



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS DO NORDESTE
DO BRASIL: *Aspidosperma ulei* Markgr.

FORTALEZA

2012

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS DO NORDESTE DO
BRASIL: *Aspidosperma ulei* Markgr.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química. Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Esdras de Andrade Uchoa.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

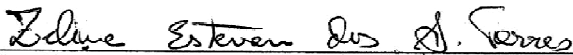
Z649c Torres, Zelina Estevam dos Santos.
Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Aspidosperma ulei*
Markgr / Zelina Estevam dos Santos Torres. – 2012.
262 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e
Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Esdras de Andrade Uchoa.

1. *Aspidosperma ulei*. 2. Alcaloides indólicos. 3. Química vegetal. I. Título.

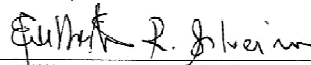
CDD 547

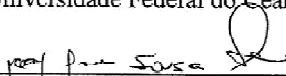
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



Zelina Estevam dos Santos Tôrres

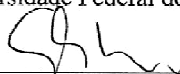
TESE APROVADA EM: 30/03/2012

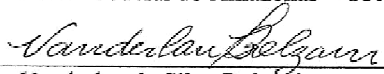
EXAMINADORES:


Prof. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profª. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profª. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profª. Maria Lucia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM


Profª. Vanderlan da Silva Bolzani
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

À Deus, fonte de sabedoria, força e caminho da felicidade.

Aos meus pais *in memoriam* Gedeon José dos Santos e Dibe Estevam dos Santos, pela educação, amor e dignidade.

Aos meus irmãos Ricardo Sergio, Gedeon e Evandro Jorge, familiares e amigos, por compartilharem sucessos e insucessos que a vida nos reserva.

À família que constituí em 1996, com a bênção de Deus: Eduardo Jorge, e a graça concedida com a chegada de Gabriel, em 1997, e João Henrique, em 2001, pela alegria, companheirismo, amor, dedicação, crescimento espiritual e afetivo – minhas maiores conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pela acolhida e oportunidade para a realização deste curso.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira pela orientação, amizade, compreensão, amizade, dignidade, competência, ética e, sobretudo, amor ao que faz.

Ao professor Daniel Esdras pela co-orientação e valiosos conhecimentos da técnica de HPLC.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Química Prof. Ronaldo Nascimento, Prof. Francisco José Queiroz Monte, Prof^ª. Maria Goretti, Prof^ª. Otília Deusdênia, Prof^ª. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Prof^ª Telma Leda G. Lemos, Prof^ª Nilce Viana Pompeu Brasil - pelos conhecimentos transmitidos, e em especial a Prof^ª Mary Anne Souza Lima pelo constante incentivo e valiosos momentos de conhecimento.

Ao professor Raimundo Braz Filho pela grande contribuição na determinação estrutural de alguns alcaloides, além de sua simplicidade como pessoa e grandes conhecimentos.

A professora Letícia Lotufo, do laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela realização dos testes citotóxicos.

Aos operadores dos Equipamentos de Infravermelho e Espectrometria de Massa, pela obtenção dos espectros.

Aos operadores dos espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear – RMN, Patrícia Coelho, Karísia Barros, Elton, Regivaldo, Gustavo e Honório, pela realização dos espectros e pela paciência.

Aos colegas da turma de doutorado, Ayla, Cléia, Eduardo, Leandro, Ceíça, Karen, e Elton, pelo convívio e laços de amizade que ficarão eternos na minha memória.

Aos colegas de laboratório e Pós-graduação, Patrícia Coelho, Nayara Coriolano, Nicolau, Regivaldo, Honório, Paula, Mariano, João Víto, Vanessa, Isabel, Ceíça, Hozana Patrícia, Thiciana, Cléia, Andreza, Daniele, Gustavo, Elton, Luis Cláudio, Chaguinha, Max, Roberto, Robério e Aurélio, pelo convívio e harmonia.

Aos amigos Artur, Antônia e Cristiane, pelo carinho e companheirismo.

As amigas Karísia Barros e Cléia Rocha, por todos os momentos de alegrias, tristezas, ajuda mútua, disponibilidade e autoestima.

Aos funcionários da UFC (Bloco da Química) Raimunda – “Mundinha”, Aurilana “Lana”, Sr. Paulo, Sra. Célia e Sr. Orlando e terceirizados (Sr. Raimundo, Sra. Paula e ao

amigo Cícero), pessoas alegres, prestativas e solícitas em todos os momentos de busca, minha eterna gratidão.

Ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massa – CENTRAL ANALÍTICA – CAM/UFAM, pela aquisição dos espectros de massa, realizados por Felipe Moura Araújo da Silva.

À Equipe de Casais - Equipe 41 - Nossa Senhora da Saúde, pela acolhida em Fortaleza, amizade e muitos momentos de alegria e paz e, em especial, ao casal Patrícia e Elbio e ao Conselheiro Espiritual das Equipes – Pe. Justino, por todos os momentos de crescimento como casal e cristão.

Ao meu sogro e sogra Jorge e Janete Torres, por todos os momentos de sabedoria e harmonia.

Ao Sergio Nunomura, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela amizade e profissionalismo.

A Professora Maria de Meneses Pereira do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, pelas valiosas informações sobre *Aspidosperma*.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de Doutorado e suporte financeiro.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela liberação para realização deste trabalho.

A Prefeitura Municipal de Manaus – SEMED/PMM, pela liberação para cursar o doutorado.

Ao CNPq, PRONEX e CAPES pelo suporte técnico e financeiro.

Àqueles que por qualquer motivo não tenham sido nominalmente citados, agradeço imensamente, por tudo que tenham feito para que este trabalho fosse realizado.

“Importante é saber, mas, mais importante é
nunca perder a capacidade de aprender.”
(Leonardo Boff – Teólogo)

RESUMO

Aspidosperma ulei Markgr, popularmente conhecida como pitiá ou piquiá, apresenta-se como uma árvore com casca áspera e acinzentada. No presente trabalho foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos etanólicos das folhas de *Aspidosperma ulei*, além de uma reinvestigação fitoquímica do caule e raiz de um espécime coletado na localidade Garapa, Município de Acarape, no estado do Ceará. Para os extratos etanólicos dos lenhos do caule e raiz e da casca da raiz foram realizados tratamentos por extração ácido/base para obtenção das frações alcaloídicas. Para as folhas e a casca do caule, alíquotas dos extratos etanólicos de ambas foram submetidas a cromatografias convencionais sobre sílica gel e por CLAE, possibilitando o isolamento do triterpeno ácido ursólico, um derivado do inositol, o metil-*chiro*-inositol e dos alcaloides indólicos β -ioimbina, ioimbina, 3,4,5,6-tetra-desidro- β -ioimbina, 19,20-desidro-17 α -ioimbina e 19(E)-hunteracina. Das frações alcaloídicas dos lenhos do caule e da raiz foram obtidos por CLAE, 20(E)-17-nor-subincanadina E, relatado pela primeira vez como produto natural, além do ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-óico, um alcaloide indólico também inédito como produto natural. Da fração alcaloídica da casca da raiz foram obtidos por CLAE a uleína, 20-*epi*-dasicarpidona, 20-*epi*-N-nordasicarpidona, N-desmetiluleína, olivacina e a δ -lactona booneína. O ácido ursólico e a 20(E)-17-nor-subincanadina E foram submetidos a testes de atividade citotóxica e apresentaram resultados significativos frente a 4 linhagens de células tumorais. A identificação e caracterização dos compostos isolados foram realizadas por técnicas espectroscópicas como IV, EM e RMN uni e bidimensional, inclusive técnicas como HSQC, NOESY, COSY e HMBC, além de comparação com dados da literatura.

Palavras-chave: *Aspidosperma ulei*. Alcaloides indólicos. Determinação estrutural. CLAE. RMN.

ABSTRACT

Aspidosperma ulei Markgr. popularly known as pitiá or piquiá, is a tree of a rough and gray trunk bark. This work reports the phytochemical analysis of the leaves, and the re-investigation of the trunk and roots of an *A. ulei* specimen collected at the locality of Garapa-Acarape Country – Ceará State. The ethanol extracts of all parts were obtained. Acid/base extraction was performed with the extracts from the trunk and root heartwoods and root bark, in order to obtain the alkaloids fraction. For the leaves and trunk bark small portions of the ethanol extract were submitted to conventional chromatography over silica gel followed by semipreparative HPLC to afford the triterpene ursolic acid, an inositol derivative the methyl-chiro-inositol, and the alkaloids β -yohimbine, yohimbine, 3,4,5,6-tetrahydro- β -yohimbine, 19,20-dehydro- α -yohimbine and 19(E)-hunteracine. From the alkaloidal fractions of the trunk and the root heartwood, were obtained, by semi preparative HPLC, the alkaloids 20(E)-17-nor-subincanadine E, reported for the first time for the species and also an natural product, and the 12-hydroxy-N-acetyl-21(N)-dehydro-plumeran-18-oic acid, on unknown indole alkaloid. From the alkaloidal fraction of the root bark, after semipreparative HPLC, were obtained the indole alkaloids uleine, 20-epi-dasycarpidone, 20-epi-N-nordasycarpidone, N-noruleine, olivacine and the booneine lactone. Ursolic acid and 20(E)-17-nor-subincanadine E were assayed as citotoxic and showed significative results against four tumour cell lines. The identification and characterization of all compounds were realized by means of spectroscopic techniques such as IR, MS and uni and bidimensional NMR, including pulse sequences such as HSQC, NOESY, COSY and HMBC, after comparison to the literature data.

Key words: *Aspidosperma ulei*. Indole alkaloids. Structure elucidation. HPLC. NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Núcleo de indolo mono-terpênicos	32
Figura 2	Estrutura dos alcaloides indólicos vinblastina e vincristina	33
Figura 3	Alcaloides isolados de <i>A. ulei</i>	34
Figura 4	Alcaloides já isolados da casca do caule e casca da raiz de <i>A. ulei</i>	34
Figura 5	Distribuição geográfica de Apocynaceae no Brasil	38
Figura 6	Esqueletos característicos da série Pyricola	39
Figura 7	Árvore, flores e frutos de <i>A. ulei</i>	40
Figura 8	Classificação dos alcaloides quanto a sua classe biogenética	42
Figura 9	Representação dos alcaloides indólicos terpênicos, de acordo com sua função biológica e espécie da planta no qual foram isolados	43
Figura 10	Etapa inicial da biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos	44
Figura 11	Maiores classes de alcaloides indólicos terpênicos derivados da strictosidina	45
Figura 12	Proposta da via biossintética da ioimbina (esqueleto corinante)	46
Figura 13	Proposta da via biossintética dos alcaloides do tipo aspidosperma e iboga	46
Figura 14	Acoplamentos escalares observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY de AUF-1	48
Figura 15	Correlações importantes observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Pyr –d5, 500 x 125 MHz) de AUF-1	49
Figura 16	Estrutura do triterpeno ácido ursólico (AUF-1)	48
Figura 17	Espectro de absorção na Região do Infravermelho de AUF-1 (Pastilha de KBr)	51
Figura 18	Espectro de Massa de AUF-1 (IE, 70 eV) e alguns fragmentos observados	52
Figura 19	Espectro de RMN de ^1H de AUF-1 (Pyr-d5, 500 MHz)	53
Figura 20	Espectro de RMN de ^{13}C de AUF-1 (Pyr-d5, 125 MHz)	53
Figura 21	Espectro de RMN de DEPT 135° de AUF-1 (125 MHz, Pyr-d5)	54
Figura 22	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AUF-1 (Pyr-d5, 500 x 125 MHz)	54

Figura 23	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AUF-1 (Pyr- <i>d</i> 5, 500 x 125 MHz) estrutura e subestruturas de algumas correlações a longa distância	55
Figura 24	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Pyr- <i>d</i> 5, 500 MHz) e expansão de AUF-1	56
Figura 25	Expansão do Espectro de COSY e algumas correlações de AUF-1	56
Figura 26	Correlações observadas no espectro de COSY para AUCC-1	58
Figura 27	Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC	58
Figura 28	Estruturas de inositóis, com variações na posição da hidroxila	59
Figura 29	Estrutura da substância inositol (AUCC-1)	60
Figura 30	Espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-1 (Pastilha de KBr)	61
Figura 31	Espectro de Massa de AUCC-1 (IE, 70 eV)	61
Figura 32	Espectro de RMN de ^1H de AUCC-1 (D_2O , 500 MHz)	62
Figura 33	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135 (D_2O , 125 MHz) de AUCC-1	63
Figura 34	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (D_2O , 500 MHz) de AUCC-1	64
Figura 35	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (D_2O , 500 x 125 MHz) de AUCC-1	64
Figura 36	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AUCC-1 (D_2O , 500 x 125 MHz), estrutura e subestruturas de algumas correlações a longa distância	65
Figura 37	Estruturas parciais obtidas através do espectro de COSY de AUCC-2	67
Figura 38	Estruturas parciais observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2	67
Figura 39	Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125) de AUCC-2	68
Figura 40	Conformação em cadeira do alcaloide ioimbina	69
Figura 41	Diferentes derivados do esqueleto ioimbano	70
Figura 42	Acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de AUCC-2	71
Figura 43	Estrutura do alcaloide indólico β -ioimbina (AUCC-2)	72
Figura 44	Espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-2 (Pastilha de KBr)	73
Figura 45	Espectro de massa de AUCC-2 (fonte APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization)	73
Figura 46	Espectro de RMN ^1H de AUCC-2 (500 MHz, CD_3OD) com expansões.	74

Figura 47	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-2	74
Figura 48	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-2 ..	75
Figura 49	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2	75
Figura 50	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2	76
Figura 51	Expansão do Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2	76
Figura 52	Expansão do Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2	77
Figura 53	Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear de ^1H , ^1H - NOESY de AUCC-2	77
Figura 54	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-2 e expansões e subestrutura mostrando algumas correlações	78
Figura 55	Algumas correlações à longa distância, observadas através do espectro de HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) para a subestrutura de AUCC-3 ...	81
Figura 56	Comparação de AUCC-3 com o alcaloide quaternário 3,4,5,6-tetra-desidro-ioimbina da literatura	83
Figura 57	Estrutura do alcaloide indólico 3,4,5,6-tetradésidro- β -ioimbina (AUCC-3) .	84
Figura 58	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-3	85
Figura 59	Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-3 (Pastilha de KBr)	85
Figura 60	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC- 3 e expansões.....	86
Figura 61	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3	86
Figura 62	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3	87
Figura 63	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de AUCC-3	87
Figura 64	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de AUCC-3	88
Figura 65	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de AUCC-3	88
Figura 66	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-3	

	e correlações dipolares	89
Figura 67	Subestruturas mostrando correlações vicinais e geminais observadas no espectro de COSY para AUCC-4	91
Figura 68	Correlações a duas e três ligações de ^1H , ^{13}C -HMBC de AUCC-4	92
Figura 69	Correlações observadas no espectro de NOESY de AUCC-4	93
Figura 70	Comparação de AUCC-2 (β -ioimbina) com AUCC-4	93
Figura 71	Alcaloide indólico ioimbina ou 17α -hidroxi-ioimbano- 16α -carboxilato de metila (AUCC-4)	94
Figura 72	Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-4 (UATR)	95
Figura 73	Espectro de massa (analisada por fonte APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization) de AUCC-4	95
Figura 74	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4	96
Figura 75	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT-135 (75 MHz, CD_3OD) de AUCC-4 ..	96
Figura 76	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-4 e subestruturas mostrando os acoplamentos vicinais	97
Figura 77	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4	97
Figura 78	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4 e expansão	98
Figura 79	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H –NOESY de AUCC-4 (500 MHz, CD_3OD)	99
Figura 80	Espectro de RMN 2 D de ^1H , ^1H –NOESY de AUCC-4 e expansão com os acoplamentos dipolares observados	99
Figura 81	Estruturas parciais observadas a partir do espectro de COSY para AUCC-5	101
Figura 82	Algumas correlações à longa distância, observadas através do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC para as subestruturas de AUCC-5	102
Figura 83	Proposta de possíveis subestruturas obtidas a partir do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC para AUCC-5	103
Figura 84	Estrutura proposta para AUCC-5 e correlações observadas no espectro de NOESY	104
Figura 85	Estrutura do alcaloide 19E-hunteracina (AUCC-5)	105
Figura 86	Espectro de absorção na Região do Infravermelho de AUCC-5 (Pastilha	

	de KBr)	106
Figura 87	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-5	106
Figura 88	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão ...	107
Figura 89	Espectro de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-5	108
Figura 90	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5 ..	109
Figura 91	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5 e expansão	109
Figura 92	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5	110
Figura 93	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão	110
Figura 94	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125x500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5	111
Figura 95	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão	111
Figura 96	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão	112
Figura 97	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125x500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão	112
Figura 98	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H –NOESY de AUCC-5 (CD_3OD , 500 MHz)	113
Figura 99	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H –NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5 e expansão	113
Figura 100	Comparação de AUCC-6 com os alcaloides β -ioimbina e ioimbina	117
Figura 101	Alcaloide indólico 19,20-desidro-17 α -ioimbina (AUCC-6)	118
Figura 102	Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-6 (UATR)	119
Figura 103	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-6	119
Figura 104	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de AUCC-6	120
Figura 105	Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (125 e 75 MHz, CD_3OD) de AUCC-6	121
Figura 106	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-6 ..	122
Figura 107	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-6 e	

	expansão	122
Figura 108	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (CD_3OD , 300 x 75MHz) de AUCC-6	123
Figura 109	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (CD_3OD , 300 x 75 MHz) de AUCC-6 e expansão	123
Figura 110	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (300 x 75 MHz) de AUCC-6	124
Figura 111	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (300 x 75 MHz) de AUCC-6 e expansão	124
Figura 112	Subestruturas propostas para LCA-1 e correlações obtidas a partir do espectro de HMBC	126
Figura 113	Comparação com modelo da literatura (KOBAYASHI, 2002) para LCA-1 .	129
Figura 114	Acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -NOESY para LCA-1	129
Figura 115	Estrutura do alcaloide indólico 20(E)17-nor-subcanadina E (LCA-1)	130
Figura 116	Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de LCA-1 (Pastilha de KBr)	131
Figura 117	Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de LCA-1	131
Figura 118	Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1	132
Figura 119	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de LCA-1	132
Figura 120	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) de LCA-1	133
Figura 121	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) de LCA-1 e expansão	133
Figura 122	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz de LCA-1 e expansão	134
Figura 123	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1 e subestrutura mostrando alguns acoplamentos dipolares	135
Figura 124	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1 e expansão	135
Figura 125	Subestruturas obtidas a partir dos dados de COSY e HSQC de LREB-1 .	137
Figura 126	Subestruturas D, E e F obtidas das correlações de RMN 2D de ^1H , ^{13}C –HMBC de LREB-1	138

Figura 127	Acoplamentos dipolares observados no espectro de NOESY para LREB-1 e estrutura em 3D	139
Figura 128	Comparação das estruturas LREB-1(I) e estrutura da 12-demetoxi-N-acetilcilindrocarina (II)	140
Figura 129	Estrutura do alcaloide ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidroplumerano-18-óico (LREB-1)	140
Figura 130	Espectro de absorção na região do Infravermelho de LREB-1(Pastilha de KBr)	142
Figura 131	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de LREB-1	142
Figura 132	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de LREB-1	143
Figura 133	Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de LREB-1	143
Figura 134	Espectro de RMN de ^{13}C -CPD (CD_3OD , 125 MHz) de LREB-1	144
Figura 135	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT (CD_3OD ; 125 MHz) de LREB-1	144
Figura 136	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1 ...	145
Figura 137	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1 e expansão	145
Figura 138	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1	146
Figura 139	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1 e expansão	146
Figura 140	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1 e subestruturas mostrando algumas correlações	147
Figura 141	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de LREB-1(CD_3OD , 500 x 125 MHz) e expansão	148
Figura 142	Expansão do Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC de LREB-1e subestruturas com algumas correlações	149
Figura 143	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1 .	150
Figura 144	Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125) de CRE-5	152
Figura 145	Estrutura do alcaloide indólico olivacina (CRE-5)	153
Figura 146	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de CRE-5	154
Figura 147	Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de CRE-5 (UATR) ..	154
Figura 148	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5	155

Figura 149	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CRE-5	155
Figura 150	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CRE-5	156
Figura 151	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CRE-5	156
Figura 152	Expansão do Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de CRE-5	157
Figura 153	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de CRE-5	157
Figura 154	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H –NOESY (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5 .	158
Figura 155	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H –NOESY (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5 .	158
Figura 156	Subestrutura proposta e correlações obtidas a partir da análise do espectro de HMBC para CREA-1N	161
Figura 157	Correlações dipolares observadas através do espectro de NOESY para CREA-1N	162
Figura 158	Grupamento etila sobre o sistema π aromático da substância uleína	163
Figura 159	Comparação dos dados de RMN de ^1H de CREA-1N com os dados da literatura para o alcaloide uleína	164
Figura 160	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de CREA-1N com os dados da literatura para o alcaloide uleína	165
Figura 161	Alcaloide indólico uleína (CREA-1N)	166
Figura 162	Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREA-1N	167
Figura 163	Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREA-1N	167
Figura 164	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N	168
Figura 165	Expansão do Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N	168
Figura 166	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N	169
Figura 167	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N	169
Figura 168	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC de CREA-1 e expansão de 4,0-1,0 e 58-10 ppm e expansão de 7,6-5,0 e 124-126 ppm	170
Figura 169	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-1N	170
Figura 170	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-1N e expansão	170
Figura 171	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC de CREA-1N (500 x 125 MHz, CDCl_3)	171

Figura 172	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão	171
Figura 173	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão	172
Figura 174	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão	172
Figura 175	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (Expansão de 5,4-4,0 e 47-25 ppm) de CREA-1N (500 MHz, CDCl_3)	173
Figura 176	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de CREA-1 (500 MHz, CDCl_3) .	173
Figura 177	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de CREA-1 (500 MHz, CDCl_3) (Expansão de 5,3-0,8 e 5,3-0,8 ppm)	174
Figura 178	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREA-1A	174
Figura 179	Espectro de RMN ^1H de CREA-1A (500 MHz, CDCl_3)	175
Figura 180	Espectro de RMN ^1H de CREA-1A (500 MHz, CD_3OD)	175
Figura 181	Espectro de RMN ^{13}C -CPD e ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de CREA-1A	175
Figura 182	Subestrutura proposta e correlações obtidas a partir do espectro de HMBC para CREA-2A	177
Figura 183	Acoplamentos dipolares observadas no espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY para CREA-2A	178
Figura 184	Estrutura da 20-epi-dasicarpidona com o grupo etila em axial	178
Figura 185	Estrutura do alcaloide indólico 20-epi-dasicarpidona (CREA-2A)	179
Figura 186	Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREA-2A (UATR)	181
Figura 187	Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREA-2A	181
Figura 188	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A	182
Figura 189	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A	182
Figura 190	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A	183
Figura 191	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-2A e expansão de 5,0-1,0 ppm	183
Figura 192	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-2A e expansão de 7,8-7,0 e 7,8-6,9 ppm	183
Figura 193	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A	184
Figura 194	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A (expansão 5,0-	

	1,0 e 60-10 ppm)	184
Figura 195	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A (expansão 7,8-7,2 e 130-107 ppm)	184
Figura 196	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A	185
Figura 197	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A e expansão	185
Figura 198	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A e expansão	186
Figura 199	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A ...	186
Figura 200	Subestruturas propostas e correlações obtidas a partir do espectro de HMBC para CREA-3	188
Figura 201	Estrutura da δ -lactona booneína (CREA-3)	189
Figura 202	Espectro de Infravermelho de CREA-3 (UATR)	190
Figura 203	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3	190
Figura 204	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3 e expansão	191
Figura 205	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREA-3	191
Figura 206	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3	192
Figura 207	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CREA-3	192
Figura 208	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CREA-3	193
Figura 209	Estrutura do alcaloide indólico 20-epi-N-nordasicarpidona (CREB-1A) .	197
Figura 210	Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREB-1A (UATR)	198
Figura 211	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de CREB-1A	198
Figura 212	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A	199
Figura 213	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A ...	199
Figura 214	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (75 MHz, CD_3OD) de CREB-1A	200
Figura 215	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de CREB-1A	200
Figura 216	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (75 x 300 MHz, CD_3OD) de CREB-1A	201
Figura 217	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (75 x 300 MHz, CD_3OD) de CREB-1A (expansão de 114 a 129 ppm e 7,9 a 7,00 ppm e 50-26 ppm e	

	3,4-1,3 ppm)	201
Figura 218	Espectro RMN 2D ^1H , ^1H – COSY de CREB-1A (500 MHz, CD_3OD) ..	202
Figura 219	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY de CREB-1A (500 MHz, CD_3OD) e expansão de 3,4-1,0 ppm	202
Figura 220	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de CREB-1A	203
Figura 221	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC de CREB-1A (expansão de 7,9-7,2 e 142-114 ppm)	203
Figura 222	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC de CREB-1A (expansão de 3,2-0,0 e 50-11 ppm)	203
Figura 223	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H –NOESY de CREB-1A (CD_3OD , 500 MHz)	204
Figura 224	Comparação das estruturas de CREA-1A (uleína) com CREB-2N	207
Figura 225	Estrutura do alcaloide indólico N-desmetiluleína (CREB-2N)	209
Figura 226	Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREB-2N(UATR)	210
Figura 227	Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de CREB-2N	210
Figura 228	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N	211
Figura 229	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N e expansão de 6,0 a 0,9 ppm	211
Figura 230	Espectro de RMN 2D de ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2N ...	212
Figura 231	Espectro de RMN 2D de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2N	212
Figura 232	Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (125 X 500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N	213
Figura 233	Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N	213
Figura 234	Expansão do Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N	214
Figura 235	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N	215
Figura 236	Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N e expansão	215
Figura 237	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2A	216
Figura 238	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2A	216

Figura 239	Cromatograma obtido a partir da fração CCM5-1-1	234
Figura 240	Cromatograma obtido por CLAE a partir da substância LCA-1	238
Figura 241	Cromatograma obtido por CLAE a partir da fração LRE-B5-8	241
Figura 242	Cromatograma da fração CRE-A obtido por CLAE nos comprimentos de onda de 323 e 254 nm	244
Figura 243	Cromatograma obtido por CLAE e realizado no comprimento de onda de 254 nm da fração CRE-B (5-7)	246
Figura 244	Cromatograma obtido da fração ácida das folhas de <i>A. ulei</i> - AUFE-A ...	248
Figura 245	Cromatograma obtido da fração básica das folhas de <i>A. ulei</i> - AUFE-B .	248
Figura 246	Cromatograma obtido da fração ácida do lenho do caule de <i>A. ulei</i> - AULCE-A	249
Figura 247	Cromatograma obtido da fração ácida do lenho da raiz de <i>A. ulei</i> - AULRE-A	249
Figura 248	Cromatograma obtido da fração básica do lenho do caule de <i>A. ulei</i> - AULCE-B	250
Figura 249	Cromatograma obtido da fração básica do lenho da raiz de <i>A. ulei</i> - AULRE-B	250
Figura 250	Cromatograma obtido da fração ácida da casca do caule de <i>A. ulei</i> - AUCCE-A	251
Figura 251	Cromatograma obtido da fração ácida da casca da raiz de <i>A. ulei</i> - AUCRE-A	251
Figura 252	Cromatograma obtido da fração básica da casca do caule de <i>A. ulei</i> - AUCCE-B	252
Figura 253	Cromatograma obtido da fração básica da casca da raiz de <i>A. ulei</i> - AUCRE-B	252
Figura 254	Reação de redução do sal de tetrazol no sistema óxido-redutor NAD/NADH	254

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Partição líquido-líquido AUCCE	235
Fluxograma 2	Partição líquido-líquido de AUCCE-Interface	236
Fluxograma 3	Obtenção do extrato do lenho do caule de A. ulei – AULCE	237
Fluxograma 4	Obtenção do extrato do lenho da raiz de A. ulei – AULRE	239

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Alcalóide indólico subcanadina (A-E) e seus respectivos dados de RMN de ^1H e ^{13}C	127
----------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Substâncias isoladas a partir do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas, caule e raiz de <i>Aspidosperma ulei</i>	37
Tabela 2	Dados de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AUF-1 por Padrão de Hidrogenação	48
Tabela 3	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUF-1 e comparação com os dados da literatura para o triterpeno ácido ursólico (SEEBACHER <i>et al.</i> , 2003) ² ; (LEMES <i>et al.</i> , 2011) ³	50
Tabela 4	Dados de RMN ^{13}C de AUCC-1 comparados com dados da literatura de alguns inositois e seus derivados metilados (DORMAN; ANGYAL; ROBERTS, 1970) ^b	59
Tabela 5	Dados de RMN de 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-1 (D_2O , 500 x 125 MHz)	60
Tabela 6	Dados de RMN ^{13}C de AUCC-2 e dados da literatura (WENKERT <i>et al.</i> , 1976)	69
Tabela 7	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUCC-2 (500 x 125 MHz) comparados com os dados da literatura para o alcaloide β -ioimbina (1 WENKERT <i>et al.</i> , 1976; 2 UCHOA, 2006)	72
Tabela 8	Deslocamento químico de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3 por padrão de hidrogenação	80
Tabela 9	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUCC-3 e comparação com os dados da literatura para o alcaloide 3,4,5,6-tetra-desidroioimbina (STAHL; BORSCHBERG, 1996) ² e (WACHSMUTH, 2002) ³	82
Tabela 10	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 500 x 125 MHz) para AUCC-3	84
Tabela 11	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-4 e comparação com os dados da literatura para os alcaloides ioimbina (WENKERT <i>et al.</i> , 1976) ² e β -ioimbina (AUCC-2) ³	94
Tabela 12	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-5 (500 x 125 MHz) comparado com os dados da literatura para o alcaloide 19,20-hunteracina (BURNELL <i>et al.</i> , 1974) ¹	105

Tabela 13	Comparação dos dados de RMN ^{13}C e ^1H de AUCC-2, AUCC-4 com AUCC-6	117
Tabela 14	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H de AUCC-6 e comparação com dados de RMN da Literatura para o alcaloide 19,20-desidro- β -ioimbina (PASCALE <i>et al.</i> , 1991) ²	118
Tabela 15	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de LCA-1 e dados da literatura (UCHOA, 2006) ¹ ; (KOBAYASHI, 2002) ²	128
Tabela 16	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para LCA-1	130
Tabela 17	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C de LREB-1 e dados da literatura para o alcaloide 12-demetoxi-N-acetilcilindrocarina (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012) ² , (MILBORROW; DJERASSI, 1969) ³ .	141
Tabela 18	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para CRE-5 e dados do alcaloide olivacina da literatura (FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2010)	153
Tabela 19	Dados de RMN de ^1H para CREA-1N e comparação com os dados da literatura para os alcaloides uleína e epiuleína (² BORRIS <i>et al.</i> , 1983; ³ FRANÇA <i>et al.</i> , 2000; ⁴ JÁCOME <i>et al.</i> , 2004)	164
Tabela 20	Dados de RMN de ^{13}C para CREA-1N e comparação com os dados da literatura para o alcaloide indólico uleína e epiuleína (² BORRIS <i>et al.</i> , 1983; ³ FRANÇA <i>et al.</i> , 2000; ⁴ JÁCOME, <i>et al.</i> , 2004)	165
Tabela 21	Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C de CREA-1 (ácida e neutra) realizadas em CD_3OD e CDCl_3	166
Tabela 22	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREA-2A e comparação com os dados da literatura para os alcaloides epi-dasicarpidona e dasicarpidona (FORNS <i>et al.</i> , 1996)	180
Tabela 23	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREA-3 e comparação com os dados da literatura para a booneína (² MARINI-BETTOLO <i>et al.</i> , 1983; ³ BIANCO <i>et al.</i> , 1994)	189
Tabela 24	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de CREB-1A e CREA-2A com os dados da literatura (^{3,5} FORNS <i>et al.</i> , 1996; ⁴ GRÀCIA <i>et al.</i> , 1994)	196
Tabela 25	Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREB-1A e comparação com os dados de CREA-2A e os dados da literatura (³ FORNS <i>et al.</i> , 1996; ⁴ GRÀCIA <i>et al.</i> , 1994)	197

Tabela 26	Comparação dos dados de RMN de ¹³ C para CREB-2N, CREA-1N (uleína) e CREB-2A (20-epi-dasicarpidona)	208
Tabela 27	Dados de RMN de ¹ H de CREB-2N e CREB-2A e comparação com os dados da literatura para o alcaloide N-desmetiluleína (³ BORRIS <i>et al.</i> , 1983; ⁴ JÁCOME <i>et al.</i> , 2004)	208
Tabela 28	Dados de RMN 1D e 2D de ¹³ C e ¹ H de CREB-2N comparados com os dados de RMN de ¹ H da literatura para o alcaloide N-desmetiluleína (JÁCOME <i>et al.</i> , 2004) ²	209
Tabela 29	Valores de CI ₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata com 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL	217
Tabela 30	Frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de <i>A. ulei</i>	223
Tabela 31	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AUFAC-insol	224
Tabela 32	Frações obtidas de AUCC (Interface) DCM	227
Tabela 33	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico e reunião das frações de AUCC (Interface) DCM	227
Tabela 34	Frações obtidas de CCID8	228
Tabela 35	Reunião das frações obtidas de CCID8	228
Tabela 36	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de CCID8 ₂	229
Tabela 37	Fracionamento cromatográfico de AUCC-AqLM2HM	229
Tabela 38	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico e reunião das frações de AUCC-AqLM2HM	230
Tabela 39	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AUCCE	231
Tabela 40	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de AUCCM	232
Tabela 41	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CCM5	232
Tabela 42	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CCM5-1	233
Tabela 43	Frações obtidas por CLAE de CCM5-1-1 (solução aquosa de TFA 0,1 %) em MeOH (55:45)	234
Tabela 44	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de LRE-B	240
Tabela 45	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico por CLAE de LRE-B5-8	240

Tabela 46	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-A	242
Tabela 47	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CREA (8-13)	243
Tabela 48	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-A (8-13)4-9 .	244
Tabela 49	Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-B	244
Tabela 50	Frações obtidas do fracionamento por CLAE de CREB5-7	245
Tabela 51	Frações alcalóidicas obtidas da extração ácido/base dos extratos etanólicos de <i>A. ulei</i>	247
Tabela 52	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	253

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino da Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CPD	Composite Pulse Decoupling
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
IES/EM	Ionização por Elétron Spray/ Espectrometria de Massa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IV	Infravermelho
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PDA	Photo Diodo Array
PPM	Parte Por Milhão
RMN de 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótio
RMN de 13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
TFA	Ácido Trifluoracético
UV	Ultravioleta
AUCCE	Extrato etanólico da casca do caule de <i>Aspidosperma ulei</i>
AU	<i>Aspidosperma ulei</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
1.1	<i>Objetivos do Estudo Químico de <i>Aspidosperma ulei</i></i>	36
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	38
2.1	<i>Abordagem Taxonômica da Família Apocynaceae</i>	38
2.2	<i>Distribuição Geográfica de <i>Aspidosperma ulei</i></i>	39
2.3	<i>Considerações Botânicas sobre a Espécie <i>Aspidosperma ulei</i> Markgr</i> .	40
3	CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS	41
3.1	<i>Alcaloides</i>	41
3.2	<i>Classificação dos tipos de alcaloides indólicos</i>	42
3.3	<i>Biossíntese dos alcaloides indólicos terpenicos</i>	44
3.3.1	<i>Alcaloides derivados do triptofano</i>	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	<i>Determinação Estrutural de AUF-1</i>	47
4.2	<i>Determinação Estrutural de AUCC-1</i>	57
4.3	<i>Determinação Estrutural de AUCC-2</i>	66
4.4	<i>Determinação Estrutural de AUCC-3</i>	79
4.5	<i>Determinação Estrutural de AUCC-4</i>	90
4.6	<i>Determinação Estrutural de AUCC-5</i>	100
4.7	<i>Determinação Estrutural de AUCC-6</i>	114
4.8	<i>Determinação Estrutural de LCA-1</i>	125
4.9	<i>Determinação Estrutural de LREB-1</i>	136
4.10	<i>Determinação Estrutural de CRE-5</i>	151
4.11	<i>Determinação Estrutural de CREA-1N</i>	159
4.12	<i>Determinação Estrutural de CREA-2A</i>	176
4.13	<i>Determinação Estrutural de CREA -3</i>	187
4.14	<i>Determinação Estrutural de CREB-1A</i>	194
4.15	<i>Determinação Estrutural de CREB-2N</i>	205
4.16	<i>Atividade citotóxica in vitro em linhagens de células tumorais</i>	217
4.16.1	Resultados obtidos da atividade citotóxica	217
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	218
5.1	<i>Métodos Cromatográficos</i>	218

5.1.1	Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC)	218
5.1.2	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCD)	218
5.1.3	Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular	219
5.1.4	Extração em Fase Sólida (EFS \approx SPE)	219
5.1.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE \approx HPLC)	219
5.2	<i>Métodos Físicos</i>	220
5.2.1	Ponto de fusão	220
5.2.2	Determinação da Rotação Óptica (α)	220
5.3	<i>Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos</i>	221
5.3.1	Espectroscopia na Região de Absorção no Infravermelho (IV)	221
5.3.2	Espectrometria de Massa (EM)	221
5.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	222
5.4	<i>Material Botânico</i>	223
5.5	<i>Obtenção do Extrato Etanólico das Folhas de <i>Aspidosperma ulei</i> Markgf</i>	223
5.5.1	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico das Folhas de <i>A. ulei</i>	223
5.5.1.1	<i>Cromatografia em Gel de Sílica de AUFAC-insol: Isolamento de AUF-1</i>	224
5.6	<i>Obtenção do Extrato Etanólico da Casca do Caule de <i>A. ulei</i></i>	225
5.6.1	Partição Líquido-Líquido de AUCCE e Isolamento de AUCC-1	225
5.6.1.1	<i>Partição Líquido-Líquido da Fração AUCC-Interface</i>	226
5.6.1.2	<i>Tratamento Cromatográfico da Fração AUCC (Interface) DCM = AUCCID</i>	226
5.6.1.3	<i>Recromatografia de CCID8</i>	227
5.6.1.4	<i>Cromatografia em Camada Delgada Preparativa da Fração CCID82 e Isolamento de AUCC- 2</i>	228
5.6.2	Tratamento Cromatográfico da Fração AUCC-AqLM	229
5.6.2.1	<i>Separação por CLAE- Isolamento de AUCC-3</i>	230
5.6.3	Coluna Cromatográfica por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) de AUCCE	231
5.6.3.1	<i>Fracionamento Cromatográfico de AUCCM por Sephadex</i>	231
5.6.3.2	<i>Fracionamento Cromatográfico da Fração CCM5</i>	232

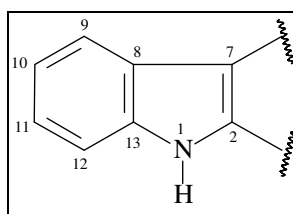
5.6.3.3	<i>Recromatografia da Fração CCM5-1</i>	233
5.6.3.4	<i>Fracionamento Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de CCM5-1-1 e Isolamento de AUCC-2, AUCC-4, AUCC-5 e AUCC-6</i>	233
5.7	<i>Estudos do Lenho do Caule (LC) e do Lenho da Raiz (LR) de <i>Aspidosperma ulei</i></i>	237
5.7.1	Obtenção do Extrato Etanólico do Lenho do Caule de <i>A. ulei</i>	237
5.7.1.1	<i>Extração Ácido/Base de AULCE</i>	237
5.7.1.2	<i>Fracionamento Cromatográfico por CLAE de LCE-A</i>	238
5.7.1.2.1	Isolamento de LCA-1	238
5.7.2	Obtenção do Extrato Etanólico do Lenho da Raiz de <i>A. ulei</i>	238
5.7.2.1	<i>Extração Ácido/Base de AULRE</i>	239
5.7.2.2	<i>Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração LRE-B</i>	239
5.7.2.3	<i>Fracionamento Cromatográfico por CLAE de LRE-B5-8</i>	240
5.7.2.3.1	Isolamento de LREB-1, LREB-2 e LREB-3	240
5.8	<i>Obtenção do Extrato Etanólico da Casca da Raiz de <i>A. ulei</i></i>	241
5.8.1	Partição Ácido/Base de AUCRE	241
5.8.2	Fracionamento Cromatográfico da Fração CRE-ppt por Sephadex .	241
5.8.2.1	<i>Purificação da Fração CRE-ppt (4-6) 10-13 por Cromatografia em Camada Delgada - Preparativa – CCD-P e Isolamento de CRE-5</i>	242
5.8.3	Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração CRE-A	242
5.8.3.1	<i>Recromatografia da Fração CREA (8-13)</i>	243
5.8.3.1.1	Isolamento de CREA-1N, CREA-2A e CREA-3.....	243
5.8.4	Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração CRE-B	244
5.8.4.1	<i>Fracionamento Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de CRE-B5-7 e Isolamento de CREB-1 e CREB-2</i>	245
5.9	<i>Tratamento de Desprotonação das Substâncias Ácidas Isoladas por CLAE</i>	246

5.10	<i>Perfil Cromatográfico para Obtenção das Frações Alcalóidicas de AUFÉ, AUCCE, AULCE, AULRE e AUCRE de A. ulei</i>	247
5.10.1	<i>Perfil cromatográfico por CLAE das Frações Alcalóidicas dos Extratos de A. ulei</i>	248
5.11	<i>Avaliação do Potencial Antitumoral in Vitro</i>	253
5.11.1	Estudo da atividade citotóxica	253
5.11.2	Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais in vitro – Teste do MTT	253
6	CONCLUSÃO	255
	REFERÊNCIAS	257

1 INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela freqüente ocorrência de alcaloides. No caso de espécies de *Aspidosperma*, há predominantemente a ocorrência de alcaloides indólicos monoterpênicos de considerável diversidade estrutural, caracterizados pelo núcleo 1H-indol (Figura 1), que são geralmente substituídos nas posições 2 e 7, levando a formação de estruturas bastantes diversificadas e nas posições 9-12, apresentando substituições como hidroxila ou metoxila. (MORALES-RÍOS *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007).

Figura 1 – Núcleo de indolo mono-terpênicos.



O gênero *Aspidosperma* é distinguido quimicamente pela freqüente ocorrência de alcaloides indólicos, característica compartilhada por 46 das 57 espécies de *Aspidosperma* estudadas (BOLZANI *et al.*, 1987).

Espécies do gênero *Aspidosperma*, são encontradas nas Américas (LORENZI, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 50 espécies desse gênero, distribuídas na caatinga, cerrado e florestas (AMORIM *et al.*, 2005). Algumas espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, carapanaúba, pau-pereiro, amargoso e quina (CORRÊA, 1984).

Os extratos da casca do caule de espécies de *Aspidosperma* são caracterizados pela presença de alcaloides indólicos com grande diversidade estrutural e estes, responsáveis por vários efeitos farmacológicos, já conhecidos no gênero (BOURDY *et al.*, 2004).

Os alcaloides podem ser definidos como sendo bases nitrogenadas orgânicas encontradas principalmente em plantas e em menor extensão em animais e microorganismos. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, sendo tipicamente caracterizado como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que confere o caráter básico dos alcaloides (SCHRIPSEMA *et al.*, 2004).

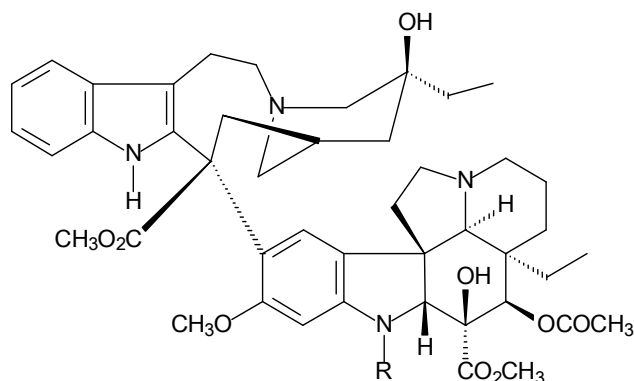
O grau de basicidade varia extensamente, dependendo da estrutura do alcaloide e da presença e localização de outros grupos funcionais (DEWICK, 2009).

A família Apocynaceae apresenta um grande potencial como agentes antimaláricos, no tratamento da leishmaniose, inflamações do útero e ovário, como anticonceptiva, em diabetes, problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Ensaios experimentais envolvendo as espécies *A. ramiflorum* Mull. Arg., *A. pyrifolium* Mart., *A. megalocarpon* Mull., *A. macrocarpon* Mart. e *A. quebracho-blanco* Schltdl. comprovaram seu uso popular para o tratamento de malária e leishmania (FERREIRA *et al.*, 2004; MITAINE-OFFER *et al.*, 2002; MESQUITA *et al.*, 2007; WENIGER *et al.*, 2001; BOURDY *et al.*, 2004).

Entre as principais substâncias extraídas de Apocynaceae estão a vimblastina e a vincristina conhecidas como os “alcaloides da vinca” (Figura 2). Alcaloides bisindólicos, amplamente utilizados e considerados como um dos mais efetivos agentes na terapia anticâncer. Sua extração se deu através das folhas e talos de *Catharanthus roseus*, espécie nativa de Madagascar, cultivada no Brasil com fins ornamentais (LUZ FERRADÁ, 2002; LOYOLA-VARGAS, 2004).

Figura 2 – Estrutura dos alcaloides indólicos vinblastina e vincristina.

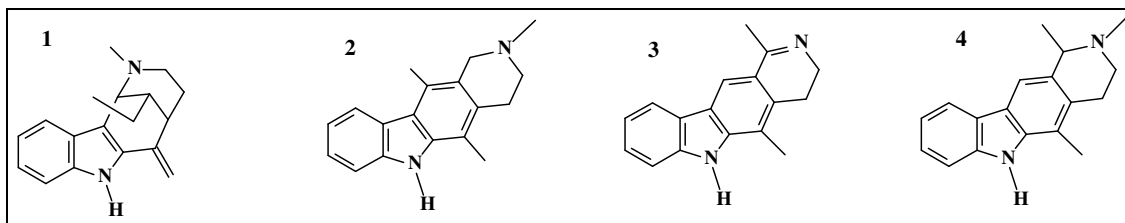


1. R = CHO (Vincristina)
2. R = CH₃ (Vinblastina)

Segundo Pereira *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2009), em uma revisão do gênero *Aspidosperma* realizado até 2006, foi relatado o isolamento de cerca de 247 alcaloides indólicos. Desses, segundo Büchi (1959, 1971), quatro alcaloides foram isolados de *A. ulei*:

uleína (1), N-metiltetrahidroelipticina (2), di-hidroolivacina (3) e N-metiltetrahidroolivacina (4) (Figura 3).

Figura 3 – Alcaloides isolados de *A. ulei*.

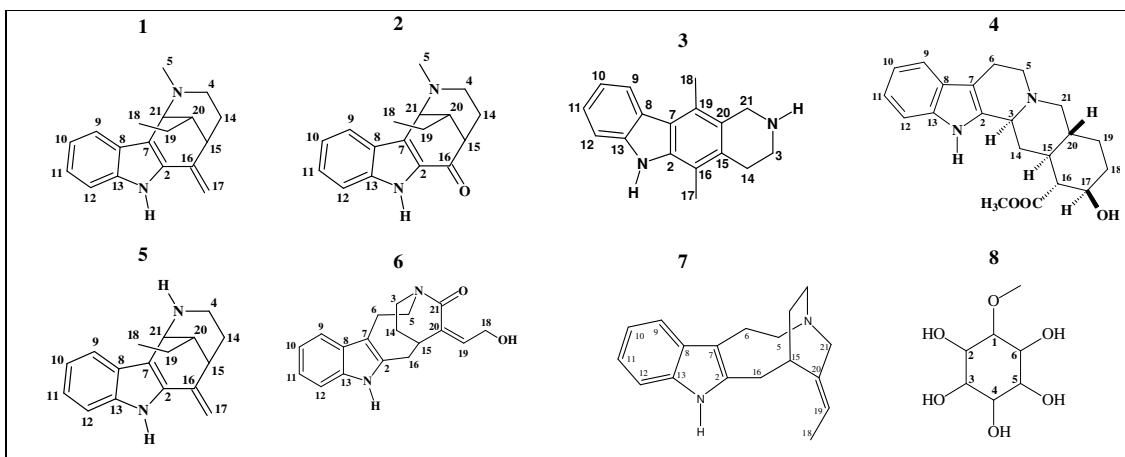


Um estudo realizado por Banerjee; Lewis (1954) referente a uma fração alcaloídica do caule de *A. ulei* apresentou atividade amebicida in vitro, além de atividades vasodilatadoras e diminuição dos batimentos cardíacos realizadas em coelhos e camundongos.

Os alcaloides indólicos apresentam diversas atividades biológicas tais como, antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, contraceptiva, antiinflamatória, antimalárico, anti-HIV, bactericida e leishmanicida (MACABEO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Estudos anteriores realizados na espécie permitiram o isolamento e identificação de sete alcaloides indólicos (Figura 4), sendo cinco da casca da raiz: uleína (1), 20-dasicarpidona (2), 16,19-dimetil-3,5,14,21-tetrahydro-elipticina (3), β -ioimbina (4), 20-N-desmetil-uleína (5) e dois da casca do caule 18-hidroxi-20(E)-17-nor-subincanadina E (6) e 20(E)-17-nor-subincanadina E (7), além de um derivado do inositol, o metil-*mio*-inositol (8) (UCHOA, 2006).

Figura 4 – Alcaloides já isolados da casca do caule e casca da raiz de *A. ulei*



Em adição, um estudo realizado entre os Departamentos de Química e de Fisiologia e Farmacologia da UFC/CE, referente a uma fração rica em alcaloides das cascas da raiz de *A. ulei*, rendeu duas Teses e duas publicações (CAMPOS *et al.*, 2006, 2008; CAMPOS, 2005; UCHOA, 2006), demonstrando o efeito pró-erétil dessa fração em três tipos de casos: ereção peniana, crescimento genital e similar à ereção. A injeção intraperitoneal da fração (25 a 50 mg/Kg) mostrou resultados semelhantes a ioimbina (2 mg/Kg). 65 % dos ratos tratados com ioimbina ou a referida fração mostraram ereção peniana mesmo após seu bloqueio por clonidina, um agonista α -2-adrenoceptor, e haloperidol, um antagonista dopaminérgico, bem como por um inibidor da sintase do óxido nítrico. Esse estudo comprova o uso tradicional relatado para os extratos de *Aspidosperma ulei* em disfunções eréteis (CAMPOS *et al.*, 2006, 2008).

O presente trabalho descreve uma investigação fitoquímica da folha de *Aspidosperma ulei*, além de uma reinvestigação dos metabólitos secundários dos lenhos do caule e raiz e cascas do caule e raiz de *A. ulei*, iniciada em trabalhos químico-farmacológicos anteriores, coletados na localidade Garapa, Município de Acarape, no estado do Ceará.

O estudo fitoquímico foi realizado primeiramente com as folhas de *A. ulei*, seguido da casca do caule para obtenção dos extratos etanólicos, realizado por partições líquido-líquido. No extrato etanólico dos lenhos do caule e da raiz foram realizados tratamentos ácido/base para obtenção das frações alcaloídicas.

As substâncias isoladas nesse estudo encontram-se listadas na Tabela 1 (p. 37).

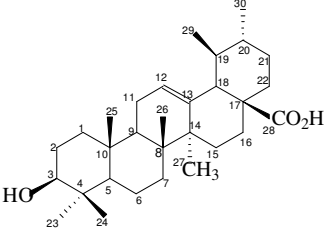
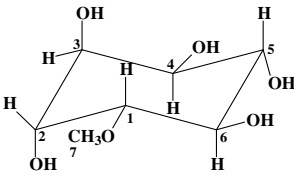
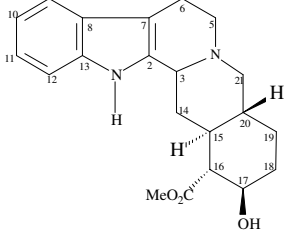
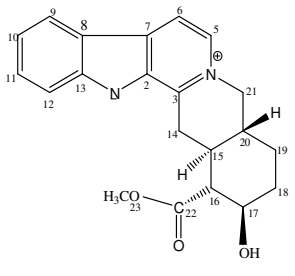
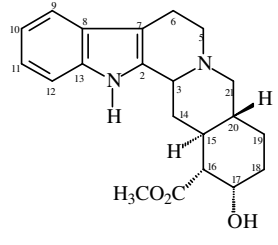
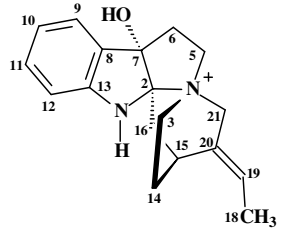
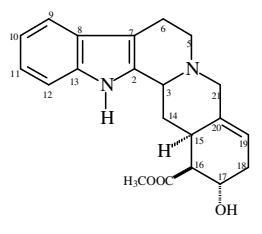
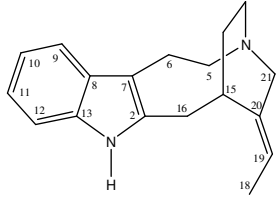
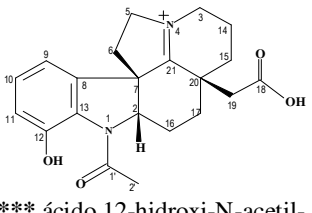
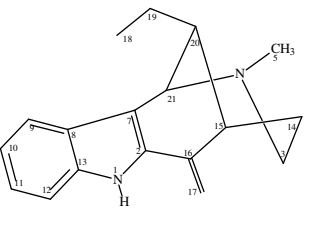
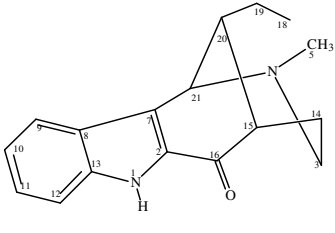
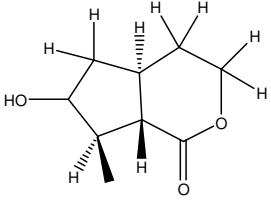
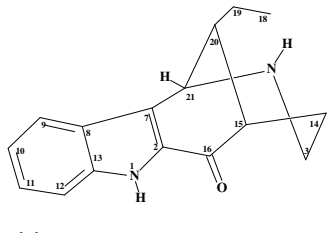
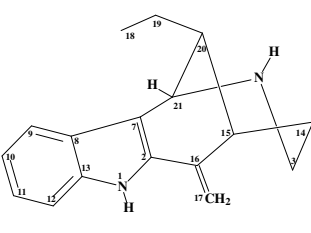
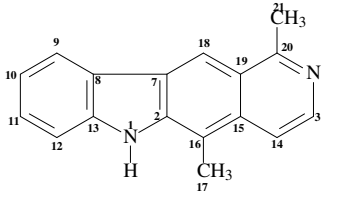
A identificação e caracterização dos compostos isolados foram realizadas por técnicas espectroscópicas como IV, EM e RMN uni e bidimensional, inclusive técnicas como HSQC, COSY, NOESY e HMBC, além de comparação com os dados da literatura.

1.1 Objetivos do Estudo Químico de *Aspidosperma ulei*

O estudo químico de *A. ulei* se faz necessário uma vez que os alcaloides são ao longo do tempo fonte de moléculas úteis na terapêutica e, sobretudo, promissores no tratamento de muitas doenças, pretendendo-se:

- a) realizar estudo fitoquímico das folhas, lenhos do caule e raiz e cascas do caule e raiz, já que grupos anteriores estudaram o caule e raiz de *A. ulei*;
- b) isolar e caracterizar as substâncias;
- c) realizar testes citotóxicos frente aos compostos isolados;
- d) aumentar o acervo de novos metabólitos secundários com potencial farmacologicamente ativo na família Apocynaceae.

Tabela 1 – Substâncias isoladas a partir do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas, caule e raiz de *Aspidosperma ulei*.

 <p>*ácido ursólico</p>	 <p>1D-1-O-metil-<i>chiro</i>-inositol</p>	 <p>β-ioimbinina</p>
 <p>*3,4,5,6-tetraesidro-β-ioimbinina</p>	 <p>*ioimbinina</p>	 <p>**19E-hunteracina</p>
 <p>*19,20-desidro-17 α-ioimbinina</p>	 <p>***</p> <p>20(E)-17-nor-subincanadina E</p>	 <p>*** ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-dico</p>
 <p>uleiína</p>	 <p>*20-<i>epi</i>-dasicarpidona</p>	 <p>*δ-lactona</p>
 <p>**20-<i>epi</i>-N-nordasicarpidona</p>	 <p>N-desmetiluleiína</p>	 <p>olivacina</p>

Legenda: substância (inédita na espécie) *; (inédita no gênero) ** (inédita na literatura) ***

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Abordagem Taxonômica da Família Apocynaceae



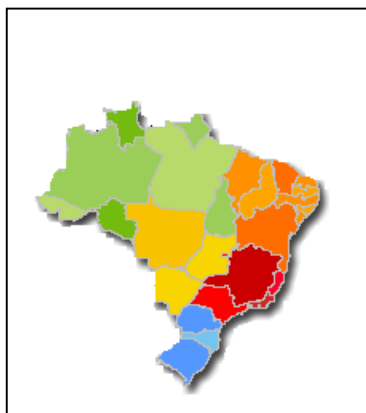
Plantas da família Apocynaceae estão incluídas fitogeneticamente na ordem Gentianales e subclasse Asteridae, consideradas como espécies dicotiledôneas bem evoluídas e normalmente caracterizadas pela presença de látex (RAPINI, 2000).

Essa família contém entre 3700 a 5100 espécies em 250 a 550 gêneros (NICHOLAS, 1994; ROCHA, 1982), sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos freqüentes em regiões temperadas (VICENTINI *et al.*, 1999).

A família Apocynaceae era representada na flora brasileira com mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (CAMPBELL; HAMMOND, 1989). Atualmente esses dados já são de 761 espécies distribuídas em 72 gêneros (KOCH; RAPINI, 2011).

A distribuição geográfica de Apocynaceae no Brasil (Figura 5) ocorre nas cinco regiões do Brasil e em praticamente todos os estados, sendo encontradas na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e no Pantanal.

Figura 5 - Distribuição geográfica de Apocynaceae no Brasil



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB000048>

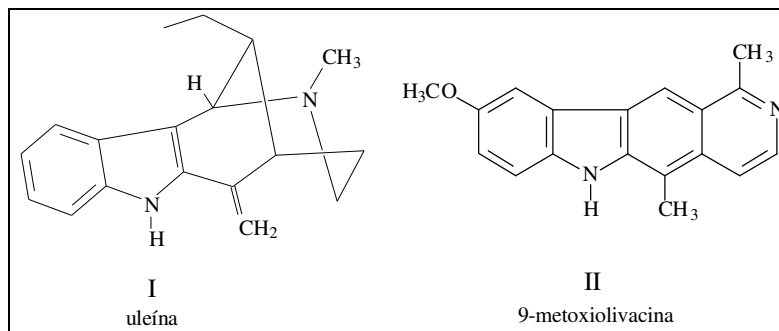
Entre os gêneros da família Apocynaceae de ocorrência no Brasil, *Aspidosperma* é um dos mais interessantes do ponto de vista fitoquímico.

O gênero *Aspidosperma* pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, subfamília Plumerioidea e Tribo Plumerieae (BARROSO, 1991).

Possui um alto valor comercial devido a qualidade das suas madeiras. A espécie mais conhecida é a “peroba” (*Aspidosperma polyneuron*), cuja madeira é muito comercializado devido sua grande resistência e flexibilidade (VICENTINI *et al.*, 1999).

Uma classificação das espécies desse gênero foi proposta por Bolzani e colaboradores (1987), levando-se em consideração os aspectos quimiotaxonômicos, o que determinou que 46 espécies fossem agrupadas em oito séries: Rígida, Nítida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobilis e Macrocarpa e Tomentosa, todas restritas a regiões tropicais e subtropicais. Algumas destas séries apresentam esqueletos característicos, como por exemplo, na série Pyricolla (Figura 6), existente em *A. ulei* e referente aos esqueletos uleano (I) e elipticano-olivaçano (II) (PEREIRA *et al.*, 2007).

Figura 6 – Esqueletos característicos da série Pyricolla.



2.2 Distribuição Geográfica de *Aspidosperma ulei*

Aspidosperma ulei, possui uma sinonímia denominada de *Aspidosperma occidentale*, nativa do Brasil. Sua distribuição geográfica ocorre na Amazônia e Mata Atlântica, no Norte (Roraima, Amazonas, Acre) e Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Bahia).

2.3 Considerações Botânicas sobre a Espécie *Aspidosperma ulei* Markgr.

Aspidosperma ulei Markgr, popularmente conhecida como Pitiá ou Piquiá, apresenta-se como uma árvore com casca áspera e acinzentada. Folhas alternas, pecioladas, lanceoladas, glabras. Flores alvacentas, pequenas, agrupadas em panículas multifloras terminais (BRAGA, 2001) (Figura 7).

Figura 7 - Árvore, flores e frutos de *A. ulei*.

Fotos: Prof. Edilberto Rocha Silveira



3 CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS

3.1 Alcaloides

Segundo Pelletier (1988), a definição aceita para alcaloide é que são substâncias orgânicas cíclicas que contêm nitrogênio e que são metabólitos secundários obtidos de fontes naturais. Esta definição excluiria as aminas simples e os derivados de aminoácidos, vitaminas e ainda os compostos nitro e nitrosos (uma vez que nos alcaloides o átomo de azoto tem de possuir estado de oxidação negativo). Contudo, até hoje não se formulou uma definição completamente abrangente (SCHRIPSEMA *et al.*, 2004).

Os alcaloides caracterizam um vasto grupo de metabólitos que podem ocorrer tanto em microorganismos como em plantas superiores e inferiores e ainda, em animais, com menor ocorrência (SCHRIPSEMA *et al.*, 2004).

De acordo com Dewick (2009) são conhecidos mais de 3000 alcaloides indólicos terpênicos, tornando-se um dos maiores grupos isolados de plantas. São encontrados principalmente em oito famílias, das quais a Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae detêm as maiores fontes desses alcaloides.

Esses produtos naturais complexos possuem uma diversidade de estruturas químicas e uma variedade de atividades biológicas conforme mostrado na Figura 9 (p. 43).

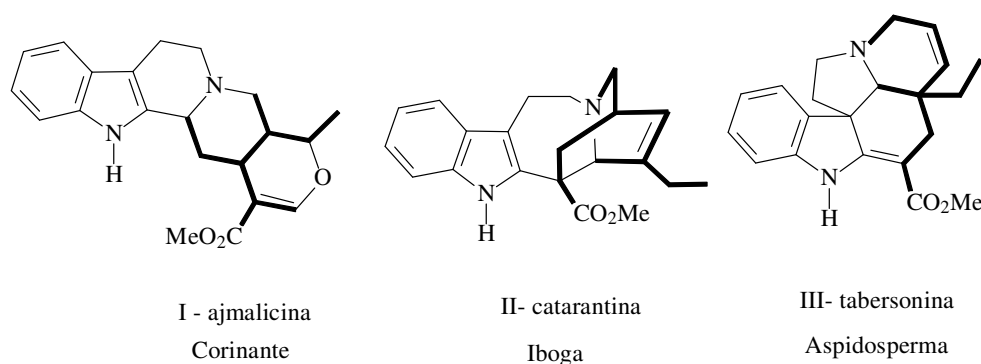
Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes da planta, contudo, em um ou mais órgãos haverá o acúmulo preferencial dessas substâncias. As funções destes compostos nos vegetais não são totalmente esclarecidas. Inicialmente, foi atribuída aos alcaloides a função de proteção, resultante da toxicidade elevada que conferem a planta. Porém, acredita-se que os alcaloides atuem também como reserva da síntese de proteínas, estimulantes ou reguladores do crescimento, do metabolismo interno ou da reprodução, sendo também agentes finais da desintoxicação e da transformação simples de outras substâncias, cujo acúmulo pode ser nocivo ao vegetal (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2001).

3.2 Classificação dos tipos de Alcaloides Indólicos

Os alcaloides indólicos costumam ser classificados de acordo com os sistemas de anéis que constituem as principais partes de suas estruturas, os quais por sua vez, podem ser classificados de acordo com o aminoácido precursor (DEWICK, 2009).

Três classes de alcaloides indólicos monoterpênicos foram propostas, tais como corinante (classe I), iboga (classe II) e aspidoesperma (classe III), conforme mostrado na Figura 8.

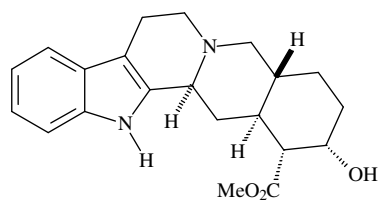
Figura 8 - Classificação dos alcaloides quanto a sua classe biogenética



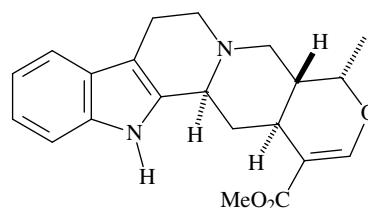
Após meio século, a biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos ainda não foi concluída. Trabalhos recentes na Biologia Molecular envolvendo químicos, biólogos e bioquímicos concluíram que a localização exata de vias enzimáticas nos alcaloides requer um trabalho complexo de transformação intra e intercelular de intermediários biossintéticos que ocorrem durante todo o processo de biossíntese desses alcaloides. Esses avanços conduzirão a novas perspectivas dessas vias biossintéticas (O'CONNOR; MARESH, 2006).

Muitas vezes a atividade da enzima é limitada a uma determinada parte da planta. Algumas são mais abundantes nas raízes, outras em folhas jovens. O alcaloide catarantina (Iboga) é distribuído ao longo dos tecidos vegetais, já o alcaloide corinante ocorre principalmente nas raízes (PIERRE; DE LUCA, 1995).

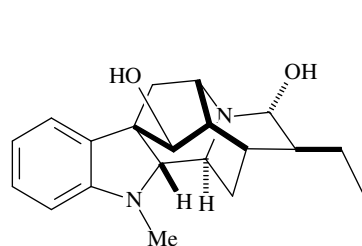
Figura 9 - Representação dos alcaloides indólicos terpênicos, de acordo com sua função biológica e espécie da planta no qual foram isolados.



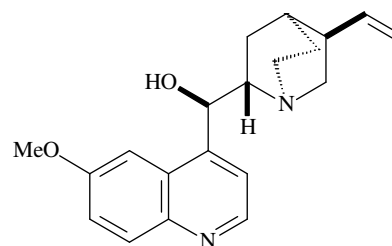
ioimbina (*Rauwolfia serpentina*)
(bloqueador e receptor adrenérgico)



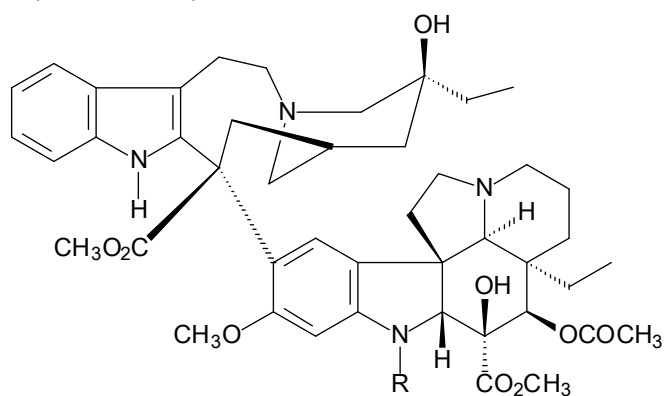
ajmalicina (*Rauwolfia serpentina*)
(*Catharanthus roseus*)
(anti-hipertensivo)



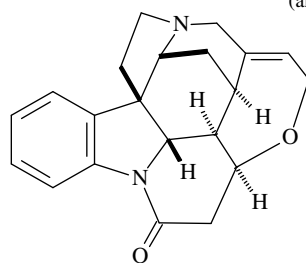
ajmalina (*Rauwolfia serpentina*)
(arritmia cardíaca)



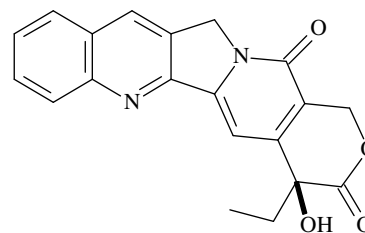
quinina (*Cinchona*)
(antimalárico)



R = CHO (vincristina)
R₁ = H (vinblastina)
(*Catharanthus roseus*)
(anticâncer)



estricnina (*Strychnos nux-vomica*)
(anticonvulsivo)



camptotecina (*Ophiorrhiza pumila*)
(*Camptotheca acuminata*)
(antitumoral)

3.3 Biossíntese dos Alcaloides Indólicos Terpênicos

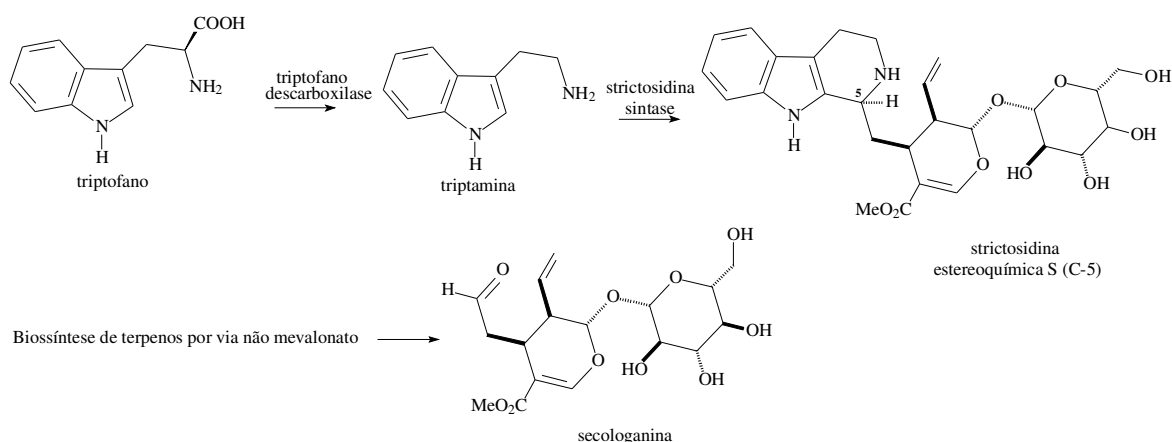
3.3.1 Alcaloides derivados do triptofano

A biossíntese dos alcaloides inclui pelo menos um aminoácido e de acordo com os precursores biogenéticos e função da estrutura do metabólito final, pode-se sistematizar os alcaloides indólicos como derivados do aminoácido triptofano.

Triptofano é um aminoácido aromático contendo um sistema indólico derivado da via do chiquimato como precursor de uma grande variedade de alcaloides indólicos, que descarboxilado origina a triptamina e seus derivados, largamente distribuídos nas plantas (DEWICK, 2009).

De acordo com a biossíntese, os alcaloides indólicos terpênicos são derivados do triptofano e do iridoide terpênico secologanina (Figura 10). A enzima dependente piridoxal triptofano descarboxilase converte o triptofano em triptamina. Após vários iridoídes terpênicos serem elucidados, a secologanina foi identificada como o iridoide precursor específico (O'CONNOR; MARESH, 2006).

Figura 10 – Etapa inicial da biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos.

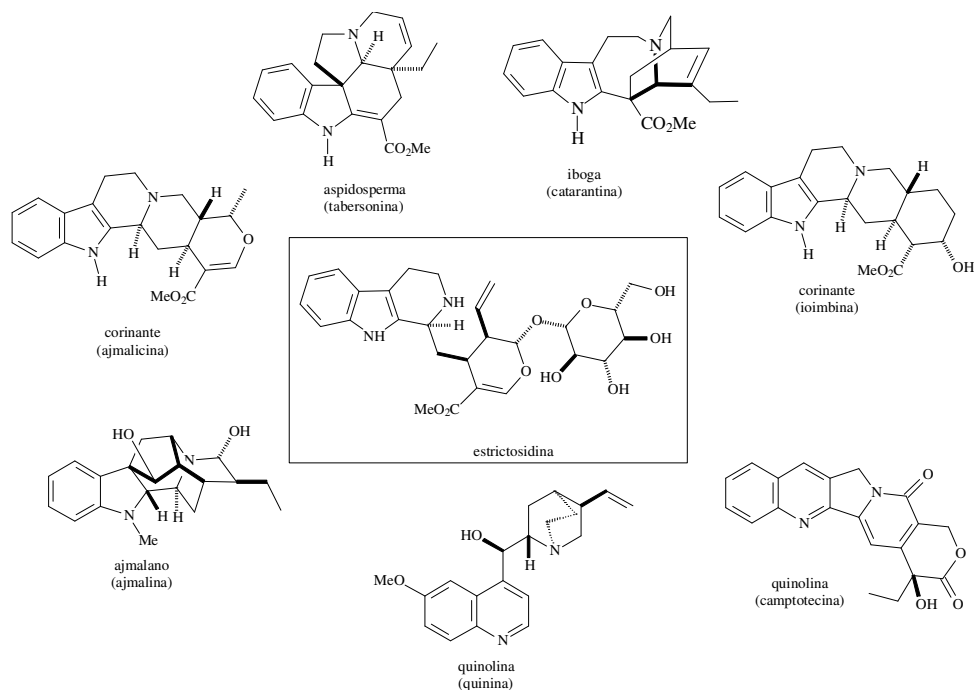


A secologanina é um produto natural e sua via biossintética não foi ainda completamente elucidada. Sabe-se que o difosfato de isopentenila (IPP), além de precursor de todos os terpenoides, é produzido pela via do mevalonato ou mais recentemente, pela via triose fosfato/piruvato (O'CONNOR; MARESH, 2006).

Os alcaloides indólicos, monoterpênicos são produtos da condensação da triptamina com o secoiridoide secologanina, que é formado a partir do monoterpene pirofosfato de geranila, por isso, monoterpênicos.

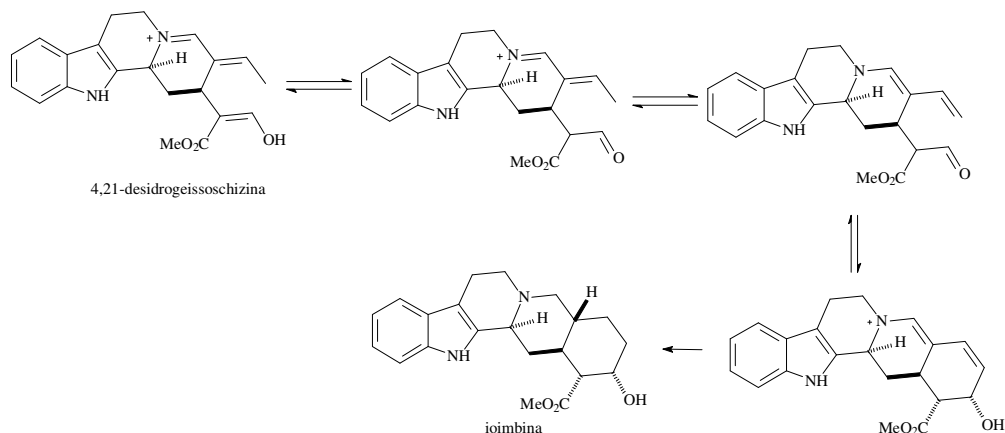
De acordo com O'Connor e Maresch (2006), Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae e Nyssaceae produzem alcaloides indólicos com uma grande diversidade de estruturas (Figura 11). No entanto, o mecanismo pelo qual a strictosidina se rearranja na formação desses produtos, continua em estudo no metabolismo secundário dessas plantas.

Figura 11 – Maiores classes de alcaloides indólicos terpênicos derivados da strictosidina.



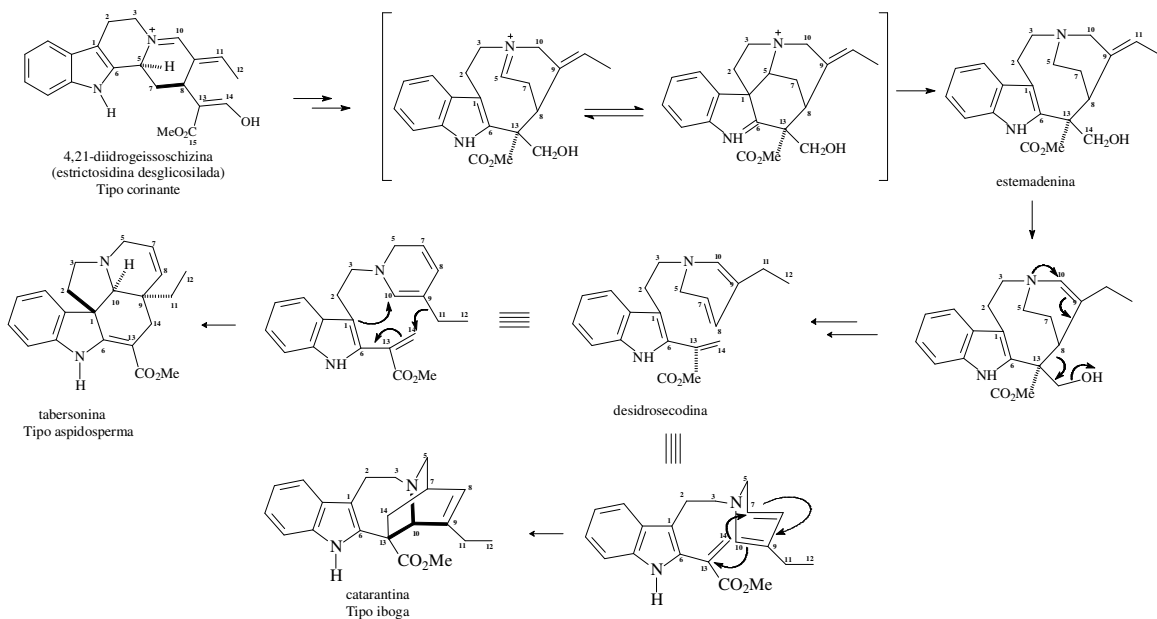
A ioimbina também isolada de *Rauwolfia* é um antagonista com potente aplicação clínica em disfunção erétil. De acordo com a proposta biossintética (O'CONNOR; MARESH, 2006) a enzima que converte a strictosidina desglucosilada em ioimbina é desconhecida, porém a rota biossintética direta envolve isomerização homoalílica da ceto desidrogeissoschizina seguida de adição 1,4 conjugada (Figura 12).

Figura 12 - Proposta da via biossintética da ioimbina (esqueleto corinante).



Segundo O'Connor e Maresh (2006), a biossíntese dos esqueletos aspidoesperma e iboga são obtidos do rearranjo do corinante, que resultaria no rearranjo da estemadenina para formar o éster cíclico desidrosecodina. Este atuaria, como um intermediário comum para os tipos aspidoesperma e iboga. É possível que o alcaloide do tipo iboga catarantina e o tipo aspidoesperma tabersonina sejam formados através da reação de Diels-Alder com a desidrosecodina, formando um intermediário para esses esqueletos (Figura 13).

Figura 13 - Proposta da via biossintética dos alcaloides do tipo aspidoesperma e iboga.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação Estrutural de AUF-1

Da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma ulei* foi isolado um sólido amorfo branco, ponto de fusão de 296-297 °C, (procedimento experimental, p. 224), $[\alpha]_D^{25} = +26^{\circ}$ (c 0,33, CH₃OH), denominado AUF-1.

O espectro na região do infravermelho de AUF-1 (Figura 17, p. 51), apresentou uma absorção forte em 3414 cm⁻¹ que pode ser atribuída a vibrações de deformação axial de ligação O–H. Absorções em 2926 e 2854 cm⁻¹ foram atribuídas às deformações de ligações C–H de carbonos sp³. Uma banda em 1734 cm⁻¹ correspondente a ligação C=O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

O espectro de RMN de ¹³C-CPD de AUF-1 (Figura 20, p. 53) revelou 30 sinais que mostraram 7 C não hidrogenados e que comparados com o espectro de RMN ¹³C-DEPT 135 (Figura 21, p. 54) revelou a presença de 7 CH, 9 CH₂ e 7 CH₃ (Tabela 2, p. 48). Foram observados sinais de carbonos metilênicos em δ_c 39,4 (C-1); 28,4 (C-2); 19,1 (C-6); 33,9 (C-7); 23,9 (C-11); 29,0 (C-15); 25,2 (C-16); 31,4 (C-21); 37,6 (C-22) e metílicos em δ_c 29,2 (CH₃-23); 16,9 (CH₃-24); 16,0 (CH₃-25); 17,9 (CH₃-26); 24,3 (CH₃-27); 17,8 (CH₃-29) e 21,7 (CH₃-30).

O espectro de RMN de ¹³C-CPD, mostrou as absorções em δ_c 78,5 (C-3), característico de carbono oximetínico, e em δ_c 180,3 (C-28), correspondente à carbonila de ácido. Além de δ_c 126,0 (C-12) e δ_c 139,6 (C-13), sinais atribuídos a carbonos olefínicos.

A análise do espectro de massa (Figura 18, p. 52) apresentou o pico do íon molecular em m/z 456, compatível com a fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃, com 7 deficiências de hidrogênios, sugerindo um triterpeno da série ursano ou oleanano. O pico base em m/z 248 possivelmente refere-se à clivagem retro-Diels-Alder de oleananos ou ursanos Δ 12, que possuem um grupo carboxílico e não têm hidroxilas nos anéis D e E. Outros fragmentos são mostrados na Figura 18 (p. 52).

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (Figuras 19 e 20, p. 53), indicou um esqueleto triterpênico para AUF-1, que devido a multiplicidade do sinal correspondente a H-18 e das metilas CH₃-29 e CH₃-30 foi possível identificar um triterpeno da série ursano. Se AUF-1 fosse da classe oleanano, H-18 em δ_H 2,63 (d, 11,3 Hz, 1H) seria relacionado a um duplo duplete, uma vez que C-19 δ_H 1,02 nos oleananos é um carbono

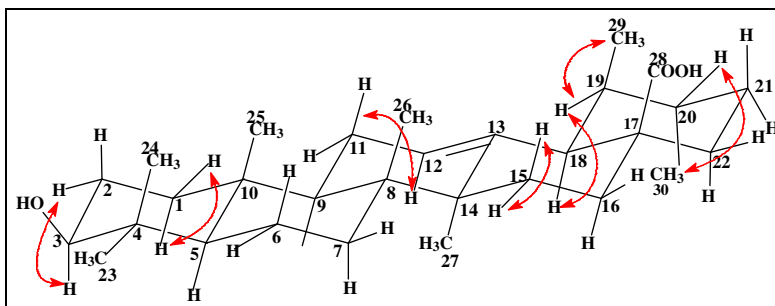
metilênico. Os dois dupletos em 0,96 e 1,02 relacionados aos hidrogênios metílicos H-29 e H-30, respectivamente, também indicaram um esqueleto carbônico condizente com triterpenos da classe dos ursanos, já que os da série oleanano apresentam sete simpletos nesta região.

Tabela 2 – Dados de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de AUF-1 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH ₂	CH ₃
48,4	78,5	39,4	29,2
42,8	56,2	28,4	16,9
37,8	53,9	19,1	16,0
40,3	48,4	33,9	17,9
180,3	39,8	23,9	24,3
139,6	39,7	29,0	17,8
39,7	126,0	25,2	21,7
-	-	31,4	-
-	-	37,6	-
-	-	-	-
C₇	C₇H₇	C₉H₁₈	C₇H₂₁
Total: C₃₀H₄₆			

Correlações escalares observadas no espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY de AUF-1 (Figuras 24 e 25, p. 56), forneceram as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 5,49 (H-12) \leftrightarrow 1,96 (H-11) e δ_{H} 2,63 (H-18) \leftrightarrow 1,49 (H-19). Foi possível também identificar as correlações entre δ_{H} 1,24 (H-15 α) \leftrightarrow 2,33 (H-15 β); δ_{H} 3,46 (H-3) \leftrightarrow 1,84 (H-2); δ_{H} 1,49 (H-19) \leftrightarrow 1,02 (CH₃-29) e δ_{H} 1,04 (H-20) \leftrightarrow 0,96 (CH₃-30), confirmando um triterpeno da série ursano (Figura 14).

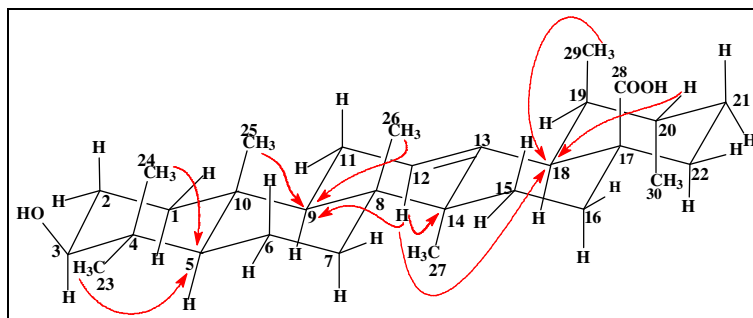
Figura 14 - Acoplamentos escalares observados no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de AUF-1.



No diagrama de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear C-H à longa distância, HMBC 3J (Figura 23, p. 55 e Tabela 3, p. 50) de AUF-1, foram observados os acoplamentos $^3J_{CH}$, dos hidrogênios em δ_H 1,24 (3H-23) e 1,03 (3H-25) com o carbono δ_C 56,2 (C-5); δ_H 5,49 (H-12), δ_H 0,88 (H-25) e δ_H 1,05 (H-26) com δ_C 48,4 (C-9); δ_H 5,49 (H-12); 1,04 (H-20) e 1,02 (H-29) com δ_C 53,9 (C-18), além de δ_H 5,49 (H-12) com δ_C 42,8 (C-14) (Figura 15, p. 49).

Também foram observadas as correlações a 2J de δ_H 5,49 (H-12) com 23,9 (C-11) e δ_H 1,49 (H-19) com δ_C 53,9 (C-18), confirmando as atribuições de um triterpeno pentacíclico para AUF-1.

Figura 15 – Correlações importantes observadas no espectro de RMN 2D $^1H, ^{13}C$ -HMBC (Pyr-*d*5, 500 x 125 MHz) de AUF-1.



A análise dos dados discutidos acima e comparados com os dados da literatura, confirmaram a substância AUF-1 tratar-se do ácido 3-hidroxiurs-12-en-28-oico, um triterpeno pentacíclico denominado ácido ursólico (Figura 16), isolado pela primeira vez nas folhas de *A. ulei*.

Figura 16 - Estrutura do triterpeno ácido ursólico (AUF-1)

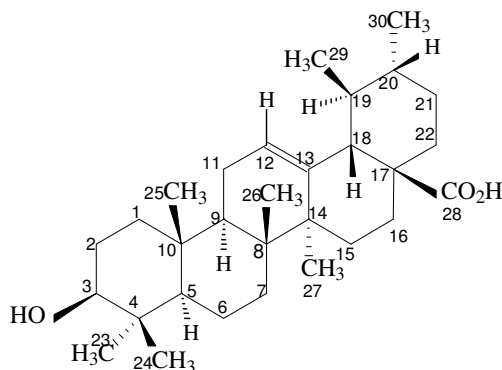


Tabela 3 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUF-1 e comparação com os dados da literatura para o triterpeno ácido ursólico (SEEBACHER *et al.*, 2003)²; (LEMES *et al.*, 2011)³.

#	HSQC AUF-1		HMBC AUF-1		² (Liter.)		³ (Liter.)
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	39,4	α 1,02 β 1,58	-	-	39,2	α 1,00 β 1,58	38,0
2	28,4	1,24 (m) 1,84 (m)	-	-	28,2	1,81 1,81	27,3
3	78,5	α 3,46 (dd; 6,7 e 9,2 Hz)	H-2	H-1; H-23; H-24	78,2	α 3,44; dd	77,6
4	39,7	-	-	-	39,6	39,6	39,3
5	56,2	0,97 (d; 6,0 Hz)		H-23; H-25	55,9	α 0,88; d	54,5
6	19,1	α 1,63 (m) β 1,46 (m)	-	-	18,8	α 1,58 β 1,39	17,6
7	33,9	α 1,58 (m) β 1,39 (m)	-	-	33,7	α 1,59 β 1,39	32,0
8	40,3	-	-	-	40,1	-	39,7
9	48,4	α 1,83 (t; 7,0 Hz)		H-25; H-26; H-12	48,1	α 1,65	46,6
10	37,8	-	-	-	37,5	-	38,8
11	23,9	1,96 (m) 1,24 (d, 5,9 Hz)	H-12	-	23,7	1,96 1,96	22,5
12	126,0	5,49 (s)	-	-	125,7	5,49; s	124,5
13	139,6	-	-	-	139,3	-	137,6
14	42,8	-		H-12	42,6	-	41,6
15	29,0	α 1,24 (m) β 2,33 (t; 4,4Hz)	-	-	28,8	α 1,22 β 2,33; t	30,0
16	25,2	β 2,01 (m) α 2,15 (m)	-	-	25,0	α 2,14; t β 2,01	23,8
17	48,4	-	-	-	48,1	-	47,6
18	53,9	β 2,63; d; 11,3 Hz	H-19; H-17	H-20; H-29; H-12; H-14; H-27	53,6	β 2,63; d	52,0
19	39,8	α 1,49 (dd; 4,5 e 6,3 Hz)	-	-	39,5	α 1,49	38,4
20	39,7	β 1,04	-	-	39,4	β 1,05	38,2
21	31,4	α 1,40 (m) β 1,48 (m)	-	-	31,1	α 1,40 β 1,49	30,0
22	37,6	1,95 (m) 1,95 (m)	-	-	37,4	1,97 1,97	36,0
23	29,2	α 1,24 (m; 3H)	-	-	28,8	α 1,24; s	27,6
24	16,9	β 1,03 (s; 3H)	-	-	16,5	β 1,02; s	16,5
25	16,0	β 0,88 (s; 3H)	-	-	15,7	β 0,92; s	16,4
26	17,9	β 1,05 (s; 3H)	-	-	17,5	β 1,06; s	16,8
27	24,3	α 1,24 (s; 3H)	-	-	24,0	α 1,24; s	22,7
28	180,3	-	-	-	179,7	-	179,2
29	17,8	β 1,02 (d; 4,5 Hz, 3H)	-	-	17,5	β 1,02; d	16,8
30	21,7	α 0,96 (d; 6,0 Hz, 3H)	-	-	21,4	α 0,97; d	20,6

¹ Pyr-*d*5, 500x125 MHz; ² Pyr-*d*5, 600x150 MHz; ³ CDCl₃/DMSO-*d*₆, 50 MHz

Figura 17 - Espectro de absorção na Região do Infravermelho de AUF-1 (Pastilha de KBr)

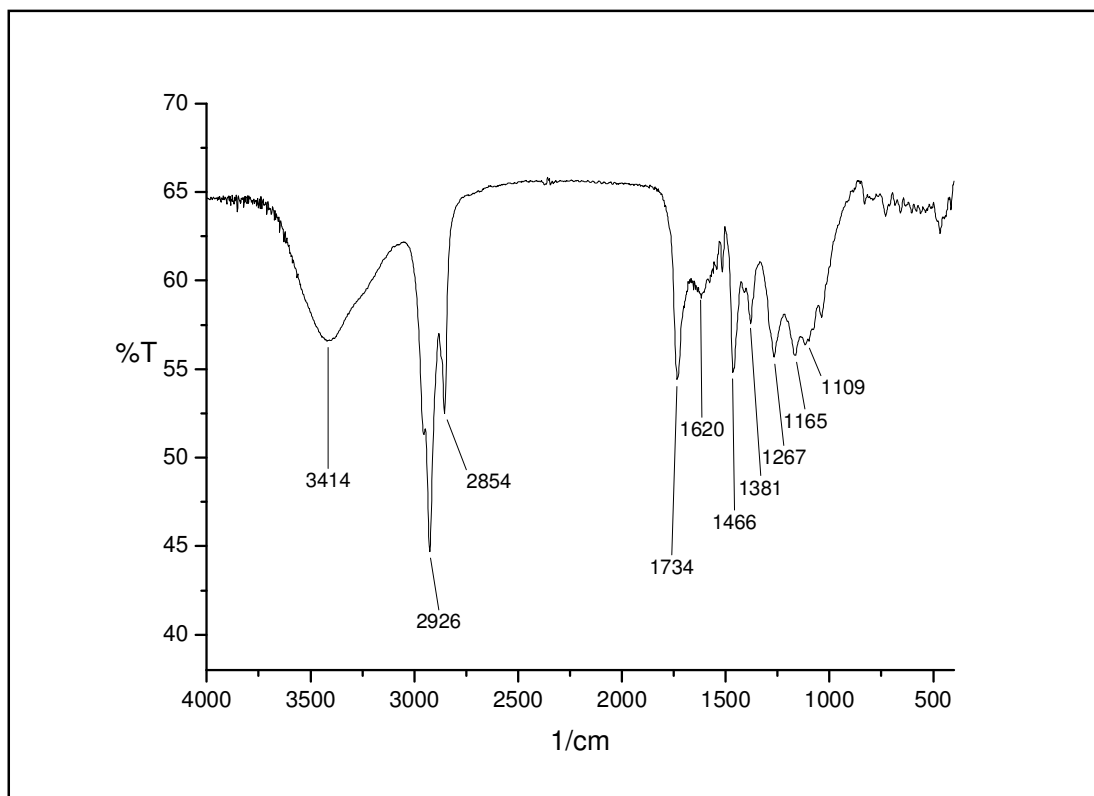


Figura 18 - Espectro de Massa de AUF-1 (IE, 70 eV) e alguns fragmentos observados.

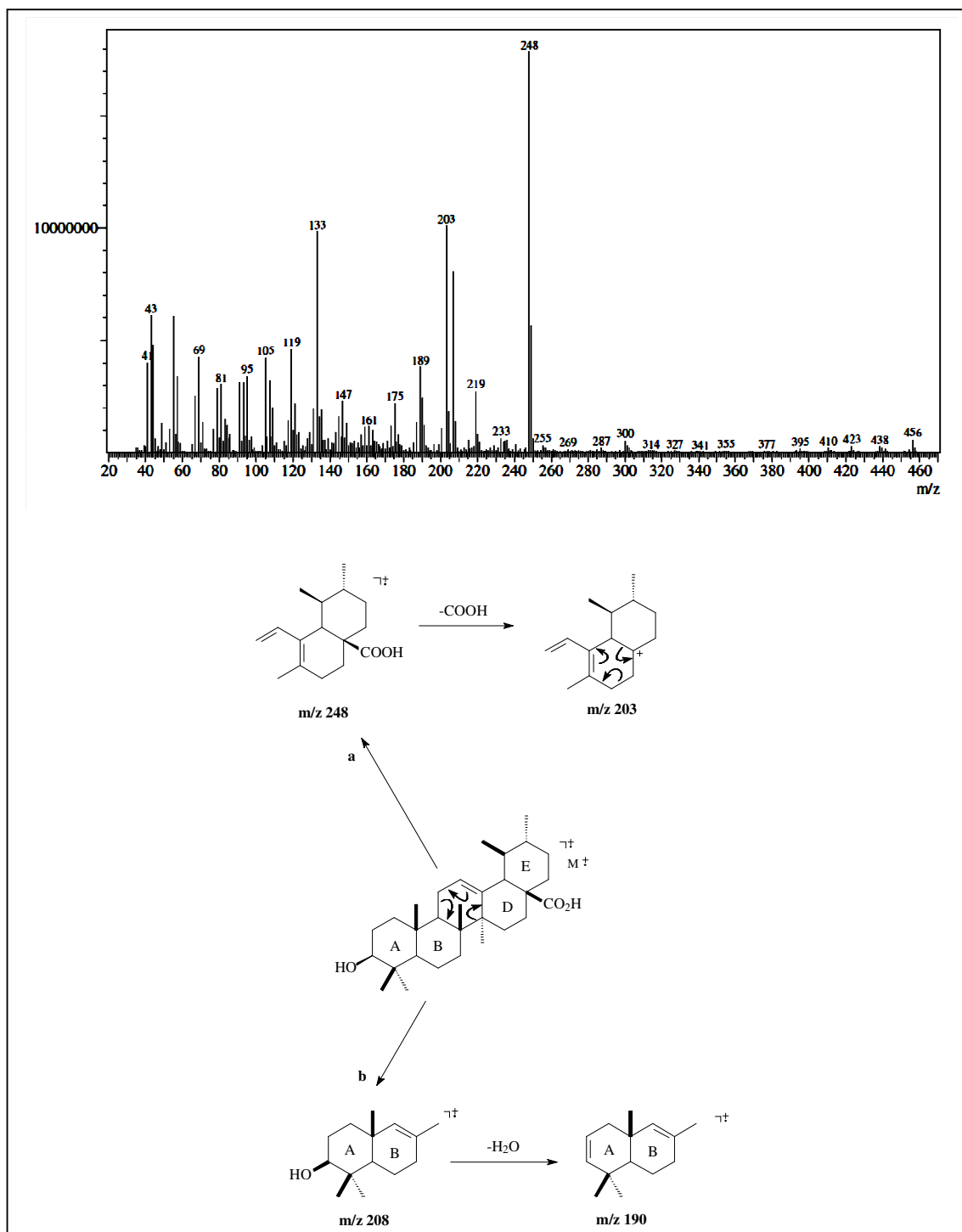


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H de AUF-1 (Pyr-*d*5, 500 MHz).

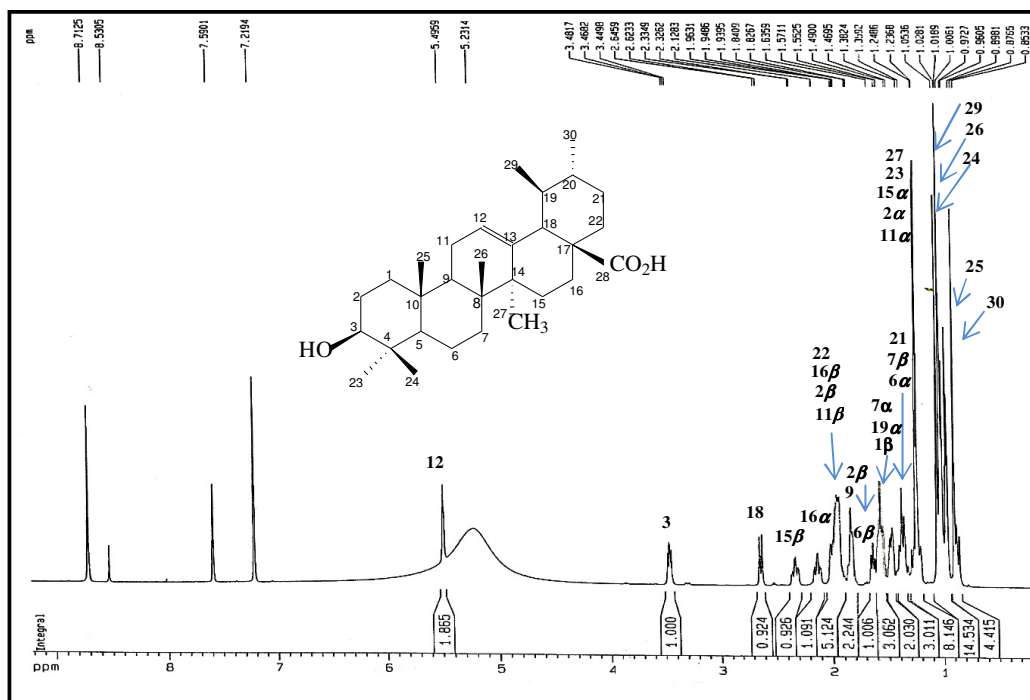


Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C de AUF-1 (Pyr-*d*5, 125 MHz).

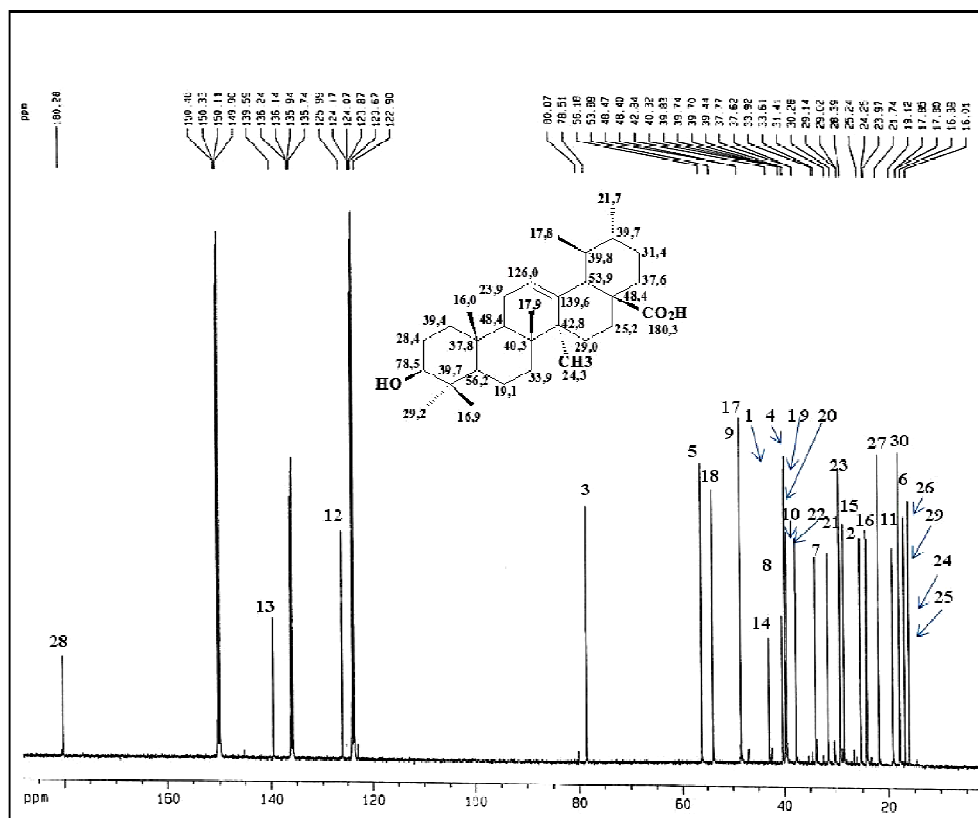


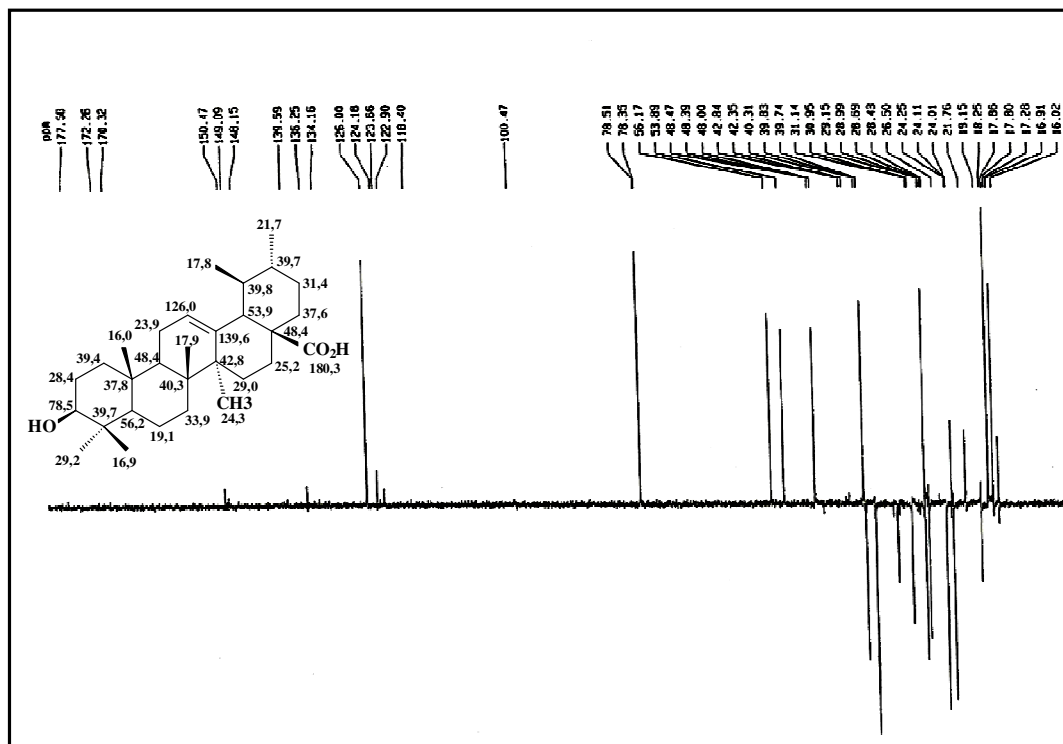
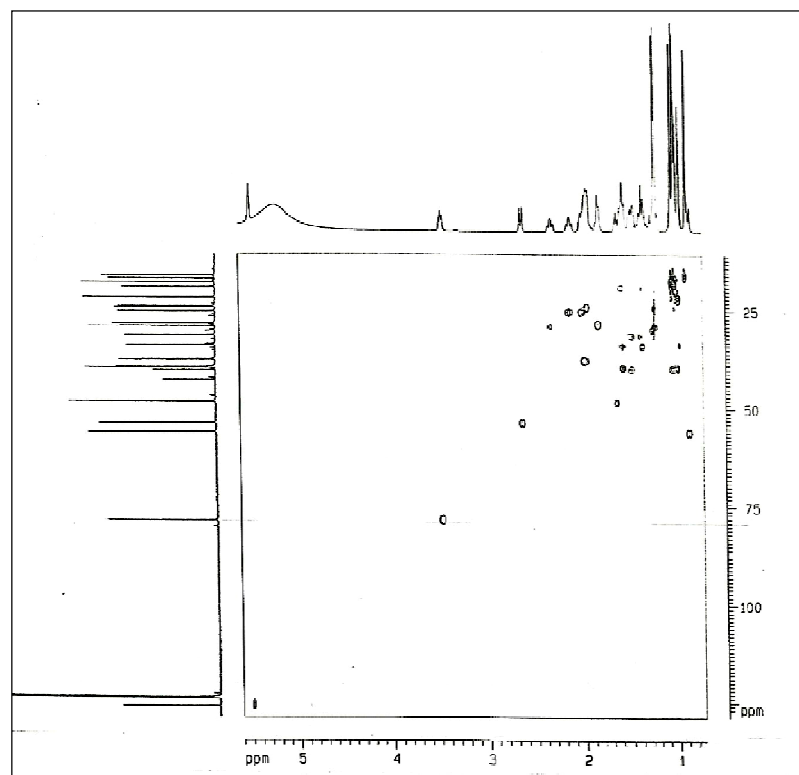
Figura 21 - Espectro de RMN de DEPT 135° de AUF-1 (125 MHz, Pyr-*d*5)Figura 22 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC de AUF-1 (Pyr-*d*5, 500 x 125 MHz).

Figura 23 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AUF-1 (Pyr- d_5 , 500 x 125 MHz) e estrutura e subestruturas de algumas correlações a longa distância.

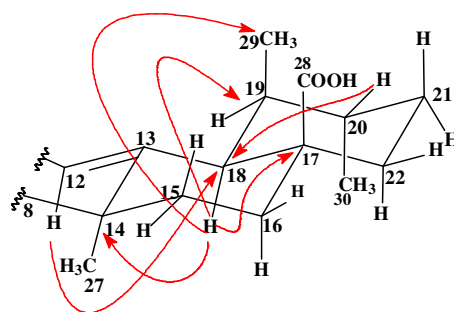
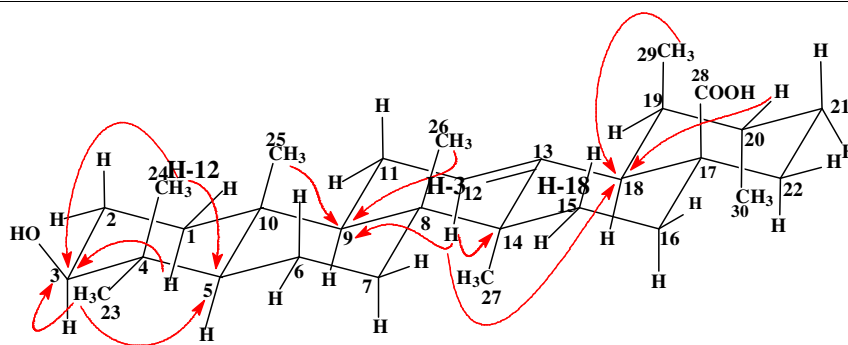
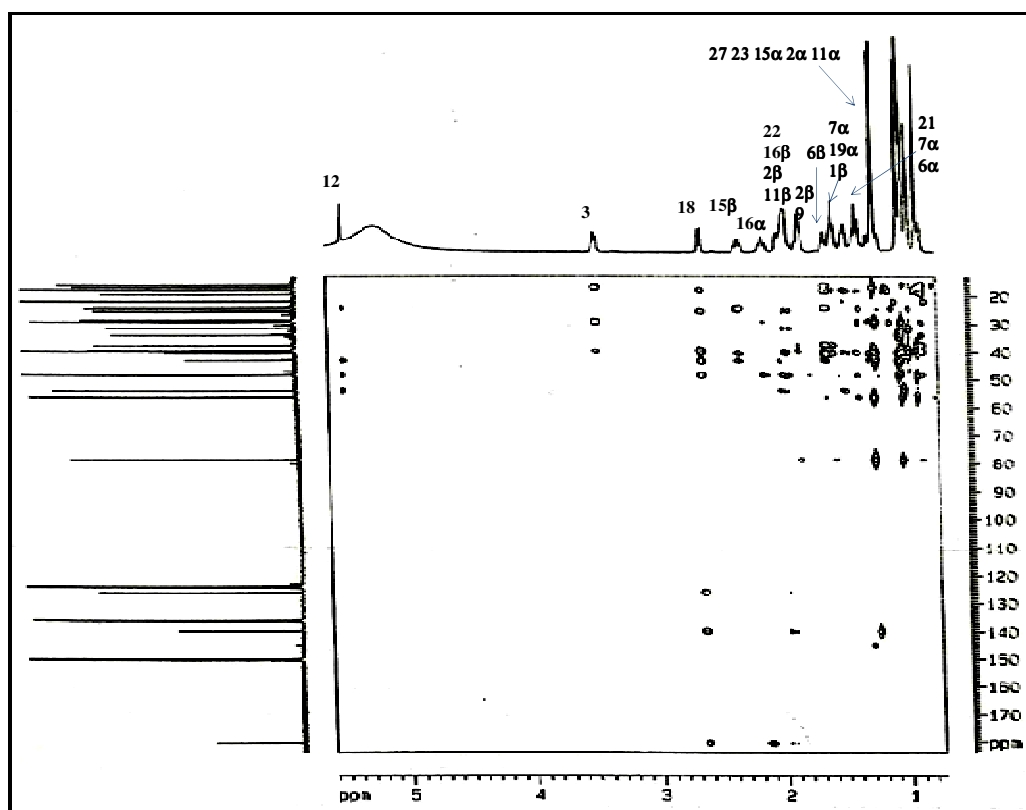


Figura 24 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Pyr-*d*5, 500 MHz) e expansão de AUF-1.

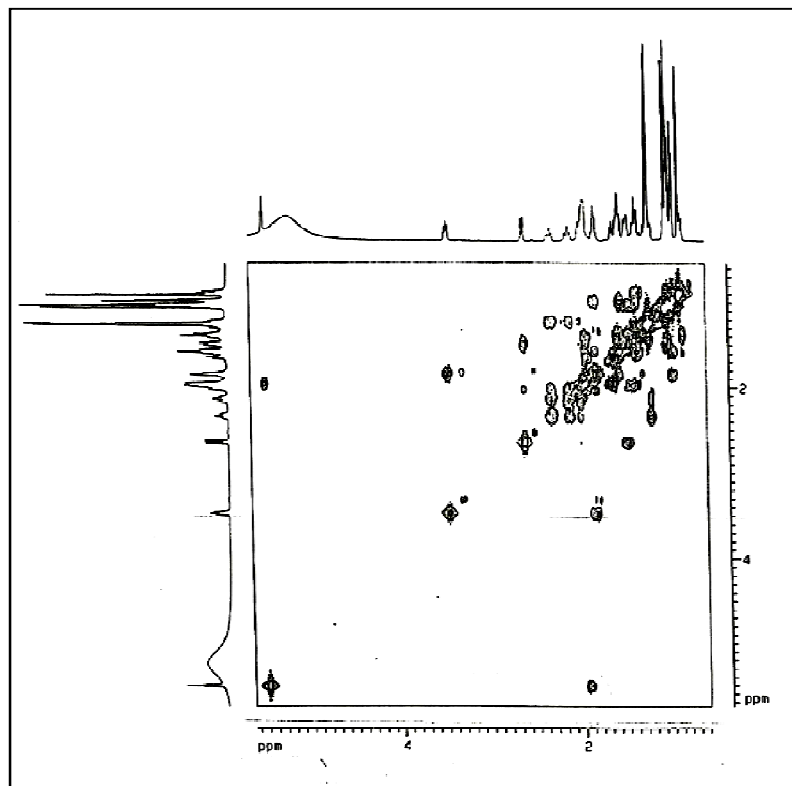
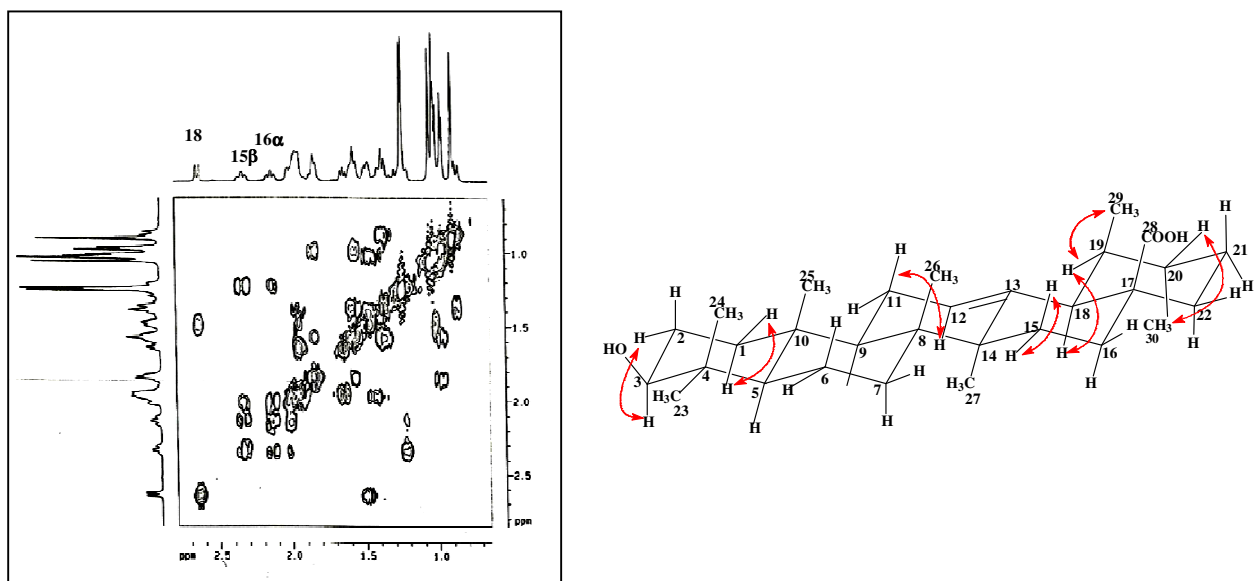


Figura 25 – Expansão do Espectro de COSY e algumas correlações de AUF-1.



4.2 Determinação Estrutural de AUCC-1

Do extrato etanólico da casca do caule de *A. ulei* foram obtidos 3,95 g de um sólido branco, ponto de fusão de 150,3-152,2 °C, denominado **AUCC-1** (parte experimental p. 225).

O espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-1 (Figura 30, p. 61) evidenciou bandas de vibração correspondente a deformação axial de ligação OH em 3339 cm⁻¹, deformação axial de ligação C-O de álcool secundário em 1049 e 1103 cm⁻¹, além de uma banda de deformação axial assimétrica de ligação C-O-C de éteres alifáticos em 1140 cm⁻¹.

O espectro de RMN ¹³C-CPD e DEPT 135 de AUCC-1 (Figura 33, p. 63), mostraram sete sinais para carbonos oxigenados em δ_C 80,2; 72,8; 71,9; 71,4; 70,4; 67,1 e 56,9 ppm.

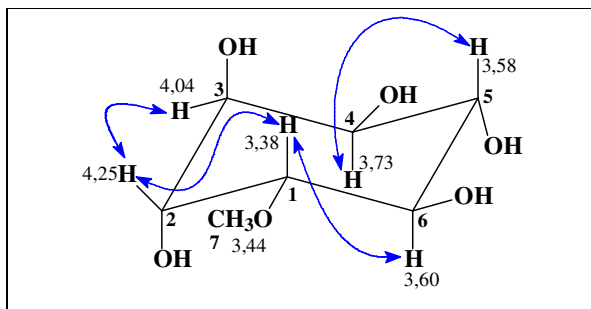
O espectro de massa de AUCC-1 (Figura 31, p. 61) mostrou o pico do íon molecular em m/z 194 Daltons, sugerindo a fórmula molecular C₇H₁₄O₆ (IDH = 1 insaturação), além de um pico intenso em m/z 144 Dalton.

No espectro de RMN ¹H de AUCC-1 (Figura 32, p. 62), observou-se seis sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ_H 3,38 (dd, 3,5 e 9,5 Hz, 1H), 3,58 (t, 9,5 Hz, 1H), 3,60 (t, 9,5 Hz, 1H), 3,73 (dd, 3,5 e 9,5 Hz, 1H); 4,04 (t, 3,5 Hz, 1H) e 4,25 (t, 3,5 Hz, 1H), além de um sinal em δ_H 3,44 (s, 3H) correlacionado a hidrogênios de um grupo metoxila.

O espectro de RMN ¹H, ¹³C-HSQC (Figura 35, p. 64) da substância AUCC-1 apresentou as correlações dos hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbono, como do carbono em δ_C 72,8 com o hidrogênio em δ_H 3,60 e do carbono metoxílico em δ_C 56,9 com os hidrogênios em δ_H 3,44. As demais correlações estão listadas na Tabela 5 (p. 60).

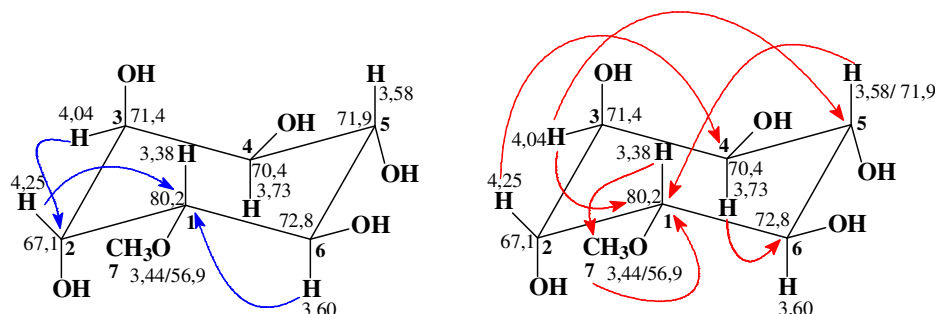
Acoplamentos escalares observados no espectro de RMN 2D ¹H, ¹H-COSY de AUCC-1 Figura 34, (p. 64) mostraram os acoplamentos vicinais dos hidrogênios em δ_H 4,25 (H-2) com 3,38 (H-1); δ_H 4,25 (H-2) com 4,04 (H-3) e δ_H 3,73 (H-4) com 3,58 (H-5), observado na Figura 26 (p. 58).

Figura 26 - Correlações observadas no espectro de COSY para AUCC-1.



Com relação às correlações heteronucleares a longa distância observadas no espectro de RMN de ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 36, p. 65), uma importante correlação foi verificada entre o hidrogênio em δ_{H} 3,44 (H-7/OCH₃) com o carbono em δ_{C} 80,2 (C-1), confirmando a posição do grupo metoxila na estrutura proposta. Outras correlações foram observadas e listadas na Tabela 5 (p. 60) e mostradas na Figura 27 (p. 58).

Figura 27 - Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC.

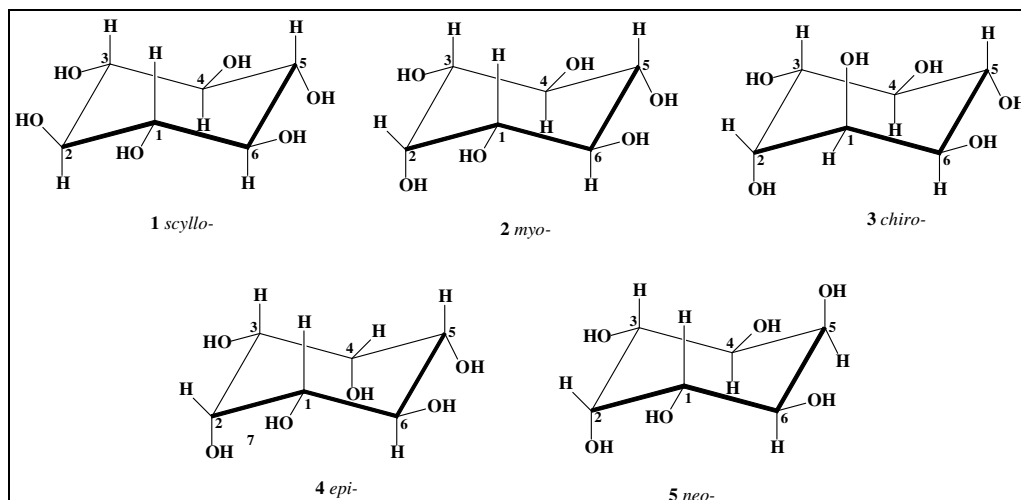


Segundo Endringer *et al.*, (2007), há diversos derivados de inosítois (Figura 28, p. 59), a exemplo o Bornesitol, que é um ciclitol metilado derivado do *mio*-inositol (2), encontrado em várias espécies de plantas e que tem apenas um grupo hidroxila com orientação em axial em C-2. Na substância AUCC-1 há duas hidroxilas em axial (C-2 e C-3), observada devido ao acoplamento vicinal dos hidrogênios H-2 com H-3 no espectro COSY e que é possível visualizar na Figura 26 (p. 58).

Verificando os dados de AUCC-1 com vários derivados descritos na literatura (DORMAN; ANGYAL; ROBERTS, 1969), (Tabela 4, p. 59 e Figura 28, p. 59), observou-se que de acordo com a posição em axial das hidroxilas, em AUCC-1, não há ocorrência de grupos hidroxila em posição do tipo 1,3-diaxial. O C-1 encontra-se metoxilado e a hidroxila em C-2 encontra-se em axial de acordo com o deslocamento químico observado para esse carbono e ao acoplamento de H-2 com H-3, cujo valor de J (3,5 Hz) é típico de acoplamento

equatorial-equatorial.

Figura 28 - Estruturas de inositóis, com variações na posição da hidroxila.



Também foi possível assegurar que as posições 4 e 6 não possuem OH axial, no entanto, as constantes de acoplamento observadas no espectro RMN ^1H indicam a ocorrência de acoplamentos do tipo axial-equatorial entre H-1 e H-2 (3,5 Hz) e axial-axial entre H-1 e H-6 (9,5 Hz). H-4 por sua vez apresenta um acoplamento axial-equatorial com H-3 (3,5 Hz) e outro axial-axial com H-5 (9,5 Hz).

Tabela 4 - Dados de RMN ^{13}C de AUCC-1 comparados com dados da literatura de alguns inositóis e seus derivados metilados (DORMAN; ANGYAL; ROBERTS, 1969)^b.

#	^a AUCC-1	¹ scyllo	² myo	³ chiro	⁴ epi	⁵ neo
1	80,2	74,4	81,1	<u>80,8</u>	72,4	70,3
2	67,1	74,4	<u>64,0</u>	67,9	<u>75,2</u>	<u>72,6</u>
3	71,4	74,4	81,1	72,6	70,8	70,3
4	70,4	74,4	72,1	73,5	<u>75,2</u>	70,3
5	71,9	74,4	75,1	71,1	72,4	<u>72,6</u>
6	72,8	74,4	72,1	<u>72,0</u>	67,5	70,3
MeO-1	56,9	-	58,1	57,5	-	-
MeO-2	-	-	-	-	-	-
MeO-3	-	-	58,1	-	-	-
MeO-4	-	-	-	-	-	-

^a(D₂O); ^b Literatura (Dioxano). Os deslocamentos de carbonos sublinhados referem-se a posição em axial da hidroxila.

Outro detalhe observado para a substância AUCC-1 é que o carbono C-4 (δ_C 70,4) encontra-se mais protegido provavelmente devido à compressão estérica exercida pela OH axial de C-3 (δ_C 71,4).

Esse padrão de acoplamento assemelha-se ao conhecido como *chiro*-inositol, em que é apresentada duas hidroxilas em posição axial, no caso de AUCC-1 (C-2 e C-3) e a comparação dos deslocamentos químicos entre a literatura apresentada na Tabela 5 (p. 60), e AUCC-1, apresentam valores muito semelhantes. Há uma divergência em C-4, cuja diferença é de 3,1 ppm (DORMAN; ANGYAL; ROBERTS, 1969; ANGYAL *et al.*, 1992), provavelmente pelas interações com o solvente dioxano, originalmente utilizado para a aquisição dos dados do composto 3.

Dessa forma a substância AUCC-1 (Figura 29, p. 60) e os resultados obtidos e discutidos acima possibilitaram caracterizar que AUCC-1 trata-se de um inositol metilado denominado 1D-1-*O*-metil-*chiro*-inositol, citado pela primeira vez para a espécie.

Tabela 5 - Dados de RMN de 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-1 (D_2O , 500 x 125 MHz).

#		HSQC		HMBC	
C	δ_C	δ_H (mult, J, H)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
1	80,2	3,38 (dd, 3,5 e 9,5 Hz, 1H)	H-6; H-2	H-3; H-5; H-7	
2	67,1	4,25 (t, 3,5 Hz; 1H)	H-3	-	
3	71,4	4,04 (t; 3,5 Hz; 1H)	-	-	
4	70,4	3,73 (dd; 3,5 e 9,5; 1H)	-	H-2	
5	71,9	3,58 (t, 9,5 Hz; 1H)	-	H-3	
6	72,8	3,60 (t, 9,5 Hz; 1H)	-	H-4	
OCH₃	56,9	3,44 (s, 3H)	-	H-1; H-5	

Figura 29 - Estrutura da substância inositol (AUCC-1).

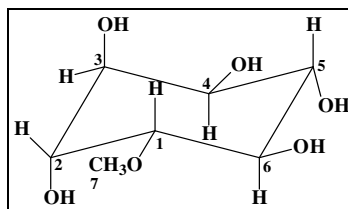


Figura 30 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-1 (Pastilha de KBr).

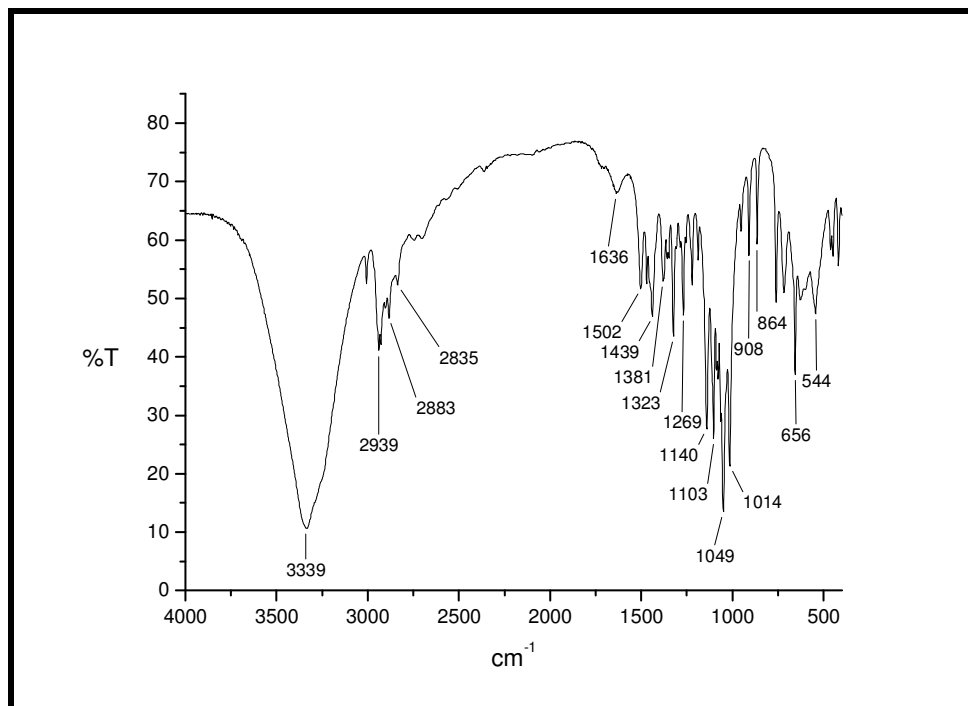


Figura 31 - Espectro de Massa de AUCC-1 (IE, 70 eV).

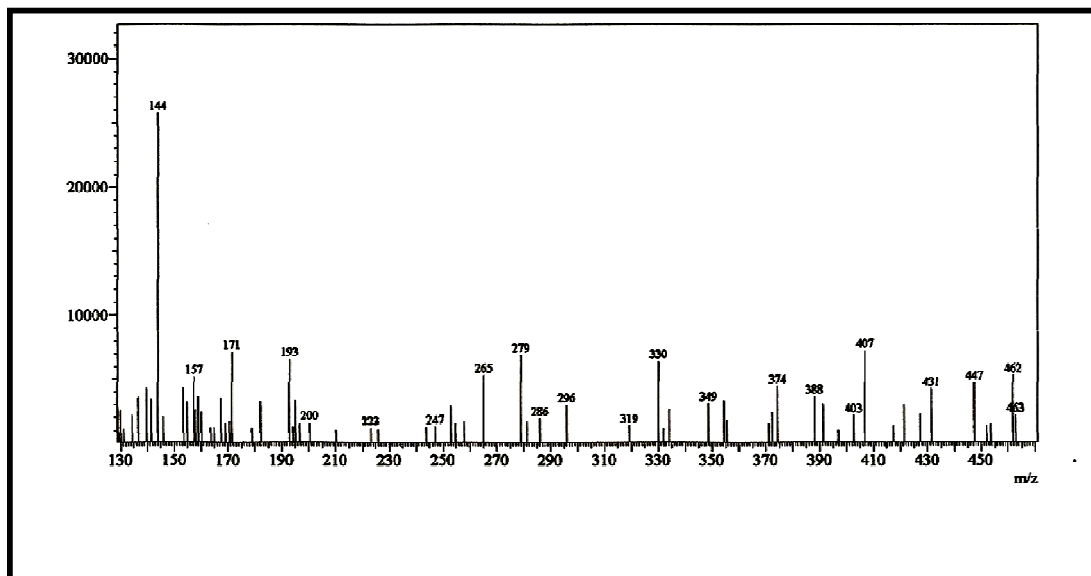


Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H de AUCC-1 (D_2O , 500 MHz).

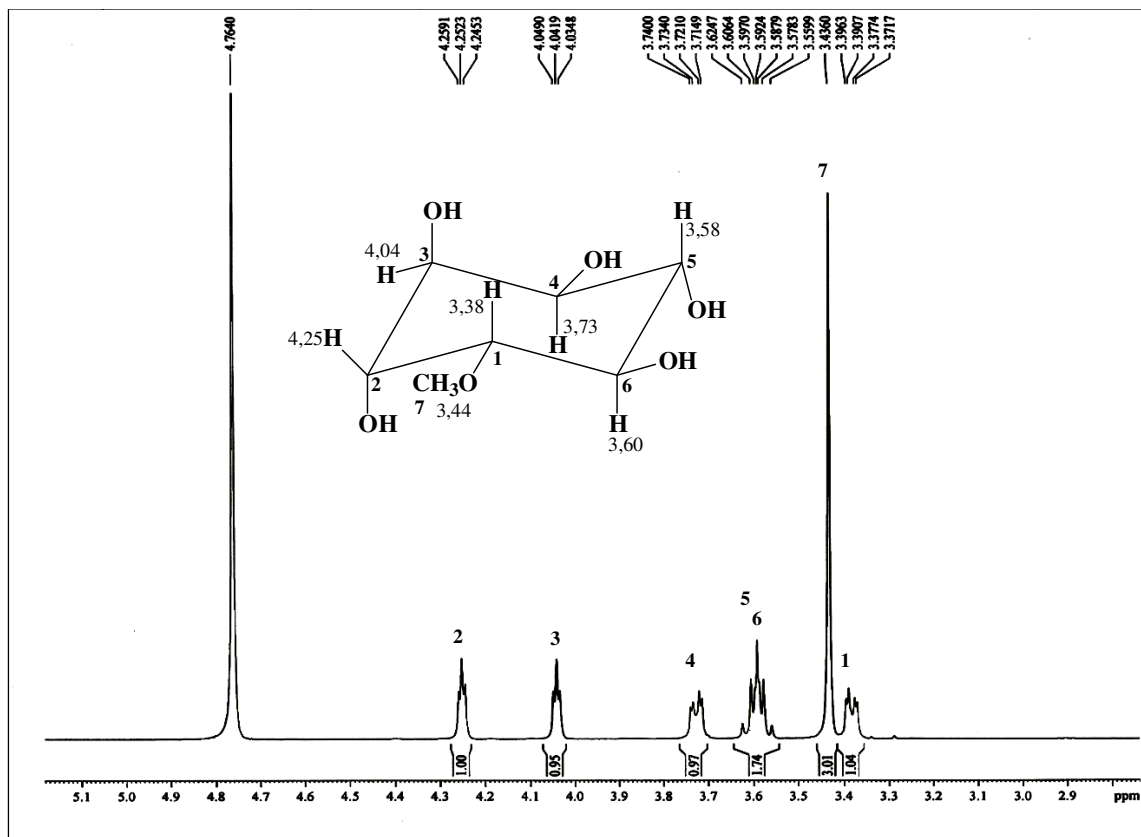


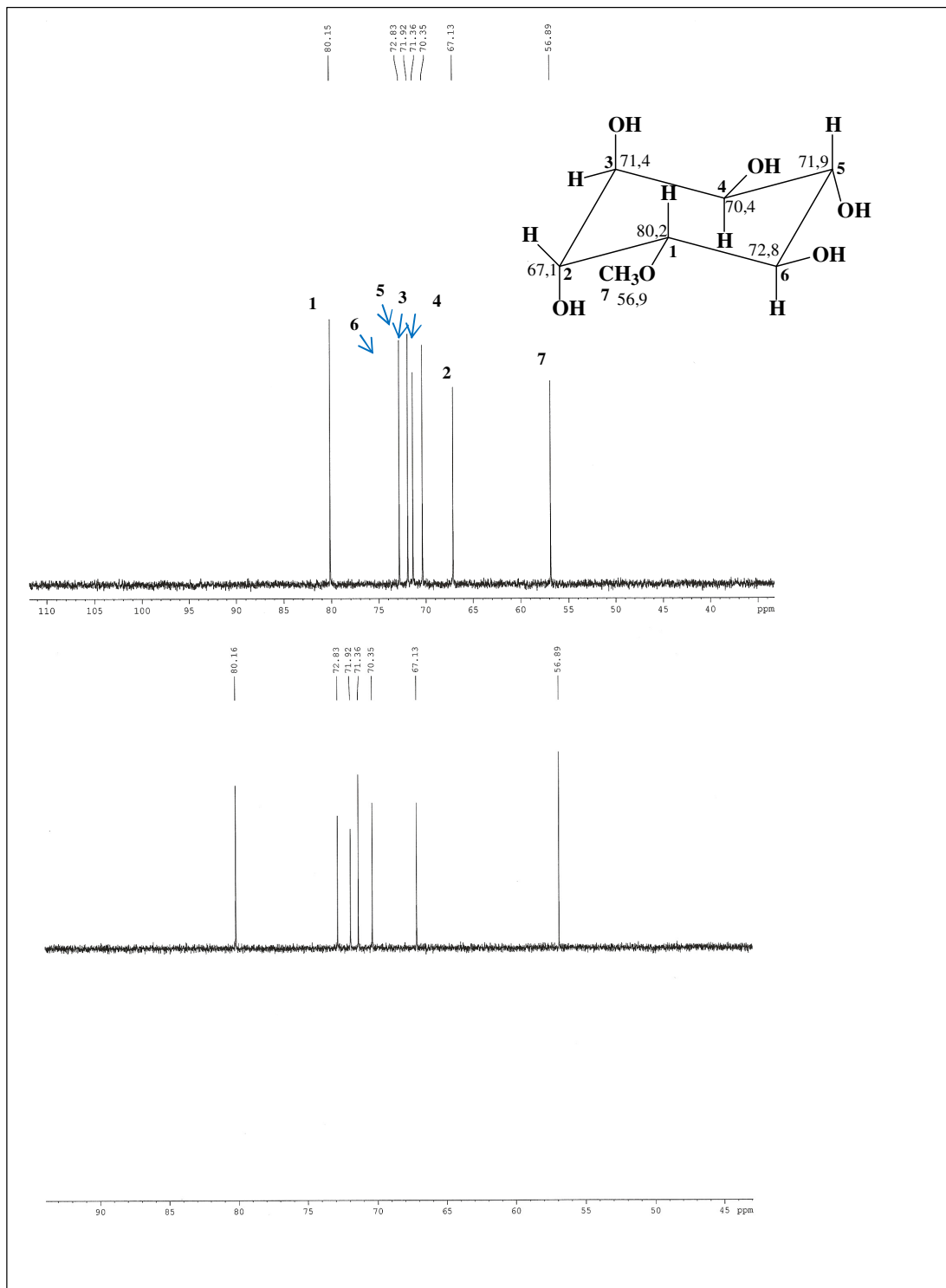
Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135 (D_2O , 125 MHz) de AUCC-1.

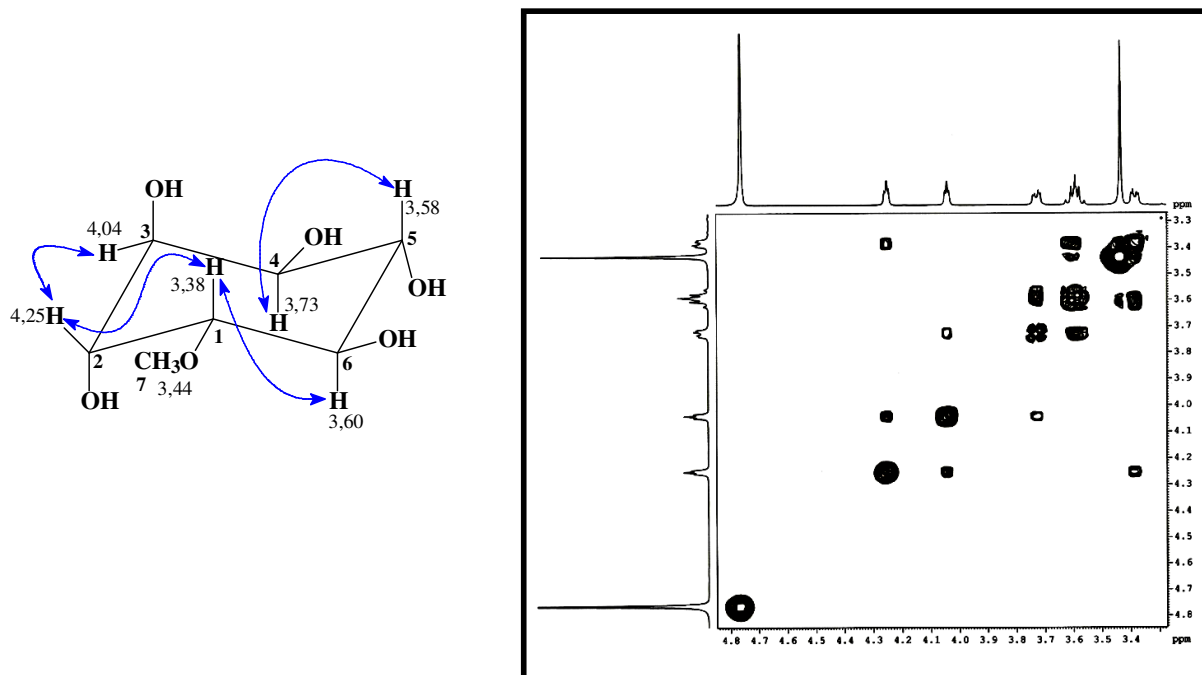
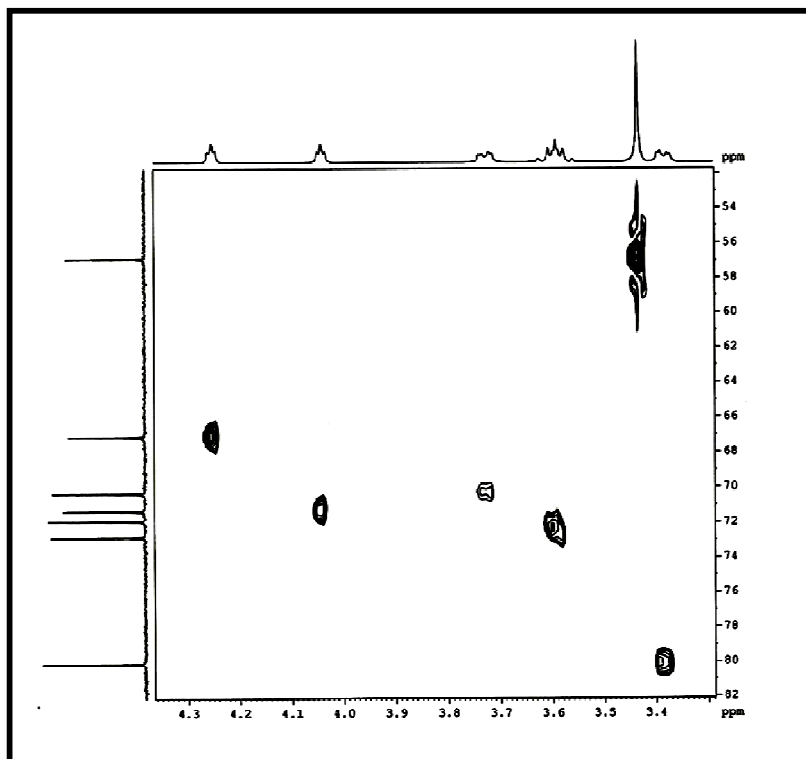
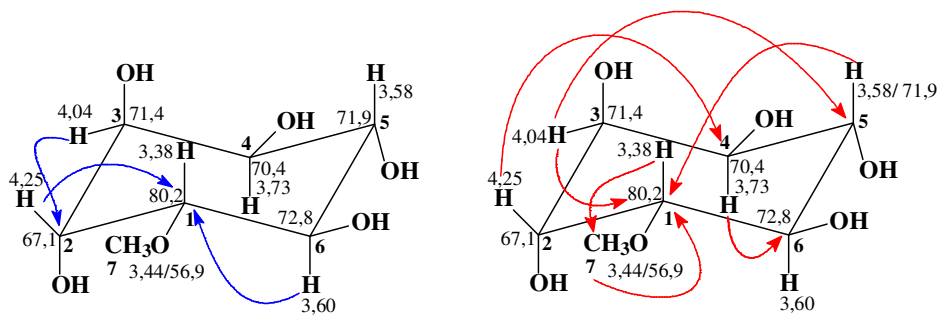
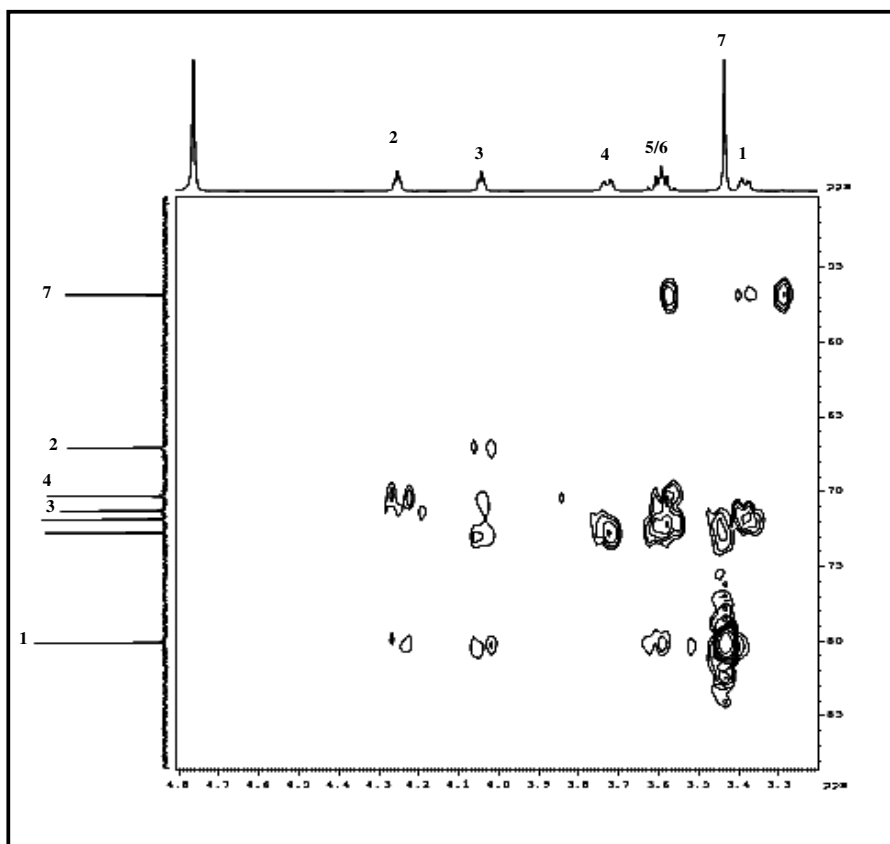
Figura 34 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (D_2O , 500 MHz) de AUCC-1.Figura 35 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (D_2O , 500 x 125 MHz) de AUCC-1.

Figura 36 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de AUCC-1 (D_2O , 500 x 125 MHz), estrutura e subestruturas de algumas correlações a longa distância.



4.3 Determinação Estrutural de AUCC-2

Do extrato etanólico da casca do caule de *A. ulei* foram realizados vários fracionamentos cromatográficos que levaram ao isolamento de 11,0 mg de cristais, com ponto de fusão 191,0-192,0 °C, solúveis em MeOH e CHCl₃, $[\alpha]_D^{25} = -3,3^\circ$ (c 0,33, CH₃OH), denominados AUCC-2 (Parte Experimental, p. 228).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 44, p. 73), mostrou uma banda larga em 3419 cm⁻¹ correspondente a vibração de deformação axial da ligação N-H, caracterizando aminas secundárias aromáticas ou OH. Duas bandas, uma em 1325 cm⁻¹ e outra em 1271 cm⁻¹ referente a deformação axial da ligação C-N de aromático. Também foi observada uma banda correspondente a deformação axial de ligação C-O de álcool em 1060 cm⁻¹ e em 1726 cm⁻¹ uma banda correspondente a deformação axial de ligação C=O, provavelmente de éster, além de bandas esqueléticas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH aromático em 742 cm⁻¹.

O espectro de RMN de ¹³C-CPD (125 MHz, CD₃OD, Figura 47, p. 74), apresentou 21 linhas espectrais, que associado ao espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HSQC (Figura 49, p. 75) apresentou os sinais em δ_C 118,8 (δ_H 7,39), 120,0 (δ_H 6,95); 122,2 (δ_H 7,05) e 112,2 (δ_H 7,28), atribuídos a carbonos mono-hidrogenados aromáticos.

O espectro de RMN ¹H, ¹³C-HSQC (Figura 49, p 75) comparado com o espectro DEPT 135 (Figura 47, p. 74), foram verificados cinco sinais em δ_C 61,5 (δ_H 3,35); 43,6 (1,50); 58,9 (2,15); 73,1 (3,78) e 40,7 (1,50) atribuídos a carbonos metínicos, além de seis carbonos metilênicos, com deslocamentos em δ_C 61,9 (δ_H 2,97 e 2,20), 54,3 (3,12 e 2,63), 35,2 (2,05 e 1,40), 34,5 (2,18 e 1,35), 29,2 (1,70 e 1,20) e 22,4 (2,90 e 2,71). Um carbono metílico, em δ_C 52,4 (δ_H 3,80), atribuído a uma metoxila e cinco carbonos não hidrogenados, em δ_C 176,6; 138,3; 135,1; 128,4 e 108,0 ppm.

Foi também observado um sinal em δ_C 73,1 (δ_H 3,78), atribuído a um carbono oximetínico e um sinal em δ_C 176,6, referente a um carbono carbonílico de éster, como sugerido pelo espectro no infravermelho (Figura 44, p. 73).

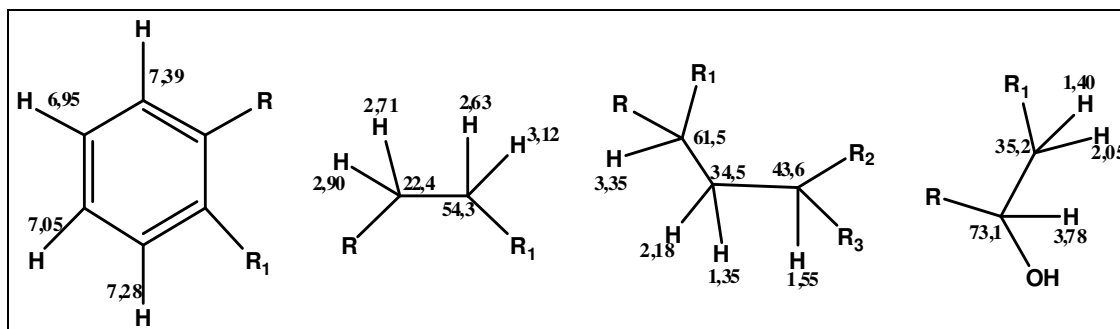
O espectro de massa (Figura 45, p. 73) revelou o pico da molécula protonada em $[M + H]^+ = 355, 28$, sugerindo uma fórmula molecular de C₂₁H₂₆N₂O₃, com IDH igual a dez.

O espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD, Figura 46, p. 74), de AUCC-2, apresentou quatro sinais correspondentes ao anel benzênico do sistema indólico, em δ_H 7,39 (d, 7,8Hz, H-9); 7,28 (d, 8,0 Hz, H-12); 7,05 (t, 8,0 Hz, H-11) e 6,95 (t, 8,0 Hz, H-10), um

sinal em δ_{H} 3,81 (s, 3H) atribuído a um grupamento metoxila, além de outros sinais listados na Tabela 7 (p. 72).

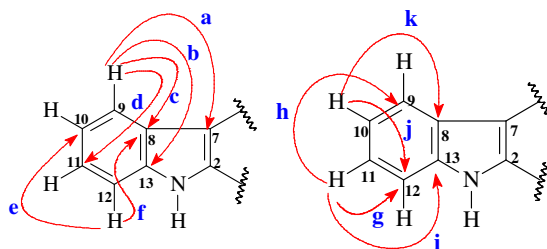
A atribuição dos hidrogênios da unidade do sistema indólico foi realizada com a análise do espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (Figura 48, p. 75), através dos acoplamentos vicinais entre os hidrogênios δ_{H} 7,39 (H-9) \leftrightarrow δ_{H} 6,95 (H-10); 7,05 (H-11) \leftrightarrow 7,28 (H-12), além de todos os acoplamentos geminais para os hidrogênios metilênicos δ_{H} 2,18 (H-14a) \leftrightarrow 1,45 (H-14b); 2,90 (H-6a) \leftrightarrow 2,71 (H-6b); δ_{H} 3,12 (H-5a) \leftrightarrow 2,63 (H-5b); δ_{H} 2,05 (H-18a) \leftrightarrow 1,40 (H-18b); δ_{H} 1,70 (H-19a) \leftrightarrow δ_{H} 1,20 (H-19b) e δ_{H} 2,97 (H-21a) \leftrightarrow 2,20 (H-21b), que possibilitaram propor as estruturas parciais na Figura 37 (p. 67), para AUCC-2.

Figura 37 - Estruturas parciais obtidas através do espectro de COSY de AUCC-2.



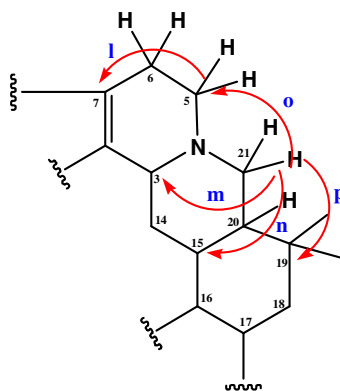
No espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 50 e 51, p. 76), observou-se os acoplamentos $^3\text{J}_{\text{CH}}$ e $^2\text{J}_{\text{CH}}$ para AUCC-2 (Figura 38, p. 67), ou seja, as correlações dos hidrogênios do sistema indólico em δ_{H} 7,39 (H-9) com os carbonos δ_{C} 108,0 (C-7, a); δ_{C} 122,2 (C-12, b); δ_{C} 128,4 (C-8, c) e δ_{C} 138,3 (C-13, d); do sinal em δ_{H} 7,28 (H-12) com δ_{C} 120,0 (C-10, e) e δ_{C} 128,4 (C-8, f); além de δ_{H} 7,05 (H-11) com δ_{C} 112,2 (C-12, g); δ_{C} 118,8 (C-9, h) e δ_{C} 138,3 (C-13, i) e do sinal em δ_{H} 6,95 (H-10) com δ_{C} 112,2 (C-12, j) e δ_{C} 128,4 (C-8, k).

Figura 38 - Estruturas parciais observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2.



Importantes acoplamentos foram observados em $\delta_{\text{H}} 3,12/2,63$ (H-5) com $\delta_{\text{C}} 108,0$ (C-7, l); $\delta_{\text{H}} 2,97/2,20$ (H-21) com $\delta_{\text{C}} 61,5$ (C-3, m), $\delta_{\text{C}} 43,6$ (C-15, n), $\delta_{\text{C}} 54,3$ (C-5, o) e $\delta_{\text{C}} 29,2$ (C-19, p) (Figura 39, p. 69).

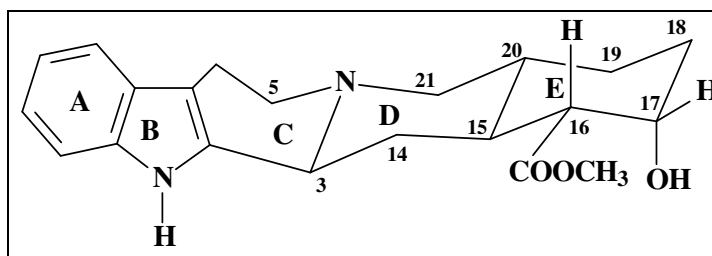
Figura 39 – Correlações observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2.



As correlações entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 2,97/2,20$ (H-21) com $\delta_{\text{C}} 54,3$ (C-5), e os respectivos deslocamentos químicos de $\delta_{\text{C}} 61,5$ (C-3), $\delta_{\text{C}} 54,3$ (C-5) e $\delta_{\text{C}} 61,9$ (C-21), possibilitaram perceber que poderia haver um segundo nitrogênio ligado a esses carbonos. Observou-se também, correlações entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 3,78$ (H-17) e $\delta_{\text{H}} 2,15$ (H-16) com o carbono carbonílico em $\delta_{\text{C}} 176,6$ (C-22) de forma a se pensar numa correlação entre $\delta_{\text{C}} 58,9$ (C-16) e $176,6$ (C=O), da mesma forma, uma correlação entre $\delta_{\text{H}} 3,81$ (OCH₃) e $\delta_{\text{C}} 176,6$ (C=O), possibilitou a confirmação de uma carbonila de éster metílico, Figura 50 (p. 76).

Na literatura (Tabela 6, p. 69 e Figura 41, pág 70), são mostrados pelo menos sete tipos de isômeros para as estruturas (ioimbina, α -ioimbina, 3-*epi*- α -ioimbina, β -ioimbina, ψ -ioimbina, *alloioimbina* e corinantina), e quando AUCC-2 é comparado aos centros estereogênicos **C-3**, **C-15**, **C-16**, **C-17** e **C-20** observam-se concordâncias quanto aos deslocamentos químicos. De acordo com WENKERT *et al.* (1976), H-15 tem uma configuração fixa, em posição axial, com configuração *S*, o que assegura uma conformação em cadeira para o anel E desses isômeros como pode ser verificado na Figura 40 (p. 69), para a ioimbina.

Figura 40 - Conformação em cadeira do alcaloide ioimbina.

Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C de AUCC-2 e dados da literatura (WENKERT *et al.*, 1976).

#	AUCC-2	a	b	c	d	e	f	g
2	135,1	134,2	134,0	135,8	134,0	134,3	134,4	131,7
3	61,5	59,8	59,0	60,5	53,7	60,1	60,1	53,7
5	54,3	52,1	52,3	52,6	50,7	53,2	52,8	50,8
6	22,4	21,5	21,3	21,6	16,4	21,7	21,3	16,5
7	108,0	107,5	107,4	106,3	105,9	108,1	107,1	107,3
8	128,4	127,0	126,9	127,0	127,2	127,1	126,8	127,2
9	118,8	117,7	117,7	117,5	117,2	117,9	117,5	117,6
10	120,0	118,8	118,8	118,4	118,1	119,1	118,6	118,9
11	122,2	120,8	120,9	120,4	120,1	121,1	120,5	121,0
12	112,2	110,6	110,7	111,1	111,1	110,6	110,6	110,8
13	138,3	135,8	135,8	136,1	135,5	135,7	135,8	135,6
14	34,5	33,8	33,8	33,6	32,2	27,6	31,0	23,6
15	43,6	36,4	41,6	34,7	32,4	37,9	37,4	32,5
16	58,9	52,6	57,1	51,1	52,4	54,6	50,6	54,1
17	73,1	66,9	71,6	65,9	66,6	66,0	66,7	65,7
18	35,2	31,4	33,5	28,2	30,9	33,2	30,2	33,5
19	29,2	23,1	27,5	23,5	23,0	24,5	24,8	23,9
20	40,7	40,2	39,1	36,5	39,5	36,4	32,0	35,6
21	61,9	61,0	60,5	62,0	51,5	60,4	59,6	49,4
C=O	176,6	175,1	175,0	172,7	172,9	174,4	174,0	174,7
OMe	52,4	51,7	51,6	51,1	51,2	51,8	51,5	51,7

AUCC-2 (CD₃OD), a, b, c, d, e, f e g (CDCl₃)

Dependendo da estereoquímica dos centros estereogênicos C-3, C-15 e C-20, os alcaloides indólicos pentacíclicos podem apresentar configurações distintas nas junções dos anéis C/D/E dando origem às conformações conhecidas como *normal*, *pseudo*, *allo* e *epiallo* (WENKERT *et al.*, 1976), conforme figura mostrada abaixo. A definição das conformações desses alcalóides é extremamente importante não apenas para a determinação de suas estruturas moleculares, mas, principalmente, para o estudo de seus mecanismos de ação farmacológica (CARBONEZI *et al.*, 2004).

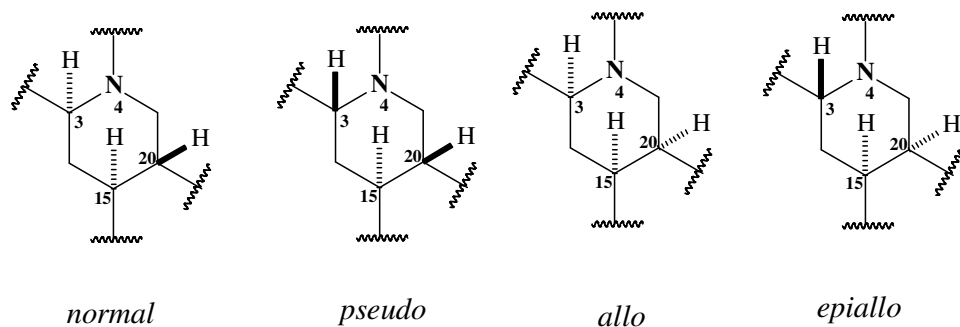
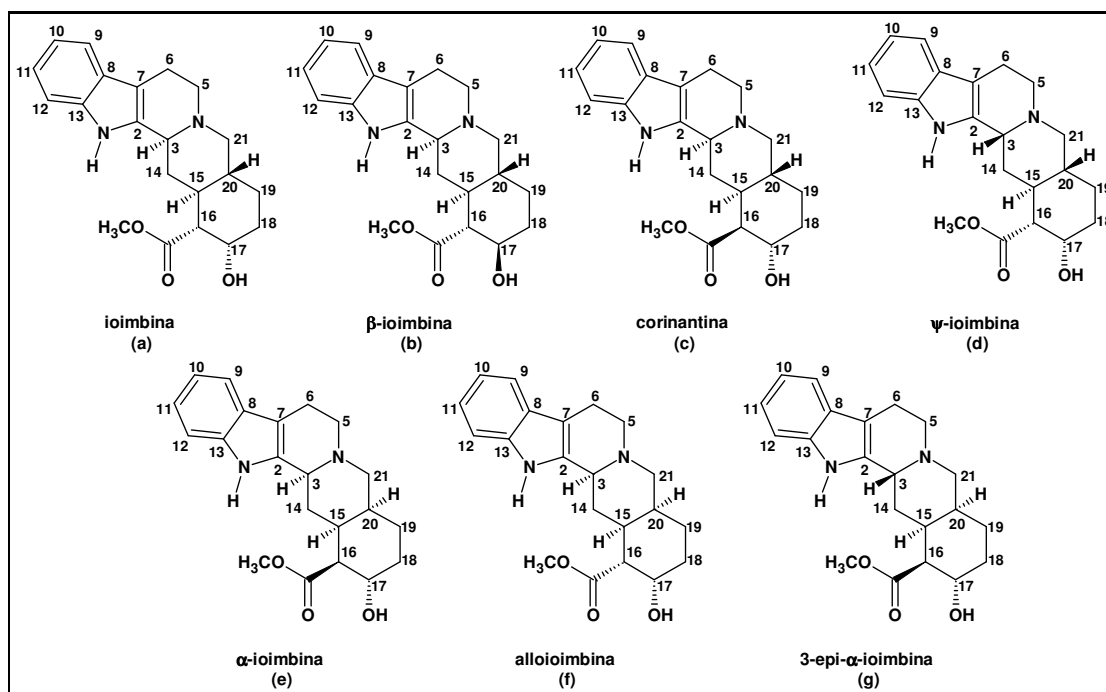


Figura 41 - Diferentes derivados do esqueleto ioimbano.

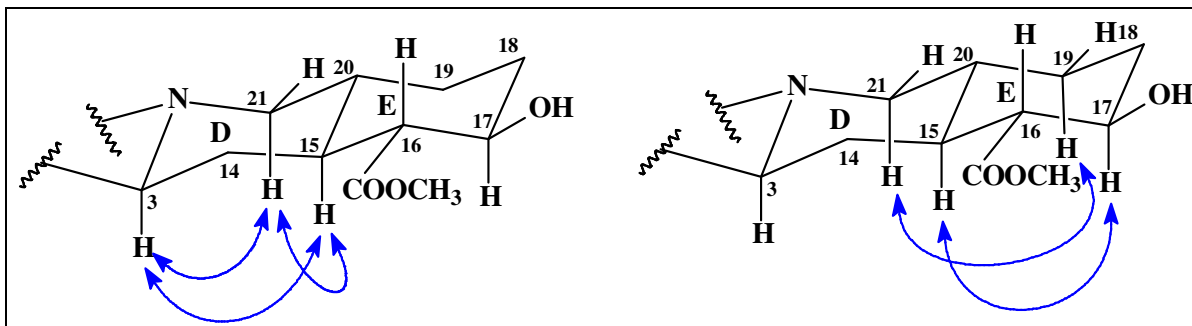


A comparação dos dados de AUCC-2 e os dados da β -ioimbina, foi estabelecida pelo espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY, (Figura 53; 54, p. 78), onde foram observados acoplamentos dipolares dos prótons H-15 em δ_{H} 1,55 e H-3 em δ_{H} 3,35, além do acoplamento com H-17 em δ_{H} 3,78 ppm.

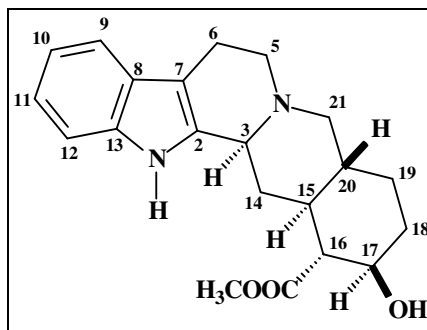
Adicionalmente, foram observados os acoplamentos que indicaram uma posição diaxial entre o H-17, em δ_{H} 3,78 e H-15 em δ_{H} 1,55 e H-18a em δ_{H} 2,05 (Figura 42, p. 71), além de outros acoplamentos dipolares de H-21a com H-19a e com H-14a, conforme mostrado na (Figura 53, p. 77).

Observa-se que o carbono C-17 de AUCC-2 ligado a hidroxila apresenta um deslocamento em δ_C 73,1 que, de acordo com a literatura apresentada na Tabela 6 (p. 69), coincide com a posição β , confirmada pelo NOESY (Figura 53, p. 77, Figura 54, p. 78 e Figura 42, p. 71).

Figura 42 – Acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN 2D 1H , 1H -NOESY de AUCC-2.



Os dados de AUCC-2 além da comparação com os dados da literatura permitiram concluir que a mesma tratava-se do alcaloide indólico β -ioimbina ou 17 β -hidroxi-ioimbano-16 α -carboxilato de metila (Figura 43, p. 72).

Figura 43 - Estrutura do alcaloide indólico β -ioimbina (AUCC-2).Tabela 7 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUCC-2 (500 x 125 MHz) comparados com os dados da literatura para o alcaloide β -ioimbina ($^1\text{WENKERT et al., 1976; }^2\text{UCHOA, 2006}$).

C	δ_{C}	AUCC-2		HMBC		^1Lit	^2Lit
		δ_{H} (mult, J, Int)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$			
2	135,1	-	H-3	H-6	134,0	135,1	
3	61,5	3,35(dl, 11,0 Hz, 1H)	H-14b	H-21a/H-21b H-5b	59,0	61,4	
5a	54,3	3,12 (dd, 5,1; 11,5 Hz)	H-6b	H-21a	52,3	54,2	
5b		2,63 (td, 4,6; 11,5 Hz)					
6a	22,4	2,90 (m)	H-5	H-3	21,3	22,4	
6b		2,74 (ddd, 3,2; 1,6 Hz)					
7	108,0	-	H-6	H-3, H-5a, H-5b e H-9	107,4	107,4	
8	128,4	-	H-9	H-10, H-12	126,9	128,4	
9	118,8	7,39 (d, 7,8 Hz)	-	H-11	117,7	118,8	
10	120,0	6,95 (td, 8,0 Hz)	-	H-12	118,8	120,0	
11	122,2	7,05 (td, 8,0 Hz)	-	H-9	120,9	122,2	
12	112,2	7,28 (d, 8,0 Hz)	H-11	H-10	110,7	112,2	
13	138,3	-	H-12	H-9	135,8	138,2	
14a	34,5	2,18 (m)	H-15	H-16	33,8	34,5	
14b		1,35 (m)					
15	43,6	1,55 (td, 3,0; 11,0 Hz)	H-14b	H-21a	41,6	43,5	
16	58,9	2,15 (m)	H-15	H-14b	57,1	58,9	
17	73,1	3,78 (m)	H-16; H-18b	-	71,6	73,1	
18a	35,2	2,05 (ddd, 3, 7 e 12,0 Hz)	-	H-16	33,5	35,2	
18b		1,40 (m)					
19a	29,2	1,70 (ddd, 3, 7 e 12,0 Hz)	-	H-21b	27,5	29,2	
19b		1,20 (m)					
20	40,7	1,50 (m)	H-15; H-19; H-21	-	39,1	40,7	
21a	61,9	2,97 (dd, 3,0; 11,0 Hz)	-	H-3; H-14a/H-14b	60,5	61,9	
21b		2,20 (q, 11,0 Hz)					
C=O	176,6	-	H-16	OCH ₃	175,0	176,5	
OCH ₃	52,4	3,81 (s, 3H)	-	-	51,6	52,3	

AUCC-2 (δ_{C} , ppm, 500 x 125 MHz; CD₃OD), $^1(\text{CDCl}_3)$; $^2(500 \times 125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$

Figura 44 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-2 (Pastilha de KBr).

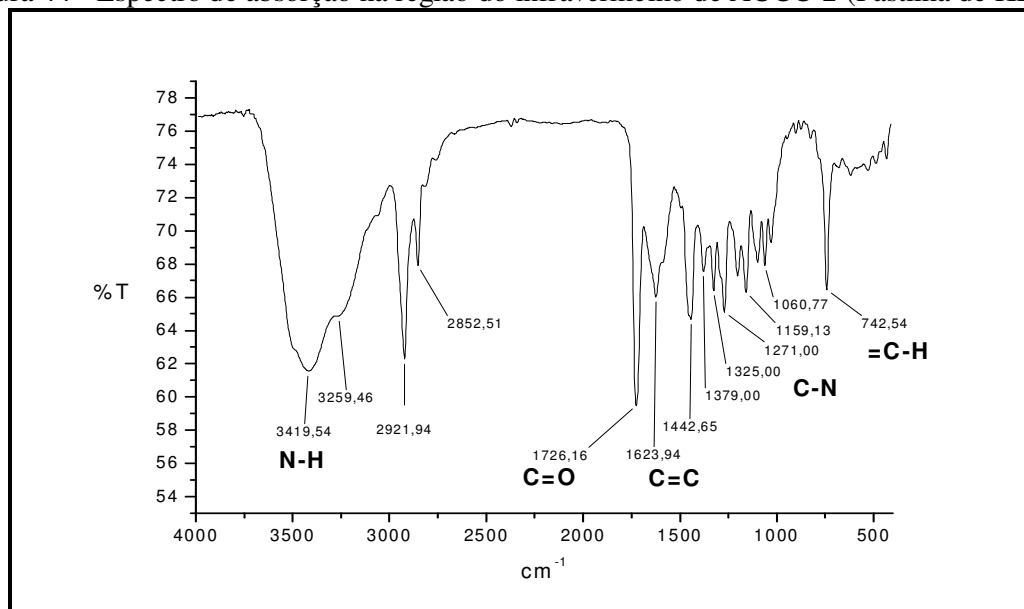


Figura 45 - Espectro de massa de AUCC-2 (fonte APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

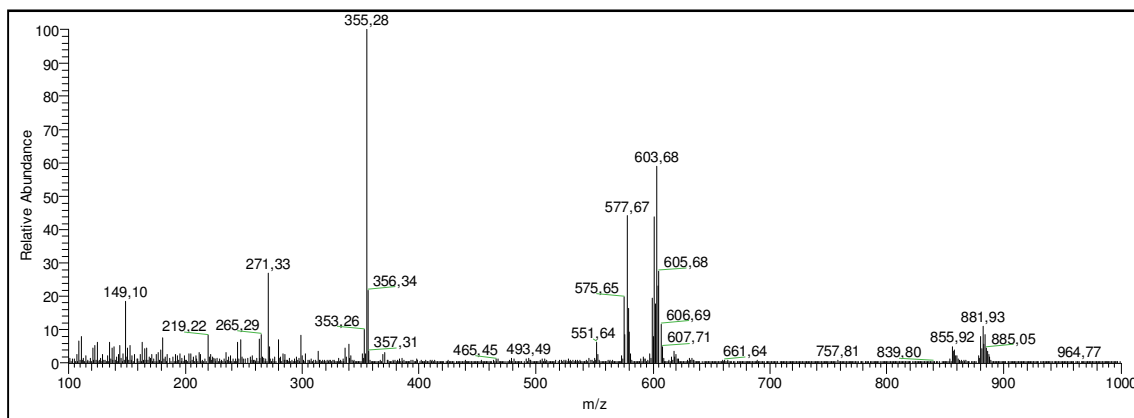


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H de AUCC-2 (500 MHz, CD_3OD) com expansões.

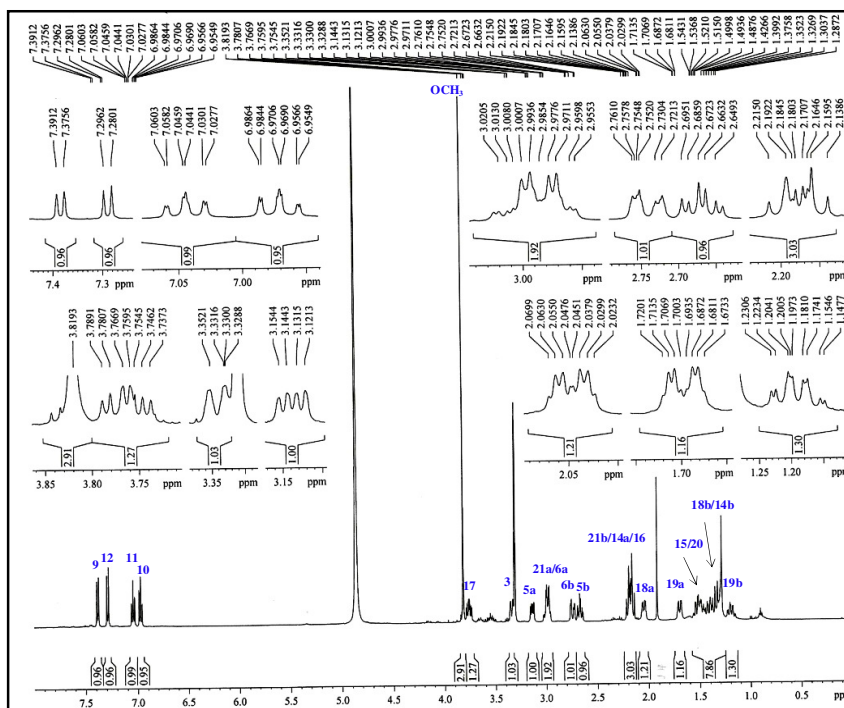


Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-2.

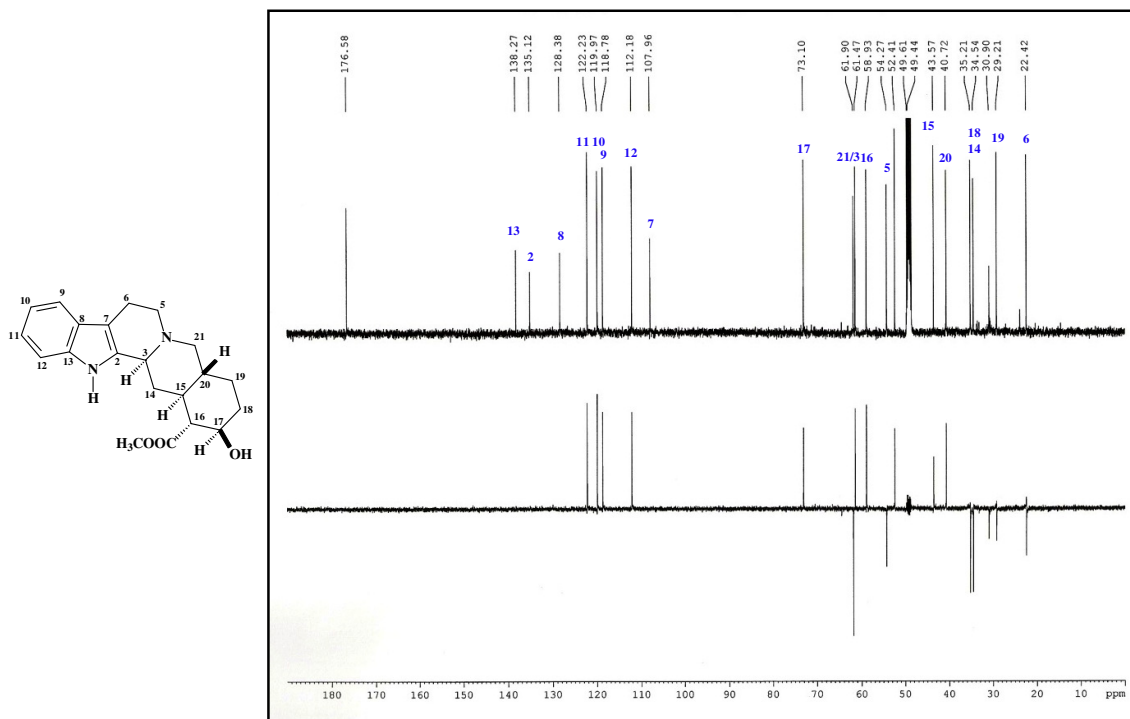


Figura 48 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-2.

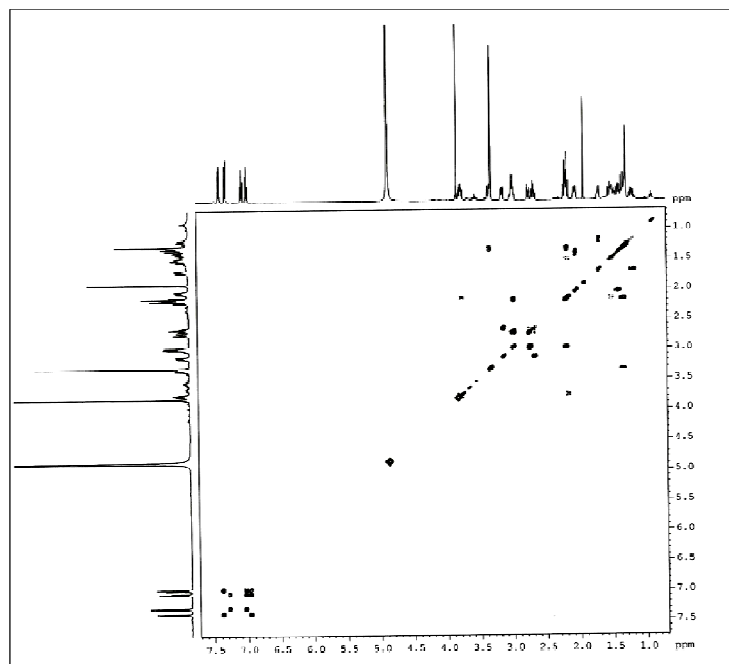


Figura 49 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2.

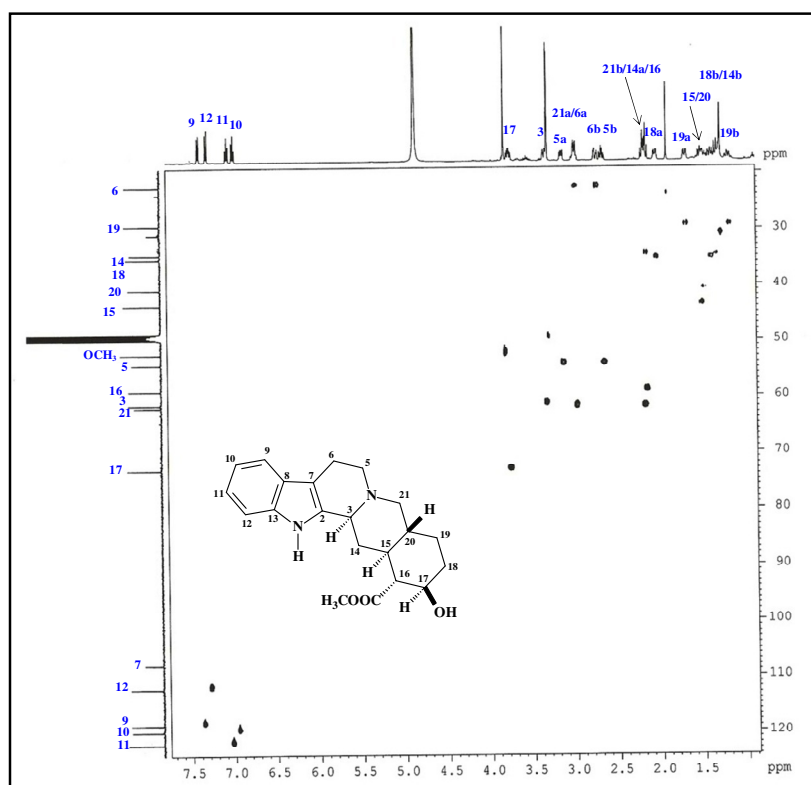


Figura 50 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2.

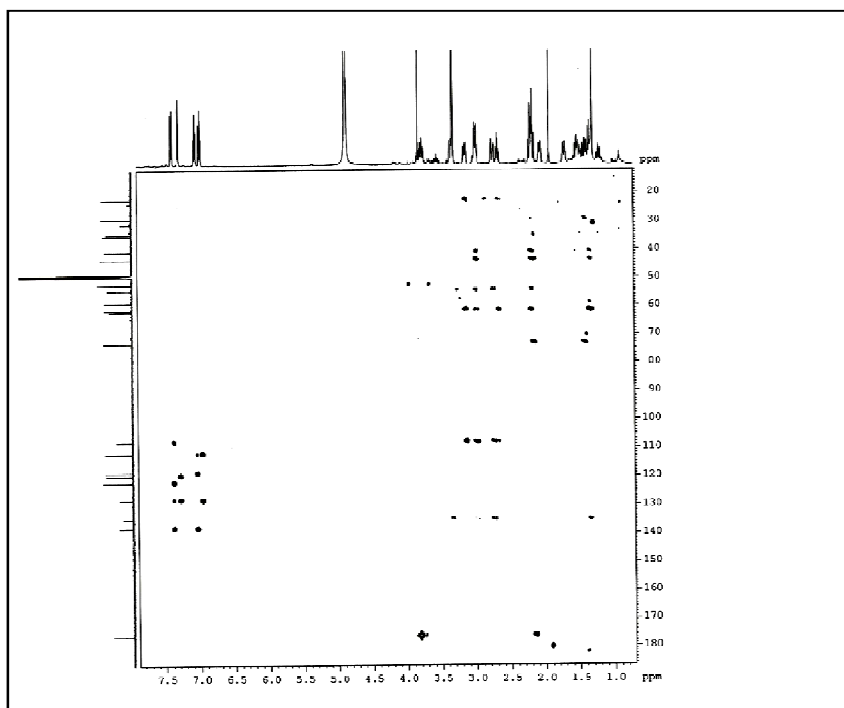


Figura 51 – Expansão do Espectro RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de AUCC-2.

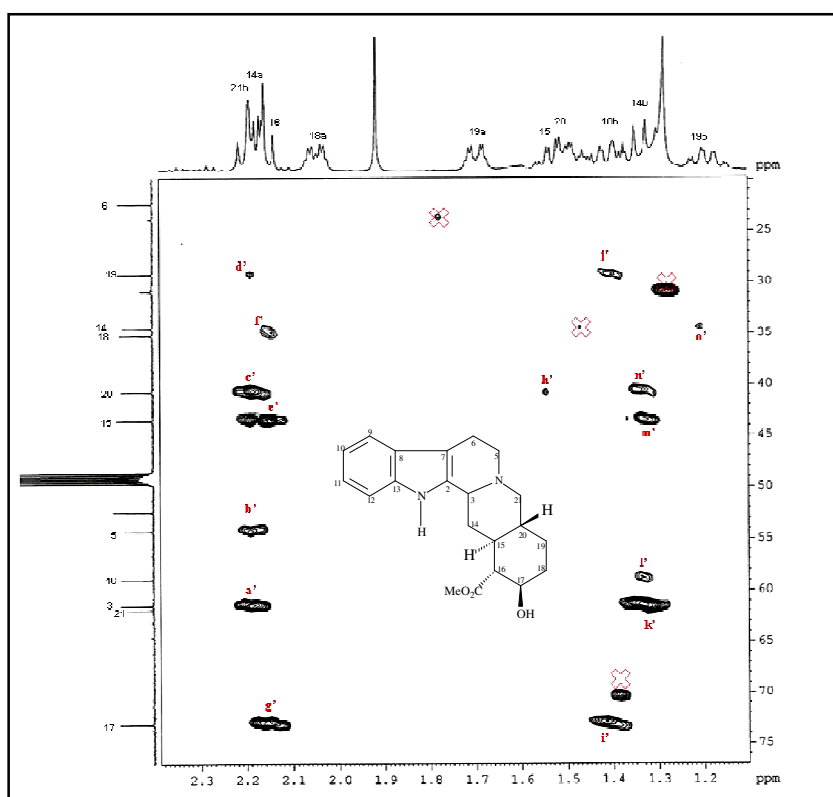


Figura 52 – Expansão do Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD $_3$ OD, 500 x 125 MHz) de AUCC-2.

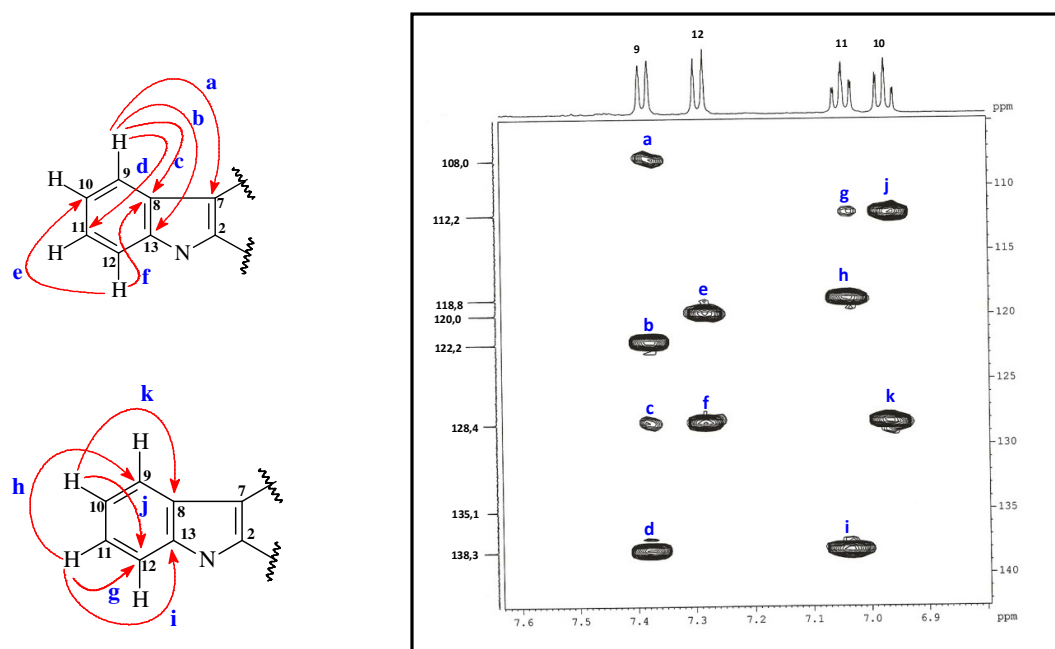


Figura 53 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H - NOESY de AUCC-2.

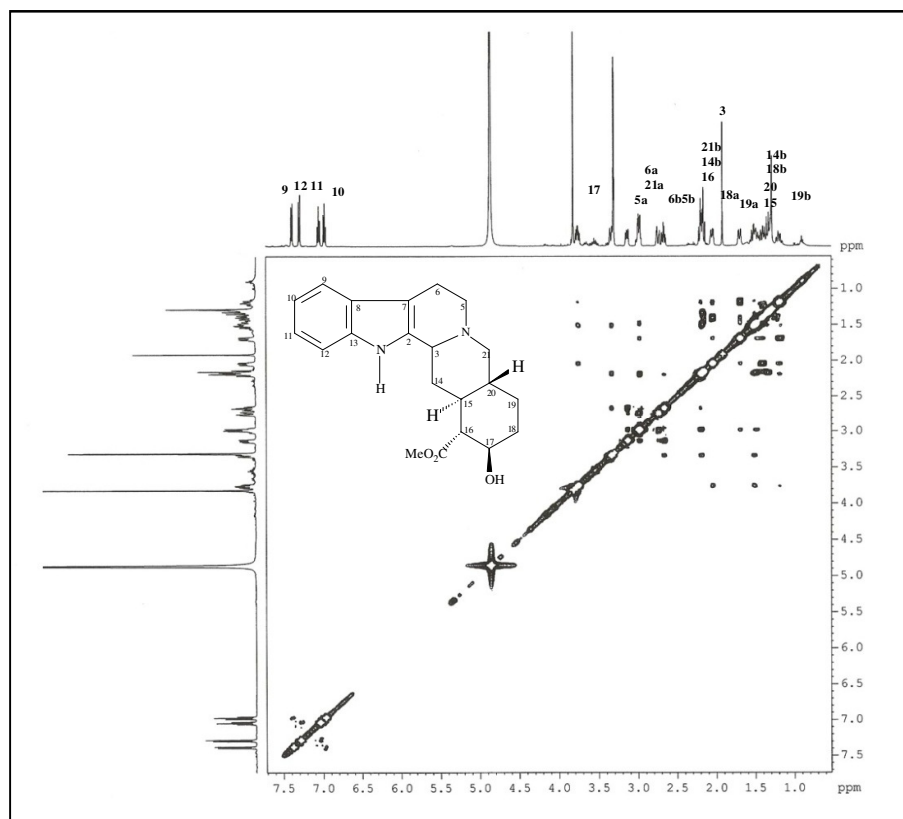
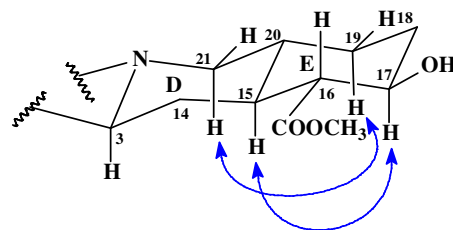
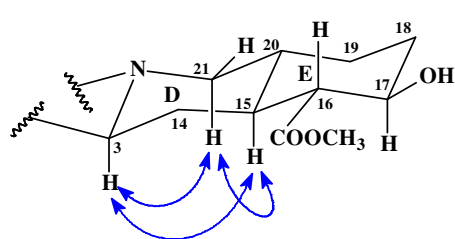
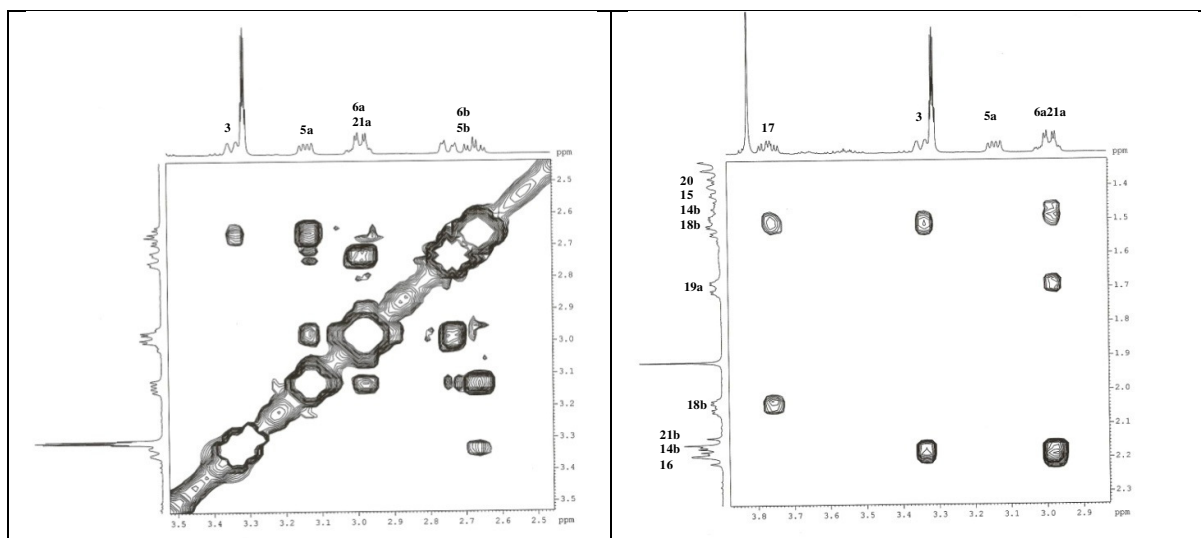


Figura 54 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-2 e expansões e subestrutura mostrando algumas correlações.



4.4 Determinação Estrutural de AUCC-3

Sucessivos fracionamentos cromatográficos a partir da fração hidrometanólica do extrato etanólico da casca do caule de *A. ulei* levou ao isolamento de 25,0 mg de um sólido amarelo, homogêneo em CCD, com ponto de fusão 260-264 °C e $[\alpha]_D^{25} = +175,4^\circ$ (c 0,33, CH₃OH), o qual foi denominado AUCC-3 (Parte Experimental p. 230).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 59, p. 85) mostrou uma banda larga entre 3600-2500 cm⁻¹, característica de deformação axial de ligação O-H, uma banda larga em 3344 cm⁻¹ (sobreposta pela hidroxila), correspondente a uma deformação axial de ligação N-H, caracterizando amina aromática; vibrações de deformação axial da ligação C-N aromático em 1321 cm⁻¹ e alifático em 1278 e 1166 cm⁻¹. Também foram observadas bandas correspondentes a deformação axial da ligação C=O em 1733 cm⁻¹ evidenciando a presença de carbonila, além de bandas em 3060 cm⁻¹ associada à deformação axial de ligação =C-H e outra banda em 1637 cm⁻¹ referente a deformação axial da ligação C=C.

No espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CD₃OD, Figuras 61 e 62, p. 85 e 87), foram observadas 21 linhas espectrais, que após comparação com o espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HSQC (Figura 63, p. 87) foi possível assinalar seis sinais associados a carbonos mono hidrogenados aromáticos δ_C 113,9 (δ_H 7,66); 123,2 (7,38); 124,0 (8,25); 132,9 (7,71), δ_C 116,9 (δ_H 8,36) e δ_C 134,0 (δ_H 8,24), quatro sinais atribuídos a carbonos metínicos (δ_C 58,3 (δ_H 2,35); 36,9 (2,21); 36,5 (2,12) e 72,3 (3,82). Quatro carbonos metilênicos (δ_C 60,9 (δ_H 4,32 e 4,79); 31,1 (3,18 e 3,55); 34,4 (2,14 e 1,54) e 28,2 (2,03 e 1,40), um sinal atribuído a uma metoxila em δ_C 52,7 (δ_H 3,84), além de 6 carbonos não hidrogenados (δ_C 175,5; 145,4; 140,5; 135,5; 132,6 e 121,4). Esses dados, por padrão de hidrogenação, podem ser conferidos na Tabela 8 (p.80).

O sinal em δ_C 72,3 (δ_H 3,82) foi atribuído a um carbono oximetínico, enquanto que o sinal em δ_C 175,5 foi relacionado a um carbono carbonílico de éster, como já observado no espectro no infravermelho (Figura 59, p. 85).

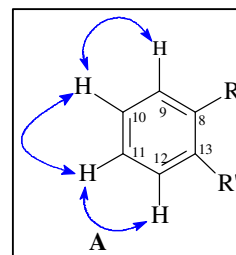
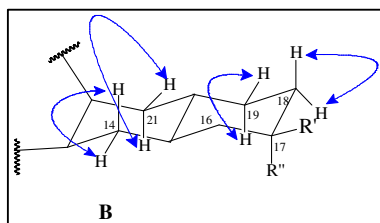
O espectro de massa de alta resolução (IES-EM, Figura 58, p. 85), revelou o pico da molécula protonada em $[M + H]^+ = 351,1748$, sugerindo uma fórmula molecular de C₂₁H₂₂N₂O₃, quatro unidades a menos que o composto anterior β -ioimbina.

Tabela 8 - Deslocamento químico de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH_2	CH_3
175,5	134,0	60,9	53,7
145,4	132,9	34,4	-
140,5	124,0	31,1	-
135,5	123,2	28,2	-
132,6	116,9	-	-
121,4	113,9	-	-
-	72,3	-	-
-	58,3	-	-
-	36,9	-	-
-	36,5	-	-
C_6	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}$	C_4H_8	CH_3
Total: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}$			

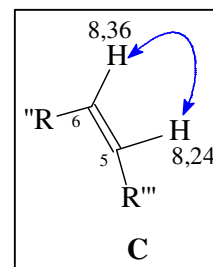
No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Figura 60, p. 86), foi caracterizada a presença de quatro sinais em região de desproteção característicos de hidrogênios de um sistema indólico em δ_{H} 7,38 (dd, 6,5 e 7,0 Hz, H-10); δ_{H} 7,66 (d, 8,0 Hz, H-12); δ_{H} 7,71 (dd, 6,5 e 7,0 Hz, H-11) e δ_{H} 8,25 (d, 6,5 Hz, H-9), além de um sinal em δ_{H} 3,84 (s, 3H) atribuído a um grupamento metoxila. Também foi observado um par de hidrogênios desprotegidos em δ_{H} 8,24 (d; 6,7 Hz, 1H) e δ_{H} 8,36 (sl, 1H). Os dados encontram-se listados na Tabela 9 (p. 82).

O espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figura 65, p. 88), apresentou os acoplamentos vicinais entre os hidrogênios aromáticos do sistema indólico (subestrutura **A**), além de todos os acoplamentos geminais para os hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,18 (H-14 α) e δ_{H} 3,55 (H-14 β), δ_{H} 4,79 (H-21 β) e δ_{H}

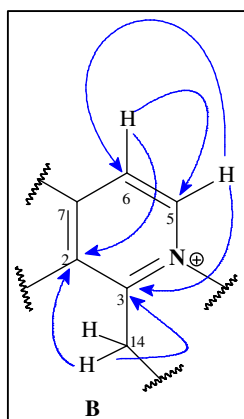
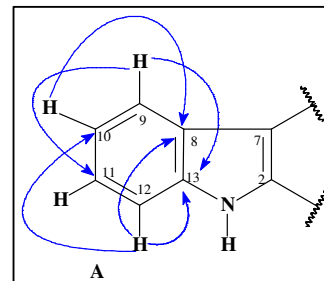


4,72 (H-21 α); δ_{H} 1,40 (H-19 α) e δ_{H} 2,03 (H-19 β); δ_{H} 1,54 (H-18 α) e δ_{H} 2,14 (H-18 β), subestrutura **B**, confirmando os dados observados para o HSQC, adicionalmente uma posição *trans* diaxial dos prótons H-15 e H-20.

Os acoplamentos vicinais encontradas para os hidrogênios em δ_H 8,24 (d; 6,7 Hz, 1H, H-5) e δ_H 8,36 (sl, 1H, H-6) foram atribuídos aos prótons aromáticos H-5 e H-6 que podem ser conferidos na subestrutura **C**. Esses prótons aromáticos já mencionados apresentaram uma similaridade nos deslocamentos e multiplicidades, levando-se a pensar em um esqueleto β -carbolínico quaternário.



Em adição, foram observadas as correlações no espectro heteronuclear de 1H , ^{13}C -HMBC (Figura 64, p. 88) dos hidrogênios em δ_H 8,36 (H-6) a $^3J_{CH}$, com o carbono em δ_C 135,5 (C-2); δ_H 7,38 (H-10) e δ_H 7,66 (H-12) com os carbonos em δ_C 121,4 (C-8) e δ_C 123,2 (C-10); H-9 em δ_H 8,25 com os carbonos em δ_C 132,9 (C-11) e δ_C 145,4 (C-13) e δ_H 7,38 (H-10) com 113,9 (C-12), além da correlação de δ_H 7,66 (H-12) com δ_C 145,4 (C-13) confirmando a presença de um anel indólico observado na subestrutura **A**.



O sistema β -carbolínico quaternário (subestrutura **B**) foi confirmado pelas correlações dos hidrogênios em δ_H 8,25 (H-5) com δ_C 140,5 (C-3); δ_H 3,18 (H-14 α) e δ_H 3,55 (H-14 β) com o carbono δ_C 140,5 (C-3); δ_H 8,36 (H-6) com δ_C 134,0 (C-5); δ_H 8,24 (H-5) com δ_C 116,9 (C-6); δ_H 3,55 (H-14 β) e δ_H 8,36 (H-6) com o carbono δ_C 135,5 (C-2), corroborando a presença de um alcaloide β -carbolínico pirídínico.

Outras correlações foram observadas e listadas na Tabela 10 (p. 84) e na subestrutura apresentada na Figura 55 (p. 81).

Figura 55 - Algumas correlações à longa distância, observadas através do espectro de HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) para a subestrutura de AUCC-3.

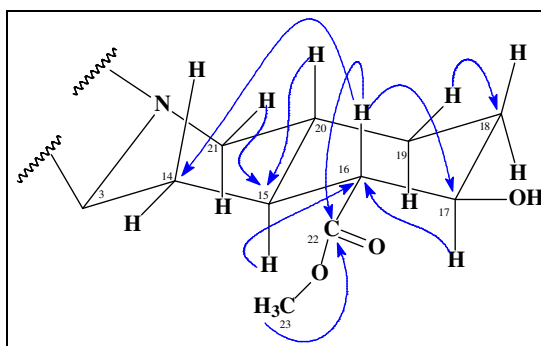


Tabela 9 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para AUCC-3 e comparação com os dados da literatura para o alcaloide 3,4,5,6-tetra-desidroioimbina (STAHL; BORSCHBERG, 1996)² e (WACHSMUTH, 2002)³.

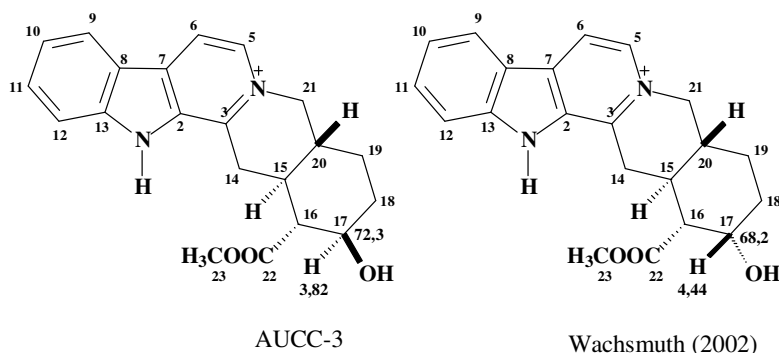
C	#	¹ AUCC-3		² Liter.		³ Liter.
		δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
2	C	135,5	-	135,5	135,5	-
3	C	140,5	-	145,2	141,6	-
5	CH	134,0	8,24 (d; 6,7 Hz)	133,9	133,8	8,29 (d, 6,6 Hz)
6	CH	116,9	8,36 (sl)	116,7	116,6	8,43 (d, 6,6 Hz)
7	C	132,6	-	132,3	132,4	-
8	C	121,4	-	121,4	121,4	-
9	CH	124,0	8,25 (d, 6,5 Hz)	123,1	123,9	8,32 (dd, 8,0 e 1,0 Hz)
10	CH	123,2	7,38 (dd, 6,5 e 7,0 Hz)	124,0	123,1	7,43 (ddd, 8,0; 7,0; 0,9 Hz)
11	CH	132,9	7,71 (dd, 6,5 e 7,0 Hz)	132,7	132,7	7,75 (ddd, 8,3; 7,0; 1,0 Hz)
12	CH	113,9	7,66 (d, 8,0 Hz)	113,9	113,8	7,71(dd, 8,3; 0,9 Hz)
13	C	145,4	-	141,5	145,2	-
14	CH ₂	31,1	3,18 (dd; 11,0 e 18,0 Hz)	31,2	31,6	4,06 (dd, 18,7 e 5,0 Hz, H α)
			3,55 (dd; 3,8 e 18,0 Hz)			3,08 (dd, 18,7 e 10,1 Hz, H β)
15	CH	36,9	2,21(m)	31,1	31,2	2,62 (dddd, 10,1; 10,1;10,1 e 5,0 Hz)
16	CH	58,3	2,35 (t, 10,3 Hz)	53,5	53,5	2,62 (m, 1H)
17	CH	72,3	3,82 (m)	68,2	68,2	4,44 (m, 1H)
18	CH ₂	34,4	2,14 (m)	32,6	32,6	2,03(dddd, 13,5; 2,8; 2,8 e 2,8 Hz, H α)
			1,54 (m)			1,82(dddd, 13,5; 13,2; 4,8 e 2,2 Hz, H β)
19	CH ₂	28,2	1,40 (m)	23,0	23,0	1,77-1,69 (m, 2H)
			2,03(m)			
20	CH	36,5	2,12 (m)	36,8	36,8	2,12 (m, 1H)
21	CH ₂	60,9	4,32 (t, 12,0 Hz)	61,0	61,0	4,44 (dd, 13,3 e 13,0 Hz, H α)
			4,79 (d, 12,0 Hz)			4,78 (dd, 13,3 e 4,5Hz, H β)
C=O	C	175,5	-	174,3	174,3	-
OCH ₃	CH ₃	52,7	3,84 (s)	52,5	52,4	3,81(s, 3H)

δ_{C} (ppm) ^{1,3}(CD₃OD, 500 x 125 MHz); ² (CD₃OD, 400 x 100).

Com base nos dados observados no espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY de AUCC-3 (Figura 66, p. 89), a análise detalhada do espectro permitiu a determinação da estereoquímica relativa do composto, através de um acoplamento dipolar dos prótons em δ_{H} 2,35 (t, 10,3 Hz, H-16) com δ_{H} 2,12 (m; H-20), indicando uma posição trans diaxial entre o H-15, em δ_{H} 2,21(m) e H-20 em δ_{H} 2,12 (m).

Também foi observado acoplamento dipolar de H-17 em δ_{H} 3,82 (m) com H-19 α em δ_{H} 1,40 (m) e H-15 em δ_{H} 2,21 (m), corroborando com o posicionamento da hidroxila em β -equatorial e o grupo éster em α -equatorial (Figura 56, p. 83).

Figura 56 - Comparação de AUCC-3 com o alcaloide quaternário 3,4,5,6-tetra-desidroioimbina da literatura.



Esses dados diferem dos dados da literatura relatados para a substância 3,4,5,6-tetra-desidroioimbina em que Wachsmuth (2002), atribuiu o deslocamento químico de H-17 em δ_{H} 4,44 (m, 1H β). Já AUCC-3, o valor de deslocamento químico observado para H-17 em δ_{H} 3,82, reforça que AUCC-3 seja um epímero de 3,4,5,6-tetradésidroioimbina (Figura 56, p. 83).

Esses dados também foram corroborados com os dados do mesmo composto (3,4,5,6-tetradésidroioimbina), sintetizado por STAHL e BORSCHBERG (1996), que apresenta similaridade nos deslocamentos químicos, porém diferente estereoquímica em C-17.

Desta forma, AUCC-3 foi caracterizada como 3,4,5,6-tetradésidro-17 β -hidroxi-16 α -metoxicarbonila-(16 α ,17 β)-ioimbina (Figura 57, p. 84), um alcaloide indólico relatado pela primeira vez para *Aspidosperma ulei*, mas já isolado de *A. oblongum* em semisíntese (ROBERT *et al.*, 1983), porém sem dados de RMN.

Tabela 10 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 500 x 125 MHz) para AUCC-3

C	δ_{C}	AUCC-3		HMBC	
		δ_{H} (mult, J, Int)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2	135,5	-	-	H-6; H-14 β	
3	140,5	-	H-14 α ; H-14 β	H-5; H-15; H-21 β	
5	134,0	8,24 (d; 6,7 Hz, 1H)	H-6	-	
6	116,9	8,36 (sl, 1H)	H-5	-	
7	132,6	-	-	-	
8	121,4	-	-	H-10; H-12	
9	124,0	8,25 (d, 6,5 Hz)	-	-	
10	123,2	7,38 (dd, 6,5 e 7,0 Hz)	-	H-12	
11	132,9	7,71 (dd, 6,5 e 7,0 Hz)	-	H-9	
12	113,9	7,66 (d, 8,0 Hz)	-	H-10	
13	145,4	-	H-12	H-9	
14	31,1	3,18 (dd; 10,5 e 18,0 Hz, H α) 3,55 (dd; 3,8 e 18,0 Hz, H β)	-	H-16	
15	36,9	2,21(m, 1H)	H-14 β ; H-20	-	
16	58,3	2,35 (t, 10,5 Hz, 1H β)	H-17; H-15	H-14 α	
17	72,3	3,82 (m, 1H)	H-16	-	
18	34,4	1,54 (m, 1H) 2,14 (m, 1H)	H-19 α	H-16	
19	28,2	1,40 (m, 1H α) 2,03 (m, 1H β)	-	-	
20	36,5	2,12 (m, 1H β)	-	H-14 α ; H-14 β ; H-16	
21	60,9	4,32 (t, 12,0 Hz; 1H α) 4,79 (d, 12,0 Hz; 1H β)	-	-	
C=O	175,5	-	H-16	H-23	
OCH $_3$	52,7	3,84 (s, 3H)	-	-	

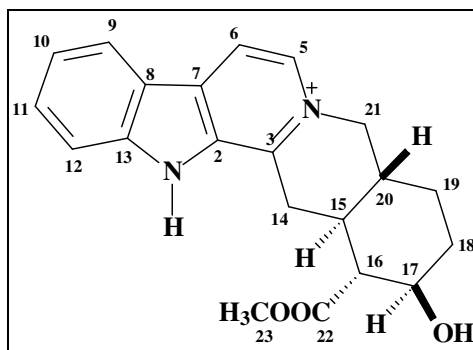
Figura 57 - Estrutura do alcaloide indólico 3,4,5,6-tetradesidro- β -ioimбина (AUCC-3).

Figura 58 - Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-3.

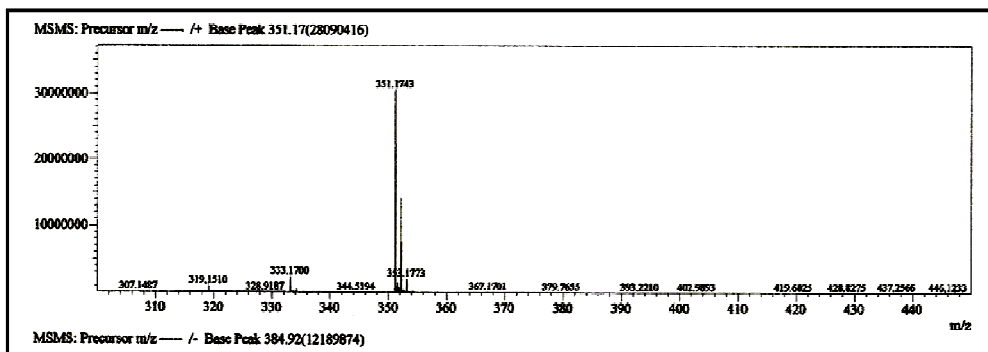


Figura 59 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-3 (Pastilha de KBr).

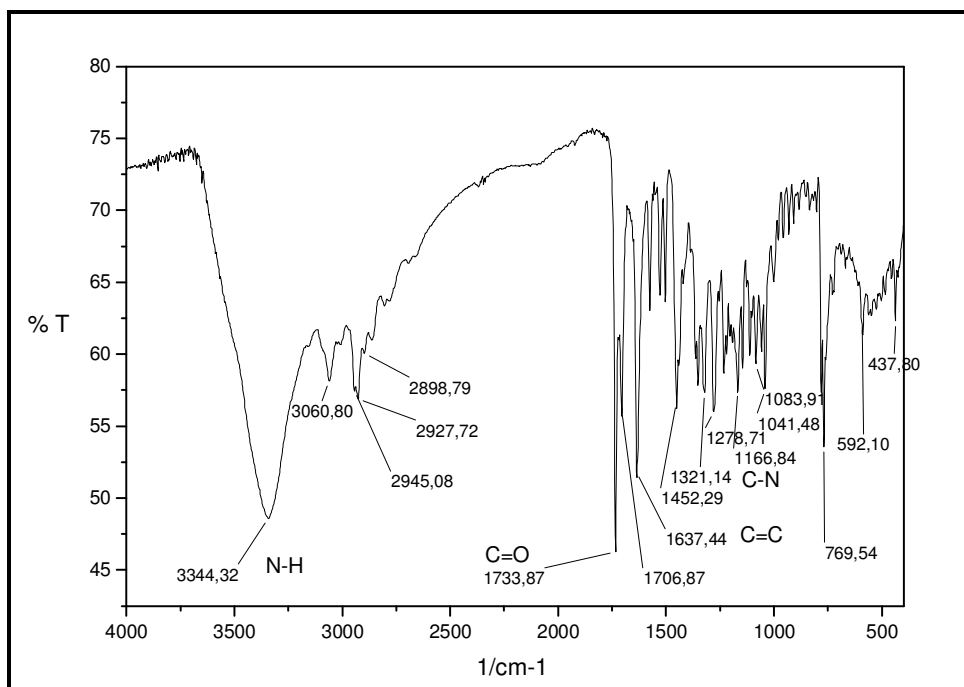


Figura 60 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC- 3 e expansões.

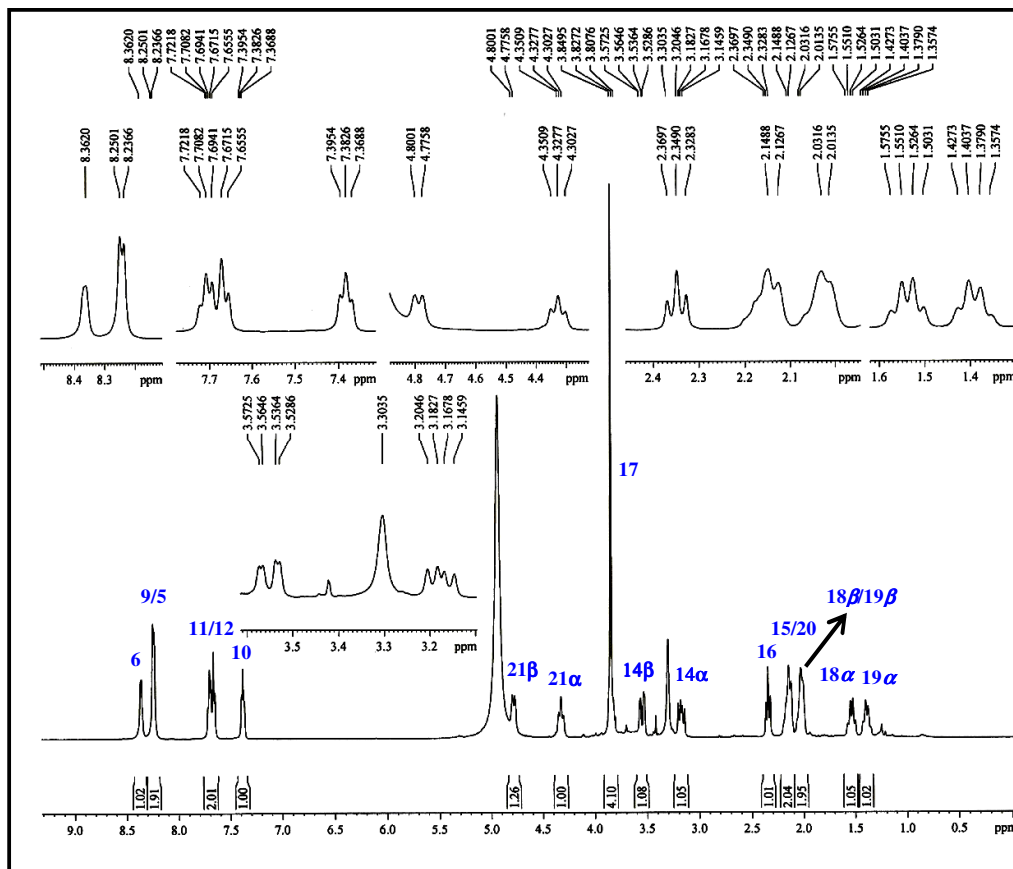


Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3.

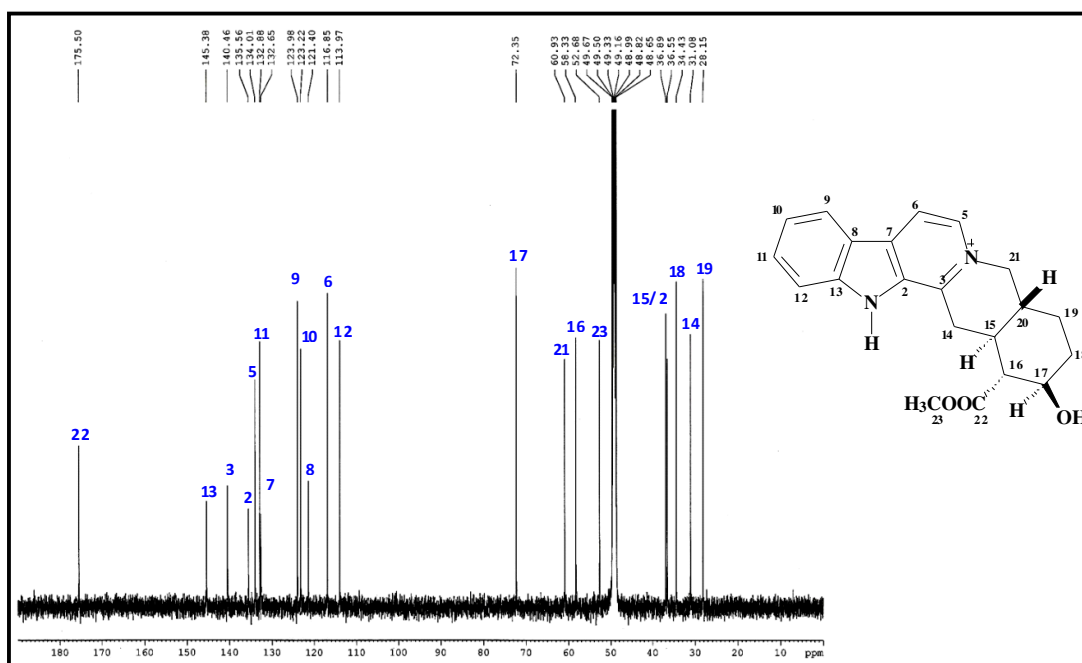


Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-3.

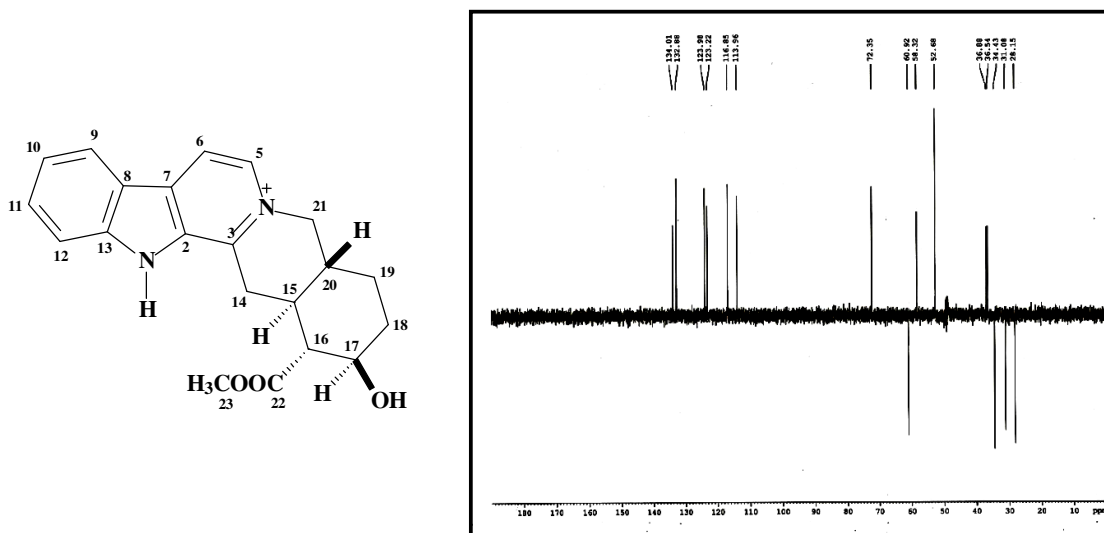


Figura 63 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de AUCC-3.

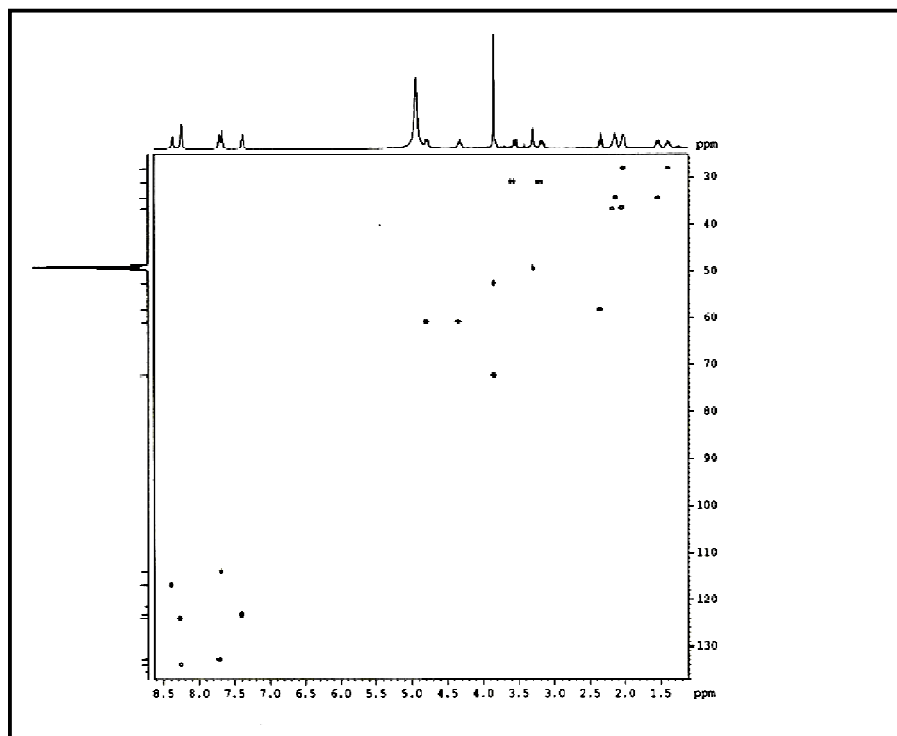


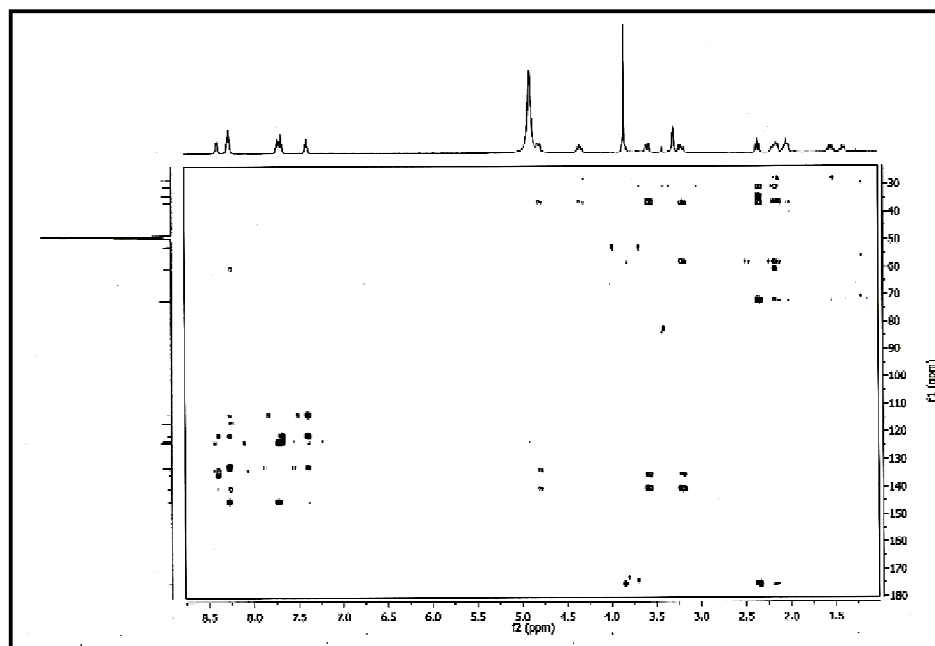
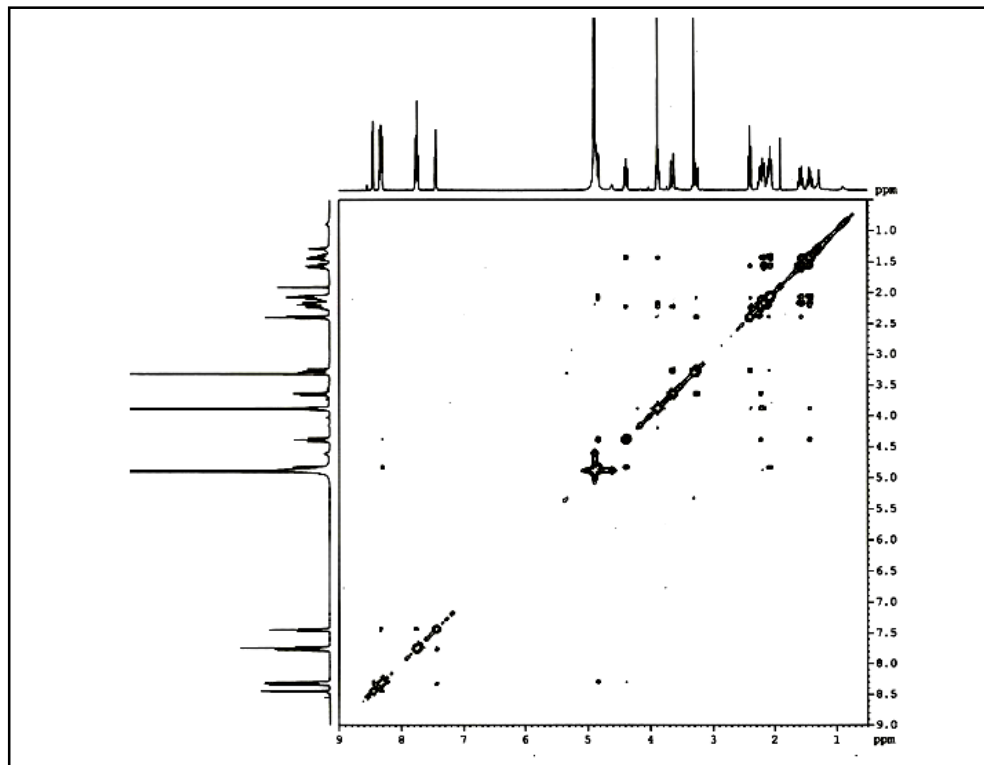
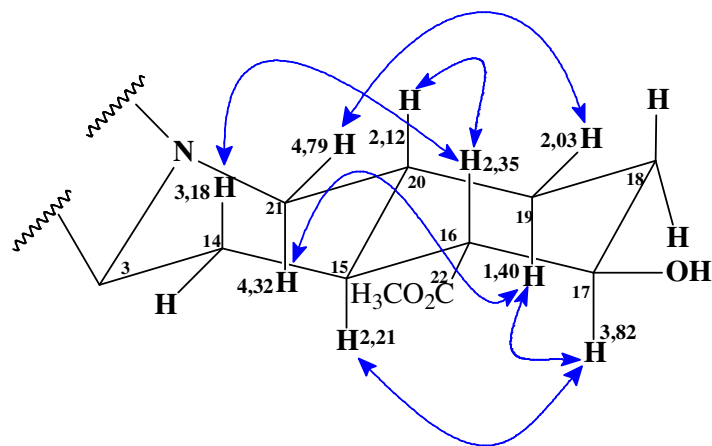
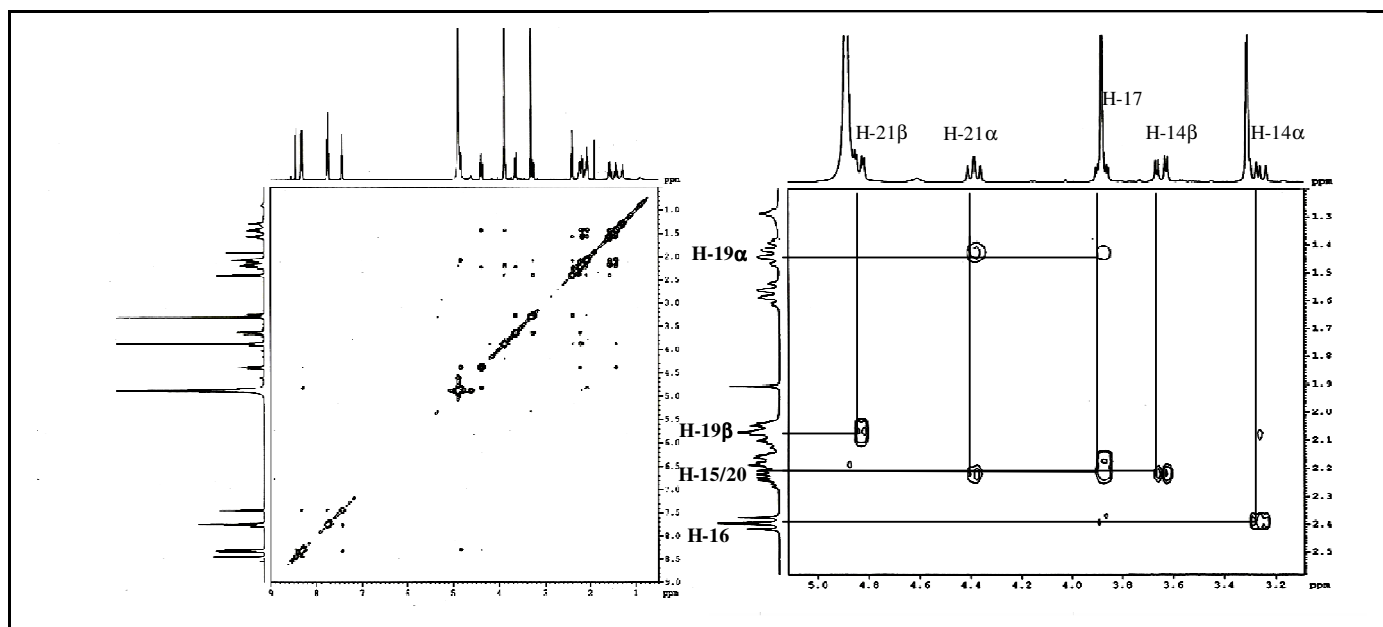
Figura 64 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 125 x 500 MHz) de AUCC-3Figura 65 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H - COSY de AUCC-3.

Figura 66 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-3 e correlações dipolares.



4.5 Determinação Estrutural de AUCC-4

Cromatografias de adsorção (sílica), exclusão (Sephadex LH-20) e purificação por CLAE da fração AUCCEM, produzida por particionamento do extrato etanólico da casca do caule forneceu 19,0 mg de um sólido amorfo, com ponto de fusão 226,0-228,0 °C, denominado AUCC-4 (Parte Experimental p. 233).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 72, p. 95) mostrou duas bandas largas em 3404 e 3228 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial da ligação N-H, caracterizando amina secundária aromática ou O-H. Em adição, foram observadas vibrações de deformação axial da ligação C-N de aromático em 1370 e 1296 cm^{-1} , e alifático em 1200 e 1124 cm^{-1} . Observou-se também bandas correspondentes a deformação axial de C=O em 1671 cm^{-1} , provavelmente de éster, e bandas esqueléticas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H aromático em 739 e 719 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , Figura 75, p. 96), foram observadas 21 linhas espectrais que, por comparação com o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (Figura 77, p. 97), apresentou os sinais em δ_{C} 120,8 (δ_{H} 7,07), 123,6 (7,17); 112,7 (7,38) e 119,2 (7,49), foram associados a carbonos mono hidrogenados de anel aromático. Cinco sinais em δ_{C} 35,8 (δ_{H} 2,27); 39,3 (1,74); 53,0 (2,46); 62,7 (4,60) e 68,3 (4,33) que foram atribuídos a carbonos metínicos, além de seis carbonos metilênicos, com deslocamentos em δ_{C} 20,4 (δ_{H} 3,24 e 3,08); 23,6 (1,64 e 1,59); 33,1 (2,85 e 1,59); 33,2 (2,00 e 1,74); 53,8 (3,76 e 3,50) e 59,6 (3,50 e 3,08), um carbono metílico, em δ_{C} 52,5 (δ_{H} 3,82), atribuído a uma metoxila, e cinco carbonos não hidrogenados, em δ_{C} 174,7; 138,7; 130,1; 127,5 e 107,0 identificados pela ausência de correlações no HSQC.

Um sinal em δ_{C} 68,3 (δ_{H} 4,33) foi atribuído a um carbono oximetínico e em δ_{C} 174,7, a um carbono carbonílico de éster, como indicado no espectro de infravermelho (Figura 72, p. 95).

O composto AUCC-4 exibiu em seu espectro de massa o pico do íon molecular com m/z igual a 355,25 Daltons, sugerindo uma fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$, com um IDH igual a dez (Figura 73, p. 95).

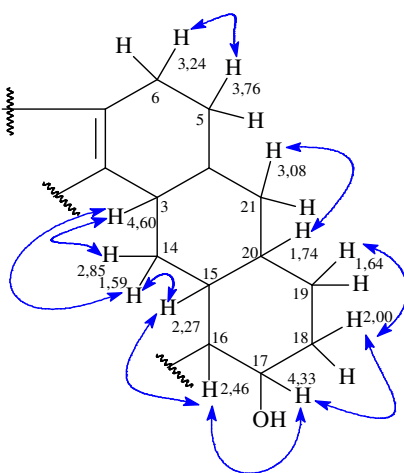
As absorções observadas no espectro DEPT 135° (Figura 75, p. 96), foram associadas a carbonos mono hidrogenados e foi possível afirmar que em δ_{C} 20,4; δ_{C} 23,6; δ_{C} 33,1; δ_{C} 33,2; δ_{C} 53,8 e δ_{C} 59,6 correspondiam a seis carbonos metilênicos.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Figura 74, p. 96), de AUCC-4 foi caracterizada a presença de quatro sinais correspondentes ao sistema indólico, em δ_{H} 7,38 (1H, d, 7,8 Hz); 7,49 (1H, d, 8,0 Hz); 7,07 (1H, t, 7,5 Hz) e 7,17 (1H, t, 7,5 Hz), um sinal em δ_{H} 3,82 (s, 3H) atribuído a um grupo metoxila. Os demais sinais encontram-se listados na Tabela 11 (p. 94).

Foi possível fazer as atribuições dos hidrogênios baseada na análise do espectro de RMN 2D de correlação homonuclear ^1H , ^1H -COSY (Figura 76, p. 97), através dos acoplamentos vicinais entre os hidrogênios δ_{H} 4,60 (H-3) \leftrightarrow δ_{H} 2,85 e 1,59 (H-14); 4,33 (H-17) \leftrightarrow 2,46 (H-16) e (H-18); δ_{H} 3,08 (H-21) \leftrightarrow 1,74 (H-20); δ_{H} 3,76 (H-5) \leftrightarrow 3,24 (H-6); δ_{H} 2,27 (H-15) \leftrightarrow 2,46 (H-16) e 1,59 (H-14); δ_{H} 2,00 (H-18) \leftrightarrow 1,64 (H-19). Além destes, foram observados acoplamentos escalares para os hidrogênios geminais em δ_{H} 2,85 (H-14a) \leftrightarrow 1,59 (H-14b) e δ_{H} 2,00 (H-18a) \leftrightarrow 1,74 (H-18b), conforme Figura 67.

O H-3 deveria apresentar uma multiplicidade de tripleto, acoplando com os dois hidrogênios do H-14. No entanto isso não ocorre, pois só um hidrogênio do H-14 acopla com o H-3, originando um duplete. Isso acontece devido ao ângulo diédrico de 90° que o H-3 faz com um hidrogênio do H-14 (Ver Figura 67, p. 91).

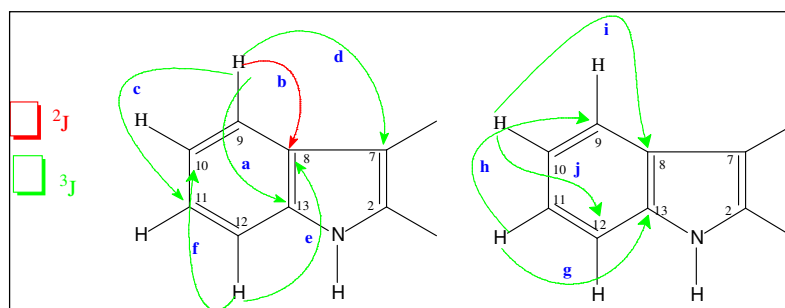
Figura 67 - Subestruturas mostrando correlações vicinais e geminais observadas no espectro de COSY para AUCC-4



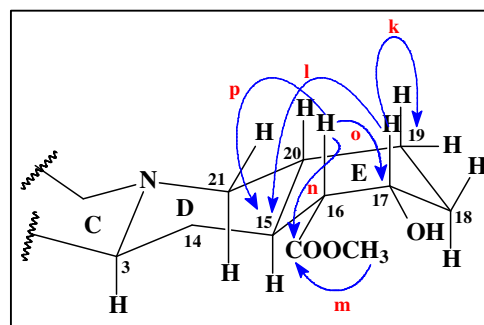
No espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 78, p. 98), observou-se as correlações a $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ dos carbonos em AUCC-4 (Figura 68, p. 92), ou seja, as correlações dos hidrogênios do sistema indólico em δ_{H} 7,49 (H-9) com os carbonos δ_{C} 138,6 (C-13, a); δ_{C} 127,5 (C-8, b); δ_{C} 123,6 (C-11, c) e δ_{C} 107,0 (C-7, d); δ_{H} 7,38 (H-12) com δ_{C} 127,5 (C-8, e) e

120,8 (C-10, f); δ_{H} 7,17 (H-11) com δ_{C} 138,6 (C-13, g) e δ_{C} 119,2 (C-9, h); δ_{H} 7,07 (H-10) com δ_{C} 127,5 (C-8, i) e δ_{C} 112,7 (C-12, j).

Figura 68 - Correlações a duas e três ligações de ^1H , ^{13}C -HMBC de AUCC-4.



Verificou-se também correlações a duas e a três ligações de δ_{H} 4,33 (H-17) com δ_{C} 23,3 (C-19, k) e δ_{C} 35,8 (C-15, l); δ_{H} 3,82 (H-23) com δ_{C} 174,7 (C-22, m); δ_{H} 2,46 (H-16) com δ_{C} 174,7 (C-22, n); δ_{C} 68,3 (C-17, o) e δ_{C} 35,8 (C-15, p), figura ao lado.



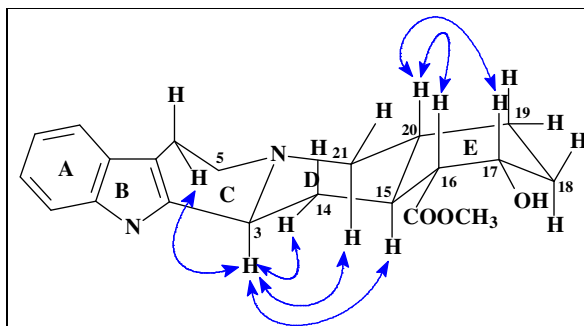
Os dados encontram-se listados na Tabela 11 (p. 94).

A comparação de AUCC-4 com o alcaloide ioimbina da literatura (WENKERT *et al.*, 1976) pôde ser completamente estabelecida pelo espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY, (Figuras 79 e 80, p. 99), em que observou-se o acoplamento dipolar do hidrogênio δ_{H} 4,60 (H-3) e 3,50 (H-21a). E, principalmente, H-16 em δ_{H} 2,46 e H-20 em δ_{H} 1,74 e H-17 em δ_{H} 4,33 e H-20 em δ_{H} 1,74, indicando uma posição axial entre os hidrogênios H-16, H-17 e H-20.

Conforme discutido, estabeleceu-se a hidroxila em posição alfa (em C-17), confirmando a estereoquímica relativa da molécula apresentada na Figura 70 (p. 93).

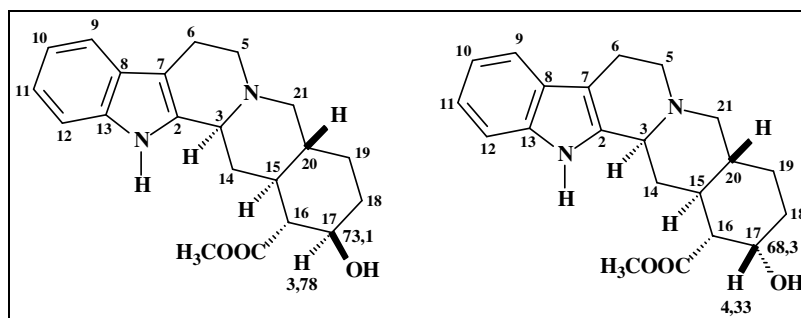
Foi observado também, que devido ao gasto de energia, ser mínimo na conformação em bote (anel E), a substância AUCC-4 (Figura 69, p. 93), apresentou-se nesta conformação.

Figura 69 - Correlações observadas no espectro de NOESY para AUCC-4.



Os compostos AUCC-4 e β -ioimbina (AUCC-2) são diastereoisômeros diferindo apenas na posição da hidroxila em C-17. Em AUCC-4, o H-17 está na posição β , diferindo de AUCC-2 que está na posição α . Essa observação se faz pela diferença no deslocamento químico de C-17/H-17 de AUCC-4 (C 68,3/ H 4,33) e AUCC-2 (β -ioimbina) em δ_C 73,1/ δ_H 3,78, Figura 70 (p. 93).

Figura 70- Comparação de AUCC-2 (β -ioimbina) com AUCC-4



Com base nos dados apresentados e comparação com os dados da literatura (WENKERT *et al.*, 1976), pôde-se propor que AUCC-4 tratava-se de um alcaloide indólico do tipo ioimbano, esqueleto corinantiano, relatado pela primeira vez para a espécie e denominado de 17α -hidroxi-ioimbano- 16α -carboxilato de metila ou ioimbina (Figura 71, p. 94).

De acordo com Dewick (2009), a ioimbina é largamente encontrada nas cascas de *Pausinnystalia yoimbe* – Rubiaceae, além de espécies de *Aspidosperma* - Apocynaceae. É usada popularmente como afrodisíaca e estudos farmacológicos atestam sua indicação para problemas de disfunção erétil, atuando na dilatação dos vasos sanguíneos.

Figura 71 - Alcaloide indólico ioimbina ou 17 α -hidroxi-ioimbano-16 α -carboxilato de metila (AUCC-4).

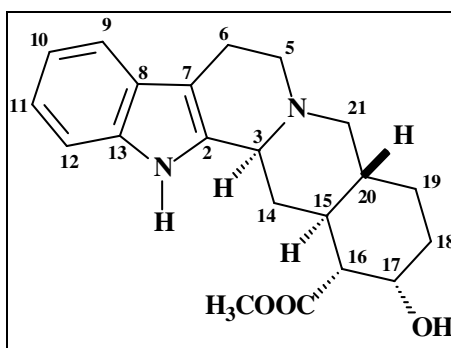


Tabela 11 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-4 e comparação com os dados da literatura para os alcaloides ioimbina (WENKERT *et al.*, 1976)² e β -ioimbina (AUCC-2)³.

C	#	¹ AUCC-4		HMBC		² Liter.	³ AUCC-2
		δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Int)	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ_{C}	δ_{C}
2	C	130,1	-	-	-	134,2	135,1
3	CH	62,7	4,60 (d, 11,4 Hz)	-	-	59,8	61,5
5a	CH ₂	53,8	3,76 (m)	-	-	52,1	54,3
5b			3,50 (m)				
6a	CH ₂	20,4	3,24 (m)	-	-	21,5	22,4
6b			3,08 (d; 11,9 Hz)				
7	C	107,0	-	-	H-9	107,5	108,0
8	C	127,5	-	H-9	H-12; H-10	127,0	128,4
9	CH	119,2	7,49 (d; 8,0 Hz)	-	H-11	117,7	118,8
10	CH	120,8	7,07 (t; 7,5 Hz)	-	H-12	118,8	120,0
11	CH	123,6	7,17 (t; 7,5 Hz)	-	H-9	120,8	122,2
12	CH	112,7	7,38 (d; 8,0 Hz)	-	H-10	110,6	112,2
13	C	138,7	-	-	H-9; H-11	135,8	138,3
14a	CH ₂	33,1	2,85 (d; 13,5 Hz)	-	-	33,8	34,5
14b			1,59 (m)				
15	CH	35,8	2,27 (m)	H-16	H-17	36,4	43,6
16	CH	53,0	2,46 (d; 1,7 Hz)	-	-	52,6	58,9
17	CH	68,3	4,33 (s)	H-16	-	66,9	73,1
18a	CH ₂	33,2	2,00 (d; 2,0 Hz)	-	-	31,4	35,2
18b			1,74 (m)				
19a	CH ₂	23,6	1,64 (m)	-	H-17	23,1	29,2
19b			1,59 (m)				
20	CH	39,3	1,74 (m)	-	-	40,2	40,7
21a	CH ₂	59,6	3,50 (m)	-	-	61,0	61,9
21b			3,08 (d; 11,9 Hz)				
22	C=O	174,7	-	H-16	H-23	175,1	176,6
23	OCH ₃	52,5	3,82 (s; 3H)	-	-	51,7	52,4

^{1,3}(500 x 75 e 125 MHz; CD₃OD); ²(CDCl₃)

Figura 72 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-4 (UATR)

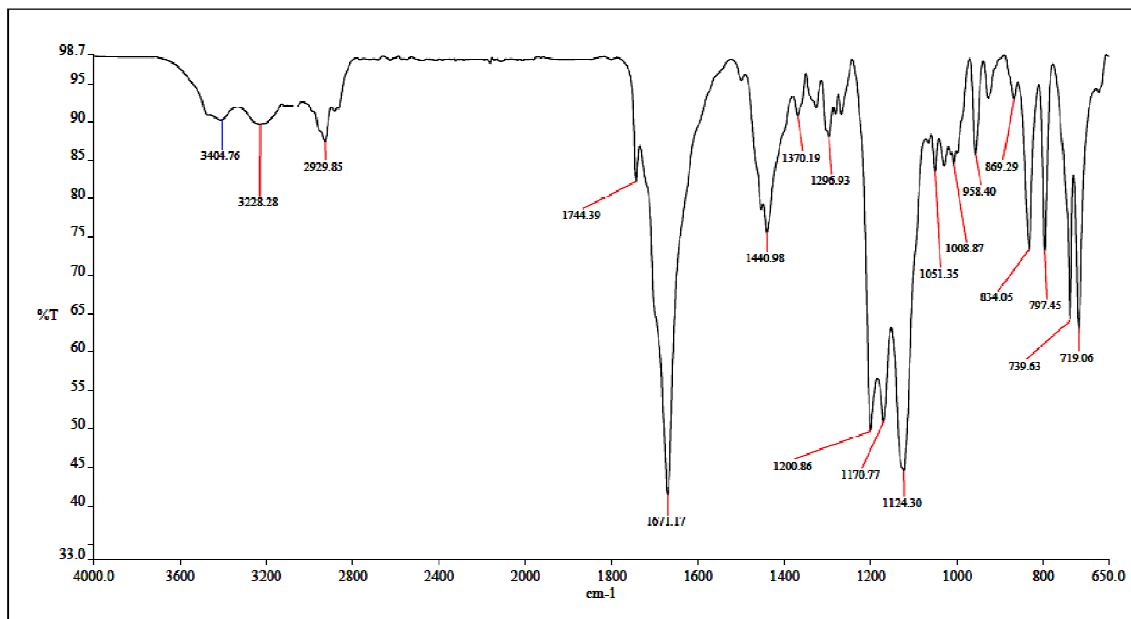


Figura 73 - Espectro de massa (analisada por fonte APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization) de AUCC-4.

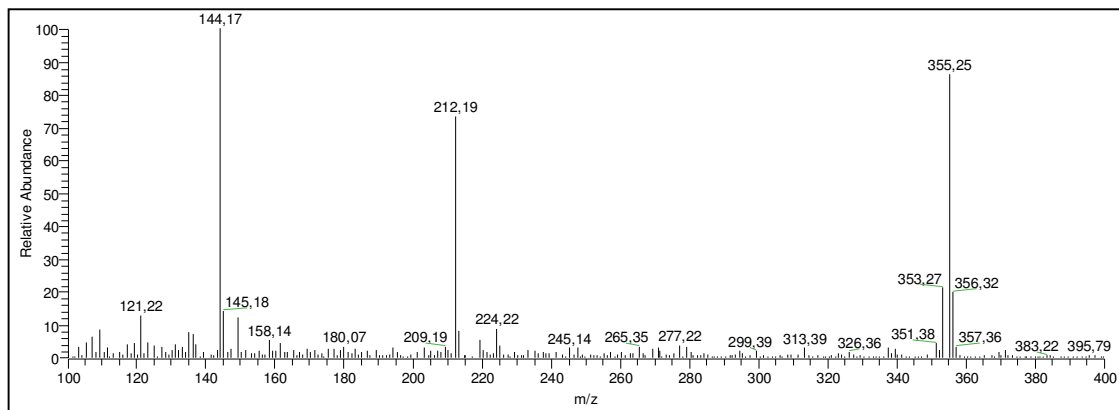


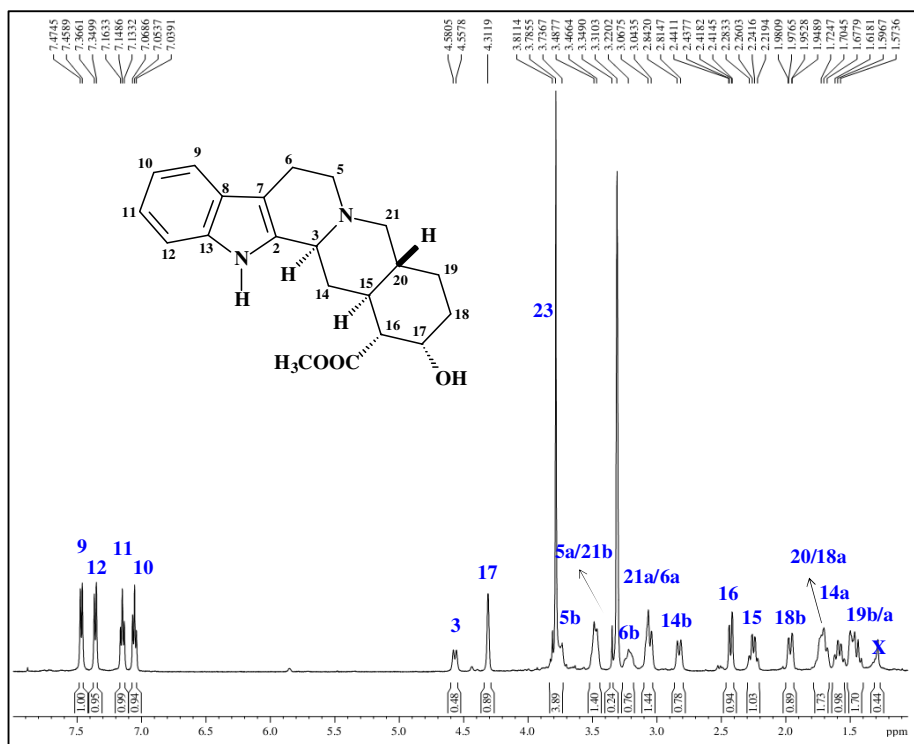
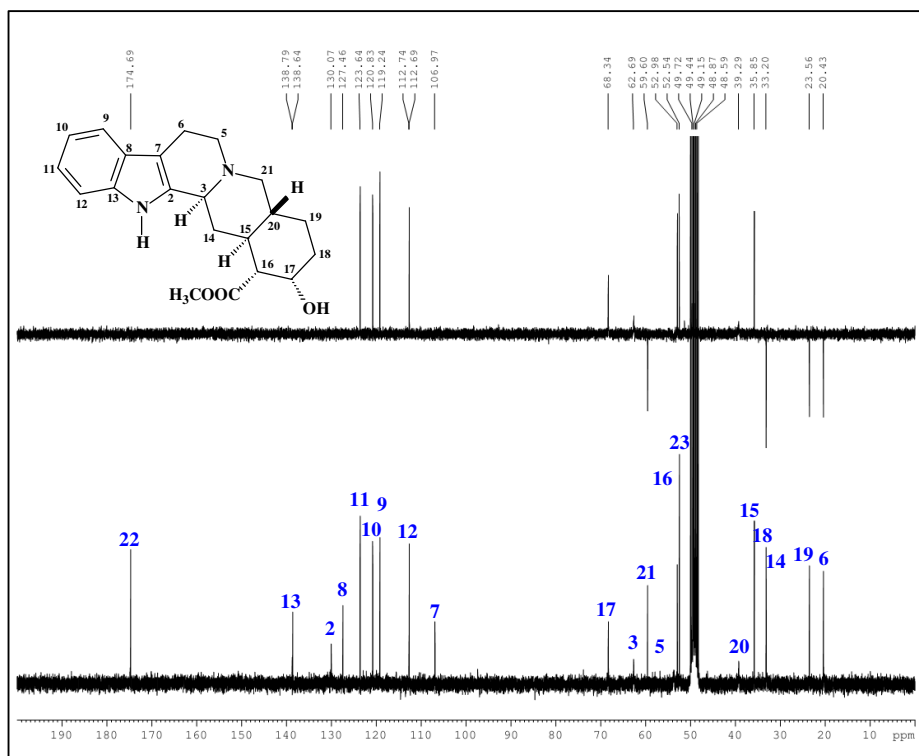
Figura 74 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4.Figura 75 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT-135 (75 MHz, CD_3OD) de AUCC-4.

Figura 76 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-4 e subestruturas mostrando os acoplamentos vicinais.

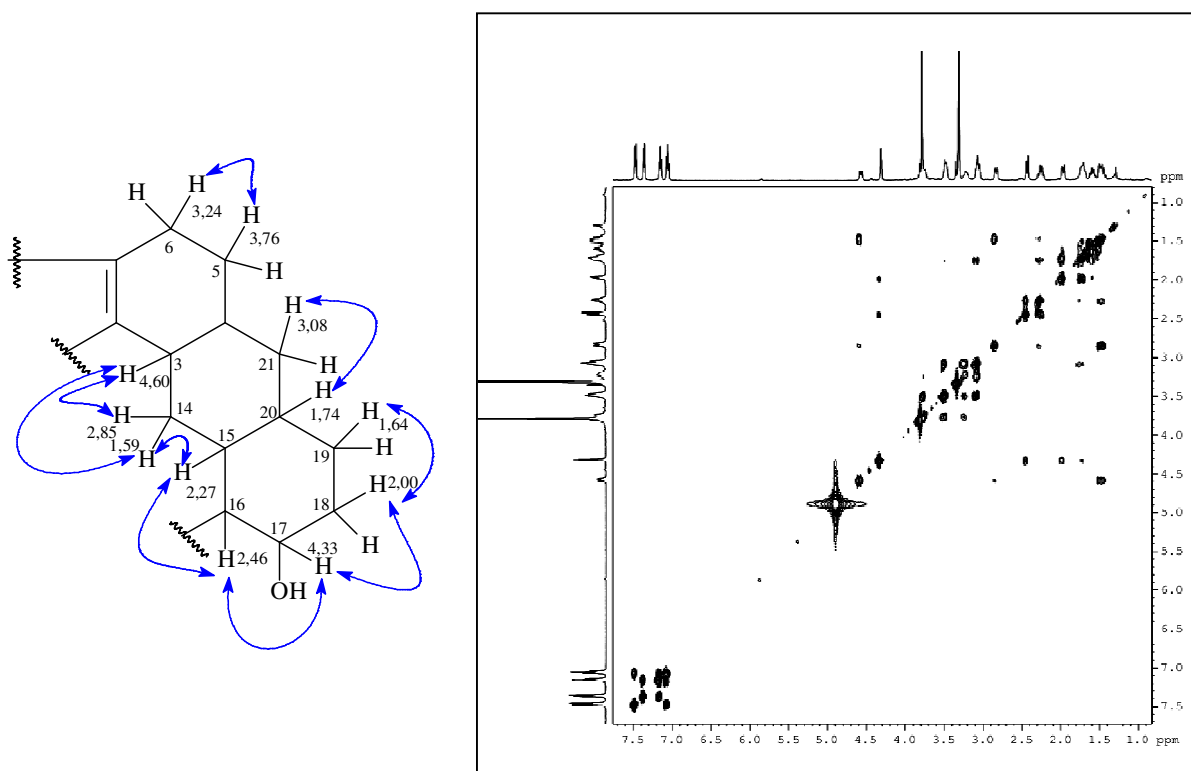


Figura 77 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4.

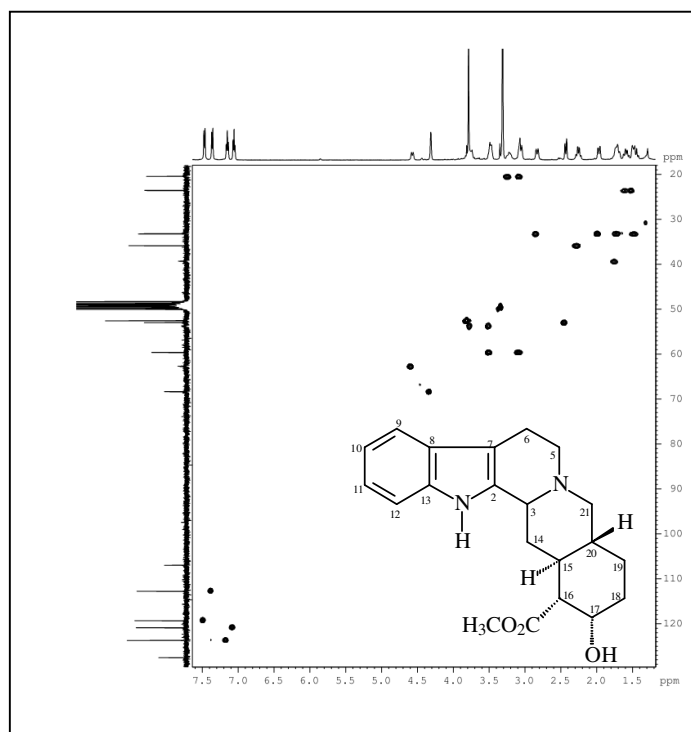


Figura 78 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4 e expansão.

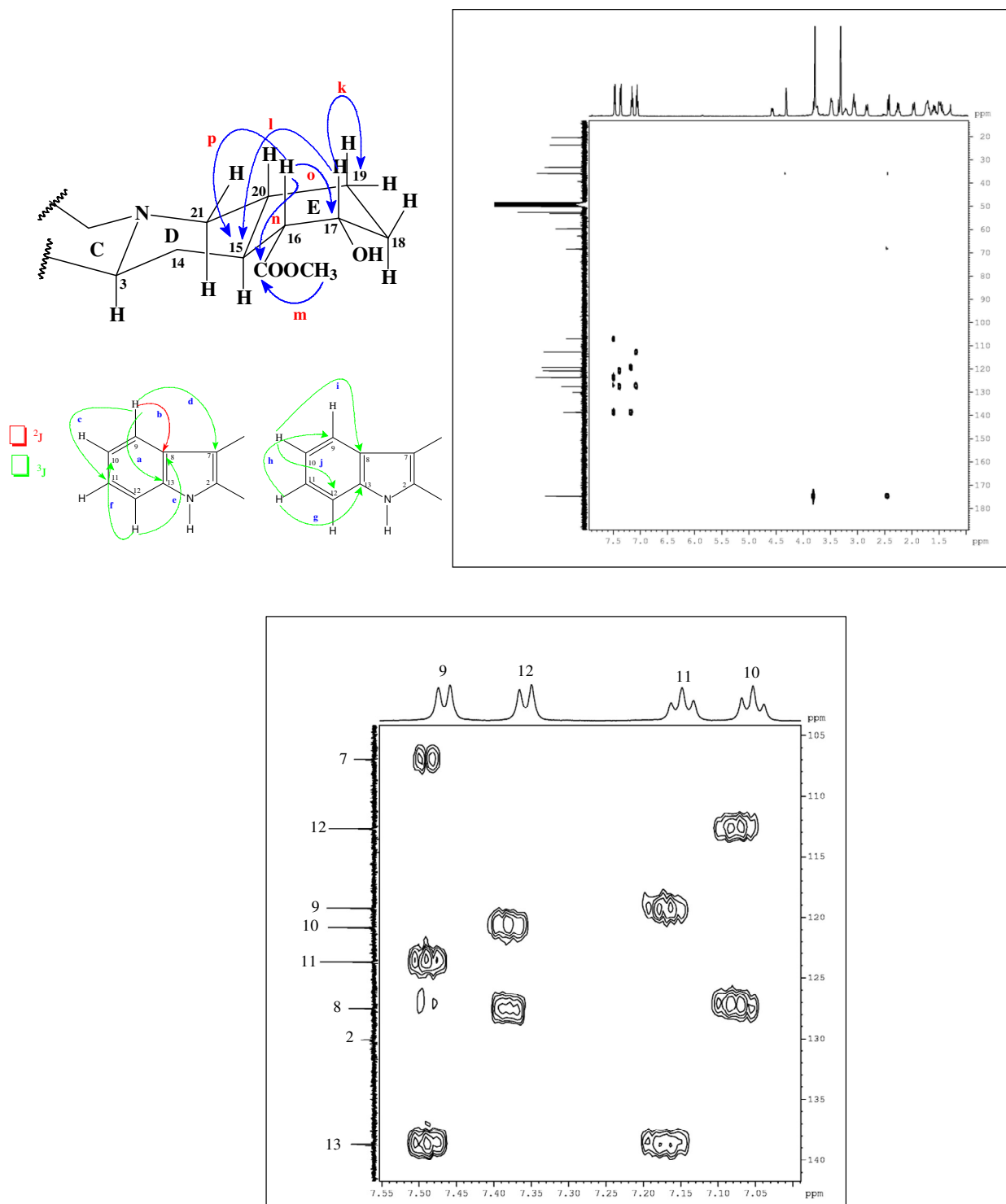


Figura 79 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-4.

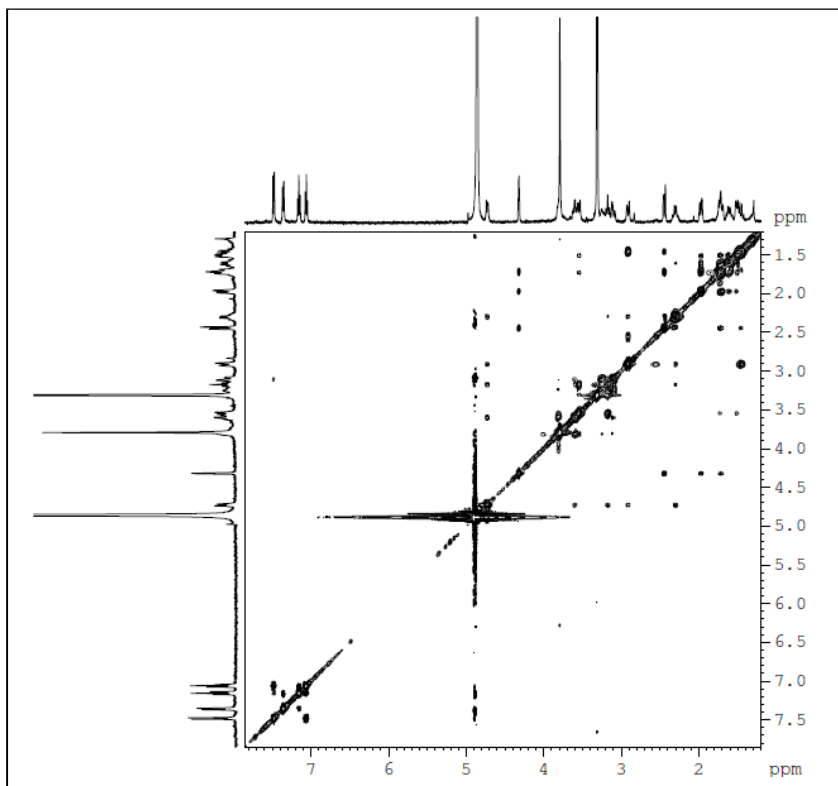
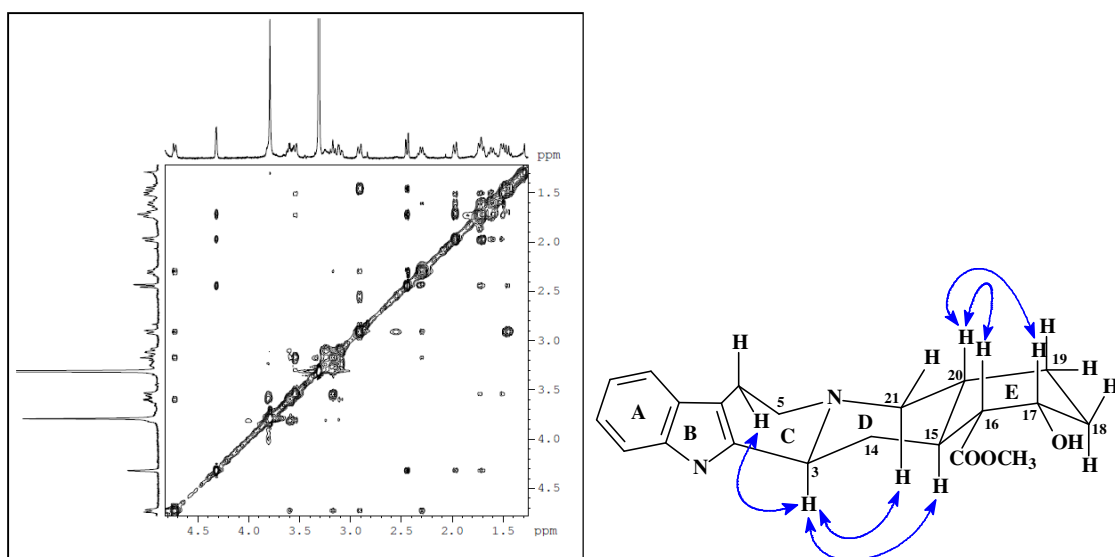


Figura 80 – Espectro de RMN 2 D de ^1H , ^1H -NOESY de AUCC-4 e expansão com os acoplamentos dipolares observados.



4.6 Determinação Estrutural de AUCC-5

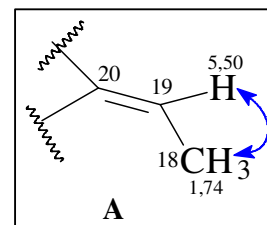
Do extrato etanólico da casca do caule de *A. ulei* foram realizados fracionamentos cromatográficos em sílica gel e purificação por CLAE que permitiram o isolamento de 5,0 mg de um sólido amarelo com ponto de fusão 343,0-343,3 °C, denominado AUCC-5 (Parte Experimental p. 233).

O espectro de absorção na região do infravermelho de AUCC-5 (Figura 86, p. 106), exibiu uma banda larga em 3249 cm^{-1} , correspondente a vibração de deformação axial de amina secundária, característica de ligação N-H, e uma banda em 2924 e 2853 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O-H. Foram observadas também bandas de deformação axial de ligação C-N alifático em 1134 cm^{-1} e aromático em 1268 cm^{-1} , além de bandas correspondentes a deformação axial de ligação C=C em 1673 cm^{-1} e 1470 cm^{-1} . Adicionalmente, bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H aromático em 720 cm^{-1} e 800 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^{13}C -CPD de AUCC-5 (125 MHz, CD_3OD , Figura 89, p. 108), apresentou 18 linhas espectrais. Por comparação do mesmo com o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (Figura 92, p. 110), foi possível identificar, quatro carbonos aromáticos monohidrogenados em δ_{C} 112,1 (6,75), δ_{C} 122,4 (6,92), δ_{C} 123,9 (7,30), δ_{C} 131,2 (7,20), seis carbonos metilênicos em δ_{C} 60,1 (δ_{H} 4,55/3,95); δ_{C} 57,6 (3,50/3,37); δ_{C} 53,7 (3,75/3,50), δ_{C} 43,2 (2,63/2,50); δ_{C} 34,5 (2,71/2,07) e δ_{C} 24,5 (2,42/1,92); um carbono metílico em δ_{C} 12,9 (1,74); uma dupla ligação trissubstituída em δ_{C} 119,8 (δ_{H} 5,50); além de 5 carbonos não hidrogenados, em δ_{C} 147,3, δ_{C} 133,2, δ_{C} 131,7, δ_{C} 101,5 e δ_{C} 88,3. Esse último, provavelmente ligado a heteroátomo. Os carbonos entre δ_{C} 131,2-112,2 ppm foram correlacionados aos carbonos aromáticos.

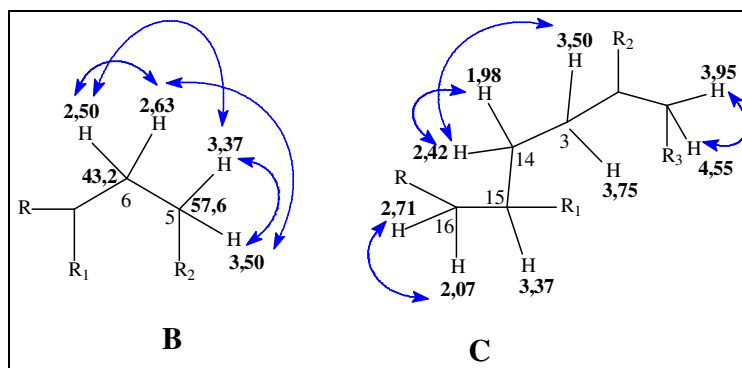
O espectro de massa de alta resolução (Figura 87, p. 106) revelou o pico do íon moléculas em $[\text{M} + \text{H}]^+ = 283,1800$ que comparado com a massa calculada de 283,1810 Daltons sugeriu uma fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove.

O espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD , Figuras 92 e 93, p. 110), indicou um grupo etilidênico exocíclico, que de acordo com o espectro de correlação homonuclear a uma ligação (COSY) (Figuras 90 e 91, p. 109) foi possível determinar acoplamentos entre os hidrogênios de uma metila em δ_{H}



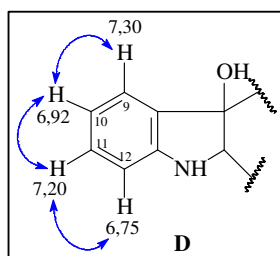
1,74 (δ_C 12,9) com δ_H 5,50 (119,8), observado na subestrutura **A**. Outros acoplamentos fortes de hidrogênios geminais em δ_H 3,50 e 3,37 (2H-5); δ_H 2,42 e 1,98 (2H-14); δ_H 2,50 e 2,63 (2H-6); δ_H 2,71 com 2,07 (2H-16); δ_H 3,75 e 3,50 (2H-3); δ_H 4,55 e 3,95 (2H-21), assim como os vicinais em δ_H 2,50 e 3,37 (H-6b/H-5b); δ_H 3,50 e 2,63 (H-5a/H-6a); δ_H 3,37 e 1,98 (H-15/H-14b); δ_H 3,50 e 2,42 (H-3b/H-14a) permitindo a confirmação dos fragmentos nas subestruturas **B** e **C** (Figura 81).

Figura 81 - Estruturas parciais observadas a partir do espectro de COSY para AUCC-5.



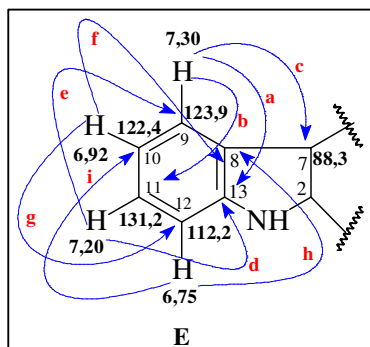
Também foram observados os acoplamentos escalares dos hidrogênios aromáticos em δ_H 6,75 \leftrightarrow 7,20 \leftrightarrow 6,92 \leftrightarrow 7,30, confirmando a existência do anel benzênico orto-dissubstituído (subestrutura **D**).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , Figura 88, p. 107), apresentou 4 sinais em δ_H 7,30 (d, 7,0 Hz), 6,92 (t, 7,7 Hz), 7,20 (t, 7,7 Hz) e 6,75 (d, 7,7 Hz), referente aos hidrogênios aromáticos, além de um sinal em δ_H 5,50 (1H, q), atribuído a uma dupla ligação tri substituída. O sinal em δ_H 1,74 (3H, dd, 6,7 Hz), foi relacionado a um grupamento metila, em adição de diversos sinais na região de proteção listados na Tabela 12, p. 105.



As correlações a longa distância exibidas no espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD , Figuras 94 e 95, p. 111), para AUCC-5 foram observadas entre os hidrogênios do anel aromático em δ_H 7,30 (H-9) com δ_C 147,4 (C-13, a) ; δ_C 131,2 (C-11, b) e δ_C 88,1 (C-7, c); δ_H 7,20 (H-11) com os carbonos em δ_C 147,4 (C-13, d) e δ_C 123,9 (C-9, e). Sinais em δ_H 6,92 (H-10) com δ_C 133,2 (C-8, f) e δ_C 112,1 (C-12, g), além de

δ_{H} 6,75 (H-12) com δ_{C} 133,2 (C-8, h) e δ_{C} 122,5 (C-10, i). Um deslocamento importante em δ_{H} 88,1 (C-7) foi observado para carbono oxigenado (subestrutura E).

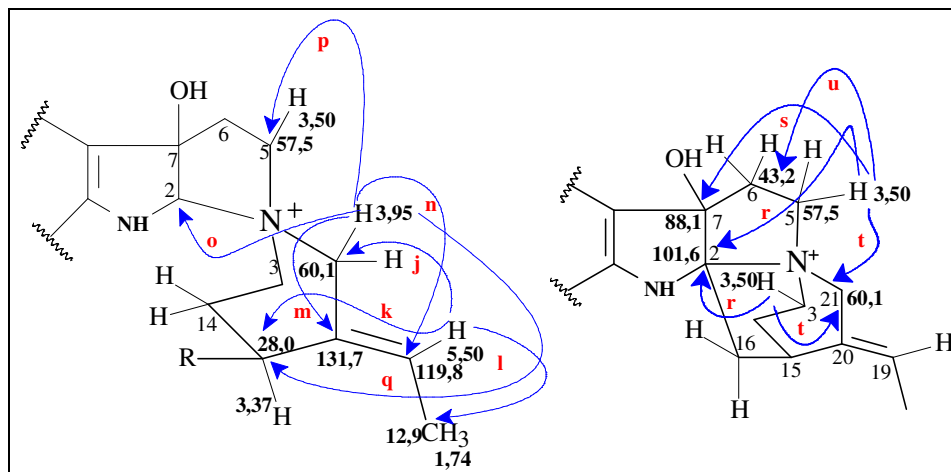


Também foram observadas correlações importantes dos hidrogênios desblindados em δ_{H} 5,50 (H-19) com os carbonos em δ_{C} 60,1 (C-21, j); δ_{C} 28,0 (C-15, k) e δ_{C} 12,9 (C-18, l); δ_{H} 3,95 (H-21b) com δ_{C} 131,6 (C-20, m); δ_{C} 119,8 (C-19, n); δ_{C} 101,6 (C-2, o); δ_{C} 57,6 (C-5, p) e δ_{C} 28,0 (C-15, q), confirmando-se a presença da cadeia lateral olefínica conforme correlações apresentadas nas estruturas parciais na Figura 82.

parciais na Figura 82.

Com relação ao hidrogênio em δ_{H} 3,50 (H-5a e/ou H-3b) pôde-se correlacionar, a duas ou três ligações com os carbonos em δ_{C} 101,6 (C-2, r); δ_{C} 88,1 (C-7, s); δ_{C} 60,1 (C-21, t) e δ_{C} 43,2 (C-6, u). Devido aos deslocamentos dos carbonos desprotegidos, poderia se pensar na presença de um átomo de nitrogênio quaternário entre esses carbonos C-3, C-5, C-21 e C-2 (Figura 82).

Figura 82 – Algumas correlações à longa distância, observadas através do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC para as subestruturas de AUCC-5.

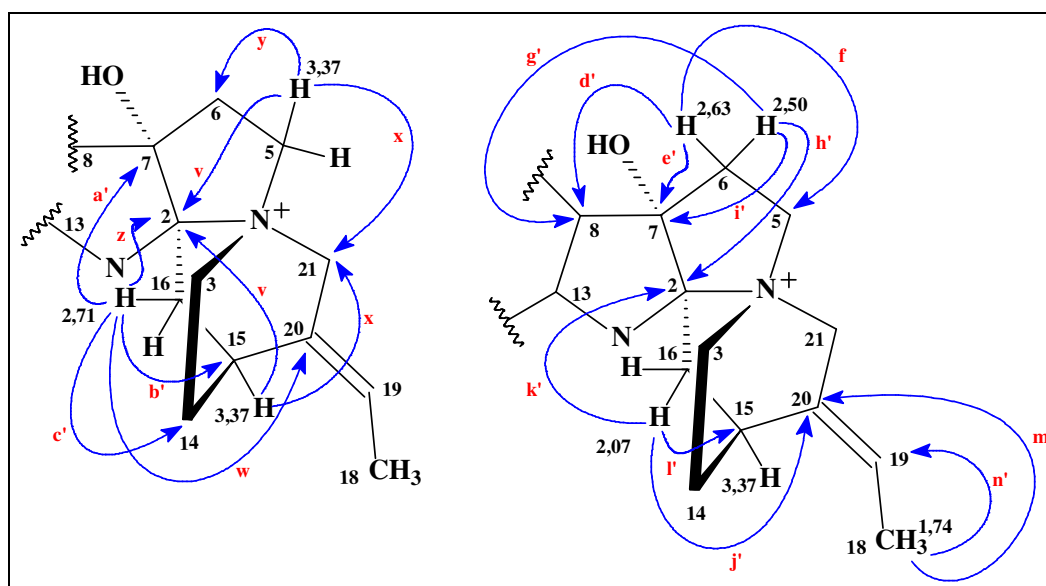


Foram observadas as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 3,37 (H-5b e/ou H-15) com os carbonos em δ_{C} 101,6 (C-2, v); δ_{C} 60,1 (C-21, x) e δ_{C} 43,2 (C-6, z); δ_{H} 2,71 (H-16a) com δ_{C} 131,6 (C-9, w); δ_{C} 101,6 (C-2, z); δ_{C} 88,1 (C-7, a'); δ_{C} 28,0 (C-15, b') e δ_{C} 24,5 (C-14, c'). Sinais em δ_{H} 2,63 (H-6a) com δ_{C} 133,3 (C-8, d'); δ_{C} 88,1 (C-7, e'); 57,6 (C-5, f'); 2,50 (H-6b) com 133,2 (C-8, g'); 101,6 (C-2, h'); 88,1 (C-7, i') (Figura 83, p. 103).

Outras correlações foram estabelecidas entre os hidrogênios em δ_H 2,07 (H-16b) com δ_C 131,7 (C-20, j'); δ_C 101,6 (C-2, k') e δ_C 28,0 (C-15, l'), além dos hidrogênios da metila em δ_H 1,74 (H-18) com os carbonos em δ_C 131,6 (C-20, m') e δ_C 119,8 (C-19, n').

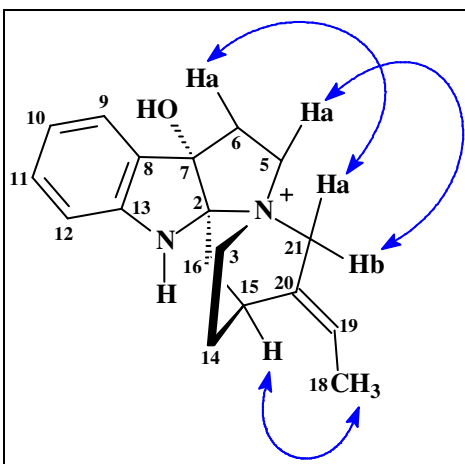
Uma vez que foram mostradas todas as correlações possíveis para AUCC-5, são apresentadas as subestruturas mostradas abaixo, na Figura 83, além dos espectros e suas expansões (Figura 95, p. 111 e Figuras 96 e 97, p. 112).

Figura 83 - Proposta de subestruturas obtidas a partir do espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC para AUCC-5.



De acordo com o espectro de RMN 2D de 1H , 1H -NOESY (500 MHz, CD_3OD , Figuras 98 e 99, p. 113) foi possível a determinação da estereoquímica relativa da molécula, demonstrando que os hidrogênios H-18 da metila acoplam dipolarmente com o H-15, conferindo à cadeia lateral etilidênica uma geometria *E*, além de acoplamentos dipolares dos hidrogênios H-6a com H-21a e H-5a com H-21b como pode ser visto na Figura 84 (p. 104).

Figura 84 - Estrutura proposta para AUCC-5 e correlações observadas no espectro de NOESY.



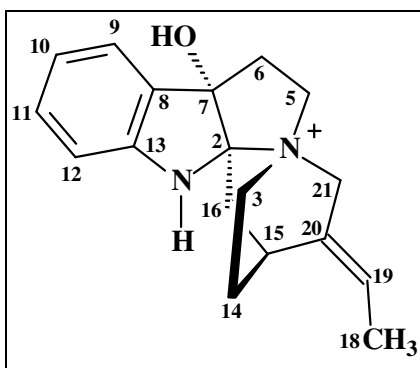
De acordo com pesquisa no “SciFinder” v2007, do Chemical Abstract, essa substância já havia sido relatada na literatura (BARTLETT *et al.*, 1963; BURNELL *et al.*, 1970, 1974), como cloreto de 19,20-hunteracina com pf 343-344 °C, $[\alpha]_D^{25} = -91^\circ$ (H₂O-CD₃OD, c = 27,5 %), isolada de *Hunteria eburnea* Pichon, Apocynaceae.

Apesar de poucos dados fornecidos pela literatura (BURNELL *et al.*, 1970, 1974; Tabela 12, p. 105), somente de hidrogênios; observa-se pouca similaridade destes com AUCC-5. Já os dados de RMN de ¹³C de AUCC-5, ausentes na literatura e listados na Tabela 12, foi possível observar boa concordância dos dados de deslocamentos químicos de AUCC-5 com a literatura específica em espectroscopia (SILVERSTEIN, R. M., 2007).

O alcaloide hunteracina apesar de já ter sido isolado em 1963, nunca fora isolado do gênero *Aspidosperma*. E, de acordo com os resultados obtidos, os dados de RMN de ¹³C, estão sendo registrados pela primeira vez.

Com base nos resultados apresentados, foi possível propor que AUCC-5 tratava-se de um alcaloide indólico do tipo Aspidospermatano, 19(E)-hunteracina (Figura 85, p. 105), inédito para o gênero *Aspidosperma*.

Figura 85- Estrutura do alcaloide 19E-hunteracina (AUCC-5)

Tabela 12 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para AUCC-5 (500 x 125 MHz) comparado com os dados da literatura para o alcaloide 19,20-hunteracina (BURNELL *et al.*, 1974)¹.

C	δ_{C}	AUCC-5 δ_{H} (mult, J, Int)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	HMBC $^3\text{J}_{\text{CH}}$	Literatura ¹ δ_{H}
2	101,5	-	2H-16	H-21; H-5a; H-16; H-	-
3a	53,7	3,75 (t, 10,5 Hz, 1H)	-	-	-
3b		3,50 (m, 1H)	-	-	-
5a	57,6	3,50 (m; 1H)	H-6a	H-21b	-
5b		3,37 (m, 1H)	-	-	-
6 ^a	43,2	2,63 (m; 1H)	H-5b	-	-
6b		2,50 (m; 1H)	-	-	-
7	88,3	-	2H-6	H-5b; H-16a; H-9	-
8	133,2	-	-	H-10; H-12; 2H-6	-
9	123,9	7,30 (d; 7,0 Hz; 1H)	-	H-11	6,7-7,5
10	122,4	6,92 (t, 7,7; 1H)	-	H-12	6,7-7,5
11	131,2	7,20 (t; 7,7 Hz; 1H)	-	H-9	6,7-7,5
12	112,2	6,75 (d; 7,7 Hz; 1H)	-	H-10	6,7-7,5
13	147,3	-	-	H-9; H-11	-
14a	24,5	2,42 (m; 1H)	-	H-16	-
14b		1,98 (m; 1H)	-	-	-
15	28,0	3,37 (m, 1H)	2H-16	H-21b; H-9	-
16a	34,5	2,71 (d; 14,0 Hz, 1H)	-	-	-
16b		2,07 (dd; 4,8 Hz; 1H)	-	-	-
18	12,9	1,74 (d; 6,7 Hz; 3H)	H-19	-	1,67 (d, 3H)
19	119,8	5,50 (q; 9,0 Hz; 1H)	H-18	H-21b	5,20 (m, 1H)
20	131,7	-	H-21b	H-18; 2H-16	-
21a	60,1	4,55 (dd; 2,4; 2,7 Hz; 1H)	-	H-19; H-3b; 2H-5	-
21b		3,95 (d, 14,5 Hz; 1H)	-	-	-

AUCC-5 δ (ppm); CD₃OD, 500/125 MHz; ⁽¹⁾ (D₂O); Não fornecido no artigo.

Figura 86 - Espectro de absorção na Região do Infravermelho de AUCC-5 (Pastilha de KBr).

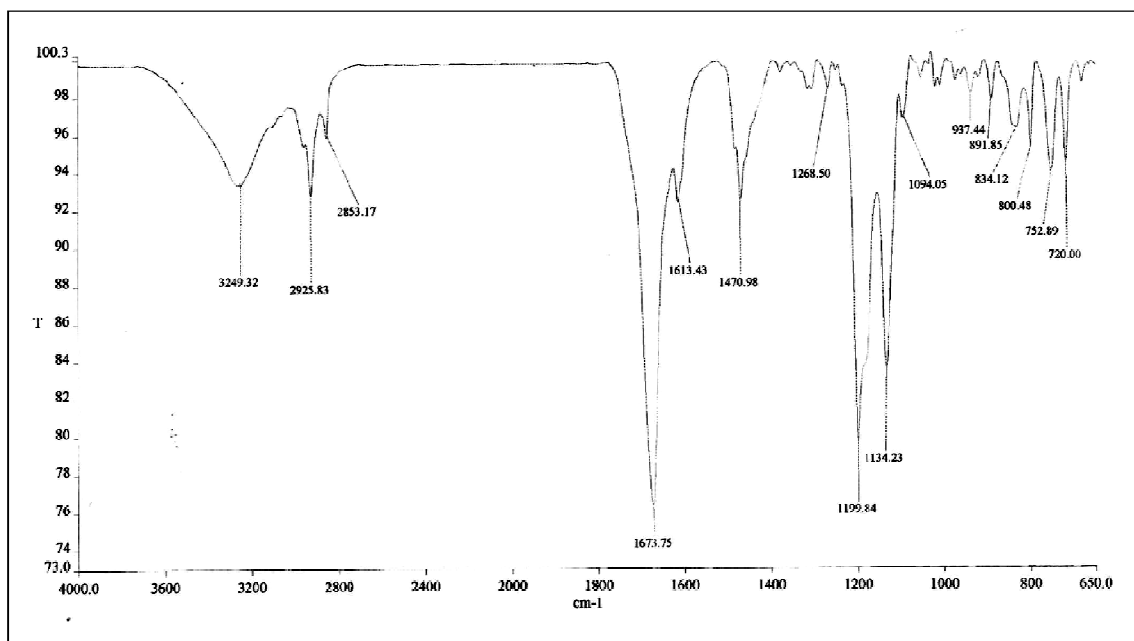


Figura 87 - Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-5

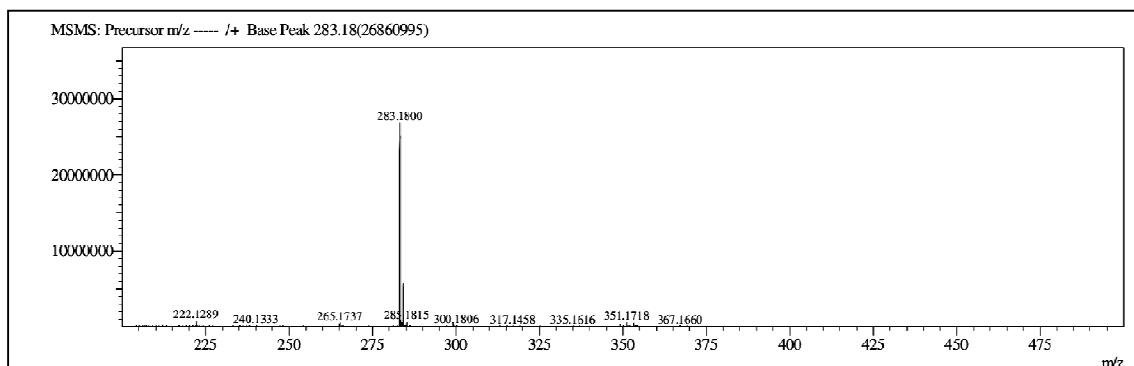


Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão.

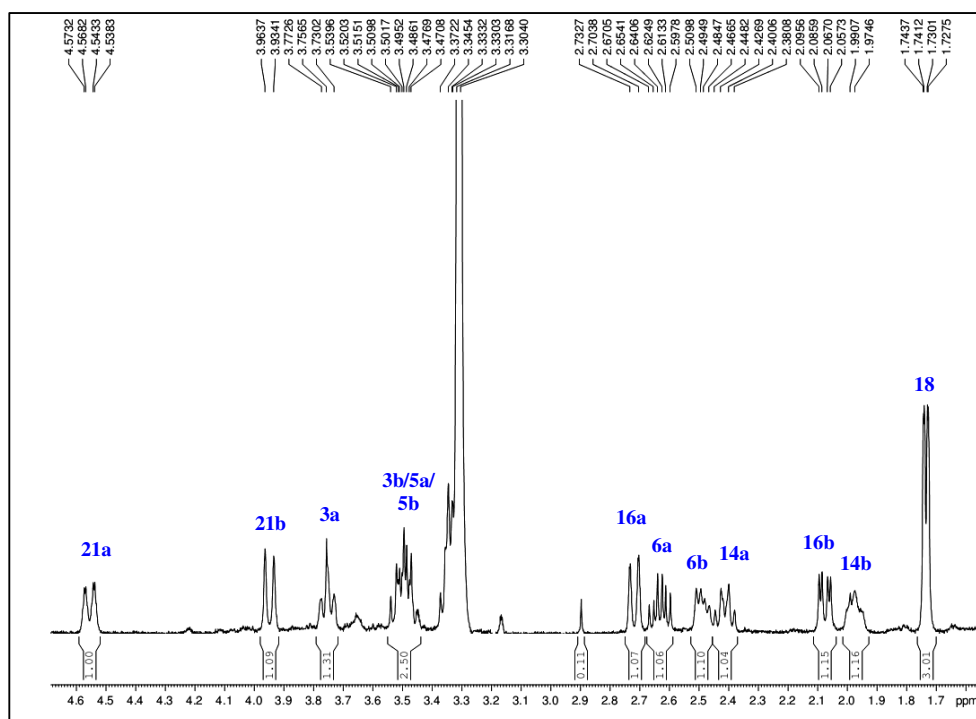
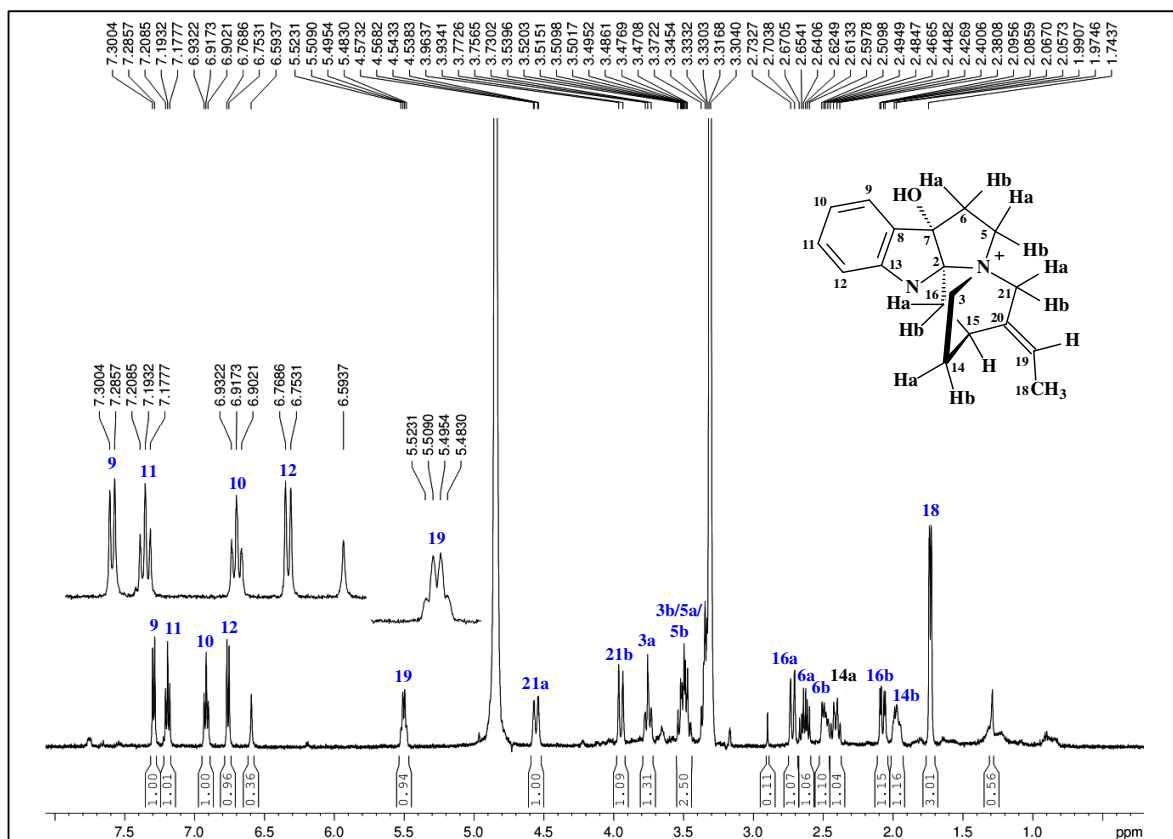


Figura 89 - Espectro de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135 $^{\circ}$ (125 MHz, CD_3OD) de AUCC-5.

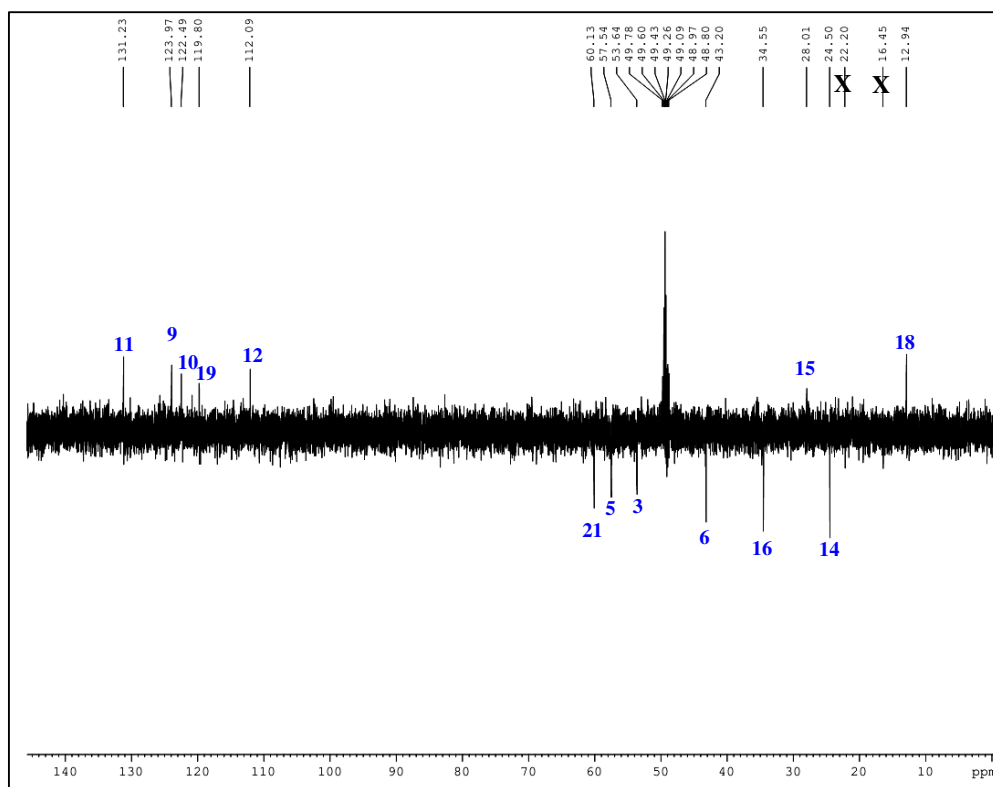
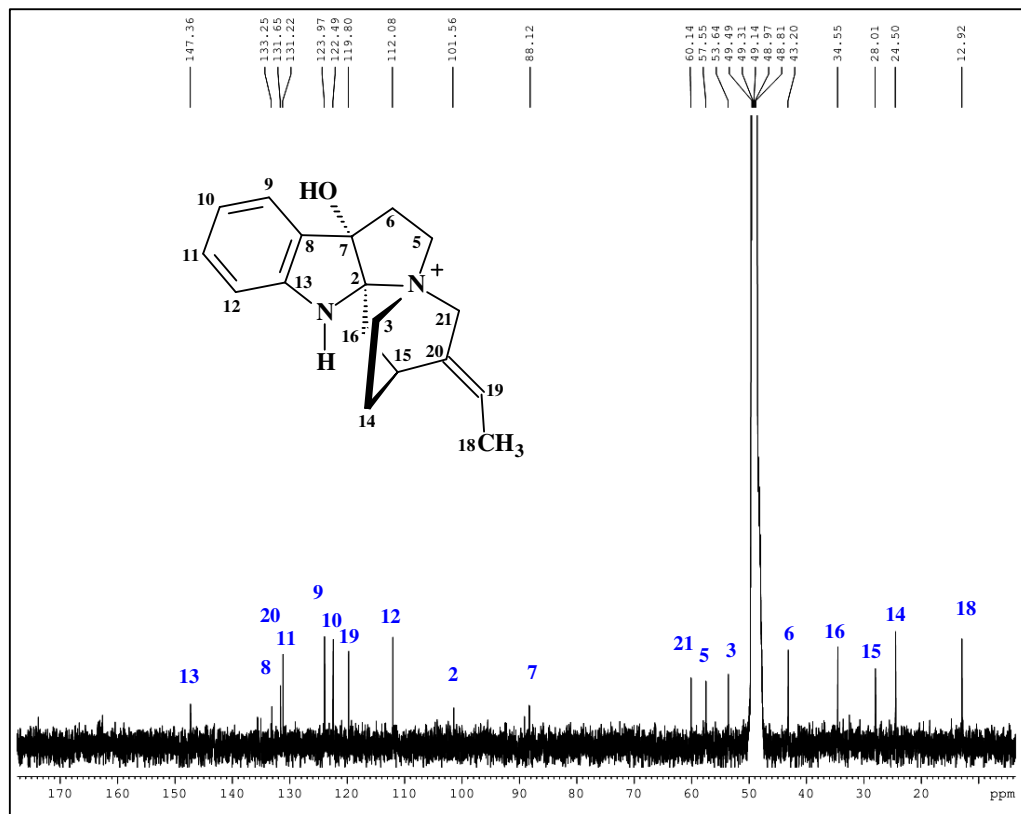


Figura 90 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5.

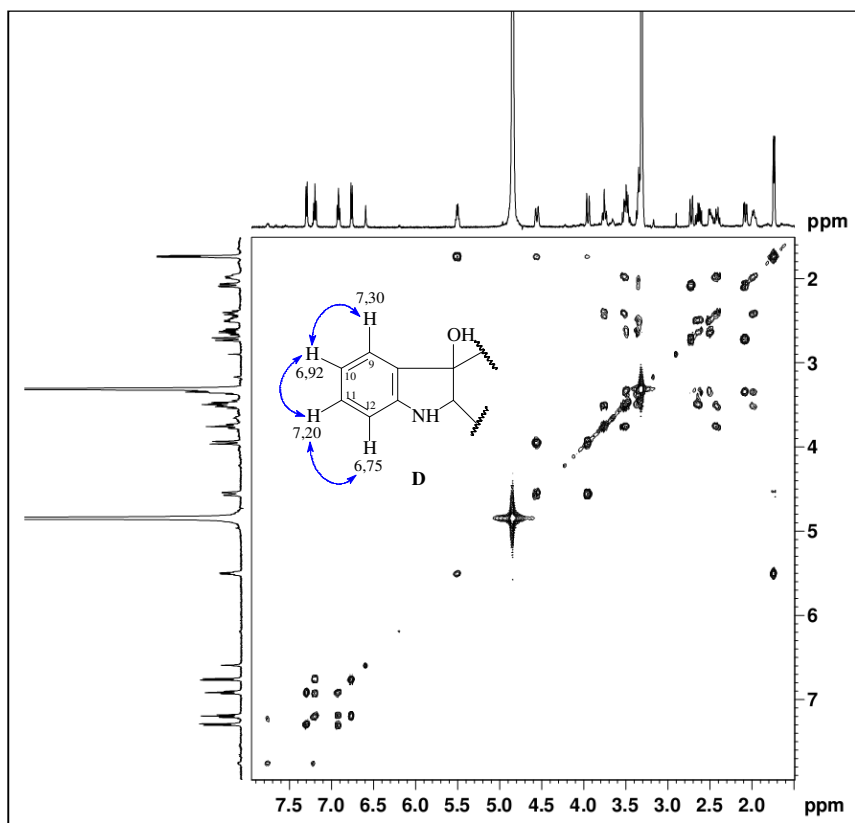


Figura 91 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5 e expansão.

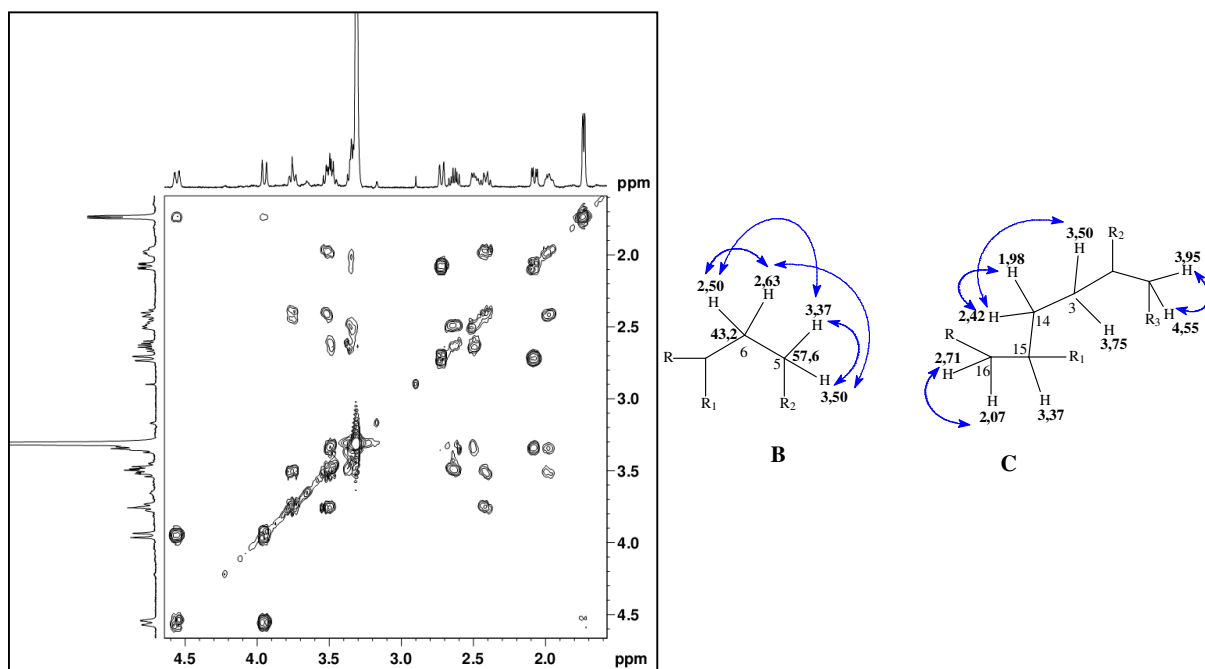


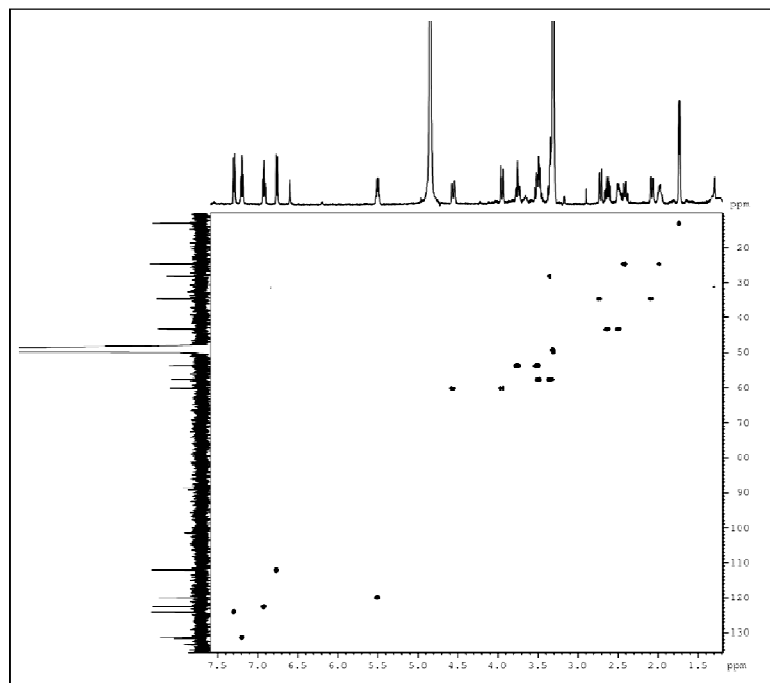
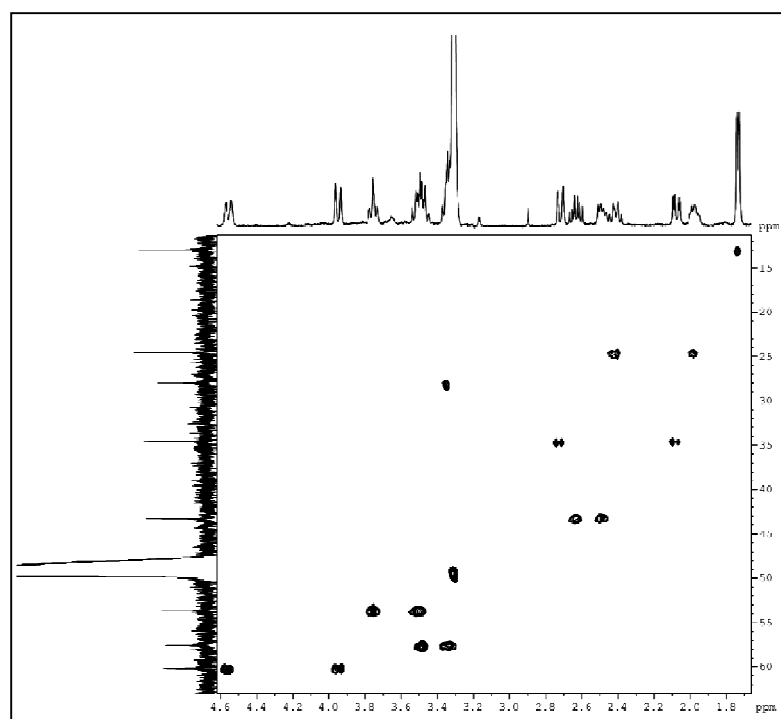
Figura 92 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5.Figura 93 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão.

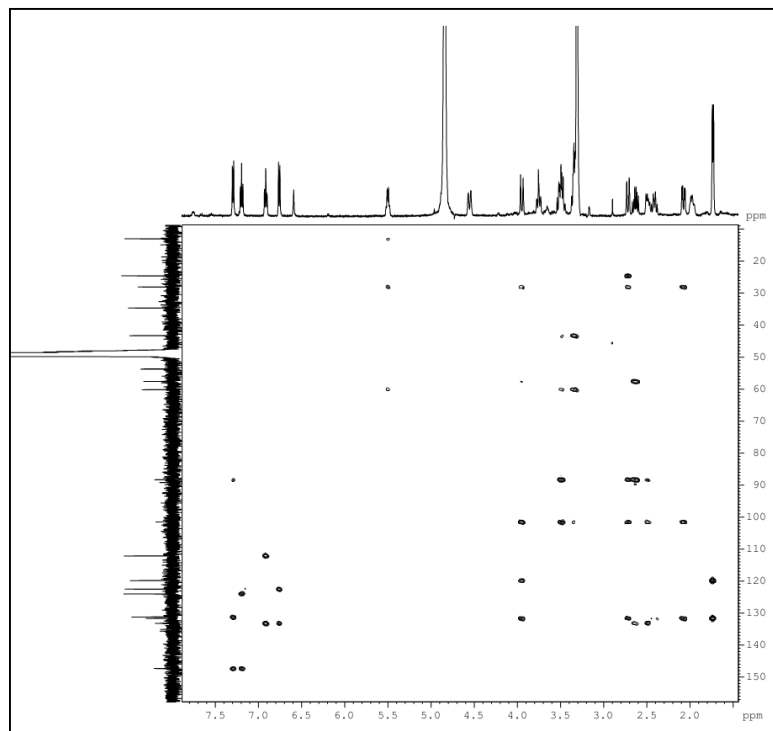
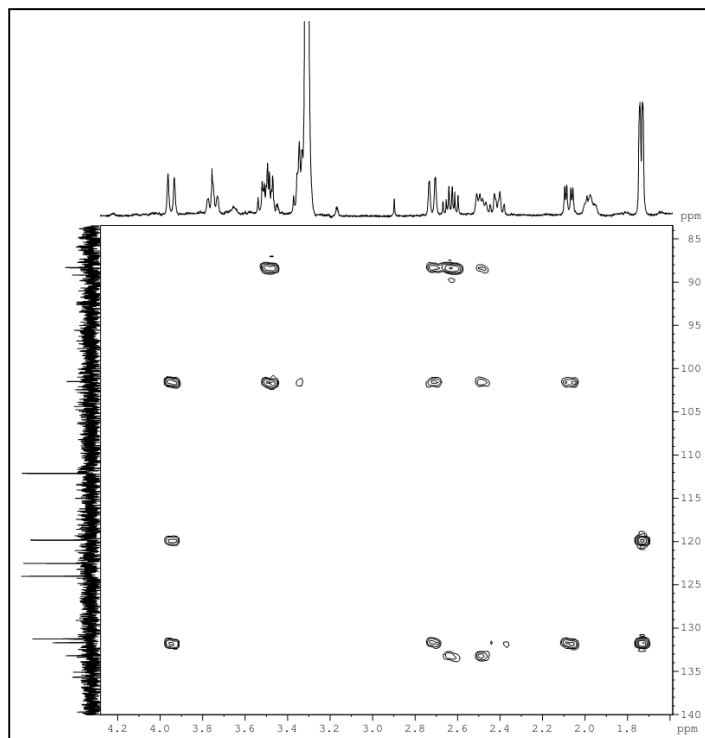
Figura 94 – Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5.Figura 95 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão.

Figura 96 – Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão.

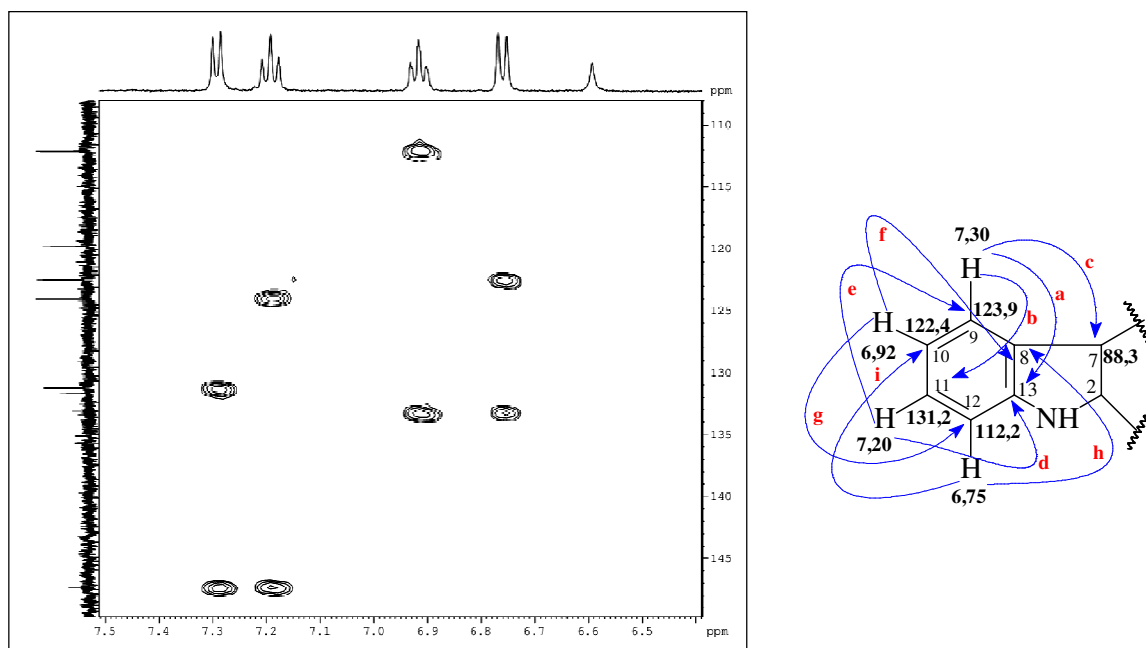


Figura 97 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de AUCC-5 e expansão.

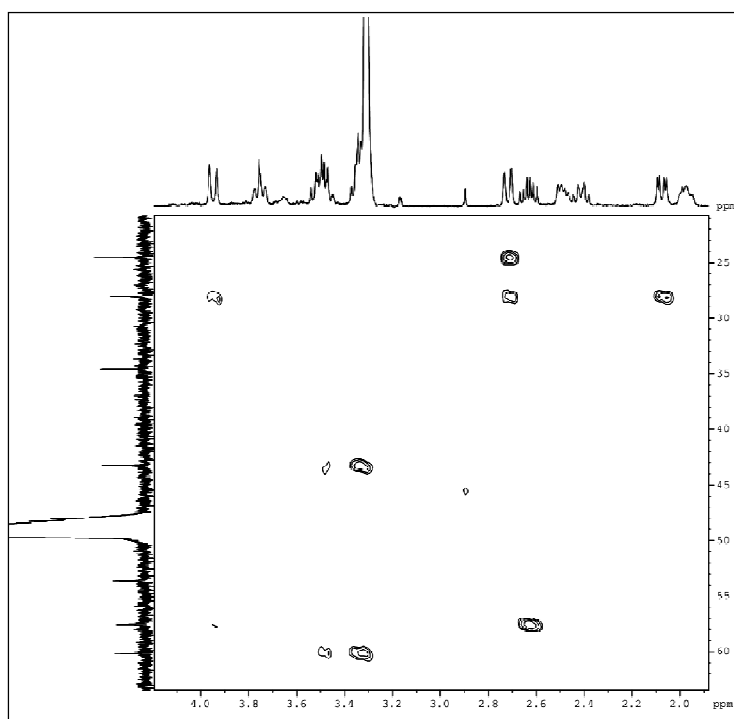


Figura 98 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5.

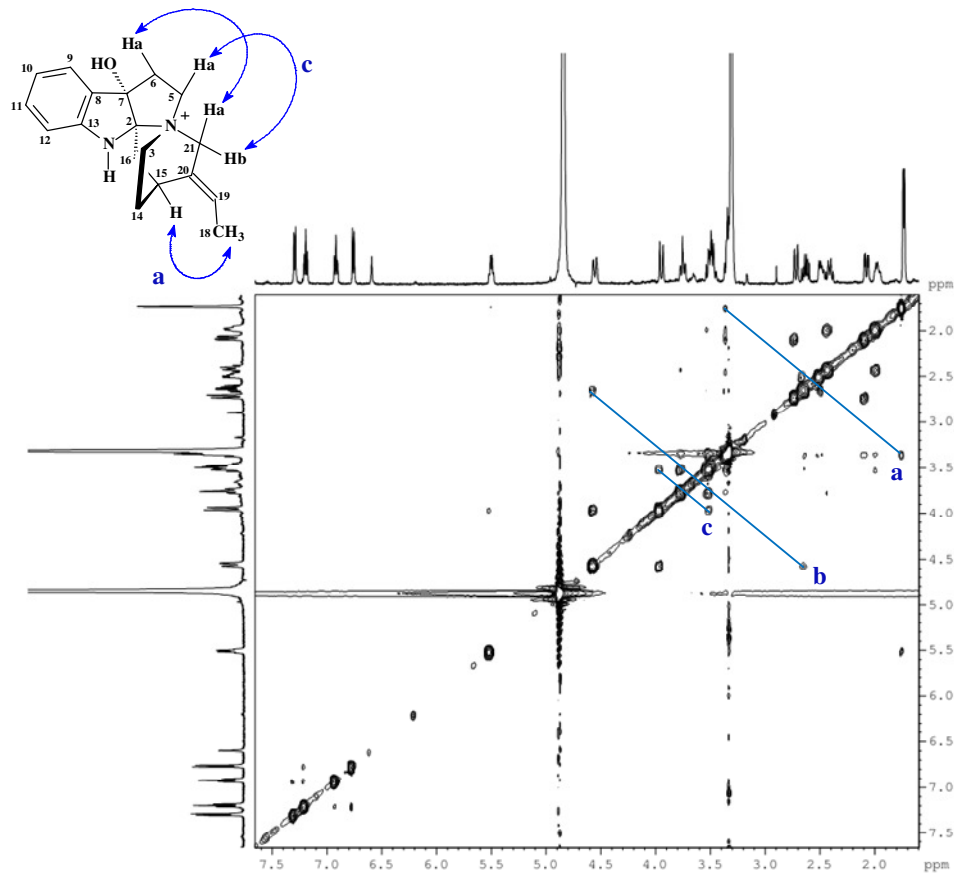
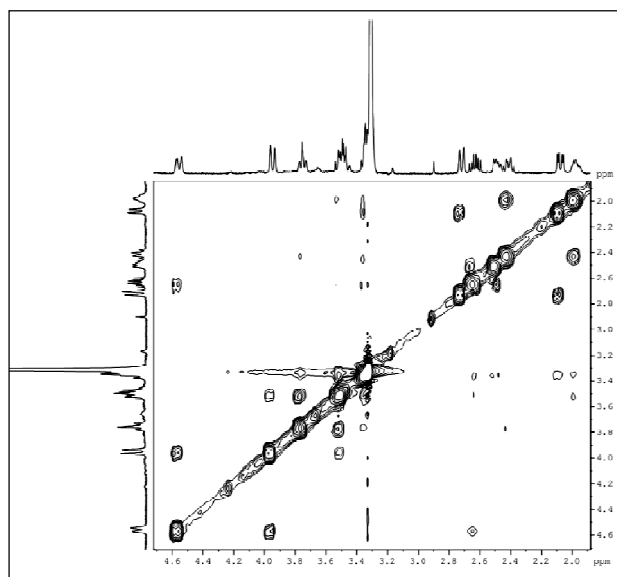


Figura 99 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-5 e expansão.



4.7 Determinação Estrutural de AUCC-6

Cromatografias de adsorção (sílica), exclusão (Sephadex LH-20) e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência da fração AUCCEM, produzida por particionamento do extrato etanólico da casca do caule forneceu 4,0 mg de um sólido amorfo, denominado AUCC-6 (Parte Experimental p. 233), com ponto de fusão de 143,2-144,4°C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 102, p. 119) mostrou uma banda larga em 3228 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial da ligação N-H, caracterizando amina secundária aromática e estiramento da ligação O-H, correspondentes a bandas entre 2924 e 3500 cm^{-1} . Foram observadas ainda, vibrações de deformação axial da ligação C-N de aromático em 1455 cm^{-1} , e alifático em 1199 cm^{-1} , além de bandas correspondentes a deformação axial de C=O em 1726 cm^{-1} .

A banda em 1673 cm^{-1} foi relacionada a ligação C=C, além de bandas esqueléticas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H aromático em 749 e 722 cm^{-1} .

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD , Figura 105, p. 121), foram observadas 13 linhas espectrais em δ_{C} 119,3 (C-9), 120,9 (C-10); 123,8 (C-11) e 112,7 (C-12), associadas a carbonos mono hidrogenados de anel benzênico. Três sinais em δ_{C} 32,9 (C-15); 51,4 (C-16) e 66,7 (C-17), atribuídos a carbonos metínicos, além de quatro carbonos metilênicos, com deslocamentos em δ_{C} 20,3 (C-6); δ_{C} 34,6 (C-18); δ_{C} 60,1 (C-21) e δ_{C} 34,9 (C-14) e um carbono metílico, em δ_{C} 52,8 (C-23), atribuído a uma metoxila. Observou-se também um carbono olefínico em $126,8$ (C-19), três carbonos não hidrogenados, em δ_{C} 174,7; 138,0 e 127,4 identificados pela ausência de correlações no HSQC.

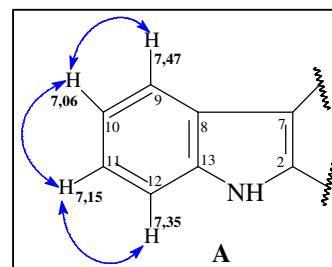
Os sinais observados entre 123,8-112,7 ppm foram atribuídos aos carbonos aromáticos do sistema indólico, enquanto o sinal em δ_{C} 66,3 foi atribuído a um carbono oximetínico e o sinal em δ_{C} 174,7, a um carbono carbonílico de éster, como indicado no espectro de infravermelho (Figura 102, p. 119).

Espectrometria de massa de alta resolução exibiu o pico do íon molecular com m/z igual a 353,1892 que comparado com a massa calculada em 352,1787 Daltons, sugeriu uma fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze (Figura 103, p. 119).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , Figura 104, p. 120), de AUCC-6, apresentou quatro sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 7,35 (H-12); 7,47 (H-9); 7,06 (H-10) e 7,15 (H-11). Um sinal em δ_{H} 3,81 (H-23, 3H) atribuído a um grupamento metoxila; um sinal em δ_{H} 5,88 (H-19), referente a hidrogênio olefínico, além de um sinal em δ_{H} 4,45 (H-17), característico de hidrogênio oximetínico. Os demais sinais encontram-se listados na Tabela 14 (p. 118).

Foi possível fazer as atribuições dos hidrogênios baseada na análise do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de AUCC-6 (Figura 107, p. 122), através dos sinais intensos de acoplamentos vicinais entre os hidrogênios δ_{H} 5,88 (H-19) \leftrightarrow δ_{H} 2,52 e 2,29 (H-18a/b); 4,45 (H-17) \leftrightarrow 2,52 (H-16 e/ou H-18) e 2,29 (H-18a); um sinal forte de hidrogênio geminal em δ_{H} 2,52 (H-18b) \leftrightarrow 2,29 (H-18a) outro em δ_{H} 3,57 \leftrightarrow 3,79; além dos acoplamentos de δ_{H} 2,52 (H-16) \leftrightarrow 3,16 (H-15) e 4,45 (H-17).

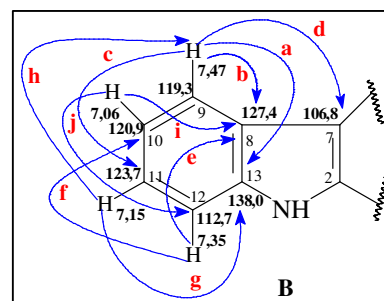
Acoplamentos escalares também foram observados para os hidrogênios que caracterizam o anel benzênico do sistema indólico dissustituído no anel pirrólico observado na subestrutura A.



Através do espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC (Figura 108, p. 123) de AUCC-6 pôde-se correlacionar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono, sendo que alguns deles não apareceram no espectro de ^{13}C , porém observados no espectro HSQC.

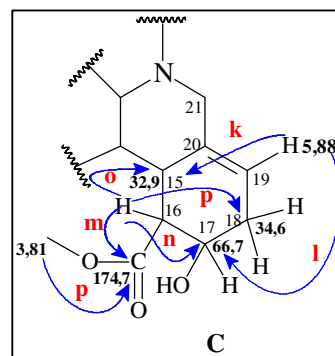
Observou-se a existência de um sinal na região de carbono sp^2 olefínico, um monohidrogenado em δ_{C} 126,4 (δ_{H} 5,88, H-19) e quatro carbonos monohidrogenados. Também foi observado um carbono metínico oxigenado em δ_{C} 66,7 (δ_{H} 4,45, H-16) e quatro carbonos metilênicos. Os dados encontram-se listados na Tabela 14 (p. 118).

O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 110 e 111, p. 124) permitiu o assinalamento de todos os sinais observados. Correlações dos hidrogênios do sistema indólico em δ_{H} 7,47 (H-9) com os carbonos δ_{C} 138,0 (C-13, a); δ_{C} 127,4 (C-8, b); δ_{C} 123,8 (C-11, c) e δ_{C} 106,8 (C-7, d); δ_{H} 7,35 (H-12) com δ_{C} 127,4 (C-8, e) e 120,9 (C-10, f).



Sinal de hidrogênio em δ_H 7,15 (H-11) com δ_C 138,0 (C-13, g) e δ_C 119,3 (C-9, h); δ_H 7,06 (H-10) com δ_C 127,4 (C-8, i) e δ_C 112,7 (C-12, j), mostradas na subestrutura **B**.

Foi verificado também correlações de δ_H 5,88 (H-19) com δ_C 32,9 (C-15, k) e δ_C 66,7 (C-17, l); δ_H 2,52 (H-16) com δ_C 174,7 (C-22, m); δ_C 66,7 (C-17, n); δ_C 32,9 (C-15, o) e δ_C 34,6 (C-18, p), além de δ_H 3,81 (H-23) com δ_C 174,7 (C-22, q) (Subestrutura C).



No espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HMBC não foram observados sinais para os carbonos C-3, C-5, C-20 e C-2.

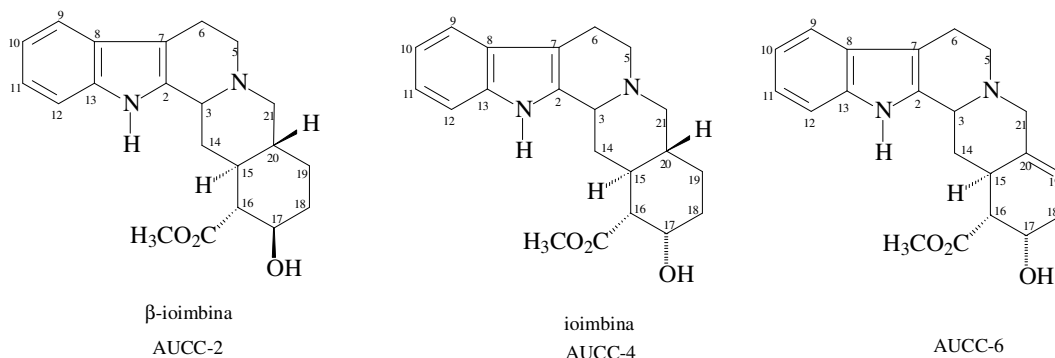
Porém, no espectro de RMN 2D de 1H 1H -COSY (Figura 106 e 107, p. 122), observou-se alguns acoplamentos de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 e sp , em, δ_H 1,52 e 3,07; δ_H 3,57 e 3,79; δ_H 3,59 e 3,23; δ_H 3,59 e 3,16.

Conforme Tabela 13, p. 117 observa-se estreita semelhança de AUCC-6 com as substâncias β -ioimbina e ioimbina, porém observa-se também que alguns sinais de carbono não foram caracterizados, devido a pouca massa obtida. Portanto, por comparação com as substâncias AUCC-2 e AUCC-4 nota-se semelhança no esqueleto corinante apresentado, observando-se, pequenas diferenças nos deslocamentos químicos em função do solvente utilizado. Uma diferença próximo de 2 ppm em relação ao solvente $CDCl_3$ e CD_3OD , este último, apresentando sinais mais desprotegidos.

De acordo com os modelos da β -ioimbina e ioimbina, uma justificativa para os carbonos C-3 e C-5 ligados a nitrogênio não aparecerem em AUCC-6 é devido ao momento quadrupolar do nitrogênio alargar demais o sinal (ver espectro HMBC, Figura 110 p. 124).

O espectro de massa de alta resolução (IES-EM, Figura 103, p. 118), de AUCC-6 interpretado juntamente com os dados RMN de 1H e ^{13}C , forneceu massa igual a 352, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{24}N_2O_3$. A partir da comparação com os espectros de massa das substâncias β -ioimbina e ioimbina ($C_{21}H_{26}N_2O_3$), constatou-se que havia uma insaturação a mais para AUCC-6 (Figura 100, p. 117).

PASCALE *et al.* (1991) relata a 19,20-desidro- β -ioimbina e após comparação da β -ioimbina e ioimbina com AUCC-6 (Tabela 13, p. 117), são observadas similaridades nos deslocamentos de C e H, porém com algumas observações em virtude do solvente utilizado (CD_3OD) para AUCC-6 ser diferente da literatura ($CDCl_3$). Além da estereoquímica da substância AUCC-6 apresentar uma hidroxila α , contrária a literatura, em β .

Figura 100 - Comparação de AUCC-6 com os alcaloides β -ioimbina e ioimbina.Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C e ^1H de AUCC-2, AUCC-4 com AUCC-6.

C	#	AUCC-2 (β -ioimbina) ¹		AUCC-4 (ioimbina) ²		(AUCC-6) ³		
		δ_c	δ_H (mult, J, Int)	δ_c	δ_H (mult, J, Int)	#	δ_c	δ_H (mult, J, Int)
2	C	135,1	-	130,1	-	C	-	-
3	CH	61,5	3,35(dl, 11 Hz)	62,7	4,60 (d, 11,4Hz)	CH	-	-
5a	CH ₂	54,3	3,12 (dd, 6 e 11 Hz)	53,8	3,76 (m)	CH ₂	-	-
5b			2,63 (tl, 6 e 11 Hz)		3,50 (m)			
6a	CH ₂	22,4	2,90 (m)	20,4	3,24 (m)	CH ₂	20,3	3,23 (m)
6b			2,71 (m)		3,08 (d; 11,9 Hz)			3,07 (m)
7	C	108,0	-	107,0	-	C	106,8	-
8	C	128,4	-	127,5	7,49 (d; 8,0 Hz)	C	127,4	-
9	CH	118,8	7,39 (d, 7,8 Hz)	119,2	7,07 (t; 7,5Hz)	CH	119,3	7,47 (d; 7,8 Hz)
10	CH	120,0	6,95 (t, 8,0Hz)	120,8	7,17 (t; 7,5 Hz)	CH	120,9	7,06 (t; 7,4 Hz)
11	CH	122,2	7,05 (t, 8,0 Hz)	123,6	7,38 (d; 8,0 Hz)	CH	123,8	7,15 (t; 7,4 Hz)
12	CH	112,2	7,28 (d, 8,0 Hz)	112,7	7,49 (d; 8,0 Hz)	CH	112,7	7,35 (d; 7,8 Hz)
13	C	138,3	-	138,7	-	C	138,0	-
14a	CH ₂	34,5	2,18 (m)	33,1	2,85 (d; 13,5Hz)	CH ₂	34,9	3,07 (m)
14b			1,35 (m)		1,59 (m)			1,52 (m)
15	CH	43,6	1,55 (m)	35,8	2,27 (m)	CH	32,9	3,16 (m)
16	CH	58,9	2,15 (m)	53,0	2,46 (d; 1,7 Hz)	CH	51,4	2,52 (m)
17	CH	73,1	3,78 (m)	68,3	4,33 (s)	CH	66,7	4,45 (s)
18a	CH ₂	35,2	2,05 (ddd, 3,7 e 12 Hz)	33,2	2,00 (d; 2,0 Hz)	CH ₂	34,6	2,52 (m)
18b			1,40 (m)		1,74 (m)			2,29 (m)
19a	CH ₂	29,2	1,70 (ddd, 3,7 e 12 Hz)	23,6	1,64 (m)	CH	126,8	5,88 (s)
19b			1,20 (m)		1,59 (m)			
20	CH	40,7	1,50 (m)	39,3	1,74 (m)	C	-	-
21a	CH ₂	61,9	2,97 (dd, 3 e 11 Hz)	59,6	3,50 (m)	CH ₂	60,1	4,07 (m)
21b			2,20 (q, 11 Hz)		3,08 (d; 11,9 Hz)			3,98 (m)
C=O	C	176,6	-	174,7	-	C	174,7	-
OCH ₃	OCH ₃	52,4	3,81 (s)	52,5	3,82 (s)	OCH ₃	52,8	3,81; s; 3H

δ_c (ppm) (CD₃OD)^{1,2,3}; RMN ^{13}C , ^1H (125/500)^{1,2} e (75/300)³

Uma vez feita essas comparações e de acordo com os dados espectroscópicos apresentados na Tabela 14 (p. 118), pôde-se concluir que AUCC-6 tratava-se de 19,20-desidro-17 α -hidroxi-ioimbina-16 α -carboxilato de metila (Figura 101, p. 118), um alcaloide

indólico com esqueleto do tipo corinantiano isolado pela primeira vez para *A. ulei*.

Figura 101 - Alcaloide indólico 19,20-desidro-17 α -ioimbina (AUCC-6).

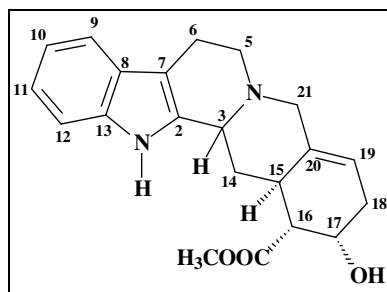


Tabela 14 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H de AUCC-6 e comparação com dados de RMN da literatura para o alcaloide 19,20-desidro- β -ioimbina (PASCALE *et al.*, 1991)².

		¹ AUCC- 6			HMBC		² Literatura	
C	#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	
2	*C	-	-	-	-	133,3	-	
3	*CH	-	-	-	-	60,9	3,40 (d br; 11,8 Hz)	
5	*CH ₂	-	-	-	-	51,9	2,59-2,80 (m) 2,95-3,15 (m)	
6a	CH ₂	20,3	3,23 (m)	-	-	21,3	2,59-2,80 (m)	
6b	CH ₂	20,3	3,07 (m)	-	-	21,3	2,95-3,15 (m)	
7	C	106,8	-	-	H-9	108,2	-	
8	C	127,4	-	H-9	H-12; H-10	127,0	-	
9	CH	119,3	7,47 (d; 7,8 Hz)	-	H-11	118,0	7,46 (d br, 7,1 Hz)	
10	CH	120,9	7,06 (t; 7,4 Hz)	-	H-12	119,4	7,08 (dt; 7,1; 1,1 Hz)	
11	CH	123,8	7,15 (t; 7,4 Hz)	-	H-9	121,3	7,14 (dt; 7,1; 1,1 Hz)	
12	CH	112,7	7,35(d; 7,8 Hz)	-	H-10	110,6	7,31 (d; br; 7,1 Hz)	
13	C	138,0	-	-	H-9; H-11	135,9	-	
14a	CH ₂	34,9	3,07 (m)	-	-	39,0	2,25 (ddd; 12; 5; 2,5 Hz)	
14b	CH ₂	34,9	1,52 (m)	-	-	39,0	1,47 (q; 12 Hz)	
15	CH	32,9	3,16 (m)	H-16	H-19	35,9	2,59-2,80 (m)	
16	CH	51,4	2,52 (m)	-	-	58,7	2,42 (t; 10,3 Hz)	
17	CH	66,7	4,45 (s)	H-16	H-19	68,5	4,07 (dt; 10,3; 5,5 Hz)	
18a	CH ₂	34,6	2,52 (m)	-	-	33,7	2,42-2,53 (m)	
18b	CH ₂	34,6	2,29 (m)	-	H-16	33,7	2,07-2,20 (m)	
19	CH	126,8	5,88 (s)	-	-	119,2	5,56 (dd; 3,7; 1,6 Hz)	
20	*C	-	-	-	-	133,3	-	
21a	CH ₂	60,1	4,07 (m)	-	-	55,1	3,46 (d; 12,6 Hz)	
21b	CH ₂	60,1	3,98 (m)	-	-	55,1	2,95-3,15 (m)	
22	C=O	174,7	-	H-16	H-23	174,7	-	
23	OCH ₃	52,8	3,81(s)	-	-	52,3	3,90 (s)	

(*) C e H não observados; ¹ (300 x 75 MHz, CD₃OD); ² (300 x 75 MHz, CDCl₃).

Figura 102 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de AUCC-6 (UATR).

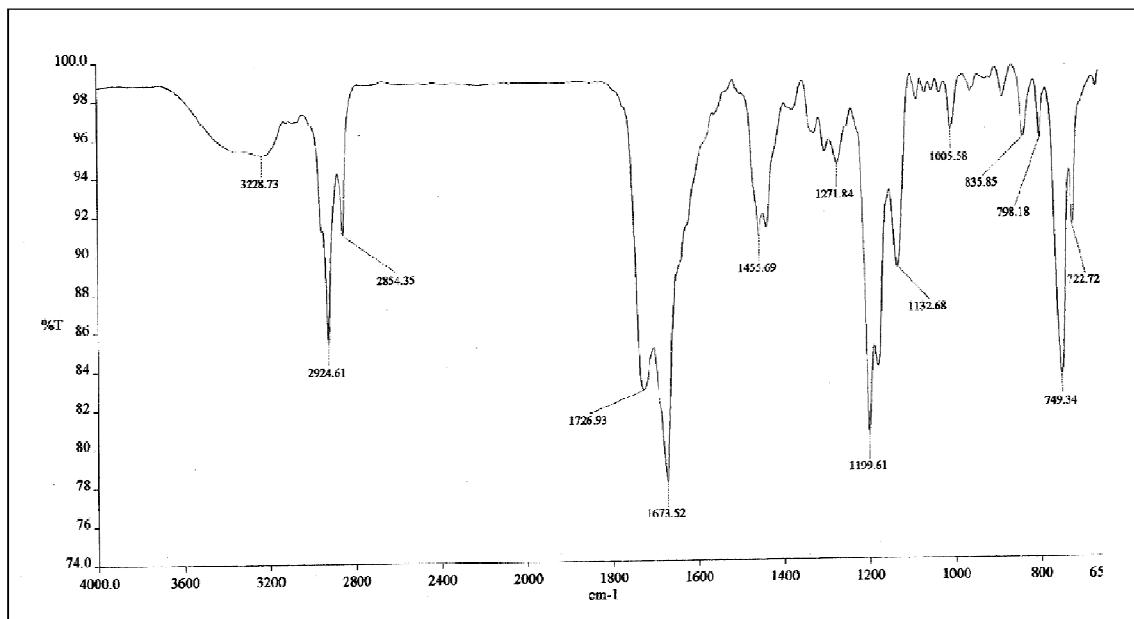


Figura 103 - Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de AUCC-6

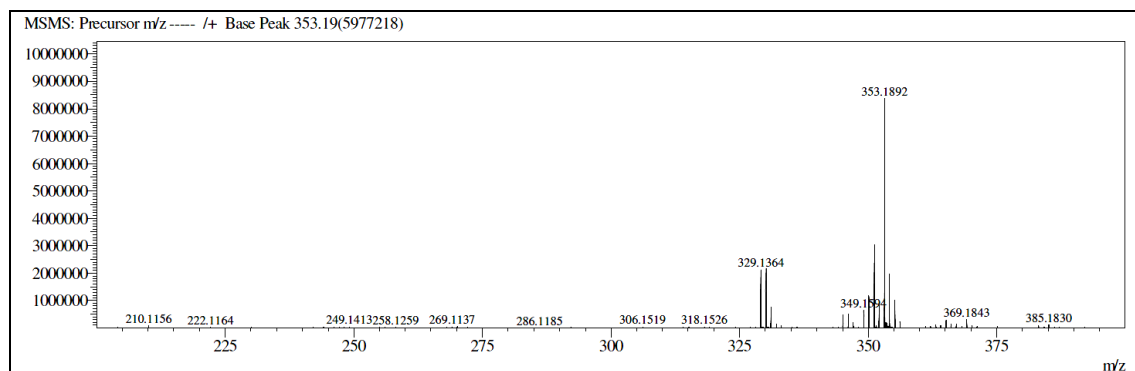


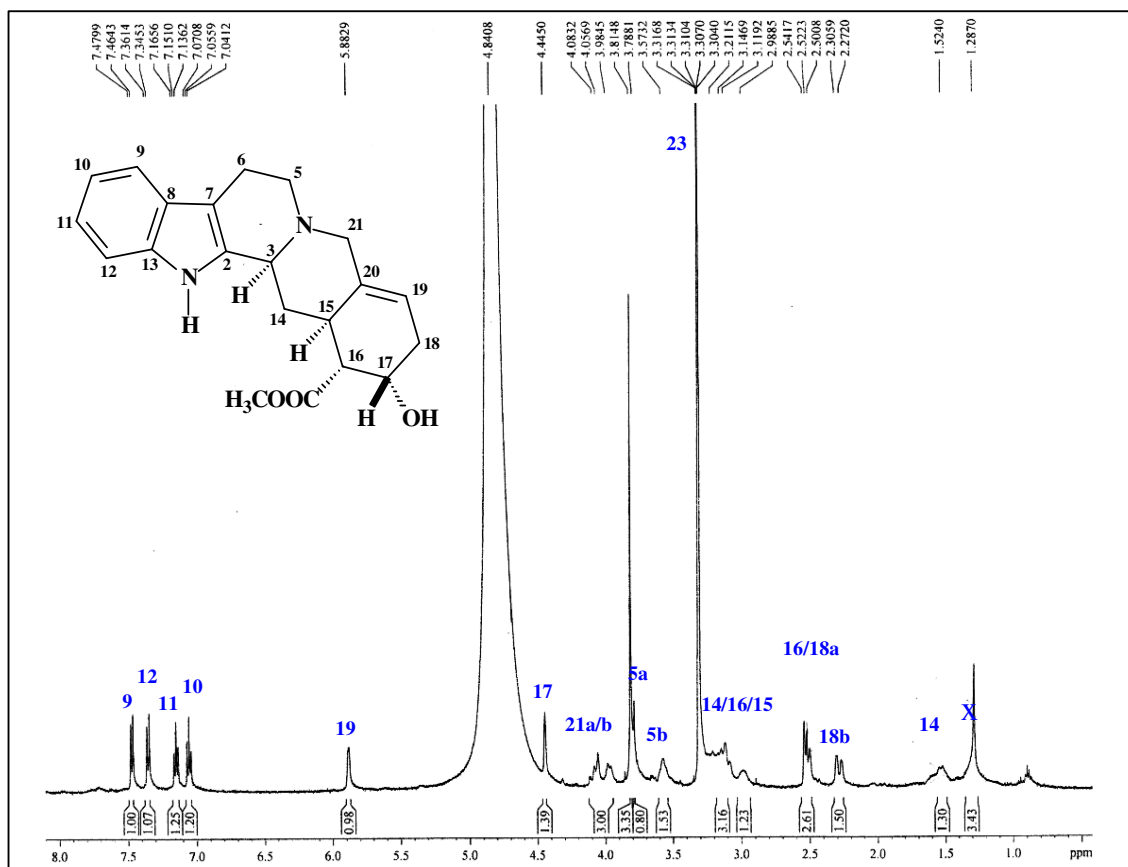
Figura 104 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de AUCC-6.

Figura 105 - Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (125 e 75 MHz, CD_3OD) de AUCC-6.

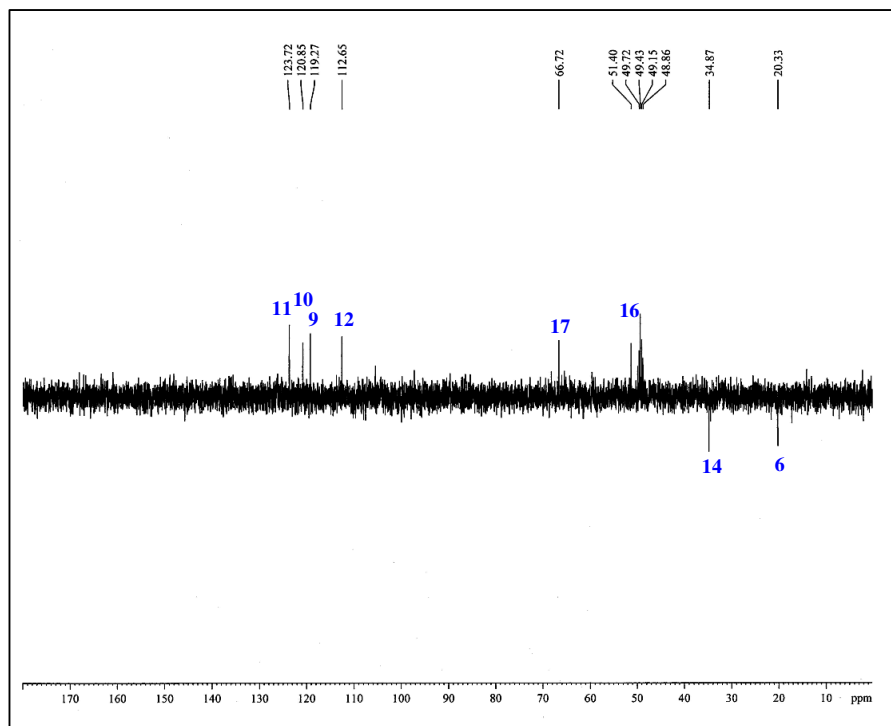
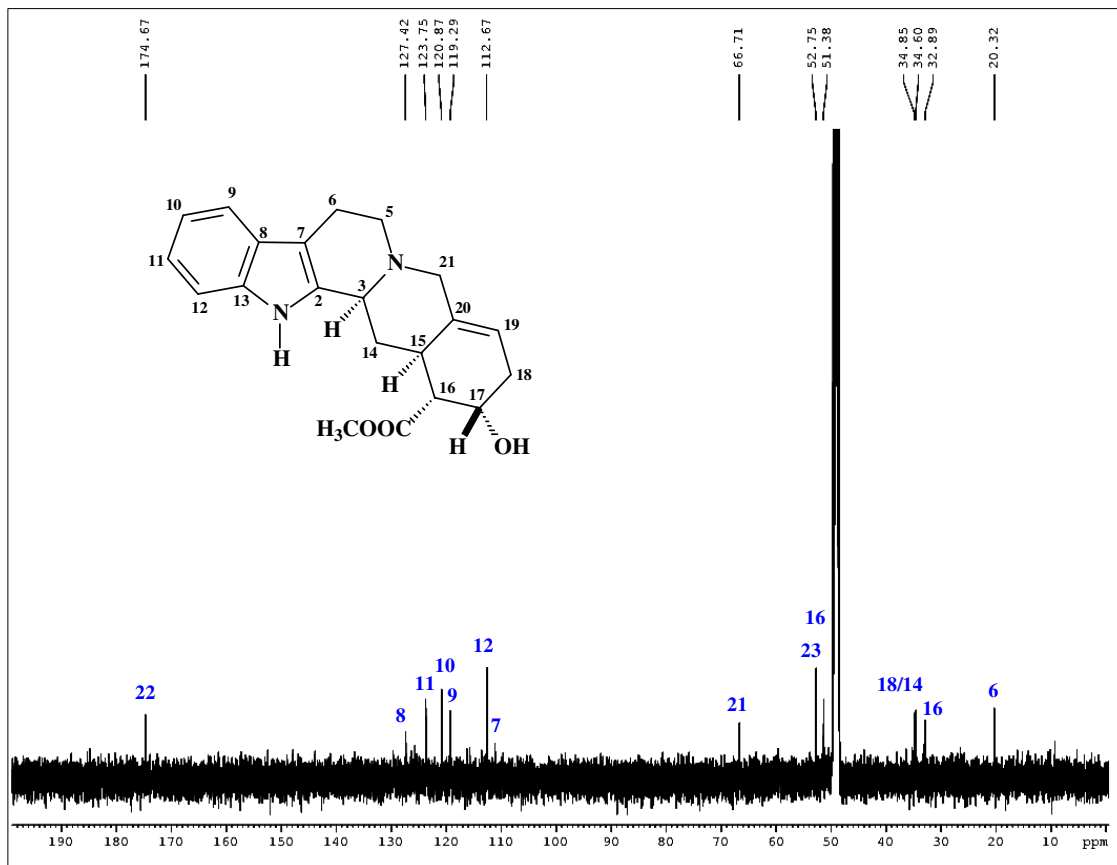


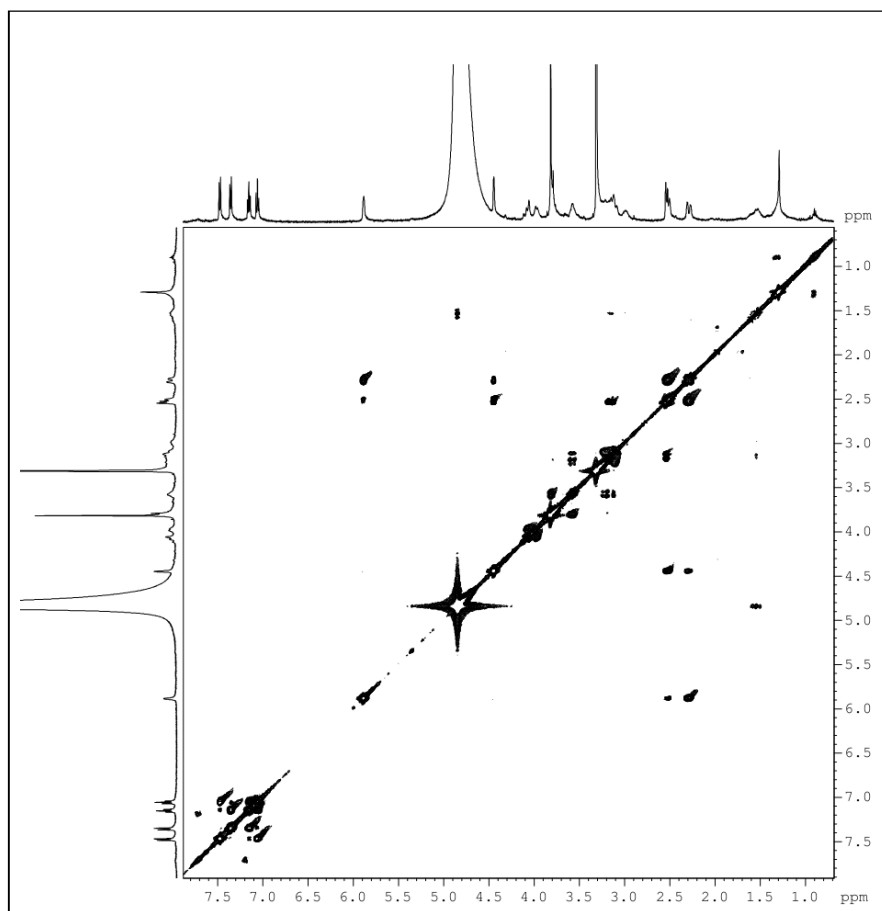
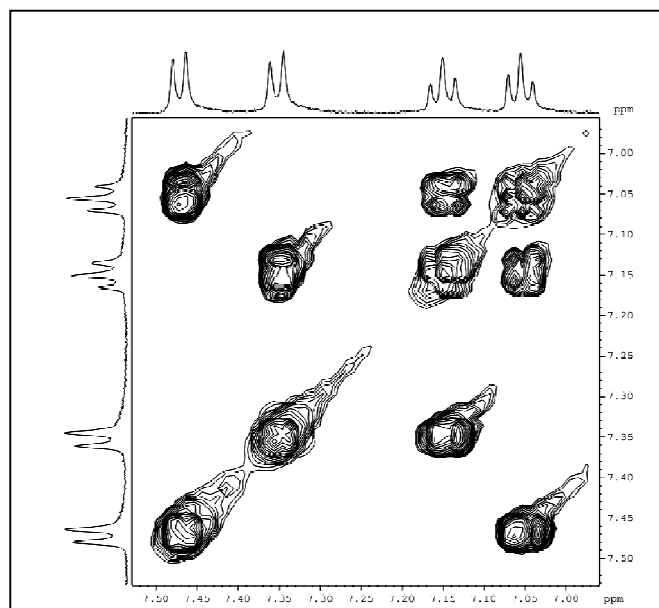
Figura 106 – Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de AUCC-6.Figura 107 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de AUCC-6 e expansão.

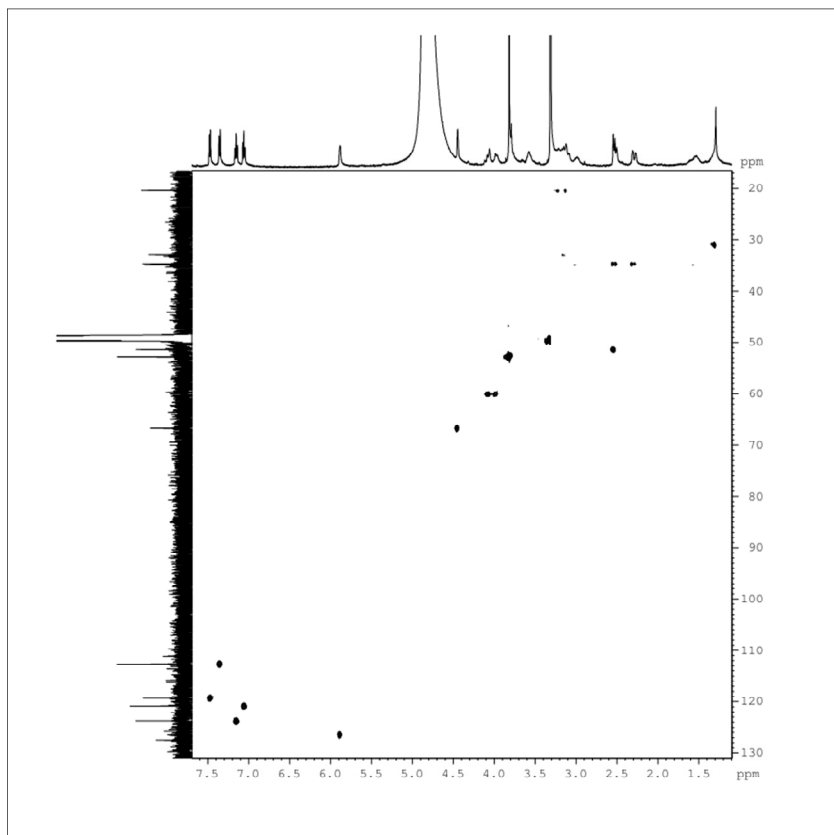
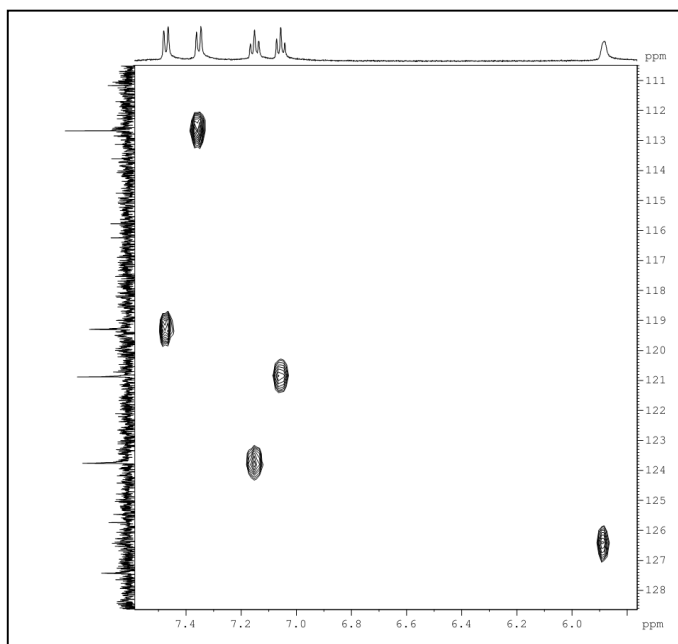
Figura 108 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (CD_3OD , 300 x 75 MHz) de AUCC-6.Figura 109 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (CD_3OD , 300 x 75 MHz) de AUCC-6 e expansão.

Figura 110 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de AUCC-6.

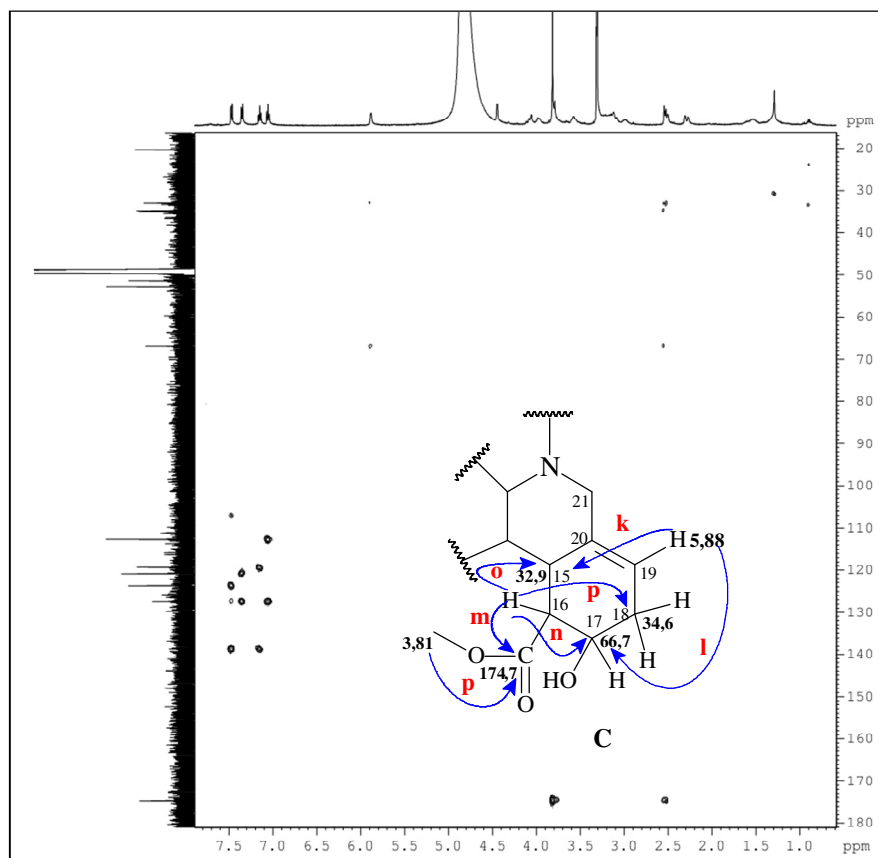
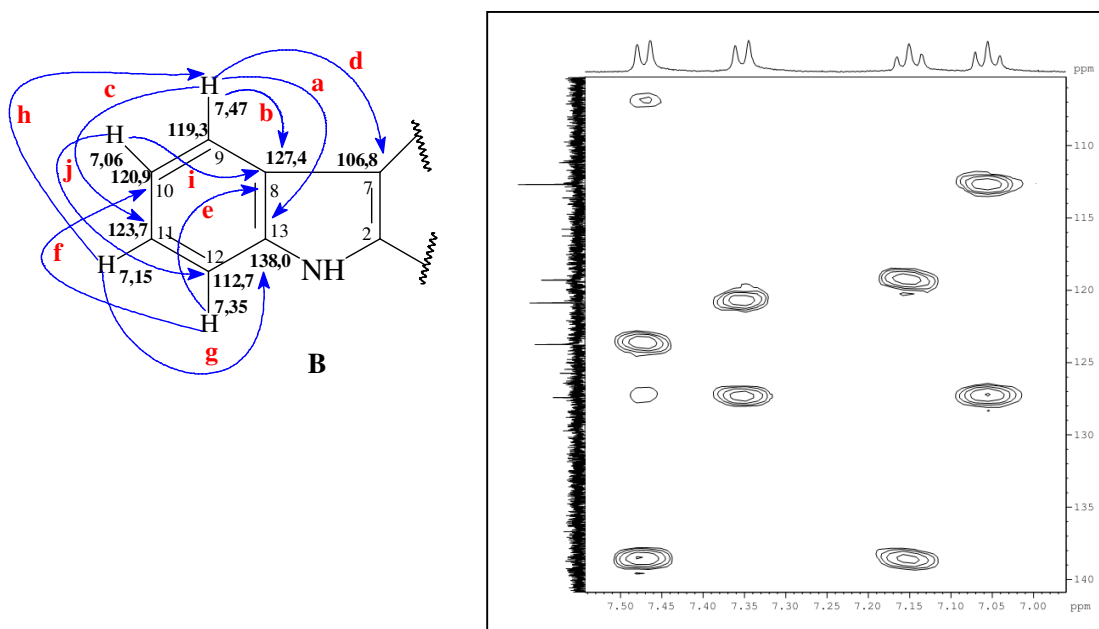


Figura 111 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C –HMBC (300 x 75 MHz, CD_3OD) de AUCC-6 e expansão.



4.8 Determinação Estrutural de LCA-1

Do extrato etanólico do lenho do caule de *A. ulei* foram realizados fracionamentos cromatográficos que permitiram o isolamento de 36,0 mg de um sólido com ponto de fusão 230,1-231,2 °C, denominado LCA-1 (Parte Experimental p. 238).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 116, p. 131), mostrou uma banda larga em 3400 cm^{-1} , correspondente a vibrações de deformação axial de ligação N-H, caracterizando aminas secundárias aromáticas; vibrações de deformação axial de ligação C-N alifático em 1132 cm^{-1} e aromático em 1203 cm^{-1} , além de bandas correspondentes a deformação axial de ligação C=C em 1677 cm^{-1} e 1461 cm^{-1} , e ainda bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H aromático em 721 cm^{-1} e 800 cm^{-1} .

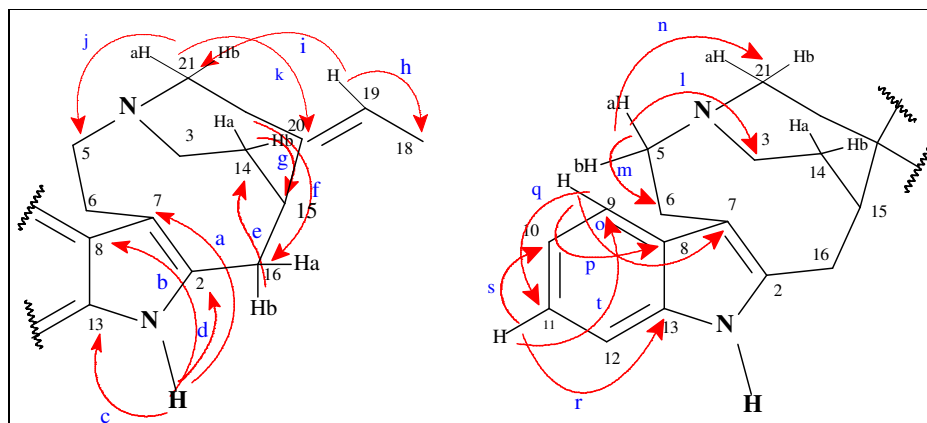
O espectro de RMN de ^{13}C -CPD de LCA-1 (Figura 119, p. 132), apresentou 18 linhas espectrais que em comparação com o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (Figuras 120 e 121, p. 133), apresentou um padrão de hidrogenação de quatro carbonos aromáticos monohidrogenados em δ_{C} 121,8 (7,29), 120,0 (7,25), 118,1 (7,54), 111,9 (7,63); um carbono metínico em δ_{C} 30,9 (3,17); seis carbonos metilênicos em δ_{C} 57,5 (δ_{H} 3,68/3,44), 52,6 (4,21/3,78), 44,8 (3,23/2,33), 32,7(3,25), 23,1 (1,91/1,52) e 20,7 (3,55/3,13); um carbono metílico em δ_{C} 13,7 (1,54). Um carbono correspondente a uma dupla ligação tri substituída em δ_{C} 124,5 (δ_{H} 5,58); além de cinco carbonos não hidrogenados, ausentes no HSQC, em δ_{C} 136,6, 136,3, 135,1, 128,2 e 107,8. Os dados discutidos para LCA-1 encontram-se listados na Tabela 16 (p. 130).

O espectro de massa de alta resolução (IES-EM) obtido para LCA-1 (Figura 117, p. 131) exibiu o pico da molécula ionizada em m/z 267.1900, que comparado com a massa calculada em 267.1861 Daltons, sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$, com um índice de deficiência de hidrogênio igual a oito.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 118, p. 132) de LCA-1, apresentou um sinal em δ_{H} 12,08, correspondente a nitrogênio hidrogenado, quatro sinais em δ_{H} 7,63 (1H, d, 8 Hz); 7,54 (1H, d, 8 Hz); 7,29 (1H, ddd, 1 e 8 Hz) e 7,25 (1H, ddd, 1 e 8 Hz), correspondente ao anel benzênico do sistema indólico, um sinal em δ_{H} 5,58 (1H, m), correspondente a uma dupla ligação tri substituída e um sinal em δ_{H} 1,54 (3H, d, 6 Hz), correspondente a um grupamento metila. Diversos sinais entre 4,2-1,5 ppm encontram-se listados na Tabela 16 (p. 130).

As correlações a longa distância observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC para LCA-1 (Figura 122, p. 134), possibilitaram propor as subestruturas da Figura 112, abaixo. As correlações observadas entre os hidrogênios com seus respectivos carbonos encontram-se listados na Tabela 16 (p. 130).

Figura 112 – Subestruturas propostas para LCA-1 e correlações obtidas a partir do espectro HMBC.

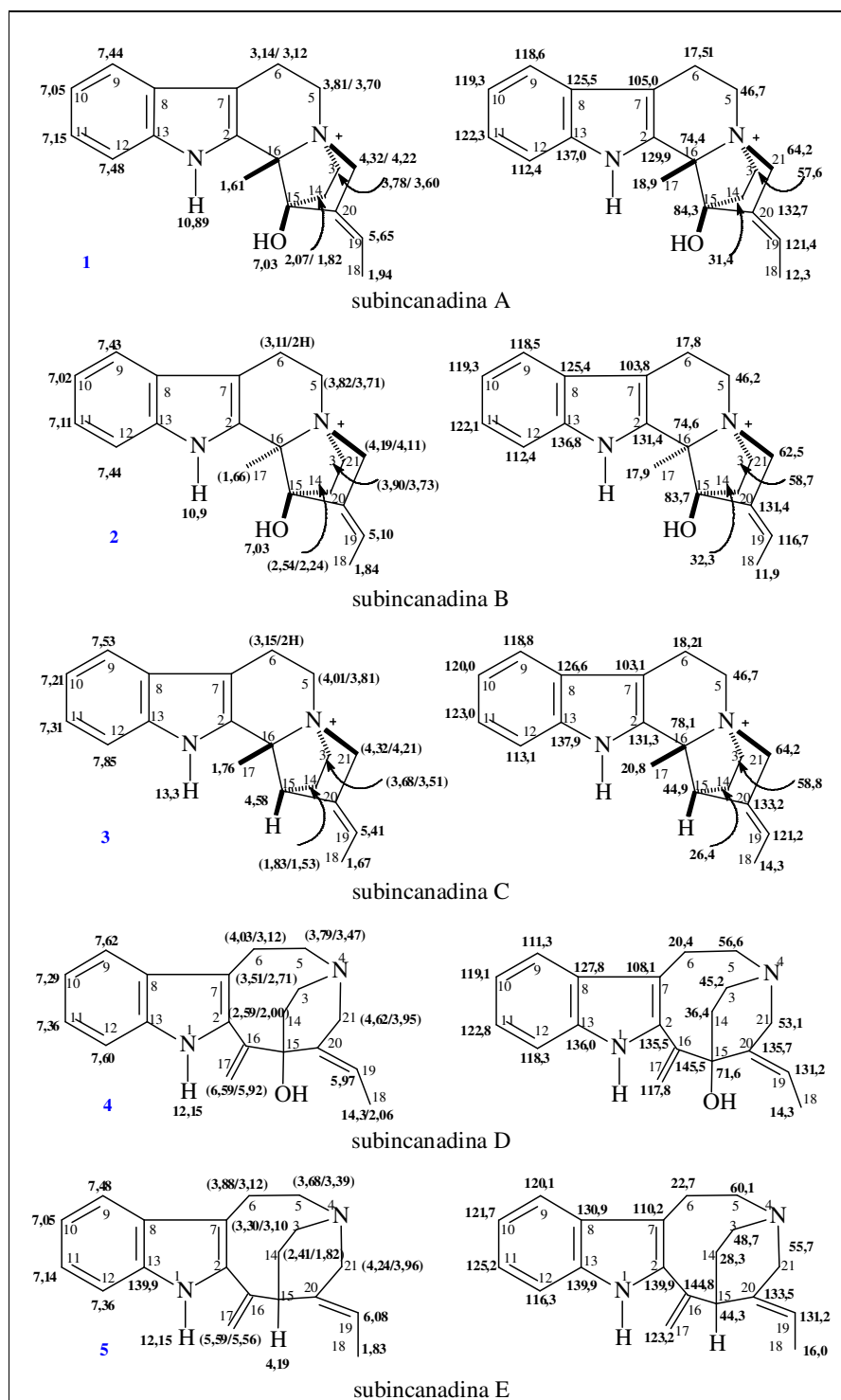


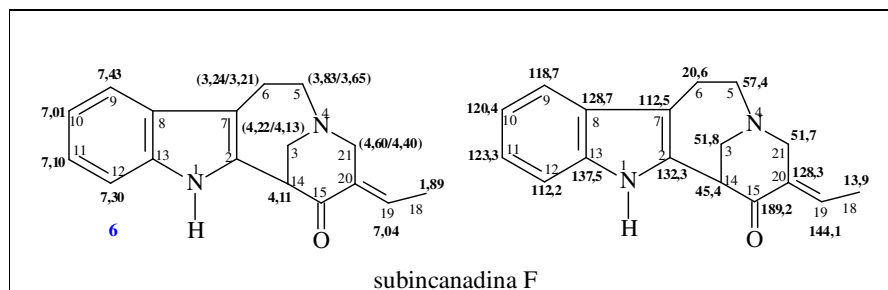
Segundo pesquisa no “SciFinder” v2007, essa substância já havia sido relatada na literatura como 17-nor-subincanadina E com pf 146-147 °C e $[\alpha]_D^{25} = -6,64^\circ$ (CD_3OD , $c = 0,5\%$), no entanto, nunca fora isolada de fonte natural, ocorrendo apenas como intermediário em sínteses de alcaloides de *Strychnos* (AMAT *et al.*, 1996; AMAT *et al.*, 1997).

De acordo com a comparação realizada com modelos da literatura (Quadro 1, p. 127) (KOBAYASHI *et al.*, 2002), para as substâncias subincanadinas de A-E, foi possível observar diferenças nos deslocamentos químicos, principalmente na dupla exocíclica.

Observa-se nessas substâncias uma variação nos deslocamentos químicos tanto de ^{13}C como ^1H . Nota-se que no carbono C-17 em δ_C 117,8 (D), e 123,2 (E), houve uma variação de 5,4 ppm. Os deslocamentos dos hidrogênios H-17 olefínicos em δ_H 6,59/5,92 (D) e δ_H 5,95/5,56 (E), exibiram uma diferença de deslocamento químico de 1,0 e 0,36 ppm.

Quadro 1 – Alcaloide indólico subcanadina (A-E) e seus respectivos dados de RMN de ^1H e ^{13}C .





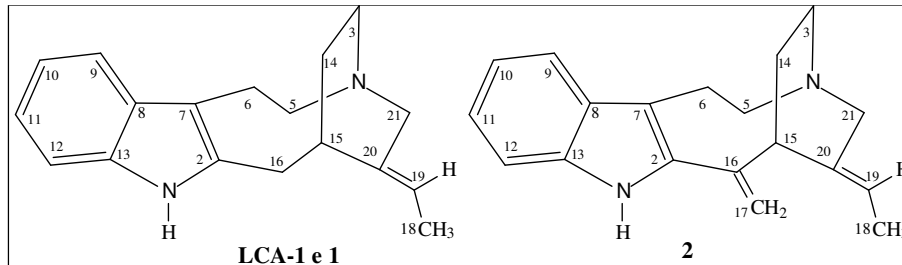
De acordo com os dados da literatura comparados com os dados de RMN ^1H e ^{13}C de LCA-1 listados na Tabela 15 (p. 128), foi possível observar boa concordância entre os dados de LCA-1 e **1**, enquanto LCA-1 e **2** mostraram diferenças principalmente devido a presença de uma dupla ligação terminal entre C-16 e C-17, em **2** (Figura 113, p. 129), além de diferenças de deslocamentos em função dos diferentes solventes.

Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de LCA-1 e dados da literatura (UCHOA, 2006)¹; (KOBAYASHI *et al.*, 2002)².

# C	LCA-1 δ_{C}	Literatura 1 δ_{C}	Literatura 2 δ_{C}
2	136,3	136,5	139,9
3	44,8	44,8	48,7
5	57,5	57,8	60,1
6	20,7	20,9	22,7
7	107,8	107,9	110,1
8	128,2	128,3	130,9
9	118,1	118,3	120,1
10	120,0	120,1	121,7
11	121,8	122,0	125,2
12	111,9	112,1	116,2
13	136,6	136,8	139,9
14	23,1	23,2	28,3
15	30,9	31,2	44,3
16	32,7	32,9	144,7
17	-	-	123,1
18	13,7	14,0	16,0
19	124,5	124,9	131,1
20	135,1	135,3	133,5
21	52,6	52,3	55,7

LCA-1 e **1** $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$ (500 x125 MHz); **2** CD_3OD (500 MHz).

Figura 113 - Comparação com modelo da literatura (KOBAYASHI, 2002) para LCA-1



De acordo com o espectro de RMN ^1H H-NOESY (Figuras 123 e 124, p. 135), foi possível determinar a configuração relativa de C-15 e da dupla ligação em LCA-1, através de acoplamentos dipolares entre H-19 e H-21b, além da interação entre H-18 e H-15. Adicionalmente, observaram-se acoplamentos dipolares em H-21a (δ_{H} 4,21) e H-15 (δ_{H} 3,17) e H-3a (δ_{H} 3,23), evidenciando que essas interações permitiram uma configuração **E** na dupla ligação, confirmada pelo NOESY entre H-19 e H-21b. (Figura 114).

Figura 114 – Acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN 2D ^1H ^1H -NOESY para LCA-1.

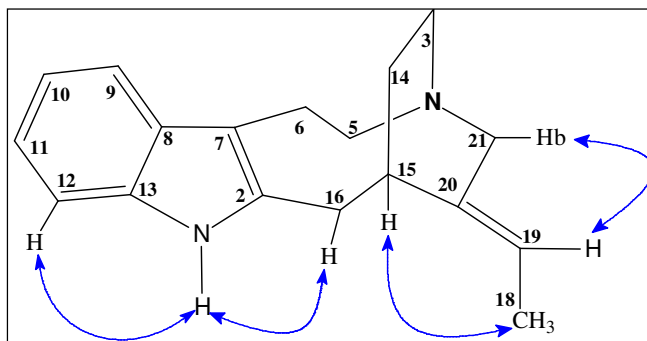


Tabela 16 – Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para LCA-1.

LCA-1			HMBC	
#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Int)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	-	12,08	-	-
2	136,3	-	H-1	-
3a	44,8	3,23 (dd, 6,0; 9,0 Hz)	H-14a	H-21b
3b		2,33 (m)		
5a	57,5	3,68 (dt, 3,0; 14,0 Hz)	H-6a; H-6b	H-21b; H-3a; H-3b
5b		3,44 (t, 13,0 Hz)		
6a	20,7	3,55 (ddd, 3,0 e 16,0 Hz)	H-5a; H-5b	-
6b		3,13 (m)		
7	107,8	-	H-6 ^a	H-1; H-5a/H-5b; H-9; H-16b
8	128,2	-	H-9	H-1, H-12; H-10; H-6a
9	118,1	7,54 (d, 8,0 Hz)	-	H-11
10	120,0	7,25 (ddd, 1,0 e 8,0 Hz)	-	H-12
11	121,8	7,29 (ddd, 1,0 e 8,0 Hz)	H-10	H-9
12	111,9	7,63 (d, 8,0 Hz)	-	H-9; H-10
13	136,6	-	H-1	H-9; H-10
14a	23,1	1,91 (hept, 6,0 Hz)	H-3a; H-3b	-
14b		1,52 (m)		
15	30,9	3,17 (m)	H-14a; H-14b	H-3; H-21
16a	32,7	3,25 (m)	-	H-14a; H-14b
16b				
18	13,7	1,54 (d, 6,0 Hz, 3H)	-	-
19	124,5	5,58 (d, 7,0 Hz)	H-18	H-21b
20	135,1	-	H-21b	H-18
21a	52,6	4,21 (d, 15,0 Hz)	H-20	H-5
21b		3,78 (d, 15,0 Hz)		

δ_{C} (ppm), ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 125x 500 MHz)

Com base nos dados de RMN obtidos para LCA-1 foi possível propor que a mesma, tratava-se de 20(E)-17-nor-subincanadina E (Figura 115), e segundo pesquisas no “SciFinder” v2007, continua sendo relatado pela primeira vez como produto natural.

Figura 115- Estrutura do alcaloide indólico 20(E)-17-nor-subincanadina E (LCA-1)

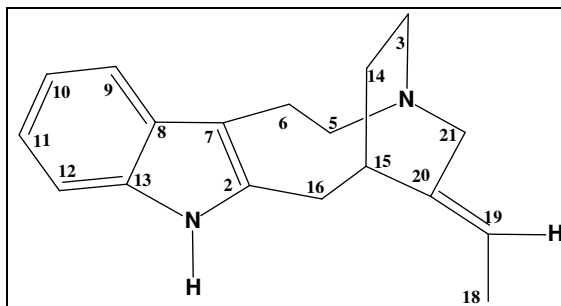


Figura 116 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de LCA-1 (Pastilha de KBr).

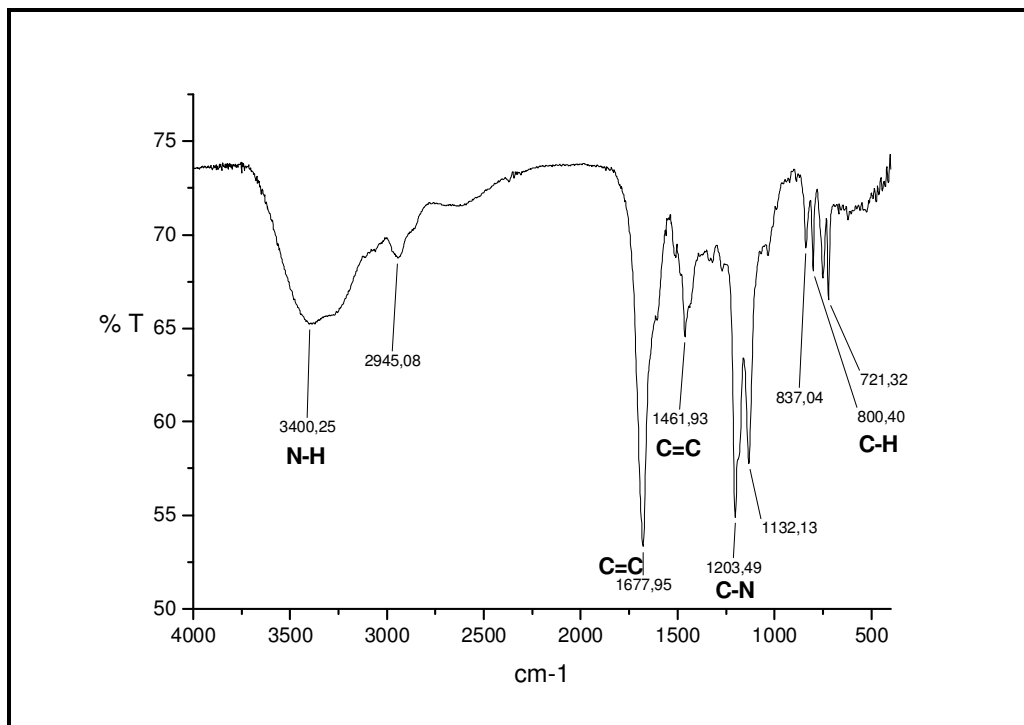


Figura 117 - Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de LCA-1.

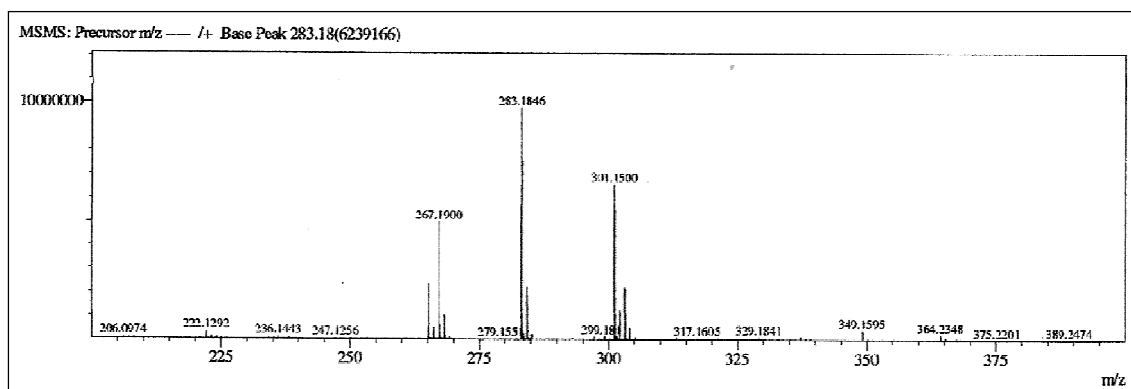


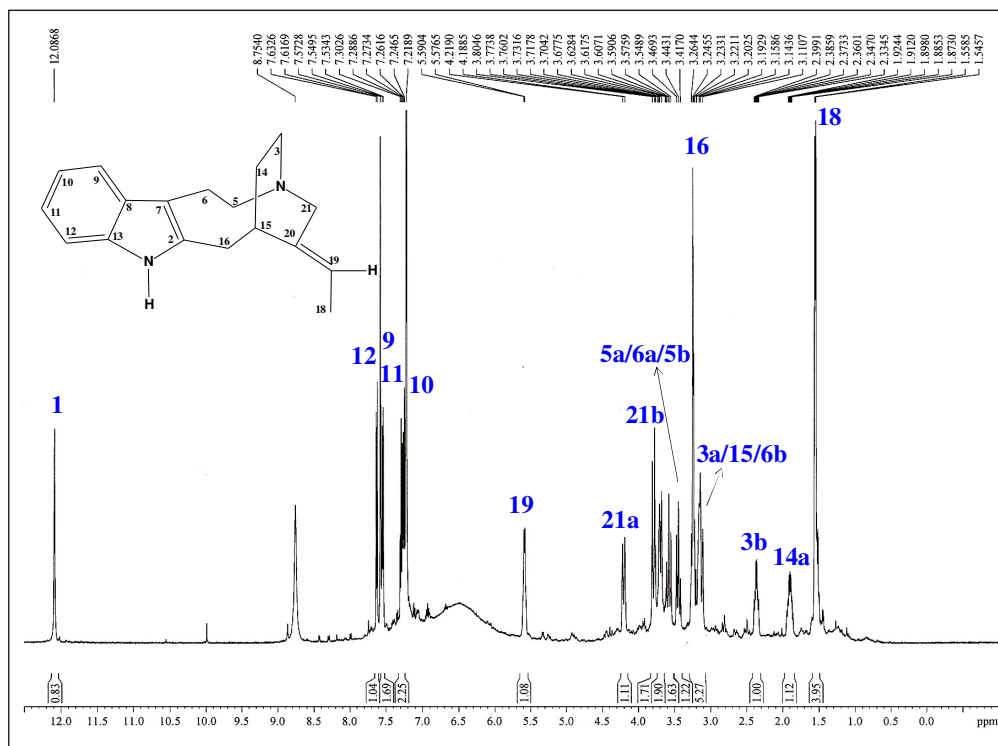
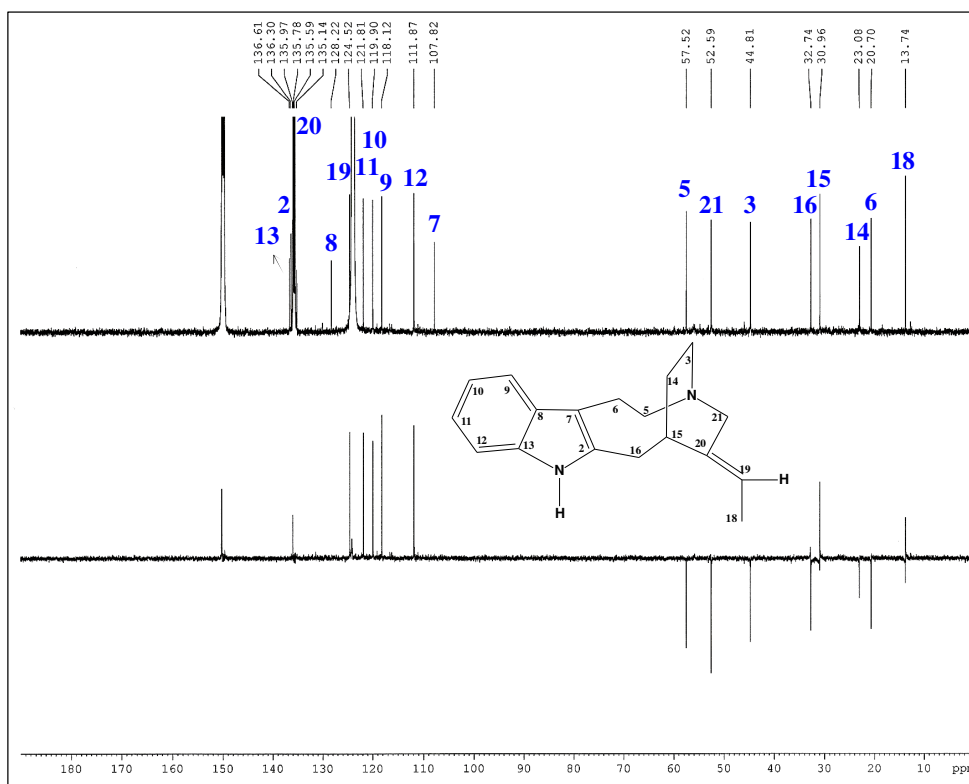
Figura 118 - Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1.Figura 119 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de LCA-1.

Figura 120 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) de LCA-1.

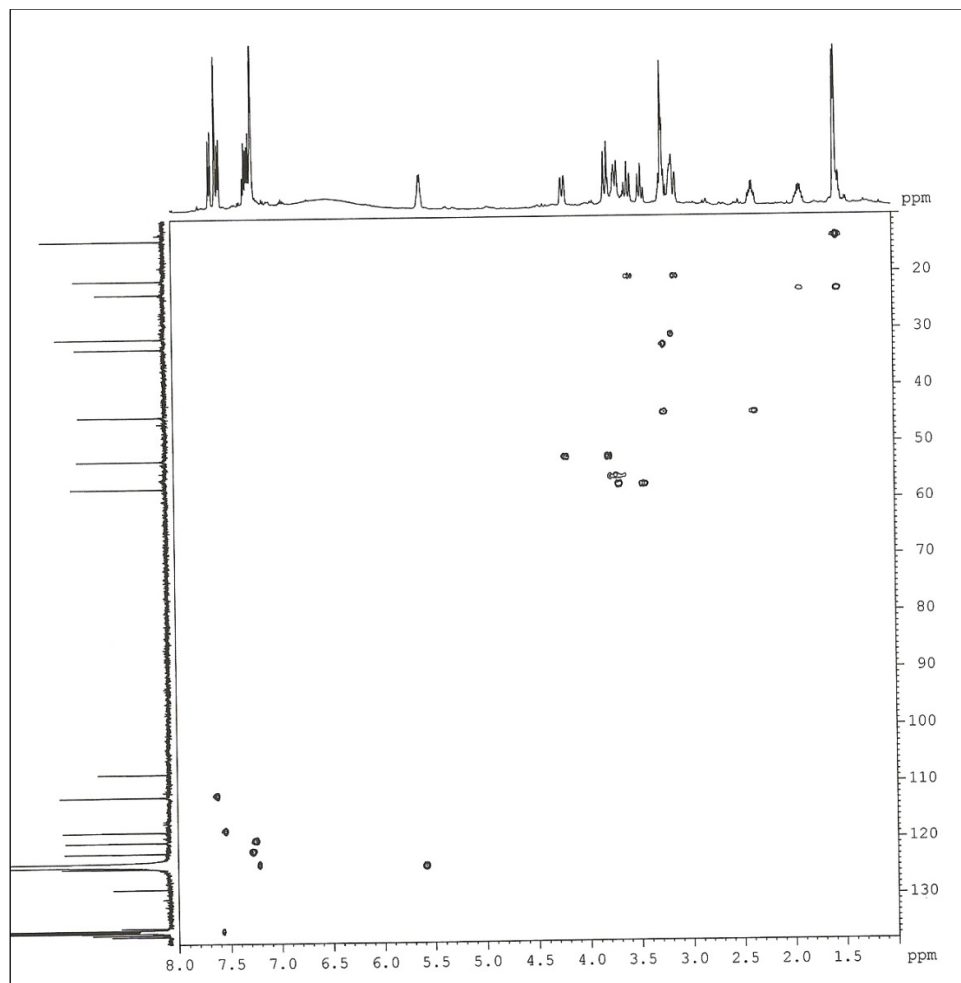


Figura 121 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz) de LCA-1 e expansão.

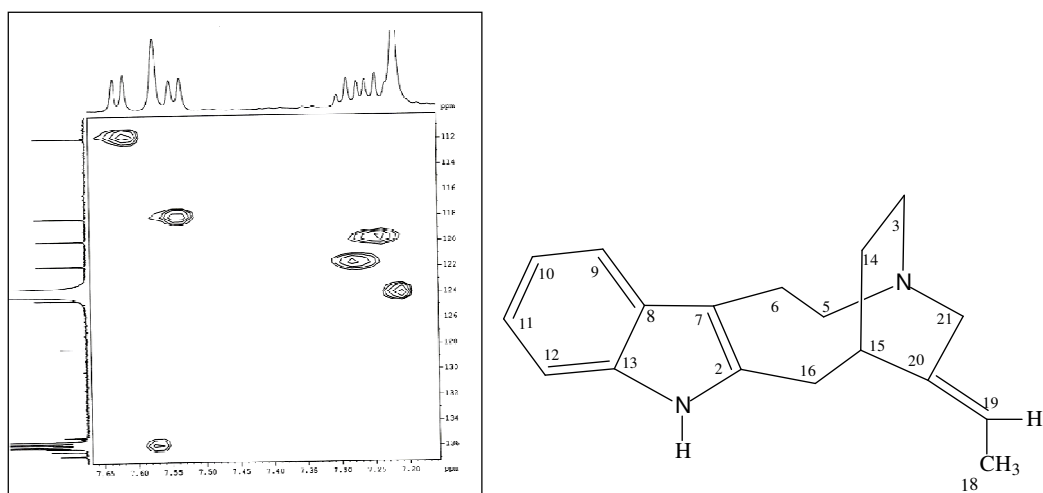


Figura 122 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 x 125 MHz de LCA-1 e expansão.

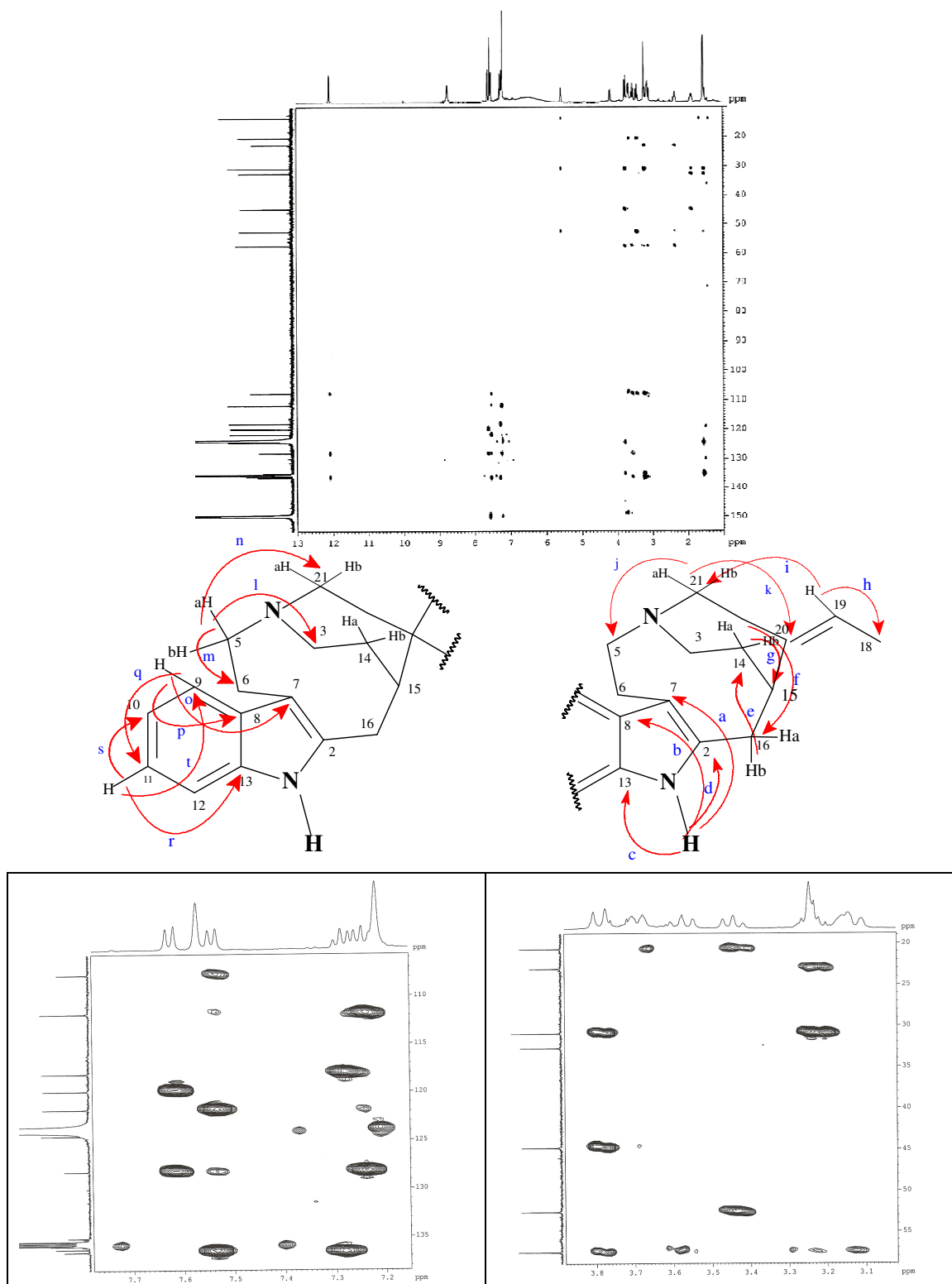


Figura 123 – Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1 e subestrutura mostrando alguns acoplamentos dipolares.

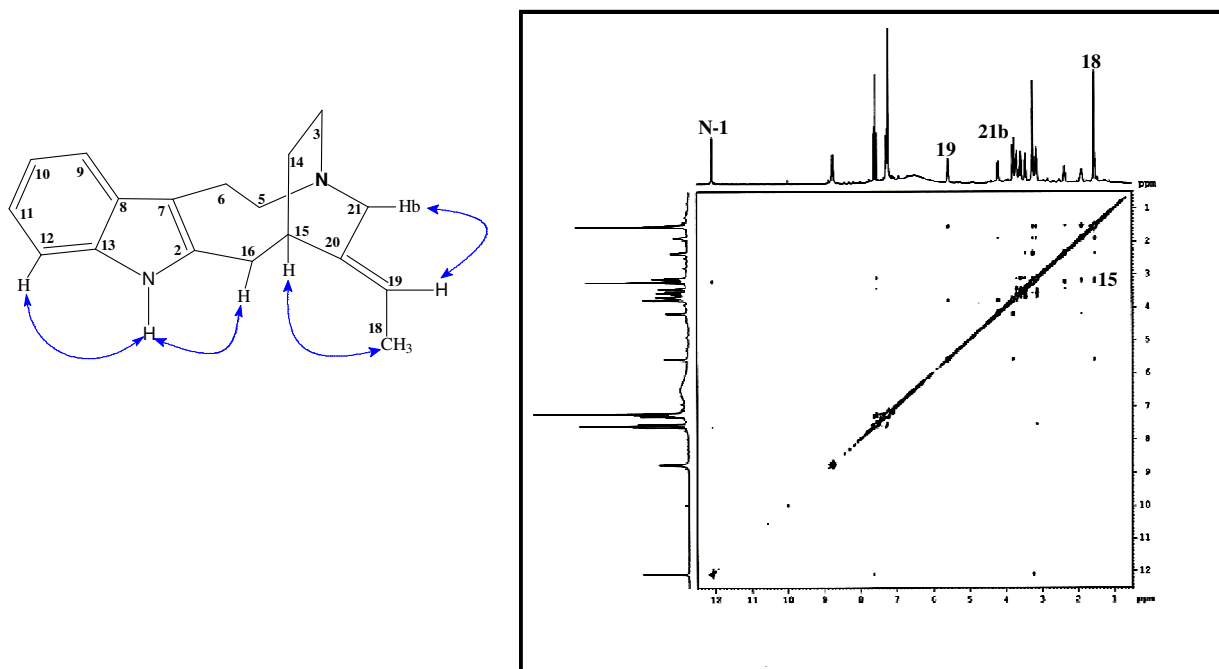
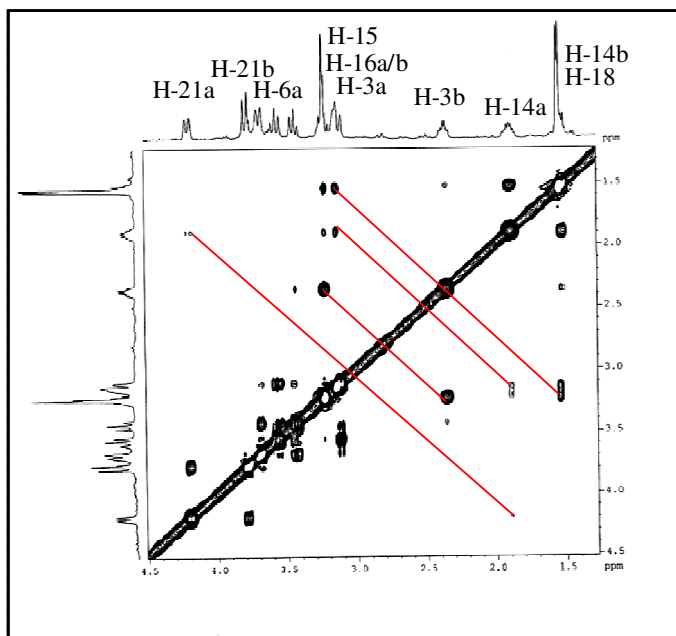


Figura 124 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de LCA-1 e expansão.



4.9 Determinação Estrutural de LREB-1

A fração LRE-B, originada do extrato etanólico do lenho da raiz de *Aspidosperma ulei*, foi submetida a cromatografias de adsorção resultou na obtenção de 4,4 mg de uma resina, denominada LREB-1 (Parte Experimental p. 240).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 130, p. 142), mostrou uma banda larga em 3440 cm^{-1} , correspondentes a estiramento da ligação O-H, e sobreposto a vibração de deformação axial de ligação N-H. Observou-se em 1135 cm^{-1} , vibrações de deformação axial de ligação C-N alifático e aromático em 1201 cm^{-1} , além de uma banda em 1683 cm^{-1} , correspondente a deformação axial de ligação C=O, característico de carbonila conjugada de ácido. Em adição observou-se uma banda em 1475 cm^{-1} , referente a ligação C=C e bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H aromático em 802 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de LRE-1 (Figura 134, p. 144), exibiu 19 linhas espectrais que comparado com o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (Figuras 138 e 139, p. 146), foi possível determinar o padrão de hidrogenação para cada carbono: três carbonos aromáticos monohidrogenados em $\delta_{\text{C}} 115,5$ (6,78), $\delta_{\text{C}} 129,7$ (7,13) e $\delta_{\text{C}} 121,1$ (6,94); um carbono metínico em $\delta_{\text{C}} 75,2$ (4,68); oito carbonos metilênicos confirmados pelo espectro de DEPT 135 (Figura 135, p. 144) em $\delta_{\text{C}} 51,1$ ($\delta_{\text{H}} 4,07/3,93$), $\delta_{\text{C}} 59,4$ (4,43/4,25), $\delta_{\text{C}} 37,6$ (2,70/2,34), $\delta_{\text{C}} 19,3$ (2,11/2,27); $\delta_{\text{C}} 31,1$ (2,10/1,62) e $\delta_{\text{C}} 25,6$ (2,34/1,83); $\delta_{\text{C}} 33,1$ (2,19/1,83) e $\delta_{\text{C}} 40,9$ (2,57/2,40); um carbono metílico desprotegido em $\delta_{\text{C}} 22,9$ (2,42); além de oito carbonos não hidrogenados, em $\delta_{\text{C}} 41,7$; $\delta_{\text{C}} 63,4$; $\delta_{\text{C}} 137,0$; $\delta_{\text{C}} 149,2$, $\delta_{\text{C}} 127,5$ $\delta_{\text{C}} 171,9$; $\delta_{\text{C}} 173,5$; e $\delta_{\text{C}} 190,0$, esses três últimos carbonos, possivelmente carbonílicos.

O espectro de massa de alta resolução (IES-EM) obtido para LREB-1 (Figura 131, p. 142, mostrou o pico do íon molecular $[\text{M}-\text{H}]^+$ com m/z 369.1832 e a massa calculada em 369.1814 Daltons, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ e um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) correspondente a onze insaturações na molécula.

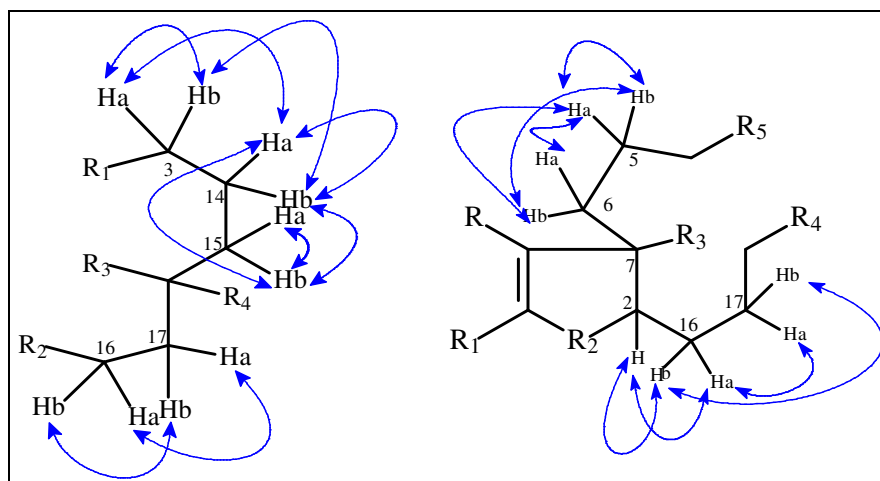
O diagrama de contorno do espectro de HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD ; Figura 138, p. 146), associada à multiplicidade e aos deslocamentos químicos, permitiu correlacionar os sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 17, p. 141).

O espectro de RMN de ^1H de LREB-1 (500 MHz, CD_3OD ; Figuras 132 e 133, p. 143), apresentou 3 sinais em δ_{H} 6,78 (1H, d, 7,9 Hz); δ_{H} 7,13 (1H, t, 7,9 Hz) e δ_{H} 6,94 (1H, d, 7,9 Hz), correspondente aos hidrogênios do anel aromático monossustituído. Um sinal em δ_{H} 2,42 (3H, s), correspondente a um grupamento metila, além de diversos sinais de hidrogênios na região entre 3,9-4,7 ppm.

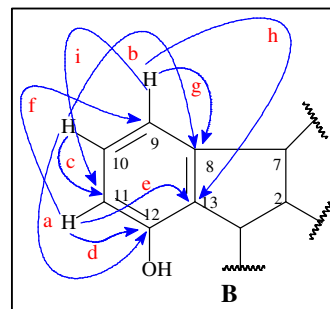
A análise das correlações homonucleares do espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY de LREB-1 (Figura 136, p. 145) mostrou acoplamentos sendo alguns do anel benzênico em δ_{H} 7,13 (H-10) com δ_{H} 6,78 (H-9) e δ_{H} 6,94 (H-11), observado na subestrutura **A**. Acoplamentos vicinais e geminais de hidrogênios em δ_{H} 4,68 (H-2) com δ_{H} 2,34 e 1,80 (H-16a e 16b); δ_{H} 2,70 (H-6a) e δ_{H} 2,34 (H-6b); δ_{H} 2,70 (H-6a) com 4,25 (H-5b) e 4,43 (H-5a). Sinais em δ_{H} 2,19 (H-17 a) e δ_{H} 2,34 (H-16a); δ_{H} 1,81 (H-17 b) e δ_{H} 2,19 (H-17 a); δ_{H} 2,34 (H-16 a) e δ_{H} 1,83 (H-16b); δ_{H} 2,19 (H-17 a) e δ_{H} 2,81 (H-17b). Demais sinais em δ_{H} 2,29 (H-15 a) e δ_{H} 1,62 (H-15b); δ_{H} 2,19 (H-17 a) e δ_{H} 2,81 (H-17b); δ_{H} 2,27 (H-14 a) e δ_{H} 2,11 (H-14b); δ_{H} 4,07/3,93 (2H-3) com δ_{H} 2,27/2,11 (2H-14) e δ_{H} 2,11 (H-14b) com δ_{H} 1,62 (H-15b), que podem ser observados nas subestruturas para LREB-1 na Figura 125 (p. 137).

Através do espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC e COSY foi possível determinar alguns pares de carbonos em LREB-1 (Figura 125, p. 137), indicando que os mesmos encontram-se isolados por carbonos não hidrogenados ou heteroátomos.

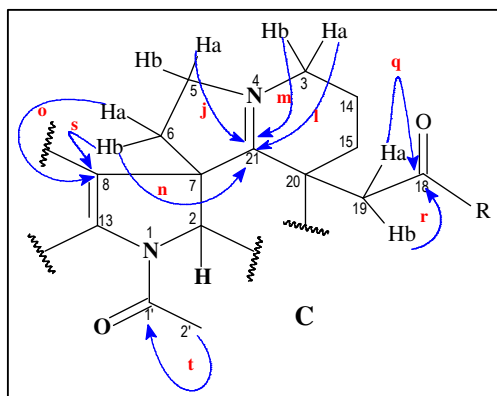
Figura 125 - Subestruturas obtidas a partir dos dados de COSY e HSQC de LREB-1



As correlações a longa distância foram observadas no espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figuras 140 e 141, p. 147 e 148), onde foi possível assinalar o hidrogênio em δ_{H} 7,13 (H-10) com δ_{C} 149,2 (C-12, a); δ_{C} 137,0 (C-8, b), 121,1 (C-11, c); δ_{H} 6,94 (H-11) com δ_{C} 149,2 (C-12, d); δ_{C} 127,5 (C-13, e) e δ_{C} 115,5 (C-9, f); δ_{H} 6,78 (H-9) com δ_{C} 137,0 (C-8, g); δ_{C} 127,5 (C-13, h) e δ_{C} 121,1, 0 (C-11, i), indicando mono substituição no C-12, mostrada na subestrutura **B**.

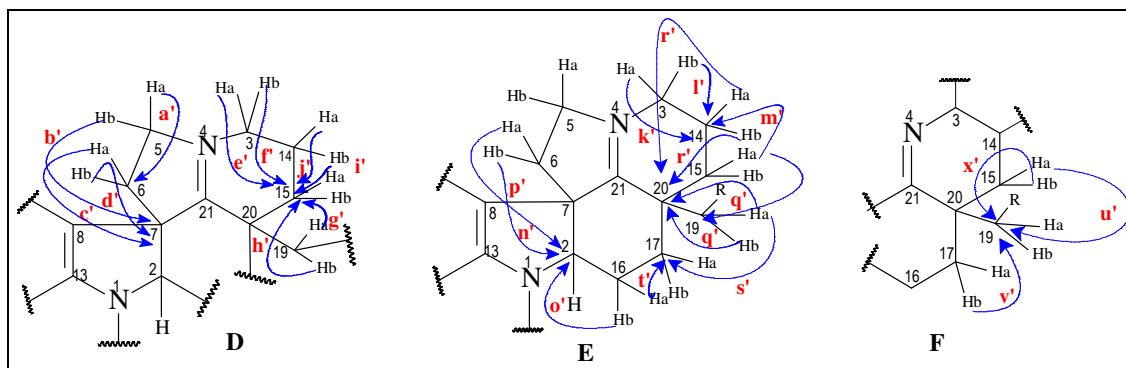


Na expansão (δ_{H} 4,4-2,2 ppm e δ_{C} 135,0-193,0 ppm) de RMN 2D de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC para LREB-1 (Figura 141, p. 148), observaram-se acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 4,43 (H-5a, j); δ_{H} 4,07 (H-3a, l); δ_{H} 3,93 (H-3b, m) e δ_{H} 2,29 (H-6b, n) a três ligações com o carbono em δ_{C} 190,0 (C-21), além de δ_{H} 2,70 (H-6a, o) com δ_{C} 137,0 (C-8, p). Sinais em δ_{H}



2,57 (H-19a, q) e δ_{H} 2,40 (H-19b, r) com δ_{C} 173,5 (C-18) e δ_{H} 2,29 (H-6b, s) com o carbono δ_{C} 137,0 (C-8), além dos hidrogênios da metila em δ_{H} 2,42 (H-2', t) com uma carbonila de amida em 171,9 (C-1'), podendo-se propor a subestrutura **C** que confere a presença de carbonila de ácido e a presença de um átomo de nitrogênio entre os carbonos C-3, C-5 e C-21. De acordo com o deslocamento de C-21 em δ_{C} 190,0 é possível que o nitrogênio esteja quaternário.

Figura 126 - Subestruturas D, E e F obtidas das correlações de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC de LREB-1

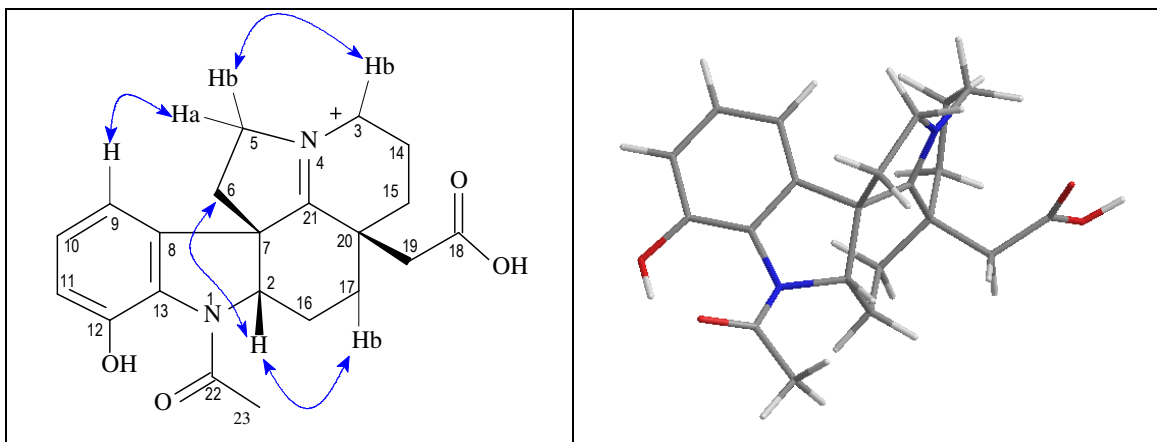


Na expansão de RMN 2D de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figura 142, p. 149), de δ_{H} 4,4 a 1,6 ppm e δ_{C} 75,0 a 18,0 ppm, encontram-se as correlações observadas nas subestruturas **D**, **E** e **F** (Figura 126, p.138).

O espectro de RMN 2D de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY de LREB-1 (Figura 143, p. 150), por sua vez, apresentou os acoplamentos dipolares, entre os hidrogênios em δ_{H} 4,68 (H-2) com o hidrogênio em δ_{H} 2,70 (H-6a), definindo a estereoquímica de H-2/H-6 em β , observado na estrutura proposta (Figura 127, p. 139).

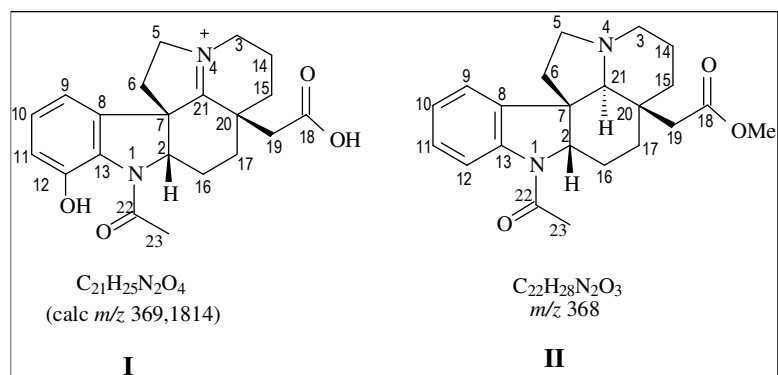
Sinais em δ_{H} 3,93 (H-3b) com δ_{H} 4,25 (H-5b); δ_{H} 4,68 (H-2) com δ_{H} 1,81 (H-17b), além do acoplamento dipolar entre H-9 (δ_{H} 6,78), com o H-5a (δ_{H} 4,43) também foram atribuídos para LREB-1.

Figura 127 – Acoplamentos dipolares observados no espectro de NOESY para LREB-1 e estrutura em 3D.



Pesquisa no “SciFinder Scholar v2007”, mostrou que LREB-1 ainda não havia sido relatado na literatura. Busca por similaridade estrutural possibilitou obter modelos para comparação de seus dados (MILBORROW; DJERASSI, 1969), juntamente com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da literatura (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012). Na Figura 128, é feita uma comparação entre as substâncias **I** (LREB-1) e **II** (literatura). Nota-se a presença de carbonila de ácido em C-18 (δ_{C} 173,5, **I**) e carbonila de éster em C-18 (δ_{C} 171,93, **II**).

Figura 128 – Comparação das estruturas LREB-1(I) e estrutura da 12-demetoxi-N-acetilcilindrocarina (II).



Diferença significativa é observada no nitrogênio (N-4) quaternário de LREB-1, e também com relação ao C-21 (δ 190,0), enquanto em **II** observa-se um C-21 hidrogenado em (δ 69,18), além de uma OH ligada ao C-12 do anel aromático indólico e, ausente em **II** (12-demetoxi-N-acetilcilindrocarina).

Com base nos dados espectroscópicos de RMN de 1H e ^{13}C , IV e EM, além da literatura pôde-se propor que a substância LREB-1 tratava-se do ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-óico (Figura 129), um alcaloide indólico com esqueleto plumerano, inédito na literatura.

Figura 129 - Estrutura do alcaloide ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-óico (LREB-1).

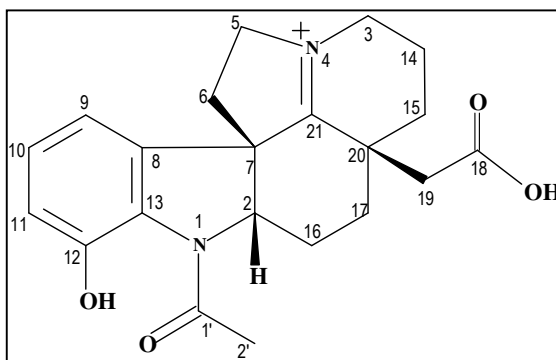


Tabela 17 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C de LREB-1 e dados da literatura para o alcaloide 12-demetoxi-N-acetilcilandrocarina (GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012)², (MILBORROW; DJERASSI, 1969)³.

#	LREB-1		HMBC		² LITER.		³ LITER.
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Int)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
2	73,2	4,68 (m)	H-16b	2H-6	67,6	4,04 (dd, 10,8; 8,0 Hz)	4,0-4,2 (q)
3a 3b	51,1	4,07 (m) 3,93 (m)		2H-15	53,0	-	-
5a 5b	59,4	4,43 (m) 4,25 (m)	H-6a		52,2	3,30-2,95 (m, 2H)	-
6a 6b	37,6	2,70 (q, 10,0 Hz) 2,29 (m)	H-5a	-	39,3	-	-
7	63,4	-	2H-6	H-5b, H-9	53,5	-	-
8	137,0	-	H-9	2H-6; H-10	137,4	-	-
9	115,5	6,78 (d, 7,9 Hz)	-	H-11	124,3	7,30-6,90 (m)	6,9-7,3 (m)
10	129,7	7,13 (t, 7,9 Hz)			122,3	7,30-6,90 (m)	6,9-7,3 (m)
11	121,1	6,94 (d, 7,9 Hz)	H-10	H-9	127,9	7,30-6,90 (m)	6,9-7,3 (m)
12	149,2	-	H-11	H-10	-	-	-
12'	-	-	-	-	118,6	8,12 (m)	-
13	127,5	-	-	H-9; H-11	141,1	-	-
14a 14b	19,3	2,27 (m) 2,11 (m)	2H-3 2H-15		21,6	-	-
15a 15b	31,1	2,29 (m) 1,62 (m)	2H-14	2H-3; 2H-19	34,8	-	-
16a 16b	25,6	2,34 (m) 1,83 (m)	H-17b		29,7	-	-
17a 17b	33,1	2,19 (m) 1,81(m)	-	H-15b; 2H-19	24,6	-	-
18	173,5	-	2H-19	-	171,8	-	-
18' OMe	-	-	-	-	51,0	3,57 (s)	2,56 (s)
19a 19b	40,9	2,57 (d, 16,0 Hz) 2,40 (m)	-	2H-15; H-17b	42,4	-	-
20	41,7	-	2H-19	2H-14	36,0	-	-
21	190,0	-	-	H-17a; 2H-3 H-5a; H-6b H-15a	-	-	-
21'	-	-	-	-	69,9	2,53 (s, 1H)	2,53 (s)
22 (Ac-N) ^{1'}	171,9	-	-	-	168,3	-	-
23 (Ac-N) ^{2'}	22,9	2,42 (s, 3H)			23,2	2,30 (s)	2,26 (s)

LREB-1 (125 x 500 MHz; CD₃OD); ²(Não fornecido; CDCl₃); ³(100 MHz, CDCl₃).

Figura 130 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de LREB-1 (Pastilha de KBr).

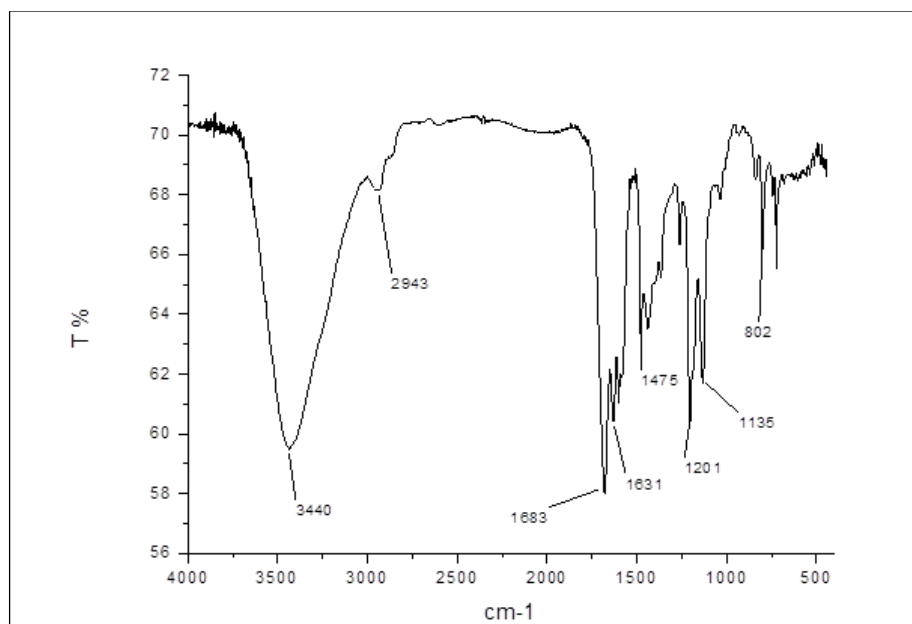


Figura 131 - Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de LREB-1.

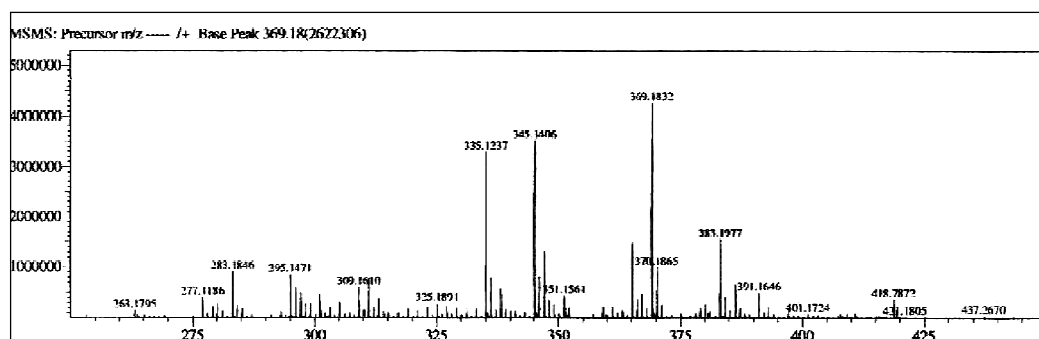


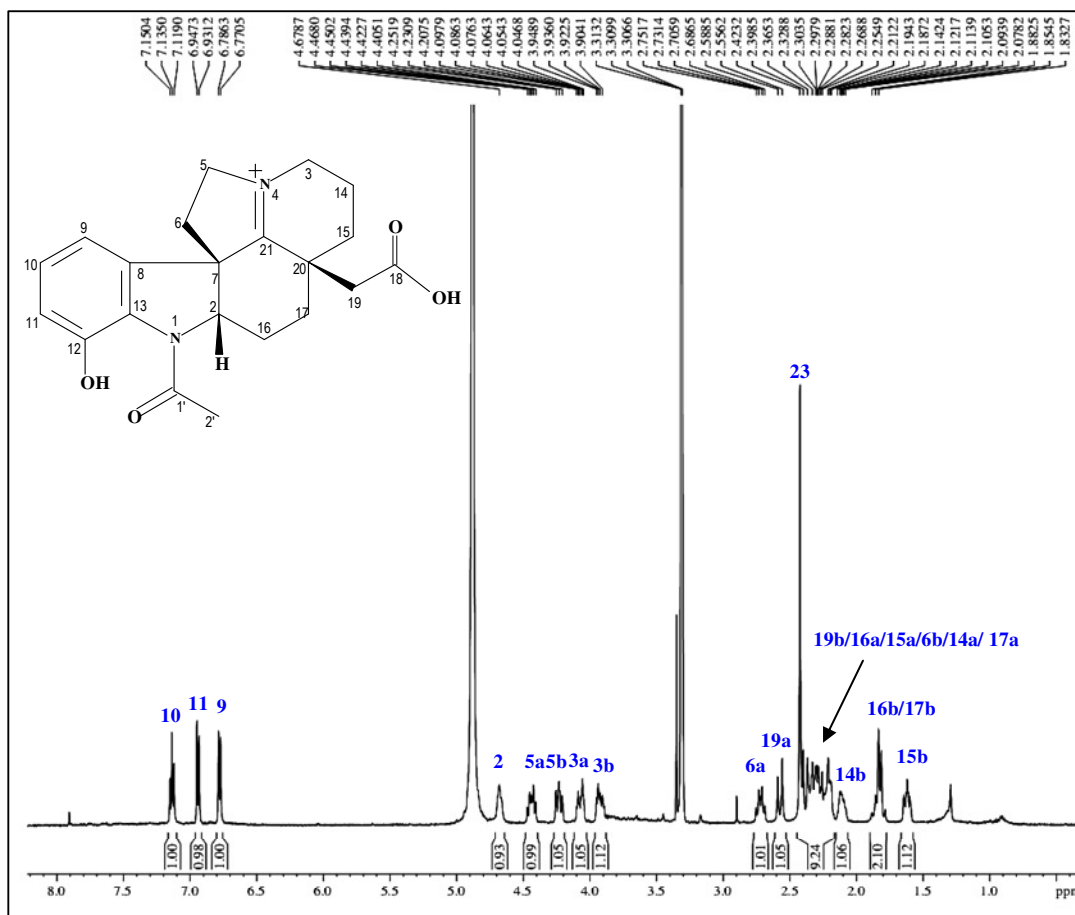
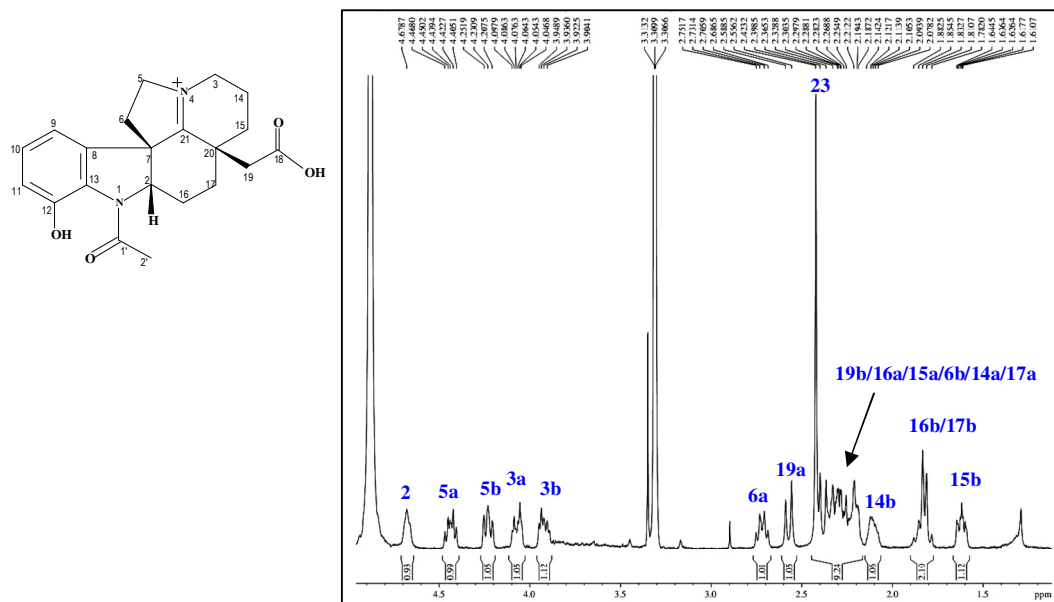
Figura 132 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de LREB-1.Figura 133 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de LREB-1.

Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C -CPD de LREB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

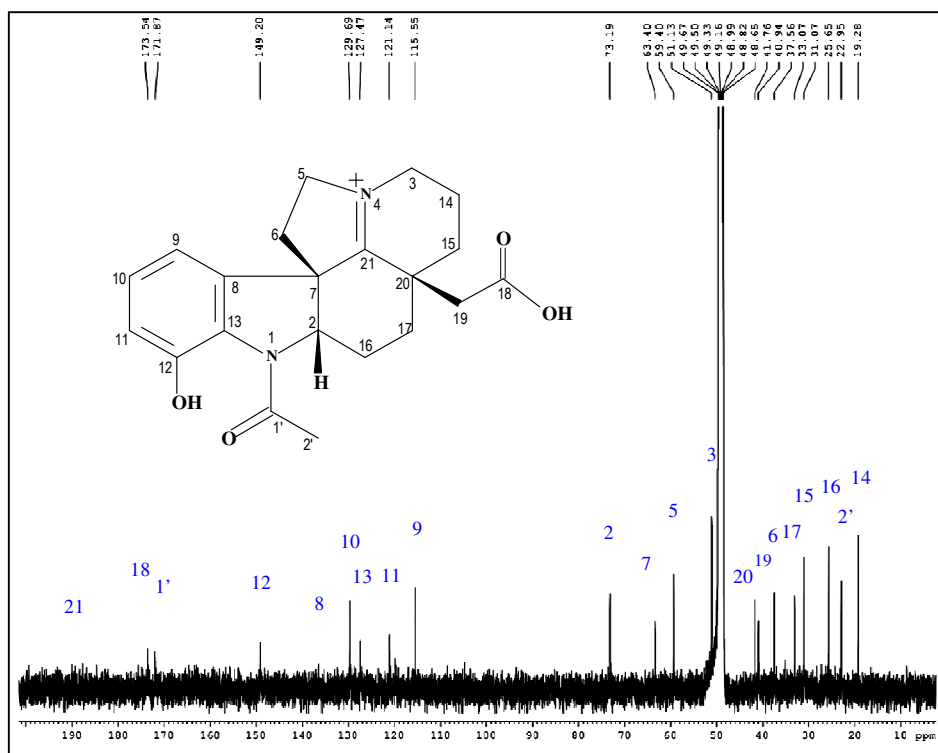


Figura 135 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT (CD_3OD ; 125 MHz) de LREB-1.

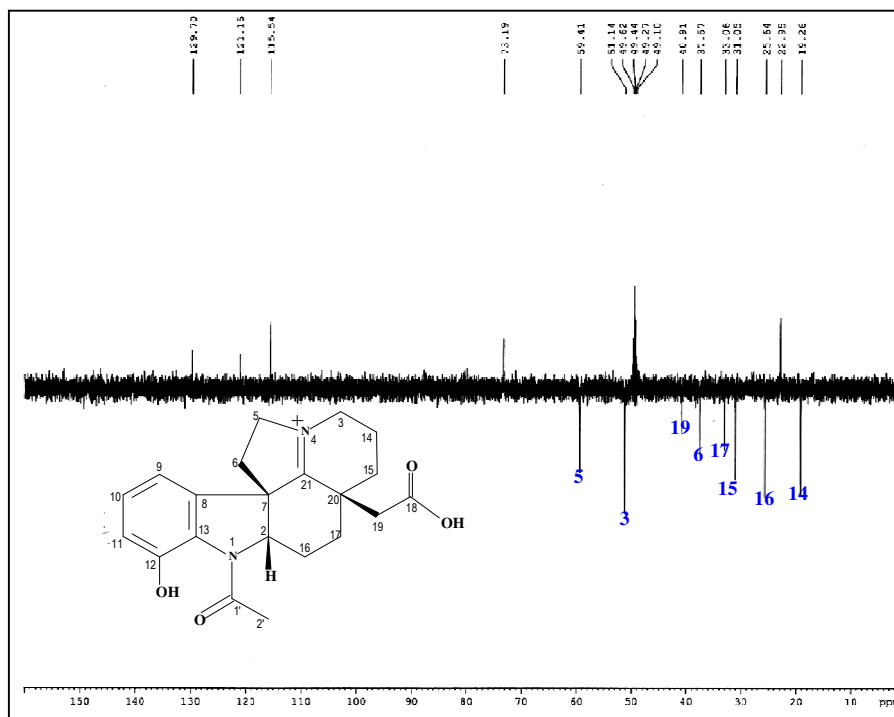


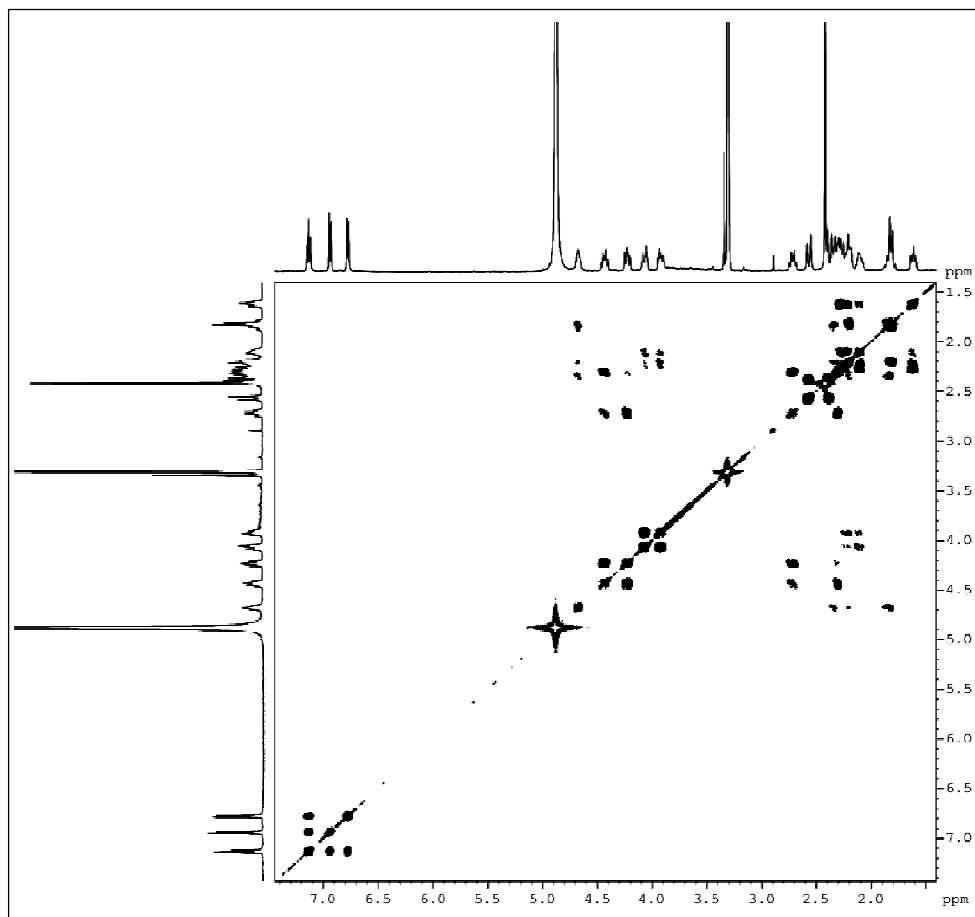
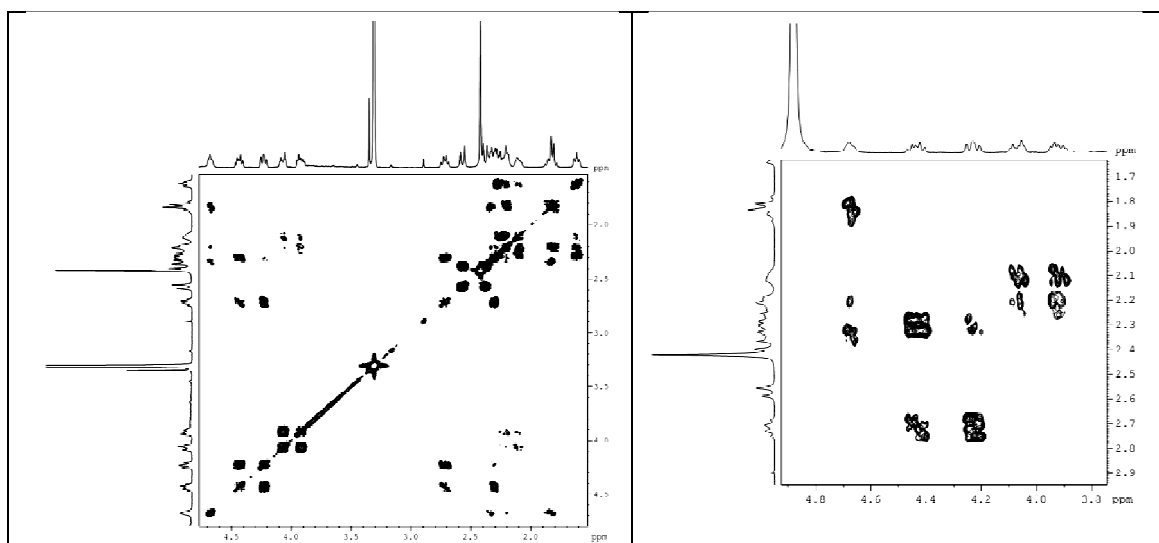
Figura 136 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1.Figura 137 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1 e expansão.

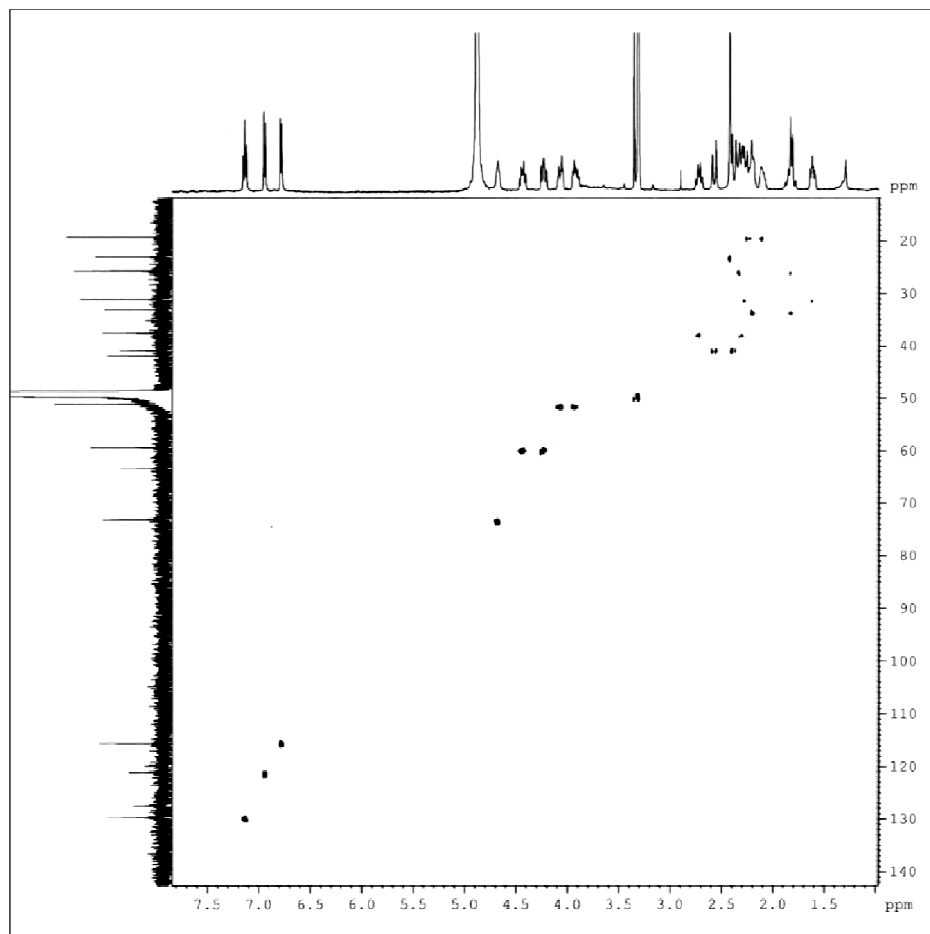
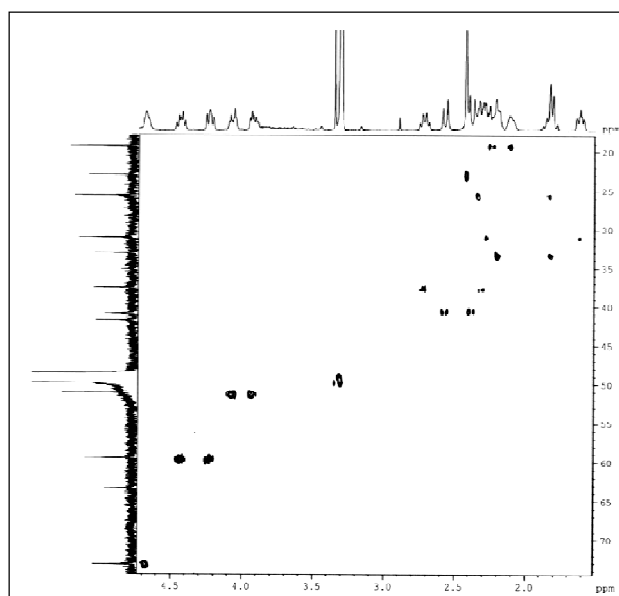
Figura 138 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1.Figura 139 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1 e expansão.

Figura 140 – Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1 e subestruturas mostrando algumas correlações.

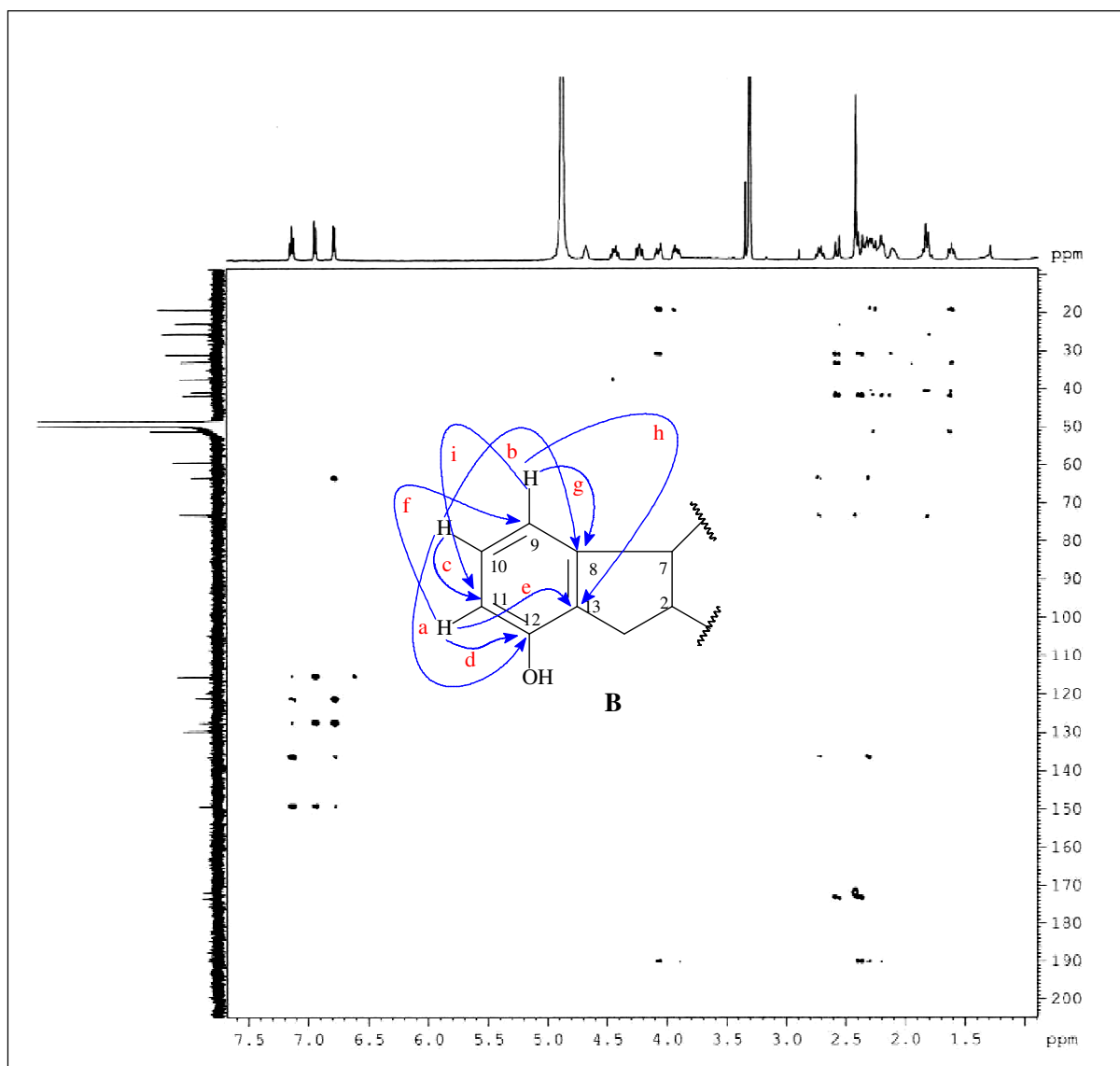


Figura 141 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de LREB-1e expansão.

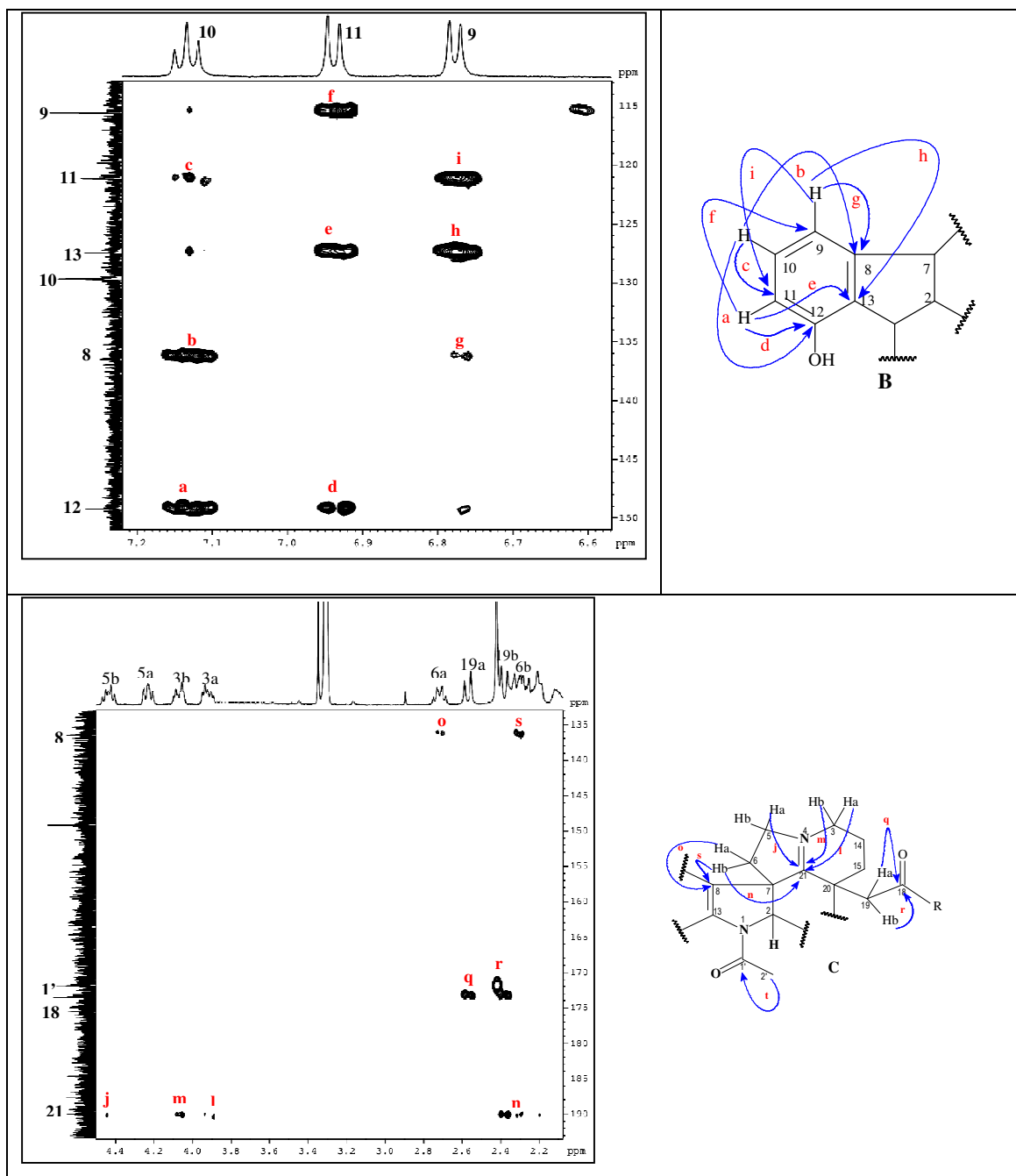


Figura 142 – Expansão do Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC de LREB-1e subestruturas com correlações.

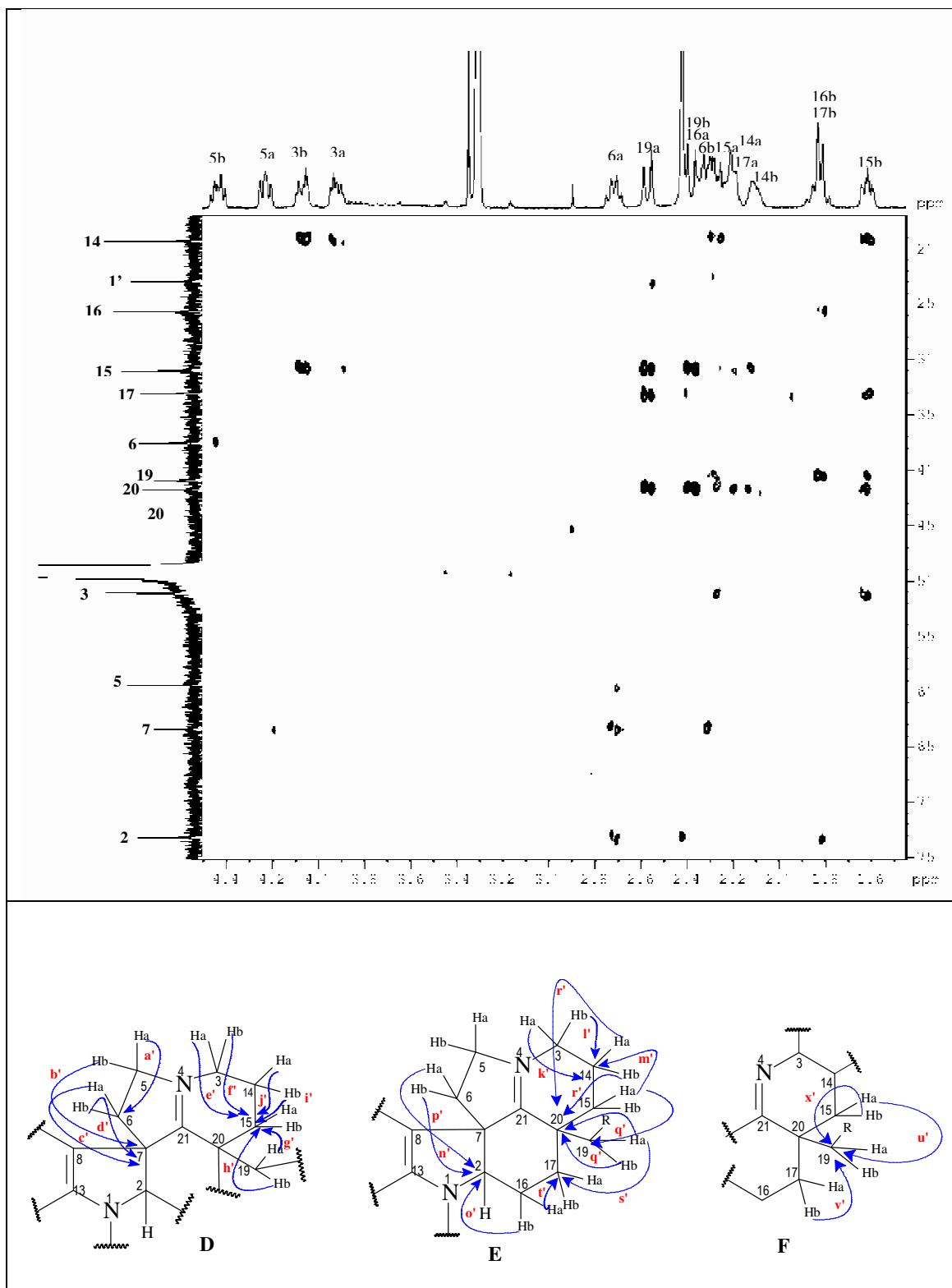
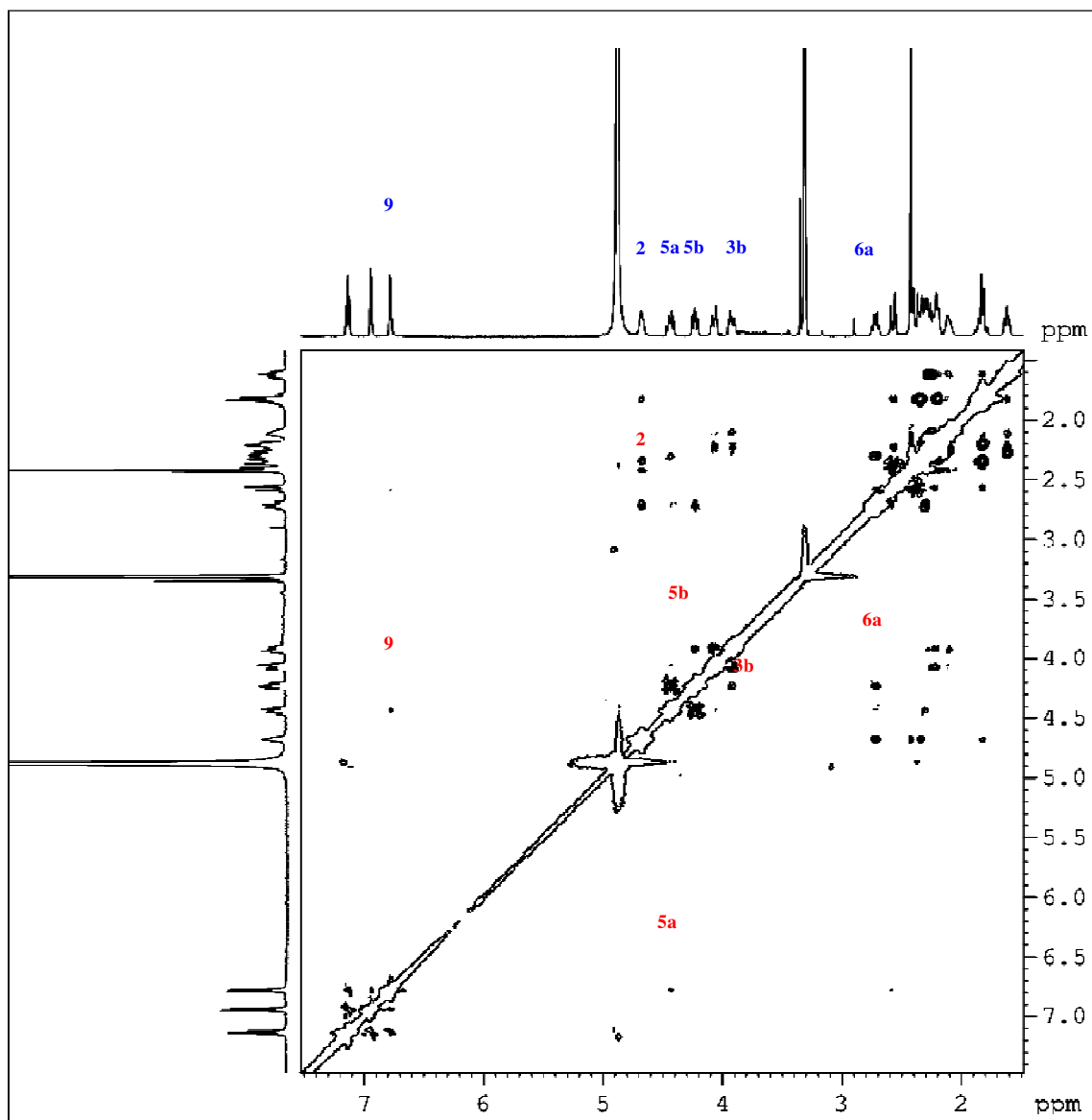


Figura 143 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de LREB-1.

4.10 Determinação Estrutural de CRE-5

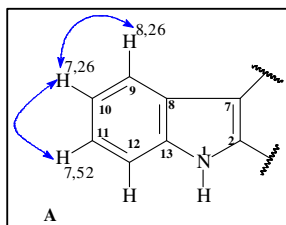
O composto CRE-5, foi isolado como um precipitado amarelo com ponto de fusão de 314,8-315,2 °C (Parte Experimental p. 242).

O espectro de absorção na região do infravermelho de CRE-5 (Figura 147, p. 154) apresentou uma banda em 3384 cm^{-1} correspondente a deformação axial de ligação N-H, caracterizando amina secundária aromática, vibrações de deformação axial da ligação C-H alifático em 2918 e 2851 cm^{-1} correspondentes a grupamentos metilas e metilênicos, além de uma banda intensa em 1664 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação C=C.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5 (Figura 148, p. 155), foi caracterizada a presença de sete sinais, sendo quatro característicos de hidrogênios de um anel benzênico de um sistema indólico em δ_{H} 7.26 (m, 1H, H-10); δ_{H} 7,52 (m, H-12 e H-11) e δ_{H} 8,26 (d, 7,4 Hz, H-9), além de mais três sinais em δ_{H} 8.84 (s, H-18); δ_{H} 8,15 (d, 6,3 Hz, H-3) e δ_{H} 7,90 (d, 6,3Hz, H-14). Também foram observadas duas metilas ligadas a anéis aromáticos uma em δ_{H} 2.81 (s, H-17) e outra em δ_{H} 3,07 (s, H-21).

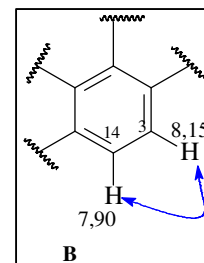
O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CRE-5 (Figura 149, p. 155) apresentou 17 linhas espectrais que apesar da presença de impurezas referentes a gordura, foi possível observar sete sinais de carbonos mono hidrogenados na região de aromáticos em δ_{C} 137,3; 129,3; 122,4; 120,9; 117,2; 116,6 e 112,1; duas absorções em δ_{C} 21,9 e δ_{C} 12,6 referentes a carbonos metílicos e os demais referentes a carbonos não hidrogenados.

O espectro de Massa de alta resolução IES-EM (Figura 146, p. 154), foi obtido a partir do pico da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ com m/z 246,1133, que comparado com a massa calculada em 246,1157 Daltons, sugeriu a fórmula molecular de $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2$, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio igual a doze.



Análise do espectro bidimensional de correlações heteronucleares - RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 151, p. 156) foi possível correlacionar cada par de carbono-hidrogênio na molécula, ou seja: δ_{C} 137,3 (δ_{H} 8,15 d, 6,3 Hz), δ_{C} 129,3 (δ_{H} 7,52, m), δ_{C} 122,4 (δ_{H} 8,26; d, 7,4 Hz); δ_{C} 120,9 (δ_{H} 7.26, m); δ_{C} 117,2 (δ_{H} 7,90; d, 6,3Hz); δ_{C} 116,6 (δ_{H} 8.84, s), δ_{C} 112,1 (δ_{H} 7.52; m); δ_{C} 12,6 (δ_{H} 2,81, s, 3H) e δ_{C} 21,9 (δ_{H} 3,07, s, 3H).

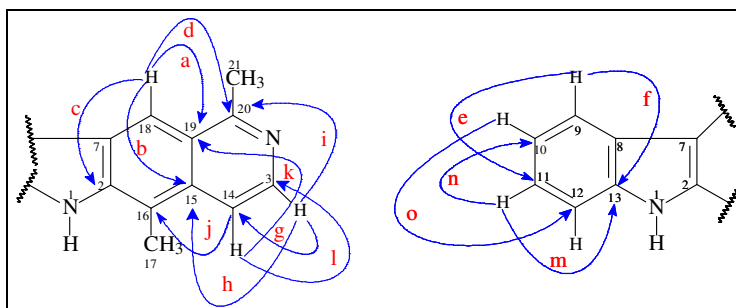
No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (Figura 150, p. 156), foi possível assinalar alguns acoplamentos escalares de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,26 \leftrightarrow 7,26 \leftrightarrow 7,52 além de correlações escalares de hidrogênios em δ_{H} 3,09 \leftrightarrow 7,90; referente a seqüência H-9 \leftrightarrow H-10 \leftrightarrow H-11 e H-3 \leftrightarrow H-14, observados conforme as subestruturas **A** e **B**.



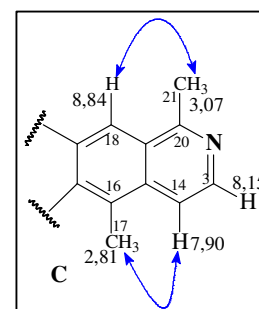
O espectro de RMN de ^1H , ^{13}C -HMBC de CRE-5 (Figuras 152 e 153, p. 157) mostrou a completa atribuição da posição dos carbonos hidrogenados com os acoplamentos a duas e três ligações entre os hidrogênios em δ_{H} 8,84 (H-18) com os respectivos carbonos em δ_{C} 160,1 (C-20); 141,5 (C-2); 134,6 (C-15) e 124,4 (C-19). Em δ_{H} 8,26 (H-9) com os carbonos em δ_{C} 144,5 (C-13) e δ_{C} 129,3 (C-11) e em δ_{H} 8,15 (H-3) com os carbonos em δ_{C} 160,1 (C-20), 134,6 (C-15) e 117,2 (C-14); além de δ_{H} 7,90 (H-14) com os respectivos carbonos em δ_{C} 112,8 (C-16); δ_{C} 124,4 (C-19) e δ_{C} 137,3 (C-3).

Também foi possível correlacionar os hidrogênios do anel indólico em δ_{H} 7,52 (H-11/12) com os carbonos em δ_{C} 144,4 (C-13); δ_{C} 120,9 (C-10) e δ_{H} 7,26 (H-10) com δ_{C} 112,1(C-12), permitindo propor a subestrutura (Figura 144, p. 152; Tabela 18, p. 153).

Figura 144 – Correlações observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125MHz) de CRE-5.



No espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY de CRE-5 (Figura 154 e 155, p. 158), correlações dipolares são observadas entre os hidrogênios das metilas em δ_{H} 2,81 com δ_{H} 7,90 e em δ_{H} 3,09 com δ_{H} 8,84, mostradas conforme subestrutura **C**. De acordo com a ilustração, nota-se a presença de um átomo de nitrogênio entre a metila em δ_{H} 3,07 e o hidrogênios (H-3) em δ_{H} 8,15, seguido de H-14 em δ_{H} 7,90 reforçado pelas correlações nos espectros anteriores.



De acordo com os deslocamentos químicos dos C e H, o nitrogênio na posição 4 de CRE-5, foi assegurado pelos sinais em δ_c 160,1 (C-20) e δ_c 137,3 (C-3) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A elucidação estrutural do alcaloide CRE-5 envolveu também a comparação com dados de literatura (FIGUEIREDO *et al.*, 2010) e pesquisas nos sites de busca (SciFinder Scholar v2007, Science Direct e SCOPUS). Os dados de RMN ^{13}C e ^1H de CRE-5 apresentaram estreita semelhança com o alcaloide indólico olivacina (Figura 145, p. 153), já isolado de *A. australe* (ONDETTI, 1961) e que apesar de leves variações devido ao efeito do solvente, trata-se do alcaloide indólico olivacina.

Tabela 18 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para CRE-5 e dados do alcaloide olivacina da literatura (FIGUEIREDO *et al.*, 2010)

#	CRE-5		HMBC		Literatura ¹	
	δ_c	δ_H (mult, J, Int)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_c	δ_H
2	141,5	-		3H-17; H-18	140,90	-
3	137,3	8,15 (d, 6,3 Hz)	H-14	-	137,93	7,72 (d, 6.2)
7	127,7	-		-	122,17	-
8	123,4	-		H-10; H-12; H-18	123,05	-
9	122,4	8,26 (d, 7,4 Hz)		H-11	120,88	8,19 (d, 7.7)
10	120,9	7,26 (m)	H-11	H-12	119,45	7,30 (m)
11	129,3	7,52 (m)		H-9	127,63	7,30 (m)
12	112,1	7,52 (m)		H-10	110,63	7,26 (m)
13	144,4	-	H-12	H-9; H-11	142,33	-
14	117,2	7,90 (d, 6,3Hz)	H-3	-	115,14	7,51 (d, 5,5)
15	134,6	-		2H-3; 3H-17; H-18	132,87	-
16	112,8	-	3H-17	H-14	110,94	-
17	12,6	2,81 (s)			11,96	2,74 (s)
18	116,6	8,84 (s)			114,64	8,62 (s)
19	124,4	-	H-18	3H-21;H-14	125,40	-
20	160,1		3H-21	H-18	158,79	
21	21,9	3,07 (s)			22,00	3,03 (s)

CRE-5 (CD₃OD; 500 x 125 MHz); ¹(CDCl₃; 400 x 100 MHz).

Figura 145 – Estrutura do alcaloide indólico olivacina (CRE-5).

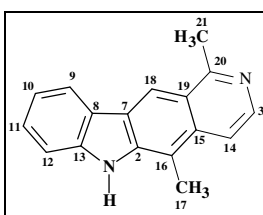


Figura 146 - Espectro de massa de alta resolução (IES-EM) de CRE-5.

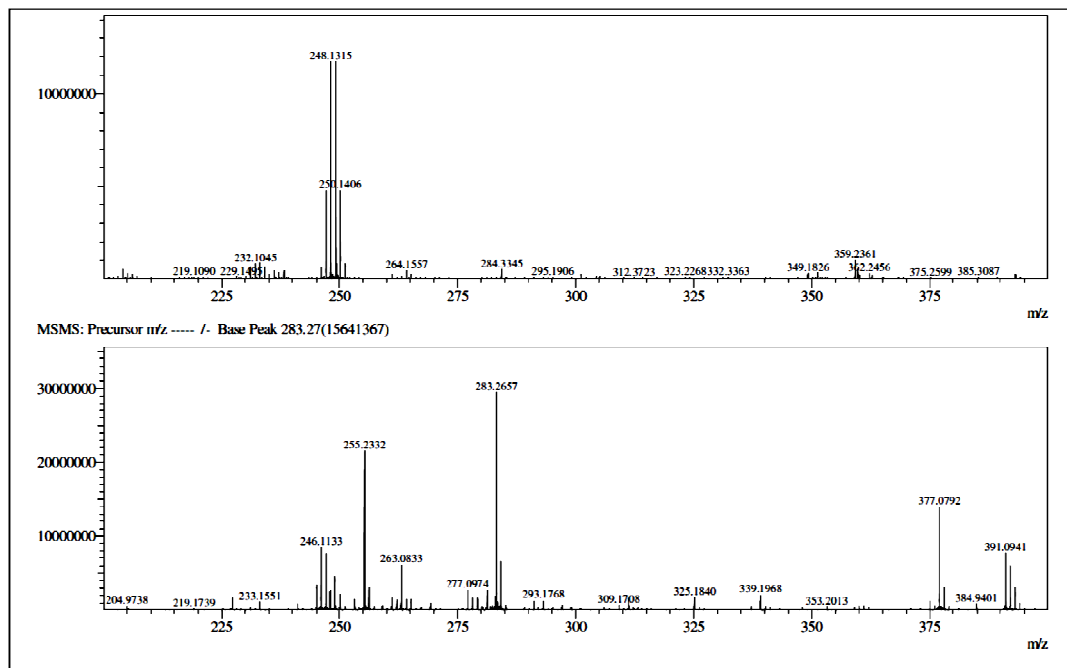


Figura 147 - Espectro de Absorção na Região do Infravermelho de CRE-5 (UATR).

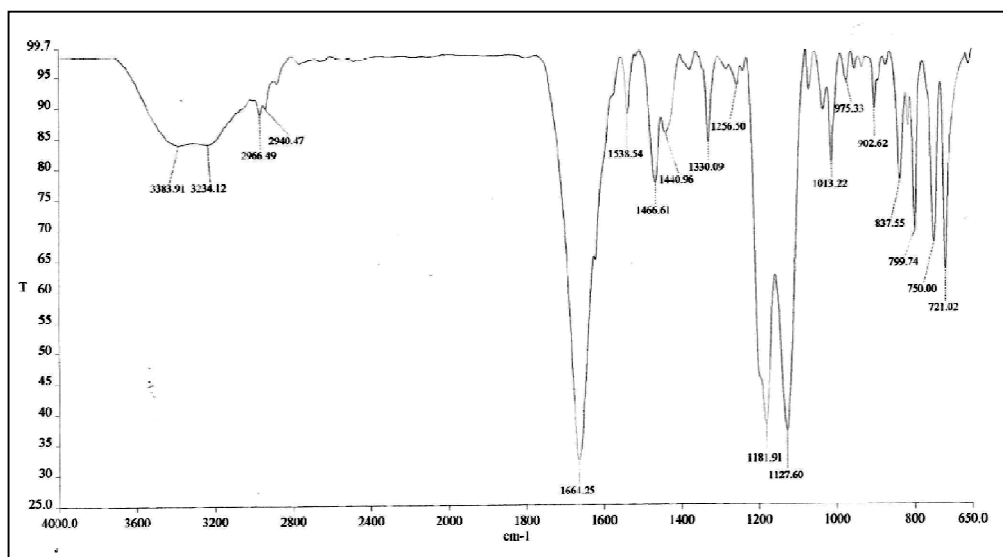


Figura 148 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5.

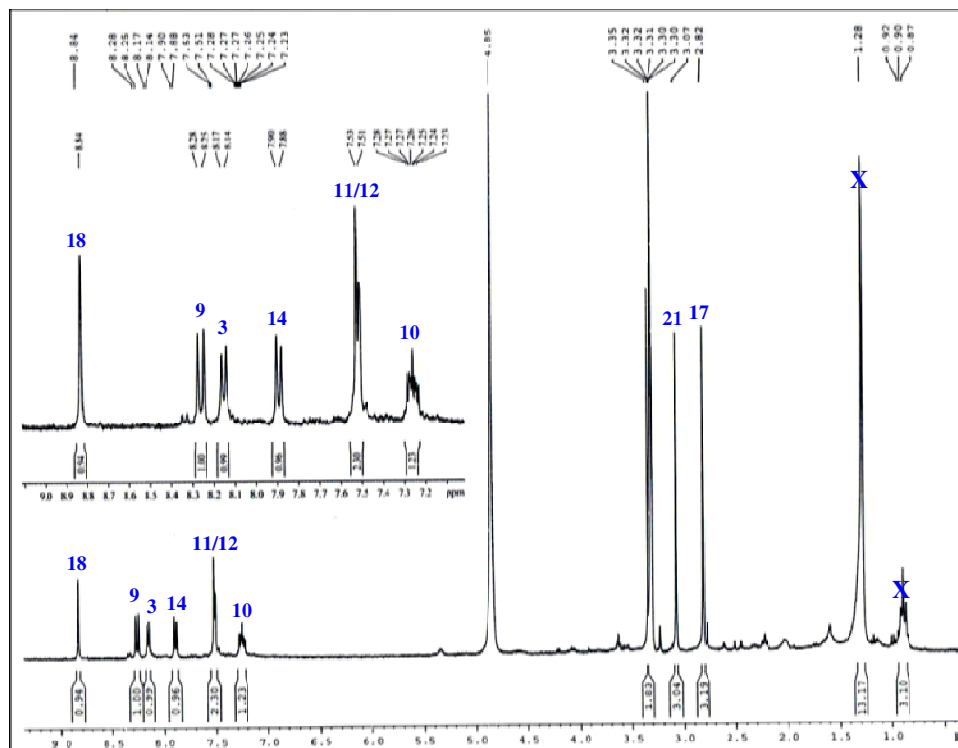


Figura 149 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CRE-5

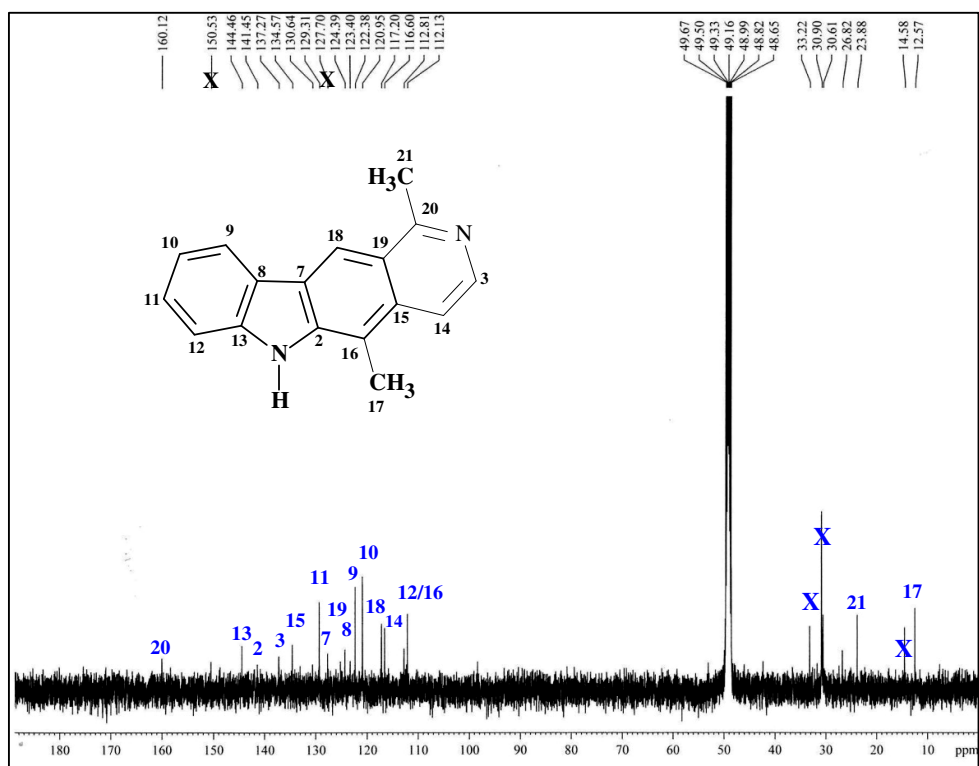


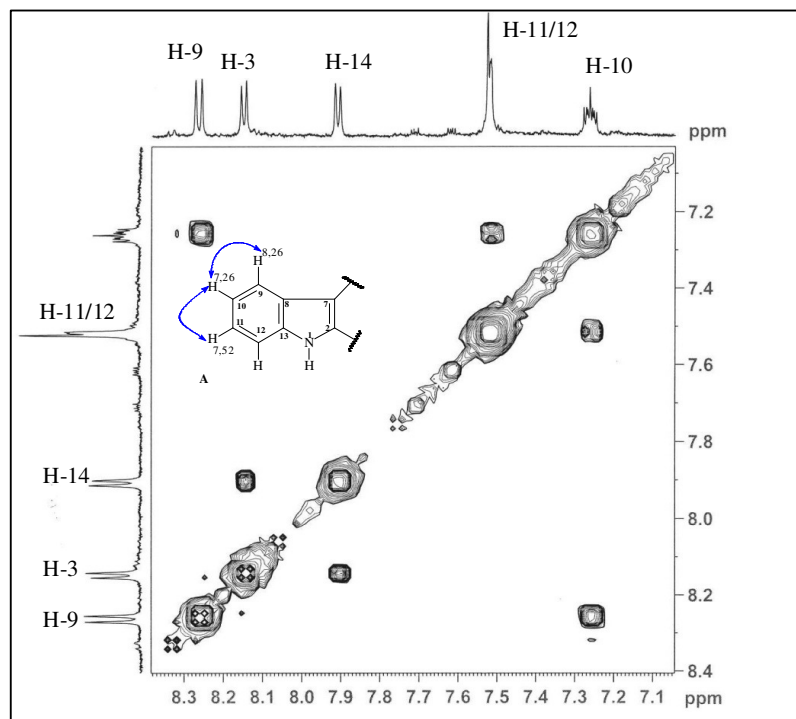
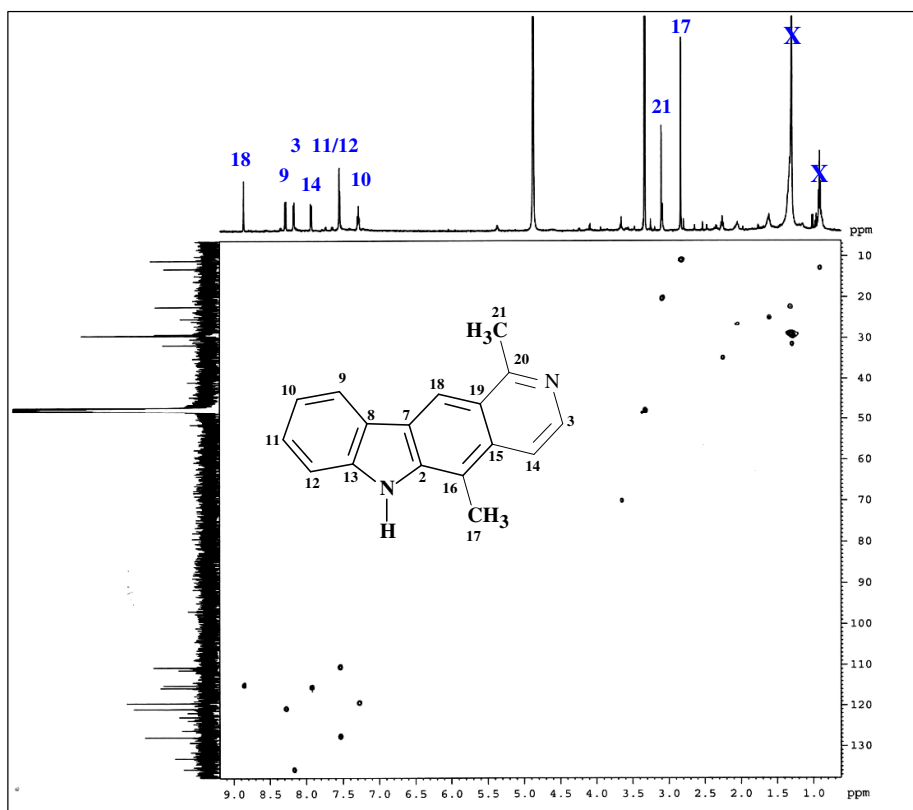
Figura 150 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CRE-5Figura 151 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CRE-5.

Figura 152 – Expansão do Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HMBC de CRE-5 (CD_3OD , 500 x 125 MHz).

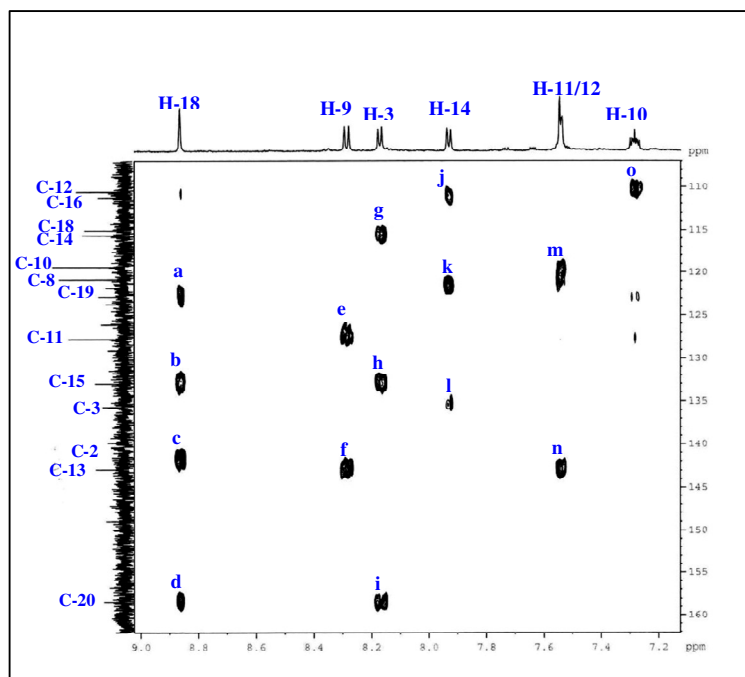


Figura 153 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de CRE-5.

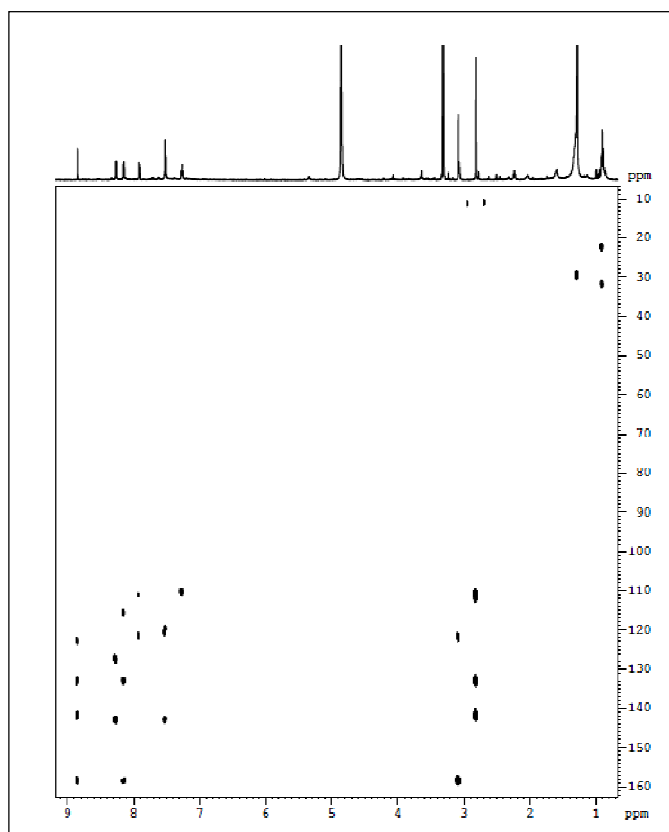
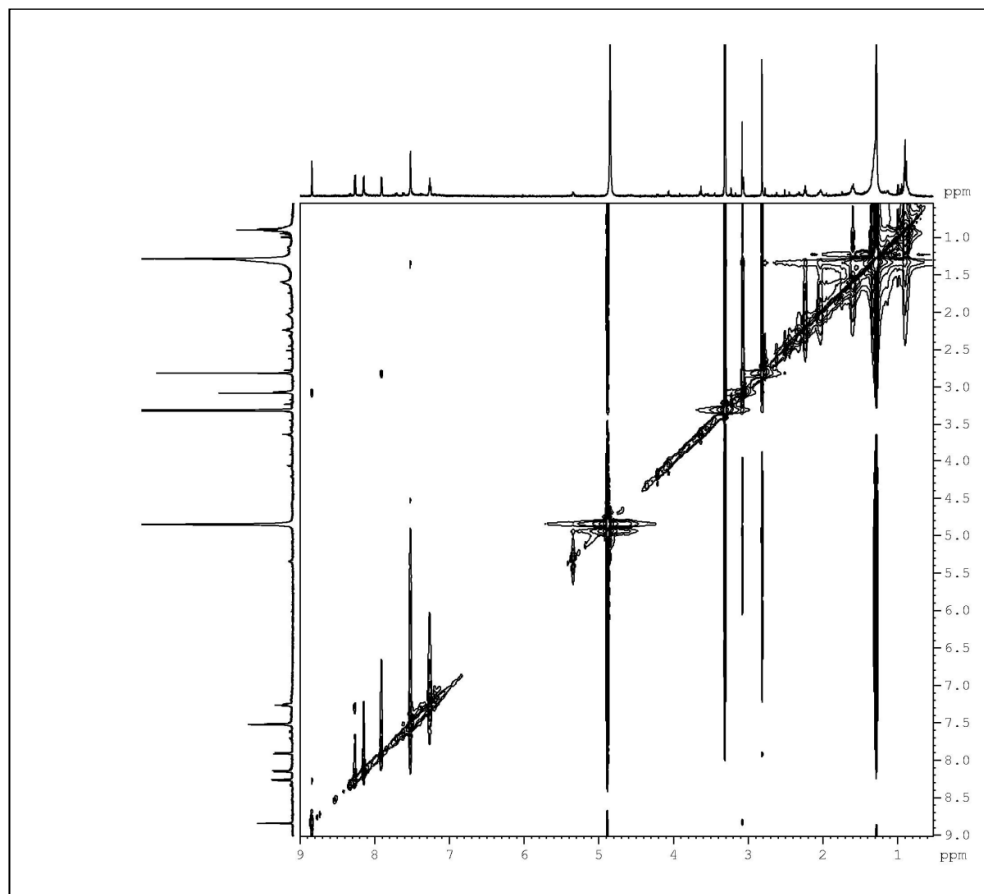
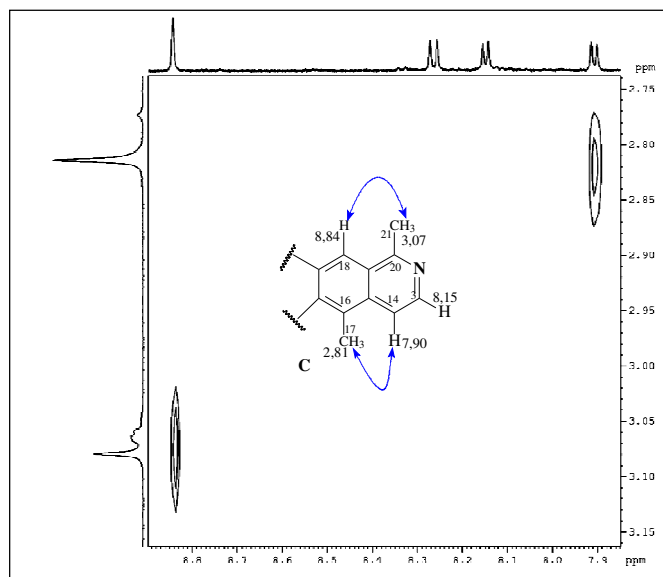


Figura 154 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5.Figura 155 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CD_3OD) de CRE-5.

4.11 Determinação Estrutural de CREA-1N

A fração CRE-A, originada do extrato etanólico das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei*, foi submetida a cromatografia de adsorção, seguida de purificação em CLAE, resultando na obtenção de um sólido amorfo, denominada CREA-1A (Parte Experimental, p. 243).

Os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -CPD de CREA-1A (500 x 125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, Figura 178, 179 e 180, p. 174 e 175), encontram-se registrados na Tabela 21, p. 166).

Após neutralização de CREA-1A (p. 246) obteve-se CREA-1N com ponto de fusão de 123,0-125,0 °C e rotação específica $[\alpha]_D^{25} = +9,0^\circ$ (c 0,33, CHCl_3).

O espectro na região do infravermelho de CREA-1N (Figura 162, p. 167) apresentou uma banda em 3386 cm^{-1} correspondente a vibrações de deformação axial de ligação N-H para aminas secundárias aromáticas e uma banda em 1669 cm^{-1} , correspondente a deformação axial da ligação C=C. Observou-se também uma banda correspondente a vibração de deformação axial de ligação C-N em 1198 cm^{-1} , além de bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para CH de anéis aromáticos em 745 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de CREA-1N (125 MHz, CDCl_3 , Figura 166, p. 169) apresentou 18 sinais que, juntamente com o espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (Figura 167, p. 169) observou-se quatro carbonos aromáticos com absorções em $\delta_{\text{C}} 110,9$ ($\delta_{\text{H}} 7,35$), $\delta_{\text{C}} 119,7$ (7,56), $\delta_{\text{C}} 120,1$ (7,11) e $\delta_{\text{C}} 122,9$ (7,19); um carbono provavelmente olefínico em $\delta_{\text{C}} 107,0$ ($\delta_{\text{H}} 5,00$ e 5,28), três carbonos metínicos em $\delta_{\text{C}} 56,8$ (4,10), $\delta_{\text{C}} 46,3$ (2,08) e $\delta_{\text{C}} 39,7$ (2,70); três carbonos metilênicos, em $\delta_{\text{C}} 46,5$ (2,08 e 2,49), $\delta_{\text{C}} 34,9$ (2,08 e 1,69) e $\delta_{\text{C}} 24,6$ ($\delta_{\text{H}} 1,13$), além dos carbonos metílicos em $\delta_{\text{C}} 44,5$ ($\delta_{\text{H}} 2,30$) e $\delta_{\text{C}} 12,0$ ($\delta_{\text{H}} 0,86$). Os demais sinais em $\delta_{\text{C}} 138,9$, 136,8, 135,4; 129,6 e 107,9 foram correlacionados a carbonos não hidrogenados.

Dentre as absorções discutidas são relevantes aquelas entre $\delta_{\text{C}} 122,9$ -110,9 correspondentes aos quatro carbonos aromáticos e as absorções em $\delta_{\text{C}} 107,0$ ($\delta_{\text{H}} 5,00/ 5,28$) e $\delta_{\text{C}} 44,5$ ($\delta_{\text{H}} 2,30$) que correspondem respectivamente, a uma dupla ligação exocíclica e a um grupamento metila ligado ao átomo de nitrogênio.

A fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$ para CREA-1N foi obtida a partir do pico do íon molecular $[\text{M}-\text{H}]^+$ com m/z 267.1877 em massa de alta resolução (IES-EM) e massa calculada com m/z 267,1861 Daltons (Figura 163, p. 167), correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove insaturações na molécula.

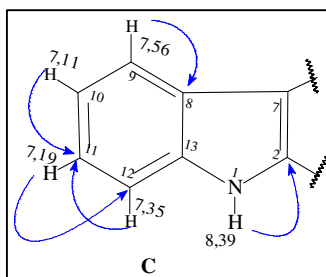
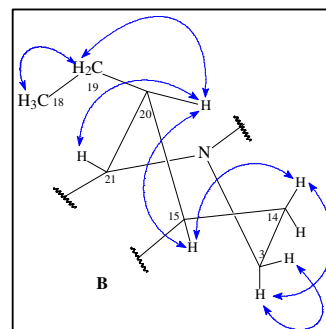
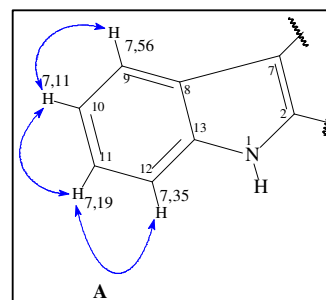
O espectro de RMN ^1H de CREA-1N (500 MHz, CDCl_3 , Figuras 164 e 165, p. 168), mostrou quatro sinais correspondentes aos hidrogênios do anel benzênico em δ_{H} 7,35 (H-12), 7,56 (H-9), 7,11 (H-10) e 7,19 (H-11). Também foram observados dois sinais correspondentes a hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,00 (H-17b) e δ_{H} 5,28 (H-17a); dois sinais em δ_{H} 0,86 (3H-18) e 2,30 (3H-5), referentes a grupos metílicos. Os demais sinais observados foram listados na Tabela 19 (p. 164).

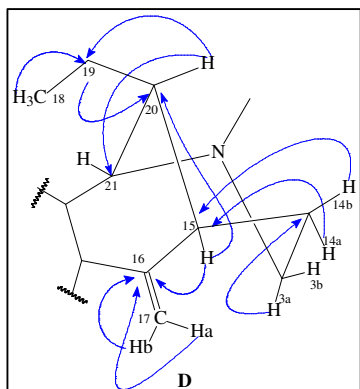
A análise das correlações homonucleares do espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de CREA-1N (Figuras 169 e 170, p. 170) mostrou os acoplamentos escalares dos hidrogênios vizinhos do anel benzênico em δ_{H} 7,56 com δ_{H} 7,11; δ_{H} 7,35 com δ_{H} 7,19 e δ_{H} 7,19 com δ_{H} 7,11 de acordo com a subestrutura **A**.

Dentre os acoplamentos escalares observados na subestrutura **B**, destacam-se as absorções em δ_{H} 0,86 (H-18) com δ_{H} 1,13 (H-19), confirmando o grupamento etila. Outros acoplamentos observados foram: δ_{H} 1,69 (H-14) e δ_{H} 2,08 (H-3); δ_{H} 4,10 (H-21) com 2,08 (H-20); δ_{H} 2,49 (H-3a) e δ_{H} 2,70 (H-15) com 1,69 (H-14b); δ_{H} 2,08 (H-3a) com δ_{H} 2,49 (H-3b) e δ_{H} 2,70 (H-15) com δ_{H} 2,08 (H-20).

No espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 171 e 173, P. 172) foi possível confirmar inequivocamente as correlações a duas ligações (Subestrutura **C**), dos hidrogênios em δ_{H} 8,39 (H-1) com δ_{C} 135,4 (C-2) e δ_{H} 7,56 (H-9) com δ_{C} 129,6 (C-8); δ_{H} 7,35 (H-12) com δ_{C} 122,9 (C-11); δ_{H} 7,19 (H-11) com δ_{C} 110,9 (C-12) e δ_{H} 7,11 (H-10) com δ_{C} 122,9 (C-11).

Adicionalmente, foram também observadas as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 5,28 (H-17b) e δ_{H} 2,70 (H-15) com δ_{C} 138,9 (C-16) e δ_{C} 46,3 (C-20); δ_{H} 2,49 (H-3a) com δ_{C} 34,9 (C-14), δ_{H} 2,08 (H-20) com δ_{C} 56,8 (C-21) e δ_{C} 39,7 (C-15), δ_{H} 2,08 (H-3b) com δ_{C} 34,9 (C-14); δ_{H} 2,08 (H-20) com δ_{C} 24,6 (C-19), δ_{H} 1,69 (H-14b) com δ_{C} 39,7 (C-15), δ_{H} 1,13 (H-19) com δ_{C} 2,08 (C-20) e δ_{H} 0,86 (H-18) com δ_{C} 46,3 (C-20) e δ_{C} 24,6 (C-19). Dessa forma, foi possível propor a subestrutura **D**.



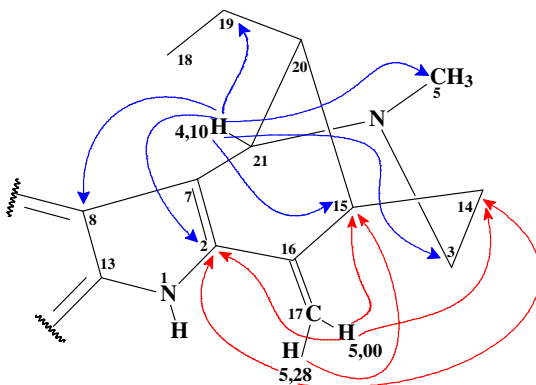


Foi possível propor importantes correlações a ${}^3J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 5,28 e 5,00 (H-17a/b) com os carbonos em δ_C 135,4 (C-2) e δ_C 39,7 (C-15); além das correlações a ${}^4J_{CH}$ dos hidrogênios olefínicos em δ_H 5,28 e 5,00 com δ_C 34,9 (C-14) (Figura 172, p. 171; Figura 175, p. 173).

Também foram observadas correlações a ${}^3J_{CH}$ (Figura 171, p. 171) do hidrogênio desprotegido em δ_H 4,10 com δ_C 135,4 (C-2), δ_C 129,6 (C-8), δ_C 46,5 (C-3); δ_C 39,7 (C-15) e δ_C 24,6 (C-19), além, da metila ligada ao átomo de nitrogênio em δ_C 44,5 (C-5) e da correlação de δ_H 2,30 (H-5, 3H) com δ_C 56,8 (C-21), conforme espectros Figura 172 (p. 171) e 175 (p. 173).

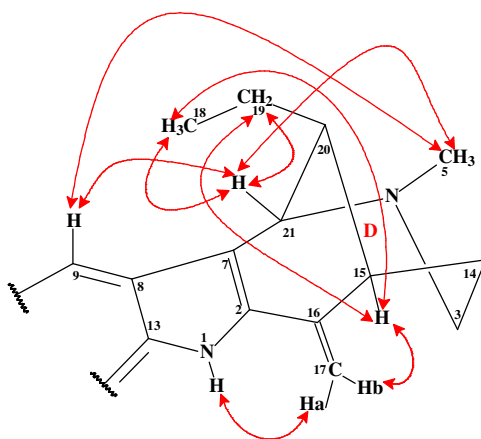
Dessa forma, foi possível propor a subestrutura apresentada na Figura 156 (p. 161), corroborando com os dados dos carbonos olefínicos C-16 e C-17, o grupamento etila ligado ao carbono 20 e, sobretudo, a metila C-5, ligada ao nitrogênio para CREA-1.

Figura 156 – Subestrutura proposta e correlações obtidas a partir da análise do espectro de HMBC para CREA-1N.



Para efetuar a atribuição dos hidrogênios equatoriais e axiais do anel D de CREA-1N, foi necessário a obtenção do espectro de RMN 2D ${}^1H, {}^1H$ -NOESY (Figura 176, p. 173; Figura 177, p. 174), em $CDCl_3$ que apresentou as seguintes correlações dipolares: H-9 com 3H-5 e H-21; H-17b com H-15; H-21 com 3H-18, 2H-19, e 3H-5, H-15 com 3H-18 e 2H-19, além dos hidrogênios H-1 (N-H) com H-17a (Figura 157, p. 162).

Figura 157 - Correlações dipolares observadas através do espectro de NOESY para CREA-1N.



Esses dados indicam que o anel D do composto deve assumir uma conformação em cadeira, com os grupos etila e N-metila em equatorial (Figura 157, p. 162). Shamma *et al.* (1967), afirma que de acordo com o impedimento estérico no átomo de nitrogênio básico, a configuração mais estável para o grupo etila e N-metila é em equatorial.

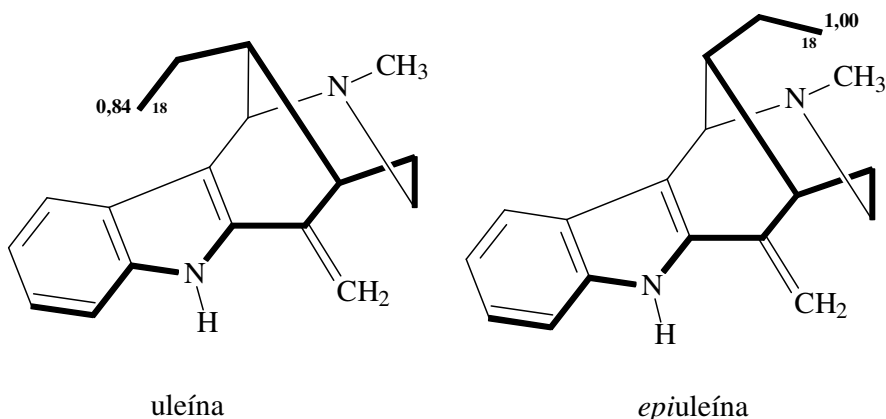
Na comparação dos dados de RMN de ^1H de CREA-1N em CDCl_3 (Tabela 19, p. 164) é observado a concordância nos valores apenas dos hidrogênios do anel aromático, da dupla exocíclica, em C-17, e da metila C-18. Borris *et al.* (1983), não apresentam os deslocamentos químicos para os hidrogênios 3, 14, 15 e 20, assim como, não é mencionado o uso de técnicas de RMN 2D na atribuição desses compostos, o que possivelmente justifica a ausência de sinais ou atribuições equivocadas.

França *et al.*, (2000), assinalou para a uleína (Tabela 20, p. 165), todos os carbonos com seus respectivos hidrogênios, porém, para C-12, um carbono aromático mono hidrogenado, foi atribuído dois valores de deslocamentos químicos diferentes (111,0/112,4), enquanto C-7, um carbono sp^2 não hidrogenado, não apresentou qualquer assinalamento de deslocamento químico. Talvez devido a um erro de digitação, em que um dos valores em C-12 pertenceria ao C-7.

Gaskell e Joule (1967) e Büchi, Gould e Näf (1971) relatam que os espectros de RMN de ^1H para uleína e epi-uleína, um alcaloide epimérico da uleína (Tabela 19 p. 164), são semelhantes, diferindo apenas com relação ao tripleto correspondente a metila (C-18) do grupamento etila, centrado em δ_{H} 0,88 para uleína e em δ_{H} 1,08 para epiuleína.

Observa-se que a metila do grupamento etila da uleína, está sobre o sistema π -aromático, conforme mostra a Figura 158 (p. 163), levando a um sinal mais blindado, em relação a epi-uleína onde a etila está mais afastada, portanto, mais desblindada.

Figura 158- Grupamento etila sobre o sistema π aromático da substância uleína.



A comparação dos dados de RMN ^1H de CREA-1N com uleína e epiuleína (Tabela 19, p. 164; Figura 158, p. 162) para o tripleto (δ_{H} 0,86) sugere CREA-1N tratar-se da uleína.

Foram observadas diferenças nos deslocamentos químicos de RMN de ^1H de CREA-1A (Figura 179 e 180, p.175), referente aos hidrogênios olefínicos H-17a e H-17b (Tabela 19, p. 164; Tabela 21, p. 166). Estes se apresentaram mais desblindados em virtude da substância estar protonada com a utilização de ácido durante o isolamento com TFA. Após o tratamento de neutralização (p. 246), os deslocamentos químicos de praticamente todos os hidrogênios de CREA-1N apresentaram-se mais blindados (Tabela 21, p. 166).

Também foi observado que a quaternarização do átomo de nitrogênio desprotege os hidrogênios olefínicos (H-17a e 17b) de CREA-1A, enquanto protege o carbono sp^2 não hydrogenado (C-16) (Tabela 20, p. 165; Tabela 21, p. 166; Figura 159, p. 164; Figura 160, p. 165).

De acordo com Jácome *et al.* (2004); França *et al.* (2000); Borris *et al.* (1983), os carbonos, C-7 e C-17, apresentam assinalamentos equivocados nos seus deslocamentos químicos (Tabela 20, p. 165) e Figura 160 (p. 165).

Borris *et al.* (1983) se equivocaram ao assinalar um mesmo deslocamento químico para dois carbonos diferentes, ou seja, em C-7 e C-12 (δ_{C} 110,8) (Tabela 20, p. 165; Figura 160, p. 165) quando deveria ser δ_{C} 107,3 e 110,8, respectivamente.

Uma vez que os dados da literatura foram obtidos em CDCl_3 optou-se pela aquisição dos espectros de CREA-1N no mesmo solvente, os quais estão listados na Tabela 21 (p. 166). A única diferença observada para CREA-1N em CDCl_3 com relação a CD_3OD é a leve proteção de vários sinais nos espectro de RMN ^1H e ^{13}C do composto. A comparação de

todos os dados de RMN de ^{13}C de CREA-1 ácida (CREA-1A) e neutra (CREA-1N) realizadas em CDCl_3 e em CD_3OD encontram-se na Tabela 21 (p. 166).

Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H para CREA-1N e comparação com os dados da literatura para os alcaloides uleína e epiuleína (2 BORRIS *et al.*,1983; 3 FRANÇA *et al.*, 2000; 4 JÁCOME *et al.*, 2004).

#	CREA-1N $^1\delta_{\text{H}}$	$^2\delta_{\text{H}}$	uleína $^3\delta_{\text{H}}$	$^4\delta_{\text{H}}$	Epiuleína $^4\delta_{\text{H}}$	$^2\delta_{\text{H}}$
NH	8,39	8,60	9,00	8,25	-	-
3a	2,49 (m)	-	2,67 (dl)	2,70 (d, 3,0Hz)	2,65 (m)	-
3b	2,08 (m)	-	1,80 (dl, 9,4 Hz)	2,45 (m)	2,40 (m)	-
5	2,30 (s)	2,29 (s)	2,59 (s)	2,30 (s)	2,25 (s)	2,28 (s)
9	7,56 (d, 10,0 Hz)	7,00-7,65 (m)	7,49 (dd, 8,0 Hz)	7,35 (d, 8,0)	7,30 (d, 8,0 Hz)	7,00-7,70 (m)
10	7,11 (dd, 5 e 10,0 Hz)	7,00-7,65 (m)	7,18 (t, 7,4 Hz)	7,10 (t, 7,8)	7,10 (t, 8,0 Hz)	7,00-7,70 (m)
11	7,19 (dd, 5 e 10,0 Hz)	7,00-7,65 (m)	7,26 (t, 7,4 Hz)	7,20 (t, 7,8)	7,15 (t, 8,0 Hz)	7,00-7,70 (m)
12	7,35 (d, 5,0 Hz)	7,00-7,65 (m)	7,46 (dd, 8,0 Hz)	7,55 (d, 8,0)	7,55 (d, 8,0 Hz)	7,00-7,70 (m)
14a	2,08 (m)	-	2,52 (d, 8,5 Hz)	2,05 (m)	2,0 (m)	-
14b	1,69 (m)	-	1,27 (sl)	-	-	-
15	2,70 (m)	-	2,82 (d, 1,5 Hz)	3,50 (s)	-	-
17a	5,28 (s)	5,28 (s)	5,59 (s)	5,27 (s)	5,20 (s)	5,24 (s)
17b	5,00 (s)	4,98 (s)	5,21 (s)	5,00 (s)	4,95 (s)	4,96 (s)
18	0,86 (t, 7,0 Hz, 3H)	0,84 (m)	0,88 (t, 7,4 Hz)	0,85 (t, 7,4)	1,08 (t, 7,4 Hz)	1,00 (t, 6,0Hz)
19	1,12 (q, 7,0Hz)	0,84 (m)	1,15 (m, 7,4 Hz)	1,15 (m, 7,4)	1,25 (t)	-
20	2,08 (m)	-	2,99 (dl, 6,9 Hz)	1,70 (m)	-	-
21	4,10 (d, 2,0 Hz)	4,11(d, 2,3 Hz)	4,55 (d, 1,5 Hz)	4,10 (d, 3,0)	4,00 (s)	4,10 (sl)

1 (500 MHz; CDCl_3); 2 (60 MHz; CDCl_3); 3 (400 MHz; CDCl_3); 4 (360 MHz, CDCl_3).

Figura 159 - Comparação dos dados de RMN de ^1H de CREA-1N com os dados da literatura para o alcaloide uleína.

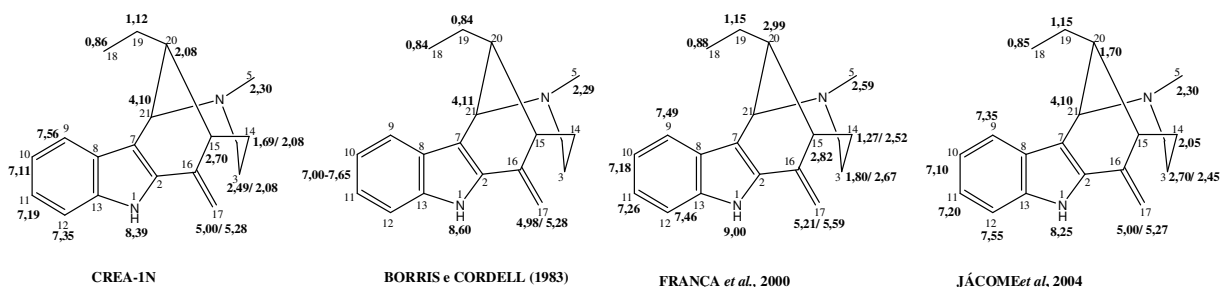
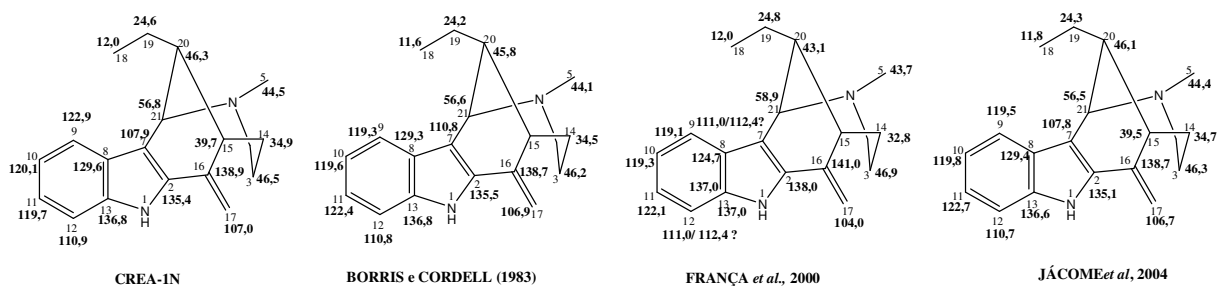


Tabela 20 - Dados de RMN de ^{13}C para CREA-1N e comparação com os dados da literatura para o alcaloide indólico uleína e epiuleína (²BORRIS *et al.*, 1983; ³FRANÇA *et al.*, 2000; ⁴JÁCOME *et al.*, 2004).

	CREA-1N δ_{C}^1	δ_{C}^2	uleína δ_{C}^3	δ_{C}^4	epiuleína δ_{C}^2	δ_{C}^4
2	135,4	135,5	138,0	135,1	136,4	136,5
3	46,5	46,2	46,9	46,3	46,2	46,4
5	44,5	44,1	43,7	44,4	44,4	44,8
7	107,9	110,8	111,0/112,4	107,8	110,0	110,8
8	129,6	129,3	124,7	129,4	127,9	128,5
9	119,7	119,3	119,1	119,5	119,0	119,6
10	120,1	119,6	119,3	119,8	119,8	119,9
11	122,9	122,4	122,1	122,7	122,6	122,8
12	110,9	110,8	111,0/112,4	110,7	111,0	111,9
13	136,8	136,8	137,0	136,6	136,6	135,9
14	34,9	34,5	32,8	34,7	27,8	28,7
15	39,7	39,4	38,3	39,5	37,7	38,5
16	138,9	138,7	141,0	138,7	141,1	142,1
17	107,0	106,9	104,0	106,7	106,1	104,7
18	12,0	11,6	12,0	11,8	12,0	12,2
19	24,6	24,2	24,8	24,3	23,3	23,5
20	46,3	45,8	43,1	46,1	44,2	44,7
21	56,8	56,6	58,9	56,5	55,3	54,9

¹(125 MHz, CDCl₃); ²(22,68 MHz, CDCl₃); ³(75 MHz, CDCl₃); ⁴(90 MHz, CDCl₃).

Figura 160 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de CREA-1N com os dados da literatura para o alcaloide uleína.



De acordo com os dados apresentados para CREA-1N e comparação com a literatura (BORRIS *et al.*, 1983), a mesma trata-se do alcaloide indólico uleína (Figura 161), já isolado de *A. ulei*.

Tabela 21 - Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C de CREA-1 (ácida e neutra) realizadas em CD_3OD e CDCl_3 .

#	CREA-1					
	CREA-1 ^a		CREA-1		CREA-1N	
	*C _A	*H _A	**C _A	**H _A	***C _N	***H _N
NH		8,83		8,93		8,39
2	139,4	-	137,4	-	135,4	-
3a	45,0	2,24	43,0	2,73	46,5	2,08
3b				3,25		2,49
5	42,3	2,73	41,9	2,73	44,5	2,30
7	101,2	-	101,4	-	107,9	-
8	129,1	-	127,8	-	129,6	-
9	119,4	7,64	118,6	7,54	119,7	7,56
10	122,1	7,14	121,9	7,22	120,1	7,11
11	124,8	7,22	124,5	7,29	122,9	7,19
12	112,9	7,44	111,9	7,45	110,9	7,35
13	139,1	-	137,0	-	136,8	-
14a		1,24		1,87		2,08
14b	33,1	1,94	31,7	2,40	34,9	1,69
15	38,6	2,93	37,2	2,86	39,7	2,70
16	137,3	-	135,4	-	138,9	-
17a		5,30		5,28		5,00
17b	112,8	5,81	111,7	5,59	107,0	5,28
18	11,7	0,96	11,2	0,86	12,0	0,86
19	25,0	1,17	24,0	1,16	24,6	1,12
20	47,6	2,73	46,6	2,40	46,3	2,08
21	60,6	4,94	58,9	4,88	56,8	4,10

CREA-1* *ácida* (CD_3OD); ** *ácida* (CDCl_3) e ****neutra* (CDCl_3);

A= *ácida*; N = *neutra*

Figura 161 - Alcaloide indólico uleína (CREA-1N).

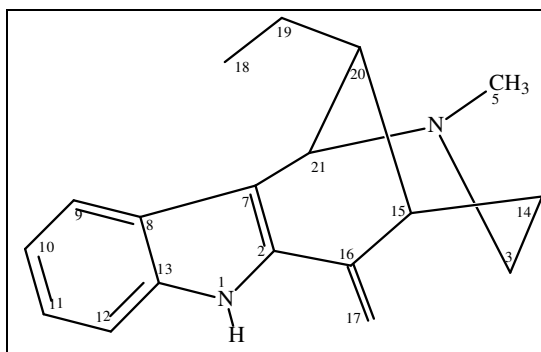


Figura 162 - Espectro de Absorção na região do Infravermelho de CREA-1N (Pastilha de KBr).

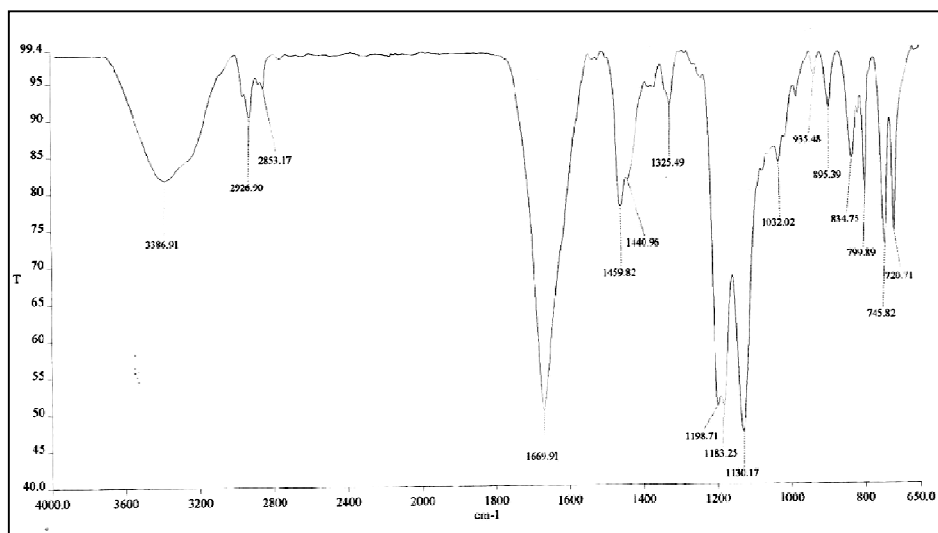


Figura 163 - Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREA-1N.

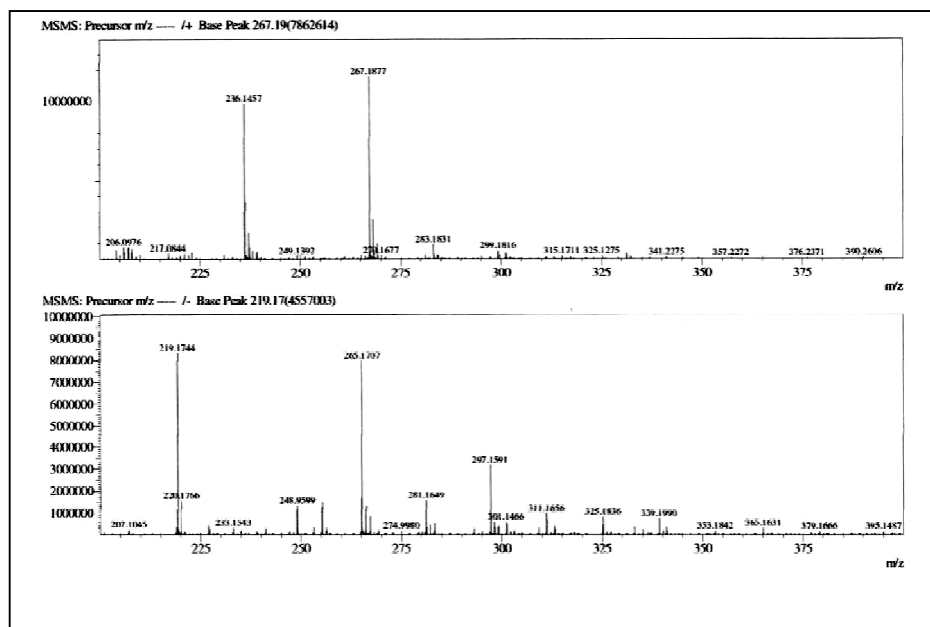


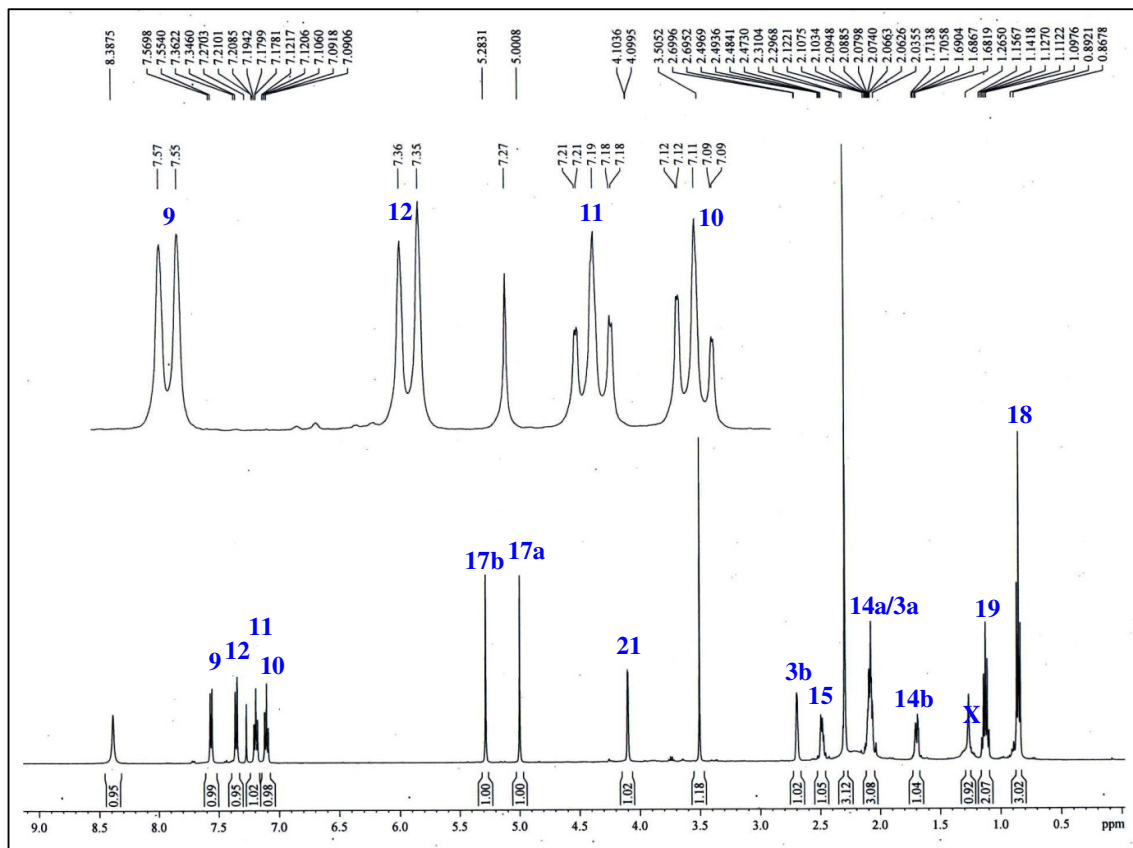
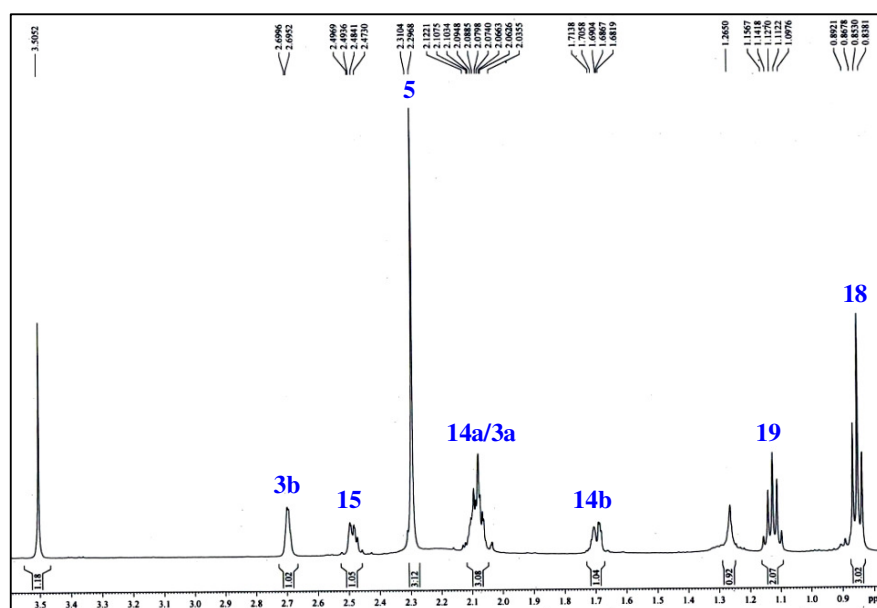
Figura 164 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N.Figura 165 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N.

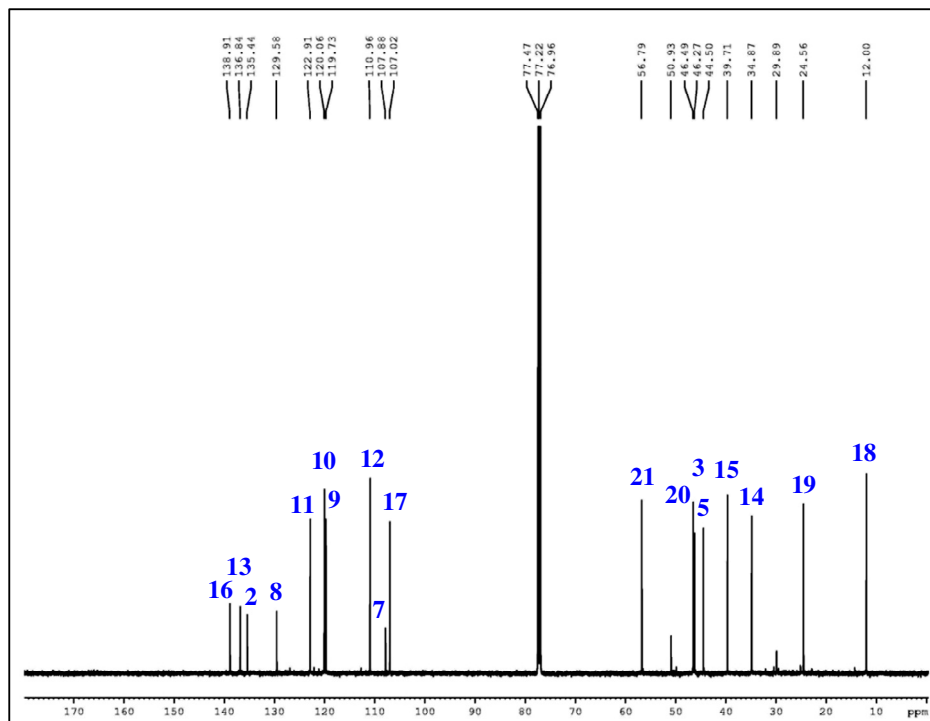
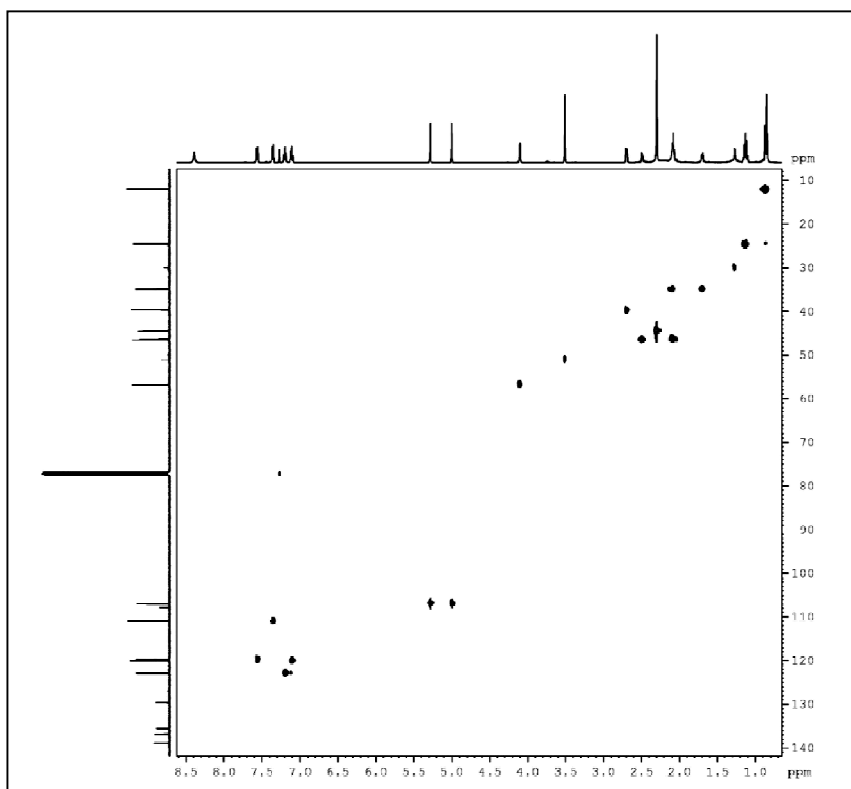
Figura 166 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N.Figura 167 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-1N (500 x 125 MHz, CDCl_3).

Figura 168 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC de CREA-1e expansão de 4,0-1,0 e 58-10 ppm e expansão de 7,6-5,0 e 124-126 ppm.

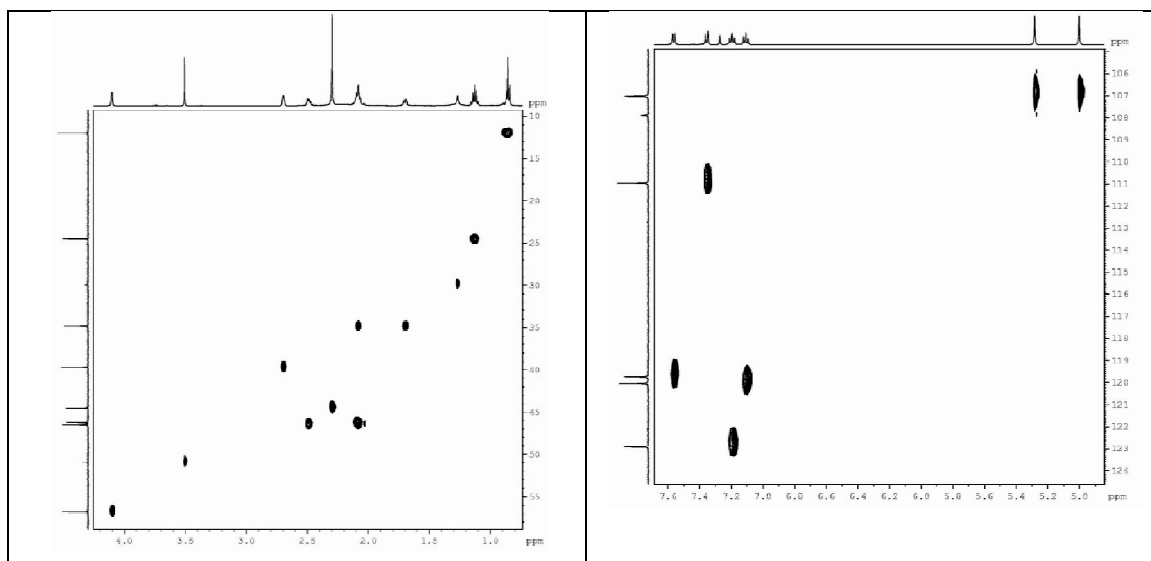


Figura 169 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-1N

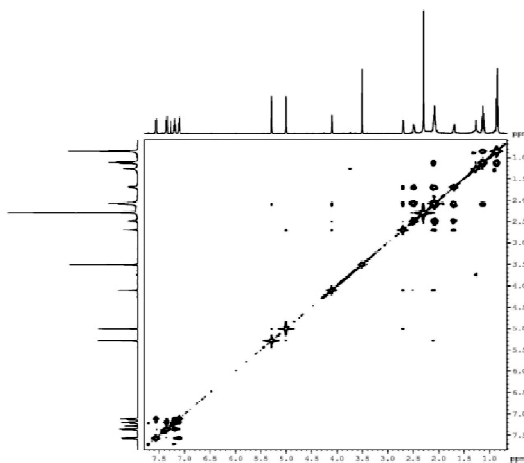


Figura 170 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY de CREA-1N e expansão.

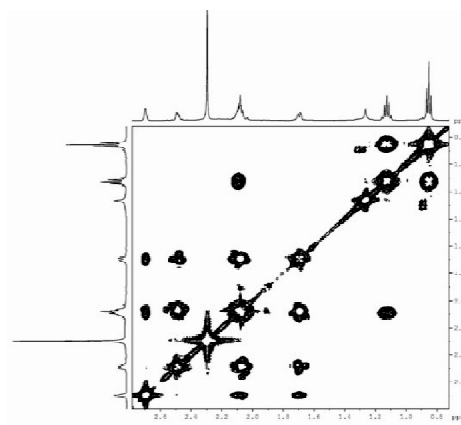


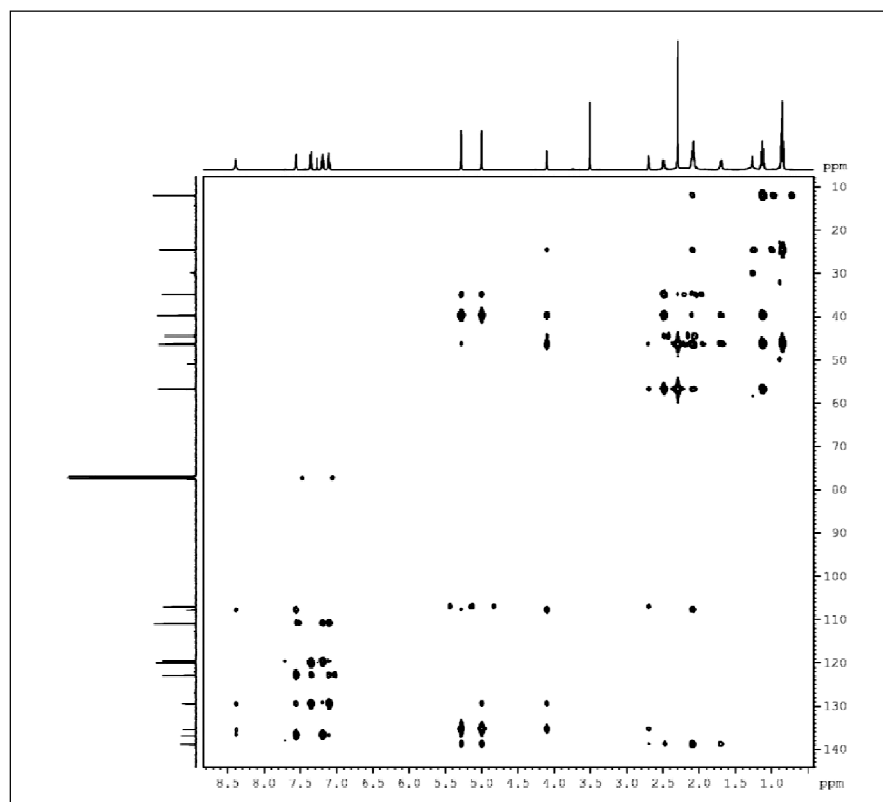
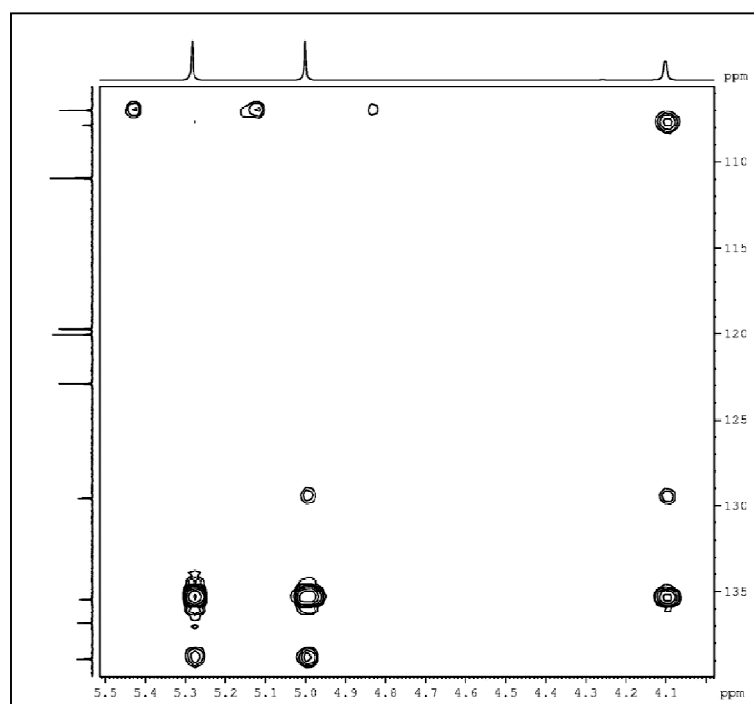
Figura 171 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N.Figura 172 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão.

Figura 173 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão.

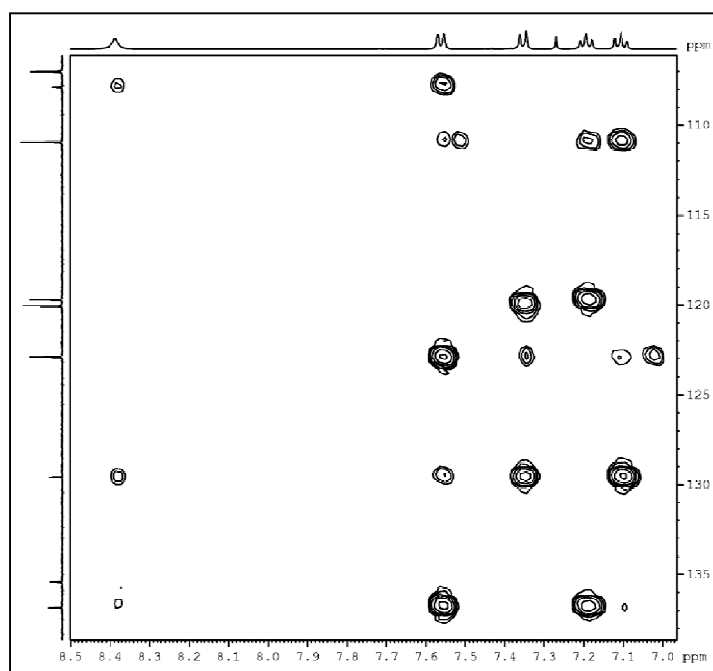


Figura 174 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão.

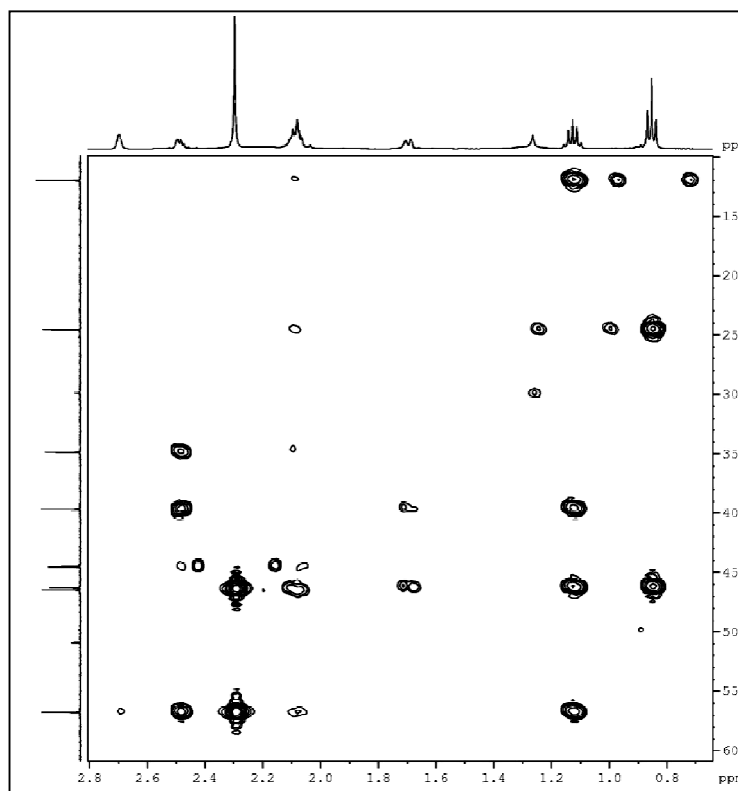


Figura 175 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão.

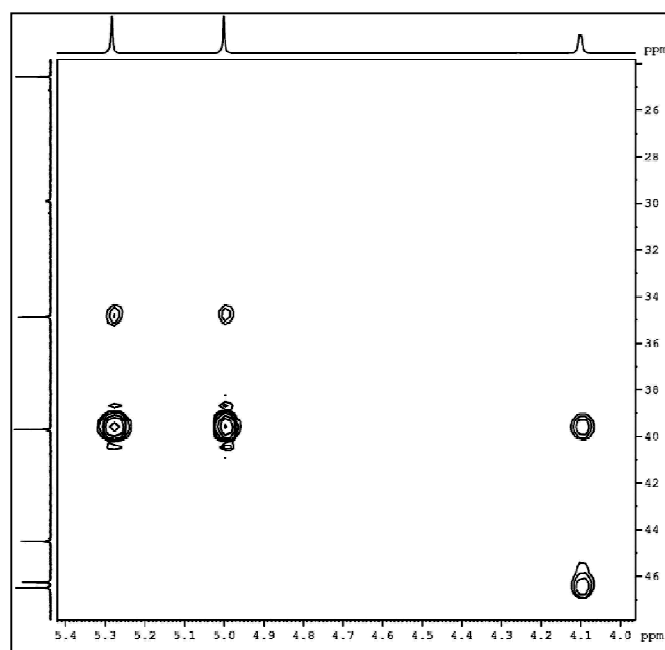


Figura 176 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N.

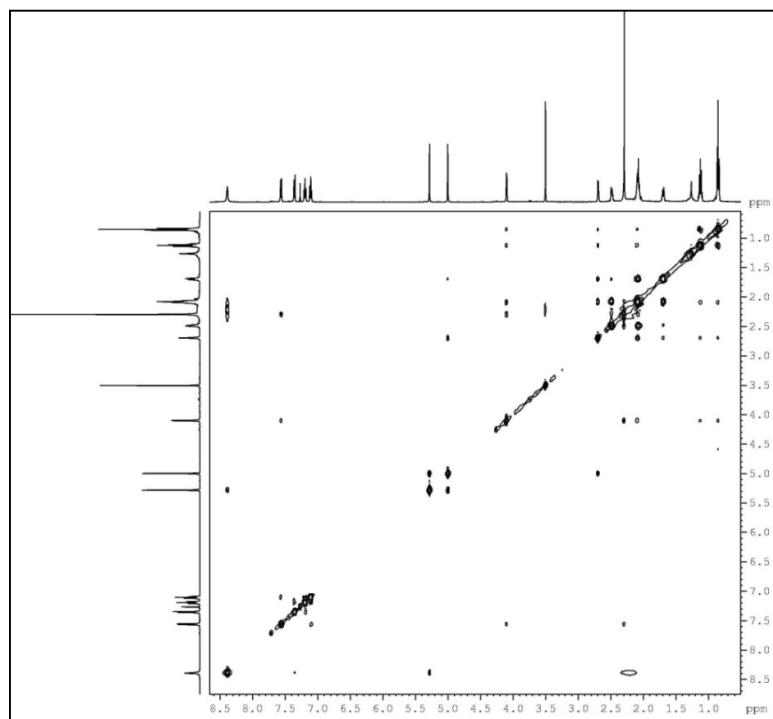


Figura 177 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-1N e expansão.

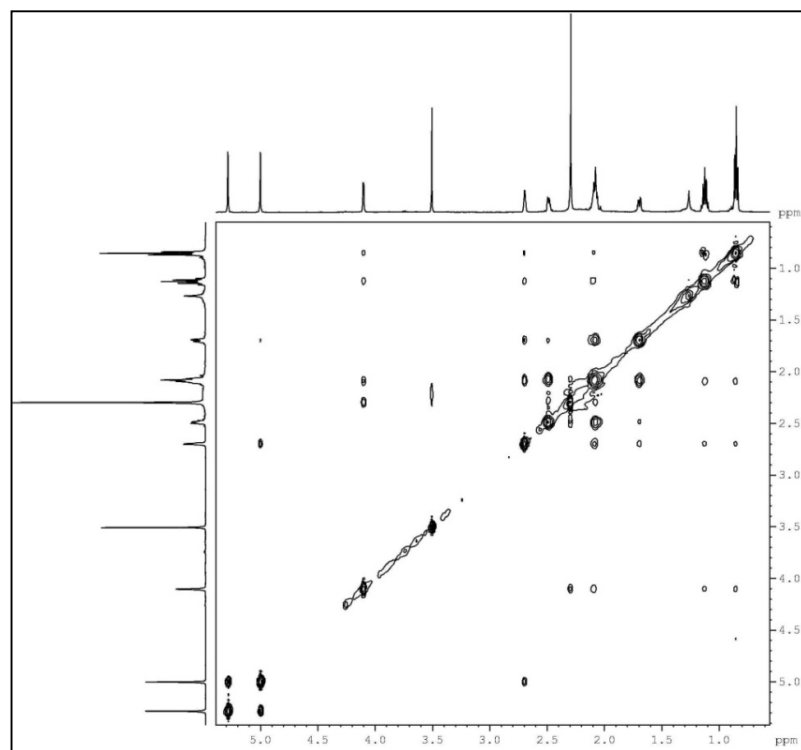
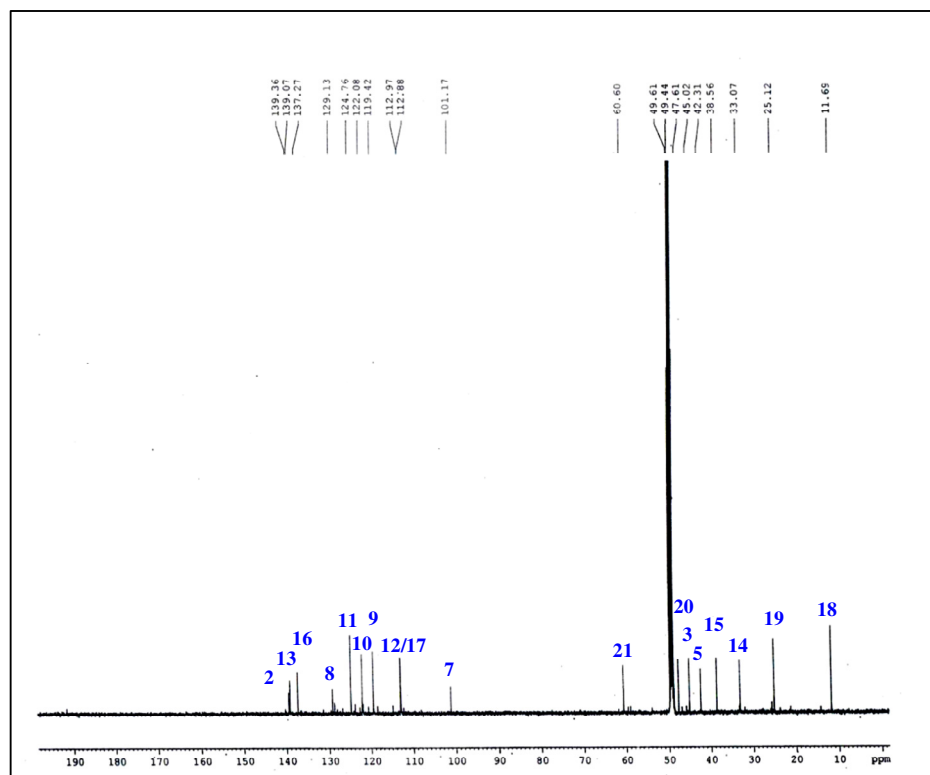


Figura 178 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREA-1A.



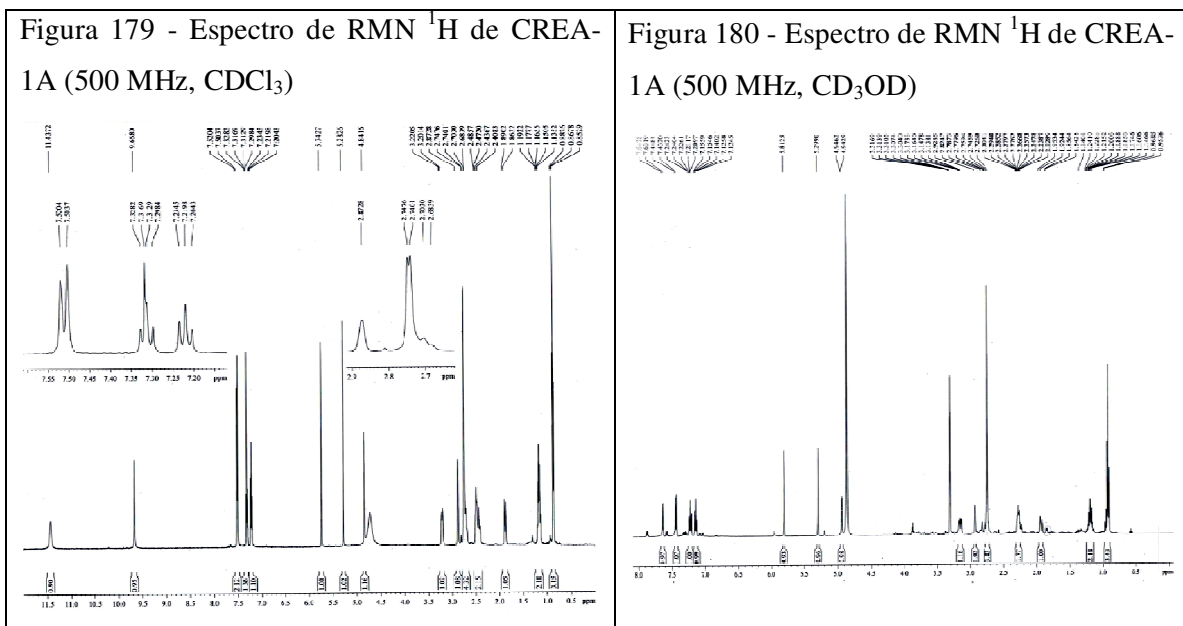
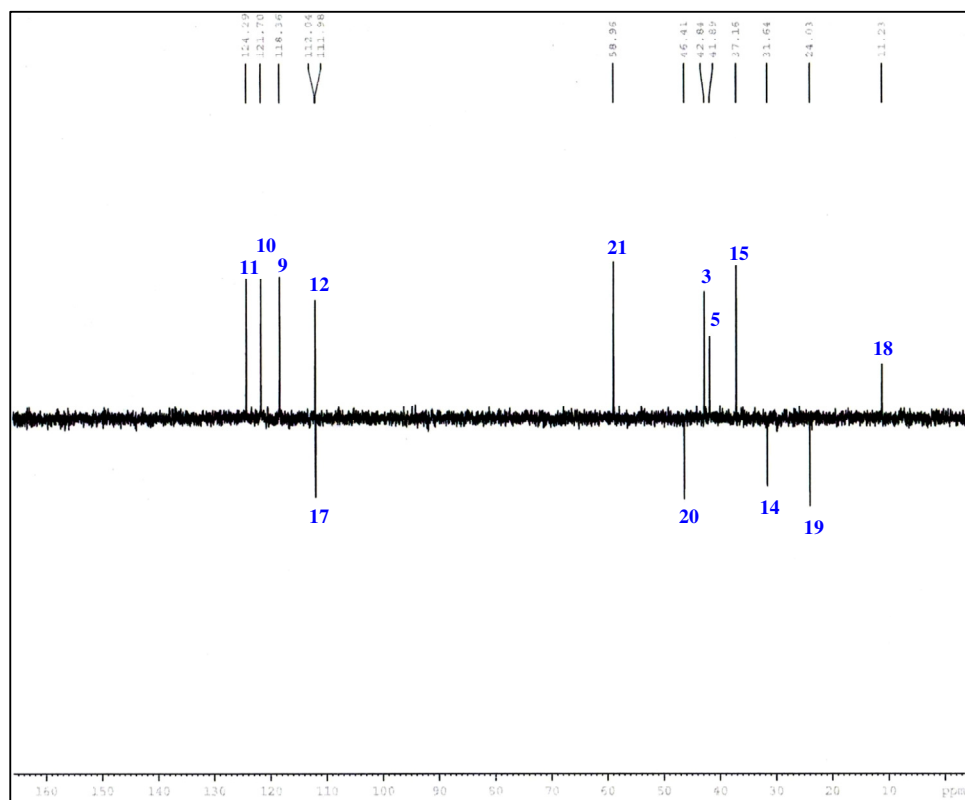


Figura 181 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD e ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de CREA-1A.



4.12 Determinação Estrutural de CREA-2A

A fração CRE-A, originada do extrato etanólico das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei*, foi submetida a cromatografias de adsorção e exclusão, seguida de purificação em CLAE, resultando na obtenção de um sólido amorfo com ponto de fusão 164,3-165,3°C, denominada CREA-2 (Parte Experimental, p. 243).

O espectro na região do infravermelho de CREA-2A (Figura 186, p. 181) apresentou absorções correspondentes a vibrações de deformação axial de N-H para aminas secundárias aromáticas em 3383 e 3234 cm^{-1} e bandas correspondentes a vibrações de deformação axial de C-N alifático em 1181 e 1127 cm^{-1} e aromático (1466 e 1330 cm^{-1}). Também foram observadas bandas correspondentes a deformação angular fora do plano para C-H em anéis aromáticos (799, 750 e 721 cm^{-1}), além de uma carbonila em 1664 cm^{-1} , possivelmente de cetona α,β insaturada.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD de CREA-2A (125 MHz, CDCl_3 , Figura 189, p. 182), exibiu 17 linhas espectrais que, juntamente com o espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C -HSQC de CREA-2A, (Figura 193, p. 184) permitiram a observação de quatro carbonos aromáticos com absorções em δ_{C} 113,8 (δ_{H} 7,60), δ_{C} 120,7 (7,74), δ_{C} 123,5 (7,39) e δ_{C} 128,4 (7,51); dois carbonos metílicos, um em δ_{C} 42,1 (δ_{H} 2,80), provavelmente ligada a um átomo de nitrogênio e δ_{C} 11,3 (δ_{H} 0,91), pertencente a um grupamento etila; três carbonos metínicos em δ_{C} 58,1 (5,09), δ_{C} 46,4 (2,72) e δ_{C} 44,2 (2,86); três carbonos metilênicos, em δ_{C} 24,7 (δ_{H} 1,36), δ_{C} 46,5 (δ_{H} 2,88 e 3,37) e δ_{C} 26,6 (δ_{H} 2,06 e 2,55) e δ_{C} 24,7 (δ_{H} 1,36). Os demais sinais de carbonos não hidrogenado em δ_{C} 113,5; 126,7; 134,0; 138,2 e δ_{C} 190,9, esse último, referente a carbonila de cetona α,β insaturada, conforme espectro de infravermelho (Figura 186, p. 181).

A fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ para CREA-2A foi obtida a partir do pico do íon molecular $[\text{M}-\text{H}]^+$ com m/z 269,1669 no espectro de massa de alta resolução – IES/EM (Figura 187, p. 181), tendo sua massa calculada em m/z 269,1654, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito insaturações na molécula.

O espectro de RMN ^1H de CREA-2A (500 MHz, CDCl_3 , Figura 188, p. 182), mostrou 4 sinais correspondentes aos hidrogênios em δ_{H} 7,74 (H-9), δ_{H} 7,60 (H-12), δ_{H} 7,39 (H-10) e δ_{H} 7,51 (H-11), referente aos hidrogênios do anel benzênico do sistema indólico. Dois sinais um em δ_{H} 0,91 (3H, t, 7,3 Hz) e δ_{H} 2,80 (3H, s), referentes a grupos metílicos, este último ligado a nitrogênio. Os demais sinais encontram-se listados na Tabela 22 (p. 180).

O espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY de CREA-2A (Figuras 190,191 e 192, p. 183) mostrou os acoplamentos escalares conforme já discutidos nas substâncias CREA-1N, além de alguns acoplamentos geminais e vicinais do composto, observados nas subestruturas **A** e **B**, conforme Figura 190 e 191 (p. 183). Entre os acoplamentos escalares observados destacam-se as absorções em δ_{H} 0,91 (H-18) com δ_{H} 1,36 (H-19), confirmando o grupamento etila já mencionado.

No espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (Figuras 196 e 197, p. 185; Figura 198, p. 186) foi possível confirmar inequivocamente através das correlações a duas e três ligações, dos hidrogênios com os carbonos, o sistema indólico da molécula, conforme mostrado na subestrutura **C** ao lado e na Figura 182 abaixo.

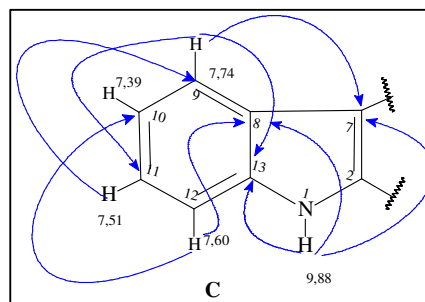
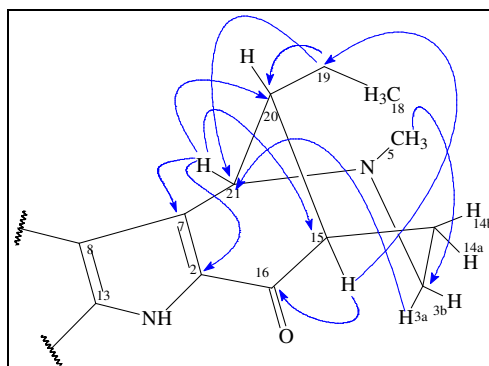
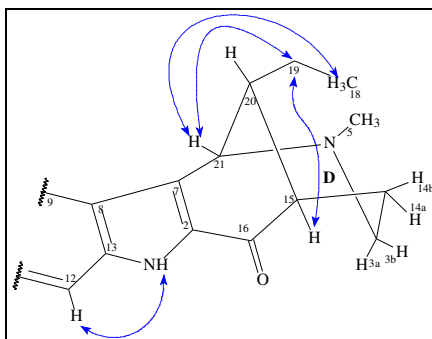


Figura 182 - Subestrutura proposta e correlações obtidas a partir do espectro de HMBC para CREA-2A.



Para efetuar a atribuição dos hidrogênios equatoriais e axiais do anel D de CREA-2A, foi necessário a obtenção do espectro de RMN 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (Figura 199, p. 186), que apresentou as correlações dipolares de H-1 (N-H) com H-12; H-21 com H-18 (CH_3) e H-19 (CH_2); além de H-19 com H-15 (Figura 183, p. 178).

Figura 183 – Acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY para CREA-2A.

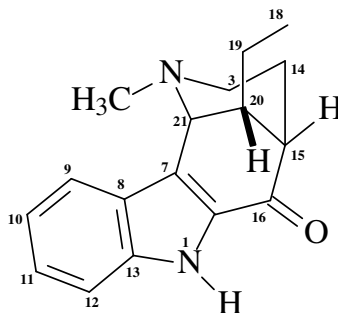


Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de CREA-2A com os dados de dasicarpidona da literatura (FORNS *et al.*, 1996), mostrou similaridade no deslocamento químico do carbono metínico C-21 (δ_c 58,1 e δ_c 56,2). Já o carbono metilênico C-14 e o carbono metínico C-20 de CREA-2A, mostrou estar mais blindado em relação ao C-14 do composto dasicarpidona com $\Delta\delta$ 3,5 ppm para o C-14 e $\Delta\delta$ 3,2 ppm para o C-20.

Com base nos dados de RMN ^{13}C mostrados na Tabela 22 (p. 180), observou-se que o C-14 e C-20 da 20-epidasicarpidona e dasicarpidona apresentavam deslocamentos químicos em δ_c 23,9 ppm e δ_c 30,1; δ_c 46,2 e δ_c 49,6 ppm, respectivamente e $\Delta\delta$ 6,2 ppm para o C-14 e $\Delta\delta$ 3,4 ppm para o C-20.

De acordo com os dados observados para uleína (CREA-1N) e epiuleína (BORRIS *et al.*, 1983) a diferença da série normal para a série epi é que, de acordo com o anel piperidínico, na uleína a cadeia lateral etila está em equatorial e na 20-epiuleína encontra-se em axial. Isto ocasionaria um efeito gama 1,3 diaxial do grupo etila ao próton axial de C-14, resultando numa compressão estérica dos carbonos C-14, C-20 e em menor grau em C-18 e C-19. Esses carbonos estariam, portanto, mais blindados que os da série normal (Figura 184, p. 178).

Figura 184 - Estrutura da 20-epi-dasicarpidona com o grupo etila em axial.



Na comparação dos dados de RMN ^1H de CREA-2A (CDCl_3) com a dasicarpidona e uleína (Tabela 22, p. 180), Gaskell e Joule (1967) observaram que as bases *epi* tem o mesmo esqueleto da uleína e dasicarpidona, porém diferindo apenas na estereoquímica de C-20 onde o grupo etila (C-18 e C-19) está ligado. Na forma epimérica é esperado que o grupamento etila estivesse mais desprotegido, comparado a etila da uleína que apresenta deslocamentos químicos de RMN de ^1H mais próximos ao TMS conferido a blindagem do sistema π do anel. No entanto, a substância CREA-2A por não estar neutra apresenta seus deslocamentos químicos de H-18 abaixo de δ_{H} 1,00 ppm (δ_{H} 0,91 ppm). Isso acontece também com o C-7 em δ_{C} 113,5 diferente da literatura (FORNS *et al.*, 1996) que estabelece para o C-7, o deslocamento químico em δ_{C} 124,4. Acredita-se que essa diferença seja devido a protonação da substância.

De acordo com os dados espectroscópicos e comparação com os dados da literatura, CREA-2A trata-se de um alcaloide indólico epimérico da dasicarpidona que já fora isolado de *Aspidosperma*, mas que para a espécie, 20-*epi*-dasicarpidona (Figura 185), está sendo relatado pela primeira vez.

Figura 185 - Estrutura do alcaloide indólico 20-*epi*-dasicarpidona (CREA-2A)

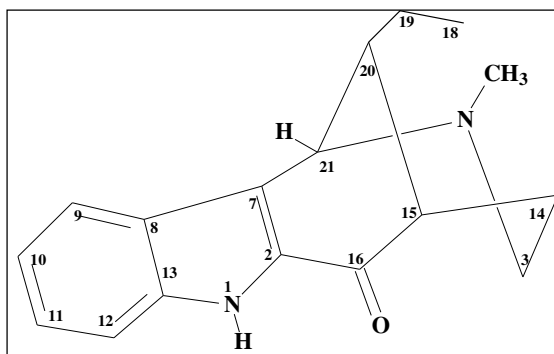


Tabela 22 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREA-2A e comparação com os dados da literatura para os alcaloides epi-dasicarpidona e dasicarpidona (FORNS *et al.*, 1996).

#	$^1\text{CREA-2A}$		$^2\text{epi-dasicarpidona}$		$^3\text{dasicarpidona}$	
	C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		134,0	-	133,3	-	132,9
3a		46,5	2,88 (m; 1H)	46,1	2,48 (dd; 12,5 Hz)	46,0
3b			3,37 (d; 8,7 Hz; 1H)		1,94-2,04 (m)	
5		42,1	2,80 (s; 3H)	44,6	2,26 (s)	44,0
7		113,5	-	124,4	-	122,0
8		126,7	-	127,0	-	127,8
9		120,7	7,74 (d; 8,0 Hz; 1H)	120,8	7,71 (d; 8,0 Hz)	119,9
10		123,5	7,39 (t; 7,0 Hz; 1H)	122,0	7,17 (td; 8,1 Hz)	121,1
11		128,4	7,51 (t; 7,0 Hz; 1H)	126,7	7,37 (td; 8,1 Hz)	126,9
12		113,8	7,60 (d; 8,0 Hz, 1H)	112,8	7,53 (d; 8,0 Hz)	112,7
13		138,2	-	138,1	-	138,1
14a		26,6	2,06 (d; 15,0 Hz, 1H)	23,9	1,67 (d; 12,0 Hz)	30,1
14b			2,55 (m; 1H)		2,16-2,32 (m)	
15		44,2	2,86 (m; 1H)	45,0	2,65 (m)	46,3
16		190,9	-	195,4	-	193,5
18		11,3	0,91 (t; 7,3 Hz, 3H)	11,7	1,02 (t; 7,0 Hz)	11,8
19		24,7	1,36 (m; 2H)	23,3	1,75-1,89 (m)	24,8
					1,88-1,97 (m)	
20		46,4	2,72 (m; 1H)	46,2	2,16-2,32 (m)	49,6
21		58,1	5,09 (s; 1H)	54,7	4,18 (s)	56,2
N-H		-	9,88 (s; 1H)	-	10,1 (s)	-

$^1\text{CDCl}_3$ (125/500 MHz); $^{2,3}\text{CDCl}_3$ (200/500 MHz);

Figura 186 - Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREA-2A (UATR).

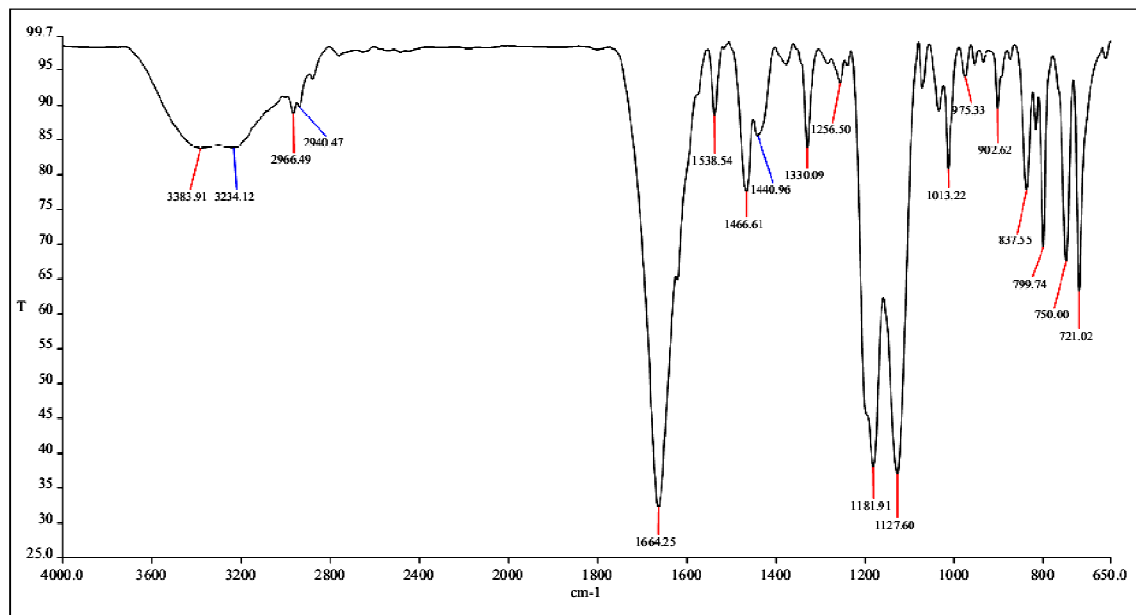


Figura 187 - Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREA-2A.

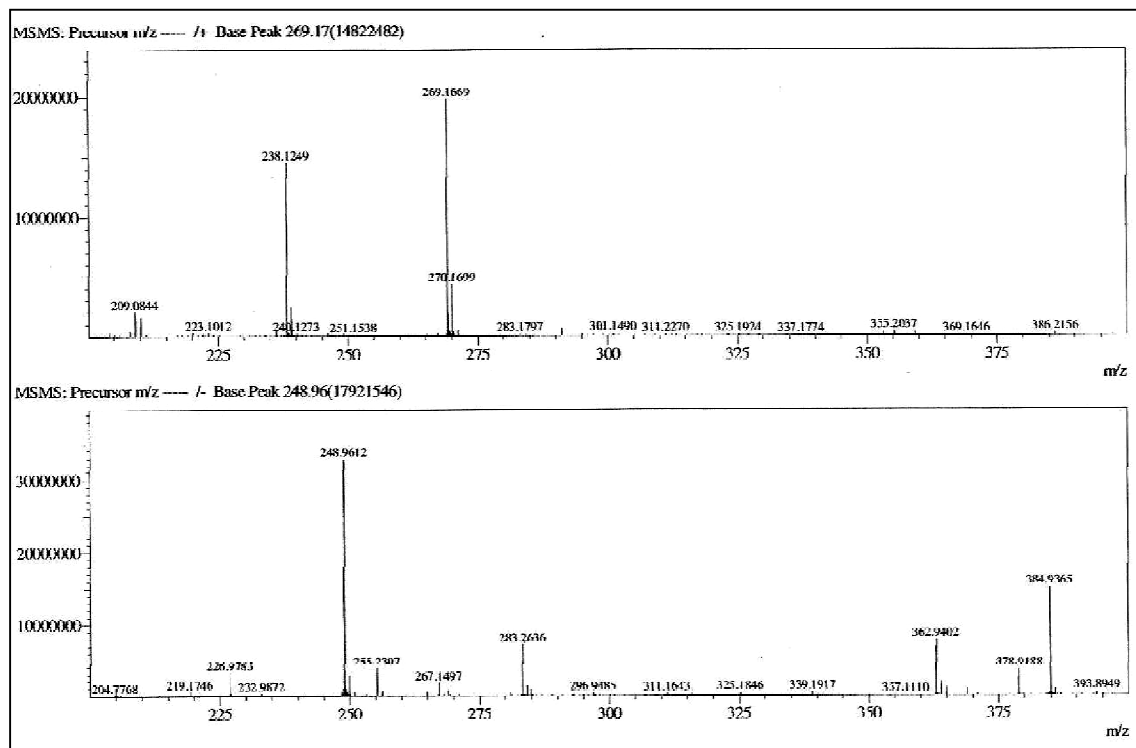


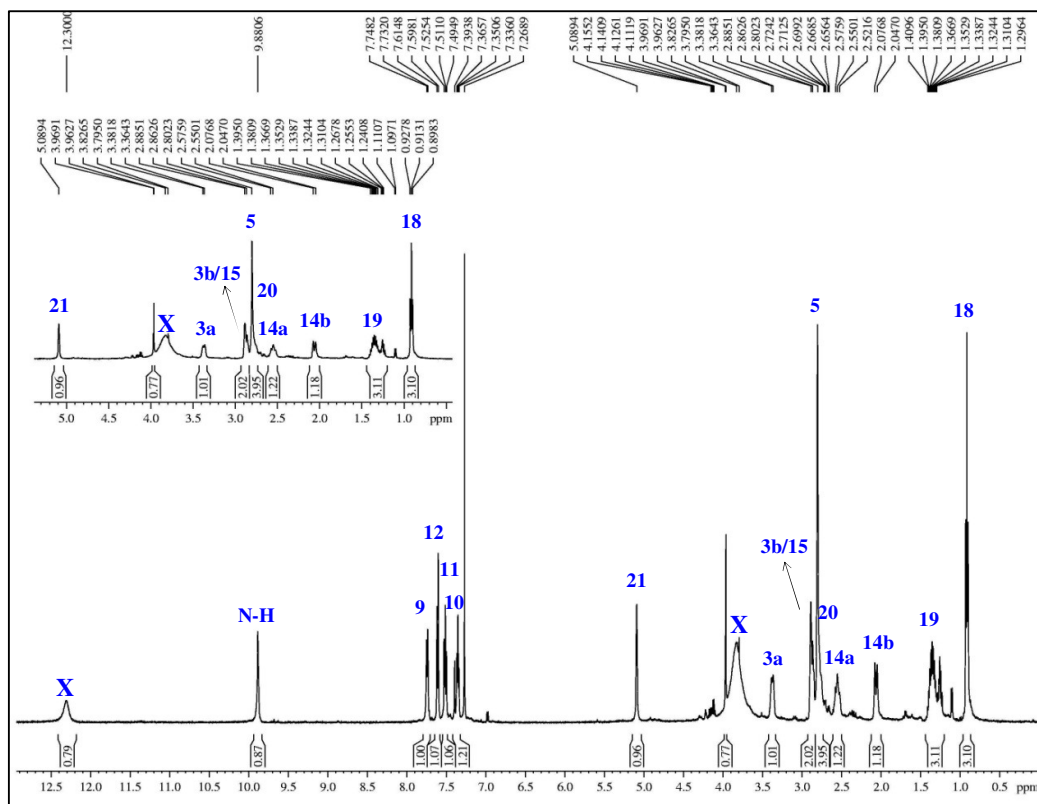
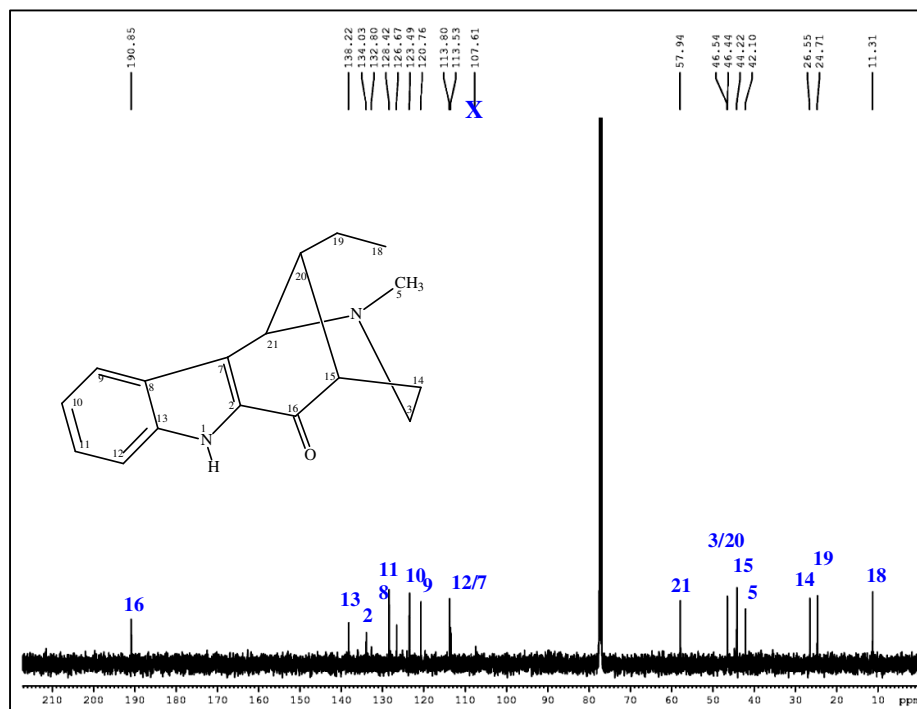
Figura 188 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A.Figura 189 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A.

Figura 190 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A.

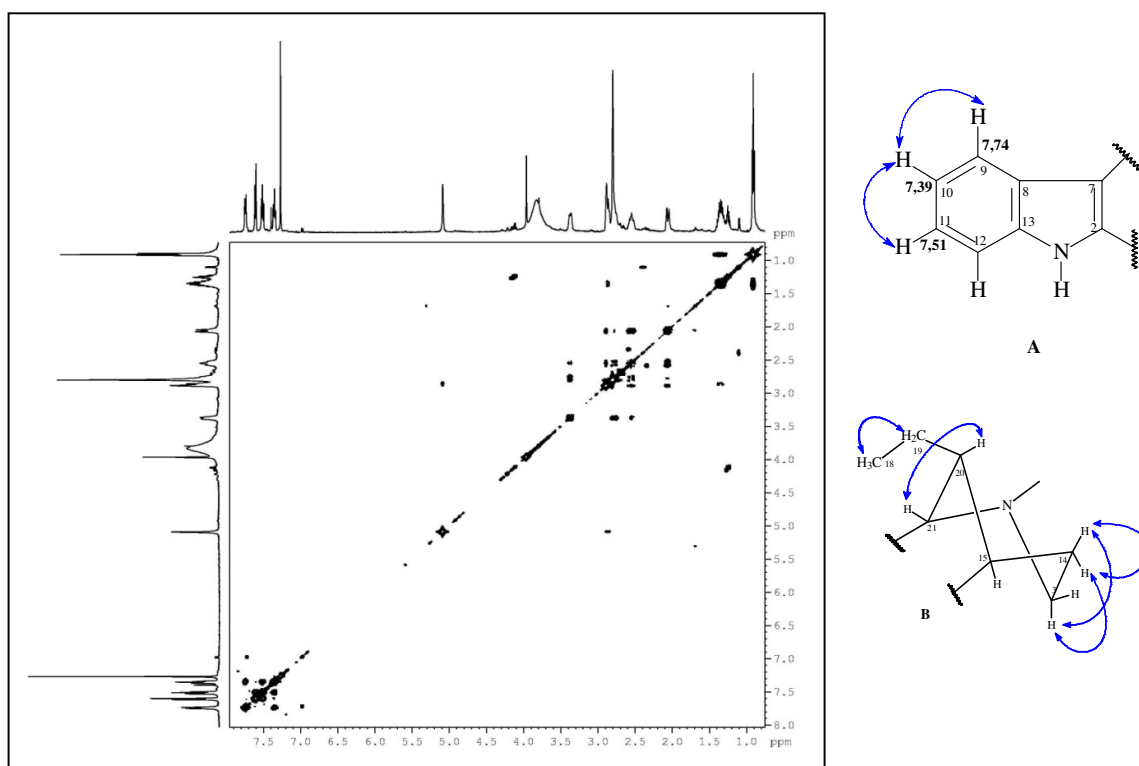


Figura 191 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - Figura 192 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -
COSY de CREA-2A e expansão de 5,0-1,0 COSY de CREA-2A e expansão de 7,8-7,0
ppm. e 7,8-6,9 ppm.

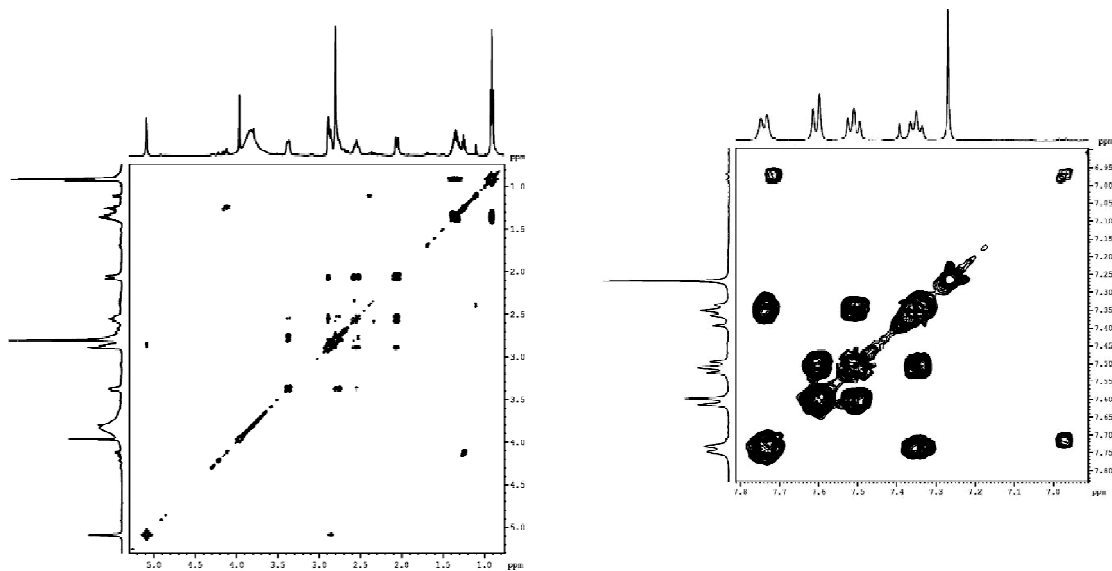


Figura 193 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A.

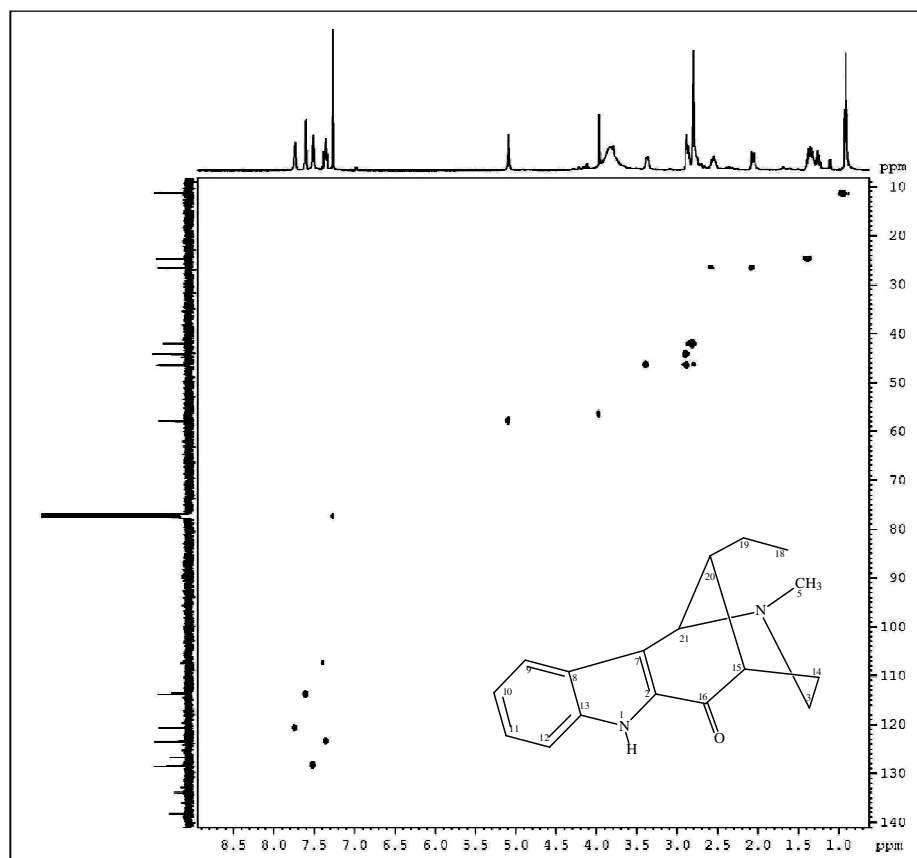


Figura 194 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A (expansão 5,0-1,0 e 60-10 ppm).

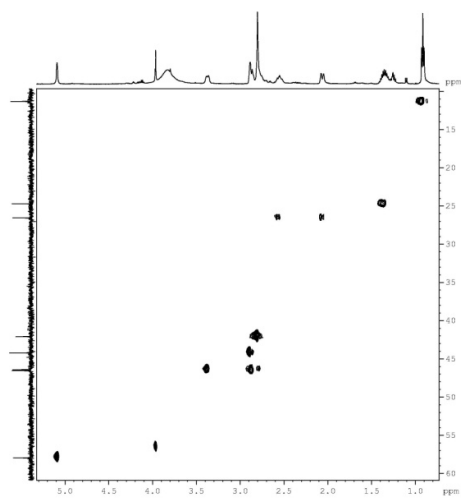


Figura 195 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HSQC de CREA-2A (expansão 7,8-7,2 e 130-107 ppm).

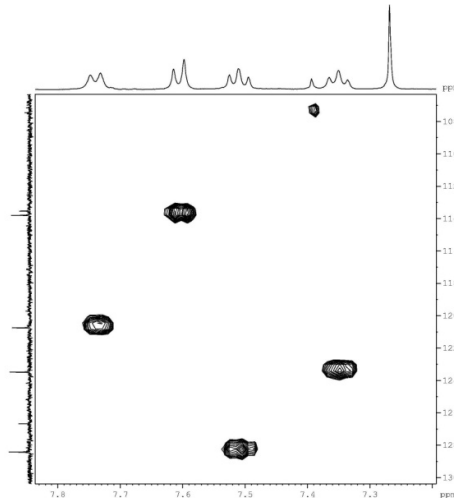


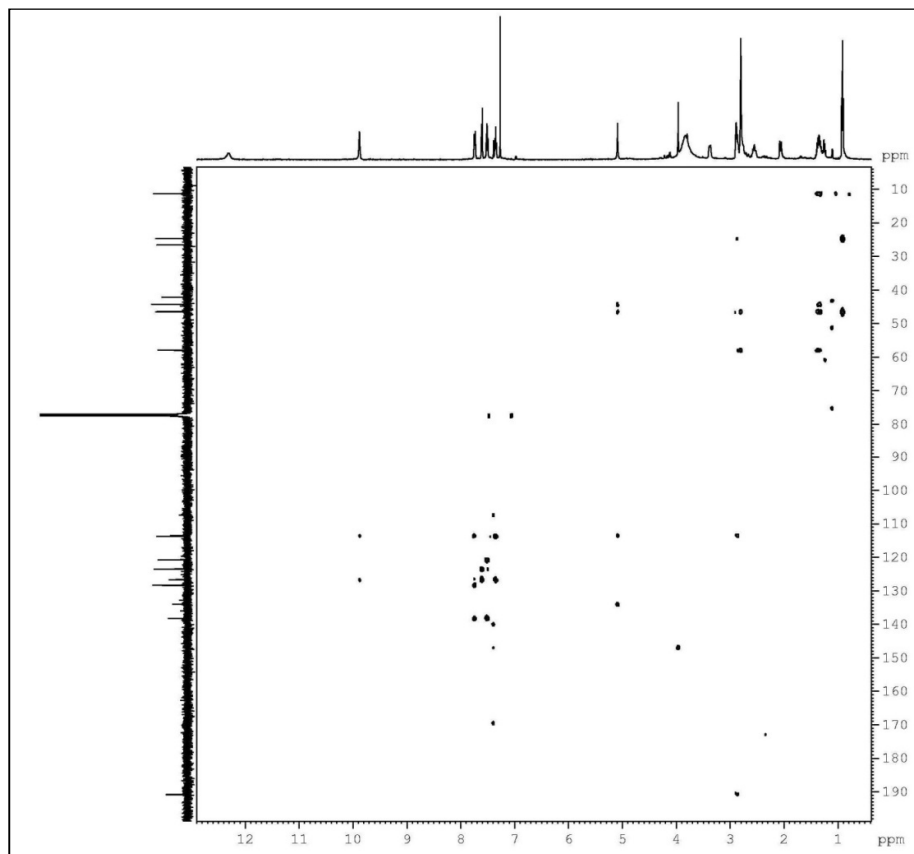
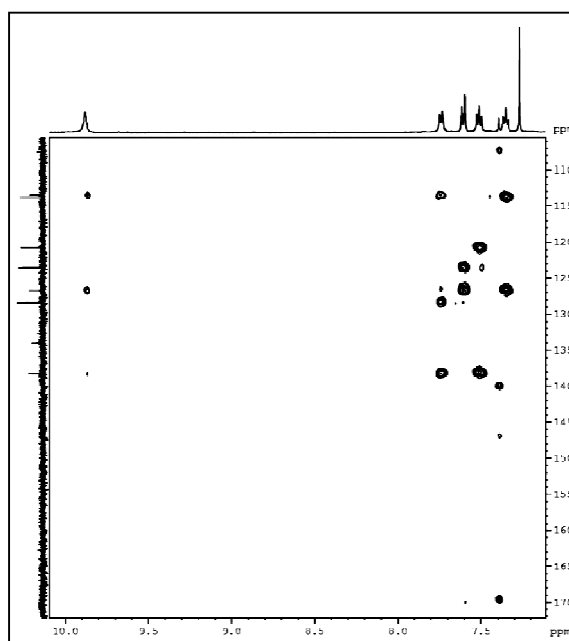
Figura 196 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A.Figura 197 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A e expansão.

Figura 198 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HMBC (500 x 125 MHz, CDCl_3) de CREA-2A e expansão.

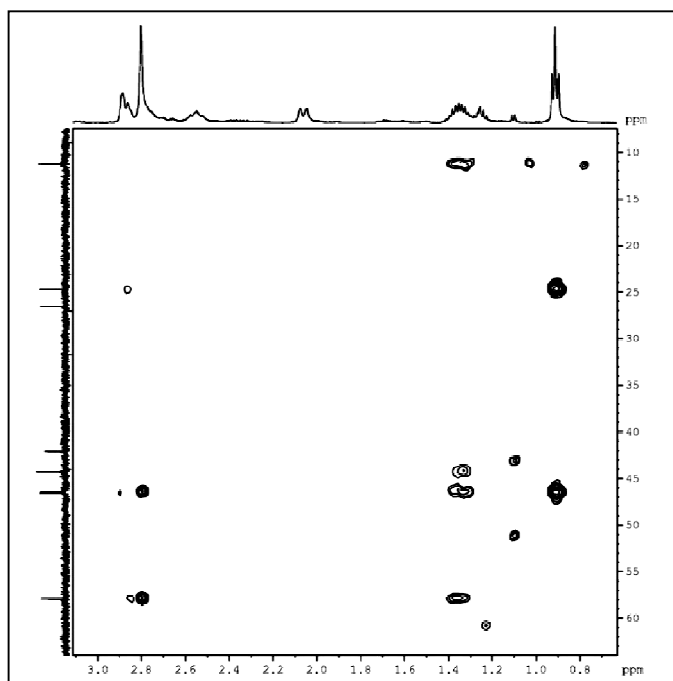
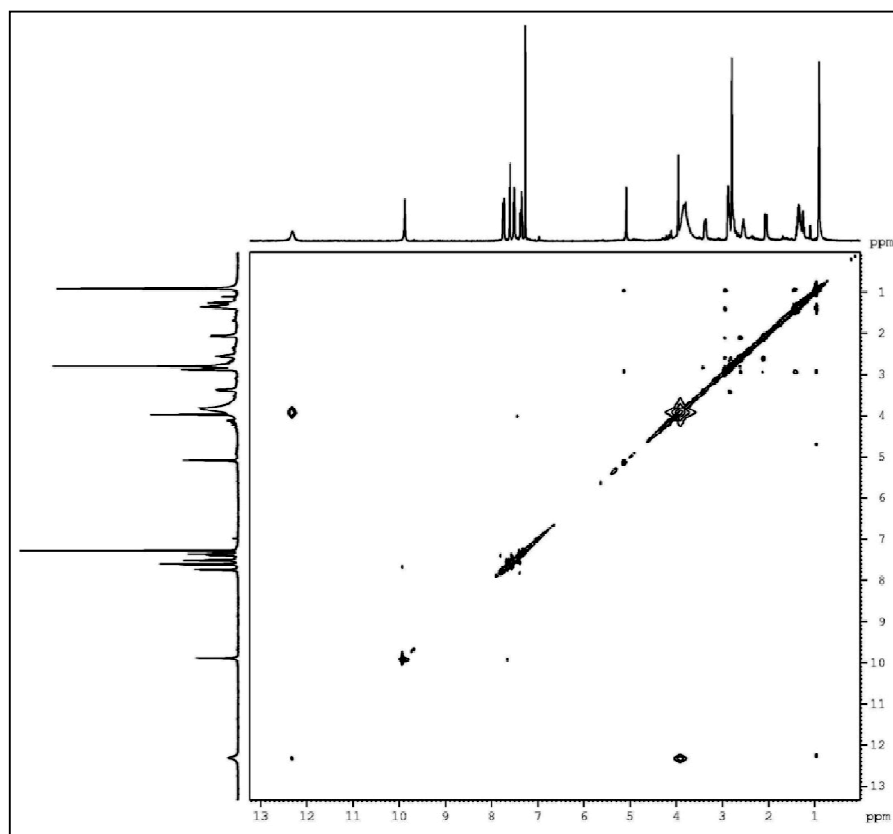


Figura 199 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H –NOESY (500 MHz, CDCl_3) de CREA-2A .



4.13 Determinação Estrutural de CREA - 3

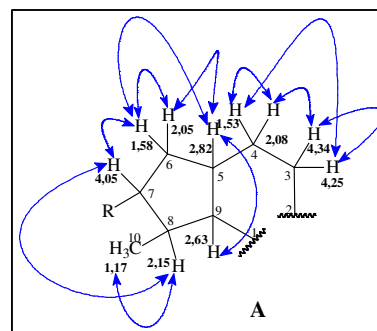
A fração CRE-A, originada do extrato etanólico das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei*, foi submetida a cromatografias de adsorção, seguida de purificação em CLAE, resultando na obtenção de uma resina marrom, denominada CREA-3 (Parte experimental, p. 243).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 202, p. 190) evidenciou uma banda larga de vibração correspondente a deformação axial de ligação OH de álcool em 3411 cm^{-1} , uma banda em 1075 cm^{-1} , referente a deformação axial correspondente a ligação C-O, além de uma banda correspondente a deformação axial de C=O em 1713 cm^{-1} , provavelmente de éster.

O espectro de RMN de ^{13}C -CPD de CREA-3 (125 MHz, CD_3OD , Figura 205, p. 191) apresentou nove linhas espectrais, sendo possível identificar um carbono não hydrogenado em $\delta_{\text{C}} 178,1$, que de acordo com o espectro no infravermelho condiz com uma carbonila de éster; três carbonos metínicos em $\delta_{\text{C}} 48,3$; $\delta_{\text{C}} 45,7$ e $\delta_{\text{C}} 35,1$ e três carbonos metilênicos em $\delta_{\text{C}} 30,3$; $\delta_{\text{C}} 68,4$ e $\delta_{\text{C}} 76,1$ foram observados e correlacionados com seus respectivos hidrogênios pela análise do espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HSQC (Figura 207, p. 192); os dois últimos são referentes a carbonos oxigenados. Foi observado ainda um sinal correspondente a uma metila em $\delta_{\text{C}} 14,3$.

O espectro de RMN de ^1H de CREA-3 (500 MHz, CD_3OD , Figura 203, p. 190), exibiu sinais correspondentes a hidrogênios desblindados em $\delta_{\text{H}} 4,34$ (m; 1H) e $4,25$ (m, 1H); $\delta_{\text{H}} 4,05$ (t, 3,0 Hz; 1H), além de sinais em $\delta_{\text{H}} 2,82$ (m, 1H); $\delta_{\text{H}} 2,63$ (t, 12 Hz, 1H); $\delta_{\text{H}} 2,15$ (m, 1H); $\delta_{\text{H}} 1,53$ (m, 1H) e $\delta_{\text{H}} 2,08$ (m, 1); $\delta_{\text{H}} 1,58$ (m, 1H) e $\delta_{\text{H}} 2,05$ (m, 1H), e um sinal em $\delta_{\text{H}} 1,17$ (d, 6,0 Hz, 3H) referente a hidrogênio metílico.

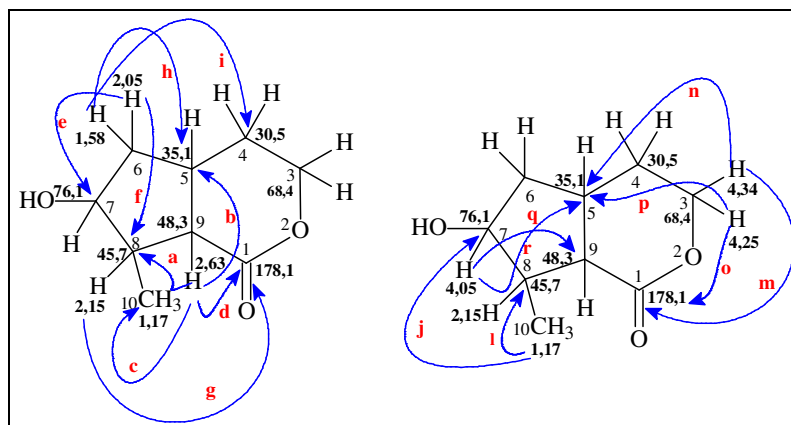
O espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -COSY (Figura 206, p. 192), revelou acoplamento entre os hidrogênios geminais $\delta_{\text{H}} 4,25$ com $\delta_{\text{H}} 4,34$; $\delta_{\text{H}} 1,53$ com $\delta_{\text{H}} 2,08$; $\delta_{\text{H}} 1,58$ e $\delta_{\text{H}} 2,05$, além dos acoplamentos de hidrogênios vicinais em $\delta_{\text{H}} 2,05$ com $2,82$ e com $1,58$; $\delta_{\text{H}} 4,05$ com $1,58$ e $2,15$, que acopla com $\delta_{\text{H}} 2,63$, e também de $\delta_{\text{H}} 4,25$ com $\delta_{\text{H}} 1,53$ e $\delta_{\text{H}} 2,08$ com $\delta_{\text{H}} 4,34$, observados na subestrutura A.



O espectro de RMN ^1H , ^{13}C -HMBC de CREA-3 (Figura 208, p. 193) mostrou as correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios em δ_{H} 2,63 (H-9) com os respectivos carbonos em δ_{C} 45,7 (C-8); δ_{C} 35,1 (C-5), δ_{C} 14,3 (C-10) e δ_{C} 178,1 (C-1). Correlações em δ_{H} 2,05 (H-6) com 76,1 (C-7) e 45,7 (C-8); δ_{H} 2,15 (H-8) com δ_{C} 178,1 (C-1); δ_{H} 1,58 (H-6) com os carbonos em δ_{C} 35,1 (C-5) e δ_{C} 30,5 (C-4); δ_{H} 1,17 (H-10) com os carbonos em δ_{C} 76,1 (C-7) e 45,7 (C-8).

Observaram-se ainda deslocamentos de hidrogênios desblindados em δ_{H} 4,34 (H-3a) com o carbono carbonílico em δ_{C} 178,1 (C-1) e 35,1 (C-5); δ_{H} 4,25 (H-3b) com δ_{C} 178,1 (C-1) e também com o 35,1 (C-5); além de acoplamentos em δ_{H} 4,05 (H-7) com carbonos metínicos em δ_{C} 48,3 (C-9) e δ_{C} 35,1 (C-5) confirmados pela estrutura na Figura 200 (p. 188). Os dados encontram-se listados na Tabela 23 (p. 189).

Figura 200 – Subestruturas propostas e correlações obtidas a partir do espectro de HMBC para CREA-3.



De acordo com Bianco (1994), os dados apresentados para CREA-3 corroboram com uma lactona do tipo iridomimercina, importante precursor biogenético dos alcaloides, e de acordo com estudos, são relatadas atividades inseticidas e bactericidas. Sua ocorrência em Apocynaceae se dá como um glicosídeo ou como aglicona.

Marini-Bettolo (1983) relatou o isolamento da booneína da casca de *Alstonia boonei* que comparados com CREA-3, exibiram similaridades nos dados, levando-se a propor que CREA-3 tratava-se da δ -lactona booneína (Figura 201, p. 189), isolada pela primeira vez para o gênero *Aspidosperma*.

Tabela 23 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREA-3 e comparação com os dados da literatura para a booneína (MARINI-BETTOLO² *et al.*, 1983; BIANCO *et al.*, 1994)³

#	¹ CREA-3		² Literatura		³ Literatura
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1	178,1	-	175,0	-	-
3	68,4	4,25 (m; 1H) 4,34 (m 1H)	66,9	4,5-4,1 (m)	4,17 (ddd; 8,5; 8,5,2,5 Hz) 4,28 (ddd; 11; 6; 3 Hz)
4	30,5	1,53 (m; 3H) 2,08 (m; 1H)	29,4	2,00 (m)	1,18 (m) 1,44 (m)
5	35,1	2,82 (m; 1H)	33,3	-	2,85 (m)
6	42,0	1,58 (m; 1H) 2,05 (m; 1H)	40,7		1,45 (ddd; 11 Hz) 2,04 (ddd; 14; 14; 8 Hz)
7	76,1	4,05 (t; 3 Hz; 1H)	74,4	4,5-4,1 (m)	4,10 (m)
8	45,7	2,15 (m; 1H)	43,8	-	2,20 (ddq; 4; 10; 7,7 Hz)
9	48,3	2,63 (t; 12 Hz; 1H)	46,8	-	2,63 (t, 10 Hz)
10	14,3	1,17 (d; 6 Hz; 3H)	13,3	1,20 (d; 7,0 Hz; 3H)	1,19 (d; 8 Hz)

¹ CD₃OD; 125 x 500 MHz; ² CDCl₃, 25 x 100 MHz; ³ CDCl₃; 125 x 500 MHz.

Figura 201 – Estrutura da δ -lactona booneína (CREA-3).

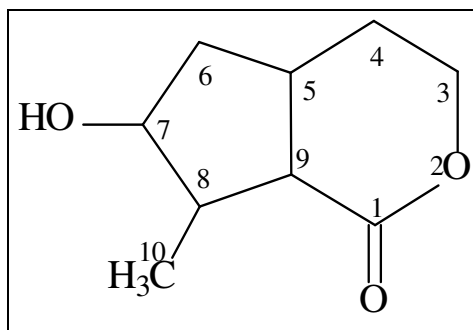


Figura 202 - Espectro de Infravermelho de CREA-3 (UATR).

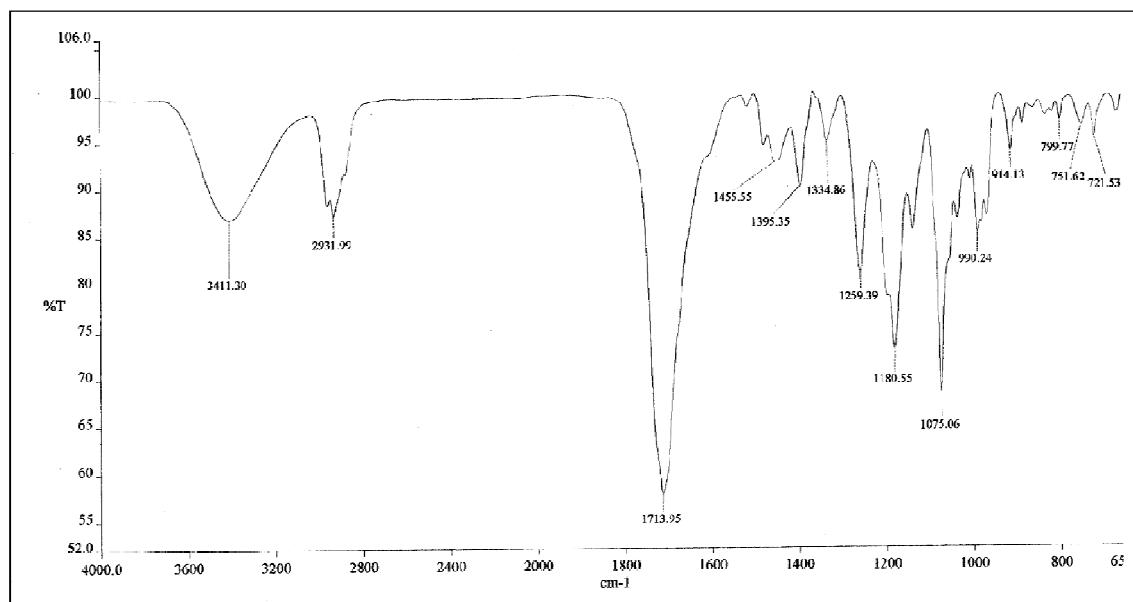
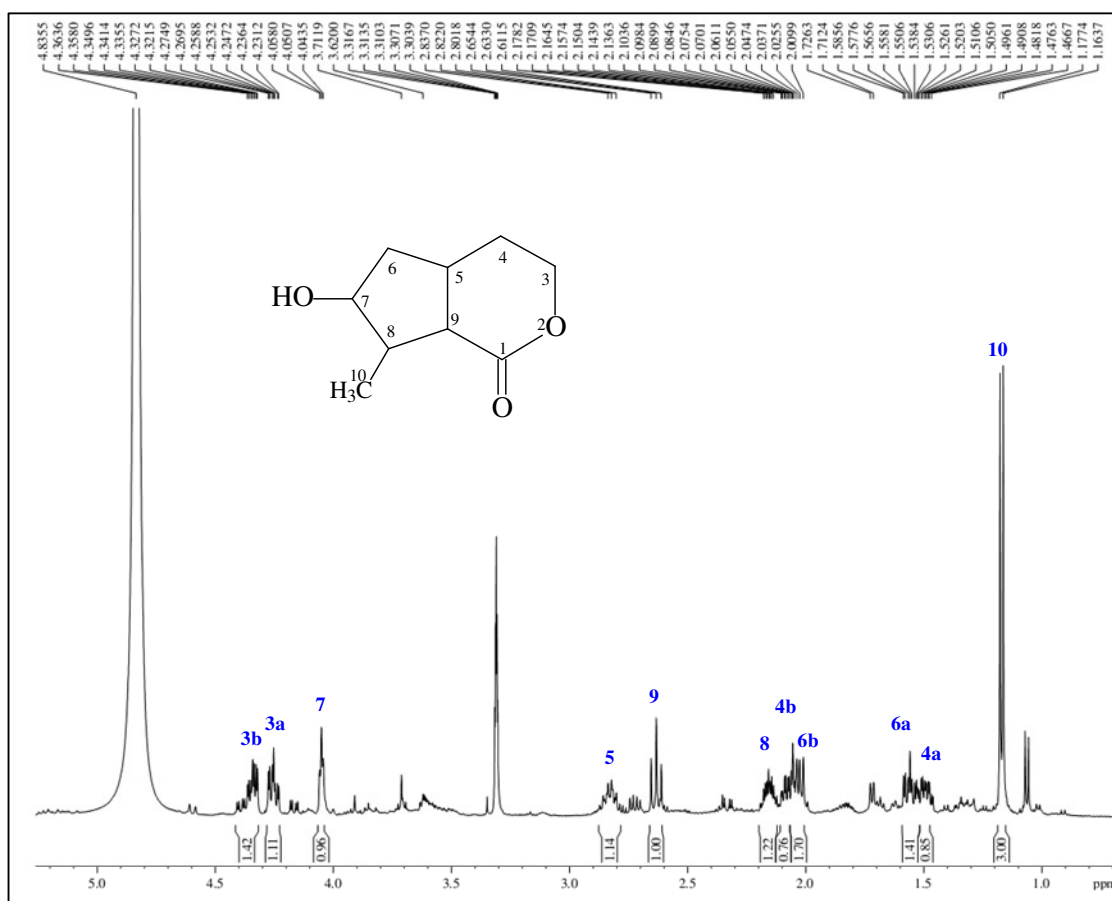
Figura 203 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3

Figura 204 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3 e Expansão.

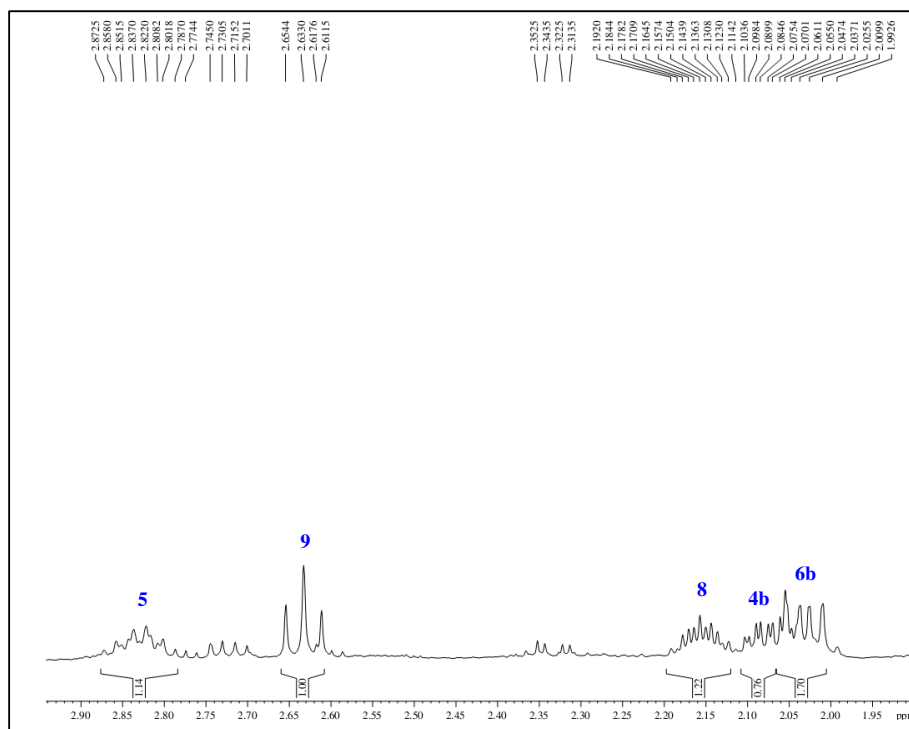


Figura 205 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREA-3.

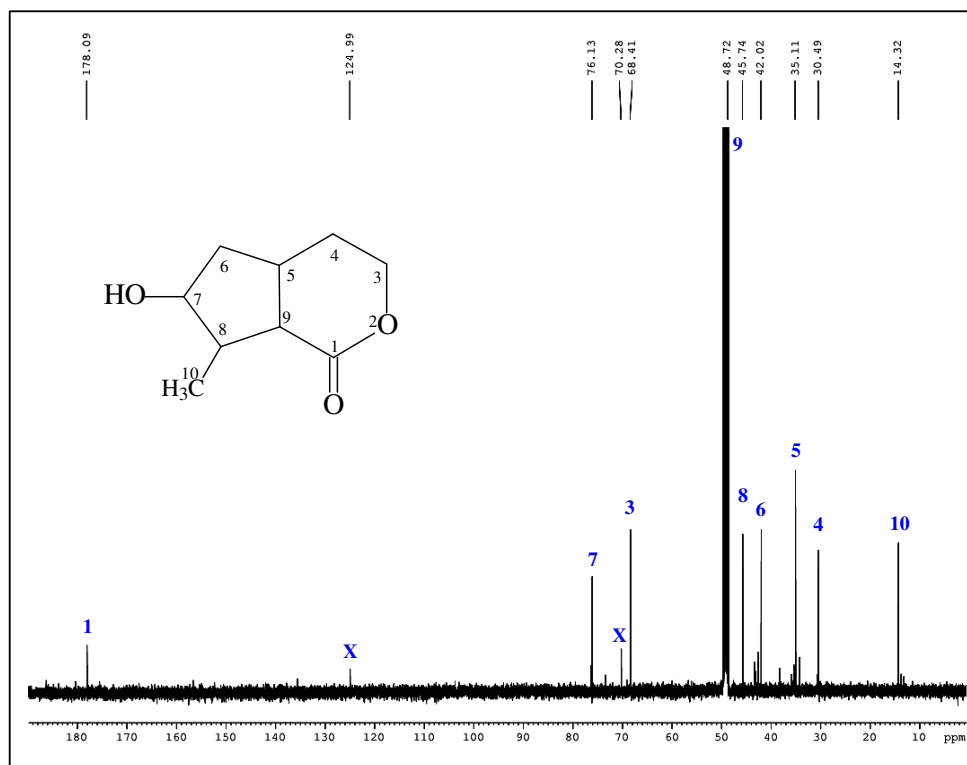


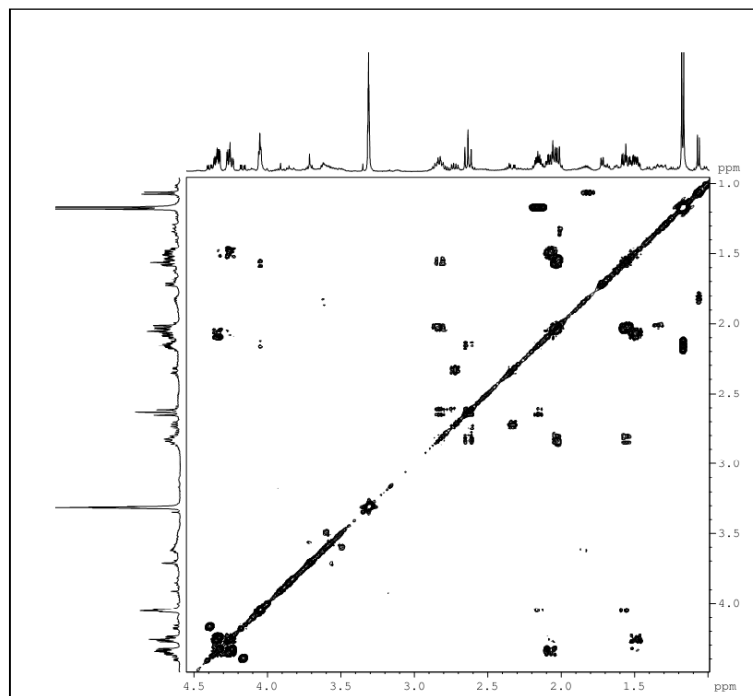
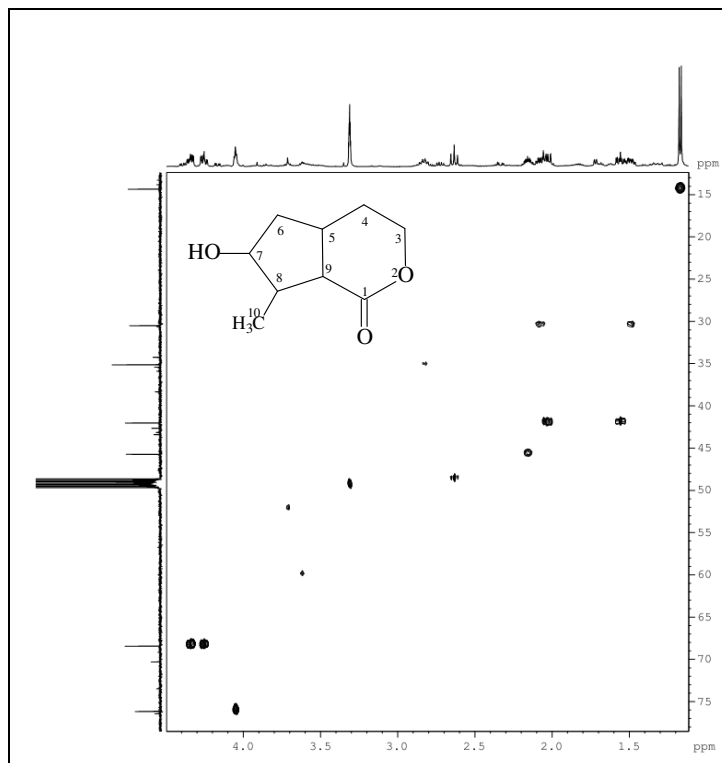
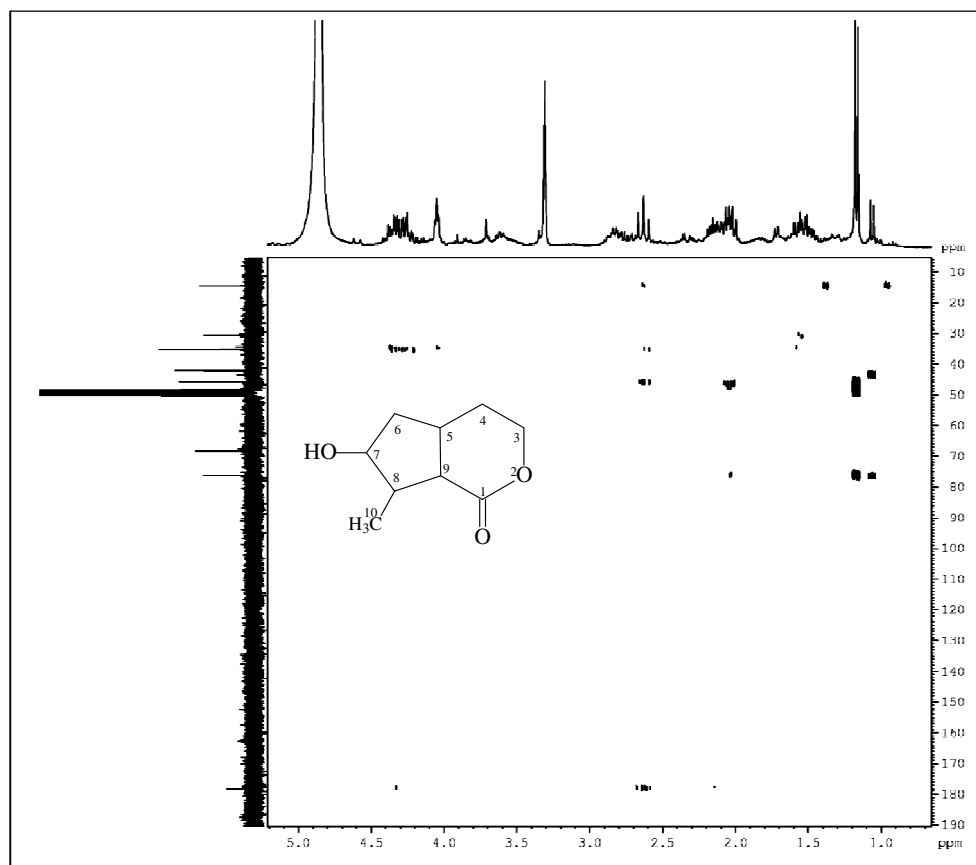
Figura 206 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CD_3OD) de CREA-3.Figura 207 – Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C – HSQC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CREA-3.

Figura 208 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C HMBC (500 x 125 MHz, CD_3OD) de CREA-3.

4.14 Determinação Estrutural de CREB-1A

O composto CREB-1A, apresentou-se como um sólido amorfo, com ponto de fusão de 220,3-221,4 °C (Parte Experimental p. 245).

O espectro na região do infravermelho de CREB-1A (Figura 210, p. 198) apresentou absorção em 3260 cm⁻¹, correspondente a vibração de deformação axial N-H para amina secundária aromática. Vibrações de deformação axial da ligação C-H alifático em 2922 e 2852 cm⁻¹, correspondentes a grupamentos metilas e metilênicos. Banda em 1646 cm⁻¹ característico de ligação C=O, de carbonila α, β insaturada. Observou-se uma banda correspondente a vibração de deformação axial de aromático em 1464 cm⁻¹, além de uma banda correspondente a deformação angular fora do plano para CH de anel aromático em 747 cm⁻¹. Comparando CREB-1A com a substância CREA-2A (p. 176), não se observa banda de deformação axial de C-N alifático.

O espectro de RMN ¹³C-CPD de CREB-1A (75 MHz, CD₃OD; Figura 214, p. 200) registrou 12 linhas espectrais, que comparados aos espectros de RMN 2D HSQC (Figuras 216 e 217, p. 201) e o espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HMBC de CREB-1A, (Figuras 220, 221 e 222, p. 203), foi possível observar 16 carbonos dos quais, oito carbonos com absorções em δ_c 114,4 (C-12), δ_c 122,0 (C-9), δ_c 122,9 (C-10) e δ_c 128,6 (C-11), δ_c 126,4 (C-8), δ_c 135,5(C-2), δ_c 140,4(C-13) e δ_c 116,2(C-7), atribuídos ao sistema indólico, facilmente identificado por comparação com os dados obtidos para as substâncias anteriores (CREA-1N e CREA-1A).

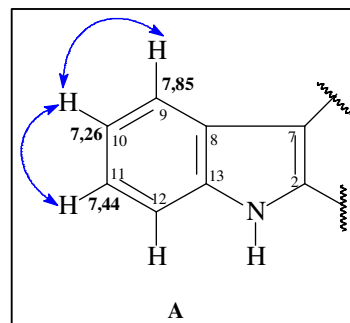
Três carbonos metínicos em δ_c 50,3 (C-21), δ_c 47,3 (C-20) e δ_c 46,6 (C-15) e três carbonos metilênicos em δ_c 37,4 (C-3), δ_c 26,8 (C-14) e δ_c 25,6 (C-19), confirmados pelo espectro de RMN ¹³C-DEPT 135 (Figura 215, p. 200). Observou-se ainda um sinal em δ_c 191,7, referente a carbonila conjugada, já observado no espectro de IV, além de um carbono metílico em δ_c 11,6 (C-18) que comparado com a substância CREA-2A (Figura 185, p. 179), apresenta duas metilas. Enquanto, neste composto não é observado, conforme mostra espectro de massa (Figura 211). Esses dados encontram-se listados na Tabela 25 (p. 197).

O espectro de Massa de alta resolução IES-EM (Figura 211, p. 198), foi obtido a partir do pico do íon molecular [M - H]⁺ com m/z 255,1527, que comparado com a massa calculada m/z 255,1497 Daltons, sugeriu a fórmula molecular de C₁₆H₁₈N₂O, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio igual a oito.

Comparando-se a massa de CREB-1A com CREA-2A (m/z 269,1669 Daltons, p. 181), observa-se 14 unidades a menos para CREB-1A.

O espectro de RMN ^1H de CREB-1A (500 MHz, CD_3OD , Figuras 212 e 213, p. 199), mostrou quatro sinais em δ_{H} 7,55 (H-12), 7,85 (H-9), 7,26 (H-10) e 7,44 (H-11), compatível com hidrogênios do anel benzênico de sistema indólico. Sinais em δ_{H} 0,97 (3H-18) e δ_{H} 1,35 (2H-19), referentes a um substituinte etila. Os demais sinais observados encontram-se listados na Tabela 25 (p. 197).

A análise das correlações escalares observadas no espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -COSY de CREA-1A (Figuras 218 e 219, p. 202), mostrou poucos acoplamentos sendo alguns do sistema indólico em δ_{H} 7,26 com δ_{H} 7,85; e δ_{H} 7,44; de acoplamentos vicinais do composto, conferidos na subestrutura A.

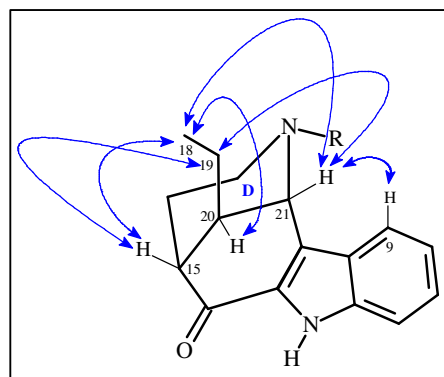


No espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC (Figura 220, 221 e 222, p. 201) de CREB-1A, foi possível confirmar inequivocamente as correlações a duas e três ligações dos hidrogênios que confirmam o sistema indólico da molécula.

Adicionalmente, foram observadas importantes correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 2,26 (H-14b) com δ_{C} 191,7 (C-16) e que acopla com δ_{H} 2,47 (H-20), confirmando a presença de uma cetona α , β insaturada; além de correlações em δ_{H} 5,22 (H-21) com os carbonos em δ_{C} 135,5 (C-2); δ_{C} 116,4 (C-7); δ_{C} 47,3 (C-20) e δ_{C} 37,4 (C-3), juntamente com os hidrogênios em δ_{H} 0,97 (H-18) com δ_{C} 47,3 (C-20) e δ_{C} 25,5 (C-19).

De acordo com comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de CREA-2A mostrou tratar-se de um alcaloide indólico com estreita semelhança ao discutido para um epímero do alcaloide dasicarpidona (GRÁCIA *et al.*, 1994), ou seja 20-epi-dasicarpidona, diferindo apenas pela ausência da metila ligada ao átomo de nitrogênio em CREB-1A, que corresponderia ao C-5 de CREA-2A.

Para efetuar a atribuição dos hidrogênios equatoriais e axiais do anel D de CREB-1A, foi necessário a obtenção do espectro de RMN 2D ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz, Figura 223, p. 204), que apresentou acoplamentos dipolares importantes em δ_{H} 5,22 (H-21) com δ_{H} 7,85 (H-9); δ_{H} 1,35 (H-19) e δ_{H} 0,97 (H-18); acoplamentos em δ_{H} 2,87 (H-15) com δ_{H}



1,35 (H-19) e δ_H 0,97(H-18); além de δ_H 2,47 (H-20) com δ_H 0,97 (3H-18) corroborando com a estrutura epimérica da cadeia lateral etila encontrar-se em posição axial ao anel piperidínico.

Tabela 24 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de CREB-1A e CREA-2A com os dados da literatura (^{3,5}FORNS *et al.*, 1996; ⁴GRÀCIA *et al.*, 1994).

#	CREB-1A ⁽¹⁾	CREA-2A ⁽²⁾	epi-dasicarpidona ⁽³⁾	nor-dasicarpidona ⁽⁴⁾	dasicarpidona ⁽⁵⁾
C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
2	135,5	134,0	133,3	132,9	132,9
3	37,4	46,5	46,1	37,2	46,0
5	-	42,1	44,6	-	44,0
7	116,2	113,5	124,4	123,8	122,0
8	126,4	126,7	127,0	125,1	127,8
9	122,0	120,7	120,8	121,0	119,9
10	122,9	123,5	122,0	120,8	121,1
11	128,6	128,4	126,7	127,0	126,9
12	114,5	113,8	112,8	113,0	112,7
13	140,4	138,2	138,1	139,0	138,1
14	26,8	26,6	23,9	30,2	30,1
15	46,6	44,2	45,0	49,0	46,3
16	191,7	190,9	195,4	193,9	193,5
18	11,6	11,3	11,7	11,5	11,8
19	25,6	24,7	23,3	25,0	24,8
20	47,3	46,4	46,2	47,4	49,6
21	50,3	58,1	54,7	49,0	56,2

¹(CD₃OD, 75 x 300MHz); ²(CDCl₃; 125 x 500MHz); ^{3,5}(CDCl₃; 200 x 500 MHz); ⁴(CDCl₃; 125 MHz)

Na comparação dos dados de RMN de ^{13}C (Tabela 24, p. 196) da epi-dasicarpidona (FORNS *et al.*, 1996), o C-21 (δ_C 54,7) apresenta-se mais blindado comparado ao C-21 da dasicarpidona (δ_C 56,2), devido a orientação em axial do grupo etila. Enquanto o C-21 (δ_C 50,3) de CREB-1A apresenta-se mais blindado devido a ausência da metila (C-5) ligada ao nitrogênio.

De acordo com a Tabela 24, os carbonos C-3, C-14, C-15, C-21 e C-20 apresentam significativas variações de deslocamentos químicos e que comparados com a literatura (FORNS *et al.*, 1996; GRÀCIA *et al.*, 1994; BORRIS *et al.*, 1983), foi possível propor que a estrutura apresentada na Figura 209 (p. 197) para CREB-1A tratava-se de um alcaloide indólico do tipo dasicarpano 20-epi-N-nordasicarpidona, isolado pela primeira vez para o gênero *Aspidosperma*.

Tabela 25 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H para CREB-1A e comparação com os dados de CREA-2A e os dados da Literatura ($^3\text{FORNS}$, *et al.*, 1996; $^4\text{GRÀCIA}$, *et al.*, 1994).

#	⁽¹⁾ CREB-1A		⁽²⁾ CREA-2A		⁽³⁾ epi-dasicarpidona		⁽⁴⁾ dasicarpidona
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}
2	135,5	-	134,0	133,3	-		132,9
3	37,4	2,92 (m) 3,17 (m)	46,5	46,1	2,48 (dd; 12,5 Hz) 1,94-2,04 (m)		46,0
5	-	-	42,1	44,6	2,26 (s)		44,0
7	116,2	-	113,5	124,4	-		122,0
8	126,4	-	126,7	127,0	-		127,8
9	122,0	7,85 (d; 8,0 Hz)	120,7	120,8	7,71 (d; 8,0 Hz)		119,9
10	122,9	7,26 (t; 8,0 Hz)	123,5	122,0	7,17 (td; 8,1 Hz)		121,1
11	128,6	7,44 (t; 7,0 Hz)	128,4	126,7	7,37 (td; 8,1 Hz)		126,9
12	114,5	7,55 (d; 7,0 Hz)	113,8	112,8	7,53 (d; 8,0 Hz)		112,7
13	140,4	-	138,2	138,1	-		138,1
14	26,8	2,05 (dl; 14,5 Hz) 2,26 (m)	26,6	23,9	1,67 (d; 12,0 Hz) 2,16-2,32 (m)		30,1
15	46,6	2,87 (s)	44,2	45,0	2,65 (m)		46,3
16	191,7	-	190,9	195,4	-		193,5
18	11,6	0,97 (t; 7,0 Hz; 3H)	11,3	11,7	1,02 (t; 7,0 Hz)		11,8
19	25,6	1,35 (m; 2H)	24,7	23,3	1,75-1,89 (m) 1,88-1,97 (m)		24,8
20	47,3	2,47 (t; 7,3 Hz)	46,4	46,2	2,16-2,32 (m)		49,6
21	50,3	5,22 (s)	58,1	54,7	4,18 (s)		56,2
NH	-	-	-	-	10,1 (s)		-

¹(CD₃OD, 75 x 300MHz); ²(CDCl₃; 125x 500MHz); ³(CDCl₃; 200 x 500 MHz); ⁴(CDCl₃; 125 MHz)

Figura 209 - Estrutura do alcaloide indólico 20-epi-N-nordasicarpidona (CREB-1A).

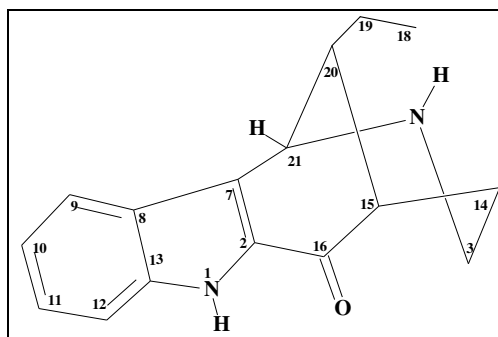


Figura 210 - Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREB-1A (UATR).

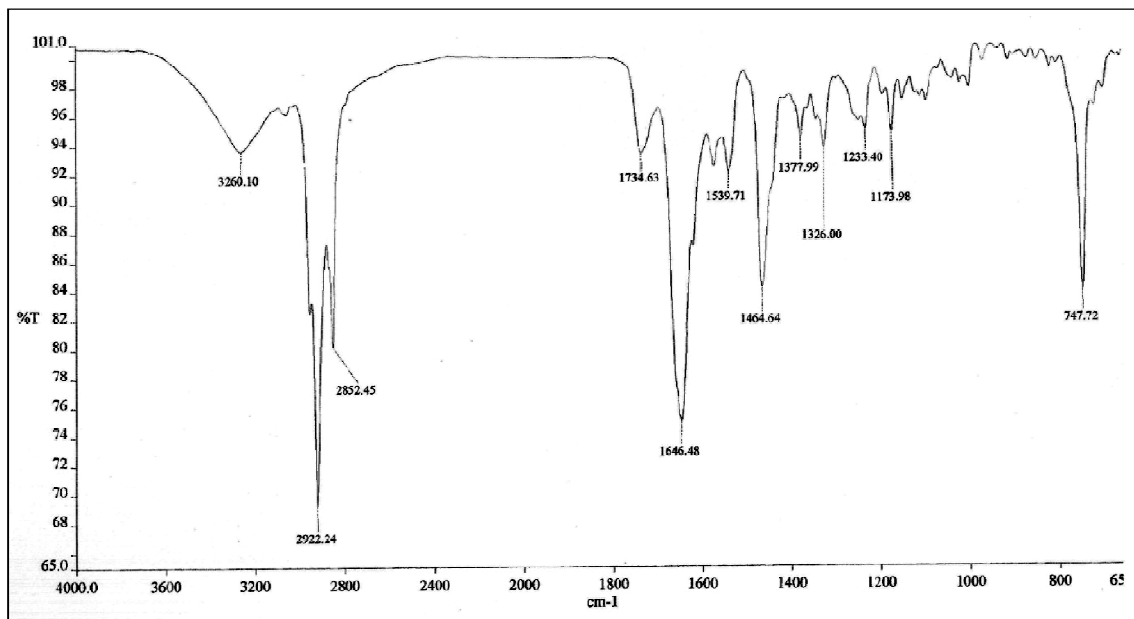


Figura 211 - Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREB-1A

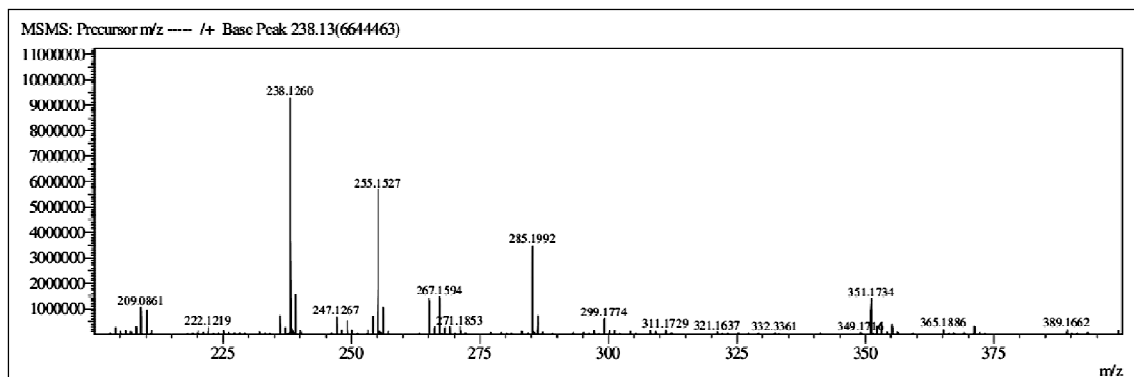


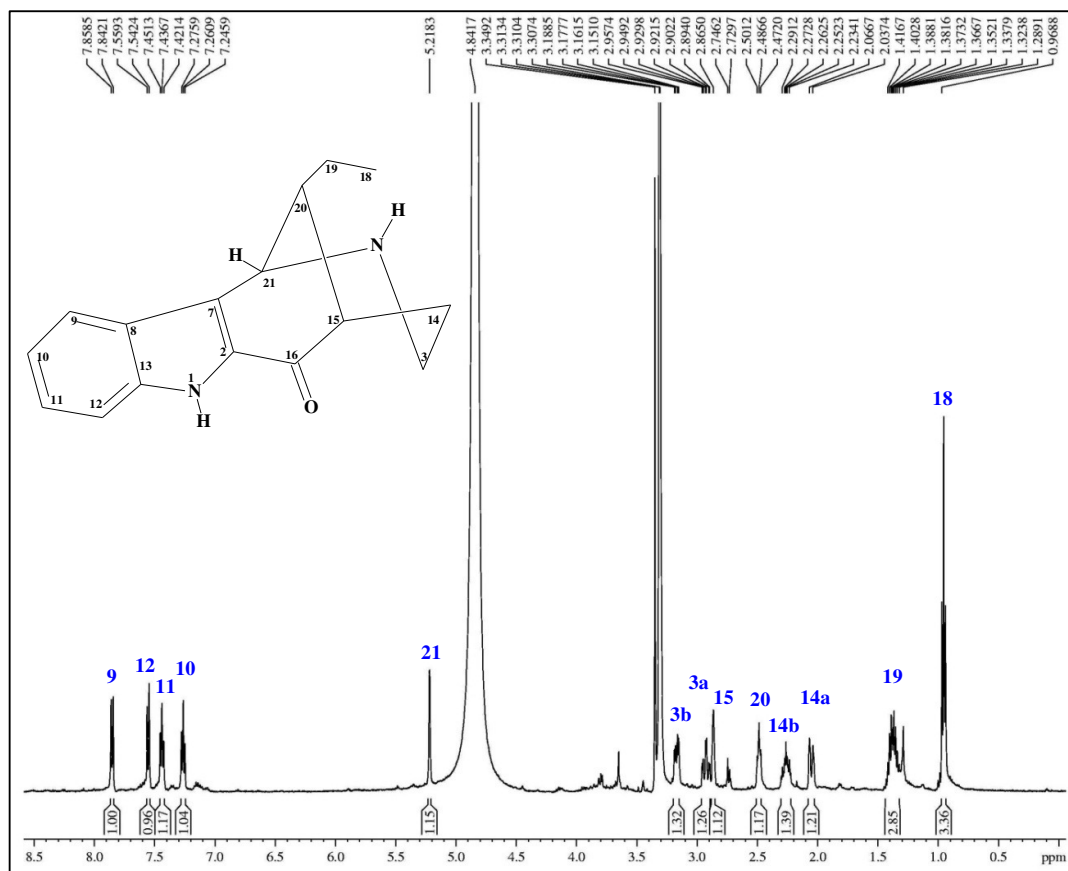
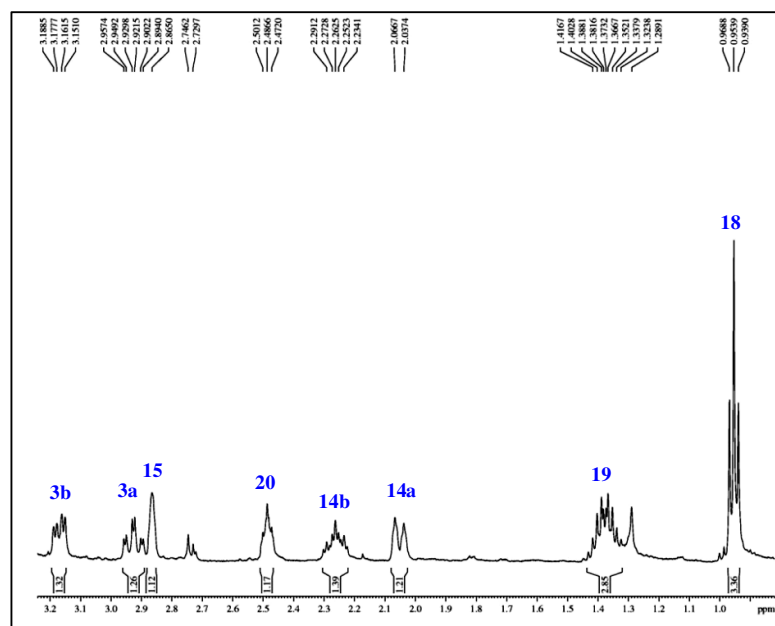
Figura 212 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.Figura 213 – Expansão do Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.

Figura 214 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (75 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.

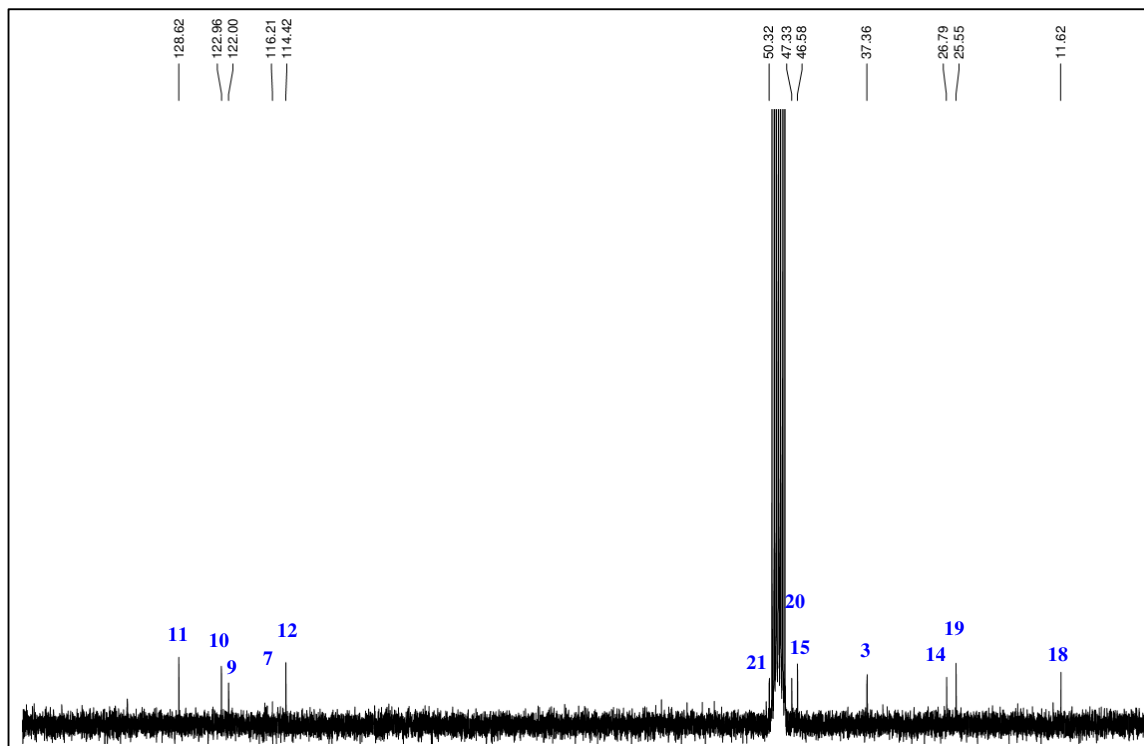


Figura 215 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.

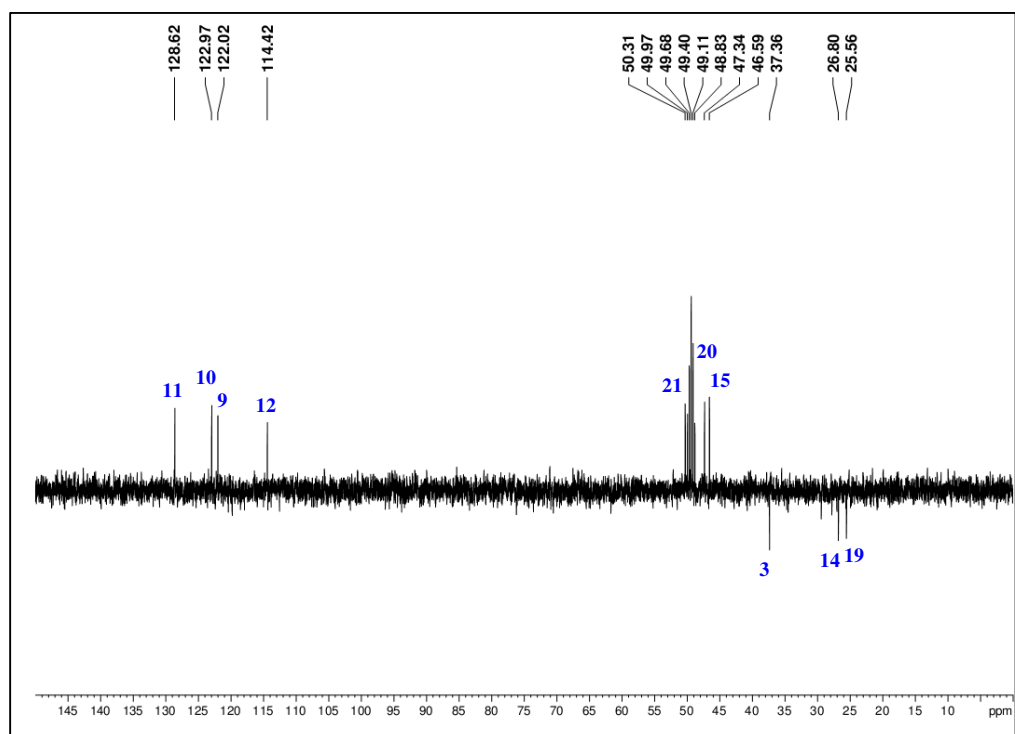


Figura 216 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (75 x 300 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.

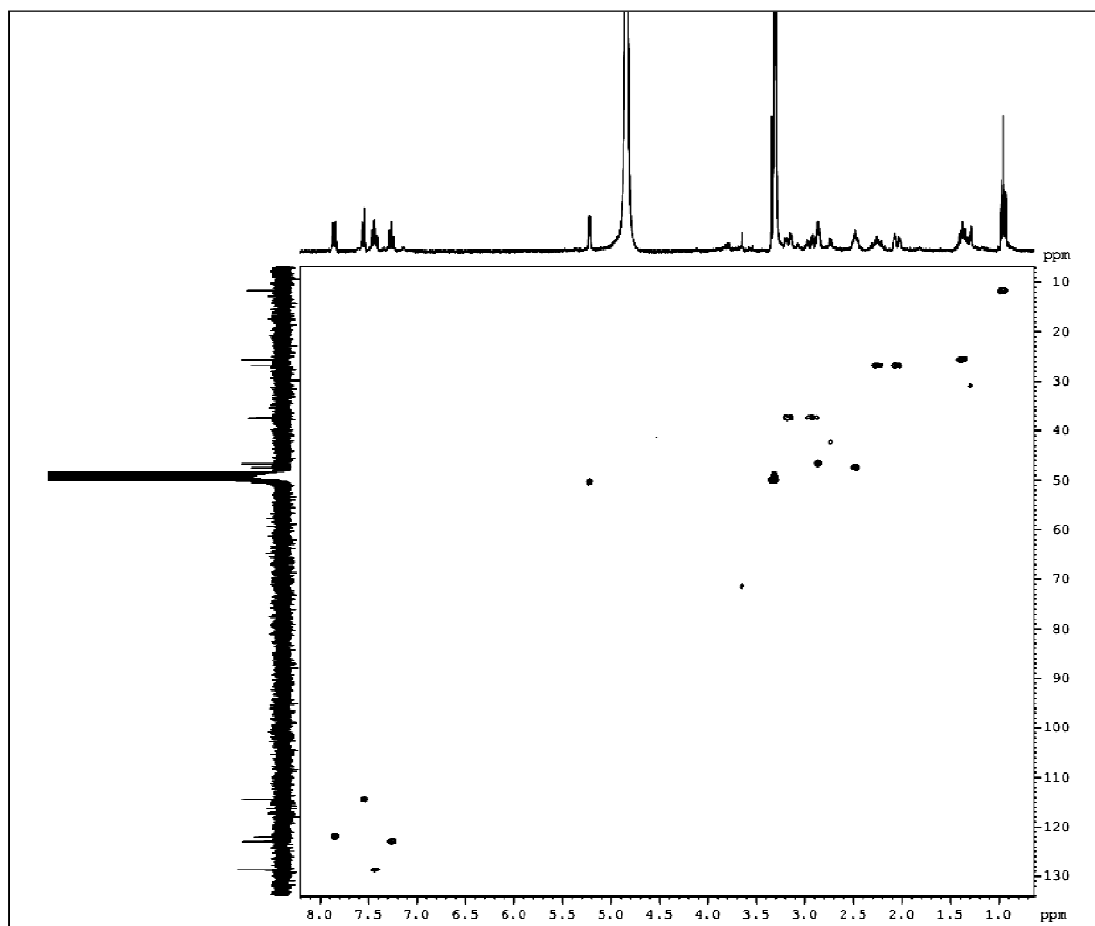


Figura 217 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (75 x 300 MHz, CD_3OD) de CREB-1A (expansão de 114 a 129 ppm e 7,9 a 7,00 ppm) e (50-26 ppm e 3,4-1,3 ppm).

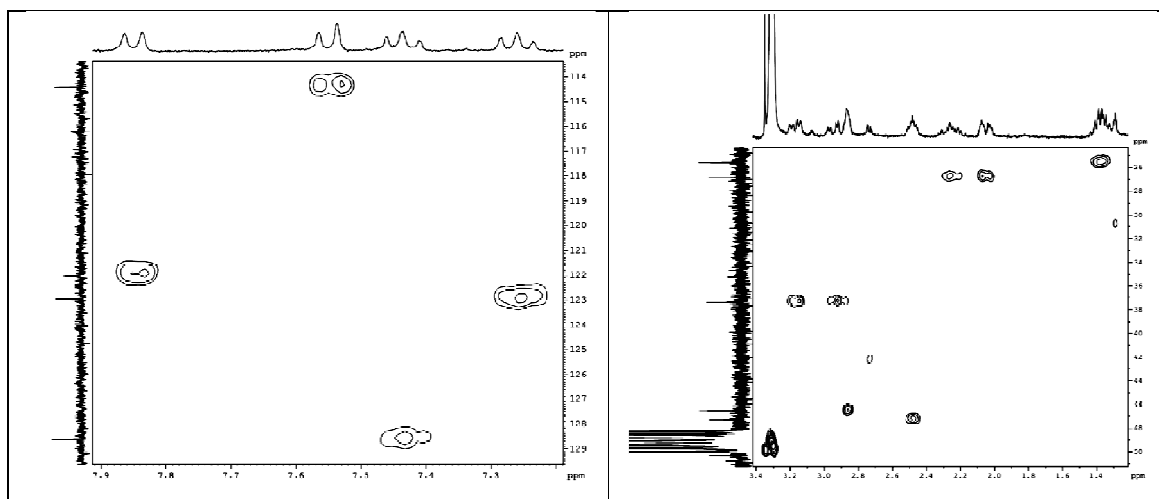


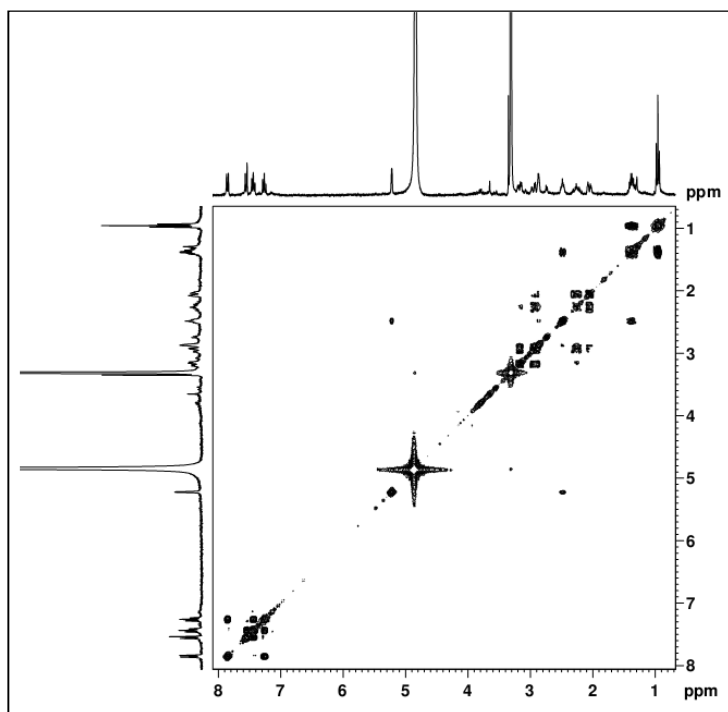
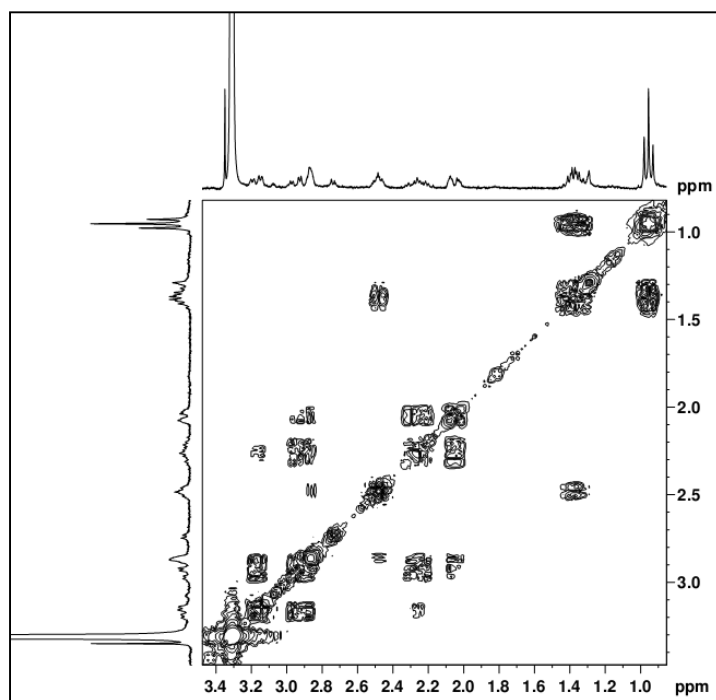
Figura 218 - Espectro RMN 2D ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A.Figura 219 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CD_3OD) de CREB-1A e expansão.

Figura 220 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC (CD_3OD , 500 x 125 MHz) de CREB-1A.

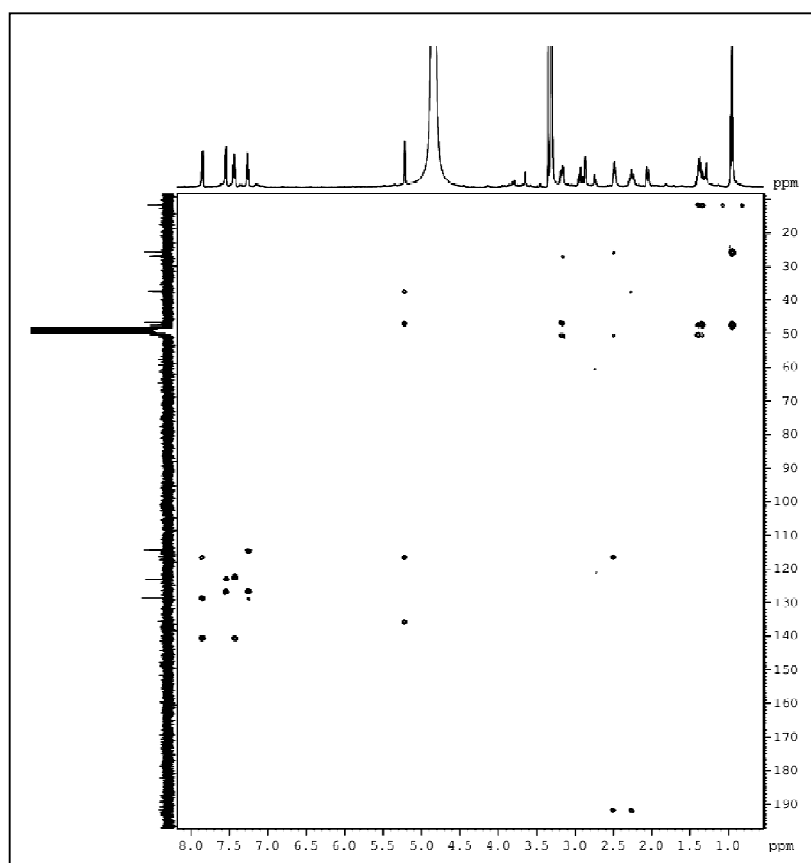


Figura 221 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC de CREB-1A (expansão de 7,9-7,2 e 142-114 ppm).

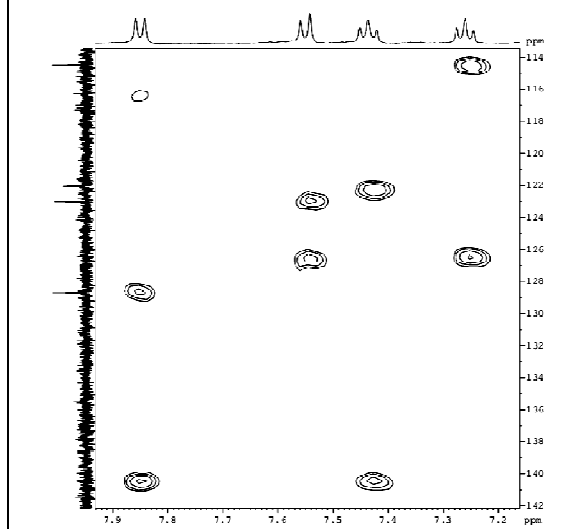


Figura 222 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC de CREB-1A (expansão de 3,2-0,0 e 50-11 ppm).

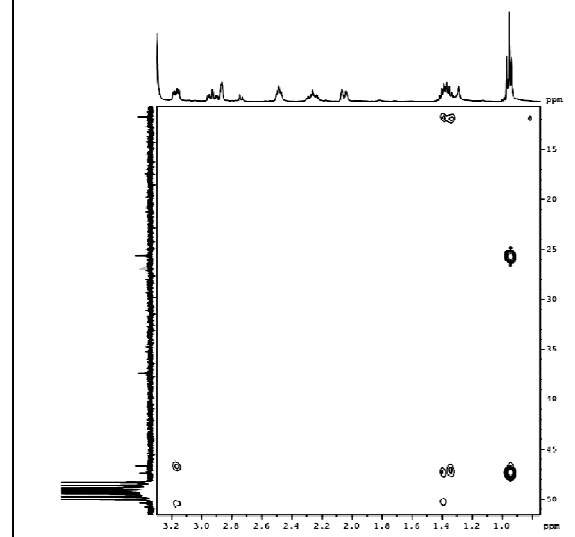
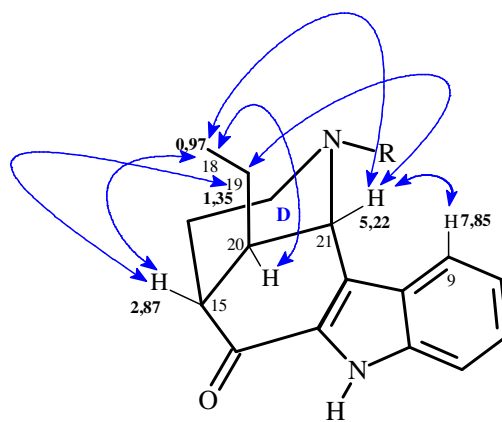
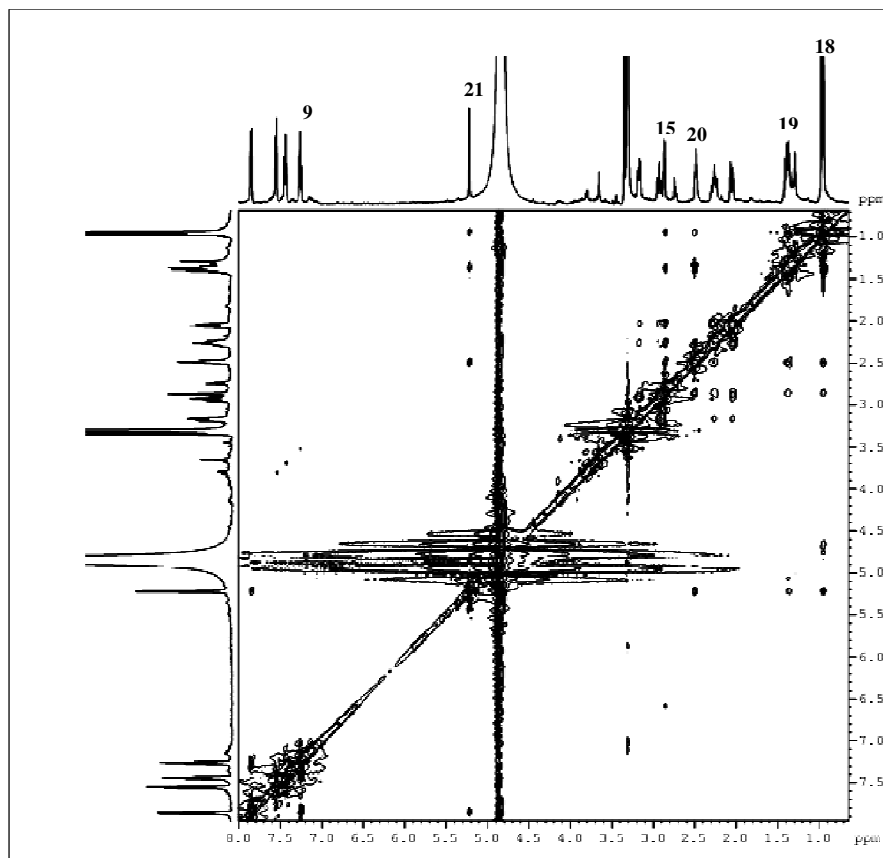


Figura 223 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^1H -NOESY (CD_3OD , 500 MHz) de CREB-1A.

4.15 Determinação Estrutural de CREB-2N

A fração CRE-B, do extrato etanólico das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei*, foi submetida a cromatografia de adsorção e exclusão, seguida de purificação em CLAE, resultando num sólido amorfo, denominado CREB-2A (Parte Experimental p. 245).

Os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -CPD de CREB-2A (500 x 125 MHz, CD_3OD , Figuras 237 e 238, p. 216), encontram-se registrados na Tabela 26 e Tabela 27 (p. 208).

Após neutralização de CREB-2A (p. 246) obteve-se CREB-2N com ponto de fusão 139,9-140,6 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho de CREB-2N (Figura 226, p. 210) apresentou banda em 3200 cm^{-1} , correspondente a vibração de deformação axial de ligação N-H para amina secundária aromática. Vibrações de deformação axial da ligação C-H alifático em 2922 e 2853 cm^{-1} , correspondentes a grupamentos metilas e metilênicos. Banda em 1632 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C=C, além de banda correspondente a deformação angular fora do plano para CH de anel aromático em 737 cm^{-1} .

Não foi observada banda correspondente a vibração de deformação axial de ligação C-N alifático, quando comparado a CREA-1N (uleína – p. 159).

O espectro de massa de alta resolução - IES-EM (Figura 227, p. 210) de CREB-2N exibiu o pico do íon molecular no modo positivo $[\text{M-H}]^+$ de m/z 253.1709, que comparado com a massa calculada em m/z de 253,1704 Daltons, foi compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2$ e um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito.

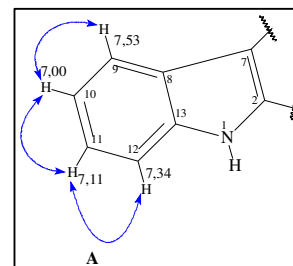
Observou-se no espectro de RMN ^{13}C -CPD de CREB-2N (Figura 230, p. 212) 17 linhas espectrais, que através da comparação com o espectro de RMN 2D HSQC (Figura 232, p. 213) foram observados quatro carbonos aromáticos com absorções em δ_{C} 112,2 (C-12), δ_{C} 119,5 (C-9), δ_{C} 120,4 (C-10) e δ_{C} 123,7 (C-11). Um sinal de carbono metilidênico em δ_{C} 108,7 (C-17), três carbonos metínicos em δ_{C} 50,6 (C-21), δ_{C} 46,7 (C-20) e δ_{C} 41,8 (C-15). Também foram observados três carbonos metilênicos, em δ_{C} 37,9 (C-3), δ_{C} 35,7 (C-14) e δ_{C} 25,7 (C-19), confirmados pelo espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (Figura 231, p. 212), além de um carbono metílico em δ_{C} 12,1 (C-18). Os demais sinais de carbonos não hidrogenados apresentaram sinais em δ_{C} 140,0 (C-13); δ_{C} 139,2 (C-2), δ_{C} 137,2 (C-16); δ_{C} 128,0 (C-8) e δ_{C} 110,2 (C-7).

Dentre as absorções discutidas, são relevantes aquelas entre δ_C 123,7-112,2 correspondentes aos quatro carbonos aromáticos do sistema indólico, as absorções em δ_C 108,7 (δ_H 5,01 e 5,53), referente a um carbono olefínico e em δ_C 12,01 (δ_H 0,89) e δ_C 25,7 (δ_H 1,14) correspondentes a um substituinte etila.

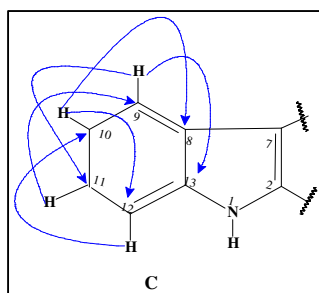
De acordo com a uleína (CREA-1N), discutida anteriormente, não foi observada a metila (C-5) ligada ao átomo de nitrogênio em CREB-2N e comparado com o espectro de massa, observou-se uma diferença de 14 unidades a menos para CREB-2N.

O espectro de RMN 1H de CREB-2N (500 MHz, CD_3OD , Figuras 228 e 229, p. 211), mostrou quatro sinais correspondentes a hidrogênios do anel benzênico em δ_H 7,34 (H-12), 7,53 (H-9), 7,00 (H-10) e 7,11 (H-11). Também foram observados dois simpletos correspondentes a hidrogênios olefínicos em δ_H 5,01 (H-17b) e δ_H 5,53 (H-17a); sinais em δ_H 0,89 (3H-18) e δ_H 1,14 (H-19), referentes a um substituinte etila. Os demais sinais observados foram assinalados na Tabela 28 (p. 209).

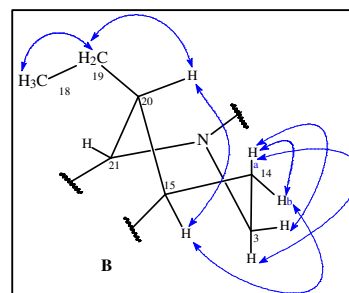
O espectro de RMN 2D $^1H, ^1H$ -COSY de CREB-2N (Figura 233, p. 213; Figura 234, p. 214) exibiu os acoplamentos escalares além de acoplamentos geminais e vicinais do composto, conferidos nas subestruturas **A** e **B**.



No espectro de RMN 2D de $^1H, ^{13}C$ -HMBC (Figuras 235 e 236, p. 215) de CREB-2N, foi



possível confirmar inequivocamente as correlações dos hidrogênios em δ_H 7,53 (H-9) com δ_C 140,0 (C-13) e δ_C 123,7 (C-11); δ_H 7,34 (H-12) com δ_C 120,4 (C-10); δ_H 7,11 (H-11) com



δ_C 119,5 (C-9); δ_H 7,00 (H-10) com δ_C 128,0 (C-8) e δ_C 112,2 (C-12), observadas na subestrutura **C**.

Adicionalmente, foram observadas importantes correlações entre os hidrogênios, conforme mostrada na subestrutura **D**, abaixo.

Na Tabela 27 (p. 208), observou-se conforme discutido anteriormente para a uleína, que os deslocamentos químicos dos hidrogênios de CREB-2A em δ_H 5,76 (H-17a) e δ_H 5,25 (H-17b) comparados com os deslocamentos dos hidrogênios de CREB-2N (Tabela 28, p. 209) em δ_H 5,53 (H-17a) e δ_H 5,01 (H-17b) apresentaram diferenças nos deslocamentos

químicos em função da protonação da molécula. Ocorre, portanto, sinais mais desblindados, em praticamente todos os deslocamentos dos hidrogênios da substância CREB-2A.

Na Tabela 26 (p. 208) observou-se diferenças nos deslocamentos químicos para os carbonos C-7 e C-17 que estando protonados apresentaram valores bem mais desblindados comparado aos deslocamentos químicos da substância neutra e aos dados da uleína (CREA-1N).

Como pode ser observado na Tabela 27 (p. 208), os dados de RMN de ^1H apresentaram diferenças questionáveis somente nos deslocamentos dos hidrogênios olefínicos H-17a e H-17b, e novamente é chamada a atenção para a desproteção desses hidrogênios quando ácidos, assim como, a concordância desses dados com os da literatura reflete na molécula neutra.

Os dados da literatura foram obtidos em CDCl_3 , e por questão de solubilidade optou-se pela aquisição dos espectros de CREB-2N em CD_3OD , cujos dados estão listados na Tabela 26 (p. 208), Tabela 27 (p. 208) e Tabela 28 (p. 209), apresentando semelhança com os dados da literatura (BORRIS *et al.*, 1983; JÁCOME *et al.*, 2004).

A estrutura apresentada na Figura 224 apresenta um alcaloide indólico com estreita semelhança ao discutido para CREA-1N (uleína) diferindo apenas na ausência da metila ligada ao átomo de nitrogênio correspondente a C-5 na uleína.

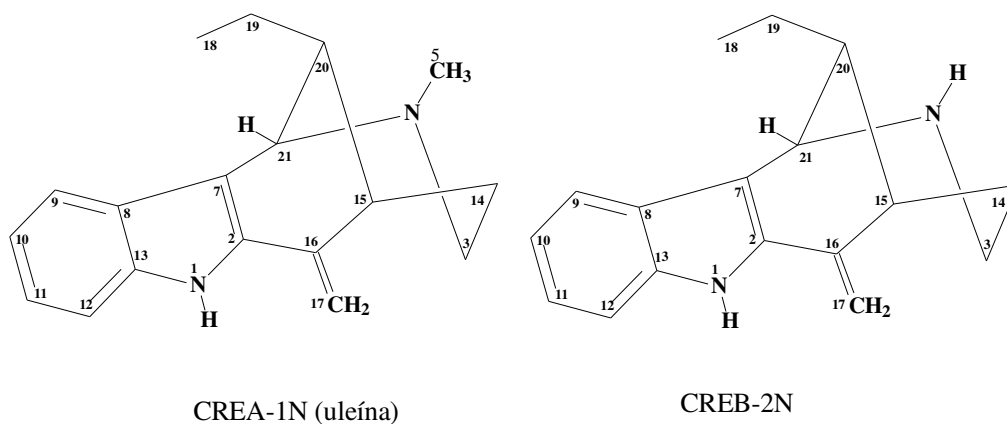
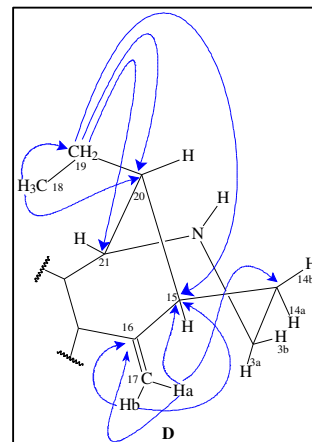


Figura 224 - Comparação das estruturas de CREA-1A (uleína) com CREB-2N.

Tabela 26 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C para CREB-2N, CREA-1N (uleína) e CREB-2A (20-epi-dasicarpidona).

#	$^1\text{CREB-2N}$	$^2\text{CREA-1N}$	$^3\text{CREB-2A}$
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	139,2	135,4	138,8
3	37,9	46,5	37,3
5	-	44,5	-
7	110,2	107,9	103,9
8	128,0	129,6	127,5
9	119,5	119,7	119,5
10	120,4	120,1	121,4
11	123,7	122,9	124,7
12	112,2	110,9	112,7
13	140,0	136,8	139,2
14	35,7	34,9	32,3
15	41,8	39,7	39,6
16	137,2	138,9	137,5
17	108,7	107,0	112,1
18	12,1	12,0	11,7
19	25,7	24,6	25,1
20	46,7	46,3	43,9
21	50,6	56,8	51,2

$^1\text{CD}_3\text{OD}$ (125 MHz) Neutra; $^2\text{CD}_3\text{OD}$ (125 MHz) neutra; $^3\text{CDCl}_3$ (125 MHz) ácida.

Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H de CREB-2N e CREB-2A e comparação com os dados da literatura para o alcaloide N-desmetiluleína ($^3\text{BORRIS et al., 1983; }^4\text{JÁCOME et al., 2004}$).

#	$^1\text{CREB-2N}$	$^2\text{CREB-2A}$	$^3\text{Liter.}$	$^4\text{Liter.}$
H	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
3a	2,62 (m)	2,83 (m)	-	2,65 (m)
3b	2,62 (m)	3,06 (m)	-	2,75 (d, 2,8 Hz)
5	-	-	-	-
9	7,53 (d, 7,0 Hz)	7,62 (d, 8,0 Hz)	7,00-7,60 (m)	7,45 (d, 7,8 Hz)
10	7,00 (t, 7,0 Hz)	7,10 (t, 7,0 Hz)	7,00-7,60 (m)	7,10 (t, 8 Hz)
11	7,11 (t, 7,0 Hz)	7,20 (t, 7,0 Hz)	7,00-7,60 (m)	7,20 (t, 8 Hz)
12	7,34 (d, 7,0 Hz)	7,40 (d, 8,0 Hz)	7,00-7,60 (m)	7,55 (d, 7,8 Hz)
14a	1,99 (m)	1,90 (d, 14,0 Hz)	-	2,05 (m)
14b	1,68 (m)	2,21 (m)	-	-
15	2,76 (sl)	2,93 (s)	-	2,60 (d, 1H)
17a	5,53 (s)	5,76 (s)	5,30 (s)	5,30 (s)
17b	5,01 (s)	5,25 (s)	5,00 (s)	5,00 (s)
18	0,89 (t, 7,7 Hz, 3H)	0,92 (t, 7,0 Hz, 3H)	0,86 (m, 3H)	0,85 (t, 7,4 Hz)
19	1,14 (m)	1,21 (m)	0,86 (m)	1,15 (m)
20	1,99 (m)	2,21 (m)	2,08 (m)	1,65 (m)
21	4,36 (d, 2 Hz)	4,96 (s)	4,42 (d, 2,4Hz)	4,40 (d, 2,2 Hz)

1,2 500 MHz, CD_3OD ; 3 (60 MHz, CDCl_3); 4 (360 MHz, CDCl_3).

Dessa forma, os dados espectroscópicos obtidos permitiram concluir que a estrutura de CREB-2N tratava-se da N-desmetiluleína (Figura 225, p. 209), um alcaloide indólico relatado pela primeira vez para a espécie.

Tabela 28 - Dados de RMN 1D e 2D de ^{13}C e ^1H de CREB-2N comparados com os dados de RMN de ^1H da literatura para o alcaloide N-desmetiluleína (JÁCOME *et al.*, 2004)².

#	CREB-2N		HMBC		² Liter.
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{H}
C					-
2	139,2	-		-	-
3	37,9	2,62 (m, 2H)		-	2,65 (m) 2,75 (d; 2,8 Hz)
7	110,2	-		-	-
8	128,0	-		H-10	-
9	119,5	7,53 (d, 7,0 Hz, 1H)		H-11	7,45 (d; 7,8 Hz)
10	120,4	7,00 (t, 7,0 Hz, 1H)		H-12	7,10 (t; 8,0 Hz)
11	123,7	7,11 (t, 7,0 Hz, 1H)	H-9	-	7,20 (t; 8,0 Hz)
12	112,2	7,34 (d, 7,0 Hz, 1H)		H-10	7,55 (d; 7,8 Hz)
13	140,0	-		H-9	-
14	35,7	1,68 (m, 1H) 1,99 (m, 1H)		H-17a	2,05 (m)
15	41,8	2,76 (sl, 1H)		H-17a; H-17b; H-19	2,60 (d)
16	137,2	-		H-17a; H-17b	-
17	108,7	5,01 (s, 1H) 5,53 (s, 1H)	-	-	5,3 (s) 5,0 (s)
18	12,1	0,89 (t, 7,7 Hz, 3H)	H-19	-	0,85 (t; 7,4 Hz; 3H)
19	25,7	1,14 (m, 2H)	H-18	-	1,15 (m)
20	46,7	1,99 (m, 1H)	H-19	H-18	1,65 (m)
21	50,6	4,36 (d, 2,0 Hz, 1H)	-	H-19	4,40 (d; 2,2 Hz)

¹CREB-2N (CD₃OD, 500 x 125 MHz); ²(CDCl₃, 360 MHz)

Figura 225 - Estrutura do alcaloide indólico N-desmetiluleína (CREB-2N).

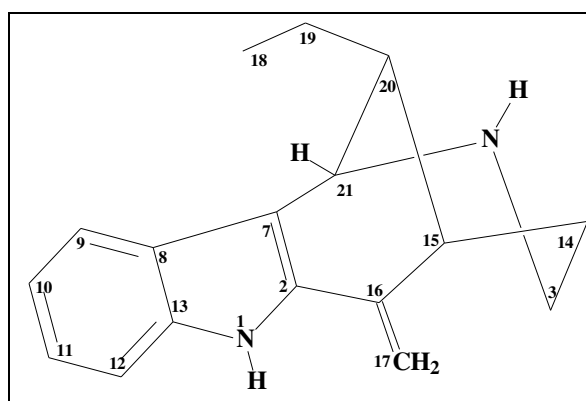


Figura 226 - Espectro de absorção na região do Infravermelho de CREB-2N (UATR).

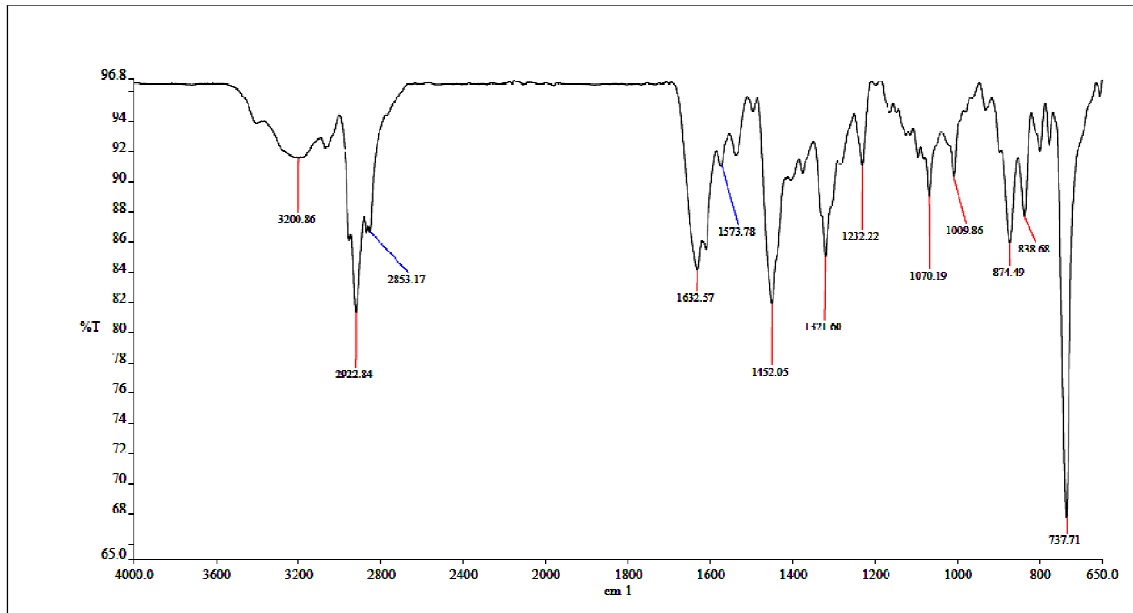


Figura 227 - Espectro de Massa de alta resolução (IES-EM) de CREB-2N.

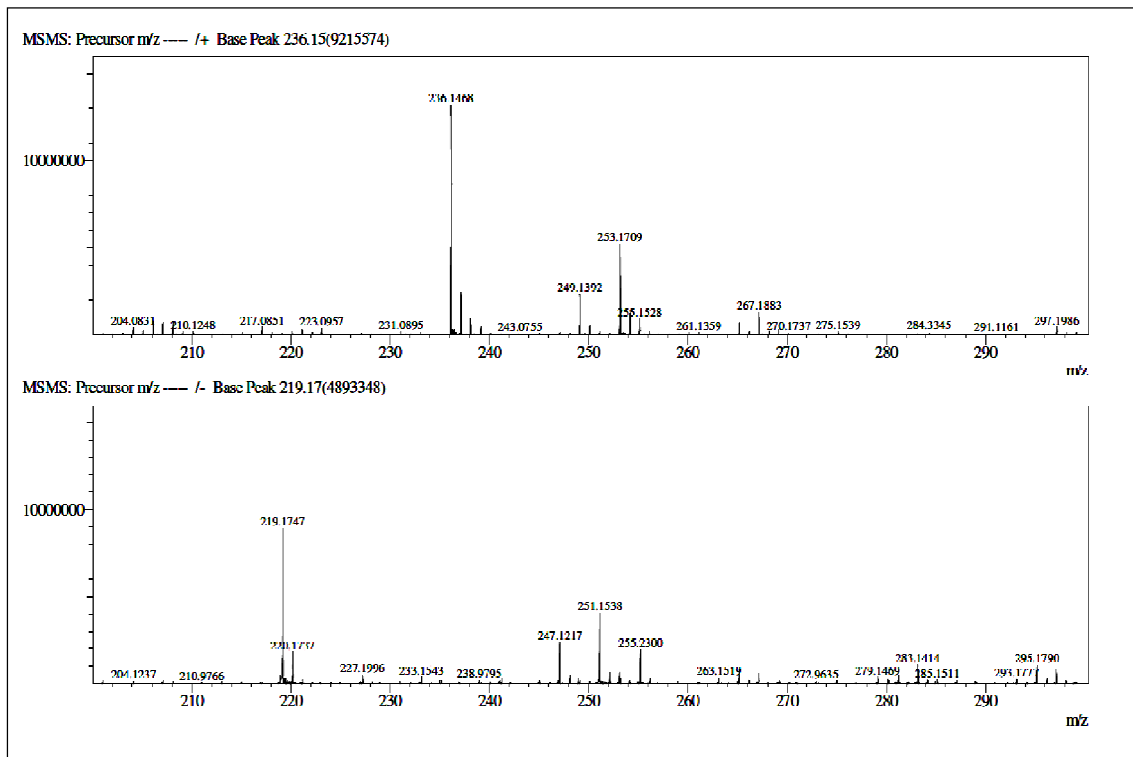


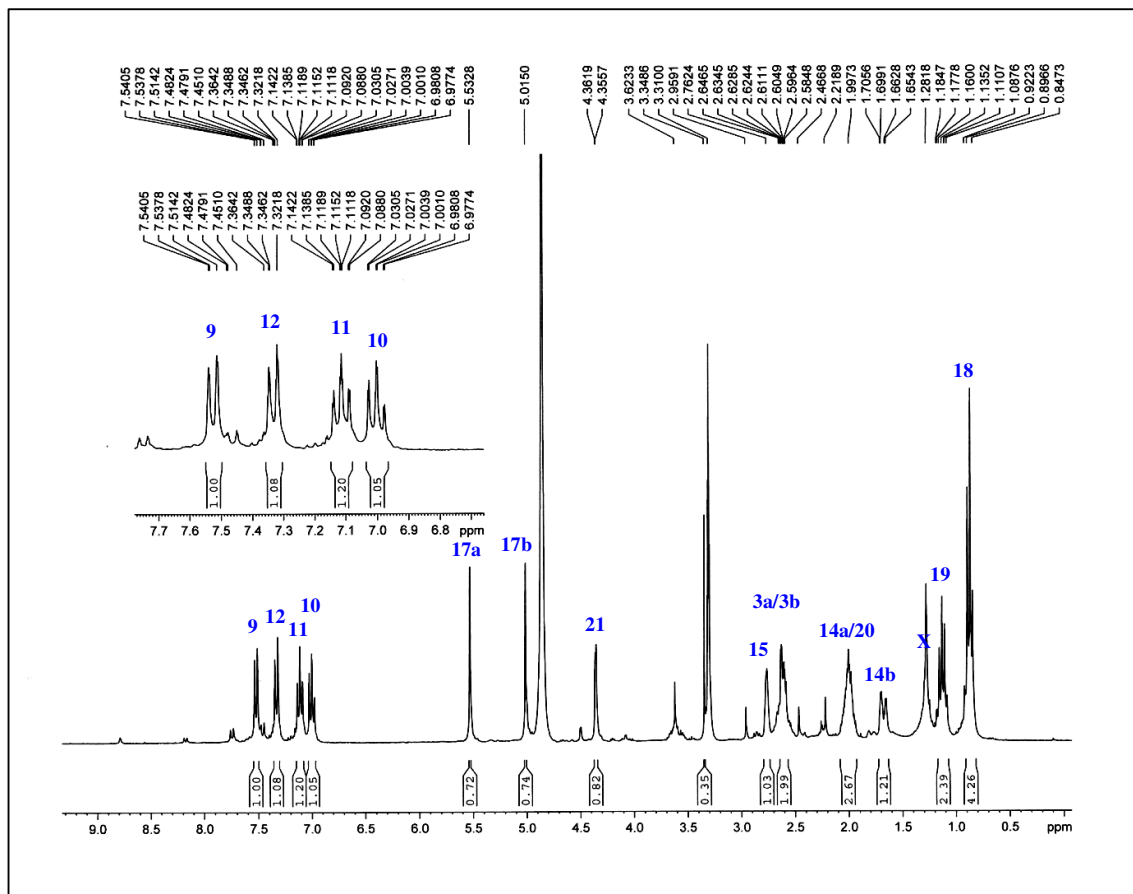
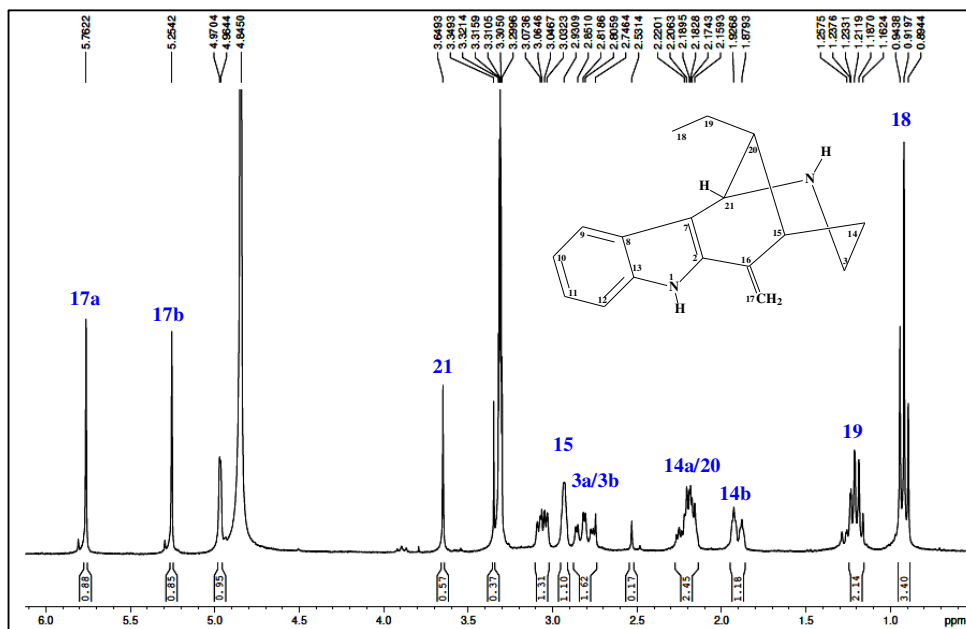
Figura 228 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N.Figura 229 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N e expansão.

Figura 230 - Espectro de RMN 2D de ^{13}C -CPD (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2N.

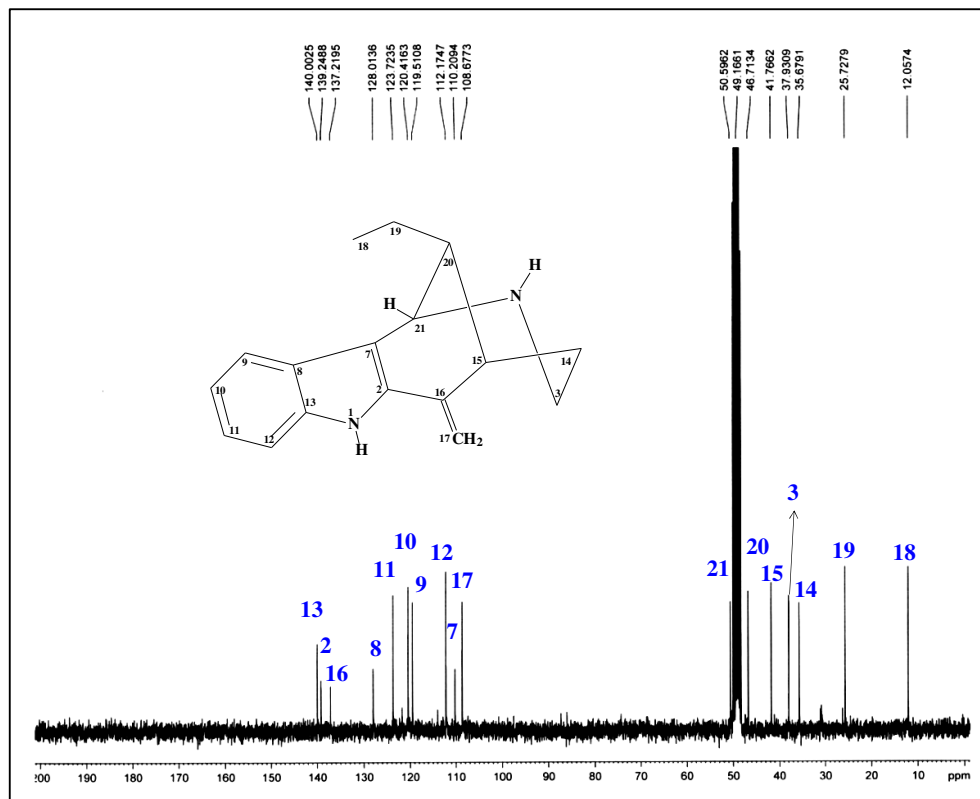


Figura 231 - Espectro de RMN 2D de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2N.

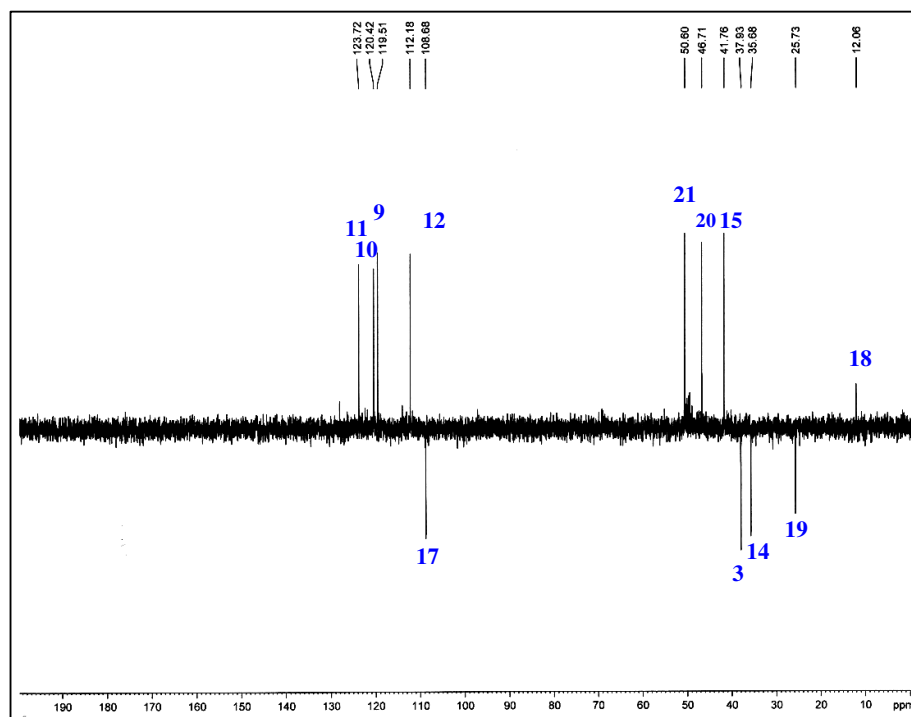


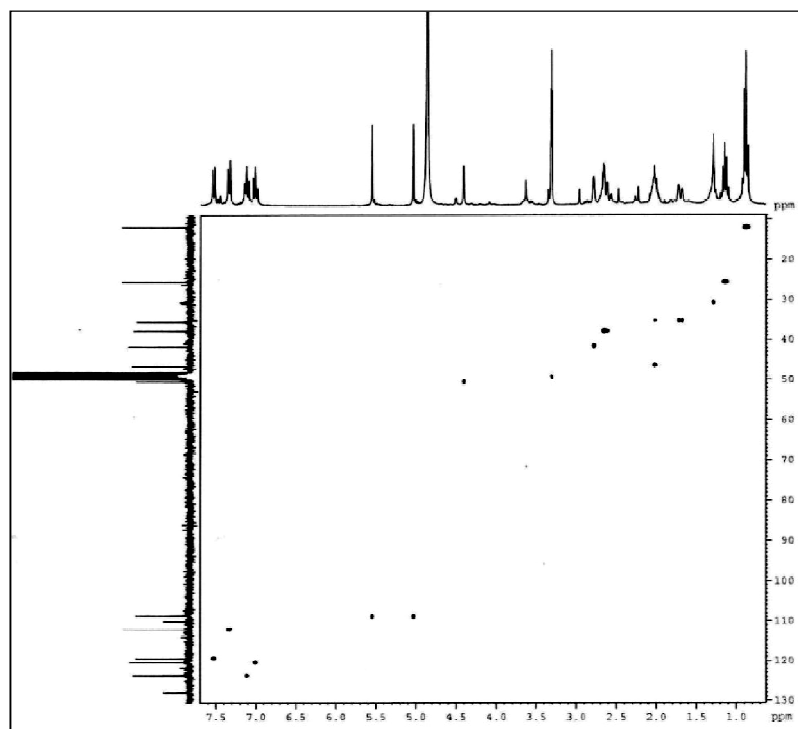
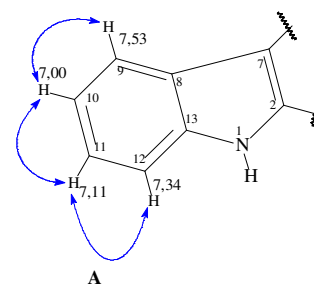
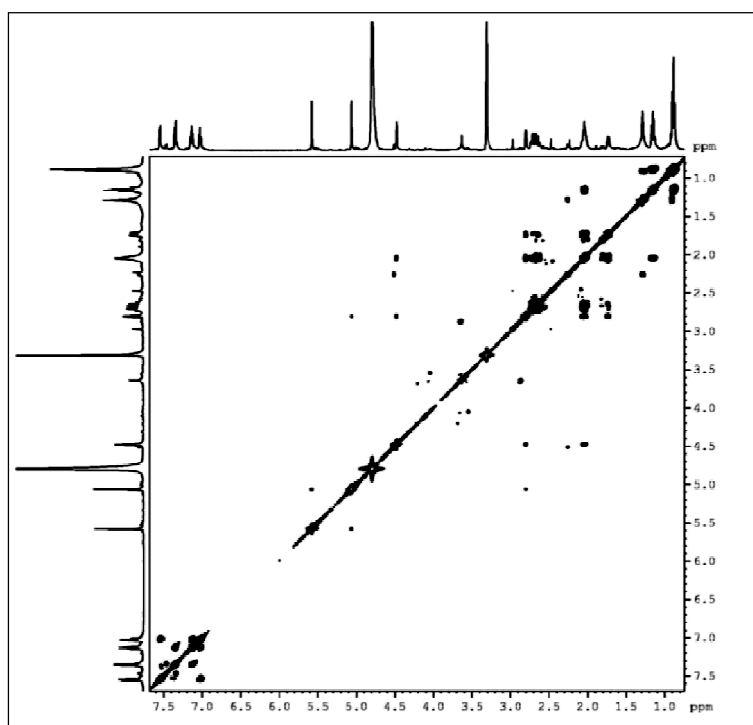
Figura 232 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C - HSQC (125 x 500 MHz, CD_3OD) de CREB-2N.Figura 233 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^1H - COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N.

Figura 234 – Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^1H – COSY (CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N.

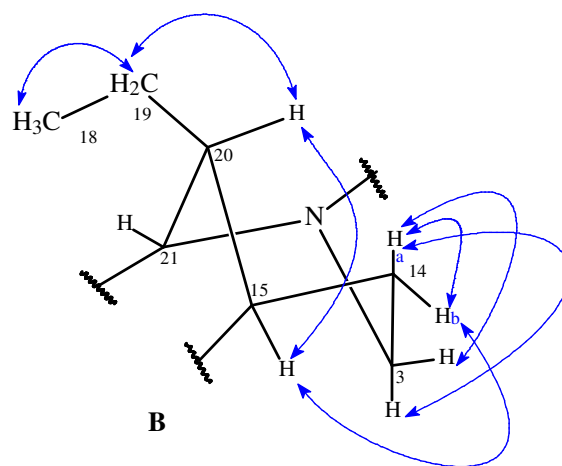
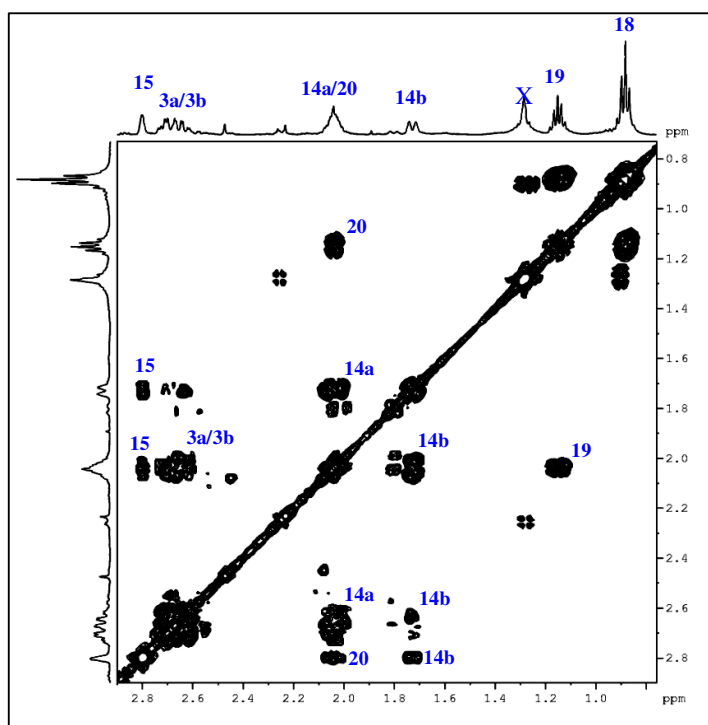


Figura 235 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC(CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N.

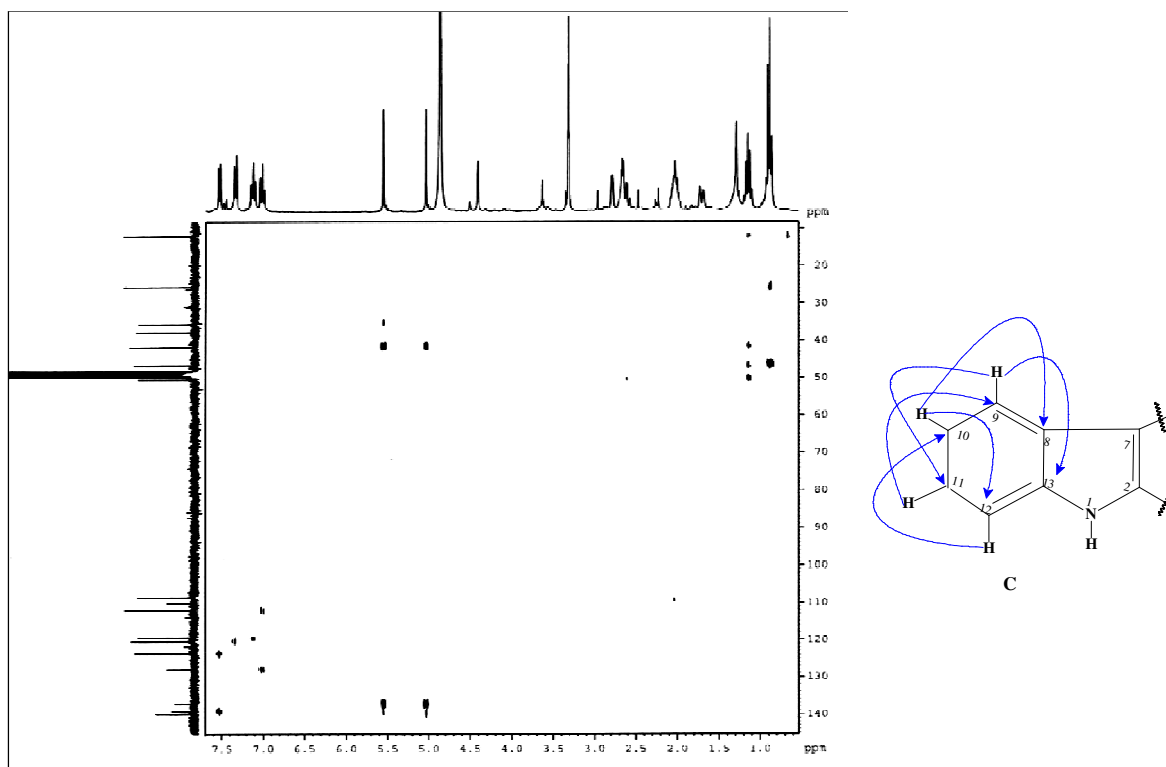


Figura 236 - Espectro de RMN 2D de ^1H , ^{13}C - HMBC(CD_3OD , 500 MHz) de CREB-2N e expansão.

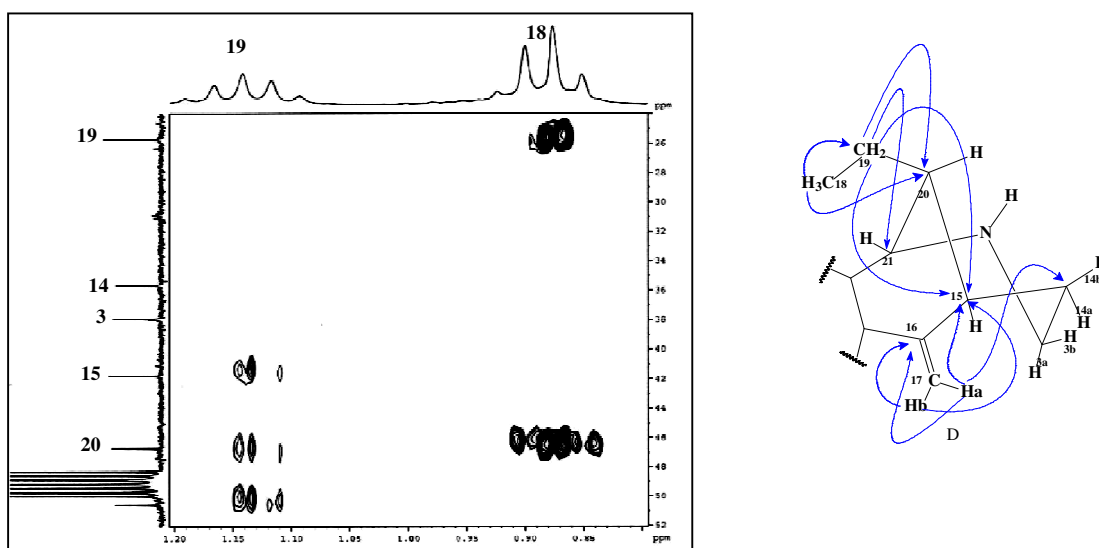
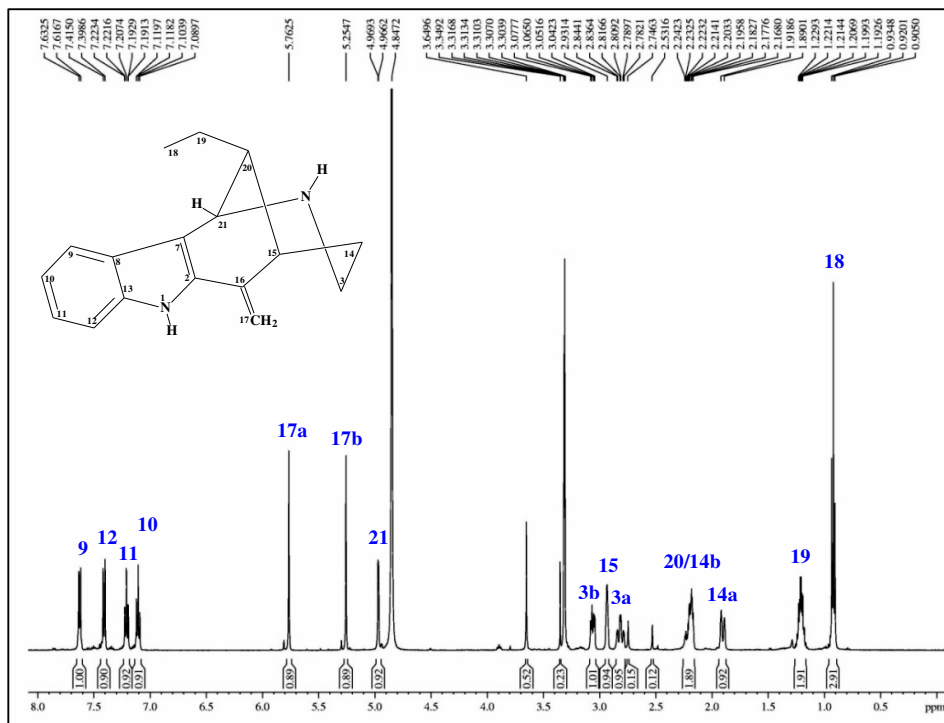
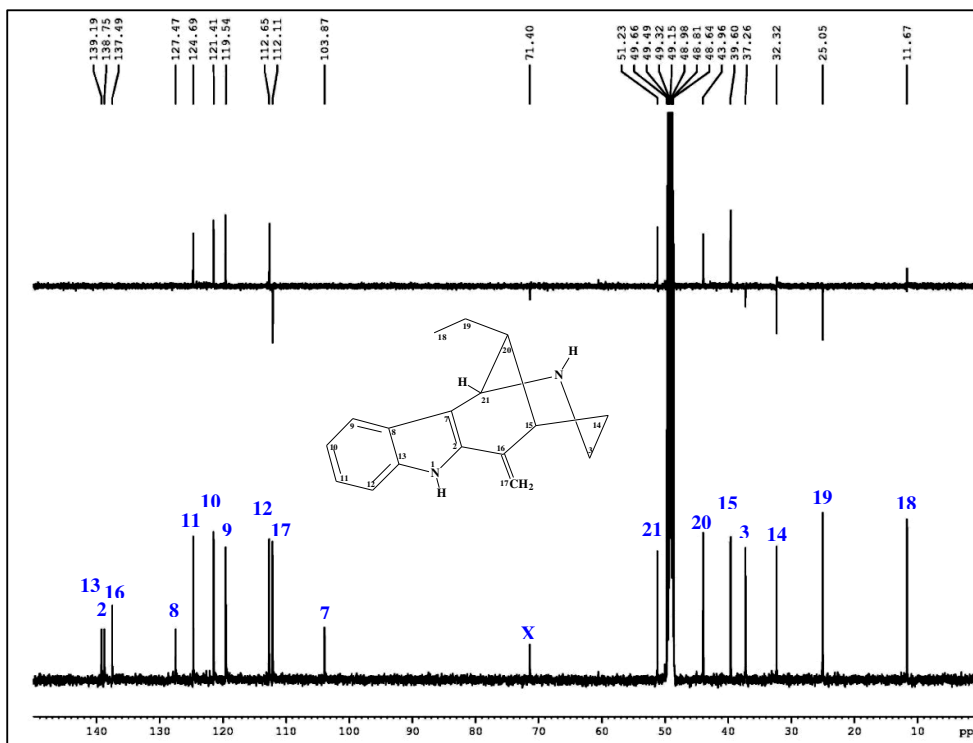


Figura 237 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de CREB-2A.Figura 238 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de CREB-2A.

4.16 Atividade citotóxica *in vitro* em Linhagens de Células Tumorais

4.16.1 Resultados obtidos da atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram realizados por Ana Jérsia Araújo, sob a orientação da Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, do Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal do Ceará UFC.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão (Procedimento Experimental, p. 253). O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

Os Resultados obtidos da atividade citotóxica das amostras estão apresentados na Tabela 29, com seus respectivos percentuais de inibição nas concentrações máximas de 25µg/mL e CI₅₀, respectivamente, e comparados com o controle positivo doxorrubicina.

Tabela 29 - Valores de CI₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata com 4 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 25 µg/mL

Amostras	HL-60	MDA MB 435	HCT-8	SF-295
doxorrubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,48 (0,34-0,66)	0,01 (0,01-0,02)	0,24 (0,2-0,27)
ácido ursólico	6,7 (5,4-8,3)	10,5 (9,5-11,6)	8,12 (7,4-8,9)	7,1 (6,1-8,2)
20(E)-17-nor-subincanadina	> 25	8,45 (6,0-11,9)	17,16 (14,6-20,1)	> 25
β -ioimbina	nd	> 25	> 25	> 25
ioimbina	nd	> 25	> 25	> 25
3,4,5,6-tetradésidro- β -ioimbina	nd	> 25	> 25	> 25
uleína	nd	> 25	> 25	> 25

De acordo com a Tabela 29, observa-se que a substância LCA-1 20(E)-17-nor-subincanadina apresentou atividade antitumoral, com ação moderada nas células testadas para MDA MB 435 (mama - humano) e HCT-8 (colon). Já a substância AUF-1 (ácido ursólico) apresentou atividade antitumoral moderada frente a todas as células testadas, porém com maior atividade em HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma - humano). As demais substâncias testadas não foram ativas, apresentando um CI₅₀ acima de 25µg/mL.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Métodos Cromatográficos

5.1.1 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC)

As colunas cromatográficas por adsorção foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (ϕ 63-200 μm) e (ϕ 40-63 μm) para cromatografia do tipo “flash” da MERCK como fase estacionária. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram de acordo com a alíquota das amostras a serem cromatografadas. Para a eluição foi utilizado diclorometano e metanol, e suas misturas binárias, em ordem crescente de polaridade.

5.1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nas cromatografias por CCD foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ da MERCK (ϕ 2-25 μm) sobre alumínio, com indicador de fluorescência com absorção em 254 nm ou placas de vidro cobertas com gel de sílica 60 da MERCK (ϕ 30-70 μm) preparadas no Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

Os resultados foram observados pela exposição das placas a luz ultravioleta, em dois comprimentos de onda diferentes: 254 e 366 nm emitidos por lâmpadas modelo UVSL-25 da mineral Light. As substâncias foram reveladas nas placas através de solução borrifada de vanilina (C₈H₈O₃), seguida de aquecimento em chapa elétrica a 100°C por aproximadamente 3 minutos além de revelador Dragendorff para alcaloides.

Os solventes empregados como eluentes foram: clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e metanol, puros ou em misturas binárias, de forma a obter um gradiente crescente de polaridade. Os solventes utilizados foram previamente destilados ou de qualidade P. A. (Synth).

Os eluentes considerados ideais para os procedimentos de cromatografia sob média pressão foram aqueles que proporcionavam um R_f próximo de 0,3 para as manchas de interesse, escolhidos após análise por CCD.

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes dos procedimentos cromatográficos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório Buchi[®] modelo R-220.

5.1.3 Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol como fase móvel. A quantidade da amostra a ser cromatografada foi determinante para a definição do comprimento e diâmetro da coluna bem como a quantidade de fase estacionária.

Os extratos e frações resultantes das colunas cromatográficas foram concentrados sob pressão reduzida em rotaevaporadores.

5.1.4 Extração em Fase Sólida (EFS \approx SPE)

As extrações em fase sólida de frações de *A. ulei*, com fins de isolamento, foram realizadas em cartuchos de fase reversa (C-18) de 500 mg e 2g, fabricados pela Waters. Na etapa de preparo das amostras injetadas no HPLC (clean-up), foram empregados cartuchos de fase reversa de 100 mg, fabricados pela Varian. O uso dos cartuchos era precedido por ativação do adsorvente com metanol, seguida de acondicionamento em água Milli-Q, utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE \approx HPLC)

A análise por CLAE das soluções de calibração, dos extratos e frações de *A. ulei* foi analisado num cromatógrafo Waters modular, controlado por um programa de computador EMPOWER, constituído de uma bomba binária Waters-1525 e um detector PDA modelo 2996 a 254nm. As separações foram efetuadas em colunas Phenomenex RP-18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) e Phenomenex RP-18 (10 x 250 mm, 10 μ m). As amostras foram eluídas com acetonitrila, metanol e solução contendo água ultra pura obtida através de um ultrapurificador de água Milli-Q, da MILLIPORE e ácido trifluoracético (TFA- 0,1-0,3%).

Adotou-se fluxos de 1mL/min (coluna analítica) e 4,72 mL/min (coluna semi-preparativa) e volume de injeção de 20 μ l (analítica) e 200 μ l (semi-preparativa). Os solventes empregados apresentaram grau HPLC (MeOH-Tedia e H₂O-Milli-Q) que foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de PTFE de 0,45 μ m (Phenomenex) e desgaseificados por sonicação a vácuo durante 15 min. As amostras foram

dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 μm (Waters e Whatman).

Os fracionamentos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também foram realizados em um segundo equipamento constituído de bombas ternárias SHIMADZU LC-20AT e um detector SHIMADZU SPD-M20A. As colunas utilizadas foram Phenomenex Sílica (250 x 10 mm, 5 μ) (Ref. N° 00G-4247-N0) de fase normal. Os solventes empregados apresentavam grau de pureza HPLC (MeOH-Tedia[®], Acetonitrila-Merck[®]) e foram filtrados através de membranas de nylon com poros de 0.45 μm (Phenomenex). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise, e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0.45 μm (Waters).

5.2 Métodos Físicos

5.2.1 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de Microdeterminação Digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e central de processamento FP90, localizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e não foram corrigidas.

5.2.2 Determinação da Rotação Óptica (α)

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341, sendo as medidas realizadas a 589 nm (20°C). A concentração e o comprimento do caminho óptico utilizados foram de 0,33 % (2 mg de amostra/6 mL de CH₃OH) e 10 cm, respectivamente, para todas as amostras. Os valores não foram corrigidos.

5.3 Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos

5.3.1 Espectroscopia na Região de Absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no Laboratório de Bioinorgânica (DQOI/UFC) em espectrômetro da marca ABB-BOMEM, modelo FTLA 2000-102 na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr para a realização das amostras.

Os espectros na região do infravermelho também foram obtidos em Espectrômetro PERKIN ELMER, modelo Spectrum 100 FT-IR, utilizando Universal Attenuated Total Reflectance Accessory (UATR), na região de frequência de 400 a 4000 cm^{-1} e obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR), da Universidade Federal do Ceará.

5.3.2 Espectrometria de Massa (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução dos constituintes voláteis foram obtidos em espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50, acoplado ao Cromatógrafo Gás-Líquido modelo HP – 5890 A série II (CGL/EM) por impacto eletrônico (70eV), da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos por inserção direta em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34), com fonte de ionização por *electrospray* (IES), do Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR), da Universidade Federal do Ceará.

Alguns espectros de massa também foram obtidos por infusão direta em espectrometro do tipo TSQ Quantum acess (Thermo Scientific) operando com fonte APCI (atmospheric pressure chemical ionization) no modo positivo/negativo* de ionização. As amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 5ppm em metanol grau HPLC, no caso de espectros de MS/MS a fragmentação foi induzida CID (Collision Induced dissociation).

Esses espectros foram obtidos no laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

5.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas uni e bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC e NOESY das substâncias isoladas neste trabalho foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará.

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado adequado e acondicionado em tubos de RMN de 5 e 2,5 mm. Foram utilizados solventes clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD), dimetilsulfóxido (DMSO- d_6), água (D_2O) ou piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e referenciados através do pico residual de ^1H do solvente deuterado utilizado na análise. O equipamento de RMN utilizado na análise foi um espectrômetro BRUKER AVANCE DRX500, operando a 499,98 MHz, 125,7 MHz e 50,7 MHz para as frequências do ^1H , ^{13}C e ^{15}N , respectivamente, em um campo de 11,7 T, utilizando uma sonda multinuclear de detecção inversa de 5 mm, com gradiente de campo no eixo z de 10 A.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), metanol (δ 3,31), DMSO (δ 2,50), piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22), água (δ 4,80). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,17), DMSO (δ 39,51) e piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), sl (simpleto largo), ql (quarteto largo).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , e 90° , somente CH, foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico ou metilidênico) e CH_3 (carbono metílico).

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram utilizados larguras espectrais de 24 e 260 ppm, respectivamente, tempo de relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente.

5.4 Material Botânico

Aspidosperma ulei, popularmente conhecida como Pitiá ou Piquiá, foi coletada pelo Professor Edilberto Rocha Silveira na localidade Garapa, Município de Acarape, no estado do Ceará. A identificação foi realizada pelo botânico Prof. Edson P. Nunes e as exsiccatas da planta encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob os números de registro 30823, 32630 e 34813.

As partes da planta (folhas, cascas do caule, lenho do caule, casca da raiz e lenho da raiz) foram separadas, secas, trituradas, pesadas e submetidas à extração com etanol.

5.5 Obtenção do Extrato Etanólico das Folhas de *Aspidosperma ulei* Markgf

As folhas secas e moídas (1 kg) de *A. ulei* foram extraídas (3 vezes) com 10 L de etanol por 72 horas à temperatura ambiente. O extrato obtido foi rotaevaporado sob pressão reduzida fornecendo 98,0 g de um pó verde, denominado AUFE.

5.5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *A. ulei*

O extrato AUFE (10 g) foi submetido a extração sólido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, seguindo uma ordem de polaridade crescente. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se as frações conforme mostradas na Tabela 30 (p. 223).

Tabela 30 - Frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *A. ulei*.

Eluente	Frações	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	AUFE-H	1,2	12,0
Diclorometano	AUFE-D	2,0	20,0
Acetato de etila	AUFE-Ac	1,5	15,0
Metanol	AUEF-M	3,8	38,0
Total	-	8,5	85,0

A análise cromatográfica por cromatografia de camada delgada (CCD) das frações obtidas permitiu a escolha da fração acetato de etila para dar início ao estudo uma vez que apresentou melhor separação dos constituintes de interesse fitoquímico.

1,5 g de AUFAC foram solubilizados em CHCl_3 , gotas de MeOH e extraídos com 100 mL de clorofórmio sob agitação. Após separação por filtração do material, seguido de rotaevaporação sob vácuo, obteve-se 418 mg de um pó branco denominado AUFAC-sol (solúvel), e 936 mg de um precipitado denominado AUFAC-insol (insolúvel).

5.5.1.1 Cromatografia em Gel de Sílica de AUFAC-insol: Isolamento de AUF-1

AUFAC-insol (936 mg) foi adsorvido em 1,0 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro ($\varnothing = 2,5$ cm) contendo 8,0 g de gel de sílica. Procedeu-se a eluição com mistura binária de CHCl_3 :MeOH em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 37 frações (10 mL cada).

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 31, abaixo.

Tabela 31 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AUFAC-insol

Frações	CHCl_3 :MeOH	Peso (mg)
1-6	1%	-
7	1%	59,3
8-9	10%	108,0
10-14	10%	110,0
15	10%	18,0
16-17	10%	37,4
18-31	10%	302,0
32-34	50%	232,6
35-37	100%	10,3
Total	-	877,6

A fração AUFAC-insol-7 apresentava-se como um sólido branco finamente dividido, solúvel em clorofórmio e metanol conforme CCD e foi denominado **AUF-1** (Determinação estrutural, p. 47).

Dados de RMN mostraram que esse sólido tratava-se do triterpeno pentacíclico ácido ursólico AUF-1, relatado pela primeira vez para a espécie.

5.6 Obtenção do Extrato Etanólico da Casca do Caule de *Aspidosperma ulei*

2 Kg da casca do caule de *A. ulei* após secagem e moagem foram submetidos à extração por maceração em 10 L de etanol por 72 horas (3x). O material resultante de todas as extrações foi rotaevaporado sob pressão reduzida fornecendo um extrato escuro e viscoso denominado AUCCE (173,1 g; 8,66%) (Fluxograma 1, p. 235).

5.6.1 Partição Líquido-Líquido de AUCCE e Isolamento de AUCC-1

50 g de AUCCE foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL e, em seguida foram adicionados 150 mL de água destilada. Após sonicação por 20 minutos a total dissolução do material foi alcançada. A solução foi transferida para um funil de separação de 1L ao qual se adicionou 150 mL de diclorometano. Agitação leve, em movimentos circulares, levou à formação de 3 fases.

A fase inferior foi separada e filtrada sobre uma camada de algodão. O processo foi repetido mais 3 vezes (100 mL). A solução diclorometânica resultante das quatro extrações foi lavada com 100 mL de água e seca com Na₂SO₄ anidro. Filtração, seguida de rotaevaporação forneceu 8,5 g de um material viscoso marrom designado AUCC-D.

À mistura remanescente (interface e fase superior) foram adicionados 50 mL de água, levando à formação de um material escuro e resinoso.

A fase aquosa foi rotaevaporada para remoção de solventes orgânicos e em seguida, liofilizada fornecendo 28,4 g de uma fração denominada AUCC-Aq.

Adicionou-se 100 mL de MeOH a AUCC-Aq e a mistura foi mantida durante a noite sob refrigeração levando à formação de um precipitado branco (3,35 g), designado AUCC-Aq (ppt), que por CCD indicou tratar-se de uma substância pura denominada **AUCC-1** (Determinação estrutural, p. 55), solúvel em água e após análise por RMN de ¹H evidenciou um derivado do inositol com ponto de fusão 150,3-152,2 °C. O líquido mãe foi rotaevaporado fornecendo 25 g de um material viscoso marrom avermelhado denominado AUCC-AqLM.

À interface foram adicionadas quantidades de metanol para uma completa solubilização e em seguida rotaevaporada, fornecendo 8,2 g de uma fração denominada AUCC-Interface.

5.6.1.1 Partição Líquido-Líquido da Fração AUCC-Interface

8,2 g de AUCC-Interface (Fluxograma 2, p. 236) foram solubilizados em 70 mL de metanol sob agitação no ultrassom por 30 min. Adicionou-se 100 mL de diclorometano, agitou-se circularmente e observou-se a formação de um material disperso, que depois de filtrado sobre papel de filtro, forneceu um sólido (930 mg) denominado AUCC - Interface (sólido).

930 mg de AUCC-Interface (sólido) foram solubilizados em 100 mL de MeOH sob aquecimento e agitação. O material foi rotaevaporado e durante esse processo, observou-se que houve cristalização do material.

Após separação e filtração do material cristalizado obteve-se 416 mg de um pó levemente amarelado, finamente dividido denominado AUCC (interface) sólido branco, e 312 mg de um pó escuro, denominado de AUCC (interface) (líq.mãe).

Adicionou-se ao filtrado, quantidades de água, totalizando 170 mL e que após agitação circular, observou-se a separação de duas fases. Tratada previamente com Na₂SO₄ anidro a fase diclorometânica foi filtrada e rotaevaporada á pressão reduzida fornecendo 1,5 g de uma fração denominada de AUCC (interface) DCM.

Observou-se a formação de um precipitado escuro com aspecto viscoso (tipo “piche”), que aderiu ás paredes do funil de separação. Este foi separado da fração hidrometanólica e solubilizado com MeOH e piridina, que posteriormente foi seco com N₂ obtendo-se 1,1 g de um pó escuro denominado AUCC (interface) ppt (piche), que após análise por RMN de ¹H revelou muita graxa, sendo descartada.

A fração hidrometanólica foi rotaevaporada a pressão reduzida para remoção do metanol e posteriormente liofilizada fornecendo 3,6 g de um sólido marrom denominada AUCC (interface) hidrometanólica (Fluxograma 2, p. 236).

5.6.1.2 Tratamento Cromatográfico da Fração AUCC (Interface) DCM = AUCCID

1,5 g da fração AUCC (Interface) DCM (Fluxograma 2, p. 234) foram adsorvidas com 2,0 g de gel de sílica, sendo posteriormente acondicionada sobre 10 g de gel de sílica numa coluna de vidro de 50 mL (Ø = 2,5 cm), cromatografada com CHCl₃ (100%), CHCl₃/MeOH (com gradiente variando de 1% a 100%).

Foram coletadas 20 frações (50 mL cada) e após rotaevaporadas e pesadas foram reunidas (Tabela 32, p. 227).

Tabela 32 - Frações obtidas de AUCC (Interface) DCM

Frações	CHCl ₃ :MeOH
1-3	100% CHCl ₃
3-4	1%
5-6	2%
7-8	3%
9-10	4%
11-12	5%
13-14	10%
15-16	20%
17-18	50%
19-20	100%

As frações após analisadas por CCD e reunidas, de acordo com a similaridade de seus R_fs (Tabela 33).

Tabela 33 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico e reunião das frações AUCC (Interface) DCM

Frações	Identificação	Massa (mg)
1	CCID ₁	110,0
2	CCID ₂	120,0
3	CCID ₃	84,0
4	CCID ₄	75,0
5	CCID ₅	58,0
6	CCID ₆	365,0
7-8	CCID ₇	330,0
9-13	CCID ₈	174,0
14-20	CCID ₉	150,0
		Total: 1,466 mg/97,7%

5.6.1.3 Recromatografia de CCID₈

174,0 mg da fração CCID₈ foi adsorvida em 1,0 g de gel de sílica e acondicionada sobre 5,0 g de gel de sílica em coluna de vidro de (\varnothing = 2,0 cm). CCID₈ foi fracionada por eluição com os seguintes solventes: CH₂Cl₂/MeOH (1%) e variação de gradiente até MeOH (100%). Foram coletadas 10 frações (50 mL cada), que após evaporação dos solventes, foram pesadas para obtenção dos seus rendimentos (Tabela 34, p. 228).

Tabela 34 - Frações Obtidas de CCID8

Frações	CH ₂ Cl ₂ :MeOH
1	1%
2	2%
3	3%
4	4%
5	5%
6	10%
7	20%
8	30%
9	50%
10	100%

As frações foram comparadas por CCD e reunidas (rendimentos entre parênteses) como segue: 1-2 (3,4 mg), 3-5 (74,0 mg), 6 (19,6 mg), 7 (18,3 mg) e 8-10 (18,0 mg) que resultou nos seguintes grupos de frações, observados na Tabela 35.

Tabela 35 - Reunião das frações obtidas de CCID8

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-2	CCID8 ₁	3,4
3-5	CCID8 ₂	74,0
6	CCID8 ₃	19,6
7	CCID8 ₄	18,3
8-10	CCID8 ₅	18,0
		Total: 133,3 mg/77,0%

Através da obtenção de espectros de RMN de ¹H das frações obtidas, pôde-se determinar a constituição parcial da fração CCID8₂, enquanto as demais frações apresentaram misturas complexas de substâncias.

5.6.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa da Fração CCID8₂ e Isolamento de AUCC- 2

A fração CCID8₂ (74,0 mg) foi submetida à CCDP com CH₂Cl₂:MeOH (20%) em uma cuba para placa de 20 x 20 cm, contendo 100 mL do sistema eluente e tempo de eluição de 30 minutos. Após evaporação do solvente, notou-se por CCD a presença de quatro manchas que originaram 4 frações (Tabela 36, p. 229).

Tabela 36 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de CCID8₂

Frações	Identificação	Massa (mg)
1	CCID8 ₂₋₁	5,6
2	CCID8 ₂₋₂	8,5
3	CCID8 ₂₋₃	11,0
4	CCID8 ₂₋₄	8,0

Essas frações foram submetidas à análise por RMN de ¹H, que evidenciou o isolamento de CCID8₂₋₃. A substância apresentou-se como cristais amarelos que após obtenção de todos os espectros de 1D e 2D de RMN de ¹H e ¹³C, foi caracterizada como um alcaloide indólico β-ioimbina (Determinação estrutural de AUCC-2 p. 66). As três demais frações, foram descartadas em virtude da natureza complexa de misturas apresentadas.

5.6.2 Tratamento Cromatográfico da Fração AUCC-AqLM

25 g da fração AUCC-AqLM (Fluxograma 1, p. 235) foi solubilizada em 100 mL de metanol sob agitação no ultrassom, seguida da adição de 100 mL de diclorometano e posterior filtração das duas fases que após evaporação do metanol sob pressão a vácuo, as frações obtidas foram pesadas e calculadas o rendimento, obtendo-se as frações denominadas de AUCC-AqLM2D (1,37 g) e AUCC-AqLM2HM (21,4 g).

500 mg de AUCC-AqLM2HM foram adsorvidas em 2,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 20,0 g de gel de sílica em coluna de vidro de (∅ = 3,5 cm). AUCC-AqLM2HM foi fracionada por eluição com os seguintes solventes: CHCl₃/MeOH (5%), CHCl₃/MeOH (10%), e MeOH (100%). Foram coletadas 17 frações (50 mL cada), que após evaporação dos solventes, foram pesadas para obtenção dos seus rendimentos.

Tabela 37 - Fracionamento cromatográfico de AUCC-AqLM2HM

Fração	CHCl ₃ :MeOH
1-6	5%
7-11	10%
12-17	100%

As frações após analisadas por CCD foram reunidas, de acordo com a Tabela 38, abaixo.

Tabela 38 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico e reunião das frações de AUCC-AqLM2HM

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-3	CC-AqLM2HM ₁	5,9
4-5	CC-AqLM2HM ₂	4,2
6-7	CC-AqLM2HM ₃	6,8
8	CC-AqLM2HM ₄	7,1
9-11	CC-AqLM2HM ₅	59,6
12	CC-AqLM2HM ₆	103,0
13	CC-AqLM2HM ₇	262,4
14-15	CC-AqLM2HM ₈	14,9
16-17	CC-AqLM2HM ₉	13,2
		Total: 0,476 mg/95,2%

A fração CC-AqLM2HM13 (262,4 mg) apresentou-se como um material sólido marrom e que observada no UV 365 nm apresentava uma fluorescência azul intensa, além de uma mancha alaranjada escura no revelador para alcaloides (Dragendorff).

5.6.2.1 Separação por CLAE- Isolamento de AUCC-3

A fração CC-AqLM2HM13 (262,3 mg) foi analisada por HPLC numa coluna de modo reverso, empregando-se uma solução binária aquosa de TFA 0,2% e CH₃CN (30:70) como fase móvel. As injeções foram realizadas através de alíquotas de 200 µL de solução filtrada da amostra, dissolvida na fase móvel inicial. O tempo de corrida foi 7,5 minutos, mantendo-se um fluxo constante de 4,72 mL/min. Após 110 injeções coletadas em um comprimento de onda de 254 nm, foram detectados 3 frações de interesse: fração 1 ($t_r = 2,1$ min.), fração 2 ($t_r = 5,6$ min.), fração 3 ($t_r = 6,3$ min.).

A fração 2 (25,0 mg) denominada de **AUCC-3**, apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em MeOH, cuja análise por CCD mostrou que a mesma, apresentava uma fluorescência azul intensa quando observada no UV a 365 nm e alaranjado intenso, quando revelada em Dragendorff. A substância após analisada por RMN de ¹H e ¹³C foi caracterizada como um alcaloide indólico quaternário do tipo ioimbano (Determinação estrutural, p. 79). As demais frações, apresentaram pouca massa, além de misturas de alcaloides.

Após sucessivos tratamentos cromatográficos com o extrato da casca do caule, nenhuma das outras frações forneceu compostos em quantidade ou pureza suficiente, devido apresentarem muito açúcar e de difícil remoção. Dessa forma, a metodologia foi modificada, como segue.

5.6.3 Coluna Cromatográfica por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) de AUCCE

1,0 g de extrato de AUCCE foram adsorvidos em 0,5 g de gel de sílica, sobre 5,0 g deste mesmo adsorvente, numa coluna de vidro de 50 mL ($\varnothing = 2,0$ cm). A eluição da coluna foi efetuada inicialmente com hexano (100 mL cada), seguida de diclorometano, acetato de etila e, finalmente metanol, recolhendo-se alíquotas de 50 mL (Tabela 39, p. 231).

Tabela 39 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AUCCE

Frações	Identificação	Massa (mg)
Hexano	AUCCH	1,4
DCM	AUCCD	109,0
AcOEt	AUCCAc	99,0
MeOH	AUCCM	776,0
		Total: 985,4 mg/98,5%

Análise por CCD revelou que as frações AUCCAc (99 mg,) e AUCCM (776 mg), apresentavam maior intensidade frente ao reagente Dragendorff para alcaloide, principalmente a fração metanólica que, devido ao rendimento foi selecionada para análise.

5.6.3.1 Fracionamento Cromatográfico de AUCCM por Sephadex

A fração AUCCM (776 mg), sólido marrom dissolvida em 5 mL de MeOH, foi submetida a cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 (60 g - $\varnothing_{int} = 3,5$ cm), obtendo-se 10 frações de 10mL (fr.1) 20mL (fr. 2); 30 mL (fr. 3); 40 mL (fr. 4 a 8) e as frações 9 e 10 (100mL), por eluição com MeOH. Após análise por CCD, reuniram-se as frações e em virtude da baixa massa das três primeiras frações, as mesmas foram descartadas. Porém a fração de interesse CCM5 (458,0 mg) (Tabela 40, p. 232) foi recromatografada.

Tabela 40 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de AUCCM

Frações	Vol. Recolhido (mL)	Identificação	Massa (mg)
1	10	CCM1	-
2	20	CCM2	-
3	30	CCM3	-
4	40	CCM4	197,0
5-6	40	CCM5	458,0
7-8	40	CCM6	18,4
9-10	100	CCM7	9,6
			Total: 683,0/89,2%

5.6.3.2 Fracionamento Cromatográfico da Fração CCM5

458 mg de CCM5 foi adsorvida em aproximadamente 1,0 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 5,0 g de gel em sílica em coluna de vidro de (\varnothing = 2,0 cm). CCM5 foi fracionada por eluição com os seguintes solventes: CH₂Cl₂/MeOH (3%), CH₂Cl₂/MeOH (5%), CH₂Cl₂/MeOH (10%) e MeOH (100%). Foram coletadas 6 frações em alíquotas de 100 mL cada (Tabela 41, p. 232), que após evaporação dos solventes, foram pesadas para obtenção dos seus rendimentos além da análise por CCD que permitiram a reunião das seguintes frações:

Tabela 41 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CCM5

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-3	CCM5-1	150,0
4-5	CCM5-2	90,0
6	CCM5-3	202,0
		T = 442 /96,5%

A fração CCM5-1 apresentou na cromatoplaça revelada em dragendorff, uma mistura de três alcaloides com R_fs muito próximos e de difícil separação. Foi necessário recromatografar devido a presença de material polar na base, possivelmente açúcar.

5.6.3.3 Recromatografia da Fração CCM5-1

Adsorvida com 0,5 g de gel de sílica, a fração CCM5-1 (150,0 mg) foi depositada sobre 5,0 g deste mesmo adsorvente, numa coluna de vidro de 50 mL ($\odot = 2,0$ cm). A eluição da coluna foi efetuada com CH_2Cl_2 :MeOH (5%, 10% e 100% de MeOH), recolhendo-se alíquotas de 200 mL. Foram obtidas três frações conforme Tabela 42, abaixo.

Tabela 42 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CCM5-1

Frações	Identificação	Massa (mg)
1	CCM5-1-1	87,0
2	CCM5-2-2	19,7
3	CCM5-3-3	28,0
		T=135/90,0%

Essas frações após rotaevaporadas, pesadas e calculados seus rendimentos, foram submetidas a CCD e após serem reveladas em revelador para alcaloide, observou-se na cromatoplaça a presença de três manchas que apresentaram impurezas, sendo necessário purificá-las por CLAE.

5.6.3.4 Fracionamento cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de CCM5-1-1 e Isolamento de AUCC-2, AUCC-4, AUCC-5 e AUCC-6.

A fração CCM5-1-1 com 87,0 mg foi submetida à análise preparativa por CLAE, utilizando-se uma coluna semipreparativa Phenomenex em modo reverso (4,6 x 250 mm, 5 μm), e eluída através de um gradiente de solução aquosa ácida de TFA 0,1% em MeOH (55:45), com tempo de corrida de 10 min, fluxo de 4,72 mL/min e 200 μL de volume injetado. De acordo com o cromatograma mostrado, coletaram-se quatro frações, utilizando-se comprimento de onda de 254 nm (Figura 239, p. 234).

Após rotaevaporação das frações obtidas (Tabela 43, p. 234) e comparação por CCD, verificou-se que se tratava de alcaloides as frações **1**, **2**, **3** e **4**, pois exibiram manchas intensas quando reveladas em Dragendorff para alcaloides, comprovadas por RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D que mostrou tratar-se de alcaloides indólicos, sendo a substância **1** (determinação estrutural, AUCC-5, p. 100) tratar-se de um alcaloide do tipo estemadenina, inédito no gênero e os demais (**2**, **3** e **4**) do tipo ioimbano, pertencente ao esqueleto corinantiano.

Figura 239 - Cromatograma obtido a partir da fração CCM5-1-1.

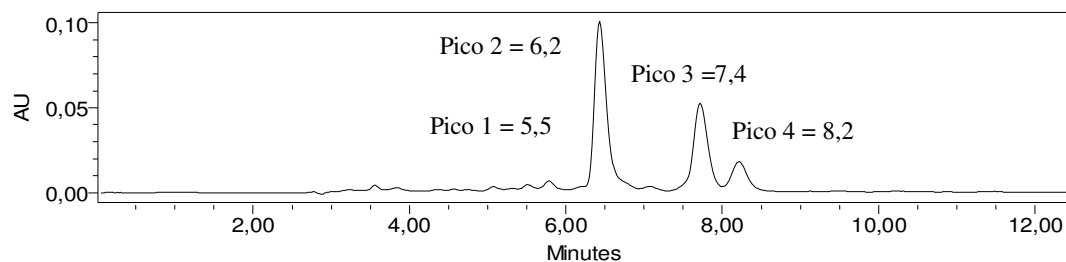
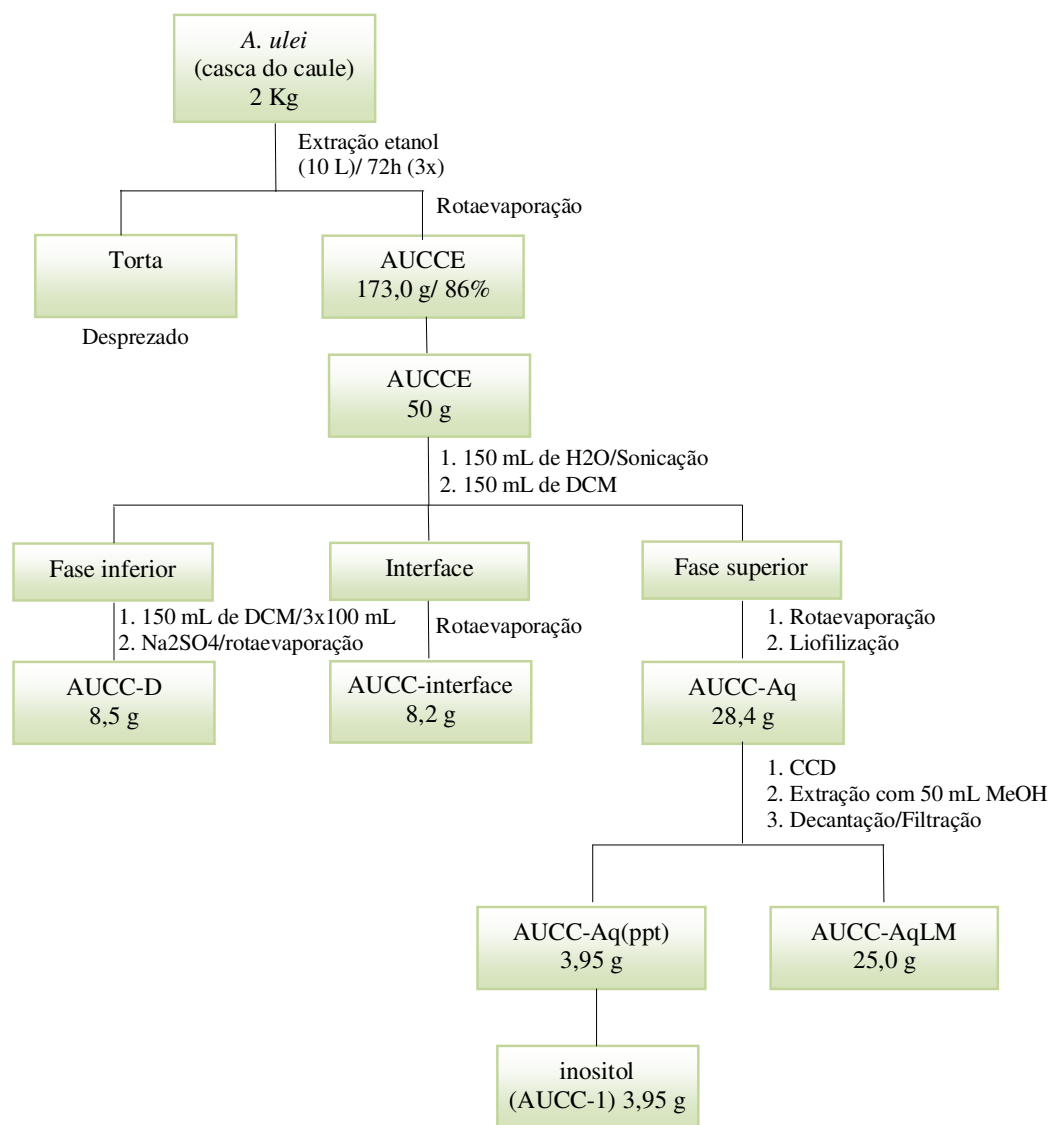


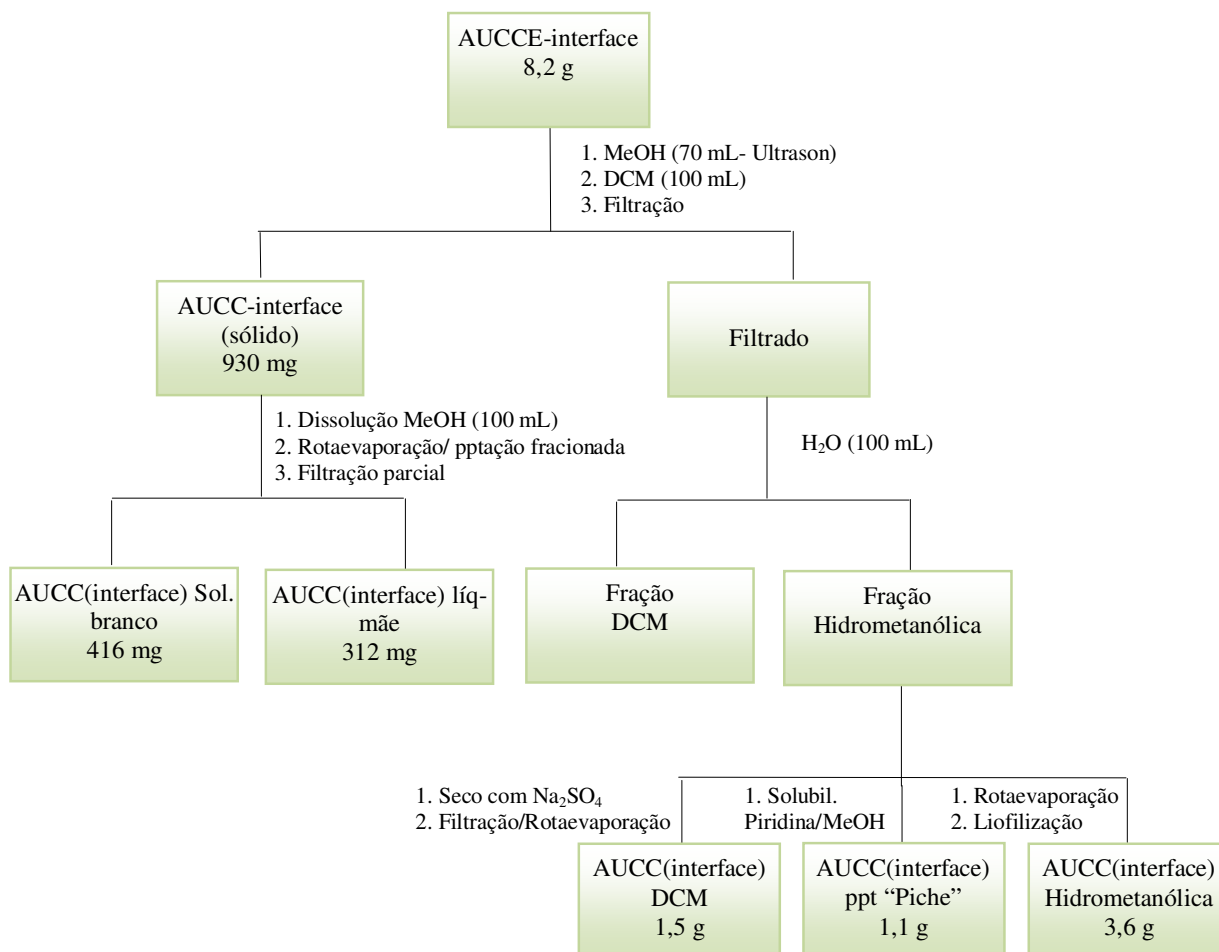
Tabela 43 - Frações obtidas por CLAE de CCM5-1-1 (solução aquosa de TFA 0,1 %) em MeOH (55:45).

Fração	Tempo de Retenção (min)	Massa (mg)	Substância
1	5,5	5,0	AUCC-5
2	6,2	26,0	β -ioimbina (AUCC-2)
3	7,4	19,0	Ioimbina (AUCC-4)
4	8,2	4,0	desidro-ioimbina (AUCC-6)
T= 53,5/61,5%			

Fluxograma 1 - Partição líquido-líquido AUCCE.



Fluxograma 2 - Partição líquido-líquido de AUCCE-Interface.

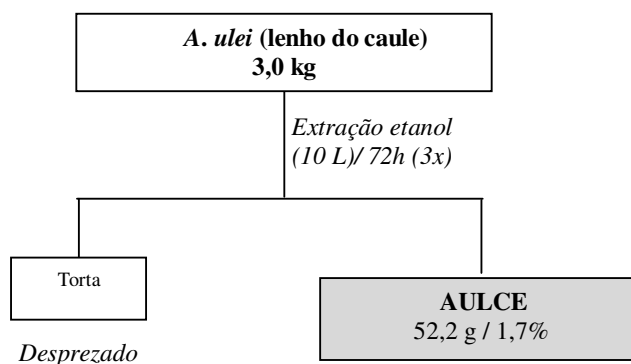


5.7 Estudos do Lenho do Caule (LC) e do Lenho da Raiz (LR) de *Aspidosperma ulei*

5.7.1 Obtenção do Extrato Etanólico do Lenho do Caule de *A. ulei*

3 Kg do lenho do caule de *A. ulei* após secagem, moagem e pesagem foram submetidos a extração por maceração em 10 L de etanol por 72 horas (3x). O material resultante de todas as extrações foi rotaevaporado sob pressão reduzida fornecendo um extrato amarelo (pó) denominado **AULCE** (52,2 g; 1,7%) (Fluxograma 3, p. 237).

Fluxograma 3 - Obtenção do Extrato do lenho do caule de *A. ulei* - AULCE



Foi necessário realizar uma extração ácido/base com os extratos obtidos do lenho do caule da planta em estudo a fim de se obterem frações alcaloídicas livres de ácidos graxos e, principalmente de açúcares. Por isso optou-se em fazer um perfil cromatográfico por CLAE (p. 247).

5.7.1.1 Extração Ácido/Base de AULCE

24,3 g de AULCE foram suspensas em 200 mL de HCl 2M e colocados sob agitação por 30 min. A solução foi filtrada em funil de Büchner sob vácuo e extraída com CH_2Cl_2 (3 x 200 mL cada). A fração diclorometânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e rotaevaporada, fornecendo 255,0 mg de uma fração denominada LCE-A.

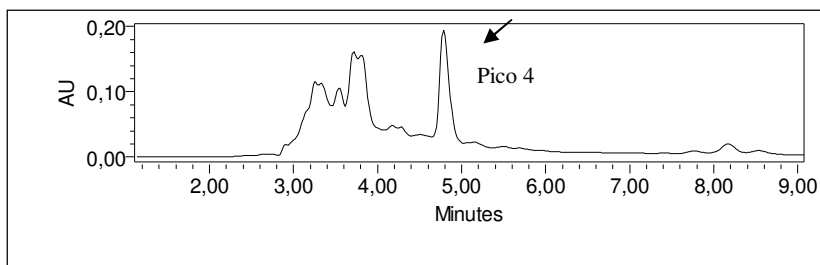
À fase aquosa ácida foi adicionado NH_4OH (~30 mL) até alcançar pH 9, monitorado por papel de pH, seguida por extração com CH_2Cl_2 (3 x 200 mL exaustivo), seco com Na_2SO_4 anidro, filtração e rotaevaporada, fornecendo 363,3 mg de uma fração denominada LCE-B.

5.7.1.2 Fracionamento Cromatográfico por CLAE de LCE-A

5.7.1.2.1 Isolamento de LCA-1

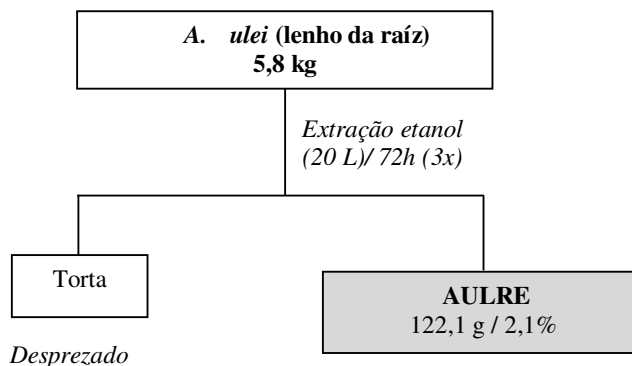
Os 255,0 mg da fração LCE-A foi cromatografada por CLAE, utilizando-se uma coluna de fase reversa semi-preparativa (4,6 x 250 mm, 5 μ m), com um gradiente de uma solução aquosa de TFA 0,1% e MeOH (70:30), em um tempo de corrida de 20 minutos, com fluxo de 3,0 mL/minuto e 200 μ L de volume injetado em cada análise. As frações foram coletadas em UV 300 nm (ver cromatograma Figura 238, p. 236). Somente a fração 4 (43,0 mg), com tempo de retenção de 5,1 minutos, apresentava-se pura e com quantidade ideal para determinação. Após rotaevaporação da fração obtida e análise por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional observou-se que a substância isolada, denominada de **LCA-1** tratava-se de um alcaloide do tipo estemadenina nor-subincanadina E (Determinação Estrutural, p. 125).

Figura 240 - Cromatograma obtido por CLAE a partir da substância LCA-1



5.7.2 Obtenção do Extrato Etanólico do Lenho da Raíz de *A. ulei*

5,8 Kg do lenho da raíz de *A. ulei* após secagem, moagem e pesagem foram submetidos a extração por maceração em 20 L de etanol por 72 horas (3x). O material resultante de todas as extrações foi rotaevaporado sob pressão reduzida fornecendo um extrato marrom e viscoso denominado AULRE (122,1 g; 2,1%). (Fluxograma 4, p. 239).

Fluxograma 4 - Obtenção do Extrato do lenho da raiz de *A. ulei* - AULRE

5.7.2.1 Extração Ácido/Base de AULRE

20,0 g de AULRE foi extraído com 200 mL de HCl 2M sob agitação por 30 minutos. Filtrou-se e o resíduo foi descartado.

O material foi extraído com diclorometano (3x 300 mL), originando a fração orgânica A que foi seca com Na₂SO₄, rotaevaporada e pesada fornecendo 287,0 mg de uma fração denominada LRE-A.

À fração aquosa ácida foi adicionado hidróxido de amônio P. A. (~40 mL) até atingir pH 9,0. Extraiu-se com diclorometano (3 x 300 mL) resultando na fração orgânica B que foi seca com Na₂SO₄ e rotaevaporada sob pressão á vácuo, originando 302,0 mg de uma fração denominada LRE-B.

5.7.2.2 Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração LRE-B

As 302,0 mg da fração LRE-B foram adsorvidas com 1,5 g de gel de sílica, e depositada sobre 10,0 g deste mesmo adsorvente, numa coluna de vidro de 50 mL (∅ = 2,5 cm). A eluição foi efetuada inicialmente com CH₂Cl₂ (100%); CH₂Cl₂:MeOH (1%, 3%, 5% e 10%) e 100% de MeOH, recolhendo-se alíquotas de 50 mL cada e 13 frações foram obtidas. Após rotaevaporação e monitoramento por CCD, as frações foram reunidas como segue na Tabela 44, abaixo.

Tabela 44 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de LRE-B

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-4	LRE-B1-4	36,5
5-8	LRE-B5-8	58,0
9-11	LRE-B9-11	80,0
12-13	LRE-B12-13	59,0
		T=233,5/77,3%

5.7.2.3 Fracionamento Cromatográfico por CLAE de LRE-B5-8

5.7.2.3.1 Isolamento de LREB-1, LREB-2 e LREB-3.

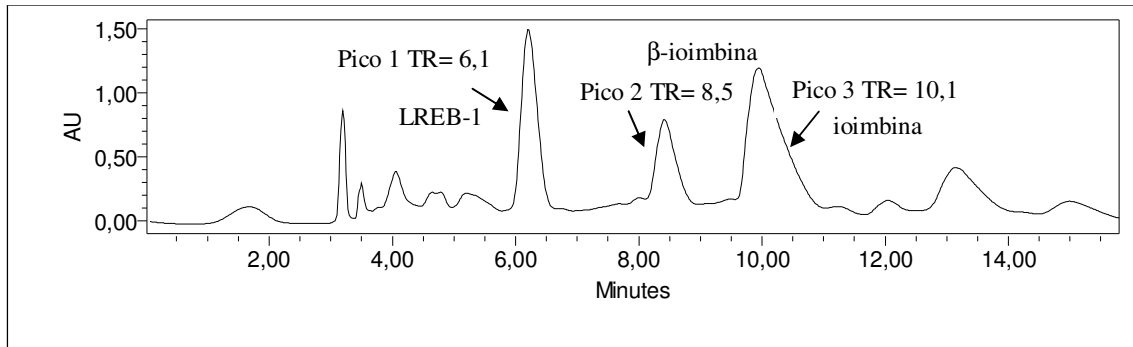
58,0 mg da fração LRE-B5-8 foi cromatografada por CLAE, utilizando-se uma coluna de modo reverso semi-preparativa (10,0 x 250 mm, 5 μ m), e eluída através de um gradiente de solução aquosa de TFA 0,1% e MeOH (60:40), com um tempo de corrida de 15 minutos, com fluxo de 4,0 mL/minuto e 200 μ L de volume injetado em cada análise. Seis frações foram coletadas, utilizando-se UV 254 nm (ver cromatograma Figura 241, p. 240). As frações **1**, **2** e **3** (4,4; 5,6 e 9,8 mg), com tempo de retenção de (6,1; 8,5 e 10,1 minutos), apresentavam-se puras já as demais, não foi possível determinação estrutural.

Após rotaevaporação das frações e análise por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais observou-se que as substâncias isoladas, denominada de LREB-1; LREB-2 e LREB-3 (Tabela 45, p. 240) tratava-se de alcaloides indólicos e desses, **LREB-1**, (Determinação estrutural p. 136) tratava-se de um alcaloide inédito na literatura. Já os demais, alcaloides LREB-2 (β -ioimbina, p. 66) e LREB-3 (ioimbina, p. 90) já foram isolados da casca do caule.

Tabela 45 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico por CLAE de LRE-B5-8.

Frações	Tempo de Retenção	Identificação	Massa (mg)
1	6,1	LREB-1	4,4
2	8,5	LREB-2	5,6
3	10,1	LRE-B-3	9,8
4	12,3	LREB-4	3,2
5	13,2	LREB-5	6,2
6	15,3	LREB-6	4,6
			T=33,8/58,3%

Figura 241 - Cromatograma obtido por CLAE a partir da fração LRE-B5-8.



5.8 Obtenção do Extrato Etanólico da Casca da Raiz de *A. ulei*

4 Kg da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* após secagem, moagem e pesagem foram submetidos a extração por maceração em 15 L de etanol por 72 horas (3x). O material resultante de todas as extrações, depois de reunidos foram rotaevaporados sob pressão reduzida fornecendo um extrato marrom denominado **AUCRE** (274 g; 6,9%).

5.8.1 Partição Ácido/Base de AUCRE

50,0 g de AUCRE foram suspensas em 750 mL de HCl 2M e colocados sob agitação por 30 min. A solução foi filtrada em funil de Büchner sob vácuo e extraída com CH₂Cl₂ (4 x 200 mL cada). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e rotaevaporada, fornecendo 960,0 mg de uma fração denominada CRE-A, além de um precipitado escuro formado durante a extração que foi separado, pesado e denominado de CRE-ppt com 890,0 mg.

À fase aquosa ácida foi adicionado NH₄OH (~15 mL) até alcançar pH 9, monitorado por papel de pH, extraído com CH₂Cl₂ (5 x 200 mL), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e rotaevaporada, fornecendo 1,98 g de uma fração denominada CRE-B. A fração aquosa alcalina foi descartada.

5.8.2 Fracionamento Cromatográfico da Fração CRE-ppt por Sephadex

890,0 mg da fração CRE-ppt foi dissolvida em 5 mL de MeOH, e submetida a cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 (60 g – Øint = 3,5 cm), obtendo-se 10 frações de 10mL (fr.1) 20mL (fr. 2); 30 mL (fr. 3); 40 mL (fr. 4 a 8) e 100mL (fr. 9 e 10), por

eluição com MeOH. Após análise por CCD, reuniram-se as frações e em virtude da baixa massa das três primeiras frações, as mesmas foram descartadas. Porém a fração de interesse CRE-ppt 4-6 (512,0 mg) foi novamente recromatografada sobre sephadex nas mesmas condições. Desta, obteve-se a fração CRE-ppt (4-6) 10-13 com 24,0 mg.

5.8.2.1 Purificação da Fração CRE-ppt (4-6) 10-13 por Cromatografia em Camada Delgada - Preparativa – CCD-P e Isolamento de CRE-5

As 24,0 mg de CRE-ppt (4-6) 10-13 foram submetidas à CCD-P em uma placa 20 x 20 cm, com CH₂Cl₂:MeOH (5%), com tempo de eluição de 30 minutos. Após rotaevaporação do solvente, foi obtido 5,0 mg de um sólido amarelo e puro que, após análise de RMN de ¹H e de ¹³C 1D e 2D, verificou-se que se tratava de um alcaloide indólico do tipo olivacina denominado **CRE-5** (Determinação estrutural p. 151).

5.8.3 Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração CRE-A

960,0 mg da fração CRE-A foi adsorvida com 1,0 g de gel de sílica, e depositada sobre 5,0 g deste mesmo adsorvente, numa coluna de vidro de 50 mL (∅ = 2,5 cm x 12,0 cm). A eluição da coluna foi efetuada com CH₂Cl₂ (100%); CH₂Cl₂:MeOH (2%, 4% , 8% e 100% de MeOH), recolhendo-se diferentes alíquotas de 50 mL cada e 16 frações foram obtidas. Após rotaevaporação e monitoramento por CCD, as frações foram reunidas como segue na Tabela 46, abaixo.

Tabela 46 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-A

<i>Frações</i>	<i>Identificação</i>	<i>Massa (mg)</i>
1	CREA (1)	25,0
2-6	CREA (2-6)	101,5
7	CREA (7)	127,0
8-13	CREA (8-13)	430,0
14-16	CREA (14-16)	36,3
		T=776,2/80,5%

5.8.3.1 Recromatografia da Fração CREA (8-13)

430,0 mg de CREA (8-13) foram adsorvidas em 0,5 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 2,5 g de gel em sílica em coluna de vidro de 50 mL ($\odot = 2,5$ cm). A eluição ocorreu com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1%, 2%, 6%, 10% e 100% de MeOH). Foram coletadas 12 frações em alíquotas de 20 mL cada (Tabela 47, p. 243), que após evaporação dos solventes, foram pesadas para obtenção dos seus rendimentos além das análises por CCD que permitiram a reunião das seguintes frações:

Tabela 47 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CREA (8-13)

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-3	CREA (8-13)	13,8
4-9	CREA (8-13)	331,0
10-12	CREA (8-13)	26,0
		T = 371 /86,0%

5.8.3.1.1 Isolamento de CREA-1N, CREA-2A e CREA-3.

331,0 mg da fração CREA (8-13) foi recromatografada por CLAE, utilizando-se uma coluna no modo reverso semi-preparativa (10,0 x 250 mm, 5 μm), eluída através de um gradiente de solução ácida de TFA 0,1% e MeOH (45:55). O tempo de análise foi de 15 minutos, com fluxo de 4,5 mL/minuto e 200 μL de volume injetado em cada análise. Seis frações foram coletadas utilizando-se um comprimento de onda de UV 323 nm (ver Figura 242, p. 244).

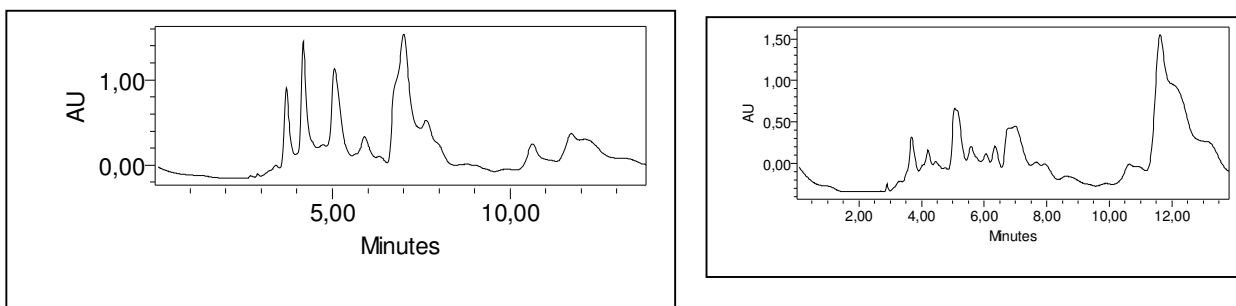
Das seis frações obtidas, a fr. **1**, **2** e **5** (10,0; 26,0 e 40,0 mg) e tempo de retenção de (3,7; 4,1 e 6,3 minutos), apresentavam-se puras. As demais, não apresentaram pureza e quantidade.

Após rotaevaporação das frações obtidas e comparação por CCD, além de análise por RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D observou-se que as substâncias isoladas, denominadas de **CREA-1N**; **CREA-2A** e **CREA-3** (Tabela 48, p. 244) tratavam-se dois alcaloides indólicos e de uma lactona (Determinação estrutural, p. 159, 176 e 187), respectivamente.

Tabela 48 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-A (8-13) 4-9

Frações	Tempo de Retenção	Identificação	Massa (mg)
1	3,7-3,9	CREA-1	10,0 booneína
2	4,1-4,6	CREA-2	26,0 epi-dasicarpidona
3	5,1-5,5	CREA-3	5,0
4	6,2-6,6	CREA-4	3,2
5	6,3-6,9	CREA-5	40,0 uleína
6	11,2-11,9	CREA-6	4,6
			T=88,8/26,8%

Figura 242 - Cromatograma da fração CRE-A obtido por CLAE, nos comprimentos de onda de 323 e 254 nm.



5.8.4 Fracionamento Cromatográfico por Desadsorção Seletiva (Coluna filtrante) da Fração CRE-B

401,6 mg de CRE-B foram adsorvidas em aproximadamente 0,5 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 2,5 g de gel em sílica em coluna de vidro de ($\varnothing = 2,5$ cm). CRE-B foi fracionada por eluição com os seguintes solventes: CH_2Cl_2 ; (100%); $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1%, 6% e 100% de MeOH).

Foram coletadas 10 frações, em alíquotas de 25 mL cada (Tabela 49, p. 244), que após evaporação dos solventes, foram pesadas para obtenção dos seus rendimentos e reunião das seguintes frações:

Tabela 49 – Frações obtidas do fracionamento cromatográfico de CRE-B

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-4	CRE-B1-4	201,0
5-7	CRE-B5-7	135,0
8-10	CRE-B8-10	60,0
		T = 396 /98,6%

5.8.4.1 *Fracionamento Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de CRE-B5-7 e Isolamento de CREB-1A e CREB-2N*

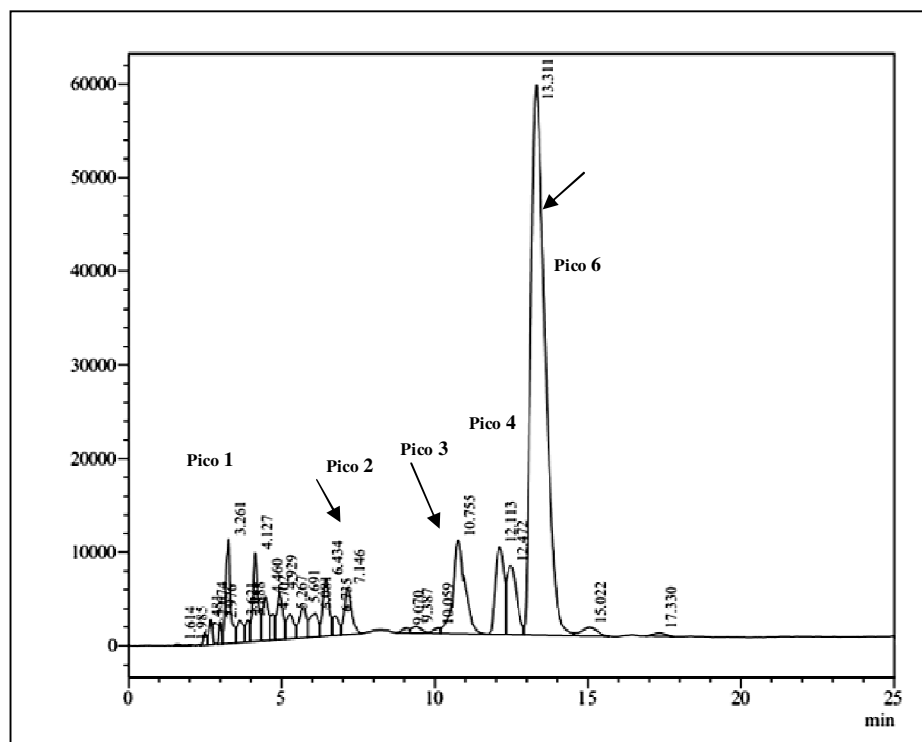
135,0 mg da fração CRE-B5-7 foi cromatografada por CLAE, utilizando-se uma coluna de modo reverso semi-preparativa (4,6 x 250 mm, 5 μ m), e eluída através de um gradiente de solução aquosa de TFA 0,1% e MeOH (55:45). O tempo de corrida foi de 15 minutos, com fluxo de 4,72 mL/minuto e 200 μ L de volume injetado em cada análise. As seis frações foram coletadas utilizando-se um comprimento de onda de UV 254 nm (ver cromatograma Figura 243, p. 246). Das seis frações obtidas, as frações **1** e **6** (13,0 e 28,0 mg), com tempo de retenção de 2,5-6,3 e 12,4-14,0 minutos, apresentavam-se puras e com quantidade (Tabela 50, p. 245).

Após rotaevaporação das frações obtidas, comparação por CCD e análise por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais observou-se que as substâncias isoladas, denominadas de **CREB-1A (CREB-1)** e **CREB-2N (CREB-6)** (Determinação Estrutural, p. 194 e 205), tratava-se de alcaloides indólicos. As demais, não foi possível a determinação estrutural em função da pouca quantidade das amostras e das impurezas observadas nos espectros.

Tabela 50 – Frações obtidas do fracionamento por CLAE de CREB 5-7

Frações	Tempo de Retenção	Identificação	Massa (mg)
1	2,5-6,3	CREB-1	13,0
2	6,7-7,1	CREB-2	5,8
3	10,0-10,7	CREB-3	10,0
4	11,9-12,0	CREB-4	4,5
5	12,0-12,3	CREB-5	7,1
6	12,4-14,0	CREB-6	28,0
			T=68,4/50,7%

Figura 243 - Cromatograma obtido por CLAE e realizado no comprimento de onda de 254 nm da fração CRE-B (5-7).



5.9 Tratamento de Desprotonação das Substâncias Ácidas Isoladas por CLAE

No desenvolvimento de metodologias para o isolamento dos alcaloides em cromatografia líquida de alta eficiência, foi necessária a utilização de ácido trifluoracético (TFA) de forma a se obter picos mais resolvidos e com tempos de retenção menores. No entanto, as substâncias isoladas, após análise por RMN, apresentaram variações nos deslocamentos químicos esperados.

Sendo assim, aquelas, que apresentaram massa significativa (CREA-1N e CREB-2N), foram tratadas para remoção do respectivo ácido solubilizando-se as mesmas em 0,5 mL de MeOH, com adição de gotas de NH_4OH concentrado até pH 12.

Após alcalinização, as soluções foram particionadas com 15 mL de diclorometano (5x), obtendo-se a fase aquosa que foi desprezada e a fase orgânica que fora lavada com água Milli-Q. Após serem secas com Na_2SO_4 , filtradas, rotaevaporadas e pesadas as mesmas permaneceram neutras, caracterizando assim a sua forma básica livre.

Em função da pouca quantidade de massa obtida no isolamento por CLAE, algumas substâncias não foram alcalinizadas.

5.10 Perfil Cromatográfico para Obtenção das Frações Alcaloídicas de AUFE, AUCCE, AULCE, AULRE e AUCRE de *A. ulei*

Com o objetivo de se obterem frações alcaloídicas, livres de ácidos graxos e, principalmente, de açúcares, optou-se pela extração ácido/base. Em seguida foram coletadas alíquotas de cada fração, para a obtenção de um perfil cromatográfico por CLAE.

Foi utilizado 1 g do extrato de AUFE, agitado na presença de uma solução aquosa ácida de HCl (5%) por 30 minutos, de forma que os alcaloides ficassem na forma de sais e solubilizassem nessa solução. A mesma foi submetida a uma extração com diclorometano (3 x 20 mL). Separou-se a fase orgânica denominada de fração alcaloídica **A**. Em seguida, alcalinizou-se a solução ácida com NH₄OH até pH 9. Fez-se uma partição com diclorometano obtendo-se fração alcaloídica que após seca com Na₂SO₄, filtrada e rotaevaporada, denominou-se de fração alcaloídica **B** com os alcaloides totais.

O mesmo procedimento foi realizado para cada extrato obtido de *A. ulei*, ou seja, 1 g de extratos etanólicos de AUCCE, AULCE, AULRE e AUCRE, de forma a se obterem frações alcaloídicas A e B de cada extrato mencionado (conforme mostra a Tabela 51, abaixo).

Tabela 51 - Frações alcaloídicas obtidas da extração ácido/base dos extratos etanólicos de *A. ulei*.

Frações	Identificação	Massa (mg)
1	AUFE-A	6,3
2	AUFE-B	4,3
3	AUCCE-A	35,3
4	AUCCE-B	40,3
5	AUCRE-A	33,9
6	AUCRE-B	30,2
7	AULCE-A	16,3
8	AULCE-B	15,6
9	AULRE-A	19,3
10	AULRE-B	16,6

5.10.1 Perfil cromatográfico por CLAE das frações alcalóidicas dos extratos de *A. ulei*

Alíquotas dessas frações A e B obtidas da extração ácido/base dos extratos etanólicos de *A. ulei*, foram solubilizadas em 0,8 mL de MeOH e 1,2 mL de H₂O e cromatografada por CLAE, utilizando-se uma coluna Phenomenex Analítica no modo reverso C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e um gradiente de solução aquosa de TFA 0,1% e MeOH (70:30), em um tempo de corrida de 20 minutos, com fluxo de 1,0 mL/minuto e 20 µL de volume injetado de cada amostra.

Esse procedimento foi repetido para cada fração A e B, obtida das extrações ácido/base.

Com os cromatogramas obtidos (Figuras 244 e 245, p. 248), constatou-se que as frações referentes as folhas de *A. ulei* (AUFE-A e AUFE-B) não continham alcaloides com quantidade para caracterizar.

Figura 244 - Cromatograma obtido da fração ácida das folhas de *A. ulei* - AUFE-A.

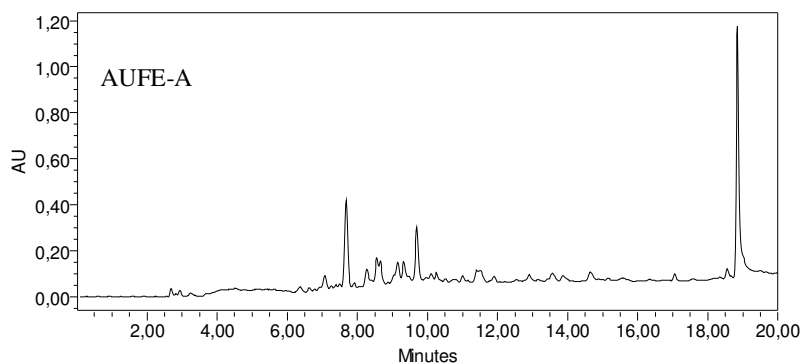
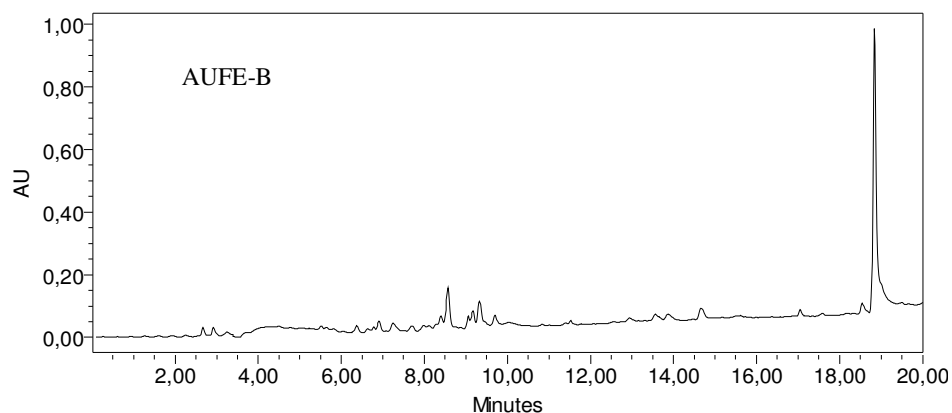


Figura 245 - Cromatograma obtido da fração básica das folhas de *A. ulei* - AUFE-B.



As frações tanto de AULCE-A como AULRE-A (Figuras 246 e 247, p. 249) apresentaram perfis semelhantes para conteúdo alcaloídico, exibindo como composto majoritário os alcaloides β -ioimbina e derivados, com tempo de retenção entre 10 e 12 minutos.

Na fração AULCE-A foi isolado o alcaloide nor-subincanadina E.

Figura 246 - Cromatograma obtido da fração ácida do lenho do caule de *A. ulei* - AULCE-A.

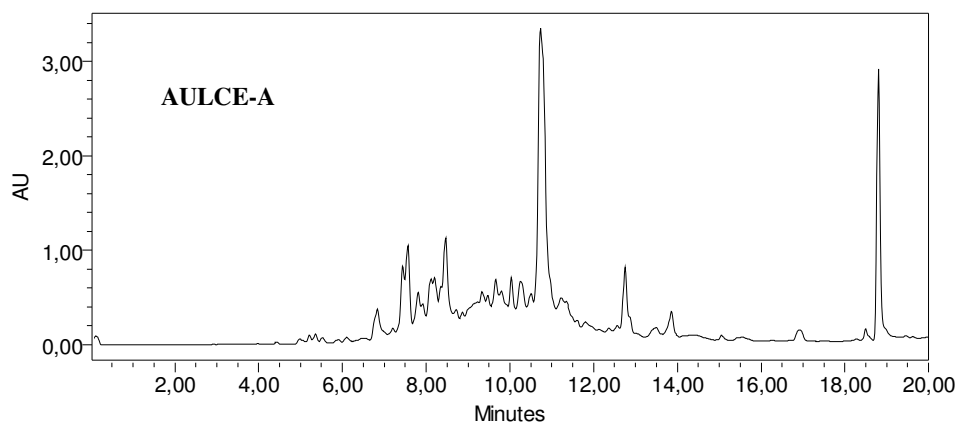
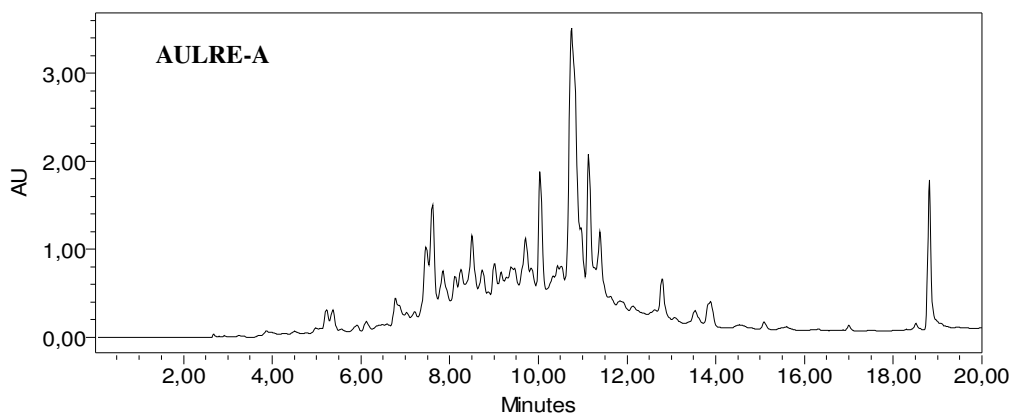


Figura 247 - Cromatograma obtido da fração ácida do lenho da raiz de *A. ulei* - AULRE-A



AULCE-B e AULRE-B, (Figuras 248 e 249, p. 250) apresentaram similaridades nos conteúdos alcaloídicos, porém com uma grande quantidade de alcaloides em concentrações muito próximas. Estas frações continham as ioimbinas.

Na fração AULRE-B foi isolado o alcaloide inédito ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-óico com tempo de retenção de 6,5 minutos.

Figura 248 - Cromatograma obtido da fração básica do lenho do caule de *A. ulei* - AULCE-B

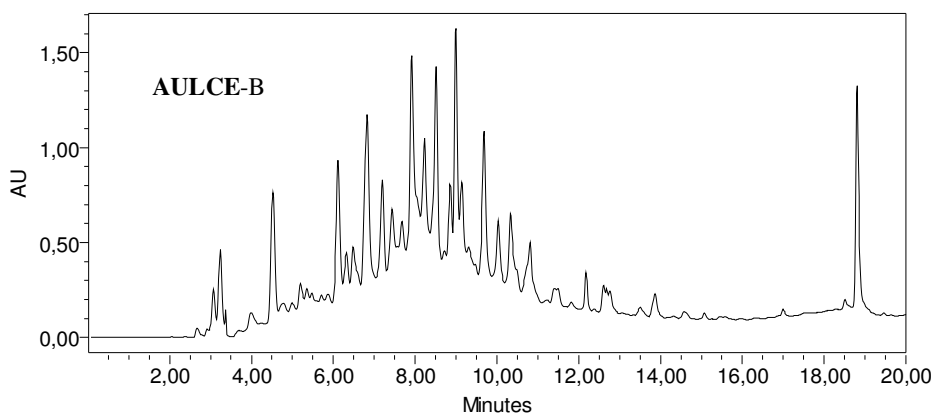
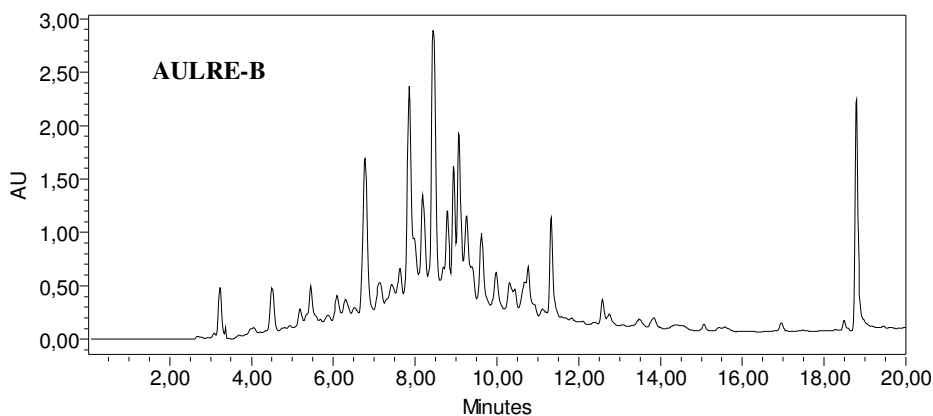


Figura 249 - Cromatograma obtido da fração básica do lenho da raiz de *A. ulei* - AULRE-B



As frações AUCCE-A e AUCRE-A, (Figuras 250 e 251, p. 251) exibiram cromatogramas com compostos similares tanto no tempo de retenção como na concentração. Porém, AUCRE-A, apresentou como composto majoritário a uleína observada no tempo de retenção entre 10,5 a 12,0 minutos, também isolada da fração AUCRE-B.

Figura 250 - Cromatograma obtido da fração ácida da casca do caule de *A. ulei* - AUCCE-A

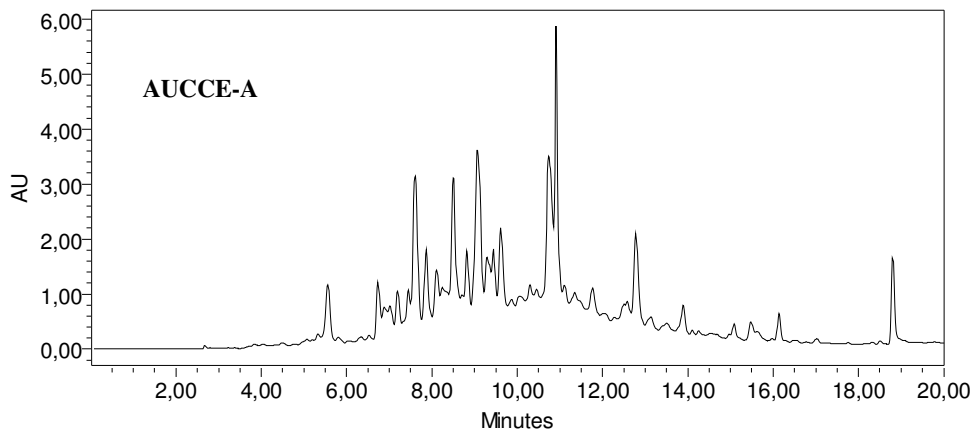
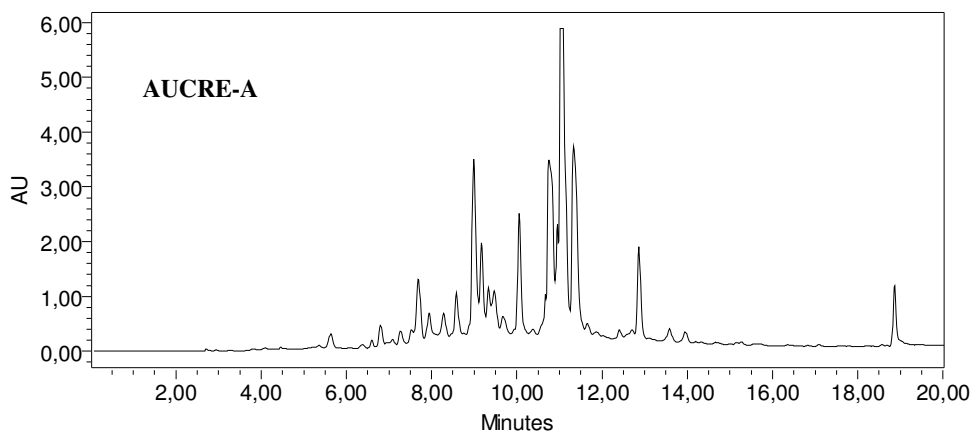


Figura 251 - Cromatograma obtido da fração ácida da casca da raiz de *A. ulei* - AUCRE-A



As frações AUCCE-B e AUCRE-B (Figuras 252 e 253, p. 252) notadamente, apresentaram os maiores rendimentos e os perfis cromatográficos semelhantes. A fração AUCRE-B apresentou como composto majoritário o alcaloide indólico desmetiluleína, observado no tempo de retenção de 11 a 12 minutos, além da uleína, também majoritária nessa fração com tempo de retenção entre 8 e 9 minutos.

Na fração AUCCE-B encontra-se a maior concentração do alcaloide β -ioimibina e derivados.

Esse perfil cromatográfico foi importante do ponto de vista qualitativo, embora as concentrações e sistemas de eluições para o isolamento sejam diferentes de uma fração a outra. Também foi importante observar que os alcaloides estavam presentes tanto nas frações ácidas como nas básicas.

Figura 252 - Cromatograma obtido da fração básica da casca do caule de *A. ulei* - AUCCE-B

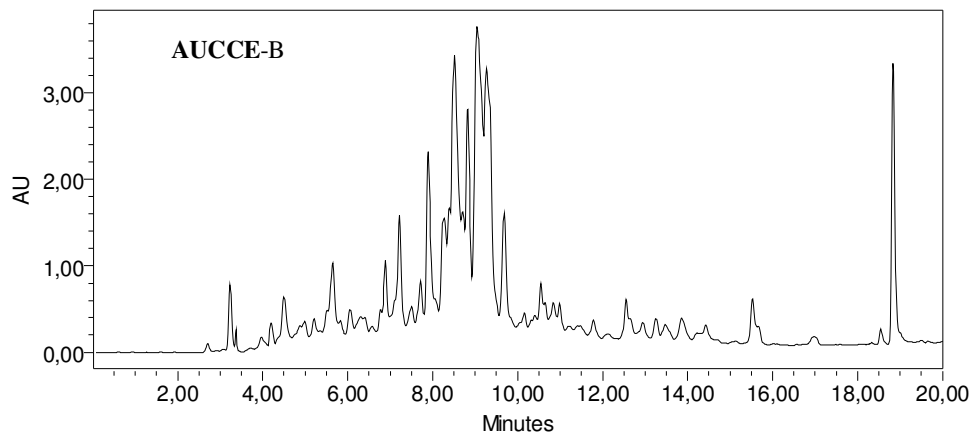
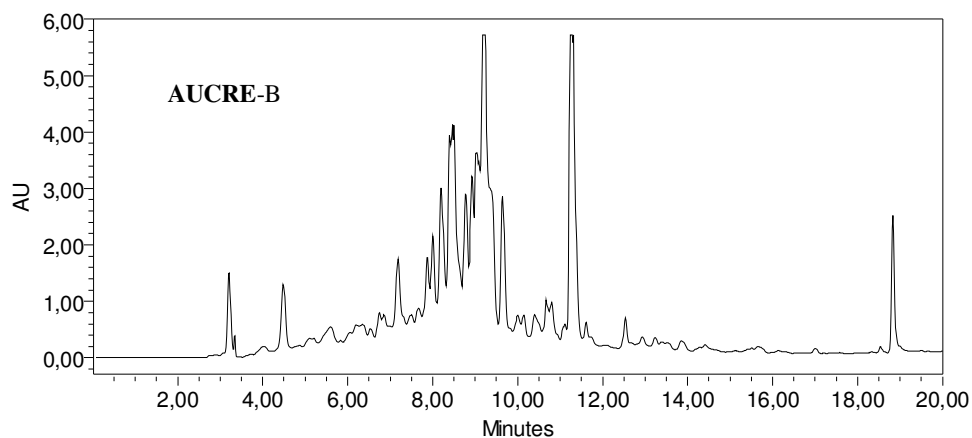


Figura 253 - Cromatograma obtido da fração básica da casca da raiz de *A. ulei* - AUCRE-B



5.11 Avaliação do Potencial Antitumoral *in Vitro*

As análises foram realizadas para verificar a citotoxicidade *in vitro* das substâncias puras em 4 linhagens de células tumorais e determinar o potencial antitumoral destas substâncias.

5.11.1 Estudo da atividade citotóxica

Cultivo da Linhagem tumoral

As linhagens celulares utilizadas (Tabela 52) foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

Tabela 52 - Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de plaqueamento (cél/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	0,3 x 10 ⁶
MDA-MB-435	Melanoma humano	0,1 x 10 ⁶
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	0,7 x 10 ⁵
SF-295	Glioblastoma humano	0,1 x 10 ⁶

5.11.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais *in vitro*

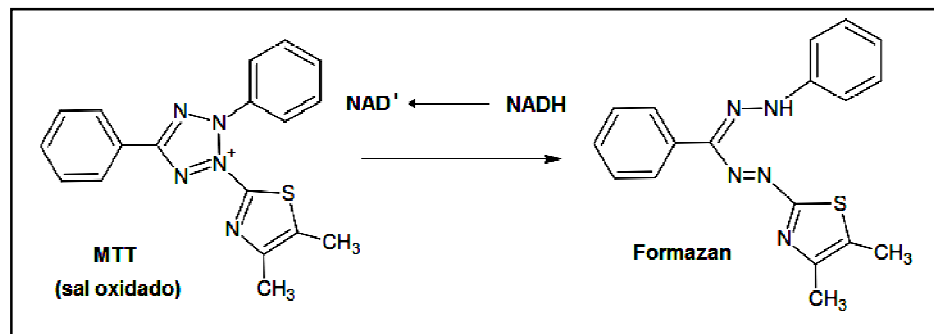
- Teste do MTT

Princípio do Teste

O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor púrpura. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase

presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas (MOSMANN, 1983). O estudo citotóxico pelo método do MTT (Figura 254, p. 254) permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

Figura 254 - Reação de redução do sal de tetrazol (MTT) no sistema óxido-reductor NAD/NADH.



Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em placas de 96 poços em densidades adequadas como citadas na Tabela 52. As substâncias testes (0,049 – 25 µg/mL) foram incubadas durante 69 horas juntamente com as células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e as placas foram reincubadas por mais 3 horas, em estufa a 37°C e a 5%CO₂.

Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150µL de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal de MTT reduzido pelas células vivas, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

A discussão e os resultados encontram-se na p. 217.

6 CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de um espécime de *Aspidosperma ulei* (Apocynaceae), permitiu o isolamento de quinze metabólitos secundários, dos quais doze são alcaloides indólicos monoterpênicos, bastante comum nesse gênero, além de um triterpeno da série ursano, um derivado do inositol e uma δ -lactona.

O extrato etanólico das folhas após sucessivas análises cromatográficas forneceu um triterpeno pentacíclico ácido ursólico (ácido 3-hidroxiurs-12-en-28-óico) **AUF-1**.

Do extrato etanólico da casca do caule de *A. ulei*, foram isolados o metil-*chiro*-inositol (**AUCC-1**), cinco alcaloides indólicos: β -ioimbina (17 β -hidroxi-ioimbano-16 α -carboxilato de metila) **AUCC-2**, dois alcaloides quaternários 3,4,5,6-tetradésidro- β -ioimbina (**AUCC-3**) e 19(E)-hunteracina (**AUCC-5**) este, isolado pela primeira vez para o gênero. Além da ioimbina (17 α -hidroxi-ioimbano-16 α -carboxilato de metila) (**AUCC-4**) e 19,20-desidro-17 α -ioimbina (**AUCC-6**).

Dos extratos etanólicos do lenho do caule e do lenho da raiz foram realizados tratamentos ácido/base para a obtenção das frações alcaloídicas, em virtude da quantidade excessiva de açúcar detectado nas partes estudadas da planta. Para realizá-los, foi indispensável a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, no isolamento dos alcaloides.

Do extrato etanólico do lenho do caule foi obtido o alcaloide, 20(E)-17-nor-subincanadina E (**LCA-1**) que, segundo pesquisas no “SciFinder”, esta sendo relatado pela primeira vez para a espécie, e também como produto natural.

Do extrato etanólico do lenho da raiz, foram isolados, o ácido 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidro-plumerano-18-óico, (**LREB-1**), um alcaloide de esqueleto plumerano, inédito na literatura, além da β -ioimbina e ioimbina, isolados também do extrato etanólico da casca do caule.

Como o objetivo foi estudar folha, caule e raiz de *A.ulei*, esperava-se isolar o alcaloide uleína que é considerado um marcador taxonômico desta espécie, contudo, pôde-se concluir que no extrato da folha e no lenho do caule não foi detectado a uleína.

Do extrato etanólico da casca da raiz foi isolado o alcaloide olivacina (**CRE-5**) e após extração ácido/base do extrato etanólico da mesma, seguido de sucessivos fracionamentos cromatográficos, sobretudo, por CLAE, foram isolados da fração alcaloídica ácida a uleína (**CREA-1N**), 20-*epi*-dasicarpidona (**CREA-2A**) e uma δ -lactona booneína

(**CREA-3**).

Da fração alcaloídica básica foram isolados os alcaloides indólicos 20-*epi*-N-nordasicarpidona (**CREB-1A**), inédito no gênero e N-desmetiluleína (**CREB-2N**).

A utilização de técnicas uni e bidimensional para a identificação e caracterização dos compostos isolados foram imprescindíveis para os resultados apresentados.

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizadas com as substâncias ácido ursólico, β -ioimbina, ioimbina, 3,4,5,6-tetradesidro- β -ioimbina, uleína e 20(E)-17-nor-subincanadina E. Dessas, o alcaloide 20(E)-17-nor-subincanadina E apresentou atividade moderada para as células MDA MB 435 (mama - humano) e HCT-8 (côlon).

Já o triterpeno ácido ursólico apresentou atividade citotóxica também moderada frente a todas as células testadas, porém a concentração máxima de 25 $\mu\text{g/mL}$ foi menor comparado ao alcaloide e maior atividade para HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma - humano).

As substâncias isoladas neste espécime refletem a importância e a necessidade no estudo da reinvestigação fitoquímica da planta, sobretudo, para aumentar o acervo de alcaloides em Apocynaceae e, contribuir dessa forma, para fins terapêuticos, além da produção de novos metabólitos produzidos pela planta.

REFERÊNCIAS

- AMAT, M. *et al.* An enantioselective synthesis of the *Strychnos* alkaloid (-)-tubifoline. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n. 10, p. 2775-2778, 1996.
- AMAT, M. *et al.* Total synthesis of the *strychnos* indole alkaloids (-)-tubifoline, (-)-tubifolidine, and (-)-19,20-dihydroakuammicine. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 6, p. 935-948, 1997.
- AMAT, M. *et al.* Conjugate additions to phenylglycinol-derived unsaturated. δ -Lactams enantioselective synthesis of uleine alkaloids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 25, p. 8681-8693, 2004.
- ANGYAL, S. L. *et al.* **Biochemical Nomenclature and Related Documents**. 2nd ed. London: IUPAC, 1992.
- BANERJEE, J. N.; LEWIS, J. J. Pharmacological studies in the Apocynaceae genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Aspidosperma ulei* MGF. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 42-45, 1954.
- BARBOSA, V. B. *et al.* Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.
- BARROSO, G. B. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- BARTLETT, M. F. *et al.* The alkaloids of *Hunteria eburnean* Pichon. II: the quaternary bases. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1445-1449, 1963.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, n. 4, p. 14-19, 1996.
- BIANCO, A. *et al.* Iridoids of *Rauwolfia grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 35, No. 6, p. 1485-1487, 1994.
- BOLZANI, V. S. *et al.* Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.
- BORRIS, R. P.; LARRIS, D. C.; CORDELL, G. A. Studies on the uleine alkaloids I. Carbon-13 nmr studies on uleine, 20-epiuleine and (4S)-uleine-N_b-oxide. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 2, p. 200-205, 1983.
- BOURDY, G. *et al.* A search for bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 269-277, 2004.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará**. 4. ed. Fortaleza: UFRN, 2001.
- BÜCHI, G.; GOULD, S. J.; NÄF, F. Stereospecific syntheses of uleine and epiuleine.

Journal of The Americal Chemical Society, v. 93, n. 10, p. 2492-2501, 1971.

BURNELL, R. H.; CHAPELLE, A.; KHALIL, M. F. Quaternary bases *Hunteria eburnean* Pichon. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 2327-2330, 1974.

BURNELL, R. H.; CHAPELLE, A.; KHALIL, M. F. Hunteracine: the crystal structure of a quaternary alkaloid from *Hunteria eburnean* Pichon. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 12, p. 722-723, 1970.

BUTLER, M.; DAWSON, M. M. **Cell Culture Labfax**, Academic Press. 1. ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers, p. 247, 1992.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D. **Floristic inventory of tropical countries: the status of plant systematics, collections, and vegetation, plus recommendations for the future**. New York: Botanical Garden, 1989.

CAMPOS, A. R. **Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcaloides isolada de *Aspidosperma ulei* Markgr.:** Estudo *in vivo* e *in vitro*. 2005. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

CAMPOS, A. R. *et al.* Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 240-244, 2006.

CAMPOS, A. R. *et al.* Relaxant effects of an alkaloid-rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark on isolated rabbit corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p. 255-263, 2008.

CARBONEZI, C. A. *et al.* Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcaloides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878-881, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento, 1984.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chippenham: John Wiley & Sons, 2009.

DORMAN, D. E.; ANGYAL, S. J.; ROBERTS, J. D.; Nuclear magnetic resonance spectroscopy: ¹³C Spectra of Unsubstituted Inositols. **Chemistry**, v. 63, p. 612-614, 1969.

ENDRINGER, D. C. *et al.* L-(+)-Bornesitol. **Acta Crystallographica Section E**, v. 63, p. 1067-1068, 2007.

FERREIRA, I. C. P. *et al.* Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 325-327, 2004.

FIGUEIREDO, E. R. *et al.* Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* (A. DC.), Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 675-681, out./nov. 2010.

FORNS, P.; DIEZ, A.; RUBIRALTA, M. Synthetic applications of 2-(1,3-Dithian-2-yl) indoles VI. Synthesis of 20-epidasycarpidone. **Tetrahedron**, v. 52, n. 10, p. 3564-3574, 1996.

FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. M. Uleine and emethoxyaspidospermine from the barks of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 208-209, 2000.

GASKELL, A. J.; JOULE, J. A. Structure of Uleine: relative stereochemistry. **Chemistry and Industry**, v. 24, p. 1089-1090, June 1967.

GRÁCIA, J. *et al.* Total synthesis of uleine-type and *Strychnos* alkaloids through a common intermediate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 3939-3951, 1994.

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

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

JÁCOME, R. L. R. P. *et al.* Estudo químico e perfil cromatográfico de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 897-900, 2004.

KOBAYASHI, J. *et al.* Subcanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 6449-6455, 2002.

KOCH, I.; RAPINI, A. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB021894>>. Acesso em: 13 Jan. 2011.

LE MEN, J.; TAYLOR, W. I. A uniform numbering system for indole alkaloids. **Experientia**, v. 21, p. 508-510, 1965.

LEMES, G. F.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. Constituintes químicos de *Hyptidendron canun* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 39-42, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 1998.

LOYOLA-VARGAS, V. M. *et al.* Biosíntesis de los alcaloides indólicos: una revisión crítica. **Revista de La Sociedad Química de México**, v. 48, n. 1, p. 67-94, 2004.

LUZ, L. A.; FERRADÁ, T. C. R. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don. Vicaria. **Revista Cubana de Planta Medicinal**, v. 7, p. 96-99, 2002.

MACABEO, A. P. G. *et al.* Phytochemical survey and Pharmacological activities of the indole alkaloids in the Genus *Voacanga* Thouars (Apocynaceae): an update. **Pharmacognosy Reviews: Plant Review**, v. 3, n. 5, p. 132-142, 2009.

MARINI-BELLOTO, G. B. *et al.* Research on Africa medicinal plants-IV: boonein, a new C-9 terpenoid lactone from *Alstonza boonei*: a possible precursor in the indole alkaloid biogenesis. **Tetrahedron**, v. 39, n. 2, p. 323-329, 1983.

MESQUITA, M.L. *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MILBORROW, B. V.; DJERASSI, C. Alkaloids Studies: Part LXI: the structure of twelve new alkaloids from *Aspidosperma cylindrocarpon*. **Journal of The Chemical Society C**, p. 417-424, 1969.

MITAINE-OFFER, A. C. *et al.* Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytochemistry**, v. 9, p. 1442-1145, 2002.

MORALES-RÍOS, M. S.; ESPÍÑEIRA, J.; JOSEPH-NATHAN, P. ¹³C NMR spectroscopy of indole derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 377-395, 1987.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, n. 65 p. 55-63, 1983.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, H.; A concensus classification for the order Gentianales with additional details on the suborder Apocynaceae. **The Botanical Review**, v. 60, p. 440-482, 1994.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

ONDETTI, M. A.; DEULOFEU, V. Alkaloids from *Aspidosperma australe* MULL ARGOV. The structure of olivacine and u-alkaloid C (guatambuine). **Tetrahedron**, v. 15, p. 160-166, 1961.

PASCALÉ, C. *et al.* Alkaloids from leaves and root bark of *Ervatamia hirta*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3785-3792, 1991.

PELLETIER, S. W. Alkaloids chemical and biological perspectives. New York: Wiley, [198-].

PEREIRA, M. M. *et al.* Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PEREIRA, M. M. *et al.* Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2006.

PEREIRA, P. S. *et al.* Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and *in vitro* cytotoxicity. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 20-24, 2008.

- RAPINI, A. **Sistemática**: estudos em *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) da cadeia do espinhaço de Minas Gerais. 2000. 283 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ROBERT, G. M. T. *et al.* *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides des graines de *Aspidosperma oblongum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 708-722, sept./oct. 1983.
- ROCHA, A. I.; REIS-LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcaloides em espécies botânicas da Amazônia. VII – Apocynaceae. **Acta Amazônica**, v. 12, p. 381, 1982.
- SCHMUTZ, V. J.; HUNZIKER, F. Die Alkaloide von *Aspidosperma olivaceum* M. Arg. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 33, p. 341-347, 1958.
- SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. 5. ed. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; UFSC, 2004.
- SEEBACHER, W. *et al.*, Spectral assignments and reference data. **Magnetic Resonance in Chemistry** v.41, p. 636-38, 2003.
- SHAMMA, M.; WEISS, A. J.; SHINE, R. J. The stereochemistry of the C-3 ethyl side chain in uleine and its analogs. **Tetrahedron Letters**, n. 26, p. 2489-2492, 1967.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SOUSA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- STAHL, R.; BORSCHBERG, HANS-JÜRGEN. A Reinvestigation of the oxidative rearrangement of yohimbane-type alkaloids. **Helvetica Chimica Acta**, v. 79, p. 1361-1377, 1996.
- ST-PIERRE, B.; DE LUCA, V. A Cytochrome P-450 Monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology** v. 109, p. 131-139, 1995.
- UCHOA, D. E. A. **Aplicação de técnicas contemporâneas de ressonância magnética nuclear no estudo fitoquímico de *Aspidosperma ulei* Markgf.** 2006. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- VICENTINI, A.; OLIVEIRA, A. A. LEEUWENBERG, A. J. M. Apocynaceae e Asclepiadaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.*, **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.
- WASCHSMUTH, R.; MATUSCH, R. Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 705-709, 2002.

WENIGER, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193–200, 2001.

WENKERT, E. Biosynthesis of indole alkaloids: the *Aspidosperma* and *Iboga* bases. **Journal of The American Chemical Society**, v. 84, p. 98-102, 1962.

WENKERT, E. *et al.* General methods of synthesis on indole alkaloids. 14. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their ^{13}C nuclear magnetic resonance spectral analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, p. 12, 1976.

WOODSON, R. J. Studies in the Apocynaceae: VIII an interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & ucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, p. 119-204, 1951.