



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

LABORATÓRIO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

**Raquel Ferreira da Silva Leite**

**Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos  
extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e  
*Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae) com  
atividade antimalárica**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

Raquel Ferreira da Silva Leite

**Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de  
*Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e *Aspidosperma pyriformium* Mart.  
(Apocynaceae) com atividade antimalárica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Química com ênfase em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Maceió/AL

2016

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto**

L533e Leite, Raquel Ferreira da Silva.  
Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e *Aspidosperma pyriforme* Mart. (Apocynaceae) / Raquel Ferreira da Silva Leite. – 2016.  
148 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Edson de Souza Bento.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 138-148.

1. *Aspidosperma*. 2. Alcaloides indólicos. 3. Ressonância magnética nuclear. 4. Malária. I. Título.

CDU:547.947

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Raquel Ferreira da Silva Leite**, intitulada: “**Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae) com atividade antimalárica**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 05 de abril de 2016, às 9h, na Sala de Seminários do Instituto de Ciências Atmosféricas da Universidade Federal de Alagoas.

### COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Edson de Souza Bento  
Orientador  
(PPGQB/IQB/UFAL)



Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
(PPGQB/IQB/UFAL)



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento  
(ESENFAR/UFAL)



Profa. Dra. Josiane de Souza Luna  
(IFAL)

***Aos meus Amores,***

***Minha querida mãe Leila, meu lindo esposo Jamesson Lucrecio e meu precioso filho Juan Pablo, que são meus exemplos de vida, de força, e que sempre estiveram presentes nas minhas grandes conquistas!***

***À vocês, que sempre serão as pessoas mais importantes da minha vida...***

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** primeiramente, por estar sempre presente na minha vida, iluminando todos os meus passos;

À minha **Mãe Leila** e ao **José Gomes**, pessoas de grande importância na minha vida, que sempre me incentivaram e proporcionaram oportunidades de conquistar todos os meus objetivos. Tudo o que sou e o que sei devo a eles;

Ao meu esposo **Jamesson Lucrecio**, muito companheiro e compreensivo, que me deu amor, força e incentivo em todos os momentos dessa caminhada;

Ao meu lindo e esperto filho **Juan Pablo**, alegria da minha vida e responsável por recarregar minhas forças. Filho você é uma dádiva de Deus em minha vida, mamãe te ama muito!

Ao meu Orientador Prof. Dr. **Edson de Souza Bento**, pela paciência, dedicação, confiança e ensinamentos ao longo deste trabalho. Obrigada pelo incentivo!

Ao Prof. Dr. **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana** e ao doutorando **Pedro Gregório Vieira Aquino**, pela importante orientação, contribuição, espaço e materiais cedidos para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Antoniana Ursine Krettli**, do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais, pelo material cedido para o fracionamento e pelos resultados dos testes antimaláricos, dados imprescindíveis para conclusão deste trabalho;

Aos meus irmãos **Júlio Vinícius** e **Juliano Valentim**, minha **Avó Domerina** em especial, minha **tia Galega**, minha cunhada **Lenir Alessandra** e à minha grande amiga **Maria dos Prazeres**, cujo amor, carinho e compreensão foram importantíssimos. Amo todos vocês!

Ao CNPq pelo suporte financeiro e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidade, lembrai-vos de que as  
grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”***

***Charles Chaplin***

## RESUMO

As espécies do gênero *Aspidosperma* são conhecidas pela grande bioprodução de alcaloides indólicos, os quais possuem grande importância química e farmacológica, por apresentarem diversas atividades biológicas. São utilizadas na medicina popular como potenciais agentes antimaláricos, no tratamento da leishmaniose, de inflamações do útero e ovário, como anticonceptiva, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Diante do potencial químico e biológico do gênero *Aspidosperma*, este trabalho teve por objetivo a elucidação estrutural dos alcaloides indólicos presentes no extrato da casca do caule de *Aspidosperma nitidum*, e no extrato etanólico da madeira de *Aspidosperma pyrifolium*. O estudo fitoquímico de *A. nitidum* resultou no isolamento de Braznitidumina e permitiu o isolamento de um novo alcaloide indólico com esqueleto do tipo Corinanteol, e com o estudo fitoquímico de *A. pyrifolium* isolou-se a Pirifolina e um novo alcaloide indólico com esqueleto do tipo Aspidospermina. A determinação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base nos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPTs, incluindo experimentos bidimensionais (COSY, J- resolvido, NOESY, HSQC e HMBC).

**Palavras-chave:** *Aspidosperma*, alcaloides indólicos, atividade antimalárica, RMN



## ABSTRACT

*Aspidosperma* species are known by their bioproduction of indole alkaloid, with chemistry and pharmacological importance, and several biological activities. They are used in folk medicine as potential antimalarial agents; in the treatment of leishmaniasis, and uterus and ovary inflammations; as contraceptive; in diabetes and stomach disorders; and against cancer, fever and rheumatism. Due to its chemical and biological potential of the genus *Aspidosperma*, this work aimed to structural elucidation of indole alkaloids present in the stem bark of extract *Aspidosperma nitidum*, and ethanol extract of wood *Aspidosperma pyriformium*. The phytochemical study of *A. nitidum* has led to the isolation of Braznitidumina and allowed the isolation of a new alkaloid indole skeleton with type Corinanteol, and with the phytochemical study of *A. pyriformium* isolated and the Pirifolina a new indole alkaloid with skeleton type Aspidospermine. The structural determination of the of compounds were carried out based on spectral data, such as  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and DEPTs NMR, including two-dimensional evaluations (COSY, J-resolved, NOESY, HSQC and HMBC).

**Key-words:** *Aspidosperma*, indole alkaloids, antimalarial activity, NMR

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para o 2-metilbutano.....	29
FIGURA 2.2	Diagrama da modulação da amplitude dos carbonos em função do ângulo de nutação ( $\Theta$ ) e do padrão de hidrogenação dos mesmos.....	30
FIGURA 2.3	Espectros de $^{13}\text{C}$ , DEPT 45, 90 e 135 para o etilbenzeno, dispostos de baixo para cima.....	30
FIGURA 2.4	Possíveis acoplamentos que ocorrem no experimento COSY..	31
FIGURA 2.5	Acoplamento direto observado no experimento HSQC.....	31
FIGURA 2.6	Acoplamento à longa distância, observado no experimento HMBC.....	32
FIGURA 2.7	Espectro de RMN J-resolvido. ....	32
FIGURA 5.1	Fórmula estrutural da ioimbina com numeração proposta por Le Men e Taylor (1965).....	39
FIGURA 5.2	Fórmula estrutural da aspidospermina, alcaloide de <i>Aspidosperma quebracho blanco</i> .....	40
FIGURA 5.3	Fórmula estrutural da polineuridina, alcaloide de <i>Aspidosperma polineuron</i> .....	40
FIGURA 5.4	Alcaloides de <i>Aspidosperma ramiflorum</i> .....	41
FIGURA 5.5	Alcaloides de <i>Aspidosperma ulei</i> .....	42
FIGURA 5.6	Alcaloides de <i>Aspidosperma marcgravianum</i> .....	42
FIGURA 5.7	Alcaloides de <i>Aspidosperma subicanum</i> .....	43
FIGURA 5.8	Alcaloides de <i>Aspidosperma excelsum</i> .....	44
FIGURA 5.9	Alcaloides de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> .....	45
FIGURA 5.10	Alcaloides de <i>Aspidosperma megalocarpon</i> .....	45
FIGURA 5.11	Alcaloides de <i>Aspidosperma spruceanum</i> .....	46

FIGURA 6.1	Planta da espécie <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	47
FIGURA 6.2	Alcaloides de <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	47
FIGURA 6.3	Alcaloide indólico Ácido harmanocarboxílico, de <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	48
FIGURA 6.4	Alcaloide indólico 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidro-corinanteol, de <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	48
FIGURA 7.1	Planta da espécie <i>Aspidosperma pyriformium</i> .....	49
FIGURA 7.2	Alcaloides indólicos Aspidofractina <b>(A)</b> , (+)-Pirifolina <b>(B)</b> , 6-Desmetoxipirifolina <b>(C)</b> , Refractidina <b>(D)</b> e (-)-Aspidofilina <b>(E)</b> .....	50
FIGURA 8.1	Alcaloides de raízes, folhas e cascas do caule.....	51
FIGURA 8.2	O núcleo Indólico.....	52
FIGURA 8.3	Alcaloides indólicos simples.....	52
FIGURA 8.4	Alcaloides $\beta$ -carbolínicos simples. ....	53
FIGURA 8.5	Reação de obtenção da strictosidina.....	53
FIGURA 8.6	Esquema das reações na cadeia terpenóidica.....	54
FIGURA 8.7	Esqueletos básicos dos alcaloides indólicos monoterpênicos.....	55
FIGURA 9.1	Núcleo Indólico com carbonos enumerados.....	57
FIGURA 15.1	Espectros de RMN- $^1\text{H}$ da fração <b>ANCC-5</b> e das suas respectivas subfrações, dispostos de baixo para cima de acordo com o aumento da polaridade dos eluentes.....	69
FIGURA 15.2	Espectro de RMN $^1\text{H}$ para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD, com intensificação (32x) do sinal duplo para um hidrogênio aromático.....	71
FIGURA 15.3	Expansões e intensificações (64x) dos sinais de hidrogênios.....	72
FIGURA 15.4	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD.....	73

FIGURA 15.5	Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD.....	73
FIGURA 15.6	Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD.....	74
FIGURA 15.7	Espectro de RMN HSQC para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD, com os sinais de correlação direta $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ para os aromáticos em evidência.....	75
FIGURA 15.8	Espectro de RMN HMBC para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ entre os átomos em $\delta_{\text{C}}$ 128.67 e $\delta_{\text{H}}$ 7.17 ( $^2J_{\text{CH}}$ ), em expansão.....	76
FIGURA 15.9	Correlações importantes $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC (via $^2J$ $^3J$ e $^4J$ ) para o fragmento indólico.....	78
FIGURA 15.10	Fragmento de sistema fundido imidazolidina-pirano do composto em estudo, e correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC.....	78
FIGURA 15.11	Espectro de RMN COSY para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD, com sinais de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-9 e H-6 que acoplam entre si.....	79
FIGURA 15.12	Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY.....	80
FIGURA 15.13	Espectro de RMN NOESY para a subfração <b>ANCC-5/1</b> , em MeOD, com sinais de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-16a e H-2 que interagem entre si.....	81
FIGURA 15.14	Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY.....	83
FIGURA 15.15	Estrutura para o composto em estudo, com geometria otimizada.....	85
FIGURA 15.16	Alcaloide indólico braznitidumina.....	85

FIGURA 15.17	Espectro de RMN $^1\text{H}$ para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com intensificações (32x) dos sinais de hidrogênios aromáticos.....89
FIGURA 15.18	Expansões e intensificações (64x) dos sinais em $\delta\text{H}$ 3.11, 2.48 e 0.96.....89
FIGURA 15.19	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD.....90
FIGURA 15.20	Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD.....91
FIGURA 15.21	Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD. ....91
FIGURA 15.22	Espectro de RMN HSQC para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com os sinais de correlação direta $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ para os aromáticos em evidência.....92
FIGURA 15.23	Espectro de RMN HMBC para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ entre os átomos em $\delta\text{C}$ 107.80 e $\delta\text{H}$ 7.38 ( $^3J_{\text{CH}}$ ) em expansão.....93
FIGURA 15.24	Correlações importantes $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC (via $^2J$ e $^3J$ ) para o composto em estudo. ....95
FIGURA 15.25	Espectro de RMN COSY para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com sinais de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-7 e H-6/H-5 e H-4 que acoplam entre si.....96
FIGURA 15.26	Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY.....96
FIGURA 15.27	Espectro de RMN J-resolvido para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com os sinais de hidrogênios aromáticos evidenciados, e em destaque as constantes de acoplamento. ....97
FIGURA 15.28	Espectro de RMN NOESY para a subfração <b>ANCC-5/2</b> , em MeOD, com sinais de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da

	diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-16a e H-2 que interagem entre si.....	98
FIGURA 15.29	Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY.....	100
FIGURA 15.30	Estrutura para o alcaloide em estudo com geometria otimizada.....	100
FIGURA 15.31	Estrutura para o alcaloide indólico estudado.....	102
FIGURA 15.32	Espectros de RMN- $^1\text{H}$ da fração <b>APM-5</b> e das suas respectivas subfrações, dispostos de baixo para cima de acordo com o aumento da polaridade dos eluentes.....	105
FIGURA 15.33	Espectro de RMN $^1\text{H}$ da subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD, com intensificações (32x) dos sinais duplo-duplete e tripleto, dos hidrogênios aromáticos.....	107
FIGURA 15.34	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD.....	108
FIGURA 15.35	Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD.....	108
FIGURA 15.36	Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD.....	109
FIGURA 15.37	Espectro de RMN HSQC para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD, com os sinais de correlação direta $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ para os aromáticos em evidência.....	110
FIGURA 15.38	Espectro de RMN HMBC para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD, com os sinais de correlação à longa distância entre o átomo de carbono em $\delta_{\text{C}}$ 112.26 e os hidrogênios em $\delta_{\text{H}}$ 7.07 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e $\delta_{\text{H}}$ 7.13 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), em expansão.....	111
FIGURA 15.39	Correlações importantes $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC (via $^2J$ e $^3J$ ) para o composto em estudo.....	113
FIGURA 15.40	Espectro de RMN COSY para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD, com sinais de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em	

	expansão para os hidrogênios aromáticos H-4 e H-3b que acoplam entre si.....	114
FIGURA 15.41	Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY. ....	114
FIGURA 15.42	Espectro de RMN NOESY para a subfração <b>APM-5/3</b> , em MeOD, com sinais de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-10b e H-21b que interagem entre si.....	115
FIGURA 15.43	Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY.....	117
FIGURA 15.44	Estrutura para o composto em estudo com geometria otimizada.....	117
FIGURA 15.45	Alcaloide indólico Pirifolina.....	119
FIGURA 15.46	Espectro de RMN $^1\text{H}$ para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com intensificação (32x) dos sinais duplo-triplete e triplo-duplete de hidrogênios aromáticos.....	121
FIGURA 15.47	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD.....	122
FIGURA 15.48	Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD.....	122
FIGURA 15.49	Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD. ....	123
FIGURA 15.50	Espectro de RMN HSQC para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com os sinais de correlação direta $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ para os aromáticos em evidência.....	124
FIGURA 15.51	Espectro de RMN HMBC para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância entre o átomo de carbono em $\delta_{\text{C}}$ 58.19 e o hidrogênio em $\delta_{\text{H}}$ 7.29 ( $^4J_{\text{CH}}$ ), em expansão.....	125

FIGURA 15.52	Correlações importantes $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no espectro HMBC (via $^2J$ , $^3J$ e $^4J$ ) para o composto em estudo.....	126
FIGURA 15.53	Espectro de RMN COSY para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com sinais de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-17 e H-15 que acoplam entre si. ....	127
FIGURA 15.54	Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	128
FIGURA 15.55	Espectro de RMN J-resolvido para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com os sinais de hidrogênios aromáticos evidenciados, e em destaque as constantes de acoplamento.....	128
FIGURA 15.56	Espectro de RMN NOESY para a subfração <b>APM-5/4</b> , em MeOD, com sinais de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-11 e H-17 que interagem entre si.....	129
FIGURA 15.57	Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY.....	131
FIGURA 15.58	Estrutura para o composto em estudo com geometria otimizada.....	131
FIGURA 15.59	Estrutura para o alcaloide indólico estudado.....	133



## LISTA DE TABELAS

TABELA 9.1	Espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> , em ordem alfabética, parte estudada e substâncias isoladas.....58
TABELA 9.2	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ em ppm) de alcaloides de espécie do gênero <i>Aspidosperma</i> , agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos. Dados obtidos em $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificados o contrário.....60
TABELA 9.3	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ em ppm) de alcaloides de espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> , agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos. Dados obtidos em $\text{CDCl}_3$ . CONTINUAÇÃO.....61
TABELA 15.1	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC) para o composto em estudo, em MeOD.....77
TABELA 15.2	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY) para o composto em estudo, em MeOD.....82
TABELA 15.3	Dados de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ extraídos do espectro de RMN NOESY do composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas.....84
TABELA 15.4	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ em ppm) para o alcaloide indólico Braznitidumina, em MeOD, em comparação com dados da literatura.....86
TABELA 15.5	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC) para o composto em estudo, em MeOD.....94

TABELA 15.6	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY) para o composto em estudo, em MeOD.....	99
TABELA 15.7	Dados de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas.....	101
TABELA 15.8	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ em ppm) para o alcaloide indólico estudado, em MeOD, em comparação com dados da literatura.....	104
TABELA 15.9	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC) para o composto em estudo, em MeOD.....	111
TABELA 15.10	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY) para o composto em estudo, em MeOD.....	116
TABELA 15.11	Dados de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas.....	118
TABELA 15.12	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC) para o composto em estudo, em MeOD.....	125
TABELA 15.13	Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) (incluindo correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY) para o composto em estudo, em MeOD.....	130
TABELA 15.14	Dados de correlação espacial $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas.....	132

TABELA 15.15	Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ em ppm) para o alcaloide indólico estudado, em MeOD, em comparação com dados da literatura.....	135
--------------	--	-----

## QUADRO

QUADRO 9.1	Substâncias isoladas de espécies de <i>Aspidosperma</i> , agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos.....	59
------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCC	Casca do Caule de <i>Aspidosperma nitidum</i>
APM	Madeira de <i>Asidosperma pyrifolium</i>
AQ	Tempo de Aquisição
COSY	<i>CO</i> rrrelated <i>S</i> pectroscopY
d	Dupleto e distância
dd	Duplo-dupleto
ddd	Duplo-duplo-dupleto
dt	Duplo-tripleteo
DEPT	<i>D</i> istortionless <i>E</i> nhancement by <i>P</i> olarization <i>T</i> ransfer
FID	<i>F</i> ree <i>I</i> nduction <i>D</i> ecay
FT	<i>T</i> ransformada de <i>F</i> ourier
HMBC	<i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple <i>B</i> ond <i>C</i> oherence
HSQC	<i>H</i> eteronuclear <i>S</i> ingle <i>Q</i> uantum <i>C</i> oherence
Hz	Hertz
IC	Concentração de Inibição
IS	Índice de seletividade
<i>I</i>	Integral
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
lb	<i>L</i> ine <i>B</i> roadening; Parâmetro Empregado no Ajuste das Funções Exponencial e Lorentziana
m	Multipleteo
$\mu$	Momento Magnético Nuclear
MDL	Dose Mínima Letal
MRI	Ressonância Magnética de Imagem
NOE	Efeito Overhauser Nuclear
NOESY	<i>N</i> uclear <i>O</i> verhausar <i>E</i> nhancement <i>S</i> pectroscopY
NS	Número de Pulsos
q-NMR	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
r.f.	Radiofrequência

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
s	Simpleto
SI	Número de Pontos Utilizados no Processamento do Espectro
SW	Largura Espectral
t	Tripleto
td	Tripleto de duplete
V	Volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
W	Varredura de Onda Contínua
$d_1$	Tempo de espera entre aquisições
$d_8$	Tempo de mistura
$f$	Freqüência do Equipamento
$F_1, F_2$	Dimensões de Freqüência de um Espectro Bidimensional
$T_1$	Tempo de Relaxação Longitudinal ou Spin-rede
$T_2$	Tempo de Relaxação Transversal ou Spin-spin
$T_d$	Tempo de Espera entre os Ciclos de Pulso, Tempo de Reciclagem
$t_1$	Tempo de evolução
$\delta$	Deslocamento Químico
$\phi$	Ângulo Diedro

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	23
Considerações Gerais .....	23

### **REVISÃO DE LITERATURA: Técnica de RMN, Malária, Gênero *Aspidosperma* e Alcaloides Indólicos.**

#### REVISÃO DE LITERATURA

1. Importância da técnica de RMN.....	25
1.1. Áreas de Aplicações .....	25
2. Técnica de RMN moderna.....	25
2.1. Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C.....	28
2.1.1. Espectros de <sup>13</sup> C DEPTs.....	29
2.2. COSY.....	31
2.3. HSQC.....	31
2.4. HMBC.....	31
2.5. J - resolvido.....	32
3. Malária.....	33
3.1. O tratamento da malária com o uso plantas medicinais .....	35
4. Família Apocynaceae.....	37
5. O Gênero <i>Aspidosperma</i> : etnofarmacologia, atividade biológica e alcaloides indólicos.....	38
6. <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	46
7. <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	48
8. Alcaloides.....	50
8.1. Ocorrência.....	50
8.2. Alcaloides indólicos.....	52
8.2.1. Alcaloides indólicos simples.....	52
8.2.2. Alcaloides β-carbolínicos simples.....	53
8.2.3. Alcaloides indólicos monoterpênicos.....	53

**Dados de RMN <sup>13</sup>C descritos da literatura para alcaloides isolados de espécies do gênero *Aspidosperma***

9.	Dados de RMN <sup>13</sup> C descritos da literatura para alcaloides isolados de espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> .....	57
OBJETIVOS .....		62
10.	Objetivo Geral .....	62
10.1	Objetivos Específicos.....	62
MATERIAIS E MÉTODOS .....		63
11.	Material vegetal .....	63
11.1.	<i>Aspidosperma nitidum</i> .....	63
11.2.	<i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	63
12.	Testes de Atividade Antimalárica.....	64
13.	Experimentos de RMN.....	64
13.1	Parâmetros de aquisição e processamento dos dados de RMN.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		68
14.	Avaliação da atividade antimalárica.....	68
15.	Identificação dos alcaloides com a aplicação da técnica de RMN.....	69
15.1	Determinação estrutural de alcaloides isolados de <i>Aspidosperma nitidum</i> .....	69
15.1.1	Alcaloide presente na subfração ANCC-5/1.....	69
15.1.2	Alcaloide presente na subfração ANCC-5/2.....	87
15.2	Determinação estrutural de alcaloides isolados de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	105
23.2.1	Alcaloide presente na subfração APM-5/3.....	105
23.2.2.	Alcaloide presente na subfração APM-5/4.....	120
CONCLUSÃO.....		136
PERSPECTIVAS.....		137
REFERÊNCIAS.....		138

## INTRODUÇÃO

### Considerações Gerais

A completa elucidação de sistemas químicos ao nível molecular exige normalmente o emprego de varias técnicas, no entanto é possível afirmar que a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) constitui uma das técnicas físicas mais importantes no estudo químico e físico-químico de compostos com interesse farmacológico, medicinal e industrial, obtidos a partir de extratos de plantas ou através de processos sintéticos.

O ponto chave para a caracterização está na potência do campo magnético do espectrômetro, visto que a separação dos sinais é proporcional a esta potência de campo magnético <sup>[1]</sup>.

O presente trabalho consiste na aplicação da Ressonância Magnética Nuclear no estudo químico de substâncias isoladas a partir de espécies do gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae.

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas. No caso de espécies de *Aspidosperma* como, *A. nitidum* e *A. pyrifolium*, há, predominantemente, a ocorrência de alcaloides indólicos de considerável diversidade estrutural <sup>[2]</sup>.

A *Aspidosperma nitidum*, popularmente conhecida como carapanaúba, possui um vasto uso na medicina popular, como anticonceptiva, no tratamento de inflamações de útero e de ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Nativos da Região Amazônica utilizam as cascas dessa espécie para a cura da malária <sup>[3]</sup>.

A espécie *Aspidosperma pyrifolium* conhecida como pereiro, é uma planta nativa do semiárido, bioma presente no nordeste brasileiro <sup>[4]</sup>. Esta espécie é caracterizada pelo uso de sua madeira na construção civil e pelo constante uso na medicina popular no combate da febre e problemas estomacais, além de apresentar atividade antimalárica.



**REVISÃO DE LITERATURA: Técnica de RMN, Malária, Gênero *Aspidosperma* e Alcaloides Indólicos.**

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Importância da técnica de RMN

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é bastante empregada na confirmação estrutural de substâncias obtidas pelo processo de síntese, na elucidação de estruturas por meio da análise de espectros obtidos a partir de produtos naturais, em estudos conformacionais, troca química e estudos de cinética química.

A RMN é uma técnica que permite elucidar ao mesmo tempo detalhes a nível atômico e propriedades dinâmicas de macromoléculas biológicas <sup>[5]</sup>.

#### 1.1 Áreas de Aplicações

A técnica de RMN é aplicada em diversas áreas como: na indústria farmacêutica, no controle de qualidade de fármacos (q-NMR); no setor ambiental, para análise de fertilizantes, pesticidas, determinação (quantitativa e/ou qualitativa) de metais pesados e elementos-traço; na indústria petrolífera, para análise de combustíveis (qualitativa ou quantitativa) na determinação de composição orgânica ou inorgânica, análise de óleos, biodiesel e polímeros; na área de biologia estrutural, aplicada no estudo de estruturas de proteínas e peptídeos, nas interações entre proteínas e DNA ou RNA, e entre proteínas e membranas; em Metabolômica, na obtenção do perfil completo e quantificação dos metabólitos presentes em plantas e em amostras biológicas; na área de medicina, com o uso da Ressonância Magnética de Imagem (MRI) para exames conclusivos no diagnóstico de muitas doenças; na indústria de alimentos, com RMN de baixo campo, entre outras áreas <sup>[5, 6]</sup>.

### 2. Técnica de RMN moderna

A RMN com transformada de Fourier (FT) trouxe um grande aumento na sensibilidade dos experimentos e possibilitou o estudo de fenômenos dependentes

do tempo, como troca química e relaxação, antes impossibilitados pela própria natureza da excitação por onda contínua (CW). Uma terceira vantagem foi revelada por Jeener, em 1971, descrevendo um novo experimento onde um sistema de spins acoplados foi excitado por uma sequência de dois pulsos separados por um intervalo de tempo variável  $t_1$ . Jeener imaginou que se  $t_1$  fosse variado em valores pequenos em uma série de experimentos, isso deveria construir uma nova dimensão, em função de  $t_1$ . A esse intervalo chamou-se “tempo de evolução”. Através desse procedimento obteve-se duas dimensões temporais independentes, com matriz  $S(t_1, t_2)$  cuja FT gera duas dimensões de frequências independentes de matriz  $S(f_1, f_2)$ , com intensidade  $S$ .

As técnicas criadas a partir das modificações propostas por Jeener passaram a ser classificadas como técnicas bidimensionais ou 2D, e subdivididas em homonucleares (mesmo núcleo) e heteronucleares (diferentes núcleos). A partir da técnica homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (correlation spectroscopy), proposta por Jeener, em 1971, diversas outras foram sugeridas.

Em 1979, Jeener propôs o experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (nuclear overhauser enhancement spectroscopy) após estudos de relaxação cruzada dipolar. No experimento NOESY é observado a interação espacial entre os núcleos, característica do efeito Overhauser nuclear (NOE) <sup>[7,8]</sup>.

A distância máxima observável entre hidrogênios, a partir do rápido decaimento do sinal do NOE é de aproximadamente 5.0 Å. Baseado nas intensidades dos sinais originados a partir do efeito Overhauser, é possível se derivar distâncias internucleares. O cálculo das distâncias pode ser feito através da equação abaixo <sup>[9]</sup>:

$$V_{NOE} \propto d_{NOE}^{-6} \quad (\text{Equação. 2.1})$$

Sendo  $V_{NOE}$  o volume do pico fora da diagonal, e  $d_{NOE}$  a distância internuclear, onde o volume é dado pela integração numérica de cada pico. A partir destas integrações, e utilizando uma distância conhecida como referência, um conjunto de distâncias internucleares pode ser obtido, com base na equação 2.2:

$$I_{NOE} \propto \frac{1}{d^6} \rightarrow I = k \cdot \frac{1}{d^6} \quad (\text{Equação. 2.2})$$

Esta distância fixa conhecida pode ser, por exemplo:

$d = 1.8 \text{ \AA}$ , entre hidrogênios metilênicos.

$d = 2.5 \text{ \AA}$ , entre hidrogênios vizinhos no anel benzênico.

O desenvolvimento de novas sequências de pulsos (programas que controlam como o espectrômetro deve proceder para realizar o experimento desejado) e das sondas de detecção proporcionou um aumento na sensibilidade das técnicas bidimensionais. Uma nova técnica de detecção, denominada genericamente de “detecção inversa”, favorecida pela disponibilidade comercial de sondas específicas, trouxe a tona um conceito já existente na época de Jeener, mas não aproveitado: a possibilidade de ganhar sensibilidade em técnicas 2D pela observação indireta dos núcleos de interesse, através dos efeitos que os núcleos de alta sensibilidade, normalmente  $^1\text{H}$ , exercem sobre eles.

Um grande número de sequências de pulsos vem sendo propostas utilizando esse tipo de detecção. Técnicas como HETCOR e COLOC puderam ser substituídas por técnicas mais sensíveis, como  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (heteronuclear single quantum coherence) <sup>[10]</sup> e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) <sup>[11]</sup>.

Enquanto as técnicas “diretas” são limitadas pela quantidade de amostra disponível, as técnicas “inversas” são, na maioria, de fácil aquisição. Isso se deve ao fato que em sondas especificamente preparadas para a detecção inversa, as bobinas de detecção de hidrogênio encontram-se mais próximas do centro da sonda, portanto mais próximas da amostra, que as bobinas para detecção de outros núcleos. Essa mudança de configuração no hardware possibilita uma maior facilidade na detecção do sinal, até quatro vezes maior que nas sondas de detecção direta.

Atualmente, a rotina de laboratórios de RMN voltados a Química de Produtos Naturais envolve o uso de algumas técnicas, de onde se pode obter praticamente toda a informação necessária para a elucidação estrutural desses tipos de compostos. Normalmente essa rotina inicia-se com técnicas clássicas 1D como RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Além disso, empregam-se técnicas modernas 2D como COSY, J-resolvido,

HSQC e HMBC. Em casos onde seja necessária a determinação da estereoquímica relativa da molécula, ou para estudos que envolvam dinâmica molecular, o experimento NOESY é o mais empregado.

Um novo ganho de sensibilidade pode ser obtido pela introdução de gradiente de campo pulsado, do inglês “pulsed field gradient” (PFG) nas técnicas já utilizadas, substituindo-se a modulação de fase (*phase cycling*). A modulação de fase faz-se necessária para a perfeita coerência de ordem quântica e cancelamento das ordens não desejadas. O PFG conduz a uma seleção quântica muito mais eficiente e em um tempo muito menor. Dessa forma, espectros 2D com PFG possuem ruídos muito menores que aqueles obtidos com modulação de fase <sup>[12]</sup>. Além disso, observa-se ainda uma diminuição no tempo experimental, redução do ruído de  $t_1$  em 2D e eficiente supressão de magnetização indesejada ( $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$ ,...) em experimentos por detecção de hidrogênio <sup>[13]</sup>.

Nesse trabalho introduzimos experimentos recentes de RMN, como o NOESY descrito anteriormente, em adição às técnicas de rotina utilizadas na análise estrutural de produtos naturais, por sua aplicação, qualidade dos espectros obtidos e redução do tempo de análise. Essas técnicas encontram-se descritas a seguir.

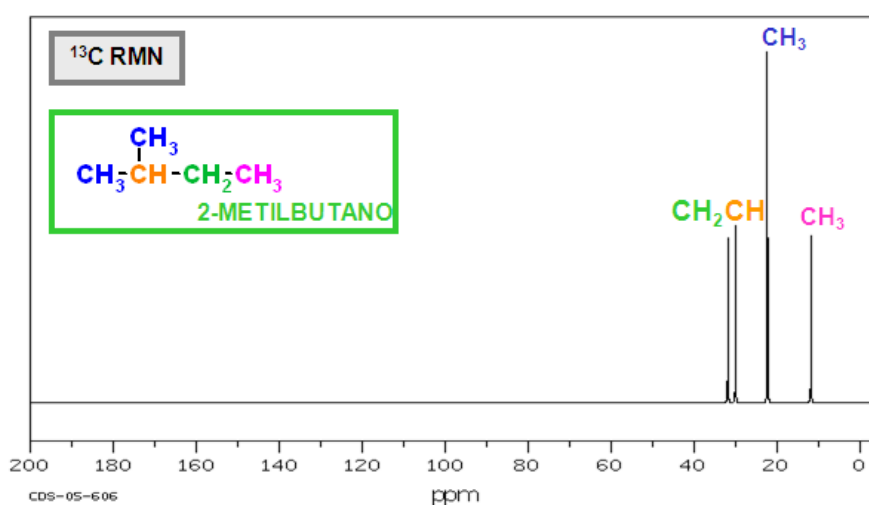
## 2.1. Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$

A RMN de  $^{13}\text{C}$  foi estudada pela primeira vez em 1957, mas só a partir de 1970 teve seu uso generalizado. Durante esse período ocorreu o desenvolvimento de instrumentos sensíveis o suficiente para detectar sinais fracos de RMN de  $^{13}\text{C}$ . A baixa intensidade dos sinais de  $^{13}\text{C}$  deve-se a baixa abundância natural do isótopo (1,1%) e a pequena razão giromagnética, que é cerca de 0,25 vezes a do  $^1\text{H}$ .

A RMN de  $^{13}\text{C}$  possui várias vantagens sobre a RMN de  $^1\text{H}$ , no que diz respeito a sua potência para elucidar estruturas orgânicas e bioquímicas. O intervalo de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  em compostos orgânicos é cerca de 200 ppm, comparado a 10-15 ppm para  $^1\text{H}$ . Como resultado, há menos superposições de picos nos espectros de  $^{13}\text{C}$  do que nos espectros de  $^1\text{H}$  <sup>[14]</sup>.

Um aspecto dos espectros de  $^{13}\text{C}$  que simplifica muito o processo de interpretação é que cada tipo de átomo de carbono em uma molécula orgânica comum produz apenas um pico. No entanto, os átomos de hidrogênios ligados a

carbono podem desdobrar os sinais de  $^{13}\text{C}$  em picos múltiplos, mas, é possível eliminar esse desdobramento de sinal causado pelo acoplamento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , selecionando os parâmetros instrumentais do espectrômetro de RMN que desacoplam a interação hidrogênio-carbono. Um espectro de  $^{13}\text{C}$  cujas interações com  $^1\text{H}$  foram eliminadas é chamado completamente desacoplado dos  $^1\text{H}$  (desacoplamento em banda larga, BB). Assim, em um espectro típico de  $^{13}\text{C}$  completamente desacoplado, cada tipo de átomo de carbono fornece apenas um pico (Figura. 2.1) [15].



**FIGURA 2.1** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o 2-metilbutano. (Fonte: M<sup>a</sup> Selma Arias Pérez, determinación estructural, ppt).

### 2.1.1. Espectros de $^{13}\text{C}$ DEPTs

Atualmente é possível obter espectros de  $^{13}\text{C}$  muito mais simples para interpretar no que diz respeito ao tipo de carbono. Um desses espectros é denominado espectro de  $^{13}\text{C}$  DEPT.

O experimento DEPT é utilizado na determinação do padrão de hidrogenação de um átomo de carbono. Existem três tipos de espectros  $^{13}\text{C}$  DEPT:

**O espectro DEPT 45** – é obtido ajustando o ângulo de nutação ( $\Theta$ ) do pulso de hidrogênios para  $45^\circ$ . Fornece todos os sinais para carbonos hidrogenados ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ).

O espectro DEPT 90 – é obtido ajustando o ângulo de nutação ( $\Theta$ ) do pulso de hidrogênios para  $90^\circ$ . Fornece somente sinais para carbonos monohidrogenados (CH – metínicos).

O espectro DEPT 135 – é obtido ajustando o ângulo de nutação ( $\Theta$ ) do pulso de hidrogênios para  $135^\circ$ . Apresenta sinais para carbonos monohidrogenados (CH – metínicos) e trihidrogenados ( $\text{CH}_3$  – metílicos) com mesmo sinal de amplitude, em oposição à amplitude dos carbonos dihidrogenados ( $\text{CH}_2$  – metilênicos) (Figura. 2.2).

Os sinais de carbonos quaternários não são detectados nos subespectros DEPT (Figura. 2.3) <sup>[15,16,17]</sup>.

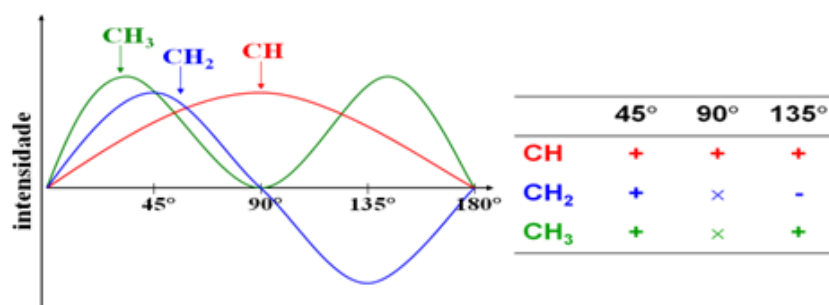


FIGURA 2.2 – Diagrama da modulação da amplitude dos carbonos em função do ângulo de nutação ( $\Theta$ ) e do padrão de hidrogenação dos mesmos. (Fonte: Autora)

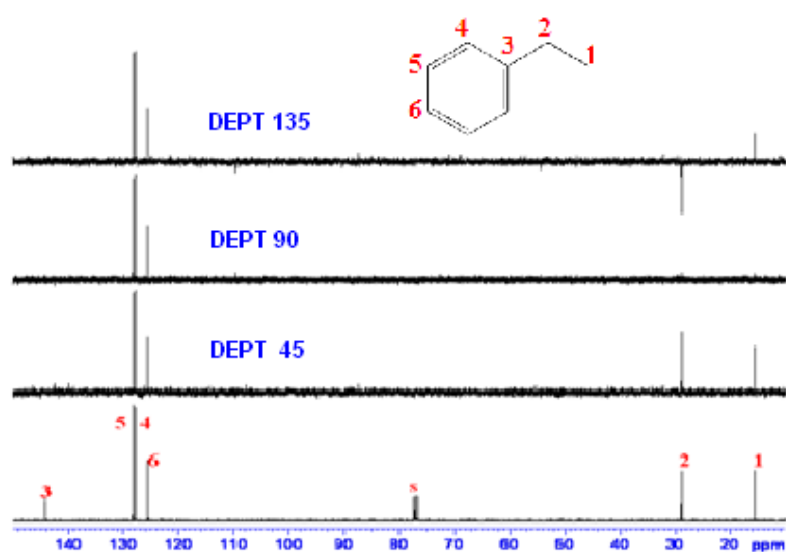


FIGURA 2.3 – Espectros de  $^{13}\text{C}$ , DEPT 45, 90 e 135 para o etilbenzeno, dispostos de baixo para cima. (Fonte: [http://www.azom.com/images/Article\\_Images/ImageForArticle\\_11529.jpg](http://www.azom.com/images/Article_Images/ImageForArticle_11529.jpg), em 2016)

## 2.2. COSY

O espectro COSY evidencia a correlação homonuclear, acoplamento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , este acoplamento ocorre através de duas até três ligações (Figura 2.4). É uma das técnicas mais empregadas na determinação da correlação principalmente entre hidrogênios vicinais e geminais. No espectro COSY, os picos fora da diagonal, ou picos cruzados, têm origem na interação entre todos os hidrogênios que apresentam acoplamento spin-spin significativo [12,17].

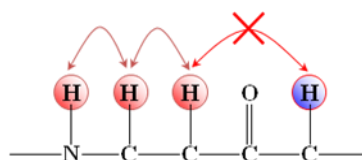


FIGURA 2.4 – Possíveis acoplamentos que ocorrem no experimento COSY. (Fonte: Autora)

## 2.3. HSQC

O experimento de RMN HSQC é uma classe de sequências de pulsos de correlação heteronuclear. O espectro HSQC mostra a correlação direta entre os núcleos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura. 2.5). Logo, é possível detectar quais carbonos estão diretamente ligados aos hidrogênios presentes numa molécula [17].

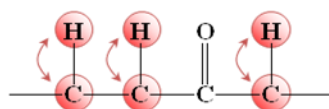
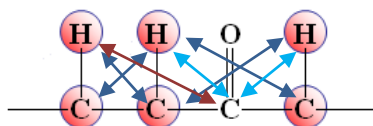


FIGURA 2.5 – Acoplamento direto observado no experimento HSQC. (Fonte: Autora)

## 2.4. HMBC

O experimento de RMN HMBC é um método de detecção inversa, que revela a correlação heteronuclear à longa distância (duas ou mais ligações) (Figura. 2.6) [17].



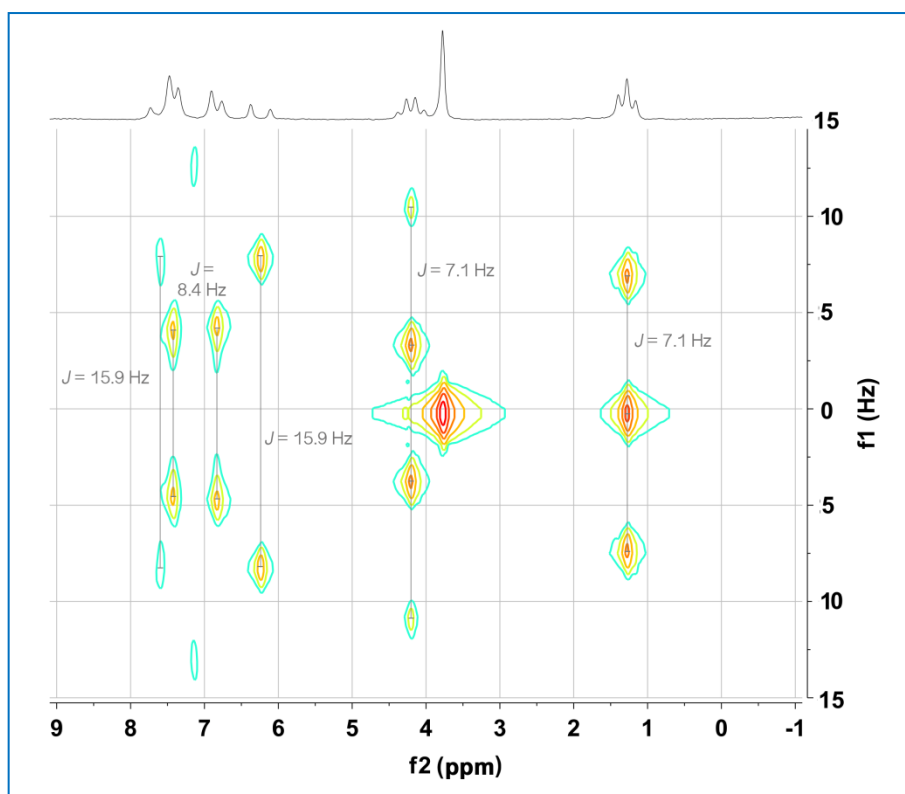


**FIGURA 2.6** – Acoplamento à longa distância, observado no experimento HMBC. (Fonte: Autora)

## 2.5. J - resolvido

O experimento J-resolvido permite separar os deslocamentos químicos dos acoplamentos escalares, de modo que se possa examinar um parâmetro sem as complicações decorrentes de outro. Por exemplo, a análise de espectros de  $^1\text{H}$  é muitas vezes complicada pela sobreposição de multipletos vizinhos, tornando a verificação das constantes de acoplamento ou a medição precisa dos deslocamentos químicos difícil ou mesmo impossível <sup>[18]</sup>.

O espectro J-resolvido pode ser obtido como resultado de um experimento homo e/ou heteronuclear (Figura. 2.7), apresentando numa dimensão informações a respeito dos deslocamentos químicos, enquanto que na outra as informações sobre os acoplamentos escalares entre os núcleos.



**FIGURA 2.7** – Espectro de RMN J-resolvido. (Fonte: [http://nanalysis.com/wp/wordpress-content/uploads/2015/09/pMeOethylcinnamate\\_8scans\\_32pts\\_spectrum1.png](http://nanalysis.com/wp/wordpress-content/uploads/2015/09/pMeOethylcinnamate_8scans_32pts_spectrum1.png), em 2016)

### 3. Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, cujos agentes etiológicos são protozoários transmitidos por vetores. Atualmente, reveste-se de importância epidemiológica pela sua elevada incidência no mundo e potencial gravidade clínica, causando consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco, principalmente aquela que vive em condições precárias de habitação e saneamento [19].

Na África, uma em cada quatro crianças morrem devido à doença, além disso, esta enfermidade é a causa da morte de mais de 10 mil grávidas e por volta de 200 mil infantes no continente. Nas Américas, a transmissão de malária ocorre em 21 países, sendo o *Plasmodium vivax* responsável por 77% do total dos casos. No entanto, em países como Haiti e República Dominicana o *P. falciparum* ainda domina as estatísticas com 100% dos casos [20].

No Brasil, mesmo com a redução no número de notificações nos últimos anos, a doença ainda apresenta elevado risco de incidência e transmissão na Amazônia Brasileira, sendo esta considerada a região endêmica do país. De acordo com o Ministério da Saúde, a região Amazônica concentra 99,7% dos casos de malária do país e abrange os estados do Amazonas, Amapá, Acre, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, além de Mato Grosso e Maranhão. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença também em áreas urbanas em cerca de 15% [21].

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pelas fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo. Além disso, a malária pode ser transmitida de forma induzida, através de transfusão sanguínea com sangue contaminado, ou com utilização de seringas com agulhas contaminadas. Existem cerca de 150 espécies de parasitas causadoras desta enfermidade em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo quatro delas capazes de transmitir a doença em humanos: *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (este ocorre apenas em regiões restritas do continente africano) e *P. falciparum*, sendo este último capaz de desencadear as formas graves da doença [19,21].

O *Plasmodium knowlesi*, causador de malária em macacos no sudeste asiático, é também causador de um tipo específico de malária em humanos.

Pesquisadores da Malásia estudam a apresentação clínica deste parasita para definição de sua evolução nos homens <sup>[22,23]</sup>.

O início da infecção ocorre quando esporozoítos infectantes são inoculados nos seres humanos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Uma vez alcançada a corrente sanguínea, os esporozoítos migram pelo corpo até atingirem os hepatócitos, onde se processa o desenvolvimento parasitário, cerca de 30 minutos após a infecção.

Os sintomas típicos da malária são: mal-estar, cefaleia, cansaço e mialgia, os quais geralmente precedem a febre. O acesso malárico (ataque paroxístico agudo) que coincide com a ruptura das hemácias, é geralmente acompanhado de calafrio, sudorese e fraqueza intensa, que tendem a desaparecer após algumas horas <sup>[19]</sup>.

Além dos sintomas clássicos descritos acima, a malária comumente acarreta o desenvolvimento de anemia, que apesar de frequente, apresenta-se em graus variáveis, sendo mais intensa nas infecções por *P. falciparum*. Em áreas endêmicas, podem surgir manifestações crônicas, como a síndrome da esplenomegalia aguda, que consiste nos seguintes sintomas: esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia. Ainda podem ocorrer proteinúria, hipoalbuminemia e edema em casos de malárias não tratadas causadas por *P. malariae*. <sup>[19]</sup>.

No caso da infecção causada pelo *P. falciparum*, pode ocorrer manifestações mais graves da doença, que podem chegar a ser fatais. Sintomas como convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência, são indicadores desta situação e podem preceder o quadro grave. Dentre as diversas manifestações graves da malária, podemos destacar a malária cerebral. Esta consiste de um quadro de forte cefaléia, hipertermia, vômitos e sonolência, além de convulsões em crianças. Este quadro tende a evoluir para o coma <sup>[19]</sup>.

O tratamento e o controle da malária tornaram-se mais difíceis com a crescente expansão dos casos de parasitas resistentes aos fármacos amplamente utilizados <sup>[24]</sup> e de vetores resistentes aos inseticidas usuais <sup>[20]</sup>. A toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica também limita os seus usos. Por estas razões, é premente a necessidade de busca de novas e mais eficazes alternativas terapêuticas para combater as cepas de *P. falciparum* resistentes, promovendo a cura em tempo razoável (3 dias) para garantir adesão ao tratamento, sejam seguros e de baixo custo <sup>[25]</sup>.

Neste contexto, as plantas têm dado importante contribuição, e produtos isolados a partir do extrato destas fontes naturais continuam a representar uma importante fonte para a obtenção de protótipos candidatos a novos fármacos antimaláricos [26].

A atividade antimalárica de alcaloides de origem vegetal tem sido amplamente relatada na literatura, sendo que no período de 1990 a 2000 mais de uma centena de substâncias ativas desta classe foram descritas, algumas até mais potentes que a cloroquina [27].

### **3.1. O tratamento da malária com o uso plantas medicinais**

A pesquisa de plantas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas enfermidades, bem como a identificação e o isolamento dos principais componentes químicos, tem se tornado o foco mais importante na busca de novas substâncias farmacologicamente ativas.

Estima-se que 65% da população mundial utilizam plantas medicinais como fonte principal de terapia devido à dificuldade de acesso a outras formas de tratamento [28]. Além disso, foi relatado que só se conhece entre 5 e 15% da composição química de 250.000 a 750.000 espécies de plantas superiores desse planeta e que nada se conhece sobre a composição de mais de 99% da flora brasileira [29], situação esta agravada pela perda de espécies vegetais devido à intensa ocupação humana e destruição dos ecossistemas.

O tratamento para malária humana visa, principalmente, interromper a esquizogonia sanguínea, que é a causa da patogênese e dos sintomas clínicos da doença. O tratamento oral previne a progressão da doença para estados severos, ou seja, se os fármacos forem administradas corretamente, ocorre a diminuição da morbidade e mortalidade causada pela doença [30].

Para que uma substância de origem vegetal de fato se torne uma droga antimalárica, sugere-se que sejam seguidos alguns critérios de seleção para as substâncias candidatas, como: apresentar atividade antiplasmódica potente, tanto em cepas de *P. falciparum* resistentes, como as não resistentes à cloroquina; ser seletivamente tóxica aos parasitas da malária; erradicar parasitas da malária em camundongos, sem apresentar toxicidade; ser ativa quando utilizadas por via oral.

O primeiro fármaco antimalárico foi a quinina, uma substância isolada pela primeira vez em 1820 da casca de *Chinchona spp.* A estrutura da quinina foi estabelecida por Rabe em 1908, e sua síntese foi concluída em 1944 por Woodward e Doering, porém, sua produção em escala industrial mostrou ser muito onerosa, o que restringiu seu uso. A quinina é atualmente isolada de árvores *Chinchona spp.* que crescem na América do Sul <sup>[30]</sup>.

A Cloroquina foi sintetizada a partir da quinina e, até pouco tempo atrás, uma das únicas drogas disponíveis para o combate à malária. Porém, nos últimos trinta anos, a situação ficou pior com a multiplicação das cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, o que causou o aumento na mortalidade, principalmente nos países do continente africano <sup>[30]</sup>.

Apesar dos esforços para a produção de novos fármacos antimaláricos sintéticos, a contribuição mais relevante foram as pesquisas com plantas medicinais que contêm artemisinina. Esta substância foi isolada em 1972 da *Artemia annua*, uma espécie de uso tradicional da China. Os derivados semissintéticos desse composto vêm sendo usados de maneira crescente. Embora eles sejam efetivos contra *P. falciparum* resistentes à cloroquina, o tratamento combinado com outra droga é recomendado, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência <sup>[30]</sup>.

Embora muitos extratos de plantas com atividade antimalárica tenham sido reportados na literatura, os resultados muitas vezes mostram apenas modesta atividade *in vitro* contra os parasitas ou contra a malária experimental em camundongos, sugerindo que a espécie em questão provavelmente tem apenas um limitado efeito no homem e que a cura da doença é improvável. No entanto, isso pode não significar necessariamente que medicamentos elaborados a partir destas espécies não tenham valor, já que os tratamentos podem ser benéficos nos casos em que o curso da doença é reduzido, por exemplo, pela redução da anemia e outras complicações decorrentes desta anemia, até mesmo o risco de morte. Além disso, os benefícios podem incluir o alívio dos sintomas, como dor, febre e imunomodulação, levando a um aumento da imunidade <sup>[31]</sup>.

Finalmente, é importante ressaltar que os extratos de plantas também podem ser eficazes contra o parasita na fase hepática. Conforme comentado anteriormente, o desenvolvimento de derivados de artemisina reafirmou o potencial de diferentes espécies de plantas em fornecer medicamentos eficazes no tratamento da malária.

Dentre os inúmeros espécimes vegetais que são utilizados tradicionalmente na Região Amazônica, as espécies da família Apocynaceae destacam-se por suas diferentes propriedades medicinais <sup>[32]</sup>. As Apocynaceae também são ricas em alcaloides indólicos, uma classe química de variada atividade biológica nas quais certas substâncias já demonstraram potencial antimalárico <sup>[33]</sup>.

#### **4. Família Apocynaceae**

A família Apocynaceae pertence à ordem Gentianales, subclasse Asteridae <sup>[34]</sup> e compreende cerca de 2000 espécies distribuídas em aproximadamente 200 gêneros de habitat marcadamente tropical e subtropical em todo mundo <sup>[35]</sup>. No Brasil ocorrem cerca de 400 espécies subordinadas a 41 gêneros <sup>[36]</sup>. São plantas de grandes variedades, ervas, arbustos, árvores, com ocorrência tanto nos campos quanto nas matas. São caracterizadas pela presença de látex, folhas geralmente opostas, inteiras, flores pentâmeras, estiletos unidos no ápice, formando uma cabeça ampliada, frutos usualmente bifolculares e sementes geralmente carnosas <sup>[35]</sup>.

Apesar das muitas aplicações e usos das espécies de Apocynaceae, elas se destacam especialmente por serem reconhecidamente produtoras de substâncias bioativas como iridoides, glicosídeos cardioativos e alcaloides, especialmente os alcaloides indólicos <sup>[37]</sup>.

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies dessa família, e muitas dessas espécies representam protótipos de classes farmacológicas distintas de drogas e fazem parte da história da farmacologia e da terapêutica <sup>[34]</sup>. Deve-se destacar, contudo, que essa família inclui um grande número de espécies tóxicas, tanto para animais como para a espécie humana <sup>[34,35]</sup>.

## 5. O Gênero *Aspidosperma*: etnofarmacologia, atividade biológica e alcaloides indólicos

O gênero *Aspidosperma* compreende cerca de 260 espécies arbóreas <sup>[38]</sup>, que ocorrem apenas na América, principalmente entre o México e a Argentina. No Brasil encontram-se representantes desse gênero em praticamente todos os ecossistemas <sup>[39]</sup>.

As espécies do gênero *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, pau-pereiro, carapanaúba, pequiá, quina, taroba e amargoso <sup>[40]</sup>. São árvores de grande porte de 2 a 60 m de altura, fornecedoras de madeira de lei, muitas utilizadas na construção civil e naval, em cabos de ferramentas e de instrumentos agrícolas, na marcenaria, carpintaria e peças flexíveis <sup>[39,40]</sup>.

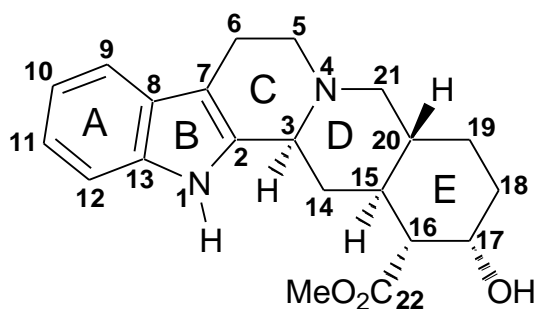
As folhas de *Aspidosperma* geralmente auxiliam na classificação e divisão das espécies em séries, são alternas, espiraladas, não agrupadas no ápice dos ramos <sup>[38]</sup>. Possuem flores pequenas dispostas em cimeiras verticiladas ou racemocorimbiformes, geralmente brancas, castanho-escuro ou amarela. Apresentam frutos cápsula lenhosa, orbiculares, ovais ou elípticos, chatos, verdes pardacentos e pubescentes no exterior, e amarelentos no interior, normalmente 7-9 cm de comprimento, 5-6 cm de largura e 1-2 cm de espessura com 8-16 sementes aladas e asas membranáceas mais ou menos circulares <sup>[40]</sup>.

Além da importância econômica do gênero *Aspidosperma* por seu valor comercial como fornecedor de matéria-prima para os vários setores industriais que empregam madeira, apresenta grande relevância como produtor de uma importante classe de substâncias do metabolismo secundário, os alcaloides.

Em 1951 o gênero *Aspidosperma* sofreu uma revisão sistemática, haja vista que espécies distintas vinham sendo classificadas com o mesmo nome. Esta revisão agrupou 52 espécies em nove séries, Macrocarpa, Ramiflora, Pyricolla, Polyneura, Rigida, Nitida, Stegomeria, Quebrachines e Nobile, levando em consideração suas características morfológicas <sup>[38]</sup>. Entretanto, ainda existiam controvérsias quanto ao número exato de espécies que constituíam este gênero. Então, em 1987 Bolzani propôs uma nova classificação das espécies deste gênero, compreendendo 48 espécies em 8 séries, Rigida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa e Tomentosa, levando em consideração os aspectos quimiotaxonômicos <sup>[42]</sup>.

O grande número de alcaloides indólicos encontrados nas espécies de *Aspidosperma*, cerca de 247 <sup>[43]</sup>, confirmam a grande importância dessa classe de substâncias, no que tange à classificação, e divisão de espécies do gênero em três grupos, de acordo com as semelhanças químicas das estruturas alcaloídicas <sup>[38,42]</sup>, fato este, que coloca os alcaloides indólicos como marcadores quimiotaxonômicos das espécies do gênero *Aspidosperma* <sup>[44]</sup>. Neste gênero ocorrem predominantemente alcaloides indólicos contendo esqueleto  $\beta$ -carbolínico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos <sup>[2]</sup>, com a parte indólica originada biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de hidratos de carbono, pela via chiquimato <sup>[45]</sup>.

Le Men e Taylor (1965) propuseram um sistema de numeração para essas substâncias baseadas na sua biogênese sendo, hoje em dia, o sistema de numeração aceito. A numeração baseia-se no esqueleto do alcaloide ioimbina (Figura 5.1).



**FIGURA 5.1** – Fórmula estrutural da ioimbina com numeração proposta por Le Men e Taylor (1965).

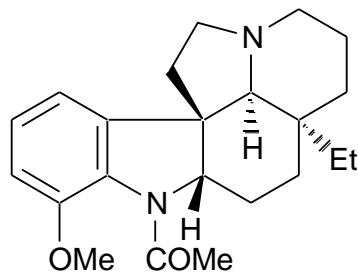
Gilbert (1966) estudou 33 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcaloides indólicos, o que levou mais uma vez a conclusão da predominância desta classe de alcaloides neste gênero.

Del Vitto et al. (1997) realizaram a catalogação de 273 espécies de uso popular como medicamento na Argentina, das quais a *Aspidosperma quebracho blanco* relatada como antidiabético, antiasmático, cicatrizante e febrífugo. Desta espécie já foram isolados e identificados cerca de 34 alcaloides, dentre os quais a aspidospermina (Figura 5.2), um alcaloide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina.

O extrato de *A. quebracho blanco* é usado para o tratamento da disfunção erétil, e este efeito tem sido atribuído ao seu conteúdo de ioimbina, que é um inibidor



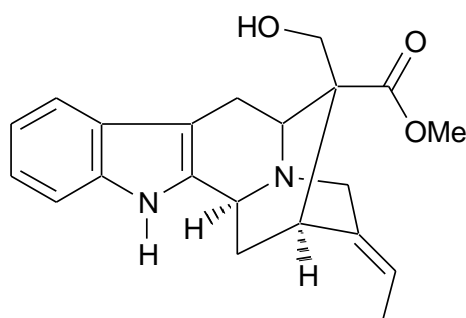
seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, um agente simpatolítico cujo efeito mais pronunciado é a vasodilatação periférica [48].



**FIGURA 5.2** – Fórmula estrutural da aspidofermina, alcaloide de *Aspidosperma quebracho blanco*. (Fonte: Sperling et al., 2002).

Extratos etanólicos de folhas, raízes e caules de *Aspidosperma polineuron* (peroba rosa) foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Clasdosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicilium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* sp, para que houvesse justificativas biológicas que embasasse seu estudo fitoquímico. Dessa forma foram testados os extratos etanólicos das folhas, raízes e caules dessa espécie, mas apenas o extrato etanólico do caule foi capaz de inibir o crescimento de *C. herbarum* [49].

Estudos semelhantes foram conduzidos por Granato et al. (2005) que testaram o extrato etanólico de rejeitos de indústria madeireira de *A. polineuron*, resultando em atividade positiva contra *Pseudomonas mirabilis*, neste caso, foram obtidos dados de espectroscopia de ultravioleta os quais demonstraram grande similaridade com valores descritos na literatura para o alcaloide polineuridina (Figura 5.3), o principal alcaloide indólico isolado das cascas e das folhas de *A. polineuron* [51], espécie reconhecida também por apresentar alcaloides quaternários nas raízes [52].



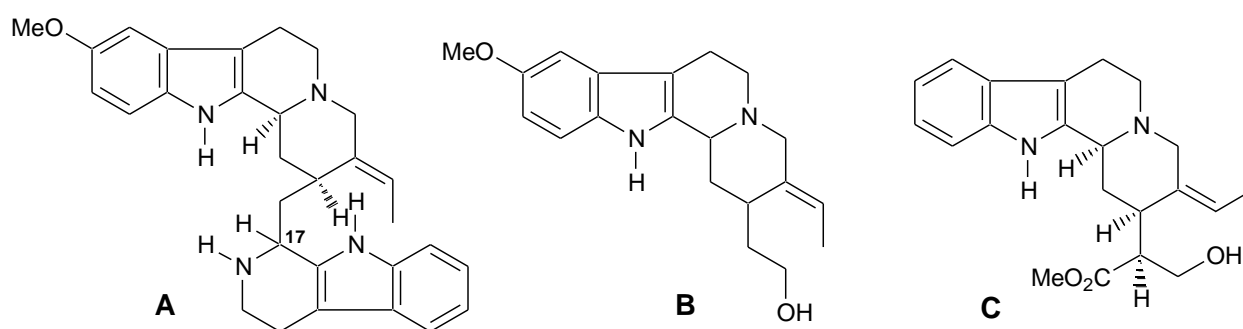
**FIGURA 5.3** – Fórmula estrutural da polineuridina, alcaloide de *Aspidosperma polineuron*. (Fonte: Marques, 1988).

A atividade antibacteriana de extratos etanólicos das espécies de *Aspidosperma*, como *A. dispersum*, *A. olivaceum*, *A. pyriformium*, *A. pyricollum*, *A. polyneuron* e *A. ramiflorum* foi observada em bactérias Gram positivas e negativas [53].

Um total de 114 extratos de 88 espécies de plantas diferentes ocorrentes na Mata Atlântica no Estado de São Paulo, somente os extratos de folhas e cascas do caule de *A. ramiflorum* (guatambu) mostraram atividade antibacteriana contra *E. coli* [54].

Tanaka et al. (2006), demonstraram que os extratos metanólicos de *Aspidosperma ramiflorum*, tiveram ação contra bactérias gram-positivas enquanto que as frações alcaloídicas desta espécie foram mais eficazes contra bactérias gram-negativas.

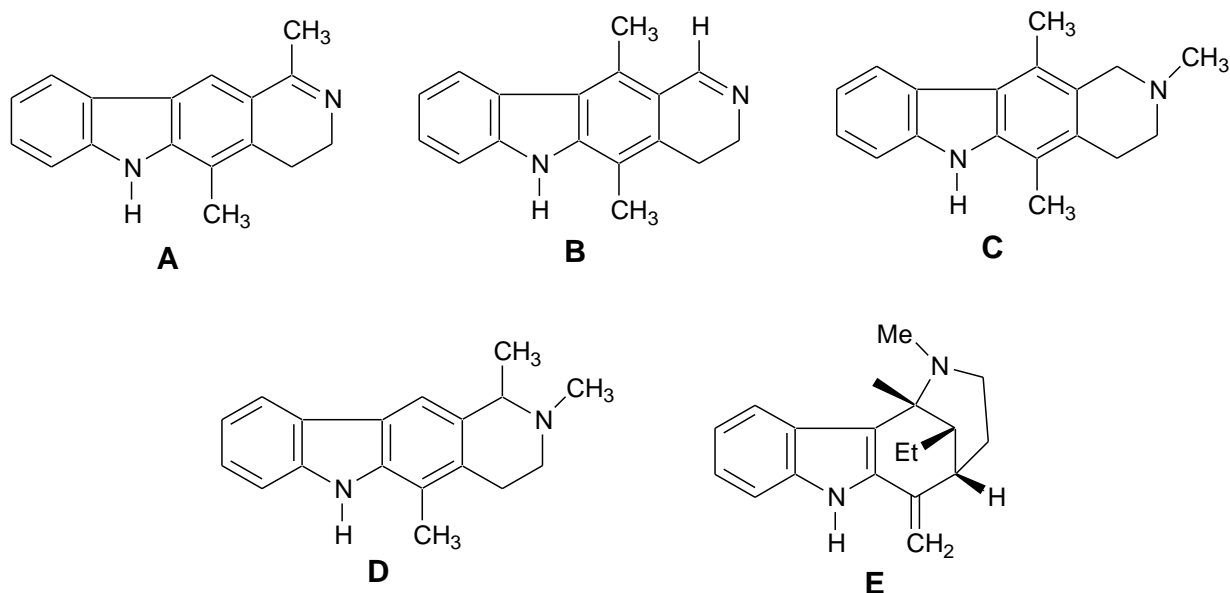
Data de 1988 o primeiro trabalho de isolamento e identificação de alcaloides de *A. ramiflorum*, onde foram descritos os alcaloides  $\beta$ -ioimbina (OH-17 em  $\beta$ ) (Figura 5.1), 10-metoxigeissoschizol (Figura 5.4B) presentes nas cascas do caule e sementes com estruturas já relatadas em outras espécies, e ramiflorina (Figura 5.4A), presentes nas cascas do caule [51]. Somente dez anos depois um novo alcaloide foi isolado, a isositsiriquina (Figura 5.4C) [53].



**FIGURA 5.4** – Alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum*. (Fonte: Marques, 1988 e Oliveira, 1999).

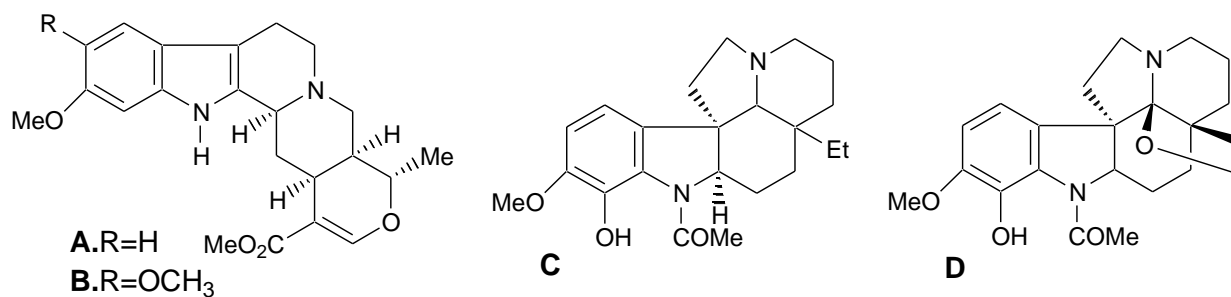
Campos et al. (2006) observaram o efeito pró-erétil de uma fração rica em alcaloides de cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* (piquiá) comparado ao padrão ioimbina como controle positivo mediado por mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e nitrérgicos. A *Aspidosperma ulei* possui pelo menos cinco alcaloides indólicos isolados e identificados: 1,2-dihidroolivacina (Figura 5.5A), 1,2-

dihidroelipticina (Figura 5.5B), N-metil-tetrahydro-elipticina (Figura 5.5C), (D)-guatambuina (Figura 5.5D) e uleina (Figura 5.5E) [51].



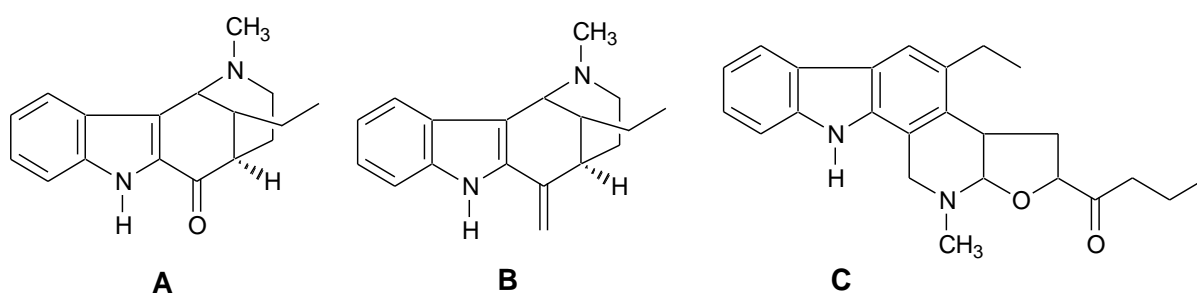
**FIGURA 5.5** – Alcaloides de *Aspidosperma ulei*. (Fonte: Marques, 1988).

A *Aspidosperma marcgravianum* é uma espécie com indicações populares para tratamento da malária, além do diabetes e câncer, da qual são utilizadas suas cascas [57]. De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcaloides indólicos, dentre os quais a reserpinina (Figura 5.6A), reserpilina (Figura 5.6B), aspidoescarpina (Figura 5.6C), e aspidoimidina (Figura 5.6D) [51], que podem justificar a atividade tóxica preliminar dos extratos desta espécie nos ensaios com larvas de *Artemia franciscana* [57] e atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, entre outros [58].



**FIGURA 5.6** – Alcaloides de *Aspidosperma marcgravianum*. (Fonte: Marques, 1988).

*Aspidosperma subicanum* (guatambu) foi submetida as análises macroscópicas e microscópicas das cascas, análise microscópica do pó da casca, prospecção fitoquímica e testes de pureza a fim de se obter dados padronizados a respeito das partes da planta que são aplicados por populares como medicamentos para tratamento de diabetes e da hipercolesterolemia. De *A. subicanum* foram isolados e identificados a partir das cascas, dez alcaloides indólicos, dentre os quais, *N*-metil-tetraidro-elipticina (Figura 5.5C), uleina (Figura 5.5E), 3-*epi*-dasycarpidona (Figura 5.7A), 3-*epi*-uleina (Figura 5.7B), e subincamina (Figura 5.7C) [51].

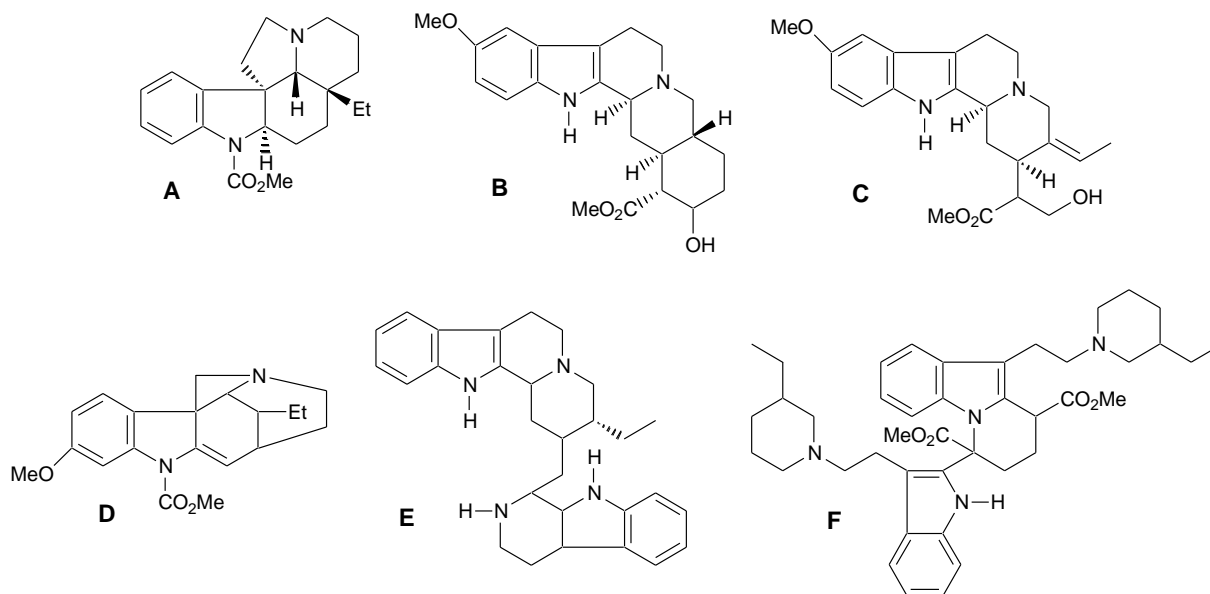


**FIGURA 5.7** – Alcaloides de *Aspidosperma subicanum*. (Fonte: Marques, 1988).

*Aspidosperma excelsum* (sapopema) é uma espécie com grandes aplicações na medicina popular. No Peru é utilizada por Índios Shipibo-Conibo, para o tratamento da hepatite e malária, e por outros nativos como afrodisíaco, vasodilatador, antisséptico, antimicrobiano, cicatrizante, aumento da pressão sanguínea e bronquite [59]. No Brasil, é utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamação, febre, diabetes, câncer e malária. Apesar das várias indicações terapêuticas e de sua grande aplicação como poderoso agente antimalárico [59] poucas pesquisas biológicas foram conduzidas com esta espécie. Os dados que provavelmente sustentam estas indicações etnofarmacológicas, em especial a atividade antimalárica, que é comum nas espécies do gênero, é a presença do conteúdo alcaloidal, da qual são conhecidos cerca de 18 alcaloides indólicos, dos quais podemos citar, a ioimbina (Figura 5.1), *N*-acetilaspidospermidina (Figura 5.8A), excelsinina (Figura 5.8B) e aspexcina (Figura 5.8C) [51].

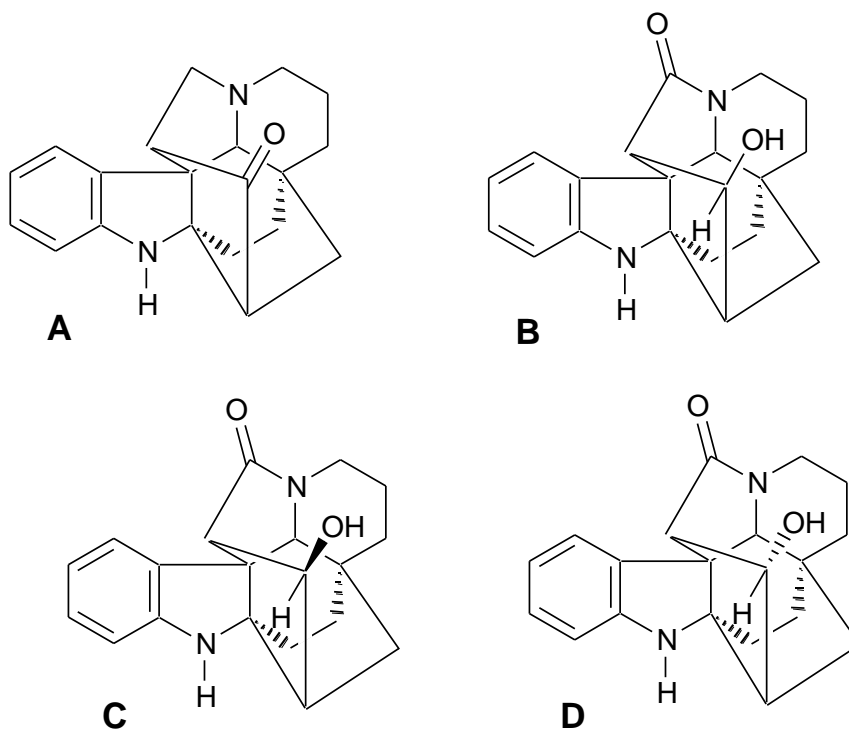
A atividade antimicrobiana foi confirmada por Verpoorte et al. (1983) demonstrando a atividade inibitória no crescimento de *Bacillus subtilis* de pelo menos seis alcaloides desta espécie, tais como a 11-metoxitubotaivina (Figura

5.8D), ochrolifuanina (Figura 5.8E), e tetraidrosecamina (Figura 5.8F), todos presentes nas raízes da planta [51].



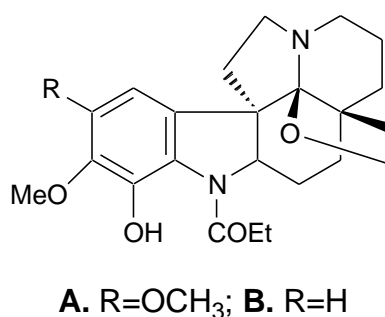
**FIGURA 5.8** – Alcaloides de *Aspidosperma excelsum*. (Fonte: Marques, 1988).

Mesquita et al. (2007) testaram os extratos hexânico e etanólico das folhas, madeira, casca do caule, raízes e cascas das raízes de *Aspidosperma macrocarpon* para verificação da atividade antimalárica *in vitro* contra uma linhagem de *Plasmodium falciparum*, resistente a cloroquina e citotóxica contra células pulmonares embrionárias de humanos (MRC-5) e células retiradas dos músculos de ratos (L-6). O melhor resultado foi obtido com o extrato etanólico das cascas das raízes para a atividade contra *P. falciparum*, e não foram observados efeitos citotóxicos para nenhum dos extratos nas células ensaiadas. Das cascas de *A. macrocarpon* foram isolados e identificados quatro alcaloides indólicos, kopsanona (Figura 5.9A), *epi*-kopsanal-10-lactama (Figura 5.9B), kopsanol (Figura 5.9C), e *epi*-kopsanol (Figura 5.9D), [61], o que poderia justificar os resultados obtidos por Mesquita et al. (2007).



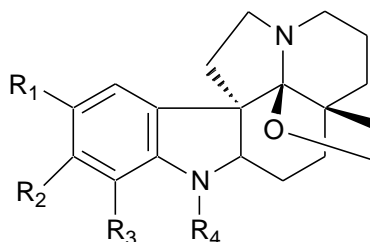
**FIGURA 5.9** – Alcaloides de *Aspidosperma macrocarpon*. (Fonte: Ferreira-Filho et al., 1966).

*Aspidosperma megalocarpon* foi avaliada quanto à sua atividade antimalárica por Weninger et al. (2001), realizando testes *in vitro* com os extratos obtidos em diclorometano e metanol contra *P. falciparum*. Mitaine-Offer et al. (2002) testaram três dos quatro alcaloides isolados desta espécie, aspidolimidina (Figura 5.6D), aspidoalbina (Figura 5.10A) e fendlerina (Figura 5.10B) (madeira) <sup>[65]</sup> demonstrando uma baixa atividade antimalárica ao testar os alcaloides purificados.



**FIGURA 5.10** – Alcaloides de *Aspidosperma megalocarpon*. (Fonte: Mitaine et al., 1998).

Gilbert et al. (1965) e Bolzani et al. (1987) realizaram os únicos trabalhos de isolamento de substâncias do metabolismo secundário de *Aspidosperma spruceanum*. A partir do extrato etanólico das cascas do caule foram isolados três alcaloides, a Aspidoalbina (Figura 5.11A), *N*-acetil-*N*-despropionilaspidoalbina (*N*-acetilaspidoalbina) (Figura 5.11B) e Des-*O*-metilaspidolimidina (Figura 5.11C).



- A.**  $R_1=R_2=OMe$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_4=COEt$   
**B.**  $R_1=R_2=OMe$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_4=COMe$   
**C.**  $R_1=H$ ;  $R_2=R_3=OH$ ;  $R_4=COMe$

**FIGURA 5.11** – Alcaloides de *Aspidosperma spruceanum*. (Fonte: Gilbert et al. (1965) e Bolzani et al. (1987)).

## 6. *Aspidosperma nitidum*

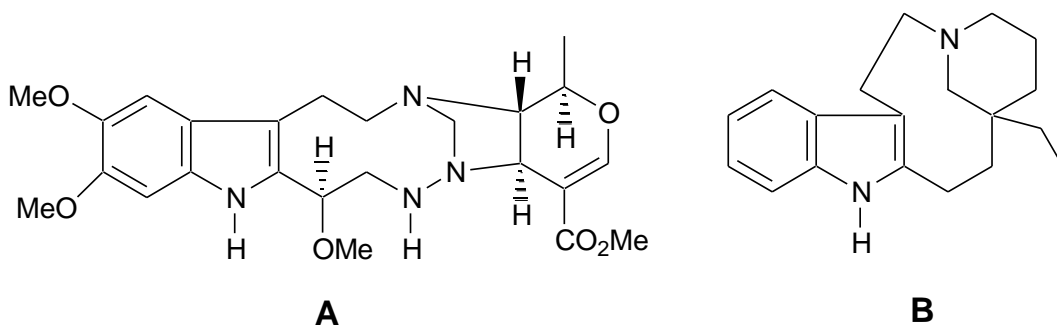
*Aspidosperma nitidum* é popularmente conhecida como carapanaúba (Figura 6.1). As cascas do caule desta espécie são utilizadas por mais de 8.000 nativos em várias partes do Brasil para curar a malária <sup>[3]</sup>. Os índios Makunas e Taiwanos relatam que o látex desta árvore é eficaz na cura de lesões provocadas pela hanseníase <sup>[67]</sup>. No estado do Amapá, a espécie *A. nitidum* é utilizada no tratamento de bronquites e diabetes, e em Manaus é utilizada como anti-inflamatória, cicatrizante e contraceptivo <sup>[67]</sup>.



**FIGURA 6.1** – Planta da espécie *Aspidosperma nitidum*. (Fonte: Julia Penna Coutinho et al. 2013).

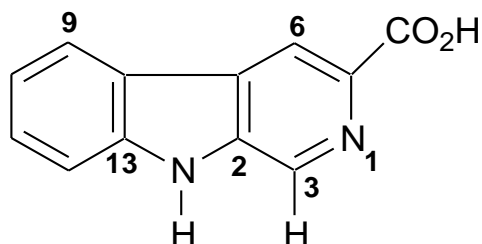
Pereira et al. (2006) tomando por base que *A. nitidum* era utilizada no tratamento de inflamações, realizaram pesquisas para avaliar a atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne. Também foi relatado o isolamento e a identificação de um alcaloide indólico com um sistema 1,2,9-triazabicyclo[7.2.1], denominado braznitidumina (nome este em homenagem ao Professor Raimundo Braz-Filho) (Figura 6.2A) [68].

De *A. nitidum* já são conhecidos pelo menos treze estruturas de alcaloides indólicos, merecendo destaque a ioimbina (Figura 5.1), a aspidospermina (Figura 5.2), a quebrachamina (Figura 6.2B), o ácido harmanocarboxílico com esqueleto do tipo harmano (Figura 6.3) [43], e o alcaloide indólico 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidrocorinanteol, com esqueleto do tipo corinanteol ou corinanteano (Figura 6.4), muito comuns em outros representantes do gênero, e na sua maioria presentes nas cascas, folhas e galhos [69, 70].

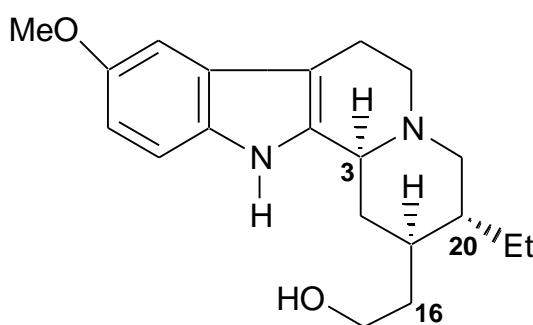


**FIGURA 6.2** – Alcaloides de *Aspidosperma nitidum*. (Fonte: Pereira et al., 2006 e Marques et al., 1996).





**FIGURA 6.3** – Alcaloide indólico Ácido harmanocarboxílico, de *Aspidosperma nitidum*. (Fonte: Pereira et al., 2007).



**FIGURA 6.4** – Alcaloide indólico 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -10-Metoxi-18,19-diidro-corinanteol, de *Aspidosperma nitidum*. (Fonte: Arndt et al., 1967).

O estudo de *A. nitidum* é justificável tendo em vista a importância da busca de alternativas medicamentosas oriundas de produtos naturais, principalmente para a região da Amazônia, onde o acesso à medicina convencional apresenta-se dificultado por fatores geográficos e culturais.

## 7. *Aspidosperma pyrifolium*

*Aspidosperma Pyrifolium* é uma espécie de planta popularmente conhecida como pereiro (Figura 7.1), típica da caatinga e de grande ocorrência nas áreas semiáridas do Brasil <sup>[4]</sup>. Adapta-se facilmente ao clima seco, e apresenta fins medicinais no tratamento de doenças.

O pereiro é utilizado na medicina popular no tratamento de distúrbios respiratórios, febre e como remédio para o estômago. Na medicina veterinária

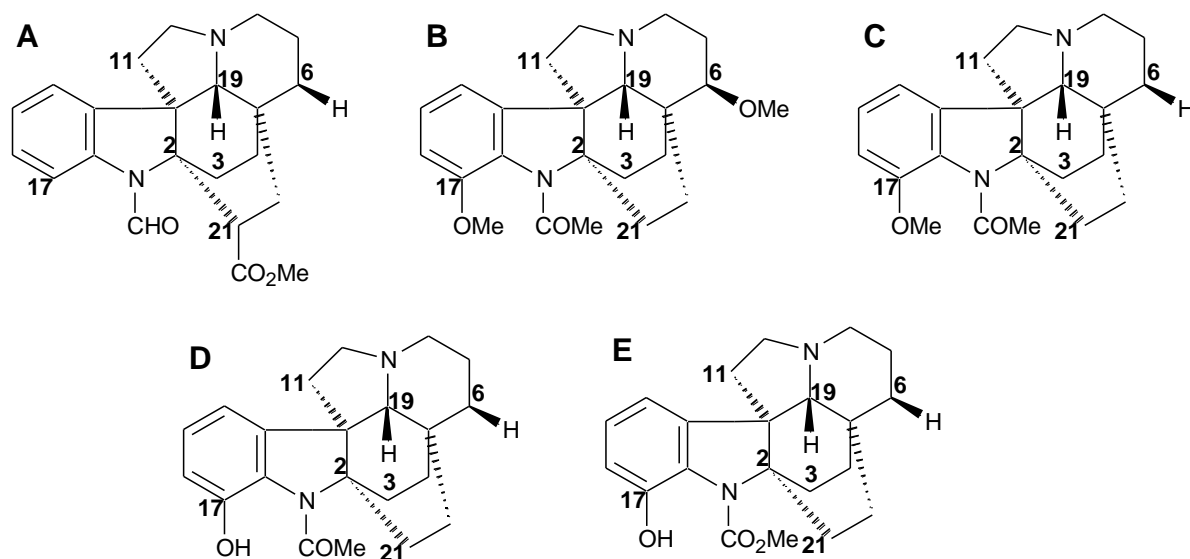
popular é utilizado no tratamento de ectoparasitoses dos animais domésticos (sarnas, piolhos e carrapatos). Sua madeira é bastante utilizada para serviços de carpintaria, para fazer carvão, cerca e lenha [71].



**FIGURA 7.1** – Planta da espécie *Aspidosperma pyrifolium*. (Fonte: Dr. José Elias de Paula (UnB), São José da Tapera/AL., 10/2001).

A espécie *A. pyrifolium* foi validada como útil no tratamento de inflamações do trato urinário e de dermatites [72]. Em relação aos efeitos tóxicos de plantas do gênero, em uma pesquisa direcionada à ocorrência de toxicidade em animais na região do Seridó Ocidental e Oriental (RN, Brasil), a espécie *A. pyrifolium* foi citada como causadora de abortos e de alterações nervosas em ovinos, caprinos e bovinos [73].

Embora vários alcaloides tenham sido isolados das folhas, cascas das raízes e galhos de *A. pyrifolium*, como alcaloides indólicos de esqueleto do tipo aspidostractina (Figura 7.2) dentre outros, não há na literatura relatos do estudo químicos da madeira desta espécie [74,75]. Neste trabalho procuramos identificar alcaloides indólicos isolados a partir da madeira de *A. pyrifolium*.



**FIGURA 7.2** – Alcaloides indólicos Aspidofractina **(A)**, (+)-Pirifolina **(B)**, 6-Desmetoxipirifolina **(C)**, Refractidina **(D)** e (-)-Aspidofilina **(E)**. (Fonte: Craveiro et al., 1983 e Djerassi et al., 1962).

## 8. Alcaloides

São substâncias nitrogenadas, na maioria das vezes farmacologicamente ativas encontradas predominantemente nas Angiospermas <sup>[76]</sup>.

Os alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros, já os alcaloides com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominados de protoalcaloides <sup>[76]</sup>, e alguns autores ainda classificam em pseudoalcaloides, substâncias que apresentam todas as características dos alcaloides verdadeiros, mas não são derivadas dos aminoácidos <sup>[45]</sup>. Quase a totalidade dos alcaloides é derivada de aminoácidos e daí vem sua classificação. A partir dos aminoácidos alifáticos, têm-se os alcaloides pirrolidínicos e tropânicos (Ornitina) e os piperidínicos (Lisina), e dos aminoácidos aromáticos, têm-se os alcaloides isoquinolínicos (Tirosina) e os indólicos (Triptofano) <sup>[45]</sup>.

### 8.1. Ocorrência

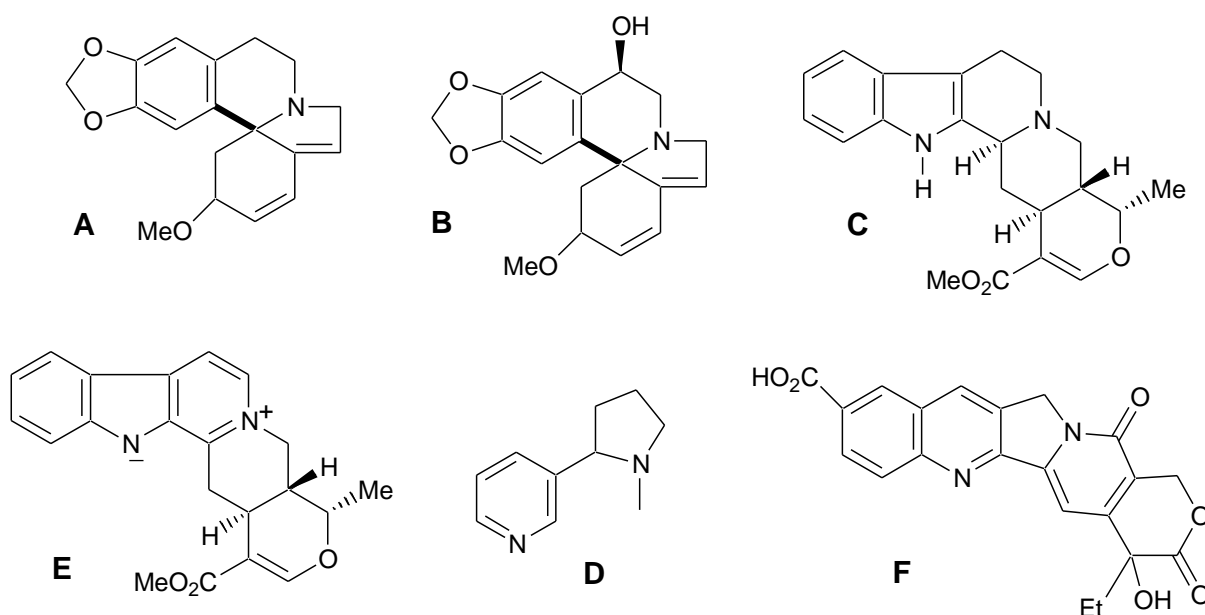
Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também podem ser encontrados em microrganismos e animais <sup>[45]</sup>.

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcaloides, com maior frequência as dicotiledôneas [77]. Essas substâncias podem ser encontradas em diferentes partes do vegetal.

Em raízes de *Erythrina crista-galli* L., encontram-se os sedativos, hipertensivos, laxativos e diuréticos, eritralina (Figura 8.1A) e eritrina (Figura 8.1B) [78]; em folhas de *Catharantus roseus* são encontrados os alcaloides indólicos monoterpênicos, ajmalicina (Figura 8.1C), um anti-hipertensivo, e a serpentina (Figura 8.1D), um sedativo.

Em geral, os alcaloides são produzidos em um local da planta e armazenados em outro, exemplo disto é a nicotina (Figura 8.1E) produzida nas raízes de *Nicotiana tabacum* e posteriormente translocadas para as folhas, nas quais é armazenada [79].

Um alcaloide pode ser encontrado ainda em representantes de diversas famílias vegetais, como é o caso da camptotecina (Figura 8.1F), um importante agente anticancerígeno, que pode ser encontrado em *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), *Nothapodytes foetida*, *Pyrenacantha klaineana* (Icacinaceae), *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae) e *Ervatamia Heyneana* (Apocynaceae) [80].



**FIGURA 8.1** – Alcaloides de raízes, folhas e cascas do caule. (Fonte: Maier et al., 1999 e Peres, 2005).

## 8.2. Alcaloides indólicos

São alcaloides derivados do ácido aminado triptofano, ácido aminado aromático que contém um sistema de anel indólico (Figura 8.2), originado na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico. Ele atua ainda como o precursor de uma grande variedade de outros alcaloides além dos indólicos, e pode sofrer rearranjos que promovem a conversão do sistema de anel indólico em quinolínico <sup>[45]</sup>.

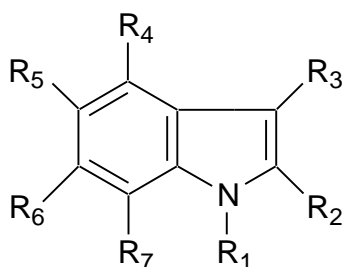


FIGURA 8.2 – O núcleo Indólico. (Fonte: Autora)

### 8.2.1. Alcaloides indólicos simples

Este tipo de alcaloide é formado por modificação simples do L-triptofano, dando origem à triptamina por reação catalisada pela enzima triptofanod Descarboxilase e aos derivados *N*-metil e *N,N*-dimetil, largamente distribuídos em muitos vegetais, como, por exemplo, derivados hidroxilados, como o 5-hidroxitriptamina (serotonina) (Figura 8.3A), encontrado em tecidos de mamíferos onde age como neurotransmissor no sistema nervoso central. Uma série de reações de descarboxilação e hidroxilação do L-triptofano dá origem à psilocina (Figura 8.3B) e psilocibina (Figura 8.3C) substâncias responsáveis por propriedades alucinógenas. Uma via biossintética que cliva dois átomos de carbono produz ainda o alcaloide gramina (Figura 8.3D) <sup>[81]</sup>.

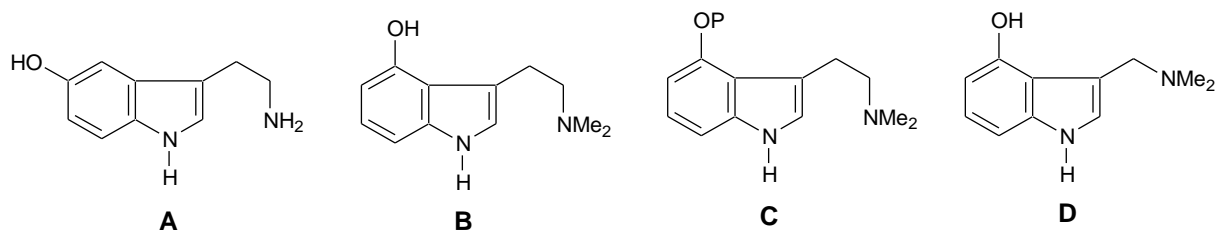


FIGURA 8.3 – Alcaloides indólicos simples. (Fonte: Mustich, 2003)

### 8.2.2. Alcaloides $\beta$ -carbolínicos simples

Esta classe de alcaloides é gerada pela reação da cadeia lateral etilamina da triptamina com um aldeído ou cetoácido de acordo com a complexidade do substrato.

Propriedades psicoativas são relatadas nas plantas *Pegamum harmala* e *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) atribuídos aos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos simples, harmina (Figura 8.4A), harmalina (Figura 8.4B) e tetraidroharmina (Figura 8.4C) <sup>[81]</sup>.

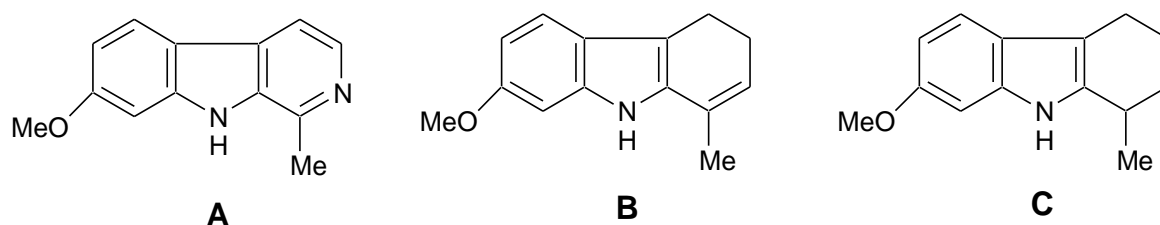
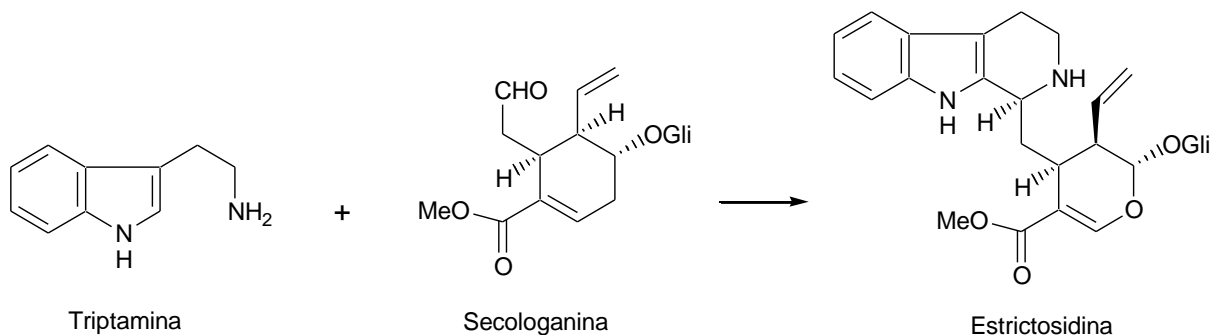


FIGURA 8.4 – Alcaloides  $\beta$ -carbolínicos simples. (Fonte: Mustich, 2003)

### 8.2.3. Alcaloides indólicos monoterpênicos

Os alcaloides indólicos monoterpênicos constituem o maior grupo de alcaloides em plantas, podendo ser encontrados em cerca de oito famílias, dentre as quais a Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae.

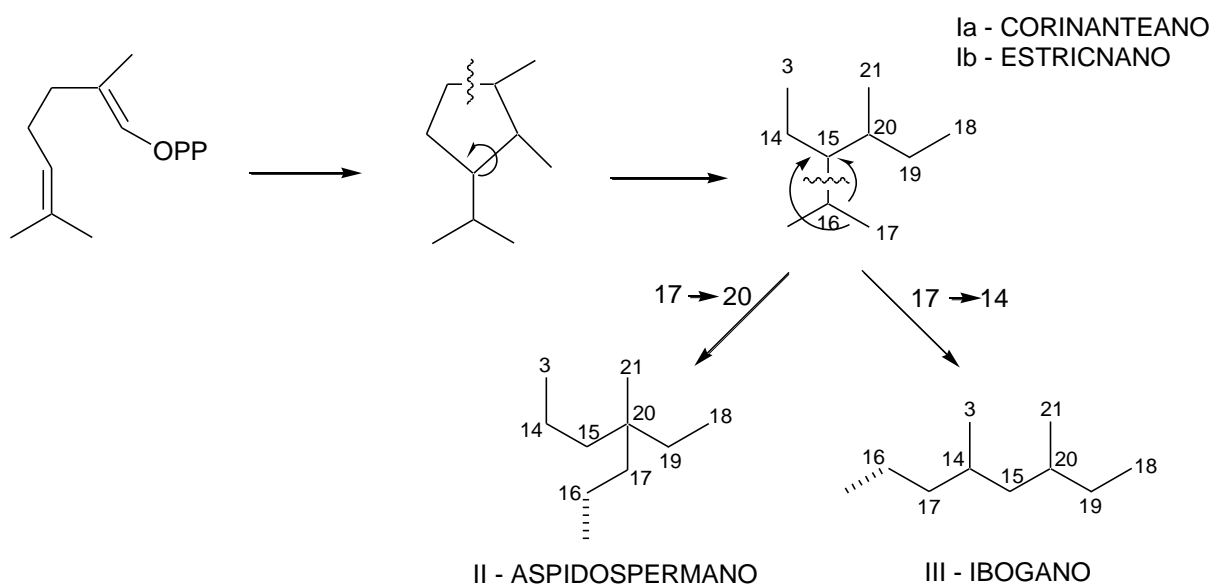
Esta classe de alcaloides possui uma origem biossintética comum, o precursor strictosidina, glicosídeo formado a partir da condensação da triptamina com o aldeído monoterpênico secologanina (Figura 8.5). Esta reação é catalisada pela enzima strictosidina sintase <sup>[82]</sup>.



**FIGURA 8.5** – Reação de obtenção da strictosidina. (Fonte: Bruneton, 1999)

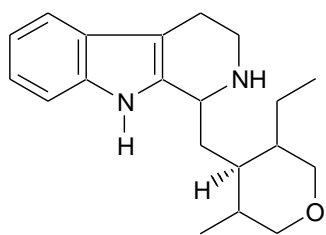
Rearranjos na parte terpenóidica da strictosidina leva à formação de subclasses (Figura 8.6) <sup>[82,83]</sup>:

- I - Alcaloides em que a unidade monoterpênica não sofreu rearranjos [esqueletos corinanteano (a) ou estricnano (b)];
- II - Alcaloides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-20 da unidade monoterpênica (esqueleto aspidospermano);
- III - Alcaloides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-14 da unidade monoterpênica (esqueleto ibogano).

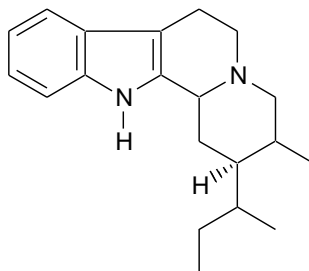


**FIGURA 8.6** – Esquema das reações na cadeia terpenóidica. (Fonte: Bruneton, 1999 e Zenk, 1980).

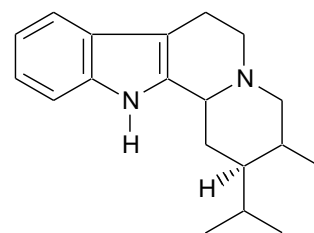
Estas subclasses são ainda subdivididas em 9 tipos principais, às quais se adicionam os *bis*-indólicos que são alcaloides diméricos (Figura 8.7).



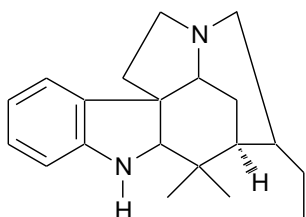
VINCOSANO



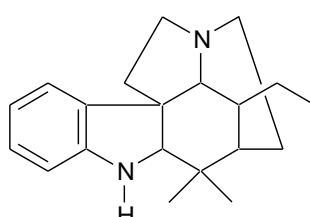
VALESIACOTAMANO



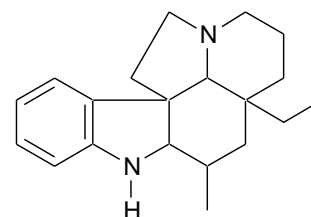
CORINANTEANO



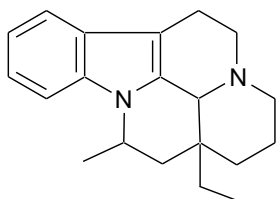
ESTRICNANO



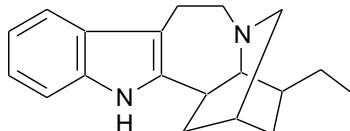
ASPIDOSPERMATANO



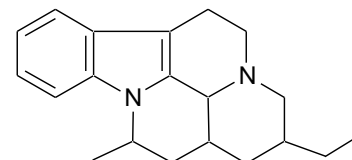
PLUMERANO



EBURNANO



IBOGANO



TACAMANO

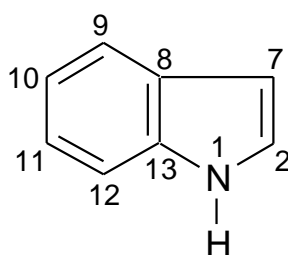
**FIGURA 8.7** – Esqueletos básicos dos alcaloides indólicos monoterpênicos. (Fonte: Bruneton, 1999 e Zenk, 1980).



**Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  descritos da literatura para alcaloides isolados de espécies  
do gênero *Aspidosperma***

## 9. Dados de RMN $^{13}\text{C}$ descritos da literatura para alcaloides isolados de espécies do gênero *Aspidosperma*

Em alcaloides indólicos, as posições 2 e 7 do núcleo indólico (Figura 9.1) são normalmente substituídas levando a formação de estruturas bastantes diversificadas, enquanto as posições 9-12 podem, ocasionalmente, apresentar substituições como grupos hidroxila ou metoxila. Substituições no nitrogênio indólico são menos comuns, ocorrendo principalmente na forma de lactonas ou lactamas <sup>[84]</sup>.



**FIGURA 9.1** – Núcleo Indólico com carbonos enumerados. (Fonte: Morales-Ríos et al., 1987)

A determinação estrutural desses compostos é realizada utilizando-se principalmente  $^{13}\text{C}$ , o que motivou a busca de dados de  $^{13}\text{C}$  na literatura que possibilitassem a comparação com os compostos isolados.

A Tabela 9.1, apresenta algumas espécies do gênero *Aspidosperma* estudadas anteriormente, indicando a parte estudada e os compostos isolados enquanto o Quadro 9.1, contém as estruturas desses compostos, dispostos pela semelhança entre suas estruturas. A numeração utilizada para os compostos levou em consideração a numeração mais comumente adotada na literatura para cada tipo de esqueleto de alcaloide indólico, onde geralmente a contagem inicia no nitrogênio do núcleo indólico.

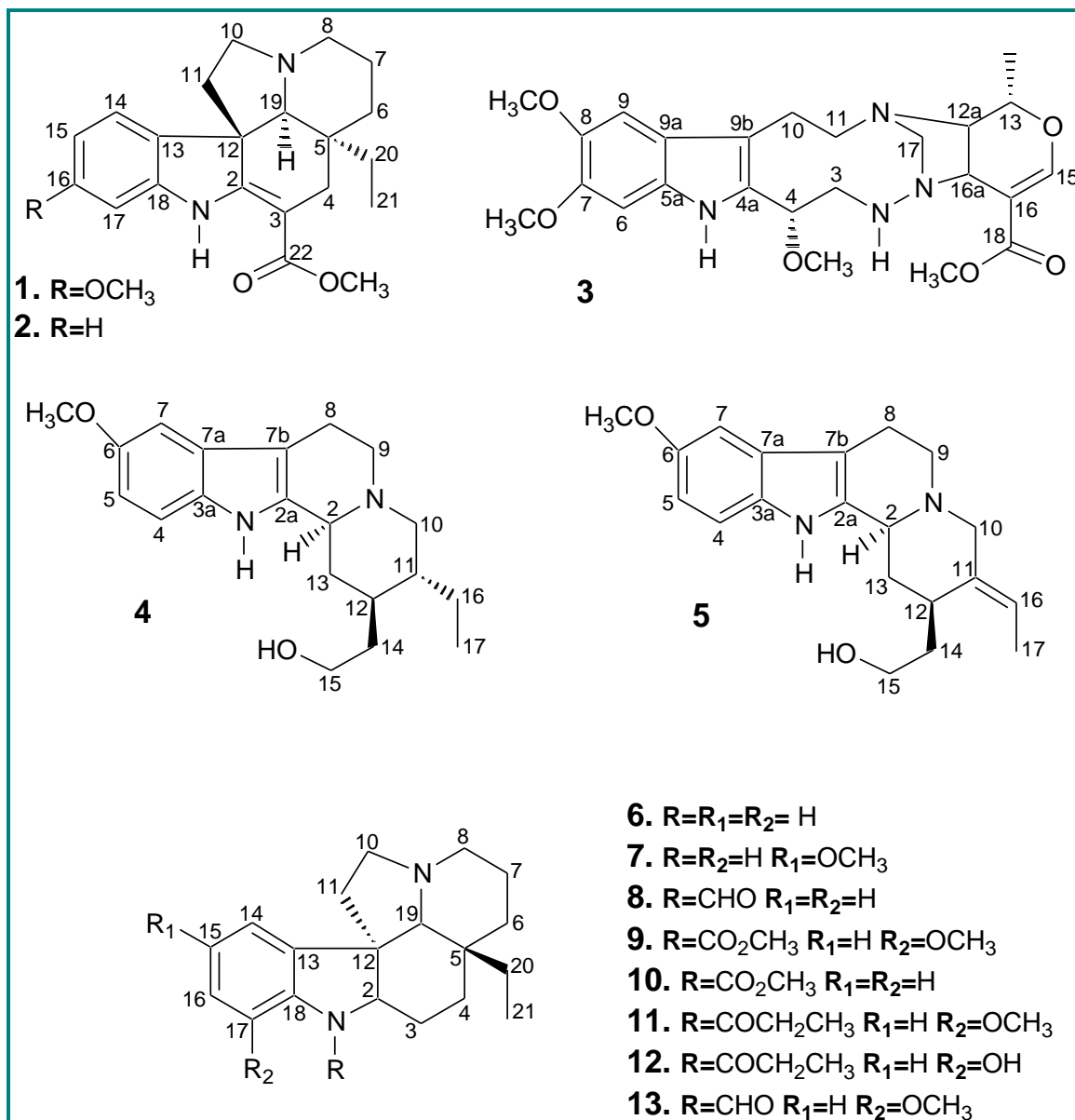
As Tabelas 9.2 e 9.3, contem os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para os compostos do Quadro 9.1, quando disponível na literatura, e identificando o solvente utilizado na obtenção dos dados.

**TABELA 9.1** – Espécies do gênero *Aspidosperma*, em ordem alfabética, parte estudada e substâncias isoladas. (Fonte: Autora).

<b>Espécie</b>	<b>Parte Estudada</b>	<b>Alcaloide</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Referência</b>
<i>A. macrocarpon</i>	Sementes	ervinceina	1*	[85]
		(-)-vincadiformina	2	[85]
				[86]
<i>A. nitidum</i>	casca do caule	Braznitidumina	3	[68]
<i>A. pruinatum</i>	casca da raiz	10-metoxi-di-hidrocorinanteol	4	[87]
		10-metoxi-geissosquizol	5	[87]
<i>A. pyriformium</i>	casca do caule	aspidospermidina	6	[85]
		10- metoxi-aspidospermidina	7	[85]
		N-formil-aspidospermidina	8*	[85]
		(-)-aspidospermina	9*	[85]
		desmetoxiaspidospermina	10	[85]
		palosina	11	[85]
		O-desmetil-palosina	12*	[85]
		Valesina	13*	[85]
				[85]
				(-)-vincadiformina
<i>A. ramiflorum</i>	cultura de células	10-metoxi-geissosquizol	5	[88]
	sementes	10-metoxi-geissosquizol	5	[69]

\* Sem dados de RMN  $^{13}\text{C}$  na literatura. Estrutura determinada por RMN  $^1\text{H}$ , E. M e/ou modificações químicas.

**QUADRO 9.1** – Substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos. (Fonte: Autora).



**TABELA 9.2** – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  em ppm) de alcaloides de espécies do gênero *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos. Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , exceto quando especificados o contrário. (Fonte: Autora).

Átomo	Composto 2 $\delta_{\text{C}}$	Átomo	Composto 3 <sup>†</sup> $\delta_{\text{C}}$	Átomo	Composto 4 $\delta_{\text{C}}$	Composto 5 $\delta_{\text{C}}$
2	167.7	3	32.3	2	60.1	54.1
3	92.6	4	64.0	2a	135.8	135.3
4	25.6	4a	123.3	3a	131.2	130.9
5	38.2	5a	130.8	4	110.6	110.8
6	32.9	6	95.4	5	111.4	111.5
7	22.1	7	145.9	6	153.6	153.7
8	51.7	8	144.6	7	100.3	100.2
10	50.6	9	101.1	7a	127.3	127.8
11	45.3	9a	118.2	7b	107.2	107.0
12	55.5	9b	102.1	8	21.6	18.4
13	137.9	10	17.8	9	52.9	53.3
14	121.0	11	54.3	10	59.8	51.2
15	120.5	12a	35.7	11	41.5	136.8
16	127.4	13	71.3	12	37.0	31.8
17	109.3	15	155.0	13	35.4	32.7
18	143.3	16	107.6	14	35.1	36.1
19	72.6	16a	27.6	15	59.8	61.3
20	29.3	17	61.4	16	29.3	120.2
21	7.1	18	166.4	17	11.0	13.0
22	169.1	Me-13	17.9	MeO-6	58.8	55.9
MeO-22	50.9	MeO-4	49.6	-	-	-
-	-	MeO-7	56.1	-	-	-
-	-	MeO-8	55.8	-	-	-
-	-	MeO-18	51.1	-	-	-

<sup>†</sup> DMSO- $d_6$ .

**TABELA 9.3** – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  em ppm) de alcaloides de espécies do gênero *Aspidosperma*, agrupadas de acordo com seus esqueletos básicos. Dados obtidos em  $\text{CDCl}_3$ . CONTINUAÇÃO.  
(Fonte: Autora).

Átomo	Composto 6 $\delta_{\text{C}}$	Composto 7 $\delta_{\text{C}}$	Composto 10 $\delta_{\text{C}}$	Composto 11 $\delta_{\text{C}}$
2	65.9	66.0	69.5	69.4
3	28.3	28.2	24.9	24.4
4	23.2	23.2	23.2	23.1
5	35.9	35.6	35.6	35.5
6	34.7	34.5	34.3	34.2
7	21.9	21.8	21.7	21.6
8	54.1	53.7	53.7	53.6
10	53.2	53.0	52.5	52.5
11	39.0	38.4	38.1	37.9
12	53.6	54.1	53.7	53.7
13	135.9	136.6	110.9	125.9
14	119.2	115.3	125.9	115.4
15	110.6	146.0	115.3	125.9
16	127.3	108.8	129.2	111.2
17	123.0	119.5	143.6	Nd
18	149.6	138.3	149.2	Nd
19	71.5	71.3	71.1	71.1
20	30.2	29.9	30.2	30.1
21	7.0	6.8	7.0	6.6
22	-	-	171.3	161.4
23	-	-	-	28.1
24	-	-	-	10.1
MeO-15	-	55.2	-	-
MeO-17	-	-	-	55.6
MeO-22	-	-	55.5	-

nd - significa valores não disponíveis

## OBJETIVOS

### 10. Objetivo Geral

Aplicar a técnica de ressonância magnética nuclear na elucidação estrutural de alcaloides indólicos obtidos de extratos etanólicos das espécies *Aspidosperma nitidum* e *Aspidosperma pyriformium*, e ampliar o conhecimento do potencial biológico do gênero *Aspidosperma*.

#### 10.1 Objetivos Específicos

- Identificar através da técnica de RMN, os alcaloides indólicos presentes nas subfrações obtidas de plantas das espécies *Aspidosperma nitidum* e *Aspidosperma pyriformium*;
- Contribuir para o conhecimento químico de espécies de *Aspidospermas* nativas do Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 11. Material vegetal

#### 11.1. *Aspidosperma nitidum*

O material vegetal de *Aspidosperma nitidum* foi coletado na fazenda da Universidade Federal do Amazonas, Campus em Manaus, Rodovia BR-174 (Manaus - Presidente Figueiredo), km 38, em fevereiro de 2001. Um espécime comprovante foi depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o código 181832.

Apenas a casca do caule de *A. nitidum* foi usada nos estudos fitoquímicos por ser esta, a parte da planta utilizada como remédio pela população amazônica.

O extrato bruto e as frações de *A. nitidum* foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz localizado em Minas Gerais, sob a coordenação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antoniana Ursine Krettli.

As amostras de *A. nitidum* foram codificadas da seguinte forma: **ANCC-1** - Extrato etanólico bruto, **ANCC-2** - Fração em acetato de etila, **ANCC-3** - Fração aquosa, **ANCC-4** - Fração clorofórmica e **ANCC-5** - Fração alcaloídica em clorofórmio. Desta última, foram obtidas cinco subfrações: **ANCC-5/1** (Hex:AcOEt 20%), **ANCC-5/2** (AcOEt), **ANCC-5/3** e **ANCC-5/4** (AcOEt:MeOH), e **ANCC-5/5** (MeOH).

#### 11.2. *Aspidosperma pyrifolium*

O material vegetal de *Aspidosperma pyrifolium* foi coletado pelo Botânico José Elias de Paula da Universidade de Brasília, em outubro de 2001, em São José da Tapera (AL). A exsicata JEP 3686 (UnB) foi depositada no herbário da UnB.

O material da planta de *A. pyrifolium* utilizado foi a madeira, por ser a parte ativa da planta (segundo testes realizados por Krettli e colaboradores) e por não apresentar na literatura relatos do seu estudo químico.



O estudo fitoquímico da madeira, bem como a obtenção das subfrações oriundas de *A. pyrifolium*, foram realizados com a colaboração direta do doutorando Pedro Gregório Vieira Aquino do grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob a coordenação do prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

As amostras de *A. pyrifolium* foram codificadas da seguinte forma: **APM-1** - Extrato etanólico bruto, **APM-2** - Fração em acetato de etila, **APM-3** - Fração aquosa, **APM-4** - Fração clorofórmica e **APM-5** - Fração alcaloídica em clorofórmio. Desta última, foram obtidas seis subfrações: **APM-5/1** (Hex:AcOEt 20%), **APM-5/2** (Hex:AcOEt), **APM-5/3** (AcOEt), **APM-5/4**, **APM-5/5** e **APM-5/6** (MeOH).

## 12. Testes de Atividade Antimalárica

Os extratos e frações de *A. nitidum* e *A. pyrifolium* foram submetidos a testes de atividade antimalárica, realizados no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (MG) pela prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antoniana Ursine Krettli e colaboradores.

O procedimento de análise e validação de drogas antimaláricas é relativamente demorado e complicado. A primeira fase da avaliação da droga consiste normalmente em duas subfases. A primeira abrange o uso de ensaios “*whole-cell*” (células totais) para a determinação do efeito do composto no crescimento do parasito humano *Plasmodium falciparum in vitro*. A segunda fase abrange a análise da eficiência *in vivo* de drogas selecionadas de malária em pequenos modelos animais, utilizando principalmente os parasitos *Plasmodium berghei* de roedores, em camundongos de laboratório.

## 13. Experimentos de RMN

Todos os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker de 9,4 Tesla, modelo Avance 400 (400,13 MHz para frequência do hidrogênio e 100,03 MHz para carbono), localizado no Laboratório de RMN do Instituto de

Química e Biotecnologia da UFAL, utilizando sonda com detecção inversa (BBI) para tubos de RMN de 5,0 mm de diâmetro externo e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelos sinais do solvente e foram obtidos em parte por milhão (ppm), enquanto as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram obtidas em Hertz (Hz).

Para a realização dos experimentos de RMN, 18,0 mg de cada amostra foram solubilizados em 0,6 mL de metanol deuterado (MeOD).

O processamento dos espectros de RMN foi realizado utilizando-se o programa TOPSPIN (Bruker), versões 1.3 e 2.1.

As estruturas químicas foram desenhadas com o uso do programa ChemDraw Ultra 6.0, enquanto os valores teóricos das distâncias internucleares e a otimização das estruturas químicas foram determinados através do programa Chem3D Ultra 6.0.

### 13.1 Parâmetros de aquisição e processamento dos dados de RMN

A sequência de pulsos convencional de  $^1\text{H}$  utilizada para os experimentos foi a zg30, com a aplicação de pulsos de  $30^\circ$ , visando uma recuperação rápida da magnetização do núcleo. Foram realizadas 32 varreduras (NS = Número de Pulsos), com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1 s, tempo de aquisição (AQ) de 4.5351 s com 64k pontos durante a aquisição (TD) (1K corresponde a 1024 pontos), 32k pontos para o processamento (SI), utilizando uma multiplicação exponencial com  $lb = 0.3$  Hz (LB = *Line Broadening*) e correção automática de linha de base.

Para a elucidação das estruturas dos compostos foram utilizados os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPTs 90 e 135, HSQC, HMBC, COSY, NOESY e J-resolvido. Os experimentos de  $^{13}\text{C}$  foram realizados com o programa de pulsos zgpg30, com 16k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1.366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2.0 s e número de pontos na aquisição (TD) de 64k. O processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um  $lb = 2$  Hz.

Os experimentos DEPT 90 foram realizados com o programa de pulsos dept90, com 12k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1.366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2.0 s e número de pontos na

aquisição (TD) de 64k. O processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um  $\text{lb} = 2$  Hz.

Os experimentos DEPT 135 foram realizados com o programa de pulsos dept135, com 13k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1.366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2.0 s e número de pontos na aquisição (TD) de 64k. O processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um  $\text{lb} = 2$  Hz.

Os experimentos bidimensionais HSQC foram realizados com o programa de pulsos hsqcsetgpsi, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5341.88 Hz e em F1 (SWF1) 20127.88 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0.383 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1.5 s e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 1k em F1 (TDF1), ou seja, foram acumulados 1024 FIDs. No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e F1 (SI1).

Os experimentos bidimensionais HMBC foram realizados com o programa de pulsos hmbcgpplndqf, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5208.33 Hz e em F1 (SWF1) 22351.74 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0.393 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1.5 s, tempo de espera de observação à longa distância (d6) de 65.0 ms e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 1k em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 2k pontos em F2 (SI2) e 1k pontos em F1 (SI1).

Os experimentos bidimensionais COSY foram realizados com o programa de pulsos cosygpqf, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5341.88 Hz e em F1 (SWF1) 5342.815 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0.191 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1.48 s e número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 512 em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e em F1 (SI1).

Os experimentos bidimensionais NOESY foram realizados com o programa de pulsos noesyph, com largura espectral em F2 (SWF2) de 4084.96 Hz e em F1 (SWF1) 4085.68 Hz, com 8 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0.501 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2.0 s, número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 1k em F1 (TDF1) e tempo de mistura (d8) de 500 ms. No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e em F1 (SI1).

Os experimentos bidimensionais J-resolvido foram realizados com o programa de pulsos jresgpprqf, com largura espectral em F2 (SWF2) de 8012.82 Hz, com 16

varreduras (NS), tempo de aquisição (AQ) de 1.27 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2.0 s, número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1) e tempo de mistura (d8) de 500 ms. No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e em F1 (SI1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 14. Avaliação da atividade antimalárica

As amostras foram preparadas e avaliadas em ensaios biológicos frente ao *Plasmodium falciparum* e camundongos infectados com o *Plasmodium berghei*.

As amostras de *Aspidospema nitidum* que apresentaram atividade biológica esperada foram aquelas codificadas como **ANCC-1**, **ANCC-2** e **ANCC-5**.

O extrato etanólico da casca do caule (**ANCC-1**) foi capaz de reduzir a parasitemia em camundongos infectados pelo *P. berghei* em 55%, a fração em acetato de etila (**ANCC-2**) reduziu em 39% e a fração alcaloídica em clorofórmio (**ANCC-5**) reduziu significativamente em 63%, apresentando melhor atividade antimalárica *in vivo*. Nos os ensaios *in vitro* frente ao *P. Falciparum*, as amostras se comportaram de forma similar ou ainda melhor quando testadas em células normais.

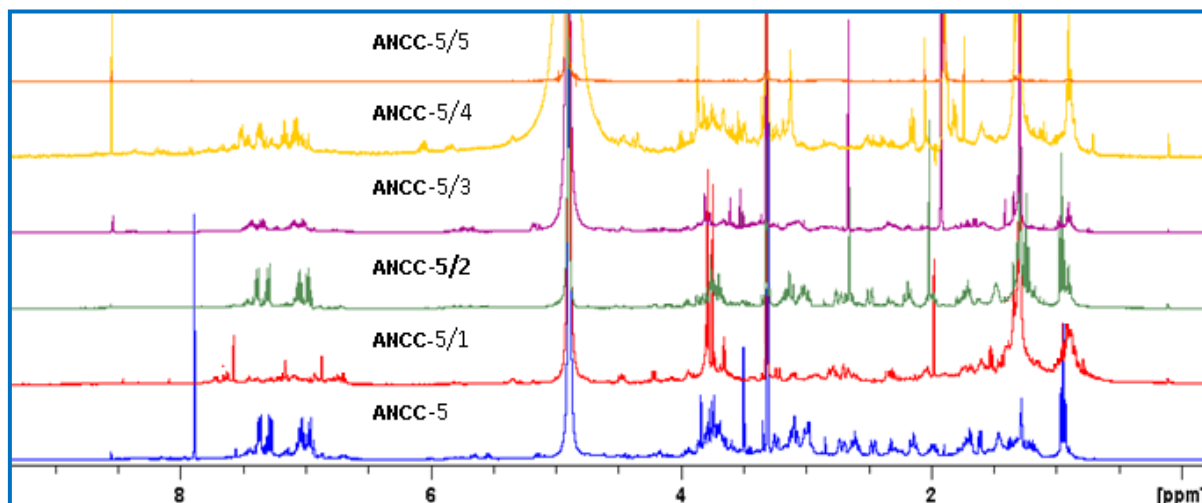
As amostras de *Aspidospema pyrifolium* que apresentaram atividade biológica esperada foram aquelas codificadas como **APM-2** (fração em acetato de etila) e **APM-5** (fração alcaloídica em clorofórmio).

Os resultados dos testes *in vitro* contra o *P. Falciparum*, mostraram que a fração **APM-5** foi mais ativa que a fração **APM-2**.

## 15. Identificação dos alcaloides com a aplicação da técnica de RMN

### 15.1 Determinação estrutural de alcaloides isolados de *Aspidosperma nitidum*

A fração **ANCC-5** biologicamente ativa e suas subfrações foram submetidas a técnica de RMN-<sup>1</sup>H, e os seus respectivos espectros estão dispostos na Figura 15.1. Para o estudo químico desse material, optou-se por investigar os constituintes presentes nas subfrações **ANCC-5/1** e **ANCC-5/2**. A escolha foi baseada na maior diferenciação e separação dos sinais no espectro, devido ao grau de pureza das frações.



**FIGURA 15.1** - Espectros de RMN-<sup>1</sup>H da fração **ANCC-5** e das suas respectivas subfrações, dispostos de baixo para cima de acordo com o aumento da polaridade dos eluentes. (Fonte: Autora).

#### 15.1.1. Alcaloide presente na subfração ANCC-5/1

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da subfração ANCC-5/1 (Figura 15.2 e Tabelas 15.1 e 15.2) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de grupos metila, metoxila, hidrogênios aromáticos, grupos metínicos, metilênicos e hidrogênio ligado a nitrogênio provavelmente pertencente a grupo amina. A integração dos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H indicou a presença de trinta e dois átomos de hidrogênios. O espectro foi calibrado com base nos deslocamentos

químicos dos sinais do solvente MeOD, representado por um sinal simples em  $\delta_H$  4.89 e um quinteto em  $\delta_H$  3.31.

Na análise do espectro de RMN  $^1H$ , observaram-se dois sinais simples em  $\delta_H$  3.79 e  $\delta_H$  3.78, cada um integrado para três hidrogênios, característicos de grupos metoxilas provavelmente ligados a um anel benzênico; dois sinais duplos centrados em  $\delta_H$  7.17 e  $\delta_H$  6.86 (Figura 15.2), característicos de hidrogênios aromáticos, cada um integrado para um hidrogênio, acoplado entre si em *para* ( $d$ ,  $J$  1.6 Hz), um acoplamento spin-spin fraco com  $^5J$  em W [5,93,94], sugerindo a presença de um núcleo indólico cujo o anel benzênico apresenta dois substituintes em posições *para*, provavelmente os grupos metoxilas citados anteriormente.

Observou-se no espectro um sinal simples integrado para um hidrogênio em  $\delta_H$  10.21, o qual foi atribuído a um hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do núcleo indólico, sendo posteriormente confirmado pelas correlações a longa distância observadas no espectro HMBC (Figura 15.8 e Tabela 15.1). O deslocamento químico para o H-N indólico pode ser explicado devido a proximidade com um átomo de oxigênio por exemplo, pertencente a um grupo metoxila, podendo levar à formação de uma ligação de hidrogênio. O sinal característico para esta metoxila apresenta-se como sinal simples com deslocamento químico em  $\delta_H$  3.65.

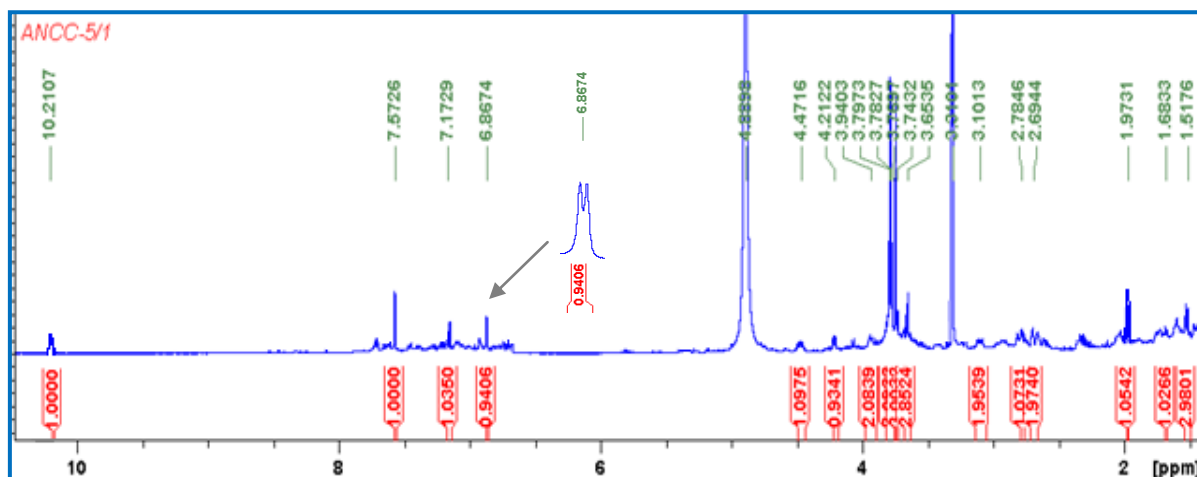
Foi possível observar ainda, um duplo duplete em  $\delta_H$  4.21 ( $dd$ ,  $J$  6.5 e 2.2 Hz) integrado para um hidrogênio (Figura 15.3), acoplado com hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2.69 ( $^3J = 6.5$  Hz), e apresentando ainda um acoplamento  $^4J$  spin-spin fraco com um hidrogênio de grupo amina em  $\delta_H$  1.97. Os hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2.69, por sua vez, apresentaram como sinal característico um duplete largo, originado do acoplamento também com um hidrogênio de grupo amina, onde era de se esperar um duplo-duplo-duplete ( $ddd$ ) para este sistema de spin, e observou-se um multiplete largo que foi atribuído ao hidrogênio do grupo amina.

O espectro evidenciou sinais para hidrogênios de dois grupos metilênicos com deslocamentos químicos em  $\delta_H$  3.10 e  $\delta_H$  3.94, acoplado-se entre si ( $J$  12 e 6 Hz) e apresentando duplos-dupletos como sinais (Figura 15.3). Apresentou também, um duplete em  $\delta_H$  1.51 com  $J = 6.2$  Hz, integrado para três hidrogênios, condizente com um grupo metila acoplado com o hidrogênio metínico em  $\delta_H$  4.47, de sinal duplo-quarteto com  $J = 10.4$  e 6.2 Hz (Figura 15.3). Este último, por sua vez acopla também com outro hidrogênio metínico em  $\delta_H$  1.68, justificando, portanto a

multiplicidade do sinal. O deslocamento químico do hidrogênio em  $\delta_H$  4.47, deve-se possivelmente a desblindagem causada pela proximidade com um heteroátomo.

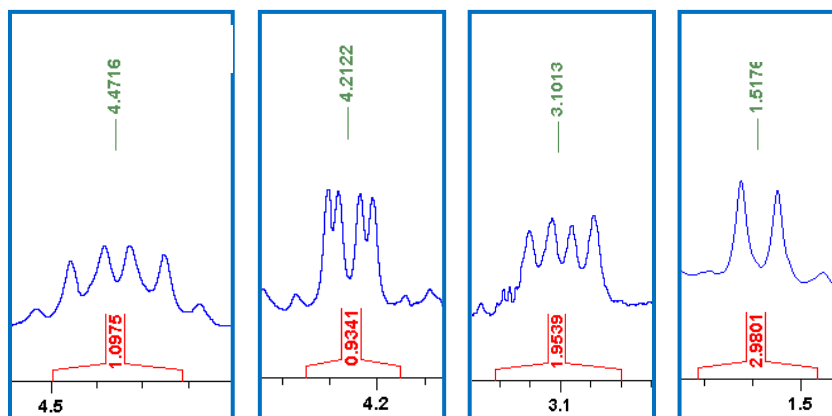
O espectro revelou um simpleto em  $\delta_H$  7.57, integrado para um hidrogênio, provavelmente ligado a um carbono  $sp^2$  próximo a um heteroátomo, causando a desblindagem observada. Evidenciou-se ainda, um duplete com deslocamento químico em  $\delta_H$  2.78 (d,  $J$  4.5 Hz) atribuído a um hidrogênio metínico, acoplado com outro hidrogênio em  $\delta_H$  1.68, cujo sinal relativo é um multipeto devido ao acoplamento simultâneo com os hidrogênios em  $\delta_H$  4.47,  $\delta_H$  2.78 e  $\delta_H$  3.76, e um sinal simples largo em  $\delta_H$  3.76 atribuído a hidrogênios metilênicos, originado do acoplamento spin-spin fraco com o hidrogênio em  $\delta_H$  1.68, que só foi detectado pelo experimento  $^1H$ - $^1H$  COSY, possivelmente devido a um acoplamento W ( $^4J$ ) [5,93,94].

Observou-se também, a presença de um sinal simples integrado para três hidrogênios em  $\delta_H$  3.74, característico de metoxila, sendo esta, posteriormente atribuída a um grupo carbometoxi, pelas correlações a longa distância (Figura 15.8 e Tabela 15.1).



**FIGURA 15.2** – Espectro de RMN  $^1H$  para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD, com intensificação (32x) do sinal duplo para um hidrogênio aromático. (Fonte: Autora).





**FIGURA 15.3** – Expansões e intensificações (64x) dos sinais de hidrogênios. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da subfração ANCC-5/1 (Figura 15.4 e Tabela 15.1) apresentou um total de vinte e quatro sinais, e foi calibrado com base no deslocamento químico do sinal do solvente MeOD, representado por um septeto em  $\delta_{\text{C}}$  49.17.

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 (Figura 15.5) e DEPT 90 (Figura 15.6) permitiu a observação de quatro sinais em  $\delta_{\text{C}}$  61.98,  $\delta_{\text{C}}$  51.98,  $\delta_{\text{C}}$  51.84 e  $\delta_{\text{C}}$  56.43, condizentes com carbonos de grupos metoxilas, e um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  19.04, característico de carbono de grupo metila.

Observou-se também, oito sinais relativos a carbonos não hidrogenados (quaternários), destes, seis com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  155.56,  $\delta_{\text{C}}$  155.27,  $\delta_{\text{C}}$  133.47,  $\delta_{\text{C}}$  130.54,  $\delta_{\text{C}}$  128.67 e  $\delta_{\text{C}}$  107.93 pertencem ao núcleo indólico, atribuições confirmadas posteriormente com o experimento HMBC (Figura 15.8 e Tabela 15.1).

Evidenciou-se ainda, a presença de um grupo carbometoxi, com o carbono de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  169.75, ligado a um átomo de carbono não hidrogenado em  $\delta_{\text{C}}$  110.92 [( $\text{sp}^2$ ) comum no esqueleto para alcaloides do tipo corinanteano] <sup>[95]</sup>.

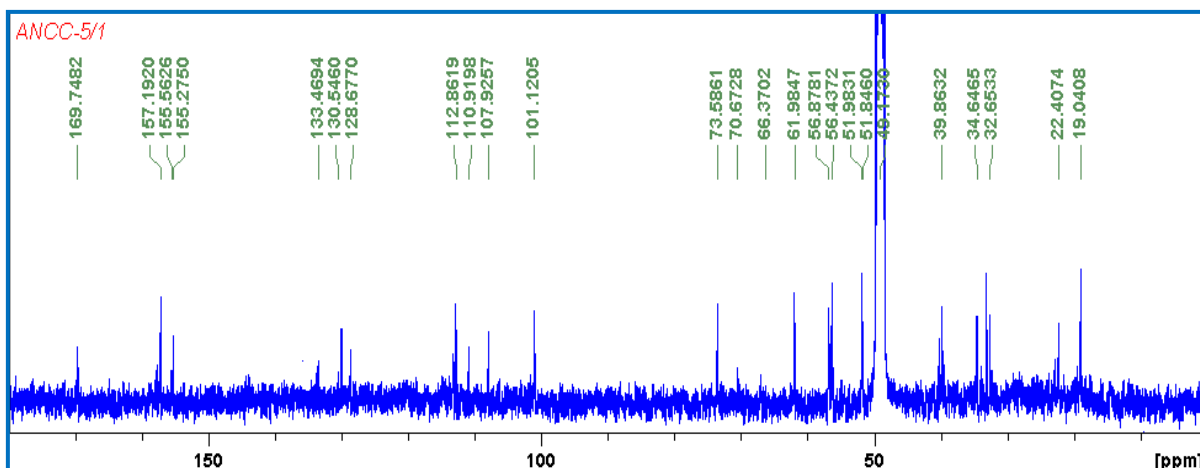


FIGURA 15.4 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD. Fonte: Autora).

A análise do espectro DEPT 135, forneceu evidências a presença de sete sinais para carbonos metínicos, destes, dois com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  112.86 e  $\delta_{\text{C}}$  101.12 pertencem ao anel aromático do núcleo indólico, atribuídos com base nas correlações diretas com os hidrogênios aromáticos, observadas no espectro HSQC (Figura 15.7) e quatro em  $\delta_{\text{C}}$  157.19,  $\delta_{\text{C}}$  73.58,  $\delta_{\text{C}}$  39.86, e  $\delta_{\text{C}}$  32.65.

O espectro revelou quatro sinais de carbonos metilênicos em fase oposta, com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  66.37,  $\delta_{\text{C}}$  56.87,  $\delta_{\text{C}}$  34.64 e  $\delta_{\text{C}}$  22.40, onde o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  66.37, faz parte de um sistema imidazolidina localizado entre dois átomos de nitrogênios, apresentando-se bem mais desblindado que os demais. Os cinco sinais para carbonos metílicos foram descritos anteriormente.

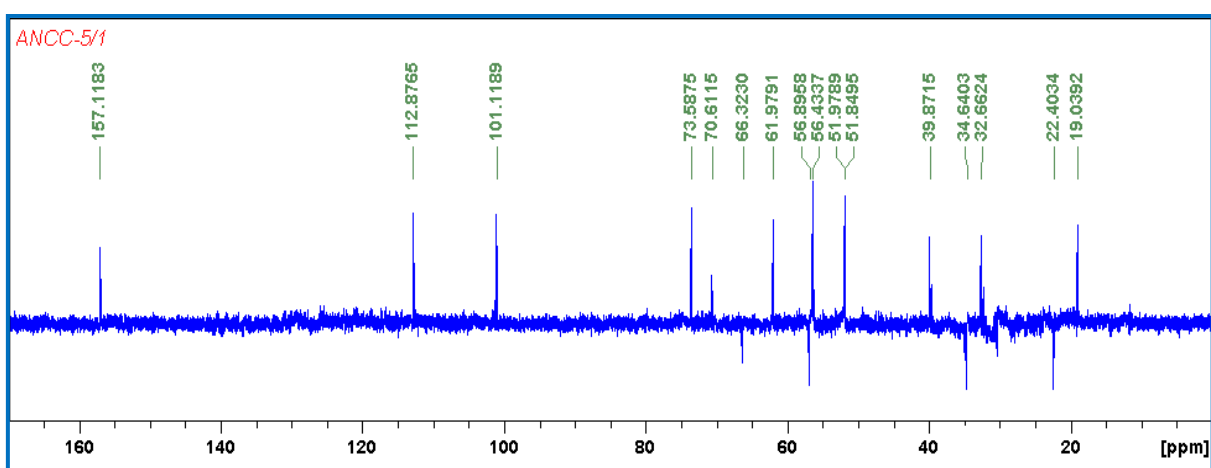


FIGURA 15.5 – Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN DEPT 90 (Figura 15.6) revelou apenas sete sinais referentes aos carbonos metínicos, estes foram descritos anteriormente, e estão apresentados na Tabela 15.1.

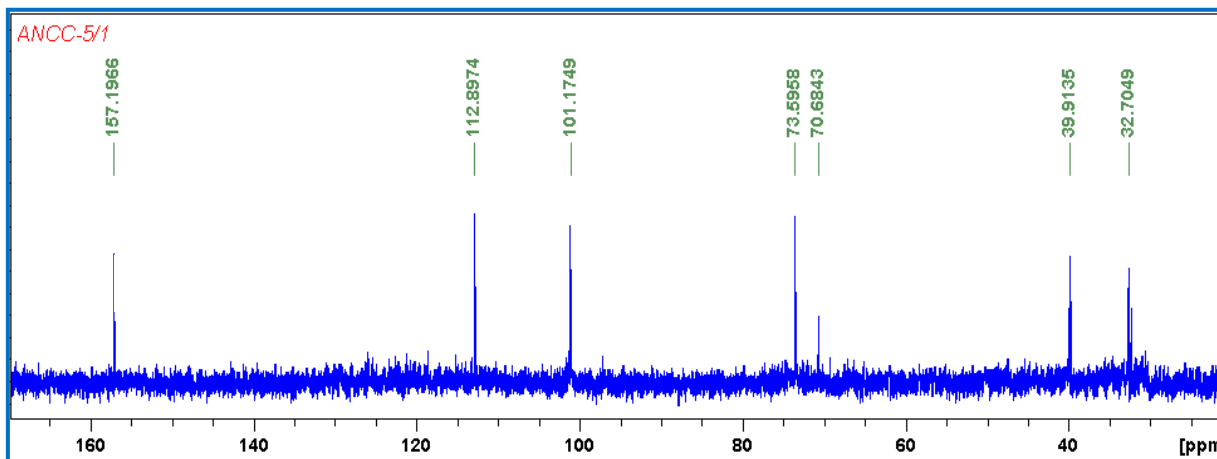
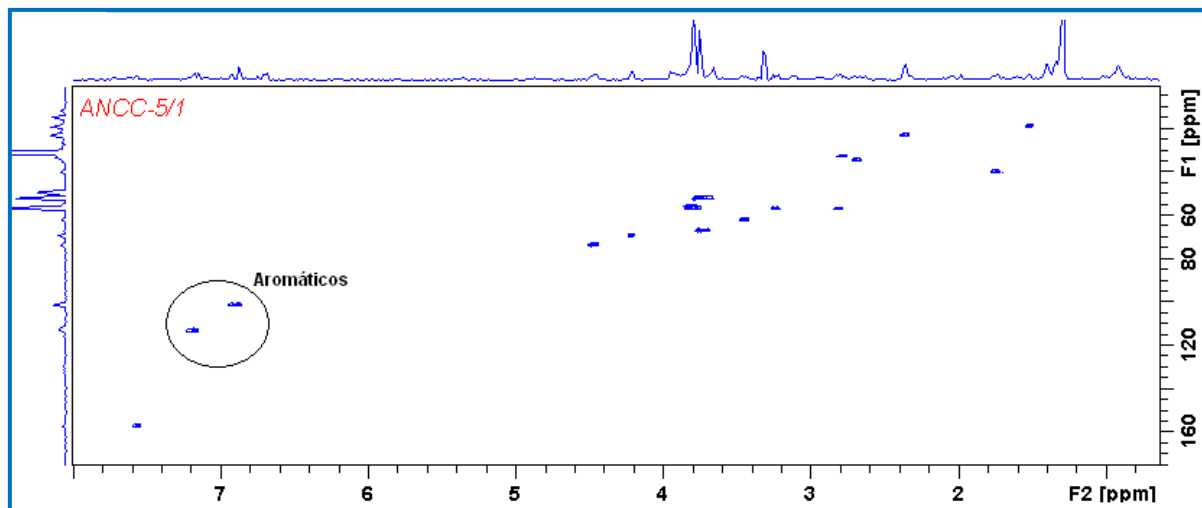


FIGURA 15.6 – Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro HSQC (Figura 15.7) apresentou os sinais de correlação direta entre os átomos de carbonos e hidrogênios e permitiu conectar de forma inequívoca cada hidrogênio ao seu respectivo carbono.

Observaram-se no espectro HSQC as correlações entre os átomos com os seguintes deslocamentos químicos: para grupos metínicos – o carbono em  $\delta_C$  112.86 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.17,  $\delta_C$  101.12 e  $\delta_H$  6.86 (aromáticos),  $\delta_C$  157.19 e  $\delta_H$  7.59,  $\delta_C$  73.58 e  $\delta_H$  4.47,  $\delta_C$  70.67 e  $\delta_H$  4.21,  $\delta_C$  39.86 e  $\delta_H$  1.68,  $\delta_C$  32.65 e  $\delta_H$  2.78; para grupos metilênicos – o carbono em  $\delta_C$  66.37 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.76,  $\delta_C$  56.87 e  $\delta_H$  3.94,  $\delta_C$  22.40 e  $\delta_H$  3.10,  $\delta_C$  34.64 e  $\delta_H$  2.69; para grupo metílico – o carbono em  $\delta_C$  19.04 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.51; para grupos metoxílicos – o carbono em  $\delta_C$  61.98 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.78,  $\delta_C$  56.43 e  $\delta_H$  3.79,  $\delta_C$  51.98 e  $\delta_H$  3.74,  $\delta_C$  51.84 e  $\delta_H$  3.65 (Tabela 15.1).



**FIGURA 15.7** – Espectro de RMN HSQC para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD, com os sinais de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para os aromáticos em evidência. (Fonte: Autora).

Uma vez definidas as correlações heteronucleares diretas (visualizadas no espectro HSQC), foi possível localizar através do experimento de RMN HMBC [correlação heteronuclear à longa distância ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )] as posições relativas para os carbonos, e montar uma proposta de esqueleto para o composto em estudo.

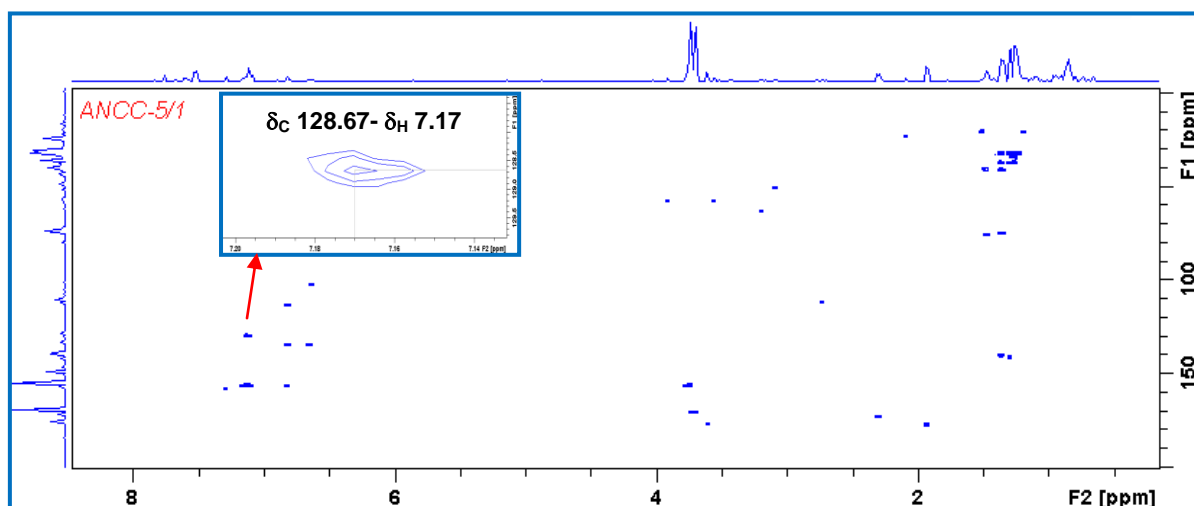
A análise do espectro HMBC (Figura 15.8 e Tabela 15.1) permitiu confirmar as correlações à longa distância entre o carbono com deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  155.56 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3.78 ( $^3J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6.86 ( $^2J_{\text{CH}}$ ); entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  155.27 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3.79 ( $^3J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  7.17 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7.17 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  101.12, 107.93, 133.47, e 155.56. Foram observadas correlações entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,86 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  112.86, 128.67, e 155.27, e entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3.78 e 3.79, de grupos metoxilas e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  101.12, 112.86, 155.27, e 155.56 (Figura 15.9). Estas últimas indicam correlações entre a porção fenil do núcleo indólico, e dois substituintes metoxilas em posição *orto*, um em relação ao outro.

O padrão de substituição *para* do anel benzênico, foi confirmado através das correlações a longa distância entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  155.56 e o hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  7.17 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), e entre  $\delta_{\text{C}}$  155.27 e  $\delta_{\text{H}}$  6.86 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), observadas no espectro HMBC (Figura 15.8 e Tabela 15.1). O hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  10.21 ligado ao átomo de nitrogênio do núcleo indólico apresentou correlações a longa distância com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  128.67 e  $\delta_{\text{C}}$  107.93 através de  $^3J_{\text{CH}}$ , e com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  133.47 e  $\delta_{\text{C}}$  130.54 através de  $^2J_{\text{CH}}$ .

A conectividade do núcleo indólico com o resto da molécula foi deduzida a partir das sequências de correlações: do hidrogênio em  $\delta_H$  3.10 com o carbono em  $\delta_C$  107.93 através de  $^2J_{CH}$ , e com os carbonos em  $\delta_C$  130.54 e  $\delta_C$  128.67 através de  $^3J_{CH}$ ; do hidrogênio em  $\delta_H$  3.94 com o carbono em  $\delta_C$  107.93 através de  $^3J_{CH}$ ; do hidrogênio em  $\delta_H$  4,21 com os carbonos em  $\delta_C$  107.93 através de  $^3J_{CH}$ , e  $\delta_C$  130.54 através de  $^2J_{CH}$ .

Correlações à longa distância  $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$  foram observadas para os hidrogênios em  $\delta_H$  3.94 e  $\delta_H$  3.65 com os carbonos em  $\delta_C$  22.40 e  $\delta_C$  70.67, respectivamente.

A localização de um grupo carbometoxi foi confirmada através das correlações entre o carbono em  $\delta_C$  169.76 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.74 e  $\delta_H$  7.57 ( $^3J_{CH}$ ); a localização de um grupo metila com hidrogênios em  $\delta_H$  1.51 foi confirmada através das correlações à longa distância com os carbonos em  $\delta_C$  73.58 ( $^2J_{CH}$ ) e  $\delta_C$  39.86 ( $^3J_{CH}$ ), do sistema fundido de imidazolidina-pirano (Figura 15.10), apresentadas no espectro HMBC. Outras correlações à longa distância dos demais átomos de carbonos encontram-se sumarizadas na Tabela 15.1.

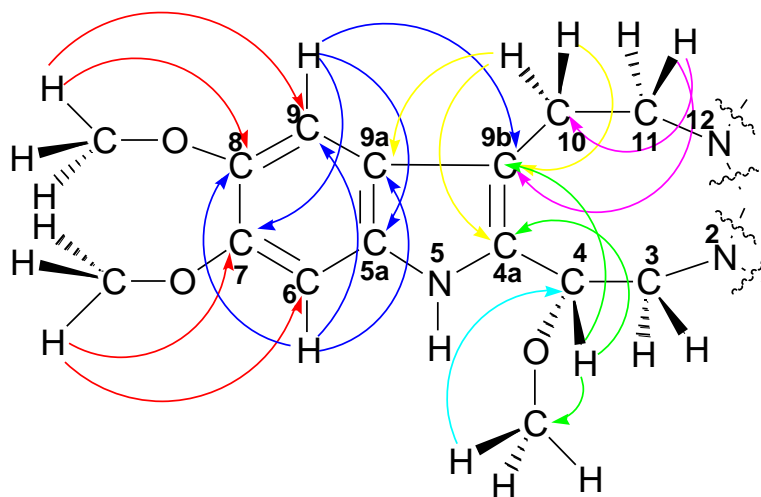


**FIGURA 15.8** – Espectro de RMN HMBC para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância  $^1H$ - $^{13}C$  entre os átomos em  $\delta_C$  128.67 e  $\delta_H$  7.17 ( $^2J_{CH}$ ), em expansão. (Fonte: Autora).

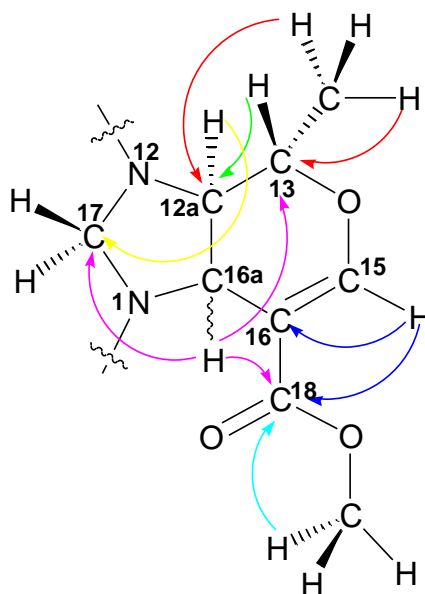
**TABELA 15.1** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	HSQC		HMBC		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{C,H}}$	$^3J_{\text{C,H}}$	$^4J_{\text{C,H}}$
<b>2</b>	-	1.97	-	-	-
<b>3</b>	34.64	2.69	H-4	-	-
<b>4</b>	70.67	4.21	H-3	MeO-4	-
<b>4a</b>	130.54	-	H-4; H-5	H-10	-
<b>5</b>	-	10.21	-	-	-
<b>5a</b>	133.47	-	H-6; H-5	H-9	-
<b>6</b>	101.12	6.86	-	-	H-9; MeO-7
<b>7</b>	155.56	-	H-6	H-9; MeO-7	-
<b>8</b>	155.27	-	H-9	H-6; MeO-8	-
<b>9</b>	112.86	7.17	-	-	H-6; MeO-8
<b>9a</b>	128.67	-	H-9	H-5; H-6; H-10	-
<b>9b</b>	107.93	-	H-10	H-5; H-9; H-4; H-11	-
<b>10</b>	22.40	3.10	H-11	-	-
<b>11</b>	56.87	3.94	H-10	H-12a; H-17	-
<b>12a</b>	39.86	1.68	H-13; H-16a	Me-13; H-17	-
<b>13</b>	73.58	4.47	H-12a Me-13	H-16a	-
<b>15</b>	157.19	7.57	-	H-16a	-
<b>16</b>	110.92	-	H-15; H-16a	H-12a	-
<b>16a</b>	32.65	2.78	H-12a	H-13; H-17	-
<b>17</b>	66.37	3.76	-	H-11; H-12a; H-16a	-
<b>18</b>	169.75	-	-	H-15; H-16a; MeO-18;	-
<b>Me-13</b>	19.04	1.51	H-13	H-12a	-
<b>MeO-4</b>	51.84	3.65	-	H-4	-
<b>MeO-7</b>	61.98	3.78	-	-	-

MeO-8	56.43	3.79	-	-	-
MeO-18	51.98	3.74	-	-	-



**FIGURA 15.9** – Correlações importantes  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro HMBC (via  $^2J^3J$  e  $^4J$ ) para o fragmento indólico. (Fonte: Autora).

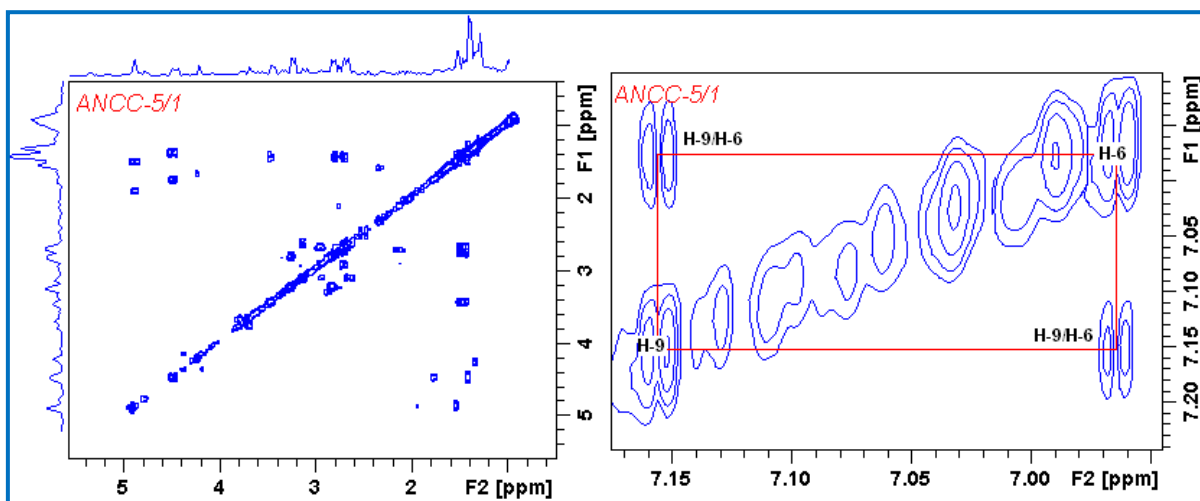


**FIGURA 15.10** – Fragmento de sistema fundido imidazolidina-pirano do composto em estudo, e correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN COSY (Figura 15.11 e Tabela 15.2) apresenta sinais de acoplamento spin-spin homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) entre os átomos de hidrogênios pertencentes ao composto em estudo.

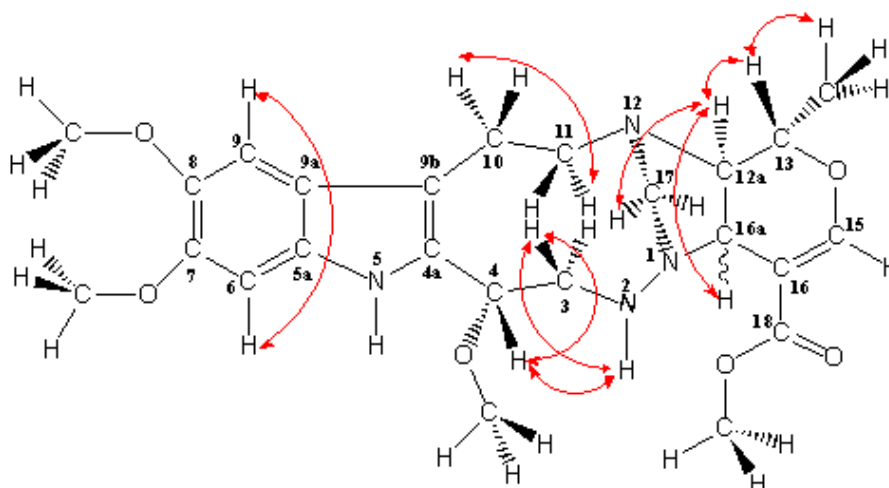
O sinal de acoplamento do hidrogênio do grupo amina em  $\delta_{\text{H}}$  1.97 (H-2) com os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2.69 (2H-3), ocorre com  $^3J_{\text{HH}}$ , e foi revelado pelo experimento COSY.

No espectro COSY observou-se o acoplamento spin-spin entre o hidrogênio metínico em  $\delta_{\text{H}}$  2.78 (H-16a) e o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1.68 (H-12a), com  $^3J_{\text{HH}}$  (Tabela 15.2). O hidrogênio H-12a acopla fracamente com H-17 e só é detectado pelo experimento COSY, possivelmente devido a um acoplamento em  $W^4J_{\text{HH}}$ . O espectro apresentou ainda, um sinal referente ao acoplamento de hidrogênios da metila em  $\delta_{\text{H}}$  1.51 (Me-13) com  $\delta_{\text{H}}$  4.47 (H-13), via  $^3J_{\text{HH}}$  (Figura 15.12). Outros acoplamentos spin-spin homonucleares dos demais átomos de hidrogênios encontram-se sumarizados na Tabela 15.2.



**FIGURA 15.11** – Espectro de RMN COSY para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD, com sinais de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-9 e H-6 que acoplam entre si. (Fonte: Autora).





**FIGURA 15.12** – Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. (Fonte: Autora).

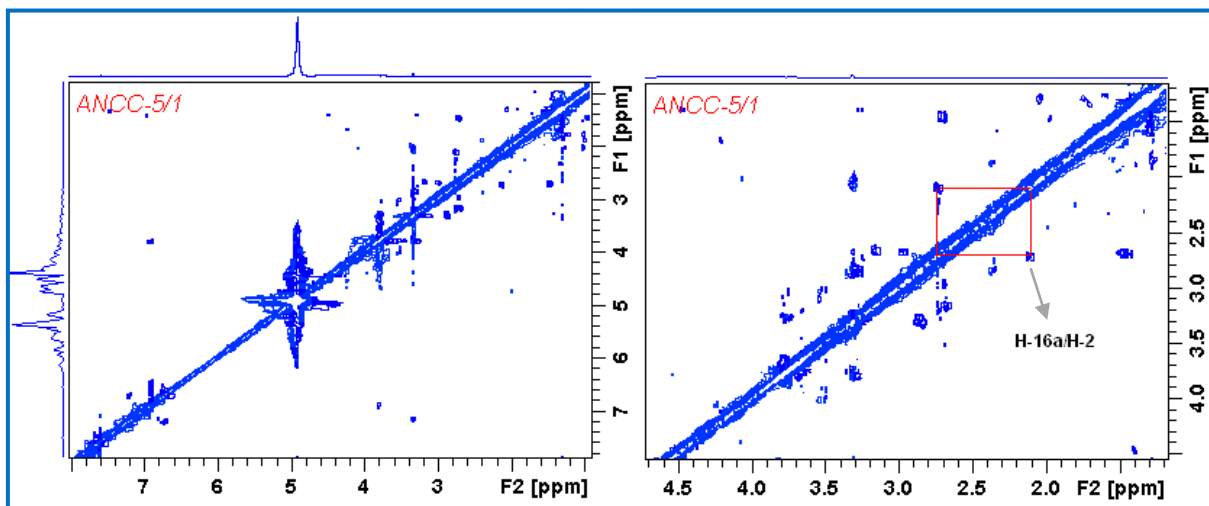
As estereoquímicas relativas dos hidrogênios H-4, H-16a, H-12a, H-13 e do grupo Me-13 foram definidas com base nas constantes de acoplamento.

A relação *trans* entre os hidrogênios H-13 e H-12a foi deduzida com base na constante de acoplamento dos mesmos. Portanto, o valor de  $J = 10.4$  Hz entre H-13 e H-12a, apresentados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , é consistente para relações *trans* do tipo *axial-axial* entre hidrogênios vicinais, em anéis de seis membros <sup>[95]</sup>, com ângulo diedro de  $180^\circ$  <sup>[1]</sup>.

O espectro de RMN NOESY (Figura 15.13 e Tabela 15.2) apresenta sinais referentes às interações espaciais ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) entre átomos de hidrogênios.

Observou-se no espectro NOESY que não houve correlação espacial entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 1.68$  (H-12a) e o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 2.78$  (H-16a). A correlação de H-12a com Me-13 mostra que eles estão no mesmo lado da molécula, e também, se correlaciona de forma similar com MeO-4. Assim, a configuração de H-12a é estabelecida relativamente aos grupos na molécula. No entanto, nada se pode deduzir para a configuração de H-16a com base somente no espectro NOESY, porque a única correlação observada é com o hidrogênio H-2 (Figura 15.14). Podendo, H-16a ser *cis* ou *trans* em relação ao hidrogênio H-12a. Porém, com base no valor da constante de acoplamento  $J = 4.5$  Hz (observada no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ) é mais provável que ocorra uma relação *cis* entre os hidrogênios H-12a e H-16a,

permitindo afirmar a relação *axial-equatorial* entre os hidrogênios, com ângulo diedro definido pelo diagrama de Karplus, de aproximadamente  $60^\circ$  [1].

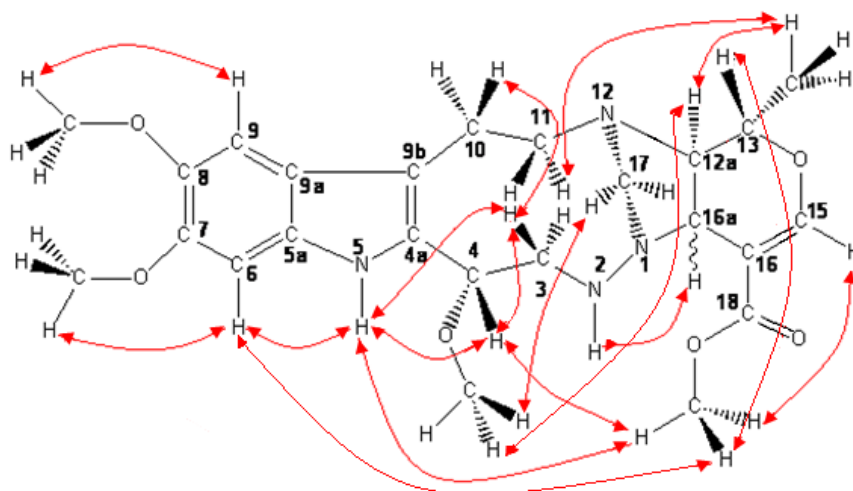


**FIGURA 15.13** – Espectro de RMN NOESY para a subfração **ANCC-5/1**, em MeOD, com sinais de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-16a e H-2 que interagem entre si. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.2** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY
<b>2</b>	1.97 (m)	H-3; H-4	H-16a
<b>3</b>	2.69 (dl, <i>J</i> 13 Hz)	H-2; H-4	H-4; H-5; H-10
<b>4</b>	4.21 (dd, <i>J</i> 6.5 e 2.2 Hz)	H-2; H-3	H-3; H-5; MeO-4; MeO-18
<b>5</b>	10.21 (s)	-	H-3; H-4; H-6; MeO-18
<b>6</b>	6.86 (d, <i>J</i> 1.6 Hz)	H-9	H-5; MeO-7; MeO-18
<b>9</b>	7.17 (d, <i>J</i> 1.6 Hz)	H-6	MeO-8
<b>10</b>	3.10 (dd, <i>J</i> 12 e 6.0 Hz)	H-11	H-3
<b>11</b>	3.94 (dd, <i>J</i> 12 e 6.0 Hz)	H-10	Me-13
<b>12a</b>	1.68 (m)	H-13; H-16a; H-17	Me-13; MeO-4
<b>13</b>	4.47 (dq, <i>J</i> 10.4 e 6.2 Hz)	H-12a; Me-13	Me-13; MeO-18
<b>15</b>	7.57 (s)	-	MeO-18
<b>16a</b>	2.78 (d, <i>J</i> 4.5 Hz)	H-12a	H-2
<b>17</b>	3.76 (s)	H-12a	MeO-4
<b>Me-13</b>	1.51 (d, <i>J</i> 6.2 Hz)	H-13	H-12a; H-11; H-13
<b>MeO-4</b>	3.65 (s)	-	H-4; H-12a
<b>MeO-7</b>	3.78 (s)	-	H-6
<b>MeO-8</b>	3.79 (s)	-	H-9
<b>MeO-18</b>	3.74 (s)	-	H-4; H-5; H-6; H-13; H-15

Nenhuma correlação foi observada em experimentos de RMN via acoplamento escalar heteronuclear ou spin-spin homonuclear (HMBC, COSY) de átomos do sistema imidazolidina-pirano com átomos do núcleo indólico. No entanto, a estrutura proposta foi confirmada por interações dipolares devido à proximidade espacial observada nas correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  no experimento NOESY (Tabela 15.3).



**FIGURA 15.14** – Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. (Fonte: Autora).

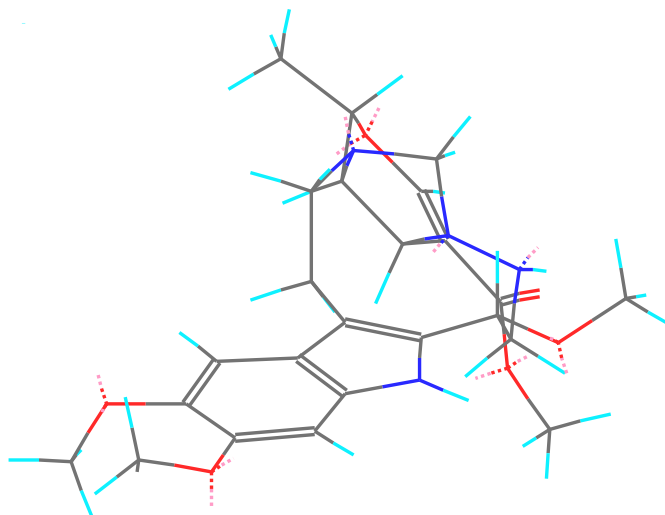
As correlações dos hidrogênios MeO-18 com os hidrogênios H-4, H-5 e H-6, bem como a correlação dos hidrogênios Me-13 com H-11 indicam sua proximidade espacial, o que poderia ser explicado se a estrutura para o composto em estudo apresentar uma conformação dobrada <sup>[68]</sup>, devido a rotação das ligações simples desta molécula.

No experimento de RMN NOESY, quanto mais intenso for o efeito overhauser nuclear menor a distância interatômica. Esta descrição foi comprovada experimentalmente e os valores das distâncias comparados com os dados teóricos (Tabela. 15.3). Os sinais revelados no espectro NOESY foram integrados para cálculos de distâncias interatômicas  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , a partir da Equação 2.1, utilizando a distância fixa  $d = 2.5 \text{ \AA}$ , entre os hidrogênios vizinhos no anel benzênico como referência para a derivação das demais distâncias.

**TABELA 15.3** – Dados de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  extraídos do espectro de RMN NOESY do composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas. (Fonte: Autora).

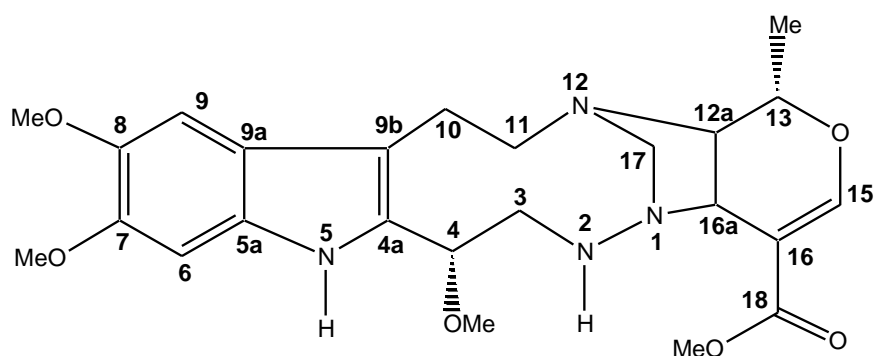
$\delta_1$	$\delta_2$	Integral <sub>n.o.e.</sub>	d (Å) Experimental	d (Å) Teórica
1.97 (H-2)	2.78 (H-16a)	0.0726	3.87	3.92
2.69 (H-3)	4.21 (H-4)	1.7379	2.28	2.30
2.69 (H-3)	10.21 (H-5)	0.0402	4.27	4.44
2.69 (H-3)	3.10 (H-10)	0.0803	3.80	3.91
4.21 (H-4)	10.21 (H-5)	0,2459	3.16	3.16
4.21 (H-4)	3.65 (MeO-4)	0.6741	2.67	2.65
4.21 (H-4)	3.74 (MeO-18)	5.7093	1.87	2.00
10.21 (H-5)	6.86 (H-6)	0.6131	2.71	2.83
10.21 (H-5)	3.74 (MeO-18)	1.0000	2.50	2.52
6.86 (H-6)	3.78 (MeO-7)	0.0658	3.93	4.26
6.86 (H-6)	3.74 (MeO-18)	0.0441	4.21	4.32
7.17 (H-9)	3.79 (MeO-8)	0.6521	2.68	2.65
3.94 (H-11)	1.51 (Me-13)	0.1714	3.35	3.31
1.68 (H-12a)	1.51 (Me-13)	0.9356	2.53	2.48
1.68 (H-12a)	3.65 (MeO-4)	0.0029	6.62	7.01
4.47 (H-13)	1.51 (Me-13)	0.8934	2.55	2.46
4.47 (H-13)	3.74 (MeO-18)	0.0396	4.30	4.65
7.57 (H-15)	3.74 (MeO-18)	0.0398	4.28	4.46
3.76 (H-17)	3.65 (MeO-4)	0.0803	3.80	3.92

Para as distâncias experimentais interatômicas dos hidrogênios (Figura 15.15 e Tabela 23.3): MeO-18/H-4 = 1.87 Å; MeO-18/H-5 = 2.50 Å; MeO-18/H-6 = 4.21 Å; MeO-4/H-17 = 3.80 Å, uma configuração *trans* é mais provável <sup>[68]</sup>.



**FIGURA 15.15** – Estrutura para o composto em estudo, com geometria otimizada. (Fonte: Autora)

Os dados espectrais de RMN permitiram o assinalamento inequívoco da estrutura de um alcaloide com núcleo indólico (Figura 15.16), contendo um sistema 1,2,9-triazabicyclo[7.2.1], denominado braznitidumina, isolado anteriormente da casca do caule de *A. nitidum*<sup>[68]</sup>.



**FIGURA 15.16** – Alcaloide indólico braznitidumina. (Fonte: Autora).

Os dados apresentados para o alcaloide indólico Braznitidumina foram comparados (Tabela 15.4), e estão de acordo com os dados descritos na literatura<sup>[68]</sup>, a única diferença observada é a leve proteção para todos os carbonos da Braznitidumina em DMSO-d<sub>6</sub> (dados da literatura para o composto 3 do Quadro 9.1)<sup>[68]</sup>, comprovando assim a proposta estrutural para o alcaloide Braznitidumina com fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, isolado a partir do extrato etanólico da casca do caule de *A. nitidum*.

**TABELA 15.4** – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  em ppm) para o alcaloide indólico Braznitidumina, em MeOD, em comparação com dados da literatura. (Fonte: Autora).

<b>Átomo</b>	<b>Braznitidumina em MeOD</b>	<b>Composto 3 em DMSO-<math>d_6</math></b>
<b>3</b>	34.6	32.3
<b>4</b>	70.7	64.0
<b>4a</b>	130.5	123.3
<b>5a</b>	133.5	130.8
<b>6</b>	101.1	95.4
<b>7</b>	155.5	145.9
<b>8</b>	155.3	144.6
<b>9</b>	112.8	101.1
<b>9a</b>	128.7	118.2
<b>9b</b>	107.9	102.1
<b>10</b>	22.4	17.8
<b>11</b>	56.9	54.3
<b>12a</b>	39.8	35.7
<b>13</b>	73.6	71.3
<b>15</b>	157.2	155.0
<b>16</b>	110.9	107.6
<b>16a</b>	32.6	27.6
<b>17</b>	66.4	61.4
<b>18</b>	169.7	166.4
<b>Me-13</b>	19.0	17.9
<b>MeO-4</b>	51.8	49.6
<b>MeO-7</b>	61.9	56.1
<b>MeO-8</b>	56.4	55.8
<b>MeO-18</b>	51.9	51.1

Braznitidumina foi o primeiro alcaloide indólico identificado neste trabalho, e o conhecimento de seus dados espectroscópicos foi de grande importância na elucidação estrutural dos alcaloides posteriormente identificados.

### 15.1.2 Alcaloide presente na subfração ANCC-5/2

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da subfração ANCC-5/2 (Figura 15.17 e Tabela 15.6) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de grupamento etila, hidroxila, hidrogênios aromáticos, grupos metínicos, metilênicos e hidrogênio ligado a nitrogênio referente a grupamento amina. A integração dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou a presença de vinte e oito átomos de hidrogênio. O espectro foi calibrado utilizando como referência os sinais do solvente MeOD.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou quatro sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos, acoplados entre si. Dois sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.38 e  $\delta_{\text{H}}$  7.29 (dt,  $^3J_{\text{H}}$  7,5 Hz;  $^4J_{\text{H}}$  1,2 Hz e  $^5J_{\text{H}}$  1,0 Hz), apresentam feição de duplos-tripletos devido a coalescência de sinais do tipo duplo-duplo-dupletos (ddd), originados do acoplamento *orto* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.38 e  $\delta_{\text{H}}$  6.97, e entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e  $\delta_{\text{H}}$  7.03 ( $^3J_{\text{H}}$  7,5 Hz); do acoplamento *meta* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.38 e  $\delta_{\text{H}}$  7.03, e entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e 6.97 ( $^4J_{\text{H}}$  1,2 Hz); e do acoplamento *para* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.38 e  $\delta_{\text{H}}$  7.29 ( $^5J_{\text{H}}$  1,0 Hz). Os outros dois sinais são triplos-dupletos, com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  7.03 e  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (td,  $^3J_{\text{H}}$  7,5 Hz e  $^4J_{\text{H}}$  1,2 Hz), originados do acoplamento *orto* entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6.97 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.38 e  $\delta_{\text{H}}$  7.03, e entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7.03 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6.97 e  $\delta_{\text{H}}$  7.29 ( $^3J_{\text{H}}$  7,5 Hz); e do acoplamento *meta* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6.97 e  $\delta_{\text{H}}$  7.29, e entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.03 e  $\delta_{\text{H}}$  7.38 ( $^4J_{\text{H}}$  1,2 Hz), indicando possivelmente, que o anel aromático de um núcleo indólico encontra-se livre de substituintes.

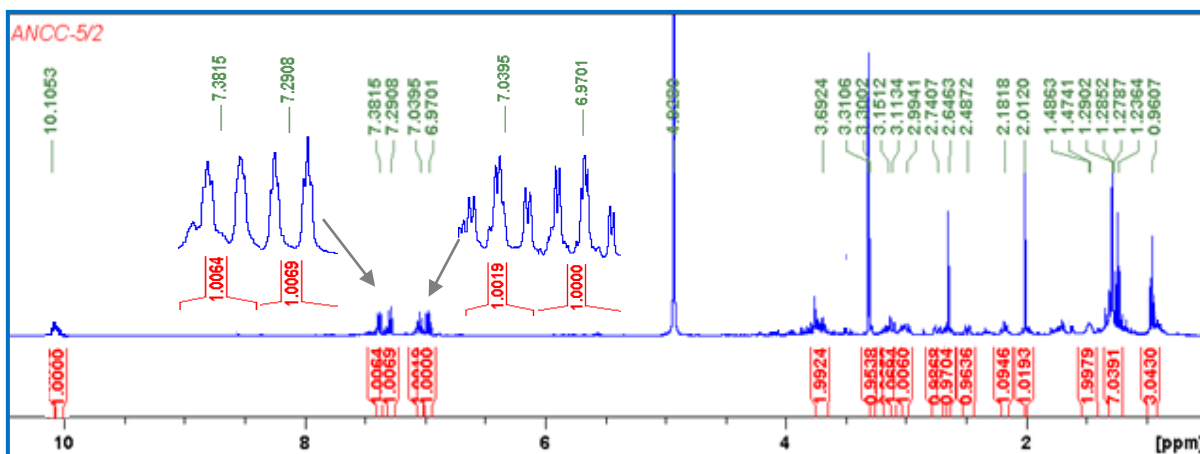
O espectro evidenciou a presença de um sinal simples integrado para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  10.10, o qual foi atribuído a um hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio do núcleo indólico, sendo posteriormente confirmado pelas correlações a longa distância observadas no espectro HMBC (Figura 15.23 e Tabela 15.5) e quatro multipletos com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  2.99,  $\delta_{\text{H}}$  2.74,  $\delta_{\text{H}}$  3.15 e  $\delta_{\text{H}}$  2.62, condizentes com hidrogênios de grupos metilênicos. Apresentou ainda, dois duplos-



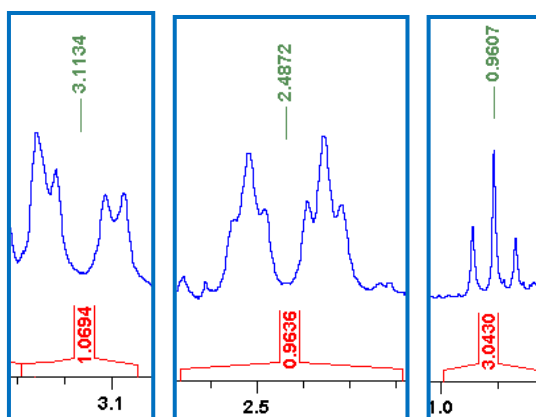
dupletos em  $\delta_H$  3.11 e  $\delta_H$  2.18 (Figura 15.18), com valor da constante de acoplamento  ${}^2J_H = 11.4$  Hz, característico de acoplamento geminal, e  ${}^3J_H = 2.8$  Hz característico de acoplamento vicinal, devido ao acoplamento com um hidrogênio em  $\delta_H$  1.48. Este último hidrogênio apresenta como sinal um multipletto, gerado do acoplamento também com os hidrogênios em  $\delta_H$  1.23, e com o hidrogênio em  $\delta_H$  1.47 que por sua vez, também acopla com os hidrogênios em  $\delta_H$  1.28, e com os hidrogênios em  $\delta_H$  2.48 e  $\delta_H$  1.27, tendo como sinal característico um multipletto (em  $\delta_H$  1.47).

Observaram-se também, dois duplos-tripletos em  $\delta_H$  2.48 e  $\delta_H$  1.27, com constantes de acoplamento  ${}^2J_H = 13$  Hz, devido ao acoplamento geminal entre eles, e  ${}^3J_H = 5.5$  Hz, devido ao acoplamento vicinal com os hidrogênios em  $\delta_H$  1.47, e em  $\delta_H$  3.30. O sinal referente ao hidrogênio em  $\delta_H$  3.30 revelou um tripleto devido ao acoplamento com os hidrogênios em  $\delta_H$  2.48 e  $\delta_H$  1.27, com  ${}^3J_H$  5.5 Hz.

O espectro revelou multipletos em  $\delta_H$  1.28 e  $\delta_H$  1.29, que se apresentam sobrepostos e foram atribuídos a hidrogênios metilênicos, devido ao valor da área de integração. Foram revelados ainda: um tripleto para os hidrogênios em  $\delta_H$  3.69 devido ao acoplamento vicinal  ${}^3J_H = 5$  Hz com os hidrogênios em  $\delta_H$  1.29 onde, o deslocamento químico em campo mais baixo para o sinal em  $\delta_H$  3.69 é devido provavelmente, a sua proximidade com um elemento eletronegativo; um sinal simples para um hidrogênio em  $\delta_H$  2.0; um tripleto em  $\delta_H$  0.96 ( ${}^3J_H$  7.6 Hz) (Figura 15.18), integrado para três hidrogênios, característicos de hidrogênios metílicos, acoplado com hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  1.23. Os hidrogênios em  $\delta_H$  1.23 apresentaram como sinal um multipletto, por também acoplarem com o hidrogênio em  $\delta_H$  1.48.



**FIGURA 15.17** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD, com intensificações (32x) dos sinais de hidrogênios aromáticos. (Fonte: Autora).



**FIGURA 15.18** – Expansões e intensificações (64x) dos sinais em  $\delta\text{H}$  3.11, 2.48 e 0.96. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da subfração ANCC-5/2 (Figura 15.19 e Tabela 15.5) apresentou um total de vinte sinais referentes aos átomos de carbonos presentes no composto em estudo, e foi calibrado usando como referência o sinal do solvente MeOD.

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 (Figura 15.20) e DEPT 90 (Figura 15.21) permitiu a observação de sinais com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  118.76,  $\delta_{\text{C}}$  119.98,  $\delta_{\text{C}}$  122.19,  $\delta_{\text{C}}$  112.16, condizentes com carbonos aromáticos, provavelmente pertencentes ao núcleo indólico. O deslocamento químico para o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112.16 pode ser justificado pelo efeito mesomérico do nitrogênio pertencente ao núcleo indólico, tornando esse carbono mais blindado do que o esperado.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou quatro sinais relativos a carbonos não hidrogenados (quaternários), com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  138.26,  $\delta_{\text{C}}$  135.57,  $\delta_{\text{C}}$  128.45 e  $\delta_{\text{C}}$  107.80 característicos do núcleo indólico. Forneceu também, evidências para a presença de um grupo metila em  $\delta_{\text{C}}$  11.39, ligado a um carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  24.60, formando um grupamento etila; e para um grupamento propanol ligado ao carbono com deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  42.4, com evidências confirmadas através de correlações à longa distância observadas no espectro HMBC (Figura 15.23 e Tabela 15.5).

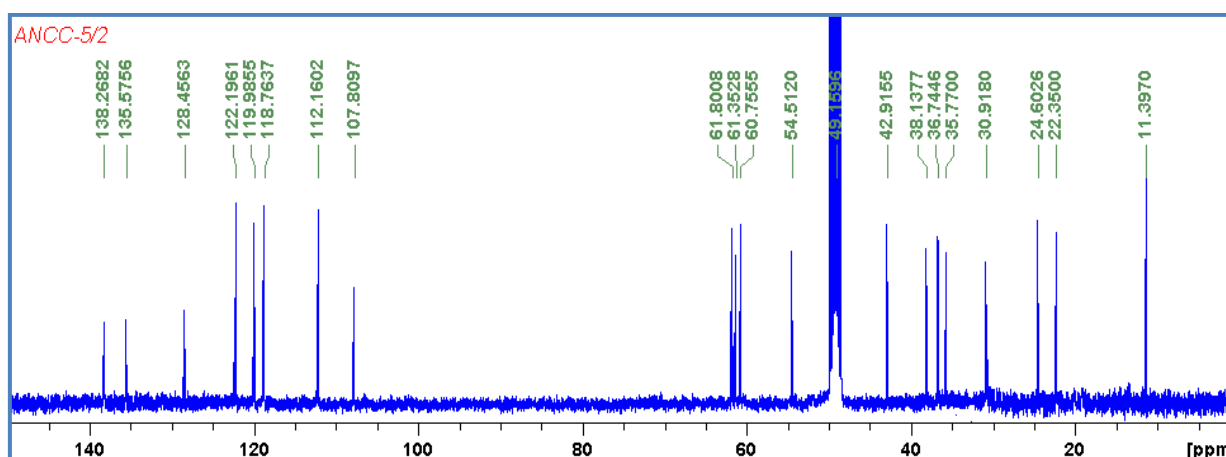
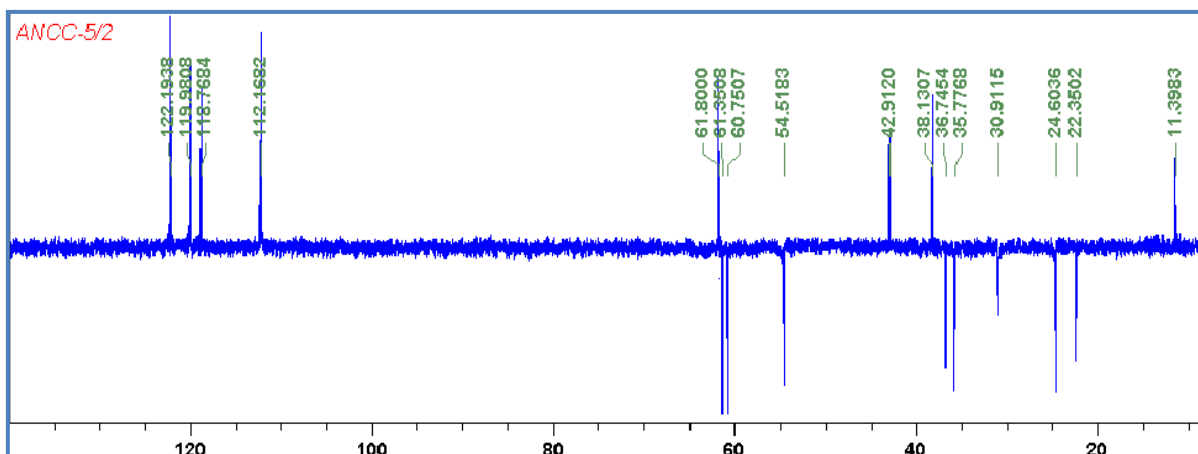


FIGURA 15.19 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a subfração ANCC-5/2, em MeOD. (Fonte: Autora).

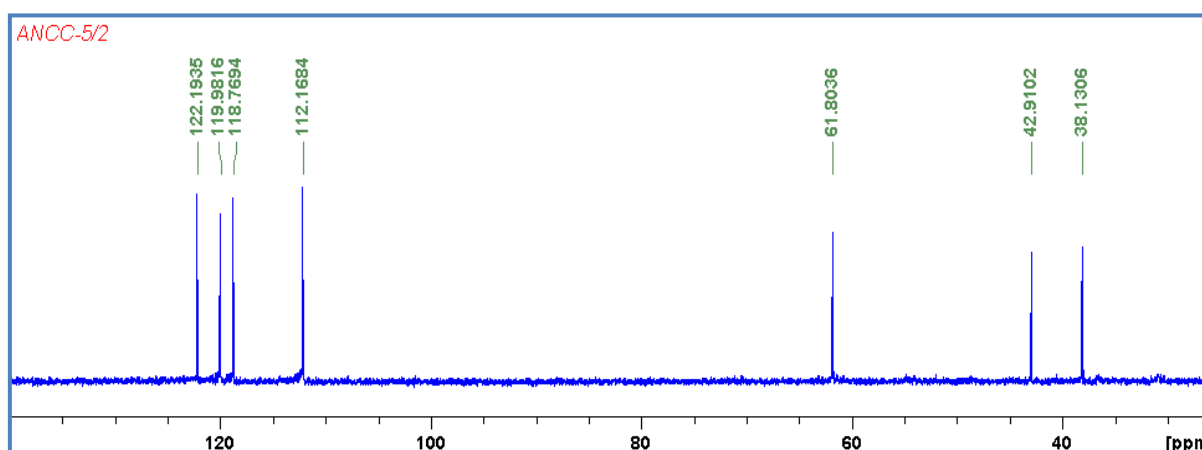
O espectro DEPT 135 (Figura 15.20 e Tabela 15.5) forneceu evidências para a presença de sete sinais para carbonos metínicos, destes, quatro com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  118.76,  $\delta_{\text{C}}$  119.98,  $\delta_{\text{C}}$  122.19,  $\delta_{\text{C}}$  112.16 pertencentes ao anel aromático do núcleo indólico, e três em  $\delta_{\text{C}}$  61.80,  $\delta_{\text{C}}$  42.41 e  $\delta_{\text{C}}$  38.13.

O espectro apresentou oito sinais para carbonos metilênicos, com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  22.35,  $\delta_{\text{C}}$  56.51,  $\delta_{\text{C}}$  61.35,  $\delta_{\text{C}}$  35.77,  $\delta_{\text{C}}$  30.91,  $\delta_{\text{C}}$  36.74,  $\delta_{\text{C}}$  60.75 e  $\delta_{\text{C}}$  24.60. Pelos deslocamentos observados para os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  56.51,  $\delta_{\text{C}}$  61.35 e  $\delta_{\text{C}}$  60.75, é provável que estejam próximos a átomos eletronegativos, assim, apresentam-se bem mais desblindados que os demais. Apresentou também, um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  11.39, característico de carbono de grupo metila.



**FIGURA 15.20** – Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro DEPT 90 (Figura 15.21) revelou apenas sete sinais referentes aos carbonos metínicos, descritos anteriormente e relacionados na Tabela 15.5.

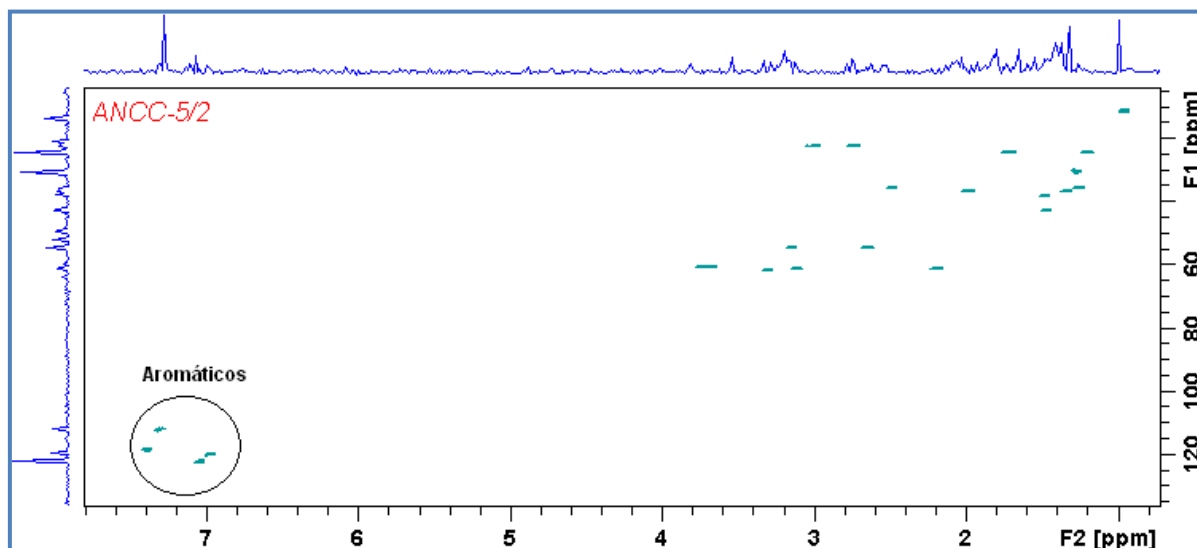


**FIGURA 15.21** – Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD. (Autora).

A análise do espectro HSQC (Figura 15.22) permitiu relacionar de forma inequívoca cada hidrogênio ao seu respectivo carbono,

Observaram-se no espectro HSQC as correlações entre os átomos com os seguintes deslocamentos químicos: para grupos metínicos – o carbono em  $\delta_C$  112.16 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.29,  $\delta_C$  122.19 e  $\delta_H$  7.03,  $\delta_C$  119.98 e  $\delta_H$  6.67,  $\delta_C$  118.76 e  $\delta_H$  7.38 (aromáticos),  $\delta_C$  61.80 e  $\delta_H$  3.30,  $\delta_C$  38.13 e  $\delta_H$  1.48 e entre  $\delta_C$  42.41 e  $\delta_H$  1.47; para grupos metilênicos – o carbono em  $\delta_C$  22.35 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.99 e 2.74, o carbono em  $\delta_C$  54.21 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.15 e 2.67, o carbono em  $\delta_C$  61.35 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.11 e 2.18, o carbono em  $\delta_C$  35.77 e

os hidrogênios em  $\delta_H$  2.48 e 1.27,  $\delta_C$  30.91 e  $\delta_H$  1.28,  $\delta_C$  36.74 e  $\delta_H$  1.29,  $\delta_C$  60.75 e  $\delta_H$  3.69 e entre  $\delta_C$  24.60 e  $\delta_H$  1.23; para grupo metílico – o carbono em  $\delta_C$  11.39 e os hidrogênios em  $\delta_H$  0.96 (Tabela 15.5).



**FIGURA 15.22** – Espectro de RMN HSQC para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD, com os sinais de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para os aromáticos em evidência. (Fonte: Autora).

Uma vez definidas as correlações heteronucleares diretas (visualizadas no espectro HSQC), foi possível localizar através do experimento de RMN HMBC as posições relativas para os carbonos, e montar uma proposta de esqueleto para o composto em estudo.

A análise do espectro HMBC (Figura 15.23 e Tabela 15.5) permitiu estabelecer as correlações à longa distância entre o carbono com deslocamento químico em  $\delta_C$  118.76 e os hidrogênios em  $\delta_H$  6.67 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_H$  7.03 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), e entre o carbono em  $\delta_C$  119.98 e os hidrogênios em  $\delta_H$  7.03,  $\delta_H$  7.38 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_H$  7.29 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), confirmando que o anel aromático do núcleo indólico não apresenta grupos substituintes. Foram observadas ainda correlações entre o hidrogênio em  $\delta_H$  7.38 e os carbonos em  $\delta_C$  138.26 e  $\delta_C$  107.80 através de  $^2J_{\text{CH}}$ , e entre o carbono em  $\delta_C$  128.45 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.29 através de  $^2J_{\text{CH}}$ .

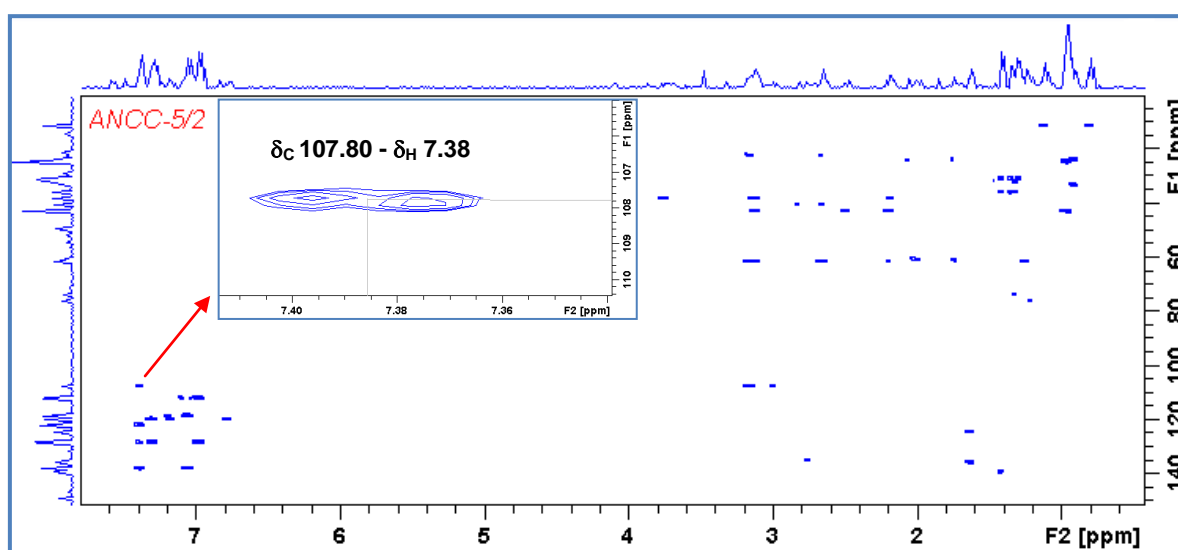
O hidrogênio em  $\delta_H$  10.10 ligado ao átomo de nitrogênio do núcleo indólico apresentou correlações a longa distância com os carbonos em  $\delta_C$  138.26 e  $\delta_C$  107.80 através de  $^3J_{\text{CH}}$ , e correlações com os carbonos em  $\delta_C$  128.45 e  $\delta_C$  135.57 através de  $^2J_{\text{CH}}$ .

A conectividade do núcleo indólico com o resto da molécula foi deduzida a partir da sequência de correlações: os hidrogênios em  $\delta_H$  2.99 e  $\delta_H$  2.74 com os carbonos em  $\delta_C$  107.80 através de  $^2J_{CH}$ ,  $\delta_C$  135.57 através de  $^3J_{CH}$  e  $\delta_C$  138.26 através de  $^3J_{CH}$ ; os hidrogênios em  $\delta_H$  3.15 e  $\delta_H$  2.64 com o carbono em  $\delta_C$  107.80 através de  $^3J_{CH}$  e o hidrogênio em  $\delta_H$  3.30 com os carbonos em  $\delta_C$  107.80 através de  $^3J_{CH}$ , e  $\delta_C$  135.57 através de  $^2J_{CH}$ .

Correlações à longa distância  $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$  foram observadas para os hidrogênios em  $\delta_H$  3.15 e  $\delta_H$  2.64 com os carbonos em  $\delta_C$  22.23 e  $\delta_C$  61.35, respectivamente.

A localização de um grupamento etila ligado ao átomo de carbono em  $\delta_C$  38.13 foi confirmada através das correlações entre o carbono do grupo metila em  $\delta_C$  11.39 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.23 ( $^2J_{CH}$ ) e  $\delta_H$  1.48 ( $^3J_{CH}$ ).

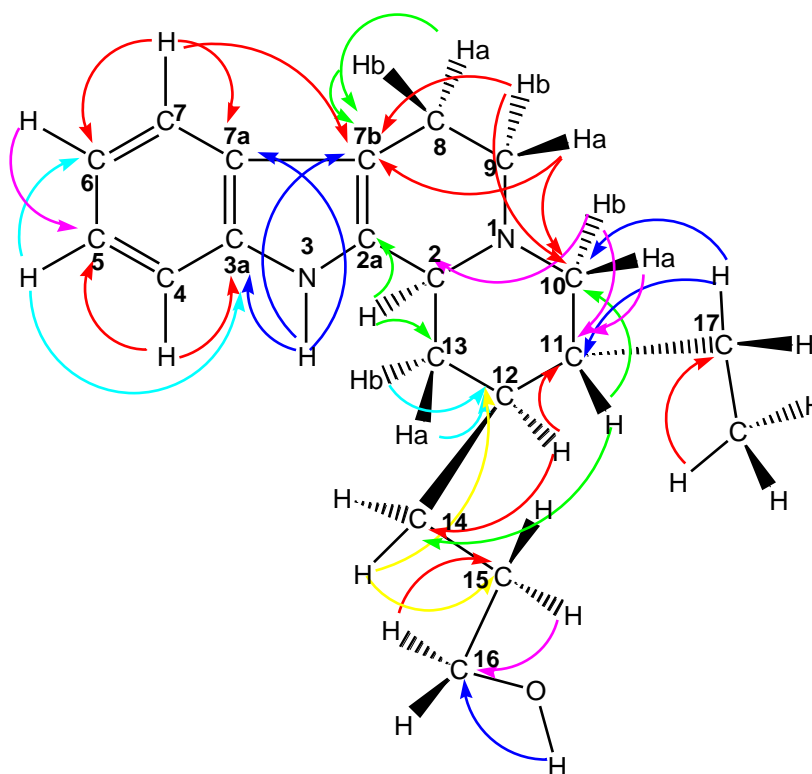
A localização de um grupo propanol ligado ao átomo de carbono com deslocamento químico em  $\delta_C$  42.41 foi confirmada através das correlações à longa distância ( $^2J_{CH}$ ) entre o carbono em  $\delta_C$  60.75 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.01 e  $\delta_H$  1.29. Os hidrogênios em  $\delta_H$  1.29 também apresentaram correlação ( $^2J_{CH}$ ) com o carbono em  $\delta_C$  30.91 e este, com o hidrogênio em  $\delta_H$  1.47 (Figura 15.24). Outras correlações à longa distância dos demais átomos de carbono encontram-se sumarizadas na Tabela 15.5.



**FIGURA 15.23** – Espectro de RMN HMBC para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância  $^1H$ - $^{13}C$  entre os átomos em  $\delta_C$  107.80 e  $\delta_H$  7.38 ( $^3J_{CH}$ ) em expansão. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.5** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	HSQC		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{C,H}}$	$^3J_{\text{C,H}}$
2	61.80	3.30	H-13a,b	H-10a,b; H-9a,b
2a	135.57	-	H-2	H-8a,b
3	-	10.10	-	-
3a	128.45	-	H-3; H-4	H-5
4	112.16	7.29	H-5	H-6
5	122.19	7.03	H-4; H-6	-
6	119.98	6.67	H-5; H-7	-
7	118.76	7.38	H-6	H-5
7a	138.26	-	H-7	H-3; H-6; H-8a,b
7b	107.80	-	H-8a,b	H-3; H-7; H-9a,b
8	22.35	(a) 2.99	H-9a,b	-
		(b) 2.74		
9	54.51	(a) 3.15	H-8a,b	-
		(b) 2.64		
10	61.35	(a) 3.11	H-11	H-9a,b; H-12; H-17
		(b) 2.18		
11	38.13	1.48	H-10a,b; H-12; H-17	-
12	42.41	1.47	H-11; H-13a,b	H-10a,b
13	35.77	(a) 2.48	H-2; H-12	H-11; H-14
		(b) 1.27		
14	30.91	1.28	H-12; H-15	H-11; H-13a,b
15	36.74	1.29	H-14; H-16	H-12
16	60.75	3.69	H-15; OH-16	H-14
17	24.60	1.23	H-11; Me-17	-
Me-17	11.39	0.96	H-17	H-11
OH-16	-	2.01	-	-

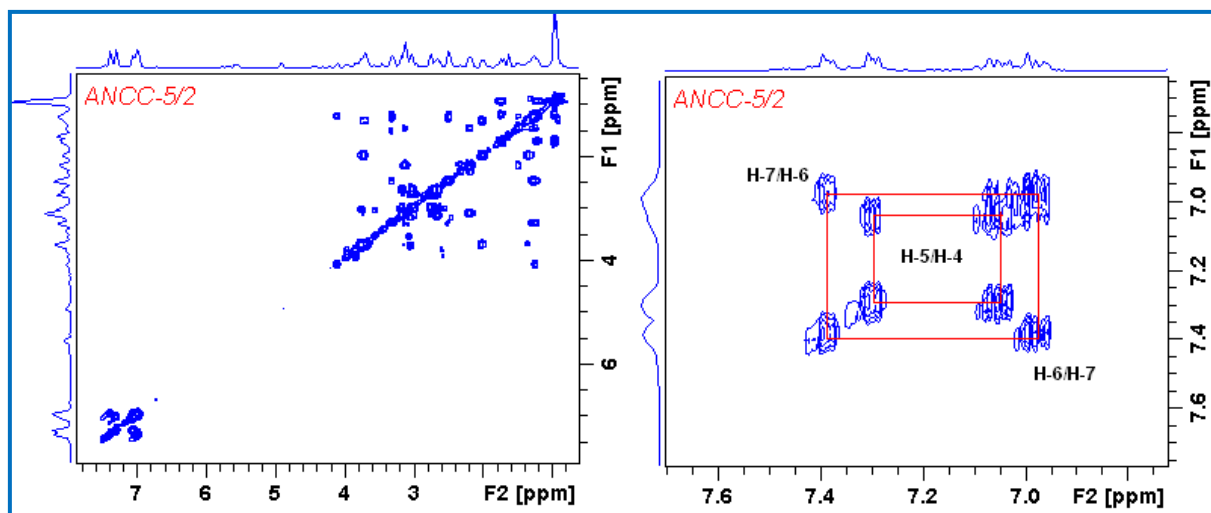


**FIGURA 15.24** – Correlações importantes  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro HMBC (via  $^2J$  e  $^3J$ ) para o composto em estudo. (Fonte: Autora).

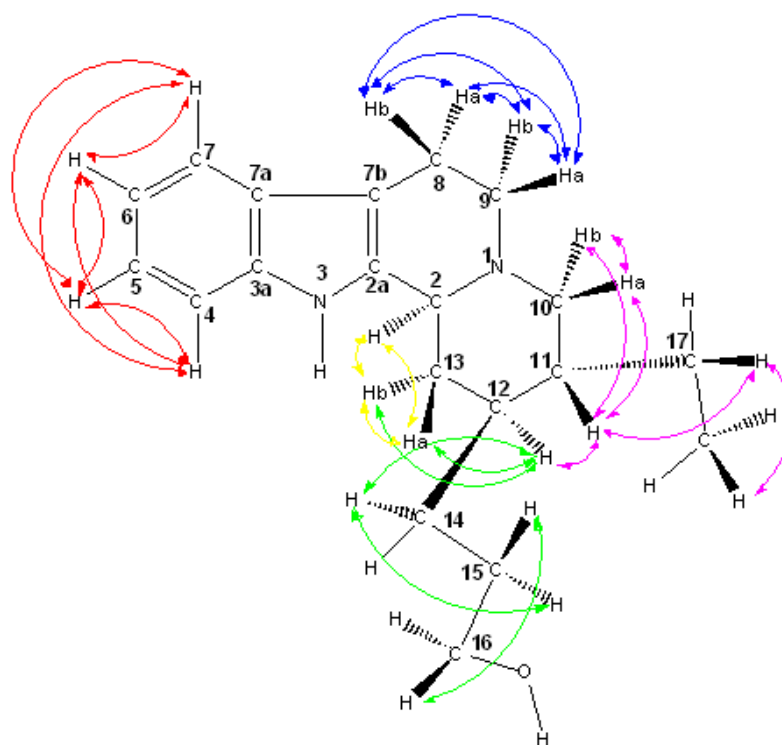
O espectro COSY (Figura 15.25 e Tabela 15.6) apresentou sinais para acoplamentos spin-spin entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3.30 (H-2) e os hidrogênios com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  2.48 e  $\delta_{\text{H}}$  1.27 (H-13a,b) através de  $^3J_{\text{HH}}$ , e um sinal de acoplamento entre os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  0.96 (Me-17) e  $\delta_{\text{H}}$  1.23 (H-17), através de  $^3J_{\text{HH}}$ . Observou-se ainda um sistema de spin correspondente ao acoplamento  $^3J_{\text{HH}}$  entre os átomos de hidrogênios H-8a,b e H-9a,b, indicando a presença do fragmento  $-\text{CCH}_2-\text{CH}_2\text{N}-$ .

Foi possível também visualizar os acoplamentos entre os hidrogênios do anel aromático do núcleo indólico através de  $^3J_{\text{HH}}$ ,  $^4J_{\text{HH}}$  e  $^5J_{\text{HH}}$ , sendo este último, para o acoplamento spin-spin entre os hidrogênios H-7 e H-4 (Figura 15.26). Outros acoplamentos spin-spin homonucleares dos demais átomos de hidrogênios encontram-se sumarizados na Tabela 15.6.





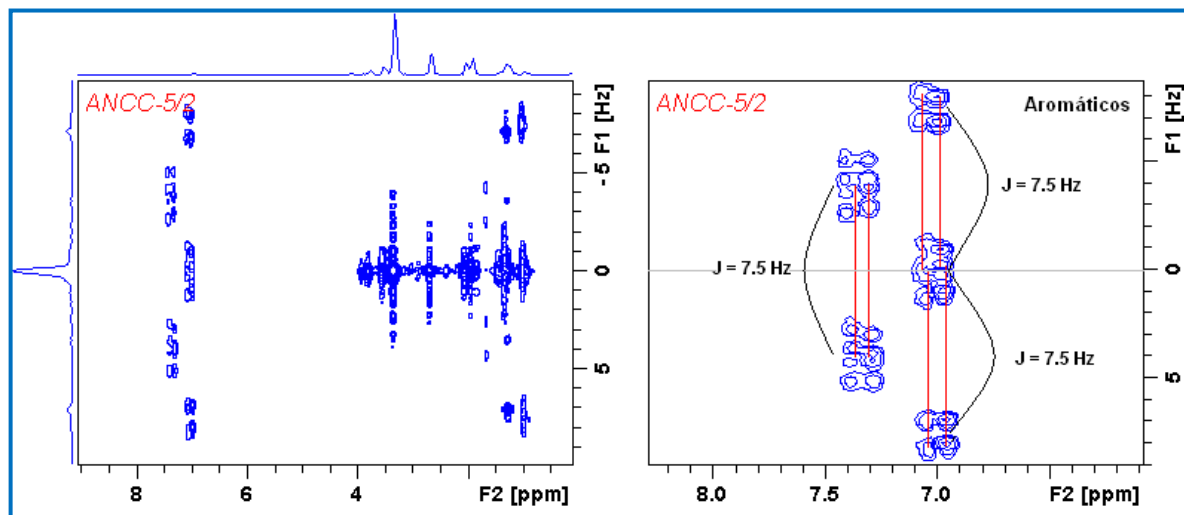
**FIGURA 15.25** – Espectro de RMN COSY para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD, com sinais de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-7 e H-6/H-5 e H-4 que acoplam entre si. (Fonte: Autora).



**FIGURA 15.26** – Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN J-resolvido (Figura 15.27) evidenciou os valores das constantes de acoplamento dos sinais relativos aos hidrogênios da molécula, assim como, a multiplicidade destes sinais. É importante resaltar, que neste experimento

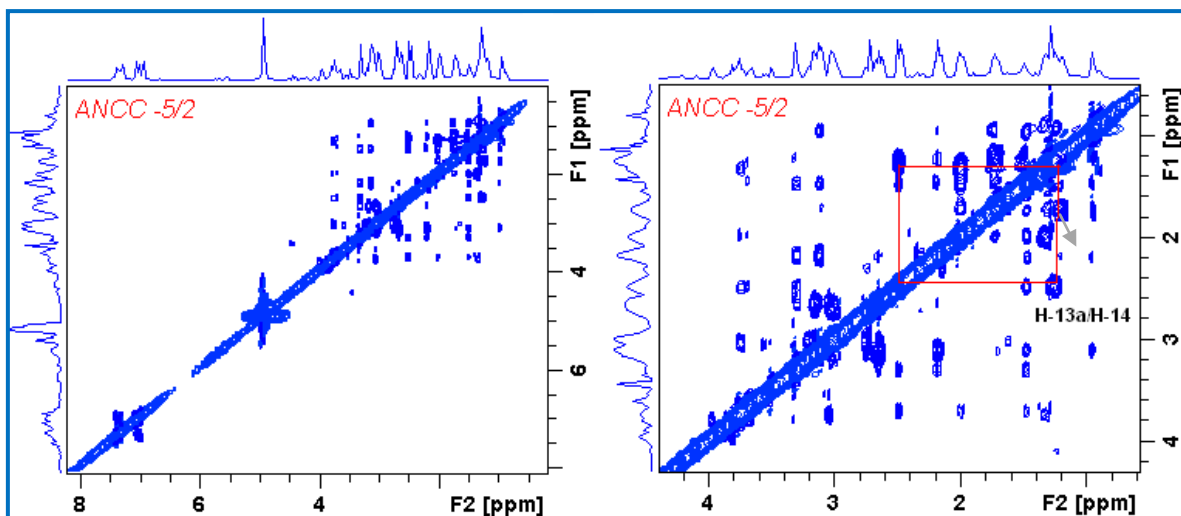
as regiões de sobreposições de sinais (RMN  $^1\text{H}$ ) apresentam uma melhor resolução, o que facilita a identificação das constantes de acoplamento (Tabela 15.6).



**FIGURA 15.27** – Espectro de RMN J-resolvido para a subfração ANCC-5/2, em MeOD, com os sinais de hidrogênios aromáticos evidenciados, e em destaque as constantes de acoplamento. (Fonte: Autora).

As estereoquímicas relativas dos hidrogênios H-2, H-10a,b, H-11, H-12 e H-13a,b foram definidas com base nas constantes de acoplamento. Os valores de  $\delta_{\text{H}}$  apresentados pelos hidrogênios H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  3.30) e H-13b ( $\delta_{\text{H}}$  1.27) e valor de  $J = 5.5 \text{ Hz}$  entre H-2 e H-13b, apresentado no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , são consistentes para relações *cis* do tipo *axial-equatorial* entre hidrogênios vicinais em anéis de seis membros <sup>[95]</sup>, com ângulo diedro de  $60^\circ$ . O acoplamento de H-13b com H-12 ocorre da mesma forma, e a relação é do tipo *cis equatorial-axial*. Já os valores de  $\delta_{\text{H}}$  apresentados pelos hidrogênios H-10a ( $\delta_{\text{H}}$  3.11) e H-11 ( $\delta_{\text{H}}$  1.48) e valor de  $J = 2.8 \text{ Hz}$  entre H-10a e H-11 são consistentes para relações *trans* do tipo *equatorial-equatorial*, com ângulo diedro de  $60^\circ$ . Assim, baseado nos acoplamentos anteriores, definimos a relação *cis* do tipo *axial-equatorial* para H-12 e H-11.

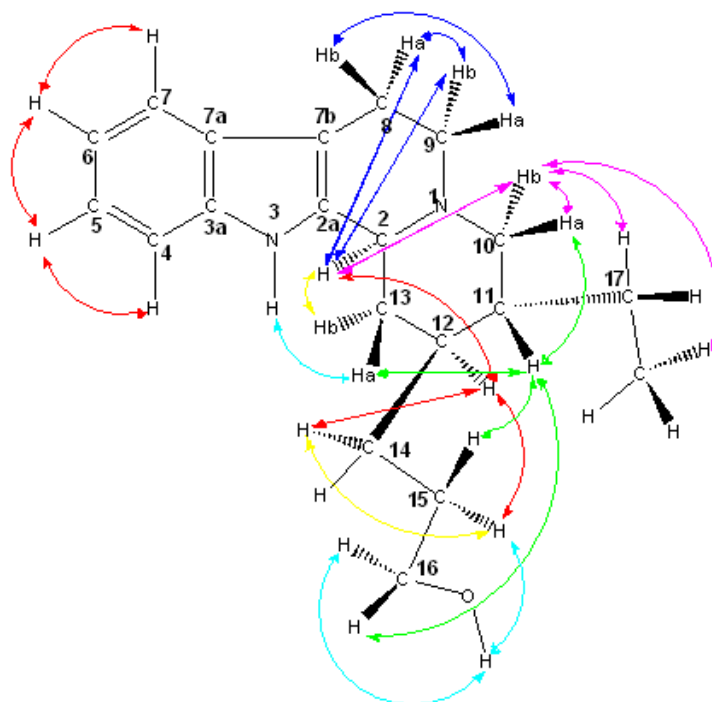
O espectro de RMN NOESY (Figura 15.28 e Tabela 15.6) apresentou sinais referentes às interações espaciais entre átomos de hidrogênios que podem ser visualizadas na Figura 15.29.



**FIGURA 15.28** – Espectro de RMN NOESY para a subfração **ANCC-5/2**, em MeOD, com sinais de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-16a e H-2 que interagem entre si. (Fonte: Autora).

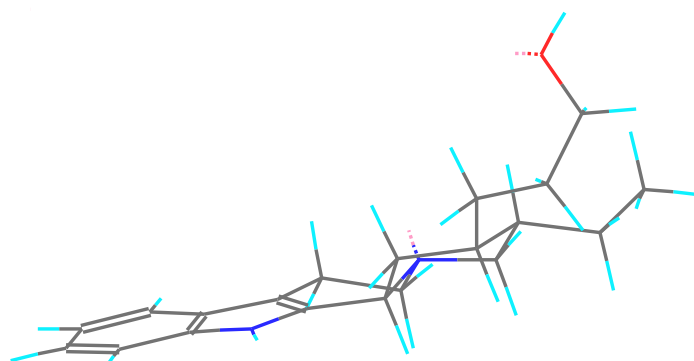
**TABELA 15.6** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	$\delta$ (multiplicidade)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY
2	3.30 (t, $J$ 5.5 Hz)	H-13a,b	H-8a; H-9b; H-10b; H-12; H-13b; Me-17
3	10.10 (s)	-	H-13 <sup>a</sup>
4	7.29 (dt, $J$ 7.5, 1.2 e 1.0 Hz)	H-5; H-6; H-7	H-5
5	7.03 (td, $J$ 7.5 e 1.2 Hz)	H-4; H-6; H-7	H-4; H-6
6	6.97 (td, $J$ 7.5 e 1.2 Hz)	H-4; H-5; H-7	H-5; H-7
7	7.38 (dt, $J$ 7.5, 1.2 e 1.0 Hz)	H-4; H-5; H-6	H-6
8	(a) 2.99 (m)	H-8b; H-9a,b	H-2; H-9b
	(b) 2.74 (m)	H-8a; H-9a,b	H-9 <sup>a</sup>
9	(a) 3.15 (m)	H-8a; H-9b	H-8b; H-10a
	(b) 2.64 (m)	H-8a,b; H-9a	H-2; H-8a; H-10b
10	(a) 3.11 (dd, $J$ 11.4 e 2.8 Hz)	H-10b; H-11	H-9a; H-11
	(b) 2.18 (dd, $J$ 11.4 e 2.8 Hz)	H-10a; H-11	H-2; H-9b; H-12; H-17; Me-17
11	1.48 (m)	H-10a,b; H-12; H-17	H-10a; H-13a; H-14; H-15; H-16
12	1.47 (m)	H-11; H-13a,b; H-14	H-2; H-10b; H-13b; H-14; H-17
13	(a) 2.48 (dt, $J$ 13.0 e 5.5 Hz)	H-2; H-12; H-13b	H-3; H-11; H-13b; H-14; H-16
	(b) 1.27 (dt, $J$ 13.0 e 5.5 Hz)	H-2; H-12; H-13a	H-2; H-12; H-13 <sup>a</sup>
14	1.28 (m)	H-12; H-15	H-11; H-12; H-13a; H-15
15	1.29 (m)	H-14; H-16	H-11; H-14; H-16; OH-16
16	3.69 (t, $J$ 5.0 Hz)	H-15	H-11; H-13a; H-15; OH-16
17	1.23 (m)	H-11; Me-17	H-10b; H-12; Me-17
Me-17	0.96 (t, $J$ 7.6 Hz)	H-17	H-2; H-10b; H-17
OH-16	2.01 (s)	-	H-15; H-16



**FIGURA 15.29** – Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. (Fonte: Autora).

A correlação entre os hidrogênios H-2 e H-12 mostra que eles estão no mesmo lado da molécula, e também, se correlaciona de forma similar com com o grupamento etila, e as correlações entre os hidrogênios H-11a e H-10a, H-13a e H-16, bem como a correlação entre H-10a e H-9a indicam suas proximidades espaciais (Figura 15.30).



**FIGURA 15.30** – Estrutura para o alcaloide em estudo com geometria otimizada. (Fonte: Autora).

A estrutura proposta foi confirmada por interações dipolares devido à proximidade espacial observada nas correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  no experimento NOESY (Tabela 15.7).

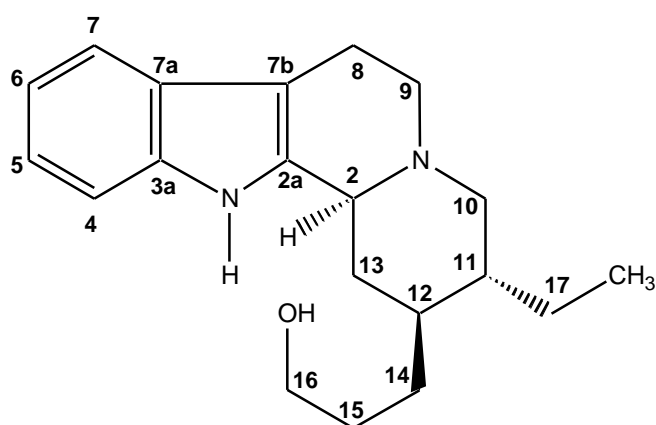
Os sinais revelados no espectro NOESY foram integrados para cálculos de distâncias interatômicas  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e os valores das distâncias comparados com os dados teóricos obtidos a partir da Equação 2.1, utilizando a distância fixa  $d = 2.5 \text{ \AA}$  entre hidrogênios vizinhos no anel benzênico como referência para derivação das demais distâncias.

**TABELA 15.7** – Dados de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas. (Fonte: Autora).

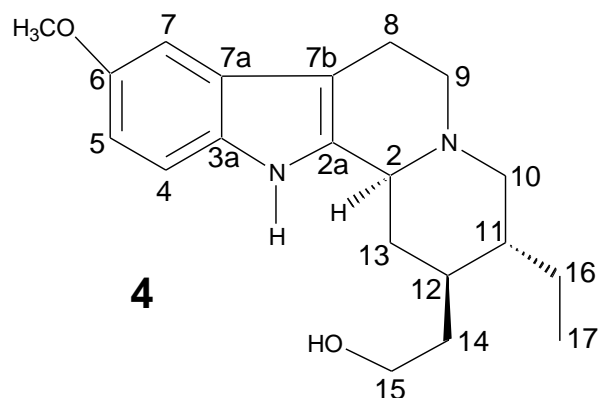
$\delta_1$	$\delta_2$	Integral <sub>n.o.e.</sub>	d (Å) Experimental	d (Å) Teórica
3.30 (H-2)	2.99 (H-8a)	0.2207	3.22	3.99
3.30 (H-2)	2.64 (H-9b)	0.9958	2.51	2.52
3.30 (H-2)	2.18 (H-10b)	1.0000	2.50	2.30
3.30 (H-2)	1.47 (H-12)	0.9359	2.53	2.71
3.30 (H-2)	1.27 (H-13b)	0,2459	3.16	3.07
10.10 (H-3)	2.48 (H-13a)	0.3748	2.94	3.31
7.29 (H-4)	7.03 (H-5)	1.0000	2.50	2.50
7.03 (H-5)	6.97 (H-6)	1.0000	2.50	2.50
2.99 (H-8a)	2.64 (H-9b)	0.9359	2.53	2.46
2.74 (H-8b)	3.15 (H-9a)	0.2709	3.11	2.94
2.64 (H-9b)	2.18 (H-10b)	0.0939	3.71	3.05
3.11 (H-10a)	1.48 (H-11)	0.1331	3.50	3.08
2.18 (H-10b)	1.47 (H-12)	0.1529	3.42	3.97
2.18 (H-10b)	1.23 (H-17)	0.1807	3.32	3.06
2.18 (H-10b)	0.96 (Me-17)	0.0658	3.93	3.81
1.48 (H-11)	2.48 (H-13a)	0.1714	3.35	2.88
1.48 (H-11)	1.28 (H-14)	0.8934	2.55	2.58
1.48 (H-11)	1.29 (H-15)	0.6741	2.67	3.09

1.48 (H-11)	3.69 (H-16)	1.0000	2.50	2.42
1.47 (H-12)	1.27 (H-13b)	0.0803	3.80	3.58
1.47 (H-12)	1.23 (H-17)	0.0726	3.87	3.71
2.48 (H-13a)	1.27 (H-13b)	0.6131	2.71	2.07
2.48 (H-13a)	1.28 (H-14)	0.6131	2.71	2.82
2.48 (H-13a)	3.69 (H-16)	0.1132	3.59	3.98
1.28 (H-14)	1.29 (H-15)	0.5209	2.79	2.65
1.29 (H-15)	3.69 (H-16)	0.1131	3.60	3.09
1.29 (H-15)	2.01 (OH-16)	0.5209	2.79	3.01
3.69 (H-16)	2.01 (OH-16)	0.0441	4.21	3.78
1.23 (H-17)	0.96 (Me-17)	0.1481	3.44	3.11

Os dados espectrais de RMN permitiram o assinalamento inequívoco para a estrutura de um alcaloide com núcleo indólico (Figura 15.31), os quais foram comparados com os dados descritos na literatura <sup>[87]</sup> para o alcaloide indólico 10-metoxi-dihidrocorinanteol (composto 4 do Quadro 9.1), de esqueleto do tipo corinanteano ou corinanteol <sup>[82,83]</sup>, isolado da casca da raiz de *A. pruinatum* <sup>[87]</sup>.



**FIGURA 15.31** – Estrutura para o alcaloide indólico estudado. (Fonte: Autora).



A diferença estrutural entre o composto identificado neste trabalho e o composto 4 está nos substituintes do carbono C-6 e C-12, enquanto o composto 4 reportado na literatura apresenta um grupo metoxila ligado ao carbono C-6 e um grupamento etanol ligado ao carbono C-12, o composto estudado neste trabalho apresenta um grupamento propanol ligado ao carbono C-12 e o carbono C-6 livre de substituintes, justificando os valores para os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  descritos e comparados na Tabela 15.8.



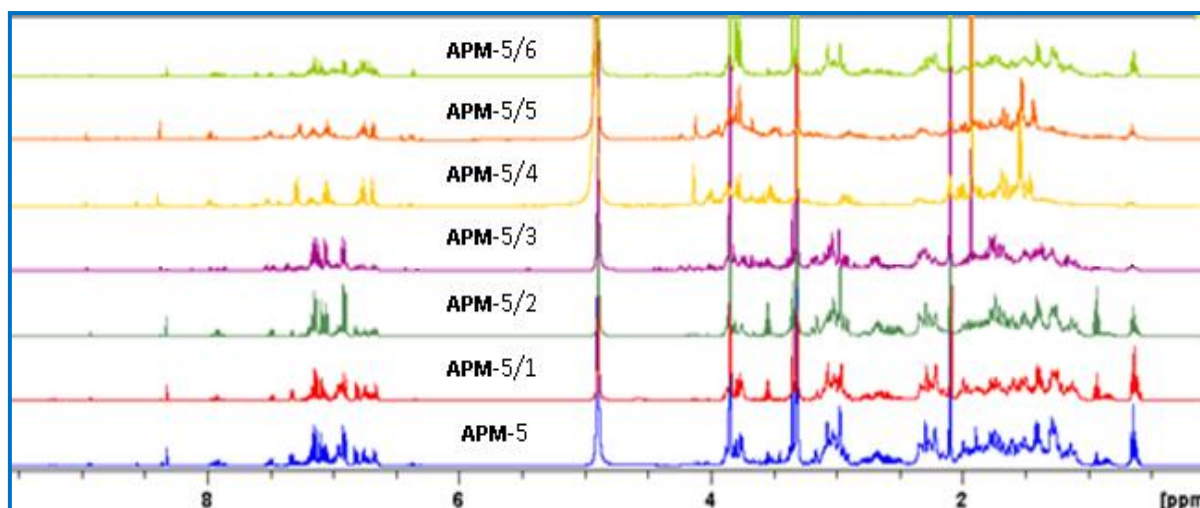
**TABELA 15.8** – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  em ppm) para o alcaloide indólico estudado, em MeOD, em comparação com dados da literatura. (Fonte: Autora).

Átomo	Alcaloide estudado em MeOD	Composto 4 em $\text{CDCl}_3$
2	61.8	60.1
2a	135.6	135.8
3	128.4	131.2
4	112.2	110.6
5	122.2	111.4
6	119.9	153.6
7	118.7	100.3
7a	138.3	127.3
7b	107.8	107.2
8	22.3	21.6
9	54.5	52.9
10	61.3	59.8
11	38.1	41.5
12	42.4	37.0
13	35.8	35.4
14	30.9	35.1
15	36.7	59.8
16	60.75	29.3
17	24.6	11.0
Me-17	11.39	-
MeO-6	-	58.8

Comprovou-se a partir dessas evidências, a proposta estrutural para um alcaloide indólico inédito, com esqueleto do tipo Corinanteol e de fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ , isolado a partir do extrato etanólico da casca do caule de *A. nitidum*.

## 15.2 Determinação estrutural de alcaloides isolados de *Aspidosperma pyrifolium*

A fração **APM-5** biologicamente ativa e suas subfrações foram submetidas a técnica de RMN-<sup>1</sup>H, e os seus respectivos espectros estão dispostos na Figura 15.32. Para o estudo químico desse material, optou-se por investigar os constituintes presentes nas subfrações **APM-5/3** e **APM-5/4**. A escolha foi baseada na maior diferenciação e separação dos sinais no espectro, devido ao grau de pureza das frações.



**FIGURA 15.32** - Espectros de RMN-<sup>1</sup>H da fração **APM-5** e das suas respectivas subfrações, dispostos de baixo para cima de acordo com o aumento da polaridade dos eluentes. (Fonte: Autora).

### 15.2.1 Alcaloide presente na subfração **APM-5/3**

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da subfração APM-5/3 (Figura 13.33 e Tabela 15.10) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de grupos metoxilas, metila, hidrogênios aromáticos, grupos metínicos e metilênicos. A integração dos sinais no espectro de RMN <sup>1</sup>H indicou a presença de trinta átomos de hidrogênios. O espectro foi calibrado com base nos deslocamentos químicos dos sinais do solvente MeOD, representado por um sinal simples em  $\delta_H$  4.89 e um quinteto em  $\delta_H$  3.31.

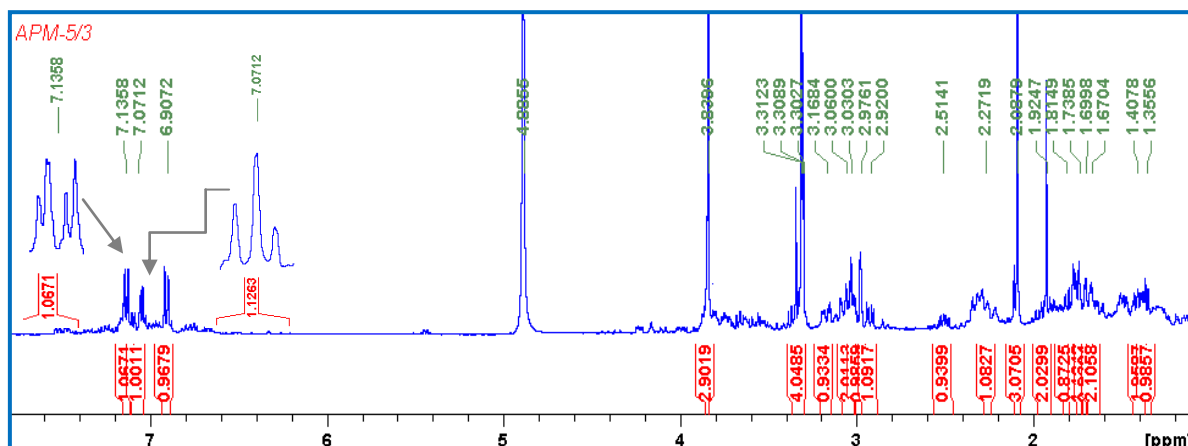
A análise do espectro indicou a presença de um simpleto em  $\delta_H$  2.08, integrado para três hidrogênios, condizente com grupo metila desprotegido, provavelmente devido a proximidade com um grupo retirador de elétrons, e outros dois simpletos em  $\delta_H$  3.83 e  $\delta_H$  3.31, característicos de hidrogênios de grupos metoxilas, onde um deles possivelmente encontra-se ligado a um anel aromático.

O espectro evidenciou ainda dois duplos-dupletos, centrados em  $\delta_H$  7.13 e  $\delta_H$  6.70 (dd,  $J$  8.0 e 2.5 Hz), cada um integrado para um hidrogênio, característicos de hidrogênios aromáticos, acoplando entre si em *meta* ( $J$  2.5 Hz), e acoplando em *orto* ( $J$  8.0 Hz) com o hidrogênio em  $\delta_H$  7.07 (triplete), indicando a presença de um substituinte ligado ao anel aromático de um núcleo indólico, provavelmente a metoxila em  $\delta_H$  3.83 citada anteriormente.

Foram observados também, sinais para hidrogênios com deslocamentos químicos em campo mais baixo: um simpleto largo em  $\delta_H$  2.97, dois multipletos largos em  $\delta_H$  3.30 e  $\delta_H$  3.06, e dois duplos-tripletos em  $\delta_H$  3.16 e  $\delta_H$  3.03 ( $J$  12 Hz devido provavelmente a um acoplamento geminal e  $J$  5.0 Hz característico de acoplamento vicinal). Estes deslocamentos químicos podem ser resultados, por exemplo, da proximidade dos hidrogênios com elétrons não compartilhados.

Verificou-se que o grupo metoxila em  $\delta_H$  3.31 se posiciona de forma pseudo-equatorial numa relação *trans*, pois as constantes de acoplamento para um hidrogênio de grupo metínico com sinal em  $\delta_H$  2.92 (dd,  $J$  11.2 e 4.5 Hz) indicam que este hidrogênio posiciona-se a um ângulo próximo a  $180^\circ$  (*trans* axial-axial) em relação a um dos hidrogênios de um grupo metilênico com sinal multiplete em 1.67, e de aproximadamente  $60^\circ$  do outro hidrogênio do grupo metilênico. Se o grupo metoxila estivesse na posição *axial*, as constantes de acoplamento entre o hidrogênio metínico e os metilênicos teriam que estar entre 2.0 e 5.0 Hz. Baseado nestes resultados, atribuímos que o hidrogênio em  $\delta_H$  2.92 encontra-se na posição *axial*.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios para os demais sinais evidenciados no espectro de RMN  $^1H$  foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênios (Tabela 15.10) <sup>[96]</sup>.



**FIGURA 15.33** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da subfração **APM-5/3**, em MeOD, com intensificações (32x) dos sinais duplo-duplete e tripleto, dos hidrogênios aromáticos. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da subfração APM-5/3 (Figura 15.34 e Tabela 15.9) apresentou um total de vinte e três sinais e foi calibrado com base no deslocamento químico do sinal do solvente MeOD, representado por um septeto em  $\delta_{\text{C}}$  49.17.

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 (Figura 15.35) e DEPT 90 (Figura 15.36) permitiu a observação de sinais com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  56,12 e  $\delta_{\text{C}}$  57.50, característicos de carbonos de grupos metoxilas, e em  $\delta_{\text{C}}$  24.92 para deslocamento de carbono de grupo metila. Observou-se também, a presença de um sinal com deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  172.96, condizente com carbono carbonílico, característico de uma função amida.

Evidenciaram-se ainda, sete sinais relativos a carbonos não hidrogenados, destes, cinco com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  73.52,  $\delta_{\text{C}}$  59.97,  $\delta_{\text{C}}$  131.23,  $\delta_{\text{C}}$  147.51 e  $\delta_{\text{C}}$  150.95 foram atribuídos a um núcleo indólico.

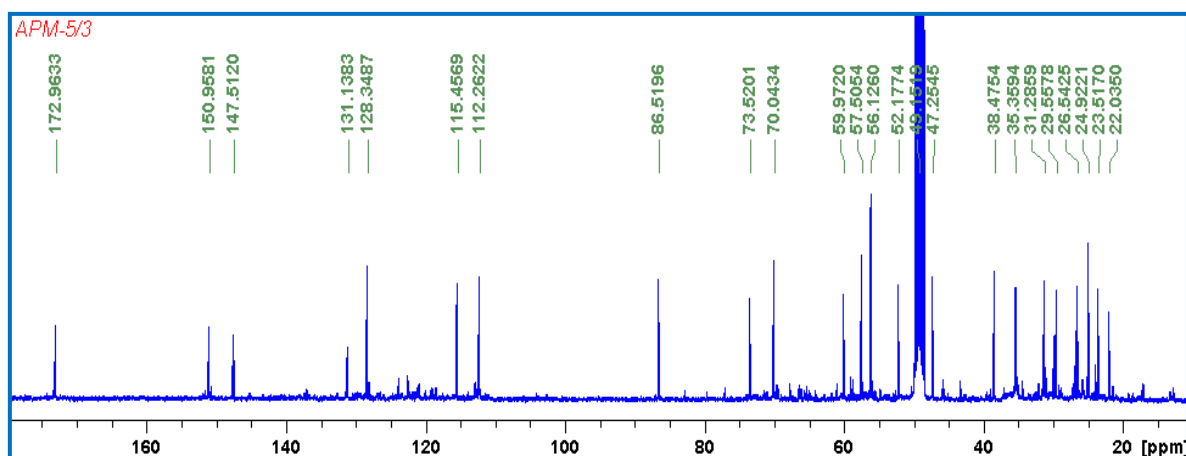


FIGURA 15.34 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da subfração **APM-5/3**, em MeOD. (Fonte: Autora).

Na análise do espectro DEPT 135, evidenciaram-se cinco sinais para carbonos metínicos, destes, três com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  128.34,  $\delta_{\text{C}}$  115.35 e  $\delta_{\text{C}}$  112.26 são característicos para carbonos de anel aromático, provavelmente do núcleo indólico, os outros dois em  $\delta_{\text{C}}$  86.52 e  $\delta_{\text{C}}$  70.04, fazem parte do restante da molécula. Observou-se ainda, oito sinais para carbonos metilênicos, e três para carbonos metílicos com deslocamentos químicos listados na Tabela 15.9.

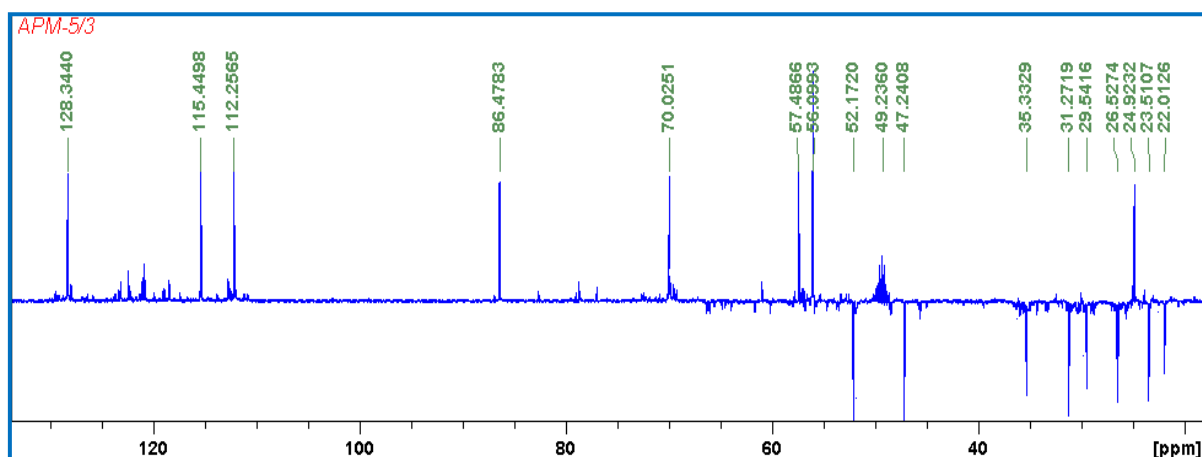
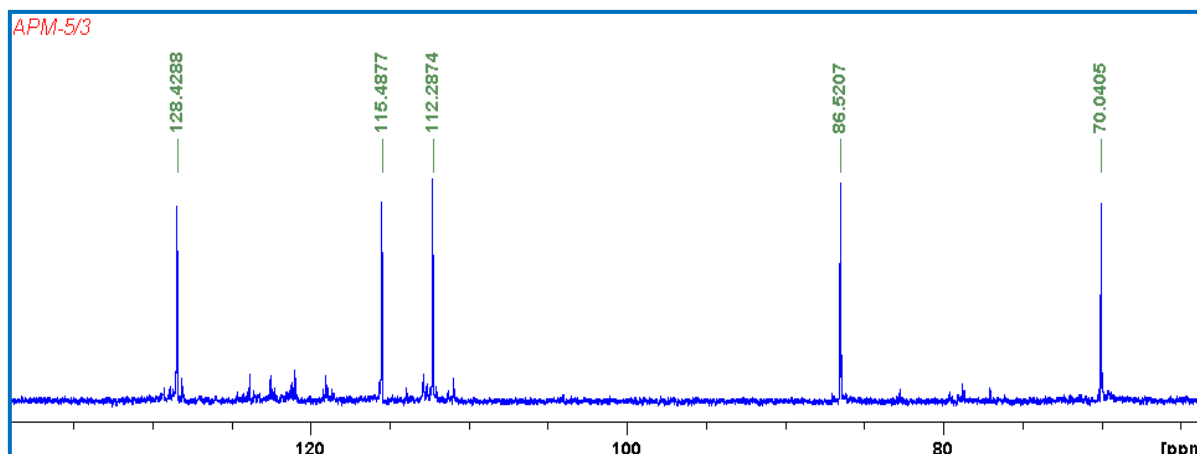


FIGURA 15.35 – Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração **APM-5/3**, em MeOD. (Fonte: Autora).

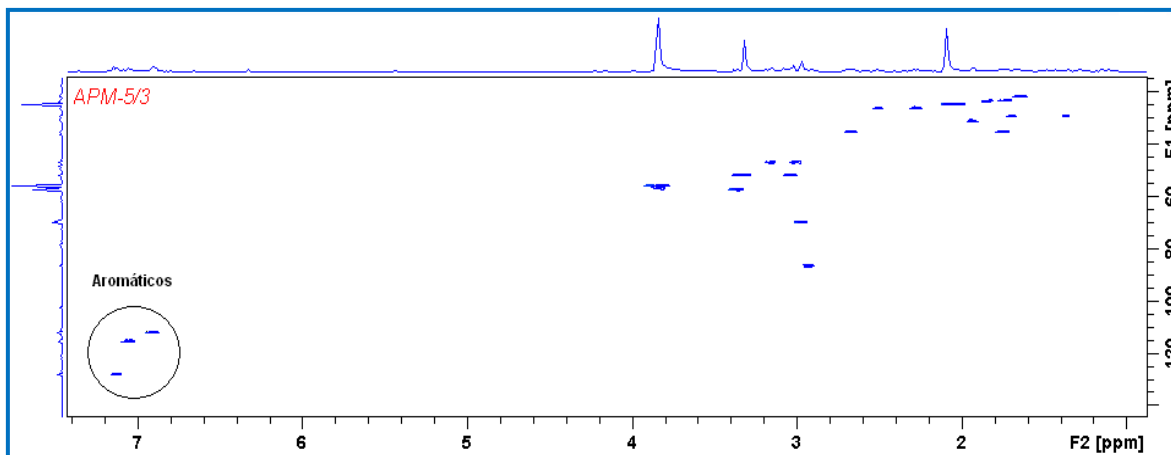
O espectro DEPT 90 (Figura 15.36) revelou apenas cinco sinais referentes a carbonos metínicos, estes foram descritos anteriormente, e estão apresentados na Tabela 15.9.



**FIGURA 15.36** – Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração **APM-5/3**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro HSQC (Figura 15.37) apresentou os sinais de correlação direta entre os átomos de carbonos e hidrogênios e permitiu conectar de forma inequívoca cada hidrogênio ao seu respectivo carbono.

Observaram-se no espectro HSQC as correlações entre os átomos com os seguintes deslocamentos químicos: para grupos metínicos – o carbono em  $\delta_C$  128.34 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.13,  $\delta_C$  115.45 e  $\delta_H$  7.07,  $\delta_C$  112.26 e  $\delta_H$  6.90 (aromáticos),  $\delta_C$  86.52 e  $\delta_H$  2.92, e entre  $\delta_C$  70.04 e  $\delta_H$  2.97; para grupos metilênicos – o carbono em  $\delta_C$  52.17 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.30 e  $\delta_H$  3.06, o carbono em  $\delta_C$  47.25 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.16 e  $\delta_H$  3.03,  $\delta_C$  35.35 e  $\delta_H$  1.40,  $\delta_C$  22.03 e  $\delta_H$  1.67,  $\delta_C$  31,28 e  $\delta_H$  1.92, o carbono em  $\delta_C$  29.55 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.69 e  $\delta_H$  1.35, o carbono em  $\delta_C$  23.51 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.81 e  $\delta_H$  1.73, e entre o carbono em  $\delta_C$  26.54 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.51 e  $\delta_H$  2.27; para grupo metílico – o carbono em  $\delta_C$  24.92 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.08 e para grupos metoxilicos – o carbono em  $\delta_C$  57.50 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.31 e entre  $\delta_C$  56.12 e  $\delta_H$  3.83 (Tabela 15.9).



**FIGURA 15.37** – Espectro de RMN HSQC para a subfração **APM-5/3**, em MeOD, com os sinais de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para os aromáticos em evidência. (Fonte: Autora).

Uma vez definidas as correlações heteronucleares diretas (visualizadas no espectro HSQC), foi possível localizar através do experimento de RMN HMBC as posições relativas para os carbonos, e montar uma proposta de esqueleto para o composto em estudo.

A análise do espectro HMBC (Figura 15.38 e Tabela 15.9) permitiu confirmar as correlações à longa distância entre o carbono com deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  29.55 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2.51,  $\delta_{\text{H}}$  2.27 ( $^3J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  1.92 ( $^2J_{\text{CH}}$ ), e entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  31.28 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2.92,  $\delta_{\text{H}}$  2.97,  $\delta_{\text{H}}$  1.81,  $\delta_{\text{H}}$  1.73 ( $^3J_{\text{CH}}$ ),  $\delta_{\text{H}}$  1.69 e  $\delta_{\text{H}}$  1.35 ( $^2J_{\text{CH}}$ ).

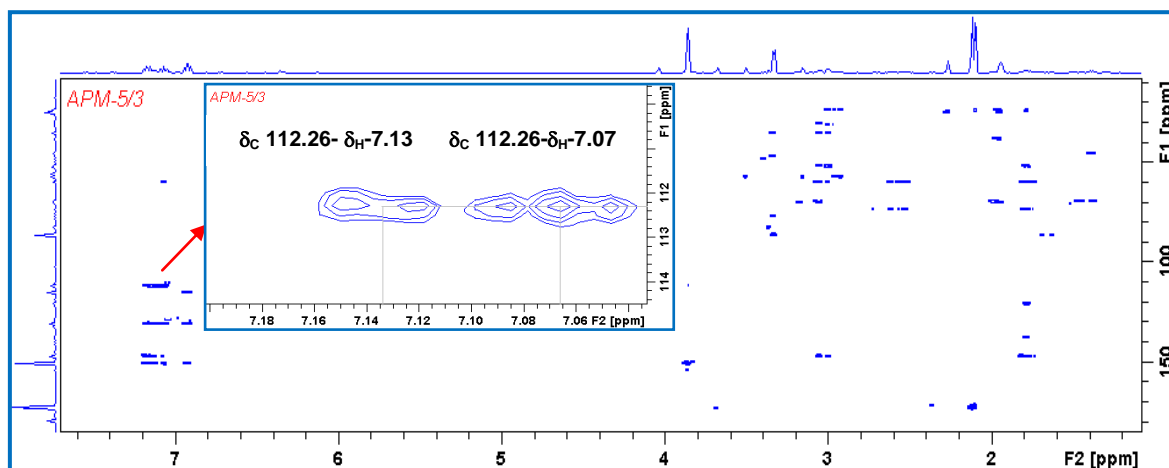
Confirmou-se ainda, sinais para as correlações à longa distância entre um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  2.92 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  38.47 e  $\delta_{\text{C}}$  22.03, através de  $^2J_{\text{CH}}$ , e também com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  31.28,  $\delta_{\text{C}}$  47.25,  $\delta_{\text{C}}$  70.04 e  $\delta_{\text{C}}$  23.51, através de  $^3J_{\text{CH}}$ ; entre os hidrogênios metoxílicos em  $\delta_{\text{H}}$  3.83 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112.26, através de  $^4J_{\text{CH}}$ , e entre os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  2.08 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  147.51 ( $^4J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  172.96 ( $^2J_{\text{CH}}$ ).

O padrão de substituição do anel benzênico foi confirmado através das correlações a longa distância entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  131.13 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.14 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  7.07 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), e entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  150.95 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6.90 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  7.07 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), observadas no espectro HMBC e na Figura 15.39.

A conectividade do núcleo indólico com o resto da molécula foi deduzida a partir da sequência de correlações: os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2.97 e  $\delta_{\text{H}}$  1.40 com o

carbono em  $\delta_C$  59.97, através de  $^2J_{CH}$ , e entre os hidrogênios em  $\delta_H$  2.51,  $\delta_H$  2.27,  $\delta_H$  1.69 e  $\delta_H$  1.35 com o carbono em  $\delta_C$  73.52, através de  $^2J_{CH}$ .

Outras correlações à longa distância para os demais átomos de carbonos encontram-se sumarizadas na Tabela 15.9.



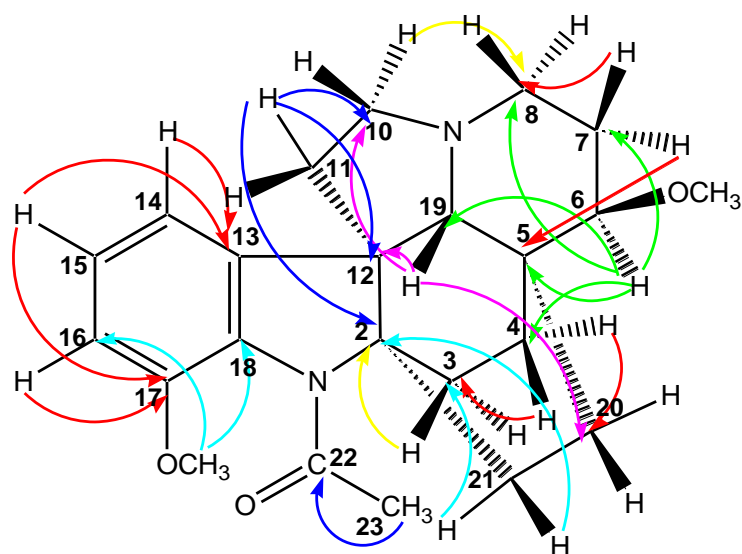
**FIGURA 15.38** – Espectro de RMN HMBC para a subfração **APM-5/3**, em MeOD, com os sinais de correlação à longa distância entre o átomo de carbono em  $\delta_C$  112.26 e os hidrogênios em  $\delta_H$  7.07 ( $^2J_{CH}$ ) e  $\delta_H$  7.13 ( $^3J_{CH}$ ), em expansão. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.9** – Dados de RMN  $^1H$  (400 MHz) e  $^{13}C$  (100 MHz) (incluindo correlações  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC e  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	HSQC		HMBC		
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{C,H}$	$^3J_{C,H}$	$^4J_{C,H}$
2	73.52	-	H-3a,b; H-21a,b	H-11	-
3	29.55	(a) 1.69	H-4	H-21a,b	-
		(b) 1.35			
4	31.28	1.92	H-3a,b	H-6; H-19; H-20a,b	-
5	38.47	-	H-4; H-6; H-19; H-20a,b	H-7	-
6	86.52	2.92	H-7	H-4; H-8a,b; MeO-6; H-19; H-20a,b	-
7	22.03	1.67	H-6; H-8a,b	-	H-4; H-10a,b



<b>8</b>	47.25	<b>(a)</b> 3.16 <b>(b)</b> 3.03	H-7	H-6; H-10a,b; H-19	-
<b>10</b>	52.17	<b>(a)</b> 3.30 <b>(b)</b> 3.06	H-11	H-8a,b; H-19	H-2; H-7
<b>11</b>	35.35	1.40	H-10a,b	H-19	-
<b>12</b>	59.97	-	H-11; H-19	H-3; H-10a,b; H-14; H-21a,b	H-6; H-15
<b>13</b>	131.13	-	H-14	H-11; H-15; H-19	H-3
<b>14</b>	128.34	7.13	H-15	H-16	-
<b>15</b>	115.45	7.07	H-14; H-16	-	-
<b>16</b>	112.26	6.90	H-15	H-14	MeO-17
<b>17</b>	150.95	-	H-16	H-15; MeO-17	-
<b>18</b>	147.51	-		H-14; H-16,	H-23
<b>19</b>	70.04	2.97	-	H-6; H-8a,b; H-10a,b	-
<b>20</b>	23.51	<b>(a)</b> 1.81 <b>(b)</b> 1.73	H-21a,b	H-4; H-6; H-19	H-3
<b>21</b>	26.54	<b>(a)</b> 2.51 <b>(b)</b> 2.27	H-20a,b	H-3a,b	-
<b>22</b>	172.96	-	H-23	-	-
<b>23</b>	24.92	2.08	-	-	-
<b>MeO-6</b>	57.50	3.31	-	H-6	-
<b>MeO-17</b>	56.12	3.83	-	-	H-16

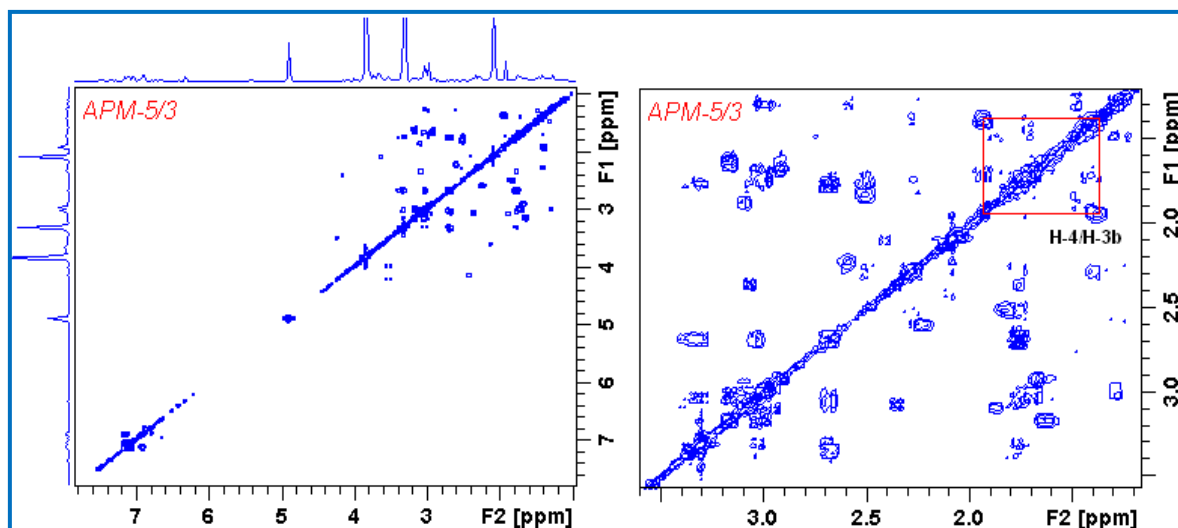


**FIGURA 15.39** – Correlações importantes  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro HMBC (via  $^2J$  e  $^3J$ ) para o composto em estudo. (Fonte: Autora).

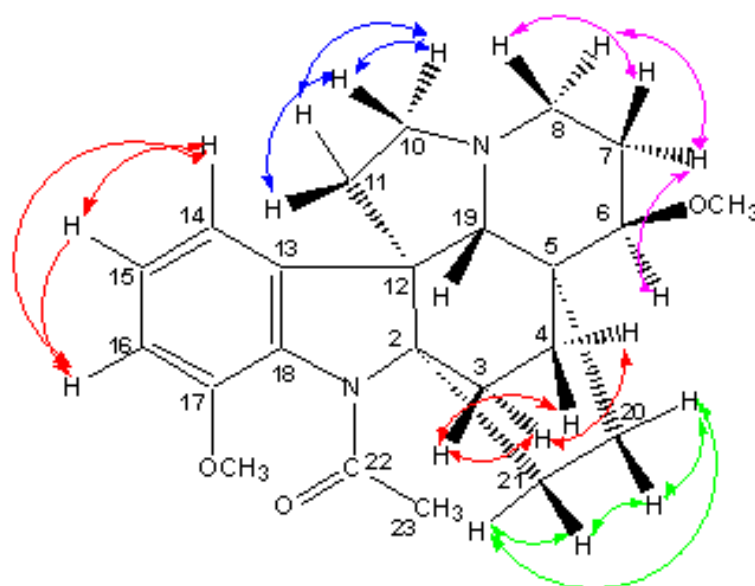
O espectro COSY (Figura 15.40 e Tabela 15.10) apresenta sinais de acoplamento spin-spin homonuclear entre os átomos de hidrogênios pertencentes ao composto em estudo.

Foram revelados no espectro COSY, sinais referentes ao acoplamentos spin-spin entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1.92 (H-4) e os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  1.69 e 1.35 (H-3a,b) com  $^3J_{\text{HH}}$ ; entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2.92 (H-6) e  $\delta_{\text{H}}$  1.67 (H-7) com  $^3J_{\text{HH}}$ . Permitiu ainda, a observação de sinais de acoplamentos entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1.40 (H-11) e os hidrogênios metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$  3.30 e 3.06 (H-10a,b) com  $^3J_{\text{HH}}$ .

Outros acoplamentos spin-spin homonucleares para os demais átomos de hidrogênios encontram-se sumarizados na Tabela 15.10 e ilustrados na Figura 15.41.



**FIGURA 15.40** – Espectro de RMN COSY para a subfração **APM-5/3**, em MeOD, com sinais de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-4 e H-3b que acoplam entre si. (Fonte: Autora).

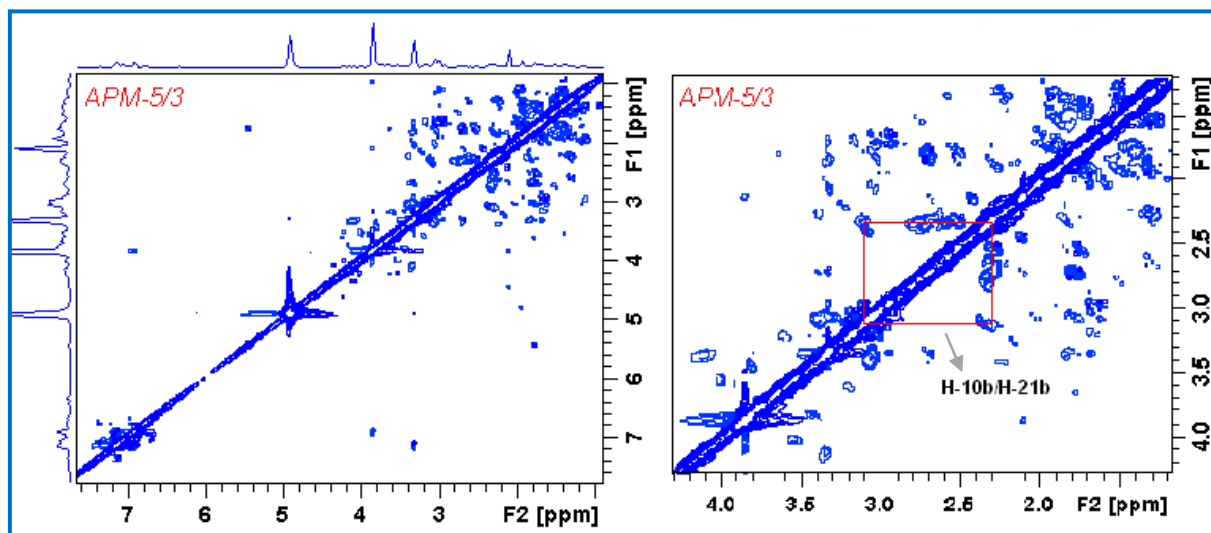


**FIGURA 15.41** – Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN NOESY (Figura 15.42) apresenta sinais referentes à interação espacial entre átomos de hidrogênio.

A estrutura proposta foi confirmada com base na literatura <sup>[97]</sup> e por interações dipolares devido à proximidade espacial observada nas correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  no experimento NOESY (Tabela 15.10).

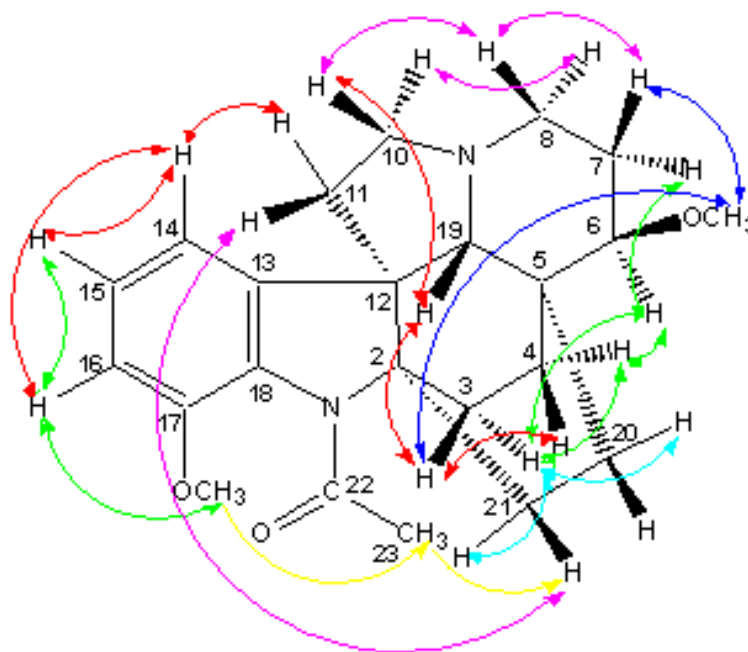
Observou-se no espectro que houve sinais de correlação espacial entre os hidrogênios em  $\delta_H$  3.31 (MeO-6),  $\delta_H$  2.97 (H-19) e  $\delta_H$  1.69 (H-3a), mostrando que eles estão no mesmo lado da molécula (Figura 15.43).



**FIGURA 15.42** – Espectro de RMN NOESY para a subfração **APM-5/3**, em MeOD, com sinais de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-10b e H-21b que interagem entre si. (Fonte: Autora).

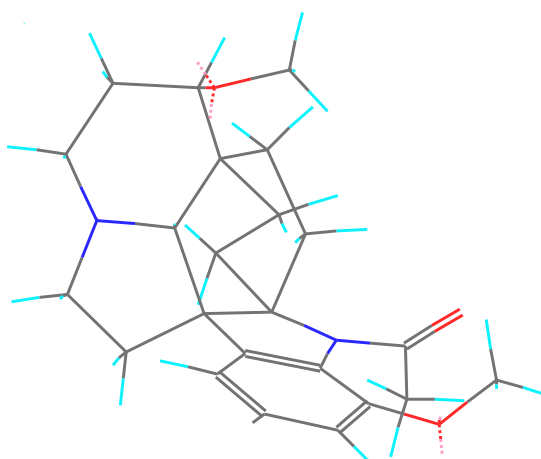
**TABELA 15.10** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY
<b>3</b>	(a) 1.69 (m)	H-3b; H-4	H-4; H-19; MeO-6
	(b) 1.35 (m)	H-3a; H-4	H-4; H-6; H-20a; H-21b
<b>4</b>	1.92 (dd, $J$ 6.3 Hz)	H-3a,b	H-3a,b; H-6; H-20b; H-19
<b>6</b>	2.92 (dd, $J$ 11.2 e 4.5 Hz)	H-7	H-3b; H-4; H-7; H-20a
<b>7</b>	1.67 (m)	H-6; H-8a,b	H-6; H-8a,b; H-20a,b; MeO-6
<b>8</b>	(a) 3.16 (dt, $J$ 12 e 5.0 Hz)	H-7; H-8b	H-7; H-10a
	(b) 3.03 (dt, $J$ 12 e 5.0 Hz)	H-7; H-8a	H-7; H-10b
<b>10</b>	(a) 3.30 (m)	H-10b; H-11a,b	H-8a; H-19
	(b) 3.06 (m)	H-10a; H-11a,b	H-8b; H-20a; H-21b
<b>11</b>	1.40 (m)	H-10a,b	H-14; H-21a,b
<b>14</b>	7.13 (dd, $J$ 8.0 e 2.5 Hz)	H-15; H-16	H-11; H-15; H-16
<b>15</b>	7.07 (t, $J$ 8.0 Hz)	H-14; H-16	H-14; H-16
<b>16</b>	6.90 (dd, $J$ 8.0 e 2.5 Hz)	H-14; H-15	H-14; H-15; MeO-17
<b>19</b>	2.97 (s)	-	H-3a; H-4; H-10a; MeO-6
<b>20</b>	(a) 1.81 (m)	H-20b; H-21a,b	H-3b; H-6; H-10b; H-21b
	(b) 1.73 (m)	H-20a; H-21a,b	H-4; H-7; H-21a
<b>21</b>	(a) 2.51 (m)	H-20a,b; H-21b	H-11; H-20b; H-23
	(b) 2.27 (m)	H-20a,b; H-21a	H-3b; H-10b; H-11; H-20a
<b>23</b>	2.08 (s)	-	H-21a; MeO-17
<b>MeO-6</b>	3.31 (s)	-	H-3a; H-7; H-19
<b>MeO-17</b>	3.83 (s)	-	H-16; H-23



**FIGURA 15.43** – Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. (Fonte: Autora).

As correlações de H-6 com H-3b, H-4, H-7 e H-20a, bem como a correlação de H-11 com H-21 indicam suas proximidades espaciais, o que poderia ser explicado se a estrutura para o composto apresentar uma conformação dobrada (Figura 15.44), facilitada pela rotação das ligações simples da molécula. Com isso, pode ser verificado a proximidade espacial entre H-21a e H-23 com 3.59 Å, bem como entre H-21a,b e H-11 com 1.87 Å e 2.93 Å (Tabela 15.11).



**FIGURA 15.44** – Estrutura para o composto em estudo com geometria otimizada. (Fonte: Autora).

No experimento de RMN NOESY, quanto mais intenso for o efeito overhauser nuclear menor a distância interatômica. Esta descrição foi comprovada

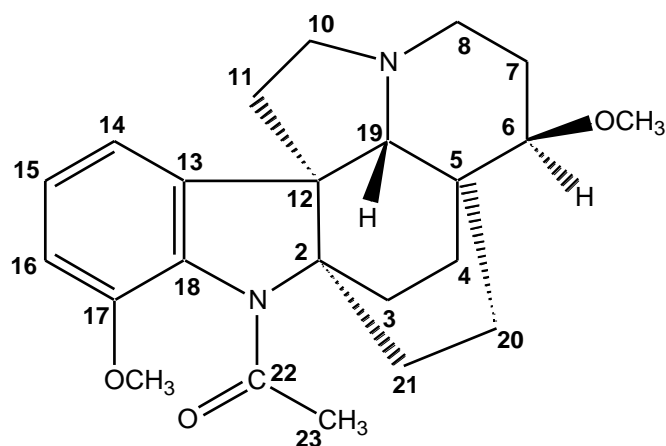
experimentalmente e os valores das distâncias comparados com os dados teóricos (Tabela. 15.11). Os sinais revelados no espectro NOESY foram integrados para cálculos de distâncias interatômicas  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , a partir da Equação 2.1, utilizando a distância fixa  $d = 2.5 \text{ \AA}$ , entre os hidrogênios vizinhos no anel benzênico como referência para a derivação das demais distâncias.

**TABELA 15.11** – Dados de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas. (Fonte: Autora).

$\delta_1$	$\delta_2$	Integral <sub>n.o.e.</sub>	d (Å) Experimental	d (Å) Teórica
1.69 (H-3a)	1.92 (H-4)	1.0000	2.50	2.45
1.69 (H-3a)	2.97 (H-19)	0.0160	4.98	5.08
1.69 (H-3a)	3.31 (MeO-6)	0.0402	4.27	4.44
1.35 (H-3b)	1.92 (H-4)	0.0803	3.80	3.95
1.35 (H-3b)	2.92 (H-6)	0.0160	4.98	5.04
1.35 (H-3b)	1.81 (H-20a)	0.2459	3.16	3.26
1.35 (H-3b)	2.27(H-21b)	1.7379	2.28	2.42
1.92 (H-4)	2.92 (H-6)	0.6131	2.71	2.54
1.92 (H-4)	1.73 (H-20b)	0.0658	3.93	3.43
1.92 (H-4)	2.97 (H-19)	0.0441	4.21	4.51
2.92 (H-6)	1.67 (H-7)	0.6521	2.68	2.41
2.92 (H-6)	1.81 (H-20a)	0.1714	3.35	3.48
1.67 (H-7)	3.16 (H-8a)	0.9356	2.53	2.42
1.67 (H-7)	3.03 (H-8b)	0.2709	3.11	3.08
1.67 (H-7)	1.81 (H-20a)	0.0396	4.30	4.74
1.67 (H-7)	1.73 (H-20b)	0.0290	4.51	4.80
1.67 (H-7)	3.31 (MeO-6)	0.1110	3.60	3.80
3.16 (H-8a)	3.30 (H-10a)	0.6741	2.67	2.51
3.03 (H-8b)	3.06 (H-10b)	0.6131	2.71	2.79
3.30 (H-10a)	2.97 (H-19)	0.8934	2.55	2.45

3.06 (H-10b)	1.81 (H-20a)	0.0396	4.30	4.80
3.06 (H-10b)	2.27 (H-21b)	1.7379	2.28	2.27
1.40 (H-11)	7.13 (H-14)	1.0000	2.50	2.52
1.40 (H-11)	2.51 (H-21a)	5.7093	1.87	2.02
1.40 (H-11)	2.27 (H-21b)	0.3816	2.93	2.95
7.13 (H-14)	7.07 (H-15)	1.0000	2.50	2.49
7.13 (H-14)	6.90 (H-16)	0.0396	4.30	4.31
7.07 (H-15)	6.90 (H-16)	1.0000	2.50	2.47
6.90 (H-16)	3.83 (MeO-17)	0.0726	3.87	3.76
2.97 (H-19)	3.31 (MeO-6)	0.1132	3.59	3.35
1.81 (H-20a)	2.27 (H-21b)	0.0803	3.80	3.61
1.73 (H-20b)	2.51 (H-21a)	0.0803	3.80	3.65
2.51 (H-21a)	2.08 (H-23)	0.1139	3.59	3.50
2.51 (H-21a)	3.31 (MeO-6)	0.8934	2.55	2.45
2.08 (H-23)	3.83 (MeO-17)	0.0396	4.30	4.53

Os dados espectrais de RMN permitiram o assinalamento inequívoco da estrutura de um alcaloide com núcleo indólico (Figura 15.45) do tipo Aspidosfractina, denominado Pirifolina (composto B da figura 7.2) <sup>[43, 74,75]</sup>, com fórmula molecular  $C_{23}H_{30}N_2O_3$ , isolado anteriormente de extratos clorofórmicos de *Aspidosperma olivaceum* <sup>[97]</sup>.



**FIGURA 15.45** – Alcaloide indólico Pirifolina. (Fonte: Autora).



### 15.2.2. Alcaloide presente na subfração APM-5/4

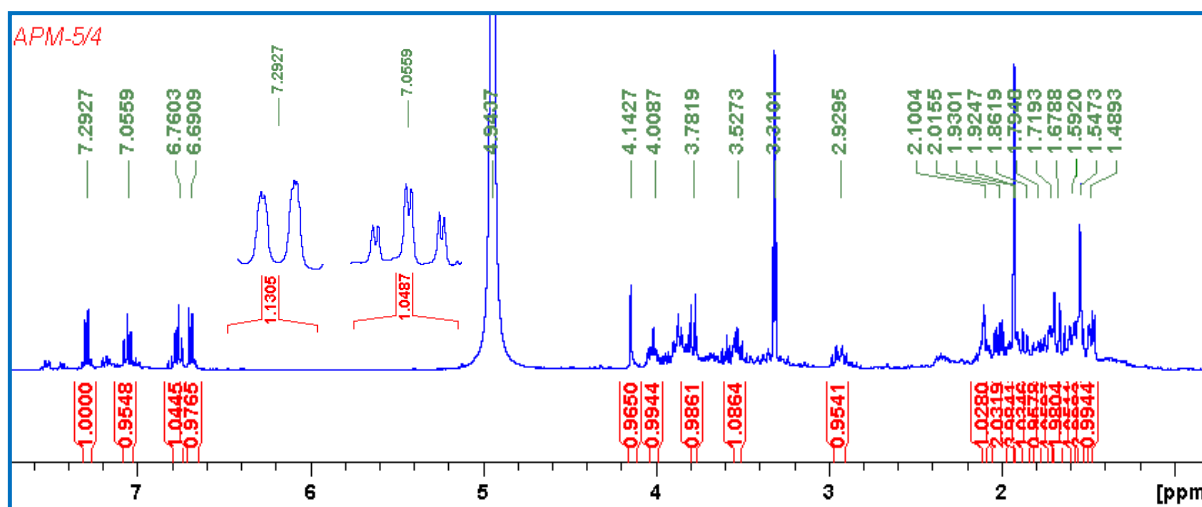
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da subfração APM-5/4 (Figura 13.46 e Tabela 15.13) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de hidrogênios aromáticos, grupos metínicos, metilênicos e metílicos. A integração dos sinais no espectro indicou a presença de vinte e seis átomos de hidrogênios. O espectro foi calibrado com base nos deslocamentos químicos dos sinais do solvente MeOD.

A análise do espectro indicou a presença de quatro sinais característicos de átomos de hidrogênios aromáticos acoplados entre si. Dois sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e  $\delta_{\text{H}}$  6.69 (dt,  $^3J_{\text{H}}$  7,8 Hz,  $^4J_{\text{H}}$  1,5 Hz e  $^5J_{\text{H}}$  0.8 Hz), apresentam feição de duplo-tripletto devido a coalescência de sinais duplo-duplo-dupletos (ddd), originados do acoplamento *orto* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6.69 e  $\delta_{\text{H}}$  6.76, e entre  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e  $\delta_{\text{H}}$  7.05 ( $^3J_{\text{H}}$  7,8 Hz); do acoplamento *meta* entre  $\delta_{\text{H}}$  6.69 e  $\delta_{\text{H}}$  7.05, e entre  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e  $\delta_{\text{H}}$  6.76 ( $^4J_{\text{H}}$  1,5 Hz); e do acoplamento *para* entre  $\delta_{\text{H}}$  7.29 e  $\delta_{\text{H}}$  6.69 ( $^5J_{\text{H}}$  0.8 Hz). Os outros dois sinais são triplos-dupletos, com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  7.05 e  $\delta_{\text{H}}$  6.76 (td,  $^3J_{\text{H}}$  7,8 Hz e  $^4J_{\text{H}}$  1,5 Hz), originados do acoplamento *orto* entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6.76 e os hidrogênios em 6.69 e  $\delta_{\text{H}}$  7.05, e entre  $\delta_{\text{H}}$  7.05 com  $\delta_{\text{H}}$  6.76 e  $\delta_{\text{H}}$  7.29 ( $^3J_{\text{H}}$  7,8 Hz); do acoplamento *meta* entre  $\delta_{\text{H}}$  6.76 e 7.29, e entre  $\delta_{\text{H}}$  7.05 e  $\delta_{\text{H}}$  6.69 ( $^4J_{\text{H}}$  1,5 Hz), característicos de núcleo indólico, indicando que o anel encontra-se livre de substituintes.

O espectro revelou a presença de dois simpletos, cada um integrado para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1.93 e  $\delta_{\text{H}}$  1.54, característicos de metilas. Apresentou também, um tripletto integrado para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4.00 (t,  $J$  12 Hz), este acoplamento (t,  $J$  12 Hz).

Em campo baixo foram observados um simpleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  4.14, dois multipletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  3.77 e  $\delta_{\text{H}}$  3.52, e um duplo-tripletto em  $\delta_{\text{H}}$  2.01 ( $J$  12 Hz devido a um acoplamento geminal, e  $J$  6.0 Hz devido a um acoplamento vicinal, constantes reveladas no experimento J-resolvido) que podem ser justificados, por exemplo, devido a proximidade com um par de elétrons não compartilhados.

As atribuições dos deslocamentos químicos para os hidrogênios metilênicos restantes da cadeia alifática, foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (Tabela 15.13) <sup>[96]</sup>.



**FIGURA 15.46** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com intensificação (32x) dos sinais duplo-triplete e triplo-duplete de hidrogênios aromáticos. (Fonte: Autora).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da subfração APM-5/4 (Figura 15.47 e Tabela 15.12) apresentou um total de vinte sinais e foi calibrado com base no deslocamento químico do sinal do solvente MeOD.

A análise conjunta dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 (Figura 15.48) e DEPT 90 (Figura 15.49) permitiu a observação de sinais com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  123.70,  $\delta_{\text{C}}$  129.53,  $\delta_{\text{C}}$  121.04 e  $\delta_{\text{C}}$  112.54, característicos de carbonos aromáticos, e sinais em  $\delta_{\text{C}}$  151.86,  $\delta_{\text{C}}$  136.23 e  $\delta_{\text{C}}$  58.19 relativos a carbonos não hidrogenados, provavelmente do núcleo indólico. O deslocamento químico do carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112.54 pode ser justificado pelo efeito mesomérico do nitrogênio do núcleo indólico, tornando esse carbono mais blindado do que o esperado.

O espectro apresentou também sinais em  $\delta_{\text{C}}$  18.42 e  $\delta_{\text{C}}$  24.11, condizentes com grupos metilas; um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  180.16, relativo a um carbono carbonílico, característico de uma função amida; e ainda, dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  79.39 e  $\delta_{\text{C}}$  71.33, relativos a carbonos de grupos metínicos.

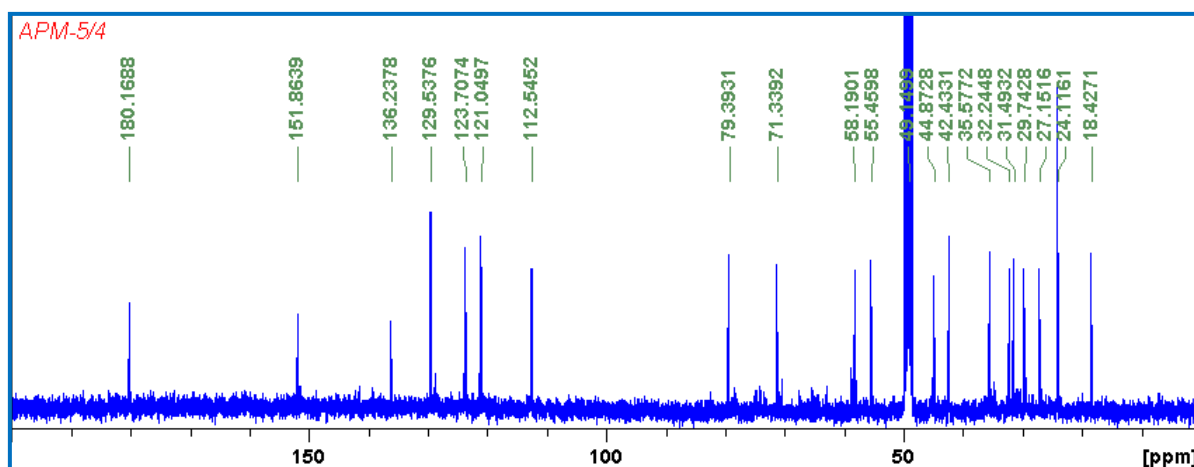


FIGURA 15.47 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a subfração **APM-5/4**, em MeOD. (Fonte: Autora).

Na análise do espectro DEPT 135 (Figura 15.48), evidenciaram-se seis sinais para carbonos metínicos, sete sinais para carbonos metilênicos, e dois para carbonos metílicos, com deslocamentos químicos listados na Tabela 15.12.

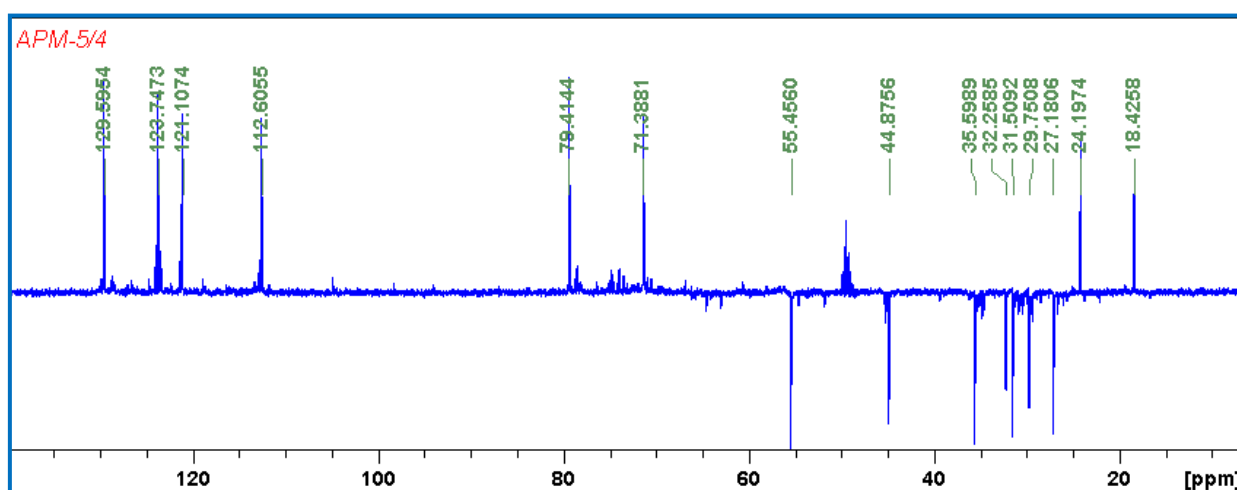


FIGURA 15.48 – Espectro de RMN DEPT 135 para a subfração **APM-5/4**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro DEPT 90 (Fig. 15.49) revelou a presença de apenas seis sinais referentes a carbonos metínicos, estes foram descritos anteriormente, e estão apresentados na Tabela 15.12.

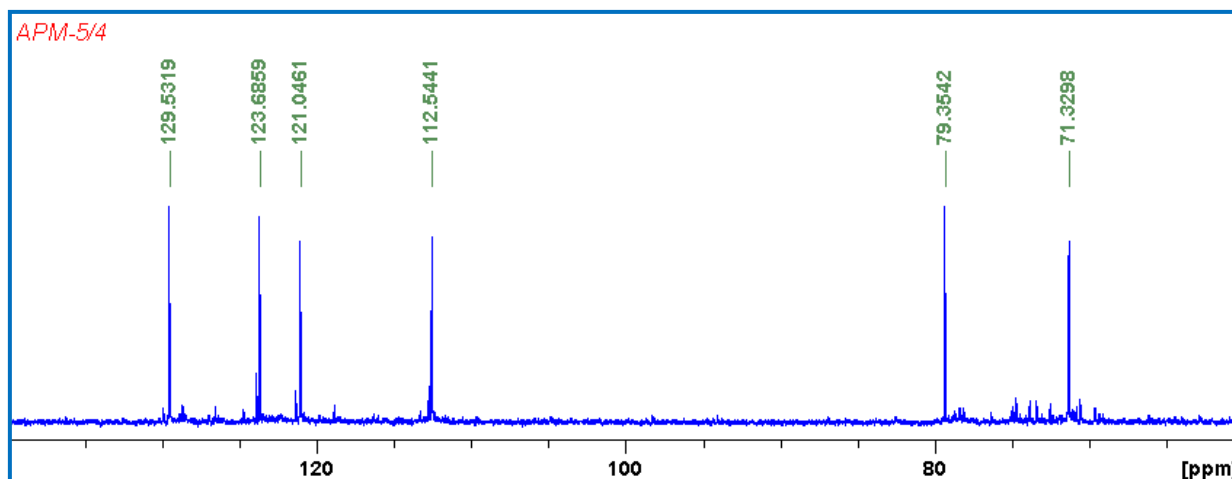
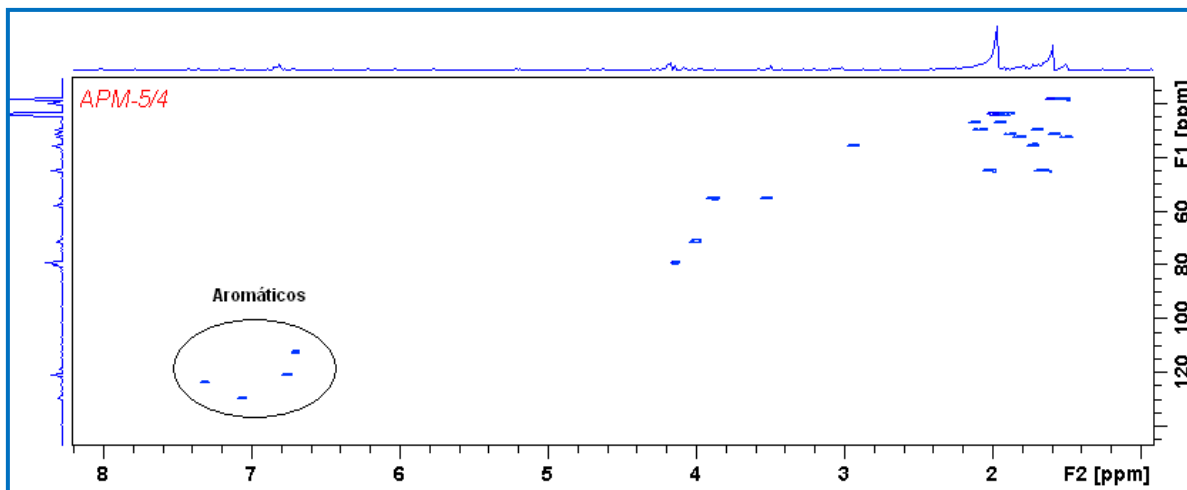


FIGURA 15.49 – Espectro de RMN DEPT 90 para a subfração **APM-5/4**, em MeOD. (Fonte: Autora).

O espectro HSQC (Fig. 23.50) permitiu conectar de forma inequívoca cada hidrogênio ao seu respectivo carbono.

Observaram-se no espectro HSQC as correlações entre os átomos com os seguintes deslocamentos químicos: para grupos metínicos – o carbono em  $\delta_C$  129.53 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.05,  $\delta_C$  123.70 e  $\delta_H$  7.29,  $\delta_C$  121.04 e  $\delta_H$  6.76,  $\delta_C$  112.54 e  $\delta_H$  6.69 (aromáticos),  $\delta_C$  79.39 e  $\delta_H$  4.14, e entre  $\delta_C$  71.33 e  $\delta_H$  4.00; para grupos metilênicos – o carbono em  $\delta_C$  55.45 e os hidrogênios em  $\delta_H$  3.77 e  $\delta_H$  3.52, o carbono em  $\delta_C$  44.87 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.01, o carbono em  $\delta_C$  35.57 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.92 e  $\delta_H$  1.71, o carbono em  $\delta_C$  32.24 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.79 e  $\delta_H$  1.48, o carbono em  $\delta_C$  31.49 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.86 e  $\delta_H$  1.59,  $\delta_C$  29.74 e  $\delta_H$  1.67, e entre o carbono em  $\delta_C$  27.15 e os hidrogênios em  $\delta_H$  2.10 e  $\delta_H$  1.92; para grupos metílicos – o carbono em  $\delta_C$  24.11 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.93 e entre o carbono em  $\delta_C$  18.42 e os hidrogênios em  $\delta_H$  1.54 (Tabela 15.12).



**FIGURA 15.50** – Espectro de RMN HSQC para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com os sinais de correlação direta  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para os aromáticos em evidência. (Fonte: Autora).

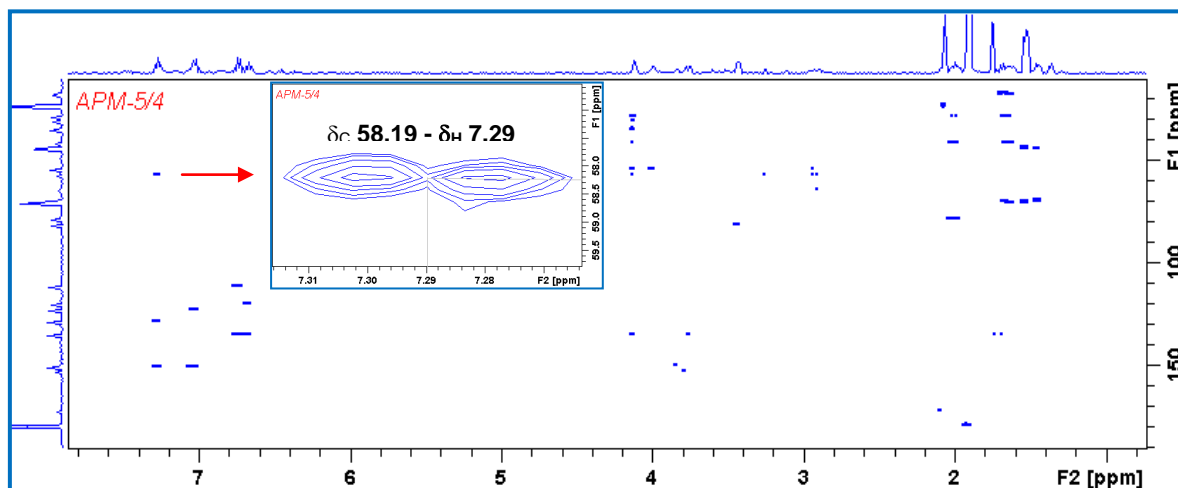
Uma vez definidas as correlações heteronucleares diretas (visualizadas no espectro HSQC), foi possível localizar através do experimento de RMN HMBC as posições relativas para os carbonos, e montar uma proposta de esqueleto para o composto em estudo.

A análise do espectro HMBC (Figura 15.51 e Tabela 15.12) permitiu estabelecer as seguintes correlações à longa distância entre os átomos de carbonos e hidrogênios aromáticos do núcleo indólico: entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  123.70 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7.05 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6.76 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), e entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  129.53 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6.76,  $\delta_{\text{H}}$  7.29 ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6.69 ( $^3J_{\text{CH}}$ ), confirmando que o anel não apresenta grupos substituintes.

Observou-se correlações à longa distância entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  58.19 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4.00,  $\delta_{\text{H}}$  2.92,  $\delta_{\text{H}}$  1.71 e  $\delta_{\text{H}}$  4.14 através de  $^2J_{\text{CH}}$ , os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1.67,  $\delta_{\text{H}}$  3.77,  $\delta_{\text{H}}$  3.52 e  $\delta_{\text{H}}$  6.69 através de  $^3J_{\text{CH}}$ , e com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7.29 através de  $^4J_{\text{CH}}$ . Estas correlações fizeram a conexão do núcleo indólico com o restante da molécula. Observou-se também, as correlações entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  42.43 e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1.86,  $\delta_{\text{H}}$  1.59,  $\delta_{\text{H}}$  2.10,  $\delta_{\text{H}}$  1.92  $\delta_{\text{H}}$  4.14 e  $\delta_{\text{H}}$  1.54 através de  $^2J_{\text{CH}}$ , e com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1.67,  $\delta_{\text{H}}$  1.79 e  $\delta_{\text{H}}$  1.48 através de  $^3J_{\text{CH}}$ . A interação entre o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  42.43 e o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  1.54 confirma a presença do grupo metila ligado a este carbono  $sp^3$ .

A análise do espectro permitiu ainda confirmar as correlações entre o carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  180.16 e os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1.93 através de  $^2J_{\text{CH}}$ , e

com o hidrogênio em  $\delta_H$  4.00 através de  $^3J_{CH}$  (Figura 15.52). Outras correlações à longa distância dos demais átomos de carbonos encontram-se sumarizadas na Tabela 15.12.

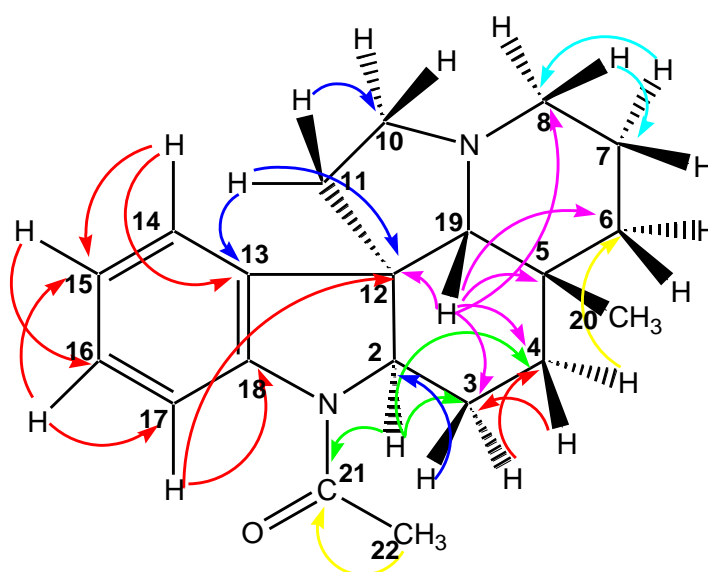


**FIGURA 15.51** – Espectro de RMN HMBC para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com o sinal de correlação à longa distância entre o átomo de carbono em  $\delta_C$  58.19 e o hidrogênio em  $\delta_H$  7.29 ( $^4J_{CH}$ ), em expansão. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.12** – Dados de RMN  $^1H$  (400 MHz) e  $^{13}C$  (100 MHz) (incluindo correlações  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC e  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

Átomo	HSQC		HMBC		
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{C,H}$	$^3J_{C,H}$	$^4J_{C,H}$
2	71.33	4.00	H-3	-	-
3	29.74	1.67	H-2; H-4a,b	-	H-19
4	31.49	(a) 1.86	H-3	H-2; H-19	-
		(b) 1.59			
5	42.43	-	H-4a,b; H-6a,b; H-19; H-20	H-3; H-7a,b	H-8
		(a) 2.10			
6	27.15	(b) 1.92	H-7a,b	H-4a,b; H-8; H-19	-
		(a) 1.79			
7	32.24	(b) 1.48	H-6a,b; H-8	-	H-4a,b

8	44.87	2.01	H-7a,b	H-6a,b; H-10a,b	-
		(a) 3.77			
10	55.45	(b) 3.52	H-11a,b	H-8; H-19	H-2
		(a) 2.92			
11	35.57	(b) 1.71	H-10a,b	H-2; H-19	-
12	58.19	-	H-2; H-11a,b; H-19	H-3; H-10a,b; H-14	H-17
13	136.23	-	H-14	H-11a,b; H-15; H-19	H-3
14	112.54	6.69	H-15	-	-
15	121.04	6.76	H-14; H-16	-	-
16	129.53	7.05	H-15; H-17	-	-
17	123.70	7.29	H-16	H-15	-
18	151.86	-	H-17	H-16	-
19	79.39	4.14	-	H-4a,b; H-6a,b; H-8	-
20	18.42	1.54	-	H-4a,b; H-6a,b; H-19	H-3
21	180.16	-	H-22	H-2	-
22	24.11	1.93	-	-	H-2



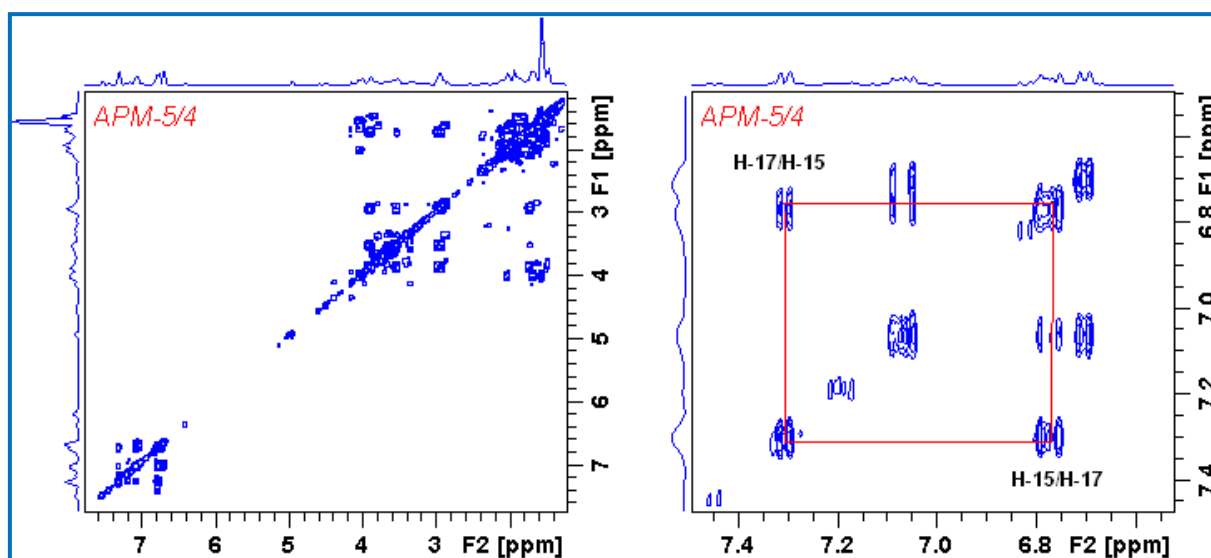
**FIGURA 15.52** – Correlações importantes  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro HMBC (via  $^2J$ ,  $^3J$  e  $^4J$ ) para o composto em estudo. (Fonte: Autora).

O espectro COSY (Figura 15.53 e Tabela 15.13) apresentou sinais de acoplamento spin-spin homonuclear entre os átomos de hidrogênios.

O sinal de acoplamento entre H-2 em  $\delta_H$  4.00 e H-3 em  $\delta_H$  1.67, ocorreu através de  $^3J_{HH}$  e foi revelado pelo experimento de RMN COSY. Observou-se também, o acoplamento spin-spin entre os hidrogênios H-7a,b em  $\delta_H$  1.79 e  $\delta_H$  1.48 e os hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2.01 (2H-8), e com os hidrogênios em  $\delta_H$  2.10 e  $\delta_H$  1.92 (H-6a,b), através de  $^3J_{HH}$ .

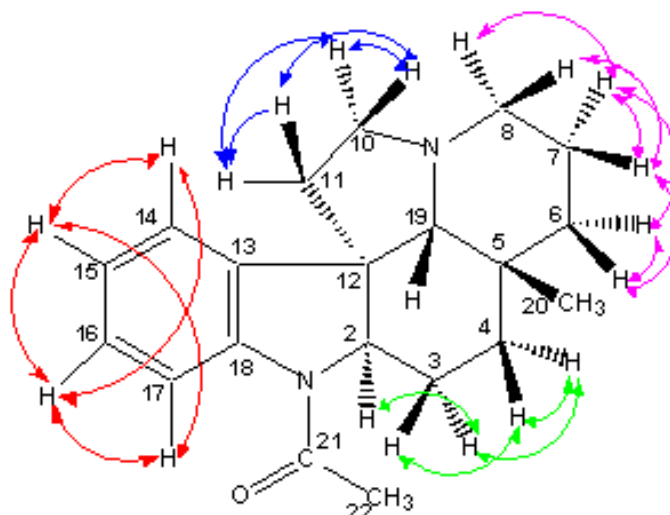
O espectro apresentou ainda sinais de acoplamento entre os hidrogênios metilênicos H-3 e H-4, através de  $^3J_{HH}$ , e revelou sinais de acoplamentos entre todos os hidrogênios aromáticos (Figura 15.54).

Outros acoplamentos spin-spin homonucleares para os demais átomos de hidrogênios encontram-se dispostos na Tabela 15.13.



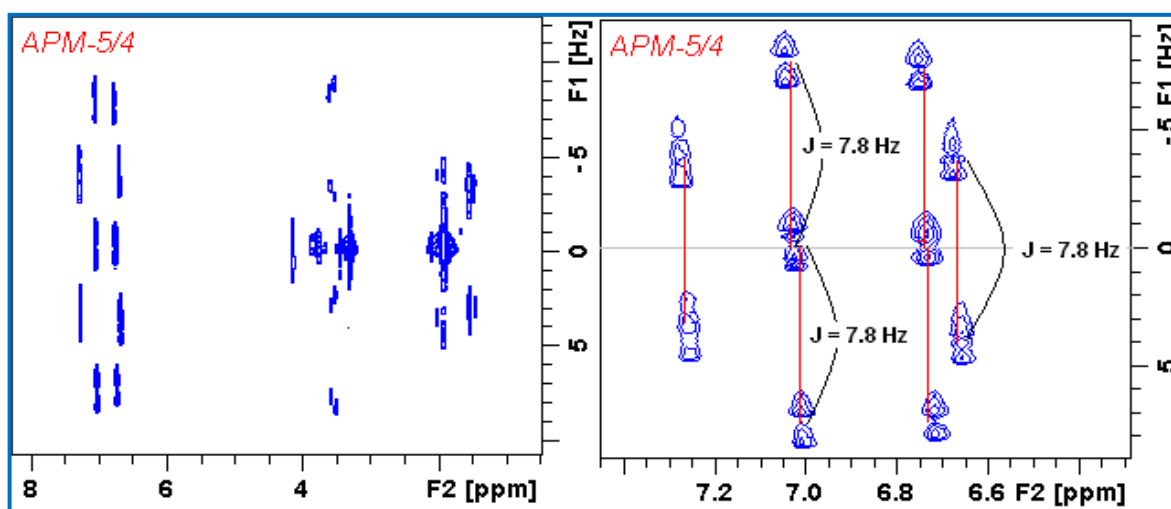
**FIGURA 15.53** – Espectro de RMN COSY para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com sinais de correlação  $^1H$ - $^1H$  fora da diagonal, e sinais em expansão para os hidrogênios aromáticos H-17 e H-15 que acoplam entre si. (Fonte: Autora).





**FIGURA 15.54** – Estrutura para o composto em estudo e acoplamentos spin-spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. (Fonte: Autora).

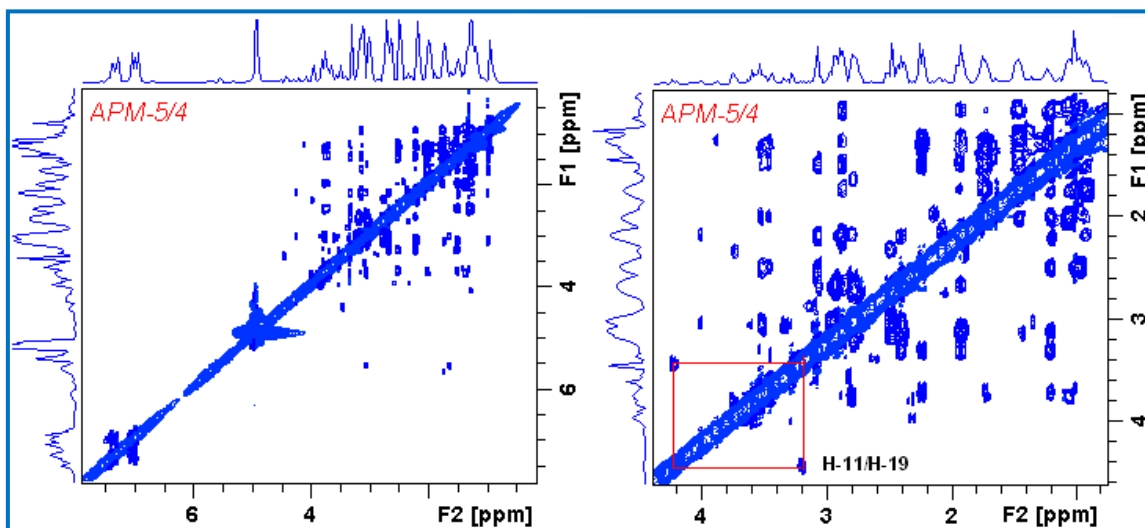
O espectro de RMN J-resolvido (Figura 15.55) evidenciou os valores das constantes de acoplamento dos sinais relativos aos hidrogênios da molécula, assim como, a multiplicidade destes sinais (Tabela 15.13).



**FIGURA 15.55** – Espectro de RMN J-resolvido para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com os sinais de hidrogênios aromáticos evidenciados, e em destaque as constantes de acoplamento. (Fonte: Autora).

O espectro NOESY (Figura 15.56 e Tabela 15.13) apresentou sinais referentes à interações espaciais entre os átomos de hidrogênios.

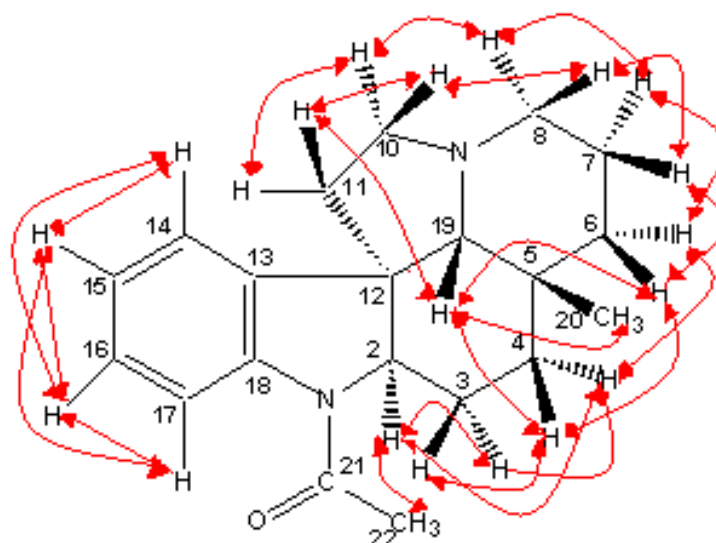
Observou-se no espectro o sinal de correlação espacial entre os hidrogênios em  $\delta_H$  1.54 (H-20),  $\delta_H$  4.14 (H-19) e  $\delta_H$  1.59 (H-4b), indicando que eles encontram-se do mesmo lado na molécula. (Figura 15.57).



**FIGURA 15.56** – Espectro de RMN NOESY para a subfração **APM-5/4**, em MeOD, com sinais de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  fora da diagonal, e sinais em destaque para os hidrogênios H-11 e H-17 que interagem entre si. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.13** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) (incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) para o composto em estudo, em MeOD. (Fonte: Autora).

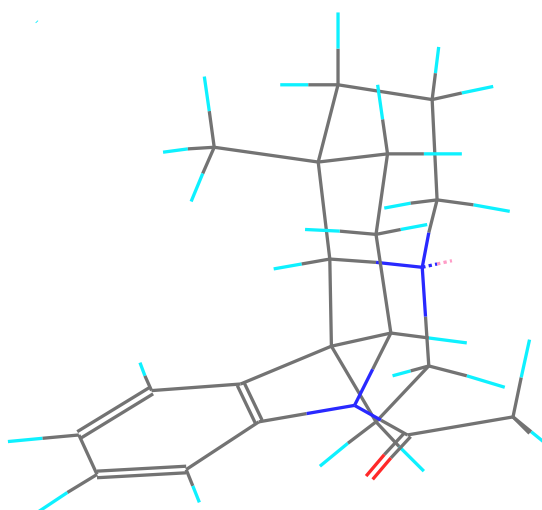
Átomo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY
2	4.00 (t, $J$ 12 Hz)	H-3	H-3; H-4a; H-11b; H-22
3	1.67 (m)	H-2; H-4a,b	H-2; H-4a,b
4	(a) 1.86 (dt, $J$ 11 e 5.5 Hz)	H-3, H-4b	H-2; H-3; H-6b
	(b) 1.59 (dt, $J$ 11 e 5.5 Hz)	H-3; H-4a	H-3, H-6a; H-19; H-20
6	(a) 2.10 (m)	H-6b; H-7a,b	H-4b; H-7a; H-8; H-19; H-20
	(b) 1.92 (m)	H-6a; H-7a,b	H-4a; H-7b; H-8
7	(a) 1.79 (m)	H-6a,b; H-7b; H-8	H-6a; H-8
	(b) 1.48 (m)	H-6a,b; H-7a; H-8	H-6b; H-8
8	2.01 (dt, $J$ 12 e 6 Hz)	H-7a,b	H-4a,b; H-7a,b; H-10a,b
10	(a) 3.77 (m)	H-10b; H-11a,b	H-8; H-11b
	(b) 3.52 (m)	H-10a; H-11a,b	H-8; H-11 <sup>a</sup>
11	(a) 2.92 (m)	H-11b; H-10a,b	H-10b; H-19
	(b) 1.71 (m)	H-11a; H-10a,b	H-2; H-10 <sup>a</sup>
14	6.69 (dt, $J$ 7.8, 1.5 e 0.8 Hz)	H-15; H-16	H-15; H-16
15	6.76 (td, $J$ 7.8 e 1.5 Hz)	H-14; H-16; H-17	H-14; H-16; H-17
16	7.05 (td, $J$ 7.8 e 1.5 Hz)	H-14; H-15; H-17	H-14; H-15; H-17
17	7.29 (dt, $J$ 7.8, 1.5 e 0.8 Hz)	H-15; H-16	H-15; H-16
19	4.14 (s)	-	H-4b; H-6a; H-11a; H-20
20	1.54 (s)	-	H-4b; H-6a; H-19
22	1.93 (s)	-	H-2



**FIGURA 15.57** – Estrutura para o composto em estudo e correlações espaciais principais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. (Fonte: Autora).

As correlações espaciais de H-2 com H-3, H-4a, H-11b e H-22, bem como a correlação de H-22 com H-2 indicam suas proximidades espaciais.

As ligações simples desta molécula podem rotacionar, com isso, pode ser verificada uma grande proximidade espacial de 2.28 Å entre H-2 e H-11b, bem como de 2.93 Å entre H-19 e H-11a. Apresentados esses valores experimentais de distâncias interatômicas dos hidrogênios (Tabela 15.14) e em comparação com os dados teóricos, foi proposta a estrutura para o composto em estudo (Figura 15.58).



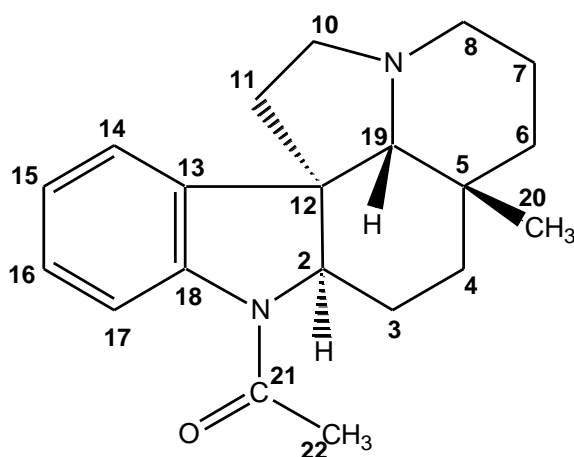
**FIGURA 15.58** – Estrutura para o composto em estudo com geometria otimizada. (Fonte: Autora).

**TABELA 15.14** – Dados de correlação espacial  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do espectro de RMN NOESY para o composto em estudo, integrais, valores experimentais de distâncias interatômicas e dados teóricos de distâncias interatômicas. (Fonte: Autora).

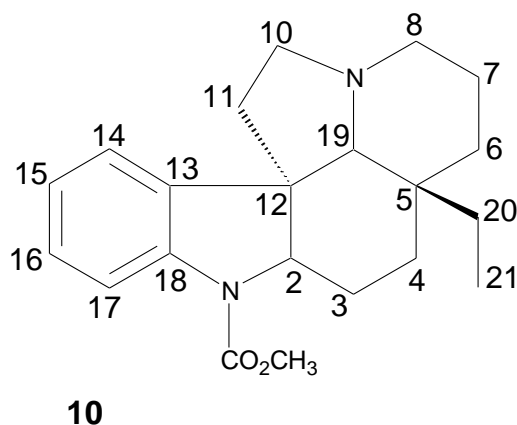
$\delta_1$	$\delta_2$	Integral <sub>n.o.e.</sub>	d (Å) Experimental	d (Å) Teórica
4.00 (H-2)	1.67 (H-3)	1.0000	2.50	2.45
4.00 (H-2)	1.86 (H-4a)	0.6131	2.72	2.70
4.00 (H-2)	1.71 (H-11b)	1.7379	2.28	2.38
4.00 (H-2)	1.93 (H-22)	0.8934	2.55	2.54
1.67 (H-3)	1.86 (H-4a)	1.0000	2.50	2.49
1.67 (H-3)	1.59 (H-4b)	0.2459	3.16	3.07
1.86 (H-4a)	1.92 (H-6b)	1.0000	2.50	2.55
1.59 (H-4b)	2.10 (H-6a)	0.6131	2.71	3.01
1.59 (H-4b)	4.14 (H-19)	0.0658	3.93	3.85
1.59 (H-4b)	1.54 (H-20)	0.0939	3.71	3.78
2.10 (H-6a)	1.79 (H-7a)	0.6521	2.68	2.48
2.10 (H-6a)	2.01 (H-8)	0.0658	3.93	3.85
2.10 (H-6a)	4.14 (H-19)	0.0658	3.93	3.82
2.10 (H-6a)	1.54 (H-20)	0.2709	3.11	3.15
1.92 (H-6b)	1.48 (H-7b)	0.9356	2.53	2.43
1.92 (H-6b)	2.01 (H-8)	0.6741	2.67	2.66
1.79 (H-7a)	2.01 (H-8)	1.0000	2.50	2.46
1.48 (H-7b)	2.01 (H-8)	0.6131	2.71	2.54
2.01 (H-8)	3.77 (H-10a)	0.6741	2.67	2.41
2.01 (H-8)	3.52 (H-10b)	0.8934	2.55	2.66
3.77 (H-10a)	1.71 (H-11b)	1.7379	2.28	2.28
3.52 (H-10b)	2.92 (H-11a)	1.7379	2.28	2.28
2.92 (H-11a)	4.14 (H-19)	0.3816	2.93	2.88
6.69 (H-14)	6.76 (H-15)	1.0000	2.50	2.50
6.69 (H-14)	7.05 (H-16)	0.0396	4.30	4.33

6.76 (H-15)	7.05 (H-16)	1.0000	2.50	2.49
6.76 (H-15)	7.29 (H-17)	0.0396	4.30	4.32
7.05 (H-16)	7.29 (H-17)	1.0000	2.50	2.49
4.14 (H-19)	1.54 (H-20)	0.2207	3.22	3.04

Os dados espectrais de RMN permitiram o assinalamento inequívoco para a estrutura de um alcaloide com núcleo indólico (Figura 15.59), os quais foram comparados com os dados descritos na literatura <sup>[85]</sup> para o alcaloide indólico Desmetoxiaspidospermina (composto 10 do Quadro 9.1), de esqueleto do tipo Aspidospermina <sup>[43]</sup>, isolado da casca do caule de *A. pyriformium* <sup>[85]</sup>.



**FIGURA 15.59** – Estrutura para o alcaloide indólico estudado. (Fonte: Autora).



A diferença estrutural entre o composto identificado neste trabalho e o composto 10 está nos substituintes do carbono C-5 e N-1 (do núcleo indólico), enquanto o composto 10 reportado na literatura apresenta um grupo etila ligado ao carbono C-5 e um grupo  $-\text{COOCH}_3$  (carbometoxi) ligado ao N-1, o composto estudado neste trabalho apresenta um grupo metila ligado ao carbono C-5 e um grupo  $-\text{COCH}_3$  ligado ao N-1, justificando os valores para os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  descritos e comparados na Tabela 15.15.

Comprovou-se a partir dessas evidências, a proposta estrutural para um alcaloide indólico inédito, com esqueleto do tipo Aspidospermina e de fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ .

**TABELA 15.15** – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  em ppm) para o alcaloide indólico estudado, em MeOD, em comparação com dados da literatura. (Fonte: Autora).

Átomo	Alcaloide estudado em MeOD	Composto 10 em $\text{CDCl}_3$
2	71.33	69.5
3	29.74	24.9
4	31.49	23.2
5	42.43	35.6
6	27.15	34.3
7	32.24	21.7
8	44.87	53.7
10	55.45	52.5
11	35.57	38.1
12	58.19	53.7
13	136.23	110.9
14	112.54	125.9
15	121.04	115.3
16	129.53	129.2
17	123.70	143.6
18	151.86	149.2
19	79.39	71.1
20	18.42	30.2
21	180.16	7.0
22	24.11	171.3
MeO-22	-	55.5



## CONCLUSÃO

Os resultados dos testes antimaláricos para os extratos e frações das espécies trabalhadas, mostraram que as frações ANCC-5 e APM-5 (fração alcaloídica em clorofórmio) apresentaram melhor atividade antimalárica.

Os experimentos de RMN realizados permitiram-nos fazer a atribuição inequívoca para todos os hidrogênios e carbonos dos alcaloides isolados. Os estudos por RMN das frações oriundas do extrato etanólico da casca do caule de *Aspidosperma nitidum* possibilitou a elucidação estrutural do alcaloide indólico Braznitidumina e de um alcaloide indólico inédito do tipo Corinanteol. Já os estudos das frações oriundas do extrato etanólico da madeira de *Aspidosperma pyrifolium* permitiram a elucidação estrutural do alcaloide indólico Pirifolina e de um alcaloide indólico inédito do tipo Aspidospermina.

Os valores obtidos a partir dos cálculos de otimização de geometria realizados para as estruturas dos alcaloides foram comparados e estão de acordo com os dados de n.O.e obtidos a partir do experimento de RMN NOESY, confirmando portanto as propostas estruturais.

## PERSPECTIVAS

Os desdobramentos futuros do presente trabalho são de verificar a real influência dos alcaloides indólicos isolados, na ação antimalárica descrita para as frações ANCC-5 e APM-5, bem como continuar com os estudos de elucidação estrutural dos compostos presentes nas outras subfrações obtidas das frações ANCC-5 e APM-5.

## REFERÊNCIAS

1. SILVERSTEIN, ROBERT M.; FRANCIS, X. WEBSTER; DAVID J. KIEMLE; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, (2007).
2. ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.; **The simple  $\beta$ -carboline alkaloids**. *Phytochemistry*, 1573-1582, 19, (1980).
3. BRANDÃO, M. G. L., GRANDIT, S. M., ROCHA, E. M. M., SAWYER, D. R., KRETTLI, A. U. **Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon**. *Journal of Ethnopharmacology*, 36:175-182. (1992).
4. CORREA. M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF, v.5, 687p, (1978).
5. AUREMN, CURSO UFAL – **MÓDULO I “Ressonância Magnética Nuclear”**, jan. (2011).
6. BALES J. R, HIGHAM D. P, HOWE I, NICHOLSON J. K, SADLER P. J. **Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine**. *Clin Chem*; 30(3):426-32. 1984.
7. JEENER, J. *Ampère International Summer School*, Basko Polje (proposal), 1971.
8. JEENER, J.; MEIER, B. H. BACHMANM, P.; ERNST, R. R.; *Journal of Chemical Physics*, 71, 4546-4553, 1979.
9. BENTO, E. S.; CALIXTO, J. B.; HAWKES, G. E.; PIZZOLATTI, M. G.; SANT'ANA, A. E. G.; YUNES, R. A.; **The structure of velutinol A is (15R,16R,20S)-14,16:15,20:16,21-triepoxy-15,16-seco-14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -pregn-5-ene 3 $\beta$ ,15-dioul. A combined quantitative Overhauser effect and molecular modelling study**. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1359-1366, (1996).
10. BODENHAUSER, G.; RUBEN, D. J. **Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy**. *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-189, 1980.

11. BAX, A.; SUMMERS, M. **Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR.** *Journal of American Chemical Society*, 108, 2093-2094, 1986.
12. KAYSER, C. R. **RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos.** *Química Nova*, 23, 2, 231-236, 2000.
13. PARELLA, T.; SÁNCHEZ-FERRANDO, F.; VIRGILI, A. **Improved sensitivity in gradient-based 1D and 2D multiplicity-edited HSQC experiments.** *Journal of Magnetic Resonance*, 126, 274-277, 1997.
14. SCKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, TIMOTHY A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5.ed. Porto Alegre: Bookman, (2002).
15. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. Vol. 1. 8ª Ed., Rio de Janeiro: LTC, (2005).
16. EDILBERTO R. S.; Curso: **Fundamentos Básicos da RMN e Seqüências de Pulsos**. 28ª RASBQ – (2005).
17. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.: **Introdução à Espectroscopia**, 4.ed. São Paulo: Cengage Learning, (2010).
18. LUDWIGA, C.; VIANT, M. R.; **Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: Review of a Key Methodology in the Metabolomics Toolbox**, *Phytochem. Anal.*, **21**, 22–32, (2010).
19. BRAGA, E. M. **Plasmodium – Malária**. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 143, 2005.
20. WHO - World Health Organization. **World Malaria Report 2015** (Geneva, Switzerland). Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/index.html>>. Acessado em: 10/03/2016.

21. MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. *Malária 2014*. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar>>. MINISTERIO DA SAUDE. *Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2014*. Brasília, 2014.
22. WHITE, N. J. **Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite**. *Clin Infect Dis*. v.15, n. 46, p.172-3. 2008.
23. DANESHVAR, C.; DAVIS, T. M.; COX-SINGH, J.; RAFA'EE, M. Z.; ZAKARIA S. K.; DIVIS, P. C.; SINGH, B. **Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection**. *Clin Infect Dis*. v.15, n.49(6), p.852-60. 2009.
24. CASTEEL, D. A. Antimalarial Agents. In: WOLFF, M. E. **Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery**. 5 ed. Willey-Interscience Publication. v. 5, p. 4-90, 1997.
25. FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, R.; NWAKA, S. **Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening**. *Nature Rev Drug Discovery*. v. 3, p.509–520, 2004.
26. BIOT, C.; CHIBALE, K. Novel approaches to antimalarial drug discovery. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 6, p.173-204, 2006. BISSET, N. G. Arrow and dart poisons. **J Ethnopharmacol**, v. 25, n. 1, p. 1-41, 1989.
27. SAXENA, S; PANT, N.; JAIN, D.C.; BHAKUNI, R.S. **Antimalarial agents from plant sources**. *Current Sci*, v. 85, p.1314-1329, 2003.
28. FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. **Medicinal plants in therapy**. *Bull World Health Organ*, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.
29. BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. **Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials**. *Science*, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.
30. OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, L. J. C. **Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão**. *Rev. Bras. Pl. Med.* v.11, n.1, p.92-99, 2009.

31. WRIGHT C. W. **Traditional antimalarial and the development of novel antimalarial drugs.** *J Ethnopharmacol* 100: 67–71. 2005.
32. FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI, L. F.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. **Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.99, p. 325- 327, 2004.
33. KAUR, K. D.; JAIN, M.; KAUR, T.; MARCH, R. J. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Antimalarials from nature.** v.17, p. 3229–3256, 2009.
34. DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2.ed. rev. ampl. São Paulo: Editora UNESP, p.372-393. (2002).
35. JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 10. ed, v.4. São Paulo: Editora Nacional, 777p. (1991).
36. MOREIRA, F. F., MENDONÇA, C. B. F., PEREIRA, J. F., ESTEVES, V. G. **Polinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na restinga de Carapebus, RJ, Brasil.** *Acta botanica. Brasileira*, 18 (4): 711-721. (2004).
37. SCHRIPSEMA, J., DAGNINO, D., GOSMANN, G. ALCALÓIDES INDÓLICOS. *IN:* SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROCICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. PortoAlegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 819-846. (2004).
38. WOODSON, R. J. **Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. e Zucc.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 38:119-204. (1951).
39. CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** v. 2. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. (1931).
40. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 352p. (1998).

41. BOLZANI, V. S., SERUR, L. M., MATOS, F. J. A., GOTTLIEB, O.R. **Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15(2): 187-200. (1987).**
42. GILBERT, B. **Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38 (supl):315-319. (1966).**
43. PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. **ALCALÓIDES INDÓLICOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). *Química Nova*, Vol. 30, No. 4, 970-983, 2007.**
44. NUNES, D. S. ***Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma pruinosum* Markgraf*. Tese (Mestrado em Química Orgânica) Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 177p. (1980).**
45. DEWICK, P. M. ***Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley e Sons, 466p. (1997).**
46. LE MEN, L. E W. I. TAYLOR. **A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia*, 21(9): 508-10. (1965).**
47. DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. **Recursos herbolarios de San Luis (Republica Argentina). Primeira parte: Plantas Nativas. *Multequina*. Latin American Journal of Natural Resources, v.6, p.49-66, 1997.**
48. SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGE, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M. C. **An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho Blanco*, binds to human penile  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *The Journal of Urology*. v. 168, p. 160 – 163. july. 2002.**
49. FERREIRA, D. T. et al. **Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *Aspidosperma polyneuron*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11., Pelotas, 2003.**

50. GRANATO, D. et al. **Chemical and biological evaluation of rejects from the word industry.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.48, p.237-41, 2005.
51. MARQUES, M. F. S. **Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.** Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1988.
52. ALVES, C. F. **Alcalóides quaternários da *Aspidosperma Polyneuron*.** Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1991.
53. OLIVEIRA, A. J. B.; SILVA, C. C. ; TANAKA, J. C. A. ; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C.V. **Atividade antibacteriana do extrato bruto e frações de *Aspidosperma ramiflorum*.** In: 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG. 2005. Livro de Resumos da 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.
54. AGRIPINO, D. G. et al. **Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging activities. I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins.** Biota Neotropica, v.4, n.2, 2004.
55. TANAKA, J.C.A.; DA SILVA, C.C.; DE OLIVEIRA, A.J.B.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. **Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 39, p. 387 – 391. 2006.
56. CAMPOS A. R.; LIMA, R. C. P. JR.; UCHOA; D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS F. A.; RAO, V. S. N. **Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice.** Journal of Ethnopharmacology. v. 104, p. 240-244. 2006.
57. QUIQNARD, E. L. J. **Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine-shrimp.** Acta Amazonica, v.33, p.93-104, 2003.



58. VERPOORTE, R.; PUIGROK, C. L. M.; BERARHEIM, S. A. **Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum***. *Planta Medica*, v.46, p.149-52, 1982.
59. PEREZ, D. **Etnobotânica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali**. *Folia Amazónica*, 13:87-108. (2002).
60. VERPOORTE, R., KOSKUYCK, E; TSOI, A. T. A., RUIGROK, C. L. M., DEJONG, G. **Medicinal plants of Surinam. Antimicrobially active alkaloids from *Aspidosperma excelsum***. *Planta Medica*, 48:283-289. (1983).
61. FERREIRA-FILHO, J. M., GILBERT, B., KITAGAWA, M., PAES LEME, L. A., DURHAM, L. J. **Four heptacyclic alkaloids from *Aspidosperma* species**. *Journal of Chemical Society. Orgânica C.*, 14:1260-1266. (1966).
62. MESQUITA, M. L., GRELLIER, P., MAMBU, L., PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S. ***In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies**. *Journal of Ethnopharmacology*, 110:165-170. (2007).
63. WENINGER, B. et al. **Antiprotozoal activities of Colombian plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.78, p.193-200, 2001.
64. MITAINE-OFFER, A. C., SAUVAIN, M., VALENTIN, A., CALLAPA, J., MALLIÉ, M., ZECHES-HANROT, M. **Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids**. *Phytomedicine*, 9:142-145. (2002).
65. MITAINE, A. C., MITAINE, A. C., WENIGER, B., SAUVAIN, M., LUCUMI, E., ARAGON, R., ZECHES-HANROT, M. **Indole alkaloid from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon***. *Planta Medica*, 64:487. (1998).
66. GILBERT, B., DUARTE, A. P., NAKAGAWA, Y., JOULE, J. A., FLORES, S. E., BRISSELESE, J. A., CAMPELLO, J., CARRAZZONI, E. P., OWELLEN, E. C., BLOSSEY, E. C., BROWN, K. S., DJERASSI, C. **Alkaloid studies L. The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species**. *Tetrahedron*, 21:1141-1166. (1965).

67. ESTRELLA, E.; PICASSO, B. **Plantas medicinales Amazónicas: realidad y perspectivas**. *Tratado de Cooperación Amazônica (TCA)*, 28:302-315, (1995).
68. PEREIRA, M.M. ALCANTARA, A.F.C., PILO-VELOSO, D. **NMR structural analysis of Braznitidumine: A new Indole Alkaloid with 1,2,9-Triazabicyclo[7.2.1]System, Isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae)**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17 (7):1274-1280, (2006).
69. MARQUES, M.F.S. et al. **Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum***. *Phytochemistry*, v. 41, n. 3, p. 963-7, 1996.
70. ARNDT, R. R.; BROWN, S. H.; LING, N. C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA-FILHO, J. M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.; DUARTE, A. P.; CARRAZZONI, E. P.; *Phytochemistry*, 6, 1653, 1967.
71. TIGRE, C.B. **Silvicultura para as matas xerófilas**. Fortaleza: DNOCS, 175p. 1968.
72. AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. **Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 383-395, 2007.
73. DA SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DE OLIVEIRA, O. F. **Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.
74. CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M.; *Phytochemistry*, 22, 1526. 1983.
75. DJERASSI, C.; OWELLEN, R. J.; FERREIRA, J. M.; ANTONACCIO, L. D.; *Experientia*, 18, 397. 1962.
76. HENRIQUES, A. T., LIMBERGER, R. P., KERBER, V. A. E MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.,

PETROCICK, P. R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 765-92. (2004).

77. LUCA, V., LAFLAMME, P. **The expanding universe of alkaloid biosynthesis.** *Physiology and Metabolism*, 4:225-233. (2001).
78. MAIER, U. H., RODL, W., DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M. H. **Biosynthesis of Erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*.** *Phytochemistry*, 52:373-382. (1999).
79. SOTTOMAYOR, M., CARDOSO, I. L., PEREIRA, L. G., BARCELÓ, A. R. **Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** *Phytochemistry Reviews*, 3:159-171. (2004).
80. LORENCE, A., NESSLER, E. **Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings.** *Phytochemistry*, 65:2735-2749. (2004).
81. MUSTICH, G. **Approfondimenti di alkaloid.** 5<sup>o</sup> parte. *Natural*, 1:63-65. (2003).
82. BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2. ed. Tradução de Hatton. C. K. London : Lavoisier, 1136p. (1999).
83. ZENK, P. **The spectrum of biological activities of indole alkaloids. Indole and Biogenetically related alkaloids.** New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press-London, p.1-10. (1980).
84. MORALES-RÍOS, M. S.; ESPÍÑEIRA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. **<sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of indole derivatives.** *Magnetic Resonance in Chemistry*, 25, 377-395, 1987.
85. MITAINE, A. C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, S.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZECHES-HANROT, M.; LE MEN-OLIVER, L. **Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolivia.** *Planta Medica*, 62, 458-461, 1996.
86. KALAUS, G.; GREINER, I.; KAJTÁR-PEREDY, M.; BRLIK, J.; SZABÓ, L.; SZÁNTAY, C. **Synthesis of Vinca alkaloids and related compounds. A new synthetic pathway for preparing alkaloids and related compounds with the**

- aspidosperma skeleton. Total Syntheses of ( $\pm$ )-vincadifformine, ( $\pm$ )-tabersonine, and ( $\pm$ )-3-oxotabersonine. *Journal of Organic Chemistry*, 58, 1434-1442, 1993.
87. NUNES, D. S.; KOIKE, L.; TAVEIRA, J. J.; REIS, F. A. M. **Índole alkaloids from *Aspidosperma pruinosum***. *Phytochemistry*, 31, 7, 2507-2511, 1992.
88. OLIVEIRA, A. J. B.; KOIKE, L.; REIS, F. A. M.; SHEPERD, L. K. **Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production**. *Acta Scientiarum*, 23, 2, 609-612, 2001.
89. CLEMEDSON C, KOLMAN A, FORSBY A. **The integrated acute systemic toxicity project (ACuteTox) for the optimisation and validation of alternative *in vitro* tests**. *Altern Lab Anim*;35(1):33-8, 2007 Mar.
90. JONVILLE MC, KODJA H, HUMEAU L, FOURNEL J, DE MOL P, CAO M, ET AL. **Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity**. *J Ethnopharmacol*;120(3):382-6, 2008 Dec.
91. MAHMOUDI N, JULIAN-ORTIZ JV, CICERON L, GALVEZ J, MAZIER D, DANIS M, ET AL. **Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening**. *J Antimicrob Chemother*; 57(3):489-97, 2006 Mar. DOI:10.1093/JAC/DKI470.
92. TRAGER W E J. JENSEN. **Human malaria parasites in continuous culture**. *Science* 193:673-675, 1976.
93. GIL, VICTOR M. S.; GERALDES, CARLOS F. G. C.; **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, (1987).
94. BERLINCK, R.; **Curso de Ressonância Magnética Nuclear: Análise de compostos Orgânicos**. Cap. III. Disponível em < <http://www.qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursormn3.pdf> > Acesso em: maio (2015).

95. ZENK, P. **The spectrum of biological activities of indole alkaloids.** *In:* Neuss, N. (org.) *Indole and Biogenetically Related Alkaloids*. Nova Iorque: Academic Press, 298p. 1980.
96. BREITMAIER, E., VOELTER, W. **Carbon-13 NMR spectroscopy; High-Resolution Methods and applications in organic chemistry and biochemistry.** 3. ed. Germany: VCH verlagsgesellschaft, 515p (1987).
97. OLIVEIRA ARILDO JOSÉ BRAZ DE, Tese: **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.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 1999.

