

ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Aspidosperma spruceanum*
(APOCYNACEAE)

VOLUME 1

VILMA BRAGAS DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO – 2008

ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE)

VOLUME 1

VILMA BRAGAS DE OLIVEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Ivo José Curcino Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO – 2008

ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE)

VILMA BRAGAS DE OLIVEIRA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 09 de dezembro de 2008

Comissão examinadora:

Prof^a. Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Walter Luiz Brasil Medeiros (D.Sc., Química Orgânica) - CEFET-Campos

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (D.Sc., Química Orgânica) - UENF

Prof. Ivo José Curcino Vieira (D.Sc., Química Orgânica) – UENF
Orientador

Minha mãe – Maria Bragas (*in memoriam*)
Homenageio!

A Nicholas Rayan e Lino Martins
Dedico!

Aos meus irmãos – Vidilma, Vildilene,
Vidilson, Vidimilson e Víldima
Ofereço!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o grande responsável por esta vitória;

Sinto-me imensamente grata ao Professor Ivo José Curcino Vieira pela orientação, confiança, paciência, compreensão e incentivo;

Agradecimento especial aos professores Raimundo Braz Filho e Leda Mathias pelas contribuições na realização deste trabalho;

A todos os professores do Laboratório de Ciências Químicas e do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal que em muito contribuíram para minha formação acadêmica;

Aos técnicos e responsáveis pelos laboratórios da Universidade Federal do Ceará, da Universidade de Ribeirão Preto e da Universidade Estadual do Norte Fluminense;

Aos colegas do Laboratório de Ciências Químicas da UENF: Lara, Vinicius, Virginia, Cecília, Lanamar, Jucimar, Moema, Raquel, Marcelo, Graziela, Ildomar e Elaine pelo apoio, torcida e momentos de descontração;

Aos meus familiares que sempre foram os meus pilares emocionais, de

forma especial ao meu pai – Lino Martins – o homem mais sábio que já conheci;

E como não poderia deixar de ser, um agradecimento todo especial aos meus irmãos que de forma bem nordestina chamam-se Vidilma, Vidilson, Vildilene Víldima, Vidimilson e a seus respectivos cônjuges, John Wayne, Alcilene, Everton, Washington e Lucimar, pelo apoio e torcida;

Ao meu noivo Junior, pela dedicação carinhosa, cumplicidade, incentivo e companheirismo;

Para que esse trabalho fosse realizado, diversas pessoas não citadas acima contribuíram direta ou indiretamente, sendo que não me é possível citá-las nominalmente. A elas, meus mais profundos agradecimentos;

A UENF-FAPERJ pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Família Apocynaceae.....	4
2.2. O Gênero <i>Aspidosperma</i>	5
2.3. Alcalóides.....	7
2.3.1. Ocorrência.....	8
2.3.2. Importância histórica, social e econômica dos alcalóides.....	9
2.3.3. Alcalóides indólicos.....	11
2.3.3.1. Alcalóides indólicos simples.....	11
2.3.3.2. Alcalóides β -carbolínicos simples.....	11
2.3.3.3. Alcalóides indólicos monoterpênicos.....	12

2.3.4. Alcalóides e atividade biológica de espécies de <i>Aspidosperma</i>	14
2.3.4.1 <i>Aspidosperma quebracho blanco</i>	14
2.3.4.2 <i>Aspidosperma polineuron</i>	15
2.3.4.3 <i>Aspidosperma nitidum</i>	16
2.3.4.4 <i>Aspidosperma ramiflorum</i>	17
2.3.4.5 <i>Aspidosperma ulei</i>	18
2.3.4.6 <i>Aspidosperma subicanum</i>	19
2.3.4.7 <i>Aspidosperma excelsum</i>	20
2.3.4.8 <i>Aspidosperma marcgravianum</i>	21
2.3.4.9 <i>Aspidosperma macrocarpon</i>	22
2.3.4.10 <i>Aspidosperma megalocarpon</i>	23
2.4. <i>Aspidosperma spruceanum</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Escolha da espécie vegetal	26
3.2. Coleta do material vegetal e identificação botânica.....	26
3.3. Secagem e moagem.....	27
3.4. Obtenção dos extratos brutos.....	27
3.5. Prospecção preliminar	29
3.6. Fracionamento dos extratos brutos de <i>A. spruceanum</i>	30
3.6.1. Fracionamento do Extrato Hexânico das Cascas - EHC	30
3.6.2. Fracionamento do Extrato Metanólico das Cascas – EMC	41
3.6.3. Fracionamento do Extrato Hexânico das Sementes resultante da partição – EHS	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Determinação estrutural dos alcalóides isolados de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	54
4.1.1. Determinação estrutural do alcalóide (+)-aspidospermidina	55

4.1.2. Determinação estrutural do alcalóide (-)-desmetoxipalosina	59
4.1.3. Determinação estrutural do alcalóide (+)-aspidocarpina	64
4.1.4. Determinação estrutural do alcalóide (+)-aspidolimina	70
4.1.5. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B	74
4.1.6. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina	81
4.1.7. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides (-)-obscurinervidina e (-)-obscurinervina	84
4.1.8. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D	89
5. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcalóides de <i>Vinca rosea</i> , vincristina (A) e vimblastina (B).	5
Figura 2. Fórmula estrutural da ioimbina com numeração proposta por Le Men e Taylor (1965).....	7
Figura 3. Alcalóides de raízes, folhas, raízes e cascas do caule.	9
Figura 4. Alcalóides de importância social e econômica.....	10
Figura 5. Alcalóides de importância histórica.	10
Figura 6. Alcalóides indólicos simples.....	11
Figura 7. Alcalóides β -carbolínicos simples.....	12
Figura 8. Reação de obtenção da strictosidina.	12
Figura 9. Esquema das reações na cadeia terpenóidica.....	13
Figura 10. Esqueletos básicos dos alcalóides indólicos monoterpênicos.	14
Figura 11. Alcalóides de <i>A. quebracho blanco</i>	15
Figura 12. Alcalóide de <i>A. polineuron</i>	16
Figura 13. Alcalóides de <i>A. nitidum</i>	17
Figura 14. Alcalóides de <i>A. ramiflorum</i>	18
Figura 15. Alcalóides de <i>A. ulei</i>	19

Figura 16. Alcalóides de <i>A. subicanum</i>	20
Figura 17. Alcalóides de <i>A. excelsum</i>	21
Figura 18. Alcalóides de <i>A. marcgravianum</i>	22
Figura 19. Alcalóides de <i>A. macrocarpon</i>	23
Figura 20. Alcalóides de <i>A. megalocarpon</i>	23
Figura 21. <i>Aspidosperma spruceanum</i> . Em detalhes: tronco (1), flores (3), folhas (2 e 3), galhos (3), frutos (2,4 e 5) e sementes (4 e 5).....	25
Figura 22. Alcalóides de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	25
Figura 24. Fluxograma de obtenção do extrato ácido/base das folhas de <i>A. spruceanum</i>	28
Figura 25. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 43 obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de <i>A. spruceanum</i>	38
Figura 26. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 46 obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de <i>A. spruceanum</i>	39
Figura 27. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 55 obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de <i>A. spruceanum</i>	40
Figura 28. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 19 obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. spruceanum</i>	44
Figura 29. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 5 obtida a partir do extrato hexânico das sementes de <i>A. spruceanum</i>	52
Figura 30. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento das frações 7 e 9 obtidas a partir do extrato hexânico das sementes de <i>A. spruceanum</i>	53
Figura 31. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 283,2192$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidospermidina.....	58
Figura 32. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 339,2458$ ($[M+H]$) para o alcalóide (-)-desmetoxipalosina.....	62
Figura 33. Principais interações observadas no espectro $^1H-^1H$ -NOESY do alcalóide (-)-desmetoxipalosina.....	63

- Figura 34.** Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 371,2352$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidocarpina.68
- Figura 35.** Principais interações observadas no espectro $^1H-^1H$ -NOESY do alcalóide (+)-aspidocarpina.69
- Figura 36.** Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 385,2561$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidolimina.73
- Figura 37.** Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 424,1998$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide spruceanumina A.79
- Figura 38.** Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 438,2154$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide spruceanumina B.80
- Figura 39.** Principais interações observadas no espectro $^1H-^1H$ -NOESY dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B.80
- Figura 40.** Principais interações observadas no espectro $^1H-^1H$ -NOESY da mistura dos alcalóides (-)-obscurinervidina e (-)-obscurinervina.88
- Figura 41.** Proposta de fragmentação para IE/MS do pico $m/z= 458$ $[M+]$ para os alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D.93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos brutos obtidos de partes vegetais de <i>A. spruceanum</i>	29
Tabela 2. Extratos obtidos na partição do extrato metanólico das sementes.....	29
Tabela 3. Estudo cromatográfico do extrato hexânico das cascas do caule de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	31
Tabela 4. Estudo cromatográfico da fração 43	31
Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração 43.4	32
Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração 43.4.51	32
Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração 46	33
Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração 46.8	33
Tabela 9. Estudo cromatográfico da fração 46.12	34
Tabela 10. Estudo cromatográfico da fração 55	35
Tabela 11. Estudo cromatográfico da fração 55.8	35
Tabela 12. Estudo cromatográfico da fração 55.8.20	36
Tabela 13. Estudo cromatográfico da fração 55.20	36
Tabela 14. Estudo cromatográfico da fração 55.20.43	37
Tabela 15. Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas do caule de <i>A. spruceanum</i>	41

Tabela 16. Estudo cromatográfico da fração 19	41
Tabela 17. Estudo cromatográfico da fração 19.10	42
Tabela 18. Estudo cromatográfico da fração 19.10.45	43
Tabela 19. Estudo cromatográfico da fração hexânica das sementes de <i>Aspidosperma spruceanum</i>	44
Tabela 20. Estudo cromatográfico da fração 5	45
Tabela 21. Estudo cromatográfico da fração 5.1	45
Tabela 22. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1	46
Tabela 23. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1.3	46
Tabela 24. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1.3.2	47
Tabela 25. Estudo cromatográfico da fração 5.1.29	47
Tabela 26. Estudo cromatográfico da fração 5.1.29.2	48
Tabela 27. Estudo cromatográfico da fração 7	48
Tabela 28. Estudo cromatográfico da fração 7.54	49
Tabela 29. Estudo cromatográfico da fração 7.54.6	49
Tabela 30. Estudo cromatográfico da fração 9	50
Tabela 31. Estudo cromatográfico da fração 9.17	50
Tabela 32. Estudo cromatográfico da fração 9.17.21	51
Tabela 33. Estudo cromatográfico da fração 9.17.32	51
Tabela 34. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidospermidina, e comparação com valores de literatura para os modelos Mo-1 e Mo-2.....	57
Tabela 35. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (-)-desmetoxipalosina	61
Tabela 36. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidocarpina, e comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina.....	67

Tabela 36. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidolimina, e comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina	72
Tabela 38. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B.....	78
Tabela 39. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC para a mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina	83
Tabela 40. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides (-)-obscurinervidina e (-)-obscurinervina	87
Tabela 41. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D	92

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em Coluna
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada em Escala Preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
COSY	Correlation Spectroscopy
CVRD	Companhia Vale do Rio Doce
d	Sinal duplo
dd	Sinal duplo duplete
ddd	Sinal duplo duplo duplete
DL_{50}	Dose letal média
EM	Espectro de Massas
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IE/EM	Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”
J	Constante de acoplamento medida em Hertz
KBr	Brometo de Potássio

LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
m	Sinal múltiplo
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
M ⁺	Pico do Íon Molecular
MHz	Megahertz
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
PA	Pureza Analítica
PENDANT	Polarization Enhancement that is Nurtured During Attached Nucleus Testing
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Sinal simples
sl	Sinal simples largo
t	Sinal triplo
tl	Sinal triplo largo
TMS	Tetrametilsilano

RESUMO

OLIVEIRA, Vilma Bragas; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, dezembro, 2008; Alcalóides Indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae); Orientador: Ivo José Curcino Vieira. Co-orientador: Raimundo Braz-Filho e Leda Mathias.

Espécies do gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, são reconhecidas pela qualidade da madeira produzida e pela produção de uma importante classe de substâncias do metabolismo secundário, os alcalóides, conferindo a estes a posição de marcadores quimiotaxonômicos das espécies deste gênero. Várias espécies de *Aspidosperma* são utilizadas na medicina popular por suas propriedades terapêuticas, como *Aspidosperma quebracho blanco*, utilizada como antiasmático, cicatrizante e febrífugo; *Aspidosperma polineuron*, usada por suas propriedades antifúngicas; *Aspidosperma nitidum*, usada para curar malária; *Aspidosperma ramiflorum*, aplicada no tratamento de leishmaniose; e *Aspidosperma ulei*, utilizada como remédio para disfunção erétil. Diante do potencial químico e biológico do gênero *Aspidosperma*, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar os alcalóides indólicos presentes nas sementes e cascas do caule de *Aspidosperma spruceanum*. Dessa forma, do extrato em hexano das cascas do caule foram isolados os alcalóides indólicos (-)-desmetoxipalosina, (+)-aspidolimina, (+)-aspidocarpina e (+)-aspidospermidina; do extrato em hexano das sementes foram isolados os alcalóides indólicos (-)-fendlerina, (-)-aspidolimidina, (-)-obscurinervidina, (-)-obscurinervina, e 4 alcalóides indólicos descritos pela primeira vez na literatura (spruceanumina A, spruceanumina B, spruceanumina C e spruceanumina D).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Vilma Bragas; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, December, 2008; Indole Alkaloids of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae); Advisor: Ivo José Curcino Vieira. Counselors: Raimundo Braz-Filho and Leda Mathias.

Species of the genus *Aspidosperma*, family Apocynaceae, are known by the quality of the produced wood and for the production of an important class of substances of the secondary metabolism, the alkaloids, checking to these the position of chemotaxonomy markers of the species of this genus. Several species of *Aspidosperma* are used in the popular medicine by its therapeutic properties, like *Aspidosperma quebracho blanco*, used against asthma, healing and against fever; *Aspidosperma polineuron*, used by its properties against mushroom; *Aspidosperma nitidum*, used to cure malaria; *Aspidosperma ramiflorum*, used in the leishmaniose treatment; and *Aspidosperma ulei*, used as medicine for erectile dysfunction. Before the chemical and biological potential of the genus *Aspidosperma*, this work had for objective to isolate and to identify the indole alkaloids existent in the seeds and peels of the stem of the *Aspidosperma spruceanum*. In that way, from the hexanic extract of the barks of the stem were isolated the indole alkaloids (-) -desmetoxipalosine, (+)-aspidolimine, (+)-aspidocarpine and (+)-aspidospermidine; of the hexanic extract of the seeds were isolated the indole alkaloids (-) -fendlerine, (-) -aspidolimidine, (-) -obscurinervidine, (-) -obscurinervine, and four indole alkaloids described for the first time in the literature (spruceanumine A, spruceanumine B, spruceanumine C and spruceanumine D).

1. INTRODUÇÃO

Toda sociedade humana acumula um acervo de informações sobre o ambiente que o cerca, que vai lhe possibilitar interagir com ele para provê suas necessidades de sobrevivência. Neste acervo, inscreve-se o conhecimento relativo ao mundo vegetal com o qual estas sociedades estão em contato (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). A química de produtos naturais faz uso deste conhecimento para justificar o estudo de determinadas espécies vegetais.

O uso de extratos vegetais contendo substâncias utilizadas como medicamentos, venenos e em porções mágicas, pode ser traçada desde os primórdios da civilização (Elisabetsky e Souza, 2004). Dentre as classes de substâncias destacam-se os alcalóides (substâncias oriundas do metabolismo secundário dos ácidos aminados). Os alcalóides são famosos pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, com muitos deles tendo papel fundamental em fatos que marcaram a história da humanidade (Luca e Pierre, 2000).

Devido ao elevado número de atividades biológicas atribuídas aos alcalóides, estes foram continuamente objetos de estudos, e continuam sendo descritos com seu uso introduzido na terapêutica.

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcalóides, com maior frequência nas Dicotiledôneas (Luca e Laflamme, 2001). Essas substâncias podem ser encontradas em diferentes partes do vegetal (Sottomayor et al., 2004), e em representantes de diversas famílias (Lorence e Nessler, 2004).

Neste contexto de espécies vegetais bioprodutoras de alcalóides, insere-

se o gênero *Aspidosperma* da família Apocynaceae, o qual tem sido alvo de inúmeros trabalhos sobre a química de alcalóides indólicos.

Espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas nas Américas (Lorenzi, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (Woodson, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os ecossistemas (Corrêa, 1931), tais como, caatinga, cerrado e florestas (Amorim et al., 2005).

As espécies deste gênero apresentam grande importância tanto do ponto de vista econômico quanto científico, pois além de ser fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria (Lorenzi, 1998 & Joly, 1991), a maioria são objetos de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

Gilbert (1966) estudou 33 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcalóides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcalóides neste gênero. Especificamente foi observada a ocorrência de alcalóides indólicos com uma grande variedade estrutural, dos quais, muitos deles contendo esqueleto β -carbólico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (Pereira et al., 2007).

Pereira et al. (2007) realizaram um vasto levantamento das estruturas dos alcalóides identificados em espécies do gênero *Aspidosperma*, onde nessa revisão foi possível observar a diversidade estrutural de cerca de 247 alcalóides indólicos isolados até 2006 neste gênero.

É atribuído aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica (Bourdy et al., 2004). Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais detalhada sobre suas atividades terapêuticas, com os alcalóides indólicos presentes no gênero. Provavelmente, a maioria dos alcalóides indólicos age nos sistemas neurotransmissores opiáceos, colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (Roberts e Wink, 1998 & Biel et al., 1959).

Com vistas a contribuir para o conhecimento da composição química relativa aos alcalóides do gênero *Aspidosperma*, e de posse da informação que a mesma apresenta uma vasta diversidade estrutural de alcalóides, este trabalho

objetiva o isolamento e a identificação dos alcalóides presentes na espécie *Aspidosperma spruceanum* Benth. Ex. Mull Arg.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Apocynaceae

A família Apocynaceae pertence à ordem Gentianales, subclasse Asteridae (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002) e compreende cerca de 2000 espécies distribuídas em aproximadamente 200 gêneros de distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo mundo (Joly, 1991). No Brasil ocorrem cerca de 400 espécies subordinadas a 41 gêneros (Moreira et al., 2004). São plantas de hábito variado, 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 bifoliculares e sementes geralmente carnosas (Joly, 1991).

Da grande diversidade de aplicações e da importância da família Apocynaceae pode-se citar três representantes: *Aspidosperma polyneron* (Peroba) é fornecedora de madeira de excelente qualidade, com grande resistência e flexibilidade (Vicentini e Oliveira, 1999), *Allamanda cathartica* é um arbusto trepador com folhas brilhantes espessas e flores amarelas e grandes, essa espécie é muito utilizada na ornamentação de ambientes (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002) e *Vinca rosea* produtora dos alcalóides vincristina (**Figura 1A**) e vimblastina (**Figura 1B**) utilizados como quimioterápicos no tratamento de câncer (Vicentini e Oliveira, 1999).

Apesar das muitas aplicações e usos das espécies de Apocynaceae, elas se destacam especialmente por serem reconhecidamente produtoras de substâncias bioativas como iridóides, glicosídeos cardioativos e alcalóides, especialmente os alcalóides indólicos (Schripsema et al., 2004).

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 (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).

Deve-se destacar, contudo, que essa família inclui um grande número de espécies tóxicas, tanto para animais como para a espécie humana (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002 & Joly, 1991).

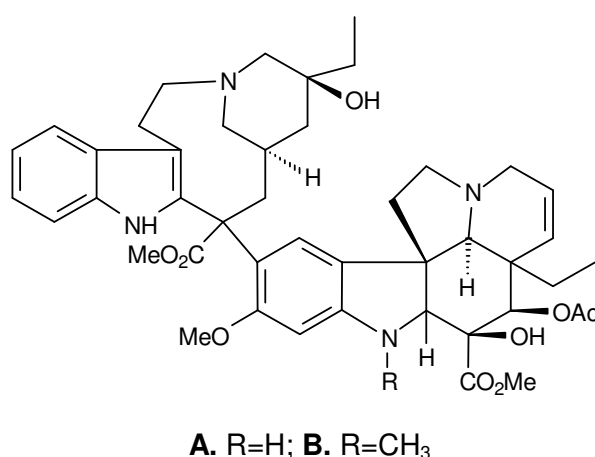


Figura 1. Alcalóides de *Vinca rosea*, vincristina (**A**) e vimblastina (**B**).

2.2. O Gênero *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma* compreende cerca de 260 espécies arbóreas (Woodson, 1951), ocorrem apenas na América, principalmente entre o México e a Argentina (Corrêa, 1931). No Brasil encontram-se representantes desse gênero em praticamente todos os ecossistemas (Corrêa, 1931).

As espécies do gênero *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, pau-pereiro, carapanaúba, pequiá, quina, taroba e

amargoso (Lorenzi, 1998). São árvores de grande porte de 2 a 60 m de altura, a largura, a textura e a cor do tronco circular variam consideravelmente e aparentemente sem uma correlação filogenética, apresentam pouco ou nenhum látex no tronco, diferentemente da maioria das Apocynaceae (Woodson, 1951). São fornecedoras de madeira de lei, muitas utilizadas na construção civil e naval, dormentes, cabos de ferramentas e de instrumentos agrícolas, xilografia, marcenaria, carpintaria e peças flexíveis (Lorenzi, 1998 & Corrêa, 1931).

As folhas de *Aspidosperma* geralmente auxiliam na classificação e divisão das espécies em séries, haja vista apresentarem características de dimensões e textura típicas a cada uma das séries propostas por Woodson. Mas em geral são alternas, espiraladas, não agrupadas no ápice dos ramos (Woodson, 1951). Apresenta flores pequenas dispostas em cimeiras verticiladas ou racemo-corimbiformes, geralmente brancas, castanho-escuro ou amarela. Apresentam frutos cápsula lenhosa, orbiculares, ovais ou elípticos, chatos, verde pardacentos e pubescentes no exterior e amarelentas no interior, normalmente 7-9 cm de comprimento, 5-6 cm de largura e 1-2 cm de espessura com 8-16 sementes aladas, asas membranáceas mais ou menos circulares (Lorenzi, 1998).

Além da reconhecida importância econômica do gênero *Aspidosperma* por seu valor comercial como fornecedora de matéria-prima para os vários setores industriais que empregam madeira, há que se reconhecer sua importância como produtora de uma importante classe de substâncias do metabolismo secundário, os alcalóides.

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 (Woodson, 1951). Entretanto, ainda existiam controvérsias quanto ao número exato de espécies que constituíam este gênero (Allorge e Poupat, 1991).

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 (Gilbert, 1966).

Com intensificação dos estudos fitoquímicos sobre os alcalóides de *Aspidosperma*, pode-se obter uma correlação entre a classificação taxonômica proposta por Woodson (1951) e a química proposta por Gilbert (1966).

O grande número de alcalóides indólicos encontrados nas espécies de *Aspidosperma*, cerca de 247 (Pereira et al., 2007), 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 (Woodson, 1951 & Gilbert, 1966), fato este, que coloca os alcalóides indólicos como marcadores quimiotaxonômicos das espécies do gênero *Aspidosperma* (Nunes, 1980).

Neste gênero ocorrem predominantemente alcalóides indólicos, muitos deles contendo esqueleto β -carbolínico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (Allen e Holmstedt, 1980). Com a parte indólica originária biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de hidratos de carbono, pela via chiquimato (Dewick, 1997).

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 da ioimbina (**Figura 2**).

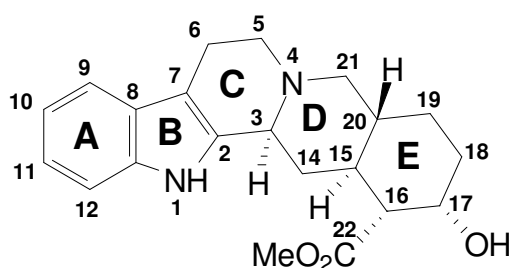


Figura 2. Fórmula estrutural da ioimbina com numeração proposta por Le Men e Taylor (1965).

2.3. Alcalóides

São substâncias nitrogenadas na maioria das vezes farmacologicamente ativas encontradas predominantemente nas Angiospermas (Henriques et al., 2004).

Os alcalóides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros, já os alcalóides com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominados de protoalcalóides (Henriques et al., 2004), e alguns autores ainda classificam em pseudoalcalóides, substâncias que apresentam todas as características dos alcalóides verdadeiros, mas não são derivadas dos aminoácidos (Dewick, 1997).

Quase a totalidade dos alcalóides é derivada de aminoácidos e daí vem sua classificação. A partir dos aminoácidos alifáticos, têm-se os alcalóides pirrolidínicos e tropânicos (Ornitina) e os piperidínicos (Lisina), e dos aminoácidos aromáticos, têm-se os alcalóides isoquinolínicos (Tirosina) e os indólicos (Triptofano) (Dewick, 1997).

2.3.1. Ocorrência

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também podem ser encontrados em microrganismos e animais (Dewick, 1997).

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcalóides, com maior frequência nas Dicotiledôneas (Luca e Laflamme, 2001). 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 3A**) e eritrinina (**Figura 3B**) (Maier et al., 1999); em folhas de *Catharantus roseus* são encontrados os alcalóides indólicos monoterpênicos ajmalicina (**Figura 3C**), um anti-hipertensivo e a serpentina (**Figura 3D**), um sedativo (Sottomayor et al., 2004).

Em geral os alcalóides são produzidos em um local da planta e armazenados em outro, exemplo disto é a nicotina (**Figura 3E**) produzida nas raízes de *Nicotiana tabacum* e posteriormente translocadas para as folhas, nas quais é armazenada (Peres, 2005).

Um alcalóide pode ser encontrado ainda em representantes de diversas famílias vegetais, como é o caso da camptothecina (**Figura 3F**), um importante agente anticancerígeno, que pode ser encontrado em *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), *Nothapodytes foetida*, *Pyrenacantha klaineana* (Icacinaceae), *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae) e *Ervatamia Heyneana* (Apocynaceae) (Lorence

e Nessler, 2004). Este alcalóide é encontrado em todas as partes de *C. acuminata*, apresentando maiores níveis em folhas jovens ($2\text{-}5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco), 50% a mais do que nas raízes, e 250% a mais do que na casca do caule (Lorence e Nessler, 2004).

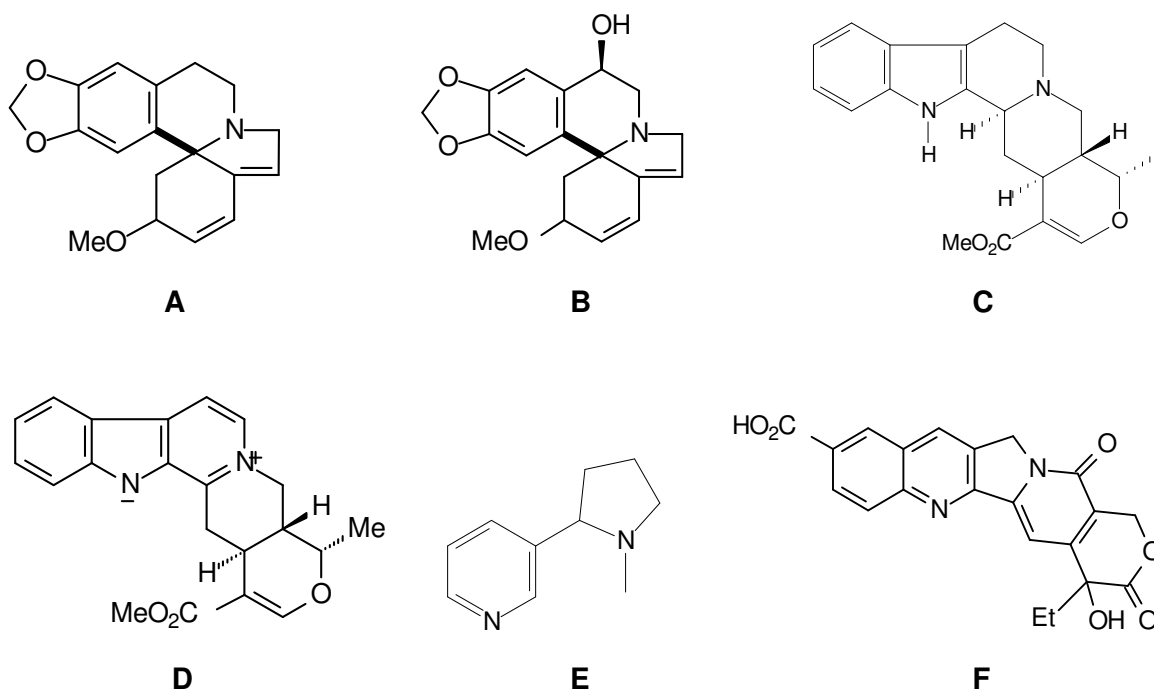


Figura 3. Alcalóides de raízes, folhas, raízes e cascas do caule.

2.3.2. Importância histórica, social e econômica dos alcalóides

A sociedade moderna tem feito usos diversos dessas substâncias, tanto de forma lícita como a utilização da nicotina (**Figura 3E**) e mesmo ilícita como os entorpecentes comercializados pelo narcotráfico como o LSD (**Figura 4A**) (dietilamida do ácido lisérgico) e a cocaína (**Figura 4B**).

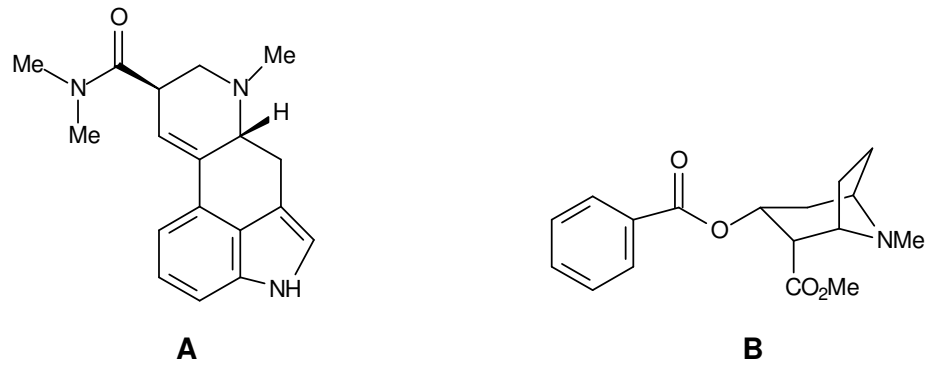


Figura 4. Alcalóides de importância social e econômica.

Essa classe de substâncias do metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos.

Na antiguidade há referências do uso dessa classe de substâncias na execução do filósofo grego Sócrates, condenado à ingerir cicuta (*Conium maculatum*), fonte do alcalóide coniina (**Figura 5A**). Os romanos também utilizavam os alcalóides hiosciamina (**Figura 5B**), e atropina (**Figura 5C**), derivados da *Atropa belladonna*, em homicídios. Outras civilizações antigas ainda usavam alcalóides para o envenenamento de setas empregadas em caçadas e guerras, como o extrato do curare (*Chondodredron tomentosum*), produtor do alcalóide tubocurarina (**Figura 5D**) e da estricnina (**Figura 5E**) extraída de *Strychnos nux-vomica* (Peres, 2005).

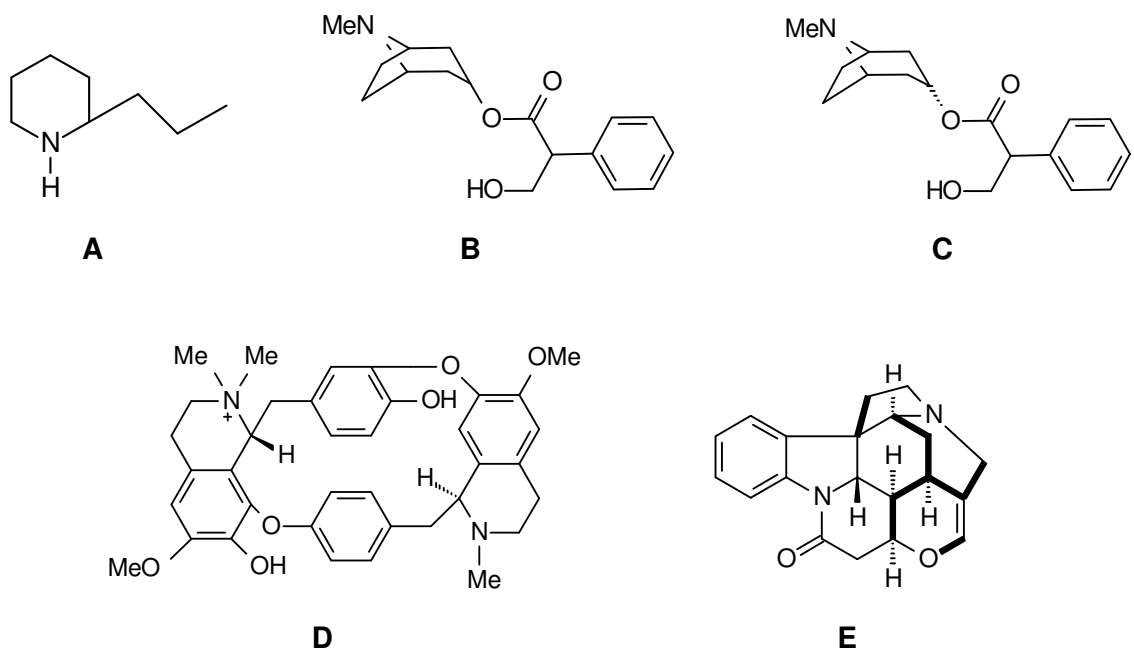


Figura 5. Alcalóides de importância histórica.

2.3.3. Alcalóides indólicos

São alcalóides derivados do ácido aminado triptofano, ácido aminado aromático que contém um sistema de anel indólico, originado na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico. Ele atua ainda como o precursor de uma grande variedade de outros alcalóides, além dos indólicos, pode sofrer rearranjos que promovem a conversão do sistema de anel indólico em quinolínic (Dewick, 1997).

2.3.3.1. Alcalóides indólicos simples

Este tipo de alcalóide é formado por modificação simples do L-triptofano, dando origem à triptamina por reação catalisada pela enzima triptofano-decarboxilase 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 6A**), 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 6B**) e psilocibina (**Figura 6C**) substâncias responsáveis por propriedades alucinógenas. Uma via biossintética que cliva dois átomos de carbono produz ainda o alcalóide gramina (**Figura 6D**) (Mustich, 2003).

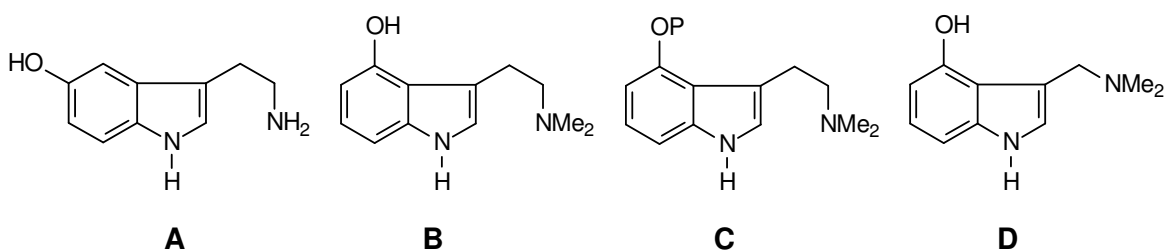


Figura 6. Alcalóides indólicos simples.

2.3.3.2. Alcalóides β -carbolínicos simples

Esta classe de alcalóides 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 alcalóides β -carbólicos simples harmina (**Figura 7A**), harmalina (**Figura 7B**) e tetraidroharmina (**Figura 7C**) (Mustich, 2003).

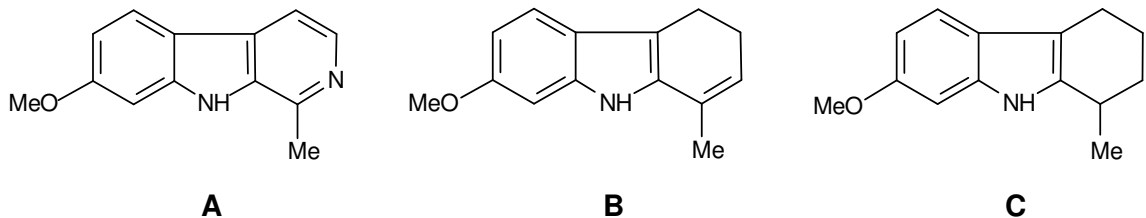


Figura 7. Alcalóides β -carbólicos simples.

2.3.3.3. Alcalóides indólicos monoterpênicos

Esta classe de alcalóides possui uma origem biossintética comum, o precursor strictosidina, glicosídeo formado a partir da condensação da triptamina com o aldeído monoterpênico secologanina (**Figura 8**). Esta reação é catalisada pela enzima strictosidina sintase. Os alcalóides indólicos monoterpênicos constituem o maior grupo de alcalóides em plantas, podem ser encontrados em cerca de oito famílias, dentre as quais a Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae (Bruneton, 1999).

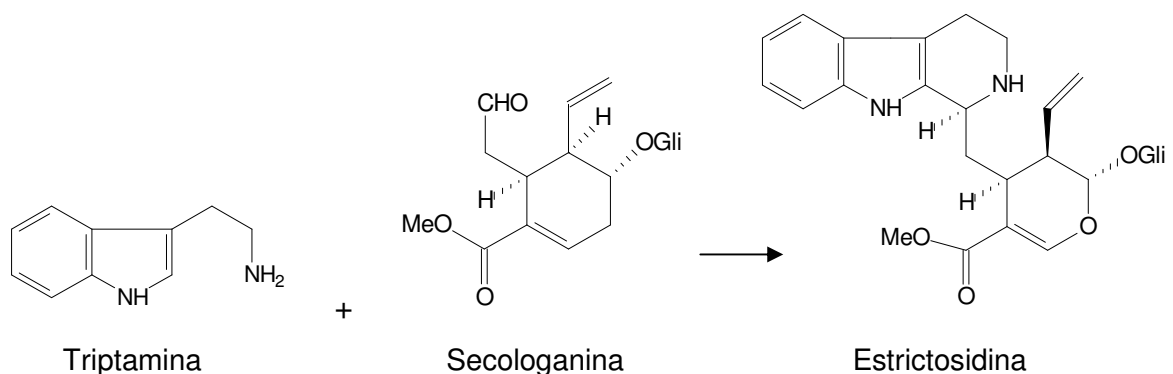


Figura 8. Reação de obtenção da strictosidina.

Rearranjos na parte terpenóidica da strictosidina leva à formação de subclasses (**Figura 9**) (Bruneton, 1999 & Zenk, 1980).

Classe I - Alcalóides em que a unidade monoterpênica não sofreu rearranjos [esqueletos corinanteano (a) ou estricnano (b)]

Classe II - Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-20 da unidade monoterpênica (esqueleto aspidoespermano)

Classe III - Alcalóides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-14 da unidade monoterpênica (esqueleto ibogano)

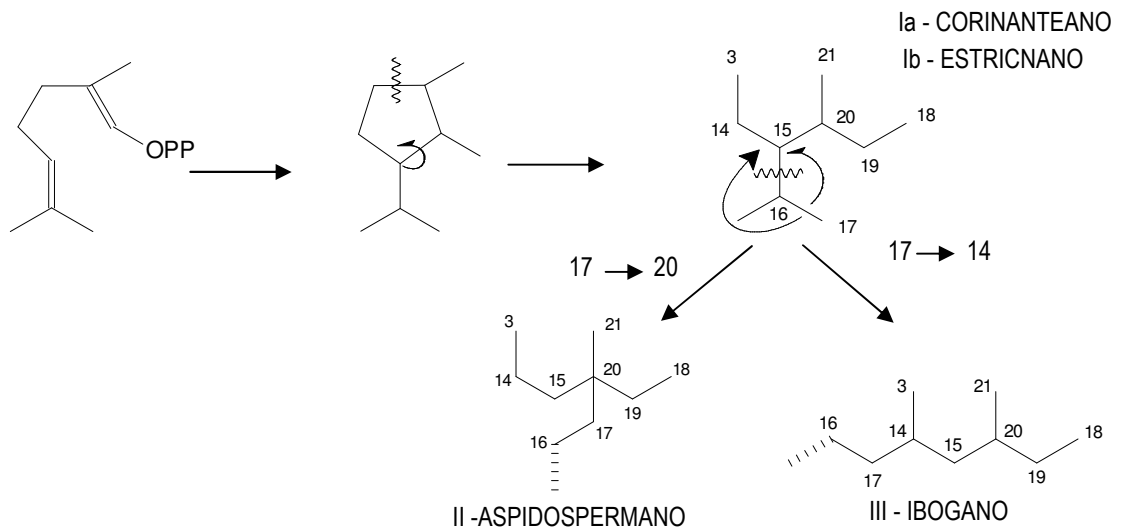


Figura 9. Esquema das reações na cadeia terpenóidica.

Estas subclasses são ainda subdivididas em 9 tipos principais às quais se adicionam os *bis*-indólicos que são alcalóides diméricos (**Figura 10**).

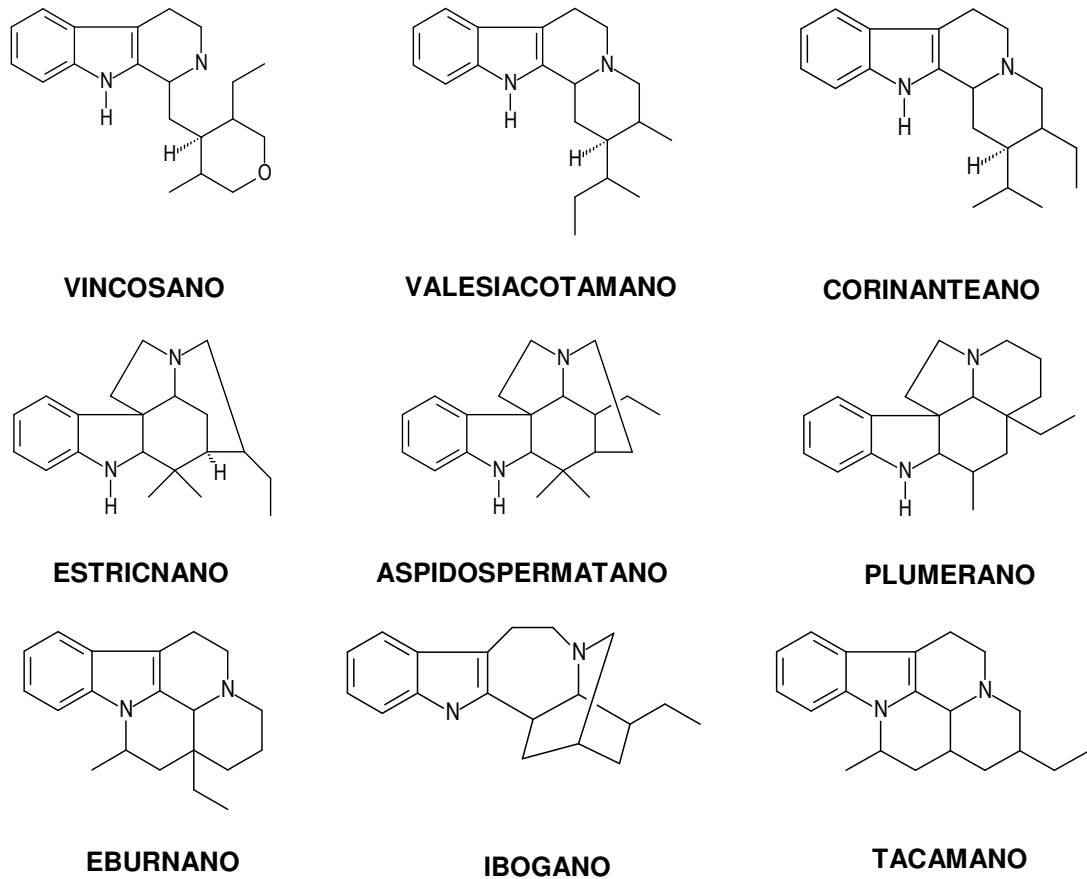


Figura 10. Esqueletos básicos dos alcalóides indólicos monoterpênicos.

2.3.4. Alcalóides e atividade biológica de espécies de *Aspidosperma*

2.3.4.1 *Aspidosperma quebracho blanco*

Del Vitto et al. (1997) catalogaram 273 espécies vegetais de uso popular como medicamento na Argentina, dentre as quais se encontra a *A. quebracho blanco* relatada como antidisnéico, antiasmático, cicatrizante e febrífugo. Seguindo a mesma linha Scarpa (2000) realizou uma busca das espécies vegetais utilizadas contra transtornos digestivos na região do Chaco na Argentina e das espécies mais utilizadas foi relatada a aplicação da infusão em água das cascas e dos talos de *A. quebracho blanco* para curar diarréias.

Desta espécie já foram isolados e identificados cerca de 34 alcalóides (Marques, 1988), dentre os quais a aspidospermina (**Figura 11A**), um alcalóide indólico com atividade sobre uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (Mitaine-Offer et al., 2002), e a ioimbina (**Figura 11B**), que atua

como bloqueador dos receptores α_2 -adrenérgicos, como serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, e aumento da atividade motora e antidiurética (Deutsch et al., 1994). O extrato de *A. quebracho blanco* é usado como droga prescrita para o tratamento da disfunção erétil e este efeito tem sido atribuído ao seu conteúdo de ioimbina (**4**), mas diferentemente ao uso da substância pura o extrato não é seletivo ao se ligar aos receptores α_1 ou α_2 (Sperling et al., 2002).

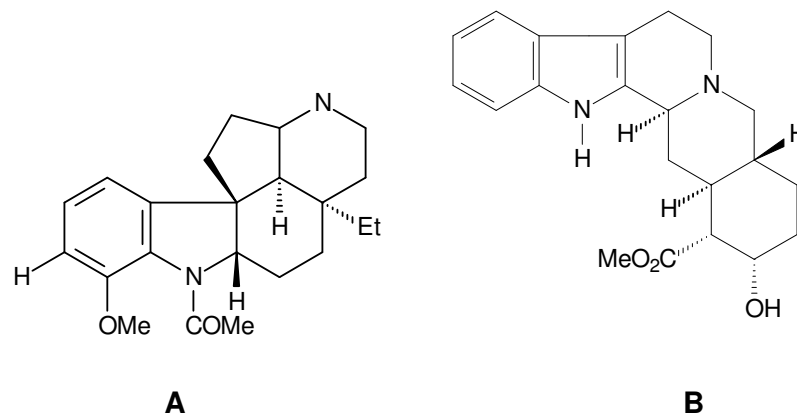


Figura 11. Alcalóides de *A. quebracho blanco*.

2.3.4.2 *Aspidosperma polineuron*

Os extratos etanólicos de folhas, raízes e caules de *A. polineuron* (peroba rosa) foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia sp.* Assim foram testados os extratos etanólicos das folhas, raízes e caule dessa espécie, mas apenas o extrato etanólico do caule foi capaz de inibir o crescimento de *C. herbarum* (Ferreira et al., 2003). 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 alcalóide polineuridina (**Figura 12**), o principal alcalóide indólico isolado das cascas e das folhas de *A. polineuron* (Marques, 1988), espécie reconhecida também por apresentar alcalóides quaternários nas raízes (Alves, 1991).

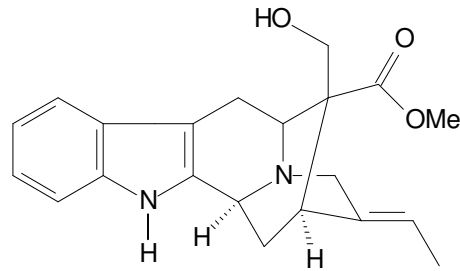


Figura 12. Alcalóide de *A. polineuron*.

2.3.4.3 *Aspidosperma nitidum*

As cascas do caule de *A. nitidum* (carapanaúba) são utilizadas por mais de 8.000 nativos em várias partes do Brasil para curar malária (Brandão et al., 1992). Os índios Makunas e Taiwanos relatam que o látex desta árvore é eficaz na cura de lesões provocadas pela hanseníase (Estrella e Picasso, 1995). No estado do Amapá, a espécie *A. nitidum* é utilizada no tratamento de bronquites e diabetes, e em Manaus é utilizada como antiinflamatória, cicatrizante e contraceptivo (Estrella e Picasso, 1995).

Pereira et al. (2006) tomando por base que *A. nitidum* era utilizada no tratamento de inflamações, avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne, através dos testes de nocicepção induzida por formalina, da latência para o reflexo de retirada da cauda (“tail-flick”), de performance motora (“rota-rod”), e edema induzido pela injeção intraplantar da carragenina. O efeito antinociceptivo foi detectado em 2ª fase, indicando que não houve a participação do sistema opioidérgico, houve ainda uma redução do edema de pata em relação ao controle do teste (Pereira et al., 2006). Recentemente foi relatado o isolamento e a identificação de um novo alcalóide indólico de *A. nitidum* com um sistema 1,2,9-triazabiciclo[7.2.1], denominado braznitidumina (nome este em homenagem ao Professor Raimundo Braz-Filho) (**Figura 13A**), o que poderia justificar as atividades biológicas relatadas (Pereira et al., 2006).

De *A. nitidum* já são conhecidos pelo menos treze estruturas de alcalóides indólicos, merecendo destaque a aspidospermina (**Figura 11A**), quebrachamina (**Figura 13B**), e ioimbina (**Figura 2**), muito comuns em outros representantes do gênero, e na sua maioria presentes nas cascas, folhas e galhos (Marques et al., 1996).

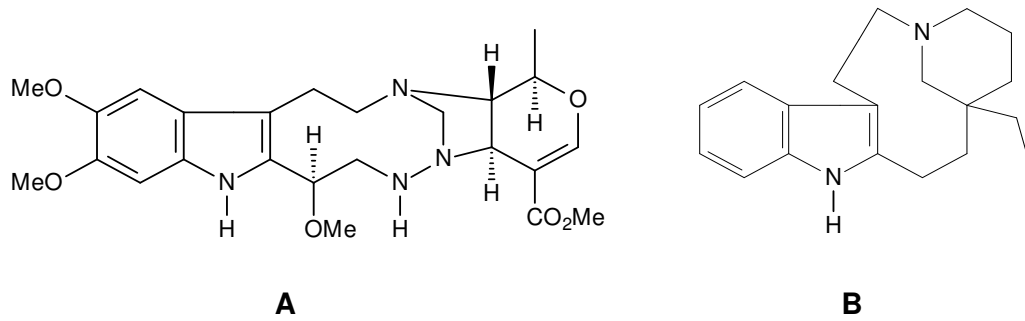


Figura 13. Alcalóides de *A. nitidum*.

2.3.4.4 *Aspidosperma ramiflorum*

Do 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* (Agripino et al., 2004).

Com o objetivo de se descobrir drogas menos tóxicas para o tratamento da leishmaniose, extratos de plantas brasileiras bioprodutoras de alcalóides vêm sendo avaliadas (Oliveira et al., 2002). Assim a atividade antileishmaniose do extrato alcaloidal das cascas do caule e substâncias puras de *A. ramiflorum* contra *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis* foram avaliados e constatou-se uma maior efetividade contra *L. amazonensis* do que contra a *L. brasiliensis*, tanto para o extrato ($DL_{50} < 47 \mu\text{g/mL}$) quanto para as substâncias puras, ramiflorina A ($DL_{50} = 16,3 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$) e ramiflorina B ($DL_{50} = 4,9 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) (8) (Tanaka et al., 2006(b) & Ferreira et al., 2004).

O mesmo grupo de trabalho avaliou a atividade antibacteriana, e neste foram constatados resultados de inibição de crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* do extrato básico e das substâncias ramiflorinas A e B (Figura 14A) (Oliveira, 1999 & Tanaka et al., 2006(b)), e antifúngica do extrato bruto metanólico e ramiflorinas A e B (Figura 14A) contra *Cryptococcus neoformans* (Souza et al., 2006).

Data de 1988 o primeiro trabalho de isolamento e identificação de alcalóides de *A. ramiflorum*, onde foram descritos os alcalóides β -ioimbina (OH-17 em β) (Figura 2), 10-metoxigeissoschizol (Figura 14B) presentes nas cascas do caule e sementes com estruturas já relatadas em outras espécies, e ramiflorinas

A e B (**Figura 14A**), presentes nas cascas do caule (Marques, 1988 & Marques et al., 1996). Somente dez anos depois um novo alcalóide foi isolado, a isositsiriquina (**Figura 14C**) (Oliveira, 1999).

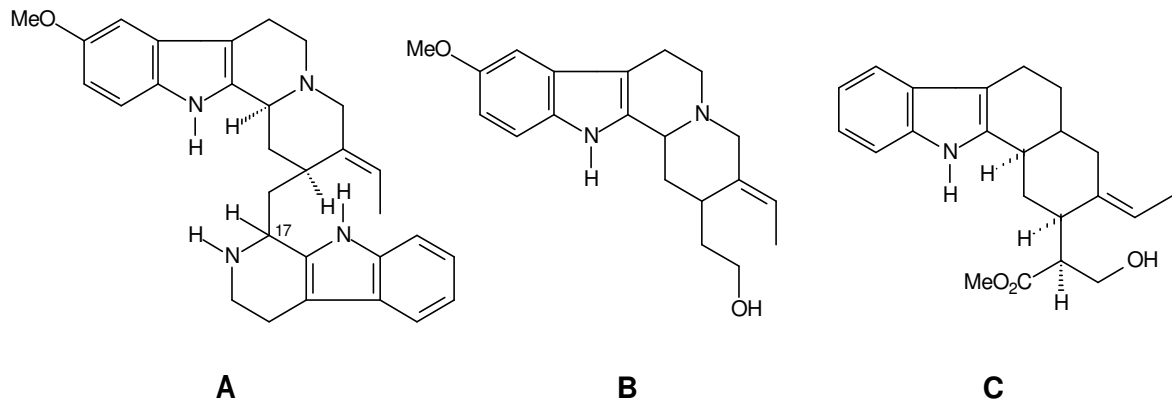


Figura 14. Alcalóides de *A. ramiflorum*.

2.3.4.5 *Aspidosperma ulei*

Campos et al. (2006) observaram o efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides de cascas da raiz de *A. ulei* (pequiá) comparado ao padrão ioimbina (**4**) como controle positivo mediado por mecanismos dopaminérgicos, noradrenérgicos e nitrgérgicos, resultados estes que, segundo os autores, aliados a estudos posteriores serão suficientes para embasar o uso popular de extratos de *A. ulei* como remédio para disfunção erétil.

A. ulei possui pelo menos cinco alcalóides indólicos isolados e identificados: 1,2-diidro-olivacina (**Figura 15A**), 1,2-diidro-elipticina (**Figura 15B**), *N*-metil-tetraidro-elipticina (**Figura 15C**), (D)-guatambuina (**Figura 15D**) e uleina (**Figura 15E**) (Marques, 1988).

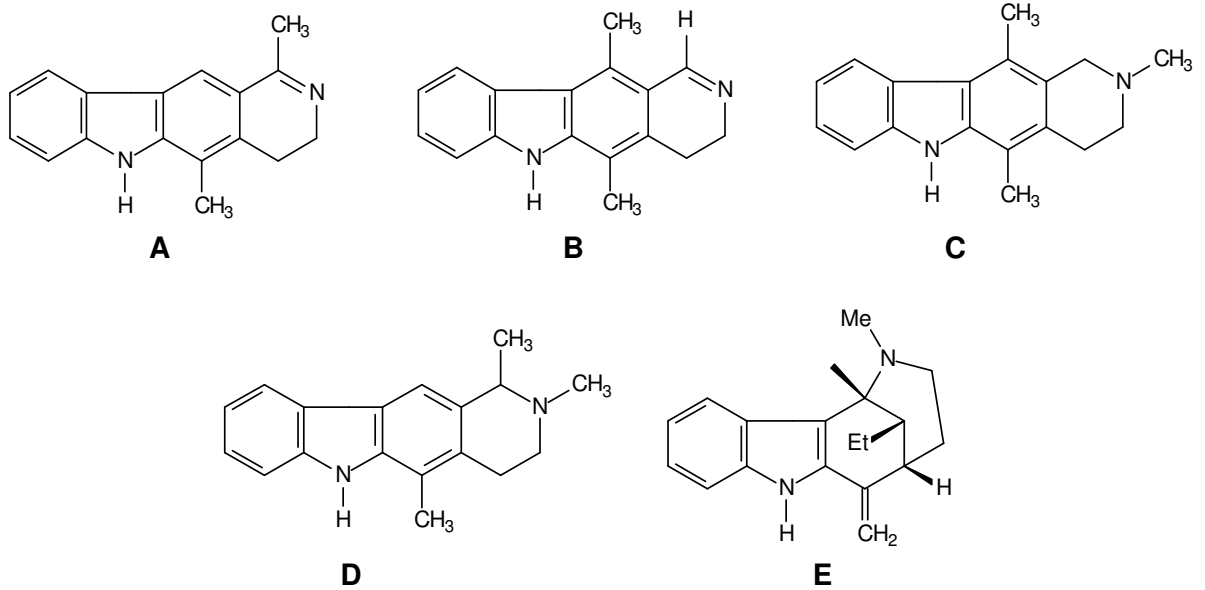


Figura 15. Alcalóides de *A. ulei*.

2.3.4.6 *Aspidosperma subicanum*

A. subicanum (guatambu) foi submetida a análises de dados de coleta, 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. Dessa forma pode ser assegurado certo grau de confiança às populações consumidoras (Morais et al., 2005 & Balzon et al., 2004).

Outro aspecto importante é a toxicidade aguda presente em algumas espécies de plantas consumidas como medicinais, dessa forma, o extrato metanólico das cascas do caule de *A. subicanum* foi submetida a estudos de toxicidade aguda de dose única e dose letal aproximada. Não havendo resposta significativa de letalidade para nenhum dos métodos aplicados em doses variando de 500 mg/Kg a 5000 mg/Kg, caracterizando a espécie praticamente como atóxica (Goloni et al., 2005).

De *A. subicanum* foram isolados e identificados a partir das cascas, dez alcalóides indólicos, dentre os quais, *N*-metil-tetraidro-elipticina (**Figura 15C**), uleina (**Figura 15E**), 3-*epi*-dasycarpidona (**Figura 16A**), 3-*epi*-uleina (**Figura 16B**), e subincamina (**Figura 16C**), (Marques, 1988).

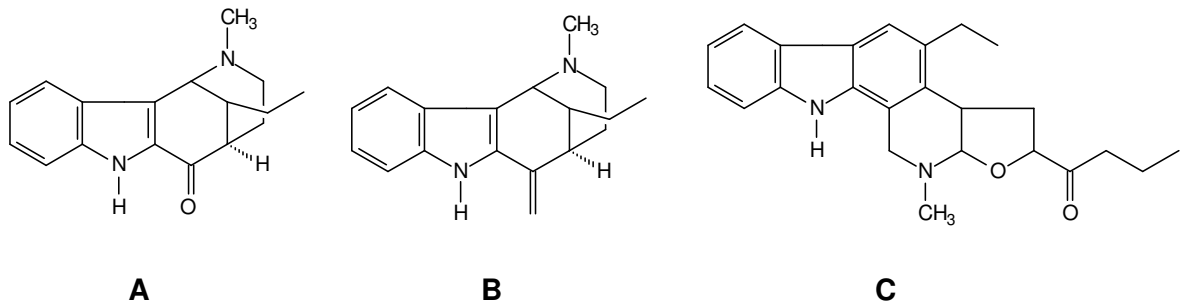


Figura 16. Alcalóides de *A. subicanum*.

2.3.4.7 *Aspidosperma excelsum*

A. 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, antiséptico, antimicrobiano, cicatrizante, aumento da pressão sanguínea e bronquite (Perez, 2002).

No Brasil, é utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamação, febre, diabete, câncer e malária (Mejia e Rengifo, 2000 & Perez, 2002). Apesar das várias indicações terapêuticas e de sua grande aplicação como poderoso agente antimalárico (Perez, 2002) poucas pesquisas biológicas têm sido 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 conhecidas cerca de 18 alcalóides indólicos, dos quais, a ioimbina (**Figura 2**), *N*-acetilaspidospermidina (**Figura 17A**), excelsinina (**Figura 17B**) e aspexcina (**Figura 17C**) (Marques, 1988).

A atividade antimicrobiana foi confirmada por Verpoorte et al. (1983) demonstrando a atividade inibitória no crescimento de *Bacillus subtilis* de pelo menos seis alcalóides desta espécie, tais como a 11-metoxitubotaivina (**Figura 17D**), ochrolifuanina A (**Figura 17E**), e tetraidrosecamina (**Figura 17F**), todos presentes nas raízes da planta (Marques, 1988).

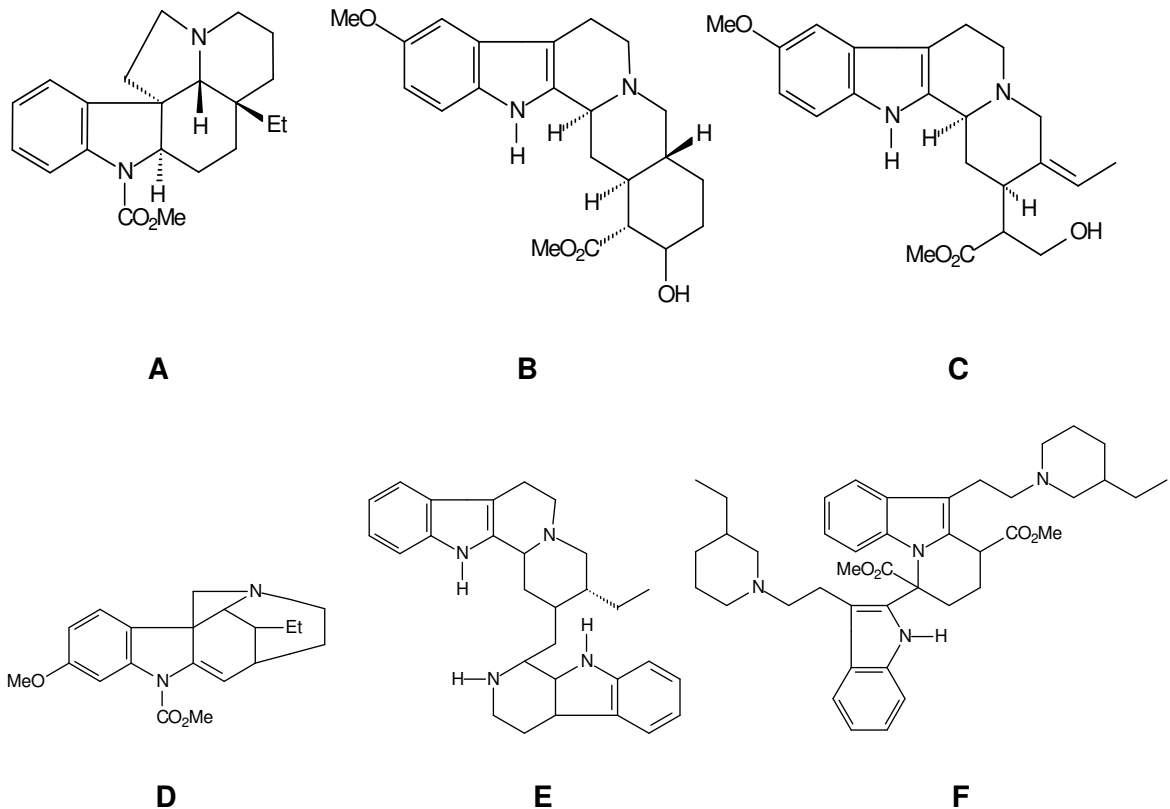


Figura 17. Alcalóides de *A. excelsum*.

2.3.4.8 *Aspidosperma marcgravianum*

A. marcgravianum (carapanaúba) é também uma espécie com indicações populares no tratamento da malária, além de diabetes e câncer, da qual são utilizadas madeira e cascas (Quiqnard, 2003).

De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcalóides indólicos, dentre estes a reserpinina (**Figura 18A**), reserpilina (**Figura 18B**), aspidoscarpina (**Figura 18C**), e aspidolimidina (**Figura 18D**) (Marques, 1988), os quais podem justificar sua atividade letal frente às larvas de *Artemia franciscana* na concentração de 500 µg/mL (Quiqnard, 2003), e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, entre outros (Verpoorte et al., 1982).

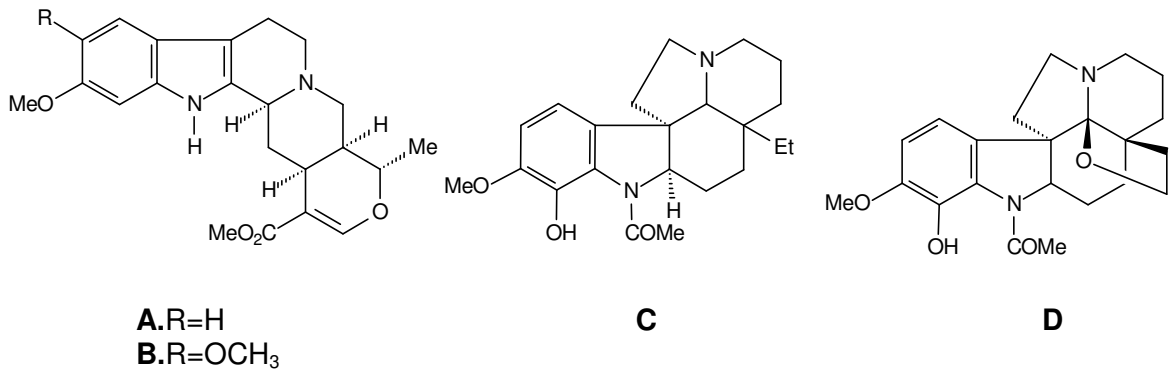


Figura 18. Alcalóides de *A. marcgravianum*.

2.3.4.9 *Aspidosperma macrocarpon*

Mesquita et al. (2007) testaram os extratos hexânico e etanólico das folhas, madeira, casca do caule, raízes e cascas das raízes de *A. macrocarpon* frente à 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 alcalóides indólicos, kopsanona (**Figura 19A**), *epi*-kopsanal-10-lactama (**Figura 19B**), kopsanol (**Figura 19C**), e *epi*-kopsanol (**Figura 19D**), (Ferreira-Filho et al., 1966), o que poderia justificar os resultados obtidos por Mesquita et al. (2007).

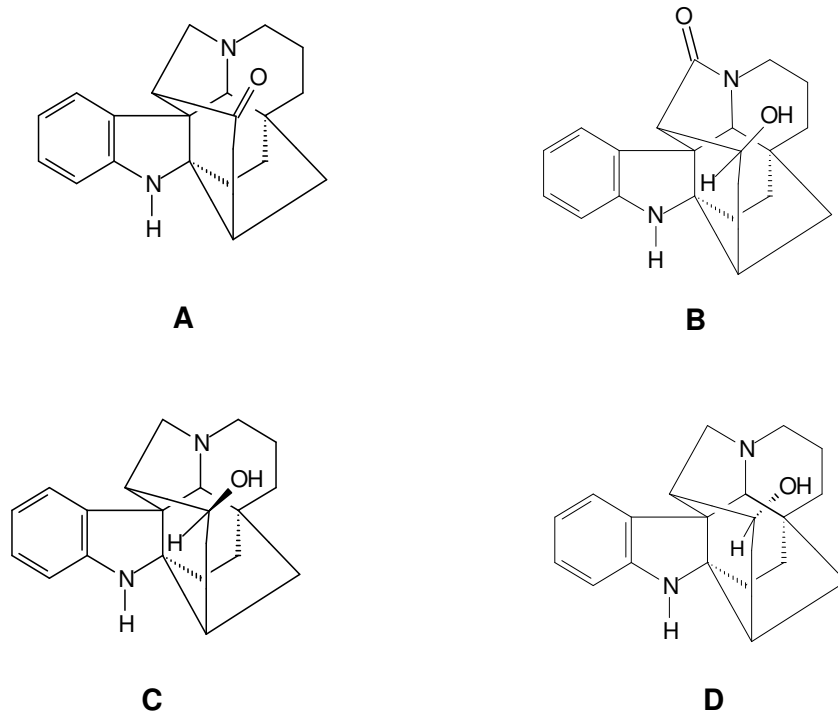
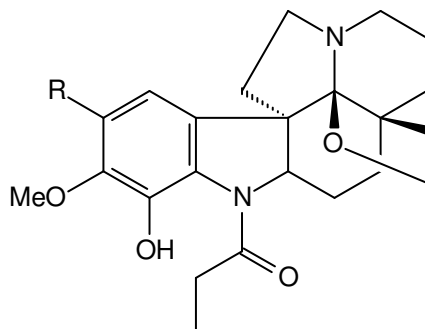


Figura 19. Alcalóides de *A. macrocarpon*.

2.3.4.10 *Aspidosperma megalocarpon*

A. megalocarpon foi avaliada quanto à sua atividade antimalárica por Weninger et al. (2001) realizando testes *in vitro* dos extratos obtidos em diclorometano e metanol contra *P. falciparum* obtendo-se bons resultados. Mitaine-Offer et al. (2002) testaram três dos quatro alcalóides isolados desta espécie, aspidolimidina (**Figura 18D**), aspidoalbina (**Figura 20A**) e fendlerina (**Figura 20B**) (madeira) (Mitaine et al., 1998) demonstrando uma baixa atividade antimalárica ao testar os alcalóides purificados.



A. R=OCH₃; **B.** R=H

Figura 20. Alcalóides de *A. megalocarpon*.

2.4. *Aspidosperma spruceanum*

A. spruceanum é o objeto de estudo deste trabalho. É uma árvore de 5-20 m, dotada de copa arredondada, com ramos sem lenticelas e com pelos diminutos dando uma aparência farinhenta. Tronco de 30-40 cm de diâmetro e revestido por grossa camada de cortiça. Folhas curto pecioladas, coriáceas, discoloradas, de 6-10 cm de comprimento, com a face superior glabra e a inferior densamente pubérola com pilosidade levemente ferrugínea. Fruto folículo denso-viloso, deiscente, com 8-10 sementes dispostas em cimeiras verticiladas ou racemo-corimbiformes (**Figura 21**) (Corrêa, 1931).

Ocorrem preferencialmente em solos argilosos de boa fertilidade. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis, facilmente disseminada pelo vento (Woodson, 1951).

Ocorrem desde a Amazônia até os Estados de São Paulo e Minas Gerais, tanto na mata primária como secundária (Lorenzi, 1998).

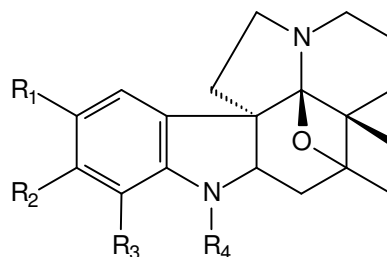
Fornecedora de madeira moderadamente pesada, dura, textura média, grã reversa, de boa resistência mecânica e bastante durável empregada na construção civil, como caibros, vigas e esteios, para obras externas como dormentes de estradas de ferro, postes, cruzetas e moirões.

A árvore apresenta copa ampla e frondosa quando completamente desenvolvida fora da mata, característica essa muito desejável no paisagismo rural. Quando jovem, entretanto, sua copa é graciosamente piramidal e muito ornamental, o que a recomenda para a arborização de parques e grandes jardins (Lorenzi, 1998).



Figura 21. *Aspidosperma spruceanum*. Em detalhes: tronco (1), folhas (2), galhos (2), frutos (2 e 3) e sementes (3).

Gilbert et al. (1965) e Bolzani et al. (1987) realizaram os únicos trabalhos de isolamento de substâncias do metabolismo secundário de *A. spruceanum*. A partir do extrato etanólico das cascas do caule foram isolados dois alcalóides nunca relatados na literatura a Aspidoalbina (**Figura 22A**) e *N*-acetil-*N*-despropionilaspidoalbina (*N*-acetilaspidoalbina) (**Figura 22B**) e Des-*O*-metilaspidolimidina (**Figura 22C**).



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 22. Alcalóides de *Aspidosperma spruceanum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Escolha da espécie vegetal

A escolha da planta foi realizada de acordo com os objetivos propostos pelo grupo de pesquisa de produtos naturais da UENF, e ainda devido aos poucos trabalhos realizados com determinadas espécies vegetais.

Dessa forma a escolha da espécie vegetal *Aspidosperma spruceanum* Muell. Arg. foi realizada segundo critérios filogenéticos e pela escassez de trabalhos de isolamento e identificação dos constituintes químicos do metabolismo secundário da mesma.

Outro aspecto importante para a escolha desta espécie pertencente ao gênero *Aspidosperma* refere-se à informação popular sobre o uso de espécies do gênero para o tratamento da malária e outras enfermidades como citado na revisão de literatura apresentada neste trabalho.

3.2. Coleta do material vegetal e identificação botânica

O material vegetal, constituído das cascas do caule, sementes, folhas, frutos sem as sementes e galhos de *Aspidosperma spruceanum* foram coletados em novembro de 2004 na reserva florestal da Cia. Vale do Rio Doce na cidade de

Linhares – ES, onde sua exsicata encontra-se depositada sob o número CVRD-273.

3.3. Secagem e moagem

As folhas, frutos sem as sementes, cascas do caule e galhos de *A. spruceanum* foram secos separadamente, inicialmente ao ar livre, sendo os mesmos revirados de tempos em tempos para evitar a proliferação de microorganismos, em seguida foram levados para estufa de secagem com circulação de ar a 40°C até perda total da umidade, e posteriormente moídos em moinho de martelos da marca Tecnal.

3.4. Obtenção dos extratos brutos

As sementes foram submetidas diretamente à infusão em metanol (Todos os solventes utilizados são PA da marca Synth) para realização de três extrações sucessivas. O extrato resultante foi submetido à evaporação em evaporador rotativo Büchi modelo R-114 sob pressão reduzida, e particionado segundo o esquema descrito na **Figura 23**, resultando em cinco extratos de polaridades distintas.

As cascas do caule, frutos e galhos secos triturados foram separadamente submetidos à maceração para realização de três extrações sucessivas, a frio, inicialmente com hexano e posteriormente com metanol. Os extratos resultantes foram filtrados e evaporados separadamente em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

As folhas secas e moídas foram submetidas a três extrações sucessivas, a frio, com metanol. O extrato livre de solvente foi submetido à extração ácido/base (Harborne, 1984) como descrito na **Figura 24**.

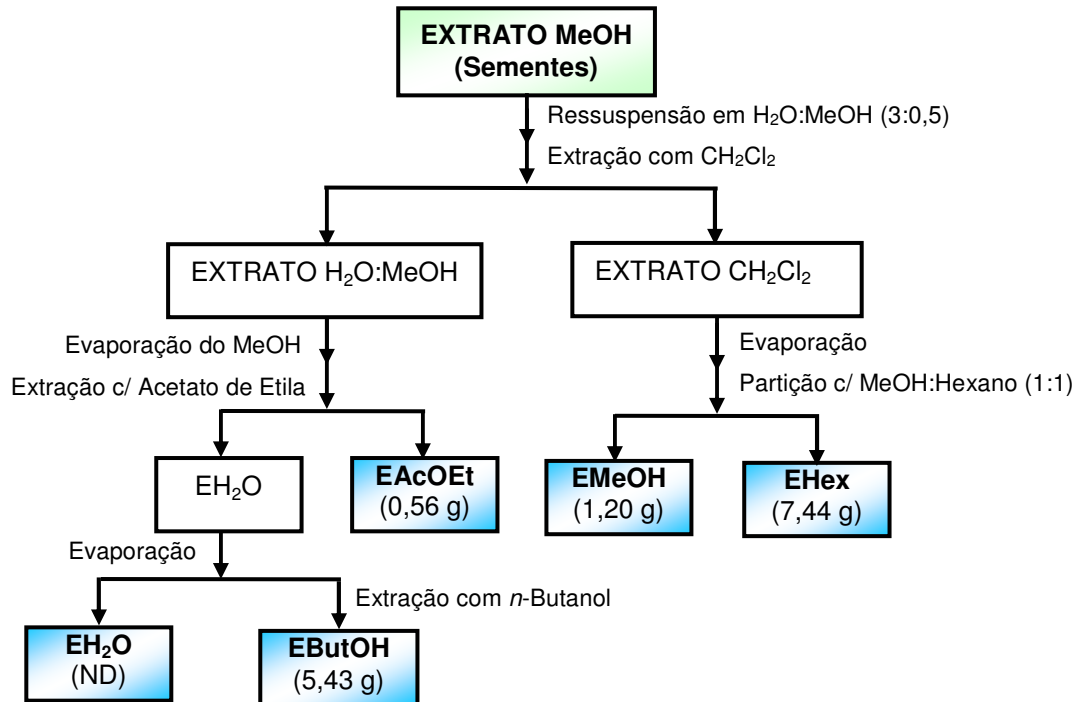


Figura 23. Fluxograma de partição do extrato metanólico das sementes de *A. spruceanum* com solventes imiscíveis para obtenção de extratos de polaridades distintas.

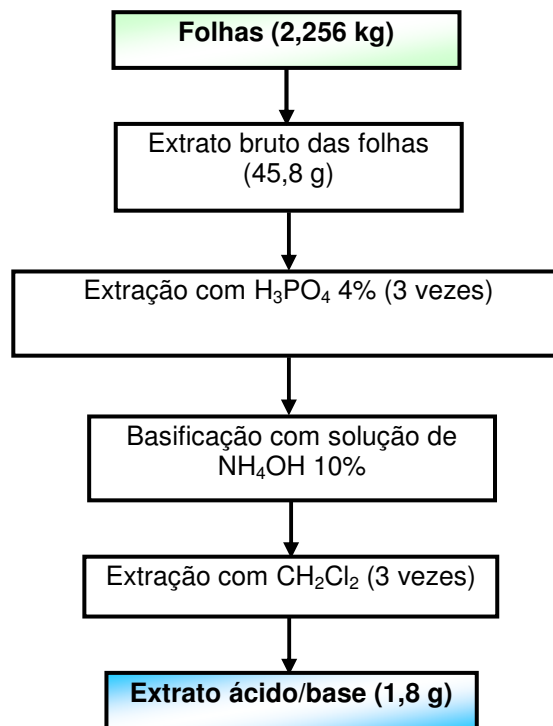


Figura 24. Fluxograma de obtenção do extrato ácido/base das folhas de *A. spruceanum*.

As massas secas obtidas nos extratos brutos das cascas do caule, folhas, galhos, frutos e sementes de *A. spruceanum* encontram-se descritas nas **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 1. Extratos brutos obtidos de partes vegetais de *A. spruceanum*

Espécie Vegetal	Parte do vegetal	Peso do Material (g)	Solventes	Peso dos Extratos (g)
<i>A. spruceanum</i>	Sementes	ND	b	18,54
	Cascas do caule	3095,30	a	7,71
			b	163,75
	Frutos	1293,50	a	113,29
			b	98,68
	Galhos	1772,0	a	20,46
b			58,49	
Folhas	2256,0	b	1,80	

a – Hexano; b – Metanol; ND - Não Determinado

Tabela 2. Extratos obtidos na partição do extrato metanólico das sementes

Espécie Vegetal	Parte do vegetal	Solventes	Peso dos Extratos (g)	Denominação
<i>A. spruceanum</i>	Sementes	Água	ND	EH₂OS
		Metanol	1,20	EMS
		Butanol	5,43	EBS
		Acetato de etila	0,56	EAS
		Hexano	7,44	EHS

ND - Não Determinado

3.5. Prospecção preliminar

Esta etapa foi realizada com o intuito de se confirmar a presença de alcalóides nos extratos obtidos. Para tal uma pequena quantidade dos extratos obtidos de *A. spruceanum* foi adicionada em cromatofolhas de gel de sílica (60 F₂₅₄), utilizando como revelador o reagente de Dragendorff, solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio (MERCK, 1972), onde foram confirmadas as presenças de alcalóides indólicos através da formação de coloração laranja-avermelhado (Matos, 1997).

Todos os extratos obtidos foram submetidos a testes para confirmação da presença de alcalóides nos mesmos, e destes apenas os extratos hexânico e metanólico das cascas do caule, e os extratos metanólico, acetato de etila, hexânico e butanólico das sementes apresentaram resultados positivos, o que justificaria o fracionamento para o isolamento dos alcalóides. Mas vale mencionar

que estes resultados não foram suficientes para justificar o fracionamento devido ao complexo perfil cromatográfico apresentado e às pequenas quantidades em massa obtidas. Dessa forma foram submetidos ao fracionamento, os extratos hexânico obtidos da partição do extrato metanólico das sementes, e do metanólico e hexânico das cascas do caule.

3.6. Fracionamento dos extratos brutos de *A. spruceanum*

Foram utilizadas técnicas de cromatografia em coluna a pressão normal e cromatografia em camada delgada analítica e preparativa.

Nas análises de cromatografia em coluna foram utilizados gel de sílica Merck Darmstadt 60 (0,063–0,200 mm) e alumina neutra.

As análises de cromatografia em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck. As substâncias foram visualizadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (Aldrich) a 254 nm e 365 nm e/ou pulverizadas com os seguintes reagentes cromogênicos: Dragendorff e H₂SO₄ conc./Vanilina, seguido de aquecimento.

As frações descritas como misturas complexas, com perfis semelhantes a outras, com massas insuficientes ou impurezas não foram trabalhadas.

3.6.1. Fracionamento do **Extrato Hexânico das Cascas - EHC**

Inicialmente o extrato em hexano das cascas de *A. spruceanum* foi submetido à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Utilizando-se como eluente hexano (100%), com um gradiente de polaridade até acetato de etila (100%). Foram coletadas 68 frações, as quais foram posteriormente reunidas em 10 novas frações através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações encontra-se detalhado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Estudo cromatográfico do extrato hexânico das cascas do caule de *Aspidosperma spruceanum*

Frações Reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	1	374,8	Mistura complexa
7-12	7	2917,9	Mistura complexa
13-17	13	1299,4	Mistura complexa
19-29	18	135,7	Mistura complexa
30-32	30	372,5	Mistura complexa
33-42	33	307,4	Mistura complexa
43-45	43	453,7	Trabalhada
46-51	46	475,8	Trabalhada
52-54	52	63,0	Perfil semelhante a 46 e 55
55-68	55	364,5	Trabalhada

Análise da fração 43 (453,7 mg)

A fração 43 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Inicialmente utilizou-se como eluente hexano (100%), com um gradiente de polaridade até acetato de etila (100%), na qual foram coletadas 26 frações, que posteriormente, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 3 novas frações. O estudo cromatográfico da fração encontra-se detalhado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Estudo cromatográfico da fração 43

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-3	43.1	87,2	Mistura complexa
4-19	43.4	323,0	Trabalhada
20-26	43.20	32,0	Impureza

Análise da fração 43.4 (323,0 mg)

A fração 43.4 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando inicialmente como eluente diclorometano (100%), com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (98,5:1,5 v/v). Foram coletadas 86 frações,

que através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica foram reunidas em 7 novas frações. A **Tabela 5** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração 43.4

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-30	43.4.1	160,0	Perfil semelhante a 43.4.51
31-50	43.4.31	48,5	Perfil semelhante a 43.4.51
51-82	43.4.51	70,9	Trabalhada
83-86	43.4.83	31,6	Impureza

Análise da fração 43.4.51 (70,9 mg)

A fração 43.4.51 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizando-se inicialmente uma mistura de eluentes, hexano:acetato de etila (95:5 v/v), com um aumento de gradiente de polaridade até acetato de etila (100%). Deste procedimento foram obtidas 40 frações, as quais foram reunidas em 7 frações de acordo com os perfis cromatográficos apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração 43.4.51

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0	43.4.51.0	2,7	Contém o alcalóide 43.4.51.1
1-10	43.4.51.1	19,0	Desmetoxipalósina
11-16	43.4.51.11	2,2	Contém o alcalóide 43.4.51.1
17-18	43.4.51.17	2,5	Contém o alcalóide 43.4.51.1
19-23	43.4.51.19	5,3	Contém o alcalóide 43.4.51.1
24-36	43.4.51.24	18,0	Contém o alcalóide 43.4.51.1
37-40	43.4.51.37	0,8	Não trabalhada

Análise da fração 46 (475,8 mg)

A fração 46 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo usado inicialmente como eluente diclorometano (100%), com um

aumento de gradiente de polaridade até a mistura, diclorometano:metanol (90:10 v/v), sendo coletadas 44 frações, que através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica foram reunidas em 7 novas frações. A **Tabela 7** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração 46

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	46.1	3,8	Não trabalhada
7	46.7	4,1	Aspidolimina
8-11	46.8	85,0	Trabalhada
12-13	46.12	39,9	Trabalhada
14-15	46.14	45,0	Igual a 46.14 + impurezas
16-28	46.16	123,0	Igual a 46.14
29-44	46.29	170,0	Não trabalhada

Análise da fração 46.8 (85,0 mg)

A fração 46.8 foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa usando como eluente diclorometano:metanol (85:15 v/v) obtendo-se desta 6 novas frações, descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração 46.8

Frações obtidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1	46.8.1	13,8	Não trabalhada
2	46.8.2	9,9	Não trabalhada
3	46.8.3	10,9	Contém o alcalóide 46.8.6
4	46.8.4	15,8	Contém o alcalóide 46.8.6
5	46.8.5	2,8	Contém o alcalóide 46.8.6
6	46.8.6	30,6	Aspidolimina

Análise da fração 46.12 (39,9 mg)

A fração 46.12 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo usado inicialmente como eluente diclorometano (100%), com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3 v/v), sendo coletadas 65 frações, que através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica foram reunidas em 7 novas frações. A **Tabela 9** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 9. Estudo cromatográfico da fração 46.12

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0-4	46.12.0	2,1	Contém o alcalóide 46.12.5
5-19	46.12.5	15,9	Desmetoxipalosina
20-21	46.12.20	4,0	Contém o alcalóide 46.12.5
22-27	46.12.22	6,1	Contém o alcalóide 46.12.5
28-48	46.12.28	3,8	Contém o alcalóide 46.12.5
49-59	46.12.49	1,8	Contém o alcalóide 46.12.5
60-65	46.12.60	1,0	Contém o alcalóide 46.12.5

Análise da fração 55 (364,5 mg)

A fração 55 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, inicialmente eluída com diclorometano (100%), e com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (50:50 v/v), onde foram coletadas 50 frações, que após análise em cromatografia em camada delgada comparativa foram reunidas em 8 novas frações (**Tabela 10**).

Tabela 10. Estudo cromatográfico da fração 55

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-7	55.1	12,0	Mistura complexa
8-11	55.8	155,0	Trabalhada
12-13	55.12	25,2	Perfil semelhante a 55.8
14-15	55.14	13,0	Perfil semelhante a 55.8
16-19	55.16	38,3	Perfil semelhante a 55.8
20-30	55.20	89,0	Trabalhada
31-45	55.31	21,0	Perfil semelhante a 55.20
46-50	55.46	17,2	Não trabalhada

Análise da fração 55.8 (155 mg)

A fração 55.8 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%), com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (50:50 v/v), onde foram coletadas 62 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica foram reunidas em 6 novas frações. A **Tabela 11** descreve o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 11. Estudo cromatográfico da fração 55.8

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0-2	55.8.0	2,1	Contém o alcalóide 55.8.7
3	55.8.3	4,0	Contém o alcalóide 55.8.7
4-6	55.8.4	2,0	Contém o alcalóide 55.8.7
7-19	55.8.7	27,4	Aspidocarpina
20-59	55.8.20	92,2	Trabalhada
60-62	55.8.60	12,0	Não trabalhada

Análise da fração 55.8.20 (92,2 mg)

A fração 55.8.20 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizando inicialmente como eluente diclorometano (100%), com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (60:40 v/v), sendo coletadas 55 frações, que foram reunidas em 3 novas frações, através de comparação por

cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações coletadas está descrito na **Tabela 12**.

Tabela 12. Estudo cromatográfico da fração 55.8.20

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0-2	55.8.20.0	13,0	Mistura complexa
3-29	55.8.20.3	70,5	Aspidocarpina
30-55	55.8.20.46	5,0	Não trabalhada

Análise da fração 55.20 (89,0 mg)

A fração 55.20 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizando inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade de eluição até diclorometano:metanol (50:50 v/v), sendo coletadas 96 frações, que foram reunidas em 9 novas frações, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações coletadas está descrito na **Tabela 13**.

Tabela 13. Estudo cromatográfico da fração 55.20

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0-14	55.20.0	6,9	Mistura complexa
15-18	55.20.15	3,0	Contém o alcalóide 55.20.43
19-30	55.20.19	1,1	Contém o alcalóide 55.20.43
31-42	55.20.31	17,2	Contém o alcalóide 55.20.43
43-66	55.20.43	49,0	Trabalhada
67-72	55.20.67	6,2	Contém o alcalóide 55.20.43
73-96	55.20.73	2,4	Contém o alcalóide 55.20.43

Análise da fração 55.20.43 (49,0 mg)

A fração 55.20.43 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol

(50:50 v/v), onde foram coletadas 47 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 14** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 14. Estudo cromatográfico da fração 55.20.43

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
0-13	55.20.43.4	8,6	Contém o alcalóide 55.20.43.14
14-26	55.20.43.14	19,1	Aspidospermidina
27-47	55.20.43.27	21,4	Contém o alcalóide 55.20.43.14

A seguir são apresentados os fluxogramas que resumem os procedimentos experimentais adotados no fracionamento do extrato hexânico das cascas do caule de *A. spruceanum* **Figuras 25, 26 e 27**.

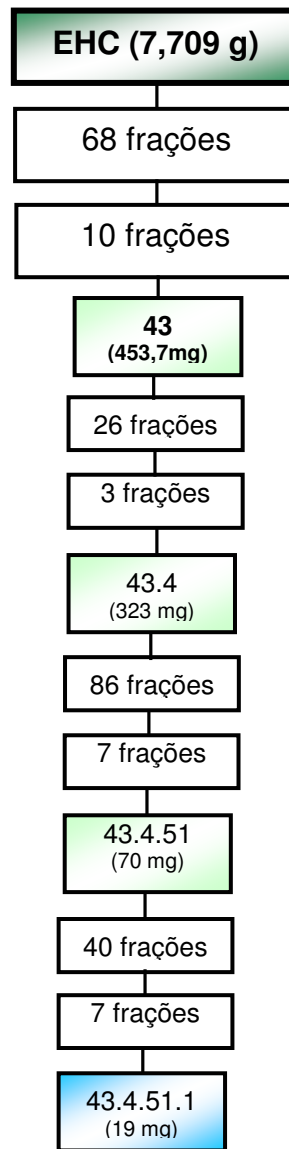


Figura 25. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração **43** obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de *A. spruceanum*.

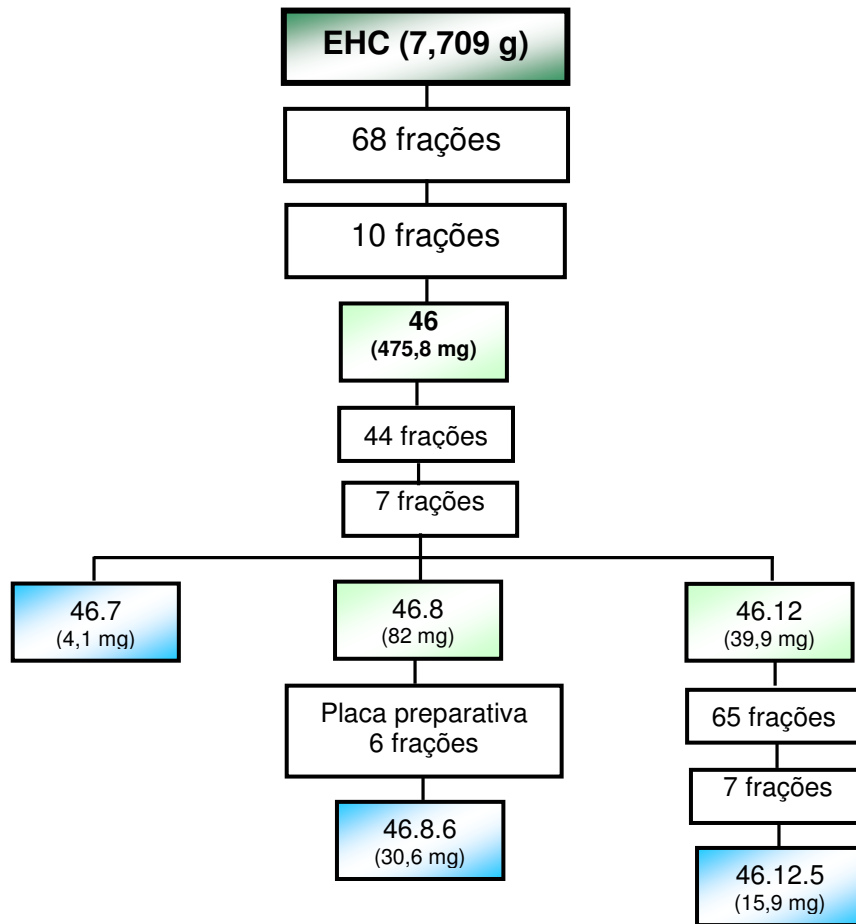


Figura 26. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 46 obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de *A. spruceanum*.

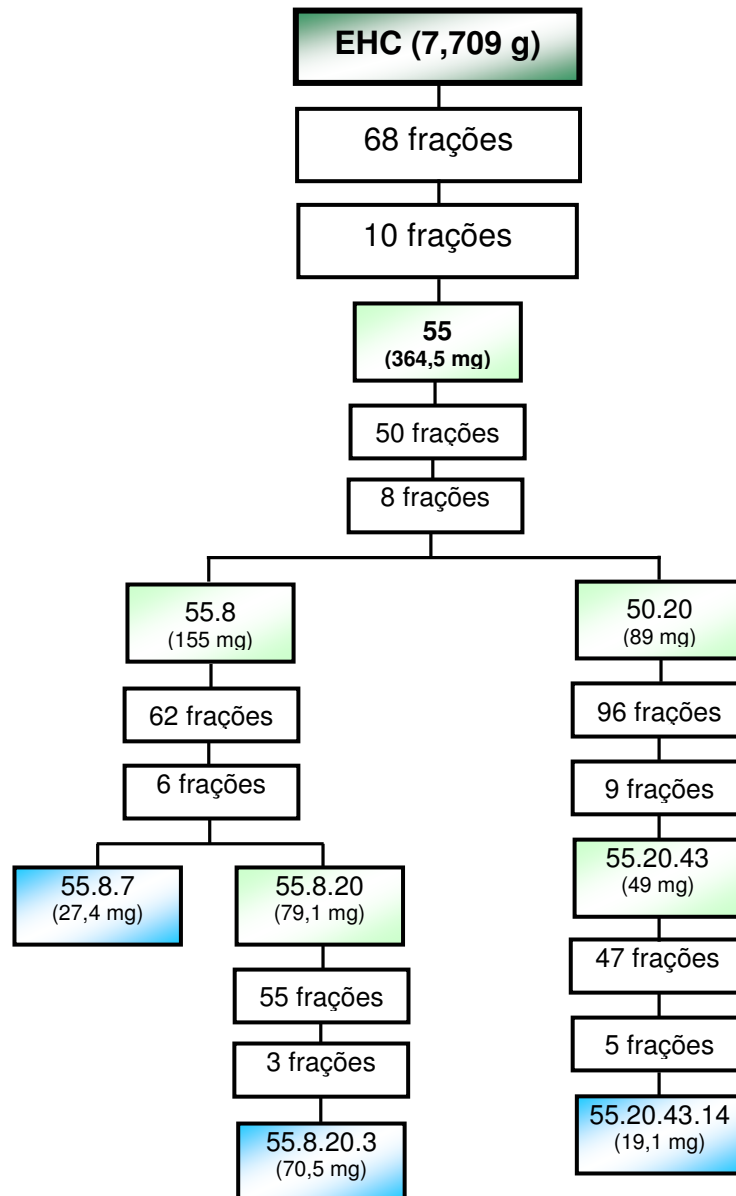


Figura 27. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 55 obtida a partir do extrato hexânico das cascas do caule de *A. spruceanum*.

3.6.2. Fracionamento do Extrato Metanólico das Cascas – EMC

O extrato em metanol das cascas do caule de *A. spruceanum* foi submetido a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, usando inicialmente como eluente diclorometano (100%), com gradiente de polaridade até metanol puro (100%), sendo coletadas 30 frações, que posteriormente foram reunidas em 7 novas frações através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica. O estudo cromatográfico das frações está na **Tabela 15**.

Tabela 15. Estudo cromatográfico do extrato metanólico das cascas do caule de *A. spruceanum*

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-6	2	323,4	Mistura complexa
7-8	8	130,6	Perfil semelhante a 19
9	9	16,2	Perfil semelhante a 19
10-16	10	198,2	Perfil semelhante a 19
17-18	18	150,9	Perfil semelhante a 19
19-26	19	3837,1	Trabalhada
27-30	20	5756,8	Não trabalhada

Análise da fração 19 (3837,1 mg)

A fração 19 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (70:30 v/v), onde foram coletadas 28 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 4 novas frações. A **Tabela 16** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 16. Estudo cromatográfico da fração 19

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-3	19.1	323,4	Mistura complexa
4-10	19.10	250,8	Trabalhada
11-18	19.11	817,1	Perfil semelhante a 19
19-28	19.19	1206,8	Mistura complexa

Análise da fração 19.10 (250,8 mg)

A fração 19.10 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano puro com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (92:8 v/v), onde foram coletadas 54 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 10 novas frações. A **Tabela 17** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 17. Estudo cromatográfico da fração 19.10

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-4	19.10.1	62,7	Mistura complexa
5-7	19.10.5	1,5	Massa insuficiente
8-9	19.10.8	8,6	Perfil semelhante a 19.10.45
10-13	19.10.10	3,4	Perfil semelhante a 19.10.45
14-23	19.10.14	12,2	Perfil semelhante a 19.10.45
24-26	19.10.24	8,6	Perfil semelhante a 19.10.45
27-28	19.10.27.	19,8	Perfil semelhante a 19.10.45
39-44	19.10.39	15,4	Perfil semelhante a 19.10.45
45-49	19.10.45	84,0	Trabalhada
50-54	19.10.54	10,2	Mistura complexa

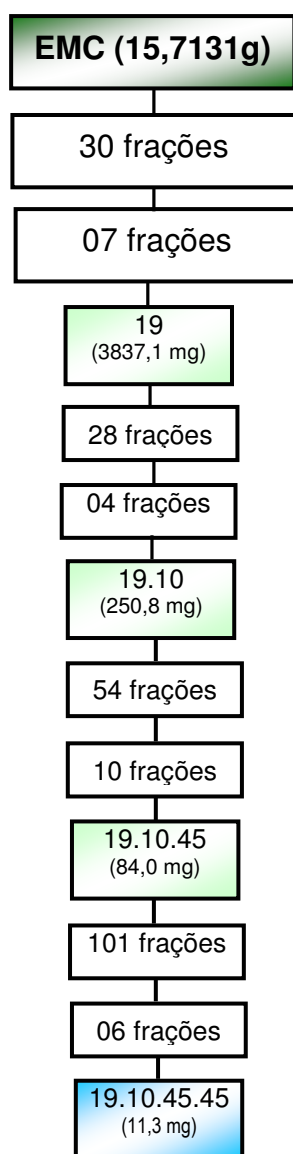
Análise da fração 19.10.45 (84,0 mg)

A fração 19.10.45 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com alumina neutra, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3 v/v), onde foram coletadas 101 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 6 novas frações. A **Tabela 18** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 18. Estudo cromatográfico da fração 19.10.45

Frações reunidas	Códigos	Massa (mg)	Observação
1-4	19.10.45.17	13,1	Mistura complexa
5-7	19.10.45.45	11,3	Mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B Contém o alcalóide 19.10.45.45
8-9	19.10.45.57	7,9	
10-13	19.10.45.69	20,4	Mistura complexa
14-23	19.10.45.94	27,2	Mistura complexa
24-26	19.10.45.99	4,1	Mistura complexa

A seguir são apresentados os organogramas contendo os esquemas operacionais adotados no fracionamento do extrato metanólico das cascas do caule de *A. spruceanum* (**Figura 28**).

**Figura 28.** Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 19 obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *A. spruceanum*.

3.6.3. Fracionamento do Extrato Metanólico das Sementes - EMS

Inicialmente o extrato metanólico das sementes foi submetido ao procedimento de partição segundo esquema descrito em 3.4 na Figura 23, resultando na obtenção de 5 extratos de polaridades distintas. Destes o extrato hexânico foi submetido ao fracionamento descrito a seguir.

3.6.3. Fracionamento do Extrato Hexânico das Sementes resultante da partição – EHS.

A fração hexânica (EHS) das sementes de *A. spruceanum* resultante da partição foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com gel de sílica utilizando inicialmente como eluente diclorometano (100%) e aumentando a polaridade com uso de metanol até 60%. Foram coletadas 48 frações, posteriormente reunidas em 06 frações (Tabela 19).

Tabela 19. Estudo cromatográfico da fração hexânica das sementes de *Aspidosperma spruceanum*

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1	1	148,6	Mistura complexa
2-7	2	103,2	Mistura complexa
8-9	5	3953,8	Trabalhada
10-12	6	147,2	Perfil semelhante a 5
13-15	7	1007,0	Trabalhada
16-48	9	2132,0	Trabalhada

Análise da fração 5 (3953,8 mg)

A fração 5 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3 v/v), onde foram coletadas 22 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 4 novas frações. A Tabela 20 mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 20. Estudo cromatográfico da fração 5

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1	5.1	3201,7	Trabalhada
2	5.2	712,8	Perfil semelhante a 5.1
3	5.3	20,5	Mistura complexa
4-16	5.16	4,4	Mistura complexa

Análise da fração 5.1 (3201,7 mg)

A fração 5.1 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (90:10 v/v), onde foram coletadas 45 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 3 novas frações. A **Tabela 21** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 21. Estudo cromatográfico da fração 5.1

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-28	5.1.1	1210,5	Trabalhada
29-33	5.1.29	1744,0	Trabalhada
34-44	5.1.38	86,7	Mistura complexa

Análise da fração 5.1.1 (1210,5 mg)

A fração 5.1.1 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo inicialmente utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (95:5 v/v), onde foram coletadas 89 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 22** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 22. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
01-25	5.1.1.1	124,7	Mistura complexa
26-29	5.1.1.2	1,1	Perfil semelhante a 5.1.1.1
30-45	5.1.1.3	760,9	Trabalhada
46-75	5.1.1.4	179,7	Perfil semelhante a 5.1.1.3
76-89	5.1.1.5	36,8	Mistura complexa

Análise da fração 5.1.1.3 (760,9 mg)

A fração 5.1.1.3 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (98,5:1,5 v/v), onde foram coletadas 37 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 4 novas frações. A **Tabela 23** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 23. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1.3

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
01-16	5.1.1.3.1	367,3	Mistura complexa
17-25	5.1.1.3.2	366,8	Perfil semelhante a 5.1.1.3.4
26-32	5.1.1.3.3	40,5	Perfil semelhante a 5.1.1.3.4
33-37	5.1.1.3.4	20,6	Mistura dos alcalóides Fendlerina e Aspidolimidina

Análise da fração 5.1.1.3.2 (366,8 mg)

A fração 5.1.1.3.2 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (99:1 v/v), onde foram coletadas 23 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 6 novas frações **Tabela 24.**

Tabela 24. Estudo cromatográfico da fração 5.1.1.3.2

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
01-3	5.1.1.3.2.1	1,0	Massa insuficiente
04-07	5.1.1.3.2.4	68,2	Mistura dos alcalóides Obscurinervidina e Obscurinervina
08	5.1.1.3.2.8	86,9	
09-18	5.1.1.3.2.18	11,7	Perfil semelhante a 5.1.1.3.2.4
19-20	5.1.1.3.2.20	2,4	Massa insuficiente
21-23	5.1.1.3.2.23	7,7	Mistura complexa

Análise da fração 5.1.29 (1744,0 mg)

A fração 5.1.29 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3 v/v), onde foram coletadas 17 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 3 novas frações. A **Tabela 25** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 25. Estudo cromatográfico da fração 5.1.29

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-8	5.1.29.1	1129,5	Mistura complexa
9-16	5.1.29.2	91,1	Trabalhada
12-17	5.1.29.3	140,9	Perfil semelhante a 5.1.29.2

Análise da fração 5.1.29.2 (91,1 mg)

A fração 5.1.29.2 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com alumina neutra, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até metanol 1%, onde foram coletadas 20 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 4 novas frações. A **Tabela 26** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 26. Estudo cromatográfico da fração 5.1.29.2

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-20	5.1.29.2.1	2,3	Mistura complexa
9-21	5.1.29.2.9	45,4	Mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D
11	5.1.29.2.11	3,1	
12-20	5.1.29.2.12	5,2	Contém o alcalóide 5.1.29.2.9

Análise da fração 7 (1007,7 mg)

Inicialmente a fração 7 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (75:25 v/v), onde foram coletadas 116 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 27** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 27. Estudo cromatográfico da fração 7

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-36	7.1	0,8	Mistura complexa
37-47	7.37	1,7	Mistura complexa
48-54	7.54	52,4	Trabalhada
55-85	7.85	834,7	Perfil semelhante a 7.54
86-116	7.116	68,0	Mistura complexa

Análise da fração 7.54 (52,4 mg)

A fração 7.54 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (80:20 v/v), onde foram coletadas 39 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 28** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 28. Estudo cromatográfico da fração 7.54

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-2	7.54.1	8,5	Mistura complexa
3	7.54.3	0,5	Massa insuficiente
4-5	7.54.5	5,1	Perfil semelhante a 7.54.6
6	7.54.6	35,2	Trabalhada
7	7.54.7	1,1	Massa insuficiente

Análise da fração 7.54.6 (35,2 mg)

Inicialmente a fração 7.54.6 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com alumina, sendo utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3v/v), onde foram coletadas 25 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 29** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 29. Estudo cromatográfico da fração 7.54.6

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
01-02	7.54.6.20	6,7	Massa insuficiente
03-13	7.54.6	19,9	Mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B
14-16	7.54.6.26	1,7	Contém o alcalóide 7.54.6
17	7.54.6.28	0,7	Contém o alcalóide 7.54.6
18-25	7.54.6.29	2,6	Contém o alcalóide 7.54.6

Análise da fração 9 (2132,0 mg)

A fração 9 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo inicialmente utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (9:1 v/v), onde foram coletadas 37 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 7 novas frações. A **Tabela 30** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 30. Estudo cromatográfico da fração 9

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-6	9.1	103,9	Mistura complexa
7	9.7	256,98	Perfil semelhante a 9.17
8	9.8	69,5	Perfil semelhante a 9.17
9-10	9.10	205,2	Perfil semelhante a 9.17
11-26	9.17	1024,0	Trabalhada
27-68	9.68	498,26	Perfil semelhante a 9.17
69-86	9.86	302,4	Perfil semelhante a 9.17

Análise da fração 9.17 (1024,0 mg)

A fração 9.17 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de eluição até diclorometano:metanol (95:5 v/v), onde foram coletadas 40 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 5 novas frações. A **Tabela 31** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 31. Estudo cromatográfico da fração 9.17

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
0-9	9.17.9	113,6	Mistura complexa
10-21	9.17.21	40,8	Trabalhada
22-29	9.17.29	20,6	Perfil semelhante a 9.17.21
30-32	9.17.32	803,1	Trabalhada
33-40	9.17.40	571,7	Perfil semelhante a 9.17.32

Análise da fração 9.17.21 (40,8 mg)

A fração 9.17.21 foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo utilizado inicialmente como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (97:3 v/v), onde foram coletadas 21 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 4 novas frações. A **Tabela 32** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 32. Estudo cromatográfico da fração 9.17.21

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
1-21	9.17.21	17,2	Mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B
29	9.17.21.29	2,39	Contém o alcalóide 9.17.21
30	9.17.21.30	5,2	Contém o alcalóide 9.17.21
31	9.17.21.31	8,23	Contém o alcalóide 9.17.21

Análise da fração 9.17.32 (83,1 mg)

A fração 9.17.32 foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, sendo inicialmente utilizado como eluente diclorometano (100%) com gradiente de polaridade até diclorometano:metanol (93:7v/v), onde foram coletadas 25 frações que, através de comparação por cromatografia em camada delgada analítica, foram reunidas em 3 novas frações. A **Tabela 33** mostra o estudo cromatográfico das frações coletadas.

Tabela 33. Estudo cromatográfico da fração 9.17.32

Frações reunidas	Fração resultante	Massa (mg)	Observação
0-1	9.17.32.1	1,1	Massa insuficiente
2-3	9.17.32.2	37,5	Mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B
3-14	9.17.32.3	39,4	Contém o alcalóide 9.17.32.2

A seguir são apresentados os organogramas contendo os esquemas operacionais adotados no fracionamento do extrato hexânico das sementes de *A. spruceanum* **Figuras 29 e 30**.

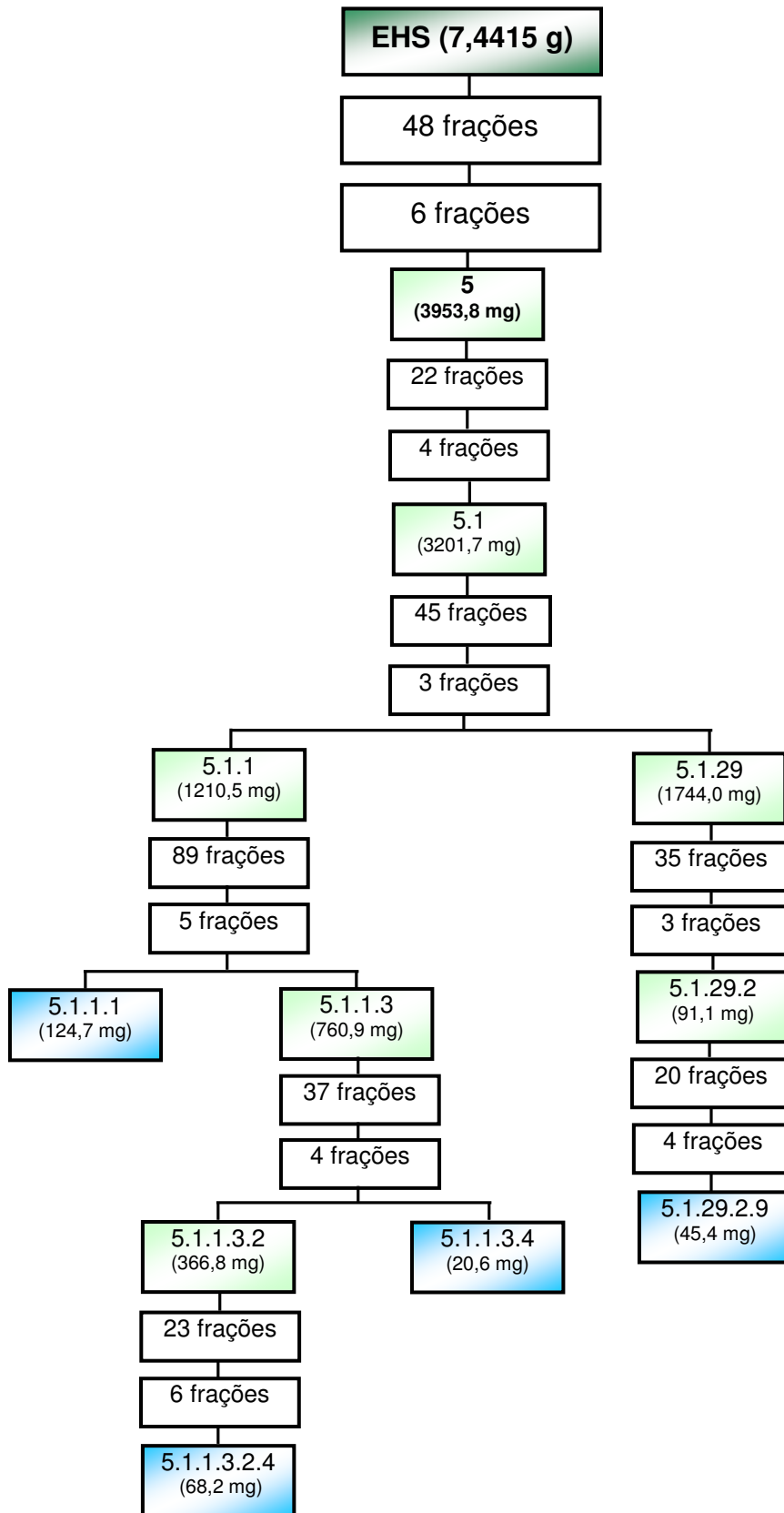


Figura 29. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento da fração 5 obtida a partir do extrato hexânico das sementes de *A. spruceanum*.

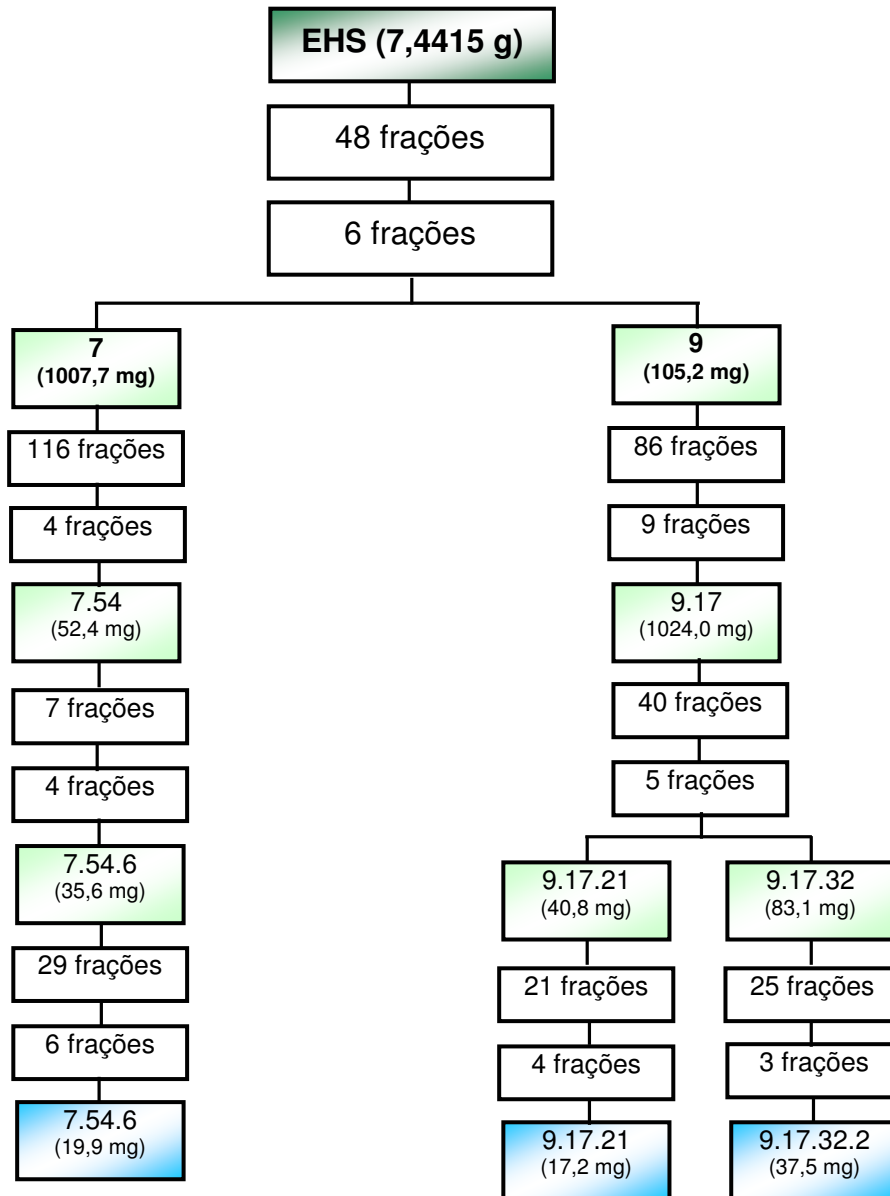


Figura 30. Fluxograma do esquema operacional adotado no fracionamento das frações 7 e 9 obtidas a partir do extrato hexânico das sementes de *A. spruceanum*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação estrutural dos alcalóides isolados de *Aspidosperma spruceanum*

As análises espectrométricas foram realizadas em aparelhos do Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, na Universidade Federal do Ceará e na Universidade de Ribeirão Preto.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C) foram obtidos em um espectrômetro Jeol (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e em um Brüker (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$), utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

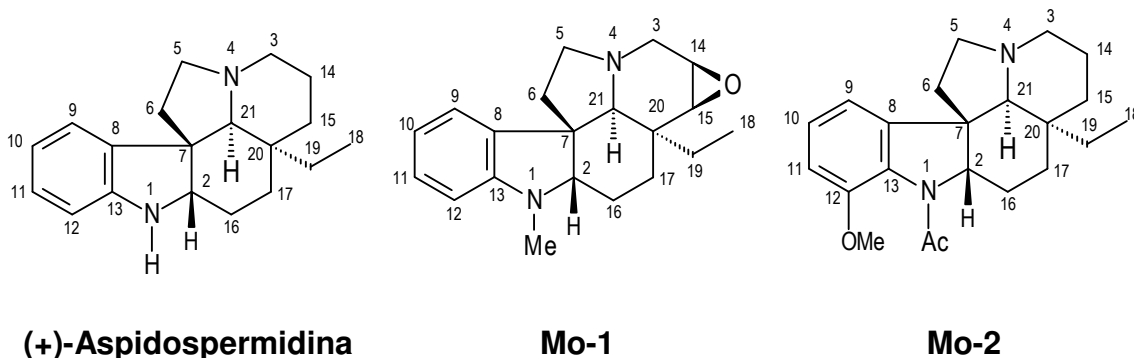
Os espectros de massas foram obtidos por CG/EM em um aparelho CG/EM–QP–5050 A SHIMADZU, utilizando impacto de elétrons (70 eV), e por ESI-MS/MS em um espectrômetro Q-TOF MicroTM MICROMASS.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando pastilha de KBr, em um equipamento FTIR-8300 da marca SHIMADZU.

As análises de poder ótico rotatório foram realizadas em um polarímetro digital 343 da Perkin Elmer.

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

4.1.1. Determinação estrutural do alcalóide (+)-aspidospermidina



A substância presente na fração **55.20.43.14** apresentou-se como um sólido amorfo de cor marrom alaranjado, com ponto de fusão 180°C, e com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} +40^\circ$ ($1,5 \times 10^{-4}$, CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste positivo com o reagente de Dragendorff.

Analisando o espectro na região do infravermelho (IV) (**Espectro 1, p.13, v.2**) pode-se observar a presença de absorções em 3399 cm^{-1} (N-H indólico), característica de grupamento amina, e 742 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} e 2929 cm^{-1} de anel aromático substituído (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 3-6, p.15-18, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) na região correspondente a hidrogênios aromáticos, e no espectro de RMN ^{13}C -APT (**Espectro 7, p.19, v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 19 átomos de carbono.

O espectro de massas de alta resolução (EM-EM) (**Espectro 2, p.14, v.2**) mostrou um sinal em $m/z = 283,2192$ correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -APT, pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2$ para o alcalóide presente na fração 55.20.43.14.

No espectro de massas foram observados ainda a presença dos íons $m/z = 252,1626$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_6]$, indicando a perda de um grupamento etila e hidrogênio, e do íon $m/z = 252,1752$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{CH}_3\text{NH}_2]$ indicando a perda de metilamina (**Figura 31**). Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para o alcalóide presente na fração 55.20.43.14 e são coerentes com o espectro de massas para o alcalóide aspidospermidina, isolado anteriormente de *Aspidosperma quebracho blanco* (Biemann et al., 1963 & Brown e Djerassi, 1964).

O espectro de RMN ^1H apresenta quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos a δ_{H} 7,07 (1H, dd, $J = 7,7$ e $1,4$ Hz, H-9), 6,72 (1H, dt, $J = 7,7$ e $1,1$ Hz, H-10), 7,01 (1H, dt, $J = 7,7$ e $1,4$ Hz, H-11) e 6,63 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-12) característicos de um núcleo indólico, indicando que o anel A encontra-se livre de substituintes (Lounasma e Tolvanen, 1986 & Kam e Anuradha, 1995) confirmado através das correlações heteronucleares (HMQC) (**Espectros 8-12, p.20-24, v.2**) entre CH-9 (δ_{C} 122,78)/H-9 (δ_{H} 7,07), CH-10 (δ_{C} 119,00)/H-10 (δ_{H} 6,72), CH-11 (δ_{C} 127,07)/H-11 (δ_{H} 7,01), CH-12 (δ_{C} 110,37)/H-12 (δ_{H} 6,63).

A presença do núcleo indólico livre de substituintes foi também corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 13-15, p.25-27, v.2**) através das correlações entre CH-9 (δ_{C} 122,78)/H-11 (δ_{H} 7,01), CH-10 (δ_{C} 119,00)/H-12 (δ_{H} 6,63), CH-11 (δ_{C} 127,07)/H-9 (δ_{H} 7,07), CH-12 (δ_{C} 110,37)/H-10 (δ_{H} 6,72), e C-13 (δ_{C} 149,33)/H-9 (δ_{H} 7,07)/H-11 (δ_{H} 7,01), as demais correlações estão descritas na **Tabela 34**.

Um grupamento etila ligado a um átomo de carbono sp^3 tetra substituído pode ser reconhecido no espectro de RMN ^1H pelo sinal triplo a δ_{H} 0,67 (3H, $J = 7,4$ Hz) e pelos dois sinais múltiplos a δ_{H} 0,86 e δ_{H} 1,48, através das correlações heteronucleares a longa distância dos átomos de carbono CH_3 -18 (δ_{C} 6,78) e CH_2 -19 (δ_{C} 29,97) apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 13-15, p.25-27, v.2**).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20 e CH-21 como apresentada na estrutura do alcalóide, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +40^\circ$ ($1,5 \times 10^{-4}$, CHCl_3), ou seja, forma (+) (Kam e Anuradha, 1995). A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 34**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio.

O conjunto de dados de RMN e massas descritos acima para o alcalóide 55.20.43.14 estão em acordo com os dados descritos em literatura (Biemann et al., 1963 & Patrick e Nicole, 1991) e permitiram atribuir para esta substância, a estrutura do alcalóide (+)-aspidospermidina, anteriormente isolado de *Aspidosperma quebracho blanco*. (Biemann et al., 1963).

A atribuição dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e massas aqui discutidas para o alcalóide servirão de modelo para os demais alcalóides identificados aqui neste trabalho.

Tabela 34. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidospermidina, e comparação com valores de literatura para os modelos Mo-1 e Mo-2

(+)-aspidospermidina				Mo-1	Mo-2
HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{C}
δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
C					
7	53,30	-		51,3	53,4
8	135,67	-		136,7	
13	149,33	-		150,1	
20	35,62	-	2H-19	34,6	35,3
CH					
2	65,57			73,3	69,5
9	122,78	7,07 (dd, 7,7, 1,4)		121,3	
10	119,00	6,72 (dt, 7,7, 1,1)		117,1	
11	127,07	7,01 (dt, 7,7, 1,4)		127,6	
12	110,37	6,63 (d, 7,7)		106,5	
21	71,29	2,24 (s)		67,7	71,1
CH₂					
3	53,60	3,52 (dd, 11,0; 6,2)		53,1	53,5
5	52,96	3,14 (m)		53,7	52,4
		2,26 (m)			
6	38,79	2,28 (m)		41,1	37,8
		1,48 (m)			
14	21,68	1,48		-	21,3
15	34,43	1,65 (m)		-	34,0
		1,11 (m)			
16	28,06	1,46 (m)		19,9	24,6
17	22,95	1,96 (m)		23,4	22,7
		1,05 (m)			
19	29,97	1,48 (m)	3H-18	27,7	29,8
		0,86 (m)			
CH₃					
18	6,78	0,67 (t, 7,4)	2H-19	7,5	6,5

*O δ_{C} 28,06 do CH₂-16 quando comparado com valor correspondente do **Mo-1** (δ_{C} 19,90) revela ausência do efeito γ do grupo metila localizado no átomo de nitrogênio.

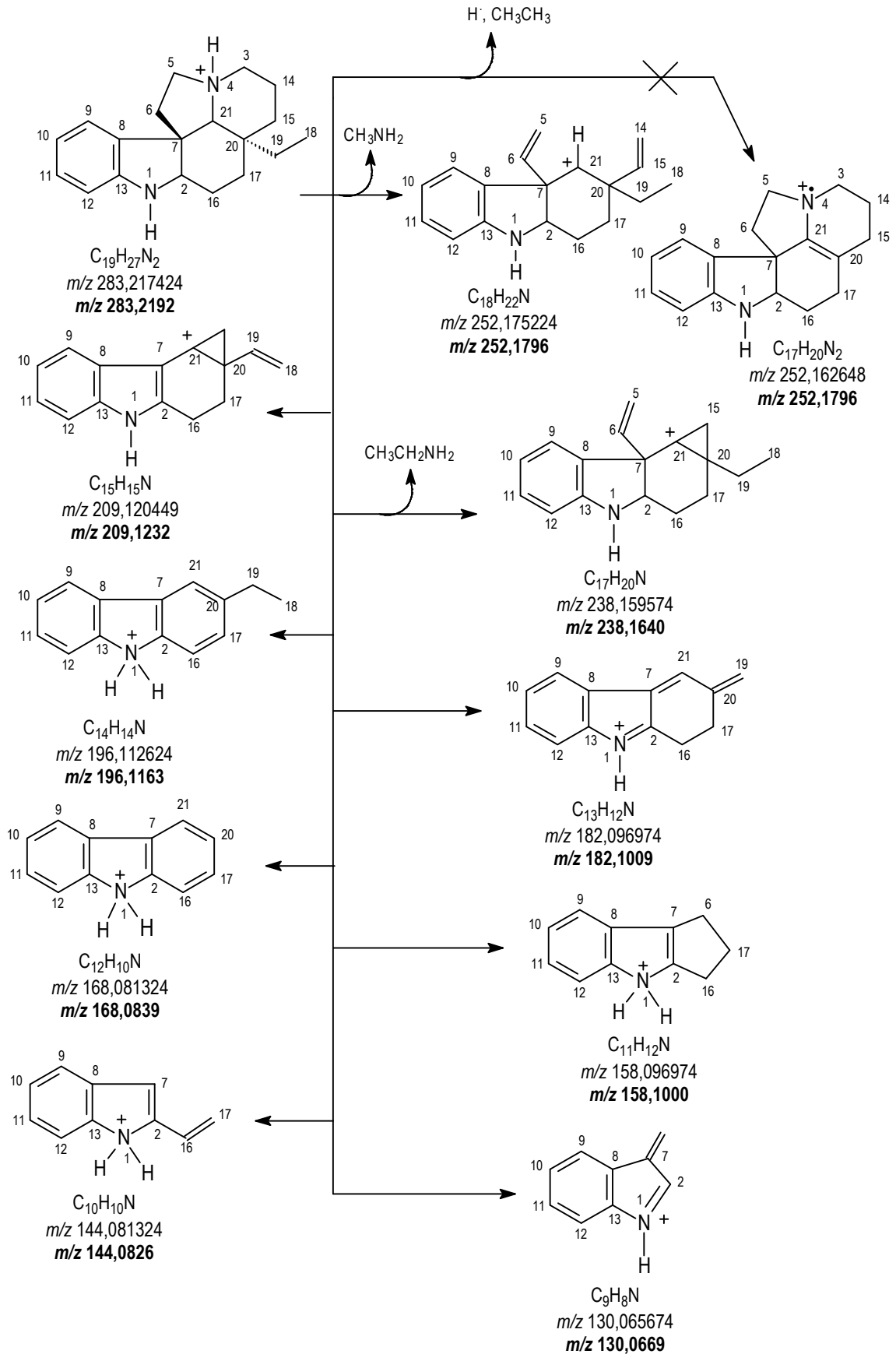
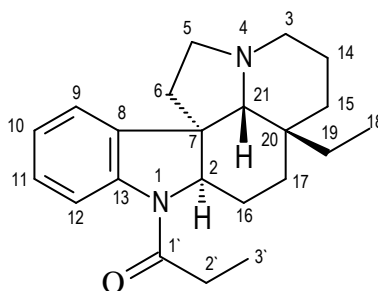


Figura 31. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 283,2192$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidospermidina.

4.1.2. Determinação estrutural do alcalóide (-)-desmetoxipalosina



(-)-desmetoxipalosina

A substância presente nas frações **46.12.5** e **43.4.51.1** apresentou-se como um óleo de cor amarelo-clara, com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} -79^\circ$ ($2,8 \times 10^{-4}$, CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro na região do infravermelho apresentou sinais característicos de anel aromático (750 , 1477 e 2993 cm^{-1}) e 1660 cm^{-1} característico de carbono de amida (**Espectro 16, p.28, v.2**) (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 20-22, p.32-34, v.2**) apresentou sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos. No espectro de RMN ^{13}C -APT (**Espectro 23, p.35, v.2**) observou-se sinais (δ_c) para 22 átomos de carbono.

O espectro de massas de alta resolução (EM-EM) mostrou um sinal em $m/z = 339,2458$ (**Espectros 17-19, p.29-31, v.2**) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -APT, pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}$ para o alcalóide 46.12.5.

A presença do íon $m/z = 308,1874$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_6]$, indicando a perda de um grupamento etila e hidrogênio, e ou $[(\text{M}+\text{H}) - \text{CH}_3\text{NH}_2]$ indicando a perda de metilamina (**Figura 32**). Os demais fragmentos presentes nos espectros de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para o alcalóide 46.12.5, coerente com o espectro de massas descrito para o alcalóide desmetoxipalosina (Budzikiewicz et al., 1964) isolado anteriormente de *Aspidosperma discolor* (Ferreira et al., 1963).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C mostraram-se bastante semelhantes aos do alcalóide (+)-aspidospermidina apresentando quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos, $[(\delta_H) 7,16$ (d, 7,4), 7,04 (t, 7,4), 7,20 (dd, 7,4; 8,0), 8,15 (d,

8,0)], comprovando a presença do núcleo indólico livre de substituintes, corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância apresentadas nos espectros de HMBC (**Espectros 29-33, p.41-45, v.2**). A **Tabela 35** descreve todos os valores de deslocamentos químicos para o alcalóide em questão.

Novamente, a presença do grupamento etila ligado a um átomo de carbono sp^3 tetra substituído pôde ser reconhecido no espectro de RMN 1H , e confirmado pelas correlações heteronucleares a longa distância apresentadas nos espectros de HMBC (**Espectros 29-33, p.41-45, v.2**).

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20 e CH-21, como apresentada na estrutura o alcalóide (+)-aspidospermidina, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_D^{23}$ -79° ($2,8 \times 10^{-5}$, $CHCl_3$), ou seja, forma (-), e confirmada através das interações espaciais observadas nos espectros de 1H - 1H -NOESY (**Espectros 34-36, p.46-48, v.2**) (**Figura 33**).

A oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pode ser verificada através do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ_C 172,07 relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (Breitmaier e Voelter, 1987), o qual apresentou correlações a longa distância 2J com sinais múltiplos em δ_H 2,56 e 2,43, e a 3J com sinal triplo em δ_H 1,23 ($J = 7,7$ Hz), observadas no espectro de HMBC.

Semelhante ao alcalóide (+)-aspidospermidina, a atribuição dos deslocamentos químicos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática, foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio e estão de acordo com as correlações apresentadas nos espectros de HMQC (**Espectros 24-28, p.36-40, v.2**).

Os dados de RMN e massas descritos acima para o alcalóide desmetoxipalosina estão em acordo com os dados descritos em literatura (Budzikiewicz et al., 1964 & Ferreira et al., 1963) para o alcalóide (-)-desmetoxipalosina, isolado anteriormente de *Aspidosperma discolor*, comprovando assim a proposta estrutural para este alcalóide.

Tabela 35. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (-)-desmetoxipalossina

(-)-desmetoxipalossina				
	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
7	52,57	-	H-2	H-9
8	138,21	-		H-2; H-6; H-10; H-12; H-21
13	140,64	-		H-2; H-9; H-11
20	35,30	-	H-19; H-21	3H-18
1'	172,07	-	2H-2'	3H-3'
CH				
2	66,85	4,18 (dd, 11,3; 6,2)		2H-6; 2H-17; H-21
9	122,14	7,16 (d, 7,4)		H-11
10	124,06	7,04 (t, 7,4)		H-12
11	127,46	7,20 (dd, 7,4; 8,0)		H-9
12	118,25	8,15 (d, 8,0)		H-10
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
21	70,78	2,38 (s)		H-3b; 2H-5; 2H-15; 2H-19
CH₂				
3	53,58	3,14 (dl, 10,2) 2,00		H-5b; 2H-15
5	52,36	3.20 (ddd, 9,2; 6,6; 2,6) 2,27		H-3b
6	39,45	2,10 1,50	2H-5	H-2; H-21
14	21,27	1,78 1,55	H-3a	
15	33,93	1,58 1,15		H-3a; H-19a
16	25,70	1,90 1,40	H-2; 2H-17	
17	22,87	2,02 1,15		H-19b; H-21
19	30,04	1,40 0,85	3H-18	H-21
2'	28,07	2,56 (m) 2,43 (m)	3H-3'	
CH₃				
18	6,67	0,64 (t, 7,7)	2H-19	
3'	9,15	1,23 (t, 7,7)	2H-2'	

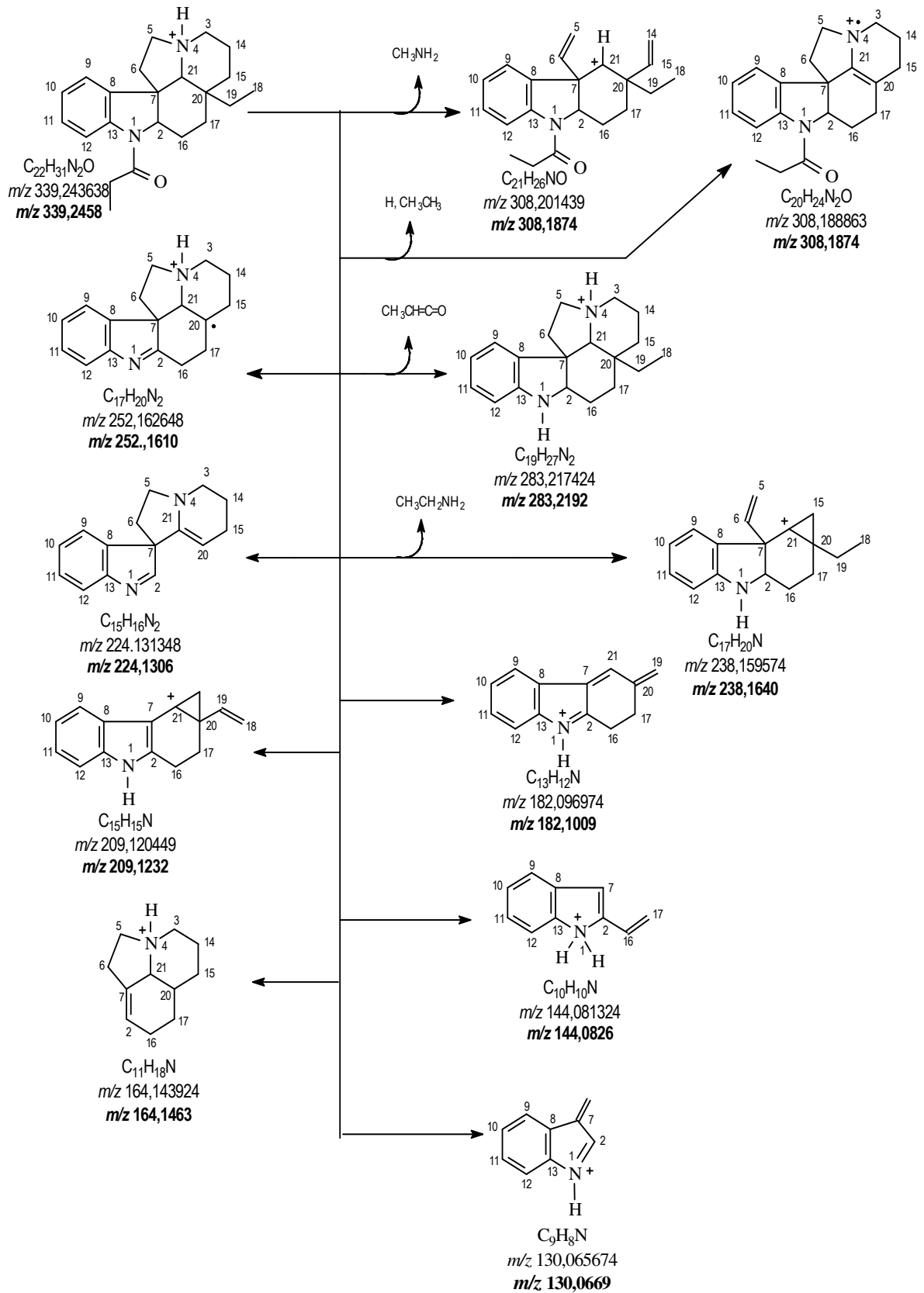


Figura 32. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 339,2458$ ($[M+H$ para o alcalóide (-)-desmetoxipalossina.

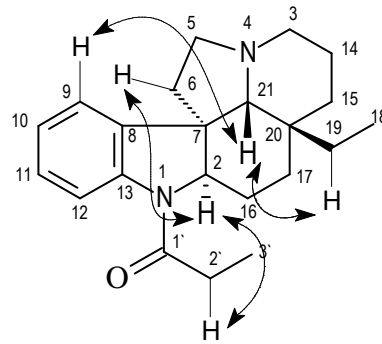
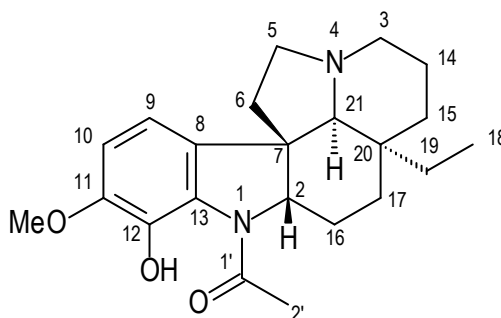


Figura 33. Principais interações observadas no espectro ^1H - ^1H -NOESY do alcalóide (-)-desmetoxipalosina.

4.1.3. Determinação estrutural do alcalóide (+)-**aspidocarpina**



(+)-aspidocarpina

A substância presente nas frações **55.8.7** e **55.8.20.30** apresentou-se como um sólido de cor amarelo alaranjado, com ponto de fusão 172°C, e com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} +149^\circ$ ($6,3 \times 10^{-4}$, CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro na região do infravermelho revelou sinais característicos de anel aromático (792, 1456 e 3012 cm^{-1}) e do grupamento C=O em 1627 cm^{-1} (**Espectro 37, p.49, v.2**) (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 39-42, p.51-54, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C -APT (**Espectro 43, p.55, v.2**) observaram-se sinais (δ_{C}) para 22 átomos de carbono.

O espectro de massas de alta resolução (EM-EM) (**Espectro 38, p.50, v.2**) mostrou um sinal em $m/z= 371,2352$ correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -APT, pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ para o alcalóide 55.8.20.30. Foram observados ainda a presença do íon $m/z= 329,2255$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]$, indicando a perda de um grupamento $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$, e do íon $m/z= 284,1681$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2]$ indicando a perda de etilamina (**Figura 34**). Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para o alcalóide 55.8.20.30, coerente com o espectro de massas para o alcalóide aspidocarpina, isolado anteriormente de *Aspidosperma megalocarpon* (McLean et al., 1960).

O espectro de RMN ^1H apresenta dois sinais duplos relativos a dois hidrogênios aromáticos a δ_{H} 6,62 (1H, d, $J= 8,3$, H-9), e δ_{H} 6,68 (1H, d, $J= 8,3$ Hz, H-10) acoplado entre si com valor de J característico de acoplamento *orto*, condizente com um núcleo indólico dissubstituído (Mclean et al., 1987),

confirmado pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (**Espectros 51-52, p.63-64, v.2**), corroborado pelas correlações heteronucleares no espectro de HMQC (**Espectros 44-47, p.56-59, v.2**), onde se observam as correlações a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 109,94)/H-9 (δ_{H} 6,62), CH-10 (δ_{C} 110,15)/H-10 (δ_{H} 6,68).

O modo de substituição e os substituintes no anel aromático foram confirmados pela presença de um sinal característico de um grupo metoxila no espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 56,31 acoplado com um sinal relativo a três hidrogênios em δ_{H} 3,87 no espectro RMN ^1H a $^1J_{\text{CH}}$ confirmado pelo espectro de HMQC. A posição do grupo metoxila ligado ao átomo de carbono C-11 no anel benzênico pôde ser confirmado através das correlações a longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-11 (δ_{C} 149,22)/H-9 (δ_{H} 6,62) e MeO-11 (δ_{H} 3,87) apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 48-50, p.60-62, v.2**).

A função hidroxila ligada ao átomo de carbono C-12 do anel benzênico foi confirmada pelo sinal característico de hidrogênio do grupo hidroxila em δ_{H} 10,97, mostrando que este se encontra quelado com o grupo carbonila C=O na posição C-1', como mostra o espectro de RMN ^1H (Mclean et al., 1987).

O grupamento etila ligado a um átomo de carbono sp^3 tetra substituído pode ser reconhecido no espectro de RMN ^1H pelo sinal triplo a δ_{H} 0,64 (3H, $J = 7,3$ Hz), e pelos dois sinais múltiplos a δ_{H} 0,85 e δ_{H} 1,38, confirmado também através das correlações heteronucleares a longa distância dos átomos de carbono CH₃-18 (δ_{C} 6,63) e CH₂-19 (δ_{C} 29,97) apresentadas no espectro de HMBC.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20 e CH-21 como apresentada na estrutura do alcalóide (+)-aspidocarpina, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +149^\circ$ ($6,3 \times 10^{-4}$, CHCl₃), ou seja, forma (+), e confirmada através das interações espaciais observadas no espectro de ^1H - ^1H -NOESY (**Espectros 53-54, p.65-66, v.2**)(**Figura 35**).

A oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pode ser verificada através do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 169,20 relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (Breitmaier, E. e Voelter, W. 1987), o qual apresentou correlações à longa distância no espectro de HMBC ($^2J_{\text{CH}}$), com um sinal simples, integrando para três hidrogênios em δ_{H} 2,32, característico de um grupo metila α a um carbono carbonílico.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática, foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (**Tabela 36**) (Breitmaier e Voelter, 1987).

Os dados de RMN e massas descritos acima para o alcalóide 55.8.20.30 estão em acordo com os dados descritos em literatura (Budzikiewicz et al., 1964 & Mclean et al., 1987) para o alcalóide (+)-aspidocarpina, isolado anteriormente de *Aspidosperma megalocarpon*, comprovando assim a proposta estrutural para o alcalóide em questão.

Tabela 36. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidocarpina, e comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina

	(+)-aspidocarpina				Aspidocarpina	
	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
7	52,05	-	H-2	H-9	52,20	
8	133,01	-		H-2; MeO-11	133,13	
11	149,22			H-10	149,35	
12	137,30			H-2; H-9	137,47	
13	127,39	-	H-15b; 2H-19		127,51	
20	35,34	-	3H-2'		35,46	
1'	169,20	-			169,31	
CH						
2	70,13	4,07 (dd, 11,3;6,2)		H-21	70,25	4,07 (dd, 11,6)
9	109,94	6,62 (d, 8,3)			112,36	6,61 (d,8,0)
10	110,15	6,68 (d, 8,3)			110,04	6,69 (d, 8,0)
21	70,50	2,24 (s)		H-6b; H-15b; 2H-19	70,62	2,25 (s)
CH₂						
3	53,55	3,04 (d, 11,7), 1,84 (m)	H-14b	H-5b	53,67	3,04 (dm, 12,0) 1,98 (td, 12,0 e 4,0)
5	52,32	3,12 (ddd, 9,2, 6,2, 2,9), 2,26	H-6b	H-3	52,43	2,27 (m), 3,12 (m)
6	39,23	1,98, 1,52		H-2	39,37	1,57 (m), 2,04 (m)
14	21,36	1,78, 1,52			21,50	1,72 (tm, 12,0), 1,53(dm, 12,0)
15	33,87	1,67, 1,12			34,02	1,65(dt, 12,0 e 4,0), 1,11 (td, 12,0 e 4,0)
16	24,97	1,78, 1,49			25,10	1,86 (m), 1,52 (m)
17	22,79	1,96, 1,14		2H-19	22,92	2,0 (td, 12,0 e 14,0), 1,15(dm, 12,0)
19	29,97	1,38, 0,85	3H-18		30,03	1,44(m), 0,93(m)
CH₃						
18	6,63	0,64 (t, 7,3)	2H-19		6,76	0,63 (t, 7,5)
2'	22,53	2,32 (s)			22,68	2,33(s)
MeO	56,31	3,87 (s)			56,43	3,88(s)
HO	-	10,97 (s)			-	10,98 (s)

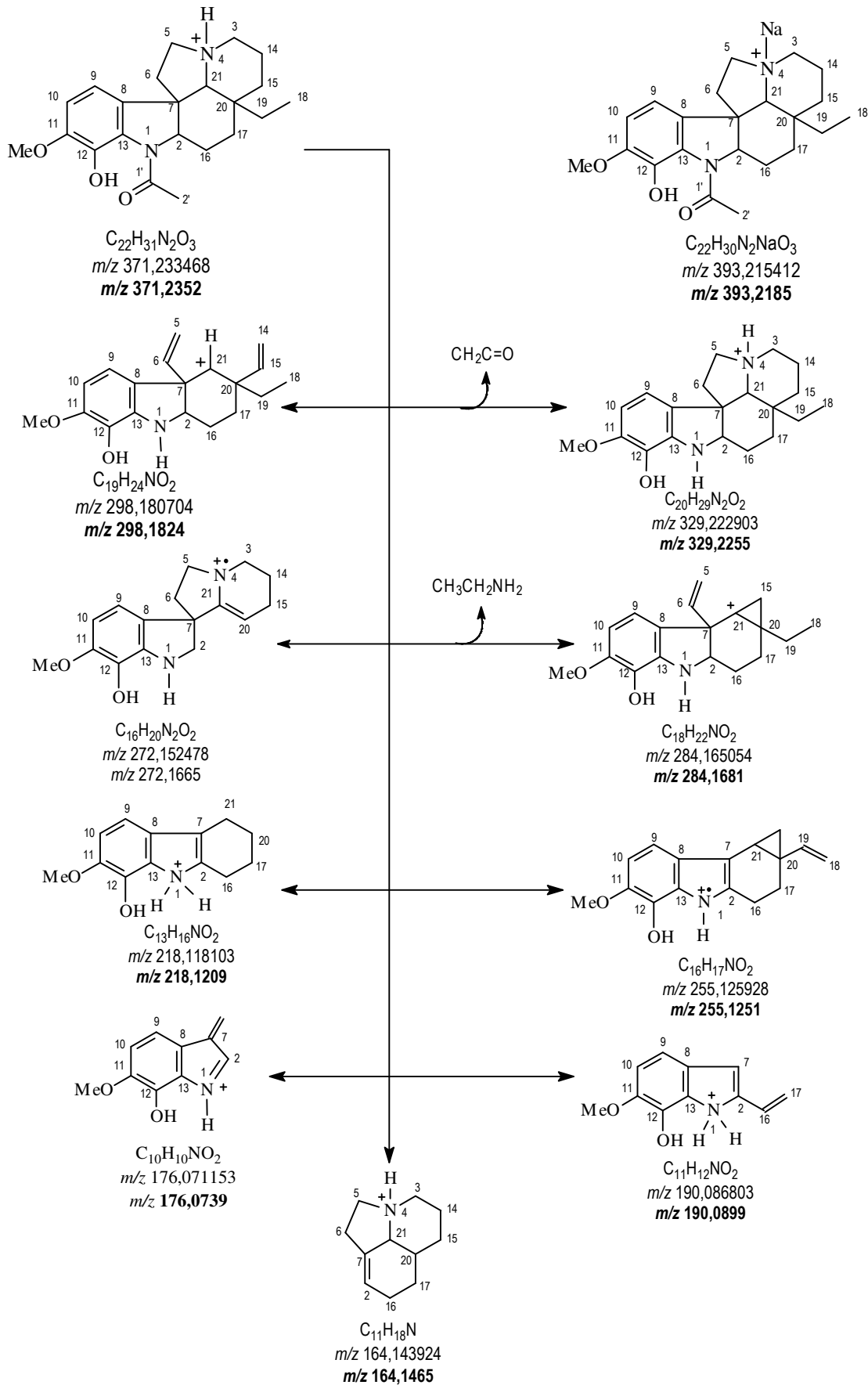


Figura 34. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 371,2352$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidocarpina.

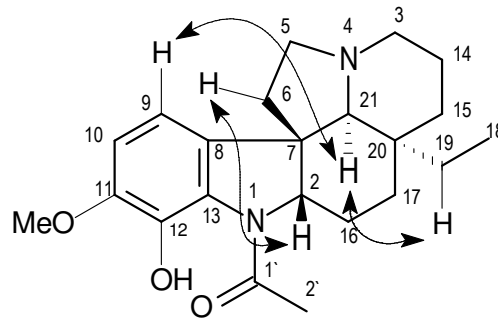
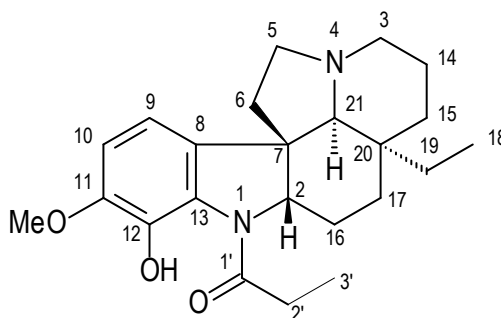


Figura 35. Principais interações observadas no espectro ^1H - ^1H -NOESY do alcalóide (+)-aspidocarpina.

4.1.4. Determinação estrutural do alcalóide (+)-**aspidolimina**



(+)-aspidolimina

A substância presente nas frações **46.7** e **46.8.6** apresentou-se como um óleo de cor amarelo-clara, com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} +67^\circ$ (3×10^{-4} , CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

A análise do espectro na região do infravermelho demonstrou bandas características de hidroxila em 3500 cm^{-1} , de anel aromático em 792, 1463 e 2993 cm^{-1} e ainda do grupamento $\text{C}=\text{O}$ em 1630 cm^{-1} (**Espectro 55, p.67, v.2**) (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 57-61, p.69-73, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C -APT (**Espectro 56, p.68, v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 23 átomos de carbono.

O espectro de massas de alta resolução (EM/EM) (**Espectro 56, p.68, v.2**) mostrou um sinal em $m/z = 385,2561$ correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -APT, pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$ para o alcalóide 46.7. Observou-se ainda a presença do íon $m/z = 329,2302$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{C}_3\text{H}_4\text{O}]$, indicando a perda de um grupamento $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}$, e do íon $m/z = 284,1695$ $[(\text{M}+\text{H}) - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2]$ indicando a perda de etilamina (**Figura 36**). Observa-se uma diferença de 14 unidades de massas em relação ao alcalóide (+)-aspidocarpina, ou seja, uma unidade de CH_2 .

Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para o alcalóide presente na fração **46.7**, coerente com o espectro de massas descrito para o alcalóide aspidolimina, isolado anteriormente de *Aspidosperma limae* (Pinar et al., 1965).

O espectro de RMN ^1H do alcalóide aspidolimina, igualmente ao do alcalóide (+)-aspidocarpina, apresenta dois sinais relativos a hidrogênios

aromáticos a δ_H 6,60 (1H, d, $J= 8,4$, H-9), e δ_H 6,68 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-10) característicos de um núcleo indólico dissustituído, corroborado através das correlações heteronucleares apresentadas no espectro de HMQC (**Espectros 72-74, p.84-86, v.2**) a $^1J_{CH}$ entre CH-9 (δ_C 112,33)/H-9 (δ_H 6,60), CH-10 (δ_C 110,03)/H-10 (δ_H 6,68).

Como no alcalóide (+)-aspidocarpina, o alcalóide aspidolimina apresenta no espectro de HMQC um sinal em δ_C 56,52 e δ_H 3,87, característico de grupo metoxila. A posição deste grupo pode ser confirmada pelas correlações a longa distância a $^3J_{CH}$ C-11 (δ_C 149,41)/H-9 (δ_H 6,60) e MeO-11 (δ_H 3,87) apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 63-71, p.75-83, v.2**). A segunda substituição foi confirmada pelo sinal simples, característico de grupo hidroxila quelado apresentado no espectro de RMN 1H em δ_H 10,98 (Pinar et al., 1965).

A presença do grupo etila ligado ao átomo de carbono C-20 no espectro de RMN 1H foi reconhecido pelo sinal triplo a δ_H 0,63 (3H, $J = 7,3$ Hz) e pelos dois sinais múltiplos a δ_H 0,85 e δ_H 1,38 através das correlações heteronucleares a longa distância dos átomos de carbono CH₃-18 (δ_C 6,76) e CH₂-19 (δ_C 30,08) apresentadas no espectro de HMBC.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20 e CH-21 como apresentada na estrutura do alcalóide (+)-aspidolimina, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} +67^\circ$ (3×10^{-4} , CHCl₃), ou seja, na forma (+).

A oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pode ser verificada através do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ_C 172,85 relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (Breitmaier e Voelter, 1987), o qual apresentou correlações a $^2J_{CH}$ (2H, δ_H 2,65; 2,45) e $^3J_{CH}$ (3H, δ_H 1,27) no espectro de HMBC.

Os dados de RMN e massas descritos acima para o alcalóide aspidolimina e a comparação com valores de referência para o alcalóide aspidocarpina estão em acordo com os dados descritos na literatura (**Tabela 37**) (Budzikiewicz et al., 1964 & Pinar et al., 1965) para o alcalóide (+)-aspidolimina, isolado anteriormente de *Aspidosperma limae*, comprovando assim a proposta estrutural para o alcalóide em questão.

Tabela 36. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC do alcalóide (+)-aspidolimina, e comparação com valores de referência do alcalóide aspidocarpina

	(+) -aspidolimina				Aspidocarpina	
	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
C						
7	52,21				52,20	-
8	133,10			H-10	133,13	-
11	149,41			H-9; MeO-11; HO-12	149,35	
12	137,60		HO-12	H-10	137,47	
13	127,79			H-9	127,51	-
20	25,51		2H-19	3H-18	35,46	-
1'	172,85		2H-2'	3H-3'	169,31	-
CH						
2	69,19	4,10 (dd, 11,0, 5,8)		H-6b; H-21	70,25	4,07 (dd, 11,6)
9	112,33	6,60 (d, 8,4)			112,36	6,61 (d,8)
10	110,03	6,68 (d, 8,4)			110,04	6,69 (d, 8)
21	70,70	2,23 (s)		H-5a	70,62	2,25 (s)
CH₂						
3	53,22	3,04 (dl, 12,5) 1,97		H-21	53,67	3,04 (dm, 12) 1,98 (td, 12, 4)
5	52,52	3,11 2,26		H-21	52,43	2,27 (m) 3,12 (m)
6	39,23				39,37	1,57 (m) 2,04 (m)
14	21,52				21,50	1,72 (tm, 12) 1,53 (dm, 12)
15	34,03				34,02	1,65(dt, 12, 4) 1,11 (td, 12, 4)
16	25,32				25,10	1,86 (m) 1,52 (m)
17	22,98	2,04 1,11		H-21	22,92	2,0 (td, 12, 14) 1,15 (dm, 12)
19	30,08	1,38 0,85	3H-18	H-21	30,03	1,44 (m) 0,93(m)
2'	28,70	2,65 – 2,45 (m)	3H-3'			
CH₃						
18	6,76	0,63(t, 7,3)			6,76	0,63 (t, 7,5)
2'					22,68	2,33 (s)
3'	9,92	1,27 (t, 7,7)	2H-2'			
MeO	56,52	3,87 (s)			56,43	3,88 (s)
HO		10,98 (s)				10,98

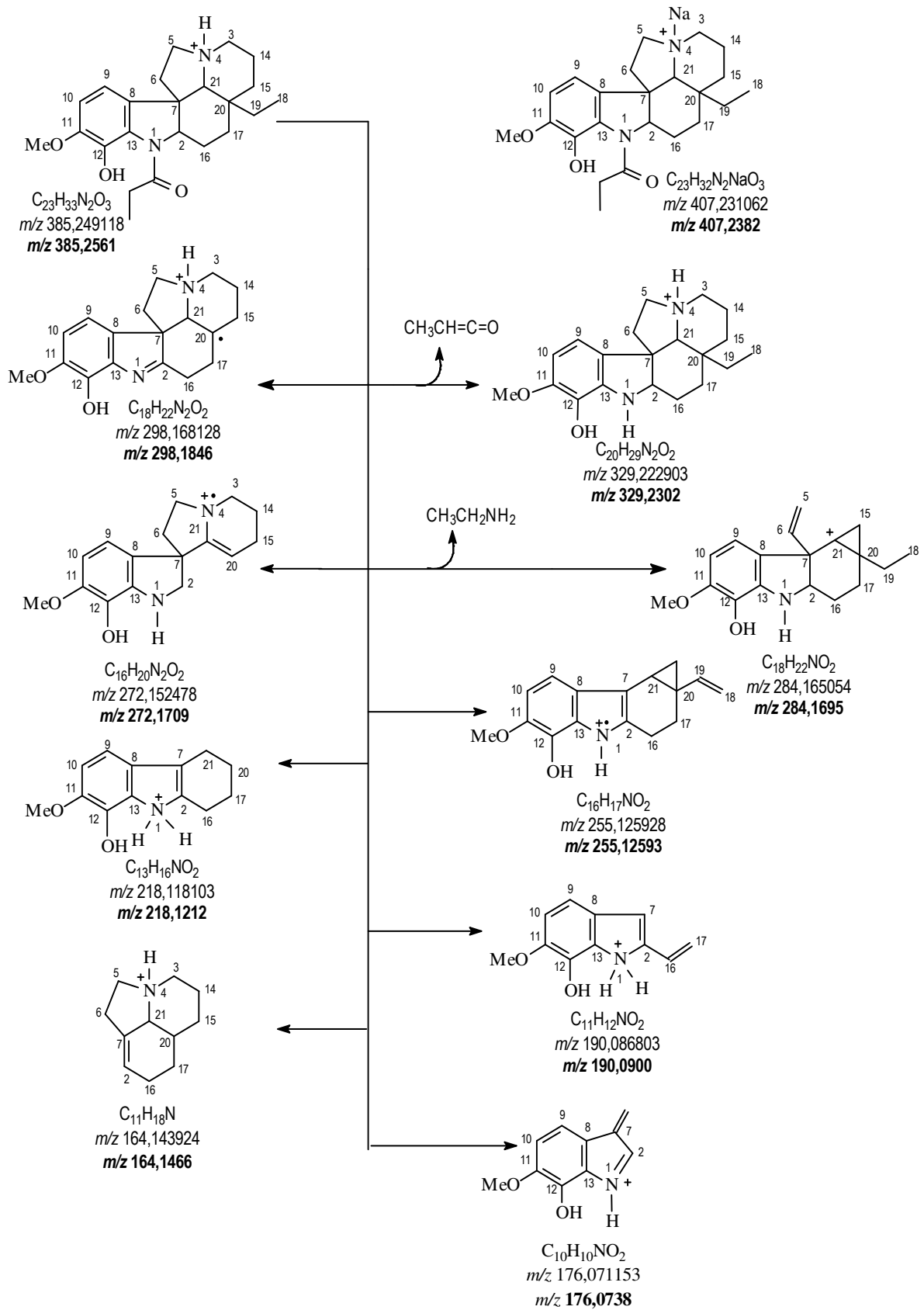
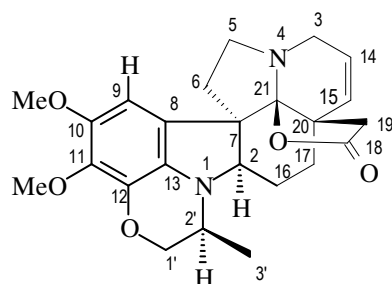
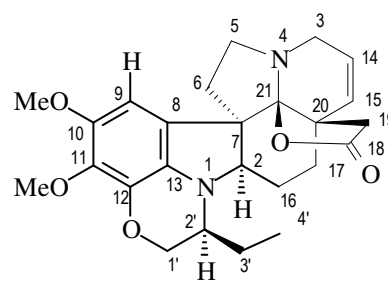


Figura 36. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 385,2561$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide (+)-aspidolimina.

4.1.5. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides **spruceanumina A** e **spruceanumina B**



spruceanumina A



spruceanumina B

A substância presente nas frações **7.54.6**, **9.17.21**, **9.17.32.2** e **19.10.45.45** apresentou-se como um sólido de cor amarelo-clara, revelando seres alcalóides, através do teste com o reagente de Dragendorff.

A mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B apresentou valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} -102^\circ$ (6×10^{-1} , CHCl_3) e ponto de fusão na faixa de $192-195^\circ\text{C}$.

Analisando o espectro na região do infravermelho (**Espectros 75**, **p.87**, **v.2**) pôde-se observar a presença de absorções em 1755 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$) característica de carbonila de lactona, e 738 , 1479 e 2950 cm^{-1} de anel benzênico e 3430 cm^{-1} de grupamento amina do núcleo indólico (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 79-82**, **p.91-94**, **v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C -DEPT (**Espectros 87**, **p.99**, **v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 24 e 25 átomos de carbono.

O espectro de massas de alta resolução (EM-EM) (**Espectros 76-78**, **p.88-90**, **v.2**) mostrou sinais em $m/z = 424,1998$ (**Figura 37**) e $m/z = 438,2154$ (**Figura 38**) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 83-86**, **p.95-98**, **v.2**), pôde-se propor as fórmulas moleculares $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$ para o alcalóide spruceanumina A e $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ para o alcalóide spruceanumina B. Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para a mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B, semelhante ao espectro de massas para

esqueleto do tipo 18-oxo-aspidalbidina, isolado anteriormente de *Aspidosperma exalatum* (Keith et al., 1966).

O espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B, apresenta um sinal simples relativo a um hidrogênio aromático a δ_{H} 6,63 (1H, s, H-9) característicos de um núcleo indólico substituído nas posições C-10, C-11 e C-12, e apresentando correlações heteronucleares no espectro de HSQC (**Espectros 92-94, p.104-106, v.2**) a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 101,78; spruceanumina A) e (δ_{C} 101,86; spruceanumina B).

O modo de substituição pode ainda ser confirmado pelas correlações à longa distância a $^2J_{\text{CH}}$ C-10 (δ_{C} 147,45; spruceanumina A) (δ_{C} 147,27; spruceanumina B) e $^3J_{\text{CH}}$ C-7 (δ_{C} 60,21), C-11 (δ_{C} 136,53), C-13 (δ_{C} 131,06) com o hidrogênio H-9 (δ_{H} 6,63; spruceanumina A e spruceanumina B) apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 95-104, p.107-116, v.2**).

Os sinais em δ_{C} 56,49 (spruceanumina A) e 56,97 (spruceanumina B) e δ_{C} 61,18 (spruceanumina A) e (spruceanumina B), apresentados no espectro de RMN ^{13}C , os quais apresentam correlações heteronucleares no espectro de HSQC a $^1J_{\text{CH}}$ com os sinais em δ_{H} 3,70 (spruceanumina A) e 3,74 (spruceanumina B) e δ_{H} 3,81 (spruceanumina A) e 3,86 (spruceanumina B), respectivamente, corroboram com a presença de dois grupos metoxila, sendo um desprotegido, pois se encontra impedido estericamente (OCH₃-11).

A localização dos dois grupos metoxila foi apoiada nas correlações à longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-10 (δ_{C} 147,45, spruceanumina A) e (δ_{C} 147,27, spruceanumina B) com OCH₃-10; δ_{H} 3,70 (spruceanumina A) e 3,74 (spruceanumina B); C-11 (δ_{C} 136,53) com OCH₃-11; δ_{H} 3,81 (spruceanumina A) e 3,86 (spruceanumina B), respectivamente, apresentadas no espectro de HMBC.

A formação de um anel de seis membros envolvendo o átomo de carbono C-12 e o nitrogênio N-1 foi apoiada nas correlações à longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-12 (δ_{C} 136,24; spruceanumina A e spruceanumina B) com 2H-1'; δ_{H} 4,27 e 3,91 (spruceanumina A) e 4,35 e 4,00 (spruceanumina B), respectivamente, apresentadas no espectro de HMBC.

A presença dos sinais no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 4,27 (1H, dd, $J = 10,8$ e 2,6 Hz, H-1'b (spruceanumina A) e δ_{H} 4,00 (1H, dd, $J = 10,8$ e 8,6 Hz, H-1'a (spruceanumina A) e em δ_{H} 4,35 (1H, dd, $J = 10,8$ e 2,6 Hz, H-1'b

(spruceanumina B) e δ_H 4,00 (1H, *dd*, $J = 10,8$ e $8,6$ Hz, H-1'a (spruceanumina B), ambos acoplando com um sinal em δ_H 3,13 (1H, *m*, H-2' (spruceanumina A) e (spruceanumina B) como apresentado no espectro de 1H - 1H -COSY (**Espectros 88-91, p.100-103, v.2**), confirmam a formação do anel de seis membros.

O grupo CH_3 -3' presente no alcalóide spruceanumina A foi comprovado pelo sinal duplo em δ_H 1,12, $J = 6,2$ Hz, acoplando com o hidrogênio H-2', e confirmado por correlações a longa distância a $^3J_{CH}$ CH_3 -3' (δ_C 22,56) com os hidrogênios 2H-1' (δ_H 4,35 e 4,00) apresentados no espectro de HMBC.

Já para o alcalóide spruceanumina B o grupo CH_2CH_3 pode ser comprovado pela presença de sinais múltiplos em δ_H 1,69 e 1,46, relativos ao CH_2 -3' acoplando com sinal triplo em δ_H 0,97 com $J = 7,5$ Hz, relativo ao grupo CH_3 -4', e confirmado pela correlação a longa distância a $^3J_{CH}$ CH_2 -3' (δ_C 22,56) com os hidrogênios 3H-4' (δ_H 0,98) apresentados no espectro de HMBC.

A oxidação nos átomos de carbono CH-14 e CH-15 pode ser observada na mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B no espectro de RMN ^{13}C , através dos sinais em δ_C 123,51 (CH-14) e 130,65 (CH-15), respectivamente, e pelos sinais no espectro RMN 1H em δ_H 5,81 (1H, *ddd*, $J = 9,9$; 3,7 e 1,7 Hz, H-14) e δ_H 5,37 (1H, *dl*, $J = 9,9$ Hz, H-15) acoplando entre si, como observado no espectro de 1H - 1H -COSY, característicos de hidrogênios olefínicos (Silverstein et al., 2007).

Observa-se agora na mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B a ausência do sinal triplo com $J \cong 7,0$ Hz, e dos dois sinais múltiplos relativos ao grupo etila ligado ao átomo de carbono C-20, como apresentado nos alcalóides anteriormente descritos.

Pode-se observar ainda pelo espectro de RMN ^{13}C -APT a formação de uma γ -lactona entre os átomos de carbono C-20 e CH-21, onde se observa um sinal em δ_C 175,10 (C-18), característico de carbono de lactona de cinco membros (Silverstein et al., 2007 & Breitmaier e Voelter, 1987).

A função lactona foi comprovada pelas correlações heteronucleares a longa distância a $^2J_{CH}$ C-18 (δ_C 175,10) com os hidrogênios em δ_H 2,50 (1H, *d*, $J = 16,4$ Hz, H-19b) e δ_H 2,12 (1H, *d*, $J = 16,4$ Hz, H-19a) e diferentemente da mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D, onde a função γ -lactona encontra-se localizada nos carbonos C-20 e C-17, pode-se comprovar ainda a

formação de uma γ -lactona entre os átomos de carbono C-20 e CH-21, através das correlações $^3J_{CH}$ CH₂-19 (δ_C 40,53) com os hidrogênios 2H-17 (livre de substituintes) e com o hidrogênio olefínico H-15 em δ_H 5,37, apresentados no espectro de HMBC.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20, C-21 e CH-2', como apresentada nas estruturas da mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_D^{23}$ -102° (6×10^{-1} , CHCl₃), ou seja, na forma (-), e confirmada pelo espectro de 1H - 1H -NOESY (**Espectros 105-110, p.117-122, v.2**) (**Figura 39**).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática, foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio (**Tabela 38**).

Observando-se a intensidade dos sinais dos grupos CH₃-3' e CH₃-4' pôde-se propor uma mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B, na proporção aproximada de 32,9% do alcalóide spruceanumina A para 67,1% de spruceanumina B.

Os dados de RMN e massas descritos acima para os alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B estão sendo descritos pela primeira vez pelo melhor do conhecimento.

Tabela 38. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B

spruceanumina B					spruceanumina A	
C	HSQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
7	60,21	-	H-2; 2H-6	H-5a; H-9; 2H-16	60,21	-
8	124,76	-	H-9	H-6b	124,90	-
10	147,27	-	H-9	MeO-10	147,45	-
11	136,53	-		H-9; MeO-11	136,53	-
12	136,24	-		2H-1'	136,24	-
13	131,06	-		H-9	131,03	-
18	175,10	-	2H-19		175,10	-
20	43,90	-	H-15; 2H-27	H-14; 2H-16	43,90	-
CH						
2	68,91	3,50		H-1'; 2H-6; 2H-17	68,91	3,50
9	101,85	6,63 (s)			101,78	6,63 (s)
14	123,51	5,81 (ddd, 9,9;3,7;1,7)	H-3		123,51	5,81 (ddd, 9,9, 3,7; 1,7)
15	130,66	5,37 (dl, 9,9)		H-3; 2H-17; 2H-19	130,79	5,37 (dl, 9,9)
2'	50,43	3,13 (m)	2H-1'; 2H-3'	3H-4'	50,09	3,13 (m)
CH₂						
3	45,88	3,60-3,40 (m)	H-14	H-15	45,00	3,60-3,40 (m)
5	50,43	3,34 (m), 3,15 (m)	2H-6		50,09	3,34 (m), 3,15 (m)
6	33,89	2,55 (m), 2,03 (m)	2H-5	H-2	33,76	2,55 (m), 2,03 (m)
16	19,11	1,77 (m), 1,47 (m)	2H-17		18,96	1,77 (m), 1,47 (m)
17	28,82	1,75 (m), 1,58 (m)	2H-16	H-19a	28,82	1,75 (m), 1,58 (m)
19	40,53	2,50 (d, 16,4) 2,12 (d, 16,4)		H-15; 2H-17	40,53	2,50 (d, 16,4) 2,12 (d, 16,4)
1'	70,20	4,35 (dd, 10,8, 2,6) 4,00 (dd, 10,8, 8,6)	H-2'	2H-3'	72,26	4,27 (dd, 10,7; 2,7) 3,91 (dd, 10,7; 8,8)
3'	22,56	1,69 (m); 1,46 (m)	H-2'; 3H-4'	2H-1'	-	-
CH₃						
MeO-10	56,97	3,74 (s)			56,49	3,70 (s)
MeO-11	61,18	3,86 (s)			61,18	3,81 (s)
3'	-	-	-	-	15,10	1,12 (d, 6,2)
4'	9,39	0,98 (t, 7,5)	2H-3'	H-2'	-	-

O CH_2 -1' da spruceanumina B recebe efeito γ do grupo metil CH_3 -4', o que não ocorre na spruceanumina A.

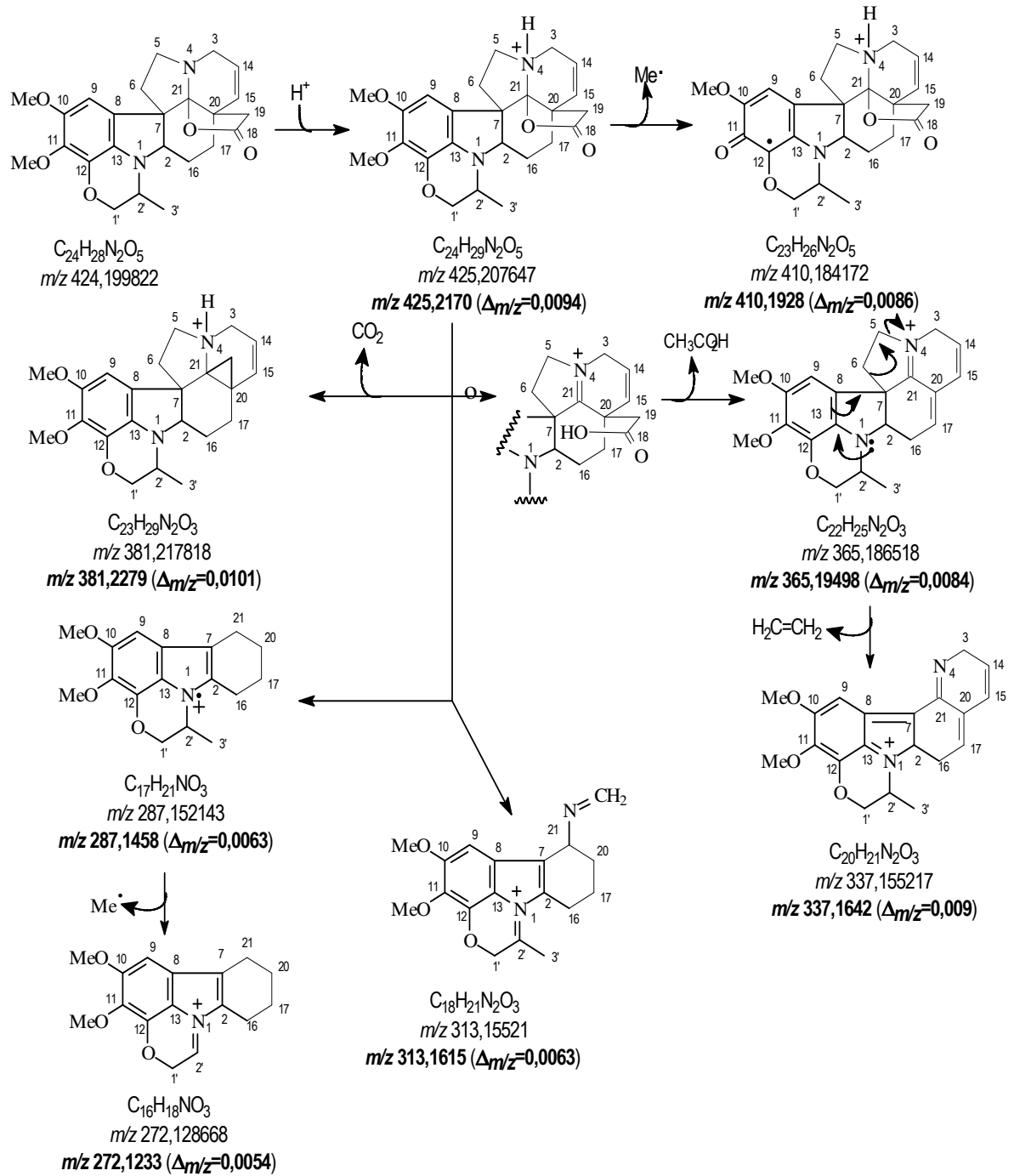


Figura 37. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 424,1998$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide spruceanumina A.

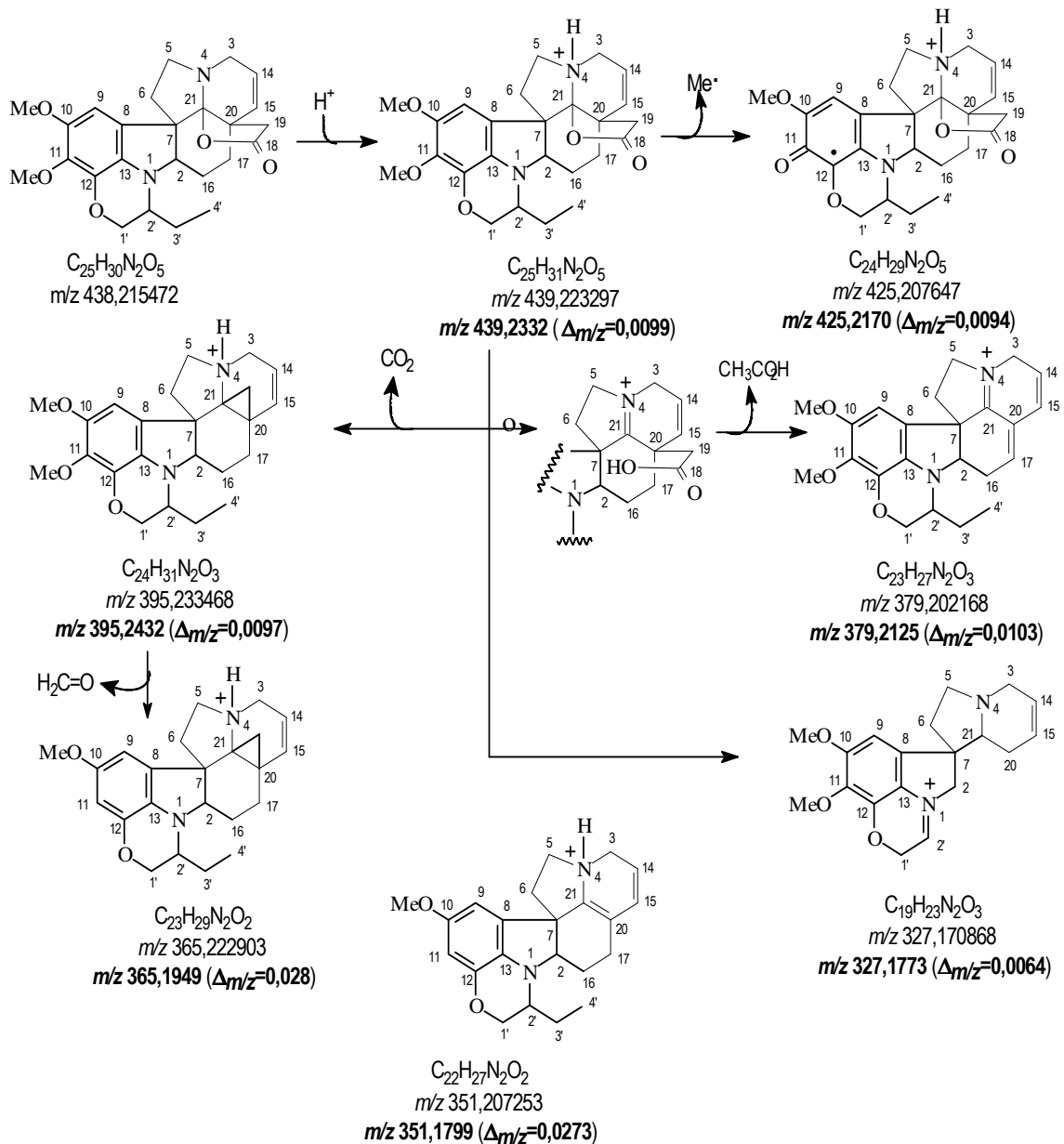


Figura 38. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em $m/z= 438,2154$ ($[M+H]^+$) para o alcalóide spruceanumina B.

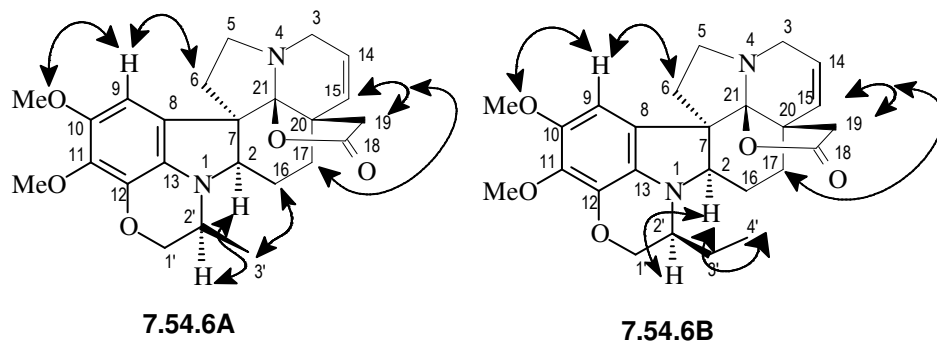
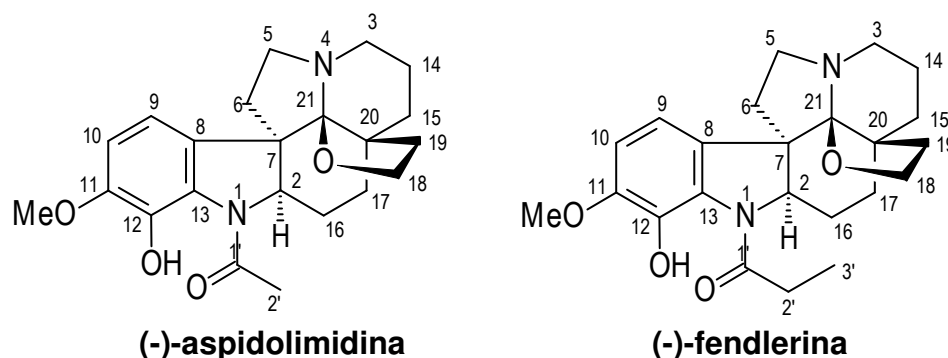


Figura 39. Principais interações observadas no espectro $^1H-^1H$ -NOESY dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B.

4.1.6. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina



A substância presente na fração **5.1.1.3.4** apresentou-se como um sólido amorfo de cor marrom alaranjado com ponto de fusão na faixa de 210-214°C, e com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} -157^\circ$ (2×10^{-4} , CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 111-113, p.123-125, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C -PENDANT (**Espectros 114-116, p.126-128, v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 23 átomos de carbono.

O espectro de RMN ^1H , igualmente ao do alcalóide (+)-aspidolimina, apresenta dois sinais relativos a hidrogênios aromáticos a δ_{H} 7,04 (1H, d, $J = 8,2$, H-9), e δ_{H} 6,69 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-10) característicos de um núcleo indólico dissustituído, corroborado através das correlações heteronucleares apresentadas no espectro de HMQC (**Espectros 117-119, p.129-131, v.2**) a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 114,50)/H-9 (δ_{H} 7,04), CH-10 (δ_{C} 110,21)/H-10 (δ_{H} 6,69).

Como no alcalóide (+)-aspidolimina, a mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina apresenta no espectro de HMQC um sinal em δ_{C} 56,37 e δ_{H} 3,86, característico de grupo metoxila. A posição deste grupo pode ser confirmada pelas correlações a longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-11 (δ_{C} 149,41)/H-9 (δ_{H} 7,04) e MeO-11 (δ_{H} 3,86) apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 120-122, p.132-134, v.2**). A segunda substituição foi confirmada pelo sinal simples, característico de grupo hidroxila quelado apresentado no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 10,74 (Pinar et al., 1965).

A ausência do sinal triplo com $J \cong 7,0$ Hz, e dos dois sinais múltiplos relativos ao grupo etila ligado ao átomo de carbono C-20, como apresentado nos alcalóides anteriormente descritos indicam a ausência desta parte da molécula no alcalóide em questão.

Pode-se observar agora no espectro de RMN ^{13}C -PENDANT, uma oxidação do carbono CH_2 -18 formando um anel tetrahydrofurano com o carbono C-21 (δ_{C} 101,71), comprovado pelas correlações heteronucleares a longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-21 (δ_{C} 101,71)/H-18a (δ_{H} 4,08)/ H-15b (δ_{H} 1,36) e H-16b (δ_{H} 1,35) apresentadas no espectro de HMBC.

Com a oxidação do carbono C-21, observa-se uma desproteção (**efeito β**) nos átomos de carbono C-7 (δ_{C} 57,44) e C-20 (δ_{C} 39,69) em relação ao alcalóide (+)-aspidolimina, onde C-7 (δ_{C} 52,21) e C-20 (δ_{C} 25,51), e para os carbonos CH_2 -3 (δ_{C} 43,87), CH_2 -5 (δ_{C} 48,72), CH_2 -6 (δ_{C} 34,45), CH_2 -15 (δ_{C} 32,89) e CH_2 -17 (δ_{C} 20,95) em relação ao alcalóide (+)-aspidolimina são CH_2 -3 (δ_{C} 53,22), CH_2 -5 (δ_{C} 52,52), CH_2 -6 (δ_{C} 39,23), CH_2 -15 (δ_{C} 34,03) e CH_2 -17 (δ_{C} 22,98), e observa-se uma proteção (**efeito γ**) confirmando a oxidação do carbono C-21.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20 e CH-21 como apresentada na estrutura da mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -157^\circ (2 \times 10^{-4}, \text{CHCl}_3)$, ou seja, na forma (-).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 39**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio, e também pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (**Espectros 123-124, p.135-136, v.2**).

A oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pode ser verificada através do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 172,21 relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (Breitmaier e Voelter, 1987), o qual apresentou correlações a $^2J_{\text{CH}}$ (2H, δ_{H} 2,56; 2,50) e $^3J_{\text{CH}}$ (3H, δ_{H} 1,26) no espectro de HMBC.

Observou-se ainda a presença de um sinal simples em δ_{H} 1,26, integrado para três hidrogênios, característico de grupo metila ligado a um carbono carbonílico N-C=O, o qual apresentou correlação a $^2J_{\text{CH}}$ com δ_{C} 172,21 (C-1') mostrado no espectro de HMBC, comprovando que a amostra trata-se de uma

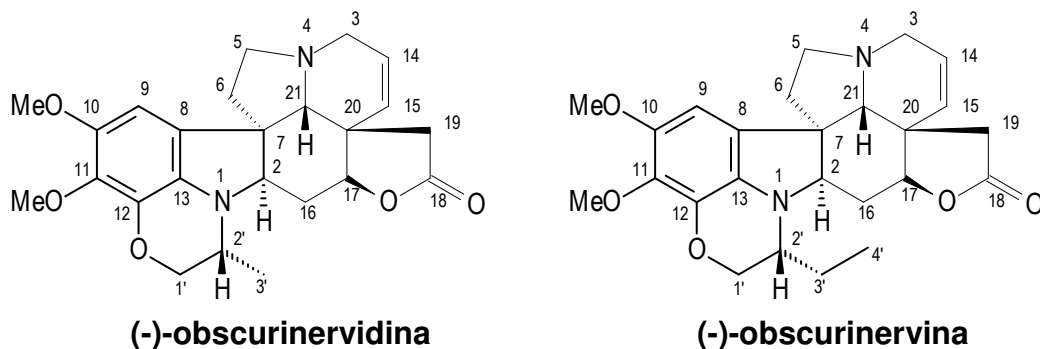
mistura de uma função 1-oxo-metil (92,29%; (-)-aspidolimidina) e 1-oxo-etil (7,71%; (-)-fendlerina).

Os dados de RMN descritos acima para a mistura dos alcalóides presentes na fração 5.1.1.3.4 estão de acordo com os dados descritos na literatura (Ferrari e Marion, 1964) para os alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina, isolados anteriormente de *Aspidosperma album*, comprovando assim a proposta estrutural para os alcalóides em questão.

Tabela 39. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC para a mistura dos alcalóides (-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina

(-)-aspidolimidina e (-)-fendlerina				
	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
7	57,44			H-9
8	132,37			H-2; H-10
11	149,41		H-10	H-9; MeO-11; HO-12
12	137,06		HO-12	H-10
13	128,11			H-9; H-2
20	39,69		2H-18	
21	101,71			H-15b, H-16b, 2H-18
1'	172,21		2H-2'	3H-3'
CH				
2	69,47	3,89 (m)		H-6b
9	114,50	7,04 (d, 8,2)		
10	110,21	6,69 (d, 8,2)		
CH₂				
3	43,87	2,76 (dt); 2,57 (m)		H-15b
5	48,72	2,98 (m); 2,90 (m)		
6	34,45	2,00 – 1,80		
14	24,97	1,80 – 1,70		
15	32,89	1,72- 1,76	H-16	
16	26,35	1,90-1,35		
17	20,95	1,53; 1,23		H-15b
18	65,16	4,13 (t, 8,8);4,08 (m)		
19	36,39	1,92		
		1,85		
2'	28,29	2,56 (m) – 2,50 (m)	3H-3'	
CH₃				
2'	-	-		
3'	9,76	1,26 (t, 7,0)	2H-2'	
MeO	56,37	3,86 (s)		
HO		10,74 (s)		

4.1.7. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides (-)-obscurinervidina e (-)-obscurinervina



A substância presente na fração **5.1.1.3.2.4** apresentou-se como um sólido de cor marrom com ponto de fusão na faixa de 219-222°C, e com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} -114^\circ$ ($3,2 \times 10^{-4}$, CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

No espectro na região do infravermelho (**Espectro 125, p.137, v.2**) pode-se observar a presença de absorções em 1766 cm^{-1} (C=O) característica de carbonila de lactona, e 732 , 1487 e 2960 cm^{-1} de anel benzênico e 3494 cm^{-1} de grupamento amina do núcleo indólico (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 126-128, p.138-140, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 129, p.141, v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 25 átomos de carbono.

O espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides presente na fração **5.1.1.2.3.4**, apresenta um sinal simples relativo a um hidrogênio aromático a δ_{H} 6,33 (obscurinervidina) e 6,32 (obscurinervina) (1H, s, H-9) característicos de um núcleo indólico substituído nas posições C-10, C-11 e C-12, e apresentando correlações heteronucleares no espectro de HSQC (**Espectros 130-131, p.142-143, v.2**) a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 100,22)/H-9 [δ_{H} 6,33 (obscurinervidina) e 6,32 (obscurinervina)].

O modo de substituição pode ainda ser confirmado pelas correlações à longa distância a $^2J_{\text{CH}}$ C-10 [δ_{C} 147,79, obscurinervidina) (δ_{C} 147,54, obscurinervina)] e $^3J_{\text{CH}}$ C-7 (δ_{C} 51,40), C-11 (δ_{C} 136,88), C-13 [δ_{C} 130,43, obscurinervidina) (δ_{C} 131,01, obscurinervina)] com o hidrogênio H-9 [δ_{H} 6,33 (obscurinervidina) e 6,32 (obscurinervina)] apresentadas no espectro de HMBC (**Espectros 132-137, p.144-149, v.2**).

Os sinais em δ_C 57,52 e 61,18, apresentados no espectro de RMN ^{13}C , os quais apresentam correlações heteronucleares no espectro de HSQC a $^1J_{CH}$ com os sinais em δ_H 3,79 (obscurinervidina) e 3,78 (obscurinervina) e δ_H 3,86 (obscurinervidina) e 3,85 (obscurinervina), respectivamente, corroboram com a presença de dois grupos metoxila, sendo um desprotegido, pois se encontra impedido estericamente (OCH₃-11).

A localização dos dois grupos metoxila foi apoiada nas correlações à longa distância a $^3J_{CH}$ C-10 [(δ_C 147,79, obscurinervidina) (δ_C 147,54, obscurinervina)] com OCH₃-10 [(δ_H 3,79 (obscurinervidina) e 3,78 (obscurinervina)]; C-11 (δ_C 136,88) com OCH₃-11 [(δ_H 3,86 (obscurinervidina) e 3,85 (obscurinervina)], respectivamente, apresentadas no espectro de HMBC.

A formação de um anel de seis membros envolvendo o átomo de carbono C-12 e o nitrogênio N-1 foi apoiada nas correlações à longa distância a $^3J_{CH}$ C-12 [(δ_C 135,65, obscurinervidina) (δ_C 135,95, obscurinervina)] com 2H-1' [(δ_H 4,17 e 4,12 (obscurinervidina) e 4,30 e 4,10 (obscurinervina)]; C-13 [(δ_C 130,43, obscurinervidina) (δ_C 131,01, obscurinervina)] com H-2' [(δ_H 3,45 (obscurinervidina e obscurinervina)], respectivamente, apresentadas no espectro de HMBC.

A presença dos sinais no espectro de RMN 1H em δ_H 4,17 [(1H, *dl*, $J=$ 10,3 Hz, H-1' b (obscurinervidina)] e δ_H 4,30 [(1H, *dl*, $J=$ 10,3 Hz, H-1' b (obscurinervina)], e em δ_H 4,12 [(1H, *dd*, $J=$ 10,3 e 1,2 Hz, H-1' a (obscurinervidina)] e δ_H 4,10 [(1H, *dl*, $J=$ 10,3 Hz, H-1' a (obscurinervina)], ambos acoplando com um sinal em δ_H 3,45 [(1H, *m*, H-2' (obscurinervidina e obscurinervina)] como apresentado no espectro de 1H - 1H -COSY (**Espectro 138, p.150, v.2**), confirmam a formação do anel de seis membros.

O grupo CH₃-3' presente no alcalóide obscurinervidina foi comprovado pelo sinal duplo em δ_H 1,04, $J =$ 6,6 Hz, acoplando com o hidrogênio H-2', e confirmando correlações a longa distância a $^3J_{CH}$ CH₃-3' (δ_C 10,64) com os hidrogênios 2H-1' (δ_H 4,17 e 4,12) apresentados no espectro de HMBC.

Já para o alcalóide obscurinervina, o grupo CH₂CH₃ pôde ser comprovado pela presença de sinais múltiplos em δ_H 1,60 e 1,30, relativos ao CH₂-3' acoplando com sinal em δ_H 0,95 relativo ao grupo CH₃-4' em 1H - 1H -COSY, e confirmado pela correlação a longa distância a $^3J_{CH}$ CH₂-3' (δ_C 16,97) com os hidrogênios 3H-4' (δ_H 0,95) apresentados no espectro de HMBC.

A oxidação nos átomos de carbono CH-14 e CH-15 pode ser observada na mistura dos alcalóides obscurinervidina e obscurinervina no espectro de RMN ^{13}C , através dos sinais em δ_{C} 123,47 (CH-14) e 133,83 (CH-15), respectivamente, e pelos sinais múltiplos no espectro RMN ^1H em δ_{H} 5,70, acoplando entre si, como observado no espectro de ^1H - ^1H -COSY, característicos de hidrogênios olefínicos (Silverstein et al., 2007).

Observa-se agora na mistura dos alcalóides obscurinervidina e obscurinervina a ausência do sinal triplo com $J \cong 7,0$ Hz, e dos dois sinais múltiplos relativos ao grupo etila ligado ao átomo de carbono C-20, como apresentado em alcalóides anteriormente descritos.

Pode-se observar agora no espectro de RMN ^{13}C a formação de uma γ -lactona entre os átomos de carbono C-20 e CH-17, onde se observa um sinal em δ_{C} 176,57 (C-18), característico de carbono de lactona de cinco membros (Silverstein et al., 2007 & Breitmaier e Voelter, 1987).

A função lactona foi comprovada pelas correlações heteronucleares a longa distância a $^2J_{\text{CH}}$ C-18 (δ_{C} 176,57) com os hidrogênios em δ_{H} 2,49 (1H, *d*, $J = 18,6$ Hz, H-19b) e δ_{H} 2,07 (1H, *d*, $J = 18,6$ Hz, H-19a), e ainda pelas correlações $^3J_{\text{CH}}$ C-17 (δ_{C} 81,71) com os mesmos hidrogênios descritos anteriormente 2H-19 e com o hidrogênio olefínico H-15 em δ_{H} 5,70, apresentados no espectro de HMBC.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20, CH-21 e CH-2 como apresentada na estrutura dos alcalóides obscurinervidina e obscurinervina, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -114^\circ$ ($3,2 \times 10^{-4}$, CHCl_3), ou seja, na forma (-), e confirmada pelo espectro de ^1H - ^1H -NOESY (**Espectros 139-140, p.151-152, v.2**) (**Figura 40**).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 40**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio, e também pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY.

Observando-se a intensidade dos sinais dos grupos CH_3 -3' e CH_3 -4' pôde-se propor uma mistura dos alcalóides obscurinervidina e obscurinervina, na proporção de 75,61% de obscurinervidina para 24,39% do alcalóide obscurinervina.

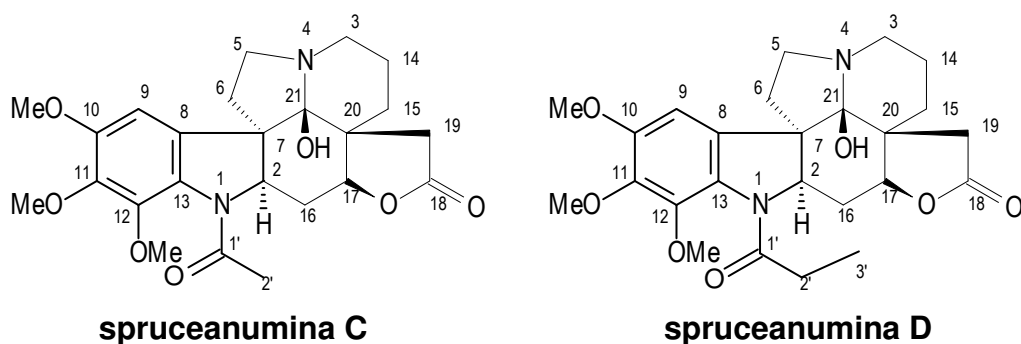
Os dados de RMN ^1H descritos acima para os alcalóides obscurinervidina e obscurinervina estão de acordo com os dados descritos na literatura (Brown e

Djerassi, 1964) para os alcalóides obscurinervidina e obscurinervina, isolados anteriormente de *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja, (na época uma nova classe de alcalóides heptacíclicos) comprovando assim a proposta estrutural para os alcalóides em questão.

Tabela 40. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides (-)-obscurinervidina e (-)-obscurinervina

	(-)-obscurinervidina				(-)-obscurinervina			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C								
7	51,40	-		H-9	51,40	-		H-9
8	130,05	-			130,00	-		
10	147,79	-	H-9	MeO-10	147,54	-	H-9	MeO-10
11	136,88	-		H-9; MeO-11	136,88	-		H-9; MeO-11
12	135,65	-		2H-1'	135,95	-		2H-1'
13	130,43	-		H-2; H-2'; H-9	131,01	-		
18	176,57	-	2H-19		176,57	-	2H-19	
20	40,78	-	H-15; 2H-19; H-21	H-14	40,78	-	H-15; 2H-19; H-21	H-14
CH								
2	65,17	3,26 (m)		H-6b	64,73	3,26 (m)		H-6b
9	100,22	6,33 (s)			100,22	6,32 (s)		
14	123,47	5,70 (m)			123,47	5,70 (m)		
15	133,83	5,70 (m)	2H-19	H-17	133,83	5,70 (m)	2H-19	H-17
17	81,76	4,54 (sl)		H-15; 2H-19	81,76	4,54 (sl)		H-15; 2H-19
21	69,67	2,20 (m)		H-6b; H-15; H-19b	69,67	2,20 (m)		H-6b; H-15; H-19b
2'	44,58	3,45 (m)	3H-3'		50,72	3,45 (m)		3H-4'
CH₂								
3	52,30	3,47 (m) 2,72 (m)	H-14	H-15	52,30	3,47 (m) 2,72 (m)	H-14	H-15
5	54,48	3,20 (m) 2,30 (m)			54,48	3,20 (m) 2,30 (m)		
6	23,86	2,26 (m) 2,20 (m)			23,81	2,26 (m) 2,20 (m)		
16	38,93	2,25 (m) 1,80 (m)			38,93	2,25 (m) 1,80 (m)		
19	39,43	2,49 (d, 18,6) 2,07 (d, 18,6)			39,36	2,49 (d, 18,6) 2,07 (d, 18,6)		
1'	72,07	4,17 (dl, 10,3) 4,12 (dd, 10,3; 1,2)		3H-3'	68,03	4,30 (dl, 10,3) 4,10 (dl, 10,3)		
3'	-	-			16,97	1,60 (m) 1,30 (m)	3H-4'	
CH₃								
MeO-10	57,52	3,79 (s)			57,52	3,78 (s)		
MeO-11	61,18	3,86 (s)			61,18	3,85 (s)		
3'	10,64	1,04 (d, 6,6)		2H-1'	-	-		
4'	-	-			10,53	0,95 (t, 7,5)		

4.1.8. Determinação estrutural da mistura dos alcalóides **spruceanumina C** e **spruceanumina D**



A substância presente na fração **5.1.29.2.9** apresentou-se como um sólido amorfo de cor marrom com ponto de fusão na faixa de 216-220°C, e com valor de rotação ótica $[\alpha]_D^{23} -110^\circ$ ($1,1 \times 10^{-3}$, CHCl_3), revelando ser um alcalóide através do teste com o reagente de Dragendorff.

No espectro na região do infravermelho (**Espectro 141, p.153, v.2**) pode-se observar a presença de absorções em 1747 cm^{-1} (C=O) característica de carbonila de lactona, e 725 , 1446 e 2941 cm^{-1} de anel benzênico e 3440 cm^{-1} de grupamento amina do núcleo indólico (Silverstein et al., 2007).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 142-144, p.153-155, v.2**) apresentou sinais (δ_{H}) correspondentes a hidrogênios aromáticos e no espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 145-146, p.157-158, v.2**) observou-se sinais (δ_{C}) para 25 átomos de carbono.

O espectro de massas mostrou um sinal em $m/z= 458$ correspondente ao pico do íon molecular $[\text{M}]^{+}$ (**Figura 41**), que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT (**Espectro 147, p.159, v.2**), pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$ para a mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D. Foram observados ainda a presença dos íons $m/z= 410$ indicando a perda de um grupamento H_2CO e H_2O , e $m/z= 382$ indicando uma subsequente perda de $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$. Os demais fragmentos presentes no espectro de massas sugerem um esqueleto do tipo plumerano para a mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D, semelhante ao esqueleto dos alcalóides obscurinervidina e obscurinervina, descritos no item anterior e isolados de *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja (Brown e Djerassi, 1964).

O espectro de RMN ^1H da mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D, apresenta um sinal simples relativo a um hidrogênio aromático a δ_{H} 6,94 característico de um núcleo indólico substituído nas posições C-10, C-11 e C-12, e apresentando correlações heteronucleares no espectro de HSQC (**Espectros 150-151, p.162-163, v.2**) a $^1J_{\text{CH}}$ entre CH-9 (δ_{C} 104,7)/H-9 (δ_{H} 6,94).

O modo de substituição pode ainda ser confirmado pelas correlações à longa distância entre o hidrogênio H-9 (δ_{H} 6,94) a $^2J_{\text{CH}}$ com os carbonos C-10 (δ_{C} 151,98) e C-8 (δ_{C} 133,37), e a $^3J_{\text{CH}}$ C-7 (δ_{C} 60,13), C-11 (δ_{C} 142,00) e C-13 (δ_{C} 127,05) apresentados no espectro de HMBC (**Espectros 152-155, p.164-167, v.2**).

Os sinais em δ_{C} 56,47, 61,44 e 60,13, apresentados no espectro de RMN ^{13}C , os quais apresentam correlações heteronucleares no espectro de HSQC a $^1J_{\text{CH}}$ com os sinais simples, ambos integrando para três hidrogênios em δ_{H} 3,79, 3,86 e 3,77, respectivamente, corroboram com a presença de três grupos metoxila, sendo um desprotegido, pois se encontra impedido estericamente (OCH_3 -11).

A localização dos três grupos metoxila foi apoiada nas correlações à longa distância a $^3J_{\text{CH}}$ C-10 (δ_{C} 151,98) com OCH_3 -10 em δ_{H} 3,79; C-11 (δ_{C} 142,00) com OCH_3 -11 em δ_{H} 3,86, e C-12 (δ_{C} 144,60) com OCH_3 -12 em δ_{H} 3,77, respectivamente, apresentadas no espectro de HMBC.

Observa-se agora na mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D a ausência do sinal triplo com $J \cong 7,0$ Hz, e dos dois sinais múltiplos relativos ao grupo etila ligado ao átomo de carbono C-20, como apresentado em alguns dos alcalóides anteriormente descritos.

No espectro de RMN ^{13}C -DEPT observa-se a formação de uma γ -lactona entre os átomos de carbono C-20 e CH-17, onde se verifica a presença de um sinal em δ_{C} 175,19 (C-18), característico de carbono de lactona de cinco membros (Silverstein et al., 2007 & Breitmaier e Voelter, 1987).

A função lactona foi comprovada pelas correlações heteronucleares a longa distância a $^2J_{\text{CH}}$ C-18 (δ_{C} 176,57) com os hidrogênios em δ_{H} 2,23 (1H, *d*, $J = 16,8$ Hz, H-19b) e δ_{H} 2,16 (1H, *d*, $J = 16,8$ Hz, H-19a), apresentados no espectro de HMBC.

A presença de um sinal relativo a um carbono quaternário no espectro de RMN ^{13}C desprotegido em δ_{C} 108,36 sugere uma oxidação no átomo de carbono C-21, com a presença de um grupo hidroxila, comprovada pelo fragmento em $m/z= 410$ indicando a perda de um grupamento H_2CO e H_2O .

A presença do grupo OH no carbono C-21 justifica os maiores deslocamentos químicos dos átomos de carbono C-7 e C-20 (**efeito β**) e os menores observados para CH-1, CH₂-3, CH₂-5, CH₂-6 e CH₂-15 (**efeito γ**) quando comparado ao alcalóide (+)-aspidocarpina descrito anteriormente.

A oxidação do átomo de nitrogênio N-1 pode ser verificada através do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 170,45 relativo ao carbono carbonílico C-1', característico de uma função amida (Breitmaier e Voelter, 1987), o qual apresentou uma correlação à longa distância no espectro de HMBC ($^2J_{\text{CH}}$), com um sinal simples, integrando para três hidrogênios em δ_{H} 2,03, característico de um grupo metila α a um carbono carbonílico

Observando os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D, observa-se a presença de grupo CH_2CH_3 ligado ao carbono C-1' em δ_{C} 173,84, um sinal em δ_{C} 27,75 (CH₂-2') acoplando em HSQC com dois sinais múltiplos em δ_{H} 2,66 e 2,29. Por fim, um sinal em δ_{C} 9,98 acoplando com um sinal triplo em δ_{H} 1,12 com um $J= 7,3$ Hz, comprovando a presença de uma função etila ligada ao carbono C-1', comprovando que a substância **5.1.29.2.9** trata-se de fato de uma mistura de alcalóides.

A estereoquímica relativa dos átomos de carbono estereogênicos CH-2, C-7, C-20, CH-21 e CH-2, como apresentada na estrutura dos alcalóides spruceanumina A e spruceanumina B, foi baseada na comparação com valores de rotação ótica $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -114^\circ$ ($1,1 \times 10^{-3}$, CHCl_3), ou seja, na forma (-).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos e metínicos restantes da cadeia alifática (**Tabela 41**), foi feita com base nos parâmetros conhecidos para deslocamentos químicos de hidrogênio, e também pelo espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ -COSY (**Espectros 148-149, p.160-161, v.2**).

Observando-se a intensidade dos sinais dos grupos CH₃-2' e CH₃-3' pôde-se propor uma mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D, na proporção de 75% de spruceanumina C para 25% do alcalóide spruceanumina D.

Os dados de RMN descritos acima para os alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D estão sendo descritos pela primeira vez pelo melhor do conhecimento.

Tabela 41. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC para a mistura dos alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D

spruceanumina C e spruceanumina D				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
7	60,13	-	2H-6	H-9
8	133,37	-	H-9	H-6b
10	151,98	-	H-9	MeO-10
11	142,00	-		H-9; MeO-11
12	144,60	-		MeO-12
13	127,05	-		H-9
18	175,19		2H-19	
20	45,25	-	2H-15; H-17; H-19	H-14a
21	108,36			
1'	170,45(C) 173,84(D)		Me/AcO	
CH				
2	67,38	4,48 (sl)	H-16b	2H-6
9	104,07	7,27 (s)		
17	74,88	4,81 (dd, 11,7 e 4,5), H-17a		2H-19
CH₂				
3	41,52	3,01 (m), 2,84 (dd, 11,8 e 2,4)		H-15a
5	48,13	3,14 (m), 3,02 (m)	2H-6	
6	34,41	2,09 (m), 1,97 (m)	2H-5	
14	23,73	2,02 (m), 1,30 (m)	2H-15	
15	20,46	1,86 (m), 1,67 (dl, 14,7)	H-14a	H-17; H-19a
16	25,42	1,95 (m), 1,86 (m)	H-17	H-19a
17	-	-	-	-
19	39,24	2,23 (d, 16,8), 2,16 (d, 168)		2H-15; H-17
2'	27,75(D)	-	-	-
CH₃				
2'	21,21(C)	2,03 (s)		
3'	9,98 (D)	1,12 (t, 7,3)		
MeO-10	56,47	3,79 (s)		
MeO-11	61,44	3,86 (s)		
MeO-12	60,13	3,77 (s)		

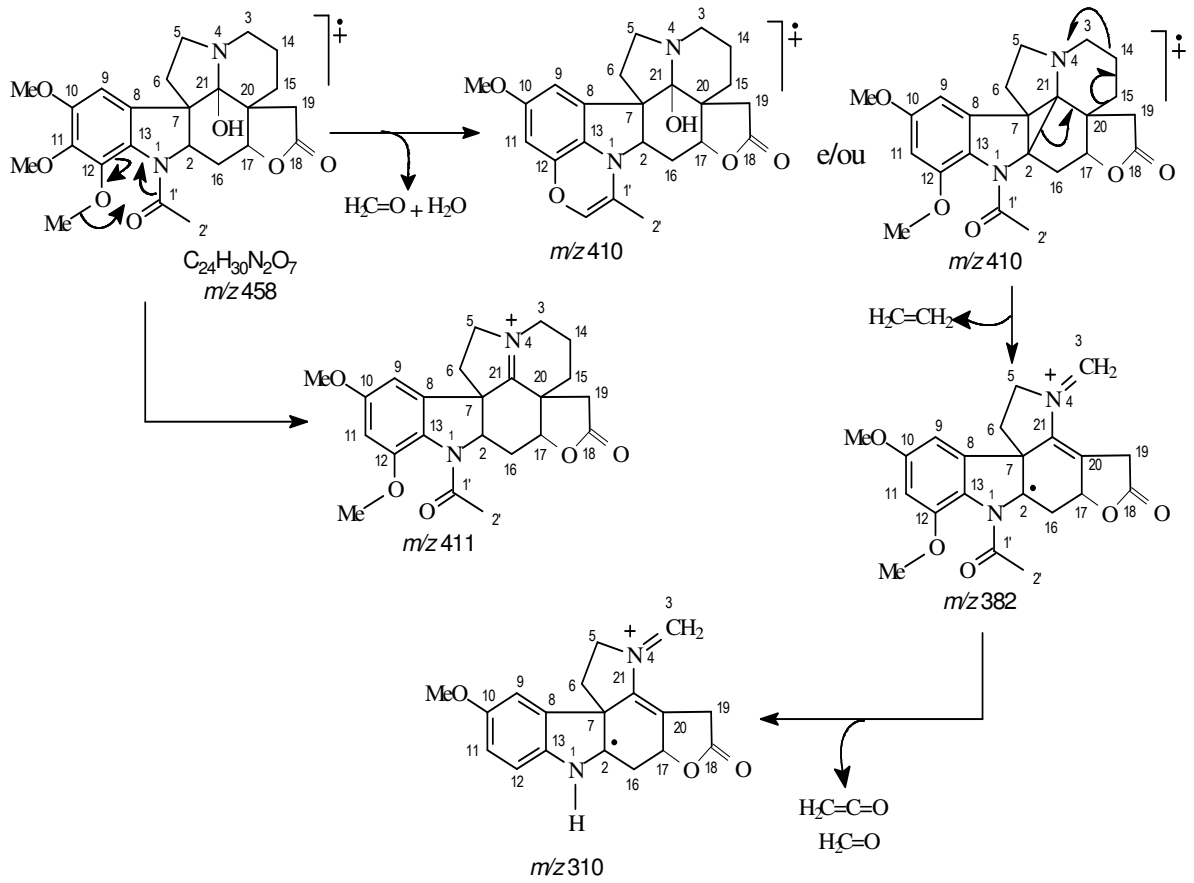


Figura 41. Proposta de fragmentação para IE/MS do pico $m/z= 458$ $[M^+]$ para os alcalóides spruceanumina C e spruceanumina D.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho é uma contribuição ao conhecimento da química da espécie *Aspidosperma spruceanum*, para tal foram isolados e identificados 12 alcalóides indólicos monoterpênicos. Do extrato em hexano das cascas do caule foram isolados os alcalóides indólicos (-)-desmetoxipalosina, (+)-aspidolimina, (+)-aspidocarpina e (+)-aspidospermidina; do extrato em hexano das sementes foram isolados os alcalóides indólicos (-)-fendlerina, (-)-aspidolimidina, (-)-obscurinervidina, (-)-obscurinervina, e 4 alcalóides indólicos descritos pela primeira vez na literatura (spruceanumina A, spruceanumina B, spruceanumina C e spruceanumina D). Foi constatado que os alcalóides spruceanumina A, spruceanumina B estão presentes nas cascas do caule e nas sementes de *A. spruceanum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agripino, D.G., Lima, M.E.L., Silva, M.R., Meda, C.I., Bolzani, V.S., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Moreno, P.R.H. (2004) Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica*, 4 (2):1-15.
- Allorge, L., Poupat, C. (1991) Position systématique et révision du genre *Aspidosperma* (Apocynaceae) pour les trois Guyanes. Le point sur leur chimique. *Letters Botaniques*, 138 (415):267-301.
- Allen, J.R.F. e Holmstedt, B.R. (1980) The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, 19:1573-1582.
- Alves, C.F. (1991) Alcalóides quaternários da *Aspidosperma Polyneuron*. Tese (Mestrado em Química Orgânica) – Campinas –SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 220 p.
- Amorim, I.L., Sampaio, E.V.S.B., Araújo, E.L. (2005) Flora e estrutura da vegetação arbustiva-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19 (3):615-623.

- Balzon, D.R., Silva, J.C.G.L., Santos, A.J. (2004) Aspectos mercadológicos de produtos florestais não madeireiros – Análise retrospectiva. *Floresta*, 34(3):363-371.
- Biel, J.H., Drukker, A. E., Mitchell, T.F. (1959) Central Stimulants. Chemistry and Structure-Activity Relationship of Alkyl Hydrazines. *Journal of the American Chemical Society*, 81(11):2805-2813.
- Biemann, K., Spiteller-Friedmann, M., Spiteller, G. (1963) Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. X. Alkaloids of the Bark of *Aspidosperma quebracho blanco*. *Journal of the American Chemical Society*, 85:631-638.
- Bolzani, V.S., Serur, L.M., Matos, F.J.A., Gottlieb, O.R. (1987) Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15(2): 187-200.
- Bourdy, G., Oporto, P., Gimenez, A., Deharo, E. (2004) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 93:269-277.
- Brandão, M.G.L., Grandit, S.M., Rocha, E.M.M., Sawyer, D.R., Krettl, A.U. (1992) Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 36:175-182.
- Breitmaier, E., Voelter, W. (1987) *Carbon-13 NMR spectroscopy; High-Resolution Methods and applications in organic chemistry an biochemistry*. 3. ed. Germany: VCH verlagsgesellschaft, 515p.
- Brown, K., Djerassi, C. (1964) Alkaloid Studies. XLVI.¹ The Alkaloids of *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja. A New Class of Heptacyclic Indole Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 86:2451-2463.

- Brown, K.S.J., Wolfango, E., Sanchez. L., Figueiredo, A.A., Ferreira, F.J.M. (1966) Unusual Mass Spectral Fragmentation of 21-Oxoaspidoalbidine-Type Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 88:4984-4989.
- Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2. ed. Tradução de Hatton. C. K. London : Lavoisier, 1136p.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Willians, D.H., (1964) *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry:Alkaloids*. San Francisco: Holden-Day, p. 98-132.
- Campos, A.R., Lima, R.C.P., Uchoa, D.E.A., Silveira, E.R., Santos, F.A., Rao, V.S.N. (2006) Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:240-244.
- Corrêa, M.P. (1931) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. v. 2. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M., Petenatti, M.E. (1997) Recursos herbolarios de San Luis (Republica Argentina). Primeira parte: Plantas Nativas. Multequina. *Latin American Journal of Natural Resources*, 6:49-66.
- Deutsch, H.F., Evenson, M.A., Drescher, P., Sparvasser, C., Madsen, P.O. (1994) Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. *Journal Pharmacology and Biomedical Analysis*, 12:1283-1287.
- Dewick, P.M. (1997) *Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. New York :John Wiley e Sons, 466p.
- Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A. (2002) *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2.ed. rev. ampl. São Paulo: Editora UNESP, p.372-393.

- Elisabetsky, E., Souza, G.C. (2004) Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. 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. 107-122.
- Estrella, E.; Picasso, B. (1995) Plantas medicinales Amazónicas: realidad y perspectivas. *Tratado de Cooperación Amazônica (TCA)*, 28:302-315,
- Ferrari, C., Marion, L. (1964) Further alkaloids related to aspidoalbine and limaspermine. *Canadian Journal of Chemistry*, 42:2705-2709.
- Ferreira, D.T., Silva, J.V.J., Soeira, L.S., Zanolli, L.A. F., Ishikawa, N.K., Barbosa, A.M., Yassumoto, L. (2003) Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folha de *Aspidosperma polyneuron*. XI Encontro de Química da Região Sul - RS.
- Ferreira, I.C.P., Lonardoní, M.V.C., Machado, G.M.C., Leon, L.L., Filho, L.G., Pinto, L.H.B., Oliveira, A.J.B. (2004) Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (3):325-327.
- Ferreira, J.M., Gilbert, B., Owellen, R. J., Djerassi, C. (1963) Alkaloid studies: Alkaloids of *Aspidosperma discolor* A DC. *Experientia*, 19:585.
- Ferreira-Filho, J.M., Gilbert, B., Kitagawa, M., Paes Leme, L.A., Durham, L.J. (1966) Four heptacyclic alkaloids from *Aspidosperma* species. *Journal of Chemical Society. Orgânica C.*, 14:1260-1266.
- Gilbert, B. (1966) Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38 (supl):315-319.
- Gilbert, B., Duarte, A.P., Nakagawa, Y., Joule, J.A., Flores, S. E., Brissoliese, J.A., Campello, J., Carrazzoni, E.P., Owellen, E.C., Blossey, E.C., Brown, K.S.,

- Djerassi, C. (1965) Alkaloid studies L. The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species. *Tetrahedron*, 21:1141-1166.
- Goloni, R., Alves, N.M., Garrote, C.F.D., Paula, J.R., Valadares, M.C., Bara, M.T.F., Cunha, L.C. (2005) Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2 (2):89-91.
- Granato, D., Nunes, D.S., Mattos, P.P., Rios, E.M., Glinski, A., Rodrigues, L.C., Zanusso Junior, G. (2005) Chemical and biological evaluation of rejects from the Word industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48:237-241.
- Harborne, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Champman and Hall, 301p.
- Henriques, A.T., Limberger, R.P., Kerber, V.A. e Moreno, P.R.H. (2004) 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.
- JOLY, A. B. (1991) *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 10. ed, v.4. São Paulo: Editora Nacional, 777p.
- Kam, T., Anuradha, S. (1995) Alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*, 40:313-316.
- Le Men, L. e W. I. Taylor. (1965) A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia*, 21(9): 508-10.
- Lorence, A., Nessler, E. (2004) Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, 65:2735-2749.
- Lorenzi, H. (1998) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantanarum, 352p.

- Lounasma, M., Tolvanen, A. (1986) H-1-NMR data of monoterpenoid indole alkaloids, *Heterocycles*, 24:3229-3281.
- Luca, V., Laflamme, P. (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Physiology and Metabolism*, 4:225-233.
- Luca, V., Pierre, B.S. (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science. Reviews*, 5:168-173.
- Maier, U.H., Rodl, W., Deus-Neumann, B., Zenk, M.H. (1999) Biosynthesis of Erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*. *Phytochemistry*, 52:373-382.
- Marques, M.F.S. (1988) Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. Tese (Mestrado em Química Orgânica) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 141p.
- Marques, M.F.S., Kato, L., Leitão Filho, H.F., Reis, F.A.M. (1996) Indole alkaloid from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytochemistry*, 41 (3):963-967.
- Matos, F.J.A. (1997) *Introdução à fitoquímica Experimental*. 2. Ed. Fortaleza. Editora da Universidade Federal do Ceará, 141p.
- Mclean, S., Palmer, K., Marion, L. (1960) Isolation and structure of a new alkaloid: aspidoscarpine. *Canadian Journal Chemical*, 38:1547-1555.
- Mclean, S., Reynolds, W. F., Zhu, X. (1987) Assignment of the ^1H and ^{13}C spectra of aspidocarpine and assignment of the structure and stereochemistry of the von Braun reaction product of aspidocarpine by 2D NMR spectroscopy. *Canadian Journal Chemical*, 65: 200.
- Mejia, K., Rengifo, E. (2000) *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazônia Peruana*. 2. ed. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa, 286p.

- Ménez, P.L., Kunesch, N. (1991) Synthesis of (\pm)-aspidospermidine. *Journal of Organic Chemistry*, 66:2915-2918.
- Merck, E. (1972) Reactivos de coloración para cromatografía em capa fina y em papel. Alemanha:Darmstadt, p.130.
- Mesquita, M.L., Grellier, P., Mambu, L., Paula, J.E., Espindola, L.S. (2007) *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 110:165-170.
- Mitaine, A.C., Mitaine, A.C., Weniger, B., Sauvain, M., Lucumi, E., Aragon, R., Zeches-Hanrot, M. (1998) Indole alkaloid from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. *Planta Medica*, 64:487.
- Mitaine-Offer, A.C., Sauvain, M., Valentin, A., Callapa, J., Mallié, M., Zèches-Hanrot, M. (2002) Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*, 9:142-145.
- Morais, I.C. Silva, L.D.G., Ferreira, H.D., Paula, J.R., Tresvenzol, L.M.F. (2005) Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia: abordagem popular (raizeiros) e abordagem científica (levantamento bibliográfico). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2 (1):13-16.
- Moreira, F.F., Mendonça, C.B.F., Pereira, J.F., Esteves, V.G. (2004) Polinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na restinga de Carapebus, RJ, Brasil. *Acta botanica. Brasileira*, 18 (4): 711-721.
- Mustich, G. (2003) Approfondimenti di alkaloid. 5^o parte. *Natural*, 1:63-65.
- Nunes. D. S. (1980) *Contribuição ao estudo químico do gênero Aspidosperma: Aspidosperma pruinosum Markgraf*. Tese (Mestrado em Química Orgânica) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 177p.

- Oliveira, A. J. B. (1999) *Estudo de seis espécies do gênero Aspidosperma utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautobiográfico; Cultura de tecidos e células vegetais e Rota de preparação dos compostos diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B*. Tese (Mestrado em Química Orgânica) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 392p.
- Oliveira, A.J.B., Koike, L., Reis, F.A.M., Simone, L.K.S. (2002) Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. *Acta Scientiarum*, 23:609-612.
- Pereira, M.M., Souza Júnior, S.N., Alcântara, A.F.C., Piló-Veloso, D., Alves, R.B., Machado, P.O., Azevedo, A.O., Moreira, F.H., Castro, M.S.A., Raslan, D.S. (2006) Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8 (3):1-8.
- Pereira, M.M. Alcantara, A.F.C., Pilo-Veloso, D. (2006) 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.
- Pereira, M.M., Jácome, R.L.R.P., Alcântara, A.F.C., Alves, R.B., Raslan, D.S. (2007) Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). *Química Nova*, 30 (4):970-983.
- Peres, L.E.P. Metabolismo secundário. <http://www.daneprairie.com> em 15/08/2005.
- Perez, D. (2002) Etnobotânica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. *Folia Amazónica*, 13:87-108.
- Pinar, M.B., Seibl, B.W., Schmid, J.H. (1965) Notiz uber limatin aus *Aspidosperma limae* woods. *Helvetica Chimica Acta*, 48:822.

- Quiquard, E.L.J. (2003) Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine-shrimp. *Acta Amazonica*, 33:93-104.
- Roberts, M.F., Wink, M. (1998) *Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications*. New York e London: Plenum Press, 486p.
- Scarpa, G.F. (2000) Plantas empleadas contra trastornos digestivos em la medicina tradicional criolla del Chaco noroccidental. *Darwiniana*, 38:253-280.
- Schripsema, J., Dagnino, D., Gosmann, G. (2004) 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. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 819-846.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2007) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC. 490p.
- Sottomayor, M., Cardoso, I.L., Pereira, L.G., Barceló, A.R. (2004) Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Reviews*, 3:159-171.
- Souza, A.C.M., Souza, L.K.H., Silva, M.R.R.; Oliveira, C.M.A., Kato, L., Silva, C.C., Tanaka, J.C.A.; Oliveira, A.J.B. (2006) Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia – SP.
- Sperling, H., Lorenz A., Krege, S., Arndt, R., Michel, M.C. (2002) An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile α -adrenoceptors. *The Journal of Urology*, 168:160-163.
- Tanaka, J.C., Silva, C.C., Oliveira, A.J., Nakamura, C.V., Dias-Filho, B.P. (2006a) Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Urological Research*, 39:387-391.

- Tanaka, J.C.A., Silva, C.C.; Ferreira, I.C.P., Machado, G.M.C., Leon, L. L., Oliveira, A.J.B. (2006b) Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine*, 9 (1):1-4.
- Verpoorte, R., Koskuyck, E; Tsoi, A.T.A., Ruigrok, C.L.M., Dejong, G. (1983) Medicinal plants of Surinam. Antimicrobially active alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. *Planta Medica*, 48:283-289.
- Verpoorte, R., Puigrok, C.L.M., Berarheim, S.A. (1982) Medicinal plantas of Surinam: Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. *Planta Medica*, 46:149-152.
- Vicentini, A., Oliveira, A.A. (1999) Apocynacea e Asclepiadaceae. In: *Flora da reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. v.1, Manaus: INPA – DFID, p. 568-581.
- Woodson, R.J. (1951) Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. e Zucc. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 38:119-204.
- Zenk, P. (1980) *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.