a estrutura mostrada a seguir, a qual nós denominamos de 15-metóxi-pirifolidina.

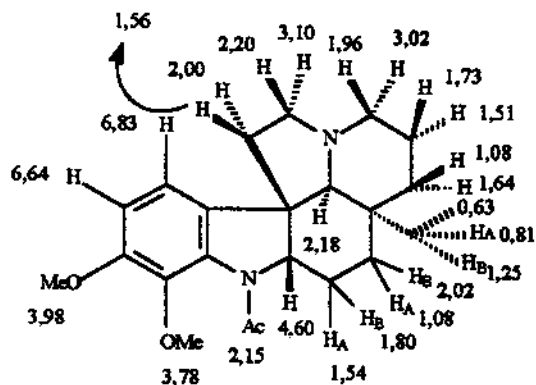


15-metóxi-pirifolidina

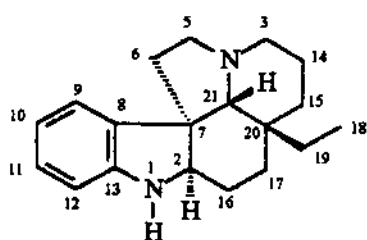
Apesar dos compostos 19 e 20 estarem presentes na forma de uma mistura, que depois foi gradativamente purificada, a medida da rotação óptica (obtida em CHCl_3 a 25°C) desta apresentou um desvio óptico com sinal positivo para ambos os compostos. Como a rotação dos outros compostos relacionados a ambos isolados da mesma espécie, a (+)-aspidospermina (9A), (+)-pirifolidina (14) e a (+)-pirifolina (18) também são dextrorotatórios, assumimos que os compostos novos 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15-metóxi-pirifolidina (20) devam ter a mesma configuração dos compostos 9A, 14 e 18. Os dados de RMN ^1H , ^{13}C destes novos compostos estão ilustrados no Quadro 8 e 9.



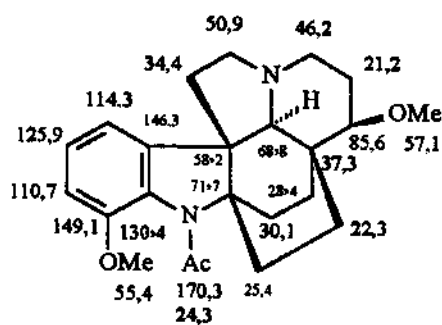
(+)-pirifolidina (14)



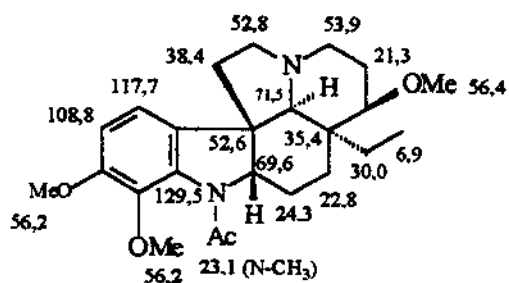
(+)-pirifolidina (14)



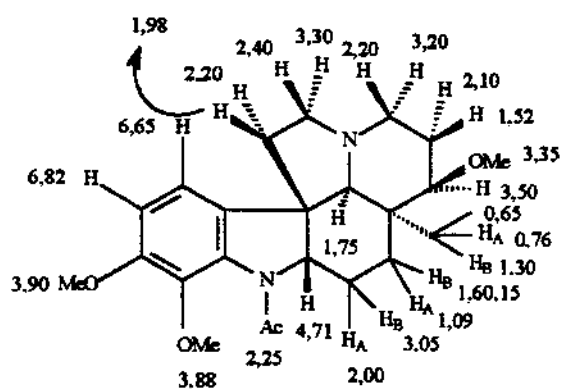
(33)



(+)-pirifolidina



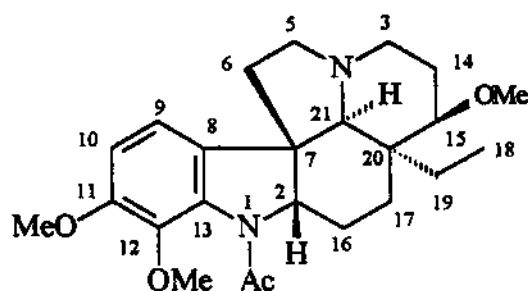
15-metóxi-pirifolidina (20)



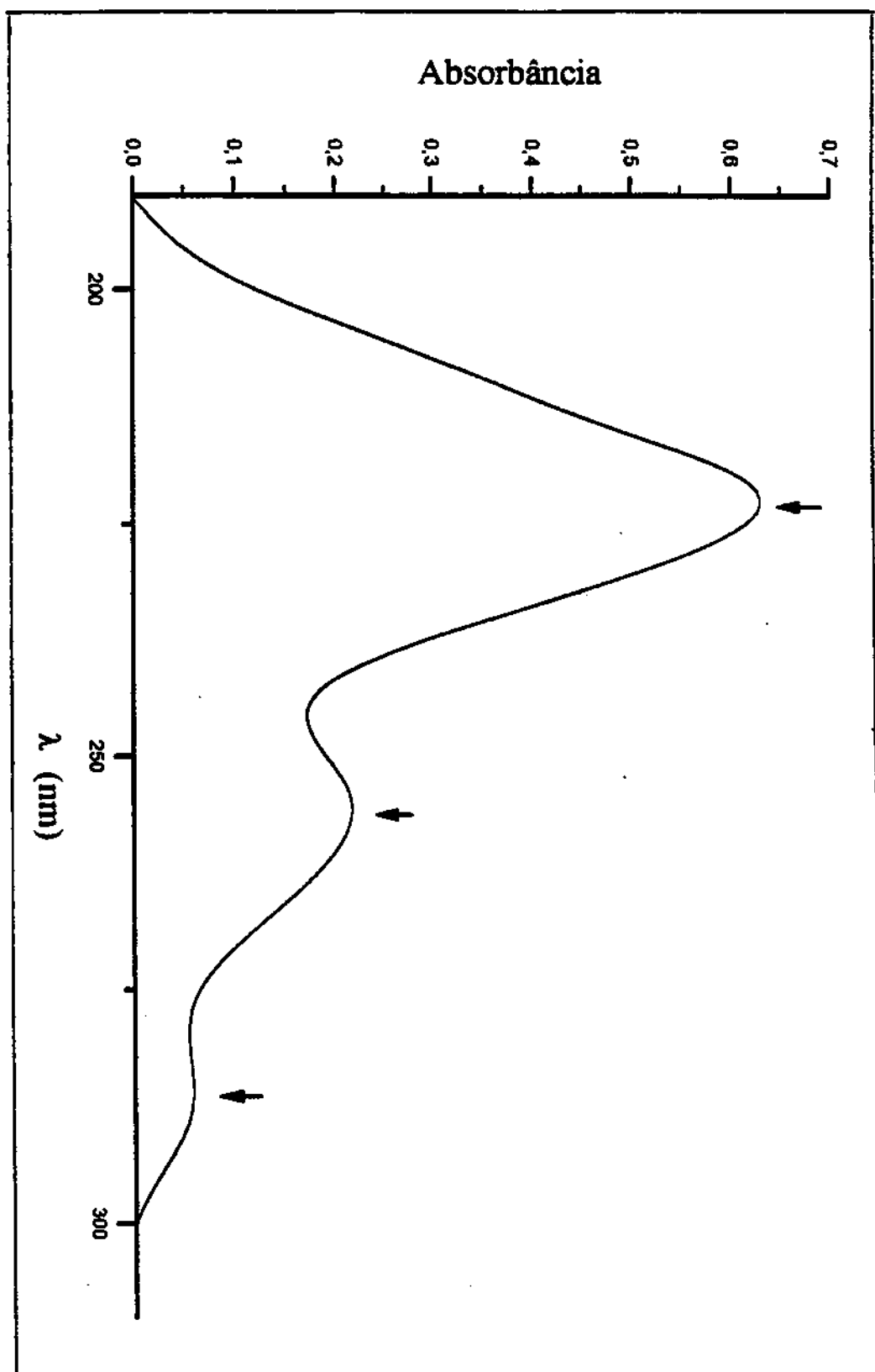
15-metóxi-pirifolidina (20)

Quadro 9. Dados de RMN ¹H e ¹³C do 15-metóxi-pirifolidina (20) e da (+)-pirofolidina (14) isolados de *A. pyriforme*.

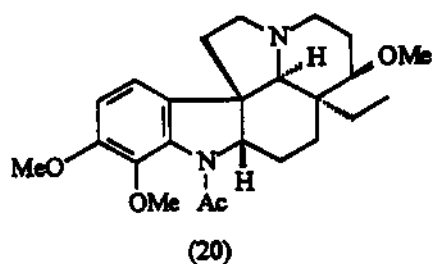
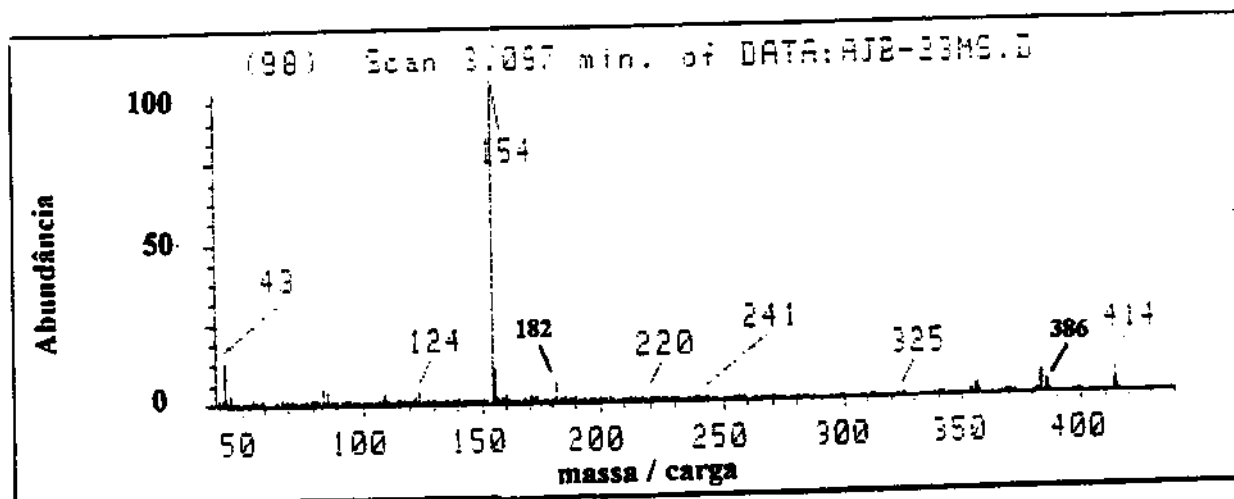
(+)-15-metóxi-pirifolidina (20): IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1652 (N-C=OMe). UV λ_{max} nm: 288, 254, 223. RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,71 (1H, s, H-2 α), 3,26 (1H, m, H-3 α), 2,20 (1H, H-3 β), 3,48 (1H, m, H-5 α), 2,40 (1H, m, J= 13,8 Hz, H-5 β), 2,20 (1H, m, H-6 α), 1,80 (1H, m, H-6 β), 6,65 (1H, d, J= 8,0, H-9), 6,82 (1H, d, J= 8,0, H-10), 3,90 (6H, s, 11-OMe e 12-OMe), 2,10 (1H, H-14 α), 1,52 (1H, m, H-14 β), 3,22 (1H, m, J= 14,0, J= 7,0Hz H-15 α), 1,25 (1H, m, H-16A), 2,0 (1H, m, H-16B), 1,00 (1H, dq, J= 14,7, H-17A), 2,15 (1H, m, H-17A), 0,63 (3H, t, J= 7,2, H-18), 0,76 (1H, q, J= 7,2, H-19A), 1,30 (1H, m, H-19B), 2,28 (1H, s, H-21 α), 2,25 (3H, s, NC=OMe), 3,22 (3H, s, C-15-OMe). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 69,6 (C-2), 52,9 (C-3), 52,8 (C-5), 38,4 (C-6), 52,6 (C-7), 143,4 (C-8), 117,7 (C-9), 108,8 (C-10), 152,7 (C-11), 152,7 (C-12), 129,5 (C-13), 24,4 (C-14), 75,5 (C-15), 25,0 (C-16), 24,4 (C-17), 6,90 (C-18), 30,0 (C-19), 35,7 (C-20), 71,5 (C-21), 56,2 (11-OMe), 56,2 (12-OMe), 56,4 (15-OMe), 23,1 (NC=OMe), 171,2 (N-C=O). CG/EM m/z (A. R. %): 414 (40), 386 (20), 154 (100).



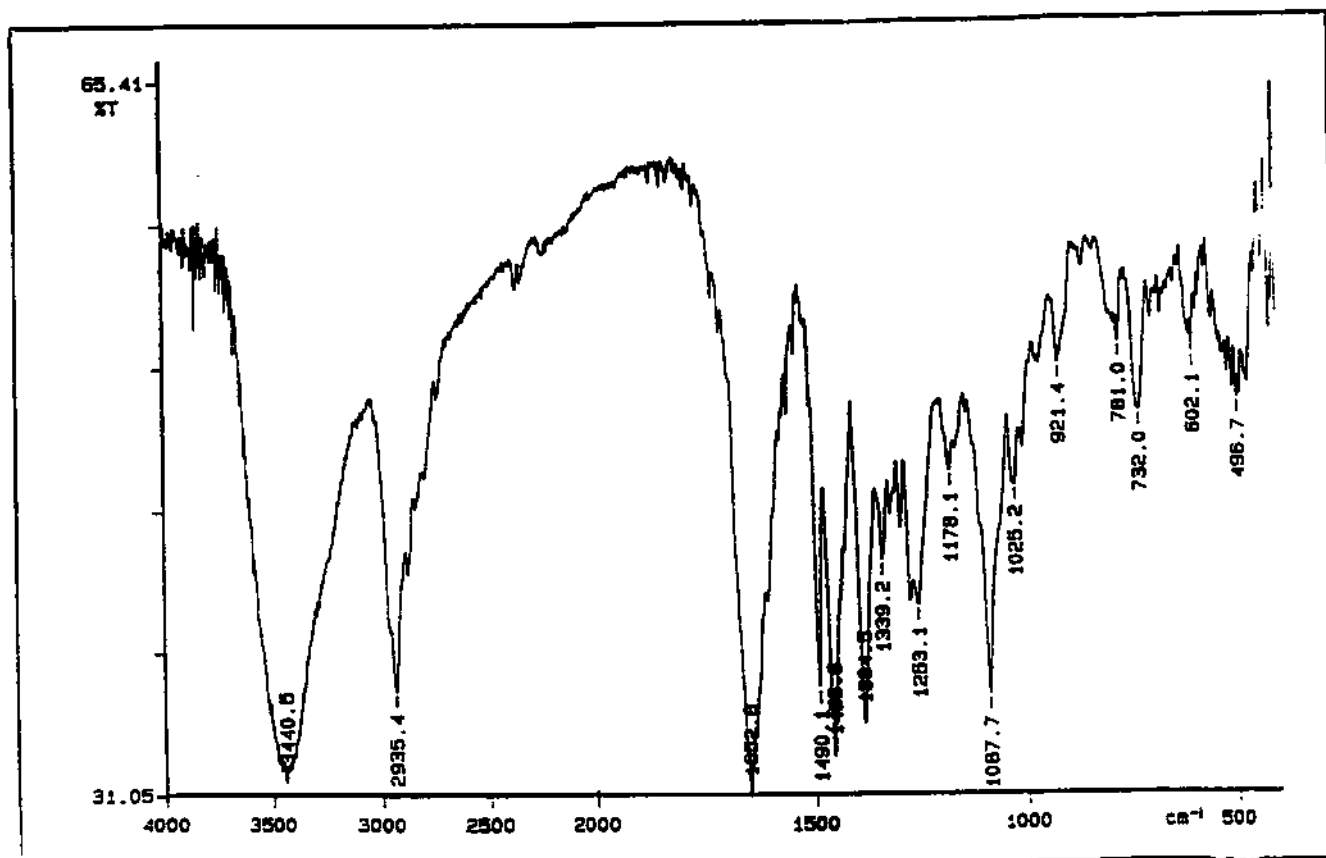
(+)-15-metóxi-pirifolidina



Espectro de UV-VIS da 15-metóxi-pirrolidina (20).



Espectro de Massas de Alta Resolução da 15-metóxi-pirifolidina (20).



Espectro no Infra-Vermelho da 15-metóxi-pirifolidina (20).

Chemical structure of compound (20) is shown. It features a benzene ring substituted with a methoxy group (MeO) at position 11 and a quinuclidine-like system at position 13. The quinuclidine system includes a piperidine ring fused to a bicyclic system, with an acetyl group (Ac) attached to the nitrogen atom. The structure is labeled (20).



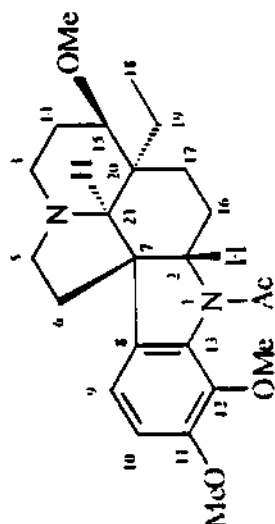
ARLINDO "A.B.-23" CMC.3.1125

EPH) POL. DE SEMEADURA

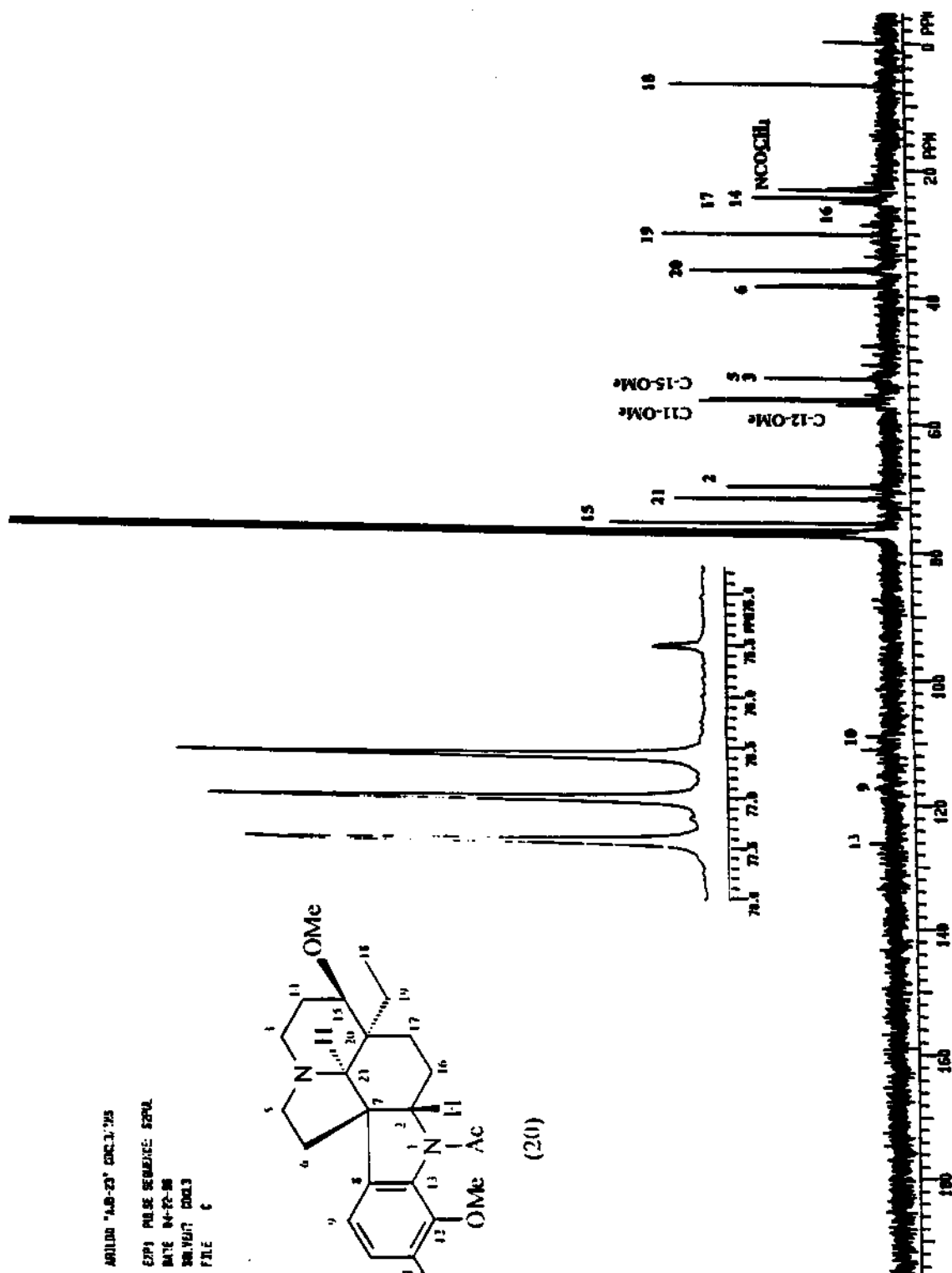
DATE 04-22-88

SOLVENT CDCl₃

FILE C

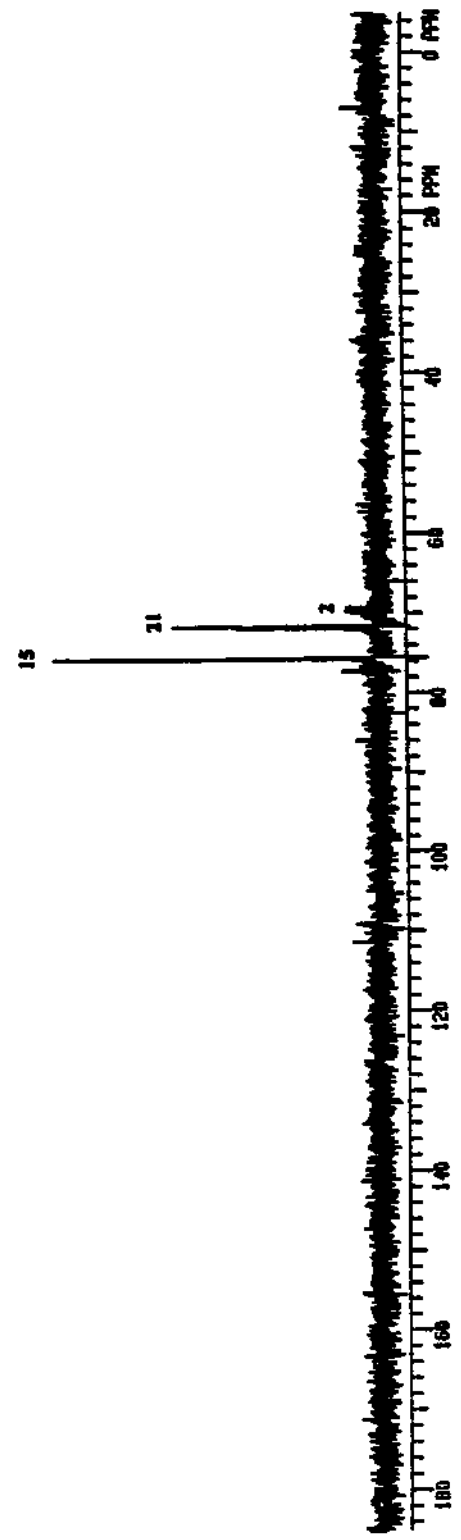
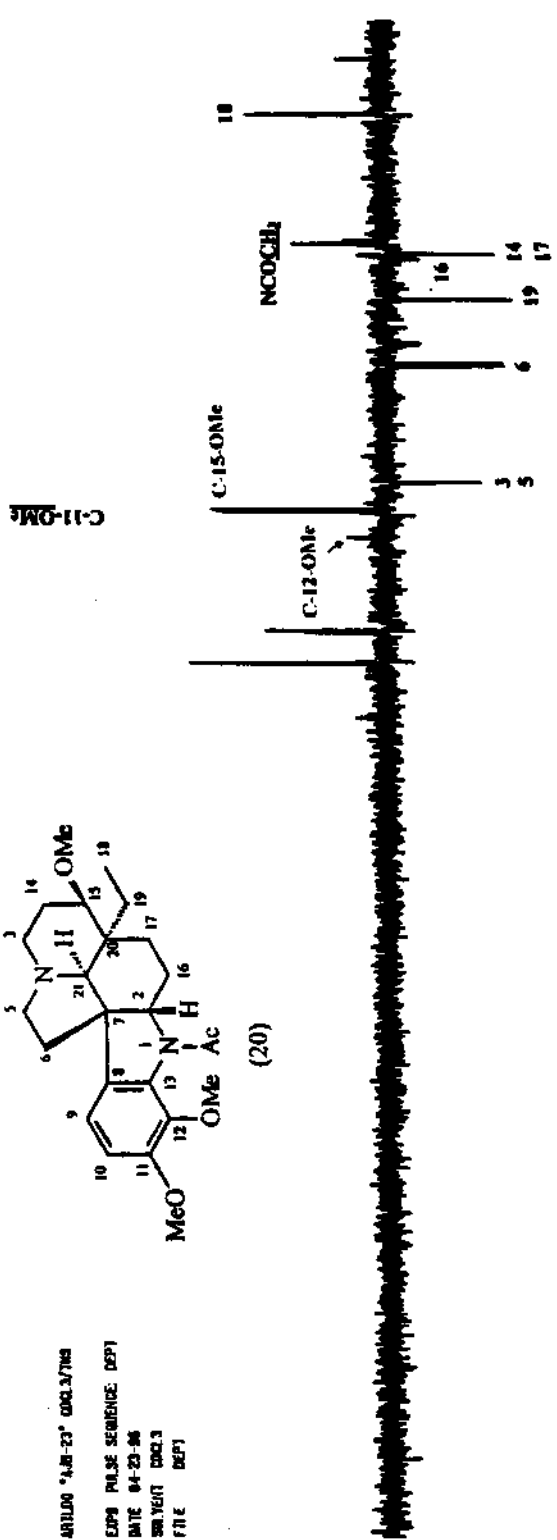
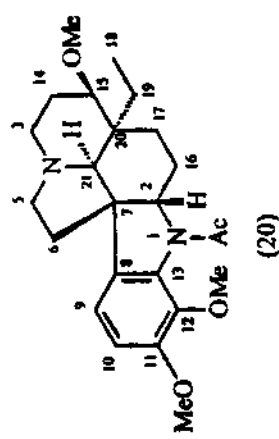


(20)



Espectro de RMN ¹³C da 15-metóxi-pirifolidina (20).

ARJL00 *JUN-23* 0003.3718
 EXP9 PULSE SEQUENCE: DEPT1
 DATE 04-20-96
 SOLVENT CDCl3
 F1E1 DEPT1



Espectro DEPT de RMN ¹³C da 15-metóxi-pirifidina (20).

2.1.4. Obtenção de padrões em *A. polyneuron*.

Três alcalóides conhecidos foram isolados de *A. polyneuron*, a saber: (-)-aspidospermina (9B), (±)-normacusina B (21) e (+)-polineuridina (22) e suas estruturas foram estabelecidas por comparação de seus dados físicos com os descritos na literatura [17,18,31], dados espectrais e/ou por comparação com padrões autênticos. Outros dois alcalóides a (-)-*N*-acetil-cilindrocarina (23), isolado anteriormente da espécie *A. cylindrocarpon* [47] e o 12-metóxi-21-oxo-aspidoalbina (81), foram isolados e identificados pela primeira vez em *A. polyneuron*, a Tabela 5 resume estes resultados.

Composto 23- (-)-*N*-acetil-cilindrocarina:

A presença do composto 23 nos extratos de *A. polyneuron* foi evidenciada quando realizamos a análise por CG/EM dos extratos alcaloídicos desta espécie.

O 23 composto é um sólido que apresentou, P.F. entre 85-90 °C, e o valor de rotação óptica, realizada em clorofórmio a 25 °C, foi de $[\alpha]_{25}^D = -138,0^\circ$.

O espectro no IV mostrou bandas de absorção a 1650 cm^{-1} referente a uma carbonila de amida [38], e outra a 1731 cm^{-1} que é uma típica banda de uma carbonila de éster [38]. A banda a 3439 cm^{-1} provavelmente devido a presença de umidade na amostra.

O espectro de UV com máximos a 222 nm, 270 nm e 300 nm, é um espectro típico de um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas de 23, mostrou os seguintes picos principais: íon molecular a m/z 398, que corresponde a uma fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$, outro devido a perda de um substituinte angular (juntamente com um átomo de hidrogênio) levando a um pico importante a m/z 324, este pico é um análogo do íon $[\text{M}^+ - 28]$ que ocorre em compostos derivados da aspidospermina (9A e 9B). O terceiro é o pico base a m/z 168 que pode ser representado pelo íon **g**, na Figura 10 na pag. 56, o qual é o equivalente direto do m/z 124 (pico base) adicionado do grupo carbometoxila que é característico da aspidospermina (9A e

Tabela 5. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. polyneuron*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
<u>(-)-aspidospermina (9B)</u>	++++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
<u>(±)-normacusina (21)</u>	++++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
<u>(+)-polineuridina (22)</u>	+++	EM, padrão
(-)-N-acetil-cilindrocarina (23)	++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
(-)-12-metóxi-21-oxo-aspidoalbina (81)	+	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

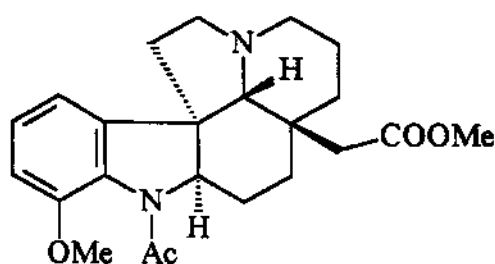
negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

itálico - composto inédito

9B) e seus derivados. Finalmente o íon a m/z 196 que pode ser representado pelo íon d, na Figura 10, que é um análogo do íon a m/z 152 também observado no espectro de 9B.

Estes dados oriundos das informações obtidas a partir do espectro de massas de 23 e seus dados físicos e espectrais descritos anteriormente, levou a sugerir a seguinte estrutura para 23, que equivale ao composto conhecido como (-)-*N*-acetil-cilindrocarina, também chamado de (-)-cilindrocarpidina [46].



estrutura proposta para
o composto (23)

As atribuições do espectro de RMN ^1H , ^{13}C do composto 23 foram feitas usando-se o experimento de DEPT e os dados de RMN ^1H , ^{13}C do alcalóide (-)-aspidospermina (9B), Quadros 2 e 10, com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida.

O espectro de RMN ^1H mostrou claramente os singletos a 3,88 δ (C-12-OMe), a 3,58 δ (éster) e a 2,10 δ (NCOMe).

Os hidrogênios aromáticos foram assinalados como H-9 (t a 6,86 δ , $J = 7,5$ Hz), H-10 (dd a 7,08 δ , $J = 7,5$ Hz) e H-11 (t a 6,82 δ , $J = 7,5$ Hz), com base nos acoplamentos esperados e efeitos eletrônicos do substituinte metóxi ligado ao C-12. O espectro do composto 9B também auxiliou na correta atribuição da porção aromática deste alcalóide.

O singlete largo a δ 4,65 foi atribuído ao H-2 α e o sinal de carbono a 68,7 δ ao C-2, o carbono quaternário remanescente no esqueleto indolina a 53,2 δ foi assinalado ao C-7 pela comparação com os dados de RMN ^{13}C da apidospermina (9B), Quadro 10 na pag. 131.

Os hidrogênios metóxi assinalados a 3,88 e 3,58 δ , e os sinais de carbono a 55,4 e 51,1 δ , ao carbonos C-12 e C-18 respectivamente.

Todos os carbonos metilênicos estavam presentes no experimento em DEPT e os prótons por comparação com os deslocamentos químicos de 9B.

Os sinais de hidrogênio em campo mais baixos (3,2-3,0 δ) foram atribuídos aos prótons H-5 α e H-3 α devido a sua grande proximidade do par de elétrons não ligante do N-4. As atribuições individuais foram feitas pela análise cuidadosa do espectro de RMN ^1H a 300 MHz utilizando-se os espectros expandidos. Os modelos de acoplamento na forma de um triplo dubleto a 3,16 δ (H-5 α) e do duplo triplete a 3,08 δ que foi atribuído ao H-3 α . Outra atribuição fundamentada nos modelos de acoplamento foi a referente ao sinal a 1,78 δ (H-14 α), como visto nos compostos anteriormente discutidos.

Os hidrogênios remanescentes nos dois sistemas de spin foram identificados com o auxílio do espectro de 9B, Quadro 2 e 10. Desta maneira também atribuiu-se o C-21 a δ 69,5 e o C-20 a 35,8 δ .

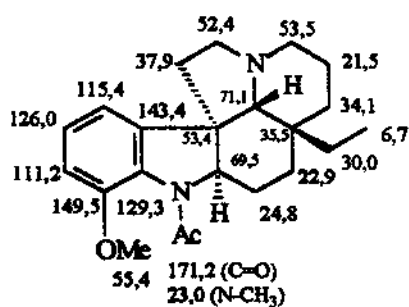
O C-19 mostra sinal a 45,0 δ , que é o valor previsto para um grupo metilênico α -carbonílico [38].

Os deslocamentos químicos dos carbonos da carbonila da amida a 172,0 δ e da carbonila de éster a 175,7 δ foram também assinalados

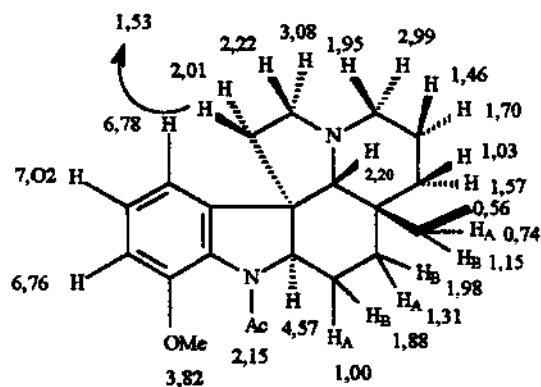
Os carbonos a 24,8 e 34,6 δ foram atribuídos aos C-16 e C-17, respectivamente, e os prótons a eles associados foram atribuídos por comparação com os de 9B, Quadro 10, pag. 131.

Uma observação interessante foi a do $\Delta\delta = +11,7$ no carbono C-17, e C-15 ($\Delta\delta = +8,2$) em relação ao mesmo carbono em 9B, este fato nos leva sugerir uma forte desproteção eletrônica devido ao grupo carbometoxi que pode se posicionar anti ao C-17 e C-15 por possuir rotação livre, e um pequeno efeito de proteção γ gauche no C-21 ($\Delta\delta = -1,6$).

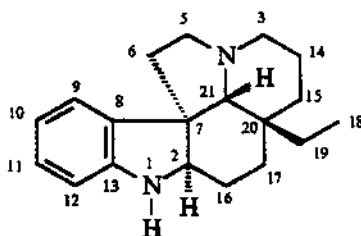
O conjunto de todos os dados físicos e espectrais relatados, permitiram atribuir a estrutura do composto 23, como sendo a do alcalóide conhecido como (-)-N-acetil-cilindrocarina.



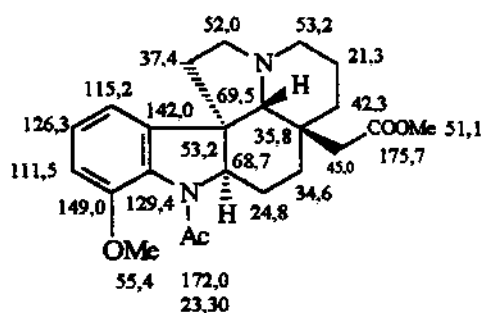
dados de NMR ^{13}C em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42].



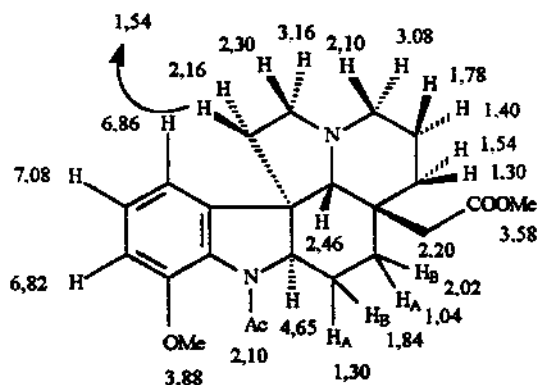
dados de NMR ^1H em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42]



(33)



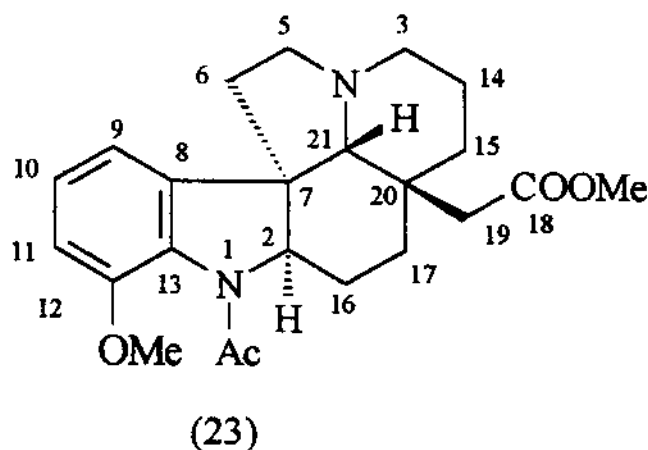
composto (23)

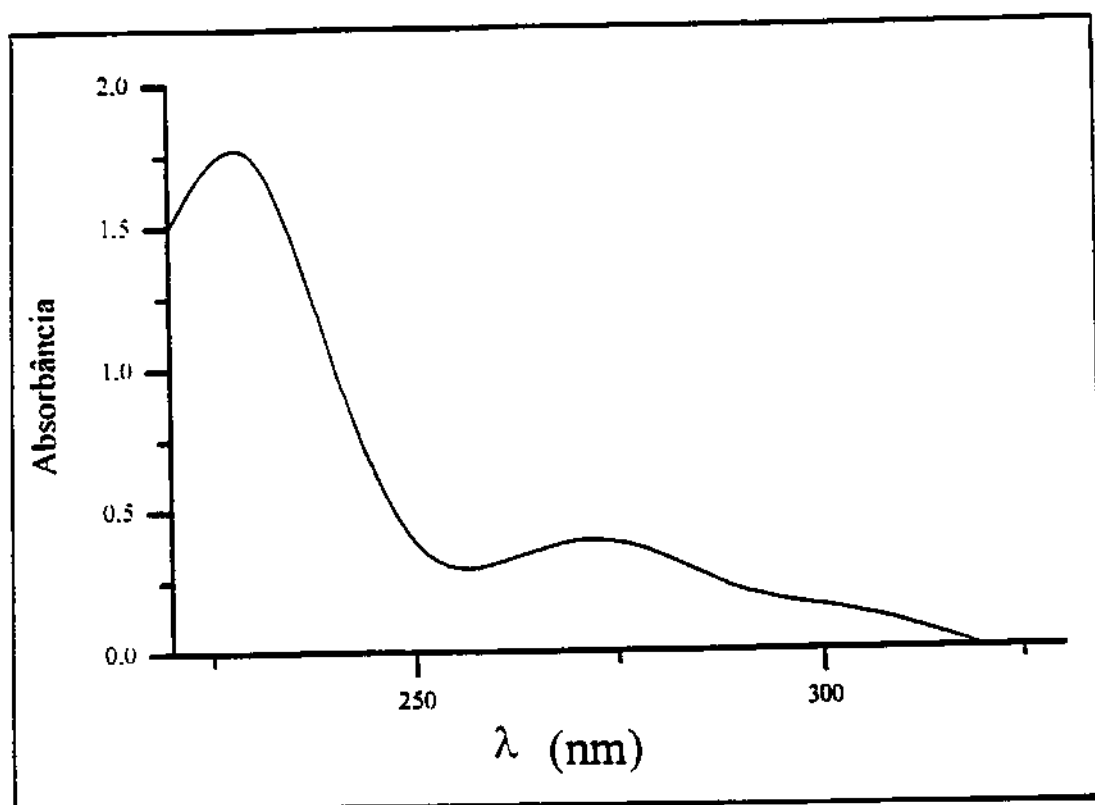


composto (23)

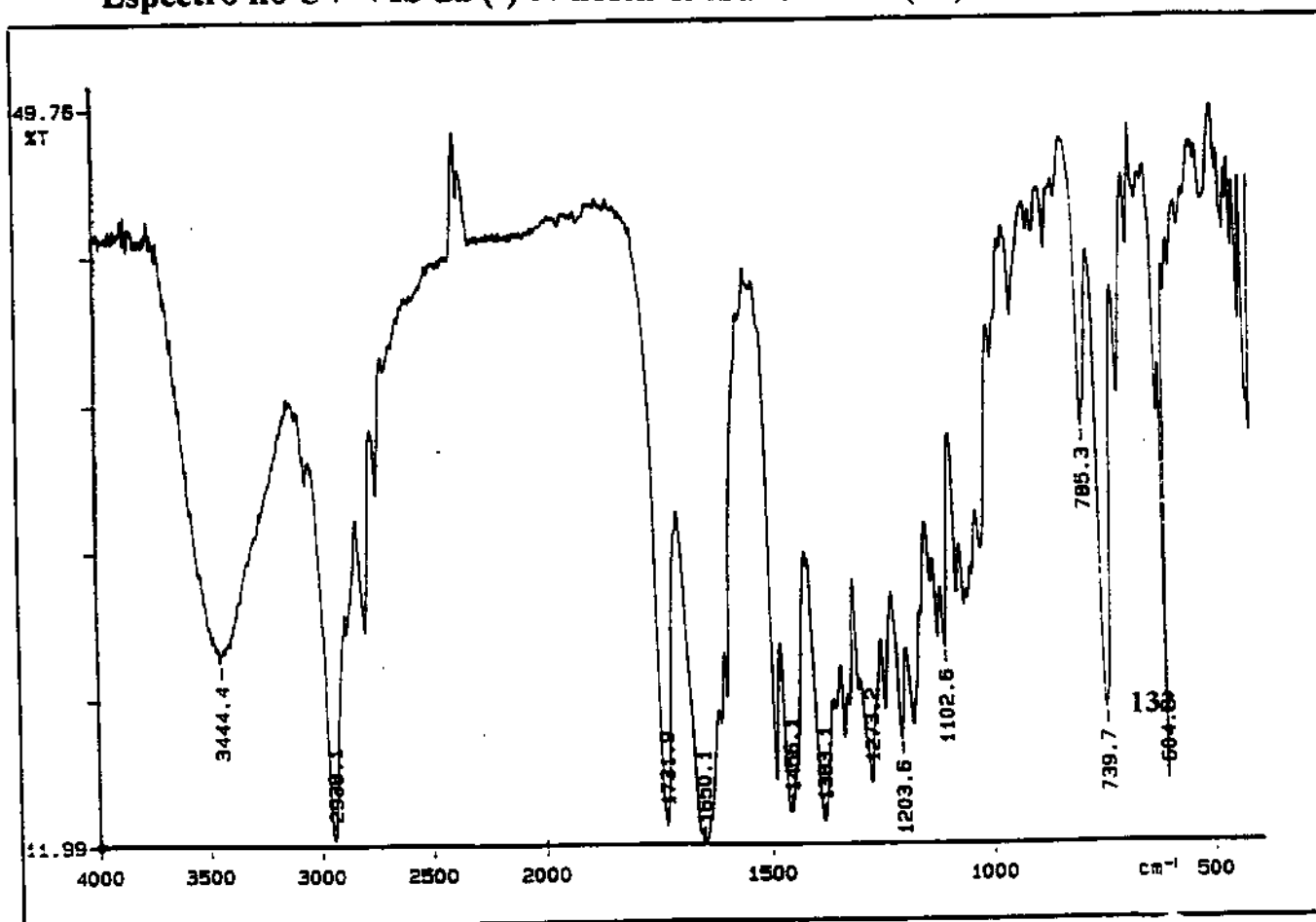
Quadro 10. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (23) e do composto modelo (-)-aspidospermina (9B).

(-)-*N*-acetyl-cilindrocarina (23): Cristais, P.F.= 85-90 °C (CH₂Cl₂); P. F. lit.= 118-118,5 °C, ref. [17,18,31]. $[\alpha]_D^{25} = -138,0$ (c= 0,0068); $[\alpha]_D^{25}$ lit.= - 122,0 (CHCl₃), ref. [17,18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 1650 (N-C=OMe), 1731 (COOMe). UV $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$: 286 (log_e= 3,60), 252 (log_e= 4,00), 220 (log_e= 4,61). RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,65 (1H, s, H-2 α), 3,08 (1H, m, J= 8,7 Hz, H-3 α), 2,10 (1H, m, H-3 β), 3,16 (1H, dt, J= 9,0 Hz, J= 3,0 Hz, H-5 α), 2,30 (1H, m, J= 9,0 Hz, H-5 β), 2,16 (1H, m, H-6 α), 1,54 (1H, m, H-6 β), 6,86 (1H, t, J= 7,5, H-9), 6,82 (1H, t, J= 7,5, H-11), 7,08 (1H, d, J= 7,5, H-10), 3,88 (3H, s, 12-OMe), 2,10 (3H, s, NCOMe), 1,78 (1H, m, J= 13,5 Hz, H-14 α), 1,40 (1H, dq, J= 13,5 Hz, H-14 β), 1,54 (1H, m, H-15 α), 1,30 (1H, m, H-15 β), 1,84 (1H, m, H-16B), 1,30 (1H, m, H-16A), 2,02 (1H, t, J= 15,0 Hz, H-17B), 1,04 (1H, m, H-17A), 2,20 (1H, s, H-19), 2,46 (s, H-21 β). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 68,7 (C-2), 53,2 (C-3), 52,0 (C-5), 37,4 (C-6), 53,2 (C-7), 142,0 (C-8), 115,2 (C-9), 126,3 (C-10), 111,5 (C-11), 149,0 (C-12), 129,4 (C-13) 21,3 (C-14), 42,3 (C-15), 24,8 (C-16), 34,6 (C-17), 45,0 (C-19), 35,8 (C-20), 69,5 (C-21), 23,30 (NCOMe), 172,0 (N-C=O), 55,4 (12-OMe), 51,1 (COOMe). CG/EM m/z (A. R. %): 398 (50), 324 (90), 168 (100).

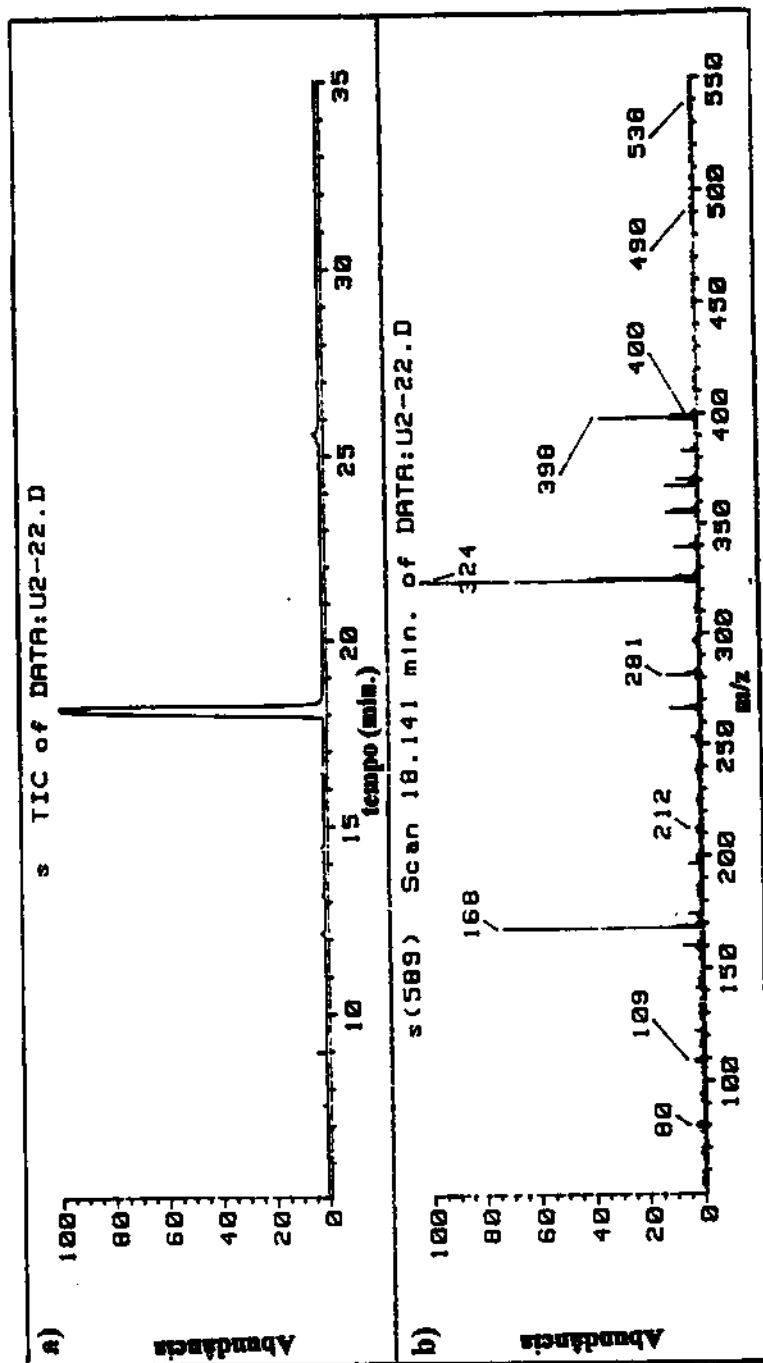




Espectro no UV-VIS da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).

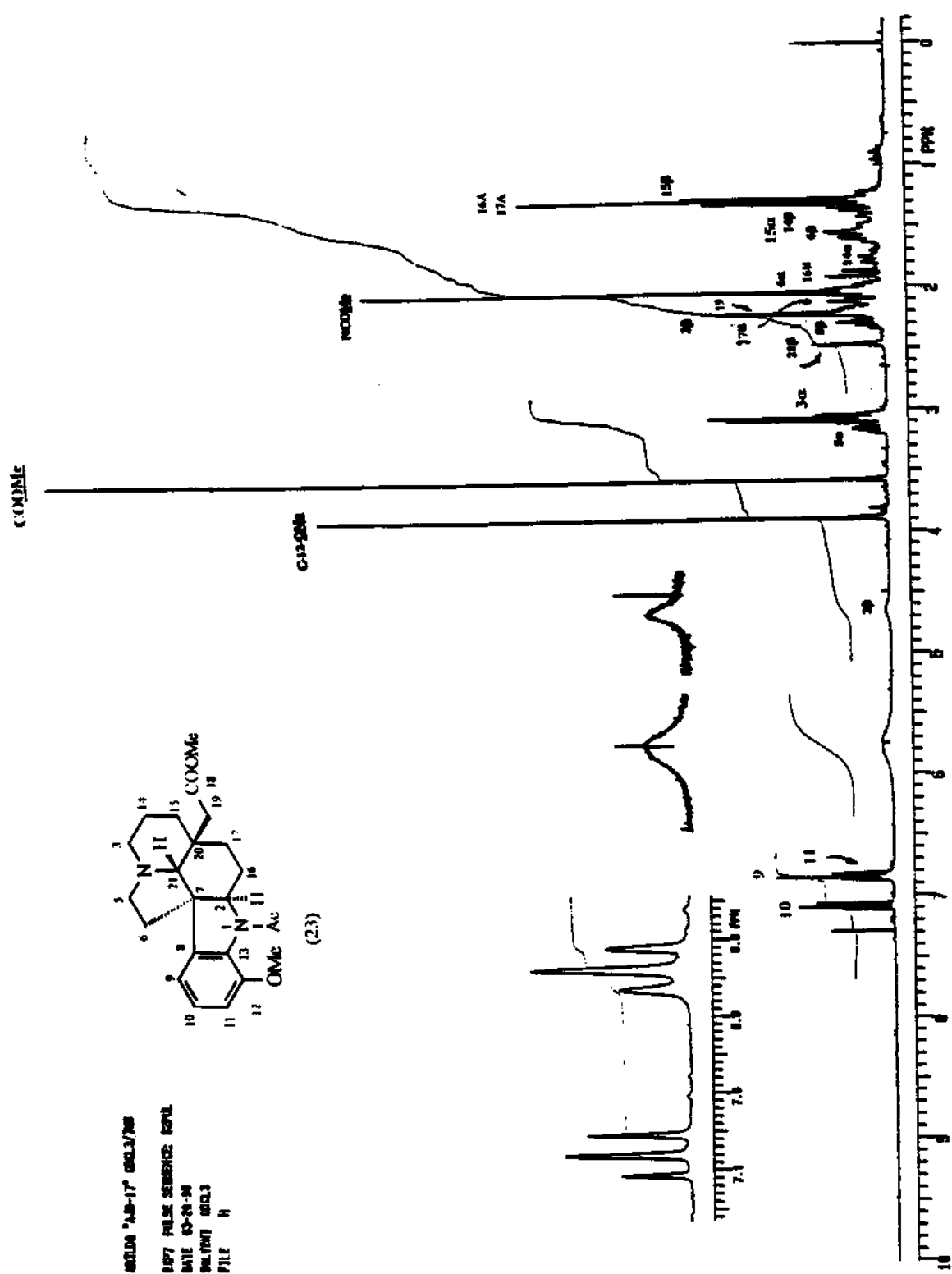


Espectro no Infravermelho da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).



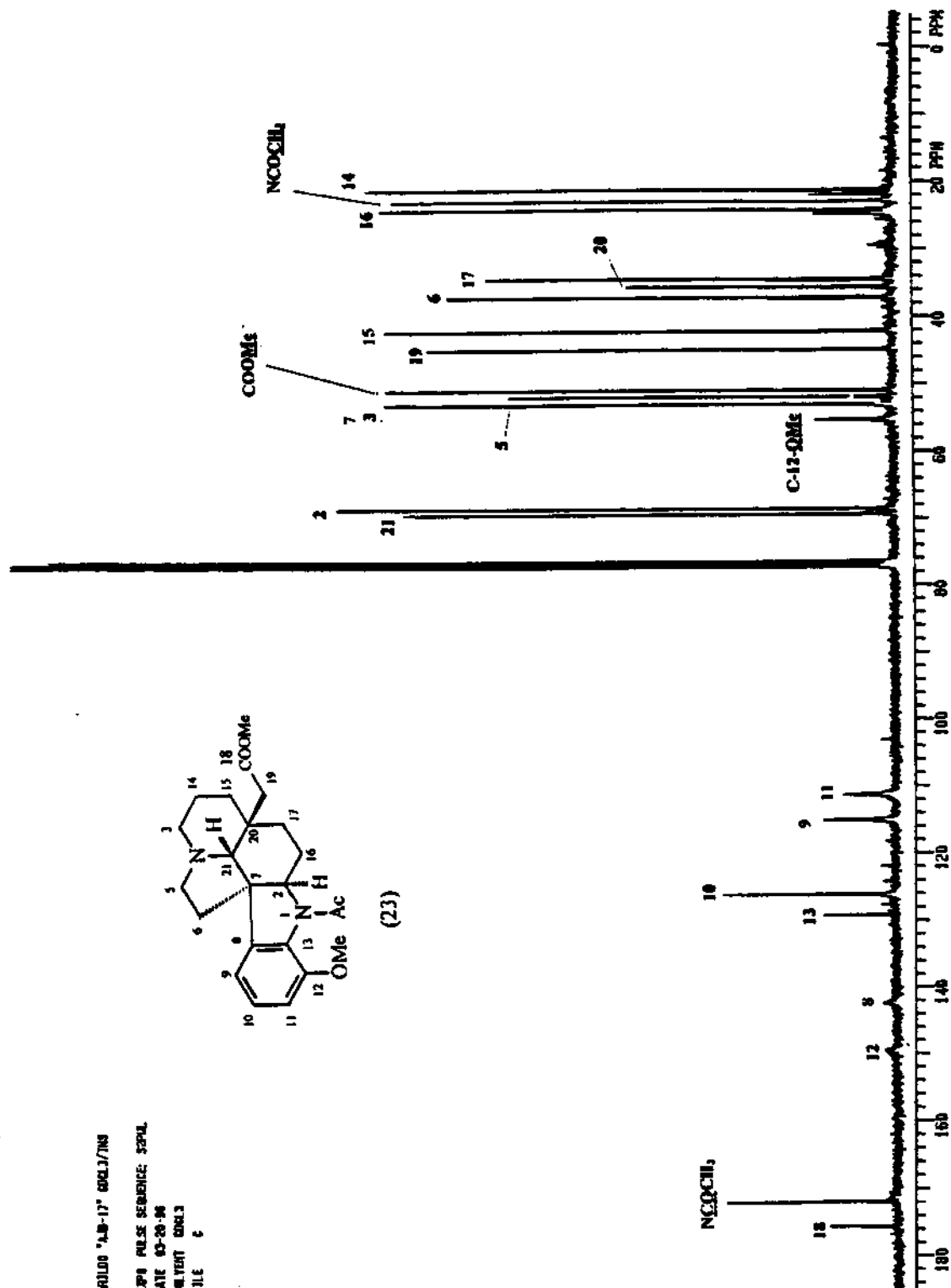
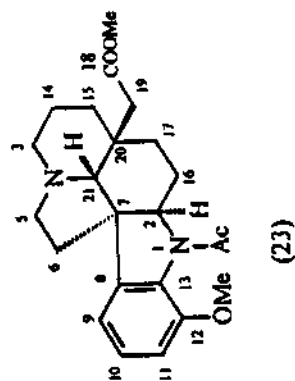
a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).

b) Espectro de massas da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).

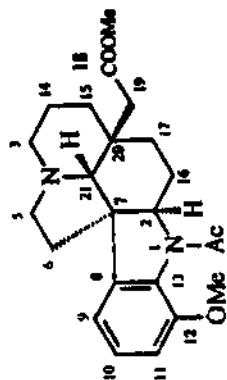


Espectro de RMN ¹H da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).

ARILDO "A,B-17" CMCJ3/1103
 CPM9 PULSE SEQUENCE: 32PUL
 DATE 03-20-96
 SWEPT CMCJ3
 FILE 6

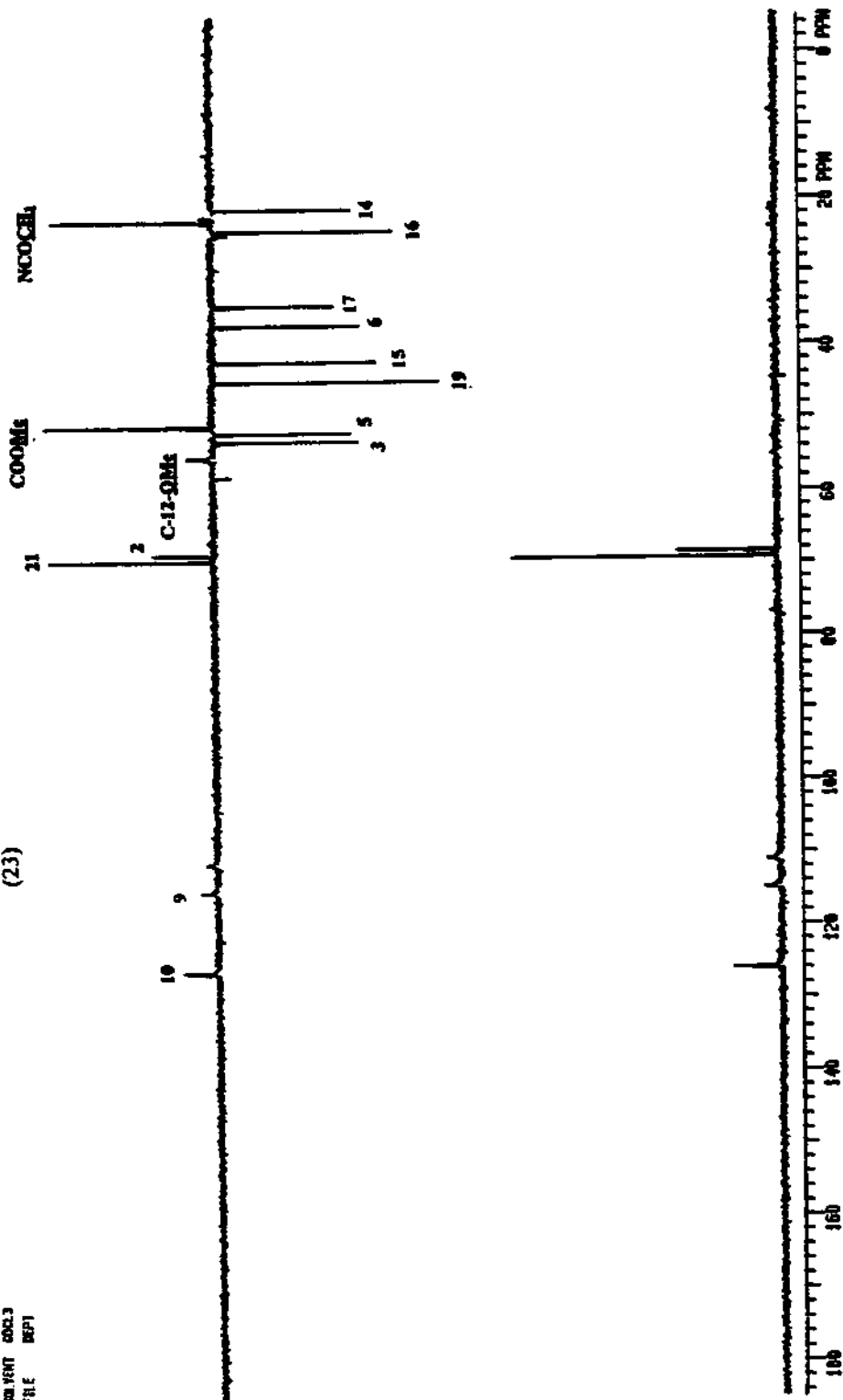


Espectro de RMN ^{13}C da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).



(23)

ARILAB "AUB-17" 0001.3/MS
 CPM9 PULSE SEQUENCE: DEPT1
 DATE 03-28-96
 SOLVENT CDCl3
 F1E1 DEPT1



Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (-)-N-acetil-cilindrocarina (23).

Composto 81 12-metóxi-21-oxo-aspidoalbina:

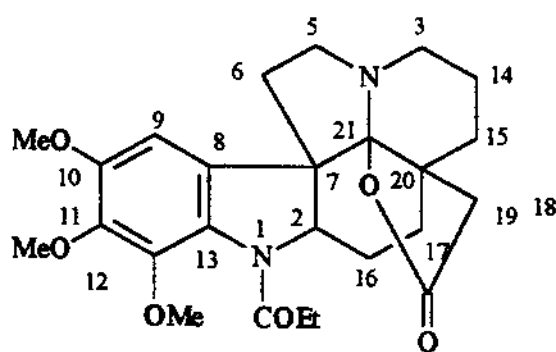
O composto 81 apresentou um valor de rotação óptica de $[\alpha]_{D25} = -63,8$, realizada usando-se metanol como solvente.

O espectro no infravermelho mostrou bandas de absorção a 1675 cm^{-1} referente a uma carbonila de amida [38] e outra banda a 1754 cm^{-1} que é uma banda típica de uma carbonila de lactona [38].

O espectro no UV apresentou máximos a 218 nm, 256 nm e 296 nm.

O espectro de massas de 81, apresentou os seguintes íons principais: o íon molecular a m/z 456, que corresponde a uma fórmula $C_{25}H_{38}N_2O_6$, os íons a 132, 136, 160 (íon base) e 174. O último íon é um fragmento que contém toda a porção alifática da molécula, com exceção do CO_2 da lactona. Este conjunto de fragmentos foram formados muito provavelmente devido inicialmente a perda de CO_2 a partir do íon molecular para dar o fragmento característico a m/z 412 $[M+ - 44]$.

O conjunto de informações obtidos a partir dos espectros de IV, UV, EM e de uma pesquisa detalhado sobre os espectros de alcalóides indólicos na literatura (34), permitiu sugerir ao composto 81 a seguinte estrutura planar, correspondente ao composto 12-O-metil-21-oxo-aspidoalbina (81).



Estrutura planar proposta para o composto (81)

compostos (-)-aspidospermina (9B) e (-)-*N*-acetil-cilindrocarina (23), Quadro 11 na pag. 141, com o objetivo de confirmar-se a estrutura sugerida.

O espectro de RMN ^{13}C de 81, atribuído pela primeira vez, apresentou os sinais referentes a 25 carbonos, os carbonos metínicos, metilênicos e metilas foram evidenciados pelo espectro de DEPT. Ao total pode-se assinalar a presença de oito carbonos metilênicos, quatro carbonos metila, dois carbonos metínicos um alifático (C-2) e outro aromático (C-9), além de dez carbonos não ligados a hidrogênio.

A atribuição dos carbonos foi feita baseada nos dados espectrais e confirmados pela comparação com os dos compostos 9B, 23 e 107, Quadro 11 na pag. 141.

A partir das informações da atribuição do espectro de RMN ^{13}C efetuamos a atribuição dos hidrogênios, que puderam ser assinalados via correlação C-H (HETCOR) e H-H (COSY).

O espectro de RMN ^1H mostrou claramente os singletos a 3,83 δ (C-10-OMe), 3,80 (C-11-OMe) e 3,89 δ (C-12-OMe) que estão associados aos sinais de carbono a 56,2, 60,2 e 61,2 δ , respectivamente.

Os sinais dos prótons H-5 α , H-5 β e H-3 α , H-3 β , foram atribuídos ao conjunto de hidrogênios mais desprotegidos (3,00-2,80 δ), devido a sua grande proximidade do par de elétrons do *N*-4. As atribuições individuais foram feitas pela análise cuidadosa do espectro de RMN ^1H a 500 MHz e pelos espectros de correlação (HETCOR e COSY). O H-5 α foi atribuído ao hidrogênio na forma de um multipeto a 3,15 δ , o H-5 β a um multipeto a 3,04 δ e o H-3 α a um duplo triplete a 2,92 δ , o H-3 β a um dubleto disforme a 2,80 δ .

Os hidrogênios remanescentes nos dois sistemas de spin foram atribuídos usando-se H-5 α,β e H-3 α,β como ponto de partida e confirmados combinadamente com as informações obtidas dos espectros de COSY e HETCOR.

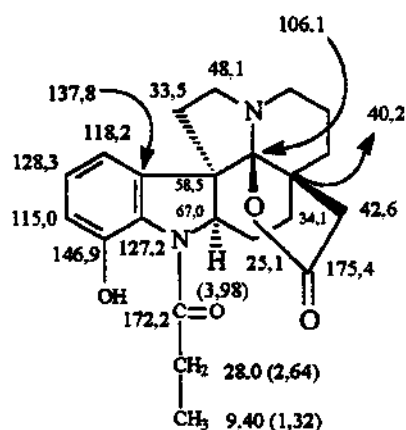
O C-19 que mostra sinal a δ 42,6 foi relacionado com os hidrogênios H-19A a 1,94 e H-19B a 2,35 δ .

O fechamento lactônico no C-21, provoca diminuição da carga eletrônica do *N* protegendo C-5 ($\Delta\delta = -3,4$) e C-3 ($\Delta\delta = -9,7$) e desprotegendo C-7 ($\Delta\delta = +6,1$) e C-20 ($\Delta\delta = +4,6$) pela proximidade da ligação com este oxigênio. Um pequeno efeito de proteção sobre

o C-19 ($\Delta\delta = -2,4$) pelo fechamento do anel e o efeito γ gauche com o oxigênio lactônico. O C-15 mostra sinal a δ 42,6 e correlaciona-se com os hidrogênios a 1,90 (H-15 α) e 1,35 (H-15 β) δ e o C-17 que mostra sinal a 34,1 δ aos hidrogênios a 0,88 (H-17A) e 1,58 (H-17B) δ e o C-20 a 40,4 δ . O C-21 foi atribuído ao sinal a 107,9 δ .

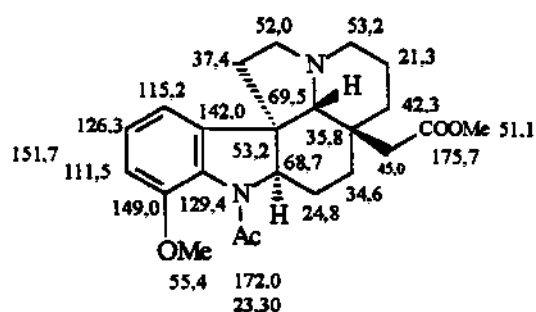
Por último confirmou-se os deslocamentos químicos dos carbonos do grupo *N*-propionil (*N*-COCH₂CH₃), o carbono metilênico a 27,6 está associado aos hidrogênios a 2,32 e 2,68 δ e o carbono da metila que foi atribuído ao sinal a 9,80 δ , ao tripleto a 1,14 δ e todos os deslocamentos podem ser confirmados com os modelos apresentados no Quadro 11 na pag. 141.

O conjunto de todos estes dados físicos e espectrais permitiram confirmar a estrutura sugerida a 81, como sendo a (-)-12-*O*-metil-21-oxo-aspidalbina (81).

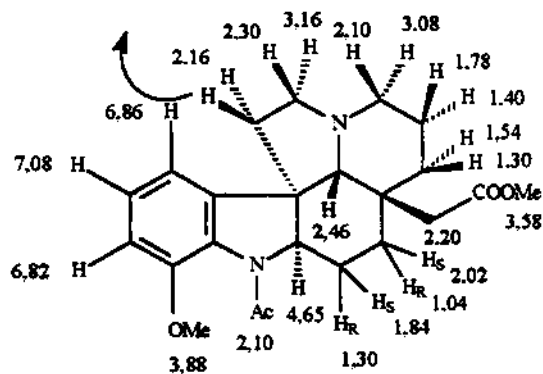


camicina (107), em CDCl_3 [102]

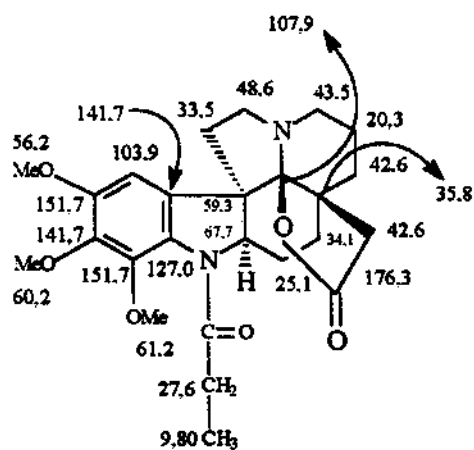
(δ) = RMN ^{13}C



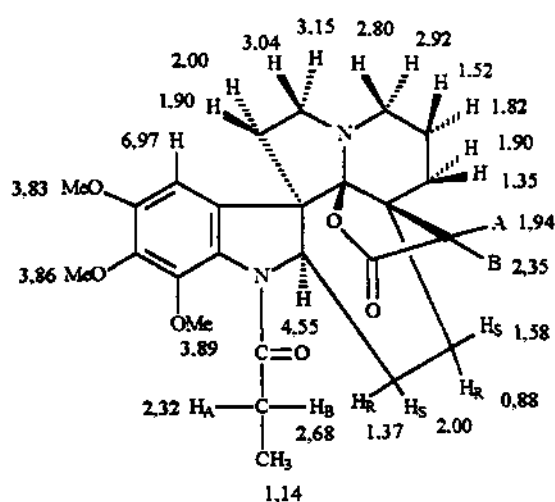
(-)-N-acetil-cilindrocaina (23)



(-)-N-acetil-cilindrocaina (23)



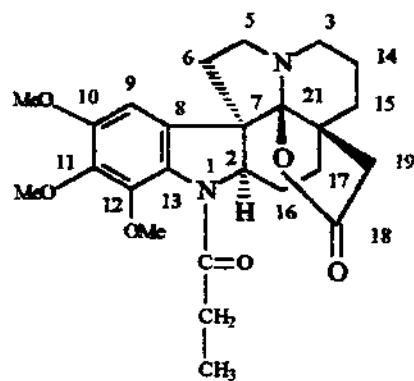
composto (81)



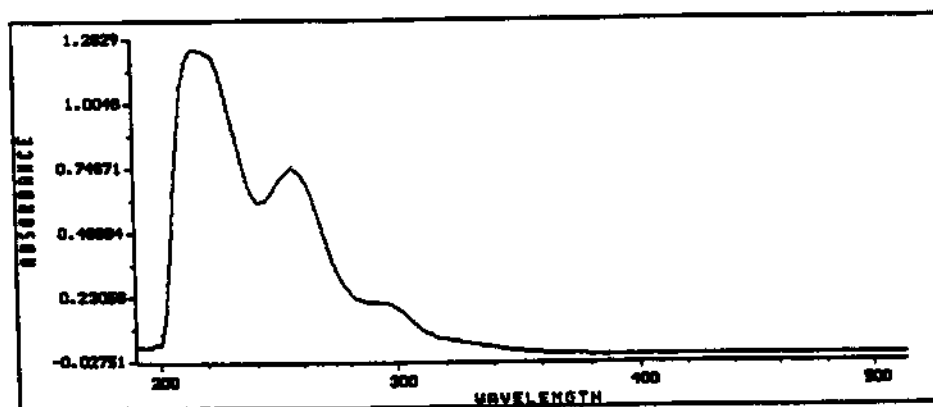
composto (81)

Quadro 11. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (81) e dos compostos modelos (-)-N-acetil-cilindrocaina (23) e Camicina (107).

(-)-12-*O*-metóxi-21-oxo-aspidoalbína (81): $[\alpha]_D^{25} = -63,8$ (MeOH, $c = 0,0002$); $[\alpha]_D^{25}$ lit. = $+63,8$ (MeOH), ref. [17,18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1657 (N-C=OEt), 1754 (lactona). UV λ_{max} nm: 296 ($\log \epsilon = 2,96$), 256 ($\log \epsilon = 3,53$), 218 ($\log \epsilon = 2,75$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,55 (1H, s, H-2 α), 2,92 (1H, dt, $J = 12,5$ Hz e $J = 3,0$ Hz, H-3 α), 2,80 (1H, m, $J = 12,$ Hz, $J = 7,5$ Hz, H-3 β), 3,15 (1H, m, H-5 α), 3,04 (1H, m, H-5 β), 2,00 (1H, m, H-6 α), 1,90 (1H, m, H-6 β), 6,97 (1H, s, H-9), 3,83 (3H, s, 10-OMe), 3,86 (3H, s, 11-OMe), 3,89 (3H, s, 12-OMe), 1,82 (1H, m, H-14 α), 1,52 (1H, m, H-14 β), 1,90 (1H, m, H-15 α), 1,35 (1H, m, H-15 β), 1,37 (1H, m, H-16A), 2,00 (1H, m, H-16B), 0,88 (1H, m, H-17A), 1,58 (1H, m, H-17B), 2,32 (1H, m, $\text{NCOCH}_A\text{H}_B\text{CH}_3$), 2,68 (1H, m, $\text{NCOCH}_A\text{H}_B\text{CH}_3$), 1,14 (3H, t, $\text{NCOCH}_A\text{H}_B\text{CH}_3$). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 67,7 (C-2), 43,5 (C-3), 48,6 (C-5), 33,5 (C-6), 59,3 (C-7), 141,7 (C-8), 103,9 (C-9), 1151,7 (C-10), 141,7 (C-11), 151,7 (C-12), 127,0 (C-13), 20,3 (C-14), 42,6 (C-15), 25,1 (C-16), 34,1 (C-17), 42,6 (C-19), 35,8 (C-20), 107,9 (C-21), 176,3 (NCOEt), 176,3 (lactona), 56,2 (10-OMe), 60,2 (11-OMe), 61,2 (12-OMe), 9,80 ($\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$). CG/EM m/z (A. R. %): 456 (M^+ , 60), 383 (50), 253 (30), 160 (100).



(81)



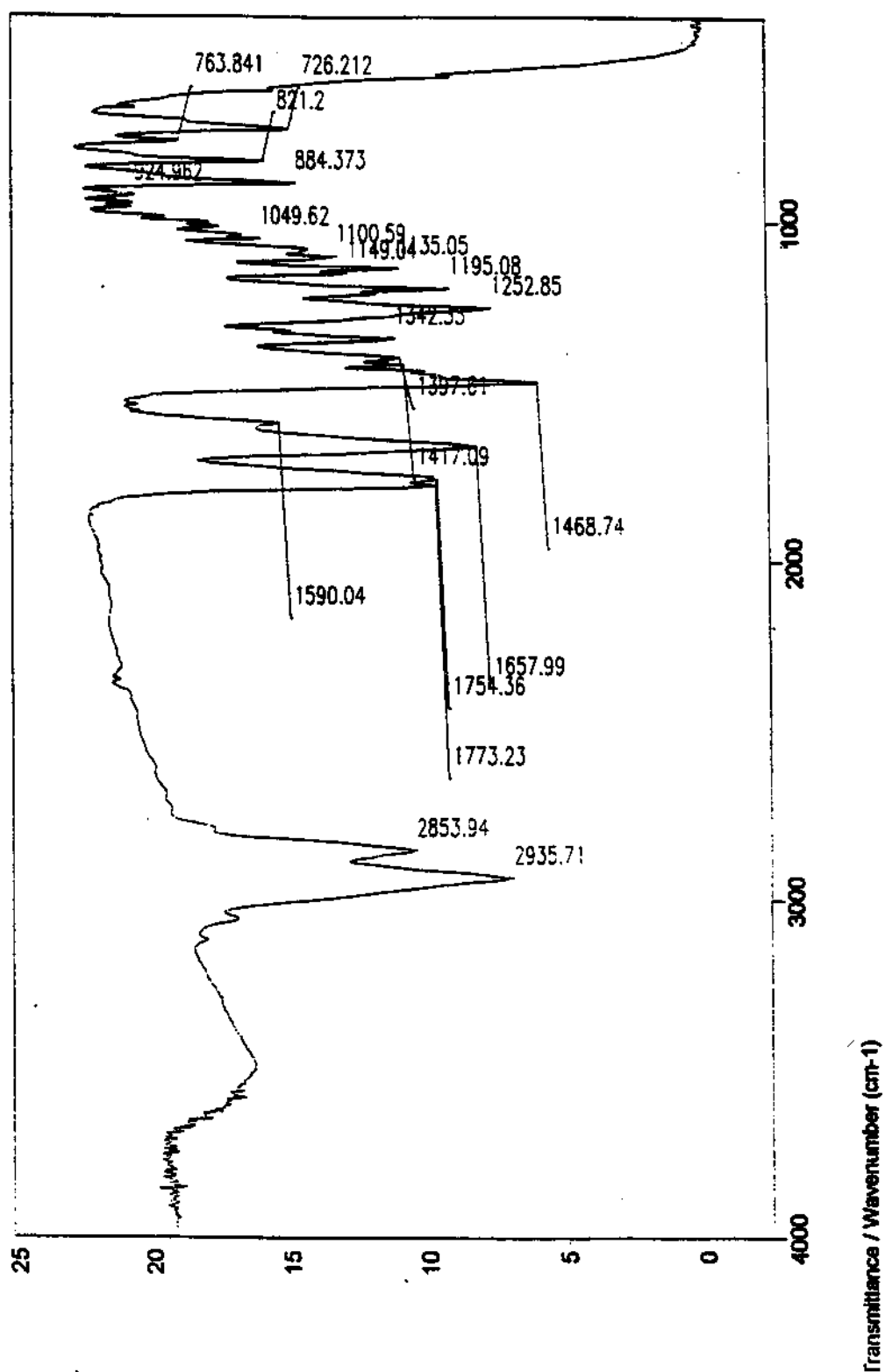
Marked Wavelengths

Reg A: L 296 = 0.20457

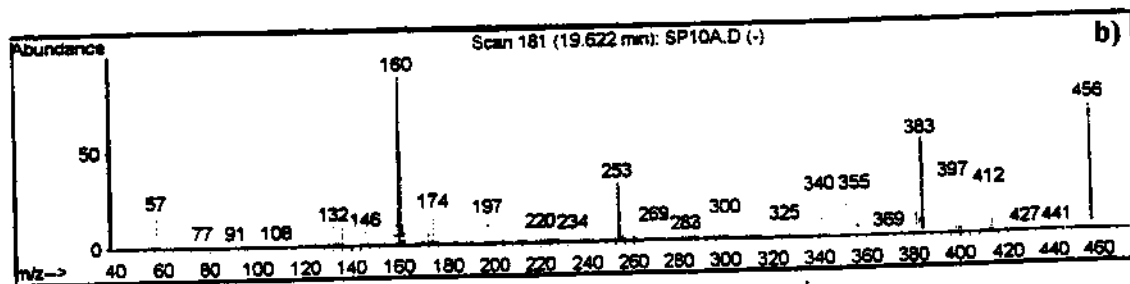
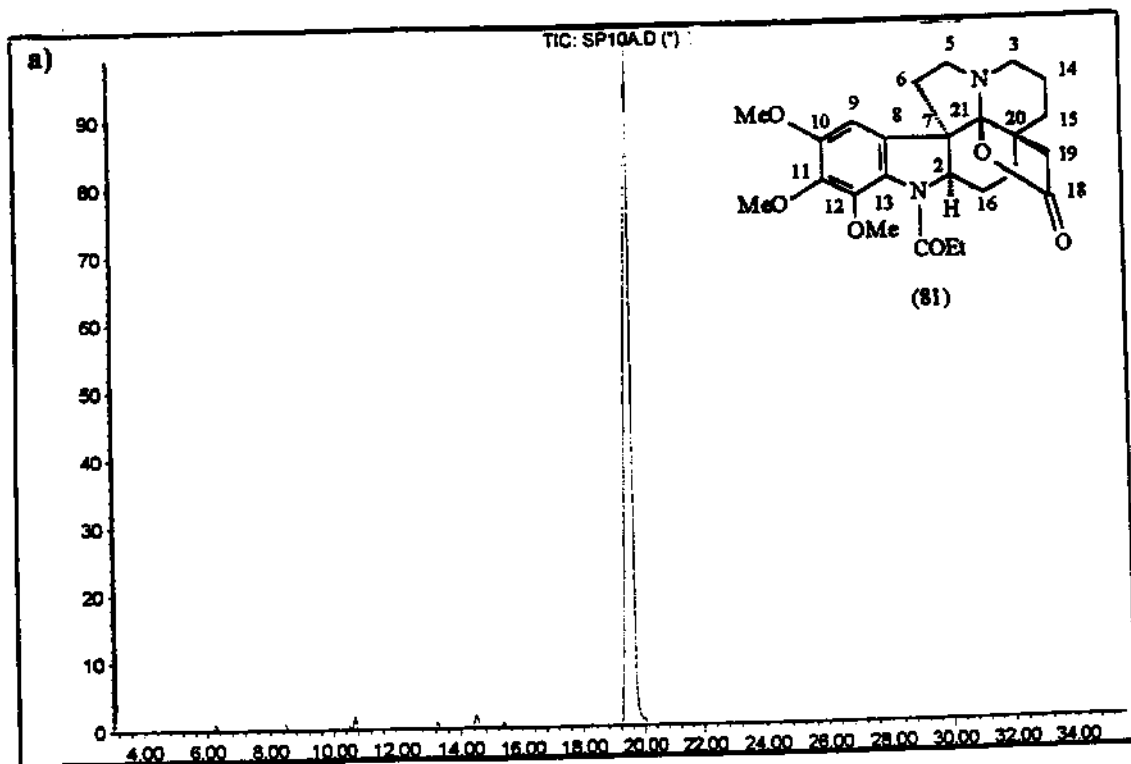
Reg A: L 256 = 0.74446

Reg A: L 218 = 1.2216

Espectro no UV-VIS da (-)-12-O-Metil-21-oxo-aspidoalbina (81).



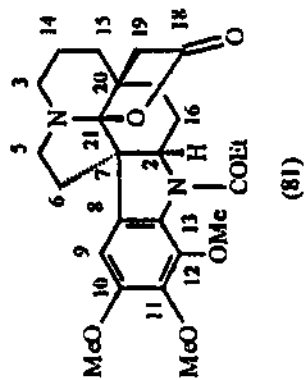
Espectro no Infravermelho da (-)-12-O-Metil-21-oxo-aspidoalbina (81).



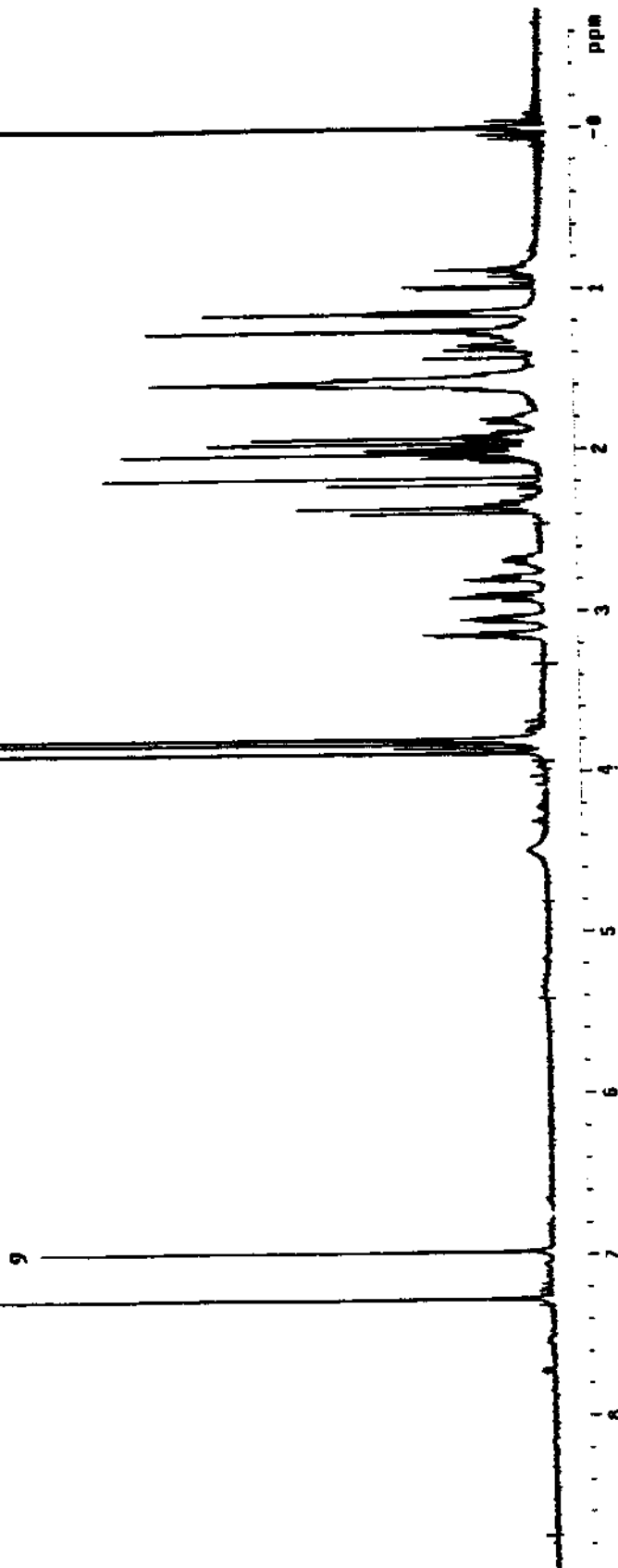
a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (-)-12-O-metil-aspidoalbina (81).

b) Espectro de massas da (-)-12-O-metil-aspidoalbina (81).

Art11d0 SP 10A fev14ajbh
 Pulse Sequence: szpu1
 Solvent: CDCl3
 Temp: 27.0 C / 300.1 K
 INOVA-500 "INOVAS500"
 PULSE SEQUENCE
 Relax delay 1.000 sec
 Pulse 21.3 degrees
 Acq. time 0.100 sec
 Width 8000.0 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE: H1, 499.8027630 MHz
 DATA PROCESSING
 FI size 65536
 Total time 2 minutes



12-OMe



Espectro de RMN ^1H da (-)-12-O-metil-aspidalbinsina (81).

Arildo SP 10A fev14mjbh

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃
Temp. 27.0 C / 300.1 K

File: fev14mjbh

INOVA-500 "nucrun"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 21.1 degrees

Acq. time 4.000 sec

Width 8000.0 Hz

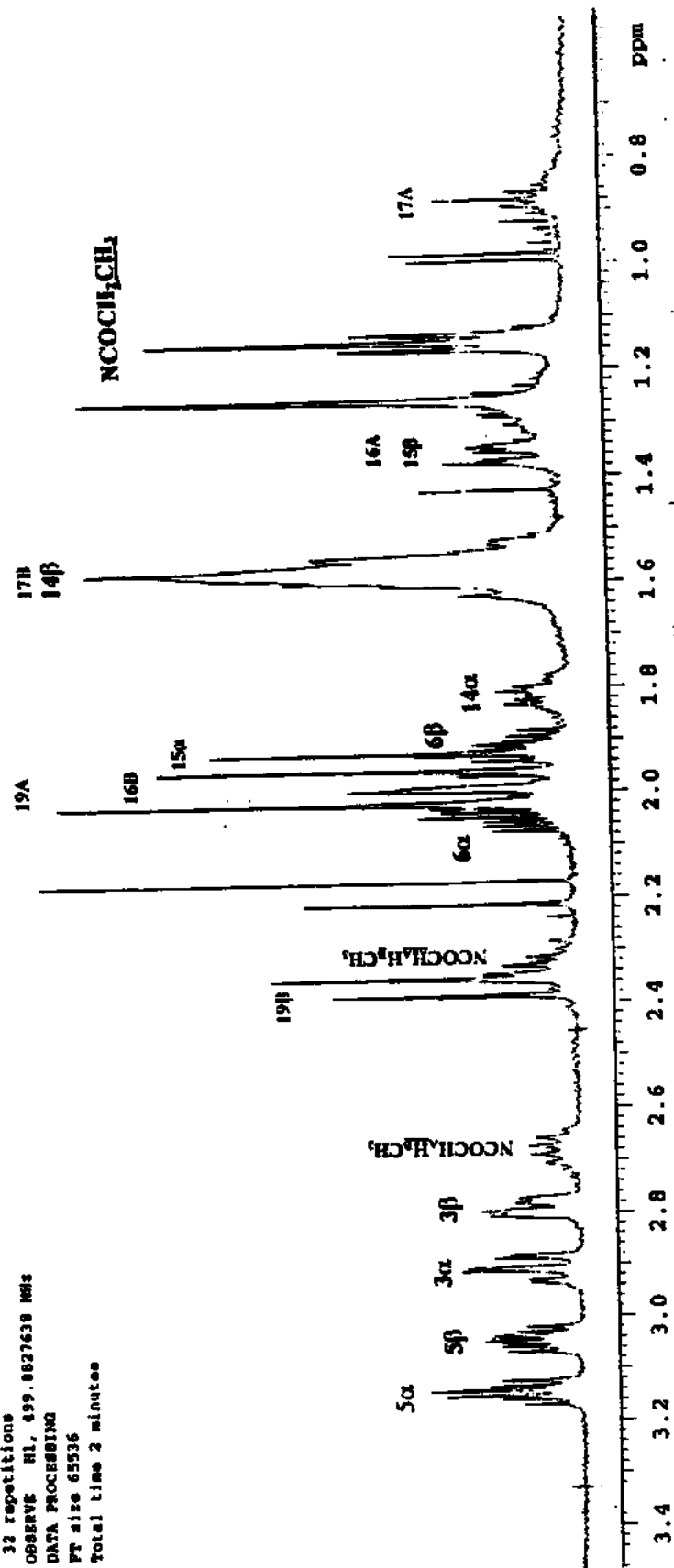
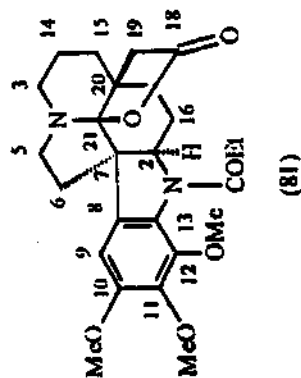
32 repetitions

OBSERVE N1, 499.8827638 MHz

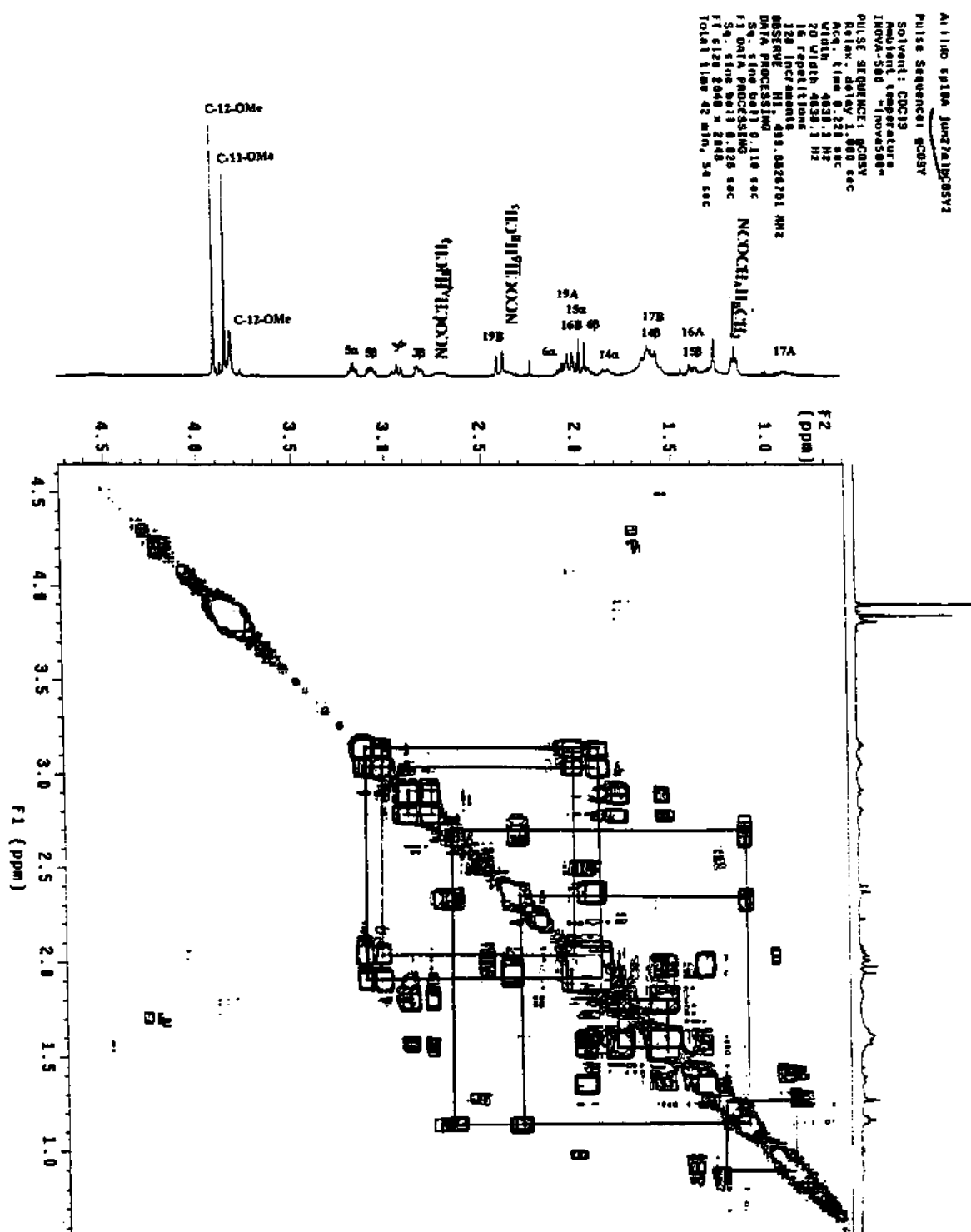
DATA PROCESSING

PT size 65536

Total time 2 minutes

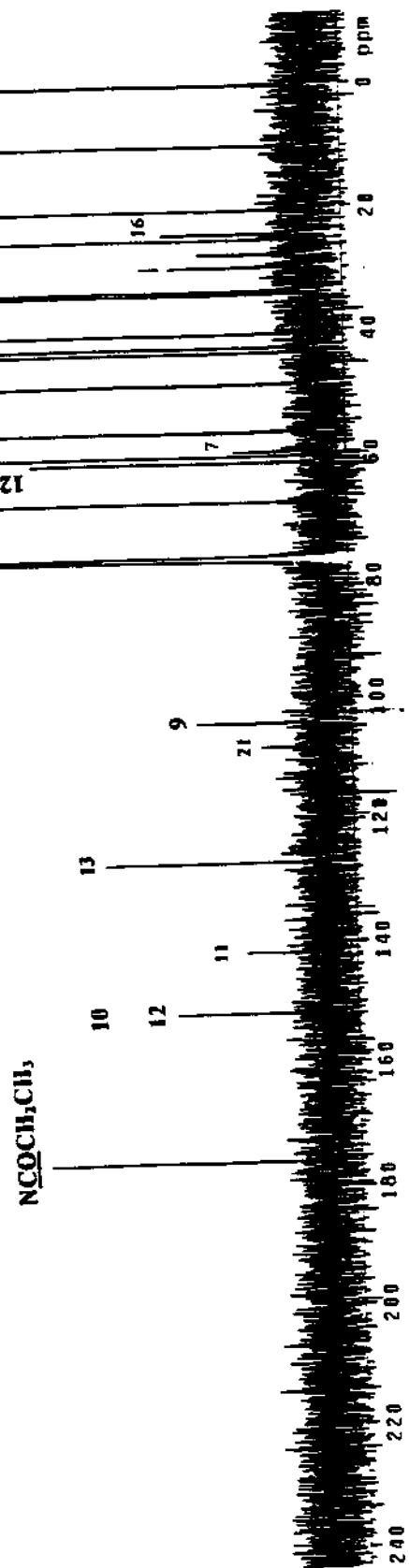
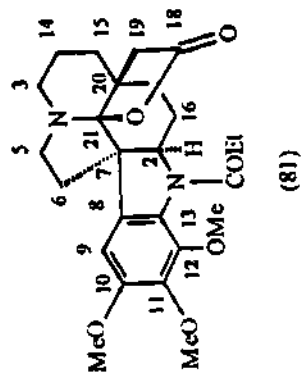


Espectro de RMN ¹H da (-)-12-O-metil-aspidobalina (81), ampliado de 0,8 a 3,4 ppm.



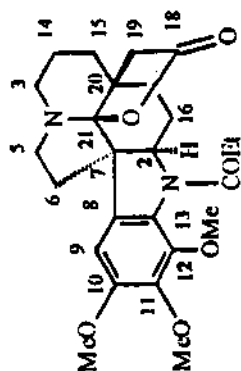
Espectro de correlação H-H (COSY) da (-)-12-O-Metil-21-oxo-aspidoalbina (81), ampliado de δ 0,00-4,50.

A11100 SP 10A fevinaJbc
 Pulse Sequence: szpul
 Solvent: CDCl3
 Temp: 22.0 C / 380.1 K
 Smp: sz user 1-14-87
 INOVA-500 "INOVAS00"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.500 sec
 Pulse 43.8 degrees
 Acq. time 1.324 sec
 Width 32831.3 Hz
 8000 repetitions
 OBSERVE C13, 125.8054201 MHz
 DECOUPLE H1, 411.8051557 MHz
 Power 33 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 131872
 Total time 5.8 hours



Espectro de RMN ^{13}C da (-)-12-O-metil-aspidobalina (81).

Pulse Sequence: dept



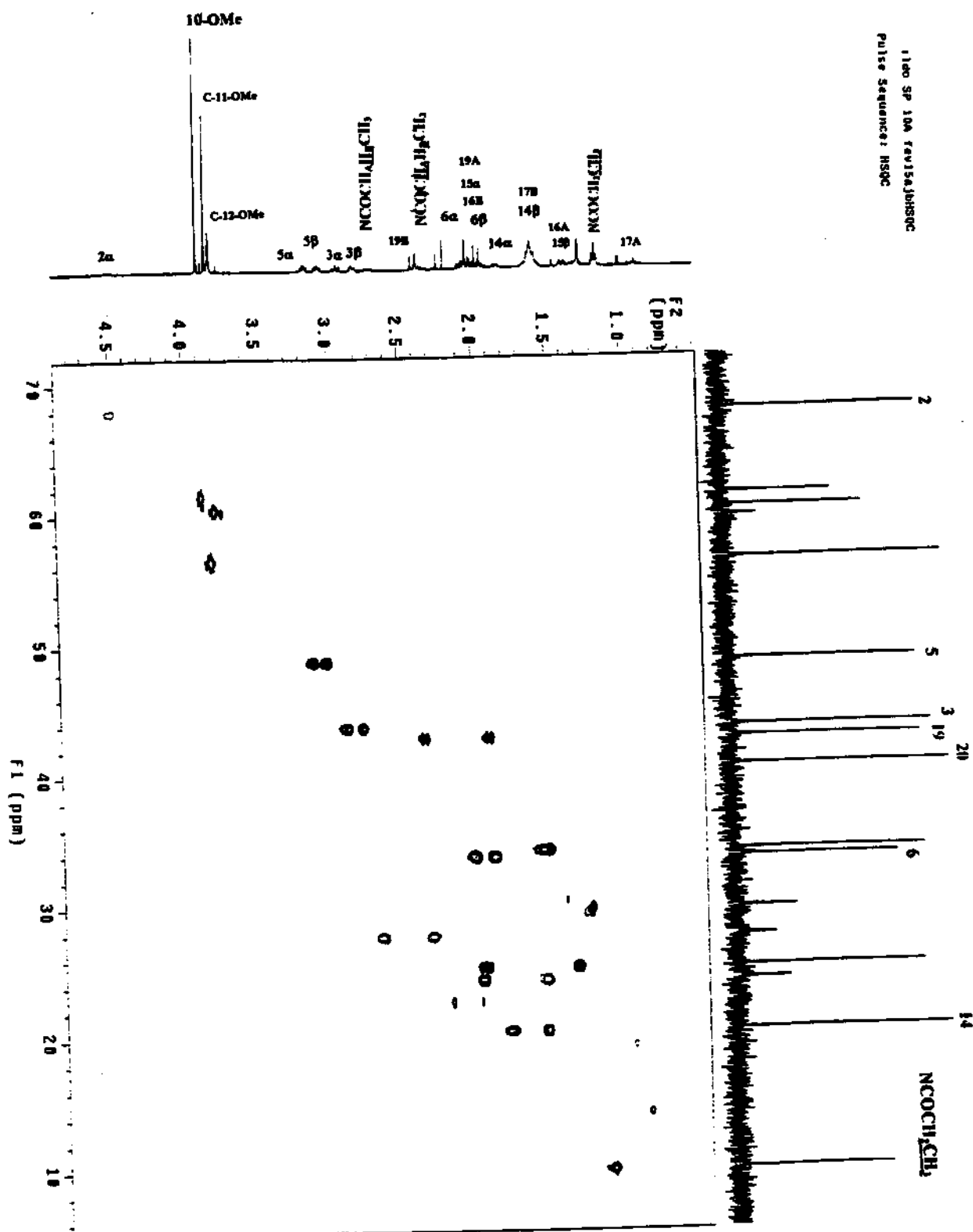
(81)

NC(=O)CH₃

NC(=O)CH₃

9

Espectro DEPT de RMN ¹³C da (-)-12-O-metil-aspidobina (81).



Espectro de correlação C-H (HETCOR) da (-)-12-OMe-21-oxo-aspidoalbina (81). 151

2.1.5. Obtenção de padrões em *A. ramiflorum*.

Três alcalóides conhecidos, 10-metóxi-geissoschizol (24), ramiflorina A (25), ramiflorina B (26), foram isolados de *A. ramiflorum*, Tabela 6. As estruturas e a configuração dos alcalóides conhecidos foram estabelecidas por comparação de seus dados físicos e espectrais com os existentes na literatura ou por comparação com padrões autênticos. Um quarto composto, a E-isositsiriquina (27) foi isolado pela primeira vez nesta espécie, o mesmo não havia sido isolado no estudo anteriormente realizado com esta espécie pelo grupo do Professor Dr. Francisco de Assis Machado Reis [47]. Apenas a elucidação estrutural do composto 27 será a seguir.

No estudo realizado posteriormente, experimentos visando o cultivo das células de *A. ramiflorum* "in vitro", estudamos o conteúdo alcaloídico das sementes desta espécie. O extrato alcaloídico das sementes é rico no composto β -yohimbina (10), que pode ser isolado, identificado deste extrato e utilizado como padrão nos estudos descritos nas outras partes deste trabalho.

Tabela 6. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. ramiflorum*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
<u>(+)-10metóxi-geissoschizol</u> (24)	+++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
<u>(+)-ramiflorina A</u> (25)	+++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
<u>(+)-ramiflorina B</u> (26)	+++	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C
(±)-E-isositsiriquina (27)	+	UV, IV, EM, RMN ¹ H, ¹³ C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

itálico - composto inédito

Composto 27 - (±)-19-E-isositsiriquina:

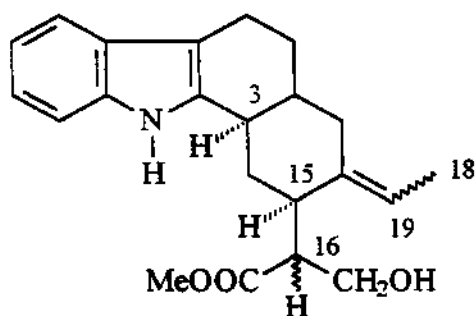
O composto 27 apresentou um ponto de fusão na faixa de 87 °C, e o valor da rotação óptica, realizada em EtOH à 25 °C, foi de $[\alpha]_{25}^D = 0,0^\circ$.

O espectro no IV de 27 mostrou absorções a 3345 cm^{-1} (NH, OH) e 1731 cm^{-1} referente a uma carbonila de éster [38].

As absorções no UV a 226 nm e 280 nm são características de um cromóforo indólico não substituído [39].

O seu espectro de massas mostrou um íon molecular a m/z 354 correspondendo a uma fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$, o íon a m/z 251 (pico base) resultado da fragmentação entre os carbonos C-17 e C-16, o íon intenso a m/z 353 $[\text{M}^+ - 1]$ e o íon a m/z 169, este conjunto de íons corresponde a um modelo de fragmentação característico de alcalóides com esqueleto corinante [43, 48].

Baseados nestas informações anteriores e nas biogênese deste tipos de alcalóides [48, 73] sugerimos uma estrutura para 27, sem ainda nenhuma definição da estereoquímica, que é mostrada abaixo.



estrutura proposta para (27)

A atribuição do espectro de RMN ^1H , ^{13}C do composto 27, Quadro 12 na pag. 156, foram feitas usando-se o experimento de DEPT e os dados de RMN ^1H , ^{13}C dos compostos 10-metóxi-geissoschizol (24) e outros modelos relacionados a seguir, Quadro 12 na pag. 156, com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida.

O espectro de RMN ^1H de 27 confirmou que o sistema indólico não tem substituintes devidos aos sinais de quatro hidrogênios presentes na região aromática. O singlete fino devido a três hidrogênios a 3,80 δ foi atribuído como sendo o do grupo metoxila do éster metílico.

A presença de um hidrogênio olefínico foi evidenciada por um quarteto centrado a 5,64 δ , acoplado a um dubleto a 1,67 δ indicando que o grupo metila está associado a um carbono olefínico. Uma vez que as constantes de acoplamento são as mesmas ($J = 6,0 \text{ Hz}$), em ambos casos, estes sinais são típicos de um grupo etilidênico possuindo uma ligação dupla trissubstituída.

As funções carbonila e metoxila acomodam dois dos átomos de oxigênio presentes nesta molécula. A natureza do terceiro oxigênio foi revelada pela presença de um singlete largo a 2,00 δ , que é característico de uma hidroxila alcoólica.

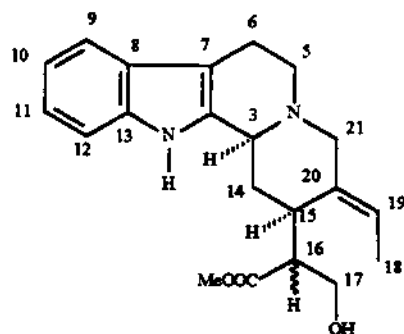
A determinação da estereoquímica relativa desta molécula será agora discutida. Em primeiro lugar, o hidrogênio ligado ao C-3 deve estar na posição α , bem como também o hidrogênio ligado ao C-15, uma vez que esta estereoquímica é a preferencial para esta série de alcalóides indólicos [48].

Estas contribuições biogenéticas auxiliam mas não permitem definir a estereoquímica de 27, a análise e discussão do espectro de RMN ^{13}C elucidou este problema.

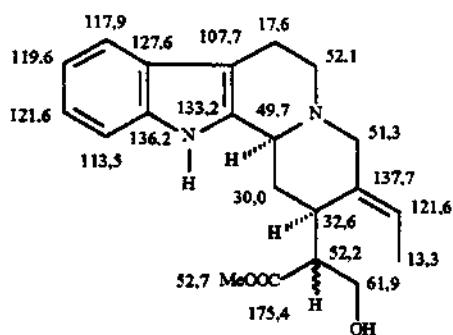
No espectro de RMN ^{13}C do composto 27, Quadro 12 na pag. 156, puderam ser assinalados um total de 21 carbonos, sendo destes duas metilas, uma do grupo carbometóxi a 52,7 δ e outra ligado ao grupo etilidênico a 13,3 δ (C-18), quatro carbonos metilênicos a 49,7 (C-3), 52,1 (C-5), 51,3 δ (C-21) e o carbono ligado diretamente ao grupo carbometoxila a 52,2 δ (C16), oito carbonos metínicos (4 aromáticos, 1 olefínico e 3 alifáticos) e 6 carbonos quaternários.

A atribuição e a definição da estereoquímica relativa de C-3 e C-15 e de todos os outros carbonos foram feitas empregando-se como modelos os compostos 10-metóxi-geissoschizol (24) e a geissoschizina (60), Quadro 12 na pag. 156, o que permitiu assinalar os outros carbonos da molécula sendo possível atribuir os prótons ligados aos C-3 e C-15 como tendo uma orientação α .

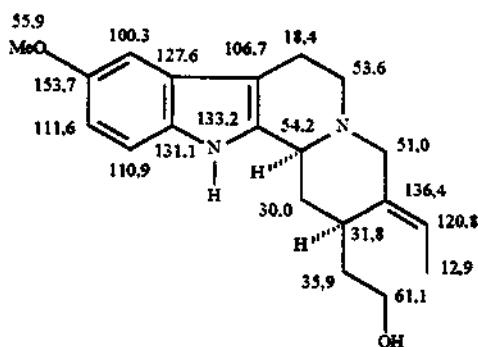
A cadeia lateral, o grupo etilidênicopode sere definido baseado nos dados de ressonância de hidrogênio da molécula 27 e mais especificamente dos H-18 e H-19, podemos notar que os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de 27 coincidentes com aqueles descritos para o composto (E)-isositsiriquina da literatura, Tabela 7a,b. Após estas definições, ficou ainda uma dúvida em relação a estereoquímica do centro assimétrico no C-16. O próton ligado ao C-16 aparece no espectro de RMN ^1H na forma de um multiplete a 2,52 δ , o que é coerente com o valor descrito na literatura [49] para o composto 16R-(E)-isositsiriquina, Tabela 7a,b, que por comparação permitiu atribui-lo como sendo 16R. Com todas estas informações anteriores e os outros dados físicos e espectrais podemos atribuir ao composto 27 a estrutura da 16R-19-(E)-isositsiriquina, porém o valor de $[\alpha]_D^{25}$ parece ser uma mistura enantiomérica.



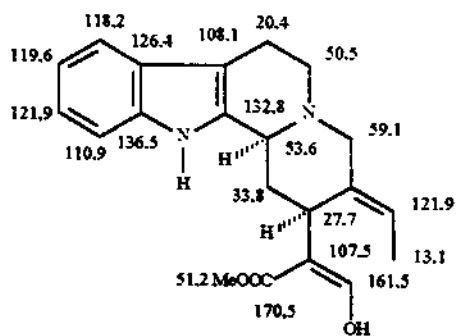
(27)



Atribuição de RMN ^{13}C do composto (27)
isolados dos extratos de *A. ramiflorum*



10-metóxi-geissoschizol (24)

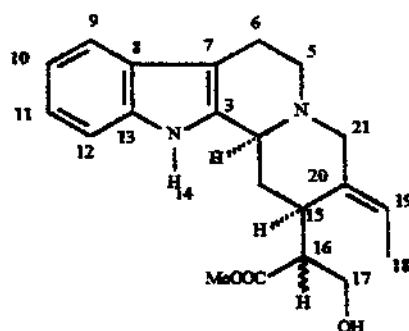


geissoschizina (60)

Quadro 12. Atribuição de RMN ^{13}C do composto (27) e compostos modelos [47, 50].

Tabela 7a. Dados de ^1H NMR das Isositsiriquinas [49].

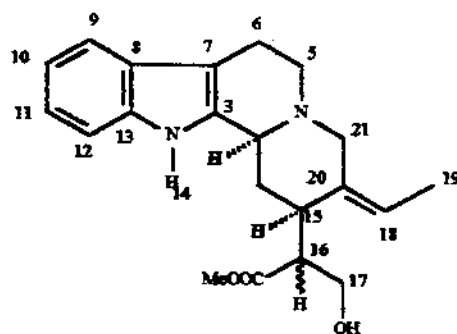
(E)-isositsiriquina (A)			16-epi-(E)-isositsiriquina (B)	
Próton	δ	J (Hz)	δ	J (Hz)
3 α -H	4,31 br s	J5 α , 5 β = 12	3,90 br s	J5 α , 5 β = 12
5 α -H	3,15 ddd	J5 α , 6 α = 4	2,84 ddd	J5 α , 6 α = 4
5 β -H	3,27 dd	J5 α , 6 β = 12	3,17 dd	J5 α , 6 β = 12
6 α -H	2,65 br d	J5 β , 6 α = 1	2,68 br d	J5 β , 6 α = 12
6 β -H	3,0 m	J5 β , 6 β = 5,5	3,0 m	J5 β , 6 β = 5,5
9-12-H	7,1-7,48	J6 α , 5 β = 15	7,09-7,48	J6 α , 5 β = 15
14 α -H	2,26a m	J16- 17 = 7	2,27b m	J16- 17 = 5
14 β -H	2,22a m	J16- 17 = 5	2,25b m	J16- 17' = 5
15 α -H	3,10 m	J17- 17' = 5	3,38 m	J17- 17' = 5
16-H	2,52 m	J18- 19 = 6,5	2,66 m	J18- 19 = 6,5
17-H	3,55 br dd	J19- 21 α < 0,5	3,92 br dd	J19- 21 α < 0,5
17'-H	3,50 br dd	J19- 21 β < 0,5	3,87 br dd	J19- 21 β < 0,5
18-H	1,67 d	J21 α -21 β = 12	1,63 d	J21 α -21 β = 12
19-H	5,64 br q		5,52 br q	
21 α -H	3,54 br d		3,08 br d	
21 β -H	2,93 br d		3,80 br d	
CO ₂ CH ₃	3,67 s		3,57 s	
NH	8,67 br s		8,23 br s	



16R - (E)-isositsiriquina (A)
16S - Epi- (E)-isositsiriquina (B)

Tabela 7b. Dados de ^1H NMR das Isositsiriquinas [49].

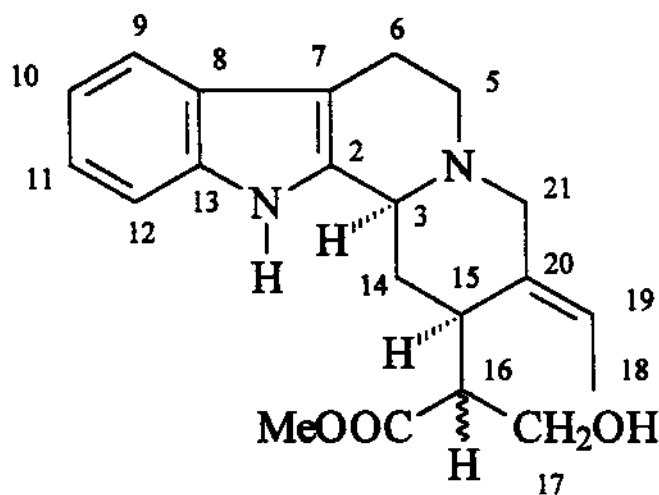
(Z)-isositsiriquina (C)			16-epi-(Z)-isositsiriquina (D)	
Próton	δ	J (Hz)	δ	J (Hz)
3 α -H	3,64 br d	J3 α , 14 β = 4	3,44 br d	J3 α , 14 α = 4
5 α -H	2,74 m	J3 α , 14 β = 12	2,63 ddd	J3 α , 14 β = 12
5 β -H	3,19 dd	J5 α , 5 β = 12	3,11 dd	J5 α , 5 β = 12
6 α -H	2,76 br d	J5 α , 6 β = 12	2,73 br d	J5 α , 6 β = 12
6 β -H	3,0 m	J5 β , 6 α = 1,0	3,0 m	J5 β , 6 α = 1,0
9-12-H	7,1-7,48	J5 β , 6 β = 5,5	7,06-7,45	J5 β , 6 β = 5,5
14 α -H	2,17 ddd	J6 α - 6 β = 15	2,26 ddd	J6 α - 6 β = 15
14 β -H	1,72 m	J14 α - 14 β = 12	1,42 ddd	J14 α - 14 β = 12
15 α -H	2,66 m	J14 α - 15 β = 4	2,82 m	J14 α - 15 β = 4
16-H	3,01 m	J14 β - 15 α = 12	2,94 m	J14 β - 15 α = 12
17-H	3,94 br dd	J16- 17 = 7,0	3,95 br dd	J16- 17 = 7,0
17'-H	3,85 br dd	J16- 17' = 5,0	3,88 br dd	J16- 17' = 5,0
18-H	1,74 d	J17- 17' = 12	1,67 d	J17- 17' = 12
19-H	5,48 br q	J18- 19 = 6,5	5,36 br q	J18- 19 = 6,5
21 α -H	2,91 br d	J19- 21 α < 0,5	2,76 br d	J19- 21 α < 0,5
21 β -H	3,82 br d	J19- 21 β < 0,5	3,85 br d	J19- 21 β < 0,5
CO ₂ CH ₃	3,76 s	J21 α - 21 β = 12	3,72 s	J21 α - 21 β = 12
NH	7,91 br s		8,21 br s	



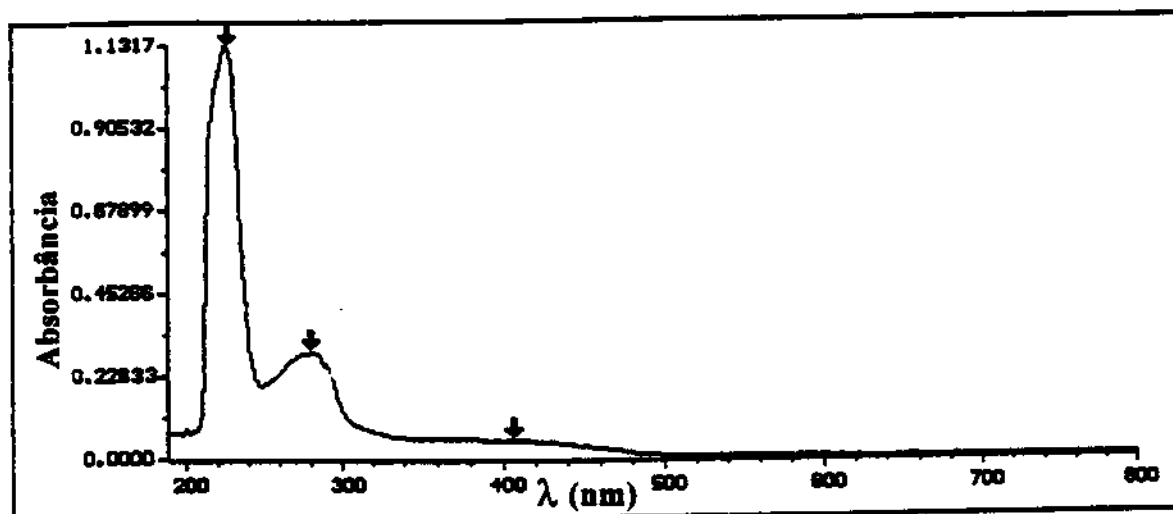
16R - (E)-isositsiriquina (C)

16S - Epi- (E)-isositsiriquina (D)

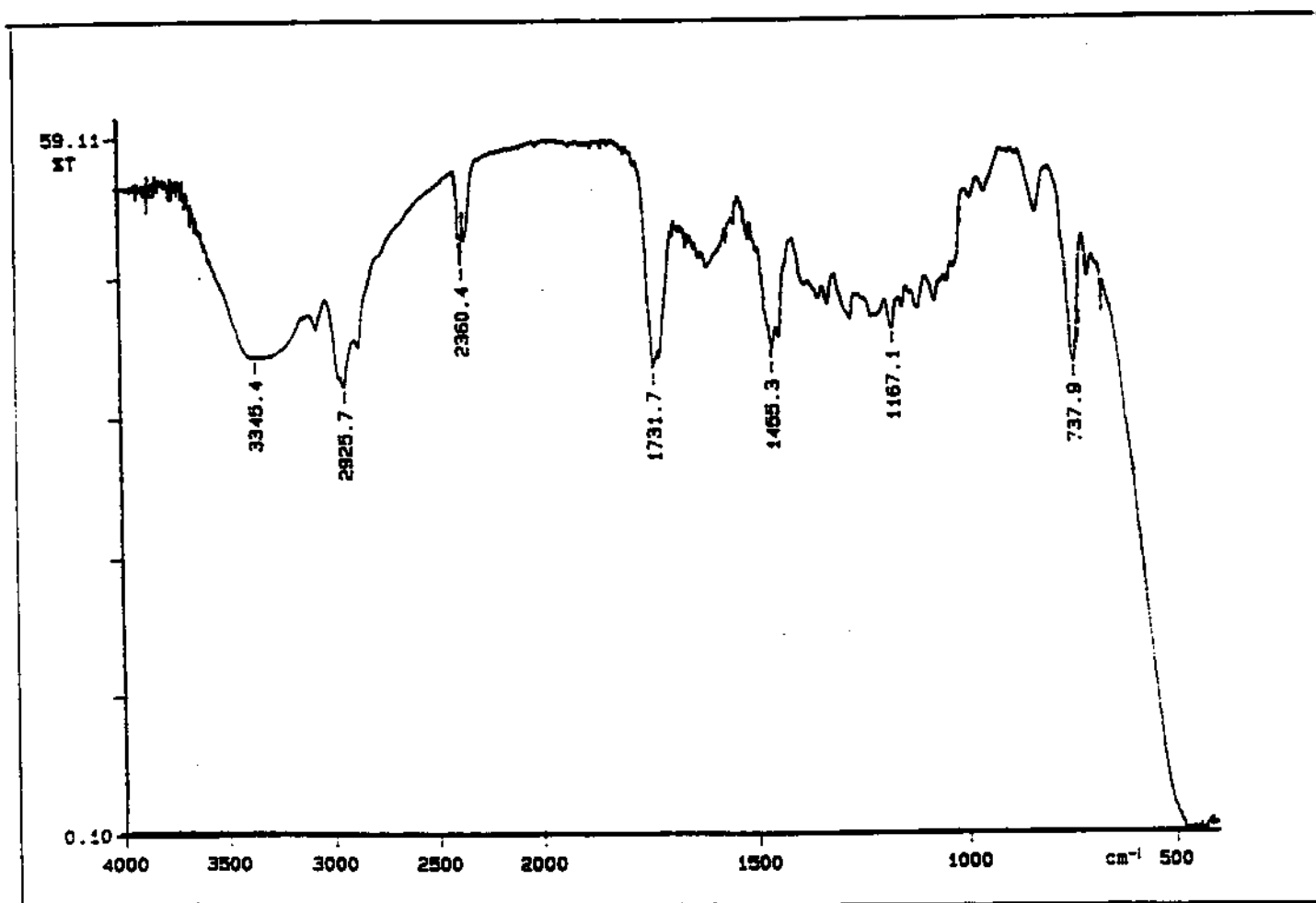
(+/-)-(E)-isositsiriquina (27): P. F. = 87°C; P. F. lit = 205 °C (na forma de sulfato, ref. [17,18,31]. $[\alpha]_D \approx 0,0$ (EtOH, $c=0,08$); $[\alpha]_D$ lit. = -20,0, ref. [17, 18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3345 (N-H e OH), 1731 (COOMe). UV $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$ (EtOH): 291 ($\log \epsilon = 3,83$), 283 ($\log \epsilon = 3,92$), 221 ($\log \epsilon = 4,53$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,3 (1H, sl, H-3 α) 3,12 (1H, m, H-5 α), 3,30 (1H, m, J= 13, J= 7,3, H-5 β), 2,65 (1H, dd, J= 15,0, J=4,8, H-6 α), 3,00 (1H, m, H-6 β), 7,40 (1H, t, J= 7,50, H-9), 7,12 (1H, d, J= 7,50, H-10), 7,12 (1H, d, J= 7,50, H-10), 7,48 (1H, d, J= 7,5, H=12), 2,26 (1H, m, H-14 α), 2,20 (1H, m, J= 5,0, H-14 β), 3,10 (1H, m, H-15 α), 2,52 (1H, m, H-16), 3,55 (1H, m, H-17R), 3,50 (1H, m, H-17S), 1,67 (3H, d, J= 6,0, J= 1,1, H-18), 5,64 (1H, q, J= 6,00, H-19), 3,54 (1H, m, H-21 α), 2,93 (1H, m, H-21 β), 3,8 (3H, s, C=OOMe), 8,75 (1H, s, N-H), 2,0 (1H, s, OH). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 133,2 (C-2), 49,7 (C-3), 51,3 (C-5), 17,6 (C-6), 107,7 (C-7), 127,6 (C-8), 117,9 (C-9), 121,6 (C-10), 119,5 (C-11), 111,3 (C-12), 30,0 (C-14), 32,5 (C-15), 52,3 (C-16), 61,9 (C-17), 13,3 (C-18), 121,6 (C-19), 137,7 (C-20), 52,1 (C-21), 175,4 (C=OOMe), 52,7 (OMe). CG/EM m/z (A. R. %): 354 (82), 353 (90), 323 (38), 251 (100), 169 (45).



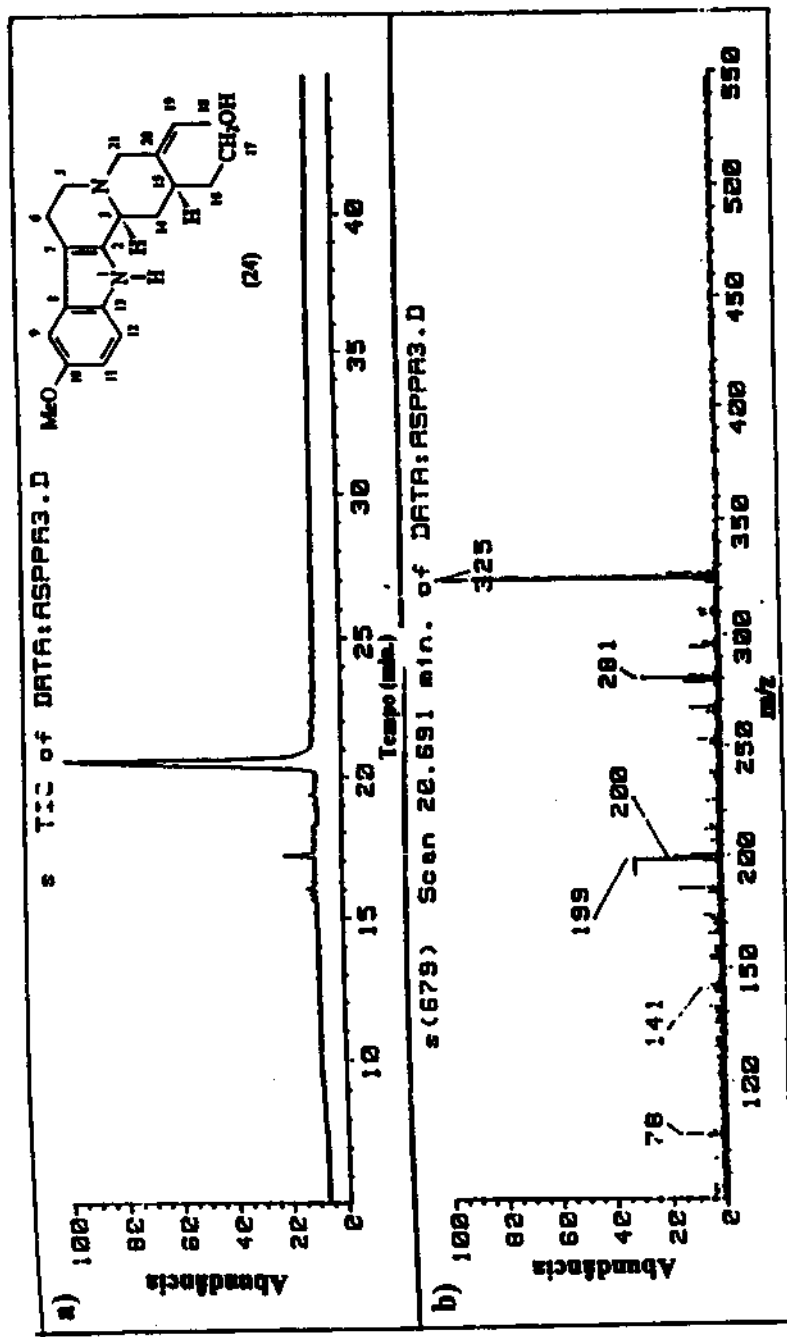
(27)



Espectro no UV-VIS da E-isositsiriquina (27).

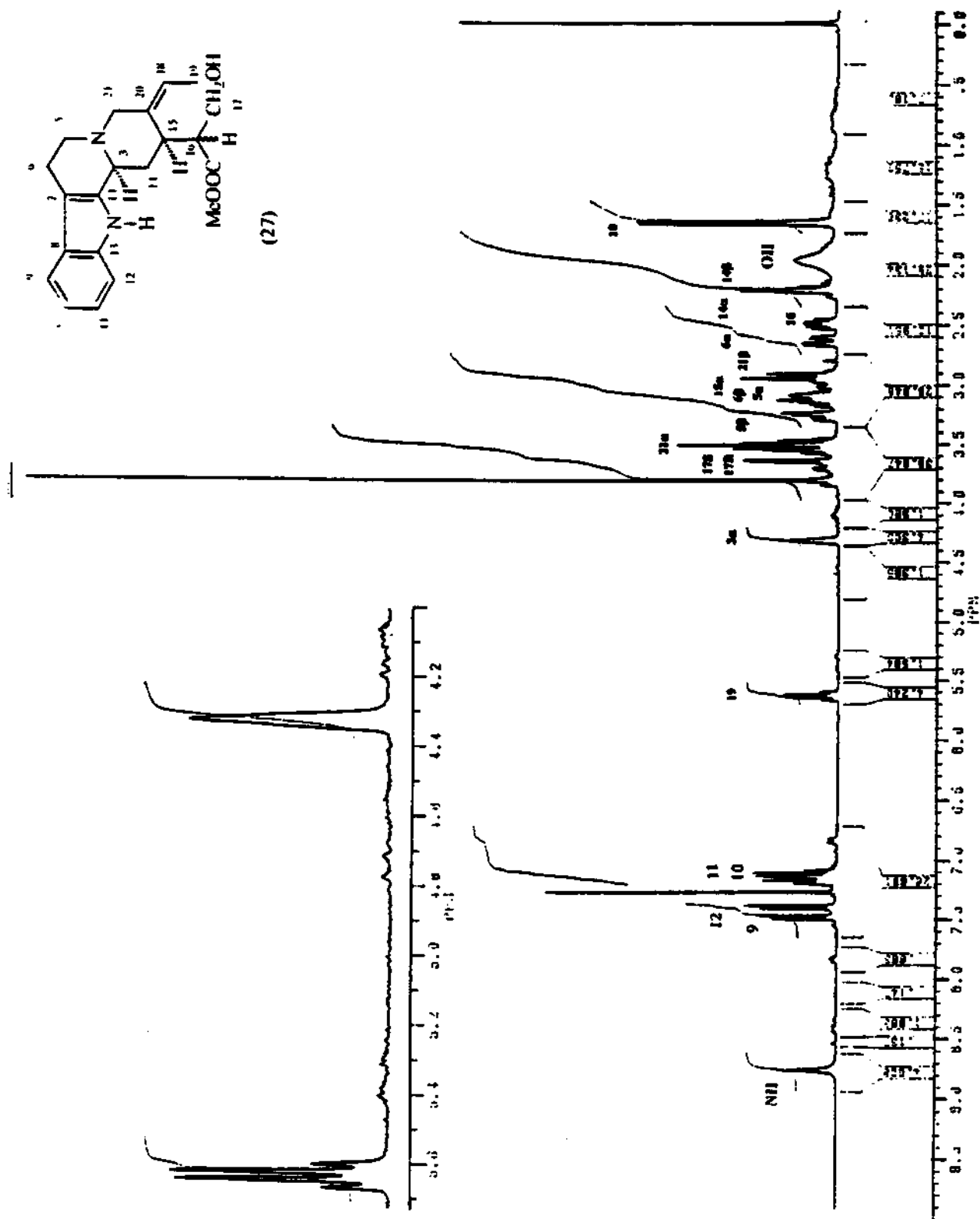


Espectro no Infra-Vermelho da E-isositsiriquina (27).

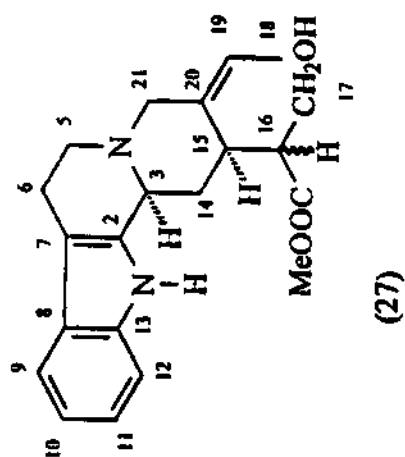


a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da *E*-isositsiriquina (27).

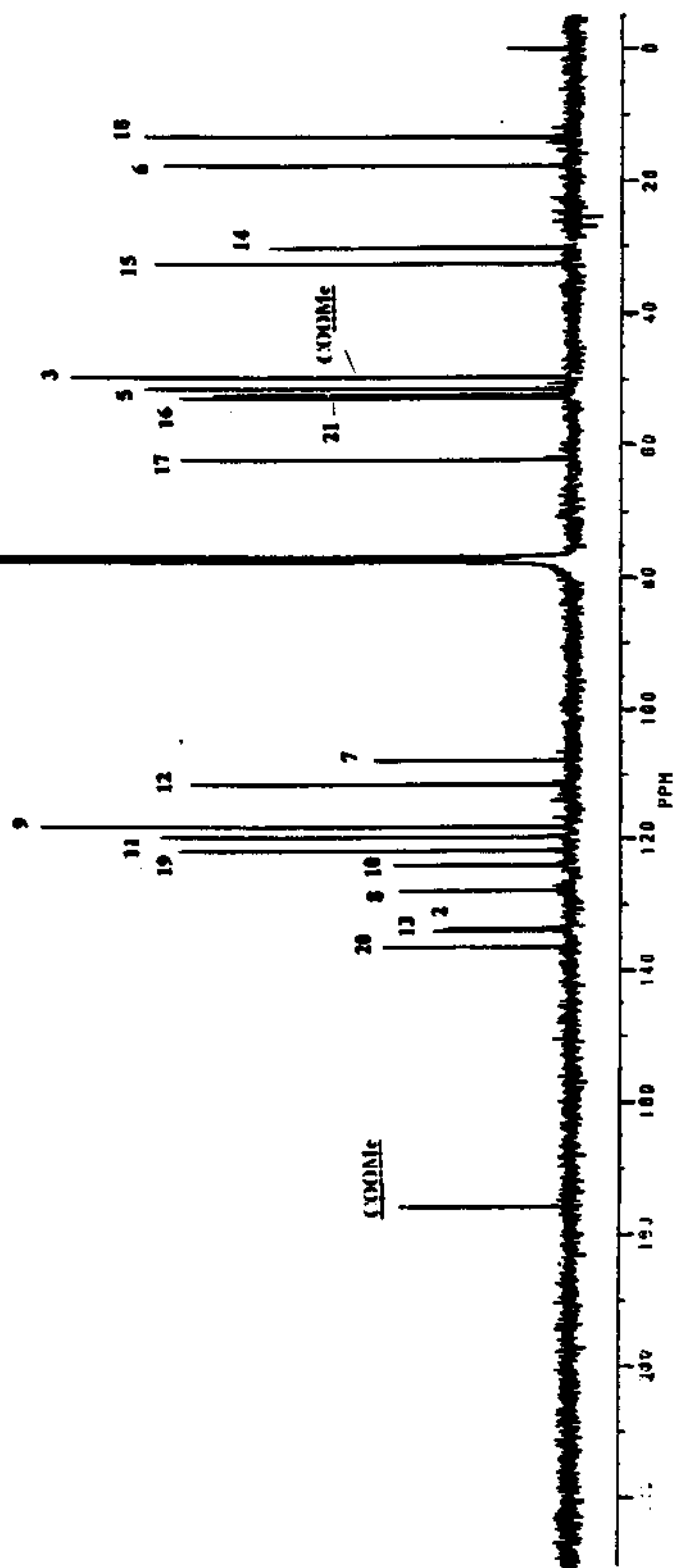
b) Espectro de massas da *E*-isositsiriquina (27).



Espectro de RMN ^1H da *E*-isositsiriquina (27).



(27)



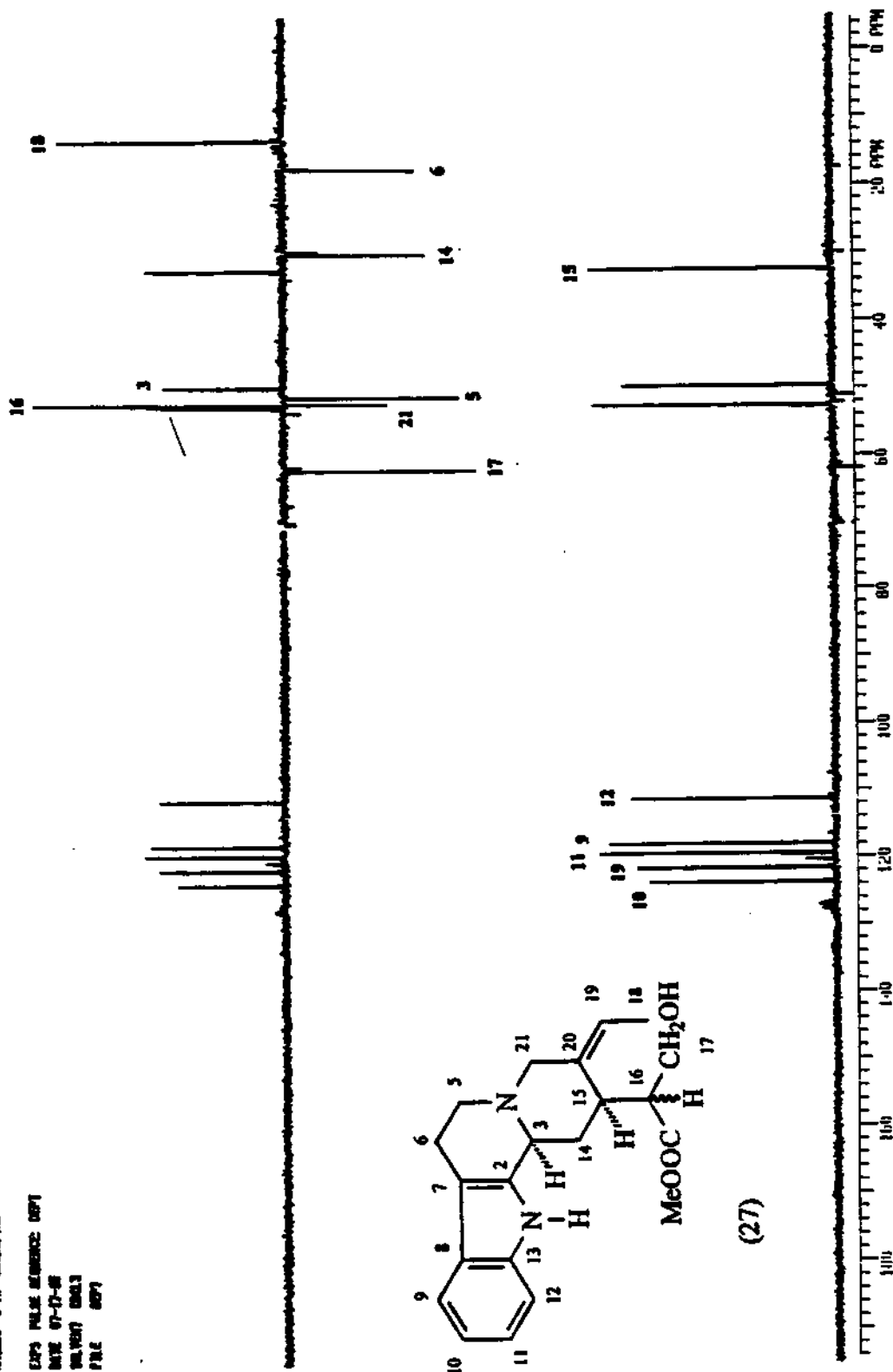
ARLDB '9-76' 00011700

DATA PULSE SEQUENCE DEPT

DATE 07-17-88

ANALYST 00013

FILE 0071



164 Espectro DEPT de RMN ¹³C da *E*-isotsiriquina (27).

2.1.6. Obtenção de padrões em *A. dispersum*.

Quatro alcalóides conhecidos: (-)-aspidospermina (9B), (+)-1,2-desidroaspidospermidina (28), geissosvellina (29) e (-)-*N*-acetil-cilindrocarpinol (30), foram isolados e identificados em *A. dispersum*, Tabela 8. Dos quatro apenas o alcalóide (-)-*N*-acetil-cilindrocarpinol (30) havia sido isolado anteriormente desta espécie [47].

Tabela 8. Alcalóides isolados dos extratos clorofórmicos de *A. dispersum*.

Alcalóide	Abundância Relativa	Métodos de Identificação
(-)-aspidospermina (9B)	+++	UV, IV, EM, ^1H , ^{13}C
(+)-1,2-desidroaspidospermina (28)	+++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
geissosvellina (29)	++	UV, IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C
<u>(-)-<i>N</i>-acetil-cilindrocarpinol (30)</u>	+++	IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C

++++ - componente principal (> 50mg)

+++ - componente importante (10-50 mg)

++ - componente menor (4-10 mg)

+ - traços (< 4 mg)

negrito - composto isolado no trabalho de doutorado.

sublinhado: composto já isolado anteriormente nesta espécie por outros pesquisadores e descrito na literatura.

italico - composto inédito

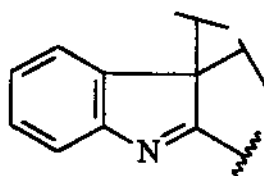
Compostos (9B) e (30)

A (-)-aspidospermina (9B) e (-)-*N*-acetil-cilindrocarpinol (30) foram identificados por métodos físicos, espectrais e ou por comparação com padrões autênticos.

Composto (28) – (+)-1,2-desidro-aspidospermidina:

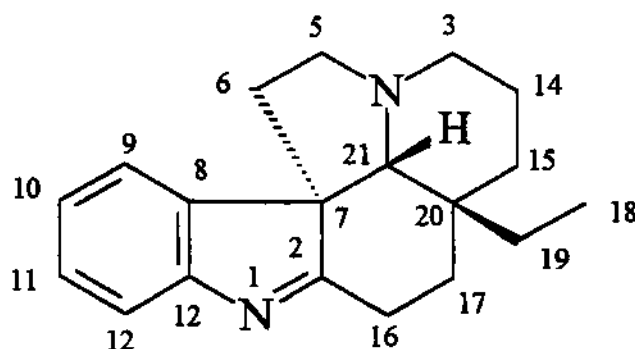
O composto 81 apresentou um valor de rotação óptica de $[\alpha]_{25}^D = +42,53^\circ$, realizada usando-se metanol como solvente.

Este alcalóide exibiu um espectro no UV típico de uma cromóforo indolenina, com máximos a 218, 232 e 282 nm [39].



cromóforo indolenina

O espectro de massas mostrou o íon molecular a m/z 280, correspondendo a uma fórmula molecular $C_{19}H_{24}N_2$, o íon a m/z 251 $[M^+ - C_2H_5]$, os íons a m/z 210 e m/z 125. Este conjunto de picos no espectro de massas são característicos do composto (-)-1,2-desidro-aspidospermidina, já descrito na literatura, isolado de *Aspidosperma quebracho-blanco* [51], mas que não possuía dados e RMN de 1H , ^{13}C de alta resolução. Baseados nestes dados de espectrometria de massas e UV sugeriu-se que o composto deve apresentar uma estrutura similar a da (+)-1,2-desidro aspidospermidina.



(+)-1,2-desidro-aspidospermidina

As atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do composto 28 foram feitas usando-se o experimento de DEPT e empregando-se o composto (-)-aspidospermina (9B), também isolado desta espécie, como composto modelo com o objetivo de confirmar a estrutura sugerida, Quadro 13 na pag. 169.

O espectro de RMN ^1H mostrou claramente o tripleto a campos altos a 0,50 δ (CH_2CH_3), o quarteto a 0,64 δ (CH_2CH_3), e os sinais aromáticos assinalados entre 6,15-7,53 δ .

Uma inspeção mais detalhada permitiu assinalar os hidrogênios aromáticos do H-9 (d a 7,53 δ , $J = 7,2$ Hz), H-10 e H-11 (m a 7,25 δ , $J = 7,2$ Hz), e H-12 (t a 6,17 δ , $J = 7,2$ Hz) com base nos acoplamentos esperados para um sistema indólico não substituído.

A presença de um sinal de um carbono quaternário a 193,0 δ atribuído como o C-2 que está ligado por uma dupla ao nitrogênio do anel indólico ($N = C_2$), caracteriza um sistema indolenina. Este valor está coerente com o deslocamentos químicos descritos na literatura [51] para o composto 31 com um esqueleto indolenina, Quadro 13. O carbono que sobrou no anel indolenina (C-7) foi assinalado como o sinal de carbono não ligado a hidrogênio a 58,1 δ pela comparação com os dados da (-)-aspidospermina (9B) (C-7 a 53,3 δ) e da (+)-20R-1,2-desidro-aspidospermidina (31) (C-7 a 62,7 δ [52]), Quadro 13 na pag. 169.

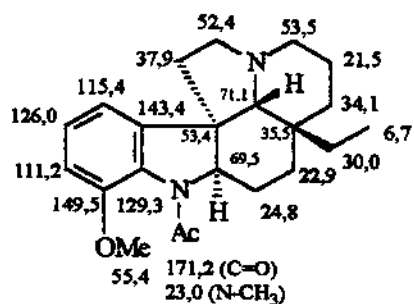
Todos os carbonos metilênicos foram revelados pelos experimentos de DEPT e os hidrogênios a eles ligados foram sugeridos pelo seu modelos e constantes de acoplamentos

e pela comparação com os compostos 9B e 31. Os sinais a campos mais altos 3,26-3,00 δ foram atribuídos aos prótons H-5 α , H-3 α e H-16B, os dois primeiro devido a sua grande proximidade do par de elétrons não compartilhados do N-4, o H-16B mostra sinal a campo mais alto ($\delta = 3,10$), também o H-16A que mostra sinal a 2,60 δ , ambos cerca de $\Delta\delta = +1,00$ ppm em relação ao H-16A de 9B.

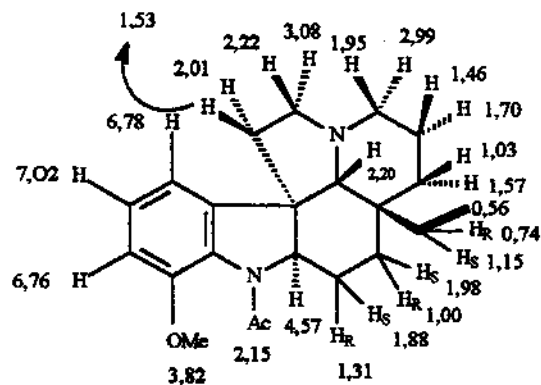
Outro hidrogênio que pode ser atribuído, foi o correspondente a um sinal a 1,86 δ , pois é o único que apresenta um modelo de acoplamento na forma de um quarteto de tripleto. Este sinal deve-se ao H-14 α pois o C-14 é o único átomo de carbono adjacente a dois grupos metilênicos.

Os hidrogênios remanescentes nos dois sistemas de spin foram identificados por comparação com os modelos 9B e 31. Estas comparações permitiram também atribuir o C-21 ao sinal 79,0 δ , o singlete a 2,42 δ (H-21 β) no espectro de hidrogênio e o C-20 a 36,3 δ .

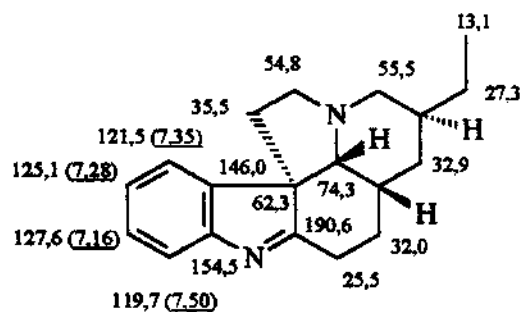
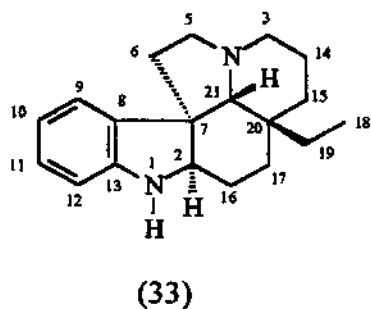
O conjunto de todos estes dados permitiu atribuir a estrutura do composto 28 como sendo a da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina.



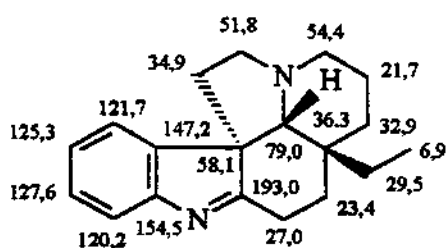
dados de RMN ^{13}C em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42].



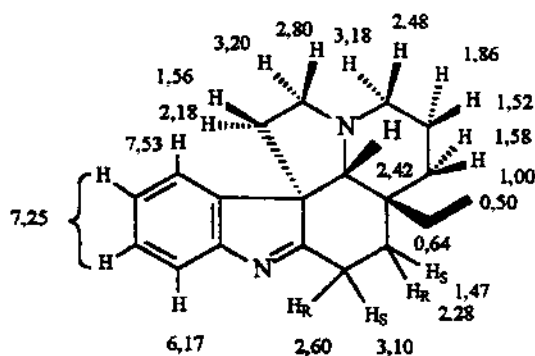
dados de RMN ^1H em CDCl_3
da (-)-aspidospermina (9B),
descritos na literatura [42]



20R-1,2-desidro-pseudo-
aspidospermidina (31)
(6) dados de RMN ^{13}C

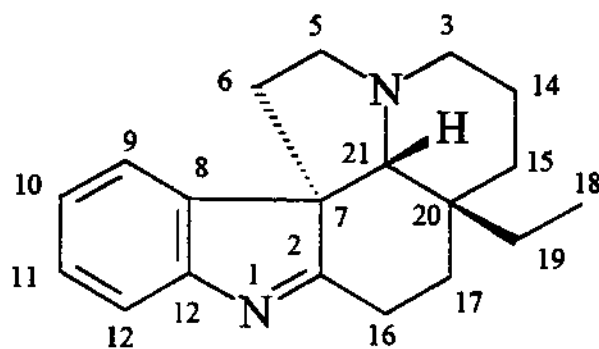


composto (28)

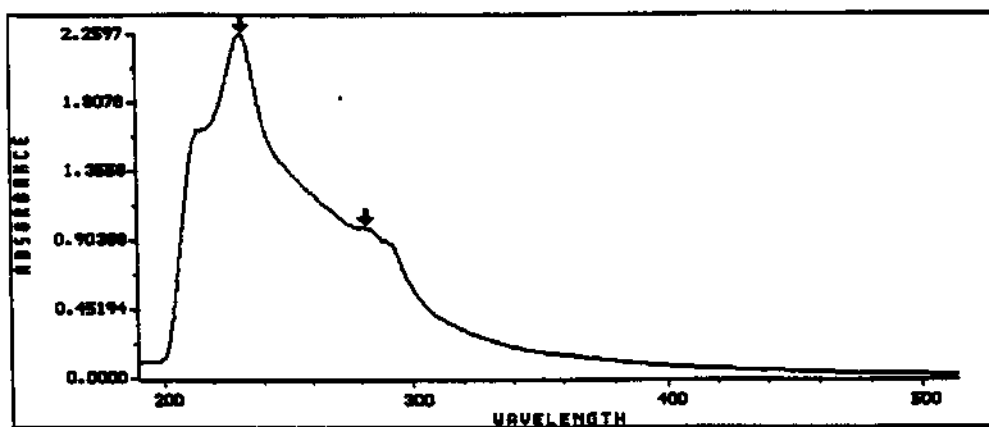


Quadro 13. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (28) e dos compostos modelos (-)-aspidospermina (9B), 20R-1,2-desidro-pseudo-aspidospermidina (31).

1,2-desidro-aspidospermidina (28): UV λ_{max} nm (EtOH): 253 ($\log \epsilon = 3,78$), 228 ($\log \epsilon = 4,00$), 222 ($\log \epsilon = 4,30$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,18 (1H, m, H-3 α), 2,48 (1H, dd, $J = 13,2$ Hz, $J = 3,3$ Hz, H-3 β), 3,20 (1H, m, H-5 α), 2,80 (ddd, $J = 10,2$ Hz, $J = 3,3$ Hz), 2,18 (1H, m, H-6 α), 1,56 (1H, m, H-6 β), 7,35 (1H, t, $J = 8,0$, H-9 *), 7,25-7,30 (1H, m, H-10 e H-11), 7,53 (1H, d, $J = 8,0$, H-12 *), 1,86 (dq, $J = 12,9$ Hz, H-14 α), 1,52 (1H, m, H-14 β), 1,58 (1H, m, H-15 α) 1,0 (1H, dt, $J = 13,5$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H-15 β), 2,60 (1H, m, H-16A), 3,1 (1H, ddd, H16B), 1,28 (1H, m, H-17A), 1,47 (1H, m, H-17B), 0,50 (3H, t, $J = 6,9$, H-18), 0,65 (2H, q, $J = 6,9$, H-19), 2,42 (1H, s, H-21 β). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 193,0 (C-2), 51,8 (C-3), 54,4 (C-5), 34,9 (C-6), 58,1 (C-7), 147,2 (C-8), 121,7 (C-9), 125,3 (C-10), 127,6 (C-11), 120,2 (C-12), 154,5 (C-13), 21,7 (C-14), 32,9 (C-15), 27,0 (C-16), 23,4 (C-17), 6,9 (C-18), 29,5 (C-19), 36,2 (C-20), 69,0 (C-21). CG/EM m/z (A. R. %): 280 (100), 251 (24), 210 (48), 194 (22), 157 (15), 125 (12).



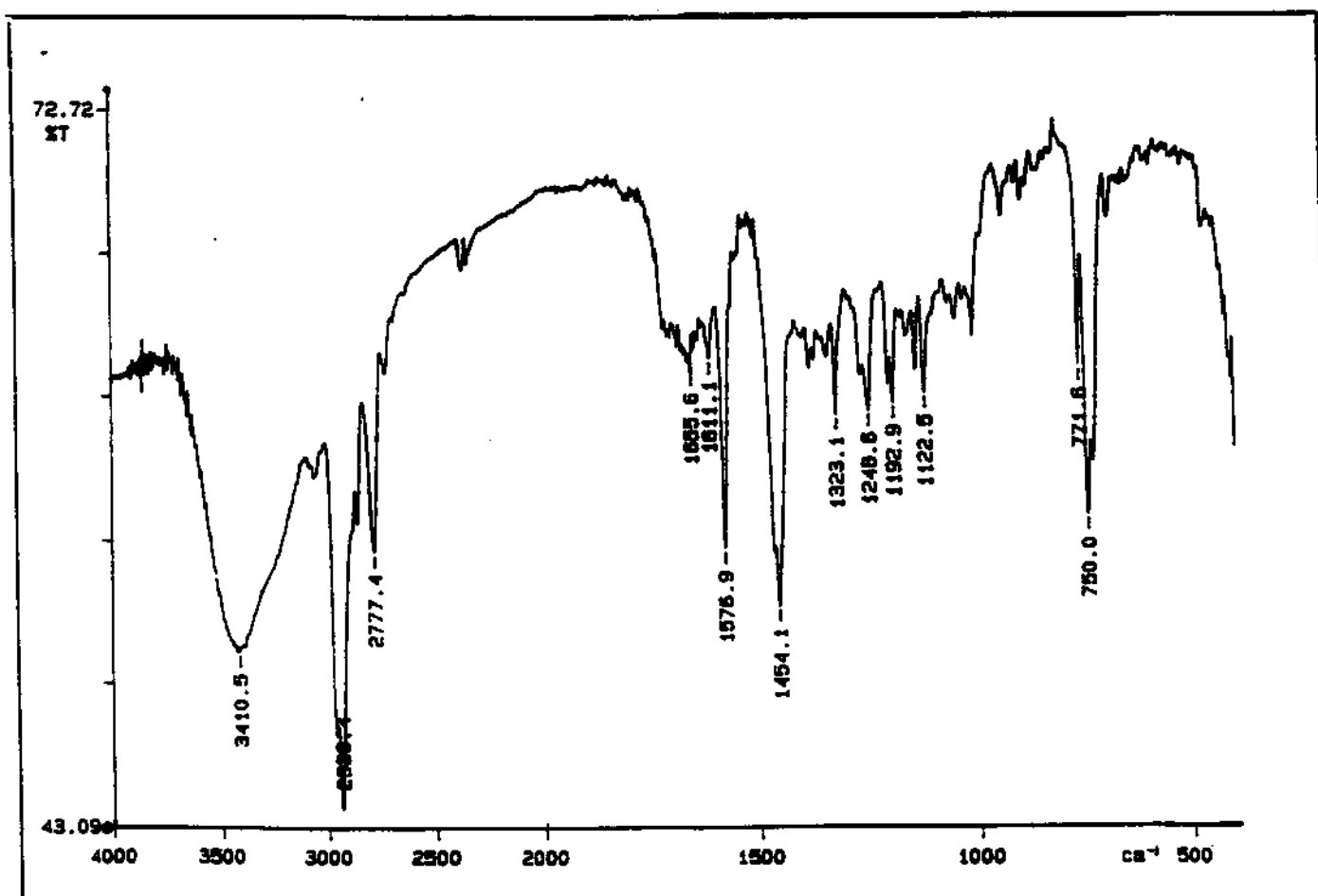
(28)



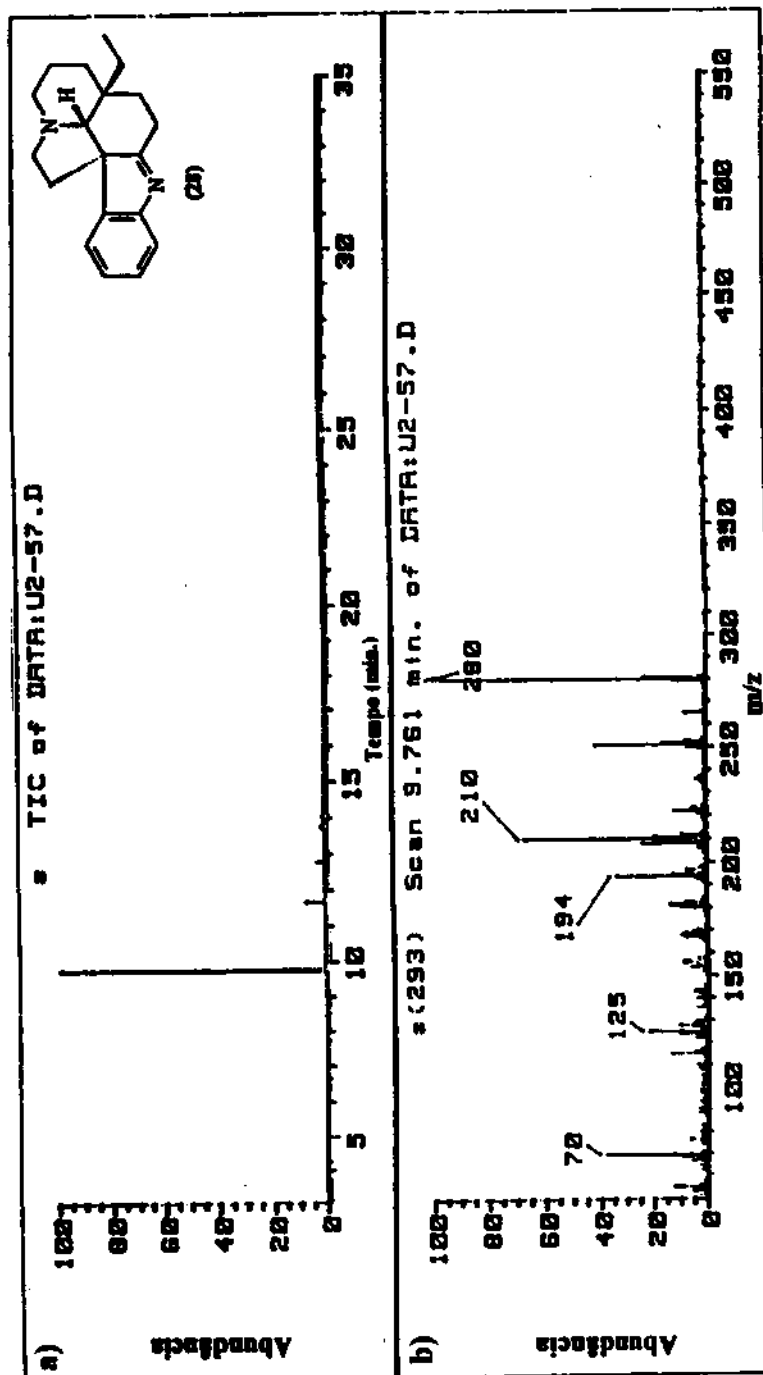
Marked Wavelengths

Reg A: L 232 = 2.2597

Reg A: L 282 = 0.99005



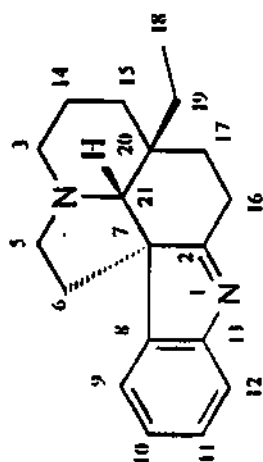
Espectro no Infravermelho da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina (28).



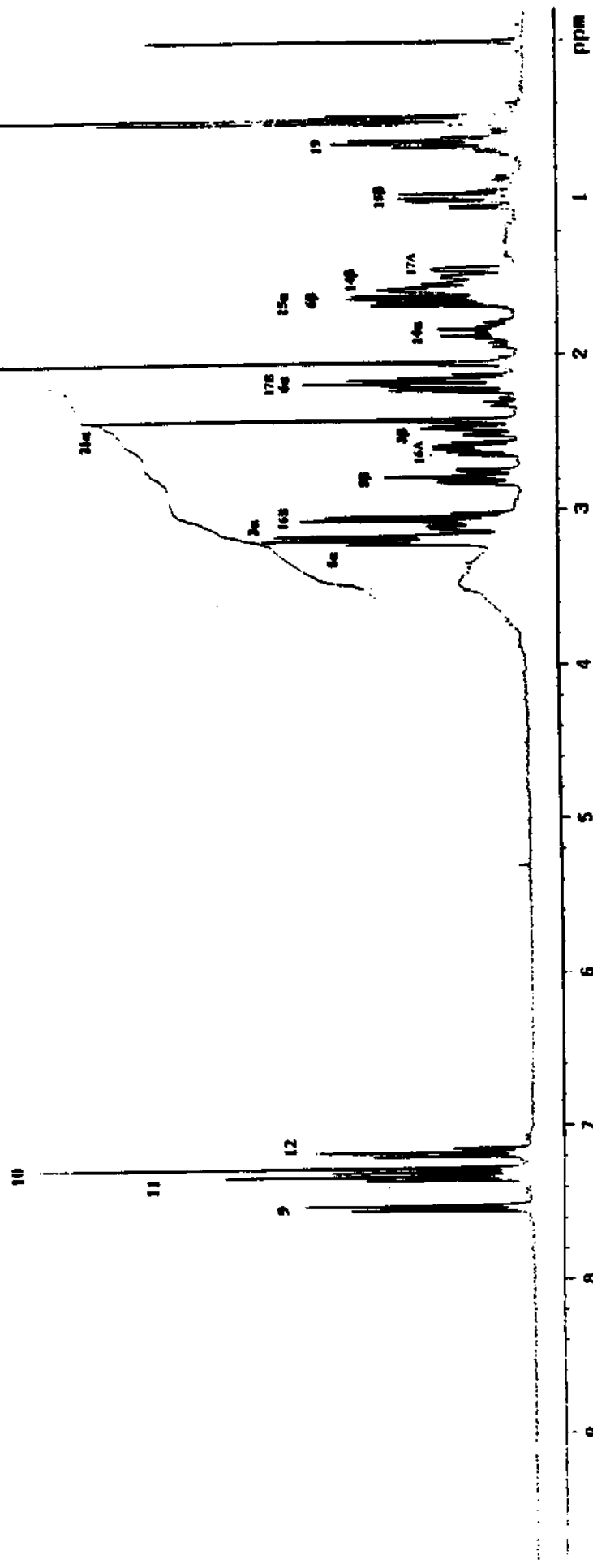
a) Cromatograma da Corrente Iônica Total da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina (28).

b) Espectro de massas da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina (28).

GEMINI 300MHz "gemini"
 PULSE SEQUENCE
 Pulse 30.2 degrees
 Acq. time 2.587 sec
 Width 6000.0 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE M1, 300.8673540 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.3 Hz
 SI size 32768
 total time 1 minute

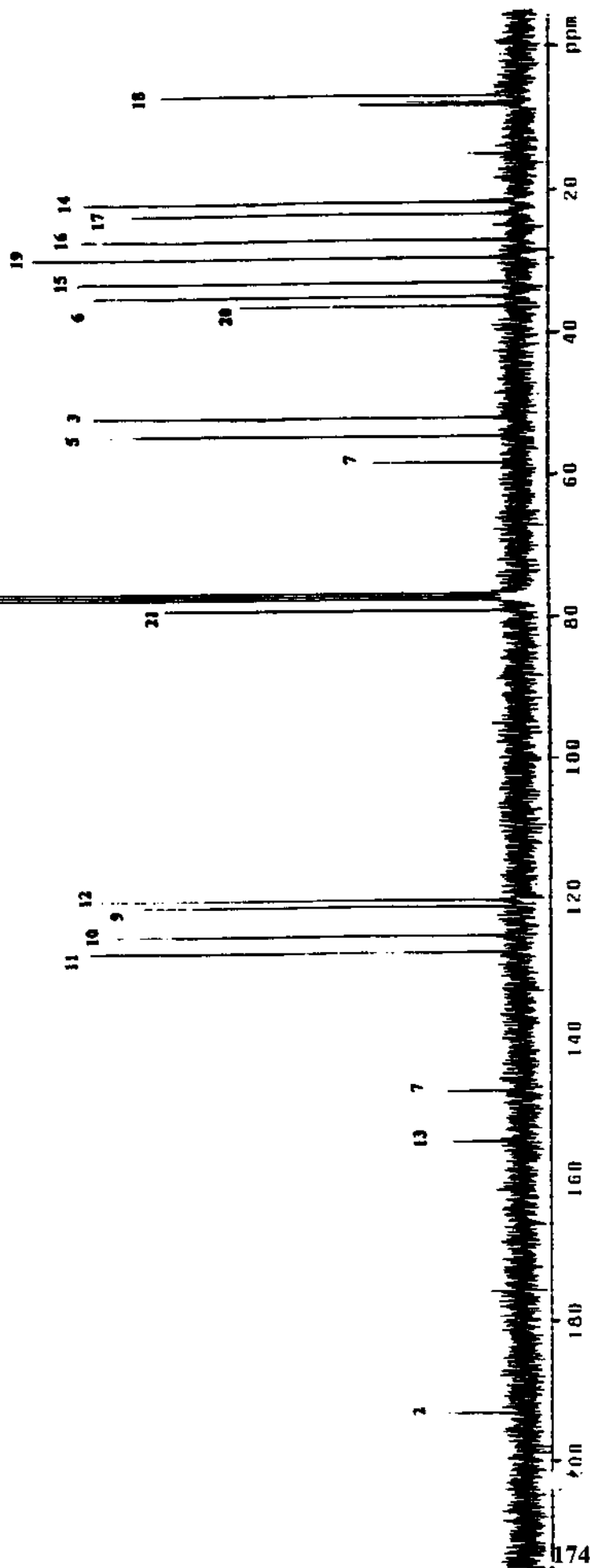
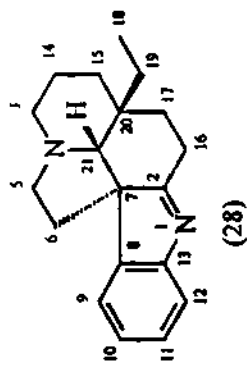


(28)



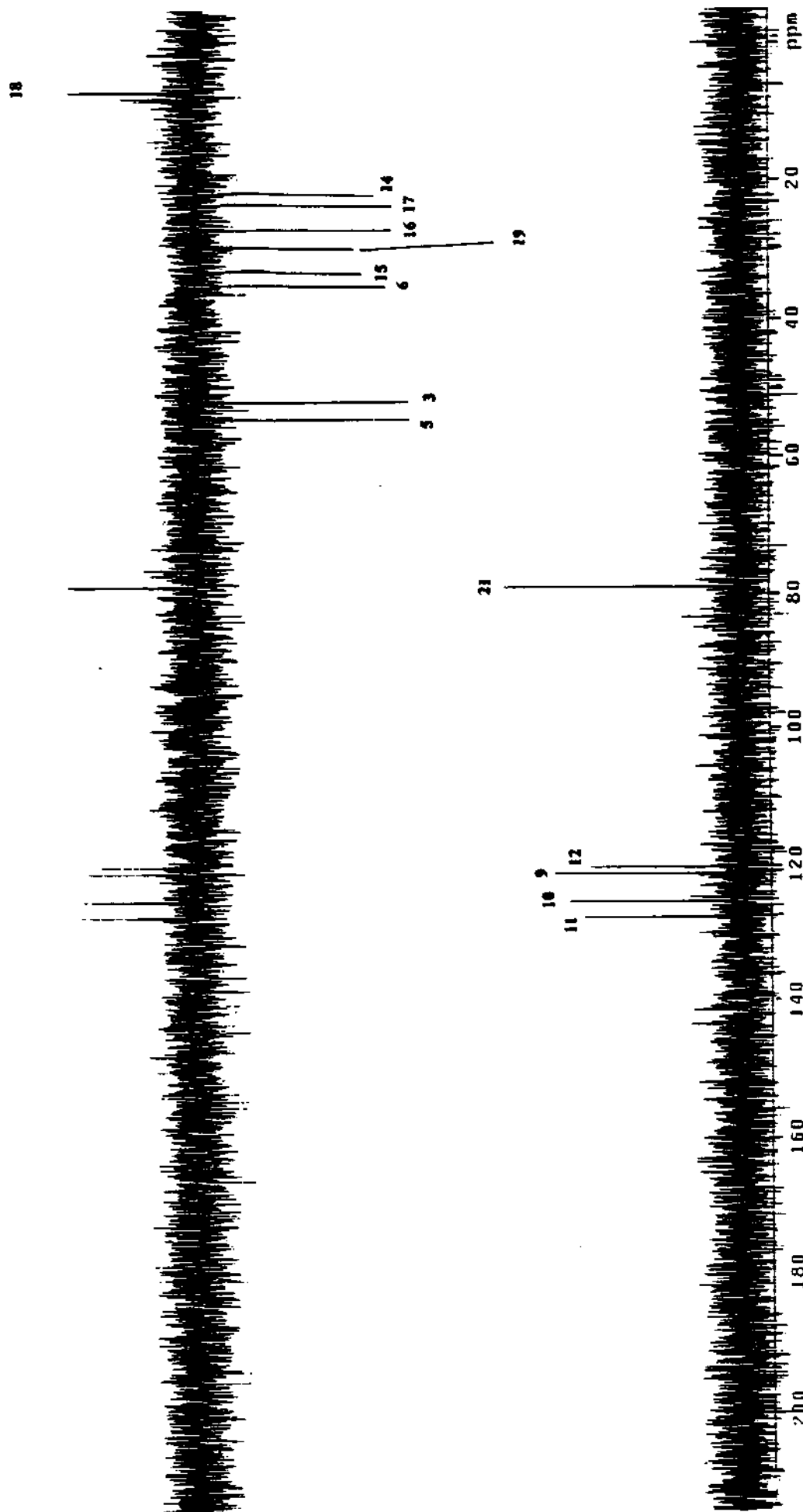
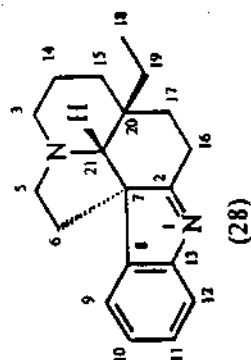
Espectro de RMN ^1H da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina (28).

Width 28800.0 Hz
 6400.0 repetitions
 OBSERVE F13, 75.4519911 MHz
 DECOUPLE H1, 100.6264076 MHz
 Power 3/ dB
 continuously on
 VAL 12-16 modulated
 DATA PROCESSING
 line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 2.7 hours



Espectro de RMN ^{13}C da (+)-1,2-desidro-aspidospermidina (28).

Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.600 sec
 Width 20000.0 Hz
 SIZ 1 repetitions
 OBSERVED C13, 75.4519955 MHz
 REFERENCE H1, 300.068076 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 Size 65536
 Total time 44 minutes



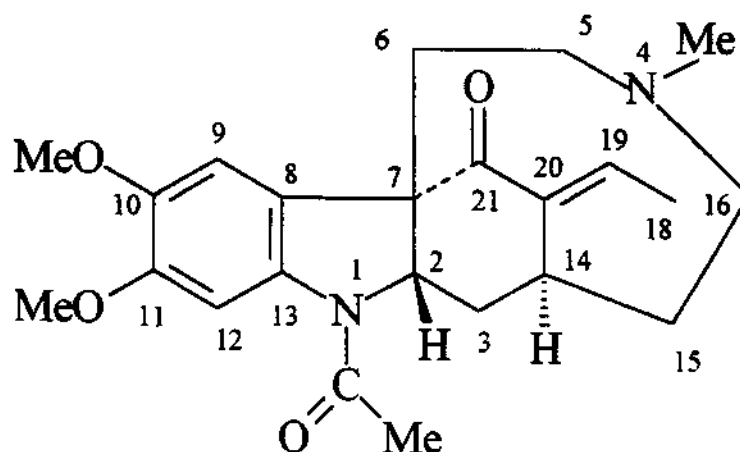
Espectro DEPT de RMN ^{13}C da (+)-1,2-desidro-aspido-permidina (28).

Composto (29) - geissosvellina:

O espectro no IV de (29) exibe um forte banda de absorção referente a uma carbonila de amida a 1648 cm^{-1} [38].

O espectro no UV (λ máx) a 292 nm (2,90), 242 nm (3,34) e 214 nm (3,78) mostra absorções típicas para um cromóforo indolina [39].

O espectro de massas de MEM exibiu um íon molecular a m/z 398, correspondendo a uma fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$, o fragmento que produziu um íon mais abundante ocorre a m/z 327 e corresponde a perda de 71 unidades de massa ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$). Uma pesquisa detalhada na literatura e na biblioteca do aparelho de CG/EM associada as informações espectrais descritas anteriormente permitiram sugerir ao composto 29 a estrutura conhecida como (-)-geissosvellina, mostrada a seguir.

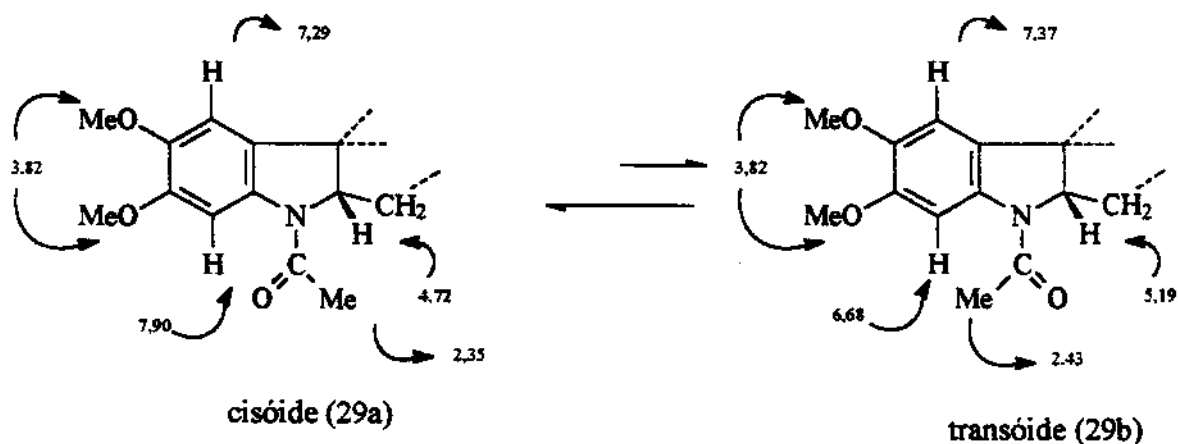


geissosvellina (29)

As atribuições dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C do composto 29 foram feitas usando o experimento de DEPT e os dados espectrais existente na literatura para a (-)-geissosvellina [53], Quadro 14, pag. 179.

O espectro de RMN ^1H de 29 apresentou sinais semelhantes a uma mistura, porém uma análise mais minuciosa e o auxílio da literatura notamos que devido a presença do

grupo N-acetil vizinho ao anel aromático C-10 e C-11-substituídos, este composto se constitui em um equilíbrio cisóide 29a e transóide 29b, onde a espécie cisóide tem preferência sobre o transóide a 25 °C. Portanto os sinais de hidrogênio dos dois conformêros (29a e 29 b) são observadas. Por exemplo os hidrogênios da metila do grupo *N*-acil aparecem como dois singletos numa proporção 2:1 a 2,35 δ e 2,43 δ para os conformêros cisóide 29a e transóide 29b. O hidrogênio localizado no C-2 aparece como um duplo dubleto a 4,72 e 5,19 δ ($J= 11,7$ Hz e $J= 6,2$ Hz) para os dois conformêros, mostrando que estes prótons localizam-se no anel indólico acoplado com um grupo metileno vizinho. Outros sinais também mostram esta interconversão, como o grupo *N*-CH₃ a 1,99 e 1,96 δ e o hidrogênio do grupo etilidênico (H-19) a 5,76 e 5,74 δ , também dos hidrogênios aromáticos H-9 a 7,37 e 7,29 δ e o H-12 a 7,90 e 6,68 δ , a forma cisóide está em maior proporção pela interação estérica menor do grupo amida com H-12 em 29a e ao mesmo tempo a repulsão eletrônica menor entre o *N*-4 e a cetona α,β -insaturada. Apesar da complexidade da análise espectral de 29, o mesmo apresentou uma boa concordância com a atribuição feita por Moore [53].



O espectro de RMN ^{13}C , permitiu finalizar a elucidação estrutural do composto, para isso utilizou-se como modelo a molécula da *N*-desacetil-geissosvellina (32) [53], quadro 14. Todos os 23 carbonos de (27) foram assinalados em CDCl_3 , e o espectro de DEPT permitiu assinalar a presença de oito carbonos não ligados a hidrogênio, cinco carbonos metilênicos, cinco metínicos e cinco grupos metila presentes em 27.

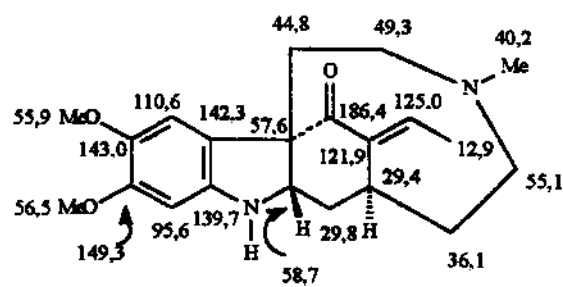
O sistema olefínico foi atribuído como sendo os carbonos a 124,4 δ (C-20), a 132,0 δ (C-19, CH olefínico) e o grupo metila a 15,1 δ .

Os carbonos que permitem definir a estereoquímica relativa de 27 foram atribuídos e os valores comparados com os de 32, mostrando que existe uma boa correlação entre os valores. O C-2 (CH α) ressona a 62,7 δ , o C-7 a 56,9 δ , o C-14 (αCH) a 38,9 δ . Os C-2 e C-14 apresentam uma desproteção de aproximadamente 9,0 δ em relação aos deslocamentos químicos apresentados por estes carbonos no composto 32, eliminando a densidade eletrônica sobre estes carbonos, porque o *N*-1 compartilha seus elétrons preferencialmente com o grupo acila.

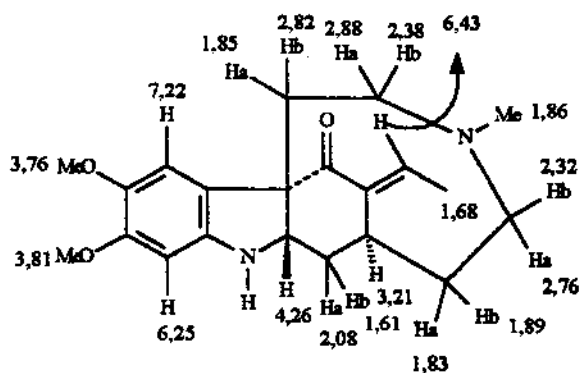
A presença do grupo acetamido, um sinal de carbono não ligado a hidrogênio a 167,7 δ e a do grupo cetona do anel C a 186,7 δ também puderam ser confirmadas.

Este conjunto de dados relatados anteriormente permitiram a confirmação da estrutura anteriormente sugerida, por isto podemos propor que o composto (29) possua a estrutura do alcalóide conhecido como geissosvellina.

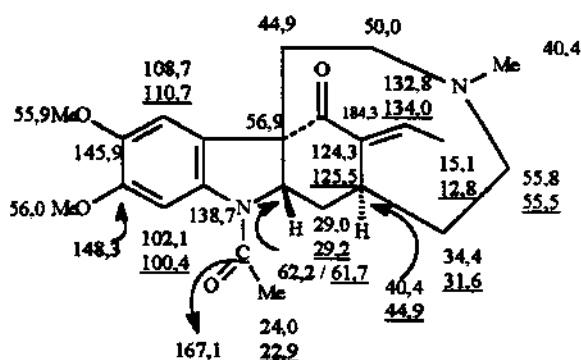
O composto geissosvellina (29) foi isolado pela primeira vez, não só nesta espécie, como também no gênero *Aspidosperma*. Este composto só havia sido isolado de uma espécie do gênero *Geissospermum*, *G. vellosii* [53].



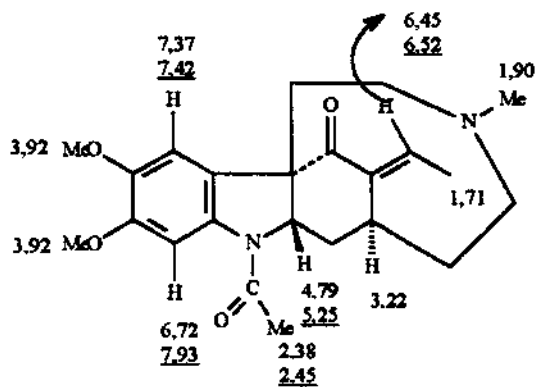
Dados de RMN ^{13}C da
N-desacetil-geissosvellina (32)



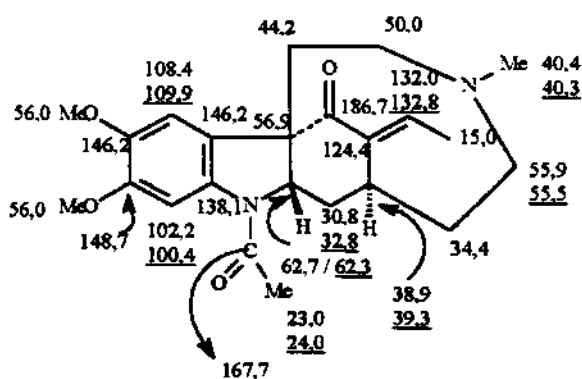
Dados de RMN ^1H da
N-desacetil-geissosvellina (32)



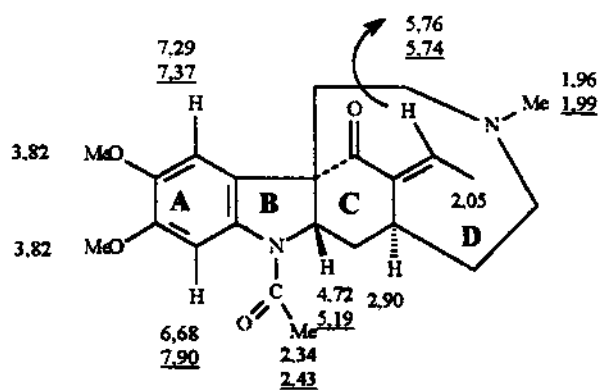
Dados de RMN ^{13}C
da Geissosvellina (29)
descritos na literatura [53]



Dados de RMN ^1H
da Geissosvellina (29)
descritos na literatura [53]



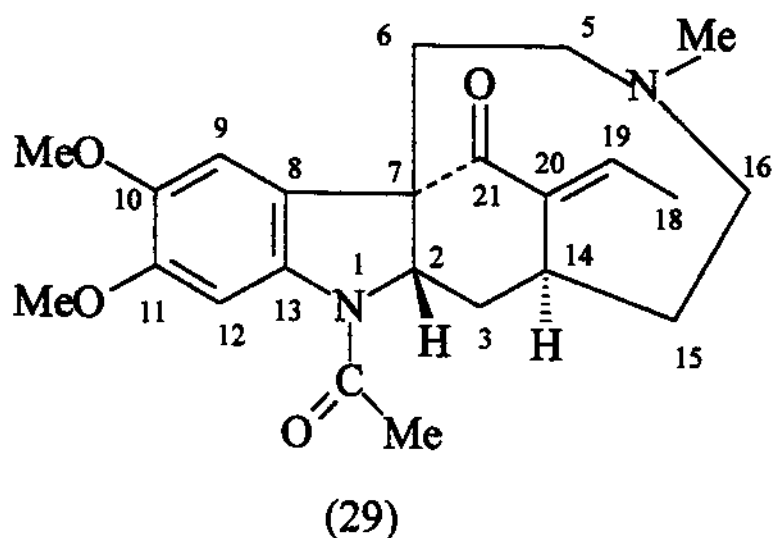
Dados de RMN ^{13}C
do composto (29)

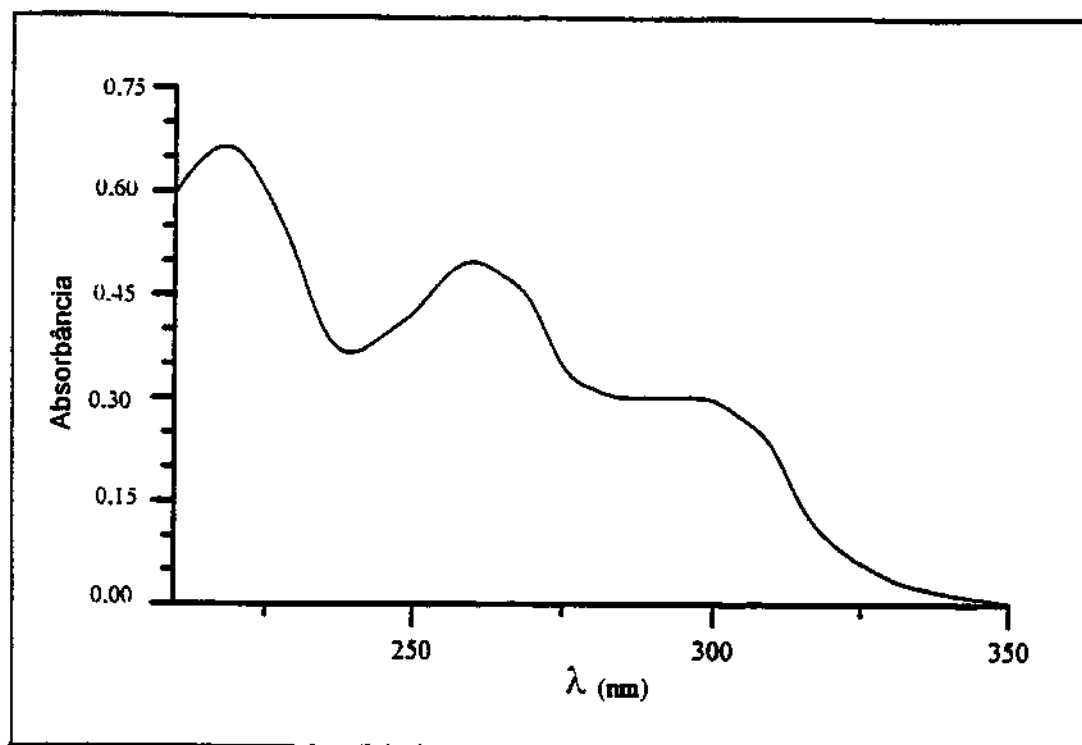


Dados de RMN ^1H
do composto (29)

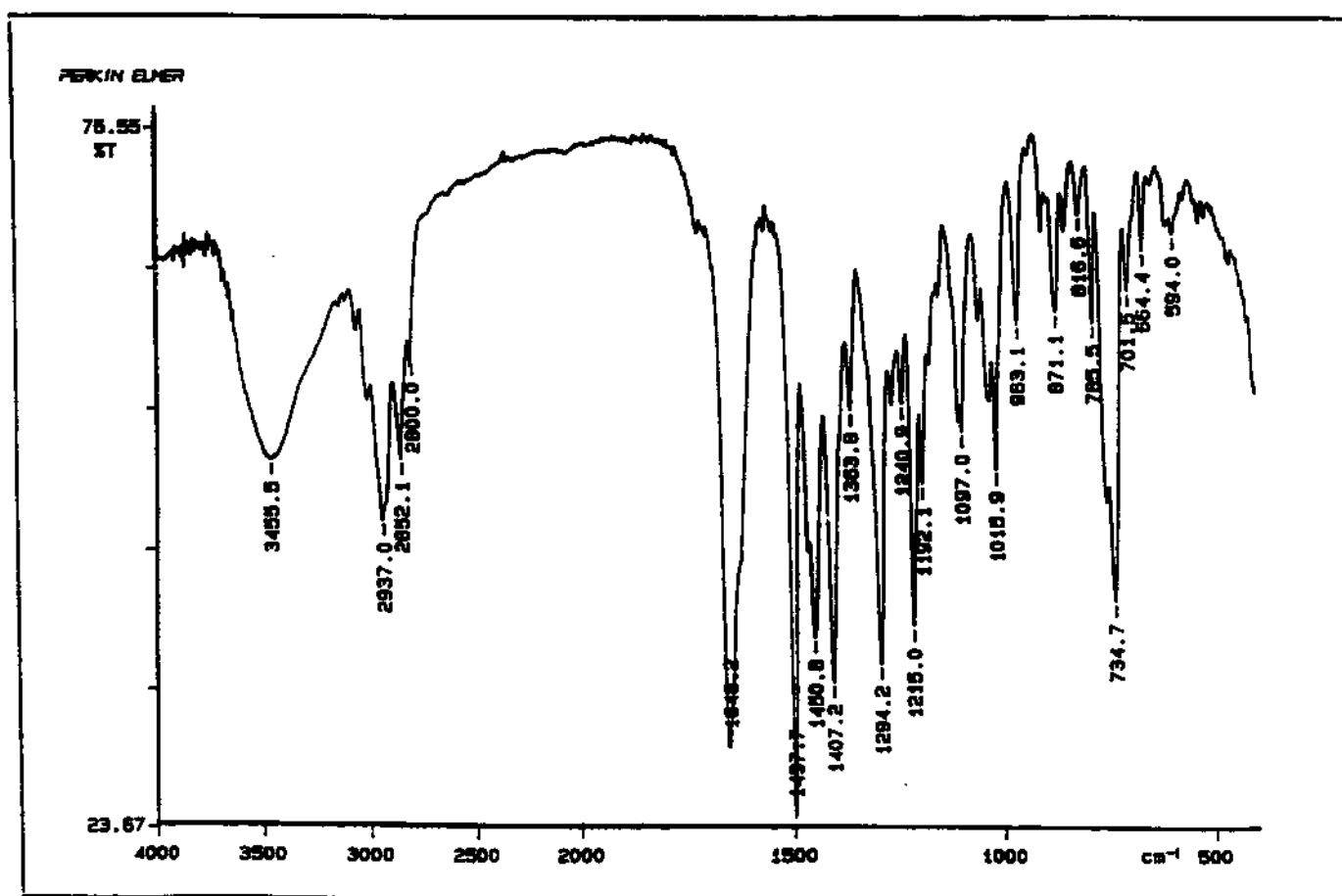
Quadro 14. Dados de RMN ^1H , ^{13}C do composto (29) e dos compostos modelos
N-desacetil-geissosvellina (32) e geissosvellina (29) em CDCl_3 .
($\hat{\delta}$) = dados do confômero (29b).

geissosvellina (29): IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1648 (N-C=OMe, C=O). UV λ_{max} nm: 299 ($\log \epsilon = 4,00$), 262 ($\log \epsilon = 4,24$), 217 ($\log \epsilon = 4,35$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,72 (1H, m, H-2 β), 7,29 (1H, s, H-9), 7,90 (1H, s, H-12), 1,95 (3H, s, N-Me), 2,05 (3H, d, $J = 6,9$, H-18), 5,76 (1H, q, $J = 6,9$, H-19), 2,34 (3H, s, NC=OMe). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 62,7 (C-2), 30,8 (C-3), 50,0 (C-5), 44,2 (C-6), 56,9 (C-7), 146,2 (C-8), 108,4 (C-9), 146,2 (C-10), 148,7 (C-11), 102,2 (C-12), 38,9 (C-14), 34,4 (C-15), 55,9 (C-16), 15,0 (C-18), 132,0 (C-19), 124,4 (C-20), 167,7 (N-C=O), 184,9 (C=O), 56,0 (10-OMe), 56,0 (11-OMe). EMIE m/z (A. R. %): 398 (100), 355 (34), 327 (80), 285 (16), 190 (20).



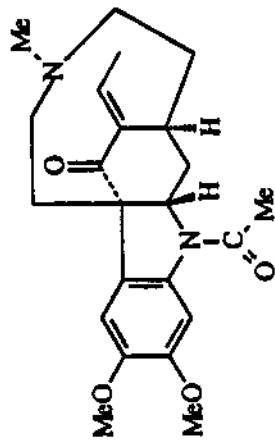
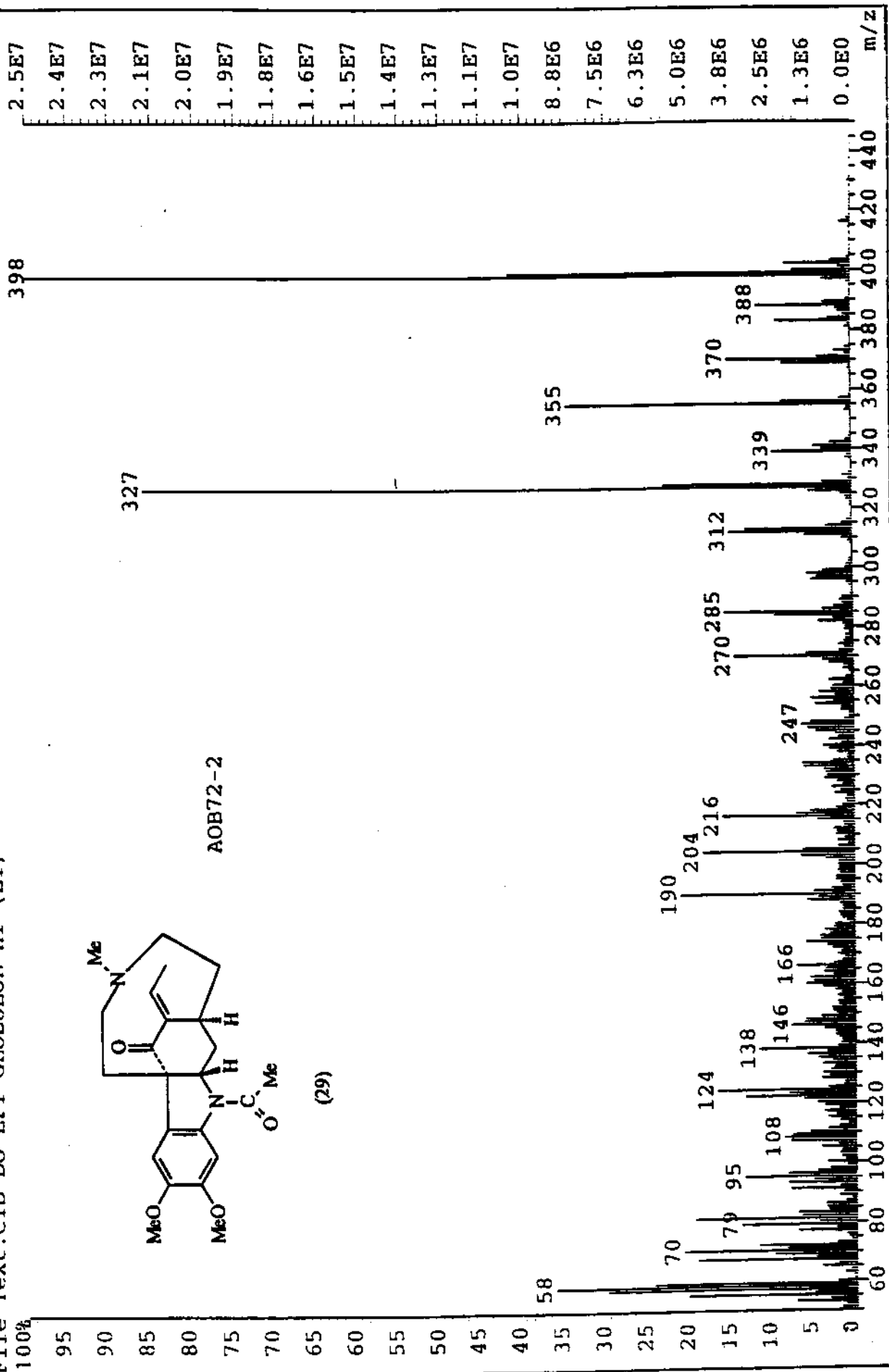


Espectro no UV-VIS da geissosvellina (29).



Espectro no Infra-Vermelho da geissosvellina (29).

File:16AGO Ident:522 Acq:15-AUG-1997 14:14:54 +48:06 Cal:N1
 AutoSpec EI+ Magnet BpI:25059616 TIC:390530304 Flags:HALL
 File Text:CID DO EPI-GLOBULOI. H1 (EI)



AOB72-2

(29)

Espectro de massas de MEM da geissosvellina (29).

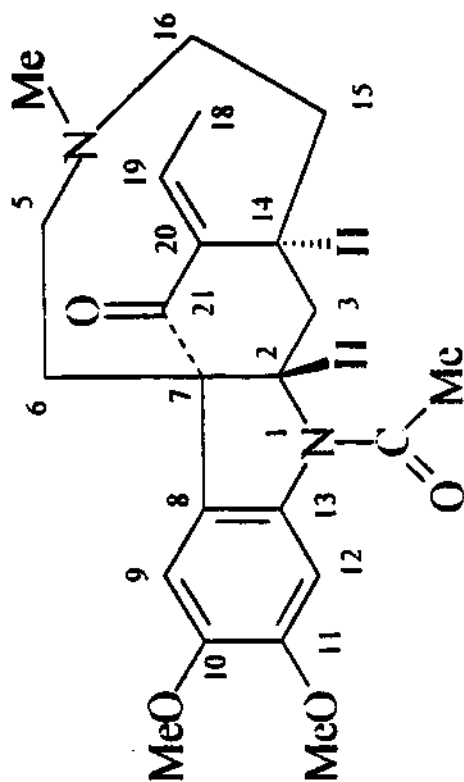
C:-11-QAfc

540-01

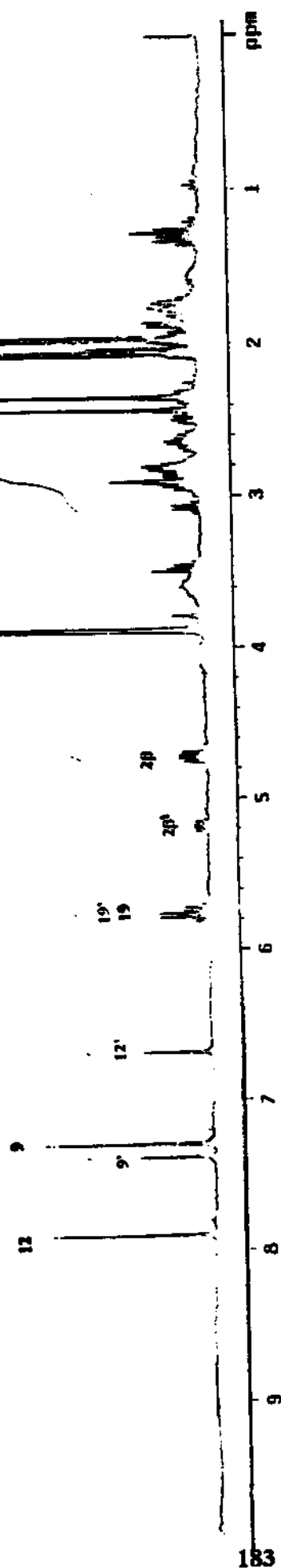
```

16 repetitions
OBSERVE 11, 300.0673453 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
File size 32768
Total time 1 minute

```

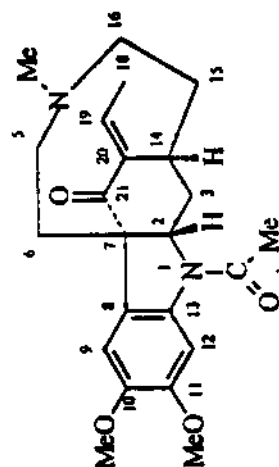


(29)

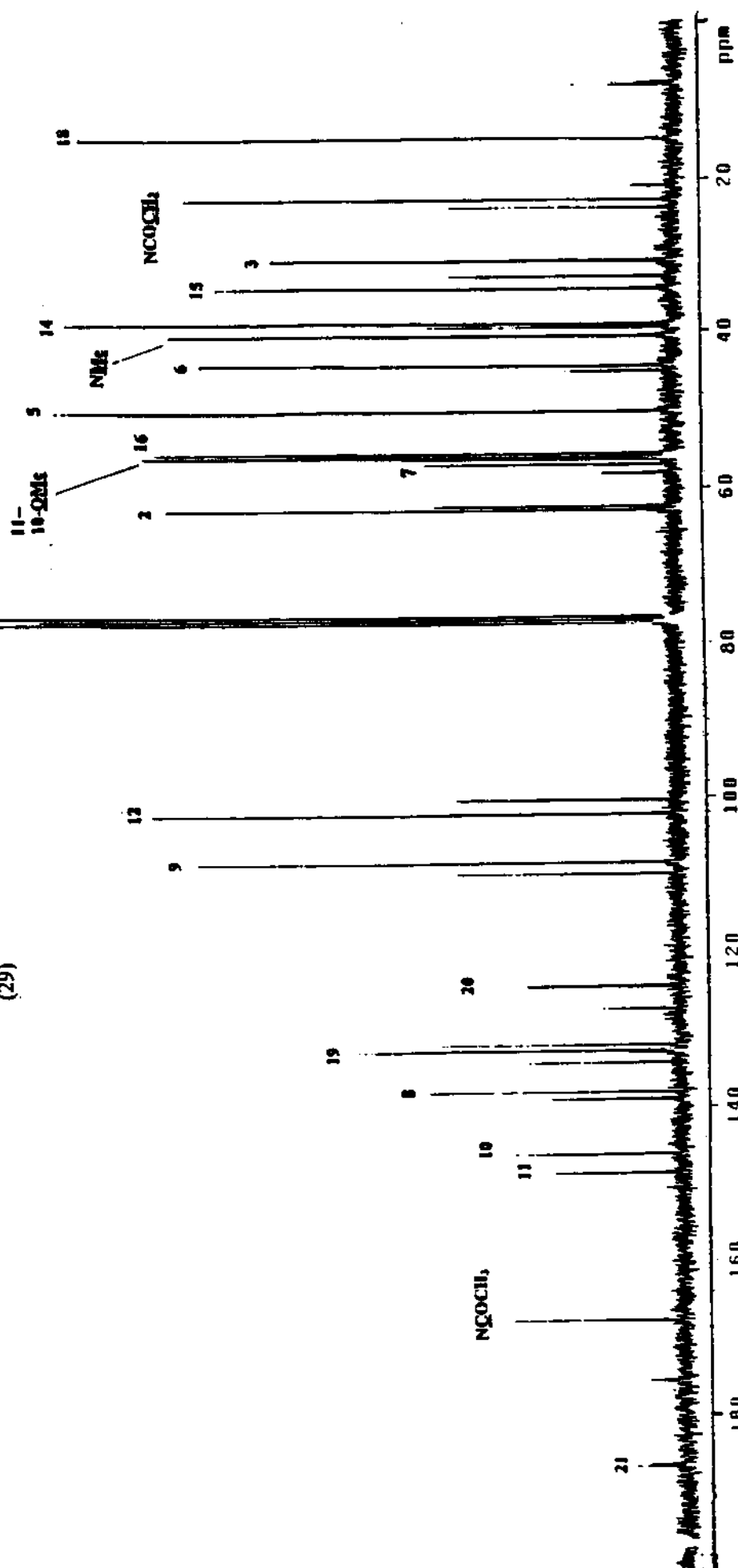


Espectro de RMN ^1H da geissosvellingina (29).

Date: 11/11/83
 Pulse: 44.4 degrees
 Acq. time: 1.006 sec
 Width: 20000.0 Hz
 SFO: 100.613110 MHz
 OBSERVED: 13, 75.4519935 MHz
 RECORDED: 13, 100.606076 MHz
 Power: 37 dB
 continuously on
 VOLTAGE: 12-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening: 1.0 Hz
 FID size: 65536
 Total time: 2.3 hours

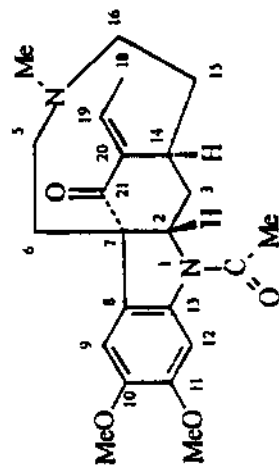
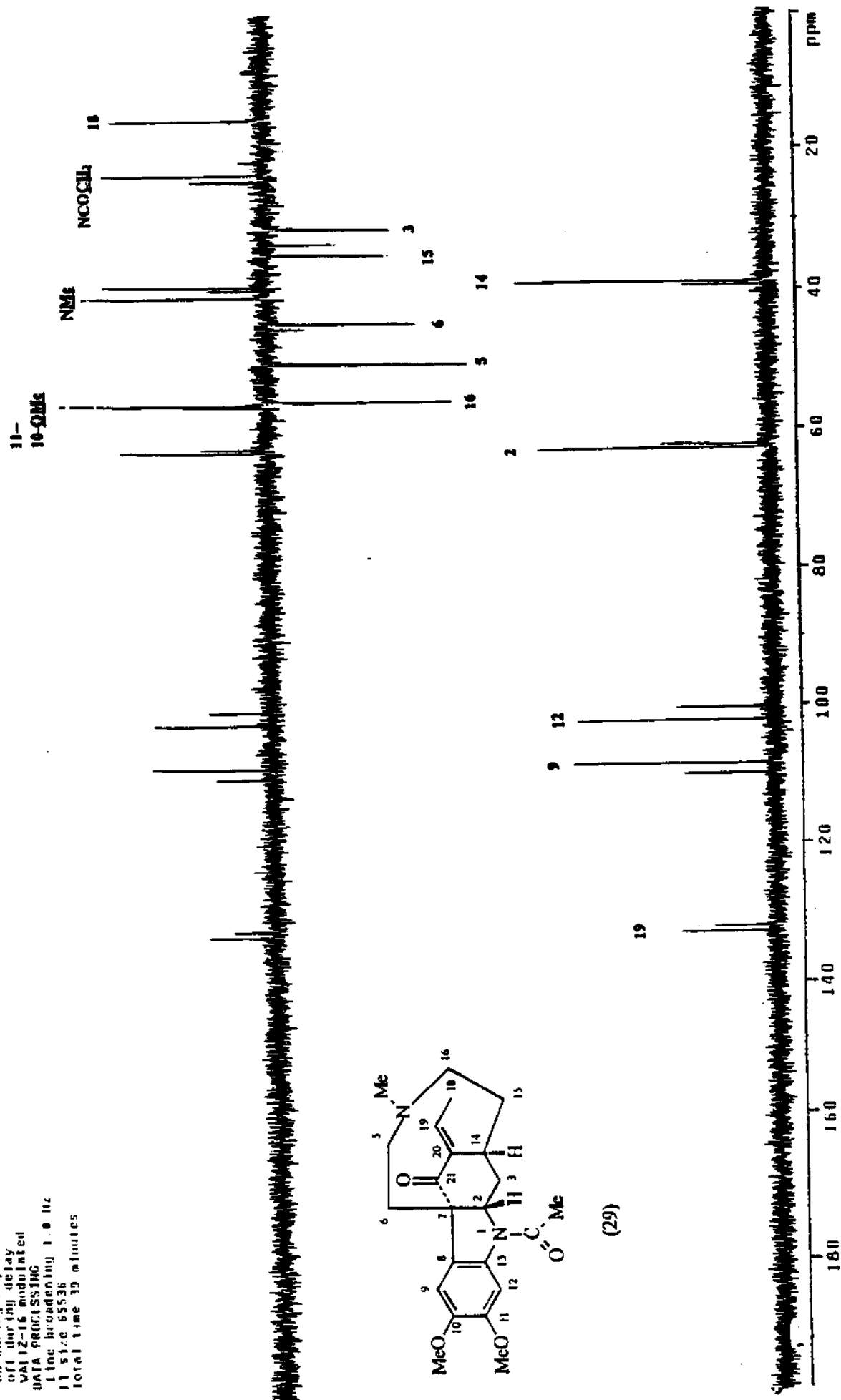


(29)



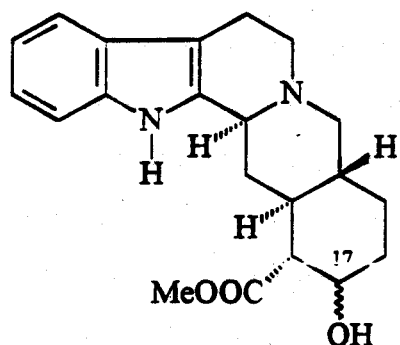
Espectro de RMN ^{13}C da geissosvellina (29).

RELAY DELAY 1.000 sec
 PULSE 90.0 degrees
 ACQ. TIME 1.600 sec
 WIDTH 20000.0 Hz
 438 repetitions
 RESERVE C13, 75.4519973 MHz
 DECPHASE 0.0, 100.0084075 MHz
 Power 17 dB
 on during acquisition
 off during delay
 VARIATION 12-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 size 65536
 Total time 39 minutes

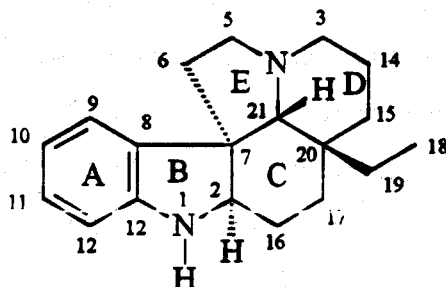


(29)

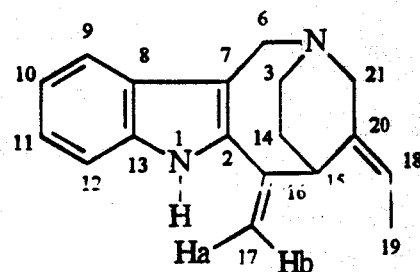
ESTRUTURAS I



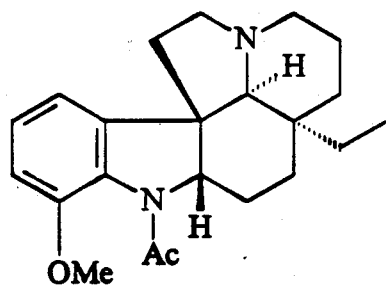
17 α -OH yohimbina (8)
17 β -OH β -yohimbina (10)



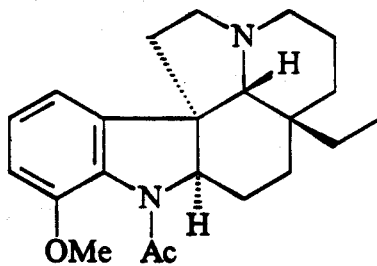
aspidospermidina (33)



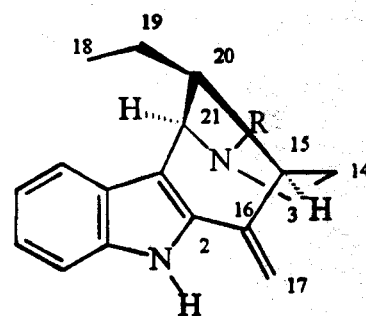
aparicina (13)



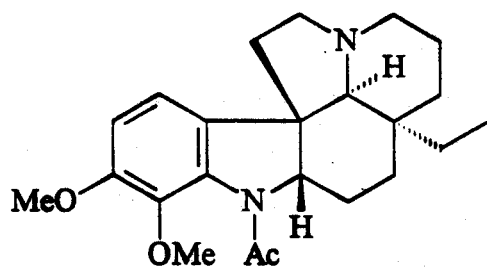
(+)-aspidospermina (9A)



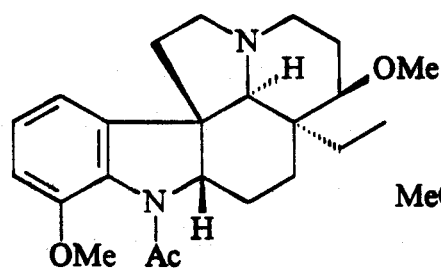
(-)-aspidospermina (9B)



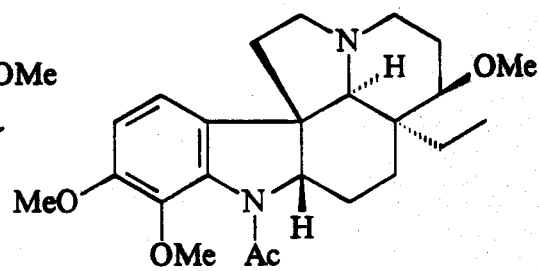
R= CH₃ uleina (11)
R= H N-desmetil-uleina (12)



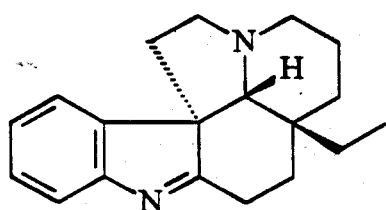
(+)-pirifolidina (14)



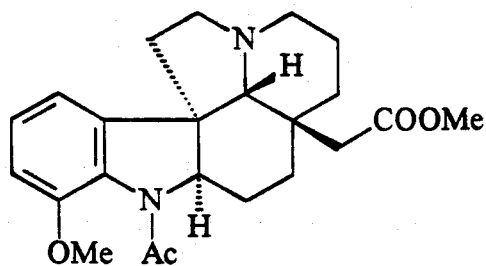
15-metóxi-aspidospermina (19)



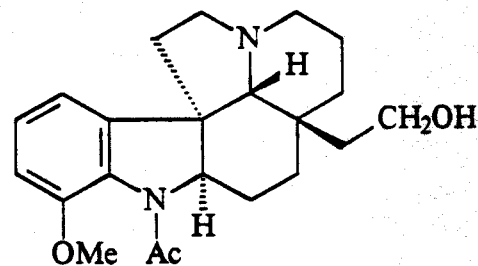
15-metóxi-pirifolidina (20)



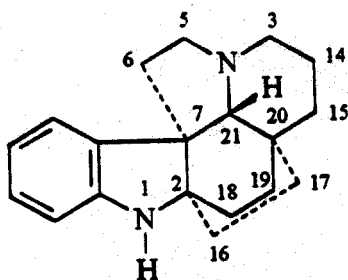
1,2-desidro-aspidospermidina (28)



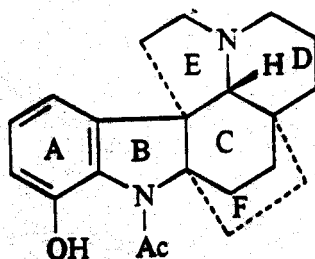
N-acetil-cilindrocarina (23)



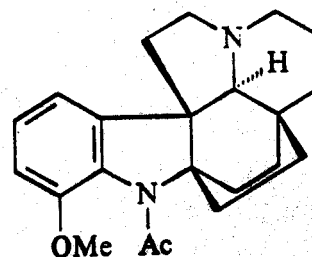
cilindrocarpinol (30)



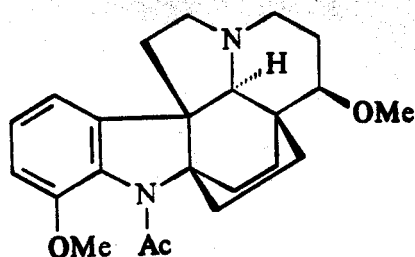
(-)-aspidofractinina (15)



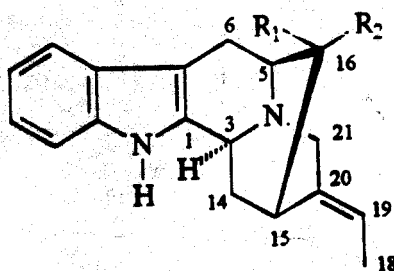
(-)-aspidofilina (16)



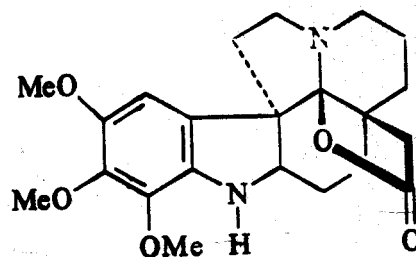
(+)-15-desmetoxi-pirifolina (17)



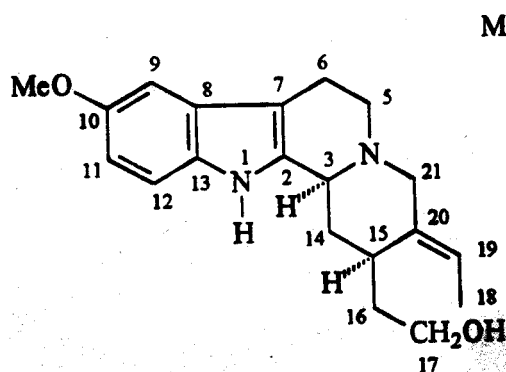
(+)-pirifolina (18)



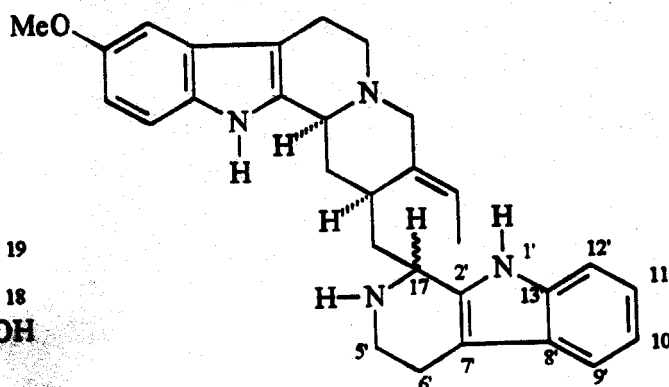
$R_1 = H, R_2 = CH_2OH$, normacusina B (21)
 $R_1 = CH_2OH, R_2 = COOCH_3$, polineuridina (22)



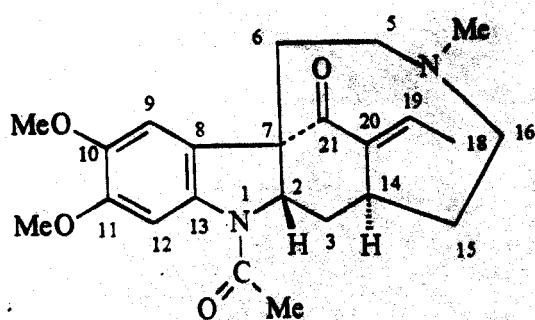
(-)-12-O-metil-21-oxo-aspidobalina



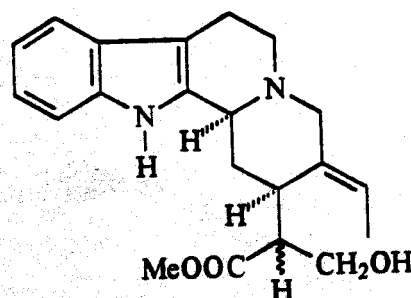
10-metoxi-geissoschizol (24)



H-17 α , ramiflorina A (25)
H-17 β , ramiflorina B (26)



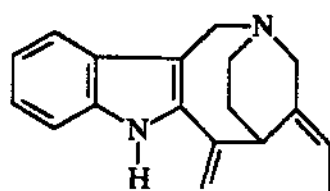
geissosvellina (29)



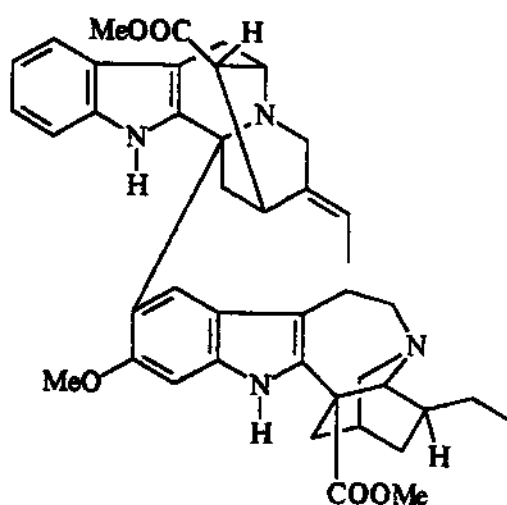
19-E-isositsiriquina (27)

2.2. Análise Qualitativa por CG e CG/EM

A literatura tem mostrado a eficiência do método de CG/EM na separação e detecção dos alcalóides indólicos, aplicando-o na análise de várias classes de alcalóides indólicos cujas massas moleculares variam de 264, aparicina (13), à 704, conuduramina (34). Desenvolvendo o trabalho anteriormente citado [34] estendeu-se o estudo para mais duas espécies (*A. ramiflorum* e *A. dispernum*), totalizando-se seis espécies do gênero *Aspidosperma*. Os compostos isolados no estudo fitoquímico foram utilizados como padrões nesta etapa do trabalho.



(13)



(34)

As sugestões e atribuições estruturais foram feitas baseando-se em quatro pontos principais: {1} revisão da literatura de todos os compostos já isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* e de seus respectivos espectros de massas, {2} apoio nas hipóteses biogenéticas propostas para a biossíntese dos alcalóides indólicos bem como as interconversões propostas para as diferentes classes de alcalóides indólicos, {3} injeção dos padrões autênticos isolados, {4} auxílio da biblioteca NBS/Wiley base de dados instalado no equipamento de CG/EM.

Ainda que o método tenha se mostrado eficiente para estas análises, era importante que as mesmas pudessem ser relacionadas e comparadas com aquelas que venham a ser realizadas em diferentes laboratórios.

Para superar este problema utilizamos todas as informações por nós obtidas sobre CG/EM de alcalóides indólicos de *Aspidosperma* e sugerimos um procedimento simples o qual baseia-se na comparação entre os dados obtidos em colunas capilares utilizando-se os Índices de Kovats (IK) [55].

Com este objetivo calculamos os valores de IK dos alcalóides padrões isolados e identificados nas espécies, bem como os IK dos alcalóides identificados nos extratos através dos cromatogramas, utilizando-se as colunas DB-1 (metil-polisiloxano) e DB-5 (5% de fenil-metil-polisiloxano). Juntamente com estes índices apresentamos os espectros de massas de cada um dos padrões, Tabela 9 e no conjunto de espectros mostrados a seguir.

Os valores de IK dos alcalóides presentes nos extratos das espécies do gênero *Aspidosperma* foram calculados pela primeira vez, usando-se a fórmula abaixo, esta é utilizada para o cálculo quando onde se empregam programação diferenciada de temperatura nas análises. [55]:

$$IK = 100. (X - M) / (M_{n+1} - M_n) + 100n$$

Onde: n - nº de átomos de Carbono dos n -alcanos padrões.

X - tempo de retenção do soluto em minutos.

M_n - alcano com n átomos de Carbono que elui antes do soluto.

M_{n+1} - alcano com $n + 1$ átomos de Carbono que elui depois do soluto.

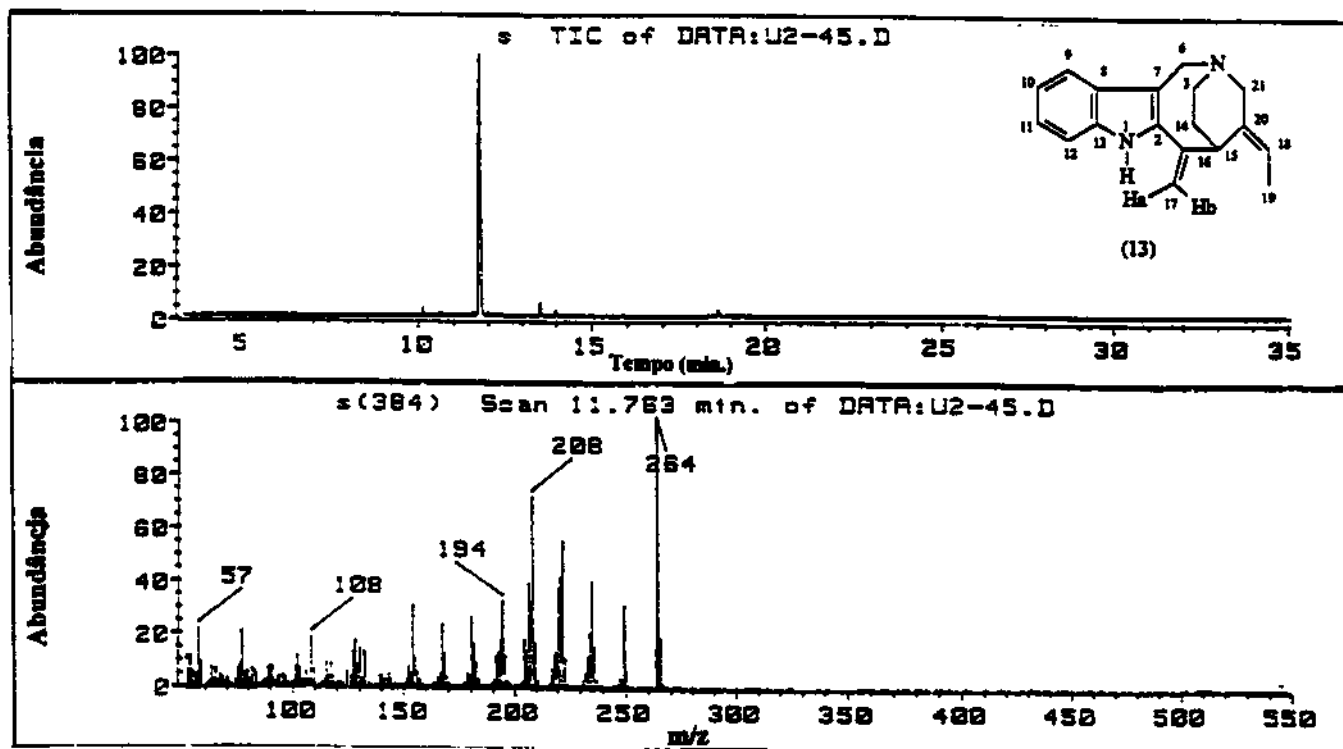
A importância de lançar-se os valores dos IK para os componentes destes extratos é que os IK são reprodutíveis quando forem utilizadas as mesmas colunas sob as mesmas condições de análise, o que os torna um dado muito importante para a análise qualitativa dos alcalóides indólicos deste gênero. E no caso de plantas, os dados dos espectros de massas combinados com os valores IK para melhor relacionar um alcalóide a uma estrutura conhecida, com elevado grau certeza.

Tabela 9. Índice de Kováts dos alcalóides padrões isolados e identificados das seis espécies do gênero *Aspidosperma*.

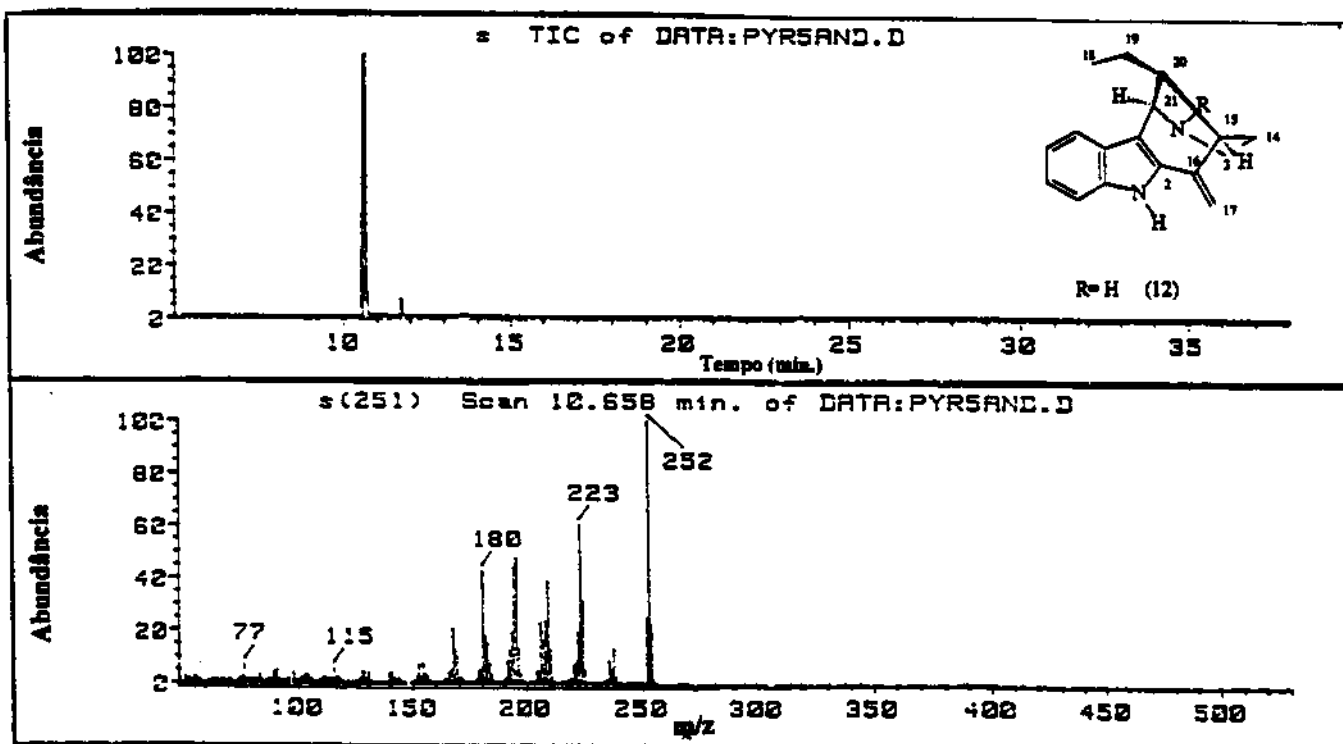
N-A1	Composto	MS		IK	
		Íons Característicos (A. R. %)		DB-1	DB-5
A1-1	N-desmetil-aleína (12)	252 (M ⁺ , 100), 223 (60), 196 (50), 180 (45)		-	2304
A1-2	aparcina (13)	264 (M ⁺ , 100), 248 (60), 222 (58), 208 (70)		2360	2506
A1-3	uleína (11)	266 (M ⁺ , 98), 248 (65), 209 (84), 194 (100)		2237	2306
A1-4	1,2-desidro-aspidospermina (28)	280 (M ⁺ , 100), 250 (40), 210 (64), 193 (36)		2171	2235
A1-5	aspidofractinina (15)	280 (M ⁺ , 80), 252 (100), 258 (40), 109 (70)		2255	2329
A1-6	normacusina B (21)	294 (M ⁺ , 56), 206 (5), 169 (100), 140 (25)		2932	2946
A1-7	10-metóxi-geissoschizol (24)	326 (M ⁺ , 80), 325 (100), 281 (28), 199 (36)		3018	3125
A1-8	aspidofilina (16)	338 (M ⁺ , 100), 295 (40), 124 (20), 109 (100)		2848	2948
A1-9	15-desmetóxi-pirifolina (17)	352 (M ⁺ , 100), 324 (60), 124 (10), 109 (62)		2712	2792
A1-10	polineuridina (22)	352 (M ⁺ , 40), 321 (30), 249 (38), 169 (100)		2900	2998
A1-11	19-(E)-isositsiriquina (27)	354 (M ⁺ , 85), 353 (90), 251 (100), 169 (50)		2945	3017
A1-12	aspidospermina (9A/B)	354 (M ⁺ , 18), 326 (10), 152 (5), 124 (100)		2660	22673
A1-13	yohimbina (8)	354 (M ⁺ , 70), 353 (100), 295 (5), 169 (50)		3106	3174
A1-14	β-yohimbina (10)	354 (M ⁺ , 70), 353 (100), 295 (5), 169 (50)		3127	3193
A1-15	N-acetil-cilindrocarpinol (30)	370 (M ⁺ , 10), 342 (5), 174 (5), 140 (100)		2920	2932
A1-16	pirifolina (18)	382 (M ⁺ , 100), 339 (35), 154 (25), 109 (15)		2895	2913
A1-17	15-metóxi-aspidospermina (19)	384 (M ⁺ , 40), 356 (10), 298 (2), 154 (100)		2808	2890
A1-18	pirifolidina (14)	384 (M ⁺ , 65), 356 (22), 152 (5), 124 (100)		2765	2847
A1-19	N-acetil-cilindrocarina (23)	398 (M ⁺ , 40), 324 (100), 281 (10), 168 (75)		2881	2963
A1-20	geissosvellina (29)	398 (M ⁺ , 82), 327 (100), 285 (18), 190 (15)		2985	3087
A1-21	15-metóxi-pirifolidina (20)	414 (M ⁺ , 36), 383 (20), 220 (5), 154 (100)		2914	3000
A1-22	12-O-metil-21-oxo-aspidoalbina (81)	456 (M ⁺ , 60), 383 (50), 253 (30), 160 (100)		-	-

IK Índice de Kováts, DB-1 e DB-5= colunas capilares, MS= espectro de massas, N-A1= número no apêndice 1.

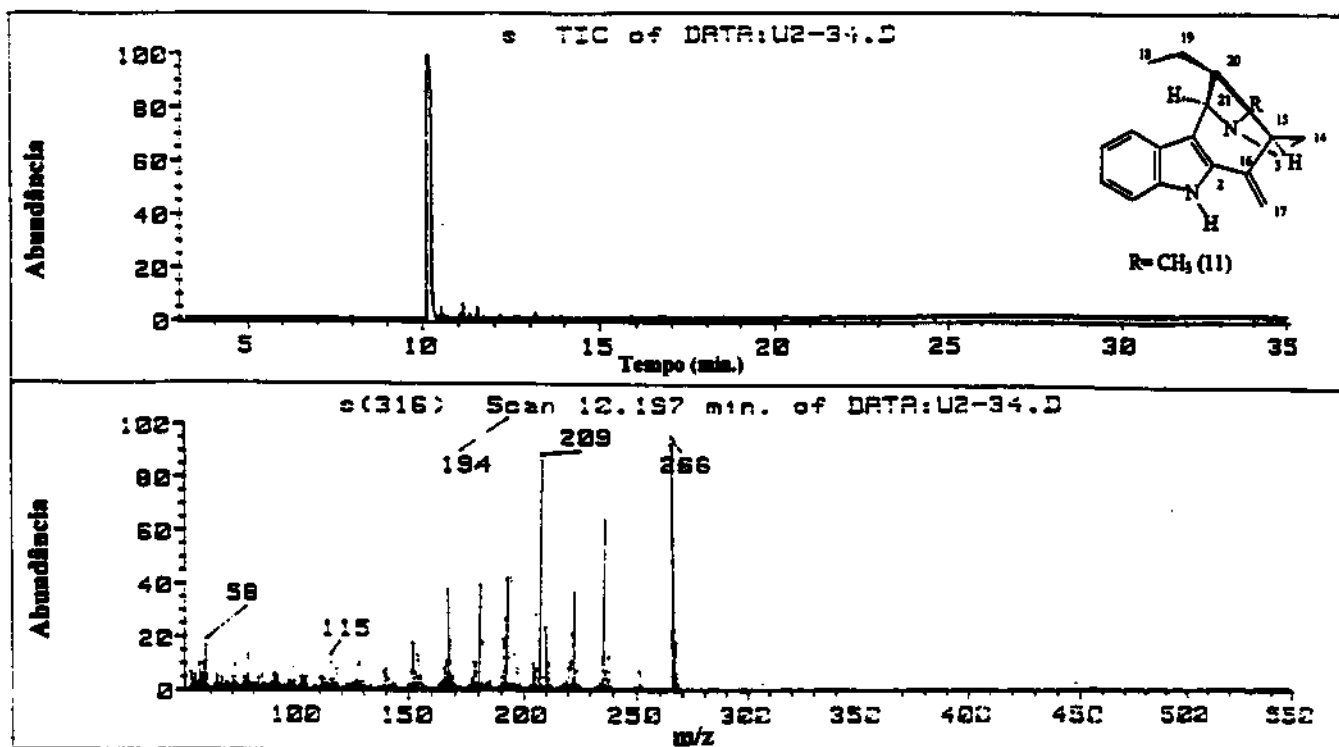
**CONJUNTO DE CROMATOGRAMAS
E ESPECTROS DE MASSAS
DOS COMPOSTOS PADRÕES**



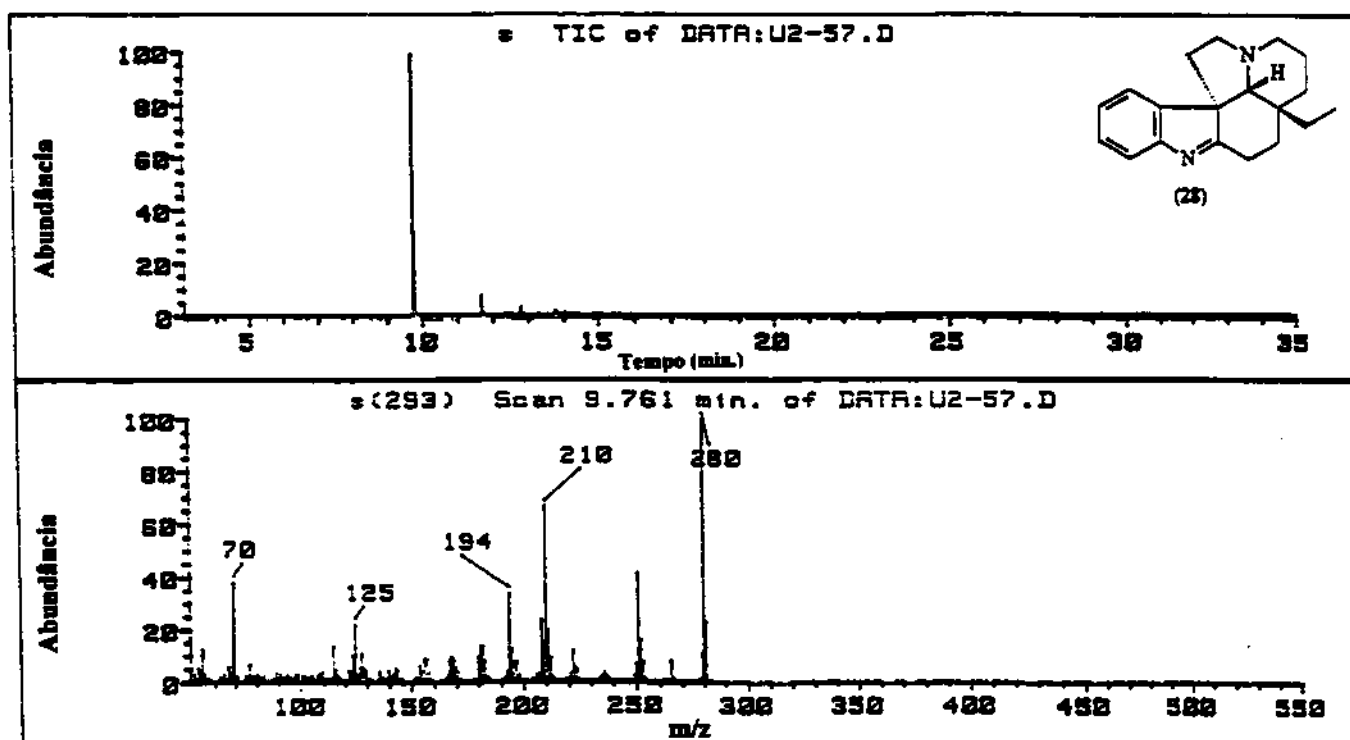
A1-1- Cromatograma e espectro de massas da *N*-desmetil-uleina (12).



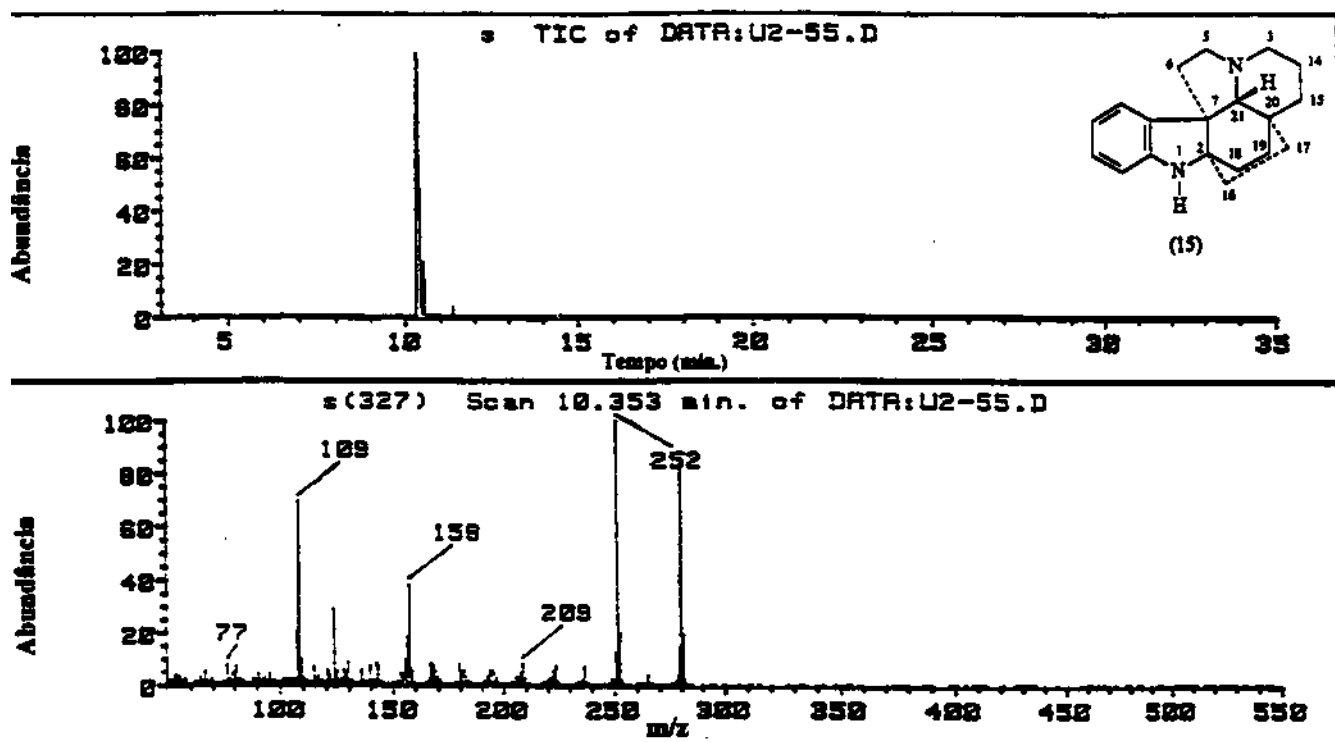
A1-2- Cromatograma e espectro de massas da aparcina (13).



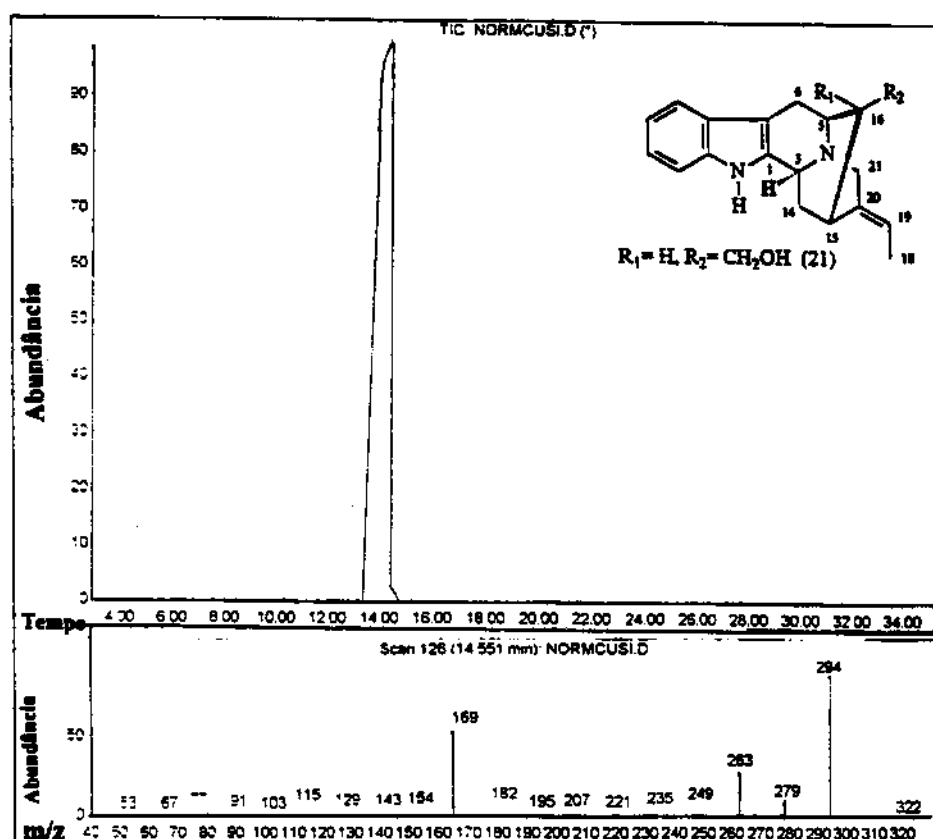
A1-3- Cromatograma e espectro de massas da uleina (11).



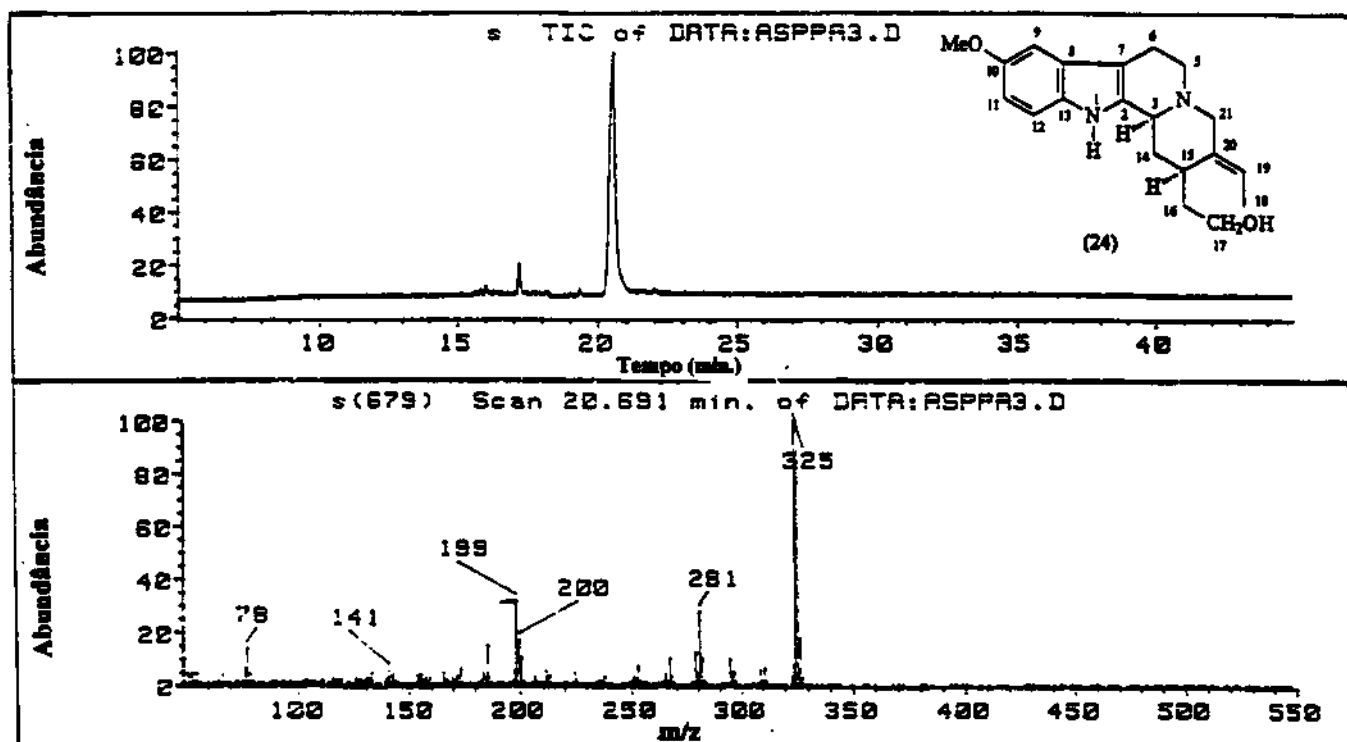
A1-4- Cromatograma e espectro de massas da 1,2-desidro-aspidospermina (28).



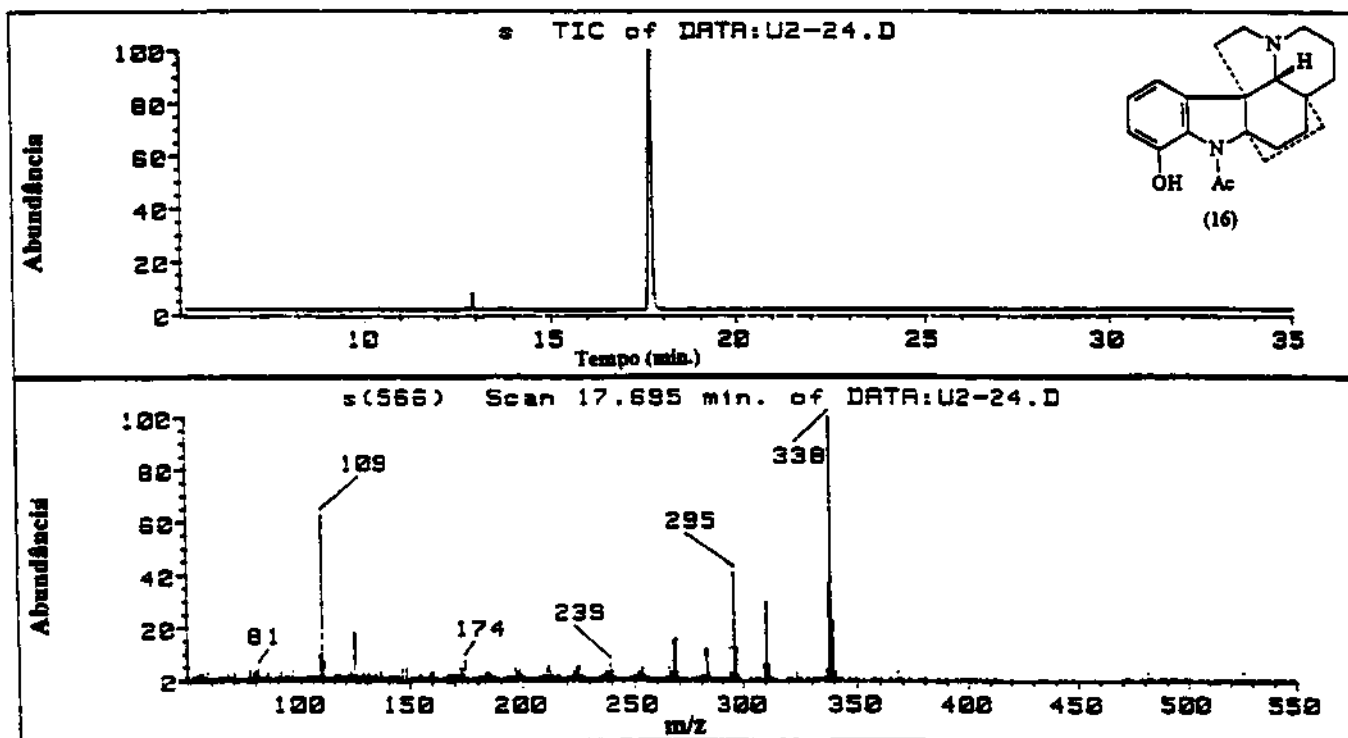
A1-5- Cromatograma e espectro de massas da aspidofractinina (15).



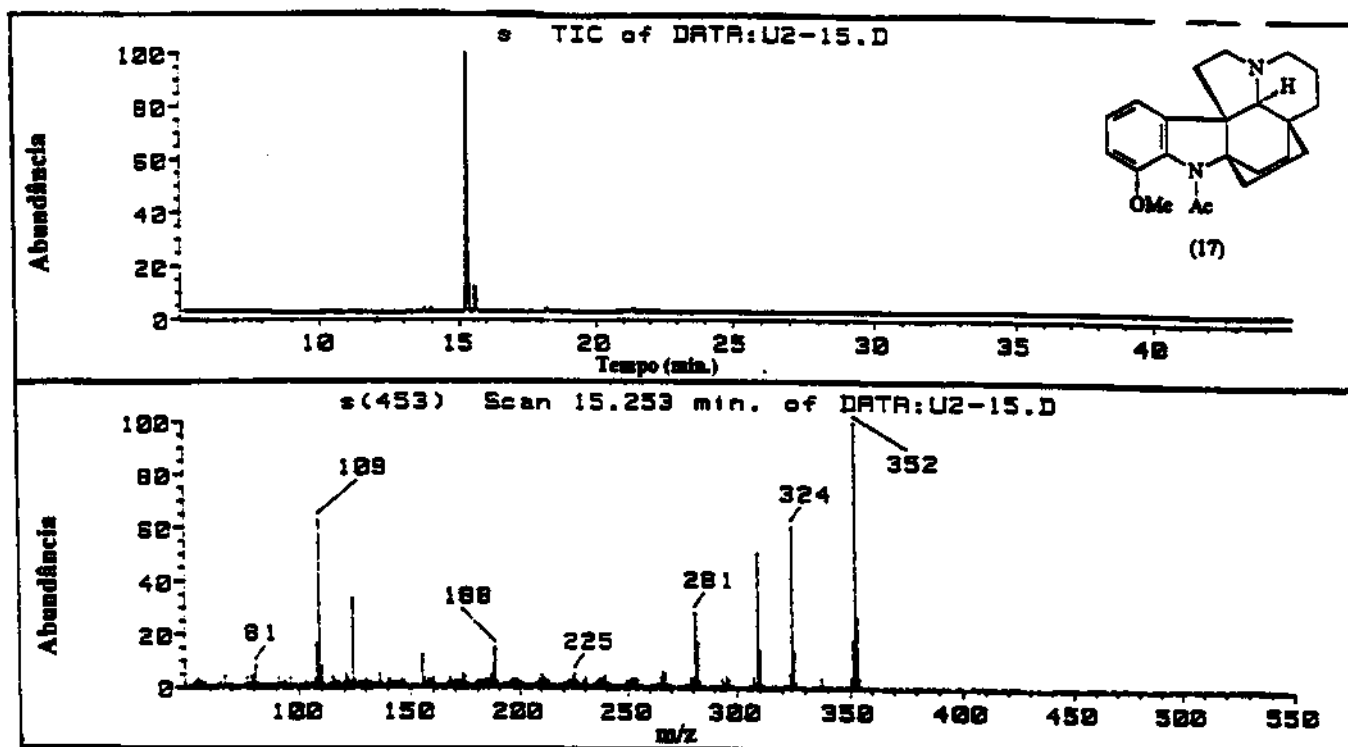
A1-6- Cromatograma e espectro de massas da normacusina B (21).



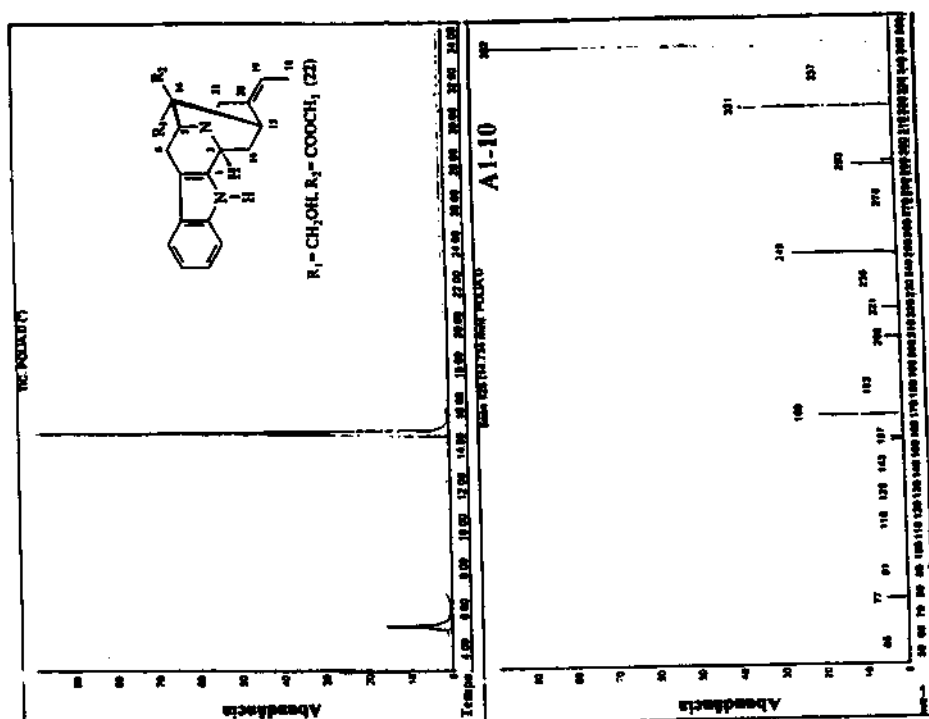
A1-7- Cromatograma e espectro de massas da 10-metóxi-geissoschizol (24).



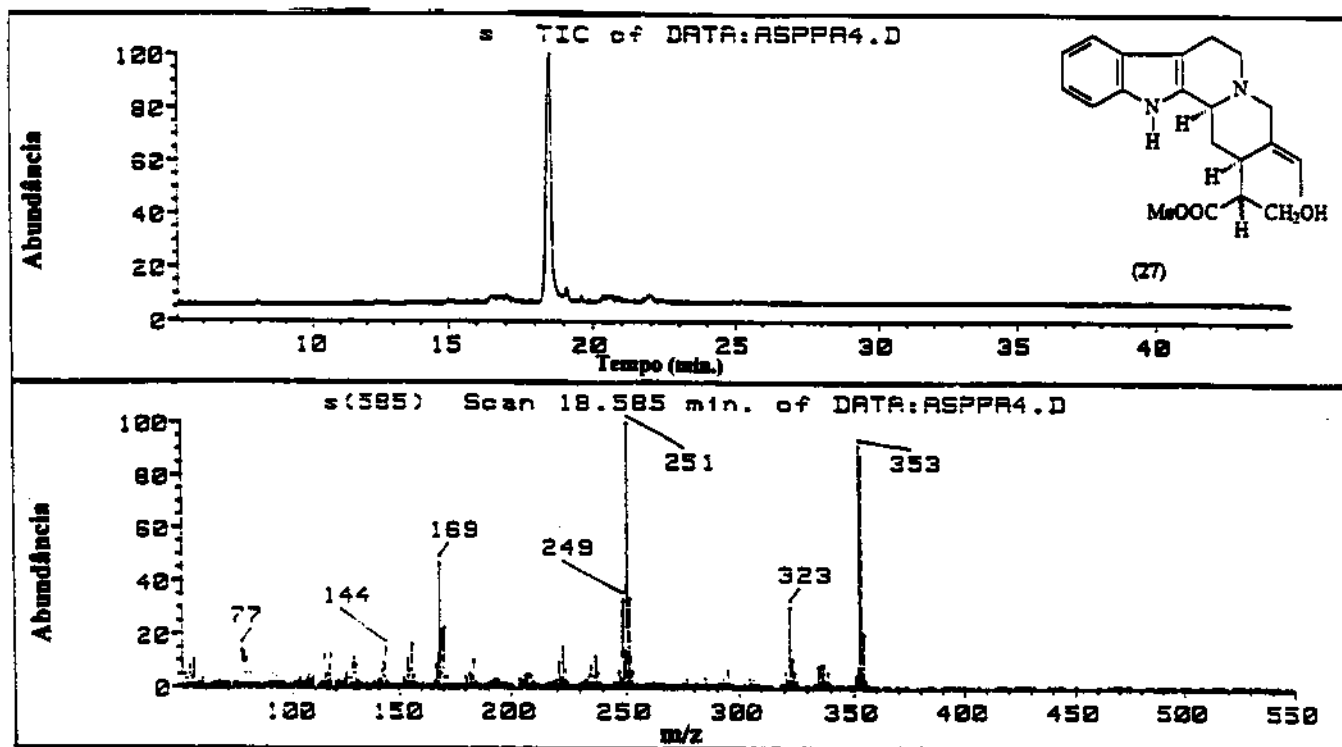
A1-8- Cromatograma e espectro de massas da aspidofilina (16).



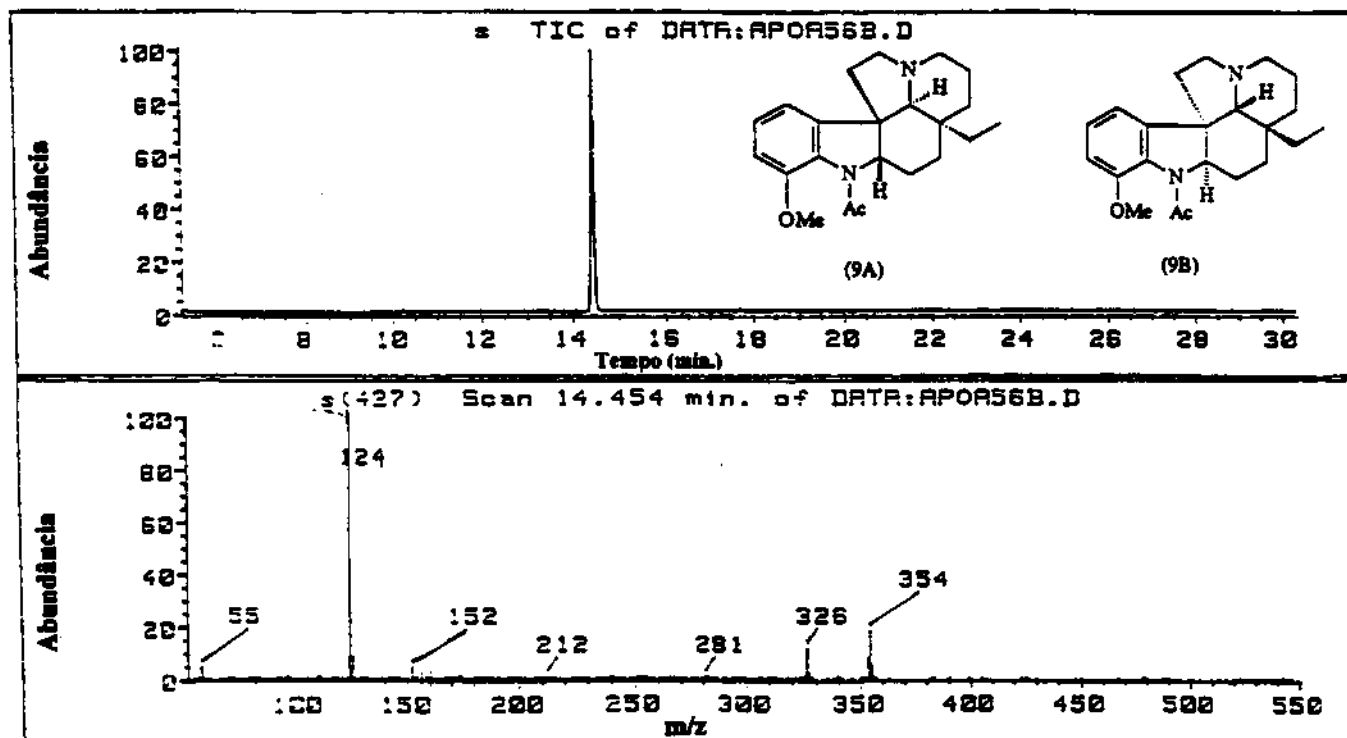
A1-9- Cromatograma e espectro de massas da 15-desmetóxi-peirifolina (17).



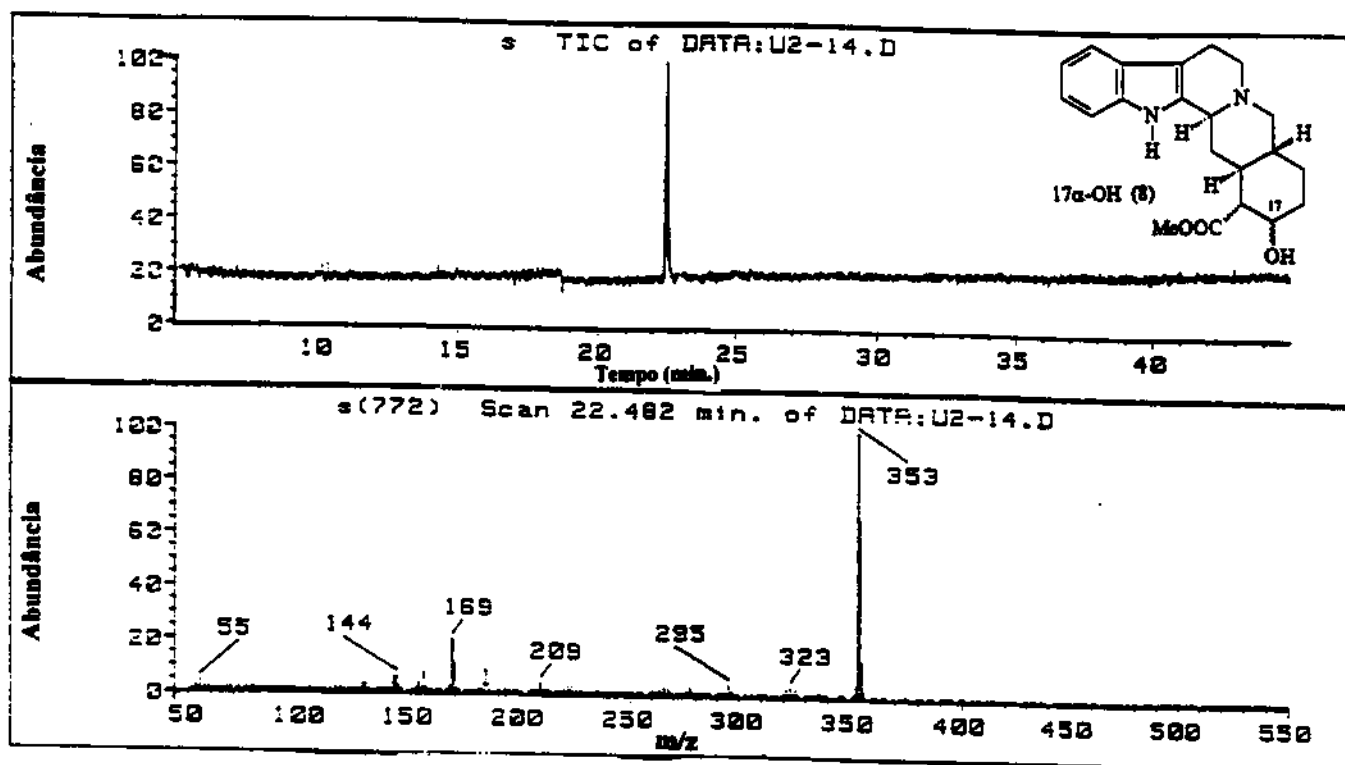
A1-10- Cromatograma e espectro de massas da polineuridina (22).



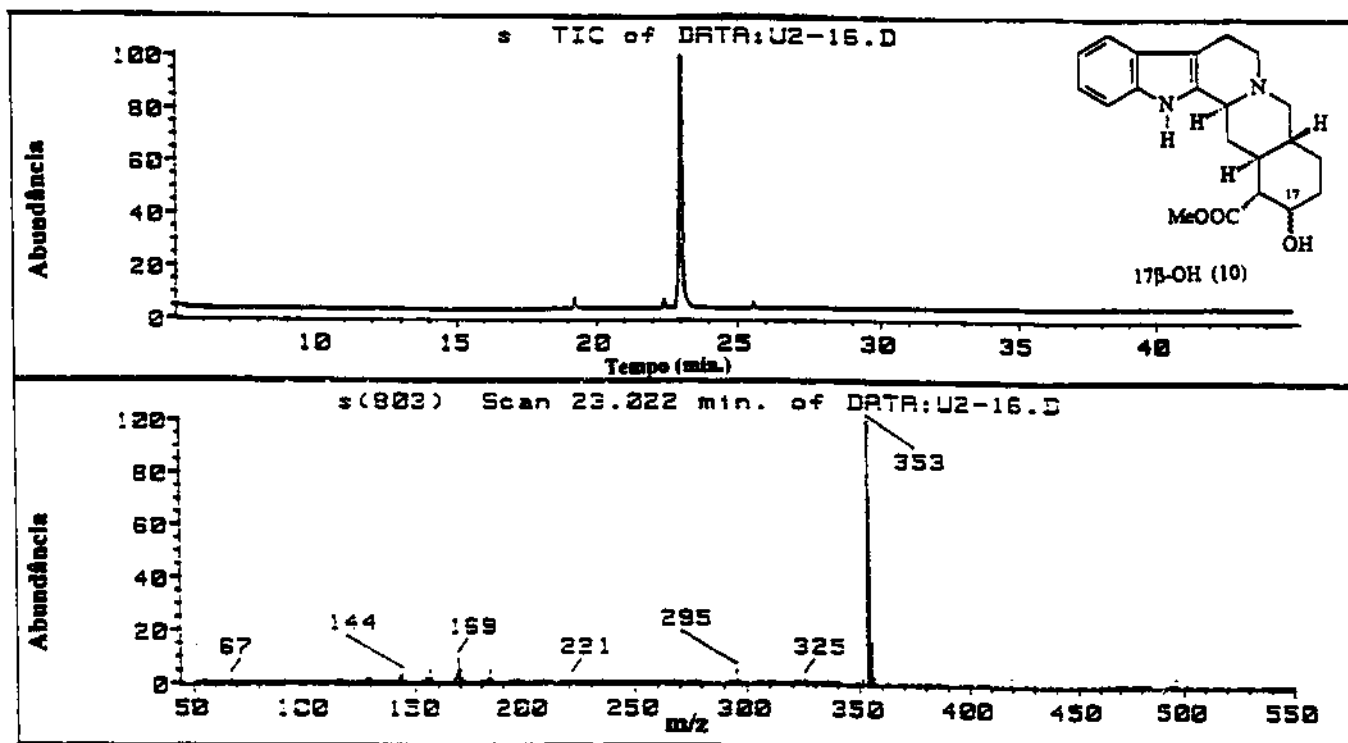
A1-11- Cromatograma e espectro de massas da 19(E)-isositsiriquina (27).



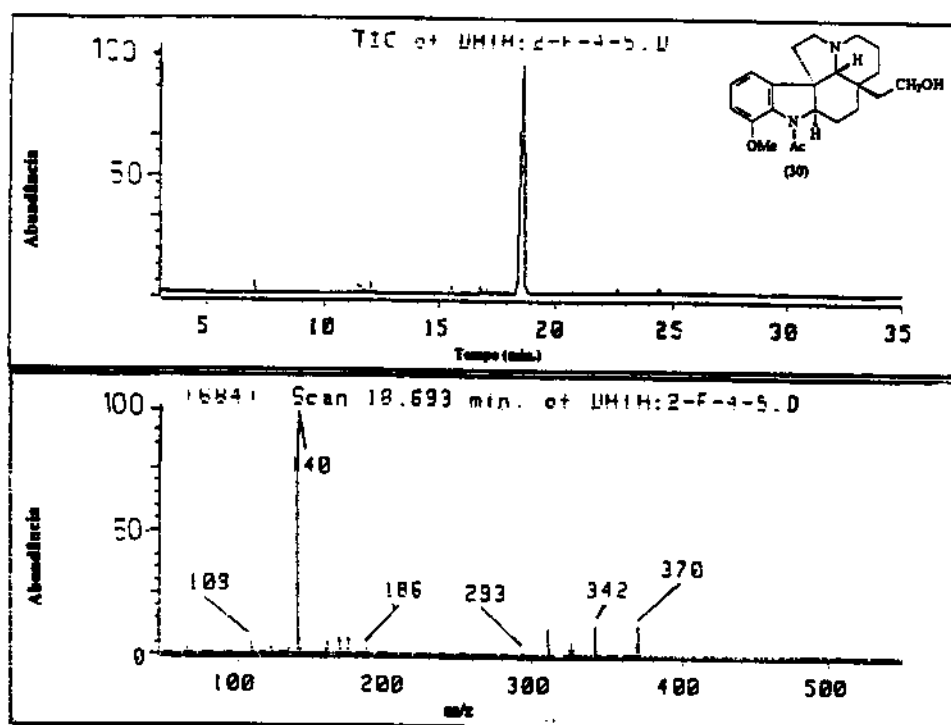
A1-12- Cromatograma e espectro de massas da aspidospermina (9A/9B).



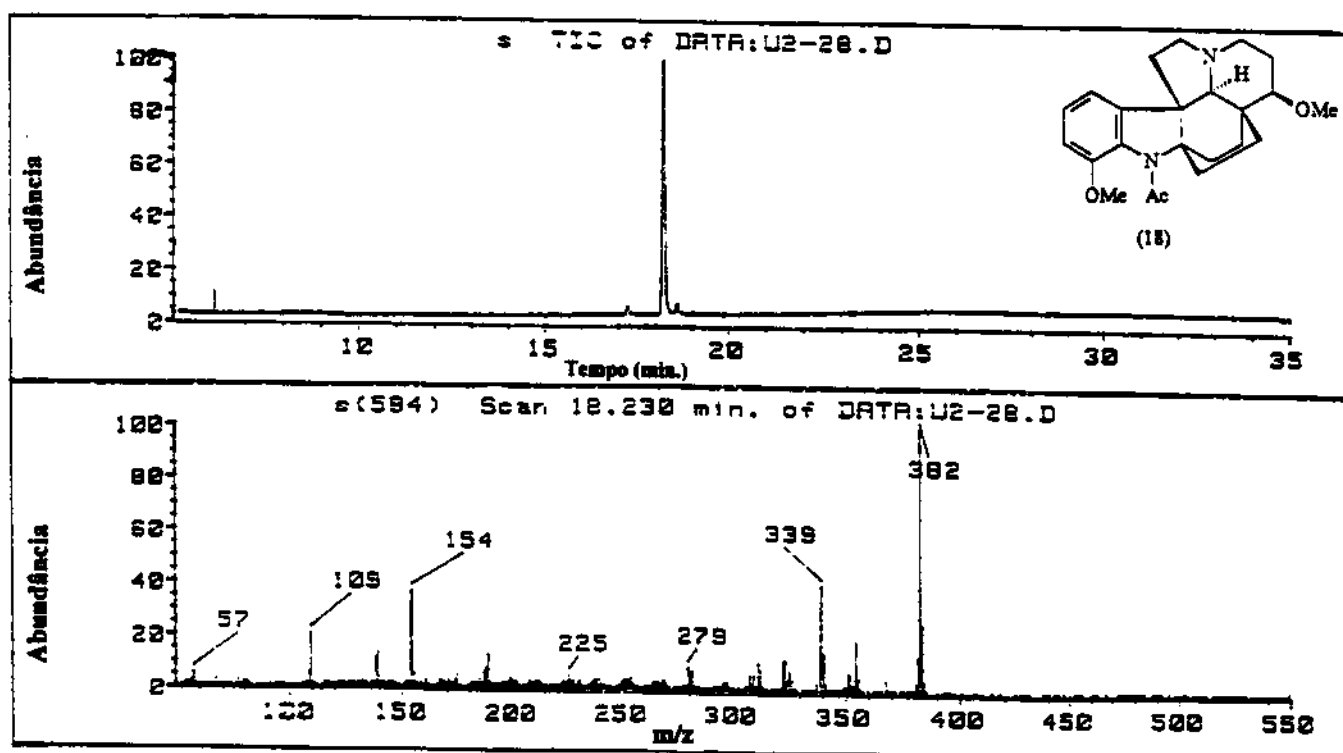
A1-13- Cromatograma e espectro de massas da yohimbina (8).



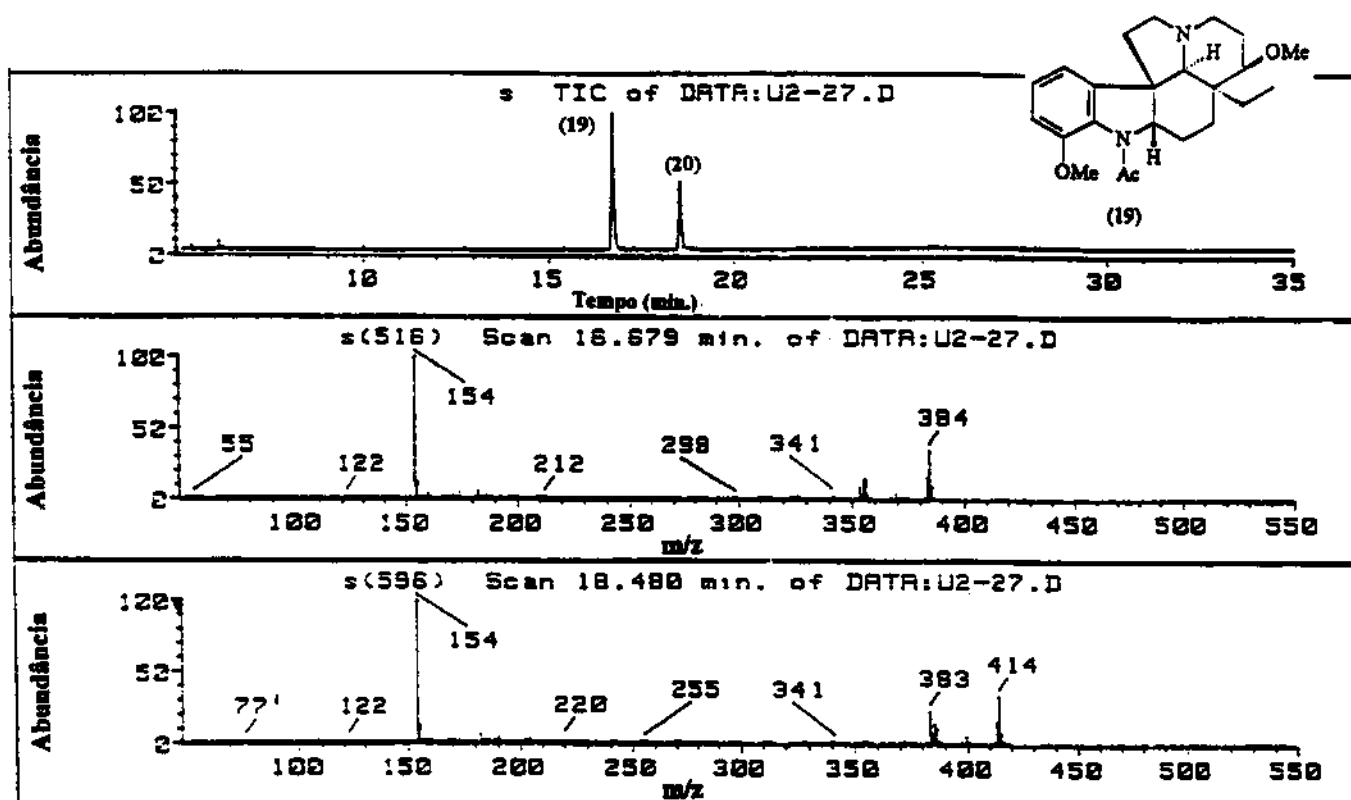
A1-14- Cromatograma e espectro de massas da β-yohimbina (10).



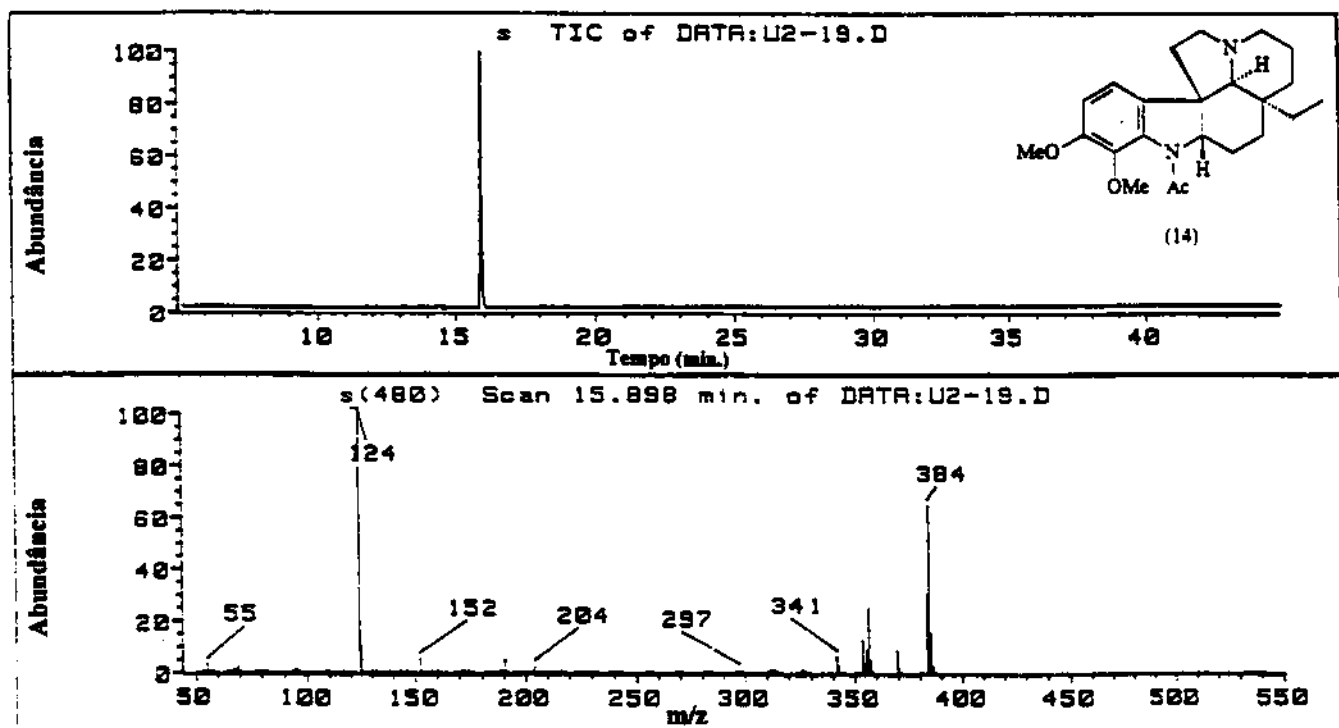
A1-15- Cromatograma e espectro de massas da *N*-acetil-cilindrocarpinol (30).



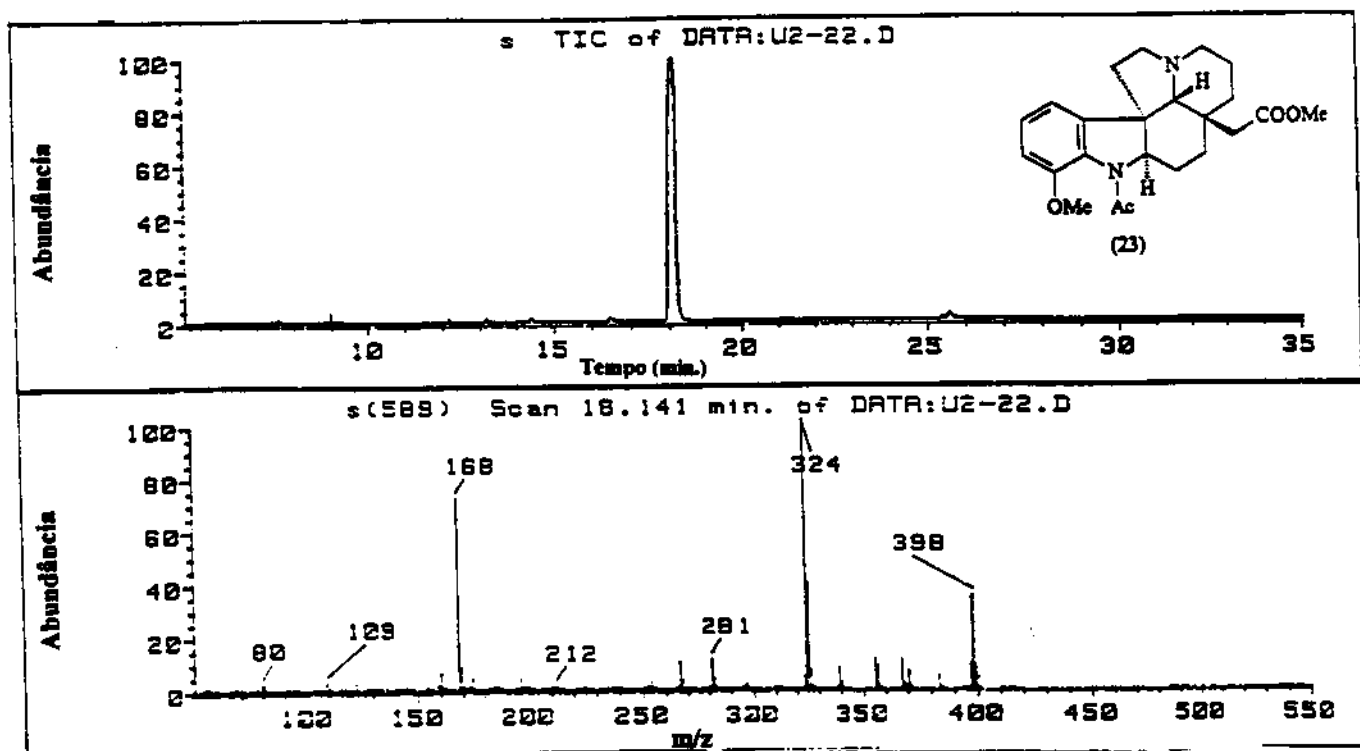
A1-16- Cromatograma e espectro de massas da pirifolina (18).



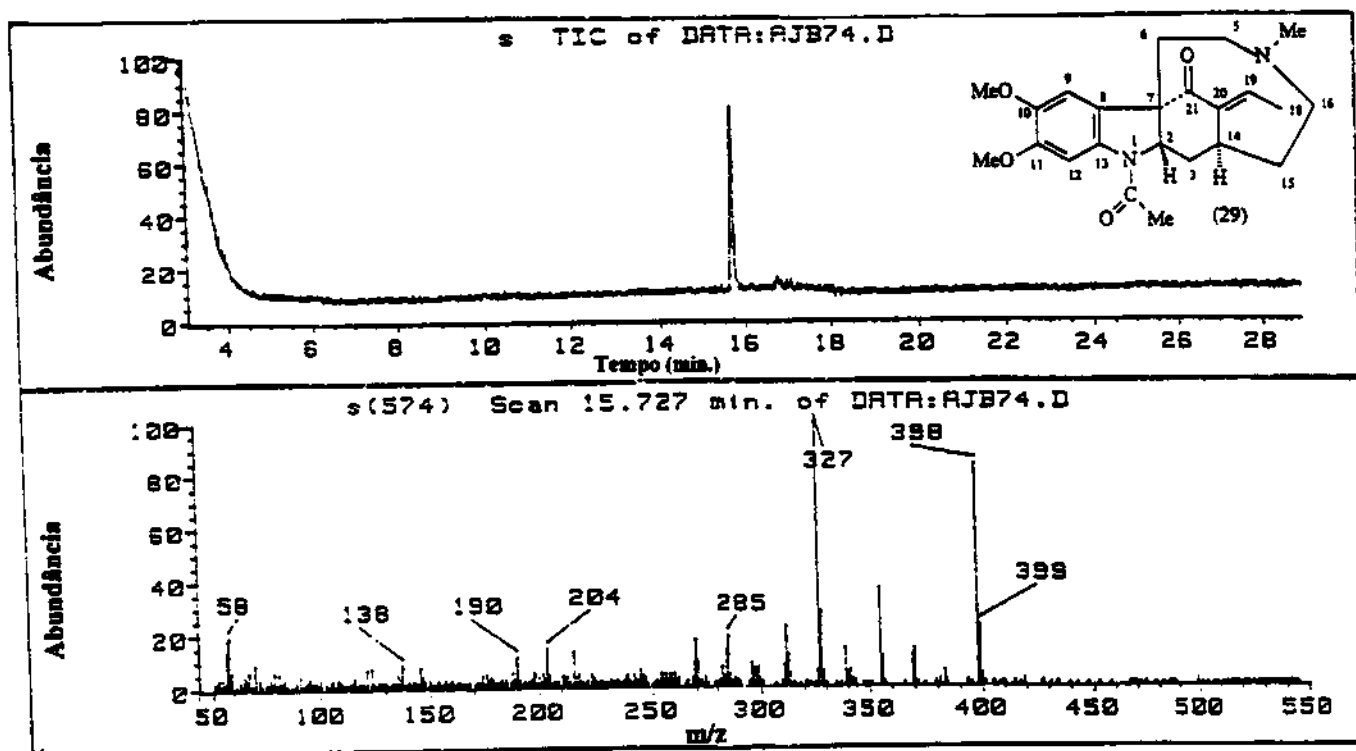
A1-17- Cromatograma e espectro de massas da 15-metóxi-aspidospermina (19).



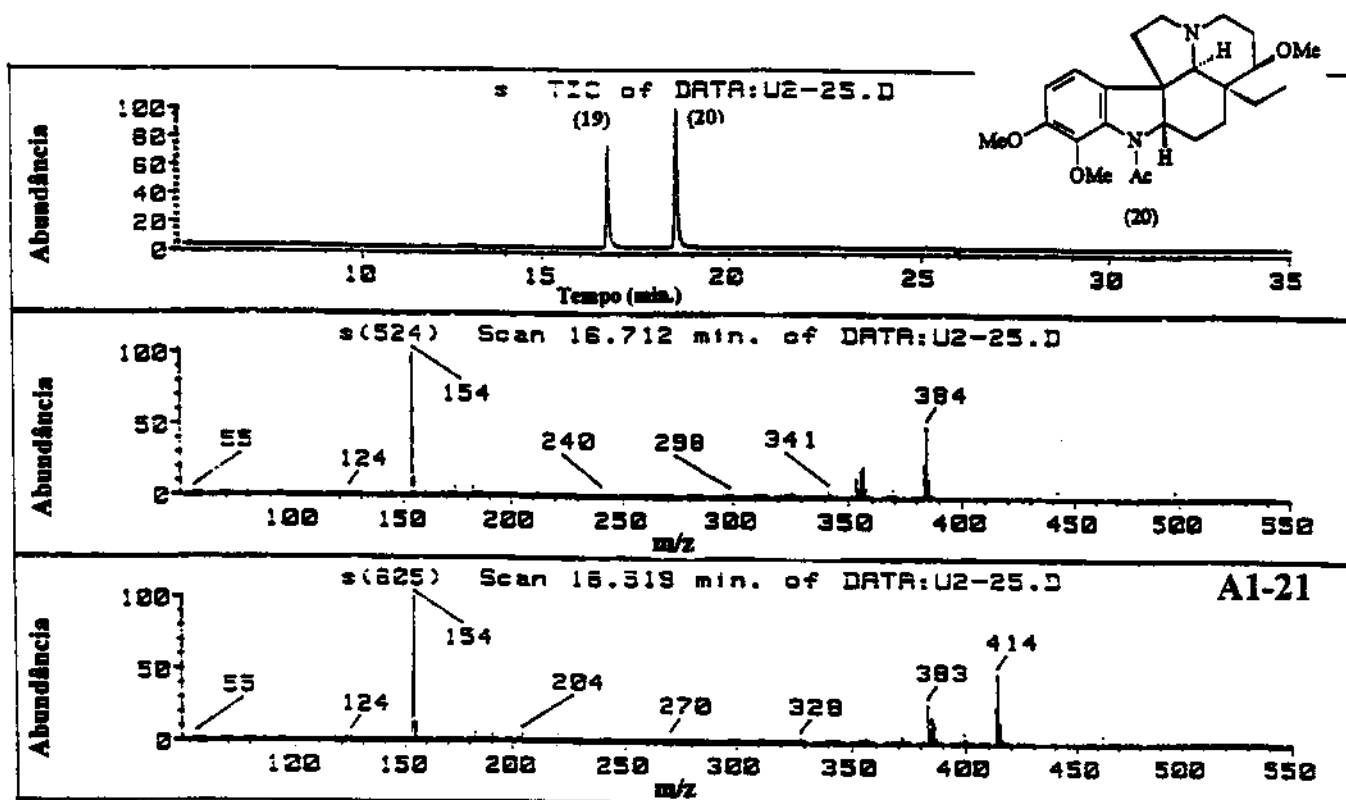
A1-18- Cromatograma e espectro de massas da pirifolidina (14).



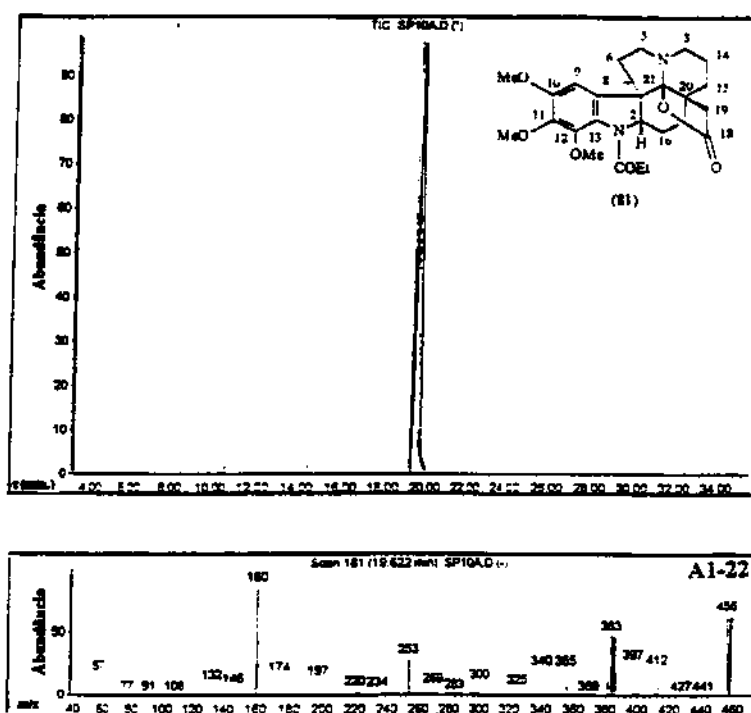
A1-19- Cromatograma e espectro de massas da *N*-acetil-cilindrocarina (23).



A1-20- Cromatograma e espectro de massas da geissosvellina (29).



A1-21- Cromatograma e espectro de massas da 15-metóxi-pirifolidina (20).



A1-22- Cromatograma e espectro de massas da 12-O-metil-21-oxo-aspidoalbina (81).

2.3. Análise qualitativa e quantitativa das espécies estudadas

2.3.1. Análise qualitativa e quantitativa de *Aspidosperma pyricollum*

O estudo fitoquímico de *Aspidosperma pyricollum* Muell. Arg. (Apocynaceae) foi realizado anteriormente por B. Gilbert [56] e C. Djerassi [57], que identificaram os alcalóides yohimbina (8), aspidospermina (9), β -yohimbina (10), uleína (11), aparicina (13), desmetil-aspidospermina (35), dasycarpidona (36), 18,19-desidro-yohimbina (37) e stemmaderina (38).

Neste trabalho foi realizada a análise qualitativa por CG/EM dos extratos à pH ácido e básico desta espécie, e foi feita uma comparação entre os alcalóides isolados por métodos fitoquímicos com os detectados em CG/EM e permitiu-nos observar que os alcalóides que estão presentes em maior concentração, com algumas exceções, são aqueles que já haviam sido isolados fitoquimicamente.

Cinco alcalóides, yohimbina (8), β -yohimbina (10), uleína (11), N-desmetil-uleína (12) e aparicina (13), foram isolados e identificados nesta espécie e utilizados como padrões na análise qualitativa (IK) e quantitativa.

A quantificação dos componentes principais, foi feita nos extratos alcaloidicos desta e das outras espécies analisadas em Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC), utilizando o método do padrão interno [33]. As concentrações obtidas para cada um dos componentes foi expressa em miligramas do alcalóide por 100g de massa da planta seca, para facilitar a comparação entre as concentrações das espécies estudadas.

O alcalóide presente em maior concentração foi a β -yohimbina (10), as concentrações dos outros componentes estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11. A identidade dos picos foi determinada através do tempo de retenção dos compostos que foram corrigidos em relação ao padrão interno (7), o seus índices IK, e os espectros de massas obtidos através da análise das amostras por CG/EM nas mesmas condições empregadas na análise em CG/DIC.

As Tabelas 10 e 11, além das concentrações dos componentes, estão os valores dos IK calculados para duas colunas diferentes, DB-1 e DB-5.

Os cromatogramas de CG/DIC obtidos das análises dos extratos à pH ácido e básico são mostrados na Figura 11 e 12 e os cromatogramas da Corrente Iônica Total (TIC) destes, obtidos na análise por CG/EM com seus respectivos espectros de massas, são mostrados nas Figuras 13, 14 e 15 a, b (respectivamente).

Tabela 10. Extrato à pH ácido de *Aspidosperma pyricollum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	uleina (11)	2244	2300	1,4
3	aparinina (13)	2359	2499	0,53

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas [32].

(b) massa de substância em mg por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 - colunas capilares

Tabela 11. Extrato à pH básico de *Aspidosperma pyricollum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	uleina (11)	2244	2300	0,79
3	aparinina (13)	2359	2499	0,17
4	yohimbina (8)	3106	3216	0,23
5	β -yohimbina (10)	3127	3247	0,37

(a) isolado e identificado na espécie, ou caracterizado por seu espectro de massas [32].

(b) massa de substância em mg por 100g de planta seca.

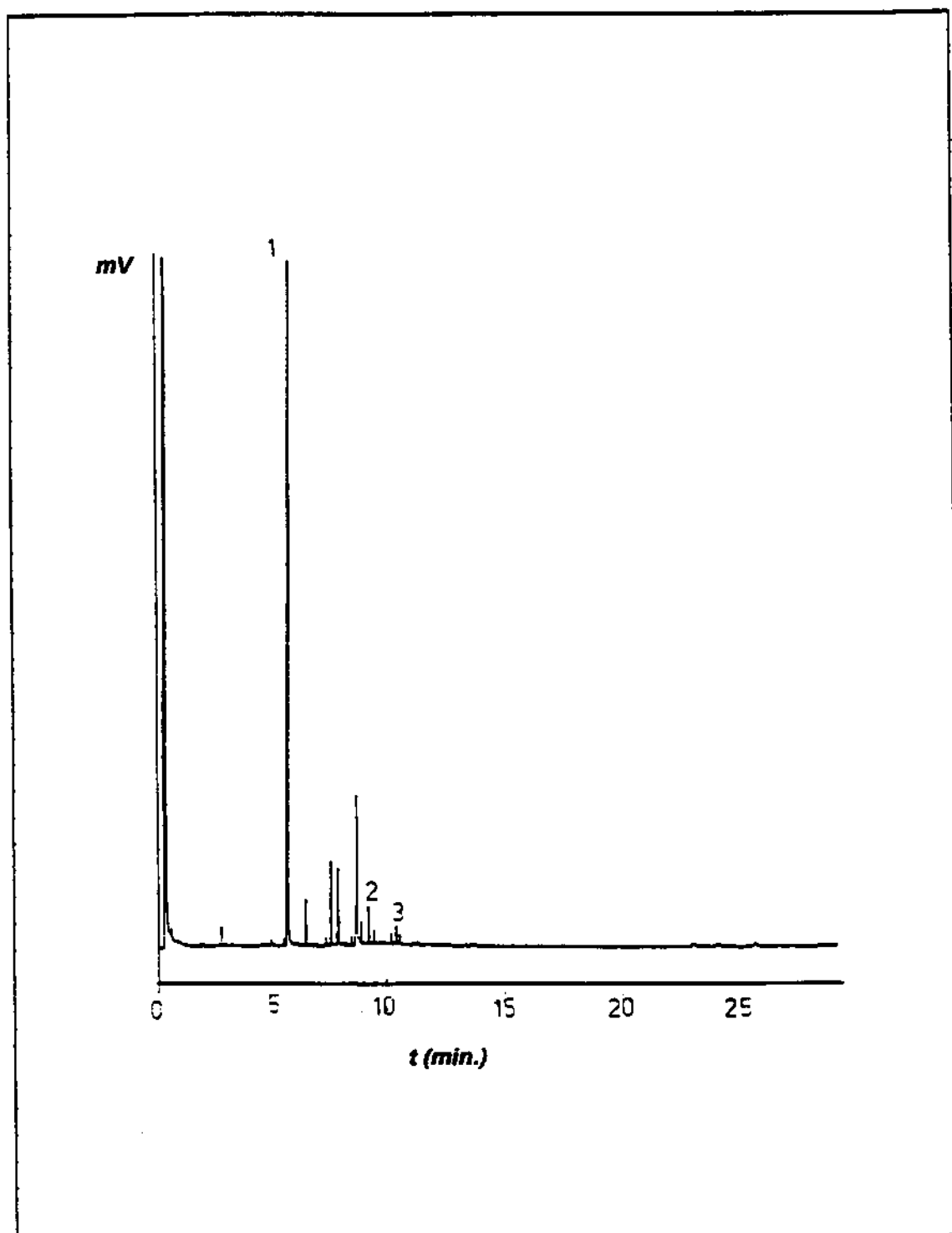


Figura 11. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A. pyricollum*.

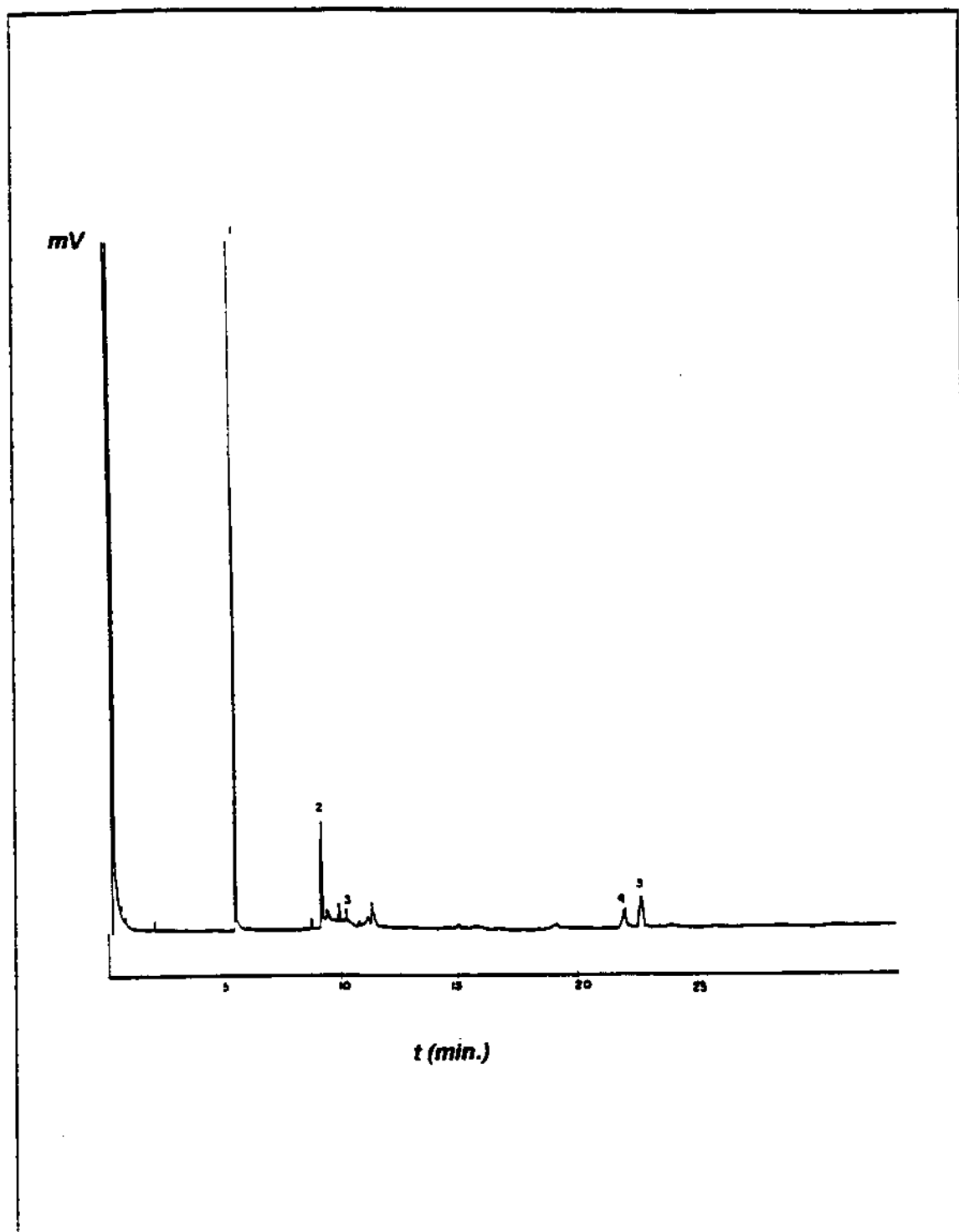


Figura 12. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. pyricollum*.

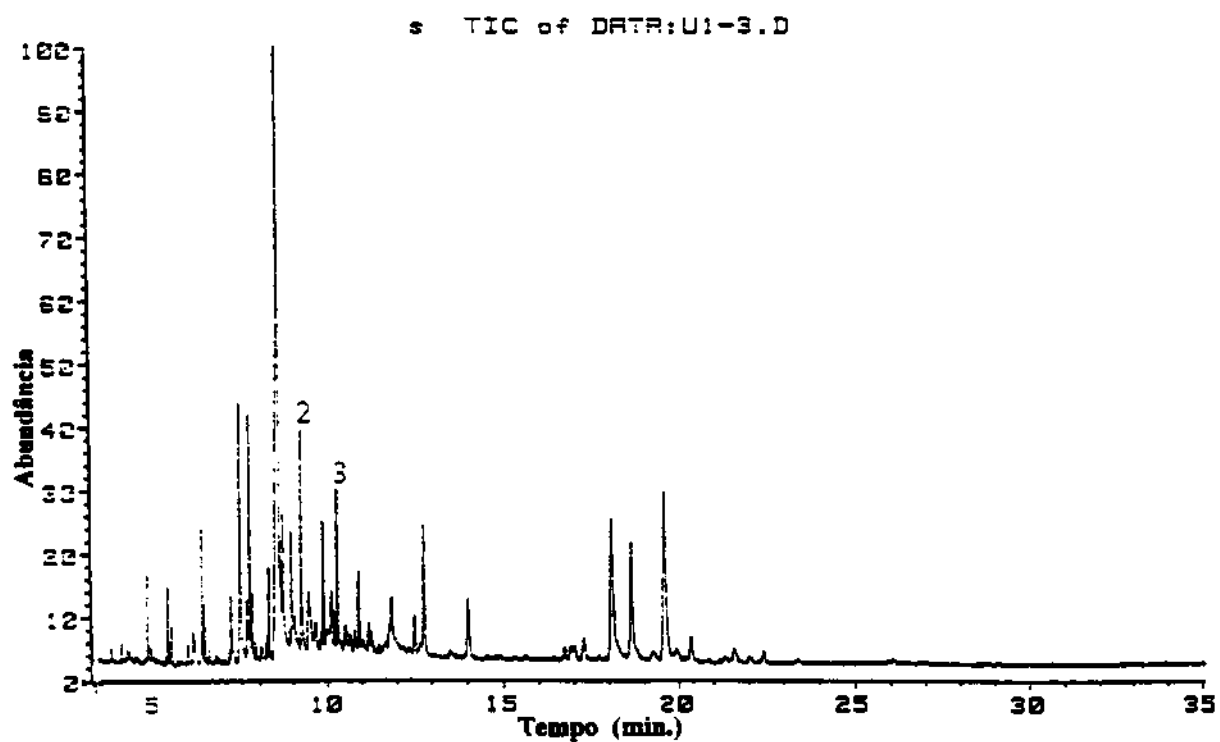


Figura 13. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. pyricollum*.

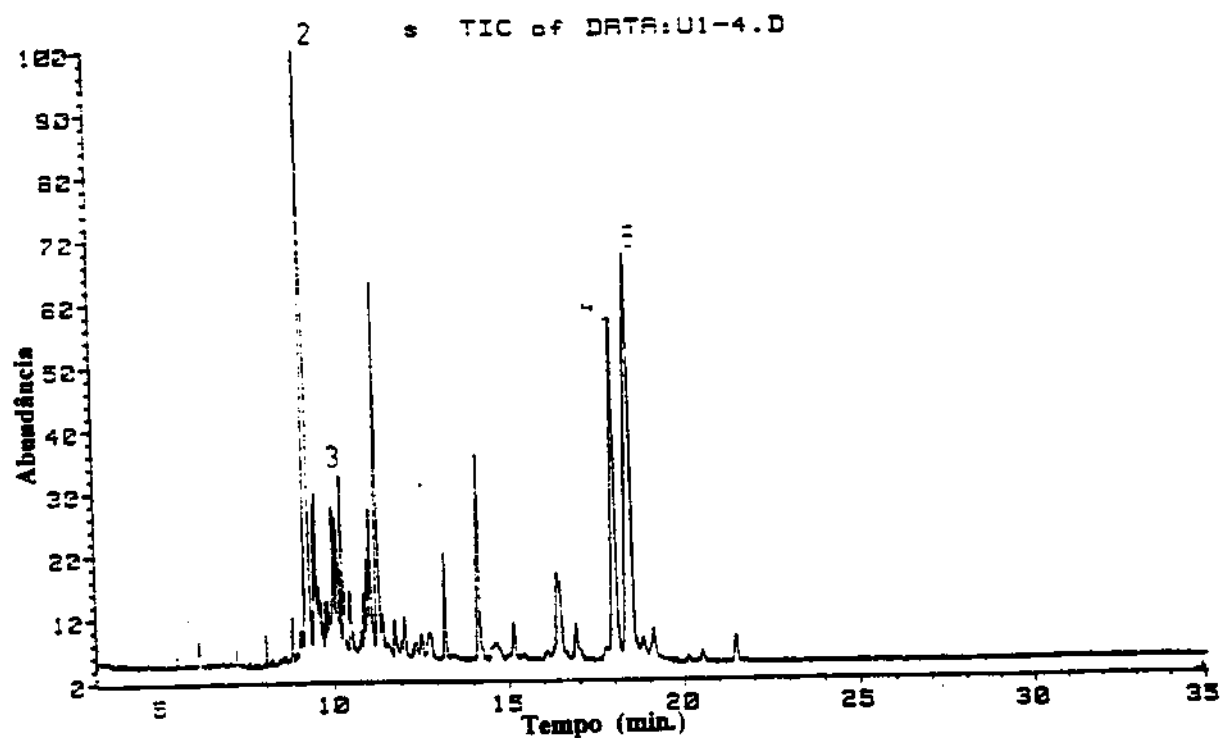


Figura 14. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. pyricollum*.

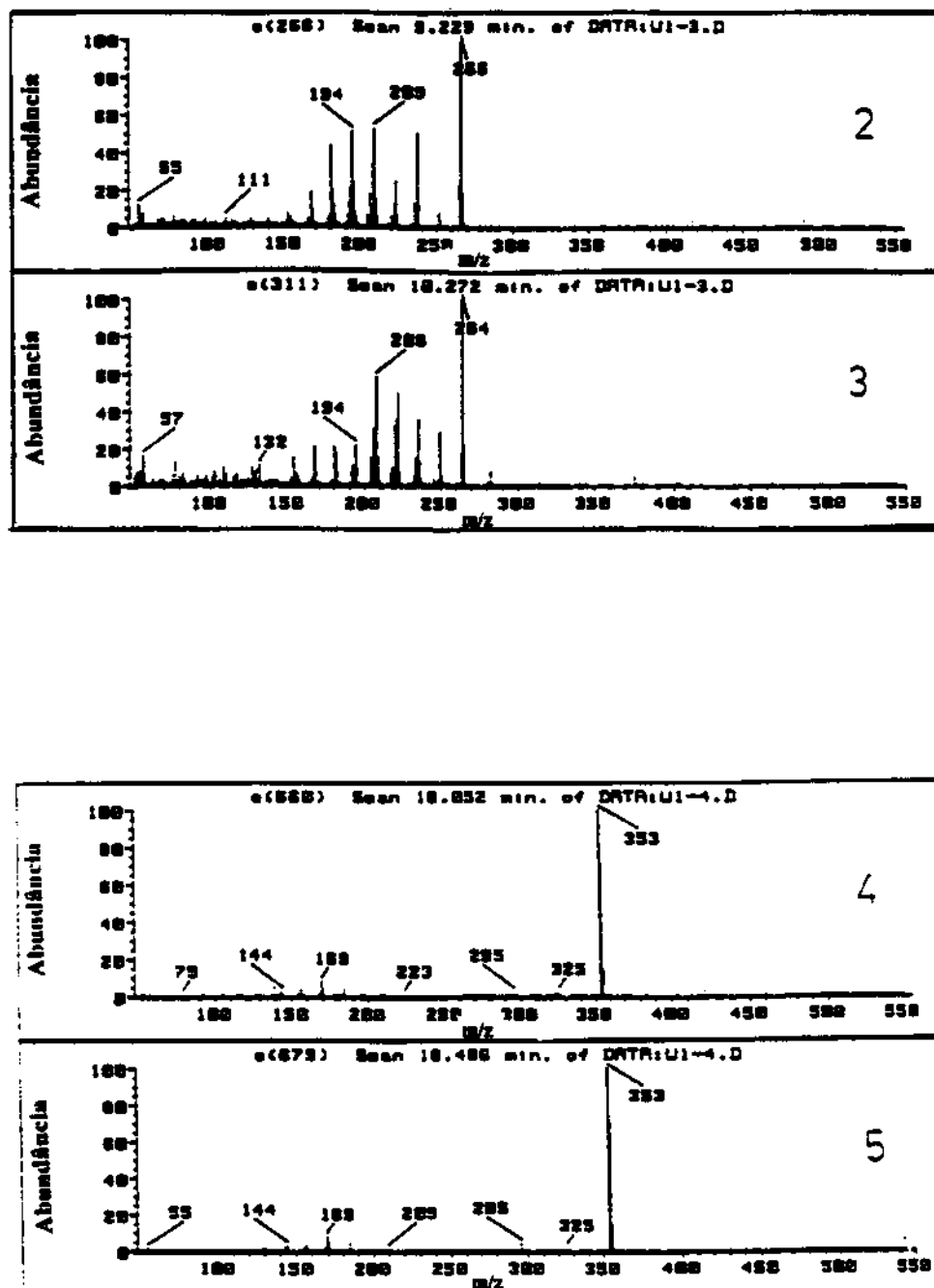
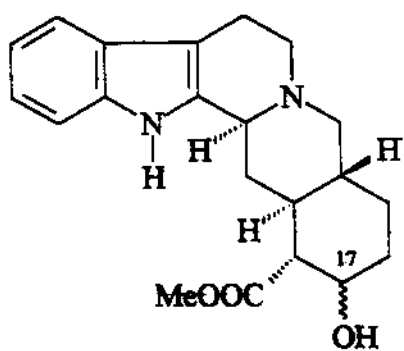
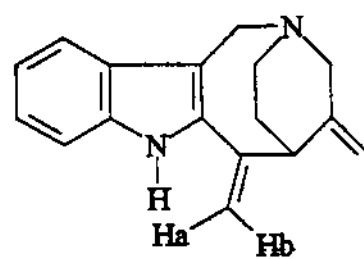


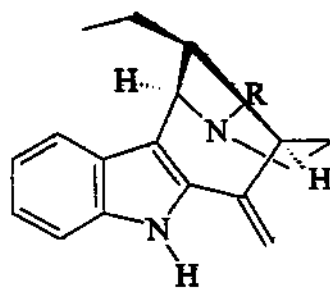
Figura 15. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. pyricollum*. Picos: 2- uleína (11), 3- aparicina (13), 4- yohimbina (8), 5- β -yohimbina (10).



17 α -OH (8) Pico 4
17 β -OH (10) Pico 5



(13) Pico 3



R= CH₃ (11) Pico 2

2.3.2. Análise qualitativa e quantitativa de *Aspidosperma olivaceum*.

Aspidosperma olivaceum foi estudada fitoquimicamente por B. Gilbert e colaboradores [37], que identificaram os alcalóides uleína (11), aparicina (13), olivacina (39), guatambuina (40) e aspidocarpina (41).

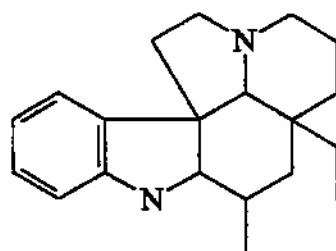
A análise qualitativa por CG/EM mostrou uma correlação muito boa entre os compostos isolados fitoquimicamente e os compostos identificados em CG/EM, pois foi possível a detecção de todos os compostos já isolados anteriormente [37].

Foram isolados oito alcalóides, uleína (11), aparicina (13), aspidospermina (9A), aspidofractarina (15), aspidofilina (16), 15-desmetóxi-pirifolina (17), pirifolina (18) e pirifolidina (14), que foram usados como padrões nas análises.

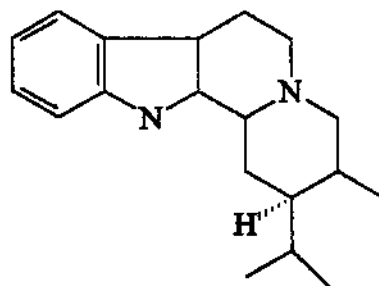
A análise quantitativa por CG/DIC também foi realizada e revelou que a uleína (11) é o composto presente em maior concentração. Outros componentes que estão presentes em concentrações altas são a olivacina (39), um composto de muito interesse farmacológico devido a sua comprovada ação antileucêmica [19, 20], e a pirifolidina (14), conforme o descrito nas Tabelas 12 e 13.

A análise por CG/DIC e o isolamento fitoquímico de padrões confirmaram a presença de alcalóides com esqueleto do tipo plumerano, compostos estes com estruturas similares aos alcalóides aspidospermina (9A) e aspidofractarina (15). A presença destes alcalóides com esqueleto do tipo plumerano foram evidenciados principalmente no extrato obtido à pH ácido, pois somente um alcalóide do tipo plumerano, ou seja a aspidocarpina (41), havia sido isolada anteriormente nesta espécie [37], e a presença destes só pôde ser evidenciada nos extratos, utilizando-se CG/EM.

Woodson [15] baseado em aspectos botânicos classificou as espécies *A. pyricollum* e *A. olivaceum* como sendo sinônimas. Por outro lado, outros pesquisadores são da opinião que se tratam de espécies distintas [16]. Os resultados das análises dos extratos ácidos e básicos das duas espécies revelaram-se muito diferentes, pois apesar da presença de alguns compostos similares, a marcante presença de alcalóides com esqueletos plumerano e a ausência de compostos com esqueleto corinanteano, como por exemplo a yohimbina (8) e a β -yohimbina (10), nos extratos de *A. olivaceum* são um importante aspecto para diferenciação das mesmas. Estas observações são reforçadas por um trabalho publicado recentemente por L. S. Kinoshita e W. M. Ferreira [25], no qual propõe-se uma nova divisão infragênica para o gênero *Aspidosperma*, onde *A. pyricollum* e *A. olivaceum* são reclassificadas como sendo espécies distintas.



Esqueleto Plumerano



Esqueleto Corinanteano

Tabela 12. Extrato à pH ácido de *Aspidosperma olivaceum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	uleína (11)	2252	2328	30,0
3	aspidofractinina (15)	2248	2328	3,10
4	apparicina (13)	2357	2505	13,2
5	12-desmetóxi- aspidospermina (42)	2586	2731	2,93
6	aspidospermina (9A)	2652	2760	2,93
7	olivacina (39)	2680	2792	1,72
8	15-desmetóxi- pirifolina (17)	2703	2798	0,86
9	pirifolidina (14)	2761	2847	14,6
10	15-metóxi-aspidospermina (19)	2804	2892	1,97
11	aspidofilina (16)	2842	2949	2,24
12	pirifolina (18)	2889	2981	0,14
13	15-metóxi-pirifolidina (20)	2910	2999	1,39

14	Aspidocarpina (41)	2934	3034	6,20
----	--------------------	------	------	------

Tabela 13. Extrato à pH básico de *Aspidosperma olivaceum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	uleina (11)	2234	2305	66,0
15	dihidro-uleina (43)	2277	2367	11,8
4	apparicina (13)	2357	2505	8,90
5	12-desmetóxi- aspidospermina (42)	2583	2731	7,77
6	aspidospermina (6)	2646	2760	5,80
7	olivacina (39)	2674	2795	26,2
9	pirifolidina (14)	2761	2847	24,3
11	aspidofilina (16)	2842	2949	3,80
14	Aspidocarpina (30)	2923	3034	11,1

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

Os cromatogramas de CG/DIC dos extratos ácidos e básicos são mostrados nas Figuras 16 e 17, os cromatogramas de CG/DIC dos extratos são mostrados nas Figuras 18 e 19 e os espectros de massas dos componentes detectados nos extratos na Figura 20 a, b, c, d.

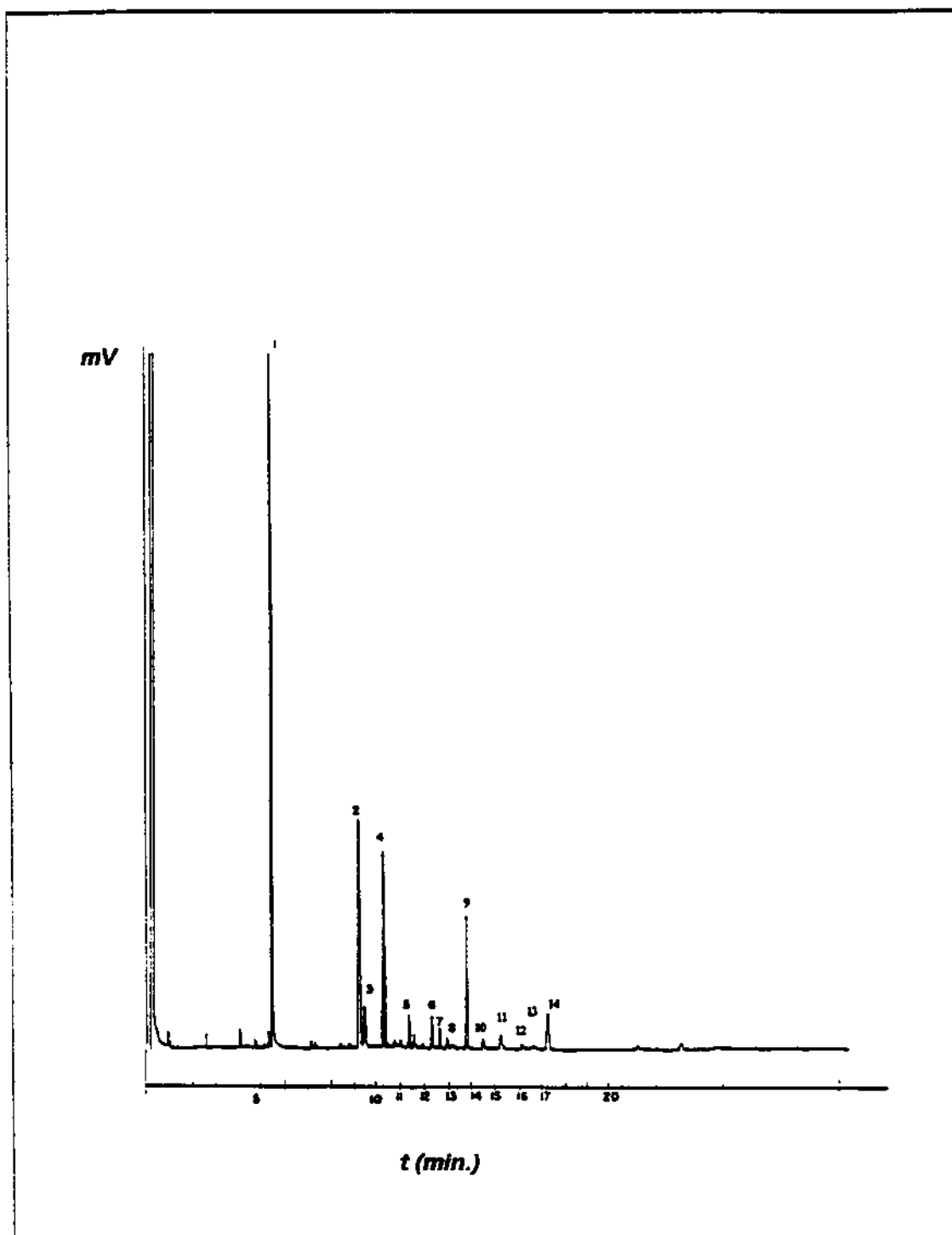


Figura 16. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A. olivaceum*.

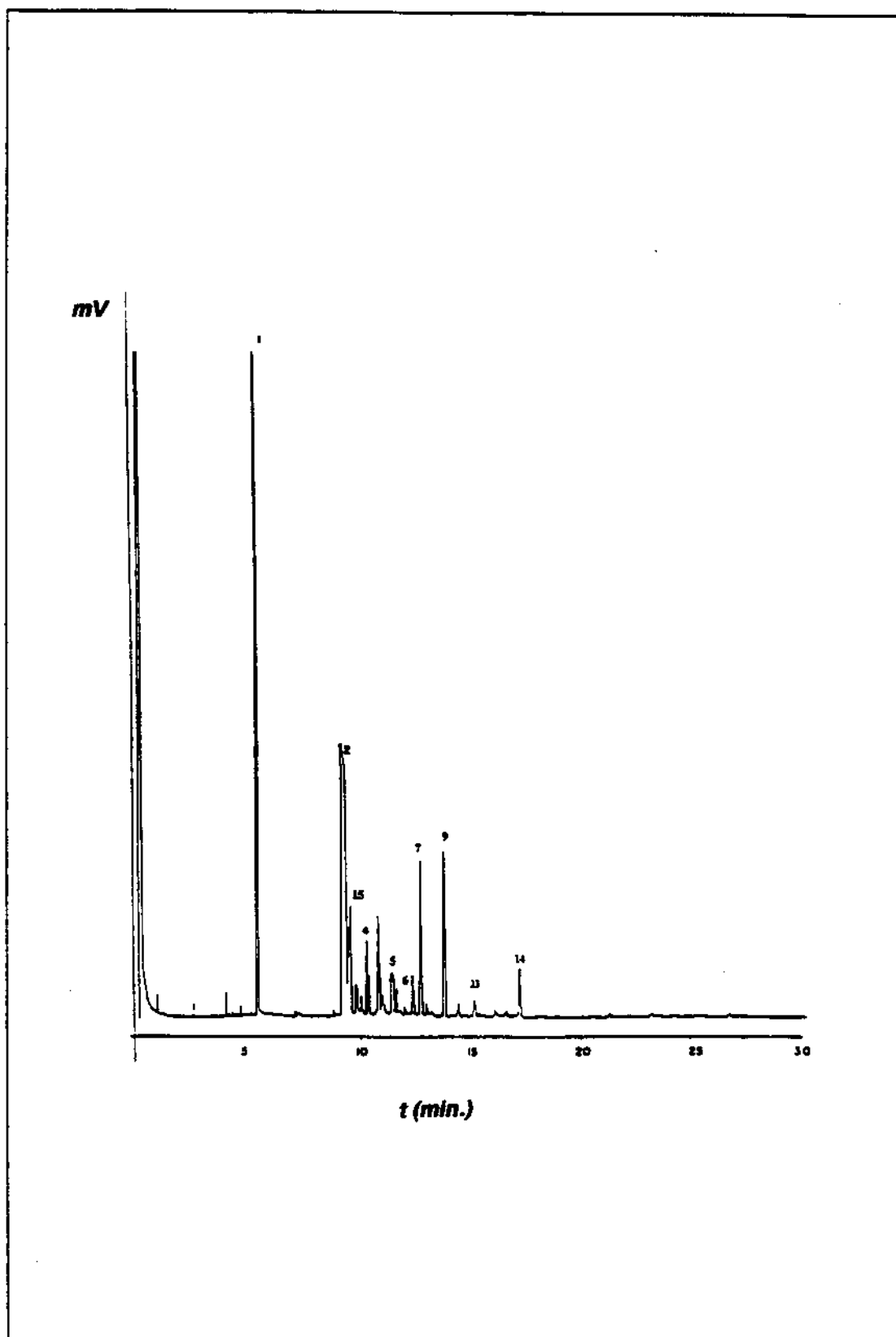


Figura 17. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. olivaceum*.

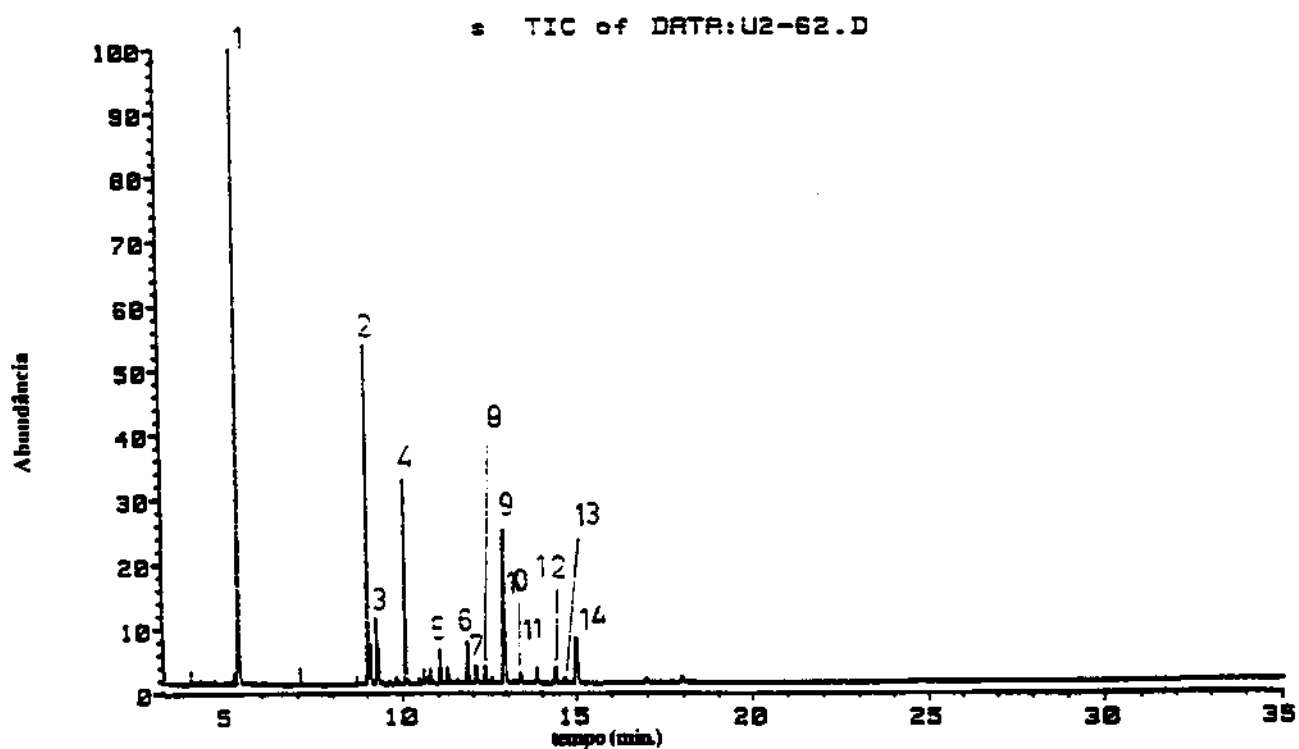


Figura 18. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. olivaceum*.

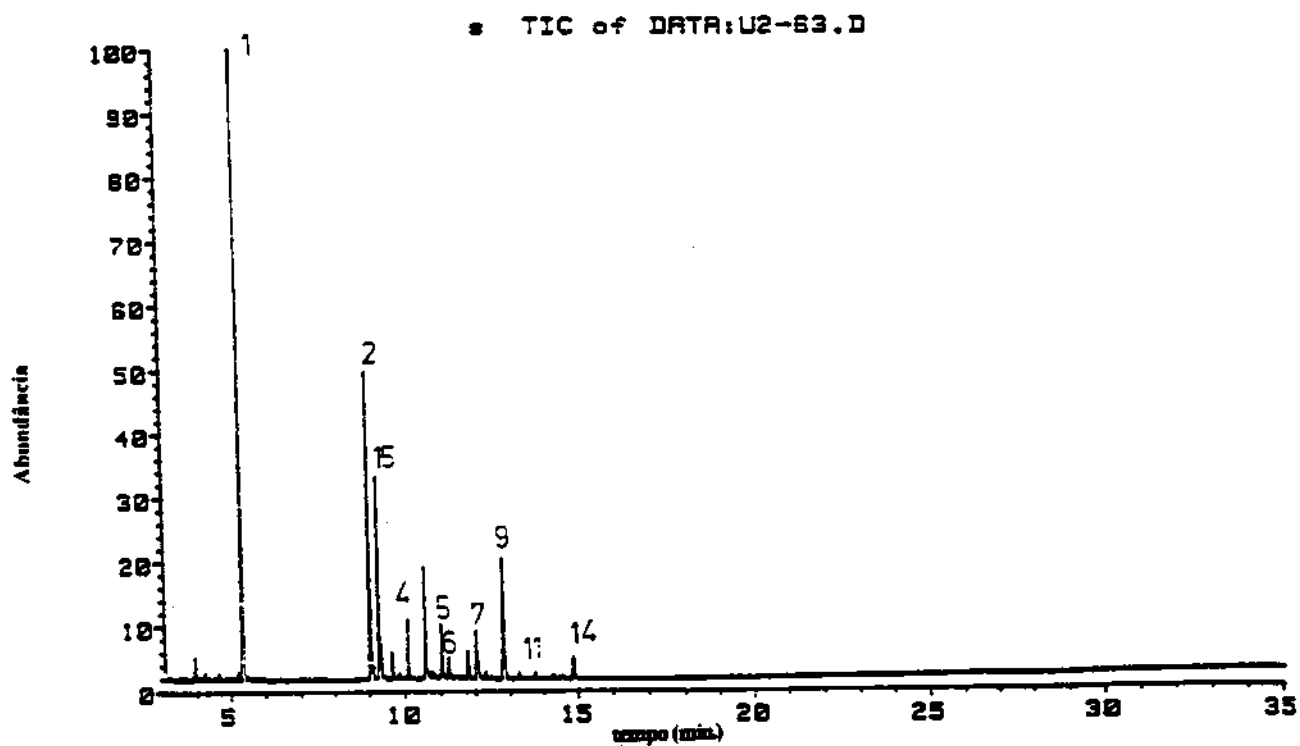


Figura 19. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. olivaceum*.

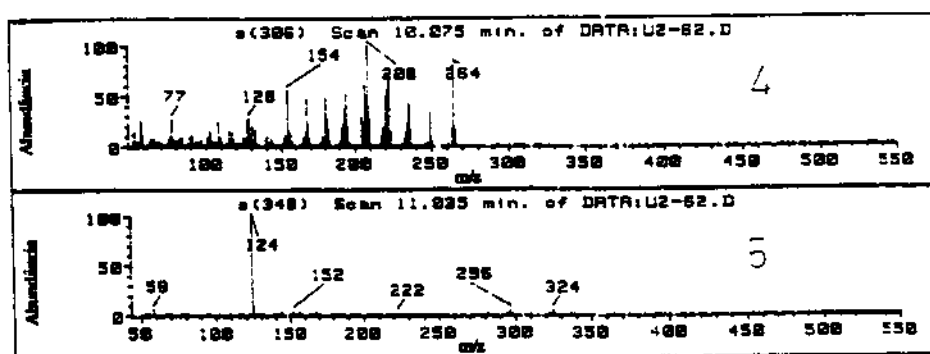
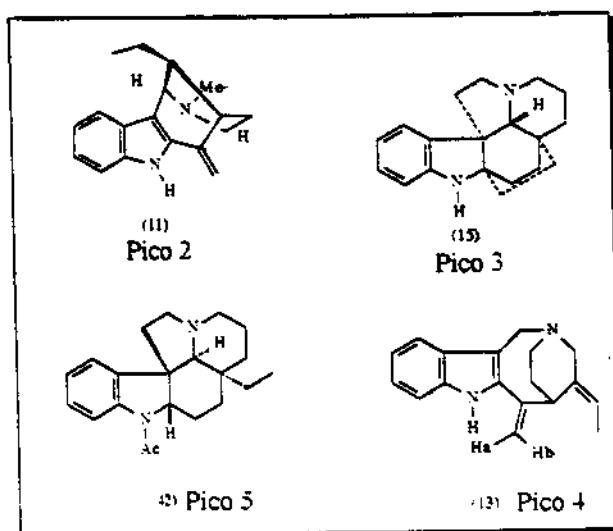
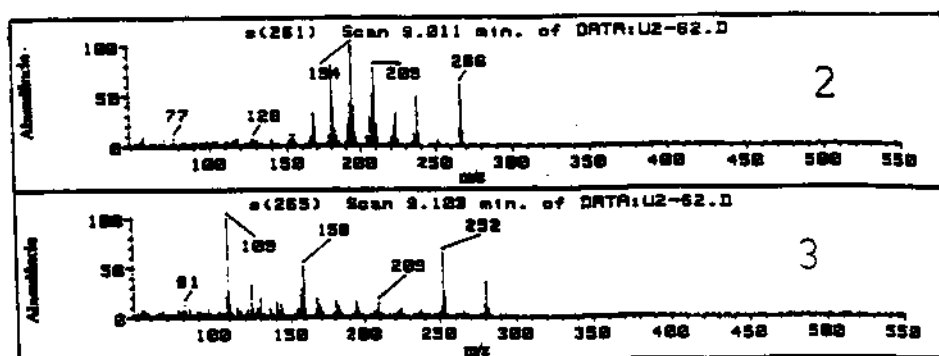


Figura 20a. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. olivaceum*. Picos: 2- uleína (11), 3- aspidofractinina (15), 4- aparicina (13), 5- 12-desmetóxi-aspidospermina (42).

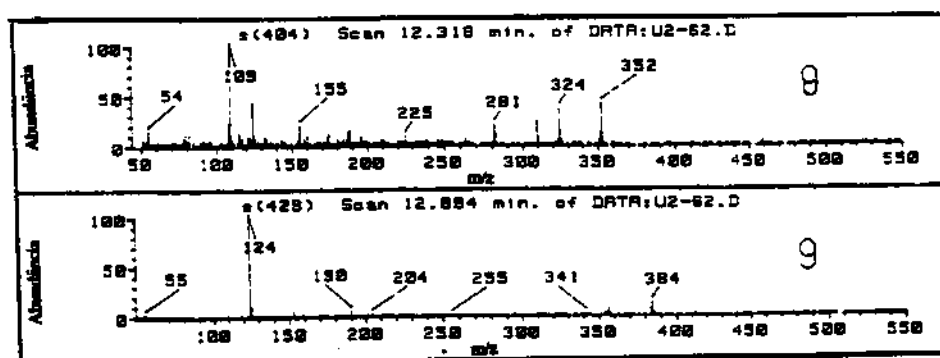
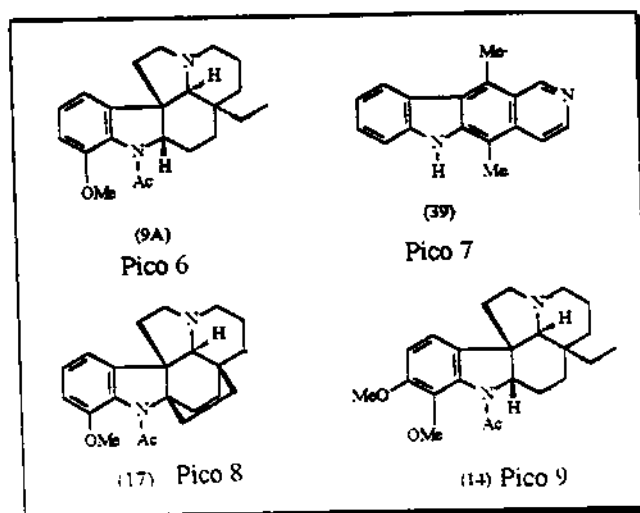
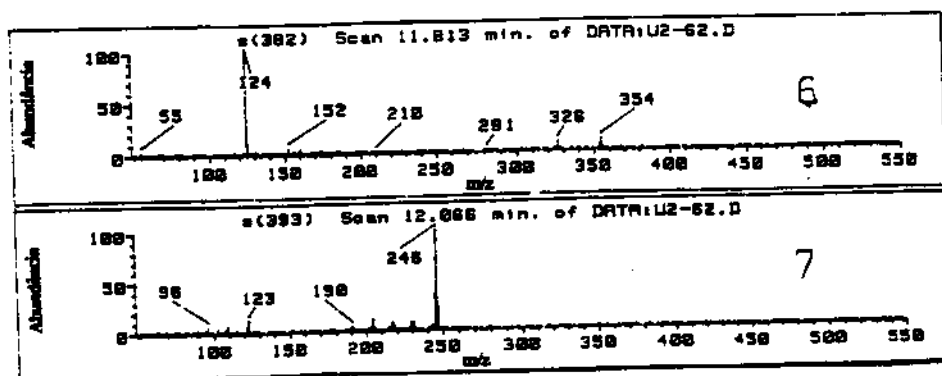


Figura 20b. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. olivaceum*. Picos: 6- (+)-aspidospermina (9A), 7- olivacina (39), 8- 15-desmetoxi pirifolina (17), 9- pirifolidina (14).

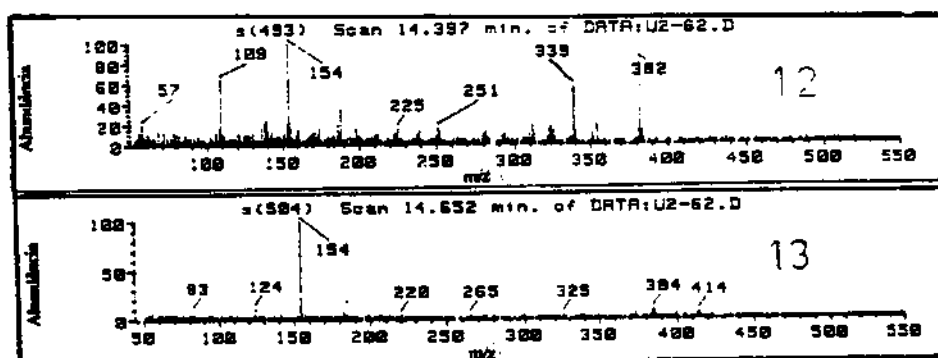
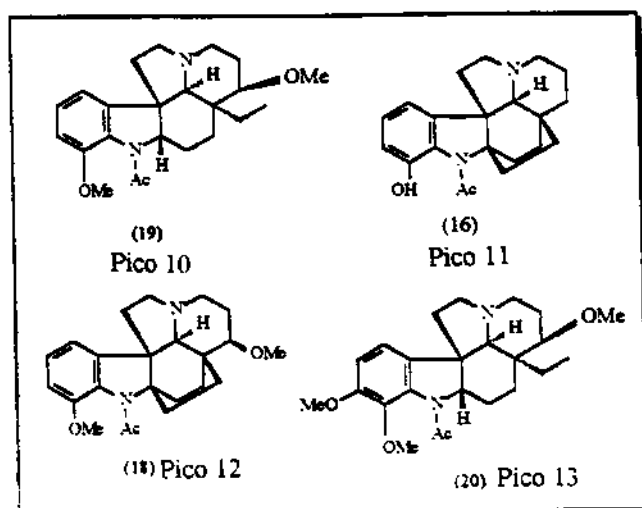
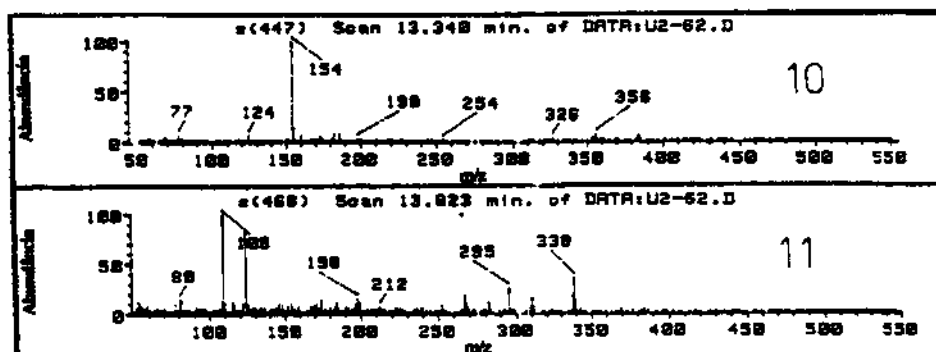
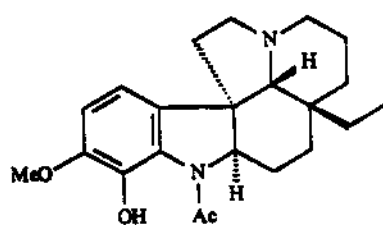
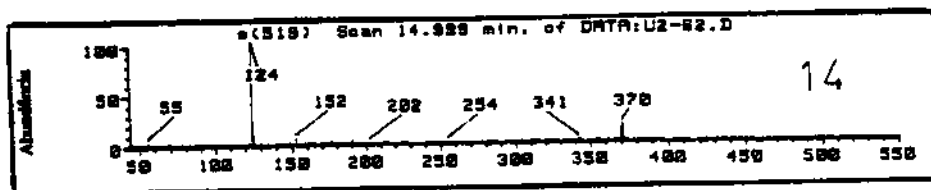
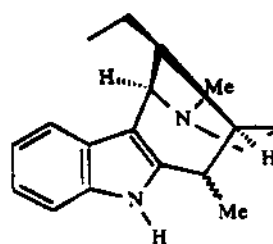


Figura 20c. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. olivaceum*. Picos: 10- 15-metóxi-aspidospermina (19), 11- aspidofilina (16), 12- pirifolina (18), 13- 15-metóxi-pirifolidina (20).



(41)
Pico 14



(43)
Pico 15

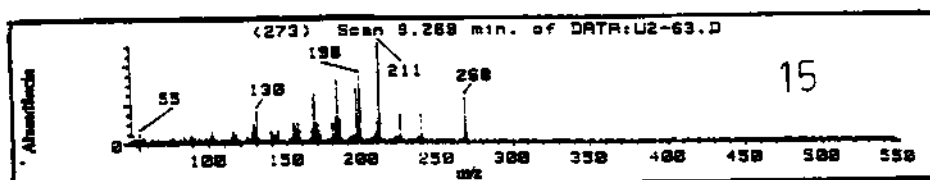


Figura 20d. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. olivaceum*. Picos: 14- aspidocarpina (41), 15- dihidro-uleima (43).

2.3.3. Análise qualitativa e quantitativa de *Aspidosperma pyrifolium*.

Aspidosperma pyrifolium foi estudada fitoquimicamente por B. Gilbert e colaboradores [44] em 1965, A. Craveiro e colaboradores [40] em 1983, e mais recentemente, 1996, A. C. Mitaine e colaboradores [45], que ao todo identificaram os compostos aspidospermina (9A), aspidofilina (16), pirifolidina (14), 15-desmetóxi-pirifolina (17), pirifolina (18), 12-desmetóxi-aspidospermina (42), vincadifformina (44), O-desmetil-palosina (45), haplocina (46), N-formil-aspidospermidina (47), desidróxi-haplocidina (48), vallesina (49), palosina (50), 10-metóxi-aspidospermidina (51), aspidospermidina (52), akuammicina (53), tubotaiwina (54).

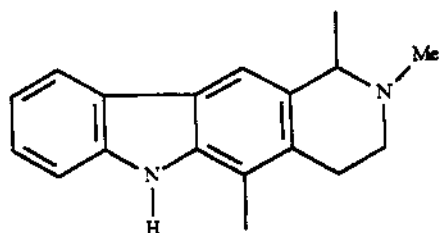
A análise qualitativa por CG/EM realizada anteriormente [34] revelou boa correlação entre os compostos isolados fitoquimicamente e os compostos detectados por CG/EM, pois os compostos presentes em maior concentração em todos os estudos fitoquímicos realizados anteriormente [40, 44, 45] puderam ser detectados.

Nesta espécie isolamos oito alcalóides, aspidospermina (9A), pirifolidina (14), aspidofractarina (15), aspidofilina (16), 15-desmetóxi-pirifolina (17), pirifolina (18), 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15-metóxi-pirifolidina (20), destes o composto aspidofractarina (15) foi isolado pela primeira vez nesta espécie e os compostos inéditos 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15-metóxi-pirifolidina (20), compostos estes que tiveram suas estruturas sugeridas a partir da análise qualitativa por CG/EM [34] e confirmadas agora neste estudo após o isolamento e identificação. Todos estes compostos isolados e identificados foram usados como padrões nas análises.

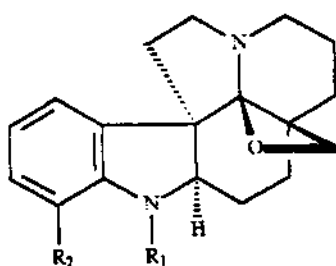
A análise quantitativa em CG/DIC e revelou que a pirifolidina (14), pico 7 na Figura 21, é o composto presente em maior concentração. Outros componentes que estão presentes em concentrações altas são a pirifolina (18), pico 10 na Figura 22, e a 15-desmetóxi-pirifolina (14), pico 6 na Figura 22, conforme o descrito nas Tabelas 14 e 15.

Os cromatogramas de CG/DIC dos extratos ácidos e básicos são mostrados nas Figuras 21 e 22, os cromatogramas de CG/EM dos extratos são mostrados nas Figuras 23 e 24 e os espectros de massas dos componentes detectados nos extratos na Figura 25 a, b, c, d.

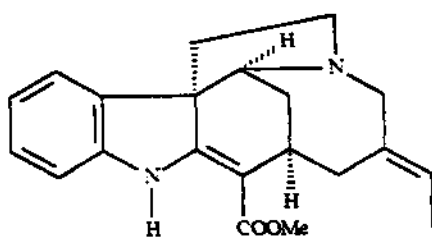
ESTRUTURAS II



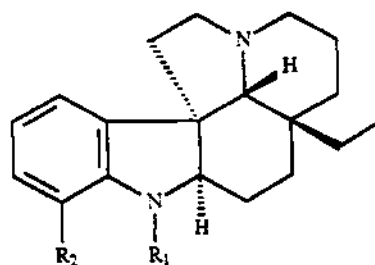
(40)



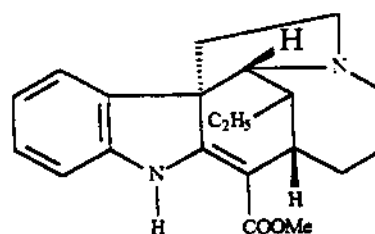
$R_1 = \text{COC}_2\text{H}_5$, $R_2 = \text{OH}$ - (46)
 $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$ - (48)



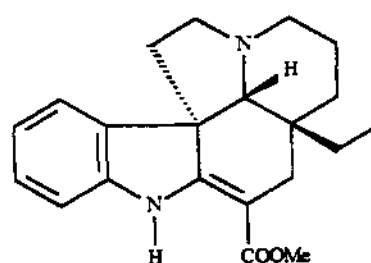
(53)



$R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{H}$ - (47)
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$ - (51)
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ - (52)
 $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$ (49)



(54)



(44)

Tabela 14. Extrato à pH ácido de *Aspidosperma pyrifolium*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	aspidofractinina (15)	2249	2328	22,1
3	desacetil-pirifolidina (42)	2525		21,0
4	N-formil-aspidofractinina (55)	2588	2729	11,5
5	aspidospermina (9A)	2654	2760	38,9
6	15-desmetóxi-pirifolina (17)	2711	2799	93,6
7	pirifolidina (14)	2765	2847	257
8	15-metóxi-aspidospermina (19)	2804	2892	19,0
9	aspidofilina (16)	2844	2948	16,7
10	pirifolina (18)	2897	2989	201
11	15-metóxi-pirifolidina (20)	2909	3000	25,7
12	aspidocarpina (41)	2930	3030	22,1

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

Tabela 15. extrato à pH básico de *Aspidosperma pyrifolium*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	aspidofractinina (15)	2249	2306	6,82
13	14,15-desidro- aspidofractinina (56)	2267	2390	5,17
4	N-formil- aspidofractinina (55)	2496	2726	6,22
5	aspidospermina (9A)	2654	2757	6,34
6	15-desmetóxi- pirifolina (17)	2708	2792	5,60
7	pirifolidina (14)	2764	2840	59,7
8	15-metóxi- aspidospermina (19)	2805	2887	18,5
9	aspidofilina (16)	2846	2949	6,60
10	pirifolina (18)	2892	2975	6,80
11	15-metóxi-pirifolidina (20)	2917	2993	12,7
14	11-metóxi-N-acetil- cilindrocarpinol (57)	3039	3047	7,90

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

Woodson [15] classificou a espécie *A. pyrifolium* na série botânica Pyricolla, mais tarde Aparício P. Duarte [16] baseados em características morfológicas, sugeriu que a espécie deveria ser reclassificada em uma nova série, a qual deveria chamar-se série Pyrifolia. A análise por CG/EM realizada entretanto forneceu

a composição química dos constituintes dos extratos alcaloídicos desta espécie, a comparação destes com a dos extratos das duas outras espécies do gênero por nós analisadas, *A. pyricollum* e *A. olivaceum*, levou-nos a não acatar a sugestão proposta por Aparicio [16] e sim aquela proposta anteriormente feita por Woodson [15].

A análise dos extratos alcaloídicos da espécie *A. olivaceum*, um representante típico da série Pyricolla, no que diz respeito ao aspectos químicos, revelou a presença de alcalóides similares aos detectados e isolados de *A. pyriforme*, principalmente em seus extratos obtidos à pH ácido. Portanto do ponto de vista químico, as duas espécies podem continuar agrupadas na mesma série. Este exemplo demonstra a utilidade da técnica de CG/EM, pois a mesma contribuiu com dados que auxiliem a resolução de controvérsias taxonômicas, a nível molecular.

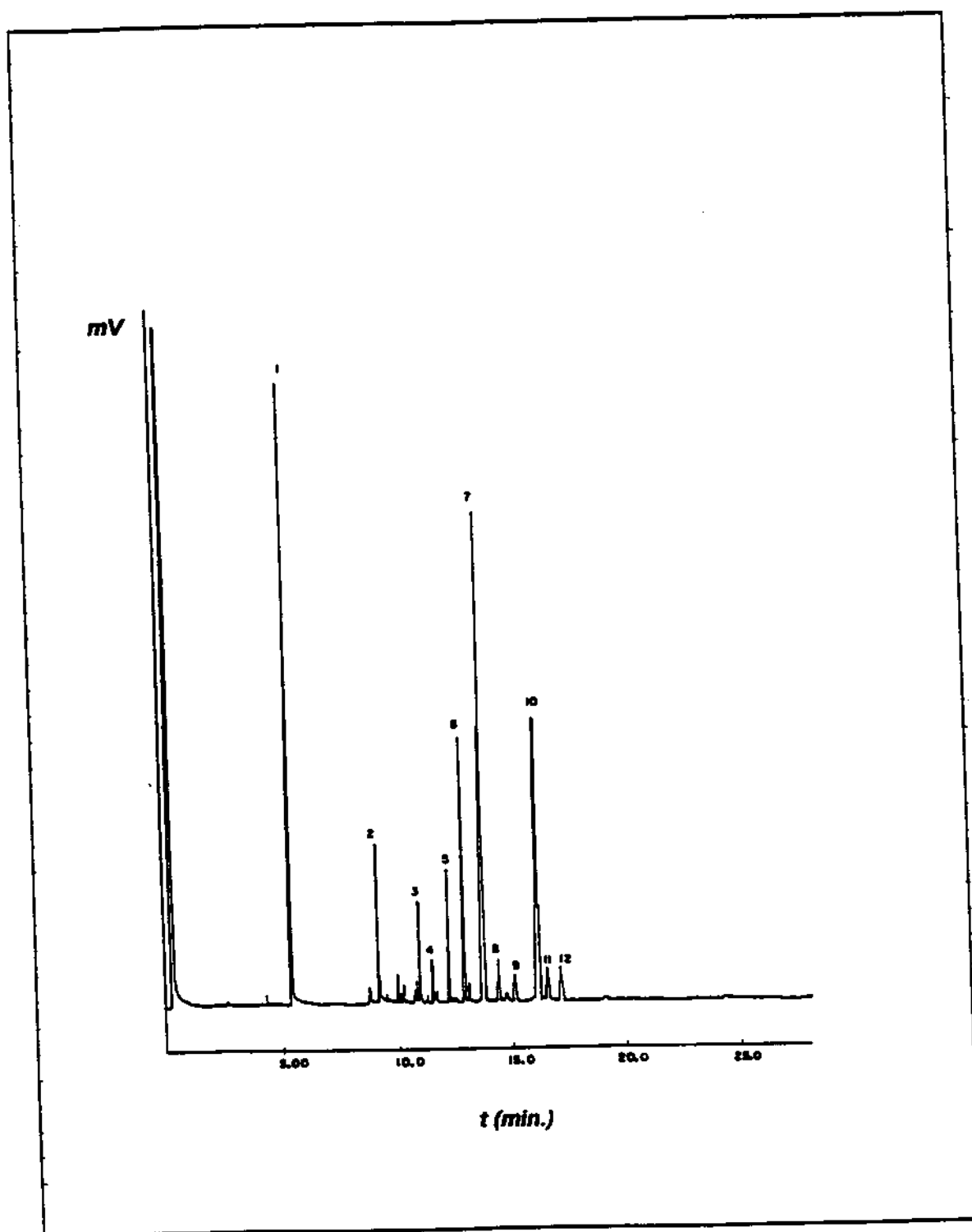


Figura 21. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A. pyrifolium*.

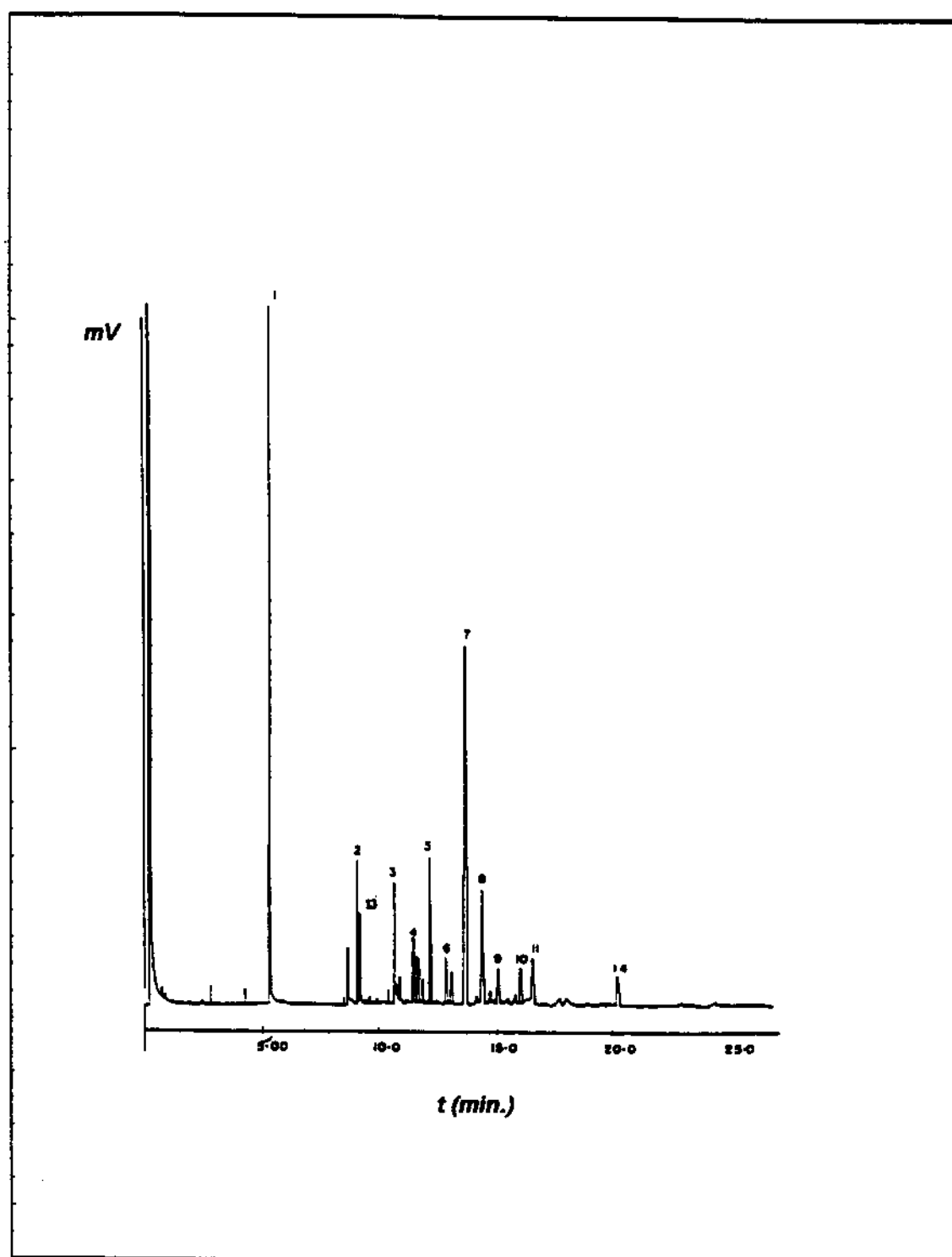


Figura 22. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. pyrifolium*.

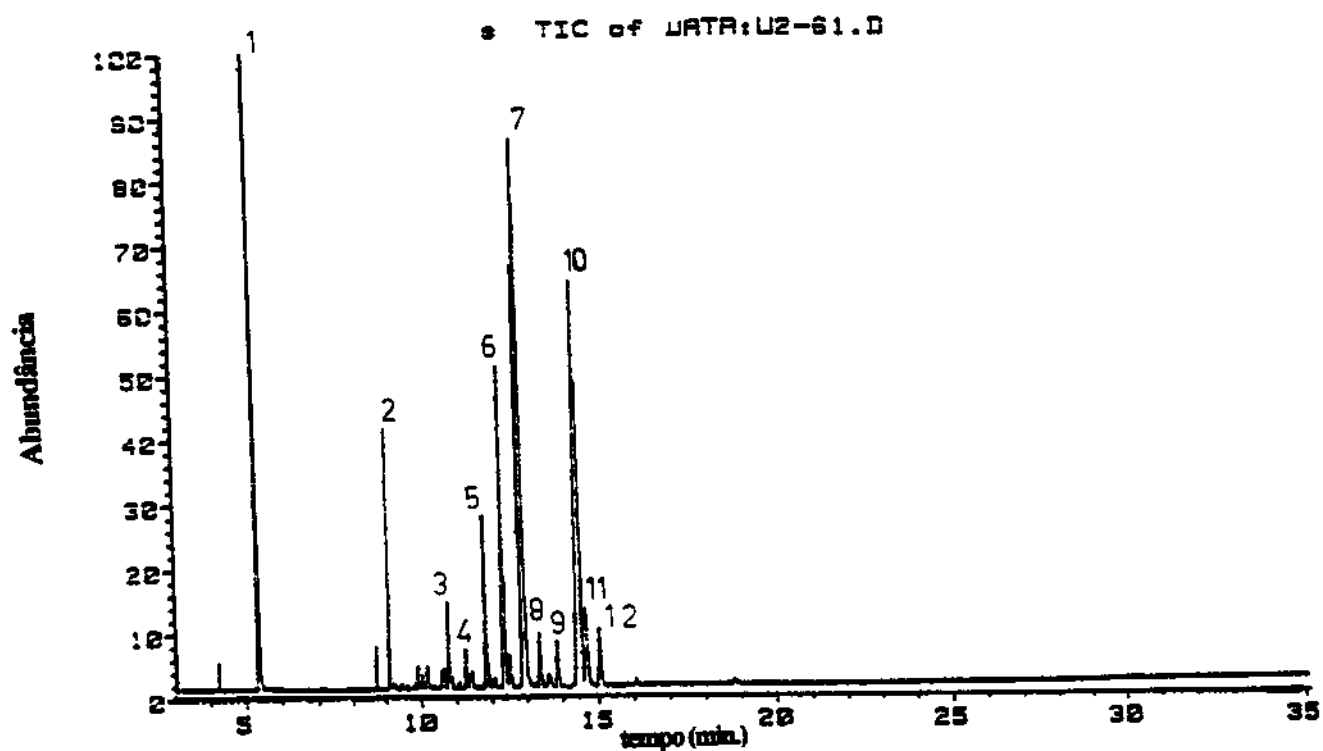


Figura 23. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. pyrifolium*.

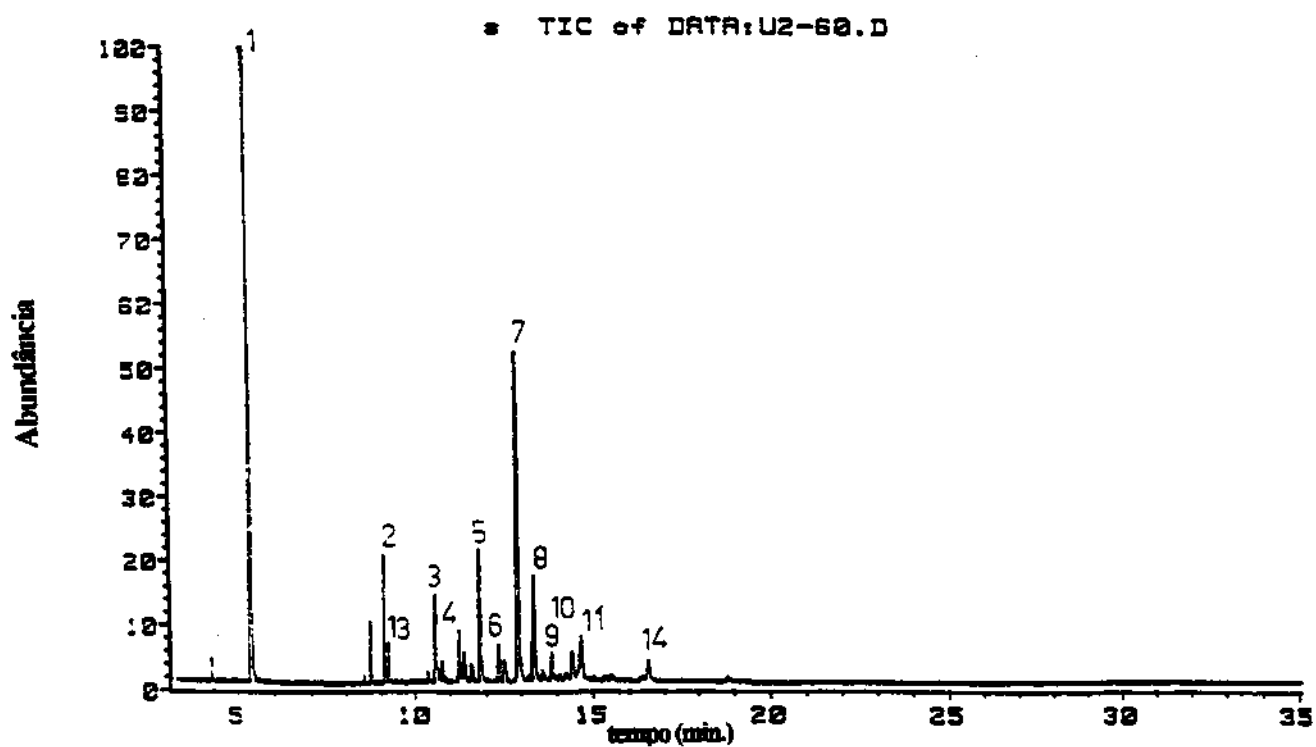


Figura 24. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. pyrifolium*.

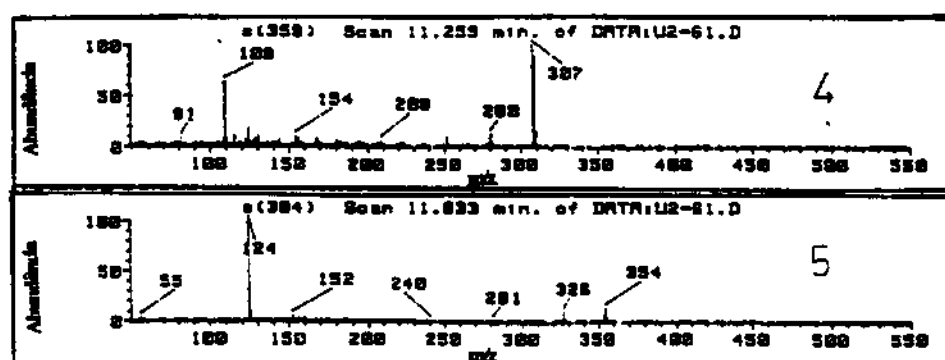
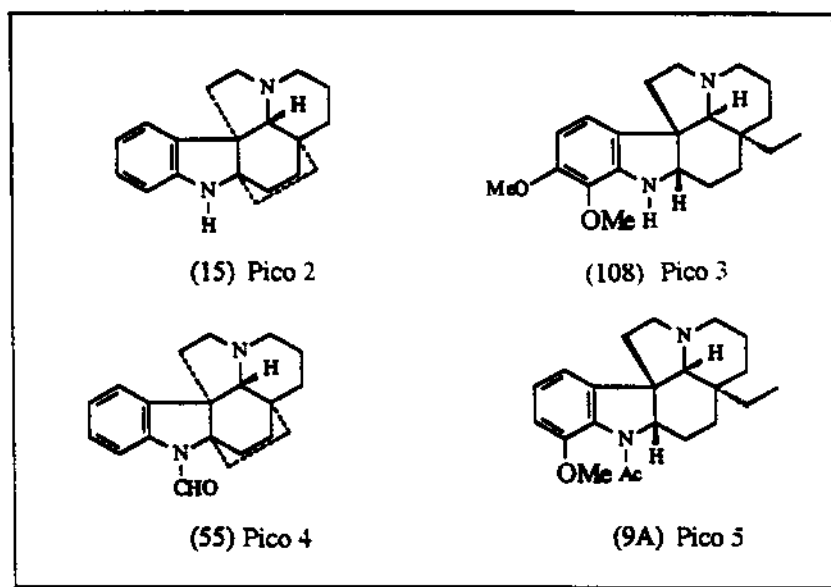
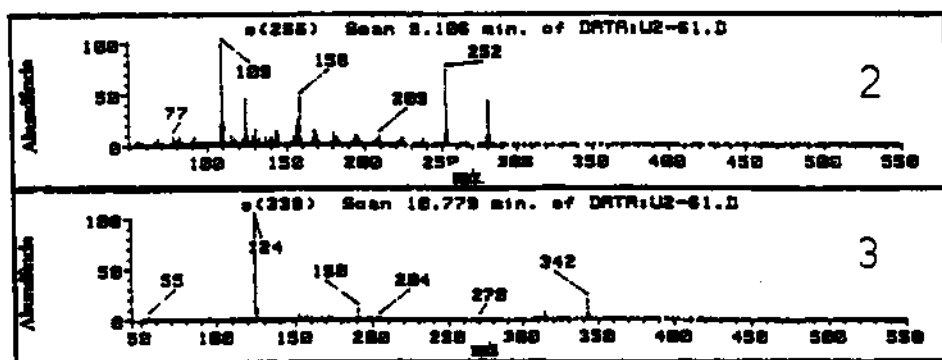


Figura 25a. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. pyrifolium*. Picos: 2- aspidofractinina (15), 3- desacetil-pirifolidina (108), 4- N-formil-aspidofractinina (55), 5- (+)-aspidospermina (9A).

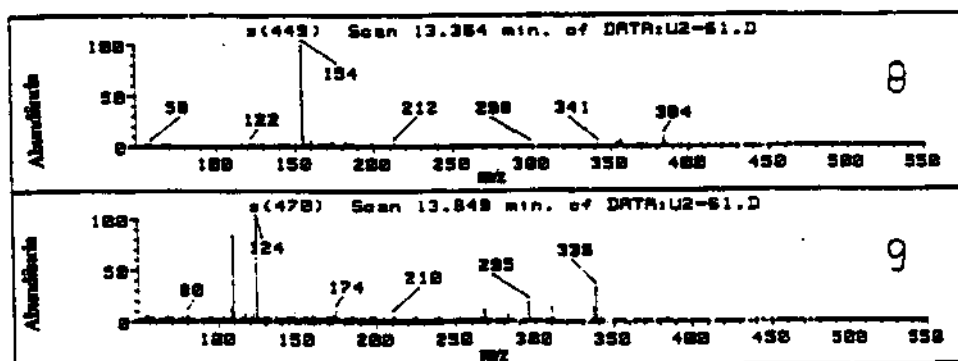
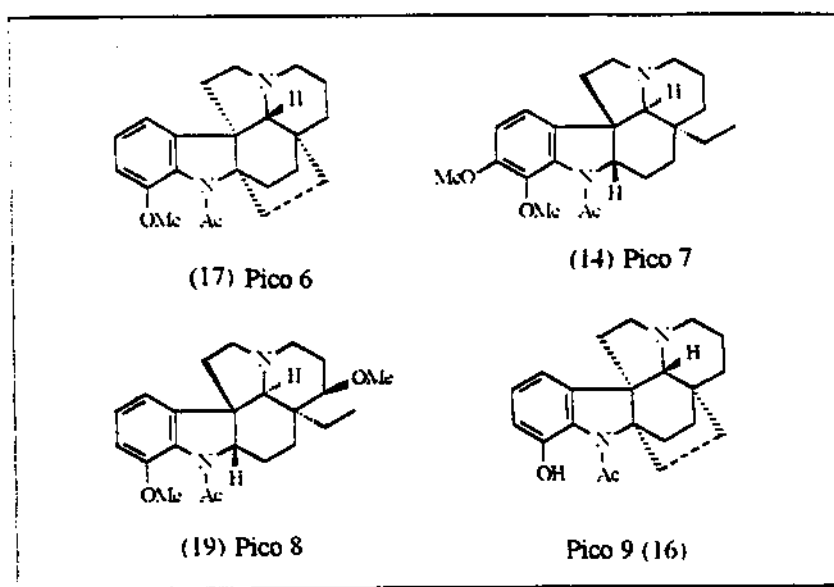
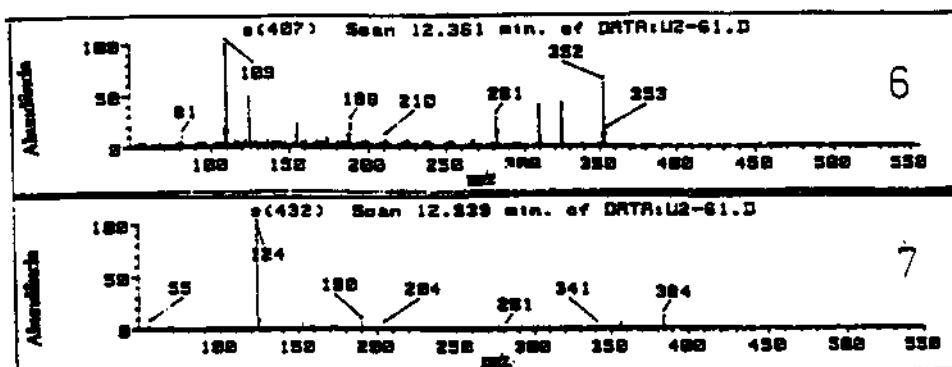


Figura 25b. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A.pyrifolium*. Picos: 6- 15-desmetóxi-pirifolina (17), 7- pirifolidina (14), 8- 15-metóxi-aspidospermina (19), 9- aspidofilina (16).

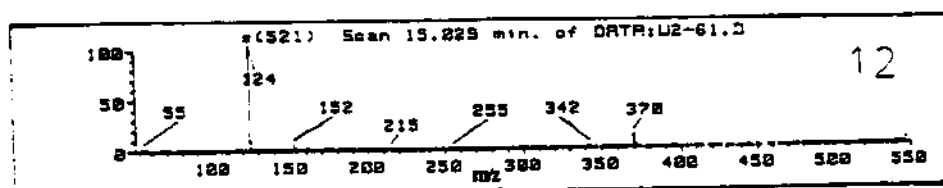
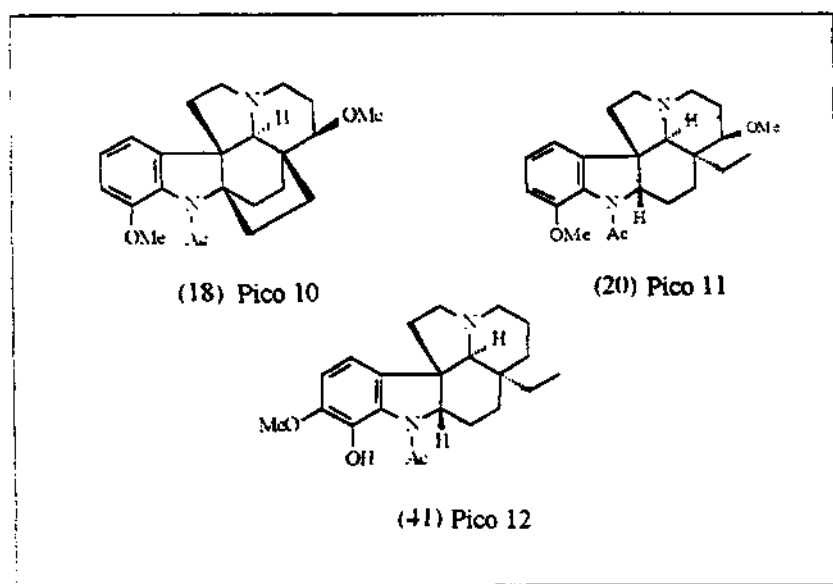
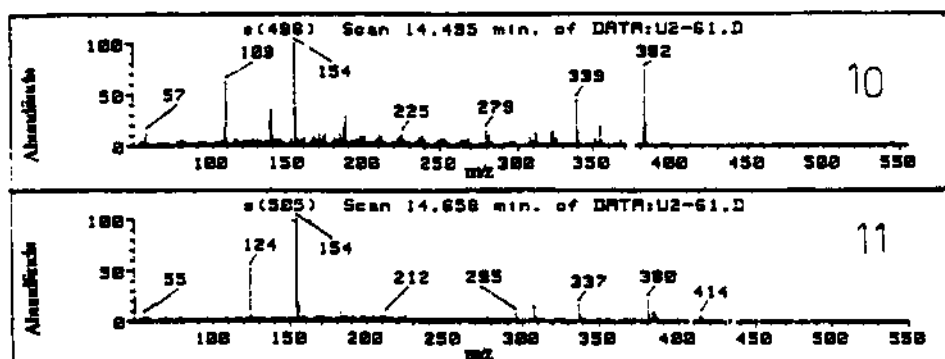


Figura 25c. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. pyrifolium*. Picos: 10- pirifolina (18), 11- 15-metóxi-pirifolidina (20), 12- aspidocarpina (41).

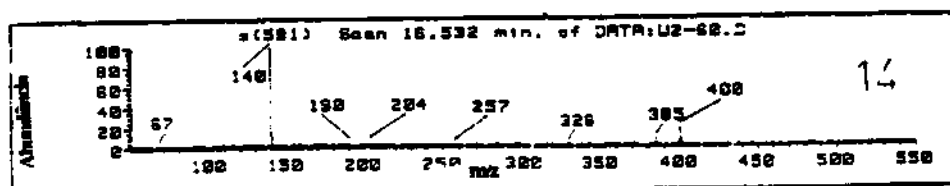
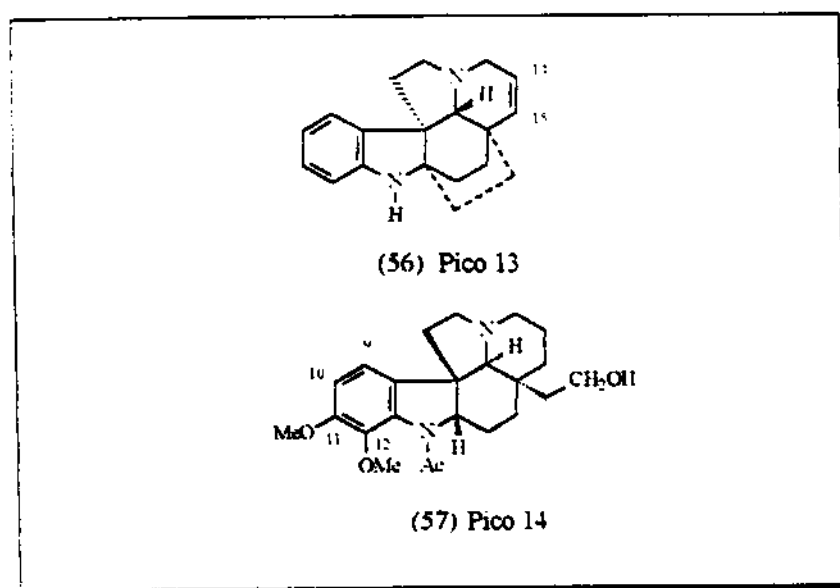
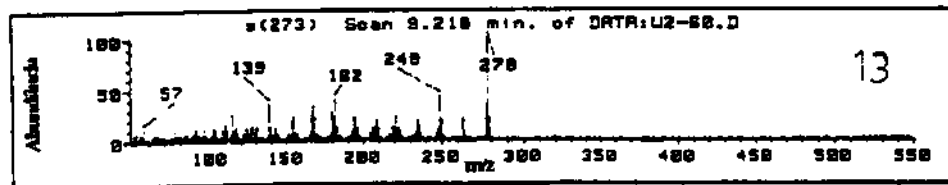


Figura 25d. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. pyrifolium*. Picos: 13- 14,15-desidro-aspido-fractinina (56), 14- 11-metóxi-N-acetil-cilindrocarpinol (57).

2.3.4. Análise qualitativa e quantitativa de *Aspidosperma polyneuron*.

Aspidosperma polyneuron foi estudada fitoquimicamente por B. Gilbert e colaboradores [58], que isolaram os compostos: yohimbina (8), apidospermina (9B), normacusina B (21), polineuridina (22), quebrachamina (58), palosina (50), ácido harmam-3-carboxílico (59) e perobina (60).

A análise por CG/EM permitiu-nos fazer a comparação entre os compostos obtidos através de estudo fitoquímicos já realizados com esta espécie descritos na literatura e a CG/EM, e o resultado obtido mostrou que existe uma boa relação entre as duas metodologias empregadas.

Quatro alcalóides, apidospermina (9A) normacusina B (21), polineuridina (22), *N*-acetil-cilindrocarina (23), foram isolados e caracterizados a partir da espécie *A. polyneuron* e utilizados como padrões, os cromatogramas de CG-DIC dos extratos obtidos a pH ácido e básico são mostrados nas Figuras 26 e 27 e as Tabelas 16 e 17 mostram as concentrações dos principais alcalóides nos dois extratos.

Uma constatação importante foi a presença de alcalóides dos tipos *N*-acetil-cilindrocarina (23) e composto similar (61) (picos 8 e 9 na Figura 26), que representam uma variação do esqueleto do tipo apidospermina (9B), na qual a cadeia etila lateral sofreu uma oxidação seguida de uma esterificação. A presença de compostos com estrutura básica do tipo (23), só foi possível ser evidenciada por CG/EM. E conseqüentemente nos levou a voltar para o estudo fitoquímico, isolar e identificar um composto novo nesta espécie, a *N*-acetil-cilindrocarina (23), confirmando a presença de compostos mais oxidados com o esqueleto básico (9B).

Tabela 16. Extrato à pH ácido de *Aspidosperma polyneuron*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
1	triptofol (7) - padrão interno			
2	N-1-desacetil- aspidospermina (51)	2342	2460	4,59
3	Quebrachamina (58)	2358	2278	2,97
4	12-desmetóxi- aspidospermina (42)	2562	2710	50,2
5	aspidospermina (9B)	2656	2767	166
6	palosina (50)	2702	2792	8,64
7	desmetil-aspidospermina (35)	2722	2814	7,29
8	N-1-acetil- cilindrocarina (23)	2873	2977	24,3
9	N-1-propionil- cilindrocarina (61)	2919	3020	8,91

Tabela 17. Extrato à pH básico de *Aspidosperma polyneuron*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
3	quebrachamina (58)	2358	2278	3,05
10	normacusina B (21)	2828	2978	40,0
11	polineuridina (22)	2906	3022	10,5
12	N-acetilcilindrocarinol (30)	2920	3117	-

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

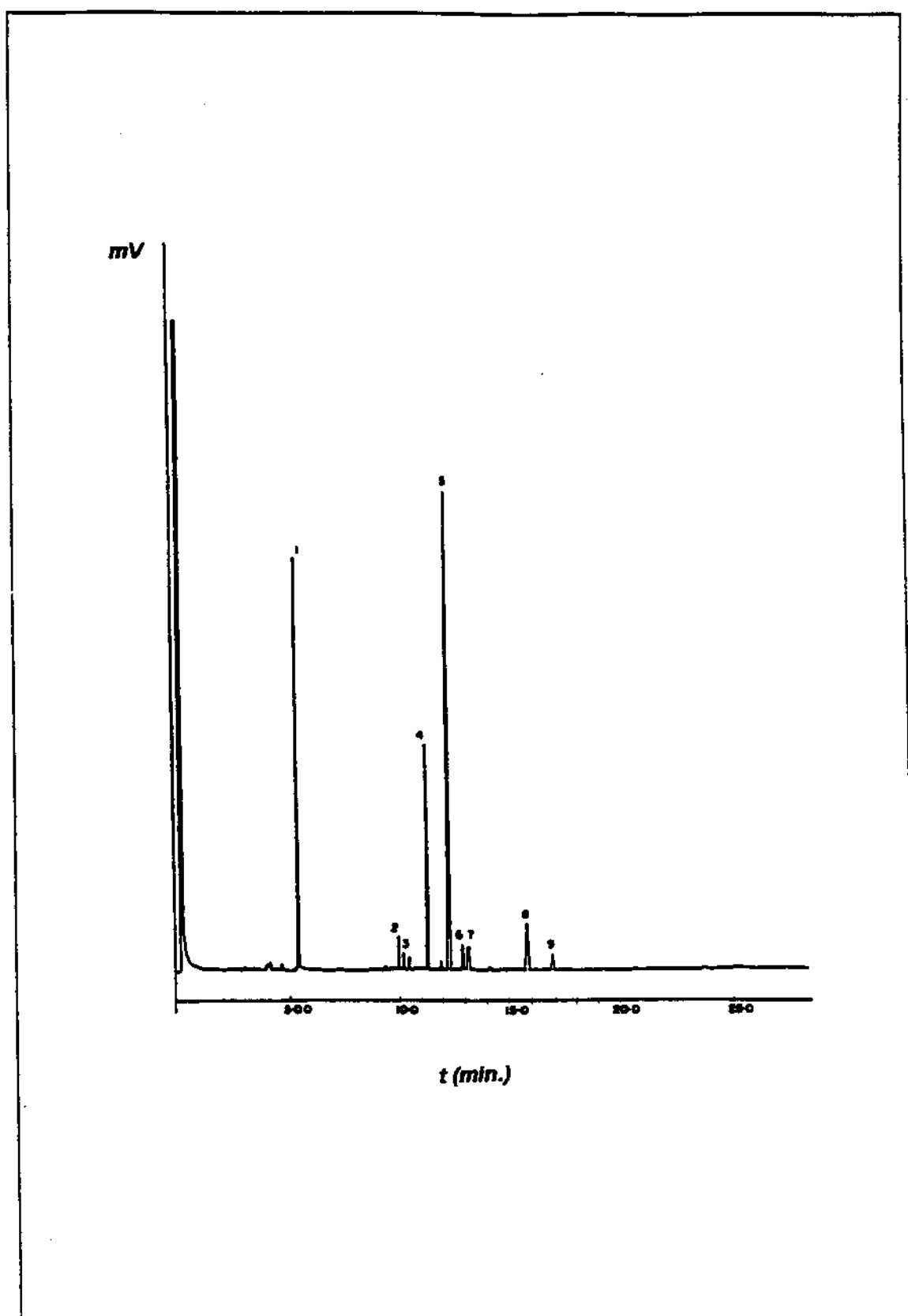


Figura 26. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A. polyneuron*.

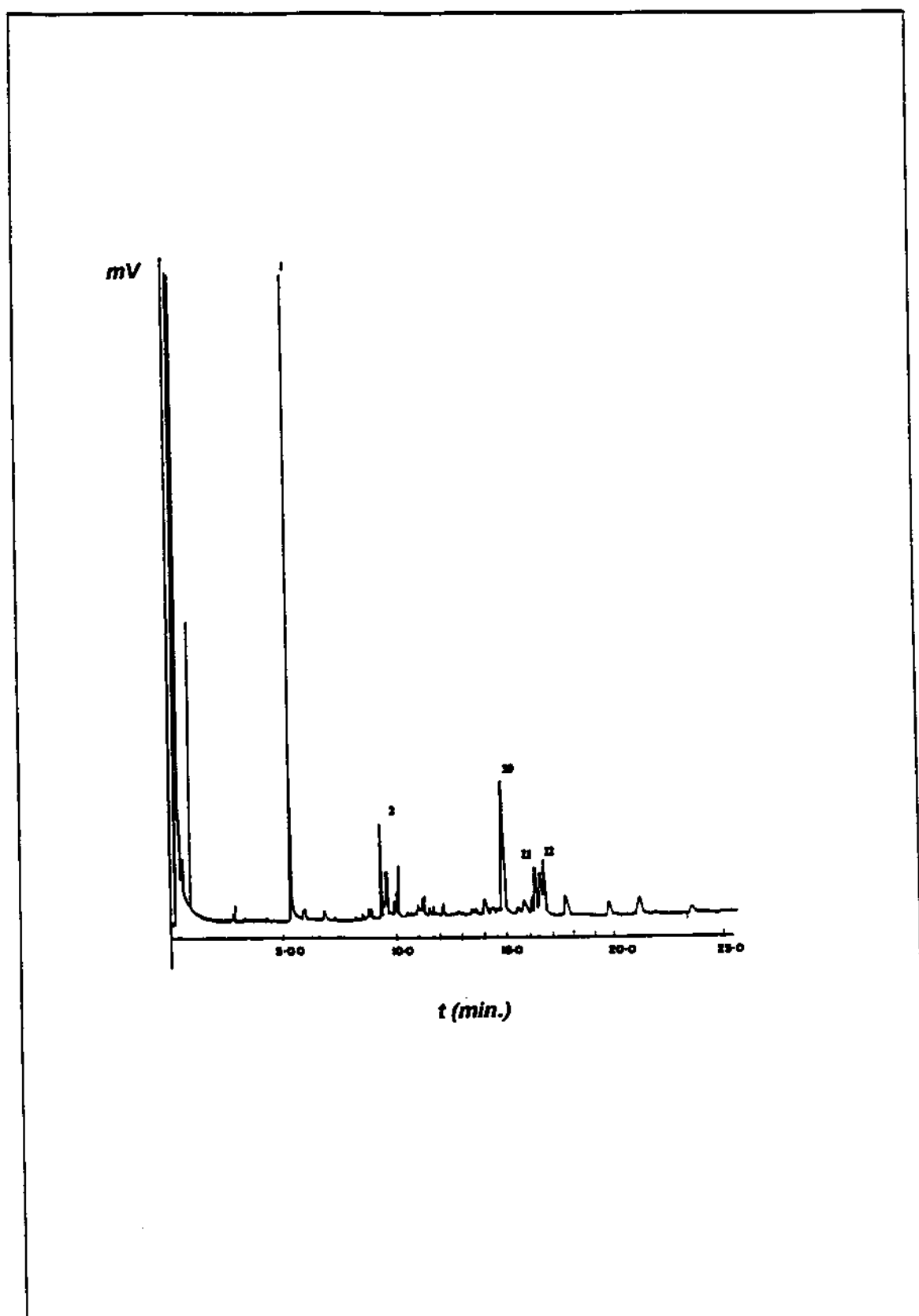


Figura 27. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. polyneuron*.

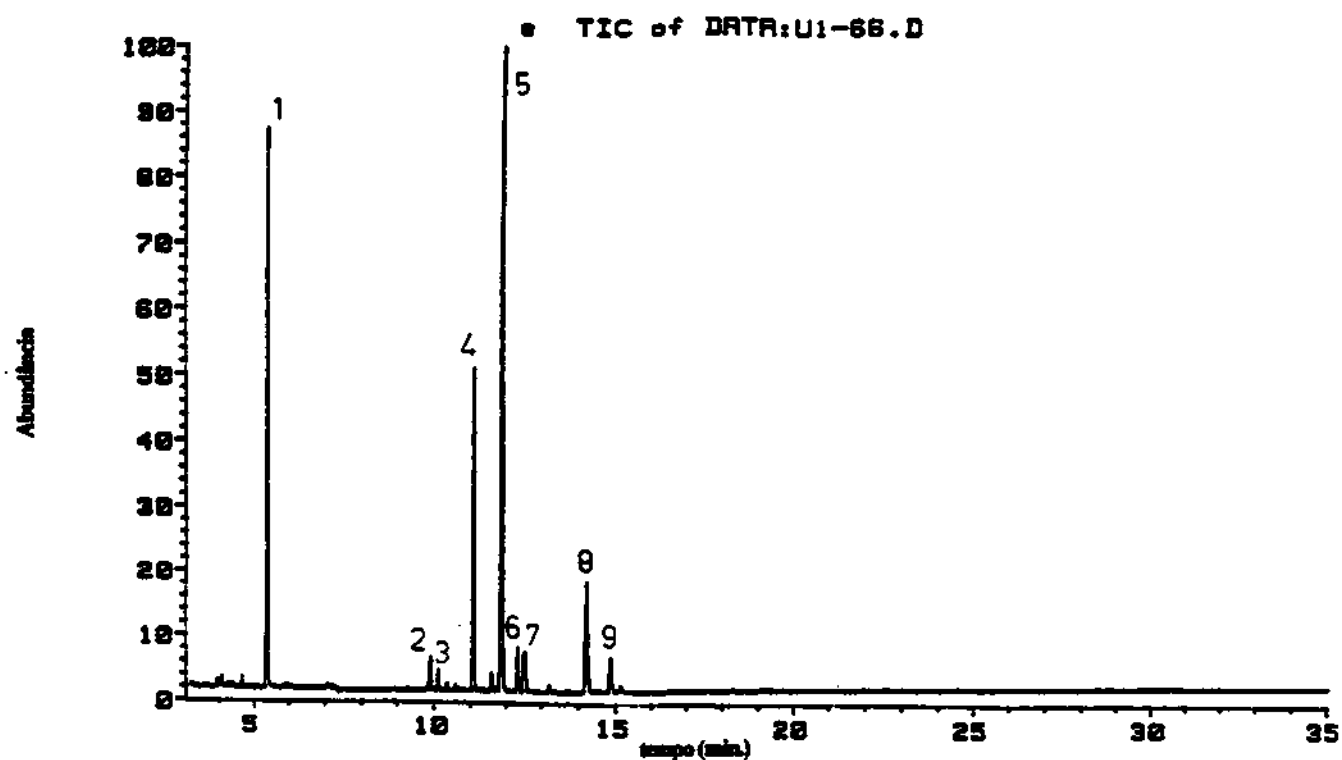


Figura 28. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. polyneuron*.

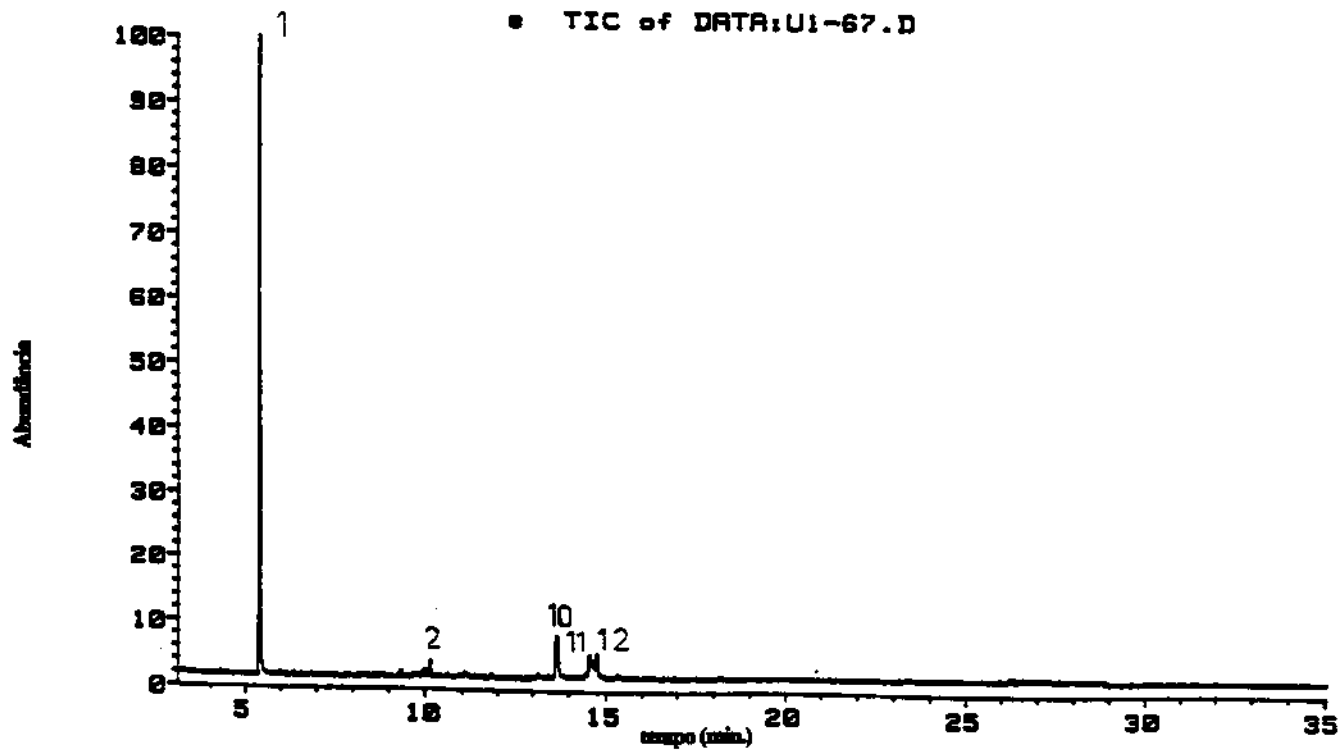


Figura 29. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. polyneuron*.

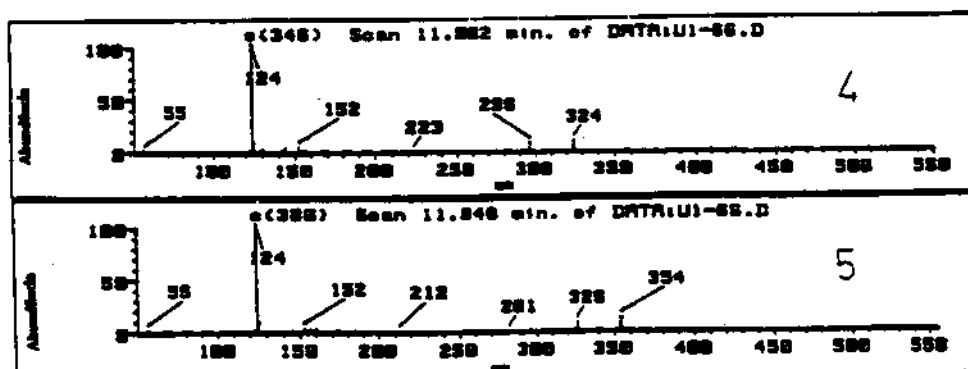
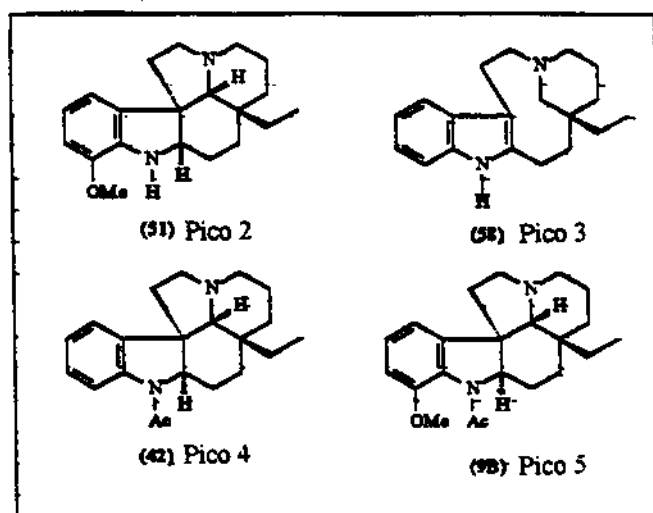
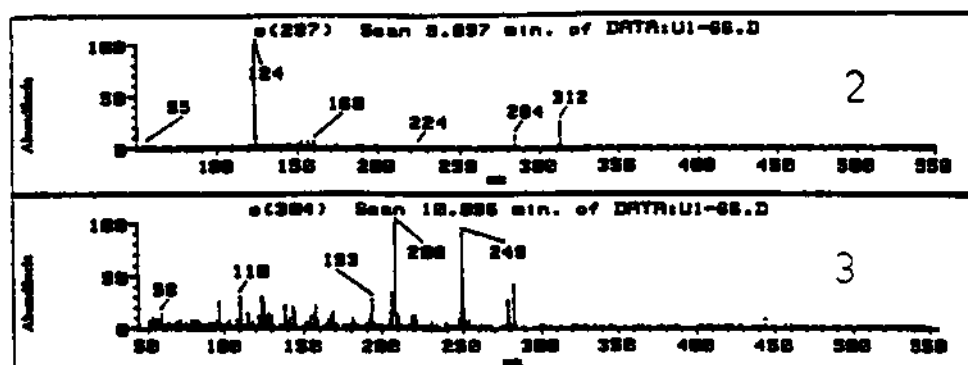


Figura 30a. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. polyneuron*. Picos: 2- desacetil-aspidospermina (51), 3- quebrachamina (58), 4-²³⁵ 12-desmetóxi-aspidospermina (42), 5- (-)-aspidospermina (9B).

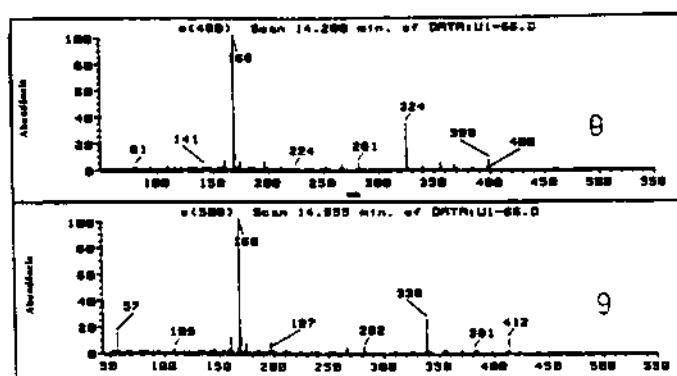
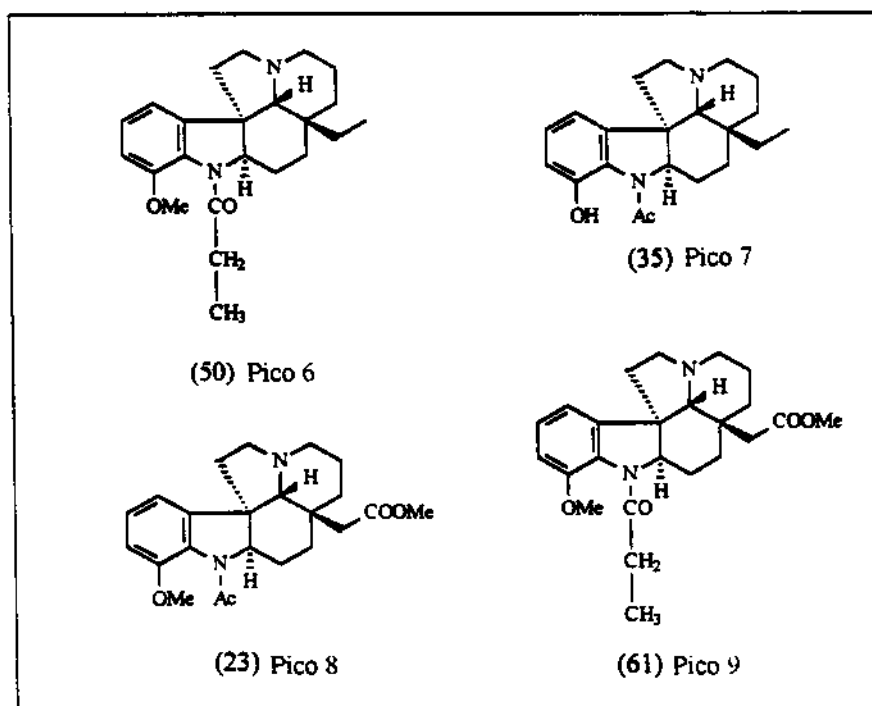
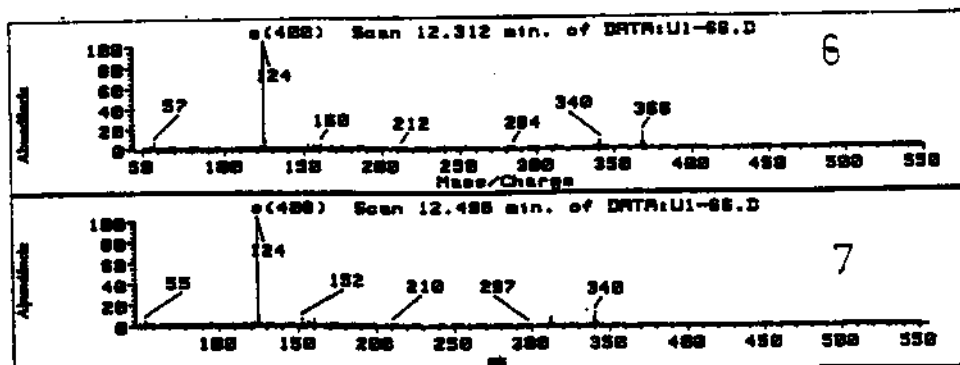


Figura 30b. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. polyneuron*. Picos: 6- palosina (50), 7- desmetil-aspidospermina (35), 8- N-acetil-cilindrocarina (23), 9- N-propionil-cilindrocarina (61).

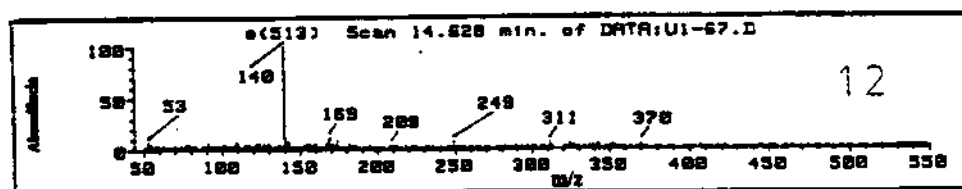
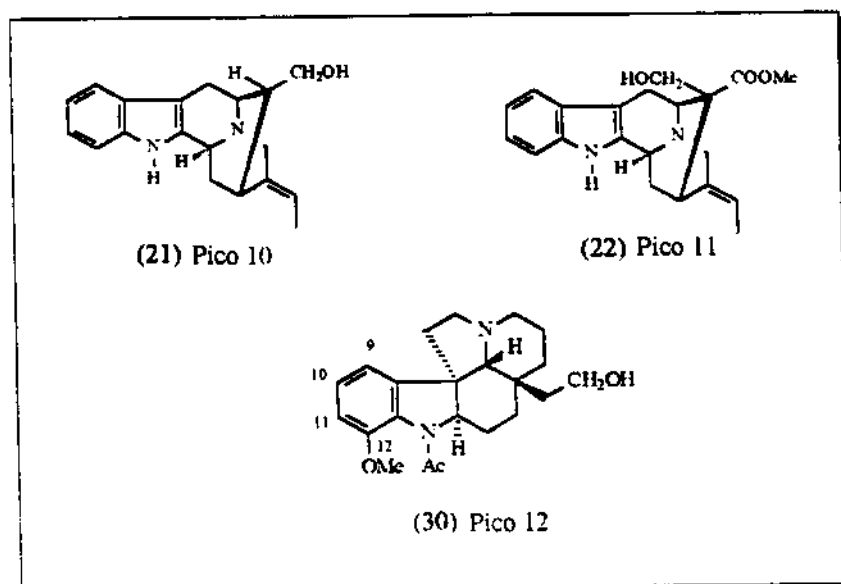
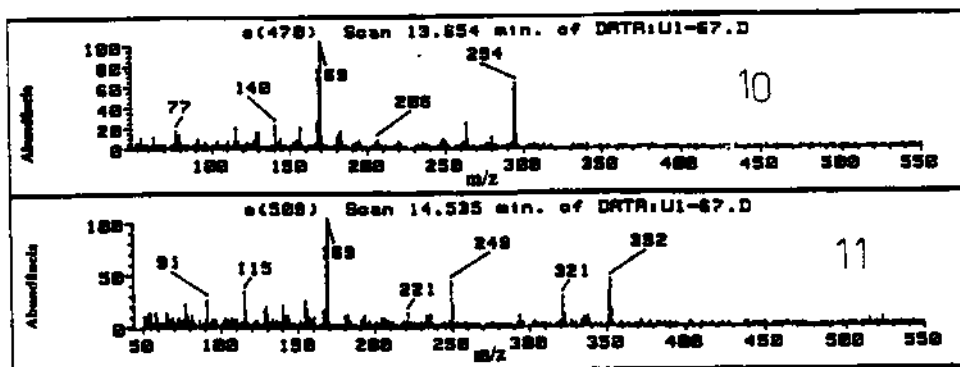


Figura 30c. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. polyneuron*. Picos: 10- normacusina B (21), 11- polineuridina (22), 12- N-acetil-cilindrocarpinol (30).

2.3.5. Análise quantitativa por GC/FID e GC/MS de *Aspidosperma ramiflorum*

Aspidosperma ramiflorum foi estudada fitoquimicamente anteriormente pelo grupo do Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Reis [47] que isolaram os compostos: 10-metóxi-geissoschizol (24), ramiflorina A (25), ramiflorina B (26) e β -yohimbina (10).

Quatro alcalóides, 10-metóxi-geissoschizol (24), ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26) e (E)-isositsiriquina (27), foram por nós isolados e caracterizados dos extratos dos galhos e cascas da espécie *A. ramiflorum*, mas apenas os dois primeiros puderam ser utilizados como padrões em CG, pois os compostos ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26) são alcalóides indólicos diméricos, de altos pesos moleculares e pouco voláteis, portanto não analisáveis nas condições empregadas na análise por CG. Por isso desenvolveu-se uma metodologia de análise por CLAE para a análise e quantificação dos alcalóides indólicos desta espécie, que será apresentado a seguir. Um quinto alcalóide a β -yohimbina (10) foi isolado e identificado no extrato das sementes desta espécie, cujo isolamento será discutido no capítulo posteriormente apresentado em cultura de células vegetais.

Os cromatogramas de CG/DIC dos dos extratos ácido e básico desta espécie estão apresentados nas Figuras 31 e 32 e as concentrações obtidas para os compostos são apresentados na Tabela 18 e 19, os cromatogramas de CG/EM são mostrados nas Figuras 33 e 34 e os espectros de massas dos componentes dos extratos são apresentados na Figura 35.

Tabela 18. Concentração dos alcalóides indólicos nos extratos à pH ácido dos galhos de *A. ramiflorum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
2	1,2-dihidro-olivacina (62)	2350	2482	3,45
3	metóxi-1,2-dihidro-olivacina (63)	2653	2728	16,1
4	10-metóxi-geissoschizol (24)	3018	3117	65,0

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

Tabela 19. Concentração dos alcalóides indólicos nos extratos à pH ácido dos galhos de *A. ramiflorum*.

Pico	Composto ^(a)	IK		Concentração (mg/100g) ^(b)
		DB-1	DB-5	
5	aspidospermatidina (64)	2284	2365	1,1
3	metóxi-1,2-dihidro-olivacina (63)	2653	2728	4,60

(a) identificado usando padrão isolado ou caracterizado por seu espectro de massas.

(b) massa em mg de substância por 100g de planta seca.

DB-1 e DB-5 colunas

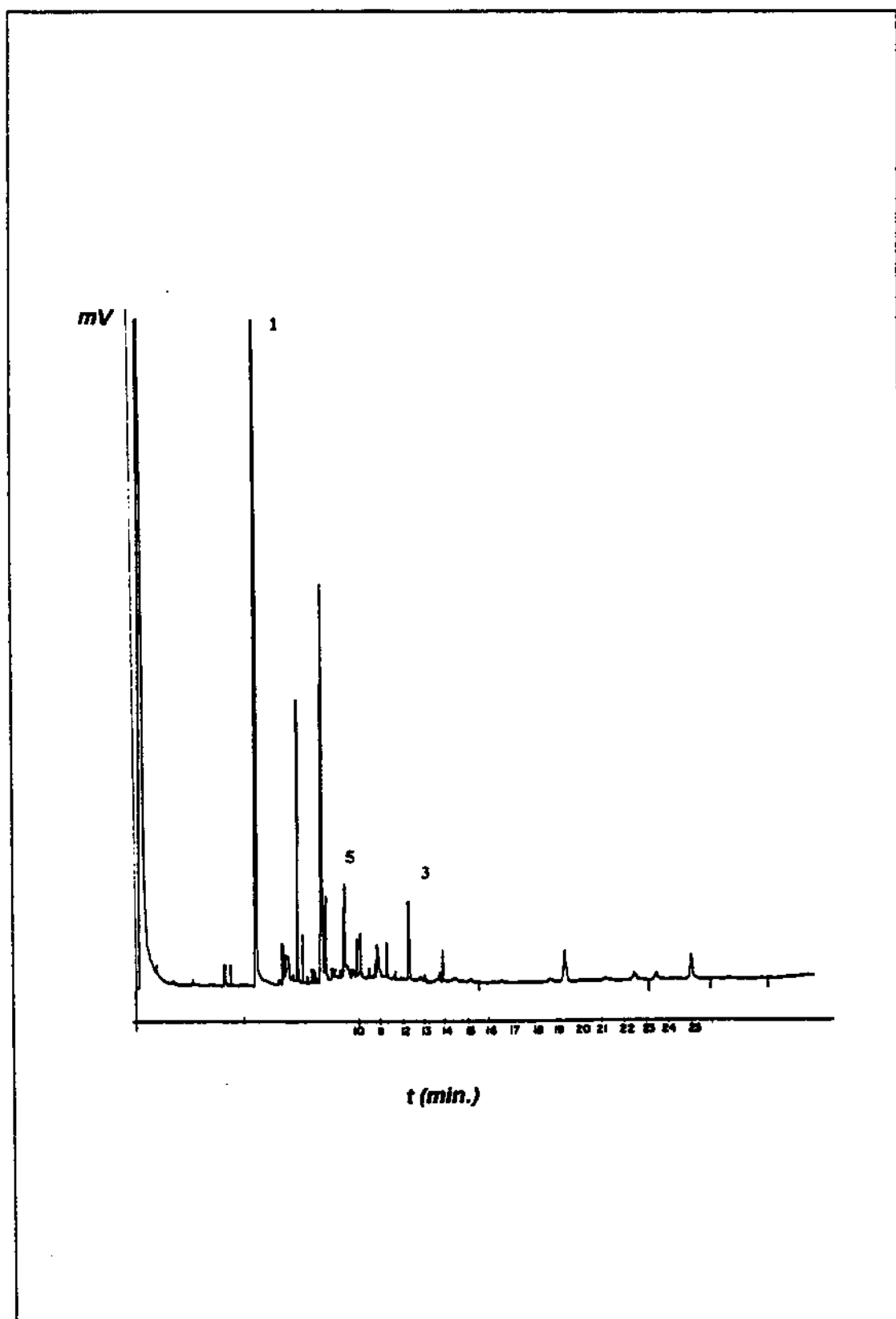


Figura 31. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A. ramiflorum*.

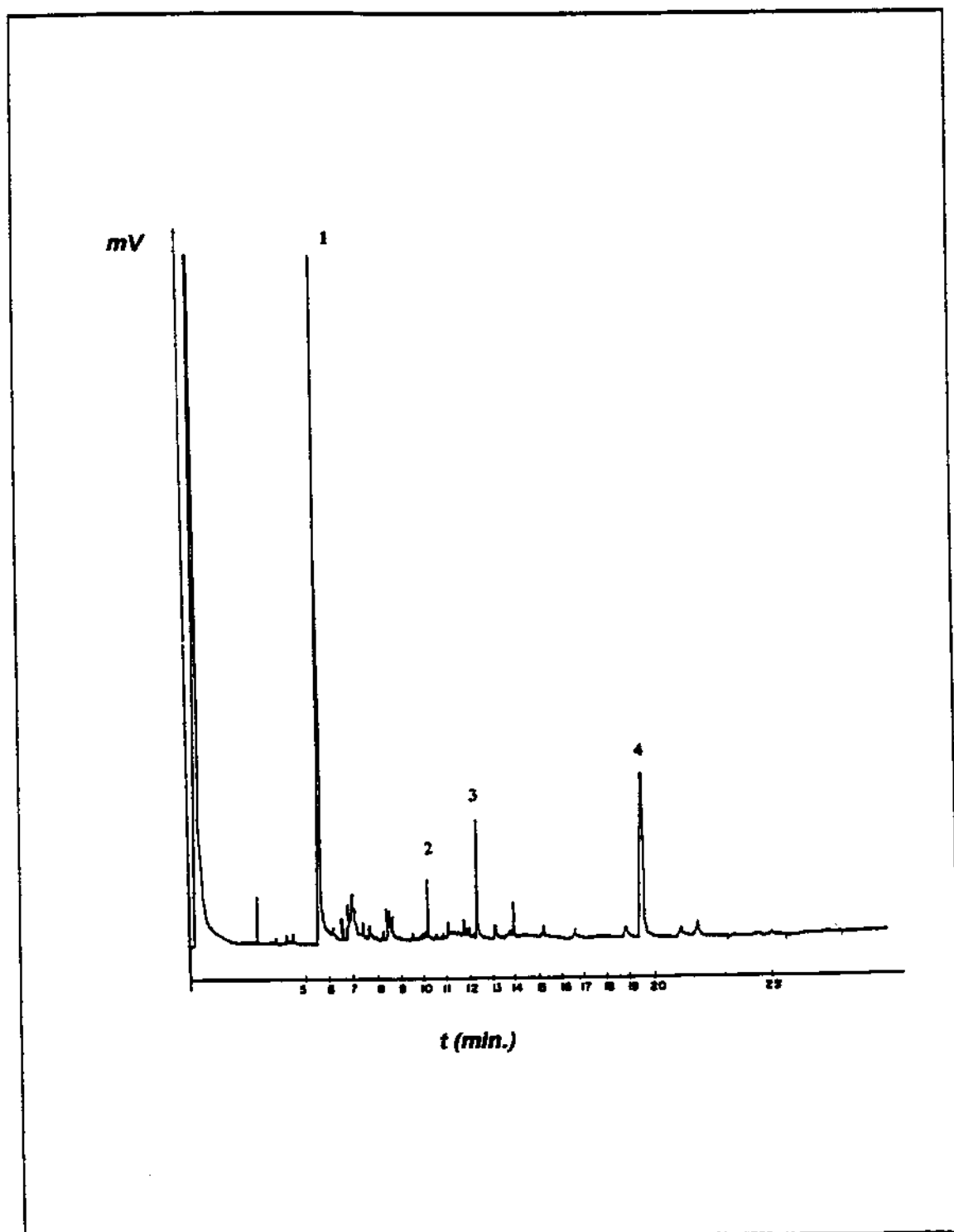


Figura 32. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. ramiflorum*.

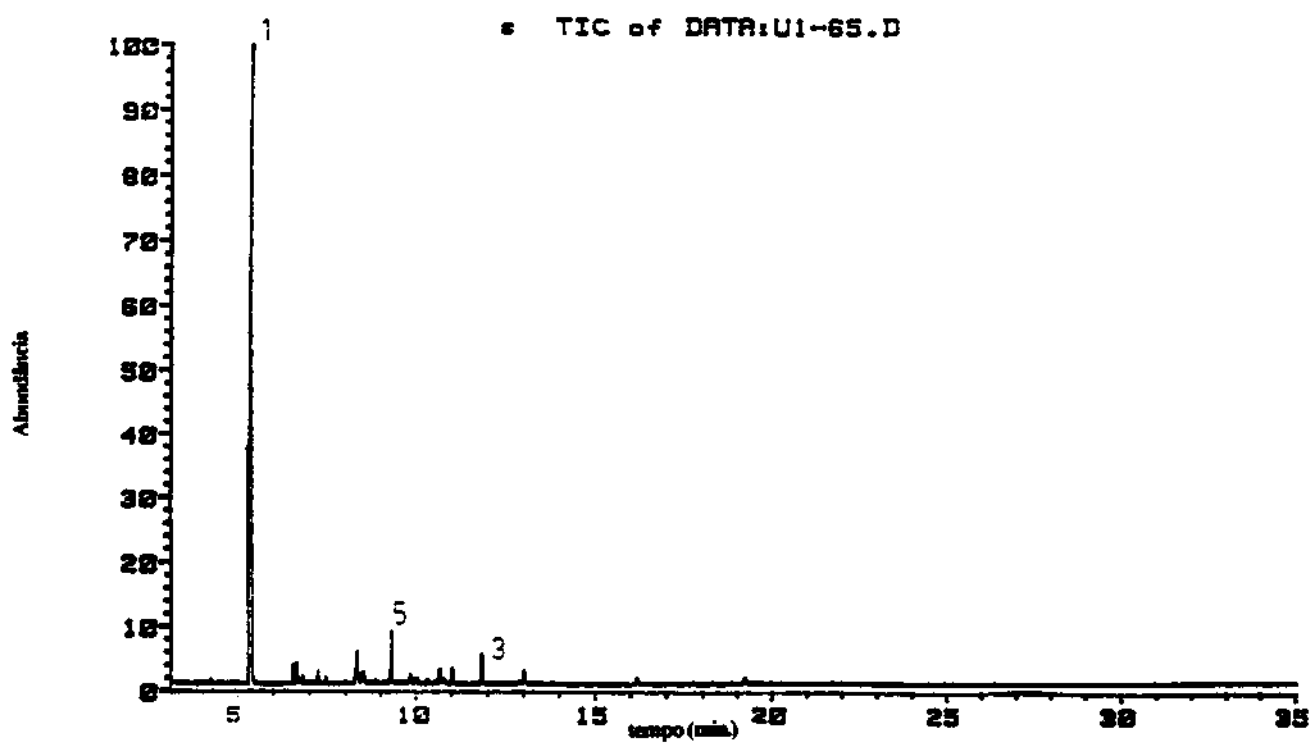


Figura 33. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. ramiflorum*.

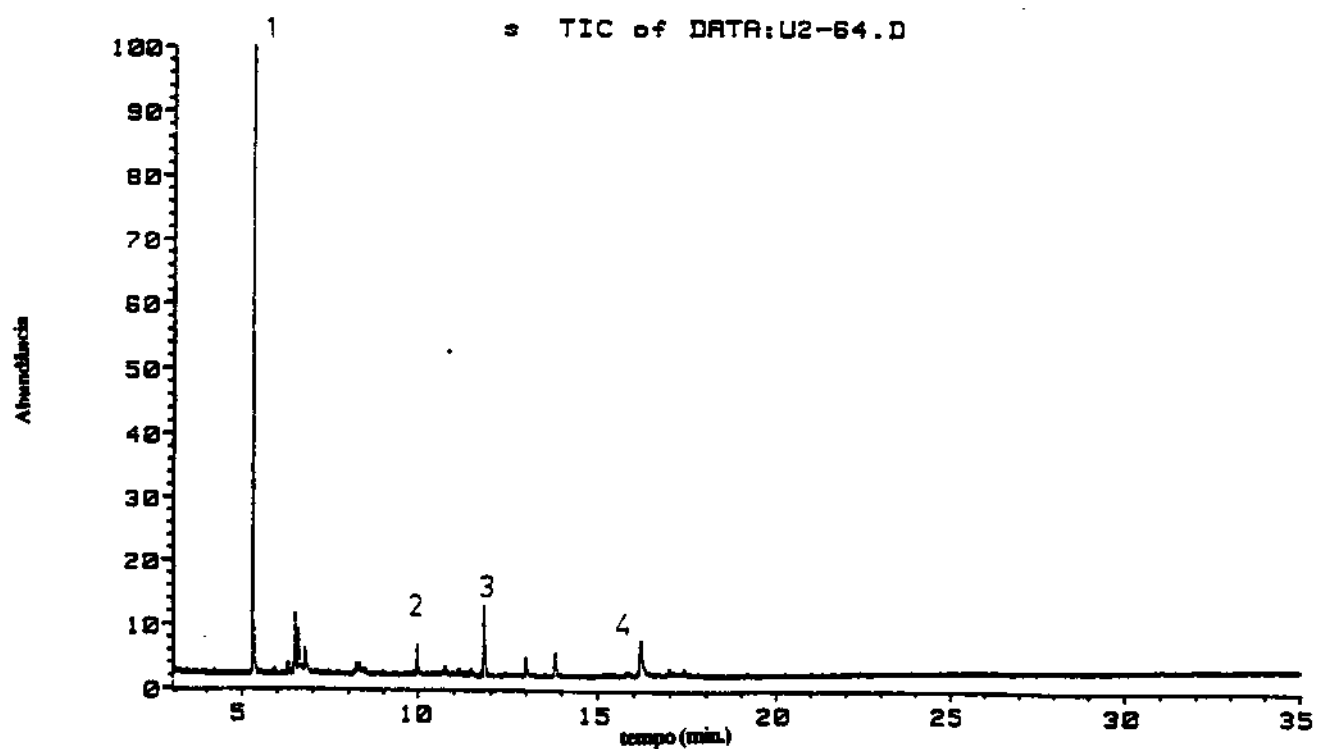


Figura 34. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. ramiflorum*.

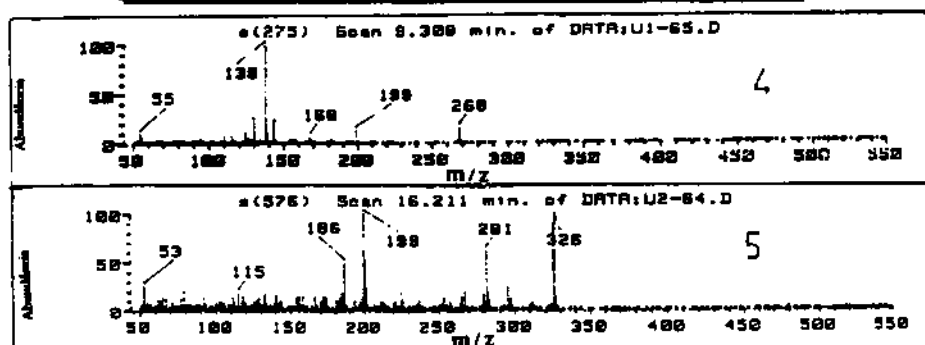
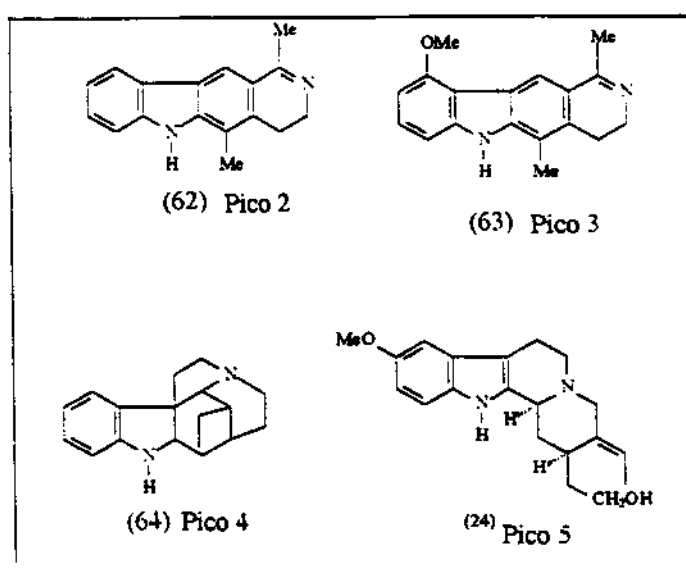
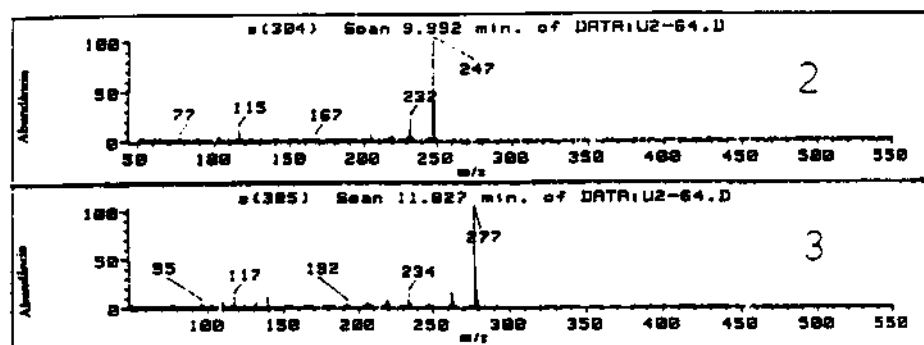
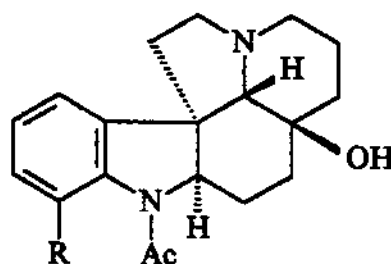


Figura 35. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. ramiflorum*. Picos: 2- 1,2-desidro-olivacina (62), 3- metóxi-1,2-desidro-olivacina (63), 4- 10-metóxi-geissoschizol (24), 5- aspido-spermatidina (64).

2.3.6. Análise quantitativa por CG/DIC e CG/EM de *Aspidosperma dispersum*

Aspidosperma dispersum foi estudada fitoquimicamente anteriormente por C. Djerassi e M. Ikeda [59] que isolaram os compostos aspidodispermina (65) e desóxi-aspidodispermina (66).



R= OH (65)

R= H (66)

Quatro alcalóides, (-)-aspidospermina (9B), *N*-acetil-cilindrocarpinol (30), 1,2-desidro-aspidospermidina (28) e geissosvellina (29), foram por nós isolados e caracterizados dos extratos dos galhos e cascas da espécie *A. dispersum*, e usados como padrões na análise por CG/EM. Apesar de não ter sido isolado, o alcalóide desóxi-aspidodispermina (66) foi detectado.

A análise quantitativa por CG/DIC dos componentes dos extratos alcaloídicos foi feita, o resumo destes resultados são ilustrados nas Figuras 36 e 37 e nas Tabelas 20 e 21. Os alcalóides presentes em maior concentração são a (-)-aspidospermina (9B) (Figura 36, pico 4) e a 12-desmetóxi-*N*-acetil-cilindrocarpinol (67) (Figura 37, pico 13), conforme o mostrado nas Tabelas 20 e 21.

A análise dos extratos alcaloídicos de *Aspidosperma dispersum* por CG/FID foi realizada pela primeira vez, e alguns dos resultados obtidos surpreenderam. O que se esperava na análise era encontrarmos basicamente alcalóides contendo o esqueleto plumerano (aspidospermina (9B), aspidodispermina (65) e análogos), e foi detectado alguns destes compostos como já esperados. Além destes detectamos outros alcalóides que apresentavam esqueletos do tipo da aspidospermatina (68) (pico 3, Figura 36) e um derivado mais complexo a geissosvellina (29), que teve sua atribuição comprovada após o seu isolamento e identificação do extrato básico de *A. dispersum*, conforme o descrito anteriormente. Este foi mais um caso onde o composto teve a sua estrutura primeiramente proposta baseada nas informações obtidas da análise por CG/EM, e posteriormente a estrutura pode ser confirmada após o isolamento e identificação do composto como ocorreu nas análises das outras espécies estudadas.

Tabela 20. Análise de GC/MS e GC/FID do extrato à pH ácido de *A. dispernum*, ref. [30, 31, 32].

Pico	Composto	Espectro de massas (m/z, A.R. %)	IK		Concentração
			DB-1	DB-5	(mg/100g)
1	tripkófol (7)	161(M ⁺ , 20), 130(100), 77(30)	-	-	-
2	12-desmetóxi-aspidospermina (42)	324(M ⁺ , 10), 296(8), 124(100)	2566	2263	1,50
3	aspidospermatina (68)	338(M ⁺ , 20), 174(10), 136(100)	2613	2688	2,90
4	(-)-aspidospermina (9B)	354(M ⁺ , 5), 326(3), 124(100)	2680	2735	18,4
5	N-propionil-aspidospermatina (69)	352(20), 173 (100), 136(90)	2712	2812	2,65
6	desmetil-aspidospermina (35)	340(M ⁺ , 10), 339(18), 124(100)	2732	2814	1,40
7	N-acetil-aspidalbidina (70)	338(M ⁺ , 2), 294(100), 138(80)	2741	2833	2,52
8	pirifolidina (14)	384(M ⁺ , 10), 152(12), 124(100)	2765	2840	0,73
9	12-metóxi-N-acetil-aspidalbidina (71)	368(M ⁺ , 5), 367(6), 324(100), 138(90)	2833	2929	1,68
10	geissosvellina (29)	398(M ⁺ , 80), 327(100), 285(36), 204(30), 190(40)	2983	3087	1,86

Tabela 21. Análise de GC/MS e GC/FID do extrato à pH básico de *A. dispersum*, ref. [30, 31, 32].

Pico	Composto	Espectro de massas (m/z, A.R. %)	IK		Concentração
			DB-1	DB-5	(mg/100g)
1	triplofol (7)-Padrão Interno	161(M ⁺ , 20), 130(100), 77(30)	-	-	-
11	1,2-desidro-aspidosperminina (28)	280(M ⁺ , 80), 210(100), 194(56)	2171	2235	7,02
12	desóxi-aspidodisperminina (66)	312(M ⁺ , 30), 294 (10), 112(100)	2554	2640	1,18
4	(-)-aspidosperminina (9B)	354(M ⁺ , 5), 326(3), 124(100)	2680	2735	5,07
7	N-acetil-aspidalbidina (70)	338(M ⁺ , 2), 294(100), 138(80)	2381	2836	13,5
13	12-desmetóxi-N-acetil-cilindrocarpinol (67)	340(M ⁺ , 3), 324(12), 140(100)	2841	2932	15,5
14	N-acetil-cilindrocarpinol (30)	370(M ⁺ , 3), 342(5), 140(100)	2920	3117	5,16
15	12-desmetil-cilindrocarpinol (72)	356(M ⁺ , 8), 297(1), 140(100)	3006	3209	3,80

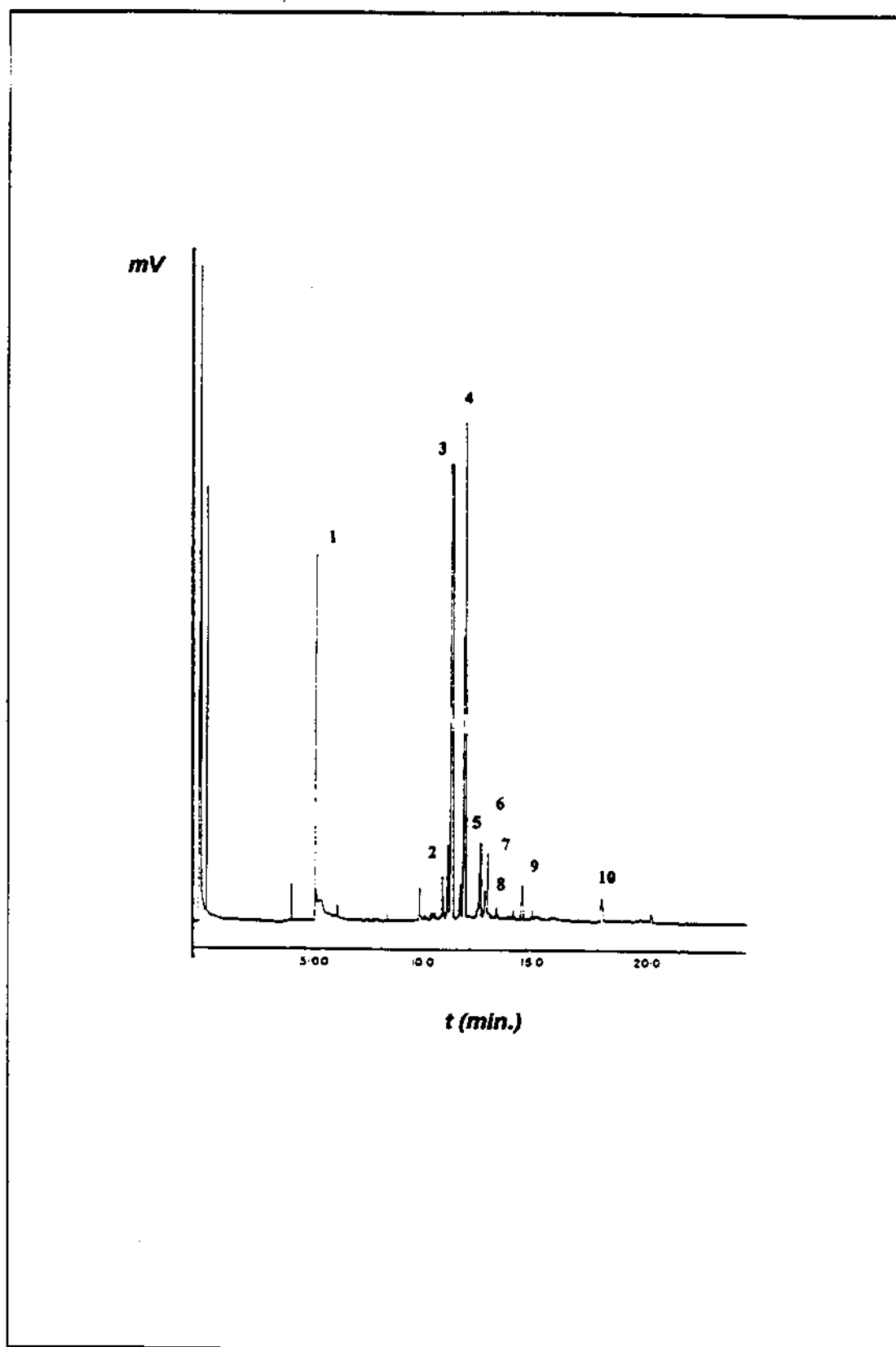


Figura 36. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH ácido de *A .dispermum*.

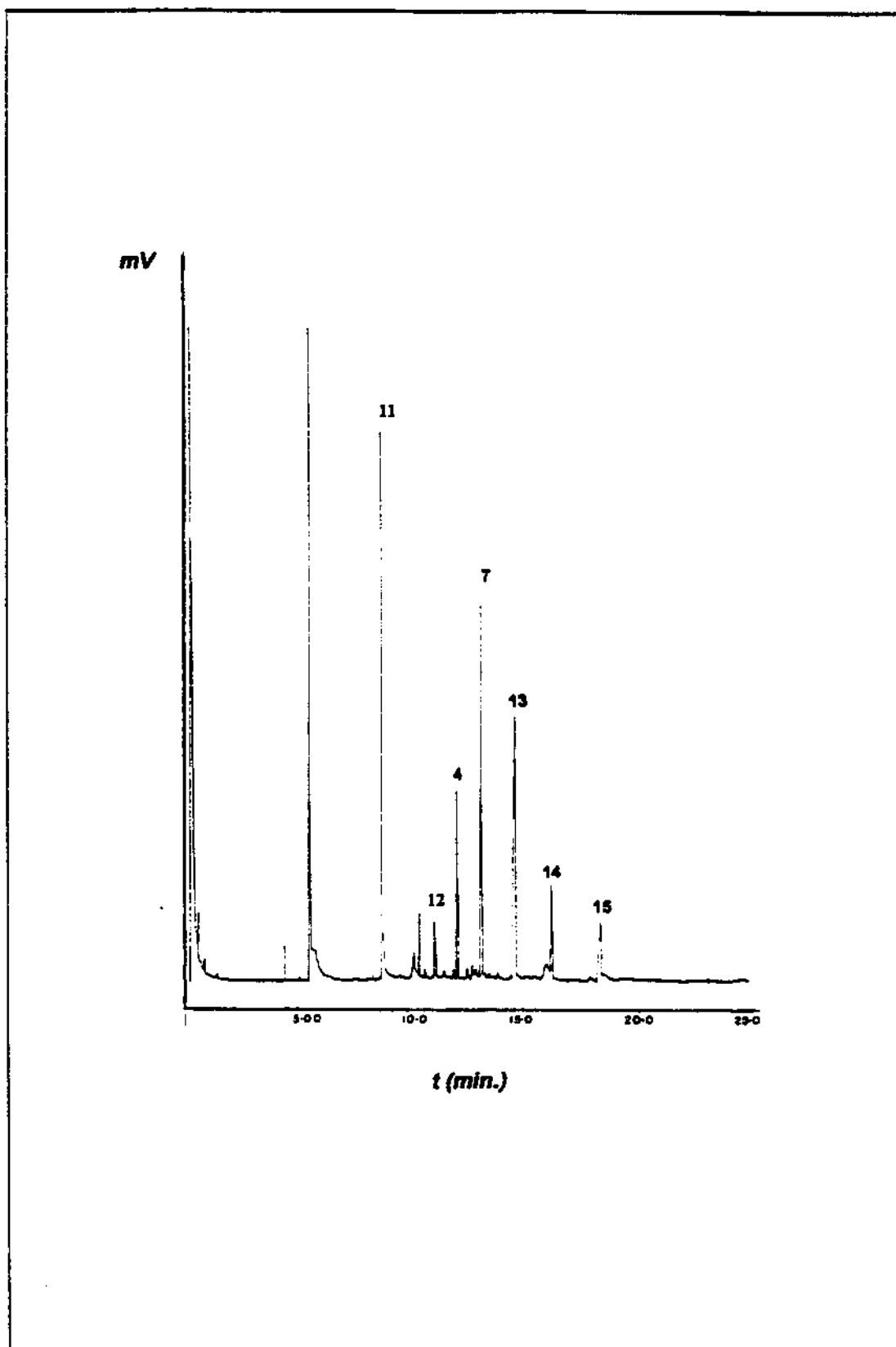


Figura 37. Cromatograma de CG/DIC do extrato à pH básico de *A. dispersum*.

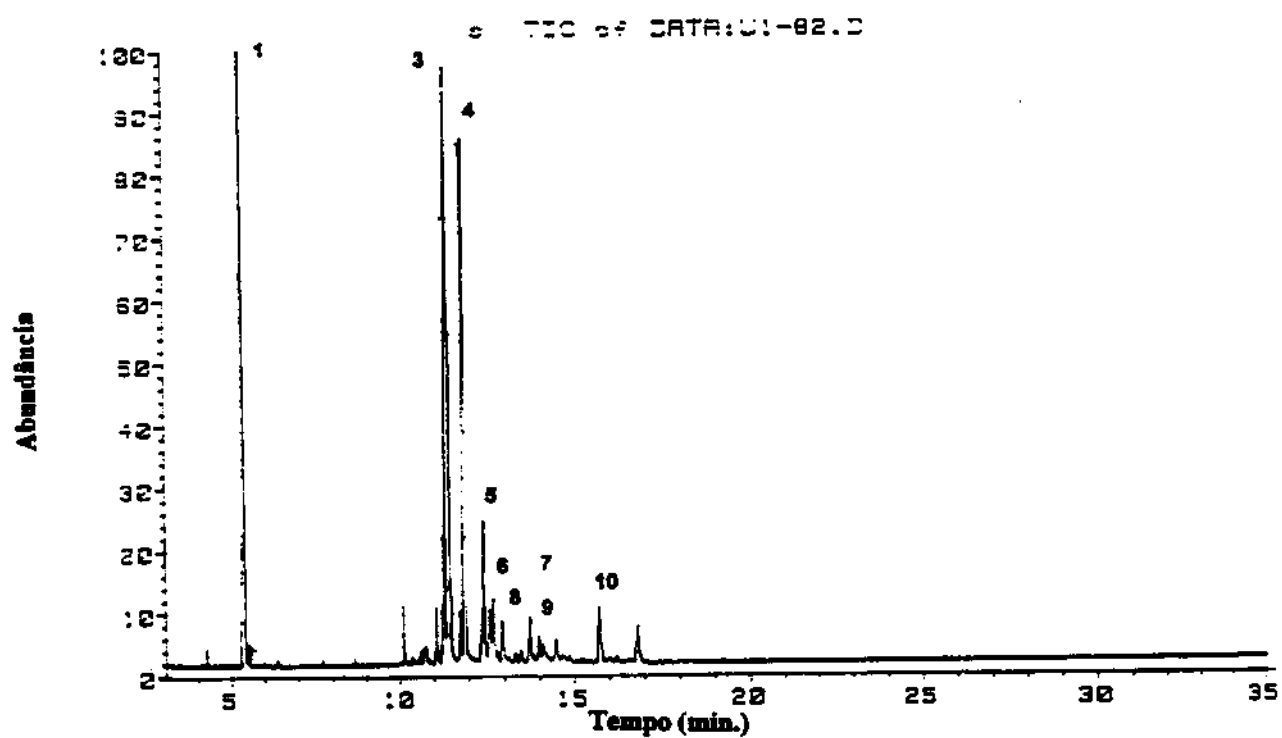


Figura 38. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH ácido de *A. dispersum*.

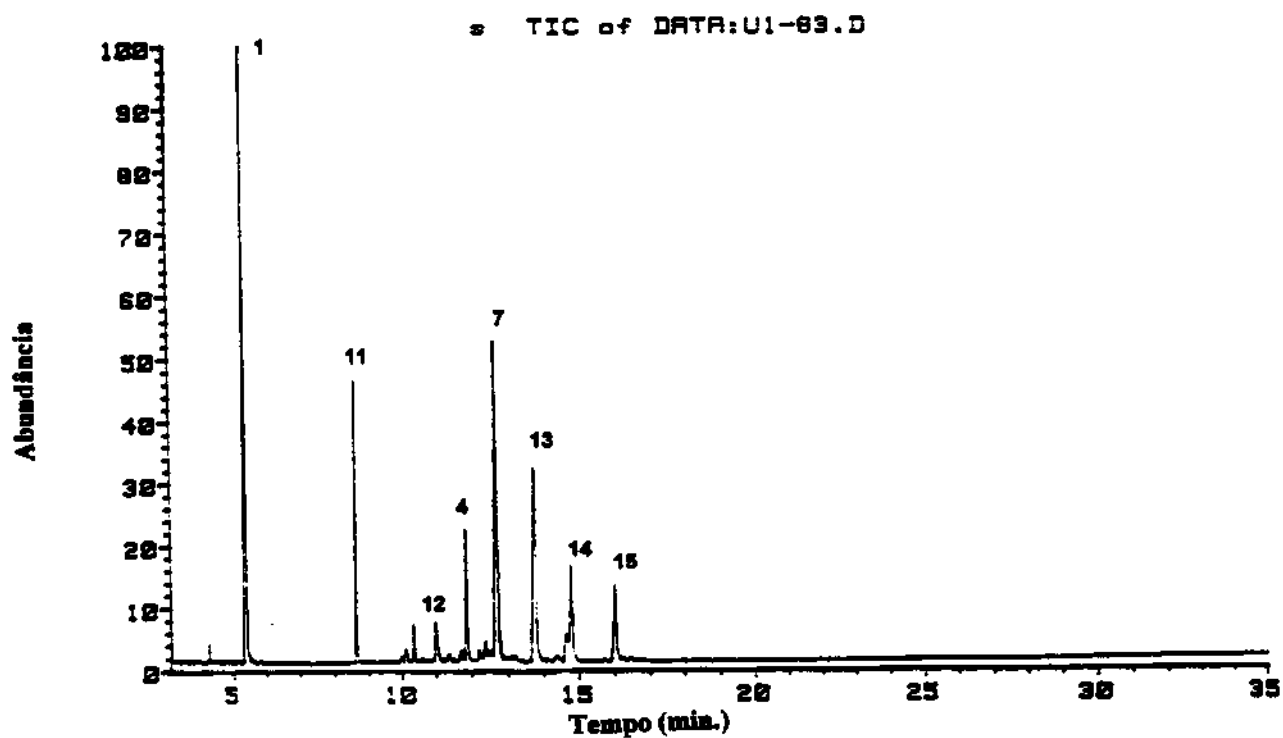


Figura 39. Cromatograma de CG/EM do extrato à pH básico de *A. dispersum*.

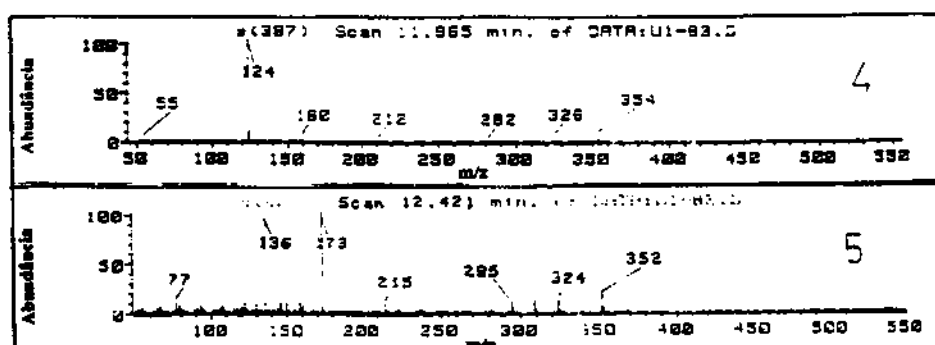
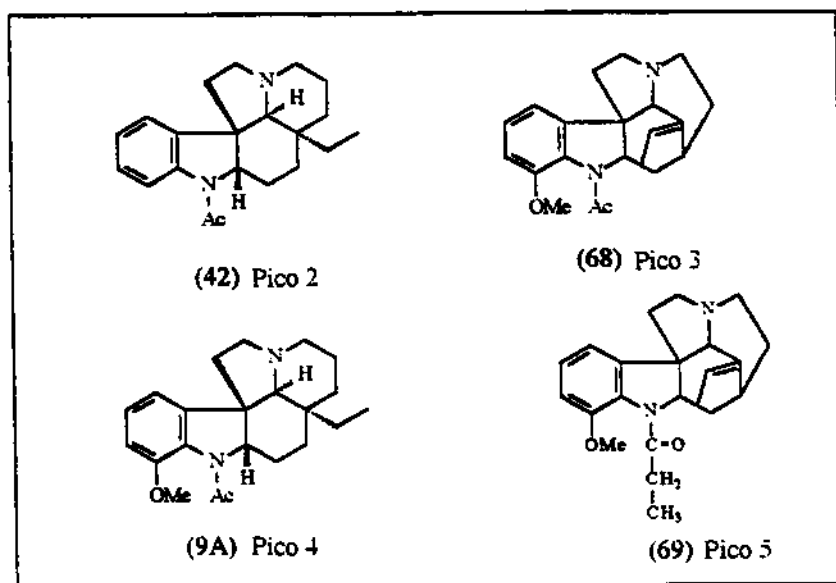
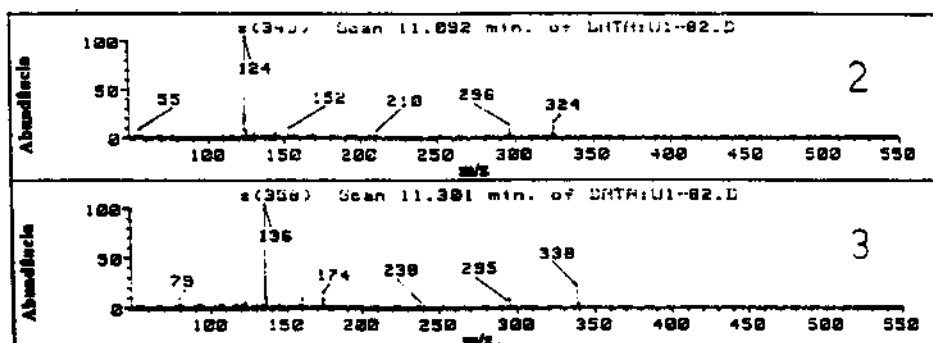


Figura 40a. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. dispersum*. Picos: 2- 12-desmetóxi-aspidospermina (42), 3- aspidoespermatina (68), 4- (-)-aspidospermina (9B), 5- N-propionil-aspidoespermatina (69).

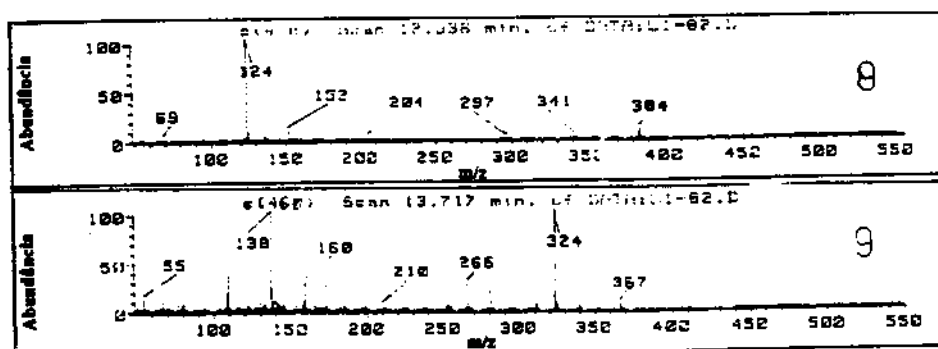
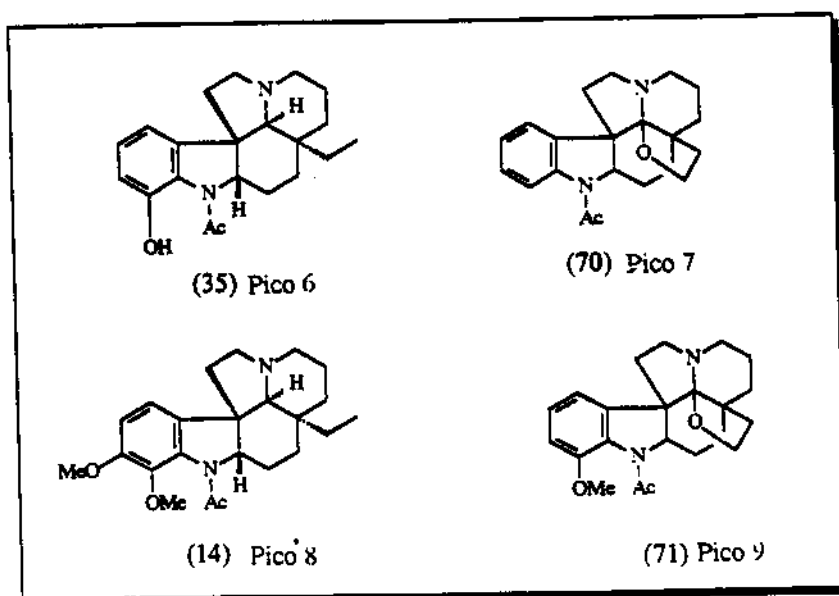
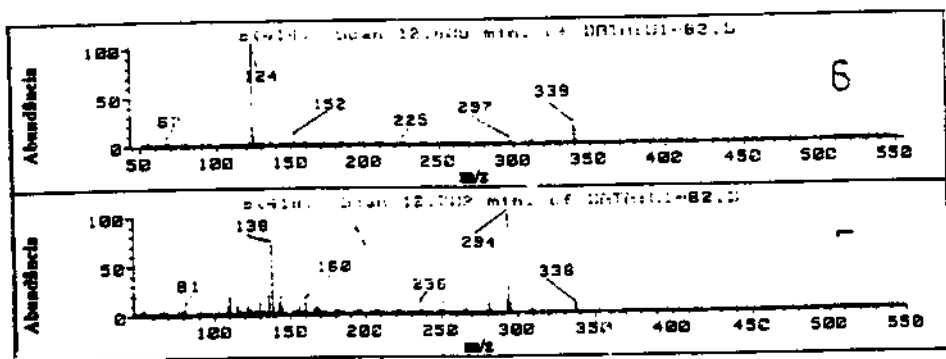


Figura 40b. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A.dispermum*. Picos: 6- desmetil-aspidospermina (35), 7- N-acetil-aspidoalbidina (70), 8- pirifolidina (14), 9- 12-metóxi-N-acetil-aspidoalbidina (71).

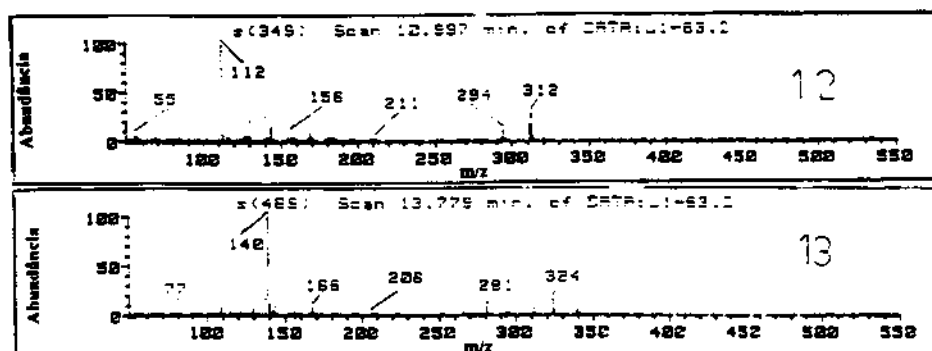
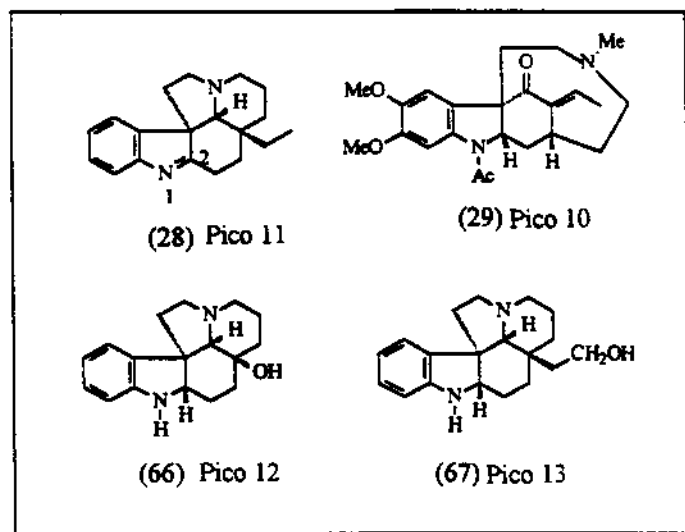
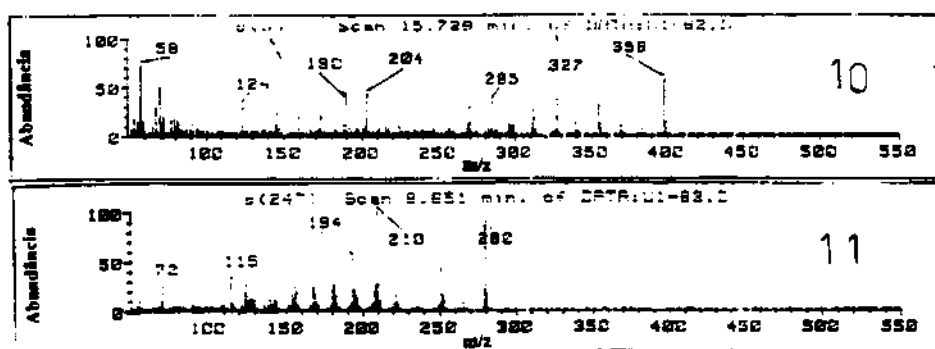


Figura 40c. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. dispersum*. Picos: 10- geissosvellina (29), 11- 1,2-desidro-aspidospermidina (28), 12- desóxi-aspidodispermina (66), 13- 12-desmetóxi-N-acetil-cilindrocarpinol (67).

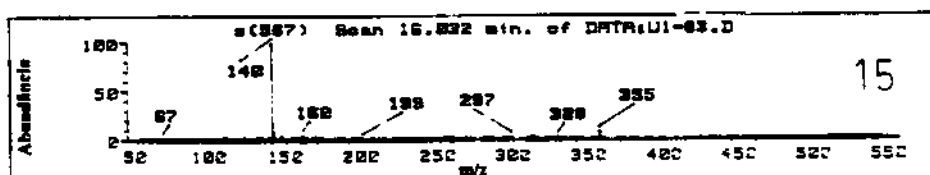
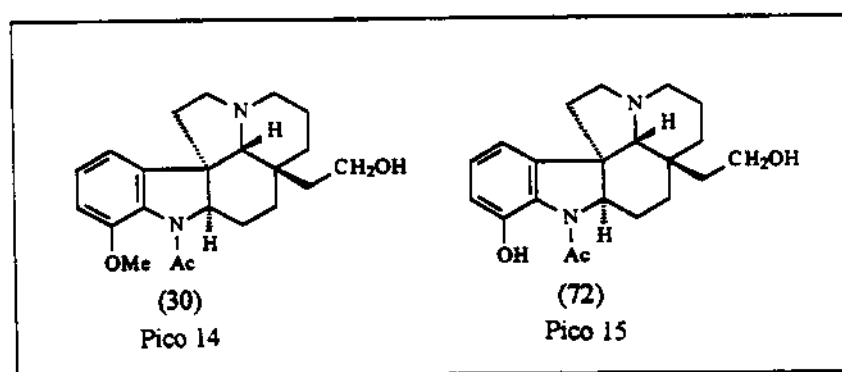
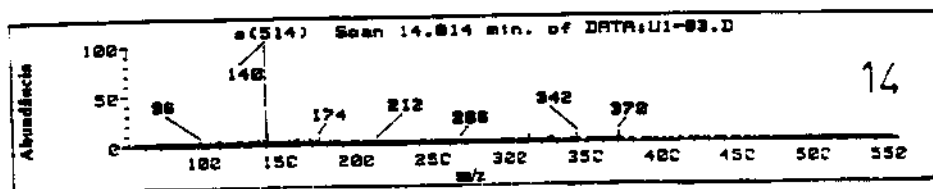


Figura 40d. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos ácido e básico de *A. dispersum*. Picos: 14- N-acetil-cilindrocarpinol (30), 15- 12-desmetil-N-acetil-cilindrocarpinol (72).

2.4. Análise por CLAE dos alcalóides do gênero *Aspidosperma*

Apesar da grande variabilidade nas solubilidade, pesos moleculares e polaridades, o sistema mostrou uma boa separação cromatográfica para os alcalóides. As análises foram efetuadas a tempos aceitáveis (60 min.) com uma boa simetria dos picos, utilizando-se da técnica de eluição por gradiente. Ainda que a cromatografia de fase reversa venha sendo utilizada em grande extensão para a análise de alcalóides, problemas ainda existem, a análise destes compostos pode levar a uma baixa eficiência, picos largos e assimétricos, atribuídos ao mecanismo de retenção dual [60,61,62].

As aminas lipofílicas podem ser usadas para converter o mecanismo de retenção dual em um mecanismo solvofóbico. Neste estudo a trietilamina foi adicionada à fase móvel, como uma tentativa de se melhorar a eficiência da análise, pois este composto interage com os grupos silanóis [63]. O íon NH_4^+ do tampão salino de formiato de amônio tem também a função de diminuir a ação destes grupos silanóis [64], a adição ao sistema de um componente: o octanossulfonato de sódio, que permitiu que a separação fosse mediada por um ou mais tipos de interação, no qual opera o mecanismo de pares iônicos, que melhorou em muito a eficiência e a resolução.

O padrões obtidos, conforme relatado anteriormente, foram submetidos à análise no sistema de eluentes descritos na metodologia, quando a este sistema adicionou-se a trietilamina o mesmo foi denominado sistema LC-1 e ao se adicionar o octanossulfonato de sódio o sistema passou a ser denominado de sistema LC-2. O sistema LC-2 mostrou-se mais adequado no objetivo de aumentar a eficiência do processo de separação, levando também a um incremento da resolução.

Estabelecendo-se o sistema LC-2 como mais adequado, o mesmo foi utilizado para todas as análises subsequentes.

O objetivo deste trabalho foi analisar os alcalóides utilizando a CLAE, e a quantificação foi realizada empregando-se o método de calibração externa [33], para se pudesse traçar um paralelo de análise com o doseamento por CG, bem como fazer uma comparação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas.

A análise qualitativa por CLAE das seis espécies de *Aspidosperma* foi realizada e os resultados só puuderam ser analisados contra padrões. A análise de algumas espécies, como *Aspidosperma ramiformum* (Figuras 41,a,b; Tabela 22) e *Aspidosperma pyricollum* (Figuras 42a, b) foram realizadas e conseguiu-se nas duas uma boa separação dos componentes principais. Nas

análises dos extratos das outras espécies a resolução cromatográfica foi pobres mesmo nos componentes principais, dos componentes principais, provavelmente devido ao grande número de estruturas com esqueleto similar e/ou isoméricas, isto fica evidente no caso das outras espécie *Aspidosperma olivaceum*, *Aspidosperma pyrifolium*, *Aspidosperma polyneuron* e *A. dispersum* , ilustrado nas Figuras 43a, b; 44a, b; 45a, b e 46a, b, respectivamente.

A espécie *A. ramiflorum* foi a mais adequada para análise por CLAE, pois além da boa separação apresentada, a CLAE funciona como uma técnica complementar a CG/EM, a combinação das duas técnicas permitiu analisar componentes de diferentes pesos moleculares presentes nos extratos clorofórmicos. A tabela 22 descreve o valores obtidos para as concentrações dos compostos presentes no extrato à pH básico de *A. ramiflorum* empregando-se a CLAE. Os extratos à pH ácido e básico foram monitorados por CCD onde ficou evidente que o extrato básico contém maior concentração de alcalóides, pela análise por CG (Figuras 31, 32), por isso somente efetuamos a análise para o extrato à pH básico.

Tabela 22. Concentração dos alcalóides indólicos no extrato à pH básico dos galhos e cascas de *A. ramiflorum*.

Pico (HPLC)	Alcalóide	Concentração (mg/100g)	
		CLAE	CG
1	triptofol (7)	-	-
2	10-metóxi-geissoschizol (24)	72,8	65,0
3	ramiflorina A (25)	154,4	-
4	ramiflorina B (26)	274,4	-

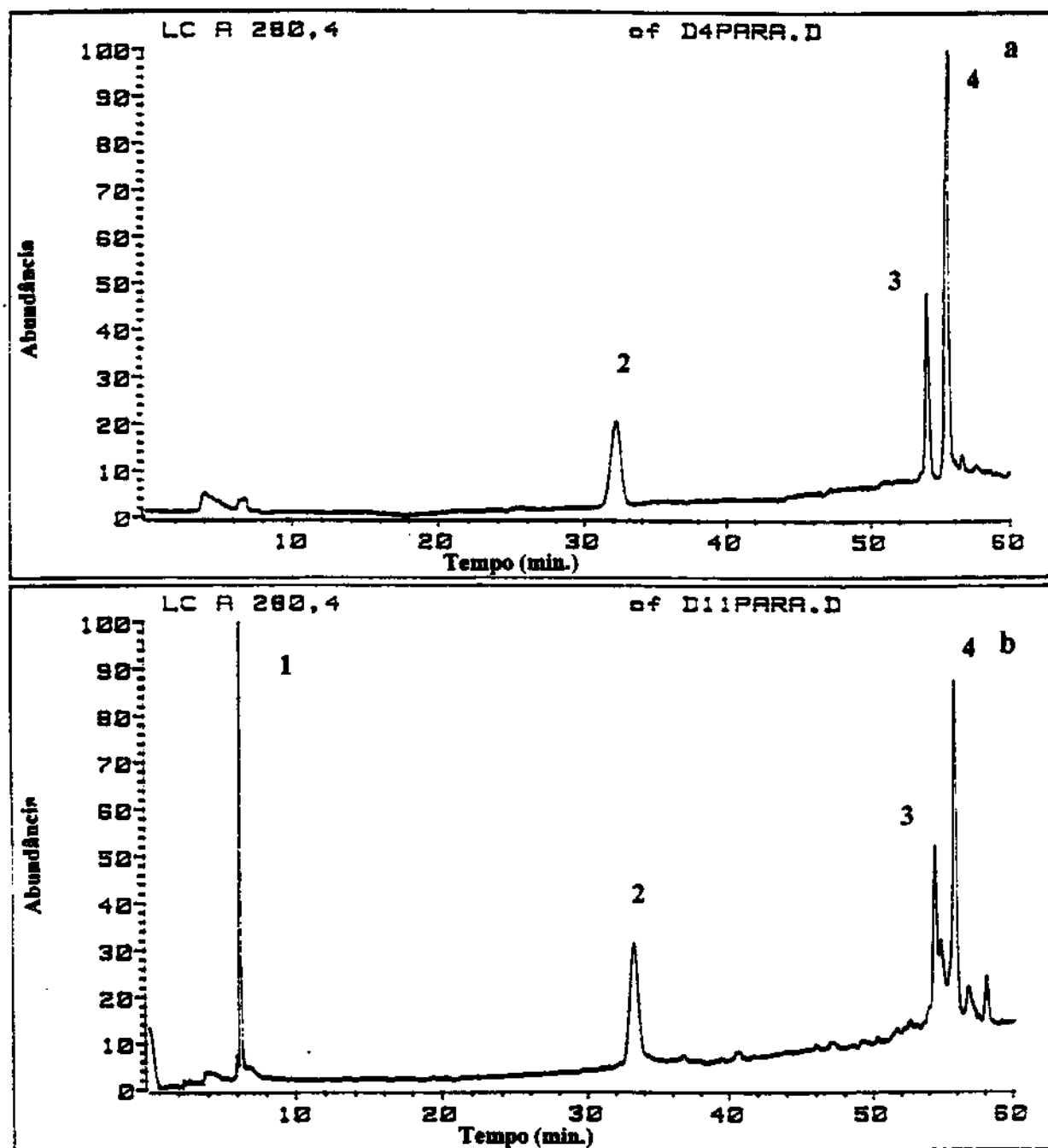


Figura 41. (a) Cromatograma de CLAE da mistura dos alcalóides padrões isolados de *A. ramiflorum*.
 (b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. ramiflorum*.
 Picos: 1- triptofol (7), 2- 10 metóxi-geissoschizol (24), 3- ramiflorina A (25) e 4- ramiflorina B (26).

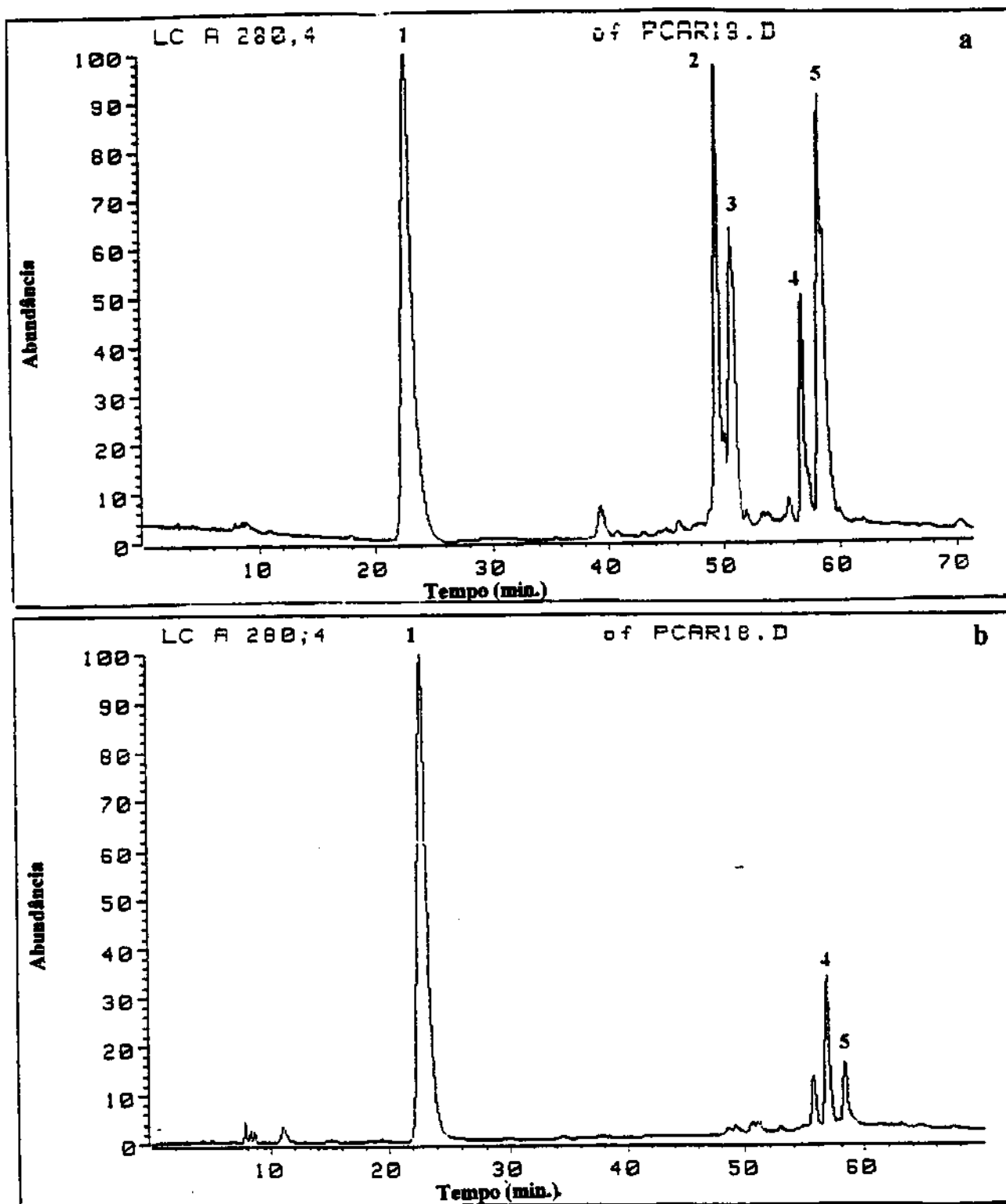


Figura 42. (a) Cromatograma de CLAE do extrato à pH ácido de *A. pyricollum*.

(b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. pyricollum*.

Picos: 1- triptofol (07), 2- b-yohimbina (10), 3- yohimbina (8), 4- aparicina (13), 5-uleina (11).

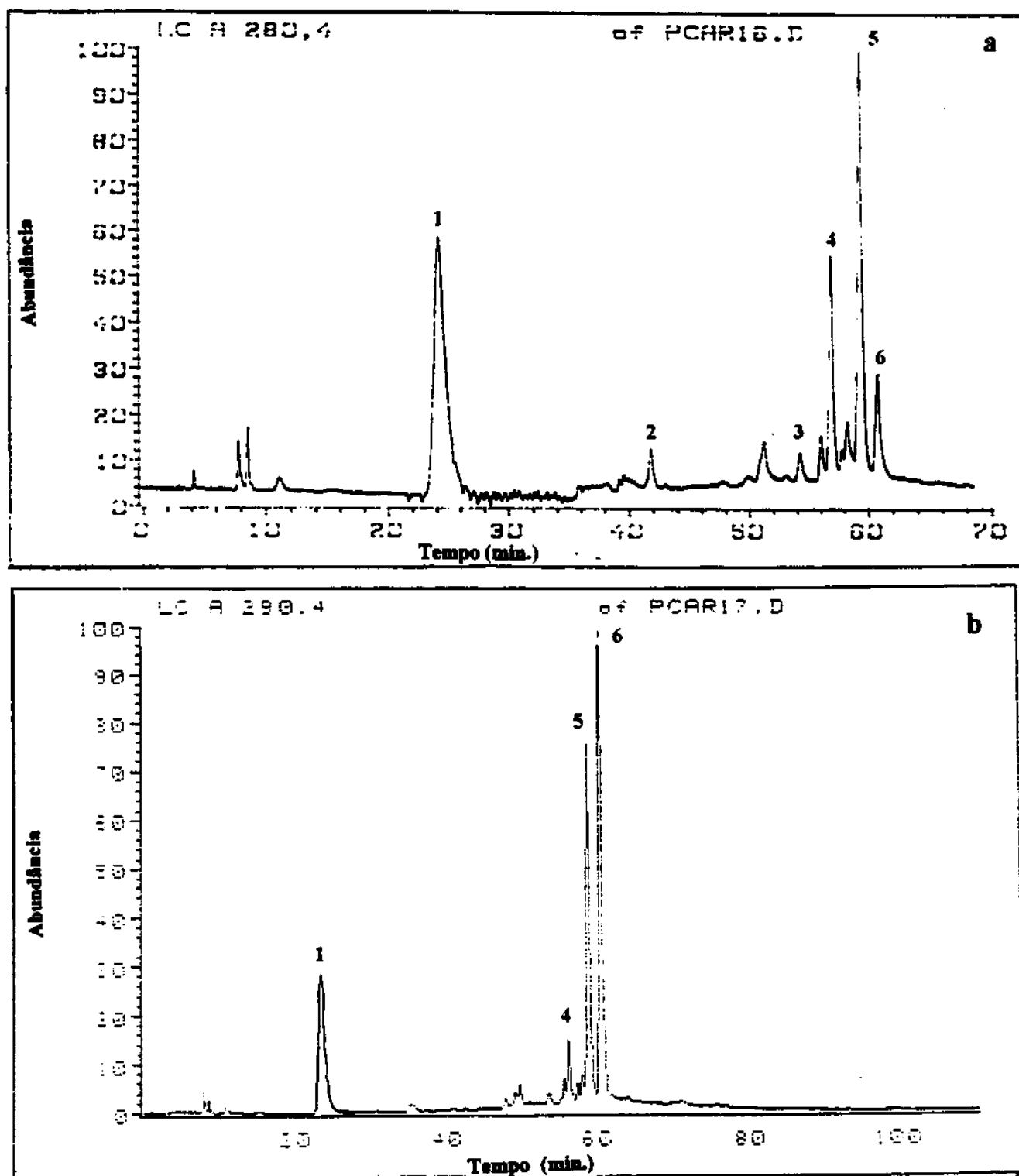


Figura 43. (a) Cromatograma de CLAE do extrato à pH ácido de *A. olivaceum*.

(b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. olivaceum*.

Picos: 1- triptofol (7), 2- aspidofractinina (15), 3- aparicina (13), 4- pirifolidina (13), 5-uleina (11), 6- (+)-aspidospermina (9A).

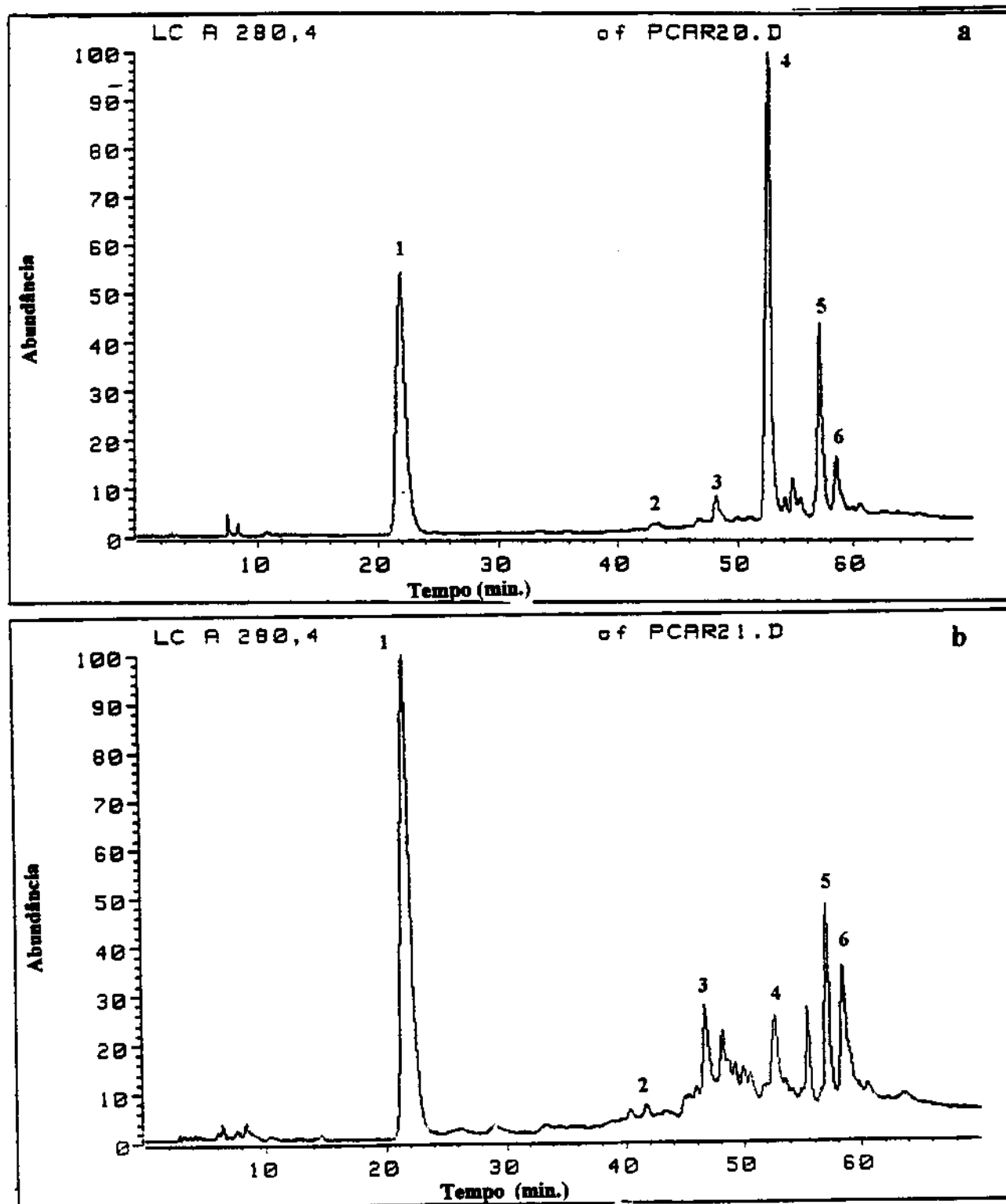


Figura 44. (a) Cromatograma de CLAE do extrato à pH ácido de *A. pyrifolium*.

(b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. pyrifolium*.

Picos: 1- triptofol (07), 2- aspidofractinina (15), 3- aspidofilina (16), 4- pirifolina (18), 5- pirifolidina (11), 6- (+)-aspidospermina (9A).

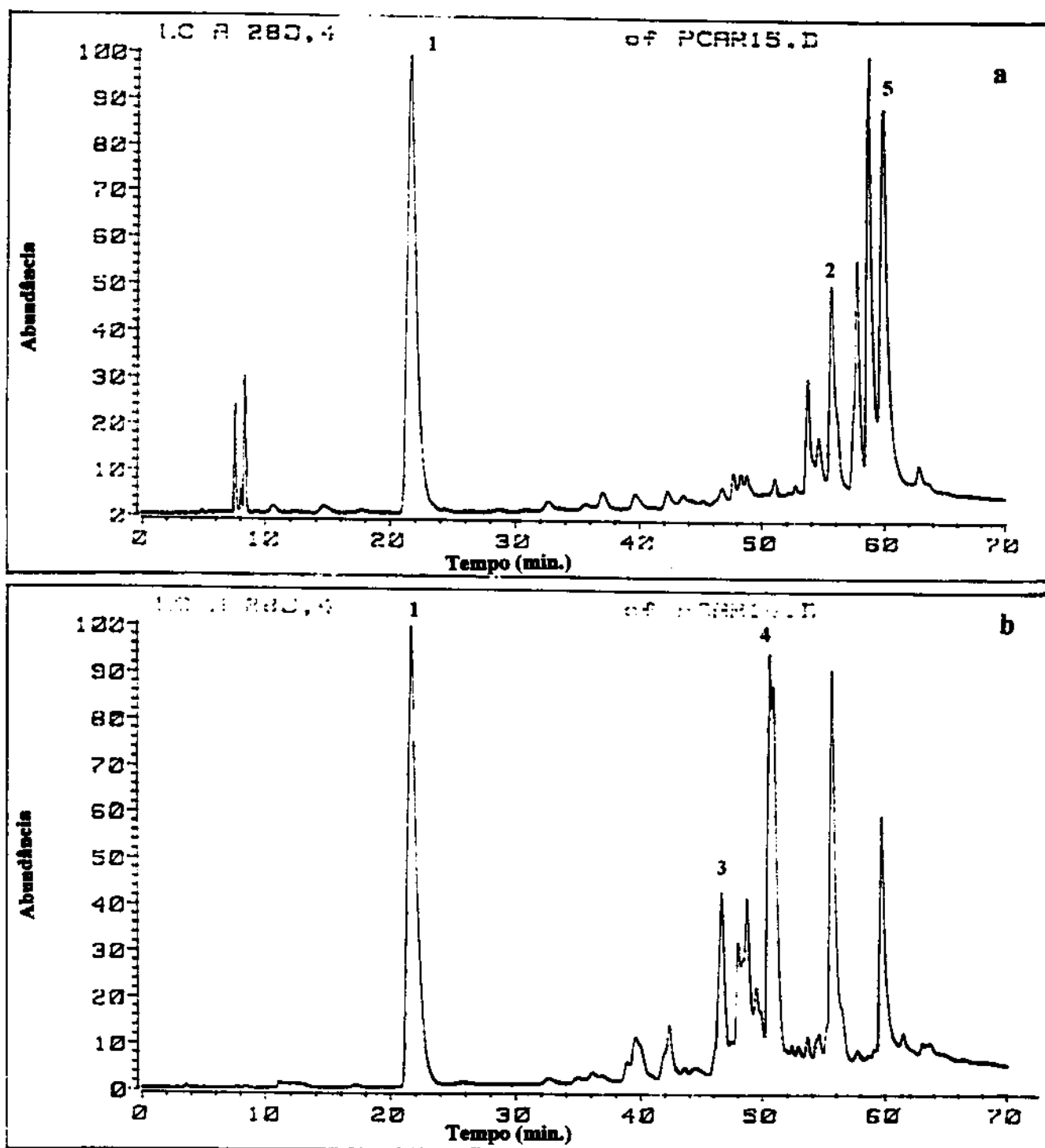


Figura 45. (a) Cromatograma de CLAE do extrato à pH ácido de *A. polyneuron*.

(b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. polyneuron*.

Picos: 1- triptofol (7), 2- N-acetil-cilindrocarina (23), 3- normacusina B (21), 4- polineuridina (22), 5- (-)-aspidospermina (9B).

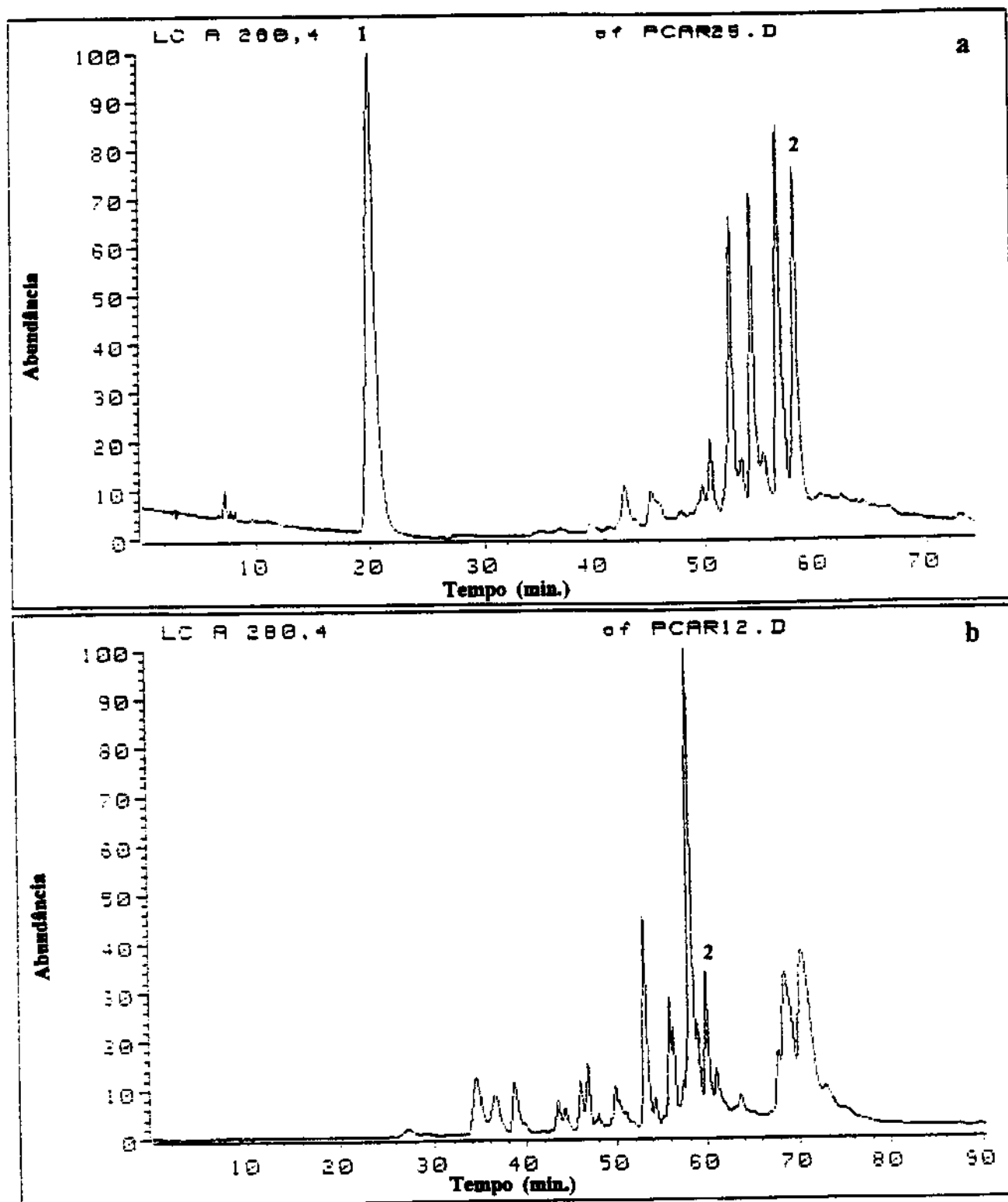


Figura 46. (a) Cromatograma de CLAE do extrato à pH ácido de *A. dispersum*.

(b) Cromatograma de CLAE do extrato à pH básico de *A. dispersum*.

Picos: 1- triptofol (7), 2- (-)-aspidospermina (9B). A determinação de todos os componentes não pode ser realizada para esta espécie, em função que algumas estruturas dos padrões só puderam ser determinadas posteriormente.

3. CONCLUSÕES

3.1. Estudo Fitoquímico

O estudo fitoquímico dos extratos clorofórmicos das seis espécies do gênero *Aspidosperma* estudadas, permitiu-nos isolar e identificar ao todo vinte e um alcalóides, sendo treze destes novos nas espécies e dois inéditos a 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15-metóxi-pirifolidina (20), que foram utilizados como padrões nas análises por CG/EM/DIC e CLAE.

Outros aspectos que valem a pena ser ressaltados em relação aos padrões são:

(a) A existência de alguns deles havia sido por nós analisados em CG/EM, mas como não existiam registros do isolamento destes em estudos anteriormente descritos na literatura, o isolamento destes compostos veio a confirmar a análise feita antes por CG/EM.

(b) Os padrões foram também utilizados para monitorar experimentos que visavam pesquisar a presença de atividade antimicrobiana e antifúngica. As espécies *A. pyricollum*, *A. olivaceum*, *A. polyneuron* e *A. ramiflorum* apresentaram atividade antimicrobiana, os resultados destes experimentos serão relatados no Capítulo 2.

(c) Os compostos padrões auxiliaram na análise por CG/EM e estes puderam auxiliar em alguns aspectos da biossíntese dos alcalóides 25 e 26 em *A. ramiflorum*, e dos alcalóides com esqueleto Plumerano em *A. polyneuron* em estudos “in vivo” e “in vitro”, conforme serão apresentados no Capítulo 3.

3.2. Método de Análise

A CG representa um poderoso instrumento para à análise qualitativa e quantitativa dos extratos alcaloídicos de espécies do gênero *Aspidosperma*. O potencial desta técnica é ainda maior quando associada a espectrometria de massas, que permite uma atribuição inequívoca dos componentes da mistura no extrato.

A dosagem dos componentes de interesse biológico é perfeitamente executável sob as condições de aqui desenvolvidos, permitindo o monitoramento na busca de espécies desse gênero que possam ser usadas como fontes de alcalóides comercialmente importantes.

A metodologia empregada permitiu com sucesso a análise dos extratos destas espécies, com exceção da *A. ramiflorum*, que possui alcalóides indólicos de alto peso molecular e altamente polares

que não são analisáveis sob as condições empregadas. Para casos como esse sugerimos a associação com a técnica de CLAE.

A utilização combinada do IK com os padrões isolados e a interpretação dos espectros de massas, torna a metodologia um poderoso instrumento no estudo de misturas extrativas de alcalóides indólicos deste gênero bem como o de outros gêneros que contenham alcalóides indólicos. Vale a pena salientar que o Banco de Dados Wiley da “workstation” HP 3970B foi de grande importância na identificação dos componentes não característicos do gênero *Aspidosperma*, como no caso do composto geissosvellina (29).

As condições de análise utilizadas na CLAE, fez com que esta técnica apresentasse uma certa similaridade com a CG, em relação a detecção dos componentes majoritários, ainda que ocorram casos de coeluição em alguns extratos. A CLAE como ferramenta para análise quantitativa mostrou-se menos reprodutível que a CG em função da grande variação nas classes de alcalóides indólicos analisados e por estes compostos apresentarem espectros de absorção muito semelhantes, consequentemente mostram menor linearidade na medida das concentrações nas amostras quando comparada ao método de detecção por ionização de chama (DIC). Apesar disto a CLAE foi muito importante na dosagem dos alcalóides dos extratos de *A. ramiflorum*.

A CG pode ser usado como o método de escolha na análise de misturas extrativas clorofórmicas de espécies do gênero *Aspidosperma* e a CLAE como uma técnica complementar.

3.3. Aplicações

A análise por CG/EM permite detectar-se os alcalóides minoritários, estes são de fundamental importância para estudos de biossíntese de alcalóides indólicos, pois permite que se detectem intermediários biogénéticos que existem em quantidades muito pequenas nas plantas. A detecção destes será de grande valia para esclarecimento de algumas rotas biossintéticas ainda não totalmente elucidadas.

A quimiosistemática pode também usufruir desta metodologia de análise, pois a mesma permite estudar um maior número de espécies de uma maneira mais rápida. A partir de dados obtido por CG/EM pode comparar-se componentes de uma espécie, séries, tribos ou até mesmo uma família, para que conjuntamente com os dados fitoquímicos já existentes e as características botânicas, possa-se fazer uma classificação mais precisa das espécies vegetais, como os realizados

para as espécies *A. pyricollum* e *A. olivaceum* (distinção entre espécies sinônimas) e *A. pyrifolium* (criação ou não de uma nova série).

A praticidade do método permite que estudos sazonais possam ser realizados, visando estudar a variação anual na produção de alcalóide pela planta.

Outras aplicações importantes serão em estudos que visam selecionar plantas que possuam boas quantidades de compostos com atividade farmacológica já comprovada, bem como monitorar estudos buscando novas substâncias farmacologicamente ativas

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS E DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DE SEIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspidosperma*..

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A busca de novos antibióticos, métodos rápidos e relativamente simples foram desenvolvidos para o "screening" de substâncias antibióticas [65-67]. As substâncias a serem testadas devem difundir-se no meio de cultura, a base de ágar. Normalmente preparam-se pequenos discos de papel de filtro no qual são imersos um volume de concentração conhecida das substâncias a serem testadas (extratos vegetais, fungicos ou bacterianos normalmente). Os discos são colocados sobre placas de ágar semeadas com o microorganismo utilizado no teste. Por exemplo, atividade contra bactérias gram-positivas podem ser determinadas com *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus subtilis*, a atividade contra bactérias gram-negativas com *Escherichia coli* ou *Salmonella typhi* e a antifúngica com *Neurospora crassa*. As placas testes são incubadas sob condições apropriadas para o crescimento do microorganismo testado, e se após a incubação existir um halo claro ao redor do disco (halo de inibição), pode-se assumir que uma substância no extrato inibe o crescimento do microorganismo teste, Figura 47 e 48.

A próxima etapa no procedimento de "screening" é determinar qual substância química produziu a inibição e se esta é um novo candidato a um antibiótico. Um método rápido que foi desenvolvido para este fim é denominado de bioautografia [68]. Este ensaio emprega a cromatografia em papel ou em camada delgada e um ensaio biológico; um extrato contendo a substância antibiótica nova é eluído em uma placa cromatográfica junto com padrões, das substâncias presentes nestes extratos usando diversos sistemas de solventes. Porque cada substância possui uma mobilidade característica em cada sistema de solventes, a comparação das mobilidades (R_f) da substância antibiótica com os padrões nos diversos sistemas de solventes indicará qual composto é responsável pela atividade antibiótica. A detecção dos compostos sobre o cromatograma é feito usando-se métodos químicos, às vezes dificultada pela grande quantidade de compostos no extrato, consequentemente em alguns casos teriam que ser utilizados métodos biológicos para detectar-se estas substâncias. Uma maneira de se fazer isto é colocando um cromatograma já desenvolvido sobre um meio com ágar que foi semeado com o microorganismo a ser testado, as manchas com os halos de inibição sobre o próprio ágar, indica qual composto foi ativo, Figuras 49 e 50.

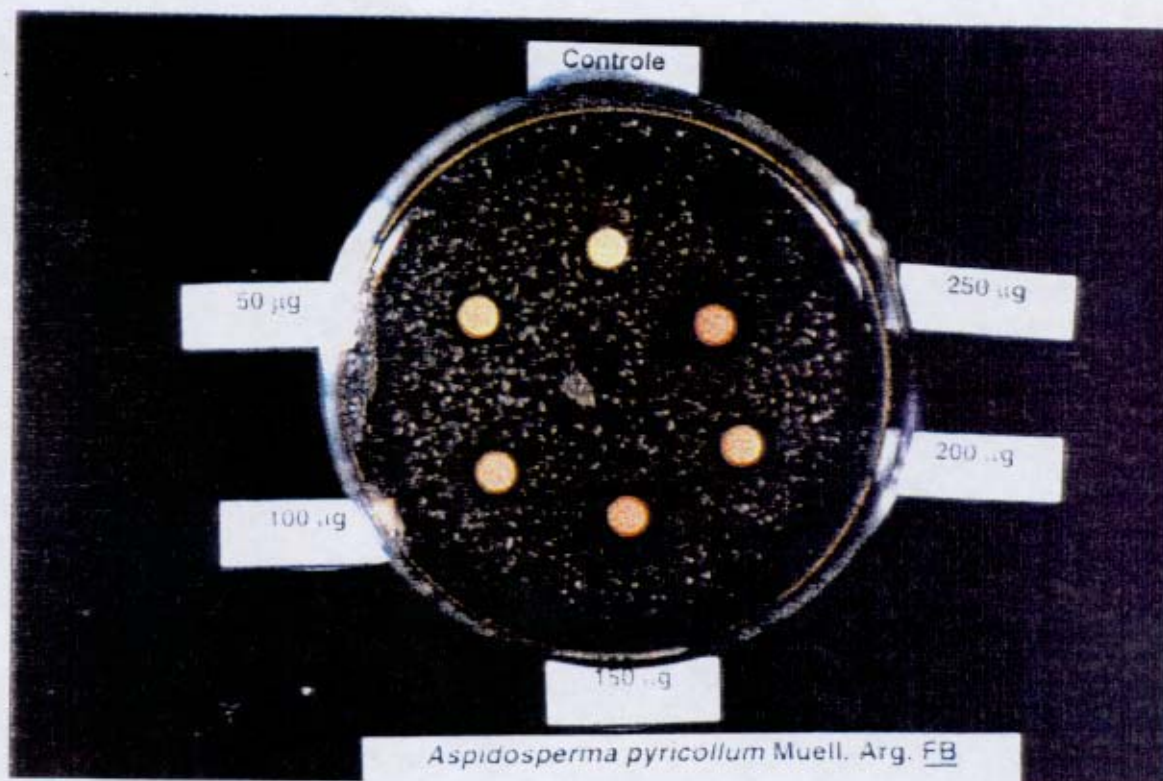


Figura 47. Teste de antibiose [66] por difusão em disco de *A. pyricollum* extrato à pH básico.

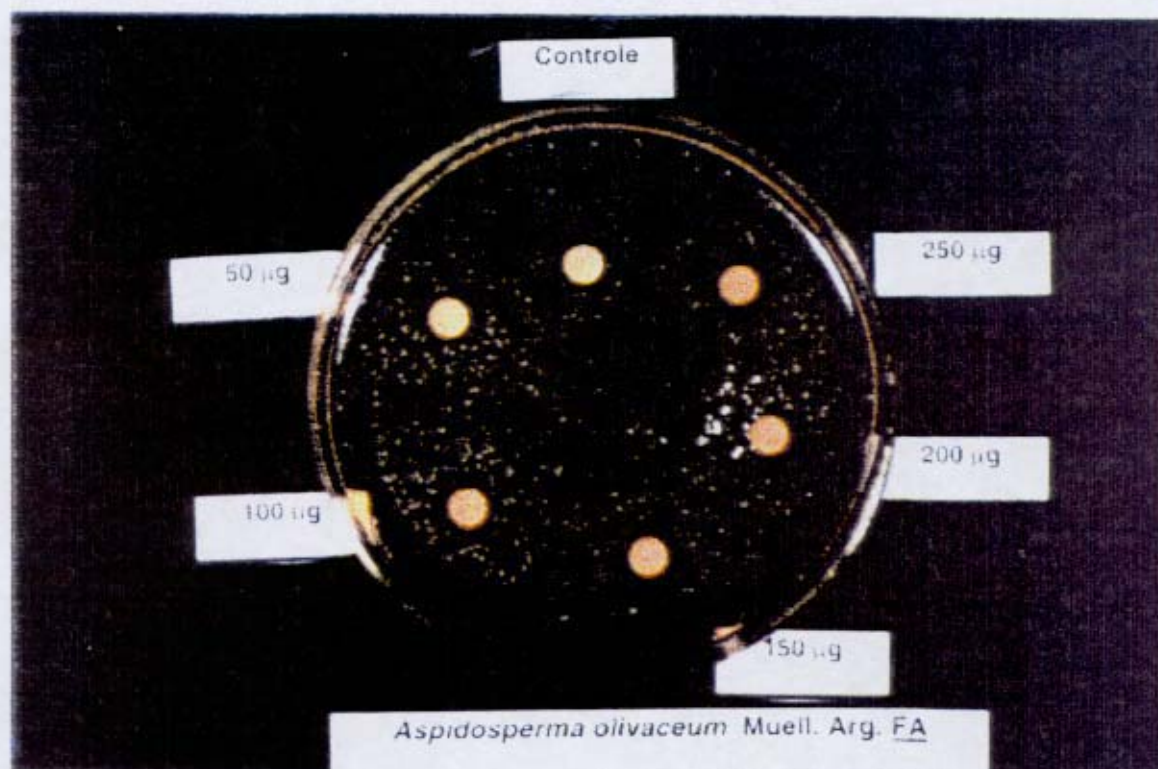


Figura 48. Teste de antibiose [66] por difusão em disco de *A. olivaceum* extrato à pH ácido.

Após estabelecido que um composto isolado do extrato tem um potencial antibiótico, devem ser empregados ensaios quantitativos para se estabelecer o título de atividade. Os dois testes mais comumente empregados são, o teste turbidimétrico (diluição em tubo) [69] que requer o uso do microorganismo testado como no teste bioautográfico. No teste turbidimétrico, o microorganismo cresce em tubos testes que contêm diferentes concentrações do composto ativo. Existe uma relação direta entre a concentração do antibiótico e o crescimento do microorganismo testado, e pela medida do crescimento do microorganismo, o qual é indicado pela turbidez do conteúdo dos tubos do teste, o título do antibiótico pode ser determinado. Tubos límpidos indicam uma maior concentração do potencial antibiótico do que os tubos turvos, e a menor concentração do antibiótico que previne completamente o aparecimento da turbidez é conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM) [69].

No teste em placa [70], discos de papel de filtro são impregnados com soluções do composto ativo em concentrações variadas, elimina-se o solvente, e colocados em um meio com ágar, semeado com o microorganismo teste apropriado, e incubado. Quando a concentração do composto ativo aumenta, a sua difusão através do ágar aumenta também, portanto, o tamanho do halo de inibição ao redor do disco de papel é relacionado a concentração do antibiótico, Figuras 47 e 48.

Verpoorte, R. e colaboradores [71] publicaram um trabalho no qual avaliaram a atividade antimicrobiana em três espécies do gênero *Aspidosperma*, o qual nos incentivou a realizar os testes com os extratos de seis espécies deste gênero disponíveis em nosso laboratório. Utilizando-se do método da literatura [68], testou-se a atividade antimicrobiana dos compostos puros isolados pelo método fitoquímico como dos extratos obtidos à pH ácido e básico das espécies a citar: *Aspidosperma pyricollum*, *A. olivaceum*, *A. pirifolium*, *A. polyneuron*, *A. ramiflorum* e *A. dispernum*, cuja atividade não tinha sido objeto de estudos anteriores. A atividade antimicrobiana dos extratos foi testada qualitativamente.

O *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, foram escolhidos como microorganismos gram positivos e negativos representativos.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies *A. pyricollum*, *A. olivaceum*, *A. polyneuron* apresentaram atividade antimicrobiana ao microorganismo *S. aureus*, e *A. ramiflorum* a *S. aureus* e *B. subtilis*, conforme o mostrado na Tabela 23 e ilustrado nas Figuras 47 e 48, para o caso de *A. pyricollum* e *A. olivaceum*, no casos destas espécies realizamos antes o teste de antibiose em discos com um primeiro objetivo de estabelecer-se qual apresentava ou não atividade antibacteriana, a segundo razão para utilizarmos este testes foi descobrirmos qual a menor concentração de extrato a ser utilizada que ainda leve a inibição do crescimento dos microorganismos, a qual foi estabelecida como 50 µg por disco, conforme o ilustrado nas Figuras 47 e 48.

A partir destes resultados procurou-se identificar se os alcalóides isolados eram responsáveis pela atividade em cada um dos extratos. A tabela 24 resume os resultados e as Figuras 49 e 50 mostram um exemplo dos compostos aos quais se relacionou a atividade. O que pode se observado é que os alcalóides indólicos do tipo corinante, (25) e (26), mostraram atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas, *S. aureus* e *B. subtilis*. Os alcalóides diméricos do tipo corinante não apresentam até o momento, nenhum relato na literatura que confere a estes compostos a atividade antimicrobiana. O fato de alguns compostos possuindo o esqueleto corinante apresentar atividade antimicrobiana a bactérias gram-positivas já ser conhecida [71], poderia explicar em parte a atividade antimicrobiana dos compostos diméricos (25) e (26).

Os outros compostos a que relacionou-se a atividade antimicrobiana, ao *B. subtilis*, foram a (-)-aspidospermina (9B), *N*-acetil-cilindrocarina (23), que possuem estruturas relacionadas e os compostos aparicina (13) e normacusina B (21), também não apresentavam uma descrição prévia de atividade antimicrobiana.

Tabela 23. Atividade antimicrobiana dos extratos à pH ácido e básico de 6 espécies do gênero *Aspidosperma*, testados por autobiograma.

Planta	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. pyricollum</i>				
extrato básico	(+)	(-)	(-)	(-)
extrato ácido	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>A. olivaceum</i>				
extrato básico	(-)	(-)	(+)	(-)
extrato ácido	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>A. pyriforme</i>				
extrato básico	(-)	(-)	(-)	(-)
extrato ácido	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>A. polyneuron</i>				
extrato básico	(-)	(-)	(-)	(-)
extrato ácido	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>A. dispersum</i>				
extrato básico	(-)	(-)	(-)	(-)
extrato ácido	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>A. ramiflorum</i>				
extrato básico	(+)	(-)	(+)	(-)
extrato ácido	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabela 24. Atividade antimicrobiana de alcalóides de *Aspidosperma*, testados por autobiograma.

Alcalóide	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Rf S ₁
ramiflorina A (<i>A.r.</i>) (25)	(+)	(-)	(+)	0,36
ramiflorina B (<i>A.r.</i>) (26)	(+)	(-)	(+)	0,31
10-metóxigeisoschizol (<i>A.r.</i>) (24)	(-)	(-)	(-)	0,30
isositsiriquina (<i>A.r.</i>) (27)	(-)	(-)	(-)	0,76
β-yohimbina (<i>A.pc.</i>) (10)	(-)	(-)	(-)	0,25
yohimbina (<i>A.pc.</i>) (8)	(-)	(-)	(-)	0,44
uleína (<i>A.pc.</i> , <i>A.o.</i>) (11)	(-)	(-)	(-)	0,46
aparicina (<i>A.pc.</i> , <i>A.o.</i>) (13)	(+)	(-)	(-)	0,59
(-)-aspidospermina (<i>A.pa.</i>) (9B)	(+)	(-)	(-)	0,68
normacusina B (<i>A.pa.</i>) (21)	(+)	(-)	(-)	0,46
<i>N</i> -acetil-cilindrocarina (<i>A.pa.</i>) (23)	(+)	(-)	(-)	0,60
<i>A.r.</i> - <i>A. ramiflorum</i> <i>A.pc.</i> - <i>A. pyricollum</i> <i>A.o.</i> - <i>A. olivaceum</i> <i>A. pa.</i> - <i>A. polyneuron.</i>				



Figura 49. Autobiograma para o *B. subtilis*: 10MG (10-metóxi-geissoschizol) (24), RA (ramiflorina A) (25), RB (ramiflorina B) (26), Sistema eluente S_1 : CHCl_3 :MeOH (95:5) em atmosfera de amônia.

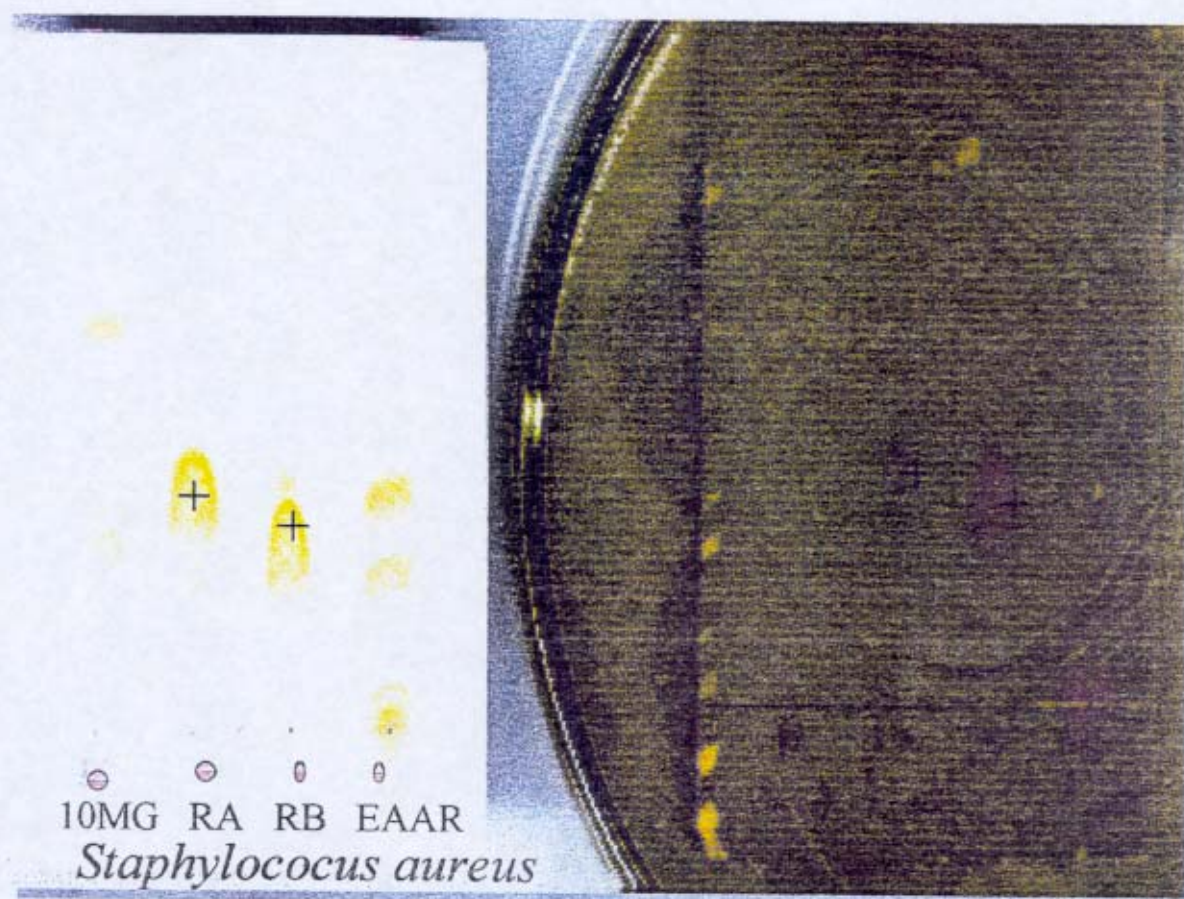


Figura 50. Autobiograma para o *Staphylococcus aureus*: 10MG (10-metóxi-geissoschizol) (24), RA (ramiflorina A) (25), RB(ramiflorina B) (26), EAAR (extrato ácido de *A. ramiflorum*).

3. EXPERIMENTAL

3.1. Matéria-prima vegetal, extração e preparação das amostras

O material vegetal foi tratado conforme o descrito para a metodologia de análise por CG e CLAE e permitiu a obtenção dos extratos que foram utilizados nos testes. A concentração dos extratos foram ajustadas para 5 mg/ml, a concentração aplicada de extrato foi 50µg.

3.2. Separação dos alcalóides por CCD

Os seguintes sistemas solventes (S) foram usados para CCD S₁: CHCl₃:MeOH (95:5) em atmosfera de amônio e S₂: Tolueno:CHCl₃:MeOH (10:2:2) em atmosfera de amônia. Todos os solventes em combinação com cromatoplaças prontas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck em cubas cromatográficas saturadas.

3.3. Bactérias

Os microorganismos *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (CCT 4296), *C. albicans* (CBS 562), foram gentilmente cedidos pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” e os testes foram realizados nesta Fundação. Os microorganismos foram mantidos em caldo nutriente ou em “slants” de ágar para reativação antes do uso.

3.4. Meios de Cultura

As culturas das bactérias foram realizadas em Meio ágar nutriente (Difco) e as da *C. albicans* em meio à 37°C por 24hr.

3.5. Autobiografia

As cromatoplasmas foram cuidadosamente secas com jatos de ar quente até a remoção completa dos solventes. Compostos ativos foram detectados pela leitura da placa de CCD em uma câmara com uma lâmpada de UV em uma lâmpada de $\lambda = 254$ nm. As suspensões bacterianas (10^9 bactérias/ml) foram adicionadas à placa de Petri, esta já com ágar nutriente recobrimdo a cromatoplasma do teste. As placas de CCD foram incubadas por 24 horas à 37°C , as leituras foram feitas após este período.

4. CONCLUSÃO:

Dentre os extratos das espécies testadas, a *A. polyneuron*, *A. olivaceum* e *A. ramiflorum*, apresentaram atividades antibacteriana; as substâncias puras testadas foram isoladas dos extratos das mesma espécies, ou seja a (-)-aspidospermina (9B), normacusina B (21), *N*-acetil-cilindrocarina (23), aparicina (13), ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26).

Diante destes resultados, passamos às etapas seguintes deste trabalho.

CAPÍTULO 3

CULTURA DE TECIDOS:

PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES EM

CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

1. ASPECTOS GERAIS

As plantas produzem diversas substâncias que levam à formação de açúcares, proteínas ou gorduras envolvidas na respiração, digestão e outros de seus processos vitais [72]. Os metabólitos secundários, como são chamadas algumas das substâncias produzidas em pequenas quantidades e em condições especiais pelas plantas, são indispensáveis à sua sobrevivência, além de constituírem a maioria dos princípios ativos de medicamentos, antibióticos, alucinógenos, vitaminas, pigmentos, borrachas, e fragrâncias usados para a saúde, alimentação e bem-estar do homem [72].

Entretanto, somente uma pequena parte das plantas existentes na natureza, que se estima em 250 mil espécies, tem sido pesquisada à procura de metabólitos secundários. A pesquisa em cultura de tecidos vegetais tem se voltado basicamente para substâncias de interesse farmacêutico, embora, outras áreas tenham também recebido atenção [72].

Plantas comuns, como a vinca (*Catharanthus roseus*), popularmente conhecida pelos nomes de “bom-dia”, “boa-noite” ou erroneamente algumas vezes como “maria-sem-vergonha”, constituem uma boa fonte de alcalóides, vincristina (4) e vinblastina (5), efetivos no tratamento da leucemia, especialmente a infantil. O problema é que a planta produz cerca de 70 alcalóides, dos quais (4) e (5) são os de maior interesse farmacológico [18, 19], além disso, para se obter um único grama desses alcalóides, é preciso coletar uma quantidade imensa de folhas da vinca, cerca de 200 Kg [2, 3].

A ciência tem desenvolvido caminhos alternativos e um deles é preparar sinteticamente os compostos em laboratórios, entretanto este método depara com barreiras tais como a complexidade das moléculas, no caso dos alcalóides da vinca, onde o processo envolvido na síntese fica mais caro que o processo de extrativo atualmente empregado.

Uma outra opção seria a aplicação de biotecnologia. As células vegetais, cultivadas de modo semelhante a leveduras e bactéria, podem ser propagadas para produção de metabólitos secundários “in vitro” (em laboratório). Até recentemente, essa abordagem foi utilizada principalmente como um instrumento acadêmico para entender a bioquímica e fisiologia da célula vegetal, mas estudos recentes mostraram que células vegetais sob condições estéreis podem crescer de forma a produzir, em várias etapas, grandes quantidades do metabólito de interesse [73], Figura 51.

A produção de substâncias químicas a partir de células vegetais cultivadas em laboratório tem se revelado um método de alto rendimento. Em mais de 20 casos estudados, essa produção excede 1% do peso seco das folhas

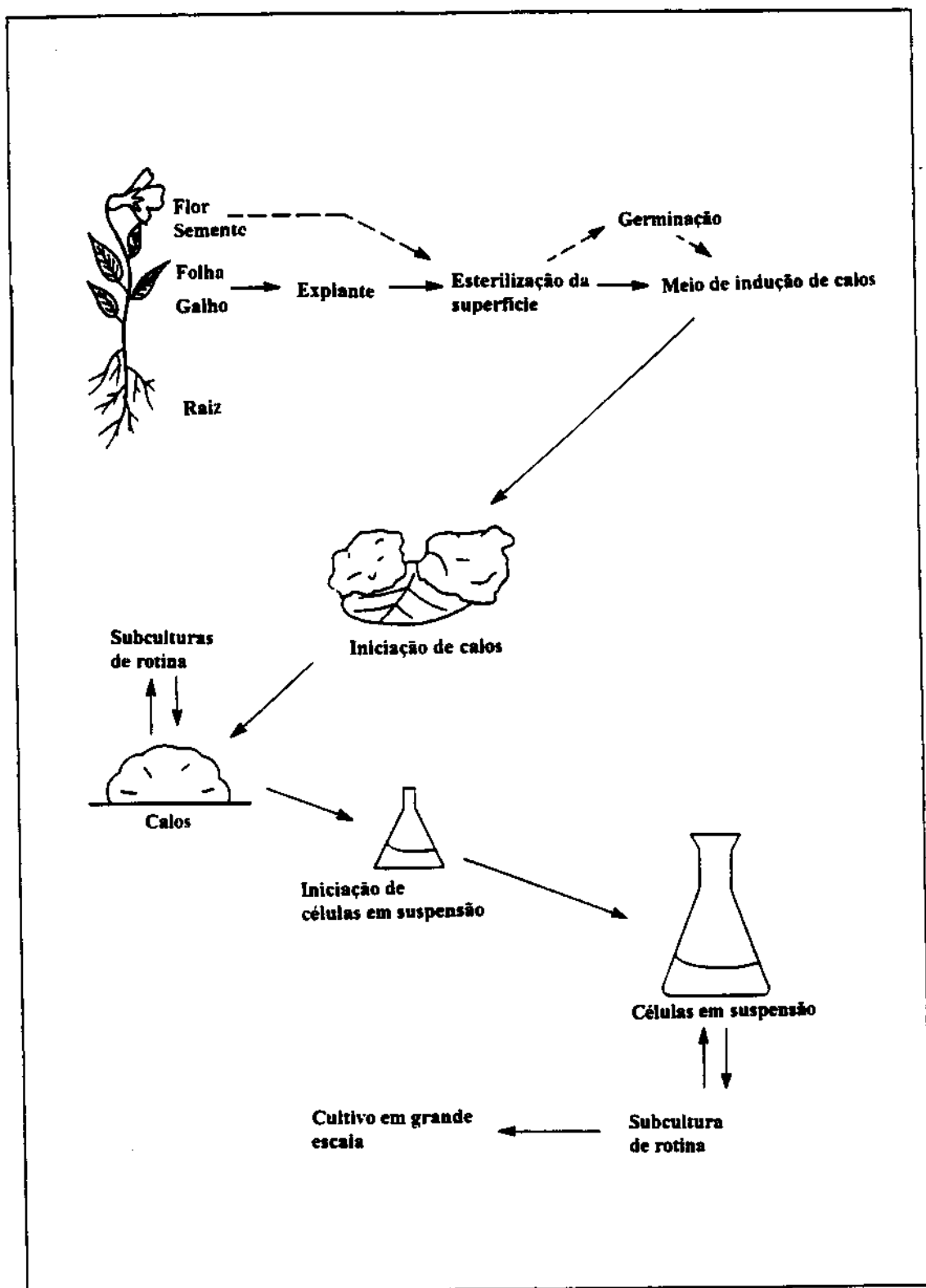
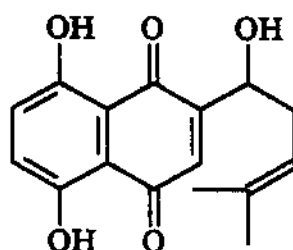


Figura 51. Iniciação de calos e cultura de células em suspensão.

da planta e, algumas vezes, chega a mais de 20% [74].

A viabilidade dessa técnica pode ser demonstrada com a shiconina, um pigmento usado como corante em produtos e cosméticos (dá o tom vermelho a batons). Desde 1983, esse pigmento tem sido fabricado em larga escala no Japão pela Mitsui & CO., com biorreatores de 750 litros, a preços competitivos e ampla aceitação pela comunidade. O outro exemplo é o do pigmento de origem vegetal de grande interesse e o carmin, outro corante vermelho, feito com besouros esmagados [72].



shiconina

Outra empresa japonesa, a Japanese Salt & Tobacco Monopoly, tem tentado, utilizar-se dos mesmos métodos, produzir tabaco em biorreatores com capacidade superior a seis mil litros, porem existem problemas que necessitam ser superados quando se transfere para escala industrial [72].

No caso da shiconina, a técnica utilizada é proveniente de estudos básicos feitos desde 1974, os quais indicaram que são necessários dois meios de cultura diferentes, um para promover o crescimento das células e o outro para produzir o pigmento e seus derivados. Graças ao método de dois estágios, adotado industrialmente, é possível produzir 1.500 mg/l dos derivados de shiconina, cerca de 13 vezes mais do que o método de cultura única.

Comparadas com a planta intacta, a *Lithospermum erythrorhizon*, uma variedade perene nativa no Japão e na China e produtiva somente após dois ou três anos, a cultura de células vegetais apresentou uma vantagem: a diminuição drástica do período de produção, já que podem ser coletadas em cerca de três semanas após o cultivo. Outra vantagem observada é o aumento significativo do composto em células cultivadas em laboratório: cerca de 14% nas células cultivadas e de 1-2% na planta intacta.

Descrito dessa maneira, parece não haver dúvidas quanto às vantagens na adoção desta técnica, entretanto, o cultivo das células vegetais não é um método fácil. As exigências nutricionais e ambientais específicas da planta

são maiores quando criadas em laboratórios [74]. Células isoladas de algumas plantas são muito exigentes, por exemplo em relação aos micronutrientes artificiais (produtos químicos) diferentes das utilizadas pelas plantas no seu habitat natural. A composição do meio de cultura artificial exige um estudo intensivo dos efeitos de cada nutriente isolado e da interação entre cada um deles.

Os hormônios vegetais e as condições ambientais, como a intensidade de luz e a concentração de dióxido de carbono, também interferem no crescimento das células *in vitro* e na produção de metabólitos secundários [73, 74]. Mas nenhuma modificação nos fatores externos afeta a programação genética original das plantas. Tanto as células de raízes, quanto as células de plantas inteiras são incapazes de fazer fotossíntese e por isso necessitam de uma fonte extra de carbono (geralmente sacarose), no meio de cultura.

1.1. Cultura de tecidos, produção de calos e células em suspensão em espécies do gênero *Aspidosperma*:

As espécies *Aspidosperma ramiflorum* e *Aspidosperma polyneuron* tem atraído continuo interesse dos químicos de produtos naturais pela sua importância na fitoterapia, devido a sua capacidade de produzir alcalóides indólicos ativos. Alguns dos alcalóides presentes nestas espécies tem suas ações farmacológicas comprovadas e bem descritas, conforme relatado por diversos pesquisadores [22, 71]. A espécie *A. polyneuron* produz alcalóides indólicos com maior variabilidade estrutural [34, 58] enquanto que a espécie *A. ramiflorum* é mais especializada produz principalmente alcalóides indólicos do tipo corinante, a destacar os alcalóides isolados recentemente por Reis e colaboradores [47], Ramiflorina A (25) e B(26). O fato de serem duas espécies arbóreas nativas de ciclo de vida longo, biossintetizam alcalóides de interesse farmacológico com ação antimicrobiana, como mostrado na parte II, Estes dados levaram-nos a desenvolver técnicas visando obter a cultura de tecidos e células em suspensão para estas espécies, para um futuro aproveitamento biotecnológico dessas espécies.

Os primeiros trabalhos nos quais conseguiu-se o cultivo “*in vitro*” de outras espécies deste gênero foram relatados por Aimi, N. e colaboradores [75, 76], que utilizou o hipocótilo de plântulas jovens como fonte de explantes. Este trabalho forneceu indicativos de que a cultura de tecidos com a espécies *A. ramiflorum* e *A. polyneuron* poderiam ser viáveis.

O estudo destas duas espécies tem como objetivo determinar a fonte de explante mais adequada, desenvolver um protocolo de esterilização, comparar o efeito de alguns fitorreguladores sobre a produção de calos nestas espécies, analisar qualitativamente e quantitativamente a produção de alcalóides na planta adulta, semente, plântulas, calos e células em suspensão, usando como ferramentas as CCD, CLAE, CG e CG/EM.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A germinação “in vitro” foi obtida pela primeira vez com sucesso neste trabalho, a taxa de germinação ficou em torno de 95%, gerando plântulas em 4 semanas. As folhas e hipocótilos foram usados como fonte de explantes, a presença ou ausência de luz permitiu controlar o tipo de explante com o qual se deseja trabalhar, pois a ausência de luz favoreceu o crescimento dos hipocótilos e a presença de luz o crescimento das folhas.

O procedimento analítico empregado foi desenvolvido de maneira que se pudesse acompanhar todas as fases do desenvolvimento desta espécie quando submetida à cultivo “in vitro” e compará-las com um extrato alcaloídico obtido da planta adulta.

2.1. Acúmulo de alcalóides indólicos em *A. ramiflorum*

2.1.1. Acúmulo de alcalóides indólicos nas sementes, plântulas e plantas adultas de *A. ramiflorum*

A sementes de *A. ramiflorum* acumulam como alcalóide majoritário a β -yohimbina (10) (321mg/100g de massa seca), que foi isolada e identificada comparando-se com um padrão autêntico. As Figuras 52a,b,c, ilustram estes resultados, mostrando os cromatogramas da análise do extrato da semente por CLAE e CG/EM. A concentração deste alcalóide foi diminuindo após a germinação, Figura 53a, sendo ainda encontrado a baixas concentrações nas plântulas e ao mesmo tempo iniciando a produção do 10-metóxi-geissoschizol (24), o que não pode ser observado por CLAE porque o 10-metóxi-geissoschizol (24) coelui com a β -yohimbina (10), Figura 53a, porem a análise por CG/EM permitiu monitorar os resultados experimentais, Figura 53b. As Figuras 54a,b,c mostram os cromatogramas de CLAE (semente, plântula e planta adulta) e as Figuras 55a,b,c,d os cromatogramas de CG/EM (plântula e planta adulta) com os espectros de massas dos compostos 10-metóxi-geissoschizol (24, pico 2) e β -yohimbina (10, pico 3), ilustrando as variações que ocorrem a cada um destes estágios de desenvolvimento da planta.

Nas sementes de *A. ramiflorum* ocorre um acúmulo quase exclusivo do alcalóide β -yohimbina (10). Entretanto durante a germinação, no momento em que a radícula emerge da semente (observar as fases de desenvolvimento de uma espécie arbórea descrita na Figura 56) os alcalóides são formados. Provavelmente nas sementes de *A. ramiflorum* estão presentes, todos os precursores necessários para a formação dos alcalóides, e durante a germinação estes são convertidos essencialmente em alcalóides indólicos.

Algumas espécies utilizam o triptofano (73) como precursor, mas os fatos nos levam a sugerir que *A.*

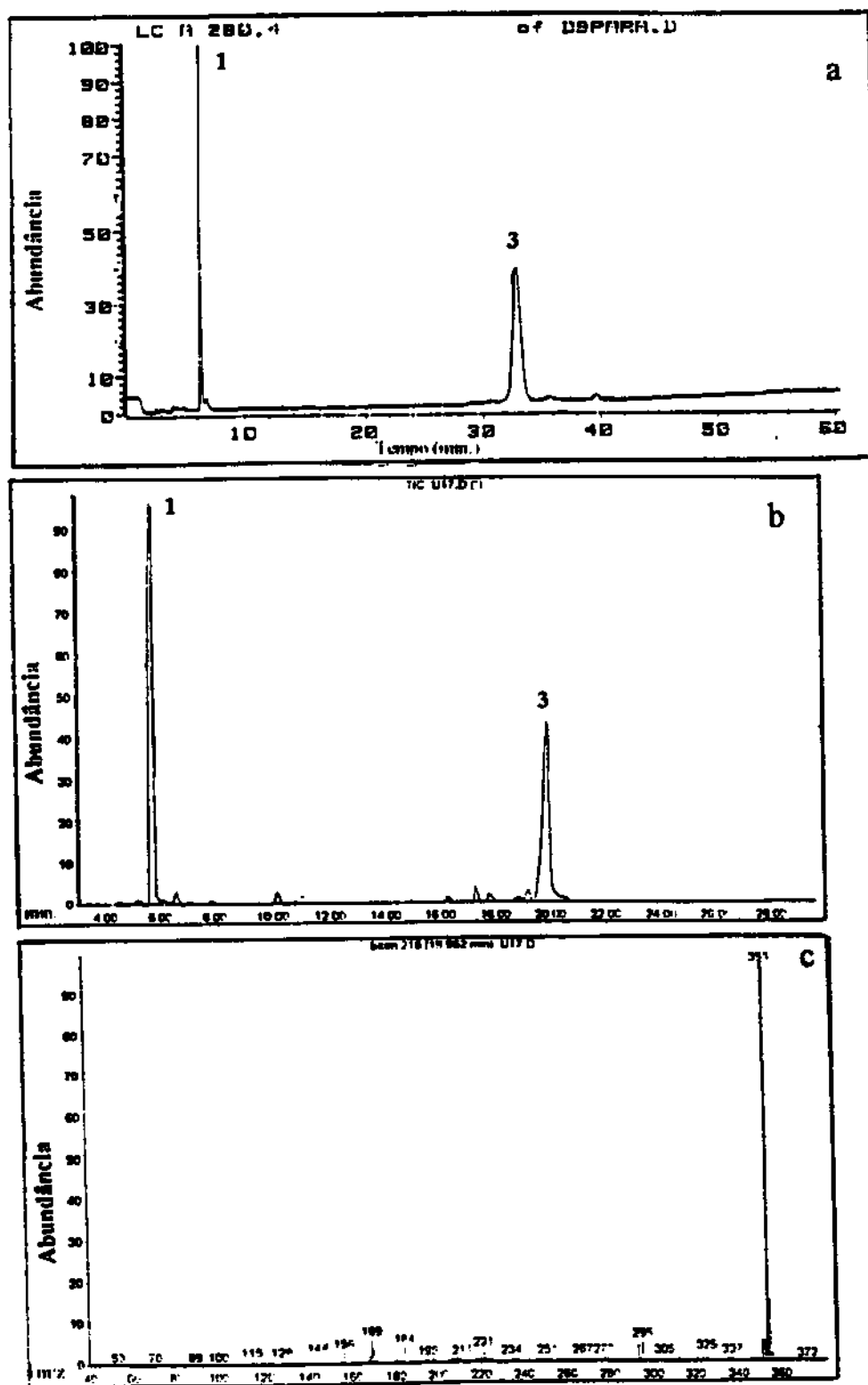


Figura 52.

(a) Cromatograma de CLAE do extrato alcalóidico das sementes de *A. ramiflorum*.

(b) Cromatograma de CG/EM do extrato alcalóidico das sementes de *A. ramiflorum*.

Picos: 1- triptofol (7), 3- β -yohimbina (10).

(c) Espectro de massas do alcalóide β -yohimbina (10).

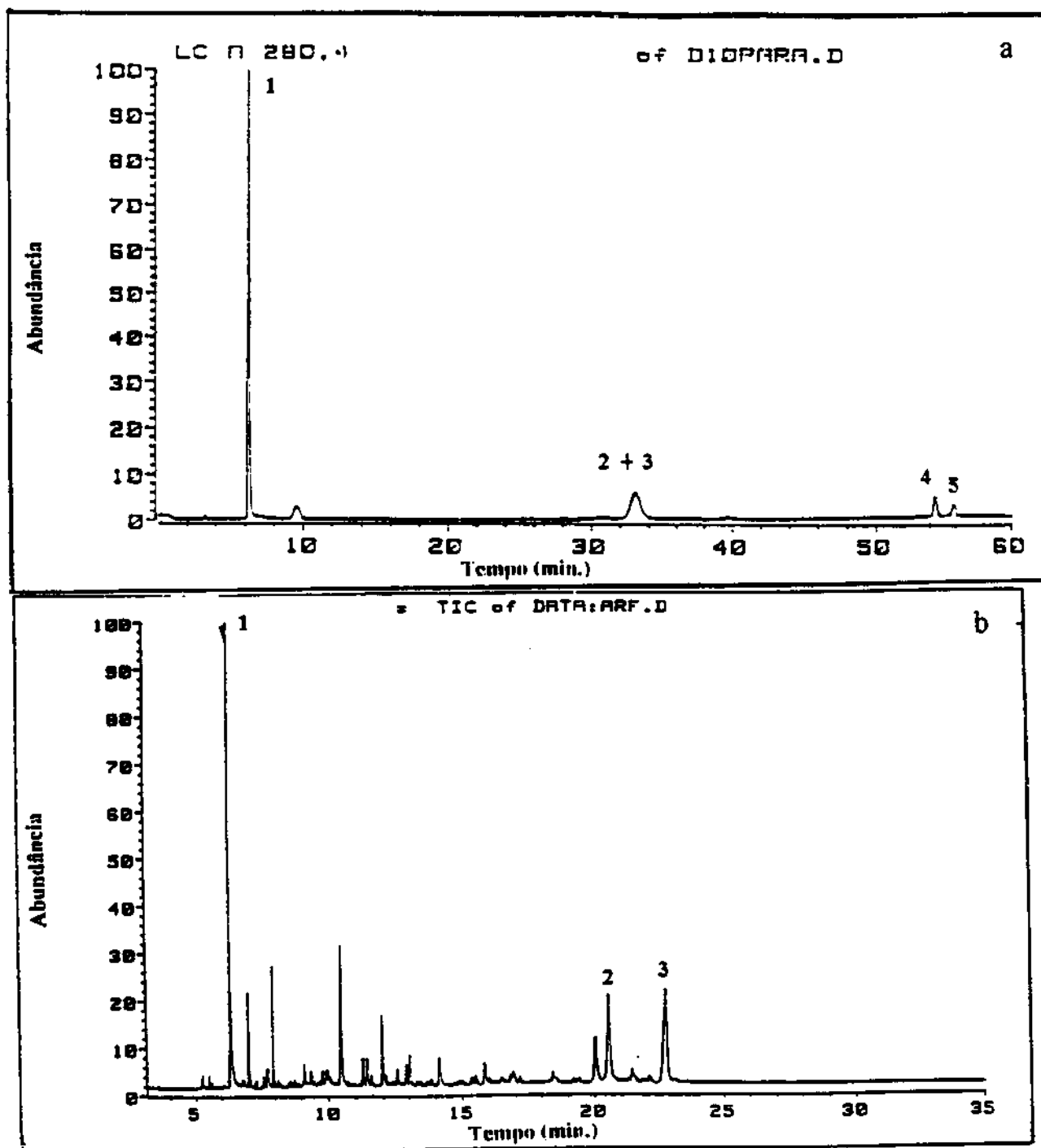


Figura 53.

(a) Cromatograma de CLAE do extrato alcalóidico das plântulas de *A. ramiflorum*.

(b) Cromatograma de CG/EM do extrato alcalóidico das plântulas de *A. ramiflorum*.

Picos: 1- triptofol (7), 2- 10-metóxi-geissoschizol (24), 3- b-yohimbina (10), 4- ramiflorina A (25), 5- ramiflorina B (26).

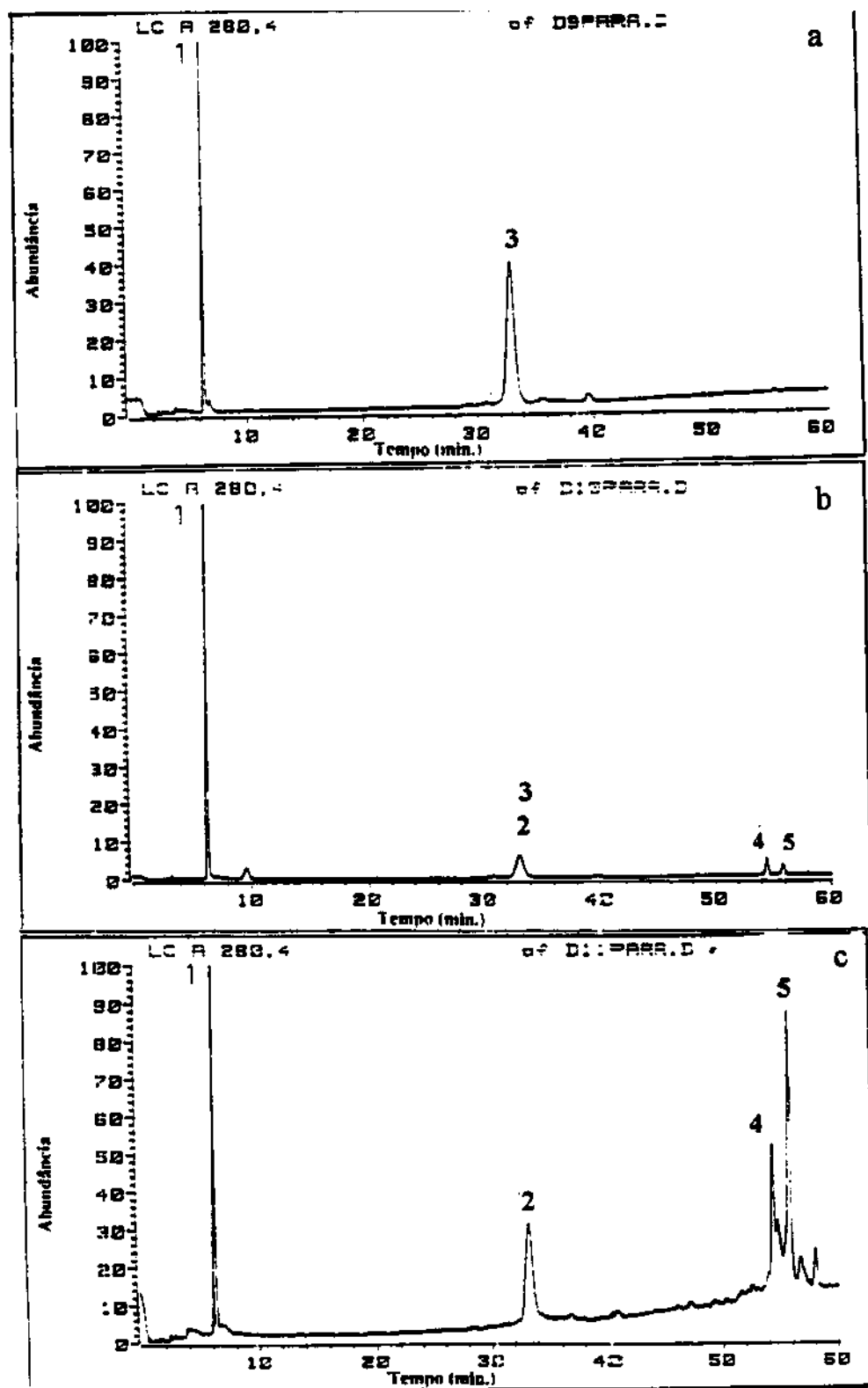


Figura 54. (a) Cromatograma de CLAE do extrato alcaloídico das sementes de *A. ramiflorum*.
 (b) Cromatograma de CLAE do extrato alcaloídico das plântulas de *A. ramiflorum*.
 (c) Cromatograma de CLAE do extrato alcaloídico da planta adulta de *A. ramiflorum*.
 Picos: 1- triptofol (7), 2- 10-metóxi-geissoschizol (24), 3- b-yohimbina (10), 4- ramiflorina A (25), 5-ramiflorina B (26).

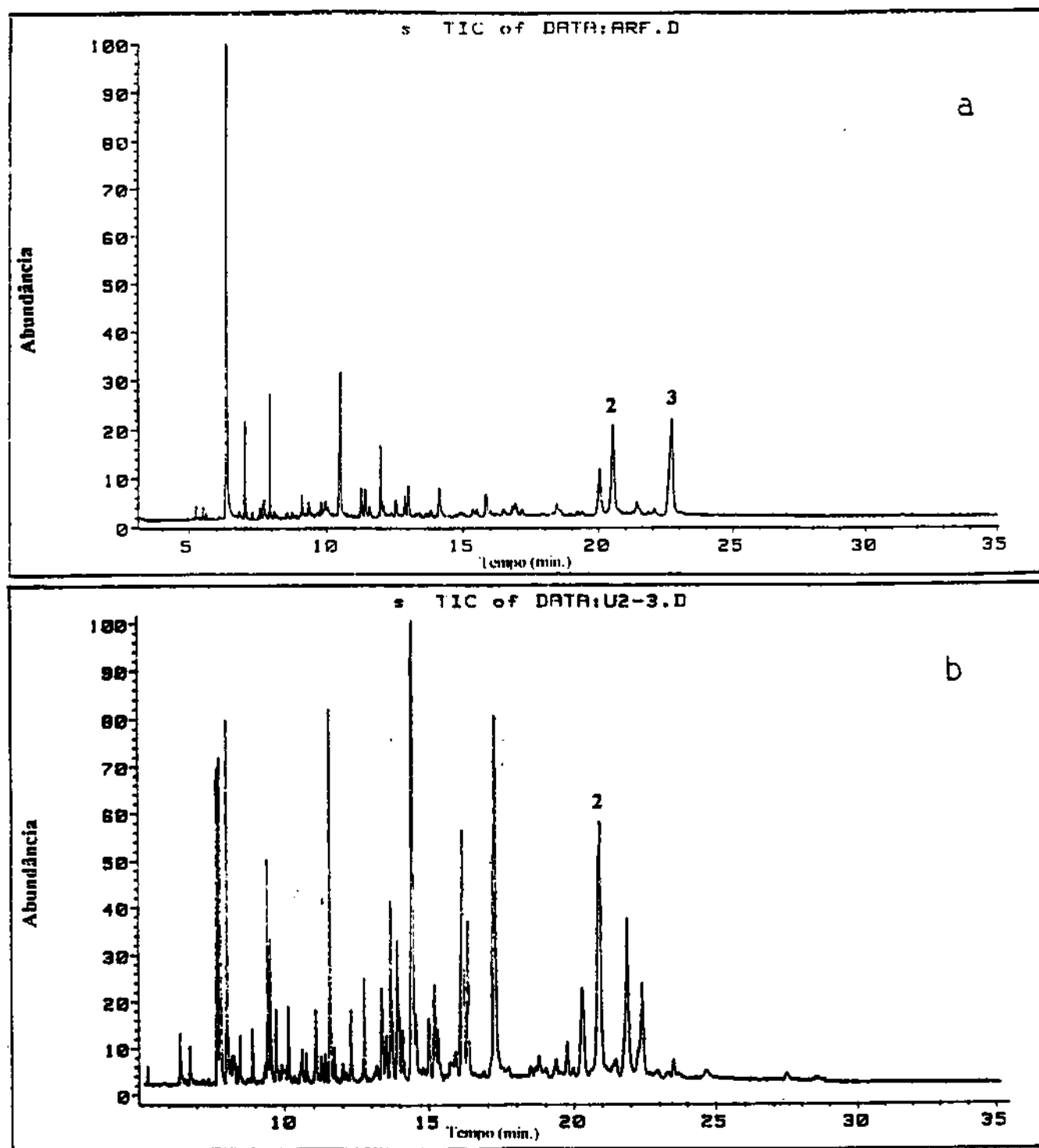


Figura 55. (a) Cromatograma de CG/EM do extrato alcaloídico das plântulas de *A. ramiflorum*
 (b) Cromatograma de CG/EM do extrato alcaloídico da planta adulta de *A. ramiflorum*.
 Picos: 2- 10-metóxi-geissoschizol (24), 3- b-yohimbina (10).

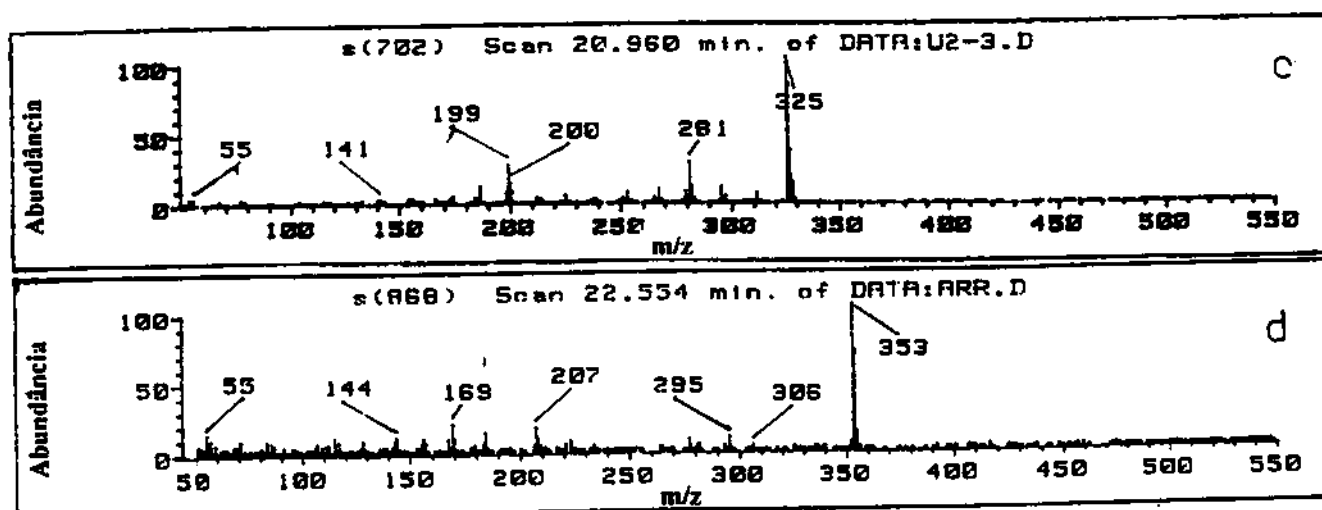
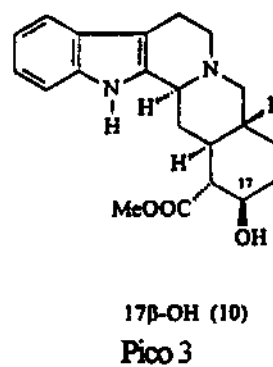
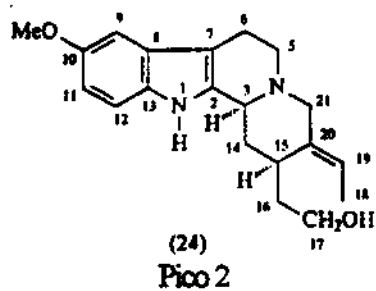


Figura 55. (c) Espectro de massas do 10-metoxi-geissoschizol (24), Pico 2.
(d) Espectro de massas da β -yohimbina (10), Pico 3.

Nasce uma árvore

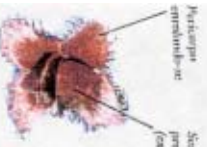


Com mais de 130 anos de idade, esta é a árvore mais antiga do mundo.

Os primeiros meses de vida de uma árvore são mais perigosos do que as décadas ou até os séculos seguintes. Só uma pequena fração das sementes sobrevive. Em ano propício, um exemplar de carvalho produz cerca de 50.000 bolotas. A maioria serve de alimento para animais ou cai onde não consegue germinar. As sobreviventes correm o risco de ser pisoteadas por animais. Apenas um punhado estará vivo depois de um ano. A semente tem uma reserva que lhe permite sobreviver, germinar e crescer. Em certos casos, como nos salgueiros, essa reserva é tão pequena que as sementes devem germinar logo que caem. Mas sementes de árvores como o carvalho e a faia contêm nutrientes suficientes para sobreviver a invernos gelados. A germinação — o verdadeiro nascimento da árvore — ocorre assim que o tempo começa a esquentar, na primavera.

1 NA TERRA

A produção de sementes da árvore é feita em grande quantidade. Algumas sementes, como as do carvalho, permanecem no chão por meses antes de germinar.



2 COMEÇA A GERMINAR

No inverno, muitas sementes que se espalharam sob uma casca de árvore por causa da queda de folhas e gelo permanecem no chão. Às vezes, elas germinam antes de serem enterradas na terra. O processo de germinação é muito lento, mas a semente sobrevive por meses, esperando a primavera.



3 UM ANO

O cotilédone, as raízes e o caule da semente crescem e se tornam parte da planta. A semente agora é uma plântula.



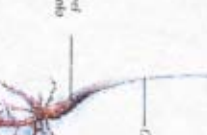
4 CRESCIMENTO

Cerca de um ano após a germinação, a plântula cresce e se torna uma pequena árvore. A semente agora é uma árvore.



5 SURTI A MÍDIA NOVA

Cerca de dois anos após a germinação, a plântula cresce e se torna uma pequena árvore. A semente agora é uma árvore.



6 A PROCURA DA LUZ

Depois que as sementes da árvore se espalharam, elas começam a crescer. A semente agora é uma plântula.



7 VIRANDO FOLHA

Um mês depois, as sementes da árvore se espalharam e começaram a crescer. A semente agora é uma plântula.



8 NO VERÃO

Cerca de 30 dias, a semente da árvore se espalharam e começaram a crescer. A semente agora é uma plântula.



Figura 56. As primeiras semanas de uma árvore [82].

ramiflorum possa utilizar a β -yohimbina como precursor dos alcalóides majoritários presentes nesta espécie, 10-metóxi-geissoschizol (24), ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26).

A hipótese sugerida neste trabalho é que a planta acumularia a β -yohimbina (10) como uma possível forma de proteção das semente contra ataques externos, e quando não necessitam deste mecanismo de defesa, biossinteticamente transformam-na em alcalóides necessários em outros estágios de desenvolvimento da planta. No caso de plântulas, devido a fragilidade, um mecanismo de defesa químico contra herbívoros, proporcionado pelos alcalóides indólicos diméricos pode ser sugerido e semelhantemente como ocorre em algumas espécies de “Quina” (*Chinchona* sp) [77, 78], importante para sobrevivência da espécie neste estágio de desenvolvimento. A Figura 57 mostra um esquema no qual são sugeridas as possíveis interconversões entre os alcalóides presentes nesta espécie durante a transição de semente à espécie adulta.

2.1.2. Distribuição de alcalóides indólicos nos calos de *A. ramiflorum*.

Os calos produzem os mesmos alcalóides que ocorrem na planta adulta, sem necessidade de fornecimento de algum precursor externo. A Figura 58 ilustra este fato e a Tabela 25 permite a comparação das concentrações de cada um dos alcalóides principais presentes nas sementes, plântulas, calos, células em suspensão e planta adulta de *A. ramiflorum*.

2.1.3. Distribuição de alcalóides indólicos nas células em suspensão de *A. ramiflorum*

A produção de alcalóides utilizando-se células em suspensão foi relativamente baixa quando empregadas as mesmas condições de cultivo utilizadas para induzir a formação de calos, por isso realizamos dois experimentos com o objetivo de aumentar a produção de alcalóides e a taxa de crescimento das células “in vitro” (aumento da biomassa).

A biossíntese dos alcalóides de *A. ramiflorum* processa-se de uma maneira muito parecida à aquela que ocorre em *Chinchona ledgeriana* [77, 78], a Figura 60 mostra um esquema proposto para a biossíntese dos alcalóides ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26), nas duas espécies o intermediário chave é um alcalóide com função aldeídica, em *A. ramiflorum* este alcalóide é o 10-metóxi-geissoschizal (70) que deve acoplar-se a triptamina (75) em uma reação catalisada pela enzima strictosidina sintetase (SS), para dar os alcalóides diméricos (25) e (26).

Como o metabolismo desta espécie em muitos aspectos, é muito similar às das espécies de *Chinchona*, entre as similaridades podemos destacar o trabalho de Kowanko e Leete [79], no qual foi estabelecido o triptofano (73) como precursor principal na biossíntese dos alcalóides em *Chinchona*, portanto, utilizou-se a adição de

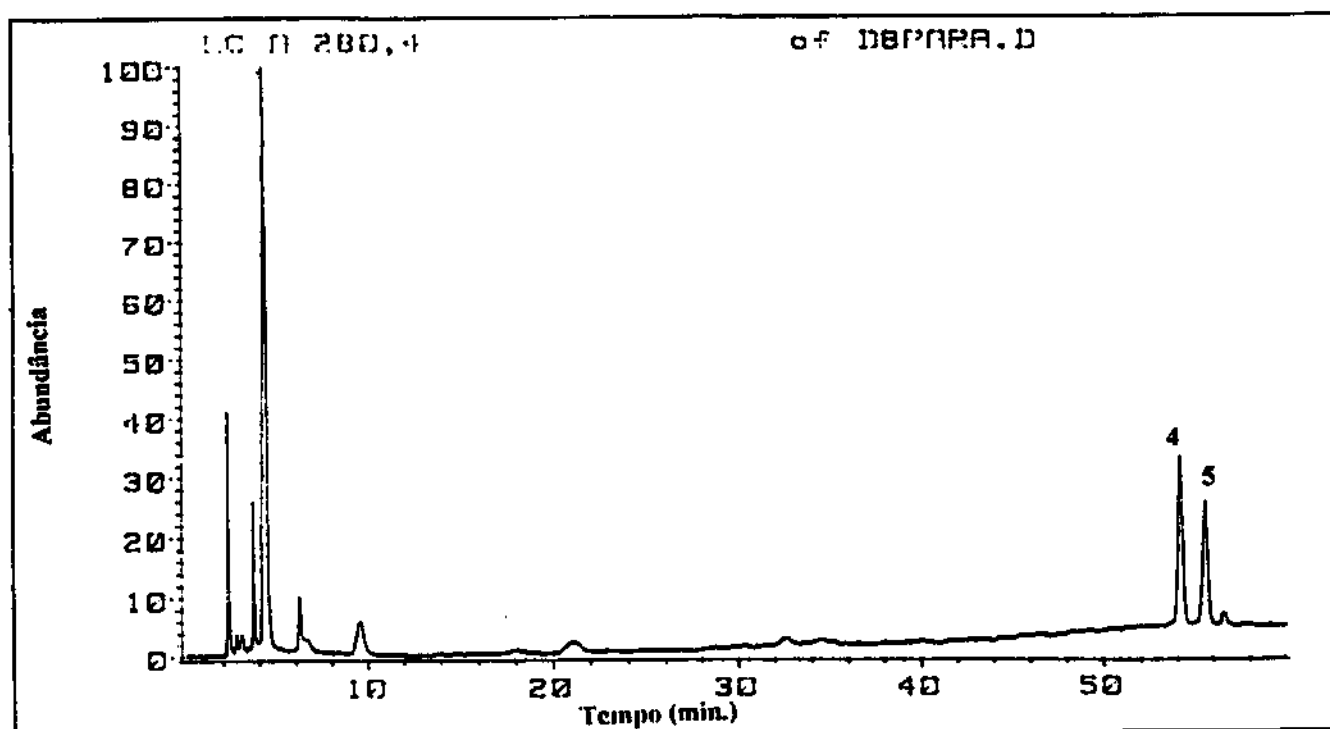


Figura 58. Cromatograma de CLAE do extrato alcaloídico dos calos de *A. ramiflorum*.

Picos: 4- ramiflorina A (25), 5- ramiflorina B (26).

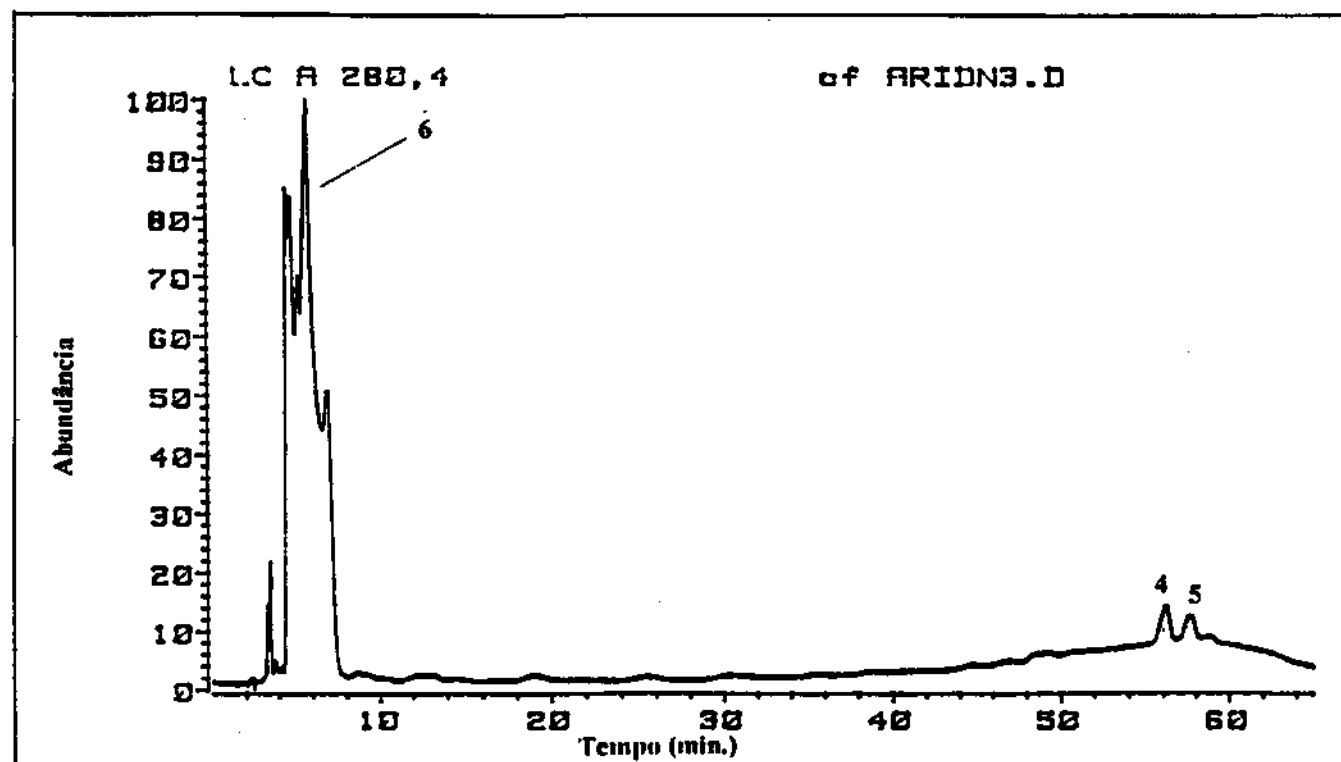


Figura 59. Cromatograma de CLAE do extrato alcaloídico das células em suspensão de *A. ramiflorum*.

Picos: 6- triptofano (73), 4- ramiflorina A (25), 5- ramiflorina B (26).

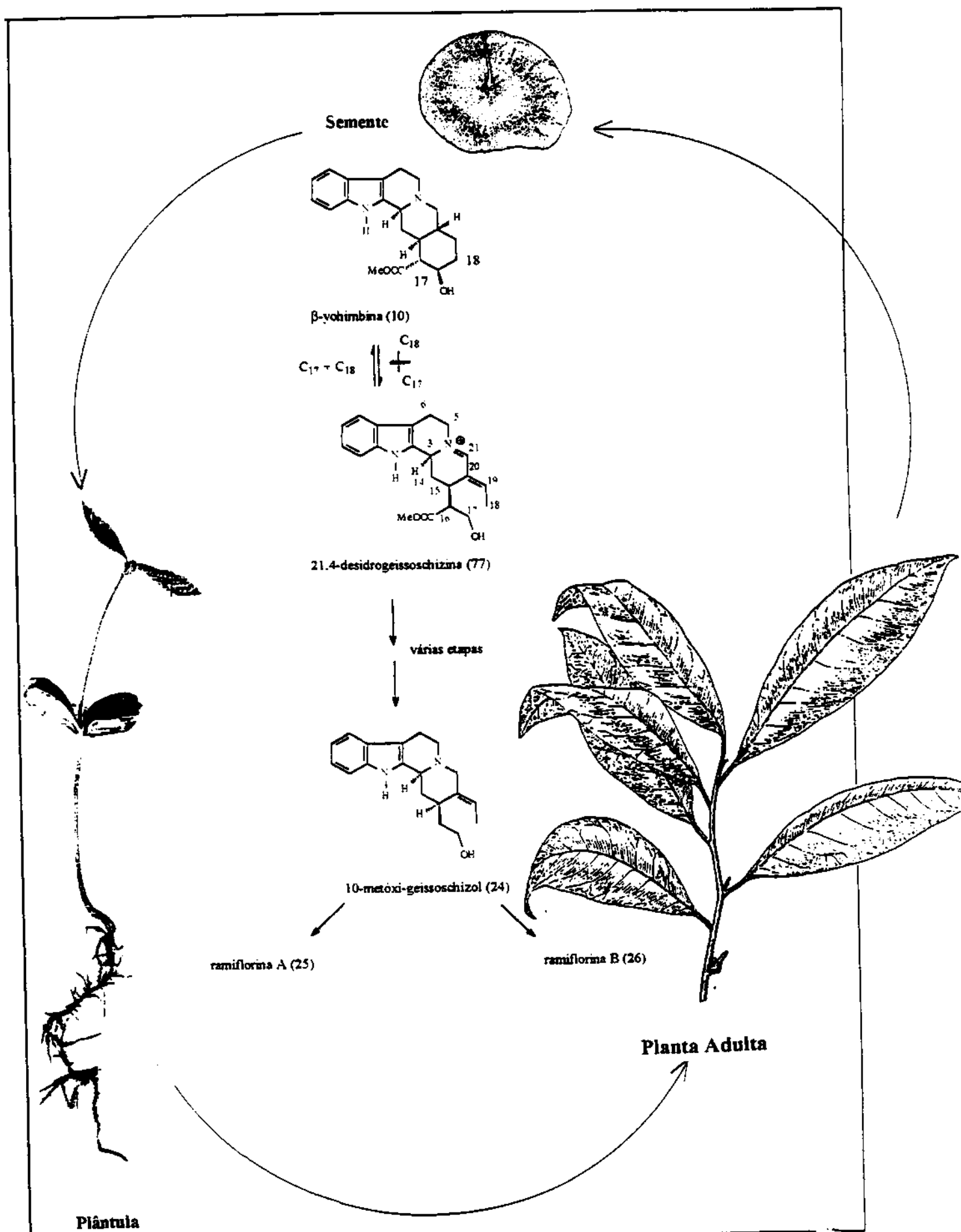


Figura 57. Sugestão de interconversão dos alcalóides de *A. ramiflorum* em suas diferentes fases de desenvolvimento.

triptofano (73) à cultura de células em suspensão em espécies deste gênero num trabalho publicado por Hunter e colaboradores [80]. Os experimentos mostraram que a adição de triptofano (73) aumenta marcadamente a produção de alcalóides em espécies de *Chinchona*. Realizou-se então um experimento similar com as células em suspensão de *A. ramiflorum*, no qual adicionou-se ao meio de cultura o triptofano (73) na concentração de 125 mg/l, como resultado houve um aumento significativo na produção de alcalóides, conforme o mostrado na Figura 59 e Tabela 25.

A cultura de calos e células em suspensão foi estabelecida à partir de explantes estéreis da folhas e hipocótilos de *A. ramiflorum* em um meio contendo os fitorreguladores nas seguintes concentrações de 2,4-D (1,0 mg/l) e BA (1,5 mg/l). Existem trabalhos [81] que relatam que altas concentrações de 2,4-D levam a uma menor taxa de crescimento e também a uma menor produção de alcalóides. Assim realizou-se um segundo experimento com as células em suspensão na tentativa de estabelecer a concentração mínima necessária de 2,4-D que permita uma taxa de crescimento máxima associada a uma boa produção dos alcalóides. A combinação mais adequada foi aquela na qual a concentração de 2,4-D é de 0,5 mg/l e de BA é 0,5 mg/l mostra maior taxa de crescimento celular, e onde a produção de alcalóides sofre um pequeno incremento em relação ao que ocorre nas células em suspensão, comparados aos dados obtidos no meio sem adição do triptofano (73).

Tabela 25. Concentração em mg de alcalóides/100g de massa seca das sementes, plântulas, calos , células em suspensão e da planta adulta de *A. ramiflorum*.

Alcalóide	Estágio de desenvolvimento da planta mg/100g material seco
β -yohimbina (10)	Sementes - 321
	Plântulas - 13,0
	Planta adulta - ausente
	Calos - ausente
	Células em suspensão - ausente
10-metóxi-geissoschizol (24)	Sementes - traços
	Plântulas - 13,4
	Planta adulta - 72,8
	Calos - ausente
	Células em suspensão - ausente
ramiflorina A (25)	Sementes - ausente
	Plântulas - 10,2
	Planta adulta - 155
	Calos - 8,68
	Células em suspensão - 28,9
ramiflorina B (25)	Sementes - ausente
	Plântulas - 6,97
	Planta adulta - 274
	Calos - 6,32
	Células em suspensão - 14,5

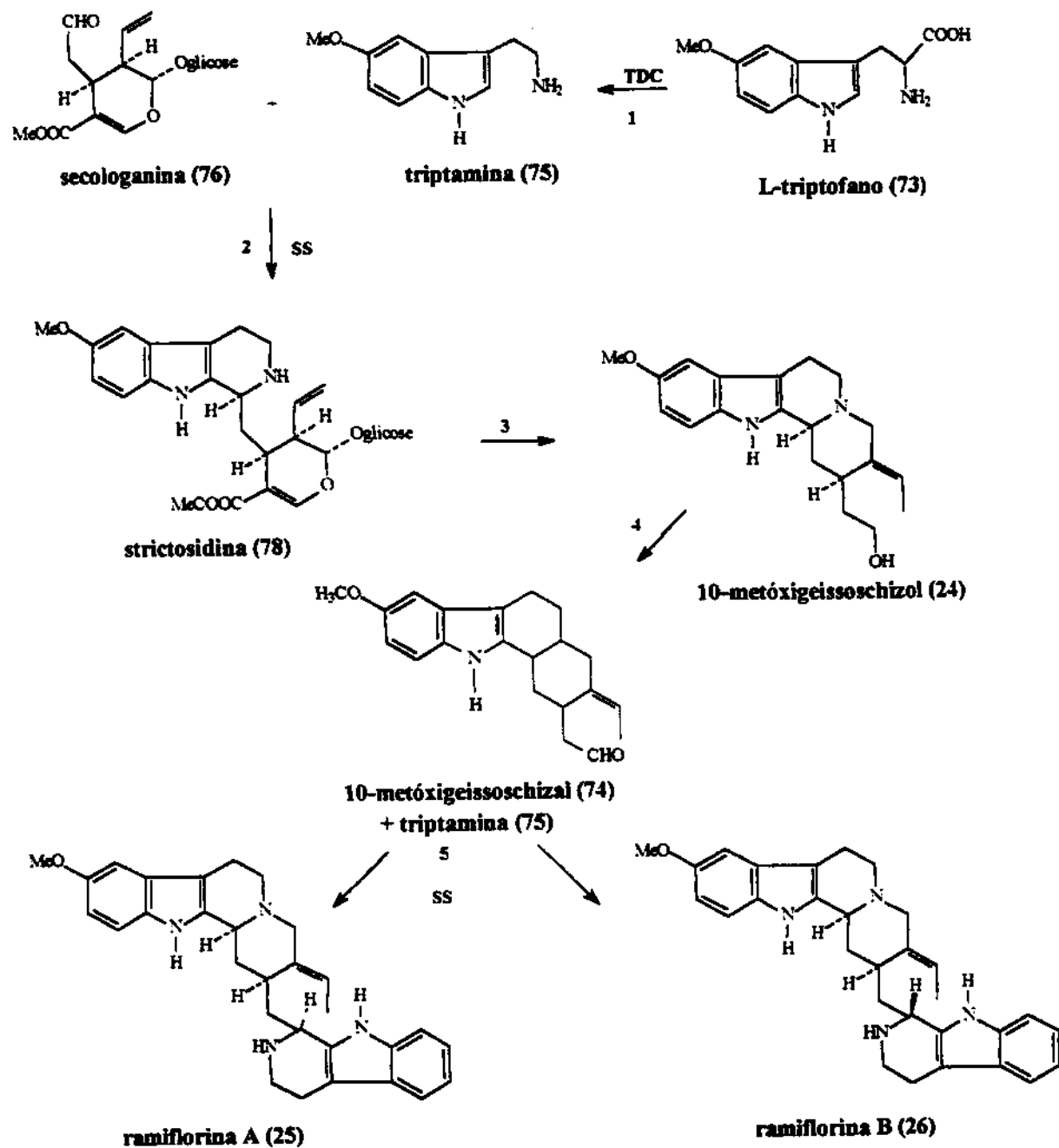


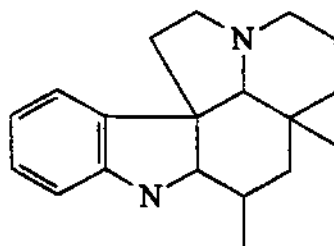
Figura 60. Proposta de biossíntese para os alcalóides de *A. ramiflorum*

- 1) triptofano descarboxilase (TDC)
- 2) strictosidina sintetase (SS)
- 3) etapas diversas
- 4) desidrogenase NADP dependente
- 5) strictosidina sintetase (SS)

2.2. Acúmulo de alcalóides indólicos nas sementes, plântulas e planta adulta de *A. polyneuron*.

Um estudo similar ao relatado anteriormente para *A. ramiflorum* foi feito para *A. polyneuron* com o objetivo de observar se ocorria também o acúmulo na forma de um alcalóide específico em suas sementes. O estudo da composição alcalóidica das sementes de *A. polyneuron* também não havia sido realizado anteriormente [58], no extrato das sementes por CG/EM.

A partir da análise por CG/EM dos extrato alcalóidico da semente pode-se concluir que o acúmulo não ocorre na forma de um composto específico, como acontecia em *A. ramiflorum*, mas sim na forma de um conjunto de compostos possuindo um mesmo esqueleto básico, o Plumerano.



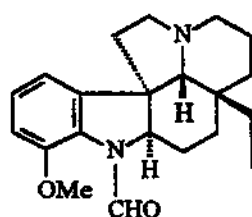
Esqueleto Plumerano

Nesta espécie existem três tipos principais de alcalóides com esqueleto básico Plumerano, entre estes podemos estabelecer como modelos os alcalóides (-)-aspidospermina (9B), *N*-acetil-cilindrocarina (23) e 21-oxo-aspidoalbina (79), compostos estes que se encontram distribuídos em diversas fases do desenvolvimento da planta.

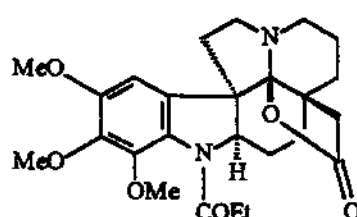
Os resultados obtidos da análise por CG/EM conclui-se que nas sementes ocorrem o predomínio dos alcalóides possuindo o grupo etila lateral oxidado, ou seja, *N*-acetil-cilindrocarina (23) e 21-oxo-aspidoalbina (79), Figura 61, alcalóides estes que podem ter a função de proteção da semente e/ou de reserva de alcalóides usados como precursores.

Após o início da germinação no estágio de plântula, existem praticamente só alcalóides indólicos com o esqueleto relacionado a *N*-acetil-cilindrocarina (23) (picos 5, 7, 9, Figura 61), e os outros relacionados com os composto (9B) e (79) presentes em baixas concentrações (picos 3, 4, 15, Figura 61).

Por outro lado, a planta adulta apresenta uma distribuição dos alcalóides totalmente inversa à das sementes, pois possui maior concentração dos alcalóides do tipo Plumerano com a cadeia etila lateral não oxidada



(80)



(81)

Tabela 26. Compostos detectados na análise por CG/EM do extrato alcaloídico das sementes, plântulas e plantas adultas de *A. polyneuron*, ref. [30, 31, 32, 58]

Pico	Composto	Espectro de massas (A. R. %)
1	aspidospermatidina (64)	266(M ⁺ , 90), 180(10), 136(100)
2	<i>N</i> -desacetil-cilindrocarina (82)	356(M ⁺ , 10), 282(30), 168(100)
3	aspidospermina (9B)	354(M ⁺ , 22), 326(16), 124(100)
4	desmetil-aspidospermina (35)	340(M ⁺ , 35), 296(18), 124(100)
5	12-desmetóxi- <i>N</i> -acetil-cilindrocarina (83)	368(M ⁺ , 35), 340(16), 168(100)
6	12-desmetóxi- <i>N</i> -acetilcilindrocarpinol (67)	340(M ⁺ , 10), 312(16), 140(100)
7	<i>N</i> -acetil-cilindrocarina (23)	398(M ⁺ , 36), 324(100), 168(95)
8	21-oxo- <i>N</i> -acetil-aspidalbidina (84)	352(M ⁺ , 5), 308(36), 160(100)
9	<i>N</i> -formil-cilindrocarina (85)	384(M ⁺ , 20), 310(100), 168(98)
10	12-desmetil- <i>N</i> -acetil-cilindrocarpinol (72)	356(20), 140(100)
11	<i>N</i> -acetil-cilindrocarpinol (30)	370(M ⁺ , 22), 342(5), 140(100)
12	β-yohimbina (10)	354(M ⁺ , 4), 353(100), 169(50)
13	21-oxo-aspidalbidina (79)	442(M ⁺ , 36), 383(20), 160(100)
14	10,11-desmetóxi-21-oxo-aspidalbidina (86)	382(M ⁺ , 20), 338(40), 160(100)
15	12-O-metil-21-oxo-aspidalbidina (81)	456(M ⁺ , 36), 383(36), 160(100)
16	isômero de 21-oxo-aspidalbidina (79)	442(M ⁺ , 36), 383(20), 160(100)
17	<i>N</i> -desacetil-aspidospermina (87)	312(M ⁺ , 40), 284(22), 124(100)
18	12-desmetóxi-aspidospermina (42)	456(M ⁺ , 20), 296(10), 124(100)
19	<i>N</i> -propionil-cilindrocarina (88)	412(M ⁺ , 30), 281(10), 168(100)

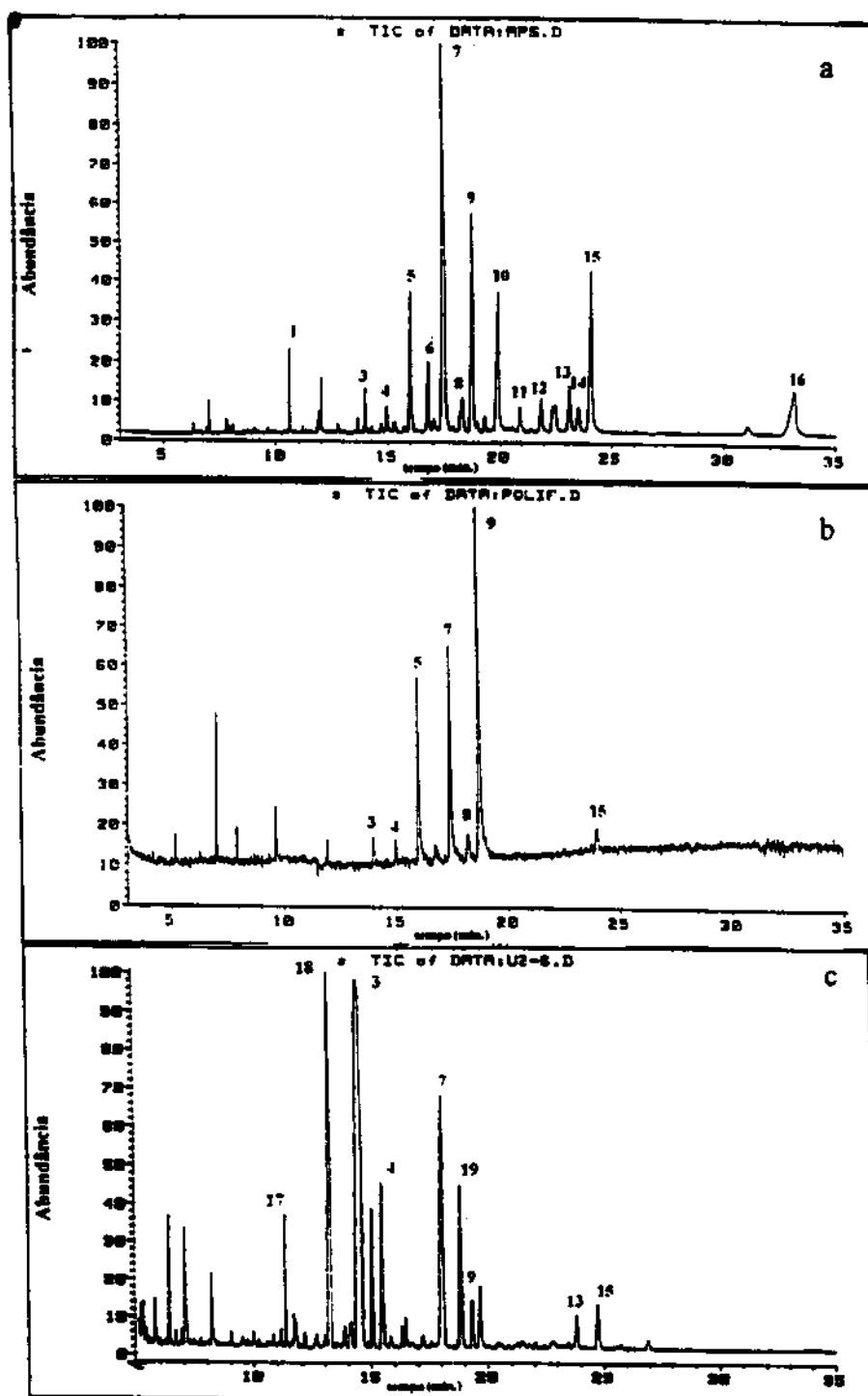


Figura 61.

- (a) Cromatograma de CG/EM do extrato alcaloídico das sementes de *A. polyneuron*.
- (b) Cromatograma de CG/EM do extrato alcaloídico das plântulas de *A. polyneuron*.
- (c) Cromatograma de CG/EM do extrato alcaloídico da planta adulta de *A. polyneuron*.

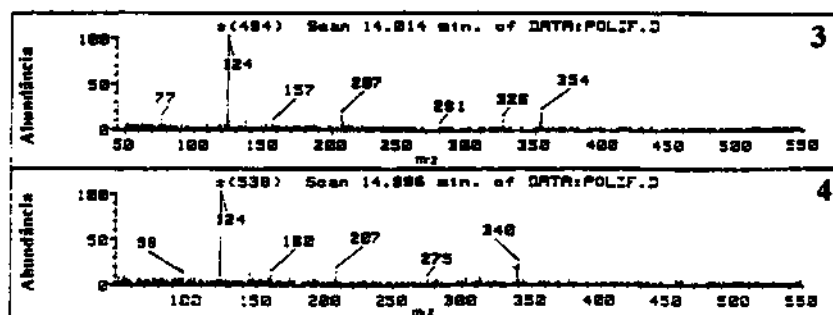
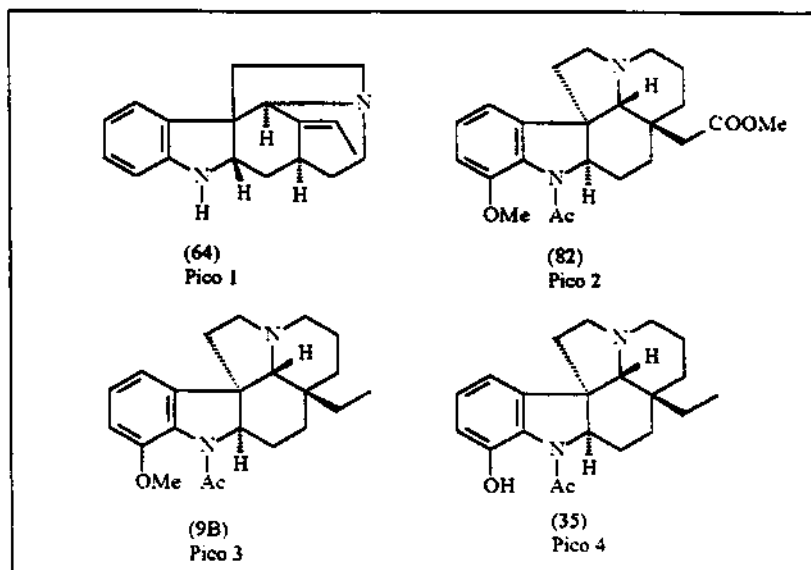
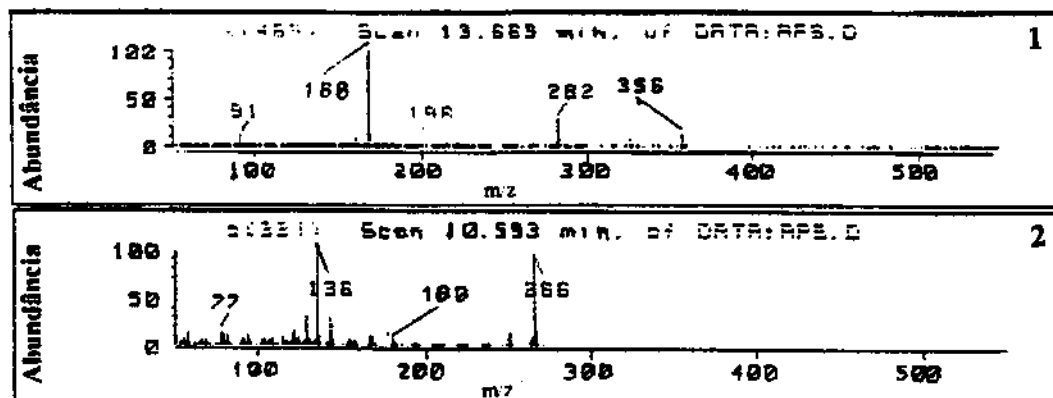


Figura 62a. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos alcaloidicos das sementes e plântulas de *A. polyneuron*. Picos: 1- aspidospermatidina (64), 2- N-desacetil-cilindrocarina (82), 3- (-)-aspidospermina (9B), desmetil-aspidospermina (35).

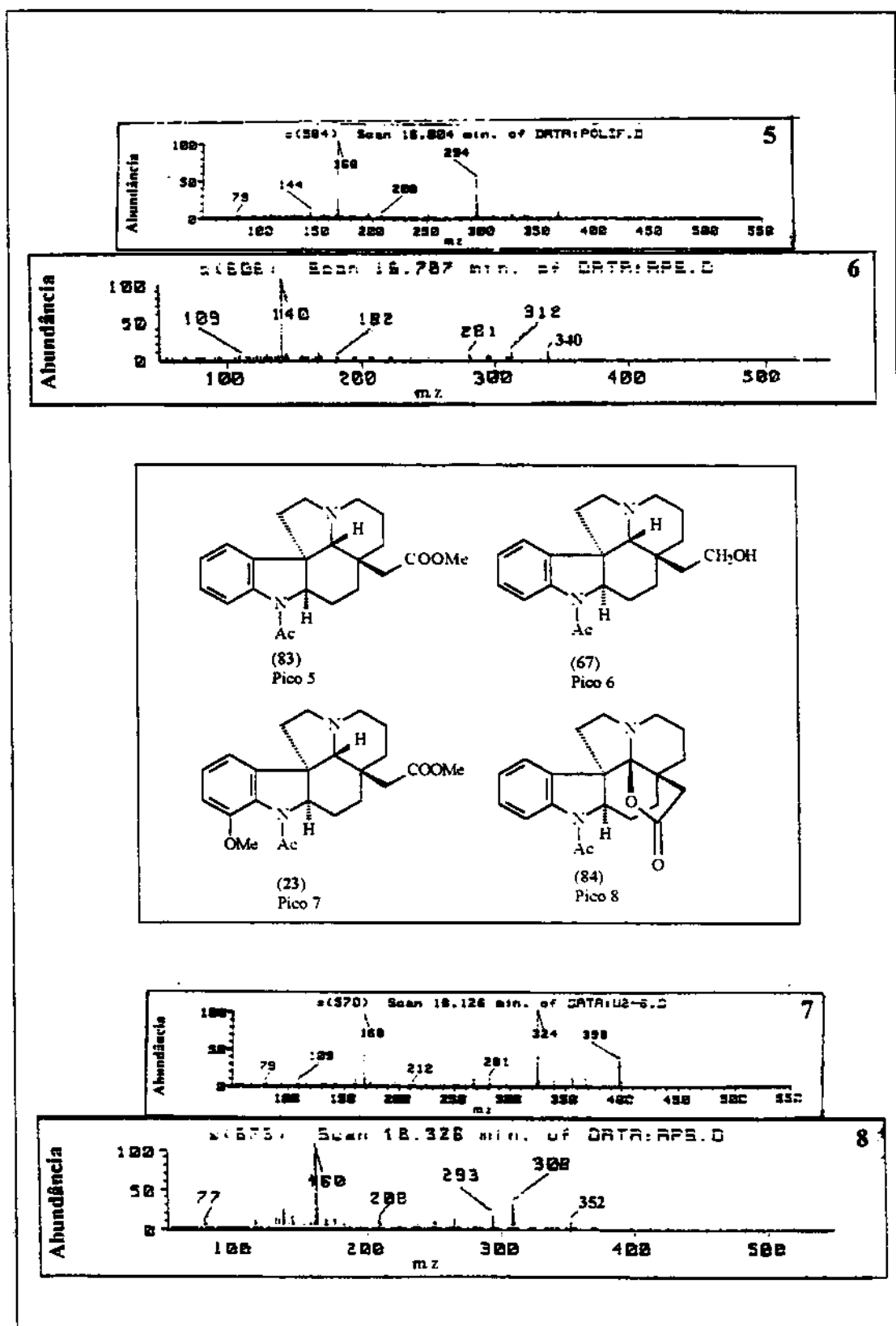


Figura 62b. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos alcaloidicos das sementes e plântulas de *A. polyneuron*. Picos: 5- 12-desmetóxi-N-acetil-cilindrocarina (83), 6- 12-desmetóxi-N-acetil-cilindrocarpinol (67), 7- (-)-N-acetil-cilindrocarina (23), 8- 21-oxo-N-acetil-aspidoalbidina (84).

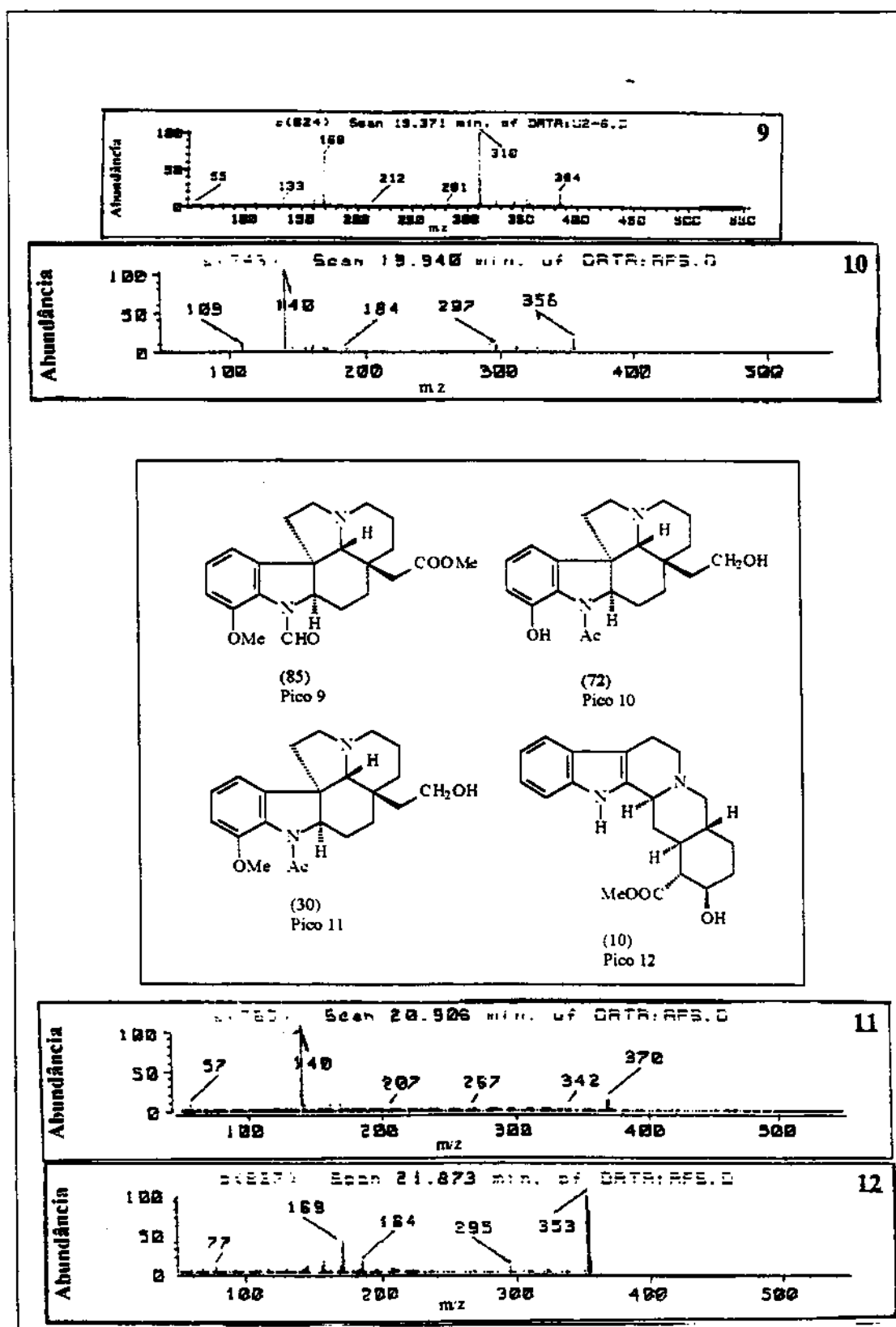


Figura 62c. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos alcaloidicos das sementes e plântulas de *A. polyneuron*. Picos: 9- N-formil-cilindrocarina (85), 10- 12- desmetil-N-acetil-cilindrocarpinol (72), 11- (-)-N-acetil-cilindrocarpinol (30), 12- β-yohimbina (10).

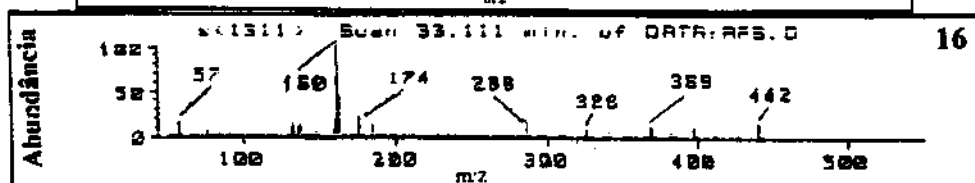
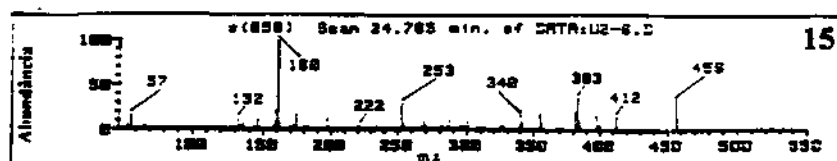
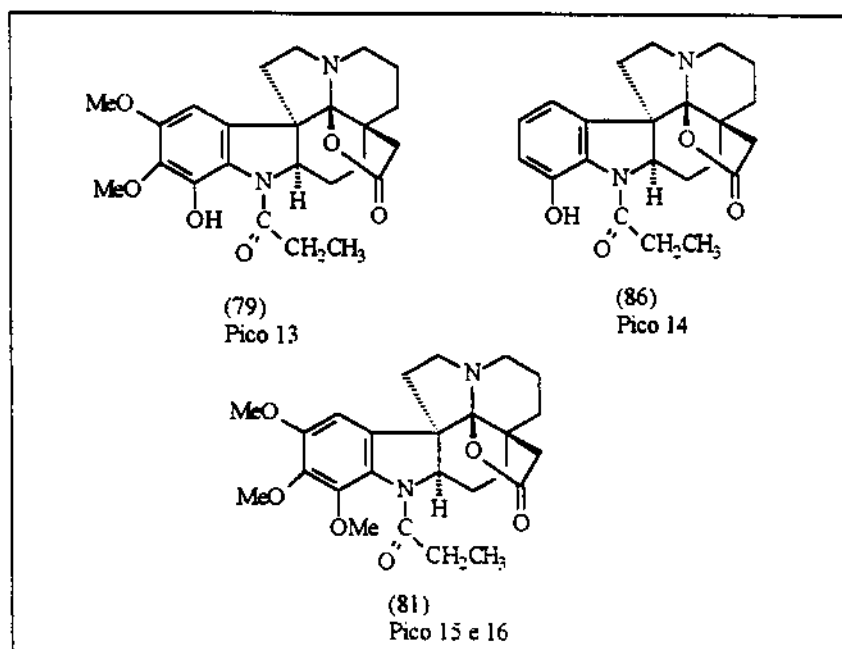
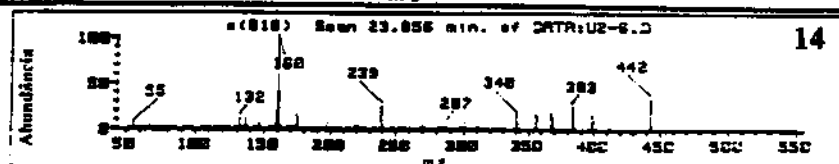
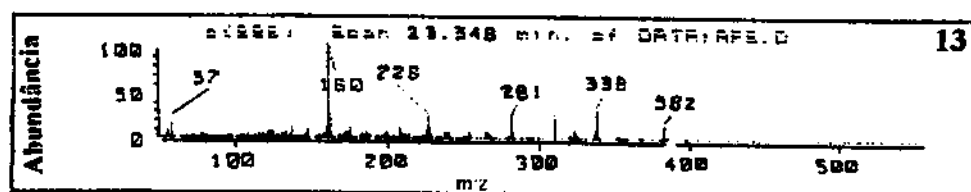


Figura 62d. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos alcalóidicos das sementes e plântulas de *A. polyneuron*. Picos: 13- 21-oxo-aspidoalbin (79), 14- 10,11-desmetóxi-21-oxo-aspidoalbin (86), 15- 12-O-metil-21-oxo-aspidoalbin (81), 16 isômero da 21-oxo-aspidoalbin (79).

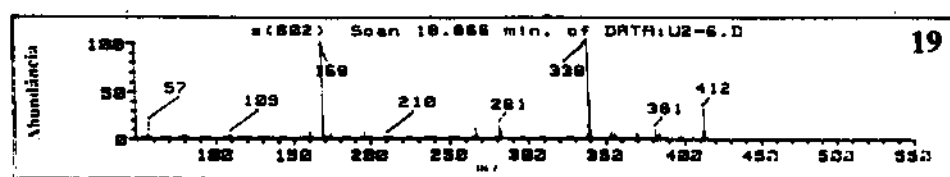
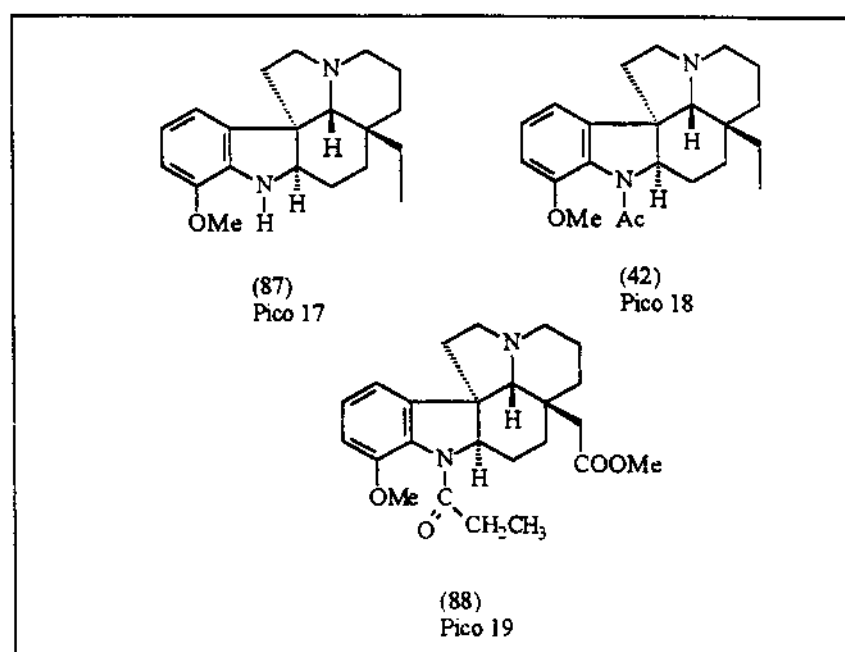
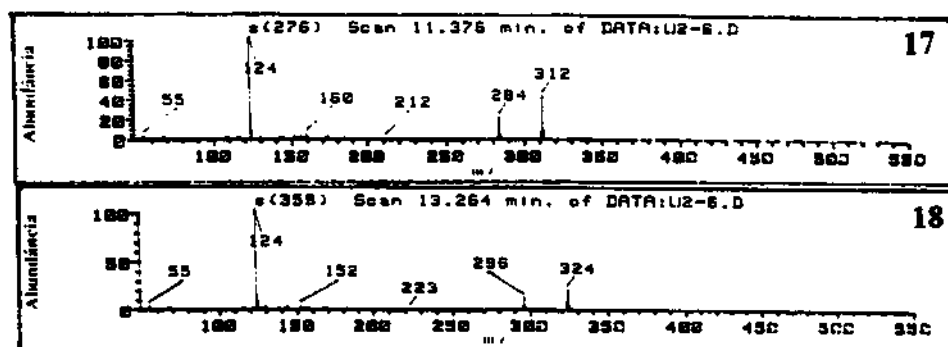


Figura 62e. Espectros de massas dos compostos detectados nos extratos alcaloidicos das sementes e plântulas de *A. polyneuron*. Picos: 17- N-desacetil-aspidospermina (87), 18- 12-desmetóxi-aspidospermina (42), 19- N-propionil-cilindrocarina (88).

(picos 3, 4, 17, 18, Figura 61) juntamente com uma certa quantidade de substâncias com cadeia lateral oxidada (picos 7, 15, 19) a Tabela 26 resume os dados da análise por CG/EM e a Figura 62 apresenta os espectros de massas dos componentes principais nos extratos dos sementes, plântulas e planta adulta respectivamente.

A hipótese formulada anteriormente para *A. ramiflorum* pode também ser aplicada ao caso de *A. polyneuron*. Para este caso, sugeriu-se que a planta estoca alcalóides no interior das sementes na forma oxidada, *N*-acetil-cilindrocarina (23) e 21-oxo-aspidobina (79) e no processo de germinação, quando ocorre a entrada de água, esta ativa as enzimas presente nas sementes.

Os eventos bioquímicos que ocorrem quando a germinação inicia são desconhecidos [83], destaca-se o aumento da respiração como um dos primeiros a serem observados na maioria das sementes. Isto é seguido em sequência por (a) liberação de enzimas hidrolíticas que digerem e mobilizam as reservas estocadas, e (b) renovam a divisão celular e o aumento celular no eixo embrionário. A via das pentoses também é importante nas sementes pois ela produz o potencial redutor na forma requerida (NADPH) para a síntese redutiva de ácidos graxos e outros constituintes celulares essenciais, como neste caso redução da grupo etila lateral a hidrocarboneto. A via das pentoses também geram intermediários na síntese de compostos aromáticos e dos ácidos nucleicos [83].

Com o crescimento e desenvolvimento da planta este processo se completa, tendendo a um equilíbrio, é o que observamos na análise por CG/EM dos extratos da planta adulta, Figura 61, na qual os alcalóides com o grupo etila lateral não oxidado são predominantes.

A proposição sugerida anteriormente está mostrada na Figura 63, que ilustra uma rota biossintética para a interconversão dos alcalóides indólicos do tipo Plumerano nas diferentes fases de desenvolvimento da *A. polyneuron*.

Os alcalóides (-)-aspidospermina (9B) e *N*-acetil-cilindrocarina (23) que já haviam sido isolados (Parte I) foram usados como padrões neste estudo e recentemente isolamos os alcalóides *N*-formil-12-metóxi-aspidospermidina (80) (identificado por espectrometria de massas e RMN ^1H) e 12-metóxi-21-oxo-aspidobina (81) (identificado por UV, espectrometria de massas, RMN ^1H , ^{13}C), que não haviam sido isolados anteriormente nesta espécie e são compostos que podem estar envolvidos nas etapas iniciais e finais do esquema biossintético sugerido, e ajudam a reforçar a proposta para interconversão.

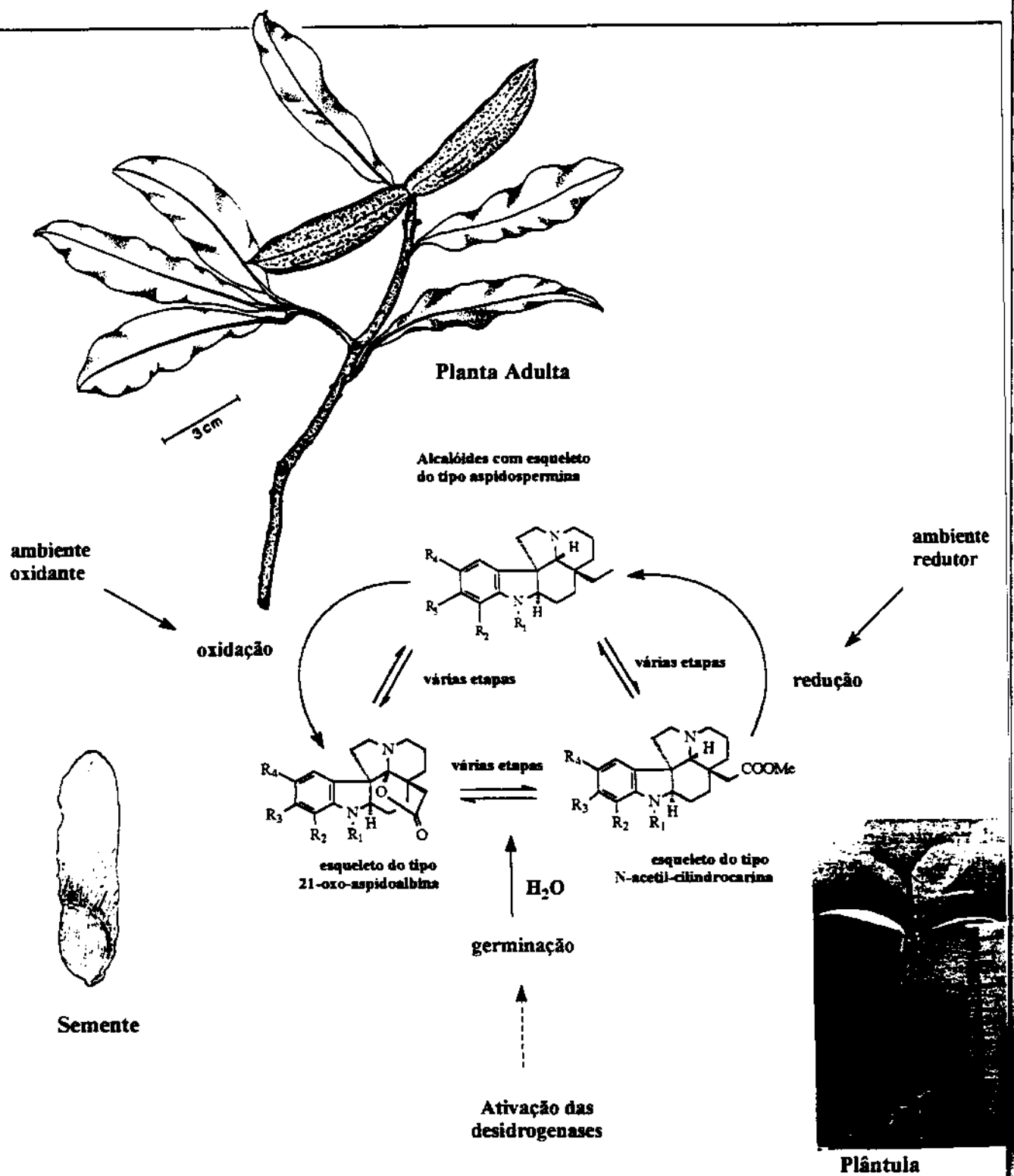


Figura 63. Rota biossintética proposta para a interconversão dos alcalóides de *A. polyneuron*.

3. EXPERIMENTAL

Todo o trabalho descrito a seguir foi por nós desenvolvido , no que se refere a obtenção e manutenção das células “in vitro” e foram realizados no laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, sob a orientação da Professora *Simone Liliane Kirszenhaft Shepherd*.

3.1. Obtenção das plântulas estéreis

As sementes de *A. ramiflorum* Muell Arg. e *A. polyneuron* Muell. Arg., foram doadas pelo IPEF-Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais da ESALQ-USP de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

As sementes das duas espécies foram submetidas a um processo de esterilização usando Benlate 1% por 30 min. sob agitação, a seguir com hipoclorito de sódio comercial diluído à 20% e por fim lavadas com água destilada estéril.

As sementes estéreis foram então colocadas para germinar no meio de cultura Murashige & Skoog (MS) [84], a 25°C na presença e ausência de luz. Após quatro semanas produziram plântulas em condições de serem utilizadas como fonte de explantes estéreis. A Figura 51 resume toda a metodologia básica empregada nos estudos de cultura de tecidos vegetais “in vitro”. As folhas e os hipocótilos foram escolhidos como fonte de explantes para a indução e formação de calos nas duas espécies.

3.2. Cultura de calos em *A. ramiflorum*

As folhas e hipocótilos de plântulas de 1 mês, foram cultivados em meio MS [84] suplementado por ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D, 1,0 mg/l), benziladenina (6-BA, 1,5 mg/l), ácido giberélico 3 (GA₃, 1 mg/ml). As culturas foram incubadas à 25°C na ausência de luz.

As folhas e hipocótilos produziram calos, e as folhas foram as fontes de explantes preferenciais, em função de fornecerem uma maior quantidade de material e facilidade de manipulação.

3.3. Cultura de células em suspensão

Os calos de 45 dias (2g de peso fresco) foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml do meio MS líquido suplementado com os fitorreguladores descritos acima, permitiu-se que as células crescessem por 30 dias, após este intervalo de tempo aliquotas de 5 ml das mesmas foram transferidas para novos meios de cultura. No experimento no qual adicionou-se o triptofano (73), foi utilizado também o meio MS líquido

o qual foi preparado de maneira que a concentração final de triptofano fosse de 125 mg/L. A análise dos alcalóides foi realizada no intervalo de 30 dias.

3.4. Extração e separação dos alcalóides

As plântulas das duas espécies, após um mês foram cortadas e congeladas em N₂ líquido e liofilizadas. O material liofilizado foi triturado e macerado em um gral de porcelana e suspenso em ácido acético (HOAc) a 5% (1g de plântula/200ml) por 1 hora sob agitação. A solução foi filtrada sobre uma placa de vidro sinterizado (1,6 µm) e o resíduo foi suspenso em HOAc 5% por 30min. e novamente filtrado. Os filtrados foram combinados e alcalinizados com NH₄OH 30% até pH 9,5, então extraídos com diclorometano (DCM), o extrato DCM foi seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado à secura.

As semente, os calos e as células em suspensão foram analisados de maneira similar a descrita acima para as plântulas.

3.5. Análise dos alcalóides

Os extratos diclorometânicos secos foram dissolvidos e 1ml de uma solução de DCM:Metanol (MeOH) (80:20), e a identificação dos alcalóides foi feita através da CCD, CLAE, GC e CG/EM. A CCD foi realizada empregando como eluente CHCl₃:MeOH (95:5) em atmosfera de amônia. A identificação foi feita utilizando-se padrões autênticos, após reação colorida como o reagente (NH₄)Ce(SO₄)₄ [85] e fluorescência à 254 nm e 366 nm. Os extratos foram analisados também por CLAE usando-se uma coluna de fase reversa µ-Bondapak C-18 (300 x 4,6 mm, 5µm) da Water Assoc. A coluna foi eluída como sistema LC-2, descrito na parte I, com um fluxo de 1,3 ml/min. O efluente da coluna foi monitorado usando um detector de Ultravioleta (UV) com um conjunto de fotodiodos, a identificação foi realizada comparando-se os tempos de retenção e os espectros de UV das amostras autênticas. As condições empregadas nas análises por CG e CG/EM foram idênticas aquelas empregadas anteriormente na análise quantitativas das espécies em estudo.

3.5. Alcalóides padrões

(+)-10-metóxi-geissoschizol (24): P.F.= 165 °C (P.F. lit.=185 °C, ref. [47, 85]), [α]_D= +11,8 (CHCl₃, c= 0,01, [α]_Dlit.= +22,12 (EtOH, ref. [47, 85]). Os espectros de IV, UV, RMN ¹H, ¹³C e EM estão em concordância com os dados publicados na literatura [32, 47, 85] e com os de um padrão autêntico.

(+)-*ramiflorina A* (25): P.F.= 160 °C (P.F. lit.=159 °C, ref [47]), $[\alpha]_D^{25} = +13,7$ (CHCl₃, c= 0,017, $[\alpha]_D^{lit} = +23,5$ (EtOH, c= 1,0, ref [47]). Os espectros de IV UV, RMN ¹H, ¹³C e EM estão em concordância com os dados publicados na literatura [47] e com os de um padrão autêntico.

(+)-*ramiflorina B* (26): P.F.= 200 °C (P.F. lit.=194 °C, ref [47]), $[\alpha]_D^{25} = +24,5$ (CHCl₃, c= 0,005, $[\alpha]_D^{lit} = +59,2$ (EtOH, c= 1,0, ref [47]). Os espectros de IV UV, RMN ¹H, ¹³C e EM estão em concordância com os dados publicados na literatura [47] e com os de um padrão autêntico.

(+)-*β-yohimbina* (10): P.F.= 230 °C (P.F. lit.=236-237 °C, ref [47]), $[\alpha]_D^{25} = -16,4$ (EtOH, c= 0,01, $[\alpha]_D^{lit} = -43,0$ (piridina, ref [47]). Os espectros de IV, UV, RMN ¹H, ¹³C e EM estão em concordância com os dados publicados na literatura [47] e com os de um padrão autêntico.

(-)-*aspidospermina* (9A): Cristais, P.F.= 200 °C com decomposição (CH₂Cl₂); P. F. lit.= 208-209 °C, ref [17, 18, 31]. $[\alpha]_D^{25} = -80,0$ (c= 1,0); $[\alpha]_D^{25} lit = +90,0$ (CHCl₃, c= 1,0), ref [17, 18, 31]. IV ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1634 (N-C=OMe). UV λ_{max} nm: 290 (log_e= 3,46), 256 (log_e= 4,06), 220 (log_e= 4,61). RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,6 (1H, s, H-2 α), 3,10 (1H, d, J= 11,0 Hz, H-3 α), 1,95 (1H, m, H-3 β), 3,28 (1H, dt, J= 8,0 Hz, H-5 α), 3,16 (1H, m, H-5 β), 2,06 (1H, m, H-6 α), 1,56 (1H, m, H-6 β), 6,84 (2H, t, J= 8,0 Hz, H-9 e H-11), 7,07 (1H, d, J= 8,0 Hz, H-10), 3,8 (3H, s, 12-OMe), 1,74 (1H, J= 12,8 Hz, J= 3,6, H-14 α), 1,5 (1H, m, H-14 β), 1,64 (1H, m, H-15 α), 1,1 (1H, m, H-15 β), 1,46 (1H, m, H-16A), 1,0 (1H, m, H-16B), 1,06 (1H, m, H-17A), 1,93 (1H, m, H-17B), 0,6 (3H, t, J= 7,3 Hz, H-18), 0,77 (1H, q, J= 6,9 Hz, H-19A), 1,2 (1H, m, H-19B), 2,2 (1H, s, H-21 α), 2,2 (3H, s, NC=OMe). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 69,5 (C-2), 53,5 (C-3), 52,3 (C-5), 37,8 (C-6), 53,3 (C-7), 143,4 (C-8), 115,6 (C-9), 126,2 (C-10), 111,1 (C-11), 149,5 (C-12), 21,4 (C-14), 34,0 (C-15), 24,6 (C-16), 22,8 (C-17), 5,6 (C-18), 29,8 (C-19), 35,4 (C-20), 71,1 (C-21), 171,2 (N-C=O), 55,3 (OMe). EMIE m/z (A. R. %): 354 (40), 326 (30), 124 (100).

(-)-*N-acetil-cilindrocarrina* (23): Cristais, P.F.= 85-90 °C (CH₂Cl₂); P. F. lit.= 118-118,5 °C, ref [17,18,31]. $[\alpha]_D^{25} = -138,0$ (c= 0,0068); $[\alpha]_D^{25} lit = -122,0$ (CHCl₃), ref [17, 18, 31]. IV ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1650 (N-C=OMe), 1731 (COOMe). UV λ_{max} nm: 286 (log_e= 3,60), 252 (log_e= 4,00), 220 (log_e= 4,61). RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,65 (1H, s, H-2 α), 3,08 (1H, m, J= 8,7 Hz, H-3 α), 2,10 (1H, m, H-3 β), 3,16 (1H, dt, J= 9,0 Hz, J= 3,0 Hz, H-

5 α), 2,3 (1H, m, J=9,0 Hz, H-5 β), 2,16 (1H, m, H-6 α), 1,54 (1H, m, H-6 β), 6,84 (2H, t, J=7,5 Hz, H-9 e H-11), 7,08 (1H, d, J=7,5 Hz, H-10), 3,9 (3H, s, 12-OMe), 2,10 (3H, s, NC=OMe), 1,78 (1H, m, J=13,5 Hz, H-14 α), 1,40 (1H, dq, J=13,5 Hz, H-14 β), 1,54 (1H, m, H-15 α), 1,30 (1H, m, H-15 β), 1,84 (1H, m, H-16B), 1,30 (1H, m, H-16A), 1,9 (1H, t, J=15,0 Hz, H-17B), 1,24 (1H, m, H-17A), 2,20 (1H, s, H-19), 2,46 (s, H-21 β). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 68,7 (C-2), 53,2 (C-3), 52,0 (C-5), 37,4 (C-6), 53,2 (C-7), 142,0 (C-8), 115,2 (C-9), 126,3 (C-10), 111,5 (C-11), 149,0 (C-12), 129,4 (C-13), 21,3 (C-14), 34,6 (C-15), 24,3 (C-16), 42,3 (C-17), 45,0 (C-19), 35,8 (C-20), 69,5 (C-21), 23,0 (NCOMe), 172,0 (N-C=O), 55,4 (12-OMe), 51,1 (COOMe). CG/EM m/z (A. R. %): 398 (50), 324 (90), 168 (100).

N-formil-12-metóxi-aspidospermina (80): RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,80 (3H, s, 12-OMe), 7,20-6,80 (3H, Ar-H), 0,6 (3H, t, J=7,0 Hz, H-18), 8,95 (1H, s, N-CHO). CG/EM m/z (A. R. %): 338 (M^+ , 38), 124 (100).

(-)-12-*O*-metóxi-21-oxo-aspidobalbina (81): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -63,8$ (MeOH, $c=0,0002$); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ lit. = +63,8 (MeOH), ref [17,18, 31]. IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1657 (N-C=OEt), 1754 (lactona). UV λ_{max} nm: 296 ($\log \epsilon=2,96$), 256 ($\log \epsilon=3,53$), 218 ($\log \epsilon=2,75$). RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,55 (1H, s, H-2 α), 2,92 (1H, dt, J=12,5 Hz e J=3,0 Hz, H-3 α), 2,80 (1H, m, J=12,5 Hz, J=7,5 Hz, H-3 β), 3,15 (1H, m, H-5 α), 3,04 (1H, m, H-5 β), 2,00 (1H, m, H-6 α), 1,90 (1H, m, H-6 β), 6,97 (1H, s, H-9), 3,83 (3H, s, 10-OMe), 3,86 (3H, s, 11-OMe), 3,89 (3H, s, 12-OMe), 1,82 (1H, m, H-14 α), 1,52 (1H, m, H-14 β), 1,90 (1H, m, H-15 α), 1,35 (1H, m, H-15 β), 1,37 (1H, m, H-16A), 2,00 (1H, m, H-16B), 0,88 (1H, m, H-17A), 1,58 (1H, m, H-17B), 2,32 (1H, m, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,68 (1H, m, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,14 (3H, t, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 67,7 (C-2), 43,5 (C-3), 48,6 (C-5), 33,5 (C-6), 59,3 (C-7), 141,7 (C-8), 103,9 (C-9), 1151,7 (C-10), 141,7 (C-11), 151,7 (C-12), 127,0 (C-13), 20,3 (C-14), 42,6 (C-15), 25,1 (C-16), 34,1 (C-17), 42,6 (C-19), 35,8 (C-20), 107,9 (C-21), 176,3 (NCOEt), 176,3 (lactona), 56,2 (10-OMe), 60,2 (11-OMe), 61,2 (12-OMe), 9,80 ($\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). CG/EM m/z (A. R. %): 456 (M^+ , 60), 383 (50), 253 (30), 160 (100).

4. CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou a viabilidade da produção de alcalóides em cultura de calos como também em suspensão celular de *A. ramiflorum* "in vitro". A produção dos alcalóides utilizando as células em suspensão pode ser melhorada associando-se, a adição de triptofano

ao balanço hormonal, com objetivo de aumentar a produção, pois a adição de triptofano (73) permitiu incrementar a biossíntese dos alcalóides enquanto que o novo balanço dos fitorreguladores do segundo experimento levou a uma maior taxa de crescimento celular. Os bons resultados conseguidos para *A. ramiflorum* abriram grandes perspectivas para o mesmo estudo com a espécie *A. polyneuron*.

O estudo mostrou ser importante na avaliação de processos envolvendo o acúmulo de alcalóides em diferentes fases de crescimento das *A. ramiflorum* e *A. polyneuron*, Também nos permitiu monitorar o acúmulo dos alcalóides nas sementes destas espécies, bem como as consequências fisiológicas sobre estes, após o início do processo de germinação e posterior transformação nas diferentes fases de crescimento das plantas.

CAPÍTULO 4

ROTA DE PREPARAÇÃO

DOS ALCALÓIDES DIMÉRICOS

RAMIFLORINA A E RAMIFLORINA B

1. Considerações Gerais

De um estudo realizado com as cascas de *Aspidosperma ramiflorum*, o grupo do Professor Dr. Francisco de Assis Machado Reis [47] isolou dois alcalóides bisindólicos isoméricos, os quais foram chamados de ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26).

Os alcalóides ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26) apresentaram uma boa atividade antimicrobiana frente a dois tipos diferentes de microorganismos, o *B. subtilis* e *S. aureus*, conforme o descrito na Parte II deste trabalho.

Outros trabalhos relatados na literatura com compostos de estruturas muito semelhantes as "ramiflorinas" apresentam atividades antimaláricas e antiamebiana [86]. Devido as propriedades antimicrobianas das "ramiflorinas" e a outras possíveis, resolvemos tentar a semi-síntese destes compostos a partir de um precursor existente em concentrações consideráveis nesta planta, o 10-metóxi-geissoschizol (24). A rota sintética por nós proposta baseia-se primeiramente em oxidar o (24) à 10-metóxi-geissoschizal (74) e a seguir fazer uma condensação do tipo *Pictet-Spengler* [87] do composto (74) com a triptamina (75) levando aos compostos (25) e (26) conforme o descrito na Figura 65.

A reação de *Pictet-Spengler* é uma reação muito importante para a síntese de alcalóides indólicos e isoquinoleínicos [88]. Esta condensação foi desenvolvida em 1911 por Amé Pictet e Theodor Spengler quando eles condensaram a feniletilamina (89) com o acetaldeído (90) levando a tetrahydroisoquinolina (91), Fig.64. A reação foi utilizada originalmente exclusivamente para preparar tetrahydroisoquinolinas. A mesma foi concebida sobre propostas biogenéticas, as quais propunham que os alcalóides isoquinolínicos em plantas deveriam ser formados pela condensação de b-ariletil aminas com compostos carbonílicos. Mais tarde, publicada, a reação tornou-se o procedimento padrão para a formação de tetrahydroisoquinolinas. A condensação de *Pictet-Spengler* da triptamina (75) com a secologanina (76) catalisada enzimaticamente, leva à strictosidina (78), esta condensação é a etapa chave na rota biogenética dos alcalóides indólicos monoterpênicos, Figura 60 [74].

O interesse na síntese total ou parcial de alcalóides indólicos é devido as complexas estruturas destes compostos e as suas diversas propriedades medicinais. O desenvolvimento

O interesse na síntese total ou parcial de alcalóides indólicos é devido as complexas estruturas destes compostos e as suas diversas propriedades medicinais. O desenvolvimento de uma rota sintética ou semi-sintética para os alcalóides ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26), baseada num mesmo intermediário comum, proporcionaria um aumento da quantidade de material disponível para estudos farmacológicos, bem como forneceria a possibilidade de produzir-se derivados que visem potencializar os efeitos destes compostos.

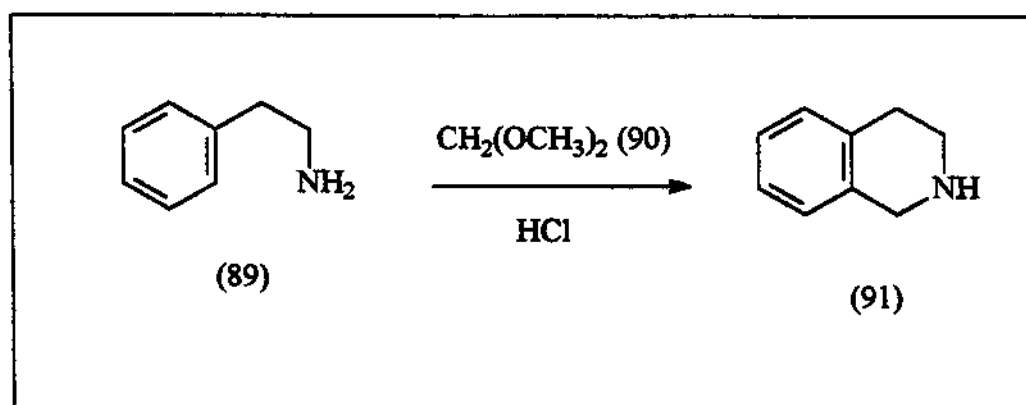


Figura 64. Preparação da tetrahydroisoquinolina (Reação de *Pictet-Spengler*).

Uma importante etapa na semi-síntese proposta para os compostos 25 e 26 mostrada na Figura 65, é a oxidação do composto 24 para transformá-lo em 74.

Para tanto uma análise na literatura sobre este tipo de reação nos mostra que em estruturas similares como por exemplo o 3-indolacetaldeído (93), algumas considerações que são relevantes e serão discutidas a seguir. O 3-indolacetaldeído (IAC, 93) é um hormônio de crescimento de plantas, encontrado em diversos tecidos vegetais [89, 90, 91]. A sua presença em extratos de plantas foi estabelecida indiretamente pela sua conversão a ácido 3-indolacético (AIA, 99) pela aldeído desidrogenase. Gordon e Nieva [92] demonstraram que o IAC (93) pode ser o precursor do AIA (99) em tecidos de abacaxi, Figura 66.

Larsen [89] preparou o IAC (93) a partir do triptofano (73) tratado com isatina ou ninhidrina, Figura 66. Os rendimentos porem foram inferiores a 2% e o produto esta muito

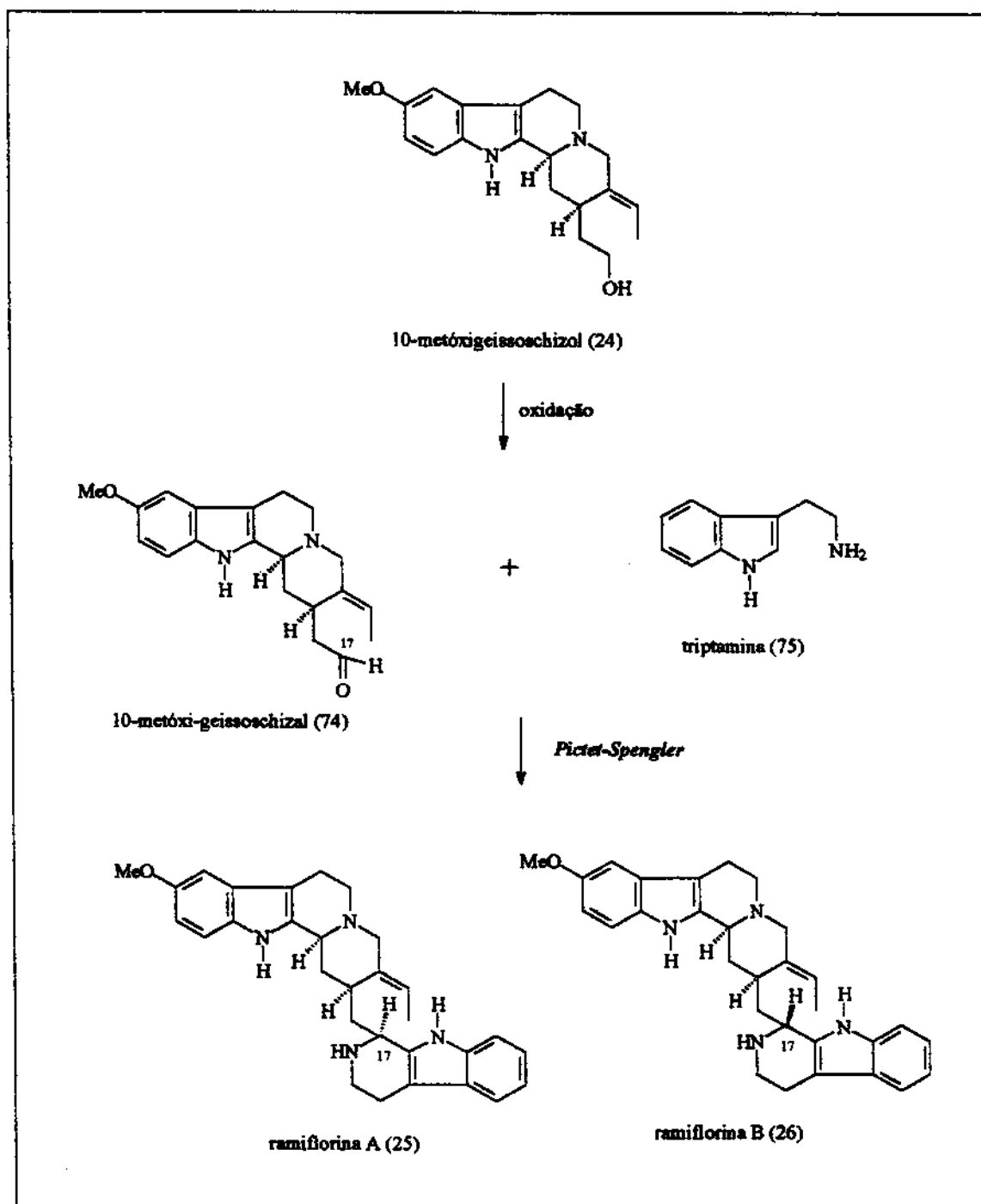


Figura 65. Proposta de semi-síntese da ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26).

impuro. A síntese do IAc (93) em grande escala, com o objetivo de isolá-lo em quantidades apreciáveis, foi reportado por Brown e colaboradores [93], Figura 66, utilizando-se o indol (100) como material de partida, nesta síntese um composto de Grignard derivado do indol (100D) foi preparado e tratado com brometo de alila (101) para dar o 3-alil-indol (102). O 3-alil-indol (102) a seguir foi tratado com tetróxido de ósmio produzindo o 3,3-indol-propano-1,2-diol (103). Este glicol foi ao final oxidado com periodato de sódio dando o IAc (93), que foi purificado por destilação a pressão reduzida.

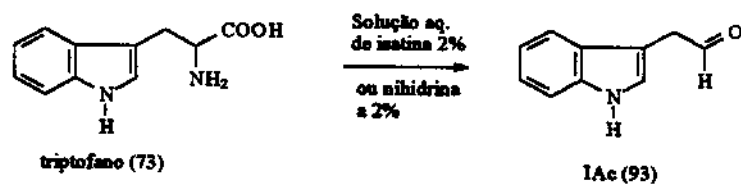
Mais tarde vários pesquisadores tentaram preparar o IAc (93) pelo método de Brown [93] sem sucesso, em função disto o composto continuou pouco disponível para os estudos sobre substâncias de crescimento de plantas. Devido a este fato Grey [94] desenvolveu um método mais simples, em uma só etapa, para a preparação do IAc (93), Figura 66, este método consiste em oxidar o triptofano (73) com uma solução de hipoclorito de sódio 0,52%, o que levou ao IAc (93), que a seguir foi isolado como um derivado na forma de bissulfito, o qual é muito estável.

Recentemente duas novas preparações foram descritas por Kametani e colaboradores [95] e por Massiot e colaboradores [96], Figura 66. A reação proposta por Kametani [95] consiste da redução com DIBAL do éster metílico do AIA (103), que é uma reação de resultados incertos quando aplicada em grande escala.

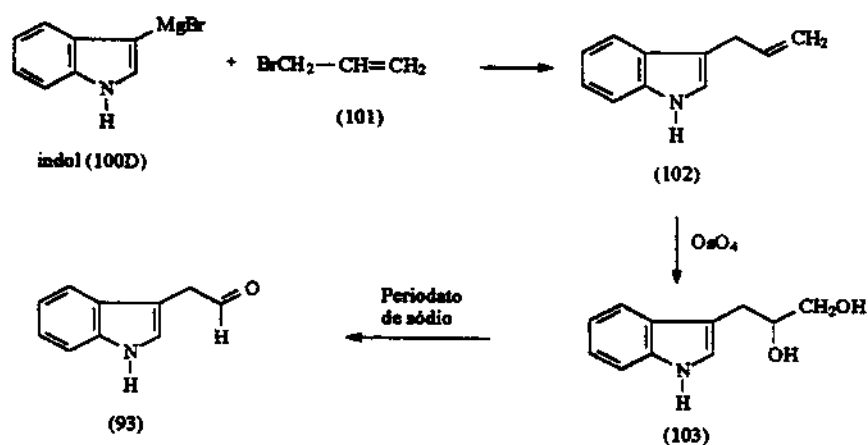
A proposta de Massiot [96] também baseia-se na redução de um derivado do AIA (99), as duas empregam o mesmo material de partida, o AIA (99), o qual deve ser transformado em um derivado que possa ser reduzido mais facilmente. No caso do procedimento de Massiot [96] foi preparado um outro derivado do AIA (99) a *N*-metóxi-*N*-metil-3-indolacetamida (104). A redução deste composto com o LiAlH_4 em THF a 0°C levou ao IAc (93) puro com 80% de rendimento.

Uma outra alternativa a ser considerada para a preparação do IAc (93) seria a de obtê-lo via uma oxidação do triptofol (7), mas isto requereria uma proteção do anel indólico contra a oxidação, o que seria difícil de se realizar utilizando-se grupos protetores comuns, pois os grupos hidroxila e amino possuem reatividade muito similares frente a vários reagentes utilizados para proteger o grupo amino do anel indólico.

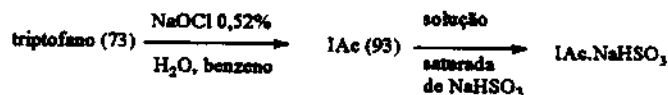
1) Método de Laersen:



2) Método de Brown:



3) Método de Gray:



4) Método de Kametani

5) Método de Massiot

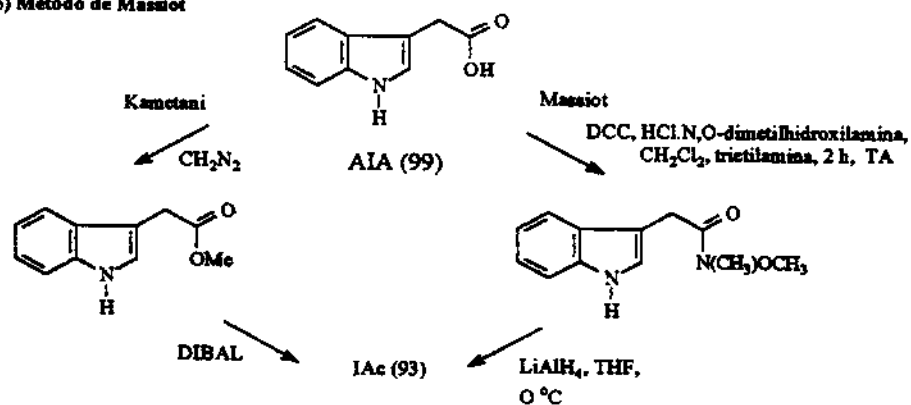


Figura 66. Métodos de síntese descritos para o IAc (93).

2. Resultados e Discussão

Preparação dos Compostos Diméricos

Com objetivo de preparar as "ramiflorinas" imaginamos isolar quantidades adequadas do 10-metóxi-geissoschizol (24) e transformá-lo em um sinton apropriado, o 10-metóxi-geissoschizal (74), e então condensá-lo com a triptamina (75) através de uma reação de *Pictet-Spengler* em condições semelhantes as utilizadas por Pathy-Lukáts et al [98].

A etapa de obtenção do sinton, envolve a transformação de um álcool (24) em aldeído (74) através de uma oxidação, uma reação delicada quando empregada para alcalóides indólicos, pois o anel indólico é muito sensível aos reagentes normalmente empregados para se fazer uma oxidação seletiva da álcool a aldeído. Como por exemplo as reações com complexos de Crômio, com PCC e PDC [96]. O que normalmente ocorre é uma abertura do anel indólico levando a compostos derivados do ácido antranílico (92), como mostrado a Figura 67.

Após várias tentativas, optou-se por realizar a oxidação com reações que empregam o Dimetil-Sulfóxido (DMSO) ativado com agente oxidante. Como dispunha-se de pequena quantidade do alcalóide (24) resolveu-se primeiramente realizar a reação com um composto modelo, o triptofol (7), com o objetivo de testar o procedimento, para a seguir realizá-la com o alcalóide (24).

Das reações que utilizam o DMSO ativado a que forneceu melhores resultados com o modelo (7) foi a de Moffat [97], na qual o triptofol (7) foi convertido ao indolacetaldeído (IAc, 93) com um rendimento de 20%, Figura 67. A seguir foi realizado a proteção do grupo aldeído transformando-o em dois derivados acetalizados, chamados de ac-IAc-A (94) e ac-IAc-B (95).

A reação de *Pictet-Spengler* modificada foi realizada em meio ácido, com os dois acetais e a triptamina (75), porem o ac-IAc-A (94) mostrou ser um acetal mais estável que o ac-IAc-B. Uma vantagem do IAc-B (95) é o fato de retornar ao aldeído na própria para a próxima etapa que é a reação que produziu onde levou o composto dimérico (96) com 60% de rendimento, Figuras 67 e 68.

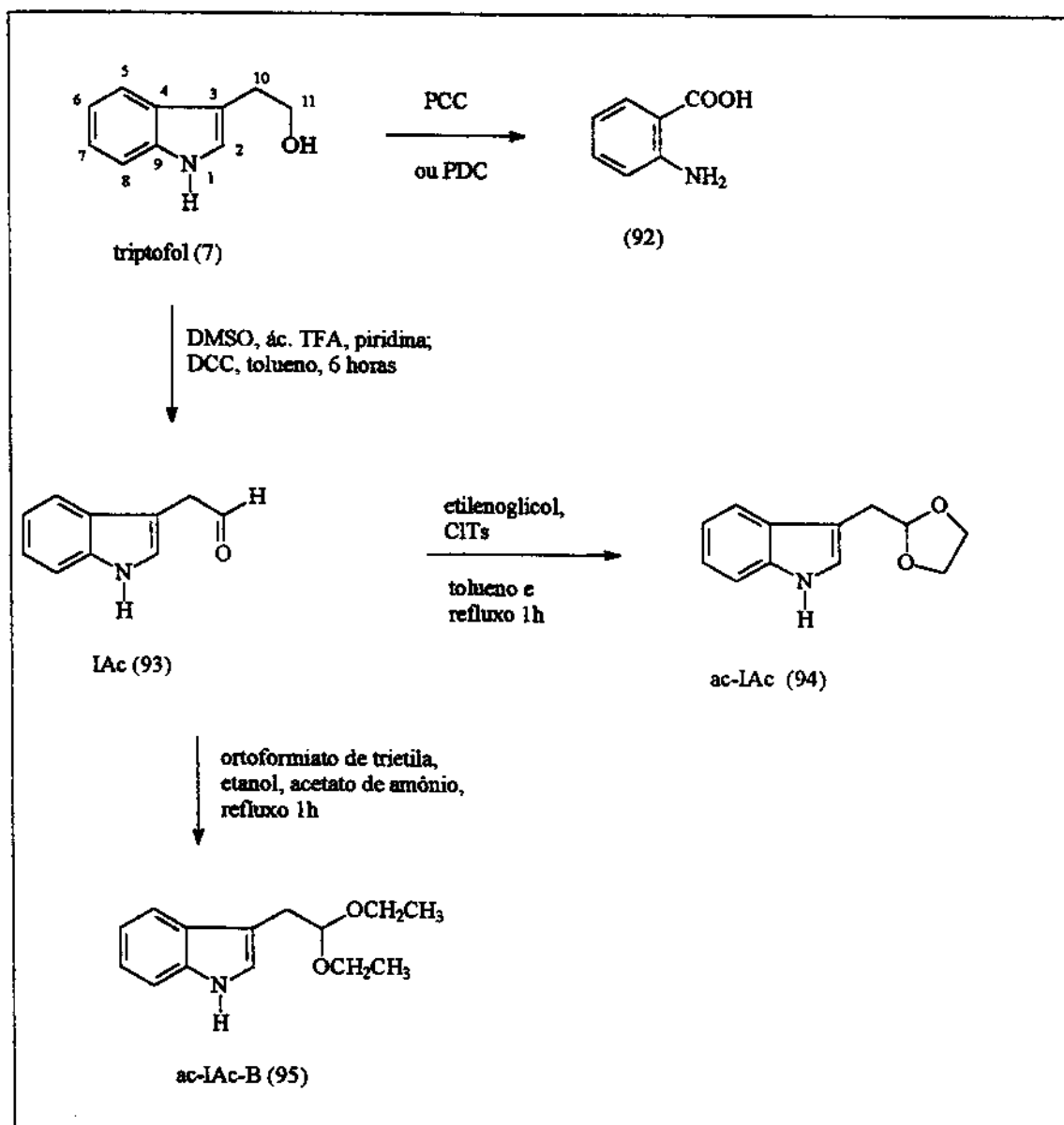


Figura 67. Preparação dos derivados acetalizados do IAc (93).

O composto (93), (94) e (95), intermediários da preparação de (96), foram identificados pelos seus dados espectrais, infravermelho, RMN ^1H , ^{13}C e CG/EM, cujas estruturas planares não apresentaram dificuldades na identificação e o dados estão apresentados no Quadro 15 ou na parte experimental.

O composto dimérico (96) foi identificado por métodos físicos e espectrais. O espectro de IV de (96) apresentou as bandas referentes aos $\nu_{\text{N-H}}$ indólico e carbazólico em torno de 3300 cm^{-1} .

O seu espectro de medidas exatas de massa (EMEM) mostrou um íon molecular a m/z 301,15732, correspondendo a uma fórmula de $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3$, um íon principal a m/z 171 (pico base) correspondente ao fragmento da porção carbazólica da molécula, outro fragmento importante a m/z 130 correspondente ao anel indólico, ou seja outra porção do dímero.

A identificação do composto (96) foi completada pela análise e atribuição de seus espectros de RMN ^1H , ^{13}C , utilizando espectros em dois solventes, metanol deuterado e acetona deuterada, através das técnicas de DEPT, HETCOR e COSY (Quadro 15).

O espectro de RMN ^1H apresentou nove sinais a 7,00-7,80 δ , com integração para nove hidrogênios aromáticos dos anéis indólico e carbazólico não substituídos, que foram atribuídos e confirmados utilizando os modelos 78, 97 e 98, ressalta-se aqui que os compostos 93, 94 e 95, apresentados nos Quadros 15 e 16, também ajudaram na atribuição dos espectros de RMN ^{13}C . Os hidrogênios foram assinalados como H-5' um dubleto a que ressona 7,64 δ ($J = 8,0\text{ Hz}$) é o mais desprotegido, confirmado com os modelos utilizados, o H-9 um dubleto a 7,64 δ ($J = 8,0\text{ Hz}$), o H-8' um dubleto a 7,37 δ ($J = 8,0\text{ Hz}$) e o H-12 também um dubleto a 7,35 δ ($J = 8,0\text{ Hz}$), com acoplamento orto. Os hidrogênios H-6' e H-7' aparecem como um multipeto a 7,12 δ e os hidrogênios H-10 e H-11 na forma de um multipeto a 7,02 δ , a multiplicidade esta associada aos hidrogênios vizinhos diorto e meta apresentando sinais se sobrepõem. O último hidrogênio aromático foi atribuído ao singlete a 7,10 δ referente ao hidrogênio H-2' do anel indólico, considerando a integração e os modelos apresentados no Quadro 15, como este próton não ficou claro no espectro obtido

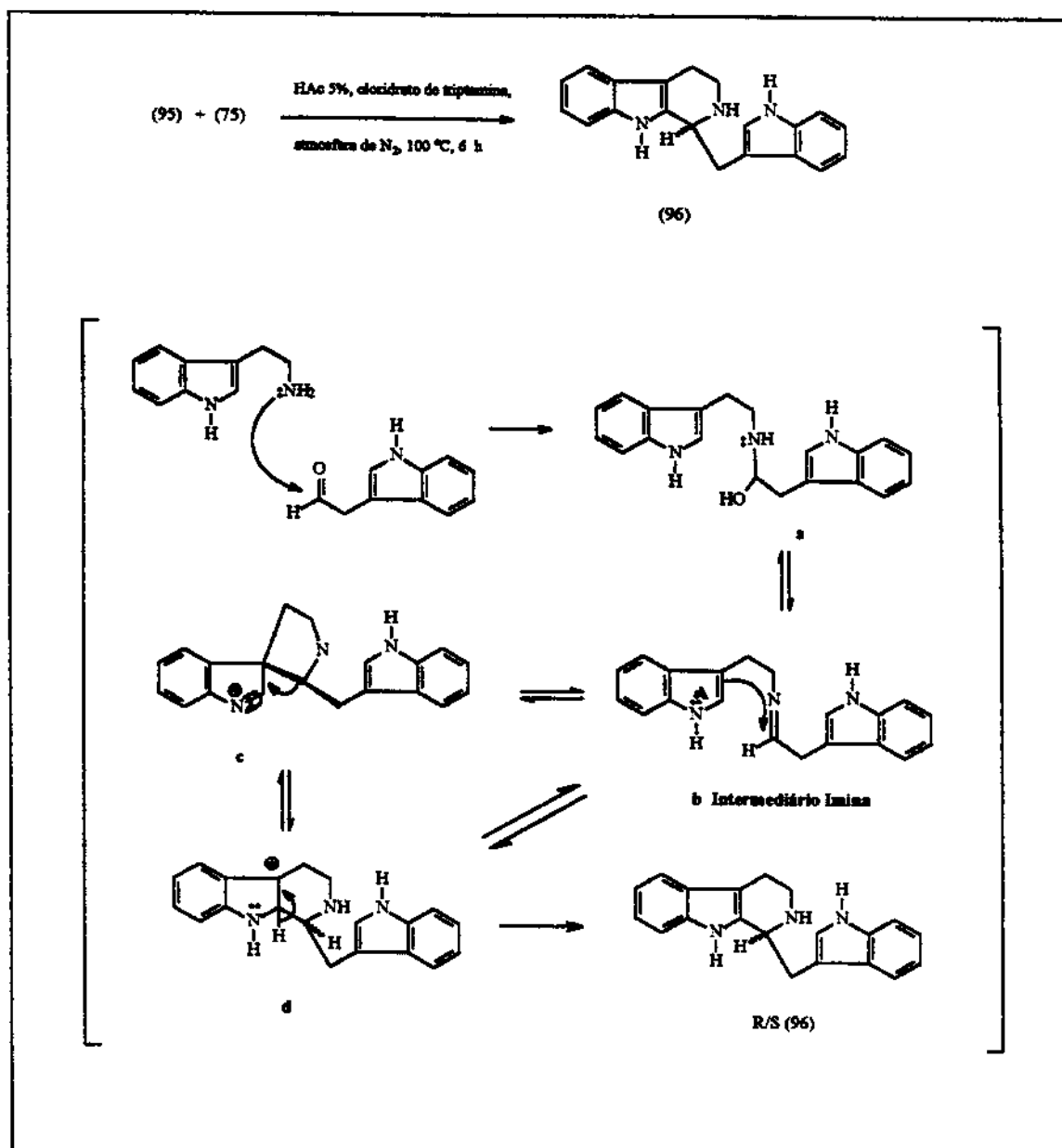


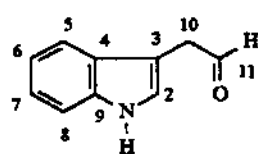
Figura 68. Síntese do composto dimérico (96) e o mecanismo proposto para a reação [88].

em metanol deuterado, porém em acetona deuterada o deslocamento químico deste, foi esclarecido.

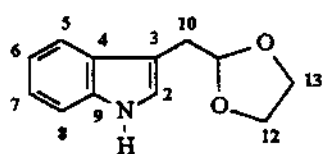
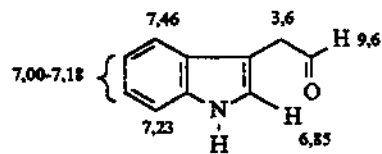
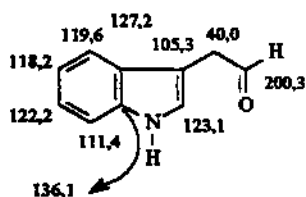
O hidrogênio H-3 cujo sinal está localizado debaixo do solvente a 4,86 δ (dubleto largo, $J = 12,8$ Hz) foi confirmado no espectro de hidrogênio obtido em acetona deuterada, e o espectro bidimensional, é o hidrogênio alifático mais desprotegido e como 96 se trata de uma mistura enantiomérica, este sinal aparece na forma de um dubleto largo indefinido cujo deslocamento foi confirmado com os modelos. Acoplados ao H-3 estão os hidrogênios H-10' A e B, o duplo dubleto a 3,78 δ ($J = 3,3$ Hz e $J = 14,6$ Hz) é referente ao H-10'A que está acoplado geminalmente com H-10'B e H-3 e por sua vez o H-10'B, ocorre na forma de um duplo dubleto a 3,22 δ ($J = 8,8$ Hz e $J = 14,6$ Hz), não se deve esquecer que estamos tratando de uma mistura enantiomérica portanto H-10'A e H-10'B são uma média das ressonâncias do par isomérico. O hidrogênio H-6 α (pseudo-equatorial) que aparece na forma de um multipletto a 2,97 δ e H-6 β (pseudo-axial) outro multipletto a 2,90 δ . Além destes hidrogênios atribuiu-se também os hidrogênios H-5 α (pseudo-axial) um multipletto a 3,16 δ e H-5 β (pseudo-equatorial) que aparecem na forma de um multipletto a 3,48 δ , desprotegidos pela proximidade do nitrogênio, estas atribuições foram confirmadas também como modelos.

As atribuições do espectro de RMN ^{13}C foram feitas através da multiplicidade dos picos obtidas no espectro de DEPT, e por comparações com moléculas padrões, conforme o mostrado nos Quadros 15 e 16. Os carbonos aromáticos mostram sinais a valores muito próximos aos dos sistemas indólico e carbazólico comparados com os modelos 78, 97, 98. O carbono correspondente ao grupo metilênico ligado ao anel indólico (C-10') mostra um sinal a 29,70 δ , e os carbonos metilênicos do anel carbazólico C-5 e C-6 a 43,1 e 20,0 δ respectivamente, foram assinalados utilizando os espectros bidimensionais acoplados (HETCOR) e confirmados utilizando os modelos 78, 97 e 98.

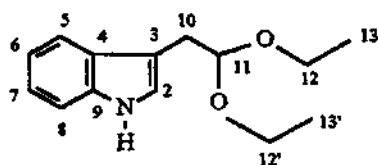
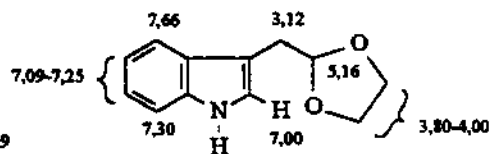
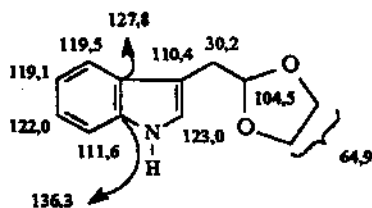
O carbono C-3 foi atribuído utilizando a técnica de HETCOR, no solvente acetona deuterada. A análise deste espectro permitiu relacionar o sinal do H-3 (4,52 δ em acetona deuterada) com a do carbono metínico (DEPT) a 54,9 δ .



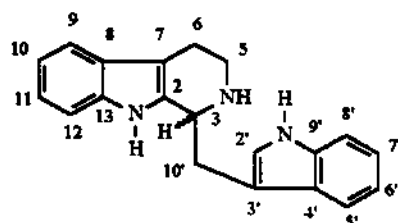
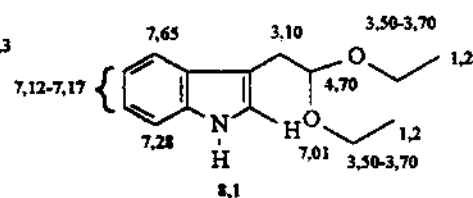
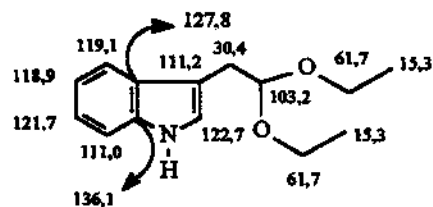
Iac (93)



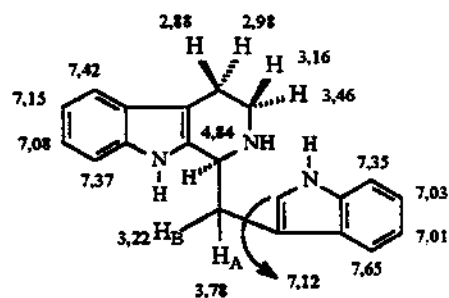
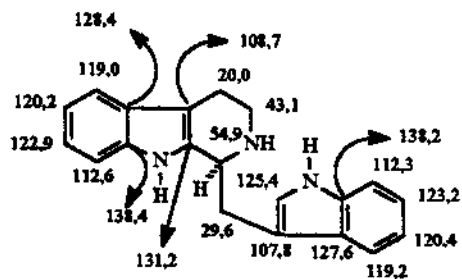
ac-Iac-A (94)



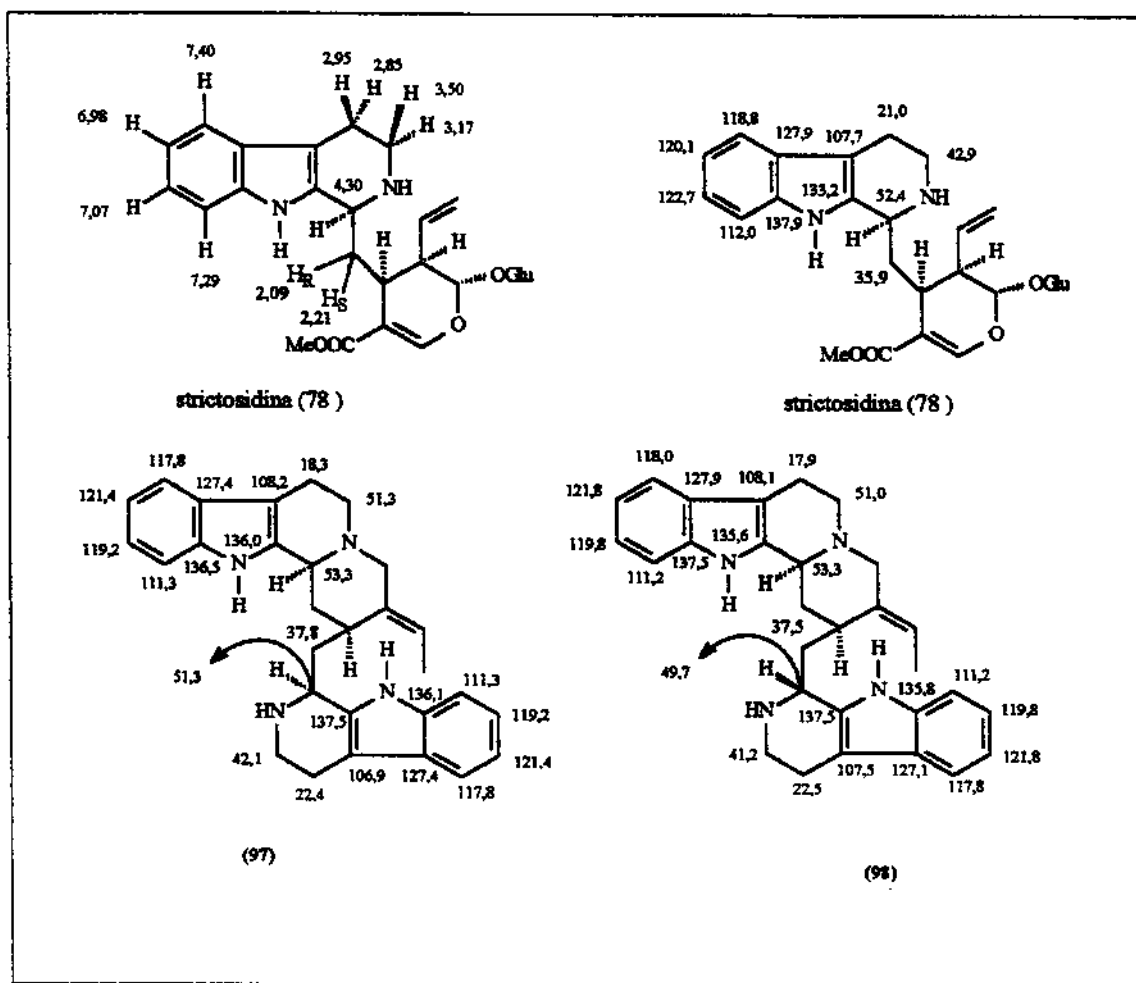
ac-Iac-B (95)



(96)



Quadro 15. Dados de RMN ^1H , ^{13}C dos compostos intermediários e do dímero (96).



Quadro 16. Compostos usados como modelos na atribuição dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto (96) [47, 98].

3. Conclusões

O resultado obtido com o composto modelo forneceu-nos uma metodologia adequada para que possamos realizar a síntese das "ramiflorinas", o que não foi possível neste trabalho, mas que pode ser perfeitamente implementado em trabalhos a serem realizados posteriormente. A preparação dos derivados estáveis do IAc (93) foi importante pois permite aumentar a disponibilidade e acesso a este composto, principalmente aos grupos de pesquisa que empregam hormônios vegetais derivados do AIA (99).

4. Experimental

Os pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Metler FP-5 e não foram corrigidos. Os espectros de infra vermelho foram obtidos na forma de filme ou em pastilha de KBr. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram registrados em CDCl_3 e CD_3OD . O reconhecimento dos hidrogênios dos grupos metila, metileno, metino e os carbonos quaternários no espectro de RMN ^{13}C foram determinados por uma sequência de "spin-echo" J-modulada. A análise por espectrometria de massas foi registrada por impacto eletrônico a 70 eV. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em sílica gel Merck 60 F₂₅₄ em placas de vidro (0,25 mm). O benzeno, CH_2Cl_2 sobre hidreto de cálcio em atmosfera de nitrogênio, o DMSO e piridina também foram tratados de forma a tornarem-se anidros. Todas as reações envolvendo compostos sensíveis ao ar ou água foram conduzidas em vidrarias seca na chama. As camadas orgânicas foram secas sobre MgSO_4 anidros. Os produtos químicos foram obtidos de fornecedores tradicionais (Sigma, Merck e Fluka) e foram usados sem purificação. A análise cromatografica por CG/EM foi realizada no equipamento HP 5970B com um detector seletivo de massas, utilizando o mesmo programa de temperaturas descritos na Parte I, utilizando-se uma coluna DB-2 (30 m, 0,25 ϕ , 0,2 mm de espessura do filme da fase estacionária, J&W Scientific, CA), usando hélio como gás de arraste.

Indolacetaldeído (IAc) (93). O triptofol (7) (0,5 g, 3,12 mmol) foi dissolvido em DMSO (5 ml) e benzeno (10 ml), e a seguir foram adicionados em um balão de 50 ml contendo diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1,92 g, 9,3 mmol) e piridina (0,25 ml, 3,1 mmol). O ácido trifluoroacético (0,125 ml, 3,1 mmol) foi adicionado, e a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 6 horas. Após este período o acetato de etila (25 ml) foi adicionado e o DCC (700 mg, P.F. 234°C) foi removido por filtração. A solução de acetato de etila foi lavada três vezes com água destilada (50 ml), seca e evaporada. O extrato seco foi cromatografado por CCD preparativa usando-se o benzeno como eluente, para dar 0,100 g (20%) do IAc (93) cromatograficamente puro: IV (filme em CH_2Cl_2) 3406,

2926, 2855, 1718 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,85 (d, $J=2,2$ Hz, 1H, H-2), 7,46 (d, $J=7,7$ Hz, 1H, H-5), 7,00-7,18 (m, $J=6,2$ Hz, $J=2,5$ Hz, 2H, H-6 e H-7), 7,23 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H-8), 3,6 (d, $J=2,5$ Hz, 2H, H-10), 8,27 (sl, 1H, NH), 9,6 (t, $J=2,5$ Hz, 1H, CHO); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 123,1 (CH, C-2), 105,3 (Co, C-3), 127,2 (Co, C-4), 119,6 (CH, C-5), 118,2 (CH, C-6), 122,2 (CH, C-7), 111,4 (CH, C-8), 136,1 (Co, C-9), 40,0 (CH_2 , C-10), 200,3 (Co, C-11, CHO); CG/EM (tempo de retenção = 4,878 min.), m/z (A.R. %) 159 (M^+ , 22), 130 (100), 77 (20).

triptofol (7): P.F. = 57-60 $^\circ\text{C}$, = IV (filme em CH_2Cl_2) 3405, 1660, 1456, 1043 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,06 (d, $J=2,4$ Hz, 1H, H-2), 7,62 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-5), 7,10-7,26 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,36 (d, $J=8,1$ Hz, 1H, H-8), 3,05 (dt, $J=6,3$ Hz, 2H, H-10), 3,9 (t, $J=6,3$ Hz, H-11) 8,11 (sl, 1H, NH); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 122,5 (CH, C-2), 103,3 (Co, C-3), 127,3 (Co, C-4), 119,4 (CH, C-5), 118,8 (CH, C-6), 122,1 (CH, C-7), 111,2 (CH, C-8), 136,4 (Co, C-9), 28,7 (CH_2 , C-10), 62,56 (CH_2 , C-11); CG/EM (tempo de retenção = 5,495 min.), m/z (A.R. %) 161 (M^+ , 20), 130 (100), 77 (14).

Acetal-A do indolacetaldeído (ac-IAc-A) (94). Uma solução do IAc (0,05 g, 0,31 mmol), etilenoglicol (0,2 ml, 4,7 mmol) e cloreto de p-tolueno-sulfonila (15 mg, 0,06 mmol) em tolueno (10ml) foi refluxada com agitação e aquecimento por 1 hora. Após este período a reação foi encerrada com uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 , a mistura foi extraída com acetato de etila, que depois de seca e evaporada rendeu o produto (94) quase puro. O composto (94) foi então purificado por CCD usando benzeno como eluente, dando 0,049 g (98%) do acetal A do IAc (94) cromatograficamente puro: IV (filme em CH_2Cl_2) 3409, 3055, 1457, 1137 e 1307 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,0 (d, $J=2,4$ Hz, 1H, H-2), 7,66 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H-5), 7,09-7,25 (m, $J=1,2$ Hz, $J=6,9$ Hz, 2H, H-6 e H-7), 7,30 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H-8), 3,12 (d, $J=4,8$ Hz, 2H, H-10), 5,16 (t, $J=4,5$, 1H, H-11), 3,80-4,00 (m, 4H, H-12 e H-13), 8,04 (sl, 1H, NH); RMN ^{13}C (75Mz, CDCl_3) δ 123,0 (CH, C-2), 110,4 (Co, C-3), 127,8 (Co, C-4), 119,5 (CH, C-5), 119,1 (CH, C-6), 122,0 (CH, C-7), 111,6 (CH, C-8), 136,3 (Co, C-9), 30,2 (CH_2 , C-10), 104,5 (CH, C-11), 64,9 (2CH_2 , C-12 e C-13); CG/EM (tempo de retenção = 12,528 min.), m/z (A.R. %) 203 (M^+ , 22), 130 (50), 73

(100).

Acetal-B do indolacetaldeído (ac-IAc-B) (95). Uma solução do IAc (0,05 g, 0,31 mmol), ortoformiato de trietila (1,0 ml, 6,25 mmol) e acetato de amônio (20 mg, 0,25 mmol) em etanol (10 ml) foi refluxada com agitação e aquecimento por 1 hora. A reação foi encerrada com uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 , a mistura foi extraída com acetato de etila, que depois de seca e evaporada rendeu o produto (95), que a seguir foi purificado por CCD utilizando o benzeno como eluente para dar 0,048 g (96%) do acetal do IAc-B (95) cromatograficamente puro: IV (filme em CH_2Cl_2) 3411, 3056, 2974, 1457, 1115 1056; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,01 (d, $J=2,1$ Hz, 1H, H-2), 7,65 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-5), 7,12-7,17 (m, $J=1,2$ Hz e $J=6,9$ Hz, 1H, H-6 e H-7), 7,28 (d, $J=7,8$, 1H, H-8), 3,1 (d, $J=5,4$ Hz, H-10), 4,7 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, H-11), 3,5-3,70 (m, 4H, H-12 e H-12'), 1,2 (q, $J=7,5$ Hz, 6H, H-13 e H-13'), 8,1 (sl, 1H, NH); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 122,7 (CH, C-2), 111,2 (Co, C-3), 127,8 (Co, C-4), 119,1 (CH, C-5), 118,9 (CH_2 , C-6), 121,7 (CH, C-7), 111,0 (CH, C-8), 136,1 (Co, C-9), 30,4 (CH_2 , C-10), 103,2 (CH, C-11), 61,7 (CH_2 , C-12 e C-12'), 15,3 (2CH_3 , C-13 e C-13'), CG/EM (tempo de retenção = 11,968 min.), m/z (A.R. %) 233 (M^+ , 10), 130 (72), 103 (100), 75 (70).

Dímero (96). Quantidades equimolares de triptamina (base livre, 0,16 g, 0,1 mmol) e cloridrato de triptamina (0,20 g, 0,1 mmol) foram dissolvidas em uma mistura de H_2O (10 ml) e HOAc glacial (0,5 ml), a seguir o ac-IAc-B (0,046 g, 0,2 mmol) foi adicionado, e a mistura reativa foi mantida por 6 horas sob agitação em refluxo sob atmosfera de N_2 em um banho de glicerol a 100°C . Após este intervalo, foi feito um tratamento da mistura reativa em um banho de gelo por 30 min., a seguir o meio reacional foi extraído com acetato de etila (3 vezes de 30 ml). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , e a seguir evaporada, rendendo o produto quase puro, que após purificado por CCD utilizando benzeno:MeOH (90:10) como eluente forneceu 0,034 g (84%) do produto dimérico (96) puro. P.F. = $116-118^\circ\text{C}$; IV (filme em CH_2Cl_2) 3408, 3054 cm^{-1} ; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4,86 (m, 1H, H-3), 3,78 (dd, 1H, $J=3,9$ Hz e $J=15,1$ Hz, H-5 α), 3,47 (m, 1H, H-5 β), 2,97 (m, 1H, H-6 α), 2,90 (m, 1H, H-6 β), 3,18 (m, 2H, H-14-pró-R e H-14-pró-S), 7,10 (s, 1H, H-2'), 7,42

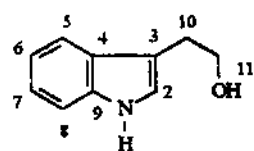
(d, 1H, J= 8,0 Hz, H-9), 7,02 (m, 2H, H-10 e H-11), 7,34 (d, 1H, J= 8,0 Hz, H-12), 7,64 (d, 1H, J= 8,0 Hz, H-5'), 7,12 (m, 2H, H-6' e H-7'), 7,37 (d, 1H, J= 8,0 Hz, H-8'), 10,5 (s, 1H, N1-H), 10,75 (s, 1H, N1'-H), 1,85 (s, 1H, N4-H), 1,85 (s, 3H, NH). RMN ^{13}C (75 MHz) δ 131,3 (Co, C-2), 54,9 (CH, C-3), 43,1 (CH₂, C-5), 20,1 (CH₂, C-6), 127,6 (Co, C-8), 119,0 (CH, C-9, *), 119,1 (CH, C-5', *), 120,4 (CH, C-10, #), 120,2 (CH, C-6', #), 123,3 (CH, C-11, ^), 122,9 (CH, C-7', ^), 112,6 (CH, C-12, \$), 112,3 (CH, C-8', \$), 107,7 (Co, C-7, †), 107,8 (Co, C-3', †), 128,4 (Co, C-8, ◆), 127,6 (Co, C-4', ◆), 138,2 (Co, C-9', ☆), 138,5 (Co, C-13, ☆); HRMS m/z (A.R. %) 301,15732 (M^+ , 10, C₂₀H₁₉N₃), 171,08902 (100), 130,06203 (15).

*, #, ^, \$, †, ◆, ☆ = valores intercambiáveis.

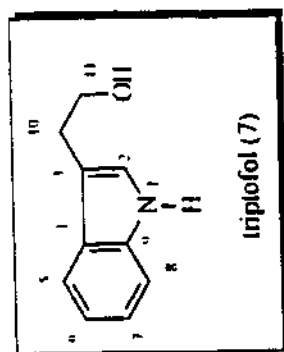
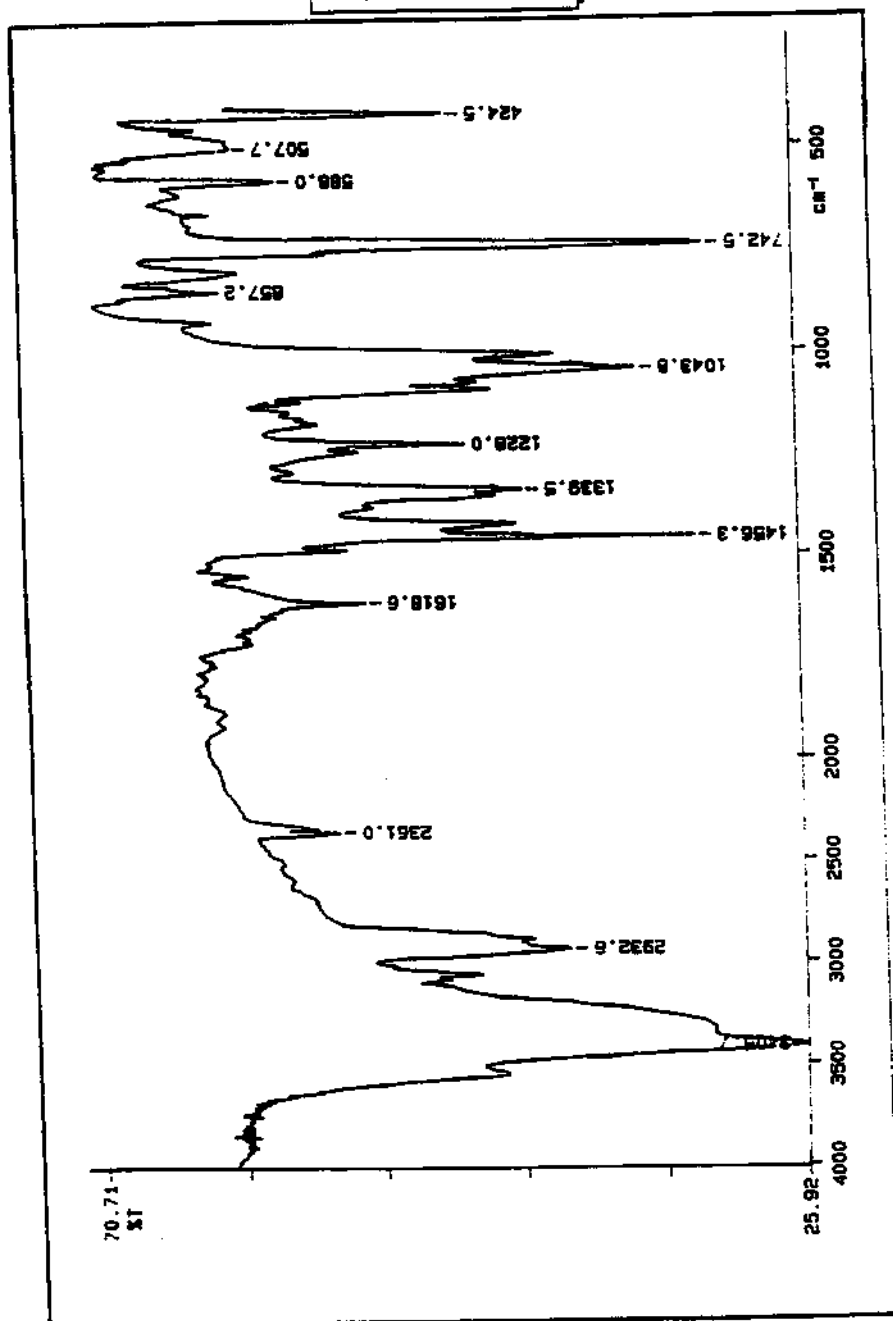
ESPECTROS DOS COMPOSTOS

PREPARADOS NA

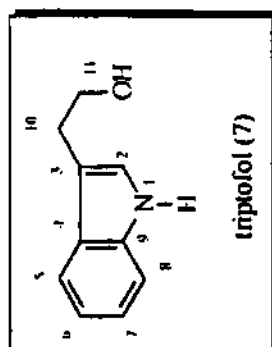
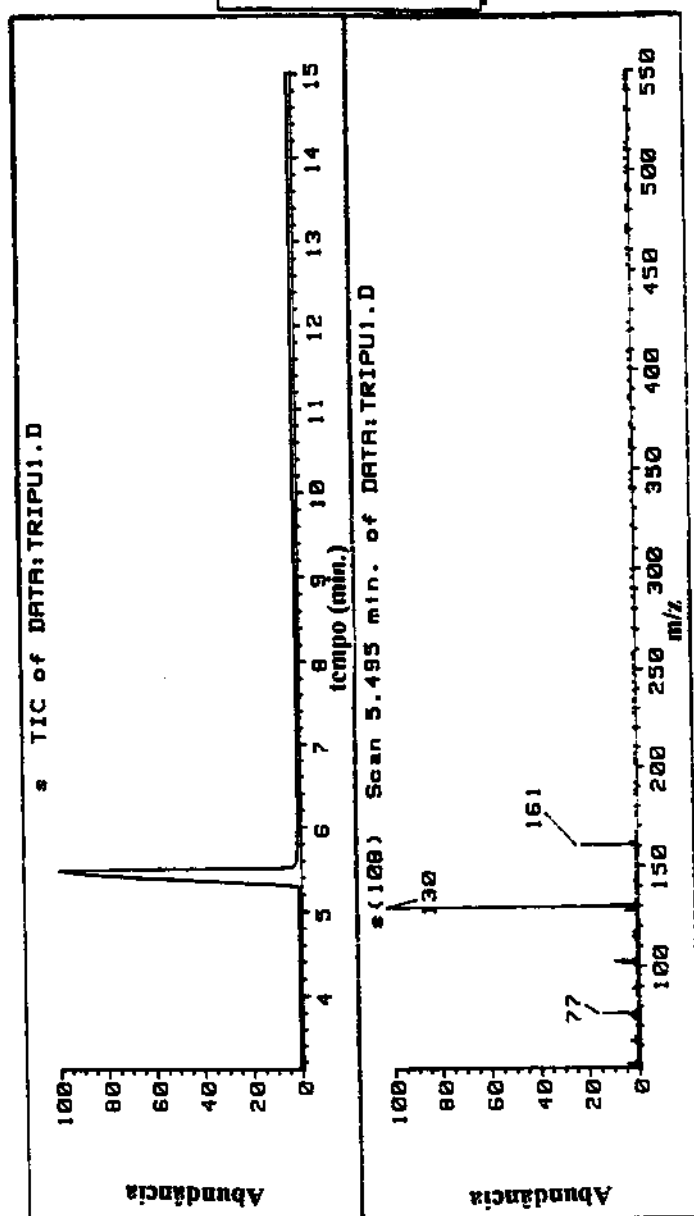
SÍNTESE



triptofol (7)

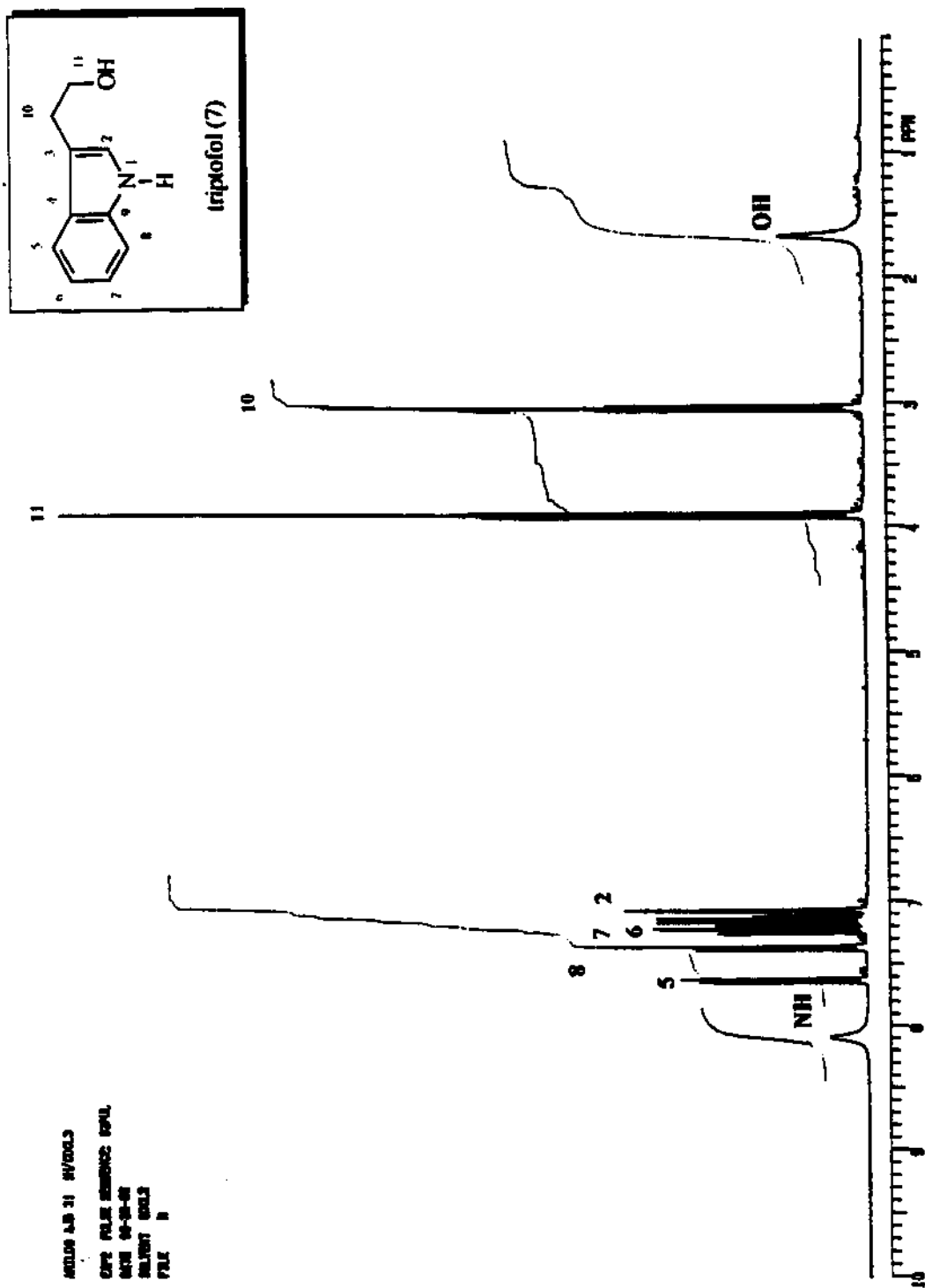


Espectro no infravermelho do triptofol (7).



Espectro de massas de CG/EM do triptofol (7).

000000 11 00/0000
 0000 00000000 0000
 0000 00-00-00
 000000 0000
 0000 0



Espectro de RMN ^1H do triptofol (7).

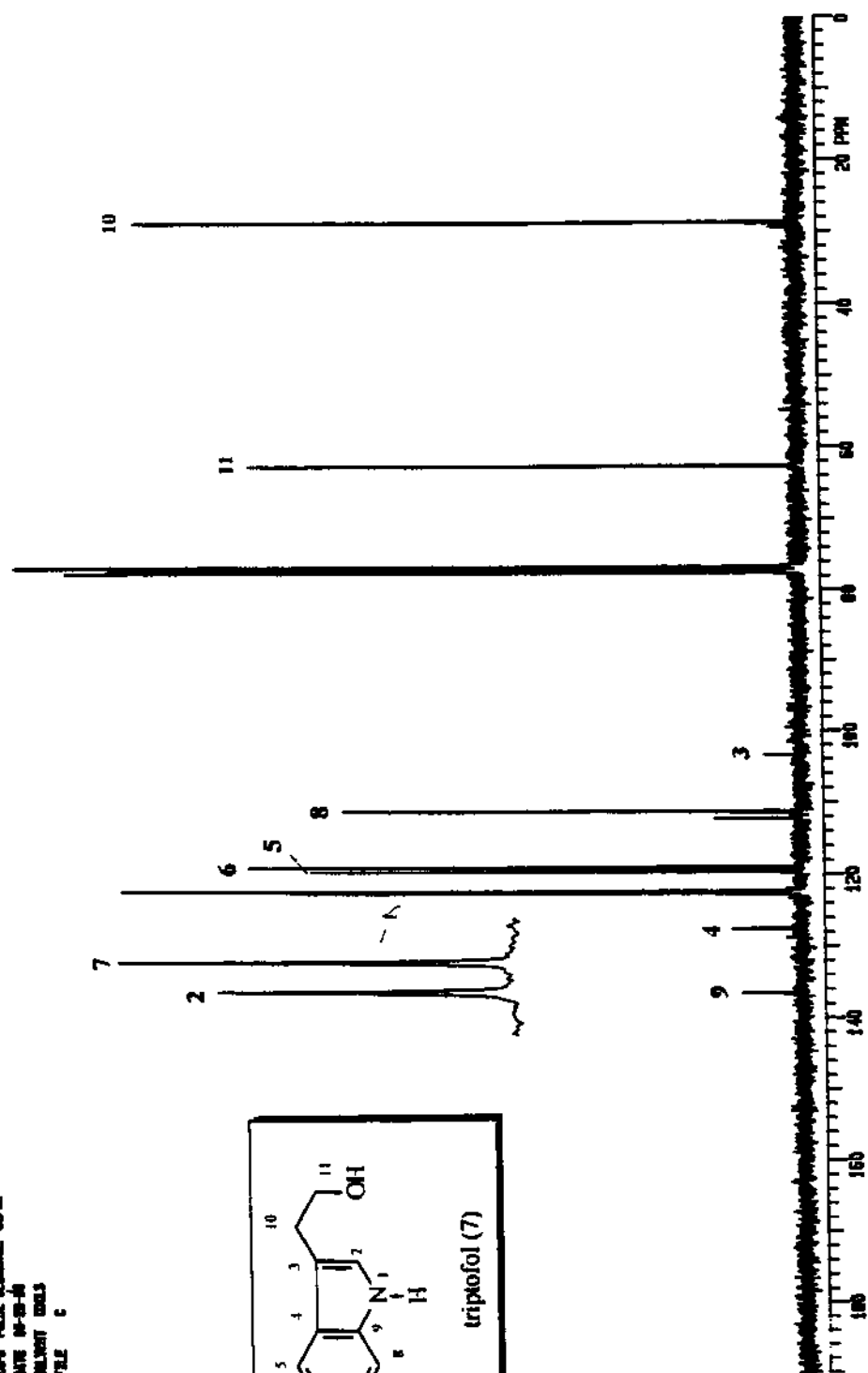
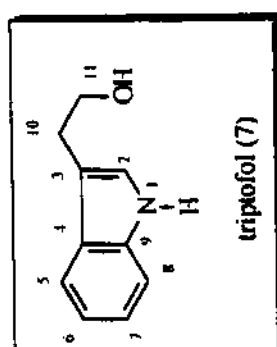
ARLDO AMN 12C/001.3

0070 PULSE PROGRAM 0070

DATE 04-29-80

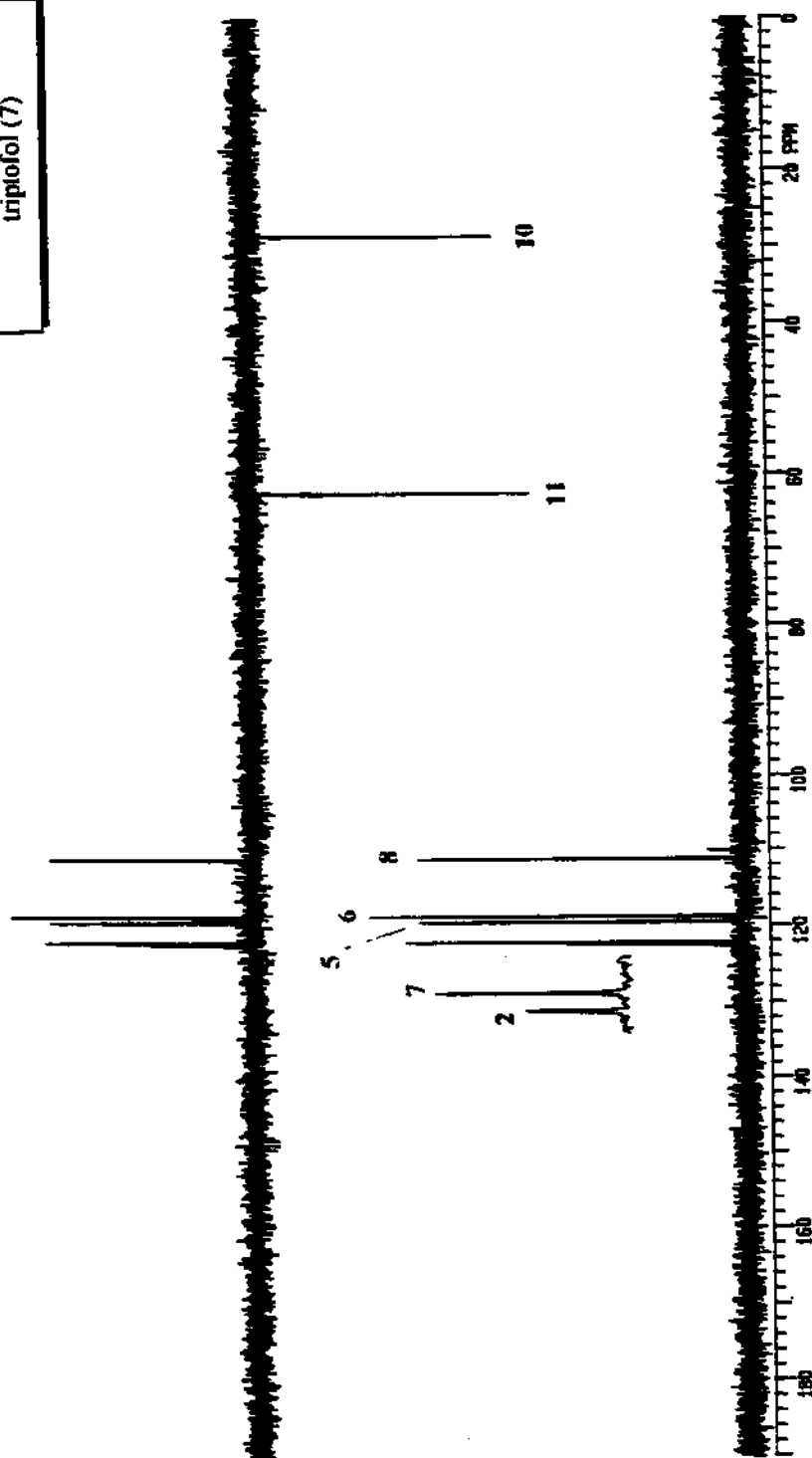
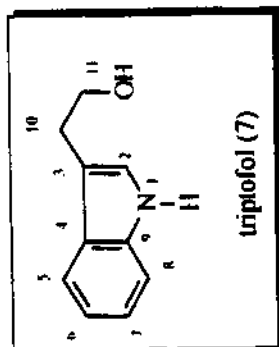
SOLVENT DMS

FILE C

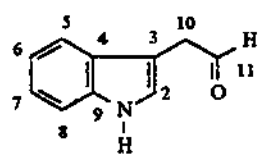


Espectro de RMN ^{13}C do triptofol (7).

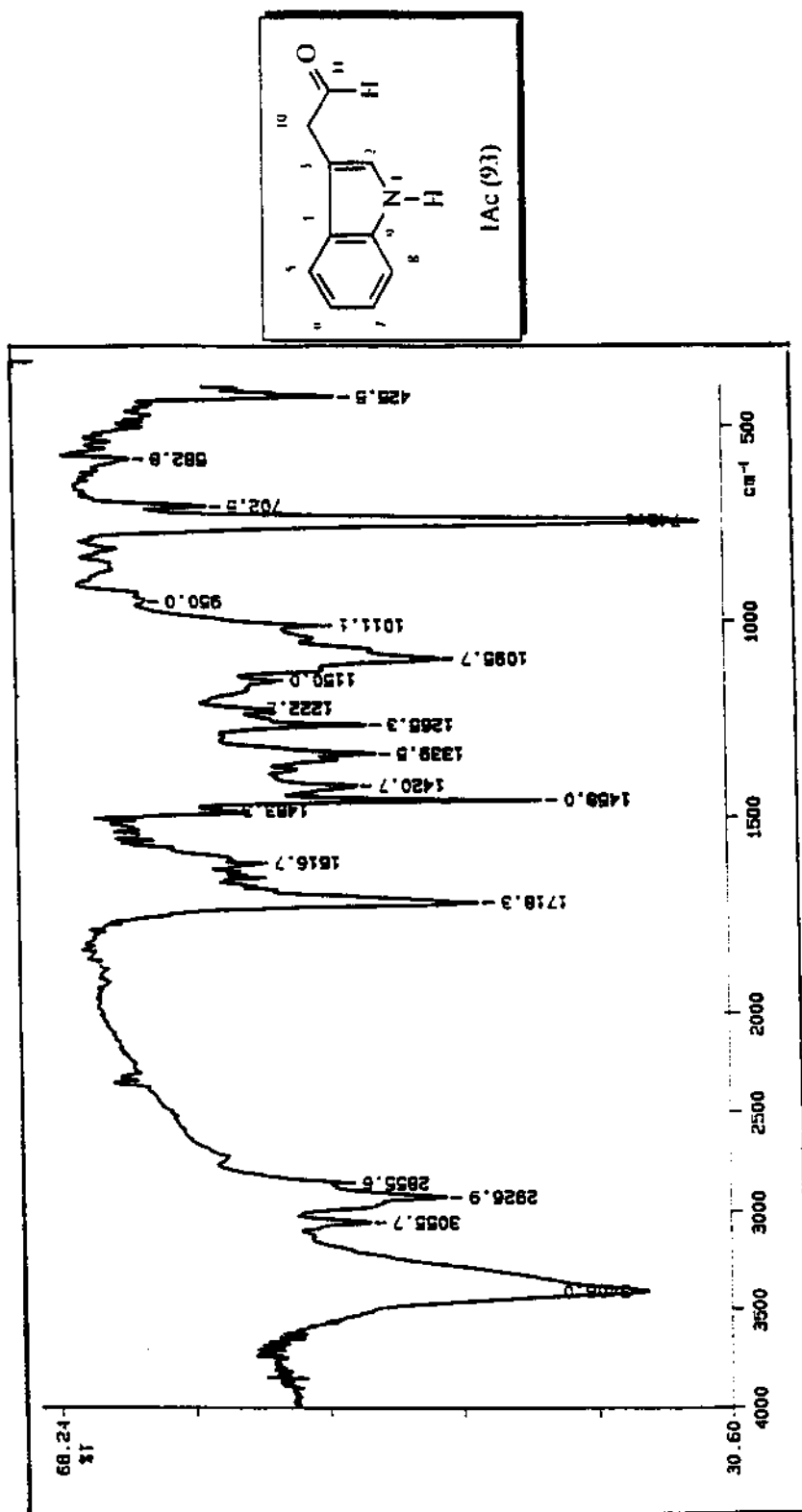
AM101414001 13C/DEPT
 EXP4 PULPROG 13C/DEPT
 DATE 04-05-00
 SOLVENT CDCl3
 FILE DEPT



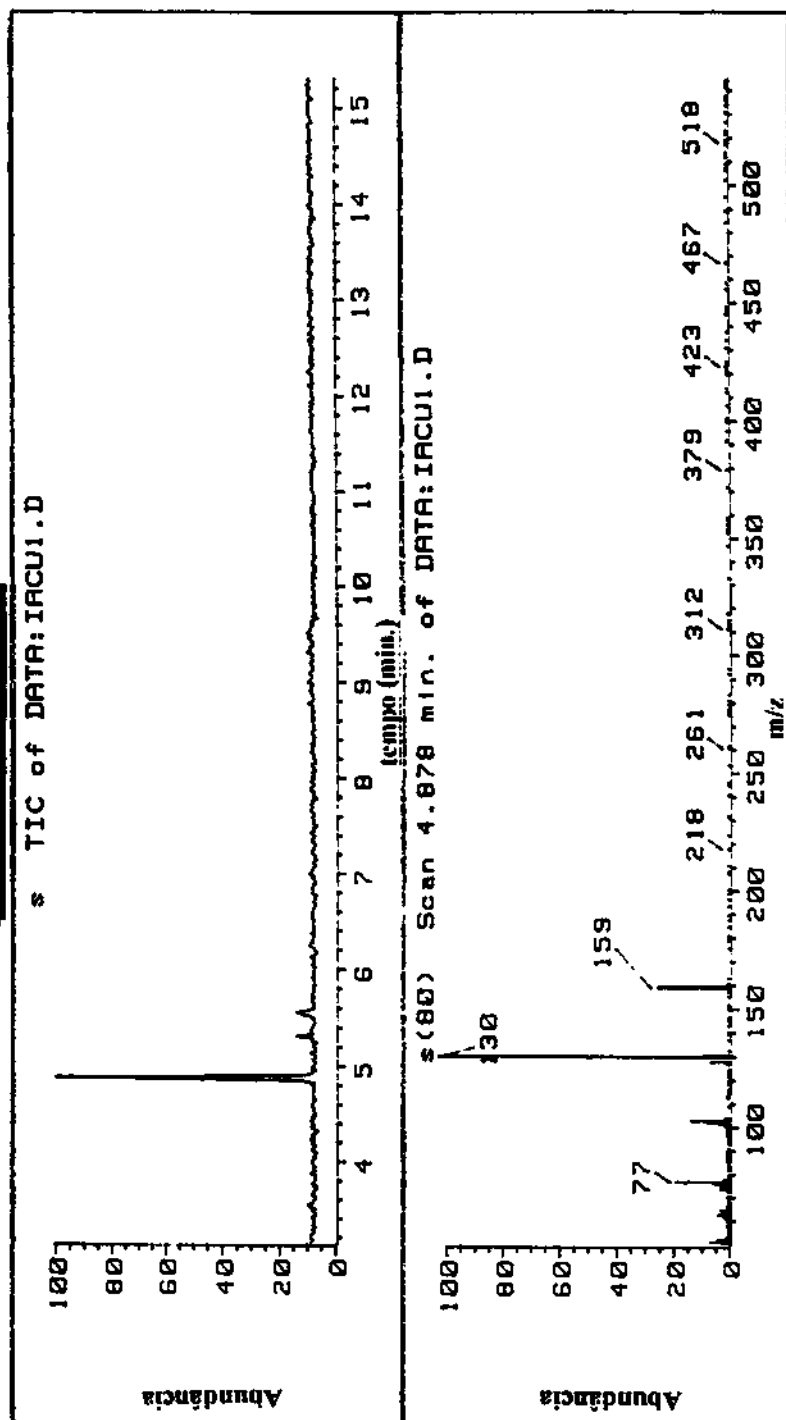
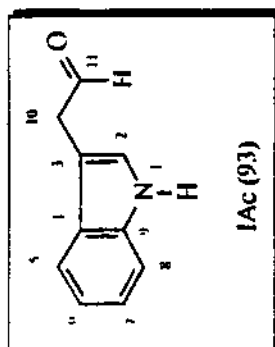
Espectro DEPT de RMN ^{13}C do triptofol (7).



lac (93)



Espectro no infravermelho do 3-indol-acetaldeído (93).

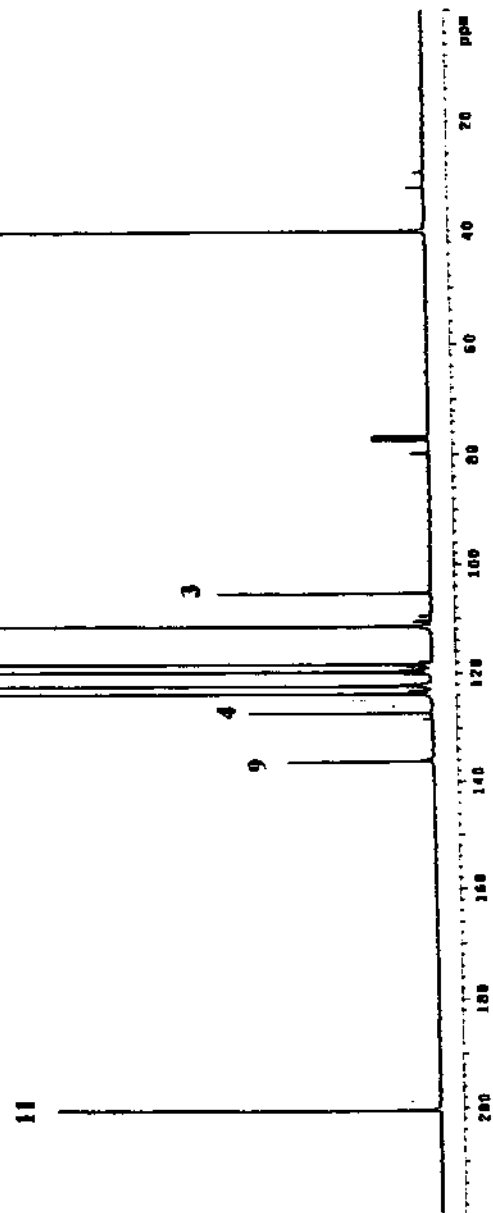
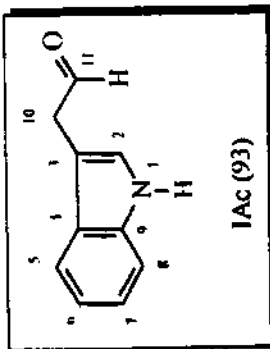


333 Espectro de massas de CG/EM do 3-indol-acetaldeído (93).



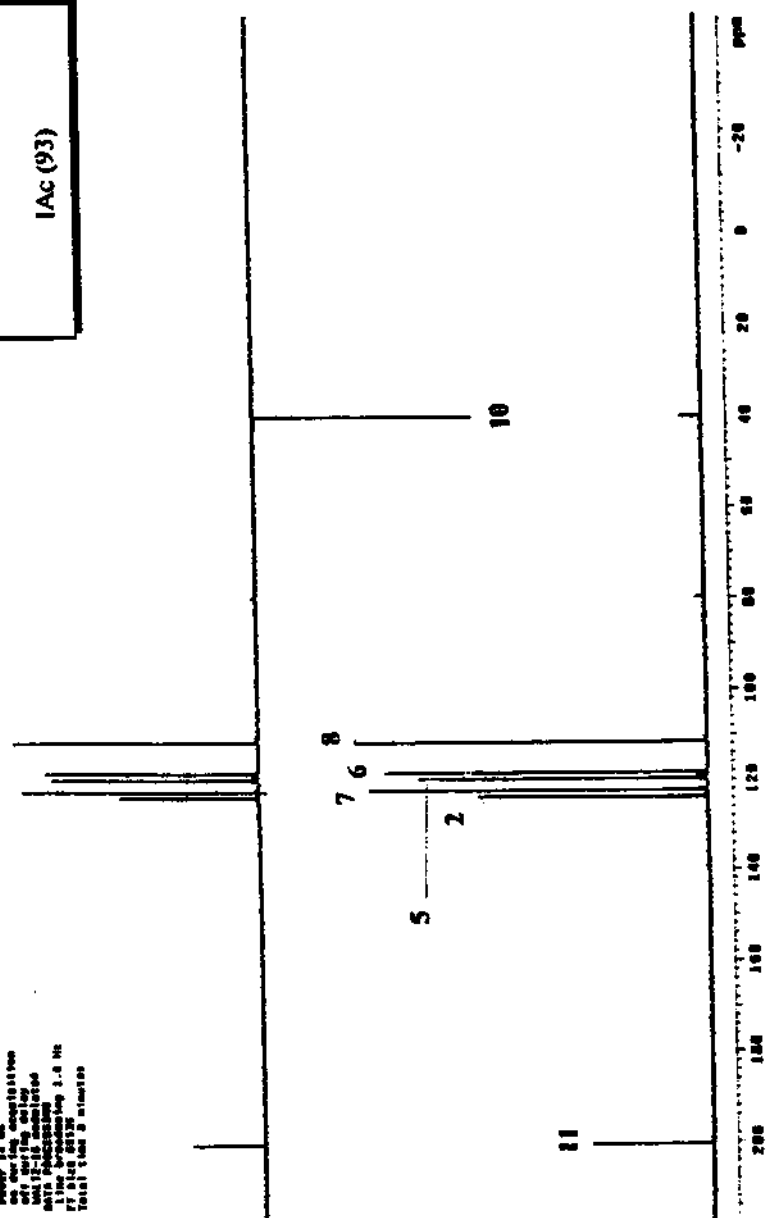
```

arido "Iac(12)" setis20C
Solvent: CDCl3
Solvent Temperature
Acquisition Date: 08/01/2008
Pulse Sequence
NUC1: 13C
NUC2: 13C
Acq: 1200.1488 sec
SOL: 120000.0 Hz
F2: 125.7618000 MHz
SOLVENT: CDCl3
Sample: 12. 001. 000000000000
Pulse 14 of 16
Pulse 15: 120000.0 Hz
Pulse 16: 120000.0 Hz
DATA PROCESSING
F1: 125.7618000 MHz
F2: 125.7618000 MHz
Total Time: 20 minutes
  
```

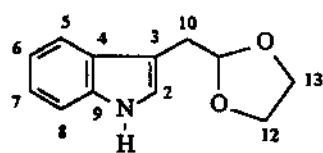


Espectro de RMN ^{13}C do 3-indol-acetaldeido (93).

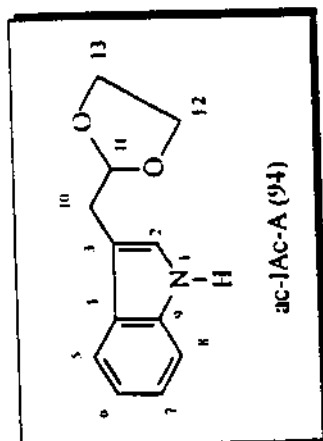
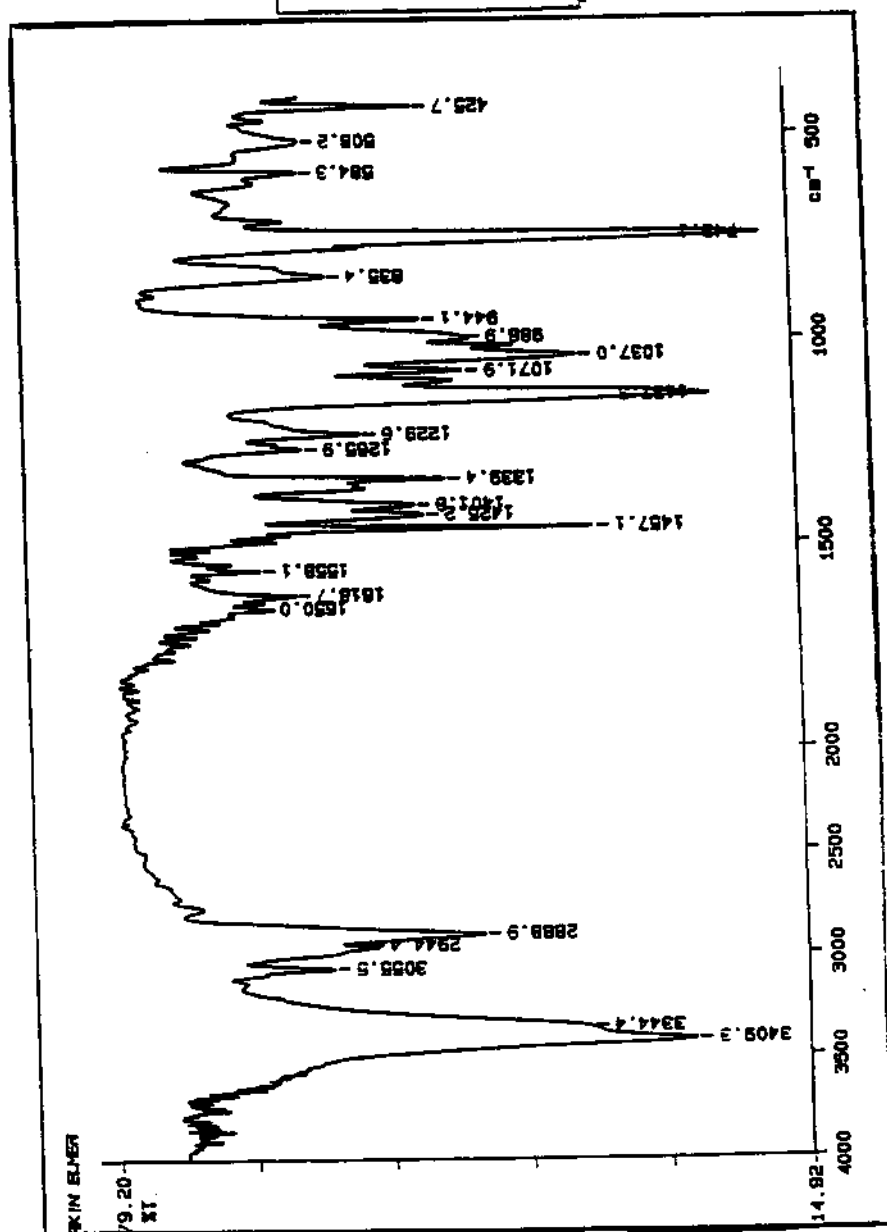
Chemical structure of IAC (93) is shown, which is a substituted indole derivative. The structure features a benzene ring fused to a pyrrole ring. The pyrrole ring has a methyl group at position 2 and a side chain at position 3. The side chain consists of a methylene group (CH₂) attached to a carbonyl group (C=O). The carbonyl group is labeled with '11' and 'H'. The side chain is labeled with '10' and 'H'. The pyrrole ring is labeled with '1' and 'H' at the nitrogen atom. The benzene ring is labeled with '5' and 'H' at the position ortho to the fusion point, and '7' and 'H' at the position para to the fusion point.



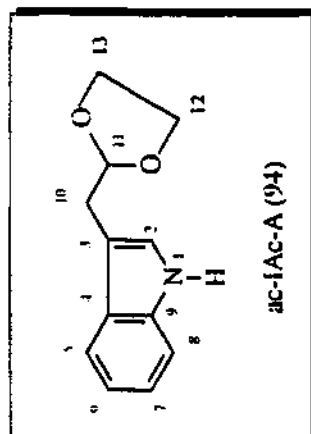
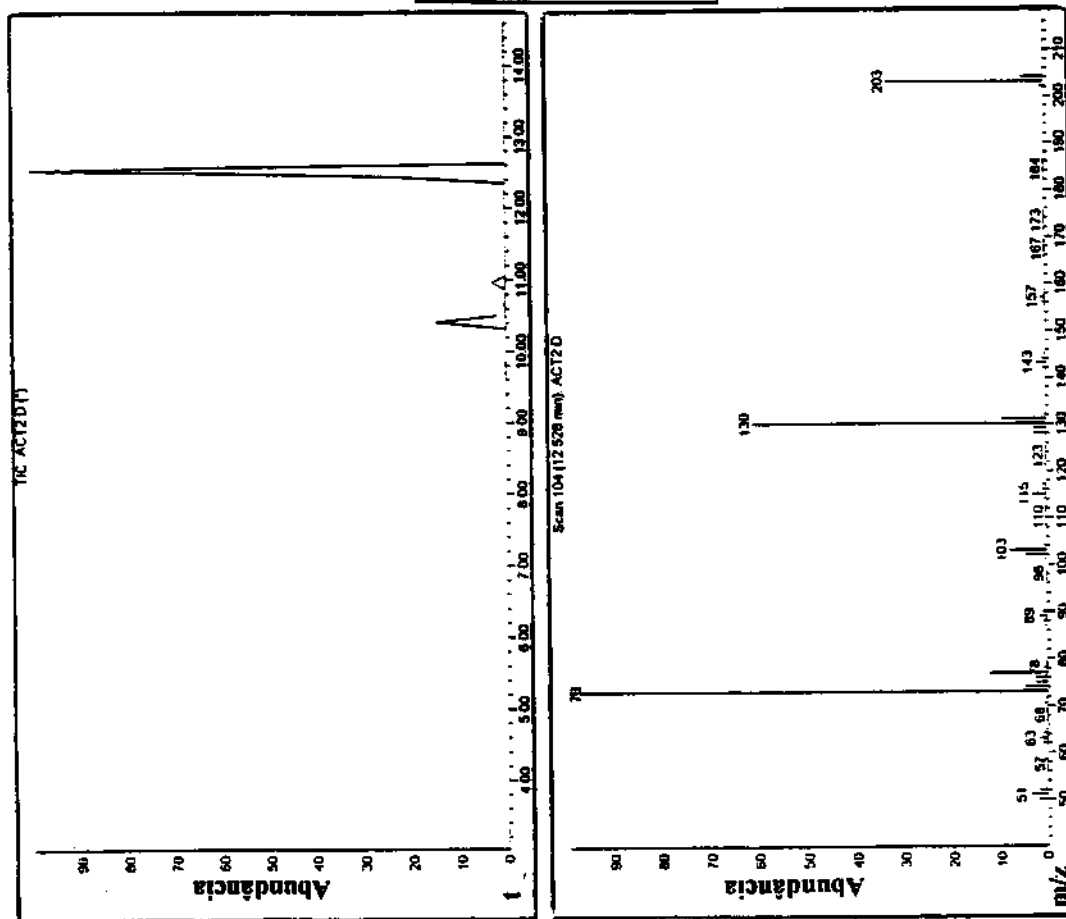
Espectro DEPT de RMN ^{13}C do 3-indol-acetaldeído (93).



ac-lac-A (94)

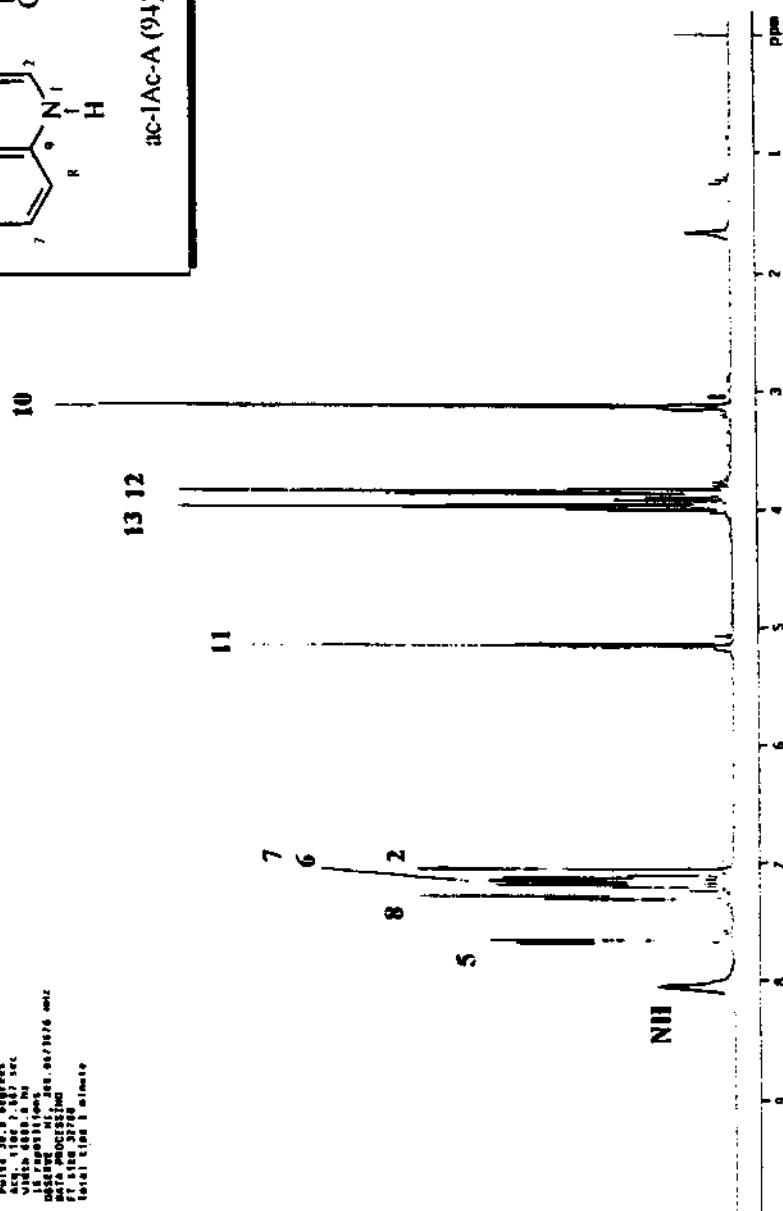


Espectro no infravermelho do 1Ac-A (94).



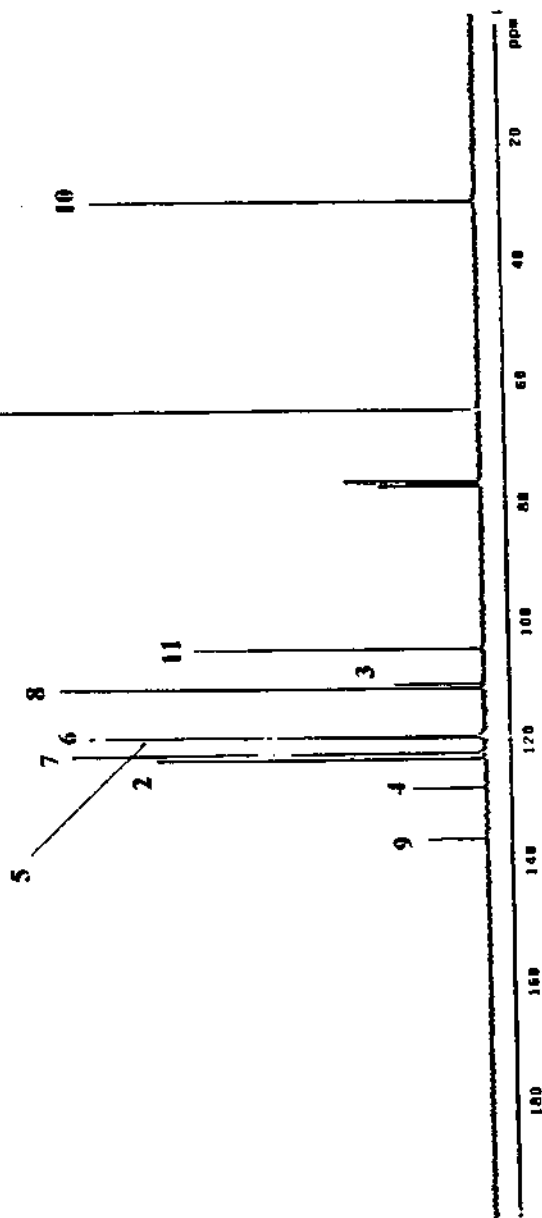
Espectro de massas de CG/EM do ac-IAc-A (94).

Chemical structure of ac-1Ac-A (94) is shown. It features a benzene ring fused to a pyrrole ring. The pyrrole ring has a nitrogen atom (N1) with a hydrogen atom (H) and a substituent R. The benzene ring is numbered 1 through 6. The pyrrole ring is numbered 1 through 4. A side chain is attached to the pyrrole ring at position 2, consisting of a methylene group (10) and a tetrahydrofuran ring (11, 12, 13).



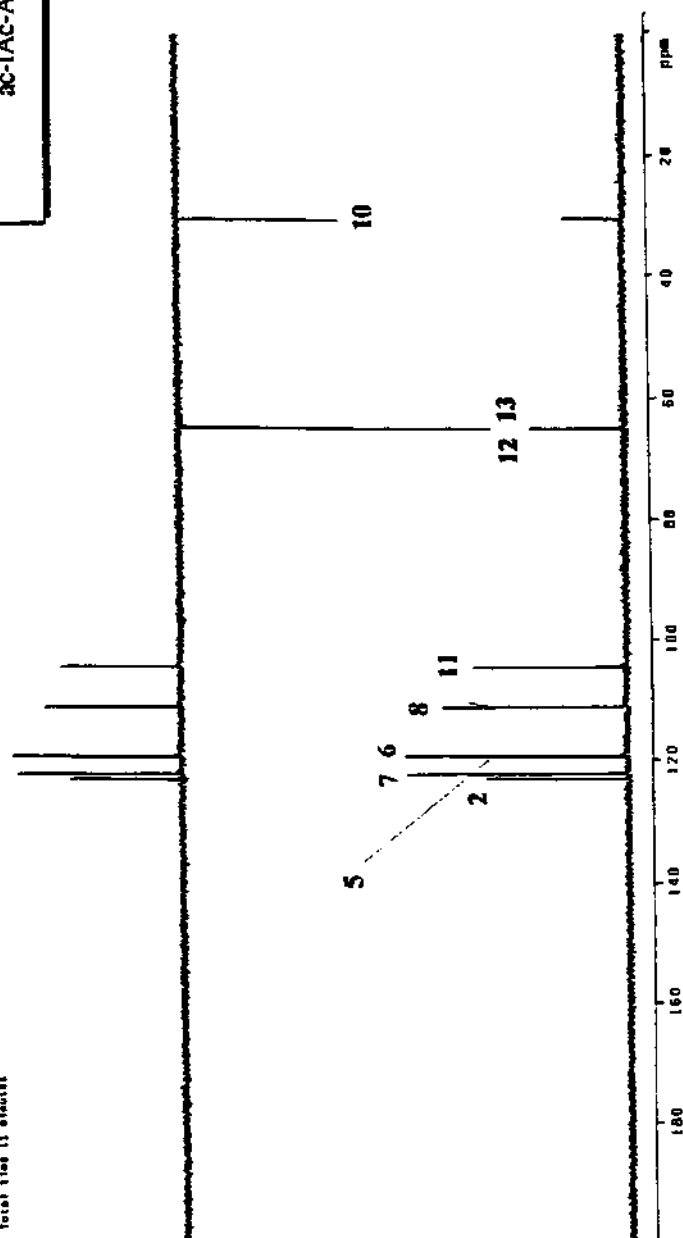
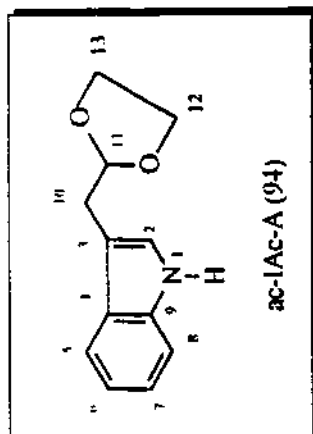
Espectro de RMN ^1H do ac-IAC-A (94).

Chemical structure of ac-IAC-A (94) is shown. It consists of an indole ring system substituted with a 2-(4,5-dihydroisoxazol-2-yl)ethyl group. The atoms are numbered 1 through 13. The indole nitrogen is labeled 1, with a hydrogen atom attached. The carbons of the indole ring are labeled 2 through 9. The ethyl chain carbons are labeled 3 and 4. The isoxazole ring carbons are labeled 10 and 11, and the oxygen atom is labeled 12. The acetyl group is labeled 13.

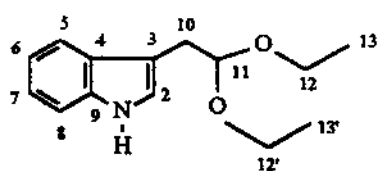


Espectro de RMN ^{13}C do ac-IAc-A (94).

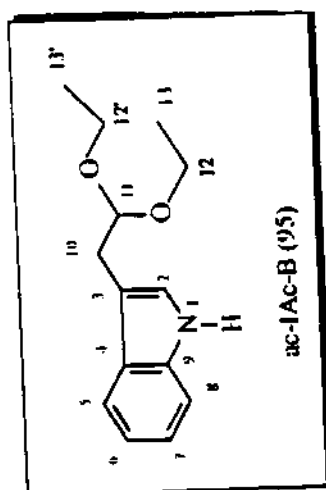
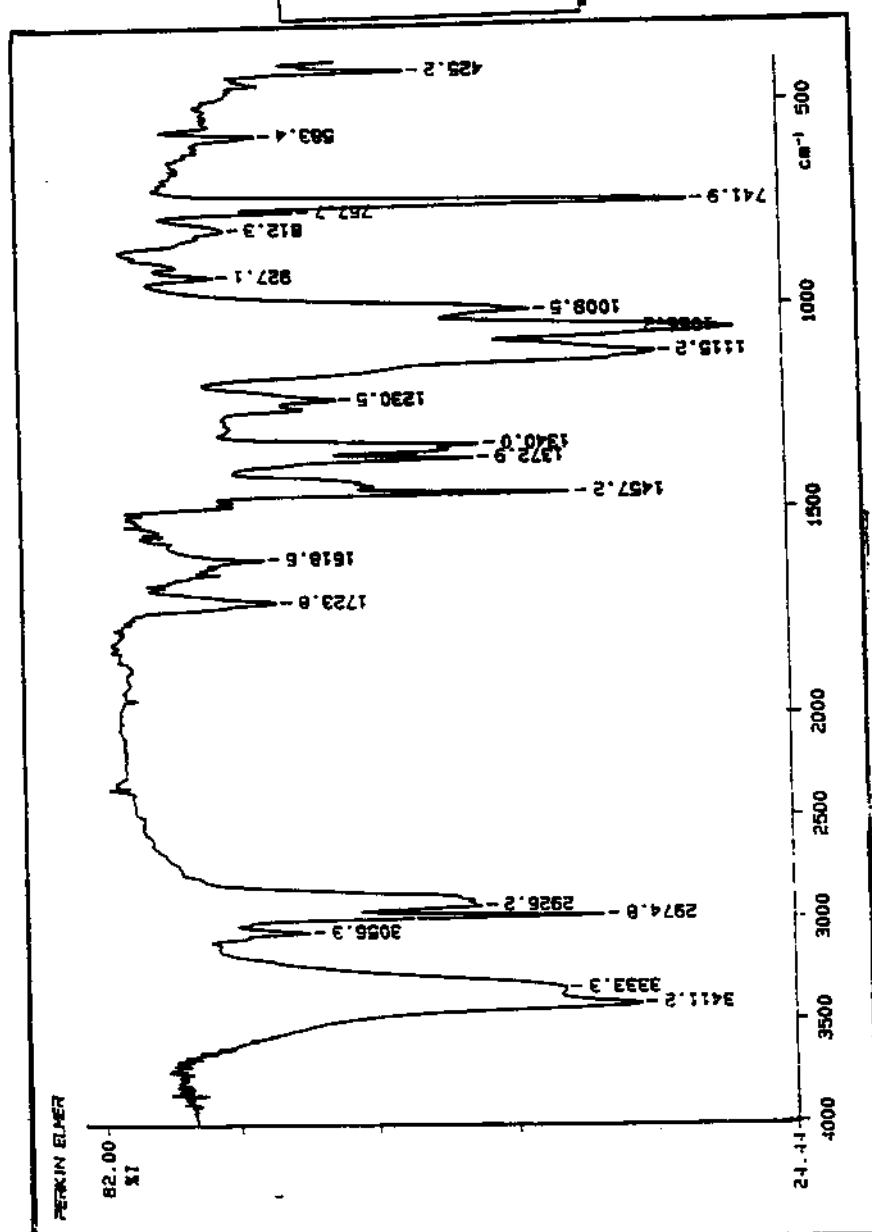
arquivo "A3B-45" cdc15/105 nov14jpb
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 CHN12-3000 "gpc13"
 Pulse sequence: zgpg30
 Relaxation delay: 2.00 sec
 Delay: 30.00 sec
 ACG: 1.00 sec
 Width: 1.600 sec
 Width: 2.000 sec
 Frequency: 125.761 MHz
 Observed: C13: 75.452001 MHz
 Observed: H1: 200.626176 MHz
 Acquisition: 1.00 sec
 On during Acquisition
 off during delay
 SALT2-1E: 0.000000
 Data processing:
 FT size: 65536
 Total time: 15.00 minutes



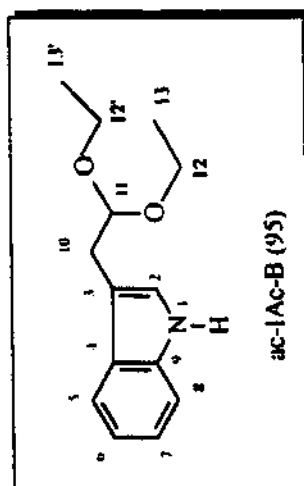
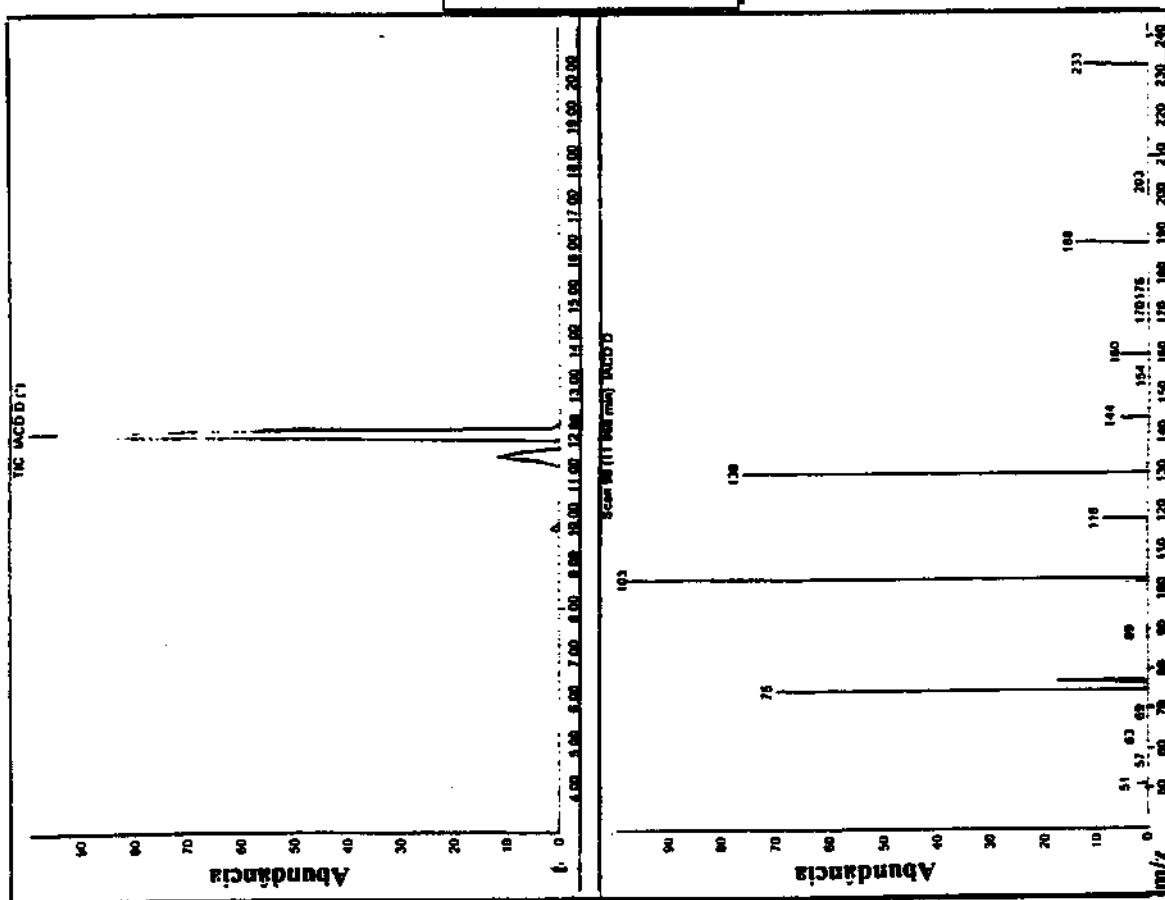
Espectro DEPT de RMN ^{13}C do ac-IAC-A (94).



ac-lac-B (95)

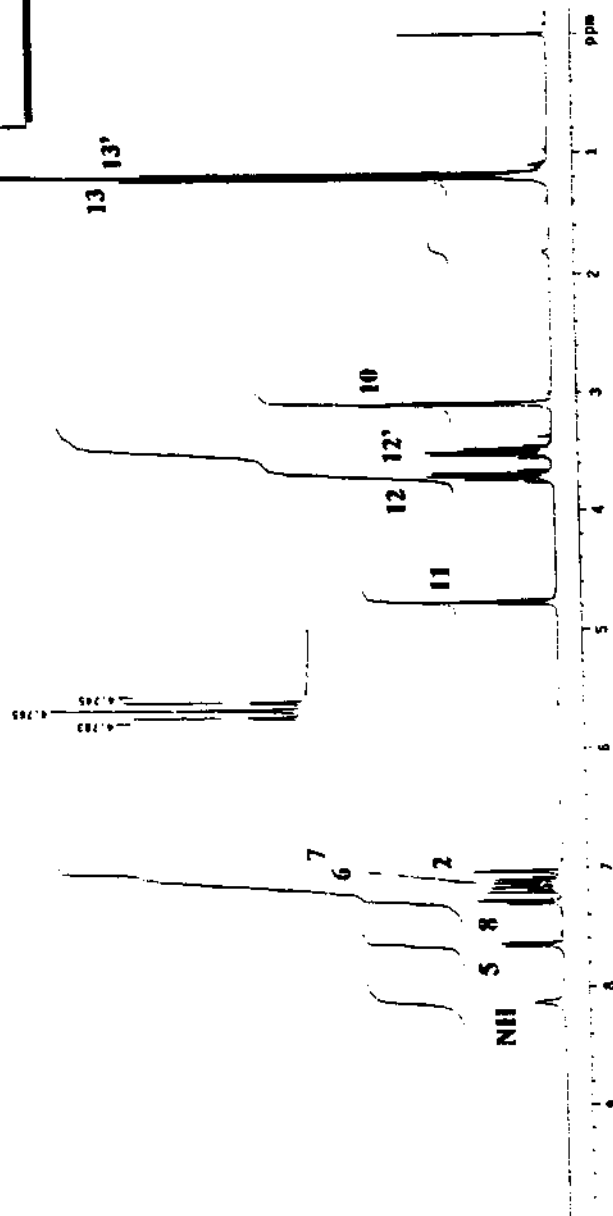


Espectro no infravermelho do ac-IAC-B (95).



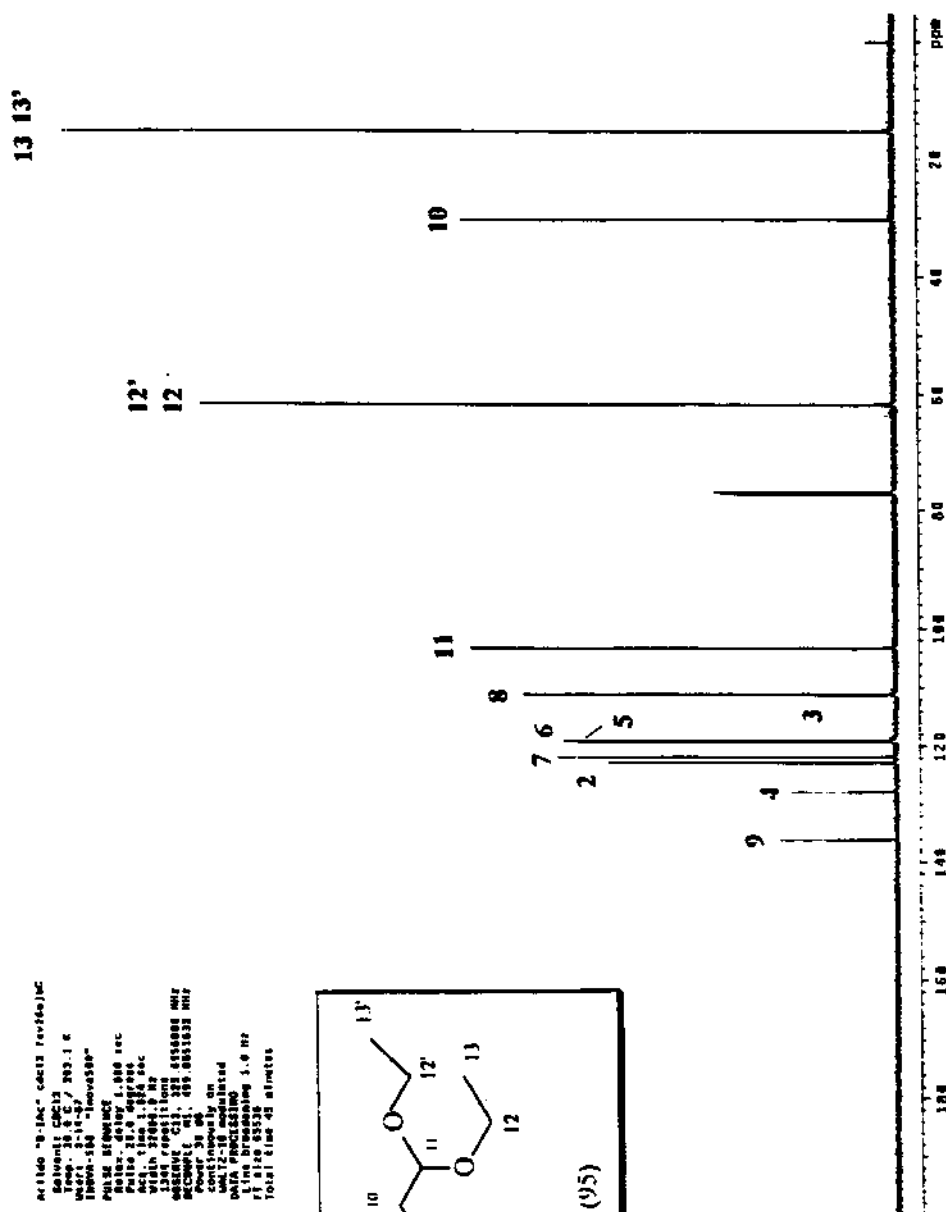
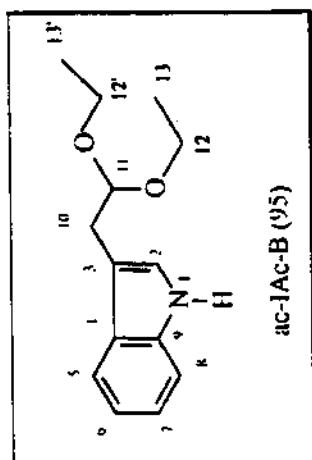
Espectro de massas de CG/EM do ac-Iac-B (95).

Chemical structure of ac-IAC-B (95) is shown. It features a benzene ring fused to a pyrrole ring. The pyrrole ring has a hydrogen atom (H) attached to the nitrogen atom (N). The benzene ring is numbered 1 through 6, and the pyrrole ring is numbered 7 through 9. The side chain is numbered 10 through 13, and the acetyl group is numbered 13'.

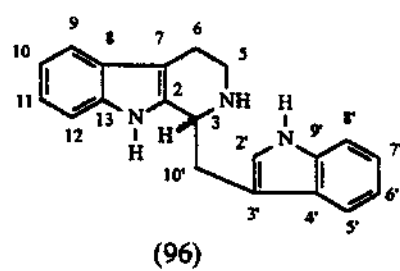


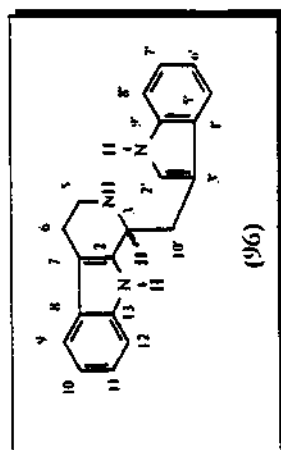
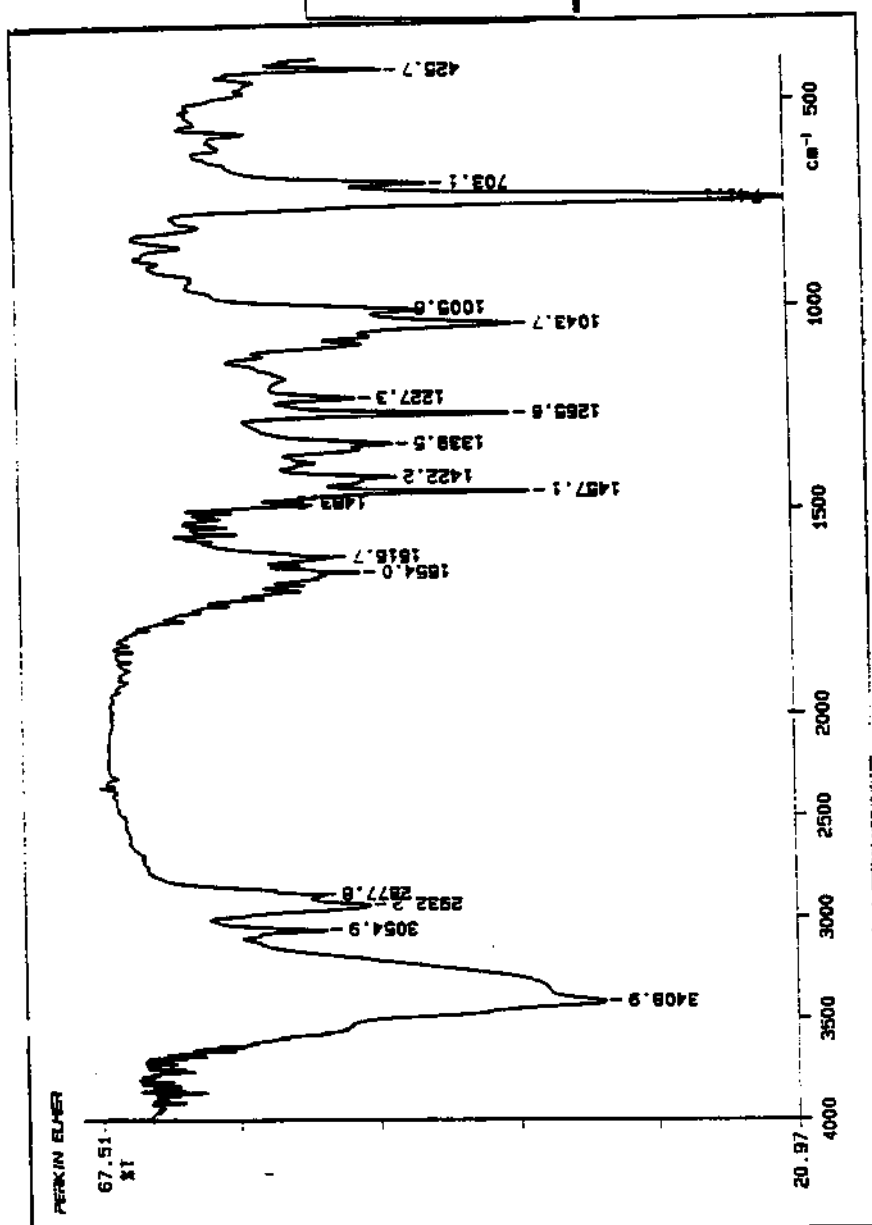
Espectro de RMN ^1H do ac-IAc-B (95).

AC100 75-1AC' CMC13 Tcvf0aJMC
 Date: 11-01-97 10:11:37
 1000-150 -1000550
 PULSE SEQUENCE: zgpg30
 Relaxation delay: 2.00 sec
 Pulse 21.4 degrees
 Acq. time: 1.345 sec
 FID file: 1000550.fid
 F2 file: 1000550.f2
 F3 file: 1000550.f3
 RECONV: 0.1 0.05 0.051633 MHz
 Power: 0.00 on
 Unit: 1.00 on
 Unit: 1.00 on
 DATA PROCESSING
 F2 file: 1000550.f2
 F3 file: 1000550.f3
 Total time: 42 minutes

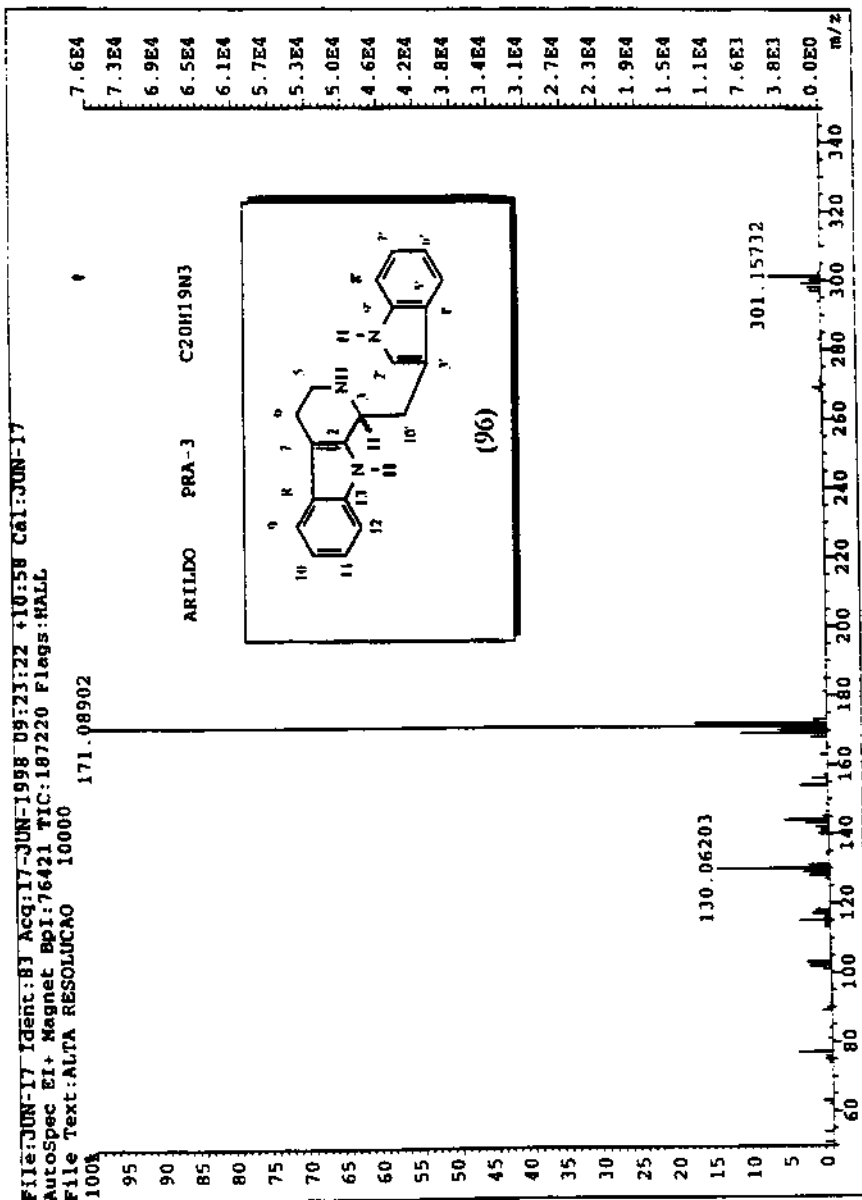


Espectro de RMN ^{13}C do ac-IAC-B (95).

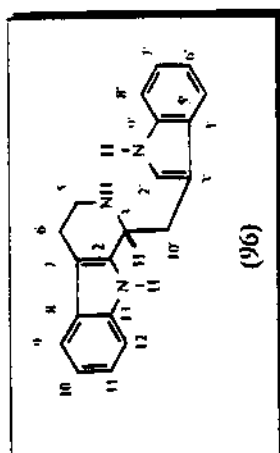




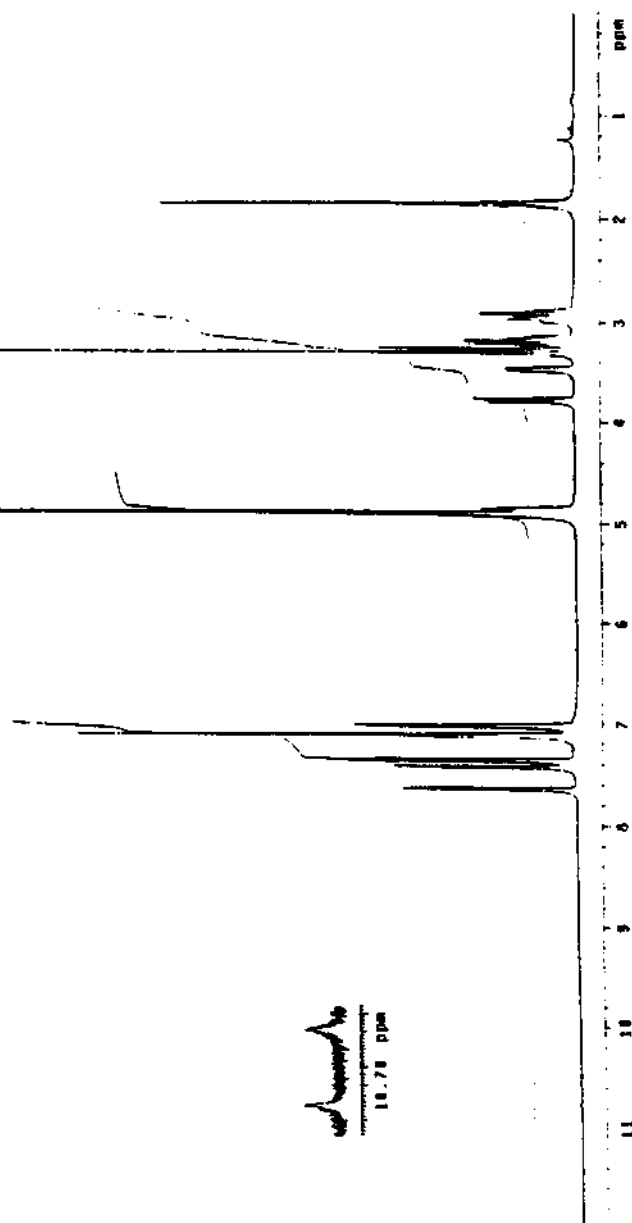
Espectro no infravermelho do dímero (96).



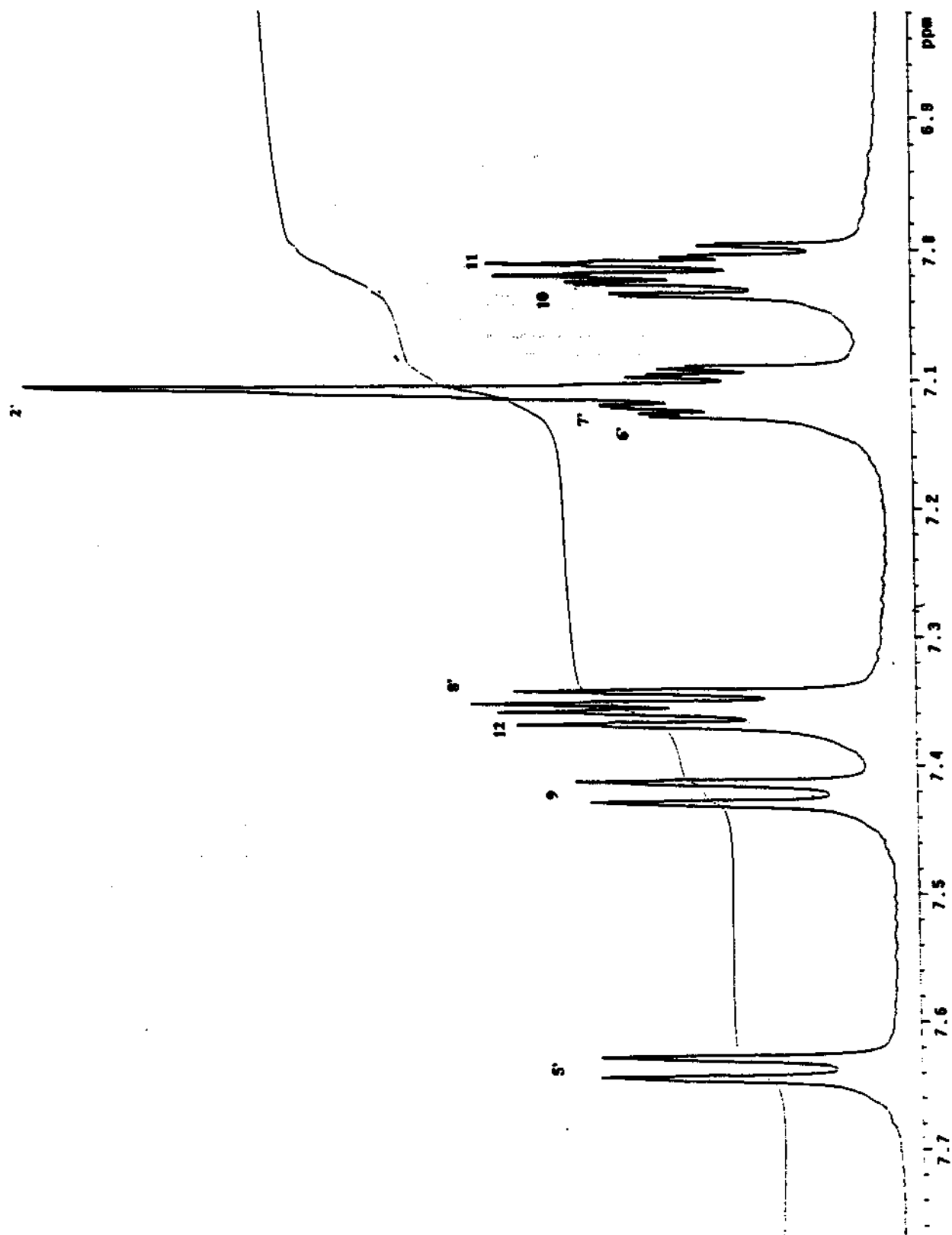
351 Espectro de massas de MEM do dímero (96).



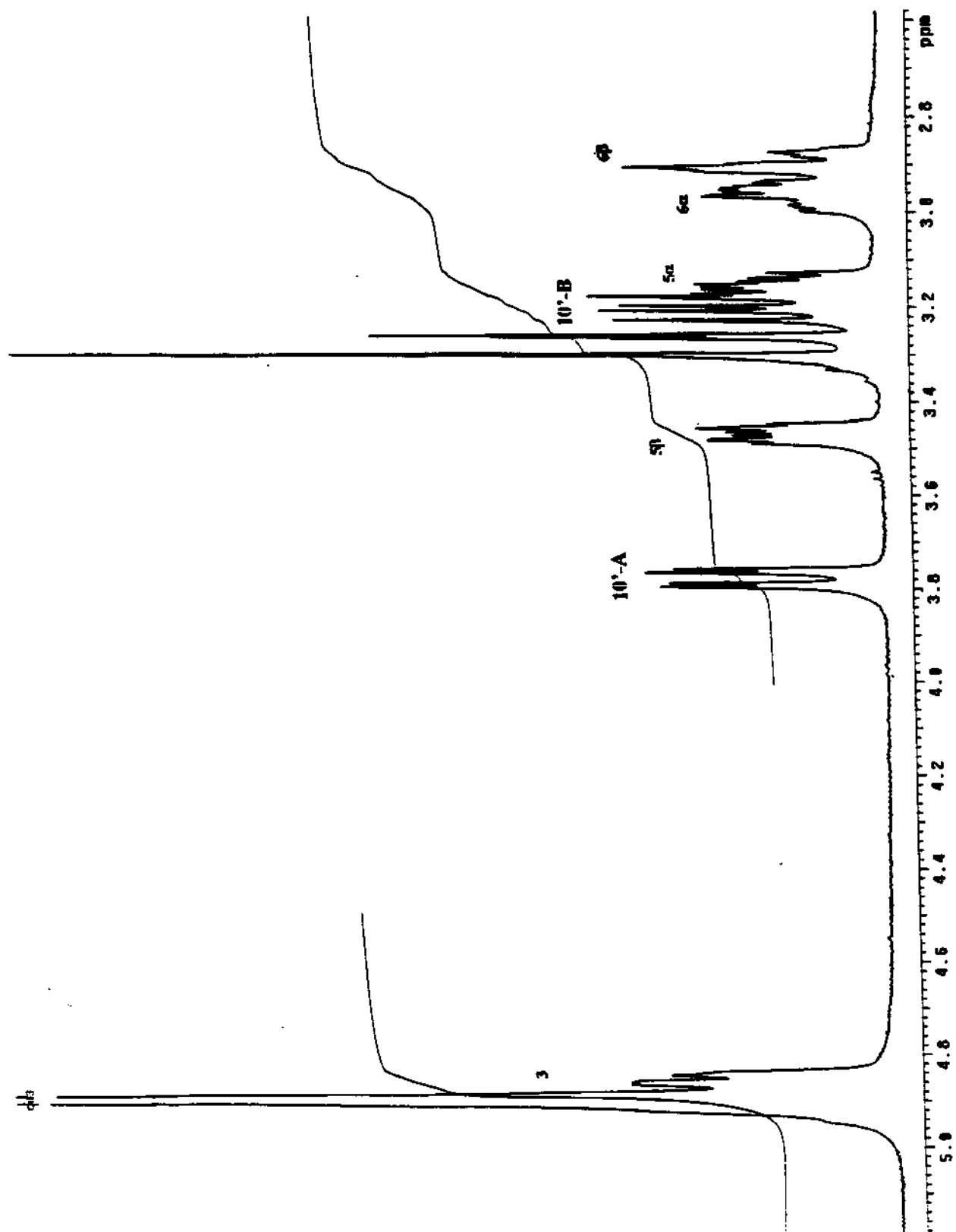
acqf10 - 400 MHz CDCl₃ 400 MHz
 Solvent: cdcl3
 Acquisition Date: 20080501
 Acquisition Time: 10:00:00
 Processing Date: 20080501
 Processing Time: 10:00:00
 F2: 400.136 MHz
 F1: 101.254 MHz
 A1: 320.000 MHz
 A2: 101.254 MHz
 Total time: 2.00 min



Espectro de RMN ¹H do dímero (96) em CDCl₃



33 Espectro de RMN ^1H do dímero (96) em CDCl_3 , ampliado de 6,90-7,70 δ .



32 Espectro de RMN ^1H do dímero (96) em CDCl_3 , ampliado de 2,80-5,00 δ .

Pulse sequence: s2pul1

Solvent: Acetone

Ambient temperature

File: ju29ufbexp11b

INOVA-500 "mircon"

PULSUS ASQUENSCH

Relax. delay 0.200 sec

Pulse 10.7 degrees .

Acq. time 2.657 sec

W14th 6080.0 Hz

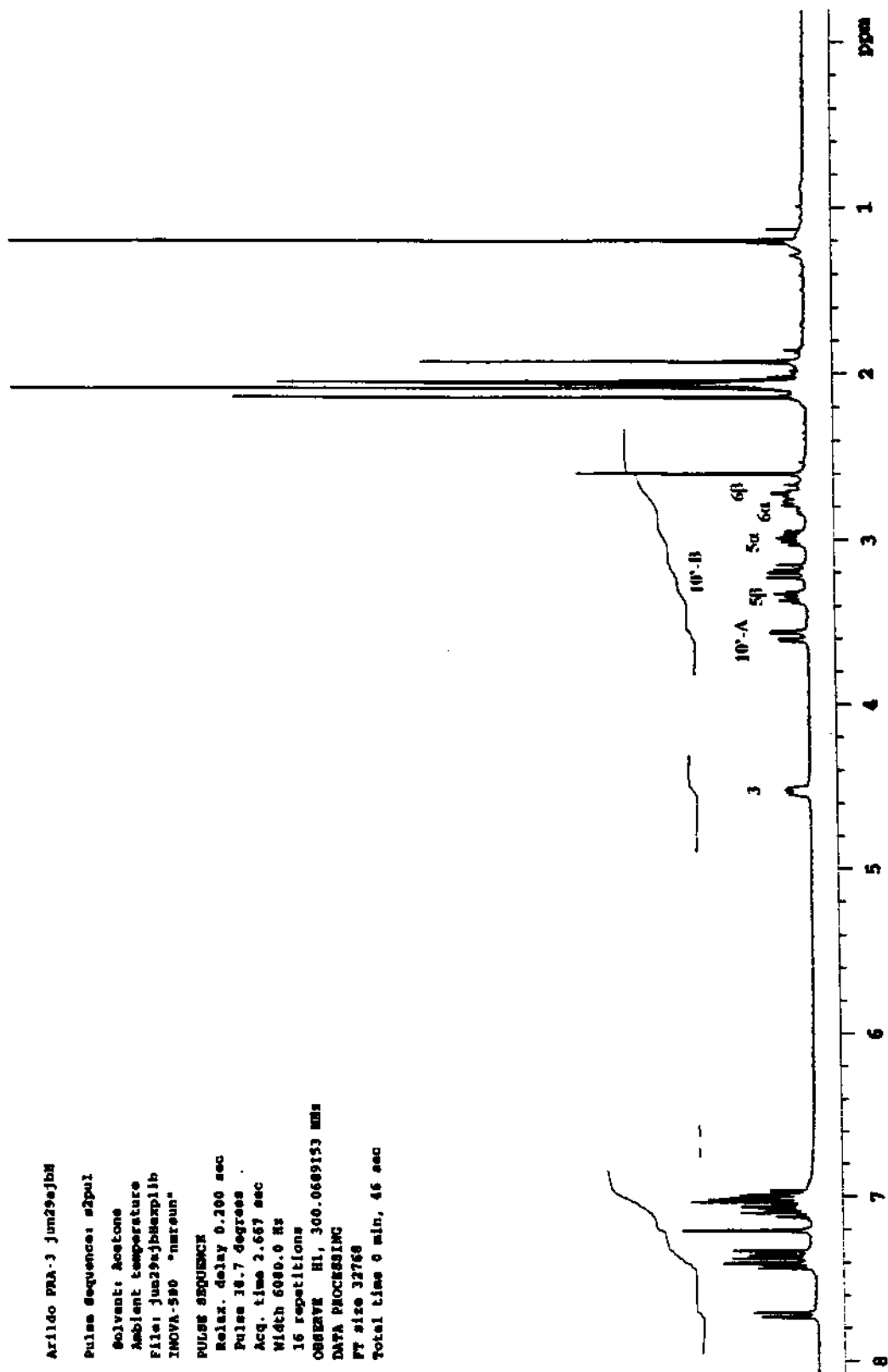
16 repetitions

TO DIRECTOR

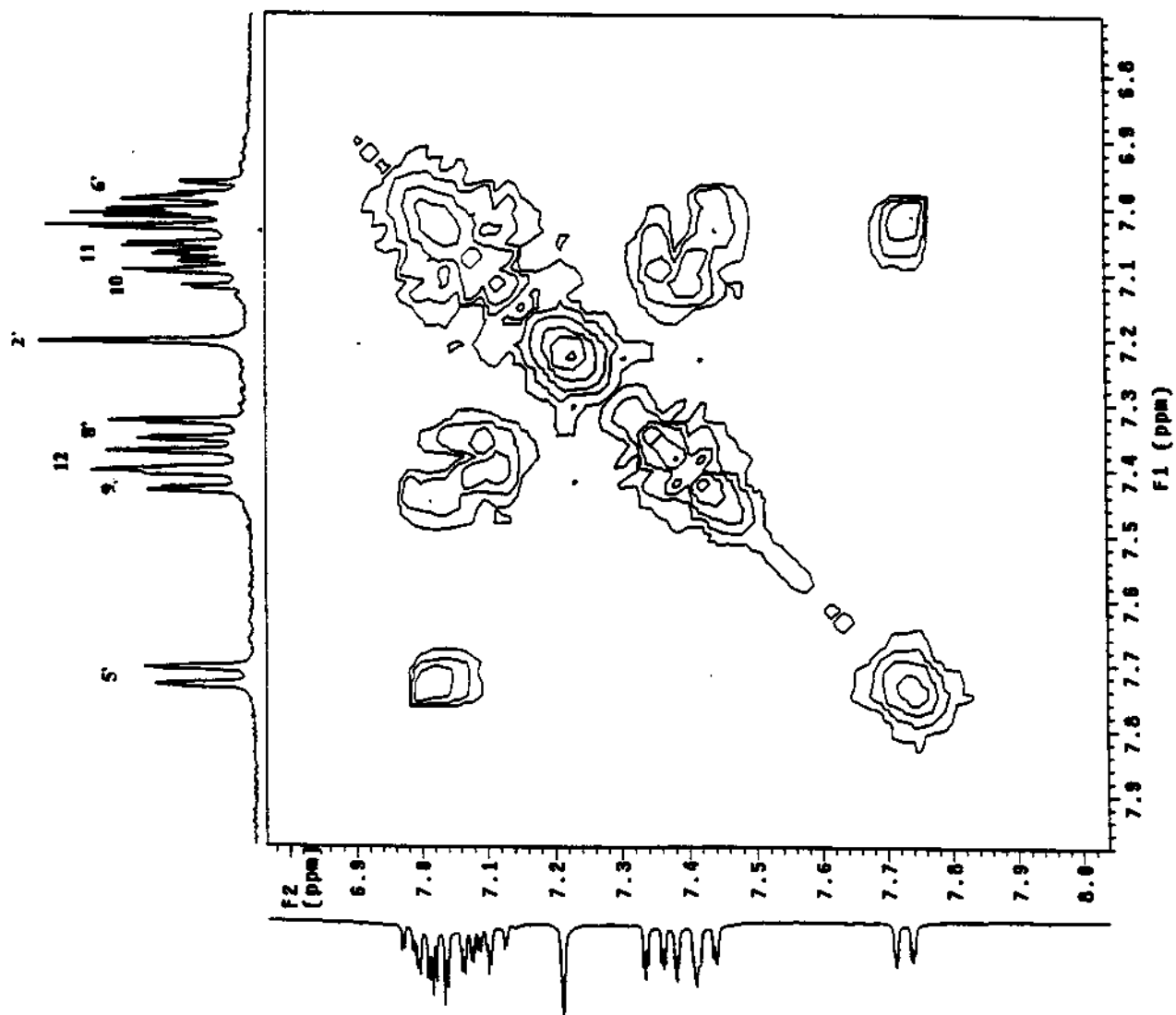
DATA PROCESSING

DATE 03/20/2018

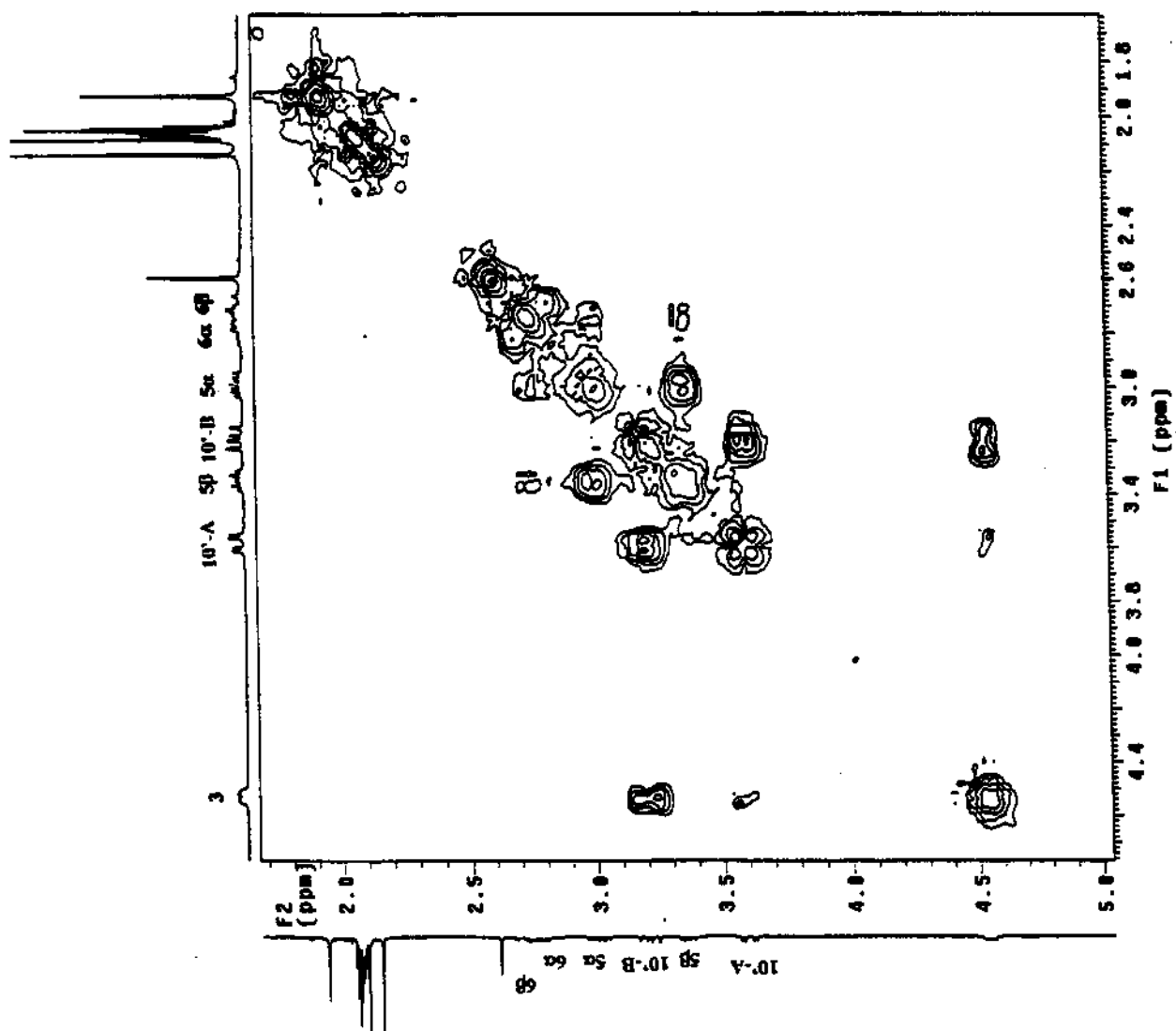
PT #120 32760
Total time 0 min, 46 sec



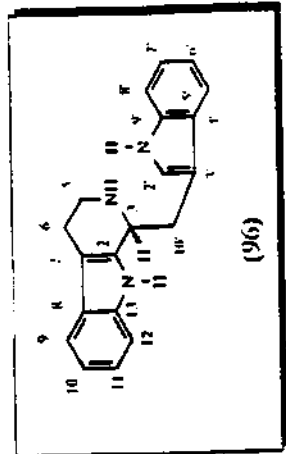
Espectro de RMN ^1H do dímero (96) em acetona deuturada.



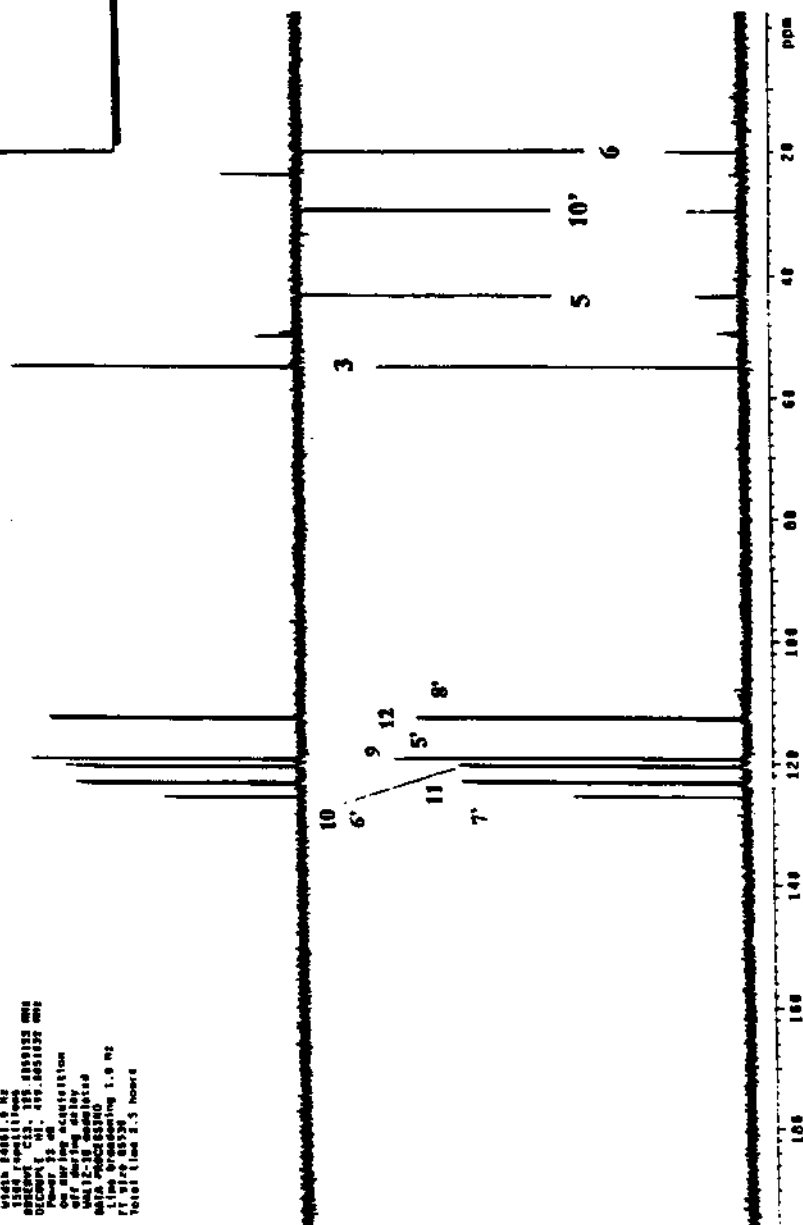
38 **Espectro de COSY do dímero (96) em acetona deuterada, ampliado de 6,90-7,70 δ .**

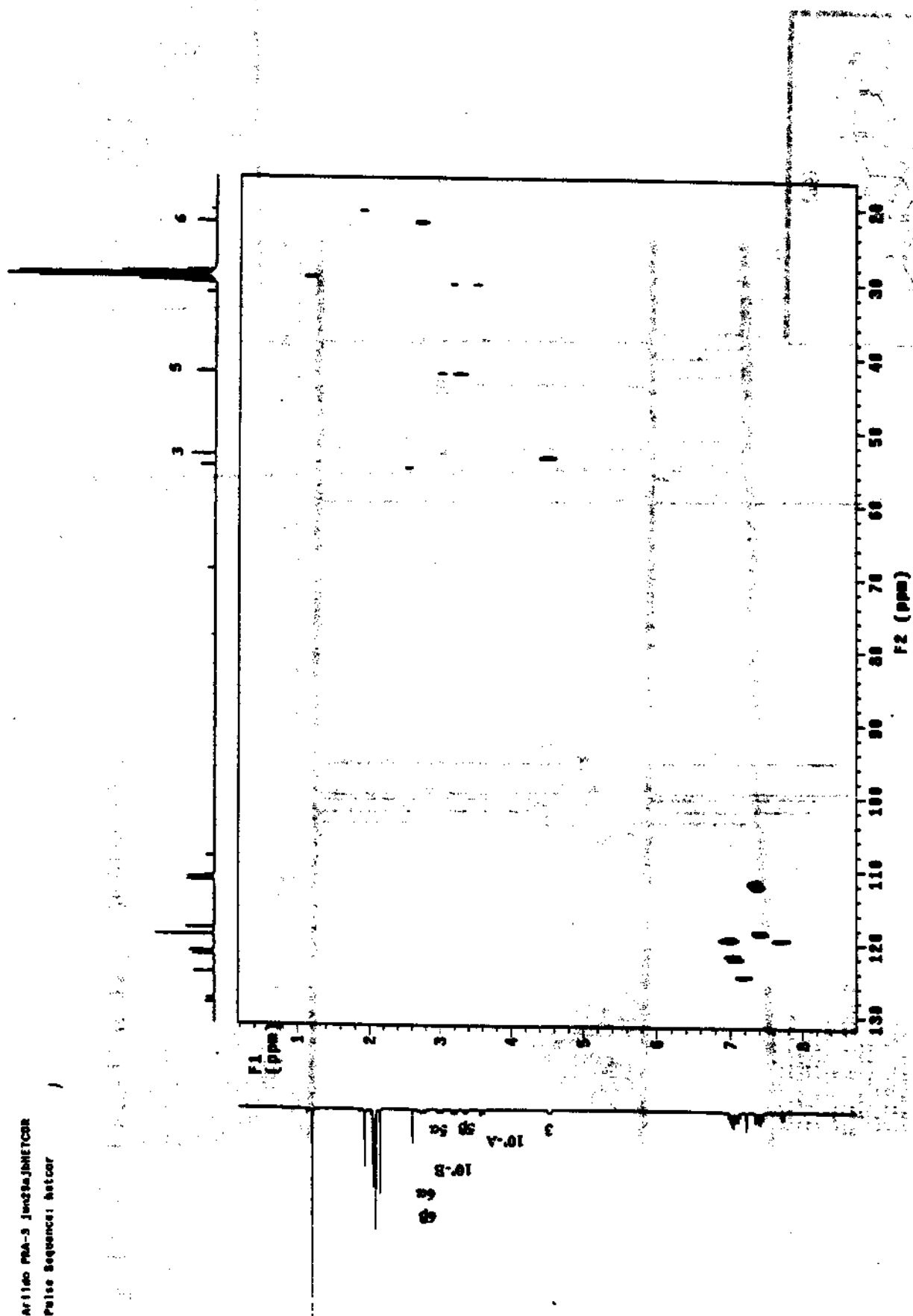


357 Espectro de COSY do dímero (96) em acetona deuterada, ampliado de 1,80-5,00 δ .



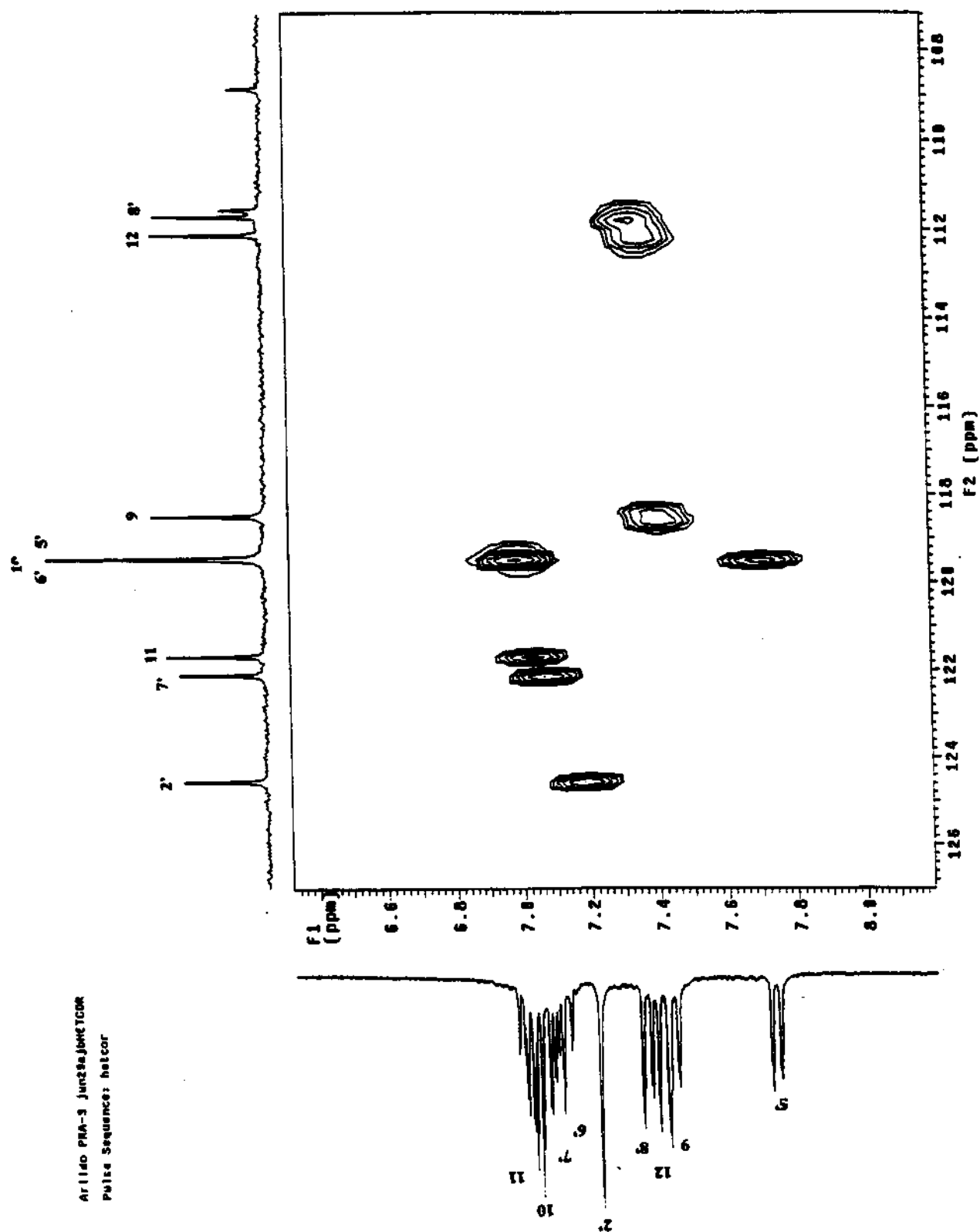
(96)





360 Espectro de HETCOR do dímero (96) em acetona deuterada.

Arilido PEA-3 jun28a.jun28a
 Pulse Sequence: hetcor



Espectro de HETCOR do dímero (96) em acetona deuterada, ampliado de 6,90-7,70 δ .

CONCLUSÕES FINAIS

⇒ O estudo fitoquímico das seis espécies de *Aspidosperma* levou ao isolamento e identificação de vinte e dois compostos puros, entre eles quatorze não haviam sido isolados anteriormente nas espécies estudadas. Os compostos 15-metóxi-aspidospermina (19) e 15 metóxi-pirifolidina (20) são novos.

⇒ O método de análise usando-se combinadamente CG/DIC, CG/EM e Índice de Kováts permitiu detectar e quantificar as diversas classes de alcalóides presentes nos extratos alcaloidicos das espécies estudadas, e é o primeiro trabalho usando-se CG capilar associada a detecção por DIC para os extratos alcaloidicos das seis espécies do gênero *Aspidosperma*. Este método é rápido e eficaz para alcalóides solúveis em clorofórmio e pode dar assistência a estudos biogenéticos.

⇒ As espécies *A. pyricollum*, *A. olivaceum*, *A. polyneuron* e *A. ramiflorum*, apresentaram atividade antimicrobiana e também pode-se relacionar a atividade a determinados alcalóides padrões previamente isolados destas espécies, como os alcalóides diméricos, ramiflorina A (25) e ramiflorina B (26).

⇒ A cultura de calos e células em suspensão com o objetivo de se obter os alcalóides diméricos 25 e 26 foi realizada apresentando bons resultados, e os estudos preliminares com a *A. polyneuron* mostraram-se promissores.

⇒ A rota sintética proposta para a síntese de 25 e 26 foi testada utilizando-se um composto modelo 7, e obtivemos bons resultados, que mostraram que a rota proposta pode ser empregada para realizar a semi-síntese da ramiflorina A (25) e ramiflorina (B).

BIBLIOGRAFIA

1. Farnsworth, N. R., *Bioactive Compounds from Plants*, ed. D. J. Chadwick e J. Marsh, Ciba Foundation Symposium 154, John Wiley & Sons, Chichester, USA, 1990, p. 2.
2. Mc Hale, D., *The Biologist*, 1986, **33**, 45.
3. Veltkamp, E., Breteler, H., Huizing, H. J., e Bertola, M. A., *Plantebiotecnologie in Nederland*, Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek, Studierapport, 14g, Gravenhage, 1985.
4. Verpoorte, R., Van der Heijden, R e Schripsema, J., *J. Nat. Prod.*, 1983, **56**, 186.
5. Blechert, S. e Schepartz, S. A., Sufness, M., Grever, M. R., *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, 1657.
6. Cragg, G. M., Schepartz, S. A., Sufness, M., Grever, M. R., *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, 1657.
7. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P., Bignami, G., *J. Nat. Prod.*, 1995, **58**, 1315.
8. Wender, P. A., Mucciario, T. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5878.
9. Van Beek, T. A., Verpoorte, R. e Svendensen, A. B., *J. Chromatogr.*, 1984, **298**, 289.

10. Ylinen, M., Suhonen, P. T., Naranlahti, T., Lapinjoki, S. P. e Huhtikangas, S. P., *J. Chromatogr.*, 1980, **505**, 429.
11. Naranlahti, T., Ranta, V. P., Jarho, P., Nordström, M., Lapinjoki, S. P., *Analyst (London)*, 1989, **114**, 1229.
12. Verpoorte, R., Baerheim, A. S., in *Chromatography of Alkaloids*, Vol. 23B, Chap. 17, Journal of Chromatography Library, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1984.
13. Pieters, L., Hartmann, A. Janssens, T. J. e Vlietinck, A. J., *J. Chromatogr.*, 1989, **462**, 387.
14. Dagnino, D., Schruosenam, J. S., Peltenburg, Verpoorte, R., *J. Nat. Prod.*, 1991, **54**, 1558.
15. Woodson, R. C., *Ann. Missow. Bot. Gard.*, 1951, **38**, 119.
16. Rizini, R. T., em *Árvores Úteis do Brasil*, 2ª ed., Edgard Blücher, São Paulo, Brasil, 1978, p. 21.
17. Gilbert, B., in *The Alkaloids*, vol 11., Chap. 9, ed. Manske, M., Academic Press, London, 1968, p. 205 e referências citadas.
18. Saxton, J., in *The Chemistry of Heterocycles: The Monoterpenoid Indole Alkaloids*, vol. 25, part 4, John Wiley & Sons, New York, 1994, p. 715.
19. Potier, P., *J. Chem. Soc. Rev.*, 1992, 113.
20. Oliveira, M. M., Biagio, M. M., *Ciência e Cultura*, 1997, **49**, 370.

21. Lyon, R. L., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R. e Svoboda, G. H., *J. Pharmaceutical Sciences*, 1973, **62**, 1991, 218.
22. Wright, C. W., Bray, D. H., O'Neill, M. J., Warhurst, D. C., Phillipson, J. D., Leclercq, J. Q. e Angenot, L., *Planta Med.*, 1991, **57**, 337.
23. Verpoorte, R., Rugirok, C. L. M., Svendsen, B., *Planta Med.*, 1982, **46**, 149.
24. Rizini, R. T., em *Árvores Úteis do Brasil*, 2ª ed., Edgard Blücher, São Paulo, Brasil, 1978, p. 22.
25. Ferreira, W. M. e Kinoshita, L. S., *Revista Brasileira de Botânica*, 1996, **19**, 203.
26. Lorenzi, H., *Árvores Brasileiras*, Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa-Brasil, 1992, p. 21-26.
27. Reitz, R., Klein, R. M. e Reis, A. *Sellowia*, 1983, 385.
28. Correia, P., Penna, L. A., *Dicionário de Plantas Úteis Brasileiras*, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro-Brasil, 1984, vol. 5, pp. 443, 444, 448, 460.
29. Girou, G., Van der Leer, T., Van der Heijden, R. Verpoorte, Heeremans, C. E. M., Niessen, W. M. A. e Van der Greef, J., *Planta Med.*, 1991, **57**, 142.
30. Saxton, J., in *The Chemistry of Heterocycles: The Monoterpenoid Indole Alkaloids*, vol. 25, part 4, John Wiley & Sons, New York, 1994.
31. Southon, I. W., in *Dictionary of Alkaloids*, vol. 1, Chapman and Hall, New York, 1989.

32. Gilbert, B., in *The Alkaloids*, vol. 8, ed. Manske, M., Academic Press, London, 1965, p. 335 e referências citadas.
33. Collins, C. H. e Braga, G. L., *Introdução à Métodos Cromatográficos*, 2ª ed., Editora da Unicamp, Campinas, Brasil, 1987, p. 173.
34. Koike, L. e Oliveira, A. J. B., *Estudo de Quatro Espécies do Gênero Aspidosperma por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução Acoplada à Espectrometria de Massas*. Tese de Mestrado, IQ-Unicamp, 1994.
35. Joule, J. A., Monteiro, H., Durham, L. J., Gilbert, B. e Djerassi, C., *J. Chem Soc.*, 1965, 1473.
36. Van Beek, T. A., Verpoorte, R., Kish, P. Q., *Planta Med.*, 1985, 277.
37. Gilbert, B., Duarte, A. P., Nakagawa, Y., Joule, J. A., Flores, S. E., Briollesse, J. A. Campello, J., Carrazzoni, E. P., Owellen, R. J., Blossey, E. C., Brown, Jr., K. S. e Djerassi, C., *Tetrahedron*, 1965, 21, 1141.
38. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, 1981.
39. Verpoorte, R., *J. Nat Prod.*, 1986, 49, 1.
40. Craveiro, A. A., Matos, F. J. A., Serur, L. M., *Phytochemistry*, 1983, 22, 1526.
41. Williams, R. K., King, R. W., *J. Chem. Educ.*, 1990, 67, A125.
42. Campbell, W. E., Jackson, G. E. e Ravenscroft, N., *Spectroscopy Letters*, 1993, 26, 707.

43. Saxton, J., in *The Chemistry of Heterocycles: The Monoterpenoid Indole Alkaloids*, vol. 25, part 4, John Wiley & Sons, New York, 1994, p. 336.
44. Djerassi, C., Budzikiewicz, H., Owellen, R. J., Wilson, J. M., Kump, W. G., Le Count, D. J., Battersby, A. R., e Schmid, H., *Helv. Chim. Acta*, 1963, **46**, 742.
45. Mitaine, A. C., Mesbah, K., Petermann, C., Arrazola, S., Moretti, C., Zéches-Hanrot, M. e Le Men, L. O., *Planta Med.*, 1996, **62**, 458.
46. Milborow, B. V. e Djerassi, C., *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 417.
47. Marques, M. F. S., Kato, L., Filho, H. F. L. e Reis, F. A. M., *Phytochemistry*, 1996, **41**, 963.
48. Phillipson, J. D., *Indole and Biogenetically Related Alkaloids*, Academic Press, London, 1980, p. 11.
49. Kan, C., Kan, S. K., Lounasmaa, M. e Husson, H. P., *Acta Chem. Scand. Se. B.*, 1981, **B35**, 269.
50. Damak, M., Ahond, A., Potier, P., Janot, M. M., *Tetrahedron Lett.*, 1976, 4731.
51. Biemann, K., Spiteller, G., *Tetrahedron Lett.*, 1961, 299.
52. Van Beek, T. A., Verpoorte, R. e Svendensen, A. B., *Tetrahedron*, 1984, **40**, 737.
53. Moore, R. E., Rapoport, H., *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 215.
54. Kováts, E., *Adv. Chromatogr.*, 1965, **1**, 229.

55. Peng, C. T., *Journal of Chromatogr. A*, 1994, **678**, 189.
56. Arndt, R., Brown, S. H., Ling, N. C., Roller, P., Djerassi, C., Ferreira, F. J. M., Gilbert, B., Miranda, E. C., Flores, S. E., Duarte, A. P. e Carrazzoni, E. P., *Phytochemistry*, 1967, **6**, 1653.
57. Arndt, R. R. e Djerassi, C., *Experientia*, 1965, **21**, 566.
58. Antonaccio, L. D., Pereira, N. A., Gilbert, B., Vorkbrueggen, H., Budzikiewicz, J. M., Durham, L. J. e Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 2161.
59. Ikeda, M. e Djerassi, C., *Tetrahedron Letters*, 1968, **56**, 5837.
60. Verpoorte, R. Baherheim, A. S., *Chromatography of Alkaloids*, Amsterdam-Netherlands, Elsevier, vol 23B, part B, 1984, p. 331.
61. Philipson, J. D., Supavita, N. Anderson, I. A., *J. Chromatogr.*, 1982, **244**, 91.
62. Kiel, J. S., Morgan, S. L., Abramson, R. K., *J. Chromatogr.*, 1982, **244**, 91.
63. Bij, K. E., Hovath, C. S., Melander, W. R., Nahum., W. R., *J of Chromatogr.*, 1981, **203**, 65.
64. Lim, C. K., Peters, T. P., *J; Chromatogr.*, 1984, **316**, 397.
65. Wallhausser, K. H., *Thin-Layer Chromatography*, E. Stahl, George Allen & Unwin, London, Springer-Verlag, Berlin, 2^a ed., 1969, 569.
66. Betina, V., *Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography*, K. Macek(ed), Elsevier, Amsterdam, 1972, 503.
67. Betina, V., *J. Chromatogr.*, 1973, **78**, 41.

68. G.A. Cordell, M.O. Hamburger, *J. Nat. Prod.*, 1987, **50**, 19.
69. Tyler, V. E., Brady, L. R., Robbers, J. E., *Pharmacognosy*, 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1988, p. 312
70. Costa, A. F., *Farmacognosia*, 2nd ed., vol. 3, F.K. Gulbenkian, , 1970, p. 939.
71. Verpoorte, R., C. L. M. Ruigrok, B. Svendsen, *Planta Med.*, 1982, **46**, 149.
72. Shepherd, S. L. K., *Ciência Hoje*, 1995, **19**, 59-62.
73. Scott, A. I, Lee, S-L., Culver, M. G., Wan, W., Hirata, T., Guéritte, F., Baxter, R. L., Nordlöv, H., Dorschell, A., Mizokami, H.. e Mackenzie, N. E., *Heterocycles*, 1981, **15**, 1657.
74. Verpoorte, R., Van der Heijden, R. e Schripsema, J., *J. Nat. Prod.*, 1983, **56**, 186.
75. Aimi, N, Uchida, N., Ohya, N., Hoaokaw, H., Takayama, H., Sakai, S., Mendoza, L. A., Polz, L., Stöckit, J., *Tetrahedron Letters*, 1991, **32**, 4949.
76. Aimi, N, Uchida, N., Ohya, N., Hoaokaw, H., Takayama, H., Sakai, S., Mendoza, L. A., Obitz, P., Stöckit, J., *Heterocycles*, 1994, **38**, 2411.
77. Aerts, R. J., Van der Leer, T., Van der Heijden, R. e Verpoorte, R., *J. Plant. Physiol.*, 1990, **136**, 86.
78. Aerts, R. J., Snoeijer, W., Aerts-Teerlink, O., Van der Meijden, E. e Verpoorte, R., *Phytochemistry*, 1991, **30**, 3571.
79. Kowanko, N., Leete, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 4919

80. Hunter, C. S., McCalley, D. V., Barraclough, A. J., in *Plant Tissue Culture: Alkaloids produced by Cultures of Chinchona ledgeriana*, ed. Fugiwara, A., Maruze, Tokyo, Japan, 1982, pp. 801.
81. Robins, R. J., Payne, J., Rhodes, M. J. C., *Planta Med.*, 1986, 220.
82. Burnie, D., em *Aventura Visual: Árvores*, Editora Globo, Rio de Janeiro, Brasil, 1991, p. 14.
83. Hopkins, W. G., in *Introduction to Plant Physiology*, Chap. 14, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, p. 270.
84. Murashige, T., Skoog, F., *Physiol. Plant*, 1962, **15**, 473.
85. Farnsworth, N. R., Blomster, R. N., Damratoski, S., Meer, W. A. e Camarato, L. V., *Lloydia*, 1964, **27**, 302.
86. Wrigth, C. W., Bray, D. H., O'Neill, M. J., Warhurst, D. C., Phillipson, J. D., Leclercq, J. Q., Angenot, L., *Planta Med.*, 1991, **57**, 337.
87. Pictet, A., Splenger, T., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1991, **44**, 2030.
88. Cox, E. D., Cook, J. M., *Chemical Reviews*, 1995, **95**, 1796.
89. Larsen, P., *Dansk Botan. Ark.*, 1944, **11**, 1.
90. Hemberg, T., *Acta Horti Bergiani*, 1947, **14**, 133.
91. Gordon, S. A., Nieva, F. S., *Arch. Biochem.*, 1949, **20**, 356.

92. Gordon, S. A., Nieva, F. S., *Arch. Biochem.*, 1949, **20**, 367.
93. Brown, J. B., Henbest, H. B., Jones, E. R. H., *J. Chem. Soc.*, 1952, Part 3, 3172.
94. Gray, R. A., *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1959, **81**, 480.
95. Ihara, M., Noguchi, K., Fukumoto, K., Kametani, T., *Tetrahedron*, 1985, **41**, 2109.
96. Buumendjel, A., Nuzillard, J. M., Massiot, G., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1990, **127**, 645.
97. Moffat, J. G., In *Oxidation*, Augustine, R. L. e Trecker, D. J. Eds., Marcel Decker Inc., New York, 1991, p. 1.
98. Zeches, M., Sigaut, F., Le Men-Olivier, Lévy, J., Le Men, J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1981, 1-2, II-75.
99. Lukáts, P. A., Károlyházy, J. M., Szabó, L., Podány, B., *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**, 69.
100. Crippa, S. Danieli, B., Lesma, G., Palmisano, G., Passarella, D., *Heterocycles*, 1990, **31**, 1663.
101. Koike L.; Marsaioli A. J.; Rúveda, E.A., Reis, F. de A.M e Bick, I.R.C.; *Tetrahedron Letters*, 1979, 3765.
102. Cava, P. V., Laksmikantham, M. V., Talapatra, S. K., Yates, P., Rae, I. D., Rosenberg, M., Szabo, A. G., Douglas B. and Weisbach, *Canad. J. Chem.*, 1973, **51**, 3102.